

令和 3 年 4 月 15 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K09221

研究課題名(和文)法医学的に有用な睡眠薬代謝物の探索

研究課題名(英文)Search for hypnotic metabolites for forensic toxicological analysis

研究代表者

山口 晃志 (Yamaguchi, Koji)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：90465344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠薬ゾルピデム(ZOL、商品名マイスリー)の代謝について、剖検資料を用いて調査した。ZOLを摂取したヒトの尿に含まれるZOL代謝物をLC-MS/MSで探索したところ、7-水酸化体(7-OH)、8-水酸化体(8-OH)、ジヒドロジオール体、システイン抱合体などが含まれていることが分かった。

ZOL代謝物M1～M4、7-OH及び8-OHを合成した。合成品を標準品として用い、ヒト尿に含まれるZOL及びその代謝物の一斉分析法を開発した。

ZOLを服用していたヒトの尿に含まれるZOL及びその代謝物を定量した。M1が最も多く、次いでM2、7-OH、M4などが多く含まれていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの資料を用い、日本で最も販売されているゾルピデムの代謝について研究した。得られた知見により、今後ゾルピデムが犯罪に悪用され、ゾルピデムが使用されたことを証明する時に、より証拠力の高い鑑定が可能になった。今後、ゾルピデムの排泄の経時変化が明らかになれば、服用時間のおおよその推定が可能になったり、事件から長時間経過していても尿からゾルピデム代謝物を検出できるようになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate metabolites of zolpidem (ZOL) in urines obtained from autopsies. The search for ZOL metabolites using LC-MS/MS revealed the presence of novel metabolites, 7-hydroxy ZOL (7-OH), 8-hydroxy ZOL (8-OH), ZOL dihydrodiol, and cysteine conjugates of ZOL, in urine.

ZOL metabolites, M1-4, 7-OH and 8-OH were synthesized. These products were used as authentic standards. And a method for simultaneous analysis of ZOL, M1-4, 7-OH, and 8-OH in urine was developed.

Quantitative analysis of ZOL and its metabolites in human urines revealed that concentrations of M1 was the highest, followed by those of M2, 7-OH, M4.

研究分野：法医中毒学

キーワード：睡眠薬 ゾルピデム LC-MS/MS 代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

睡眠薬を飲食物に密かに含ませて、相手を眠らせた上での殺人、強盗、強姦などの事件がしばしば発生している。このような事件が発生した場合、被害者の尿、血液などの資料を採取し、睡眠薬由来物質(未変化体や代謝物)が含まれているかどうかを検査し、睡眠薬が用いられたことを証明する必要がある。ゾルピデム(ZOL、商品名:マイスリーなど)は、日本で最も売り上げが高い睡眠薬であり、そのため犯罪に悪用されることもある。

ZOLを服用すると、ベンゼン環のメチル基がカルボン酸に酸化された代謝物(M1)を主要代謝物として、主に尿中に排泄される。その他の代謝物として、M2~M4が知られている(スキーム1参照)。しかし、実際にZOLを服用したヒトから、どのような代謝物がどのくらいの濃度で尿中に排泄されるかは、未変化体とM1の濃度以外にはあまり分かっていなかった。この理由として、

(1) 未変化体とM1以外の標準品が市販されてなく、また自ら合成しようとしても、これまで報告されている合成法は多くのステップを経ているため、非常に困難であった。

(2) ZOLが開発される段階で製薬会社による代謝研究が行われ、創薬の分野ではZOLの代謝は既知のものとなった。法医中毒学の分野においては、その知見に基づいた分析法の開発が主流となり、ZOLの代謝を改めて研究することがなかった。

などが挙げられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ZOLの代謝について、代謝物の濃度や、排泄された代謝物を検出できる期間(いわゆる detection window)などを念頭に置いて、法科学的な立場に立って理解を深めることである。具体的には、以下の項目がある。

(1) 液体クロマトグラフ - タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いてZOLを服用したヒトの尿を分析し、ZOLの代謝物はどのようなものが含まれているか明らかにする。

(2) 代謝物を同定し、定量するには、標準品が不可欠である。そこで、代謝物を合成する。

(3) 代謝物を定量し、どのような代謝物がどのくらい含まれているかを明らかにする。

以上のことを通じて、ZOL使用者の生体資料にZOLの未変化体や代謝物がどのように含まれているかを明らかにする。ZOL使用の証明をする上で、法科学的に有用なZOL代謝に関する知見を得ることを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) ZOLが検出された剖検資料について、その尿を試料として、ZOL代謝物をLC-MS/MSにて探索した。尿抽出液をスキャン分析し、そのスキャン分析をトリガーとしたデータディペンデント-プロダクトイオンスキャン分析でMS/MSスペクトルを獲得した。ZOLのMS/MSスペクトルは、ジメチルアミノ基( $(\text{CH}_3)_2\text{N}$ )やジメチルカルボキサミド基( $(\text{CH}_3)_2\text{NCO}$ )が脱離した特徴的なフラグメンテーション(それぞれ-45 Da及び-73 Da)を与える。このことを利用し、同様のフラグメンテーションを示すピークをZOL由来の物質のものとしてピックアップした。さらに、ピックアップしたピークのMS/MSスペクトルを複数のコリジョンエネルギーで分析し、得られたスペクトルを解析することで構造を推定した。

(2) (1)で見つかった代謝物の標準品を合成した。ZOL未変化体の合成法は、これまで様々なものが報告されているが、これらの中から代謝物合成にも適用できるものを探し出し、代謝物の合成を試みた。

(3) 尿に含まれるZOLとその代謝物について、定量分析法を確立した。確立した分析法は、各種バリデーションのパラメータを調べ、分析法としての妥当性を検討した。

(4) ZOLが検出された剖検資料を選び、ヒト尿に含まれるZOLとその代謝物について、定量分析した。

### 4. 研究成果

(1) LC-MS/MS分析の結果、既知の水酸化体代謝物M3、M4以外の水酸化体の存在が明らかになった。その水酸化体は、MS/MSスペクトルからピリジン環が水酸化された構造であることが分かった。しかし、質量分析による構造推定でこれ以上水酸基の位置を特定することは不可能であった。

また、 $m/z$  342(未変化体 +34 Da)をプロトン化分子に持つピークが確認され、そのMS/MSスペクトルでは $m/z$  324、297、251及び108にフラグメントが現れた。これらの結果から、このピークはピリジン環が水酸化したゾルピデムにさらに水が付加した構造の代謝物と考えられ、ZOL

のジヒドロジオール (ZDHD) と考えられた。

さらに、 $m/z$  427 (未変化体 +119 Da) をプロトン化分子に持つピークが確認され、その MS/MS スペクトルでは  $m/z$  340、295、267 及び 124 にフラグメントが現れた。このピークはピリジン環に硫黄が結合した構造の代謝物と考えられ、ZOL のシステイン抱合体 (ZCys) と考えられた。

$m/z$  445 のピークも確認され、 $m/z$  427、340、324 及び 251 にフラグメントが現れた。このピークは ZCys の水付加体 ( $ZH_2OCys$ ) であると考えられた。

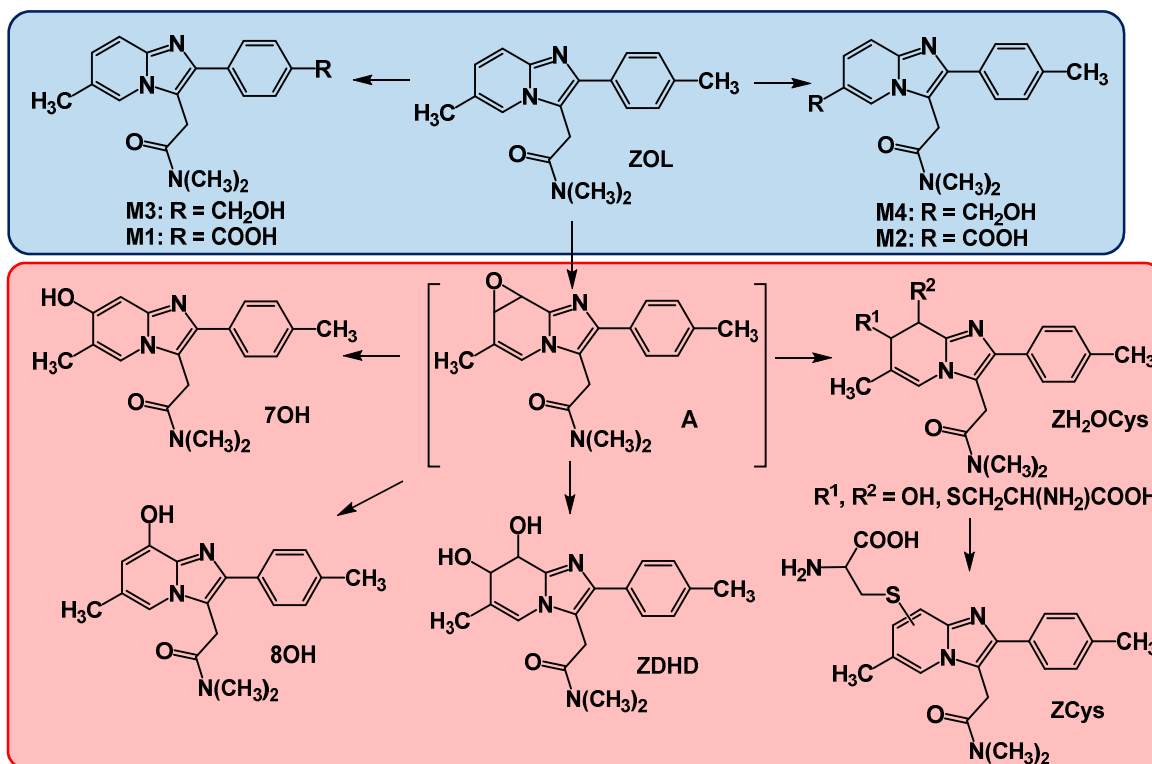
ヒドロキシゾルピデム及び ZDHD のグルクロニドも確認された。

(2) ZOL 代謝物のうち、M1 ~ M4、7-水酸化体 (7OH) 8-水酸化体 (8OH) の標準品を合成した。これまでに報告されているゾルピデムの合成法のうち、銅触媒を用いたアセチレン、アルデヒド及びアミンのカップリングを応用し、代謝物を効率的に合成することに成功した。合成品は、NMR、元素分析及び高分解能質量スペクトルにより純度の高いものであることが分かった。合成品とヒト資料抽出液との分析結果の比較から、ヒト資料に多く含まれている水酸化体は 7OH であることが分かった。

(3) 合成した代謝物を標準品として用い、尿中に含まれる ZOL、M1 ~ M4、7OH 及び 8OH の一斉分析法を開発した。尿 50 $\mu$ L に 0.1%ギ酸を含むアセトニトリルを加えて除タンパクし、溶媒を留去した後、水 - メタノール混合液で再溶解したものを、LC-MS/MS にて MRM モードで分析した。1 ~ 400 ng/mL の範囲で定量可能であった。

(4) 剖検で得られたヒト尿について、(3)の方法を適用して ZOL 及びその代謝物を定量した。すべての資料において、M1 の濃度が最も高く、1000 ~ 7500 ng/mL であった。次いで M2、7OH、M4 が高濃度であった。水酸化体は、尿をグルクロニドで処理した後に分析すると濃度が 2 ~ 5 倍程度上昇した。このことから、水酸化体は多くがグルクロン酸抱合体として排泄されていることが分かった。

本研究で発見された ZOL 代謝物から、ZOL の代謝経路を示すとスキーム 1 のようになる。



スキーム 1

これまでわかっていた ZOL の代謝経路はスキーム 1 の青枠で囲んだものであった。主要な代謝経路はベンゼン環上のメチル基の酸化で、M1 を生成して尿中に排泄される。この他、ピリジン環上のメチル基も酸化され、M2 や M4 を与える。これに加えて、本研究により赤枠で囲んだ代謝経路の存在が明らかになった。まず、ピリジン環が酸化され、A のようなオキシドが生成する。ここから、水分子が付加することで ZDHD が生じ、ZDHD から水が脱離すると 7OH 及び 8OH が生じる。また A にグルタチオンが付加し、その後グリシン及びグルタミン酸が脱離し、 $ZH_2OCys$  が生じる。 $ZH_2OCys$  から水が脱離すると ZCys が生じる。

ZOL と同様のイミダゾピリジン系抗不安薬のアルピデムは、肝毒性があるため市場から撤退したが、その理由として A と同様のオキンドが活性代謝物になるためと考えられている。本研究により、ZOL にも主要な代謝経路ではないものの、同様の代謝経路が存在することが分かった。

また、法科学的な観点からこの代謝経路を考察すると、ZOL の使用を証明するために、ZOL 未変化体や主要代謝物 M1 の分析だけでなく、その他の代謝物を検出・定量することにより、ZOL が被害者の体内に吸収されていたことの強力な証明になるばかりでなく、未変化体や代謝物の濃度から ZOL を服用したおおよその時間の推測などにも応用できると考えられる。また、本研究で発見された新規 ZOL 代謝物のなかで、もし detection window が長いものが存在すれば、発生してから長時間経過した事件において、非常に有用な分析対象になると考えられる。ZOL の水酸化体がグルクロニドになって排泄されていることから、水酸化体のなかには腸肝循環を示し、比較的長く体内に存在する代謝物がある可能性がある。また、ZOL のシステイン抱合体が生じることから、グルタチオン抱合体やタンパク質に共有結合した ZOL が存在する可能性もある。本研究を契機に ZOL 代謝物の尿中排泄の経時変化(いわゆるプロファイリング)などが実施されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguchi Koji, Miyaguchi Hajime, Hirakawa Keiko, Ohno Youkichi, Kanawaku Yoshimasa	4. 巻 39
2. 論文標題 Qualitative analysis of zolpidem and its metabolites M-1 to M-4 in human blood and urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 134 ~ 145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11419-020-00551-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口晃志、増田優紀、普神敬悟、石川慎吾、大野曜吉
2. 発表標題 銅触媒による3成分カップリング反応を用いたゾルピデム代謝物の合成
3. 学会等名 日本法中毒学会第37年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口晃志、普神敬悟、石川慎吾、大野曜吉
2. 発表標題 7-ヒドロキシゾルピデムの合成及び剖検で得られた胆汁からの検出
3. 学会等名 日本法中毒学会第35年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Koji Yamaguchi, Keigo Fugami, Shingo Ishikawa, Youkichi Ohno
2. 発表標題 Analysis of zolpidem metabolites in human bile: identification of hydroxyzolpidems by LC-MS/MS and chemical synthesis
3. 学会等名 The 54th annual meeting of the international association of forensic toxicology
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------