

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02530

研究課題名(和文) 最新質量分析計による体液中危険ドラッグの検出・同定法の開発及び学際的検討

研究課題名(英文) Application of novel mass spectrometric techniques for highly sensitive, specific and speedy identification of new psychoactive substances in human specimens

研究代表者

石井 晃 (Ishii, Akira)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30252175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、最新の質量分析装置及び通常質量分析計を結合し、合成カンナビノイドを含む危険ドラッグの超高感度・特異的分析法と、簡易で包括的なスクリーニング方法を開発することである。

我々は高速液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析計(LC-QTOFMS)を用い、ヒト血漿中合成カンナビノイド及びこれら代謝物の高感度・特異的分析法を開発した。このほか、5-fluoro-ADB(5-F-ADB)とdiphenidine中毒例について、初めて血液中からの5-F-ADBの検出に成功し、代謝経路の同定も行った。現在、5-F-ADBの臓器分布の差異とカルボキシエステラーゼとの関連性を検討中である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to develop simple and comprehensive methods for determining novel abused drugs including synthetic cannabinoids by combining ultra-sensitive and/or highly specific mass spectrometers, and conventional mass spectrometers. We developed a simple method for determining several synthetic cannabinoids and their metabolites using a high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometer (LC-QTOFMS). The combination of an LC-QTOFMS and an LC-QTrap enabled the first identification of 5-fluoro-ADB (5-F-ADB) in the blood of a fatal intoxication case of 5-F-ADB and diphenidine. We then proposed possible metabolic pathways of the compounds. We are now investigating the difference of 5-F-ADB levels among organs in which the expression levels of carboxyesterase differ.

研究分野：法医学

キーワード：法中毒学 法医学 質量分析 危険ドラッグ 合成カンナビノイド 飛行時間型質量分析計

1. 研究開始当初の背景

合成カンナビノイドをはじめとするいわゆる危険ドラッグの乱用拡大は全世界的に深刻な社会問題となっており、安心・安全な社会への大きな脅威である。特に、危険ドラッグによる急性中毒事故が多発していることや、危険ドラッグの入手が比較的容易でより作用の強い乱用薬物へ移行するおそれが強い等の点から、日本社会にとって、これら危険ドラッグに対する適切な対策が不可欠である。法医中毒学的な対策としては、違法ドラッグ類の体液中からの高感度かつ迅速な分析及び、代謝物の同定が極めて重要である。

また、合成カンナビノイド類は以下のような特色が存在する。

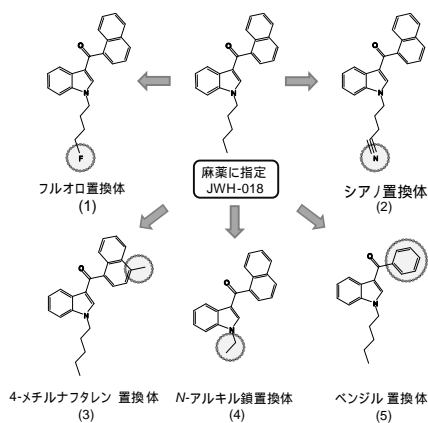


図1 構造の変換例

- (1) 図1に示すように、一つのプロトタイプから、規制を逃れることを目的とした多種多様な化合物が合成され、これらは通常標準品がないため、化合物の同定がしばしば困難であること、
- (2) 同時に、極めて低濃度で作用し、速やかに代謝されるため、体液中からの同定や検出が困難であること、
- (3) 新しい化合物については、どのような薬理作用が新たに加わっているか不明で、未知の健康被害が生じうること、
- (4) 特にアジアにおいては、欧米と比較して、新規化合物の回転が早く、多種類の化合物がブレンドされている傾向にあるため、事態がより深刻であること等の点が挙げられる。

上記の問題を解決するためには、学際的な観点から、多角的なアプローチを柔軟に行わなければならないと考える。

近年、タンデム質量分析計の進歩は著しく、比較的簡便に操作可能なタンデム四重極(QqQ)型分析計、従来の常識を超えた超高感度の検出が可能な最新のQqQ型分析計、あるいは網羅的な探索や元素組成が推定可能なOrbitrap型や四重極飛行時間型質量分析計(Q-TOFMS)等、多種多様な質量分析計が使用可能となっている。質量分析計は長所と短所がうらはらであり、どれか単一の機種ですべての要求を満たす測定が可能となるわけ

ではない。他方、これらの質量分析計を適切に組み合わせることにより、上述した合成カンナビノイド特有の問題に対し、適切に対処することが可能であると我々は考えている。

この問題は、横断的かつ全国的な取り組みを行わなければ、到底十分な対策を取ることにはできない。即ち、危険薬物については「オールジャパン」の取り組みができる体制づくりが喫緊の課題である。その体制を支えるのは、危険ドラッグを精密かつ正確に同定・定量する方法と、簡便かつ迅速にスクリーニングする方法を確立し、共有することであり、前述した種々の質量分析技術を適切に使い分けることが必須である。

2. 研究の目的

本研究は、ますます多様化し、低濃度でも作用する危険ドラッグへの対策システムを構築するために、三つの柱を立てた。

(1) 最新型QqQ-MS-MSとQ-TOFMSによる危険ドラッグの超高感度及び特異的検出法の開発

最新型のQqQ-MS-MS (QTrap MS-MS) は、従来型のLC-MS-MSと比較して、100倍程度高感度であり、pg/mlないしpg/g以下の極微量の薬物検出が可能となった。前述のように、合成カンナビノイドは速やかに代謝され、検出は極めて困難であるものの、今回最新型QqQ-MSを用いて極超高感度検出を可能にし、同時に汚染などによる偽陽性等の対策も講じ、実用化を図る。さらに、精密質量が測定できるLC-Q-TOFMSを用い、体液中合成カンナビノイドをはじめとする危険ドラッグの精密分析法を開発する。

(2) 合成カンナビノイドを中心とした代謝物検索及び代謝経路の解明

合成カンナビノイドは、続々と新しい化合物が出現しているのに比して、その代謝経路は殆ど明らかになっていない。これまでに、我々はMAM-2201について、尿に排泄される第I相及び第II相の代謝物について、研究協力者の久恒とともに、経路の概略を明らかにした。しかし、代謝に関与する酵素の同定は今後の課題である。また、最近流通している合成カンナビノイドやカチノン類の代謝物の検索及びその代謝経路についても明らかにする。

(3) 標準品を用いない危険ドラッグの簡易スクリーニング法の開発

これまでの結果を踏まえ、次に危険ドラッグの簡易スクリーニング法の開発、特に標準品を用いないスクリーニング法の開発を目指す。従来からの問題として、日本の法医学教室等の分析施設においては、麻薬をはじめとする標準品の入手が困難で、そのため、分析が困難である点が問題であった。合成カンナビノイドをはじめとする危険ドラッグは、次々に新規化合物が開発されるという点で、麻薬よりも厳しい状況になることが予想さ

れ、標準品なしのスクリーニング法が従前に増して望まれている。今回、我々は、中位機種 LC-QqQ-MS-MS と付属のライブラリーソフトを使用し、これまでに検出された合成カンナビノイドをはじめとする危険ドラッグとその情報について、分析に必要なパラメータを含め、広く分析者・研究者に公開する。

3. 研究の方法

本研究では、以下のような研究方法をとる。

- (1) 危険ドラッグの標準品の合成を行う。
- (2) LC-Q-TOFMS による危険ドラッグの特異的検出法と LC-Qtrap MS-MS による超高感度分析法を開発し、この二種類の質量分析計を複合的に使用することで、より高感度かつ正確な危険ドラッグの同定・定量法を開発する。
- (3) 動物や実際例における危険ドラッグの代謝物の同定や代謝経路の検索を行う。
- (4) これらの知見を踏まえ、国産の簡便で使いが容易な LC-MS-MS を用いた簡便スクリーニング法の開発と実際例でのスクリーニング法の実用性の検討を行う。
- (5) 代謝物や代謝経路から、危険ドラッグを代謝する酵素系の同定を行う。
- (6) 予想される代謝物等から、高感度・特異的分析法と簡便分析法の両者に対し、新たなターゲットの提示を行うことで、上述した分析法のエラレーション及びロバストネスの向上を図る。
- (7) 実際例での検討も行って、スクリーニング法として広く共有できるような形に構築する。

4. 研究成果

(1) 合成カンナビノイドの高感度検出・同定法の開発

ヒト血漿中 MAM-2201, AM-2201, AM-2232 と代謝物の高感度分析法

合成カンナビノイドについて、ヒト血漿中 MAM-2201, AM-2201, AM-2232 及びこれら代謝物について、高速液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析計 (LC-QTOFMS) を用いた高感度・特異的分析法を開発した。これらの化合物の定量限界は概ね 0.5 - 1 ng/ml と極めて高感度で日内及び日間変動も 13 % 以内であり、十分実務に応用可能であると考えられる。

5-fluoro-ADB (5-F-ADB) 中毒死事例における高感度分析

実際の中毒死例で、5-F-ADB 中毒が疑われた事例を検討した。その際、LC-QTOFMS の information-dependent acquisition (IDA) モードによる non-targeted screening では、5-F-ADB は検出できなかった。そこで、もう一つの高感度質量分析装置である LC-Q-Trap を用い、当時流通していた薬物を組み込んだデータベースを用いて、product ion mode によるターゲット分析を併用することで、死亡

例においても極めて低い濃度でしか認められない 5-F-ADB の血液からの検出、同定が可能となった。即ち、目的に応じ、種々の質量分析装置を組み合わせることにより、超微量の合成カンナビノイドも同定可能であることが示された。次いで、本事例の危険ドラッグの定量を試みたところ、血液中の 5-F-ADB の濃度は約 0.2 ng/ml であった。また、同時に含まれていた diphenidine 濃度は約 12 ng/ml であり、これらの危険ドラッグは極めて低濃度で作用が発現することが示された。

ガスクロマトグラフィー / タンデム質量分析法 (GC/MS/MS) による合成カンナビノイド異性体の識別法

また、我々は、GC/MS/MS による危険ドラッグの異性体識別を開発した。危険ドラッグには異性体を有するものが多く、法的小よび毒性学的観点から、異性体の識別が極めて重要となるため、ガスクロマトグラフタンデム質量分析計 (GC/MS/MS) を用いて、危険ドラッグ (JWH-081, JWH-122 及び JWH-210) の位置異性体について、マススペクトルを用いて確実に識別する方法を開発した。

(2) 合成カンナビノイドの代謝経路の検討

5-F-ADB と diphenidine の代謝物の分析と代謝経路の推測

我々は、次いで、5-F-ADB の代謝物の測定を行った。前述の中毒事例において、さらに尿中の 5-F-ADB を解析した。解剖時に採取された尿をグルクロニダーゼ処理後、LC-Q-TOFMS で解析した。代謝物を同定した結果、5-F-ADB の代謝においては、エステル結合が加水分解し、その後ペンチル鎖の脱フッ素化と水酸化が起こる経路、アミド結合が加水分解し、その後ペンチル鎖の脱フッ素化と水酸化が起こる経路、インドール環の水酸化が起こる経路が想定された。

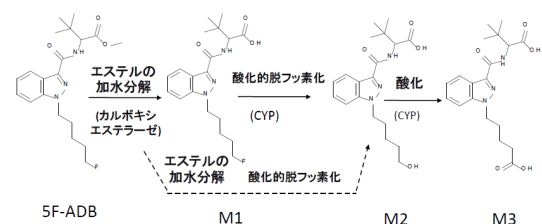


図 2 : 5-F-ADB の推定される代謝経路

GC/MS/MS による合成カンナビノイドの代謝物分析

同様に、我々は GC/MS/MS を用い、危険ドラッグの代謝物を同定することが可能であることを示した。9 週齢の雄性マウスに JWH-018 を腹腔内投与し、30 分後に尿を採取した。尿サンプルにグルクロニダーゼ処理を行い、精製後再構成を行って GC/MS/MS 分析を行った。その結果、主に 6 位のインドール環が水酸化され、4 位ないし 7 位では生じにくいことが示された。これは立体障害によるものと推定された。

5-F-ADB の臓器間での代謝の差異の検討

我々は、以上のデータに基づき、5-F-ADBの代謝の臓器間の差異に着目した。昨年報告した通り、5-F-ADBは死亡例と考えられる場合でも血中濃度が極めて低値であり、代謝酵素、特にカルボキシエステラーゼ (CES)の関与が考えられる。死亡事例の各臓器について、未変化体と代謝物の測定を施行した。精製には、簡便な抽出法である QuEChERS 法をベースにした方法を改良した。多くの臓器で代謝物が検出された一方で、未変化体は肝臓では検出されず、肺からはごく微量検出され、CES 活性と 5-F-ADB の代謝物との関連性が示唆された。また、今回改良した QuEChERS 法は、臓器中の 5-F-ADB と代謝物の検出に有用であることも示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

1. K Zaitso, Y Hayashi, T Murata, K Yokota, T Ohara, M Kusano, H Tsuchihashi, T Ishikawa, A Ishii, K Ogata, H Tanihata. In vivo real-time monitoring system using probe electrospray ionization/tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS) for metabolites in mouse brain. *Analytical Chemistry*, 2018, 90 (7): 4695-4701. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05291 査読有
2. M Kusano, K Zaitso, K Taki, K Hisatsune, J Nakajima, T Moriyasu, T Asano, Y Hayashi, H Tsuchihashi, A Ishii. Fatal Intoxication by 5F-ADB and Diphenidine: Detection, Quantification, and Investigation of their Main Metabolic Pathways in Human by LC/MS/MS and LC/Q-TOFMS. *Drug Testing and Analysis*, 2018, 10: 284-293. doi: 10.1002/dta.2215. 査読有
3. Y Hayashi, K Zaitso, T Murata, T Ohara, S Moreau, M Kusano, H Tanihata, H Tsuchihashi, A Ishii, T Ishikawa. Intact metabolite profiling of mouse brain by probe electrospray ionization/triple quadrupole tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS) and its potential use for local distribution analysis of the brain. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 983: 160-165. doi: 10.1016/j.aca.2017.06.047. 査読有
4. 草野麻衣子、財津桂、土橋均、石井晃. GC/MS/MSの基礎と法中毒学への応用, 中毒研究, 29(4) : 387-392, 2016. 査読有
5. M Kusano, M Yamanaka, K Zaitso, H Nakayama, J Nakajima, T Moriyasu, H Tsuchihashi, A Ishii. Regioisomeric differentiation of the alkyl-substituted synthetic cannabinoids JWH-122 and JWH-210 by GC-EI-MS/MS. *Forensic Toxicology*, 2016, DOI 10.1007/s11419-016-0317-x 査読有
6. T Ogawa, M Tada, H Hattori, Y Shiraishi, T Suzuki, M Iwai, M Kusano, K Zaitso, A Ishii, H Seno. Sensitive determination of picrotoxin by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Legal Medicine*, 2016, 20;8-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.03.002> 査読有
7. M Kusano, K Zaitso, M Yamanaka, K Hisatsune, T Asano, K Taki, Y Hayashi, H Tsuchihashi, A Ishii. Development of a mass spectrometric hydroxyl-position determination method for the hydroxyindole metabolites of JWH-018 by GC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 2016, 51 (5) :350-357. doi: 10.1002/jms.3761. 査読有
8. K Zaitso, Y Hayashi, T Murata, T Ohara, K Nakagiri, M Kusano, H Nakajima, T Nakajima, T Ishikawa, H Tsuchihashi, A Ishii. Intact endogenous metabolite analysis of mice liver by probe electrospray ionization/triple quadrupole tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS) and its preliminary application to in vivo real-time analysis. *Analytical Chemistry*, 2016, 88 (7), pp 3556-3561. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04046. 査読有
9. K Zaitso, Y Hayashi, M Kusano, H Tsuchihashi, A Ishii. Application of metabolomics to toxicology of drugs of abuse: a mini review of metabolomics approach to acute and chronic toxicity studies. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2016; 31: 21-26. doi: 10.1016/j.dmpk.2015.10.002. 査読有
10. K Zaitso, Y Hayashi, K Suzuki, H Nakayama, N Hattori, R Takahara, M Kusano, H Tsuchihashi, A Ishii. Metabolome disruption of the rat cerebrum induced by the acute toxic effects of the synthetic cannabinoid MAM-2201. *Life Sciences* 2015; 137: 49-55. doi: 10.1016/j.lfs.2015.05.013. 査読有
11. K Zaitso, H Nakayama, M Yamanaka, K Hisatsune, K Taki, T Asano, T Kamata, M Katagi, Y Hayashi, M Kusano, H Tsuchihashi, A Ishii. High resolution mass spectrometric determination of the synthetic cannabinoids MAM-2201, AM-2201, AM-2232

and their metabolites in postmortem plasma and urine by LC/Q-TOFMS. International Journal of Legal Medicine 2015; 129(6): 1233-1245. doi: 10.1007/s00414-015-1257-4. 査読有

〔学会発表〕(計 56 件)

1. M Kusano, K Zaitzu, K Hisatsune, A Ishiba, M Hida, J Nakajima, J Suzuki, T Moriyasu, H Tsuchihashi, A Ishii. Relative abundances of 5F-ADB and its ester hydrolysis metabolite in carboxylesterase-containing tissue specimens. SOFT-TIAFT 5th Joint Meeting. 2018.

2. K Zaitzu, Y Hayashi, M Kusano, K Hisatsune, T Ohara, T Murata, H Nakajima, H Tanihata, H Tsuchihashi, T Ishikawa, A Ishii. Direct drug analysis in serum by probe electrospray ionization/tandem mass spectrometry and its preliminary application to a real-time metabolism study. MSACL-US 9th Annual Conference & Exhibits, 2017

3. A Ishii, M Kusano, K Taki, K Hisatsune, H Tsuchihashi, K Zaitzu. A fatal intoxication case of 5-Fluoro-ADB and diphenidine. The 54th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT).2016

4. K Zaitzu, Y Hayashi, T Murata, H Nakajima, T Nakajima, M Kusano, H Tsuchihashi, T Ishikawa, A Ishii. Real-time metabolome analysis by probe electrospray ionization-tandem mass Spectrometry (PESI-MS/MS): preliminary challenge to real-time metabolomics. Pittcon Conference&EXPO 2016

5. K Hisatsune, K Zaitzu, M Kusano, M Yamanaka, J Nakajima, T Moriyasu, A Ishiba, M Hida, H Tsuchihashi, A Ishii. Determination of newly encountered designer drugs -PHP and acetylfentanyl in an acute intoxication case by LC/Q-TOFMS. The 53rd Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists. 2015

6. M Kusano, K Zaitzu, Y Sakamoto, H Miyagawa, H Tsuchihashi, A Ishii. Development and validation for a highly sensitive GC-MS/MS screening and quantification method of forensically relevant drugs of abuse in whole blood. The 53rd Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicol-

ogists.2015

7. M Kusano, K Zaitzu, M Yamanaka, K Hisatsune, T Asano, K Taki, Y Hayashi, H Tsuchihashi, A Ishii. Development of a hydroxyl- position determining method for the metabolites of naphthoylindole-type synthetic cannabinoids by GC/MS/MS. Society of Forensic Toxicologists (SOFT) 2015 ANNUAL MEETING

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者

石井 晃 (ISHII AKIRA)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 30252175

(2)研究分担者

財津 桂 (ZAITSU KEI)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 30700546

那須 民江 (中島 民江) (NASU TAMIE)
中部大学・生命健康科学部・特任教授
研究者番号: 10020794

林 由美 (HAYASHI YUMI)
名古屋大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 30632707

土橋 均 (TSUCHIHASHI HITOSHI)
名古屋大学・医学系研究科・招へい教員
研究者番号: 40596029

妹尾 洋 (SENO HIROSHI)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50236113

小川 匡之 (OGAWA TADASHI)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50559937

草野麻衣子 (KUSANO MAIKO)
名古屋大学・医学系研究科・特任助教
研究者番号: 60733574

内藤 久雄 (NAITO HISAO)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：90547556

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

久恒 一晃 (HISATSUNE KAZUAKI)
愛知県科学捜査研究所・化学鑑定室・警察職員

中嶋 順一 (NAKAJIMA JUN'ICHI)
東京都健康安全研究センター・生薬研究室・主任研究員