

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08874

研究課題名(和文)ホルマリン固定臓器からの薬毒物分析法の開発研究

研究課題名(英文) Development of the analytical method to quantify toxicological substances in formalin-fixed tissue

研究代表者

浅野 水辺 (Asano, Migiwa)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90283879

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)：急性薬毒物中毒は血液中薬物濃度によって診断するが、血液或いはその他の試料が薬物分析用に保存されていない場合を想定し、ホルマリン固定臓器が代替試料になる可能性について検討した。血中濃度が相当に高い薬物はホルマリン固定臓器からも検出できた。ある種の薬物は分解等されて濃度が著しく減少すること、減少程度は個々の薬物により様々であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study was to consider whether formalin-fixed human tissues for pathological examination were useful as substitutes for conventional specimens in toxicological analysis. As a first step, we developed UPLC-MS/MS analytical methods to simultaneous analysis for 60 drugs. Some psychotropic drugs were markedly depleted to varying degrees in formalin-fixed porcine liver homogenates. In forensic practice case, the drug was detected in formalin-fixed tissues, only if the concentration of the drug in blood was significantly high. It was suggested that in forensic practice formalin-fixed organs was partially useful for toxicological examination.

研究分野：法医学

キーワード：薬物中毒 薬物定量分析 ホルマリン固定 肝臓 UPLC-MS/MS

### 1. 研究開始当初の背景

近年、犯罪死の見逃し防止および死因究明に対する社会的要請が高まっている。当初は病死とされ事件性がないと判断されたが、後に犯罪死の疑いが浮上した事例が散見される。なかでも、薬毒物はその摂取が致死量に達しており死因が中毒死である場合は勿論のこと、直接の死因ではなくとも、意識レベルや行為能力に影響を与え死因に間接的に関係することがある。また、被害者が通常服用していない薬物が検出されることは、捜査上重要な意味を持つ。しかし残念ながら、犯罪性のない死亡や薬物中毒が疑われない事例の場合には、ルーチン検査として必ずしも薬物検査は実施されず、薬毒物検査用の検体保存もなされない。

本研究の端緒は、犯罪性がないとして病理解剖に附されたが、事後に農薬服用の可能性が強く推定され、農薬摂取を証明する必要性が生じた事例である。諸臓器がホルマリン中で保管されていたが、一般的な薬毒物検査試料である血液等の体液は全く残存していなかった。ホルマリン固定された肝臓および脳を試料として LC-MS による定性分析を行ったが、薬毒物は検出されなかった。

しかし、ある程度の高濃度の薬毒物または農薬以外のある種の薬毒物はホルマリン中に長期保存された臓器から薬毒物を証明できる可能性があることが、先行研究で示唆されている。自験例の失敗は機器の分析感度をあげることで克服される可能性がある。もし、ホルマリン固定臓器を検体とした薬毒物検査が実用化できれば、見逃されていた薬物摂取を事後に証明することが可能になり、死亡の経緯の詳細推定や犯罪の見逃し防止に極めて有用である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、薬毒物検査における血液等の代替試料として、ホルマリン固定臓器が使用検討することである。解剖時には事件性がないと判断され薬毒物検査目的で血液または尿、臓器等の検体を凍結保存していなかったにもかかわらず、事後的に薬毒物検査の必要性が生じた場合を想定し、ホルマリン固定臓器から薬毒物を検出することが可能か検証する。ホルマリン固定臓器を代替試料の候補とした理由は、法医解剖のみならず、病理解剖や生検を含めて、組織検査のために臓器をホルマリン固定して長期保存することは一般的であること、解剖のルーチン検査として組織検査を行うことが多く、多くの解剖事例でホルマリン固定臓器は入手が比較的容易であることである。

本研究では、まずホルマリン固定臓器中の微量薬物を定量するために、UPLC-MS/MS によるホルマリン固定臓器中の高感度薬毒物分析法の確立をめざす。次に、確立した分析法を用い、実際にホルマリン固定臓器中の薬物分析を行い、保存期間および薬物の種類、

血中薬物濃度の点から、ホルマリン固定臓器が薬物分析用検体としてどの程度使用可能かを検証する。

### 3. 研究の方法

本研究の方法の骨子は以下の通りである。

(1) 急性薬物中毒死の剖検事例のホルマリン固定臓器を試料として、LC-MS/MS 法による薬物分析を定量する。臓器による当該薬物濃度の差違や血中濃度との比較を行い、ホルマリン固定臓器で急性薬物中毒死の診断が可能か検討する。

(2) 死後にホルマリを含む液体で全身還流処置(エンバーミング処置)が行われた死体の臓器中及び血中薬物濃度を LC-MS/MS 分析し、両者を比較検討する。

(3) 約 60 種の向精神薬について、血清中薬物の UPLC-MS/MS による高感度な同時定量分析法を構築する。

(4) 急性薬物中毒死の剖検事例のホルマリン固定臓器及び-80℃ 冷凍保存臓器中の当該薬物濃度を上記の UPLC-MS/MS 法により定量し、両者を比較検討する。

(5) 抗精神薬 10 種(図 1)を添加したブタ肝臓ホモジネートをホルマリンに 3 日~6 ヶ月浸漬し経時的に薬物濃度を定量し、長期に亘るホルマリン浸漬による薬物濃度減少について検討する。

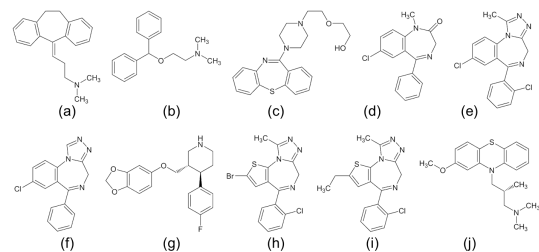


図 1. 肝臓ホモジネートに添加した 10 種の向精神薬 . (a) amitriptyline, (b) diphenhydramine, (c) quetiapine, (d) diazepam, (e) triazolam, (f) estazolam, (g) paroxetine, (h) brotizolam, (i) etizolam, (j) levomepromazine

### 4. 研究成果

(1) 過去の解剖例から死因が急性薬物中毒死である症例を抽出し、既に確立している LC-MS/MS 法により薬物分析を行った。その結果、血中濃度が相当に高いフェノバルビタール等はホルマリン固定臓器からも検出できることがわかった。

(2) 輸液等の医療行為は行われていない向精神薬多剤服用による急性薬物中毒死の症例。死亡確認後、防腐処置のためホルムアルデヒド水溶液(3.7~4.1% w/v) 10 L を血管内に注入され、死後約 15 日に司法解剖が施行されている。剖検時に採取した血液及び諸臓器

(何れも薬物分析まで-80 で保存) からアミトリプチリン、ジフェンヒドラミン、アセトアミノフェン、サリチル酸が検出された。アミトリプチリン濃度は心臓血及び大腿静脈血では一般的な血中致死濃度を遙かに上回っており、肺臓、脾臓、脾臓でも高値であった。ジフェンヒドラミンの血中濃度は中毒濃度であった。エンバーミングされた遺体の血液及び臓器試料を分析した結果、ホルムアルデヒド濃度は右心血清 10800 µg/mL、尿 9480 µg/mL、肝臓 2360 µg/g、脳 201 µg/g であった。

ホルマリン固定された遺体の血液及び諸臓器から薬物が検出できることが示された。エンバーミング処置が為されていない状態での血液・臓器中の薬物濃度は不明であるが、臓器及び心臓血の濃度は処置前の値と概ね一致するとの動物モデルを用いた知見が示されており、これに照らせば本事例の死亡直後の血中・臓器中薬物濃度も今回得られた値に近いものと推定することができる。従って、死因は急性薬物(三環系抗うつ薬)中毒死と判断した。

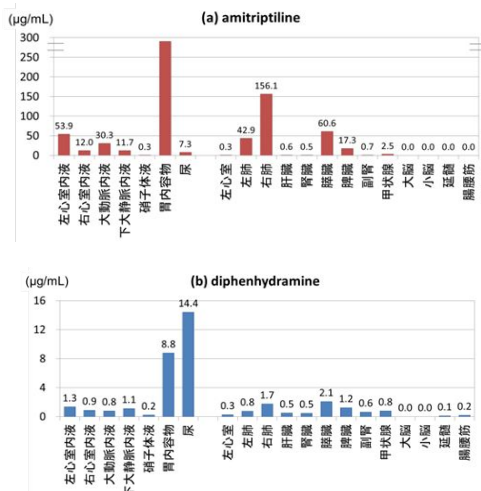


図 2. エンバーミング処置された剖検例の体液及び臓器中薬物濃度 . (a) amitriptyline, (b) diphenhydramine

(3) 約 60 種の向精神薬につき血清中及び臓器中の UPLC-MS/MS による同時定量分析法を構築した。即ち、固相カラムによる精製・濃縮法(分析前処理法)並びに UPLC 及び MS の至適条件を決定し、信頼できる精度で定量分析ができることを確認した。さらに、既存のライブラリに前述約 60 種の薬物を加え、UPLC-MS/MS による薬毒物スクリーニング法が概ね構築出来た。

(4) 構築した UPLC-MS/MS による薬毒物スクリーニング法により解剖例から死因が薬物中毒死である症例を抽出した。さらに、今回我々が確立した簡便・高感度定量法を用い、冷凍保存及びホルマリン固定した諸臓器中薬物分析を行った。

例えば、剖検時に採取した血清中エチゾラム濃度が 0.059 µg/mL の剖検症例では、-85 で 3 日間冷凍保存した肝臓ではエチゾラム 0.348 µg/mL、10%ホルマリン緩衝液に 3 日間浸漬し 20 で保存した肝臓中エチゾラム濃度は 0.154 µg/mL であった。

血中濃度が相当に高い薬物はホルマリン固定臓器からも検出できるが、ある種の薬物は分解等されて濃度が著しく減少すること、或いは検出下限を下回り検出できないことがわかった。

(5) 法医実務で検出頻度の高い抗精神薬 10 種を添加したブタ肝臓ホモジネートをホルマリンに 6 ヶ月間浸漬し、長期に亘るホルマリン浸漬による薬物濃度減少について検討した。

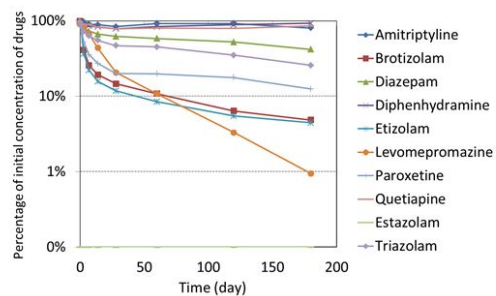


図 3. ホルマリン固定したブタ肝臓ホモジネート中の 10 種の向精神薬濃度の経時変化

減少率はアミトリプチリン、ジフェンヒドラミン、クエチアピンは 30%以下であったが、プロチゾラム、エチゾラム、レボメプロマジン、パロキセチンは 80%、エスタゾラムは添加直後から検出下限以下まで減少した。

エスタゾラムが初日より検出されなかったのは、ホルマリンとの反応によるものではなく、肝臓中の酵素による分解によるとの仮説を検証するため、肝臓ホモジネートを加熱処理して肝臓酵素を失活させた後に、薬物を添加したところ、初日のエスタゾラム濃度は減少しなかった。

ホルマリン固定した肝臓ホモジネート中並びに 10%ホルマリン緩衝液中の薬物濃度の経時変化を図 4 に示した。

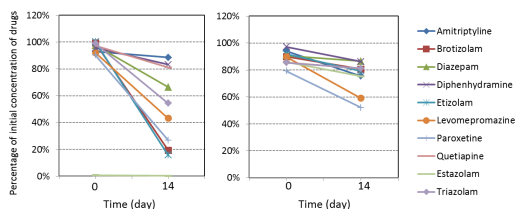


図 4. ホルマリン固定した肝臓ホモジネート中 (A) 並びに 10%ホルマリン緩衝液中 (B) の薬物濃度の経時変化

ホルマリン液中で各薬物濃度は減少するが、肝臓ホモジネート中での減少の方が顕著であった。肝臓含有酵素による薬物の分解及びホルマリンとの化学反応の相加的作用により薬物濃度が減少するものと推定される。

#### 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 4 件)

1. Kaszynski RH, Nishiumi S, Azuma T, Yoshida M, Kondo T, Takahashi M, Asano M, Ueno Y. Postmortem interval estimation: a novel approach utilizing gas chromatography/mass spectrometry-based biochemical profiling. Anal Bioanal Chem. 2016; 408: 3103-3112. 査読有
2. Kondo T, Takahashi M, Watanabe S, Ebina M, Mizu D, Ariyoshi K, Asano M, Nagasaki Y, Ueno Y. An autopsy case of zinc chloride poisoning. Leg Med. 2016; 21:11-14. 査読有
3. Kaneko H, Nakanishi K, Murakami A, Asano M. Estimating the cause of death and the postmortem interval from Biochemical markers. 愛媛医学. 2015; 34(1); 31-41. 査読有
4. 石上安希子, 浅野水辺, 徳永逸夫, 上野易弘, 西村明儒. 筋弛緩剤「サクシン®」を誤投与され死亡した一剖検例. 法医学の実際と研究. 2015; 58: 161-165. 査読有

[学会発表](計 4 件)

1. Asano M, Yoahioka N, Kuse A, Kuwahara N, Nakabayashi Y, Takahashi M, Kondo T, Morichika M, Makagawa K, Sakurada M, Ueno Y. The stability of drugs on formalin fixed porcine liver homogenates. 24<sup>th</sup> Congress of the International Academy of Legal Medicine, 2018, Fukuoka
2. Sakurada M, Kuse A, Yosgioka N, Morichika M, Nakagawa K, Takahashi M, Kondo T, Sugimoto M, Asano M, Ueno Y. The development of a rapid identification method for Colchicum autumnale and Gloriosa suoerba using melting curve analysis. 24<sup>th</sup> Congress of the International Academy of Legal Medicine, 2018, Fukuoka
3. 浅野水辺, 吉岡直樹, 久世亜澄, 桑原奈

都美, 高橋玄倫, 近藤武史, 中川加奈子, 森近 舞, 櫻田 誠, 上野易弘. 血清および臓器中のホルムアルデヒド定量分析法の検討. 第 101 次日本法医学会学術全国集会. 日本法医学雑誌. 2017; 71(1): p97, 岐阜.

4. 浅野水辺, 久世亜澄, 谷口絵美, 桑原奈都美, 高橋玄倫, 近藤武史, 中川加奈子, 森近舞, 櫻田誠, 上野易弘. エンバーミング処置された遺体の血液及び臓器中薬物濃度から薬物中毒死と診断した一例. 第 100 次日本法医学会学術全国集会. 日本法医学雑誌. 2016; 70(1): p103, 東京.

[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

浅野 水辺 (Asano, Migiwa)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 90283879

##### (2)研究分担者

上野 易弘 (Ueno, Yasuhiro)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 30184956