

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19590682

研究課題名 (和文) 質量分析の新技法を用いたベンゾジアゼピン系薬物分析法の再構築研究課題名 (英文) Reconstruction of the benzodiazepine screening using the new technologies of mass spectrometry

研究代表者 林田真喜子 (HAYASHIDA MAKIKO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60164977

研究代表者の専門分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：ベンゾジアゼピン系薬物，質量分析，LC-TOF，LC-MS-MS，GC-MS，スクリーニング，生体試料，固相抽出

1. 研究計画の概要

ベンゾジアゼピン系薬物は、微量で薬効を示し、血中濃度は数 ng/ml と著しく低濃度であること、国内では約 30 種類が使用されているが、類似の化学構造や近似な分子量を有し、不分離ピークや類似なマススペクトルを示すことなどから、各薬物の識別が難しく、現在、法医中毒領域で生体試料からの分析が最も困難とされている薬物で、質量分析の技法が必須とあれている。一方、最近の質量分析の進展はめざましく、複雑なマトリックス中から目的物質のみを高選択的に精密質量分析できる飛行時間型質量分析計(LC-TOF)や定量イオンと確認用イオンを別々に設定することのできる高感度な LC 三連四重極質量計(LC-MS-MS)、GC/MS 用相対定量・迅速他成分一斉分析ソフトウェア(NAGINATA)、超微粒子技術に基づく Ultra performance LC (UPLC)などが有力な手段となりうる。しかしながら、これらの高機能精密機器は高価で、現状の法中毒学分野の単一機関で維持できるものではない。当課題では、日本医大、福島県立医大、東邦大、九州大の各法医学教室と機器メーカーの協力で本研究を立案した。

2. 研究の進捗状況

H21 年度では前年度に引き続き、(1) 飛行時間型 LC-TOF-MS を用いて、ベンゾジアゼピン系薬物の未変化体及び代謝物 43 種類の精密質量データベースを検討した。この方法では、従来の LC-MS では同定が困難であった、類似のクロマト溶出挙動を示す同重体を識別できるなど有効であることが確認された。しかしながら、救命救急センター(CCMC)でみられる多剤併用薬物中毒症例の試料には、ベンゾジアゼピン系薬物以外の薬物が多く含まれ、これらの高濃度を示す薬物の影響についても見直すことが重要と思われたので、法中毒学的薬物分析に重要と思われる薬物を追加、合計 142 種類の精密質量データベースとして拡充した。CCMC 収容の多剤併用薬物中毒症例の解析に応用し、精密質量を用いた TOF-MS 薬物スクリーニングの有用性を検討した。

(2) TOF-MS 薬物スクリーニングの有用性を確認したので、Q-TOF 装置での測定・解析を試みた。Q-TOF 薬物スクリーニングは、精密質量データベースに加えて個々の薬物における product ion と MRM クロマトグラムを用いた TARGET ANALYSIS が可能であった。精密質量による NON-TARGET ANALYSIS も併せて実施することが可能であり、Q-TOF 薬物スクリーニングが有効であることが示唆された。(3) GC/MS 用相対定量・迅速一斉分析ソフトウェア(NAGINATA)を用いたベンゾジアゼピンスクリーニングを検討した。calibration rocking database を用いた NAGINATA スクリーニングでは 10-5000ng/ml の範囲で直線性、回収率、再現性とも良好で、法医学的試料への実用性が確認された。

3. 現在までの達成度

当課題では、「質量分析の新技法を用いたベンゾジアゼピン系薬物分析法の再構築」を目指すものであったが、実際に研究を進めていくに従って、多剤併用薬物中毒症例にはベンゾジアゼピン系薬物以外の薬物も多く含まれ、これらの高濃度を示す薬物の影響について見直すことが重要と思われたので、法医中毒学的薬物分析に重要な薬物を追加、合計 142 種類の精密質量データベースとして拡充するなど、当初の研究目的は十分な成果をあげ、加えて予測を超えた研究到達を果たした。

4. 今後の研究の推進方策

H21 年度で Q-TOF 薬物スクリーニングの有効性が示唆されたので、法医中毒の実務的応用を含めた検討を行う。また、質量分析の新技法を考察するにあたって、TARGET ANALYSIS と精密質量による NON-TARGET ANALYSIS の詳細についても研究の枠組みに加える予定である。H22 年度は最終年度であるので、当課題で得られた知見を国内外に広くアピール、関連研究者たちとのディスカッションを通じて、研究へのフィードバックを計り、成果をまとめた。

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7件) H21 分のみ

1. Hayashida M, Takino M, Uekusa K, Terada M, Kurisasi E, Kudo K. TOF-MS accurate mass database for benzodiazepine screening. Legal Med 11 (2009) S423-S425. (査読有)
2. Uekusa K, Ono T, Hayashida M, Nihira M, Ohno Y. GC/MS analysis of a herbal dietary supplement containing ephedrine. Legal Med 11 (2009) S573-S575. (査読有)
3. Ono T, Hayashida M, Uekusa K, Cui FL, Hayakawa H, Nihira M, Ohno Y. An accidental case of acute poisoning due to Kampo herbal medicine ingestion. Legal Med 11 (2009) 132-135 (査読有)
4. Kudo K, Ishida T, Hikiji W, Hayashida M, Uekusa K, Usumoto Y, Tsuji A, Ikeda N. Construction of calibration-locking databases for rapid and reliable drug screening by gas chromatography-mass spectrometry. Forensic Toxicol 27 (2009) 21-31. (査読有)
5. Ishida T, Kudo K, Hayashida M, Ikeda N. Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column. J of Chromatogr B 877 (2009) 2652-2657 (査読有)
6. Kurisasi E, Kato N, Ishida T, Matsumoto A, Shinohara K, Hiraiwa K. Fatal human poisoning with Padan™: a cartap-containing pesticide. Clin Toxicol, 48(2010) 153-155 (査読有)
7. 林田真喜子, 植草協子, 仁平 信, 大野曜吉. 分析ラボ紹介-日本医科大学法医学教室. 中毒研究, 23(2010), 68-72 (査読無).

[学会発表] (計12件) H21 分のみ

1. Hayashida M, Takino M, Kudo K, Terada M, Ohno Y. Application of Time-of-Flight Mass Spectrometry (TOF-MS) to Multiple-Drug Poisoning Cases. The International Association of Forensic Toxicologists 47th International meeting (Geneve), 2009.
2. Kudo K, Hikiji W, Hayashida M, Uekusa K, Ikeda N. Construction of calibration locking databases for rapid and reliable drug screening by gas chromatography-mass spectrometry. The International Association of Forensic Toxicologists 47th International meeting (Geneve), 2009.
3. 林田真喜子, 植草協子, 工藤恵子, 石田知己, 大野曜吉. FOCUSカラムを用いたアコニチン系アルカロイドのLC/MS分析. 第93次日本法医学学会学術全国集会 (大阪), 2009.5.
4. 寺田賢, 佐々木千寿子, 林田真喜子, 栗原克由, 篠塚達雄, 田中榮之介, 長谷川智華, 大野曜吉, 的場梁次, 黒崎久仁彦. ベンゾジアゼピン系薬物の4検出事例について. 第93次日本法医学学会学術全国集会 (大阪), 2009.5
5. 林田真喜子, 滝埜昌彦, 植草協子, 工藤恵子, 寺田賢, 栗崎恵美子, 大野曜吉. ベンゾジ

アゼピン系薬物を含む多剤併用薬物中毒症例へのTOF-MS薬物スクリーニングの応用. 日本法中毒学会第28年会 (金沢), 2009.6

6. 林田真喜子, 植草協子, 工藤恵子, 大野曜吉. 剖検試料中セルトラリン, ニトラゼパム, アルプラゾラムのLC/MS分析. 日本法中毒学会第28年会 (金沢), 2009.6
7. 寺田賢, 篠塚達雄, 田中榮之介, 林田真喜子, 長谷川智華, 大野曜吉, 黒崎久仁彦. GC/MSによるクアゼパム及びその代謝物の分析. 日本法中毒学会第28年会 (金沢), 2009.6
8. 工藤恵子, 引地和歌子, 林田真喜子, 植草協子, 池田典昭. GC/MSによる標準品を必要としない薬毒物スクリーニング法のためのデータベースの構築. 日本法中毒学会第28年会 (金沢), 2009.6
9. 白川洋一, 奈良女 昭, 林田真喜子, 福本真理子, 福家千昭, 堀 寧, 波多野弥生, 野村奈央, 飯塚富士子, 黒木由美子, 遠藤容子, 吉岡敏治. 急性中毒症例の予後推定. 第31回日本中毒学会総会・学術集会 (東京), 2009.7
10. 滝埜昌彦, 林田真喜子, 工藤恵子, 寺田賢, 栗崎恵美子, 大野曜吉. LC/Q-TOF-MS及び保持時間-精密質量データベースを用いた薬物スクリーニング法の検討. 日本法科学技術学会第15回学術集会 (東京), 2009.11
11. 寺田賢: 超高速LC/MS分析を用いたベンゾジアゼピン系薬物の迅速・高精度スクリーニング法の開発. 第63回東邦医学会総会, 平成20年度医学研究科推進研究報告 (東京), 2009.11
12. 須藤美和子, 栗崎恵美子, 加藤菜穂, 水澤郁文, 平岩幸一. 薬物スクリーニングにおけるFocusTMカラムを用いた前処理法について. 第10回日本法医学学会学術北日本地方集会 (旭川), 2009

[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:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:
[その他]