

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：82505

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790616

研究課題名（和文） イメージング質量分析による乱用薬物の体内分布に基づく毒性評価法の構築

研究課題名（英文） Evaluation of toxicity of drugs based on drug distributions in organs by imaging mass spectrometry

研究代表者

桑山 健次 (KUWAYAMA KENJI)

科学警察研究所・法科学第三部・研究員

研究者番号：40356233

研究成果の概要（和文）：マウスに薬物（メタンフェタミン、MDMA）を投与し、薬物の影響による自発運動量、体温及び行動の変化を調べた。また、一定時間後に臓器（脳、肝臓、腎臓）を摘出し、MALDI/imaging MSによる臓器内薬物分布測定及びLC/MSによる臓器中薬物濃度測定を行った。本研究で規格化した毒性試験法から得られたイメージング質量分析による画像データと運動量、体温、薬物濃度等の数値データを集約し、薬物毎に毒性データシートを作成した。毒性データシートの拡充は、薬物間の毒性比較、新規薬物の毒性推定等に役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：Drugs (methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine) were administered to mice, and the effects of drugs on locomotor activity, body temperature and behavior were examined. Moreover, the organs (brain, liver and kidney) were removed from mice after drug administration and then drug distributions and drug concentrations in organs were measured by MALDI/imaging MS and LC/MS, respectively. Data obtained using the standardized method were integrated on a data sheet every drug. The increment of data sheets would be useful for the comparison of toxicity among drugs and the estimation of toxicity of novel drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	0	700,000
2011年度	600,000	0	600,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	240,000	2,340,000

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：法中毒学・イメージング質量分析・乱用薬物・体内分布・毒性・メタンフェタミン・MDMA

1. 研究開始当初の背景

(1) 薬物の乱用は、依存性、中毒等の健康被害を及ぼすだけでなく、幻覚、妄想等の精神障害に陥り、殺人、強盗、放火等の凶悪な犯

罪を引き起こす深刻な社会問題の一つである。乱用薬物は、覚せい剤、大麻、麻薬等に分類され、法令でその取り扱いが規制されているが、依然としてその乱用が絶えない。中

毒の原因解明、死因究明等のための薬物鑑定において、その薬物がどのような毒性を持っているかが重要となる。しかしながら、乱用薬物は、医薬品、農薬等のように規定された毒性試験が存在しないため、毒性に関する情報が少ない。また、毒性研究の文献が入手できても、知りたい毒性試験項目が不十分であったり、方法に統一性がなく、薬物間の毒性の比較が困難で、迅速に正確な毒性評価ができない場合がある。

(2) 近年、イメージング質量分析（別名、顕微質量分析）の装置及びソフトの開発が進み、体内の薬物及び代謝物の分布解析が可能となってきた。イメージング質量分析は、試料を観察するためのカメラ、レーザーによって気化・イオン化した試料表面の成分を分析するための質量分析計（MS）で構成され、試料の形態と目的成分の分布を同時にイメージングする手法である。これにより、体内のどの部位に、どんな薬物または代謝物がどの程度含まれているかという情報を視覚的に与えてくれる。

(3) イメージング質量分析は、医学、薬学をはじめとして様々な分野での研究が行われつつある。薬理学の分野では、投与された薬物が脳のどの部位に特異的に分布するか等の研究に利用される。免疫染色等の手法と組み合わせることで、薬物と関連する受容体等を特定することも可能となる。また、薬物動態の分野では、投与薬物及びその代謝物の全身における分布解析等の研究に利用される。体内分布の経時変化から投与薬物が特定の組織に特異的に蓄積しやすいか等の情報を得ることができる他、オートラジオグラフィと異なり、投与薬物と代謝物との識別、代謝物の同定、代謝物のみイメージングが可能となる [Caprioli et al, Anal Chem 78 (2006)]。

(4) 法医学や法中毒学分野における薬物鑑定では、臓器等の生体試料から薬物を抽出した後、液体クロマトグラフィー質量分析計（LC-MS）等で薬物の同定や定量を行う [Kuwayama et al, J chromatogram B 867 (2008)]。この方法では、貴重な鑑定資料を磨り潰し、均一化した後に分析するため、資料中のどこに薬物が存在したかを判断することはできない。イメージング質量分析では、元の試料の構造を保ったまま分析できるため、薬物及び代謝物の分布を視覚的に判断でき、毒性の原因物質についても明確に画像で表現される可能性があるため、新たな毒性評価法として期待できる。

(5) イメージング質量分析計に関して、各分

析機器メーカーでの本格的な開発が進むとともに、イメージング質量分析に関心を持つ研究者や関連のある研究報告も増加してきた [Stoeckli et al, Int J Mass Spectrom 260 (2007)]。しかしながら、装置が高価であり、装置を所有する限られた施設環境でしか研究を行うことができないため、この分野での研究はまだ不十分である。幸いなことに、当研究所にイメージング分析の機能を有したMSが導入され、臓器中薬物のイメージング質量分析に関する基礎データの取得が行われている。

(6) イメージング質量分析で得られた薬物及び代謝物の体内分布データは、毒性の評価のための指標として有効である。この画像データとともに、規格化された乱用薬物毒性試験の結果をデータシートにまとめて一括管理し、データベース化できれば、迅速な情報検索、薬物間の毒性比較が容易となり、毒性発現メカニズムの解明や死因究明等に役立つと本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

乱用薬物は、規定された毒性試験が存在しないため、毒性に関する情報が少なく、迅速に正確な毒性評価ができない場合がある。そこで、イメージング質量分析を用いて、臓器中薬物及び代謝物の分布の画像データを取得し、規格化された乱用薬物毒性試験の結果を集約して、乱用薬物毎の毒性データシートを作成する。体内分布の経時変化や局在に基づいて乱用薬物の毒性評価を行い、ヒトでの毒性発現メカニズムの解明や死因究明等に役立つ毒性評価法を構築する。

3. 研究の方法

マウスに薬物を投与し、薬物の影響による自発運動量、体温変化等を調べる。また、臓器を摘出し、MALDI/imaging MSによる臓器内薬物分布測定及びLC/MSによる臓器中薬物濃度測定を行う。イメージング質量分析による画像データと運動量、体温、致死量、薬物濃度等の数値データを集約し、薬物毎に毒性データシートを作成する。どの薬物がどの部位に蓄積しやすいか、どのような毒性が予想されるか等を考察し、ヒトでの毒性発現メカニズムの解明や死因究明等に役立つ毒性評価法を構築する。

様々な投与量でマウスに薬物投与

↓

カゴに入れる

{行動記録、体温測定、自発運動量測定}

↓

一定時間後に屠殺または中毒死

{致死量推定}
↓
臓器（脳、肝臓、腎臓）を摘出し、凍結保存
↓
マイクロトームで試料切片作製
↓
試料表面にマトリックス噴霧
↓
MALDI/imaging MS
{臓器内薬物分布測定}

残余臓器
↓
ステンレス製クラッシャーで臓器粉砕
↓
薬物抽出
↓
LC/MS
{臓器中薬物濃度測定}

全結果を集約し、毒性データシートを作成

4. 研究成果

(1) 薬物によるマウスの行動及び体温変化の測定法及びイメージング質量分析のためのマトリックス試薬噴霧法の最適化を図った。マウスを赤外線センサー付きのカゴに入れ、サーモグラフィー及び監視カメラを設置することで、マウスの運動量、体温及び行動を自動で常時記録できるシステムを構築した（図1）。

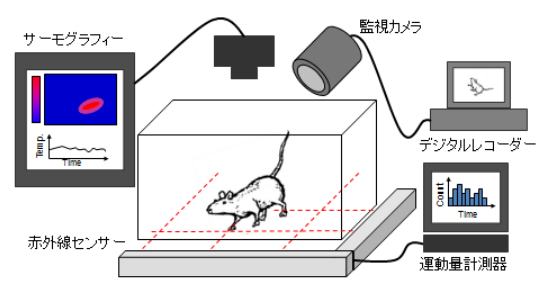


図1 薬物によるマウスの行動及び体温の変化の測定

また、マトリックス試薬噴霧の再現性向上のため、エアブラシ、ターンテーブル、顕微鏡等を組み合わせたマトリックス試薬自動噴霧装置を開発した（図2）。

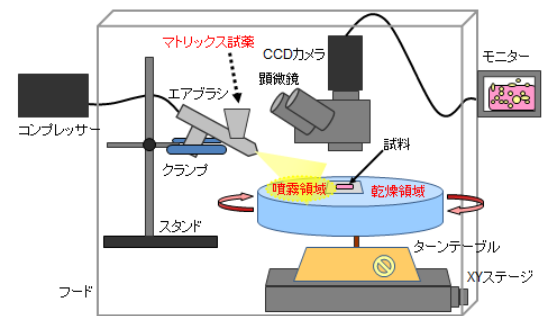


図2 開発した自動マトリックス試薬噴霧装置

(2) メタンフェタミン及び3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) によるマウスの運動量及び体温変化の測定を行った。メタンフェタミン投与時（15または45 mg/kg）、MDMA投与時（19または58 mg/kg）、生理食塩水投与時のマウスの運動量及び体温を比較したところ、MDMA投与時の運動量は、いずれの投与量でも生理食塩水投与時と比べて有意な増加が認められた。一方、いずれの薬物でも体温の有意な変化は認められなかった。

(3) メタンフェタミン及びMDMAを投与したマウスから摘出した臓器を9分割し、脳及び腎臓の断片中の薬物及び代謝物濃度をLC/MSにより測定したところ、いずれの薬物とも、脳では脳幹付近、腎臓では中心（腎盂）付近に相当する断片で未変化体が高濃度であった。また、臓器切片について、MALDI/imaging MSによる臓器内薬物分布測定を行ったところ、LC/MSによる臓器中薬物濃度と同様の分布傾向を示し、両結果に相関が認められた。

(4) LC/MSによる臓器中薬物濃度測定及びMALDI/imaging MSによる臓器内薬物分布測定の結果を集約し、毒性データシートを作成した（図3）。

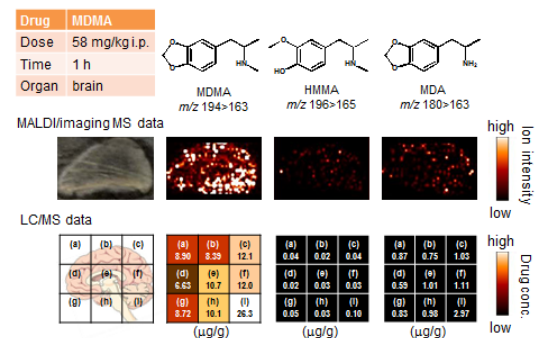


図3 臓器内薬物分布測定データシート

他の薬物についても、本研究で規格化した毒性試験法を用いてデータを取得し、毒性データシートの拡充を図っている。本研究で作成された毒性データシートは、薬物間の毒性比較や新規薬物の毒性推定等に利用でき、迅速かつ正確な毒性評価に役立つと期待される。

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3件)

- ① Kenji Kuwayama, Kenji Tsujikawa, Hajime Miyaguchi, Tatsuyuki Kanamori, Yuko T. Iwata, Hiroyuki Inoue, Interaction of 3,4-methylenedioxyamphetamine and methamphetamine during metabolism by *in vitro* human metabolic enzymes and in rats, Journal of Forensic Sciences, 査読有、In press、
[DOI:10.1111/j.1556-4029.2011.02039.x](https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.02039.x)
- ② Kenji Kuwayama, Kenji Tsujikawa, Hajime Miyaguchi, Tatsuyuki Kanamori, Yuko T. Iwata, Hiroyuki Inoue, Rapid, simple, and highly sensitive analysis of drugs in biological samples using thin-layer chromatography coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 査読有、402、2012、1257-1267、
[DOI:10.1007/s00216-011-5576-0](https://doi.org/10.1007/s00216-011-5576-0)
- ③ Kenji Kuwayama, Kenji Tsujikawa, Hajime Miyaguchi, Tatsuyuki Kanamori, Yuko T. Iwata, Hiroyuki Inoue, Distribution measurement of amphetamine-type stimulants in organs using micropulverized extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry to complement drug distribution using mass spectrometry imaging, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 査読有、25、2011、2397-2406、[DOI:10.1002/rcm.5145](https://doi.org/10.1002/rcm.5145)

[学会発表] (計4件)

- ① 桑山健次、マトリックス支援レーザー脱離イオン化/イメージング質量分析による乱用薬物の臓器内分布測定の最適化、日本薬学会第132年会、平成24年3月31日、北海道大学(札幌市)

- ② Kenji Kuwayama、Development of automatic matrix spraying system with an air brush and a turn table for drug distribution measurement in organs by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry、PITTCON 2012、平成24年3月13日、オーランドオレンジカウンティコンベンションセンター(アメリカ)
- ③ 桑山健次、薄層クロマトグラフィー/マトリックス支援レーザー脱離イオン化/イメージング質量分析による生体試料中の薬物の同定及び画像化、日本薬学会第131年会、平成23年3月30日、ツインメッセ静岡(静岡市)
- ④ Kenji Kuwayama、Development of analytical method for distribution measurement of amphetamine-type stimulants in organs、PACIFICHEM 2010、平成22年12月15日、ハワイコンベンションセンター(アメリカ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑山 健次 (KUWAYAMA KENJI)

科学警察研究所・法科学第三部・研究員

研究者番号：40356233