

機関番号：32676

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590043

研究課題名 (和文) 法科学及び臨床化学に役立つ乱用薬物の迅速分析法の開発

研究課題名 (英文) Development of rapid analysis method of drugs of abuse used for forensic science and clinical chemistry

研究代表者

斉藤 貢一 (SAITO KOICHI)

星薬科大学・薬学部・薬品分析化学教室・准教授

研究者番号：40386347

研究成果の概要 (和文)： 乱用薬物分析における、測定方法と生体試料からの前処理方法に関して斬新な手法の構築を試みた。MDMA などの脱法ドラッグ、ベンゾジアゼピン系薬物やリタリン、覚せい剤のメタンフェタミンなどを測定対象薬物とし、精密質量の測定が可能な LC/TOF-MS を駆使して、迅速にこれらの乱用薬物を同定できる方法を検討した。

また、生体試料中から測定対象物質を効率よく抽出、濃縮および精製するための新規前処理法として固相分散抽出法を開発し、その操作を簡便化するために、遠心ろ過フィルターを発明 (実用新案取得)した。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, determination of abused drugs such as MDMA, TFMPP, and related illegal drugs, and psychoactive drugs such as benzodiazepines, methylphenidate and methamphetamine has been developed by liquid chromatography / time-of-flight mass spectrometry (LC/TOF-MS), which is able to measure accurate mass with high sensitivity and high accuracy. Furthermore, a new pretreatment method so-called solid-phase dispersive extraction (SPDE) has been also developed for sample purification. In addition, a novel apparatus named a centrifugal filtration filter unit was invented for the purpose of simple and easy operation of the SPDE method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2020年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：6802

キーワード：乱用薬物、法科学、LC/TOF-MS、固相分散抽出法、遠心ろ過フィルター

1. 研究開始当初の背景

一般に薬物乱用とは、「医薬品を本来の目的から逸脱した用法や容量あるいは目的のもとに使用すること」、「医療目的にない薬物を不正に使用すること」と、定義されている。最近では、いわゆる脱法ドラッグといわれる薬物の乱用が大きな社会問題となっている。脱法ドラッグは、麻薬および向精神薬取締法による麻薬や向精神薬には指定されていないものの、麻薬や向精神薬と似た作用や有害性があると疑われる物質であり、主に人に乱用されることを目的に製造・輸入され、インターネットを利用して誰でも容易に入手が可能な状況にある。これらの脱法ドラッグは、特に、青少年の乱用や他の乱用薬物の導入機会（ゲートウエイドラッグ）になっている。

脱法ドラッグの蔓延に対する我が国の取り組み状況として、国は、平成18年に薬事法の改正を行った。改正法案の成立により、興奮作用等があり、健康被害が心配される脱法ドラッグは、平成19年4月1日から指定を受けて、全国的に輸入、製造、販売および広告等が規制されている。また、学校を基盤とした薬物乱用防止教育をはじめとした防止のための対策が実施されている。

しかしながら、規制薬物は化学構造式で定義されているために、脱法ドラッグの中には規制薬物（違法薬物）の分子構造の一部を組み替えただけの類似薬物もある。これらの類似薬物は、「実験室で作られた薬」という意味で、「デザイナードラッグ」と呼ばれており、次々に新しい脱法ドラッグが登場するため、規制が追いつかない状況になっている。このように次々と合成される化合物による乱用を防ぐためには、乱用実態を把握し、新たな薬物指定に向けた作業に取りかからなければならない。

また、近年では、脱法ドラッグとは異なり、正規の医薬品として用いられてきたリタリンやベンゾジアゼピン系薬物などの向精神薬を常用することで身体的・精神的依存症となり、更に自殺者が発生するといった問題点が浮き彫りにされた。リタリンなどの乱用・依存者の中には、脱法ドラッグを併用していたり、薬物乱用の前歴があったりすることが多いと言われている。

このように青少年における薬物乱用の問題は後を絶たないことから、薬物中毒被害者の原因薬物の特定や健康被害者の治療、また、新たな乱用薬物の迅速把握などは公衆衛生的にも社会的にも問題解決に必要な不可欠であり、乱用薬物を広範かつ迅速に規制するための検査法確立が必要とされている。

しかし、該当する薬物が同定できなければ、これらの把握や治療も困難である。従来、麻薬や覚せい剤など指定薬物を測定するためには、純度の高い標準品が必要となるが、多くの乱用薬物の場合、標準品を入手することは非常に困難である。従って、自ら合成することが出来る研究機関を除いて、どこの検査機関でも測定できるわけではなかった。そこで、標準品を必要とせずに乱用薬物の測定を可能にする汎用性の高い分析方法を確立することにより、薬物乱用の迅速かつ広範な把握と、中毒患者の治療に資することが可能と推察される。

また、救急医療や法科学分野において、中毒や乱用の原因物質の同定・定量を行うために、中毒者の生体試料を対象とした迅速かつ信頼性の高い分析法の確立が求められている。しかし、生体試料中には様々な夾雑物が存在し、それによって測定が妨害される恐れがある。そのため、試料中から微量の測定対象物質を効率よく抽出、濃縮および精製する

ための前処理が極めて重要である。近年、前処理には固相抽出 (SPE) 法が汎用されている。SPE 法は、試料中の夾雑物および測定対象物質各々と固相との親和性の差を利用して、選択的に精製・濃縮を行う方法である。しかし、通液速度の変動が回収率を低下させることや、開放系での処理のため感染性試料の実験者への曝露が危惧されるといった様々な問題点があることから、これらの改善が求められている。

2. 研究の目的

薬物乱用は大きな社会問題であり、薬事法改正によりその対応がなされているが、法施行後も次々と化学構造を変化させて出現してくる脱法ドラッグなどを、広範かつ迅速に規制するためには、迅速な検査法の確立が必要である。本研究では指定薬物を含めたフェネチルアミン系およびピペラジン系の薬物、また正規の医薬品でありながらその乱用が大きな社会問題となっているリタリンやベンゾジアゼピン系薬物などの向精神薬、更に覚せい剤のメタンフェタミンについて、精密質量の測定が可能な液体クロマトグラフィー/飛行時間型質量分析法 (LC/TOF-MS) を駆使して標準品なしでも迅速にこれらの乱用薬物を同定できる方法を確立することを目的とした。

また、従来から汎用されている生体試料分析における試料前処理法は、目的物質の回収率や操作性に問題があり、更に開放系での処理のため、感染性試料の実験者への曝露が危惧されるといった様々な問題点があることから、これらの問題点を克服する新たな試料前処理法を考案することも目的に加えた。

3. 研究の方法

(1) 測定対象物質

脱法ドラッグとしては、代表的なフェネチルアミン系化合物 4 種類 (MDMA、Methylone、

MMDA-2、BDB) およびピペラジン系化合物 7 種類 (2CPP、4CPP、2MPP、4MPP、2M3MPP、3,4-DMPP、TFMPP) の合計 11 種類を選定した。

向精神薬としては、ベンゾジアゼピン系のプロマゼパム、ニトラゼパム、ロラゼパム、アルプラゾラム、トリアゾラム、フルニトラゼパム、エチゾラム、ジアゼパムおよびニメタゼパムの 9 種類を、更に、覚せい剤系薬物としてはメタンフェタミンおよび覚せい剤と類似した作用をもち、処方箋医薬品でありながら乱用が問題となっているメチルフェニデート (商品名: リタリン) を測定対象物質とした。

(2) 測定装置

精密質量の測定が可能な LC/TOF-MS を用いた。LC/TOF-MS とは、質量電荷比 m/z 値の違いでイオンの飛行時間が異なることを利用して質量分析を行う方法である。その特徴としては、測定対象物質の精密質量を測定することが可能な点である。そのため、他の機器で生じるクロスオーバー現象を防ぐことが可能であり、より高い定性能力を有している。

(3) 脱法ドラッグの一斉分析

上記の薬物の各系 (脱法ドラッグ系、向精神薬系、覚せい剤系) について、それぞれ逆相系カラムを用いた LC による一斉分離条件を確立すると共に、TOF-MS による精密質量を測定できる条件を検討し、各薬物の保持時間と共に精密質量を併せたデータベースを作成した。

(4) 血清中ベンゾジアゼピン系薬物の分析

処方箋偽造の問題となった医薬品の中で、事例の多いベンゾジアゼピン系向精神薬を測定対象物質とした。固相として Waters 社製のポリマー基材の固相抽出剤である Oasis® HLB を選択し、SPDE 法による前処理

の至適条件を検討した。検討項目はコンディショニングによる影響、必要固相量、固相粒子径および溶出時間とした。なお、SPDE法の容器には1.5~2 mL容のミニチューブを用い、溶媒相と固相の分離には、本研究において考案した遠心ろ過フィルターを使用した。本法によって処理する試料として血清を選択し、実試料の測定には定性能力の高いLC/TOF-MSを用い、至適測定条件を検討した。

(5) 尿中メタンフェタミンおよびメチルフェニデートの分析

日本の薬物犯罪の8割を占める覚せい剤メタンフェタミンおよび覚せい剤と同様に依存性があり、乱用によって幻覚妄想などを引き起こす医療用医薬品であるメチルフェニデートを測定対象物質とした。固相として、Oasis® HLB、MCX、WCXの3種類を検討し、必要固相量および保持と溶出時間の至適条件を検討した。試料は非侵襲的に採取が可能な尿を選択し、測定にはLC/TOF-MSを用いて、至適測定条件を検討した。

(6) 動物実験

臨床現場において健康被害に陥った乱用者から検出される薬物の同定や、法科学の証拠資料作成に貢献するためにも、生体試料からの薬物検出法を確立することが必要である。そこで、上記薬物の一部をラットに投与して、本研究で開発した方法により、実際に血液や尿からの薬物検出が可能か否かを検討した。

動物実験には、9週齢のSD系雄性ラットを用い、各薬物を生理食塩液に溶解し、腹腔内投与した。尿試料は、薬物投与後にラットを代謝ケージに入れ、24時間尿を採取した。血清試料は、薬物投与15分後に断頭し、血液の採取を行った。

本研究の動物実験は関係法令、厚生労働省の基本指針等を遵守し、動物愛護に細心の注

意を払って遂行した。更に、法律上、麻薬類に該当する違法ドラッグの取り扱いに際しては、関係法令に準じて厳重な管理を行い、研究を推進した。

(7) 研究等における倫理的配慮

ヘルシンキ宣言の趣旨に則して研究を行い、研究対象者の人権を尊重した。研究を行うことにより、研究対象者に不利益および危険が生じないよう十分配慮した。

4. 研究成果

(1) 脱法ドラッグ一斉分析法の構築

本研究では、デザイナードラッグが出現しやすい薬物として、フェネチルアミン骨格を有するMDMA、BDB、Methylone、MMDA-2の4種、およびピペラジン骨格を持つTFMPP、2MPP、4MPP、2CPP、4CPP、3、4-DMPP、2M-3MPPの7種、計11種類の薬物を測定対象として、LC/TOF-MSを駆使して、標準品なしでも迅速にこれらの乱用薬物を同定できる方法を検討した。その結果、今回測定した11種の薬物すべてについて、LC/TOF-MSにより良好な相互分離が得られ、濃度範囲2~50 ppbにおいて相関係数0.999以上の良好な直線性が得られた。また、各薬物の精密質量測定において、標準品および尿中の薬物を測定する際の精密質量誤差は、5 ppm以内であったことから、これら薬物の定性が可能であると示唆された。これらの結果から、本法は法科学分野において要求される薬物の検出・同定に応用することが可能であると考えられた。

更に、薬物を投与したラットを用いて生体内の挙動を検討した結果、MDMA、MethyloneおよびTFMPPを投与したラットの尿試料および血清試料においても、精密質量の誤差が3.6 ppm以内で各薬物のプロトン化分子を確認でき、その精密質量より薬物の定性が可能であると示唆された。

(2) 生体試料の前処理

新規前処理法として固相分散抽出 (solid-phase dispersive extraction; SPDE) 法を考案した。本法は試料液中で固相抽出剤 (以下、固相と略) を分散させることによって迅速な抽出およびクリーンアップが可能な前処理法である。その際、SPDE 法の操作簡便化を目的に、遠心ろ過フィルターを発明(実用新案取得)した。遠心ろ過フィルターの外観および構成パーツを下の写真に、また SPDE の操作の概略を図 1 に示した。

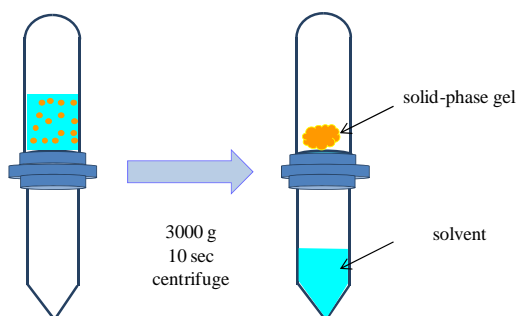


図 1. 遠心ろ過フィルターを用いた固相分散抽出法

(3) 血清中ベンゾジアゼピン系薬物の分析

SPDE 法の操作条件の最適化には絶対回収率を指標とした。市販の固相抽出カートリッジには 30 mg の固相が充填されていることから、必要固相量を 5 mg~30 mg の範囲で検討した。その結果、5 mg のとき最も良好な回収率が得られたため、5 mg を採用した。固相粒子径については 30 μ m の充填剤を用いたとき、最も回収率が良好であったため、30 μ m を採用した。固相からの溶出時間については、固相を溶出液にて再分散後、遠心分離機にかけるまでの超音波処理時間を溶出時間と定義し、

0 秒~90 秒の範囲で至適時間を検討した。その結果、検討時間内で回収率に有意な変化は見られなかったため、迅速性および再現性を考慮して 10 秒間の超音波処理を行うこととした。

LC/TOF-MS 分析には、サロゲートとしてデスアルキルフルラゼパムを用いた。構築した分析法において、定量限界は 5~50 ng/mL であり、作成した検量線の相関係数は 0.998 以上と良好な直線性を得た。添加回収試験において、平均回収率は 89.6~110.4% であり、相対標準偏差(RSD)は 5%程度と良好な結果を得た。また、実際に臨床量 (2 mg) のエチゾラム服用者の血清を測定したところ、エチゾラムおよび代謝物のピークを検出し、同定することができた。

(4) 尿中メタンフェタミンおよびメチルフェニデートの分析

上記と同様に SPDE 法に関して至適条件を検討した結果、固相は Oasis® WCX、必要固相量は 5 mg が最適であった。溶出に関しては、超音波照射を 10 秒間行うことにより溶出率の向上が認められた。LC/TOF-MS 分析においては、サロゲートとして (1*R*, 2*S*)-1-phenyl-2-(1-pyrrolidinyl)propan-1-ol を使用することによりマトリックス効果が効果的に補正され、検量線は 2~100 ng/mL (メタンフェタミン) および 0.5~200 ng/mL (メチルフェニデート) の範囲で良好な直線性を示した。また尿試料におけるメタンフェタミンとメチルフェニデートの添加回収率はいずれも 90% 以上 (RSD < 5%) と良好な結果が得られた。

SPDE 法では微粒子である固相を液体試料中に分散させることで、固相表面と液相での分配平衡が瞬時に到達し、迅速な抽出・クリーンアップが可能となることが実証された。また、開発した遠心ろ過フィルターの使用により、従来の SPE 法において問題となるカートリッジ内通液速度の問題や感染性試料に

における実験者への曝露という問題は低減された。これらの結果から、生体試料分析の多検体処理に際して、SPDE 法は従来のカラム方式の SPE 法に比べて迅速な前処理が期待され、救急医療や法科学分野での有用性が示唆された。

以上の結果から、本研究成果は、法科学分野において要求される薬物の検出・同定や臨床医療分野における薬物中毒患者の原因薬物の特定等に貢献することが推察された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計4件）

- ① 斉藤貢一、齋藤理枝子、菊地 優、岩崎雄介、伊藤里恵、中澤裕之、固相分散抽出-LC/TOF-MS 法による尿中メタンフェタミンおよびメチルフェニデートの分析、日本法科学技術学会 第16回学術集会、2010年、東京
- ② 齋藤理枝子、斉藤貢一、菊地 優、岩崎雄介、伊藤里恵、中澤裕之、固相分散抽出-LC/TOF-MS 法による血清中BZP系薬物の分析、第54回日本薬学会関東支部大会、2010年、東京
- ③ 齋藤理枝子、斉藤貢一、菊地 優、岩崎雄介、伊藤里恵、中澤裕之、固相分散抽出法を用いたベンゾジアゼピン系薬物の前処理、フォーラム2010：衛生薬学・環境トキシコロジー、2010年、東京
- ④ 谷戸雅和、斉藤貢一、植木温子、岩崎雄介、伊藤里恵、中澤裕之、乱用薬物の同定分析における固相抽出法の評価、第21回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2008年、北海道

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：遠心ろ過フィルター
発明者：斉藤貢一

権利者：学校法人星薬科大学

種類：実用新案

番号：実願2010-004-43

出願年月日：平成22年6月15日

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：遠心ろ過フィルター

発明者：斉藤貢一

権利者：学校法人星薬科大学

種類：実用新案

番号：登録第3162273号

取得年月日：平成22年8月24日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 貢一 (SAITO KOICHI)

研究者番号：40386347

(2) 研究分担者

なし