Radioimmunoassay による 2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamine の定量

城戸靖雅, 永松国助, 石関忠一

国立衛生試験所¹⁾

Studies on Radioimmunoassay of 2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamine

YASUMASA KIDO, KUNISUKE NAGAMATSU and CHUICHI ISHIZEKI

National Institute of Hygienic Sciences¹⁾

(Received March 5, 1974)

A method of radioimmunoassay of 2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine (DOM), a hallucinogen, was studied. In order to use for immunization, DOM-glutaraldehyde-human serum albumin conjugate was prepared from DOM, glutaraldehyde, and human serum albumin, followed by purification by dialysis. Anti-DOM antiserum was obtained by repeated injection of the prepared antigen to guinea pig. The method of radioimmunoassay established after some experiments was as follows: To an aliquot of the test serum or sample solution, a definite amount of DOM labeled with ³H and anti-DOM antiserum were added, then the globulin fraction was isolated by salting out as a precipitate, which contains the bound DOM come from the test serum or sample solution, and labeled DOM. Radioactivity of the precipitate was measured, and the amount of DOM in the test serum or sample solution was determined from a calibration curve, which was prepared with various known amounts of standard DOM.

The sensitivity of this radioimmunoassay was 1—100 ng/ml, and the specificity to DOM was so sufficient that several pharmaceuticals such as ephedrine, dopamine and epinephrine showed no disturbance to this method.

2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamine (以下 DOM と略す) はヒトに対して数 mg で幻覚誘発作用を有し、その作用は約 8 時間持続することから、LSD、メスカリンにかわって、近年幻覚剤として乱用される傾向にある。

従来 DOM は分光光度法など²⁾ の手法により定量されてきた。しかし服用量がきわめて少ないため、生体液中の本物質の濃度がうすく直接定量することは困難であった。

一方 Vunakis ら³⁾ は、Reichlin 法⁴⁾ に従って合成した DOM-glutaraldehyde-rabbit serum albumin conjugate で家兎を免疫すると DOM に対する抗体を産生することを報告した。

著者らは裁判化学の見地から、血清中の微量の DOM を直接定量する目的で、radioimmunoassay による微量定量法を検討し、抗体産生条件および血清中 DOM の定量条件を確立することができた。

本法は被検血清に一定量の放射能標識 DOM および抗 DOM 抗体溶液の一定量を加えたのち塩析法によりグロブリン分画を沈殿、分離する。これを 1 回再沈殿したのち、bound DOM (抗原—抗体 complex) の放射能を測定するきわめて簡単な手法から成っており、しかも 1—100 ng/ml の間で検量線が直線を示すことを認めた。

免疫反応を基礎としたことから、本定量法の DOM に対する特異性はもちろんのこと、検出感度の点からも十分所期の目的を達したものとといえる。

本報では、radioimmunoassay に必要な DOM-glutaraldehyde human serum albumin (HSA) に対する抗体の生成、DOM と DOM-glutaraldehyde-HSA 抗体との反応、および DOM-glutaraldehyde-HSA 抗体と DOM 類似化合物との反応について検討した結果を報告する。

1) Location: 1-18, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo.

2) 丹羽口徹吉, 衛生化学, 18, 347 (1972).

3) H. van Vunakis, H. Bradvica, P. Benda, L. Levine, *Biochem. Pharmacol.*, 18, 393 (1969).

4) M. Reichlin, J. J. Schnure, V. K. Vance, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 128, 347 (1968).

実験方法

1. 抗 DOM 抗体の生成 DOM-glutaraldehyde-HSA conjugate 溶液（製法は実験の部に示す）の一定量に等容量の complete Freund's adjuvant を加えて油中水型の乳剤を調製し、免疫用試料液とした。

抗原投与量と血清抗体価の相関性の検討には、種々量の免疫用試料液を体重約 300 g の雄モルモットの尾部一背部に 1 週間間隔で皮下注射した。注射の各前日に心臓穿刺により血液 5 ml を採取して血清を分離し、経時的抗体価測定に供した。

抗体価の測定は、一定量の DOM を用い、2 の radioimmunoassay 法によって行なった。

2. Radioimmunoassay の方法 Incubation 時の pH, incubation time, 抗原-抗体 complex から free DOM の洗浄除去条件を検討し、得られた方法を次に示す。この方法により全部の実験を行なった。

0.15M NaCl を含む 0.01M Tris-HCl buffer (pH 7.4) で 8 倍に希釈した抗血清 0.1 ml に一定量の ^3H -DOM の溶液および既知量の非放射性 DOM の溶液を加えて全量を 0.4 ml とし、2—4° で 1 夜 incubate した。

Incubation 終了後に同容量の中性飽和硫酸アンモニウム溶液を加え、直ちに 4° で 5000 rpm 15 分間遠心沈殿してグロブリン分画を分離した。⁵⁾ 沈殿を上記 buffer 0.4 ml に溶かし、同容量の中性飽和硫酸アンモニウム溶液を加えて再沈殿により精製した。

沈殿の放射能を測定し、free/bound DOM の放射能比から検量線に基づいて DOM の量を求めた。この操作を Chart 1 に示す。

検量線の作成は希釈抗血清 0.1 ml に種々量の非放射性 DOM および一定量の ^3H -DOM の溶液を加えて全量を 0.4 ml とし、以下前記と同様に操作して、非放射性 DOM の各量における free/bound DOM の放射能比を求めて検量線を作成した。

3. 特異性の検討 被検血清中に存在するカテコールアミン、および医薬品として ephedrine, methylephedrine などが、抗血清との間で交叉反応を示すならば DOM の定量に影響を与えるので、抗血清の特異性について検討した。

Chart 1. Method for Radioimmunoassay of DOM

Fig. 1. Paper Electrophoresis of ^3H -DOM-HSA in Veronal Buffer (pH 8.6)

結果

1. ^3H -DOM-glutaraldehyde-HSA Conjugate について

DOM-glutaraldehyde-HSA conjugate の合成（実験の部に示す）と同じ条件で ^3H -DOM を用いて ^3H -DOM-glutaraldehyde-HSA を合成し、反応液を 0.15M NaCl に対して透析し、内液の放射能から DOM と HSA の平均結合比を求めた結果、HSA 1 mmole あたり DOM 12.6 mmole が結合していることが明らかとなった。しかし ^3H -DOM-glutaraldehyde-HSA のろ紙電気泳動を行ない、ペーパークロマトグラムスキャナーで放射能を測定したところ、HSA の泳動位置から原点にかけて幅広い放射性ゾーンが認められた。

5) S. Spector, C.W. Parker, *Science*, **168**, 1347 (1970).

2. DOM-glutaraldehyde-HSA Conjugate による抗体産生

免疫用試料液を雄モルモットに、DOM-glutaraldehyde-HSA conjugate として 0.02 mg/animal, 0.2 mg/animal, 1.0 mg/animal に相当する量をそれぞれ 5 回投与したのち抗血清を分離し、抗体価を測定した。その結果を Table I に示す。

Table I にみられるように 0.02 mg/animal の投与では、DOM に対する抗体はほとんど産生されていない。0.2 mg/animal, 1.0 mg/animal では抗体は産生されるが、動物の個体差もかなり大きかった。以上の結果により免疫用投与用量としては、0.5 mg/animal で十分であるとした。したがって DOM-glutaraldehyde-HSA conjugate 0.5 mg/animal を 1 週間間隔で反復投与し、投与回数と抗体価の上昇との関係を検討した。その結果 Table II に示すように、DOM-glutaraldehyde-HSA conjugate の投与回数とともに DOM に対する抗体価は上昇した。5 回投与で DOM の radioimmunoassay に適当な抗体価をもつ抗血清が得られたので、この抗血清を以下の実験に用いた。

TABLE I. Effect of the Dose of Antigen on the Binding Activity of Antisera prepared from Guinea-pigs after 5 Times Injection

Dose of DOM-HSA	Bound ^3H -DOM% to total added ^3H -DOM Dilution rate of antisera					
	2	4	8	16	32	64
0.02 mg	6.1	3.5	1.9	1.1	—	—
	4.9	2.9	1.7	—	—	—
0.2 mg	32.4	12.6	9.4	5.8	3.5	1.5
	17.4	7.2	5.3	2.8	1.3	—
1.0 mg	34.3	16.4	7.8	3.1	2.0	0.7
	9.9	4.1	2.5	1.4	0.8	—

TABLE II. Effect of the Frequency of Antigen Injections on the Titer of Antisera

Injection times	Bound ^3H -DOM %		Injection times	Bound ^3H -DOM %	
2	24.2	17.1	4	28.0	30.7
3	—	25.6	5	46.9	34.5

2. Radioimmunoassay の諸条件の検討

Incubation に際して抗血清と一定量の ^3H -DOM 溶液の混合液に Tris-HCl buffer を加えて抗原抗体反応に対する pH の影響を検討した結果、Fig. 2 に示すように pH 7.4 が最適であることがみとめられた。Phosphate buffer を用いて同様の検討を行なったところ Fig. 2 と同様の結果が得られたが chemically luminescence が生じ、そのため放射能測定時に誤差が大きく再現性が悪くて不適であった。それで Tris-HCl buffer を用い pH 7.4 で行なうのが至適であった。

グロブリン分画と共沈する free の DOM は、硫酸アンモニウム溶液による沈殿の放射能測定結果から、再沈殿を 1 回行なうことによりほとんど除去されることがわかった。

Incubation の時間については抗血清、一定量の ^3H -DOM および Tris-HCl buffer を用いて前記と同じ実験を行ない、経時的に観察して Fig. 3 に示すような結果を得た。Fig. 3 にみられるように、6 時間で free と bound DOM は平衡に達し 15 時間後でも一定であった。

3. Radioimmunoassay の感度

定量条件は実験方法 2 の項に示したように行ない、既知量の標準 DOM の溶液を用いて検量線を求め、この条件下の感度について実験を行なった。

Fig. 2. Effect of pH on the Precipitation of ^3H -DOM

—○—: antiserum
—●—: normal serum of guinea pig

Fig. 4. Standard Curve

4. 特異性

放射性 DOM と抗体との結合に対する阻害を tyramine, Dopa, dopamine, epinephrine, norepinephrine, ephedrine, methylephedrine について測定した。その結果を Fig. 5 に示す。Fig. 5 には、一定量の放射性 DOM および抗血清により得られた沈殿の放射能測定値と、これに各量の各医薬品類を加えた場合に得られた沈殿の放射能測定値とを比較して、測定値の差を前者に対する百分率にして示してある。Fig. 5 中の最も左の線は、各医薬品類のかわりに非放射性 DOM を段階的に加えて得られた沈殿の放射能測定値を同様に百分率として比較のために示した。

生体成分の tyramine, Dopa, dopamine, epinephrine, norepinephrine では阻害はほとんど認められない。methylephedrine では一定量の放射性 DOM の 10^4 倍量で 10%, 10^5 倍量で 32% 阻害する。

考 察

1. DOM-glutaraldehyde-HSA Conjugate について

DOM-glutaraldehyde-HSA は HSA 中のリジンの ϵ -アミノ基で glutaraldehyde を介して DOM と結合して

Fig. 3. Effect of the Incubation Time on the Recovery of ^3H -DOM

—○—: antiserum
—●—: normal serum of guinea pig

Fig. 5. Inhibition of Antisera- ^3H -DOM Binding by Phenylethylamines and Phenylisopropylamines

—○—: DOM, ...△...: methylephedrine, —▲—: ephedrine, —×—: tyramine, —■—: Dopa, —□—: dopamine, —○—: epinephrine, —●—: norepinephrine

その結果得られた DOM の検量線を Fig. 4 に示す。Fig. 4 にみられるように、DOM の 0.1—10 ng の間で直線性が得られた。

なお既知量の標準 DOM を含む家兎正常血清を用いて同様に検量線を求めた結果でも標準 DOM の溶液と同様に 0.1—10 ng の間で直線性が得られた。

いるものと考えられるが、Fig. 1 の泳動像から、DOM と HSA の種々の結合比の分子が生成していることが予想される。すなわち DOM の結合比が小さい分子ほど泳動距離が大であることは当然予想され、したがって合成した抗原は HSA と分子量が類似した（結合比が小さい）1つの conjugate グループのほか、きわめて結合比の大きい2つの conjugate グループから成っていることを示している。しかし前述の結合比は相異しても、これらの抗原を用いて免疫して得られる DOM に対する抗体は、量的な差異はあっても質的な差異はないものと考えられる。また、反応液中には、DOM-glutaraldehyde-HSA conjugate のほか、HSA-glutaraldehyde-HSA や DOM-glutaraldehyde-DOM などの生成物の存在も予想された。低分子の DOM-glutaraldehyde-DOM は透析により除去され、HSA-glutaraldehyde-HSA は DOM に対する抗体産生には関係しないものと考えられたので、今回はこの混合抗原をそのまま投与試料とした。なお、投与試料は凍結乾燥すると 0.1N HCl, 0.1N NaOH や塩類溶液などに不溶性の化合物に変性するので、合成に用いた DOM, HSA および glutaraldehyde の重量から反応液中の conjugate 濃度を求めて投与量の目安として免疫を行なったが、実験結果の項に述べたように、少なくとも radioimmunoassay には十分用いられ得る抗体が得られた。

2. Radioimmunoassay の感度について

確立した条件で radioimmunoassay を行なうと血清中 0.1—10 ng/0.1 ml の間で検量線に直線性が得られ、本法の感度は 1 ng/ml であった。

DOM を成人に 3 mg 以上経口投与すると幻覚作用があると報告されている。⁶⁾ 血中濃度に関しては、マウスに ^3H -DOM の 10 $\mu\text{Ci/g}$ (28 mg/kg) を静注し、1時間後に 0.74 $\mu\text{Ci/ml}$, 6時間後に 0.03 $\mu\text{Ci/ml}$ の放射能が存在し、そのうちそれぞれ 32.2, 17.2% が未変化の DOM の形であったという報告がある。⁷⁾ また中尾⁸⁾ によればラットに 1.33 mg/100 g 腹腔内投与したとき、血清中の未変化 DOM 濃度は5分後で 2, 30分後に 0.6, 3時間後に 0.1 $\mu\text{g/ml}$ であった。

われわれは DOM の常用量について正確な情報は得ていないが上記の報告から 3 mg/60 kg 経口摂取したとすれば、0.05 $\mu\text{g/g}$ となる。上記の動物実験の結果をヒトにあてはめると、血中濃度は静注で投与6時間後で 250 ng/ml, 腹腔内投与3時間後で 37 ng/ml となる。動物からヒトへ、また静注、腹腔内注射から経口投与へかわることを考慮に入れ、また実際に応用する場合服用後の経過時間がもっと長くなることも考えられるが、本法は感度が 1 ng/ml で、しかも 1—100 ng/ml の範囲で検量線に直線性が得られたことから、DOM 服用者の検査法として応用できるものと思われる。

3. 特異性について

本検査法の特異性について問題となるのは、DOM の構造から考えて生体成分中に含まれているカテコールアミンおよびその代謝産物である。そこで tyramine, Dopa, dopamine, epinephrine, norepinephrine について本法に対する阻害効果を検討したが、これらの生体アミンではほとんど交叉反応は認められなかった。また DOM と構造の類似した methylephedrine では 10⁵ ng/0.1 ml の濃度で約 30% の交叉反応を示した。Methylephedrine の常用量は1日約 150 mg 以下である。これを体重 60 kg のヒトにあてはめると 2500 ng/g となり、DOM の radioimmunoassay による定量には影響を与えないと思われる。

実 験 の 部

1. DOM-glutaraldehyde-HSA Conjugate 溶液の合成 人血清アルブミン 20 mg を 2 ml の 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かし、これに DOM 塩酸塩 6 mg を加えて溶かした。この溶液に $2 \times 10^{-3}\text{M}$ glutaraldehyde 水溶液 1 ml を加えて室温に2時間静置して反応を完結させた。反応液に 1M リジン溶液 0.1 ml を加えて、1時間放置して過剰の glutaraldehyde を処理した。0.15M NaCl に対して48時間透析したのち、透析膜内液に水を加えて一定容量とし、抗原溶液とした。

2. ^3H を用いる DOM の標識 $\text{TH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{BF}_3$ complex を触媒に用い、DOM 100 mg と $\text{TH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{BF}_3$ (1 Ci/0.35 ml) を室温で48時間反応させたものを入手し⁹⁾ Dowex 1 によるイオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製した。

6) S.H. Snyder, L. Fillace, *Science*, **158**, 669 (1967).

7) J.E. Idanpaan-Heikkila, W.M. McIssac, *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 933 (1970).

8) 中尾 健, 昭和 46 年度医療研究助成補助金による精神幻覚剤 STP に関する研究報告。

9) 第一ラジオアイソトープ株式会社より入手した。

Benzene: acetic acid: water (65: 34: 1), *n*-butanol: acetic acid: water (4: 1: 2) によるラジオ薄層クロマトグラフィーの結果純度 99%, 比放射能 0.1 mCi/mg であった.

3. 放射能測定 抗血清と DOM との反応後, 分離したグロブリン分画は Soluene-100 0.5 ml を加えて 40° に加温してとかし, シンチレーター溶液 (DPO 5 g, POPOP 0.5 g, toluene 1000 ml, acetic acid 1.3 ml) 15 ml を加えて液体シンチレーションカウンター (日本無線医理学研究所製 Aloka LSC-601 型) を使用し放射能を測定した.