

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2009

課題番号：18590631

研究課題名 (和文) 薬毒物の錯体励起による高感度イオンスプレー質量分析法の開発

研究課題名 (英文) Development of sensitive detection method for chelated poisons using electrospray ionization mass spectrometry

研究代表者

南方 かよ子 (MINAKATA KAYOKO)

浜松医科大学・医学部・講師

研究者番号：70115509

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：薬毒物、錯体、質量分析、イオンスプレー

1. 研究計画の概要

イオンスプレー質量分析法 (ESI-MS) は分子構造を知るには最も適した方法であるが、分子が強く荷電していたり、反対に全く荷電していないと検出できないという欠点がある。例えば有害な種々の重金属イオンは強く+に荷電し、青酸イオン、アザイドイオン等は強く-に荷電しているため検出できない。生体内では多くの薬毒物は錯体となっているので、錯体の分子構造解析や定量は重要であるが、上記理由により、ESI-MS による錯体の高感度解析は殆どなされていなかった。申請者は、薬毒物を錯体化し、さらに第三の因子を反応させて ternary complex を作成 (励起) し、分子を弱く荷電させることによりイオン化を促進し、ESI-MS で高感度に検出する方法を見出した。この励起化法を用いた薬毒物の高感度定量と作用機序の解明が目的である。

(1) モリブデン、プラチナ、クロム、コバルト等の陽イオン含有薬毒物測定のための励起化法の開発

(2) 青酸カリ、アジ化ナトリウム、チオシアン等の陰イオン含有薬毒物のための励起化

(3) ヒ素、セレン等の非金属元素含有薬毒物のための励起化

(4) 解毒に関与するモリブデン酵素と薬毒物中毒との関係解明

(5) 以上を総合した、ESI-MS に適した錯体励起化メカニズムの解明と多くの物質に適した励起化法の開発

2. 研究の進捗状況

(1) モリブデン含有酵素にはアルデヒドや亜硫酸の酸化酵素や、硝酸の還元酵素等があ

り、生体内の解毒に寄与している酵素であるが、生体内には極めて微量しか含まれていないので、高感度定量が望まれていた。酵素反応時には5価のラジカルとなる。酵素のモデル物質としての錯体を作成し、ラジカルを作成してその構造を ESI-MS で決定した。またこの方法を応用して、生体内のモリブデンの高感度定量をした。Anal Biochem 2006 で報告。

(2) シスプラチンの定量ならびにシスプラチン中毒の解明。シスプラチンはプラチナを含む抗癌剤である。この薬剤の過剰投与後の44日と181日に死亡した二人の患者について、10種以上の組織、尿、血液中のプラチナを定量した。このような患者についての報告は今迄になされていなかった。J Chromatogr B 2006, Forensic Toxicol 24, 83-87, 2006 で報告。

(3) 6価クロムならびに6価クロム錯体 (Urine Luck) の結合様式の解明。3価のクロムは糖、蛋白、脂肪の代謝に必須の金属であるが、6価クロムは微量でも、発ガン作用等があり、有害である。また、6価クロム化合物は Urine Luck の商品名で売られ、尿中の大麻、モルヒネ、コデインの検出を妨害するので3価のクロムと、6価クロムとを分けて定量する必要がある。MS-MS により錯体の結合様式を解明した。また検出限界を MS 法の50分の1以下にする事ができた。Forensic Toxicol 24, 48-50, 2006, Forensic Toxicol 2008 で報告。

(4) コバルトの定量ならびに造血機構の解明。コバルトはビタミン B12 の構成要素であり、コバルト製剤の服用により、赤血球が増加するので運動選手が血液ドーピングの代わり

に用いていることが示唆されている。一方、コバルトの過剰摂取は発ガンその他の害があるので血液中、尿中の鋭敏な定量が必要である。従来の ICP-MS 法では 1 本のシグナルしか観察できないが、MS-MS 法を用いて、数本のプロダクトイオンのシグナルが観測できるようにし、同定の信頼性を向上させ、かつ感度も向上させた。Anal Chim Acta 2008 で報告。

(5) 無機ヒ素の定量法の開発。無機ヒ素類は古くから知られている毒物で、亜ヒ酸の毒性はヒ酸の約 10 倍と報告されている。両者を高感度で分別定量した。Anal Chim Acta 2009 で報告。

3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。

下記の研究成果に記されている①③④⑤の雑誌論文の Impact Factor の合計は 12.31 で、よい成果をあげることができた。研究の途中で、本学に設置されている装置でプロダクトイオンスキャン (MS-MS) ができるとに気がついた。その方法を用いて、より詳細に分子構造を知ることができ、また、感度も 10 倍から 50 倍向上することができた。

4. 今後の研究の推進方策

(1) ヒ素等の非金属元素を含有した薬毒物の検出法については既に一部成果を得ているが、さらに中毒患者試料についても検討を行う。

(2) 青酸カリ、チオシアン等の陰イオンの薬毒物のための測定法について、既に一部成果を得ているが、さらに中毒患者試料についても検討を行う。

(3) 数種の化合物を同時に励起化定量する方法について、既に一部成果を得ているが、さらに優れた方法の開発に努める。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

① Kayoko Minakata, Masako Suzuki, Osamu Suzuki, Simple and selective determination of arsenite and arsenate by electrospray ionization mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 631, 87-90, 2009, 査読有

② Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al, Determination of Urine Luck in urine using electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Forensic Toxicology*, 26, 71-75, 2008, 査読有

③ Kayoko Minakata, Masako Suzuki, Osamu Suzuki, Application of electrospray

ionization tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cobalt in urine, *Analytica Chimica Acta*, 614, 161-164, 2008, 査読有

④ Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al, Determination of platinum derived from cisplatin in human tissues using electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 832, 286-291, 2006, 査読有

⑤ Kayoko Minakata, Masako Suzuki, Osamu Suzuki, Determination of molybdenum and/or ruthenium in urine using electrospray ionization mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 348, 148-150, 2006, 査読有

[学会発表] (計 22 件)

① Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al, Solvent extraction procedure for the differential determination of arsenite and arsenate by electrospray ionization mass spectrometry, *International Symposium, Advances in Legal Medicine*, September 5, 2008, Osaka, Japan

② Kayoko Minakata, Kunio Gonmori, Osamu Suzuki, Determination of cobalt in urine to discriminate its excessive administration using electrospray ionization tandem mass spectrometry, *The International Association of Forensic Toxicologists*, June 7, 2008, La Martinique, France

③ Kayoko Minakata, Kunio Gonmori, Osamu Suzuki, Determination of Urine Luck in urine using electrospray ionization tandem mass spectrometry, *The International Association of Forensic Toxicologists*, August 28, 2007, Seattle, USA

④ Kayoko Minakata, Osamu Suzuki, Platinum levels in various tissues of a patient died 181 days after cisplatin overdose determined by electrospray ionization mass spectrometry, *The International Association of Forensic Toxicologists*, August 28, 2006, Ljubljana, Slovenia

⑤ Kunio Gonmori, Kayoko Minakata, Kanako Watanabe, et al, Studies on the cause of an encephalopathy which took place in the limited areas in Japan 2004: a possibility of poisoning by cyanide being contained in a kind of mushroom, *The International Association of Forensic Toxicologists*, August 29, 2006, Ljubljana, Slovenia