

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13802  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K10519  
研究課題名(和文) 関節液・関節軟骨試料を用いた数十年前に摂取した薬毒物の超高感度検出法の開発

研究課題名(英文) Development of high-sensitive detection method for compounds taken even decades ago, using human synovial fluid or cartilage specimens

研究代表者  
長谷川 弘太郎 (Hasegawa, Koutaro)  
浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40574025  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、膝関節を構成する要素(関節液、軟骨など)を分析対象とすることにより、コンタミネーションが少なく、かつ検出可能期間がきわめて長期間(数年から数十年を期待)である法医学分野での薬毒物の分析・鑑定方法を開発することである。申請者は、ベンゾジアゼピン系薬物であるトリアゾラムが関与した解剖事例で、左右膝関節液、血液、髄液、心臓液、胃内容物及び胆汁を採取した。これらを試料として、各試料中のトリアゾラム及び代謝物であるヒドロキシトリアゾラムの濃度を測定し、分布を明らかにした。また、法学分野で用いられる定量方法とそのバリデーションについて網羅的調査を行い、総説論文として成果をまとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
法医学分野では、関節液や関節軟骨を対象とした薬毒物分析について、これまでごく少数の膝関節液での報告のみであった。関節軟骨はそのターンオーバー(入れ替わり)が極めて長く、数十年ともいわれている。これら関節構造での薬毒物の分布・死後再分布についての知見や体系的なデータの蓄積は極めて乏しい。本研究では、膝関節を構成する要素(関節液、軟骨など)を分析対象とした高感度分析方法の開発を試みる。この研究により、コンタミネーションが少なく、かつ検出可能期間がきわめて長期間(数年から数十年を期待)である法医学分野での薬毒物の分析・鑑定方法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aim to develop a novel and reliable analytical method for detecting and measuring target xenobiotic(s) administrated far before (up to years) and then contained in various tissues of human joints, such as intervertebral discs and synovial fluids, in forensic cases; it would also be expected to carry out the analysis without contaminations owing to robust and compact anatomical structure of the human joints. Distribution of triazolam and its major metabolite hydroxy-triazolam in synovial fluid, femoral vein and heart blood, cerebrospinal fluid, pericardial fluid, bile and stomach contents obtained from an authentic intoxication case could be determined. In addition, comprehensive review on quantitative methods employed in forensic toxicological field, including matrix matched calibration method, standard addition method and surrogate analyte approach method with their validation, was carried out and published as a review article.

研究分野：法中毒学

キーワード：関節液 関節軟骨 LC-MS/MS 超高感度分析

## 1. 研究開始当初の背景

関節液(synovial fluid)は、関節部位を包む関節包の滑膜によって作られ、潤滑剤として関節内部に分泌されている。さらに関節構造は接触する骨同士の表面が関節軟骨によって覆われている。関節軟骨はそのターンオーバー(入れ替わり)が極めて長期間にわたることが知られており、推定では100年以上とも、実質再生しないとされている(Maroudas et al. Connect. Tissue Res. 1992)。

法医学分野でのヒト試料を対象とした薬毒物分析では、さまざまな臓器や組織(筋肉、脂肪、毛髪など)、液体試料(髄液、眼房水など)がその対象となり得る(Musshoff et al. Forensic Sci. Int. 2004)。しかし、関節液を対象とした法医学分野での薬毒物分析については、これまでごく少数の膝関節液での報告(Deking et al. Am. J. Forensic Med. Pathol. 2014)がなされてきたのみであり、関節液での薬毒物の分布・死後再分布についての知見や体系立ったデータの蓄積は乏しいままである。特に、関節軟骨についての法医学的な薬毒物分析については、申請者は報告を見つけることができなかった。

これまで、申請者はさまざまな薬毒物が関与した司法解剖事例での人体臓器・組織・体液中の薬毒物の分布・死後再分布を明らかにし、高感度分析方法の開発を行ってきた(Wurita, Hasegawa et al. Forensic Sci. Int. 2020, ほか多数報)。

一般的に、法医学分野の薬毒物分析ではさまざまなヒト試料や鑑定対象が死後変化や損壊、汚染(コンタミネーション)の影響を受けてしまう事がしばしば問題となる。例えば、毛髪は採取が容易で薬毒物の使用期間も推定でき、かつ対象の検出可能期間(detection window)も比較的広い試料である(Kuwayama et al. Forensic Toxicol. 2020)。しかし、意図的な散髪(丸刈りなど)や染毛、化学処理によって薬毒物の鑑定を故意に妨害される場合や、さまざまな薬毒物の偶然的付着や故意の塗布・散布などによるコンタミネーションで鑑定結果に錯誤が生じてしまう恐れがある。薬毒物の関与とコンタミネーションとの鑑別では、対象物質のヒト代謝物の検出を併せて行うことが多い。その際にはヒト尿が代謝物検出のための試料として用いられることが多いが、尿を用いた分析では薬毒物の検出可能期間(detection window)はせいぜい数週間程度までと言われている(Deveaux et al. Ther Drug Monit. 2008)。

そこで、本研究では膝関節を構成する要素(関節液、軟骨など)を対象として、死後変化に対して比較的頑健で、コンタミネーションを極力排除でき、かつdetection windowが広い薬毒物分析方法の確立を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、膝関節を構成する要素(関節液、軟骨など)を分析対象とすることにより、コンタミネーションが少なく、かつ検出可能期間がきわめて長期間(数年から数十年を期待)である法医学分野での薬毒物の分析・鑑定方法を開発することである。

関節構造は、比較的頑健な要素(関節包、軟骨など)で構成されている。加えて関節包によって密閉・閉鎖的な構造となっており、分析でコンタミネーションの影響が少なくなることが期待される。さらに、関節軟骨はそのターンオーバーが極めて長い(100年以上とも)と言われている。よって、関節軟骨成分に残留している微量薬毒物の高感度分析方法を開発することにより、これまで証明が不可能であったような遠く過去に摂取した薬毒物の分析・鑑定が期待される。関節液を研究対象とした法医学分野の薬毒物分析はこれまでほとんど報告されておらず、関節軟骨に関しては報告を発見することができなかった。これは、関節液や関節軟骨が鑑定試料として非典型的であるためデータや知見の蓄積が乏しく、鑑定での解釈が難しかったことが考えられる。

これまで申請者は、薬毒物が関与した多くの司法解剖事例で自ら執刀して試料を採取し、ヒト試料中の薬毒物の分布・死後再分布を明らかにしてきた。日本国内で2010年代中盤に流行した危険ドラッグ類の分析・研究では、危険ドラッグ中毒例の法医解剖でヒト各種臓器や血液、尿その他体液、軟部組織を採取し、それらから危険ドラッグ類を抽出し高感度に分析する手法について研究を行った(Hasegawa et al. Forensic Toxicol. 2015, ほか多数報)。申請者が関節液や関節軟骨を司法解剖で採取し、かつ薬毒物の超高感度検出方法を開発することにより、検出可能期間がきわめて長期間に及ぶ鑑定方法の確立が期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では、薬毒物が関与した解剖事例で申請者が関節液や関節軟骨を採取し、これらを試料として対象物質の超高感度検出方法を開発することで、関節構造での薬毒物の存在や分布を明らかにする。加えて、各事例での薬毒物の摂取歴から検出可能期間の検討も行う。

なお、本研究で用いるヒト試料に関しては、基本的に浜松医科大学臨床研究倫理委員会で審査され、承認された研究計画に基づいて取り扱うものとする。なお、法医解剖で採取したヒト試料の取り扱いでは、薬毒物の鑑定を行う目的内での分析を行うものとする。

すでに申請者は予備的な膝関節液中の眠剤成分の分析を行っており、検出と定量分析が可能であった。この結果も踏まえたうえで、以下のように研究を進めていく。

薬毒物が関与した解剖事例で、関節液や関節軟骨を採取する。  
申請者が薬毒物関与の解剖事例で関節液や関節軟骨を採取する。ここでは、試料の採取手技について、適切な関節の穿刺方法や軟骨の採取部位を比較・検討する。

血液や尿試料、その他人体試料を比較対象試料として採取する。  
上記と同じ事例で、血液・尿試料やその他の人体試料を採取する。各事例の背景や対象とする薬毒物に応じて、より適切な人体試料の選択と採取を目指す。

関節液や関節軟骨からの薬毒物の抽出方法を検討する。  
関節液・関節軟骨からの薬毒物の効率的な抽出方法を検討する。ここでは固相抽出、液液抽出、塩析、液液抽出、拡散固相抽出、徐タンパク、リン脂質除去カラム濾過等を比較し、より効率的かつ薬毒物の回収率の高い抽出方法を探る。

分離カラムの選択や機器条件の設定により、最適な分析条件を模索する。  
高感度な分析を目指して、分離条件や分析装置の機器条件を検討する。液体クロマトグラフィー・タンデム質量計(LC-MS/MS)を用いて分析を行う。ODSカラムやHILICカラム、イオン交換カラムや金属フリーカラム等を用い、高感度で高効率な分離カラムを模索する。

定量分析を行い、関節液や関節軟骨、その他人体試料での薬毒物分布を明らかにする。  
関節液、関節軟骨およびその他の比較対象試料(血液・尿、臓器など)での薬毒物の濃度分布を明らかにする。定量分析には、精密な測定が可能である標準添加法を用いる。

関節液や関節軟骨での薬毒物の検出可能期間(数年から数十年程度)を検討する。  
関節液や関節軟骨、その他試料での薬毒物濃度を明らかにしながら、事例の蓄積を行い、検出可能期間が最長でどの程度となるかを明らかにしていく。分析の安定性、回収率やマトリックス効果など分析の評価項目(validation data)について、再現性を検証する。

以上の研究計画により、関節構造での薬毒物の高感度分析方法を確立し、検出可能期間がきわめて長期間(数年から数十年を期待)である薬毒物の分析・鑑定方法の開発が期待される。

加えて、関節液中の薬毒物分布の基礎データの採取のために、ボランティアの協力による薬物動態実験も検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) トリアゾラム関与事例での分析

ベンゾジアゼピン系薬物であるトリアゾラムが関与した解剖事例で、左右膝関節液、血液、髄液、心嚢液、胃内容物及び胆汁を採取した。これらを試料として、各試料中のトリアゾラム及び代謝物であるヒドロキシトリアゾラムの濃度を測定した。

##### ・対象物質の抽出と分析方法

各試料中のトリアゾラム及び代謝物であるヒドロキシトリアゾラムの抽出には、塩析-液液抽出と分散固相抽出を組み合わせた QuEChERS 法を用いた。トリアゾラムとヒドロキシトリアゾラムの標準品を購入し、LC-MS/MS を用いてこれらのプロダクトイオンマスペクトルを取得して、定性及び定量イオントランジションの最適条件を設定した。設定した機器条件を用いて、左右膝関節液、血液、髄液、心嚢液、胃内容物及び胆汁の抽出サンプル中の対象物質の検出及び定量分析を行った。定量分析には、標準添加法を用いた。

##### 結果

左右膝関節液、血液、髄液、心嚢液、胃内容物及び胆汁の抽出サンプル中から、トリアゾラムとその主代謝物であるヒドロキシトリアゾラムがいずれも検出され、定量分析が可能であった。左右膝関節液、大腿静脈血液、右心臓血液、髄液、心嚢液、胆汁及び胃内容物中のトリアゾラム濃度は各々20.7, 22.1, 38.5, 78.3, 23.5, 121, 184, 365 ng/mL であり、ヒドロキシトリアゾラム濃度は各々4.9, 5.6, 25.3, 31.5, 7.5, 44.4, 135, 40.9 ng/mL であった。右膝関節液を用いて グルクロニダーゼによる酵素処理を行ったところ、ヒドロキシトリアゾラム濃度は 55.8 ng/mL と著しく上昇した。関節液中でのトリアゾラム、ヒドロキシトリアゾラム及びその抱合体の分布は血中とは異なることが示唆された。

これらの結果について、第 104 次日本法医学会学術全国集会(2020)で発表を行った(日本法医学雑誌 74(1) 57-57)。また、追加の実験結果を加えて成果をまとめ、論文として学術雑誌に投稿した(Forensic Toxicology, 40:208-214, 2022)。

## (2)法医学試料を用いた物質定量方法の網羅的調査と整理

本研究ではヒト関節液及び関節を構成する人体試料を主な分析対象とするが、法医学分野では薬毒物の分析を行う際に血液や尿といった液体試料が最もよく用いられる。しかし、薬物種やその投与方法、投与時期、試料の状態や変性によっては臓器や組織、毛髪などありとあらゆる試料が採取と分析の対象となりうる。様々な試料を対象とする法医学分野での物質の定量方法やそのバリデーションに関して、これまで報告されてきた方法論や論文の網羅的な調査とその整理を試みた。

### ・調査方法

法医学中毒学や生化学分野で、生体異物(xenobiotics)、内因性物質(endogenous substances)を対象とした定量分析に関する論文類(事例報告や総説含む)や成書について網羅的に調査を行った。例えば、論文データベース(web of science など)を用いて分野横断的に「standard addition method」「validation」「distribution」などといったキーワードで検索を行い、適切な文献を選択した。それから文献の内容を精査し、対象物質や用いられた定量方法、分析のバリデーション手技を抽出して整理した。

### ・結果

法医学分野での試料中物質の定量方法には、matrix matched calibration method (MMCM)、いわゆる内部標準法が頻用されている。ブランク試料の入手が難しい場合の定量方法として、標準添加法が用いられている。しかしながら、特に法医学試料での標準添加法を用いた定量分析の事例では、体系的なバリデーション方法について言及されている文献は極めて少なく、かつその評価項目は体系的とはいえない状況であった。近年では、新たな試みとして安定重水素標識薬を用いた surrogate analyte approach (SAA)法の法医学試料への応用が散見された。

## 成果報告

法医学分野での試料中物質の定量法の網羅的調査を行い、その内容を整理してかつ申請者らの論文や報告の内容も加味し、総説論文として学術雑誌に投稿した(Forensic Toxicology, 39:311-333, 2021)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wang Yue, Pan Yefei, Yang Hongkun, Liu Jinlei, Wurita Amin, Hasegawa Koutaro	4. 巻 40
2. 論文標題 Quantification of MDMA-4en-PINACA and ADB-BUTINACA in human hair by gas chromatography-tandem mass spectrometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 340 ~ 348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11419-022-00615-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Wang Yue, Han Lifeng, Yi Liye, Liu Jinlei, Qiu Shi, Gu Jie, Bai Huiru, Li Jun, Wurita Amin, Hasegawa Koutaro	4. 巻 41
2. 論文標題 Newly emerging synthetic cannabinoid ADB-4en-PINACA: its identification and quantification in an authentic human hair sample by GC/MS/MS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 173 ~ 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11419-022-00643-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Wurita Amin, Suzuki Masako, Miyoshi Naotomo, Minakata Kayoko, Yamagishi Itaru, Nozawa Hideki, Hasegawa Koutaro	4. 巻 40
2. 論文標題 Investigation on toxicological usefulness of synovial fluids, as an alternative matrix: postmortem distribution/redistribution of triazolam and its predominant metabolite - hydroxytriazolam in human body fluids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 208 ~ 214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11419-021-00604-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hasegawa Koutaro, Minakata Kayoko, Suzuki Masako, Suzuki Osamu	4. 巻 39
2. 論文標題 The standard addition method and its validation in forensic toxicology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 311 ~ 333
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11419-021-00585-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wurita Amin, Suzuki Masako, Miyoshi Naotomo, Minakata Kayoko, Yamagishi Itaru, Nozawa Hideki, Hasegawa Koutaro	4. 巻 40
2. 論文標題 Investigation on toxicological usefulness of synovial fluids, as an alternative matrix: postmortem distribution/redistribution of triazolam and its predominant metabolite - hydroxytriazolam in human body fluids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 208 - 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11419-021-00604-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
中国	Inner Mongolia Medical University		