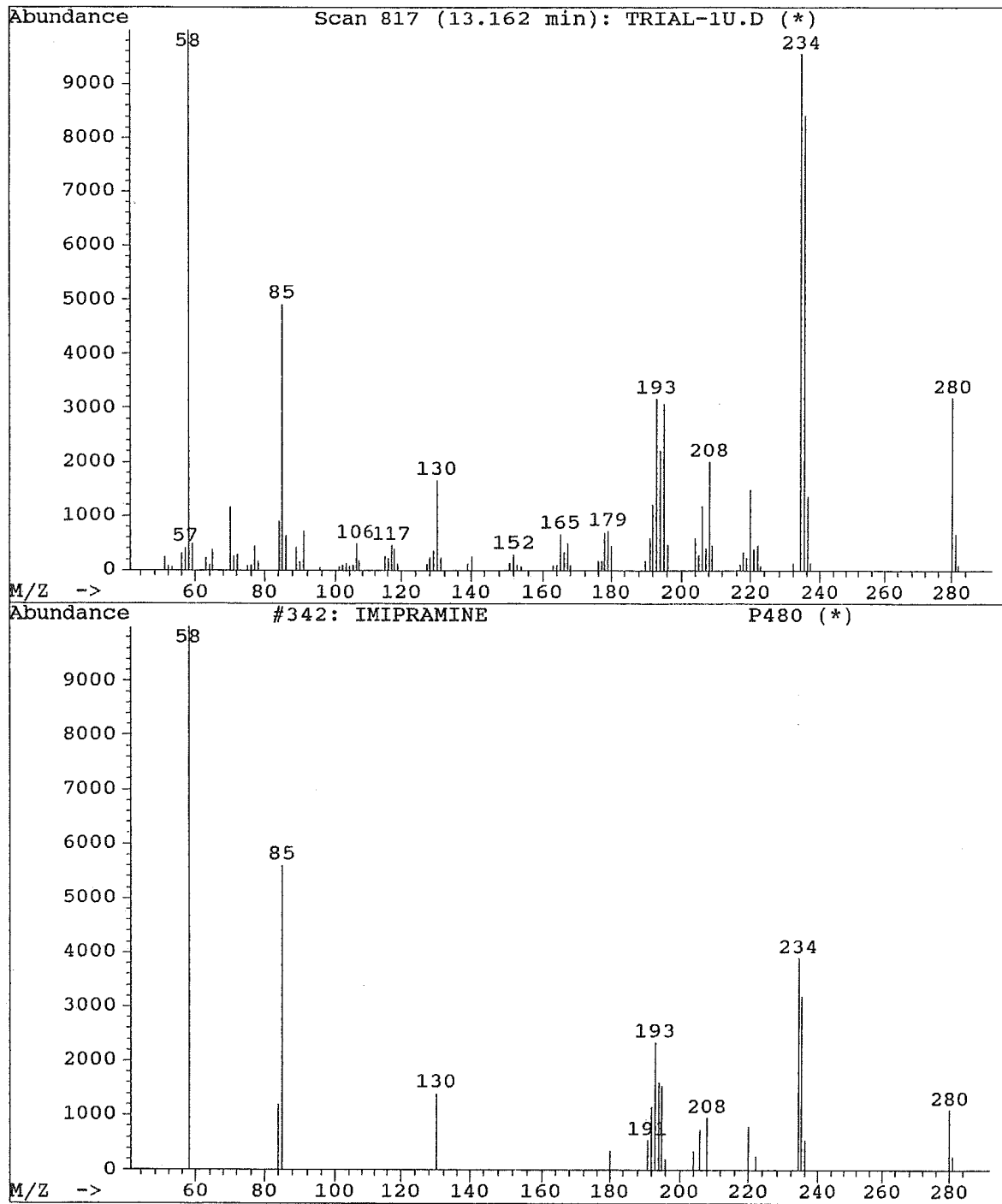


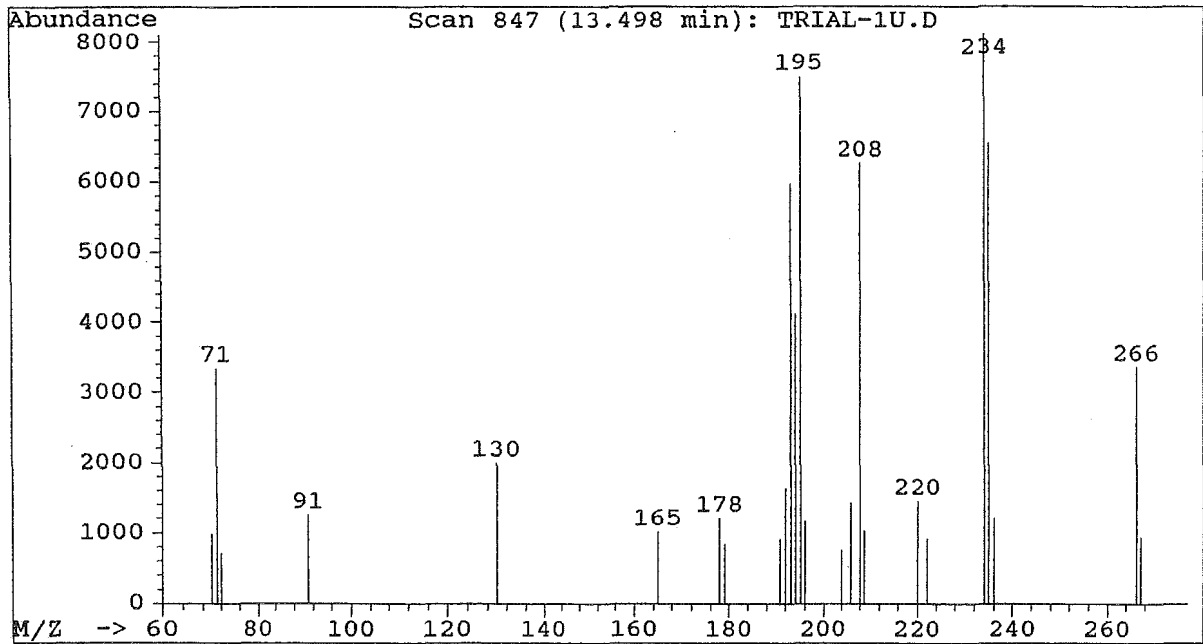
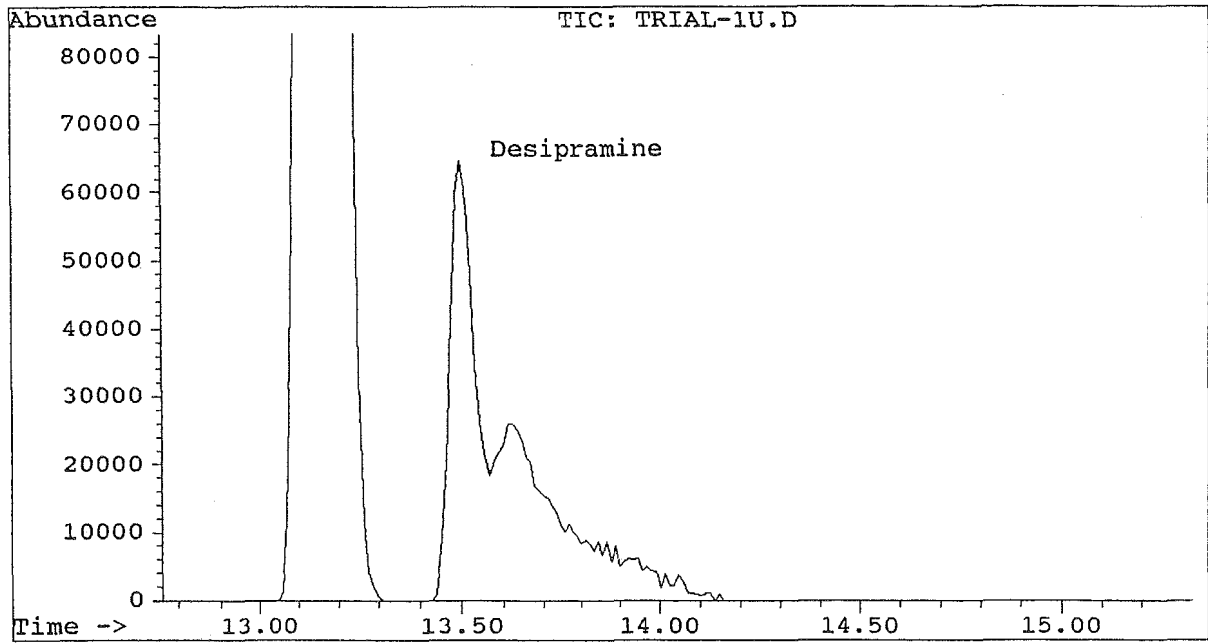
クロマト1 (症例1)

SCANモードによるクロマトグラムとイミプラミンのマススペクトル



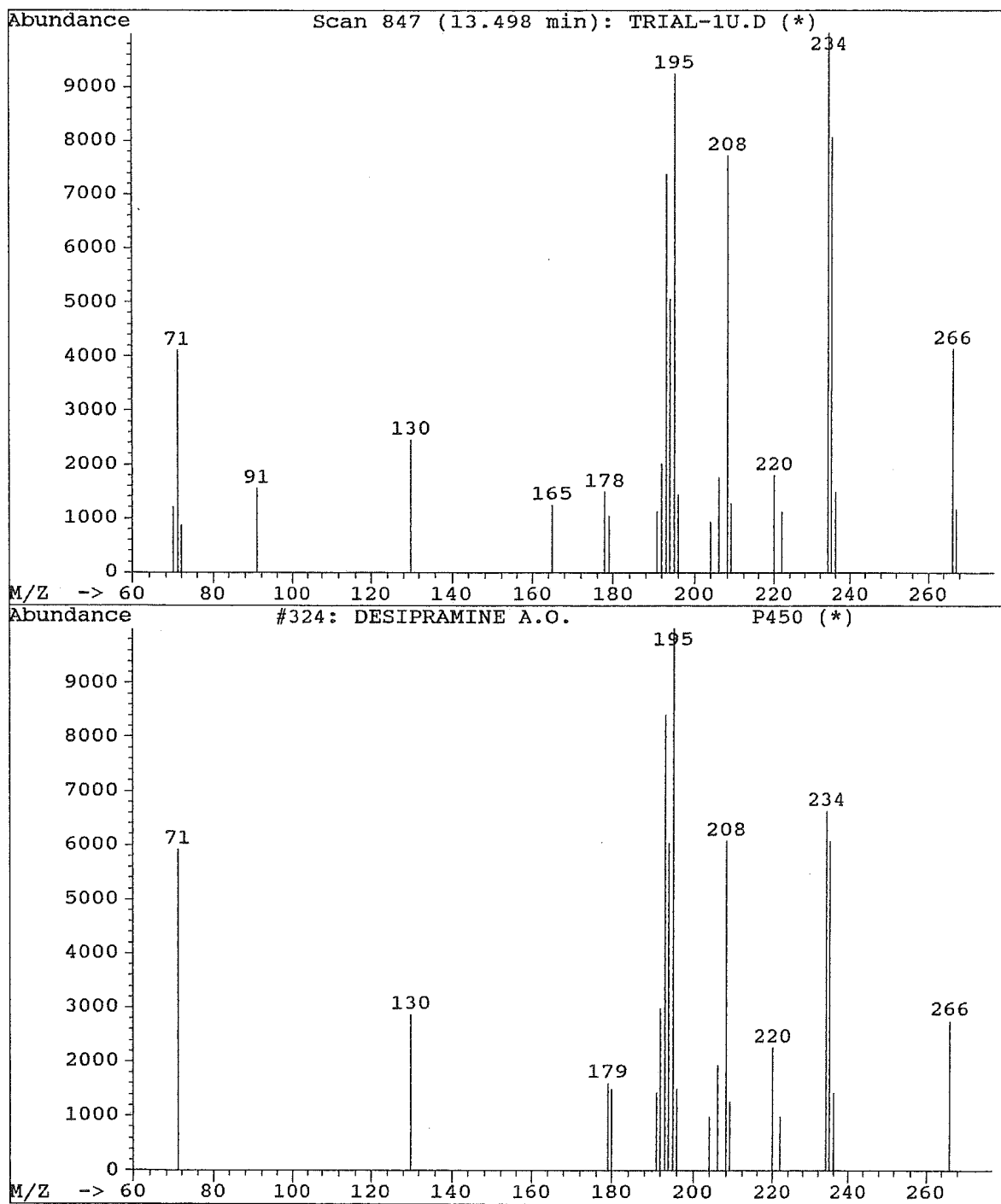
クロマト2 (症例1)

イミプラミンのマススペクトル (上段) とライブラリー (下段) との比較



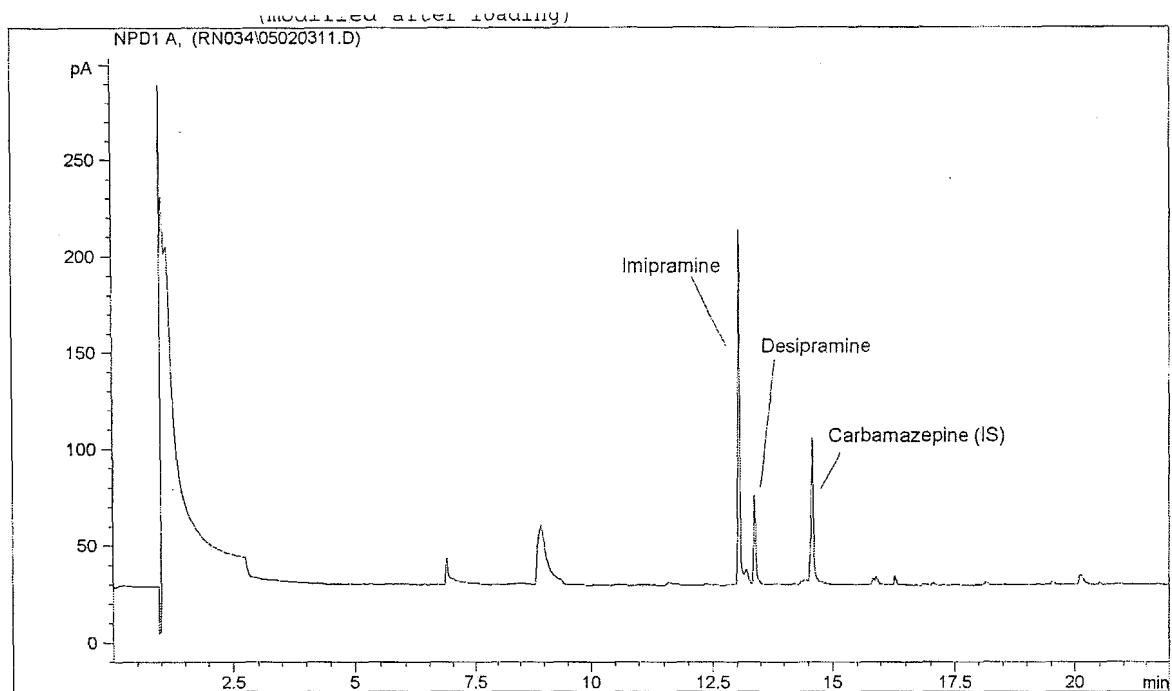
クロマト3 (症例1)

SCAN モードによるクロマトグラム (拡大) とデシプラミンのマススペクトル



クロマト 4 (症例 1)

デシプラミンのマススペクトル (上段) とライブラリー (下段) との比較



=====
 Area Percent Report
 =====

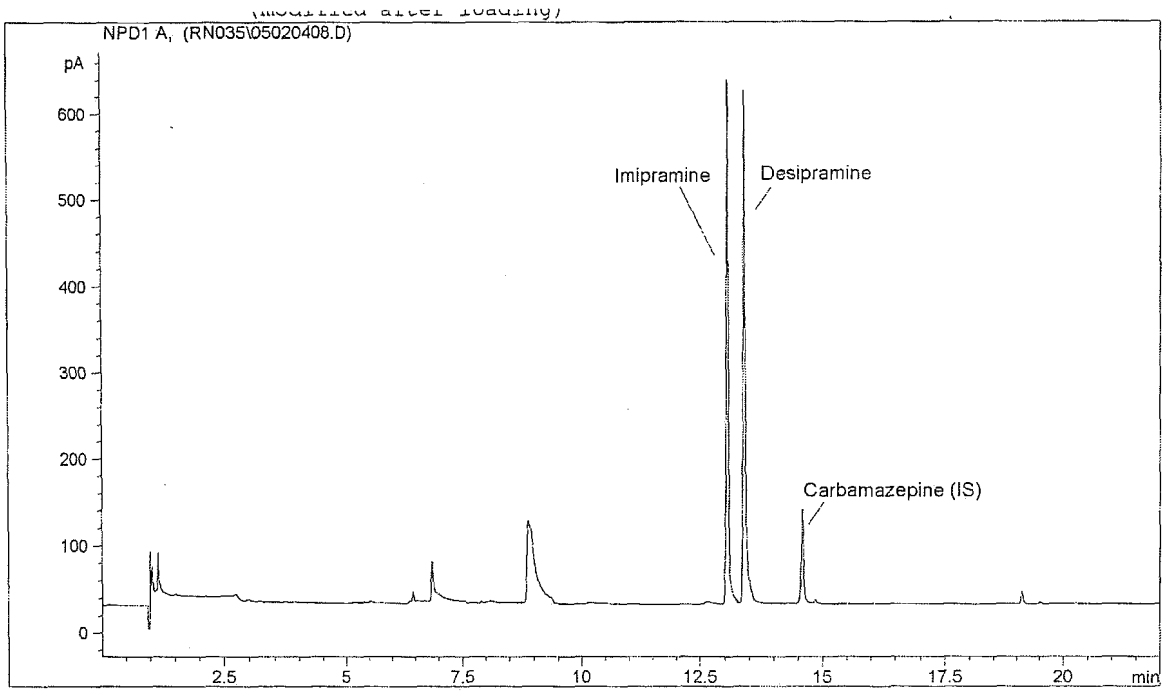
Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Sample Amount : 4.00000 [ng/ul] (not used in calc.)

No peaks found

=====
 *** End of Report ***
 =====

クロマト5 (症例1)

血清に内部標準物質を添加し抽出した後の GC-NPD によるクロマトグラム



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Sample Amount : 4.00000 [ng/ul] (not used in calc.)

No peaks found

=====
 *** End of Report ***
 =====

クロマト6 (症例1)

尿に内部標準物質を添加し抽出した後の GC-NPD によるクロマトグラム

症例2

本症例はコリンエステラーゼの活性低下が認められるため有機リン系農薬もしくはカーバメイト系農薬による中毒と考えられた。そこで、検体の尿を用いて有機リンに対する予備試験を行った。



予備試験

「有機りん系農薬検出キット」(関東化学)を用いて操作手順に従って検査を行ったところ、エーテル層が紫色に変色したため、少なくとも有機リンが含まれていると判断できたので確認検査を行った。



確認検査

予備試験で行った「有機りん系農薬検出キット」はカーバメイト系農薬に対しては反応しない。また、有機リン系農薬、カーバメイト系農薬は数多くの種類が市販されているため、これらの確認検査は試料の尿から化合物を抽出して GC-NPD と GC-MS のライブラリーを用いて検索を行った。



抽出方法

7. Empore disk C2 をメタノール、純水各 0.5 ml でコンディショニング。
8. 尿 0.5 ml を Empore disk C2 にアプライ。
9. 5%メタノールで洗浄。
10. 吸引乾燥後、遠心(3,000 回転、5 分間)。
11. 0.5 ml の溶媒[クロロホルム:エタノール(9:1)]で溶出。
12. 窒素気流下で溶媒を蒸発乾固。
13. 残渣を 50 μ l のメタノールに溶解し、GC-NPD、GC-MS の試料とした。



GC-NPD の分析条件(確認検査)

Hewlett-Packard 6890 Series Gas Chromatograph-NP Detector
Column: DB-5 (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm film thickness)
Injector Temp.: 250°C
Detector Temp.: 280°C
NP Bead: 30 pA
Oven Temp.: 100°C (3 min) – 20°C/min – 300°C (3 min)

GC-MS の分析条件(確認検査)

Hewlett-Packard 5890 Series II Gas Chromatograph/5971 Mass Selective Detector
Column: HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm film thickness)
Injector Temp.: 250°C
Oven Temp.: 100°C (3 min) – 20°C/min – 300°C (3 min)

定量時 GC-MS 条件

Oven Temp.: 150°C (3 min) – 10°C/min – 250°C (3 min)
Monitor Ions: Fenitrothion; m/z 277, 260, 125
Fenthion; m/z 278, 169, 125



結果(確認検査)

GC-NPD、GC-MS のスクリーニングによって単一のピークが検出された。このピークはライブラリー検索によってフェニトロチオンのマスフラグメントと一致した。更に、フェニトロチオンの標準品とも保持時間が一致した。この他にピークは検出されなかったためカーバメイト系農薬の存在は否定され、本中毒症状はフェニトロチオンによるものと判断した。(クロマト1、2)



定量方法

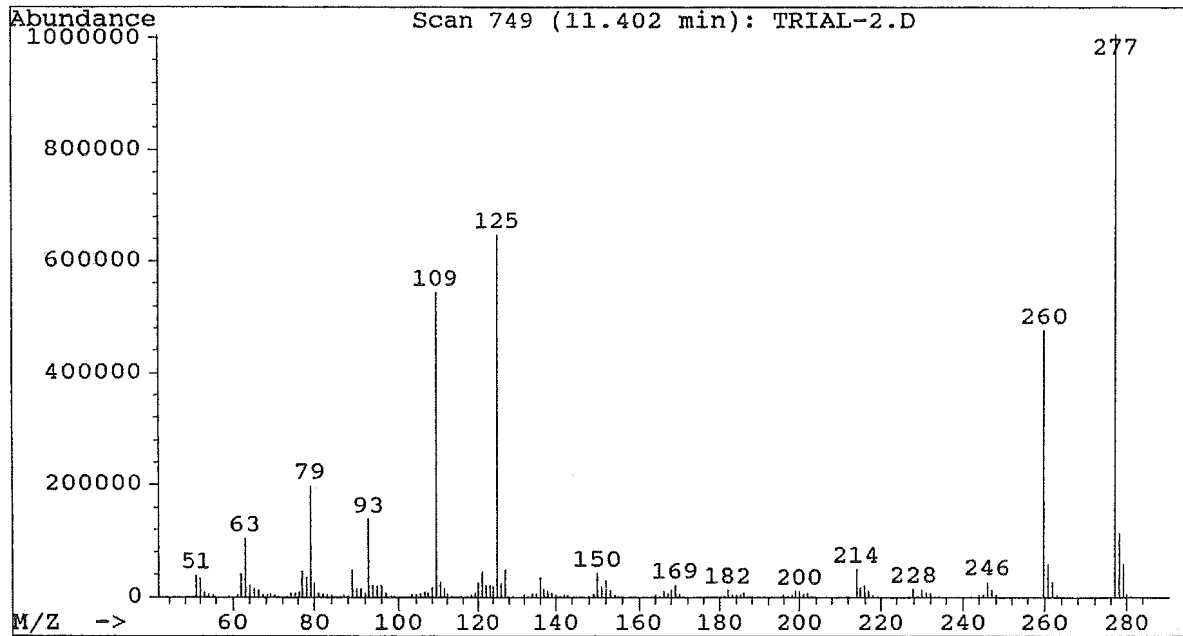
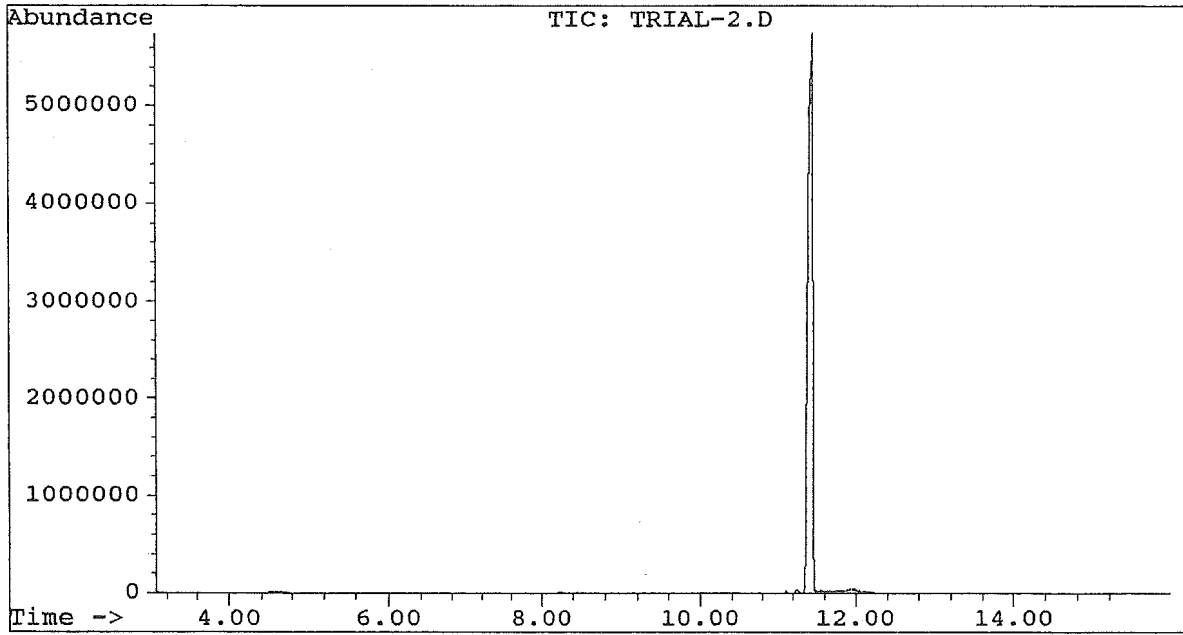
フェンチオン 3 µl (1mg/ml)を内部標準物質として添加して上記抽出を行い、フェニトロチオンと内部標準物質との面積比により検量線から求めた。検量線の精度は低、高濃度のQCを用いて確認した。(クロマト3)

注)本抽出方法は0.5 – 50 $\mu\text{g/ml}$ までの間で良好な直線性が得られたが、定量時はフェニトロチオンが高濃度の場合を想定して、10倍希釈した尿と希釈なしの2組みを抽出して測定を行った。



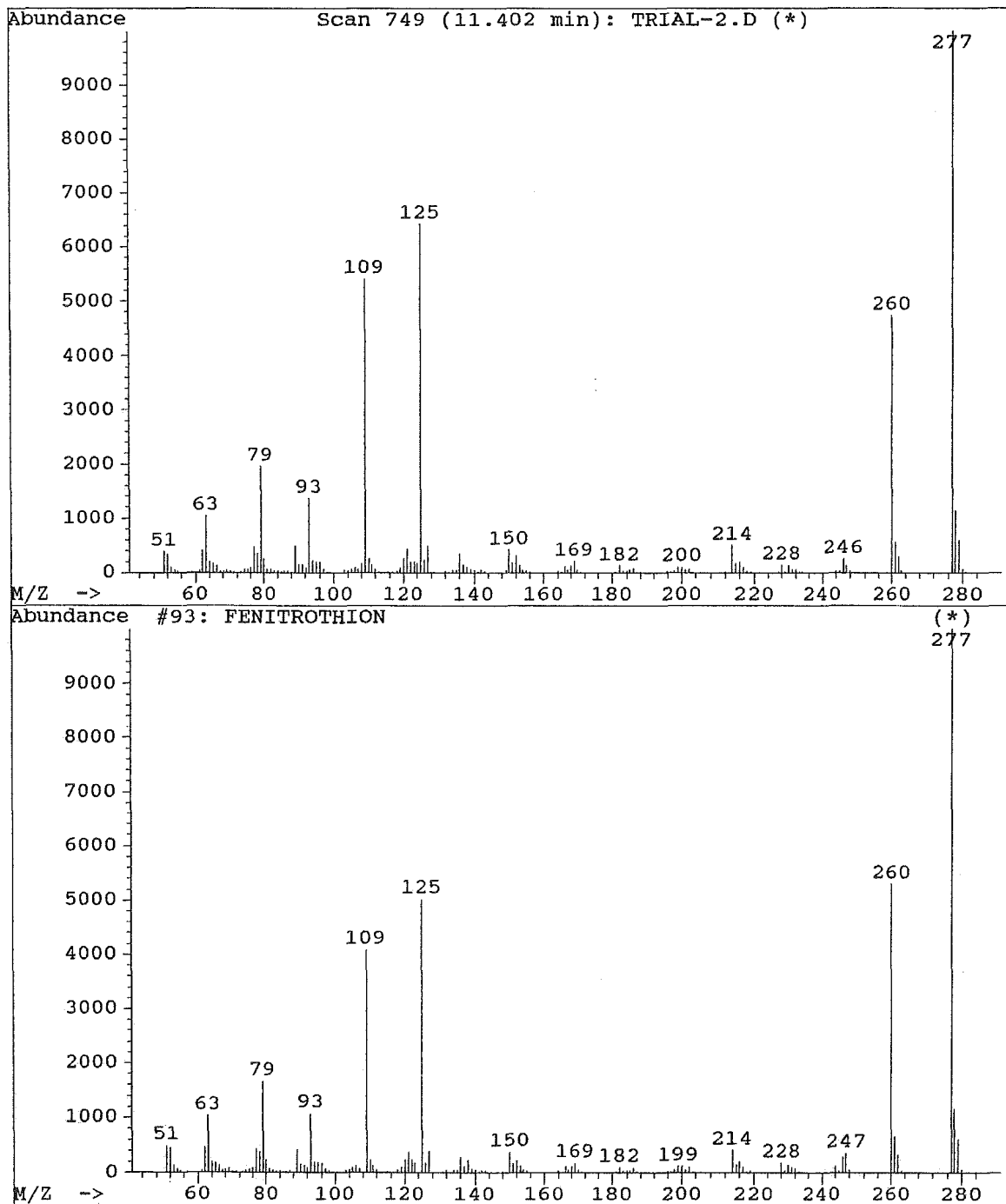
定量結果

フェニトロチオン	38.6 $\mu\text{g/ml}$
----------	-----------------------



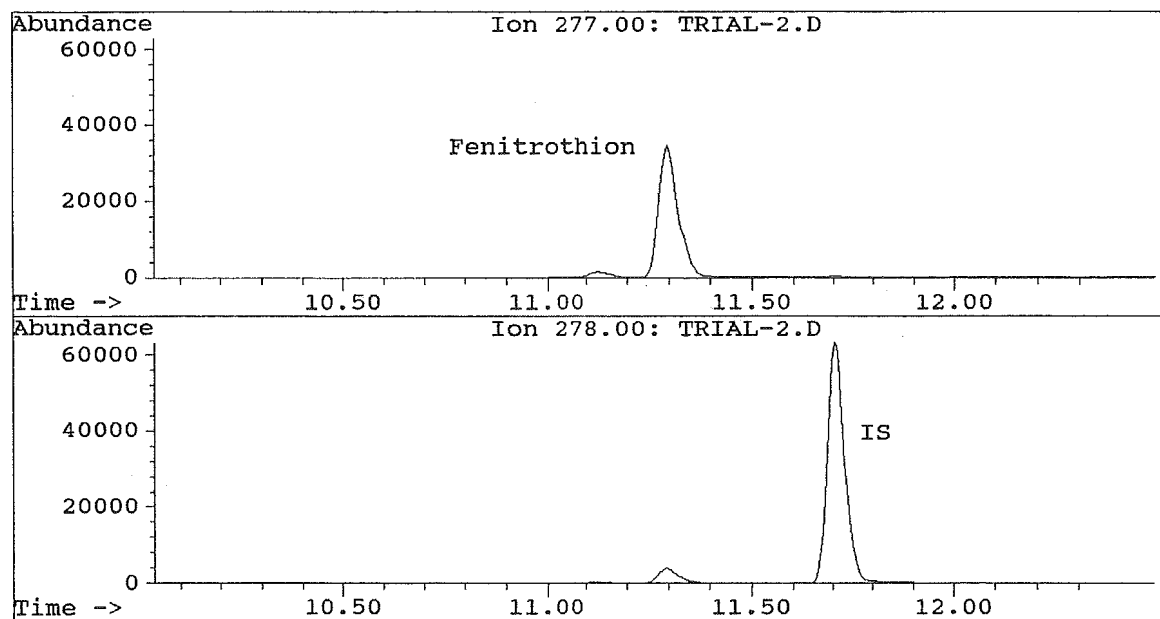
クロマト1 (症例2) (尿抽出後)

SCANモードによるクロマトグラムとフェニトロチオンのマススペクトル



クロマト2 (症例2)

フェニトロチオンのマススペクトル (上段) とライブラリー (下段) との比較



クロマト 3 (症例 2)

尿に内部標準物質を添加し抽出した後の GC-MS (SIM)によるクロマトグラム

症例3

症例はルルに含有するアセトアミノフェン中毒と考えられるため、アセトアミノフェンの予備試験を行った。



予備試験

14. 血清 1 ml に 2.5 ml の 5%トリクロロ酢酸を添加。
15. ボルテックスミキサーで攪拌後、遠心(3,000 rpm, 10 分)
16. 上澄 200 μ l に 200 μ l の濃塩酸を添加。
17. 100°Cで 10 分間加熱。
18. 冷却後、0.5 ml の 1%*o*-クレゾールと 0.5 ml のアンモニアを添加。
10 分以内に判定(青変した場合はアセトアミノフェン陽性)。

予備試験結果

陽性と判定されたためアセトアミノフェンによる中毒と考えられたため、確認及び定量検査を行った。



確認と定量検査方法

確認と定量は GC-MS を用いれば同時に行えるため以下のような抽出操作を行った。



抽出方法

1. 血清 0.1 ml に内部標準物質として 20 μ l の *o*-Acetoamidophenol 溶液 (0.1 mg/ml) と 0.5 ml の純水を添加し、ボルテックスミキサーで十分攪拌。
2. あらかじめメタノールと水各 1 ml でコンディショニングした抽出用カラム Oasis MCX (30 mg/1 cc)に 1 をアプライ。
3. 0.1 N の塩酸 1 ml でカラムを洗浄。

4. メタノール 1 ml で溶出。
5. 窒素気流下でメタノールを蒸発乾固。
6. 70 μ l の BSTFA+1%TMCS を添加。
7. 80°C、20 分間誘導体化。
8. 1 μ l を GC-MS 試料。



GC-MS の分析条件

Hewlett-Packard 5890 Series II Gas Chromatograph/5971 Mass Selective Detector
Column: HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm film thickness)
Injector Temp.: 250°C
Oven Temp.: 100°C (3 min) – 20°C/min – 300°C (3 min)
Monitor Ions: Acetaminophen; m/z 280, 206, 295
o-Acetoamidophenol; m/z 280, 295, 165



定量方法

アセトアミノフェンと内部標準物質との面積比により検量線から求めた。

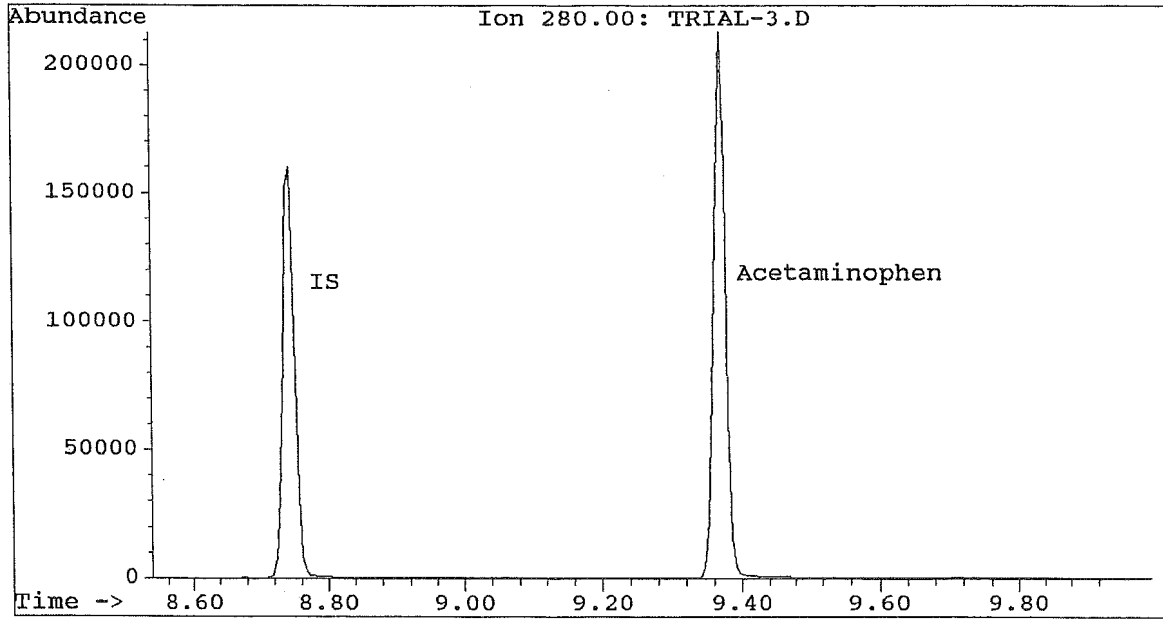
注)本抽出方法は 0.5 – 75 μ g/ml までの間で直線性が得られるが、初回の測定では 75 μ g/ml 以上であったため試料量を 10 分の 1(10 μ l)にして再度測定を行った。定量はキャリブレーターを用いて検量線を作成したが、検量線の精度は低、中、高濃度の QC によって確認した。十分な精度を確認した後に、検量線からアセトアミノフェン濃度を求めた。



定量結果

アセトアミノフェン

97.4 μ g/ml



クロマト 1 (症例 3) 10 倍希釈

血清に内部標準物質を添加し抽出した後の GC-MS (SIM) によるクロマトグラム

薬毒物検査の精度管理（平成 17 年度実施）

1. 目的

2001年9月、アメリカにおいて民間機を使用した自爆テロが発生し、数千人が犠牲となった。一部には化学兵器を搭載していたとの噂もあり、化学兵器を念頭においたテロ事件を想定する必要がある。化学兵器などの化学物質は、目に見えないために広範囲に拡大し、甚大な被害をもたらす。可及的速やかに原因物質を特定できれば、被害を最小限に留めることができるとともに治療に役立てることが可能である。すでに、高度救命救急センターなど国内の主要な医療施設には分析装置が配備され、各施設独自で中毒原因物質の特定が一部可能となっている。しかし、施設内には薬毒物分析の実務経験者が少なく、薬剤師や臨床検査技師が通常業務との兼任で分析を行っている場合が大半である。ましてや治療方針に対して大きな影響を与える分析の精度管理についての対策もなされていない。急性中毒患者は救急隊の判断で市中の医療機関に搬送されて治療されるが、平等な治療を受ける権利があるにも関わらず、搬送される医療機関の技術レベルや検査精度の格差により、平等な治療を受けることができない可能性がある。これは厚生労働行政上、重大な問題であり、早急に解決すべき課題と考える。

本研究では、国内の薬毒物分析技術を国際レベルに引き上げ、医療の質の向上や医療費削減など厚生労働行政の向上に資することを目的に、各施設における薬毒物分析の実態を把握すると同時に検査精度に対する理解度ならびに取り組みについて調査を行った。本研究の成果によって、全国の主要となる高度救命救急センターなどにおける薬物検査レベルを維持・向上が大いに期待される。

2. 参加者の募集

本研究の参加は、全国の救命救急センター186カ所の施設長と分析担当者宛に行った(資料2-1)。ただし、参加の諾否は各施設の判断に委ねた。同時に広島大学大学院医歯薬学総合研究科法医学で主宰している中毒情報メーリングリスト(ml-poison、ml-anal)でも募集した。

3. 試料の配布

検査は実際の中毒患者の検査試料を分析することに意義があるが、倫理面に問題があることから、薬物を服用していない健常人から得られた尿に薬毒物を添加することとした。検査試料の送付は、締切期限までに参加意思が確認できた施設に冷凍状態で送付した。

4. 送付した血清試料の調製

検査対象となる薬毒物は、日本中毒学会分析委員会が提唱した15品目のなかで、中毒症例の多い薬物ならびに血中濃度の測定が治療に有意義とされるバルビツール酸、有機リン系農薬、アセトアミノフェンを選定した。いずれの化合物も市販の検査キットや呈色反応によって検出可能である。つまり、いずれの薬物も予試験としての簡易検査法が知られている薬物である。

これまで実施してきたトライアルでも触れたように、薬物を服用していない健常人から得られた尿に薬物を人為的に添加することで試料を作成することとした。従って、実際の中毒発生時と

は異なった生化学検査値が得られることの懸念は拭い難い。

市販のヒト血清あるいは薬物を服用していない健常人から得られた尿に各薬毒物の標準品（1mg/ml のメタノール溶液あるいは水溶液）を添加した後、約 3 時間スターラーにて攪拌し、試料送付用のガラスバイアル瓶（6, 20ml 容量）に分注した。試料分注後、速やかに凍結保存した。

【使用した薬毒物標準品】

アセトアミノフェン

フェニトロチオン（MEP、有機リン系農薬）

ペントバルビタール（バルビツール酸）

最終濃度が下記の濃度となるように、血清と尿にバルビツール酸、有機リン系農薬、アセトアミノフェンを添加した。

症例 1

バルビツール酸 5.4 μ g/ml （尿中濃度）

症例 2

フェニトロチオン 18.7 μ g/ml （尿中濃度）

症例 3

アセトアミノフェン 82.4 μ g/ml （血清中濃度）

5. 患者情報の添付

これまでの調査では、検査対象を伏せて医薬品や農薬のように漠然とした情報しか与えなかった。その結果、中毒濃度も考慮せずに、単に検出された化合物（例えばカフェインなど）を列記する傾向が見られた。今回は患者情報を添付し、実際に薬毒物検査が依頼されるケースを想定した。また、情報は、服用が疑われる医薬品名から想定される症例、臨床症状から推察する症例など複数のケースを想定した。

6. 参加の諾否、分析結果の返送

6.1. 参加諾否（全施設対象）

参加諾否の回答は、本企画を説明した資料送付後に FAX、E-mail で行った。締切期日以内に参加諾否の連絡があった施設は、以下の通りである。

諾 86 施設 （救命救急センター以外からの参加 5 施設）

否 36 施設

無回答 69 施設

6.2. 分析結果の解析（86 施設対象）

分析結果の返送は、転記漏れを最小限に抑えるために E-mail で行った。E-mail の使用できない施設は、FAX にて行った。分析結果受領後、ファイルメーカーで作成したフォーマットに入力し、検査試料ごとにデータベース化した。

結果の返送あり 76 施設

結果の返送なし 10 施設

他施設の具体的な操作は資料 2-2 にまとめた。単に結果の善し悪しを判断するのではなく、今後の資質向上に他施設の情報が参考になると考える。ただし、施設が特定されることを避けるため、集計上番号の振り直しを行った。

6.2.2. 症例 1・尿について

バルビツール酸類を推定できた施設	66	
ペントバルビタールを同定できた施設	23	(定量まで行った施設 18)
バルビツール酸類を推定できなかった施設	10	

6.2.3. 症例 2・尿について

有機リン系農薬を推定できた施設	63	
フェニトロチオンを同定できた施設	26	(定量まで行った施設 19)
有機リン系農薬を推定できなかった施設	13	

6.2.4. 症例 3・血清について

アセトアミノフェンを推定できた施設	68	
アセトアミノフェンを同定できた施設	45	(定量)
アセトアミノフェンを推定できなかった施設	8	

今回、患者情報を添付した。添付した患者情報から症例 1 は医薬品、症例 2 は農薬、症例 3 は医薬品（アセトアミノフェン）が予想される。次に市販の検査キットや呈色反応によって、症例 1 はバルビツール酸類（尿中乱用薬物検査キットより）、症例 2 は有機リン系農薬（有機りん系農薬検出キットより）、症例 3 はアセトアミノフェン（アセトアミノフェン検出キットより）が推定されることを期待した。

その結果、症例 1 の尿中バルビツール酸を推定していた施設は 66 施設（結果が返送された施設の 86.8%）、症例 2 の尿中有機リン系農薬を推定していた施設は 63 施設（結果が返送された施設の 82.9%）、症例 3 の血清中アセトアミノフェンを推定していた施設は 68 施設（結果が返送された施設の 89.5%）であった。症例 1 の血清を直接検査し、三環系抗うつ薬を推定する方法がないため、症例 1 の血清中三環系抗うつ薬を推定していた施設は 43 施設（結果が返送された施設の 58.1%）であった。しかし、実務上は、同じ症例での尿から中毒起因物質を推定し、機器を使用

して血清中の中毒起因物質を同定、定量すると考えられるので、仮に症例1の血清中毒起因物質が推定できなくても問題ないとする。機器がない施設で、どうしても与えられた検査試料中の中毒起因物質を推定したい場合には、何らかの工夫が必要となる。尿中乱用薬物検査キットを使用して血清を検査している施設が見受けられるが、本キットは尿を検査した場合の結果の保証はあるが、血清などを検査した場合の結果の保証のないことを承知しておく必要がある。

過去の調査結果でも報告したが、依然として定量値の有効数字、前処理や分析精度を吟味している施設は少なく、分析値の扱い方や分析精度についての知識を周知する必要があると考える。広島大学大学院医歯薬学総合研究科法医学主催の分析講習会や日本中毒学会主催の分析講習会などへの積極的な参加の意見がある反面、実務への応用が伴っていない結果となっている。実務に直結させるためにも、それに見合った教育活動の場の提供が急務であるため、次年度には救命救急センターの分析担当者を対象とした実務講習会を企画している。

本結果は薬毒物分析に直接携わっている医師や分析担当者の努力の賜であり、施設全体で薬毒物分析に理解を示している施設が増加している。今後の課題としては、薬毒物分析が金銭的裏付けのない業務である、施設の検査体制のみでなく、資格・肩書きがないため、業務上のメリットがないなど分析担当者自身の意欲にも左右される。また、標準物資が入手できないために同定、定量できないことも大きな問題の一つである。

これらの改善のため、早急なる保険診療への拡大とともに分析技術に対する資格化が望まれるところである。

7. 薬毒物分析例

本調査を実施すると同時に福家千昭（琉球大学大学院医学研究科法医学分野）、斉藤 剛（東海大学医学部専門診療学系救命救急医学）両氏に、今回配布した試料の分析を依頼した。模範的な分析例として示したので、参考にして頂きたい。