

法医学中毒学における質量分析研究の新展開

林田眞喜子 大野 曜吉

日本医科大学大学院医学研究科法医学

New Developments in Mass Chromatography-spectrometry Research for Forensic Toxicology

Makiko Hayashida and Youkichi Ohno

Department of Legal Medicine, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

Abstract

Toxicological analysis with mass chromatography-spectrometry has spread widely and quickly with the progress in ionizing methods.

This review describes new developments in mass chromatography-spectrometry research for forensic toxicology. Time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) coupled with liquid chromatography (LC) has been developed for screening and for determining benzodiazepines with an exact mass database. All benzodiazepines have similar chemical structures and molecular weights, and, thus, show similar mass spectra and protonated molecule ions. Discrimination of mass spectrometry at low resolving power with LC-MS is usually difficult.

Benzodiazepines are widely used in medical practice in Japan, and data acquired from LC/TOF-MS measurements of 130 drugs, including benzodiazepines, were used to create an exact mass database. This database comprises molecular formulae, calculated exact masses, retention times and calibrations. In the analysis of samples from patients who had taken many drugs, selectivity was improved when the LC/TOF-MS exact mass database was used.

Comprehensive screening with LC/quadrupole TOF is the most effective method in forensic toxicology for analyzing the samples from cases of multidrug overdose. New developmental mass chromatography-spectrometry equipment is required because of the more precise and exact analyses in forensic toxicology.

(日本医科大学医学会雑誌 2011; 7: 8-15)

Key words: forensic toxicology, liquid chromatography/mass spectrometry, screening, benzodiazepines, serum

はじめに

近年のイオン化法の進歩に伴って質量分析を用いた薬毒物分析が急速に普及しつつあり、熱に不安定な化

合物や難揮発性化合物の分析には、試料前処理が比較的容易で分子構造の情報が得られる液体クロマトグラフィ質量分析 (LC/MS) が用いられることが多い。催眠薬・抗精神病薬など向精神薬は臨床現場で多用されており、法医学中毒学でも多種類の薬物による多剤併

Correspondence to Makiko Hayashida, Department of Legal Medicine, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan

E-mail: mh@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

用薬物中毒が注目を集めている。致死濃度を示し中毒が死因であった中毒事例の報告は散見されるが、殺害の補助的手段として使用されたような場合は比較的濃度であることが多く、分析は困難である。

法医中毒学分析の資料は剖検資料あるいは救命救急センター (CCMC) 収容の薬物中毒患者の試料などで、血清・尿・胃内容をはじめ、心臓血、大腿血、心のう液、胸腔内液、気管内液、腹腔内液、胆汁、肝臓、腎臓、肺臓、筋肉、脳、脂肪などを用いて行うことになる。また、法医中毒学分析を迅速かつ正確に行うためには、わが国における中毒事故の発生状況から、中毒起因物質を正確に把握した上で、体系的な分析方法を構築していく必要がある¹。これらの多種多様な中毒起因物質に対して LC/MS²³、ガスクロマトグラフィ質量分析 (GC/MS)⁴⁵ といった選択的スクリーニングが最適だが、複雑なマトリックスが多い法医中毒学分析の資料への実施や、20~30 種類の処方薬物を大量に服用する“多剤併用薬物中毒”への対応に関して様々な問題点が指摘されている^{6,9}。そこで、これらを解決するために、多くの質量分析の最新技法を取り上げ、法医中毒学分析への応用を検討し、効果的であれば積極的に分析に組み込んでいくといった姿勢が必須となることは言うまでもない。

ベンゾジアゼピン系薬物タイムプログラミング モニタリング

法医中毒学分析で分析困難な薬物の代表的なものとしてベンゾジアゼピン系薬物群がある。ベンゾジアゼピン系薬物に対する選択的イオンモニター法 (SIM)/タイムプログラムモニタリングスクリーニング法 (BZTPM) を用いて、向精神薬処方薬の中からベンゾジアゼピン系薬物のみを殺害時に用いたことが明らかとなった剖検事例を紹介する。

一般的な法医中毒分析では、エタノール測定ならびにイムノアッセイ Triage を初期スクリーニングとして行い、イムノアッセイの結果を GC/MS で確認する。GC/MS で分析が困難な不揮発性薬物などを LC/MS で分析する¹⁰。BZTPM は LC/MS を用いた、ベンゾジアゼピン系薬物の保持時間における分子量関連イオン $[M+H]^+$ の SIM クロマトグラムをスクリーニングする方法で、陽性であればクロマトグラム上の明瞭なピークとして検出される。

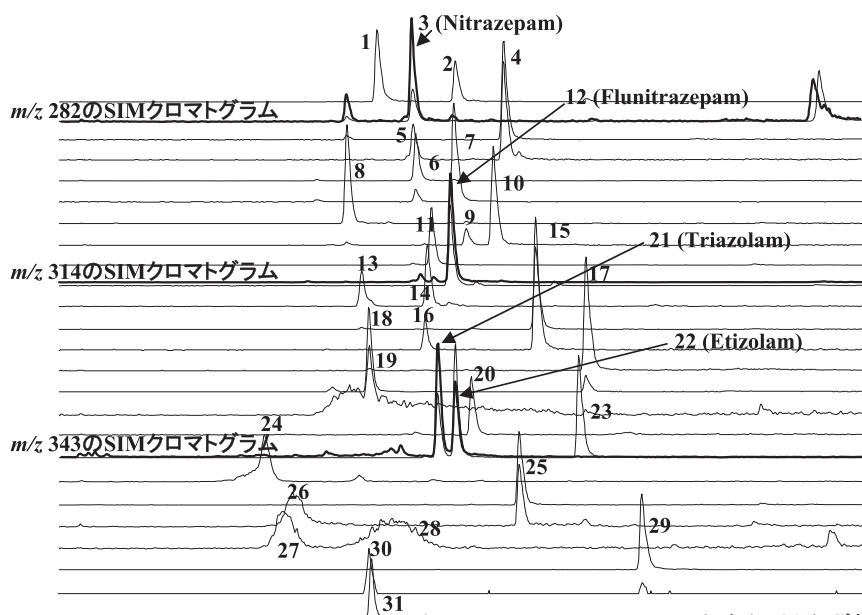
<case 1>ではいずれの資料からもエタノールは検出されず、GC/MS 薬毒物スクリーニングでは、バルビツル酸系薬物・サリチル酸などの酸性薬物ならびに

覚醒剤・フェノチアジン系薬物・三環系抗うつ薬・麻薬類などの塩基性薬物は検出されなかった。BZTPM の結果、Nitrazepam, Flunitrazepam, Triazolam, Etizolam が検出された (Fig. 1)。胃内容抽出物から、これらの標準品溶液と同様の保持時間において、それぞれの $[M+H]^+$ イオンを含むスペクトルを確認した後、Nitrazepam, Flunitrazepam, Triazolam, Etizolam の SIM 定量を行った。薬物陰性の健常人血漿ならびに尿抽出物では、これらの $[M+H]^+$ イオンの保持時間において妨害となるようなピークは見当たらなかった。健常人尿ならびに血漿に一定量の Nitrazepam, Flunitrazepam, Triazolam, Etizolam を添加して回収率、検量線、再現性などを検討した結果良好な成績であった。これらのベンゾジアゼピン系薬物が胃内容で高濃度に検出され、 $[M+H]^+$ イオンが確認できたことから、処方薬リストのなかでサイレース[®]、デパス[®]、ベンザリン[®]、ハルシオン[®] の服用が確認された。これらの血中薬物濃度を文献値と比較すると、単独で致死濃度となるものはないが、4 種類のベンゾジアゼピン系薬物の複合作用による重篤な薬理学的影響下にあったことが示唆された。以上が剖検資料を用いた法中毒学的質量分析手法の手順である。

エチゾラムとトリアゾラムおよび代謝物の LC/TOF-MS 分析

Etizolam および Triazolam の水酸化体代謝物は質量数が近似しているため、低分解能 LC/MS による識別は難しい。そこで、分解能が高く精密質量による識別が可能となる飛行時間型質量分析計 (LC/TOF-MS) を用いて、Etizolam, Triazolam および代謝物の分析法を検討した。LC/TOF-MS はデュアルスプレー方式の ESI イオン源を装着した Agilent 1100TOF。プリンおよびフッ素系化合物溶液を常時イオン源に導入し、リアルタイム質量校正を行った。

Etizolam (m/z 343.07787) と Triazolam (m/z 343.05117) の精密質量差は 0.027Da、各代謝物についても観察されるプロトン化分子の精密質量差は 0.028 Da であった (Fig. 2)。これらは分子量からは全く区別がつかないということを示している。それぞれの水酸化体は LC 条件を最適化することによりピーク頂点が識別され、各ピークの精密質量で代謝物の正確な同定が可能となった。各化合物のプロトン化分子の理論値からの相対質量誤差は 10ppb 濃度で -3.02~2.12 ppm と良好であった。定量には window 幅 0.02Da のマスクロマトグラムを用いて、標準溶液での検出限界



	name	RT(min)	ion (m/z)		name	RT(min)	ion (m/z)
1	Medazepam	7.88	271	17	Prazepam	13.03	325
2	Nordiazepam	9.81	271	18	Midazolam	7.68	326
3	Nitrazepam	8.45	282	19	Oxazolam	7.69	329
4	Diazepam	11.00	285	20	Lormetazepam	10.21	335
5	Oxazepam	8.77	287	21	Triazolam	9.38	343
6	Estazolam	8.84	295	22	Etizolam	9.81	343
7	Nimetazepam	9.78	296	23	Flutoprazepam	12.86	343
8	Flumazenil	7.15	300	24	Cloazolam	5.11	349
9	Clobazam	10.08	303	25	Ethyl lofrazepate	11.37	361
10	Fludiazepam	10.75	303	26	Mexazolam	5.79	363
11	Alprazolam	9.22	309	27	Haloxazolam	5.55	377
12	Flunitrazepam	9.68	314	28	Flutazolam	8.25	377
13	Bromazepam	7.51	316	29	Quazepam	14.41	387
14	Clonazepam	9.12	316	30	Flurazepam	7.70	388
15	Clotiazepam	11.79	319	31	Rilmazafone	7.74	475
16	Lorazepam	9.07	321	IS	d5-Diazepam	12.20	290

Fig. 1 ベンゾジアゼピン系薬物に対する選択的イオンモニター法 (SIM)/タイムプログラムモニタリングスクリーニング法 (BZTPM) を用いて、向精神薬処方薬の中からベンゾジアゼピン系薬物のみを殺害時に用いたことが明らかとなった剖検事例。

は 0.19~1.07ppb であった。Etizolam, Triazolam の常用量を服用している精神科外来患者尿を用いた分析では、LC/TOF-MS を使用することで選択性が向上し、妨害成分の影響なく、数 ppb レベルでの定量および精密質量スペクトルによる確認が可能であった。

Etizolam, Triazolam の常用量を服用している健常人の血清濃度はそれぞれ、Etizolam 0.5 mg を服用後 0.9 時間で 8.3 ng/mL, Triazolam 0.25 mg を服用後 0.75~1.5 時間で 3.0 ng/mL, である^{11,12}。

精密質量データベース

前項で述べたように LC/TOF-MS を用いて、ベン

ゾジアゼピン系薬物の未変化体および代謝物の精密質量データベースを作成した (Table 1)。この方法では、近似した質量数で類似のクロマト溶出挙動を示すような、従来の低分解能 LC/MS で同定が困難であったものについても識別できることが確認された¹³。精密質量データベースは必ずしも実測値を必要とするものではなく、Table 1 の精密質量に * を付したものは文献からの計算値である。これらには活性代謝物も多く、すべての標準品を入手することは不可能だが、このような精密質量データベースを作成することによって、従来は未知ピークとして処理されていたものを検索することが可能である。

しかしながら、CCMC で多い“多剤併用薬物中毒”

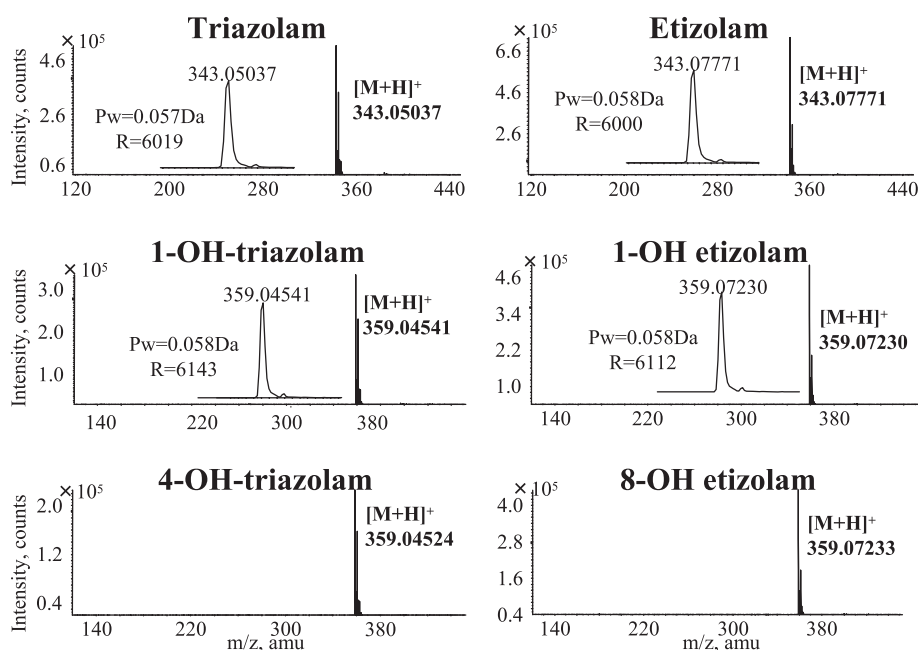


Fig. 2 飛行時間型質量分析計 (LC/TOF-MS) を用いた Triazolam, Etizolam および代謝物の分析法. Etizolam (m/z 343.07787) と Triazolam (m/z 343.05117) の精密質量差は 0.027Da, 各代謝物の観察されたプロトン化分子の精密質量差は 0.028Da.

には、ベンゾジアゼピン系薬物以外の薬物が多く、これらの高濃度を示す薬物の影響についても見直す必要があった。そこで、法中毒学的薬物分析に重要と思われる薬物を追加し、さらに合計 220 種類の精密質量データベースを作成し、CCMC 収容の多剤併用薬物中毒症例へ TOF-MS 薬物スクリーニングを応用した。

対象とした薬物は、バルピツール酸系催眠・鎮静・抗てんかん薬、ベンゾジアゼピン系抗不安薬、ベンゾジアゼピン系薬物代謝物、ベンゾジアゼピン拮抗薬、解熱鎮痛薬、筋弛緩薬、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRI)、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 Serotonin & Norepinephrine Reuptake Inhibitors (SNRI) を含む抗うつ薬、抗精神病薬、非ベンゾジアゼピン系抗不安薬、抗てんかん薬、抗不整脈薬、降圧薬、催眠・鎮静薬、自律神経系作用薬、昇圧薬、精神刺激薬、Ca 拮抗薬、アルツハイマー治療薬、パーキンソン病治療薬、筋弛緩薬、麻酔薬、経口糖尿病薬その他代謝物などで、保持時間と精密質量を測定し、定量性、検出限界、再現性、添加回収実験などについて検討し分離識別の評価を行った。

対象とした薬物のうち、観察されるプロトン化分子が近似した質量数を示すものを Table 2 に示した。これらの精密質量差はいずれも 0.02 Da 以下であったが、LC 条件を最適化することによりピーク頂点の識別は可能となった。各化合物のプロトン化分子の理論

値からの相対質量差は $-3.02 \sim 2.12$ ppm (10 ng/mL 濃度) と良好で、定量には window 幅 0.01 Da のマスククロマトグラムを用いた。<case 2>では、リボトリール[®]、ヒルナミン[®]、レンドルミン[®]、ソラナックス[®]、サイレース[®]、ベゲタミン[®]、ジプレキサ[®]を服用の疑いであったが、Clonazepam, Alprazolam, Phenobarbital, Promethazine, Chlorpromazine, Flunitrazepam, Levomepromazine, Clomipramine, Oranzapine が検出された。<case 3>では、セロクエル[®]、デパス[®]、ハルシオン[®]を服用の疑いであったが、Quetiapine, Etizolam, Triazolam, Bromazepam, Clonazepam, Zolpidem, Amoxapine が検出された。このような試料では、ng/mL とレベルのベンゾジアゼピン系薬物と $\mu\text{g/mL}$ レベルを示す薬物とを同時に、互いに干渉することなく、精密質量スペクトルによる確認・定量が可能であった。精密質量データベースを用いた薬物スクリーニングは、ベンゾジアゼピン系薬物を含む“多剤併用薬物中毒”症例の一斉分析に有用な分析方法であることが示された。現在の状況では、GC/MS や低分解能 LC/MS ではこのような分析は困難であると言わざるをえない。

LC/Q-TOF 包括的薬物スクリーニング

LC/TOF-MS は分解能の高い包括的な測定が可能であることから精密質量—保持時間データベースを併

Table 1 LC/TOF-MS を用いたベンゾジアゼピン系薬物の未変化体および代謝物の精密質量データベース

compound	formula	exact mass	Rt (min)	mass window (Da)	LOD (ng/mL)	Linearity (1 ~ 100ng/mL)
2-Amino-5-nitrobenzophenone	C15H10N2O3	242.0691*	-	-	-	-
7-Aminonitrazepam	C15H11N3O	251.1059	2.73	252.10 ~ 252.14	2.16	0.9998
3-Hydroxy-2-amino-5-nitrobenzophenone	C15H10N2O4	258.0641*	-	-	-	-
Nordiazepam	C15H11CIN2O	270.0560	22.41	271.05 ~ 271.09	0.18	0.9991
Medazepam	C16H15CIN2	270.0924	16.94	271.08 ~ 271.12	0.62	0.9992
Nitrazepam	C15H11N3O3	281.0800	19.54	282.07 ~ 282.11	0.24	0.9995
7-Aminoflunitrazepam	C16H14FN3O	283.1121*	-	-	-	-
Diazepam	C16H13CIN2O	284.0716	25.71	285.06 ~ 285.10	0.19	0.9985
Desmethylchlordiazepoxide	C16H14CIN3O	285.0669*	-	-	-	-
7-Aminoclonazepam	C15H12CIN3O	285.0669	7.09	286.06 ~ 286.10	1.91	0.9995
Oxazepam	C15H11CIN2O2	286.0509	19.67	287.04 ~ 287.08	1.14	0.9999
N-1-Desalkylflurazepam	C15H9CIN2O	287.0387*	-	-	-	-
Demoxepam	C16H14CIN3O	288.0666*	-	-	-	-
7-Acetamidonitrazepam	C17H13N3O2	291.1008*	-	-	-	-
Estazolam	C16H11CIN4	294.0672	19.89	295.06 ~ 295.10	0.75	0.9998
Nimetazepam	C16H13N3O3	295.0957	22.36	296.09 ~ 296.13	0.16	0.9994
Desmethylflunitrazepam	C15H10FN3O3	299.0706	19.24	300.06 ~ 300.10	0.64	0.9997
Chlordiazepoxide	C16H14CIN3O	299.0825	18.01	300.07 ~ 300.11	0.43	0.9999
Clobazam	C16H13CIN2O2	300.0666	22.93	301.06 ~ 301.10	0.33	0.9994
Temazepam	C16H13CIN2O2	300.0666	22.61	301.06 ~ 301.10	0.51	0.9995
Fludiazepam	C16H12CIN2O	302.0622	24.78	303.05 ~ 303.09	0.32	0.9987
N-1-Desalkyl-3-hydroxyflurazepam	C21H23CIN3O	303.0337*	-	-	-	-
Flumazenil	C15H14FN3O3	303.1019	13.58	304.09 ~ 304.13	0.23	0.9982
Alprazolam	C17H13CIN4	308.0829	20.49	309.07 ~ 309.11	0.18	0.9984
4-Hydroxyestazolam	C16H11CIN4O	310.0621*	-	-	-	-
1-Oxoestazolam	C16H11CIN4O	310.0621*	-	-	-	-
Flunitrazepam	C16H12FN3O3	313.0863	24.78	314.08 ~ 314.12	0.2	0.9995
Bromazepam	C14H10BrN3O	315.0007	15.75	315.99 ~ 316.03	2.04	0.9998
Clonazepam	C15H10CIN3O3	315.0411	20.62	316.03 ~ 316.07	0.6	0.9993
Clotiazepam	C16H15CIN2OS	318.0594	27.47	319.05 ~ 319.09	0.2	0.9983
Lorazepam	C15H10CIN2O2	320.0119	20.54	321.00 ~ 321.04	1.01	0.9987
4-Hydroxyalprazolam	C17H13CIN4O	324.0778	19.11	325.07 ~ 325.11	0.75	0.9994
α -Hydroxyalprazolam	C17H13CIN4O	324.0778	18.54	325.07 ~ 325.11	0.47	0.9999
7-Acetamidoclonazepam	C15H10CIN3O3	325.0618*	-	-	-	-
Midazolam	C18H13CIN3	325.0782	16.47	326.07 ~ 326.11	0.17	0.9982
7-Acetamido flunitrazepam	C18H16FN3O2	325.1227*	-	-	-	-
Oxazolam	C18H17CIN2O2	328.0979	15.18	329.09 ~ 329.19	24.3	0.9988
3-Hydroxyflunitrazepam	C16H12FN3O4	329.0812*	-	-	-	-
3-Hydroxybromazepam	C14H10BrN3O2	330.9956	15.10	331.99 ~ 332.03	5.12	0.9992
N-1-Hydroxyethylflurazepam	C17H14CIN2O2	332.0728	20.86	333.06 ~ 333.10	0.19	0.9987
Lormetazepam	C16H12CIN2O2	334.0276	18.86	335.02 ~ 335.06	0.6	0.9994
1,4-Dihydroxyalprazolam	C17H13CIN4O2	340.0727*	-	-	-	-
1-Hydroxymidazolam	C18H13CIN3O	341.0731*	-	-	-	-
4-Hydroxymidazolam	C18H13CIN3O	341.0731*	-	-	-	-
Triazolam	C17H12CIN4	342.0439	21.02	343.03 ~ 343.07	0.22	0.9999
Etizolam	C17H15CIN4S	342.0706	22.68	343.06 ~ 343.10	0.18	0.9982
Cloxacolam	C17H14CIN2N2O2	348.0432	7.80	349.03 ~ 349.06	0.34	0.9994
1,4-Dihydroxymidazolam	C18H13CIN3O2	357.068*	-	-	-	-
1-Hydroxytriazolam	C17H12CIN4O	358.0388	19.09	359.03 ~ 359.07	0.71	0.9998
4-Hydroxytriazolam	C17H12CIN4O	358.0388	19.35	359.03 ~ 359.07	0.62	0.9992
8-Ethylhydroxyetizolam	C17H15CIN4SO	358.0655	13.96	359.06 ~ 359.10	0.28	0.9994
1-Methylhydroxyetizolam	C17H15CIN4SO	358.0655	19.32	359.06 ~ 359.10	0.57	0.9982
Ethyl loflazepate	C18H14CIN2O3	360.0677	26.91	361.06 ~ 361.10	0.24	0.9991
1-Hydroxymethyl-4-hydroxytriazolam	C17H12CIN4O2	374.0337*	-	-	-	-
Haloxazolam	C17H14BrFN2O2	376.0223	9.04	377.01 ~ 377.05	32.1	0.9932
Flurazepam	C21H23CIN3O	387.1514	15.79	388.14 ~ 388.18	0.18	0.9988
Brotizolam	C15H10BrCIN4S	391.9498	22.40	392.94 ~ 392.98	1.12	0.9993
9-Hydroxymethylbrotizolam	C15H10BrCIN4OS	407.9447	19.87	408.93 ~ 408.97	23.2	0.9962
3-Hydroxybrotizolam	C15H10BrCIN4OS	407.9447	19.43	408.93 ~ 408.97	1.22	0.9994
Rilmazafone	C21H20CIN2N6O3	474.0974	15.45	474.09 ~ 475.13	3.21	0.9997

Table 2 精密質量データベースのうち、観察されたプロトン化分子が近似した質量数を示すもの

m/z 237	Carbamazepine (236.09496), Cyclobarbital (236.11609)
m/z 271	Nordiazepam (270.05599), Medazepam (270.09238)
m/z 278	Maprotyline (277.18305), Amitriptyline (277.18305)
m/z 287	Desmethylclobazam (286.05091), Demoxepam (286.05091),
m/z 300	Chlordiazepoxide (299.08254), Desmethylflunitrazepam (299.07062)
m/z 301	Clobazam (300.06656), Temazepam (300.06656)
m/z 314	Azelnidipine (313.07324), Amezinium (313.07324), Flunitrazepam (313.08627), Amoxapine (313.09819)
m/z 316	Bromazepam (315.00072), Clonazepam (315.04107)
m/z 319	Clotiazepam (318.05936), Chlorpromazine (318.09575), Fluvoxamine (318.05551)
m/z 325	1-Hydroxyalprazolam (324.07779), 4-Hydroxyalprazolam (324.07779)
m/z 343	Triazolam (342.04390), Etizolam (342.07059)
m/z 359	1-Hydroxytriazolam (358.03882), 4-Hydroxytriazolam (358.03882), 8-Ethylhydroxyetizolam (358.06551), 1-Hydroxyetizolam (358.06551)
m/z 375	Desmethylzopiclone (374.08942), Hydroxyzine (374.17611), Haloperidol (375.14013)
m/z 380	Donepezil (379.21474), Droperidol (379.16961)
m/z 408	9-Hydroxymethylbrotizolam (270.05599), 3-Hydroxybrotizolam (270.05599)

用したスクリーニング法として有効である。最近では、“多剤併用薬物中毒”を呈する剖検事例もあり、資料には多種多様の薬物が複数含まれていることが多い。これらに対応するためには、大規模な精密質量データベースと併用した包括的スクリーニング法の開発が必要と考えられる。そこで130薬物の保持時間—精密質量データベースの構築とともに6643薬物の精密質量データベースを用いてCCMC収容の“多剤併用薬物中毒”症例へ応用し、包括的薬物スクリーニング法の検討を行った。さらに確認手法としてQ-TOFによる精密質量MS/MSスペクトルのライブラリを構築し、MS/MSスペクトルによるライブラリ検索手法も検討した。

デュアルスプレーESIイオン源付Agilent 6520 LC/Q-TOFを使用した。大規模データベースによる包括的スクリーニングには、測定結果をMolecular Feature Extraction(MFE)法を用いてデータ処理後、Agilent G6855AA Forensic databaseを用いた精密質量検索を行った。

大規模な精密質量データベースを用いた包括的スクリーニングの場合、測定対象の決まったターゲット分析とは異なり測定データから検出された化合物を取りこぼしなく取り出す必要がある。そこでコントロール尿および血漿に130種薬物を100 ng/mL相当添加した試料をLC/Q-TOFで測定後、MFE/6643薬物精密質量データベースによるスクリーニングを行った。その結果、MFE法のパラメータを最適化することで、全薬物の検出が可能であった。“多剤併用薬物中毒”症例の血漿、尿、胃内容物について包括的スクリーニングを実施した。まず、胃内容物全データポイントから

MFE法を用いて405化合物が抽出され(Fig. 3-A)、130薬物保持時間—精密質量データベースで24薬物に絞込みが行われ(Fig. 3-B)、さらに6薬物が新たに検索された(Fig. 3-C)。LC/Q-TOFおよびMFE/大規模精密質量データベースが包括的スクリーニング法として有効であることが確認できた。“多剤併用薬物中毒”症例の場合は、このような複雑な手法も採用せざるをえない。

法医中毒分析と今後の課題

法医中毒分析の結果として重要なのは、測定値の意義付けをすることである。医薬品であれば測定値が常用量のレベルなのか致死的なレベルなのかを可能な限り多くの文献値と比較して判断する。したがって、分析の結果得られた測定値の妥当性や正当性を評価するために、定量性、検出限界、再現性、添加回収実験等分析バリデーションは必須である。

日本医科大学法医学教室は2003年から司法解剖を開始した。剖検例の全例について、血中アルコール、GC/MS薬物スクリーニングなど薬毒物の関与を検索している。血液や尿以外に肝臓・腎臓・心臓・筋肉・脳などの臓器内濃度を測定することにより、中毒死だけでなく、薬物の影響下における犯罪の解明にも寄与してきた。

自然毒であるテトロドトキシンやアコニチン類の検出も法医中毒分析では重要である。われわれはアコニチンへの腐敗の影響¹⁴、アコニチン長期投与による心機能への影響¹⁵や、LC/MSを用いたフグ毒分析法として、C9分解物ではなくテトロドトキシン本体を分

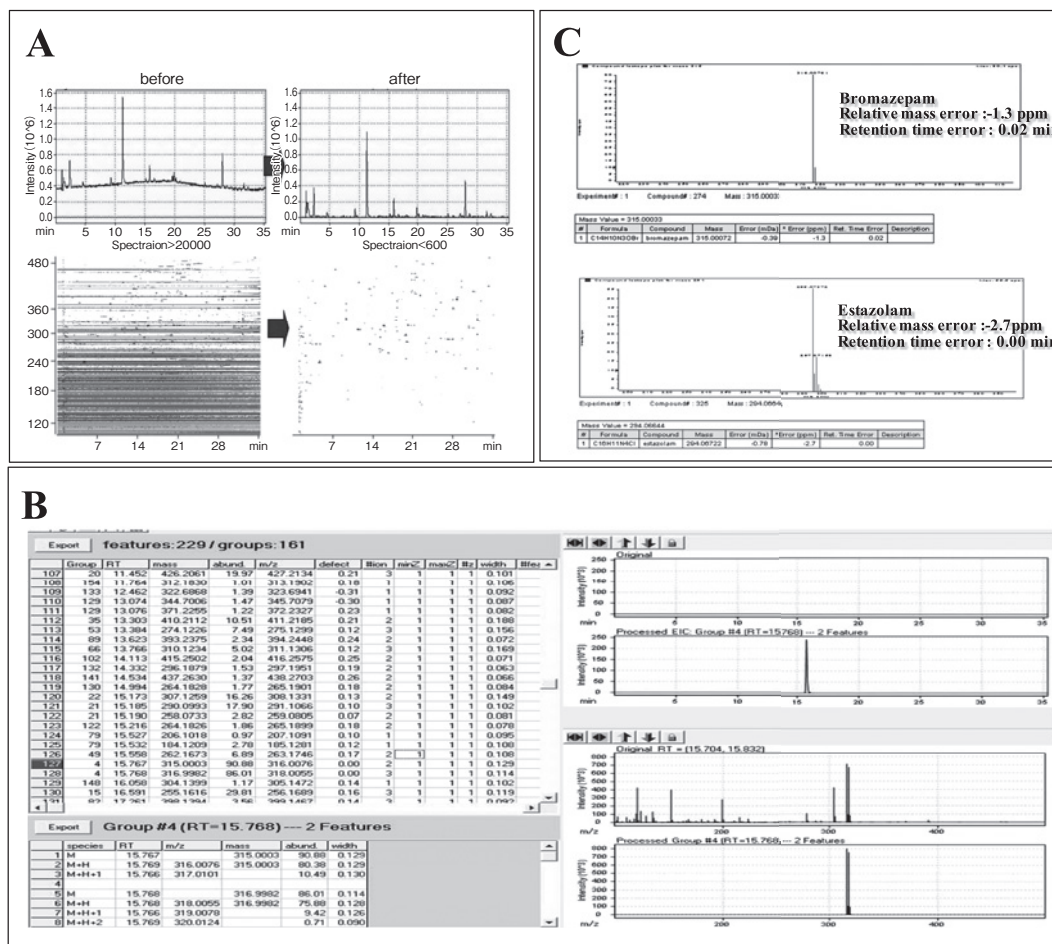


Fig. 3 “多剤併用薬物中毒”症例の包括的スクリーニング。A：Molecular Feature Extraction (MFE)法を用いたデータ処理，B：Forensic database (Agilent G6855AA)を用いて検索，C：精密質量検索からサーチされた化合物。

析するカラムスイッチング法を確立した^{16,17}。アコニチンとテトロドトキシン分析を確立することができたことから、これら毒物の同時投与における生体への作用機序を解明することも可能となった。また、最近では、“多剤併用薬物中毒”症例でも消炎鎮痛剤としてアコニチン製剤が処方されている場合もあり、ますます分析が複雑化している¹⁸。アコニチン系アルカロイドも Aconitine, Mesaconitine, Hypaconichine, Jesaconitine といったジテルペノイドならびにこれらの代謝物の一斉分析をする場合 BZTPM と同様の SIM タイムプログラムモニタリングスクリーニング法 (ACTPM) が有効である。BZTPM と ACTPM は異なるメソッドになるので、取りこぼしの可能性をなくすためには包括的スクリーニングの実施が望ましい。

最近の分析機器の開発・発展はすさまじく、1年前には最先端の分析機器であった LC/MS/MS はすでに分析の必需機器となりつつある。これは 2007 年から 2008 年にかけて、全国警察機関、高度救命救急セン

ター、救命救急センターなどに複数の補助金が拠出され、最新分析機器の導入が進められたことに端を発している。しかし、残念ながら大学法医学教室はこれらの対象ではないのが現状である。一方、処方医薬品も開発競争が繰り広げられており、分析するためにはこれらの標準品の入手が必要となるが、個々の施設で対応することには限界がある。薬毒物分析の今後を考えると、分析センターの拠点化も考えていかなければならないが、同時に、分析レベルの向上、すなわちこの施設で行われようと同じ成績が得られるような分析法の評価を含めた体制の確立も重要な課題であり、これらは先進国にならって国家的規模の支援ならびに指導が必要なものだといえる。

謝辞：LC/TOF-MS, LC/Q-TOF 測定をしていただきましたアジレント・テクノロジー (株)、アプリケーションセンター滝埜雅彦氏に深謝いたします。また、質量分析標準品として貴重な薬物ならびに代謝物を供与していただ

いた製薬会社各位に深謝いたします。本研究の一部は文部科学省科学研究費補助基盤研究 (C) 課題番号 19590682「質量分析の新技术を用いたベンゾジアゼピン系薬物分析法の再構築 (H19-H22)」の成果によるものである。

文 献

1. Kudo K, Ishida T, Hikiji W et al.: Pattern of poisoning in Japan: selection of drugs and poisons for systematic toxicological analysis. *Forensic Toxicol* 2010; 28: 25-32.
2. Gregov M, Ojanpera I, Vuori E: Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. *J of Chromatogr B* 2003; 795: 41-53.
3. Ishida T, Kudo K, Hayashida M, Ikeda N: Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column. *J of Chromatogr B* 2009; 877: 2652-2657.
4. 犬塚 祥, 林田眞喜子, 仁平 信: 救急医療施設における薬物使用の実態と迅速薬物スクリーニングの有用性についての研究. *J Nippon Med Sch* 1997; 64: 58-66.
5. Kudo K, Ishida T, Hikiji W et al.: Construction of calibration-locking databases for rapid and reliable drug screening by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Toxicol* 2009; 27: 21-31.
6. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B: Forensic toxicology. In *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons* 3rd. edition (Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, eds), 2004; pp 80-93, Pharmaceutical Press, London.
7. Quintela O, Sauvage FL, Charvier F, Gaulier JM, Lachatre G, Marquet P: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for detection of low concentrations of 21 benzodiazepines, metabolites, and analogs in urines: method with forensic applications. *Clin Chem* 2006; 52: 1346-1355.
8. Sauvage FL, Gaulier JM, Lachatre G, Marquet P: Pitfalls and prevention strategies for liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the selected reaction monitoring mode for drug analysis. *Clin Chem* 2008; 54: 1519-1527.
9. Butzbach DM: The influence of putrefaction and sample storage on post-mortem toxicology results. *Forensic Sci Med Pathol* 2010; 6: 35-45.
10. Kurisaki E, Hayashida M, Nihira M et al.: Diagnostic performance of Triage for benzodiazepines: urine analysis of the dose of therapeutic cases. *J Anal Toxicol* 2005; 29: 539-543.
11. Baselt RC: Triazolam. In *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man* (Baselt RC, ed), 2008; pp 1585-1588, Biomedical Publications, Foster city, California.
12. Baselt RC: Etizolam. In *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man* (Baselt RC, ed), 2008; pp 586-588, Biomedical Publications, Foster city, California.
13. Hayashida M, Takino M, Uekusa K, Terada M, Kurisaki E, Kudo K: TOF-MS accurate mass database for benzodiazepine screening. *Legal Med* 2009; 11: S423-S425.
14. Hayakawa H, Nihira M, Tomita Y, Hayashida M, Ohno Y: Influence of putrefaction on concentrations of aconitum alkaloids in tissues. *Jpn J Forensic Toxicol* 2003; 21: 235-244.
15. Wada K, Nihira M, Hayakawa H, Tomita Y, Hayashida M, Ohno Y: Effects of long-term administration of aconitine on electrocardiogram and tissue concentrations of aconitine and its metabolites in mice. *Forensic Science International* 2005; 148: 21-29.
16. Hayashida M, Hayakawa H, Wada K, Yamada T, Nihira M, Ohno Y: A column-switching LC/MS/ESI method for detecting tetrodotoxin and Aconitum alkaloids in serum. *Legal Medicine* 2003; 5: 101-104.
17. Hayashida M, Hayakawa H, Wada K, Nihira M, Ohno Y: Sensitive determination of tetrodotoxin using column-switching liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization in mouse serum. *J Anal Toxicol* 2004; 28: 46-49.
18. Ono T, Hayashida M, Uekusa K et al.: An accidental case of acute poisoning due to Kampo herbal medicine ingestion. *Legal Med* 2009; 11: 132-135.

(受付: 2010年8月30日)

(受理: 2010年11月5日)