

氏名	かた おか み え こ 片 岡 美 江 子
学位の種類	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 707 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	ガスクロマトフィー — 質量分析 (GC/MS) による生体・環境試料からの神経ガス分解物定量法の確立

論文調査委員 (主査) 教授 松崎勝巳 教授 半田哲郎 教授 佐治英郎

論 文 内 容 の 要 旨

1994年から1995年に発生した松本及び東京地下鉄サリン事件において使用されたサリンは神経ガスの一つであり、揮発性が高くかつ化学的に不安定で加水分解しやすいことから、実際に現場で押収された試料からほとんど検出されなかった。神経ガスは加水分解され、通常天然に存在しないメチルホスホン酸モノアルキルエステルに変化することから、これらの化合物の検出が神経ガスの使用・製造の主要な証明となる。メチルホスホン酸モノアルキルエステルは極性が高くかつ水溶性であるため、シリル誘導体化処理を行って揮発性を持たせた後GC/MSを実施する。GC/MS法は、化学査察における化学兵器及びその関連化合物の検証分析の標準法であり、また、国内の警察機関において薬毒物分析に最も汎用されている手法である。サリン事件の鑑定試料は、被害者の血液、尿等の生体試料、衣服、現場周辺や神経ガス製造プラント内の壁面、地面等の拭き取り試料や油状物、大気、土砂、水などの環境試料など非常に多岐に渡っており、試料は除タンパクや水抽出などの前処理を施した後GC/MS法により分析された。しかし、試料によってはサリン分解物が全く検出されない場合や、多量の夾雑物により定量が不可能である場合などの致命的問題を経験した。そこで、筆者は試料（生体試料及び環境試料）中の夾雑物による神経ガス分解物の検出への影響を詳細に検討し、そのメカニズムの考察を行った。そして、試料からの夾雑物の除去や吸着物からの脱離などの前処理法の開発を行い、誘導体化GC/MS法による神経ガス分解物の定量法を確立した。

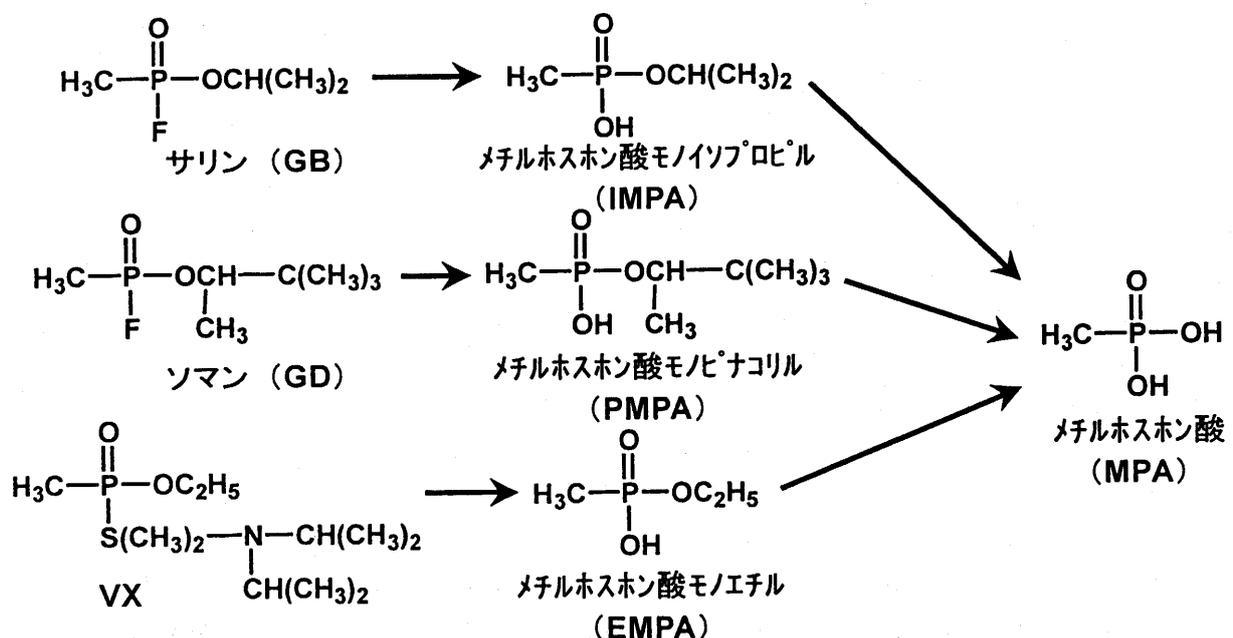


図 神経ガスの分解経路

〈実験経過・結果及び考察〉

今回使用した化合物はソマン、サリン、VXの分解物であるピナコリルメチルホスホン酸 (PMPA)、イソプロピルメチルホスホン酸 (IMPA)、エチルメチルホスホン酸 (EMPA) の3種のメチルホスホン酸モノアルキルエステル (以下RMPAとする)、メチルホスホン酸 (MPA) の4種 (以下MPA類とする) である (図)。

(1) 生体試料

神経ガスは主に呼吸器からの吸入や皮膚浸透により体内に吸収され、大半は加水分解されてMPA類に変換される。よって、生体試料からのMPA類の検出が神経ガス曝露の主要な証明法と認められており、さらにそれらを定量することで被害者の神経ガス曝露量を推定することができる。これまでの報告では、いずれもRMPAの定量法にしか触れておらず、極性の高いMPAについての検討はなされていない。しかしながら、MPAは神経ガス合成中間体の分解物でもあることから、検出対象として絶対に外すことのできない化合物である。そこで、生体試料として主に用いられる血漿からのRMPA及びMPAの検出に関して検討を行った。なお、試料中マトリクスの影響を受けることなく測定が可能なキャピラリー電気泳動法を比較検討、最適化し、回収率の定量的評価法として使用した。

血漿の前処理法として、まずRMPA及びMPAの同時除タンパク抽出法を検討したが、使用する除タンパク剤の溶解性、変性タンパク質との親和性の違いから同時抽出が達成できないことが判明し、個別に前処理法を検討することとした。アセトニトリルによる除タンパクによりRMPAは定量的に回収されたが、MPAは30%前後であった。次に、MPAについては強酸のトリクロロ酢酸による除タンパク法を適用したところ、MPAを血漿からほぼ100%回収することができた。また、強陰イオン交換固相抽出を使用し、アンモニア-メタノール溶液により競合的に溶出させることで、誘導体化反応を妨害する金属イオンや中性化合物からのMPA類の精製にも成功し、血漿からのMPA類の定量が可能となった。本法は、世界初のMPAの定量法である。

(2) 環境試料

イラン・イラク戦争の戦場の土砂から神経ガスであるタブンの分解物が検出されてタブン使用の証拠として示されるなど、土砂は神経ガス関連物質の検出において非常に重要な環境試料として位置付けられている。土砂からのMPA類の検出に関するこれまでの報告では、いずれもMPA類の検出感度が非常に低いにもかかわらず、十分な検討がなされていない。そこで、その原因及びメカニズムを解明すべく、①土砂からのMPA類の抽出、②MPA類の誘導体化反応の2段階について検討を行った。

標準土砂21種の物理化学的性質 (粒径, pH, 全炭素量・窒素量, 交換性塩基, 陽イオン交換容量, リン酸吸収係数) と、MPA類の土砂からの水抽出率との相関について多変量解析を行った結果、リン酸吸収係数、粘土含量とMPA類の水抽出率との間に負の相関が、全炭素量, pH, 交換性塩基と正の相関が認められた。リン酸吸収係数は、土砂に吸着・固定されるリン酸量を表しており、MPA類はリン酸と構造や特性が類似していることから、リン酸の吸着部位にMPA類が吸着する可能性が高いと考えられた。また、リン酸の吸着・固定には、粘土鉱物中のアルミニウムや鉄との配位子交換反応が関与することが知られており、粘土含量の高い土砂では、MPA類の吸着・固定が進み、抽出率が低下すると推察された。全炭素量は、土砂中の有機物すなわち腐植を反映した値であり、腐植は配位子交換に関与するアルミニウムを不活性化することから、MPA類の吸着量が減少し、結果的に水抽出率が上昇した。さらに、配位子交換反応による陰イオンの吸着はpKa値付近で極大を示すことから、RMPA (pKa 2-3) ならびにMPA (pKa 2及び7) については、pHの上昇に伴いMPA類の吸着は減少し、水抽出率が上昇するものと考えられた。この吸着メカニズムを利用し、土砂からのMPA類の抽出効率を上昇させるために、水酸化ナトリウム水溶液によるアルカリ抽出を行ったところ、MPA類の抽出率はいずれの土砂においても劇的に上昇し、70%以上となった。

MPA類のシリル誘導体化反応に影響を及ぼす因子について検討したところ、土砂から水層に抽出される遊離アルカリ土類金属イオン (Mg^{2+} , Ca^{2+}) が陰イオンであるMPA類と不溶性塩を形成し、誘導体化反応を妨害することを突き止めた。糖などの中性化合物も誘導体化反応を妨害することから、強陰イオン交換固相抽出法による前処理法を適用してMPA類のクリーンアップを試みた。その結果、土砂のアルカリ抽出と固相抽出法との組み合わせにより、誘導体化GC/MS法による土砂からのMPA類の定量が可能となった。

〈結論〉

生体試料ならびに環境試料中における神経ガス分解物のマトリクス吸着のメカニズムを考察した。また、神経ガス分解物の誘導体化反応に影響を及ぼす因子を突き止めた。さらに、従来の手法では定量が全く不可能であった誘導体化GC/MS法において前処理法の開発を行い、神経ガス分解物の定量を可能とした。固相抽出法前処理法については、非常に塩濃度の高い海水や飲料、尿についても神経ガス分解物を定量することが可能であったことから、あらゆる水性試料への応用が期待できる。神経ガス自身の毒性は非常に高く、取り扱いに細心の注意を要するが、分解物は毒性が低く市販品として入手可能であることから、通常の衛生・警察等の分析機関での定量分析として十分活用できる。また、神経ガスは有機リン系農薬の化学構造と基本的に類似していることから、本研究での成果は農薬の環境動態を解明する上での一助にもなる。

論文審査の結果の要旨

松本及び東京地下鉄サリン事件をはじめとする神経ガスを用いた化学テロの脅威から、神経ガスの検出方法の確立が急務である。しかし、神経ガス自体は揮発性が高くかつ化学的に不安定で加水分解しやすいことから、実際に現場で押収された試料からほとんど検出されない。そこで、加水分解物である非天然のメチルホスホン酸モノアルキルエステルの検出が神経ガスの使用・製造の主要な証明となる。メチルホスホン酸モノアルキルエステルは極性が高く水溶性であるため、シリル誘導体化処理を行って揮発性を持たせた後、化学査察における標準法であるガスクロマトグラフィー-質量分析 (GC/MS) を実施する。しかし、現実には環境試料や生体試料中の目的物質は多量の夾雑物の影響により定量できないことが多い。そこで、片岡氏はソマン、サリン、VXの分解物であるピナコリルメチルホスホン酸 (PMPA)、イソプロピルメチルホスホン酸 (IMPA)、エチルメチルホスホン酸 (EMPA) の3種のメチルホスホン酸モノアルキルエステル (以下RMPAとする)、およびこれらの二次加水分解産物であるメチルホスホン酸 (MPA) の4種 (以下MPA類とする) を対象とし、環境試料や生体試料中からの定量法の確立を行った。

まず、MPA類標品のGS/MSおよびキャピラリー電気泳動法による定量法を確立した。ついで、MPA類標品のシリル誘導体化反応に影響を及ぼす因子について検討し、遊離アルカリ土類金属イオンや糖などの中性化合物が誘導体化反応を妨害することを突き止めた。この結果を基に、強陰イオン交換固相抽出法による前処理法を適用してMPA類のクリーンアップ法を確立した。さらに、標準土砂21種の物理化学的性質と、MPA類の土砂からの水抽出率との相関について多変量解析を行い、土砂のアルカリ抽出によってMPA類の抽出率を劇的に向上させることに成功した。このように土砂のアルカリ抽出と固相抽出法との組み合わせにより、誘導体化GC/MS法による土砂からのMPA類の定量を可能ならしめた。加えて、塩や糖を高濃度に含む海水や飲料からの定量法も確立した。

つぎに、生体試料として血漿からのMPA類の定量に挑み、RMPAについてはアセトニトリルを、MPAについてはトリクロロ酢酸をそれぞれ用いることにより効率的に除蛋白できることを示した。MPAについてはさらに強陰イオン交換固相抽出を使用し、アンモニア-メタノール溶液により競合的に溶出させることで、誘導体化反応を妨害する金属イオンや中性化合物からのMPA類の精製にも成功し、血漿からのMPA類の定量を世界で初めて可能にした。また、尿中のMPA類の定量法も確立した。

以上のように、本研究は、従来定量が不可能であった誘導体化GC/MS法によって、多様な生体試料・環境試料中からのMPA類の定量法を確立するものであり、きわめて実用性の高い応用分析研究である。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

さらに平成16年2月23日論文内容とそれに関連した事項につき口頭試問を行った結果合格と判定した。