

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790646

研究課題名(和文) 催眠薬代謝物の合成, 分析及び催眠薬代謝に対する法医学的アプローチ

研究課題名(英文) Synthesis and analysis of hypnotic metabolites and forensic toxicological approach to hypnotic metabolism

研究代表者

山口 晃志 (YAMAGUCHI, Koji)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：90465344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠薬クアゼパムを服用していた死者の胆汁、尿、血液からクアゼパム及びその代謝物を定量した。胆汁には一部の代謝物が非常に高い濃度で含まれていた。さらに、胆汁中に新たな代謝物を発見した。睡眠薬ゾルピデムを服用していた死者の胆汁、尿について、ゾルピデム代謝物を分析したところ、既知の代謝物の他にピリジン環が水酸化された代謝物が発見された。睡眠薬トリアゾラムの水酸化体のグルクロン酸抱合体を合成し、これを標準品としてトリアゾラム服用者の尿から直接抱合体を検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Quazepam (a benzodiazepine-type hypnotic) and its metabolites in blood, bile, and urine, which were obtained from a deceased who had administered quazepam before death, were quantified. Concentrations of some metabolites in bile were extremely high. Furthermore, we found several novel quazepam-metabolites in the bile. Metabolites of zolpidem, a non-benzodiazepine-type hypnotic, in bile and urine obtained from a man who had administered zolpidem before death were investigated. Hydroxyzolpidem, which has a hydroxyl group on the pyridine ring, was found along with known zolpidem metabolites, M1-4. The glucuronide of hydroxytriazolam was synthesized. And by using the synthetic product as authentic standard, the glucuronide was detected from urine obtained from a man who had ingested triazolam.

研究分野：法医学(法医中毒学)

キーワード：ゾルピデム クアゼパム トリアゾラム 代謝物 睡眠薬 胆汁 LC-MS/MS LC-IT-TOF MS

1. 研究開始当初の背景

埼玉県結婚詐欺殺人事件など、催眠薬を用いて眠らせた上で自殺に見せかけて殺害する殺人事件が発生した。これに伴い、解剖において死者が催眠薬を服用したかどうかを検査することの重要性が再認識されている。

事件で催眠薬が使用されたことを立証する場合、事件の経緯と資料中の催眠薬由来物質の濃度が符合するかどうか重要であり、そのため、催眠薬の代謝に関する詳細な知見が必要である。現在の法医学中毒学では、既存の薬物動態の研究結果を用いて薬物濃度を解釈している。しかし、それらの研究は薬理作用を念頭に置いたものが多く、未変化体や活性代謝物のみに着目していたり、血中濃度しか分析されてないなど、法医学分野で応用するには不十分なものも多い。生理活性を持たないものが高濃度で存在する代謝物を分析、血液だけでなく、尿、胆汁、筋肉、臓器なども分析、など、法医学独自の視点で薬物の代謝・排泄を研究すれば、催眠薬が用いられた事件が発生した時に事件の経緯を理解する上で有用な知見となる。

一方、薬毒物分析には技術的な問題もある。薬毒物を分析するには、分析対象となる物質の標準品が必要である。しかし、催眠薬の未変化体と比べて代謝物は標準品が入手困難な場合が多い。標準品が入手できないために分析できない代謝物も多い。

2. 研究の目的

法医学の視点に立って、改めて催眠薬の代謝について調査する。

(1) 催眠薬の未変化体に加えて、代謝物も分析できる方法を開発する。また、血液だけでなく、法医学ならではの資料、すなわち、尿、胆汁、胃内容なども分析し、代謝物の分布を明らかにする。

(2) 未知の代謝物を探索する。特に、尿や胆汁には生理活性がないものの濃度の高い代謝物が存在する可能性がある。これらの物質の構造を明らかにする。薬物の代謝を法医学的に考察する上で有用なものと判断されれば、その分析法を考案する。

(3) 標準品が入手できない代謝物については合成する。

(4) 得られた結果から代謝物の濃度が事案の概要とどのように関連付けられるか検討する。

3. 研究の方法

(1) 剖検資料を分析した。催眠薬が含有されていた場合、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) や液体クロマトグラフ-イオントラップ-飛行時間質量分析計 (LC-IT-TOF MS) などを用い、既存の代謝物に加えて未知の代謝物が含まれているかどうかを調査した。未知の代謝物が発見された場合には、分析機器の性能を最大限に利用して、その構造を可能な限り明らかにした。

(2) 催眠薬代謝物のうち入手困難であり、かつ催眠薬の代謝を研究する上で重要な代謝物を合成した。合成には未変化体や類似化合物の合成法などを参考にした。有機合成分野の学術論文だけでなく、特許なども注意深く調査し、もっとも可能な方法を適用した。

(3) 合成で得られた代謝物を標準品として用い、催眠薬の未変化体と代謝物が同時に検出・定量できる分析法を確立した。抽出は固相抽出、液-液抽出、除タンパクなどを一通り試みた後、もっとも成績の良いものを適用した。代謝物は水酸基やカルボキシル基などを有しているため難揮発性であることが多いことから、誘導体化が不要な LC-MS/MS を用いた。

(4) 確立された分析法を用いて剖検資料中の催眠薬を分析した。検出下限、定量下限、回収率、マトリックス効果、安定性など、分析法バリデーションの各パラメータを調査した後、剖検資料を分析した。得られた結果と事案の概況とを詳細に比較検討して、催眠薬の服用状況が分析結果にどう反映されるかを検討した。

4. 研究成果

(1) クアゼパム (QZP、長期作用型ベンゾジアゼピン系催眠薬) を服用していた死者の剖検資料からクアゼパムとその代謝物を分析した。これまでの研究からクアゼパムの代謝経路は、オキソ体 (オキソクアゼパム、OQ) となった後、3-水酸化体 (3-ヒドロキシオキソクアゼパム、HOQ)、N-脱アルキル体 (N-デスアルキルオキソクアゼパム、DOQ) を与える。DOQ はさらに3位が水酸化して3-ヒドロキシ-N-デスアルキルオキソクアゼパム (HDOQ) を与える、と報告されている。そこで、これらの代謝物の心臓血、大腿血、尿、胆汁、及び胃内容の濃度を求めた。

QZP の代謝物のうち、HDOQ は入手ができなかったため、HDOQ を合成した。2-アミノ-4-クロロ-2'-フルオロベンゾフェノンにヒドロキシアミンを反応させてオキシムとし、オキシムと塩化クロロアセチルとの反応により 2-(クロロメチル)-4-(2-フルオロフェニル)-6-クロロキナゾリン N-オキシドを得た。

水酸化ナトリウムで処理して DOQ の N-オキシドにした後、無水酢酸との反応でアセチル HDOQ にし、加水分解で HDOQ を得た。

抽出は、血液資料には HLB による固相抽出を適用した。一方、胆汁にこの方法を用いると、胆汁色素が多量残ってしまった。様々な方法を試みた結果、酢酸エチルで一度液-液抽出した後、抽出液を PSA 樹脂に通すことで色素を取り除くことに成功した。

LC-MS/MS を用いた分析では良好な結果で、分析法バリデーションの条件も満たした。

剖検資料を分析した結果、血中濃度は QZP

≠OQ<<DOQであった。この結果は死者が定期的にQZPを服用していたため、半減期が長いDOQが蓄積したと考えられた。OQとDOQの血中濃度比較は長期服用の指標として利用できる可能性がある。

また、HOQは胆汁に非常に高濃度に蓄積していた。これはHOQが腸肝循環によって蓄積したと考えられた。

胆汁にHOQが高濃度で検出されたことから、胆汁には未知の代謝物がHOQのように蓄積している可能性が考えられた。そこで、胆汁中の未知のQZP代謝物を調査した。分析はLC-IT-TOF MSを用いた。その結果、OQ、HOQの水酸化体、もしくはメトキシ-ヒドロキシ体が構造異性体も含めると何種類も含まれていることが確認された。多段階の質量分析(MSⁿ)の結果から、これらの代謝物の水酸基及びメトキシ基は2-フルオロフェニル基上にあることが分かった。しかし、2-フルオロフェニル基上のどこに水酸基及びメトキシ基があるか、は特定できなかった。

存在が確認された代謝物は、標準品の合成を試みている。4-クロロアニリンを出発として合成する予定である。

胆汁に蓄積している代謝物は全て水酸基を有している。これは、水酸基にグルクロン酸などが抱合して腸肝循環することで胆汁に蓄積したことを示唆している。

腸肝循環によって一部の代謝物が長く体内に留まる性質を利用して、様々な情報が得られる可能性がある。例えば、腸肝循環をする代謝物とそうでない代謝物の胆汁中の濃度比を、薬物の服用時間や服用期間の推定などに応用できる可能性がある。

(2) ゾルピデム(非ベンゾジアゼピン系催眠薬)を服用していた死者の剖検資料からゾルピデム代謝物を分析した。ゾルピデムの代謝経路はこれまでの研究により、2つのメチル基のいずれかが水酸化、さらなる酸化によってカルボン酸になり、尿中に排泄されることが分かっている。しかし、剖検資料の胆汁及び尿を分析したところ、これらの代謝物の他にピリジン環が水酸化された代謝物が存在し、しかもその濃度がメチル基の水酸化体よりも高いことが示唆された。

ピリジン環の水酸化される位置は5、7、8位の3つが考えられる。しかし、LC-MS/MSの結果はピリジン環上のどこが水酸化されているのか、明らかにできなかった。そこで、それらの標準品の合成を試みた。

8-ヒドロキシゾルピデムは以下の方法で合成した。4-(4-メチルフェニル)-4-オキソ酪酸のカルボン酸をジメチルアミドにした後、3位をプロモ化。2-アミノ-3-プロモ-5-メチルピリジンとの反応により8-プロモゾルピデムを合成。プロモ基をメトキシ基に置換。塩化アルミニウムにより脱メチル化。LC-MS/MS分析したところ、8-ヒドロキシゾルピデムは胆汁及び尿に存在した代謝

物と質量スペクトルは一致したものの、保持時間が大きく異なっていた。この結果から、胆汁及び尿に存在する代謝物は8-水酸化体ではないことが分かった。

今後、7-ヒドロキシ体及び5-ヒドロキシ体の合成を目指す予定である。

(3) トリアゾラムの尿中代謝物である-ヒドロキシトリアゾラム(HT)のグルクロン酸抱合体(HTGlu)を合成した。まず、2-アミノ-4,2'-ジクロロベンゾフェノンから4段階でHTを合成した。2,3,4-トリ-O-アセチル-1-O-(トリクロロアセトイミドイル)-D-グルクロン酸メチルをHTに作用させてグルクロン酸部分を導入し、保護基であるアセチル基とメチル基を脱離させた。ベンゾジアゼピン系薬物は複雑な構造であるため、グルクロン酸部分の導入は困難と予想されたが、十分実用的な収率で合成できた。しかしながら、グルクロニドは新水性が高いため、最終生成物の精製が非常に困難であった。

一般的にはグルクロン酸抱合体は新水性が高いため、逆相カラムへの保持が弱く、LC-MS/MSによる分析が困難であると予想されたが、初期の移動相を水95%から始めるグラジエント分析にすることで分析可能であった。

実際の剖検資料からHTGの検出にも成功した。

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2件)

Koji Yamaguchi, Makiko Hayashida, Youkichi Ohno, Analysis of 11-nor-9-carboxyl- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in human blood and bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after derivatization with ethyl chloroformate and amines, Forensic Toxicology, 査読有、32巻、2014、51-58 DOI: 10.1007/s11419-013-0200-y
Jing Zhou, Koji Yamaguchi, Youkichi Ohno, Quantitative analysis of quazepam and its metabolites in human blood, urine, and bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Forensic Science International, 査読有、241巻、2014、e5-e12 DOI:10.1016/j.forsciint.2014.04.027

[学会発表](計7件)

山口晃志, 林田真喜子, 大野曜吉, Synthesis and analysis of glucuronides of -hydroxyalprazolam and -hydroxytriazolam, The 50th annual meeting of the international

association of forensic toxicologists、
2012年06月03日～2012年06月08日、
静岡県浜松市

山口晃志、林田眞喜子、大野曜吉、検資
料中のクアゼパム及びその代謝物の分析、
第97次日本法医学会学術全国集会、2013
年6月26～28日、札幌

山口晃志、林田眞喜子、大野曜吉、クロ
ロギ酸エチルとアミンによる誘導体化を
利用したLC-MSによる血液及び胆汁中
の11-ノル-9-テトラヒドロカナビノール-9-カルボン酸の分析、日本法中毒学会
第32年会、2013年7月5～6日、柏

山口晃志、周婧、合田隆大、大野曜吉、
剖検で得られた胆汁に含まれるクアゼパ
ム代謝物の構造解析、日本法中毒学会第
33年会、2014年7月4～5日、名古屋

周婧、山口晃志、大野曜吉、Quantitative
analysis of quazepam and its
metabolites in human blood, urine, and
bile by liquid chromatography-tandem
mass spectrometry、9th International
symposium on advances in legal
medicine、2014年6月16～20日、福岡

山口晃志、合田隆大、大野曜吉、
Structural analysis of quazepam
metabolites in bile by ion-trap
time-of-flight mass spectrometry、The
52th annual meeting of the
international association of forensic
toxicologists、2014年11月9～13日、
プエノスアイレス

山口晃志、勝又美穂、大野曜吉、剖検で
得られた胆汁及び尿に含まれるゾルピデ
ム代謝物の分析、日本法中毒学会第34年
会、2015年6月26～27日、福岡

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 晃志(YAMAGUCHI, Koji)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：90465344

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし