

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590872

研究課題名(和文)死因究明のための体組織からの高感度・迅速薬物スクリーニング・システムの開発

研究課題名(英文)Development of high-sensitive and fast drug screening systems in body materials for investigation on cause of death

研究代表者

原 健二(HARA, Kenji)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：00090738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：法医中毒学では死因究明に、薬物の分析が重要である。死体試料中多種多様な薬物のスクリーニング法の開発を検討した。死体試料にはしばしば脂質が多量に含まれるので、脂質の除去を中心に研究した。死体試料の調製は、イオン対のアセトニトリル抽出、特定のフィルターおよび有機溶媒洗浄による脂質除去、イオン交換精製を検討した。カラム2つを接続した高速GC-MSは、迅速で高感度の測定に利用できる。高度に変性した試料を除き、本研究の方法は、実際の用途に適している。この試料調製では、親水性薬物から親油性薬物までの広範囲の薬物が、GC-MSおよびLC-MS/MSの組み合わせにより測定できることになる。

研究成果の概要(英文)：In the investigation of the cause of death in forensic toxicology, analysis of the drug is important. We have examined the development of screening methods for searching for a wide variety of drugs. Postmortem samples, since often contains a large amount of lipids, removal of lipids were mainly studied. Preparation of postmortem sample was studied on ion pair acetonitrile extraction, lipid removal by a specific filter and by organic solvent washing, and ion exchange purification. Fast GC-MS by use of two connected column, was able to apply to the measurement of rapid and sensitive. Except highly denatured sample, the methods developed in this study were feasible for practical applications. In this sample preparation, a wide range of from lipophilic drugs to hydrophilic drugs can be measured by a combination of GC-MS and LC-MS / MS.

研究分野：法医学

キーワード：法医中毒学 体組織試料 試料処理 薬物スクリーニング GC-MS LC-MS/MS 迅速 簡素化

1. 研究開始当初の背景

わが国では、剖検診断における薬物分析の重要性が問われていたにも関わらず、その実施率は低かった。しかし、近年、司法解剖に関わる検査費の公費負担の結果、分析機器が利用できる環境が整備されてきており、薬物分析の実施率はかなり増加している。しかし、今後薬物分析の実施率が上がれば、薬物分析予算の拡大が、問題となることが予想される。そこで、我々は、分析の高い質の向上とともに、経費削減を目的とした試料調製の効率化、測定の高速化を検討してきた。実際に、コストのかかる固相カートリッジのかわりに水溶性の溶媒を使った方法で検討している。GC-MS の高速化については、基礎的なシステムを確立している(基盤研究(B) 課題番号18390207)。現在、島津製作所との共同研究を進めており、2 段式キャピラリーカラムという新しい技法を取り入れ、従前の約3 倍の速さでの測定を可能にしている。その成果をもとに、今年の前半には、島津製作所から高感度・高速対応の GC-MS 装置が発売になり、現在、この高速測定を用いた実務の薬物分析を検討している。また、LC-MS/MS も当教室に設置され、GC-MS に使用した残りの試料を測定している。LC-MS/MS は、装置の特性上、かなり高速化が可能である。GC-MS 測定には、キャリアガスにヘリウムを使うのが定着しているが、国際的にヘリウム資源が減少してきて、かなり高価になり、入手困難になると言われている。事実、東欧など経済的に余裕がないところでは、ヘリウムの代わりに水素を使わざるを得ないという。理論的には水素はキャリアガスとして一番適していると言われている。ただ、水素の仕様は、ヘリウムと同じようにはならないのも課題である。経済的な面、資源の節約のためにも、キャリアガスに水素を使うシステムの開発が望まれる。

2. 研究の目的

当初の背景を基に、本研究では、

- (1) グローバル化を視野に入れた水素ガスをキャリアガスとしてより高速の GC-MS 測定条件の確立を行い、数台分の測定を可能にすることを旨とする。
- (2) GC-MS と LC-MS/MS を同じ調製試料を使って測定し、より広範な薬物分析の確立を目指す。
- (3) 将来的には、試料処理から測定まで自動操作ができる基礎をつくる。

3. 研究の方法

目的(1)の水素ガスを GC-MS のキャリアガスに導入する研究では、従来のヘリウムガスと比較して、水素ガスの応用性を調べた。高速 GC-MS 測定条件の確立は、実際の検査を行いながら、行った。

目的(2) GC-MS 測定が可能な試料を調製する方法を研究した。同じ試料を LC-MS/MS

でも測定し、経過を見ながら、研究を進めた。GC-MS では、脂質が夾雑物となるので、脂質除去法に焦点をあわせた。本研究には、最近、頻繁に使用されている除タンパク質・除脂質用フィルター、有機溶媒の分配率による除脂質を検討した。また、試料調製を簡素化するため、イオン交換抽出カラムを検討した。

目的(3)は、目的(2)の発展になる。

4. 研究成果

(1) キャリアガスとして水素ガスを検討

高速測定用に準備したカラムを使って、水素ガスとヘリウムガスで、実務上問題がないかを調べた。

カラム: BPX5 (2 m x 0.25 mm i.d., フィルムの厚さ 0.5 μm)/BPX5 (4 m x 0.15 mm i.d., フィルムの厚さ 0.25 μm) [SGE 製: Siltite μUnion で接続]

両ガスの線速度が同じになるように、条件を設定(Shimadzu QP-2010Ultra のソフト)して比較を行った。標準品を添加して得られた標準試料の分析で研究を行った。

- ① 線速度が同じであれば、標準品の保持時間はほとんど同じであった。
- ② 測定できる線速度の範囲は、水素ガスがヘリウムガスに比べ狭かった。
- ③ 測定感度は、水素ガスがヘリウムガスに比べ、一部低くなるがあった。
- ④ 本条件の利用が実務に適しているかを検討した。血液、尿、体組織などから調製した試料の分析を1年間ほど行い、実用性が認められた[図1]。一方、水素ガス発生装置を使った条件では、長期にわたって、装置を厳重に管理する必要があるという問題があった。

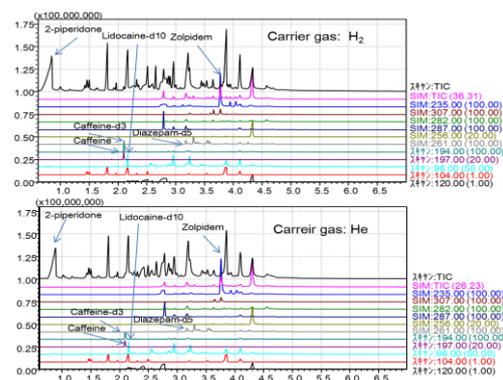


図1 ある腐敗肝臓試料の分析 上(H₂)下(He)

[結論]

GC-MS 測定に、水素ガスをキャリアガスとして利用することはできる。しかし、水素発生装置を使用する場合、装置保守の問題があり、ヘリウムガスが使用できる環境であれば、ヘリウムを利用する方が良いという結論になる。

本研究において得られた知見は、ヘリウムガス入手が困難になったときの、対処法になる。

(2) GC-MS、LC-MS/MS を同じ調製試料で測定するための試料調製法の開発

GC-MS のための試料調製は、薬物が有機溶媒に溶ける状態にされて、有機溶媒に抽出する方法がとられる。一方、LC-MS/MS は、親水性などのある化合物も分析できることから、GC-MS に合わせた方法では、LC-MS/MS 測定にたどり着かない薬物も存在する可能性がある。そこで、我々は、本研究では、親水性のある薬物も抽出可能な方法を検討した。

検討した内容

- ① 親水性、疎水性の両性質をもつアセトニトリルを溶媒に使い、酸・アルカリでイオン対として、塩基性あるいは酸性薬物を試料中のタンパク質などのマトリックスからアセトニトリルと水(試料に存在)の混液への抽出を検討した。
- ② 近年、開発されている除タンパク質・除脂質のフィルターと、ヘプタンとアセトニトリル(水も含む)との分配率の差によって脂質除去する方法を検討した。
- ③ イオン交換抽出カラムを使用して、妨害となるイオン性物質の除去による精製する方法を検討した。

イオン対抽出を行うため、薬物を塩基性、酸性の2つに分けて、検討を行った結果、イ、ロの方法を開発した。

イ. 塩基性薬物のための試料処理

試料としては、血液、尿、体組織で、ほとんど同じ行程で行えるようにした。本報告では、血液で説明を行う。

試料に蒸留水、試料の状態をみるための内部標準物質、ウレアーゼ溶液を混ぜ、尿素が分解するまで、室温で放置する。反応後、2.5倍のアセトニトリル、5M 塩酸、ギ酸で酸性にして、タンパク質などの変性物質を除去、除タンパク質、除脂質用フィルターでリン脂質、トリグリセライド、コレステロールなどを除去する。ろ液をヘプタンで洗浄して、脂肪酸などを除去する。この抽出液から強アルカリ水、炭酸ナトリウムなどで、酸性物質を除く。さらに、抽出液に水酸化カルシウムを入れ、パルミチン酸などの脂肪酸を吸収する。このある程度精製した試料液を陰イオン交換抽出カラム PSA に通し、精製する。この精製液(pH 8 にする)を硫酸マグネシウムで脱水して、濃縮乾涸後、GC-MS、LC-MS/MS 測定を行う。

極度に変性を伴う試料以外は図2のようなクロマトグラムを得ることができた。

ロ. 酸性薬物のための試料処理

試料としては、血液、尿、体組織で、ほとんど同じ行程で行えるようにした。本報告では、血液で説明を行う。

試料に蒸留水、試料の状態をみるための内部標準物質、ウレアーゼ溶液を混ぜ、尿素が分解するまで、室温で放置する。反応後、2.5

倍のアセトニトリル、5M 水酸化ナトリウム溶液、アンモニア水でアルカリ性にして、タンパク質などの変性物質を除去、除タンパク質、除脂質用フィルターでリン脂質、トリグリセライド、コレステロールなどを除去する。次に、ろ液を強陽イオン交換抽出カラムに通液し、強塩基性物質を除去する。抽出液を窒素気流で濃縮乾涸したので、アセトニトリル/水 pH 5 の溶液とし、ヘプタンで洗浄する。洗浄した抽出液を塩酸、ギ酸で酸性とし、硫酸マグネシウムでよく脱水する。この液を窒素気流で濃縮乾涸した後、GC-MS、LC-MS/MS 測定を行う。

死体から得られる試料は、アミノ酸の誘導体と推定する物質が大量に存在し、GC-MS 分析が障害されることが多い。図3では、このような障害物は存在するが、添加している内部標準物質は確認されているので、分析は成立している。

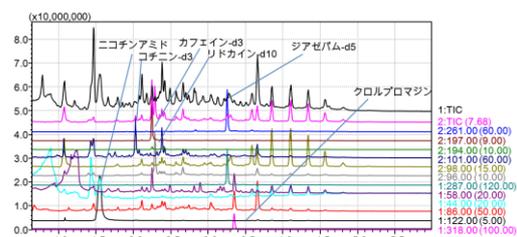


図2 血液から抽出した塩基性薬物分析の

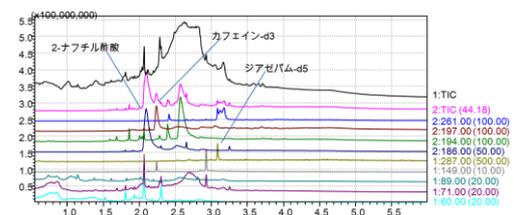


図3 血液から抽出した酸性薬物分析の GC-MS のクロマトグラムの例

[試料処理(イとロ)の実務応用への問題点]

死後経過時間があまり経っていないか、生体の試料であれば、両方法とも、GC-MS 測定において妨害の少ない結果を得ることができる。しかし、死後の経過時間とともに、試料の変性が高度になると、除去しにくい脂質、アミノ酸誘導体などが大量に存在し、GC-MS 分析に障害が出てくる。LC-MS/MS で、データベースに存在する薬物については、LC の性質上、薬物と分離して分析ができるので、両試料処理において、かなりの薬物の確認ができる。

高度に変性した試料の問題点は、現時点では、トリグリセライドが分解して生じるジグリセライド、モノグリセライドのような親水性のある脂質が大量に存在する。親水性の薬物まで抽出できる両方法では、親水性の夾雑

物が問題となるので、その除去方法を、今後、検討していく必要がある。

[試料調製のまとめ]

塩基性、酸性薬物の分析に関しては、GC-MSとLC-MS/MS測定を組み合わせれば、本研究で開発した試料処理で、大部分の事案の分析は可能である。高度な変性を伴う一部の事案についての試料処理の開発はGC-MS測定には必須である。問題点は、ほぼ把握できたので、本研究を基盤として改良していくことで、ほとんどの事案で分析が可能になる。

5. 主な発表論文等

(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 2 件)

- ① Takuma Yamamoto, Katsuhiko Yoshizawa, Shin-ichi Kubo, Yuko Emoto, Kenji Hara, Brian Waters, Takahiro Umehara, Takehiko Murase, and Kazuya Ikematsu

Case report: Autopsy report for a caffeine intoxication case and review of the current literature. J Toxicol Pathol, 28: 33-36 (2015) [査読あり]

- ② 高山 みお, Brian Waters, 原 健二, 松末 綾, 柏木 正之, 久保 真一
「食堂・胃破裂を認めた解熱鎮痛剤中毒死の1剖検例」法医学の実際と研究 57: 29-34 (2014) [査読あり]

[学会発表] (計 1 件)

- ① Kenji Hara, Brian Waters, Masayuki Kashiwagi, Aya Matsusue, Takayama, M., Shin-ichi Kubo.
Comparison of hydrogen and helium as carrier gas in a fast GC-MS. 92nd Annual Conference of the German Society of Legal Medicine, Saarbruecken, Germany, 2013年9月17日～9月21日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 健二 (HARA, Kenji)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：00090378

(2) 研究分担者

ウォーターズ ブライアン (WATERS, Brian)

福岡大学・医学部・助教
研究者番号：00609480

(3) 研究分担者

久保 真一 (KUBO, Shin-ichi)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：10205122

(4) 研究分担者

柏木 正之 (KASHIWAGI, Masayuki)
福岡大学・医学部・准教授
研究者番号：70301687

(5) 研究分担者

松末 綾 (MATSUSUE, Aya)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：70309920