

学位論文題名

メタンフェタミン、ヒ素並びにブロムワレリル尿素の
法薬毒物学的検査法に関する検討

学位論文内容の要旨

死因究明をはじめとする法医学的な鑑定においては、肉眼的あるいは組織学的な解剖検査所見はもとより、解剖のときなどに得られる種々の試料について薬物や毒物（以下薬毒物という）の検査をすることは死因を判断する上で密接に関わることがあるため重要である。本研究では、薬物としての乱用が最も多く社会問題になっている覚せい剤のメタンフェタミンのスクリーニング法、事件に使用され注目を集めた毒物であるヒ素の簡易で確実な検出法及び市販の催眠薬の成分として自殺の例に用いられることの多いブロムワレリル尿素の分析法について検討を行い、それぞれの有用性について考察した。

第一にメタンフェタミンの標識化合物を合成し、電気化学的イムノアッセイの確立を試みた。

この方法は、フェロセンを薬毒物に導入した標識化合物を用いるイムノアッセイである。この標識化合物はフェロセン誘導体として電気化学的手法（ボルタンメトリー）により検出でき、またグルコースオキシダーゼ（GOD）の電子受容体としての役割も演じられる一方で抗体に対して抗原として働く。標識化合物は抗体を加えると抗原抗体反応により抗体との結合体を生じるので、結合していない自由な標識化合物濃度が低くなる。それに対して非標識（検査対象）薬毒物の共存下では標識化合物と非標識化合物が抗体に対して競争的に反応して抗体結合体を生成するので標識化合物と抗体の結合体の濃度が低くなり、自由な標識化合物の濃度が高くなる。このようにして自由な標識化合物の濃度は検査対象薬毒物濃度に比例する。

今回、*p*-アミノメタンフェタミンとフェロセン酢酸を縮合させてメタンフェタミンの標識化合物を合成し、また一方で抗メタンフェタミン抗体として*p*-アミノメタンフェタミンと牛血清アルブミンをグルタルアルデヒドで縮合させたものを免疫原として作製された抗メタンフェタミンポリクローナル抗体を用い、この電気化学的イムノアッセイをメタンフェタミン検査に応用した。

標識化合物の抗体に対する挙動及び非標識メタンフェタミンに対する競争反応について直流サイクリックボルタンメトリー（CV）による検討を行った。その結果、標識化合物のピークは抗体の添加により強く低下し、標識化合物が抗原としての性質を持っていることが示され、抗体と標識化合物とが抗原抗体反応を起こしたことが示された。また、非標識メタンフェタミン共存下ではその競争反応によりピークの低下が抑制された。このことにより、標識化合物が非標識のメタンフェタミンと互いに競争的に反応していることが示され、非標識のメタンフェタミンが抗体と結合したことにより結合できなかった自由な標識化合物が電極反応に寄与し、電流が低下しなかったことが示された。さらに、これらの反応はブドウ糖-GOD系により電流の増幅を受けて明瞭になった。

そこで次の測定操作により検量線を作成した。1ml容ガラス製測定セルに緩衝液 (pH7.4) をとり、標識化合物のエタノール溶液を加え、メタンフェタミン標準溶液を加える。よく攪拌した後、抗メタンフェタミン抗体溶液をセルに加え37°Cで10分インキュベートする。次いでブドウ糖溶液とGOD溶液を加え攪拌後電極3本 (作用電極:金ディスク電極, 対極:白金線, 参照電極:銀/塩化銀電極) をセルに入れ、37°Cにおいて電位0~+400mV (vs. Ag/AgCl) の範囲を掃引速度5mV/sでCV測定する。

今回の検討の結果、次のような特長があり、覚せい剤のスクリーニング法として有用と認められた。

1. 操作が簡便で1検体の検査が20分以内で完了する。
2. 検出限界が10nM (1.5ng/ml) と低い。
3. 検査濃度の範囲が10nM-100 μ M (1.5ng-15 μ g/ml) と濃度域が非常に広く、検査試料の希釈操作が簡便である。
4. 放射性核種や往々にして安全性に問題のある発色試薬を用いない等、安全性の面で心配がない。
5. 高価な装置を必要とせず、ランニングコストも低い。

第二にラインシュ反応を応用した電子プローブX線マイクロアナライザ (EPMA) によるヒ素の検出法について検討した。

ラインシュ反応はヒ素などの検出のための予試験として知られた検査法で、ヒ素 (III) イオンが塩酸酸性溶液中でヒ化銅として金属銅上に析出し灰黒色を呈することを利用したものである。今回、高性能機器の前処理法としてその簡易さに着目して検討を行い、ラインシュ反応を行った銅板をそのままEPMAによる元素分析の試料とすることにより、ヒ素の検出法として検査資料に応用した。

測定操作は次のとおりである。試料溶液1mlをフラスコにとり、濃塩酸0.5mlを加えた後1 \times 2mm大 (厚さ0.25mm) の銅板を投入する。沸騰水浴上で時々振とう攪拌しながら30分間加温する。銅板を取り出した後、水で洗浄し乾燥する。乾燥した銅板を炭素試料台に導電性両面テープで接着し電子顕微鏡及びEPMAの試料とする。電子顕微鏡下1000倍の視野で加速電圧20kV、試料吸収電流1 \times 10⁻¹¹Aで測定しヒ素のK線 (10.542keV) のスペクトルを検査する。

今回の検討の結果、ヒ素の検出法として、測定が1時間以内で終了し、正確に検出でき、処理が簡易であるという利点を持つ優れた方法と認められた。また、血液試料について本法の応用を検討した結果、血液の混在により検出強度は減少したが、血液を希釈し、酸消化後に還元剤として硫酸ヒドラジンを添加することにより減少が抑えられるので、血液試料にも有効な方法であると示唆された。

第三にエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) によるブロムワレリル尿素の分析について検討した。

ブロムワレリル尿素は熱で分解することから、一般に薬物の分析において最もよく用いられるガスクロマトグラフィー (GC) 及びガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) は困難であり、加熱を要しない高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 及び質量分析と組み合わせた高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) による分析が適している。LC/MSについて種々のイオン化法が検討され報告されているが、いずれも条件検討が困難であるなどの制限があった。イオン化法として近年実用化された大気圧イオン化法のうちESI法は従来のイオン化法の制限を受けないものとして注目されていることから、本薬物の分析に応用した。

今回、逆相系セミマイクロカラム (直径2mm) を用い、移動相はメタノール+水 (40+60) を流量0.2ml/分として、正イオンモード測定 (キャピラリー出口電圧:100V) を行った。その結果、注入量500ng以上では擬分子イオン及びナトリウム付加イオンが、注入量500ng未満ではナトリウム付加イオンのみが検出され、同定能力の高い分析法と認められた。このナトリウム付加イオンを対象とした検出限界はスキャンモードで質量スペクトルを確認するためには

注入量で100ng（イオンピークを観察できるためには10ng），選択イオンモニタリング（SIM）モードでの検出限界は1ng（S/N比10）であり，十分な検出感度の分析法と認められた．

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 寺 沢 浩 一
副 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 宮 崎 勝 巳

学 位 論 文 題 名

メタンフェタミン、ヒ素並びにブロムワレリル尿素の 法薬毒物学的検査法に関する検討

薬物としての乱用が最も多い覚せい剤のメタンフェタミンのスクリーニング法、事件で注目された毒物であるヒ素の簡易で確実な証明法及び中毒事故が多いブロムワレリル尿素の適用しやすい同定法について検討を行い、有用性について考察した。

第一に p -アミノメタンフェタミンとフェロセン酢酸を縮合させて標識化合物を合成し、電気化学的イムノアッセイをメタンフェタミン検査に応用した。

標識化合物の挙動を直流サイクリックボルタンメトリー (CV) により検討した結果、標識化合物のピークは抗体の添加により強く低下し、非標識メタンフェタミン共存下ではピークの低下が抑制された。このことにより、標識化合物が非標識メタンフェタミンと互いに競争的に抗体と反応していることが示された。これらの反応はブドウ糖-グルコースオキシダーゼ (GOD) 系により電流の増幅を受けて明瞭になった。そこで次の測定操作により検量線を作成した。測定セルに緩衝液 (pH7.4) をとり、標識化合物溶液、メタンフェタミン標準溶液、抗メタンフェタミン抗体溶液を加えて37℃で10分インキュベートする。次いでブドウ糖溶液とGOD溶液を加え攪拌後電極3本 (作用電極: 金ディスク電極、対極: 白金線、参照電極: 銀/塩化銀電極) をセルに入れ、37℃で電位+100~+400mVを掃引速度5mV/sでCV測定する。

今回の検討の結果、次のような特長があり、覚せい剤のスクリーニング法として有用と認められた。1. 操作が簡便で1検体の検査が20分以内で完了する。2. 検出限界が10nM (1.5ng/ml) と低い。3. 検査濃度の範囲が10nM-100 μ Mと濃度域が非常に広い。4. 放射性核種や安全性に問題のある発色試薬を用いない。5. 高価な装置を必要とせず、ランニングコストも低い。

第二にヒ素などを検出するための予試験であるラインシュ反応を行った銅板をそのまま電子プローブX線マイクロアナライザ (EPMA) による元素分析の試料とする、ヒ素の検出法について検討した。

測定操作は次のとおりである。試料溶液1mlをとり、濃塩酸0.5mlを加えた後1×2mm大（厚さ0.25mm）の銅板を投入し、沸騰水浴上で30分間加温する。銅板を洗浄、乾燥し炭素試料台に導電性両面テープで接着し電子顕微鏡及びEPMAの試料とする。1000倍の視野で加速電圧20kV、試料吸収電流 1×10^{-11} Aで測定しヒ素のK線（10.542keV）のスペクトルを検査する。

今回の検討の結果、ヒ素の検出法として、測定が1時間以内で完了し、正確に検出でき、処理が簡易であるという利点を持つ優れた方法と認められた。

第三にエレクトロスプレーイオン化（ESI）高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS）によるブロムワレリル尿素の分析について検討した。

ブロムワレリル尿素は熱で分解することから、加熱を要しないLC/MSによる分析が適している。種々のイオン化法が報告されているが、いずれも条件検討が困難であるなどの制限があり、この制限を受けないものとしてESIを本薬物の分析に応用した。

今回、逆相系セミマイクロカラムを用い、移動相はメタノール+水（40: 60）を流量 0.2ml/分として、正イオンモード測定を行った。その結果、注入量500ng以上では擬分子イオン及びナトリウム付加イオンが、注入量500ng未満ではナトリウム付加イオンのみが検出され、同定能力の高い分析法と認められた。検出限界はスキャンモードにおいて注入量で100ng、選択イオンモニタリングモードで1ng（S/N比10）であり、十分な検出感度と認められた。

公開発表では、石橋教授から電気化学的イムノアッセイの測定電流のノイズ、尿の夾雑物成分の除去法、ヒ素中毒者の血液中濃度とヒ素の濃縮法、ブロムワレリル尿素の質量スペクトルピークの有効性についての質問があった。宮崎教授からメタンフェタミンのイムノアッセイの干渉物質、我国の乱用覚せい剤の種類、検量線が原点を通らない理由、検出感度の実務での有効性、ブロムワレリル尿素に関する本 LC/MS 法の利点についての質問があった。寺沢教授から3法の特長に関して質問があった。いずれの質問に対しても申請者は概ね妥当な回答をした。

この論文は、薬毒物の検査法の確立についての基礎的な検討として、電気化学的イムノアッセイによる覚せい剤のメタンフェタミンのスクリーニング法を、ヒ素の簡易で確実な証明法を、ブロムワレリル尿素の実用的な同定法を、それぞれ初めて行ったものであり、本研究の成果は高く評価され、今後本研究が応用可能となることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。