

## 原 著 論 文

Instant-View™ M-1 におけるベンゾジアゼピン  
類似薬物とその代謝物の交差反応性について鳥越 愛子<sup>1)</sup>, 奈女良 昭<sup>2)</sup>, 有馬 陽介<sup>2)</sup>, 當房 浩一<sup>2)</sup>  
田 島 隆<sup>2)</sup>, 白石 弘章<sup>2)</sup>, 長尾 正崇<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 広島大学大学院医歯薬学総合研究科法医学<sup>2)</sup> 広島大学大学院医歯薬保健学研究院法医学

原稿受付日 2013年3月4日, 原稿受領日 2013年8月20日

Cross-reactivity of Instant-View™ M-1 for detection of benzodiazepine-related  
drugs and their metabolites in urineAiko Torikoshi<sup>1)</sup>, Akira Namera<sup>2)</sup>, Yousuke Arima<sup>2)</sup>, Hirokazu Toubou<sup>2)</sup>,  
Takashi Tajima<sup>2)</sup>, Hiroaki Shiraishi<sup>2)</sup>, Masataka Nagao<sup>2)</sup><sup>1)</sup> Department of Forensic Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University<sup>2)</sup> Department of Forensic Medicine, Institute of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University

—Summary— (Jpn J Clin Toxicol 2014 ; 27 : 33-38)

Immunoassays are useful methods for the determination of regulated drugs in clinical and forensic laboratories. Although the Instant-View™ M-1 (IV M-1) immunoassay kit is frequently used to screen drugs in laboratories in Japan, basic information about the IV M-1 such as its specificity and reactivity is not available. In this study, we determined the specificity and cross-reactivity of IV M-1 for the detection of benzodiazepine-related drugs and their metabolites in urine.

The IV M-1 could detect triazolobenzodiazepines such as triazolam in urine at concentrations  $\geq 300$  ng/mL. However, thienodiazepines such as etizolam could not be detected because of lack of cross reactivity. A correlation was observed between the structure of the metabolites and the reactivity of the kit; 4-hydroxy metabolites of alprazolam and triazolam were detectable, whereas  $\alpha$ -hydroxy metabolites were not. Furthermore, 7-amino metabolites such as nitrazepam could not be detected at any concentration, including high concentrations.

The specificity and reactivity of various kits used for detection of drugs in urine are different. Therefore, it is necessary to consider the basic features of the kit used while assessing the results obtained.

**Key words** : Instant-View™ M-1, benzodiazepine, benzodiazepine metabolite, cross-reactivity, specificity

## はじめに

抗原抗体反応を利用した検査キットは、原因不明の意識障害時の薬物スクリーニングに用いられ、薬物関与の有無を判断するうえで重要な役割を担っている。日本国内で使用可能な検査キットの種類も増

加してきたが、これらの検査キットで検出可能な薬物の種類や濃度、いわゆる選択性や特異性、検出感度(カットオフ値)の違いなどを熟知せずに、どの検査キットを使用しても同じ結果が得られるなどキットの誤った解釈が散見される。

近年、簡便な操作や短時間で結果が得られる、ま

た安価であるなどの利点から Instant-View™ M-1 (以下 IV M-1 と略す) の使用が広まりつつあり, その有用性も報告されている<sup>1)~3)</sup>。IV M-1 は, 付属のピペットを用いて尿を検体滴下窓に滴下するのみで, 覚せい剤, 大麻, コカイン系麻薬, ベンゾジアゼピン類, バルビツール酸類, 三環系抗うつ薬の6種類の薬物を7分程度で検出できる検査キットである。フェネチルアミン系薬物の交差反応性については詳細な検討がなされているものの<sup>4)</sup>, それ以外の薬物群の特異性やカットオフ値についての報告は見当たらない。

筆者らは, 各種検査キットの評価を行うなかでベンゾジアゼピン類似薬物 (以下, BZD と略す) であり, 精神科領域で汎用されているエチゾラムを主成分とするデパス® 服用者の尿を検査しても Triage® DOA では陰性となること, エチゾラムの検出には AccuSign® BZO が適していることを報告した<sup>5)</sup>。そこで今回, IV M-1 の特異度表に未記載で, 血液中治療薬物濃度の幅が広いために比較的安全な薬剤として広く用いられているが<sup>6)</sup>, 大量服薬による急性中毒例が増加している BZD およびその代謝物に対する交差反応性とカットオフ値について詳細な検討を加えた。

## I 方法

### 1. 試薬

アルプラゾラムは和光純薬工業 (株) (大阪), アルプラゾラム代謝物 ( $\alpha$ -ヒドロキシアプラゾラム, 4-ヒドロキシアプラゾラム) とトリアゾラム代謝物 ( $\alpha$ -ヒドロキシトリアゾラム, 4-ヒドロキシトリアゾラム) は Biomol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA, USA), 7-アミノフルニトラゼパム, 7-アミノクロナゼパムと 7-アミノニトラゼパムは Cerillant (Round Rock, Texas, USA) より購入した。エチゾラムとクロチアゼパムは吉富薬品 (株) (大阪), エチゾラム代謝物 (M-III, M-VI) は田辺三菱製薬 (株) (大阪), トリアゾラムはファルマシア & アップジョン (株) (東京), プロチゾラムは日本ベーリンガーインゲルハイム (株) (東京), エスタゾラムとエスタゾラム代謝物 (M-II, M-VII) は武

田薬品 (株) (大阪) より譲り受けた。メタノールおよびアセトニトリルは HPLC/MS 用を, その他の試薬は特級品を用いた。

### 2. 検査デバイス

IV M-1 (ALFA Scientific Designs, Poway, CA) は, (株) テイエフビー (東京) より供与された。検査は, 取扱説明書の記載どおりに行った。反応性の評価および検出下限の検討に用いた尿は, 薬物を服用していない健康人の尿に人為的に薬物を添加して調製した。検討した各薬物濃度は Table 1 に示すとおりである。なお, 検討する薬物濃度は, IV M-1 の添付資料中の特異度表から該当する BZD の陽性となる濃度を参考に決定した。

## II 結果

各薬物の検査結果を Table 1 に示す。また, Triage® DOA と比較しやすいように, Triage® DOA で BZD 陽性となる濃度を Table に加えた。

### 1. エチゾラムとその代謝物に対する反応性 (Table 1A)

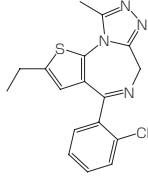
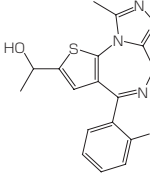
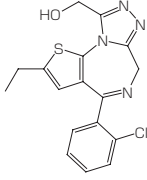
Triage® DOA では, 25,000 ng/mL 以上の濃度で陽性とされているため, 同じ濃度の添加尿を用いて検査したが IV M-1 では陰性であった。さらに高濃度 (100,000, 50,000 ng/mL) の添加尿で検査したが陰性であった。代謝物 M-III および M-VI においては, 100,000 ng/mL 添加尿では陽性であったが, それ以下の濃度では, 使用するロットによって異なる結果 (陽性となるロットと陰性となるロット) が認められた。これまでに尿中エチゾラムおよび代謝物濃度が, 100,000 ng/mL を超えている報告はなく, 実務上, IV M-1 もエチゾラム服用者尿のスクリーニングには不向きであることが判明した。

### 2. プロチゾラムおよびクロチアゼパムに対する反応性 (Table 1B)

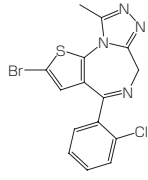
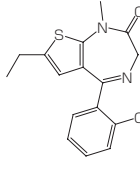
プロチゾラムまたはクロチアゼパムを異なる濃度 (100,000, 50,000 ng/mL) に調製した添加尿を検査した結果, いずれの濃度の添加尿でも陰性であった。

**Table 1 Specificity of Instant-View for detection of benzodiazepines and its metabolites in spiked urine**

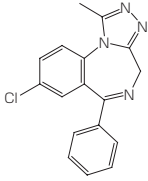
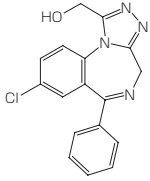
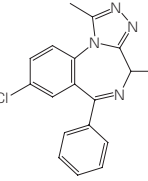
(A. Etizolam and its metabolites)

	Etizolam	M-III	M-VI
			
25,000	-	+/-	+/-
50,000	-	+/-	+/-
100,000	-	+	+
Triage® DOA	25,000	>25,000	>25,000

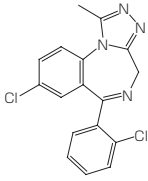
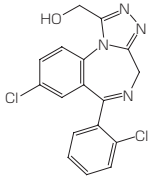
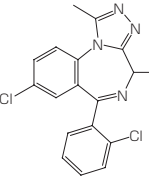
(B. Brotizolam and Clotiazepam)

	Brotizolam	Clotiazepam
		
50,000	-	-
100,000	-	-
Triage® DOA	700	ND

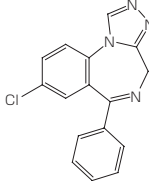
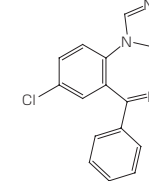
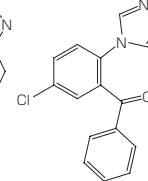
(C. Alprazolam and its metabolites)

	Alprazolam	$\alpha$ -OH Alprazolam	4-OH Alprazolam
			
100	+	-	+
300	+	-	+
Triage® DOA	450	400	500

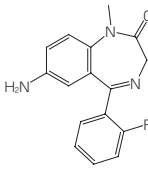
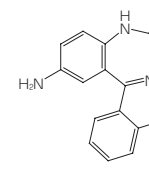
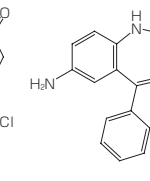
(D. Triazolam and its metabolites)

	Triazolam	$\alpha$ -OH Triazolam	4-OH Triazolam
			
100	-	-	-
300	+/-	-	+
500	NT	-	+
600	+	-	+
3,000	NT	-	NT
Triage® DOA	450	700	1,000

(E. Estazolam and its metabolites)

	Estazolam	M-II	M-VII
			
100	+	NT	NT
300	+	-	-
600	NT	-	-
1,000	NT	+	-
Triage® DOA	300	ND	ND

(F. 7-Amino-metabolites)

	7-NH <sub>2</sub> - Flunitrazepam	7-NH <sub>2</sub> - Clonazepam	7-NH <sub>2</sub> - Nitrazepam
			
1,000	-	-	-
5,000	-	-	-
Triage® DOA	2,000	7,500	ND

(Unit in table is ng/mL  
+ : positive, - : negative  
NT : not tested, ND : no data)

一方, Triage® DOA では, プロチゾラムは 700 ng/mL の添加尿で陽性となり, IV M-1 と比較すると低濃度まで検出可能である。

3. アルプラゾラムとその代謝物に対する反応性 (Table 1C)

IV M-1 の特異度表では, アルプラゾラムは 300

ng/mL 以上の濃度で陽性を示すと記載されているが, 100 ng/mL 添加尿で陽性となった。製造ロットの異なる製品でも検証したが, 他のロットにおいても 100 ng/mL 添加尿で陽性となり, 特異度表よりも高感度で検出できることが判明した。また, 代謝物の  $\alpha$ -ヒドロキシアルプラゾラムは, 検討したいずれの濃度 (300, 100 ng/mL) の添加尿でも陰性

となったが、4-ヒドロキシアルプラゾラムは検討したいずれの濃度 (300, 100 ng/mL) でも陽性となり、代謝部位の違いにより検出感度が大きく異なっていた。一方、Triage® DOAでは、アルプラゾラム、 $\alpha$ -ヒドロキシアルプラゾラムおよび4-ヒドロキシアルプラゾラムは、各々 450, 400 および 500 ng/mL の添加尿で陽性となり、IV M-1 と比較すると、未変化体と代謝物との間での検出下限の差が小さい。

#### 4. トリアゾラムとその代謝物に対する反応性 (Table 1D)

IV M-1 の特異度表では、トリアゾラムは 300 ng/mL 以上の濃度で陽性を示すと記載されているが、300 ng/mL を添加した尿では、陰性となるロットがあった。代謝物 $\alpha$ -ヒドロキシトリアゾラムは、検討したいずれの濃度 (3,000, 600, 500, 300, 100 ng/mL) の添加尿でも陰性となったが、4-ヒドロキシトリアゾラムは 300 ng/mL 以上の濃度 (600, 500, 300 ng/mL) の添加尿では陽性となった。トリアゾラムについてもアルプラゾラム同様に、代謝部位の違いにより検出感度が大きく異なった。一方、Triage® DOAでは、トリアゾラム、 $\alpha$ -ヒドロキシトリアゾラムおよび4-ヒドロキシトリアゾラムは、各々 400, 700 および 1,000 ng/mL の添加尿で陽性となり、IV M-1 と比較すると、未変化体と代謝物との間での検出下限の差が小さい。

#### 5. エスタゾラムとその代謝物に対する反応性 (Table 1E)

検討したいずれの濃度の添加尿 (1,000, 600, 300, 100 ng/mL) でも陽性であった。また、代謝物の M-II は 600 ng/mL 以下の濃度の添加尿では陰性となり、1,000 ng/mL の添加尿では陽性となったが、M-VII においては、いずれの濃度の添加尿でも陰性となり、代謝部位の違いにより検出感度が大きく異なっていた。一方、Triage® DOAでは、エスタゾラムは 300 ng/mL の添加尿で陽性となり、IV M-1 と比較すると検出下限が高い。

**Table 2 Summary of Triage® DOA and Instant-View™ M-1 results and comparison with the concentration of each benzodiazepine and its metabolites in urine**

Triage® DOA	Instant-View™ M-1	Drug concentration (ng/mL)
+	-	Triazolam 10
		$\alpha$ -OH Triazolam 2,700
		4-OH Triazolam 260

(+ : positive, - : negative)

#### 6. 7-アミノフルニトラゼパム、7-アミノクロナゼパムおよび7-アミノニトラゼパムに対する反応性 (Table 1F)

7-アミノフルニトラゼパム、7-アミノクロナゼパムおよび7-アミノニトラゼパムをそれぞれ異なる濃度 (5,000, 1,000 ng/mL) に調製した添加尿を検査した結果、いずれの濃度の添加尿でも陰性であった。一方、Triage® DOAでは、7-アミノフルニトラゼパムおよび7-アミノクロナゼパムは、2,000 および 7,500 ng/mL の添加尿で陽性となる。

#### 7. 剖検例 (Table 2)

HPLC/MS 法にて確認分析後、定量を行った結果<sup>5)</sup>、尿中のトリアゾラム、 $\alpha$ -ヒドロキシ体および4-ヒドロキシ体濃度が、10, 2,700, 260 ng/mL であった剖検例において、Triage® DOAではBZO陽性となったが、IV M-1ではBZD陰性となった。

### III 考 察

本結果から、同一ロット内の検査キットでは、結果の相違は認めなかったものの、検討した多くの薬物において、異なるロットを使用した場合に陽性と陰性が混在するなど、ロット間で結果にばらつきがあった。この原因は、カットオフ値付近の濃度を検査した結果であると考えられるが、抗原抗体反応を用いた検査キットでは、製造ロットにより反応が異なることが報告されている<sup>7)~9)</sup>。IV M-1が臨床現場で普及するに従い、本検査の結果が救命処置の有無を判断するなど、重要な治療方針決定の一助となる場合も想定されることから、製造ロットによる特異性やカットオフ値など、詳細な検討とともに厳密な製品管理が必要であると考えられる。また、ライ



ンの有無は目視で判断するキットの共通問題点の1つであるが、IV M-1でも、ラインの判定が困難な場合があり、判定を数値化するなどの改良が望まれる。

IV M-1は検査試料として尿を用いるが、尿には未変化体だけではなく、代謝物も排泄される<sup>10)~12)</sup>。とくに、BZDの尿への未変化体排泄はわずかであり、多くは代謝物(主に水酸化後、グルクロン酸抱合体)として排泄される<sup>10)~12)</sup>。具体的には、アルプラゾラムは、未変化体(約20%)、4-ヒドロキシ体(約0.5%)、 $\alpha$ -ヒドロキシ体(約60%)が尿中に排泄され<sup>13)</sup>、トリアゾラムは、未変化体(約2%)、4-ヒドロキシ体(約3~11%)、 $\alpha$ -ヒドロキシ体(40~70%)が尿中に排泄される<sup>14)</sup>。本結果では、代謝物の構造式により反応性が大きく異なっていることが判明し、アルプラゾラムおよびトリアゾラムにおいて、4-ヒドロキシ体は感度よく検出可能であったが、 $\alpha$ -ヒドロキシ体の検出には適していなかった。これは、IV M-1において、 $\alpha$ 位のメチル基が抗原抗体反応に大きくかかわっていることが推測され、アルプラゾラム、トリアゾラムの服用者の尿検出には不向きであると考えられる。実際にトリアゾラムを服用していた剖検例を検査した結果(Table 2)、Triage® DOAでは陽性となったが、尿中の薬物濃度を定量した結果、 $\alpha$ -ヒドロキシ体が2,700 ng/mLと高濃度であったにもかかわらず、トリアゾラムと4-ヒドロキシ体濃度が10と260 ng/mLとカットオフ値以下であったためにIV M-1で陰性となったと考えられる。

さらに、7-アミノ体は高濃度の添加尿であっても検出できなかった。これらのことから、IV M-1において、7位がアミノ基に置換されることで抗原として認識されない可能性が推測される。フルニトラゼパム、クロナゼパムおよびニトラゼパムなどのニトロ誘導体の主代謝物は、7-アミノ体であるため、現時点ではIV M-1ではこれらの薬物を見逃してしまう可能性があり、これらに対する反応性を高めるような改善が望まれる。

以上のように、薬物検査キットは、用いるキットによって薬物に対する反応性が異なるため、検査

キットの特性を熟知したうえで使用する必要がある。とくに、IV M-1については、特異性や感度についての詳細な知見が少ないことから、検査結果の解釈に注意が必要とされる。今後は、BZDに限らず、他の薬物種の交差反応性などについての詳細な検証が望まれるところである。さらに、近年、セロトニン再取り込み阻害薬や非定型抗精神病薬など、従来の検査キットで検出できない薬物が、機器分析では高濃度で検出される事例が増加していることから、流通する薬物の種類の増加や社会変化に対応した検査項目や検査キットの開発が強く望まれる。

#### <謝辞>

本研究を実施するにあたり、快く検査キットを提供いただきました(株)テイエフビー、各種標準品を譲渡していただきました吉富薬品(株)、田辺三菱製薬(株)、ファルマシア&アップジョン(株)に感謝いたします。

#### <利益相反>

本論文の検討にあたっては、(株)テイエフビーから測定キット(Instant-View™ M-1)の提供を受けた。それ以外の開示すべき利益相反状態はない。

#### 【文 献】

- 1) Moody DE, Fang WB, Andrenyak DM, et al : A comparative evaluation of the instant-view 5-panel test card with On Trak Tes Tcup Pro 5 : Comparison with gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2006 ; 30 : 50-6.
- 2) 守屋文夫, 横野貴文, 吉留敬, 他 : 尿中濫用薬物検査キットのインスタントビュー™ M-1とトライエージ® DOAの性能の比較. *中毒研究* 2012 ; 25 : 243-6.
- 3) 杉村朋子, 原健二, 久保真一, 他 : 尿中簡易薬物スクリーニングキット2製品の比較検討. *日救急医学会誌* 2012 ; 23 : 842-50.
- 4) Nakanishi K, Miki A, Zaitso K, et al : Cross-reactivities of various phenethylamine-type designer drugs to immunoassays for amphetamines, with special attention to the evaluation of the one-step urine drug test Instant-View™, and the Emit® assays for use in drug enforcement. *Forensic Sci Int* 2012 ; 217 : 174-81.
- 5) 奈良良昭, 牧田亨介, 長尾正崇 : ベンゾジアゼピン系薬物とその代謝物の検出における4種類の薬物検査デバイスの比較 ; 主としてチエノジアゼピン系薬物エチゾラムの検出について. *中毒研究* 2011 ; 24 : 27-34.
- 6) 吉尾隆 : 総論 : 向精神薬とは. *中毒研究* 2012 ; 25 : 243-8.
- 7) Crouch DJ, Hersch RK, Cook RF, et al : A field evaluation of five on-site drug-testing devices. *J Anal Toxicol* 2002 ; 26 : 493-9.

- 8) Schutz H, Erdmann F, Rochholz G, et al : False positive and false negative immunochemical findings : A permanent risk of analytical pitfalls. *Jpn J Forensic Toxicol* 2000 ; 18 : 14-20.
- 9) 長井辰男, 倉重綾, 柳澤裕子, 他 : 覚せい剤スクリーニングキット On Trak Tes Tstik の特異性に関する研究. *法中毒* 2002 ; 20 : 42-8.
- 10) 奈女良昭 : 中毒起因物質の簡易検査法. *中毒研究* 2009 ; 22 : 331-7.
- 11) Wolff K, Farrell M, Marsden J, et al : A review of biological indicators of illicit drug use, practical considerations and clinical usefulness. *Addiction* 1999 ; 94 : 1279-98.
- 12) Kintz P : Drug testing in addicts : A comparison between urine, sweat, and hair. *Ther Drug Monit* 1996 ; 18 : 450-5.
- 13) Fraser AD, Bryan W, Isner AF : Urinary screening for alprazolam and its major metabolites by the Abbott ADx and TDx analyzers with confirmation by GC/MS. *J Anal Toxicol* 1991 ; 15 : 25-9.
- 14) Tsujikawa K, Kuwayama K, Miyaguchi H, et al : Urinary excretion profiles of two major triazolam metabolites, *a*-hydroxytriazolam and 4-hydroxytriazolam. *J Anal Toxicol* 2005 ; 29 : 240-3.

## 要旨

Instant-View™ M-1 は、救急医療現場や法医実務において中毒起因物質のスクリーニングに用いられ、その有用性も報告されている。しかし、一部の薬物を除いては、選択性や特異性、検出下限などの基本情報が不足している。そこで今回、急性薬物中毒事例の多いベンゾジアゼピン類似薬物および代謝物に注目し、それら薬物および代謝物に対する Instant-View™ M-1 の交差反応性について検討した。

本結果から、トリアゾラムなどのトリアゾロベンゾジアゼピン類との反応性は高いが、エチゾラムなどのチエノジアゼピン類には反応しないことが判明した。代謝物の 4-

ヒドロキシ体とは、親化合物と同程度の反応性を有するにもかかわらず、*a*-ヒドロキシ体とは反応しないなど、代謝物の構造と交差反応性との相関性が認められた。また、フルニトラゼパムなどの主代謝物である 7-アミノ体には反応しないことも判明した。さらに、検査対象薬物によっては、製造ロット間の差が明らかとなった。このように、使用する検査キットに依存して薬物に対する反応性が異なるため、検査キットの特性を十分に熟知したうえで検査キットを使用し、得られた結果を判断する必要がある。