

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10568

研究課題名（和文）新規前処理法を用いた血中薬毒物LC-MS/MS分析法開発とその評価法の検討

研究課題名（英文）Development of LC-MS/MS analysis method for drugs and poisons in blood using a new pretreatment method and examination of its evaluation method

研究代表者

小川 匡之（Ogawa, Tadashi）

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50559937

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：血中薬毒物のLC-MS/MS分析試料前処理法として、従来の除タンパク法やQuEChERS法に代わる、除タンパク・リン脂質除去カラムや簡易化液抽出カラムを用いた、新規方法開発を目的とした研究を行い、向精神薬やネオニコチノイド系殺虫剤を対象に分析法を開発した。さらに、それらの前処理法の適切な評価の確立を目指したが、分析時のマトリックス効果の原因が、分析中の試料だけではなく、連続分析時のキャリーオーバーによってもたらされることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、薬毒物分析の中心となっているLC-MS/MSにおいて、測定時のマトリックス効果は定量上の大きな問題であり、その解消は重要な課題である。特に、測定試料が著しく劣化している法医学分野において極めて重要である。米国食品医薬品局（FDA）、日米EC医薬品規制調和国際会議（ICH）等で定められている分析法バリデーションのマトリックス効果評価法は、測定試料自体のマトリックスを念頭に定められているが、連続分析におけるマトリックス効果原因物質のキャリーオーバーが極めて大きな要因であることが本研究において明らかとなった。この事は、分析法評価法自体の見直しの必要性を訴える、重要な提言となったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We conducted research aimed at developing novel extraction methods for toxic substances in whole blood by LC-MS/MS analysis using deproteinization/phospholipid removal columns and simplified liquid extraction columns, replacing the conventional deproteinization method and QuEChERS method. We also developed analytical methods for psychotropic drugs and neonicotinoid insecticides. Furthermore, we aimed to establish an appropriate evaluation of these pretreatment methods, and it became clear that the cause of the matrix effect during analysis was not only the sample being analyzed but also carryover during consecutive analyses.

研究分野：法医学

キーワード：LC-MS/MS マトリックス効果 除タンパク・リン脂質除去カラム 簡易化液抽出カラム

1. 研究開始当初の背景

近年、死因究明に対するニーズはますます高まっており、鑑定の全てに関わってくる訳ではないが、薬毒物分析はその重要な役割を担っている。LC-MS/MS(液体クロマトグラフタンデム質量分析装置)は、法医学をはじめ様々な分野での分析手段として広く用いられているが、生体試料を LC-MS/MS 分析に供する際に重要になってくるのが試料の前処理である。特に血液中の薬物を分析する場合などは試料中にタンパク質が共存しており、そのまま LC 分析を行うとタンパク質が分析カラムに吸着しカラムの劣化を早めることになる。このためサンプル中に共存するタンパク質を除くことが必要になる。古くから用いられている除タンパク法や QuEChERS では精製度が十分とは言えず、装置の汚染、それに伴う感度の著しい低下を招くことになり、ESI イオン化に影響を及ぼすマトリックス効果も大きな問題となっている。生体試料中の薬毒物を簡便かつ高精度に分析する方法を確立するためには、簡便で効果的な前処理法を開発することが求められており、併せてその前処理法を正しく評価するための指標の確立が重要であると考えられている。

2. 研究の目的

本研究は、従来法である除タンパク法や QuEChERS 法に代わる、簡便でかつ効果的な前処理法を開発し、血中薬毒物を LC-MS/MS により高精度に分析することと、併せてその前処理法を正しく評価する方法の確立を目的とする。本研究の学術的独自性と創造性は、新たな前処理法を開発し、正確に評価、適用することにより、血中薬毒物分析の精度が飛躍的に向上し、死因究明に大きく貢献する事である。

3. 研究の方法

(1) 除タンパク・除リン脂質カラムに着目して、血中向精神薬の前処理法開発に取り組んだ。当講座の解剖で検出される 20 種類の向精神薬(アミトリプチリン、アンフェタミン、カルバマゼピン、クロルプロマジン、ジアゼパム、デュロキセチン、エスタゾラム、エチゾラム、フルニトラゼパム、ハロペリドール、メタンフェタミン、ミアンセリン、ニトラゼパム、オランザピン、パロキセチン、フェノバルビタール、プロメタジン、クアゼパム、リスペリドン、ゾルピデム)を対象薬物として選択した。対象薬物をスパイクした血液 100 μ L をリン酸緩衝液(pH9)で希釈し(1:1, v/v) 内部標準物質(ジアゼパム-d5、フェノバルビタール-d5) 700 μ L の MeCN および 200 μ L のメタノール(MeOH)を ISOLUTE PLD+ カラム(バイオタージ)に添加した後、10 分間遠心分離(670 \times g)した。溶出液に 0.1%TFA 含有 MeCN 100 μ L を加え、遠心エバポレーターで乾固した。その残渣を 100 μ L の MeOH に再溶解し、分析に供した。装置:LC:Nexera X2 (島津製作所) MS:LCMS-8040 (島津製作所) イオン化法:ESI(正/負) 分離カラム:Kinetex XB-C18 (2.1 mm \times 100 mm、2.6 μ m; Phenomenex) カラム温度:40、移動相:(A) 0.1%ギ酸含有 10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液、(B) 0.1%ギ酸含有 10 mmol/L ギ酸アンモニウム MeOH 溶液によるグラジエント溶離、流速:0.5 mL/min を用いた。

(2) 各社の除タンパク・リン脂質除去カラムを全血中薬毒物の LC-MS/MS 分析前処理へ使用するための検討を行った。Captiva EMR-Lipid (アジレント・テクノロジー)、HybridSPE-Phospholipid (SUPELCO)、InertSep Phospholipid Remover (ジーエルサイエンス)、Oasis PRiME HLB (Waters) そして従来から検討している ISOLUTE PLD+ について、除タンパク能力、リン脂質除去能力、血中試料回収率を従来法と比較し、より優れた前処理方法開発のために比較検討した。

(3) LC-MS/MS 測定時のマトリックス効果評価法を模索した。一般的に、マトリックス効果は米国 FDA ガイドライン等で定められた、標準液とブランク試料を前処理したマトリックスサンプルに標準物質を同濃度添加した溶液を分析し、得られた MS クロマトグラムの面積を比較する方法で評価されている。しかし、LC-MS/MS 分析において、マトリックスを含むサンプルを測定した前後で比較すると、同じ標準物質でも得られるクロマト面積が小さくなり、内部標準による補正もないため、マトリックス効果の評価が正しく行うことが

できなくなっている事が明らかとなった。そこで、従来の LC グラジエントに加え、リン脂質除去のために追加の洗浄フェーズを設けること、LC ニードル洗浄方法の改良を行い、評価を行った。

(4) アセタミプリド、イミダプロクリド、クロチアニジン、ジノテフラン、スルホキサフロル、チアクロプリド、チアメトキサム、トリフルメゾピリム、ニテンピラム、フルピラジフロンの 10 種類のネオニコチノイド系殺虫剤に加え、ネオニコチノイド系様作用を示すフィプロニル、エチプロール、フロニカミドの計 13 種類の殺虫剤を対象とした。検討した 13 種類の中で、特にジノテフランにおいて著しいイオン化抑制が認められるという問題が生じたため、簡易化液抽出カラム (Novum、Phenomenex) を適用し、検討した。装置は、LC : Nexera X3、MS : LCMS-8045 (島津製作所)、分離カラム : Kinetex XB-C18 (2.1 mm × 100 mm、2.6 μm; Phenomenex) を用いた。対象化合物と内部標準物質 (アセタミプリド-d3、イミダプロクリド-d4、クロチアニジン-d3、ジノテフラン-d3、スルホキサフロル-d3、チアクロプリド-d4、チアメトキサム-d3、ニテンピラム-d3、フィプロニル (3-シアノ、ピラゾール-3,4,5-13C4,3-シアノ,5-15N2)) をスパイクした市販のブランク血液 (Tennessee Blood Service) 100 μL をリン酸緩衝液 (pH 9) で希釈 (1:1、v/v) した後、Novum カラムに負荷した。5 分間静置した後、1 mL の酢酸エチル、アセトニトリル混合溶媒 (84:16、v/v) を 3 回添加した。溶出液を遠心エバポレーターで乾固し、その残渣を 100 μL の初期移動相に再溶解し、分析に供した。

4. 研究成果

(1) ISOLUTE PLD+カラムは、マトリックス効果の主な原因と言われるリン脂質や、タンパクといったサンプル中の夾雑物を、従来法と比べより効果的に除去することが示された。本法における回収効率は 64.6-96.8%、マトリックス効果は 82.6-112.6% であった。特に、従来法では不十分であったオランザピン、クロルプロマジン、プロメタジンの回収効率 (35.4-42.3%) が、本法を用いることで改善された (64.6-83.9%)。検量線はそれぞれ良好な直線性を示し、決定係数はいずれも 0.99 以上であった。日内および日間の再現性は、真度 90.2-109.2%、精度 1.0-9.4% と良好であった。ISOLUTE PLD+カラムは、全血中の夾雑物をより効果的に除去することが示されるとともに、本カラムを前処理法として用いる本法は、従来法と比べ回収効率が改善された。また、検量線の直線性、日内・日間の再現性も良好で、実サンプルの測定も問題なく行えたため、全血中の向精神薬の一斉分析法としての有用性が明らかとなった。

(2) 試料の精製度、回収率、マトリックス効果などを比較した結果、HybridSPE-Phospholipid と ISOLUTE PLD+ の 2 つがバランスの取れた高い性能を示す前処理カラムであるという結果が得られた。

(3) LC の追加洗浄フェーズに加えて、ニードルの洗浄過程を加える事によって、リン脂質のキャリーオーバーが抑制され、前処理法の正確な比較が可能となり、従来検討していた除タンパク・リン脂質除去カラムである ISOLUTE PLD+に加えて、より効果的なマトリックス効果除去を発揮する簡易化液抽出カラム Novum の可能性を見出せた。

(4) Novum を用いた前処理法では、ISOLUTE PLD+で認められたマトリックス効果によるイオン化抑制は軽減されたが、ニテンピラムの回収率が 10%以下まで低くなる問題が発生した。そこで、種々の抽出条件を検討した結果、抽出溶媒の酢酸エチルにアセトニトリルを 16% 添加することで、回収率が大幅に改善された。定量範囲において検量線は良好な直線性を示し、決定係数は 0.9946 以上であった。日内、日間の精度、真度はそれぞれ 85.5-113.9%、13.0% 以内の範囲であった。また、回収率は 52.7-92.7%、マトリックス効果は 60.6-201.0% であった。本法では全体的にマトリックス効果は低く抑えられていたが、フィプロニルにおいて 200% 程度の比較的強いイオン化促進が認められた。

倫理委員会審査通過後に、実際の中毒死例の血液で測定する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogawa Tadashi, Kondo Fumio, Iwai Masae, Matsuo Tomohito, Kubo Katsutoshi, Seno Hiroshi	4. 巻 331
2. 論文標題 Novel extraction method using an ISOLUTE PLD+ protein and phospholipid removal column for liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of 20 psychoactive drugs in postmortem whole blood samples	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Forensic Science International	6. 最初と最後の頁 111130 ~ 111130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.forsciint.2021.111130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小川匡之, 近藤文雄, 岩井雅枝, 久保勝俊, 妹尾 洋	4. 巻 45
2. 論文標題 法医学分野における薬毒物分析のための生体試料前処理法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JSBMS Letters	6. 最初と最後の頁 36-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川匡之, 近藤文雄, 岩井雅枝, 鈴木隆佳, 久保勝俊, 妹尾 洋
2. 発表標題 除タンパク・リン脂質除去カラム ISOLUTE PLD+を用いた全血中向精神薬のLC-MS/MSによる一斉分析法
3. 学会等名 日本法中毒学会第39年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川匡之, 近藤文雄, 岩井雅枝, 久保勝俊, 妹尾 洋
2. 発表標題 LC-MS/MSによる血中ネオニコチノイド系農薬の一斉分析法の開発 除タンパク・リン脂質除去カラム ISOLUTE PLD+を用いた前処理法の検討
3. 学会等名 第45回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川匡之, 近藤文雄, 岩井雅枝, 松尾友仁, 久保勝俊, 妹尾 洋
2. 発表標題 除タンパク・リン脂質除去カラムISOLUTE PLD+を用いた全血中ネオニコチノイド系殺虫剤のLC-MS/MSによる一斉分析法
3. 学会等名 日本法中毒学会第40年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川匡之, 近藤文雄, 岩井雅枝, 松尾友仁, 庄司幸子, 鈴木隆佳, 久保勝俊, 大矢友子, 妹尾 洋
2. 発表標題 LC-MS/MSによる全血中薬毒物分析のための前処理法開発 5種類の除タンパク・リン脂質除去カラムの性能比較
3. 学会等名 第46回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川匡之, 近藤文雄, 岩井雅枝, 松尾友仁, 久保勝俊, 妹尾洋
2. 発表標題 LC-MS/MSによる血中のネオニコチノイド系殺虫剤分析法の開発 LC条件の構築及びマトリックス効果、回収率の検証
3. 学会等名 日本法中毒学会第41年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川匡之, 岩井雅枝, 松尾友仁, 土田 栞, 久保勝俊, 近藤文雄, 妹尾 洋
2. 発表標題 簡易化液抽出カラムNovumを用いた全血中ネオニコチノイド系殺虫剤のLC-MS/MSによる一斉分析法
3. 学会等名 日本法中毒学会第42年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------