

第9回法医中毒研究会セミナー

ブラインドテスト

(1)ジフェンヒドラミンとエチゾラム

令和2年3月19日(木)

東京慈恵会医科大学 南講堂
東京都港区西新橋3丁目 25-8



世話人 前橋 恭子
東京慈恵会医科大学法医学講座

第9回法医中毒研究会セミナー

「ブラインドテスト：(1)ジフェンヒドラミンとエチゾラム」

目 次

第9回法医中毒研究会セミナー開催にあたって	2
抄録	
1. 第1回ブラインドテストの準備および実施の実際	3
久保 真一・Brian Waters (福岡大学)	
2. 第1回ブラインドテスト結果報告	7
矢島 大介 (国際医療福祉大学)	
3. ブラインドテストの今後のあり方と方針	31
運営委員会	
4. 第1回ブラインドテスト対象薬物の分析事例について	
1) エチゾラムの分析報告	36
奈女良 昭 (広島大学大学院)	
2) ジフェンヒドラミンの分析報告	52
奥田 勝博 (旭川医科大学)	

令和2年3月19日

法医中毒研究会会長 久保 真一

第9回法医中毒研究会セミナー開催にあたって

第9回法医中毒研究会セミナーは、世話を東京慈恵会医科大学の前橋恭子先生にお願いし、東京で開催することで準備を進めて参りました。しかし、新型コロナウイルス（COVID-19）の感染拡大が危惧される状況を踏まえて、2月19日に中止とさせて頂きました。

今回のセミナーは、下記のような企画で行う予定でした。そこで要旨集を発行し、セミナーの内容をご理解頂き、既に頂いております質疑についても、要旨集の中で、お答えすることといたしました。そのうえで、改めてメールでセミナーに関する質疑をお寄せいただき、回答する形式で、実施させて頂きます。ご理解の程、宜しくお願ひ申し上げます。

法医中毒研究会セミナーでは、法医鑑定における薬毒物分析業務全般から各物質の分析方法に至るまでを、薬毒物分析マニュアルに即して、より実践的、専門的に学ぶことを目的としております。

法医中毒研究会は、これまで薬毒物分析について実施してきたセミナーの結果を踏まえて、昨年、初めてブラインドテストを実施しました。今回から法医中毒研究会セミナーでは、実施したブラインドテストの結果を共有し、今後の薬物分析の精度の向上に繋げたいと考えております。

第9回セミナーは、「ブラインドテスト：(1)ジフェンヒドラミンとエチゾラム」というテーマで、ブラインドテストの実施要領、ブラインドテストの結果の報告、対象薬物についての分析例を扱う予定です。

本セミナーにおいて薬毒物スクリーニングならびに定量法について理解を深め、業務の発展、改善等に役立てていただければと思います。

第1回ブラインドテストの準備および実施の実際

1. 目的

法医中毒研究会（MeLT）では、薬毒物分析を担う人材育成、分析技術や鑑定能力の向上を目的とし、これまで薬毒物検査マニュアルの改訂、法医中毒研究会勉強会・セミナーを行ってきた。ブラインドテストは、これまでの活動を踏まえて、分析検査の精度の向上を目的として、実施することになった。

現在、日本法医学会・教育研究委員会に設置された法医中毒ワーキンググループ（FTWG）では、法医解剖における薬毒物分析体制の充実を目的として、法医中毒薬物検査登録機関の制度を検討している。「法医中毒薬物検査登録機関規程（案）」では、「毎年、分析精度管理検査を受審すること。」と規定している。

ブラインドテストは、この分析精度管理検査の試行として実施することにした。

2. 準備

第12回法医中毒ワーキンググループ委員会・法医中毒研究会役員会（2019年8月26日）において、第1回ブラインドテストの概要を決定した。

2.1. 対象薬物

薬毒物検査マニュアルに掲載された薬毒物とエタノールを添加することとした。

①エチゾラム 0.1 µg/mL、②ジフェンヒドラミン 1 µg/mL、③エタノール 1 mg/mL

2.2. 事務局・結果の解析

ブラインドテストの受付は、法医中毒研究会事務局（横浜市立大学・福家 千昭先生）、実施結果の集計・解析は、国際医療福祉大学・矢島 大介先生が担当した。

2.3. 分析試料の調製・発送

福岡大学医学部法医学教室および薬毒物探索解析研究所（福岡大学基盤研究機関）において、ブラインドテスト分析試料を調製・発送した。

実施要領については教員3名、外部研究員1名、教育技術補助職員2名で検討し、実際の調整・発送は、主に教員1名、教育技術補助職員2名が担当した。

3. 材料および方法

ブラインドテストに使用した薬品・資材の一覧を下表にまとめる。

薬品・資材名	製造・販売	単位	数量	単価	金額
ヒト全血	BioIVT	20 mL	4	10,000	40,000
エタノール	Sigma-Aldrich	500 mL	1	1,830	1,830
ジフェンヒドラミン HCl	Supelco	1.0 mg/mL in MeOH	1	6,210	6,210
エチゾラム	Supelco	1.0 mg/mL in MeOH	1	36,540	36,540
チューブ（5-mL）	Labcon	1,000	1	11,200	11,200
封筒（緩衝材付）	Askul	50	1	1,900	1,900
封筒（No. 3）	Askul	100	1	400	400
封筒（No. 4）	Askul	100	1	350	350
宛先ラベル（12枚入）	Askul	20	1	520	520
プラスチック袋（No. 12）	Askul	100	1	230	230

薬品・資材の合計購入経費は、99,180 円となった。ブランクのヒト全血と標準薬物の購入費が、経費を占めていた。

3.1. ブラインドテスト分析試料の調製

市販の凍結ヒト全血は、-20°Cで保管した。凍結ヒト全血の解凍は、冷蔵庫4°Cに一晩保存して行った。解凍した血液（4本）は25mLメスシリンドラーで計測した。合計72mLの血液を300mLフラスコに移して、スターラーで攪拌した。蒸留水8mLを加え、最終量を80mLとした。この血液に、氷冷しながらエチゾラム・メタノール溶液（1.0mg/mL）8μL、ジフェンヒドラミン・メタノール溶液（1.0mg/mL）80μL、エタノール101μLを添加し、さらに攪拌した。この添加試料をブラインドテストの分析試料とした。

分析試料2mLを、凝血がないことを確認して、チューブ（5mL）に分注し、冷凍庫-20°Cで、発送まで保管した。

3.2. 分析試料の発送

宛名ラベルを貼付した封筒（緩衝材付）に、分析試料（5mLチューブ）（プラスチック袋に容れたうえで）、説明文書（A4、1枚）、回答用紙（A4、2枚）、回答用紙用封筒、事務所宛返信用封筒を容れて、クール宅急便（ヤマト運輸）で、参加機関に発送した。

分析試料は、発送用封筒（緩衝材付）に収容する直前まで、冷凍庫（-20°C）で保管した。35機関への宅急便の発送手続きには、15分ないし20分を要した。

4. 分析試料の検定

分析試料について、調整・発送機関において検定した結果は、以下の通りである。

薬品・化合物名	濃度
エタノール	1.03 mg/mL
メタノール	0.87 mg/mL
ジフェンヒドラミン	1.04 μg/mL
エチゾラム	0.112 μg/mL
カフェイン	1.23 μg/mL
テオブロミン	1.11 μg/mL
パラキサンチン／テオフィリン	1.20 μg/mL

4.1. GC-FIDによるアルコール類分析

冷凍した分析試料2mLは、室温に30分間静置して解凍した。

解凍した血液0.2gを5-mLのチューブに容れ、緩衝液（70%過塩素酸17mL、チオ尿素1g、蒸留水500mL）1.6mLを加えた。さらに、内部標準溶液0.2mL（0.2%（v/v）1,4-dioxane水溶液）を添加した。チューブを20秒間、攪拌した。その後、3000回転、5分間遠心分離し、水層0.2mLをヘッドスペースバイアル（20-mL）に容れ、密栓し、60°Cで12分間加温した後、速やかに気相をGC-FIDで分析した。

分析条件：

測定機器： GC2010Plus（島津製作所）、FID（Flame Ionization Detector）付

カラム： Rtx-1 (60 m x 0.7 mm I.D. x 1.0 μm film thickness)

オープン条件： 110°C、定温

検量線: (7 点) : 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, and 5.0 mg/mL

対象化合物質: メタノール、エタノール、アセトン、1-プロパノール、1-ブタノール

直線性: 全ての化合物は、R2 は 0.995 以上であった。

分析結果: エタノール濃度; 1.03 mg/mL

メタノール濃度; 0.87 mg/mL

注) 試料中のメタノールは、精度検査のために添加されたものではなく、添加したエチゾラムとジフェンヒドラミンに使用されたメタノール溶液由来のものである。従って、メタノール濃度は設定されたものではない。

4.2. LC-MS/MS による薬物定量分析

解凍した血液 0.2 g を 5-mL のチューブに容れ、ジフェンヒドラミン-d3 とエチゾラム-d3 の内部標準溶液 10 μ L、蒸留水 0.2 mL とアセトニトリル 1.6 mL を加えた。チューブは、蓋をして 5 分間、攪拌した。次に、遠心分離 (5 分間、3,000 rpm) した上清を、Captiva ND Lipids チューブ (Agilent、3 mL) で遠心分離して通した。濾液は窒素気流下 (60°C) で蒸発させた。残渣は、0.1% ギ酸水溶液に溶解し、LC-MS/MS によって分析した。

分析条件:

測定機器: Thermo Scientific Quantum Access MAX LC-MS/MS

カラム: Thermo Scientific Hypersil GOLD PFP (50 x 2.1 mm, 5 μ m)

移動相: A: 0.1% ギ酸水溶液

B: 0.2% ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント: 5% B を、5.5 分で 95% B に上げ、10 分まで維持し、5 分間で 5% B に戻す。合計溶出時間は 15 分。

イオン化: エレクトロスプレー法 (ポジティブ・モード)

検出モード: 選択反応検出 (SRM)

SRM 測定条件: ジフェンヒドラミン m/z 256 > 167

ジフェンヒドラミン-d3 m/z 259 > 167

エチゾラム m/z 343 > 314

エチゾラム-d3 m/z 346 > 317

検量線: ジフェンヒドラミン (6 点); 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, and 2.0 μ g/mL

エチゾラム (6 点); 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, and 0.2 μ g/mL

直線性: ジフェンヒドラミンの R2 は 0.999、エチゾラムの R2 は 0.999。

分析結果: ジフェンヒドラミン濃度; 1.04 μ g/mL

エチゾラム濃度; 0.112 μ g/mL

4.3. LC-MS/MS(MRM)によるカフェインとカフェイン代謝物分析

解凍した血液 0.1 g を 2-mL のチューブに容れ、内部標準溶液(カフェイン-d3、100 μ g/mL メタノール溶液)0.01 mL、蒸留水 0.1 mL をチューブに加えた。チューブは、蓋をして 5 分間、攪拌した。次に、遠心分離 (10 分間、4,500 rpm) した上清を、Captiva ND Lipids チューブ (Agilent、3 mL) で遠心分離して通した。濾液は窒素気流下 (45°C) で蒸発させた。残渣は、

メタノール 0.15 mL に溶解し、フィルタ (0.2 μm) でろ過し、オートサンプラーバイアルに容れ、試料 1 μL を LC-MS/MS で分析した。

分析条件：

測定機器： Shimadzu LC8045 LC-MS/MS
カラム： Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 x 2.1 mm, 2.6 μm)
移動相：
A: 10 mmol/L ギ酸アンモニウム+0.1% ギ酸水溶液
B: 10 mmol/L ギ酸アンモニウム+0.1% ギ酸メタノール液
溶出時間は 15 分となる。
イオン化： エレクトロスプレー法 (ポジティブ・モード)
検出モード： 多重反応モニタリング (MRM)
MRM 測定条件：
カフェイン m/z 195 > 138
カフェイン-d3 (IS) m/z 198 > 141
テオブロミン m/z 181 > 163
パラキサンチン/テオフィリン m/z 181 > 124
検量線：
標準添加法 (2 点) ; 0 および 1 μg

分析結果： カフェイン濃度；1.23 μg/mL

テオブロミン濃度；1.11 μg/mL

パラキサンチン/テオフィリン*；1.20 μg/mL

注) カフェインおよびその代謝物は、分析試料として添加したものではなく、購入した血液試料にすでに含有されたものである。従って、分析試料としての設定濃度はない。

* 今回の検定分析では、パラキサンチンとテオフィリンは分離することはできていない。

5. 今後のブラインドテストのための注意点および改良点

今回のブラインドテストでは、参加 35 機関に 2 mL 配布とした。そこで、ブランク血液を 80 mL として、分析試料を調製したが、実際購入した血液量はカタログの血液量より少なかった。その結果、2 mL より少ない分析試料となった。また、参加者からは分析試料の增量 (例えば 5 mL) を求める意見もあったことから、十分な量を提供できるように、改めて検討する。

配布した分析試料が解凍していたり、再凍結した可能性が疑われる状態で届いていたとの意見があった。次回からは、梱包の仕方を変える。また、宅配業者との問題点を共有したうえで、改善を図る必要がある。

第1回ブラインドテスト結果報告

(2019年度)

法医中毒研究会

報告事項
1. 参加機関
2. エタノール分析結果
3. 薬物スクリーニング分析結果
4. 薬物定量分析結果
5. その他(ご意見・ご要望など)

1. 参加機関

参加機関数	35 機関
回答機関数	35 機関
✓ 参加 35 機関全てから回答があり。ただし、エタノール検査のみ、スクリーニング検査のみ参加の機関を含む。	
検査	参加機関 35 機関中の回答機関数
エタノール分析	32
薬物スクリーニング検査	33
薬物定量検査	22

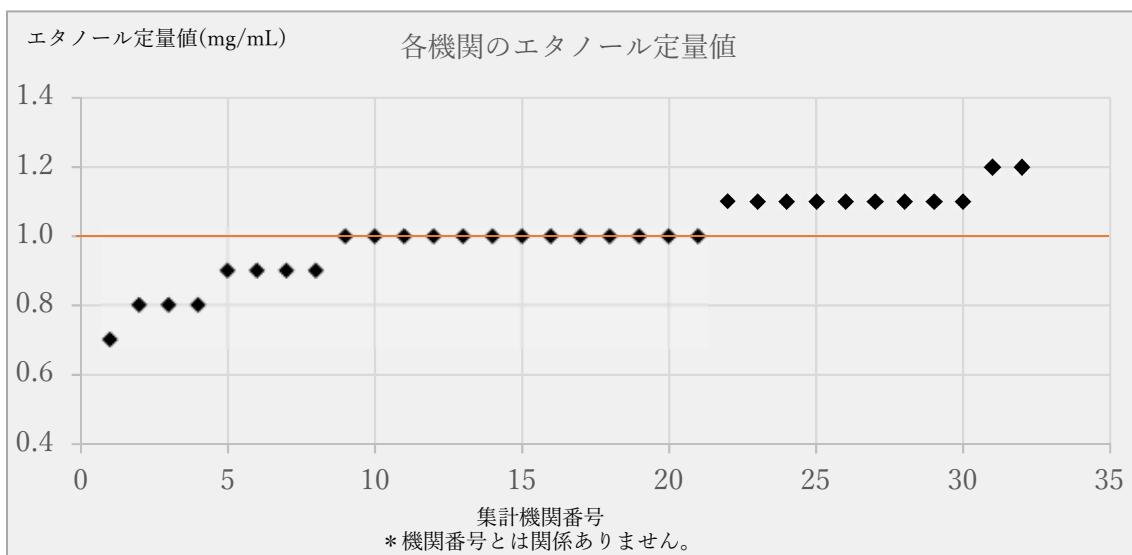
2. エタノール分析結果

【調製濃度と定量値の処理】

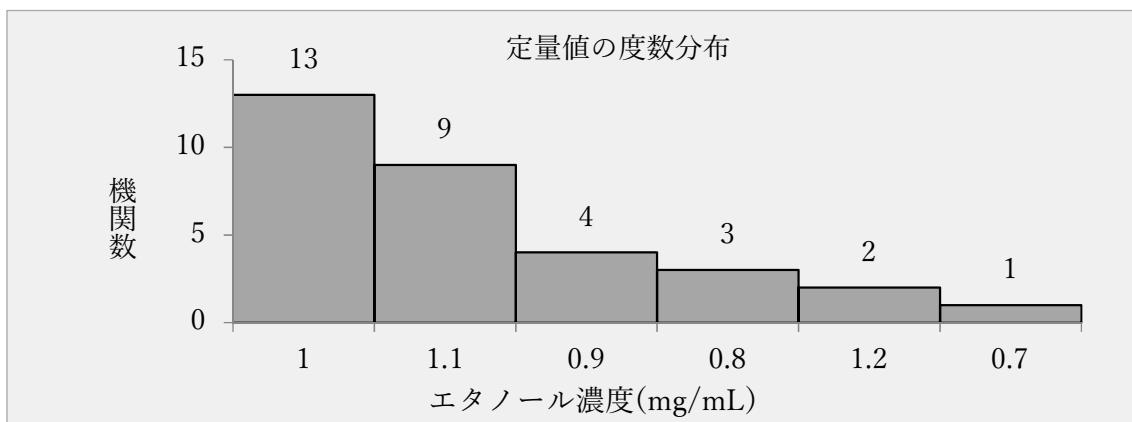
調製濃度	1.0 mg/ml
調製機関分析濃度	1.03mg/ml

- ◆ エタノール濃度は一般の成書や文献では小数点第1位までの数値で症状などを提示している。
- ◆ それ以下の細かい数値での症状の違いは明記されていない。
- ◆ 提出された結果を小数点第1位となるように四捨五入して解析した。

【各機関の定量値の分布】



【各機関の定量値の解析】



エタノール濃度	機関数	機関の割合	累積割合
1.0	13	41%	41%
1.1	9	28%	69%
0.9	4	13%	82%
0.8	3	9%	91%
1.2	2	6%	97%
0.7	1	3%	100%

- ◆ 32 機関中 26 機関 (82%) が調製値の $\pm 10\%$ 以内の結果であった (注意: 10% 以内が妥当ということではない)。

【定量値の解釈】

- ◆ 調製値 \pm 何% 以内が妥当な分析結果か?

(前提) 調製が正しくなされ、分析時まで劣化がないとする。

⇒ 一概には定められない。

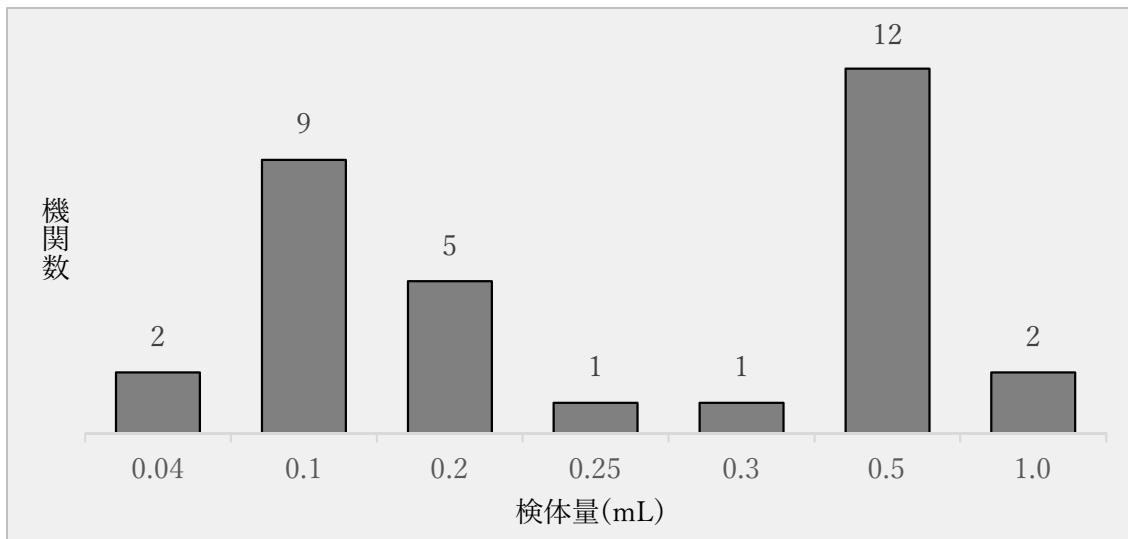
(考慮すべき要因)

 - ① 分析の精度としての妥当性 (分析手技や分析機器)
 - ② エタノール血中濃度から症状を推測する場合の妥当性
 - それより細かい数値で提示しても意味がない。
- ◆ 各機関が提出した値には様々な要素が影響している。

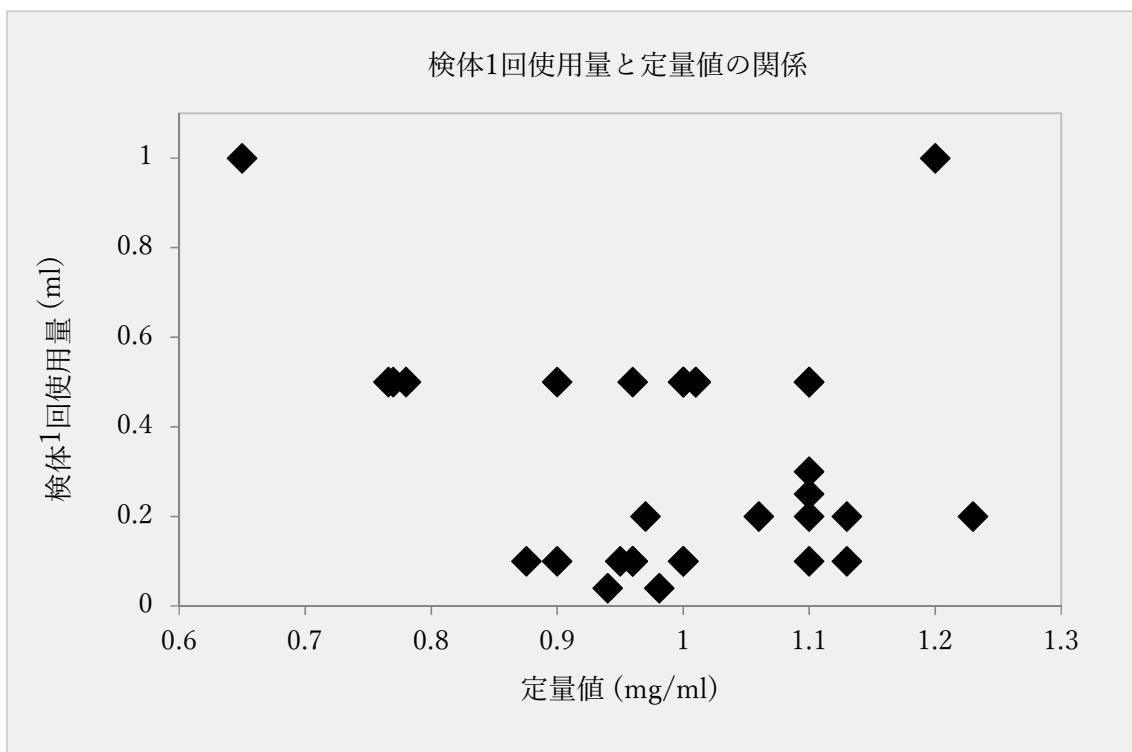
(考慮すべき事項)

 - ① 調整時の不均一性の可能性 (調製方法の検証)
 - ② 搬送時の変化の可能性 (事前の検証)
 - ⇒ 今回は、結果を見る限り問題なさそうである。
 - ③ 機関受け取り後の保管による影響の可能性 (各機関自身で検証)
 - ④ 各機関で調製した標準溶液作成方法の影響 (各機関自身で検証)
 - ⑤ 分析方法の影響の可能性 (各機関自身で検証)

【検体1回使用量】

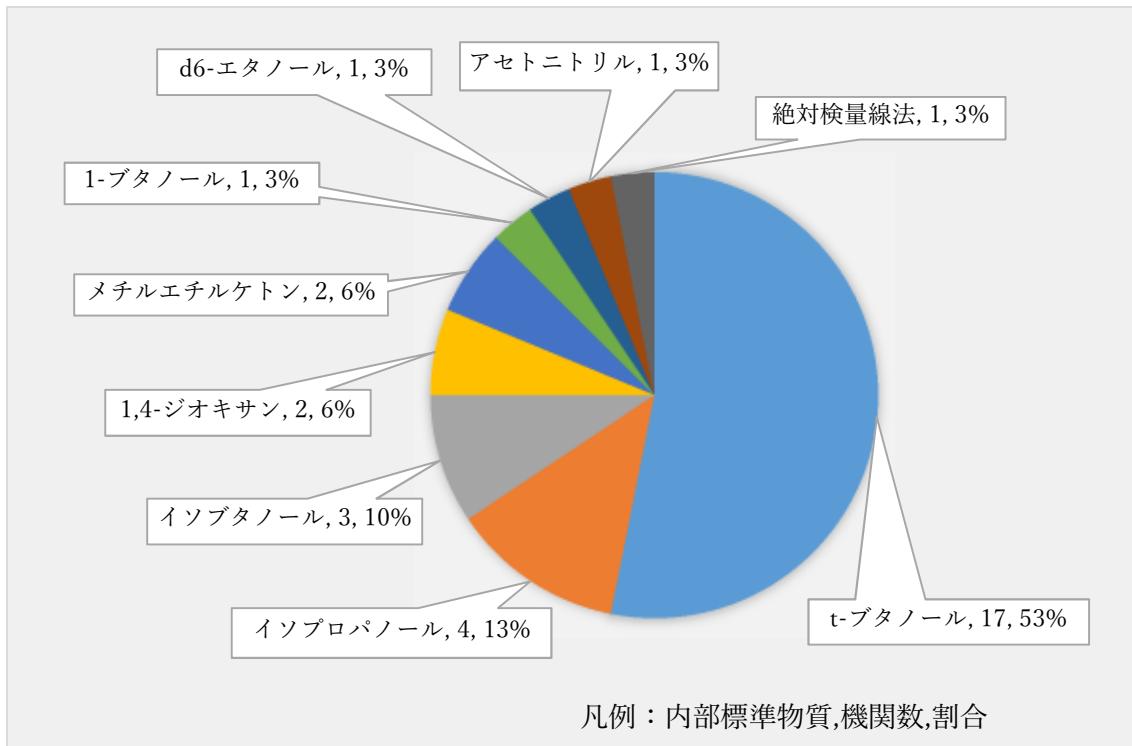


- ◆ 1分析当たりの検体使用量は0.5mLか0.1mLの機関が多く、最少で0.04mL、最大で1.0mLであった。ただし、配布量が少量のため、使用量を削減した機関もあった可能性がある。



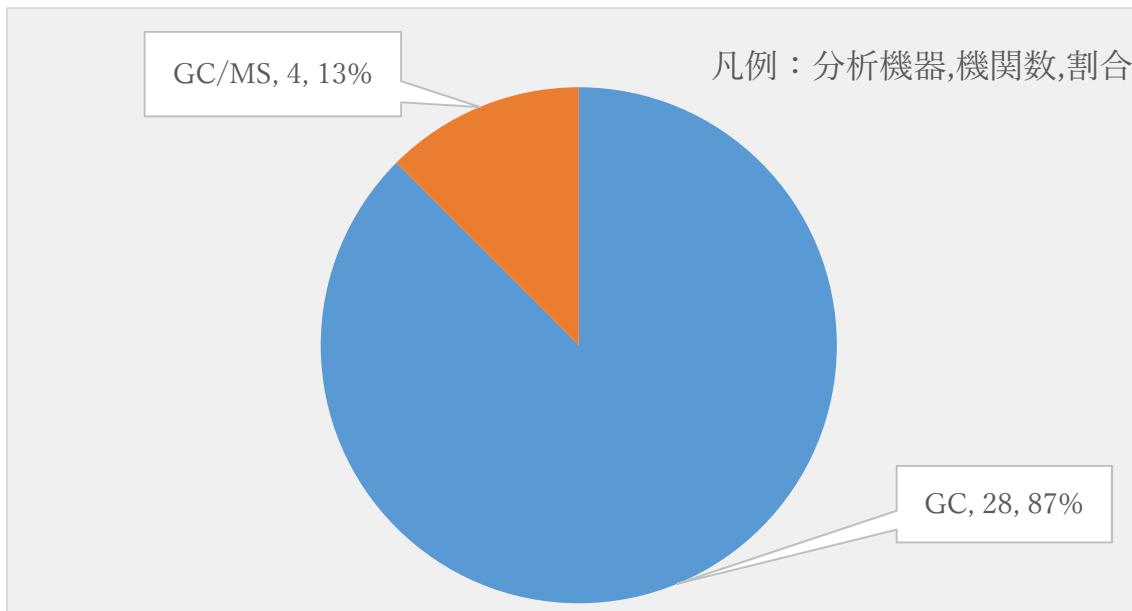
- ◆ 検体使用量と分析結果に相関は認められなかった。

【内部標準物質】



- ◆ 32 機関中 17 機関(53%)が t-ブタノールを使用していた。

【分析機器及び分析方法】



- ◆ 32 機関中 28 機関(87%)が GC(ガスクロマトグラフィー)、4 機関(13%)が GC/MS(ガスクロマトグラフィー・質量分析計)を使用していた。
- ◆ 分析方法は 32 機関すべてでヘッドスペース法であった。

【コメント・ご意見】

《概要》

内容	件数
メタノール	13
エタノール以外の物質を検出	
アセトン	1
アセトアルデヒド	1
測定回数・検量線に関する事項	4
送付検体に関する事項	
配布量が少ない	2
解凍していた	1
分析方法に関する事項	2
質問	2

* 重複あり。

《詳細》

エタノール以外の検出に関する事項

- ・ 血液中からエタノール以外にメタノール 0.547mg/mL を検出した。
- ・ メタノールも検出。
- ・ メタノール(0.85mg/mL相当)のピークが検出された。
- ・ メタノールのピークが検出された。
- ・ メタノールを 0.8mg/ml 程度検出。
- ・ メタノールも検出された。検出量 0.84mg/ml。
- ・ メタノールのピークが見られたのですが、エタノール分析ということで、今回はそれ以上はしませんでした。
- ・ 同時にメタノールが検出されました。
- ・ メタノールが 0.9mg/ml と定量されました。
- ・ メタノール検出 0.9mg/ml。
- ・ メタノールと思われるピークが検出された。
- ・ 血液サンプルからはエタノールの他、メタノールも検出された。
- ・ メタノールも 0.1mg/ml 程度含有されていると思料される。
- ・ アセトン、アセトアルデヒドも検出された。

◆ メタノールは試料調整時に用いている溶媒である。

(参考)各機関のメタノール検出濃度

調製機関分析値(mg/mL)	各機関のメタノール検出濃度(mg/mL)
	0.1mg/ml 程度
	0.547mg/mL
	0.8mg/ml 程度
0.87	0.84mg/ml
	0.85mg/mL 相当
	0.9mg/ml
	0.9mg/ml

測定回数・検量線に関する事項

- 3点検量線で測定、n=1。
- N=2。
- 試料量が少なかったのでn=3での定量は実施しなかった。
- 日常業務ではI.S.無添加サンプル(n=1)ならびに、I.S.添加サンプル(n=2、エタノールN.D.の場合はn=1)を測定している。

検体送付に関する事項

- 試料量が少なかったのでn=3での定量は実施しなかった。
- 今回は使用量削減のためI.S.添加サンプルをn=1のみ行った。
- 血液が手元に届いた時、すでに解凍されていました。大学に届けられてから講座へ届くまでの間、しばらく時間が経過してしまったのかもしれません。

分析方法に関する事項

- 日常業務ではI.S.無添加サンプル(n=1)ならびに、I.S.添加サンプル(n=2、エタノールN.D.の場合はn=1)を測定している。
- エタノール分析はヘッドスペースGC/MS法を用いた。NIST標準ライブラリを用いてそれぞれ同定を行った。

質問	回答
<ul style="list-style-type: none"> 通常、結果は小数点第1位で出しているが、どこまでが適当なのでしょうか。 	<ul style="list-style-type: none"> 目的により異なると思います。分析方法や機器の精度として結果は出す場合は、バリデーションなどを行って判断します。一方、エタノールの血中濃度から精神・運動作用を評価する場合は小数点第1位で問題無いと思います。それより詳細な数値での症状の違いは成書には記載はありません。
<ul style="list-style-type: none"> エタノールの他に、どのような物質を測定しているのかを(各機関で)知りたいと思いました。 	<ul style="list-style-type: none"> 腐敗または病態生理の指標として n-プロパノール、アセトン、アセトアルデヒド、その他の乱用有機溶剤スクリーニングやガソリン・灯油成分の検索としてメタノールやトルエン、キシレン、エチルベンゼンなどを同時に分析している機関もあります。
<ul style="list-style-type: none"> 血液が手元に届いた時、すでに解凍されていました。大学に届けられてから講座へ届くまでの間、しばらく時間が経過してしまったのかもしれません。 	<ul style="list-style-type: none"> 分析結果は他機関の結果と比べて著しい逸脱はありませんでしたので、解凍による明らかな劣化は確認できませんでした。

3. 薬物スクリーニング分析結果

【分析機器】

分析機器	機関数
GC/MS・LC/MS/MS 併用	13
LC/MS/MS のみ	13
GC/MS のみ	4
GC/MS・LC/MS 併用	1
GC/MS/MS のみ	1
GC/MS/MS・LC/MS/MS 併用	1

【併用の理由】

- ◆ 主要な理由は以下であった。

- ①それぞれに長短があり、それを相互に補完するため。
- ②2種の方法で確認するため。

併用の理由(詳細)

- ・ 以前から NAGINATA スクリーニングを行っていて、そちらで検出されやすいものもあるので、念のため。
- ・ 複数の分析法で検出できるか確認する。ターゲット以外の化合物について情報を補う。
- ・ バルビツール酸系薬毒物とベンゾジアゼピン系薬毒物の2系統に分けて抽出と分析をしており、上記3種(GC/MS、LC-MS/MS、LC)による分析結果を総合的に判断して成績を出している。
- ・ GC-MS/MS : ①NIST 標準ライブラリ ②3 チャンネル SRM スキャン、LC-MS/MS : ①プロダクトイオンスキャン
- ・ GC-MS (NAGINATA 使用)、LC-MS/MS(2種類のスクリーニングメソッド使用)の結果を総合的にみる。
- ・ 各分析法に長短があるので相互に補完している。
- ・ (以下の3つの方法に分けて分析しているから) ①下記以外の薬毒物(向精神薬、違法薬物、自然毒、その他)、②フェネチルアミン系、③シアン、アジ化ナトリウム
- ・ LC-MS/MS をメインとし、GC/MS は LC/MS/MS で検出されないものを補うため、また確認のため行っている。
- ・ それぞれ個別に結果報告書を作成。

【添加化合物】

- ◆ 今回は以下の 2 種とした。

添加化合物	①ジフェンヒドラミン ②エチゾラム
✓ 初回であり基本的な薬物を 2 種程度が適当と判断した。	
✓ ジフェンヒドラミンは市販薬での中毒が頻発している。	
✓ エチゾラムはベンゾジアゼピン系類似薬物で 2016 年までは向精神薬に指定されておらず、乱用も多い薬物。	

【各機関の検出結果】

対象 2 化合物の検出状況	機関数
ジフェンヒドラミン、エチゾラム両物質検出	28
ジフェンヒドラミンのみ検出	4
エチゾラムのみ検出	なし
いずれも不検出	1

- ◆ 33 機関中 28 機関(85%)で対象 2 化合物を検出した。

【対象 2 化合物以外の検出化合物】

化合物	報告機関数	化合物	報告機関数
カフェイン*	21	グリベンクラミド	1
ニコチン	6	クロルフェニラミン	1
ゾテピン	6	ブロチゾラム	1
コチニン	4	ガバペチン	1
トリアゾラム	3	サリチル酸	1
メキタジン	2	リドカイン	1
テオフィリン*	2	* 試料調整機関確認化合物	

- ✓ 試料調整機関で確認した化合物以外にも多数の化合物が検出されていた。
✓ 市販の血液を用いていることから、その他の薬物などの混入は避けられない。
✓ 試料調製機関でも詳細分析には限界があり、参加者が検出した化合物が実際に含まれているか否かの回答は、残念ながら今回のテストでは困難である。

【コメント】

コメントの種類	機関数
自機関の検査法の詳細	6
検出化合物に関する事項	3
記入方法に関する事項	1

[コメントの詳細]

自機関の検査法の詳細

- 当教室が標準品として保有している薬物(ベンゾジアゼピン類 28種、バルビツール酸類 2種、その他の向精神薬 51種、覚醒剤 2種、感冒薬成分 5種)についてスクリーニング検査を行った。
- 実際には試料 0.5ml を Free 体として GC/MS へ、0.5ml をアセチル化体に誘導体化して GC/MS を行っています。抽出も 0.5ml ずつで行っています。(0.5ml を 2 本抽出)
- 約 270 成分程度をターゲットしてスクリーニング。
- 今回検出した薬物は LC-MS/MS、GC/MS の両者で確認。
- ①下記以外の薬毒物(向精神薬、違法薬物、自然毒、その他)、②フェネチルアミン系、③シアン、アジ化ナトリウム、②③では特に何も検出されず。
- 検体使用量について、通常は LC-MS/MS で 0.5ml、GC/MS の NAGINATA(フリー)で 0.5ml、NAGINATA(アセチル化)で 0.5ml の計 1.5ml を使用しているが、今回は使用量削減のため NAGINATA のフリー測定後の抽出液を用いてアセチル化を行った。

検出化合物に関する事項

- 血液中よりジフェンヒドラミンを検出した。
- カフェインとニコチンが検出されました。スクリーニングで治療域の範囲内であったため、定量分析はしませんでした。
- GC-MS/MS 分析においてはカフェイン、ジフェンヒドラミン及びエチゾラムが検出され、それぞれ同定を行った。LC-MS/MS 分析においてはジフェンヒドラミンおよびエチゾラムが検出され、それぞれ同定を行った。

記入法に関する事項

- 記入方法がわかりにくいです。
- ◆ 多数の機関で分析方法の詳細を記載。
- ◆ 記入方法の改善をする。

【前処理方法】

[LC-MS 及び LC-MS/MS 分析における前処理方法(28 方法)]

前処理法	機関数	追加処理	機関数	備考
除タンパク法	9	特記無し	8	液-液抽出(2 機関)
		リン脂質除去	1	
QuEChERS 法	7	特記無し	6	
		リン脂質除去	1	
固相抽出法	4	特記無し	1	
		リン脂質除去	3	
分散固相抽出法	4	特記無し	4	
その他	2	特記無し	2	抽出法未記載
記載なし	2		2	

- ✓ 「QuEChERS 法」との記載がある場合は別に分類した。
- ✓ Captiva 類はリン脂質除去とした。
- ✓ 「その他」で除タンパクとある場合は「除タンパク法」に分類した。

[GC-MS 及び GC-MS/MS 分析における前処理方法(21 方法)]

前処理法	機関数	追加処理	機関数
分散固相抽出法	6	特記無し	6
		リン脂質除去	2
QuEChERS 法	5	リン脂質除去+カラムによる酸性・塩基性薬物同時抽出法	1
		分散固相	1
		特記無し	1
液-液抽出法	3	特記無し	3
除タンパク	2	特記無し	1
		リン脂質除去	1
珪藻土、液-液分配	1	特記無し	1
微量拡散法	1	特記無し	1
その他	1	詳細記載なし	1
記載なし	2		2

- ✓ Captiva 類はリン脂質除去とした。
- ◆ LC 系分析では除タンパク法と QuEChERS 法が、GC 系の分析では分散固相抽出法と QuEChERS 法を前処理法として採用している機関が多かった。

【内部標準物質】

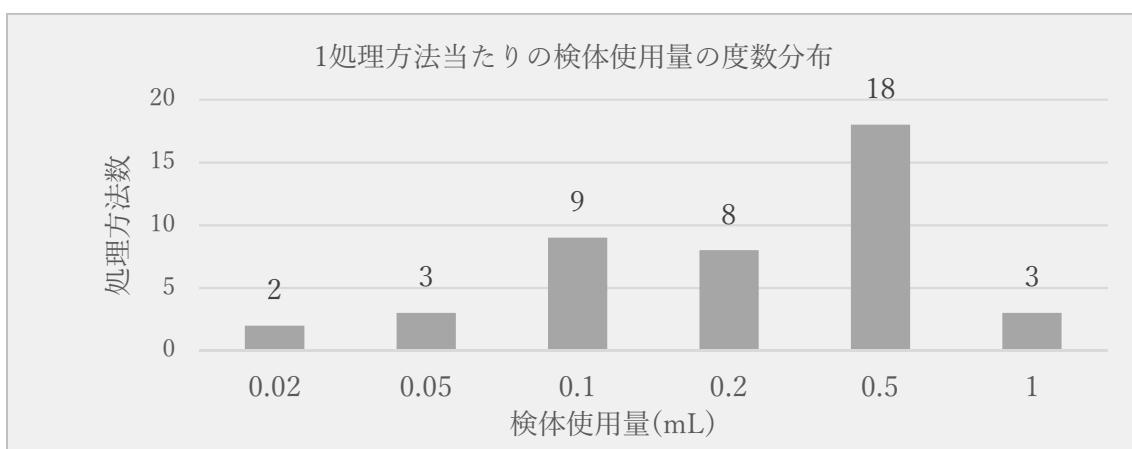
内部標準物質	機関数
d5-ジアゼパム	12
d5-ジアゼパム、d5-フェノバルビタール	7
d3-ジフェンヒドラミン	1
d5-エスタゾラム	1
d5-ジアゼパム、d3-エチゾラム	1
d5-ジアゼパム、d6-ベガフィブラー	1
d5-ジアゼパム、d6-イミプラミン、ミクリジン、d4-リスペリドン	1
ペルフェナジン(固相抽出)、フェナセチ ^ン (除タンパク)	1
QuEChERS : d5-ジアゼパム、d5-フェノバルビタール	1
珪藻土—液液分配—TFA 誘導体化 : 3-フェニルプロピルアミン	1

- ✓ 記載のあった 26 機関で集計
- ◆ d5-ジアゼパムは 26 機関中 23 機関(88%)で採用されており、最多であった。
- ◆ 1 化合物の機関が 14 機関、2 化合物以上の機関が 12 機関であった。

【検体使用量】

- ✓ 1 機関内でも分析機器等により 2 種以上の前処理方法を採用している場合があり、それらは各 1 方法として集計した。
- ✓ 計 43 方法(前処理方法①31 機関、前処理方法②12 機関)として集計した。
- ✓ 前処理方法と分析機器に関係なく 1 処理方法当たりの検体使用量として集計した。

検体使用量(mL)	前処理方法数
0.02	2
0.05	3
0.1	9
0.2	8
0.5	18
1.0	3



- ◆ 1処理あたり 0.5mL 用いている場合が最多であった。
ただし、配布量が少量とのことで通常より減量した機関もあると考えられる。

【検体使用量と前処理方法、分析機器】

検体使用量(mL)	前処理方法数	前処理方法	内訳	分析機器	内訳
0.02	2	分散固相抽出	1	LC-MS/MS	1
		固相抽出	1	LC-MS/MS	1
0.05	3	除タンパク	2	LC-MS/MS	1
		QuEChERS	1	LC-MS/MS	1
		除タンパク	6	LC-MS/MS	6
0.1	9	固相抽出	2	LC-MS/MS	2
		液-液抽出	1	GC/MS	1
		QuEChERS	2	LC-MS/MS	1
		分散固相抽出	2	GC/MS	1
0.2	8	除タンパク	1	GC/MS	1
		液-液抽出	1	LC-MS/MS	1
		珪藻土+液-液抽出	1	GC/MS	1
		その他	1	GC/MS	1
		分散固相抽出	9	LC-MS/MS	6
0.5	18	QuEChERS	2	GC/MS	3
		QuEChERS+ 分散固相抽出	2	LC-MS/MS	1
		QuEChERS+ カラムによる酸性・塩基性薬物同時抽出法	1	GC/MS	1
		除タンパク	1	GC/MS	1
		固相抽出	1	LC-MS/MS	1
1.0	3	その他	2	GC/MS	1
		分散固相抽出	2	GC/MS	2
		固相抽出	1	GC/MS	1

◆ 検体使用量が少量の場合は LC 系の分析方法である傾向がみられる。

- ◆ 1分析当たり検体を 0.5mL 使用している分析が最多であったが、0.5mL 使用している 18 分析中、固相分散抽出法が最多の 9 分析で、そのうち分析機器は 6 分析が LC-MS/MS、3 分析が GC-MS であった。
- ◆ 2 番目に多かった検体使用量は 0.1mL であり(9 分析)、そのうち除タンパク法が最多の 6 分析で、分析機器は LC-MS または LC-MS/MS であった。

4. 薬物定量分析結果

【添加濃度】

添加化合物	調製濃度(µg/mL)	調製機関分析濃度(µg/mL)	
ジフェンヒドラミン	1	1.04	
エチゾラム	0.1	0.112	
✓ 中毒症状が出現すると推定される濃度かつ切りの良い濃度に設定した(下表参照)。			
化合物	治療域	中毒域	致死域
ジフェンヒドラミン	0.05-1	1-4	5-10
エチゾラム	0.008-0.02	0.038	0.264

薬毒物情報インデックスより

【分析機器】

分析機器	機関数
LC/MS/MS	17
GC/MS	1
LC-MS/MS と GC/MS	1
LC-QTOF	1
記載なし	2

◆ 記載のあった 20 機関中 19 機関(95%)が LC 系を用いていた。

【分析方法】

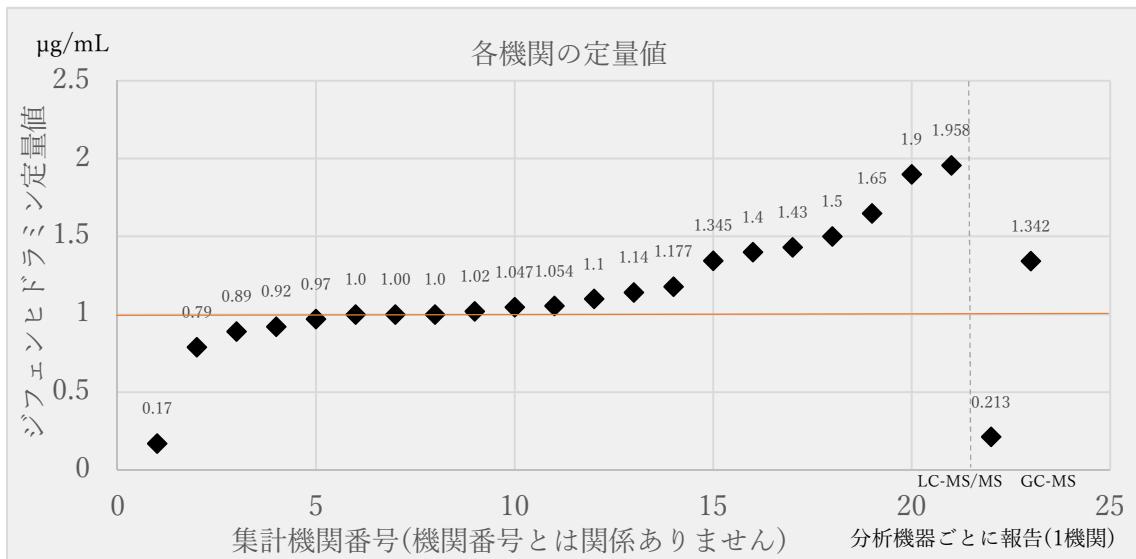
定量分析方法	機関数
内部標準法	16
標準添加法	2
内部標準法と標準添加法	1
絶対検量線法	1
記載なし	2

◆ 記載のあった 20 機関中 16 機関(80%)で内部標準法を用いていた。

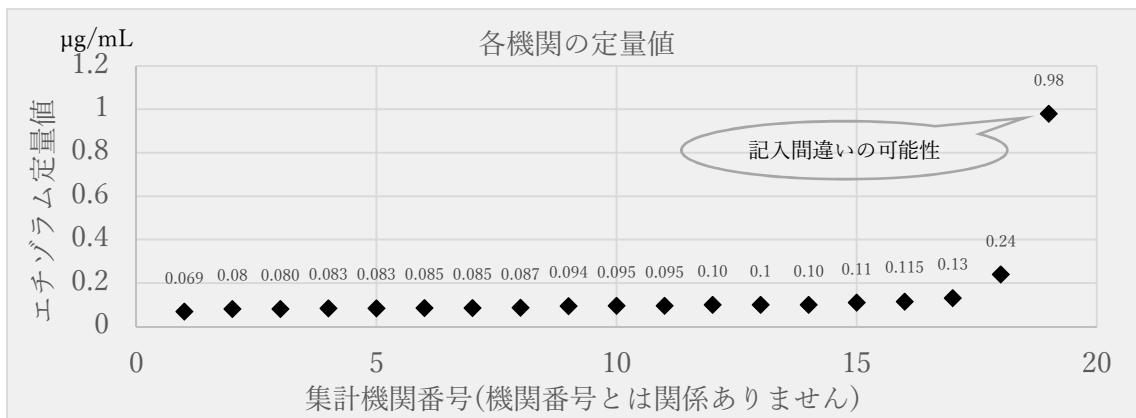
◆ 配布量少量のため通常は標準添加法を用いているが、今回はその他の方法で分析した機関もあり。

【各機関の定量値】

[ジフェンヒドラミン] 22 機関で定量値を算出

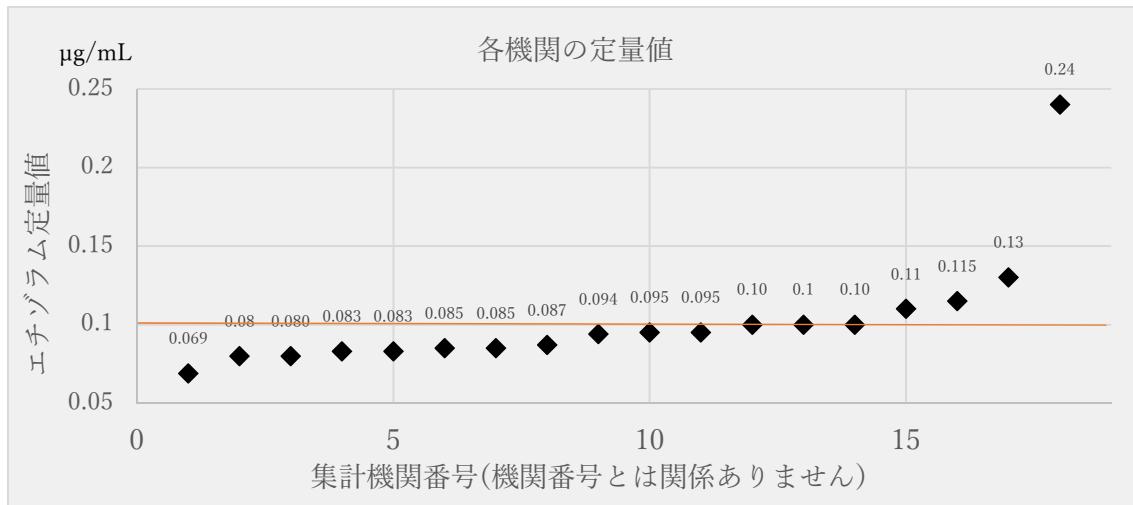


[エチゾラム] 19 機関で定量値を算出



✓ 外れ値が 1 機関あり、記入間違いと推定される。

外れ値を除いた 18 機関で集計



【各機関の定量値の評価】

- ◆ どの程度までが受容可能な分析値かは、各機関、各分析者の判断による。
- ◆ 血中濃度と症状との関連という立場であれば、今回の対象化合物の場合、桁が変わることでなければ問題ないと推定される。

【対象 2 化合物以外の化合物の検出濃度】

化合物	報告機関数	各機関の定量値(µg/mL)	調製機関提示値(µg/mL)
カフェイン*	21	1.00 1.1 1.33 3.158(LC-MS/MS) 1.198(GC/MS)	1.23
ニコチン	6	0.302(GC/MS)	
ゾテピン	6	0.001 0.002 0.006 0.02 未満	
トリアゾラム	3	0.013 0.09	
メキタジン	2	0.001	
テオフィリン*	2	0.88	1.20
グリベンクラミド	1	0.006(LC-MS/MS)	
クロルフェニラミン	1	0.011	
プロチゾラム	1	0.008	

- ✓ 定量値の記入があった場合のみ記載。
- ✓ LC-MS/MS、GC/MS と分析機器が示されているものは 1 機関内でそれぞれの機器で分析した値を示す。

【内部標準物質】 18 機関で記載あり。

内部標準物質	機関数
d5-ジアゼパム	10
d5-エスタゾラム	1
d5-ジアゼパム、d3-ジフェンヒドラミン	1
d5-ジアゼパム、d5-フェノバルビタール	1
d5-ジアゼパム、d3-エチゾラム	1
d5-ジアゼパム、d6-イミプラミン、ミクリジン、d4-リスペリドン	1
d5-ジアゼパム、クロルフェニラミン	1
ジフェニルピラリン、プロチゾラム、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、ドチエピン	1
フェナセチン	1

- ◆ 内部標準物質は最少で 1 物質(12 機関)、最多で 4 物質(2 機関)を用いていた。
- ◆ d5-ジアゼパムは 18 機関中 15 機関(83%)で採用されていた。
- ◆ 6 機関では 2 種以上の物質を内部標準として採用していた。

【前処理方法】

[LC-MS/MS 及び LC-QTOF 分析における前処理方法(19 機関)]

前処理法	機関数	追加処理	内訳	備考
除タンパク法	7	特記無し	6	
		リン脂質除去	1	
QuEChERS 法	3	特記無し	1	
		リン脂質除去	1	
分散固相抽出法	4	分散固相	1	
		特記無し		
固相抽出法	3	特記無し		
その他	1		ギ酸アンモニウム添加、アセトニトリル液-液抽出	
記載なし	1		詳細記載なし	

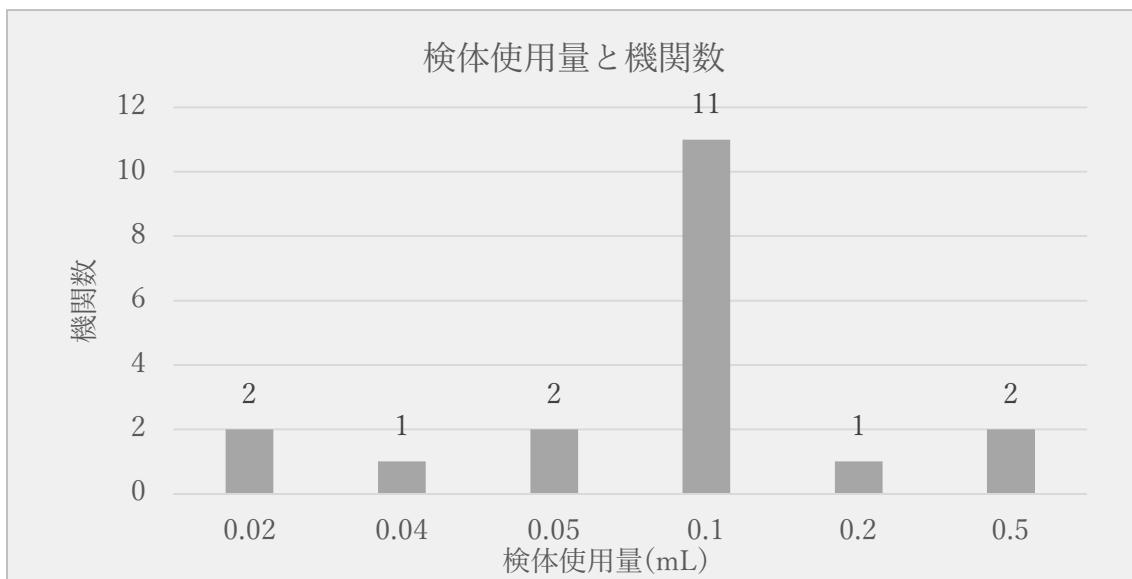
- ✓ 「QuEChERS 法」との記載がある場合は、分けて分類した。
- ✓ Captiva 類はリン脂質除去とした。

[GC-MS 分析における前処理方法(2 機関)]

前処理法	機関数	追加処理	コメント
固相抽出法	1	特記無し	
記載なし	1		詳細記載なし

【検体使用量】

検体使用量(mL)	機関数
0.02	2
0.04	1
0.05	2
0.1	11
0.2	1
0.5	2
0.1、0.04、0.01、0.004 の各 2	1



- ◆ 記載のある 20 機関中、11 機関(55%)では 0.1mL の検体量で定量分析を行っていた。
- ◆ ただし、配布量少量のため通常業務より少量で分析した機関もある可能性がある。

【検体使用量と前処理方法、分析機器】記載のあった 20 機関

検体使用量 (mL)	機関 数	前処理方法	内 訳	分析方法	内 訳	分析機器	内 訳
0.02	2	固相抽出	2	標準添加法 内部標準法	1 1	LC-MS/MS LC-MS/MS	1 1
0.04	1	除タンパク	1	内部標準法	1	LC-MS/MS	1
0.05	2	除タンパク QuEChERS	1 1	内部標準法 内部標準法 内部標準法 標準添加法	1 1 3 1	LC-MS/MS LC-MS/MS LC-MS/MS LC-MS/MS	1 ¹⁾ 1 3 1 ²⁾
0.1	11	除タンパク	6	内部標準法と 標準添加法	1	LC-MS/MS	1 ²⁾
				絶対検量線法	1	LC-QTOF	
		分散固相抽出	3	内部標準法	3	LC-MS/MS	2
		固相抽出	2	内部標準法	2	LC-MS/MS GC/MS	1 1
0.2	1	QuEChERS	1	内部標準法	1	LC-MS/MS	1
0.5	2	QuEChERS 分散固相抽出	1	内部標準法	1	LC-MS/MS	1
0.1、 0.04、 0.01、 0.004 の各 2	1	ギ酸アンモニ ウム添加、ア セトニトリル 液-液抽出	1	内部標準法	1	LC-MS/MS	1

1)この機関は 0.05mL×2 で分析。

2)この 2 機関は 0.1mL×4 で分析。

5. その他(ご意見・ご要望など)

[概要]

分類	件数	内容	内訳
配布した試料の量や質に関する事項	6	配布量の増量 凝血を含まないように	5 1
テストのあり方に関する事項	4		

[詳細]

配布した試料の量や質に関する事項

- 本施設のマニュアル通りに検査を実施した場合、今回提供された血液 2ml では検体量不足となるため、検体量を減らして前処理を実施した。再検査や検体保存等のことを考慮すると、10ml 程度の検体量提供が望ましいです。
- 試料量をもう少し多くしてほしかった。
- LC と GC をそれぞれダブルでやりましたので、アルコールの検査が出ませんでした。もう少しサンプル多くください。
- 標準添加法での定量を考えていたが、送付されてきた試料量が少なかったので断念した。
- 普段行っている方法ではアルコール検査+スクリーニングで 2.5-3.0mL の検体を消費しており、今回は足りなかった。
- 検体に凝血が含まれていましたので、次回は凝血ができないよう作成していただけと助かります。

テストのあり方に関する事項

- ブラインドテストも有益だと思いますが、予め濃度が分かった上で測定して、どの程度バラツキが出るのかも結構大切だと思います。是非又このような機会があれば参加したいです。
- 代謝物がないので、本当に飲んでいるのか確認できない。尿などの他の試料がない。血中の未変化体のみで含有を判断するようなことは通常行っていないので、これは単なるクイズであり分析の確かさを吟味するものではないと思う。
- LC/MS/MS の MRM で分析しているので、見落としがあればそれはチャネル数の問題ではないのか？
- このような機会を作っていただきありがとうございます。
- 使用量見直しのため、今後セミナーなどで一般的な装置で少ない検体量で行える分析方法をレクチャーしてほしい。

- ◆ 配布試料に関する事項は今後検討いたします。ご意見を頂けましたらと思います。
- ◆ 「ブラインドテストの今後のあり方と方針」でお答えします。

ご協力頂きましてありがとうございました。

皆様のご意見を伺いつつ、より良い制度へ発展できますように検討を重ねていきたいと思います。忌憚のないご意見、ご感想を頂けましたらと思います。

ブラインドテストの今後のあり方と方針

【はじめに】

昨年の第9回法医中毒研究会セミナーで、「法医中毒薬物検査登録機関規程（案）」を説明させて頂きました。この規定は、死因究明、法医剖検診断のための薬毒物分析機関の充実を図ることを目的として、日本法医学会として、薬毒物分析機関を登録する制度です。現在、教育研究委員会、理事会で検討頂いているところです。この規定の中で、「毎年、分析精度管理検査を受審すること。」と規定しております。

今回ブラインドテストは、この分析精度管理検査の試行として実施するものです。即ち、「質の管理(クオリティーコントロール)」を行っていこうという考えのもとで始めた試行テストです。「ブラインドテスト」と銘打ち、それに準じた手続きで行いましたが、今後どのようにクオリティーコントロールを行っていくべきか、そのために必要なテストはどのようなものであるべきかをこの試行テストをたたき台として会員の皆さんで考えていきたいと思います。

下記のテストの目的、今後の選択肢、実施機関やテスト参加者の声などを参考にご意見を頂ければと思います。

【多施設参加のテストの目的】

国内外で行われている各種テストの目的には以下のようなものがあると考えられます。

【目的】

- ① 施設の認定(登録)に必要：ある一定の設備や検査技術を有することを認定(登録)
 - ② 分析者の分析技術や精度の研鑽
 - ③ 分析技術の改善、共有
-
- ✓ 諸外国では一般に、司法領域は当然のこととして、公正・中立な結果が必要である場合には国などが基準を定めて行わせる①の場合が多いと思われる。
 - ✓ 日本でも環境分析、農薬分析、食品分析などの分野では国の定める基準に合格した機関だけがその検査を行うことができる制度を採用している。
 - ✓ 法医分野における薬毒物分析担当者の「自分の結果が正しいか不安、何か指針があれば」という声にも答えられるものと思われる。

【今後の選択肢】

以下の項目をご検討の上、今後の方針についてご意見を頂けましたらと思います。

[意義]

- ① 認定(機関登録)を利用する。
- ② 分析技術の確認及び自己研鑽に用いる。
- ③ 特殊ではあるが重要な化合物の分析に挑戦する。

[効果・利用]

- ① 認定証、参加証(機関登録証)などを発行する。
- ② 逸脱した結果となった機関には適切な助言や改善の方法を教授する。
- ③ 分析対象化合物の指針や各種化合物の妥当な検出範囲設定を利用する。
- ④ 分析マニュアルの改善・充実に用いる。

[試料配布方法]

- ① 濃度既知の試料を配布する。
 - ② 物質既知、濃度未知の試料を配布する。
 - ③ 未知試料を配布する。
- ✓ 認定や認定証発行については、法医中毒研究会独自で行うことは可能であるが、法医学会との連携で初めて意味のあるものになる。現在目指している構想である。
- ✓ 既知濃度の試料配布は臨床検査領域ではよく行われている。自機関の精度管理及び全国一律の基準値設定などに用いられる方法である。
- ✓ 下記のテスト例などを組み合わせて、または年毎に変えて実施することも可能と思われる。
- ✓ 未知試料を配布し、回答締め切り後、速やかに物質名、濃度を公表し、各機関が、検証できるようにする。そのうえで、セミナーで結果報告、事例報告を行う。

[具体例]

ブラインドテスト	未知化合物をスクリーニング
定量値検定テスト	濃度既知化合物の定量分析
希少化合物分析	重要であるが希少または分析困難化合物の分析の試み

【実施機関】

継続して行うためには実施機関を定めておくことが必要です。

[実施機関]

①法医中毒研究会で実施

- ・選出委員またはその依頼機関が共同して行う。
- ・研究会内に委員会を設置して行う。

②法医学会で実施

- ・教育研究委員会の法医中毒ワーキンググループ (FTWG)で行う。
- ・法医学会内に薬毒物分析クオリティーコントロール委員会を置いてそこで行う。

③外部機関に依頼する(検査会社や試薬会社など)

- ・どのように予算を確保するかが問題。

- ✓ FTWG は教育研究委員会の下部組織、兼法医中毒研究会の運営委員でもある。
- ✓ 法医中毒研究会は法医学会とは独立した組織ではあるが、ホームページや分析マニュアルは法医学会の予算で行っており、研究会運営委員は FTWG メンバーである。
- ✓ 今回は福岡大学法医学教室及び薬毒物探索解析研究所の協力で試料調製を行って頂いたが、今後継続してお願いすることは難しい。
- ✓ 外部機関に依頼することで、第三者性を担保することが、本来のブラインドテストである。国内で依頼できる外部機関を探すことが難しいのが現状である。

【参加者からの意見】

参加者からは様々な有用な意見を頂きました。以下は今後の方針についてのご意見を抜粋したものです。

- ① ブラインドテストも有益だと思いますが、予め濃度が分かった上で測定して、どの程度バラツキが出るのかも結構大切だと思います。是非又このような機会があれば参加したいです。
- ② 代謝物がないので、本当に飲んでいるのか確認できない。尿などの他の試料がない。血中の未変化体のみで含有を判断するようなことは通常行っていないので、これは単なるクイズであり分析の確かさを吟味するものではないと思う。
- ③ LC/MS/MS の MRM で分析しているので、見落としがあればそれはチャネル数の問題ではないのか？
- ④ このような機会を作っていただきありがとうございます。
- ⑤ 使用量見直しのため、今後セミナーなどで一般的な装置で少ない検体量で行える分析方法をレクチャーしてほしい。

[回答]

①のご意見は、臨床検査分野でよく行われている方法で、全国の各分析施設が同程度の結果

を提出できるようにという目的で始められたものです。対象化合物を定めて順次行っていくことにより、参加機関内での分析の質の確保に有用です。今後の方針の候補となります。未知試料を配布し、回答締め切り後、速やかに物質名、濃度を公表し、各機関が検証できるようにすることで、ご意見のような検証も可能と考えます。

②のご意見は、非常に実務に即したご意見です。実検体での検出・不検出を判断する場合には必須の考え方です。このような実地に即したテストも将来展望としては重要です。現状では法医学分野の薬毒物分析担当者は幅が広く、このようなテストは非常に発展的な内容で試料調製も複雑になると思われます。今後の課題といたします。今回は一般的な化合物を一定の精度で分析できているか否かを外部の評価から確認したいという要望に応える目的、また分析機関が行うべき基本的な質管理の部分を構築する目的で行いました。ご了承頂きたいと思います。

③ご指摘の通り MRM はターゲット分析ですので、今回の化合物が分析対象となつていなければ検出されません。対象薬物数(チャネル数)をどのように設定するかは基本的かつ重要な問題ですが、現時点ではその指針はございません。本来ならば学会などがそれらを提示することが必要と思われます。今回の化合物は、法医解剖例の薬毒物検査で比較的よく遭遇する化合物ということで選定いたしました。今後テスト対象とすべき化合物についてご意見を頂けましたらと思います。

④このようなご意見を数件いただいております。通常業務は確信をもって行つてはいるが、やはり外部からの評価でもそれを確認しておきたいと考えている会員がおられることを示していると解釈しております。基本的な質管理へのサポートが現時点では重要だと考えております。

⑤試料は十分量を確保して鑑定に臨むことが基本ではありますが、消費量を最小限にできるような方法を採用することも重要です。また、再鑑定に備えるために、試料を残すことも重要です。今回のテストを少量で分析を行つてはいる先生方から助言を頂けましたらと思います。今後、薬毒物分析マニュアルにおいても、分析試料の量を提示したいと思います。なお、分析に使用した試料の量については、本要旨集の「第1回ブラインドテストの準備及び実施の実際」の項を参照下さい。

【実施者・結果解析者からの意見】

- ① テスト参加機関と回答用紙との連結を完全になくすと、記入漏れや記載内容の確認ができず、十分な結果が提供できない。会員からのご意見を頂きたい。
- ✓ ブラインドテストにおいて連結すると、機関ごとの測定結果(精度)が、テスト実施組織において明らかなることで、参加を控えることが危惧された。記入漏れ、記載内容の確認については、セミナー等での結果報告を踏まえて、各参加機関が自律的に行うこととして、今回は、連結しない方法、二重盲検法で実施した。
- ✓ 二重盲検法 (Double blind test) とは、特に医学の試験・研究で、実施している薬や治

療法などの性質を、医師(観察者)からも患者からも不明にして行う方法である。

- ✓ 第三者機関に業務委託する場合は、連結方式がとれると考える。

【おわりに】

先進諸外国では法医薬毒物検査を行う機関は公的機関から分析機器や人員、分析結果の質などに関して何等かの規制または認証を受けているのが一般的です。しかし、日本にそのような制度はなく、分析の質の管理は個々の機関に任せられているのが現状です。

法医鑑定は中立な立場で公正に行う科学鑑定であり、司法判断に大きな影響を与える場合もあります。法医鑑定が科学鑑定であるならば、科学の一つの重要な要素である再現性、「いつ、どこで、だれが行っても同じ結果」が確保されるべきでしょう。法医中毒研究会は、日本法医学会としての登録機関制度を目指しております。

大学等医育機関における薬毒物分析の教職員の人数の現状は厳しく、薬毒物分析を行っている機関で 1-2 名程度という現状で、疑問や不安を持ちながら日々の業務に向かっている方もいると思います。法医中毒研究会ではクオリティーコントロールを含むテストなどを行うことで、それらを解消するとともに会員相互で情報を共有できる環境を築きたいと考えております。学会としての登録機関制度とすることで、死因究明に関わる機関・法医学教室が、薬毒物分析機関の機能を有することになり、薬毒物分析に関わる人材および予算の確保につながることを目指しております。

ブラインドテストの今後のあり方や方針、要望につきまして、皆さまの忌憚のないご意見をお待ちしております。

エチゾラム中毒事例とその分析

奈女良 昭

広島大学大学院医系科学研究科法医学

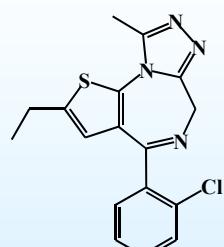
第9回法医中毒研究会セミナー(2020.3.19)

エチゾラム

エチゾラム(Etizolam)はチエノトリアゾロジアゼピンに分類され、ベンゾジアゼピン系の薬物と薬理効果を示す。

エチゾラムは日本で開発され、現在、日本、イタリア、インドにおいて医薬品登録されている。

主に抑うつ症状を伴う全般性不安障害の治療に用いられる。エチゾラム(1日2回0.5mg)による治療効果は、アルプラゾラム(1日2回0.5mg)およびプロマゼパム(1日2回3mg)に匹敵する。



性状: 白色～微黄白色の結晶性の粉末

溶解性: クロロホルムに溶けやすく、エタノールにやや溶けやすく、無水酢酸又は酢酸エチルにやや溶けにくく、エーテルに溶けにくく、水にほとんど溶けない。希塩酸に溶ける。

融点: 146～149°C

各抗不安薬・睡眠薬の処方人数(n=3,257)、処方率、投与量

薬剤名	処方人数 (人)	処方率 (%)	投与量(mg/日)			薬剤名	処方人数 (人)	処方率 (%)	投与量(mg/日)		
			平均	最小	最大				平均	最小	最大
Flunitrazepam	856	26.3%	1.93	0.5	14.0	Diazepam	99	3.0%	6.9	1	42
Nitrazepam	650	20.0%	9.00	2	70	Clotiazepam	91	2.8%	13.68	2.5	40.0
Brotizolam	594	18.2%	0.305	0.125	1.000	Rilmazafone	78	2.4%	1.73	0.5	6.0
Zolpidem	502	15.4%	7.76	2.5	70.0	Lormetazepam	63	1.9%	1.20	0.5	2.0
Zopiclone	392	12.0%	9.55	3.75	70.00	Tandospirone	56	1.7%	22.1	5	80
Lorazepam	356	10.9%	1.486	0.25	4.50	Flurazepam	48	1.5%	21.3	15	30
Clonazepam	324	9.9%	1.36	0.10	7.00	Clozazolam	35	1.1%	3.3	1	12
Etizolam	323	9.9%	1.39	0.25	9.00	Bromvalerylurea	18	0.6%	0.42	0.1	0.5
Phenobarbital	318	9.8%				Amobarbital	15	0.5%	0.14	0.10	0.20
Phenobarbital	60	1.8%	75.1	10	180	Fludiazepam	12	0.4%	0.583	0.25	1.00
ベグタミンA	132	4.1%	1.4*	1	4	Clobazam	9	0.3%	14.4	5	30
ベグタミンB	140	4.3%	1.25*	0.5	4	Tofisopam	9	0.3%	105.6	50	150
Alprazolam	188	5.8%	1.03	0.2	3.6	Flutoprazepam	6	0.2%	3.0	2	6
Loflazepate	176	5.4%	1.50	0.5	8.0	Pentobarbital	5	0.2%	55.0	50	75
Bromazepam	166	5.1%	8.0	1	25	Nimetazepam	5	0.2%	4.6	3	5
Triazolam	155	4.8%	0.3234	0.125	1.750	Medazepam	3	0.1%	13.3	10	15
Quazepam	132	4.1%	17.73	7.5	30	Chlordiazepoxide	1	<0.1%	20	20	20
Estazolam	123	3.8%	2.03	0.5	4.0						

*:総数

中川敦夫:向精神薬の処方実態に関する国内外の比較研究
(平成22年度 厚生労働科学研究補助金 報告書より引用)

過量服薬の主要な原因薬剤 (上位1位から20位を抜粋)

Substance	Total (n = 676)		Incidence (%) ^a	
	n	%	Prolonged ICU stay	Aspiration pneumonitis
Total	676	100.0	10.2	10.7
1. Flunitrazepam	178	26.3	10.1	15.7
2. Etizolam	121	17.9	8.3	10.7
3. Brotizolam	113	16.7	9.7	12.4
4. Zolpidem	105	15.5	8.6	11.4
5. Chlorpromazine-promethazine-phenobarbital	104	15.4	20.2	28.8
6. Triazolam	103	15.2	10.7	13.6
7. Bromazepam	91	13.5	12.1	16.5
8. Alprazolam	89	13.2	7.9	10.1
9. Valproate	82	12.1	7.3	8.5
10. Nitrazepam	71	10.5	9.9	16.9
11. Levomepromazine	63	9.3	4.8	15.9
12. Acetaminophen	61	9.0	11.5	0.0
13. Paroxetine	59	8.7	13.6	15.3
14. Fluvoxamine	58	8.6	12.1	17.2
15. Lorazepam	48	7.1	8.3	16.7
16. Risperidone	48	7.1	4.2	4.2
17. Diazepam	43	6.4	7.0	11.6
18. Estazolam	43	6.4	14.0	18.6
19. Chlorpromazine	41	6.1	14.6	17.1
20. Clonazepam	41	6.1	7.3	7.3

^a The denominator was the number of patients who ingested a substance and the numerator was the number of incident cases among the patients.
ICU = Intensive care unit

過量服薬入院患者における原因薬剤と臨床経過に関する研究について
PLoS ONE, 11, e0161996, 2016

国内で流通しているエチゾラム製剤

薬剤名	容量	製薬会社名
デパス錠	0.25mg, 0.5mg, 1mg	田辺三菱製薬
デソラム錠	0.25mg, 0.5mg, 1mg	武田デバ薬品
エチゾラム錠「EMEC」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	サンノーパ
エチゾラム錠「JQ」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	長生堂製薬
エチゾラム錠「KN」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	小林化工
エチゾラム錠「NP」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	ニプロ
エチゾラム錠「SW」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	メディサ新薬
エチゾラム錠「TOK」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	辰巳化学
エチゾラム錠「アメル」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	共和薬品
エチゾラム錠「オーハラ」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	大原薬品
エチゾラム錠「クニヒロ」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	皇漢堂製薬
エチゾラム錠「ツルハラ」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	鶴原製薬
エチゾラム錠「トーワ」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	東和薬品
エチゾラム錠「フジナガ」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	藤永製薬
エチゾラム錠「日医工」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	日医工
エチゾラム錠「日新」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	日新製薬
エチゾラム錠「武田デバ」	0.25mg, 0.5mg, 1mg	武田デバ

先発品

1. 神経症、うつ病の場合: エチゾラムとして1日3mgを3回に分けて経口投与する
2. 心身症、頸椎症、腰痛症、筋収縮性頭痛の場合: エチゾラムとして1日1.5mgを3回に分けて経口投与する
3. 睡眠障害に用いる場合: エチゾラムとして1日1~3mgを就寝前に1回経口投与する なお、いずれの場合も年齢、症状により適宜増減するが、高齢者には、エチゾラムとして1日1.5mgまでとする

相当量が流通している。

案生第0914第1号
平成28年9月14日

各〔都道府県知事
保健所設置市長
特別区長〕様

向精神薬に移行

厚生労働省医薬・生活衛生局長
(公印省略)

麻薬、麻薬原料植物、向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令の一部を改正する政令並びに麻薬及び向精神薬取締法施行規則の一部を改正する政令並びに向精神薬取締法施行規則の一部を改正する省令の施行について(通知)

本邦、麻薬、麻薬原料植物、向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令の一部を改正する政令(平成28年政令第306号。以下「改正政令」という。)並びに麻薬及び向精神薬取締法施行規則の一部を改正する省令(平成28年厚生労働省令第147号。以下「改正省令」という。)が公布されましたので、貴職におかれましては、下記事項について御了知の上、向精神薬に指定された物質が應用されることなく適正に使用されるよう、関係各方面に対する周知の徹底と適切な指導をお願い申し上げます。

記

第1 改正要旨

1 改正の趣旨

今般、向精神薬と同種の有効作用及び向精神薬と同種の應用のおそれが確認された物質について、新たに向精神薬として指定するため、麻薬、麻薬原料植物、向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令(平成2年政令第238号)を改正するとともに、自己の病状の治療の目的で携帯輸出入することが可能な向精神薬として、携帯輸出入することが可能な分量と併せて定めたため、麻薬及び向精神薬取締法施行規則(昭和28年厚生省令第14号)を改正した。

2 改正の内容

(1) 次の3物質を新たに向精神薬(第三種向精神薬)に指定したこと。
(改正政令関係)
① (R S) -6 -イソ-クロロビリジン-2-イル) -7-オキソ-2-ジヒドロ-5H-ピロロ[3, 4-b]ピラジン-5-イル=4-メチルピラジン-1-カルボキシラート(別名ソピクロン)及びその塩類
② 4-(2-クロロフェニル)-2-エチル-9-メチル-6H-エノ[3, 2-f][1, 2, 4]トリアゾロ[4, 3-a][1, 4]ジアゼピン(別名エチゾラム)及びその塩類
③ 7-ブロモ-5-(2-クロロフェニル)-1, 3-ジヒドロ-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オノン及びその塩類

※ ①及び②については、現在医薬品として市場流通しているが、すでに規制している向精神薬と同種の應用が確認されたことから改正するもの。③については、向精神薬に関する条約(平成2年条約第7号)第2条第7項の規定に基づき、同条約附表IVに追加する決定が行われた旨の通知があつたことから必要な措置をとったもの。

(2) 次の向精神薬を自己の病状の治療の目的で携帯輸出入することが可能なものとして、携帯輸出入することが可能な分量と併せて定めたこと。
(改正政令関係)
①名称 (R S) -6 -6-(2-クロロビリジン-2-イル) -7-オキソ-2-ジヒドロ-5H-ピロロ[3, 4-b]ピラジン-5-イル=4-メチルピラジン-1-カルボキシラート(別名ソピクロン)、その塩類及びこれらを含有する物
分量 300mg
②名称 4-(2-クロロフェニル)-2-エチル-9-メチル-6H-エノ[3, 2-f][1, 2, 4]トリアゾロ[4, 3-a][1, 4]ジアゼピン(別名エチゾラム)、その塩類及びこれらを含有する物
分量 90mg
③名称 7-ブロモ-5-(2-クロロフェニル)-1, 3-ジヒドロ-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オノン、その塩類及びこれらを含有する物
分量 300mg

3 施行期日等
(1) 施行期日
公布の日(平成28年9月14日)から起算して30日を経過した日(平成28年10月14日)から施行する。

事例の概要

10歳代、男性。

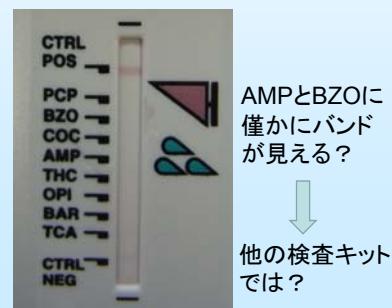
某日午後8時半頃、母親が心中目的で兄弟にエチカーム[®](エチゾラム錠「トーワ」)100錠余りをすりつぶし、アルコールに溶かして飲ませた。

翌日午後10時頃、弟が目を覚まし、母親と兄に意識がなかったため、救急車を呼んだ。母親は病院収容後に意識を回復したが、兄は死亡が確認された。

兄はてんかん治療のため、抗てんかん薬デパケン[®](バルプロ酸)を常用していたとのことである。

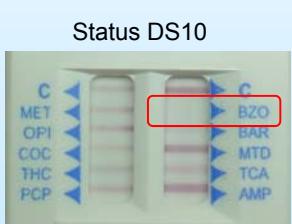
アルコール: 血液・尿 <0.1mg/ml
胃内容 0.3mg/ml
トライエージ: 陰性

バルプロ酸: 血液 17.5 μ g/ml
尿 19.5 μ g/ml

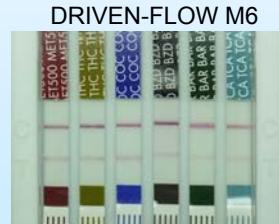


各検査キットの交差反応性

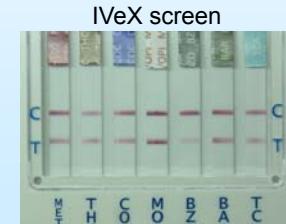
Etizolam and metabolites (ng/ml)	Triage		Status DS10		Driven-Flow M6		IVeX screen	
	25,000	10,000	5,000	1,000	—	+	—	—
25,000	—	+	—	—	—	—	—	—
10,000	—	+	—	—	—	—	—	—
5,000	—	+	—	—	—	—	—	—
1,000	—	—	—	—	—	—	—	—



BZO: 陽性



BZO: 陰性



BZO: 陰性

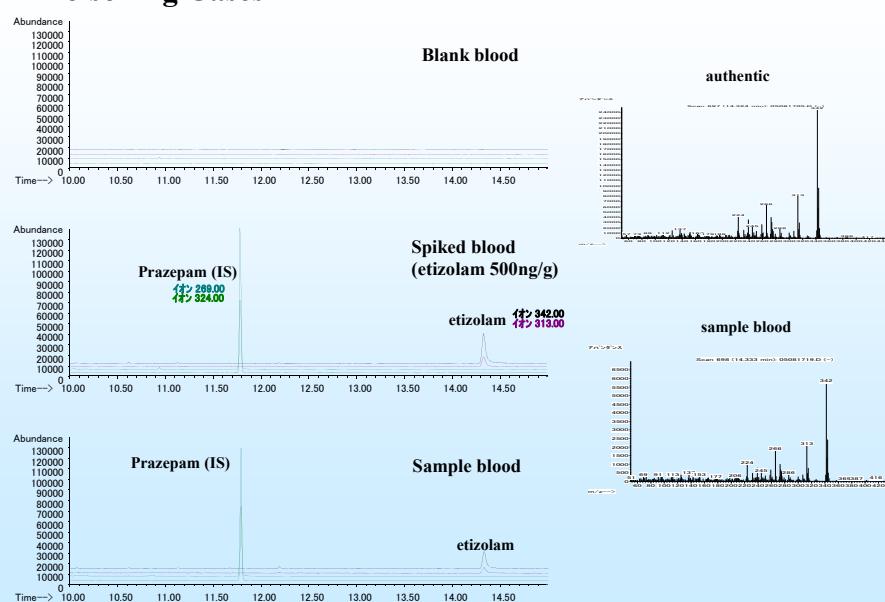
抽出方法と分析条件

1. 血液(尿および胃内容物)0.5g(ml)に内部標準物質(プラゼパム0.1mg/ml)溶液5μlとホウ酸緩衝液(pH 10)1.0mlを加える。
2. トルエン3mlを加えて2分間、転倒混和する。
3. 3,000rpmで5分間、遠心分離し、上層(トルエン層)を新しい試験管に採り、窒素気流下(50°C)で溶剤を留去する。
4. 残渣にトルエン0.1mlを加えて溶解し、その1μlをGC/MSに注入して分析する。

【GC/MS分析条件(Agilent 6890GC/5973MSD)】

coulun:HP-5MS (0.25 mm ID × 30m, film thickness 0.25μm)
oven temp.: 100°C(1min)-20°C/min-300°C(5min)
injector temp.: 250°C
detector temp.: 230°C
carrier: He (1.0ml/min)
injection: splitless (purge off; 1min)
mass range: m/z 50-450 (1.88scan/sec)

Selected Ion Chromatograms of Etizolam and Its Metabolites in Poisoning Cases



過去の報告例

Forensic cases

		Blood concentration	Urine concentration	References
Case 1	59-y F	Etizolam: 263.7 α-OH Etizolam: 7.2 8-OH Etizolam: 11.5		Forensic Sci Int, 182, e1-e6, 2008
Case 2		Etizolam: 270 AH-7921: 330 Methoxetamine: 64 Phenazepam: 1330 7-aminonitrazepam: 43 Diazepam: 46 Nordazepam: 73 Oxazepam: 18		Forensic Sci Int, 244:e21-e24, 2014 the contribution of the combination with several drugs
Case 3	31-y M	Etizolam: 103	Codeine: 322 6-acetyl morphine: 272	Ann Emerg Med, 65, 465-466, 2015
Our case	15-y M	Etizolam: 228.1 α-OH Etizolam: 57.1 8-OH Etizolam: 56.1		Unpublished data

濃度の単位はng/ml

致死濃度は、100～200ng/mlと推察される。

過去の報告例

Forensic cases (the results do not suggest the contribution of etizolam to death.)

		Blood concentration	References
Case 1	49-y M	Etizolam: 25.8 α-OH Etizolam: 9.4 8-OH Etizolam: 9.3	Forensic Sci Int, 182, e1-e6, 2008
Case 2	42-y M	Etizolam: 86 Phenobarbital: 5,000 Promethazine: 107 Chlorpromazine: 144	Soud Lek. 56, 38-39, 2011
Case 3	35-y M	MT-45: 520 Etizolam: 35	J Anal Toxicol, 40, 313-317, 2016

濃度の単位はng/ml

Clinical cases

	Dose	Blood concentration	References
Case 1	6 persons(M) 0.5 mg(Single)	Etizolam: 8.3 (±1.7)	Eur J Clin Pharmacol, 40, 181-185, 1991
Case 2	0.5 mg(Multi)	Etizolam: 9.3 (±1.7) α-OH Etizolam: 9.9 (±4.0)	
Case 3	6 persons(M) 1 mg	Etizolam: 17.7 (±4.0)	Eur J Clin Pharmacol, 60, 427-430, 2004

濃度の単位はng/ml

ブラインドテスト試料について

抽出方法と分析条件(スクリーニング)

- 血液0.1mlに内部標準物質溶液(ジアゼパム-d₅, 0.01mg/ml)5μlとアセトニトリル0.5mlを加え、ビーズ破碎機で10秒間攪拌する。
- 13,400rpmで5分間遠心分離し、上層をCaptiva EMRに通液させる。
- 通過液を窒素気流下(50°C)で溶剤を留去する。
- 残渣を30%メタノール0.1mlを加えて溶解し、その5μlをLC/MSに注入して分析する。

【LC/MS分析条件】

LC/MS: Agilent 1290 LC/6420MSD

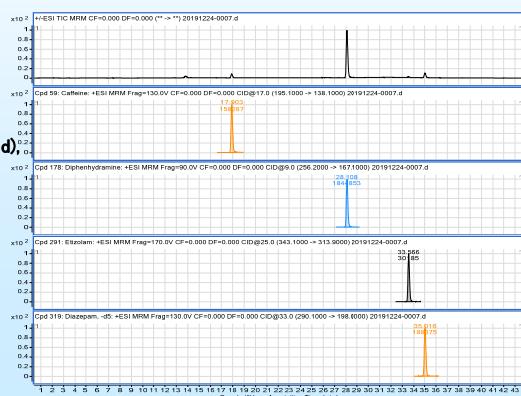
Column: ZORBAX Eclipse Plus C18
(2.1mm ID, 100mm, 3.5μm)

Mobile phase: A: Ammonium formate (0.1% formic acid),
B: Methanol, gradient

Flow rate: 0.2ml/min

Oven temp.: 40°C

エチゾラムとジフェンヒドラミン
を検出



抽出方法と分析条件(エチゾラムの定量)

1. 血液0.1mlに内部標準物質溶液(ジアゼパム- d_5 , 0.01mg/ml)5μlとアセトニトリル0.5mlを加え、ビーズ破碎機で10秒間攪拌する。
2. 13,400rpmで5分間遠心分離し、上層をCaptiva EMRに通液させる。
3. 通過液を窒素気流下(50°C)で溶剤を留去する。
4. 残渣を30%メタノール0.1mlを加えて溶解し、その5μlをLC/MSに注入して分析する。

検量線用試料:

薬物未検出の全血にエチゾラム溶液(10μg/ml)を添加して、100, 50, 20, 10ng/mlになるよう調製する。

検量線の範囲設定:

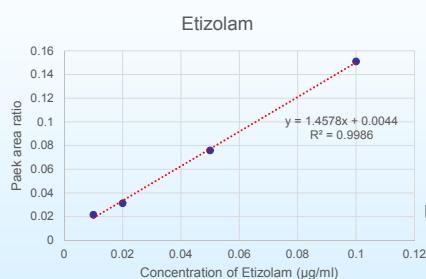
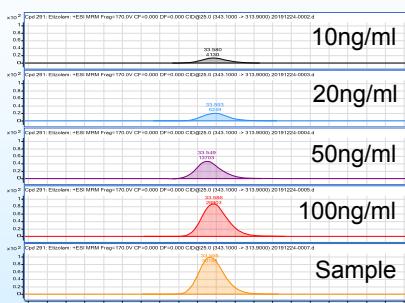
予め作成した同抽出法での検量線を使用して、スクリーニング分析後に概算値を出せるようにし、定量時に用いる検量線幅の参考値に使用している。

【エチゾラムの溶液を検査試料に直接添加すれば、標準添加法になる。】



作成した検量線から、検査試料中の薬物濃度を算出する。

抽出方法と分析条件(エチゾラムの定量)



1. 内部標準物質との面積比を算出する。
2. 横軸に薬物濃度を、縦軸に内部標準物質との面積比をプロットする。
3. 定量したい試料の内部標準物質に対する面積比を算出する。
4. 検量線より、試料中の薬物濃度を読み取る(検量線より算出する)。

エチゾラム
0.10 μg/ml

正解しているか
不安ですが…

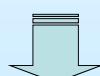
ところで

ベンゾジアゼピン系を分析する際の課題

ベンゾジアゼピン系は、服用後速やかに代謝を受け、その多くはグルクロン酸抱合体として尿中に排泄される(未変化体が検出できないこともある)。

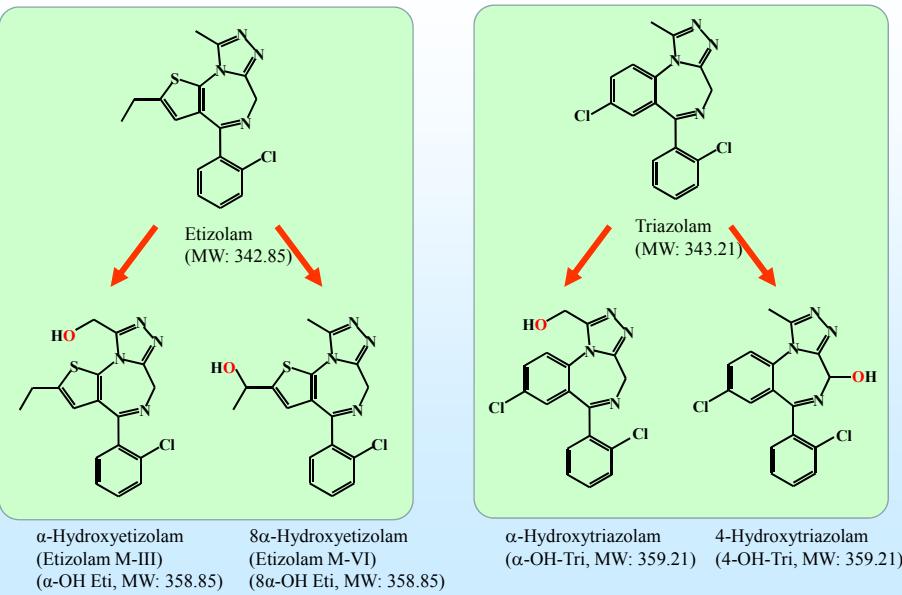
服用薬物を確定するには、排泄された抱合体を分析することが望まれるが、現状ではグルクロン酸抱合体の標準品の入手が困難であるために加水分解した水酸化体を分析している。

また、エチゾラムとトリアゾラムの代謝物のプロトン付加分子イオンは同じ m/z を与えるため、超高速液体クロマトグラフやタンデム型質量分析計などの上位機種での分析が不可欠となる。



UVやPDA、シングルMSなどで分析出来ないか？？
(ベースライン分離できる条件は無いか？)

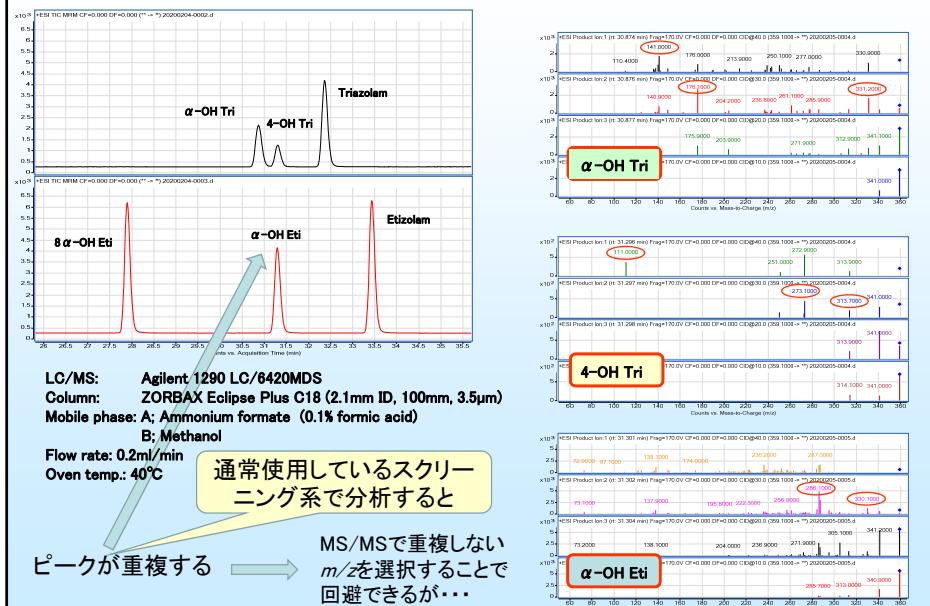
Metabolic Pathways of Etizolam and Triazolam



エチゾラムとトリアゾラム代謝物の入手先

Name	Amount (Concentration)	Catalogue Number	Vender
Etizolam	500mg	057-06811	和光純薬
Etizolam	1.0mg/ml	E-081-1ML	Cerilliant (Merck)
Etizolam-d3	0.1mg/ml	E-082-1ML	Cerilliant (Merck)
α-Hydroxyetizolam	1.0mg/ml	H-129-1ML	Cerilliant (Merck)
Triazolam	500mg	205-14221	和光純薬
Triazolam	10mg	T9772-10MG	Sigma-Aldrich (Merck)
Triazolam	1.0mg/ml	T-910-1ML	Cerilliant (Merck)
Triazolam-d4	0.1mg/ml	T-908-1ML	Cerilliant (Merck)
α-Hydroxytriazolam	5mg	H2529-5MG	Sigma-Aldrich (Merck)
α-Hydroxytriazolam	1mg	BML-J130-0001	ENZO
α-Hydroxytriazolam	1.0mg/ml	T-911-1ML	Cerilliant (Merck)
4-Hydroxytriazolam	5mg	BML-J131-0005	ENZO

エチゾラムとトリアゾラム代謝物の分析例

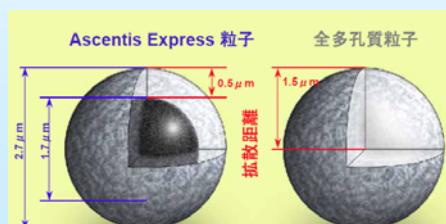


分離改善のアプローチ1

分離能(理論段数)を上げる

カラムを長くする
 粒径の細かいカラムを使用する } 背圧が高くなる
 (カラム圧力・ポンプ圧力)

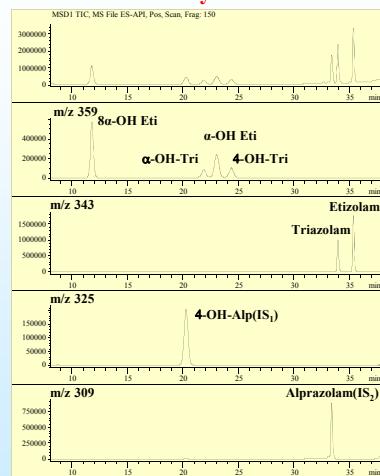
Fused Core typeカラム → 低圧で高分離能



実際は、粒子径3.5μmや5μmの
 カラムに比べると高くなる！！

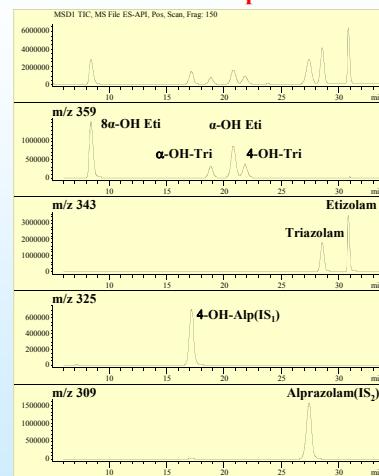
Sellected Ion Chromatograms of Etizolam, Triazolam, and Those Metabolites

A: Discovery® HS F5



Discovery® HS F5 (150 mm, 2.1 mm ID, particle size 3 μ m).
HCOONH₄ (10 mM and 0.1% HCOOH) : CH₃CN = 80 : 20 (v/v).
Flow rate; 0.4 mL/min., Column oven temperature ; 40 °C

B: Ascentis® Express C18



Ascentis® Express C18 (150 mm, 2.1 mm ID, particle size 2.7 μ m).
HCOONH₄ (10 mM and 0.1% HCOOH) : MeOH = 55 : 45 (v/v).
Flow rate; 0.2 mL/min. Column oven temperature ; 20 °C.

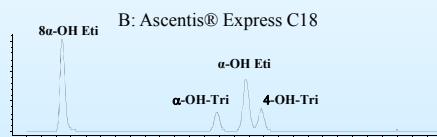
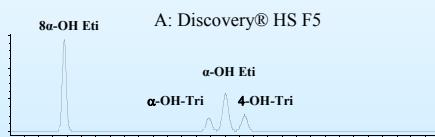
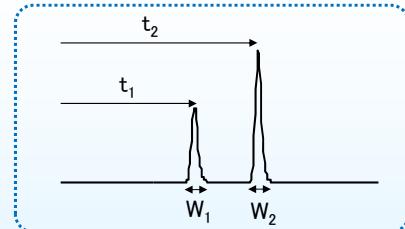
分離できるが、背景が30MPa位になる

AOAC, 94, 765-774, 2011より

Evaluation of Peak Separation in Chromatogram

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

$R_s \geq 1.5$: complete baseline separation



	Column A	Column B
8a-OH Eti ~ α-OH-Tri	15.0	12.8
α-OH-Tri ~ α-OH Eti	1.5	2.0
α-OH Eti ~ 4-OH-Tri	1.6	1.0

分離改善のアプローチ2

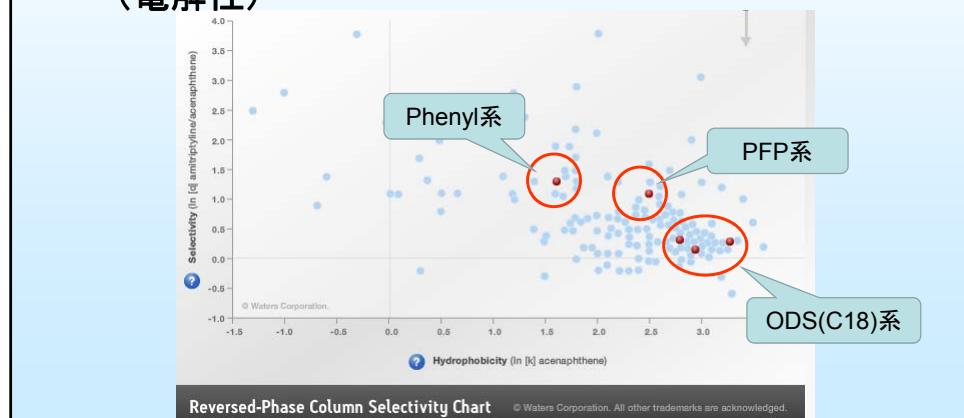
選択性を変える

疎水性の変化

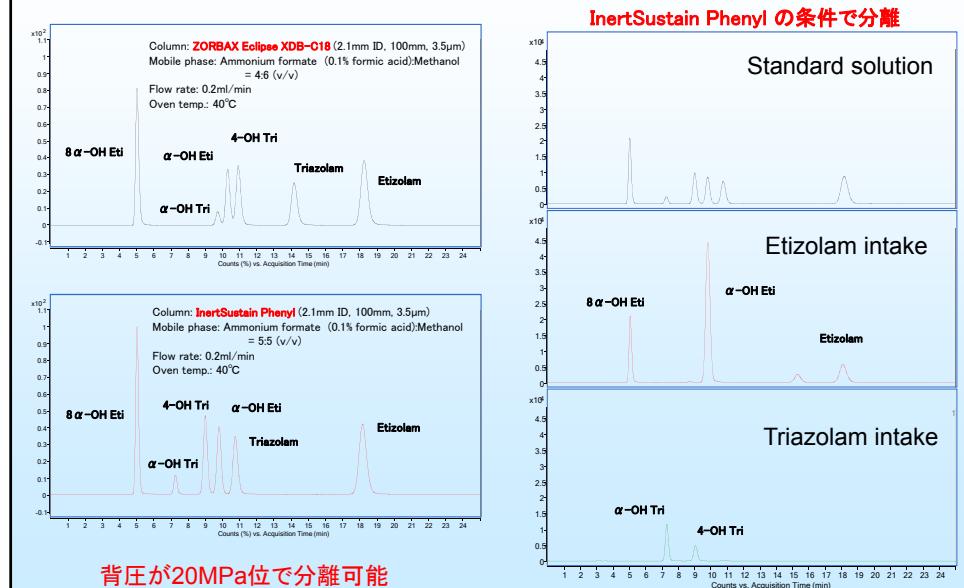
官能基の変化

(電解性)

フェニル基、フェニルヘキシル基、
ペンタフルオロベンジル基など



Complete Separation of Etizolam, Triazolam, and Those Metabolites by isocratic condition and application in Poisoning Cases



前処理方法のアプローチ

	選択性	精製度	
除タンパク 無機・有機物によるタンパク変性 タンパク変性 + リン脂質除去 QuEChERS法	×	△	機器やカラムが汚れる 薬物の抽出漏れが少ない
液液抽出 溶剤抽出 珪藻土カラムの利用	△	○	水溶性化合物には不向き
固相抽出	○	○	選択性の検証が不可欠 (ターゲットを保持できるか)

スクリーニング分析 → 除タンパク

ターゲット分析 → 液液・固相抽出

いずれも溶剤濃縮に時間を要することがネックである。

前処理方法のアプローチ(補足1)

除タンパク法

検査試料に無機・有機物(あるいは有機溶剤)を加えることによって、
タンパクを変性させて試料中の溶解度を下げることで系内から除去
する方法である。

Recent advances in analytical techniques,
Bentham Science Publishers, 2017を改変

Precipitants		% Protein precipitation efficiency						
		Ratio of precipitant to plasma						
		0.5:1	1:1	1.5:1	2:1	2.5:1	3:1	4:1
Acids	Trichloroacetic acid	91.4	91.8	91.5	91.0	91.3	91.3	91.4
	m-phosphoric acid	89.4	90.5	90.3	90.2	90.7	90.5	90.0
Metal ions	Zinc sulphate	89.2	98.8	96.8	99.0	98.0	99.0	>99.9
	Acetonitrile	3.6	88.7	91.6	92.1	93.2	93.5	94.9
Organic	Ethanol	0.1	78.2	87.2	88.1	89.8	91.8	92.0
	Methanol	13.4	63.8	88.2	89.7	90.0	91.1	91.5
Salts		Ammonium sulphate	24.8	90.7	94.0	84.2	90.4	89.0

% Protein precipitation efficiency = (total plasma protein - protein remaining in supernatant) / total plasma protein × 100.

さらに除タンパクした溶液を

リン脂質などを特異的に除去するカラム(Phospholipids removing column)を通過して精製する方法もある。

(アセトニトリルで除タンパクした溶液をそのまま通液できるので便利)

前処理方法のアプローチ(補足2)

固相抽出法

シリカゲルやポリマーなどの固体基剤(粒子を用いる場合が多い)に分析対象化合物を吸着(分配)させて、分析の障害となる内因性化合物などを除去する方法である。固体基剤はカートリッジなどに充填・パッキングされている場合が多く、加圧および減圧することで、検査試料を通液させて基剤と接触させ、基剤の表面で分配を行う。

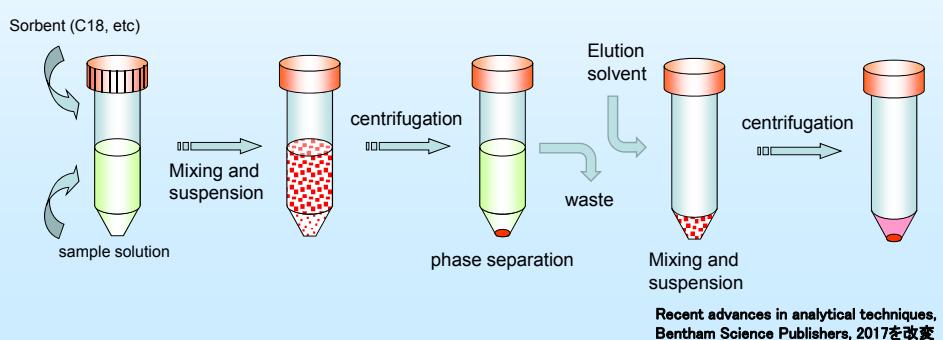
一般的には、分析対象化合物を一端基剤に吸着させて、分析の障害となる内因性化合物など先に通過・溶出させた後に必要な化合物を脱離・分取する方法がとられる。稀に、分析対象化合物を素通りさせて、分析の障害となる内因性化合物などを吸着させて除去する手法も取られる。

ところで、カートリッジに珪藻土が充填されたカラムを用いた抽出法がある。外見上から固相抽出に分類されている場合があるが、分離・分配の機構は液液分配であるので、液液抽出(溶剤抽出)に分類される。

前処理方法のアプローチ(補足3)

分散固相抽出法

カートリッジに充填されたカラムを用いずに、検査試料中に固体基剤を直接加えて懸濁・混合させた後に遠心分離やろ過によって基剤を分取して、必要な化合物を小量のメタノールなどの有機溶剤で脱離・分取する方法もある。



前処理方法のアプローチ(補足4)

QuEChERS法

QuEChERS法は、相分離と分散固相法を組み合わせた抽出法で、食品中の残留農薬分析の前処理として用いられている手法である。AOACメソッドやEUメソッドなどとして公定法に定められている。

一般的には、検査試料にアセトニトリルとpH調整剤や塩(硫酸マグネシウムや酢酸ナトリウムなど)を加えて攪拌する(塩析効果で薬物などをアセトニトリル相に移行させる)。

遠心分離後にアセトニトリル相を分取し、分散固相として、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル(Primary Secondary Amine:PSA)、グラファイトカーボン(GCB)、オクタデシルシリカ(C18)などを加えて、脂肪酸や色素成分の除去することができる(種々の変法がある)。

遠心分離のみで前処理が出来るため、簡便である。

まとめ

ターゲットが不明な場合は、選択性の低い除タンパク法などの前処理を選択し、ターゲットが決まった段階で適切な前処理法(液液抽出や固相抽出など)を選択することを勧める。

検査に用いる試料の性状はその都度異なるので、標準添加法での定量がお勧めである(非常に手間を要するが)。

種々のブラインドテストに参加し、自施設のターゲットに入っていない薬物を順次追加して充実させる。
(順次、バージョンアップを)

値付けされた試料を分析することで、定性・定量能の検証が出来る(生体試料については、バイオラッドなどで入手可能)。

バイオラッド・精度管理用コントロール:
<https://www.bio-rad.com/ja-jp/category/quality-control-products?ID=781c35e5-e91e-472c-9e03-6195e8cb2053>

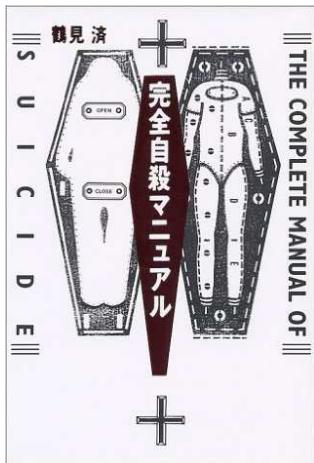
数多くのルーチン分析を行っている施設では実情に合わないことも…

ジフェンヒドラミン過量摂取事例における 薬物分析の実際

旭川医科大学法医学講座
奥田勝博

なぜジフェンヒドラミンなのか？

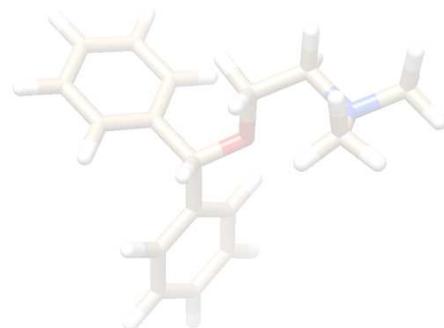
1993年出版し、ミリオンセラーとなった本
「完全自殺マニュアル」に掲載。



体重60 kgで38～60錠と記載され、体重1 kg当たり1錠で死ねるという情報は、その後もインターネットの自殺サイト等で発信され続ける。

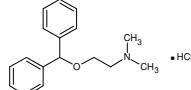
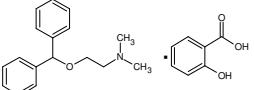
ジフェンヒドラミンサリチル酸塩40 mg(1錠)中には約26 mgのジフェンヒドラミンが含まれるため、本発表中の成人致死量は26 mg/kgとして計算。

ジフェンヒドラミン(DPH)中毒事例紹介



DPH中毒死事例の概要

解剖番号	事例_1	事例_2	事例_3	事例_4	事例_5	事例_6
年齢	20代	20代	70代	20代	60代	20代
性別	男性	女性	女性	女性	男性	男性
末梢血中 DPH濃度、死因	70.6 µg/mL 急性薬物中毒	49.9 µg/mL 急性薬物中毒	20.0 µg/mL 急性薬物中毒	40.8 µg/mL 急性薬物中毒	28.6 µg/mL 急性薬物中毒	18.8 µg/mL 急性薬物中毒
検出薬物（血液）	ジフェンヒドラミン シタロプロラム アリビプロラゾール リドカイン	ジフェンヒドラミン トラゾドン イブプロフェン イブプロフェン代謝物 フルニトラセバム代謝物	ジフェンヒドラミン ジプロフィリン サリチル酸	ジフェンヒドラミン ジプロフィリン サリチル酸 ゾルピデム ゾルピデム M-1 バルサルタン	ジフェンヒドラミン ジプロフィリン サリチル酸 ゾルピデム ゾルピデム M-1 バルサルタン	ジフェンヒドラミン ジプロフィリン サリチル酸
検出薬物（尿）	ジフェンヒドラミン	ジフェンヒドラミン	ジフェンヒドラミン トラゾドン イブプロフェン代謝物 フルニトラセバム代謝物	ジフェンヒドラミン ジプロフィリン サリチル酸 ロキソプロフェン	ジフェンヒドラミン ジプロフィリン サリチル酸 ゾルピデム ゾルピデム M-1 バルサルタン	ジフェンヒドラミン ジプロフィリン サリチル酸
CTでの消化管内高吸収	小腸内	胃内、小腸内	小腸内	胃内	確認できず (胃全摘出)	不明 (胃の死後開裂)
肺水腫	著明	著明	中程度	著明	中程度	著明

検出薬物から摂取製品を推定可能						
解剖番号	事例 1	事例 2	事例 3	事例 4	事例 5	事例 6
年齢	20代	20代	70代	20代	60代	20代
性別	男性	女性	女性	女性	男性	男性
検出薬物 (血液)	ジフェンヒドラミン シタロプラム アリビプラゾール リドカイン	ジフェンヒドラミン イブプロフェン イブプロフェン代謝物 フルニトラゼバム代謝物	ジフェンヒドラミン ジプロフィリン サリチル酸	ジフェンヒドラミン ジプロフィリン サリチル酸	ジフェンヒドラミン ジプロフィリン ゾルビデム ゾルビデム M-1 バルサルタン	ジフェンヒドラミン ジプロフィリン サリチル酸
考察	 <p>ジフェンヒドラミン塩酸塩の製剤を示唆</p>	 <p>ジフェンヒドラミンサリチル酸塩(↑)と ジプロフィリン(↓)の合剤を示唆</p>				
推定商品 (例)	 	 				

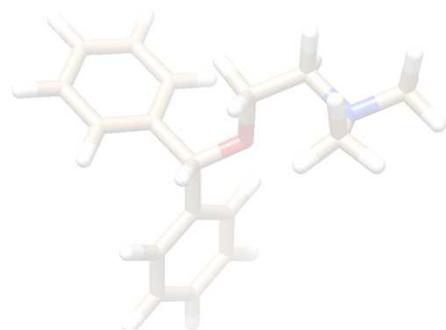
部位別血中DPH濃度と死後経過時間						
解剖番号	事例 1	事例 2	事例 3	事例 4	事例 5	事例 6
死後経過時間	2週間内外	2日半内外	3日内外	2-4日程度	2日半内外	2日内外
左心血中濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	236.5	56.8	11.6	51.4	36.9	16.3
右心血中濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	68.7	79.1	7.3	40.6	34.7	13.0
末梢血中濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	70.6	49.9	20.0	40.8	28.6	18.8

死後再分布の部位に一定の傾向は認められないが、
死後経過時間が長いと再分布が顕著に観察された。

推定摂取量						
解剖番号	事例 1	事例 2	事例 3	事例 4	事例 5	事例 6
薬物情報	レスタミンコーウ 糖衣錠120錠入 3瓶	ジフェンヒドラミン 系186錠の空箱	ドリエル48錠の 空包	トラベルミン9箱 (54錠)の購入記録	トラベルミン11箱 (66錠)の空箱発見 (1錠はPTPに残、1.5 錠は落ちていた)	空箱等発見されず (100錠くらい用意し ていると友人に話し ていた)
体重 (kg)	47.4	65.6	37.4	54.3	65.3	62.5
推定摂取量 (錠)	360	186	48	54	63	(100)
推定摂取量 (DPH mg)	3168	(4073) (ドリエルと仮定して)	1051	1404	1638	(2600) (トラベルミン と仮定して)
体重当たり摂取量 (mg/kg)	66.8	(62.1)	28.1	25.9	25.0	(41.6)

事例3,4,5については、致死量についての
情報を得ている可能性が高い。

DPH含有市販薬の一例



代表商品のDPH含有量と致死量

商品	ドリエル	レスタミン コーワ糖衣錠	トラベルミン大人用	マイトラベル錠
塩	塩酸塩	塩酸塩	サリチル酸塩	サリチル酸塩
含有量/錠(/回) (塩として)	25 mg (50 mg)	10 mg (30 mg)	40 mg (40 mg)	15 mg (45 mg)
含有量/錠(/回) (遊離DPHとして)	21.9 (43.8 mg)	8.8 (26.4 mg)	26.0 (26.0 mg)	9.7 (29.1 mg)
内容量	6錠	120錠	6錠	15錠
含有量/商品 (遊離DPHとして)	131.4	1056	156.0	145.5
60 kg 成人の致死量	11.9箱	1.5瓶	10箱	10.7箱

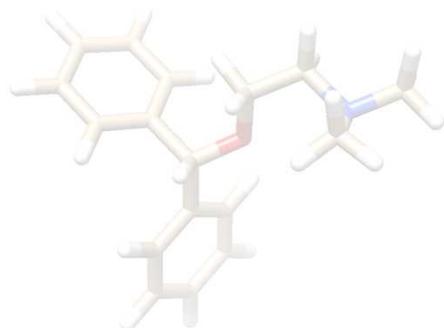
10箱程度であれば、分割購入やインターネット販売で容易に入手可能

意外な商品のDPH含有量と致死量

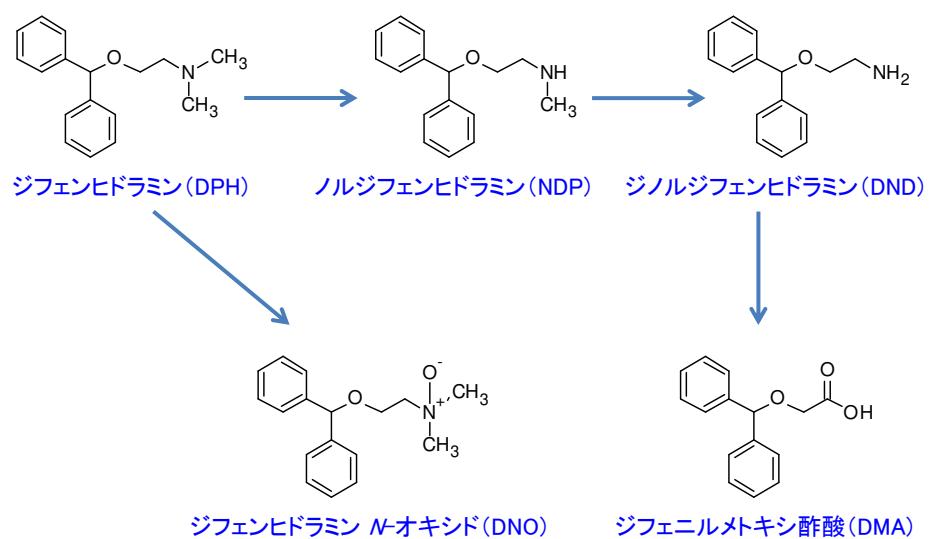
商品	ケアノキュア 毛穴・目立つ ボリュッサ肌治薬 ケノキュア	メディータム 水虫ブ ラス HT10クリーム	新ウナコーウクール	フェミニーナミスト
塩	遊離塩基	遊離塩基	塩酸塩	塩酸塩
含有量 (塩として)	-	-	20 mg/mL	2 g/100 g
含有量 (遊離DPHとして)	1 g/100 g	1 g/100 g	17.5 mg/mL	1.75 g/100 g
内容量	20 g	36 g	55 mL	30 mL
含有量/商品 (遊離DPHとして)	200 mg	360 mg	962.5 mg	525 mg
60 kg 成人の致死量	7.8本	4.3個	1.6本	3本

CTには消化管内高吸収として写らないと推察される。
虫刺されの薬2本が部屋にあった時、警察は気にするのか....。

DPHの代謝物とその組織分布



DPHの一次代謝様式

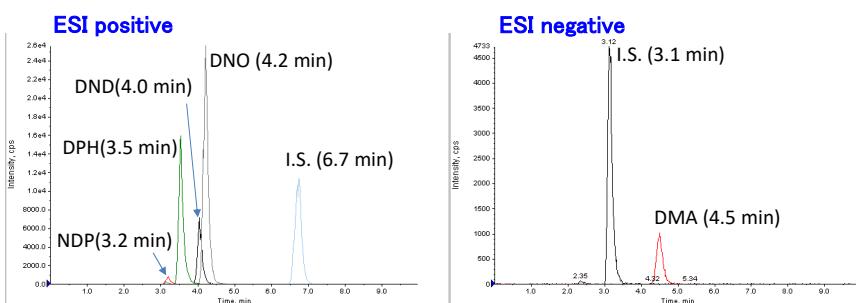


DPH代謝物の分析条件

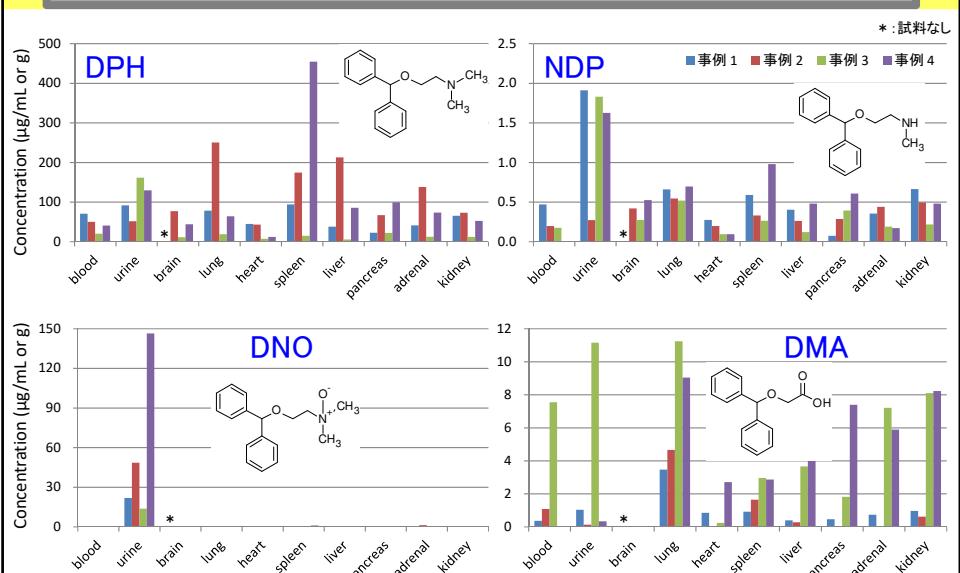
HPLC : Prominence system
(Shimadzu)
Column : L-column 2 ODS
(150 mm, 1.5 mm i.d., 5.0 μ m)
Eluent : 73% MeOH containing
10 mM HCOONH₄
Column Temp : 40°C
Flow rate : 0.1 mL/min

Product ionとcollision energyを調整して、
大過剰の未変化体と少量の代謝物の
ピーク面積が近くなるように感度を調整

MS/MS : AB SCIEX 3200[®] QTRAP
Mode : MRM
Ionization : ESI positive
DPH (256.1/165.0, CE30)
NDP (242.2/166.9, CE45)
DND (228.2/167.0, CE15)
DNO (272.0/167.0, CE19)
Diazepam-d5 (290.1/198.1)
Ionization : ESI negative
DMA (241.1/59.2, CE-26)
Phenobarbital-d5 (236.0/42.1)



DPHおよび代謝物の組織分布



DPHは尿および脾臓にやや多い。NDPは尿中に多い。DNDは検出せず。
DNOは速やかに尿中排泄。DMAは肺に多く、脳には移行しない。

代謝物分析の応用事例



代謝物分析の応用事例(概要)

	事例 7	事例 8
年齢	10代後半	20代前半
性別	男性	男性
身長	160 cm	168 cm
体重	53.4 kg	66.9 kg
状況	頭にビニール袋 (10L程度)	頭にビニール袋 (45L)
付近にあった空包	ドリエル24錠分	ドリエル24錠、ウット12錠分
死因	窒息	窒息

どちらの事例も二十歳前後で体格普通の男性が頭にビニール袋をかぶった状態で発見され、付近にドリエルの空包があった非常に酷似した事例。

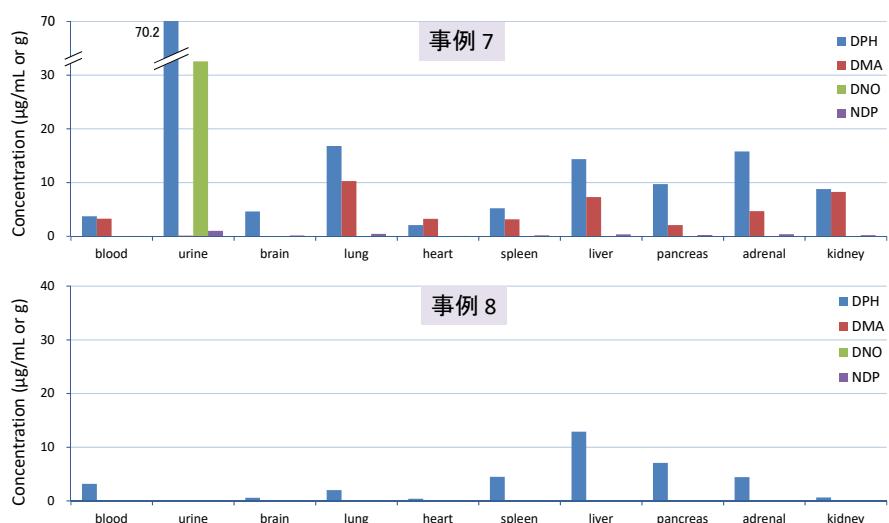
解剖により、死因はいずれもビニール袋による窒息と診断。

代謝物分析の応用事例(薬毒物分析)

	事例 7	事例 8
末梢血中エタノール濃度	検出されず	1.04 mg/mL
血中検出薬毒物	ジフェンヒドラミン	ジフェンヒドラミン プロムワレリル尿素 アリルイソプロピルアセチル尿素
尿中検出薬毒物	ジフェンヒドラミン	ジフェンヒドラミン プロムワレリル尿素 アリルイソプロピルアセチル尿素
末梢血中DPH濃度	3.71 µg/mL	3.15 µg/mL
尿中DPH濃度	70.2 µg/mL	0.11 µg/mL

末梢血中ジフェンヒドラミン濃度はほぼ同程度の中毒域。
尿中濃度には大きな差が認められた。

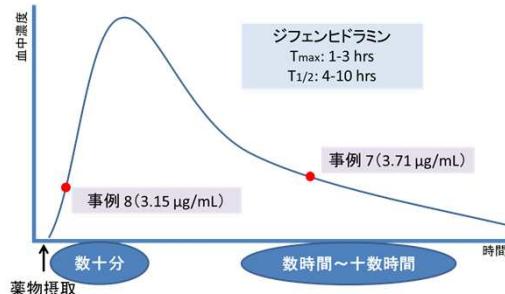
代謝物分析の応用事例(代謝物分析)



事例 7 は全身に代謝物が分布し、DNOの尿中排泄も認められたのに対し、事例 8 は未変化体の軽度な分布しか認められなかった。

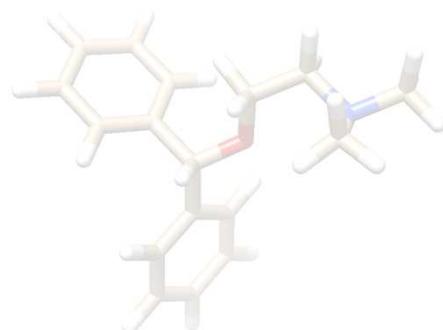
代謝物分析の応用事例(考察)

	事例 7	事例 8
空包	ドリエル24錠	ドリエル24錠、ウット12錠
ジフェンヒドラミン含有量	525 mg	525 mg、88 mg
体重	53.4 kg	66.9 kg
摂取量	9.8 mg/kg	9.2 mg/kg
末梢血中濃度	3.71 µg/mL	3.15 µg/mL



摂取量や血中濃度などが酷似した事例であるが、事例 7 は薬物摂取から数時間～十数時間経過した排泄期に死亡、事例 8 は摂取から数十分程度の吸收期に死亡したことが代謝物分析から判明した。

組織分布の応用事例



組織分布の応用事例(概要)

<事例 9>

- ・某年12月、河川敷で頭部のない遺体が発見される。
- ・その周囲の雪上には無数の狐と思しき足跡や糞が認められた。
- ・頭部は、ほぼ白骨化状態で体幹部直近の川底に沈んでいた。
- ・着衣は獸により引きちぎられ、左右上肢もほぼ白骨化。
- ・胸部は食い破られ、胸腔内には左肺の一部を残すのみ。
- ・肝臓の上端も食害により欠損。
- ・約2週間前に行方不明となった男性と推定され、司法解剖。

解剖時、血管や心臓からの血液採取はできず。
肝臓の食害部位から漏れ出してきた血液を採取した。

組織分布の応用事例(薬毒物分析)

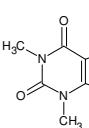
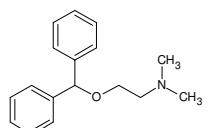
($\mu\text{g}/\text{mL}$)	血液 (肝臓から)	尿 (非加水分解)	治療濃度	中毒濃度	致死濃度
ジフェンヒドラミン	124	68.7	0.05-1	1-4	5-10

肝臓から浸出してきた血液中のDPH濃度($124 \mu\text{g}/\text{mL}$)は肝臓組織の影響を大きく受けていると推定される。

肝臓中DPH濃度は血中濃度の 2.5 ± 0.9 倍であることが、事例1-4,7,8のデータから算出され、それをもとに本事例の血中濃度を推測すると、最も低く見積もっても $36.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ となり、致死濃度に達していると判断した。その結果、死因は急性薬物中毒と診断した。

ジメンヒドリナート(ドラマミン)

ジメンヒドリナートとは



8-クロロテオフィリンをライブライ リに追加しておくと識別可能

ジフェンヒドラミンと8-クロロテオフィリンの1:1合剤の慣用名。処方箋医薬品に指定されていないが、現在本邦でのOTC商品はなく(過去にはあった)、医療用医薬品のドラマミンのみが鎮吐・鎮吐剤として流通。



1錠にジメンヒドリナート50 mg(DPHとして約27 mg)を含有するため、トラベルミン(1錠中にDPHとして約26 mg)とほぼ同量で死に至る。

ドラマミンの入手

ドラマミンは医療用医薬品であるが、インターネット通販で容易に入手可能。海外ではOTC医薬品として薬局等で購入可能。

販売サイトや商品のパッケージ等には**ジフェンヒドラミンを含むことは一切記載されていない**。(知る人ぞ知る情報)



まとめ

