

第1回法医中毒研究会総会・勉強会プログラム

日 時：平成25年6月26日（水）

第97次日本法医学術全国集会評議員会終了後（17:00～）

会 場：ロイトン札幌（学術全国集会会場 B会場：2階エンプレスホール）

司会者：間瀬田千香暁（旭医大）

開会の挨拶（17:00～17:05）

法医中毒研究会会長 石井 晃（名大）

総会議事（17:05～18:30）

事務局 福家千昭（琉大）

1. 会則についての確認事項
2. 役員の改選
3. 会長の選出
4. その他

口演発表

座長 向井敏二（聖医大）

守屋文夫（川崎医福大）

演題1（18:30～18:40）

市販解析ソフトを用いたLC-MS/MSシステムによる薬物スクリーニング検査

－過去の見逃し事例の検証と市販解析ソフトの評価－

矢島大介¹⁾, 佐藤由依²⁾, 永澤明佳¹⁾, 安部寛子¹⁾, 岩瀬博太郎¹⁾

(¹⁾千葉大, ²⁾材料科学技術振興財団)

演題2（18:40～18:50）

LC-MS/MSを用いた「脱法ハーブ・バスソルト」の分析事例

藤田友嗣^{1,2)}, 遠藤重厚³⁾, 新津ひさえ²⁾, 出羽厚二²⁾

(¹⁾岩手医大救急薬毒, ²⁾岩手医大, ³⁾岩手医大救急)

演題3（18:50～19:00）

違法ドラッグ分析における異性体識別の重要性

財津 桂¹⁾, 土橋 均²⁾, 石井 晃¹⁾

(¹⁾名大, ²⁾阪医大)

演—1

市販解析ソフトを用いた LC-MS/MS システムによる薬物スクリーニング検査 —過去の見逃し事例の検証と市販解析ソフトの評価—

○矢島大介¹、佐藤由依²、永澤明佳¹、安部寛子¹、岩瀬博太郎¹

1 千大 法医、2 材料科学技術振興財団

Drug screening using LC-MS/MS system with commercially available drug analysis software

-A survey of overlooked cases and evaluation of the software-

Daisuke Yajima¹, Yui Sato², Sayaka Nagasawa¹, Hiroko Abe¹, Hirotaro Iwase¹

¹ Dept. Legal Med., Grad. Sch. Med., Chiba Univ., ² Foundation for Promotion of Material Science and Technology of Japan

【緒言】

千葉大学法医学教室では 2013 年現在、市販の薬物分析ソフトを搭載している LC-MS/MS システムを用いて薬物スクリーニングを行っている。以前は、薬物の服用が死因に関連する可能性がある事例のみでトライエージを行い、そこで検出された薬物に関して定量検査などを外注していたが、この検査体制では、多くの服用薬物を見逃していた可能性があった。一方、2013 年 4 月から解剖に関する新しい法律が施行され、そこでは警察官によるトライエージなどの簡易薬物検査の実施および結果の判定が合法化され、その結果が事件性の有無や解剖の要否を判断する情報の 1 つとなる。しかし、薬物簡易検査では検出できない薬物は多くあり、ここでも多くの薬物が見逃されている可能性がある。そこで、LC-MS/MS システムを用いた薬物スクリーニングの結果とトライエージの結果を比較することによって、以前の当教室ではどの程度の薬物を見逃していたのか、そして現在の検視の現場でもどの程度見逃している可能性があるのか検証するとともに、今回用いた市販の薬物分析ソフトの利点と欠点について検討した。

【方法】

1) 対象事例：2010 年 4 月～2011 年 3 月までの 1 年間の司法解剖事例、2) 対象検体：血液及び尿・その他の体液、3) トライエージ検査：尿を検体として遠心分離(1500rpm、10 分)した上清を検査に使用、4) 検査検体の前処理：検体 100μl にアセトニトリル 200μl を加え、超音波を用いてよく混和したのち、遠心分離(15000rpm、5 分)後、その上清を分取。上清にブランク液(アセトニトリル：水=1:4)700μl を加え検査検体とした。尿は除蛋白の前に β-グルクロニダーゼ処理を行った。5) 分析装置：[LC]Shimadzu Prominance、[MS]AB Sciex 社製 3200QTrap、(分析条件 1)カラム：RESTEK PFP propyl column(50 mm x 2.1 mm, 5.0μm)、移動相：グラジエント A)水+2mM ギ酸アンモニウム+0.2% ギ酸、B)アセトニトル+2mM ギ酸アンモニウム+0.2% ギ酸、イオン化法：ESI、positive、negative、MRM-EPI モード、MRM 対象成分：濫用薬物・毒物分析用 iMethodTM テスト(AB Sciex 社製)に登録されている一般薬毒物 335 成分、脱法ドラッグ 376 成分を用いた。(分析条件 2)カラム：L-column ODS (150 mm x 1.5 mm, 5.0μm)、移動相：グラジエント A)95% 10mM ギ酸アンモニウム+5% メタノール、B)5% 10mM ギ酸アンモニウム+95% メタノール、イオン化：ESI positive、MRM-EPI モード、MRM 対象成分：ベンゾジアゼピン類 57 成分。

【結果・考察】

[見逃し事例の検証]2010年4月～2011年3月までの1年間の全司法解剖例251例中、検査が可能であったもの218例、その内薬物が検出されたものは90例であった。この90例をトライエージのみ陽性であったもの、トライエージとLC-MS/MSの両者で検出されたもの、LC-MS/MSのみで検出されたものに分類すると、それぞれ15例、27例、48例であった。LC-MS/MSのみでしか検出できなかつた事例は検出事例の半数強(48/90)を占めた。また、両者で検出された事例の中には、トライエージで陽性とされた薬物ではない薬物がLC-MS/MSで検出された事例も14例あった。これら48例と14例は、当教室では今まで見逃してきた、あるいは検視現場で見逃している可能性の高い例と考えられた。前者の48例で検出された薬物の約4割が精神神経用薬であり、直接の死因にはならないものではあったが、ゾルピデムやワルファリンも検出され、ゾルピデムが検出された場合、事件性が出てくる可能性があり、ワルファリンは易出血性が死因と関連する可能性があると思われた。後者の14例については、特にトライエージでベンゾジアゼピンが陽性の場合は、他の精神神経用薬も服用している場合が多く、ベンゾジアゼピン以外にカルバマゼピンとハロペリドールが検出された事例もあり、注意が必要であると思われた。さらにトライエージでは検出できないゾルピデムとゾピクロンについて調べると、同期間の251例中、2成分が検出されたものが8例、この内トライエージが陰性となり、情報がなければ見逃していた可能性があるものが4例あった。この4例は、2例は火災事案、1例は練炭自殺の事案であり、後者は当教室で正確な薬物情報の提供ができなかった場合、検査結果に影響する可能性もあると思われた。以上から、薬物検査としてトライエージのみを採用していた当時は、当教室では重要な薬物を見逃してきた可能性があることが示唆され、また、現在も十分な薬物検査が行えていない機関があるとしたら、その機関でも同様の状況と推定され、現在の検視現場での現状を示唆しているものと思われた。

[脱法ハーブ事例]近年、脱法ハーブでの死亡が疑われる事例が急増してきている。これらも簡易検査では検出できないが、当教室が購入した解析ソフトには、脱法ドラッグのライブラリーが収載されている。2012年から2013年にかけて4例の脱法ハーブによる死亡が疑われる事例を経験し、このソフトを用いて分析したところ、2例で α PVP、XLR-11、UR-144、EAM2201を検出することができた。GC-MSに比べ感度が高いこと、前処理が簡易なため抽出操作や溶媒留去による減損が少ないことから検出が可能であったものと思われた。

[市販薬物分析ソフトの利点と欠点]利点として、前処理と分析操作が簡便、ライブラリーに計1253成分を収載し標品がなくてもスクリーニングが可能、376成分の脱法ドラッグのライブラリーを収載していることがある。欠点としては、登録薬物のスペクトルや保持時間の取得条件が不明で、プリカーサー/フラグメント比などが信頼性に欠けること、検出限界値などが明示されておらず、全収載薬物に対してバリデーションを行わないと不検出の定義ができないこと、海外製品のため登録薬物が地域の実情に合わない場合があり、容易には新規薬物をスクリーニングには加えられないことなどがあった。スクリーニングとして非常に有用なソフトではあるが、分析の原理や検出判定の仕組みをよく理解して使用しなければ、適切な判断ができないことも示唆された。

[まとめ]LC-MS/MS分析の結果とトライエージの結果を比較することにより、当教室では過去にどの程度の薬物を見逃してきたか明らかになり、同時に、現在の検視の現場での見逃しの現状が推測できた。将来的には解剖にならない死亡事例でも薬物検査は必要となる可能性があると思われた。市販薬物分析ソフトは非常に便利ではあるが、使用には装置の原理や検出判定の仕組みを知るとともに、バリデーションなどのクオリティコントロールを行う必要があると考えられた。

演－2

LC-MS-MS を用いた「脱法ハーブ・バスソルト」の分析事例

○藤田友嗣^{1,2}，遠藤重厚³，新津 ひさえ²，出羽 厚二²

1 岩手医科大学高度救命救急センター薬物毒物検査部門

2 岩手医科大学医学部法医学講座

3 岩手医科大学医学部救急医学講座

An Analysis of Synthetic Cannabis and Bath Salts by LC-MS-MS

Yuji Fujita^{1,2}, Shigeatsu Endo³, Hisae Niitsu², Koji Dewa²

¹Poisoning and Drug Laboratory Division, Critical Care and Emergency Center, Iwate Medical University Hospital

²Department of Legal Medicine, Iwate Medical University School of Medicine

³Department of Emergency Medicine, Iwate Medical University School of Medicine

【緒言】近年、合成カンナビノイドやカチノン系化合物が添加された「脱法ハーブ・バスソルト」の乱用が社会問題となっている。今回、我々は脱法ハーブ等を摂取・吸引し、錯乱等の精神症状を呈した2例の患者を経験した。症例1は16種類、症例2は1種類の脱法ハーブ等の製品を所持していた。脱法ハーブに添加されている成分を特定することは、今後の法医中毒において有用な情報の一つとなると考える。本会では、患者が所持していた脱法ハーブ等の製品について行った成分分析の結果について報告する。

【方法】液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置：SHIMADZU 社製 UFLC®システム/AB SCIEX 社製 3200 Q TRAP®, 分析用カラム：Waters 社製 XTerra RP18 (150 x 2.1 mm, i.d., 粒径 2.5 μm), カラム温度：40°C, 流速：0.2 mL/min, 注入量 2 μL, 移動相：A 液 10 mM ギ酸アンモニウム, B 液 アセトニトリル, グラジエント条件：B 液 10%から 90%まで 30 min のリニアグラジエント, イオン化法：エレクトロスプレーイオン化法, 測定法：Enhanced Mass Scan でサーベイスキャンを行い, Enhanced Resolution で質量誤差の補正を行った後, Enhanced Product Ion Scan にて MS/MS スペクトルを採取し化合物のフラグメント情報を取得した。前処理として、ハーブ等の製品の一部を秤量し、メタノールを加え超音波処理後、遠心分離した上清を試料とした。

【結果および考察】患者が所持していた脱法ハーブ等の製品を分析した結果、症例1が所持していた16種類のうち14種類から、合成カンナビノイド系、カチノン系、ケタミン類縁化合物が検出さ

れた。検出された合成カンナビノイド系化合物は MAM 2201, XLR 11, JWH 122 N(4-pentenyl) analog, XLR 11 N(4-pentenyl) analog, UR 144, APINACA, カチノン系化合物は MDPPP, Pentedrone, α -PVP, MePHP, ケタミンの類縁化合物は Metoxethamine であった。症例 2 は所持していた 1 種類の脱法ハーブから合成カンナビノイド系化合物である PB 22, 5-Fluoro PB 22 が検出された。症例 1 で検出された化合物は患者が摂取した時点において、指定薬物には登録されていない化合物であり、症例 2 で検出された 2 つの化合物は包括規制に指定された骨格を持たない合成カンナビノイド系化合物であった。なお、症例 2 が脱法ハーブを吸引し救急外来に受診したのは包括規制が施行される約 1 か月前であり、規制が施行される前から規制逃れの脱法ハーブが流通していた事実が判明した。

演—3

違法ドラッグ分析における異性体識別の重要性

○財津 桂¹, 土橋 均², 石井 晃¹

¹名古屋大・法医, ²大阪医大・法医

Significance of isomeric differentiation on designer drug analysis

○Kei Zaitsu, Hitoshi Tsuchihashi and Akira Ishii

¹Department of Legal Medicine & Bioethics, Nagoya University Graduate School of Medicine, ²Department of Legal Medicine, Osaka Medical College

【諸言】

違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）の乱用は今なお深刻な社会問題であり、厚生労働省は違法ドラッグの取締り強化を進めている。本年3月からは我が国初の包括指定制度も施行されたが、このような規制強化の一方で、違法ドラッグの過剰摂取等による中毒事故は後を絶たず、法医中毒学的に生体試料からの違法ドラッグの分析は非常に重要である。特に、流通している違法ドラッグは位置異性体や構造異性体を有するものが多く、位置あるいは構造異性体によって規制・未規制の法的取り扱いが異なる場合もあることから、違法ドラッグの分析において異性体識別は重要である。加えて、異性体によって急性毒性の強さが異なる場合も考えられることから、中毒起因物質を特定するためには、違法ドラッグの異性体識別が重要と考えられる。そこで本演題では、違法ドラッグである *p*-methoxyethylamphetamine (PMEA) の GC/MS による位置異性体識別¹⁾について発表するとともに、GC/MS/MS を用いた違法ドラッグの異性体識別法について発表する。

【方法】

試料: 各標準品は当研究室で合成した。装置: 島津製作所製ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-2010 Plus および島津製作所製トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ8030. 分析カラム Rxi-5Sil MS (30 m × 0.25 mm i.d.; film thickness, 0.25 μm; Restek 製). 分析条件: 升温条件 60°C (1 分保持) → 300°C (10°C 升温), 流速 1.56 ml/min (He), 試料注入法 スプリットレスモード, イオン化モード EI (70 eV), スキャンタイム 0.5 sec/scan, スキャンレンジ 40-300 Da, プリカーサーイオン *m/z* 72 及び 121, コリジョンガス アルゴン, コリジョンエネルギー 15 V. 試料の調製: アルカリ性下で有機溶媒抽出を行った後、抽出液を 40°C, 窒素気流下で乾固した。残さに酢酸エチルを加えて再溶解したものを分析試料とした。また、同様に処理して得た残さを酢酸エチルに再溶解し、無水トリフルオロ酢酸を用いてトリフルオロアセチル誘導体とした。これを乾固した後、酢酸エチルに再溶解したものを分析試料 (TFA 誘導体) とした。

【結果と考察】

GC/MS による異性体の識別: PMEA, *o*-methoxyethylamphetamine (OMEA) 及び *m*-methoxyethylamphetamine (MMEA) の各遊離塩基について GC/MS を行った。その結果、図 1 に示すように、何れの EI マススペクトルもプロファイルが同じであり、遊離塩基のマススペクトルから異性体を識別することは困難であった。これまでの我々の研究から、フェネチルアミン系違法ドラッグの異性体識別には TFA 誘導体化が有効であることが示されている²⁾ことから、TFA 誘導体化を行い、GC/MS を行った。その結果、観察されるフラグメントイオンは共通するものの、PMEA のマススペクトルにおいてのみ、*m/z* 121 の相対強度比が異なり、PMEA を識別することが可能であった。しかし、OMEA および MMEA の識別は TFA 誘導体でも困難であった。GC/MS/MS による位置異性体の識別: 上記 TFA 誘導体化法を用いた場合であつ

ても、OMEA と MMEA のマススペクトルによる識別は困難であったことから、GC/MS/MS による異性体識別を検討した³⁾。PMEA, OMEA 及び MMEA の遊離塩基の EI マススペクトル（図 1）では、アミンの α 開裂由来の m/z 72 のイオンがベースピークとして観察されることに加え、ベンジル位での開裂による m/z 121 のイオンが観察される。 m/z 121 のイオンは位置異性を示す構造に由来していることから、 m/z 121 をプリカーサーイオンとして MS/MS を行った。その結果、図 2 に示すように位置異性体によってプロダクトイオンの相対強度比が異なることから、各異性体を容易に識別することが可能であった。

GC/MS/MS による構造異性体の識別：PMEA, OMEA 及び MMEA に加え、*o*-, *m*- 及び *p*-methoxydimethylamphetamine を用いて、GC/MS/MS によるアミン部位の構造異性体の識別について検討した。プリカーサーイオンにアミンの骨格を反映するフラグメントイオンである m/z 72 を選択し、プロダクトトイオンスペクトルを行った。その結果、図 3 に示すように、PMEA と *p*-methoxydimethylamphetamine (PMDMA) のプロダクトトイオンスペクトルにおいて、観察されるイオン種の違いから、エチルアミン骨格とジメチルアミン骨格の識別が可能であった。以上の結果、GC/MS/MS を用いることで、TFA 誘導体化を行うことなく、6 種類の位置異性体および構造異性体を容易に識別できることがわかった。

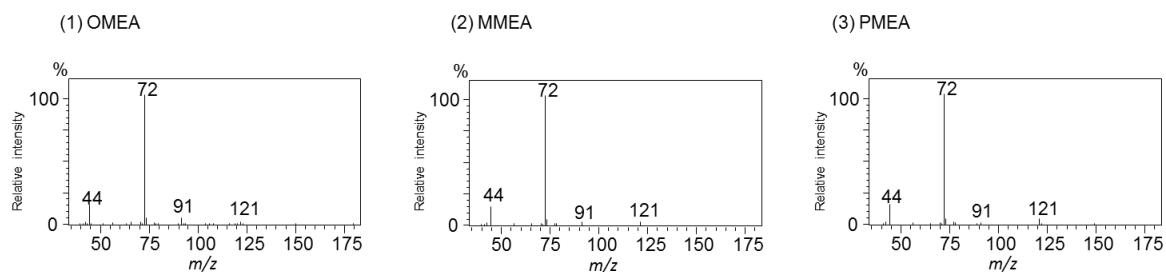


図 1 遊離塩基の EI マススペクトル

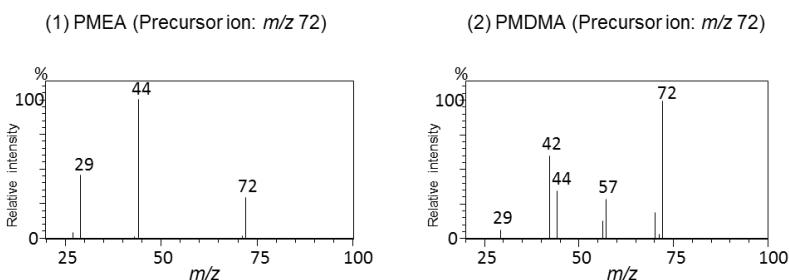


図 3 プロダクトトイオンスペクトルによる構造異性体の識別 (CE: 15 V)
（メタノノクサンハイドレーファーメータムイリウム共存下で測定）(CE: 15 V)

【引用文献】1) *Forensic Sci Int* **177**:77-84 (2008). 2) *J Mass Spectrom* **43**:528-534 (2008). 3) *Forensic Toxicol*, in press (2013).