

学 位 論 文 題 名

ラジオイムノアッセイによるベンゾジアゼピン系
薬剤のマススクリーニングの開発

学位論文内容の要旨

緒 言

現在、数多くの Benzodiazepine (BDP) 系薬剤が临床上使用されており、これらが自殺、他殺の目的やその補助的手段として使用されているケースも多く、法医学的にも BDP 系薬剤のマススクリーニング法の確立が望まれている。

ところで、BDP 系薬剤の一つである diazepam の radioimmunoassay (RIA) は diazepam に対する特異性が高く、他の BDP 系薬剤のスクリーニングには適さない。そこで著者は BDP の代謝物である benzophenone (BP) に着目し、このうち 2 - amino - 5 - chlorobenzophenone (A - CBP) と 2 - amino - 5 - nitrobenzophenone (A - NBP) に対する抗体を別個に作製し 2 種類の RIA を確立した。一方、ラットに diazepam あるいは nitrazepam を投与し、その尿を酸加水分解して、総 BP 量を RIA で測定し、本法のマススクリーニング法としての有用性について考察した。

材料および方法

1. 免疫原の作製

A - CBP あるいは A - NBP の 2 位のアミノ基にスペーサーとして無水コハク酸を導入し、2 - hemisuccinylamino - 5 - chlorobenzophenone (HSA - CBP) および 2 - hemisuccinylamino - 5 - nitrobenzophenone (HSA - NBP) を合成した。これらを混合酸無水物法により牛血清アルブミン (BSA) に結合させて 2 種の免疫原 HSA - CBP - BSA と HSA - NBP - BSA を作製した。

2. 抗体の作製

各々の免疫原 (1 mg 蛋白量) を生理食塩水に溶解し、Freund の完全アジュバントとともにウサギに皮下注射した。十分な抗体価が得られたのち全採血し、抗 CBP 血清と抗 NBP 血清を得た。

3. BP の合成

各 BDP 系薬剤 10mg に 5 N HCl 10ml を加え、100℃ の水浴中で 150 分間反応させた後、2 N NaOH で中和し酢酸エチルで BP を抽出した。抽出物はトルエンを展開溶媒とした薄層クロマトグラフィーで分離後、各 BP 部分をかき取りアセトンで溶出した。RIA 用の標識化合物としては $[\text{CH}_3 - ^3\text{H}]$ -diazepam および $[\text{CH}_3 - ^3\text{H}]$ -flunitrazepam を酸加水分解して $[^3\text{H}]$ -2-methylamino-5-chlorobenzophenone (^3H -CBP) および $[^3\text{H}]$ -2-methylamino-5-nitro-2'-fluorobenzophenone (^3H -FBP) を得た。

4. RIA

1) 操作法

0.01M リン酸ナトリウム緩衝生理食塩水、0.3% γ -グロブリン溶液、検体試料、標識化合物および抗血清各 100 μl を加えて室温で 2 時間静置後、ポリエチレングリコール 6000 液を加え Bound と Free を分離した。残存白色沈澱物に蒸留水を加え攪拌溶解後、その放射活性を測定した。抗 CBP 血清と ^3H -CBP を用いた RIA-I および抗 NBP 血清と ^3H -FBP を用いた RIA-II を行った。

2) RIA-I と RIA-II の検量線

RIA-I には A-CBP (10 pg ~ 5 ng) を、RIA-II には A-NBP (1 pg ~ 1 ng) を段階的に加えて、結合したトリチウム標識化合物の % を算出し、検量線を求めた。

3) RIA-I および RIA-II における各 BP の交差反応性

RIA-I には R₇ 位にクロール基あるいはブroom 基を有する BP を、RIA-II には R₇ 位にニトロ基を有する BP をそれぞれ加えて、各々のトリチウム標識 BP に対する抗血清との結合を 50% 抑制する各 BP の量を求め、交差反応率を求めた。

5. diazepam, nitrazepam の回収率

正常ラット尿 1 ml に diazepam, nitrazepam を一定量加え酸加水分解して BP としたのち、RIA-I あるいは RIA-II で測定し、回収率を求めた。

6. diazepam と nitrazepam の動物投与実験

ラットに diazepam (0.15mg/kg) あるいは nitrazepam (0.08mg/kg) を腹腔内注射した後、0-3, 3-6, 6-9, 9-24 時間の各蓄尿を酸加水分離して BP とした後、酢酸エチルで抽出し、これらを RIA-I あるいは II で測定した。また diazepam 投与ラットの尿の一部を中性にしたのち遊離型 diazepam を酢酸エチルで抽出し、これを直接 RIA により測定した。

結果と考察

1. BP の RIA

1) 免疫原の作製と抗体産生

ハプテンの BSA 1 モルに対する結合度は HSA - CBP が約12モル, HSA - NBP が約9.6モルであった。また, これらをウサギに6ヵ月間免疫後, HSA - CBP - BSA については800倍, HSA - NBP - BSA については20倍希釈可能な抗血清を得ることができた。

2) 検量線

RIA-I では100pg から3000pg の A - CBP, RIA-II では10pg から300pg の A - NBP を添加することによって標識化合物と抗体との結合が逆S字状に阻止され, A - CBP は150pg, A - NBP は30pg まで測定可能であった。なお, RIA-I, RIA-II における10例の intraassay と interassay による変動係数はそれぞれ3.1%と4.6%および10.2%と12.3%であった。

3) 各 BP に対する交差反応性

RIA-I において A - CBP との反応性に対し, 各 BP は cyclopropyl - methylamino - CBP に対しては約250%を上限とし, 下限は 2 - amino - 5 - bromobenzoylpyridine で12%の交差反応を示したが, nitrazepam 由来の A - NBP に対しては1.0%と反応性が低かった。これらのことから本抗体はR₁位の - NH - CH₂ - 部のみならず2' 位, R₇位のハロゲン基をも強く識別していることが分かる。一方, RIA-II において, A - NBP に対する交差反応性を100%とすると, R₇位にニトロ基をもつ各 BP に対してはその交差反応性は300%以上と良好な結果が得られた。このことから RIA-II の反応系ではR₁位の - NH - CH₂ - 部のみならず, BP の2' 位のハロゲン基の有無をも強く認識していることが分かる。

2. diazepam, nitrazepam の回収率

diazepam あるいは nitrazepam を正常ラット尿に添加し, 酸加水分解により得られた各 BP の回収率はそれぞれ93.1±3.3%, 91.2±4.3%であった。

3. BDP 投与後のラット尿中 BP の経時的变化

diazepam, nitrazepam のいずれについても, 尿中総 BP 量は最初の3時間で最も多く, その後動物の個体差はあるものの漸減していった。また, diazepam 投与ラット尿について総 BP 量と遊離型 diazepam を比較したところ, diazepam 量は2分の1から6分の1であり, diazepam が検出されなかったラットにおいても BP として検出可能であった。

結 論

BDP 系薬剤の尿中からのマススクリーニングの目的で BDP を酸加水分解して得られる BP のうちで、A - CBP と A - NBP を抗原としてそれぞれの抗体を作製し、これらの RIA を確立し考察を加えた。

1. HSA - CBP および HSA - NBP を有機合成後、これらを BSA に縮合させたものを抗原としてウサギに免疫し、それぞれ800倍、20倍に希釈して使用可能な抗血清を得た。

2. 本2種類の抗体を用いて、確立された RIA により A - CBP と A - NBP は少なくともそれぞれ150pg と30pg まで測定可能であった。

3. 本2種類の抗体は、多くの CBP 誘導体と NBP 誘導体に交差反応性があった。

4. diazepam 投与ラット尿中の総 BP 量を経時的に検討した結果、deazepam が検出されなかった尿からも BP としては検出可能であった。

5. 3, 4 から2種類の RIA は、繁用 BDP 系薬剤の尿中からのマススクリーニングに有用であることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 寺 沢 浩 一

副 査 教 授 宮 崎 勝 巳

副 査 教 授 齋 藤 秀 哉

ベンゾジアゼピン系薬剤は今日広く使用されており、これの関与している法医学的事例も多く、そのマススクリーニングの確立が望まれてきている。

申請者の行ったのは、この薬剤に関する法医中毒学的研究であり、ラジオイムノアッセイ (RIA) によるこの薬剤のスクリーニング法の開発を試みたものである。

すなわち、

① この薬剤に属する多くのものに反応する抗体を作製することを考えて、化学構造の上で共通性がより強く認められる代謝物に着目し、ジアゼパムとニトラゼパムの各々のベンゾフェノン体に対して抗体を作製した。

② そして確立された2種類の RIA のマススクリーニング法としての有用性について評価す

るために、ラットにジアゼパム並びにニトラゼパムを投与し、得られた尿を加水分解して総ベンゾフェノン量を測定した。

具体的には、

① ジアゼパムおよびニトラゼパムのベンゾフェノン体のアミノ基に無水コハク酸を導入した後、混合酸無水物法によって牛血清アルブミンに結合させたものをウサギに免疫して抗血清を得た。

② この抗血清を用いて2種のRIAを確立した。標識化合物としては、トリチウムでラベルされたジアゼパムおよびフルニトラゼパムを加水分解したベンゾフェノン体を用いた。

③ ラットにジアゼパム並びにニトラゼパムを腹腔内注射した後、尿を経時的に採取し、それを加水分解した後、前記2種のRIAで総ベンゾフェノン量として測定した。

その結果、

① ジアゼパムのベンゾフェノン体のためのRIAでは150pgから3000pgの範囲で、またニトラゼパムのベンゾフェノン体のためのRIAでは30pgから300pgの範囲で測定可能であることがわかった。また抗体の交差反応性は十分に広く、2種のRIAによりベンゾジアゼピン系薬剤のベンゾフェノン体を広く検出できることがわかった。

② ジアゼパムあるいはニトラゼパムを投与したラットから得られた尿を加水分解して得られる総ベンゾフェノン量は、未変化体よりも数倍多く、投与後長時間を経過しても、陽性の結果を得ることができた。

以上のように、

ジアゼパム並びにニトラゼパムの代謝物に対する抗体を作製することにより、多くのベンゾジアゼピン系薬物をスクリーニングすることのできる2種のRIAを確立することができ、その有用性が動物実験により確認された。

口頭発表時の試問に際し、宮崎勝巳教授よりベンゾジアゼピンをベンゾフェノンにするための加水分解の条件について、並びにベンゾジアゼピン類似薬物に対する交差反応性についての質問がなされたが、申請者は概ね適切な回答をしたものと考えられる。

また副査の宮崎勝巳教授・齋藤秀哉教授に学位論文に関して個別に試問を受け、学位授与について可の判定がなされた。

本論文はベンゾジアゼピン系薬剤のマスクリーニング法に関して、有用性の高い試みを行ったものであり、学位の授与に値するものと判定される。