

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09264

研究課題名(和文)死因究明のための法医鑑定試料中水溶性薬物の一斉抽出・分析法の研究

研究課題名(英文)Development of an extraction for water soluble drugs in forensic samples

研究代表者

奈女良 昭(Namera, Akira)

広島大学・医系科学研究科(医)・准教授

研究者番号：30284186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では親水相互作用を利用した生体試料中水溶性化合物の簡便で失敗の無い抽出・精製方法を検討した。生体試料を除タンパクした後にZIC-HILICカラムで分離することで50種余の水溶性薬物の一斉分離が可能となった。しかし、生体試料からの精製度や回収率を検討したが、水溶性薬物を一斉に抽出できる基剤の発見には至らなかった。最終的には、全血を0.1%ギ酸含有アセトニトリルにて除タンパクし、得られた上清を脂質除去カラムに通液させることで分析の妨害となる内因性成分を除去し、簡便かつ人為的な誤差なく水溶性成分の単離・精製が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、法医中毒学および臨床中毒学といった学術的意義のみならず、犯罪解決に大きな影響を与えることから対社会的にも大いに期待される。また、検査機関毎で結果の異なることが懸念され、再検査の必要性が指摘されているが、国内外を問わず同一の結果が出せることから再検査も不要となる。このように最先端かつ実用的分析法を加味した研究は、国内外を問わず全く行われておらず、大変意義のある研究であり、科学技術発展にも大いに貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to extract water-soluble compounds from postmortem samples using the hydrophilic interaction chromatography separation mode and to enable simple and rapid drug identification. As a result, 0.1 ml of whole blood was deproteinized with acetonitrile containing 0.1% formic acid, and the supernatant was then passed through a phospholipids removing column with a centrifugation to remove endogenous components. The recovery rate of the model compounds in whole blood was close to 60% when acetonitrile was used, and further increased by 20 to 30% when acetonitrile containing formic acid was used. In addition, it was recognized that the variation was as small as 2.4 to 7.9%. By using this method, it became possible to quantify reproducibly even down to the therapeutic level of the water-soluble drugs. However, satisfactory results were not obtained regarding tetrodotoxin and 2-aminothiazoline-4-carboxylic acid, so they were left as a subject for future study.

研究分野：薬物分析化学

キーワード：薬物分析 法医鑑定 クロマトグラフィー 質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の急激な生活・社会習慣、人口構成の変化を背景に、循環器や中枢神経障害、認知症に対する治療薬の処方が激増する反面、インターネットを介した国内未承認医薬品の簡便な入手により、多種多様な薬物の誤用や多量摂取などが大きな社会問題となっている。また、異物混入など、殺人が疑われる手法も巧妙化し、検視や法医解剖だけでは見逃しの危険性が避けられない。行政や学会レベルで「死因究明のあり方について」の検討もなされ、薬毒物検査の重要性も指摘されているが、医師、技術者を含めた慢性的な人員不足などが大きな課題となっている。

これまで死因に関与する多くの薬毒物の抽出・精製法が多数報告されているが、その多くは脂溶性に富んだ医薬品および代謝物の抽出・生成方法であり、生体試料からの水溶性薬毒物の抽出・精製に関する報告例は少なく、見逃されている可能性が示唆される。水溶性薬毒物の抽出・精製法としては、アセトニトリルなどによる除タンパクや活性炭の利用が主流であったが、非特異的で内因性成分の除去効果は乏しく、機器の汚れや分析精度の低下をもたらしていた。近年、簡便な前処理法として脂質除去法が注目されており、従来実施されてきたアセトニトリルなどでの除タンパクでは生体由来の妨害成分の除去が不十分ということで、主にイオン化に悪影響を及ぼすとされているリン脂質除去カラムが開発、販売されている。本手法での処理後の溶液はアセトニトリルなどの有機溶媒リッチになっており、溶出溶媒を留去せずに直接 LC への導入が可能となり操作の簡便化と前処理時間の短縮化に期待が持てる。

また近年、法医学分野においても高性能の質量分析計の汎用性が増して検出感度は向上しているが、検査試料中の内在成分(タンパクや脂質など)が固化するなどの理由から依然として“試料そのままを検出器に導入できない”ため、薬物の精製や濃縮に莫大な時間と労力を掛けている。さらに、知識不足が原因で不適切な抽出・精製法の選択によって、毒性の高い水溶性の薬毒物を見逃すだけでなく、唯一無二の貴重で限られた量の試料を台無しにすることが危惧される。早急な人員補充が困難な現状を鑑み、分析の専門技術を有していなくても、失敗することなく、効率的な再現性を担保した薬物検査が喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を進展させ、スピнкаラム抽出法に親水性相互作用クロマトグラフィー(Hydrophilic Interaction Chromatography: HILIC)分離モードを導入して法医鑑定試料(特に血液、尿)からの水溶性薬毒物の一斉抽出を可能とし、死因に関与する多種多様な薬毒物の見逃し回避する。これまでに、水溶性薬毒物の一斉抽出法の検討は成されておらず、国内外を問わず、学術的・産業的にも重要な課題と考える。

3. 研究の方法

本研究では、(1)水溶性薬毒物の分離条件の検討、(2)検査試料溶媒の検討、(3)全血中からの水溶性薬物の抽出条件の検討、(4)抽出した薬物の精製条件の検討、(5)バリデーションデータの取得を行い、法医鑑定試料(特に血液、尿)からの水溶性薬毒物の一斉抽出を目指す。

法各薬物の分析には、LCMS(Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)を用いる。分析条件は、下記表1に示した通りである。

表1. LCMSでの分析条件

LCMS	1260 Infinity / 6420 Triple Quad LCMS	Ionization	Electrospray ionization
Column	ZIC-HILIC (100mm, 2.1mm, 5 μm)	Polarity	Positive and Negative
Mobile phase	A: Acetonitrile, B: Ammonium formate (10mM, 0.1% Formic acid)	Vcap	4000V
	linear gradient: A 5%-50% / 25 min	Dry gas	300°C, 10 l/min
Flow rate	0.3 ml/min	Nebulizer	50 psi
Column temperature	40°C		

対象とする化合物は、油水分係数(logP値)が小さい(水溶性が高い)為に、薬毒物分析で汎用されている液-液抽出法やオクタデシルシリル基結合の固相抽出法で抽出・精製が困難とされている抗生物質(セフトリアキソン)、モルヒネ系麻薬(モルヒネ)、拮抗薬(アテノロール)、解熱鎮痛剤(アセトアミノフェン)、海産毒素(テトロドトキシン)などの死因への関与が懸念されている薬物を対象とする。検討した薬物の種類と検出条件は、下記の表2に記している。

表2. 検出対象薬物と検出条件

Compound Name	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Fragmentor	Collision Energy	Compound Name	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Fragmentor	Collision Energy
Acetaminophen	152.1	110.1	90	13	Morphine	285.2	165.1	170	45
Amphetamine	136.1	91.2	50	17	Neostigmine	224.1	72.3	130	33
ATC (2-aminothiazoline-4-COOH)	147	101.1	90	17	Nicotine	163.1	84.2	90	21
Atenolol 10	267.2	145	130	29	Nitenpyram	271.1	126.1	90	29
Bupropion	158.1	60.2	90	13	Nitrazepam, 7-NH2	252.1	121.1	130	29
Caffeine	195.1	138.1	130	17	Oxycodone	315.2	238.1	130	17
Chlorprocaine	271.1	100.2	90	13	Oxycodone, Nor	302.1	284.1	130	13
Clonidine	230	212.9	130	25	Oxymorphone, Nor	288.1	213	130	33
Codeine	300.2	165	130	49	Pemoline	177.1	108.1	90	13
Dihydrocodeine	302.2	199	170	37	Phenylethylamine	122.1	105.1	50	9
Dinotefuran	203.1	129.1	90	9	Pilocarpine	209.1	95.2	130	41
Ecgoinine	186.1	168	90	17	Pindolol	249.2	116.1	130	17
Ecgoinine, methyl ester	200.1	182	90	17	Pregabalin	160.1	142.1	90	9
Ephedrine	166.1	148.1	90	9	Salbutamol	240.2	148	90	17
Ephedrine, N-methyl	180.1	162.1	90	13	Salicylic acid	137	93.1	90	13
Ephedrine, nor-	152.1	134.1	50	5	Siuamide	342.2	112.2	130	29
Ephedrine, pseudo-	166.1	148.1	90	9	Sulfonamide	355.2	112.2	170	29
Galanteramine	288.2	213.1	130	21	Theophyllin	181.1	124.1	130	17
Hydromorphone	286.2	185	130	33	Thiamethoxam	292	211.1	90	9
Metformin	130.1	60.3	90	13	Tiaproline	329.2	255.9	130	21
Methamphetamine	150.1	91.2	90	17	Tizanidine	254	59.2	130	29
Methylenedioxymphetamine	180.1	163.1	90	9	Tramadol, O-desmeth	250.2	59.2	90	17
Methylenedioxymphetamine	194.1	163	90	9	Tryptamine	161.1	144	50	9
Midodrine	255.1	237	50	5	Varenicline	212.1	183	130	21
Midodrine, desalicyl	198.1	180.1	50	5	Zonisamide	213	132.1	90	13

4. 研究成果

(1) 水溶性薬物の分離条件の検討

近年、水 100% の移動相を使い、水溶性薬物の保持を謳った逆相性カラムの開発がなされている。それらのカラムでの保持・分離を検討したが、満足のいくものではなかった。それ故、薬物分離においても HILIC モードでの分離を検討した。汎用されているオクタデシルシリル基の結合している逆相性カラムで保持の弱く、標準品が入りできた上記 50 種余りの薬物について分離条件を検討した。



図 1. 一斉分離を目的に分離した各成分のクロマトグラム

HILIC モードでの分離は、極性化合物の分析に対し有効な方法とされており、アミノ基やアミド基、ジオール基のような高極性基が結合された固定相を使用する。HILIC モードで使用する移動相は、通常の逆相系の分離で用いられる水やメタノール、アセトニトリルなどである。通常の逆相系分離では水が溶出力の弱い溶媒であるが、HILIC モードでは水が溶出力の強い溶媒となる。

まずは、アミド基を固定相に持つカラム (Inertsil Amide (150mm, 2.1mm, GL Sciences)) で検討していたが、移動相の水の含量が増えるに従い、MS イオン化室内が白く変色して分離カラム内のシリカ粒子の溶出が懸念された。カラム自体の分離には影響を及ぼさなかったが、イオン化室の汚染や感度低下が懸念されたため、アミド基カラムの使用は断念した。次に、HILIC モードでは定評のある ZIC-HILIC カラムでの分離を検討した。分析時間の短縮を考慮して単一組成の移動相によって溶出させる溶離方法 (アイソクラティック分離) を検討した。移動相中のアセトニトリル含量を 95 ~ 50% まで段階的に変化させて行ったが、一つの条件で多くの薬物を溶出させることは困難であった。また、溶出時間が遅くなる薬物では、ピーク高さが稼げず、感度低下が懸念されるなど一斉分離可能な条件には至らなかった。そこで、グラジエント分離を検討した。HILIC モードでは水が溶出力の強い溶媒となるため、通常の逆相系とは逆のパターンで移動相の濃度勾配を掛けることとなる。今回は、分離条件に示したように移動相中のアセトニトリル濃度を 95% から 50% に低下させることで、多成分の一斉分離条件の検討を行った。その結果、図 1 に示すように良好な分離が得られた。本検討では、一部逆相系条件でも分離できる薬物があるが、逆相系で保持可能な薬物は溶媒先端に溶出されることも判明した。

(2) 検査試料溶媒の検討

LC 分離では、LC に注入する試料の溶媒組成や注入量によってピーク形状が崩れたり、ピーク形成されないことが報告されており、分析に使用するカラムや移動相を考慮して、試料の溶媒組成や注入量を十分に注意する必要がある。また、前処理時に行うカラム溶出溶媒の留去や再溶解は、前処理工程の律速段階（ボトルネック）となっている。それ故、この溶出溶媒の留去工程を削除できれば、大きな時間と手間の削減が可能となる。本研究では、前処理にも HILIC モードを使った抽出・精製を想定しており、溶出溶媒であるアセトニトリルが高濃度の試料を直接注入できれば、大きなメリットとなる。そこで、対象薬物をアセトニトリルに溶解し、注入量を 5、10、20 μ l と順次増やして分析可能であるかを検討した。

その結果、注入量の増加にも関わらずにピークは対称性の形状を呈してピーク面積も増大した。これ以上の注入も考えられたが、オートサンプラーの配管容量などの物理的要因からこれ以上の容量を LC に注入することは断念した。

(3) 全血中からの水溶性薬物の抽出条件の検討

全血にはヘモグロビンや各種タンパク質が多く含まれており、分析の障害となるために除去する必要がある。また、分析対象となる薬物に比べて桁違いの量が含まれており、対象となる薬物のみを抽出することは至難の業である。健常人から採取して間もない血液であれば、血清・血漿分離することが可能であるが、本研究での対象は法医解剖にて得られる血液であり、既に溶血している（血清・血漿分離不可能）。近年、LCMS 分析での妨害成分（主としてリン脂質など）除去を目的とした手法が注目を浴びている。この方法は、既存の有機溶剤によるタンパク変性処理とリン脂質除去を組み合わせた方法であり、本研究にも使用可能と考えられる。

そこで、除タンパク効果の高いアセトニトリルで不要成分を除去して全血中から薬物を抽出可能であるかを検討した。また、イオン化を想定してアセトニトリルにギ酸を添加して薬物抽出の変化も検討した。通常、アセトニトリルに加えるギ酸などの酸の含量は 1~5% とされているが、ギ酸を 1% 添加すると全血中のヘモグロビンが溶出して赤く着色してきた。この色は脂質除去カラムでも除去できずに最終溶液まで残留したため、添加するギ酸量を変化させた。その結果、0.1~0.2% にギ酸量を低下させることで着色を抑えることが出来た。

モデル化合物として、ATC (2-aminothiazoline-4-carboxylic acid)、エクゴニン、オキシコドン、コデイン、テトロドトキシン、ノルエフェドリン、メトホルミン、モルヒネを選択して回収率などの検討を行った。

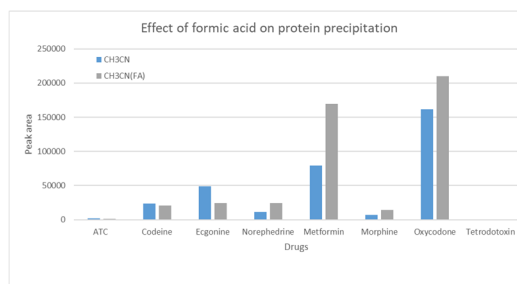


図2. ギ酸添加有無での各種薬物の回収率の変化

その結果、図2に示すように、オキシコドンやメトホルミンは、ギ酸添加により回収率が上昇したが、エクゴニンは逆に低下した。ATC とテトロドトキシンはこの方法では抽出されず、抽出法の再検討が必要となった。除タンパク法としては、硫酸アンモニウム（硫酸）などの無機塩を使用する方法などが知られており、種々検討したが改善できる方法は発見できなかった。過去に MonoSpin を使用したテトロドトキシン抽出の検討では、尿や血清よりテトロドトキシンを抽出することが可能であった。今回、検査試料が全血であり、除タンパク時に不溶物の沈殿が生じる。この時点で系内において HILIC 分配が起こり、テトロドトキシンなどの水溶性成分が沈殿物に取り込まれる、あるいは沈殿物表面に吸着することが推測される。また、血球膜や血球成分との相互作用でアセトニトリルなどの溶剤への移行が出来ていないことも推定され、不要物の生じない抽出系の必要性が感じられた。

(4) 抽出した薬物の精製条件の検討

精製に使用する基剤として、Captive EMR、MonoSpin SCX、MonoSpin C18-SCX、MonoSpin Phospholipid、OASIS MCX、を使用して精製度や回収率を検討した。

まず、全血をアセトニトリルおよびアセトニトリル（0.1%ギ酸添加）で除タンパクして得られた上清に対象薬物を添加して Captiva EMR での精製・回収率を検討した。その結果、ギ酸の有無に関わらず、60%以上の回収率が得られた。ただし、エクゴニンについては、Captiva EMR に保持されたまま溶出させることが出来なかった（図3）。

次に、MonoSpin SCX、OASIS MCX および限外ろ過膜による精製・回収率を検討した。その結果、エクゴニンに加えてメトホルミンも基剤に保持されたまま、溶出・回収することが出来なかった（図4）。全血に添加する緩衝液の pH を変化させて検査試料中の分析対象薬物のイオン化状態を変化させ、ミックスモードの MonoSpin C18-SCX での保持を検討したが、エクゴニンやメトホルミンの保持は改善できなかった（図5）。

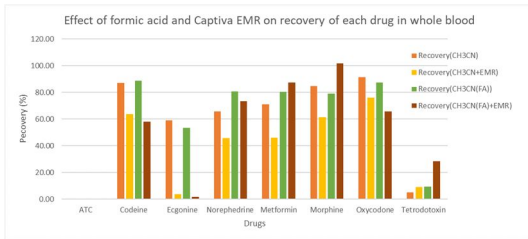


図3. Captiva EMR でのギ酸の効果

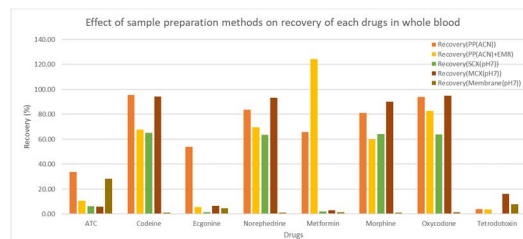


図4. 各種充填剤の効果

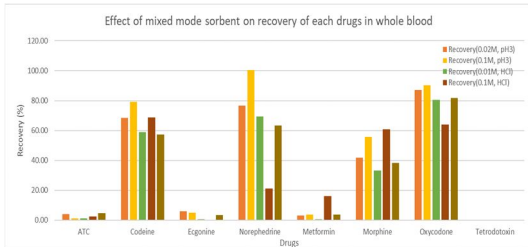


図5. ミックスモードにおける回収率

さらに MonoSpin Phospholipid については全血の処理量が 20 μ l と、他のカラムの処理量に比べて少ない事に加えて溶出に必要な溶媒量が 0.1ml を必要とすることから検出感度の低下が危惧された。処理量の大きい L 型でも検討したが、処理量が増えた対価として基剤の充填量が多くなったことから、溶出に要する溶媒量が 0.5ml に増量し、濃縮工程の必要が生じたことで当初の目的を達成することが困難となった。

以上を鑑み、これ以降の検討では、Captiva EMR を用いての検討を進めることとした。ただし、MonoSpin の利点である、遠心分離機を用いた人的誤差の解消や抽出工程の手間を省くことを、Captiva EMR での抽出にも取り入れて抽出などには遠心分離機を用いることとした。

(5) バリデーションデータの取得

これまでの検討の結果を総合すると、全血 0.1ml にアセトニトリル（あるいは 0.1%ギ酸含有アセトニトリル）0.5ml を加えて激しく攪拌し（可能であれば、ビーズ粉碎機などを使用し）遠心分離する。得られた上清を Captiva EMR のシリンジパレルに注ぎ込み、遠心分離してリン脂質などの内因性妨害物質を除去する。通過液をそのまま、あるいは溶媒収去して 30%メタノール 0.1ml に溶解した溶液を LCMS に注入して分析する。内部標準物質には、ジアゼパム-d5 (10 μ g/ml) を用いる。

その結果、表 3 に示すようにアセトニトリル除タンパクで 60% 近くの回収率が得られた。さらにギ酸含有のアセトニトリルで除タンパクを行うと回収率が 20~30% 上昇した。また、ばらつきも小さくなる傾向が認められた。ただし、メトホルミンについては、両条件共にイオンサプレッションが認められ、分離条件の再検討の必要性も示唆されたが、血液中のメトホルミン濃度が高い為に実分析には大きな影響を及ぼさないと考えられる。

表3. 代表成分の回収率・ばらつき・マトリックス効果

	Acetonitrile			Acetonitrile (0.1% formic acid)		
	Recovery (%)	CV (%)	Matrix effect (%)	Recovery (%)	CV (%)	Matrix effect (%)
エフェドリン	68.5	9.6	95.5	90.6	3.3	95.7
オキシコドン	68.8	8.9	91.9	87.7	3.7	95.8
コデイン	71.2	7.4	93.3	92.9	7.9	90.6
メトホルミン	58.3	8.3	10.9	77.8	6.7	10.5
モルヒネ	62.2	9.9	77.1	82.2	2.4	78.4

以上の結果、全血を 0.1%ギ酸含有アセトニトリルにて除タンパクし、遠心分離して得られた上清を Captiva EMR を通液させることで分析の妨害となる内因性成分を除去し、簡便に水溶性成分の単離・精製が可能となった。本法を使用することで、治療域レベルの濃度まで再現良く定量することが可能となった。

本研究の成果は、法医中毒学および臨床中毒学といった学問的意義のみならず、犯罪解決に大きな影響を与えることから対社会的にも大いに期待される。また、検査機関毎で結果の異なることが懸念され、再検査の必要性が指摘されているが、国内外を問わず同一の結果が出せることから再検査も不要となる。このように最先端かつ実用的分析法を加味した研究は、国内外を問わず全く行われておらず、大変意義のある研究であり、科学技術発展にも大いに貢献できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 奈女良 昭、斎藤 剛、村田和大、吉本寛司、長尾正崇
2. 発表標題 血液中薬物分析における簡便・迅速前処理法の検討
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Namera
2. 発表標題 Comparative evaluation of clean up efficiency of phospholipid removal columns for simultaneous analysis of medicinal and illegal drugs in whole blood
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奈女良 昭
2. 発表標題 全血中薬物抽出における各種珪藻土の比較およびピットフォール
3. 学会等名 日本法中毒学会第37年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----