

令和元年5月31日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18134

研究課題名(和文)高温曝露した骨は薬物分析に有用か? ; 分析試料としての検証

研究課題名(英文)The usefulness of burned bone for toxicological analysis

研究代表者

中尾 賢一郎 (NAKAO, Ken-ichiro)

東京女子医科大学・医学部・准講師

研究者番号：20621618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：メタンフェタミンを投与したマウスの大腿骨を100℃で10分加熱、100℃で30分加熱および300℃で10分加熱した時、メタンフェタミンおよびアンフェタミンが検出された。HE染色において、大腿骨を300℃で加熱した場合、組織の崩壊と染色性の低下が見られ、500℃では組織が完全に崩壊していた。メタンフェタミン及びアンフェタミンの熱安定性について、メタンフェタミン-アンフェタミン混合溶液を100℃で加熱した時メタンフェタミン及びアンフェタミンのイオンピークは鋭敏であったが、300℃で加熱した場合、イオンピークは観察されなかった。以上の結果より、大腿骨は有用な分析試料となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医学における薬毒物分析は、血液や尿等を用いて行われるが、場合によって毛髪、爪、骨等の固体試料が用いられる。しかし、焼死事例では毛髪や爪も焼損することがある。本研究では高温曝露した骨からメタンフェタミン及びアンフェタミンを検出することができた。骨は厚い皮膚や脂肪、筋肉で覆われているため、低温短時間曝露では、骨内部まで熱が伝導しづらいと思われる。このため、たとえ周囲の温度が薬物固有の分解温度を超えたとしても骨からの薬物検出が可能であったと考えられた。体液採取が難しい焼死事例において骨試料が有用な分析試料となり得ることができ、死因究明の一助となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Methamphetamine and amphetamine were detected upon heating the femurs of mice treated with methamphetamine at 100℃ for 10 min, 100℃ for 30 min, and 300℃ for 10 min. Hematoxylin and eosin (HE) staining analysis revealed tissue disintegration and decreased staining upon heating the femur at 300℃ and complete tissue disintegration upon heating at 500℃. To study the heat stability of methamphetamine and amphetamine, a methamphetamine-amphetamine mixed solution was heated at 100℃. The resultant ion peaks of methamphetamine and amphetamine were sharp; however, when heated at 300℃, these peaks disappeared. These results demonstrated that the femur can be a useful analytical sample.

研究分野：法中毒

キーワード：法中毒 骨 メタンフェタミン 薬物分析 LC-MS/MS 社会医学 法医学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一時期相次いだ毒物混入事件、習慣性薬物の乱用など薬物分析の重要性が社会的に増している一方、犯罪の見逃しを防ぐ観点から薬物分析のさらなる発展が急務となっている。警察庁は2016年春から警察が取り扱う全遺体について原則、薬物使用の有無を検査する方針を取っており、社会的に薬毒物分析の重要性が非常に高まっていた。一般に薬物摂取の証明には血液や尿が用いられるため、白骨死体や焼損死体など体液が採取できない場合は爪、毛髪、骨等の固体試料が用いられる場合がある。本研究者はこれまでにマウスを用いた動物実験で、血液、筋肉、骨中の覚せい剤あるいはコカイン濃度を比較し、骨中の覚せい剤あるいはコカイン濃度が一番高くなることを見いだした。さらに、180日間土中に埋めた骨から経時的に覚せい剤あるいはコカインを検出し、血液や尿が採取できなくても骨が分析試料になりうることを示した(文献、)。メタンフェタミンやコカイン以外でも骨中の薬物濃度が高くなるものが数例報告されている(文献、)。骨髄は硬組織に包囲されており、外界からの影響を受けにくい。さらに骨内には高度な血管分布と脂肪に富む黄色骨髄が存在する。このため、脂溶性薬物であるメタンフェタミンやコカインは相対的に骨へ多く分布され骨中濃度が高くなったと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を踏まえ、様々な特殊環境下における骨試料の安定性を調べ、それを実務に応用することを目的とした。今回は血液や尿の採取が難しい焼死事例を想定し、メタンフェタミンを投与したマウスの大腿骨を高温曝露させ、大腿骨中のメタンフェタミン及び代謝物アンフェタミン濃度を、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を用いて定量分析した。さらに、高温曝露後の大腿骨の組織学的変化とメタンフェタミン及びアンフェタミンの熱安定性から分析試料としての骨の有用性について検討した。骨は厚い皮膚や脂肪、筋肉で覆われ、水分も保持しているため、低温短時間曝露では、骨内部まで熱が伝導しづらいと思われる。このため、たとえ周囲の温度が薬物固有の分解温度を超えたとしても骨からの薬物抽出は可能であると予想した。加熱温度、加熱時間と骨中薬物濃度の関係が明らかになれば、死亡当時の薬物濃度を予測できるなど、法医診断学上大きな前進をもたらすと考えられる。また、焼死は家屋火災だけでなく、爆破によるテロ事件でも見られる。この研究は学術的にも国際的にも寄与できるものと認識している。

3. 研究の方法

本動物実験は東京女子医科大学動物実験倫理委員会により承認され、規定に従い実施した。

(1) 骨中覚せい剤濃度の測定

5週齢 ddY 系雄マウスにメタンフェタミンを1日1回、7日間腹腔内投与した。メタンフェタミン投与量は1、5または10mg/kgとした。7日目のメタンフェタミン投与後120分にイソフルラン吸入下でペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与で全身麻酔を施行し、右房切損による放血で安楽死後、大腿骨を採取した。大腿骨はマッフル炉内で温度を100、300または500、加熱時間を10分または30分に設定し高温曝露させた。加熱後大腿骨をピーズ式ホモジナイザーで粉碎し、抽出操作を行い、LC-MS/MSを用いてメタンフェタミンとアンフェタミンの定量分析を行った。

(2) 高温曝露した大腿骨の組織学的変化の観察

5週齢 ddY 系雄マウスにイソフルラン吸入下でペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与で全身麻酔を施行し、右房切損による放血で安楽死後、大腿骨を採取した。大腿骨はマッフル炉内で温度を100、300または500、加熱時間を10分または30分に設定し高温曝露させた。高温曝露後、大腿骨を95%エタノールに24時間漬けて脱脂し、脱灰液に3日間浸漬した。浸漬後5%硫酸ナトリウム液に一晩浸漬し、その後30分水洗を行った。水洗後、エタノールにて脱水、キシレンにて脱アルコールをしたのちパラフィン包埋を行った。切片は4μmで作製し、ヘマトキシリンエオシン(HE)染色を行った。なお、コントロールの切片は非加熱の大腿骨を用いて作製した。

(3) メタンフェタミン及びアンフェタミンの熱安定性評価

濃度を100、500または1000ng/mLに調製したメタンフェタミンとアンフェタミンの混合溶液をふた付きのつぼに入れ、温度を100または300、加熱時間を10分または30分に設定したマッフル炉内にセットした。加熱後LC-MS/MSを用いてメタンフェタミン及びアンフェタミンのイオンピークを評価した。メタンフェタミンは91.05、119.10のイオンピークを、アンフェタミンは91.05、119.05のイオンピークを用いた。

4. 研究成果

(1) 骨中覚せい剤濃度について (図1)

大腿骨中のメタンフェタミン濃度は加熱温度が高い程減少し、1mg/kgと10mg/kg投与群における30分加熱群の濃度は100分加熱群より有意に減少した。また、10mg/kg投与群における100分加熱群の大腿骨中のメタンフェタミン濃度は、100分加熱群より有意

に増加した。大腿骨中のアンフェタミン濃度は、全ての投与群において加熱温度が高く加熱時間が長い程減少した。特に 5mg/kg 投与群では、100 30 分加熱群と 300 10 分加熱群のアンフェタミン濃度は、100 10 分加熱群と比べ有意に減少した。

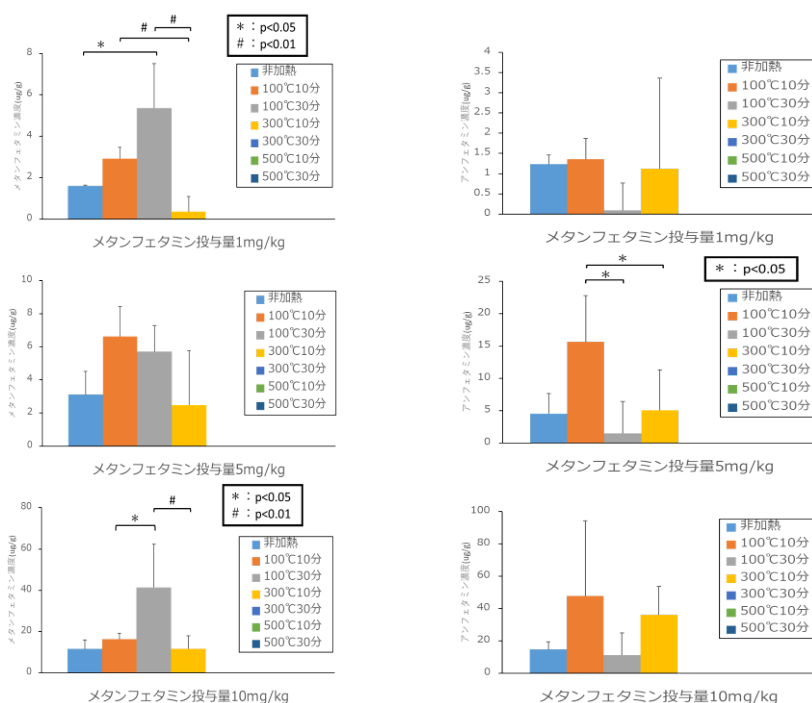


図 1. 大腿骨中のメタンフェタミン濃度(左)とアンフェタミン濃度(右)

(2) HE 染色結果 (図 2)

100 で 10 分または 30 分加熱した場合、細胞核や細胞質ともに大きな変性は見られなかった。300 で加熱した場合、組織の崩壊が見られ、染色性の低下も見られた。500 で 10 分加熱した場合、組織が完全に崩壊していた。500 30 分加熱の大腿骨は、灰化が進み、パラフィン包埋の作業自体が不可能であった。

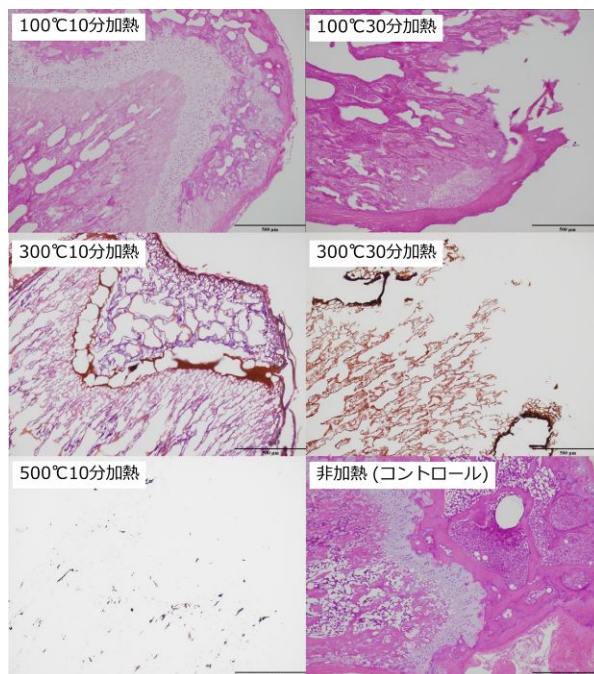


図 2. 大腿骨の HE 染色結果

(3) メタンフェタミン及びアンフェタミンの熱安定性評価 (図 3、図 4)

調製したいずれの濃度においても、100 で 10 分または 30 分加熱したメタンフェタミンとアンフェタミンの混合溶液のメタンフェタミン及びアンフェタミンのイオンピークは鋭敏であ

った。しかし、300 で加熱した場合、メタンフェタミン及びアンフェタミンのイオンピークは観察されなかった。

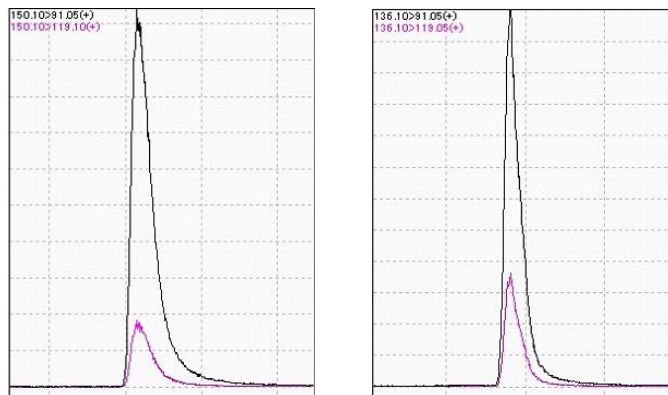


図 3. 100 で 10 分加熱した時のメタンフェタミン(左)とアンフェタミン(右)のイオンピーク(調製濃度 500ng/mL)

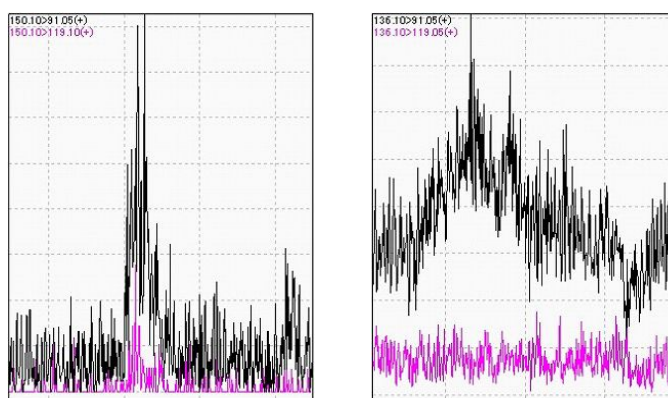


図 4. 300 で 10 分加熱した時のメタンフェタミン(左)とアンフェタミン(右)のイオンピーク(調製濃度 500ng/mL)

今回の研究より、100 10分加熱、100 30分加熱及び300 10分加熱した大腿骨において、構造はある程度崩壊したものの、メタンフェタミン及びアンフェタミンが検出された。しかし、メタンフェタミンとアンフェタミンの混合溶液を 300 で加熱するとメタンフェタミン及びアンフェタミンのイオンピークは観察されなかった。このことは、大腿骨が皮膚や大腿筋で覆われており、大腿骨内部への熱伝達が抑制され、メタンフェタミン及びアンフェタミンが残存できることを支持するものと考えられた。従って、体液採取が難しい焼死事例において骨は有用な分析試料となりうることを示唆された。

引用文献

Nakao K., et al. Quantification of methamphetamine in mouse thighbones buried in soil. J Forensic Sci. 62、2017、1554-1558

Nakao K., et al. Detection of cocaine and metabolites from mouse femur buried in soil. Legal Med. (Tokyo) 37、2018、1-6

McIntyre IM., et al. Post-mortem drug analyses in bone and bone marrow. Ther Drug Monit. 22、2000、79-83

Winek Cl., et al. Blood versus bone marrow pentobarbital concentration. Forensic Sci Int. 27、1985、15-24

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

中尾賢一朗、高温曝露したマウス大腿骨からの覚せい剤検出、日本法中毒学会第38年会、2019

中尾賢一朗、薬物分析における高温曝露した骨の有用性検討、第103次日本法医学会学術全国集会、2019

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者：なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者：なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。