

高速液体クロマトグラフィーによる 青酸中毒ウサギの臓器中の青酸量の測定

東海大学医学部法医学教室 (指導: 平瀬文子教授)

平瀬 文子・斉藤銀次郎・永田 正博・
ヒラセ フミコ サイトウギンシロウ ナガタ マサヒロ
 中村 公一・近藤 光世・小島 正記
ナカムラ キミカズ コンドウ テルコ コジマ マサノリ

(受付 昭和54年1月26日)

Analysis of Cyanide in some Organs of Rabbits Killed by the Administration of potassium cyanide, using high pressure Liquid Chromatography

**Fumiko HIRASE, Ginjiro SAITO, Masahiro NAGATA, Kimikazu NAKAMURA,
Teruyo KONDO and Masanori KOJIMA**

Department of Legal Medicine (Director: Prof. Fumiko HIRASE)
School of Medicine, Tokai University

A new method was attempted for quantitative analysis of cyanide in some tissues by high pressure liquid chromatography. This method was rapid and specific because there was no need of colorimetric assay after extraction and cyanide has been separated from other components. We determined cyanide level in some tissue of the rabbits which were killed by the oral administration of potassium cyanide or subcutaneous injection, and compared the results of our method with those of existing. As the results of this experiments, this technique could be applied for forensic toxicology.

緒 言

近年開発された高速液体クロマトグラフはガスクロマトグラフと同程度の分離精度が得られ、しかも試料の揮発性や熱安定性による制限がないことから特にガスクロマトグラフィーで測定が困難とされている物質の分離・定量に応用されつつある。

現在、法医学領域では毒物などの分離・定量は薄層クロマトグラフィーあるいはガスクロマトグラフィーが中心であるが、扱う毒物の性質を考えると、今後高速液体クロマトグラフィーの有用性が増すものと思われる。この高速液体クロマトグ

ラフィーを用いて、近年中毒死が減少しているとはいえ、法医学上重要な毒物のひとつである青酸の分離・定量を試みた。青酸中毒は青酸塩の経口摂取または青酸ガスの吸引がほとんどであるが、なかには注射によるもの¹⁾、あるいは皮膚からの吸収²⁾によるものも報告されている。今回われわれはウサギを経口投与と皮下注射で中毒死させ、投与量および投与方法の違いによる主な臓器中の青酸量の相違を調べた。また致死量に相当する青酸を投与したにもかかわらず死亡しなかつたウサギの血中青酸濃度を経時的に測定した。

実験材料および方法

1. 投与方法

1) 経口投与

一昼夜絶食させたウサギ（約2.5kg・雄）に体重 1kg あたり 4・8・16mg に相当する青酸カリを10ml の純水に溶解させ、カテーテルで胃内に注入した。4mg/kg 投与群ではウサギを10匹用いて、投与前30分と投与後1時間から5時間まで1時間おきに耳静脈から採血し、血中濃度を測定した。8.16mg/kg 投与群ではウサギをそれぞれ5匹用いて行ない、心拍動停止30分後に胃内容心臓血・脳・肺・肝・脾・腎を剔出し、青酸量を測定した。

2) 皮下注射

ウサギの前頸部・上腹部・背部（各5匹）に16mg/kg の青酸カリウムを0.5ml の純水に溶解させて皮下に注射した。その後の操作は経口投与と同様の方法で行なった。

2. 青酸の抽出

剔出した臓器3.0g に冷0.1N NaOH を3.0ml 加え、低温で十分に細かく切載したものを検体とした。抽出には Conway cell を使用し、内室に0.1N NaOH 3.0ml、外室に検体および10%硫酸1.5ml を加え、蓋をして内室と外室の液が混合しないように注意して振盪した後、3時間室温に放置した。放置後内室液の一部を小試験管にとり高速液体クロマトグラフィーの試料とした。

3. 高速液体クロマトグラフィーの条件

装置は島津・デュポン高速液体クロマトグラフ830型、(254nm 紫外外部吸光度計付属)、カラム permaphase AAX (500×2.1mm)、液圧60kg/cm²、流速0.8ml/min、カラム温度45°C、移動層0.1M 硫酸アンモニウム、感度0.02A.U.F.S.

4. 青酸の定量

検量線は青酸カリウムを0.1N NaOH に溶解させ、Liebig-Denigues 法で滴定し0・2・4・6・8・10μg/ml に調製したものをピーク高さ法によつて作成した。クロマトグラフィー用の検体はマイクロシリンジを用いて10μl 注入した。

実験成績

1. 青酸の高速液体クロマトグラフィー

青酸は図1に示すように2.8分の所に単一のピークとして出現した。臓器中の青酸を測定した場合、抽出などの際生じた夾雑物が1分以内出現するため、青酸と夾雑物が完全に分離された形で測定された（図1、図2）。

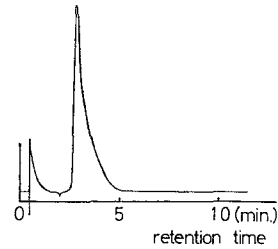


Fig. 1 Chromatogram of cyanide

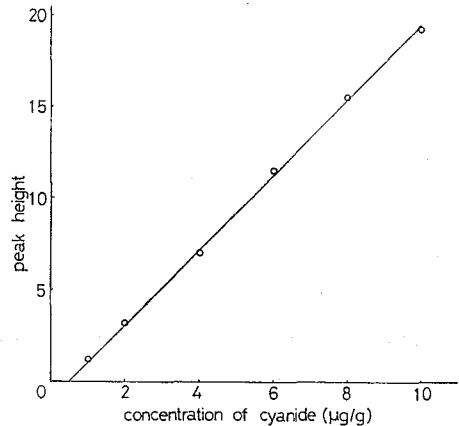


Fig. 2 Calibration curve of cyanide

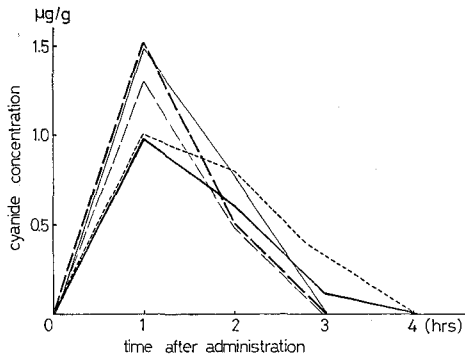
検量線は図2に示すように0—10μg/g の範囲内で直線関係が得られた。また10μg/g 以上になると直線関係は得られなかつたため、0.1N-NaOH で0~10μg/g の範囲内に入るように希釈して測定した。回収率は0.1N-NaOH に既知量の青酸を加えて測定し得られた値に対し、各臓器に同量の青酸を加えて抽出して、測定し得られた値の両者から算出した。その結果は表1に示す通りである（表1）。

2. 死亡しなかつたウサギ血中の青酸の経時的变化

4mg/kg の青酸を経口投与したにもかかわらず10匹中5匹のウサギはその後1カ月以上生存した。この5匹のウサギについて、投与後5時間まで経時的に血中青酸濃度を測定した。結果は図3のごとくで、血中青酸濃度は投与後1~2時間以内に急速に上昇してピークに達し、急速に減少して4~5時間後には検出されなかつた（図3）。

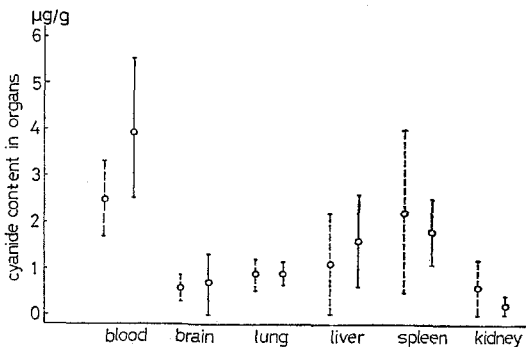
Table 1 Recovery (mean±SD) % of added cyanide

gastric contents	blood	brain	lung	liver	spleen	kidney
82.8±3.2	82.8±3.2	83.0±2.0	71.1±2.2	71.3±0.4	70.0±3.0	72.7±3.2

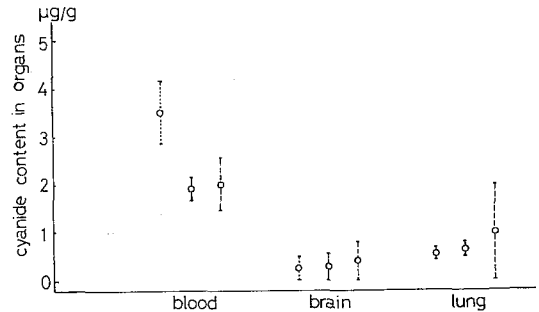
**Fig. 3** Cyanide concentration in blood of survived rabbits

3. 経口投与で死亡したウサギ臓器中の青酸量

4mg/kg を投与して死亡した残りの5匹のウサギはすべて1~2時間以内に死亡し、その時の血中青酸濃度は1.5µg/g以上で、死亡しなかつたウサギに較べ高値を示した。8mg/kg 投与群の各臓器中の青酸濃度は血液が最も高値を示し、その平均値は2.6µg/gとなり、図4に示すように脾・肝・肺・脳・腎の順に低くなつた。また16mg/kg 投与群でも8mg/kg 投与群と同様の傾向がみられ、脾と肝の青酸濃度が逆になつたが、他の臓器

**Fig. 4** Cyanide content after oral administration (mean±SD)

⋯○⋯⋯ 8mg/kg, —○— 16mg/kg

**Fig. 5** Cyanide content after subcutaneous injection (mean±SD)

⋯○⋯⋯ anterior neck, —○— epigastrica
- - ○ - - dorsalis

では著しい差異はみられなかつた。

青酸の投与量と死亡までの時間との関係を見ると、8mg/kg 投与群では投与後14分から28分(平均26分)に死亡したが、16mg/kg 投与群では7分から16分(平均13分)となり死亡までの時間に大きな差がみられた(図4, 図5)。

4. 皮下注射で死亡したウサギ臓器中の青酸量

血液・肺・脳からのみ青酸が検出された。これら臓器中の青酸濃度は図5に示すように血中青酸濃度が最も高値を示した。経口投与群と比較した場合、臓器中の青酸濃度は大きな差はみられなかつた。

死亡までの時間は経口投与群に較べて全体的に短かく、前頸部注射群では平均6分で最も早く、上腹部および背部の注射群ではともに平均10分となつた。

考 按

青酸は法医学上重要な毒物のひとつであり古くから種々の方法^{1)~3)}で測定されている。特にShönbein反応は予備試験として青酸検出にとって必須の検査として重要で、この反応が陽性あるいは凝陽性の場合には確認試験が行なわれ、さらに

定量試験へと検査が進められる。定量法は現在ピリジンピラゾロン法やピクリン酸比色法が多く用いられているが、これらは発色操作後に吸光分析を行なつてから測定値を求めるために臓器から抽出した検体では夾雑物の影響を受けるため特異性に乏しくなるという欠点がある。この点高速液体クロマトグラフィーによる測定法では、青酸と夾雑物の分離を行ない青酸のみを測定するため特異性が高く、また抽出後の発色操作が不用であるため簡便かつ迅速といえる。

致死量¹²⁾とされている青酸カリを投与したにもかかわらず死亡しなかつたウサギの血中青酸濃度は投与後急速に上昇して約1～2時間後に最高値を示し、その後の消失も急速であつたことから、青酸に対する生体反応としてのチトクロームオキシダーゼ・CN 複合体形成という中毒作用ばかりでなく、SCN 形成としての解毒作用も生体内では急速に行なわれていることがわかる。このような急性の作用はヒトにおいても同様で松倉ら¹³⁾が報告した149例中の青酸中毒死亡者の中で60分以内に死亡したものが140例で94.6%を占めるということからも示されている。

また生体内には rhodanese は十分に備わつてはいるが、substrate としてのチオ硫酸が少ないために解毒作用としての SCN 形成が制限される¹⁴⁾ということから、致死量を与えたにもかかわらず死亡しなかつたウサギはこの解毒機構が優勢に働いたため死に至らなかつたものと考えられる。

また投与量および投与方法の如何にかかわらず死亡したウサギ臓器中の青酸濃度は血中が最も高値を示した。これは従来報告されている多くの実験結果^{4)~7)}とほぼ一致しているが、血液以外の他の臓器では若干の相違がみられた。今回行なつたわれわれの実験では経口投与群では別出した臓器のすべてから青酸が検出されたのに対して、皮下注射群では肝・脾・腎からは検出されなかつた。この理由として青酸の吸収経路が第一に考えられることであり、皮下注射の場合には接種後急速に青酸が血中に吸収されてしまうことから、青酸の強力な生体への作用とされている心臓の刺激伝導

系の麻痺および呼吸中枢への刺激が胃腸管から吸収される場合に較べ急激にしかも同時に働いたためと考えられる。また、Gettler ら²⁾がイヌを用いて行なつた筋肉注射による青酸中毒実験でも、臓器中の青酸濃度をみると血液・肺・脳が腎・肝に較べはるかに高い値を示していることから、われわれの実験結果がこれに類似していたことがわかつた。

さらに、ヒトの場合も動物実験とほぼ同様の測定結果が多数報告^{5)9)~11)}されているが、特に Ballantyne ら⁴⁾がヒトと動物との血中青酸濃度は同程度であると述べている点は興味深いが、われわれのウサギの結果をヒトの場合に比較してみたが、各臓器中の濃度はいずれも低値を示した。

結 論

高速液体クロマトグラフを用いてウサギ臓器中青酸の分離・定量を行なつた。この方法は臓器中の夾雑物の分離を行ない、また従来の方法に必要とされていた発色操作の必要がないため迅速・簡便であつた。

致死量の青酸を投与したにもかかわらず死亡しなかつたウサギ血中の青酸濃度を経時的に測定したことにより、青酸が生体に対して急激に作用するが解毒作用も生体内で急速に行なわれていることがわかつた。また死亡したウサギの臓器中の青酸濃度は経口投与・皮下注射ともに血中が最高値を示した。

本論文の要旨は第61次日本法医学会総会(昭和52年5月、福岡)で発表した。

文 献

- 1) **Feldsrein, M.A. and N.C. Klendshoj:** J Lab Clin Med **44** 166~170 (1954)
- 2) **Gettler, A.O. and L. Goldbaum:** Anal Chem **19** 270~271 (1947)
- 3) 福井巳芳: 日法医誌, **22** 35~40 (1969)
- 4) **Ballantyne, B. et al.:** Medicine Sci Law **12** 209~219 (1972)
- 5) **Ballantyne, B.:** J Forens Sci Law **15** 51~56 (1975)
- 6) **Gettler, A.O. and J.O. Bain:** Am J Med Sci **195** 182~198 (1938)

- 7) **Ballantyne, B. and P. Williams:** J Forens Sci **3** 71~76 (1974)
 - 8) **Bonnichen, R. and A.C. Maehly:** J forens Sci **11** 516~528 (1966)
 - 9) **Curry, A.S.:** Acta pharmacol et toxicol **20** 219~294 (1963)
 - 10) **Sunshine, I. and I. Frinke, I.:** Int Arch Gewerbepath Gewerbehyg **20** 558~561 (1964)
 - 11) **Halström, F. and K.O. Möller:** Acta pharmacol **1** 18~28 (1945)
 - 12) **池田良雄:** 薬物致死量集 南山堂 東京 (1953)
 - 13) **松倉豊治・福井己芳:** 日法医誌 **22** 219~ 222 (1969)
 - 14) **南 卓男・ほか:** 日本医事新報 **2746** 43~ 45 (1976)
 - 15) **上条一也** 監訳: グッドマン・ギルマン 薬理書 [下] 薬物治療の基礎と臨床 4版 広川書店 東京 (1974)
-