

論文内容要旨

目的

裁判化学の役割は、被害者、被疑者及び犯罪現場をそれぞれ物的証拠により結びつけ、犯罪を再構成し、裁判官に正確な判断材料を提供することにある。それ故、犯罪捜査における物的証拠は、事実解明のための貴重な資料となる。しかし、これらの証拠資料は経時変化していることが多く（汚染や腐敗などの変性）、しかも微量である場合が多い。裁判化学分野では、この微量な資料から、含有される未知化合物を確実に同定、定量することが要求される。この要求に応えるため、分析感度及び化合物選択性に優れた高速液体クロマトグラフィー質量分析法（LC/MS）は必要不可欠な分析法となっている。

LC/MS による分析が特に有効で、裁判化学上重要な化合物に筋弛緩薬があげられる。筋弛緩薬は、麻酔科領域で汎用されている薬剤であるが、各種骨格筋と同様に呼吸筋も抑制するため人工呼吸器が無い場合、容易に人を死に至らしめることが可能である。さらに、これらの筋弛緩薬は微量で効果を発現し、生体内半減期が非常に短く、分解により証拠が残りにくいことから犯罪に利用されるケースが増えている。本研究では、実際に事件で使用された Pancuronium (PAN) や Vecuronium (VEC) 等の非脱分極型筋弛緩薬を取り上げ、極性化合物の測定に有用なエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用いた LC/ESI-MS による簡便かつ高感度なヒト試料中からの一斉分析法の開発を行った。

筋弛緩薬とその関連化合物の LC/ESI-MS による分析法の開発

筋弛緩薬の生体内半減期は非常に短く、しかもその代謝物の一部は活性を持つことが知られている。そのため、裁判化学分野においては、迅速に、かつ代謝物を含めた一斉分析法の開発が非常に重要であると考えられる。

そこで、PAN、VEC 及び関連化合物である 17-hydroxy-pancuronium (17-OH-PAN), 3,17-dihydroxy-pancuronium (3,17-OH-PAN), 3-hydroxy-vecuronium (3-OH-VEC), 3,17-dihydroxy-vecuronium (3,17-OH-VEC), 3,17-dipropionyl-pancuronium (IS) を対象として一斉分析法の検討を行った。

質量スペクトルの解析

筋弛緩薬とその関連化合物の ESI におけるマススペクトルを詳細に検討した。このなかで、PAN 及びその類縁体では 2 価の分子量関連イオン ($[M]^{2+}$) のみが観測され、VEC 及びその類縁体では 1 価及び 2 価の分子量関連イオン ($[M]^+$ 及び $[M+H]^{2+}$) が観測された。さらに In-source CID (collision induced dissociation) 法によりフラグメントイオンを生成させ、構造情報に基づきフラグメンテーション経路を推定した結果、PAN、VEC 及びこれら関連化合物は LC/ESI-MS により確実に同定が可能であることが示唆された。

LC/MS の分析条件の検討

LC/MS の分析条件（移動相の組成，カラム長さ，カラム温度，流速及びグラジエント時間）を詳細に検討し，犯罪捜査に求められる迅速な分析法を開発した（サイクルタイム 6.5 分）。本分析条件は，分離能及び迅速性に優れているだけでなく，汎用性の高い ODS カラムを使用したことにより，筋弛緩薬の薬物スクリーニングへの導入も可能とした。

分析上の注意点

筋弛緩薬及びその関連化合物を正確に定量するための留意事項として，以下のことを明らかにした。

- (1) 筋弛緩薬及びその関連化合物は第 4 級アンモニウム基を有するため，著しくガラス製容器に吸着することが判明した。その回収率は約 30% 程度であった。一方，ポリプロピレン製の容器では吸着が認められないため（90% 以上の回収率），試料調製にはポリプロピレン製の器具を使用した。
- (2) 除粒子操作に使用するろ過膜は，その材質の種類によって著しい吸着が認められるため，適切な膜を選択する必要がある。親水性 PTFE 膜，セルロース膜及びナイロン膜では 62-109% の回収率が得られた。一方，親水性 PVDF 膜，PES（Polyethersulfone）膜では回収率 0-24% と著しい損失が認められた。
- (3) 筋弛緩薬は，メタノール及び水溶液中では脱アセチル化され易く，アセトニトリル中では安定であった。また，より低温で保存することにより脱アセチル化による分解が抑制される傾向にあった。それ故，保存溶液はアセトニトリルで調製し，より低温での保存が望ましいと考えられる。筋弛緩薬を含有する生体試料を保存する場合においても，アセトニトリルによる除タンパク操作を行った後，その上清を -80°C で保存すること提唱する。

筋弛緩薬の分解過程

裁判化学では保存状態の悪い試料を取扱う場合が多いため，対象化合物の経時変化（分解過程など）を明らかにしておくことが，犯罪事実の解明に重要であると考えられる。それ故，本研究では筋弛緩薬の分解過程も明らかにした。

Pancuronium

PAN は，ステロイド骨格の 3 位または 17 位のアセトキシル基が加水分解して 3-OH-PAN と 17-OH-PAN を生成することが判明した。これらの化合物は，さらに脱アセチル化され 3,17-OH-PAN へと分解が進行するものと考えられた。

Vecuronium

VEC は，まず 3-OH-VEC に分解した後，さらに分解が進み 3,17-OH-VEC を生成すると考えられる（PAN の分解経路とは異なり 17-OH-VEC の生成は確認されなかった）。3-OH-VEC が主に生成する理由として，ステロイド骨格の 2 位に置換したピペラジンの第 3 級アミンが塩基性を示すため，近傍のアセトキシル基が加水分解され易いものと考えられる（VEC の水溶液は， $\text{pH} = 8.8 - 9.8$ ， $\text{pKa} = 8.9$ と報告されている）。

実際に第3級アミンを有する VEC は、PAN（第3級アミンを有しない）と比較して容易に脱アセチル化されることが判明している。

これらの結果は、実際の事件における有益な分析対象の選択を可能とし、裁判化学上の貢献は大きいと考えられる。

血液試料への応用

弱カチオン交換カートリッジ（Bond Elut CBA）を用いて、血清からの筋弛緩薬及びその関連化合物の効果的なクリーンアップ法を確立した。また本分析法は、各種バリデーション（検量線、再現性、回収率、検出下限値、定量下限値）の結果、高い信頼性と再現性を有することが示された。

開発した分析法を臨床試料（VEC を投与した患者血液）に応用した結果、VEC、3OH-VEC 及び 3,17-OH-VEC の存在が確認された。このうち、活性代謝物である 3-OH-VEC の濃度が圧倒的に高値を示した。この事実と VEC の生体内半減期を考慮すると、裁判化学における VEC の摂取証明には 3-OH-VEC の測定が必須であると考えられる。また、ほとんど活性を示さない 3,17-OH-VEC の測定は、臨床的な重要性は少ないと思われるが、変性した試料を扱う裁判化学においては、犯罪事実の解明に有用な知見を提供するものと考えられる。

結論

LC/ESI-MS が筋弛緩薬をはじめとする極性の高い医薬品による自殺や犯罪事実の解明に有用な情報を提供すると同時に、臨床現場における患者の治療支援にも貢献することが示された。これまで LC/ESI-MS によるスペクトルは、使用する装置及び分析条件の違いにより変化することが危惧され、EI（電子イオン化）スペクトルのような汎用性のあるライブラリーが構築されていなかった。しかし、同一機種、同一メソッドを用いた場合、スペクトルの変化がないことも報告されており、事実、今回解析したイオンは再現性よく得られ、本法の信頼性が示されている。LC/ESI-MS による代謝物等の同時分析や他の分析機器を相補的に用いることにより裁判に耐えうる十分な証明力が得られると考えられる。

審査結果の要旨

犯罪捜査における物的証拠は、事実解明、犯罪の再構成にきわめて重要である。しかし、犯罪の複雑化、質の変化により、得られる物的証拠の解析には高度な手法が要求される。従来、未知化合物の同定と定量にはガスクロマトグラフィー(GC)/マススペクトロメトリー(MS)が主に用いられてきた。本法では、GCの高分離能とMSの高感度性のみならず、電子イオン化法により化合物に特徴的なフラグメントイオンを再現性よく得ることができる。しかし、水溶性に富み、熱安定性に欠ける化合物の測定には不向きである。こうした観点から、本研究では、非脱分極型筋弛緩薬 pancuronium (PAN), vecuronium (VEC) を例に取り上げ、液体クロマトグラフィー (LC) / エレクトロスプレーイオン化 (ESI) -MS の有用性について検討を加えた。

PAN, VEC は分子内に3級, 4級のアミノ基を持ち水溶性に富むことから、ESIが好適なイオン化法といえる。一方、これら筋弛緩薬の生体内半減期は短く、しかも代謝物の一部は薬理活性を持つ。このため体内動態の解析には迅速な一斉分析法の構築が求められる。そこで、PAN, VEC とそれらの代謝物 17-hydroxy-pancuronium (17-OH-PAN), 3,17-dihydroxy-pancuronium (3,17-OH-PAN), 3-hydroxy-vecuronium (3-OH-VEC), 3,17-dihydroxy-vecuronium (3,17-OH-VEC) の高感度一斉分析法を構築することとし、先ずこれらのMsにおける挙動に吟味を加えた。その結果、いずれも分子量関連イオンを与え、しかも in-source CID によりフラグメントイオンを生成することから、定量のみならず、定性にも有力な手法であることが明かとなった。

引き続き、LCにおける溶出挙動に検討を加え、分離能に優れ、しかも分析時間6.5分という迅速な分離条件を設定した。また、これら筋弛緩薬および代謝物は、ガラス製容器や、試料のろ過に用いるPVDF膜、PES膜に吸着され回収率が極めて低く、これに対しそれぞれポリプロピレン製の器具、親水性PTFE膜やセルロース膜、ナイロン膜ではこれが回避されることが明かとなった。さらに、試料の溶解にメタノールを用いると脱アセチル化されることも判明し、アセトニトリルを溶媒に用いる必要のあることも判明した。

本測定法を用い、ヒト血清試料に標品を添加し、測定したところ、PANでは3位あるいは17位のアセトキシル基が加水分解され、それぞれ3-OH体、17-OH体になった後、さらに3,17-OH体に変換されることが明かとなった。一方、VECでは3-OH体になり、次いで3,17-OH体に変換されることが分かった。これは、VECの17位アセトキシル基が、PANのそれより加水分解を受けにくいためと予想された。次いで、VECを投与した臨床試料に適用したところ、VEC, 3-OH-VEC, 3,17-OH-VECが認められ、このうち薬理活性を持つ3-OH体が圧倒的に高値を示すことがはじめて明かとなった。

以上、本論文は、裁判化学領域におけるLC/ESI-MSの有用性を示したものであり、博士(薬学)の学位論文として合格と認める。