

# 薬物スクリーニングキットのための 限外濾過フィルタを用いた溶血液前処理法

内田 雪絵<sup>1)</sup>, 中本 晃弘<sup>1)</sup>, 奈女良 昭<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>広島県警察本部刑事部科学捜査研究所

<sup>2)</sup>広島大学大学院医歯薬学総合研究科法医学

原稿受付日 2011年9月14日, 原稿受理日 2011年12月4日

## はじめに

殺人や昏睡強盗などの凶悪犯罪で睡眠薬が使用されるケースが多く, 残された生体試料から迅速に薬物スクリーニングを行い, 薬物の関与を明らかにすることは死因の特定, 事件の解明のために重要である。

わが国では, 尿を試料とする抗原抗体反応を用いた簡易薬物スクリーニングキットが数種類市販されており<sup>1)</sup>, 救急医療, 法医学, 警察などの現場で広く用いられている。しかし, 生体試料が血液しか存在しない場合, これらの薬物スクリーニングキットは血液そのものに色があるため, 正しく結果を表示することができない。そのため, Moriyaら<sup>2)</sup>は, 血液にスルホサリチル酸を加え遠心し, 得られた上清に酢酸アンモニウムを加えるという前処理を行うことで, 血液を薬物スクリーニングキットに適用させる方法を開発している。

血液の色調の要因はヘモグロビンであり, これを分離, 除去すれば血液をスクリーニングキットに適用させることができると考えられる。ヘモグロビンを分離するもっとも簡便な方法は遠心分離であるが, 検視で取り扱う死体からの血液は溶血していることが多く, 遠心しても透明な血清を得ることができない。そのような場合には, 上記の除蛋白剤を加える方法以外に, 濾過処理方法がある。鈴木ら<sup>3)</sup>は, 溶血液を遠心式フィルタを用いて限外濾過し, 得られ

た濾液を Triage<sup>®</sup>DOA スクリーニングに適用しているが, 濾過操作の影響などについては検討していない。本研究では, ヘモグロビンの分子量が約 64,500 である<sup>4)</sup> ことから, 分画分子量が 60,000 付近の限外濾過フィルタを使用し, 限外濾過操作の実用性の検討を行った。

## I 方 法

血液はウマ溶血液 (関東化学, 東京) を使用し, 薬物スクリーニングキットは AccuSign<sup>™</sup> One-step BZO test (関東化学, 東京) を使用した。薬物はベンゾジアゼピン系薬物である, ニトラゼパム, トリアゾラム, オキサゼパム (シグマアルドリッチジャパン, 東京) を使用し, 各薬物の 1 mg/mL 溶液をエタノールで調製後, 順次希釈し, ウマ溶血液に添加して検査試料とした。限外濾過フィルタはアミコンウルトラ-0.5 mL 遠心式フィルタ 3, 10, 30, 50, 100 K デバイス (日本ミリポア, 東京) を使用した。

血液 1 mL を 7,000×g で 30 秒間遠心分離後, 上層部の 400 μL をフィルタ (3, 10, 30, 50, 100 K デバイス) に添加し, 7,000×g で 5 分または 10 分間遠心した。得られた濾液を AccuSign<sup>™</sup>BZO に滴下し, 結果を判定した。

LC/MS 分析でベンゾジアゼピン系薬物が陽性または陰性であった血液 (溶血しているもの) をそれぞれ上記のとおり前処理後, AccuSign<sup>™</sup>BZO に滴

Table 1 Volume ( $\mu$ L) of ultrafiltrate obtained from 400  $\mu$ L of horse hemolysate

Spin time	Filter Device NMWL				
	3 K	10 K	30 K	50 K	100 K
5 min	80	200	180	180	230
10 min	140	240	230	230	260

(n=1)

下し結果を判定した。

## II 結果と考察

分画分子量の異なる限外濾過フィルタを使用した結果を Table 1 に示す。分画分子量が 3 K 以外のフィルタでは、遠心時間 10 分でスクリーニングキットに使用するのに十分な濾液量を得ることができた。一方で、分画分子量が 50 および 100 K のフィルタを使用すると、濾液の色が赤みを帯びており、とくに 100 K では著しく、AccuSign™BZO に滴下後の結果の判定がやや困難であった。分画分子量が 10 K および 30 K のフィルタは濾液の量および色はほぼ同じであった。ウマ溶血液より粘性の高い実試料を適用させるにあたり、分画分子量の大きいほうが目詰まりを起こしにくいのではないかと考え、以降の実験では限外濾過フィルタは 30 K のものを使用し、遠心は 10 分間行うこととした。

各薬物を添加したウマ溶血液の AccuSign™BZO 検査結果を Table 2 に示す。ニトラゼパムまたはトリアゾラムを添加した血液は、添加濃度がそれぞれの薬物の検出下限値で陽性を示した。オキサゼパムを添加した血液は、検出下限値では陰性であったが、添加濃度をその 2 倍にすると陽性を示した。この限外濾過操作では、血中の蛋白と結合した薬物はフィルタを透過することができない。濾液中の薬物濃度は定量していないが、濾過操作によって濾液中の薬物量が減少したぶん濾液が濃縮されたため、このような検出感度が得られたのではないかと考えられる。

実際に検視で採取した血液(溶血しているもの)についても上記フィルタを使用した前処理が行えるかを検討した。その結果、スクリーニングキットに

Table 2 Results of AccuSign™BZO screening of ultrafiltrate obtained from horse hemolysate that was spiked with drugs

Drug	Spiked at 1×LOD*	Spiked at 2×LOD*
nitrazepam	+	NT
oxazepam	-	+
triazolam	+	NT

+ : positive, - : negative, NT : not tested

\*Limit of detection ; LODs for nitrazepam, oxazepam, triazolam in urine, which were stated by the manufacturer, were 100,000 ng/mL, 300 ng/mL, >100,000 ng/mL, respectively

使用するのに十分な透明濾液を得ることができ、AccuSign™BZO は LC/MS 分析でベンゾジアゼピン類が陰性であった試料(3 例)については陰性を示し、陽性であった試料(1 例; ジアゼパム検出)は陽性を示し、実試料にも本フィルタを適用可能であることがわかった。

## まとめ

アミコンウルトラ-0.5 mL 遠心式フィルタ 30 K を使用することにより、10 分間の遠心で溶血液から透明な濾液が得られ、AccuSign™BZO スクリーニングを実施することができた。各薬物のフィルタへの吸着性や検出下限値などを検討する必要があるが、限外濾過フィルタを用いた本前処理方法は、血液を薬物スクリーニングキットに適用させる方法として有用であると考えられる。

本研究は、平成 22 年度科学研究費補助金(奨励研究)の交付を受けて行った。

## 【文 献】

- 1) 奈女良昭: 中毒起因物質の簡易検査法. 中毒研究 2009 ; 22 : 331-7.
- 2) Moriya F, Hashimoto Y : Application of the Triage™ panel for drugs of abuse to forensic blood samples. Jpn J Legal Med 1996 ; 50 (2) : 50-6.
- 3) 鈴木修, 野澤秀樹, 権守邦夫, 他: 法医学分野でのトライエージ DOA 検査の尿以外各試料への適用性について. Sysmex Journal 2006 ; 29 : 74-8.
- 4) 久保裕子, 大島泰郎: 物質編; タンパク質. 井村伸正, 大島泰郎, 黒川正則, 他編, 生化学ハンドブック, 丸善, 東京, 1984, p 68.