

氏名	みくま としやす 三熊 敏靖
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲第4619号
学位授与の日付	平成29年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Development of the new separation methods for the drug analysis in the field of forensic toxicology (法中毒学領域における薬物の新規分離分析法の開発)
論文審査委員	(主査) 教授 金澤 秀子 (薬学博士) (副査) 教授 有田 誠 (博士(薬学)) 准教授 大江 知之 (博士(薬学))

論文内容の要旨

【緒言】

法中毒学 (Forensic Toxicology) とは、すべての中毒に関する法的問題について医学的および化学的に解明を与える学問領域である。中毒物質の法的取扱いといった行政面での研究のほか、裁判等における中毒原因の科学的な証明を目的として分析法の研究もさかんに行われている。中毒原因となりうる物質は多岐にわたるが、中でも薬物中毒は、その効能を求めて利用者が能動的に摂取することから、中毒の防止策を立てることが極めて難しく、依然として大きな社会問題の一つとなっている。覚せい剤、大麻、麻薬等のいわゆる乱用薬物については、法律で使用が厳しく規制されているにも関わらず、これらの中毒者はあとを絶たない。また、中枢神経系に作用をもたらす向精神薬についても、その依存性から適正量を大きく上回る分量を摂取する者がおり、意識を失って病院に搬送される例が散見される。

これら中毒者の生体試料から中毒原因の薬物を正確に検出することは、その中毒者を罰するうえでも、また的確な治療を施すうえでも極めて重要である。しかし、生体試料中には薬物以外の生体由来成分が多く含まれており、これら (夾雑成分) が分析を妨害することが多い。そのため、薬物および試料の種類によって適切な前処理法を施す必要があるが、一般的に前処理には多くの時間と労力が必要になるため、これを改善するために様々な前処理法の研究が進められている。一方、近年の分析機器の高度化により、低濃度の薬物を正確に検出できるようになってきた。ただし、高価な機器は一部の検査機関にしか設置されていないため、これらの機器を用いて検査を続けると、場所によって中毒原因特定の成否が決まってしまうという新たな問題が生じる。そこで、汎用機器での分析手法を見直し、多くの検査機関に設置されている機器で、これまでにできなかった分析を可能にする研究も進められている。

本博士論文は、中毒原因として問題となっている向精神薬および覚せい剤に着目し、生体試料中に含まれるこれら薬物の新規分離分析法を開発してその成果をまとめたものである。前処理法の改良を目的とした 2 次元高速液体クロマトグラフィー (2D-HPLC) による血清中向精神薬の分析法開発と、汎用機器での分析手法改良を目的としたキャピラリー電気泳動 (CE) による毛髪中覚せい剤の分析法開発について、2 章構成でまとめた。

1. 温度応答性カラムを用いた 2D-HPLC による血清中向精神薬の分析法開発

【背景】

Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) は、温度応答性を持つことで知られるポリマーであり、下限臨界溶解温度 (Lower Critical Solution Temperature: LCST) と呼ばれるポリマー固有の温度を境に可逆的な相転移を起こす。この相転移により、LCST 以下では親水性、LCST 以上では疎水性を示すため、PNIPAAm をシリカ表面に結合させて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用のカラムに充填することで、カラム温度の変調により固定相の性質をコントロールできる温度応答性カラムとして使用することができる。

一方、生体試料中の薬物の定性、定量分析は、法中毒学分野において極めて重要な検査であるが、煩雑な前処理法を用いると、習熟度によって回収率に差が出るなどの問題がある。これを解決する方法として、オンライン前処理法の利用が挙げられる。現在、カラムスイッチングを用いた 2D-HPLC により、血清や血漿などの生体試料を直接導入し、1 次元目のカラムで前処理を、2 次元目のカラムで分離分析を行う方法が複数のメーカーから提案されており、すでに前処理カラムも市販されている。

しかし、市販の前処理カラムでは夾雑成分の一部がどうしても分析カラムに導入されてしまい、クロマトグラム上に不要なピークを与えることが多い。そこで本研究では、温度応答性カラムを前処理カラムに応用し、夾雑成分の影響が少ないデータを得るための新たな 2D-HPLC の系を構築した。

【実験方法】

(1) 試料

各種向精神薬の標準品を、水またはヒト血清に適切な濃度で溶かしたものを試料とし、直接導入により分析を行った。

(2) HPLC カラム

シリカビーズ (粒径: 5 μm) の表面に 5 % butyl methacrylate を共重合させた PNIPAAm を修飾し、これを HPLC 用エンブティーカーラム (150 \times 4.6 mm) に詰めたものを、温度応答性カラムとして用いた。分析カラムには、Hitachi LaChrom II ODS カラム (150 \times 4.6 mm, 5 μm) を用いた。

(3) 装置

分析装置には、Hitachi 製 Chromaster HPLC システムを用いた。前処理カラム (1次元目カラム) に温度応答性カラムを、分析カラム (2次元目カラム) に ODS カラムを配置し、これらを六方バルブを介して接続した。1次元目カラムから血清の夾雑成分が溶出している間はカラム末端を廃液に繋ぎ、薬物が溶出する間のみ2次元目カラムに繋ぎ変える「ハートカッティング法」により 2D-HPLC を行った。

(4) 測定条件

温度応答性カラムでは、移動相として 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 6.5) を流速 1.0 mL/min で用いた。ODS カラムでは、移動相として 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 6.5) およびアセトニトリルの混合液を、イソクラティックモードにより 1.0 mL/min で用いた。混合比は、薬物ごとに最適となるよう設定した。

【結果および考察】

(1) 温度応答性カラムを用いた薬物標準品の分析

バルビツール酸系薬物およびベンゾジアゼピン系薬物について、カラム温度を変えながら温度応答性カラムで分析を行ったところ、温度変化に伴って各薬物の保持時間に変化が観測された。また、保持時間の変化の度合いや向きは薬物ごとに異なっており、複数の薬物の保持時間が近接する温度が見受けられた。2D-HPLC において、薬物とともに分析カラムに送り込まれる夾雑成分の量を極力減らすためには、ハートカッティングの時間をなるべく短くした方が良い。そこで、この近接するカラム温度を最適温度として 2D-HPLC による分析を行った。

(2) 2D-HPLC による分析

血清に薬物をスパイクした試料を調製し、これを 2D-HPLC により分析した。ベンゾジアゼピン系薬物をスパイクした血清を、最適温度 40 °C で分析した。初めに、バルブを切り替えずに分析し、温度応答性カラムからの溶出挙動を確認した。血清の主要夾雑成分であるヒト血清アルブミン

(Human Serum Albumin: HSA) が保持されることなく溶出し、その後に保持時間が近接した薬物が溶出した。次に、薬物が溶出する間バルブを切り替え、薬物群を ODS カラムに送って分析を行った。血清を直接導入したにも関わらず、夾雑成分の影響がほとんど見られない良好な結果を得ることができた。

【結論】

本法はこれまでにない新しいオンライン前処理法であり、最終的に得られるクロマトグラム上に、夾雑成分のピークがほとんど現れないという良好な結果を得ることができた。今後、温度応答性カラムの組成も含めてさらなる条件検討を行い、多数の薬物を同時分析できるようになれば、実際の中毒検査において有益な手法になると考え

られる。

2. オンライン濃縮法を用いた CE による毛髪中覚せい剤のキラル分析法開発

【背景】

覚せい剤事犯においてその使用を証明するためには、対象者の生体試料（尿、血液、毛髪など）を分析し、そこから覚せい剤を検出しなければならない。この際、注意すべき問題として、一部の医薬品を摂取すると、その有効成分が体内で代謝反応を受けて覚せい剤になってしまうことが知られている。セレギリンは、パーキンソン病の治療薬に含まれる有効成分であるが、代謝により覚せい剤である(*R*)-メタンフェタミン ((*R*)-MA) を生じる。一方、国内で流通している覚せい剤のほとんどは(*S*)-メタンフェタミン ((*S*)-MA) を主体としたものであることから、生体試料中の覚せい剤分析においては、(*R*)-体、(*S*)-体の識別を伴う分析法、すなわちキラル分析法を導入することが推奨されている。

一方、検査対象とする生体試料の選択も重要である。毛髪は長期間（数ヶ月以上）に渡る覚せい剤の使用履歴が残るなど優れた特徴を持つ試料であるが、毛髪に含まれる覚せい剤の量は他の生体試料に比べて著しく少なく、一般的に毛髪中覚せい剤の検査では、高価な高感度分析機器が必要になる。また含有量の少なさから検査は覚せい剤の検出に焦点が置かれ、追加でキラル分析が導入されることはほとんどないのが現状である。

本研究では CE に着目し、すでに報告されているオンライン濃縮法である「陽イオン選択的完全注入ースウィーピングーミセル動電クロマトグラフィー (Cation-selective exhaustive injection and sweeping micellar electrokinetic chromatography: CSEI-sweeping-MEKC)」を改良することによって、毛髪中覚せい剤のキラル分析法確立を試みた。

【実験方法】

(1) 試料

覚せい剤を 1 mM リン酸バッファーに適切な濃度で溶かしたものを標準品試料とした。覚せい剤摂取者の毛髪は、千葉県内で逮捕された者の頭髪である。

(2) 装置

キャピラリー電気泳動装置には HP ^{3D}CE system (Agilent Technologies) を用い、検出波長は 195 nm とした。キャピラリーには内径 50 μm、全長 64.5 cm（有効長 56 cm）のフューズドシリカキャピラリー (GL Sciences) を用い、測定時の温度は 25 °C とした。

(3) 毛髪の前処理

洗浄後の毛髪を 3 mg 秤量し、試験管に入れた。これに 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 1 mL を加え、70 °C に 30 分置くことで毛髪を溶解した。溶解液を室温まで冷

ましたのち、シクロヘキサンを 2 mL 加えて攪拌、遠心分離を行った。得られた有機層を分取し、濃塩酸-メタノール (1:20) 50 μ L を加えたのちに窒素気流下で溶媒を留去した。得られた乾固物を 1 mM リン酸バッファー 250 μ L に溶かし、ウルトラフリー (0.22 μ m) でろ過したものを分析用の試料とした。

【結果および考察】

(1) CSEI-sweeping-MEKC の改良によるキラル分析

CSEI-sweeping-MEKC を用いることで、数千~数万倍のオンライン濃縮が可能になり、微量である毛髪中覚せい剤も分析可能であることが報告されているが、これまでキラル分析に適用した例はなかった。本研究では、カラム両端に位置する溶液に陰イオン性のシクロデキストリン (Highly sulfated γ -cyclodextrin: HS- γ -CD) を加えることで、覚せい剤のオンライン濃縮を伴うキラル分析を試みた。ラセミ体の MA を 2 ng/mL となるように試料調製し、HS- γ -CD を加えながら CSEI-sweeping-MEKC で分析した。HS- γ -CD を未添加の場合、MA のピークは 1 本であるが、HS- γ -CD を添加するにつれ、ピークが 2 本にキラル分離し始めていることがわかる。さらに、各ピークの幅は顕著に変わることがなかった。これらのことから、カラム両端に位置する溶液に陰イオン性のシクロデキストリンを添加することにより、オンライン濃縮を伴いながら覚せい剤をキラル分析できることが確認された。

(2) 毛髪中覚せい剤の分析

上記の実験結果から、本法は毛髪中覚せい剤の分析にも適応可能であることが示唆されたため、覚せい剤使用者の毛髪を分析し、その有用性を確認した。分析の結果、(S)-MA、(R)-MA に加え、(S)-MA の代謝物である(S)-アンフェタミンが検出され、本法が実試料の分析に適応できることが示された。

【結論】

本法は既存のオンライン濃縮法を改良してできた新しいキラル分析法である。高濃縮を伴いながら覚せい剤をキラル分析することができ、実試料にも適応可能であることが確認された。

【総括】

温度応答性カラムを用いた 2D-HPLC の系を構築し、血清中向精神薬の分析に適用したところ、試料を機器に直接導入したにもかかわらず、夾雑成分の影響がほとんどない良好な結果を得ることができた。また、CE によるオンライン濃縮法を陰イオン性のシクロデキストリンを用いて改良することにより、高い濃縮効率を維持したまま覚せい剤のキラル分析が可能になり、毛髪中覚せい剤の分析にも適応可能であった。

今回開発した分析法は、いずれも生体試料から中毒原因である薬物を検出するうえで有用なものであり、既存の方法にはない利点を含むものである。これら方法が、現

場における分析技術の向上に貢献することを期待する。

論文審査結果の要旨

博士論文発表会は、平成 29 年 2 月 23 日（木）に、慶應義塾大学薬学部 1 号館マルチメディア講堂において、研究科委員会のメンバーなどの出席の下、学内公開の形で実施された。25 分間の口頭発表では、研究の背景並びに問題点、研究過程並びに研究成果が整然と提示された。その後の 15 分間の試問では、質問に対して概ね的確な応答がなされた。

論文申請者は、千葉県警科学捜査研究所に勤務しながら、当大学院薬学研究科の社会人博士課程の学生として研究を実施してきた。本研究は、法中毒学領域において中毒原因として問題となっている向精神薬および覚せい剤に着目し、生体試料中に含まれるこれら薬物の新規分離分析法を開発してその成果をまとめたものである。

法中毒学は、すべての中毒に関する法的問題について医学的および化学的に解明を与える学問領域である。中毒物質の法的取扱いといった行政面での研究のほか、裁判等における中毒原因の科学的な証明を目的として分析法の研究もさかんに行われている。薬毒物が関連しているかどうかを見極めるためには、薬毒物分析が極めて重要になる。法中毒学の分野は血液や尿などのマトリックスから、毛髪、唾液、汗などへとさらに拡大しており、さらなる高感度化が求められている。しかし、生体試料中には薬物以外の生体由来成分が多く含まれており、これら夾雑成分が分析を妨害することが多い。そのため、薬物および試料の種類によって適切な前処理法を施す必要があるが、一般的に前処理には多くの時間と労力が必要になるため、これを改善するために様々な前処理法の研究が進められている。

本博士論文は、中毒原因として問題となっている向精神薬および覚せい剤に着目し、生体試料中に含まれるこれら薬物の新規分離分析法を開発してその成果をまとめたものである。温度応答性高分子修飾カラムを用い前処理法の改良を目的とした 2 次元高速液体クロマトグラフィー (2D-HPLC) による血清中向精神薬の分析法開発と、汎用機器での分析手法改良を目的としたキャピラリー電気泳動 (CE) による高感度な毛髪中覚せい剤のキラル分析法開発について、2 章構成でまとめたものである。

1 次元目の前処理カラムとして従来法と大きく異なる分離モードである温度応答性カラムを用いた 2D-HPLC の系を構築し、血清中向精神薬の分析に適用したところ、試料を機器に直接導入したにもかかわらず、夾雑成分の影響がほとんどない良好な結果を得ることができた。また、CE によるオンライン濃縮法を陰イオン性のシクロデキストリンを用いて改良することにより、高い濃縮効率を維持したまま覚せい剤のキラル分析が可能になり、毛髪中覚せい剤の分析にも適応可能であった。

本研究により開発した分析法は、いずれも生体試料から中毒原因である薬物を検出するうえで大変有用なものであり、既存の方法にはない利点を含むものである。

本論文の内容は、温度応答性高分子を用いた充填剤による 2 次元 HPLC システムの構築にはじまり、CE によるオンライン濃縮法を陰イオン性のシクロデキストリンを用いて改良することにより、高い濃縮効率を維持した覚せい剤のキラル分析、毛髪中覚せい剤の分析までも含んでおり、分析化学分野において専門性の高い国際学術誌に 2 報の論文を掲載されていることから、博士（薬科学）の学位に値する業績であると判定した。

さらに、申請者の博士論文発表会での発表、試問に対する応答も妥当で、周辺の知識も十分であり、これらに関しても博士（薬科学）の学位に十分値するものである。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

- 1) T. Mikuma, R. Uchida, M. Kajiya, Y. Hiruta, H. Kanazawa: The use of a temperature-responsive column for the direct analysis of drugs in serum by two-dimensional heart-cutting liquid chromatography; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **409**, 4, 1059–1065 (2016).
- 2) T. Mikuma, Y. T. Iwata, H. Miyaguchi, K. Kuwayama, K. Tsujikawa, T. Kanamori, H. Kanazawa, H. Inoue: Approaching over 10 000-fold sensitivity increase in chiral capillary electrophoresis: cation-selective exhaustive injection and sweeping cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography; *Electrophoresis*, **37**, 2970-2976 (2016).

【参考論文】

- 1) T. Mikuma, Y. T. Iwata, H. Miyaguchi, K. Kuwayama, K. Tsujikawa, T. Kanamori, H. Inoue: The use of a sulfonated capillary on chiral capillary electrophoresis/mass spectrometry of amphetamine-type stimulants for methamphetamine impurity profiling; *Forensic Science International*, **249**, 59-65 (2015).
- 2) 芳川満輝、内田亮、黒木巽、三熊敏靖、蛭田勇樹、永田佳子、金澤秀子: 超高速液体クロマトグラフィーを用いた向精神薬の複数同時迅速分析; *分析化学*, **65(4)**, 173-9 (2016).