

図 4. ダイオードアレイ検出器によるサイロシビンの検量線 (265nm)

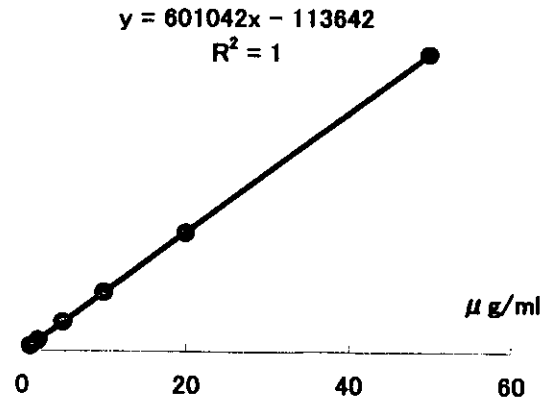


図 5. 分光蛍光検出器によるサイロシビンの検量線

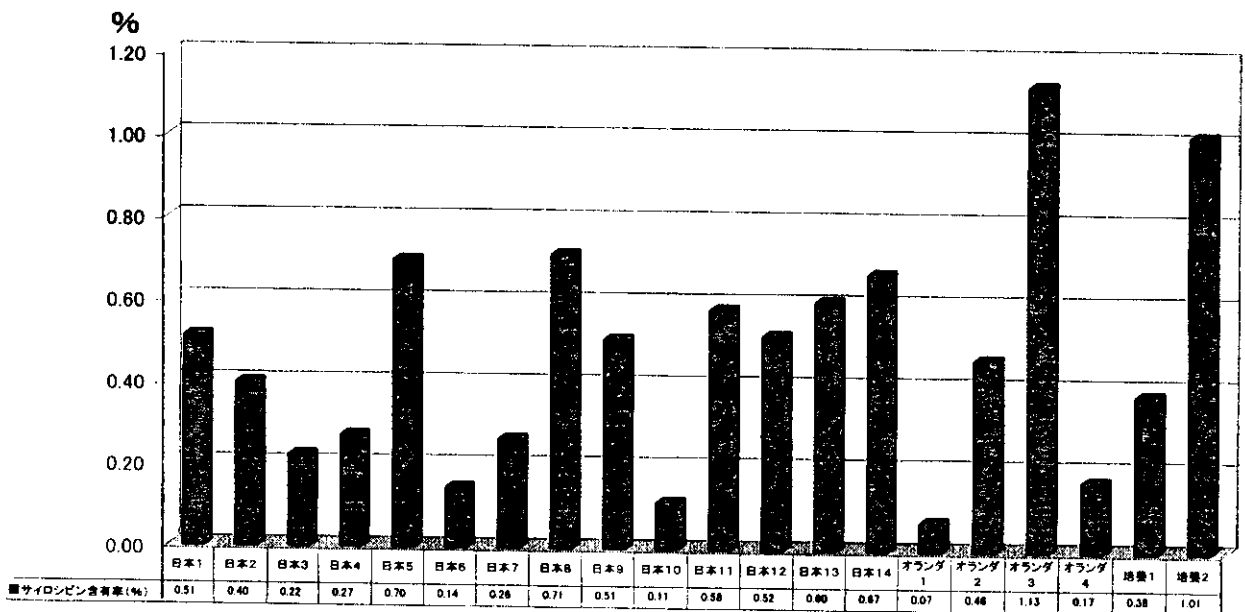


図 6. 幻覚性キノコ中のサイロシビン定量結果

#### D. 結論

平成14年、新たに麻薬原料植物に指定された幻覚性キノコの成分であるサイロシビンは、逆相HPLC分析ではカラムに保持されず、キノコ常在成分との分離が不十分であったが、移動相として5 mM di-hexylammonium acetate / methanol (70/30) を用いるイオンペア-HPLCにより良好な分離が得られ、キノコ中のサイロシビン定量法として有効であった。また、分光蛍光検出器を使用すればより高

感度の分析ができ、経年変化によりサイロシビン含有量の極端に減少した幻覚性キノコにも本分析法が適用可能である。

#### E. 参考文献

1. Sottolano S.M., Lurie I.S., *J. Forensic Sci.*, **28**, 929-935, 1983.
2. Michael W.B., Jeremy B., *J. Chromatogr.*, **207**, 379-385, 1981
3. White P.C. *J. Chromatogr.*, **169**, 453-456, 1979

## 分担研究報告書

### 乱用薬物の簡便分析法構築の試み

分担研究者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨 新興乱用薬物  $\gamma$ -Hydroxybutyric acid (GHB)の簡便分析法構築を目的として、本薬物のケイ光誘導体化と呈色反応について検討を行った。ケイ光誘導体化については、体液中の GHB 分析も視野に入れ、水溶液中での誘導体化が可能と期待されたカルボン酸誘導体化剤である 1-pyrenyldiazomethane(PDAM)及び 9-anthryldiazomethane(ADAM)による反応を検討した。しかし、GHB のみならず、陽性対照である高級脂肪酸等も誘導体化は進行しなかった。従って、本反応は繊細な反応条件で結果が大きく変動する可能性が推定され、簡便分析には不適切であった。アクリフラビンおよびプロモクレゾールグリーンによる呈色反応を試みた結果、GHB は発色しなかった。アクリフラビンについては、陰性を示す他の薬物も多かったが、プロモクレゾールグリーンでは陰性となるカルボン酸基含有薬物は少なく、本呈色反応における挙動は押収 GHB の推定に有用と考えられた。ラテックス凝集阻止反応試験法を用いたスクリーニング法を継続して検討し、本年度は毛髪試料中に残存しているモルヒネの検出感度の向上を目指した。その結果、毛髪を溶解したのち、試料をフィルター濾過し除蛋白を確実にすることにより、モルヒネの毛髪試料中濃度 5~1000 ng/mg hair の濃度範囲で良好に測定でき、感度の向上をはかる事ができた。近年その乱用が問題となり麻薬に指定されたマジックマッシュルーム中に含まれるサイロシビン及びサイロシンに対する特異的抗体の作成を試み、一定の成果が得られたが、実用化のためにはさらに特異抗体に精製する必要がある。一方、サイロシンのインドール骨格の 4 位 OH 基を修飾した誘導体をキャリアタンパクに結合させて抗原とし、これを用いたサイロシン特異的抗血清の作成を試みた。瘦身用健康食品に違法に含まれるフェンフルラミンおよび *N*-ニトロソフェンフルラミンを簡便かつ高感度に分析するために、HPLC-蛍光及び UV 定量法を検討した。蛍光ラベル化試薬には、4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)-benzoyl chloride を用いた。開発した方法を用いて、市販の瘦身用健康食品を分析した結果、数種の健康食品から *N*-ニトロソフェンフルラミンあるいはフェンフルラミンが定量できた。また、*N*-ニトロソフェンフルラミンあるいはフェンフルラミンの摂取履歴を検証する目的で、毛髪中のフェンフルラミンおよびその代謝物であるノルフェンフルラミンの HPLC-蛍光定量法を開発した。

#### 研究協力者

吉田 武美 昭和大学薬学部 教授  
北條 博史 昭和薬科大学薬学部 教授  
中島 憲一郎 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

#### A. 研究目的

新興乱用薬物の簡便分析法開発を中心課題として研究を行った。今年度は、 $\gamma$ -hydroxybutyric acid (GHB)、マジックマッシュルームの薬効成分であるサイロシン

とサイロシビン、並びに痩身用健康食品中および毛髪中のフェンフルラミンとその *N*-ニトロソ体の分析方法構築とその有効性の検証を行った。また、毛髪中モルヒネの簡便分析方法についても、その改良を加えるための検討を行った。

## B. 方法

### 1. GHB 分析法についての検討

カルボン酸のケイ光誘導体化剤である 1-pyrenyldiazomethane (PDAM) および 9-anthryldiazomethane (ADAM) を用いて GHB 誘導体化を試みた。また、アクリフラビンおよびプロモクレゾールグリーンを用いた呈色反応について検討した。

### 2. ラテックス凝集阻止反応試験法(Latex agglutination inhibition reaction test: LAIRT)による毛髪中モルヒネの分析

Carboxymethylmorphine (CMM) 結合ハプテンを免疫して得られた薬物抗体をラテックス磁性粒子と結合させ、これと CMM 結合ハプテン-青色ラテックス複合体との結合を遊離薬物が阻害することを利用する分析方法を検討した。

### 3. サイロシンおよびサイロシビン特異的抗体調製

4-ヒドロキシトリプタミンをグルタルアルデヒド法およびカルボジイミド法によりヘモシアニンと結合させてハプテン化し、ウサギに免疫してサイロシン/サイロシビン認識抗体の調製を試みた。また、サイロシンの butylsuccinamic acid 誘導体を調製し、これを mixed anhydride 法によりヘモシアニンに結合させたのち、ウサギに免疫した。

### 4. 食品中および毛髪中フェンフルラミンおよび *N*-ニトロソフェンフルラミンの分析

健康食品中のフェンフルラミンと *N*-ニトロソ体を UV 検出による HPLC 法で分析した。また、毛髪中のフェンフルラミンと代謝物ノルフェンフルラミンを 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride (DIB-Cl) を用いてケイ光誘導体化したのち、アキラルおよびキラル分離条件の HPLC による条件で分析した。

## C. 結果

### 1. GHB ケイ光誘導体化の試みと呈色反応

PDAM および ADAM による GHB の誘導体化反応を試み、反応状況を HPLC で観察した。しかし、GHB 非存在下と存在下に行った反応液のクロマトグラムに違いが認められず、誘導体化物の生成は確認できなかった。

GHB を含む 36 化合物について、アクリフラビンおよびプロモクレゾールグリーンによる呈色を比較した。カルボキシル基を有する化合物のほとんどは 100 ないし 1000  $\mu\text{g/ml}$  の濃度において試験を実施した場合、プロモクレゾールグリーンで黄色に呈色した。アクリフラビンは陽性が期待されても、結果として陰性を示す薬物がかなり存在した。一方、GHB はカルボキシル基含有薬物であるにもかかわらず、アクリフラビンとプロモクレゾールグリーンのどちらに対しても発色しなかった。

### 2. LAIRT による毛髪中モルヒネ(MOR) 分析の改良

モルヒネ非添加条件でラテックス抗体試薬(60 mg/mL x 20 倍希釈)およびラテックス抗原試薬 (25 mg/mL x 150 倍希釈)を用いて反応した場合、反応 4 分後にはラテックス粒子が結合した明らかな凝集塊

が認められた。反応液に 0~2 mg/mL のモルヒネを添加すると用量依存的な凝集阻害が生じることが視認された。抗原—抗体結合凝集塊を、抗体に結合しているラテックスの磁性を利用して除き、上清の透過度を測定することにより試料中モルヒネ依存的な凝集阻害の程度を評価した。その結果、1 mg hair 当たり換算して 5~1000 ng モルヒネ/mg hair の範囲で定量性があることが確認できた。

### 3. サイロシン/サイロシピン抗体調製に関する検討

4-ヒドロキシトリプタミンをカルボジイミド法によりヘモシアニンと結合させたハプテンを抗原としてウサギに免疫を行った。固相化抗原による酵素免疫測定法により評価した結果、抗血清中に抗原と反応する物質が含まれていた。しかし、この抗血清には特異性に関して問題があることも判明した。

一方、サイロシンの butylsuccinamic acid 誘導体をヘモシアニンに結合させたハプテンでウサギを感作した検討では、PSI-BSA に対して高い力荷を示す抗サイロシン抗体が得られた。しかし、サイロシン構造以外を認識する非特異的抗体も混在し、実用のためには更に特異性上昇を目指して検討する必要がある。

### 4. 毛髪中フェンフルラミンおよび *N*-ニトロソフェンフルラミン分析法の検討

HPLC-UV 法によるフェンフルラミンとその *N*-ニトロソ体の分析法を検討した結果、それぞれ 5.6  $\mu$ M および 0.43  $\mu$ M を検出下限として分析できた。また、ケイ光誘導体化物の HPLC-ケイ光法では、毛髪中のフェンフルラミンおよびその主代謝物であるノルフェンフルラミンを定量下限 0.036 ng/mg および 0.016 ng/mg と

非常に高感度に分析できた。キラル分離条件では *d*-および *l*-フェンフルラミンの分別が可能であった。

### D. 考 察

GHB は分子内縮合してラクトン体を形成しやすい特徴を有している。この性質から水溶液中の GHB はラクトン体を形成しないまでも、分子内のカルボン酸基が水酸基との水素結合で不活性な状態にあることが推測できる。もしそうならば、非特異的な酸性薬物呈色反応でも GHB については陰性になる可能性があり、これをスクリーニングに応用しようと考えて検討を行った。その結果、プロモクレゾールグリーンでの反応では、GHB を含む少数の薬物のみが呈色陰性となった。同様の結果を示す酸性薬物は少なく、この判定法は粉末として押収された GHB の簡便なスクリーニングに応用できる可能性が考えられた。

磁性ラテックスを用いた LAIRT 法により毛髪試料を用いての凝集阻害の確認、また透過率の測定をすることでより定量的な測定法としての有用性を検討した。過去の凝集板での感度は 30 ng/mg hair であったが、今回の結果では 5 ng/mg hair (0.020 mg/mL)まで測定可能となり、より良好な検出感度を得ることができた。さらに定量的なスクリーニング法の開発を目的として、透過率の測定を行った結果、MOR 5~1000 ng/mg hair の濃度範囲では MOR を濃度依存的に測定することができ、試料中 MOR 濃度がこの範囲内である時、試料中の薬物濃度を推定することが可能となった。今回の凝集板反応と透過率測定法は毛髪溶解液を酸性にした後フィルターに通し、試料中の蛋白を色

素とともに除去することで測定可能範囲が5~1000 ng/mg hair になり、感度をあげることができた。他の測定法と比較すると、ラジオイムノアッセイ法でのカットオフ値は0.1 ng/mg hair であり、GC/MSでも0.1 ng/mg hair (両測定法ともに毛髪試料50 mg 用いて実験している)と高感度測定が可能であり、微量含有サンプルに用いるには更に検討の余地がある。

サイロシビンおよびサイロシン特異的抗体の作成では4-ヒドロキシトリプタミンのハプテン結合体を免疫原にしてウサギより抗血清を得たが、ハプテン合成時の夾雑物であるBSA-EDCを認識する抗体も共存していることが判明したので、今後、抗血清をアフィニティークロマトグラフィーなどにより、特異的抗体のみに精製する必要がある。サイロシンの4位のOH基を化学修飾したのち、キャリアタンパク質に結合させて免疫した検討でも、サイロシンに対する抗体が得られた。しかし、この場合も、サイロシン構造を認識する抗体以外に、タンパク質と結合させるために化学修飾したスペーサ部分に対する抗体が多く含まれていることを示唆する結果が得られた。サイロシンを結合したアフィニティークラムを調製し、これにより特異性の高いIgG画分を精製するなどの検討が必要と考えられた。

問題健康食品の分析を行った結果、*N*-ニトロソフェンフルラミンと共にフェンフルラミンが同時に検出された。この理由としては、製造・保管過程での*N*-ニトロソフェンフルラミンの分解によるものかあるいは合成原料として残存していたものかのいずれかが考えられた。今回開発したHPLC-ケイ光法による毛髪分析

法は非常に高感度であり、微量のフェンフルラミンを十分追跡できると思われる。今後、*N*-ニトロソフェンフルラミンあるいはフェンフルラミンを摂取したヒトの毛髪分析が可能であるものと期待される。

## E. 結 論

PDAM および ADAM を用いた GHB の蛍光誘導体化は、反応生成物が確認できなかった。本誘導化法は試薬純度や反応条件の繊細な管理が必要と考えられた。アクリフラビンおよびプロモクレゾールグリーンによる呈色反応でも、GHB は発色しなかった。同様な結果を示すカルボン酸基含有薬物は少なく、特にプロモクレゾールグリーン呈色反応における挙動は押収 GHB の簡便な推定に有用と考えられた。

磁性ラテックス LAIRT 法を用いた毛髪試料中のモルヒネの検出感度向上を目的として検討を行ったところ、毛髪を溶解した後、試料をフィルター濾過して除蛋白を確実にすることにより、モルヒネの毛髪試料中濃度が5~1000 ng/mg hair の濃度範囲で良好に測定でき、これまでの検出限界を30 ng/mg hair より感度を上げる事が出来た。

マジックマッシュルーム中に含まれるサイロシビンおよびサイロシンに対する特異的抗体の作成を試み、酵素免疫測定法により抗血清中にその抗体活性が認められたが、さらにアフィニティークロマトグラフィーなどにより特異抗体に精製する必要があった。また、butylsuccinamic acid 誘導体化サイロシンをキャリアタンパク質 KLH に結合させたのち、ウサギに免疫し、抗サイロシン抗体を調製した。しかし、サイロシンに対する特異性

は十分ではなく、サイロシン構造以外を認識する抗体が多く含まれていることが示唆された。今後、アフィニティーカラムを用いて精製することにより、特異性を上昇させる必要性が考えられた。

2種類の健康食品からN-ニトロソフェンフルラミンを定量することができた。また、わが国では未承認であるフェンフルラミンを健康食品中から検出した。HPLC-ケイ光法では高感度に毛髪中フェンフルラミンを分析する方法を構築できた。

## 分担研究報告書

### $\gamma$ -Hydroxybutyric acid の簡易分析法：蛍光誘導体化の試みと呈色試験

分担研究者 山田英之 九州大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨 新興乱用薬物  $\gamma$ -Hydroxybutyric acid (GHB) の簡易分析法構築を目的として、本薬物のケイ光誘導体化と呈色反応について検討を行った。ケイ光誘導体化については、体液中の GHB 分析をも視野に入れ、水溶液中での誘導体化が可能と期待されたカルボン酸誘導体化剤である 1-pyrenyldiazomethane (PDAM) および 9-anthryldiazomethane (ADAM) による反応を検討した。しかし、GHB のみならず、陽性対照である高級脂肪酸等の誘導体化は進行しなかった。従って、本反応は繊細な反応条件で結果が大きく変動する可能性が推定され、簡易分析には不適切と考えられた。アクリフラビンおよびプロモクレゾールグリーンによる呈色反応を試みた結果、GHB は発色しなかった。アクリフラビンについては、陰性を示す他の薬物も多かったが、プロモクレゾールグリーンでは陰性となるカルボン酸基含有薬物は少なく、本呈色反応における挙動は押収 GHB の推定に有用と考えられた。

#### A. 研究目的

$\gamma$ -Hydroxybutyric acid (GHB) は神経伝達物質である  $\gamma$ -aminobutyric acid の代謝物の一つであり、脳内やその他の体組織に存在する短鎖脂肪酸である(1)。本物質はドーパミン分泌を抑制することにより、成長ホルモンやプロラクチンの分泌を高め、筋肉弛緩作用を示す。多量摂取では麻酔作用や催眠作用を惹起し、アルコールとの併用時には作用が増強されると言われている。海外では多幸感を求めての乱用、あるいは「クラブドラッグ」としてレイプ目的などの犯罪に使われている。米国での中毒件数は1992年で20件、1996年には約30倍の638件、1998年には更に2倍の1282件に登っており、ここ10年間でGHBの乱用が急激に増加している(2,3)。一方、日本での乱用はまだ散見される程度であるが、インターネット上で数多く紹介され、容易に入手できる

状況にあったため、我が国でも平成13年11月に麻薬に指定されている。乱用されるようになってからの日も浅く、そのほとんどが代謝されてしまうことから、GHBの鑑定法や尿中からの微量分析法についての報告は少ない。精密分析法としてはヘッドスペースガスクロマトグラフィーマススペクトル(GC/MS)法が報告されている(2,4)。しかし、GHBの簡易分析法は知られておらず、これからGHBの乱用が増加する可能性を考えるとGHBの簡便分析方法の開発は重要な課題と考えられる。

本研究では、GHBの簡易分析法として、蛍光誘導体化を行いHPLCで測定する分析法および呈色反応の検討を行った。蛍光誘導体化としては、体液中のGHB分析をも視野に入れ、水溶液中での誘導体化が可能と期待されたカルボン酸誘導体化剤である1-pyrenyldiazomethane(PDAM)

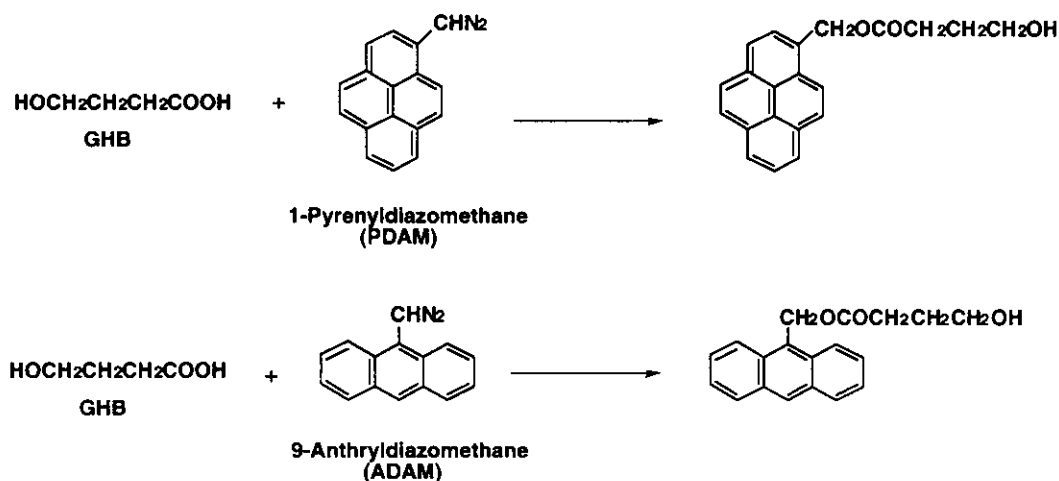


Fig. 1 Possible derivatization of GHB with PDAM and ADAM

および 9-anthryldiazomethane (ADAM)を用いた誘導体化について検討を行なった (Fig. 1) (5, 6)。また、アクリフラビン(7)およびプロモクレゾールグリーンを用いた呈色反応について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

PDAM および ADAM はフナコシ(株)より購入した。一部の実験では、Quillian等の方法に従い (8)、9-anthraldehyde より ADAM を合成して使用した。

### 2. ケイ光誘導体化反応

GHB 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のメタノール溶液と酢酸エチルに溶解した PDAM あるいは ADAM 1  $\text{mg}/\text{mL}$  を 1:1 で混合し室温で 90 分間反応させた。反応後、反応液の 5  $\mu\text{g}$  をカラムに注入し HPLC で分析した。

### 3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

HPLC は、HITACHI L-6200 型ポンプを用い、これに HITACHI L-7200 型オートサンプラー、Z-module TM (Waters) 加圧モジュール、HITACHI L-7480 型蛍光検出器および HITACHI D-2500 型クロマ

トデータ処理装置を装着して使用した。Nova Pak C18 カートリッジ(0.8 x 10 cm) をカラムとし、移動相にはアセトニトリル:水=1:1 (v/v) を用い、励起波長 365 nm、測定蛍光波長 412 nm で測定した (5)。

### 4. 呈色反応

アクリフラビンによる呈色は、被検薬物の水溶液 1  $\text{mg}/\text{mL}$  に亜硝酸ナトリウム約 20 mg を加えたのち、1  $\text{mg}/\text{mL}$  のアクリフラビン水溶液を 2 滴加えて混和後に呈色を観察した。プロモクレゾールグリーンによる呈色反応は、被検物質の水あるいはメタノール溶液 (1  $\text{mg}/\text{mL}$ ) に 0.1N 水酸化ナトリウムでアルカリ性とした 0.04% プロモクレゾールグリーンのエタノール溶液 5 滴を加え、呈色を観察した。

## C. 結果

### 1. PDAM および ADAM による蛍光誘導体化の試み

PDAM および ADAM による GHB の誘導体化反応を試み、反応状況を HPLC を



用いて観察した。しかし、GHB 非存在下と存在下に行った反応液のクロマトグラムに違いが認められず(成績未掲載)、誘導体化物の生成は確認できなかった。PDAM 等は生体内脂肪酸の分析に応用した例が報告されていることから、酢酸やオレイン酸の誘導体化をも行ったが報告されているような誘導体化を再現することはできなかった。これらの検討は市販 PDAM および ADAM を用いたものであり、試薬の低純度の可能性を考え、9-anthraldehyde を原料として ADAM を合成し、この用事調製 ADAM を用いて誘導体化を試みたが、これによっても酢酸やオレイン酸の誘導体化を実現できなかった。

## 2. GHB の呈色反応

カルボン酸ないし酸性薬物の発色に用いられている呈色試薬 アクリフラビンとプロモクレゾールグリーンの2種を用いて呈色試験を行った。これらによる発色の機構と発色状況を Figs. 2, 3 に示す。アクリフラビンでの反応では、カルボン

酸基含有化合物であるアスピリンとグリホサートは陽性であるのに対し、GHB は予想通り陰性であった (Fig. 3A)。ただ、陽性反応が予想されたイブプロフェンでも陰性であった。プロモクレゾールグリーンでの反応では、GHB のみが陰性であり、当初の予想通りの結果が得られた (Fig. 3B)。

発色の特異性を検討する目的で、GHB の他のカルボキシル基含有化合物、並びに医薬品、農薬および麻薬等 36 種類について、アクリフラビンおよびプロモクレゾールグリーンによる呈色を比較した。今回用いた化合物の構造と呈色の結果をそれぞれ Fig. 4 と Table 1 に示す。1~15 まではカルボキシル基含有化合物、16~18 はカルボキシル基を有さない酸性化合物、19~21 はカルボキシル基含有化合物のナトリウム塩、22~36 はカルボキシル基を有さない医薬品や麻薬等である。カルボキシル基を有する化合物のほとんどは 100 ないし 1000  $\mu\text{g/mL}$  の濃度において試験を実施した場合、プロモクレゾ

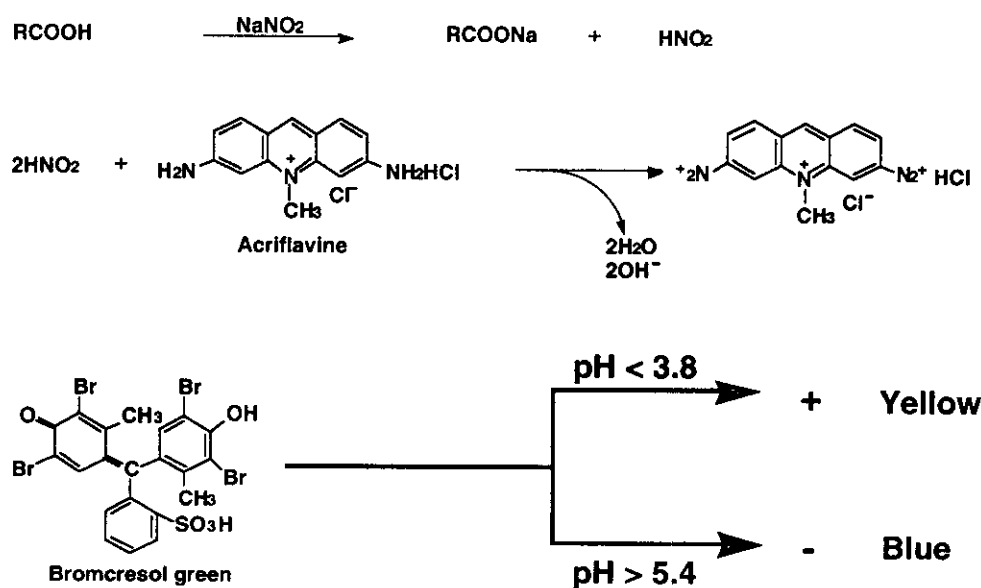


Fig. 2 Color reaction of acidic drugs with acriflavine and bromocresol green

ールグリーンで黄色に呈色した。アクリフラビンは陽性が期待されても、結果として陰性を示す薬物がかなり存在した(8薬物/15; Table 1)。一方、GHB はカルボキシル基含有薬物であるにもかかわらず、アクリフラビンとプロモクレゾールグリーンのどちらに対しても発色しなかった。

#### D. 考 察

PDAM および ADAM はジアゾ化試薬であり、カルボン酸をエステル体に誘導するものであり、長鎖脂肪酸などの蛍光誘導体化試薬として応用されている(5,

6)。これらは触媒を必要とせず、また常温下で極性溶媒中での反応が期待されたことから、GHB 分析への応用を試みたが、誘導体化が確認できなかった。これらジアゾ化試薬は保存可能であり市販されているが、安定な化合物とは考えがたく、試薬分解によって反応が進行しない可能性が考えられた。しかし、用事調製 ADAM を用いても酢酸やオレイン酸の誘導体化を実現できなかった。従って、ジアゾ化芳香族炭化水素による誘導体化はかなり繊細な条件によって大きく影響を受けるものと考えられ、再現性の面か

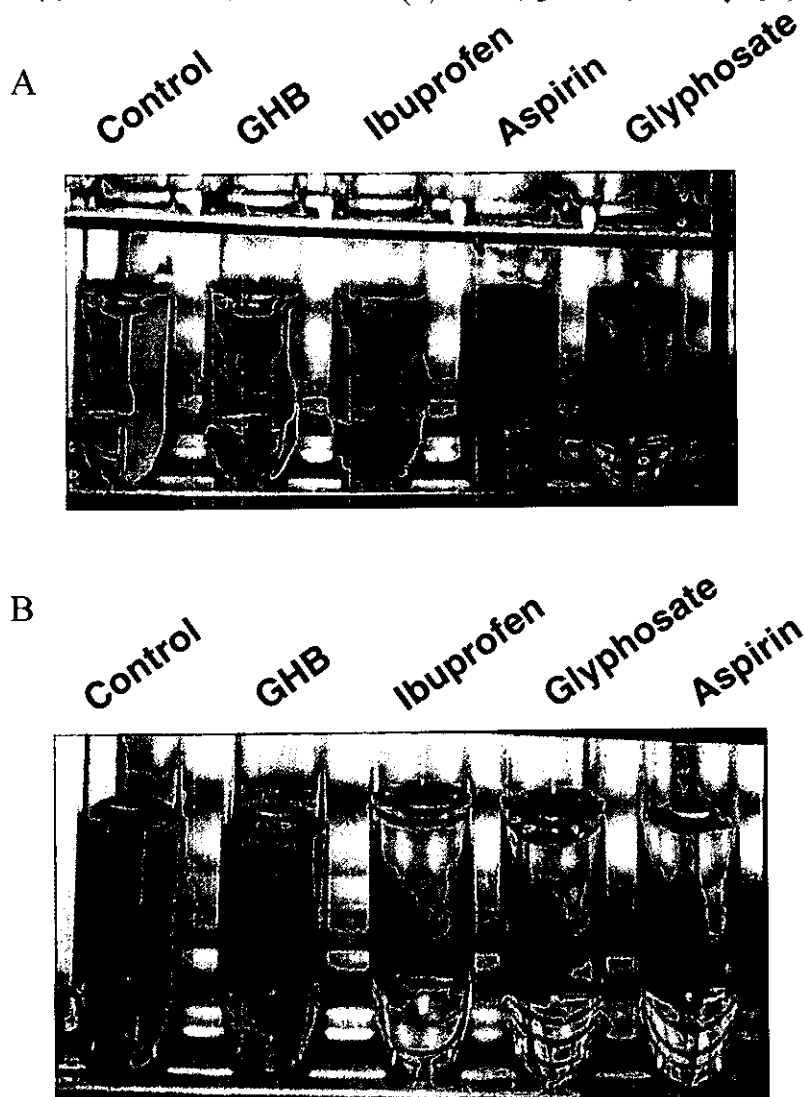


Fig. 3 Examples for the color reaction of acidic drugs with acriflavine (A) and bromocresol green (B)

## Test Compounds

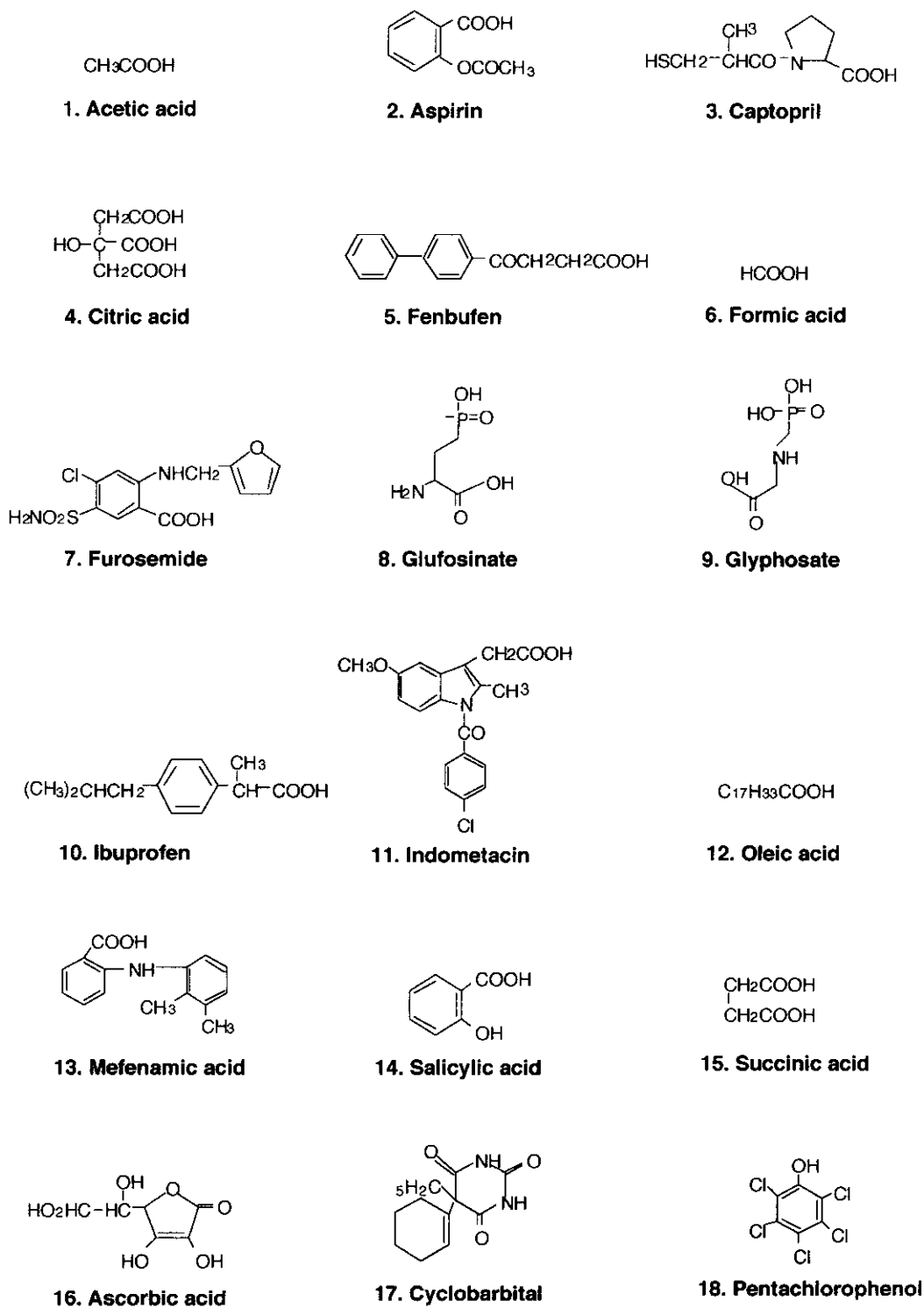
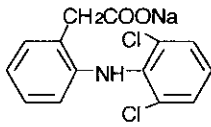
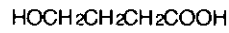


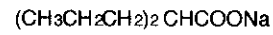
Fig. 4 Chemical structures for the compounds examined in this study.



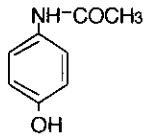
19. Diclofenac Sodium



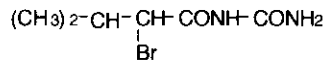
20. GHB



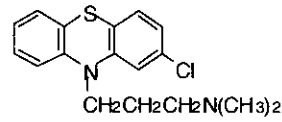
21. Sodium Valproate



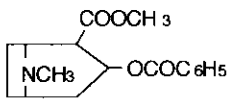
22. Acetaminophen



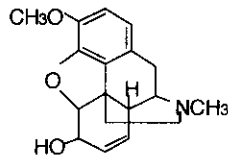
23. Bromvalerylurea



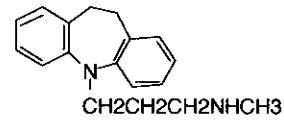
24. Chlorpromazine



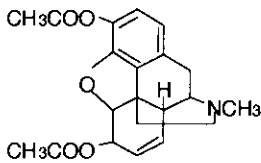
25. Cocaine



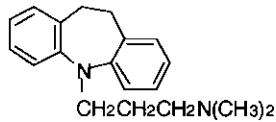
26. Codeine



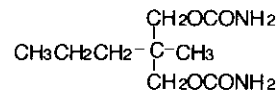
27. Desipramine



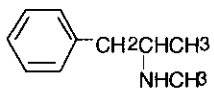
28. Heroin



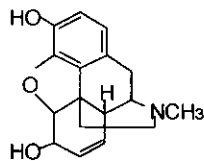
29. Imipramine



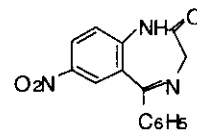
30. Meprobamate



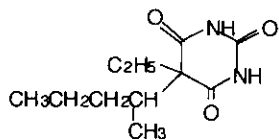
31. Methamphetamine



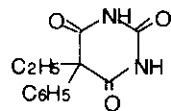
32. Morphine



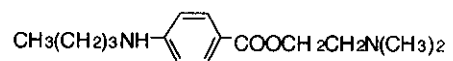
33. Nitrazepam



34. Pentobarbital



35. Phenobarbital



36. Tetracaine

Fig. 4 Continued

Table 1. Specificity of color reaction with acriflavine and bromcresol green

Test compound			acriflavine			bromcresol green		
			10µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml
1	Acetic acid	W	-	-	+	-	+	+
2	Aspirin	W	-	-	+	-	+	+
3	Captopril	W	-	-	-	-	+	+
4	Citric acid	W	-	-	+	-	+	+
5	Fenbufen	M	-	-	-	-	-	+
6	Formic acid	W	-	-	+	-	+	+
7	Furosemide	M	-	-	-	-	+	+
8	Glufosinate	W	-	-	-	-	-	-
9	Glyphosata	W	-	-	+	-	+	+
10	Ibuprofen	M	-	-	-	-	+	+
11	Indometacin	M	-	-	-	-	+	+
12	Oleic acid	M	-	-	-	-	-	+
13	Mefenamic acid	M	-	-	-	-	+	+
14	Salicylic acid	W	-	-	+	-	+	+
15	Succinic acid	W	-	-	+	-	+	+
16	Ascorbic acid	W	-	-	-	-	+	+
17	Cyclobarbitol	W	-	-	-	-	-	+
18	Pentachlorophenol	M	-	-	-	+	+	+
19	Diclofenac Sodium	M	-	-	-	-	-	-
20	GHB	W	-	-	-	-	-	-
21	Sodium Valproate	W	-	-	-	-	-	-
22	Acetaminophen	W	-	-	-	-	-	-
23	Bromvalerylurea	W	-	-	-	-	-	-
24	Chlorpromazine	M	-	-	-	-	+	+
25	Cocaine	W	-	-	-	-	-	-
26	Codeine	W	-	-	-	-	-	-
27	Desipramine	W	-	-	-	-	-	-
28	Heroin	W	-	-	-	-	-	-
29	Imipramine	W	-	-	-	-	-	-
30	Meprobamate	W	-	-	-	-	-	-
31	Methamphetamine	W	-	-	-	-	-	-
32	Morphine	W	-	-	-	-	-	-
33	Nitrazepam	M	-	-	-	-	-	-
34	Pentobarbital	W	-	-	-	-	-	-
35	Phenobarbital	W	-	-	-	-	-	-
36	Tetracaine	W	-	-	-	-	-	-

M(methanol) and W(water) in the third column indicate the solvent used for the solution of test compounds.

ら難点が大きいと考えられた。

GHB は分子内縮合してラクトン体を形成しやすい特徴を有している。この性質から水溶液中の GHB はラクトン体を形成しないまでも、分子内のカルボン酸基が水酸基との水素結合で不活性な状態にあることが推測できる。もしそうならば、非特異的な酸性薬物呈色反応でも GHB については陰性になる可能性があり、これをスクリーニングに応用しようと考えて検討を行った。その結果、プロモクレゾールグリーンでの反応では、GHB を含む少数の薬物のみが呈色陰性となった。GHB が陰性を示す一つの理由として、本薬物が塩であることに由来する可能性もある。19~21 の塩化合物が全て陰性なのはこれを支持するかもしれない。しかし、農薬グリホシネート(No 8) は塩ではないにもかかわらず陰性であり、GHB の陰性の原因としては当初予想したカルボン酸基が分子内の水酸基と会合していることによる可能性も否定できない。今回の検討から、結果としてプロモクレゾールグリーン呈色が陰性となる GHB と同様の結果を示す酸性薬物は少なく、この判定法は粉末として押収された GHB の簡便なスクリーニングに応用できる可能性が考えられた。

#### E. 結論

1. PDAM および ADAM を用いた GHB の蛍光誘導体化は、反応生成物が確認できなかった。本誘導化法は試薬純度や反応条件の繊細な管理が必要と考えられた。  
2. アクリフラビンおよびプロモクレゾールグリーンによる呈色反応でも、GHB は発色しなかった。同様な結果を示すカルボン酸基含有薬物は少なく、特にプロ

モクレゾールグリーン呈色反応における挙動は押収 GHB の簡便な推定に有用と考えられた。

#### F. 参考文献

1. Bernasconi, R., Mathivet, P., Bischoff, S., Marescaux, C., Gamma-hydroxybutyric acid : an endogenous neuromodulator with abuse potential?. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**, 135-141 (1999).
2. ElSohly, M.A., Salamone, S.J., Prevalence of drugs used in cases of alleged sexual assault. *J. Anal. Toxicol.*, **23**, 141-146 (1999).
3. Nicholson, K.L., Balster, R.L., GHB: a new and novel drug of abuse. *Drug Alcohol Depend.*, **63**, 1-22 (2001).
4. Ferrara, S.D., Tedeschi, L., Frizon, G., Castagna, F., Gallimberti, L., Giongetti, R., Gessa, G.L., Palatini, P., Therapeutic gamma-hydroxybutyric acid monitoring in plasma and urine by GC-MS. *J. Pharm. Biom. Anal.*, **11**, 483-487 (1993).
5. Yoshida, T., Uetake, A., Yamaguchi, H., preparation method for 9-anthryldiazo-methane (ADAM) as a fluorescent labeling reagent for fatty acids and derivatives. *Anal. Biochem.*, **173**, 70-74 (1988).
6. Nimura, N., Kinoshita, T., Yoshida, T., Uetake, A., Nakai, C., 1-Pyrenyldiazo-methane as a fluorescent labeling reagent for liquid chromatographic determination of carboxylic acids. *Anal. Chem.*, **60**, 2067-2070 (1988).
7. Johar, G.S., Agarwala, U., Sodhi, H.S., New methods for the detection of carboxylic acid groups in organic

compounds, with acriflavine. *Talanta*, **18**, 1051-1055 (1971).

8. Quillian, M.A., Gago-Martínez, A., Rodríguez-Vázquez, J.A., Improved method for preparation and use of 9-anthryldiazomethane for derivatization of hydroxycarboxylic acids : application to diarrhetic shellfish poisoning toxins. *J. Chromatogr. A*, **807**, 229-239 (1998).

## 研究協力報告書

磁性ラテックスを用いた LAIRT 法による毛髪試料中モルヒネ定量法の改良と  
マジックマッシュルーム含有成分サイロシビン及びサイロシンの特異的抗体作成

研究協力者 吉田 武美 昭和大学薬学部 毒物学教室 教授

研究要旨 毛髪検体は薬物を長期にかけて蓄積できるので薬物使用の時期を数ヶ月から年単位に遡って調べることができ、尿試料の場合の採尿時トラブルや衛生面などと比較し、検体試料として利点も多い。磁性ラテックスを用いたラテックス凝集阻止反応試験法(Latex agglutination inhibition reaction test: LAIRT)は定量的検出が可能な方法であり、本研究では毛髪試料を用いた時のモルヒネの検出感度を向上することを目的とした。その結果、毛髪を溶解した後、試料をフィルター濾過して除蛋白を確実にすることで、モルヒネの毛髪試料中濃度が5~1000 ng/mg hair の濃度範囲で良好に測定でき、これまでの検出限界を30 ng/mg hair より上げることが出来た。また近年その乱用が問題となり麻薬に指定されたマジックマッシュルーム中に含まれるサイロシビンおよびサイロシンに対する特異的抗体の作成を試み、酵素免疫測定法により抗血清中にその抗体活性が認められたが、さらにアフィニティークロマトグラフィーなどにより特異抗体に精製する必要があった。

### A. 研究目的

現在、麻薬、覚せい剤に代表される依存性乱用薬物の検査には主に血液や尿が用いられており、既に我々は特別な機器を必要としないラテックス凝集阻止反応試験(Latex agglutination inhibition reaction test: LAIRT)を尿中のメタンフェタミン(MA)、モルヒネ(MOR)、コカインのスクリーニング法として開発してきた<sup>1,2)</sup>。さらに磁性ラテックスを用いることにより、大型機器等を使わずに試料を簡便に濃縮でき、かつ定量的な LAIRT 法の開発を試み、昨年までに報告してきた。その方法は抗体と磁性ラテックス粒子を結合させることにより、遠心機等の大型機器を利用せずに磁石を用いて試料中の薬物を簡易的に濃縮することが可能で、また、試料中に薬物が存在する時には残存する薬

物結合(抗原結合)青色ラテックス粒子の透過率を測定し、薬物の定量的測定を行うものである。しかし、毛髪試料を用いた場合に、毛髪の蛋白および色素の影響を受け、高感度な測定が行えないため、改良が必要であった。そこで本研究では毛髪試料における本法の感度を高めるべく、試験法の改良を行った。

また、昨年6月麻薬に指定されたマジックマッシュルームと総称されるキノコに含まれるサイロシビン(psilocybin, 4-phosphoryloxy-*N,N*-dimethyltryptamine)及びサイロシン(psilocin, 4-hydroxy-*N,N*-dimethyl-tryptamine)等のトリプタミン誘導体は幻覚作用を有し、その乱用は社会問題に発展している。しかし、これらの麻薬を鑑定する簡便な方法は確立されておらず、現在は HPLC/ECD<sup>4)</sup>、LC/MS<sup>5)</sup>



などを用いているのが現状である。日本ではマッシュルームが広範囲に存在することから、サイロシンなどの簡便な測定法またスクリーニング法の開発が望まれている。イムノアッセイの応用は抗体によっては非常に特異性が高くなり、また試料の前処理が比較的簡便であることから微量試料中の薬物鑑定にも適した方法である。そこで、本研究ではサイロシピンやサイロシンに対する特異的抗体を作成し、そのエンザイムイムノアッセイ(EIA)を確立することを目的とした。

## B. 方法

### B-1. LAIRT 法による MOR の定量

#### 1. 試薬と抗原及び抗体試料

牛血清アルブミン (bovine serum albumin fraction V: BSA) と 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) は Sigma 社より購入した。ラテックス粒子(carboxylated polystyrene microparticle 青色(直径 0.55  $\mu\text{m}$ )、磁性粒子(直径 1-2nm) は Polysciences 社より購入した。Bio-rad protein assay は BIO-RAD 社より購入した。Morphine hydrochloride (以下 MOR と略す)は武田薬品より購入した。本研究では抗体試料として 3-carboxy methyl morphine (CMM)-BSA 結合体を免疫原として得られた抗血清を用い、抗原試料としてすでにウサギ血清アルブミン(rabbit serum albumin: RSA) と結合した CMM-RSA を用いた。フィルター(DISMIC 13JP050AN)は ADVANTEC 社より購入した。

#### 2. 抗体の調製

抗 CMM 血清は sepharose 4B-BSA により抗 BSA 抗体を除いてから、protein A cellulofine を用いたアフィニティークロ

マトグラフィーにより IgG 画分を調製し、これを抗 CMM 抗体として用いた。

#### 3. ラテックス・抗原試薬及びラテックス・抗体試薬の調製

抗原である CMM-RSA と青色ラテックス粒子、抗 CMM 抗体とラテックス磁性粒子の結合体の調製は Polysciences 社のプロトコールに従い、ECD を用いるカルボジイミド法によりラテックス粒子上のカルボキシル基と抗原または抗体のアミノ基を結合させた。

ラテックス粒子懸濁液は 0.1 M carbonate buffer (pH9.6) で 2 回遠心洗浄 (15000 rpm, 10 min) し、更に 0.02 M phosphate buffer (pH 4.5) で 3 回遠心洗浄した。次にラテックス粒子は 1%EDC を含む 0.02 M phosphate buffer (pH 4.5) 1.25 mL に懸濁させてイムノローテーターを用いて室温で 3 時間攪拌した。反応後ラテックス粒子は遠心し、0.2 M borate buffer (pH 8.5) を用いて 3 回遠心洗浄した。青色ラテックス粒子は抗原 (CMM-RSA 100  $\mu\text{g}$  蛋白) と、また磁性ラテックス粒子は抗体 (CMM IgG 画分, 100  $\mu\text{g}$  蛋白) を含む 1.2 mL の 0.2 M borate buffer (pH 8.5) に懸濁させて一夜攪拌した。反応液に 0.25 mol/L ethanolamine 50  $\mu\text{L}$  を加えて 30 分反応させることにより活性部位をブロックし、更に 1%BSA を含む 0.2 M borate buffer (pH 8.5) 1 mL に懸濁して 30 分攪拌することにより、非特異的タンパク結合部位をブロックした。抗原または抗体結合ラテックス粒子は 0.5 mL の保存液に懸濁させて使用時まで 4°C で保存した。

#### 4. 毛髪中 MOR の凝集阻止反応試験法

室温保存された乱用薬物非摂取者の毛髪を約 3 mm の長さに細断後、10 mg を

秤量し、試験管内でアセトン 5 mL を加えて 5 分間超音波洗浄した。アセトンを除き、ドライヤーで完全に乾燥させた後、エッペンドルフチューブに移し、1N NaOH 990  $\mu$ L と、各濃度 (0、5、12.5、25、50、125、250、500、1000  $\mu$ g/mL) の MOR 標準溶液 10 $\mu$ L を加えてイムノローターを用い室温で一晩攪拌し、毛髪を溶解させたものを毛髪試料とした (反応系中濃度は 0、50、125、250、500、1250、2500、5000、10000 ng/mL)。標品 (Std) のみの場合は毛髪を溶解せず、1N NaOH に Std のみを添加した。

6 N HCl を用いて試料溶液が pH 3 になるように加え (今回は 170  $\mu$ L)、15,000 rpm で 5 分間遠心し、沈殿を取らないように上清を注射筒にとり、フィルターでこの上清を濾過した。この試料溶液を 700  $\mu$ L に 0.27 M GBS (pH 9.6) 250  $\mu$ L、0.27 M GBS (pH 8.2) 500  $\mu$ L を加え、50  $\mu$ L を凝集像の観察に残り 1400  $\mu$ L を透過率測定に用いた。

#### 4-1. 凝集像の観察

凝集板に試料溶液 50  $\mu$ L に、ラテックス抗体試薬 25  $\mu$ L を滴下し、マイクロプレートミキサーを用いて 10 分間攪拌して MOR とラテックス抗体試薬を反応させた。これにラテックス抗原試薬 25  $\mu$ L を加え、攪拌を続けながら凝集像を肉眼で経時的に観察した。

#### 4-2. 透過率測定法

ラテックス試薬の非特異的吸着を防ぐために BAS コーティングチューブ (1.5 mL エッペンドルフチューブ) に 0.1% BSA 1 mL を加え、4°C で一夜保存した。保存中にチューブを逆さにし、チューブ内部が全て BSA 溶液に浸されるようにした) を用意した。BSA コーティングチューブ

は使用する際 BSA 溶液を取り除き、GBS (pH 9.6) で 3 回洗浄後に軽く遠心してチューブ内に GBS 溶液が残らないように除去した。

試料溶液 1400  $\mu$ L 及びラテックス抗体試薬 50  $\mu$ L を加えイムノローターを用いて 10 分間攪拌後、MOR の結合した磁性ラテックス粒子をマグネットで吸引し、上清 1300  $\mu$ L を除いた。残渣にラテックス抗原試薬 50  $\mu$ L を加え攪拌した (攪拌時間は凝集板上での反応を観察して、凝集像に差が認められた時間に設定した)。MOR の結合した磁性ラテックス粒子をマグネットで吸引し上清 150  $\mu$ L ずつを 96 穴プレートにとり 405 nm で透過率を測定した。

#### B-2. サイロシピンの抗体作成

##### 1. 試薬、試液および測定機器

4-Hydroxytryptamine (4-HT・1/2 シュウ酸塩) は金沢大学薬学部薬化学研究室より提供して頂いた。Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) は SIGMA 社、Horse Radish Peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体は Cell Signaling 社よりそれぞれ購入した。1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC)、glutaraldehyde (GA)、morpholinoethane sulfonic acid monohydrate (MES) および o-フェニレンジアミン二塩酸塩錠 (OPD) は和光純薬工業株式会社より購入したものをそれぞれ用いた。

##### 2. 抗原の調製と免疫

4-Hydroxytryptamine (4-HT) は、カルボジイミド法とグルタルアルデヒド法によりヘモシアニンと結合させ、免疫原 (BSA-EDC-4HT と BSA-GA-4HT) とした。

免疫原は Freund's complete adjuvant と乳化させ、初回に 0.15 mg 蛋白を、追加

時には 0.3 mg 蛋白をウサギに免疫した。10 回の追加免疫後に得られた抗 4-HT 血清を用いた。

### 3. 抗原固相化プレートを用いた酵素免疫測定法

#### 3-1. 固相抗原の調製

10 mg/mL BSA 水溶液 0.2 mL に 4 mg/mL の 4-HT 溶液 (0.9 M NaCl を含む 0.1 M MES buffer pH 4.5 に溶解した) 0.5 mL を加えて、ゆっくりと攪拌しながら 20 mg/mL EDC 水溶液を 0.5 mL 滴下した。2 時間室温で攪拌後、一夜 4°C で攪拌した。反応液は 0.05 M PBS (pH 7.0) に対して 3 日間透析後、PBS (pH 7.0) で 0.25 mg/mL の濃度とし、4°C に保存した。同様の方法により、4-HT を加えないものも調製した。

#### 3-2. プレート調製法

固相用抗原を 0.05 M carbonate buffer (pH 9.5) で 10 µg/mL に希釈し、96 穴マイクロタイタープレートの各ウェルに 100 µL 加え 10 分間室温で攪拌後、一夜 4°C に静置した。溶液を除去後、ポストコーティング用液 (1% BSA、0.05 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> を含む 0.05 M PBS pH 7.0) を 200 µL 加え使用時まで 4°C で保存した。

#### 3-3. 酵素免疫測定法

洗浄液 (0.05% Tween 20 及び 0.9 % NaCl を含む 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.0) で 3 回洗浄した抗原固相化プレートの各ウェルに、assay buffer (1 % BSA、0.05 % Tween 20 及び 500 倍希釈 normal rat serum を含む 0.05 M phosphate buffer pH 7.0) を 50 µL、各倍率に希釈したウサギ抗 4-HT 血清を 50 µL 加え、10 分間室温で攪拌後、4°C に一夜静置した。各ウェルを洗浄液で 3 回洗浄し、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (assay buffer で 3000 倍希釈したもの) 100

µL を加え室温で 1 時間攪拌した。各ウェルを洗浄液で 3 回洗浄し、OPD 溶液 (0.1% プロピレングリコール、0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含むクエン酸ナトリウム溶液 pH 4.1 に OPD 錠 (OPD 13 mg/錠) を 1 錠加え溶解したものを) 100 µL 加え、室温で 30 分間攪拌した。2 M 硫酸 50 µL を加え室温で 10 分間攪拌後、490 nm で吸光度を測定した。

## C. 結果

### C-1. LAIRT 法による MOR の定量

#### 1. 毛髪中 MOR の凝集板上での肉眼による観察

ラテックス抗体試薬濃度は 60 µg/mL × 20 倍希釈 (60 µg/mL はラテックス抗体試薬を作成した際に希釈した IgG の濃度)、ラテックス抗原試薬濃度は 25 µg/mL × 150 倍希釈を用いた。MOR 標品最終反応系中濃度 0、0.026、0.052、0.103、0.258、0.516、1.032、2.063 µg/mL の条件で、経時的に凝集像の観察を行ったところ、反応時間の経過に伴い反応 4 分後には MOR 非添加にラテックス粒子が結合した明らかな凝集塊が認められ、反応 8.5 分後には、0.026、0.516、1.032 µg/mL に凝集像が認められはじめ、MOR の用量依存的に凝集阻害が生じる事を確認した。

#### 2. 毛髪中 MOR の透過率測定

ラテックス抗体試薬濃度は 60 µg/mL × 20 倍希釈、ラテックス抗原試薬濃度は 25 µg/mL × 100 倍希釈 (毛髪試料の場合試料溶液に毛髪色素が含まれるため肉眼の観察より希釈倍率を下げたほうが良い結果がでる) を用い、0、5、12.5、25、50、125、250、500、1000 µg/mL の濃度の MOR 標品を 10 µL 用いて反応系中濃度が 0、0.050、0.100、0.200、0.500、0.996、

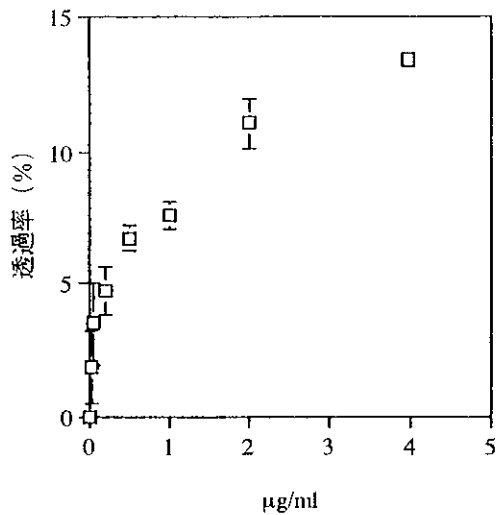


Fig. 1 透過率測定によるモルヒネの標準曲線

1.992、3.984  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように設定した条件で透過率を測定した所、Fig. 1 のような結果が得られた。グラフは縦軸に透過率(MOR 非存在下での透過率が0になるように補正)、横軸に MOR 濃度をプロットしたものである。反応系中の MOR 濃度 0.020  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において 2.00%、0.050  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において 3.49%、0.100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において 4.70%、0.200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において 5.66%、0.500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において 6.70%、0.996  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において 7.54%、1.992  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において 11.2%、3.984  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において 13.4%の透過率を示し、MOR に依存した飽和曲線を描いた。これを 1 mg hair 当たり換算すると 5 ng/mg hair から 1000 ng/mg hair の濃度範囲で定量性があることが確認できた (Fig. 2)。

#### C-2. 4-HT の抗体作成

4-HT はグルタルアルデヒド法とカルボジイミド法によりヘモシアニンと結合させ、ハプテン抗原としたが、グルタルアルデヒド法から得られた抗血清からは特異的抗体を得られなかった。カルボジイミド法により作成したハプテン抗原で免役したウサギ抗血清には固相化抗原に

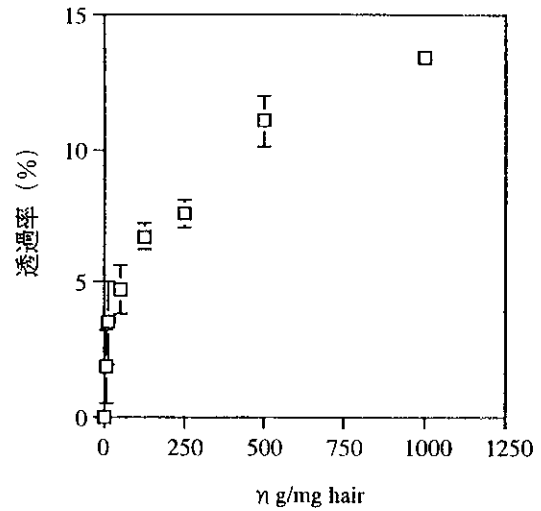


Fig. 2 透過率測定による毛髪 1 mg 当たりのモルヒネの標準曲線

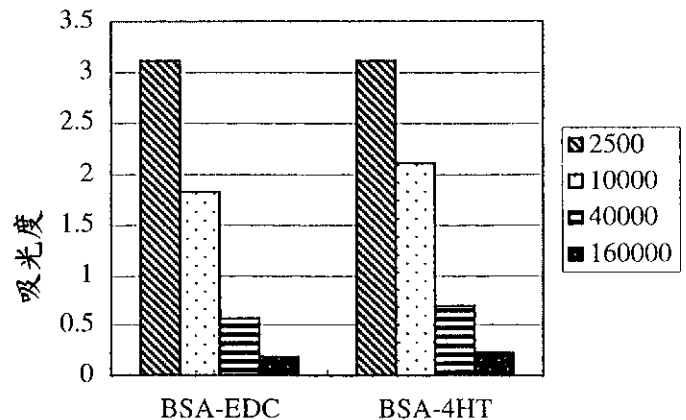


Fig. 3 希釈による抗体価の変化

よる酵素免疫測定法により抗血清中に固相化抗原と反応する物質が含まれることがわかった(Fig.3)。酵素免疫測定において抗血清の希釈倍率に従い、明らかな吸光度の減少が認められた。また、この抗血清には免疫原とした BSA-EDC-4HT に対する抗体の他に BSA-EDC に反応する抗体が含まれていることもわかった (Fig.3)。

#### D. 考 察

磁性ラテックスを用いた LAIRT 法により毛髪試料を用いての凝集阻害の確認、また透過率の測定をすることでより定量