

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18978

研究課題名(和文)メソミルの血液中特異的の死後分解-分解因子の特定及び中毒マーカーの探索

研究課題名(英文)Post-mortem changes of methomyl in blood

研究代表者

山岸 由和 (Yamagishi, Yoshikazu)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：50834470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：血中薬物濃度の死後変化というクリニカルクエスチョンを着想し、その解決に向けて研究を実施している。既知のメカニズムだけでは多くの薬物に対する死後の血中濃度変化を完全に説明することは難しい。本研究では、死後に血中濃度が著しく変化する代表的な薬物であるメソミル等のカーバメート薬物に対して、生前の血液成分が影響を与えるのではないかと仮説し、LC-QTOF-MS(液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型-質量分析装置)を用いた質量分析法に基づく緻密な解析を重ねてヘモグロビンが関与した血中死後薬物濃度変化の新規メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法中毒学は、人々の権利を守るために必要な薬学・医学・法学の要素が含まれる、言わば毒性学の応用研究分野の一つであり、薬毒物に関連した死因を究明するために、ご遺体から採取された血液等の検体の薬毒物分析を主要な手法としている。この日々の実務の中から、血中薬物濃度の死後変化というクリニカルクエスチョンを着想し、その解決に向けて研究を実施している。本研究結果であるヘモグロビンが関与した血中死後薬物濃度変化を明らかにしたことにより、血中薬物濃度を正確に把握することが可能になり、薬毒物に関連した死因を究明することに役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Forensic toxicology is one of the applied research fields of toxicology and necessary to protect people's rights. The accurate determination of blood drug concentration is mandatory to prove death by drug poisoning. However, it has been reported that the fatal drug concentration in blood at autopsy differs from that at the time of death. In this study, methomyl, is specifically bound to Hemoglobin (Hb), which results in the decrease in blood concentration of its free form after death. Methomyl is preferably bound to tryptophan, tyrosine, and valine residues in Hb. Furthermore, it was clarified that the blood concentration at the time of death can be estimated from the amounts of postmortem metabolites produced after death. Moreover, we found that oxime-type carbamate pesticides having an oxime moiety such as aldicarb, butocarboxim, methomyl, oxamyl, and thiofanox were decomposed by Hb in a temperature-dependent fashion.

研究分野：法中毒学

キーワード：メソミル ヘモグロビン アミノ酸付加体 カーバメート系殺虫剤 酸化反応

1. 研究開始当初の背景

メソミルはカーバメート系の殺虫剤であり、法医学分野では自殺を目的とした多量服薬事例が多い。そのため、本農薬の定性及び定量は死因究明を行う上で重要である。しかしながら、これまでにメソミルを血液から検出することが困難であると報告されている。実際、本研究室においてもメソミル中毒を疑われたが血液からメソミルを検出できず、死因究明に苦慮した事例を多数経験した。よって、メソミルの血液中特異的分解機構を明らかにすることはより正確な死因究明を行う上で重要である。

2. 研究の目的

本研究ではメソミルの血液中死後分解因子を特定し、特定した分解因子を用いてメソミルの分解速度を明らかにすることで、死後血液におけるメソミル濃度評価法を確立することを目的とする。さらに、死後変化の影響を受けにくいメソミル由来代謝物（バイオマーカー）を探索し、メソミル本体及び代謝物の両面からメソミル中毒を確実に診断できる新たな分析システムの構築を行う。

3. 研究の方法

(1) メソミルの血液中死後分解因子の特定

メソミルの血液、血漿、血球、血球内成分、赤血球膜中での分解を検討した (Figure 1.)。メソミル濃度の定量は LC-QTOF-MS (液体クロマトグラフ - 四重極 / 飛行時間型 - 質量分析装置) を用いた。分解が確認された画分における主要な分解因子を用いてメソミルの分解を検証し、死後分解因子を探索した。

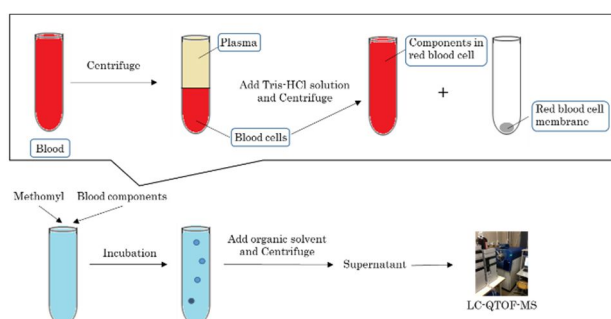


Figure 1. メソミルの血液成分による分解検討の概略図

(2) メソミル中毒マーカーとなるメソミル由来代謝物の探索

メソミル中毒マーカーとなるメソミル由来代謝物の探索するため、血液中死後分解因子を用いて主要代謝物を探索した。主要代謝物は LC-QTOF-MS を用いて non-target でデータを取得し、差分解析することで探索した。主要代謝物を同定後、メソミル中毒事例の検体を用いて有用性を確認した。

(3) メソミルと構造類似なカーバメート系殺虫剤アルジカルブ、プトカーボキシム、オキサミル及びチオフアノックスでのヘモグロビン分解の検討

メソミルと構造類似のアルジカルブ、プトカーボキシム、オキサミル及びチオフアノックスのヘモグロビン中で各温度ごとの分解を検討した。各薬物濃度の定量は LC-QTOF-MS を用いた。加えて、ヘモグロビンにアルジカルブ、プトカーボキシム、オキサミル及びチオフアノックスを処理し、メソミルで検出した W_{car} -adduct 及び V_{car} -adduct を検出した。 W_{car} -adduct 及び V_{car} -adduct が両方検出されなかったプトカーボキシムにおいてはプトカーボキシム由来のヘモグロビン中主要代謝物を non-target でデータを取得し、差分解析することで探索した。さいごに、メソミル、アルジカルブ、オキサミル及びチオフアノックスとプトカーボキシムのアミノ酸付加体形成の違いをヘモグロビンから自然発生する過酸化水素との反応性が関与しているか検討した。

4. 研究成果

(1) メソミルの血中ヘモグロビンによる死後変化

メソミルの血液中死後分解因子はヘモグロビンであった (Figure 2)。分解メカニズムはアミノ酸付加体の形成で、カルバモイル化されたトリプトファン ($W_{car}\text{-adduct}$)、チロシン ($Y_{car}\text{-adduct}$)、バリン ($V_{car}\text{-adduct}$) の三種類のアミノ酸付加体を同定した。 $W_{car}\text{-adduct}$ はメソミルを添加したヘモグロビン及びメソミル中毒死者の血液から特異的に検出され、 $W_{car}\text{-adduct}$ を基に算出したメソミル濃度は致死域として適当な濃度であった。これらのことより $W_{car}\text{-adduct}$ は濃度算出のバイオマーカーとして使用できると考えられた。

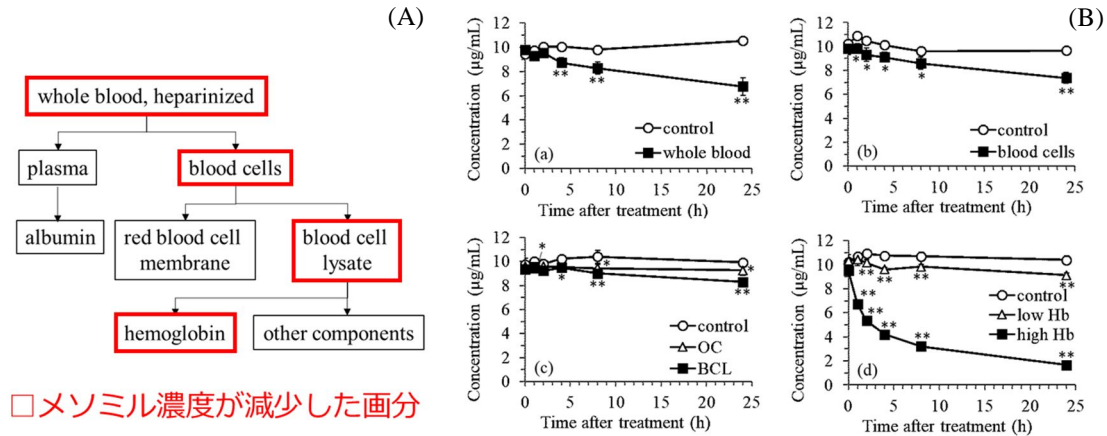


Figure 2. 使用した血液成分の分画の概略図 (A) ならびにメソミル濃度に対する血液成分の影響 (B)。

(2) カーバメート系殺虫剤アルジカルブ、ブトカーボキシム、オキサミル及びチオファノックスの血中ヘモグロビンによる死後変化

メソミルと構造類似のアルジカルブ、ブトカーボキシム、オキサミル及びチオファノックスもヘモグロビンにより温度依存的に分解された。分解メカニズムはメソミルと同様のアミノ酸付加体の形成で、アルジカルブ、オキサミル及びチオファノックス処理ではカルバモイル化されたトリプトファン ($W_{car}\text{-adduct}$)、バリン ($V_{car}\text{-adduct}$) の二種類のアミノ酸付加体を同定した。カルバモイル化されたアミノ酸付加体が検出されなかったブトカーボキシム処理ではアルキル化されたトリプトファン ($W_{alkyl}\text{-adduct}$) のアミノ酸付加体を同定した。過酸化水素との反応性を検討した結果、メソミル、アルジカルブ、オキサミルに比べてブトカーボキシムは高い反応性を示し、酸化された代謝物が検出された (Figure 3A)。そのため、過酸化水素との反応がアミノ酸付加体形成に関与していると考えられた (Figure 3B)。これらをまとめるとアルジカルブ、ブトカーボキシム、オキサミル及びチオファノックスにおいても死後に分解され、薬物に由来したアミノ酸付加体はアルジカルブ、ブトカーボキシム、オキサミル及びチオファノックスそのものに代わる濃度算出の中毒バイオマーカーとして使用できる可能性が考えられた。

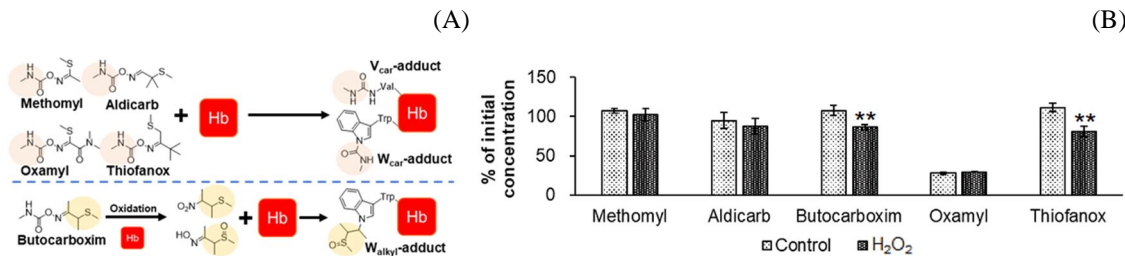


Figure 3. カーバメート系殺虫剤メソミル、アルジカルブ、ブトカーボキシム、オキサミル及びチオファノックスのヘモグロビン中アミノ酸付加体形成の概略図 (A) 及び過酸化水素とメソミル、アルジカルブ、ブトカーボキシム、オキサミル及びチオファノックスの反応性の違い (B)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamagishi Yoshikazu, Iwase Hirotarō, Ogra Yasumitsu	4. 巻 34
2. 論文標題 Post-Mortem Changes of Methomyl in Blood with Hemoglobin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 161 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamagishi Yoshikazu, Iwase Hirotarō, Ogra Yasumitsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of human serum albumin on post-mortem changes of malathion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-91145-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamagishi Yoshikazu, Iwase Hirotarō, Ogra Yasumitsu	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of hemoglobin on post-mortem oxidation of bromazepam	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 61 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.8.61	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamagishi Yoshikazu, Nagasawa Sayaka, Iwase Hirotarō, Ogra Yasumitsu	4. 巻 47
2. 論文標題 Post-mortem interaction between methidathion and human serum albumin in blood	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 139 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.47.139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamagishi Yoshikazu, Nagasawa Sayaka, Iwase Hirotaro, Ogra Yasumitsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Evaluation of Post-Mortem Interaction between Hemoglobin and Oxime-Type Carbamate Pesticides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.2c00092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yoshikazu Yamagishi, Hirotaro Iwase, Yasumitsu Ogra
2. 発表標題 Effects of Hemoglobin on Post-Mortem Changes of Methomyl
3. 学会等名 第105 次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸由和、岩瀬博太郎、小椋康光
2. 発表標題 マラチオンの死後変化に対するヒト血清アルブミンの影響
3. 学会等名 日本法中毒学会第40年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸由和、岩瀬博太郎、小椋康光
2. 発表標題 死後におけるメチダチオンとヒト血清アルブミンの相互作用
3. 学会等名 第90回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------