

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590873

研究課題名(和文) インスリン大量投与による死亡例の剖検診断：インスリン製剤の検出法の開発

研究課題名(英文) Autopsy diagnosis of deaths due to overdoses of insulin: development of detection methods of insulin formulations

研究代表者

柏木 正之 (KASHIWAGI, Masayuki)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：70301687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究期間内において、ヘッドスペース固相マイクロ抽出(HS-SPME)法、ガスクロマトグラフ・タンデム型質量分析装置(GC-MS/MS)を用いて、インスリン製剤の添加物であるm-クレゾールの検出が可能であることが確認され、応用することにより、その定量も可能であると考えられた。また、インスリンアナログの検出法について、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析装置(LC-MS/MS)を用いて検討を行い、その定量の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：During this study period, meta-cresol, one of the additives in insulin formulations, could be detected with a head space-solid phase micro extraction (HS-SPME) method using gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS), and quantitation was believed to be achievable by the application of the method. For insulin analogues, detection was possible using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and quantitation was also considered a possibility.

研究分野：法医学

キーワード：インスリン GC-MS LC-MS/MS 低血糖症

1. 研究開始当初の背景

(1) インスリン製剤を自殺や殺人の目的で故意に他人に投与する(文献 ~)といった事件が実際に生じている。某県では年間異状死体取扱数 6,000 体弱のうち、インスリン大量投与が疑われる事例が、1 年に 1~2 例認められるとのことであり、他県においても同様に発生している可能性が考えられ、実際、当教室においてもインスリン大量投与が疑われる事例を過去に数例経験している。このような事件が発生した場合、死者の血液、尿等の試料を分析することによって、インスリンが大量に投与されたことを証明することが重要である。

(2) しかしながら、インスリンは血液中で短時間内に分解されることが知られていて、当教室でのインスリン大量投与事例においても、剖検時に得られた血液中のインスリン濃度は病院搬送時に比較して高度に低下しているのを確認している。またインスリン製剤は合成インスリンとともに、数種類の保存剤、安定剤などを含有している。

(3) 上記のことから、法医鑑定例の血液中、あるいは尿中において、インスリンの濃度やインスリン製剤に含有される保存剤、安定剤などの添加物の濃度、インスリンの分解物の濃度の定量法を確立する研究の着想に至った。本研究は、剖検・検案の際の死因診断において、インスリン大量投与を証明する新たな方法を提案する研究と位置づけられる。

2. 研究の目的

当初の研究目的として、下記(1)~(4)について、想定した。

(1) 死体血液、尿中のヒトインスリン及び合成インスリン濃度の定量法を開発する。

(2) インスリン製剤中で、本研究の目的に合致した添加物を選択し、その定量法を開発する。

(3) インスリンの分解物中で、本研究の目的に合致した物質を選択し、その定量法を開発する。

(4) 上記の方法により、最終的には、法医鑑定例におけるインスリン大量投与の証明を目指す。

3. 研究の方法

(1) インスリン濃度の定量法

血中ヒトインスリン濃度の測定では、化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) などによる測定系が知られているが、ヒトインスリンの化学構造を一部変えて作られた、複数のインスリン製剤(インスリンアナログ)について、網羅的に分析できる方法は完全には確立されていない。従って、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いて、インスリン グルリジン(アピドラ®)、インスリン リスプロ(ヒューマログ®)、インス

リン グラルギン(ランタス®)、インスリン アスパルト(ノボラピッド®)の4種のインスリン製剤の希釈試料の分析を行った。

分析条件

液体クロマトグラフシステム: Prominence liquid chromatograph (島津製作所)

検出器: TSQ Quantum Access MAX tandem mass spectrometer (Thermo Scientific)

カラム: Hypersil GOLD PFP column (50 mm x 2.1 mm i.d., particle diameter of 0.5 um) (Thermo Scientific)

カラム温度: 40

移動相 A: 0.1 %ギ酸水溶液

移動相 B: 0.2 %ギ酸アセトニトリル溶液

移動相組成: 移動相 B の 5~100% のグラジエント分析

分析時間: 15 分

流速: 0.2 ml/min

注入量: 10 ul

イオン化モード: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) positive

(2) インスリン製剤の添加物の定量法

インスリン製剤中には、保存剤や安定剤として、*m*-クレゾール、トロメタモール、塩化ナトリウム、酸化亜鉛、フェノール、グリセリン、プロタミン硫酸塩、リン酸水素二ナトリウムなどが含有されているが、これらの中で本研究の目的に合致しうる添加物の有無を検討し、その定量方法も併せて検討することとした。

(3) インスリン分解物の定量法

インスリンやインスリンアナログの摂取者の尿に、その分解物が排泄されていることが知られており(文献・), それらの中で本研究の目的に合致しうる分解物の有無を検討し、その定量方法も併せて検討することとした。

4. 研究成果

(1) インスリン濃度の定量法

測定モードとして、選択反応検出 (SRM) モードを用いた結果、それぞれピークが検出された。例としてインスリン グルリジン(アピドラ®)のクロマトグラムを図 1 に示す。コリジョンエネルギーは 25 V で、トランジションは表 1 の通りとした。

Brand Name	Precursor Ion (m/z)	Product Ion 1	Product Ion 2
Apidra	1165.02	346	329
Humalog	1162.01	230	217
Lantus 1	1212.01	758	219
Lantus 2	1213.01	308	284
NovoRapid	1165.01	216.6	210

Brand Name	Product Ion 3	Product Ion 4	Product Ion 5
Apidra	227	199	

Humalog	171	136	204
Lantus 1			
Lantus 2			
NovoRapid	136.3	86.7	

表 1 MS/MS transitions

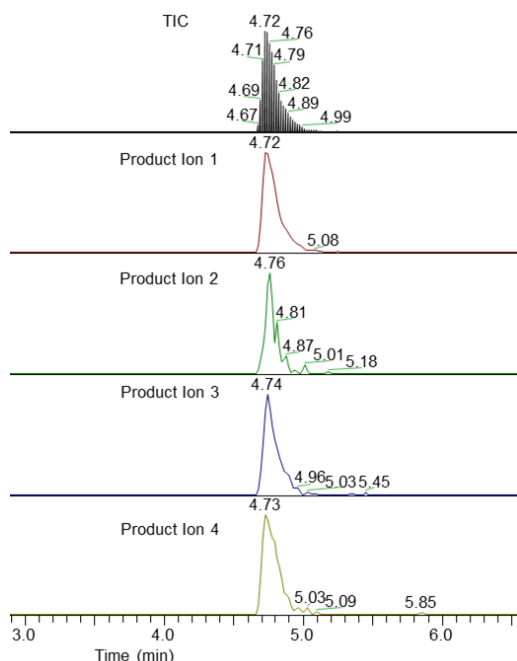


図 1 インスリン グルリジン(アピドラ®)のクロマトグラム

インスリン グルリジン(アピドラ®)は保持時間約 4.72 分、インスリン リスプロ(ヒューマログ®)は 4.78 分、インスリン グラルギン(ランタス®)は 4.69 分、インスリン アスパルト(ノボラピッド®)は 4.74 分にそれぞれピークが検出された。

(2) インスリン製剤の添加物の定量法

種々の添加物の中で、*m*-クレゾールが本研究の目的に合致しうる添加物と考えられ、その分析法を検討した。

m-クレゾールの分析条件

装置：GCMS TQ8030 (島津製作所)

カラム：RT-BetaDEXsa (30 m x 0.25mm i.d. x 0.25 μm df) (Restek)

カラム温度：100 ~ 180 の昇温分析

分析時間：11 分

キャリアガス：ヘリウムガス

流速：9 ml/min

注入法：スプリットレス

注入口温度・イオン源温度・インターフェース温度：いずれも 230

測定モード：多重反応モニタリング (MRM)

試料調整

20 ml のガラスバイアル瓶に試料 0.5 g、蒸留水 1.5 ml、塩化ナトリウム 0.4 g を入れ、直ちに密栓し、固相マイクロ抽出 (SPME) ファイバーアセンブリーのニードルをバイアルの蓋のセプタムに挿入し、ファイバー (膜厚 85 μm のポリアクリレート) を気相に

に露出させる。バイアル瓶を 100 °C で 10 分加温し、平衡状態にした後、GC-MS/MS に導入する。

クレゾールの他の異性体とも良好に分離でき、保持時間約 6.1 分に *m*-クレゾールのピークが検出された。

(3) インスリン分解物の定量法

これまで行ってきた研究では、本研究の目的に合致しうる明らかな分解物を確認することはできなかった。

(4) 研究の総括

GC-MS/MS を用いて、*m*-クレゾールの検出が可能であることが確認され、応用することにより、その定量も可能であると考えられた。またインスリン製剤の含有成分の検出法についても検討を行い、その定量の可能性が示唆された。当初の研究期間内の定量法開発には至らなかったが、今後更に設定条件等の検討を行い、実際の法医鑑定、即ち、法医鑑定例におけるインスリン大量投与の証明に利用できるように進めていきたいと考えている。なお、得られた知見を発信する際は、科学研究費補助金の交付を受けて行った研究の成果であることを表示し、国内及び海外の学会発表や、論文を投稿しての誌上発表を行う所存である。

<引用文献>

Birkinshaw VJ, Gurd MR, Randall SS, Curry AS, Price DE, Wright PH. Investigations in a case of murder by insulin poisoning. Br Med J. 1958 23;2(5094):463-468

Bauman WA, Yalow RS. Insulin as a lethal weapon. J Forensic Sci. 1981;26(3):594-598

Haibach H, Dix JD, Shah JH. Homicide by insulin administration. J Forensic Sci. 1987;32(1):208-216

Koskinen PJ, Nuutinen HM, Laaksonen H, Klossner JA, Irjala KM, Kalimo H, Viikari JS. Importance of storing emergency serum samples for uncovering murder with insulin. Forensic Sci Int. 1999;105(1):61-66

Thomas A, Thevis M, Delahaut P, Bosseloir A, Schänzer W. Mass spectrometric identification of degradation products of insulin and its long-acting analogues in human urine for doping control purposes. Anal Chem. 2007;79(6):2518-2524

Thevis M, Thomas A, Schänzer W. Mass spectrometric determination of insulins and their degradation products in sports

5. 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

柏木 正之、松末 綾、原 健二、高本
睦夫、高山 みお、久保 真一、インス
リンの大量投与が疑われた2剖検例. 第
6回福岡県医学会総会、2014年2月2日、
福岡県医師会館(福岡県福岡市博多区)

柏木 正之、久保 真一、法医学領域に
おける質量分析の最新応用-執刀者の立
場から-. 第38回日本医用マススペク
トル学会年会、2013年9月26・27日、神
戸市産業振興センター(兵庫県神戸市中
央区)

高宮 紘士、柏木 正之、高山 みお、
原 健二、Brian Waters、松末 綾、久
保 真一、糖尿病性ケトアシドーシスの
1剖検例. 第19回日本警察医会総会・学
術講演会、2013年9月22・23日、シー
ガイアコンベンションセンター(宮崎県
宮崎市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

柏木 正之(KASHIWAGI, Masayuki)
福岡大学・医学部・准教授
研究者番号: 70301687

(2)研究分担者

原 健二(HARA, Kenji)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号: 00090738

ウォーターズ ブライアン
(WATERS, Brian)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号: 00609480

久保 真一(KUBO, Shin-ichi)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号: 10205122