免疫測定法の法科学への応用

青木公子, 黒岩幸雄

昭和大学薬学部

Immunoassays in Forensic Sciences

KIMIKO AOKI and YUKIO KUROIWA

*Department of Biochemical Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences,
Showa University, 1-5-8, Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan*

There are various drugs to be analysed in the forensic science. Of all analytical methods, an immunoassay is suitable to detect some drugs in biological materials because of its high sensitivity and simple pretreatment.

This review has been presented on the method for the preparation of immunogen, principles of non-isotopic immunoassays, and immunoassays as the screening method with microtiter plate and/or latex particles. The examples of hapten synthesis were the drug causing dependence and pesticides.

The immunoassay will be a more powerful tool in using monoclonal antibody and developing a simple and rapid analytical system.

Keywords—hapten; immunogen; fluoroimmunoassay; enzyme immunoassay; luminescent immunoassay; nephelometric immunoassay; latex agglutination inhibition reaction test; microtiter plate; latex particles

1. はじめに

裁判化学において対象となる薬毒物の種類は多岐にわたっている。¹⁾ 例えば催眠薬, 鎮静剤であるブロムワレリル尿素, ニトラゼパム, フェノバルビタール, クロルプロマジン, プロメタジンは中毒多発薬物の上位中5位を占めており, これら薬物の複数摂取中毒例も多い。農業では除草剤であるパラコートが群をぬいており, いやがらせや自殺殺人事件が新聞紙上をにぎわしている。依存性薬物の中で特に覚せい剤は取締りの強化にもかかわらず第二次乱用時代であり, 暴力団の大きな資金源として, 一般市民層までまきこんだ乱用者数の増加が大きな社会問題をうみだしている。覚せい剤の年間鑑定数は4万件にも達するといわれ,²⁾ 1986年度1—9月間の覚せい剤押収量は305.8kgと前年同期に比べ12kgの増加がみられている。一方, 乾燥大麻は112.9kgと前年同期の2.4倍も押収されており, 新たな大麻汚染が心配されだしている。このように鑑定すべき薬毒物の種類とその検体数は今後ますます増加することが予想され, 出来るだけ安価で一般的な機器のみを用いて行える

簡便な測定法の確立が望まれている。

種々の測定法の中で免疫測定法は特異性にすぐれ前処理が簡便であることから微量の生体試料の分析に適した方法であり, 裁判化学の分野においては古くから血液型判定や体液(血液, 汗, 精液等)中の蛋白質の同定による個人又は人獣間の識別に用いられてきた。自身が抗原性を示さない薬毒物は免疫動物に対し異種の蛋白質や合成ポリペプチドとの複合体を免疫原とすることにより薬毒物に対する特異抗体が得られることから, 種々の薬毒物免疫測定法が開発されて裁判化学の分野にも応用されている。

免疫測定法はガスクロマトグラフィー—質量分析(GC-MS)法に比べると感度が劣ることが多いが, 多数の検体を一度に処理出来る利点をもっている。また抗体の類似化合物に対する交叉反応性により特定化合物を同定することが出来ないという免疫測定法の最大の欠点は, 一方で類似化合物を1グループとして判断することが可能であることを示しており, 薬毒物のスクリーニング法として用いる場合には利点とすることが出来る。近

TABLE I. Commercial Available Immunoassay Kits in Japan^{g)}

Drug	MARKIT ^{b)}	EMIT ^{c)}	SLFIA ^{d)}	FPIA ^{e)}	ARIS ^{f)}	Nephelo test ^{g)}
Antiepileptic drug						
Phenytoin	○	○	○	○	○	○
Phenobarbital	○	○	○	○	○	○
Primidone	○	○	○	○		
Carbamazepine	○	○	○	○		○
Ethosuximide		○	○	○		
Valproic acid	○	○	○	○		○
Cardioactive drug						
Digoxin	○	○	a)	○		○
Digitoxin	○			○		
Lidocaine		○		○		
Procainamide		○	○	○		
N-Acetylprocainamide		○	○	○		
Quinidine		○	○	○		
Disopyramide		○	○	○		○
Propranolol			a)			
Antimicrobial drug						
Gentamicin	○	○	○	○		
Tobramycin	○	○	○	○		
Amikacin	○	○	○	○		
Kanamycin			○			
Dibekacin		a)	a)	○		
Streptomycin				○		
Netilmicin		○	○			
Sisomicin			○			
Antiasthmatic drug						
Theophylline	○	○	○	○	○	○
Antineoplastic drug						
Methotrexate		○		○		
Analgesic-antipyretic drug						
Acetaminophen				○		
Salicylate				○		
Toxicology						
Benzodiazepine		○				
Barbiturate		○				

a) Not available yet (Dec. 1986). b) Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., heterogeneous enzyme immunoassay. c) Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., enzyme multiplied immunoassay technique. d,f) Miles-Sankyo Co., Ltd. d) substrate-labeled fluorescent immunoassay. f) apoenzyme reactivation immunoassay system. e) Dainabot Co., Ltd., fluorescence polarization immunoassay. g) Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., nephelometric immunoassay.

年急速に開発されてきているモノクローナル抗体の使用により特定化合物の同定も可能となり裁判化学における免疫測定法の適用範囲はますます広がっていくと思われる。

临床上、血中薬物濃度のモニタリングを必要とする薬物に対しては数種の免疫測定法キットが市販されており (Table I),³⁾ 感度の点でキットをそのまま使うことが出来ない場合でも抗体だけを用いることも可能である。また、キット中の酵素標識薬物を免疫原として抗体を得た例⁴⁾もある。乱用薬物の測定キットは外国では市販され

ているにもかかわらず日本では入手することが困難である (Emit-dau, Emit-st; Syva 社,⁵⁾ Abuscreen; Roche 社⁶⁾)。このため必要な薬毒物に対する抗体を得るためには我々にとって難問であるハプテン合成よりはじめなくてはならないことが多く、ここでは免疫原の調製を中心に話を進め、ついで測定系について述べようと思う。

2. 免疫原の調製

(1) ハプテンの合成 自身が抗原性を示さない薬毒物は免疫動物に対して異種の蛋白質 (血清アルブミン, γ-グロブリン, ヘモシアニン等) や合成ポリペプチ

ド（ポリリジン，ポリグルタミン酸等）との複合体を免疫原とすることにより薬毒物に対する抗体を得ることが出来る。

薬毒物がアミノ基，カルボキシル基又はチオール基をもつ場合は直接蛋白質と結合させることが出来るが，もたない場合にはこれらの基を導入することが必要である。この時，得られる抗体は免疫原における蛋白質との結合部位より離れた部位をよく認識することが多いことを考慮して目的に応じた導入部位を選ぶ必要がある。⁷⁾

薬毒物の免疫原に関する総説は種々あるが，^{7,8)} ここでは乱用薬物，抗精神薬と農薬をとりあげることにして免疫原調製に用いられた化合物（ハプテン）を Table II にまとめた。Table II より官能基の一般的な導入法として次の方法をあげることが出来る。

(a) 水酸基をもつ薬物——無水コハク酸と反応させてカルボキシル基を導入する（モルヒネ，テトラヒドロカンナビノール（THC））。

(b) ベンゼン環をもつ薬物——ニトロ化後還元することによりアミノ基を導入するか（モルヒネ，フェノバルビタール），*p*-アミノ安息香酸又は *p*-アミノアセトアニリドをジアゾカップリングさせてカルボキシル基又はアミノ基を導入する（モルヒネ，THC，クロルプロマジン，ジアゼパム）。

(c) 活性水素をもつ薬物——ハロゲン化物（ ClCH_2COOH 等）と反応させてカルボキシル基を導入する（モルヒネ，メタンフェタミン）。

(2) 担体蛋白質との結合 ハプテンがカルボキシル基又はアミノ基を有する場合の担体蛋白質との代表的な結合法とその反応様式を Table III に示した。⁵⁾

ハプテン中のカルボキシル基は酸無水物法，カルボジイミド法又は活性エステル法により蛋白質のアミノ基（主にリジンの ϵ -アミノ基）と結合させることが出来る。ハプテン中のアミノ基はカルボジイミド法では蛋白質のカルボキシル基（アスパラギン酸又はグルタミン酸残基）と，グルタルアルデヒド法によりリジンの ϵ -アミノ基と結合する。特にアミノ基が芳香族第一アミンの場合はジアゾカップリングにより蛋白質のチロシン，トリプトファン又は，ヒスチジン残基と結合させることができる。

ハプテンと蛋白質が両者共チオール基を有する場合は2つのマレイミド基をもつ架橋剤を，それぞれがチオール基とアミノ基を有する場合にはマレイミド基と *N*-サクシミジル基を有する架橋剤を用いることにより温和な条件下で結合させることが出来る。^{51a,57)} チオール基をもたない蛋白質には *S*-アセチルメルカプト無水コハク

酸により容易にチオール基を導入出来ることが^{57b,d)} これら架橋剤の適用範囲を広げていると言える。

フェノバルビタール特異抗体を得るために，我々は *p*-アミノフェノバルビタールと牛血清アルブミン（BSA）をジアゾ化法（A法）とグルタルアルデヒド法（B法）により結合させて2種類の免疫原を調製した。A法による免疫原ではウサギによる抗体産生能の違いが大きくあらわれ，低い抗体価のものしか得られない場合が多かった。一方B法による免疫原では免疫したウサギすべてに使用するのに十分な抗体が産生され，得られた抗体はA法による抗体より，強くフェノバルビタールのパラ位置換体を認識していた。^{56b,58)} これらのことはA法ではハプテンが BSA のチロシン又はヒスチジン残基に直接結合し，一方B法では5個のメチレン基を介してリジンの ϵ -アミノ基と結合していることから，免疫原におけるハプテンの自由度の違いによると推測される。Takatori ら⁵⁹⁾ はアンチピリンの抗体産生において4-アミノアンチピリンをジアゾ化法で BSA と結合させた免疫原と，無水コハク酸を用いて4-アミノアンチピリンにカルボキシル基を導入後，酸無水物法で BSA と結合させた免疫原により産生された抗体を比較し，後者の場合にアンチピリンに対する特異性が高い抗体が得られたことを報告している。これらの例はハプテンと担体蛋白質間の架橋部に4原子程度の炭素鎖があるとハプテンの免疫原性が高まるといわれていることを⁷⁾ 裏づけたものといえる。

更にステロイドのエンザイムイムノアッセイにおいては免疫原の架橋部の長さが酵素標識ステロイドの架橋部の長さより長い時に高感度測定系となることが示されており，⁶⁰⁾ 免疫原の架橋部の長さが抗体産生時のみでなく測定系の感度にも影響することに留意して免疫原を調製することが必要である。

抗体産生に必要な担体蛋白質に導入するハプテンの最適モル数には諸説があるが，⁷⁾ モルヒネでは3—4モル¹²⁾ の，2,4-ジニトロフェノール（DNP）では1モル⁶¹⁾ のハプテン導入モル数の免疫原でもそれぞれの抗体が得られている。ハプテンの化学構造により必要モル数は当然異なってくるが，我々の経験では10モル前後であれば十分であると思われる。

3. 抗体産生の限界

ほとんどすべての化合物はハプテンとなり得て，リン酸基でさえもアゾベンゼン基を介して蛋白質と結合させたものを免疫原とすると弱いながらもリン酸イオンと結合する抗体が産生するといわれている。⁶²⁾ しかしながら免疫測定法に必要とされるに十分な親和力を化合物に対

TABLE II. Structure of Hapten Used to Prepare Immunogen

Drug	Hapten	Reference
Morphine	1 -NH ₂	9)
	1 -N=N- -NH ₂	10)
	1 -N=N- -COOH	11)
	2 -CH ₂ COOH	12)
	2 -glucuronyl	13)
	3 -CO(CH ₂) ₂ COOH	14)
	4 -CO(CH ₂) ₂ COOH	15)
	4 -CH ₂ COOH	16)
	4 -(CH ₂) ₃ COOH	17)
		18)
Fentanyl		19)
		20)
Pentobarbital		21)
Phenobarbital		22)
		23)
	2 -NHCO(CH ₂) ₂ COOH	24)

TABLE II. (Continued)

Drug	Hapten	Reference
Diazepam		
	1 -N=N-	25)
		26)
		26)
		27)
Chlordiazepoxide		
	1 -NH ₂	28)
	1 -OCH ₂ CON ₃	29)
Nitrazepam		
	1 -NH ₂	30)
Cocaine		
		31)

TABLE II. (Continued)

Drug	Hapten	Reference
Δ^1 -THC		
	1 -CO(CH ₂) ₂ COOH	32)
	1 -COCl	33)
	2 -N=N- -COOH	34)
Δ^8 -THC		
	1 -COOH	35)
	1 -CH=CH ₂ COOH	35)
	2 -CH ₂ COOH	35)
	3 -COOH	35)
Methamphetamine		
	1 -CH ₂ COOH	36)
	1 -(CH ₂) ₃ COOH	37)
	1 -(CH ₂) ₄ NH ₂	38)
	2 -NH ₂	39)
LSD		
	1 -COOH	40)
	2 -(CH ₂) ₅ COOH	41)
	3 Mannich reaction	42)
Phencyclidine		
	1 -NH ₂	43)
Chlorpromazine		
	1 -N=N- -COOH	44)
		45)
		46)

TABLE II. (Continued)

Drug	Hapten	Reference
Haloperidol	1 -CO(CH ₂) ₂ COOH	47)
Paraoxon	1 -NH ₂	48)
Dieldrin		
Aldrin		
Paraquat	H ₃ C ⁺ -N ⁺ (CH ₃)-C ₆ H ₄ -C ₆ H ₄ -N ⁺ (CH ₃)-CH ₃	50)

しても抗体を得るためには化合物が一定量以上の分子量と立体構造をもっている必要があると思われる。

薬毒物ではないが直鎖状低分子化合物であるアセチルコリン、スベルミン、アミノ酸を例として免疫測定法に用いることが出来る抗体産生の限界について述べようと思う。

通常生体内に存在する低分子化合物は抗体産生が困難とされているが、⁶⁸⁾ アセチルコリンのラジオイムノアッセイ⁶⁴⁾ とスベルミンのラジオイムノアッセイ、⁶⁵⁾ エンザイムイムノアッセイ^{57d)} が報告されている。しかし Terazawa ら⁶⁶⁾ は Bartos の方法⁶⁵⁾ を追試したにもかかわらず満足すべきスベルミン抗体が得られず抗体産生の困難さを指摘している。一方、分子量 132 とスベルミン(分子量 202) より小さな分子であるアセチルコリンにおいて抗体が得られていることは 4 級アミノ基の存在が大

きいことが推測される。

Terazawa ら⁶⁶⁾ はスベルミンの抗原性を高めるために、*o*-フタルアルデヒドで修飾したスベルミンをハプテンとして用いることを試みた。得られた抗体はハプテンに対する親和性を 100% とした時にスベルミンに対しては 0.001% 以下の低い親和性しか示さないことから、この抗体を用いて *o*-フタルアルデヒド修飾スベルミン測定のためのラジオイムノアッセイ (40—400 pmol) が確立された。*o*-フタルアルデヒドはアミノ酸又はポリアミン等の 1 級アミノ基を有する化合物のプレ又はポスト蛍光ラベル化剤として液体クロマトグラフィーでの分析に繁用されており、*o*-フタルアルデヒド修飾化合物検出法として、この免疫測定法を使用することが出来る。

アミノ酸を BSA とグルタルアルデヒド法により結合させた免疫原により得られた抗体は、⁶⁷⁾ アミノ酸と架橋

TABLE III. Preparation of Hapten-Protein Conjugates

Reaction	Solvent	Reference
1. Mixed anhydride method $\text{RCOOH} \xrightarrow[\text{ClCOOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2]{\text{A}} \text{RCOOCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \xrightarrow[\text{NH}_2\text{-Protein}]{\text{B}} \text{RCONH-Protein}$ (C₄H₉)₃N	A:dioxane A:DMF B:H ₂ O:DMF	52) 53)
2. Carbodiimide method $\text{RCOOH} \xrightarrow[\text{R' N=C=NR''}]{\text{A}} \text{RCOC=NR'} \xrightarrow[\text{NH}_2\text{-Protein}]{\text{A}} \text{RCONH-Protein}$ (carbodiimide)	A:H ₂ O, pH 5.5-6	12,54)
3. N-Succinimidyl ester method $\text{RCOOH} \xrightarrow[\text{HO-N}]{\text{A}} \text{RCOO-N} \xrightarrow[\text{NH}_2\text{-Protein}]{\text{B}} \text{RCONH-Protein}$ carbodiimide	A:95% dioxane B:pyridine : 0.05M phosphate buffer, pH 7.3 (1:1)	55)
4. Glutaraldehyde method $\text{R-NH}_2 \xrightarrow[\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}]{\text{A}} \text{RNH}(\text{CH}_2)_5\text{NH-Protein} \xrightarrow[\text{NaBH}_4]{\text{B}} \text{R-NH-Protein}$	A:0.1M phosphate buffer, pH 7.0 B:0.1M phosphate buffer, pH 8.0	56)
5. Diazo coupling method $\text{R-NH}_2 \xrightarrow[\text{HCl}]{\text{NaNO}_2} \text{R-N}^+\equiv\text{N} \xrightarrow[\text{Protein}]{\text{A}} \text{R-N=N-Protein}$	A:0.1M borate buffer (pH 9.3)	23)

部更に担体蛋白質の一部まで含んだ部分を認識しており、アミノ酸自体に対する親和性は非常に低いことが示されている。⁶⁸⁾ この抗体はグルタルアルデヒドで固定された組織内のアミノ酸に対する親和性が強いことから免疫組織化学の分野で使用されている。

以上のことは直鎖状低分子化合物の抗体産生能は低く化合物自体の免疫測定法を確立することは困難であっても、目的に応じた化学修飾や架橋剤の選択により抗原性を増加させて抗体を得る方法があることを示していると思われる。

4. モノクローナル抗体

動物に抗原物質を免疫すると種々の特異性、親和力、クラス、サブクラスを示す抗体（ポリクローナル抗体）が産生し、抗体のつくられ方は個々の動物により、また免疫後の時期によっても異なってくるため、常に同一の抗体を得ることは困難であった。一方、単一の性質を示す抗体（モノクローナル抗体）は細胞融合法により得られるようになった。免疫した動物の脾臓中の抗体産生細胞とミエローマ細胞をポリエチレングリコールを用いて融合させてハイブリドーマを作る。種々の単一抗体を産生するハイブリドーマから培養上清中の抗体をスクリーニングしてクローニングをくりかえし行うことにより目的とするハイブリドーマを選択する。選択されたハイブリドーマの保存により特異性にすぐれた一定品質のモノクローナル抗体を理論的には無限に得ることが可能となった。⁶⁹⁾

モノクローナル抗体の調製には時間と費用がかかること、一般にモノクローナル抗体はマウスのイムノグロブリンであるため比較的変性しやすいこと、抗原基が限定

されるためモノクローナル抗体の抗原に対する親和力が弱いと高感度測定系とならないことが欠点であるといわれている。⁷⁰⁾

パラオキシソン⁷¹⁾ とクロルプロマジンの主代謝物である 7-ヒドロキシクロルプロマジン⁴⁵⁾ において同一免疫原を用いて得られたポリクローナル抗体とモノクローナル抗体が比較されている。パラオキシソンの場合モノクローナル抗体はパラオキシソンの加水分解生成物である *p*-ニトロフェノールとジエチルホスフェートに対する交叉反応性が低い点ですぐれているものの、³H-パラオキシソンと抗体の結合を50%阻害するパラオキシソン濃度が $7 \times 10^{-5} \text{M}$ とポリクローナル抗体での $2 \times 10^{-6} \text{M}$ より高く、モノクローナル抗体のパラオキシソンに対する親和性が低いことが示されている。7-ヒドロキシクロルプロマジンの場合はモノクローナル抗体のクロルプロマジンに対する交叉反応性は1%におさえられ（ポリクローナル抗体：17%）、更にポリクローナル抗体に匹敵する感度の測定系がモノクローナル抗体を用いて確立されている。

構造類似薬物混在下の特定薬物の測定、また薬理作用を示す重要な代謝物の測定などには特異性のすぐれた抗体が必要とされており、7-ヒドロキシクロルプロマジンの場合にみられるように強い親和力をもつモノクローナル抗体が得られれば、免疫測定法の適用範囲はますます広がっていくものと思われる。

5. 免疫測定法

免疫原性をもたない薬毒物は抗原決定基を1つしかもたない一価抗原であるために、測定には競合法が用いられる。この方法は一定量の抗体に対し一定量の標識化合物と試料中の化合物を競合させた後、抗体に結合した標

TABLE IV. Immunoassays

	Label	Instrument	Drug	Reference
Radioimmunoassay	Radioisotope	Liquid scintillation spectrometer	Morphine, amphetamine ^{a)}	8)
Metalloimmunoassay	Metal atom	Atomic absorption spectrometry	THC, barbiturates	75)
Spin immunoassay	Stable free radical	Electron spin resonance	Morphine	76)
			Methamphetamine	39)
Fluoroimmunoassay	Fluorescent dye	Fluorometer	Morphine, phenytoin ^{a)}	77)
Luminescent immunoassay	Luminescent substance	Photomultiplier	Phenytoin, methotrexate	78)
Enzyme immunoassay	Enzyme, coenzyme	Spectrophotometer	Methamphetamine	79)
			Morphine, barbiturates ^{a)}	80)
Precipitation test	Protein	Laser nephelometer	Phenobarbital, phenytoin	81)
Agglutination test	Latex	Naked eye	Morphine	82)
			Methamphetamine	83)
			Barbiturates	84)

a) Some drugs are shown as example.

識化合物 (bound : B) 又は遊離の標識化合物 (free : F) 量を標識物質に応じた方法で測定することにより、試料中の化合物量を求める方法である。競合法は B/F を分離せずに測定出来るホモジニアス系と分離を必要とするヘテロジニアス系にわけられる。

ヘテロジニアス系では分離法として塩析法、デキストラン・チャコール法、ポリエチレングリコール法、2抗体法、不溶化抗体法、固相法が用いられる。⁷²⁾ 固相にはアガロース、セルロース、磁性粒子、⁷³⁾ ポリスチレンチューブ、マイクロタイタープレート等が使われている。

免疫測定法は用いる標識物質の違いによっても分類される (Table IV)。⁷⁴⁾ ラジオイムノアッセイは比放射能の高い標識薬毒物が入手可能な場合高感度測定法を容易に確立することが出来るが、放射性同位元素を取り扱うために生じる難点が多々あり、非放射性標識物質を用いる測定法が開発されてきた。

ここでは特殊な大型機器を必要とするスピニンノアッセイとメタロイムノアッセイを除いた非放射性免疫測定法について述べる。検出法として吸光度法、蛍光法、発光法が用いられているが、 H_2O_2 の測定感度を目安にした時、蛍光法は吸光度法の約千倍、発光法は蛍光法の約百倍高い感度であるといわれている。⁷⁵⁾

(1) フルオロイムノアッセイ⁷⁷⁾ 標識に用いる蛍光物質は(a)モル吸光係数が大きいこと(b)水に対する溶解度が高いこと(c)血清又は抗血清によるバックグラウンド蛍光 (Ex. 340 nm, Em. 470 nm 付近) の影響を受けにくいことが必要でありフルオレッセンイソシアネート、ウンベリフェロン、ダンシルクロライド等が用いられている。

ヘテロジニアス系——蛍光標識化合物は低分子であるため B/F 分離には前述したすべての分離法を用いることが出来る。分離後蛍光強度を測定する。

ホモジニアス系——(a) Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA 法) : 低分子である蛍光標識化合物が高分子の抗体と結合すると、ブラウン運動が抑えられるため蛍光偏光度が大きくなる。試料中の化合物量の増加に伴い蛍光偏光度は小さくなる。

(b) Substrate-labeled Fluorescent Immunoassay (SLFIA 法) : 無蛍光体である蛍光標識化合物は遊離の状態にある時に酵素の基質となり蛍光体に変化する。試料中の化合物量の増加に伴い蛍光強度は増加する。

(2) 発光イムノアッセイ⁷⁸⁾ ヘテロジニアス系——一定の条件下におくと強く発光するルミノール、イソルミノール、アクリジニウム誘導体等を用いて化

物を標識する。B/F 分離には前述のすべての方法が適用でき、分離後の化学発光強度を測定する。

ホモジニアス系——NAD や ATP を標識した化合物は競合反応後遊離の状態にあるものだけが補酵素活性を示す。NAD の補酵素活性はアルコールデヒドロゲナーゼ、NADH-デヒドロゲナーゼとバクテリアルルシフェラーゼを組合せた酵素サイクリング法で発光分析する。一方 ATP はルシフェリン-ルシフェラーゼにより発光検出する。

(3) エンザイムイムノアッセイ^{5,51a)} ヘテロジニアス系——標識に用いる酵素は活性が高く安定であることが必要とされ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼとペルオキシダーゼが一般によく用いられる。B/F 分離にはラジオイムノアッセイやフルオロイムノアッセイで使われる塩析法とデキストラン・チャコール法は用いることができず、ポリエチレングリコール法の適用⁸⁵⁾ も限られている。固相を用いる ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay) では (a) 固相抗体と酵素標識化合物 (b) 固相抗原と酵素標識第 2 抗体の 2 つの系が考えられる。分離後の標識酵素活性の測定には、吸光度法、蛍光法、更に高感度測定法である発光法などが用いられる。

ホモジニアス系——(a) Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT 法) : グルコース-6-リン酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、リゾチームはこれらの酵素で標識された化合物が抗体に結合した時と遊離の時では異なった酵素活性を示すことを利用した測定法である。

(b) Apoenzyme Reactivation Immunoassay System (ARIS 法)⁸⁶⁾ : 補酵素標識化合物を用いて競合反応させた後、遊離の補酵素標識化合物によるアポ酵素の活性化を測定する。試料中の化合物量の増加に伴いホロ酵素量は増加する。

試験紙法によるテオフィリンの測定では⁸⁷⁾ FAD-標識テオフィリンによりアポブドウ糖酸化酵素はブドウ糖酸化酵素となる。この酵素活性をペルオキシダーゼによるテトラベンジジンの呈色反応で測定している (Fig. 1)。

(4) 沈降法⁸¹⁾ 免疫原の調製に用いた担体蛋白質とは異なる担体に複数個の化合物を結合させて多価抗原とする。多価抗原は抗体と免疫沈降物を形成するため、蛍光の励起光又はレーザー光を照射すると沈降粒子濃度に比例した散乱光がえられる。試料中の化合物量の増加に伴い散乱強度は低下する。

(5) 凝集法 複数個の化合物を担体蛋白質に結合させた多価抗原を赤血球又は人工担体 (ラテックス等)

Fig. 1. Principle of the Apoenzyme Reactivation Immunoassay System (ARIS) for Theophylline^{87a)}

Fig. 2. Principle of the Agglutination Reaction⁸⁸⁾

に吸着させるか、化合物と人工担体を化学結合させて、凝集原とする。凝集原は抗体と反応して凝集塊を生成するが、試料中の化合物の存在によりこの凝集塊生成は阻害される (Fig. 2)。

以上述べた測定法のいくつかは血中薬物濃度モニタリング法として実用化され、各社より販売されている (Table I)。MARKIT 法はヘテロジニアスエンザイムイムノアッセイ、ネフエロテストは沈降法である。

6. スクリーニング法としての免疫測定法

薬毒物のスクリーニング法は少ない検体量で多数の検体を一度に短時間で行えることが必要である。少ない検体量で多数処理出来る96穴のマイクロタイタープレートの使用例、抗原抗体の反応時間を短くするために人工担体であるラテックスを利用した測定系がふえてきている

Fig. 3. Principle of the Biotin-Avidin System⁷²⁾

と思われる。

マイクロタイタープレート、ラテックスとも蛋白吸着能が高く、カルボキシル基等の導入により化学結合も可能な固相である。Takatori ら⁸⁹⁾ はマイクロタイタープレートを用いてアビジン・ビオチン複合法 (ABC 法) により検出するフェノバルビタール測定法を開発した。免疫組織化学における抗原標識法として用いられている ABC 法は、塩基性蛋白であるアビジン1分子はビオチン数分子と強く結合することを利用した方法である (Fig. 3)。フェノバルビタール測定では96穴のポリスチレン製マイクロタイタープレートに人血清アルブミン (HSA) 結合フェノバルビタールを吸着させて固相抗原としている。抗体に対する固相抗原と試料中のフェノバルビタールの競合反応後に、固相抗原に結合した抗体をビオチン化第2抗体と、ついでビオチン結合能を有するアビジン・ビオチン-酵素複合体と反応させてから標識

酵素活性を測定することにより 1–20 ng のフェノバルビタールの定量が可能であった。この方法の利点は固相抗原として必要な化合物と担体蛋白質複合体の調製は ELISA 法で必要な化合物と酵素複合体の調製より容易であること、ABC 法で必要な試薬は市販されていること、ABC 法は抗体産生動物が同じであれば種々の化合物の測定に共通して用いることが出来ることである。またビオチン化第2抗体にかえてビオチン化プロテインAを用いることにより抗体産生動物種を限定するの必要がなくなる。

ラテックス粒子は種々の粒子系のものが均一に得られ、更に化学的に安定であることから凝集反応の担体として広くもちいられているが、MacCrimble ら⁹⁰⁾ は新しい測定系にラテックス粒子を応用している。ウェル底部がメンブレンフィルターである96穴のマイクロタイタープレートのウェルに抗体吸着ラテックス (径: 0.8 μm) と蛍光標識抗体と検体を加えて反応させて、吸引ろ過後にフィルター上に残ったラテックス粒子の蛍光強度測定により検体中の免疫グロブリンを定量している。この方法は特殊なプレートと装置を必要とするが、抗体吸着ラテックスに対し検体中の化合物と蛍光標識化合物を競合させることによりハプテン化合物測定に応用出来ると思われる。

一方、ラテックスを担体とした凝集法は迅速性と簡便性にすぐれていることからメタンフェタミンのスクリーニング法として開発されてきている。Niwauchi らはマイクロタイタープレートを用いて、まずメタンフェタミンと蛋白質の複合体を吸着させた赤血球による赤血球凝集阻止反応試験法を、³⁷⁾ 次いで試薬の安定化をはかるために凝集担体を赤血球からラテックスにかえたラテックス凝集反応試験法^{89a)} を報告している。後者の方法は実質的操作時間が短く簡便であるにもかかわらず凝集像の観察が一夜放置後であることから結果を得るのに時間がかかることが欠点である。

Niwauchi らの開発した凝集阻止反応は抗血清と抗原吸着担体を用いる液相-固相系である。Manita ら⁹¹⁾ は尿中エストロゲン測定において抗原、抗体共に固相とする固相-固相系は液相-固相系よりも反応時間が短く、明白な凝集像が得られるため感度が増加することを報告している。我々は、^{89b)} 抗原と抗体をそれぞれ吸着させたラテックス粒子 (カルボキシン変性ラテックス: 径 0.22 μm) を固相抗原と固相抗体としてガラス板上での凝集反応を肉眼で観察する尿中メタンフェタミンのラテックス凝集阻止反応試験法を開発した。抗体としては抗血清より Sepharose 4 B-メタンフェタミンを用いて精製し

たメタンフェタミン親和性蛋白を、抗原にはメタンフェタミンとウサギ血清アルブミン (RSA) の複合体を使用している。

黒色ガラス板上の検体尿にラテックス-抗体試薬ついでラテックス-抗原試薬を滴下して、混和4–5分後の凝集像の観察により 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のメタンフェタミン含有尿の識別が可能であった。

ラテックス-抗体試薬は分散媒の pH が低く (pH 8.2) 吸着蛋白質である抗体 (IgG) の等電点が高いために⁹²⁾ 保存中に非特異凝集が起こり、一定の分散状態での使用が不可能なため測定時には標準メタンフェタミン含有尿の並置が必要であることと、市販の一般風邪薬に含まれているメチルエフェドリンに対する交叉反応性が高いことが本法の欠点である。市販のラテックス診断薬では非特異凝集を防止して安定な分散性を得るためにさまざまな工夫がなされているようだが、⁹³⁾ 詳細な知見を得ることは出来なかった。

Miyazaki ら⁹⁴⁾ は乱用者尿を本法とガスクロマトグラフィ-化学イオン化マスフラグメントグラフィ (GC-CIMF) 法で測定した結果 GC-CIMF 法で 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のメタンフェタミンが検出された尿26検体中6検体が本法で陰性であったことを報告しているが、当教室にて尿希釈時に生じた濁りを遠心操作で除いてから再測定したところ、陰性であった6検体にもメタンフェタミンが含有されていることを確認した。またメタンフェタミン検出試薬を用いて得られた結果はアルカリホスファターゼを標識酵素としたエンザイムイムノアッセイの結果とも相関しており、^{89b)} メチルエフェドリンとの交叉反応性の低い抗体が得られれば、スクリーニング法としての実用価値が増すものと思われる。

前述のラテックス凝集阻止反応試験法では凝集塊の生成による濁度変化を肉眼で観察しているため定性又は半定量法にすぎないが、濁度変化を光学的に測定することにより定量化が可能である。濁度の光学的測定には (1) 透過光濁度を吸光度測定によりもとめる方法、(2) 積分球濁度を散乱光と透過光の強度比によりもとめる方法と (3) レーザー光照射により平均粒子径に応じた散乱強度を測定する方法がある。臨床検査の部門では透過光濁度を可視光を用いて測定する LA-システム⁹⁵⁾ (栄研化学, AIC 社, α -テック社)、近赤外光により測定する LPIA システム⁹⁵⁾ (三菱化成, ダイアトロン)、積分球濁度を測定する EL-1000⁹⁶⁾ (協和メディックス)、散乱強度を測定する PAMIA-10⁹⁷⁾ (東亜医用電子) が多価抗原の全自動化定量法として導入されている。

メタンフェタミンのラテックス凝集阻止反応を光学的

に測定することにより、高感度で再現性の高い定量法にすることも可能であると思われる。

7. 検 体

免疫測定法の対象となる検体について最後にふれておきたい。一般には検体として体液（血液，尿，汗），臓器，消化管内容物が用いられ，特に重金属中毒の際には毛髪と爪が使われている。しかし，毛髪からはフェノバルビタール，⁹⁸⁾ 麻薬（モルヒネ，⁹⁹⁾ ヘロイン，⁹⁹⁾ コデイン，^{99a)} コカイン^{99b)}），フェンサイクリジン，¹⁰⁰⁾ クロロキン，¹⁰¹⁾ ニコチン，^{102a)} アミトリプチン，^{102a)} イミプラミン^{102a)} が，またメタンフェタミンは毛髪^{79,102)} と爪¹⁰³⁾ より検出されていることから，毛髪と爪は重金属だけでなく有機化合物である薬毒物をも分布する組織であることが示されている。またこれら毛髪内の薬物測定には多くの場合，免疫測定法（ラジオイムノアッセイ，^{98a,99-101)} エンザイムイムノアッセイ⁷⁹⁾）が用いられている。

毛髪と爪は成長することが特徴であるが，身体部位により成長速度は異なっている。人の場合，平均成長速度はあごひげ-0.38 mm/日，腋毛-0.3 mm/日，頭毛-0.35 mm/日であり，¹⁰⁴⁾ 爪の場合は手の爪が3-5 mm/月，足の爪は1.1 mm/月であり指の中でも中指がいちばん速く親指と子指が最も遅いといわれている。^{103,105)} このように成長する毛髪と爪は長期間薬物を蓄積し，更に摂取量に応じた濃度と摂取時期に対応した濃度分布がみられるならば，毛根部から先端までの毛髪と各部の爪を用いることにより薬物の摂取量と時期の推測が可能となり，乱用薬物の検体としての有用性は増加すると思われる。

毛髪が薬毒物を長期にわたり蓄積している検体であることは，メタンフェタミン投与ラット^{102b)} とコデイン服用者^{99a)} において尿中で薬物が検出されなくなった時点でも毛髪から検出されたこと，モルヒネ投与マウスでは投与2ヵ月後においても2 µg/gの毛髪濃度を示したことが^{99c)} から明らかにされた。

薬物摂取量と毛髪薬物濃度の間の相関性に関しては一致した結果が得られていない。フェノバルビタール投与ラット，^{98a)} モルヒネ使用癌患者，^{99a)} コデイン投与モルモット^{99a)} では相関性はなかったが，ヘロイン乱用者では相関性がみられ長期乱用者程，高濃度であった。^{99c)} またヘロイン乱用者の毛髪では乱用期間による濃度分布も観察されており，短期乱用者は毛根側で，休薬期間の長い人程先端部でヘロインが検出された。一方メタンフェタミン乱用者においては人により毛髪内の濃度分布が異なることが示されたが乱用歴との関係は明らかにすることは出来ていない。^{102c)} またコデイン塩酸塩水溶液に毛根部をつけると1時間後には先端部でコデインが検出されたことから，毛髪内の薬毒物の輸送は成長速度に応じたものだけではないことが示唆されており，^{99a)} 摂取量と時期を正確に知ることはいまのところ困難なことだと思われる。しかし毛髪と爪からは他の検体からは得られない知見が得られることは確かであり，検体としての使用度を増すために毛髪と爪からの簡便な薬物抽出法と短時間で処理出来る高感度定量法の開発が望まれている。

8. 終 り に

幅広い交叉反応性を示すポリクローナル抗体，又はすぐれた特異性を示すモノクローナル抗体を用いる免疫測定法が裁判化学の領域で果たす役割は今後ますます増加してくると思われる。ここでは免疫測定法を確立するにあたって一番の難関である抗原調製法を中心に，種々の免疫測定法の原理とともに多数の検体処理が可能であるマイクロタイタープレートと簡便迅速化のためにラテックスを使用したスクリーニング法について述べた。

今後更に血中薬物濃度モニタリング法であるARIS法でみられる試験紙での薬物定量のように簡便化がはかれるとともに，測定装置の開発による高感度化が進んでいくと思われる。

引 用 文 献

- 1) 丹羽口徹吉，衛生化学，**28**，184 (1982)；科学警察研究所編，“薬物による中毒事故等の発生状況，第27報，”1985。
- 2) 三井利幸，ぶんせき，**4**，271 (1985)。
- 3) 上能伊公雄，加藤昌幸，ファルマシア，**21**，126 (1985)。
- 4) R.S. Kamel, J. Landon, D.S. Smith, *Clinica Chimica Acta*, **84**, 403 (1978)。
- 5) 石川栄治，河合 忠，宮井 潔編，“酵素免疫測定法，”医学書院，東京，1978。
- 6) J.S. Oliver (ed.), “*Forensic Toxicology*,” Univ. Park. Press., 1979, p. 34。
- 7) 入江 実編“続ラジオイムノアッセイ，”講談社サイエンティフィク，東京，1980, p. 77。
- 8) 城戸靖雄，衛生化学，**21**，239 (1975)；高橋正克，小井田雅夫，金戸 洋，日薬理誌，**71**，123 (1975)；中館映夫，村木 篁，徳永友喜子，斎藤章二，脳研究会会誌，**3**，1 (1977)；V.P. Butler, Jr., *Pharmacol.*

- Rev.*, **29**, 103 (1978); J.J. Langone, H.V. Vunakis, *Methods Enzymol.* **84**, 409 (1982).
- 9) M. Aoki, T. Kusama, N. Kuboyama, Y. Murakoshi, *Pharmaceutical Bulletin of Nihon University*, **14**, 8 (1974).
- 10) S. Spector, B. Berkowitz, E.J. Flynn, B. Peskar, *Pharmacol. Rev.*, **25**, 281 (1973).
- 11) S.J. Gross, J.D. Grant, S.R. Wong, R. Schuster, P. Lomax, D.H. Campbell, *Immunochemistry*, **11**, 453 (1974).
- 12) S. Spector, C.W. Parker, *Science*, **168**, 1347 (1970).
- 13) M. Koida, M. Takahashi, H. Kaneto, *Jpn. J. Pharmacol.*, **24**, 707 (1974).
- 14) B.H. Wainer, F.W. Fitch, R.M. Rothberg, J. Fried, *Science*, **178**, 647 (1972).
- 15) B.A. Moris, J.D. Robinson, E. Piall, G.W. Aherne, V. Marks, *J. Endocrinol.*, **64**, 6 P (1974).
- 16) A.R. Gintzler, E. Mohacsi, S. Spector, *Eur. J. Pharmacol.*, **38**, 149 (1976); B.L. Herndon, K. Pauli, D.H. Baeder, D.A. Ringle, *Pharmacol. Res. Commun.*, **8**, 325 (1976).
- 17) J.W.A. Findlay, R.F. Butz, E.C. Jones, *Clin. Chem.* (Winston-Salem, N.C.), **27**, 1524 (1981).
- 18) M. Koida, M. Takahashi, S. Muraoka, H. Kaneto, *Jpn. J. Pharmacol.*, **24**, 165 (1974).
- 19) G.L. Henderson, J. Frincke, C.Y. Leung, M. Torten, E. Benjamini, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **192**, 489 (1975).
- 20) S. Spector, E.J. Flynn, *Science*, **174**, 1036 (1971).
- 21) A. Chung, S.Y. Kim, L.T. Cheng, A. Castro, *Experientia*, **29**, 820 (1973).
- 22) S. Kurooka, K. Sunahara, Japan Kokai 78 65,886 (Cl, C 07 D 239/64), June 12 1978.
- 23) H. Satoh, Y. Kuroiwa, A. Hamada, *J. Biochem.* (Tokyo), **73**, 1115 (1973).
- 24) A. Yamada, T. Takatori, *J. Immunol. Methods*, **28**, 51 (1979).
- 25) R. Dixon, T. Crews, *J. Anal. Toxicol.*, **2**, 210 (1978).
- 26) B. Peskar, S. Spector, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **186**, 167 (1973).
- 27) S. Tomii, T. Takatori, *Jpn. J. Clin. Chem.*, **13**, 281 (1984).
- 28) R. Dixon, R. Lucek, J. Earley, C. Perry, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 261 (1979).
- 29) R. Dixon, J. Earley, E. Postma, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 937 (1975).
- 30) 大木 博, 岸 徹, 角田紀子, 及川智正, 法中毒ニュース, **4**, 64 (1986).
- 31) B. Kaul, S.J. Millian, B. Davidow, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **199**, 171 (1976).
- 32) J.D. Teale, E.J. Forman, L. J. King, E.M. Piall, V. Marks, *J. Pharm. Pharmacol.*, **27**, 465 (1975).
- 33) J.D. Teale, E.J. Forman, L.J. King, V. Marks, *Nature* (London), **249**, 154 (1974).
- 34) J.D. Grant, S.J. Gross, R. Bennett, R. Wong, P. Lomax, *Nature* (London) *New Biol.*, **236**, 216 (1972).
- 35) M. Cais, S. Dani, Y. Josephy, A. Modiano, H. Gershon, R. Mechoulam, *FEBS Lett.*, **55**, 257 (1975).
- 36) S. Inayama, Y. Tokunaga, E. Hosoya, T. Nakadate, T. Niwaguchi, K. Aoki, S. Saito, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 838 (1977).
- 37) T. Niwaguchi, T. Inoue, T. Kishi, Y. Kanda, T. Niwase, T. Nakadate, S. Inayama, *J. Forensic Sci.*, **24**, 319 (1979).
- 38) L.T. Cheng, S.Y. Kim, A. Chung, A. Castro, *FEBS Lett.*, **36**, 339 (1973).
- 39) 清水達造, 宮沢 正, 勝木昭次, 中井芳治, 科学警察研究所報告, 法科学編, **34**, 31 (1981).
- 40) H.V. Vunakis, J.T. Farrow, H.B. Gjika, L. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **68**, 1483 (1971).
- 41) W.A. Ratcliffe, S.M. Fletcher, A.C. Moffat, J.G. Ratcliffe, W.A. Harland, T.E. Levitt, *Clin. Chem.* (Winston-Salem, N.C.), **23**, 169 (1977).
- 42) A. Taunton-Rigby, S.E. Sher, P.R. Kelley, *Science*, **181**, 165 (1973).
- 43) A. Karlir, E. Katz, L. Raveh, E. Rivkah, M. Torten, *Theriogenology*, **6**, 193 (1976).
- 44) K. Kawashima, R. Dixon, S. Spector, *Eur. J. Pharmacol.*, **32**, 195 (1975).
- 45) P.K.F. Yeung, G. McKay, I.A. Ramshaw, J.W. Hubbard, K.K. Midha, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **233**, 816 (1985).
- 46) F.J. Rowell, S.M. Hui, J.W. Paxton, *J. Immunol. Methods*, **31**, 159 (1979).
- 47) T. Takatori, M. Kanamori, H. Fukuda, K. Terazawa, *Jpn. J. Legal. Med.*, **40**, 361 (1986).
- 48) K.W. Hunter, Jr., D.E. Lenz, *Life Sci.*, **30**, 355 (1982).
- 49) J.J. Langone, H.V. Vunakis, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **10**, 163 (1975).
- 50) D. Fatori, W.M. Hunter, *Clin. Chim. Acta*, **100**, 81 (1980).

- 51) a) 石川栄治, 河合 忠, 宮井潔編, “酵素免疫測定法,” 第2版, 医学書院, 東京, 1982; b) B.F. Erlanger, *Pharmacol. Rev.*, **25**, 271 (1973).
- 52) B.F. Erlanger, F. Borex, S.M. Beiser, S. Lieberman, *J. Biol. Chem.*, **228**, 713 (1957).
- 53) P. Samarajeewa, A.E. Kellie, *Biochem. J.*, **151**, 369 (1975).
- 54) T.L. Goodfriend, L. Levine, G.D. Fasman, *Science*, **144**, 1344 (1964).
- 55) H. Hosoda, S. Miyairi, N. Kobayashi, T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2127 (1982).
- 56) a) M. Numazawa, T. Ohkubo, T. Nambara, *FEBS Lett.*, **79**, 215 (1977); b) K. Aoki, N. Terasawa, Y. Kuroiwa, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3291 (1980).
- 57) a) T. Kitagawa, T. Aikawa, *J. Biochem. (Tokyo)*, **79**, 233 (1976); b) K. Fujiwara, M. Yasuno, T. Kitagawa, *J. Immunol. Methods*, **45**, 195 (1981); c) E. Ishikawa, M. Imagawa, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, T. Ueno, *J. Immunoassay*, **4**, 209 (1983); d) K. Fujiwara, H. Asada, T. Kitagawa, K. Yamamoto, T. Ito, R. Tsuchiya, M. Sohda, N. Nakamura, K. Hara, Y. Tomonaga, M. Ichimaru, S. Takahashi, *J. Immunol. Methods*, **61**, 217 (1983).
- 58) H. Satoh, Y. Kuroiwa, *J. Biochem. (Tokyo)*, **76**, 1293 (1974).
- 59) T. Takatori, *Methods Enzymol.* **84**, 596 (1982); T. Takatori, A. Yamaoka, *Forensic Sci. Int.*, **12**, 151 (1978).
- 60) H. Hosoda, N. Kobayashi, N. Ishii, T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 2105 (1986).
- 61) H.N. Eiser, E.S. Semms, J.R. Little, Jr., L.A. Steiner, *Fed. Proc.*, **23**, 559 (1964).
- 62) 鎮目和夫, 熊原雄一編, “新版ラジオイムノアッセイ,” 朝倉出版, 東京, 1977.
- 63) 高取健彦, 法中毒ニュース, **4**, 42 (1986).
- 64) S. Spector, A. Felix, G. Semenuk, J.P.M. Finberg, *J. Neurochem.*, **30**, 685 (1978); K. Kawashima, H. Ishikawa, M. Mochizuki, *J. Pharmacol. Methods*, **3**, 115 (1980).
- 65) D. Bartos, R.A. Campbell, F. Bartos, D.P. Grettie, *Cancer Res.*, **35**, 2056 (1975).
- 66) K. Terazawa, T. Takatori, *Jpn. J. Clin. Chem.*, **14**, 127 (1985).
- 67) J. S-Mathisen, A.K. Leknes, A.T. Bore, J.L. Vaaland, P. Edminson, F-M.S. Haug, O.P. Ottersen, *Nature (London)*, **301**, 517 (1983).
- 68) P. Seguela, M. Geffard, R.M. Buijs, M.L. Moal, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **81**, 3888 (1984).
- 69) 岩崎辰夫, 安藤民衛, 市川かおる, 保井孝太郎, “単クローン抗体——ハイブリドーマとELISA,” 講談社サイエンティフィック, 東京, 1984.
- 70) 清水不二雄, 臨床化学, **14**, 59 (1985).
- 71) A.A. Brimfield, D.E. Lenz, C. Graham, K.W. Hunter, Jr., *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 1237 (1985).
- 72) 西岡久壽彌, 嶋田孝吉, 真崎知生, “役に立つ免疫実験法,” 講談社サイエンティフィック, 東京, 1985.
- 73) L.S. Hersch, S. Yaverbaum, *Clin. Chim. Acta*, **63**, 69 (1975); J.L. Guesdon, S. Avrameas, *Immunochemistry*, **14**, 443 (1977); L. Nye, G.C. Forrest, H. Greenwood, J.S. Gardner, R. Jay, J.R. Robberts, J. Landon, *Clin. Chim. Acta*, **69**, 387 (1976); M. Pourfarzaneh, G.W. White, J. Landon, D.S. Smith, *Clin. Chem. (Winston-Salem, N.C.)*, **26**, 730 (1980).
- 74) 南原利夫, ファルマシア, **17**, 44 (1981); 宮井 潔, ぶんせき, **2**, 79 (1985).
- 75) M. Cais, S. Dani, Y. Eden, O. Gandolfi, M. Horn, E.E. Isaacs, Y. Josephy, Y. Saar, E. Slovin, L. Snarsky, *Nature (London)*, **270**, 534 (1977).
- 76) R. Leute, E.F. Ullman, A. Goldstein, *J. Amer. Med. Assoc.*, **221**, 1231 (1972).
- 77) 渡邊富久子, 宮井 潔, 検査と技術, **9**, 583 (1981).
- 78) 前田昌子, 薬物動態, **1**, 191 (1986).
- 79) K. Aoki, Y. Kuroiwa, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **6**, 33 (1983).
- 80) G.B. Wisdom, *Clin. Chem. (Winston-Salem, N.C.)*, **22**, 1243 (1976).
- 81) T. Nishikawa, H. Kubo, M. Saito, *J. Immunol. Methods*, **29**, 85 (1979); *idem*, *Clin. Chim. Acta*, **91**, 59 (1979).
- 82) R. Ross, C.A. Horwitz, H. Hager, M. Usategui, M.D. Burke, P.C.J. Ward, *Clin. Chem. (Winston-Salem, N.C.)*, **21**, 139 (1975); M. Chiarotti, N. DeGiovanni, A. Carnevale, C. Offidani, *ibid.*, **31**, 1087 (1985).
- 83) a) Y. Itoh, C. Miyauchi, Y. Kanda, T. Niwaguchi, *Jbn. J. Legal Med.*, **37**, 79 (1983); b) K. Aoki, Y. Kuroiwa, *Forensic Sci. Int.*, **27**, 49 (1985).
- 84) A.F. Clifton, J.E.H. Fairfield, S.T. Clifton, M. Weigele, N. Caldwell, U.S. Patent 690123 (1976), (CO7D 239/62).
- 85) T.M. Osterman, K.O. Juntunen, G.D. Gothoni, *Clin. Chem. (Winston-Salem, N.C.)*, **25**, 716

- (1979); *idem*, *Steroids*, **34**, 575 (1979); K. Aoki, M. Aoki, Y. Hirai, Y. Kuroiwa, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1184 (1986).
- 86) H.R. Schroeder, C.L. Dean, P.K. Johnson, D.L. Morris, R.L. Hurtle, *Clin. Chem.* (Winston-Salem, N.C.), **31**, 1432 (1985).
- 87) a) 山本千鶴子, 前田昌子, 辻 章夫, 須永 進, 福岡圭介, 奥山和男, *機器・試薬*, **8**, 744 (1985); b) 末廣雅也, *日本臨床検査自動化学会誌*, **11**, 235 (1986).
- 88) 黒岩幸雄, *臨床検査*, **29**, 333 (1985).
- 89) T. Takatori, Y. Tsutsubuchi, M. Kanamori, *Jpn. J. Clin. Chem.*, **14**, 180 (1985).
- 90) C. MacCrindle, K. Schwenzer, M.E. Jolley, *Clin. Chem.* (Winston-Salem, N.C.), **31**, 1487 (1985).
- 91) H. Manita, M. Gondo, H. Yamashita, K. Sakakibara, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1335 (1981).
- 92) 鈴木達男, *高分子*, **29**, 112 (1980).
- 93) 坪田宣之, *医用電子と生体工学*, **22**, 267 (1984).
- 94) 宮崎哲次, 屋敷幹雄, 近末文彦, 小嶋 亨, 津久江一郎, *法中毒ニュース*, **4**, 48 (1986).
- 95) 沢井政信, 右田俊介, *検査と技術*, **10**, 555 (1982); 筒井聡明, *日本臨床検査自動化学会誌*, **11**, 210 (1986).
- 96) 塚田 章, 豊口 迪, 矢野信昭, 小西章平, *日本臨床検査自動化学会誌*, **11**, 216 (1986).
- 97) 竹中清悟, 大場康寛, *日本臨床検査自動化学会誌 (講演要旨)*, **11**, 84 (1986).
- 98) a) F.P. Smith, D.A. Pomposini, *J. Forensic Sci.*, **26**, 582 (1981); b) R.W. Goldblum, L. R. Goldbaum, W.N. Piper, *J. Invest. Dermatol.*, **22**, 121, (1954).
- 99) a) K. Puschel, P. Thomasch, W. Arnold, *Forensic Sci. Int.*, **21**, 181 (1983); b) D. Valente, M. Cassini, M. Pigliapochi, G. Vansetti, *Clin. Chem.* (Winston-Salem, N.C.), **27**, 952 (1981); c) A.M. Baumgartner, P.F. Jones, W.A. Baumgartner, C.T. Black, *J. Nucl. Med.*, **20**, 748 (1979).
- 100) A.M. Baumgartner, P.F. Jones, C.T. Black, *J. Forensic Sci.*, **26**, 576 (1981).
- 101) A. Viala, E. Deturmeny, C. Aubert, M. Estadieu, A. Durand, J.P. Cano, J. Delmont, *J. Forensic Sci.*, **28**, 922 (1983).
- 102) a) I. Ishiyama, T. Nagai, S. Toshida, *J. Forensic Sci.*, **28**, 380 (1983); b) T. Niwaguchi, S. Suzuki, T. Inoue, *Arch. Toxicol.*, **52**, 157 (1983); c) 鈴木真一, 井上堯子, 安田年博, 丹羽口徹吉, 堀 均, 稲山誠一, *衛生化学*, **30**, 23 (1984).
- 103) O. Suzuki, H. Hattori, M. Asano, *Forensic Sci. Int.*, **24**, 9 (1984).
- 104) 小堀辰治, 堀 喜昭, 戸田 浄, “実地皮膚科学,” 文光堂, 東京, 1985.
- 105) C.A. Pounds, E.F. Pearson, T.D. Turner, *J. Forens. Sci. Soc.*, **19**, 165 (1979).