

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (A)  
 研究期間：2006 ～ 2009  
 課題番号：18209025  
 研究課題名（和文） ナノスケール高速液体クロマトグラフィー／質量分析計  
 の法医学への応用  
 研究課題名（英文） Application of nanoLC/MS/MS to legal medicine

研究代表者  
 石井 晃 (ISHII AKIRA)  
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：30252175

## 研究成果の概要（和文）：

高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)は、生物学領域で広く用いられているのみならず、法医学でも薬毒物分析に重要な役割を果たす。本研究では、いわゆるナノスケール LC (nanoLC)/MS/MS による薬毒物の超高感度分析法を開発し、最新の LC/MS/MS 法との比較を行った。同時に新しい質量分析のイオン化法を開発し、法医学への応用が可能なものを検討した。

## 研究成果の概要（英文）：

High performance-liquid chromatography/tandem mass spectrometers (LC/MS/MS) are widely used not only in biology, but also in forensic sciences. In this project, we have developed an ultrasensitive method for determining poisons and pharmaceuticals using a nanoscale LC (nanoLC)/MS/MS. Also, new ionization methods for LC/MS have been developed, and some methods were applied to legal medicine.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	21,500,000	6,450,000	27,950,000
2007 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
総計	36,900,000	11,070,000	47,970,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：高速液体クロマトグラフィー、質量分析、エレクトロスプレー、大気圧化学イオン化、ナノスケール LC、プローブエレクトロスプレー、マッシュクラスタイオン衝撃/SIMS、UPLC

## 1. 研究開始当初の背景

薬毒物分析は、法医鑑定において重要な役

割を果たしている。具体的には、1) 乱用薬物、特にデザイナーズドラッグの問題、2) 薬毒物による中毒事例の診断の問題、3) 生

物・化学兵器によるテロ問題等が挙げられる。これらの原因物質は、ヒ素や青酸等の無機化合物から、ボツリヌストキシン等の高分子有機化合物まで、化学的に多様な物質から構成されており、それらの全てをスクリーニングすることは非常に困難と考えられる。ところで、現在これら化学物質の同定に最も有力な手法としては質量分析法が挙げられ、最近では高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)が広く用いられている。この理由としては、LC/MS/MS は高分子の薬毒物に対応でき、これらは通常使用されている GC/MS では検出が困難であることが挙げられる。一方で、LC/MS/MS はプロテオミクスなどの分野で広く使用されているものの、通常大学の共通設備となっていることが多い。そして、LC/MS/MS は、プロテオミクスに応用するために、ナノスケール LC (nanoLC) と結合していることが多い。nanoLC は、操作が困難である一方、高感度化が期待できる。一方、法医実務で分析対象となるサンプルは、不純物を多く含み、共通設備で分析するには不適切と考えられる。これらの問題を解決するためには、ナノスケール LC を法医学サンプルに応用するための方策、特に洗練された精製法の開発が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、LC/MS 及び LC/MS/MS で広く用いられている nanoLC を用い、薬毒物分析の高感度化を図る。一方、ナノスケール LC/MS/MS システムはプロテオミクス分野で汎用されているが、多くは共通機器として使用されている。nanoLC/MS/MS による分析が法医学領域で応用されれば、主に生化学等の領域で使用されている LC/MS/MS システムを共有できることとなり、高価な分析システムを教室で保有することなく、薬毒物の高感度分析が可能となる。同時に、新しいイオン化法の開発も行い、一部のイオン化法の nanoLC への応用も同時に検討し、加えて迅速に薬物がスクリーニング可能となるような LC/MS/MS の手法についても検討を行った。

## 3. 研究の方法

まず、nanoLC として汎用されている、AMR 社の ParadigmMS4 システムを導入し、イオントラップ型の MS/MS システムであるサーモエレクトロン社の LCQ システムと結合させ、分析を行った。他方、新しいイオン化して無として有望とされている、レーザー Sprei イオン化システムをナノスケール化するため、10. 8  $\mu\text{m}$  の赤外線照射でき

るシステムの構築を同時に計画した。nanoLC システムは、流路もカラムも目詰まりしやすいため、精製方法の検討も同時に必要であり、種々の固相抽出カラム及びマイクロプレート固相抽出による精製法の差について検討した。

レーザー Sprei イオン化法は、セミミクロスケールではある程度有効であり、nanoLC においても、レーザー Sprei が応用できれば感度向上が期待できるため、ParadigmMS4 に対応可能なレーザー照射システムの構築を試みた。しかしながら、共用システムに使用可能な、着脱可能なレーザー照射システムの構築は、光路が複雑になり、乱反射の防止も困難である等の理由から放棄せざるを得なかった。

次いで、レーザー Sprei システムに代わるものとして、通常のセミミクロの 10 倍程度の速度が期待できる Ultra-performace liquid chromatography (UPLC) が接続できる MS/MS システムを導入した。本システムは、高速でスペクトルデータが処理できるため、スクリーニングには適していると考えられ、従来のプロジェクトの nanoLC/MS/MS システムとの比較を行うことにした。

平岡グループは、従来のエレクトロスプレイイオン化法を超えるイオン化法の開発を目指し、プローブエレクトロスプレイ、マッシュクラスタイオン衝撃/SIMS、後述する atmospheric pressure chemi/chemical ionization 等のイオン化法を開発し、生体分子のイオン化に応用した。

## 4. 研究成果

### (1) nanoLC/MS/MS システムの法医学への応用

我々は、nanoLC/MS/MS システムが法医学領域へ応用可能であることを示した。これは、次項の UPLC/MS/MS との比較になるが、4 種類のブチロフェノン系薬物について、感度等の検討を行い、ハロペリドールについては、感度限界は 10 pg on-column 以下の感度が得られた。この場合、感度を確保するために最も重要なファクターは流速であることが分かった。流速が 3.5  $\mu\text{l}/\text{min}$  程度で概ね十分な分離が得られたものの、カラムの耐圧性が問題になるため、通常の C<sub>18</sub> 系カラムではなく、耐圧性の良好なフェニル系カラムであれば、流速を 3.5  $\mu\text{l}/\text{min}$  でも流路の漏れを防ぐことができた。

ベンゾジアゼピン系薬物については、19 種類の検出を試みたものの、プロマゼパム、メダゼパム、エスタゾラムは 200 pg on-column でも MS/MS スペクトルの採取が困難であった。これらの化合物は UPLC/MS/MS でも高感度は得られず、その

原因としては、比較的親水性が高くイオン化が不良である可能性や、カラムとの親和性が低いため、ピークがブロードであることが想定される。しかしながら、他のベンゾジアゼピン系薬物は、10 pg on-column 程度の感度が得られた。但し、薬物との結合の強いカラムを選択すると、分離は良好になるものの、分析時間が延長するため、分離と分析時間は trade off の関係になる。我々は、種々の薬物について検討したが、5 種類のベンゾジアゼピン系薬物について、例として下記の二つの図を挙げる。図 1 では、各薬物は良好に分離され、かつ形状の良いマスクロマトグラムが採取された。また、MS/MS スペクトルについても、図 2 に示すように、超低濃度で薬物の同定に十分な特異的なスペクトルが得られた。

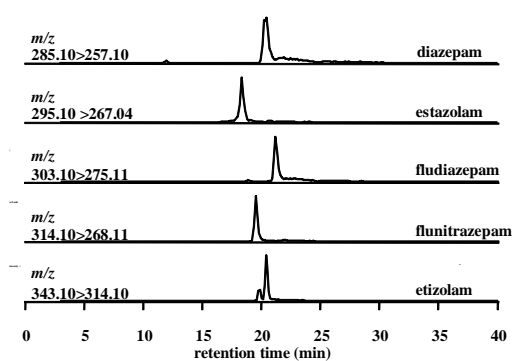


図 1: 5 種類のベンゾジアゼピン系薬物のマスクロマトグラム

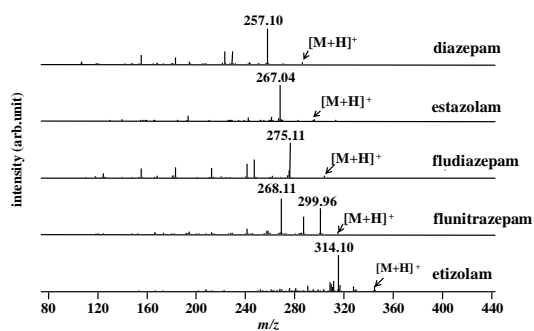


図 2: 5 種類のベンゾジアゼピン系薬物の MS/MS スペクトル

要約すると、nanoLC/MS/MS の利点として、① 低濃度領域でのスペクトル取得が安定しており、信頼性の高いスペクトルが得られる。② 定性限界は UPLC/MS/MS と比較して 10 倍以上優れていることが予想される。一方、欠点として、① 1 回の測定に要する時間が UPLC/MS/MS の 3 分に対し、nanoLC/MS/MS では 30 分を要するため、ハイスループットネスを犠牲にせざるを得ず、② システムの性質上、いわゆる robustness が劣ることは否めないこと、③ 当システムの

操作性は煩雑で、条件設定が困難であることが挙げられる。

従って、通常の法医実務において、例えば包括的な薬物スクリーニングを目的として nanoLC/MS/MS システムを応用することは、残念ながら、実際的には使用可能とは言い難い。

しかしながら、これらの状況を総合したうえで、nanoLC/MS/MS では、超微量の薬物で良好な MS/MS スペクトルが得られることは事実であり、これらが薬物の同定に有力であることを勘案すると、nanoLC/MS/MS の用途としては、毛髪や爪等の試料における超微量薬毒物の同定には有力な方法と考えられる。

## (2) UPLC/MS/MS の法医学への応用

上述したように、我々はレーザースプレーの nanoLC/MS/MS を断念し、その代わりに UPLC/MS/MS システムを導入した。UPLC/MS/MS の利点としては、スループットネスが従来の LC/MS/MS と比較して圧倒的に良好なことが挙げられる。今回、ターゲットとしては、ブチロフェノン系薬物、ベンゾジアゼピン系薬物及び三環系抗うつ薬を選んだ。

対象として、ブチロフェノン系薬物 7 種類、三環系抗うつ薬 9 種類、ベンゾジアゼピン系薬物 20 種類を選び、一斉分析のメソッドを確立した。具体的には、MRM モードを用いることで、3 分以内に全ての薬物を分離よく検出することが可能であった。検出限界は血漿に添加した薬物で 100pg-5ng/ml という結果が得られ、検量線は 1ng-100ng/ml の範囲でよい直線性が得られた。日内変動は、抗うつ剤で 15 %未満、ベンゾジアゼピン系薬物で 20 %未満、ブチロフェノン系薬物は 10 %未満 (50 ないし 200 ng/ml) であった。

UPLC/MS/MS の利点としては、以下の点が挙げられる。即ち、①高速で多試料が処理できることが最も大きい利点であり、②操作性が優れており、③精製時のフィルター処理等の前処理を省略しても十分測定可能である。欠点としては、①溶出時間が極めて短いため、データポイントの数が少なく、微量の場合、MRM モードでのデータの信頼性に問題があるケースがあること、②データポイントが少ないことのもう一つの問題点として、同定のために MS/MS スペクトルを採取しようとしても、十分な感度が得られない場合があること、③今回の UPLC/MS/MS のシステムでは、 $m/z$  の範囲が 2,000 以内であるため、パリトキシン等の高分子に対応できないことが挙げられる。

これらを総合すると、この方法は、実際の法医鑑定試料において、ある程度原因物質が想定されている状況において、迅速なスクリ

ーニングを行うのに適していると考えられる。

(3) 法医学領域に応用可能な新しい質量分析法の開発

レーザーイオン化法の他に、種々のイオン化法が質量分析計に応用されており、研究分担者である平岡らは精力的に新しいイオン化法を開発してきた。

特に、今後乱用薬物検出に応用可能なイオン化法としては、atmospheric pressure chemi/chemical ionization mass spectrometry (APC/CI)である。これは、従来エレクトロスプレーと並んで LC/MS で広く使用されている大気圧化学イオン化法において、準安定なヘリウム分子と反応イオンを誘電体バリア放電を利用することにより生成し、イオン化を行う方法である。このイオン化法を用いることにより、血中ないし尿中のメタンフェタミン、アンフェタミン、ケタミン、MDMA パルプロ酸等の乱用薬物や医薬品が、pH を調整するのみで、希釈や精製を行うことなしに検出することが可能となった。現在のシステムでは、このイオン化法を用いて当該薬物の定量を行うことは困難であるが、LC と結合することにより、今後定量も可能になると考えられる。また、これもマイクロ化を進めることにより、更なる感度の上昇も期待できる。

#### 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 45 件)

- (1) Arinobu T, Kaneko R (6 番目), Ishii A (7 番目), 他 8 名: High-throughput of theophylline and caffeine in human serum by conventional liquid chromatography-mass spectrometry. *Forensic Toxicol.* 27, 1-7, 2009. 査読有
- (2) Hattori H, Hirata Y, Kaneko R (4 番目), Ishii A (6 番目), 他 4 名: Simultaneous analysis of aconitine, mesaconitine, hyaconitine, and jesaconitine in whole blood by LC-MS-MS using a new polymer column. *Forensic Toxicol.* 27, 7-11, 2009. 査読有
- (3) Chen LC, Hiraoka K (6 番目), 他 4 名: Rapid detection of drugs in biofluids using atmospheric pressure chemi/chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 333-339, 2009. 査読有
- (4) Asakawa D, Chen LC, Hiraoka K: Negative-mode MALDI mass spectrometry for the analysis of pigments using

tetrathiafulvalene as a matrix. *J. Mass Spectrom.* 43, 1217-1222, 2008. 査読有

- (5) Chen LC, Hiraoka K (11 番目) 他 9 名: Ambient imaging mass spectrometry by electrospray ionization using solid needle as sampling probe. *J. Mass Spectrom.* 44, 1479-1477, 2008. 査読有
- (6) 石井 晃, 金子理奈, 平田ゆかり, 浜島 誠: 新しい質量分析技術の法医学領域への応用 質量分析 56, 131-138, 2008. 査読有
- (7) Hattori H, Ishii A (7 番目) 他 7 名: Rapid Analysis of sertraline, fluvoxamine, and paroxetine in serum specimens by LC-MS-MS using a new polymer column. *Forensic Toxicol.* 25, 100-103, 2007. 査読有
- (8) Hiraoka K 他 4 名.: Development of probe electrospray using a solid needle. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 3139-3144, 2007. 査読有
- (9) Kaneko R, Hamajima M (4 番目), Hirata Y (5 番目), Ishii A (8 番目) 他 4 名: Sensitive analysis of aconitine, hyaconitine, mesaconitine, and jesaconitine in human body fluids and Aconitum tubers by LC/ESI-TOF-MS. *J. Mass Spectrom.* 41, 810-814, 2006. 査読有
- (10) Kumazawa T, Ishii A (6 番目) 他 6 名: Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of mequitazine in human plasma. *Talanta* 70, 474-478, 2006. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

- (1) Hiraoka K: Shallow depth profiling by electrospray droplet/SIMS. SIMS XVII Conference, 2009 年 9 月 3 日, Bremen, Germany.
- (2) Kaneko R, Ishii A (7 番目) 他 6 名: A rapid and simultaneous analysis of psychopharmaceuticals in human body fluids with ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. The 47 th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists Conference, 2009 年 8 月 26 日 2, Geneva, Switzerland.
- (3) Kaneko R, Hirata Y et al: Simultaneous analyses of 17 volatile organic compounds by cryogenic-oven-trapping gas chromatography- mass spectrometry. The 7 th International Symposium of Advances in Legal Medicine, 2008 年 9 月 4 日, 大阪.
- (4) 服部 秀樹, 金子理奈(3 番目), 石井 晃 (7 番目) 他 6 名: 血清中 SNRI, DNRI 及び NRI の LC/MS/MS による迅速分析 日本法中毒学会第 27 年会, 2008 年 6 月 14 日,

- 東京.
- (5) Kaneko R, Hirata Y, Hamajima M, Ishii A (6 番目) 他 3 名: Sensitive analysis of volatile compounds by cryogenic-oven-trapping gas chromatography-mass spectrometry. The 46<sup>th</sup> TIAFT, 2008 年 6 月 4 日, La Martinique.French
- (6) 石井 晃: 新しい質量分析技術の法医学領域への応用 第 34 回 BMS カンファレンス, 2007 年 7 月 10 日, 鳥羽.
- (7) 石井 晃, 金子 理奈, 平田 ゆかり, 浜島 誠 他 3 名: レーザースプレーイオン化法によるヒト体液中向精神薬の高感度分析 第 91 次日本法医学会総会, 2007 年 5 月 18 日, 秋田.

[図書] (計 2 件)

- (1) 平岡賢三, 光近接場と質量分析. 「光科学研究の最前線 2」 p. 139, 強光子場科学研究懇談会編 2009.
- (2) Ishii A, Suzuki O, Katsumata Y: Surface ionization and its application to GC-MS. In: Encyclopedia of Mass Spectrometry Vol. 8, pp. 92-99, 2006.

[産業財産権]

○出願状況 (計 7 件)

名称: イオン化装置およびイオン化分析装置  
発明者: 平岡賢三  
権利者: 山梨大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-029157  
出願年月日: 2010 年 2 月 12 日  
国内外の別: 国内

名称: 過酸化水素の検出方法および装置  
発明者: 平岡賢三  
権利者: 山梨大学  
種類: 特許  
番号: PTC/JP2010/052392  
出願年月日: 2010 年 2 月 10 日  
国内外の別: 国外

名称: 帯電液滴エッチングを用いた試料表面汚染除去方法及び装置  
発明者: 平岡賢三  
権利者: 山梨大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-001947  
出願年月日: 2010 年 1 月 7 日  
国内外の別: 国内

名称: エレクトロスプレーによるイオン化法および装置、ならびに分析方法および装置  
発明者: 平岡賢三

権利者: 山梨大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2009-278458  
出願年月日: 2009 年 12 月 8 日  
国内外の別: 国内

名称: 探針を用いたイオン化方法及び装置、ならびに分析方法および装置  
発明者: 平岡賢三  
権利者: 山梨大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2009/068294  
出願年月日: 2009 年 10 月 19 日  
国内外の別: 国外

名称: イオン化分析方法及び装置  
発明者: 平岡賢三  
権利者: 山梨大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2009/060653  
出願年月日: 2009 年 6 月 4 日  
国内外の別: 国外

名称: イオン化法及び装置  
発明者: 平岡賢三  
権利者: 山梨大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2008-8247  
出願年月日: 2008 年 1 月 17 日  
国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 晃 (ISHII AKIRA)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 30252175

### (2) 研究分担者

金子 理奈 (KANEKO RINA)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 70367697

平岡 賢三 (HIRAOKA KENZO)  
山梨大学・クリーンエネルギーセンター・特任教授  
研究者番号: 80107218

平田 ゆかり (HIRATA YUKARI)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号: 50156676

浜島 誠 (HAMAJIMA MAKOTO)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教 (H18, 19)  
研究者番号: 20189601

高見澤 淳 (TAKAMIZAWA JUN)  
山梨大学・クリーンエネルギーセンター・  
科学技術振興研究員  
(H18, 19)  
研究者番号 : 80377605