

令和元年5月29日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09206

研究課題名(和文)凍結組織切片を用いたMALDI質量分析による薬毒物の直接定量

研究課題名(英文)Direct quantification of toxic substances in frozen tissues by MALDI-MS/MS

研究代表者

南方 かよ子 (Minakata, Kayoko)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：70115509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)タンデム質量分析法(MS/MS)を用い組織中の薬毒物を直接定量する方法を開発した。解剖時に薬毒物定量のために採取した組織から厚さ20 μmの凍結切片を作成した(今回はdiphenidine中毒)。プレート上に標準溶液、その上に作成した凍結切片をのせ、matrix剤を噴霧し、MALDI-MS/MS装置を用いてdiphenidineを標準添加法で定量した。この結果をForensic Toxicology 34:151, 2016で報告した。さらに超高感度定量法を考案し、今まで原因が不明であった数例の中毒における原因物質の危険ドラッグを特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医学や救急救命においては原因不明の中毒にしばしば遭遇し、薬毒物の迅速で信頼がおける分析が必要である。matrix assisted laser ionization (MALDI) tandem mass spectrometry (MS/MS) 法は試料をプレートに乗せ、装置に挿入すると20秒で結果が得られる迅速で高感度な質量分析法である。ヒト解剖組織の凍結切片にこの方法を適用することにより、ヒトにおける薬毒物の影響や組織中の局在箇所を特定するという学術的意義がある。薬毒物およびその代謝物の高感度で迅速な定量法を開発することにより中毒の原因解明という社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The direct quantification method of toxic substances in tissues from a cadaver (intoxicated with diphenidine in this case) was devised. About 20 pieces of 20 μm-thick frozen tissue sections (5x5mm) were prepared. On a MALDI plate, standard solutions of diphenidine, tissue section and matrix were piled on successively, and diphenidine was quantified by MALDI-MS/MS using standard addition method. This result was reported in Forensic Toxicology 34:151, 2016. Much more sensitive method was required for the quantification of synthetic cannabinoids because they were metabolized very quickly and could not be determined by the previous methods in most cases. Our new method was devised based on liquid chromatography (LC)-QTRAP-MS/MS, and the LOQ of the method was 10 pg/mL (that is 1/100 of the LOQ in the previous reports). This method was applied successfully to several cases where toxic substances were unknown.

研究分野：医歯薬学

キーワード：質量分析 薬毒物 危険ドラッグ 合成カンナビノイド 代謝物

## 1. 研究開始当初の背景

マトリックス支援レーザー脱離イオン化(matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) タンデム質量分析(MS/MS)法は生体内高分子のタンパク質解析に威力を発揮している装置である。欠点としては励起を支援するために混入させるマトリックス剤による妨害シグナルが低分子領域に観測されるので、法医学分野の低分子薬毒物分析には敬遠されていた。但し、測定に必要な試料量は  $10^{-15}$  モルオーダーの高感度な方法であり、試料の純度に対する許容度も大きく、試料を高純度に精製する必要がない。試料をプレートに塗布して装置に挿入するのみで、20 秒で結果が得られる等の優れた特徴を持っている。故にこの方法を生体試料中の薬毒物の分析に使用できないかと考えた。この MALDI-MS/MS 法を用いた低分子薬毒物定量の報告は数例以下であり、かついずれも感度が非常に低かった。それらを検討したところ、プレートに試料を塗布する条件がタンパク質解析と同条件であったので、その点については改良の余地があると思われた。また質量分解能が 17000 もあることからマトリックス剤による妨害シグナルと薬毒物シグナルの分離は可能であると考え、法医学分野の低分子薬毒物分析への応用を始めることとした。また、組織中の薬毒物は組織をホモジェナイズした後に抽出して定量しているが、組織切片から直接に薬毒物を定量したいと考えた。次に危険ドラッグの中の合成カンナビノイド類は代謝速度が極めて速く、それらの未変化の分子イオンの検出は極めて困難で、中毒はしていても原因物質が特定できない点が解決すべき問題となっていた。

## 2. 研究の目的

### (1) MALDI-MS/MS 法の低分子薬毒物定量分析への応用

MALDI-MS/MS 法を用いた低分子薬毒物定量分析への応用例は少なく、またのその感度も非常に低かった。それらを検討したところ、プレートに試料を塗布した条件がタンパク質解析の条件を踏襲しただけであったので、試料作成条件を検討し、MALDI-MS/MS の本来持っている感度を生かす方法を考案することを目的とする。また、組織切片中の薬毒物は検出されてはいるが、その定量法はまだ報告されていないので、定量方法を考案する。また、血液・尿等の液体試料の高感度な方法を考案する。

### (2) LC-QTRAP-MS/MS 法を用いた超高感度 MS/MS 法の開発

危険ドラッグ類の 1 種である合成カンナビノイド類は天然物大麻の成分であるカンナビノイドの 100 倍以上の活性があり、死者であっても摂取量が極めて少く、さらに代謝が非常に速く、尿中では殆んど代謝された後であり、中毒の原因物質の解明が極めて困難であった。それ故従来の定量下限の 1/100 の濃度でも測定が可能な超高感度な方法を考案する。

### (3) LC-Orbitrap-MS/MS 法と LC-QTRAP-MS/MS 法併用による代謝物の決定

上記(2)の超高感度 LC-QTRAP-MS/MS 法では分子量を  $1 m/z$  単位までしか決定できないが、有機化合物は種々の構造が可能で、 $1 m/z$  の精度の範疇には沢山の有機薬毒物が含まれ、構造を推定することができない。LC-Orbitrap-MS/MS 法を用いて、代謝物の分子イオン、種々のプロダクトイオンの質量を  $0.0001 m/z$  単位まで精密に決定することにより、それらの元素組成を決定し、代謝物を決定する。

## 3. 研究の方法

### (1) MALDI-MS/MS 法による測定

解剖時に種々の組織から直径 5 mm 程度の組織塊を採取し、-80 度で凍結保存した(今回はジフェニジン中毒例)。測定に際し、MALDI-MS/MS 測定用のステンレスプレートのウエル上に内部標準(imipramine)と種々の濃度のジフェニジン標準溶液を含んだ matrix 溶液を載せた。次に凍結組織から 20  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作成し、プレート上に約 20 枚のせ接着させた。それをシリカゲル入りの容器に密閉し、室温に 1 晩放置し乾燥した。次に組織表面に matrix 溶液をエアブラシで塗布し測定した。ウエル上を測定すると、標準溶液と組織の和の濃度が検出されるので、種々の濃度のウエルを測定することによって、標準線を作成した。ウエル外部を測定することにより組織のみの濃度を検出した。以上のような標準添加法により組織中の濃度を決定することができる方法を考案した。

血液・尿等の液体試料の場合、薬毒物を 1-chlorobutane (CB) で抽出後、matrix 溶液に溶解し、プレートのウエル上に添加して測定した。

### (2) LC-QTRAP-MS/MS 法による超高感度定量

血液・尿・ホモジェナイズした組織等 400  $\mu\text{L}$  に内部標準 4  $\mu\text{L}$ 、buffer 80  $\mu\text{L}$ 、1-chlorobutane (CB) 800  $\mu\text{L}$  を添加、混合、遠心し、CB 層を別容器に採取した。再度 CB で抽出し、採取した。抽出した CB 層まとめ、それらから CB を蒸発させ、残渣を 100  $\mu\text{L}$  のメタノール溶液とした。その 5  $\mu\text{L}$  を Acquity の LC に注入し、LC-QTRAP-MS/MS 装置を用い、MRM 法で超高感度定量をした。分離カラムの最適化、分離溶媒の最適化をはかった。

### (3) LC-Orbitrap-MS/MS 法による代謝物の決定

代謝物はグルクロン酸抱合、硫酸抱合していることが多いので、試料を酵素処理して、抱合を加水分解後、薬毒物を抽出し、LC-Orbitrap-MS/MS 装置を用い、分子イオンスペクトルと種々のプロダクトイオンのスペクトルを測定し、それらの精密質量を決定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 組織切片中のジフェニジンの MALDI-MS/MS による直接定量分析

MALDI 法における低分子薬毒物の測定試料作成条件は matrix 剤として -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (CHCA)を用いた場合、CHCA 10 mg をアセトニトリル：水(1:0.2)に溶解した溶液が最適であった。測定値の標準偏差は大きかったが、種々の組織中のジフェニジンの濃度を測定することができた。脂肪中は他臓器よりも高濃度であった。以上の結果を *Forensic Toxicology* 34: 151-157(2016)に報告した。

血液・尿等の液体試料の場合、薬毒物を 1-chlorobutane (CB)で抽出すると夾雑物が非常に少なくなり、感度が著しく向上した。また、従来の報告では、高濃度のマトリックス剤をアセトニトリル：水(1:1)に溶解し、かつトリフルオロ酢酸を混入する方法で試料を作成していたが、我々の上記の条件で試料を作成し、測定することにより、高感度に測定することができるようになった。また、マトリックス剤のシグナルの妨害も見られなかった。パーキンソン治療薬ピペリデン、抗精神薬チミペロン、数種の三環系抗うつ剤の MALDI-MS/MS での定量とそれらの代謝物の分析の結果は、で報告した。

##### (2) LC-QTRAP-MS/MS 法による超高感度定量による原因物質の解明

尿は非侵襲性であるため血液や組織よりも入手しやすい検体であるが、危険ドラッグの中で、合成カンナビノイド類は代謝速度が極めて高く、それらの未変化の分子イオンの尿中濃度は血液や組織よりも極めて低く、中毒によって死亡していても検出できないことが使用初期の頃から報告されていた。そのため、それらの代謝物の検出によって摂取された物質を推定していた。しかし、合成カンナビノイド類の構造は類似しているため、主代謝物の構造が同じで、中毒物の特定が困難であることが多く、やはり未変化の分子イオンを検出することが好ましい。我々は尿中の合成カンナビノイド類の分子イオンを超高感度に検出する方法の考案を試みた。

方法：尿 400  $\mu$ L に内部標準 4  $\mu$ L、buffer 80  $\mu$ L、1-chlorobutane (CB) 800  $\mu$ L を添加、混合、遠心し、CB 層を別容器に採取した。再度 CB で抽出し、採取した。CB を蒸発させ、残渣を 100  $\mu$ L のメタノール溶液とした。その 5  $\mu$ L を LC に注入し、QTRAP MS/MS で測定した。定量領域は 10 - 1000 pg/mL で、定量下限は従来報告の 1/100 の 10 pg/mL となり、世界中でも報告がない超高感度なレベルであった。第一の解剖例の尿では AB-PINACA, AB-FUBINACA が夫々 23, 10 pg/mL、第二の解剖者尿では AB-CHMINACA, 5F-AMB が夫々 239, 19 pg/mL、第三解剖者尿では MAB-CHMINACA, 5F-ADB が夫々 229, 19 pg/mL であった。特に第一例の解剖者の死因は不明であったが、この測定により原因物質が判明した。以上の結果を、*Forensic Toxicology* 35: 275-283(2017)に報告した。

また、原因物質不明の解剖例の肝臓、肺中の薬毒物を抽出し LC-QTRAP-MS/MS で測定することにより、危険ドラッグの EAM-2201 と -PVP の関与が判明したので、*Legal Medicine* 35: 44-49(2018) に報告した。

##### (3) LC-Orbitrap-MS/MS 法による代謝物の決定

当大学救急部の患者 2 名(case 1 と 2)の血清と尿、また警察で任意に提出された尿(case 3)について超高感度定量をしたところ、BB-22 が中毒の原因物質であることが判明した。合成カンナビノイド BB-22 に関し、2015 年にヒト血漿中濃度が 97pg/mL との報告があるが、尿中濃度についての報告はまだなかった。その分解物である BB-22 3-carboxyindole の定量の報告もなかった。BB-22 3-carboxyindole は BB-22 の分解物であるが、BB-22 の構造を保持している代謝物についての報告もなかった。定量した結果、BB-22 濃度：case 1,2 の血清は 149, 6680, case 1,2,3 の尿は 5.64, 5.62, 6.92 pg/mL、グルクロン酸抱合分解後の BB-22 3-carboxyindole 濃度：case 1,2 の血清は 0.755, 38.0, case 1,2,3 の尿は 0.131, 21.4, 5.15 ng/mL であった。尿中には BB-22 の cyclohexylmethyl または indole が水酸化した代謝物(m/z=401)が見出されたが、これらの代謝物は今までに報告がなかった。BB-22 は非常に代謝されやすいので、尿での検出が困難である。これらの未発表代謝物は BB-22 の構造を保っていて、かつ検出しやすいので、BB-22 中毒の判定に用いることができる物質である。これらの代謝物の分子イオンと種々のプロダクトイオンの精密質量を Orbitrap MS/MS で測定したところ、理論値との差は 7 ppm 以下であった。この結果を *Forensic Toxicology* 37:164-173(2019)に報告した。その他、超高感度定量によって 5F-NNE1, 5F-PB-22 が原因物質と判明した例に遭遇し、それらの未発表代謝物について、に報告した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Kayoko Minakata et al., Sensitive quantification of BB-22 and its metabolite BB-22 3-carboxyindole, and characterization of new metabolites in authentic urine and/or serum specimens obtained from three individuals by LC-QTRAP-MS/MS and high-resolution LC-Orbitrap-MS/MS, *Forensic Toxicology*, 査読有, 37: 164-173, 2019. DOI 10.1007/s11419-018-0448-3

Koutaro Hasegawa, Kayoko Minakata et al., Identification and quantification of predominant metabolites of synthetic cannabinoid MAB-CHMINACA in an authentic human urine

specimen. *Drug Testing Analysis*, 査読有, 10: 365-371, 2018. DOI 10.1002/dta.2220

Itaru Yamagishi, Kayoko Minakata et al., A case of intoxication with a mixture of synthetic cannabinoids EAM-2201, AB-PINACA and AB-FUBINACA, and a synthetic cathinone  $\alpha$ -PVP. *Legal Medicine*, 査読有, 35: 44-49, 2018. DOI 10.1016/j.legalmed.2018.004

Koutaro Hasegawa, Amin Wurita, Hideki Nozawa, Itaru Yamagishi, Kayoko Minakata et al., Fatal zolpidem poisoning due to its intravenous self-injection: Postmortem distribution/redistribution of zolpidem and its predominant metabolite zolpidem phenyl-4-carboxylic acid in body fluids and solid tissues in an autopsy case. *Forensic Science International*, 査読有, 290: 111-120, 2018. DOI 10.1016/j.forsciint.2018.06.044

Kayoko Minakata et al., Sensitive quantification of 5F-NNEI and characterization of its several metabolites in authentic urine and/or serum specimens obtained from three individuals by LC-QTRAP-MS/MS and high resolution LC-Orbitrap-MS/MS. *Forensic Toxicology*, 査読有, 36: 498-505, 2018. DOI 10.1007/s11419-018-0429-6

Kayoko Minakata et al., Sensitive quantification of 5F-PB-22 and its three metabolites 5F-PB-22 3-carboxyindole, PB-22 *N*-5-hydroxypentyl and PB-22 *N*-pentanoic acid in authentic urine specimens obtained from four individuals by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, 査読有, 36: 151-159, 2018. DOI 10.1007/s11419-017-0395-4

Kayoko Minakata et al., Sensitive identification and quantitation of parent forms of six synthetic cannabinoids in urine samples of human cadavers by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, 査読有, 35: 275-283, 2017. DOI 10.1007/s11419-017-0354-o

Kayoko Minakata et al., Quantitation of biperiden in whole blood by MALDI-QTOF tandem mass spectrometry, and estimation of new metabolites in urine of deceased subjects treated with biperiden antemortem. *Forensic Toxicology*, 査読有, 35: 86-93, 2017. DOI 10.1007/s11419-016-0341-x

Hideki Nozawa, Kayoko Minakata et al., Application of MALDI-QTOF mass spectrometry to the determination of timiperone in whole blood, and estimation of its new metabolites in urine of a deceased subject who had been treated with timiperone antemortem. *Forensic Toxicology*, 査読有, 34: 363-371, 2016. DOI 10.1007/s11419-016-0323-z

Hideki Nozawa, Kayoko Minakata et al., Simultaneous determination of cyclic antidepressants and their related drugs and the estimation of new metabolites in human whole blood and urine by MALDI-QTOF mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, 査読有, 34: 244-255, 2016. DOI 10.1007/s11419-016-0313-l

Amin Wurita, Koutaro Hasegawa, Kayoko Minakata et al., Identification and quantification of metabolites of AB-CHMINACA in a urine specimen of an abuser. *Legal Medicine*, 査読有, 19: 113-118, 2016. DOI 10.1016/j.legalmed.2015.07.011

Amin Wurita, Koutaro Hasegawa, Kayoko Minakata et al., Postmortem redistribution of methamphetamine and amphetamine in blood specimens from various blood vessels and in the specimens from pericardial fluid, bile, stomach contents and various solid tissues collected from a human cadaver. *Forensic Toxicology*, 査読有, 34: 191-198, 2016. DOI 10.1007/s11419-015-0303-8

Kayoko Minakata et al., Semiquantitation of diphenidine in tissue sections obtained from a human cadaver in a poisoning case by direct MALDI-QTOF mass spectrometry. 34: 151-157, 2016. DOI 10.1007/s11419-015-0330-y

[学会発表](計18件)

国際学会(計6件)

Kayoko Minakata et al., Analysis of new metabolites of biperiden in blood and urine of two deceased subjects having a history of its treatments. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine, June 5-8, 2018, Fukuoka, Japan

Hideki Nozawa, Kayoko Minakata et al., Determination of timiperone in blood and estimation of its new metabolites in urine of a deceased. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine, June 5-8, 2018, Fukuoka, Japan

Itaru Yamagishi, Kayoko Minakata et al., A case of intoxication of a mixture of synthetic cannabinoids EAM-2201, AB-PINACA and AB-FUBINACA, and a synthetic cathinone  $\alpha$ -PVP. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine, June 5-8, 2018, Fukuoka, Japan

Koutaro Hasegawa, Amin Wurita, Kayoko Minakata et al., Identification and quantification of synthetic cannabinoid 5F-ADB-PINACA and its predominant metabolites in an authentic urine specimen. TIAFT2018 the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), August 26-30, 2018, Ghent, Belgium

Kayoko Minakata et al., Diphenidine and its metabolites in blood and urine analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. 54th

Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, August 28-September 1, 2016, Brisbane, Australia

Koutaro Hasegawa, Amin Wurita, Kayoko Minakata et al., Identification and quantification of metabolites of AB-CHMINACA in a urine specimen of an abuser. 54th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, August 28-September 1, 2016, Brisbane, Australia

国内学会 (計 12 件)

南方かよ子、他 8 名。4 名の尿中 5F-PB-22 とその 3 種の代謝物(5F-PB-22 3-carboxyindole, PB-22 *N*-5-hydroxypentyl, PB-22 *N*-pentanoic acid) の LC-MS/MS による高感度分析。日本法中毒学会第 37 年会、2018 年 7 月 6-7 日、東京

南方かよ子、他 9 名。LC-QTRAP-MS/MS と LC-Orbitrap-MS/MS を用いた 3 名の血清・尿中の合成カンナビノイド 5F-NNEI の定量とその代謝物の構造推定。第 43 回日本医用マスペクトル学会年会、2018 年 9 月 6-7 日、札幌

長谷川弘太郎、阿民勿日他、紺野勝弘、橋本貴美子、権守邦夫、南方かよ子、他 4 名。ドクササコ(*paralepistopsis acromelalga*)中のクリチジンの検出と定量。第 40 回日本法医学学会学術中部地方集会、2018 年 10 月 13 日、新潟

野澤秀樹、南方かよ子、他 5 名、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)MS/MS を用いたチミペロンの定量と新しい代謝物の推定。第 101 次日本法医学学会学術全国集会、2017 年 6 月 7-9 日、岐阜

長谷川弘太郎、南方かよ子、他 5 名。ヒト尿中からの合成カンナビノイド MAB-CHMINACA の代謝物の同定と定量。日本法中毒学会第 36 年会、2017 年 7 月 6-7 日、東京

南方かよ子、他 6 名。3 割検尿から検出された 6 種の合成カンナビノイドの LC-MS/MS による高感度分析。日本法中毒学会第 36 年会、2017 年 7 月 6-7 日、東京

南方かよ子、他 7 名。血液・組織中の合成カンナビノイド・合成カチノンの LC-QTRAP MS/MS による高感度分析。第 42 回日本医用マスペクトル学会年会、2017 年 9 月 14-15 日、東京

長谷川弘太郎、南方かよ子、他 5 名。ヒト尿中からの合成カンナビノイド 5F-ADB-PINACA 代謝物の検出。第 39 回日本法医学学会学術中部地方集会、2017 年 10 月 14 日、岐阜

南方かよ子、他 6 名。血液中の抗パーキンソン病薬のマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)-MS/MS を用いた定量法。第 100 次日本法医学学会学術全国集会、2016 年 6 月 15-17 日、東京

長谷川弘太郎、阿民勿日他、南方かよ子、他 5 名。解剖事例におけるメタンフェタミンとアンフェタミンの臓器・体液での再分布の検討。日本法中毒学会第 35 年会、2016 年 7 月 1-2 日、大阪

南方かよ子、他 7 名。ビペリデン代謝物の MALDI-QTOF-MS による分析。第 41 回日本医用マスペクトル学会年会、2016 年 9 月 15-16 日、名古屋

山岸格、南方かよ子、他 5 名。数種の危険ドラッグが死亡に関与している可能性がある 1 割検例。第 38 回日本法医学学会学術中部地方集会、2016 年 10 月 15 日、福井

[その他]

浜松医科大学リポジトリ

HamaMed-Repository

<http://hikumano.hama-med.ac.jp/dspace/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。