

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19294

研究課題名(和文)自動抽出装置と質量分析計を用いた「生体試料中薬毒物の自動定量分析システム」の構築

研究課題名(英文)Automated quantitation of drugs in biological specimens by automated sample preparation apparatus and hyphenated MS techniques

研究代表者

草野 麻衣子(Kusano, Maiko)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：60733574

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):自動前処理装置「ATLAS-USIS」による液-液抽出法及び除タンパク法による血液・肝臓中の薬物抽出法を構築し、法医学中毒学的に重要であるベンゾジアゼピン系睡眠薬、三・四環系向精神薬、および覚せい剤・麻薬等を対象として、抽出効率の評価を行った。マニュアル操作抽出法による回収率と比較し、遜色が無い抽出効率を得られることが確認できた。構築した自動前処理法は高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC/MS/MS)、ガスクロマトグラフィー-質量分析(GC/MS)、さらにLC/四重極飛行時間型質量分析(LC/Q-TOFMS)と組み合わせ、生体試料中薬物の一斉定量分析法やスクリーニング法を構築した。

研究成果の概要(英文): Sample pretreatment is a critical step in forensic toxicological analysis of biological specimens; however, it is also labor intensive and time-consuming. Automation of sample pretreatment allows for higher sample throughput, while minimizing risks of human error, contamination, and exposure to potentially hazardous samples.

"ATLAS-USIS" is an automated sample pretreatment apparatus equipped with a robotic arm for sample handling, syringes for solvent delivery, and centrifugation and evaporation units. ATLAS-USIS was combined with GC/MS, LC/MS/MS, and LC/Q-TOFMS for the development of total workflow from automated sample preparation to qualitative and quantitative analyses of whole blood and liver spiked with forensically relevant drugs. Results demonstrated sufficient extraction efficiency, practicality, and versatility of ATLAS-USIS, applicable for screening and quantitative analyses by various MS instruments to be used in forensic and toxicology laboratories.

研究分野：分析化学

キーワード：分析化学 LC/MS/MS GC/MS LC/Q-TOFMS 薬物抽出 自動前処理装置

1. 研究開始当初の背景

薬物に関する犯罪や事故、あるいは薬物の過剰摂取に伴う急性中毒事故が発生した場合、その原因となる薬物を迅速に同定することが法医学・社会医学的に極めて重要である。特に、血中の薬物濃度が中毒程度の指標となることから、血中薬物濃度の定量分析を実施することが不可欠となる。

しかし、中毒の起因となる薬物は、処方薬や市販薬以外にも、乱用薬物などを含めた多岐にわたる成分を対象とする必要がある。法医学鑑定においては対象となる多種・多様な薬物の定量分析を個別に行うことは非常に手間と時間のかかる作業である。また、現状では薬物分析には高い専門性が必要であり、法医学教室では薬物分析に関わる専門の人員不足の慢性化が問題となっている。

特に、多検体を一斉に処理する場合には、分析の前処理（いわゆる薬物の抽出操作）に多大な時間を要し、分析者の時間的消耗が大きくなる。さらに、法医学分野では血液試料が採取できない検体の場合、代替試料となる肝臓などの臓器を分析試料とする必要があり、臓器中薬物の分析も分析者にとって極めて負担の大きい作業である。よって、法医中毒学においては、広範囲の薬物を迅速に定性・定量できる分析システムの構築が強く求められている。

上記のような分析者の時間的負担の解消や、手作業によるヒューマンエラー・生体試料からの感染リスクの低減のため、自動前処理・自動薬物分析システムの開発が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 前処理に不可欠な攪拌・遠心分離機能および蒸発乾固システムを備えたロボットアーム付き自動前処理装置「ATLAS-USIS」と高速液体クロマトグラフタンデム質量分析(LC/MS/MS)との組み合わせによる血液

試料中の一斉定量分析システムの構築を目的とした。また、自動前処理装置で行う抽出法として除タンパク法の検討も行った。

(2) ATLAS-USIS と法医学分野において汎用性の高いガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)を用いた全血中薬物のスクリーニング法の構築を目的とした。

(3) 前述(1)について、対象生体試料を臓器へ拡張し、ATLAS-USIS と近年、血中・尿中薬物スクリーニング法の有用性が示されている高速液体クロマトグラフィー四重極飛行時間型質量分析(LC/Q-TOFMS)を組み合わせ、臓器中薬物の薬物スクリーニング法の構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ATLAS-USIS による自動前処理(液-液抽出法)は以下のように設定した。図1に示すように、ロボットアームによる全血試料への内部標準液、アルカリバッファーおよび酢酸エチルの添加後、攪拌・遠心分離ユニットによる攪拌・遠心分離を行った。遠心分離後の上層分取を別のバイアルに自動で分取させ、蒸発乾固(VHD)ユニットによる蒸発乾固を行った。なお、この自動前処理作業は1検体あたり約15分で終了する。最終的に試料残渣をマニュアルでメタノールに再溶解後、分析用試料とした。マニュアル操作による液-液抽出法を併せて行い、回収率を求め、自動前処理装置の抽出効果を評価した。

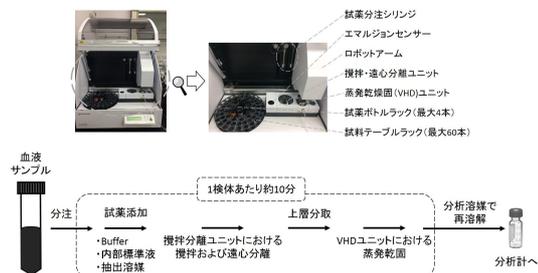


図1 自動前処理装置による前処理工程

また、ATLAS-USIS を用いた除タンパク法による自動抽出は図 2 に示すように設定した。抽出溶媒としてメタノールおよびアセトニトリルを用いて、除タンパク法における抽出効果を前記と同様に評価した。

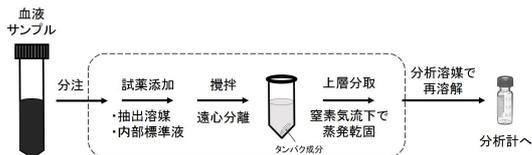


図 2 除タンパク法による前処理工程

試料

ベンゾジアゼピン系睡眠薬、三・四環系向精神薬、覚せい剤・麻薬 (30 種) の添加全血を蒸留水で 5 倍希釈した 500 μ L を試料とし、ATLAS-USIS による前処理を実施した。

装置と分析条件

装置：島津製作所製 NexeraX2 及び LCMS-8040(トリプル四重極型 LC/MS/MS) カラム：L-column2 ODS (1.5x50 mm, 3 μ m; 科学物質評価研究機構)、移動相：[A] 10 mM ギ酸アンモニウム-5%メタノール溶液; [B] 10 mM ギ酸アンモニウム-95%メタノール溶液によるリニアグラジエント (0-15 min で [A]100%→[B]100%) 流速：0.1 mL/min、カラムオープン温度：40、イオン化法：エレクトロスプレーイオン化法 (ESI, positive) 測定モード：選択イオンモニタリング (SIM) モード。

定量分析

内部標準法による検量線は 0.1 – 100 ng/mL の範囲で 6 点の濃度で作成し、さらに検量線の直線性と定量性能の評価を行った。

(2) 薬物 30 種を添加した全血試料を ATLAS-USIS を用いて前処理を実施後、GC/MS による全血中薬物のスクリーニングを行った。既存の薬毒物データベースの分析

用メソッドを 17 分に短縮した改良メソッドを構築した。その際、GC/MS では脂質等の夾雑ピークによって薬物同定が困難な場合もあるため、薬物同定能の向上と装置への負担軽減を目的とした、ステロール系脂質除去法の検討も行った。その後、最も適切であると判断した活性炭を用いて全血中の薬物回収率を求めた。

試料

ベンゾジアゼピン系睡眠薬、三・四環系向精神薬 (30 種) の添加全血を試料とし、ATLAS-USIS による前処理を実施した。脂質除去：様々な材質の活性炭 (球状、ヤシガラ、Carbofrit) を用いて脂質除去検討を行った。前処理シーケンスに抽出液を活性炭 3 mg で処理する過程を組み込み、最終的に得られた上清を分析試料とした。

装置と分析条件

装置：島津製作所製「GCMS-QP2010Plus」
分析条件：カラム：Restek 社製 Rxi-5Sil MS (30 m x 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μ m) 昇温条件：60°C(2 分)–50°C/分–250°C–10°C /分–320°C (5 分) キャリアガス：He (45.6cm/秒) 注入量：1 μ L(スプリットレスモード) 測定モード：シングルスキャンモード、イオン化法：電子イオン化法 (EI) 解析：島津製作所製「GC/MS 法薬毒物データベース Ver.1.1」改良版。

(3) 薬物 30 種を添加したブタ肝臓試料を ATLAS-USIS を用いて前処理を実施後、LC/Q-TOFMS による肝臓中薬物のスクリーニングを行った。初めに、肝臓のホモジェナイズ条件 (溶媒・pH 等) の最適化を行い、薬物の抽出効率を回収率として評価した。

試料

ベンゾジアゼピン系睡眠薬、三・四環系向精

神薬、覚せい剤・麻薬類(30種類)を添加したブタ肝臓 150 mg にホモジェナイズ溶媒 750 μ L を加え、細胞破碎機を用いてホモジェナイズを行った。ホモジェネートを遠心後、得られた上清のうち 500 μ L を試料とし、ATLAS-USIS による前処理を実施した。

装置と分析条件

装置：島津製作所製 NexeraX2 及び Sciex 製 TripleTOF5600 (四重極飛行時間型 LC/Q-TOF)、カラム：L-column2 ODS (1.5x50 mm, 3 μ m; 科学物質評価研究機構)、移動相：[A] 10 mM ギ酸アンモニウム-5%メタノール溶液; [B] 10 mM ギ酸アンモニウム-95%メタノール溶液によるリニアグラジエント (0-15 min で[A]100%→[B]100%) 流速:0.1 mL/min、カラムオープン温度:40、イオン化法：ESI (positive) 測定モード：IDA およびプロダクトイオンスキャン(PIS)

4. 研究成果

(1) ATLAS-USIS と LC/MS/MS を用いた血中薬物の一斉定量分析法の開発

内部標準法を用いて検量線を作成したところ、いずれの薬物においても R^2 値が 0.98 以上の良好な直線性を示した。また、30 ng/mL と 60 ng/mL に調整した試料の分析 (n=5) を行い、検量線を用いて各検体間のばらつき(精度)および理論値とのずれ(確度)を算出することによって評価した。定量結果の精度は概ね 10%、確度は 20%以内と良好な値を示した。また、SRM 測定による定量下限は 0.22~2.8 ng/ml であった。自動前処理装置による回収率は概ね 70%程度であった。定量分析結果の一部を表 1 に示す。

表 1 ATLAS-USIS と LC/MS/MS による血中薬物の一斉定量分析の結果 (代表 10 種)

化合物名	検出下限 (ng/mL)	定量下限 (ng/mL)	回収率
アルプラゾラム	0.072	0.72	73%
クロナゼパム	0.029	0.28	67%
フルジアゼパム	0.15	1.5	72%
フルニトラゼパム	0.13	1.3	83%
ニメタゼパム	0.054	0.53	76%
トリアゾラム	0.051	0.51	79%
アミトリプチリン	0.017	0.18	63%
カルバマゼピン	0.046	0.47	79%
アンフェタミン	0.073	0.72	72%
メタンフェタミン	0.032	0.32	86%

また、連続で試料の前処理を行う際の、次試料へのキャリアオーバー評価も行った。今回対象とした化合物では、アモキサピン、マプロチリン以外においては連続前処理間におけるキャリアオーバーは認められなかった。なお、高濃度試料の分析においてはブランク試料の分析による器機内洗浄が必要であると考えられる。

マニュアル処理の場合、1 検体あたり 45 分程度かかるが、ATLAS-USIS による前処理の時間は約 15 分であり、連続処理の場合にはオーバーラップシーケンスによる時間短縮が可能なことから、多検体処理に極めて有効であった。

以上の研究成果は国内学会において発表を行った。

(2) ATLAS-USIS による除タンパク法の検討

除タンパクに用いる溶媒を検討した結果、メタノールでは十分な除タンパクを行うことが困難であったため、ATLAS-USIS を用いた除タンパクにおいてはアセトニトリルを用いることが最適であることが示された。自動前処理装置による回収率はマニュアル操作と比較して全体的に若干劣るが概ね良好な値が得られた (表 2)。

表 2 ATLAS-USIS とマニュアル操作による除タンパク法を用いた血中薬物の回収率（代表 10 種）

化合物名	回収率 (ATLAS-USIS)	回収率 (マニュアル)
アルプラゾラム	74%	86%
プロチゾラム	72%	85%
エチゾラム	78%	89%
フルニトラゼパム	66%	86%
ニメタゼパム	69%	84%
トリアゾラム	74%	82%
アミトリプチリン	59%	48%
クロルプロマジン	73%	61%
アンフェタミン	77%	83%
メタンフェタミン	71%	82%

内部標準法を用いて作成した検量線は、いずれの薬物においても R^2 値が 0.94 以上の良好な直線性を示した。分析バリデーションの結果、概ね確度は 20%以内、精度は 10%以内であった。また、いずれの薬物においてもキャリアオーバーは認められなかった。

(3) ATLAS-USIS と GC/MS を用いた血中薬物の全自動スクリーニング法の構築

活性炭処理によってステロール系脂質はほぼ完全に除去できることが確認された。特に、ベンゾジアゼピン系睡眠薬においては、トリアゾラムなど、夾雑ピークに埋もれていた薬物の同定が可能となった（図 3）。

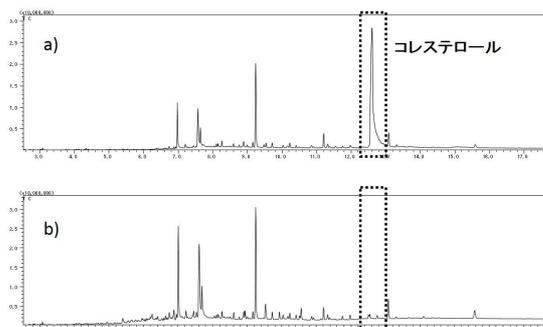


図 3 ATLAS-USIS による抽出試料のクロマトグラム a) 活性炭未処理、b) 活性炭処理

また、形状の異なる活性炭 3 種を用いて脂質除去を行い GC-MS によって検出された薬物のピーク面積を活性炭処理を行っていない試料と比較したところ、脂質除去効果に関してはどれも遜色の無い結果が得られた。扱

いやすさ、コスト、ATLAS-USIS への適用性の面から、ヤシガラが最も適切であると判断し、ヤシガラ活性炭を用いて全血中の薬物回収率を求めた。

活性炭への吸着により薬物回収率は若干下がるが、薬物スクリーニングを行うには遜色のない値が得られた（表 3）。三・四環系向精神薬については活性炭への吸着効果が大きいと、改良を要することが示唆された。

表 3 活性炭を用いた脂質除去処理の血中薬物の回収率への影響（代表 10 種）

化合物名	活性炭なし	活性炭あり
アルプラゾラム	73%	56%
クロナゼパム	67%	56%
フルジアゼパム	72%	61%
フルニトラゼパム	83%	57%
ニメタゼパム	76%	70%
トリアゾラム	79%	53%
アミトリプチリン	63%	58%
マプロチリン	58%	45%
プロメタジン	66%	61%
カルバマゼピン	79%	64%

活性炭によりステロール系脂質が除去され、スクリーニングのための多検体分析による装置への汚染や負担の軽減を可能とするメリットが得られることが示された。脂質除去法を自動前処理シーケンスへ組み込み、薬物同定能の向上や装置への負担軽減が可能となり、ATLAS-USIS による前処理および GC/MS のメソッド改良による時間短縮で、大幅な時間短縮が可能となったことから、実務レベルでの多検体処理への有用性が極めて高いことが示唆された。

以上の研究成果は国内学会において発表を行った。

(4) ATLAS-USIS と LC/Q-TOFMS を用いた肝臓中薬物のスクリーニング法の構築

肝臓のホモジェナイズ溶媒として蒸留水 (DW)、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.2)、0.2 M KCl/0.2 M NaOH (強アルカリ性バッファー, pH 12.4) を比較した結果、強

アルカリ性バッファーを用いた試料では対象とした全ての薬物が検出可能であり、最も高いピーク面積値が得られた。

肝臓中薬物の回収率は、以前に報告した全血中薬物の回収率と比べやや低いが、薬物分析には遜色のない値を示した(表4)。しかし、三・四環系向精神薬と麻薬には一部、回収率が著しく低い薬物(40%以下)が存在した。その要因として、ホモジェナイズ時に対象薬物と結合したままタンパク質が沈殿したことや、薬物の脂溶性が高いことが考えられた。

表 4 ATLAS-USIS による自動抽出の肝臓中および全血中薬物回収率の比較(代表 10 種)

化合物名	肝臓	全血
アルブラゾラム	61%	73%
プロマゼパム	52%	72%
プロチゾラム	65%	74%
クロバザム	65%	72%
トリアゾラム	66%	79%
カルバマゼピン	78%	79%
ミアンセリン	40%	61%
トリミプラミン	46%	57%
アンフェタミン	70%	72%
メタンフェタミン	44%	86%

ホモジェナイズの回収率への影響を評価するため、ホモジェナイズ前あるいは後に薬物を添加した試料について分析を行い、その回収率を比較した。その結果、ホモジェネート中の薬物が遠心分離後、上清に十分に移行していないことが確認された。よって、ホモジェナイズ時に薬物が上清に移行していないことが、低い回収率の一因であることが示唆された。タンパク結合率が高いと考えられる薬物については、ホモジェナイズ条件の改良が必要であることが考えられる。

上記の検討結果を踏まえ、薬物添加ブタ肝臓試料(各 10 ng/g)について、LC/Q-TOFMS によるスクリーニング分析を適用した。IDA および PIS モードによる分析の結果、全ての対象薬物を検出することが可能であり、本手法が臓器からの薬物スクリーニング法として有効であることが実証された。

以上の研究成果については国際学会にて発表を行うことが確定している。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計5件)

H. Miura, M. Kusano, N. Takamura, et al. Non-target screening system for drugs in liver using an automated sample pretreatment apparatus "ATLAS-USIS" and LC/Q-TOFMS, 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine, 2018.

中山佳奈、草野麻衣子、野田沙樹、大原倫美、片木宗弘、三木昭宏、土橋均、財津桂、石井晃. 自動前処理装置「ATLAS-USIS」とGC/MSを用いた血中薬毒物の全自動スクリーニング法の構築,第101次日本法医学会学術全国集会,2017.

中根有登、草野麻衣子、山中麻友美、篠田諭、酒井佑一朗、片木宗弘、三木昭宏、土橋均、財津桂、石井晃,自動前処理装置「ATLAS-USIS」を用いた血中薬毒物の一斉定量分析法の開発,第100次日本法医学会学術全国集会,2016.

6. 研究組織

(1)研究代表者

草野 麻衣子 (KUSANO, Maiko)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号: 60733574