

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 24 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19271

研究課題名(和文) 中毒例のヒト臓器・体液からの危険ドラッグ成分抽出と標準添加法による高感度機器分析

研究課題名(英文) Sensitive analysis for determination of dangerous drugs in authentic human samples using standard addition method.

研究代表者

長谷川 弘太郎 (Hasegawa, Kotaro)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：40574025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、危険ドラッグ類の中毒事例に関して、ヒト臓器や体液等の法医解剖試料を中心に薬毒物類の抽出方法と、主に液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析器(LC-MS/MS)等を用いた定性・定量分析方法の開発を行った。加えて、開発した分析方法を覚せい剤成分や眠剤成分の関与した事例にも応用した。様々なヒト試料での薬物濃度を測定することで、これらの死後体内再分布を明らかにした。定量分析には標準添加法を用いることで、試料ごとに異なるマトリックス効果や回収率の問題を解決し精密な薬物濃度の測定が可能であった。本研究を土台として、危険ドラッグ類のヒトでの代謝や排泄について研究を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Our laboratory could successfully established sensitive analysis methods for identification and quantification of cathinone derivatives and synthetic cannabinoids in various specimens, including human body fluids and solid tissues, using LC-MS/MS. In addition, we could also apply the methods to determinations of other drugs, such as amphetamine, flunitrazepam and their metabolites in authentic intoxication cases. The postmortem redistribution of various compounds in drug use cases could also be determined due to our sensitive and accurate measurement of their concentrations in various human specimens involved. As one of novel points in our research, we use standard addition method for quantification of target compounds for overcoming matrix effects and even recovery rates which quite varied among specimens. For clarifying metabolism and excretions of abused drugs especially in human, further research should be needed.

研究分野：法医学

キーワード：危険ドラッグ 死後体内分布 QuEChERS法 LC-MS/MS 標準添加法 マトリックス効果 危険ドラッグ代謝物

1. 研究開始当初の背景

近年、危険ドラッグの蔓延と使用は大きな社会問題となっている。様々な薬物がハーブ、入浴剤やお香等と称して供給され、脱法を謳い文句に販売や使用が容易になさされている。

従来までの大麻や覚せい剤、幻覚剤に加え、近年、多種・多様な合成カンナビノイド系・カチノン系化合物が見受けられる (Kikura-Hanajiri, et al. Forensic Toxicol. 31:44-53, 2013)。

これらは化学修飾や構成分子の置換・組み合わせ等により爆発的に種類を増やし、現在も次々と新種の物質が報告されている。更に最近では、ジフェニジンのように幻覚剤類似の物質も新たに検出・報告されている。

合成カンナビノイド類を用いた実験・研究によると、従来大麻やマリファナと比べてその機能発現に関わる神経細胞の CB1 受容体、CB2 受容体への親和性が 10~100 倍にも達するものが多数報告されている。

2013 年、合成カンナビノイド類(MAM-2201)での死亡例が世界で初めて日本で報告(Saito T, et al. Forensic Toxicol. 31:333-337, 2013)された。その後も MAM-2201 を中心として合成カンナビノイド類の毒性の評価がなされている。

合成カチノン類はアンフェタミン等の覚せい剤と似た構造をしている。合成カチノン類を用いた動物実験によると、多動・興奮といった行動促進作用や体温上昇等の、覚せい剤とほぼ同様な薬理作用が確認され、これも毒性評価が進められている。これまでも合成カチノン類での死亡事例は比較的多く報告されており、毒性は高いものと推定される。これら未知の薬物が身体・精神依存性や毒性の検証がなされず、含有量も他剤との混合も多種多様に及ぶまま危険ドラッグ等として社会へと供給され続けているのが現状である。

昨今、乱用薬物の供給側の技術の高度化や法規制への対応の迅速化には目を見張るものがある。厚生労働省が乱用物質の包括的な規制を行ったことは記憶に新しい。しかし、規制を逃れるため、薬理機能に関わる分子に対し化学的な修飾を加え脱法化を図る事によって、規制とほぼ同時にその対象物質が市場の製品から検出されなくなり、すぐに別の類似の新物質が出現する事もしばしばである。よって、乱用薬毒物の迅速な同定と分析を困難にしている。

2. 研究の目的

本研究では、主に危険ドラッグ関連死亡事例での法医解剖のヒト試料で薬毒物分析を行う事を目的とする。分析に当たっては標

準添加法の手技を用いることでヒト試料の取り扱いに特有の倫理問題を解決する。また、標準添加法はマトリックス効果や回収率の諸問題を解決できる優れた定量方法であり、これを用いる事により従来までの報告とは一線を画する精密な測定を可能とする。

以上のように標準添加法は非常に優れた測定法である一方、煩雑な手技である。申請者らは抽出法の簡便化・最適化によりこれを解決し、各種ヒト実質臓器や詳細な部位別ヒト体液を対象とした精密な各種薬毒物の死後体内再分布(postmortem redistribution)の法中毒学的検討を行う。法医解剖では、ヒト試料の採取から各種試料に対する包括的な分析・検討まで一貫して行い、更には体内再分布を明らかにした上で、各種薬毒物の適切な試料採取部位や方法の検討も行う。

これまで述べたような手法を用いることにより、危険ドラッグ類が関与する司法解剖例でのヒト臓器・体液等の試料を体系的に採取し、かつ対象物質の分析・測定とそれらの死後体内再分布を明らかにする。加えて、分析に用いる手技の開発までを包括して行う事を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究対象試料の入手

ヒト臓器・体液等の法医試料からの危険ドラッグ成分(合成カンナビノイド系・合成カチノン系物質等)を中心とした乱用薬物の抽出と質量分析機による高感度分析法の開発・試料別精密測定を目指すに当たり、対象試料の入手は専ら法医解剖において行う。危険ドラッグやその他乱用薬毒物の使用が疑われる事例でのヒト臓器・体液(尿・血液等)試料の採集に加え、薬毒物の体内分布が問題となる各種臓器(実質臓器、脂肪組織等)や体液の部位別採取を追加的に施行する。また、法医解剖による試料採取のみならず、警察・病院試料も適宜、収集対象とする。加えて、試料の入手にあたり法的、倫理的な問題がない場合、交通警察や救急部等の臨床各科にも協力を仰ぎ、できるだけ多くの試料を収集する。

(2) 対象物質の推定・同定

入手した試料(製剤、ヒト臓器・体液)はまず、当教室で保有する GC-MS や LC-MS-MS による物質分離を行う。次に既存のスクリーニング検査による含有化合物の特定あるいは推定を試み、未知の物質に対してはデータベースやタンデム質量分析器、高分解能質量分析器による組成推定を行う。

最終的な物質同定に当たっては、純品とのマスクロマトグラムやマススペクトルの比較により行う。もし当該純品を保有していなかった場合、国内外の試薬供給会社や協力機関(国立衛生研究所等)からの入手を行う。

(3)前処理法・分析法の改良と開発

試料の前処理方法としては液-液抽出法、固相抽出法や除タンパク法、QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)法等を検討する。液-液抽出法の開発・改良では抽出溶媒の検討、pH や塩添加等の抽出条件の検討、珪藻土等を用いた境界条件の検討などを行う。固相抽出法の開発・改良では適切な充填剤(イオン交換相、極性等)の比較・選択、抽出溶媒の比較・検討、抽出手技の改良等を行う。除タンパク法では試料への塩の添加や有機溶媒の使用、酸・塩基の添加や濾過方法の比較検討を行う。QuEChERS 法は液-液抽出法の一種であり、固体・液体の各種試料に対して広く応用できる優れた前処理方法である(Usui T, et al. Leg Med 4(6):286-96,2012)。

これらに加え、応用や当該手技の改良が可能と思われる新規の各種市販デバイスや試薬等についても積極的に検討を行う。

(4)装置

測定には、当教室で保有する GC-MS、LC-MS/MS や、浜松医科大学実験実習機器センターが保有する、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析器(MALDI-TOF-MS)や高分解能質量分析装置等、利用可能な各種分析機器を用いる。

4. 研究成果

静岡県内で 2013 年前後から多数発生した危険ドラッグ類関連事例について、司法解剖を行い、これらからのヒト試料の採取と対象物質の分析を行うことが可能であった。

(1)合成カチノン α -PVP

(α -pyrrolidinovalerophenone)中毒事例での分析
・試料の入手

合成カチノンである α -PVP が関与した中毒死事例で司法解剖を実施し、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、左右心臓血液、大腿静脈血液、尿、胃内容物を採取した。

・対象物質の抽出と分析

警察が押収した乾燥葉を入手し、これをアセトニトリルに溶解して GC-MS スペクトルを得た。このスペクトルをスペクトルライブラリに照らし合わせることで、関与した薬物が α -PVP であることを同定した。

ヒト試料からの対象物質の抽出には固相抽出法を用いた。

抽出サンプルの定量分析には LC-MS/MS を用い、夾雑ノイズの少ない良好な検出ピークを得た。検出下限(Limit of detection)は 0.1 ng/mL or g 程度、定量下限(Limit of quantitation)は 1 ng/mL or g であった。

分析方法の日内・日間変動は許容範囲内であった。抽出での回収率は良好(おおむね 80% 以上)であり、マトリックス効果の検討を行った。

・各種試料中の α -PVP 濃度と体内分布
各種試料中の α -PVP 濃度の測定には標準添加法を用い、各々の試料(体液・臓器)中の濃度分布を明らかにした。

血中 α -PVP 濃度から、事例の死因は薬物中毒死であることが推定された。

・成果報告

これらの結果をまとめ、国際学術専門雑誌に投稿した(Hasegawa K, et al. Forensic Toxicol. 2014; 32 : 225-234)。

(2)合成カチノン α -PbP

(α -pyrrolidinobutophenone)関与事例での分析

・試料の入手

合成カチノンである α -PbP が関与した中毒死事例で司法解剖を実施し、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、左右心臓血液、大腿静脈血液、尿、脳脊髄液、胃内容物を採取した。

・対象物質の抽出と分析

司法解剖で採取した尿を用いて、これを濃縮後、アセトニトリルに溶解して GC-MS スペクトルを得た。このスペクトルをスペクトルライブラリに照らし合わせることで、関与した薬物が α -PbP であることを同定した。

ヒト試料からの対象物質の抽出には

QuEChERS 法を用いた。

抽出サンプルの定量分析には LC-MS/MS を用い、夾雑ノイズの少ない良好な検出ピークを得た。検出下限(Limit of detection)は 0.1 ng/mL or g 程度、定量下限(Limit of quantitation)は 1 ng/mL or g であった。

分析方法の日内・日間変動は許容範囲内であった。抽出での回収率は良好(おおむね 80% 以上)であり、マトリックス効果の検討を行った。

・各種試料中の α -PbP 濃度と体内分布

各種試料中の α -PbP 濃度の測定には標準添加法を用い、各々の試料(体液・臓器)中の濃度分布を明らかにした。

血中 α -PbP 濃度から、事例の死因は薬物関連死であることが推定された。

LC-MS/MS を用いた測定では、マトリックス効果による検出ピークの低減が観察され、質量分析器のイオン化源での ion suppression によるものと推定された。

・成果報告

これらの結果をまとめ、国際学術専門雑誌に投稿した(Wurita A, et al. Leg. med. 2014, 16:241-246)。

(3)合成カチノン PV9 (α -POP, 1-phenyl-2-

(pyrrolidin-1-yl)octan-1-one)関与事例での分析

・試料の入手

合成カチノンである PV9 が関与した中毒死事例で司法解剖を実施し、肺、心筋、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、左右心臓血液(少量)、大腿静脈血液、腸腰筋、脂肪組織(臍窩下部)を採取した。加えて、生前の血液と尿を入手する事が可能であった。

・対象物質の抽出と分析

関与した液体をアセトニトリルに溶解して GC-MS スペクトルを得た。このスペクトルをスペクトルライブラリに照らし合わせるにより、関与した薬物が PV9 であることを同定した。

ヒト試料からの対象物質の抽出には QuEChERS 法を用いた。

抽出サンプルの定量分析には LC-MS/MS を用い、夾雑ノイズの少ない良好な検出ピークを得た。検出下限(Limit of detection)は 0.1 ng/mL or g 程度、定量下限(Limit of quantitation)は 1 ng/mL or g であった。

分析方法の日内・日間変動は許容範囲内であった。抽出での回収率は良好(おおむね 80% 以上)であり、マトリックス効果の検討を行った。

・各種試料中の PV9 濃度と体内分布

各種試料中の PV9 濃度の測定には標準添加法を用い、各々の試料(体液・臓器)中の濃度分布を明らかにした。

血中 PV9 濃度から、事例の死因は薬物関連死であることが推定された。

生前採取された血液中の PV9 濃度と解剖時に採取された血液中の PV9 濃度に著しい濃度差を認め、これは薬物の死後体内再分布によるものと推定された。

・成果報告

これらの結果をまとめ、国際学術専門雑誌に投稿した (Hasegawa K, et al. Forensic Toxicol. 2014, 32: 243-250. Hasegawa K, et al. Forensic Toxicol. 2015, 33: 141-147)。

(4)合成カンナビノイド類 AB-CHMINACA, 5-fluoro-AMB と幻覚剤類似物質 Diphenidine 関与事例での分析

・試料の入手

合成カンナビノイド類である

AB-CHMINACA, 5-fluoro-AMB と幻覚剤類似物質 Diphenidine が関与した中毒死事例で司法解剖を実施し、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、左右心臓血液、大腿静脈血液、尿、脂肪組織(臍窩下部)を採取した。

・対象物質の抽出と分析

関与した乾燥葉をアセトニトリルに溶解して GC-MS スペクトルを得た。このスペクトルをスペクトルライブラリに照らし合わせるにより、関与した薬物が AB-CHMINACA, 5-fluoro-AMB と Diphenidine であることを同定した。

ヒト試料からの対象物質の抽出には QuEChERS 法を用いた。

抽出サンプルの定量分析には LC-MS/MS を用い、夾雑ノイズの少ない良好な検出ピークを得た。検出下限(Limit of detection)は各々 0.1 ng/mL or g 程度、定量下限(Limit of quantitation)は各々 1 ng/mL or g であった。

分析方法の日内・日間変動は許容範囲内であった。抽出での回収率は良好(おおむね 80% 以上)であり、マトリックス効果の検討を行っ

た。

・各種試料中の薬物濃度と体内分布

各種試料中の薬物濃度の測定には標準添加法を用い、各々の試料(体液・臓器)中の濃度分布を明らかにした。

血中薬物濃度から、事例の主な死因は Diphenidine 中毒死であることが推定された。

本事例に関与した薬物のうち、5-fluoro-AMB は脂肪組織のみから検出可能であった。尿中からは AB-CHMINACA, 5-fluoro-AMB はいずれも検出されず、体内組織への移行と極めて早い代謝が推定された。

・成果報告

これらの結果をまとめ、国際学術専門雑誌に投稿した (Hasegawa K, et al. Forensic Toxicol. 2015, 33 : 45-53)。

(5)合成カンナビノイド類 5-fluoro-ADB と MAB-CHMINACA 関与事例での分析

・試料の入手

合成カンナビノイド類である

5-fluoro-ADB と MAB-CHMINACA が関与した中毒死事例で司法解剖を実施し、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、左右心臓血液、大腿静脈血液、尿、脂肪組織(臍窩下部)、胃内容物を採取した。

・対象物質の抽出と分析

関与した乾燥葉をアセトニトリルに溶解して GC-MS スペクトルを得た。このスペクトルをスペクトルライブラリに照らし合わせるにより、関与した薬物が MAB-CHMINACA, 5-fluoro-ADB であることを同定した。

ヒト試料からの対象物質の抽出には QuEChERS 法を用いた。

抽出サンプルの定量分析には LC-MS/MS を用い、夾雑ノイズの少ない良好な検出ピークを得た。検出下限(Limit of detection)は各々 0.1 ng/mL or g 程度、定量下限(Limit of quantitation)は各々 1 ng/mL or g であった。

分析方法の日内・日間変動は許容範囲内であった。抽出での回収率は良好(おおむね 80% 以上)であり、マトリックス効果の検討を行った。

・各種試料中の薬物濃度と体内分布

各種試料中の薬物濃度の測定には標準添加法を用い、各々の試料(体液・臓器)中の濃度分布を明らかにした。

血中薬物濃度から、事例の死因は合成カンナビノイド類関連死であることが推定された。

本事例に関与した薬物のうち、5-fluoro-ADB は「ハートショット」等の名称で流通し、使用者が多数死亡して社会を震撼させた。この研究は世界で初めて解剖試料からの 5-fluoro-ADB 検出と定量分析を行ったものである。

・成果報告

これらの結果をまとめ、国際学術専門雑誌に投稿した (Hasegawa K, et al. Forensic

Toxicology. 33: 112-121, 2015).

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 7 件)

1. Hasegawa K, Suzuki O, Wurita A, Minakata K, Yamagishi I, Nozawa H, Gonmori K, Watanabe K: 査読有 Postmortem distribution of α -pyrrolidinovalerophenone and its metabolite in body fluids and solid tissues in a fatal poisoning case measured by LC-MS-MS with the standard addition method. Forensic Toxicology. 32: 225-234, 2014
2. Wurita A, Hasegawa K(corresponding author), Minakata K, Gonmori K, Nozawa H, Yamagishi I, Suzuki O, Watanabe K: 査読有 Postmortem distribution of α -pyrrolidinobutiophenone in body fluids and solid tissues of a human cadaver. Legal Medicine. 16: 241-246, 2014
3. Hasegawa K, Wurita A, Minakata K, Gonmori K, Nozawa H, Yamagishi I, Suzuki O, Watanabe K: 査読有 Identification and quantitation of a new cathinone designer drug PV9 in an "aroma liquid" product, antemortem whole blood and urine specimens, and a postmortem whole blood specimen in a fatal poisoning case. Forensic Toxicology. 32: 243-250, 2014
4. Hasegawa K, Wurita A, Minakata K, Gonmori K, Nozawa H, Yamagishi I, Watanabe K, Suzuki O: 査読有 Postmortem distribution of AB-CHMINACA, 5-fluoro-AMB and diphenidine in body fluids and solid tissues in a fatal poisoning case: usefulness of the adipose tissue for detection of the drugs in the unchanged forms. Forensic Toxicology. 33: 45-53, 2015
5. Hasegawa K, Amin W, Minakata K, Gonmori K, Yamagishi I, Nozawa H, Watanabe K, Suzuki O: 査読有 Identification and quantitation of 5-fluoro-ADB, one of the most dangerous synthetic cannabinoid, in the stomach contents and solid tissues of a human cadaver and in some herbal products. Forensic Toxicology. 33: 112-121, 2015
6. Hasegawa K, Amin W, Minakata K, Gonmori K, Nozawa H, Yamagishi I,

Watanabe K, Suzuki O: 査読有 Postmortem distribution of PV9, a new cathinone derivatives, in human solid tissues in a fatal poisoning case. Forensic Toxicology. 33: 141-147, 2015

7. Hasegawa K, Amin W, Minakata K, Gonmori K, Nozawa H, Yamagishi I, Watanabe K, Suzuki O: 査読有 Postmortem distribution of MAB-CHMINACA in body fluids and solid tissues of a human cadaver. Forensic Toxicology, 33, 380-387, 2015

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 長谷川弘太郎: 1 中毒死例における合成力チノン PV9 の生前・死後体内分布. 日本法中毒学会第 34 年会. 要旨集. 2015; p17, 福岡
2. Hasegawa K, Wurita A, Gonmori K, Nozawa H, Yamagishi I, Minakata K, Suzuki O, Watanabe K: Identification and quantification of metabolites of AB-CHMINACA in a urine specimen of an abuser. The 54th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 弘太郎(HASEGAWA, Kotaro)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40574025