

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	抗マラリア薬クロロキンの法中毒学的研究
Author(s)	是枝, 亜子
Citation	
Issue date	2008-03-11
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/11210
Right	

学位論文

Doctor's Thesis

抗マラリア薬クロロキンの法中毒学的研究

(Forensic toxicology of chloroquine, an anti-malarial agent)

是枝 亜子

Ako Koreeda

熊本大学大学院医学教育部博士課程

環境社会医学専攻 法医学

指導教員

恒成 茂行 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程

環境社会医学専攻 法医学

2007年度

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名 : 抗マラリア薬クロロキンの法中毒学的研究
(Forensic toxicology of chloroquine, an anti-malarial agent)

著者名 : 是枝 亜子
(単名) Ako Koreeda

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程
環境社会医学専攻 法医学 恒成 茂行 教授

審査委員名 : 細胞病理学担当教授 竹屋 元裕

生体機能薬理学担当教授 光山 勝慶

病態情報解析学担当教授 安東由喜雄

侵襲制御医学担当教授 木下 順弘

2007年度

目次

I. 要旨	1
II. 学位論文の骨格となる 参考論文 ① 関連論文 及び 参考論文 ② その他の論文のリスト	3
III. 謝辞	5
IV. 略語一覧	6
V. 研究の背景と目的	7
VI. 急性クロロキン(CQ)中毒死事例における組織中 CQ 濃度の定量	
1. 事例の概要	10
2. 材料	10
3. 方法	
1) CQ の抽出方法	10
2) CQ の分析方法	11
4. 結果	11
5. 考察	13
VII. 急性クロロキン(CQ)中毒マウスにおける CQ の組織内分布 ～抗 CQ ポリクローナル 抗体(PAC)を用いた免疫組織染色法～	
1. 材料	15
2. 方法	
1) 抗 CQ ポリクローナル抗体(PAC)の作製	
(1)免疫抗原(BSA-BDCQ)	18

(2)ウサギ抗 CQ ポリクローナル抗体 (PAC)	20
(3)固相化抗原 (KLH-BDCQ)	20
(4)酵素抗体法 (ELISA)	20
(5)抗 CQ ポリクローナル抗体 (PAC) の キャラクターゼーション	21
2)抗 CQ ポリクローナル抗体 (PAC) を用いた 免疫組織染色	
(1)急性クロロキン (CQ) 中毒マウス	21
(2)免疫組織染色法	21
3. 結果	
1)抗 CQ ポリクローナル抗体 (PAC) の作製と そのキャラクターゼーション	
(1)免疫抗原 (BSA-BDCQ) の調製と免疫	24
(2)抗 CQ ポリクローナル抗体 (PAC) の キャラクターゼーション	25
2)抗 CQ ポリクローナル抗体 (PAC) を用いた 免疫組織染色	27
4. 考察	31

VIII. 抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC) を用いた試料中 CQ 濃度の簡易半定量システムの開発

1. 材料	34
2. 方法	
1)抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC) の作製	
(1)抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC) 産生 ハイブリドーマ	36
(2)抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC) の精製	37
(3)抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC) の キャラクターゼーション	37

2) 抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC) を用いた ドットプロット法による試料中 CQ 濃度の半定量法	
(1) 試料中 CQ 濃度のドットプロット法 による半定量法	37
(2) ブラインドテストによる検定	38
3. 結果	
1) 抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC) の作製と そのキャラクタリゼーション	39
2) 試料中 CQ 濃度のドットプロット法による 半定量法	40
4. 考察	41
IX. 結語	43
X. 参考文献	44

I. 要旨

研究の背景と目的

共同研究を行っているタンザニアなどアフリカの発展途上国では、抗マalaria薬クロロキン(以下、CQ と略記)による中毒死事例が増加している。しかし、これらの諸国では法中毒学的検査が殆どされていなく、これら発展途上地域の法中毒学への学術的支援を目的とした以下のCQについての研究を行った。

急性CQ中毒死事例における組織中CQ濃度の定量

【方法】タンザニアにおけるCQ中毒死3事例の試料について、塩酸逆抽出法でCQ抽出後、高速液体クロマトグラフィーによる定量分析を行った。

【結果】CQ回収率は $79 \pm 5\%$ ($n=4$)であり、検量線はCQ濃度 $0.05 \sim 10.0 \mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性を示した。3事例の大腿静脈血中CQ濃度は何れも致死血中濃度以上であった。また、血中CQ濃度は右心臓血が最も高く、大腿静脈血が低い値を示した。

【考察】死亡時の血中濃度を正確に判定するには、薬毒物の死後拡散を考慮した試料の採取部位の検討が重要である。

急性CQ中毒マウスにおけるCQの組織内分布

【方法】CQ代謝物のビスデスエチルCQ(BDCQ)と牛血清アルブミン(BSA)の複合体BSA-BDCQを調製してウサギに免疫した。得られた抗CQポリクローナル抗体(PAC)とCQ関連の各種化合物との反応性を酵素抗体法で調べ、エピトープを確認した。CQ急性中毒マウスを作製し、その諸臓器についてPACを用いた免疫組織染色を行った。

【結果】脳では脈絡叢、心臓では心筋細胞とプルキンエ細胞、肺臓では気道上皮細胞とII型肺胞細胞、肝臓では中心静脈周辺及び腎臓では遠位尿管におけるCQの染色が認められた。

【考察】PACのエピトープから判断して、染色部位はCQ代謝物を含むCQ類(CQs)の集積を示していた。脳では脈絡上皮細胞のライソゾームがCQsを取り込み、血液-脊髄関門で重要な役目を果たすことが示された。また、心臓ではCQの心臓毒性発症のトリガーとなり得るプルキンエ細胞へのCQsの強い集積が示唆された。さらに、肺臓ではサーファクタントプロテインを産生するII

型肺胞細胞に、肝臓では CQ 代謝酵素を多く含む中心静脈周辺細胞に CQs が集まり、腎臓では遠位尿細管で優位に CQs の分泌・再吸収を行うことが示された。

抗 CQ モノクローナル抗体(MAC)を用いた試料中 CQ 濃度の簡易半定量システムの開発

【方法】BSA-BDCQ を免疫原としてハイブリドーマを作製した。抗 CQ モノクローナル抗体(MAC) 産生ハイブリドーマを無血清培地中で培養し、その培養上清から抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC28)を得た。MAC28を用いて阻害試験法を応用した CQ 濃度の半定量法を考案し、検査者 2 名に対してブラインドテストを行った。

【結果】本法により血清の治療・中毒・致死の各 CQ 濃度とされる範囲の判別が可能となった。ブラインドテストの結果、検査者 2 名は高い正答率で CQ 濃度の判定を行った。

【考察】本法には今後における判定濃度などの再検討や改善が必要である。しかし、このような CQ 半定量システム開発の需要は、マラリアが蔓延している発展途上国において高まることが確実であり、研究の継続が望まれる。

研究の結論

CQ 中毒に関する本研究により、薬毒物のスクリーニング法や分析法の開発並びに急性中毒の発現機序に関する基礎的研究の重要性を示した。特に、各種薬毒物による急性中毒に関する法中毒学的研究は著しく不足しており、法医学領域における重要な研究課題である。

II. 参考論文

① 関連論文

1. Koreeda, A., K. Yonemitsu, H. Kohmatsu, S. Mimasaka, Y. Ohtsu, T. Oshima, K. Fujiwara, and S. Tsunenari. Immunohistochemical demonstration of the distribution of chloroquine (CQ) and its metabolites in CQ-poisoned mice. *Archives of Toxicology* 81(7): 471-8, 2007.
2. Yonemitsu, K., A. Koreeda, K. Kibayashi, P. Ng'walali, M. Mbonde, J. Kitinya, and S. Tsunenari. HPLC analysis of anti-malaria agent, chloroquine in blood and tissue from forensic autopsy cases in Tanzania. *Legal Medicine* 7(2): 113-6, 2005.

② その他の論文

1. Koreeda, A., K. Yonemitsu, S. Mimasaka, Y. Ohtsu, and S. Tsunenari. An accidental death due to Freon 22 (monochlorodifluoromethane) inhalation in a fishing vessel. *Forensic Science International* 168(2-3): 208-11, 2007.
2. 米満孝聖, 是枝亜子, 幸松宏恵, 大津由紀, 美作宗太郎, 恒成茂行. ジフェンヒドรามミンが関与した2自殺事例. *中毒研究* 20(2), 137-40, 2007.
3. 米満孝聖, 是枝亜子, 大津由紀, ポール ワラリ, 恒成茂行. マルチサイトサンプリングによる血中エタノールの分析—熊本大学における6年間(1994年~1999年)の法医解剖例の検討—. *日本法医学雑誌* 56(2-3): 248-53, 2002.
4. Koreeda, A., K. Yonemitsu, P.M. Ng'walali, N. Muraoka, and S. Tsunenari. Clozapramine-related fatality - Postmortem drug levels in multiple psychoactive drug poisoning. *Forensic Science International* 122(1): 48-51, 2001.
5. 是枝亜子, 米満孝聖, 樋口章浩, 木林和彦, 恒成茂行. パラコートの体内分布による服毒時

間の推定—無理心中事件の犯行順序の判断への応用—. 法医学の実際と研究 41: 95-99
1998.

III. 謝辞

本研究を行うに当たって全面的に懇切なるご指導やご助言を賜りました熊本大学大学院医学薬学研究部法医学分野 恒成茂行教授と米満孝聖准教授に深甚の謝意を表します。また、本研究における抗クロロキン抗体作製にご助言とご協力を頂きました崇城大学生物生命学部応用生命科学科の藤原邦雄教授に深く感謝致します。ついで、クロロキン代謝物のビスデスエチルクロロキン(BDCQ)をご恵与いただきましたサノフィ・アベンティスファーマ株式会社に対し、心よりお礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行にご協力を頂きました熊本大学大学院医学薬学研究部法医学分野 大島徹助教、大津由紀技術専門職員及び吉田美紀研究補助員に対して深く感謝致します。最後に、本研究における諸実験の一部を担当した熊本大学大学院医学教育部修士課程卒業生の幸松宏恵修士並びに熊本大学医療技術短期大学部卒業研究生の森田裕子氏、山内信宏氏、谷岡隆之氏、田端一恵氏、中口類子氏、堀川朝子氏、川辺靖子氏、西見美智子氏、小牧麻美氏、能塚由可氏、大石はるか氏、豊田綾氏、大楠直美氏及び米元香織氏に対して心から感謝致します。

IV. 略語一覽

BDCQ	: bisdesethyl-chloroquine
BSA	: bovine serum albumin
CBB	: coomassie brilliant blue
CQ	: chloroquine
DAB	: 3,3'-diaminobenzidine
EDC	: 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride
EnVision+ [®]	: DAKO EnVision+ [®] kit/HRP(DAB)
FCS	: fetal calf serum
GMBS	: <i>N</i> -[γ -maleimidobutyryloxy]succinimide
HRP	: horseradish peroxidase
KLH	: keyhole limpet hemocyanine
MS-BSA	: mercaptosuccinyl bovine serum albumin
PBS	: phosphate buffered saline
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sulfo-NHS	: <i>N</i> -hydroxysulfosuccinimide
Tris	: tris(hydroxymethyl)aminomethane

V. 研究の背景と目的

世界保健機構(WHO)によると、世界では毎年3~5億人がマラリアに罹患し、100万人が死亡していると報告されている^{注1}。クロロキン(CQ)は1934年に合成されて以降、マラリア予防治療薬として全てのマラリア原虫(三日熱マラリア、熱帯熱マラリア、四日熱マラリア、卵生マラリア)に対して広く用いられてきた(Tracy, 1996)。また、CQ耐性マラリアの出現によってCQはマラリア治療薬としての使用が減少したものと考えられてきたが、CQが廉価であることや常用量での副作用が他の抗マラリア薬(ファンシダール、プログアニルなど)と比較して軽微なことから、アフリカや東南アジアなどの発展途上国では現在でもなお使用されている実情にある(Ball *et al.*, 2002; Yonemitsu *et al.*, 2005)。

一方、CQは治療域と中毒域が接近した薬物であるので、過剰量を服用すれば死亡する危険性が高く、法中毒学的に重要な薬物でもある。実際、当法医学分野が国際共同研究を行っているタンザニアのダルエスサラム大学ムヒンビリ医科学センター病理学教室との交流を通じて、タンザニア首都のダルエスサラム地域においてCQ中毒死が多発していることが判明した。これら地域では、CQ(250 mg錠)20錠程度を服用すれば容易に死亡できることが一般の人々に広く知れ渡っていて、特にHIV陽性者や若い女性が自殺に用いたり、墮胎目的でCQを服用したりした急性中毒死事例が頻発している(Yonemitsu *et al.*, 2005)。しかし、発展途上国のタンザニアにおける法医学関連の施設は貧弱であり、法中毒学的な検査は殆ど実施されていない。また、CQによる自殺事例は発展途上国のみならず、近年ではヨーロッパ諸国やアメリカにおいても報告されている(Riou *et al.*, 1988; Muhm *et al.*, 1996; Lambert *et al.*, 1997; Ball *et al.*, 2002; Musshoff and Madea, 2002)。その一因として、Riouらは「パリにおけるCQを使った自殺事例の増加は『自殺の方法』についての出版物が原因である」と報告している(Riou *et al.*, 1988)。

CQの急性毒性としては強い心臓毒性が挙げられ、その致死量は成人で2-3g、小児では0.5-1gであるとされている(Muhm *et al.*, 1996)。また、急性CQ中毒死の経過は一般に急激であり、昏睡と共に致死性不整脈を伴う伝導障害によって死亡すると報告されている(Tracy, 1996)。CQの急性毒性機序としては、類似の化学構造を持つキニジンと同様に心筋と心筋の刺激伝達系の興奮性低下作用であることが示唆され、分子レベルの研究ではK⁺チャンネル(human

ether-a-go-go related gene (HERG) K⁺チャネル)を遮断することでQT延長を誘発するものと報告されている(Sanchez-Chapula *et al.*, 2002; Traebert *et al.*, 2004)。しかし、in vivoの実験系における毒物動態学や毒物力学的な研究はほとんど行われていない。これはCQに限られたことではなく、さまざまな薬毒物の急性中毒に関する研究が著しく不足している事実を反映している。法中毒学の領域においても、死因究明の目的で死体中の薬毒物濃度を化学的に分析する研究は数多く実施されているが(是枝ら, 1998; Koreeda *et al.*, 2001; 米満ら, 2002; Koreeda *et al.*, 2007b; 米満ら, 2007)、急性薬毒物中毒死の死亡機序に関連した研究は殆ど行われていないのが現状である。

ところで、法医学領域ではモルヒネやメサドンなどのいくつかの違法薬物に対する免疫抗体が免疫組織学的検査法に使われてきた(Wehner *et al.*, 2000a; Wehner *et al.*, 2000b)。この検査法は、剖検例(死者)が薬物を用いていたか、否かを調べ、その確証を得る為の手段として応用されてきた。一方、メタンフェタミンやアンフェタミン誘導体(MDMA)及び除草剤パラコートなどについては、同様の免疫組織学的方法によって各化学物質の組織における局在が研究され、それらの生物学的作用を調べる手段として有効であることが示されてきた(Ishiyama *et al.*, 1987; 梶谷明代ら, 1989; Nagao *et al.*, 1991; De Letter *et al.*, 2003)。すなわち、抗薬物抗体を用いた免疫組織染色法は、薬物の組織分布を直接的に示すものであり、その薬理学的、毒性学的機序を明らかにする良い手法である。

また、免疫学的手法は薬毒物検査の場面においても活用されている。アメリカのBiosite社が開発した乱用薬物簡易検査キット「Triage[®]」は、免疫学的手法により8種類の乱用薬物等(フェンサイクリジン類、ベンゾジアゼピン類、コカイン系麻薬、覚せい剤、大麻、モルヒネ系麻薬、バルビツール酸類、三環系抗うつ剤)を迅速かつ簡便にスクリーニングできることから、日本国内の救急医療の現場及び法医学の検屍検案や解剖の現場においても広く利用されている。このような検査キットは、高額で大型な機器や熟練した技術が不要であることから、タンザニアなどの発展途上国における中毒検査法としても有効な手段であるものと考えられる。

そこで著者は、発展途上国における法中毒学に対して学術的支援を行う目的から、CQの法中毒学的研究として以下の3つの研究を行った。まず、急性CQ中毒死事例における組織中CQ濃度の定量(第VI章)においては、簡便な高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるCQ分析方法を考案し、その方法を用いてタンザニアでの急性CQ中毒死事例におけるCQの体組織分布を調

べた(Yonemitsu *et al.*, 2002; Yonemitsu *et al.*, 2005)。また、急性 CQ 中毒マウスにおける CQ の組織内分布(第Ⅶ章)においては、CQ に対するポリクローナル抗体を作製し、抗 CQ ポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色法によって急性 CQ 中毒モデルマウスの組織中における CQ の分布状態を検索し、これを CQ の急性毒性機序の理解を深める一助となる様に検討を行った(Koreeda *et al.*, 2007a)。さらに、抗 CQ モノクローナル抗体(MAC)を用いた試料中 CQ 濃度の簡易半定量システムの開発(第Ⅷ章)では、CQ の簡易検出法を開発することを目的に、CQ に対するモノクローナル抗体を作製し、これを用いた半定量法を考案してその有用性について検討した。

注¹ <http://www.searo.who.int/EN/Section10/Section21/Section334.htm>.

VI. 急性クロロキン(CQ)中毒死事例における組織中 CQ 濃度の定量

1. 事例の概要

体組織中 CQ 濃度の定量分析をした各事例の概要と解剖所見を以下に示した。なお、何れの事例も 2000 年 7 月から 8 月の 2 ヶ月間にタンザニアのダルエスサラム大学ムヒンビリ医科学センター病理学教室で行われた法医解剖事例である。

<事例 1>

34 歳、男性屍。CQ 服用による自殺の疑い。暴行の痕跡は認められない。死後数日間を経過しており、栄養状態佳良である他に特記すべき剖検所見なし。

<事例 2>

21 歳、女性屍。夫婦間のトラブルの後、CQ を服用して自殺した。暴行の痕跡は認められない。肺はうっ血状で点状出血があり、妊娠 16 週であった。

<事例 3>

24 歳、男性屍。CQ 服用による自殺の疑い。栄養状態良好で、暴行の痕跡は認められない。鼻口部に細小泡沫があり、肺はうっ血水腫状。その他の臓器に異常を認めない。

2. 材料

リン酸クロロキン等の試薬は全て市販の特級品を用いた。また、各事例の体組織試料は解剖時に採取し、分析まで -20°C にて凍結保存した。なお、大腿静脈血は大腿静脈内にプラスチックカテーテルを挿入して採取し、また左心臓血及び右心臓血は各心房に注射針を穿刺して採取した。

3. 方法

1) CQ の抽出方法

CQ 抽出法は Walker らの報告を参考に行った(Walker and Ademowo, 1996)。すなわち、試料 1 ml に内部標準物質 (I.S.) として硝酸ストリキニーネ $0.4 \mu\text{g}$ を添加し、2 M 水酸化ナトリウム 1 ml とエーテル 4 ml を加えて 1 分間攪拌した。その後、2,000 rpm で 10 分間遠心分離してエーテル層を分取し、0.1 M 塩酸 0.4 ml を加えて再度 15 分間振盪混和した。同様に遠心分離して塩酸層を分取し、その塩酸層 $20 \mu\text{l}$ を用いて次項に示した条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による

定量分析を行った。また、正常血液に既知量のクロロキン(0-100 μg)を添加し、これをCQ標準試料として同様に抽出した試料を用いて検量線を作成した。

なお、組織試料については、組織 1 g に蒸留水 9 ml を加えてホモジナイズしたホモジネート 1 ml を検査試料として用い、各試料は必要に応じて希釈して抽出した。

2) CQ の分析方法

CQ の定量分析はHPLCで行い、Houzeらの方法を参考に下記の分析条件で行った(Houze *et al.*, 1992)。

Instrument: TOSOH SC-8020

Column: TSK gel Super-ODS (100x4.6 mm I.D.)

Mobile phase: 0.07%ジエチルアミンを含む 20 mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液(リン酸で pH 3.4 に調製):アセトニトリル=70:30 (v/v)

Flow rate: 1.0 ml/min

Detector: UV 254 nm

4. 結果

図 1 に事例 1 の右心臓血における HPLC クロマトグラムを示した。CQ は保持時間 5.6 分に、また内部標準物質のストリキニーネは 2.3 分に検出され、何れの成分も明瞭に分離した夾雑ピークの少ない良好なクロマトグラムを示した。なお、本法における CQ の検出限界は 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、検量線は 0.05~10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で直線性(相関係数 $r^2=0.96\sim 0.98$)を示し、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CQ 溶液からの CQ 回収率は $79\pm 5\%$ ($n=4$)であった。

本定量分析法による各事例の試料中 CQ 濃度を表 1 に示した。各事例の大腿静脈血中 CQ 濃度は 8.5、48.4 及び 43.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となり、何れも Baselt の報告する致死血中濃度(3~16 $\mu\text{g}/\text{ml}$)以上であった(Beselt, 2000)。また、異なる部位から採取した血液中 CQ 濃度には大きな差異が認められ、何れの症例においても右心臓血が最も高く、大腿静脈血で低い値を示した。一方、組織試料においては肝臓と腎臓が高い値を示した。

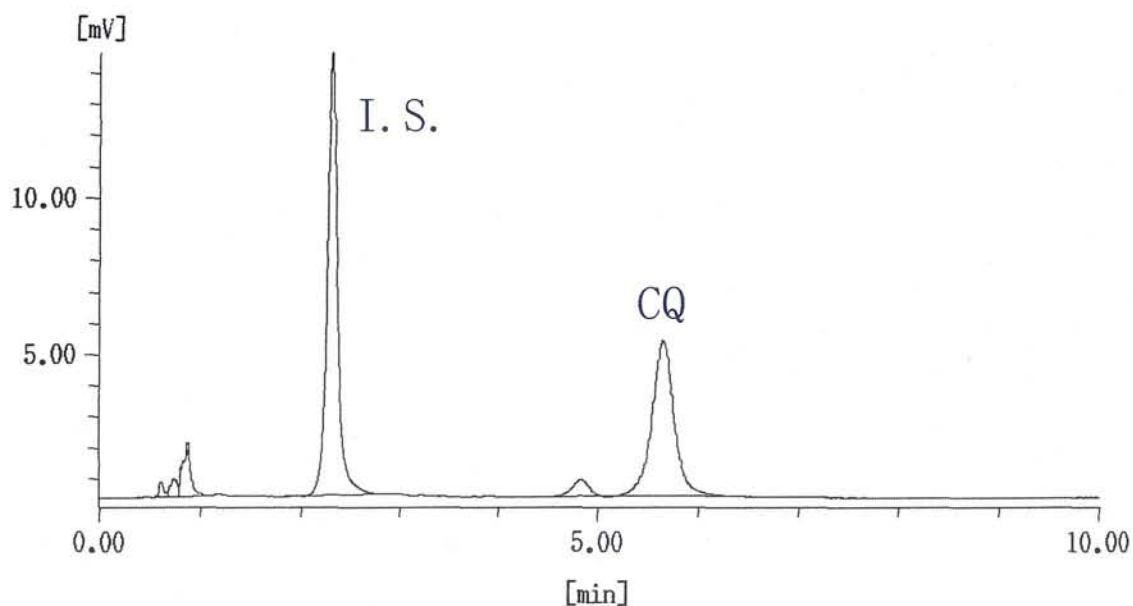


図1 右心臓血(事例1)のHPLCクロマトグラム

表1 血液、組織中CQ濃度(μg/ml or g)

試料	事例1	事例2	事例3
FV blood	8.5(1.0)	48.4(1.0)	43.8(1.0)
LH blood	15.7(1.9)	42.4(0.9)	49.9(1.1)
RH blood	21.8(2.6)	74.6(1.5)	168.2(3.8)
Brain	---	---	39.2(0.9)
Heart	38.4(4.5)	73.7(1.5)	115.0(2.6)
Lung	76.2(9.0)	76.4(1.6)	145.1(3.3)
Liver	---	192.2(4.0)	584.7(13.4)
Kidney	211.3(24.9)	215.9(4.5)	577.8(13.2)
Spleen	---	174.4(3.6)	225.1(5.2)

FV, femoral vein; LH, left heart; RH, right heart; (): ratio to FV blood; ---, no specimen available.

5. 考察

血液中 CQ 濃度の定量分析法としては、HPLC、ガスクロマトグラフィー (GC)、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) などを用いた方法が報告されている (Weingarten and Cherry, 1981; Ducharme and Farinotti, 1997; Keller *et al.*, 1998)。一方、体組織中 CQ 濃度の定量法としては GC を用いた分析法が報告されているものの、HPLC による分析法は報告されていない。そこで、著者らは、Walker らの報告した逆抽出法を用いて試料中から CQ を抽出し、Houze らの HPLC 分析条件を用いて分析を行った (Walker and Ademowo, 1996)。その結果、夾雑ピークの少ない図 1 の様なクロマトグラムが得られた。また、本法は Houze らや Walker らの報告に比べて広範囲に直線性を示す検量線が得られ、試料からの CQ 回収率は $79 \pm 5\%$ ($n=4$) と十分であった。そこで、この分析方法を用いてタンザニアにおける CQ 中毒死事例の血液と組織中 CQ 濃度の定量を行った。

定量分析の結果、異なる3カ所から採取した血液試料中の CQ 濃度には大きな差異が認められた。一般に、大腿静脈血は組織中に分布した薬物の死後拡散による影響を受けにくく、死亡時における血中薬物濃度を示すものと考えられている。3 事例においても大腿静脈血中 CQ 濃度が最も低い値であったが、それらを死亡時における血中濃度と考えると 3 事例は何れも急性 CQ 中毒死であるものと判断した。また、右心臓血中 CQ 濃度が左心臓血よりも高い値を示した原因としては、生前における体内循環上の影響や、死後における組織からの拡散による影響などが考えられた。つまり、生前においては、服用直後の薬物吸収期においては、肝臓から右心室間の血液に特に高濃度の薬物が含まれていることが予想され、また死後においては、肝臓に高く分布した CQ が肝静脈を介して右心房へ死後拡散することが予測される。これらの影響から、右心臓血中 CQ 濃度が左心臓血よりも高い値を示したものと考えられる。本結果が示す様に、血液試料の採取部位の検討は死者の「死亡時の血中濃度」を正しく判断する上で極めて重要なことである。

また、組織中 CQ 濃度の分布から、CQ は肝臓や腎臓で高濃度に、また脳にはあまり蓄積されなことが示された。この結果は、CQ 中毒死事例 29 例の組織中濃度をまとめた Kuhlman らの報告と一致した (Kuhlman *et al.*, 1991)。また、同論文において肝臓中 CQ 濃度が $150 \mu\text{g/g}$ 以上の時には CQ の過量服用が考えられると述べられている。事例 2 と事例 3 の肝臓中 CQ 濃度は $192.2 \mu\text{g/g}$ と $584.7 \mu\text{g/g}$ であり、何れも $150 \mu\text{g/g}$ 以上であった。このことから 2 事例共に急性 CQ 中毒による死亡であることが支持された。

著者らのCQ定量分析法は、血液や尿だけでなく組織試料中のCQを簡便に抽出し、かつ高感度に定量する方法であり有用なものである。しかし、HPLCなどの高額な分析機器を用いた定量分析法は、CQ中毒事故が多発する発展途上国では経済的な理由から頻用することは極めて困難である。従って、高額な機器や煩雑な手技を伴わない免疫学的手法を応用した分析法などを積極的に提供し、これら地域における法中毒学的検査の発展に寄与しうる研究を進めることも重要である。

VII. 急性クロロキン(CQ)中毒マウスにおけるCQの組織内分布

～抗CQポリクローナル抗体(PAC)を用いた免疫組織染色法～

1. 材料

1) 試薬

本研究に関連した重要な化学物質の化学構造式を図2に示した。なお、ビスデスエチルクロロキン(BDCQ)はサノフィ・アベンティスファーマ株式会社よりご恵与いただいた。また、試薬類は何れも市販の特級品を用い、以下に述べる各実験法において使用した緩衝液などは下記の通りである。

(a) 酵素抗体法(ELISA)

coating buffer: 50 mM carbonate buffer, pH 9.7

washing buffer: 0.02% Tween20を含む0.1 M PBS, pH 7.4

blocking buffer: 0.5% gelatinを含むcoating buffer

substrate buffer: 0.1 M citric acidを含む0.1 M Na_2HPO_4 , pH 5.0

substrate solution: 0.055% 1,2-phenylenediamine dihydrochloride、0.03% H_2O_2
を含む substrate buffer

stop solution: 1 M H_2SO_4

(b) 免疫組織染色法

TB: 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6

dilution buffer: 2% BSAを含むPBS

0.3% H_2O_2 -MeOH: 0.3% H_2O_2 を含むmethanol

一次抗体: PACなどの一次抗体をdilution bufferで希釈

二次抗体: HRP標識ロバ抗ウサギIgGをdilution bufferで100倍希釈

DAB solution: 0.02% DABを含むTBに30% H_2O_2 を30 μL 添加

2) 実験動物

各実験において、ウサギ(New Zealand white、雌性、約 2kg)とマウス(ddY、雄性、25-27g)を実験動物として用いた。なお、各動物実験は熊本大学動物実験等に関する規則に従って行った。

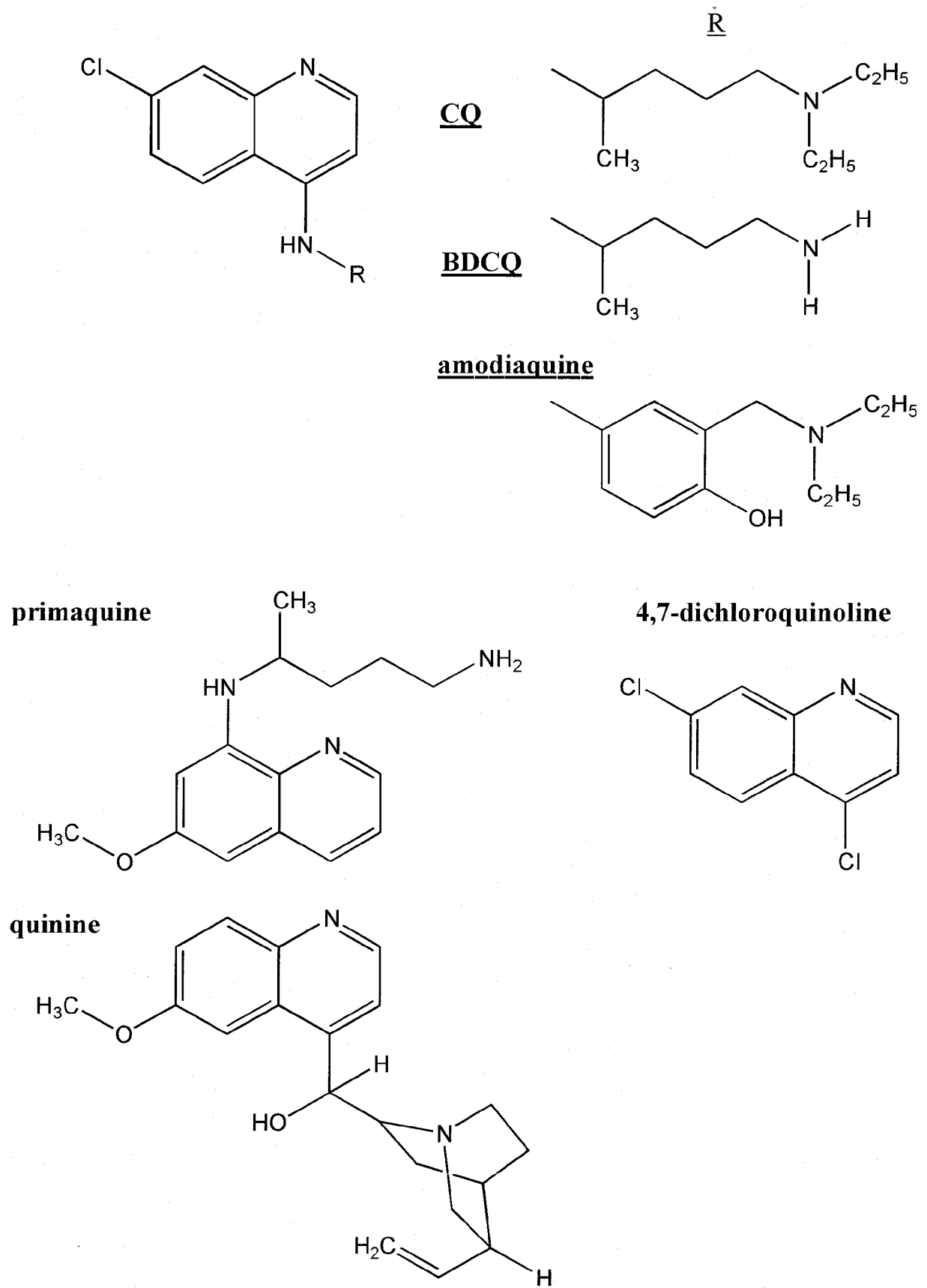


図 2 本研究に用いた化学物質の化学構造式

2. 方法

1) 抗 CQ ポリクローナル抗体 (PAC) の作製

(1) 免疫抗原 (BSA-BDCQ)

CQ (図 2) は分子量 319.9 の化合物であり、タンパク質などの高分子物質とは異なってそれ自体では免疫抗原となり得ないハプテンである。CQ を免疫抗原とする為には高分子のキャリアタンパクと結合させる必要がある。しかし、CQ 自体との結合は化学構造上困難であるので、CQ 代謝物であり化学構造が類似したビスデスエチルクロロキン (BDCQ、図 2) を用いて免疫抗原を調製した。

BDCQ とキャリアタンパクとの結合は Fujiwara らの方法 (図 3) にほぼ準拠して行った (Fujiwara *et al.*, 1983)。すなわち、BDCQ (2.5 mg、9.5 μ moles) と GMBS (0.25 mg、0.9 μ moles) を N,N-ジメチルホルムアミド 0.5 ml に溶解し、攪拌しながら室温で 100 分間インキュベートする (GMBS-acylated BDCQ)。次に、これに MS-BSA (10 mg、0.1 μ moles) を溶解した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0、2 M 尿素を含む) 3 ml を加え、室温で 30 分間攪拌する。未反応の低分子化合物と BSA-BDCQ (目的物) を分離する為に、Shephadex G-100 でゲルろ過を行って分画精製し、紫外・可視吸収スペクトルを測定して BSA 由来の 280 nm と BDCQ 由来の 320~340 nm に吸収を示す BSA-BDCQ 分画を得た。これを免疫抗原 (BSA-BDCQ) として以下の実験に用いた。

なお、本研究におけるタンパク定量は全て BCA 法にて行った (Smith *et al.*, 1985)。

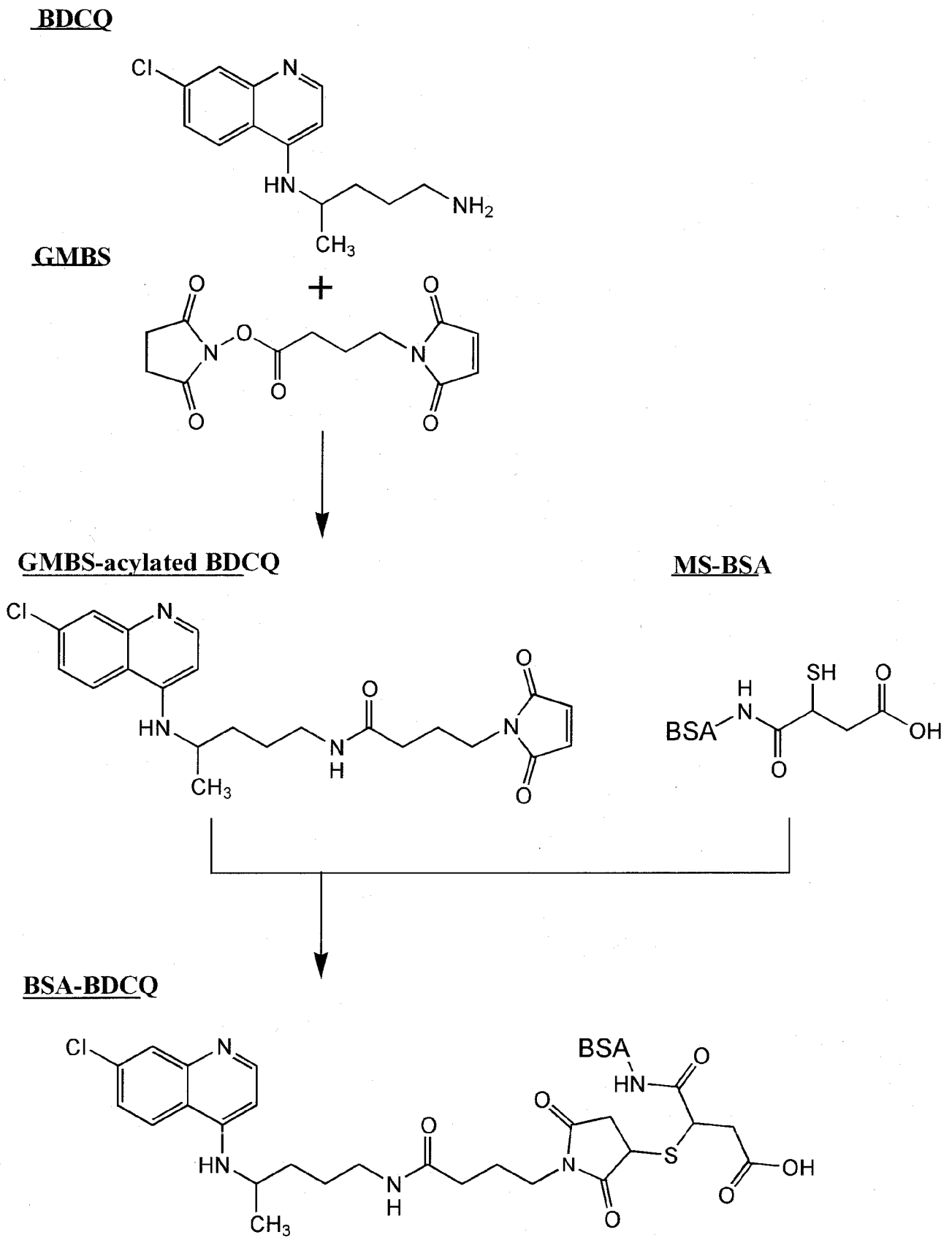


図3 免疫抗原 (BSA-BDCQ) の調製

(2)ウサギ抗 CQ ポリクローナル抗体(PAC)

第(1)項にて合成した免疫抗原(BSA-BDCQ)を常法に従ってウサギに免疫した。すなわち、滅菌生理食塩水 0.6 ml に BSA-BDCQ(初回 1.0 mg、2 回目以降 0.2 mg)を溶解し、フロイントの完全アジュバント(2 回目以降:不完全アジュバント)0.75 ml と混和して均一化し、これをウサギの背部皮内数ヶ所に注射した。初回免疫より3週間後と、さらにその後2週毎に追加免疫した。追加免疫後より経時的に採血を行い、CQ に対する抗体価を第(4)項で述べる酵素抗体法(ELISA)で測定した。7 回目の免疫1週間後にウサギを屠殺して全採血した。血液は 3,000 rpm で 15 分間遠心して血清(ウサギ抗 CQ ポリクローナル抗体、PAC)を分離し、55 °Cの恒温槽で 30 分間インキュベートして非働化した後に-80 °Cで保存した。

(3)固相化抗原(KLH-BDCQ)

キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)と BDCQ の複合体(KLH-BDCQ)を Grabarek らの方法を参考に調製し、次の第(4)項にて述べる ELISA の固相化抗原として用いた(Grabarek and Gergely, 1990)。すなわち、BDCQ(1 mg)、KLH(2 mg)、sulfo-NHS(0.5 mg)及び EDC(10 mg)を蒸留水 1 ml に溶解し、室温で 15 分インキュベーションする。次いで、2-メルカプトエタノール 1 μ l を加えて反応を止める。反応溶液は 4°Cにて 10 mM PBS (pH7.4) 3 l で透析を数回を行い、未反応の低分子化合物を除いて精製した。

(4)酵素抗体法(ELISA)

第(3)項にて調整した KLH-BDCQ を固相化タンパクとして用い、Araki らの方法に従って ELISA で抗体価の測定を行った(Araki *et al.*, 1992)。まず、coating buffer で 5 μ g/ml に希釈した KLH-BDCQ 溶液 を ELISA プレートの各ウェルに 100 μ l ずつ添加し、室温で 2 時間インキュベートして固相化した。溶液を回収後、washing buffer で 3 回洗浄し、blocking buffer を添加して 4°Cにて一晩静置した。blocking buffer を除去後、washing buffer で 3 回洗浄し、一次抗体(PAC 等) 100 μ l を添加して室温で 1 時間反応させる。その後、washing buffer で 3 回洗浄して二次抗体として 10,000 倍希釈したホースラディッシュペルオキシターゼ(HRP)標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗体溶液 100 μ l を添加して室温で 1 時間反応させた。再び washing buffer で 3 回洗浄し、substrate solution 100 μ l を添加して 30 分間反応させ、最後に stop solution を 50 μ l 添加してマ

マイクロプレートリーダーで吸光度(O.D.492 nm)を測定した。

なお、コントロールとして KLH を同様に固相化した ELISA プレートを作製し、一次抗体が KLH に反応しないことを確認した。

(5) 抗 CQ ポリクローナル抗体(PAC)のキャラクタリゼーション

PAC の抗原認識部位を調べる為に、第(4)項で述べた ELISA を用いて PAC と各化学物質(図 2)との反応性を調べた。PAC は各化学物質と室温であらかじめ 30 分間インキュベートし、これを一次抗体として ELISA を行って固相化抗原と PAC の抗原-抗体反応における各化学物質の反応阻害の程度を調べた。

2) 抗 CQ ポリクローナル抗体(PAC)を用いた免疫組織染色

(1) 急性クロロキン(CQ)中毒マウス

ddY 系雄性マウス(25~27 g)を一晩絶食し、CQ 投与群とコントロール群(CQ 非投与群)の 2 群(各 6 匹)に分けた。CQ 投与群には CQ の LD₅₀ である 400 mg/kg^{注2}、コントロール群には生理食塩水を等量経口投与した。投与 6 時間後に頸椎脱臼にてマウスを屠殺し、各臓器(脳、心臓、肺臓、肝臓及び腎臓)を摘出し、以下の第(2)項で述べる固定処理等を行った。

注2 <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/chloroqu.htm>.

(2) 免疫組織染色法

摘出した臓器は、Ishiyama らの方法に従って 2%グルタルアルデヒド、4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液で 4℃にて 3 時間固定した後、15%ショ糖溶液中に 4℃にて一晩浸漬して包埋処理を行った(Ishiyama *et al.*, 1987)。

パラフィン包埋処理を行った組織を薄切してヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行うと共に図 4 に示す方法で免疫組織染色を行った。すなわち、脱パラフィン処理済みの切片を 0.3%過酸化水素水を含むメタノールで処理して内因性ペルオキシダーゼを阻害し、その後 2% BSA を含む PBS で 100 倍希釈したロバ血清にてブロッキングした。次いで一次抗体である PAC で切片を覆い、室温で 60 分間反応させて洗浄した後、二次抗体である HRP 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体(2%BSA を含む PBS で 100 倍希釈)で切片を覆って室温で 60 分間反応させた。洗浄の後、DAB 溶液で切

片を覆って7分間反応させ、5分間流水にて水洗した。最後にMayer Haematoxylinを用いて核染色を行い、10分間の流水による水洗後に脱水、透徹、封入した。なお、一次抗体として100～2,000倍希釈したPACを用いた予備検討を行い、本染色法におけるPACの最適希釈倍率が1,000倍であることを確認した。

また、染色部位がCQ特異的であることを確認する為に、図5に示す様に通常のPACとCQ吸収PAC(1 mM CQで4℃下にて一晩インキュベーションを行ない、CQとの反応部位を阻害したPAC)を用いた染色像を比較、確認した。つまり、通常のPACにおける染色部位の中でCQ吸収PACでは染色されない部位をCQ特異的染色部位として判断した。

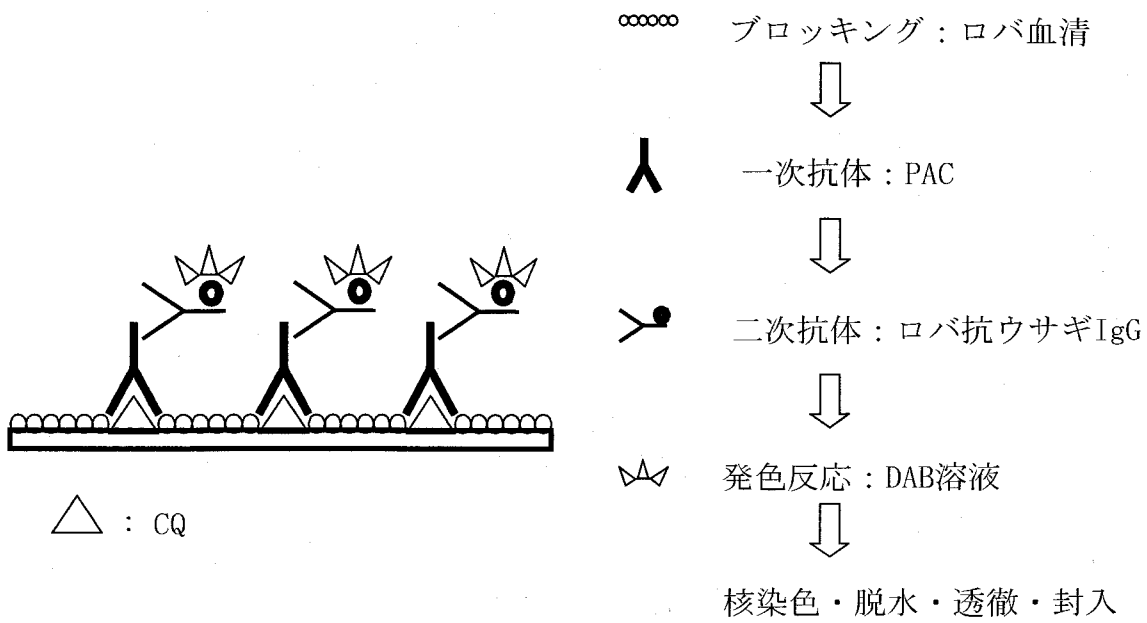


図4 免疫組織染色法

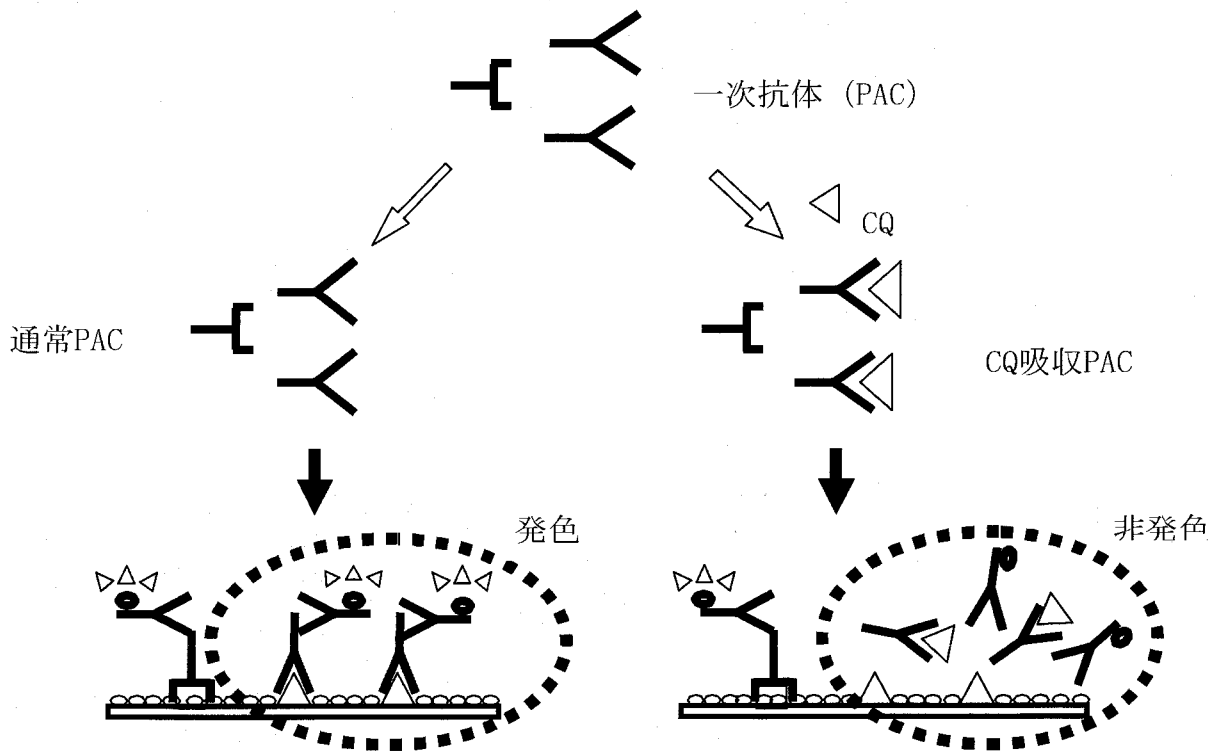


図5 CQ 特異的染色部位の確認

3. 結果

1) 抗 CQ ポリクローナル抗体 (PAC) の作製とそのキャラクタリゼーション

(1) 免疫抗原 (BSA-BDCQ) の調製と免疫

図 3 の方法により得られた免疫抗原 BSA-BDCQ の紫外・可視吸収 (UV-VIS) スペクトルを図 6 に示した。BSA-BDCQ (図 6a) は、BSA に由来する 280 nm と BDCQ (図 6b) に由来する 320~340 nm に吸収が認められ、BSA と BDCQ の結合が確認された。また、各々の分子量、モル吸光係数 (BSA: MW=69,000、 ϵ_{280} =43,600、BDCQ: MW=263.76、 ϵ_{280} =1,670、 ϵ_{329} =16,400) 及び 280、329 nm における吸光度から判断して、調製した BSA-BDCQ は BSA 1 分子に対して BDCQ 2 分子が結合していた。

BSA-BDCQ によってウサギの免疫を行った結果、3 回免疫後のウサギ血清に抗 CQ 抗体活性が ELISA にて確認された。その後、抗体価は免疫 4 回目まで上昇傾向を示し、プラトーに達した 7 回目の免疫後に全採血を行った。

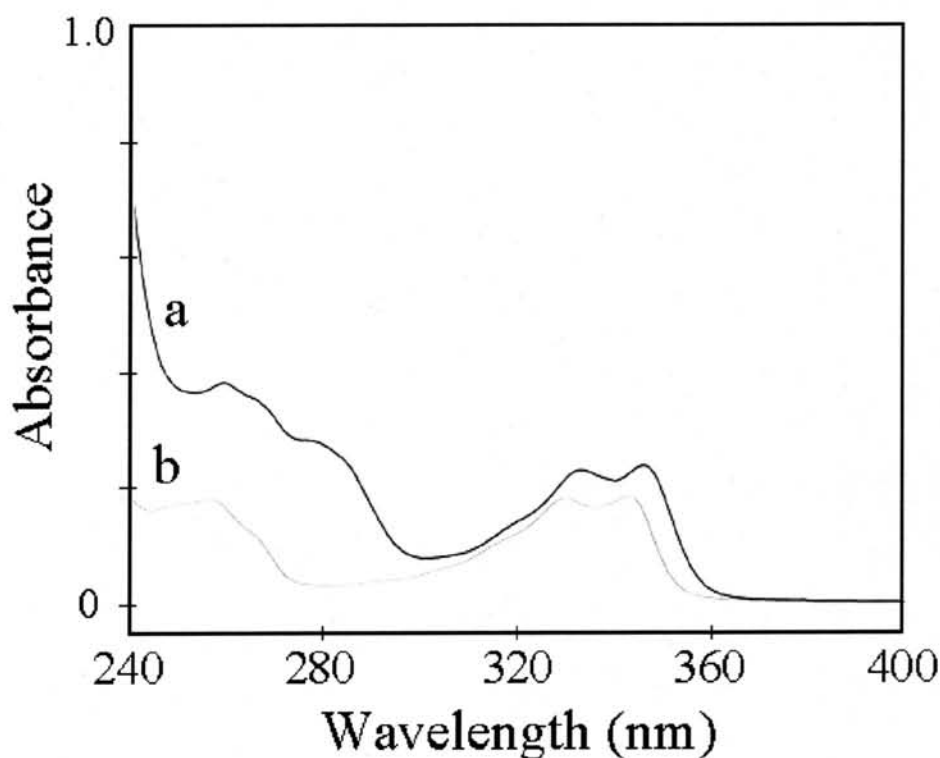


図 6 BSA-BDCQ (a) と BDCQ (b) の UV-VIS スペクトル

(2) 抗 CQ ポリクローナル抗体 (PAC) のキャラクタリゼーション

得られたウサギ血清中の抗 CQ ポリクローナル抗体 (PAC) は、ELISA において 10,000 倍希釈で十分な反応性を示した。また、KLH のみを固相化した ELISA プレートには反応しないことから、PAC の CQ との反応が確認された。

図 2 に示した CQ 自体、CQ 類似化合物 (BDCQ、4,7-ジクロロキノリン) 及びその他の抗マalaria薬 (アモジアキン、プリマキン、キニーネ) と PAC との反応性を調べる為に、各種濃度の化合物と PAC を予めインキュベーションした試料を用いて同様に ELISA を行った。その結果、図 7 に示すとおり CQ や BDCQ 濃度が上昇するに従って PAC は固相化抗原との抗原-抗体反応を阻害され、その 50 % 阻害濃度 (IC_{50}) は CQ に対して約 8 nM、BDCQ に対して 17 nM と極めて高い親和性を示した (表 2)。一方、別種の抗マalaria薬のアモジアキンに対しては反応性を示したが ($IC_{50}=158$ nM)、CQ 類似化合物の 4,7-ジクロロキノリンやその他の抗マalaria薬のプリマキンとキニーネに対する交叉反応は認められなかった。

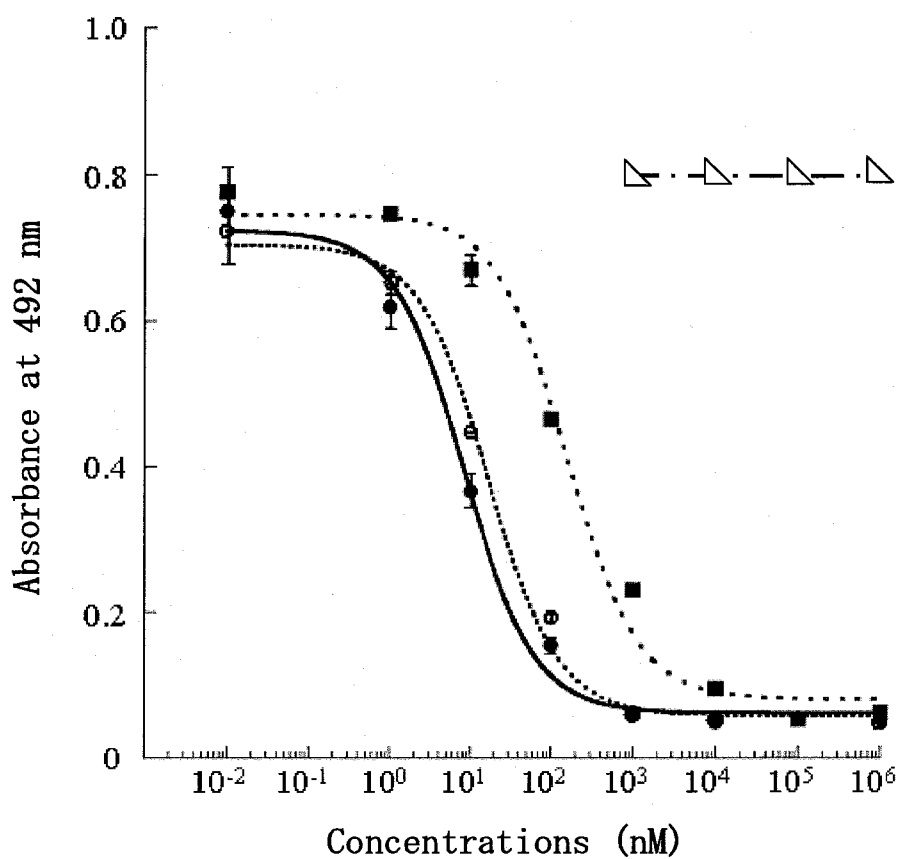


図 7 ELISA における各化合物による PAC の反応阻害

CQ:●、BDCQ:○、アモジアキン:■、プリマキン, キニーネ, 4,7-ジクロロキノリン:△

表 2 各化学物質の 50%阻害濃度 (IC₅₀)

化合物	50%阻害濃度 (IC ₅₀ , nM)
CQ	8
BDCQ	17
アモジアキン	158
プリマキン	1 mM<
キニーネ	1 mM<
4,7-ジクロロキノリン	1 mM<

2) 抗 CQ ポリクローナル抗体 (PAC) を用いた免疫組織染色

固定組織について 100、500、1,000、2,000 倍の PAC における免疫組織染色像を検討した結果、十分な発色があり、また非特異的染色が少ない 1,000 倍を PAC の最適希釈率として以後の実験に用いた。

各臓器組織について免疫染色を行ったところ、CQ 中毒マウスの組織において強い染色が認められた。一方、コントロール群では染色が認められなかった。また、CQ 吸収 PAC を用いた場合には、通常の PAC では強い染色を示した部分の染色が認められなかった。これらの結果から、染色部位が CQ 特異的染色部位であるものと判断して以下の所見を得た。

< 脳 (図 8) >

脈絡叢の強い染色が認められた (図 8a)。なお、CQ 吸収 PAC を用いた染色像 (図 8b) では、この部位の染色が認められなかった。

< 心臓 (図 9) >

心筋細胞の全般に染色が認められた。また、プルキンエ細胞では他の心筋細胞よりもやや強い染色が疑われた。一方、心臓弁の膠原線維は染色されなかった (図 9a)。

< 肺臓 (図 10) >

気管支上皮細胞と粘液分泌細胞である II 型肺胞細胞の染色が認められた。

< 肝臓 (図 11) >

肝細胞の細胞質に明瞭な顆粒状染色が認められた。それは肝門管周辺と中心静脈周辺に著しく、特に中心静脈周辺細胞に強い染色が認められた。

< 腎臓 (図 12) >

皮質部よりも髄質部で強い染色が認められた。また、糸球体や近位尿細管よりも遠位尿細管と集合管で著しい染色が認められた。

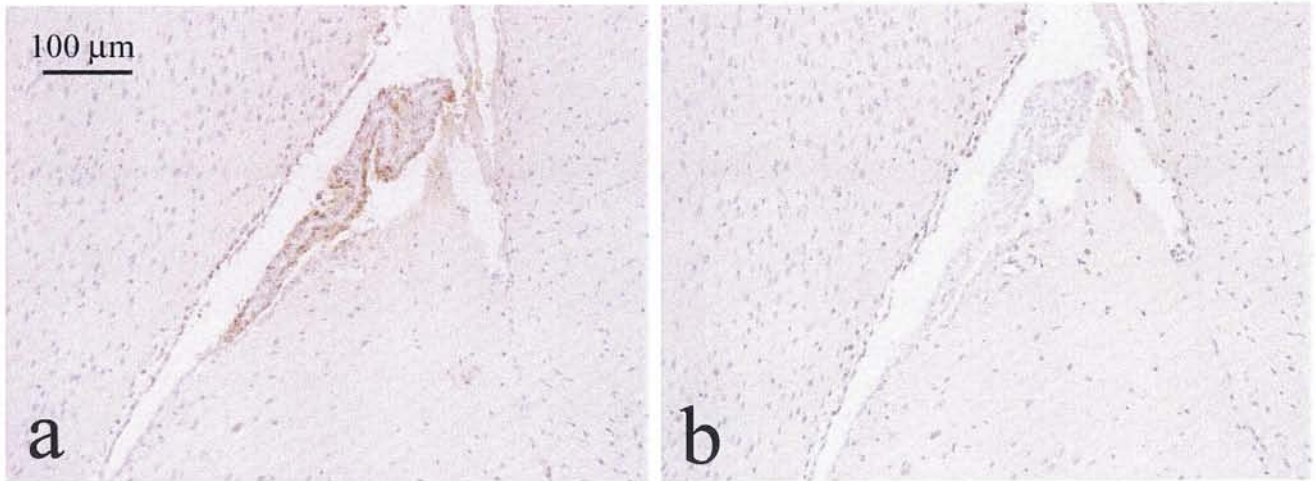


図 8 脳における染色像

a:一次抗体として PAC を使用、b:一次抗体として CQ 吸収 PAC を使用

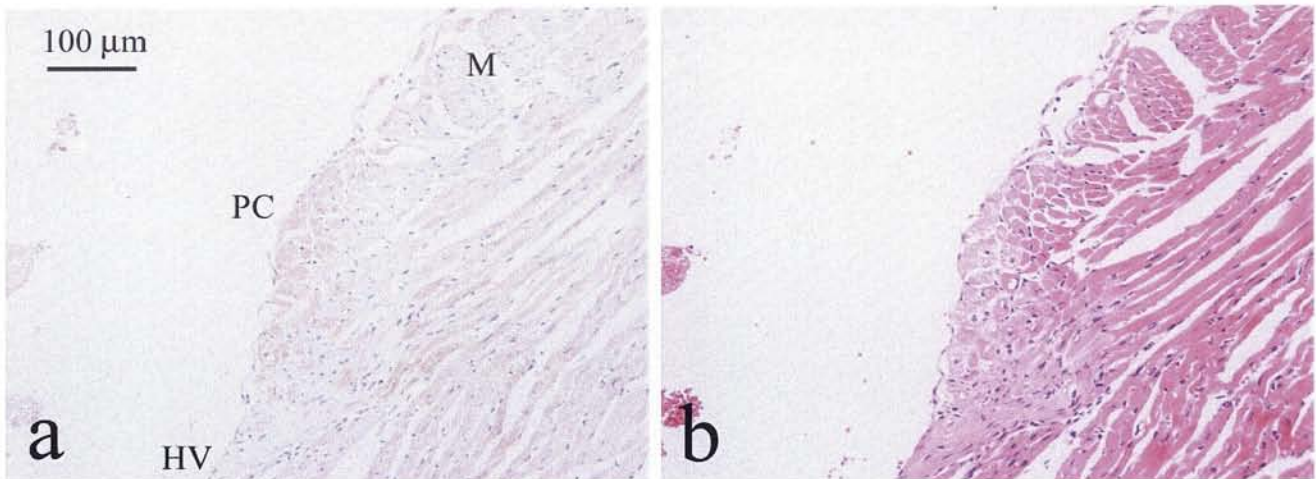


図 9 心臓における染色像

a:一次抗体として PAC を使用、b:a と同部位の HE 染色像

M:心筋細胞、PC:プルキンエ細胞、HV:心臓弁

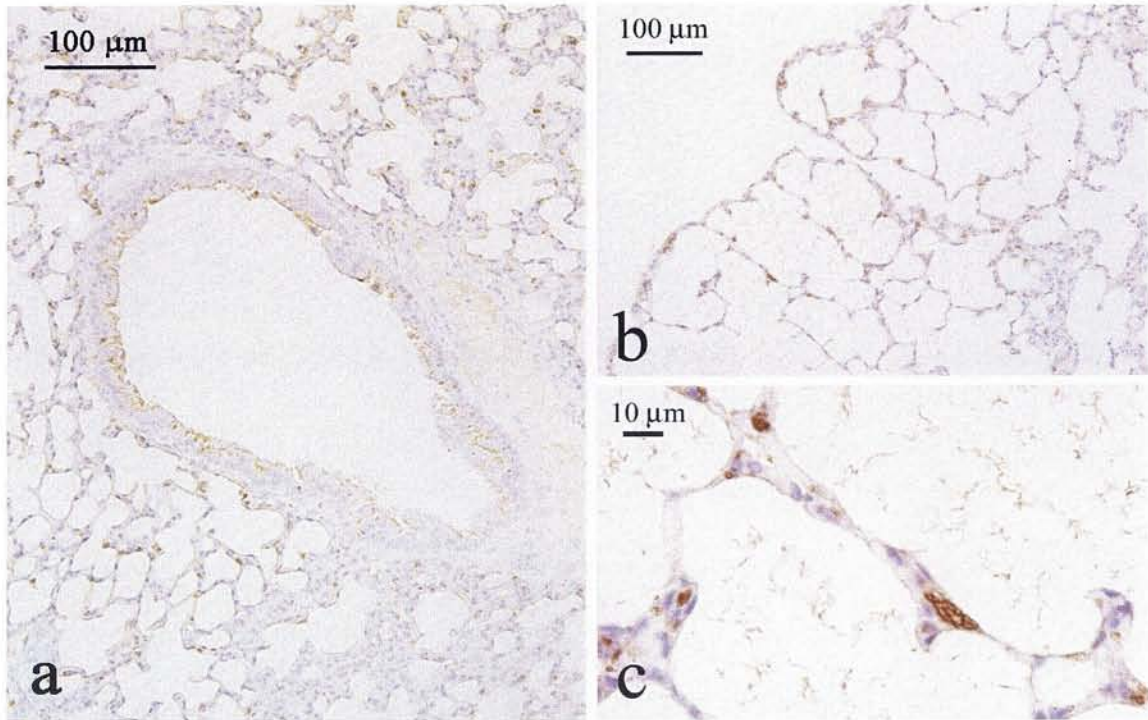


図 10 気管支、肺臓における染色像

a:気管支周辺、b:肺胞、c:Ⅱ型肺胞細胞

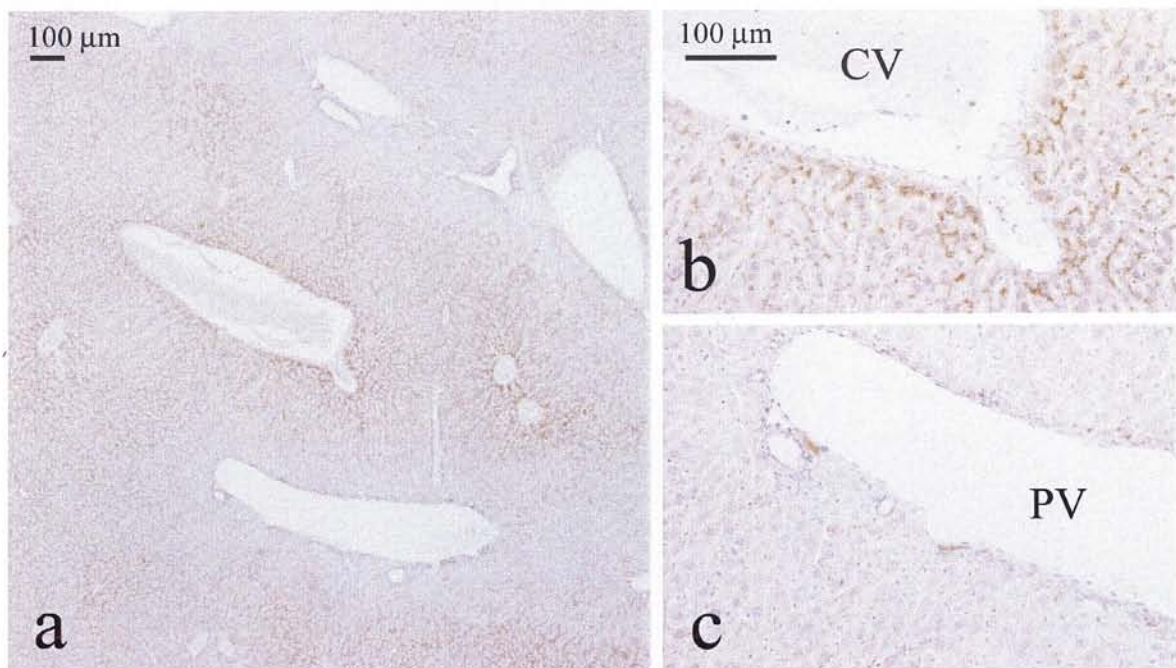


図 11 肝臓における染色像

a:肝実質、b:中心静脈周辺、c:肝門管周辺

CV:中心静脈、PV:肝静脈

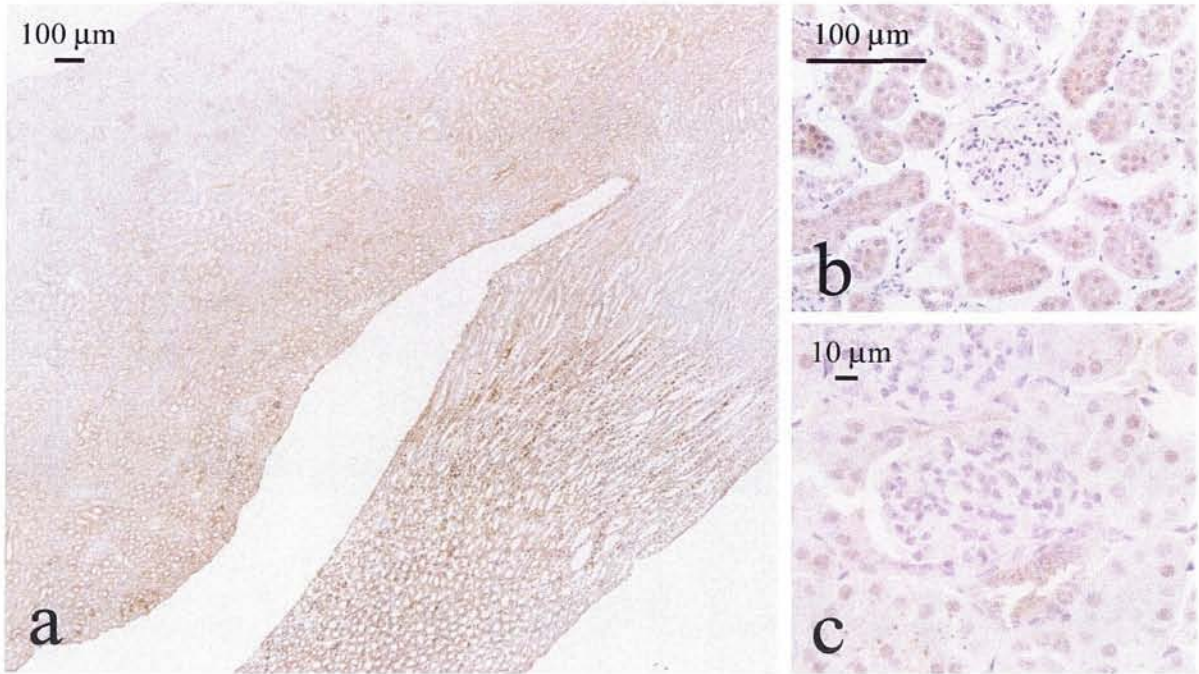


図 12 腎臓における染色像

a:腎実質、b:腎皮質、c:腎小体

4. 考察

CQ は3級アミンを持つ分子量 319.9 の薬物であり、シトクロム P450 系酵素によって脱アルキル化を受けてデスエチルクロロキン(DCQ)や BDCQ に代謝される(図 2)(Ducharme and Farinotti, 1996; Projean *et al.*, 2003)。CQ はハプテンであるので、抗 CQ 抗体を作製する為には高分子のキャリアタンパクと結合させる必要がある。しかし、CQ 自体とタンパクの結合は化学構造上極めて困難であるので、CQ に近似した構造で、かつ、BSA 等のタンパクと化学結合可能な一級アミンを持つ BDCQ を用いて免疫抗原を作製した。キャリアタンパクとの結合には、架橋試薬としてグルタルアルデヒドやカルボジイミド等を用いる方法があるが、著者らは Fujiwara らの方法に従って架橋試薬として GMBS を用い、チオール基 18 個を導入した MS-BSA と結合させることで免疫原 BSA-BDCQ を作製した(Fujiwara *et al.*, 1983)。その結果、BSA 1 分子に対して 2 分子の BDCQ が結合した免疫抗原 BSA-BDCQ を得ることができた。

BSA-BDCQ を用いてウサギの免疫を行った結果、免疫開始から約 2 ヶ月後に抗体価はプラトーとなり、本 ELISA システムにおいて約 10,000 倍希釈でも検出可能な高い抗体価を持つ抗血清が得られた。一般的に、抗体ができにくいハプテンでは安定した抗体価が得られるまでに 3 ヶ月を必要とすることもであるとされるが(大海忍, 2004)、本研究においては約 2 ヶ月で十分な抗体価を持つ抗 CQ 抗体(PAC)を得ることができた。

ELISA システムの固相化抗原と PAC の反応における CQ 等の反応阻害について調べた結果、PAC は CQ と BDCQ には強い反応性を示し(IC_{50} = 8 nM, 17 nM)、また別種の抗マラリア薬のアモジアキンに対しては反応性を示したが(IC_{50} = 158 nM)、CQ 類似化合物の 4,7-ジクロロキノリンやその他の抗マラリア薬のプリマキンとキニーネに対する交叉反応は認められなかった。このことから、PAC は 4-アミノ-7-クロロキノリン部分をエピトープとする抗体を含むポリクローナル抗体であることが確認された。

PAC を用いて免疫組織染色を行うに当たり、組織固定法は Ishiyama らの方法に従い、最適な染色濃度として 1,000 倍希釈した PAC を用いて検討を行った(Ishiyama *et al.*, 1987)。なお、上述の通り、PAC は 4-アミノ-7-クロロキノリン部分をエピトープとする為、染色部位は CQ 自体や DCQ、BDCQ などの CQ 代謝物を含めた CQ 類(以下、CQs)に反応しているものと考えられた。また、通常 PAC と CQ 吸収 PAC を用いた場合の染色像を比較し、図 8a, b の様に通常 PAC における染色部位が CQ 吸収 PAC において染色されなかった部位を CQ 特異的な染色部位と判断し、各組

織における染色部位を調べた。

脳では脈絡叢、特に脈絡上皮細胞に強い染色が認められた。これは Kaur らの報告を支持するものであった(Kaur, 1997)。Kaur らは CQ を 7~21 日間ラット腹腔内に投与した検討において、脈絡上皮細胞中のライソゾームの数と大きさが著明に増加したこと報告している。ライソゾームは CQ の様な弱塩基性化合物をよく取り込むことが知られており、本研究で得られた結果は、CQs が血液-脊髄関門に重要な役目を果たす脈絡上皮細胞のライソゾームに集積している所見が得られたものと考えられる(Ohkuma and Poole, 1981)。

心臓においては、心臓弁の膠原性結合組織を除いた心筋細胞全般、特にプルキンエ細胞によく分布することが示された。プルキンエ細胞は心臓の刺激伝導系の一部をなし、固有心室筋細胞よりも大きく、収縮蛋白が少ないとされる(Young, 2001)。その細胞内にはグリコーゲンが比較的多く、酸素不足に対して抵抗性が高いという特徴を持つ。また、プルキンエ細胞は薬物誘導性の early-after-depolarization を優先的に産生し、近接する心室筋を興奮させることによって torsade de pointes 不整脈を引き起こすとされている(Schram *et al.*, 2002)。本研究では、CQs がどの様な機序で特にプルキンエ細胞に集積するのかを明らかにできなかった。しかしながら、プルキンエ細胞が他の心筋細胞とは異なる細胞組成であることなどから、薬剤の浸透性や親和性に差異を生じる可能性は十分に考えられる。本研究での光顕レベルの免疫組織染色法ではその詳細を明らかにすることは困難であり、これら細胞に対する CQ の分布様式に差があるか、否かについては異なる実験系での検討が必要である。

肺臓では、気管粘膜や粘液分泌細胞である II 型肺胞細胞の染色が認められた。これは、CQs が II 型肺胞細胞から分泌されるリン脂質を含む脂溶性の高いサーファクタントプロテインなどの粘液と共に気管粘膜や肺胞表面に分泌されていることを示す所見であるものと考えられる。

先に述べた様に、CQ は肝臓においてシトクロム P450 系酵素によって速やかに脱アルキル化反応を受けて DCQ や BDCQ に代謝される。本研究の結果、CQs は肝門管周辺よりも中心静脈周辺細胞によく分布することが示された。これは CQ 代謝に対する肝小葉各領域の機能の違いを反映した結果であるものと考えられる。つまり、肝小葉は肝門管周辺 (zone1)、中央部 (zone2)、中心静脈周辺 (zone3) の 3 つの領域に分けられ、zone1 には zone3 に比べてグルタチオンがより多く含まれ、zone3 では zone1 に比べてシトクロム P450 がより多く含まれることが知られている(Treinen-Moslen, 2001)。つまり、CQs は中心静脈周辺細胞によく分布して、シトクロム P450 系酵素によって活発に

代謝を受けていることを示す所見であると考え。

薬物やその代謝物の腎臓から尿への排泄・体内への再吸収経路としては、3つの過程(糸球体濾過、能動的尿細管分泌、受動的尿細管再吸収)を経て行われる(Benet *et al.*, 1996)。本研究において尿細管細胞は糸球体よりも強く染色され、これはCQの排泄が糸球体よりも尿細管で優位に行われているとする報告と一致する所見であった(Ducharme and Farinotti, 1996)。また、近位尿細管よりも遠位尿細管でより強い染色が認められ、これはメタンフェタミンの組織内分布を同様の検討で調べたIshiyamaらの報告と類似した結果であった(Ishiyama *et al.*, 1987)。つまり、本結果はメタンフェタミンやCQの様な弱塩基性薬物は遠位尿細管と集合管において優位に分泌や再吸収を受けることを示した所見であるものと考え。

本研究で得られたCQsの分布は、CQやCQ代謝物の物理化学的性質に一致する結果であった。しかし、CQsの心臓におけるプルキンエ細胞への局在の理由は明らかにできなかった。CQの急性毒性症状が心臓の興奮伝導障害であることを考慮しても、本研究結果のさらなる追究は重要であり、免疫電顕等を用いた細胞レベルでの検討が必要である。

VIII. 抗 CQ モノクローナル抗体(MAC)を用いた試料中 CQ 濃度の簡易半定量システムの開発

1. 材料

1) 試薬

免疫抗原としては第VII章と同一の BSA-BDCQ を用いた。その他の試薬類は全て特級品を用いた。

2) 実験動物

実験動物としてマウス(BALB/c、雄性、約 20 g)を用いた。なお、動物実験は熊本大学動物実験等に関する規則に従って行った。

3) 細胞培養用培地

細胞培養用試薬類は、何れもクリーンベンチ内で下記の様に調製した。

RPMI 培地 : RPMI Medium 1640 (Invitrogen) 20.8 g を精製水 1.9 l に溶解し、炭酸水素ナトリウム 4.0 g を加え、1 M 塩酸で pH 6.8 に調製した。

Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) を 10 ml (終濃度が各々 50 units/ml、50 µg/ml) 加え、精製水で 2 l として濾過滅菌を行った。

HT 培地 : RPMI 培地 400 ml に 100×HT supplement (Invitrogen) 4.5 ml を濾過滅菌して加え、FCS (Biosource) 45 ml を無菌的に加えて調製した。

HAT 培地 : RPMI 培地 180 ml に 50×HAT supplement (Invitrogen) 4 ml を濾過滅菌して加え、FCS 20 ml を無菌的に加えて調製した。

無血清培地 : エス・クロン SF-B (三光純薬) の基礎培地 10.7 g を精製水 950 ml に溶解し、炭酸水素ナトリウム 2.2 g を加えて精製水で 1 l とした。濾過滅菌を行った後、添加剤 10 ml を無菌的に加えた。

4) マウスミエローマ細胞

液体窒素にて保存しているミエローマ細胞(P3/NS-1)を37°Cの温浴中で解凍し、直ちにRPMI培地に懸濁し、1,000 rpmで5分間遠心して細胞を洗浄した。上清を取り除いた後、10%FCSを含むRPMI培地5 mlに懸濁し、小フラスコで培養した。培養開始2日後より、10%FCSを含むRPMI培地に、10、20、30 µg/mlの8-アザグアニンとなる様に段階的に濃度を上げた培地で各3日間ずつ培養し、ハイブリドーマの作製に用いた。

5) フィーダー細胞

免疫を行っていないマウスの腹腔内に2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン0.5 mlを投与し、3~4日経過後に頸椎脱臼によってマウスを屠殺した。マウスの全身を70%エタノールで消毒した後、クリーンベンチ内で腹部の表皮を開き、腹壁を露出した。注射器で腹腔内にRPMI培地6 mlを注入し、注射器を刺したままで腹部を穏やかに揉んだ。その後、注入した培養液を腹腔内浸出細胞と共に回収し、1,000 rpmで5分間遠心した後、上清を取り除いた。沈渣を10%FCSを含むRPMI培地10 mlに懸濁し、細胞数を数えた後、 2×10^4 個/0.1 ml(ウェル)となる様に同培地で希釈、培養し、ハイブリドーマ細胞の増殖に必要なタンパク質を合成、分泌するフィーダー細胞として用いた。

6) 電気泳動用溶液

電気泳動用溶液類は下記の様に調製した。

試料調製溶液 : 20% グリセリン、0.02% CBB R-250、1% 2-メルカプトエタノール及び1% SDSを含む10 mM Tris-塩酸緩衝液(pH 6.8)。

泳動液 : 10×Tris/Glycine/SDS Bufferを精製水で10倍希釈した溶液。

固定液 : 10% 酢酸を含む50% メタノール溶液。

染色液 : 10% 酢酸と、0.05% CBB R-250を含む10% メタノールの濾過溶液。

脱色液 : 10% 酢酸を含む30% メタノール溶液。

7)ドットブロット用溶液

ドットブロット用溶液類は下記の様に調製した。

coating buffer : 第Ⅶ章の ELISA と同様の coating buffer。

washing buffer : 第Ⅶ章の ELISA と同様の washing buffer。

blocking buffer : 2%BSA を含む coating buffer。

substrate solution: DAB3 mg を 0.05 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 15 ml に溶解し、
使用直前に過酸化水素 10 μ l を加えた。

2. 方法

1) 抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC) の作製

(1) 抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC) 産生ハイブリドーマ

BALB/c 雄性マウス (4 週齢) 3 匹に対し、初回免疫は 1 匹当たり BSA-BDCQ 0.1 mg とフロイトの完全アジュバントを混合して均一に乳化したもの (0.4 ml/匹) を、2 回目以降の免疫は 2 週間おきにタンパク 0.05 mg とフロイトの不完全アジュバントを乳化したものを腹腔内に投与した。マウスの尾静脈から少量採血を行い、抗 CQ 抗体活性の上昇を第Ⅶ章で述べた ELISA で確認し、抗体活性の最も高かったマウスを 4 回目の免疫 5 日後にハイブリドーマの作製に用いた。

ハイブリドーマの作製は常法に従い、マウスの脾細胞を用いて行った (辻村邦夫, 稲垣昌樹, 2004)。エーテル麻酔の後にマウスの全身をエタノール消毒し、クリーンベンチ内で十分に瀉血する。その後、開腹して脾臓を剔出し、培養液中で細切して脾細胞を回収した。マウスミエローマ細胞に対して脾細胞が 10 倍数になる様に混合し、ポリエチレングリコール法で細胞融合を行った。同細胞は HAT 培地中によく懸濁し、フィーダー細胞の生育した 96 ウェルプレートに 1×10^5 個ずつ加えた。CO₂ インキュベーターで培養開始 1 週間経過後から徐々に HT 培地に交換し、コロニーを形成した各ウェルについて抗体活性の確認を行った。活性を認めたウェルについて限界希釈法でクローニングを行い、抗体産生株のモノクローンを確立した後に HT 培地を無血清培地へと段階的に交換した。最終的に無血清培地で洗浄した抗体産生細胞を大量培養し、その培養上清を粗抗体溶液として 0.1% になる様アジ化ナトリウムを加えて冷蔵保存した。また、細胞は 10% ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む HT 培地で液体窒素内に凍結保存した。

(2) 抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC) の精製

MAC の精製は Protein G Sepharose™ 4 FF ゲルによるアフィニティークロマトグラフィーで行った。すなわち、培養上清約 50 ml に対してゲル 0.5 ml を加え、4 °C で一晩転倒混和し、スタンドに立ててカラムを静置してフロースルーを除去する。その後、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) でカラムを洗浄し、0.1 M グリシン-塩酸溶液 (pH 2.7) で 0.5 ml ずつ 10 本 (合計 5 ml) を溶出する。溶出分画は直ちに 1 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.5) で中和し、280 nm に吸収の認められたタンパク分画を集めて 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 3 l で一晩透析を行った。得られた精製抗体は BCA 法でタンパク定量を行い、ELISA で抗体のタンパク濃度当たりの活性を検定し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE) で純度の確認を行った。

(3) 抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC) のキャラクタリゼーション

得られた MAC のサブクラス決定は、Mouse immunoglobulin screening/isotyping kit (ZYMED Laboratories Inc.) を用いて行った。

2) 抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC) を用いたドットブロット法による試料中 CQ 濃度の半定量法

(1) 試料中 CQ 濃度のドットブロット法による半定量法

CQ 濃度の半定量は図 13 に示す阻害試験法を応用したドットブロット法で行った。まず、検出用紙として 0.5×0.5 cm のニトロセルロース膜を 2 枚準備する。これに、coating buffer に溶解した 0.1 µg/µl BSA-BDCQ 溶液 1 µl を各々滴下・風乾して BSA-BDCQ を固相化し、blocking buffer でブロッキングしたものを用意する。次に、0.2 ml の試料溶液 2 本に、精製 MAC 28 2 ng と 10 ng をそれぞれ添加して室温にて 30 分間プレインキュベーションする。その後、検出用紙を試料溶液に浸漬して室温下で 1 時間インキュベーションし、washing buffer で洗浄。次に、二次抗体溶液 (1,000 倍希釈した HRP 標識ヤギ抗マウス IgG) に浸漬して室温下で 1 時間インキュベーションし、washing buffer で洗浄。最後に、substrate solution に 30 分間浸漬して反応させ、固相化部分の発色を確認する。試料溶液中の CQ が少量の場合、プレインキュベーションによっても MAC は枯渇せず膜抗原と反応して発色を確認されるが、CQ が過剰量存在すると、MAC は枯渇して発色しない。このシステムを用いて血清中 CQ の治療濃度 (0.02-0.5 µg/ml)・中毒濃度 (0.5-3.0 µg/ml)・

致死濃度 (3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上) とされる 3 つの濃度範囲を判別する様検査条件を設定した (Beselt, 2000; Winek *et al.*, 2001; Musshoff *et al.*, 2004)。

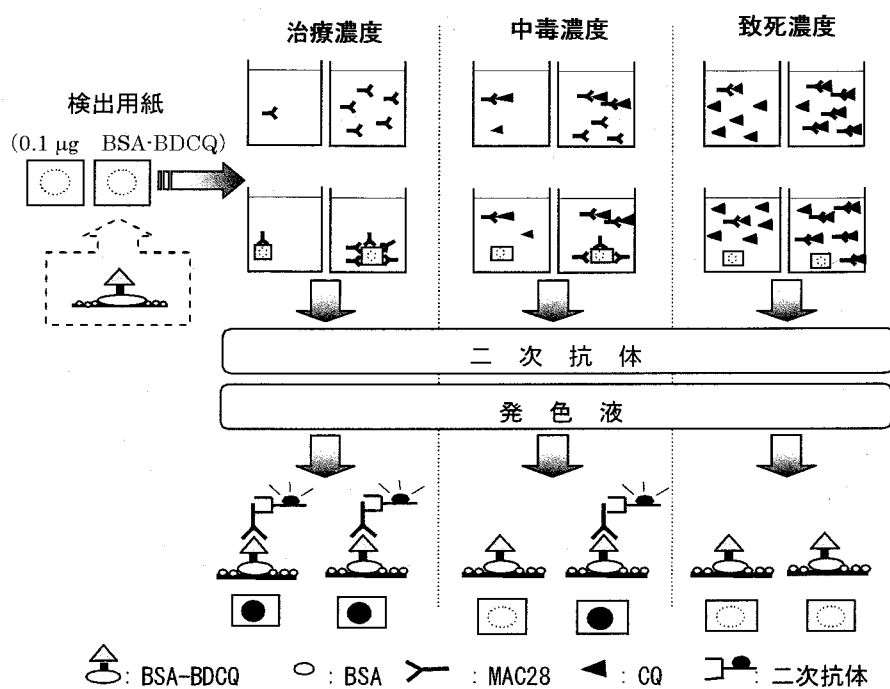


図 13 ドットブロット法による CQ 濃度の半定量

(2) ブラインドテストによる検定

作成した CQ 濃度半定量システムの有効性を確認する為に検査者 2 名によるブラインドテストを行った。すなわち、検査者 2 名が濃度を知らされずに既知濃度の CQ 溶液を試料として検査し、治療・中毒・致死濃度の判定を行い、その結果の正答率を調べた。各 CQ 溶液は、0 (2 検体)、0.1 (2 検体)、0.2、0.4、0.75 (何れも 1 検体)、1.0 (2 検体)、1.5、2.0 (何れも 1 検体)、3.0 (2 検体)、4.0 (2 検体) 及び 8.0 (1 検体) $\mu\text{g}/\text{ml}$ の合計 16 検体を用いた。

3. 結果

1) 抗 CQ モノクローナル抗体 (MAC) の作製とそのキャラクタリゼーション

BSA-BDCQ をマウスに免疫した結果、全てのマウス血清から抗 CQ 抗体活性が認められた。そこで、活性の最も高いマウスの脾臓を摘出し、常法に従ってハイブリドーマを作製した。高い抗 CQ 抗体活性の認められたハイブリドーマ (MAC28 株) を最終的に単離して、大量培養した培養上清から抗体のサブクラスを調べた結果、そのサブクラスは IgG₁ の κ であった。そこで、Protein G ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって培養上清 (粗抗体溶液) から抗体の精製を行った。その結果、精製抗体 (MAC28) は培養上清に比べてタンパク量当たりの ELISA 活性は約 10 倍上昇し、図 14 に示す様に SDS-PAGE による電気泳動像では IgG のバンド (50, 25 KDa) のみが確認され、高純度に精製されたことが示された。

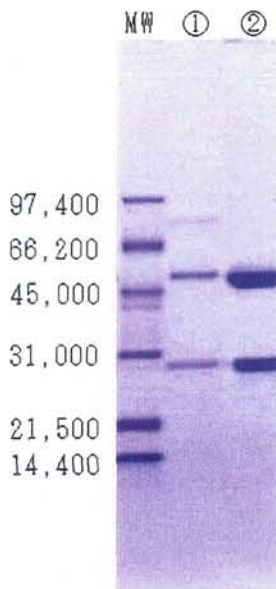


図 14 SDS-PAGE による各試料の泳動像

MW:分子量マーカー、①:培養上清、②:精製抗体 (MAC28)

2) 試料中 CQ 濃度のドットブロット法による半定量法

MAC28を用いて図 13 に示すドットブロット法による CQ 濃度の半定量分析を行った。血清中 CQ 濃度として治療、中毒、致死濃度とされる 3 つの領域を判定する様に設定した結果、感度の高いシステム(0~0.5 µg/ml で発色)として MAC28 を 2 ng、感度の低いシステム(0~3.0 µg/ml で発色)として 10 ng を予め試料溶液とプレインキュベーションすることによって表 3 に示した CQ の半定量分析が可能となった。つまり、検査用紙 2 枚が共に発色する時の試料中 CQ 濃度は治療濃度以下、感度の高い検査用紙が発色しなくなると中毒濃度、2枚共に発色しない時は致死濃度以上であることが判定可能となった。

表 3 CQ 濃度半定量システムの判定領域

	血清中 CQ 濃度 (µg/ml)	MAC28 (ng)			
		2	10		
治療濃度	0.02~0.5	+		+	
中毒濃度	0.5~3.0	-		+	
致死濃度	3.0~	-		-	

+: 発色あり、-: 発色なし

このシステムを用いたブラインドテストの結果を表 4 に示した。検査者 2 名は何れも 88、94%と高い正答率で判定を行っていた。

表 4 ブラインドテストの結果

検査者	正答数/サンプル数	正答率(%)
A	14/16	88
B	15/16	94

4. 考察

CQ の簡易検出法を考案するに当たって、抗 CQ モノクローナル抗体自体の酵素や金コロイドによる標識化を行うことを事前に検討したが、一般に抗体の標識化を効率よく行うには、抗体タンパク自体が高純度であることが望ましいことである。ところで、ハイブリドーマは牛胎仔血清を含んだ培養液を用いて培養を行うのが一般的であり、牛胎仔血清中には多量のウシ抗体等が含まれているので、目的の抗体を含む培養上清からそれらを分離・除去することは精製の手技として煩雑になる。そこで本研究においては、作製・単離したハイブリドーマ MAC28 株の培養液を徐々に無血清培地へと置換し、その培養上清を粗抗体溶液として回収し、マウス IgG₁ と親和性の高い Protein G アフィニティクロマトグラフィーにて精製した。その結果、得られた精製抗体 MAC28 は電気泳動像においても牛血清に多量に含まれるトランスフェリン (76 kDa) や BSA (67 kDa) を含まない高純度な抗体を効率よく得ることができた。

市販の薬物検出キットは「対象薬物の有無のみ」を判定するシステムが大半であり、定量分析を行うには別途の機器分析を行わなければならない。しかし、分析機器や人材の不足するタンザニアなどの発展途上国では、「対象薬物の有無のみ」だけでなく半定量分析までもが可能な薬物検出システムがより有用であると考えた。そこで本研究では、被験者がどの程度 CQ を服用していたかについても判定可能なシステムの開発を目指し、MAC28 を用いて作成したドットブロット法による半定量法は、試料中の CQ 濃度を 3 段階に判定可能なシステムとした。つまり、試料中の CQ 濃度が治療血清濃度以下であれば未検出となり、中毒濃度以上となった時に初めて検知、中毒濃度か致死濃度かを半定量するという特徴を持つシステムである。このシステムを用いて、2 名の検査者によって合計 16 サンプルの判定を実施してもらった結果、各々の検査者が 88,94% の高い正答率でもって試料濃度の判定を行うことができた。

「対象薬物の有無のみ」だけでなく半定量まで行うことができる簡易薬物検出キットの開発は、発展途上国のみならず、先進国の救急医療や検屍・検案の現場などにおいて今後ますます求められるものと考えられる。本研究で考案したシステムは、異なる薬物についても応用可能なものであるが、現時点ではあくまでも研究室にて実施可能なものであって実践的な応用は実施されていない。この半定量法には、反応条件の改良や現在のところ判定までに約 3 時間を必要とするのでその時間の短縮化などの他に、CQ 代謝物との反応も考慮した判定領域の設定など、今後、再考・改善すべきことが沢山ある。この様な半定量システムの開発への需要の高まりは容易に予想されること

であり、今後も研究を継続することが急務である。

IX. 結語

本研究では CQ に関する法中毒学的研究として、第VI章では HPLC による CQ 分析方法を示し、急性 CQ 中毒死事例における CQ の体組織分布を調べた(Yonemitsu *et al.*, 2002; Yonemitsu *et al.*, 2005)。その中で、血液の採取部位によって薬物濃度に差異があること、そして体組織中薬物濃度もまた死因の判断に重要であることを示し、これら分析結果の報告と蓄積が死因の確定診断に有用となることを示した。また、第VII章では抗 CQ ポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色法によって CQ 急性中毒マウスにおける CQ の組織内分布を調べた。この様な抗薬物抗体を用いた免疫組織染色法は、投与した薬物の動態学的所見(吸収・分布・代謝・排泄)を各組織上で直接的に観察することを可能にし、その毒性発症機序に迫るアプローチとして有用であることを示した(Koreeda *et al.*, 2007a)。さらに、第VIII章では抗 CQ モノクローナル抗体を用いた CQ 濃度の半定量法を考案し、その有用性について言及した。

これらの研究は何れもタンザニアとの交流を端緒として抗マalaria薬 CQ について行ってきたものであり、法中毒学において重要な薬毒物のスクリーニング法や、分析法の開発研究並びに急性中毒自体に関する中毒学的研究遂行の重要性を改めて示したものである。しかし、これらの中において特に急性中毒自体についての研究は、各種薬毒物による急性中毒死に対する社会的関心の低さなども要因となって、病態に関する研究が著しく不足しているものと考えられる。しかし、急性中毒の病態に関する研究成果は、急性中毒機序の理解の他に、急性中毒患者の臨床像の理解や、より効果的な治療法や治療薬の開発を行う上で極めて重要なものであり、今後も本研究の追究を通じて各種急性中毒に関する知見の蓄積を進めて行きたいと考えている。

X. 参考論文

- Araki, N., Ueno, N., Chakrabarti, B., Morino, Y., and Horiuchi, S. (1992). Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 10211–10214.
- Ball, D. E., Tagwireyi, D., and Nhachi, C. F. (2002). Chloroquine poisoning in Zimbabwe: a toxicoepidemiological study. *Journal of Applied Toxicology* **22**, 311–315.
- Benet, L. Z., Kroetz, D. L., and Sheiner, L. B. (1996). In *"Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics"* McGraw-Hill, 3–27, New York.
- Beselt, R. C. (2000). In *"Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man"* Chemical Toxicology Institute, 165–168, California.
- De Letter, E. A., Espeel, M. F., Craeymeersch, M. E., Lambert, W. E., Clauwaert, K. M., Dams, R., Mortier, K. A., and Piette, M. H. (2003). Immunohistochemical demonstration of the amphetamine derivatives 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) in human post-mortem brain tissues and the pituitary gland. *International Journal of Legal Medicine* **117**, 2–9.
- Ducharme, J., and Farinotti, R. (1996). Clinical pharmacokinetics and metabolism of chloroquine. Focus on recent advancements. *Clinical Pharmacokinetics* **31**, 257–274.
- Ducharme, J., and Farinotti, R. (1997). Rapid and simple method to determine chloroquine and its desethylated metabolites in human microsomes by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences & Applications* **698**, 243–250.
- Fujiwara, K., Isobe, M., Saikusa, H., Nakamura, H., Kitagawa, T., and Takahashi, S. (1983). Sensitive enzyme immunoassay for the quantification of bleomycin using beta-D-galactosidase as a label. *Cancer Treatment Reports* **67**, 363–369.
- Grabarek, Z., and Gergely, J. (1990). Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Analytical Biochemistry* **185**, 131–135.

- Houze, P., de Reynies, A., Baud, F. J., Benatar, M. F., and Pays, M. (1992). Simultaneous determination of chloroquine and its three metabolites in human plasma, whole blood and urine by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A* 574, 305-312.
- Ishiyama, I., Mukaida, M., Yoshii, T., and Suyama, H. (1987). Histochemical demonstration of methamphetamine by immunocytochemistry. *Journal of Forensic Sciences* 32, 658-672.
- Kaur, C. (1997). Effects of chloroquine on the ependyma, choroid plexus and ependymal cells in the lateral ventricles of rats. *Journal fur Hirnforschung* 38, 99-106.
- Keller, T., Schneider, A., Lamprecht, R., Aderjan, R., Tutsch-Bauer, E., and Kissler, W. (1998). Fatal chloroquine intoxication. *Forensic Science International* 96, 21-28.
- Koreeda, A., Yonemitsu, K., Kohmatsu, H., Mimasaka, S., Ohtsu, Y., Oshima, K., Fujiwara, K., and Tsunenari, S. (2007a). Immunohistochemical demonstration of the distribution of chloroquine (CQ) and its metabolites in CQ-poisoned mice. *Archives of Toxicology* 81, 471-478.
- Koreeda, A., Yonemitsu, K., Mimasaka, S., Ohtsu, Y., and Tsunenari, S. (2007b). An accidental death due to Freon 22 (monochlorodifluoromethane) inhalation in a fishing vessel. *Forensic Science International* 168, 208-211.
- Koreeda, A., Yonemitsu, K., Ng'walali, P. M., Muraoka, N., and Tsunenari, S. (2001). Clozapine-related fatality. Postmortem drug levels in multiple psychoactive drug poisoning. *Forensic Science International* 122, 48-51.
- Kuhlman, J. J., Jr., Mayes, R. W., Levine, B., Jones, R., Wagner, G. N., and Smith, M. L. (1991). Chloroquine distribution in postmortem cases. *Journal of Forensic Sciences* 36, 1572-1579.
- Lambert, W., Meyer, E., Van Bocxlaer, J., De Leenheer, A., and Piette, M. (1997). Relevance of toxicological screening for chloroquine in nonmalarious areas. *Journal of Analytical Toxicology* 21, 321-322.
- Muhm, M., Stimpfl, T., Malzer, R., Mortinger, H., Binder, R., Vycudilik, W., Berzlanovich, A., Bauer, G., and Laggner, A. N. (1996). Suicidal chloroquine poisoning: clinical course,

- autopsy findings, and chemical analysis. *Journal of Forensic Sciences* 41, 1077–1079.
- Musshoff, F., and Madea, B. (2002). Demonstration of a chloroquine fatality after 10-month earth-grave. *Forensic Science International* 125, 201–204.
- Musshoff, F., Padosch, S., Steinborn, S., and Madea, B. (2004). Fatal blood and tissue concentrations of more than 200 drugs. *Forensic Science International* 142, 161–210.
- Nagao, M., Takatori, T., Wu, B., Terazawa, K., Gotouda, H., Akabane, H., Inoue, K., and Shimizu, M. (1991). Immunohistochemical localization of paraquat in lung and brain. *Medicine, Science & the Law* 31, 61–64.
- Ohkuma, S., and Poole, B. (1981). Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. *Journal of Cell Biology* 90, 656–664.
- Projean, D., Baune, B., Farinotti, R., Flinois, J. P., Beaune, P., Taburet, A. M., and Ducharme, J. (2003). In vitro metabolism of chloroquine: identification of CYP2C8, CYP3A4, and CYP2D6 as the main isoforms catalyzing N-desethylchloroquine formation. *Drug Metabolism & Disposition* 31, 748–754.
- Riou, B., Barriot, P., Rimailho, A., and Baud, F. J. (1988). Treatment of severe chloroquine poisoning. *New England Journal of Medicine* 318, 1–6.
- Sanchez-Chapula, J. A., Navarro-Polanco, R. A., Culberson, C., Chen, J., and Sanguinetti, M. C. (2002). Molecular determinants of voltage-dependent human ether-a-go-go related gene (HERG) K⁺ channel block. *Journal of Biological Chemistry* 277, 23587–23595.
- Schram, G., Pourrier, M., Melnyk, P., and Nattel, S. (2002). Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circulation Research* 90, 939–950.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid.[erratum appears in *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279]. *Analytical Biochemistry* 150, 76–85.
- Tracy, J. W., Webster, LT. (1996). In "Goodman and Gilman's the pharmacological basis of

- therapeutics*" McGraw-Hill, 965-985, New York.
- Traebert, M., Dumotier, B., Meister, L., Hoffmann, P., Dominguez-Estevez, M., and Suter, W. (2004). Inhibition of hERG K⁺ currents by antimalarial drugs in stably transfected HEK293 cells. *European Journal of Pharmacology* 484, 41-48.
- Treinen-Moslen, M. (2001). In "*Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons*" McGraw-Hill, 471-489, New York.
- Walker, O., and Ademowo, O. G. (1996). A rapid, cost-effective liquid chromatographic method for the determination of chloroquine and desethylchloroquine in biological fluids. *Therapeutic Drug Monitoring* 18, 92-96.
- Wehner, F., Wehner, H., Schieffer, M. C., and Subke, J. (2000a). Immunohistochemical detection of methadone in the human brain. *Forensic Science International* 112, 11-16.
- Wehner, F., Wehner, H. D., Subke, J., Meyermann, R., and Fritz, P. (2000b). Demonstration of morphine in ganglion cells of the hippocampus from victims of heroin overdose by means of anti-morphine antiserum. *International Journal of Legal Medicine* 113, 117-120.
- Weingarten, H. L., and Cherry, E. J. (1981). A chloroquine fatality. *Clinical Toxicology* 18, 959-963.
- Winek, C. L., Wahba, W. W., Winek, C. L., Jr., and Balzer, T. W. (2001). Drug and chemical blood-level data 2001. *Forensic Science International* 122, 107-123.
- Yonemitsu, K., Koreeda, A., Kibayashi, K., Ng'walali, P., Mbonde, M., Kitinya, J., and Tsunenari, S. (2005). HPLC analysis of anti-malaria agent, chloroquine in blood and tissue from forensic autopsy cases in Tanzania. *Legal Medicine* 7, 113-116.
- Yonemitsu, K., Koreeda, A., Ohtsu, Y., Kibayashi, K., Mbonde, M., Kitinya, J., and Tsunenari, S. (2002). Chloroquine, a drug for suicide in Tanzania, Africa. *Conference Proceedings of the 6th International Conference in Clinical Forensic Medicine of the World Police Medical Officers*, 44.
- Young, B. (Ed.) (2001). In "*機能を中心とした図説組織学*" Tokyo, 144-156, Edinburgh.
- 大海忍 (2004). In "*抗ペプチド抗体実験プロトコール*" 秀潤社, 28-50, 東京.
- 梶谷明代, 海保正義, 森啓, 岡田保誠, 向田政博, 石山昱夫 (1989). *メタンフェタミンの排泄に*

関する組織化学的研究. *日本法医学雑誌* 43, 262-280.

是枝亜子, 米満孝聖, 樋口章浩, 木林和彦, 恒成茂行 (1998). パラコートの体内分布による服毒時間の推定—無理心中事件の犯行順序の判断への応用—. *法医学の実際と研究* 41, 95-99.

辻村邦夫, 稲垣昌樹 (2004). In "抗ペプチド抗体実験プロトコール" 秀潤社, 106-129, 東京.

米満孝聖, 是枝亜子, 大津由紀, ポール ワラリ, 恒成茂行 (2002). マルチサイトサンプリングによる血中エタノールの分析—熊本大学における6年間(1994年～1999年)の法医解剖例の検討—. *日本法医学雑誌* 56, 248-53

米満孝聖, 是枝亜子, 幸松宏恵, 大津由紀, 美作宗太郎, 恒成茂行 (2007). ジフェンヒドラミンが関与した2自殺事例. *中毒研究* 20, 137-40.