

平成 22 年 3 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006 ～ 2009
 課題番号：18590631
 研究課題名 (和文) 薬毒物の錯体励起による高感度イオンスプレー質量分析検出法の開発
 研究課題名 (英文) Development of sensitive detection method for chelated poisons using electrospray ionization mass spectrometry
 研究代表者
 南方 かよ子 (MINAKATA KAYOKO)
 浜松医科大学・医学部・講師
 研究者番号：70115509

研究成果の概要 (和文)：イオンスプレー質量分析法(ESI-MS)は分子構造の解明に最適な方法であるが、分子が強く荷電して水溶性が高い場合にはイオン化できず、検出ができないという欠点がある。申請者は検出できていなかった薬毒物を錯体化合物とし、さらに第三の因子を反応させて分子を励起し、これらを極性有機溶媒で抽出することによりイオン化をさらに促進し、ESI-MS で高感度に検出する方法を見出した。この方法により中毒者試料中のモリブデン、6 価クロム、シスプラチン、コバルト、ヒ酸、亜ヒ酸、モノメチルヒ素、ジメチルヒ素、シアナイドを同定・定量した。

研究成果の概要 (英文)：Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) is the most suitable method to clarify the molecular structure. When a molecule is highly hydrophilic due to its strong charge, it cannot be ionized at the spray, and, as the consequence, it cannot be detected by MS. To facilitate its ionization, we made a chelate complex from the target molecule or a ternary compound from the chelate complex, and then extract it with a polar organic solvent. Using this method several poisons such as molybdenum, chromate, cisplatin, cobalt, arsenate, arsenite, monomethylarsonic acid dimethylarsinic acid and cyanide were determined in the biological materials of intoxicated victims.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,800,000	0	1,800,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
総計	3,600,000	540,000	4,140,000

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：薬毒物、錯体、質量分析、イオンスプレー

1. 研究開始当初の背景

(1) 有害な種々の重金属イオンを検出するには、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)

が多用されているが、その方法では 2000 度にまで試料を加熱してイオン化し、検出するので、例えば 5 価のヒ酸、3 価の亜ヒ酸、モノメチルヒ素、ジメチルヒ素はすべてヒ素イ

オンとなり、これらの区別ができない。

(2) イオンスプレー質量分析法(ESI-MS)は500度以下で、電圧をかけることにより分子をイオン化させる、ソフトなイオン化であるため、分子構造が保たれ、分子構造解明には最も適した方法である。従って、前述の種々の薬毒物を原理的には分別可能な方法ではある。しかし、低分子薬毒物は水溶性が高いので、従来行なわれていたESI-MS法ではこれらをイオン化させることができず、結局は検出不能であった。

2. 研究の目的

(1) 開始当初の背景に記述されているように、ICP-MSでもESI-MSでも5価のヒ酸、3価の亜ヒ酸、モノメチルヒ素、ジメチルヒ素を分別定量することはできなかった。申請者は、薬毒物とキレート剤とを反応させて錯体とし、さらに第三の因子を反応させてternary complexを作成(励起)し、分子の荷電を弱めた後に、極性有機溶媒で抽出することによりさらにイオン化を促進し、ESI-MSで高感度に分別検出する方法を見出した。この方法を荷電が強く、水溶性が高くて今までは検出できていなかった種々の薬毒物に適用する。

(2) 酵素やDNAに薬毒物が結合している状態はまさにternary complexが形成されている状態である。今回の励起化において、金属が異常原子価を示す場合も観察された。これらの異常原子価と発ガン、抗菌作用との関連も興味をもたれる。

以上、錯体励起化法を用いた薬毒物の高感度分別定量法の開発と作用機序の解明が目的である。

(3) この方法の利点

① 対象薬毒物は低分子であるので、それらの m/z は200以下である。質量分析においてこの200以下の領域は種々の分子に由来する妨害シグナルが多い領域である。薬毒物を錯体とすることにより分子量は増加して m/z は400以上となることが多く、その結果、妨害シグナルを避けることができる点で有利である。

② 薬毒物錯体の m/z を選択した後に、アルゴンガスを衝突させて錯体からキレート剤を取り除き、次に薬毒物自体の m/z を選択するという、タンデム質量分析、即ち、2回の質量選択(MS-MS)を行うことにより、妨害シグナルをさらに除くことが可能となり、より高感度を得ることが可能である。

③ 生体試料は水溶性であるので、妨害物質も水溶性である。極性有機溶媒で薬毒物錯体

を抽出することにより、これらの多くの妨害物を除くことが可能である。

④ 今までのESI-MSの溶媒はメタノールやアセトニトリルのような、水に完全に溶解する溶媒であったが、申請者の溶媒はメチルイソブチルケトンのような、水には殆んど溶解しない溶媒であるので、イオンスプレーが一層容易となり高感度が得られる。

3. 研究の方法

薬毒物ごとに以下の項目について、最適条件の検討を行った。

(1) キレート剤：陰イオンキレート剤としてはpyrrolidinedithiocarbamate, dithizone, citric acid, diethyldithiocarbamate, 8-quinolinol, 1,10-phenanthroline, heptanesulfonic acid等があり、陽イオンキレート剤としては3価金、tetrabutylammonium, tetraethylammonium等があり、これらの中から選択した。

(2) pH：錯体作成時の最適pH、次に錯体を有機溶媒で抽出する時の最適pH、これらのpHを得るための最適緩衝剤についての検討を行った。

(3) 抽出極性有機溶媒：クロロフォルム、イソアミルアルコール、ヘキサノール、オクタノール、メチルイソブチルケトン、ジクロロメタン、ニトロベンゼン等の中から最適溶媒を選択した。

(4) 装置：四重極型質量分析機(TSQ 7000, ThermoQuest, Japan)を用いた。キャピラリー温度、イオン化電圧、コリジョン電圧の最適条件を捜した。

4. 研究成果

(1) モリブデン含有酵素にはアルデヒドや亜硫酸の酸化酵素や、硝酸の還元酵素等があり、生体内の解毒に寄与している酵素であるが、生体内には極めて微量しか含まれていないので、高感度定量が望まれていた。酵素反応時には5価のラジカルとなる。酵素のモデル物質としての錯体を作成し、ラジカルを作成してその構造をESI-MSで決定した。またこの方法を応用して、生体内のモリブデンの高感度定量をした。Anal. Biochem. 348, 148-150, 2006で報告した。

(2) シスプラチンの定量ならびにシスプラチン中毒の解明。シスプラチンはプラチナを含む抗癌剤である。この薬剤の過剰投与後の44日と181日に死亡した二人の患者について、10種以上の組織、尿、血液中のプラチナを定量した。このような患者についての報告は今迄になされていなかった。J. Chromatogr. B 832, 286-291, 2006, Forensic Toxicol. 24, 83-87, 2006で報告した。

(3) 6価クロムならびに6価クロム錯体

(Urine Luck)の結合様式の解明。3 価のクロムは糖、蛋白、脂肪の代謝に必須の金属であるが、6 価クロムは微量でも、発ガン作用等があり、有害である。また、6 価クロム化合物は Urine Luck の商品名で売られ、尿中の大麻、モルヒネ、コデインの検出を妨害するので3 価のクロムと、6 価クロムとを分けて定量する必要があるが、ICP-MS では分別できなかったが、我々の ESI-MS 法で分別定量し、Forensic Toxicol. 24, 48-50, 2006 で報告した。MS-MS により錯体の結合様式を調べたところ、イオウよりも酸素原子がクロム原子に強く結合していることが判明し、また検出限界を MS 法の 50 分の 1 以下にする事ができ Forensic Toxicol. 26, 71-75, 2008 で報告した。

(4) コバルトの定量ならびに造血機構の解明。コバルトはビタミン B12 の構成要素であり、コバルト製剤の服用により、赤血球が増加するので運動選手が血液ドーピングの代わりに用いていることが示唆されている。一方、コバルトの過剰摂取は発ガンその他の害があるので血液中、尿中の鋭敏な定量が必要である。従来の ICP-MS 法では1本のシグナルしか観察できないが、MS-MS 法を用いて、数本のプロダクトイオンのシグナルが観測できるようにし、同定の信頼性を向上させ、かつ感度も向上させた。Anal. Chim. Acta 614, 161-164, 2008 で報告した。

(5) 無機ヒ素の定量法の開発。無機ヒ素類は古くから知られている毒物で、亜ヒ酸の毒性はヒ酸の約 10 倍と報告されている。両者を高感度で分別定量した。Anal. Chim. Acta 631, 87-90, 2009 で報告した。MS-MS によるさらに高感度な解析は Forensic Toxicol. 27, 37-40, 2009 で報告した。

(6) ある種の癌の治療には亜ヒ酸が用いられている。また世界各地で報告されている飲料水のヒ素汚染は主にヒ酸である。体内に摂取されたヒ素は主に肝臓で代謝され、尿中へはモノメチルヒ素・ジメチルヒ素として排出される。尿には海産物から摂取されたアルセノベタイン・アルセノコリン等の殆ど無害な有機ヒ素化合物も大量に排出されている。ICP-MS法ではこれらのヒ素化合物を区別することができないので、カラムで分離後定量してはいるが、未知物質が混入していてもその判別はできない。申請者はヒ酸・亜ヒ酸のESI-MS-MS法による定量法については既に(5)で報告している。モノメチルヒ素・ジメチルヒ素それぞれとクエン酸との付加物を作成し、ESI-MS-MS法で高感度に解析する方法を開発した。また、亜ヒ酸治療を受けた患者尿中の種々のヒ素化合物の尿中経時変動も測定し、J. Chromatogr. B 877, 2624-2629, 2009にて報告した。

(7) 青酸ソーダ・青酸カリの摂取、建築物燃焼時のシアンガスの吸入、ある種の芋・キノ

コ・シアナイド(CN)含有化合物の摂取により、CN 中毒がおきる。従来のイオンクロマト法では同定に保持時間を用いているので、同時に溶出する物質の区別ができず、また感度も低い。申請者は CN の錯体を作成し、ESI-MS-MS 法で高感度に解析する方法を開発した。外見上でも、青酸の予備試験でも青酸中毒とは判定されなかった遺体の胃内容を調べたところ、本方法で致死レベルの CN が検出され、本方法の有効性が示された。この結果を Anal. Chim. Acta 651, 81-84, 2009 にて報告した。

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 16 件)

- ① Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al, Determination of cyanide, in urine and gastric content, by electrospray ionization tandem mass spectrometry after direct flow injection of dicyanogold, Analytica Chimica Acta, 651, 81-84, 2009, 査読有
- ② Kayoko Minakata, Kazuo Ohnishi, et al. Electrospray ionization tandem mass spectrometric determination of monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid after adduct formation with citric acid, Journal of Chromatography B, 877, 2624-2629, 2009, 査読有
- ③ Kayoko Minakata, Masako Suzuki, Osamu Suzuki, Simple and selective determination of arsenite and arsenate by electrospray ionization mass spectrometry, Analytica Chimica Acta, 631, 87-90, 2009, 査読有
- ④ Sanae Kanno, Kanako Watanabe, Seishiro Hirano, Itaru Yamagishi, Kunio Gonmori, Kayoko Minakata, Osamu Suzuki, Application of thermoresponsive HPLC to forensic toxicology: determination of barbiturates in human urine, Forensic Toxicology, 27, 103-106, 2009, 査読有
- ⑤ Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al, Sensitive determination of arsenite and arsenate in plasma by electrospray ionization tandem mass spectrometry after chelate formation, Forensic Toxicology 27, 37-40, 2009, 査読有
- ⑥ Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al, Determination of Urine Luck in urine using electrospray ionization tandem mass spectrometry, Forensic Toxicology, 26, 71-75, 2008, 査読有
- ⑦ Kayoko Minakata, Masako Suzuki, Osamu Suzuki, Application of electrospray ionization tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cobalt in urine,

Analytica Chimica Acta, 614, 161-164, 2008, 査読有

⑧ Kayoko Minakata, Kunio Gonmori, Osamu Suzuki. Determination of Urine Luck in urine using electrospray ionization tandem mass spectrometry, Proceedings in The International of Forensic Toxicologist, 45th International Meeting, published in 2008, 査読有

⑨ Kayoko Minakata, Osamu Suzuki. Platinum levels in various tissues of a patient died 181 days after cisplatin overdose determined by electrospray ionization mass spectrometry, Proceedings in The International of Forensic Toxicologist, 44th International Meeting, published in 2007, 査読有

⑩ Kunio Gonmori, Kayoko Minakata, Kanako Watanabe, et al., Studies on the cause of an encephalopathy which took place in the limited areas in Japan 2004: a possibility of poisoning by cyanide being contained in a kind of mushroom, Proceedings in The International of Forensic Toxicologist, 44th International Meeting, published in 2007, 査読有

⑪ Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al, Trace analysis of platinum in blood and urine by ESI-MS-MS, Forensic Toxicology, 25, 84-87, 2007, 査読有

⑫ Kayoko Minakata, Osamu Suzuki. Rapid and sensitive determination of Urine Luck by ESI-MS after reduction of chromate. Proceedings in The International of Forensic Toxicologist, 43rd International Meeting, published in 2006, 査読有

⑬ Kayoko Minakata, Masako Suzuki, et al. Platinum levels in various tissues of a patient who died 181 days after cisplatin overdosing determined by electrospray ionization mass spectrometry, Forensic Toxicology, 24, 83-87, 2006, 査読有

⑭ Kayoko Minakata, Masako Suzuki, Osamu Suzuki, Determination of molybdenum and/or ruthenium in urine using electrospray ionization mass spectrometry, Analytical Biochemistry, 348, 148-150, 2006, 査読有

⑮ Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al, Determination of platinum derived from cisplatin in human tissues using electrospray ionization mass spectrometry, Journal of Chromatography B, 832, 286-291, 2006, 査読有

⑯ Kayoko Minakata, Kunio Gonmori, et al. Rapid and sensitive identification and determination of Urine Luck by ESI-MS after reduction of chromate. Forensic Toxicology, 24, 48-50, 2006, 査読有

[学会発表] (計 25 件)

(1)国際学会 (計 8 件)

① Kayoko Minakata, Kunio Gonmori, Osamu Suzuki, Simple and sensitive determination of arsenite and arsenate by electrospray ionization mass spectrometry, 47th Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, August 23-27, 2009, Geneva, Switzerland

② Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al, Solvent extraction procedure for the differential determination of arsenite and arsenate by electrospray ionization mass spectrometry, International Symposium, Advances in Legal Medicine, September 1-5, 2008, Osaka, Japan

③ Kayoko Minakata, Kunio Gonmori, Osamu Suzuki, Determination of cobalt in urine to discriminate its excessive administration using electrospray ionization tandem mass spectrometry, 46th Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, June 2-8, 2008, La Martinique, France

④ Kunio Gonmori, Masako Suzuki, Atuko Hunakoshi, Kayoko Minakata, et al., Analysis of drugs and poisons by LC-TOF-MS: preliminary studies on mushroom toxin alpha-amanitin, 46th Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, June 2-8, 2008, La Martinique, France

⑤ Kayoko Minakata, Kunio Gonmori, Osamu Suzuki, Determination of Urine Luck in urine using electrospray ionization tandem mass spectrometry, 45th Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, August 26-30, 2007, Seattle, USA

⑥ Kunio Gonmori, Masako Suzuki, Kayoko Minakata, et al., Analysis of drugs and poisons by LC-TOF-MS: Preliminary studies on magic mushroom toxins psilocin and psilocybin, 45th Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, August 26-30, 2007, Seattle, USA

⑦ Kayoko Minakata, Osamu Suzuki, Platinum levels in various tissues of a patient died 181 days after cisplatin overdose determined by electrospray ionization mass spectrometry, 44th Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, August 26-September 1, 2006, Ljubljana, Slovenia

⑧ Kunio Gonmori, Kayoko Minakata, Kanako Watanabe, et al, Studies on the cause of an encephalopathy which took place in the limited areas in Japan 2004: a possibility of poisoning by cyanide being contained in a kind of mushroom, 44th Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, August 26-September 1, 2006, Ljubljana, Slovenia

(2)国内学会 (計 17 件)

- ① 南方かよ子、鈴木雅子、他 8 名、尿中ヨウ化物イオン、ヨウ素酸イオンの ESI-MS-MS による定量、第 34 回日本医用マスペクトル学会年会、2009 年 9 月 10-11 日、大阪
- ② 南方かよ子、権守邦夫、他 6 名、血漿中無機ヒ素類錯体化合物の ESI-MS-MS による高感度迅速定量法、日本法中毒学会第 28 年会、2009 年 6 月 12-13 日、金沢
- ③ 南方かよ子、野澤秀樹、他 5 名、タンデム質量分析法を用いたコバルトの高感度定量、第 93 次日本法医学会学術集会、2009 年 5 月 13-15 日、大阪
- ④ 菅野さな枝、権守邦夫、鈴木雅子、南方かよ子、他 3 名、パラコート及びジクワットの細胞内毒性に関する研究：その 1、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26-28 日、京都
- ⑤ 南方かよ子、鈴木雅子、鈴木修、クエン酸を付加させたモノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸の ESI-MS-MS による定量、第 33 回日本医用マスペクトル学会年会、2008 年 9 月 25-26 日、東京
- ⑥ 南方かよ子、権守邦夫、他 6 名、亜ヒ酸、ヒ酸の ESI-MS を用いた高感度迅速定量法、日本法中毒学会第 27 年会、2008 年 6 月 13-14 日、東京
- ⑦ 権守邦夫、船越敦子、南方かよ子、他 6 名、イオンクロマトグラフィによるきのこ含有青酸測定法の検討、日本法中毒学会第 27 年会、2008 年 6 月 13-14 日、東京
- ⑧ 南方かよ子、野澤秀樹、他 4 名、タンデム質量分析法を用いた血液と尿中のプラチナの高感度定量、第 92 次日本法医学会総会、2008 年 4 月 23-25 日、長崎
- ⑨ 鈴木修、野澤秀樹、権守邦夫、渡部加奈子、南方かよ子、トライエージ DOA 検査の尿以外試料への適用性、第 29 回法医学会中部地方会、2007 年 10 月 27 日、名古屋
- ⑩ 南方かよ子、鈴木修、金属錯体のエレクトロスプレーイオン化 MS/MS による分析、第 32 回日本医用マスペクトル学会年会、2007 年 9 月 27-28 日、京都
- ⑪ 南方かよ子、権守邦夫、他 4 名、ESI-MS/MS を用いた 6 価クロムの高感度迅速定量法、日本法中毒学会第 26 年会、2007 年 6 月 8-9 日、延岡
- ⑫ 南方かよ子、野澤秀樹、他 3 名、シスプラチンの過剰投与後 181 日で死亡した患者の組織、血液、尿中のプラチナの定量、第 91 次日本法医学会総会、2007 年 5 月 16-18 日、秋田
- ⑬ 権守邦夫、松本則行、野澤秀樹、南方かよ子、他 2 名、スギヒラタケ含有青酸濃度について、第 91 次日本法医学会総会、2007 年 5 月 16-18 日、秋田
- ⑭ 南方かよ子、野澤秀樹、他 4 名、エレクトロスプレーイオン化質量分析法を用いた

シスプラチン過剰投与患者組織中のプラチナの定量、日本法中毒学会第 25 年会、2006 年 6 月 2-3 日、東京

- ⑮ 権守邦夫、岡本直子、南方かよ子、他 10 名、スギヒラタケおよび近縁きのこの法中毒学的検討 (第 2 報)、日本法中毒学会第 25 年会、2006 年 6 月 2-3 日、東京
- ⑯ 南方かよ子、権守邦夫、他 3 名、エレクトロスプレーイオン化質量分析法を用いた銀の高感度迅速定量法、第 90 次日本法医学会、2006 年 4 月 26-28 日、福岡
- ⑰ 権守邦夫、野澤秀樹、南方かよ子、他 2 名、日本人喫煙者における一酸化炭素ヘモグロビン濃度について、第 90 次日本法医学会、2006 年 4 月 26-28 日、福岡

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 高取健彦他、廣川書店、薬毒物分析辞典 2009 年、9 ページ
- ② 酒井明夫他、太陽出版、生命倫理事典、2010 年、2 ページ

〔その他〕

ホームページ等
発表した 16 件の雑誌論文のうち、4 件の Proceedings を除いた 12 件は浜松医科大学学術機関リポジトリにて公開されている。
<http://hikumano.hama-med.ac.jp/dspace/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南方 かよ子 (MINAKATA KAYOKO)
浜松医科大学・医学部・講師
研究者番号：70115509

(2) 研究分担者 無

(3) 連携研究者 無