

機関番号：32666

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19590682

研究課題名 (和文) 質量分析の新技术を用いたベンゾジアゼピン系薬物分析法の再構築

研究課題名 (英文) Reconstruction of the benzodiazepine screening using the new technologies of mass spectrometry

研究代表者

林田 眞喜子 (HAYASHIDA MAKIKO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60164977

研究成果の概要 (和文)：

当課題は「質量分析の新技术を用いたベンゾジアゼピン系薬物分析法の再構築」を目指すものであるが、実際に研究を進めていくに従って、多剤併用薬物中毒症例にはベンゾジアゼピン系薬物以外の薬物も多く含まれ、これらの高濃度を示す薬物の影響について見直すことが重要と思われたので、法医中毒学的薬物分析に重要な中枢性薬物を追加、精密質量データベースの拡充をはかるなど、当初の研究目的は十分な成果をあげ、予測を超えた研究到達を果たした。

研究成果としては、(1) 飛行時間型 LC-TOF-MS を用いて、ベンゾジアゼピン系薬物の未変化体及び代謝物ならびに法中毒学的薬物分析に重要と思われる中枢性薬物を追加、合計 264 種類の精密質量データベースを作成、法医剖検事例、CCMC 収容の多剤併用薬物中毒症例の解析に応用し、精密質量を用いた TOF-MS 薬物スクリーニングの有用性を検討した。(2) Q-TOF 薬物スクリーニングは、精密質量データベースに加えて個々の薬物における product ion と MRM クロマトグラムを用いた TARGET ANALYSIS による高感度な定量分析が可能であった。精密質量による NON-TARGET ANALYSIS も併せて実施することが可能であり、Q-TOF 薬物スクリーニングが有効であることが示唆された。(3) GC/MS 用相対定量・迅速一斉分析ソフトウェア (NAGINATA) を用いたベンゾジアゼピンスクリーニングを検討した。calibration rocking database を用いた NAGINATA スクリーニングでもベンゾジアゼピン系薬物に加え法中毒学的薬物分析に重要と思われる中枢性薬物を追加し、法医中毒学的試料への実用性が確認された。

研究成果の概要 (英文)：

Toxicological analysis with mass chromatography-spectrometry has spread widely and quickly with the progress in ionizing methods. This study was carried out by including new developments in mass chromatography-spectrometry research for forensic toxicology. Time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) coupled with liquid chromatography (LC) has been developed for screening and for determining benzodiazepines with an exact mass database. All benzodiazepines have similar chemical structures and molecular weights, and, thus, show similar mass spectra and protonated molecule ions. Discrimination of mass spectrometry at low resolving power with LC-MS is usually difficult.

Benzodiazepines are widely used in medical practice in Japan, and data acquired from LC/TOF-MS measurements of 130 drugs, including benzodiazepines, were used to create an exact mass database. This database comprises molecular formulae, calculated exact masses, retention times and calibrations. In the analysis of samples from patients who had taken many drugs, selectivity was improved when the LC/TOF-MS exact mass database was used.

Comprehensive screening with LC/quadrupole TOF is the most effective method in forensic toxicology for analyzing the samples from cases of multidrug overdose. New developmental mass chromatography-spectrometry equipment is required because of the more precise and exact analyses in forensic toxicology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000円	510,000円	2,210,000円
2008年度	500,000円	150,000円	650,000円
2009年度	500,000円	150,000円	650,000円
2010年度	600,000円	180,000円	780,000円
年度			
総計	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

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：(1)ベンゾジアゼピン系薬物, (2)質量分析, (3)LC-TOF, (4)LC-MS-MS, (5)GC-MS, (6)スクリーニング, (7)生体試料, (8)固相抽出

1. 研究開始当初の背景

ベンゾジアゼピン系薬物は、抗不安薬、催眠薬、睡眠導入薬として精神神経疾患の治療や麻酔科領域に広く使用されている。しかし、近年、医薬品としての用途に反して、自殺や乱用、あるいは服用させた後の殺人・強盗などの事例が多発し、大きな社会問題となっており、法医中毒学・臨床中毒領域における重要な分析対象薬物となっている。

最近の分析機器の進展はめざましいものがあり、複雑なマトリックス中から目的物質のみを高選択的に精密質量分析できる飛行時間型質量分析計(TOFMS)や定量用イオンと確認用イオンを別々に設定することのできる高感度なLC三連四重極質量計(LC-MS-MS), GC/MS用相対定量・迅速多成分一斉分析ソフトウェア(NAGINATA)などがある。そこで本研究では、LC-TOFMS, LC-MS-MS, GC-MS-NAGINATA法を同時併行的に検討し、生体試料中からのベンゾジアゼピン系薬物スクリーニング法の識別能力・定量性を向上させることを主目的として立案した。

2. 研究の目的

ベンゾジアゼピン系薬物は、1)数mgから数10mgと微量で薬効を示し、その血中濃度は数ng/mlと著しく低濃度であること、2)国内では33種類が使用されているが、類似な化学構造や近似な分子量を有し、不分離ピークや類似なマススペクトルを示すことなどから、各薬物の識別が難しく、現在、法医中毒領域で人体試料中からの分析が最も困難とされている薬物で、種々遭遇するベンゾジアゼピン系薬物の服用事例や剖検例に対処するため、ベンゾジアゼピン系薬物の高精度・高感度なスクリーニング法の開発は、法医中毒学・臨床中毒領域において早急に着手しなければならない最大重要課題であると考えられる。本研究では、生体試料中からのベンゾ

ジアゼピン系薬物スクリーニング法の識別能力・定量性を向上させることを主目的として、UPLC, LC-TOFMS, LC-MS-MS, GC-MS-NAGINATA, QTOF法など最新質量分析技法について検討する

3. 研究の方法

(1) 33種類のベンゾジアゼピン系薬物混合溶液(0.01mg/mlメタノール)を作製し、UPLC, LC-TOFMS, LC-MS-MS, GC-MS-NAGINATA, QTOF一斉分析を行い、不分離ピーク、分析時間を検討する。問題が生じた場合は、移動層の溶媒やグラジエントの比率等を再検討する。

(2) 33種類のベンゾジアゼピン系薬物混合溶液の0.8-800ng/mlメタノールを作製し、各分析法における検量線、定量下限値、検出下限値(S/N 3)を測定する。

(3) 生体試料(血液、血清、尿等)に、ベンゾジアゼピン系薬物を添加し各抽出法(液-液・カラム抽出)を行い、その抽出物をUPLC, LC-TOFMS, LC-MS-MS, GC-MS-NAGINATA, QTOFで分析し、回収率、夾雑イオンの有無などを検討し、その抽出法を確立する。回収率、夾雑イオンの有無などを検討し、マトリックス効果(イオンサプレッション)の影響を検討する。

(4) ベンゾジアゼピン系薬物を各試料に添加し、上記確立された抽出法を用い、生体試料中から一斉分析を行い、各薬物のTOFマススペクトル、検量線、定量下限値、検出下限値(S/N 3)を再度検討し、生体試料中ベンゾジアゼピン系薬物のUPLC, LC-TOFMS, LC-MS-MS, GC-MS-NAGINATA, QTOFによる一斉分析を確立する。

(5) 研究代表者の所属する日本医科大学ならびに分担者の所属する東邦大学医学部、福島県立医科大学の法医学教室、救命救急センター、精神科などにおけるベンゾジアゼピン系薬物の服用者、中毒患者、服用法医解剖死

体などの実試料へ応用し、高精度・高感度スクリーニング法のその有用性を立証する。以上、3. から7. は林田、仁平（日本医科大学）、寺田（東邦大学医学部）、栗崎（福島県立医科大学）が協力して行う。また、GC-MS-NAGINATA の一斉分析に精通している九州大学、工藤を研究分担者として追加、研究協力を得ることとした。

(6) LC-TOFMS, QTOF で得られたベンゾジアゼピン系薬物の理論値と実測値の標準的データを集積する

(7) LC-MS-MS, QTOF で得られたベンゾジアゼピン系薬物のプロダクトイオンの標準的データを集積、それぞれの薬物について定量用イオンと確認用イオンを設定する。

(8) GC-MS-NAGINATA で得られたベンゾジアゼピン系薬物誘導体の保持指標, GC-MS スペクトル, マルチ内標法検量線をトリプルデータベース化する。

以上、(1) から (8) の結果を総合することにより、ベンゾジアゼピン系の類縁化合物群の識別能力、定量の高感度化について検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 生体試料からの前処理法の検討

ベンゾジアゼピン系催眠鎮静剤とその代謝物および非ベンゾジアゼピン系の催眠鎮静薬のゾルピデムとゾピクロンを合わせた25種を選定した。固相カラムとしては、多機能型ポリマー固相の Focus™ カラムを選択した。Focus™ カラムは単一ゲルにドナーとリセプターの両機能の水素結合、双極子モーメント、分子間引力の機能を有して広範な薬物を保持し、パワーリンスにより洗浄後、アセトニトリル、酸、アンモニア、水によりターゲット化合物を切り離して回収するというものである。トリフルオロ酢酸を添加したアセトニトリルで大半の薬物を溶出後、さらにアンモニアを添加したアセトニトリルで溶出することで、pKa が3~4付近を示すベンゾジアゼピン系薬物の回収率が増大し、結果的に3~10までの幅広いpKaを有する薬物の抽出が可能となった。薬物を各1 µg 添加した尿試料の抽出物のGC/MSの測定はフルスキャン、定圧モードで行い、保持時間はリテンションタイムロッキングの手法を用いて内部標準物質メダゼパムの保持時間が13.0分となるよう固定した。この手法を用いることで55種の薬物すべてにおいて、カラムカット後も保持時間は一定となった。検量線も約9割の化合物で相関係数0.99以上の良好な直線性を示した。平均回収率は71%、試料1mlに1 µgの薬物を添加した時の日内変動は55種の薬物のうち40化合物でRSD値が10%以下となり信頼性の高いスクリーニング法が確立できた。

##### (2) NAGINATATM ソフトウェアを用いた薬物データベースの構築

NAGINATATMはCLD法の考え方を元に、一定の条件下で得られた測定データを一度データベース化すると、その後分析された試料のデータ解析ではQuant Screener ReportおよびNAGINATATMブラウザにより、標準物質を用いることなく薬物の存在の有無とおおよその濃度判定を迅速に行うことが可能である。

そこで、尿に各薬物を0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5および5.0・g/mlの6段階の濃度で添加した試料を調製し、確立した方法で前処理を行った後、予めシステムパフォーマンスチェックにより良好な状態に保たれた装置に導入した。各薬物についてそれぞれ定量イオン(target ion)と定性イオン(qualifier ion)を選択、薬物の定量イオンの内部標準物質メダゼパムの定量イオンに対するピーク面積比と薬物濃度から検量線を作成した。この検量線の傾き(slope)と切片(intercept)、さらに1 µg/ml添加した試料から得られた、各薬物の保持時間とマススペクトルを用いてデータベースを構築した。

##### (3) ベンゾジアゼピン系薬物タイムプログラミングモニタリング

一般的な法医中毒分析では、エタノール測定ならびにイムノアッセイ Triage を初期スクリーニングとして行い、イムノアッセイの結果をGC/MSで確認する。GC/MSで分析が困難な不揮発性薬物などをLC/MSで分析する。BZTPMはLC/MSを用いた、ベンゾジアゼピン系薬物の保持時間における分子量関連イオン[M+H]<sup>+</sup>のSIMクロマトグラムをスクリーニングする方法で、陽性であればクロマトグラム上の明瞭なピークとして検出される。

法医中毒学的試料を用いたBZTPMの結果、Nitrazepam, Flunitrazepam, Triazolam, Etizolamが検出された。胃内容抽出物から、これらの標準品溶液と同様の保持時間において、それぞれの[M+H]<sup>+</sup>イオンを含むスペクトルを確認した後、Nitrazepam, Flunitrazepam, Triazolam, EtizolamのSIM定量を行なった。薬物陰性の健康人血漿ならびに尿抽出物では、これらの[M+H]<sup>+</sup>イオンイオンの保持時間において妨害となるようなピークは見当たらなかった。処方薬リストのなかでサイレース<sup>®</sup>、デパス<sup>®</sup>、ベンザリン<sup>®</sup>、ハルシオン<sup>®</sup>の服用が確認された。これらの血中薬物濃度を文献値と比較すると、単独で致死濃度となるものはないが、4種類のベンゾジアゼピン系薬物の複合作用による重篤な薬理学的影響下にあったことが示唆された。

##### (4) エチゾラムとトリアゾラム及び代謝物のLC/TOF-MS分析

Etizolam及びTriazolamの水酸化体代謝物

は質量数が近似しているため、低分解能 LC/MS による識別は難しい。そこで、分解能が高く精密質量による識別が可能となる飛行時間型質量分析計 (LC/TOF-MS) を用いて、Etizolam, Triazolam 及び代謝物の分析法を検討した。LC/TOF-MS はデュアルスプレー方式の ESI イオン源を装着した Agilent 1100TOF。プリン及びフッ素系化合物溶液を常時イオン源に導入し、リアルタイム質量校正を行った。

Etizolam ( $m/z$ 343.07787) と Triazolam ( $m/z$ 343.05117) の精密質量差は 0.027Da, 各代謝物についても観察されるプロトン化分子の精密質量差は 0.028Da であった (Fig. 2)。これらは分子量からは全く区別がつかないということを示している。それぞれの水酸化体は LC 条件を最適化することによりピーク頂点が識別され、各ピークの精密質量で代謝物の正確な同定が可能となった。各化合物のプロトン化分子の理論値からの相対質量誤差は 10ppb 濃度で -3.02~2.12ppm と良好であった。定量には window 幅 0.02Da のマスクロマトグラムを用いて、標準溶液での検出限界は 0.19~1.07ppb であった。Etizolam, Triazolam の常用量を服用している精神科外来患者尿を用いた分析では、LC/TOF-MS を使用することで選択性が向上し、妨害成分の影響なく、数 ppb レベルでの定量及び精密質量スペクトルによる確認が可能であった。

#### (5) 精密質量データベース

法中毒学的薬物分析に重要と思われる薬物を追加し、さらに合計 220 種類の精密質量データベースを作成し、CCMC 収容の多剤併用薬物中毒症例へ TOF-MS 薬物スクリーニングを応用した。対象とした薬物のうち、観察されるプロトン化分子が近似したものの精密質量差はいずれも 0.02 Da 以下であったが、LC 条件を最適化することによりピーク頂点の識別は可能となった。各化合物のプロトン化分子の理論値からの相対質量差は -3.02~2.12 ppm (10 ng/ml 濃度) と良好で、定量には window 幅 0.01 Da のマスクロマトグラムを用いた。法医中毒学的試料を分析した結果、ng/ml とレベルのベンゾジアゼピン系薬物と  $\mu\text{g/ml}$  レベルを示す薬物とを同時に、互いに干渉することなく、精密質量スペクトルによる確認・定量が可能であった。精密質量データベースを用いた薬物スクリーニングは、ベンゾジアゼピン系薬物を含む”多剤併用薬物中毒”症例の一斉分析に有用な分析方法であることが示された。現在の状況では、GC/MS や低分解能 LC/MS ではこのような分析は困難であった。

#### (6) LC/Q-TOF 包括的薬物スクリーニング

LC/TOF-MS は分解能の高い包括的な測定が可能であることから精密質量-保持時間データベースを併用したスクリーニング法として有

効である。最近では、”多剤併用薬物中毒”を呈する剖検事例もあり、資料には多種多様の薬物が複数含まれていることが多い。これらに対応するためには、大規模な精密質量データベースと併用した包括的スクリーニング法の開発が必要と考えられる。そこで 130 薬物の保持時間-精密質量データベースの構築と共に 6643 薬物の精密質量データベースを用いて CCMC 収容の”多剤併用薬物中毒”症例へ応用し、包括的薬物スクリーニング法の検討を行った。さらに確認手法として Q-TOF による精密質量 MS/MS スペクトルのライブラリを構築し、MS/MS スペクトルによるライブラリ検索手法も検討した。

デュアルスプレー ESI イオン源付 Agilent 6520 LC/Q-TOF を使用した。大規模データベースによる包括的スクリーニングには、測定結果を Molecular Feature Extraction (MFE) 法を用いてデータ処理後、Agilent G6855AA Forensic database を用いた精密質量検索を行った。

大規模な精密質量データベースを用いた包括的スクリーニングの場合、測定対象の決まったターゲット分析とは異なり測定データから検出された化合物を取りこぼしなく取り出す必要がある。そこでコントロール尿及び血漿に 130 種薬物を 100ng/mL 相当添加した試料を LC/Q-TOF で測定後、MFE/6643 薬物精密質量データベースによるスクリーニングを行った。その結果、MFE 法のパラメータを最適化することで、全薬物の検出が可能であった。”多剤併用薬物中毒”症例の血漿、尿、胃内容物について包括的スクリーニングを実施した。まず、胃内容物全データポイントから MFE 法を用いて 405 化合物が抽出され、130 薬物保持時間-精密質量データベースで 24 薬物に絞込みが行われ、さらに 6 薬物が新たに検索された。LC/Q-TOF 及び MFE/大規模精密質量データベースが包括的スクリーニング法として有効であることが確認できた。”多剤併用薬物中毒”症例の場合は、このような複雑な手法を採用することも必要であった。

#### 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 10 件)

1. Kurisaki E, Kato N, Ishida T, Matsumoto A, Shinohara K, Hiraiwa K. Fatal human poisoning with Padan™: a cartap-containing pesticide. Clin Toxicol, 48(2010) 153-155 (査読有)
2. 林田真喜子, 植草協子, 仁平 信, 大野曜吉. 分析ラボ紹介—日本医科大学法医学教室. 中毒研究, 23(2010), 68-72 (査読無).
3. 林田真喜子, 大野曜吉. 法医中毒学における質量分析研究の新展開. 日本医科大学

- 医学雑誌, 7(2011), 8-15(査読有).
4. Yamaguchi K, Hayashida M, Hayakawa Y, Nihira M, Ohno Y. Urinary morphine and codeine concentrations after ingestion of bean-jam buns decorated with poppy seeds. *Forensic Toxicology*, 29(2010), 69-71(査読有).
  5. Kurisasi E, Kato N, Ishida T, Matsumoto A, Hiraiwa K. Fatal human poisoning with Padan™: a cartap-containing pesticide. *Clinical Toxicology*, 48 (2010), 153-155(査読有).
  6. Hayashida M, Takino M, Uekusa K, Terada M, Kurisasi E, Kudo K. TOF-MS accurate mass database for benzodiazepine screening. *Legal Med* 11 (2009) S423-S425.(査読有)
  7. Uekusa K, Ono T, Hayashida M, Nihira M, Ohno Y. GC/MS analysis of a herbal dietary supplement containing ephedrine. *Legal Med* 11 (2009) S573-S575.(査読有)
  8. Ono T, Hayashida M, Uekusa K, Cui FL, Hayakawa H, Nihira M, Ohno Y. An accidental case of acute poisoning due to Kampo herbal medicine ingestion. *Legal Med* 11 (2009) 132-135(査読有)
  9. Kudo K, Ishida, T, Hikiji W, Hayashida M, Uekusa K, Usumoto Y, Tsuji A, Ikeda N. Construction of calibration-locking databases for rapid and reliable drug screening by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Toxicol* 27 (2009) 21-31.(査読有)
  10. Ishida T, Kudo K, Hayashida M, Ikeda N. Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column. *J of Chromatogr B* 877 (2009) 2652-2657(査読有)

[学会発表] (計 27 件)

以下に代表的なものを挙げる.

1. 林田真喜子, 植草協子, 工藤恵子, 大野曜吉. 剖検試料中セルトラリン, ニトラゼパム, アルプラゾラムの LC/MS 分析. 日本法中毒学会第 28 年会(金沢), 2009.6
2. 林田真喜子, 滝埜昌彦, 植草協子, 工藤恵子, 寺田 賢, 栗崎恵美子, 大野曜吉. ベンゾジアゼピン系薬物を含む多剤併用薬物中毒症例への TOF-MS 薬物スクリーニングの応用. 日本法中毒学会第 28 年会(金沢), 2009.6
3. 林田真喜子, 植草協子, 工藤恵子, 石田知己, 大野曜吉. FOCUS カラムを用いたアコニチン系アルカロイドの LC/MS 分析. 第 93 次日本法医学会学術全国集会(大阪), 2009.5.

4. Hayashida M, Takino M, Kudo K, Terada M, Ohno Y. Application of Time-of-Flight Mass Spectrometry (TOF-MS) to Multiple-Drug Poisoning Cases. The International Association of Forensic Toxicologists 47th International meeting (Geneve), 2009.
5. Hayashida M, Takino K, Uekusa K, Terada M, Kurisasi E, Kudo K. TOF-MS accurate mass database for benzodiazepine screening. 7th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2008.9, Osaka, Japan
6. 林田真喜子, 植草協子, 栗崎恵美子, 寺田賢, 工藤恵子, 滝埜昌彦, 他. エチゾラムとトリアゾラム及び代謝物の LC/MS-MS 分析による識別と定量. 第 92 次日本法医学会総会. 2008.4. 長崎県長崎市
7. 林田真喜子, 寺田賢, 栗崎恵美子, 工藤恵子, 仁平信, 他. UPLC を用いたベンゾジアゼピン系スクリーニング法. 日本中毒学会総会. 2007.7. 東京都品川区
8. 林田真喜子, 滝埜昌彦, 寺田賢, 仁平信, 他. LC/TOF-MS 及び精密質量データベースを用いたベンゾジアゼピン系薬物のスクリーニング. 日本法中毒学会第 26 年会. 2007.6. 宮崎県延岡市

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林田 真喜子 (HAYASHIDA MAKIKO)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60164977

### (2) 研究分担者

寺田 賢 (TERADA MASARU)  
東邦大学・医学部・准教授  
研究者番号：30104649

工藤 恵子 (KUDO KEIKO)  
九州大学・医学研究科・講師  
研究者番号：10186405

栗崎 恵美子 (KURISAKI EMIKO)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：30106356

植草 協子 (UEKUSA KYOKO)  
日本医科大学・医学部・テクニカルスタッフ  
研究者番号：50409215

山口 晃志 (YAMAGUCHI KOJI)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90465344

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：