

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09285

研究課題名(和文) 直接導入型タンデム質量分析計による薬毒物迅速検査システムの構築に関する研究

研究課題名(英文) Study on the construction of a rapid screening system for drugs and toxic substances using a direct-introduction tandem mass spectrometer

研究代表者

井上 博之 (Inoue, Hiroyuki)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：40159992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：直接導入型質量分析計等を利用し、揮発性毒物を含む薬毒物を対象とした迅速な検査システムの開発を行った。合成カンナビノイド及び合成カチノンについては、特徴的なイオンの質量数及び強度をデータベース化することで物質同定が可能であった。アルコール類、トルエン等の揮発性物質については、ナローボアキャピラリーカラムを装填したヘッドスペースガスクロマトグラフィーによる測定法を開発した。直接導入型質量分析計による農薬の測定には血液試料の前処理にQuEChERS法を採用した。開発した方法を農薬中毒が疑われた解剖試料への適用したところ、血液試料からフェニトロチオンの検知に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医学領域において中毒の原因となる物質は多岐にわたり、原因物質の確認検査を行う前の効率的なスクリーニングはきわめて重要である。また、毒物混入事件や薬物犯罪等の事実の立証には当該物質の特定が必須である。本システムは、迅速な判定、質量分析による同定能力の高さ及び検査対象物質の豊富さを兼ね備えており、法医解剖時において犯罪死の見逃し防止に資する観点で実施される薬毒物検査として活用可能と考えられる。また、救急医療の現場や環境科学分野での活用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：We developed a rapid screening system for drugs and toxic substances, including volatile compounds, by using a direct-introduction mass spectrometer and other instruments. For synthetic cannabinoids and synthetic cathinones, substance identification was possible by compiling a database of the mass number and intensity of characteristic ions. For volatile compounds such as alcohols and toluene, a method using headspace gas chromatography equipped with a narrow-bore capillary column was developed. For the measurement of pesticides by direct introduction mass spectrometry, the QuEChERS method was employed for pretreatment of blood samples. The method developed was applied to an autopsy sample suspected of pesticide poisoning. Fenitrothion was successfully detected in blood.

研究分野：法医中毒学

キーワード：法医中毒学 質量分析 スクリーニング 揮発性毒物 薬物 農薬

1. 研究開始当初の背景

法医学領域において中毒の原因となる物質は多岐にわたり、原因物質の確認検査を行う前の効率的な簡易検査(スクリーニング)は極めて重要である。また、毒物混入事件や薬物犯罪等の事実の立証には当該物質の特定が必須である。さらに、救急医療の現場では、急性中毒患者が搬送された場合、一般的な処置と対症療法を行いながら、薬物スクリーニングが実施され、治療方針が決定される。このように、法医中毒学、臨床中毒学及び犯罪鑑識上必要な薬物検査において、その前段階としてのスクリーニングのもつ意義は極めて高く、スクリーニングの成否がそれぞれの目的の成否に大きく関与している。

近年、犯罪死の見逃し防止の観点から、検視・死体見分及び検案と同時に簡易薬物検査を実施することが提唱されているが、現在、使用されている簡易薬物検査キットについては、死後経過による死体の腐敗等の影響により、正確な検査結果が得られない場合もあることや、検査キットに反応する薬物の種類が限定されている等の限界が指摘されている[文献1]。

2. 研究の目的

本研究課題では、逆流型大気圧化学イオン化質量分析技術を利用し、シアン、アジ化物などの揮発性毒物を含む広範な薬毒物を対象とした迅速、簡便、高精度な一斉検査システムを開発することを目的とする。本システムを構築することにより、薬物中毒事例の法医診断能力が飛躍的に向上するのみならず、検視・検案や救急医療の現場においてもその活用が期待され、社会的意義もきわめて大きい。

3. 研究の方法

(1) 本研究の重要な要素である直接導入型質量分析計として、逆流型大気圧化学イオン化質量分析計を用いる。試験溶液をガラスろ紙上に滴下し、150°C ~ 320°Cに加熱されたヒーター部に挿入する。気化した試料は、イオントラップ型質量分析部で測定される。これにより、分子量情報を与えるシングル MS モードと開裂パターン情報を与えるタンデム MS モードによる測定が可能であり、薬物自動判定プログラムを本体に組み込むことにより、質量分析計の知識がない者でも簡単に使用可能となる。

(2) シアン、アジ化物、シンナー、トルエン、アルコール類等の揮発性物質、農薬(有機リン系、カルバメート系等)、向精神薬、規制薬物(麻薬、危険ドラッグ)を測定対象物質とする。初期段階では各群単位で測定条件を最適化し、統合する。このため、本研究では以下の実験を行い、検査システムを構築する。質量分析条件の最適化、高感度測定のための各種条件検討、生体試料からの測定、自動判定アルゴリズムの構築、検証実験

4. 研究成果

(1) シアン及びアジ化物の検査： 逆流型大気圧化学イオン化質量分析計を用いた。試験溶液をガラスろ紙上に滴下し、約 250°Cに加熱されたヒーター部に挿し測定を行った。

アルカリ水溶液中のシアンイオン及びアジ化物イオンは、負イオン測定モードで検出可能であったが、その感度は注入量として、それぞれ 200 ng 及び 10 ng 程度であり、中毒レベルのヒト生体試料を測定するための高感度化が必要であった。そこで、ペンタフルオロベンジルブロミド及びテトラデシルジメチルベンジルアンモニウムによる誘導体化処理を行い、測定したところ、シアンについては特徴的なイオンが確認されたが、遊離体を大きく上回る感度向上は得られなかった。また、2,3-ナフタレンジアルデヒドによる誘導体化物を作製し、同様に測定したが、目的とする特徴的なイオンは検出されなかった。

(2) 危険ドラッグのスクリーニング： 逆流型大気圧化学イオン化質量分析計を用いた。試験溶液の一部をガラスろ紙上に滴下し(固形試料の場合は、1 mg 以下程度を 2 枚のガラスろ紙で挟み)、320°Cに加熱されたヒーター部に挿入した。気化した試料は、イオントラップ型質量分析部で測定され、シングル MS モードで一定強度以上のイオンについて、タンデム MS モードでの測定を行った。結果：合成カンナビノイド JWH-250、JWH-081 及び 5F-QPIC の標準品は、フルスキャン MS モードにおいて、それぞれのプロトン化分子に相当する m/z 336、372 及び 377 に主要なイオンを有した。プロトン化分子の衝突誘起解離を利用したタンデム MS モードにより、JWH-250 では m/z 121、188 及び 91 に特徴的なプロダクトイオンを与えた(図1)。また、合成カチノン α -PVT、 α -PHP 及び α -POP は、フルスキャン MS モードにおいて、それ

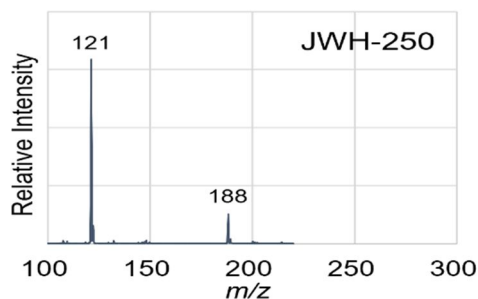


図1 JWH-250 (プリカーサイオン m/z 336) のプロダクトイオンスペクトル

それ m/z 238, 246 及び 274 にプロトン化分子を有するとともに、タンデム MS モードにおいて、それぞれ特徴的なプロダクトイオンを与えた (図 2)。21 種類のハーブ等製品を同様に分析したところ、フルスキャンモード及びタンデム MS モードの両方で特徴的なイオンを示した。化合物の自動同定は、特徴的なイオンの質量数及び強度を内蔵の薬物データベースのそれらと比較することによって行うことができた。ただし、この測定系では、いくつかの異性体の組み合わせ、例えば、4-メチルエチカチノンと N-エチルプフェドロンの識別は困難であった。本法はサンプル前処理や分離工程を必要とせず、また客観的な自動判定が可能であり、ハーブ製品中の危険ドラッグの迅速スクリーニングに適用可能と考えられた。

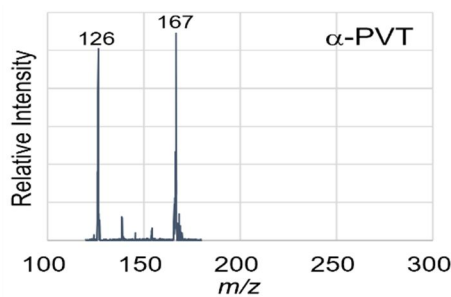


図 2 α-PVT(プリカーサイオン m/z 238)のプロダクトイオンスペクトル

(3) 揮発性物質の測定： 直接導入型質量分析計による揮発性物質の測定を補完するため、ナローポアキャピラリーカラムを装填したヘッドスペースガスクロマトグラフィー (HS-GC) による測定法の構築を試みた。HS バイアルに測定試料 0.1 mL 及び内部標準溶液 (0.1% t-ブタノール水溶液) 0.1 mL を入れ、直ちに密封した。分析カラムとして、ナローポアカラム (Rtx-624、内径 0.18 mm×20 m) を用いた。バイアル内での気液平衡状態に達する最適条件を検討し、バイアル加温条件を 65°C、5 分に設定した。全 6 成分は 2 分以内に分離され、各ピークの保持時間及び面積値の繰り返し再現性は良好であった。エタノール濃度 0.04 - 4 mg/mL の範囲で良好な直線性を示すとともに 1 サイクル 10 分で測定可能であった。また、ガソリン中毒事例等で測定対象となるベンゼン、トルエン、キシレン、ペンタン、ヘキサン等についても同様の操作 (バイアル加温条件 65°C、10 分) により、0.1 - 10 µg/mL の範囲で良好な直線性を示すとともに 1 サイクル 15 分で測定可能であった。本法は、揮発性物質の迅速測定法として有用であると考えられた。

(4) 化学兵器の測定： フーリエ変換赤外分光 (FT-IR) 毒性ガス検知器 (MKS AIRGARD) を用い、化学兵器の検知性能を評価した。周囲空気希釈・調製したサリン蒸気の FT-IR スペクトルには、バックグラウンド処理が不完全であったことによる二酸化炭素と水の吸収帯が認められたが、特徴的な指紋領域 (700 ~ 1400 cm⁻¹) と 2950 cm⁻¹ 付近の吸収帯が観察できた。希釈したサリン (0.44 mg/m³ 以上) を含む n-ヘキサン蒸気に対して、装置は GB 検出のアラームを出した。ソマン、タブン、シクロヘキシルサリン、VX 及び RVX の蒸気に対しては、正しいアラームを出したが、FT-IR スペクトルはサリンのそれと類似していた。マスタードガス、窒素マスタード 3、ルイサイト 1、塩化シアン及びホスゲンは正しいアラームを出した。本システムは一定の制約のもと、化学兵器検知器として有用であると考えられた。

(5) LC-MS/MS を用いた有機リン系及びカルバメート系農薬の測定： 有機リン系農薬としてフェントロチオン、アセフェート、ジクロロボスなど 16 種類、カルバメート系農薬については、メソミル及びカルバリルを分析対象化合物とした。2 mL 容マイクロチューブに血液試料を分取し、精製水及びアセトニトリル (内部標準品としてフェントロチオン-d6 を含有) を加えて振とう混和し、遠心後の上清を測定用試料とした。LC-MS/MS は、QTRAP 5500 を用い、分析カラムには L-column2 ODS、移動相として 10 mM ギ酸アンモニウム - メタノール系を用いた。各化合物の血液からの回収率 (0.1 µg/mL 添加) は、ジクロロボス (72%) 及びピロピリホス (83%) を除き 88% 以上であった。検出下限はフェントロチオン及びサリチオンについては 0.04 µg/mL であったが、それ以外の化合物については 0.001 ~ 0.004 µg/mL であり、いずれも 4 µg/mL まで良好な直線性を示した。本法はアセトニトリルによる除タンパクのみの簡単な前処理で血液中の主要有機リン系及びカルバメート系農薬をスクリーニング可能であり、法医実務に適用可能であると考えられた。

(6) 逆流型大気圧化学イオン化質量分析装置を用いた農薬類の測定： 直接導入型タンデム質量分析計を用いて血液試料から有機リン系農薬をスクリーニングするための各種条件設定を行った。血液の前処理法として、まず有機溶媒を用いた除タンパク法を試みた。アセトニトリルによる除タンパクは簡便であるが、残存する夾雑物によると考えられる妨害が認められ、本質量分析計では目的イオンを低濃度で効果的に測定することが困難であった。次に、QuEChERS 法による前処理を検討した。Agilent

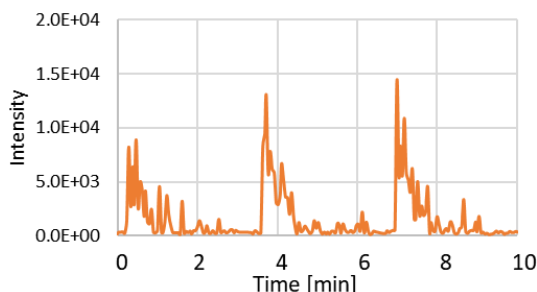


図 3 フェントロチオン 0.1 µg/mL 添加血液得られたイオンクロマトグラム (3 回連続測定、イオン取込み時間 30 msec)

AOAC パウダー（硫酸マグネシウム：酢酸ナトリウム = 4:1）0.1 g を入れた 2 mL マイクロチューブに精製水 0.2 mL 及びアセトニトリル 0.3 mL を分注したのち血液 0.1 mL を添加した。これを攪拌、遠心後の上清を測定試料とした。ガラス製ろ紙に測定試料 30 μ L を滴下し、質量分析計に導入した。図 3 に示すように、フェニトロチオン 0.1 μ g/mL 添加血液を QuEChERS 法にて前処理後の試料から目的とするプロダクトイオン（ m/z 278 > 127）のピークが検出された。このピーク面積は対象物質の濃度上昇とともに増大し、0.1 μ g/mL から 5.0 μ g/mL の範囲で直線性が認められた（図 4）。フェニトロチオンのプロダクトイオンスペクトルを図 5 に示す。フェニトロチオンの中毒量（昏睡～致死濃度）は 1.1～17 μ g/mL と報告されており[文献 2]、本法は血液からのスクリーニングとして利用可能な感度を有すると考えられた。

次にマラチオンの測定条件の最適化を行った。イオン取込み時間 100 msec で良好な結果が得られ、0.1 μ g/mL から 5.0 μ g/mL の範囲で直線性が認められた。マラチオンのプロダクトイオンスペクトルを図 6 に示す。プリカーサイオン m/z 331 から m/z 285 の特徴的なプロダクトイオンが検出された。その他の有機リン系農薬としてダイアジノン及びジクロルボスについても同様に添加血液を前処理後の試料を用いて条件の最適化を行った。いずれも、0.1 μ g/mL から 5.0 μ g/mL の範囲で直線性が認められ、それぞれ特徴的なプロダクトイオンを検知することにより、物質の同定が可能であった（図 7 及び 8）。

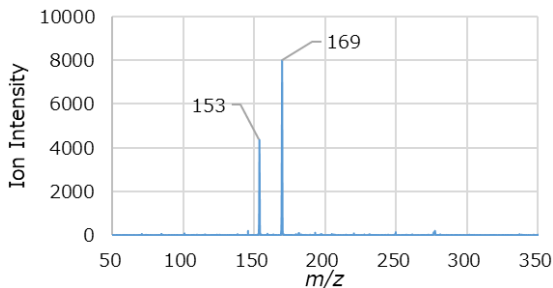


図 7 ダイアジノン（プリカーサイオン m/z 305）のプロダクトイオンスペクトル

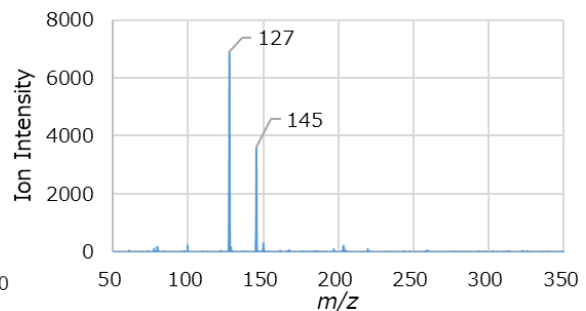


図 8 ジクロルボス（プリカーサイオン m/z 221）のプロダクトイオンスペクトル

実試料への適用： 直接導入型質量分析計を用いたスクリーニング法を農薬中毒が疑われた解剖事例の血液試料に適用した。すなわち、QuEChERS 法による前処理後の試料溶液をガラスろ紙に滴下し、測定したところ、図 9 に示すクロマトグラム及びプロダクトイオンスペクトルが得られた。これらの結果から、試料中にフェニトロチオンの存在が認められた。

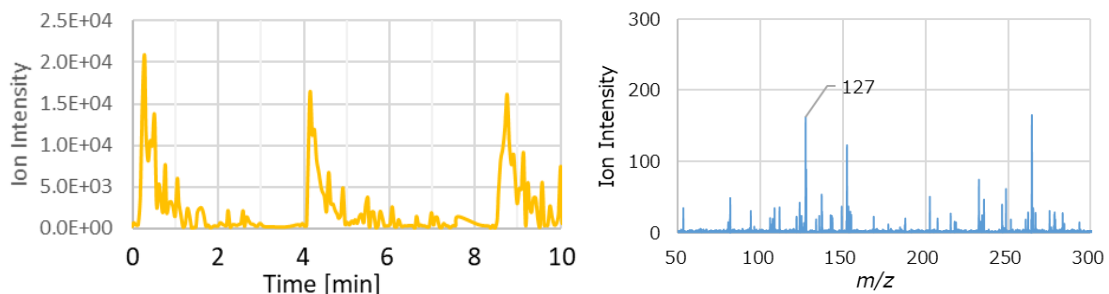


図 9 農薬中毒被疑事例の血液から得られたイオンクロマトグラム（ m/z 278 > 127、左）及びプリカーサイオン m/z 278 のプロダクトイオンスペクトル（右）

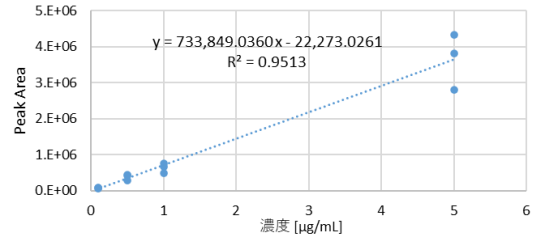


図 4 フェニトロチオン添加血液の検量線

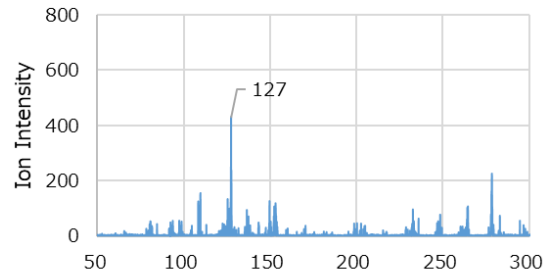


図 5 フェニトロチオン添加血液（0.5 μ g/mL）から得られたプリカーサイオン m/z 278 のプロダクトイオンスペクトル

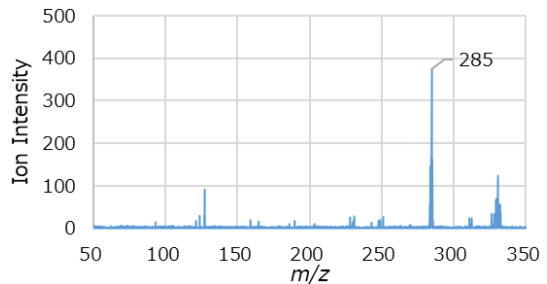


図 6 マラチオン（プリカーサイオン m/z 331）のプロダクトイオンスペクトル

また、フェニトロチオン添加血液を用いて作成した検量線から濃度計算し、別途液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC-MS/MS)を用いて定量検査を行った定量値と比較した(表1)。大腿血及び右心血においては極めて近い数値を示したが、左心血においては本法の数値が約30%低値となった。本法は現時点で正確な定量分析への利用を想定しておらず、迅速なスクリーニング並びに簡易な検量線に基づく半定量値の算出を目的としている。この観点において今回の実試料へ適用結果は、十分に満足するものであった。今後も実試料の測定を継続し、本法の実務への適用可能性を総合評価したいと考えている。

表1 定量分析結果とスクリーニング結果との比較

試料名	フェニトロチオン濃度, µg/mL	
	LC-MS/MS	本 法
大腿血	0.18	0.19
右心血	0.12	0.11
左心血	0.15	0.11

(7) 全体の研究成果

逆流型大気圧化学イオン化質量分析技術を利用し、揮発性毒物を含む薬毒物を対象とした迅速、簡便、高精度な一斉検査システムを開発することを目的とした。シアンイオン及びアジ化物イオンは負イオン測定モードで検出可能であったが、中毒レベルのヒト生体試料を測定するための高感度化が要求された。各種誘導体化処理を行ったが、感度向上は得られなかった。合成カンナビノイド及び合成カチノンについては、それぞれ特徴的なイオンの質量数及び強度をデータベース化することで物質同定が可能であった。

揮発性物質の測定については、ナローボアキャピラリーカラムを装填したヘッドスペースガスクロマトグラフィーによる測定法の構築を試みた。血中・尿中アルコールの測定に加え、ベンゼン、トルエン、キシレン、ペンタン、ヘキサン等について実務的な定性・定量検査に利用可能な手法を開発し、直接導入型質量分析を補完する手法と位置付けた。

農薬については、LC-MS/MSによる迅速測定法を確立し、血液・尿からの回収率やマトリクス効果の評価実験に利用した。直接導入型質量分析計による測定には血液試料の前処理にQuEChERS法を採用した。基礎実験をもとに実試料への適用を試みたところ、解剖事例の血液試料からフェニトロチオンを検知し、濃度推定に成功した。

以上、揮発性薬毒物を対象とした迅速、簡便、高精度な一斉検査システムを開発するための要素技術を確立することができた。

<引用文献>

犯罪死の見逃し防止に資する死因究明制度の在り方に関する研究会, 犯罪死の見逃し防止に資する死因究明制度の在り方について, <https://www.npa.go.jp/sousa/souichi/gijiyoushi.pdf>, 2011.

Schulz M, Schmoldt A, Andresen-Streichert H, Iwersen-Bergmann S. Revisited: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 1100 drugs and other xenobiotics. Crit Care. 2020 (1):195.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohrai Yasuhiko, Hashimoto Ryota, Ohmori Takeshi, Seto Yasuo, Inoue Hiroyuki, Nakagaki Hideki, Yoshikawa Katsutoshi, McDermott Larry	4. 巻 21
2. 論文標題 Continuous monitoring of chemical warfare agents in vapor using a Fourier transform infra-red spectroscopy instrument with multi pass gas cell, mercury cadmium telluride detector and rolling background algorithm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Forensic Chemistry	6. 最初と最後の頁 100292 ~ 100292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.forc.2020.100292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井上博之	4. 巻 139
2. 論文標題 法科学と科学捜査	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 685-691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.18-00166-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井上博之、岡馬恵介、堀岡希衣、石井名実子、本村あゆみ、矢島大介
2. 発表標題 有機リン系及びカルバメート系農薬の迅速測定法の開発とその法医学的応用
3. 学会等名 第11回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上博之、岡馬恵介、石井名実子、本村あゆみ、矢島大介
2. 発表標題 ナローボアキャピラリーカラムを装填したヘッドスペースGCによる血中アルコール類の測定
3. 学会等名 第89回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上博之、岡馬恵介、石井名実子、本村あゆみ、矢島大介
2. 発表標題 アルコール類を含む揮発性毒物の迅速測定法の開発とその法医学的応用
3. 学会等名 第10回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上博之
2. 発表標題 法科学と科学捜査
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inoue H., Hashimoto H., Tsujikawa K., Kuwayama K., Kanamori T., Yamamuro T., Segawa H., Iwata Y.T.
2. 発表標題 Rapid screening of new psychoactive substances in herbal products by thermal desorption counter-flow introduction atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry
3. 学会等名 国際法中毒学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上博之、岡馬恵介、堀岡希衣、石井名実子、本村あゆみ、矢島大介
2. 発表標題 ナローボアキャピラリーカラムを用いた揮発性毒物一斉検査システムの開発
3. 学会等名 第12回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	瀬戸 康雄 (Seto Yasuo) (10154668)	国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・ グループディレクター (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------