

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09278

研究課題名(和文) 全血を試料とした単剤及び多剤併用時の薬毒物中毒評価に関する基礎データの構築

研究課題名(英文) Construction of basic data in toxicological evaluation: single and drug combinations used whole blood

研究代表者

斉藤 剛 (SAITO, Takeshi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30266465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：急性薬物中毒症例を対象として血清と全血中の薬物濃度の比率を求めた結果、化合物や濃度によって3つのパターンに分類された。また血清や全血中のフェノチアジンを珪藻土カラムで抽出する際は、使用するカラムに適した抽出溶媒が存在することを明らかにした。特に全血に於いて適さない組み合わせで抽出を行うと目的化合物が高濃度でも抽出過程で化合物が酸化されて全く検出されなくなることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医解剖に於いて急性薬物中毒の診断は血中薬物濃度によって評価されるが得られる試料は全血である。このため全血と血清の薬物濃度が比較できるデータは法医実務に応用可能である。また、死亡症例の多いフェノチアジン化合物の抽出過程によって化合物が酸化されるデータは実務上極めて重要でこれまで報告がみあたらない。これらのデータは、正しく診断が行われるために極めて有意義であり社会性も高い。

研究成果の概要(英文)：We have compiled serum and whole blood concentrations for each compound found in acute toxicological cases. The results were characterized as follows: (1) Concentrations of many compounds were less than two times higher in serum than in whole blood, and the ratio remained constant regardless of concentration. (2) The ratio was 1 regardless of concentration. (3) The serum and whole blood concentration ratio was reversed with a decrease in concentration. Although, phenothiazine in the whole blood was not detected in extracted samples using K-solute cartridges (diatomaceous earth-based solid phase), methyl t-butyl ether was effective for whole blood extraction using K-solute. These results suggest that phenothiazines antipsychotics extraction from serum and whole blood using diatomaceous earth-based solid-phase columns seems to have an affinity with the elution solvent.

研究分野：法中毒

キーワード：全血 血清 急性薬物中毒 フェノチアジン 珪藻土カラム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者は日常的に急性薬物中毒症例の血中薬物濃度の測定を行っている。対象は法医学解剖症例及び急性薬物中毒によって救急搬送された患者であるが解剖症例は全血、臨床例は血清が試料である。急性中毒の診断は測定された対象化合物の血中濃度が基にされる。各化合物の治療域や中毒域の血中濃度は成書に掲載されているが成書中の多くのデータは血清や血漿中の濃度である。全血のデータが少ないのが実情である。

2. 研究の目的

(1) 血清と全血の化合物濃度の割合を求める

全血中の化合物濃度と症状に関するデータが少ないことから、全血中の化合物濃度から血清中化合物濃度が推定可能になれば成書に掲載されている血清の薬物濃度のデータが診断に活用できると考える。

(2) 珪藻土カラムを用いた抽出条件

上記(1)を実施中、全血中のフェノチアジンの検出が血清より悪かった。特に全血と珪藻土カラムの組み合わせの結果が悪く血清と全血の濃度割合が求められない。そこで原因の解明と解決策を急遽研究目的に加えた。

- ① 異なる珪藻土カラムを用いても同様の結果が得られるのか。
- ② 珪藻土カラムによって結果が異なるのであれば、同じ結果を導く手段は何か。

3. 研究の方法

(1) 血清と全血中の化合物の濃度比

①急性薬物中毒で当院高度救命救急センターへ搬送された症例の血清及び全血を試料として化合物濃度を測定する。

- ②血清は中毒分析用として採取された血液を使用する。
- ③全血は血算用に採血された血液の検査後の残余を用いる。

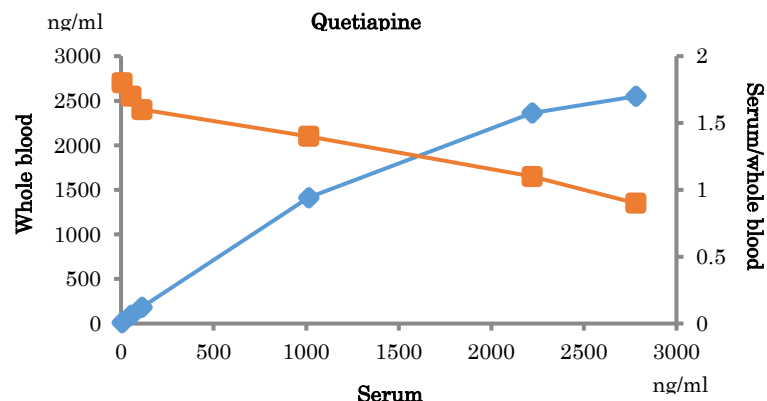
(2) 本研究の開始に際し東海大学医学部附属病院の臨床研究審査委員会から承認を得た。(17R028)

4. 研究成果

(1) 血清と全血中の化合物濃度比

血清と全血中の化合物は、内部標準を用いた固相抽出で行った。分析は、液体クロマトグラフ質量分設計とガスクロマトグラフ質量分析計で実施したところ、以下のような結果が得られた。

- ①多くの化合物は、全血より血清の方が高くその割合は濃度の高低に影響されなかった。
- ②カフェインは、ほぼ 1:1 の濃度比であり、その割合は濃度の高低に影響されなかった。
- ③非定型抗精神病薬のクエチアピンは、低濃度では血清 > 全血であったが高濃度では全血 > 血清となった。



(2) フェノチアジンの血中濃度は抽出方法によって異なる結果が得られた。

①固相抽出に於いて血清中の化合物は検出されるが全血では全く検出されないか極端に低濃度で検出された。

②Quechers法では、血清、全血共に検出された。

③珪藻土カラム(K-solute)で抽出すると全血では全く検出されなかった。

(3) 珪藻土カラムによる違い

全血から化合物が検出されないと血清と全血の濃度割合を求めることができない。そこでこの原因を解明する目的でメーカーが異なる下記の 4 種類の珪藻土カラムを用いてフェノチアジンの抽出を行った。

- ① ChemElut
- ② EXtrelut NT1
- ③ K-solute
- ④ ISOLUTE

薬物を含まない血清、全血にフェノチアジンを添加して上記の珪藻土カラムを用いて抽出した。分析の結果、未変化体の検出に於いて ISOLUTE が良かったが回収率は高くなかった。次いで、抽出した試料を SCAN 分析したところフェノチアジンの酸化体と思われるピークを検出した。

そこでフェノチアジンが酸化された標準品を用いて抽出試料中に酸化体の有無を確認したところ N-オキシソン体、スルフォキシド体が確認された。他の酸化体と思われるピークも検出されたが標準品の入手が不可能で確認ができなかった。

4 種類の珪藻土カラムを使用した全ての抽出試料から酸化体のピークが検出されたが、ISOLUTE が最も酸化体のピークが小さかった。

(4) 抽出時の酸化体回避の方法

珪藻土カラム内に何らかの酸化物質の含有が考えられたが抽出溶媒として用いていた酢酸エチルによる影響も考えられた。そこで酢酸エチル以外の以下の溶媒を用いてフェノチアジンの抽出を行った。

以下の抽出溶媒を用いた。

- ① クロロホルム：メタノール (9:1)
- ② ジクロロメタン：イソプロパノール (8:2)
- ③ メチル t-ブチルエーテル
- ④ ジエチルエーテル

上記の溶媒の中では、メチル t-ブチルエーテルによる抽出が最も良好であった。

K-solute を用いて全血を酢酸エチルで抽出した際は、全く検出されなかった化合物がメチル t-ブチルエーテルでは検出され直線性も良好となった。

4 種類の珪藻土カラムと抽出溶媒の違いによる定量限界

Ethyl acetate		Lowest detected concentration (limit of quantitation) (ng/mL)			
		CP	LP	PMA	PME
ChemElut	WB	5 (5)	5 (5)	5 (5)	5 (5)
	SE	5 (5)	5 (5)	5 (5)	5 (5)
ISOLUTE	WB	5 (5)	5 (5)	5 (5)	5 (5)
	SE	5 (5)	5 (5)	5 (5)	5 (5)
EXtrelut NT1	WB	50 (50)	10 (50)	5 (100)	5 (100)
	SE	5 (10)	5 (10)	5 (10)	5 (10)
K-solute	WB	ND	ND	ND	ND
	SE	50 (50)	50 (50)	500 (500)	100 (100)
Methyl t-butyl ether					
ChemElut	WB	10 (50)	10 (50)	10 (50)	10 (50)
	SE	10 (50)	10 (50)	10 (50)	10 (50)
ISOLUTE	WB	5 (50)	5 (50)	5 (50)	5 (50)
	SE	10 (50)	5 (10)	5 (10)	10 (50)
EXtrelut NT1	WB	5 (10)	5 (50)	5 (50)	5 (50)
	SE	5 (5)	5 (5)	5 (5)	5 (5)
K-solute	WB	5 (5)	5 (5)	5 (5)	5 (50)
	SE	5 (10)	5 (5)	5 (10)	5 (10)

WB: whole blood; SE: serum; CP: chlorpromazine; LP: levomepromazine; PRA: promazine; PME: promethazine

直線性の範囲

Column	Matrix	Compound name	Range (ng/mL)	Linearity (r^2)
ChemElut ^a	WB	CP, LP, PMA, PME	5–2000	> 0.99
	SE	PME	5–2000	
		CP	10–2000	
		LP, PMA	50–2000	
EXtrelut NT1 ^b	WB	PME	50–2000	
		CP, LP, PMA	5–2000	
	SE	CP, LP, PMA, PME	5–2000	
ISOLUTE ^a	WB, SE	CP, LP, PMA, PME	5–2,000	
K-solute ^b	WB	PME	50–2000	
		CP, PMA	10–2000	
		LP	5–2000	
	SE	CP, PMA, PME	10–2000	
		LP	5–2000	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Saito, T., Namera, A., Tsuji, T., Inokuchi, S.	4. 巻 35
2. 論文標題 Assessment of concentrations of four phenothiazine antipsychotics in serum and whole blood using different diatomaceous earth-based solid-phase columns: A comparative analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 815-819
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Saito T., Namera A., Inokuchi S.
2. 発表標題 Assessment of phenothiazine concentrations in serum and whole blood using different diatomaceous earth-based solid-phase cartridges
3. 学会等名 56th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 斉藤 剛、奈女良 昭
2. 発表標題 全血及び血清中薬物濃度の比較
3. 学会等名 第101次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Saito, A. Namera, S. Inokuchi
2. 発表標題 Comparison of Serum and Whole Blood Concentrations in Acute Poisoning from Prescribed Drugs
3. 学会等名 2017 SOFT-TIAFT Joint Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saito T., Namera A., Tsuji T., Inokuchi S
2. 発表標題 Assessment of concentrations of four phenothiazine antipsychotics in serum and whole blood using different diatomaceous earth-based solid-phase columns: A comparative analysis
3. 学会等名 57th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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