

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590645

研究課題名（和文） 剖検中に判定可能な中毒原因物質の迅速測定法の構築

研究課題名（英文） construction of the rapid screening method for the poisonous substances which can be judged during autopsy

研究代表者

井上 博之（INOUE HIROYUKI）

科学警察研究所・法科学研修所・主任教授

研究者番号：4015992

研究成果の概要（和文）：本研究では、直接導入型の質量分析計を用い、生体試料を簡単な前処理のみで中毒原因物質を判定する手法の開発を行った。対象薬毒物として、わが国で中毒事故発生件数の多い上位45種類の薬物を用い、血漿を固相抽出カートリッジで前処理し、測定に供した。薬物の同定は、各薬物に特徴的なプロダクトイオンスペクトルの比較により行った。測定に要する時間は、前処理を含めて5分以内であり、本法は法医学領域における中毒原因物質の迅速測定法として活用可能であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In the present study, construction of the rapid screening method for the poisonous substances is described. Target substances were chosen from the list of drugs selected as the most important compounds for toxicological analysis in Japan. Human plasma extracts with solid-phase extraction cartridges were determined by an ion-trap mass spectrometer. Collision-induced dissociation of protonated molecules gave characteristic product ion spectra and provided identification of the analytes. Time required for one sample was 5 min or less. The method seems to be useful for rapid screening of the poisonous substances in the practice of forensic science.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	800,000	0	800,000
2012年度	700,000	0	700,000
総計	2,400,000	0	2,400,000

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：社会医学、分析科学、法中毒学、質量分析、薬毒物、スクリーニング、血液、違法薬物

1. 研究開始当初の背景

法医学領域において、剖検により薬毒物の関与が疑われる場合、あるいは剖検によっても確かな死因が特定できない場合には、薬毒物検査が実施される。中毒の原因となる物質は、青酸等の比較的古典的なものから覚せい剤、麻薬等の乱用薬物や向精神薬等の医薬品、殺虫剤や除草剤等の農業等、多種類に及んでおり、原因物質の確認

検査を行う前の効率的なスクリーニングはきわめて重要である。また、毒物混入事件や薬物犯罪等の事実の立証には当該物質の特定が必須である。さらに、救急医療の現場では、急性中毒患者が搬送された場合、とりあえず一般的な処置と対症療法を行いながら、薬毒物スクリーニングが実施され、治療方針が決定される。このように、中毒原因物質の検査において、その前段階

としてのスクリーニングのもつ意義はきわめて高く、スクリーニングの成否がそれぞれの目的の成否に大きく関与している。

剖検中に実施可能な薬物スクリーニングとしてイムノキット等が多く利用されているが、トライエージ®を用いた場合でも対象物質は8種類に限られ、その他の薬毒物の関与についてはそれぞれに対応した検査キットを使用しなければならない。また、腐敗試料では覚せい剤に擬陽性を呈したり、薬用量のベンゾジアゼピン系催眠薬に対しては反応しなかったり等の問題点が指摘されている。

機器分析による生体試料からの薬毒物スクリーニングについては、これまで多数の報告がある。われわれも国内の全催眠薬を網羅するスクリーニング法を開発し、実際の鑑定に適用してきた。しかしながら、これらの方法は、化学分析ラボでの実施を前提としており、法医解剖と並行して実施するのは容易ではない。近年、尿試料を直接質量分析計に導入する薬物測定法が紹介され、時間短縮では大きな成果を上げているが、装置を常にベストの状態に保つには専門家としての知識が不可欠である。誰もが容易に使用でき、迅速に結果が得られ、特異性が高く、かつ広範な薬毒物スクリーニング法の確立が求められている。

2. 研究の目的

本研究ではガスクロマトグラフ (GC) や高速液体クロマトグラフ (HPLC) 等を連結しない質量分析計 (MS) を用い、生体試料 (尿、血液) をそのまま、あるいは簡単な前処理のみで測定する手法の確立を行う。中毒事故例として多く見られる**医薬品** (バルビツール酸系、その他の向精神薬等) を測定対象物質とする。**試料前処理を含め、10分以内に判定する技術の開発を目標とする。**

3. 研究の方法

(1) 構造類似化合物の識別能の評価

アンフェタミン類等の各薬物標準品のメタノール溶液を調製し、GC-MS 及び直接導入型 MS で測定した。

(2) 薬毒物の迅速スクリーニング法の開発

薬物添加尿 0.5 mL を固相抽出カートリッジ (Oasis HLB, 1 cc, 30 mg、メタノール及び蒸留水各 0.5 mL にて活性化) に注入し、5% メタノール 0.5 mL で洗浄後、メタノール 0.5 mL で薬物を溶出した。この溶出液、0.1 mL をガラス製ろ紙に滴下し、直接導入型 MS で測定した (図1 参照)。ろ紙上の分析対象物は、金属製ブロックヒーターにて加熱気化され、ダイアフラムポンプによりイオン源に送られる。コロナ放電により

イオン化された分析対象物は、電場によって質量分析部に送られ、質量分析される (図2)。

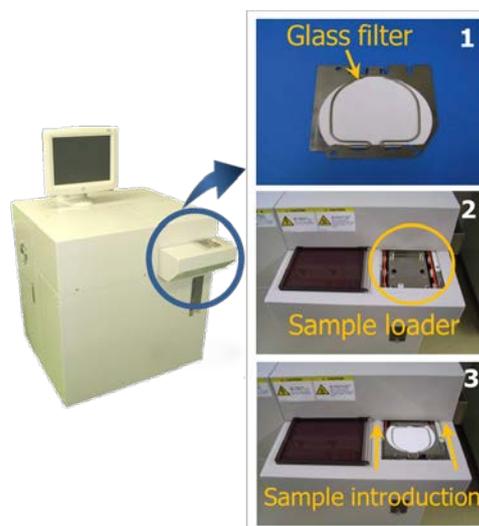


図1 装置の外観と操作手順

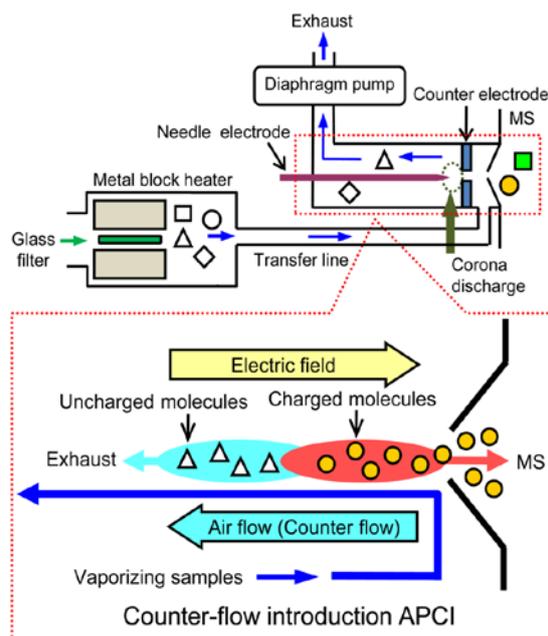


図2 質量分析計の直接導入部 (逆流型大気圧化学イオン化法) の構造

4. 研究成果

(1) 構造類似化合物の識別能の評価

アンフェタミン類の識別能を評価するため、フルオロアンフェタミン類6種類の位置異性体 (図3) の標準溶液を調製し、GC-MS 及び直接導入型 MS で測定した。

各化合物の遊離塩基を GC-MS により測定した結果を図4に示す。各化合物はテーリング気味であり、それぞれの分離も不十分であった。分析カラムとして、無極性カ

(DB-1ms) および中極性カラム (DB-17ms) を用いたが、各ピークの見分けは改善されなかった。そこで、各化合物をトリメチルシリル (TMS) 化し、分析を行ったところ、各化合物は相互に分離可能であった (図 5)。

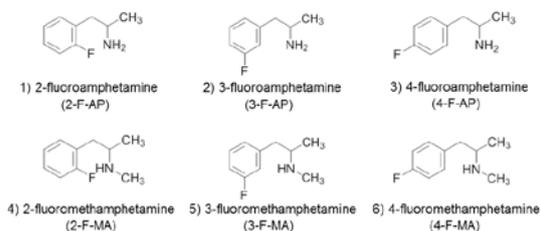


図 3 フルオロアンフェタミン類の構造式

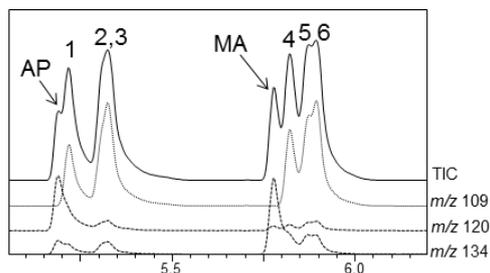


図 4 フルオロアンフェタミン類 (遊離塩基)、アンフェタミン (AP) 及びメタンフェタミン (MA) の全イオンクロマトグラムとマスクロマトグラム (カラム: DB-5ms)

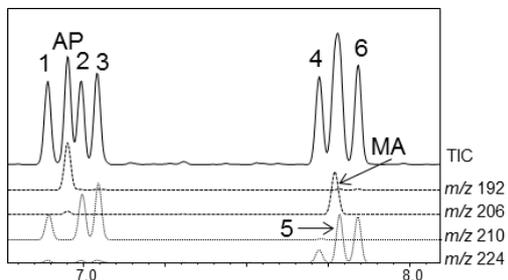


図 5 フルオロアンフェタミン類 (TMS 体)、AP 及び MA の全イオンクロマトグラムとマスクロマトグラム (カラム: DB-5ms)

次に、LC-MS を用いてフルオロアンフェタミン類を分析した。通常の逆相 ODS 系カラムでは分離は困難であったが、ペンタフルオロフェニルタイプのカラムを用いたところ、各ピークは相互に分離可能であった (図 6)。

フルオロメタンフェタミン 3 種類のタンデム質量分析から得られたプロダクトイオンスペクトルを比較したところ、特徴的なフラグメントイオンの出現 (3-F-MA) により、一部の化合物は明らかな差異を見つけることができたが、3 化合物を相互に識別することは困難と考えられた (図 7)。

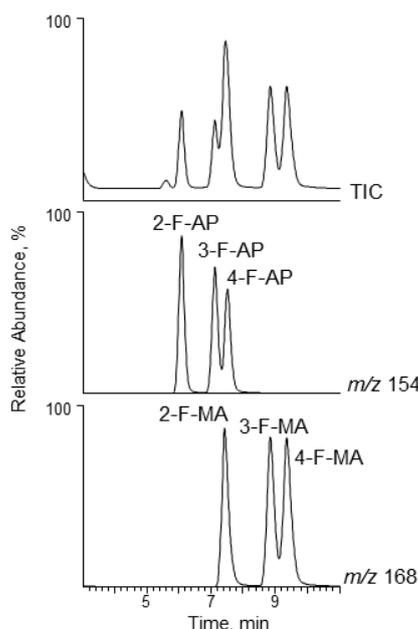


図 6 フルオロアンフェタミン類の全イオンクロマトグラムとマスクロマトグラム (ペンタフルオロフェニルタイプカラム使用)

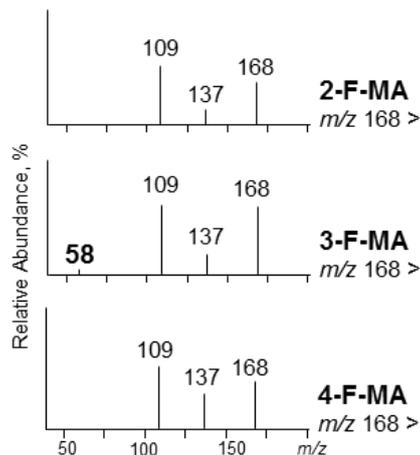


図 7 フルオロメタンフェタミン類の電子トラップイオン化プロダクトイオンスペクトル (コリジョンエネルギー; -15 eV)

直接導入型 MS を用いて、フルオロメタンフェタミン 3 種類のタンデム質量分析を行った (図 8)。3-F-MA については、LC-MS からのデータと同様、 m/z 58 のフラグメントイオンを確認することで、他との識別は可能であると考えられた。一方、2-F-MA と 4-F-MA については、 m/z 137 のイオン強度に若干の差異が認められたが、十分な識別のための指標となり得るかについては、今後再現性等を評価する必要があると考えられた。メトキシメタンフェタミン類に

についても同様に、直接導入型 MS による識別の可能性を評価したところ、これら3種の位置異性体についてはプロダクトイオンスペクトルにより、明瞭に識別可能であると考えられた (図9)。

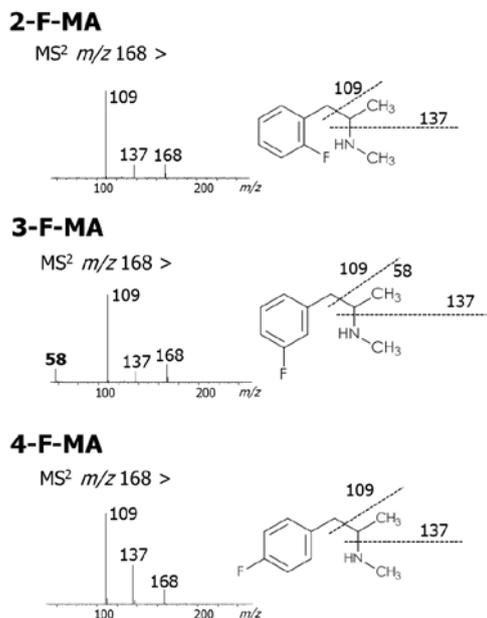


図8 直接導入型 MS (W60) によるフルオロメタンフェタミン類のプロダクトイオンスペクトル

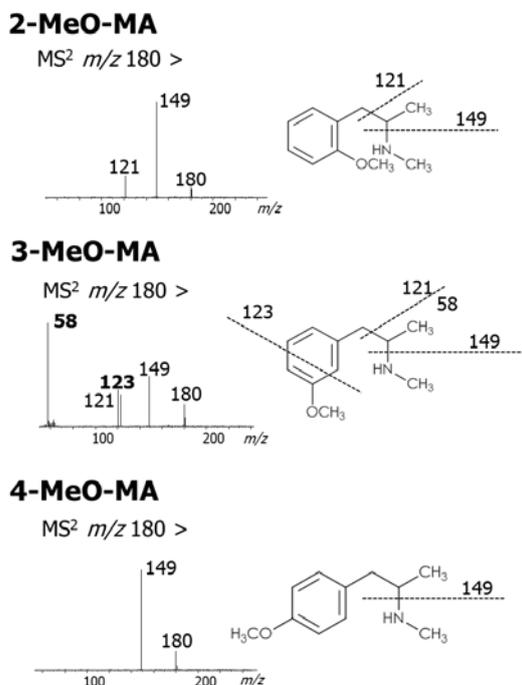


図9 直接導入型 MS (W60) によるメトキシメタンフェタミン類のプロダクトイオンスペクトル

(2) 薬毒物の迅速スクリーニング法の開発
ヒト血漿に薬物を添加し、固相抽出カートリッジ (Oasis HLB) にて前処理した時の各薬物の回収率を表1に示す。本測定は LC-MS により行った。

表1 固相抽出による各薬物の回収率 (%)

分類	化合物	0.5 µg/mL	10 µg/mL
催眠薬 抗不安薬	フェノバルビタール	100.1	99.0
	ペントバルビタール	97.5	94.3
	アモバルビタール	99.6	108.2
	ゾルピデム	100.3	92.8
	ゾピクロン	95.3	90.9
	フロムワレリル尿素	74.5	93.9
	ジフェンヒドラミン	73.6	104.5
	アリルイソプロピルアセチル尿素	118.3	95.4
	プロマゼパム	100.6	89.2
	ジアゼパム	90.9	86.8
	クアゼパム	103.7	101.8
	ロラゼパム	93.2	79.1
	ロフラゼパムエチル	92.7	85.8
	フルニトラゼパム	96.3	94.8
	ニトラゼパム	99.5	96.5
	クロキサゾラム	95.7	90.4
	抗精神病薬	エチゾラム	96.7
トリアゾラム		99.5	97.9
プロチゾラム		99.5	107.1
エスタゾラム		103.1	101.2
アルプラゾラム		97.6	103.3
クロルプロマジン		65.0	72.2
プロメタジン		96.2	100.6
レボメプロマジン		77.6	91.2
ハロペリドール		93.3	104.0
スルピリド		89.1	110.7
抗うつ薬	リスベリドン	85.3	107.5
	クエチアピン	96.8	113.0
	オランザピン	88.2	111.1
	アミトリプチリン	82.4	86.5
	アモキサピン	70.2	87.9
	クロミプラミン	82.5	92.6
	イミプラミン	86.5	81.9
	ミアンセリン	85.1	79.2
	パロキセチン	19.3	28.4
	フルボキサミン	60.6	75.5
抗痙攣薬	ミルナシプラン	65.3	75.3
	トラゾドン	36.6	46.8
	カルバマゼピン	89.8	118.7
抗てんかん薬	バルプロ酸	49.2	55.8
	ビペリデン	85.6	89.7
抗パーキンソン病薬	トリヘキシフェンジル	75.2	99.4
	アスピリン	10.1	32.5
酸性抗炎症薬	アセトアミノフェン	99.5	98.0
	天然毒	102.4	112.0

一部の医薬品 (パロキセチン、トラゾドン、バルプロ酸およびアスピリン) を除き、回収率は、低濃度 (0.5 µg/mL) で 61%~118%、高濃度 (10 µg/mL) で 72%~119% であり、おおむね満足する結果を得た。

溶出液の一部 (0.1 mL) をガラス製ろ紙に滴下し、直接導入型質量分析計 (日立 DS-1000) で測定した。シングル MS モードの測定では、分析開始後、直ちに薬物のプロトン付加分子 (ネガティブモードの場合、脱プロトン化分子) に相当するイオンが検出された。クロルプロマジンの測定例を図10に示す。また、タンデム MS モードでは、プロトン付加分子 (あるいは脱プロトン化分子) から各薬物に特徴的なプロ

ダクトイオンスペクトルが得られ、薬物の同定に有効であった。クロルプロマジン、プロメタジンおよびフェノバルビタール（中毒事故原因物質の1位～3位）の例を図11に示す。

Chlorpromazine

MS² traces, *m/z* 319 > 86

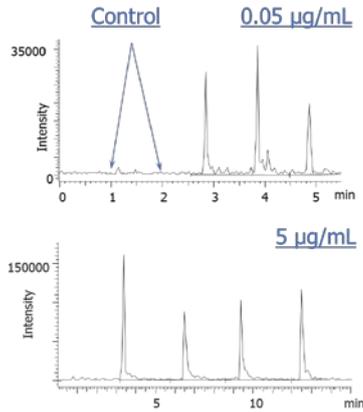


図10 直接導入型MS (DS1000) によるクロルプロマジンのタンデム質量トレース

す。薬物濃度 4 µg/mL において、正確さ（定量値と理論値とのずれ）は日内 2.6%–17.0%、日間 0.8%–13.6%、精密さ（相対標準偏差）は日内 2.7%–5.3%、日間は 12.1%–13.0%であった。また、低濃度（0.2 µg/mL）では、プロメタジンの精密さ（日内 25.5%、日間 39.5%）を除き、スクリーニング法として十分満足できる結果であった。測定に要する時間は、血漿試料の前処理を含めて 5 分以内であった。

以上の結果より、本法は、法医学領域におけるヒト血清からの中毒原因物質の迅速スクリーニング法として活用可能であると考えられた。

Chlorpromazine

$y=1.4694x-0.09, R^2=0.9932$

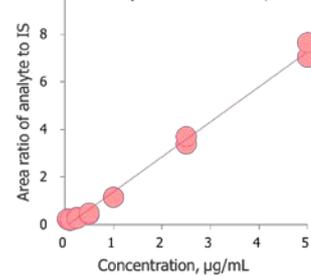
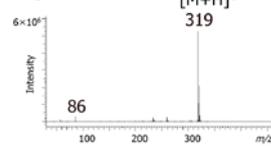


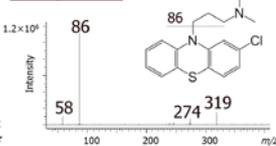
図12 クロルプロマジンの検量線

Chlorpromazine

Single MS

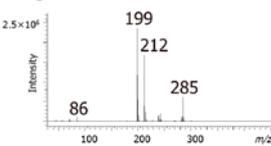


MS² *m/z* 319 >

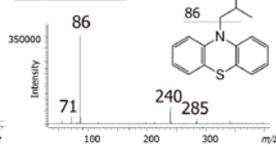


Promethazine

Single MS

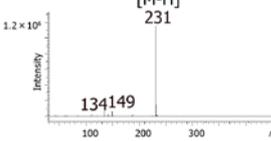


MS² *m/z* 285 >



Phenobarbital

Single MS



MS² *m/z* 231 >

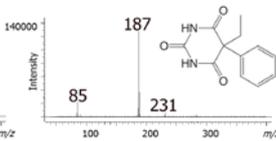


図11 各医薬品のマススペクトル及びプロダクトイオンスペクトル

検量線を作成したところ、0.05–5 µg/mL の範囲で良好な直線性 ($r > 0.99$) が得られた (図12)。

各化合物の日内及び日間変動を表2に示

表2 各化合物の日内および日間変動

Analyte	Con. Spiked (µg/mL)	Intraday (n = 4)		Interday (n = 5)	
		Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)
Chlorpromazine	0.2	115.0	3.7	104.4	17.6
	4.0	93.9	2.7	99.2	12.1
Promethazine	0.2	115.4	25.5	97.0	39.5
	4.0	117.0	5.3	113.6	13.0
Phenobarbital	0.2	96.9	17.5	114.3	17.9
	4.0	102.6	3.9	106.6	12.2

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1件）

- ① Nakazono, Y., Tsujikawa, K., Kuwayama, K., Kanamori, T., Iwata, Y.T., Miyamoto, K., Kasuya, F., Inoue, H., Differentiation of regioisomeric fluoroamphetamine analogs by gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Forensic Toxicology*, 査読有, *in press*, DOI:10.1007/s11419-013-0184-7

〔学会発表〕（計7件）

- ① Inoue, H., Nakazono, Y., Hashimoto, H., Kuwayama, K., Tsujikawa, K., Kanamori, T.,

- Iwata, Y.T., Drug screening in human plasma using solid phase extraction and direct mass spectrometry, 米国分析機器展示会 (PITTCON), 平成 25 年 3 月 18 日, 米国, フィラデルフィア
- ② Inoue, H., Nakazono, Y., Tsujikawa, K., Hashimoto, M., Umeda, M., Yamada, M., Miyamoto, K., Kasuya, F., Direct analysis of amphetamines in urine by headspace atmospheric pressure chemical ionization/ion trap mass spectrometry, 21st International Symposium on the Forensic Sciences, 平成 24 年 9 月 24 日, 豪州, ホバート
- ③ Nakazono, Y., Tsujikawa, K., Kanamori, T., Kuwayama, K., Iwata, Y. T., Miyaguchi, H., Yamada, M., Miyamoto, K., Kasuya, F., Inoue, H., Differentiation of regioisomeric methoxyamphetamines and fluoroamphetamines by GC/MS and LC/MS, 国際法中毒学会 (TIAFT), 平成 24 年 6 月 7 日, 浜松
- ④ Inoue, H., Hashimoto, H., Nakazono, Y., Miyaguchi, H., Kuwayama, K., Tsujikawa, K., Kanamori, T., Iwata, Y.T., Fukushima, H., Analysis of amphetamines and ephedrine in urine using solid phase extraction and direct mass spectrometry, 米国家中毒学会－国際法中毒学会 合同会議, 平成 23 年 8 月 6 日, 米国, サンフランシスコ
- ⑤ Inoue, H., Forensic Toxicology - Detection and Profiling of Drugs and Poison -, 国際犯罪学会第 16 回世界大会, 平成 23 年 9 月 28 日, 神戸
- ⑥ Inoue, H., Hashimoto, H., Iwata, Y.T., Tsujikawa, K., Hashimoto, M., Yokokura, T., Yamada, M., Direct analysis of illicit drugs by thermal desorption counter-flow introduction atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, IUPAC2011 国際分析科学会議 (ICAS2011), 平成 23 年 5 月 25 日, 京都
- ⑦ Inoue, H., Hashimoto, H., Watanabe, S., Iwata, Y.T., Kanamori, T., Miyaguchi, H., Tsujikawa, K., Kuwayama, K., Mikuma, T., Yokokura, T., Yamada, M., Rapid urinalysis of amphetamines by thermal desorption counter flow introduction atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, PACIFICHEM2010, 平成 22 年 12 月 18 日, 米国, ホノルル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 博之 (INOUE HIROYUKI)

科学警察研究所・法科学研修所・主任教授

研究者番号：40159992