

琉球大学学術リポジトリ

有機リン系農薬の体内動態解析 —CE-MSによる代謝物分析法の開発と応用—

メタデータ	言語: 出版者: 福家千昭 公開日: 2010-08-10 キーワード (Ja): キャピラリー電気泳動質量分析法, 有機リン系農薬, 代謝物, 生体試料, 中毒 キーワード (En): 作成者: 福家, 千昭, Fuke, Chiaki メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/17850

平成22年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007年度～2009年度

課題番号：19590678

研究課題名（和文）有機リン系農薬の体内動態解析—CE-MSによる代謝物分析法の開発と応用—

研究課題名（英文）Toxicokinetics of organophosphorus insecticide - Development and application of the analytical method for the metabolites by CE-MS -

研究代表者

福家 千昭 (FUKE CHIAKI)

琉球大学・医学部・准教授

研究者番号：60173374

研究成果の概要（和文）：有機リン系農薬の分解物であるジアルキルフォスフェート（DAP）のキャピラリー電気泳動質量分析計（CE-MS）による定量分析法の開発を行い、実試料に応用した。CE-MSにより有機リン系代謝物のうち7種のDAPの定量分析が可能であった。全ての有機リン系農薬中毒患者で、予想されるDAPが検出された。さらにO,S-ジメチルチオフォスフェートというこれまでに報告のない新規の代謝物を検出した。DAPを定量することにより、摂取した有機リン系農薬のタイプや単独製剤と混合製剤の判別が可能で、ジメチルフォスフェート濃度と中毒症状の重さとの間に相関傾向をみいだすことができた。

研究成果の概要（英文）：We developed a determination method for the dialkylphosphates (DAPs), metabolites of organophosphate insecticides, using capillary electrophoresis / mass spectrometer (CE/MS) and applied this method to serum and urine collected from poisoned patients with organophosphate insecticide. The 7 DAPs were detected by CE-MS. In all of 29 cases of organophosphate insecticide poisoning, the expected DAPs were detected using this method. O,S-DMTP was also detected. The phosphate type and single or mix formulation of ingested organophosphate insecticide could be distinguished by determination of DAPs. There was a relation between DMP concentration in the serum and the degree of toxic symptoms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：キャピラリー電気泳動質量分析法、有機リン系農薬、代謝物、生体試料、中毒

1. 研究開始当初の背景

有機リン系農薬は、フوسفエート型、チオフوسفエート型、ジチオフوسفエート型の3種に大別される。チオフوسفエート型とジチオフوسفエート型の化合物は、それ自体は、それほど強いコリンエステラーゼ阻害作用を示さないが、リンに結合しているイオウが酸化され、酸素と置き換わると、その阻害作用は飛躍的に強大となるとされている。しかし、酵素阻害と化合物の毒性とは相関がなく、中毒の症状の強さと、酵素阻害度とは必ずしも一致しないとされている。

そこで、有機リン系農薬中毒における有機リン系化合物の体内動態をより詳細に観察するために、代謝物も合わせて分析を行った報告もある。その中で、リン酸部分の分解物（ジアルキルフوسفエート）を分析することは、チオフوسفエート型化合物やジチオフوسفエート型化合物が酸化されることにより、阻害作用が増強されることもあり有用であると考えられる。

これまでジアルキルフوسفエートの分析法としては、誘導体化した後ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）にて分析する方法が報告されている。しかし、誘導体化に多くの時間が必要となることや誘導体化中に酸化が起こらないように厳密な条件下で誘導体化を行わなければならなかった。それに対して、キャピラリー電気泳動法では、イオン性の化合物を誘導体化せず分析でき、質量分析計により紫外部に強い吸収をもたない化合物も検出できることより、簡単、迅速かつ高精度の分析が可能であると考えられる。

2. 研究の目的

キャピラリー電気泳動質量分析法（CE-MS）を用いての生体試料中のジアルキルフوسفエートの定量分析法の開発を行い、その分析法を実試料に応用すると共に、検出されたジアルキルフوسفエート濃度と中毒症状との相関性について検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試薬

本研究で測定対象としたジアルキルフوسفエートと内部標準物質として用いたエチルメチルフوسفオネートの構造式を図1に示した。ジメチルフوسفエート（DMP）、ジエチルジチオフوسفエート（DEDTP）は関東化学より、ジエチルフوسفエート（DEP）は Supelco より、ジメチルジチオ

フوسفエート（DMDTP）、ジエチルチオフوسفエート（DETP）および内部標準物質のエチルメチルフosphオネート（EMP）は Sigma・Aldrich Japan より購入した。ジメチルチオフوسفエート（DMTP）は Aldrich 製ジメチルクロロチオフوسفエートを水に溶解したものを用いた。O,S-ジメチルチオフوسفエート（O,S-DMTP）は林純薬工業より購入した。水は milli Q 水を使用し、メタノール、アセトニトリルは HPLC 用を使用した。その他の試薬は和光純薬特級を用いた。

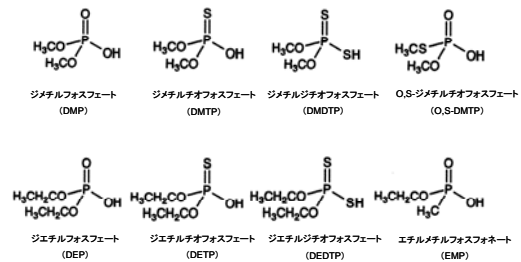


図1. 測定対象とした7種のジアルキルフوسفエートと内部標準物質

標準物質はフリーの濃度として各 1 mg/ml 水溶液を調整し、適宜希釈して使用した。

6種のジアルキルフوسفエートについてそれぞれ標準溶液で 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 μg/ml の濃度で検量線を作成し、O,S-DMTP については 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 μg/ml の濃度で検量線を作成した。回収率は、ブランク血清に 1.0, 5.0 μg/ml を添加して求めた。定量は実試料に 0.5-5.0 μg/ml の標準溶液を添加し、実試料からのピーク面積比の増加を基準として定量値を算出した。

(2) 分析条件

装置は Agilent 社製キャピラリー電気泳動質量分析計を使用し、エレクトロスプレーイオン化法にてイオン化した。キャピラリーはフューズドシリカキャピラリー（内径：75 μm、長さ：100 cm）を用い、キャピラリー温度は 20 °C とした。泳動は 1 M 酢酸-10 %メタノール溶液にて -30 kV の印加電圧で行った。注入は加圧法にて行い、水（50 mbar×5 sec）、試料（50 mbar×20 sec）、泳動用電解液（50 mbar×5 sec）の順に注入した。検出器は、極性：Positive、キャピラリー電圧：4000 V、フラグメンター電圧：20 V、ドライガス流量：10 l/min（窒素）、ドライガス温度：350 °C、ネブライザーガス圧：10 psi に設定した。シース液は 5 mM 酢酸アンモニウム-50 %メタノール溶液を 10 μl/min で流した。

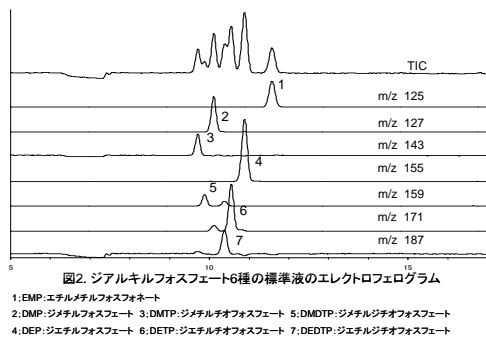
(3) 前処理

試料 100 μl に、100 μg/ml の EMP 溶液 5 μl を添加後、攪拌しながらアセトニトリル 100 μl

を加えた。さらにアセトニトリル 400 μ l を加えて十分に攪拌した。12000-g, 5 分間遠心分離後, 上清を分取して遠心エバポレーターにて乾固した。残渣に水 100 μ l を加え再溶解後, 12000-g, 5 分間遠心分離した上清を分析試料とした。

4. 研究成果

各化合物の標準溶液を分析したところ, いずれの化合物も分子量 +1 をベースピークとするマススペクトルが得られた。各化合物の検出のための選択イオンはそれぞれ, DMP:127, DMTP : 143, O,S-DMTP : 143, DMDTP:159, DEP:155, DETP:171, DEDTP : 187, EMP : 125 とした。これらの化合物は DMTP, DMDTP, DMP, DEDTP, DETP, DEP の順に検出された (図 2) が, 化合物の移動時間は試料の種類や日差により変動し一定しなかった。しかし, 内部標準物質に対する相対移動時間は同一試料内ではほぼ一定であった。



実試料の m/z 143 の電クロマトグラム上で, DMTP のピークの後に, ピークが出現するものが認められた。そこで実試料に O,S-DMTP の標準液を添加したところ DMTP の後方のピーク面積が増大 (図 3) した。また, そのピークのマススペクトルは, 標準品の O,S-DMTP のものと同一であった。以上のことより, このピークは O,S-DMTP であると同定し, 実量分析の対象とした。

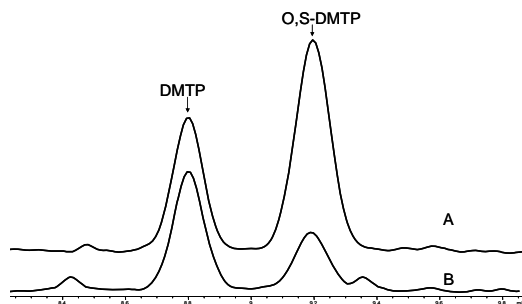
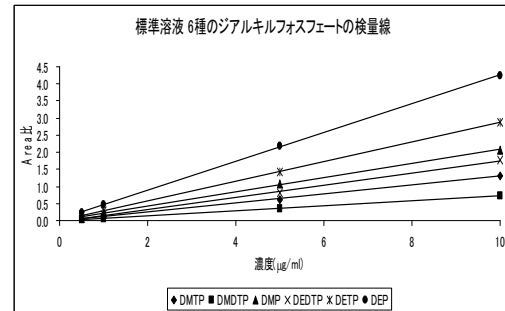


図3. 実試料に O,S-DMTP の標準液添加
A : O,S-DMTP 添加後 B : O,S-DMTP 添加前
内部標準物質のピーク面積に対する各化

合物のピーク面積の比と濃度との間の直線性について 0.5–10.0 μ g/ml の濃度範囲で良好な直線関係が得られた (図 4)。各化合物の検出下限 (S/N=3) は DMP 0.03 μ g/ml, DMTP 0.1 μ g/ml, O,S-DMTP 0.1 μ g/ml, DMDTP 0.5 μ g/ml, DEP 0.03 μ g/ml, DETP 0.1 μ g/ml, DEDTP 0.2 μ g/ml であった。



各化合物を添加した血清からの回収率と定量精度を表 1 にまとめた。

表 1. 血清におけるジアルキルフォスフェート 7 種の回収率と定量精度

ジアルキル フォスフェート	添加 (μ g/ml)	算出値 (μ g/ml)	SD	CV	回収率 (%)	SD	CV
DMP	1.0	1.0	0.0	6.2	92.5	6.5	6.2
	5.0	4.6	0.1	7.2	91.7	6.6	7.2
DMTP	1.0	0.9	0.0	3.9	92.4	3.6	3.9
	5.0	4.9	0.0	5.8	97.9	5.7	5.8
O,S-DMTP	1.0	0.9	0.0	12.5	88.6	11.1	12.5
	5.0	5.6	0.2	4.5	112.5	5.1	4.5
DMDTP	1.0	1.0	0.0	7.3	100.4	7.4	7.3
	5.0	4.9	0.0	7.5	97.8	7.3	7.5
DEP	1.0	1.0	0.0	4.5	104.9	4.7	4.5
	5.0	5.0	0.2	8.1	99.4	9.1	8.1
DETP	1.0	1.1	0.0	5.6	108.9	6.1	5.6
	5.0	5.4	0.1	7.4	107.2	7.9	7.4
DEDTP	1.0	1.0	0.0	7.7	100.7	7.8	7.7
	5.0	4.0	0.0	1.2	79.9	1.0	1.2

実試料中のジアルキルフォスフェートの定量分析の結果を表 2 にまとめた。

フェニトロチオン中毒症例 (症例 1–12) では全ての症例で, 来院時血清および尿から DMP が検出され, DMTP は, 症例 4 と症例 7 の血清を除く, 血清ならびに全ての尿より検出された。また, O,S-DMTP は症例 4 と症例 8 以外の症例において, 血清・尿のいずれからも検出された。マラチオン中毒症例 (症例 13–21) では, 来院時の血清および尿において, 全ての症例から DMP と DMTP が検出された。DMDTP は, 症例 13 と症例 20 で血清, 尿いずれからも検出下限以下であったが, 他の症例は, 血清, 尿いずれからか DMDTP が検出された。また, O,S-DMTP は, 症例 17 の血清を除く全ての血清および尿から検出された。フェニトロチオンとマラチオンの合剤中毒例 (症例 22–24) では, 全ての症例の検体から DMP と DMTP は検出されたが, DMDTP は検出されなかった。O,S-DMTP は, 3 症例の血清からいずれも検出された。ピリミホスメチル中毒症例 (症例 25) では, 血清からは DMP と O,S-DMTP が尿からは DMP

表2. ジアルキルフォスフェートの定量分析の結果

症例	摂取化合物	摂取後時間 (hr)	試料	摂取化合物濃度 (µg/ml)	DMP (µg/ml)	DMTP (µg/ml)	DMDTP (µg/ml)	O,S-DMTP (µg/ml)
1	フェニトロチオン	0.8	血清	4.3	0.5	0.3		1.0
			尿	NA	3.6	3.4		6.0
2	フェニトロチオン	1.0	血清	14.9	1.2	0.5		1.6
			尿	NA	2.3	0.8		4.0
3	フェニトロチオン	1.3	血清	5.5	0.5	0.1		5.8
			尿	NA	24	9.2		260
4	フェニトロチオン	2.3	血清	0.5	0.5	ND		ND
			尿	NA	2.1	1.7		ND
5	フェニトロチオン	2.5	血清	0.9	7.1	3.2		41
			尿	NA	240	70		40
6	フェニトロチオン	3.5	血清	0.5	0.4	0.1		0.3
			尿	NA	7.0	15		9.8
7	フェニトロチオン	6.5	血清	0.4	0.4	ND		0.2
			尿	NA	2.0	1.5		4.1
8	フェニトロチオン	7.5	血清	0.6	0.4	0.1		ND
			尿	NA	3.0	0.9		ND
9	フェニトロチオン	8.0	血清	4.7	0.9	0.4		0.6
			尿	0.4	14	12		15
10	フェニトロチオン	8.0	血清	1.0	0.3	0.1		1.0
			尿	NA	37	29		82
11	フェニトロチオン	-	血清	6.0	0.9	0.3		2.0
			尿	NA	41	21		19
12	フェニトロチオン	-	血清	2.4	0.8	0.2		2.3
			尿	NA	10	17		53
13	マラチオン	0.8	血清	1.7	0.9	1.4	ND	1.4
			尿	NA	3.2	9.0	ND	1.5
14	マラチオン	1.0	血清	2.5	2.0	8.5	0.8	2.5
			尿	NA	1.7	1.9	ND	0.8
15	マラチオン	1.0	血清	5.9	2.1	3.8	1.9	2.7
			尿	NA	70	120	13	8.0
16	マラチオン	1.8	血清	4.7	1.1	2.9	2.6	1.1
			尿	0.4	100	280	30	50
17	マラチオン	2.0	血清	0.3	0.6	5.8	ND	ND
			尿	NA	27	91	3.0	13
18	マラチオン	2.2	血清	7.0	1.2	4.2	0.9	0.6
			尿	NA	39	69	2.0	6.0
19	マラチオン	3.7	血清	1.7	2.1	3.2	ND	1.5
			尿	NA	40	180	10	30
20	マラチオン	5.6	血清	3.0	0.8	1.9	ND	0.6
			尿	NA	1.8	1.2	ND	0.9
21	マラチオン	7.5	血清	8.0	0.9	3.3	1.2	2.5
			尿	NA	1.5	6.2	ND	0.7
22	フェニトロチオン マラチオン	2.0	血清	2.6	0.5	0.6	ND	3.1
			尿	0.2	7.8	19	ND	ND
23	フェニトロチオン マラチオン	3.3	血清	0.9	0.6	0.7	ND	0.4
			尿	0.1	16	35	ND	ND
24	フェニトロチオン マラチオン	10	血清	8.5	0.7	1.5	ND	0.9
			尿	8.5				
25	ピリミホスメチル	-	血清	0.6	0.1	ND		0.3
			尿	0.03	19	19		37
26	メチダチオン	-	血清	0.7	0.6	2.6	ND	2.0
			尿	0.2	15	30	14	40
27	ジクロロボス	-	血清	ND	110			
			尿	ND	5200			
28	ジクロロボス	6.0	血清	0.5	1600			
			尿					
29	ダイアジノン	-	血清	4.1	0.7	0.3	DEP	DETP
			尿	NA	3900	3400	DEDTP	

NA:Not Analyzed, ND:Not Detected

と DMTP, O,S-DMTP が検出された。メチダチオン中毒症例 (症例 26) では、血清および尿から DMP と DMTP, O,S-DMTP が検出されたが、DMDTP は尿のみで検出した。ジクロロボス中毒症例 (症例 27-28) では、全ての検体から DMP が検出された。ダイアジノン中毒症例 (症例 29) では、血清および尿のいずれからでも DEP と DETP が検出された。

中毒患者の症状とジアルキルフォスフェートの濃度との関係性について検討した結果の中で、重症度と DMP 濃度の関係を図5に示した。

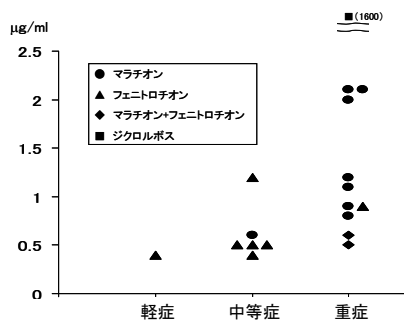


図5. 重症度と DMP 濃度の関係

<考察>

有機リン系農薬は、体内でジアルキルフォスフェートと側鎖に加水分解される。これら

の分解物は、いずれもコリンエステラーゼ阻害作用はもはや有しておらずその毒性はほとんどない。また、チオフォスフェート型やジチオフォスフェート型の有機リン系農薬は、肝臓にて酸化され、オクソン体となって強いコリンエステラーゼ作用を示し、さらに加水分解され、酸化型ジアルキルフォスフェートと側鎖を産生する。従って、有機リン系農薬中毒において代謝産物であるジアルキルフォスフェートを詳細に分析することは、有機リン系農薬中毒の病態解明につながる可能性があると考えられる。

キャピラリー電気泳動法は、誘導体化することなくイオン性の化合物を分離、分析することが可能で、検出器に質量分析計を用いることで、特徴的な紫外外部吸収を持たない化合物も高感度で分析することができる。

今回我々は、キャピラリー電気泳動質量分析法を生体試料中のジアルキルフォスフェートの定量分析に応用したところ、試料をアセトニトリルで除タンパクし、乾固後水に再溶解するという操作のみで、7種のジアルキルフォスフェートを分離分析することが可能であった。

本分析法を有機リン系農薬中毒患者に応用したところ 29 症例すべてにおいて、予想されるジアルキルフォスフェートを検出することができた。有機リン系農薬は、生体試料中で死後急速に分解するものがあることが知られており、生体試料から中毒の原因となった親化合物を検出することが困難な場合も考えられる。一方、分解物であるジアルキルフォスフェートを分析する本方法は、ジクロロボスやマラチオンなどの分解しやすい有機リン系農薬の中毒を証明するのに大変有用な方法であると考えられる。

ジアルキルフォスフェートの定量分析の結果、入院時の血清および尿においてマラチオン中毒 2 例 (症例 14, 症例 20) を除く全ての例で対応するジアルキルフォスフェートの濃度は、尿中濃度の方が血清中濃度よりも高かった。ジアルキルフォスフェートは、イオン性化合物であり代謝により産生されたものが速やかに腎臓より尿中に排泄されることが明らかとなった。

ジメチルチオフォスフェート型の有機リン系農薬であるフェニトロチオンとピリミホスメチル中毒例では、全症例で血清中ジメチルチオフォスフェート濃度がジメチルチオフォスフェート濃度を上回っていた。

チオフォスフェート型の化合物は肝臓で酸化されてフォスフェート型の化合物に代謝される。フォスフェート型の化合物は、コリンエステラーゼを強く阻害すると同時に、フォスファターゼにより加水分解されやすくなるため、ジメチルチオフォスフェート濃度よりもジメチルフォスフェート濃度が高

くなったものと考えられる。ジエチルチオフォスフェート型の有機リン系農薬であるダイアジノン中毒例でも同様の結果であった。

ジメチルジチオフォスフェート型の有機リン系農薬であるマラチオンとメチダチオン中毒例では、ジメチルジチオフォスフェートは、症例 13 と症例 20 を除く 9 例中 7 例で血清・尿のいずれかもしくは両方から検出された。また、ジメチルフォスフェート、ジメチルチオフォスフェートは全ての症例から検出され、その濃度は、ジメチルチオフォスフェート型の有機リン系農薬中毒例とは逆に、ジメチルチオフォスフェート濃度の方が、ジメチルフォスフェート濃度より高濃度であった。この結果は、Bradway らがラットを用いて行った実験と一致する。ジメチルフォスフェートとジメチルチオフォスフェートを検出した場合、その濃度の比により、ジメチルチオフォスフェート型の農薬を摂取したのか、ジメチルジチオフォスフェート型の農薬を摂取したのかを推測することが可能である。

フェニトロチオンとマラチオンの合剤中毒例 3 例では、いずれの検体からも、ジメチルジチオフォスフェートは検出されず、ジメチルフォスフェート濃度はジメチルチオフォスフェート濃度よりも低濃度であった。この結果はフェニトロチオン単独摂取の結果とは逆になっており、フェニトロチオンが検体から検出された場合でも、ジアルキルフォスフェートの濃度の関係を観ることにより単独製剤中毒なのか混合製剤中毒なのかを判断することができると考える。

ジクロロボス中毒例では、いずれの検体からもジメチルフォスフェートのみが検出され、その濃度は、他の有機リン系農薬中毒例よりも 10 倍以上の高値であった。

O,S-DMTP は、本研究で分析を行った 29 症例中 24 症例から検出された。血清中から O,S-DMTP が検出された症例について、O,O-DMTP と濃度を比較したところ、ジメチルチオフォスフェート型の農薬であるフェニトロチオンとピリミホスメチル中毒例では、O,S-DMTP が O,O-DMTP よりも常に高濃度であった。逆に、ジメチルジチオフォスフェート型の農薬であるマラチオンとメチダチオン中毒例では、O,O-DMTP 濃度が O,S-DMTP 濃度よりも高濃度であった。フェニトロチオンの場合、O,S-DMTP は、S-メチルフェニトロチオンの分解物として検出されると考えられる。しかし、フェニトロチオン 50%含有の農薬スミチオン中の S-メチルフェニトロチオンの含有量は 1%以下であった。フェニトロチオン中毒症例における O,S-DMTP 濃度と O,O-DMTP 濃度の関係をみると、O,S-DMTP の由来は、S-メチルフェニトロチオンのみとは考えられず、生体内で S-

メチルフェニトロチオンが産生される、もしくは O,O-DMTP から O,S-DMTP が産生される系が存在するものと考えられる。Kojima らは、フェニトロチオン中毒例から S-メチルフェニトロチオンを検出し、その由来は生体内で産生されている可能性を指摘している。S-メチルフェニトロチオンはフェニトロチオンよりも毒性が高いことが知られており、フェニトロチオン中毒例において、代謝によりオクソン体となって強毒性を発現するのみならず、S-メチル体となることでさらに強い毒性を発現している可能性がある。

有機リン系農薬中毒における外観的症状の強さと酵素阻害度とは必ずしも平行しないとされている。本 29 症例でも同様のことが言え、重症度と意識レベルやコリンエステラーゼ活性値との間に相関性は見出せなかった。唯一、血清中ジメチルフォスフェート濃度が高濃度になると症状が重症となる傾向があることが判明した (図 5)。

<まとめ>

今回我々は、キャピラリー電気泳動質量分析法による有機リン系農薬の代謝物であるジアルキルフォスフェートの生体試料中の定量分析法を開発し、有機リン系農薬中毒例に応用した。摂取した有機リン系農薬から予想されるジアルキルフォスフェートが全ての例から検出された。また、これまでに報告のない O,S-ジメチルチオフォスフェートの定量分析を行うことにより、摂取した有機リン系農薬のリン酸のタイプや単独製剤・混合製剤の判別、推測が可能であることを立証した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計2件)

- ① 野口正道、福家千昭、二宮賢司、井濱容子、宮崎哲次、有機リン系農薬中毒例におけるジアルキルフォスフェートの定量分析、第59回日本法医学会九州地方会、2009年10月2日、佐賀
- ② 野口正道、福家千昭、二宮賢司、井濱容子、宮崎哲次、フェニトロチオン中毒例におけるジアルキルフォスフェート濃度、第93次日本法医学会学術集会、2009年5月14日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福家 千昭 (FUKE CHIAKI)
琉球大学・医学部・准教授
研究者番号：60173374

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

野口 正道 (NOGUTI MASAMITI)
琉球大学・大学院医学研究科・大学院生