

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：37104

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19819

研究課題名（和文）腐敗組織を含む特殊試料中薬物の標準的定量法確立のための挑戦的研究

研究課題名（英文）Challenging study to establish a standard method for the determination of drugs in special samples containing putrefied tissue

研究代表者

工藤 恵子（Kudo, Keiko）

久留米大学・医学部・客員准教授

研究者番号：10186405

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：法医解剖で得られる特殊試料中薬物の標準的定量法の確立を目的に腐敗させたブタの組織に2種のモデル薬物を添加、類似度の異なる内部標準物質(IS)を用いて内部標準法と標準添加法で定量を行い検量線の傾きや定量値の正確度を比較した。

内部標準法では、ISの類似度が下がるにつれて検量線の傾き幅が増大し、最大67%の定量誤差が認められた。一方、標準添加法では、高い相関を示す検量線を得るのがより困難であった。いずれの定量法でもISとしては重水素標識体が最も適しており、重水素標識体が入手困難な場合は、類似度が高いISを数種選んで薬物を抽出、最も高い相関を示した化合物をISに用いて定量することが有効と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国においては、現在のところ法医解剖で得られる腐敗組織を含む特殊試料中の薬物を正しく定量するための標準的な方法が存在せず、各施設でバラバラの方法で定量しているのが実情である。そのため得られた定量値の信頼性に疑問が残る。

本研究で行った基礎実験の結果により、特殊試料中の薬物を定量する方法について一定の方向性を示すことができた。この研究成果は学術的にも新しい知見である。今後さらに研究を発展させることで、我が国の死因究明のための薬物分析の質の向上と標準化に大きく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 establish a standard method for quantifying drugs in putrefied tissues obtained by forensic autopsy. Two model drugs, and internal standards(IS) with different similarities were added to putrefied pig tissues, and quantification was performed by internal standard method and standard addition method. The slope of calibration curves and the accuracy of quantitative values were compared.

In the internal standard method, the slope of the calibration curve fluctuated as the IS similarity decreased, and a maximum quantification error of 67% was observed. On the other hand, with the standard addition method, it was more difficult to obtain a calibration curve showing a high correlation. Deuterium labeled compound was the most suitable IS for any of the quantification methods. If deuterium labeled compound is not obtained, it seems effective to extract drug using several ISs with high similarity and quantify drug using IS which showed the highest correlation.

研究分野：法医中毒学

キーワード：法医中毒学 標準添加法 内部標準法 腐敗組織 定量方法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

死因究明において、薬物分析は、極めて重要である。たとえ死後経過が長期間に及ぶ死体であっても薬物分析が求められることが多い。しかし、腐敗が進行した特殊試料からの薬物の定量は困難を極めている。

薬物を含まないブランク試料に対象薬物と構造類似化合物 (内部標準物質 IS: Internal Standard) を添加した試料を用い、両化合物の強度比と添加薬物の濃度により検量線を作成して試料中薬物の濃度を求める内部標準法が血液や尿中薬物の定量法として広く用いられている。一方、ヒトのブランク試料が入手できない固体試料については、鑑定試料そのものに対象薬物を添加して作成した検量線により試料中の薬物濃度を求める標準添加法が推奨されている。しかしながら、標準添加法は検量線作成のために多くの試料を必要とする上に作業が煩雑であり、加えてその正確性を検証した報告もほとんど存在しない。そこで血液を用いた検量線により固体組織中の薬物を定量することも便宜的に行われているが、この方法では検量線の傾きが試料によって大きく異なる場合、正確な定量値が得られない危険性がある。また IS の効率的な選択方法也未確立であり、我が国においては、腐敗組織を含む特殊試料中薬物の定量について基準となる方法が存在せず、各施設でばらばらの方法で薬物濃度を算出しているのが実情である。

そこで、腐敗組織を含む特殊試料中の薬物を正しく定量できる方法を確立して、すべての機関で共有することができれば、薬物鑑定の信頼性を飛躍的に向上できると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、基礎実験として①新鮮および腐敗させたブタの血液、肝、筋に薬物を添加した模擬試料に、類似度の異なる内部標準物質 (IS) を加えて、それぞれ内部標準法と標準添加法で定量を行い、検量線の傾きや定量値の正確度を比較する。その際に②分析対象薬物に近い挙動を示す内部標準物質 (IS: Internal Standard) を *in silico* の手法で見つけ出す方法を検討する。最後に③解剖試料で検証を行い、特殊試料中薬物の実務的で信頼性の高い定量法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象薬物の選定と内部標準物質の選択

対象薬物としては、法医剖検試料の薬物分析でしばしば分析対象となる Lidocaine と Diphenhydramine を選択した。内部標準物質 (IS) としては ACD/MS Workbook Suite (ACD/Labs) ソフトウェアを用い、独自に作成した 1319 種の薬物データベースの中から、Dice Coefficient アルゴリズムによる類似度検索を行い、それぞれ類似度 0.75~1.0 の 6 種類を選択した。

(2) 模擬試料の作成

月齢約 3 カ月、体重 30 kg のブタの血液、筋肉、肝臓 (ジャパン・ラムより購入) を -20°C で冷凍保存したものを新鮮試料とし、室温 $25\sim 31^{\circ}\text{C}$ (平均 28°C) で 2 および 7 日間放置したのちに -20°C で冷凍保存したものを腐敗試料とした。それぞれの試料に Lidocaine ($10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ or g 、ヒトの致死濃度に相当) と Diphenhydramine ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ or g 、ヒトの中毒濃度に相当) を添加して模擬試料を作成した。

(3) 前処理法と分析方法

上記模擬試料 $0.1\ \text{ml}$ or g に 6 種の内部標準物質を添加し、内部標準法と標準添加法で検量線 (Lidocaine: 0, 1, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or g , Diphenhydramine 0, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or g) を作成、両薬物の定量を行った ($n=3$)。それぞれの定量方法について、検量線の傾きと相関係数、得られた定量値の正確度について比較検討した。薬物の抽出には QuEChERS 法を用い、分析は島津 LCMS-8040 および 8045 (トリプル四重極) で行った。

LC-MS の条件

装置: LC: Nexera UHPLC システム (島津)

MS: LCMS-8040, 8045 トリプル四重極 (島津)

カラム: Phenomenex Kinetex XB-C18 ($2.1 \times 100\ \text{mm}$, $2.6\ \mu\text{m}$)

カラムオーブン: 40°C 、流速: $0.3\ \text{ml}/\text{min}$

移動相: $10\ \text{mM}$ ギ酸アンモニウム -0.1% ギ酸水溶液 (A)

$10\ \text{mM}$ ギ酸アンモニウム -0.1% ギ酸メタノール溶液 (B)

グラジエント: 5% B ($0\ \text{min}$) - 95% B ($7.5 - 10\ \text{min}$) - 5% B ($10.01 - 15\ \text{min}$)

イオン源: ESI (+)

定量イオン: Lidocaine m/z 235.00>86.10, Lidocaine-d10 (類似度 1.0) 245.15>96.15, Prilocaine (0.953) 221.05>86.15, Atenolol (0.893) 267.05>145.05, Mepivacaine (0.875) 247.10>98.10, Alprenolol (0.804) 250.05>116.10, Diazepam-d5 (0.753) 290.15>154.05
Diphenhydramine m/z 256.00>167.05, Diphenhydramine-d6 (1.0) 261.90>167.25, Bromazine (0.9827) 334.20>245.00, Atomoxetine (0.9558) 256.05>44.05, Tramadol (0.9201) 264.10>58.15, Chlorpheniramine (0.8914) 275.00>230.00, Diazepam-d5 (0.7559)

4. 研究成果

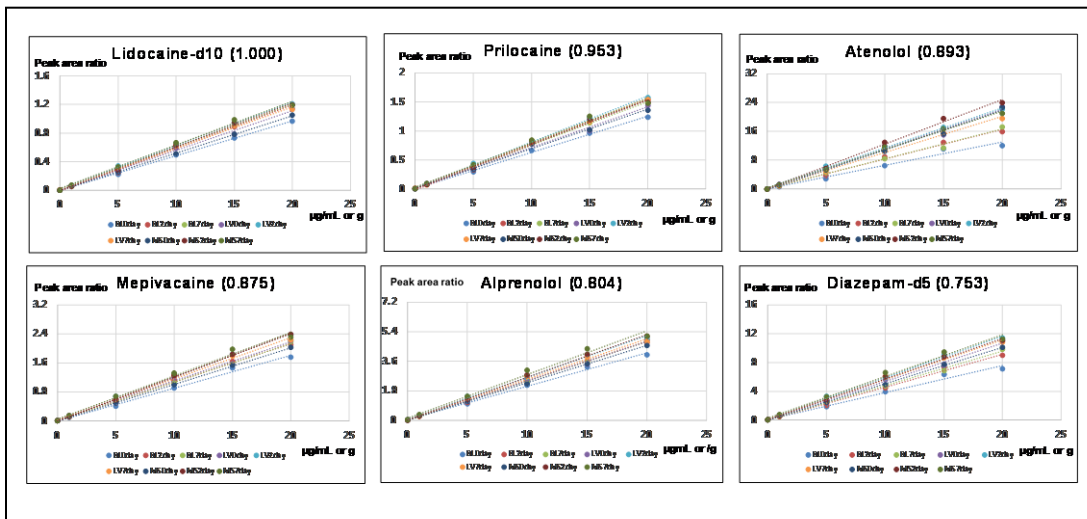
(1) 内部標準法

Lidocaine の検量線を内部標準法で作成したところ、新鮮試料の場合、いずれの IS を用いても決定係数 (r^2) が 0.99 以上の良好な直線性が得られた (Table 1)。この新鮮試料の検量線を用いて、腐敗試料中の Lidocaine を定量すると、腐敗の進行と共に、定量値の増加が認められ、7 日間放置した腐敗肝臓と筋肉では構造類似度が 0.9 以下の IS を用いた場合、最大 50% の定量誤差が認められた。それぞれの試料に各濃度の Lidocaine を添加して得られた検量線の傾きは、体組織の種類と腐敗の程度で異なり、Lidocaine と構造類似度が高い IS (Lidocaine-d10, Prilocaine) を用いた場合は検量線の傾きの差は小さくなった (Fig. 1)。一方 Atenolol と Diazepam-d5 を IS に用いると検量線の傾きの差が大きくなった。Diphenhydramine についても同様の傾向が認められ、新鮮血液の検量線で腐敗組織の定量を行うと、Diphenhydramine-d6 を IS に用いた場合は、得られた定量値のずれは腐敗した肝臓においても 15% 以内に留まったが、類似度の低い Diazepam-d5 を IS に用いると、最大 67% の定量誤差が認められた。

Table 1 内部標準法による検量線の決定係数と Lidocaine の定量値

試料	腐敗日数	r^2 と定量値 (n=3, $\mu\text{g/ml}$ or g)	Lidocaine-d10 (1.000)	Prilocaine (0.953)	Atenolol (0.893)	Mepivacaine (0.875)	Alprenolol (0.804)	Diazepam-d5 (0.753)
血液	0	r^2	0.996	0.993	0.997	0.999	0.997	0.997
		定量値	10.9	10.8	10.7	11.2	10.7	10.4
		2	11.7	11.6	11.1	12.4	11.4	11.6
肝臓	0	r^2	0.997	0.997	0.991	0.994	0.995	0.991
		定量値	10.3	10.6	10.1	10.0	10.1	9.7
		2	10.7	10.7	11.6	10.5	11.6	10.6
筋肉	0	r^2	0.995	0.994	0.994	0.992	0.995	0.992
		定量値	9.9	10.0	10.8	10.6	10.6	10.8
		2	11.6	11.4	12.9	12.4	12.3	12.6
血液	7	定量値	12.1	11.9	11.6	12.7	11.6	11.8
		2	12.1	11.9	13.3	11.6	13.3	11.9
		7	12.1	12.4	15.0	13.1	13.3	13.2

Fig. 1 異なる IS による検量線の傾きの違い (内部標準法)



(2) 標準添加法

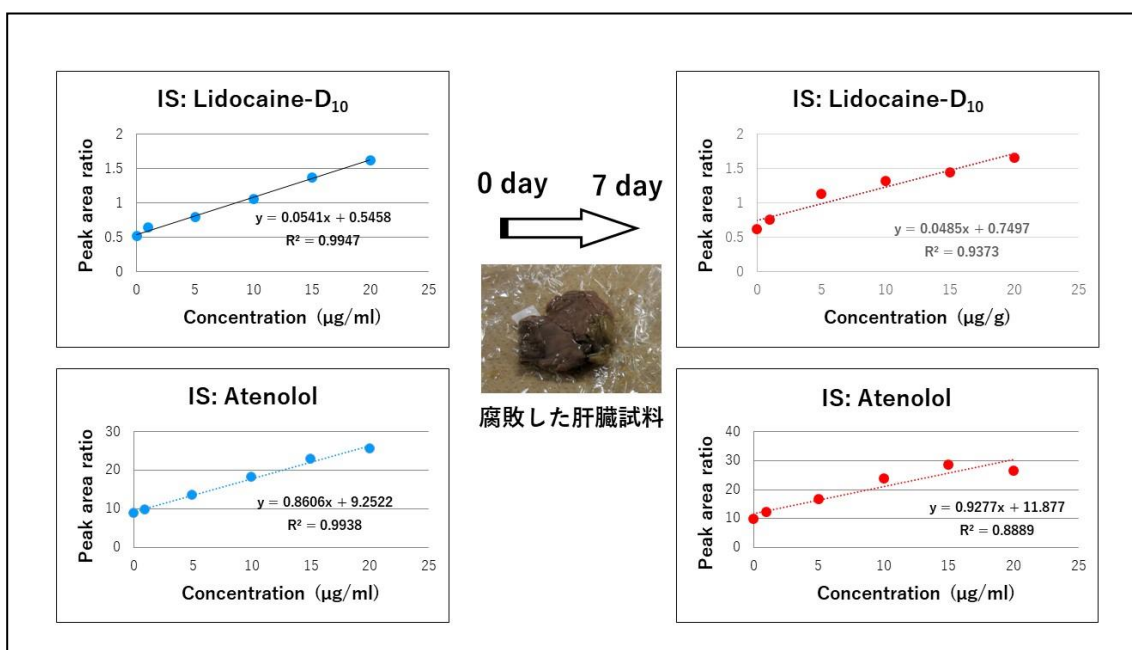
標準添加法における Lidocaine の分析では、定量精度は大幅に低下し、決定係数が 0.99 以下になる試料が多く認められた (Table 2)。この決定係数の低下は腐敗した肝臓で最も顕著であった (Table 2, Fig. 2)。得られた定量値も大きくばらつき、7 日間室温放置 (腐敗) した血液試料で 4.7~12.4 $\mu\text{g/ml}$ 、肝臓試料で 13.8~25.0 $\mu\text{g/g}$ 、筋肉試料で 9.9~13.0 $\mu\text{g/g}$ となった。

腐敗が進行した特殊試料からの薬物の定量には、マトリックス効果を相殺できる標準添加法が推奨されている。しかしながら、今回の実験結果から、標準添加法は内部標準法に比べて決定係数が 0.99 以上の良好な検量線を得るのが難しく、精度の高い定量値を得るためには、対象となる薬物ごとに、構造に近い化合物を IS として数種選択して薬物を抽出し、最も良い相関を示した IS を用いて定量することが有効であると思われた。

Table 2 標準添加法による検量線の決定係数と Lidocaine の定量値 (µg/ml or g)

試料	腐敗日数	Lidocaine-d10 (1.000)		Prilocaine (0.953)		Atenolol (0.893)		Mepivacaine (0.875)		Alprenolol (0.804)		Diazepam-d5 (0.753)	
		r ²	定量値	r ²	定量値	r ²	定量値	r ²	定量値	r ²	定量値	r ²	定量値
血液	0	0.988	10.0	0.974	12.4	0.957	4.1	0.996	7.9	0.947	2.8	0.980	6.1
	2	0.992	9.8	0.995	10.1	0.972	9.4	0.989	9.8	0.991	10.1	0.990	10.8
	7	0.968	11.9	0.974	12.4	0.961	4.7	0.996	7.9	0.988	10.1	0.980	6.1
肝臓	0	0.995	10.4	0.997	10.3	0.993	11.2	0.992	10.3	0.998	10.0	0.995	10.6
	2	0.987	10.2	0.989	10.8	0.980	11.3	0.981	10.7	0.986	10.7	0.984	10.5
	7	0.929	14.9	0.943	14.3	0.892	13.8	0.758	25.0	0.916	14.8	0.922	15.3
筋肉	0	0.984	12.4	0.980	13.0	0.977	15.1	0.993	12.7	0.990	14.3	0.984	15.1
	2	0.991	10.8	0.956	12.9	0.991	11.2	0.993	10.2	0.988	11.3	0.987	11.3
	7	0.996	9.9	0.990	13.0	0.988	10.0	0.996	12.1	0.995	11.3	0.998	11.3

Fig 2 腐敗による検量線の変化の一例 (標準添加法)



(3) 推奨される特殊試料中薬物の定量方法

本研究の成果から、内部標準法では IS として重水素標識体を用いることができれば、試料の種類や腐敗の程度が異なっても、かなり正確な定量値が得られることが判明した。一方重水素標識体の入手が困難な場合には、IS の選択によっては、定量値にかなり誤差が生じる可能性が示唆された。この場合は予め内部標準法で薬物濃度を推定したのち、構造類似度が高い IS を数種添加して標準添加法で薬物を抽出し、最も良い相関を示した化合物を IS として薬物を定量することが有効と思われた。現在までのところ決定係数が 0.99 以上になると正しい定量結果が得られると思われる。

(4) 今後の展望

本研究期間中に、ブタの組織を使った模擬試料を用いて、法医の特殊試料中薬物の定量方法について、一定の成果が得られた。今後はこの結果を元に、薬物鑑定において死因の判断に最も重要である解剖血液を用いて同様の検討を行い、今回得られた結果の検証を行いたいと考えている。また、*in silico* の手法を用いた IS の選択方法についてもさらなる検討を行う予定である。それらの結果を踏まえて、内部標準物質の選定方法や標準添加法の検量線の作成方法などについて具体的な方法を示せるよう、研究を続行したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 工藤恵子、坂幹樹、久保真一	4. 巻 26
2. 論文標題 法医剖検診断のための質量分析計（MS）を用いた薬毒物スクリーニングと定量検査 ―現在の流れと今後の方向性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 法医病理	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kudo K, Usumoto Y, Sameshima N, Okumura M, Tsuji A, Ikeda N	4. 巻 36
2. 論文標題 Reliable determination of cyanide, thiocyanate and azide in human whole blood by GC-MS, and its application in NAGINATA-GC-MS screening	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 160-169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 工藤恵子、坂幹樹、副島美貴子、池田典昭、久保真一、神田芳郎
2. 発表標題 腐敗組織を含む特殊試料中薬物の標準的定量法の確立（第1報）
3. 学会等名 日本法中毒学会第38年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saka K, Nakazono Y, Kudo K, Imoto E, Iida T, Minohata T, Furuta K, Fujii Y, Makino Y, Iwase H
2. 発表標題 Development of a non-target drug screening system in blood using LC-QTOF-MS with in silico approaches.
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saka K, Nakazono Y, Kudo K, Minohata T, Hirano I, Furuta K, Fujii Y, Makino Y, Ikeda N, Iwase H,
2. 発表標題 A state-of the-art retention time prediction model for non-target drug screening.
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saka K, Kudo K, Makino Y, Ikeda N, Iwase H
2. 発表標題 In silico modeling to predict fatal blood concentrations of drugs (preliminary study)
3. 学会等名 The 56th annual meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, (国際学会)
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
研究分担者	坂 幹樹 (Saka Kanju) (30447388)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・技術専門職員 (12601)	2017-2019年度
研究分担者	辻 彰子 (Tsuji Akiko) (10171993)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	2017-2018年度
研究分担者	池田 典昭 (Ikeda Noriaki) (60176097)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	2017-2018年度