

令和元年6月6日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15880

研究課題名(和文) 危険ドラッグ類のヒト代謝産物の高感度機器分析法の開発

研究課題名(英文) Development of sensitive analytical method for metabolites of abused drugs in human samples

研究代表者

長谷川 弘太郎 (Hasegawa, Koutaro)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40574025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)とガスクロマトグラフィー-質量分析計(GC-MS)を用いて、各種危険ドラッグ類・乱用薬物の尿中代謝産物の分析を行った。司法解剖により、危険ドラッグ等の使用が疑われる事例でのヒト尿試料とその他臓器・体液(血液等)試料の採集を行う。合成カンナビノイド類の代謝物はヒト尿中に比較的多く含まれるため、代謝物はマーカーとして有用である。各種危険ドラッグ類の尿中代謝産物に焦点を当てて定性・定量法を開発し、これを用いて実際のヒト試料に対して分析を行った。危険ドラッグ類、乱用薬物について分析を行い、論文や学会を通して報告を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

合成カンナビノイドと側鎖の長いカチノン類では、乱用者の尿からは未変化体を検出する事が大変困難である。ヒト尿は最も侵襲性が少なく、救急外来等での採取も容易であり極めて有用な試料である。この研究では、各種危険ドラッグ類・乱用薬物の尿中代謝産物に焦点を当て、検出・定量法を開発を目指す。実際の乱用者の尿中危険ドラッグ代謝産物研究論文は極めて少ない。この研究では、実際の薬毒物乱用事例での試料を用いて研究を行うことにより、エビデンスレベル・参照価値の高い成果報告が期待される。

研究成果の概要(英文)：Sensitive analytical methods for various abused drugs and its metabolites in authentic human samples including urines using liquid-chromatography tandem-mass-spectrometry and/or gas-chromatography mass-spectrometry were newly established in this study. Authentic human samples such as body fluids and solid tissues for analysis were obtained from autopsies. In intoxication cases due to intake of synthetic cannabinoids, their specific metabolites excreted in urine are thought to be useful as biomarker, because it is very difficult to detect their unchanged parent molecular in urine samples owing to their distribution, excretion and manner of metabolism in human body; concentrations of unchanged synthetic cannabinoids in urine are typically some magnitudes lower than that of metabolites. In this study, metabolites of synthetic cannabinoids and abused drugs were successfully determined in human urine samples, and their usefulness as biomarker were also demonstrated.

研究分野：法医学，法医中毒学

キーワード：危険ドラッグ 合成カンナビノイド 尿中代謝物 死後体内分布/再分布 LC-MS/MS GC-MS

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

危険ドラッグ類の蔓延を受け、日本では薬事法と関税法が大幅に改正され指定薬物の輸入や所持・使用が厳しく規制された。平成 28 年 3 月 9 日時点で包括的に 2340 物質が指定薬物として規制されている。しかし、なお新種の乱用物質（シバガス等）が次々と報告されている。加えて、インターネットを介して危険ドラッグ類は秘密裏に広く流通し、中毒や事故が散見されている。

いっぽう、欧米では今まさに日本での危険ドラッグ類の流行に数年遅れて、これらの流通と蔓延が深刻な社会問題となってきた。過去に日本で報告されたカチノン系化合物や合成カンナビノイド類による中毒事例や死亡例が、主にヨーロッパ諸国と米国から多数報告されるようになった(第 54 回国際法中毒学会, 2016)。これらの主に欧米での流行と事故の多発に伴い、先に流行した日本での危険ドラッグ類の分析と報告はこれまで多数引用・参照されている。

これら危険ドラッグ類および薬毒物の規制のためには、製品並びに使用者の人体試料（尿、血液等）からの規制物質、もしくはその代謝物を高感度かつ特異的に検出する必要がある。

規制物質の証明には未変化体の検出が理想的であるが、特に多くの危険ドラッグ類では人体の尿中に含まれる未変化体量は極微量である(Hasegawa et al., *Forensic Toxcol* 2015; 33: 45-53)。また特に人体試料(血液、臓器等)を分析対象とすると、多くの場合機器分析での検出感度が著しく低下するマトリックス効果が見受けられ(Hasegawa et al., *Forensic Toxcol* 2014; 32: 225-234)、精密かつ高感度な分析をより困難にしている。加えて、危険ドラッグ類等の新しい物質では人体での代謝物情報、代謝経路やその体内分布についての情報が極めて少ない、あるいは未解明であることが多い。

よって、危険ドラッグ類の未変化体に加え、それらの代謝産物の検出・同定方法の開発は分析・鑑定観点から重要である。

2. 研究の目的

この研究では、主に危険ドラッグ類・乱用薬毒物の代謝物に焦点を当て、①法医学解剖試料からのヒト代謝物の高感度分析法の開発 ②人間での各種危険ドラッグ類・乱用薬毒物の代謝経路と体内分布の解明 ③警察試料や病院試料の分析・鑑定への応用 を目指す。

申請者がこれまで取り組んでいる「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」の研究の発展的研究として遂行する。基本的には法医学解剖により各種臓器や体液を採取し、各試料の適切な前処理・分析方法の比較・検討・改良を行い、危険ドラッグ類の代謝産物の高感度分析法の開発することを試みる。得られた成果により主に警察・病院業務での分析や鑑定への応用を目指す。加えて、専門学術雑誌に投稿、あるいは学術学会等での報告を通して、参照価値とエビデンスレベルの高い研究成果の社会への発信を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

① 研究対象試料の入手

研究に当たり、対象ヒト試料の入手は倫理委員会の承認と遺族の同意の許に、主に法医学解剖において行う。乱用薬毒物・危険ドラッグ等の使用が疑われる事例でのヒト臓器・体液(尿・血液等)試料の採集を施行する。また、警察・救急病院試料も適宜、研究対象とする。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いで多くの試料を収集する。加えて、過去に当教室で採取し(Amin et al., *Legal Med* 2016; 19: 113-118)、 -80°C で保存してある試料も用いる。

② 対象物質の推定・同定

入手した試料(製剤・ヒト試料)はまず、当教室で保有する液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)とガスクロマトグラフィー-質量分析計(GC-MS)による含有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高分解能質量分析器による組成推定を行う。最終的な同定は純品とのマスプロファイル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別機関(国立衛生研究所等)にも協力を仰ぎ、標準物質の提供や情報共有を通して推定・同定を試みる。

③ 各試料での対象物質の精密定量分析

各試料の物質の定量分析には基本的に標準添加法を用いる。定性・定量分析のアプローチを製品、採取したヒト試料に対してそれぞれ行い、精密な定量分析を施行しこれらの濃度・分布を明らかにする。

④ 危険ドラッグ類・乱用薬毒物の代謝物の高感度分析法の開発

代謝産物の高感度検出法の開発では、主に用いる装置は当教室で保有・運用するLC-MS/MS (Agilent 1200 LC-SL, Agilent 6460 Triple Quad LC/MS tandem MS)とGC-MS (Agilent 6850 GC, Agilent 5975 mass spectrometry)とする。まずは従来の抽出方法・分析方法を試み、これらの更なる効率化や高感度化、応用を目指す。試料採取では、解剖での採取手技、採取部位の検討、検体の保存方法、保存容器等の検討を行う。抽出手技では、液-液抽出法(抽出溶媒, pH, 塩添加等の抽出条件の検討)、固相抽出法(逆相・イオン交換相, 極性等の比較, 抽出溶媒の比較・検討)、除タンパク法(強酸添加, 有機溶媒, 重金属塩, フィルタリング法の比較・検討)、QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)法の改良を試みる。分析では、LCでの分離(逆相カラム・親水性カラム・疎水性カラムの比較やサイズ・理論段数を検討)、GCでの分離(カラムの各種固定相の検討, 誘導体化の比較)を試み、GC-MSでの感度(検出限界)測定やLC-MS/MSでの感度(検出限界)測定を行う。物質の測定にあたっては、大学の共同実験施設の利用も検討する。

4. 研究成果

これまで、静岡県内で発生した危険ドラッグ類・乱用薬毒物関連事例について、司法解剖を行い、これらからのヒト試料の採取と目的物質の分析を行うことが可能であった。

(1) 合成カンナビノイド MAB-CHMINACA 中毒事例での分析

・試料の入手

過去に、合成カンナビノイドである MAB-CHMINACA が関与した中毒死事例で司法解剖を実施しており、その際に採集した尿試料を用いて分析を行った。

・対象物質の抽出と分析

文献調査により、予想される MAB-CHMINACA 代謝物の標準品を数種類購入し、LC-MS/MS を用いてこれらの質量クロマトグラムとマススペクトルを得た。解剖で得た尿試料を分析し、代謝物の標準品とのクロマトグラムやマススペクトルを比較して照らし合わせることにより、尿中代謝物(MAB-CHMINACA M1, MAB-CHMINACA M11)を明らかにした。ヒト試料からの対象物質の抽出には QuEChERS 法を用いた。

代謝物の定量分析には 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 いずれでも 0.1 ng/mL 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。尿中のこれら代謝物は、 -30°C 、 4°C そして室温保存下で約 1 週間まで比較的安定であった。

・尿試料中の代謝物濃度

MAB-CHMINACA M1 と MAB-CHMINACA M11 の尿中濃度はそれぞれ、 2.17 ± 0.15 ng/mL、 10.2 ± 0.31 ng/mL であった。なお、尿中の MAB-CHMINACA 未変化体は定量下限以下であった。ヒト培養肝臓細胞を用いた研究で予想された結果と、我々の実際の測定とでは代謝物の濃度が大きく異なっており、物質の死後再分布、実験環境による違いや代謝物の極性の影響が考えられた。

・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. Drug Test Anal. 10(2):365-371. 2018).

(2) 合成カンナビノイド 5F-ADB-PINACA 中毒事例での分析

・試料の入手

過去に、合成カンナビノイドである 5F-ADB-PINACA が関与した中毒死事例で司法解剖を実施しており、その際に採集した尿試料を用いて分析を行った。

・対象物質の抽出と分析

文献調査により、予想される 5F-ADB-PINACA 代謝物の標準品を数種類購入し、LC-MS/MS を用いてこれらの質量クロマトグラムとマススペクトルを得た。解剖で得た尿試料を分析し、代謝物の標準品とのクロマトグラムやマススペクトルを比較して照らし合わせることにより、尿中代謝物(ADB-PINACA 5-OH, ADB-PINACA pentanoic acid)を明らかにした。ヒト試料からの対象物質の抽出には QuEChERS 法を用いた。

代謝物の定量分析には 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 いずれでも 0.1 ng/mL 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。加えて、Sciex 社の QTrap-4000 質量分析装置を用いて、尿中の 5F-ADB-PINACA 未変化体の検出が可能であった。

・尿試料中の代謝物濃度

ADB-PINACA 5-OH と ADB-PINACA pentanoic acid の尿中濃度はそれぞれ、 26.7 ± 0.83 ng/mL、 543 ± 63 ng/mL であった。尿中の 5F-ADB-PINACA 未変化体は 89.7 ± 11 pg/mL であった。これまで、実際の中毒事例の尿中から 5F-ADB-PINACA 代謝物を検出・定量した例は報告されておらず、この報告が世界初となった。また、未変化体の分析の有用性も示唆された。

・成果報告

これらの結果をまとめ、第 39 回日本法医学会学術中部地方集会と国際法中毒学会(The 56th annual meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, 2018) で発表を行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1.

Hasegawa K, Minakata K, Gonmori K, Nozawa H, Yamagishi I, Watanabe K, Suzuki O: Identification and quantification of predominant metabolites of synthetic cannabinoid MAB-CHMINACA in an authentic human urine specimen. Drug Testing and Analysis. 査読有 10(2): 365-371. 2018.

2.

Hasegawa K, Amin W, Nozawa H, Yamagishi I, Minakata K, Watanabe K, Suzuki O: 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.

〔学会発表〕（計 2 件）

1.

長谷川弘太郎：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 回日本法医学会学術中部地方集会. 2017. 岐阜.

2.

Hasegawa K, Wurita A, Minakata K, Nozawa H, Yamagishi I, Watanabe K, Suzuki O: Identification and quantification of synthetic cannabinoid 5F-ADB-PINACA and its predominant metabolites in an authentic human urine specimen. The 56th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, 2018.

〔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：

<https://researchmap.jp/40574025/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：阿民勿日他

ローマ字氏名：(AMIN, wurita)

※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。