

法薬毒物学鑑定としての
パラコートおよびジクワットの分析法の確立

Establishment of analytical methods of paraquat and diquat
as toxicological drug analysis in the field of forensic science

鈴木 雄亮 (Suzuki, Yusuke)

論文内容の要旨

薬毒物の使用が疑われる傷害、殺人などの犯罪が発生した場合、警察の科学捜査研究所において、薬毒物が混入された飲食物や被害者の生体試料といった証拠物件からその成分を特定するための薬毒物鑑定が行われる。このような法科学における薬毒物鑑定（以下、法薬毒物学鑑定）で分析対象となる化学物質は、薬物、揮発性毒物、重金属類、自然毒、化学兵器、界面活性剤および農薬など非常に多岐にわたる。パラコート(PQ)およびジクワット(DQ)は、アルキルジピリジニウム塩系の農薬に分類され、日本国内においてその塩を高濃度に含まする除草剤製品が過去に広く流通した。その入手の容易さから、1980年代にこれらの製品を使用した無差別殺人や自殺といった中毒事案が多発し、1986年にはその件数は1213件に昇り、社会問題となった。これを受け、高濃度の各単独製品からPQジクロリドとDQジプロミドの低濃度混合製品への切り替えが進み、中毒件数は減少傾向に転じたものの、警察庁科学警察研究所の統計によると、2016年でも52件の中毒死の報告があり、現在も重要な分析対象であることに変わりはない。現在、法薬毒物学鑑定において、PQ・DQの分析は、呈色試験による簡易スクリーニングに始まり、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)、液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)などによる定性および定量分析が主流となっているが、これらについて、それぞれ問題点が認められる。

呈色試験によるスクリーニングでは、それに先立ち固相抽出(SPE)カートリッジによりPQ・DQを抽出する必要があるが、通常30分程度の時間を要し、迅速性にやや欠ける。また、PQ・DQ混合製剤が混入された飲食物であれば

PQ・DQの濃度は非常に高く、呈色試験で容易にその含有の有無を判定することができるが、生体試料では、軽症の場合や治療によりその濃度が下がっている場合に、PQ・DQの存在を見落とす可能性が否定できない。これらのことから、PQ・DQの迅速抽出法と、低濃度の試料にも対応可能な呈色試験に代わる高感度検出法が必要となる。更に、法薬毒物学鑑定においては、用いる試料量は最小限にとどめるべきであり、再鑑定に備えた試料の温存も必要となる。したがって、これらの点も考慮したスクリーニング法の構築が求められる。

法薬毒物学鑑定において薬毒物の同定は、ガスクロマトグラフィー(GC)、液体クロマトグラフィー(LC)といった分離分析法と、物質識別能力が高い質量分析(MS)法を組み合わせたGC/MS, LC/MSにより達成され、これらの分析手法は、公判においても信頼性の高い同定法として評価され得る。これらの分析に先立ち、難揮発性化合物の揮発性化合物への変換、熱安定性の増大、イオン化効率の増大による検出感度の向上などの目的で誘導体化反応が用いられることがある。その反応が分析対象成分に特異的なもので、MSによる検出において特徴的なフラグメンテーションが起きる場合には、その分析の特異性が増し、物質同定の一助となる。従来は、LC/MSとして親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)か、あるいは逆相系カラム(C18)にイオンペア試薬を添加した移動相を用いるといった特殊な条件により、PQ・DQを直接検出する方法が一般的であった。しかし、LCによる法薬毒物学鑑定において、薬毒物はC18カラムとギ酸アンモニウムや酢酸アンモニウムなどの揮発性塩を含む移動相を用いる条件で分析することが多く、HILICカラムやイオンペア試薬を用いる条件は特殊であるため、他の薬毒物の分析との共用は困難である。したがって、特異性が高く、かつ、他の薬毒物の分析にも適用可能な汎用性の高いPQ・DQの定性分析法の確立が望まれている。

薬毒物を用いた犯罪の公判では、被害者の体内から検出された薬毒物の濃度が適用される罪名や量刑などに大きな影響を及ぼすため、定性分析に加えて定量分析も求められることがある。その結果が公判の争点となり、他の機関による再鑑定が行われることもあるため、より信頼性の高い定量分析法が必要となる。このため、法薬毒物学鑑定では安定同位体標識物質を内部標準物質として用いた同位体希釈質量分析がしばしば用いられる。PQ・DQの分析においても、安定同位体標識PQ・DQを内部標準物質として定量を検討した報告があり、安定同位体標識DQとしてDQ- d_4 を用いているが、近年、重水素-水素交換反応によりDQ- d_4 からDQが生成し、その結果、誤検出が起き、正確な定量値が

得られないといった危険性が指摘されている。したがって、このような問題が起きないように DQ- d_4 に代わる新たな安定同位体標識 DQ が必要であり、PQ の分析と合わせた精確性の高い定量法の開発が不可欠である。

そこで本研究では、法薬毒物学鑑定において重要な分析対象となる PQ・DQ について、微量試料(0.1 mL)からの迅速スクリーニング法、公判に耐え得る証明力の高い定性分析法、同位体希釈質量分析による高感度かつ精確性の高い定量分析法を合わせた体系的分析法を確立することを目的とした。

第 I 章では、PQ・DQ が清涼飲料水に混入された試料を想定したピペットチップ型 SPE デバイスを用いたマイクロ固相抽出(μ SPE)と呈色試験、並びに生体試料に適用可能な固相分散抽出(SPDE)とマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF-MS)を併用した方法を構築し、それぞれ法薬毒物学鑑定における PQ・DQ の迅速スクリーニング法としての有用性を検討した。清涼飲料水試料について、ブチルシリカ、オクタデシルシリカ、強酸性カチオン交換タイプのピペットチップ型 SPE デバイスを用いた μ SPE-呈色試験を検討したところ、低濃度試料(清涼飲料水に PQ・DQ 混合除草剤製品を体積分率 0.01 %となるように添加したもの)においても呈色による PQ・DQ の含有の判定が可能であった。特に、抽出に要する時間は、従来の SPE カートリッジを用いる方法と比較して約 10 分の 1 に短縮された。生体試料(血液および尿)については、弱酸性カチオン交換固相(Oasis[®] WCX)を用いた SPDE を行い、溶出液にマトリックス溶液(α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸のトリフルオロ酢酸水溶液/アセトニトリル溶液)を用い、その溶出液について直接 MALDI-TOF-MS を行ったところ、軽症を想定した低濃度(0.05 μ g/mL)の試料においても PQ・DQ は良好に検出された。MALDI-TOF-MS による PQ・DQ の検出は、呈色試験と比較して迅速性の面も遜色は無く、PQ・DQ の含有の判定に資する質量情報が取得可能で、更に検出感度の面では PQ で 200 倍、DQ で 150 倍高いという利点があった。以上のことから、本スクリーニング法は法薬毒物学鑑定上、有効性の高い方法であると考えられた。

第 II 章では、生体試料(血液および尿)中 PQ・DQ について、誘導体化反応(酸化反応)により対応する各酸化体に変換し、C18 カラムとイオンペア試薬を用いない一般的な移動相を用いた LC により各酸化体を分離し、MS により検出することによる定性分析法の構築を検討した。血液試料に対してはスルホサリチル酸による除タンパク処理を、尿試料に対しては Oasis[®] WCX を用いた SPDE による簡易精製を行った後、フェリシアン化カリウムと水酸化ナトリウム水溶液

を用いた酸化反応により PQ・DQ を各酸化体に変換した。生成した酸化体を SPE カートリッジ(Oasis® MAX)で精製した後、LC カラムとして C18 カラムを、移動相としてギ酸アンモニウム緩衝液およびメタノールを用いた一般的な条件での LC/MS を行ったところ、各酸化体を良好に分離し、高感度に検出することができた。更に、誘導体化反応も伴うことで特異性もより増大している。したがって、本法は、生体試料中の PQ・DQ の定性分析法として、十分な証明力を持つものであり、法薬毒物学鑑定において有意義な方法であると考えられた。

第 III 章では、PQ- d_6 と新たに合成した DQ- d_8 を内部標準物質として、生体試料(血液および尿)中の PQ・DQ について、煩雑な操作を必要としない SPE による抽出と液体クロマトグラフィ-イオントラップ型質量分析(LC/IT-MS)による高選択性検出に基づいた精確性の高い定量分析法の構築を検討した。初めに、DQ- d_4 と DQ- d_8 の安定性について検証したところ、塩基性下、DQ- d_4 からは DQ が生成し、腐敗した血液や尿といった塩基性の試料では誤検出や定量値の押し上げといった問題が発生するものと考えられた。これに対し、同条件下で、DQ- d_8 からは DQ は検出されなかったことから、DQ- d_8 が内部標準として適当である可能性が示された。PQ・DQ の抽出は、弱酸性カチオン交換能を持つ固相が充填された SPE カートリッジ(EVOLUTE® WCX)を用いて行った。その結果、回収率は PQ が 90.5~98.7%，DQ が 88.5~94.5% と良好で、相対標準偏差(RSD)も十分に低く(1.0~3.9%)、従来の抽出法と比較しても遜色ないものであった。更に、この抽出法は、除タンパク処理や pH 調整が不要である点で従来法よりも簡便であるものと考えられた。抽出された PQ・DQ は、HILIC カラムを用いた LC により良好に保持・分離され、IT-MS の選択反応モニタリングモードにより高選択的に検出された。PQ- d_6 と DQ- d_8 を用いた同位体希釈質量分析法による定量分析を検討したところ、PQ・DQ 共に 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で良好な直線性(相関係数(r) > 0.999)が得られ、更に、真度は 93.3~103%，日内精度(%RSD)は 0.7~4.7%，日間精度(%RSD)は 0.8~6.7% と非常に精確性が高く、PQ- d_6 と DQ- d_8 は十分に内部標準物質として機能することが判明した。したがって、本法は、精確性の高い定量を求められる法薬毒物学鑑定において、生体試料中 PQ・DQ の定量分析法として非常に実用性が高いものと考えられた。

以上の研究結果から、本研究で確立した PQ・DQ の分析法は、法薬毒物学鑑定における PQ・DQ の分析法として極めて有用な方法であることが示され、今後の法科学分野への活用が期待される。