

Fig 33 Typical mass chromatograms obtained from human black hair

厚生科学研究

薬物中毒，薬害，農薬中毒等の予防と
原因解明のための毛髪診断研究

分担研究 毛髪からのパラコート分析

平成11年度研究報告書

日本医科大学

法医学教室

大野曜吉

仁平 信

林田真喜子

我が国では、地域差があるものの、未だ農薬中毒が高頻度で認められる現状である。特にパラコート系除草剤による中毒は解毒剤もなく悲惨な転帰をむかえる。服用後日数を経過してから死亡するケースも多く、薬毒物分析の上で、パラコート・ダイコート(PQ・DQ)の証明に苦勞することもある。メタンフェタミンのように毛髪への移行が証明されている薬物では、毛髪を検査対象にすることか、死因の究明ばかりでなく、薬物使用の履歴の解明にも有効な手段となっている。毛髪は腐敗に対しても抵抗性があり、生体のみならず、法医学で取り扱うような陳旧死体についても有力な情報源となるであろう。

ところが、PQ・DQについては毛髪への移行や毛髪中からの測定についての報告は未だなされていない。そこで、今年度はⅠ 毛髪中PQ・DQを測定するためのLC/MS法の確立、Ⅱ PQ・DQ投与ラットにおける体毛からの検出および中毒例のヒト毛髪からのPQ・DQの検出、の2項目につき検討を行った。

[1] 毛髪中PQ・DQを測定するためのLC/MS法の確立

1. 測定機器および分析条件

測定装置 LC ; Hewlett Packard製HP1100シリーズ

G1322Aデガッサ, G1312バイナリポンプ, G1313Aオートサンプラ,
G1316Aカラム恒温槽, G1315Aダイオードアレイ検出器,

MS , Hewlett Packard製HP1100MSD

分析条件 . カラム . Mightysil RP-18GP(2.1i.d.x250mm, 5 μ m)

カラム温度 , 40 $^{\circ}$ C

移動相 , A=0.05%CH₃COOH, 0.05%ヘプタフルオロ酪酸/H₂O,

B=アセトニトリル, A B=90 10(v/v),

流速 , 0.2mL/min

注入量 , 10 μ l

イオン化法 : API-ES(ESI), positiveモード

mass range , m/z 110-500

SIM ; m/z 185.1, 171.1 for PQ, m/z 183.1, 157.1 for DQ

キャピラリー電圧 ; 3.5kV, フラグメント電圧 , 120V

ネフライザ , N₂(50psi), N₂(12L/min), 350 $^{\circ}$ C

2 フローインジェクション(FIA)によるMS条件の最適化

FIAにてMS条件の最適化を行った。インターフェイスはエレクトロスプレーイオン化(ESI)法を用い、正(positive)イオンモードで測定した。キャピラリーの出口側の電圧(Frag電圧)を40~240Vに設定し、各電圧値におけるイオン強度とLC/MSスペクトルについて検討した。PQ・DQのいずれもトータルイオン強度はFrag.120Vの時最大となり、以降、Frag電圧の上昇に伴い減衰した(Fig. 1, 2)

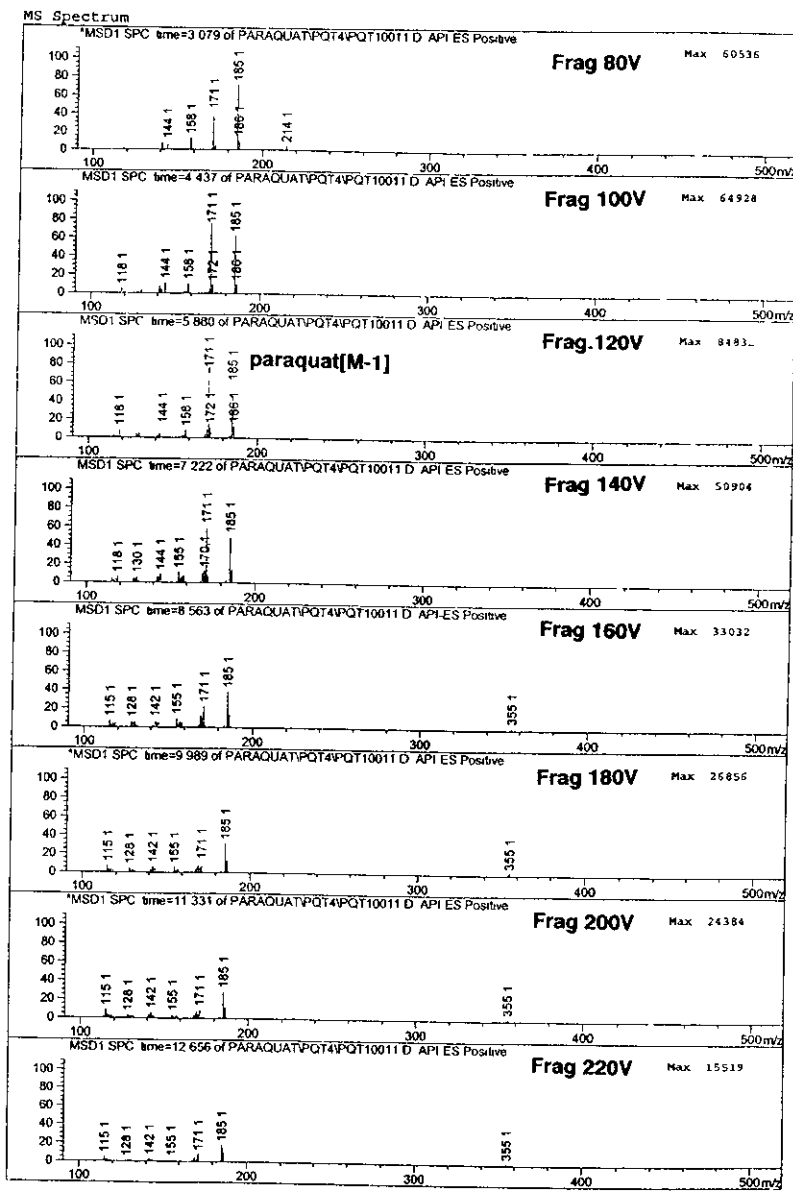
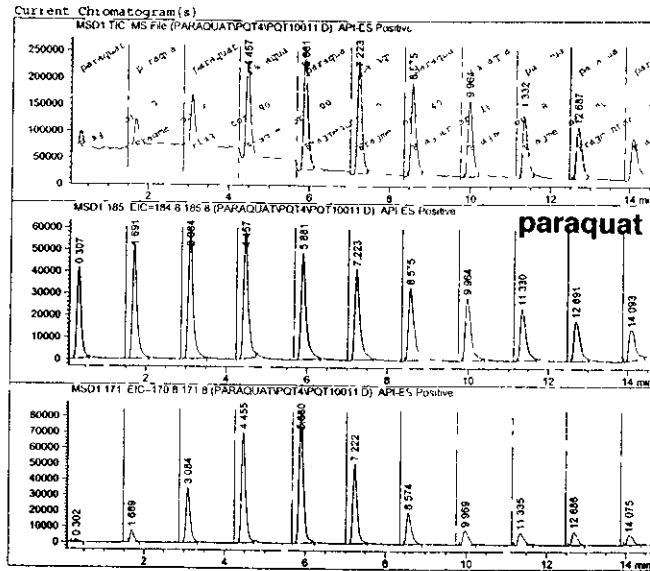


Fig 1. パラコートのFIA分析ならびにフラグメント電圧を変化させて得られるLC/MSスペクトル

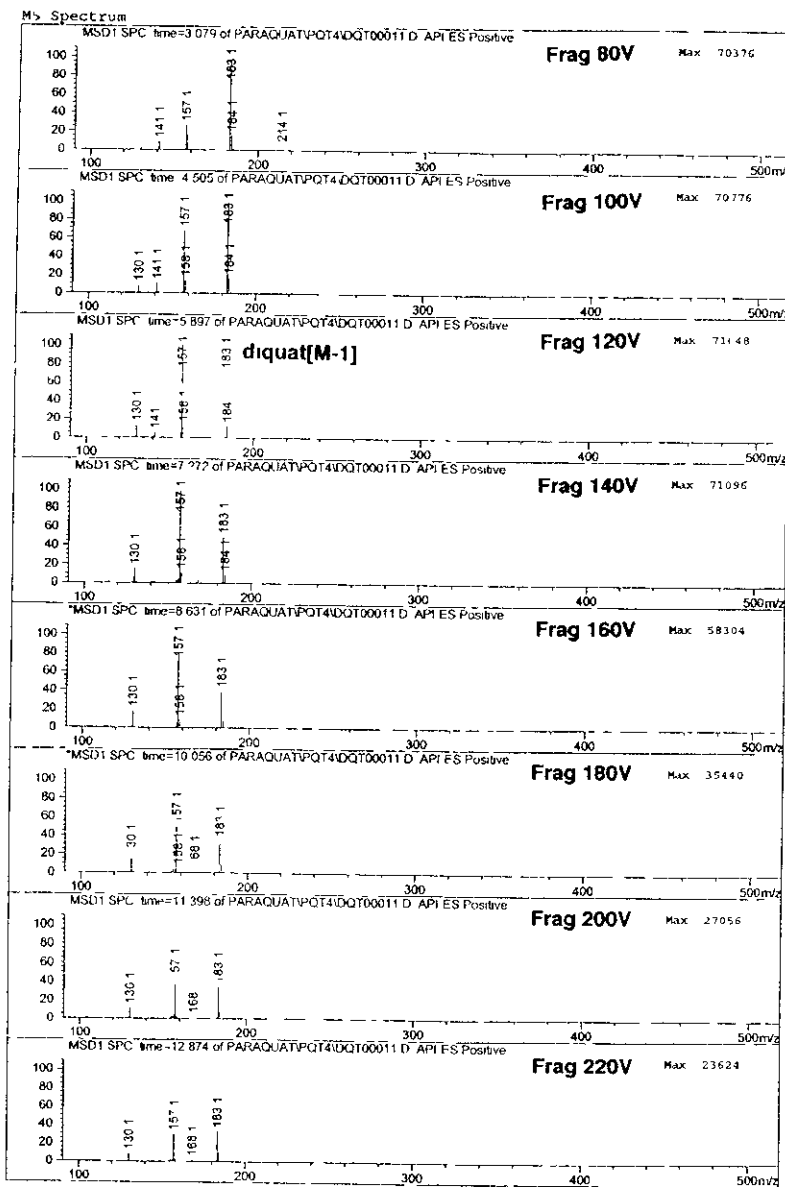
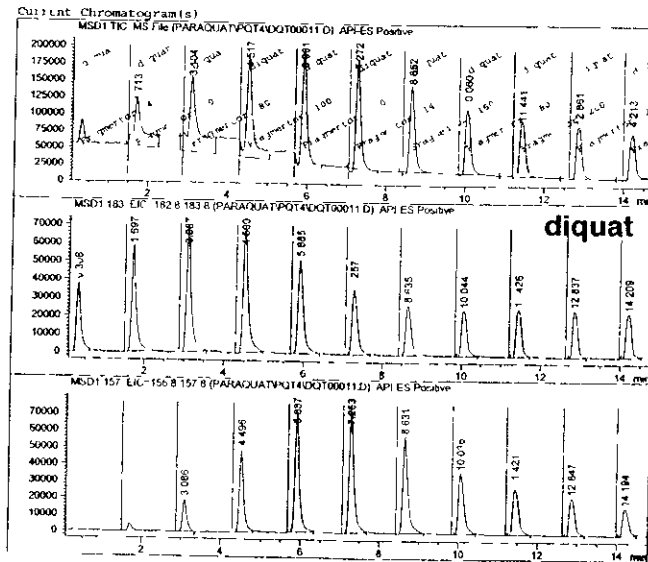


Fig 2. ダイコートのFIA分析ならびにフラグメント電圧を変化させて得られるLC/MSスペクトル

MSスペクトル上においては各電圧値で m/z 185の[M-1] がベースピークイオンとして検出された。電圧の上昇に伴い、PQ・DQの化学構造を反映したフラグメントイオンが検出された(Fig. 1, 2)

以後の測定では、Frag電圧を[M-1]イオンの強度が最大となる120Vに設定した。

3. SCANモードでの検討

LC条件に関しては、HPLCカラムに関東化学(株)製Mightysil RP-18GP (2.1i.d.x 250mm, 5 μ m)を、移動相にH₂O/アセトニトリル(90:10, v/v)を使用し、移動相の流量は0.2ml/minに設定した。また、移動相中のイオンペア試薬は、ヘプタフルオロ酪酸(HFBA)を0.05%の濃度で添加した0.05%CH₃COOH水溶液とした。PQ・DQ標準混合液(500ng/10 μ l)をSCANモードで分析した。HPLCクロマトグラム上、PQとDQは移動相の組成を変化させても分離しなかった。LC/MSスペクトルでは、PQの[M-1]である m/z 185、DQの[M-1]である m/z 183がベースピークイオンとして検出された。 m/z 185、 m/z 183マスクロマトグラムで、PQは保持時間(Rt)2.738min、DQは2.718minのピークとしてみとめられた(Fig.3)。

4. SIMモードでの検討

PQ・DQ標準混合液(0.5-5ng/10 μ l)について、 m/z 185あるいは183をモニターイオンとし、SIMモードで検量線を作成した。その結果、本分析法においては上記の濃度範囲においてPQ・DQのいずれも相関係数(r)>0.98以上の良好な直線性を示した(Fig.4)

検出限界はPQ・DQのいずれも、500pg/10 μ lでS/N比>80のピークが検出された(Fig.5)

再現性は、PQ・DQ標準混合液(2ng/10 μ l)をSIMモードで5回繰り返し測定した結果、PQ CV値=6.9%、DQ CV値=6.0%といずれも良好であった。

5 ラット毛髪抽出物のLC/MS分析

上記の分析条件にて、MilliQ水、操作ブランク(SepPak Light処理)、ラット体毛ブランクおよびPQ・DQ混合液(2ngあるいは20ng/10 μ l)添加ラット体毛ブランクについて測定した。ラット体毛ブランク試料の m/z 185、183のSIMクロマトグラム上において、PQ・DQの溶出付近(Rt 2.7min)に不明成分が検出された(Fig.6)。

このピークの詳細については不明であるが、ラット体毛ブランク試料に添加して作成したPQ・DQ標準混合液(2-20ng/10 μ l)での検量線では良好な直線性が得られた(Fig.7)

さらに、ラット体毛ブランク試料の毛根部について、SDS未洗浄のものと洗浄のものを比較したところ、 m/z 185のSIMクロマトグラム上において、PQ・DQの溶出付近(Rt 2.7min)に、洗浄・未洗浄のいずれにも不明成分が検出された(Fig.8)。

また、SCANモードでRt 2.7minに相当するスペクトルをとったところ、Fig 9の如く、特に185、183を特徴とするスペクトルは得られなかった。

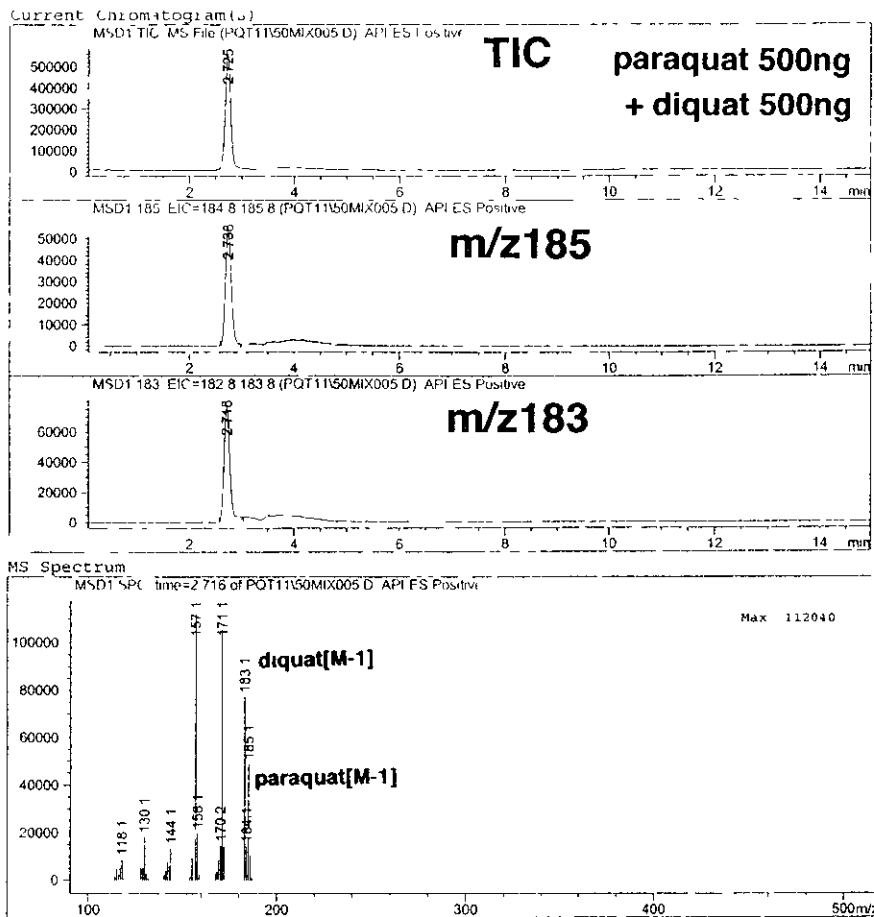


Fig 3. パラコート500ng, ダイコート500ngの標準混合液のLC/MSクロマトグラムならびにLC/MSスペクトル

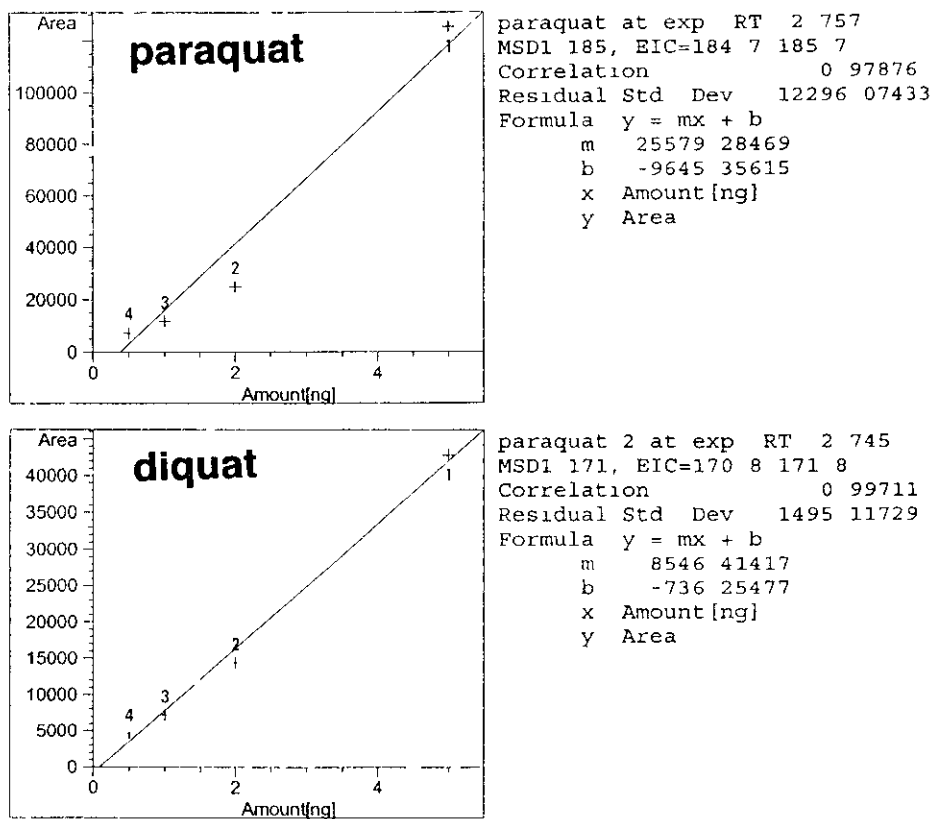


Fig 4. パラコート(m/z185)ならびにダイコート(m/z183)の検量線(0.5-5ng/10μl)

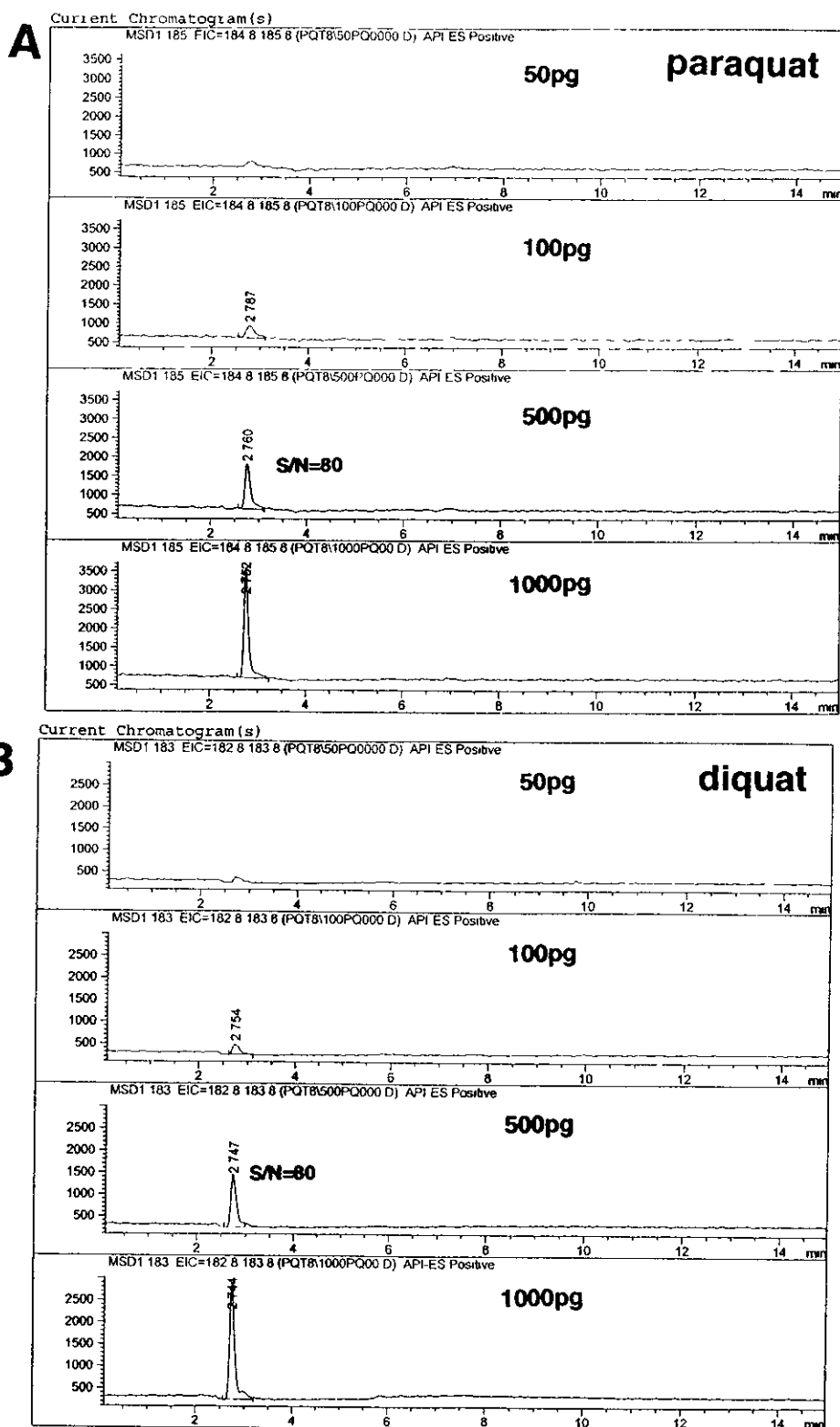


Fig 5. パラコート(A)ならびにダイコート(B)の検出限界(S/N=80)

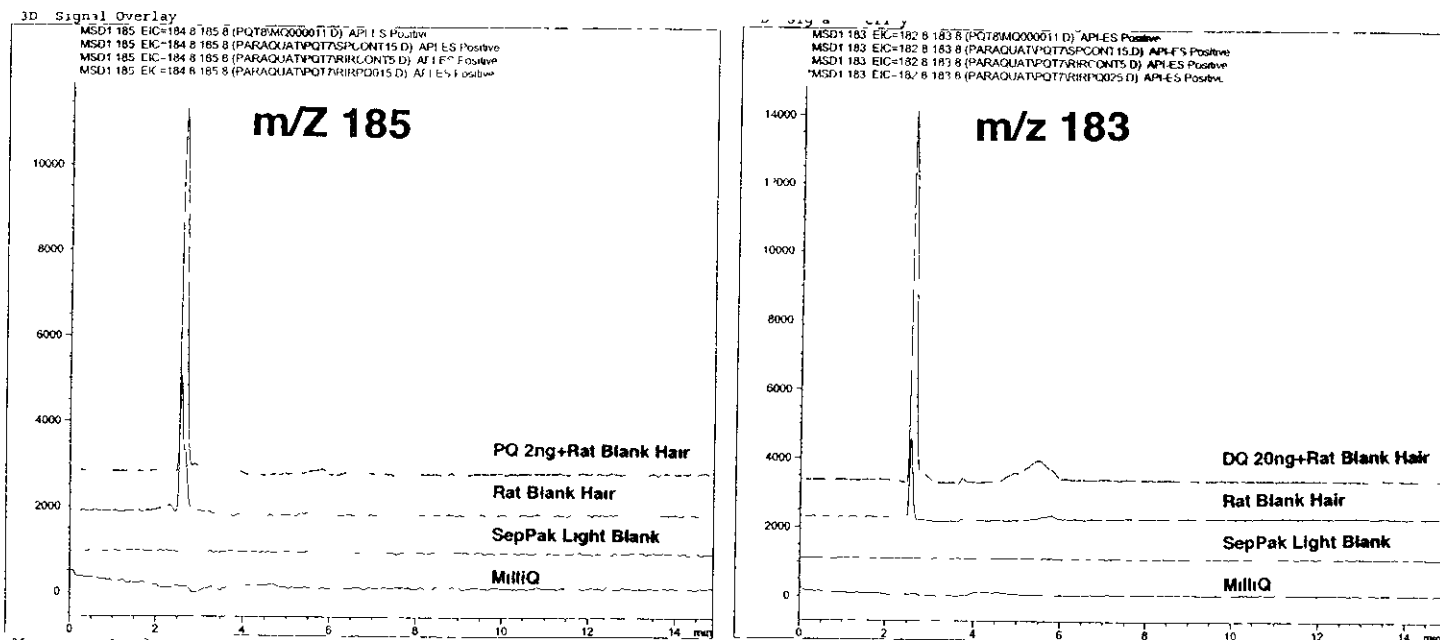


Fig 6 ラット体毛ブランク試料の特異性-1

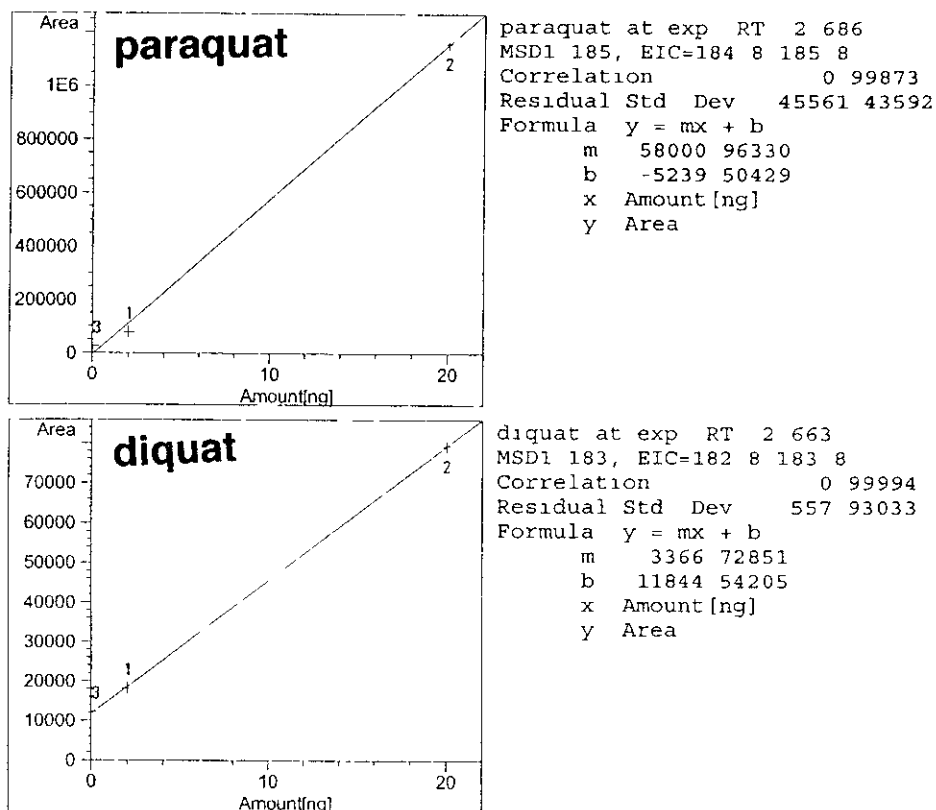


Fig 7. ラット体毛ブランク試料に添加して作成したPQ・DQ標準混合液(2-20ng/10 μ l)でのパラコート(m/z185)ならびにダイコート(m/z183)の検量線

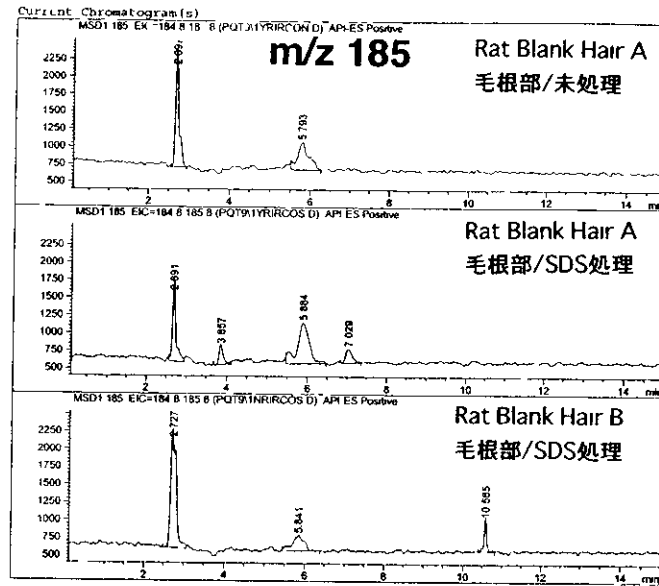


Fig 8. ラット体毛ブランク試料の特異性-2

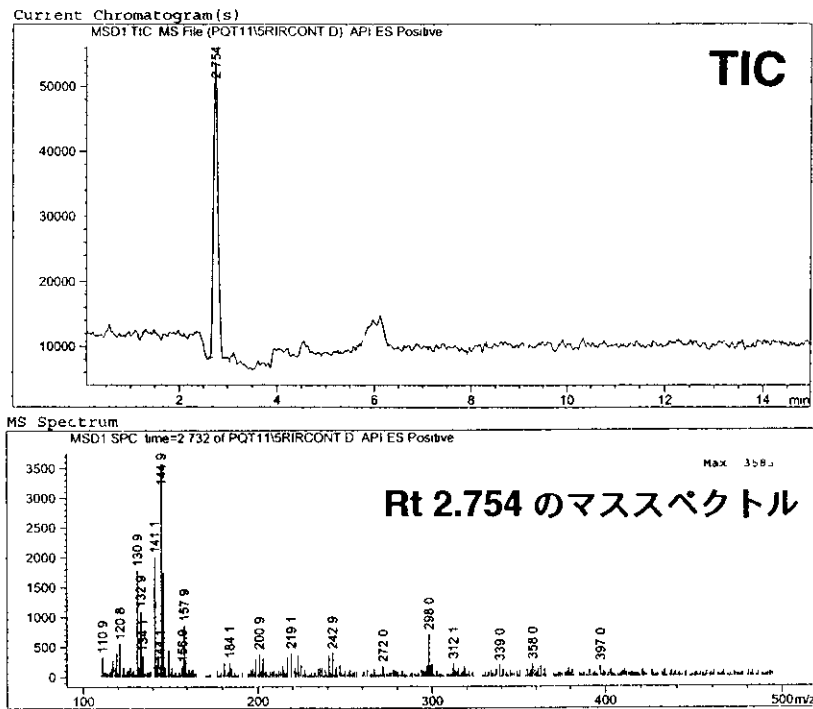


Fig 9. ラット体毛ブランク試料中のRt 2.7minピークのスペクトル(SCAN mode)

6 ヒト毛髪抽出物のLC/MS分析

上記の分析条件にて、MilliQ水、操作フランク(SepPak Light処理)、ヒト毛髪フランクおよびPQ・DQ混合液(2ngあるいは20ng/10 μ l)添加ヒト毛髪フランクについてSIMモードで測定した。ヒト毛髪フランク試料のm/z185, 183のSIMクロマトグラム上において、PQ・DQの溶出付近(Rt 2.7min)に不明成分が検出された(Fig. 10)

このピークの詳細については不明であるが、ヒト毛髪フランク試料に添加して作成したPQ・DQ標準混合液(2-20ng/10 μ l)での検量線では良好な直線性が得られた(Fig. 11).

さらに、ヒト毛髪フランク試料を毛根部と毛幹部に分け、SDS未洗浄のものと洗浄のものを比較した。m/z185, 183のSIMクロマトグラム上において、PQ・DQの溶出付近(Rt 2.7min)に、洗浄・未洗浄のものいずれにも不明成分が検出された(Fig. 12)

また、SCANモードでRt 2.7minに相当するスペクトルをとったところ、Fig 13の如く、特に185, 183を特徴とするスペクトルは得られなかった。

以上のとおり、PQ・DQ共、検出限界500pg/10 μ l以上においてLC/MSによる測定法が確立された。Rt2.7min付近における微量な不明成分との重なりはあるものの、体毛フランクを用いた検量線法によれば、毛髪からのPQ・DQの測定は可能であると結論された。

[2] LC/MS測定法によるラット体毛およびヒト毛髪中PQ・DQの測定

上記のとおり確立したLC/MSによる測定法を用いて、本年度は昨年度に引き続き、PQ・DQの毛髪への取り込みについてラット体毛を用いて検討した。さらに、ヒト毛髪への取り込みをPQ・DQ服用後の死亡例の毛髪を用いて検討した。

1 PQ・DQ濃度のラット体毛洗浄の影響について

1) 試料の調整

毛髪からのPQ・DQ検出に際しての毛髪洗浄の影響について、昨年度のPQ投与ラット体毛を用いて検討した。用いた試料は以下の5検体、重量は以下のとおりである。

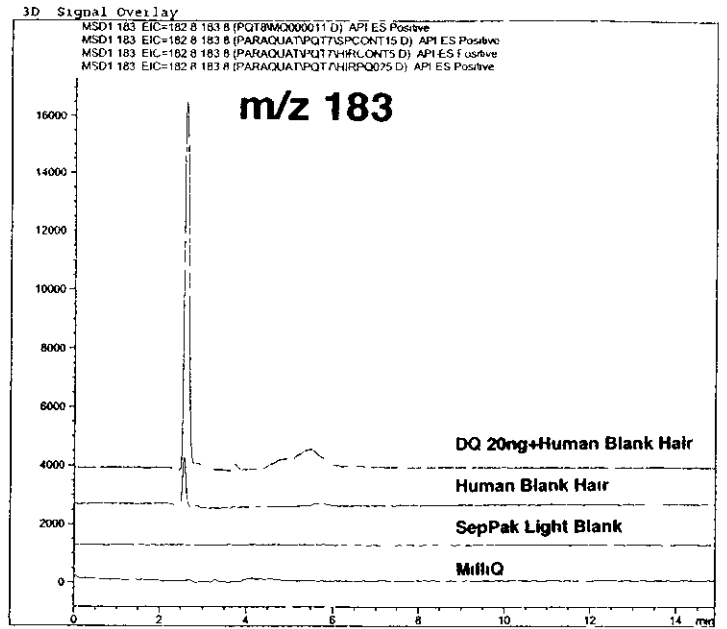
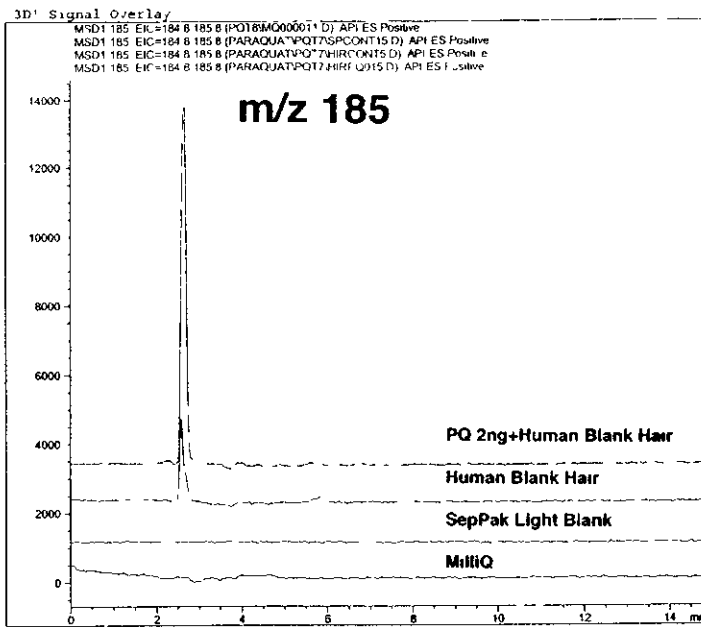
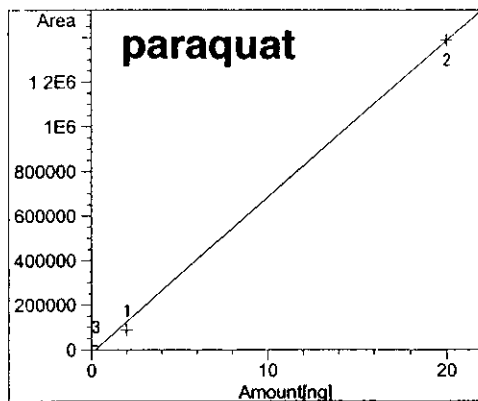
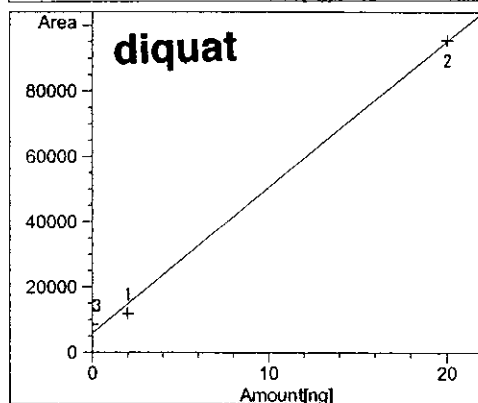


Fig 10. ヒト毛髪ブランク試料の特異性-1



paraquat at exp RT 2 678
 MSD1 185, EIC=184 8 185 8
 Correlation 0 99896
 Residual Std Dev 49725 33678
 Formula $y = mx + b$
 m 69951 34238
 b -15246 10972
 x Amount [ng]
 y Area



diquat at exp RT 2 662
 MSD1 183, EIC=182 8 183 8
 Correlation 0 99836
 Residual Std Dev 3995 22907
 Formula $y = mx + b$
 m 4471 46297
 b 5828 42257
 x Amount [ng]
 y Area

Fig 11. ヒト毛髪ブランク試料に添加して作成したPQ・DQ標準混合液(2-20ng/10 μ l)でのパラコート(m/z185)ならびにダイコート(m/z183)の検量線

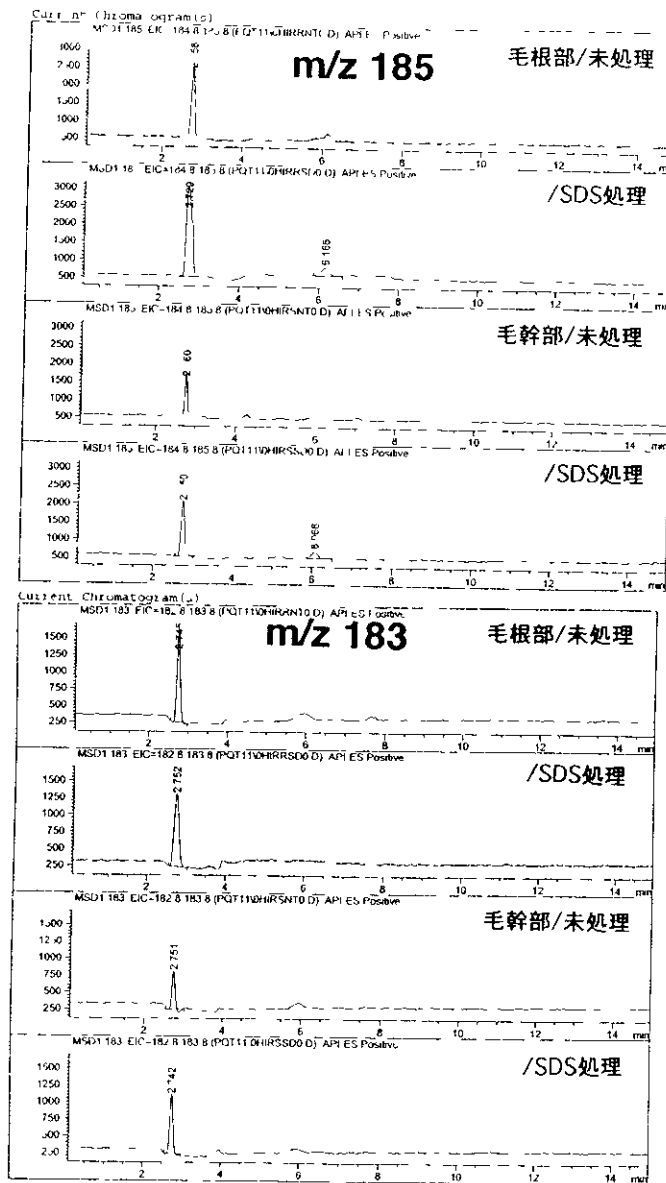


Fig 12 ヒト毛髪フランク試料の特異性-2

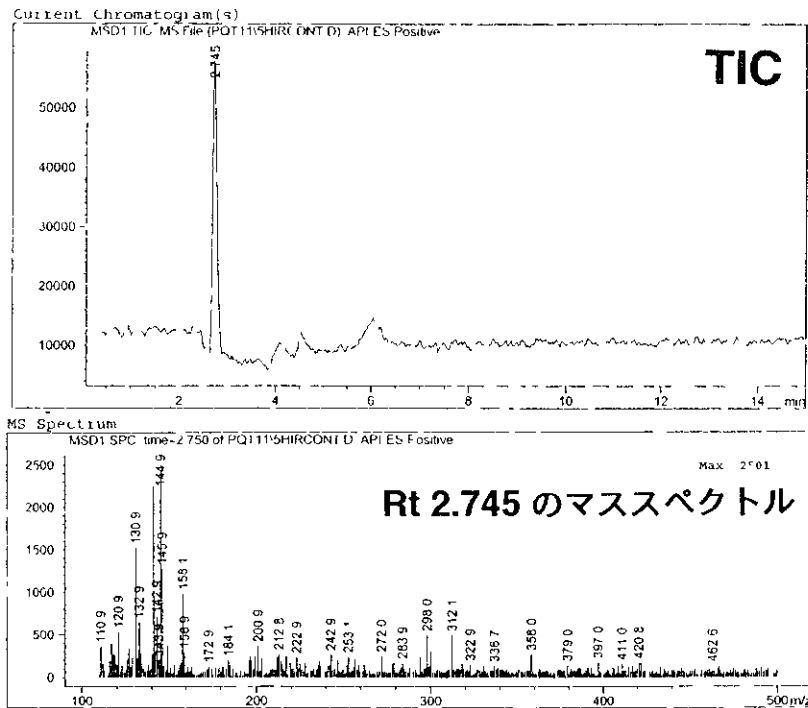


Fig 13. ヒト毛髪フランク試料中のRt 2.7minピークのスペクトル(SCAN mode)

	未処理	洗浄(0.1%SDS処理)
PQ-1(80mg/kg) 1D	5.2mg	2.7mg
PQ-2(80mg/kg) 2D	6.1mg	6.5mg
PQ-3(100mg/kg) 3D	7.8mg	4.9mg
PQ-4 Alive(100mg/kg) 4A	6.8mg	4.4mg
PQ-4 Dead(100mg/kg) 4D	5.8mg	6.2mg

2) 毛髪の洗浄

上記ラット体毛各検体に各々0.1%SDS 2mlを加え1分間超音波処理し、溶液を捨て、再度0.1%SDS 2mlを加え同様の操作を繰り返した。次に蒸留水2mlを加え1分間超音波処理し、洗浄液を捨て、再度蒸留水2mlを加え同様の操作を繰り返した。その後、ろ紙にて水分を吸収後、デシケータ内にて一晩乾燥し、体毛を秤量、鋏にて細片し試料とした。

3) 毛髪からの抽出

前年度の抽出法と同様である。各検体に10%トリクロロ酢酸2mlを加え、2時間超音波処理し、一晩、暗所に放置した。翌日、ろ過し、10%トリクロロ酢酸1mlで洗浄後、ろ液に10%炭酸ナトリウム2mlを加え、pHを11に調整後、SepPak C18 lightカラムにて精製した。カラムは蒸留水5ml、メタノール5ml、蒸留水5mlであらかじめ活性化後、試料を添加し、蒸留水5ml、メタノール5ml、蒸留水5mlで順次カラムを洗浄した。0.1N塩酸5mlにてPQ・DQをカラムから溶出させた。溶出液は窒素気流下で蒸発乾固後、0.1N塩酸0.5mlにて再溶解しLC/MSにて測定した。

4) 測定条件

前章[1]で定めた条件で行った

5) 測定結果

上記の分析条件にて、PQ投与ラット体毛、ラット体毛ブランクおよびPQ・DQ混合液(2ngあるいは20ng/10 μ l)添加ラット体毛ブランク中のm/z185についてSIMモードで測定した。PQ投与ラット体毛は、ラット体毛ブランク試料にPQ2ngを添加した場合と同程度以上のイオン強度が得られ、体毛ブランクとは明らかにイオン強度に差が認められ、PQ投与ラット体毛からのSIMモード定量は可能であることが確認された(Fig.14)。

ラット体毛ブランクにPQを添加した検量線を用いて、PQ投与ラット体毛のPQ定量を行った。

m/z185を用いたPQ投与ラット体毛のSIMモード定量の一例をFig. 15に示した。

また、すべての体毛試料の測定の前後にMilliQ水の測定を行ってm/z185ならびにm/z183に対する影響を検討した結果、コンタミ、キャリーオーバー等はみられなかった(Fig.16, 17)。

PQ投与ラット体毛中のPQ濃度と洗浄の影響についての成績を、以下の表に示した。上段は未洗浄の測定結果、下段は0.1%SDSによる洗浄後の測定結果である。0.1%SDS洗浄

による著しい濃度の低下は認められなかった。このことより、PQ・DQの体毛(毛髪)への取り込まれる機構が、メタンフェタミン等の洗浄により減少する薬物と異なっている可能性が示唆された。また、PQ-1D, PQ-3D, PQ-4Aでは洗浄したものが未洗浄のものより高値を示した。洗浄による何らかの影響が考えられるが、今後の検討課題となろう。

表. パラコート投与ラット体毛中のパラコート濃度と洗浄の影響

	毛髪重量(mg)	パラコート濃度 (ng/mg)	洗浄の影響 (%)
PQ-1D 未処理	5.2	9.3	/
PQ-2D 未処理	6.1	12.6	
PQ-3D 未処理	7.8	6.3	
PQ-4A-5 未処理	6.8	8.2	
PQ-4D-5 未処理	5.8	17.9	
PQ-1D SDS処理	2.7	19.1	204.4
PQ-2D SDS処理	6.5	12.5	98.8
PQ-3D SDS処理	4.9	10.6	167.4
PQ-4A-5 SDS処理	4.4	15.9	194.5
PQ-4D-5 SDS処理	6.2	18.9	105.2

2 ヒト毛髪への取り込みについて -毛根部と毛幹部に分けての検討-

1) 試料の調製

毛髪の毛根端から約0.5cmをとり毛根部とした。残りの先端までを毛幹とした。先のラット体毛による洗浄の影響の検討から、洗浄の影響が認められないこと、試料が少量であることを考慮し、未洗浄にて測定した。

Hair-2 76歳, 女性 マイゼット(PQ 5%, DQ 7%)服用, 変死体
(長さ約7cm前後, 10本)

Hair-3 63歳, 女性 PQ系農薬(成分詳細不明)にて自殺 (長さ約8cm前後, 10本)

Hair-4. 48歳, 男性 パラゼット(PQ 24%)を服用し死亡
(長さ約10cm前後, 20本)

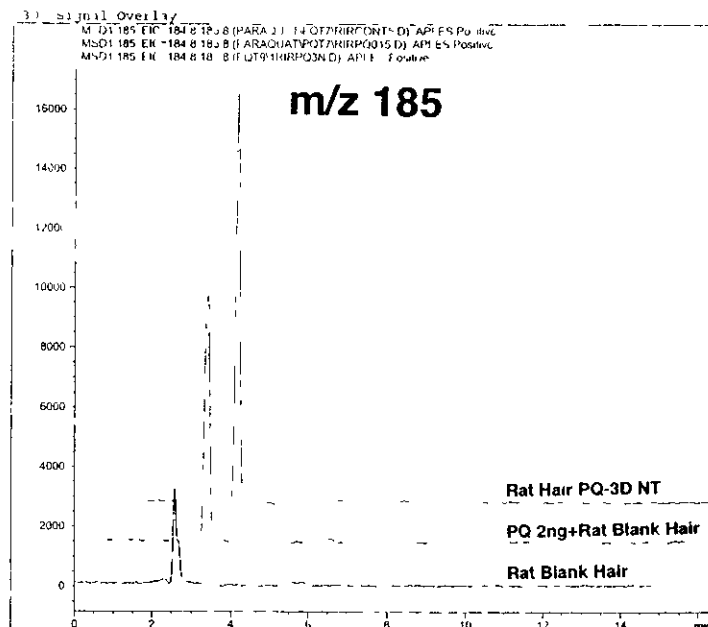
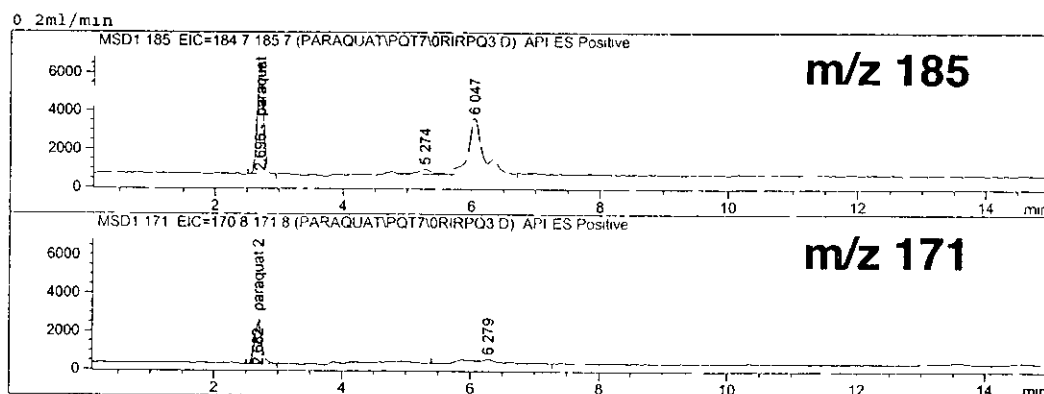


Fig 14. パラコート投与ラット体毛, ラット体毛ブランクおよび 2ngあるいは20ng PQ・DQ混液添加ラット体毛ブランク中のm/z185



External Standard Report

Sorted By Signal
 Calib Data Modified 3/7/00 3 28 47 PM
 Multiplier 1 0000
 Dilution 1 0000

Signal 1 MSD1 185, EIC=184 7 185 7
 Uncalibrated Peaks using compound paraquat

RetTime [min]	Type	Area	Amt/Area	Amount [ng]	Grp	Name
2.696	PB	3.90029e4	1.26321e-3	49.26879		paraquat
5.274	PV	7773.06494	1.26321e-3	9.81901		?
6.047	VB	5.13837e4	1.26321e-3	64.90836		?
Totals				123.99616		

Signal 2 MSD1 171 EIC=170 8 171 8
 Uncalibrated Peaks using compound paraquat 2

RetTime [min]	Type	Area	Amt/Area	Amount [ng]	Grp	Name
2.682	PB	1.65743e4	6.72349e-3	111.43736		paraquat 2
6.279	BB	1.12918e4	6.72349e-3	75.92016		?
Totals				187.35752		

Fig 15. パラコート投与ラット体毛のm/z185, 171におけるSIM分析

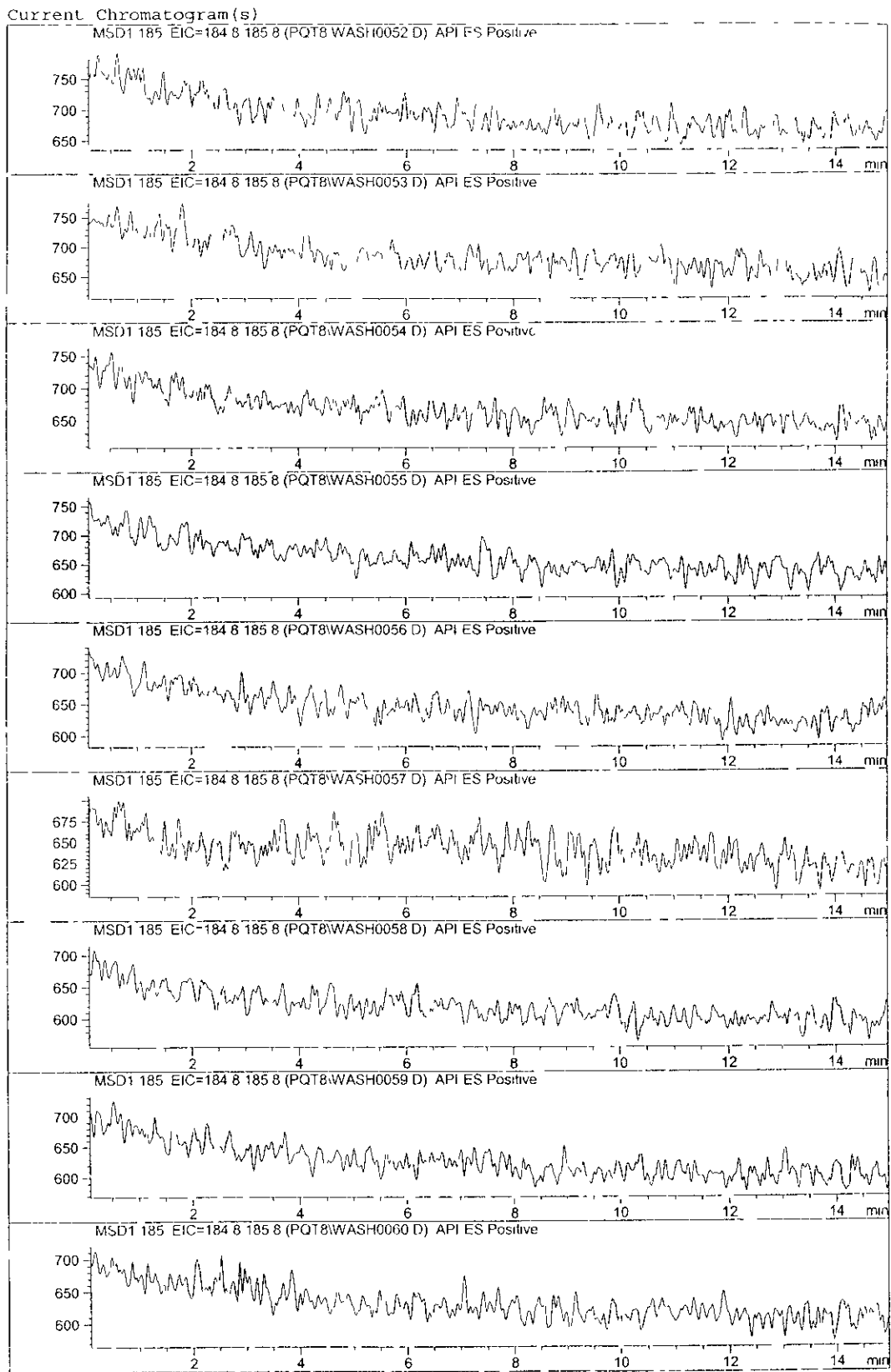


Fig.16 MilliQ水のSIMクロマトグラム(m/z185)

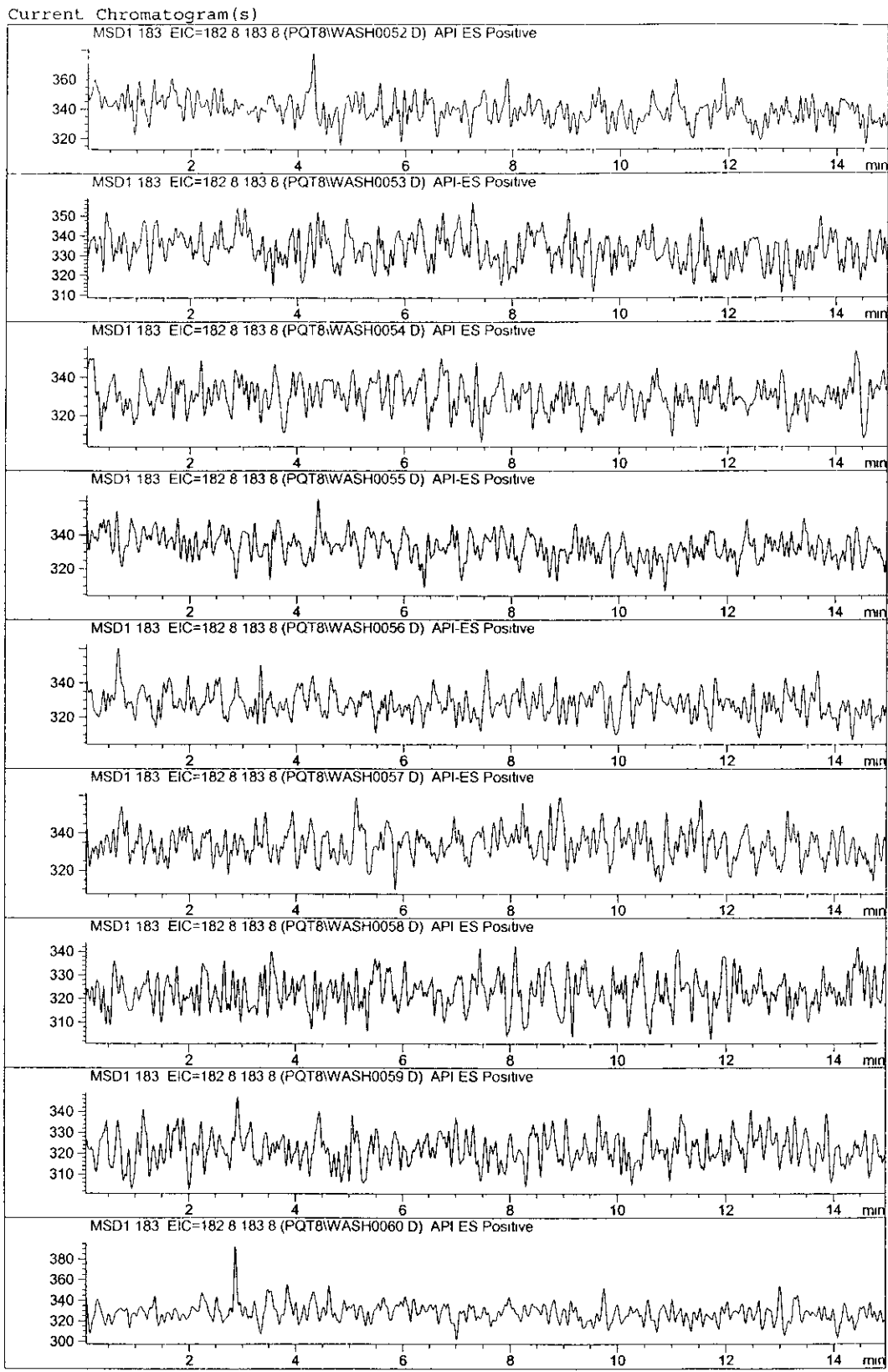


Fig.17 MilliQ水のSIMクロマトグラム(m/z183)

	毛根部	毛幹部
Hair-2	2.1mg	12.3mg
Hair-3	2.0mg	10.4mg
Hair-4	7.0mg	12.0mg

上記試料を、ラット体毛と同様に処理しLC/MSにて測定した

2) 測定条件

前章[1]で定めた条件で行った

3) 測定結果

上記の分析条件にて、PQ服用死体の毛髪、ヒト毛髪ブランクおよびPQ・DQ混合液(2ngあるいは20ng/10 μ l)添加ヒト毛髪ブランク中のm/z185, 183についてSIMモードで測定した。PQ服用死体の毛髪は、ヒト毛髪ブランク試料にPQ2ng, DQ20ngを添加した場合と同程度以上のイオン強度が得られ、毛髪ブランクとは明らかにイオン強度に差が認められ、PQ服用死体の毛髪からのSIMモード定量は可能であることが確認された (Fig.18)

ヒト毛髪ブランクにPQ・DQを添加した検量線を用いて、PQ服用死体の毛髪のPQ・DQ定量を行った

m/z185, 183を用いたPQ服用死体毛髪のSIMモード定量の一例をFig.19に示した

PQ服用死体(Hair 2,3,4)の毛髪中PQ量についての成績を、以下の表に示した Hair-2, Hair-4のいずれにおいても、服用したと思われる農薬成分と毛髪で検出された成分は一致していた。Hair-2ではDQがPQより高濃度であったが、これが何に起因するかは今後の更なる検討が必要であろう。すべての試料で毛根部が毛幹部より高い濃度を示した。各事例における中毒から死亡までの時間等は不明であるが、毛根に取り込まれたPQ・DQが、時間経過とともに毛幹部に移行する可能性を示唆しているものと思われる

表. パラコート服用死体(Hair 2,3,4)の毛髪中パラコート量

	毛髪重量(mg)	パラコート量 (ng/mg)	ダイコート量 (ng/mg)
Hair2 毛根部	2.1	16.2	53.4
Hair2 毛幹部	12.3	4.0	10.83
Hair3 毛根部	2.0	11.0	51.0
Hair3 毛幹部	10.4	3.2	13.9
Hair4 毛根部	7.0	35.2	-
Hair4 毛幹部	12.0	17.7	-

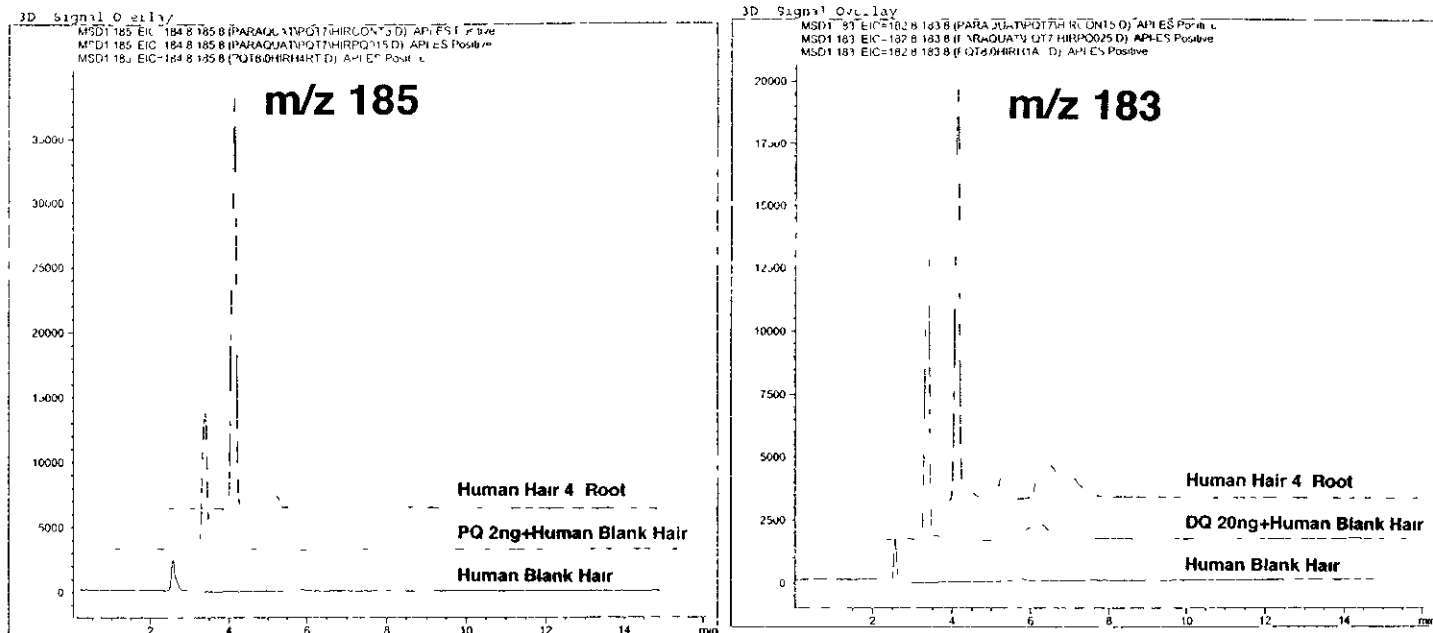
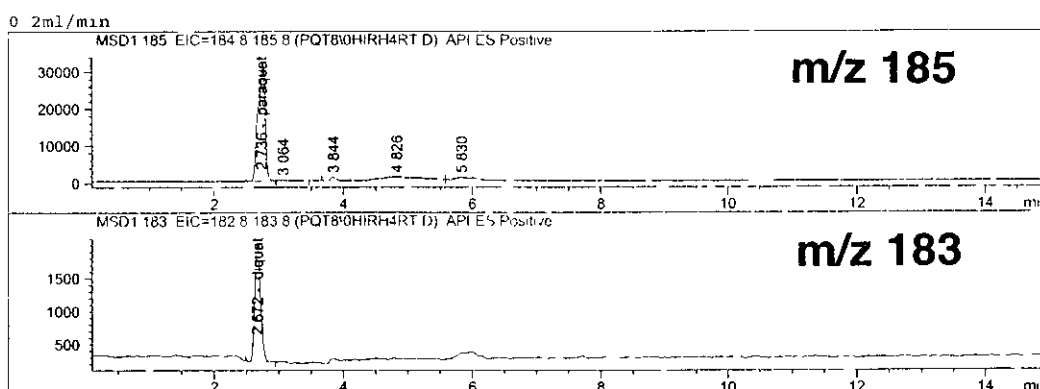


Fig 18. パラコート服用死体の毛髪, ヒト体毛ブランクおよび PQ・DQ混合液(2ngあるいは20ng)添加ラット体毛ブランク中のm/z185, 183



External Standard Report

Sorted By Signal
 Calib Data Modified Wednesday, March 08, 2000 2 48 02 PM
 Multiplier 1 0000
 Dilution 1 0000

Signal 1 MSD1 185, EIC=184 8 185 8
 Uncalibrated Peaks using compound diquat

RetTime [min]	Type	Area	Amt/Area	Amount [ng]	Grp	Name
2.736	PV	2.39225e5	1.03157e-3	246.77649		paraquat
3.064	VB	5411.24023	9.30837e-3	50.36984	?	
3.844	BB	7471.15234	9.30837e-3	69.54427	?	
4.826	BV	5.42932e4	9.30837e-3	505.38136	?	
5.830	VB	2.64575e4	9.30837e-3	246.27623	?	
Totals				1118.34819		

Signal 2 MSD1 183, EIC=182 8 183 8

RetTime [min]	Type	Area	Amt/Area	Amount [ng]	Grp	Name
2.672	PP	1.06011e4	9.30837e-3	98.67871		diquat
Totals				98.67871		

Fig 19 パラコート服用死体の毛髪のみにおけるSIM分析