

# 薬物の死後変化に対する血中タンパク質の 寄与に関する研究

2021 年

山岸 由和

## 目次

略語表 .....	3
1 章 序論 .....	4
2 章 本論 .....	5
1 節 血中メソミル濃度の死後変化に与えるヘモグロビンの影響 .....	5
2 節 ヘモグロビンによるブロマゼパムの死後酸化 .....	19
3 節 マラチオンの死後変化に対するヒト血清アルブミンの影響 .....	28
3 章 結論 .....	39
参考文献 .....	40
主論文目録 .....	43
論文審査員 .....	44

## 略語表

3-OH BZ	3-hydroxybromazepam、3-水酸化ブロマゼパム
AChE	Acetylcholinesterase, アセチルコリンエステラーゼ
ADME	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, 吸収、分布、代謝、排泄
BChE	Butyrylcholinesterase, ブチルコリンエステラーゼ
BZ	Bromazepam, ブロマゼパム
CAT	Catalase, カタラーゼ
GSH	Glutathione, グルタチオン
Hb	Hemoglobin, ヘモグロビン
HSA	Human serum albumin, ヒト血清アルブミン
LC-QTOF-MS	Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, 液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型-質量分析装置
metHb	Methemoglobin, メトヘモグロビン

## 1 章 序論

### 1-1. 法中毒学における死後血中薬物濃度の意義

法中毒学は薬学的、医学的、法的な立場で人々のあらゆる権利を守るために必要な研究分野である。法中毒学実務における重要な死因決定因子の一つとして、血中薬物濃度が挙げられる。ご遺体の血中薬物濃度と既報の生体での血中中毒濃度を比較し、薬物による中毒死の判断するためである。例えば、向精神薬 BZ では臨床知見の集積から、治療域 (0.08-0.2  $\mu\text{g/mL}$ )、中毒域 (0.3-0.4  $\mu\text{g/mL}$ )、致死域 (2  $\mu\text{g/mL}$  以上) の血中濃度が明らかとなっている。従って、中毒死かどうかを血中薬物濃度で判断するため、正確な薬物定量値を把握することが非常に重要である。

### 1-2. 死後血中薬物濃度推定における課題

死後には生前の ADME がすべて停止しているのにも関わらず、血中薬物濃度が生前と死後で異なるといった課題が指摘されている。死後の特有のメカニズムとして、死後の体内再分布、エステラーゼなどの残存薬物代謝酵素による分解、バクテリアによる死後薬物分解が挙げられる。死後の体内再分布では胃など薬物濃度が高い組織から血液に薬物が受動拡散により混入し、濃度上昇すると考えられている。エステラーゼなどの薬物代謝酵素による分解は生前に存在していた酵素により薬物が分解し、血中薬物濃度減少すると考えられている。一方、チトクローム P450 は死後では活性が急激に減少することが報告されている。バクテリアがもつ酵素等により薬物が分解され、濃度減少すると考えられているものの、バクテリアは個人差や環境差があるため、同じような死後変化が常に起こるとは考えにくい。従って、これらのメカニズムだけでは多くの薬物に対する死後の血中薬物濃度変化を完全に説明することは難しい。そこで従来から想定されていた上述の機構に加えて、なにかしらの新規のメカニズムがあるものと考えられた。

### 1-3. 本研究の目的

生前の ADME がすべて停止している状態では、血液中に含まれる薬物と相互作用できるのは主として血液中にすでにある成分であると考えられたが、死後の血液成分との相互作用は報告がない。そこで、本研究では、死後の血中薬物濃度が変化する代表的な薬物であるメソミル、BZ 及びマラチオンを用いて、死後の血中からの薬物消失の機構を明らかにすることを目的とした。

## 2章 本論

### 1節 血中メソミル濃度の死後変化に与えるヘモグロビンの影響

#### 2-1-1 背景

メソミル ((E,Z)-methyl N-[[[(methylamino)carbonyl]oxy]-ethanimidothioate or S-methyl-N-[(methylcarbamoyl)oxy]-thioacetimidate) は世界中で販売されているカーバメート系殺虫剤である。この農薬はオキシム部位とカルバミル部位がエステル結合で結合しており、AChE を阻害することで殺虫活性を示す。その化学構造は同じ毒性を発現する多くの農薬と共通している (Fukuto, 1990)。メソミルによる AChE 阻害活性はシナプス間隙に Ach の蓄積を起こし、ヒトにおける高い急性毒性の原因となる。メソミルは日本において農薬による偶発的曝露や自殺の中毒において三番目に多く報告されている化合物である (Kudo et al., 2010)。その血中致死域は 8–57 µg/mL であると報告されている (Schulz et al., 2012)。一方で、メソミルはメソミルによる自殺において検出できないもしくは予想よりも濃度が低いことが報告されている (Kawakami et al., 2017)。法中毒学において、血中メソミル濃度の正確な決定はメソミル中毒を証明する上で必須であるが、なぜ血中メソミル濃度が正確に測定できないかの適当な説明する科学的な証拠はない。

筆者は血中メソミル濃度の死後変化に関して二つの要因が関与していると推測した。一つ目の要因は、血漿タンパク質によってメソミルが分解される可能性である。HSA は最も豊富にある血漿タンパク質で血漿中において内因性及び外因性の物質の輸送タンパク質として働く (Er, et al., 2013)。加えて、メソミルはエステラーゼによってメソミルオキシムへと分解され、動物実験では主要代謝物として検出される (Huhtanen et al., 1976)。HSA はエステラーゼ活性を示すことが知られていることから (Tatsumi et al., 2016)、メソミルは HSA のその活性が微弱でもエステラーゼ活性の基質になる可能性があり、HSA によって血液中で分解されると予想された。二つ目の要因はメソミルが血中タンパク質に結合する可能性である。メソミルと結合できる可能性がある血漿タンパク質として、HSA は候補の一つであると考えられた。実際、メソミルと同じような構造特徴のある有機リン化合物は HSA に結合する一方、有機リン化合物と Hb も結合することが報告されており、Hb も候補の一つであると想定できた (Kranawetvogl et al., 2018; John et al., 2018; Fu et al., 2020)。AChE や BChE の酵素の活性中心にメソミルが結合することで阻害するため、AChE や BChE も候補であると考えられた (Rotenberg et al., 1995)。従って、本研究では筆者は上記に述べた HSA のエステラーゼ活性及び血中タンパク質との相互作用を評価することとした。

本研究で筆者は血液中のメソミル及びその代謝物及び血中タンパク質に結合したメソミルを測定することとし。この分析要件を満たすための分析法として、筆者は LC-QTOF-MS を用いた。LC-QTOF-MS はノンターゲット分析に効果的な技術で、精密質量及び構造情報を得ることができる。加えてタンパク質付加体の同定にも役に立つ (Herrera-Lopez et al.,

2014; Rubino et al., 2009)。

## 2-1-2 方法

### 試薬

アセトニトリル(LC-MS grade)、メタノール (LC-MS grade)、蒸留水 (LC-MS grade)、ギ酸 (FA) 及び 1 M ギ酸アンモニウム溶液は関東化学 (東京) より購入した。0.5 M リン酸バッファー及び 0.5 M トリス塩酸緩衝液 Corning (Woburn, MA) より入手した。ジアゼパム-*d5*は林純薬 (大阪) より手に入れた。トリフルオロ酢酸 (TFA, HPLC grade) は購入した。メソミル、HSA、Hb、及び Pronase は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。HemogloBind は Biotech (Monmouth Junction, NJ) より購入した。

### 装置

二種類の液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型-質量分析器を使用した。X500R (AB Sciex, Foster City, CA) 及び 5600+QTOF (AB Sciex)は 液体クロマトグラフとして Prominence UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)もしくは Nexera X2 (Shimadzu) を接続した。表 1 に液体クロマトグラフィー及びマススペクトロメトリーの条件をまとめた。

表 1 液体クロマトグラフィー及びマススペクトロメトリーの条件

	X500R	5600+QTOF
<u>LC conditions</u>		
LC system	Prominence UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)	Nexera X2 (Shimadzu)
Column	Atlantis T3 C18 column, 50 × 2.0 mm I.D., 3 µm (Waters, Milford, MA, USA)	←
Injection volume [µL]	2	20
Flow rate [mL/min]	0.3	0.2
Column temperature [°C]	40	65
Elution buffer A	0.1% Formic acid and 10 mM ammonium formate	←
Elution buffer B	Acetonitrile (ACN)	←

Gradient condition [A/B]	90/10 (0 min)–40/60 (12 min) – 0/100 (18–23 min)–90/10 (23–30 min)	90/10 (0 min)–80/20 (10 min)– 0/100 (12–15 min)–90/10 (15–20 min)
--------------------------	--	---

#### MS conditions

Polarity	Positive	←
Mode	IDA	Product ion scan
<i>m/z</i> range	50–800	50–300
Accumulation time [ms]	100	←
ISVF [V]	5500	←
DP[V]	60	←
CE [V]	20	←
CES [V]	5	←
IRD [ms]	67	←
IRW [ms]	25	←
GS1 [psi]	50	←
GS2 [psi]	80	←
CUR [psi]	25	←
TEM [°C]	500	350

ISVF: ion spray voltage floating, DP: declustering potential, CE: collision energy, CES: collision energy spread, IRD: ion release delay, IRW: ion release width, GS1: source gas 1, GS2: source gas 2, CUR: curtain gas, TEM: ion source temperature

#### 血液成分画分の調製

本研究は、本学の薬学研究院倫理審査委員会及び医学研究院倫理審査委員会の承認を受け、実施した（許可番号 R001 及び 2819）。全血は健常人より採血した。ヘパリン処理した全血は図 1 に示した通りの画分に分離した。血漿及び血球は 1450 *xg* で遠心分離した。血球は 0.5M のリン酸バッファー中に浮遊させた。赤血球膜及び血球抽出液は前の論文に従って準備した (Igisu et al., 1994)。Hb は Hemoglobind の説明書に従って分離した。HSA の濃度は 0.5 M リン酸バッファーで 600  $\mu$ M に調製した。Hb の濃度は 0.5 M リン酸バッファーで 10 mg/mL (low) 及び 100 mg/mL (high) に調製した。

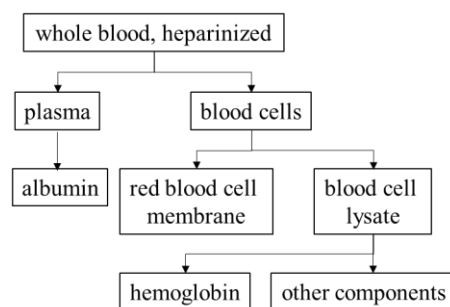


図1 血液成分の分画の概略図

#### 血液成分画分を用いた反応液からのメソミルの回収

100  $\mu\text{L}$  の反応液は血液画分 (99  $\mu\text{L}$ ) とメソミル (1  $\mu\text{L}$ 、終濃度 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で構成した。その反応液を 0、1、2、4、8、24 時間インキュベーションした。インキュベーション後、内部標準物質 diazepam-d5 (10  $\text{ng}/\text{mL}$ ) 含有 ACN を 1.9 mL を反応液に加えた。反応液を 9982  $\text{xg}$  で三分間遠心分離し、メソミル濃度を定めるために上清を LC-QTOF-MS (X500R) で分析した。

#### Hb のメソミル由来アミノ酸付加体の検出と同定

1 mL の反応溶液は 0.5 mM トリス塩酸バッファー中に 100  $\text{mg}/\text{mL}$  の Hb 及び 10  $\text{mg}/\text{mL}$  のメソミルで構成した。その反応溶液は 37°C で 24 時間インキュベーションした。インキュベーション後、反応液に 60 mg のプロナーゼを加えて、37°C の温度でオーバーナイトインキュベーションした。Hb ペプチド内のメソミル由来付加体を検出するために、二回目のインキュベーションした反応液 100  $\mu\text{L}$  に内部標準物質ジアゼパム-d5 (10  $\text{ng}/\text{mL}$ ) 含有 MeOH を加えた。その反応液を 9982  $\text{xg}$  で三分間遠心分離し、Hb 内のメソミル由来アミノ酸付加体を定めるために上清を LC-QTOF-MS (X500R) で分析した。Hb ペプチド内のメソミル由来付加体を同定するために、二回目のインキュベーションした反応液 100  $\mu\text{L}$  に 0.5%TFA 溶液を 300  $\mu\text{L}$  加えた。その反応液を 9982  $\text{xg}$  で三分間遠心分離し、上清を LC-QTOF-MS (5600+QTOF) で分析した。W-adduct と V-adduct のプレカーサーイオンはそれぞれ  $m/z$  262.1 と  $m/z$  175.1 を検出した。W-adduct と V-adduct のプロダクトイオンはそれぞれ  $m/z$  188.0708 と  $m/z$  72.0804 を検出した。

#### メソミル中毒死者血液内の W-adduct の検出

本研究は、本学の薬学研究院倫理審査委員会及び医学研究院倫理審査委員会の承認を受けた (許可番号 R001 及び 2819)。解剖検体の使用はヘルシンキ宣言に従って実施した。本研究ではメソミルが含まれるランネート®を内服して自殺後から約 48 から 96 時間経過した 85 歳の女性の血液を使用した。100  $\mu\text{L}$  の血液に 6 mg のプロナーゼを加えて、37°C の温度でオーバーナイトインキュベーションした。インキュベーションした反応液 100  $\mu\text{L}$

に 0.5%TFA 溶液を 300  $\mu$ L 加えた。その反応液を 9982  $g$  で三分間遠心分離し、上清を LC-QTOF-MS (5600+QTOF) で分析した。W-adduct のプレカーサーイオン及びプロダクトイオンはそれぞれ  $m/z$  262.1 及び  $m/z$  188.0708 を検出した。

### 統計

実験値は平均と標準偏差で表す。Student の t 検定と Dunnett の多重比較検定は、それぞれ 2 つの群間と 3 つの群間の比較で実行した。単一および二重のアスタリスク (\*) により、それぞれ  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  での有意水準として示した。

### 2-1-3 結果

#### 血液画分とメソミルの相互作用

ヘパリン処理された全血、血球、血球抽出液、低濃度 Hb 溶液、および高濃度 Hb 溶液のメソミル濃度は、24 時間にわたって有意に減少した (図 2)。0 時間と比較した 24 時間での減少率は、血液、血球、血球抽出液、低 Hb 濃度溶液、および高 Hb 濃度溶液でそれぞれ 31.0、25.0、11.1、11.6、および 82.4%であった。Hb 濃度の増加は、メソミルの回収率の低下を促進した。さらに、TOF-MS で測定したすべてのサンプルで、メソミルオキシムに対応する  $m/z$  にてシグナルは検出されなかった。一方、血漿、赤血球膜、および HSA のメソミル濃度は 24 時間で有意に減少しなかった。

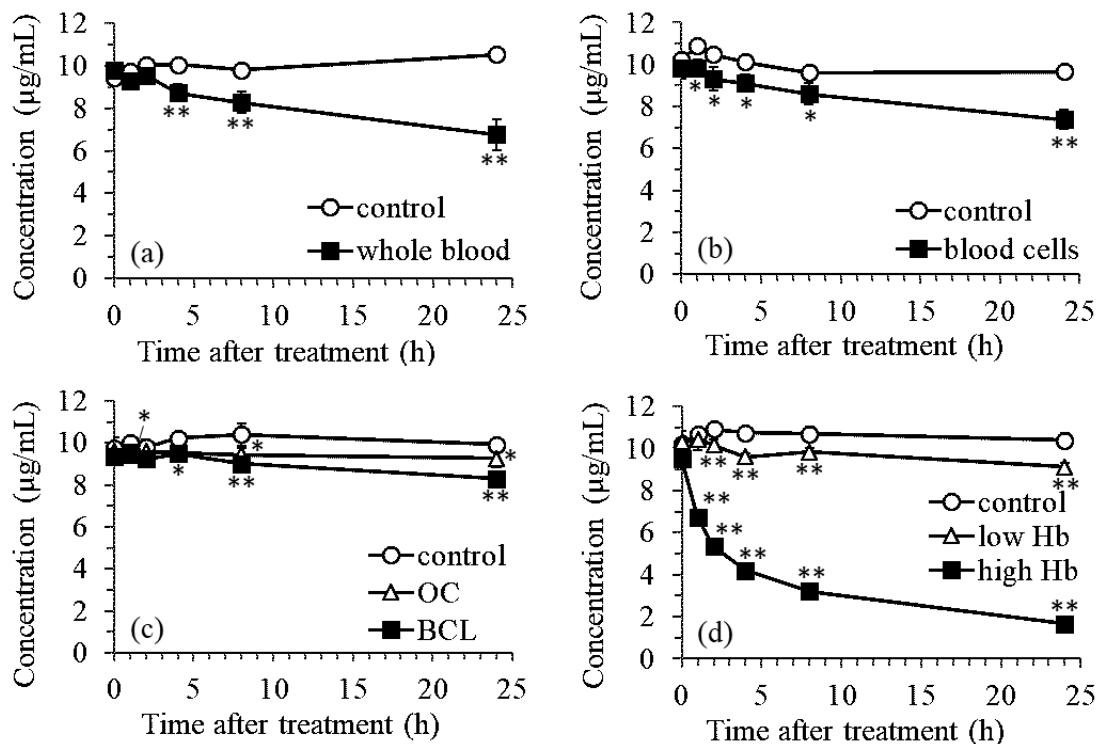


図2 メソミル濃度に対する血液成分の影響. 10 µg/mL のメソミルを (a) ヘパリン処理した全血、(b) 血球、(c) 血球抽出液 (BCL) およびその他の成分 (OC)、および (d) 低 Hb (10 mg/mL) および高 Hb (100 mg/mL) とインキュベートした. コントロールとの有意差は、 $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  でそれぞれ\*および\*\*で示す.

#### Hb 内のメソミル由来アミノ酸付加体の検出

メソミル処理と未処理の Hb の間で質量スペクトルの差分解析を実施した。メソミル自体およびメソミル試薬中の不純物/汚染物質は差分解析の結果から除外され、未処理の Hb で検出したいくつかのピークも除外した (図 3a, c, e)。これらの手順の後、3つの化合物を抽出した。最初のものは  $m/z$  262.1186 および 6.0 分のリテンションタイムでプリカーサーイオンが検出され、UK-1 と名付けた (図 3b)。2つ目は  $m/z$  239.1026 および 2.6 分のリテンションタイムでプリカーサーイオンが検出され、UK-2 と名付けた (図 3d)。3つ目は、 $m/z$  175.1077 および 2.7 分のリテンションタイムでプリカーサーイオンが検出され、UK-3 と名付けた。

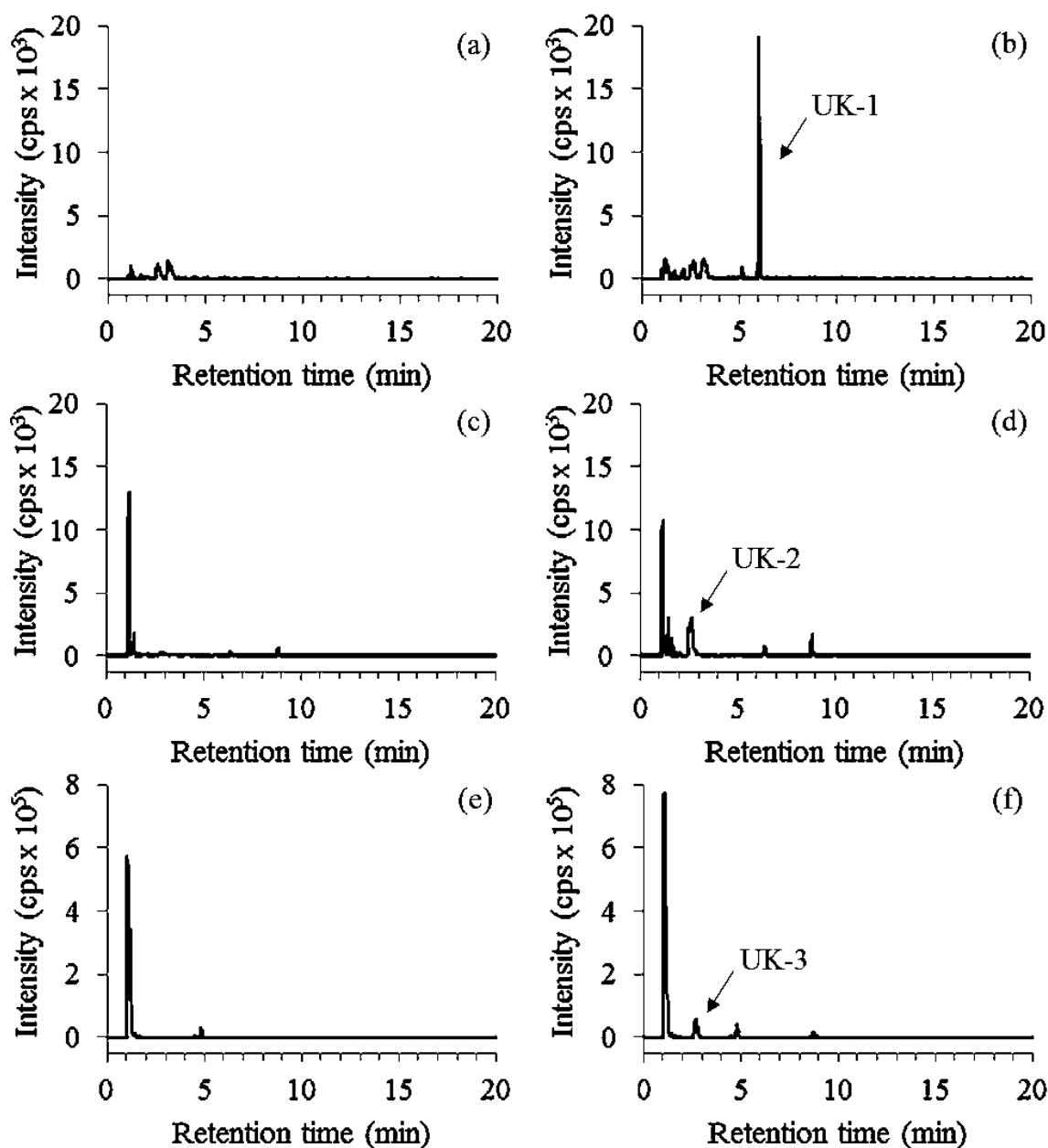


図3 メソミルなし (a, c, e) もしくはあり (b, d, f) のプロナーゼ消化 Hb の  $m/z$ 262.1186 (a, b)、239.1026 (c, d) および 175.1077 (e, f) での溶出図。

#### Hb 内のメソミル由来アミノ酸付加体の同定

図 4a-c は、それぞれ UK-1、UK-2 および UK-3 の MS/MS 分析の結果を示す。図 4a では、1つのプリカーサーイオン (W1) と 6つのフラグメントイオン (W2-W7) が得られた。TOF-MS 測定で検出された W1-W7 の  $m/z$  値は、それぞれ 262.1200、216.1139、205.0977、188.0713、159.0910、144.0803、118.0650 であった。図 4b では、1つのプリカーサーイオン (Y1) と 5つのフラグメントイオン (Y2-Y6) が得られた。TOF-MS 測定で検出された Y1-Y6 の  $m/z$  値は、それぞれ 239.1046、193.0953、182.0800、165.0556、136.0760、

119.0490 であった。図 4c では、1つのプリカーサーイオン (V1) と 5つのフラグメントイオン (V2-V4) が得られた。TOF-MS測定で検出された V1-V4 の  $m/z$  値は、それぞれ 175.1083、118.0859、72.0803、55.0539 であった。UK-1、UK-2、および UK-3 のプリカーサーイオンとプロダクトイオンの同定は、それぞれ表 2~4 にまとめた。これらの同定は、UK-1、UK-2、および UK-3 がそれぞれカルバミル化トリプトファン (W-adduct)、カルバミル化チロシン (Y-adduct)、およびカルバミル化バリン (V-adduct) であることを示唆した。W-adduct のプリカーサーイオンとフラグメントイオンの理論値との  $\Delta m/z$  値は  $\pm 10$  ppm 未満であった。

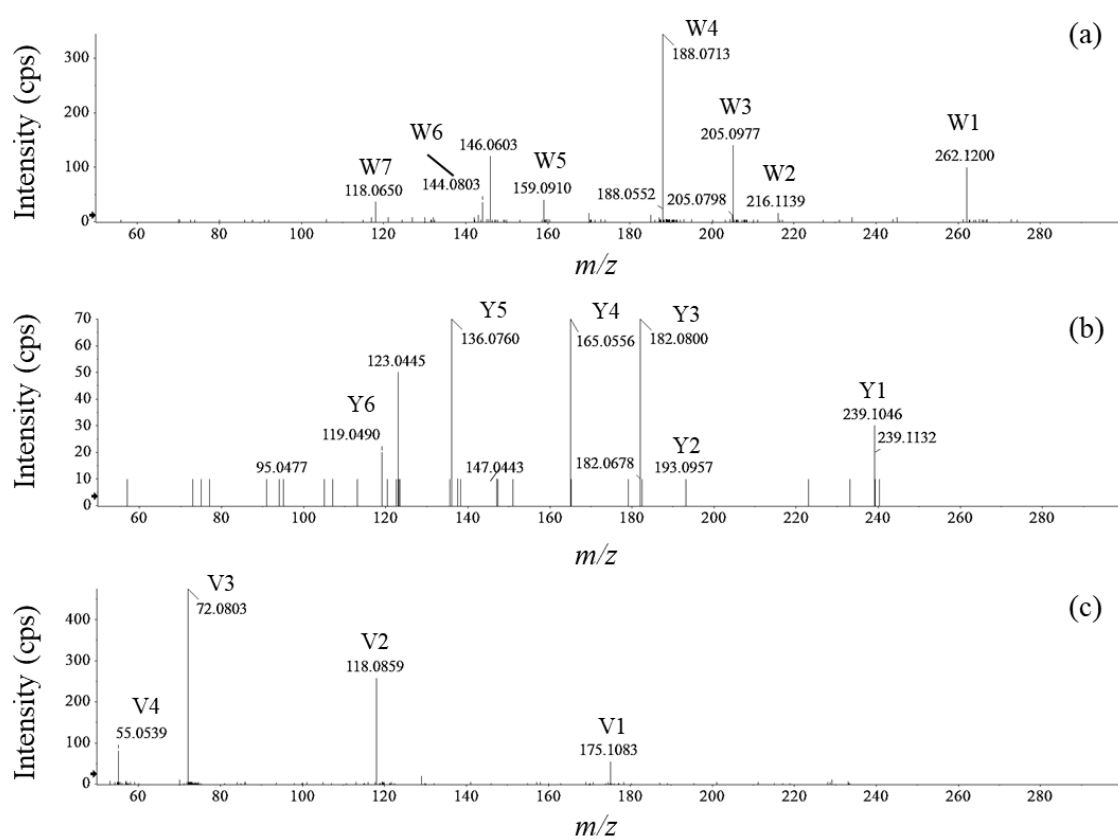


図4 ポジティブイオンモードで検出された未知の化合物の MS/MS スペクトル。図 3 で検出された (a) UK-1、(b) UK-2、および (c) UK-3 の未知ピークを LC-QTOF-MS で分析した。

表2 W-adduct のプレカーサーイオンとプロダクトイオンの帰属

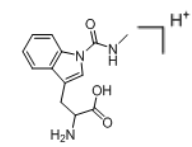
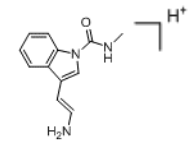
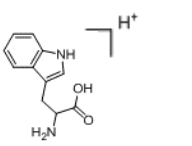
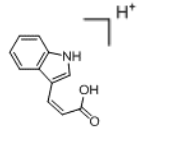
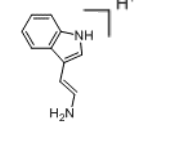
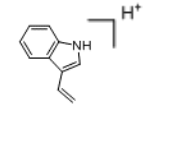
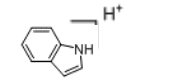
peak no.	ion	elemental composition	theoretical $m/z$	measured $m/z$	$\Delta m/z$ (ppm)
W1		$C_{13}H_{16}N_3O_3$	262.1192	262.1200	3.1
W2		$C_{12}H_{14}N_3O$	216.1137	216.1139	0.9
W3		$C_{11}H_{13}N_2O_2$	205.0977	205.0977	0.0
W4		$C_{11}H_{10}NO_2$	188.0712	188.0713	0.5
W5		$C_{10}H_{11}N_2$	159.0922	159.0910	-7.5
W6		$C_{10}H_{10}N$	144.0813	144.0803	-6.9
W7		$C_8H_8N$	118.0657	118.0650	-5.9

表3 Y-adduct のプレカーサーイオンとプロダクトイオンの帰属

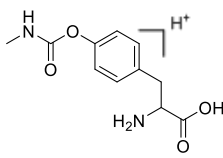
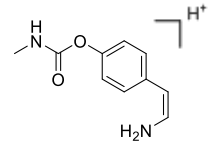
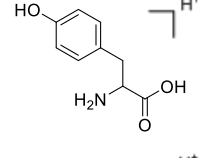
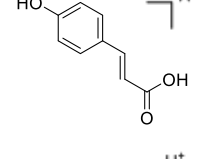
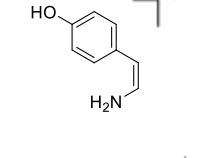
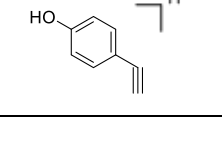
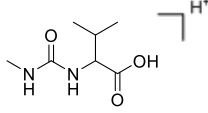
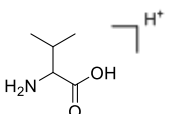
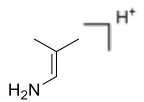

peak no.	ion	elemental composition	theoretical $m/z$	measured $m/z$	$\Delta m/z$ (ppm)
Y1		$C_{11}H_{15}N_2O_4$	239.1032	239.1046	5.9
Y2		$C_{10}H_{13}N_2O_2$	193.0977	193.0953	-12.4
Y3		$C_9H_{12}NO_3$	182.0817	182.0800	-9.3
Y4		$C_9H_9O_3$	165.0882	165.0556	-197.5
Y5		$C_8H_{10}NO_2$	136.0762	136.0760	-1.5
Y6		$C_8H_7O$	119.0497	119.0490	-5.9

表4 V-adduct のプレカーサーイオンとプロダクトイオンの帰属

peak no.	ion	elemental composition	theoretical $m/z$	measured $m/z$	$\Delta m/z$ (ppm)
V1		$C_7H_{15}N_2O_3$	175.1083	175.1083	0.0
V2		$C_5H_{12}NO_2$	118.0868	118.0859	-7.6
V3		$C_4H_9N$	72.0813	72.0803	-13.9
V4		$C_4H_7^+$	55.0542	55.0539	-5.4

メソミル由来アミノ酸付加体に対する LC-QTOF-MS のバリデーション

W-adduct はメソミル処理群で特異的に検出された。その付加物は 10  $\mu\text{g/mL}$  以上の濃度で検出された (図 5)。一方、V-adduct はメソミル処理されていない Hb 群でも検出された。これは V-adduct が他の内因性化合物で形成されたと考えられた。処理したメソミル濃度と W-adduct および V-adduct のピーク面積との関係は良好な直線性を示し (図 5)、相関係数 ( $r^2$ ) はそれぞれ 0.9889 と 0.9968 であった。Y-adduct は 0.5% TFA 溶液中では不安定であった (data not shown)。

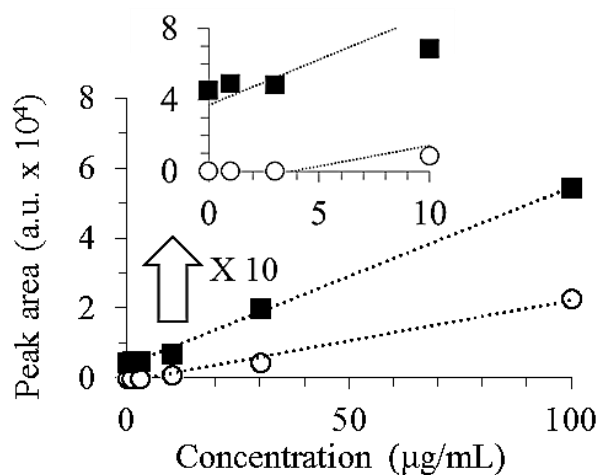


図5 メソミル濃度と W-adduct (白丸) および V-adduct (黒四角) のピーク面積との関係。

### メソミル中毒死者血液中の W-adduct 検出

W-adduct は、メソミル中毒死者の血液で特異的に検出された (図 6)。W-adduct に加えて、保持時間 8.0 分に別のピークが検出された。W-adduct の生成量からこの血液中メソミルの濃度は 13.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と推定された。

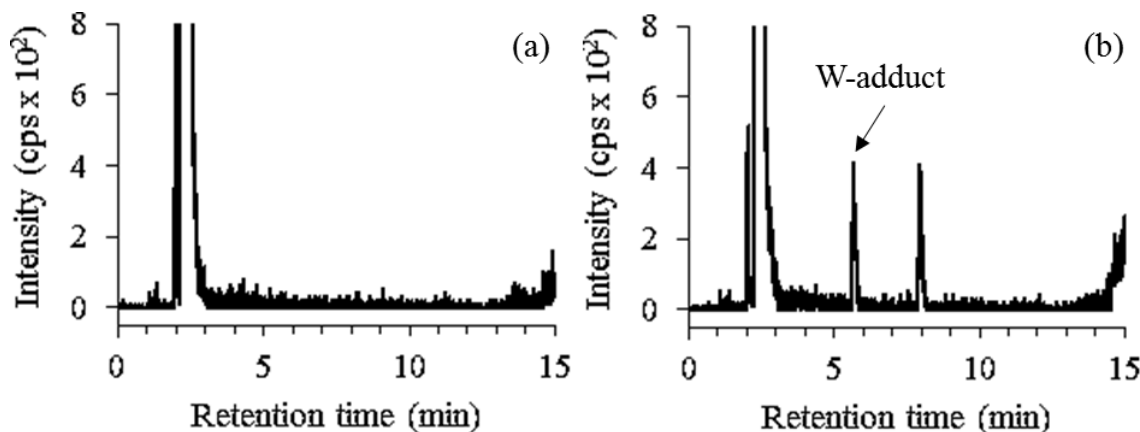


図 6 健康人 (a) およびメソミル中毒死者 (b) 血液からのプロナーゼ消化 Hb の  $m/z$ 262.1 から 188.0708 へのトランジションの溶出図。

#### 2-1-4 考察

血漿および細菌のエステラーゼは、エステル化合物の死後分解を誘発する主要な要因であると知られている (Peters and Steuer, 2019)。実際にヒトの便から分離された腸内細菌によってメソミルが分解されることが報告されている (Kawakami et al., 2017)。一方、本研究では血漿エステラーゼによって分解されると予想されたメソミルは、HSA、BChE および AChE などのエステラーゼ活性を有する血液成分によって有意に分解されなかった。しかし、Hb がメソミルの死後分解に関与していることが示唆された。Hb は赤血球に豊富に存在しており (Schechter et al., 2008)、メソミルの死後の分解において特異的な役割を果たすものと考えられた。

高濃度 Hb 群 (100  $\text{mg}/\text{mL}$ ) は、低濃度 Hb 群 (10  $\text{mg}/\text{mL}$ ) よりもメソミル濃度の急速な減少を示し、減少に Hb 用量依存的であると考えられた (図 2)。BCL 群の Hb 濃度は、ヘパリン処理された全血群の 10 分の 1 で、低濃度 Hb 群の Hb 濃度とほぼ同じとなっていた。したがって、BCL 群のメソミル濃度の減少は、低濃度 Hb 群のそれと同様であった。高 Hb 群の Hb 濃度は、ヘパリン処理された全血群および血球群の Hb 濃度とほぼ同じであったが、ヘパリン処理された全血群および血球群は、高 Hb 群に比べてメソミル濃度の減少速度は緩慢であった (図 2)。これは血球へのメソミルの取り込みに時間がかかることで説明できると考えられた。

溶血は、最も典型的な死後の変化の 1 つとして知られる。この現象は死後 6 時間から起こり、血球から Hb が放出されることが報告されている (Hirabayashi, 1953)。また、Hb

は脱水により死後に濃縮される (Na et al., 2018)。血球から放出された Hb は、血球中の Hb よりもメソミル濃度を急速に低下させた。これは溶血と脱水が生体内での死後の Hb とメソミル間の反応を促進することを示唆している。実際の事例でも死後 40 時間でメソミルが血液中にほとんど検出されなかったと報告されている (Moriya et al., 2005)。血球の溶血にて Hb を放出するのに必要な時間と、Hb とメソミルの相互作用を考慮すると、図 2 の観察結果はこの報告例を説明できると考えられた。

メソミルのカルバミル部分は、AChE のセリン残基に結合することが知られている (Fukuto, 1990)。また、Hb がさまざまな物質と付加物を形成することも知られている (Rubino et al., 2009)。本研究では、Hb のトリプトファン、チロシン及びバリン残基にメソミルが結合し、メソミルがセリン以外のアミノ酸に結合することも初めて明らかにした。Hb の配列には複数のバリン残基がある。しかし、いくつかの報告では、多くの化合物が Hb の N 末端に結合していることが示唆されている (Degner et al., 2018; Carlsson et al., 2019)。これらをまとめるとメソミルは N 末端のバリンに結合していると考えられた。また、Hb には複数のトリプトファンおよびチロシン残基があるため、メソミルに結合する特定のトリプトファンおよびチロシン残基は今のところ特定できていない。

血中メソミル濃度は、メソミル中毒による死亡を決定するための重要な要素である。V-adduct はメソミル処理および未処理の Hb サンプルで検出されたが、W-adduct はメソミル処理 Hb サンプルで特異的に検出された。メソミルの濃度と W-adduct の生成の間の用量相関関係は、10 µg/ mL を超える濃度から明確に観察された (図 5)。血中のメソミルの致死濃度は >8 µg/mL であると報告されているが (Schulz et al., 2012)、前述のように、血中のメソミルを検出することは困難である。本研究の結果は、メソミル自体の代わりに W-adduct がメソミル中毒時の死後直後の血中薬物濃度を決定するのに有用であることを示している。言い換えれば、W-adduct はメソミル中毒のバイオマーカーとして使用でき、メソミルの摂取量を W-adduct の生成量から推定できる。一方、V-adduct も検出され、V-adduct の量はメソミルの濃度とともに用量依存的に増加した (図 5)。しかし、Hb の N 末端のバリン残基は多くの未知の付加物が報告されている (Carlsson et al., 2019)。また、未処理の Hb 群でも検出された V-adduct は特定できていないが、内因性化合物で形成されていると推測された。したがって、V-adduct は偽陽性の結果が生じる可能性があるため、メソミル中毒のバイオマーカーとしては適切ではないと考えた。

意図的なメソミル摂取で死亡した剖検事例では血中において ChE 活性の阻害が確認されたため、死因はメソミル中毒であると判断されている。W-adduct の量から計算された血中メソミル濃度は 13.6 µg/mL であった。その濃度はメソミルの致死濃度として妥当であると考えられた。これは W-adduct が臨床診療におけるメソミル中毒のバイオマーカーとして有用であることを示している。意図的なメソミル摂取で死亡した剖検事例から採取した血液で検出された保持時間 8.0 分に現れるピークは、MS/MS 分析で特定するには量が少なすぎるため、特定できなかった (図 6b)。ピークは W-adduct と同じ分子量とフラグメントイ

オンを示したため、トリプトファン結合部位が異なる異性体である可能性が考えられた。

第 1 節の小括として、メソミルは死後に **Hb** によって分解された。分解のメカニズムは **Hb** 中のアミノ酸の付加物の形成である。意図的なメソミル摂取で死亡した剖検事例から採取した血液から **W-adduct** が特異的に検出されたため、**W-adduct** はメソミル中毒のバイオマーカーとして使用でき、血中の **W-adduct** の生成量に基づいて血中メソミル濃度を推定することが可能であった。

## 2節 ヘモグロビンによるプロマゼパムの死後酸化

### 2-2-1 背景

ベンゾジアゼピン系薬物は鎮静、催眠、抗不安等の作用を持つ向精神薬である。ベンゾジアゼピン系薬物はベンゼン環とジアゼピン環の結合によって構造的に特徴づけられ、それらの臨床効果に基づいて抗不安薬と催眠薬に分けられる。ベンゾジアゼピン系薬物は2~4週間の使用で比較的安全であるが、その安全性は推奨される臨床使用期間を超えると不明である。ベンゾジアゼピン系薬物の中毒は1か月以上使用している患者の約半数で発症することが報告されている (Soyka, 2017)。ベンゾジアゼピン系薬物は自殺や事故の致命的な症例で頻繁に検出され (Ida et al. 2019)、死体で頻繁に検出される薬物群に分類される (Kudo et al. 2010)。法中毒学実務においてベンゾジアゼピン系薬物中毒による死亡を証明するには、血中ベンゾジアゼピン系薬物濃度の正確な測定が必須である。以前の報告では、生前に比べて死後の血中ベンゾジアゼピン系薬物濃度が減少したことが示された (Dylan et al. 2020)。しかし、死後の血中ベンゾジアゼピン系薬物濃度を正確に決定できない理由を合理的に説明する具体的な証拠はない。

血漿エステラーゼ活性とバクテリアは、薬物の死後変化を起こす要因として知られている (Peters and Steuer, 2019)。しかし、ベンゾジアゼピン系薬物の重要な構造は血漿エステラーゼの基質にはならない考えられる。また2つのニトロベンゾジアゼピン系薬物 (ニトラゼパムとフルニトラゼパムのみ) が、死後のバクテリア代謝によってそれぞれの7-アミノ代謝物に変換されると報告されている (Robertson and Drummer, 1998)。従って、死後の血中ベンゾジアゼピン系薬物濃度変化は、血漿エステラーゼ活性とバクテリア代謝によって説明することはできない。最近、筆者はHbが死後に血中薬物の分解に関与していることを見出した (Yamagishi et al., 2021)。溶血時に血球からHbが放出されることが報告されており、この現象は死後6時間で始まる (Hirabayashi, 1953)。溶血は、最も典型的な死後の変化の1つであり、血漿へのHbの放出をもたらす。ベンゾジアゼピン系薬物とHbの相互作用に関する報告はない。従って、ベンゾジアゼピン系薬物はHbと相互作用することで、死後の血中ベンゾジアゼピン系薬物濃度が変化すると推測した。

本研究では、ベンゾジアゼピン系薬物とHbの *in vitro* での相互作用を評価するために、11種類のベンゾジアゼピン系薬物とHbの存在下で形成されるそれらの代謝物を測定した。LC-QTOF-MSを使用して、ベンゾジアゼピン系薬物とその代謝物を分析した。

### 2-2-2 方法

#### 試薬

BZ、Hbおよび分子量カットオフが10 kDaのAmicon Ultra 0.5 mL遠心フィルターユニットは、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。プロチゾラム、クロナゼパム、ジアゼパム、ロフラゼブ酸エチル、エチゾラム、フルニトラゼパム、ミダゾラム、ニトラゼパム、オキサゼパム、トリアゾラム、ジメチルトリスルフィド (DMTS)、ウシ由来のカタ

ラーゼ (CAT)、グルタチオン (GSH) およびリン酸緩衝液 (0.1 mol/L) が Fujifilm Wako Pure Chemical (大阪) から購入した。アセトニトリル (ACN、LC/MS グレード)、蒸留水 (LC/MS グレード)、ギ酸 (FA) および 1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液 (HPLC グレード) は関東化学 (東京) から購入した。ジアゼパム-*d5* は林純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。

### 装置

四重極/飛行時間型質量分析装置と接続した液体クロマトグラフを使用した。5600+QTOF (AB Sciex, Foster City, CA, USA) には、液体クロマトグラフとして Nexera X2 (島津製作所、京都) が装備された。エレクトロスプレーイオン化ソースのパラメータは次のとおりである。イオンスプレー電圧フローティング 5500 V、温度 500°C、イオンソースガス圧 1 (GS1) 50 psi、イオンソースガス圧 2 (GS2) 50 psi、カーテングス圧 (CUR) 25 psi、デクラスタリング電位 (DP) 50 V、衝突エネルギー (CE) 10 V、範囲  $m/z$  100~1000 と設定した。クロマトグラフィーによる分離は、40°C に維持された Atlantis T3 C18 カラム (50 × 2.0 mm I.D., 3 μm) を使用した。移動相は、0.1% ギ酸と 10 mM ギ酸アンモニウム (A) およびアセトニトリル (B) で構成され、次のグラジエントで溶出した。0-12 分: 10-60%B; 12-18 分: 60-100%B; 18-23 分: 100%B; 23-30 分: 10%B。流量は 0.3 mL/min で実施した。注入量は 2 μL とした。

### Hb を含む反応液からのベンゾジアゼピン系薬物の回収率評価

BZ、プロチゾラム、クロナゼパム、ジアゼパム、ロフラゼパムエチル、エチゾラム、フルニトラゼパム、ミダゾラム、ニトラゼパム、オキサゼパムおよびトリアゾラムからなるベンゾジアゼピン系薬物混合液を使用した。Hb (最終濃度、100 mg/mL) とベンゾジアゼピン系薬物混合液 (最終濃度 1 μg/mL) を含む 0.1 mL の反応液を 37°C で 0 時間および 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、1.9 mL の ACN 中の内部標準としてジアゼパム-*d5* (50 ng/mL) を反応液に加えた。反応液をボルテックス及び超音波処理、9,982 xg で 10 分間遠心分離し、上澄みを LC-QTOF-MS にかけてベンゾジアゼピン系薬物濃度を測定した。BZ、プロチゾラム、クロナゼパム、ジアゼパム、ロフラゼパムエチル、エチゾラム、フルニトラゼパム、ミダゾラム、ニトラゼパム、オキサゼパム及びトリアゾラムの抽出イオンは、 $m/z$  316.0080、 $m/z$  392.9570、 $m/z$  316.0483、 $m/z$  286.0789、 $m/z$  361.0750、 $m/z$  343.0779、 $m/z$  314.0936、 $m/z$  326.0855、 $m/z$  282.0873、 $m/z$  287.0582 及び  $m/z$  343.0512 で検出した。

### Hb 存在化における BZ 代謝物の検出と同定

0.1M リン酸緩衝液に 100 mg/mL の Hb と 10 μg/mL の BZ を含む反応液 0.1 mL を 37°C で 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、1.9 mL の ACN 中の内部標準とし

てジアゼパム-*d5* (50 ng/mL) を反応液に加えた。その反応液をボルテックス及び超音波処理、9,982 *xg* で 10 分間遠心分離し、上清を LC-QTOF-MS で測定した。

#### 塩化鉄 (II) もしくは塩化鉄 (III) を処理した反応液中の BZ 及び 3-OH BZ の検出

BZ (1 mg/mL) を含む ACN 溶液 1  $\mu$ L を、FeCl<sub>2</sub> (40 mM) または FeCl<sub>3</sub> (40 mM) を含む 0.1M リン酸緩衝液 99  $\mu$ L に添加した。その反応液を 37°C で 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、1.9 mL の ACN 中の内部標準としてジアゼパム-*d5* (50 ng/mL) を反応液に加えた。反応液をボルテックス及び超音波処理、9,982 *xg* で 10 分間遠心分離し、上清を LC-QTOF-MS で測定した。BZ と 3-OH BZ の抽出イオンはそれぞれ *m/z* 316.0080 と *m/z* 332.0029 で検出した。

#### Hb もしくは DMTS で変換した metHb を処理した反応液中の BZ 及び 3-OH BZ の検出

DMTS で Hb を metHb に変換した報告の実験条件をわずかな変更を加えて使用した (Dong et al., 2017)。0.1 M リン酸緩衝液中に Hb (100 mg/mL) と DMTS (500  $\mu$ g/mL) からなる 5 mL の反応液を 37°C で 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、0.5 mL の反応液を限外ろ過装置 (Amicon ウルトラ 0.5 遠心フィルターユニット) に移し、9,984 *xg* で 10 分間遠心分離した。反応液を 0.3 mL のリン酸緩衝液で 3 回洗浄し、9,984 *xg* で 10 分間再度遠心分離した。0.1 M リン酸緩衝液で 0.5 mL に希釈した後、混合液を 9,984 *xg* で 10 分間遠心分離した。得られた反応液を DMTS によって変換された metHb 溶液とした。

BZ (1 mg/mL) を含む ACN 溶液 1  $\mu$ L を Hb または DMTS で変換した metHb を含む 0.1M リン酸緩衝液 99  $\mu$ L に添加した。この反応液を 37°C で 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、1.9 mL の ACN 中の内部標準としてジアゼパム-*d5* (50 ng / mL) を反応液に加えた。反応液をボルテックス及び超音波処理、9,982 *xg* で 10 分間遠心分離し、上清を LC-QTOF-MS で測定した。BZ 及び 3-OH BZ は、それぞれ *m/z* 316.0080 と *m/z* 332.0029 で検出した。

#### Hb による BZ の 3-OH BZ 変換に対する CAT 及び GSH の影響

BZ (1 mg/mL) を含む 1  $\mu$ L の ACN 溶液を CAT (1 mg/mL)、Hb (100 mg/mL)、Hb (100 mg/mL) + CAT (1 mg/mL)、GSH (10 mM) または Hb (100 mg/mL) + GSH (10 mM) を含む 99  $\mu$ L の 0.1 M リン酸緩衝液に添加した。この反応液を 37°C で 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、1.9 mL の ACN 中の内部標準としてジアゼパム-*d5* (50 ng/mL) を反応液に加えた。反応液をボルテックス及び超音波処理、9,982 *xg* で 10 分間遠心分離し、上清を LC-QTOF-MS で測定した。BZ 及び 3-OH BZ は、それぞれ *m/z* 316.0080 と *m/z* 332.0029 で検出した。

### BZ中毒検体の死後血からのBZ及び3-OH BZの検出

本研究は、本学の薬学研究院倫理審査委員会及び医学研究院倫理審査委員会の承認を受けた（許可番号 R001 及び 2819）。解剖検体の使用はヘルシンキ宣言に従って実施した。

当研究室で実施した薬物スクリーニングにより BZ を検出した 17 例の血液を使用した。内部標準としてのジアゼパム-*d5* (50 ng/mL) を含む 0.4 mL の ACN を 0.1 mL の血液に添加した。反応液をボルテックス及び超音波処理、9,982 *xg* で 10 分間遠心分離し、上清を LC-QTOF-MS で測定した。BZ と 3-OH BZ は、それぞれ *m/z* 316.0080 と *m/z* 332.0029 で検出した。

### 統計

実験値は平均と標準偏差で表す。Student の t 検定と Tukey の多重比較検定は、それぞれ 2 つの群間とすべての群間の比較で実行した。単一および二重のアスタリスク (\*) により、それぞれ  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  での有意水準として示した。

### 2-2-3 結果

#### Hb 溶液中のベンゾジアゼピン系薬物の安定性

24 時間後のインキュベーションで Hb 処理群においてエチゾラムとニトラゼパムを除くベンゾジアゼピン系薬物濃度が低下した (図 7)。BZ、プロチゾラム、クロナゼパム、ジアゼパム、ロフラゼパム酸エチル、フルニトラゼパム、ミダゾラム、オキサゼパム及びトリアゾラムの減少率は、それぞれ 68.4、18.6、27.7、19.8、65.1、19.2、21.6、22.4、および 15.3% であった。また、ロフラゼパム酸エチルの回収率は、Hb 未添加の場合でも他のベンゾジアゼピン系薬物の回収率よりも低かったが、その機構は今のところ不明である。

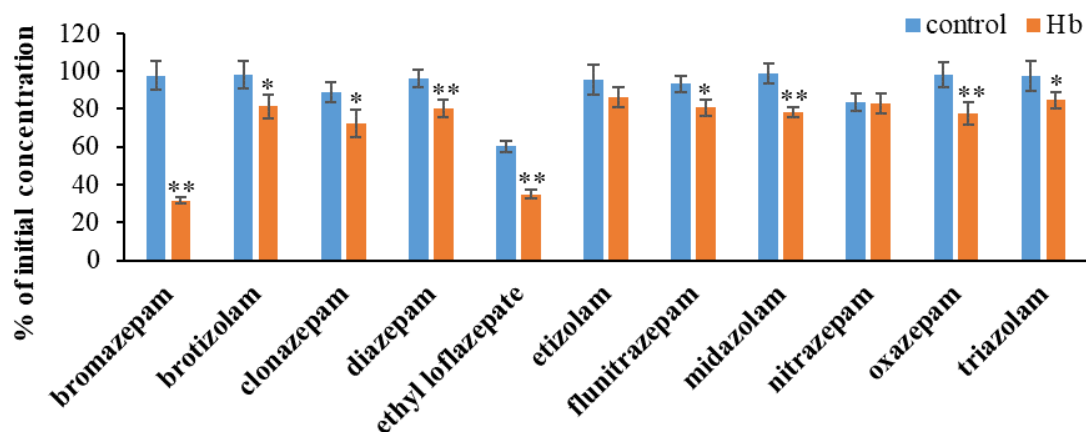


図7 ベンゾジアゼピン系薬物濃度に対する Hb 処理の効果. Student の t 検定は、コントロールと Hb 処理ベンゾジアゼピン系薬物溶液を比較するために実行し、コントロールとの有意差はそれぞれ  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  で\*および\*\*で示した.

#### Hb 処理によって生成される BZ 代謝物の検出と同定

質量スペクトルの差分解析は、Hb 処理と Hb 未処理の BZ 溶液の間で実行した。両方のスペクトルで 10.6 分の保持時間にピークが検出されたため非特異的なピークと見なした (図 8a)。未知のピーク UK-4 が 5.1 分の保持時間で検出され、 $m/z$  332.0033 のプリカーサーイオンで検出された (図 8b)。

図 9 は、UK-4 の MS/MS 分析の結果を示す。1 つのプリカーサーイオン (M1) と 3 つのフラグメント (M2-M4) イオンが検出された。M1 から M4 の  $m/z$  値は、それぞれ 332.0023、314.9758、302.9996、および 286.9810 であった。UK-4 のプロダクトイオンの想定される元素組成を表 5 にまとめ、プロダクトイオンを図 9 に示すフラグメントイオンに帰属した。これらの結果は、UK-4 が 3-OH BZ であることを示した。

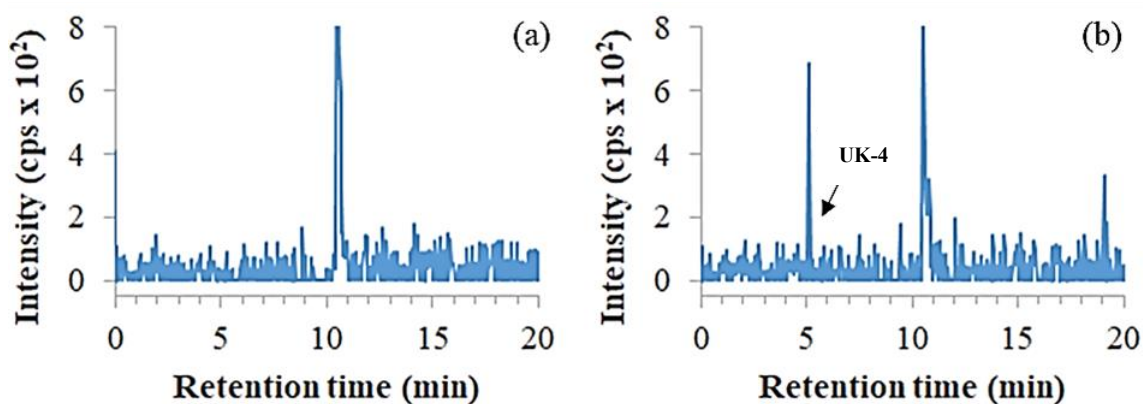


図8 Hb 処理なし (a) またはあり (b) の  $m/z$  332.0033 の溶出図.

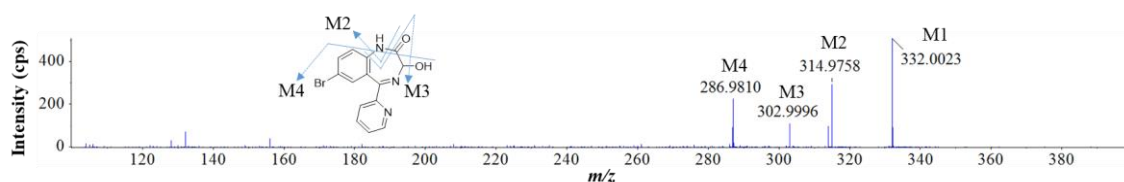


図9 ポジティブイオンモードで検出された未知化合物のMS/MSスペクトル. 図8で検出されたUK-4をLC-QTOF-MSで分析した. UK-4のプリカーサーイオンとプロダクトイオンの同定を表1にまとめている.

表5 UK-4のプレカーサーイオンとプロダクトイオンの帰属

Peak label	Elemental composition	$m/z$ theoretical	$m/z$ measured	$\Delta m/z$ (ppm)
M1	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> BrN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	332.0029	332.0023	-1.8
M2	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	314.9764	314.9758	-1.9
M3	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> BrN <sub>2</sub> O	303.0128	302.9996	-43.6
M4	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> BrN <sub>2</sub> O	286.9815	286.9810	-1.7

### 3-OH BZ 生成に対する酸化促進剤及び抗酸化剤の影響

塩化鉄 (II) 処理は 24 時間後コントロールおよび塩化鉄 (III) 処理と比較して BZ の濃度を有意に減少させ (図 10a)、減少率は 41.1%であった。塩化鉄 (III) 処理とは異なり、塩化鉄 (II) 処理は 3-OH BZ を生成した (図 10b)。

Hb 処理は、24 時間後コントロールおよび DMTS 変換メトヘモグロビン処理と比較して BZ の濃度を有意に減少させ (図 10c)、減少率は 24.6%であった。DMTS によって変換した metHb は 24 時間で 3-OH BZ を生成したが、生成された量は Hb 処理によって生成された量よりも大幅に少なかった (図 10d)。

Hb 処理による BZ 濃度の低下は CAT 処理によって弱められ、Hb と CAT 処理は、24 時間で BZ の酸化、つまり 3-OH BZ の生成を大幅に減少させた (図 10e および 10f)。Hb および Hb + GSH 処理は BZ の濃度に有意な変化をもたらさなかったが、Hb + GSH 処理は 24 時間で BZ の酸化を有意に抑制した (図 10g および 10h)。

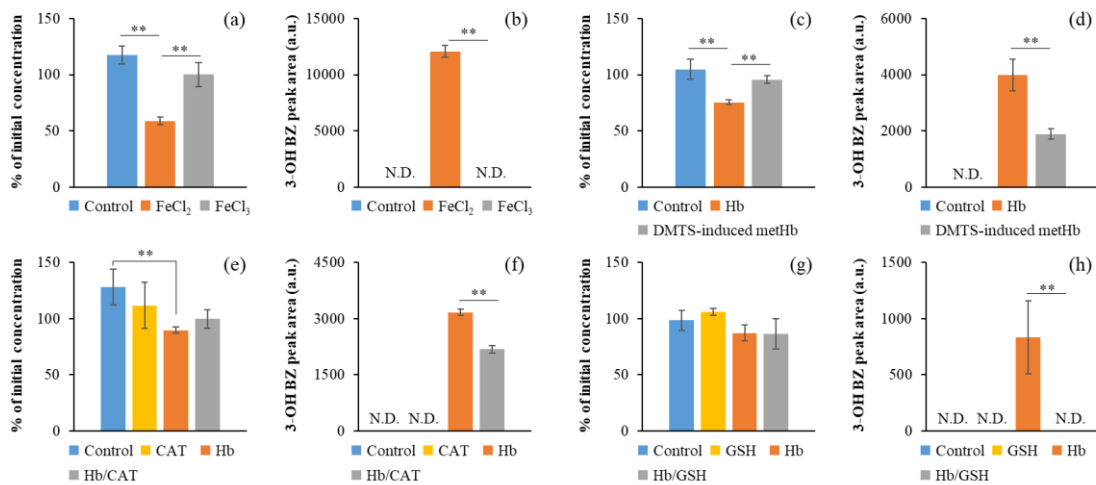


図 10 FeCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、Hb、DMTS 変換 metHb、CAT、GSH、Hb + CAT 及び Hb + GSH が BZ 濃度 (a、c、e 及び g) および 3-OH BZ ピーク面積 (b、d、f 及び h) に及ぼす影響。

BZ 中毒者の血液サンプル中の 3-OH BZ 濃度の死後変化

BZ 及び 3-OH BZ は BZ を意図的に摂取した死者から採取した血液から検出された。BZ に対する 3-OH BZ の比率は、クロマトグラムのピーク面積に基づいて計算し、死亡後の推定時間に対してプロットした。BZ のピーク面積に対する 3-OH BZ のピーク面積の比率は、死後経過時間とともに増加した (図 5)。死亡後 1、2、3 日目の平均比率はそれぞれ 9.6%、13.8%、30.7%であった。死後経過時間と 3-OH BZ と BZ の比率の間には正の相関関係が認められ (図 5)、相関係数 ( $r^2$ ) は 0.413 であった。

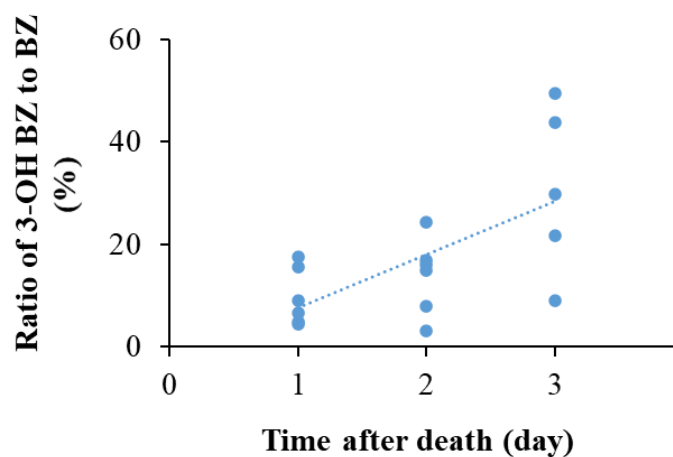


図 11 血中の BZ のピーク面積に対する 3-OH BZ の比率に対する死亡経過時間の影響。

2-2-4 考察

Hb は人体の赤血球に豊富に存在し、死後の溶血によって赤血球から放出される

(Hirabayashi, 1953)。最近、筆者らは Hb がメソミルの死後分解において特異な役割を果たしていることを報告した (Yamagishi et al. 2021)。検討したほとんどすべてのタイプのベンゾジアゼピン系薬物濃度は、Hb 処理によって減少し、BZ が最大の減少を示した。それゆえに Hb 処理によるベンゾジアゼピン系薬物濃度の低下のメカニズムを明らかにするために BZ に焦点を当てて検討した。

LC-QTOF-MS によって得られた結果は、BZ が Hb 処理によって 3-OH BZ に変換されたことを明確に示しており、BZ が Hb によって酸化されたことを示唆する。Hb は分子内に 4 つの鉄を持っており、これらの鉄が酸化に関与していると推測した。鉄が関与する最も典型的な酸化反応はフェントン反応が知られているため、Hb 中の鉄によるフェントン反応を評価した。

フェントン反応では、二価の鉄が過酸化水素の不均化を触媒し、ヒドロキシルラジカルや水酸化物イオンが生成する (Barb et al., 1949)。ヒドロキシルラジカルはイブプロフェンなどの薬物と反応して酸化代謝物を形成することが知られている (Illésetal, 2013)。DMTS は、Hb の 2 価の鉄を 3 価の鉄へ誘導し、Hb を metHb に変換する。仮説通り 3 価の鉄と DMTS によって誘導された metHb は、BZ の酸化にほとんど影響を与えていなかった。これらの結果は、Hb の二価鉄が BZ の酸化に関与していることを裏付けた。ヒドロキシルラジカルは GSH によって除去される (Fiser et al., 2013)。CAT と GSH はフェントン反応を阻害することによって BZ の酸化を抑制した。これらの結果は Hb 中の二価鉄が関与するフェントン反応が死後の血液で起こることを示唆した。

BZ 中毒死を証明するために、血中 BZ 濃度の正確な測定が必須であるが、死後の血液中ベンゾジアゼピン系薬物濃度が変化したことが報告されている (Dylan et al., 2020)。In vitro での検討に加えて、BZ を意図的に摂取した剖検事例から採取した血液から 3-OH BZ を検出し、死後の血液中の 3-OH BZ 濃度は死後に時間依存的な増加を示した。これは 3-OH BZ が BZ 中毒のバイオマーカーとして有用であることを示している。一方、3-OH BZ はヒトの BZ の主要代謝物であり、生前の服用者の血液、糞便、尿からも検出される (Schwartz et al., 1973; Allen et al., 1984)。BZ は、ヒトのチトクローム P450 (CYP) によって 3-OH BZ に変換されるが (Oda et al., 2003)、CYP1A2 や CYP3A4 などの CYP 酵素の活性は、死亡後に失われるか、大幅に低下することが報告されている (Hansen et al., 2019)。3-OH BZ の量は死後経過時間とともに解剖検体で増加したため、死後の血中 CYP ではなくフェントン反応によって増加が引き起こされたと考えた。しかし、死後の血液で死後に生成されたものと生きている間に生成された 3-OH BZ をどのように区別するかという問題は未解決のままである。

第 2 節の小括として、本研究で用いたすべてのベンゾジアゼピン系薬物が Hb によって減少し、BZ が最も著しく減少した。BZ は Hb を触媒としたフェントン反応により酸化され、3-OH BZ を形成した。酸化された代謝物は、BZ を意図的に摂取した剖検事例から採取された血液からも検出されたため、BZ 中毒のバイオマーカーとして使用できる可能性がある

る。血中の 3-OH BZ の比率は死後経過時間とともに増加するため、血中 BZ 濃度は死後の血中の 3-OH BZ の量に基づいて推定できると考えられた。

### 3節 マラチオンの死後変化に対するヒト血清アルブミンの影響

#### 2-3-1 背景

マラチオン (diethyl 2-[(dimethoxyphosphinothioyl)thio]butanedioate もしくは *S*-1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethyl *O,O*-dimethyl phosphorodithioate) は、世界中で販売されている広域スペクトラムの有機リン農薬である。マラチオンは、*O,O*-ジメチルチオホスホ部分とチオブタンジオエート部分がリン-硫黄結合で結合しており、AChE を阻害することで殺虫効果を発揮する。この構造的特徴は、同じ毒性を持つ多くの農薬に共通している (Fukuto, 1990)。マラチオンによる AChE の阻害は、シナプスにアセチルコリンが蓄積する原因であり、ヒトや動物でもマラチオンは高い急性毒性を示す。マラチオンは、日本での事故や農薬摂取による自殺を含むすべての中毒死に寄与する 5 番目の主要な化合物であり (Kudo et al., 2010)、血中のマラチオンの致死濃度は 0.6~19 µg/mL とされている (Schulz et al., 2012)。マラチオンの致死濃度は機器分析による検出には十分な濃度であるが、マラチオン中毒死者からの死後血ではマラチオン自体は検出されないことが報告されている (Chaturvedi et al., 1983)。マラチオン中毒死を判断するには、マラチオン濃度の正確な決定が必須であるが、死後の血中マラチオン濃度を正確に決定できない理由を合理的に説明する科学的証拠はない。

死後の血中マラチオン濃度変化を説明するために、2つのメカニズムを推測した。第一のメカニズムは、マラチオンがヒト血清アルブミン (HSA) のエステラーゼ活性によって分解される可能性である。HSA は血漿中に最も豊富なタンパク質であり、血流中の多くの内因性および外因性化合物のキャリアタンパク質として機能する (Er et al., 2013)。一方、マラチオンはカルボキシルエステラーゼによってマラチオンモノカルボン酸に分解され、マラチオンモノカルボン酸はヒトで検出される主要代謝物である (Buratti et al., 2005)。HSA は死後の血液中でカルボキシルエステラーゼとして作用すると推測される。実際、HSA のエステラーゼ活性が報告されている (Tatsumi et al., 2016)。マラチオンはエステラーゼの基質となり、HSA のエステラーゼ活性が比較的低い場合でも、HSA によって血中で分解される可能性がある。第二の想定されるメカニズムは、マラチオンが HSA と Hb の両方あるいは一方と結合する可能性がある。マラチオンと同じ構造特性を持つ有機リン化合物がこれらのタンパク質に結合していることが報告されている (Kranawetvogl et al., 2018; John et al., 2018; Fu et al., 2020)。このことから、上述の推測された2つのメカニズム、すなわち、HSA のエステラーゼ活性およびマラチオンと血液タンパク質との相互作用を評価した。この目的を達成するために、HSA および Hb 溶液中のマラチオンとその代謝物、さらに血液タンパク質に結合したマラチオンを LC-QTOF-MS により分析した。

#### 2-3-2 方法

##### 試薬

アセトニトリル (ACN、LC/MS グレード)、蒸留水 (LC/MS グレード)、ギ酸 (FA) 及

び 1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液 (HPLC グレード) は関東化学 (東京)。Tris-HCl バッファー (0.5 mol/L) は、Corning (MA, USA) から入手した。ジアゼパム-*d5* は、林純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。マラチオン (TraceSure®)、トリフルオロ酢酸 (TFA、HPLC グレード) 及びグルタチオン (GSH、特殊グレード) は、富士フイルム和光純薬 (大阪) から入手した。HSA、Hb、プロナーゼ及び分子量カットオフが 10 kDa の Amicon Ultra 0.5 mL 遠心フィルターユニットは、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。

#### 機器

二つの四重極/飛行時間型質量分析装置と二つの液体クロマトグラフを使用した。X500R (AB Sciex, Foster City, CA) および 5600 + QTOF (AB Sciex) には、それぞれ液体クロマトグラフとして Prominence UFLC (島津製作所、京都) および Nexera X2 (島津製作所) が接続した。液体クロマトグラフィー及びマススペクトロメトリーの条件は、表 6 にまとめた。

表 6 液体クロマトグラフィー及びマススペクトロメトリーの条件

	X500R	5600+QTOF <sup>a</sup>
<u>LC conditions</u>		
LC system	Prominence UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)	Nexera X2 (Shimadzu)
Column	Atlantis T3 C18 column, 50 × 2.0 mm I.D., 3 μm (Waters, Milford, MA, USA)	←
Injection volume (μL)	2	20
Flow rate (mL/min)	0.3	0.2
Column temperature (°C)	40	←
Elution buffer A	0.1% Formic acid and 10 mM ammonium formate	←
Elution buffer B	Acetonitrile (ACN)	←
Gradient condition (A/B)	90/10 (0 min)–40/60 (12 min) – 0/100 (18–23 min)–90/10 (23– 30 min)	←
<u>MS conditions<sup>b</sup></u>		
Polarity	positive	←

Mode	IDA	product ion scan
<i>m/z</i> range	50–800	50–400
Accumulation time (ms)	100	←
ISVF (V)	5500	←
DP (V)	60	←
CE (V)	20	←
CES (V)	5	←
IRD (ms)	67	←
IRW (ms)	25	←
GS1 (psi)	50	←
GS2 (psi)	80	←
CUR (psi)	25	←
TEM (°C)	500	350

<sup>a</sup>←, The conditions were identical to those used in X500R.

<sup>b</sup>ISVF: ion spray voltage floating, DP: declustering potential, CE: collision energy, CES: collision energy spread, IRD: ion release delay, IRW: ion release width, GS1: source gas 1, GS2: source gas 2, CUR: curtain gas, TEM: ion source temperature

#### HSA および Hb との反応液からのマラチオンの回収率の評価

血液タンパク質 (HSA 40 mg/mL または Hb 100 mg/mL) とマラチオン (1 µg/mL) を含む 0.1 mL の反応液を、37°C で 0 時間および 24 時間インキュベートした。HSA と Hb 濃度は以前の文献で報告されている濃度で実施した (Kranawetvogl et al., 2018; Yamagishi et al., 2021)。インキュベーション後、1.9 mL の内部標準としてジアゼパム-*d5* (50ng/mL) を含む ACN を反応液に加えた。混合液をボルテックス及び超音波処理、9982 ×g で 10 分間遠心分離し、上清を LC-QTOF-MS (X500R) に注入して、マラチオン濃度及びマラチオンモノカルボン酸を測定した。HSA からのマラチオンの反応時間依存性を評価するために、HSA (40 mg/mL) とマラチオン (最終濃度 1 µg/mL) を含む 0.1 mL の反応液を 37°C で 0、1、2、4、8、および 24 時間でインキュベートした。インキュベーション後、1.9 mL の内部標準としてジアゼパム-*d5* (50ng/mL) を含む ACN を反応液に加えた。反応液をボルテックス及び超音波処理、9982 ×g で 10 分間遠心分離し、上清を LC-QTOF-MS (X500R) に注入して、マラチオン濃度を測定した。

#### HSA におけるマラチオン付加物の検出と同定

0.5 M Tris-HCl バッファーに 40 mg/mL の HSA と 10 mg/mL のマラチオンを含む反応混合液 0.11 mL を 37°C で 24 時間インキュベートした。プロナーゼによる酵素消化は、以

前の文献で報告されている方法で実行した (Yamagishi et al., 2021)。6 mg のプロナーゼを反応液に加え、37°C で一晩インキュベートした。Hb ペプチド中のマラチオン付加体を検出および同定するために、2 回目のインキュベーション後に 0.3 mL の 0.5%TFA を 0.1 mL の反応液に添加した。反応液をボルテックス、9982  $\times g$  で 10 分間遠心分離し、上清を LC-QTOF-MS (X500R) に注入した。HSA ペプチド中のマラチオン付加体形成に濃度依存性があるか検証するために、40 mg/mL HSA と 1、3、10、30、100、300 または 1000 mg/mL マラチオンを含む 0.5 mL の反応液をインキュベートした。37°C で 24 時間。インキュベーション後、0.5 mL の反応液を Amicon Urtra 0.5 mL 遠心フィルターユニットに移し、9984  $\times g$  で 10 分間遠心分離した。濃縮液を 0.3 mL の 0.5 M Tris-HCl バッファーで 3 回洗浄し、9984  $\times g$  で 10 分間再度遠心分離した。プロナーゼによる酵素消化は、以前の文献で報告されている方法で実行した (Yamagishi et al., 2021)。30 mg のプロナーゼを洗浄後の濃縮液に加え、37°C で一晩インキュベートした。2 回目のインキュベーション後、0.1 mL のプロナーゼ消化液に 0.3 mL の 0.5%TFA を加えた。混合液をボルテックス、9982  $\times g$  で 3 分間遠心分離し、上清を LC-QTOF-MS (5600+QTOF) で測定した。K-adduct および CP-adduct のプレカーサーイオンは、それぞれ  $m/z$  271.1 および  $m/z$  395.1 で検出した。K-adduct と CP-adduct のプロダクトイオンは、それぞれ  $m/z$  271.0876 と  $m/z$  217.0641 で検出した。

#### マラチオン中毒者の死後検体におけるマラチオンの検出およびマラチオン中毒者の血液中の K-および CP-adduct の検出

本研究は、本学の薬学研究院倫理審査委員会及び医学研究院倫理審査委員会の承認を受けた (許可番号 R001 及び 2819)。解剖検体の使用はヘルシンキ宣言に従って実施した。

マラチオンを含む農薬を意図的に摂取して死亡した 72 歳の女性から死後推定約 72~168 時間後に大腿静脈血、心臓血、尿および胃の内容物を採取した。全血は、コントロールとして健康なボランティアから提供を受けた血液を使用した。

0.5 mL の血液を Amicon Urtra 0.5 mL 遠心フィルターユニットに移し、9984  $\times g$  で 10 分間遠心分離した。濃縮液を 0.3 mL の 0.5 M Tris-HCl バッファーで 3 回洗浄し、9984  $\times g$  で 10 分間再度遠心分離した。プロナーゼによる酵素消化は、以前の文献で報告されている方法で実行した (Yamagishi et al., 2021)。30 mg のプロナーゼを洗浄後の濃縮液に加え、37°C で一晩インキュベートした。2 回目のインキュベーション後、0.1 mL のプロナーゼ消化液に 0.3 mL の 0.5%TFA を加えた。混合液をボルテックス、9982  $\times g$  で 3 分間遠心分離し、上清を LC-QTOF-MS (5600+QTOF) で測定した。K-adduct および CP-adduct のプレカーサーイオンは、それぞれ  $m/z$  271.1 および  $m/z$  395.1 で検出した。K-adduct と CP-adduct のプロダクトイオンは、それぞれ  $m/z$  271.0876 と  $m/z$  217.0641 で検出した。

#### 統計

実験値は平均と標準偏差で表した。Student の t 検定と Tukey の多重比較検定は、それ

ぞれ 2 つの群間とすべての群間の比較で実行した。単一および二重のアスタリスク (\*) により、それぞれ  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  での有意水準を示す。

### 2-3-3 結果

#### HSA 溶液中のマラチオンの安定性

0.5 M Tris-HCl バッファー、HSA 溶液、および Hb 溶液のマラチオン濃度の 24 時間での減少率は、0 時間と比較してそれぞれ 86.0%、100%、および 89.2%であった。コントロールと HSA 溶液の間では、24 時間でのマラチオン濃度に有意差が認められたが、コントロールと Hb 溶液の間では認められなかった (図 12)。さらに、TOF-MS で測定したコントロールおよび Hb 溶液のマラチオンモノカルボン酸に対応する  $m/z$  で保持時間 8.4 分にシグナルが検出されたが、HSA 溶液では保持時間 8.4 分にシグナルは検出されなかった。コントロールおよび HSA 溶液中のマラチオン濃度は時間依存的な減少を示し、2 つの群間の濃度に有意差がインキュベーションの 1 時間後から認められた (図 13)。

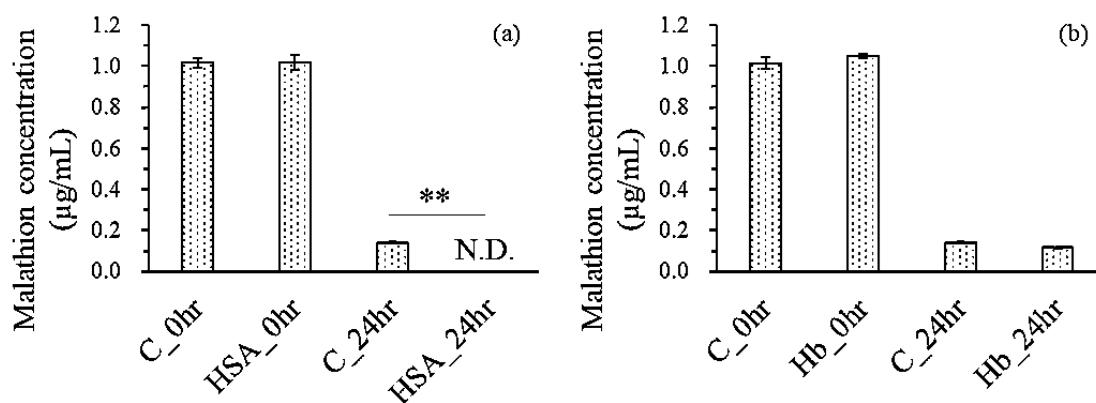


図 12 マラチオン濃度に対する血液タンパク質の影響。Tukey の検定は、群間の比較のために実行した。二重アスタリスク (\*\*) は、 $p < 0.01$  での有意差を示す。

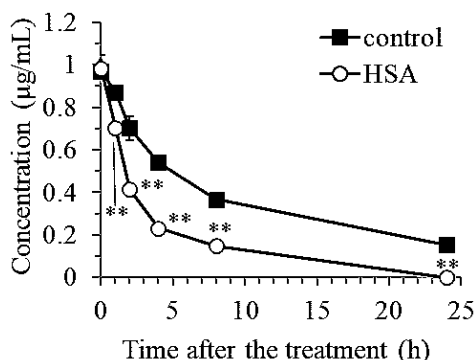


図 13 HSA 溶液中のマラチオン濃度の時間経過。1 µg/mL のマラチオンを HSA 溶液加えてインキュベートした。コントロールと HSA を比較するために、Student の t 検定を実行した。二重アスタリスク (\*\*) は、 $p < 0.01$  での有意差を示す。

### HSA ペプチド中のマラチオン付加体の検出と同定

マラチオン処理ありとなしで酵素消化した HSA ペプチドの質量スペクトラムを差分解析した。マラチオンを処理した HSA でのみ検出された抽出イオンは、 $m/z$  271.0881 および 395.0947 で二つであった。 $m/z$  271.0881 のイオンは、2.3 分の保持時間で UK-5 と名付けた (図 14a)。 $m/z$  395.0947 のイオンは、3.1 分の保持時間で UK-6 と名付けられました (図 14b)。保持時間が 1 分より前に現れるピークは非特異的なシグナルであるように考えられたため、考慮しなかった。UK-5 および UK-6 の MS/MS 分析の結果をそれぞれ図 15a 及び 15b に示した。図 15a では、6 つのイオンが検出された。最大のものは  $m/z$  が 271.0874 であったため、UK-5 のプリカーサーイオンであり、K1 と名付けた。5 つのフラグメントイオンが  $m/z$  225.0818、208.0561、142.0089、130.0864、および 84.0808 で検出され、サイズの順に K2~K6 と名付けた。これらのイオンの帰属を表 7 にまとめた。K1~K6 の  $\Delta m/z$  値は  $\pm 2.4$  ppm 未満であった。これらの帰属から *O*, *O*-ジメチルチオホスホリジンであると決定できたため、UK-5 を K-adduct と名付けた (図 15c)。図 15b では、1 つのプリカーサーと 10 のフラグメントイオンが検出された。 $m/z$  395.0942 で検出されたイオンは UK-6 のプリカーサーイオンであり、CP1 に名付けた。10 個のフラグメントイオンが  $m/z$  360.0595、286.0212、252.0386、217.0641、200.0383、171.0774、170.0805、125.0712、116.0715、および 70.0658 で検出され、サイズの順に CP2~CP11 と名付けた。これらのイオンのアサインを表 8 にまとめた。これらの帰属は、CP-1 (UK-6) が *S*<sup>-</sup> ((1-カルボキシ-3-エトキシ-3-オキソプロピル) チオ) システイニルプロリンまたは *S*<sup>+</sup> ((3-カルボキシ-1-エトキシ-1-オキソプロパン-2) であることを示唆し、CP-adduct と名付けた。マラチオンのコハク酸ジエチル部分の加水分解部位はフラグメントイオンによって特定できなかったため、2 つの可能な構造が考えられた (図 15d, e)。図 15d は、推定される CP-adduct の 1 つのフラグメントイオンのアサインを示した。CP-adduct は、24 時間の GSH 処理によって有意に減少した (図 16)。これは、図 15d, e に示すように、CP-adduct の分子内にジスルフィド結合があることを示唆している。

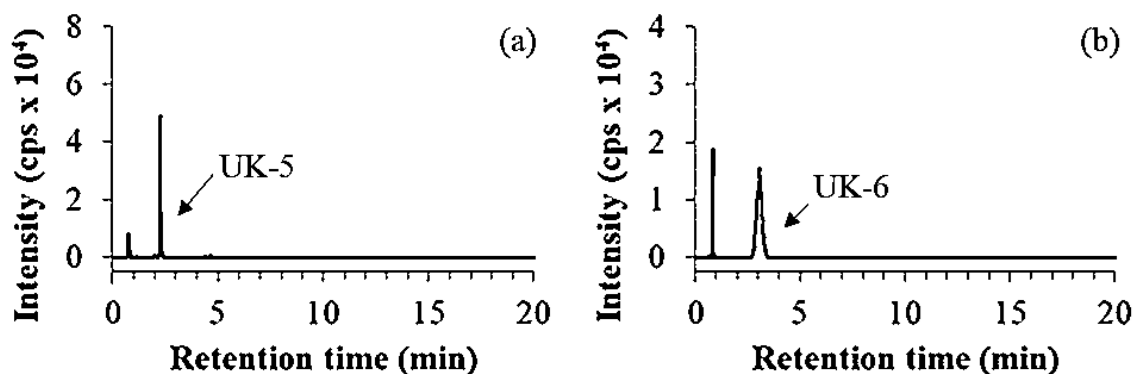


図 14 マラチオン処理したプロナーゼ消化 HSA における  $m/z$  271.0881 (a) および 395.0947 (b) での溶出図。UK-1 と UK-2 の保持時間はそれぞれ 2.3 と 3.1 分であった。

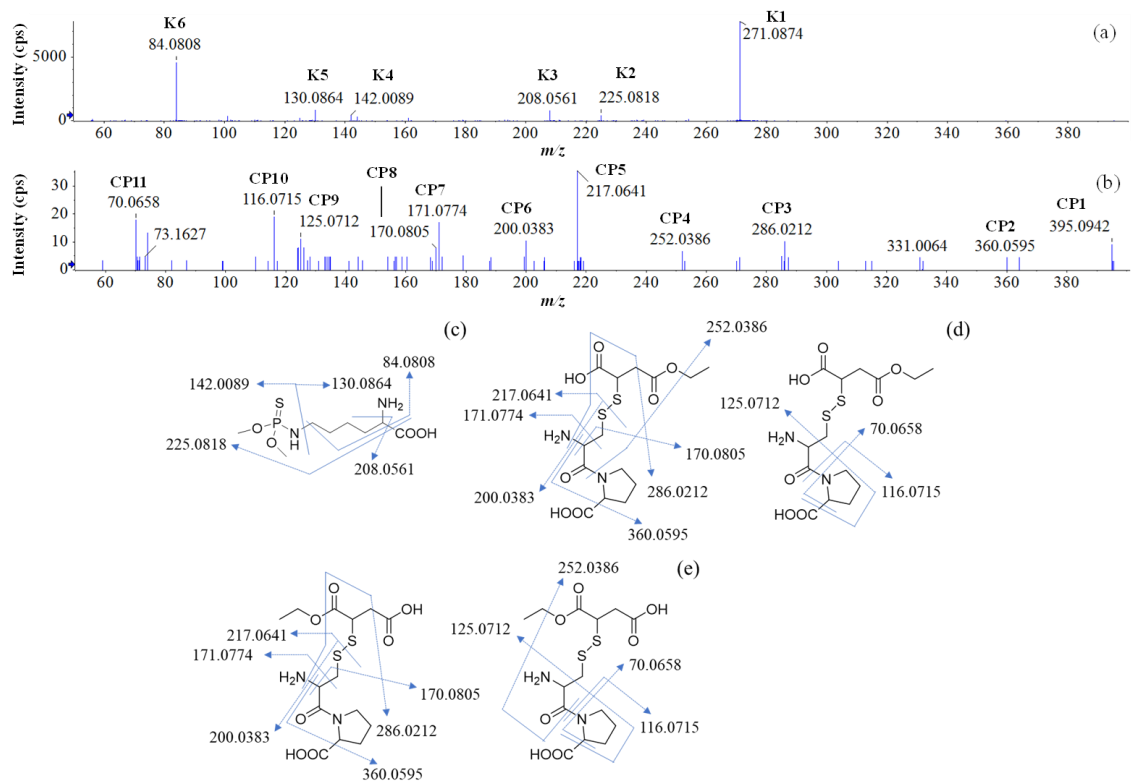


図 15 ポジティブイオンモードで検出された未知のマラチオン付加体の MS/MS スペクトルラムと帰属. 図 14 で検出された未知のピーク UK-5 (a) および UK-6 (b) は、LC-QTOF-MS で分析した。UK-5 (c) および UK-6 (d, e) イオンを帰属した。UK-6 の 2 つの可能な構造が考えられた (d, e) .

表 7 UK-5 のプレカーサーイオンとプロダクトイオンの帰属

Peak label	Elemental composition	$m/z$ theoretical	$m/z$ measured	$\Delta m/z$ (ppm)
K1	C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS	271.0876	271.0874	-0.7
K2	C <sub>7</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PS	225.0821	225.0818	-1.3
K3	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub> PS	208.0556	208.0561	2.4
K4	C <sub>2</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> PS	142.0086	142.0089	2.1
K5	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> NOPS	130.0863	130.0864	0.8
K6	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N	84.0808	84.0808	0.0

表 8 UK-6 のプレカーサーイオンとプロダクトイオンの帰属

Peak label	Elemental composition	$m/z$ theoretical	$m/z$ measured	$\Delta m/z$ (ppm)
CP1	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	395.0941	395.0942	0.3
CP2	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	360.0570	360.0595	6.9
CP3	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	286.0202	286.0212	3.5
CP4	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	252.0359	252.0386	10.7
CP5	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	217.0641	217.0641	0.0
CP6	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> S	200.0376	200.0383	3.5
CP7	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	171.0764	171.0774	5.8
CP8	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub>	170.0812	170.0805	-4.1
CP9	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O	125.0709	125.0712	2.4
CP10	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>	116.0706	116.0715	7.8
CP11	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N	70.0651	70.0658	10.0

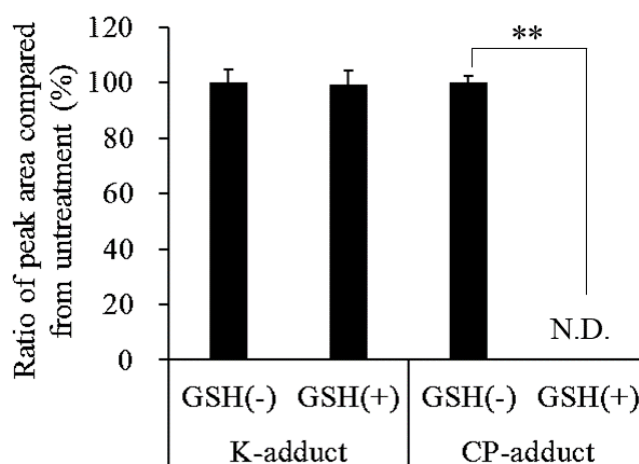


図 16 HSA の K-adduct 及び CP-adduct のピーク面積に対する GSH の影響. GSH 処理なしとありの場合を比較するために、Student の t 検定を実行した。二重アスタリスク (\*\*) は、 $p < 0.01$  での有意差を示す。

K および CP-adduct 分析における LC-QTOF-MS のバリデーション及びマラチオン中毒死者検体の分析

K-adduct および CP-adduct は、それぞれ 1.0 および 3.0  $\mu\text{g/mL}$  以上の濃度で検出可能であった。マラチオン濃度と K-adduct および CP-adduct のピーク面積との関係は、良好な直線性を示した。相関係数 ( $r^2$ ) はそれぞれ 0.995 及び 0.992 であった。マラチオン中毒死者から収集された心臓血、尿、および胃内容物中のマラチオン濃度はそれぞれ 0.019、

0.079、および 8562  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。マラチオンは大腿静脈血では検出されなかった（表 9）。健常人の血液では、K-adduct および CP-adduct も検出されなかった（図 17a、c）。一方、K-adduct は、意図的なマラチオン摂取で死亡した剖検例から採取した血液で特異的に検出された（図 17b）。しかし、同じ血液サンプルでは CP-adduct は検出されなかった（図 6d）。この血液中のマラチオン濃度は、血液中の K-adduct の量に基づいて 9.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と推定された。

表 9 マラチオン中毒死者の心臓血、尿及び胃内容物中のマラチオン濃度

Femoral vein blood	Heart blood	Urine	Stomach content
N.D.	0.019	0.079	8562

N.D.: not detected

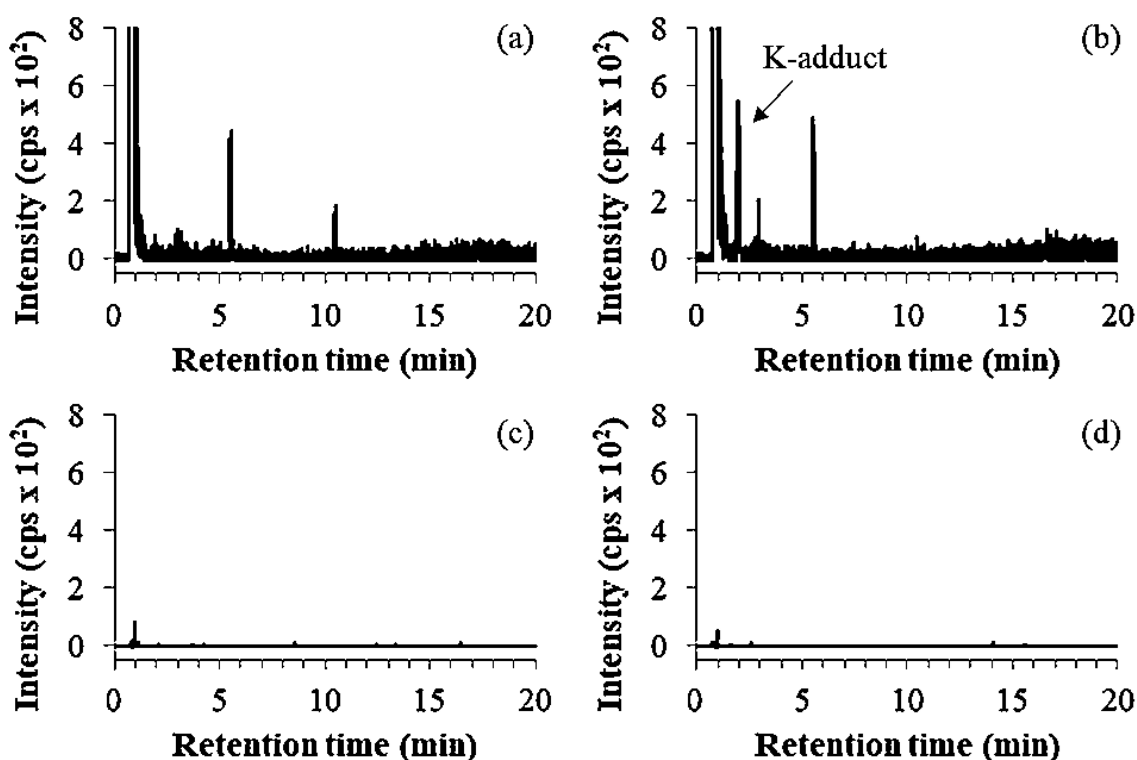


図 17 コントロール (a、c) およびマラチオン中毒死者 (b、d) からのプロナーゼ消化 HSA における K-adduct 及び CP-adduct の溶出図。

#### 2-3-4 考察

エステル化合物の死後分解の主要な要因として、血漿エステラーゼおよび細菌の関与が知られている (Peters and Steuer, 2019)。ヒトの肝臓のカルボキシルエステラーゼはマラチオンの分解に寄与するため、マラチオンは血中において HSA の有するエステラーゼ活性に

よって分解されると推測した。しかし、エステラーゼによるマラチオンの分解産物であるマラチオンモノカルボン酸に対応する  $m/z$  シグナルは検出されなかった。一方、HSA がマラチオンの死後分解に関与している別のメカニズム、すなわちマラチオンと HSA のアミノ酸残基との直接相互作用が観察された。HSA は血漿中に最も豊富なタンパク質であるため、この機構が、おそらく血中のマラチオンの消失に重要な役割を果たすと考えられた。

マラチオンのホスホリル部分が AChE のセリン残基に結合することが報告されている (Fukuto, 1990)。1,2-ベンゾキノンやエチレンオキシドなどのさまざまな物質との HSA はアミノ酸付加体の形成も知られている (Rubino et al., 2009)。LC-QTOF-MS を使用して、マラチオンが HSA の K 残基および CP 配列とアミノ酸付加体を形成すること、つまりマラチオンが 2 つの部分が別々の HSA アミノ酸残基もしくは配列に結合することを発見した。すなわち K 残基の  $\epsilon$ -アミノ基にホスホロチオニル部分が、CP 配列のチオール基にアルキルチオール部分が結合することを見出した。HSA の配列には CP 配列が 1 つしかないため、マラチオンは HSA の  $^{34}\text{Cys}$  に特異的に結合していると結論した。一方、CP 配列とは異なり、HSA 配列には複数の K 残基があり、以前の報告では、有機リン化合物が HSA のいくつかの K 残基に結合していることが示されている (Fu et al., 2020)。今後の研究では、マラチオンが HSA の特定の K 残基に結合するかどうかを明らかにすることを考えている。

血中のマラチオン濃度は、マラチオン中毒による死因を決定するための重要な要素の 1 つである。K および CP-adduct は、LC-QTOF-MS によって特異的に検出され、定量的に評価できることが示された。すなわち、マラチオン自体の代わりに K-または CP-adduct の検出を使用して、マラチオン中毒による死亡を判断できることを示している。言い換えれば K-adduct と CP-adduct の両方をマラチオン中毒のバイオマーカーとして使用することができ、マラチオンの摂取量は K-adduct と CP-adduct の濃度から計算することができると考えられた。

マラチオン中毒死者の血中コリンエステラーゼ活性阻害を測定することはマラチオン中毒を決定するのに効果的であるが、マラチオン中毒による死因を明確に決定するためのマラチオン濃度の定量化する方法が望まれている。本研究で取り扱った事例では血中マラチオン濃度はマラチオンの致死濃度よりも低かった (表 9)。しかし、K-adduct の量から計算されたマラチオン濃度 ( $9.5 \mu\text{g/mL}$ ) は、マラチオンの致死濃度として妥当であった。これは K-adduct が臨床診療におけるマラチオン中毒のバイオマーカーとして使用できることを証明していると考えられる。CP-adduct の定量性は、K-adduct と同様に *in vitro* でも検証されたが、マラチオン中毒死者から採取した血液では、CP-adduct は検出されなかった。図 16 に示すように、CP-adduct は GSH によって分解された。GSH または他の還元剤が血液、特に赤血球に豊富に存在するため、マラチオン中毒死亡者から採取した血液において CP-adduct は検出されなかったと考えられた。したがって、K-adduct のみが臨床診療に有用であると判断できた。

第 3 節の小括として、死後の血中マラチオンは、リシン (K) やシステイニルプロリン

(CP) などの HSA のアミノ酸配列と付加体を形成するため検出が困難であることを示した。意図的なマラチオン摂取で死亡した剖検事例の血液では K-adduct のみが検出されたため、血中の K-adduct の量から血中マラチオン濃度を算出することができ、K-adduct はマラチオン中毒のバイオマーカーとして使用できる。また、マラチオンと共通の構造を持つ他の有機リン農薬も、HSA で同様の付加物を生成すると予想される。

### 3章 結論

死後に血中薬物濃度が変化するメカニズムを明らかにする目的で本研究を実施した。本研究において、Hb や HSA といった血中タンパク質が、死後の血中薬物濃度変化に寄与していることが判明した。そのメカニズムはアミノ酸付加体の形成や Hb については Fenton 反応による酸化物の形成であった。さらにこれらのメカニズムを解明に基づき、死後代謝物の生成量から生前の血中薬物濃度を評価できることが明らかとなった。本研究の成果はご遺体の薬物のより正確な血中薬物濃度を把握するのに有用で、中毒の有無の判断に寄与する法中毒学上の有益な知見であり、法中毒学実務においても有用であると考えられた。

#### 死後薬物代謝メカニズム

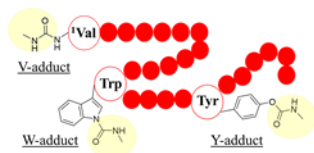
今まで 本研究の成果を踏まえて

- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>✓死後の再分布</li> <li>✓死後分解             <ul style="list-style-type: none"> <li>・血中エステラーゼ</li> <li>・バクテリア</li> </ul> </li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓死後の再分布</li> <li>✓死後分解             <ul style="list-style-type: none"> <li>・血中エステラーゼ</li> <li>・バクテリア</li> </ul> </li> </ul> |
|---|---|

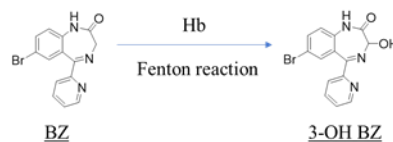


#### ✓血中タンパク質による死後代謝

- ・ヘモグロビン  
(アミノ酸付加体及びFenton反応による酸化物の形成)

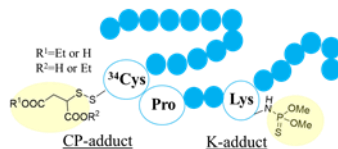


メソミルのHbアミノ酸付加体の形成の模式図



ブロマゼパム (BZ) のHbによる代謝

- ・ヒト血清アルブミン (アミノ酸付加体の形成)



マラチオンのHSAアミノ酸付加体の形成の模式図

図 18 新規死後薬物代謝メカニズム

## 参考文献

- Allen J.G., Galloway D.B., Ehsanullah R.S., Ruane R.J. and Bird H.A. (1984) The effect of bromazepam (Lexotan) administration on antipyrine pharmacokinetics in humans. *Xenobiotica*. 14, 321-326.
- Barb W.G., Baxendale J.H., George P. and Hargrave K.R. (1949) Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. *Nature* 163, 692-694.
- Buratti F. M., and Testai E. (2005) Malathion detoxification by human hepatic carboxylesterases and its inhibition by isomalathion and other pesticides. *J Biochem Mol Toxicol*. 19, 406-414.
- Chaturvedi K. A., Rao N. G. S., and McCoy E. F. (1983) A multi-chemical death involving caffeine, nicotine and malathion. *Forensic Sci Int*. 23, 265-275.
- Carlsson, H., Rappaport, S., and Tornqvist, M. (2019) Protein adductomics: methodologies for untargeted screening of adducts to serum albumin and hemoglobin in human blood samples. *High-Throughput* 8 (1), 6.
- Degner, A., Carlsson, H., Karlsson, I., Eriksson, J., Pujari, S. S., Tretyakova, N. Y., and Tornqvist, M. (2018) Discovery of novel N-(4-Hydroxybenzyl)valine hemoglobin adducts in human blood. *Chem. Res. Toxicol*. 31, 1305-1314.
- Dong X., Kiss L., Petrikovics I. and Thompson D.E. (2017) Reaction of Dimethyl Trisulfide with Hemoglobin. *Chem Res Toxicol.*, 30, 1661-1663.
- Dylan M., Dimitri G., Linda G., Matthew D.R., Jennifer S., Noel W.W. and Olaf H.D. (2020) A Compilation of Postmortem/Antemortem Drug Concentration Ratios. *J Anal Toxicol*. 20, 107.
- Er, J. C., Vendrell, M., Tang, M. K., Zhai, D., and Chang, Y.-T. (2013) Fluorescent Dye Cocktail for Multiplex Drug-Site Mapping on Human Serum Albumin. *ACS Comb. Sci*. 15, 452-457.
- Fiser B, Jójárt B, Csizmadia I.G. and Viskolcz B. (2013): Glutathione – Hydroxyl Radical Interaction: A Theoretical Study on Radical Recognition Process. *PLOS ONE*, 8, e73652.
- Fu, F., Liu, H., Gao, R., Zhao, P., Lu, X., Zhang, R., Wang, L., Wang, H., and Pei, C. (2020) Protein adduct binding properties of tabun-subtype nerve agents after exposure in vitro and in vivo. *Toxicol. Lett*. 321, 1-11.
- Fukuto, T. R. (1990) Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect*. 87, 245-254.
- Hansen J., Palmfeldt J., Pedersen K.W., Funder A.D., Frost L., Hasselstrøm J.B. and Jornil J.R. (2019) Postmortem protein stability investigations of the human

- hepatic drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes CYP1A2 and CYP3A4 using mass spectrometry. *J Proteomics.*, 194, 125-131.
- Herrera-Lopez, S., Hernando, M. D., García-Calvo, E., Fernandez-Alba, A. R., and Ulaszewska, M. M. (2014) Simultaneous screening of targeted and nontargeted contaminants using an LC-QTOF-MS system and automated MS/MS library searching. *J. Mass Spectrom.* 49, 878-893.
- Hirabayashi, A. (1953) Experimente uber die hamolyse des blutes aus leichen in verschiedener zeit nach dem Tode. *Arch. Histol. Jpn.* 5, 565-571.
- Huhtanen, K., and Dorough, H.W. (1976) Isomerization and Beckmann rearrangement reactions in the metabolism of methomyl in rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* 6, 571-583.
- Ida K. G., Øivind E., Ingemar T., Karin H., Erlend H., Sidsel R. and Ingvild M.T. (2019) Psychoactive substances in natural and unnatural deaths in Norway and Sweden – a study on victims of suicide and accidents compared with natural deaths in psychiatric patients. *BMC Psychiatry*, 19, 33
- Igisu, H., Matsumura, H., and Matsuoka, M. (1994) Acetylcholinesterase in the erythrocyte membrane. *J. UOEH* 16 (3), 253-262.
- Illés E., Takács E., Dombi A., Gajda-Schrantz K., Rác G., Gonter K. and Wojnárovits L. (2013): Hydroxyl radical induced degradation of ibuprofen. *Sci Total Environ.*, 447, 286-292.
- Kawakami, Y., Fuke, C., Fukasawa, M., Ninomiya, K., Ihama, Y., and Miyazaki, T. (2017) An experimental study of postmortem decomposition of methomyl in blood. *Leg. Med.* 25, 36-42.
- Kranawetvogl, A., Siegert, M., Eyer, F., Thiermann, H., and John, H. (2018) Verification of organophosphorus pesticide poisoning: Detection of phosphorylated tyrosines and a cysteine-proline disulfide-adduct from human serum albumin after intoxication with dimethoate/omethoate. *Toxicol. Lett.* 299, 11-20.
- Kudo, K., Ishida, T., Hikiji, W., Usumoto, Y., Umehara, T., Nagamatsu, K., Tsuji, A., and Ikeda, N. (2010) Pattern of poisoning in Japan: selection of drugs and poisons for systematic toxicological analysis. *Forensic Toxicol.* 28, 25-32.
- John, H., Siegert, M., Eyer, F., Worek, F., Thiermann, H., and Kranawetvogl, A. (2018) Novel cysteine- and albumin-adduct biomarkers to prove human poisoning with the pesticide oxy-demeton-S-methyl. *Toxicol. Lett.* 294, 122-134.
- Moriya, F., and Hashimoto, Y. (2005) A fatal poisoning caused by methomyl and nicotine. *Forensic Sci. Int.* 149, 167-170.
- Na, J.-Y., Park, J. H., Choi, B. H., Kim, H.-S., and Park, J.-T. (2018) Point-of-care

- hemoglobin testing for postmortem diagnosis of anemia. *Forensic Sci., Med., Pathol.* 14, 57-61.
- Oda M., Kotegawa T., Tsutsumi K., Ohtani Y., Kuwatani K. and Nakano S. (2003) The effect of itraconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of bromazepam in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 59, 615-619.
- Peters, F. T., and Steuer, A. E. (2018) Antemortem and postmortem influences on drug concentrations and metabolite patterns in postmortem specimens. *WIREs Forensic Sci.* 1, e1297.
- Robertson M.D. and Drummer O.H. (1998) Stability of nitrobenzodiazepines in postmortem blood. *J Forensic Sci.* 43, 5-8.
- Rotenberg, M., Shefi, M., Dany, S., Dore, I., Tirosh, M., and Almog, S. (1995) Differentiation between organophosphate and carbamate poisoning. *Clin. Chim. Acta* 234, 11-21.
- Rubino, F. M., Pitton, M., Di Fabio, D., and Colombi, A. (2009) Toward an “omic” physiopathology of reactive chemicals: Thirty years of mass spectrometric study of the protein adducts with endogenous and xenobiotic compounds. *Mass Spectrometry Reviews* 28, 725-784.
- Schechter, A. N. (2008) Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 112 (10), 3927-3938.
- Schulz, M., Iwersen-Bergmann, S., Andresen, H., and Schmoldt, A. (2012) Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Critical Care.* 16, R136.
- Schwartz M.A., Postma E., Kolis S. J. and Leon A.S. (1973) Metabolites of bromazepam, a benzodiazepine, in the human, dog, rat, and mouse. *J Pharm Sci.* 62, 1776-1779
- Soyka M. (2017) Treatment of benzodiazepine dependence. *N. Engl. J. Med.* 376, 1147-1157.
- Tatsumi, A., Okada, M., Inagaki, Y., Inoue, S., Hamaguchi, T., and Iwakawa, S. (2016) Differences in Esterase Activity to Aspirin and p-Nitrophenyl Acetate among Human Serum Albumin Preparations. *Biol. Pharm. Bull.* 39, 1364-1369.
- Yamagishi, Y., Iwase H., Ogra, Y. (2021) Post-Mortem Changes of Methomyl in Blood with Hemoglobin. *Chem Res Toxicol.* 34, 161-168.

## 主論文目録

本学位論文内容は、以下の発表論文による。

1. Yamagishi, Y., Iwase H., Ogra, Y. (2021) Post-Mortem changes of methomyl in blood with hemoglobin. *Chem. Res. Toxicol.* **34**, 161-168.
2. Yamagishi, Y., Iwase H., Ogra, Y. (2021) Effects of hemoglobin on post-mortem oxidation of bromazepam. *Fundam. Toxicol. Sci.* **8**, 61-67.
3. Yamagishi, Y., Iwase H., Ogra, Y. (2021) Effects of human serum albumin on post-mortem changes of malathion. *Sci. Rep.* **11**, 11573.

## 論文審査員

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された以下の審査員により行われた。

主査 千葉大学大学院薬学研究院 教授 博士（薬学） 小林 弥生

副査 千葉大学大学院薬学研究院 教授 博士（薬学） 伊藤 晃成

副査 千葉大学大学院医学研究院 教授 博士（薬学） 石井 伊都子

副査 国際医療福祉大学医学部 教授 博士（医学） 矢島 大介