

第 13 回法医中毒研究会セミナー

ブラインドテスト

(5) アムロジピンとレンボレキサント

令和 6 年 3 月 15 日(金)

午後 1 時～午後 4 時 30 分



世話人 原田 和生

大阪大学大学院薬学研究科/医学系研究科法医学教室
(会場 : 大阪大学中之島センター 10F 佐治敬三ホール)

目 次

第 13 回法医中毒研究会セミナー開催にあたって	2
会場案内	3
プログラム	5
抄録	
1. 第 5 回ブラインドテスト結果報告	6
矢島 大介 (国際医療福祉大学)	
2. 第 5 回ブラインドテスト対象薬物の分析事例について	
アムロジピンについて	
1) アムロジピン処方歴のある法医剖検例における血液中アムロジピン濃度	24
前橋 恭子 (東京慈恵会医科大学)	
2) アムロジピンの死後濃度評価	27
永澤 明佳 (千葉大学)	
レンボレキサントについて	
3) GC-MS および GC-MS/MS を用いたヒト血漿中オレキシン受容体拮抗薬の分析	29
長谷川 智華 (東邦大学)	
4) レンボレキサント : 紹介・LC-MS/MS 分析法・臨床例および剖検例における濃度	36
Brian Waters (福岡大学)	

第 13 回法医中毒研究会セミナー開催にあたって

法医中毒研究会会長 奈女良 昭

法医中毒研究会セミナー（以下、セミナー）も第 13 回を迎えるに加えてオンラインでのハイブリッド開催を試験的に試みる運びとなりました。会員の皆さまが直接に意見交換できることを楽しみに致しております。

さて、法医中毒研究会セミナーでは、法医鑑定における薬毒物分析を、薬毒物分析マニュアルに即して、薬毒物分析業務全般から各物質の分析方法に至るまでより実践的、専門的に学ぶことを目的としております。

今回のセミナーでは、昨年 12 月に実施した第 5 回ブラインドテストの結果を共有し、今後の薬物分析の精度の向上に繋げたいと考えており「ブラインドテスト：(5) アムロジピンとレンボレキサント」というテーマで、ブラインドテストの結果の報告、対象薬物の分析事例とともに、血中濃度の解釈や類似薬物の分析についても扱います。

また、死因究明等推進計画に基づき、死因究明拠点整備モデル事業、死亡時画像診断システム等整備事業も継続され、薬毒物分析の充実が図られようとしています。本セミナーにおいて薬毒物定量法について理解を深め、業務の発展、改善等に役立てていただければと思います。

会場案内

大阪大学中之島センター 10階 佐治敬三ホール

530-0005 大阪市北区中之島 4-3-53

<https://www.onc.osaka-u.ac.jp/access/>



電車によるアクセス

- 京阪中之島線 中之島駅より徒歩約 5 分
- JR 東西線 新福島駅より徒歩約 9 分
- 地下鉄四つ橋線 肥後橋駅より徒歩約 10 分
- 阪神本線 福島駅より徒歩約 9 分
- JR 環状線 福島駅より徒歩約 12 分
- 地下鉄御堂筋線 淀屋橋駅より徒歩約 16 分

バスによるアクセス

- 大阪市バス(53系統)
大阪駅前バスターミナル→中之島四丁目(旧玉江橋) 下車 徒歩 1 分
- 大阪市バス(75系統)
大阪駅前バスターミナル→田蓑橋 下車 徒歩 2 分
- 北港バス(中之島ループバス ふらら)
淀屋橋発(土佐堀通/住友ビル前)→大阪大学中之島センター前 下車 徒歩 1 分

新幹線でお越しの方は

- ・「JR 新大阪駅」からタクシー（約 30 分、3,000 円程度）
- ・「JR 大阪駅」から市バス（53、75 系統田蓑橋下車すぐ）
- ・「JR 大阪駅」からタクシー（約 10 分、1,000 円以内）
- ・地下鉄御堂筋線で「淀屋橋駅」下車。6 番出口から徒歩 16 分。

飛行機でお越しの方は

大阪空港・関西空港からは JR 大阪駅まで直通バスが運行されています。

- ・「JR 大阪駅」から市バス（53、75 系統田蓑橋下車すぐ）
- ・「JR 大阪駅」からタクシー（約 10 分、1,000 円以内）
- ・「JR 大阪駅」から徒歩約 25 分。

情報交換会（17:00-）

&ISLAND NAKANOSHIMA

大阪市北区中之島 5-3-60 中之島バンクス CENTER A

(前ページ地図の★印の場所)

中之島センターから堂島川沿いに西に 250 m ほど

<https://andisland.com/>

会費 5,000 円

プログラム

日 時 : 令和6年3月15日(金) 13:00~16:30

13:00-13:10	開会の挨拶	会長 奈良良 昭
13:10~	第5回ブラインドテストについて	
13:10-13:30	① ブラインドテスト結果報告	矢島大介 (国福大)
13:30-14:10	② 第5回ブラインドテストでの質問やご意見 (質疑応答を含む)	
14:10-14:25	休憩	
14:25~	第5回ブラインドテスト対象薬物の分析事例について	
	アムロジピンについて	座長: 小川匡之 (愛知医科大)
14:25-14:55	① アムロジピン処方歴のある法医剖検例における 血液中アムロジピン濃度	前橋恭子 (慈恵医大)
14:55-15:25	② アムロジピンの死後濃度評価	永澤明佳 (千葉大)
	レンボレキサントについて	座長: 草野麻衣子 (昭和大)
15:25-15:55	③ GC-MS および GC-MS/MS を用いたヒト血漿中 オレキシン受容体拮抗薬の分析	長谷川智華 (東邦大)
15:55-16:25	④ レンボレキサント: 紹介・LC-MS/MS 分析法・ 臨床例および剖検例における濃度	Brian Waters (福岡大)
16:25	閉会の挨拶	世話人 原田和生
※セミナー後半の講演時間はいずれも質疑応答 10 分を含みます。		
17:00-	情報交換会 (&ISLAND NAKANOSHIMA)	

第5回ブラインドテスト結果報告

(2024年3月15日)

第13回法医中毒研究会セミナー

報告事項

1. 参加機関	p.6
2. アルコール検査結果	p.7
3. 薬物スクリーニング検査結果	p.10
4. 薬物定量検査結果	p.11
5. その他(コメントやご意見・ご要望など)	p.16
6. 添加物情報を得た後の分析結果に関するご意見など	p.19
7. 再分析報告	p.22

1. 参加機関

参加機関数	46 機関
回答機関数	46 機関

◆参加46機関全てから回答あり。(アルコール検査のみ、スクリーニング検査のみ参加の機関を含む)

◆前回(第4回)は42機関で4機関の増。

検査	参加機関 42 機関中の回答機関数
アルコール検査	43
薬物スクリーニング検査	39
薬物定量検査	28

2. アルコール検査

【参加機関】 43 機関

【調製濃度と定量値の処理】

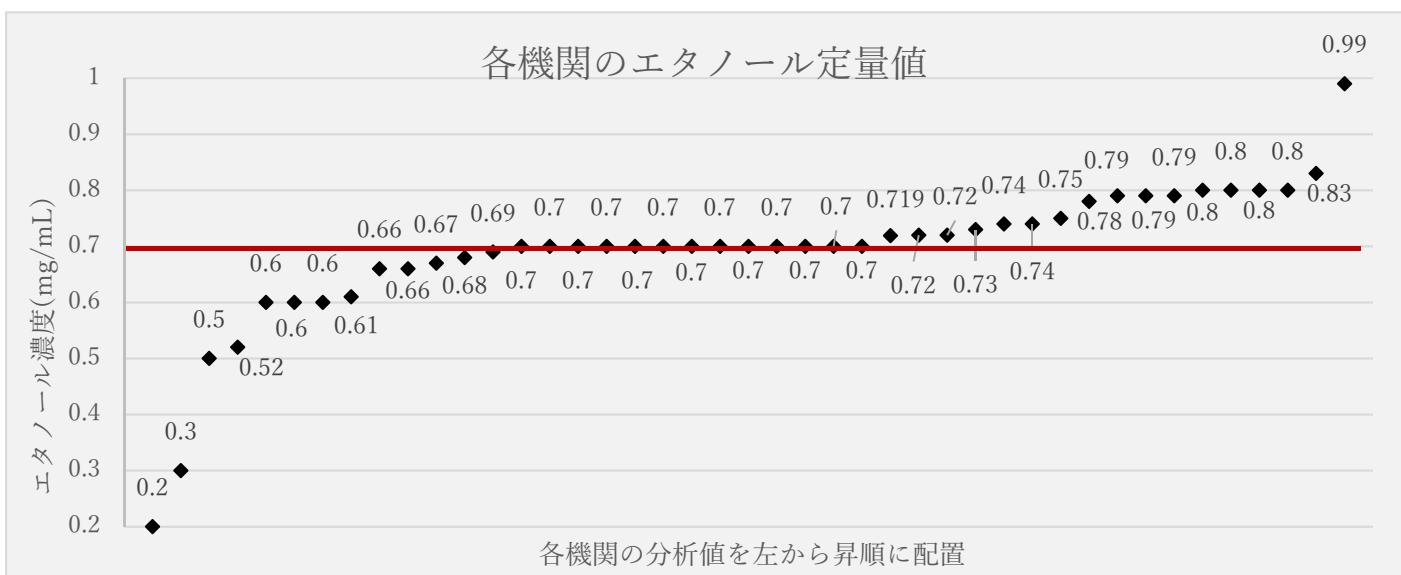
添加化合物	調製濃度(mg/mL)	調製機関分析濃度(mg/mL)
エタノール	0.7	0.71
アセトン	0.1	0.11

◆ エタノール濃度は一般の成書や文献では小数点第 1 位までの数値で症状などを提示している。

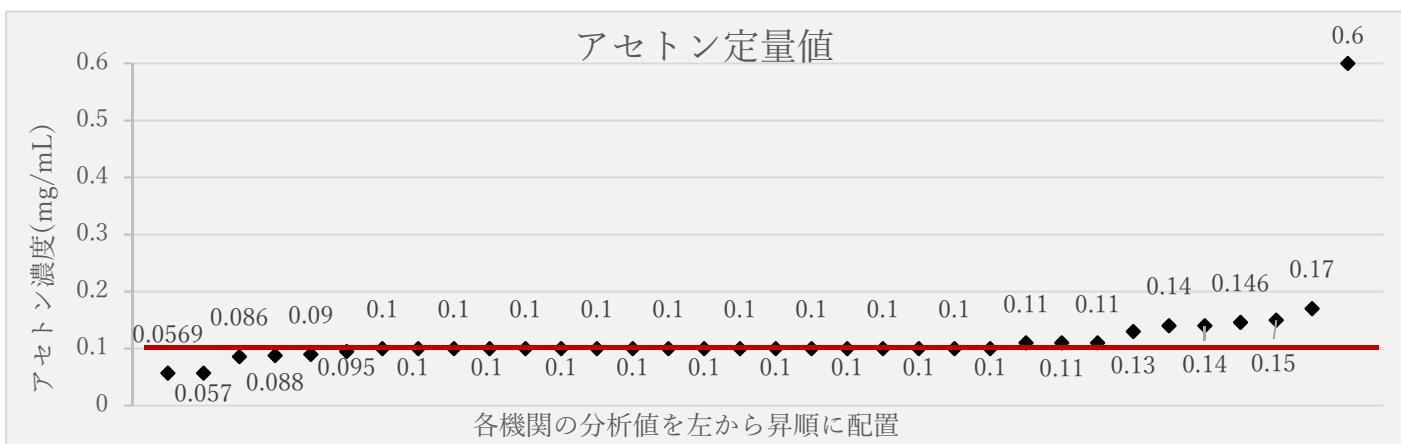
◆ それ以下の細かい数値での症状の違いは明記されていない。

◆ 提出された結果を小数点第 2 位となるように四捨五入して解析した。

【各機関の定量値の分布】



◆ 小数点第 2 衡目を四捨五入すると調整値(0.7 mg/mL)となったのは 43 機関中、24 機関(56%)であった。(注意: これが妥当ということではない)



◆ アセトンを検出した機関は 37 機関、そのうち定量 34 機関、定性のみ 3 機関であった。

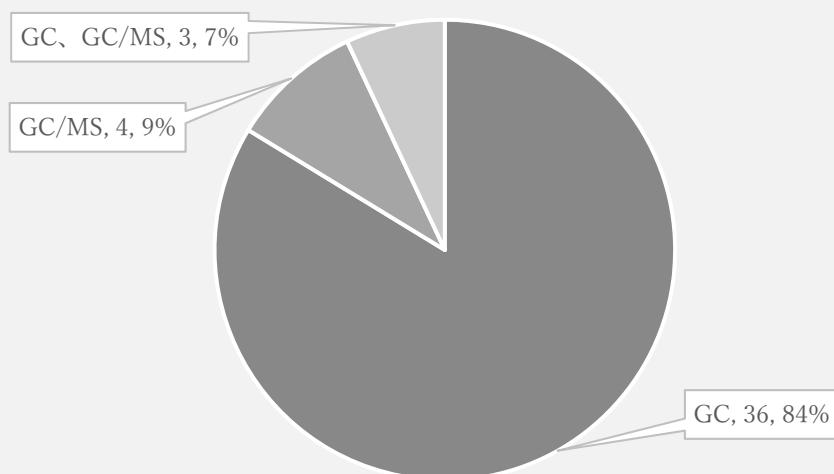
【エタノールとアセトン以外の検出物質】

物質	検出(報告)機関数	濃度 (mg/mL)
アセトニトリル	6	0.10、0.1、0.09、0.091
アセトアルデヒド	2	0.048
メタノール	2	0.1、微量
β -ヒドロキシ酪酸	1	0.4
n-プロパノール	1	0.15

- ◆ アセトニトリルは標準溶液の溶媒として使用。
- ◆ アセトアルデヒドはエタノールの酸化で生成されうるが、大気中ではごく微量と推定される。

【分析機器及び分析方法】

アルコール分析に使用している機器（分析機器、機関数、割合）



- ◆ 43 機関中 36 機関(84%)が GC(ガスクロマトグラフ)、4 機関(9%)が GC-MS(ガスクロマトグラフ質量分析計)、3 機関(7%)が 2 者を併用していた。
- ◆ 分析方法は 43 機関中、41 機関がヘッドスペース法、1 機関がマニュアルインジェクション法、1 機関が未回答であった。

【コメント・質問など】

他物質検出に関するここと

- アセトニトリルも検出されました。
- 他にもピークが検出され、戸惑っています。
- ルーチン検査で測定している揮発性物質でした。
- 酢酸エチル、アセトアルデヒドも検出されました。
- エタノール、アセトン以外にアセトニトリルも検出された。
- 第3のピークが検出されたため、定性・定量検査した（アセトニトリル 0.09mg/mL）。
- エタノールとアセトン以外にアセトニトリル（0.1mg/mL）と思われるピークも検出されました。
- メタノールは試薬調整時のコンタミと判断して定量しませんでした。（アセトン、アセトニトリル、メタノール）
- 記入項目に「*検出された揮発性物質1種を」と記載されていましたが、検出された成分は全て記入しました。（アセトン、アセトニトリル、アセトアルデヒド）
- エタノール、アセトン以外にも揮発成分が認められたので GC/MS を実施しました。正確な定性はできていませんが、今回の対象物ではないと判断しました。
- エタノール以外に1種類の揮発性物質とありましたか、n-プロパノール（0.15）も検出されました。何方が違う物なのでしょうか。2種類の物質ではなかったのでしょうか。

その他、分析法に関するこことなど

- パックドカラムでの分析。
- シアン分析で GC/MS を使用するのでアルコール類も同時に分析している。
- ケトン体三分画等は外注にしてしまうので検量線等は作成していない。
- 分析に際し、検体について原液（1倍）、2倍希釈、5倍希釈して確認しました。また、2種の装置（異なるメーカー）でも確認。
- アセトンの定量では、1点(1.0 mg/mL)検量線による簡易的な方法を用いた。
- 大変申し訳ありませんが、今回はエタノールの定量値のみ回答させていただきます。
- サンプルチューブが2本入っておりましたが、同一サンプルとして測定は1本だけ行いました。

✓ 特ない場合は省略した。

3. 薬物スクリーニング検査

【参加機関】 39 機関

【添加化合物】

◆ 今回は以下の 2 種とした。

添加化合物	採用理由
①アムロジピン	✓ 頻繁に検出されるが、血中濃度で困惑する ✓ 商品名デエビゴ®
②レンボレキサント	✓ オレキシン受容体拮抗薬でベンゾジアエピン系とは異なる作用機序 ✓ 新しい薬剤で今後使用頻度が増すと推測される

【各機関の検出結果】

対象 2 化合物の検出状況	機関数
アムロジピン、レンボレキサントの両物質を検出	16
アムロジピンのみ検出	12
レンボレキサントのみ検出	3
アムロジピンと添加化合物以外を検出	2
レンボレキサントと添加化合物以外を検出	—
対象 2 化合物以外を検出	3
2 物質とも検出できず	3

◆ 39 機関中 16 機関(41%)で対象 2 化合物を検出した。

◆ レンボレキサントは新規薬物であり、スクリーニング対象としていない機関がある。

その他の検出薬物とその濃度 (μg/mL)

ゾルピデム (0.135) 、ゾピクロン (0.108) 、リドカイン (0.001) 、アセトアミノフェン (0.08) 、エтенザミド、ビペリデン (0.042) 、ジフェンヒドラミン (0.001) 、フェンテルミン、ニコチニアミド
--

【分析機器】

分析機器	機関数
LC/MS/MS	17
LC/MS/MS GC/MS	14
GC/MS/MS	2
LC/MS/MS GC/MS/MS	2
GC/MS	1
GC/MS LC-QTOF	1
LC/MS/MS LC/MS	1
LC/MS/MS GC/MS LC-QTOF/MS	1

◆ 「LC-MS/MS のみ」が 17 機関、「GC-MS・LC-MS/MS 併用」が 14 機関であった。

4. 薬物定量検査

【参加機関】 28 機関

【添加濃度】

添加化合物	調製濃度(µg/mL)	調製機関分析濃度(µg/mL)
アムロジピン	0.1 µg/mL	0.092 µg/mL
レンボレキサント	0.05 µg/mL	0.043 µg/mL

✓ 今回、アムロジピンは文献的致死濃度を、レンボレキサントは治療域程度に設定した(下表参照)。

化合物	治療域(µg/mL)	中毒域(µg/mL)	致死域(µg/mL)
アムロジピン ¹⁾	0.003-0.015	0.088	0.1-0.2
レンボレキサント ²⁾	0.01-0.07 ²⁾	文献データ無し	文献データ無し

- 1) M. Schulz, et al. Revisited: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 1,100 drugs and other xenobiotics. Critical Care 2020.
- 2) デエビゴ®添付文書、日本人健康成人男性 2.5 mg 1 日投与時の Cmax と 10 mg 投与 14 日目の Cmax。

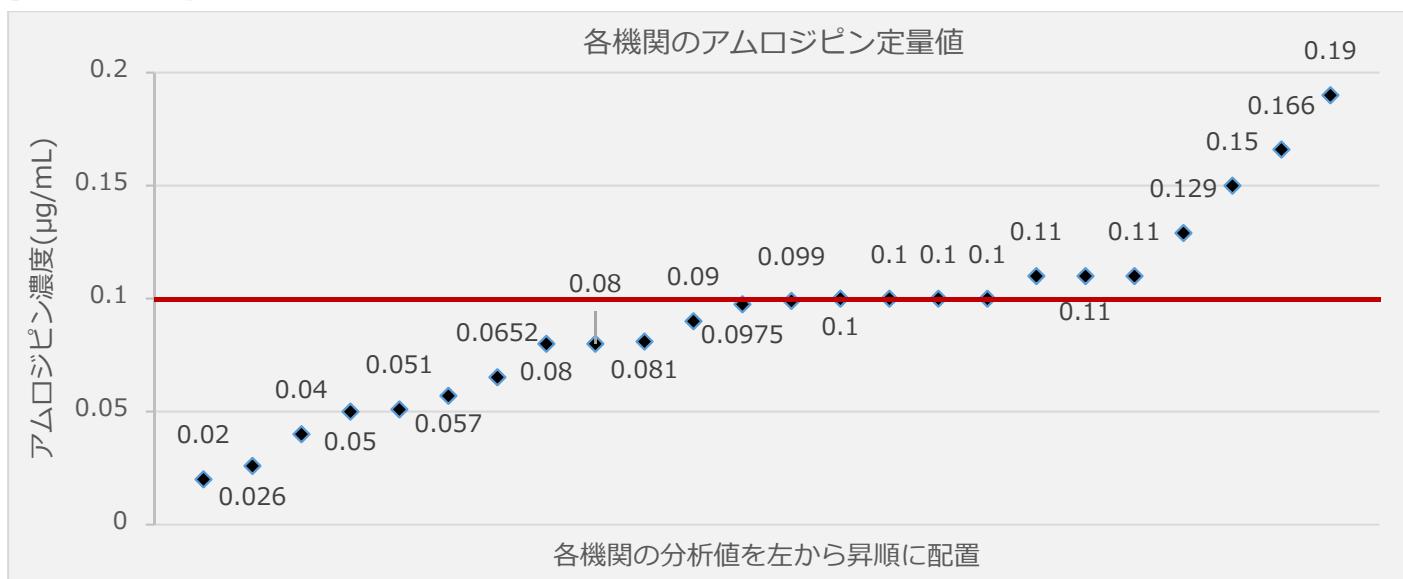
【分析機器】 28 機関

分析機器	機関数
LC/MS/MS	26
LC LC/MS/MS GC-MS	1
LC-GTOF	1

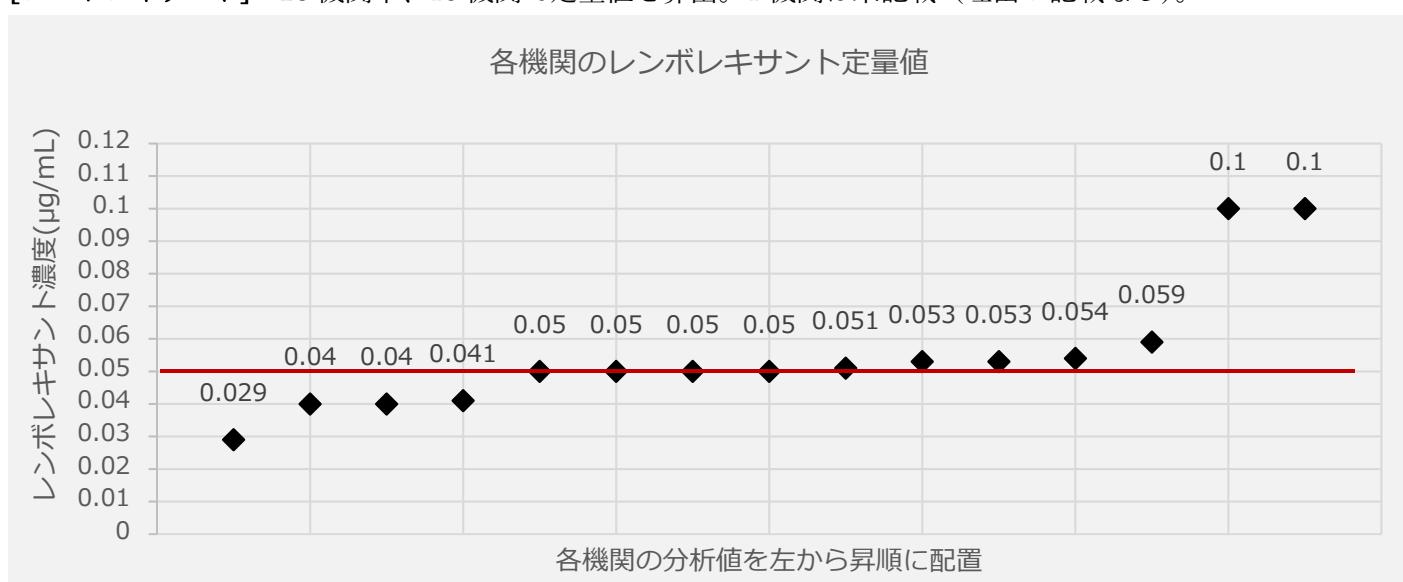
◆定量分析では LC-MS/MS が最多であった。

【各機関の定量値】

[アムロジピン] 28 機関中、24 機関で定量値を算出。4 機関は 2 物質とも添加薬物以外の定量値を報告。



[レンボレキサント] 28 機関中、15 機関で定量値を算出。1 機関は未記載（理由の記載なし）。



【薬物分析検査に関するコメント】

複数の分析方法について

- 2種以上の分析機器で定性：情報を補うため。
- LC/MS/MS と GC/MS(NAGINATA)でスクリーニング検査を行っている。
- 今回は LC-MS / MS のみでの定量でしたが薬物の濃度により LC と GC-MS も使用しています。
- データベース登録されている薬毒物数が異なるため、2種以上の分析機器でスクリーニングを行っている。
- アムロジピン、アセトアミノフェンいずれも 3 点検量線(0.05, 0.125, 0.25)で定量を行った。定量値は平均値(n=3)である。但し、アセトアミノフェンは結果の変動が大きかった。
- LC/MS/MS と LC/MS の 2種でスクリーニングすると、お互いの検出できない薬物を補い合えるから。
- スクリーニング分析では、ルーチンの薬毒物検査で使用している LC/MS/MS と GC/MS (NAGINATA) を使用した。
- 2種以上の分析機器で定性（スクリーニングも含む）を行っている理由：①分析機器によって得手不得手の薬物があるため。②異なる機器でも同じ結果ができるか確認のため。③ライブラリーに登録されている薬物が機器によって違うため。
- ②STA_ChromaLynx、Nicotinamide 及び Tamoxifen がヒットしました。Tamoxifen はスコアが低く、候補からは外れると思われる。③ToxMRM、(Positivemode) chromato ニコチニアミドが検出されました。ニコチニアミドはコンタミでしょうか？2つの分析装置を用いることで、薬物の特性に対応し、スクリーニングの精度を高めています。定量に関しては、定性結果を受け、適した装置で検査を行っています。いくつかの前処理法を試しましたが、方法によって定量結果が異なってしまったため、最終的には添加法で決定しました。

添加薬物の不検出について

- 検出できませんでした。
- 確認のため GCMS を併用しているが、今回は 1種も検出されなかった。
- レンボレキサントはスクリーニング対象化合物に入っていませんでした。
- 今回の定性検査で、1種類しか検出できませんでした。
- 次回のセミナーで勉強させていただきます。今回は 1つも検出できませんでした。そろそろ、スクリーニングの対象化合物について選定し直そうと考えていたのですが、皆さんは対象化合物をどのように選択しているのか教えてほしいです。1薬物しか見つかりませんでした。添加された薬物が測定対象外かと思われます。

その他

- ゾピクロンの分析が安定せず、苦戦しました。
- 大変貴重な機会を設けていただき、ありがとうございました。
- 分析値がどれくらい誤差があるか確認できる良い経験だと思います。
- アムロジピンの標品が間に合わなかったため定量できませんでした。
- 今年は難易度を上げたような印象を受けましたが、今後もやや難しみでよいと思います。
- 2剤とも、実務であれば N.D. としてもおかしくないほどの低い濃度だった。検体の凝血が関係しているのか不安を感じた。

【薬物分析検査に関する質問】

質問	回答
・ 今回の分析の定量値の最小単位は、どの程度まで使用しても良いのか教えてくださると助かります。	✓ 物質、分析機器や条件、その値を何に用いるかなど、場合によって提示すべき定量値の桁数は変わってきます。正確に調整できる限界、正確に分析できる限界、評価に必要な桁数を具体的に考えなければなりません。
・ 薬物の定量値ですが、例に倣って下一桁までを記入するのでしょうか。記入の仕方がわかりませんでした。	✓ 例：仮にエタノールの濃度が 1.013 mg/mL まで正確に分析できる条件下（小数点 4 桁目は何回分析しても不正確）にあったとしても、エタノールの生理作用は 1.0 や 0.5 の単位でしか文献には載っていないので、それより詳細な提示は、生理作用の評価としては意味がない。どこまで正確に数値を出せるかを主張したいのであれば、意味はあるかもしれません。
・ アムロジピンの D 体を見つけられなかったので、内標を何にすれば良いのか教えていただけます。	✓ ブラインドテストの場合は、桁数の記入の規則はありません。例に従って記入して頂くか、各機関で日頃、報告している桁数でも構いません。
・ IS に何を使っていますか？	✓ 内部標準物質は理想的には分析対象物質の重水素体を用いるべきですが、製造されていない、高額であるなどの理由で入手困難な場合もあります。その場合は構造が類似している物質や化学的・物理的性質の似ている物質を用いると良いです。また、何種類も内標を入れる訳にはいきませんので、1、2種類選んで入れる場合が多いと思います。例：ベンゾジアゼピン類 1 物質、バルビツール酸類 1 種など。
	✓ ただし、内標をどのような意味で用いているかによります。抽出操作が一定の条件でできているか、機器への注入量が一定であるかを確認するためであれば、分析対象物と区別できるものであれば何でも良いと思います。皆さんが良く用いているものに d5-ジアゼパムがあります。
	✓ GC/MS の分析システム NAGINATA では内部標準物質として d5-ジアゼパムを使用しているので、LC-MS/MS でも同様に d5-ジアゼパムを使用してよいと思います。

- 不安定な薬毒物の分析ではどのように対処していくのがよいのか教えていただけますでしょうか。合わせて、他に不安定であったり分析や試料の保存に注意する必要のある薬毒物を教えていただけますでしょうか。
 - スクリーニングの対象化合物について選定し直そうと考えていたのですが、皆さんは対象化合物をどのように選択しているのか教えてほしいです。
- ✓ 分解などで劣化が速い化合物は検量線を作成する際に標準溶液を作りなおすことをお勧めします。
 - ✓ その他にプロメタジン、レボメプロマジン、オランザピンなどがあります。
 - ✓ 一般には市販の分析ソフトを用いて、それに追加していく選定法が多いと思います。
 - ✓ 例：島津や SCIEX の標準法医薬毒物分析ソフトに必要に応じて追加するなど。

5. その他(コメントやご意見、ご要望など)

【試料受け取りの凍結/解凍状況】

- ◆ 46 機関すべてで、到着時「凍結」とのことであった。

【試料受け取り時の状態についてのコメント】

- 凝血あり。
- 凝血が認められました。
- 細かい凝血があり、採取しにくかった。
- 凝血があり、試料採取（ピペッティング）の際に詰まることがあった。
- 解凍したら血液が凝血したものがあったが、分析に影響を感じなかった。
- 分析実施日に解凍した際、2チューブともにごろっとした比較的大きな凝血を認めましたが、溶血部分を用いて実施しました。凝血が薬物分析にどのような影響があるのかは分かりません。
- 問題ありませんでした。
- 試料の状態で気になった点はありませんでした。
- 試料は凍結状態であり、解凍した跡なし、凝血なし。
- 凍結状態で受け取りました。問題なかったと思います。
- 特に問題ありませんでした。検体量が多く、大変ありがたく存じます。
- 凍結で到着した試料を一度解凍、分注して再凍結したものを使用して分析しました。揮発性化合物についてはその影響を受けた可能性があります。
- 予定通り 12月 11日に到着しました。試料の状態に特に問題ありませんでした。

【プラインドテストに関する感想・質問・要望】

要望

- 検体状態により施設間差が生じないかについても最終報告にてご回答をお願い致します。
⇒参考資料を参照してください。
- 分析初心者です。エタノール定量において小数点以下いくつまで報告すればよいかアドバイスを頂けましたら幸いです。
⇒薬物分析検査に関する質問を参照してください。
- 薬物の添加前の血液もほしい。
⇒今回ウシ血清を使用しました。特有の物質が混入している可能性もあり、困惑する場合もあると思います。今後、配布も検討します。

実施時期について

- 年末年始の期間に実施されるのは少し辛い。
- 年末年始にあたらない時期の開催を希望します。
- 年末近い時期よりは早い頃に実施していただけるといいなと思います。他業務も重なって、定量分析まで実施しようと思うとやや負担です。
⇒実施時期は検討したいと思います。

添加化合物について

- ・ 今回は新しめの薬物が含有していて、通常使用しているライブラリに入っておらず焦りました。LC-MS のフルスキャンデータから薬物を推測し、その標品との比較検討 (MS/MS やカラム保持時間) で同定に至りました。各薬物の含有濃度は絶妙に感じました！
- ・ レンボレキサントは新薬なので LD50 は算出されていませんが、毒性に関する情報があれば教えて頂きたいと考えております。あと、この薬は消化管吸収効率が低かったと記憶しており、血中半減期も短いため (4 時間程度) 、法医薬物検査で血中から検出されるケースが実際にあるのか否かについて、この機会に情報を頂けると有難く存じます。
⇒セミナーで紹介します。
- ・ 例年、ピークがはっきりと出現し、薬物同定が容易だったのですが、今回の試料はこれといったピークが出現せず同定に難儀しました。2種類の薬物を添加しているとのことだったので2種類の薬物を回答しましたが、もし「○種類の薬物を添加した」との情報がなければ正答することが難しかったと思います。早く正解が知りたいです。
- ・ 数回参加していますが、定量する薬物について、勉強会やメーリングリスト等でアンケートを行い、希望の多い薬物を行うのが良いのではないかと思います。また、急性薬物中毒疑いの法医解剖事例では、抗うつ剤や抗精神病薬等の治療域と中毒域、致死域の狭いものに関しては、薬物定量検査結果が非常に重要であるので、こうした薬物について重点的に行うのも良いと思います。
⇒対象物質については、会員の皆様のご意見も取り入れていく予定です。ブラインドテストとは違う目的で、重要であるが分析に困難を伴う物質なども今後扱うことも検討しています。

その他

- ・ とても勉強になりました。ありがとうございました。
- ・ 準備大変かと思いますがぜひ来年もよろしくお願いします。
- ・ いつもお取り纏め誠にありがとうございます。大変ありがたく貴重な機会だと思っております。
- ・ 毎年自身の精度管理も兼ねて参加させて頂いています。去年のバルプロ酸の定量方法などとても勉強になりました。3月のセミナーもとても楽しみにしています。
- ・ 今年も参加させて頂きました。学内あるいは外部機関から依頼分析を受けることもありますので、当方の薬物分析結果を担保するためにも続けていただきたいと思います。ありがとうございました。
- ・ 2024年1月12日（金）に結果をご報告しましたが、薬物検査結果の単位を誤ってご報告してしまいました。本日の報告結果を反映いただきたく存じます。お手数をおかけしますが、何卒よろしくお願い申し上げます。
- ・ 分析のタイミングで GC/MS と LC/MS/MS、それぞれ部品交換が必要なメンテナンスが入り通常業務がたまってしまったので、そちらを優先しました。GC/MS で検出できない場合、前処理等を変更して LC/MS/MS 併用で再検討しています。が、今回は締め切りに間に合いませんでした。

【参考資料】試料に凝血などが認められた機関の分析値

検体の状態	添加化合物（添加濃度 $\mu\text{g/mL}$ ）			
	エタノール	アセトン	アムロジピン	レンボレキサント
	0.7	0.1	0.1	0.05
解凍後のサンプリング時に凝固塊を認めました。	0.719	0.086	不検出 ¹⁾	不検出 ¹⁾
凝血がありました。	実施せず	実施せず	0.0652	不検出 ²⁾
凍結で到着した試料を一度解凍、分注して再凍結したものを使用して分析しました。揮発性化合物についてはその影響を受けた可能性があります。	0.68	0.10	0.11	不検出 ²⁾
解凍したら血液が凝血したものがあったが、分析に影響を感じなかった。	0.7	0.1	0.1	不検出 ²⁾
凝血があり、試料採取（ピペッティング）の際に詰まることがあった。	0.67	0.1	0.11	0.053
分析実施日に解凍した際、2チューブともにごろっとした比較的大きな凝血を認めましたが、溶血部分を用いて実施しました。凝血が薬物分析にどのような影響があるのかは分かりません。	0.79	定性のみ	不検出 ¹⁾	不検出 ¹⁾
細かい凝血があり、採取しにくかった。	0.72	0.15	0.19	0.029
凝血あり。	0.66	0.11	0.081	検出(定性のみ)
凝血が認められました。	0.66	0.088	0.08	0.05

1) 添加化合物以外を検出

2) アムロジピンのみ検出

◆ 試料に凝血が認められた機関の定量結果は概ね妥当であると思われ、凝血や再凍結・再解凍による影響は大きくないと考えられます。

6. 添加物情報を得た後の分析結果に関するご意見など

- ✓ いずれの薬物もスクリーニング DB に登録していないものだったので検出に苦労しました。
- ✓ レンボレキサントはスクリーニング対象外だったため検出できませんでした。メソッドをこまめに更新する必要性を痛感しました。
- ✓ アムロジピンは NAGINATA ライブライリーと LCMS のライブラリーに入っていたのですが、NAGINATA ではヒットせず、LCMS の方も一致率 69% と絶対入っていると確信がもてる値ではありませんでした。
- ✓ レンボレキサントはスクリーニング対象化合物だったため、比較的新しい薬品のスクリーニング対象への追加と、あまり使われていない薬品の削除など、スクリーニング対象薬物の棚卸しが必要だと考えさせられました。
- ✓ アセトンおよびエタノールの定量分析の結果、いずれも低い値を示しました。エタノールは 0.52 mg/mL、アセトンは 0.057 mg/mL でした。分析を繰り返し、標準添加法と内部標準法の両方を使用しましたが、毎回同じ結果が得られました。
- ✓ 今回、レンボレキサントは LCMSMS、GCMS 共に検出する事が出来ず、残念でした。標準品を頂いたのち、LCMSMS のメソッドに反映させて頂きたいと思います。また反映後、残ったブラインドテストサンプルを使って分析してみたいと思います。貴重な標準品をいただける事に心から感謝致します。ありがとうございます。
- ✓ アムロジピン、レンボレキサントとともに、当教室の LCMS/MS ライブライリ登録されておらず、検索に引っかかってこないため、検出は出来なかった(初回分析時、内部標準物質以外の薬物は何も検出されなかった)。結果公開後にクロマトを確認したが両剤のピークは確認できず、今回の 2 剤については今後、分析条件も含め検出できるよう検討していきたい。また私が検出薬物として報告した 2 剤については、当初両剤とも定量下限以下の濃度であり、目を皿のようにして低濃度域検量線を作成して無理矢理引っ掛けってきたものであるため、「これ、合ってるのか?」と不安があったが、やはり違っていた・・・しかし、これらの薬剤についても、微量とはいえキャリーオーバーしていることが判明したため、ガードカラムやカラムの交換時期、分析毎の配管・ニードル等のクリーニングなど、改善すべき点が洗い出せたため今回のブラインドテストに参加させていただいて良かったと思う。

質問	回答
✓ 添加薬物の濃度において、どの程度(例：規定値の 10%以内)なら誤差範囲といつて構わないのかを、アルコールと薬物の両方について教えていただけますと幸いです。	◆ 実験系のガイドライン(Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology 2019)では薬物：真度(%bias) 20%以下アルコール類：真度(%bias) 10%以下が推奨されています。 https://www.aafs.org/sites/default/files/media/documents/036_Std_e1.pdf 実務でもこの方針で差し支えないと思います。
✓ 今回の添加薬物の 1 つであります、「アムロジピン」につきまして、当機関におきましても以前より判断に躊躇する薬物であります。GC/MS に関しては、統計的	◆ 前提として生前の血中濃度と死後の血中濃度が同じか否かを知る必要がありますが、それを検証した論文がありません。

<p>に8割強、LC/MS/MSに関しては5割ほど検出件数に対して致死域量に値します（あくまでも相対定量値での判断ですので確定的なデータではありません）。血中の濃度指標には、『薬毒物情報インデックス』の内容を用いております。この中には、致死域量の濃度指標が2パターンあり、加えての混乱の要因でもあります。他機関におかれましての「アムロジピン」に対する血中濃度の判断をお聞きしたいです。</p>	<p>◆ 投薬管理されている人でも高値の場合があり、生前に当該薬物の副作用発現がなかったとしたら、死後に上昇するのか、長期運用では添付文書情報とは異なり何等か血中濃度が上昇することがあるのかは残念ながら現時点では不明です。</p> <p>◆ 中毒を判断する場合には、血中濃度は最重要項目ではありますが、その他の解剖結果や場合によっては死亡状況等も考慮して判断しなければなりません。致死濃度に達していないとも、薬物が死亡に関連したと判断するしかない場合もありますし、致死濃度であっても他に優先すべき死因がある場合は、中毒死とも言えない場合もあります。</p> <p>◆ 上記。</p>
<p>✓ 今回の薬物の濃度はどのような濃度という想定でしょうか。中毒量?実際によくある濃度?アムロジピンの採用理由にあるとおり、私も濃度に困惑しています。過量服用ではないと思われる事例でも、0.1前後や高めの値になることがありますが、どの例でも高いわけではなく、文献での致死域もかなり幅があります。セミナーで皆様の困惑と対する考え方を教えていただければありがたいです。</p>	

【再分析に関する助言】

質問	回答
<p>✓ 前処理に Oasis HLB の固相抽出カラムを使用しています。GS/MS ではアムロジピンがコレステロールとリテンションタイムが被っているのか上手く検出できず、代謝物の有無を確認する様にしています。レンボレキサントに関して、GC/MS で検出した事はありません。適当な前処理などあればご教授ください。</p>	<p>◆ NAGINATA の前処理にならって、アセトニトリルで除タンパク後、QuEChERS および Captiva ND Lipids を用いるとよいでしょう。</p> <p>◆ アムロジピンは LC-MS/MS に比べ、GC/MS では検出されにくく、NAGINATA で+の判定にならないことが多いです。</p> <p>◆ 当初 GC/MS では検出されなかったが、新しいカラムをつけた後に同じサンプルを分析したところ、+の判定となった経験があります。メンテナンスやカラムの交換もお試しいただくとよろしいかと思います。</p>
<p>✓ レンボレキサント標準品の販売先を見つけることが出来ませんでした。販売しているメーカー等、入手ルートの情報がありましたらご教示のほどお願いいいたします。</p>	<p>① Toronto Research Chemical で販売、L215945、フナコシ経由で納品</p> <p>② TRC は高くて納期が 1.5 か月要するので、フナコシ→CAB で購入</p>

✓ 今回、サンプル中の凝血の有無は検出濃度に影響を及ぼしたのでしょうか。実務上、凝血が存在する検体はあります。その際、今回の2剤以外でも、凝血の影響を受ける薬剤がもあるならば情報が欲しいです。Ex)抽出に注意を要する、凝血はホモジナイズしなければならない、凝血があった時点で正確な濃度は検出不可、あるいはあらゆる薬剤は特に凝血の影響は受けない等々、分析者の先生方のご知見や対処法があるならば参考にさせていただきたいです。

- (3) Biosynth Ltd. CAB-FL103847-10 10mg
59,653円
- ◆ 今回のテストでは凝血の有無は検出濃度に影響はなかったようです（参考資料）。
 - ◆ 凝血が存在する検体では、多くは凝血していない血液部分を用いて分析していると思います。凝血のみの場合はホモジナイズして使用していると思います。
 - ◆ 凝血はピッティングに大きく影響しますので、分注の際には注意を払わなければなりません。
 - ◆ 法医学分野では試料の死後変化や薬物の再分布があるので、凝血が分析に及ぼす影響を評価することは難しいと思います。凝血は適宜ホモジナイズしたり、避けたりする程度で大きな問題はないと思われます。今回の結果も参考になると思います。

7. 再分析報告

【再分析報告】7 機関からの再分析報告

機関	再分析理由・結果	改善点や感想など
1	<p>レンボレキサントが当教室の薬毒物スクリーニング DB に登録されておらず検出できなかったので、標品を研究会から譲与していただき分析しました。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. LC-QTOFMS（ポジティブイオンモード）で検出可能で、当教室のスクリーニングシステムに新規登録したところ、ブラインドテストサンプルが検出されるようになりました。 2. LC-MSMS で定量した結果は 0.038ug/mL で、真値より低くなりました。 	<p>貴重な標品を分けてくださいありがとうございました。早速定量してみたのですが、定量値が真値よりかなり低くなってしまいました。アドバイスがあれば伺いたいで、お恥ずかしいですが報告しました。どうぞよろしくお願ひいたします。</p> <p>抽出方法は QuEChERS 法、内部標準を何にすれば良いかわからなかったので、半定量で用いている Diazepam-D5 にしました。0.05ug/mL の QC サンプルでは日内差、日間差ともに accuracy は 15%以内に納まっています。</p> <p>⇒サンプル濃度での真度良好であり、かつ精度に著しい問題があるようには見られません。検量線作成の際の血液の種類、性状などが関与している可能性があるかもしれません。なお、同じ構成で分析を行った機関の結果は、0.55 μg/mL でした。LC-MS/MS, QuEChERS 法, Diazepam-D5 を使用し、Accuracy は 10 -100 μg/mL 範囲で inter-,intra-assay いずれも 10%以内、ヒトブランク全血を用いての検量線作成です。</p>
2	<p>初回分析結果について、アムロジピンの濃度 (0.02 ug/mL) が真の値 (0.092 ug/mL) と大きくずれていたため、アムロジピンの定量分析を改めて行った。</p> <p>アムロジピンの初回分析結果 : 0.017 ug/mL 再分析結果 : 0.098 ug/mL 真の値 : 0.092 ug/mL</p> <p>したがって、再分析で算出したアムロジピン濃度は真の値に近い結果となった。</p>	<p>初回分析では、メタノールに希釈したアムロジピン溶液 (10 mg/mL、数年前に作成して-4°C保管) を使って検量線を作成した（粉の標品が研究室に無かったため）。再分析では、アムロジピン標品を購入してメタノール希釈液を改めて作成し、検量線を作り直した。その結果、再分析結果は真の値と一致したことから、以前からストックしていた溶液に問題があったと考えられる。</p>
3	<p>アムロジピンの定量値 : 0.116μg/ml</p> <p>初回はスクリーニングのみで定量行っていませんでした。</p>	
4	<p>初回分析結果 Amlodipine 0.19 μg/mL, Lemborexant 0.029 μg/mL</p> <p>再分析結果 Amlodipine 0.09 μg/mL, Lemborexant 0.05 μg/mL</p>	
5	<p>レンボレキサント : 初回検出できず、標準品を用いて再分析時 0.05 μg/mL</p>	<p>送付頂いた標準品を用いて最適化を行い、レンボレキサントをスクリーニングメソッドに追加（機器は島津）</p>

内標準法・標準添加法で分析し添加濃度と合致

標準品の送付、ありがとうございました。

定量結果：55.5ng/mL。レンボレキサントの前処理はアセニトを用いた除タンパク法を採用しました。標準品を所有していなかったため今回が初回定量です。レンボレキサントのみ定量しました（アムロジピンの標準品所有していなかったため）。

レンボレキサント

初回：検出(-)

再分析：0.055 μg/mL

前処理はアセニトを用いた除タンパク法を採用しました。定量には内部標準法を使用しました。検量線の範囲は 2-100ng/mL で、内標は Diazepam-d5 を使用しました。分析機器は LC-MSMS を使用しました。

7

スクリーニングのデータベースにレンボレキサントの登録がなく、初回は検出できませんでした。標準試薬を研究会から送付頂き、LC-MS/MS で確認と定量分析が出来ました。

LC-MS/MS、QuEChERS 法、内部標準 Diazepam-d5 の組み合わせです。Accuracy は 10 -100 ng/mL 範囲で inter-, intra-assay いずれも 10%以内、ヒトブランク全血を用いて検量線を作成しました。

ご参加いただき、ありがとうございました。

皆様のご意見を伺いつつ、より良い制度へ発展できますように検討を重ねていきたいと思います。

今後も、忌憚のないご意見、ご感想を頂けましたらと思います。

アムロジピン処方歴のある法医剖検例における血液中アムロジピン濃度

東京慈恵会医科大学 法医学講座
前橋恭子



【検討事項】

I. AmlodipineがLC-MS/MSによる薬物スクリーニングで検出された法医解剖事例の血液中Amlodipine濃度

対象: 2020年4月から2021年3月に薬物スクリーニングを実施した849事例
男性: 578例 (平均年齢: 60.9歳±17.3歳)
女性: 271例 (平均年齢: 63.8歳±21.1歳)

心臓血からAmlodipineが検出された事例: 82例
男性: 58例 (37~95歳、平均年齢: 68.1歳±14.3歳)
女性: 24例 (42~93歳、平均年齢: 74.9歳±14.8歳)

Amlodipineの処方歴が確認された事例: 64例
男性: 48例 (37~95歳、平均年齢: 69.8歳±14.2歳)
女性: 16例 (48~93歳、平均年齢: 78.3歳±11.3歳)

【背景と目的】

当大学における法医解剖事例の薬物スクリーニング分析について集計したところ、市販の風邪薬およびAmlodipineの検出率が高かった。

これまでの経験から、あきらかにAmlodipineの作用とは関係がないと思われる死因の事例においても治療域を超えるものが多く観察された。

Amlodipine検出事例のうち、Amlodipineの処方の記録があった事例について調べ、血液中Amlodipine濃度の評価について検討した。

【LC-MS/MSによる薬物スクリーニング方法】

前処理

血液試料に内部標準物質 (Diazepam-d5およびPhenobarbital-d5) を加え、アセトニトリルで除タンパク後、遠心分離し、上清を分析試料とした。

分析機器条件

Agilent 1260 Infinity LC システム
カラム : ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1×100mm, 1.8mm
移動相: A : 0.1%HCOOH+10mM HCOONH₄ B: ACN
グラジェント条件 : 90%A/B---(20min)---0%A/B
流量 : 0.25mL/min
カラム温度 : 40 °C
試料量 : 2 μL

Agilent 6420 Triple Quad LC/MS
解析ソフト : Mass Hunter
イオン化法 : ESI
測定法 : trigger MRM
乾燥ガス流量 : 10L/min at 300°C
ネブライザー : 50psi
フラグメントー電圧 : 135V

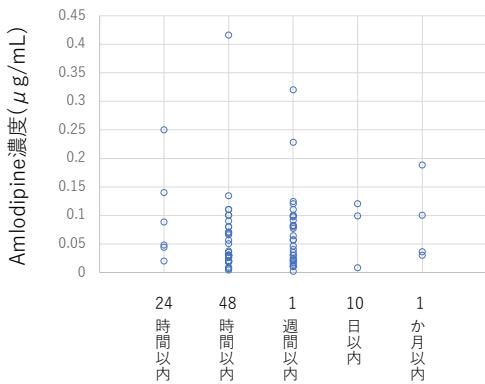


Fig.1 死後経過時間と血液中Amlodipine濃度との関係(82例)

Amlodipine処方事例:64例

A群 : Amlodipine中毒が疑われた事例: 1例

B群 : Amlodipineとは無関係の死因: 58例

内因死 : 32例

心血管系疾患: 22例
消化器系疾患: 6例
呼吸器系疾患: 3例
脳血管系疾患: 1例

外因死 : 26例

転倒・転落: 8例
溺死: 8例
窒息: 4例
低体温: 3例
焼死: 2例
胸部損傷: 1例

C群 : 死因不明: 5例

Amlodipine中毒が疑われた事例(1例)の概要

80代 女性

室内で、ぐったりしているところを家族により発見されるも応答無く、救急搬送されるも、病院到着時死亡確認。ゴミ箱にAmlodipine35錠分の空シートあり。
死亡から1日以内に法医解剖実施。

血液中から

Amlodipine	0.25 μg/mL
Furosemide	0.54 μg/mL
Ethanol	検出されず

Furosemideは治療域(1.8-7.5 μg/mL)を大幅に下回ること、
および、解剖所見や状況から、Amlodipineによる中毒が疑われた。

Table I 死因別の血液中アムロジピン濃度(μg/mL)

	事例数	濃度範囲	平均値	中央値
A群：アムロジピン中毒が疑われた事例	1	0.25	0.25	0.25
B群：アムロジピンとは無関係の死因	58	0.002-0.416	0.065	0.042
内因死	32	0.002-0.228	0.063	0.049
心血管系疾患	22	0.01-0.228	0.074	0.065
消化器系疾患	6	0.002-0.099	0.048	0.05
呼吸器系疾患	3	0.011, 0.019, 0.05	0.027	0.019
脳血管系疾患	1	0.017	0.017	0.017
外因死	26	0.004-0.416	0.069	0.033
転倒・転落	8	0.018-0.416	0.112	0.078
溺死	8	0.004-0.1	0.036	0.03
窒息	4	0.018-0.124	0.081	0.09
低体温	3	0.022, 0.082, 0.091	0.065	0.082
焼死	2	0.03, 0.03	0.03	0.03
胸部損傷	1	0.03	0.03	0.03

Table 2 これまでに報告されている血液中Amlodipine基準値($\mu\text{g}/\text{mL}$)との比較

	Schulz et.al.*	A群	B群	Linnet et.al. **	A群	B群
昏睡～致死域	0.1-0.2	1例 0.25	13例	0.9-2.7	-	-
中毒域	0.088 (0.015-0.1)	-	42例	0.067-0.39 (0.024-0.9)	1例 0.25	46例
治療域	0.003-0.015	-	8例	0.001-0.024	-	17例

注：（ ）の数字は演者が加筆

* M. Schulz et.al. Crit Care, 24, 195, 2020

** K. Linnet et.al. J Anal Toxicol, 35, 227-231, 2011

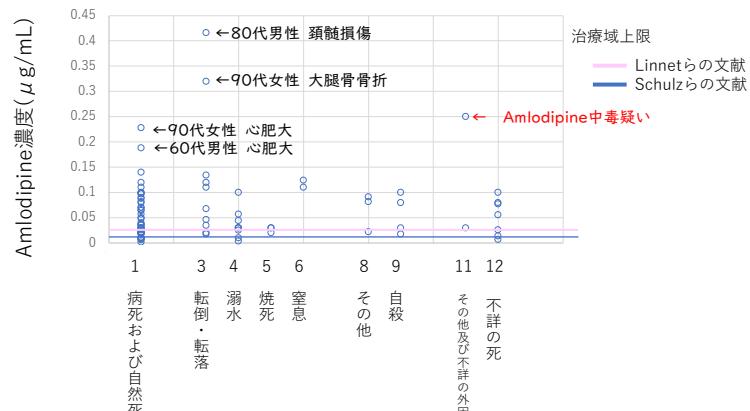


Fig.2 死因の種類と血液中Amlodipine濃度(82例)

【まとめ】

- 死因がAmlodipineとは関係の無い63例のうち、血液中濃度が治療域以下であったものは、Schulzらの基準値では8例のみ、Linnetらの基準値では17例のみであった。
- Amlodipine中毒死例は、Schulzらの基準値では致死域に達すると判断されたが、Linnetらの基準値では中毒域であった。また、Amlodipineとは無関係の死因の事例でもSchulzらの基準値では致死域と判定されるものが58例中13例あった。
- 以上の結果から、治療域の基準値は、Linnetらのものよりもさらに高いと推測されるが、正確な基準値を設定するには、Amlodipineは半減期が約36時間と長いことから、長期服用者の薬物動態などを精査する必要があると思われた。また、血液中濃度の評価に関しては、大量服用によるものか、長期服用によるものかの見極めが必要と思われた。

アムロジピンの死後濃度評価

千葉大学付属法医学教育研究センター
千葉大学大学院薬学研究院法中毒学研究室
永澤明佳

[はじめに]アムロジピは長時間作用型ジヒドロピリジン系カルシウムチャネル拮抗薬の一つであり、高血圧治療の第一選択薬として世界中で処方される薬剤である。過量服用においてはその薬理作用から、血管平滑筋の過度な弛緩による末梢血管拡張に伴う血管抵抗の減少による低血圧や、循環不全によるショックが生じる。これまでに過量服用による中毒・死亡事例も数多く報告されており、法医分析においても注意が必要な薬剤である。一方、アムロジピンは全血/血清比が高いことや死後再分布を起こすことから、臨床データにおける血清治療濃度と比較し高濃度で検出されることが多く、その濃度評価に苦慮することが多い。今回は当施設における解剖事例のアムロジピンの死後濃度評価について情報提供を行う。

[解剖事例分析の流れ]当施設では、解剖事例の心臓血及び尿を用いて LC-MS/MS による薬物スクリーニングを実施、スクリーニングメソッドに組み込まれた簡易検量線を用いて検出薬物の簡易定量値を算出後、この数値をレポートアウトした報告書を執刀医に提示している。レポートアウトには、薬毒物情報インデックス（日本医事新法社）を参考にした治療域、中毒域、致死域が並列して記載されており、特に簡易定量値が治療域を超える薬剤に関しては、その濃度を赤字で記載している。この報告書をもとに、執刀医が定量が必要と判断した事例について定量検査を実施している。

[本施設におけるアムロジピン検査の実態]2018年1月から2024年1月までにスクリーニング検査にて血液からアムロジピンが検出された事例は210事例、そのうち心臓血を用いた事例が202事例、大腿血を用いた事例が8事例であった。スクリーニング検査時の簡易定量値が治療域(0.003-0.015 µg/mL)で検出された事例は6事例のみであり、その他204事例はすべて治療域を超える濃度であった。心臓血における簡易定量値は0.007-1.4 µg/mL、平均0.14 µg/mL、中央値0.097 µg/mL。大腿血における簡易定量値は0.007-0.21 µg/mL、平均0.055 µg/mL、中央値0.043 µg/mL。これら簡易定量値を元に執刀医依頼で定量を実施した事例が5事例であった。そのうち、定量結果をもとに死因がアムロジピン中毒と診断された事例が1事例あり、大腿血濃度は0.73 µg/mL、心臓血濃度は1.7 µg/mLであった。死因にアムロジピンが関与していないと判断された事例が4事例であり、大腿血濃度は0.031-0.12 µg/mL、平均0.061 µg/mL、心臓血濃度は0.041-0.22、平均0.16 µg/mLであった。そのうち1事例では、大腿血においても0.12 µg/mLと致死域とされる濃度で検出された事例があったものの、死亡状況、解剖検査及びその他検査結果と併

せた総合的な診断の結果、アムロジピンは死因に関与していないと診断された。定量検査を実施した5事例の心臓血/大腿血比は1.0-5.2、平均2.7と高く、大腿血と比較し、心臓血で高く検出される傾向が見られた。

[アムロジピン事例対応]アムロジピンは、当施設では薬物スクリーニング運用開始時から、検出頻度が高く、また、検出事例ではほぼ治療域を超えることから、執刀医からの問い合わせが最も多い薬剤であった。そのため、すでに報告されている全血/血清比やアムロジピン死後再分布に関する論文を教室内セミナーなどで報告し、特に、当施設ではスクリーニングに心臓血全血を用いていることから、簡易定量値が臨床における血清データをもとにした治療域と比較すると高濃度で検出される傾向があることを執刀医達と共にし、その上で執刀医が必要と判断した事例では定量分析を実施している。多くの事例で定量分析は実施されていないものの、定量分析を実施した5事例の簡易定量値と定量検査結果の誤差が85% - 142%、平均109%であり、機器の状態にもよるが、現スクリーニング方におけるアムロジピン簡易定量と定量結果に大きな誤差はないこと、その上で、大腿血/心臓血が平均2.7であることや全血/血清比が1.7-1.8であることを考慮し、その他解剖検査所見と併せた総合的な診断の結果、多くの事例において、アムロジピンが死因には関与していないと診断された。しかし、アムロジピンが死因へ関与していないと診断された事例においても致死域とされる濃度が検出されており、今後事例を集め、死後濃度の正しい評価を行う必要があると考えられた。また、アムロジピンは通常量の服用であっても、めまいやふらつきなどの副作用が起り、これが死因へ影響を与える可能性や、また頻度は低いものの、劇症肝炎、肝機能障害などが報告されていることから、検出濃度に関わらず、解剖検査と併せた総合的な診断を行うことが重要であると考えられた。

GC-MS および GC-MS/MS を用いたヒト血漿中オレキシン受容体拮抗薬の分析

長谷川 智華¹⁾²⁾ , 青山 剛一¹⁾³⁾ , 藤城 雅也²⁾ , 草野 麻衣子²⁾ , 本多 満⁴⁾ , 黒崎 久仁彦¹⁾

1) 東邦大学医学部法医学講座 2) 昭和大学医学部法医学講座

3) 東邦大学医療センター大森病院薬剤部 4) 東邦大学医療センター大森病院 救命救急

【はじめに】

オレキシン受容体拮抗薬（ORAs）は、オレキシン受容体への結合を阻害することで、自然の睡眠を促す不眠症治療薬である。ベンゾジアゼピン系薬の処方制限の影響から、近年処方数が増加傾向であるため、今後 ORAs の過量内服による薬物中毒患者数の増加が懸念されている。従って、ORAs の迅速な血中濃度測定は、過量内服後の重症度を判断する上で有用と考える。今回は、Lemborexant、Daridorexant（本邦未承認）、Suvorexant の 3 種類についてモノリス型スピニチップを用いた固相抽出による GC-MS 分析と 改良型 QuEChERS を用いた GC-MS/MS 分析について救命および司法解剖の症例分析*をまじえながら紹介させていただきたい。

【モノリス型スピニチップを用いた固相抽出による GC-MS 分析】

＜方法＞ ヒト血漿 20 μL に 1 mol HCl 20 μL と内部標準物質 Suvorexant-d₆ 20 μL を加え、蒸留水で希釈して試料の調整を行った。抽出はモノリス型スピニチップ（MonoSpin mini C18 GL Sciences 社）を用い、前処理から溶出までの全ての過程を遠心操作で行い、40 μL メタノールで再溶解し、1 μL を GC-MS 分析に供した。装置は GC-MS QP-2030（島津）、カラムは DB-1 Capillary GC Column (30 m × 0.32 mm i. d. × 0.25 μm; Agilent) 使用し、m/z 278 (Lemborexant)、m/z 202 (Daridorexant)、m/z 450 (Suvorexant) で SIM 分析を行った。

＜結果＞ ORAs 3 種類は 5-1000 ng/mL の濃度範囲において、相関係数 0.9999 の良好な直線性が得られ、回収率は概ね 80%以上、再現性（CV 値）は日内 7.9、日間は 5.3%以下の結果が得られた。LOD は 2.5 ng/mL であった。1 つの試料につき抽出から分析終了まで、30 分以内で行うことができた。救命患者について分析を行ったところ、滞りなく定性定量可能であった。

【QuEChERS を用いた GC-MS/MS 分析】

＜方法＞ ヒト血漿 0.2 mL を蒸留水 1.3 mL で希釈し遠心分離を行った。その上清に内部標準のセコバルビタール-d₆ を添加した後、QuEChERS 法を用いて抽出・乾固し、40 μL 酢酸エチルで再溶解し、1 μL を GC-MS/MS 分析に供した。装置はトリプル四重極型 GCMS-TQ8040 装置（島津）を用い、カラムは Rxi-5Sil MS Capillary Column (30 m × 0.25 mm i. d. × 0.25 μm; RESTEK) 使用し、EI/MRM（定量イオンと確認イオン計 3 トランジション）法による測定を行った。

＜結果＞ ORAs 3 種類は 50-800 ng/mL の濃度範囲において、良好な直線性が得られ、回収率は概ね 83-100%、再現性（CV 値）は 日内 7.3、日間は 11.9%以下の結果が得られた。LOD は 5 ng/mL であった。司法解剖例による実際例に応用したところ、感度良く同定・定量された。

【まとめ】

東邦大・昭和大において GC と、前者はシングル、後者はタンデムマスを用い、抽出では、前者はモノリス型スピニチップ、後者は QuEChERS 法で、それぞれに ORAs 3 種類について分析を行った。前者では ORAs と推定される場合に、短時間で正確な定性・定量ができ、後者では Quick-DB へのデータベース追加により、スクリーニング分析法としてより多くの薬毒物への適用も期待でき、救急医療・法医学領域において有用な分析システムと考える。

*一部の図や症例については当日提示いたします。



東邦大学



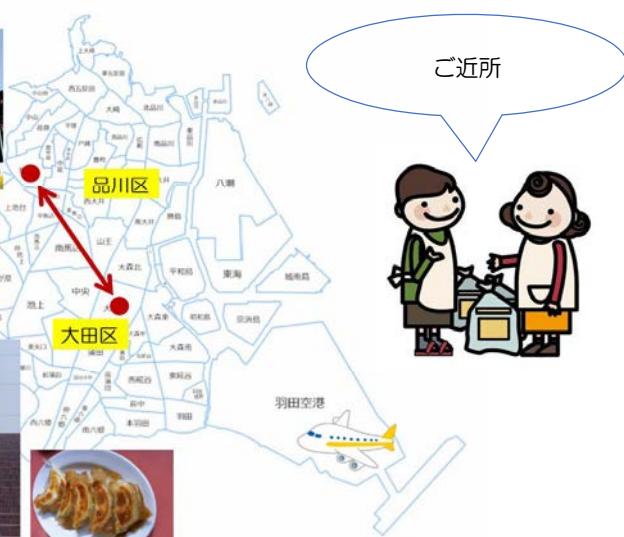
GC-MS および GC-MS/MS を用いたヒト血漿中オレキシン受容体拮抗薬の分析

長谷川 智華^{1),2)} 青山 剛一^{1),3)} 藤城 雅也²⁾ 草野 麻衣子²⁾
本多 満⁴⁾ 黒崎 久仁彦¹⁾

1) 東邦大学医学部法医学講座 2) 昭和大学医学部法医学講座 3) 東邦大学医療センター大森病院 薬剤部
4) 東邦大学医療センター大森病院 救命救急センター



東邦大、昭和大の紹介



東邦大



30



講演内容

★東邦大と昭和大の紹介

★研究紹介

オレキシン受容体拮抗薬の分析について

A : 東邦大のGC-MS分析

B : 昭和大のGC-MS/MS

★臨床サンプルの分析事例

★まとめ

東邦大の生き物と研究紹介

学内



医学部に居ついた 猫による医学教育



アホロートルの消化管腫瘍 における病理学的診断



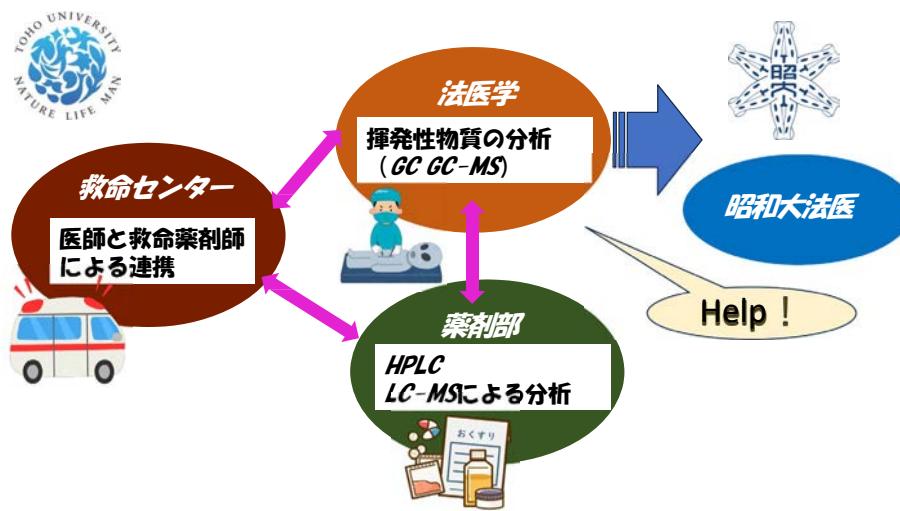
1) 東邦大学医学部法医学講座
2) 東邦大学医療センター大森病院病理診断科
3) 東邦大学医療センター大森病院放射線科
4) 東邦大学医療センター大森病院緩和ケアセンター

Toho University

1) 東邦大学医学部法医学講座
2) 新潟大学病理組織標本センター
3) ラバスマトリクリニック
4) 東邦大学医学部病理学講座
5) 多摩クリストファー大学看護学部

Toho University

東邦大内および昭和大との連携



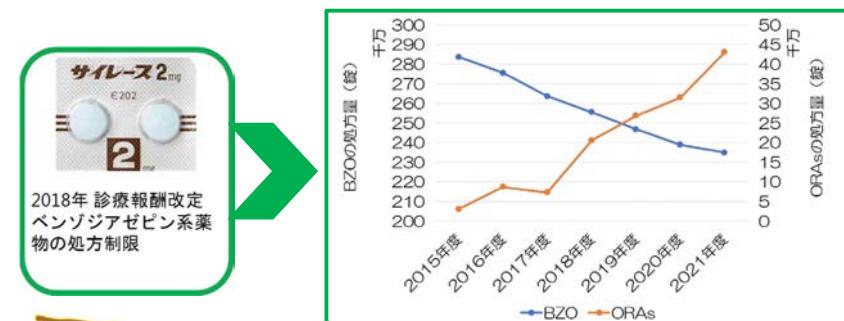
昭和大学医学部法医学教室



急性薬物中毒について

Gen Hosp Psychiatry. 34(6): 681-685, 2012.
J Epidemiol. 27(8): 373-380, 2017.
PLoS One. 11(8): e0161996, 2016.
厚生労働省 NDBオープンデータ

入院: 2万人以上 医療費: 70億円以上



ORAs過量内服患者
増加の可能性

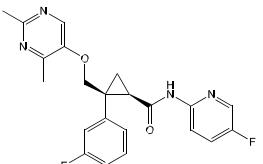
研究内容の一覧

	A : 東邦大	B : 昭和大
分析機器	GC-MS GCMS-QP2020 NX (Shimadzu)	GC-MS/MS GCMS-TQ8040 (Shimadzu)
抽出法	モノリス型スピンドルによる固相抽出	QuEChERS 法
使用薬物	Lemborexant、Daridorexant、Suvorexant	
IS	Suvorexant-d ₆	Secobarbital-d ₅
実症例	救急4例 (LB)	司法解剖1例 (LB)

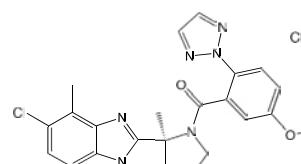
今回使用した薬物

ORAs 3種類

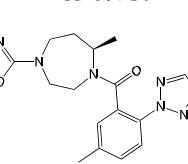
**Lemborexant
(MW : 410.42)**



**Daridorexant
(MW : 450.93)**

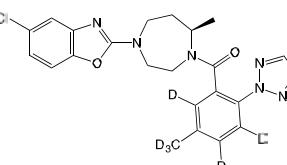


**Suvorexant
(MW : 450.93)**

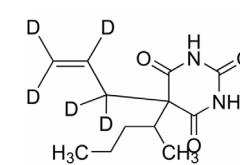


Internal standard

A: Suvorexant-d₆ (MW : 456.96)



B: Secobarbital-d₅ (MW : 243.31)



Daridorexant (Nemorexant)について

2022年

アメリカ食品医薬品局 (FDA) が、成人の不眠症の治療薬（製品名：QUVIVIQ）として承認

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/214985s000lbl.pdf

欧州医薬品庁 (EMA) もEUで承認された最初のオレキシン受容体拮抗薬として承認

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/quviviq>

2023年

10月：日本国内で、イドルシア ファーマシューティカルズジャパンが持田製薬と共同開発、厚生労働省に製造販売承認申請

11月：塩野義製薬が不眠症治療薬ダリドレキサント（開発コード：ACT-541468、一般名：ダリドレキサント塩酸塩）の日本における販売に関する提携契約



25mg錠、50mg錠
デュアルオレキシン受容体拮抗薬
(DORA)



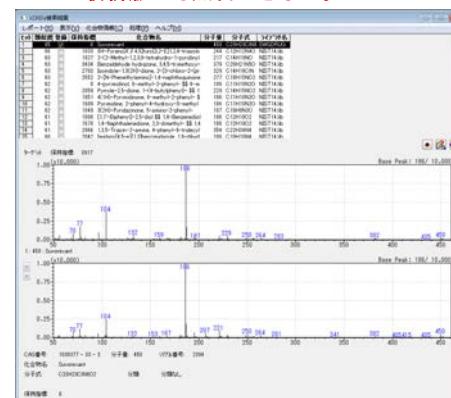
ライブラリーで照合できるか？



SWGDRUG最新版
(2023.06.30)

<https://www.swgdrug.org/>

Suvorexantはデータベースにあるが
Lemborexant, Daridorexantは
最新版でも照合できない。



NIST Library (2014)

3種類とも照合できない。



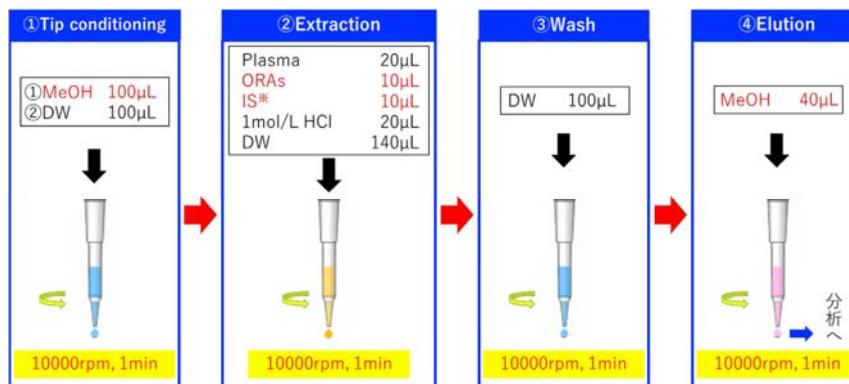
NIST Library (2023)

300万を超えるスペクトルが利用可能！
…らしい。



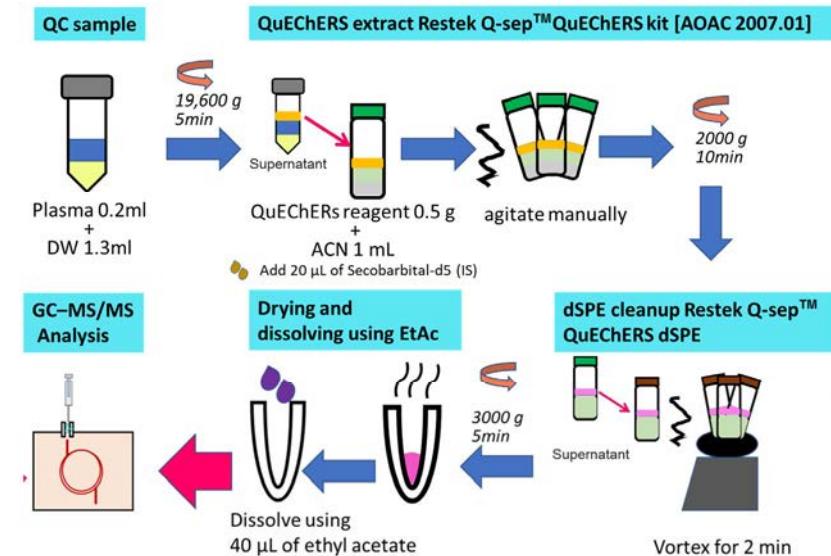
抽出

A:モノリス型スピinnチップによる固相抽出



抽出

B:QuEChERS 法



分析条件

	A : 東邦大	B : 昭和大
Device	GCMS-QP2020 NX	GCMS-TQ8040
Column	DB-1 (30 m x 0.32mm i.d., df = 0.25 µm); Agilent	Rxi®-5Sil MS (30 m x 0.25 mm i.d., df = 0.25 µm)
Injection temperature	280°C	280°C
Ion source temperature	250°C	200°C
Interface temperature	300°C	280°C
Injection mode	Splitless	Splitless
gas	He (2 mL/min)	He(1.56 mL/min)
Ionization	EI	EI
Column oven temperature	150 °C (0.5 min) → (50 °C /min) → 280 °C → (20 °C /min) → 320 °C (5 min)	60°C (2min.) → (20°C/min.) → 320°C (10min.)

Full scan spectrum

Lemborexant	<i>m/z</i> 410 , 287, 175, 139, 113
Daridorexant	<i>m/z</i> 450 ,232, 202, 206,120
Suvorexant	<i>m/z</i> 450 , 186, 104
Suvorexant-d6	<i>m/z</i> 456 , 192, 221,110

Chromatograms

A : 東邦大

Retention time			
Lemborexant	Daridorexant	Suvorexant	Suvorexant-d6
4.8min	6.7min	8.1min	8.2min

B : 昭和大

Retention time		
Lemborexant	Daridorexant	Suvorexant
15.5min	19.2min	22.5min

※Figは講演の際に提示いたします。



インジェクターの温度



	A : 東邦大	B : 昭和大
Device	GCMS-QP2020 NX	GCMS-TQ8040
Column	DB-1 (30 m x 0.32 mm i.d., df = 0.25 μm); Agilent	Rxi®-5Sil MS (30 m x 0.25 mm i.d., df = 0.25 μm)
Injection temperature	280°C	280°C
Ion source temperature	250°C	200°C
Interface temperature	300°C	280°C
Injection mode	Splitless	Splitless
gas	He (2 mL/min)	He(1.56 mL/min)
Ionization	EI	EI
Column oven temperature	150 °C (0.5 min) → (50 °C /min) → 280 °C → (20 °C /min) → 320 °C (5 min)	60°C (2min.) → (20°C/min.) → 120°C (10min.)

Injection temperature: 280°C (highlighted in red)

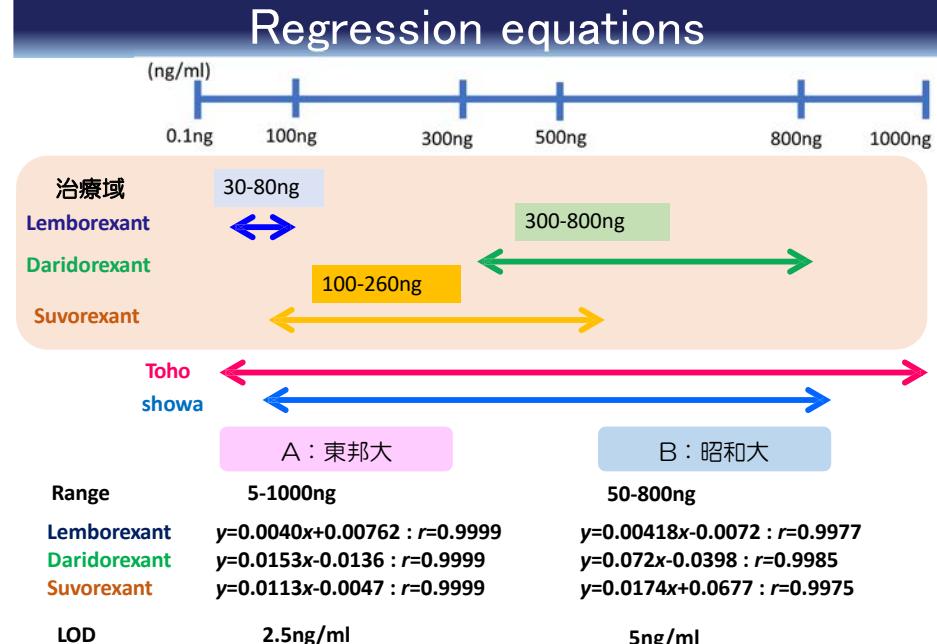
250°CくらいだとSuvorexantがない・・・



治療域の範囲



併用のODの場合、広くrangeをとっておくことが重要！
OD疑いの場合希釈しないとオーバーフローする。

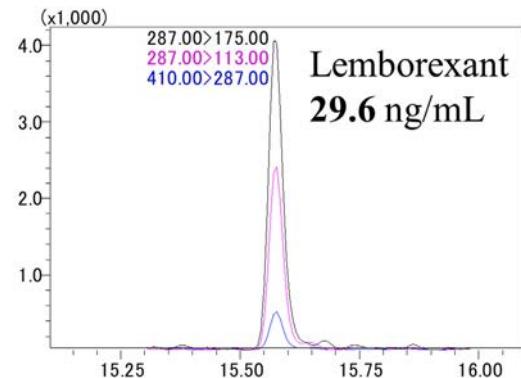


Precision /Accuracy/Recovery data

	A : 東邦大	B : 昭和大
Concentration (ng/ml)	5-1000	50-800
Intra-day	n=7 / 6Pt	n=6 / 3Pt
Precision (CV=%)	8.5%以下	7.3%以下
Accuracy (%)	91.1%以上	97.2%以上
Inter-day	n=5 / 6Pt	n=5 / 3Pt
Precision (CV=%)	6.9%以下	11.9%以下
Accuracy (%)	97.3%以上	91.4%以上
Recovery(%)	79.3-98.1%	82.6-99.5%

Autopsy case

B : 昭和大



司法解剖から得られた試料を用いて、分析をおこなったところ、定性定量可能であった。



ORAs服用の情報はある？ない？



東邦の症例では、薬の空包や精神疾患などで処方されている情報がある場合が多くかった。しかし情報がない場合、ORAsの可能性も意識しておく。



昭和大では、Quick-DB に、保持指標や検量線情報などのデータ解析条件を登録しておき、ORAsスクリーニング分析法の幅を広げている。

救急サンプルの分析事例

ORAsの過量服用の疑いあり！！

その時、救命医療の現場では！？



定性定量はできるのか！？

結果は3月15日会場にてご報告！！！

まとめ

東邦大、昭和大においてオレキシン受容体拮抗薬3種類を、モノリス型スピンドップ、QuEChERS 抽出を行い、GC-MSおよびGC-MS/MSで分析したところ、簡易、高感度、迅速な分析が可能であった。司法解剖や臨床症例に応用できた。



ライブラリーで照合できるか？



最新版のデータベースにある可能性が！？



治療域の範囲



3種類の範囲は大きく異なる。広めに！



インジェクターの温度



スポレキサントは高め、レンホレキサントは高すぎずに



ORAs服用の情報はある？ない？



情報あるにこしたことがないが、日頃スクリーニングの幅を広げておく



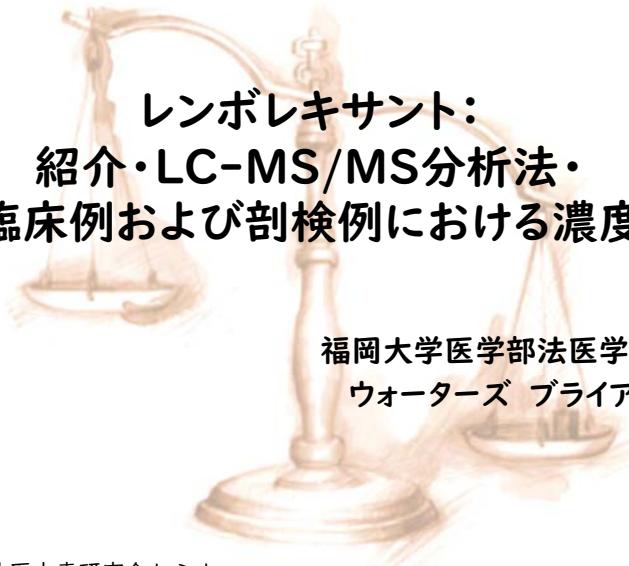
ORAsの定性定量の意義



多剤併用・単剤症状・治療効果などの？へのアプローチの可能性



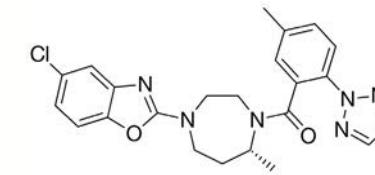
レンボレキサント： 紹介・LC-MS/MS分析法・ 臨床例および剖検例における濃度



第13回法医中毒研究会セミナー
2024.03.15

福岡大学
FUKUOKA UNIVERSITY

Suvorexant (Belsomra®)



Journal of Analytical Toxicology, 2018;42:279–283
doi: 10.1093/jat/bkx110
Advance Access Publication Date: 28 December 2017
Article

Article

Tissue Distribution of Suvorexant in Three Forensic Autopsy Cases

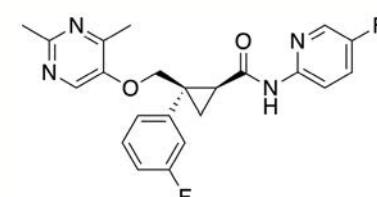
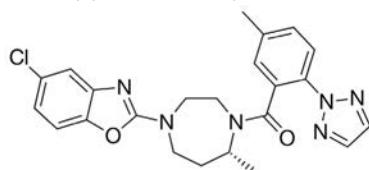
Brian Waters*, Kenji Hara, Natsuki Ikematsu, Mio Takayama,
Aya Matsusue, Masayuki Kashiwagi, and Shin-ichi Kubo

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

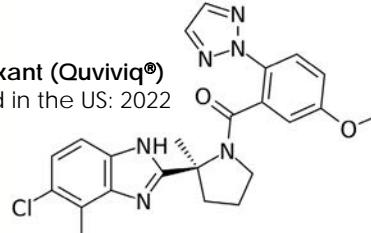
人をつくり、時代を拓く。
福岡 大学

Orexin Receptor Antagonists

Suvorexant (Belsomra®)
Approved in Japan: 2014

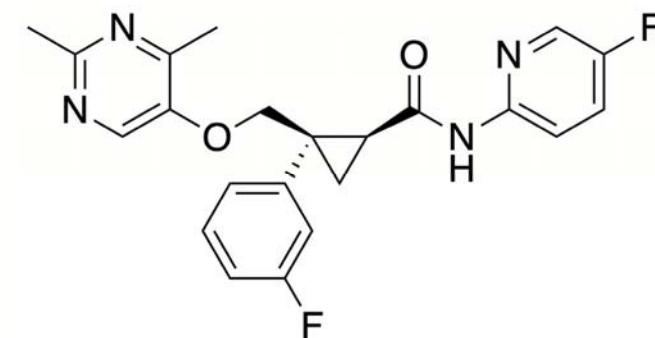


Daridorexant (Quviviq®)
Approved in the US: 2022



Lemborexant (Dayvigo®)
Approved in Japan: 2020

Lemborexant



化学式 : C₂₂H₂₀F₂N₄O₂
分子量 : 410.1554 (monoisotopic)

Lemborexant (Dayvigo®)

- Orexin antagonist used in the treatment of **insomnia**
- Developed by Eisai, Inc.
- Approved for use by the FDA in 2019
- Available in **Japan in July 2020**
- Similar to other insomnia medication like **zolpidem** (Mysleep®), **eszopiclone** (Lunesta®), and **zaleplon** (Sonata®)

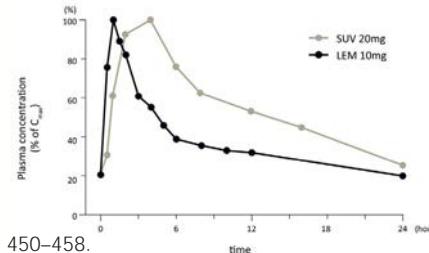


Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

人をつくり、時代を拓く。
福岡大学

Pharmacodynamics and pharmacokinetics

- Duration of Action:** Shorter than suvorexant
- Bioavailability:** At least 87%
- Absorption:** Cmax (plasma) **1 to 3 hours**
- Volume of Distribution (V_D):** 1970 L
- Plasma protein binding:** 94% (*in vitro*)
- Metabolism:** Primarily metabolized by CYP3A4
- Elimination:** Excreted in the feces (57%) and urine (29%)
➤ $T_{1/2} = 17\text{-}19$ hours



Kishi T et al. (December 2021).

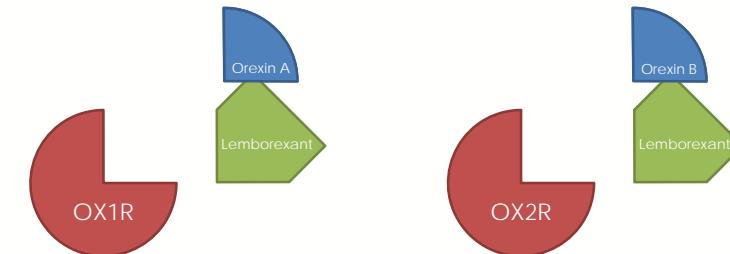
Neuropsychopharmacology Reports. 41 (4): 450-458.

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

人をつくり、時代を拓く。
福岡大学

Mechanism of action 作用機序

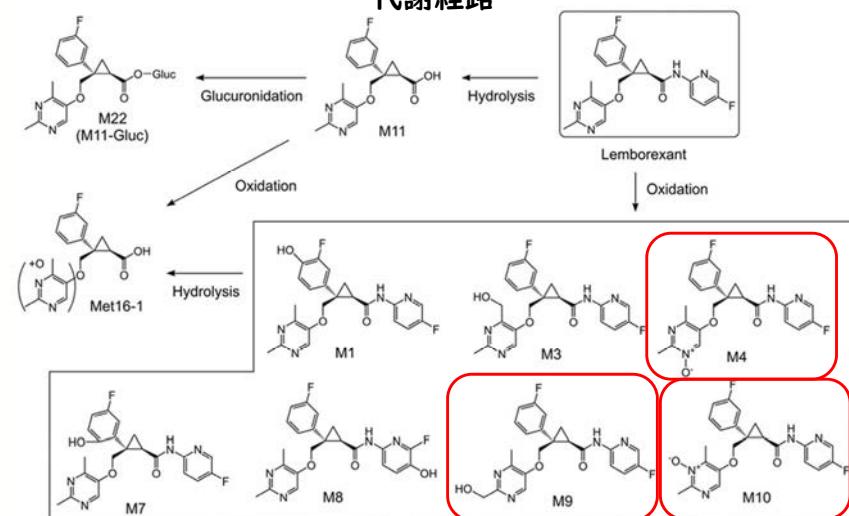
- Dual orexin receptor antagonist (DORA)
- Selective dual antagonist of the orexin receptors **OX1R** and **OX2R**
- Promotes sleep through binding **inhibition of orexin A and B**, neuropeptides that promote **wakefulness**



Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

人をつくり、時代を拓く。
福岡大学

Metabolic Pathway 代謝経路



Ueno et al. (November 2020). Drug Metabolism and Disposition. DMD-AR-2020-000229.

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

人をつくり、時代を拓く。
福岡大学

詳細	商品名	商品コード	メーカー	包装	価格	在庫	納期	文部省	
	Lemborexant お筋・治癒	L215945	TRC	10 mg	¥45,000	禁(未実 注)	3~4週 間	0	マイリストに追加
	Lemborexant メーカーサイト お筋・治癒	FL103847	CAB	10 mg	¥97,000	禁(未実 注)	3~4週 間	0	マイリストに追加
	Lemborexant メーカーサイト お筋・治癒	FL103847	CAB	50 mg	ご用意ください	禁(未実 注)	3~4週 間	0	マイリストに追加

詳細文
法規制等
保存条件
推奨カタログ
製品回事
製造記事

M.W.: 410.42 g/mol, 化学式: C₂₂H₂₀F₂N₄O₂
CAS No.: 1369764-02-2
別名: E 2006

法規制等
保存条件
推奨カタログ
製品回事
製造記事

M.W.: 410.42 g/mol, 化学式: C₂₂H₂₀F₂N₄O₂
CAS No.: 1369764-02-2
別名: E 2006

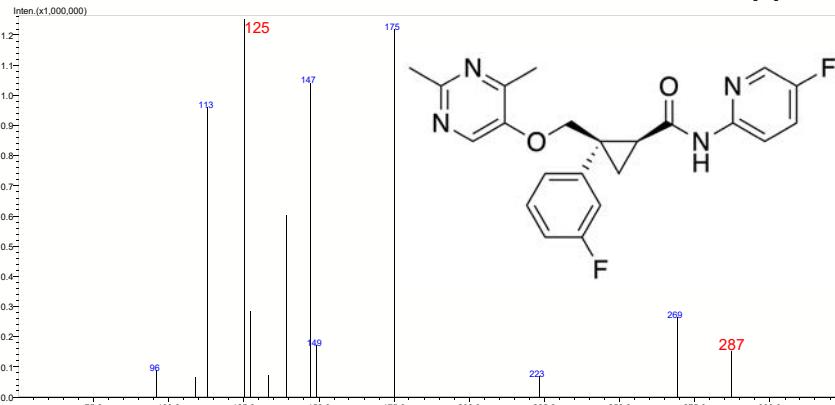
法規制等
保存条件
推奨カタログ
製品回事
製造記事

人をつくり、時代を拓く。
福岡大学

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Product Ion Scan Spectrum

LC-MS/MS – Infusion with methanolic standard (2 ppm)

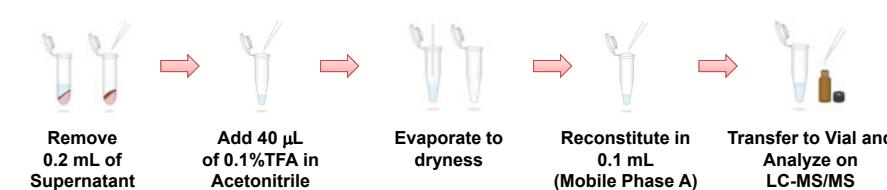
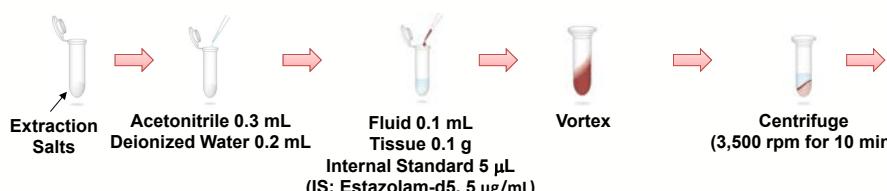


人をつくり、時代を拓く。
福岡大学

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

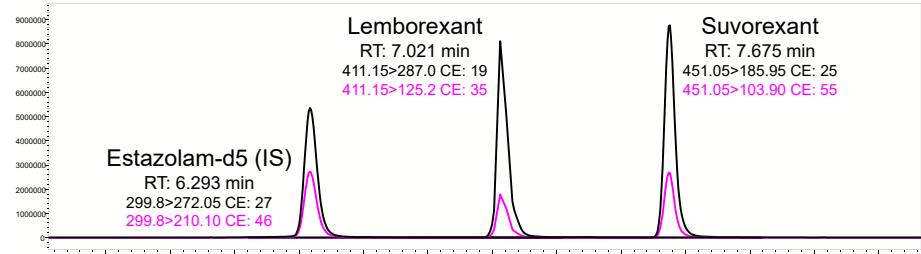
Extraction Method

Shimadzu Micro Volume QuEChERS Kit™



LC-MS/MS Chromatogram

500 ng/mL Extracted Standard (serum)

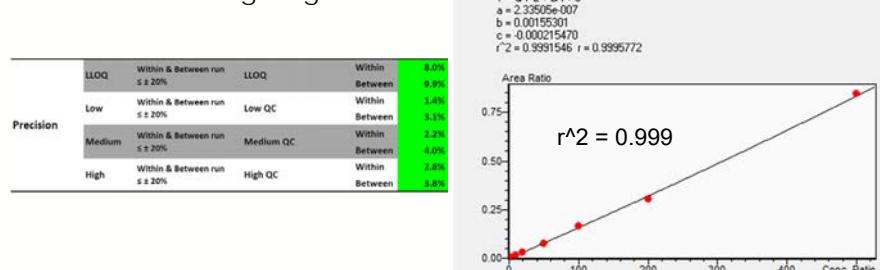


LC-MS/MS Instrument Conditions

- Instrument: Nexera UHPLC + LC8045 (Shimadzu)
- Column: Shim-pack Velox SP-C18 (100 x 2.1 mm, 2.7 μ m), 40°C constant
- Mobile Phases:
 - (A) 0.1% formic acid + 10 mM ammonium formate in water
 - (B) 0.1% formic acid + 10 mM ammonium formate in methanol
- Gradient: 5% to 80% B at 8.5 min, hold at 80% B to 11.5 min, back to 5% B (15 min)
- Ionization: Electrospray Ionization (positive)
- Detection: Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Validation of the Quantitation Method

- The 7-pt calibration curve was constructed using blank serum spiked at 2, 10, 20, 50, 100, 200, and 500 ng/mL
- Using the EZSTATSG2 Excel Template made by Sofalvi et al*, the method was assessed for **linearity** and **weighting** of the calibration method. The resultant best-fit for calibration was a **quadratic** curve with **1/C^2** weighting.



*Assessment of Bioanalytical Method Validation Data Utilizing Heteroscedastic Seven-Point Linear Calibration Curves by EZSTATSG1 Customized Microsoft Excel Template, Sofalvi & Schueler, J Anal Toxicol, 45(8): 772-779 (2021)

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University



Clinical Cases (共同研究)

- At the time of this presentation, there have been **no published reports of lemborexant analysis from clinical or postmortem cases**
- Beginning **late 2021**, the Departments of **Forensic Medicine** and **Psychiatry** at Fukuoka University collaborated on a research project from **suicide cases** presented to the Psychiatry department
- Several of these cases had been prescribed **lemborexant (Dayvigo®)**. This was the first time we had heard of lemborexant.
- Serum samples from 55 suicide patients** were collected and **routine screening** was performed.
- 8 of the 55 cases had been prescribed lemborexant.**

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University



Suicide Patients with Lemborexant Prescriptions (8 cases out of 55 total)

No	Sex	Age	Case information	Prescribed medications
1	F	late 20s	depression/ previous suicide attempt/ overdose	lemborexant/ quetiapine/ zolpidem/ risperidone/ flunitrazepam/ trihexyphenidyl/ alprazolam
2	F	late 30s	depression/ previous suicide attempt/ overdose	lemborexant/ eszopiclone/ mirtazapine/ escitalopram/ iron citrate/ neurovitam/ lorazepam
3	F	late 30s	depression/ previous suicide attempt/ overdose	lemborexant/ escitalopram/ flunitrazepam
4	F	late 20s	depression/ previous suicide attempt/ overdose	lemborexant/ escitalopram/ risperidone/ levocetirizine/ bromazepam/ sennoside/ lamotrigine/ bezarine/ trazodone/ lorazepam/ atomoxetine/ dupilumab/ olipatadine
5	F	early 40s	depression/ previous suicide attempt/ stabbing	lemborexant/ escitalopram/ risperidone/ levocetirizine/ bromazepam/ sennoside
6	F	late teens	depression/ previous suicide attempt/ jumping	lemborexant/ aripiprazole
7	F	late teens	depression/ previous suicide attempt/ overdose	lemborexant/ lithium/ lurasidone/ ramelteon
8	F	late 20s	depression/ previous suicide attempt/ overdose	lemborexant/ vortioxetine/ duloxetine/ clonazepam/ quetiapine/ valproic acid

This research was approved by the Fukuoka University Clinical Research and Ethics Centre (FU CREC), No: U20-12-008



Results

(ND = Not Detected)

No	Prescribed medications	Compounds detected by screening	Lemborexant (ng/mL)
1	lemborexant/ quetiapine/ zolpidem/ risperidone/ flunitrazepam/ trihexyphenidyl/ alprazolam	lemborexant/ alprazolam/ aripiprazole/ betamethasone/ flunitrazepam/ levomepromazine/ quetiapine/ risperidone/ trihexyphenidyl/ zolpidem	2.7
2	lemborexant/ eszopiclone/ mirtazapine/ escitalopram/ iron citrate/ neurovitam/ lorazepam	lemborexant/ 7-aminonitrazepam/ clonazepam/ diphenhydramine/ escitalopram/ flunitrazepam/ lorazepam/ mirtazapine/ paliperidone/ risperidone	19
3	lemborexant/ escitalopram/ flunitrazepam	lemborexant/ 7-aminoflunitrazepam/ escitalopram/ flunitrazepam	225
4	lemborexant/ escitalopram/ risperidone/ levocetirizine/ bromazepam/ sennoside/ lamotrigine/ bezarine/ trazodone/ lorazepam/ atomoxetine/ dupilumab/ olipatadine	7-aminonitrazepam/ acetaminophen/ atomoxetine/ escitalopram/ lamotrigine/ lorazepam/ nitrazepam/ paliperidone/ risperidone/ trazodone	ND
5	lemborexant/ escitalopram/ risperidone/ levocetirizine/ bromazepam/ sennoside	bromazepam/ escitalopram/ risperidone/ levocetirizine/ diphenhydramine/ suvorexant	ND
6	lemborexant/ aripiprazole	lemborexant/ aripiprazole/ paliperidone/ risperidone	3.0
7	lemborexant/ lithium/ lurasidone/ ramelteon	lemborexant	32
8	lemborexant/ vortioxetine/ duloxetine/ clonazepam/ quetiapine/ valproic acid	lemborexant/ aripiprazole/ chlorpheniramine/ dihydrocodeine/ diphenhydramine/ ephedrine/ methylephedrine/ vortioxetine/ quetiapine	25

Forensic Autopsy Cases (剖検例)

- We began to see prescriptions for lemborexant (Dayvigo®) in June of 2022.
- To date, we have experienced a total of 11 autopsy cases with lemborexant prescribed.
- Of the 11 cases, 9 had measurable concentrations of lemborexant.
- Of the 11 cases, 2 only had tissues available for analysis.
- One of the 11 cases (Case #1) was diagnosed as an intoxication death.

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University



Postmortem Cases

試料	Case #1	Case #2	Case #3	Case #4	Case #5	Case #6	Case #7	Case #8	Case #9	Case #10	Case #11
右心房内血	276					1.5	ND	ND	12	5.6	9.1
左心房内血					5.5						
大動脈血	296										
右大腿動脈血	204										
左大腿靜脈血							ND				
右総腸骨靜脈血							ND				
心のう液	138										
尿	253					2.6	ND	ND			
肝臓	6,218	409	75	31							
腎臓	843	109	48	24							
脾臓	149										
肺臓	1,168	80	79	36							
肺臓	500	49									
食道内液	343,256										
十二指腸内液	18,803										
筋肉	327										
脂肪	708	233	373	80							
胆汁	302				64						
脳	547		13								
脳脊髄液	69										
肝臓	409										

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University



Interpretation

デエビコ錠 2.5mg
デエビコ錠 5mg
デエビコ錠 10mg DAYVIGO®

（レンボレキサント製剤）

本剤10mg投与時の投与後14日目におけるC_{max}は70.2ng/mLであり、投与後時間及び8時間の血漿中レンボレキサント濃度はそれぞれ31.4及び17.9ng/mLであった¹⁾。

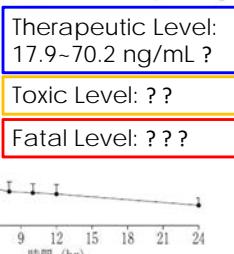


図1 健康成人に本剤10mgを反復投与したときの投与後14日目の血漿中濃度推移（平均値±標準偏差）

Clinical Cases	Postmortem Cases				
	Case #	Serum	Case #	Blood (highest)	Tissue (highest)
1	2.7		1	296 (大動脈血)	6,218 (肝臓)
2	19		2		409 (肝臓)
3	225		3		373 (脂肪)
4	ND		4	5.5 (左心房内血)	80 (脂肪)
5	ND		5	1.5 (右心房内血)	
6	3.0		6		
7	32		7		
8	25		8	12 (右心房内血)	
			9	5.6 (右心房内血)	
			10	9.1 (右心房内血)	
			11	27 (右心房内血)	