

## 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：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460878

研究課題名(和文) LC-MSMSによるアコニチン、アマニチン、テトロドトキシンの一斉分析法の開発

研究課題名(英文) Simultaneous determination of aconitines, amanitin, and tetrodotoxin using LC-MSMS

## 研究代表者

斉藤 剛 (SAITO, Takeshi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30266465

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)：フグ毒のテトロドトキシ(TTX)の分析法の開発をモノスピンを用いて行ったところ、尿中のTTXの抽出はアミドカラム、血清はCBAカラムで抽出が可能となり、LC-MSMSで分析が可能となった。この方法を実際のフグ毒中毒症例に応用した。次いで、トリカブトの毒成分のアコニチン類、イヌサフランの毒成分のホルヒチンの同時分析法を開発して実際の中毒症例に応用した。更に、毒キノコのツキヨタケとニガクリタケの毒成分(イルジンS、ファシクロールE、F)の分析法を開発した。また、幻覚作用を有するナツメグの成分のミリスチシンの分析を開発した結果、GC-MSの方がLC-MSMSより感度的に約100倍良かった。

研究成果の概要(英文)：I have developed a fully validated method for the analysis of TTX in serum and urine. In this method, serum and urine samples were extracted using MonoSpin CBA or amide columns, followed by LC-MSMS analysis. Then, I have developed and validated a rapid determination of aconitine, hyaconitine, jesaconitine, mesaconitine, and colchicine in serum, urine, and plants using LC-MSMS. All targeted compounds were extracted by C18 monolithic spin column. Hypholoma sp. The toxic components of Hypholoma and O. japonicas are fasciculole E and F and illudin S, respectively. I have developed a method for rapid detection of fasciculole E and F and illusion S in mushrooms using LC-MSMS. Myristicin is the main component of nutmeg essential oil. A GC-MS method was developed and validated for serum for the determination of myristicin. A GC-MS method was more sensitive 100 times than LC-MSMS. The application of all methods were further verified by analysis of biological materials from a poisoning patients.

研究分野：法中毒

キーワード：LC-MSMS GC-MS テトロドトキシ アコニチン イルジンS ファシクロール ミリスチシン

#### 1. 研究開始当初の背景

自然毒による中毒は、臨床や法中毒の観点から見ても、起因物質の同定は重要な意味をもつ。今回、自然毒の中でも中毒時には致命的となる可能性のある化合物が短時間に同じ分析機器で検索ができれば実務上、極めて有意義と思われたため本研究を計画した。

#### 2. 研究の目的

自然毒による中毒の起因物質は数多く存在するが、誤認や誤食により致命的となることも稀ではない。また、過去には自然毒が犯罪に用いられた事案もあるため法中毒上極めて重要な化合物が含まれる。近年、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MSMS)の開発に伴いこれまでの分析機器より一段と検出感度が高まった。この結果、従来まで検出が困難であった化合物も分析対象となってきた。そこで、自然毒の中でも致命的となる化合物、特にトリカブトの毒成分のアコニチン、キノコ毒、ふぐ毒のテトロドトキシン(TTX)、更にナツメグ中のミリスチシンが幻覚作用を有するとされることからこれらを対象として中毒起因物質の分析法の開発を行うことを目的とした。

#### 3. 研究の方法

(1)初めに、TTX を対象化合物として TTX の LC-MSMS 分析の条件を詳細に検討した。

(2)血清及び尿中から TTX を効率的に抽出する方法の検討を行った。確認は上記(1)で設定した方法で行った。

(3)上記(2)の抽出法のバリデーションを行った。

(4)バリデーションが終了した時点で実際の中毒症例の検体に開発した方法を適用した。

(5)アコニチン及びイヌサフランの毒成分であるコルヒチンを対象として、LC-MSMS 分析の条件を詳細に検討した。

(6)抽出は、TTX と同様にモノスピンを用いた。

(7)上記(6)の抽出方法のバリデーションを行った。

(8)バリデーションが終了した時点で実際の中毒症例の検体に開発した方法を適用した。

(9)毒キノコからツキヨタケの毒成分(イルジン S)とニガクリタケの毒成分(ファシクロール E、F)の抽出を行った。

(10)イルジン S、ファシクロール E、F の LC-MSMS 分析の条件を詳細に検討した。

(11)血清及び尿中からイルジン S、ファシク

ロール E、F を効率的に抽出する方法の検討を行った。

(12)上記(11)の抽出法のバリデーションを行った。

(13)バリデーションが終了した時点で実際の中毒症例の検体に開発した方法を適用した。

(14)ナツメグ中のミリスチシンの LC-MSMS 及びガククロマトグラフ質量分析計(GC-MS)による分析法の検討を行った。

(15)バリデーションが終了した時点で実際の中毒症例の検体に開発した方法を適用して評価を行った。

#### 4. 研究成果

(1)TTX の LC-MSMS 条件を求めたところ、逆相系のカラムでは、TTX が保持されなかったため HILIC モードカラムと 10 mM 蟻酸アンモニウムと 2% アセトニトリル 5 mM トリフルオロ酢酸を移動相に組み合わせたと改善が求められた。

(2)尿中の TTX の抽出を種々のモノスピンを用いて検討したところ、アミドで抽出が行えた。次いで、血清を尿と同様に抽出したところ、血清由来の妨害ピークが検出されたため再度モノスピンの検討を行ったところ、CBA で抽出可能となった。

(3)各試料から TTX を抽出する方法のバリデーションを行った結果、血清と尿における定量下限濃度は、各々 1 ng/ml、0.5 ng/ml であった。また、検出限界濃度は、各々 0.5 ng/ml、0.25 ng/ml であった。日内、日差変動は、1.5 から 8.5% であった。また、回収率は 86.5% 以上であった。

(4)本法を、実際の TTX 中毒患者から得られた試料に適用したところ尿のみから TTX が検出された。実際例において、血清から TTX が検出できなかったことは、濃度的な問題なのか抽出の問題なのかより多くの実際例を通して確認する必要があると思われた。

(5)アコニチン、ヒパコニチン、ジェサコニチン、メサコニチン、コルヒチンの LC-MSMS 分析の条件を詳細に検討した結果、逆相系のカラムで分離が可能であった。医薬品のルーチン分析で使用するカラムでは、分析時間が長く効率が悪かった。そこで分析時間の短縮目的で 2.1 mm x 50 mm のカラムを選択した。移動相は、アセトニトリルと 0.1% 酢酸水溶液で各化合物の分離が可能となった。

(6)抽出は、モノスピン C18 を用いたところ、血清、尿、植物片から良好に抽出が行えた。

(7)血清、尿中の各化合物を抽出する際のバリデーションを行ったところ、検出限界は、0.05 ng/ml、定量限界は、0.1 ng/mlであった。直線性は、血清で定量限界から 20 ng/ml、尿で定量限界から 200 ng/mlであった。回収率は、96.8%から 101.9%であった。正確さは、96.6-101.9%、日内、日差変動(%RSD)は、1.7-11.5%であった。

(8) 本法を、実際のトリカブト及びイヌサフランによる中毒患者から得られた試料に適用したところ、血清及び尿からアコニチン類及びコルヒチンが検出された。トリカブトの種類により含まれるアコニチン類の組成が異なっていたが、葉、茎、根等の全てに含有されていた。また、枯れ落ちた葉からもアコニチン類が検出されたことから周年中毒症例が発生する可能性が考えられた。

(9)ツキヨタケからイルジン S 及びニガクリタケからファシクロール E、F の抽出を行った。

(10) イルジン S、ファシクロール E、F の LC-MSMS 分析の条件を詳細に検討した結果、逆相系カラム、アセトニトリルと 0.1%酢酸水溶液の移動相で分離可能となった。

(11) 血清及び尿中からイルジン S、ファシクロール E、F の抽出方法の検討を行った結果、モノスピ C18 で良好に抽出が行えた。

(12)(13)抽出法のバリデーションを行い、実際の複数の中毒患者から得られた試料に適用したが、イルジン S、ファシクロール E、F の検出には至らなかった。抽出方法の改良を行い、更に高感度に検出可能な機器で分析を行ったが実際の中毒症例の生体試料から各化合物は検出されなかった。現時点では、毒キノコ中毒症例の起因物質の検索には、キノコ自体から毒成分を抽出、機器分析によって確認する方法が容易と結論できる。また、各毒キノコを塩蔵した後にキノコから毒成分の検出を行ったところ検出されなかった。副産物なデータになるが、毒キノコの塩蔵は、無毒化として有効な方法ではないかと考えられた。

(14)血清中ミリスチシンの LC-MSMS による分析方法の検討を行った。検出限界を数 ng/ml 程度と設定して詳細に検討したが、感度が得られなかった。そこで、GC-MS で分析を行ったところ、1 ng/ml の定量限界が得られた。感度的には、GC-MS の方が LC-MSMS とり 100 倍程度高感度であった。本法を実際の中毒症例から得られた試料に適用したところ、LC-MSMS、GC-MS 共に十分に検出が可能であった。この結果、中毒レベルであれば、LC-MSMS でも分析可能であるが、消失するまでの間を

継続的に捕捉するには、GC-MS が適していると考えられた。

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2件)

Takeshi Saito, Rimako Umebachi, Akira Namera, Hiroshi Oikawa, Shota Miyazaki, Yuji Fujita, Sadaki Inokuchi. Identification and quantification of aconitines and colchicine in serum, urine, and plants using MonoSpin C18 and LC-MSMS. *Chromatographia* 査読有 78, 1041-1048, 2015.

DOI: 10.1007/s10337-015-2921-z

Takeshi Saito, Naoya Miura, Akira Namera, Shigenori Ota, Shota Miyazaki, Sadaki Inokuchi. A rapid sample preparation procedure using MonoSpin CBA and amide columns for tetrodotoxin detection in serum and urine using LC-MS/MS analysis. *Chromatographia* 査読有 77, 687-693, 2014.

DOI:10.1007/s10337-014-2663-3

[学会発表](計6件)

斉藤 剛、平良隆行、梅鉢梨真子、猪口貞樹. GC-MS による血清中ミリスチシンの分析. 第 38 回日本中毒学会総会・学術集会. 2016 年 7 月 23 日-24 日. 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)

Takeshi Saito, Akira Namera, Hiroshi Oikawa, Shota Miyazaki, Yuji Fujita, Sadaki Inokuchi. Screening of fasciculol E and F and illudin S in mushrooms. 53rd Annual Meeting International Association of Forensic Toxicologists. 2015 年 8 月 30 日-9 月 4 日. フィレンツェ、イタリア.

斉藤 剛、奈女良 昭. モノスピ C18 と LC-MS/MS による血清、尿、植物片中アコニチン、コルヒチンの迅速分析. 第 99 次日本法医学会学術全国集会. 2015 年 6 月 10 日-12 日. 高知市文化プラザ かるぼーと(高知県・高知市)

Takeshi Saito, Akira Namera, Hiroshi Oikawa, Shota Miyazaki, Yuji Fujita, Sadaki Inokuchi. Identification and quantification of aconitine in serum, urine and plant using Monospin C18 and LC-MS/MS. 52nd Annual Meeting International Association of Forensic Toxicologists. 2014 年 11 月 9 日-13 日.

ブエノスアイレス、アルゼンチン。

Takeshi Saito, Akira Namera, Shigenori Ota, Shota Miyazaki, Sadaki Inokuchi. A rapid sample preparation procedure using Monospin amide for tetrodotoxin in serum and LC-MS/MS analysis. 51<sup>st</sup> Annual Meeting International Association of Forensic Toxicologists. 2013年9月2日-6日。マデイラ、ポルトガル。

齋藤 剛、奈女良 昭、太田茂徳、宮崎将太、猪口貞樹。モノスピンをを用いたテトロドトキシンの迅速分析。第35回日本中毒学会総会・学術集会。2013年7月19日、20日。大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 剛 (SAITO, Takeshi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30266465