

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05495

研究課題名(和文) 救急医療における中毒診療のパラダイムシフト -中毒物質の迅速検査システムの構築-

研究課題名(英文) Development of the rapid poison screening method for serum sample using probe electro ionization-tandem mass spectrometry

研究代表者

舟山 真人 (Funayama, Masato)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40190128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：探針エレクトロスプレーイオン化法(PESIイオン源)とタンデム質量分析計(MS/MS)を組み合わせることで、血清中の薬毒物を前処理することなく、迅速・簡便に検出・定量することができた。なお、測定時間は1試料あたり18秒であった。救急医療分野において頻出する薬毒物であるアセトアミノフェン、パラコート、グルホシネート、サリチル酸などについて分析法のバリデーションを行なった結果、いずれの値も基準を満たしており、簡便で迅速な中毒物質の検出法となり得ることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの薬毒物分析法は、試料の前処理(液-液抽出、固相抽出など)とクロマトグラフによる分離を行なうことで対象化合物を検出することが主流であった。しかし、本分析法ではPESIとMS/MSを組み合わせることで、試料の前処理や分離操作を省略することが可能となり、分析時間の大幅な短縮化に成功した。その結果、18秒で血清中の薬毒物濃度を明らかにすることができ、初期治療から予後の管理まで一貫して患者の治療支援に貢献することができるようになった。

研究成果の概要(英文)：Rapid identification of toxic compounds is very important in emergency medicine, and it contributes towards the initiation of toxicological treatment plans. Therefore, we aimed to develop an ultra-rapid drug-screening method for serum samples based on probe electrospray ionization tandem mass spectrometry. To confirm the reliability of the PESI-MS/MS technique, we conducted analytical validation experiments using some drugs or poisons such as acetaminophen, paraquat, glufosinate etc. Our results showed that PESI-MS/MS is an easy and rapid technique for the analysis of target compounds in serum samples (just 18 sec for determination). In the future, we will apply this technique to test for other drugs and poisons often encountered in emergency medicine.

研究分野：中毒分析

キーワード：Ambient ionization Probe electrospray PESI-MS/MS 臨床中毒 救急医療 薬毒物 質量分析

## 1. 研究開始当初の背景

薬物による急性中毒は年間数 10 万件程度発生しているとされ、救急医学とともに、社会的に重要な診療領域である。薬毒物が関与する事故・事件が発生した場合、我が国において分析が実施されている主な機関としては、科学捜査研究所（犯罪捜査）法医学分野（死因究明）がある。通常、これらの機関では犯罪の疑いがある場合にのみ分析が行われ、分析結果が診療に生かされることは稀である。一方、救急医療の現場では事件性の有無に関わらず患者を救命することが責務であり、しかも緊急性を要する場合がほとんどである。中毒の原因となる薬毒物は、医薬品・農薬・自然毒・家庭用品・工業薬品など無数に存在し、最近では危険ドラッグまで加わり、担当医はこれらの中毒事案に迅速に対応していくことが求められている。しかし、病院における薬毒物検査は、多くの場合、発見時の状況・症状・検査所見・既往歴などの聴取のみから推測され、分析に関してもイムノアッセイや呈色反応による簡易検査のみが行われているに過ぎない状況である。これらの検査キットは操作が簡易で検査時間も短いため有用であるが、具体的な薬物名までは分からず、対象となる薬毒物も限られている。実際の救急現場で求められているのは、犯罪捜査に要求されているような、時間をかけて確実性・厳格性を重視する分析法ではなく、(1) 誰でも測定できる（若干の経験の積んだ臨床検査技師など）簡便な検査法 (2) 具体的な薬物名を知るための迅速かつ広範囲な薬毒物検査法である。特に適切な対応を行わなければ、生命が危険に曝されうる薬毒物を迅速に同定・定量することが重要であり、これを目指すために本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

急性薬物中毒が疑われる臨床において、その中毒起因物質を迅速かつ簡便に特定することにより、適切な初期治療を行うことが可能となる物質が存在する。しかし、中毒を引き起こす物質は無数にあり、その特定には高度な技術と時間が必要である。現状の分析システムでは、分析結果の報告までに少なくとも 2 時間以上かかり、初期治療に反映されず、その遅れから病状悪化の可能性も生じ得る。そこで、日本中毒学会が指定する「分析が有用な中毒起因物質」を含む広範囲な薬毒物について、患者血液あるいは尿を採取後、10 分以内に薬毒物を特定する新たなシステムを開発し、救急医療における中毒診療に新たな診療展開を構築することを目指すのが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

本研究では圧倒的な時間短縮を図るために、従来法において分析時間の大半を占めている「血液試料の前処理工程」及び「カラムによる分離作業」を排除し、代わりに新しいイオン化技術であるプローブエレクトロスプレーイオン化タンデム型質量分析法（PESI-MS/MS 法）を用いた。PESI-MS/MS 法は、山梨大学の平岡らによって開発されたイオン化法であり、試料の前処理がほとんど不要なことに加えて、迅速かつ簡便に物質の検出を可能とする新しいイオン化法である。

本研究において対象とした薬毒物は、日本中毒学会が指定する「分析が有用な中毒起因物質」

や実際の臨床現場において分析が必要となる薬毒物から選定し研究を行った。具体的にはアセトアミノフェン (APAP)、サリチル酸 (SA)、パラコート (PQ)、ジクワット (DQ)、グルホシネート (GLUF)、グリホサート (GLYP) を対象化合物とした。これらの薬毒物を添加した血清に内標準 (各化合物の安定同位体を含む 10 mM ギ酸アンモニウム/エタノール溶液) を加えたものを分析試料とした。分析試料を専用試料台にセットした後、探針で溶液を穿刺する操作を繰り返し、高電圧を加えることによって探針の表面に付着した試料成分をイオン化させ測定した。イオン化法の極性は APAP、PQ、DQ はポジティブイオンモード、SA、GLUF、GLYP はネガティブイオンモードにて測定を行なった。装置は PESI イオン源およびタンデム型質量分析計 LCMS-8040 (いずれも島津製作所製) を用いた。なお、分析バリデーションを実施した後、実サンプルの測定を行ない、定量値について従来法との比較を行なった。

#### 4. 研究成果

PESI-MS/MS 法は、1 試料あたり 18 秒の測定時間で血清試料から APAP、SA、PQ、DQ、GLUF と GLYP を検出することができた。また、定量用に作成した血清マトリックスの検量線に関して、いずれの化合物においても妥当な直線性が得られた。APAP、PQ、DQ、GLUF と GLYP についてバリデーション (Accuracy, repeatability, matrix effect, stability test など) を行なった結果、いずれも許容される値を得ることができた。実サンプルへの応用を試みたところ、従来法で測定した定量値と PESI-MS/MS で測定した定量値に大きな違いはみられなかった。PESI-MS/MS 法では、血清に内標準を添加して測定するだけで精度の高い値を得ることができ、分析経験のない測定者でも容易に定量値を得ることが可能であった。初期治療への貢献だけでなく予後の管理にも応用できる薬毒物分析法として有用であることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Kiyotaka Usui, Eriko Minami, Yuji Fujita, Eito Kubota, Haruka Kobayashi, Tomoki Hanazawa, Tomohiro Yoshizawa, Yoshito Kamijo, Masato Funayama. Application of probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry to ultra-rapid determination of glufosinate and glyphosate in human serum. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. DOI:10.1016/j.jpba.2019.05.040 査読有,印刷中

Kiyotaka Usui, Haruka Kobayashi, Yuji Fujita, Eito Kubota, Tomoki Hanazawa, Tomohiro Yoshizawa, Yoshito Kamijo, Masato Funayama. An ultra-rapid drug screening method for acetaminophen in blood serum based on probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Journal of Food and Drug Analysis. DOI:10.1016/j.jfda.2019.02.001 査読有,印刷中

Kiyotaka Usui, Tasuku Murata, Yuji Fujita, Yoshito Kamijo, Tomoki Hanazawa,

Tomohiro Yoshizawa, Masato Funayama. Direct detection of a psychoactive substance MT-45 in human tissue samples by probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Drug Testing and Analysis. DOI:10.1002/dta.2390 査読有, 2018; 10(6), 1033-1038

Kiyotaka Usui, Yuji Fujita, Yoshito Kamijo, Tetsuo Kokaji, Masato Funayama. Identification of 5-fluoro ADB in human whole blood in four death cases. Journal of Analytical Toxicology. DOI:10.1093/jat/bkx088 査読有, 2018; 42(2), 21-25

Yuji Fujita, Toshinori Mita, Kiyotaka Usui, Yoshito Kamijo, Satoshi Kikuchi, Makoto Onodera, Yasuhisa, Fujino, Yoshihiro Inoue. Toxicokinetics of the Synthetic Cathinone -Pyrrolidinohexanophenone. Journal of Analytical Toxicology. DOI: 10.1093/jat/bkx080 査読有, 2018; 42(1), 1-5

Akihito Usui, Yusuke Kawasumi, Kiyotaka Usui, Yuya Ishizuka, Kaito Takahashi, Masato Funayama, Haruo Saito. Postmortem Computed Tomographic Analysis of Death Caused by Oral Drug Intoxication. The Tohoku Journal of Experimental Medicine. DOI:10.1620/tjem.242.183. 査読有, 2017; 242(3), 183-192

[学会発表](計12件)

臼井聖尊. Direct detection of the psychoactive substance MT-45 in human tissue samples by probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry. 2018 International Symposium for Research Development in Clinical Toxicology. 2018年11月30日 Taiwan・Taipei

Tomoki Hanazawa, Yoshito Kamijo, Tomohiro Yoshizawa, Tasuku Murata, Kiyotaka Usui, Yuji Fujita, Toru Kishino. Comparison of two analytical methods to determine blood caffeine concentrations: direct probe ionization-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (Asiatox 2018). 2018年6月17日 Thailand・Pattaya

Kiyotaka Usui, Eito Kubota, Yuji Fujita, Tomoki Hanazawa, Tomohiro Yoshizawa, Yoshito Kamijo, Masato Funayama. A rapid drug-screening method for acetaminophen in serum based on probe electrospray ionization tandem mass spectrometry. The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (Asiatox 2018) 2018年6月17日 Thailand・Pattaya

Kiyotaka Usui, Yuji Fujita, Yoshito Kamijo, Masato Funayama. Identification of 5-fluoro ADB and its metabolites in four fatal cases. International Symposium on Drug Abuse Related Poisoning and Snake Envenoming 2017. 2017年11月24日 Taiwan・Taipei

Yuji Fujita, Kiyotaka Usui, Haruka Kobayashi, Yoshito Kamijo, Yoshihiro Inoue, Masato Funayama. A Drug Screening Method for Serum Using Probe Electro Ionization-Tandem Mass Spectrometry. The Asia Pacific Association of Medical Toxicology (APAMT) 2017. 2017年11月7日 Sri-Lanka・Kandy

久保田永都, 臼井聖尊, 小林遥香, 藤田友嗣, 上條吉人, 久志本成樹, 舟山真人. PESI-MS/MSを用いた血清中薬毒物の迅速スクリーニング法の構築～アセトアミノフェンを対象とした分

析バリデーション～．第18回日本法医学会北日本地方集会・法医学談話会第104回例会．盛岡 2017年10月13日 盛岡

臼井聖尊，齋藤弘一，藤田友嗣，小椋哲雄，上條吉人，舟山真人．中毒診療に対応した迅速薬毒物スクリーニング法の検討．第39回 日本中毒学会学術集会．2016年6月30日 茨城

藤田友嗣，臼井聖尊，小林遥香，上條吉人，村田匡，佐々木佐恵，井上義博，久志本成樹，舟山真人．探針エレクトロスプレーイオン化法（PESI）を用いた血清中薬毒物の迅速スクリーニング法の構築．第39回日本中毒学会学術集会．2017年6月30日 茨城

臼井聖尊．死因究明に貢献する法中毒学．第24回 クロマトグラフィーシンポジウム．2017年6月14日 仙台

小林遥香，村田匡，臼井聖尊，藤田友嗣，野村亮介，久志本成樹，舟山真人．救急診療に活用するための簡便・迅速な中毒物質の検出法～PESI-MS/MSを用いた血清中薬毒物の迅速定量～第31回日本中毒学会東日本地方会．2017年1月21日 盛岡

Kiyotaka Usui，Koichi Saito，Tetsuo Kokaji，Tomomi Aramaki，Masato Funayama．Rapid drug screening for use in emergency medical treatment. The Asia Pacific Association of Medical Toxicology (APAMT) 2016. 2016年11月17日 Singapore・Singapore

Kiyotaka Usui，Tasuku Murata，Yoshie Hayashizaki，Masato Funayama．Direct detection of designer drug MT-45 in human tissue samples by probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry. The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) 2016. 2016年8月28日 Australia・Brisbane

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：臼井 聖尊

ローマ字氏名：USUI KIYOTAKA

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：80567884

研究分担者氏名：藤田 友嗣

ローマ字氏名：FUJITA YUJI

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：50721974

研究分担者氏名：久志本 成樹

ローマ字氏名：KUSHIMOTO SHIGEKI

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号 ( 8桁 ): 50195434