

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790637

研究課題名(和文) キャッチャーズを応用した薬毒物分析の迅速化と信頼性の確保

研究課題名(英文) Rapid and reliable drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method

研究代表者

臼井 聖尊 (USUI, Kiyotaka)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80567884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：法医学上重要とされる薬毒物について、キャッチャーズ法によるヒト全血試料からの薬毒物の抽出を試みた。これまでの研究で、ベンゾジアゼピン系、三・四環系薬物、フェノチアジン系、抗精神病薬類、β-ブロッカー類、覚せい剤関連薬物、脱法ドラッグ(トリプタミン系、カチノン系、カンナビノイド系など)、トリカブト毒、有機リン系農薬など様々な化合物の抽出が単一メソッドで抽出可能であることがわかった。これにより経験の少ない分析者でも簡単・迅速に分析が実施でき、質量分析と組み合わせることで質の高いデータを提供できるようになった。しかし、一部の高極性薬毒物については、抽出が困難であったため、今後更なる改良も必要である。

研究成果の概要(英文)：A modified QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) extraction method has been developed for the simultaneous determination of forensically important drugs and poisons in human whole blood. In this study, we showed that this modified QuEChERS method can extract various types of drug such as benzodiazepines, tricyclic and tetracyclic antidepressants, phenothiazines, antipsychotics, beta blockers, amphetamines, designer drugs (tryptamines, cathinones, cannabinoids), aconitines, organophosphorus compounds in a single method.

The combination of the modified QuEChERS method and LC-MS/MS (or GC-MS) allowed inexperienced technicians to acquire reliable data quickly and easily in forensic toxicological analysis. However, since some highly polar compounds were not able to extract from samples, we need further experiment for that.

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：キャッチャーズ QuEChERS 薬毒物分析 質量分析 LC-MS/MS 法中毒

1. 研究開始当初の背景

全国の解剖機関において、新たに薬毒物検査機器を導入し、検査体制を構築しようとする機関が増えている。これらの機関が検査機器を導入後、すぐに直面する問題は、前処理法の選択である。検査機関にとってボトルネックとなっているのは、分析機器の操作よりも、むしろ試料の前処理法である。もちろん個々の薬毒物についての分析法は論文などから確認することは可能であるが、法医学領域に求められているのは、死因究明のための幅広い未知化合物のスクリーニングであり、かつ簡便で信頼性の確保された分析法である。加えて、法医学領域では溶血・腐敗血液を取り扱うことも多く、これらの試料に対応できる分析法が必要とされている。

法医学領域でよく使用される前処理法には、除タンパク、液-液抽出、固相抽出がある。除タンパク処理は、最も簡便な処理法ではあるが、精製が不十分なこともあり、装置の汚染、定量値など分析の信頼性に問題が生じることもある。液-液抽出法は簡便かつ応用範囲が広い方法ではあるが、pHの調製、抽出溶媒の選択など初心者にはわかりにくい部分もある。一方、固相抽出法は、クリーンアップ効果が高く、対象とする薬毒物の範囲も広い方法だと考えられる。しかし、操作が煩雑で時間もかかり、デバイスが必要になることもある。さらに分析者間での抽出効率のバラツキも大きいと考えられる。それ故、各前処理法の利点のみを持った簡便かつ信頼性の高い抽出法の開発が法医学領域において求められている。

2. 研究の目的

薬毒物検査を新たに開始する機関では、すぐに質の高いデータが得られるものではなく、多くの問題に直面する。その中でも重要なものは「適切な前処理法の選択」である。経験の浅い分析者でも、法医学領域で扱う複雑なマトリックスから容易に薬毒物を抽出できる手法が求められている。そこで、主に食品分析分野で利用されている前処理法であるキャッチャーズ法(QuEChERS)に注目した。QuEChERSは、Quick(迅速)、Easy(簡単)、Cheap(安価)、Effective(効率的)、Rugged(堅牢)、Safe(安全)の頭字語であり、様々な食品マトリックスから農薬を迅速に抽出できる方法で、2003年にAnastassiadesらによって開発された比較的新しい前処理法である(Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. J AOAC Int 2003; 86(2): 412-31)。本法は、迅速・簡便であることに加えて、バキュームマニホールドやブロックヒーターなどのデバイス

が不要であることから初期コストはほとんどかからない。

QuEChERSを法医学試料に応用するためにはいくつかの改良が必要と考えられるが、条件を絞り込めば従来の前処理法の利点のみを取り入れた、簡便かつクリーンアップ効果の高い薬毒物の前処理法になると期待される。この新しい抽出方法であるQuEChERSを改良し、経験の少ない分析者でも、簡単かつ質の高いデータを提供できるようにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 全血試料を対象としたQuEChERS法の最適化

対象とする薬毒物は、早急な法医学実務への応用を目指すため、法医学上重要とされている薬毒物314種類から選択する。すなわち、これら薬毒物(揮発性薬毒物を除く)をベンゾジアゼピン系薬物 三環・四環系抗うつ薬 フェノチアジン系薬物 バルビツール酸系及び酸性薬毒物 その他の薬毒物代謝物 有機リン系農薬 天然毒のようにクラスを分け、各クラスから検出頻度の高い薬毒物をピックアップした。

試料としては全血試料を選択した。全血のマトリックスは比較的複雑で、抽出の難易度は高いが、法医学試料では変性・腐敗した試料が多く、血清を採取できないこともあるため、あえて全血での開発を優先した。その後、血清、尿、臓器などに適用範囲を広げていった。

QuEChERS法は、基本的にA抽出とB精製の2つのステップからなるが、それぞれのステップにおいて最適化を行なった(図1)。A抽出ステップ:全血試料の希釈率とそのサンプル量に対して、抽出試薬をどの程度添加するかが重要なポイントと考えられる。試薬としては無水硫酸マグネシウム、酢酸バッファー又はクエン酸バッファーを用いた。B精製ステップ:抽出ステップで得られた上清を分散型固相抽出(dSPE)で精製した。使用するdSPEの担体は様々なものが存在するが、PSA、C18、GCB、その他の固相担体を使用した。また脂質除去の目的でカートリッジタイプの担体も用いた。



図1 QuEChERS法の流れ

(2) 分析法のバリデーション

最適化したQuEChERS法を用いて、引き続き薬毒物のバリデーションを行った。すな

わち、特異性、検量線、再現性(真度、精度) 検出下限、定量限界、回収率、マトリックス効果の評価を行った。なお、本研究は初心者でも質の高いデータが得られることを目的としているため、バリデーションの項目の中で、分析者間での定量値の変動にも注目した。分析熟練者と分析の経験が全くない学生(5名程度)から得られたデータを比較評価し、QuEChERSの有効性を確認した。分析装置としては、誘導体化などの煩雑な操作を極力無くすため、高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を使用した。分析条件を以下に示した。

分析条件

HPLC 装置：島津製作所製 Prominence
 質量分析計：ABSCIEX 製 3200QTRAP
 分析カラム：化学物質評価研究機構製 L-Column (1.5 mm i.d. × 150 mm, 5µm)
 移動相 A：95% 10 mM ギ酸アンモニウム + 5% MeOH
 移動相 B：5% 10 mM ギ酸アンモニウム + 95% MeOH
 グラジエント条件：B 液 0% から 15 分間のリニアグラジエントで 100% .5 分間保持した後、0%に戻し 10 分間平衡化した。
 カラム温度：40
 流速：0.1 mL/min
 試料注入量：10 µL
 測定モード：MRM-EPI, MRM

(3) 実試料への応用

バリデーション作業の終了後、法医事例に適用し、QuEChERS法の有用性を確認した。

4. 研究成果

(1) 開発した改良型 QuEChERS 法の手順

最終的に作成した抽出手順は次の通りである。無水硫酸マグネシウム 0.4 g、酢酸ナトリウム 0.1 g を含むプラスチックチューブ (4.5 mL 容) に内標準物質として D₅-ジアゼパム 50 ng/mL を含有するアセトニトリルを 1 mL を加えた。次に粉碎ビーズ 1 個 (ステンレス製 5 mm. I.D.) 及び精製水で 3 倍に希釈した血液を加えて 30 秒間振とう後、遠心分離した。得られた上清を次の精製ステップに用いた。精製ステップでは、分散固相抽出担体 (PSA 25 mg, C₁₈ 25 mg, MgSO₄ 150 mg 含有) を用いて精製した後、得られた上清を分析試料とした。なお、精製ステップでは、化合物に適した固相担体を選択する必要があり、酸性薬物では PSA を除いた固相担体 (C₁₈ 25 mg, MgSO₄ 150 mg 含有) を使用した。改良型 QuEChERS 法は、全血試料の抽出・精製を約 5 分間で完了することが可能であった。

(2) バリデーション

薬毒物を添加した全血試料を、上記改良型 QuEChERS 法を用いて処理した後、LC-MS/MSで分析を行った。これまでに、208 化合物について検討を行なった結果、一部回収率の低い化合物も見られたが、検量線、再現性、マトリックス効果、検出限界、定量下限などはおおむね良好であり、法医実務に適用できると考えられた。

(3) 事例への応用

法医実務に応用した結果、溶血、腐敗血など状態の悪い試料でも、対象とした薬毒物を検出することができた(図 2)。これまでに、ベンゾジアゼピン類とその代謝物、三環・四環系抗うつ薬、フェノチアジン系薬物、バルビツール酸系薬物及び酸性薬毒物、ベータブロッカー、その他抗精神病薬、有機リン系農薬などに加えて、覚せい剤や麻薬などの違法薬物、脱法ドラッグ(カチノン系、カンナビノイド系、トリプタミン系)などが実試料から検出でき、本法の有効性が確認できた。更に本法は、尿、血清、臓器など様々な試料に応用可能であることもわかった。但し、一部極性の高い化合物では抽出が困難であったため、今後は水溶性の高い薬毒物にも適用できるように更なる改良を加えていく予定である。

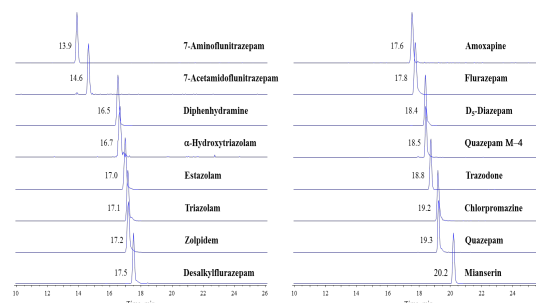


図 2 法医試料への応用例。全血を QuEChERS 法で処理した後、LC-MS/MS で分析したもの

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 4 件)

Kiyotaka Usui, Tomomi Aramaki, Masaki Hashiyada, Yoshie Hayashizaki, Masato Funayama. Quantitative analysis of 3,4-dimethylmethcathinone in blood and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a fatal case. Leg Med (Tokyo). 査読有、印刷中
<http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2014.03.008>

Kiyotaka Usui, Masaki Hashiyada, Yoshie Hayashizaki, Yui Igari, Tadashi Hosoya, Jun Sakai, Masato Funayama. Application of modified QuEChERS method to liver samples for forensic

toxicological analysis. 査読有, Forensic Toxicology 2014 32:139-147
DOI: 10.1007/s11419-013-0199-0

Keiko Kudo, Yosuke Usumoto, Kiyotaka Usui, Makiko Hayashida, Emiko Kurisaki, Kanju Saka, Akiko Tsuji, Noriaki Ikeda. Rapid and simultaneous extraction of acidic and basic drugs from human whole blood for reliable semi-quantitative NAGINATA drug screening by GC-MS. 査読有, Forensic Toxicology 2014 32: 97-104
DOI: 10.1007/s11419-013-0215-4

Masaki Hashiyada, Kiyotaka Usui, Yoshie Hayashizaki, Tadashi Hosoya, Yui Igari, Jun Sakai, Masato Funayama. Unexpectedly high blood concentration of bisoprolol after an incorrect prescription: A case report. Leg Med (Tokyo). 査読有, 2013 15(2) 103-105.
DOI: 10.1016/j.legalmed.2012.09.004.

〔学会発表〕(計 13 件)

Kiyotaka Usui, Masaki Hashiyada, Yoshie Hayashizaki, Yui Igari, Tadashi Hosoya, Masato Funayama. The 11th Indo Pacific Association of Law, Medicine and Science Congress 2013, 2013 年 10 月 5 日, マレーシア・クアラルンプール

臼井聖尊, 橋谷田真樹, 林崎義映, 猪狩由, 細谷直, 境純, 舟山真人. 薬毒物分析を 10 分以内に終わらせる (第 2 報 LDTD 編) 日本法医学会, 2013 年 6 月 26 日, 札幌

栗崎恵美子, 須藤美和子, 臼井聖尊, 舟山真人, 平岩幸一. ガスクロマトグラフィーによる薬毒物スクリーニングの前処理法としての QuEChERS 法の検討, 日本法医学会, 2013 年 6 月 26 日, 札幌

Keiko Kudo, Toshikazu Minohata, Kiyotaka Usui, Noriaki Shima, Munehiro Katagi, Hitoshi Tsuchihashi, Koichi Suzuki, Ichiro Hirano, Noriaki Ikeda. Rapid screening and semi-quantitative analysis for forensic drugs in blood using liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. American Society for Mass Spectrometry, 2013 年 6 月 9 日, アメリカ・ミネアポリス

臼井聖尊, 多田美保, 小梶哲雄, 橋谷田真樹, 林崎義映, 舟山真人. 薬毒物分析を 10 分以内に終わらせる (第 1 報 FIA 編), 第 27 回日本中毒学会東日本地方会 2013 年 1 月 19 日, 山形

塩井大智, 臼井聖尊, 橋谷田真樹, 林崎義映, 猪狩由, 細谷直, 境純, 舟山真人. 生体試料からの脱法ドラッグの分析, 第 13 回日本法医学会学術北日本地方集会 (法医学談話会第 99 回例会), 2012 年 11 月 2 日, 札幌

立入直紀, 臼井聖尊, 舟山真人. 全血中乱用薬物分析におけるキャッチャーズ法の有用性と GC-MS/MS への応用について, 第 13

回日本法医学会学術北日本地方集会 (法医学談話会第 99 回例会), 2012 年 11 月 2 日, 札幌

須藤美和子, 栗崎恵美子, 臼井聖尊, 加藤菜穂, 水澤郁文, 舟山真人, 平岩幸一. GC/MS による血中薬毒物分析の前処理としての QuEChERS 法の検討, 第 96 次日本法医学会学術全国集会, 2012 年 6 月 7 日, 浜松

臼井聖尊, 林崎義映, 橋谷田真樹, 舟山真人. 臓器を対象とした薬毒物分析法の検討, 第 96 次日本法医学会学術全国集会, 2012 年 6 月 7 日, 浜松

Kiyotaka Usui, Yoshie Hayashizaki, Masaki Hashiyada, Masato Funayama. Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method. The International Association of Forensic Toxicologists, 2012 年 6 月 3 日, 浜松

Kiyotaka Usui, Yoshie Hayashizaki, Masaki Hashiyada, Masato Funayama. Rapid determination of disulfoton and its oxidative metabolites in human whole blood and urine using QuEChERS extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. The International Association of Forensic Toxicologists, 2012 年 6 月 3 日, 浜松

Masaki Hashiyada, Kiyotaka Usui, Yoshie Hayashizaki, Masato Funayama. A fatal case of high-concentrated bisoprolol. The International Association of Forensic Toxicologists, 2012 年 6 月 3 日, 浜松

Emiko Kurisaki, Kiyotaka Usui, Masato Funayama. Utility of QuEChERS method as pretreatment for drug screening by gas chromatography-mass spectrometry. The International Association of Forensic Toxicologists, 2012 年 6 月 3 日, 浜松

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 聖尊 (USUI, KIYOTAKA)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 80567884