

27C-am03

LC-MS/MS を用いたヒト生体試料中危険ドラッグ成分のスクリーニングおよび定量分析

○河村 麻衣子¹, 花尻 (木倉) 瑠理¹, 前橋 恭子², 松本 紗里², 岩楯 公晴², 袴塚 高志¹
(¹国立衛研, ²慈恵医大)

【目的】近年、危険ドラッグ製品摂取に起因する被害事例が急増し、大きな社会問題となっている。これらの製品中には物性の異なる複数の化合物が添加されている場合が多く、また被害者が摂取した製品情報が得られない事例もあることから、生体試料中の薬物分析は困難となっている。そこで我々は、ヒト生体試料からの迅速かつ広範囲な危険ドラッグ成分検出を目的とし、LC-MS/MS を用いたスクリーニング分析法を検討した。また、死亡事例より採取した血清、尿試料に本分析法を用いて、対象化合物の検出を試みた。

【方法】スクリーニング対象化合物として 132 化合物(合成カンナビノイド 66, カチノン類 38, その他 28 化合物)に着目し、各分析用標品を添加したヒトコントロール血清および尿試料を用いて、0.1% ギ酸とアセトニトリルのグラジエント条件で LC-MS/MS 分析(BEH C18, 2.1 × 100 mm, 1.7 μm)を行い、保持時間, MRM 条件, 回収率, 検出限界等を検討した。さらに、死亡事例 4 名の試料について、血清 4 試料はタンパク除去後、尿 3 試料は酵素処理後に *t*-butyl methyl ether で抽出してスクリーニング分析を行い、検出した化合物については、代謝物と共に定量分析を行った。

【結果】132 化合物を分析した結果、本分析条件において全ての化合物が保持時間 30 分以内に溶出し、回収率は約 50-100%, 検出限界は 0.05-0.5 ng/mL となった。血清 4 試料を分析した結果、試料 1 から MDPPP (587 ng/mL), AH-7921 (235 ng/mL), カチノン類 9 の計 11 化合物, 試料 2 から 5F-QUPIC (0.5 ng/mL) と 5 代謝物, 試料 3 から α-POP (8 ng/mL), 5F-QUPIC の 5 代謝物, カチノン類 2 の計 4 化合物, 試料 4 から α-PHP (90 ng/mL), 5-APDB (5 ng/mL), 5F-AB-PINACA (7 ng/mL) と 2 代謝物, カチノン類 7 の計 10 化合物を検出した。尿試料では、5F-QUPIC の未変化体は検出されなかったが、その他は血清試料と同様の化合物が検出可能であった。

28PA-pm056

尿中危険ドラッグの抽出方法の検討

○城 克己¹, 津村 ゆかり¹, 高木 敏之¹ (¹近畿厚生局麻薬取締部)

【目的】2014年11月現在、医薬品医療機器等法により指定薬物として1429物質が指定され、4月から使用罪が施行されている。その使用証明のため、使用者の尿から指定薬物を幅広く検出することの出来る方法が求められている。そこで、未変化体が尿中にほとんど排泄されない合成カンナビノイドを除く指定薬物10物質について、尿に対する添加回収実験を行い、抽出方法を検討した。

【方法】指定薬物10物質

(5-IAI, D2PM, 4F-Methcathinone, 5MeO-MIPT, DOI, 2, 3-DCPP, ethylfenidate, PV9, acetylfentanyl, methiopropamine) 混合液を添加した尿に対し、pH・抽出溶媒・溶媒量等を変化させ、GC (Agilent 5975C FID DB-5MS, 30m×0.25mm i.d 膜厚 0.25µm, He 1.9mL/min split 昇温条件 100°C 1min-10°C/min-325°C) にて回収率を測定した。

【結果】pH9以下ではDOI, 5-MeO-MIPTのヘキサン溶媒における回収率が10%以下であった。それ以上のpHにおいて回収率は40%以上であり、大きな違いは確認されなかった。種々の抽出溶媒を用いて回収率を検討したところ、酢酸エチル77.8%、ヘキサン-酢酸エチル等量混合液77.5%、ヘキサン57.2%、クロロホルム：イソプロパノール=3：1混合溶液55.2%であった。濃縮後の試料液から、酢酸エチルを用いた場合、ヘキサン-酢酸エチル等量混合液より約1.4倍多く夾雑物が検出された。

【考察】尿の前処理方法として、塩基性で分解するとされる薬物があることを考えるとpHは9~10の間にする、抽出溶媒はヘキサン-酢酸エチルの等量混合物を用いることが望ましいと考えられた。

28PA-pm028

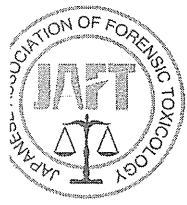
大麻の SSR マーカーによる系統識別

○緒方潤¹, 阿久津守², 河野徳昭³, 吉松嘉代³, 川原信夫³, 花尻(木倉)瑠理¹, 袴塚高志¹ (¹国立衛研, ²関東麻取, ³医薬基盤研・薬植セ)

【目的】アサ科アサ属の大麻 *Cannabis sativa* L. は世界中に多様な変異系統の存在が認められている。日本では、海外から違法に大麻種子が輸入・栽培され、検挙される事例が数多く報告されており、このような種内変異を DNA 塩基配列情報より明らかにすることは、大麻の来歴・由来を解明する上で重要と考えられる。SSR (simple sequence repeat) はマイクロサテライト又は STR と呼ばれ、2~6 塩基を単位とした縦列反復配列であり、ゲノム中に多数散在している。SSR は反復単位の繰り返し数の変異が大きく、SSR に隣接している特異的な配列をプライマーとして、SSR を含む DNA 断片を PCR 増幅し、電気泳動により増幅産物の塩基数を比較し多型を検出することにより系統識別を行う。本研究では大麻の SSR プライマーによる多型性を検討したので報告する。

【方法】海外から入手した大麻種子 16 系統および国内保存系統種子 (メキシコ産系統, トチギシロ) の各 1 粒について、Maxwell 16 (Promega) を用い DNA の抽出を行った。各 DNA 試料について既報の SSR マーカー(2 塩基および 3 塩基モチーフ (M13 tailed primer)) を用い PCR 増幅を行った。増幅産物を DNA シーケンサにより分離・検出し、内部標準のサイズスタンダード (500 ROX) を用いて GeneMapper ソフトウェアにより各 SSR の型判定を行った。

【結果】SSR マーカー 11 種を用いた多型解析では、海外入手大麻種子 16 銘柄間および同一品種間においても多型が観察され、最大で 11 種のアレルが検出された。同一系統間 (8 サンプル) で単一アレルを示したマーカーは 1 種のみであった。また、Dual-suppression-PCR 法による 4 塩基モチーフの SSR マーカーの開発を試みたので合わせて報告する。



日本法中毒学会 第34年会

The 34th Annual Meeting of Japanese Association of Forensic Toxicology

会期

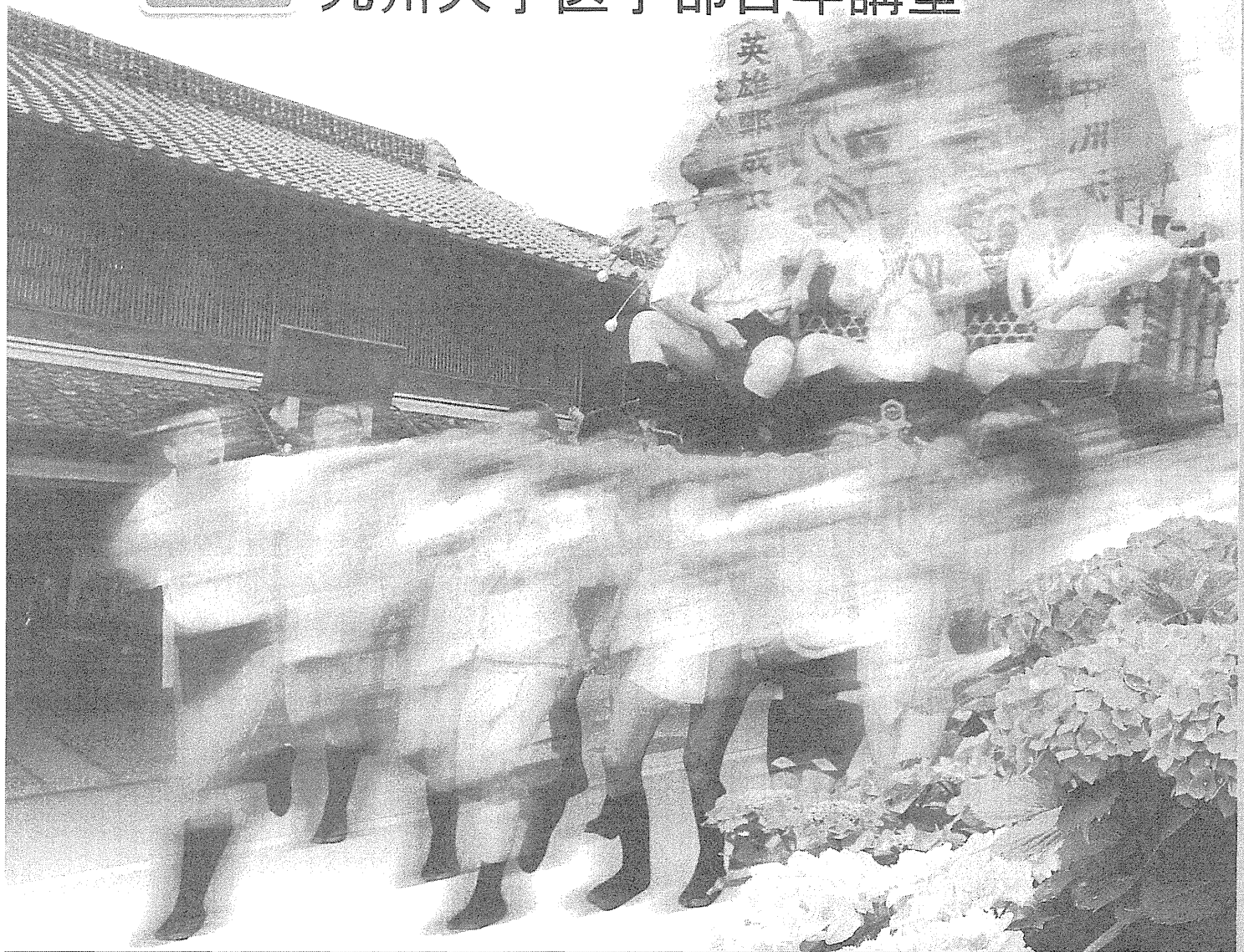
2015年 6月26日(金)・27日(土)
(平成27年)

年会長

山田 英之 九州大学大学院薬学研究院
分子衛生薬学分野 教授

会場

九州大学医学部百年講堂



講演要旨集

【目的】昨今、危険ドラッグ製品に起因すると考えられる健康被害や交通事故等が問題となっている。これら製品中から、合成カンナビノイド、カチノン類、フェネチルアミン類などの他に、最近では、麻薬成分であるフェンタニル、ケタミン、フェンシクリジン (PCP) の構造類似体などが検出されている。一方、救急医療機関等では、簡易的に薬物を識別する際に、市販の簡易薬物スクリーニングキットが使用されている。既存のキットとして Triage DOA などがあるが、いずれも合成カンナビノイド、カチノン類、フェンタニル類、ケタミン類は対象となっていない。我々は既に、合成カンナビノイドの簡易スクリーニングキット Drug check® K2/Spice Test を用いた検討結果を報告している [1]。本研究では、5 種類の法規制薬物 (フェンタニル、ケタミン、PCP、メタンフェタミン、MDMA) それぞれを検出対象薬物とした市販の各簡易薬物スクリーニングキットを用いて、法規制薬物及び未規制薬物を対象として検出法の評価を行った。

【方法】フェンタニル類 7 化合物、ケタミン類 6 化合物、PCP 類 12 化合物、メタンフェタミン類 25 化合物 (カチノン類 15 化合物を含む)、MDMA 類 24 化合物の計 74 化合物を使用した (麻薬 18 化合物、覚せい剤 2 化合物、向精神薬 3 化合物、指定薬物 21 化合物、未規制 30 化合物)。危険ドラッグ製品については、植物系 5 製品 (危険ドラッグ成分含有 3 製品、危険ドラッグ成分未検出 2 製品)、液体 2 製品 (危険ドラッグ成分含有)、粉末 2 製品 (危険ドラッグ成分含有 1 製品、危険ドラッグ成分未検出 1 製品) を用いた。簡易薬物スクリーニングキットは、上記 5 種類の法規制薬物それぞれに特化した検出キット 5 種類及び複数薬物同時検出キット 2 種類 : Status DS10 (10 化合物検出、関東化学) 及び Triage DOA (8 化合物検出、シスメックス社) を用いた。各キットは本来尿試料中の薬物検出に使用されるが、今回の試料溶液は、各化合物及び製品 (粉末及び液体) の水溶液または 0.001~1% MeOH 水溶液とした。植物系危険ドラッグ製品は、MeOH 抽出液の希釈水溶液を用いた。

【結果】複数薬物同時検出可能な 2 種のキットを含め、各検出キットにおいて、例外はあるものの、各対象薬物の一置換体 (ハロゲンやメチル基など) が概ね陽性の結果となった。フェンタニル類は、7 化合物中 5 化合物が陽性であり [検出限界濃度 (LOD) 1~250 ng/mL]、ケタミン類は、6 化合物中 3 化合物が陽性であった (LOD : 1~250 µg/mL)。PCP 類は、12 化合物中 8 化合物が陽性であり (LOD : 25 ng/mL~10 µg/mL)、メタンフェタミン類は、10 化合物中 8 化合物が陽性であった (LOD : 0.5~10 µg/mL)。また、カチノン類は、メタンフェタミン検出キットを用いたところ、15 化合物中メトカチノンを含む 3 化合物が陽性であった (LOD : 5~10 µg/mL)。MDMA 類は、24 化合物中 5 化合物が陽性であった (LOD : 0.5~10 µg/mL)。危険ドラッグ製品については、対象薬物含有製品のみが陽性であったことから、製品自体への応用も可能であると考えられた。

【考察】今回検討を行ったキットでは、法規制薬物及び未規制薬物を区別することは困難であった。しかし、新たな流通が危惧されるフェンタニル、ケタミン、PCP 等の構造類似体の簡易検出法の一つとして有用であると考えられ、今後、救急医療機関などでの活用の可能性が示唆された。

【参考文献】 [1] 内山奈穂子他 (2015) 薬学雑誌 135(3): 535-541.

1P-03

合成カンナビノイド分析における光イオン化(PI)GC/MSの有用性の検討

○阿久津 守¹, 杉江 謙一¹, 斉藤 貢一²

¹ 関東麻取・鑑定課, ² 星薬大・薬品分析化学

【目的】GC/MS(EI)法は、合成カンナビノイド分析において汎用されている機器分析法の1つであるが、分子イオン情報を得にくいいため、GC/MS(CI)法などにより分子イオン情報を得ているところである。合成カンナビノイドの同定には、EI法とCI法を並行して実施することで、同定の精度が増すが、両方法で共に測定するには、EI、CI各イオン源が設置された複数のGC/MSで並行して行うか、EI、CIイオン源を交換しなければならない。また、CI法では、最適化する条件検討が必要であることから、GC/MS測定において簡便に分子イオン情報が得られる他のイオン化法が望まれている。近年、分子イオン情報が容易に得られるイオン化法として、光イオン化(Photoionization:PI)GC/MS法が開発されたことから、本研究では合成カンナビノイド(62化合物)の分析にPI法を適用し、合成カンナビノイド分析におけるGC/MS(PI)法の有用性について検討することとした。

【方法】標準品：合成カンナビノイド 62 化合物を① Naphthoylindoles, ② Bezoylindoles, ③ Naphthoylpyrroles, ④ Naphthoylindazoles, ⑤ Carboxamide derivatives, ⑥ Naphthoylbenzimidazoles, ⑦ Naphthoynaphthalenes, ⑧ Cyclopropyles, ⑨ Phenylacetylindoles, ⑩ Carboxyindoles, ⑪ Quinolinylnyl carboxylates, ⑫ Naphthoyl carboxylates, ⑬ Cyclohexylphenols の 13 種類に分類し、各化合物をメタノールで溶解して、0.1 mg/mL に調製したものを試料とした。なお、合成カンナビノイド全 62 化合物は Cayman Chemical 社製のものを使用した。装置：GC 部 Agilent 7890B, MS 部 日本電子 JMS-Q1050GC, 測定条件：カラム：Agilent 社製 DB-5MS (30 m×0.25 mm i.d, 膜厚 0.25 μm), キャリアーガス：He, 1.0 mL/min, 注入法：スプリットレス(PI 法) スプリット(EI 法), 注入量：2 μL(PI 法) 1 μL(EI 法), 注入口温度：230°C, カラム温度：60°C (1 min hold)－10°C/min－150°C (3 min hold)－10°C/min－300°C (22min hold), イオン化法：PI 法 EI 法, イオン源温度：150°C(PI 法) 200°C(EI 法),

【結果】PI 法により測定した合成カンナビノイド 62 化合物のうち、全化合物から分子イオンを観測することができ、そのうち、分子イオンピークのみ観測されたものは 35 化合物であった。また、その他の化合物も分子イオンピークの外、フラグメントイオンピークも観測されたが、うち 8 化合物は分子イオンピークが基準ピークとならないものであった。これは、開裂を起こしやすいメチルペリジニル基を持った化合物などであり、PI 法のようなソフトなイオン化でも容易に開裂を起こしてしまう化合物の存在が確認された。また PI 法の問題点として、EI 法と比較すると感度が低く、注入に際してはスプリットレスで測定を行ったが、Quinolinylnyl carboxylates のように、スプリットレスで測定した場合、多くがエステル交換体や 8-Quinolinol へ分解してしまうもの[1]があった。

【考察】PI 法は、一部の合成カンナビノイド類においては再検討の必要はあるものの、CI 法で必須となる試薬ガス等は不要であり、EI 法と共用イオン源の使用により、切替作業のための真空解除も不要であるため、容易に EI 法から PI 法へ切り替えできることは、複数の GC/MS 装置を有していない機関にとって大きな利点である。以上のことから、PI 法は、合成カンナビノイド分析において分子イオンを確認できる有用な方法であると考えられた。

【参考文献】1. Tsujikawa, K., Yamamuro, T., Kuwayama, K., Kanamori, T., Iwata, Y., Inoue, H., Thermal degradation of a new synthetic cannabinoid QUPIC during analysis by gas chromatography-mass spectrometry, J Forensic Toxicol., 32(2), 201-207 (2014).

DNA 情報を用いた幻覚性植物の鑑定事例

○緒方 潤, 花尻 (木倉) 瑠理, 袴塚 高志
(国立医薬品食品衛生研究所)

[目的]

近年, 危険ドラッグ市場では, 「Spice」をはじめとして植物の乾燥物, 粉碎物に, 合成化合物を添加し販売する「脱法ハーブ」が出現し, ニュースや事件として社会問題化している. それに伴い, 指定薬物指定の強化や, 包括指定の導入など危険ドラッグ対策が進められている. 国立衛研では継続的に化学的, 分子生物学的手法を用いた危険ドラッグ製品の分析を行っている. これまでに, 分子生物学的手法を用いた解析では, 合成化合物の他に, 「脱法ハーブ」中に大麻 (*Cannabis sativa*), 指定薬物であるサルビア・ディビノラム (*Salvia divinorum*), 幻覚性植物であるクラートン (*Mitragyna speciosa*) の混入を確認している.

本研究では, 分析の結果, 合成化合物が検出されなかった植物製品を対象とし, DNA 塩基配列情報を用いた植物片の基原種調査を行い, 植物系違法ドラッグ製品として流通が認められた幻覚性植物の分析・鑑定を行ったので報告する.

[方法]

合成化合物の含有が認められなかった植物製品 14 試料 (葉 7 試料, 茎 2 試料, 花卉 1 試料, 種子 2 試料, 菌糸体 2 試料) を調査対象とした. 各試料 (約 20 mg) を 5 mm ジルコニアビーズとともにエッペンドルフチューブ (2 mL) に入れ, 液体窒素で凍結させた後, MM-300 (Qiagen) により粉碎した. 粉碎した各試料は Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega) 内の溶出液に懸濁・溶解し, Maxwell 16 (Promega) を用い DNA を抽出・精製した. 回収 DNA 溶液, 各 200 μ L

中の 1 μ L を PCR 反応に用いた.

各回収 DNA 溶液を鋳型として葉緑体 DNA 上の *trnL-trnF*, *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, *rpl16* inron の各領域, 核 DNA 上の ITS 領域を, 植物・菌類において保存性の高い配列を基にして作成されたユニバーサルプライマーを用い, Ex Taq (Takara) および Ampdirect plus (Shimadzu) を使用し, 以下のプログラムで PCR 増幅した (95°C 180sec; 94°C 30sec, 54°C 30sec, 72°C 90sec, 30cycle; 72°C, 300sec). 1%アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認後, ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿を行い, ダイレクトシーケンスを行った. また, ダイレクトシーケンスで配列が決定できないものは, 上記 PEG 沈殿後の一部を用い, Mighty TA-cloning Kit (Takara) によりクローニングを行い, 塩基配列を決定した. 用いたプライマーを以下に示す.

trnL-trnF forward primer;

5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'

trnL-trnF reverse primer;

5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'

rbcL forward primer;

5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'

rbcL reverse primer;

5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'

matK forward primer;

5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3'

matK reverse primer;

5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3'

psbA-trnH forward primer;

5'-CGAAGCTCCATCTACAAATGG-3'

psbA-trnH reverse primer;
5'-ACTGCCTTGATCCACTTGGC-3'
ITS forward primer;
5'-CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG-3'
ITS reverse primer;
5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
rpl16 forward primer for cactuses;
5'-GCTATGCTTAGTGTGTGACTCGTTG-3'
rpl16 reverse primer for cactuses;
5'-CGTACCCATATTTTTCCACCACGAC-3'
ITS forward primer for fungi;
5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
ITS reverse primer for fungi;
5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'
ITS LS forward primer for fungi;
5'-TCGATGAAGAACGCAGCG-3'
ITS LS reverse primer for fungi;
5'-ATCCTGAGGGAAACTTCGGCA-3'

[結 果]

今回供試した検体 14 試料は、葉、茎、花卉、種子、菌糸体（菌床）であったが、いずれも上記方法で DNA の抽出は可能であり、電気泳動による PCR 増幅産物の確認も明瞭であった。各領域を増幅後、各増幅産物の塩基配列を決定し、国際塩基配列データベース（DDBJ/EMBL/GenBank）に登録されている配列と比較した。配列比較においてデータベース上に登録されていない「塩基配列領域」、「生物種」も存在するため上記分析領域を総合的に判断した。また、サボテンの分析には *rpl16* 領域、菌糸体の分析には ITS の LS 領域に関しても調査した。

今回用いた分析検体から *Psychotria viridis*（アカネ科 チャクルーナ）、*Mimosa tenuiflora*（マメ科 ジュレマ）、*Argyria nervosa*（ヒルガオ科 ハワイアンバイビードローズ（種子））、*Echinopsis pachanoi*（サンペドロ、柱状サボテン）、

cubensis（ミナシビレタケ（菌糸体（穀類菌床））、*Turnera diffusa*（トケイソウ科 ダミアナ）、*Nymphaea* sp.（スイレン科 熱帯性スイレン）、*Calea ternifolia*（キク科 ドリームハーブ）、*Nelumbo nucifera*（ハス科 ハス）のそれぞれ 9 種類の植物・菌類が同定された。また、分析製品において得られた DNA 情報とデータベース上での比較対象（リファレンスデータ）が存在しないことで、同定不能となった生物種は存在せず、すべての製品で同定が可能であった。今回検討した製品はいずれも単独（1 種）で構成されていた。また、多くの製品が植物体の乾燥品であったが、*Argyria nervosa* 種子は発芽可能であり、*Psilocybe cubensis* 菌糸体は培養可能であった。

[考 察]

上記同定種において、*Psychotria viridis*、*Mimosa tenuiflora* はいずれもジメチルトリプタミン (DMT) を含有し、*Argyria nervosa* の種子はリゼルグ酸アミド (LSA) を含有している。また、*Echinopsis pachanoi* は、ウバタマ（ペヨーテ）同様、メスカリン (mescaline) を含有するサボテンであり、*Psilocybe cubensis* はマジックマッシュルームの 1 種でありシロシン、シロシビン (psilocin, psilocybin) を含有するきのこであり、これらはいずれも向精神作用を有する物質である。

[まとめ]

幻覚性植物の分析として 9 種の植物・菌類の DNA 塩基配列情報を用いた同定例を示した。

コンピュータシミュレーションによる
合成カンナビノイドの CB1 受容体への結合様式解析

○出水 庸介, 三澤 隆史, 内山 奈穂子,
花尻 瑠理, 袴塚 高志, 栗原 正明
国立衛研

【目的】近年, カンナビノイド受容体 (CB1 受容体) に強い活性を示す合成カンナビノイド含有製品 (危険ドラッグ) による健康被害が急増して深刻な社会問題となっている. 乱用が懸念される危険ドラッグを迅速に規制するためには, その有害性を把握し評価することが重要である. 今回, これらの製品から検出されたカンナビノイド化合物 (合成カンナビノイドおよび Δ^9 -THC, 計 69 種類) と CB1 受容体との結合様式をコンピュータシミュレーションにより予測した.

【方法・結果】ホモロジーモデル構築した CB1 受容体のリガンド結合領域を Site Finder (MOE) により検出した. 次に, 69 種類の CB1 リガンドとドッキングシミュレーション (力場; MMFF94X) を行い, リガンドの結合様式解析を行った. その結果, CB1 リガンドは結合領域中に存在する広い疎水性空間において疎水性相互作用することで安定化していることが示唆された.

○河野徳昭¹，内山奈穂子²，花尻（木倉）瑠理²，
鈴木秀幸³，吉松嘉代¹，川原信夫¹

(¹医薬基盤・健康・栄養研・薬植セ，²国立衛研・
生薬部，³かずさDNA研)

【目的】ケシ属植物の一種であるオニゲシ (*Papaver orientale* L.) は、モルヒナン骨格を有するオリパビン（平成 19 年に麻薬及び向精神薬取締法により麻薬指定）を生産する。本研究においては、ケシ属植物の網羅的な発現遺伝子情報を整備し、オリパビンをはじめとするモルヒナンアルカロイド等の生合成機構の多様性に基づいたオニゲシと他のケシ属植物との、遺伝子鑑別法を確立することを目的とする。

【方法及び結果】オニゲシ及びケシの *in vitro* 培養物の葉を主とする地上部より、それぞれ EST ライブラリーを構築した。また、オニゲシ EST ライブラリーのコンセンサス配列 (contig) について、オニゲシ及びケシにおける発現量の目安となる RPKM 値を算出した。構築したオニゲシ EST ライブラリーの contig の推定機能を示す blastx 検索結果の上位 20 位について、ケシのテバインからモルヒネへの生合成過程で鍵酵素として機能する thebaine 6-*O*-demethylase や codeine *O*-demethylase が属する 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases (ODDs) をコードする遺伝子の相同遺伝子を、“oxoglutarate”等をキーワードとして検索した。その結果、16 の contig が抽出された。これらのうち、オニゲシとケシとの間で発現量の差が顕著な 4 つの contig について、それぞれ特異的なプライマーを設計し、ケシ属植物に対する特異性を PCR にて検討した。その結果、contig #1603 について設計したプライマーがオニゲシに高い特異性を示した。

【考察】以上のように、EST ライブラリー及びトランスクリプトーム情報を活用し、オニゲシ・ケシ間で発現量に差のある酵素遺伝子を絞り込み、オニゲシに高い特異性を示すプライマーの設計に成功した。このプライマーは、ケシやハカマオニゲシに対しては交叉反応性を示さず、オニゲシ鑑別用プライマーとして有望と考えられる。

【謝辞】本研究は、厚生労働科学研究費補助金 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「乱用薬物の鑑別法に関する研究 (H25-医薬一般-019)」の一環として行った。



日本中毒学会 東日本地方会

第30回学術集会

中毒学と中毒医療の発展
～現在・過去・そして未来～

プログラム・抄録集

会期 2016年1月23日(土)

会場 昭和大学 上條講堂

会長 峯村 純子 昭和大学横浜市北部病院薬局

簡易薬物スクリーニングキットを用いた危険ドラッグ成分の
識別法の検討(3)

○内山 奈穂子、花尻(木倉) 瑠理、袴塚 高志

国立医薬品食品衛生研究所

【目的】昨今、危険ドラッグ製品に起因すると考えられる健康被害や交通事故等が問題となっている。これら製品中から、合成カンナビノイド、フェネチルアミン類、麻薬成分であるフェンシクリジン(PCP)の構造類似体などが検出されている。最近では、ベンゾジアゼピン系向精神薬の構造類似体も検出されている。一方、救急医療機関等では、簡易的に薬物を識別する際に、市販の簡易薬物スクリーニングイムノアッセイキットが使用されている。我々は既に、7種類の法規制薬物(合成カンナビノイド、フェンタニル、ケタミン、PCP、メタンフェタミン、アンフェタミン、MDMA)それぞれを検出対象薬物とした市販の各簡易薬物スクリーニングキットを用いて計135化合物についての検討結果を報告している¹⁻³⁾。本研究では、ベンゾジアゼピン類及びフェンタニル類を検出対象薬物とした市販の各簡易薬物スクリーニングキットを用いて、法規制薬物及び未規制薬物を対象として検出法の評価を行った。

【方法】ベンゾジアゼピン類及びその関連薬物17化合物(向精神薬7化合物、未規制10化合物)、フェンタニル類6化合物(麻薬1化合物、未規制5化合物)の計23化合物を使用した。簡易薬物スクリーニングキットは、ベンゾジアゼピン類検出キット:AccuSign[®] One-step BZO(関東化学)、フェンタニル類検出キット:Drug check[®] Fentanyl(Express Diagnostics)、複数薬物同時検出キット2種類:Status DS10(10化合物検出、関東化学)及びTriage DOA[®](8化合物検出、シスメックス)を用いた。また、各キットは本来尿試料中の薬物検出に使用されるが、今回の試料溶液は、各化合物の水溶液または0.001~1% MeOH水溶液とした。

【結果・考察】ベンゾジアゼピン類及びその関連薬物については、AccuSign[®] One-step BZO, Status DS10及びTriage DOA[®]何れの検出キットにおいても17化合物中11化合物(向精神薬6化合物、未規制5化合物)が陽性であった[検出限界濃度(LOD):2.5~5 µg/mL]。フェンタニル類は、Drug check[®] Fentanyl検出キットを用いた結果、6化合物中6化合物全てが陽性であった[LOD:10 ng/mL~10 µg/mL]。今回検討を行ったキットでは、法規制薬物及び未規制薬物を区別することは困難であった。しかし、新たな流通が危惧されるベンゾジアゼピン類及びフェンタニル類等の構造類似体の簡易検出法の一つとして有用であると考えられ、今後、救急医療機関などでの活用の可能性が示唆された。

【参考文献】

1-3) 内山ほか, 第36回日本中毒学会総会・学術集会(2014.7)、日本法中毒学会第34年会(2015.6)、薬学雑誌135(3):535-541(2015)。

No.

簡易薬物スクリーニングキットを用いた危険ドラッグ成分の識別法の検討 (4)

○内山 奈穂子, 花尻 (木倉) 瑠理, 袴塚 高志
(国立衛研)

【目的】危険ドラッグ製品の成分として、これまでに合成カンナビノイド、フェネチルアミン類、フェンタニル類などの構造類似体が多数検出されているが、最近では、ベンゾジアゼピン系向精神薬の構造類似体も検出されている。一方、救急医療機関等では、簡易的に薬物を識別する際に、市販の簡易薬物スクリーニングイムノアッセイキットが使用されている。我々は既に、8種類の法規制薬物（合成カンナビノイド、フェンタニル、PCP等）それぞれを検出対象薬物とした市販の各簡易薬物スクリーニングキットを用いて計158化合物についての検討結果を報告している [1-3]。本研究では、さらに検討化合物数を増やし、ベンゾジアゼピン類、メタンフェタミン、アンフェタミン、または複数薬物を検出対象薬物とした市販の各簡易薬物スクリーニングキットを用いて、法規制薬物及び未規制薬物を対象として検出法の評価を行った。なお、本研究における未規制化合物とは、麻薬及び向精神薬取締法、覚せい剤取締法、大麻取締法、あへん法における規制薬物、及び医薬品医療機器等法において指定薬物として規制される薬物以外を示す。

【方法】ベンゾジアゼピン類及びその関連薬物20化合物（向精神薬3化合物、指定薬物1化合物、未規制16化合物）、メタンフェタミン類10化合物（指定薬物1化合物、未規制9化合物）及びアンフェタミン類6化合物（向精神薬1化合物、未規制5化合物）の計36化合物を使用した。簡易薬物スクリーニングキットは、ベンゾジアゼピン類検出キット：AccuSign® One-step BZO、メタンフェタミン類検出キット：AccuSign® One-step MET500、アンフェタミン類検出キット：AccuSign® One-step AMP（いずれも関東化学）、複数薬物同時検出キット2種類：Status DS10（10化合物検出、関東化学）及びTriage DOA®（8化合物検出、シスメックス）を用いた。また、各キットは本来尿試料中の薬物検出に使用されるが、今回の試料溶液は、各化合物の水溶液または0.001~1% MeOH水溶液とした。なお、Status DS10及びTriage DOAキットに関しては、薬物濃度10 µg/mLのみで検討を行った。

【結果】ベンゾジアゼピン類及び関連薬物は、AccuSign® One-step BZOにおいて20化合物中14化合物（向精神薬3化合物、未規制11化合物）が陽性であった [検出限界濃度 (LOD) : 0.5~10 µg/mL]。Status DS10及びTriage DOAでは、それぞれ15化合物及び12化合物が陽性であり、キットにより検出結果が若干異なった。メタンフェタミン類は、AccuSign® One-step MET500において10化合物中7化合物（指定薬物1化合物、未規制6化合物）が陽性であった [LOD : 2.5~10 µg/mL]。アンフェタミン類は、AccuSign® One-step AMPにおいて6化合物中4化合物（向精神薬1化合物、未規制3化合物）が陽性であった [LOD : 2.5~5 µg/mL]。Status DS10では、メタンフェタミン類及びアンフェタミン類は、それぞれ5化合物及び3化合物が陽性であり、Triage DOAでは、メタンフェタミン類及びアンフェタミン類は、それぞれ3化合物及び1化合物が陽性であった。従って、キットにより検出結果が異なった。

【考察】今回検討を行ったキットでは、法規制薬物及び未規制薬物を区別することは困難であった。しかし、新たな流通が危惧されるベンゾジアゼピン系向精神薬などの構造類似体の簡易検出法の一つとして有用であると考えられ、今後、救急医療機関などでの活用の可能性が示唆された。

【参考文献】 [1] 内山ほか, 第30回日本中毒学会東日本地方会 (2016.1), [2] 内山ほか, 日本法中毒学会第34年会 (2015.6), [3] 内山ほか, 薬学雑誌 135(3): 535-541 (2015).

No. _____

LC-IMS-Q-TOF-MS を用いた生体試料中危険ドラッグ成分のスクリーニングおよび定量分析

○河村 麻衣子¹, 花尻 (木倉) 瑠理¹, 前橋 恭子², 岩楯 公晴², 袴塚 高志¹

¹ 国立衛研, ² 慈恵医大・法医

【目的】生体試料中から危険ドラッグ成分を検出する迅速かつ広範囲な分析法として、我々はすでに、LC-Q-TOF-MS を用いたスクリーニング分析法^[1]、さらにイオンモビリティ分析 (Ion Mobility Separation: IMS) を併用し、得られた化合物の移動時間 (Drift time: DT) から算出される衝突断面積 (Collision cross section: CCS) をライブラリーの化合物情報に加えた LC-IMS-Q-TOF-MS スクリーニング分析法^[2]を報告している。本研究では、危険ドラッグ等約 450 化合物を対象として構築した LC-IMS-Q-TOF-MS スクリーニング分析法について、実際の生体試料分析に適用して含有化合物の検索を行い、本法の有用性を評価した。さらに、検出した化合物について、LC-MS/MS 分析の MRM モードにより定量分析を行った。

【方法】試料・試薬 危険ドラッグが関与したことが疑われる死亡事例 4 件から得た尿試料を測定試料とした。分析用標品は、Cayman 社からの購入品、もしくは国立衛研保管標準品を使用した。定量分析には、内標準物質として JWH-018-d₉ もしくは MDMA-d₄ を用いた。β-グルクロニダーゼ (アワビ由来、Glucuronidase activity >100,000 unit/mL, Sulfatase activity <8000 unit/mL) は KURA BIOTEC 社製 (CA, USA) を使用した。試料前処理方法 尿試料 100 μL は緩衝液で希釈後 *t*-butyl methyl ether により複数回抽出を行い、抽出液を窒素気流下で乾固後メタノール 100 μL で溶解した。酵素処理試料についても同様の前処理を行った。スクリーニング分析 AQUITY/SYNAPT G2-Si (Waters) を使用し、IMS ガスは N₂、パルス高は 40 V、パルススピードは 600 m/s とし、解析ソフトは UNIFI (Waters) を用いた。他条件については既存の分析法^[1]に従った。定量分析 AQUITY/XevoTQD (Waters) を使用し、MRM モード各条件を設定後、コントロール試料に標準溶液を添加して回収率および検出限界を検討した。検量線を内標準法にて作成し、各試料を n=3 で分析した。

【結果および考察】4 事例より得た尿試料について、LC-IMS-Q-TOF-MS スクリーニング分析を行った結果、いずれの試料からも危険ドラッグ成分もしくは代謝物を検出し、さらに麻薬成分や向精神薬を同時に検出した試料も存在した。グルクロニダーゼ酵素未処理及び処理試料について、予測される代謝物等も含め、LC-MS/MS MRM モードで定量分析を実施した結果、4 試料から危険ドラッグ/指定薬物成分として 8 化合物 (合成カンナビノイド AB-CHMINACA, 5F-AB-PINACA, カチノン類 α-PHP, 4F-α-PHPP, フェネチルアミン類 5-APDB, 2-EAPB, その他 Diphenidine, Acetylfentanyl) および推定代謝物 10 化合物、その他麻薬、向精神薬等 9 化合物の計 27 化合物を 0.1-1538 ng/mL 検出し、様々な危険ドラッグ製品や薬物を併用している乱用実態が明らかとなった。LC-IMS-Q-TOF-MS を用いたスクリーニング分析では、LC-Q-TOF-MS を用いたスクリーニング法と比較して、より特異性の高い分析が可能であり、本研究で実施した尿試料分析においても化合物候補の絞り込みに有用であった。

【参考文献】[1] 河村麻衣子, 花尻 (木倉) 瑠理, 佐藤 太, 袴塚 高志, LC-Q-TOF-MS を用いた生体試料中危険ドラッグ成分のスクリーニング法の検討, 日本法中毒学会第 34 年会発表 (2015)。

[2] 河村麻衣子, 花尻 (木倉) 瑠理, 佐藤 太, 袴塚 高志, イオンモビリティ質量分析による生体試料中の危険ドラッグ成分スクリーニング分析法の検討, 日本薬学会第 136 年会発表 (2016)。

