

平成22年6月11日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790451

研究課題名 (和文) ホルマリン固定臓器からの薬毒物のスクリーニング法の開発

研究課題名 (英文) Development of a screening method for drugs in formalin-fixed tissue

研究代表者

辻川 健治 (TSUJIKAWA KENJI)

科学警察研究所・法科学第三部化学第一研究室・研究員

研究者番号：50356193

研究成果の概要 (和文)：ブタ肝臓のメタノールホモジネートに対し、精神神経作用薬の標準品を添加し、冷凍脱脂、ヘキサン-アセトニトリル分配、塩基性条件下での有機溶媒抽出等の前処理を順次行い、分析用の試料を調製した。調製した試料について、LC-MS/MSにより分析を行い、回収率及び繰り返し再現性について評価した。その結果、分析対象とした薬物 38 種のうち、7-アミノベンゾジアゼピン類 3 種を除いた 35 種の塩基性精神神経作用薬において、回収率 40%以上、繰り返し再現性 (CV%) 15%以内を達成することができた。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this study is to develop a screening method for 38 central nervous system drugs such as hypnotics, antidepressants, antipsychotics. The drug standards were spiked to methanol homogenate of porcine liver, then clean-up was performed as following order: i) fat precipitation by cooling, ii) hexane-acetonitrile partition, iii) liquid-liquid extraction under basic condition. The sample prepared was determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry. The recovery and repeatability (CV%) of the targeted drugs except for 7-aminobenzodiazepines (3 drugs) were more than 40% and within 15%, respectively. The method would be useful for drug screening in solid tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	500,000	0	500,000
2009年度	600,000	0	600,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	0	2,100,000

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：法医鑑定学、薬毒物スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

近年、各種事件・事故への薬毒物の関与が世界的に問題となっている。当科学警察研究所が集計している「薬物による中毒事故等

の発生状況」によれば、日本国内では年間3000～5000件程度の中毒事案が発生している。中毒の起因物質として最も頻度が高いものは一酸化炭素であるが、これに次ぐ重要な

薬毒物群としては、精神神経作用薬（催眠鎮静薬、統合失調症治療薬、抗うつ薬等）が挙げられる。これらの薬毒物群は自己使用による中毒のみならず、犯罪用途（例：昏睡状態での殺人、強盗、強姦）に使用されることもあるため、それらのスクリーニング的な分析は非常に重要である。

薬毒物のスクリーニングは、一般的には採取の容易な尿や血液を検体として行われることが多い。しかしながら、殺人等の重大犯罪においては、事件発生後歳月が経過してから薬毒物検査を要請されることもある。そのような事例においては、尿や血液は保存されていないことが多いため、保存されている可能性の高い臓器（特にホルマリン固定されたもの）が代替試料として重要となる。

これまで尿や血液を対象とした薬毒物スクリーニングに関する研究は、国内外で精力的な研究が行われてきた。しかしながら、臓器中の薬毒物のスクリーニングに関する研究は、ホルマリン固定の有無を問わずほとんど行われてこなかった。

2. 研究の目的

臓器中の精神神経作用薬のスクリーニング法の開発を目的とした。具体的には、以下の順序で検討を行い、スクリーニング法を確立することを目標とした。

(1) ホルマリン固定されていないブタ肝臓からの精神神経作用薬のスクリーニング法の開発

(2) ホルマリン固定されたブタ肝臓からの精神神経作用薬のスクリーニング法の開発

(3) ホルマリン固定が精神神経作用薬の安定性に及ぼす影響の評価

しかしながら、(1)のホルマリン固定されていない臓器からのスクリーニング法の確立に難航したため、(2)、(3)については検討を行うに至らなかった。

3. 研究の方法

(1) 分析対象薬物

精神神経作用薬のうち、当研究所が集計している「薬物による中毒事故等の発生状況」で出現頻度の高かった薬物、今後出現頻度の上昇が予想される薬物、及びそれらの重要な代謝物等計 38 種を分析対象とした。具体的な薬物名は以下のとおりである。なお、添加濃度は、各薬物の臨床血中濃度に合わせて、1 ng/ml - 500 ng/ml で設定した。

①催眠鎮静薬 (7 種)：ゾピクロン、ゾルピデム、ラメルテオン、フルニトラゼパム、トリアゾラム、クアゼパム、ロルメタゼパム

②抗不安薬 (3 種)：アルプラゾラム、ロラゼパム、エチゾラム

③抗うつ薬 (10 種)：ノルトリプチリン、デシプラミン、マプロチリン、イミプラミン、

デュロキセチン、アモキサピン、パロキセチン、アミトリプチリン、セルトラリン、フルオキセチン、

④統合失調治療薬 (9 種)：ジプラシドン、ゾテピン、ベルフェナジン、フルフェナジン、ピモジド、ハロペリドール、ブロムペリドール、クロルプロマジン、レボメプロマジン

⑤抗てんかん薬 (3 種)：クロナゼパム、クロバザム、カルバマゼピン

⑥抗パーキンソン病薬 (1 種)：プロメタジン

⑦中枢興奮薬 (2 種)：メチルフェニデート、モダフィニル

⑧7-ニトロベンゾジアゼピン類の代謝物 (7-アミノベンゾジアゼピン類) (3 種)：7-アミノニトラゼパム、7-アミノフルニトラゼパム、7-アミノクロナゼパム

(2) 遠心ろ過フィルターによるろ過時の回収率の評価

分析対象薬物を含有する各種溶液（メタノール-水混液あるいはメタノール-0.1 M 塩酸混液）について遠心ろ過フィルター

(Ultrafree MC、ミリポア) でろ過前後の液を LC-MS/MS で分析し、遠心ろ過時の回収率を評価した。

(3) ホルマリン固定されていないブタ肝臓からの分析用試料の調製

①メタノールによる除タンパク

ブタ肝臓のメタノールホモジネート 4 g（ブタ肝臓 1 g に対しメタノール 3 g を添加して調製）に対し、薬物標準溶液を添加しよく混和後、10 分程度放置した。これを遠心（7000 g、10 分、4℃）し上清を分取した。沈殿物に対しメタノール 3 g を加え、よくけん濁後、再度遠心（7000 g、10 分、4℃）し、得られた上清を一回目の上清と合わせた。この合わせた液をメタノール除タンパク液と称した。

②冷凍による脱脂

上記①のメタノール除タンパク液を冷凍庫で保存後（-20℃、30 分）、遠心（2000 g、5 分、-15℃）し、脂肪分を沈殿させて除去した。得られた上清を分取し、窒素気流下で溶媒を留去した。

③ヘキサン-アセトニトリル分配による洗浄

上記②の溶媒留去後の残さをヘキサン（アセトニトリル飽和）2 ml でけん濁した。このヘキサンけん濁液をアセトニトリル（ヘキサン飽和）2 ml で 3 回抽出した。3 回分の抽出液を合わせものを冷凍庫で保存（-20℃、30 分）後、遠心（2000 g、1 分、-15℃）し、アセトニトリルに溶解していたヘキサン層を除去した。ヘキサンを除去したアセトニトリル層は、窒素気流下で溶媒を留去した。

④塩基性条件下での有機溶媒抽出

上記③の溶媒留去後の残さに 0.5 M 炭酸

緩衝液 (pH 10.0) 0.5 ml 及び蒸留水 0.5 ml を加えけん濁した。このけん濁液をジクロロメタン-2-プロパノール (9:1) 2 ml で3回抽出した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、窒素気流下で溶媒を留去した。

⑤遠心ろ過フィルターによるろ過及び冷凍による脱脂

上記④の抽出液の残さに 90%メタノール 100 μ l を加えけん濁した後、遠心ろ過フィルター (Ultrafree MC、ミリポア) でろ過した。得られたろ液を冷凍庫で保存 (-20°C、30 分) 後、遠心 (10000 g、1 分、-15°C) し、脂肪分を沈殿させ除去した。遠心後の上清を LC-MS/MS による分析に供した。

(4) 機器分析の条件

装置: Waters Acquity UPLC & Quattro Premier XE、カラム: Waters BEH C18 (1.7 μ m、2.1 \times 50 mm)、カラム温度: 40°C、移動相: A 液 25 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.0)、B 液 アセトニトリルのグラジエント、グラジエントの条件(B%): 0-2 分 10%、2-15 分 10 \rightarrow 90%、15-18 分 90%、18-18.1 分 90 \rightarrow 10%、18.1-22 分 10%、UV 検出波長: 230 nm、MS イオン化法: ESI (ポジティブモード)、MS/MS の測定モード: SRM

4. 研究成果

(1) 移動相の選択

当初は塩基性薬物の保持を高める目的で中性移動相 (重炭酸アンモニウム pH 6.8 - アセトニトリル系) を用いたが、ブタ肝臓抽出物の存在下で三環系抗うつ薬やフェノチアジン化合物の保持時間に顕著な変動が認められた (表 1)。一方、弱酸性移動相 (酢酸アンモニウム pH 5.0 - アセトニトリル系) を用いたところ、ブタ肝臓抽出物による保持時間の変動は認められなかった (表 2)。そこで、以後の検討では、LC の移動相として酢酸アンモニウム pH 5.0 - アセトニトリル系を選択した。

なお、酢酸アンモニウム pH 5.0 - アセトニトリル系移動相を使用した場合、一部の化合物でピーク形状及び感度の向上が認められた (図 1)。

表 1: ブタ肝臓抽出物による保持時間の変動 (移動相: 重炭酸アンモニウム pH 6.8 - アセトニトリル系)

薬物名	保持時間 (分)	
	標準品のみ	標準品+ブタ肝臓抽出物
トリアゾラム	7.98	7.96
ノルトリプチリン	8.64	9.07
ペルフェナジン	10.83	10.93

表 2: ブタ肝臓抽出物による保持時間の変動 (移動相: 酢酸アンモニウム pH 5.0 - アセトニトリル系)

薬物名	保持時間 (分)	
	標準品のみ	標準品+ブタ肝臓抽出物
トリアゾラム	7.93	7.93
ノルトリプチリン	8.07	8.05
ペルフェナジン	8.78	8.77

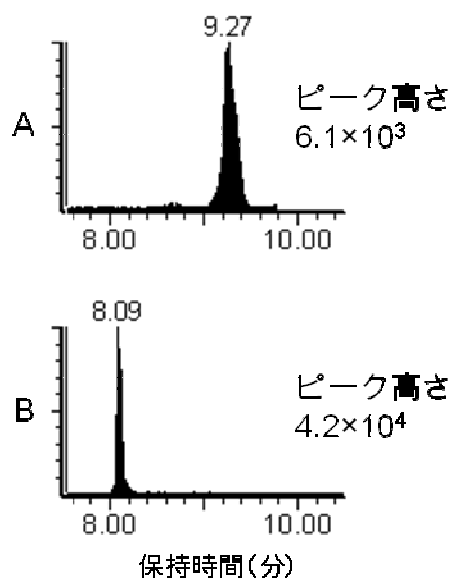


図 1 移動相の違いがピーク形状及び感度に与える影響、A: 重炭酸アンモニウム pH 6.8 - アセトニトリル系、B: 酢酸アンモニウム pH 5.0 - アセトニトリル系

同一試料 (ブタ肝臓抽出物にデュロキセチン標準品を添加、装置へのデュロキセチン注入量 1 ng) を分析、SRM のモニタリングイオン 278.4 \rightarrow 218.8

(2) 遠心ろ過フィルターによるろ過時の回収率の評価

遠心ろ過フィルターによるろ過時に、脂溶性の高い薬物はフィルターに吸着し回収率が低下することが知られている。そこで、今回分析対象とした薬物について、溶解液の組成（メタノール濃度、塩酸添加の有無）の違いが遠心ろ過時の回収率に与える影響を評価し、臓器抽出物の溶解液として最適な溶液の選定を行った。

表3に、フルニトラゼパムとクロロプロマジン为例として、溶解液の組成の違いが遠心ろ過時の回収率に与えた影響を示す。脂溶性の比較的低いフルニトラゼパムにおいては、溶解液の組成の違いによる回収率の差は顕著には認められなかった。一方、脂溶性の比較的高いクロロプロマジンでは、回収率を向上させるためには、溶解液に塩酸を添加し、さらにメタノール濃度を高くする必要があった。しかしながら、一部のベンゾジアゼピン系薬物（例：アルプラゾラム）では、塩酸を含有する溶解液に溶解して分析した場合、明らかにピーク面積が低下したことから、塩酸酸性状態で保存中に分解が進行していることが示唆された（表4）。以上の結果から、以後の検討では、分析対象薬物全体のピーク面積の向上に配慮して、ブタ肝臓抽出物の溶解液として90%メタノールを選択することとした。

今回分析対象とした薬物の遠心ろ過時の回収率を表5Aに示す。比較的脂溶性の高い三環系抗うつ薬やフェノチアジン類の回収率は概ね70-80%程度、比較的脂溶性の低いベンゾジアゼピン類などでは回収率は概ね90%以上であり、分析対象とした薬物全般にわたって許容可能と考えられる回収率を得ることができた。

表3：遠心ろ過時の回収率 (%) (n=2 の平均値)

溶解液	フルニトラゼパム	クロロプロマジン
0.1 M 塩酸-メタノール (1:1)	106.3	85.2
水-メタノール (1:1)	94.9	67.0
0.1 M 塩酸-メタノール (1:9)	101.6	100.2
水-メタノール (1:9)	99.7	75.9

表4：溶解液が薬物のピーク面積に及ぼす影響（遠心ろ過する前の溶液を分析、水-メタノール (1:9) のピーク面積を100としたと

きの相対値、n=2 の平均値)

溶解液	アルプラゾラム	クロロプロマジン
	13.4	83.2
0.1 M 塩酸-メタノール (1:1)	107.0	94.2
水-メタノール (1:1)	50.8	97.6
0.1 M 塩酸-メタノール (1:9)	100	100
水-メタノール (1:9)		

(3) ブタ肝臓からの分析用試料の調製

①各単位操作について

肝臓は尿や血液等の一般的な検体と比較して脂質（脂肪酸、トリグリセリド、ステロール類等）が多く含有されており、さらに、多量のタンパク質も含まれている。したがって、試料調製にあたってはこれらのきょう雑から薬物を回収しつつ、これらのきょう雑を除去する必要がある。

本試料調製法における各単位操作の役割を下記に記す。

- ・メタノールによるホモジナイズ：除タンパク及びタンパク質への薬物の吸着の抑制
- ・メタノール除タンパク液の冷凍：トリグリセリドの除去
- ・ヘキサソール-アセトニトリル分配：脂質の除去
- ・塩基性条件下での有機溶媒抽出：脂肪酸及び水溶性成分の除去
- ・遠心ろ過後の冷凍：トリグリセリドの除去

これらの単位操作を順次行うことで、最終的にはLC-MS/MS注入用試料は、90%メタノール溶液として調製することができた。

②分析対象薬物の回収率

ブタ肝臓からの分析対象薬物の回収率（遠心ろ過直前までの回収率）を表5Bに示す。7-アミノベンゾジアゼピン類を除いた35種の薬物における回収率は41.6%以上、CV%は10.2%以下であり、臓器中薬物のスクリーニング法としては十分な回収率であると考えられた。しかしながら、7-アミノベンゾジアゼピン類3種の回収率は13.3%以下であり、本法のこれらの化合物への適用は適当でないと考えられた。

③マトリクス効果

マトリクス効果[(ブタ肝臓抽出物存在下での各薬物標準品のピーク面積/各薬物標準品のピーク面積)×100]について評価を行った。結果を表5Cに示す。許容できるマトリクス効果の範囲を70-130%とした場合、この範囲から逸脱した薬物は、14種存在した。

これは、本前処理法では、きょう雑成分を完全には精製できていないことを示唆するものと考えられる。したがって、定量分析を行うにあたっては、さらなる精製が必要であると考えられる。

表5：各分析対象薬物の

A)遠心ろ過時の回収率 (%) (n=4 の平均値)

B)ブタ肝臓からの回収率 (%) (n=6、平均値±標準偏差)

C)マトリクス効果 (%) (n=6 の平均値)

薬物	A	B	C
7-アミノニトラゼパム	98.2	9.7±1.4	52.5
7-アミノクロナゼパム	98.0	10.3±1.8	45.2
メチルフェニデート	88.1	84.7±2.2	93.2
ゾピクロン	98.7	41.6±3.7	79.0
7-アミノフルニトラゼパム	101.4	13.3±1.2	49.2
モダフィニル	100.8	93.1±5.1	95.8
ゾルピデム	96.6	64.0±1.6	66.0
カルバマゼピン	100.1	91.6±4.7	89.9
アモキサピン	87.1	54.0±4.6	64.3
ハロペリドール	80.6	94.4±4.3	55.7
プロメタジン	81.9	105.0±3.2	132.0
クロナゼパム	92.4	98.0±4.1	100.9
ロラゼパム	100.2	99.7±3.3	99.0
ブロムペリドール	84.8	76.4±5.7	57.8
パロキセチン	89.9	79.6±8.1	136.6
ラメルテオン	97.8	94.4±5.2	102.4
デシプラミン	79.7	65.3±3.8	66.1
アルプラゾラム	98.5	86.8±2.5	78.9

イミプラミン	68.1	71.6±2.6	70.8
トリアゾラム	99.9	90.1±4.7	73.1
ノルトリプチリン	85.6	73.2±4.8	79.6
デュロキセチン	89.3	64.8±1.8	93.8
フルニトラゼパム	93.0	93.6±5.7	88.0
マプロチリン	86.7	64.6±2.4	76.4
ジプラシドン	96.5	77.8±1.1	56.8
アミトリプチリン	77.3	105.6±6.5	128.6
レボメプロマジン	70.9	128.0±8.9	120.6
エチゾラム	98.2	99.9±5.9	89.4
クロバザム	97.0	101.8±2.4	99.0
フルオキセチン	92.8	92.7±8.5	84.8
ロルメタゼパム	102.4	103.5±3.2	83.1
セルトラリン	88.8	74.7±4.7	100.6
クロルプロマジン	69.8	91.8±4.3	73.7
ペルフェナジン	73.9	74.6±4.2	53.3
ゾテピン	85.5	71.2±5.2	71.5
ピモジド	84.2	83.0±4.9	84.8
フルフェナジン	71.7	79.9±5.4	50.4
クアゼパム	94.9	81.6±5.0	36.3

なお、表5の薬物は、保持時間の早い順に並べている

(4) 研究成果の意義と今後の展望

本研究によって確立した分析法は、中毒等に関与する可能性の高い塩基性精神神経作用薬を対象とした臓器中薬物スクリーニング法であり、法薬毒物分析実務への応用が期待されるものである。今後は、以下の事項

について検討を行い、法薬毒物分析実務に適用可能であることを検証したいと考えている。

①分析対象とする塩基性精神神経作用薬の範囲をさらに拡大する

②本法を一部改変し、バルビツール酸系薬物に対しても適用可能にする

③前項①、②の検証が終了した段階で、実資料に対し本法を適用し、本法の有用性を検証する

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻川 健治 (TSUJIKAWA KENJI)

科学警察研究所・法科学第三部化学第一研究室・研究員

研究者番号：50356193

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：