

令和元年6月8日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09217

研究課題名(和文) 剖検事例におけるリチウム中毒の評価と簡易リチウム分析法の検討

研究課題名(英文) Rapid determination of lithium in blood by color reaction using fluorine substituted tetraphenylporphyrin ligand and application of the method to autopsy case

研究代表者

藤田 友嗣 (FUJITA, YUJI)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：50721974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：双極性障害の治療で用いられるリチウムは自殺目的での大量摂取に加え、有効域と中毒域が近接しているため慢性中毒の頻度が比較的高い薬物である。リチウムを簡便かつ迅速に検出する方法として、F28ポルフィリンキレート化合物(F28TPP)をリチウムの特異的発色剤とした色相変化による検出法の検討を行った。0 mEq/Lは緑色、0.5と1.0 mEq/L(治療域濃度)は橙色、1.9と3.0 mEq/L(中毒域濃度)は赤色を呈した。色相変化に基づく半定量値と分析機器で測定した値を比較した結果、両者は概ね良好な相関を示した。本法は法医学領域におけるリチウムのスクリーニング法として有用と思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リチウムは自殺目的での大量摂取に加え、治療域と中毒域が近接しているため慢性中毒の頻度が比較的高い薬物であることから、救急や精神科、法医学において分析対象となる薬物である。一般的に生体中のリチウムの測定には原子吸光光度計などの元素分析装置が用いられるが、そのような高度・高額な機器を使用せずとも、開発した方法は色相を確認するのみで簡便かつ迅速に半定量的にリチウムを検出できるスクリーニング法である。本法は臨床におけるリチウム中毒の迅速な診断に貢献できる他、法医学領域におけるリチウム中毒死の見逃ごしをなくし死因究明に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lithium (Li) preparation is widely used as an agent for bipolar disorder. Blood Li concentrations are related to Li toxicity. We developed new method for rapid determination of blood Li by a color reaction. Specifically, our reaction uses the fluorine substituted tetraphenylporphyrin ligand (F28TPP) solution. For the color reaction, changes of the color phase depend on blood Li levels: green, orange, and red indicate less effective levels, effective levels (0.6-1.2 mEq/L), and toxic levels (>2.0 mEq/L), respectively. Li concentrations determined using our color phase method showed good agreement with those measured by an analyzer. Our method helps in the rapid diagnosis of clinically Li intoxication cases, and is applicable to the screening test of Li in autopsy cases.

研究分野：中毒

キーワード：中毒 リチウム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

近年、精神疾患で医療機関にかかる患者数は大幅に増大し、そのうち双極性障害の患者は少なくとも数十万人にのぼると見積もられている。双極性障害の治療には炭酸リチウムが第一選択薬として多用されている。リチウムは血中リチウム濃度が有効濃度である治療域と中毒域とが近接しており、TDM (Therapeutic Drug Monitoring) 項目に指定されている。近年、医薬品医療機器総合機構 PMDA の調査から、重篤なりチウム中毒症例中の約 90%で、あるいはリチウムを処方された患者のうち約 52%でリチウム検査の実施が確認できないことが明らかとなった 1, 2)。PMDA からの勧告後も、過量服用によるリチウム中毒が後をたない。

リチウム中毒には急性と慢性中毒がある。慢性中毒では中枢に移行したリチウムが特に問題となり、急性と比べて重篤で致死性である。リチウム中毒の毒性は血中リチウム濃度を指標としている (治療域 0.6~1.2 mEq/L、中毒域 1.5~3.5 mEq/L、致死域 3.5 mEq/L 以上)。血中リチウム濃度による毒性の評価に関して、慢性中毒では血中濃度と毒性との相関性があるが、急性中毒では相関性が低い。

法医学ならびに臨床の薬毒物検査の現場では、医薬品、農薬、乱用薬物などの有機化合物が検査の主体で、ガスクロマトグラフ質量分析装置や液体クロマトグラフ質量分析装置の普及が進んでいる。しかし、リチウム分析のような元素分析に関して、法医学ならびに臨床の薬毒物検査の現場では有機化合物と比べて事例が少なく且つ誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) 等の元素分析装置が高価であるので所有する機関が限られており、一般的に行われていない 3)。申請者らは、高額・高度な分析機器がなくともリチウムの測定が可能な血清中リチウムの迅速分析法として、F28 ポルフィリンキレート化合物 (2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18-Octafluoro-5, 10, 15, 20-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin

(F28TPP) (Fig. 1) をリチウム特異的発色剤として応用する方法を開発し、発色プローブの光化学反応を利用した「色相変化」による定量方法を見出し 4-6)、臨床例で用いている。これは、リチウムと反応した化学種が赤色、反応しない化学種が緑色を呈し、目視でも確認できる。本法は極少量の血清試料で行え、色相変化の特性から、全血においても血清同様ダイレクトにリチウムを検出可能である 7)。

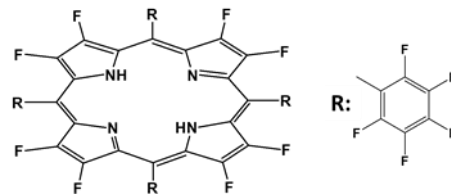


Fig. 1: Structure of F28TPP

### 2. 研究の目的

臨床の現場では、元素分析を行わなくても患者の臨床症状、服薬履歴や家族・救急隊員の情報から総合的に判断して、比較的容易に急性リチウム中毒か重篤で致死的な慢性中毒かを推定し治療が行える。一方、法医学例では、患者情報を入手できないことがあり、急性か慢性中毒かを判別することは極めて困難である。しかし、慢性中毒における中毒症状の発現には中枢に移行した高濃度のリチウム、すなわち脳中リチウム濃度が密接に関連していることから 8)、法医学例で血中濃度に加え脳中のリチウム濃度も併せて測定することで急性、慢性中毒の判別が可能である。

そこで申請者らは、法医学例の血中リチウム中毒とその影響、他薬物との相互作用などその実態を明らかにすることができ、かつ迅速・簡便な分析法があれば、リチウム測定が広く行われ、リチウム中毒死の見過ごしをなくし、法医学における死因究明に貢献できると考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 全血中の色相変化によるリチウムの検出

##### ① 全血に F28TPP 試薬を直接添加する方法

全血中リチウム濃度が 0、0.5、1.0、1.9、3.0 mEq/L の試料について、全血試料 4  $\mu$ L にメタロアッセイリチウム (メタロジェニクス) の F28TPP 試薬 240  $\mu$ L を添加して、携帯電話の LED 光を約 1 分照射後に蛍光灯下でその色相を確認した

##### ② 全血を除タンパクした上清に F28TPP 試薬を添加する方法

全血中リチウム濃度が 0、0.5、1.0、1.9、3.0 mEq/L の試料について、全血試料 150  $\mu$ L に等量の 10% スルホサリチル酸水溶液を加えて除タンパクを行い、遠心分離した上清 8  $\mu$ L に F28TPP 試薬 240  $\mu$ L を添加して、携帯電話の LED 光を約 1 分照射後に蛍光灯下でその色相を確認した。

#### (2) 安定性の検討

発色した色相の安定性を確認するために、発色後、5、10、20、30、60、120、180、240 分の色相の変化を確認した。

#### (3) 色相変化を用いた半定量値の妥当性についての検討

色相変化を用いて定量した値 (半定量値) と分析機器を用いての測定した値の比較を行った。色相変化によるリチウムの半定量に関して、リチウム標準溶液の発色と分析試料の発色を比較しリチウム濃度を推定した。分析機器での測定はマイクロプレートリーダー (CORONA 製, SH-1000 型) を用いた。マイクロプレートリーダーの測定パラメータはインキュベーション時間 10 分または 30 分、常温、主波長 550 nm、副波長 600 nm とした。

#### (4) 剖検事例への応用

本法を法医剖検事例に用い、リチウムのスクリーニング検査を実施しリチウム存在有無の確認を行った。また、臨床中毒事例にも本法を応用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 全血中の色相変化によるリチウム検出方法

①全血にF28TPP試薬を直接添加する方法ではFig. 2のAに示すようにヘモグロビンの影響を受け、色相によるリチウムの検出は困難であった。なお、全血試料の量に関して、試料量を1~3  $\mu$ Lに減じて色相変化によるリチウムの検出確認は困難であった。また、全血を2倍希釈した試料でも用いた検討を行ったが、これも色相変化によるリチウムの検出確認は困難であった。

②全血をスルホサリチル酸水溶液で除タンパクした上清にF28TPP試薬を添加する方法では、Fig. 2のBに示すように0 mEq/Lは緑色、0.5と1.0 mEq/Lは橙色、1.9と3.0 mEq/Lは赤色を呈し、色相変化によるリチウムの検出および半定量が可能であると考えられた。なお、本法が尿試料にも応用可能か検討を行ったところ、尿試料4  $\mu$ LにF28TPP試薬240  $\mu$ Lを直接添加し発色する方法で尿中リチウムの確認が可能であった (Fig. 3)。本結果から色相変化によるリチウム検出法が全血試料に加え尿試料にも応用可能であることが示され、本法は法医学領域におけるリチウムのスクリーニング法として有用と考えられた。

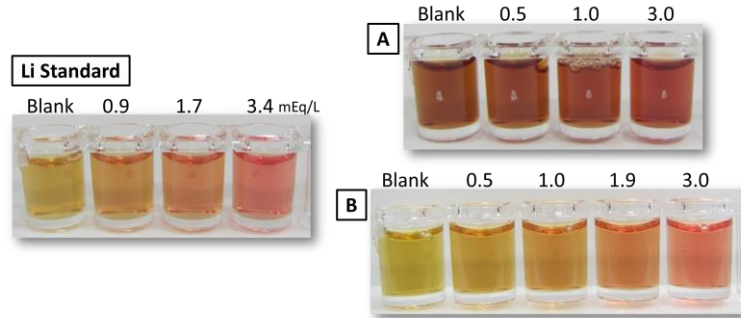


Fig. 2: Application of the color reaction method to whole blood. A, color phase of whole blood without deproteinization; B, color phase of whole blood with deproteinization treatment.

##### (2) 安定性の検討

全血をスルホサリチル酸水溶液で除タンパクした上清にF28TPP試薬を添加し発色する方法に関して、その発色後の安定性を5、10、20、30、60、120、180、240分で確認した。発色は概ね60分までは安定していた。本法を用いてのリチウムの存在有無の確認はF28TPP試薬を添加後60分までに判断することで確実に判断できると考えられた。

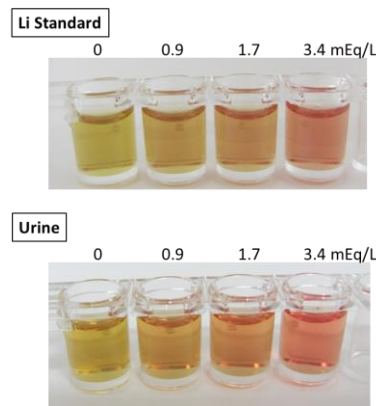


Fig. 3: Application of the color reaction method to Urine.

##### (3) 色相変化による半定量値

全血中リチウムの色相変化を用いた半定量値と分析機器を用いて測定した値の比較を行った。色相変化によるリチウムの半定量に関して、0、0.9、1.7、3.4 mEq/Lのリチウム標準溶液を作製しF28TPP試薬を添加し発色させ、その色相をコントロールとして分析試料中のおおよそのリチウム濃度を算出した (Fig. 4) なお、Sample 1に関しては、全血中リチウム濃度がコントロール濃度の1.7-3.4 mEq/Lの範囲にあると判断し、その濃度を2-3 mEq/Lとした。Sample 2に関しては、コントロール濃度の0.9-1.7 mEq/Lの範囲にあると判断しリチウム濃度を1-1.5 mEq/Lとした。Sample 3に関しては、コントロール濃度0-0.9 mEq/Lの範囲にあると判断しリチウム濃度を1 mEq/L以下とした。マイクロプレートリーダーでのリチウムの測定に関して、リチウム濃度が0.95 mEq/L、3.33 mEq/Lとなるよう添加した全血試料をスルホサリチル酸で除タンパクし、その上清を10分のインキュベーション時間で測定したところ、測定値はそれぞれ0.29 mEq/L、1.07 mEq/Lと元の値の約1/3の濃

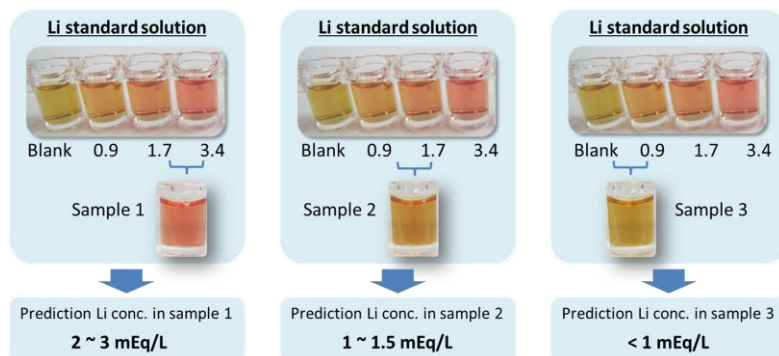


Fig. 4: Application of the color reaction method to whole blood.

度を示した。そこで、インキュベーション時間を 30 分と延長したところ 0.91 mEq/L、3.00 mEq/L と添加した濃度とほぼ同じ値を示したため、インキュベーション時間を 30 分としてリチウムの定量を行った。Table 1 に色相変化による全血中リチウムの半定量値とマイクロプレートリーダーで測定した値の比較を示す。色相変化から推定した値とマイクロプレートリーダーを用いて測定した値は概ね一致していた。本結果から、本法はリチウムのスクリーニングに加えて、血中リチウム濃度も評価できる検出法であることが確認された。

Table 1: Comparison of values between visual measurement using the current color reaction and equipment measurement.

Sample No	Visual measurement	Equipment measurement
Sample 1	2~3 mEq/L	2.5 mEq/L
Sample 2	1~1.5 mEq/L	1.2 mEq/L
Sample 3	< 1 mEq/L	0.7 mEq/L

#### (4) 剖検事例への応用

本法を剖検事例に応用したところ、簡便かつ迅速にリチウム存在の有無を確認することができ、患者のリチウム服用に関する情報が無くともリチウム摂取事例を確認することができた。これらの事例に関して、マイクロプレートリーダーを用いて血中リチウム濃度を測定したところ、その濃度は治療域以下で脳内リチウム濃度（ICP-MS を用いて測定）も検出限界以下であり、今回対象とした事例において、慢性リチウム中毒事例は存在せず死因にリチウムが影響を及ぼしていないことが確認された。なお、臨床事例においてもリチウム中毒が疑われる事例においても本法を用いたスクリーニング検査ならびに半定量を実施した。臨床事例においても迅速に血中リチウム濃度の測定が行え、臨床の初期治療に貢献することが可能であった。なお、血中リチウム濃度が 9 mEq/L と高濃度の中毒事例に関して、試料の色相が赤色ではなく桃色を示した（Fig. 5）。急性リチウム中毒事例では血中濃度が 3 mEq/L 以上になることが多く、色相の判定において桃色を示す場合、3 mEq/L 以上の濃度であると思われるため適宜希釈して再検査する必要がある。

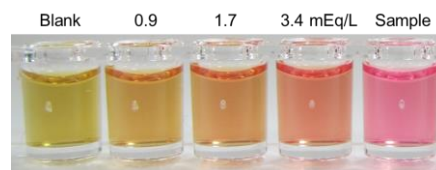


Fig. 5: Application of the color reaction method to high Li concentration sample.

リチウムは自殺目的での大量摂取に加え、治療域と中毒域が近接しているため慢性中毒の頻度が比較的高い薬物であることから、救急や精神科、法医学において分析対象となる薬物である。一般的に生体中のリチウムの測定には原子吸光光度計などの元素分析装置が用いられるが、そのような高度・高額な機器を使用せずとも、開発した方法は色相を確認するのみで簡便かつ迅速に半定量的にリチウムを検出できるスクリーニング法である。本法は臨床におけるリチウム中毒の迅速な診断に貢献できる他、法医学領域におけるリチウム中毒死の見逃ごしをなくし死因究明に貢献できると考えられる。

#### 参考文献

- 1) 医薬品医療機器総合機構 PMDA からの医薬品適正使用のお願い No. 7, 2012 年 4 月
- 2) 医薬品医療機器総合機構 PMDA からの医薬品適正使用のお願い No. 7, 2012 年 9 月
- 3) 1998 年度に厚生省（現厚生労働省）から薬物分析機器が配備された救急医療施設における分析業務の実態調査—2008 年の調査結果を基にした継続的な実態調査—。中毒研究。2013; 26: 226-233.
- 4) 特許 5100903 号
- 5) 特許 522243 号
- 6) PCT/JP2012/061015 特許公報
- 7) 秋富慎司, 藤田友嗣, 北條渉, 佐藤亜優, 岩渕拓也. 多価ハロゲン基導入ポルフィリン配位子による新規な血中リチウム検査法と救急薬物検査への可能性。中毒研究。2015; 28: 177.
- 8) 上條吉人: リチウム. 相馬一亥 監修, 臨床中毒学, 第 1 版, 医学書院, 東京, 2009, pp85-90.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. Fujita Y, Suzuki H, Iwabuchi T, Niitsu H, Dewa K, Kikuchi S, Onodera M, Fujino Y, Inoue Y. Semi-Quantitative Determination of Lithium in Blood Sample Using Fluorine Substituted Tetraphenylporphyrin Ligand (F28TPP). 10th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2017.

2. Fujita Y, Suzuki H, Niitsu H, Onodera M, Fujino Y, Inoue Y. Rapid Determination of Lithium in Blood Color Reaction Using Fluorine Substituted Tetraphenylporphyrin Ligand (F28TPP). 15<sup>th</sup> International Scientific Conference of the Asia Pacific Association of Medical Toxicology, 2016.

3. 藤田 友嗣、鈴木 裕子、新津 ひさえ、出羽 厚二、小野寺 誠、藤野 靖久、菊池 哲、井上 義博. 含フッ素ポルフィリン試薬を用いたリチウムの検出. 日本法中毒学会第 35 年会、2016.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：新津 ひさえ

ローマ字氏名：Niitsu Hisae

研究協力者氏名：岩渕 卓也

ローマ字氏名：Iwabuchi Takuya

※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、研究者個人に帰属されます。