

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：82505

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16364

研究課題名（和文）生体試料中神経剤分解物の高感度分析法の開発

研究課題名（英文）Development of a highly sensitive analytical method for nerve agent degradation products in biological samples

研究代表者

山口 晃巨（Yamaguchi, Akinori）

科学警察研究所・法科学第三部・研究員

研究者番号：50822087

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000 円

研究成果の概要（和文）：神経剤の生体試料からの使用証明のための分析法は不十分であり、特に新たな神経剤であるノビチヨク類の分析法は未報告だった。研究代表者は、縮合剤DMTMMとLC-MS/MSを活用し、ノビチヨクA剤の分解物と従来の神経剤分解物RMPA類の分析法を開発した。この方法では、DMTMMを活用してノビチヨクA剤の分解物を安定なエステルに変換し、LC-MS/MSで検出することができる。これを利用し、尿中のノビチヨク分解物の分析法も実現した。RMPAの検出限界は従来の方法と同等だが、ノビチヨク分解物の高感度な分析はこれまで非常に困難だった。本法は低コストかつ汎用機器を用いており、多くの研究室でも容易に実施できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は新たな神経剤ノビチヨクA剤の加水分解物の初めての分析法を開発しました。この分析法は、従来の神経剤分解物に対しても、従来法と同等または優れた性能を示します。本法に必要な設備は、一般的なLC-MS装置と安価な市販試薬のみであるため、リソースに限りのある研究室でも実施可能です。本法を用いることで、生体試料に対しても高感度な分析が可能であり、このことは化学テロに対する迅速かつ正確な対応に資することを意味します。ノビチヨクを含む神経剤は極めて危険な化学兵器であるため、その対応力を増強する本法の開発は公共の安全と国際的な安全保障の観点から重要です。

研究成果の概要（英文）：Analytical methods for detecting the use of nerve agents from biological samples are inadequate, especially for the new Novichok nerve agents that have not yet been reported. The principal investigator has developed an analytical method for the degradation products of Novichok-A agents and conventional nerve agent degradation products, RMPAs, using the condensing agent DMTMM and LC-MS/MS. This method uses DMTMM to convert Novichok-A agent degradation products into stable esters that can be detected by LC-MS/MS. Using this method, an analytical method for Novichok degradation products in urine was also realized; although the detection limit of RMPA is comparable to that of conventional methods, highly sensitive analysis of Novichok degradation products has been very difficult. This method is inexpensive, uses general-purpose equipment, and can be easily implemented in many laboratories.

研究分野：分析化学

キーワード：神経剤 LC-MS ノビチヨク 誘導体化 DMTMM

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

神経剤とは、化学兵器用剤と呼ばれる化合物群の中でも最も強い毒性を持つ、コリンエステラーゼ阻害活性を持つ化合物の総称である。近年でも戦場(イラン・イラク戦争(1980-1988))のみならず、大規模無差別殺人(オウム真理教関連事件(1994, 1995)等)や、暗殺(金正男暗殺事件(マレーシア、2017)、元旧ソ連スパイ暗殺未遂事件(イギリス、2018))において使用されているため、世界中のテロ対策・警備関係者に多大な負担を強いている。これら神経剤は、化学実験の設備及び知識があれば合成は困難ではなく、さらにごく少量の吸引や皮膚接触で致死的な結果を与えるため、今後も戦争はもちろんのこと、テロや暗殺など戦争以外においても国際的に、継続的に使用されることが十分予想され、その対応体制の整備は必須のものである。

さらにこの対応を困難にする要因として、2018年3月のイギリスにおける暗殺未遂事件において初めて使用された神経剤を含むノビチョク(Novichok、ロシア語で「新人」の意)と呼ばれる神経剤群の登場がある(図1)。これらは1980年ごろに旧ソ連において開発されたとされる100種にも及ぶ神経剤の総称であり、それらの大部分の化学構造は未知である。そのため、今この瞬間にこれら構造未知の化合物が使用された場合、何が使用され、何が起こったのかの判断は非常に難しく、適切な対応(事件現場、医療現場等)や状況の分析は極めて困難であると言わざるを得ない。

これら神経剤への対応において我々分析担当者が直面している重要な課題は、十分な感度(~1 ng/mL)で生体試料中の神経剤分解物を検出する手法が存在していないという点と、ライブラリに記載されていない未知の神経剤の検出・同定手法が確立していないという点である。

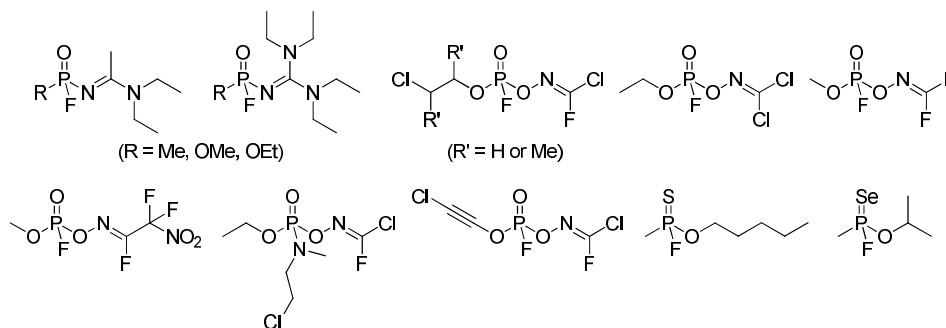


図1 ノビチョクとされる化合物の例(詳細な文献情報は不明)

2. 研究の目的

未知神経剤の分析に関しては、分析対象の化合物が数 mg あれば、精製操作の後に NMR による分析に付すことができ、構造推定において非常に有用なデータが得られる。

しかし神経剤分子は加水分解を受けやすいため、実際の事案においては、オウム真理教による松本サリン事件や VX 暗殺事件に関する法科学的分析ならびにシリア等における化学剤使用証明のように、十分な分析試料が手に入らない、生体試料のみしか手元にない、あるいは加水分解生成物しか手に入らないという状況も十分に考えられる。

このような状況が想定される中で、構造推定を確実なものとするため、本研究独自の試みとして、神経剤加水分解生成物について、誘導体化反応を利用した高感度分析法を開発する。すなわち、生体試料については煩雑で時間のかかるタンパク質と分析対象化合物のアダクト分析に代えて、加水分解生成物を直接定量分析できるようにするほか、生体試料以外の、試料中の未分解の神経剤を敢えて加水分解することで、誘導体化による高感度化及び高い感度と質量分解能を有する LC-MS/MS による分析を可能とし、目的の高感度分析を達成する。

神経剤の体液中濃度と毒性に関する情報は殆ど報告されていないが、その検出には、重症(血中のブチリルコリンエステラーゼが 100%阻害された状態)の場合で約 8 ng/mL、中毒程度であれば 1 ng/mL 以下の検出限界が必要とされている[1]。しかし、現在報告されている神経剤及びその加水分解物の検出法における検出限界は、それぞれ 77 ng/mL および 33 ng/mL と不十分である[2]。さらに化学テロ犯罪の立証のためには、軽症患者についても生体試料の化学分析によりその曝露を証明する必要がある。

このような高感度分析は、LC-MS/MS を用いた分解物の高感度分析に適した新規誘導体化法の導入によって実現可能であると考え、本研究では、より温和な条件で誘導体化でき、さらに分析対象の疎水性やイオン化効率を向上させる新規誘導体化試薬の開発を目的とする。

3. 研究の方法

一般に、よい定量結果を得るためには、過剰の誘導体化試薬が必要である。したがって、過剰な試薬を除去することは、微量分析におけるマトリックス効果の点で大きな懸念事項である。神経剤加水分解物のように親水性の分析対象物を誘導体化する場合、通常、ペンタフルオロベンジル(PFB)プロミドなどの疎水性試薬を逆相クロマトグラフィーに用いる。しかし、過剰の試薬を疎水性誘導体化から分離することは困難であり、誘導体化試薬と尿中のマトリックスが反応し、微量分析対象物の検出を妨害する。これらの問題を回避するため、誘導体化試薬として親水性の縮合剤を用いることに着目した。

まず、IMPA と反応して LC-MS 検出可能な活性化エステルを与える縮合剤を探した。IMPA を市販の縮合剤 *N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、または DMTMM (図 2) と反応させた。誘導体は DMTMM を使用した場合にのみ観察された。これらの知見の重要な構成要素は、予想に反して、活性化されたリン酸エステルおよびホスホン酸エステルが、分析中アセトニトリル中で安定であったことである。

【前処理】試料 300 μL (尿の場合、10% ピリジン 16 μL も加えた) を、50 $^{\circ}\text{C}$ で遠心濃縮した後、残渣にアセトニトリル (100 μL) と 20% DMTMM のメタノール溶液 (2 μL) を添加した。これを 50 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間攪拌した後、遠心分離 (14,000 $\times g$, 5 分, 23 $^{\circ}\text{C}$) し、上清を LC-MS/MS 分析に供した。【LC-MS/MS 分析条件】注入量: 3 μL , LC: Nexera X2 (島津製作所製), カラム: L-column3 ODS (150 mm \times 1.5 mm I.D., 粒径: 5 μm , CERI), オープン: 40 $^{\circ}\text{C}$, 移動相: 0.1% (v/v) ギ酸水溶液/アセトニトリル, 流速: 0.2 mL/分, 質量分析計: Impact HD Q-TOF (Bruker), イオン化法: ESI-Positive

4. 研究成果

神経剤分解物の DMT 活性化エステルは安定して存在し、LC-MS/MS で高感度に検出できることが判明した。この誘導体化反応を利用して、尿中のノビチョク加水分解物 (0.40–4.0 ng/mL) の初の分析法を実現した。従来の神経剤の加水分解物 (RMPA) の検出限界 (0.1–0.4 ng/mL) は、ペンタフルオロベンジル化や直接 LC-MS/MS を用いた過去の報告と同程度だった。また、生体試料中のノビチョク A シリーズ分解物の高感度かつ実用的な分析は、2021 年以前に報告された他の方法では極めて困難だった。本法は、市販の安価な試薬、汎用の逆相カラム、一般的な LC-MS 装置を用いて実施することができ、リソースの限られた多くの研究室で容易に実施することができる[3]。

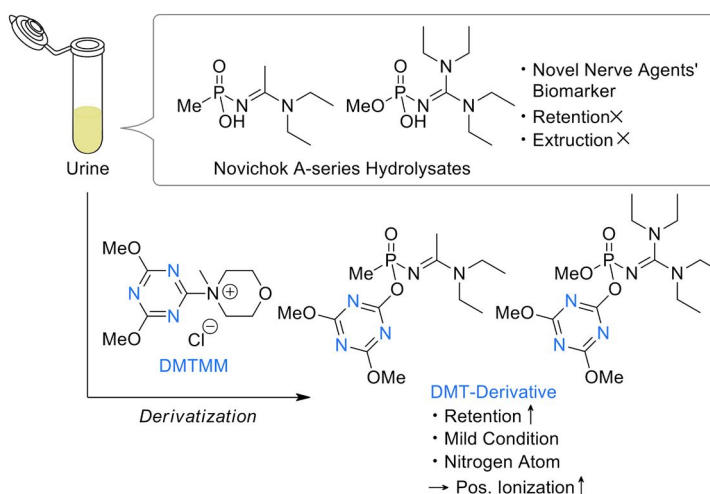


図 2. DMTMM と神経剤加水分解物との誘導体化反応

[1] 日本薬学会 (2017). 薬毒物試験法と注解 2017 東京化学同人 p. 389.

[2] M. Otsuka, K. Tsuge, Y. Seto, H. Miyaguchi, M. Uchiyama *J. Chromatogr. A*, **2018**, 1577, 31–37.

[3] A. Yamaguchi, H. Miyaguchi, M. Tokeshi *Anal. Chem.* **2022**, 94, 11, 4658–4665.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Yamaguchi Akinori, Miyaguchi Hajime, Tokeshi Manabu. | 4. 巻 94 |
| 2. 論文標題 Dimethoxytriadinylation LC-MS/MS of Novichok A-Series Degradation Products in Human Urine | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Analytical Chemistry | 6. 最初と最後の頁 4658-4665 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.1c04634 | 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 Otsuka Mai, Yamaguchi Akinori, Miyaguchi Hajime | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Analysis of degradation products of Novichok agents in human urine by hydrophilic interaction liquid chromatography?tandem mass spectrometry | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Forensic Toxicology | 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） 10.1007/s11419-022-00656-4 | 査読の有無 無 |
| 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 山口晃巨、宮口一 |
| 2. 発表標題 ノビチョクを含む神経剤加水分解物のジメトキシトリアジニル (DMT) 誘導体化LC-MS/MS法の開発 |
| 3. 学会等名 第29回クロマトグラフィーシンポジウム |
| 4. 発表年 2022年～2023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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|