

技術論文

イムノアッセイを原理とする尿中覚せい剤の捜査現場
予備試験法宮 沢 正^{®*}, 荻 野 智^{**}, 中島 邦生^{*}, 南 幸 男^{*}Screening assay in crime scene investigation for amphetamine
in urine by immunological methodTadashi MIYAZAWA^{*}, Satoshi OGINO^{**}, Kunio NAKAJIMA^{*}, Yukio MINAMI^{*}^{*}Forensic Science Laboratory, Osaka Prefectural Police Headquarters, 1-3-18, Hommachi,
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541^{**}Nagase & Co., Ltd., 5-1, Nihonbashi-Kobunacho, Chuo-ku, Tokyo 103

(Received 29 February 1996, Accepted 8 April 1996)

The Drug-of-Abuse One Step Test for the detection of methamphetamine (MA) and amphetamine (AM) in urine was evaluated. The two kinds of test device, one for MA (Device-MA) and the other AM (Device-AM), examined for their sensitivity and specificity. The detection limits of Device-MA and Device-AM were 1 µg/ml and 2 µg/ml, respectively. Seven compounds related to amphetamine such as methamphetamine, ephedrine, norephedrin, pseudo-ephedrine, methylephedrine, methoxyphenamine and *p*-hydroxymethamphetamine were found not to cross-react with Device-AM when tested at concentrations up to at least 200 µg/ml. But secondary amines such as methoxyphenamine, *p*-hydroxymethamphetamine, ephedrine and pseudo-ephedrine were found to cross-react with Device-MA at 0.5, 20, 20, 200 µg/ml, respectively. The results obtained for 175 urine samples by the proposed method using the two devices were compared with those by the conventional method (Syva Emit, TLC and GC/MS). Percent agreements between the two methods for urine samples, which are positive for both MA and AM and negative for both MA and AM were 100%. Total percent agreement was 95%.

Keywords : immunological test device; screening assay for amphetamines in urine; methamphetamine; amphetamine.

1 緒 言

我が国で乱用される薬物がしだいに多様化しつつあるが覚せい剤は依然として衰えず主流をなしている。従って、各鑑定機関においては、覚せい剤の使用証明を行う

尿資料を、常時多数を取り扱っている。この種の鑑定の品質管理や、その迅速化、効率化をより促進するには、捜査現場において得られた尿資料を予備試験することにより、いわゆる陰性となる資料を捜査現場段階であらかじめ排除することが重要となる。更に、事案の特殊性を考えた場合、捜査現場において得られた尿資料から覚せい剤使用の嫌疑が存在するか否かを、客観性及び信頼性高く迅速に判定できる簡易予備試験法が強く望まれている。

^{*} 大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所: 541 大阪府大阪市中央区本町 1-3-18

^{**} 長瀬産業(株)医療システム部試薬課: 103 東京都中央区日本橋小舟町 5-1

この種の事案の捜査現場において使用できる予備試験法の条件としては、操作性や判定法が化学分析を専門としない者が取り扱うことを前提として作られていることが必要であり、更に携行性の良いことが重要である。又、年間数千件にもなる多数の尿検体を鑑定検査する鑑定機関では、検体 1 件当たりにより要する検査費用も無視できない要件になる。このような状況において、これまでにテトラプロモブチルフェノールフタレンエチルエステル (TBPE) を用いたイオン会合による発色反応を利用した TBPE 法¹⁾²⁾、シモン反応による発色を利用した吸着チップ法³⁾、及び試験紙法⁴⁾が開発使用されている。更に最近、イムノアッセイを原理とした特異性の高い Triage (Biosite) が操作性や判定法において優れているとして一部に試されているが⁵⁾、捜査現場に使用するには価格の点から、我が国では広く普及されるには至っていない。今回、競合型のイムノアッセイを原理として、モノクロナール抗体を用いた “Drug-of-Abuse One Step Test” (以下、“ワンステップテスト”と略記) (Bionike Laboratories, Inc. 製/国内販売元: 長瀬産業) について実際の鑑定資料尿を用いた最終判定結果 (以下、“鑑定結果”と略記) との整合性など、捜査現場用予備試験法に導入するに際して想定される種々の問題について検討を行った。

2 実 験

2.1 試 薬

ワンステップテストのメタンフェタミン用テストカード (以下、“MA 用テストカード”と略記) 及びアンフェタミン用テストカード (以下“AM 用テストカード”と略記) の 2 種類について検討した。本テストカードの形態を Fig. 1 に示す。なお、直接尿試料に浸せる試験紙型のものもある。

標品として用いた試薬は、*d*-メタンフェタミン塩酸塩 (大日本製薬)、*dl*-アンフェタミン硫酸塩 (武田薬品)、*l*-エフェドリン塩酸塩 (大日本製薬)、*dl*-メチルエフェドリン塩酸塩 (関西薬品)、*p*-ヒドロキシメタンフェタミン硫酸塩 (Knoll A. G.)、ノルエフェドリン塩酸塩 (アルプス薬品)、プソイドエフェドリン塩酸塩 (アルプス薬品)、及びメトキシフェナミン塩酸塩 (日本新薬) である。

鑑定検査に用いたものは、次のとおりである。

スクリーニングテスト試薬キット: Emit d. a. u.TM Monoclonal Amphetamine/Methamphetamine Assay, 試薬 A | 抗体, グルコース-6-リン酸, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) 及び最終濃度 0.05% の

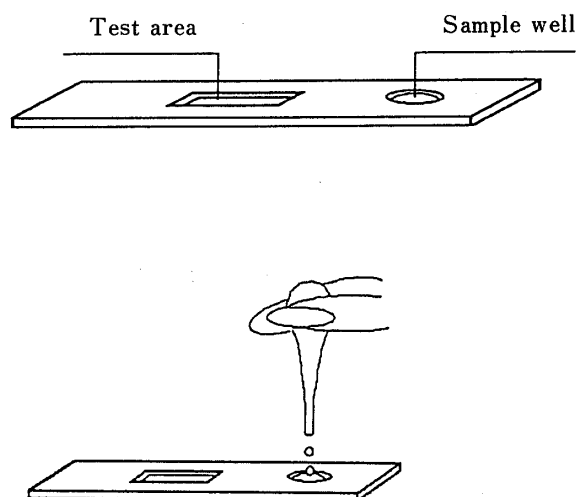


Fig. 1 Schematic illustration of Drug-of-Abuse One Step Test (card type)

アジ化ナトリウム}, 試薬 B (グルコース-6-リン酸脱水素酵素標識薬物及び最終濃度 0.05% のアジ化ナトリウム), 及び緩衝液 (トリス緩衝液及び最終濃度 0.05% のアジ化ナトリウム) (Syva)

薄層クロマトグラフィー (TLC) 用プレート: シリカゲル 60 F₂₅₄ (Merck)

溶媒及び試薬類は特級品を用いた。

2.2 装 置

Emit d. a. u.TM の測定装置は ETS plus (Syva) を、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC/MS) は QP-2000 (島津製作所) をそれぞれ使用した。

2.3 ワンステップテストの原理

本法は、薬物とタンパク質の複合体と尿中の薬物との間の抗体に対する競合反応を利用したものである。薬物が尿中に存在する場合、尿を本テストカードのサンプルウェルに注ぐと、薬物を含んだ尿は膜上のある限られた量の染料と抗体の複合体 (以下“染料-抗体”と略記) とともに抗原抗体反応しながらテストエリアに進む。尿中の薬物がある濃度以上存在すると、テストエリアにコーティングした薬物とタンパク質の複合体 (以下“薬物-複合体”と略記) と染料-抗体の反応が阻害され、染料-抗体がテストエリアに集中しないため、染料の色によるバンドが生じない。これが陽性の結果である。陰性の場合、薬物-複合体と染料-抗体の反応が阻害されず、染料の色によるバンドが生じる。又、陽性陰性にかかわらずコントロールエリアにおいては薬物とは無関係

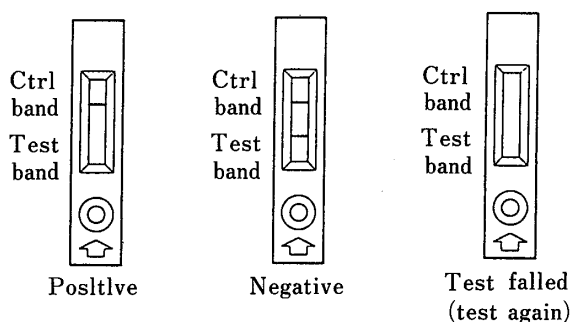


Fig. 2 Interpretation of results

な物質の抗原とその抗体と染料の複合物との反応による色バンドが生じ、これは製品の効力を見るものである。従って、Fig. 2 に示すようにテストエリアのコントロールバンドのみに赤色の線が観察されれば陽性と判定し、テストバンドとコントロールバンドの位置に共に赤色の線が観察されれば、陰性と判定する。

2.4 試験方法

捜査現場用簡易予備テストカードとしての諸条件を次のように検討した。検出限界、交差反応性試験には2:1で示した標品を正常成人尿に添加し、各種の濃度に調製したものを資料とした。試料をテストカードのサンプルウェルに150 μ lを注ぎ、8分後にテストエリアを観察した。実際の鑑定資料尿についても上記と同様の方法で観察した。鑑定検査においては次のとおり行った。なお、分析装置のキャリーオーバーなどの汚染を勘案し、以下のようにカットオフ値を設定した。

まず、Emit d. a. u.TMの測定(Emit)を行った。カットオフ値は、メタンフェタミン塩酸塩1 μ g/mlに調製した。続いてTLCの試料を次のように調製した。尿2.5 mlに0.75 gの塩化ナトリウム、0.25 mlの20%炭酸ナトリウム水溶液及び3 mlのクロロホルム-イソプロパノール(3:1)を加え、10分間振り混ぜた。これを遠心分離した後下層を採取し、無水硫酸ナトリウムで脱水処理し、氷酢酸を2滴添加して減圧下にて溶媒を留去した。残留物に50 μ lのクロロホルム-イソプロパノール(3:1)を加え再び溶解し試料とした。この試料溶液から10 μ lをTLCプレートに添着し、アセトン-ベンゼン-28%アンモニア水(2:1:0.5)にて展開し、風乾後ドラージェンドルフ試薬及びシモン試薬を噴霧し発色状態を観察した。検出限界は絶対量としてメタンフェタミン0.5 μ gであった。

最後に、GC/MSの試料を次のように調製した。

Table 1 Substances interfering in methamphetamine test

Compound	Conc. of positive result/ μ g ml ⁻¹
<i>p</i> -Hydroxy methamphetamine	0.5
Pseudo-ephedrine	20
Methoxyphenamine	20
Ephedrine	200
Methylephedrine	>200*
Norephedrine	>200*
Amphetamine	>200*

*: No cross-reaction when tested at concentration of at least 200 μ g/ml.

尿5 mlに2 gの無水炭酸カリウム及び1 mlの酢酸エチルを加え、10分間振り混ぜた。これを遠心分離し、上層を採取し、少量の無水硫酸ナトリウムを加え、かき混ぜ、遠心分離後溶液を採取して試料とした。

この試料溶液から1 μ lをGC/MSに注入し、直ちに0.5 μ lの50% *N*-メチルビストリフルオロアセトアミド(MBTFA)-酢酸エチル溶液を注入し、トリフルオロアセチル(TFA)誘導体として検出した。GC/MSにおける前記操作法によるカットオフ値は、メタンフェタミン塩酸塩は0.5 μ g/ml、又アンフェタミン硫酸塩は0.25 μ g/mlとした。

GC/MSの分析条件は次のとおりである。

カラム: DB-1 (J & W), 30 m, 0.53 mm (i.d.), 1.5 μ m (膜厚), カラム温度: 170°C, 注入口温度: 220°C, イオン源温度: 250°C, イオン化方式: EI, イオン化電圧: 70 eV, スキャン範囲: 55~254 amu, スキャン間隔: 1秒

本報告で用いたGC/MSの繰り返し精度については、メタンフェタミン塩酸塩1.5 μ g/mlを用いて検討したところ、相対標準偏差($n=12$)は2.0%であった。

3 実験結果及び考察

3.1 検出限界

2.4で述べた方法により検出限界について試験したところ、MA用テストカードではメタンフェタミン塩酸塩1 μ g/ml、AM用テストカードではアンフェタミン硫酸塩2 μ g/mlであった。

3.2 交差反応性

2.4で述べた方法により7種の覚せい剤関連化合物の交差反応性について試験したところ、MA用テストカードではTable 1に示すように、*p*-ヒドロキシメタ

Table 2 Comparison of results from proposed method(A) and conventional method(B) for 175 urine samples

MA AM		B						Total	Accuracy, %
		+	+	+	-	-	-		
A	+	+	95	0	0	0	95	100	
	+	-	5	2	0	4	11	18.2	
	-	+	0	0	0	0	0	—	
	-	-	0	0	0	69	69	100	
Total		100	2	0	73	175	94.9		

MA: methamphetamine; AM: amphetamine; A: proposed method; B: Emit d. a. u.TM, TLC & GC/MS

ンフェタミンに強い交差反応が認められ、メトキシフェタミンやエフェドリン類にも若干認められ、二級アミン類に反応すると考えられた。しかし、*p*-ヒドロキシメタンフェタミンは我が国では市販されておらず、又メタンフェタミンの代謝物でもあるが主排せつ物メタンフェタミンに比較すると少ない⁶⁾ので、実際の鑑定資料尿に対しての影響は考えられない。

AM 用テストカードでは前記のいずれの物質も、少なくとも 200 µg/ml 濃度でも交差が認められず、特異性が高いものと考えられた。

我が国での覚せい剤乱用者は、ほとんどがメタンフェタミンを使用しており、尿中に排せつされるものは未変化体のメタンフェタミンが主なもので、次いで微量の代謝物であるアンフェタミン、*p*-ヒドロキシメタンフェタミン等である現状を考慮すると、MA 用テストカードと AM 用テストカード、両方のテストカードを併用することにより、MA 用テストカードにより感度よく、AM 用テストカードにより特異性高くスクリーニングできることが考えられた。

3.3 実際の鑑定資料尿によるワンステップテストと鑑定結果の比較

実際の鑑定資料尿 175 点のワンステップテストと鑑定結果との比較を Table 2 に示す。なお、鑑定結果でメタンフェタミン陽性としたものは、Emit, TLC 及び GC/MS においてすべて検出されたもので、アンフェタミン陽性としたものは、Emit の測定及び GC/MS においてすべて検出されたものである。なお、GC/MS における判定法はフルスキャンモードでのメタンフェタミン及びアンフェタミンの各トリフルオロアセチル化体の主要なイオンピークすなわち、メタンフェタミン-TFA は

m/z 91, 110, 118, 154, アンフェタミン-TFA は m/z 91, 118, 140 が検出されたものを陽性とした。

MA 用テストカード及び AM 用テストカード共に陽性のもの 95 点は、すべて鑑定結果でもメタンフェタミン及びアンフェタミンが陽性であり、MA 用テストカード及び AM 用テストカード共に陰性のもの 69 点は、すべて鑑定結果でもメタンフェタミン及びアンフェタミンが陰性であった。

MA 用テストカードで陽性、AM 用テストカードで陰性のものは 11 点あり、そのうち 2 点のみが鑑定結果と一致し、5 点が鑑定結果でメタンフェタミン陽性及びアンフェタミンも陽性となり、4 点がメタンフェタミン及びアンフェタミン共に陰性となった。鑑定結果でアンフェタミンも陽性となった 5 点は、GC/MS が AM 用テストカードによるワンステップテストより感度が高いためと考えられた。鑑定結果で陰性となった 4 点のうち 2 点は、TLC でメタンフェタミンが陰性となったもので GC/MS ではメタンフェタミン陽性であるが、総合判定で陰性としたもので、残り 2 点は TLC 及び GC/MS 共に陰性である。TLC 及び GC/MS 共に陰性である 2 点はメチルエフェドリンを検出したもの 1 点と TLC 陰性で GC/MS でメタンフェタミン及びアンフェタミン擬陽性となったものである。

以上の結果、鑑定結果と完全に一致したものは全資料 175 点中 166 点、すなわち一致率は 95% であり、その高い特異性に加え、判定方法や携行性もよく、捜査現場用テストとして有用と考えられた。

本法ワンステップテストは、MA 用テストカードと AM 用テストカードを併用することにより検出感度及び特異性を相互補完し、我が国の捜査現場用予備試験法として有効なものと考えられた。実際の鑑定資料尿 175 点について両テストカードを併用したテストと Emit, TLC 及び GC/MS による鑑定結果とを比較したところ、その一致率は 95% となり、又両テストカードとも陰性の資料は鑑定結果もすべて陰性であり、現場での選別可能な選択性の高い捜査現場用予備試験法であると考えられた。又、判定方法や携行性もよく、捜査現場用予備試験法として有用と考えられた。従って、捜査現場には信頼しうる情報をもたらす、鑑定機関においても業務の合理化に資するものと考えられた。

なお、捜査現場においてあまり高感度な方法を用いることは覚せい剤の結晶等の押収作業からの汚染の可能性を考慮に入ると、捜査現場用予備試験法としては上記検出限界程度が現状では満足し得るものと考えられる。

(1995年9月, 日本分析化学会)
(第44年会において一部発表)

文 献

- 1) 岡元賢二: 科学警察研究所昭和54年度鑑識科学研究発表会(化学部会)講演要旨集, (1979).
- 2) 中島邦生, 小野広孝, 清水達造: 科学警察研究所昭和55年度鑑識科学研究発表会(化学部会)講演要旨集, (1980).
- 3) 中原雄二, 関根 均: 科学警察研究所昭和58年度鑑識科学研究発表会(化学部会)講演要旨集, (1983).
- 4) 井上堯子, 鈴木真一, 田中 謙: 科学警察研究所昭和61年度鑑識科学研究発表会(化学部会)講演要旨集, (1986).
- 5) 屋敷幹雄, 小嶋 亨: ぶんせき (*Bunseki*), **1995**, 816.
- 6) 日本薬学会編: “薬毒物化学試験法と注解”, p. 294 (1992), (南山堂).

要 旨

イムノアッセイを原理とした尿中覚せい剤の捜査現場用予備テストカード“Drug-of-Abuse One Step Test”を実際の事件に関連した尿資料のスクリーニングに適用するための諸条件を検討した。検出限界はメタンフェタミン用テストカード(MA用)は1 µg/ml, アンフェタミン用テストカード(AM用)は2 µg/mlであった。両テストカードの交差反応性について7種の覚せい剤類縁化合物を用いて調べたところ, MA用は二級アミン類に反応が認められたが, AM用では100倍の濃度でも反応しなかった。実際の鑑定資料尿175点について両テストカードを併用したテストとEmit, TLC及びGC/MSによる鑑定結果とを比較したところ, 両テストカード共陽性の資料及び両テストカード共陰性の資料164点は鑑定結果と100%一致し, 残り11点はMA用は陽性, AM用は陰性となったもので, これらを含めた全体の一致率は95%であった。本テストカードはその高い特異性に加え, 判定方法や携行性もよく捜査現場用テストとして有用と考えられた。