

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 20 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460867

研究課題名(和文)MALDI質量分析法用いた薬毒物群の迅速高感度な一斉分析法

研究課題名(英文)Rapid and sensitive determination of toxic substances simultaneously by MALDI mass spectrometry

研究代表者

南方 かよ子(MINAKATA, KAYOKO)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：70115509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年多種類の薬毒物が使用されているのみならず、規制外危険ドラッグ類も出回っている。法医学では中毒原因不明の事態にしばしば遭遇し、薬毒物の迅速で信頼できる一斉分析が必要である。マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)質量分析(MS)法はMS法の中では最も感度が高いのみならず、1試料20秒で結果が得られる簡便迅速なMS法である。このMALDI-MS法を用いて、薬毒物の高感度迅速一斉分析法を開発することを目的とした。この3年間の研究成果として、金属類、4種のアンフェタミン類、危険ドラッグのカチノン4種類、カチノン6種類の一斉分析が可能となり、各々の中毒解剖例に適用した。

研究成果の概要(英文)：Nowadays various medicines and toxic materials are prevailed. Furthermore, undesigned but toxic synthetic substances have been appeared on illicit drug markets. Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry (MS) is one of the most sensitive MS methods that can detect molecules having wide range of molecular mass simultaneously. The MS data can be obtained within 20 s for each sample only by inserting 100 samples placed on a plate into the instrument. Using MALDI-MS we developed simultaneous detection methods for three groups of toxic substances, respectively; metals (Pt, Au, Cu, Mo, As), amphetamines (A, MA, MDA, MDMA), synthetic cathinones (PPP, MPPP, PBP, PVP), (PVT, F-PVP, MPHP, PV8, PV9, F-PV9). The methods were applied to the detection of toxic substances obtained from cadavers, respectively. Multi-analytes detection using a single sample contributes greatly in the forensic and clinical toxicology where toxic substances are sometimes unknown.

研究分野：医歯薬学

キーワード：質量分析 MALDI 金属 アンフェタミン 危険ドラッグ

1. 研究開始当初の背景

マトリックス支援レーザー脱離イオン化(matrix assisted laser desorption ionization (MALDI)質量分析(MS)法は生化学関連の分野で近年急速に普及してきた方法で、laserでまず matrix がイオン化され、そのエネルギーが分析種に移り、分析種がソフトにイオン化される方法である。また、分子量が数百から数十万までの化合物の測定が可能な現在最も汎用性の高いイオン化法である。さらに、測定に必要な試料量もエレクトロスプレー(ESI)法をしのぐ 10^{-15} モルオーダーから測定可能で最も高感度な方法である。試料の純度に対する許容度も大きく、ESI のように試料を高純度に精製する必要がない。MALDI 法では試料をプレートに塗布して装置に挿入するのみで、20 秒程度で結果が得られるので、ESI よりもさらに迅速に結果が得られる等、多くの優れた特徴を持っている。このMALDI法は現在のところ、生体内のタンパク質解析に最も威力を発揮している装置である。欠点としては励起を支援するために混入させるマトリックス剤による妨害シグナルが低分子領域に観測されるので、法医学分野の低分子薬毒物分析には敬遠されていたようである。また、MS 装置が既存の教室においては、高価な装置の新たな購入が困難であり、MALDI 法が普及していない一因かと思われる。MALDI-MS-MS 装置が 2012 年 4 月から本大学の機器センターに配備されたので、申請者は早速、種々の薬毒物の同時分析に用いることとした。

2. 研究の目的

近年非常に多種類の薬毒物が使用されているのみならず、規制対象になっていない危険ドラッグ類も種々新たに出回っている。法医学や救急救命の分野では中毒原因不明の事態にしばしば遭遇し、薬毒物の迅速で信頼が おける一斉分析が必要である。MALDI-MS-MS 法は種々の MS 法の中では最も感度が高い MS 法であるのみならず、試料をプレートに塗布して装置に挿入し、20 秒程度で信頼のおける結果が得られる簡便迅速で優れた MS 法である。我々はエレクトロスプレー(ESI)タンデム質量分析(MS-MS)法を用いた高感度同時定量法の開発に長年に亘り携わってきたが、今回はこの優れたMALDI-MS-MS 法を新たに取り入れて、法医学分野の薬毒物の高感度迅速一斉分析法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

各薬毒物について以下の項目について、最適条件を捜した後、それらを総合したグループとしての最適条件を捜した。

(1) マトリックス剤

励起に最適なマトリックス剤として α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 2,5-dihydroxybenzoic acid, sinapic acid,

9-aminoacridine, trihydroxyacetophenone 等があり、それらの中から選択した。またそれらの濃度、マトリックス剤を溶かす溶媒についての選択をした。

(2) キレート剤

用いた陰イオンキレート剤としては diethyldithiocarbamate (DDC), pyrrolidine dithiocarbamate, dithizone, citric acid, diethyl-dithiocarbamate, 8-quinolinol, 1,10-phenanthroline, heptanesulfonic acid 等があり、また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。

(3) pH

有機薬毒物類を血液、尿、組織等から抽出する時の最適 pH およびその pH を得るための最適緩衝剤についての検討を行った。また無機金属類の場合はさらにその金属の錯体を作成する際の最適 pH、最適緩衝剤の検討をした。

(4) 抽出極性有機溶媒

クロロブタン(CB)、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、ジクロルメタン、ニトロベンゼン等の中から最適溶媒を選択した。

(5) 装置

浜松医科大学の機器センターには AB SCIEX 社の reflector type TOF-MS, QSTAR Eliet Hybrid の MALDI-MS-MS 装置が配備されている。Applied Biosystems 社の ESI-MS-MS 装置と AB SCIEX 社の ESI-MS-MS 装置も配備されているので MALDI の結果と ESI の結果の比較もした。イオン化エネルギー、コリジョン電圧、引込み電圧の最適条件を捜した。

(6) 信頼性の検討

検出限界、定量限界、検量線、回収率、再現性等、測定の信頼性についての解析を行い、最適条件を定めた。

4. 研究成果

(1) 組織中金属類の定量法の開発

目的：固体の金属イオンについては高濃度試料を laser ablation によるハードなイオン化後、ICP-MS で定量する方法が報告されているが、低濃度試料の MALDI による高感度定量については報告されていない。金属錯体(例えば diethyldithiocarbamate (DDC)錯体)は金属イオンそのものよりも UV 励起しやすい点に着目し、金属イオン定量への MALDI の適用について検討した。金 (Au)や白金(Pt)の化合物はリユーマチや腫瘍の治療に使用されており、これらのイオンの組織中の濃度は薬剤の効果や過剰投与の知見を得る上で必要とされる。

方法：組織 5 mg を HNO_3 により湿式灰化する。DDC を添加し、Au-DDC 錯体と Pt-DDC 錯体とを液-液抽出した。溶媒を蒸発させ、マトリックス剤 CHCA を溶解させたアセトニトリル(ACN)水溶液で試料を溶解し、その 2

μL をターゲットウエルに塗布した。乾燥後 MALDI-MS-MS 法で測定した。

結果： m/z 493 に $\text{Au}(\text{DDC})_2^+$ が、 m/z 639 に $\text{Pt}(\text{DDC})_3^+$ が観察された。これらのシグナルは CHCA を含有する ACN 溶液試料では CHCA を含有しない ACN 溶液試料の 100 倍程であり、CHCA が錯体のイオン化に大きく寄与していることが推察された。現在のところ、ウエル当りの検出限界は Au は 1 pg、Pt は 10 pg であった。この方法を Pt を含む抗がん剤であるシスプラチンの過剰投与で死亡された解剖例について適用し、11 種類の組織中の薬剤に由来する Pt を Au を内部標準 (IS) として定量した。この方法は Cu, Mo, As にも適用できる。この結果を 2013 年国際法中毒学会で発表し、Analytical Bioanalytical Chemistry (2014) 406:1331 で報告した。

(2) アンフェタミン類の定量法の開発

目的：アンフェタミン類 {amphetamine (A), methamphetamine (MA), 3,4-methylenedioxy-amphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)} は中枢神経興奮薬物の一種であり、大脳皮質に作用して精神機能を亢進し、疲労感、眠気を除去する。しかし、濫用により依存性を生じ、過剰摂取による中毒死の報告も多い。GC-MS 法による種々の薬毒物の同定、定量法が確立されている。しかし GC-EI-MS 法では fragment ion となり易く、分子イオンの検出および気化を促進するために誘導体化を必要することが多い。分子イオンを検出するソフトな検出法として LC-MS(-MS)法が多用されている。しかし MALDI-MS によるアンフェタミン類の血中、尿中の定量については尿中の MDMA についての報告があるのみでその定量域は 0.1 – 100 μg/ml であり、感度が低い。今回、我々は血中の 4 種のアンフェタミン類の MALDI-MS による高感度定量を試みた。

方法：A の内部標準 (IS) として A-d₇、MA の IS として MA-d₅、MDA と MDMA の IS として MDMA-d₅ を用いた。血液 20 μL に IS を 1 μL、水 50 μL、1 M K₂CO₃ 溶液 8 μL、1 M クエン酸溶液 0.8 μL を添加した。1-chlorobutane (CB) を 200 μL 添加し、1 分間 vortex mix した。10,000 G で 3 分間遠心後、CB 層 160 μL を別容器に採取し CB を蒸発させた。マトリックス剤 CHCA を含むアセトニトリル (ACN) 溶液 16 μL で残渣を溶解し、その 2 μL をターゲットウエルに塗布した。乾燥後 MALDI-MS-MS にて測定した。装置の mass resolution は 15,000、mass accuracy は 5 ppm である。355-nm Nd:YAG laser を用い power level 25 %、100 Hz、20 cycle で laser を照射し MS を測定した。

結果：CHCA 濃度 0.7 mg/ml (ACN/EtOH/水: 85/5/10, v/v/v) が最適であった。MA、MDMA では $[\text{M}+\text{H}]^+$ が、A、MDA では fragment ion が主ピークであったが、定量にはすべて $[\text{M}+\text{H}]^+$ を用いた。CHCA を含有しない ACN 溶液試料では A、MDA が 1 μg/ml、MA、MDMA が

100 ng/ml でさえイオンが観測されず、CHCA がイオン化に多大に寄与していることが示された。血中定量域は A、MDA では 30 – 500 ng/ml、MA、MDMA では 3 – 50 ng/ml であり、高感度定量が可能であった。この方法を用いて解剖 2 例における血中、尿中の A、MA の定量をした。

他の研究者による以前の報告では使用された装置の mass resolution は 300 であるので、用いた CHCA のシグナルが分析種のシグナルに重なる確率が高かった。そのため CHCA の妨害シグナルを suppress するために界面活性剤を混入させて測定していた。その結果 CHCA のシグナルは殆ど suppress されたが分析種のシグナルも強く suppress された。また CHCA を 5 mg/ml 溶解している ACN 溶液中の水の割合は 75 % と高く、ターゲットウエル上に均質な薄層の沈殿ができにくい。これらの難点があるために、彼らの報告の測定感度が今回の我々の測定感度よりも著しく低い要因と考えられる。この結果を 2014 年法中毒学会で発表し、Forensic Toxicology (2014) 32: 299 で報告した。

(3) カチノン系危険ドラッグ定量法の開発

目的：アンフェタミン骨格の B 位にケト基を有するカチノン系薬物はアンフェタミンよりも脂溶性が低くなるために血液脳関門を通過しにくくなり中枢神経作用は低下する。しかし、アミノ基が環状の pyrrolidinyl 基となったカチノン誘導体類ではそうでないカチノン類よりも脳関門通過性が高くなり、神経作用が亢進するといわれている。当教室では α-pyrrolidino cathinone 誘導体の中の PVP、PBP の中毒例に遭遇し、4 種類のカチノン類 (PVP, PBP, MPPP, PPP) の MALDI-MS-MS による分析をした。この結果を 2013 年日本医用マススペクトル学会で発表し、Forensic Toxicology (2014) 32:169 で報告した。

しかし、その後 PVP の phenyl 基が硫黄を含む 5 員環の thiophenyl 基に置換した PVT や alkyl 鎖長 C8 の PV9 が新たな designer drug として流通した。当教室では PV9 による中毒例に遭遇した。PVT、PV9 並びに PV8、MPHP、F-PVP、F-PV9 について MALDI-MS-MS による分析を試みた。

方法：血液 20 μL に内部標準 1 μL、緩衝溶液 49 μL、240 μL の CB を添加し、薬物を液-液抽出した。CB 層 192 μL を採取し蒸発させた。matrix 剤として CHCA を 0.7 mg/ml 含むアセトニトリル、エタノール、水の混合溶液 16 μL で残渣を溶解し、その 2 μL をターゲットウエルに塗布した。乾燥後 355 nm radiation、20 cycles、200 Hz で励起し、MALDI-MS-MS 法で測定した。

結果：前回報告した 4 種類のカチノン類の測定では装置の標準設定に従い delayed extraction voltage 60 V、energy 8 □J で測定したが今回はそれらを 20 V、3.4 □J とした。その結果、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ の割合は増加し、ノイズは減少した。

新たな 6 種類の薬物はすべて[M+H]⁺が主イオンであり、それらを定量に用いた。PVP を内部標準として、PV9 による中毒例において血中、尿中濃度の測定をした。この結果を 2015 年国際法中毒学会で発表し、Forensic Toxicology (2015) 33: 148 で報告した。

(4) 総括

MALDI-MS-MS 法では 1 つのターゲットプレートに 100 種類の試料を各々のウエルに塗布するのみで、MS 測定が可能であり、1 つのウエルの測定時間 20 秒で信頼できる結果を得ることができた。また、ターゲットプレートはスポンジ等による簡単な洗浄ですぐに別種類の試料の測定に使用可能であるので、救急医学や法医学分野における薬毒物の迅速な判別に非常に適した方法であると思われる。

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 13 件)

Kayoko Minakata et al., Diphenidine and its metabolites in blood and urine analyzed by MALDI-Q-TOF mass spectrometry, Forensic Toxicology, 査読有, 33: 402-408, 2015. DOI 10.1007/s11419-015-0273-x

Koutaro Hasegawa Amin Wurita, Kayoko Minakata et al., Postmortem distribution of MAB-CHMINACA in body fluids and solid tissues of a human cadaver. Forensic Toxicology, 査読有, 33: 380-387, 2015. DOI 10.1007/s11419-015-0272-y

Hideki Nozawa, Kayoko Minakata et al., MALDI-TOF mass spectrometric determination of eight benzodiazepines with two of their metabolites in blood. Legal Medicine, 査読有, 17: 150-156, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2014.12.004>

Kayoko Minakata et al., Determination of new pyrrolidino cathinone derivatives, PVT, F-PVP, MPHP, PV8, PV9 and F-PV9, in human blood by MALDI-Q-TOF mass spectrometry. Forensic Toxicology, 査読有, 33: 148-154, 2015. DOI 10.1007/s11419-014-0248-3

Koutaro Hasegawa, Amin Wurita, Kayoko Minakata et al., Postmortem distribution of PV9, a new cathinone derivative, in human solid tissues in a fatal poisoning case. Forensic Toxicology, 査読有, 33: 141-147, 2015. DOI 10.1007/s11419-014-0262-5

Kayoko Minakata et al., MALDI-TOF mass spectrometric determination of four amphetamines in blood. Forensic Toxicology, 査読有, 32: 299-304, 2014. DOI 10.1007/s11419-014-0229-6

Kayoko Minakata et al., MALDI-Q-TOF mass spectrometric determination of gold and platinum in tissues using their diethyldithiocarbamate chelate complexes. Analytical Bioanalytical Chemistry, 査読有, 406: 1331-1338, 2014. DOI 10.1007/s00216-013-6838-9

Koutaro Hasegawa, Amin Wurita, Kayoko Minakata et al., Identification and quantitation of a new cathinone designer drug PV9 in an “aroma liquid” product, antemortem whole blood and urine specimens, and a postmortem whole blood specimen in a fatal poisoning case. Forensic Toxicology, 査読有, 32: 243-250, 2014. DOI 10.1007/s11419-014-0230-0

Amin Wurita, Koutaro Hasegawa, Kayoko Minakata et al., Postmortem distribution of α -pyrrolidinobutiophenone in body fluids and solid tissues of a human cadaver. Legal Medicine, 査読有, 16: 241-246, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2014.05.001>

Kayoko Minakata et al., MALDI-TOF mass spectrometric determination of four pyrrolidino cathinones in human blood. Forensic Toxicology, 査読有, 32: 169-175, 2014. DOI 10.1007/s11419-013-0212-7

Kayoko Minakata et al., MALDI-TOF mass spectrometric determination of 11 phenothiazines with heavy side chains in urine. Forensic Toxicology, 査読有, 31: 138-144, 2013. DOI 10.1007/s11419-012-0157-2

Koutaro Hasegawa, Kunio Gonmori, Hiroyuki Fujita, Yoshito Kamijo, Hideki Nozawa, Itaru Yamagishi, Kayoko Minakata et al., Determination of ibotenic acid and muscimol, the *Amanita* mushroom toxins, in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Forensic Toxicology, 査読有, 31: 322-327, 2013. DOI 10.1007/s11419-013-0189-2

Amin Wurita, Osamu Suzuki, Koutaro Hasegawa, Kunio Gonmori, Kayoko Minakata et al., Sensitive determination of ethylene glycol, propylene glycol and diethylene glycol in human whole blood by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry, and the presence of appreciable amounts of the glycols in blood of healthy subjects. Forensic Toxicology, 査読有, 31: 272-280, 2013. DOI 10.1007/s11419-013-0188-3

[学会発表](計 17 件)

(1) 国際学会(計 7 件)

Kayoko Minakata, Itaru Yamagishi et al., Determination of new pyrrolidino cathinone

derivatives, PVT, 4F-PVP, MPPH, PV8, PV9 and 4F-PV9, in human blood by MALDI-Q-TOF mass spectrometry. The 53rd Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, August 30-September 4, 2015, Firenze, Italy.

Amin Wurita, Osamu Suzuki, Koutaro Hasegawa, Kunio Gonmori, Kayoko Minakata, et al. Postmortem production of ethylene glycol and propylene glycol in human specimens. The 20th No World Meeting of the International Association of Forensic Sciences. October 12-18, 2014, Seoul, Korea.

Kayoko Minakata, Itaru Yamagishi et al., MALDI-TOF mass spectrometric determination of 11 phenothiazines with heavy side chains in urine. 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine. June 16-20, 2014, Fukuoka, Japan.

Hideki Nozawa, Kayoko Minakata et al., MALDI-TOF mass spectrometric determination of 8 benzodiazepines with two their metabolites in blood. 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine. June 16-20, 2014, Fukuoka, Japan.

Kayoko Minakata, Hideki Nozawa et al., MALDI-Q-TOF mass spectrometric determination of gold and platinum in tissues using their diethyldithiocarbamate chelate complexes. The 51st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, September 2-6, 2013, Funchal-Madeira, Portugal.

Amin Wurita, Osamu Suzuki, Koutaro Hasegawa, Kunio Gonmori, Kayoko Minakata et al., Presence of glycols in blood from non-occupational healthy subjects proved by a sensitive isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method. The 51st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, September 2-6, 2013, Funchal-Madeira, Portugal.

Kunio Gonmori, Kayoko Minakata et al., MALDI-Q-TOF mass spectrometric determination of alpha-amanitin, meta-amanitin, and phalloidin in urine. The 51st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, September 2-6, 2013, Funchal-Madeira, Portugal.

(2)国内学会(計10件)

野澤秀樹、南方かよ子、他6名、三・四環系抗うつ剤のマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)を用いた質量分析。第99次日本法医学会学術全国集会、2015年6月10-12日、高知

南方かよ子、野澤秀樹、他6名、血中・尿中ジフェニジン代謝物のMALDI-Q-TOF-MSによる分析、日本法中毒学会第34年会、2015年6月26-27日、福岡

長谷川弘太郎、阿民勿日他、南方かよ子他5名、1中毒死例における合成カチノンPV9の生前・死後体内分布、日本法中毒学会第34年会、2015年6月26-27日、福岡

南方かよ子、鈴木雅子、他7名、組織切片中ジフェニジンのMALDI-MS(/MS)による直接分析、第40回日本医用マスペクトル学会年会、2015年9月17-18日、浜松

南方かよ子、野澤秀樹、他6名、血中アンフェタミン類のMALDI-TOF-MSによる分析、日本法中毒学会第33年会、2014年7月4-5日、名古屋

長谷川弘太郎、阿民勿日他、山岸格、野澤秀樹、南方かよ子、他3名、死因が薬毒物中毒の可能性がある事例での質量分析器検査の有用性、第39回日本医用マスペクトル学会年会、2014年10月16-17日、千葉

南方かよ子、鈴木雅子、他7名、血液中のピロリジノカチノン誘導体(PV9、PV8、PV4、PVT)のMALDI-Q-TOF-MSによる分析、第39回日本医用マスペクトル学会年会、2014年10月16-17日、千葉

野澤秀樹、南方かよ子、他6名、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)を用いたベンゾジアゼピン系薬物の分析。第99次日本法医学会学術全国集、2013年6月26-28日、札幌

南方かよ子、権守邦夫、他6名、環状側鎖を有する11種のフェノチアジンのMALDI-Q-TOF-MSによる分析、日本法中毒学会第32年会、2013年7月5-6日、柏

南方かよ子、鈴木雅子、他7名、カチノン系薬物のMALDI-Q-TOF-MSによる分析、第38回日本医用マスペクトル学会年会、2013年9月26-27日、神戸

[その他]

浜松医科大学リポジトリ

HamaMed-Repository

<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・特任研究員

研究者番号：70115509

(2)研究分担者 無

(3)連携研究者 無