

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：32428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09314

研究課題名(和文) 向精神薬・抗うつ薬の高精度・高感度分析システムの構築および臨床応用

研究課題名(英文) Development and clinical application of high resolution and high precision analytical system for psychotropic and antidepressant drugs

研究代表者

中内 暁博(Nakauchi, Akihiro)

東都大学・沼津ヒューマンケア学部・教授

研究者番号：90245829

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)：臨床薬物中毒による不慮の事故、危険ドラッグなどの違法薬物乱用による死亡事故等が急増している。その為、臨床における救急救命実務ならびに法医学実務においては、中毒原因物質を簡便・迅速かつ確実に同定することが強く求められている。本研究では、30種類ベンゾジアゼピン系薬剤およびその代謝体、6種類バルビツール酸系薬物およびその代謝体、5種類アミノグリコシド系抗菌薬について、モノリス型固相抽出スピントップUPLC/Q ToF-MSによる薬物物の高精度・高感度なハイスループット分析システムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UPLC/Q ToF-MS分析法は、標準物質を必要とせず、取得した精密質量データについて統計学的解析を行うことにより薬物の未変化体や代謝物の情報を割り出し、確実な高精度同定が可能である。新しいモノリス型SPEスピントップによる簡便・迅速な前処理と標準物質を必要とせず精密質量データを取得可能なUPLC/Q ToF-MS分析法との組み合わせは、これまで指摘されている欠点を改善し、人体試料中薬物について簡便・迅速・高精度・高感度な分析法として臨床実務に有用性を示唆された。救命救急実務への応用のみならず、法医学領域、食品衛生、環境などの分析への波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：For diagnosis and effective treatment of intoxication and for emergency medical care and forensic purposes, the methods of determining the concentration of those drugs in human samples are required. In the present study, a high-throughput method was developed to analyze in human plasma and urine samples thirty benzodiazepines and those metabolites, six barbiturates, and five aminoglycoside antibiotics using a new Monolithic C18 gel-packed Spin Tip and ultra-performance liquid chromatography (UPLC)-quadrupole time-of-flight (Q-ToF) mass spectrometry (MS).

研究分野：救急医学

キーワード：ベンゾジアゼピン系向精神薬 治療薬物モニタリング (TDM) モノリス型SPE UPLC-Q-ToF-MS 精密質量 救急救命 法医学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 臨床薬物中毒および危険ドラッグなどの違法薬物乱用による死亡事故が急増し深刻な社会問題となっている。薬物のハイスループット高精度・高感度分析が要求されている。近年、ガスクロマトグラフィー (GC) /質量分析 (MS) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) /タンデム質量分析 (MS/MS) の検出感度、再現性などは著しく向上し、薬毒分析は大きく進歩した。しかし、これらの分析法には標準物質を依存し、入手できない薬毒物については確実な同定が困難となる。更に、人体試料から薬毒物を高精度・高感度分析するには試料前処理操作が今まで従来法に依存し、多量な有機溶媒が必要な上、操作も複雑、環境性および効率性だけでなく、再現性ならびに信頼性が大きな問題となっている。このため、救急医療現場ならびに法医学鑑定における救急救命および死因究明に多大な支障を来しているのが実情である。
- (2) 人体試料からの薬毒物分析法では、GC/MS 法は難揮発性の薬物や熱に不安定な薬物の分析には不向きである。HPLC/MS/MS 法は得られたプロダクトイオン情報を用いて特定イオンの構造解析や同定は可能であるが、GC/MS 法同様、分析用標準物質が入手できない薬毒物については確実な同定が困難である。危険ドラッグのような法の規制を逃れるため、新規構造類似化合物が次々と流通・乱用され、標準物質の入手はほぼ不可能である。また、輸入制限の薬毒物などについては審査時間、コストなどの問題で標準物質の入手は断念されるケースがほとんどである。これら従来法で指摘されている分析精度などの問題点を解決できる分析法として、UPLC/Q Tof-MS 分析法が最近注目されている。UPLC 法は高速注入と高精度の高速グラジエントが可能な高速オートサンプリングと高性能マイクロ送液ユニットから構成され、従来の HPLC 法では不可能であった高速化とハイスループット化が実現できる画期的なシステムである。一方、ハイブリッド Q Tof-MS 分析装置は、優れた選択性を持つ四重極 MS を前段に、高分解能・高精度・高感度を誇る Tof 型 MS を後段に組み合わせたハイブリッド型で、高分解能かつ高精度な MS/MS 測定を行うことで精密質量の取得により、確実なターゲット分析およびノンターゲットスクリーニング分析が可能である。すなわち、この UPLC 法と Q Tof-MS 分析法を組み合わせた UPLC/Q Tof-MS システムは、標準物質を必要とせず (スタンダードレス) 取得した精密質量データについて統計学的解析を行うことより薬毒物の未変化体や代謝物の情報を割り出し、確実な高精度同定が可能となるだけでなく、人体試料を対象とする法医学上問題となる薬毒物のハイスループット分析が可能となる。また、試料前処理法として、従来の MonoTip C18 を改良し、遠心操作による簡便かつ迅速な微量固相抽出が可能な新しい SPE チップを開発し、幅広い薬毒物の前処理方法として期待できる。このように、新しいモノリス型 SPE スピンチップによる簡便・迅速な前処理と標準物質を必要とせず精密質量データを取得可能な UPLC/Q Tof-MS 法を組合せた分析システムは、これまで指摘されている欠点を改善し、救急医学ならびに法医学上問題となる薬毒物の簡便・迅速、高精度かつ高感度な分析方法になると考えて本研究を企画した。

2. 研究の目的

本研究では、ベンゾジアゼピン系向精神薬、バルビツール酸系薬物およびアミノグリコシド系抗菌薬の未変化体並びにそれらの代謝物について、昭和大学医学部法医学教室に設置されている超高速液体クロマトグラフィー/ハイブリッド四重極飛行時間型質量分析 (UPLC/Q Tof-MS) 装置を用いて、各薬物の MS および MS/MS の精密質量ライブラリーの作成を行い、UPLC/Q Tof-MS 法による人体試料からの簡便・迅速、高精度かつ高感度なハイスループット分析システムの確立を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) ベンゾジアゼピン系薬剤：ヒト血漿 10 μ L にフルラゼパムなど 30 種類のベンゾジアゼピン系薬剤またはその代謝物の標準品および内部標準物質 (オキサゼパム- d_6) を添加した後、10 mM 酢酸アンモニウム溶液 80 μ L とアセトニトリル 200 μ L を混和した。その血漿試料は遠心分離を行い、上清 5 μ L を分析に供した。カラムは Waters 社製 Acquity UPLC BEH C18 (長さ 50 mm、内径 2.1 mm、粒径 1.7 μ m) を用い、10 mM 酢酸アンモニウム溶液をベースにしたアセトニトリルのリニアグラジエント法の移動相条件下で分析を行った。更に、新開発モノリス型 SPE スピンチップを用いた試料前処理としては、ヒト血漿 20 μ L または尿 100 μ L に各薬物および内部標準物質を添加した後、1M 塩酸 10

μL を混和し、超純水で全量を 200 μL とした。モノリス型 SPE スピンチップには、メタノール、蒸留水（スピントップの前処理）、体液試料（試料負荷）、蒸留水（チップの洗浄）の順序で各溶液をロードし、各ステップは 1000 g で 15 秒の遠心操作を行った。最後にメタノール 50 μL による遠心溶出を行い、その溶出液 5 μL を UPLC 装置に直接注入した。カラムは Acquity UPLC BEH C18（長さ 50 mm、内径 2.1 mm、粒径 1.7 μm）を用い、0.1%ギ酸水溶液をベースにしたメタノールのリニアグラジエント法の移動相条件下で分析を行った（図 1）。



図1. モノリス型SPEスピントップ試料前処理手順

(2) バルビツール酸系薬：ヒト血漿 20 μL または尿 100 μL にアモバルビタールなど 6 種類のバルビツール酸系薬物および内部標準物質（フェノバルビタール- d_5 ）を添加した後、1M 塩酸 10 μL を混和し、超純水で全量を 200 μL とした。モノリス型 SPE スピンチップには、メタノール、蒸留水（スピントップの前処理）、体液試料（試料負荷）、蒸留水（チップの洗浄）の順序で各溶液をロードし、各ステップは 1000 g で 15 秒の遠心操作を行った。最後にメタノール 50 μL による遠心溶出を行い、その溶出液 5 μL を UPLC 装置に直接注入した。カラムは Acquity UPLC HSS C18（長さ 100 mm、内径 2.1 mm、粒径 1.8 μm）を用い、10 mM アンモニウム水溶液をベースにしたアセトニトリルのリニアグラジエント法の移動相条件下で分析を行った。

(3) アミノグリコシド系抗菌薬：ヒト血漿 100 μL にストレプトマイシンなど 5 種類の薬物および内部標準物質（リボスタマイシン）を添加した後 0.1%ギ酸 250 μL およびアセトニトリル 650 μL を加え、十分に混和した。19600 g で 5 分間遠心し上清を蒸発乾固した。この残渣を初期移動相で再溶解し分析に供した。カラムはマルチモード ODS カラムである Imtakt 社製 Scherzo SM-C18 MF（長さ 75 mm、内径 2 mm、粒径 3 μm）を用い、50mM ギ酸アンモニウム水溶液とアセトニトリル、水、酢酸の混合溶液（20 : 80 : 0.1）の移動相条件下でリニアグラジエント分析を行った。

4. 研究成果

(1)

ベンゾジアゼピン系薬剤：分析対象とした 30 種類のベンゾジアゼピン系薬物は、ESI 法を用いた UPLC-Q-ToF-MS 測定によって、0.2 ~ 30 ng/0.1 mL の範囲で良好な直線性を示した。また、得られた各薬物の精密質量同位体マススペクトルによる元素組成解析では、その一致度を示す i-Fit Norm 値が、検量線の濃度範囲において 0.003 ~ 4.388 であった（図 2）。

今回の実験では、UPLC-Q-ToF-MS 法によるヒト血漿中ベンゾジアゼピン系薬物の分析を試みた。その結果、各薬物の定量分析および元素組成解析を簡便かつ迅速に行うことができた。しかし、低濃度で得られた精密質量同位体マススペクトルについては、i-Fit Norm 値が高いものも存在し、元素組成解析の信頼性が低くなる傾向を示した。その信頼性を高めるには、より低い i-Fit Norm 値が得られる検量線濃度を考慮する必要があると思われる。

新開発モノリス型 SPE スピンチップを用いた試料前処理を試みたところ、フルニトラゼパム、7-アミノフルニトラゼパムおよび 2 種類の内部標準物質は、モノリス型 SPE スピンチップによって 3 分以内に固相抽出操作が完了し、血漿および尿中からはそれぞれ 4 分以内に感度良く検出された。血漿または尿において、内部標準法を用いて作成した検量線は 0.4 ~ 500 ng/mL の範囲でそれぞれ良好な直線性を示し、回収率は 94 ~ 104% であった。また、フルニトラゼパム 1 mg を服用したボランティアの血漿および尿中から、未変化体フルニトラゼパムおよび代謝物である 7-アミノフルニトラゼパムがそれぞれ感度良く同定・定量された。さらに、尿中からは 3-ヒドロキシフルニトラゼパム、7-アセトアミドフルニトラゼパムおよび 7-アセトアミド-3-ヒドロキシフルニトラゼパムも検出され、それぞれ精密質量同位体マススペクトルによる元素組成解析が可能であった。新開発したモノリス型 SPE スピンチップは、遠心操作による簡便、迅速かつ微量固相抽出が可能であり、UPLC-Q-ToF-MS との組み合わせは、高感度定量分析から精密質量同位体マススペクトルによる元素組成解析も可能なハイスループット分析解析を実現することができた。本法は多くの薬

物分析への応用が可能で、臨床および法医学領域において有用であることが示唆された。

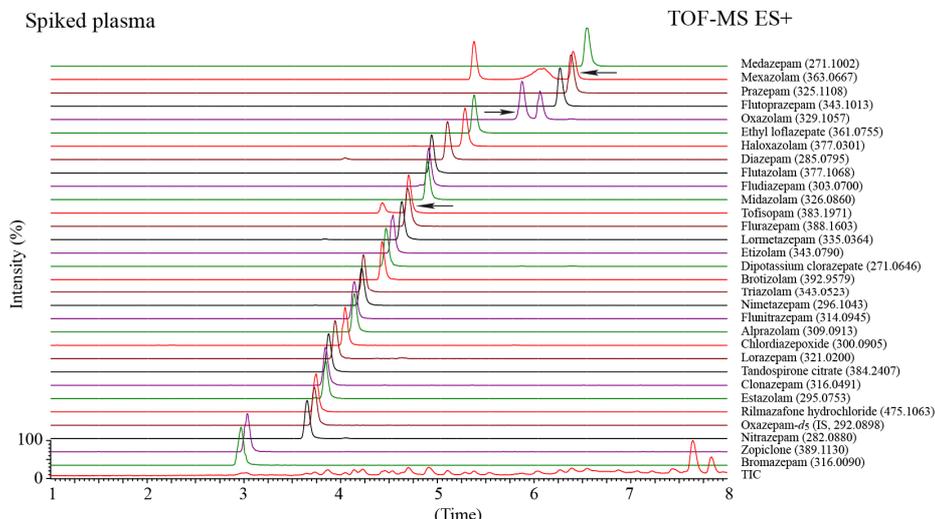


図2. ベンゾジアゼピン系薬物のクロマトグラム

- (2) バルビツール酸系薬: モノリス型 SPE スピンチップを用いた遠心微量固相抽出は目詰まりなく迅速(約3分)であった。負イオンエレクトロスプレーイオン化(ESI)法を用いた Q-ToF 測定により、6種類のバルビツール酸系薬物は、4.5分以内に感度良く検出された。内部標準法を用いて作成した検量線は約5-500 ng/mLの範囲で良好な直線性を示した。検出限界は1-2.5 ng/mLで、精密質量精度を示す i-Fit は0.239以下であった(図3、4)。

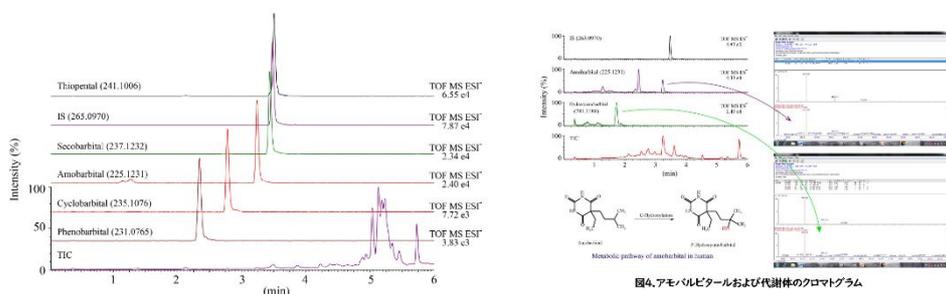


図3. バルビツール酸系薬物のクロマトグラム

図4. アモバルビタルおよび代謝物のクロマトグラム

また、本法を法医解剖薬毒物スクリーニング検査実務に応用したところ、剖検試料からフェノバルビタル、アモバルビタルとその代謝物であるヒドロキシ体およびグルコシド体が何れも高精度に同定され、法医解剖実務への寄与となった。本法は、迅速・簡便・微量分析が可能だけでなく、精密質量同位体マススペクトルによる元素組成解析も可能なハイスループット分析解析システムである。多くの薬物分析への応用が期待でき、臨床および法医学領域において有用と考える。本システムは、人体試料中バルビツール酸系薬物の迅速・簡便かつ高感度なハイスループット分析法として救急医学ならびに法医学領域の応用が可能であると考えられる。

- (3) アミノグリコシド系抗菌薬: アミノグリコシド系薬5種類および内部標準物質は3分以内に感度良く検出された。精密質量を用いた定性では、Mass Errorも0.5ppm-3.0ppmであった(図5)。内部標準法を用いて作成した検量線は約4-100 µg/mLの範囲でいずれも良好な直線性を示し、検出限界は約2 µg/mLであった。日内変動、日間変動それぞれを検量線範囲内の3点の濃度で Precision と Accuracy を計算して検証した。Precision は、変動係数(CV値)を用いて検証し、いずれのCV値も12%以内であった。Accuracy は、全ての薬剤のいずれの濃度でも89-111%と良好であった。また、本法を実際例に応用したところ、ストレプトマイシン1gを健康なボランティア3名に筋注し、いずれの被験者においても投与後0.5h-2.0hで最高血中濃度(Cmax)に達し、その後減少した。ストレプトマイシンは投与後24時間まで同定が可能であった。なお、被験者間でCmaxとCmaxに達するまでの時間は約4倍の差が得られ、アミノグリコシドのTDMの必要性が示唆された。一方、ゲンタマイシンを1.7mg/kgで上記の被験者3人に静注し、0.5時間でCmaxに達し、その後減少した。ゲンタ

マイシンは投与後、8時間後まで同定が可能であった(図6)。水溶性が非常に高いアミノグリコシド系薬は、汎用される逆相系固相抽出および逆相カラムでは分析が困難である。しかし、本法では抽出が可能な最大限の有機溶媒量およびマルチモード ODS カラムを用いることにより簡便・微量分析が可能であった。UPLC-Q-ToF-MS との組み合わせは、迅速・簡便・微量分析だけでなく、高感度定量分析から精密質量同位体マススペクトルによる元素組成解析も可能なハイスループット分析解析システムとして、多くの薬物分析への応用が期待でき、臨床および法中毒領域において有用であると考えられる。

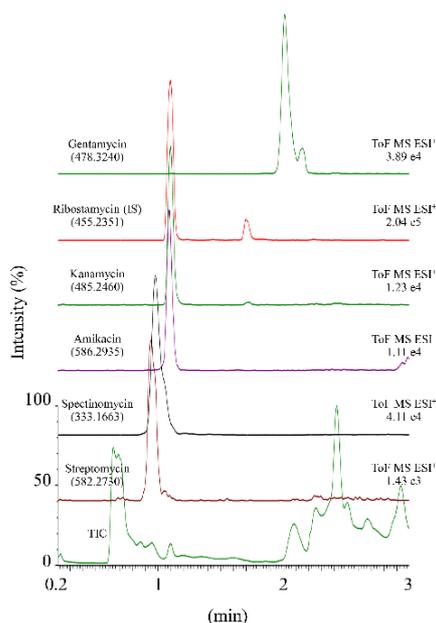


図5. アミノグリコシド系抗菌薬のクロマトグラム

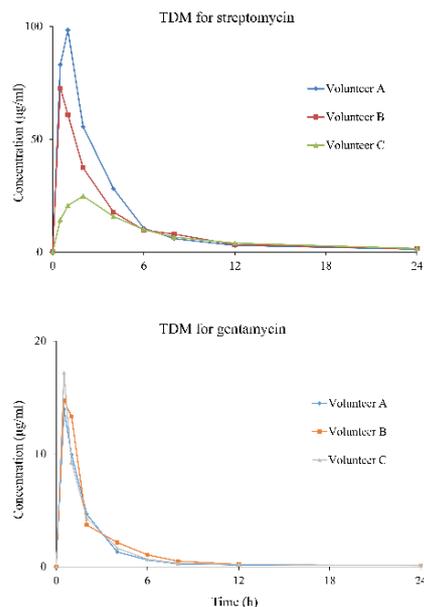


図6. アミノグリコシド系抗菌薬のTDM

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 中内暁博, 藤城雅也, 長谷川智華, 熊澤武志, 松山高明	4. 巻 12
2. 論文標題 高精度UPLC/Q Tof-MS分析システムの構築および臨床応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 東都大学紀要	6. 最初と最後の頁 57-64
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 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 Koichiro Shinya, Yuki Nishimura, Akihiro Nakauchi, et al	4. 巻 62
2. 論文標題 Short-term administration of Polypodium leucotomos extract does not inhibit CYP3A4-mediated metabolism of midazolam in healthy subjects: an open-label, two-period, fixed-sequence study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Dermatol	6. 最初と最後の頁 694-699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijd.16303.	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 3. 中内暁博	4. 巻 3
2. 論文標題 質量分析によるヒト涙液中バイオマーカーの探索	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ニュースレター(ワンヘルスサイエンティスト)	6. 最初と最後の頁 6
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 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 Mana Tsukada, Hideshi Ikemoto, Xiao-Pen Lee, 他	4. 巻 276
2. 論文標題 a traditional Japanese Kampo medicine, increases the secretion of oxytocin in rats with acute stress.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Ethnopharmacol	6. 最初と最後の頁 114218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jep.2021.114218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minohara Sawa, Fujishiro Masaya, Lee Xiao-Pen, Imai Ayumi, Hashimoto Mari, Hasegawa Chika, Kuroki Tomoaki, Kadomatsu Koichi, Kumazawa Takeshi, Kato Akihito, Matsuyama Takaaki	4. 巻 21
2. 論文標題 High-throughput identification and determination of aminoglycoside antibiotics in human plasma using UPLC-Q-ToF-MS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 63-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/14690667211003196	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 Kaki Yuki, Fujishiro Masaya, Lee Xiao-Pen, Kato Akihito, Sakamoto Yuki, Hashimoto Mari, Minohara Sawa, Hasegawa Chika, Hasegawa Iwao, Dohi Kenji, Kumazawa Takeshi, Ishii Akira, Sato Keizo, Matsuyama Takaaki	4. 巻 38
2. 論文標題 Sensitive determination of midazolam and propofol in human plasma by GC-MS/MS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 409 ~ 419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11419-020-00529-8	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Maiko Kusano, Masaya Fujishiro, Akihiro Nakauchi, et al
2. 発表標題 High-throughput forensic toxicological analysis by "Quick-DB forensic": a QuEChERS-dSPE and GC-MS/MS workflow system
3. 学会等名 3rd International Caparica Conference in Translational Forensics 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤城 雅也, 中内 暁博, 熊澤 武志 他
2. 発表標題 ヒト体液中向精神薬のハイスループット分析法の救急医療への応用
3. 学会等名 第50回日本救急医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤城 雅也, 中内 暁博, 熊澤 武志 他
2. 発表標題 高分解能LC-MSによるヒト涙液中脂肪酸の分析
3. 学会等名 第47回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤城雅也, 中内暁博, 熊澤武志, 他
2. 発表標題 UPLC-Q-ToF-MS によるヒト体液中パルピツール酸系薬物および代謝物のハイスループット分析法
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤城 雅也, 中内 暁博, 熊澤 武志, 他
2. 発表標題 GC-MS/MSを用いたヒト尿中カフェインのハイスループット分析法
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 簗原 沙和, 藤城 雅也, 中内暁博, 熊澤 武志, 他
2. 発表標題 UPLC-Q-ToF-MS を用いたヒト血漿中アミノグリコシド系抗菌薬の高感度・高精度分析
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 坂部貴生, 藤城雅也, 中内暁博, 熊澤武志, 他
2. 発表標題 ヒト血中カフェインの高感度分析法の比較検討
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 中内暁博 (李曉鵬)
2. 発表標題 生体試料中薬毒物の迅速・高感度分析
3. 学会等名 2020年昭和大学医学部准講会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤城雅也, 李曉鵬 他
2. 発表標題 UPLC-Q-ToF-MSによるヒト体液中バルビツール酸系薬物および代謝物のハイスループット分析法 (第1報)
3. 学会等名 第89回日本法医学会関東地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤城雅也, 李曉鵬 他
2. 発表標題 GC-MS/MSを用いたヒト尿中カフェインのハイスループット分析法
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松山高明, 李曉鵬 他
2. 発表標題 Rastelli術後遠隔期に突然死した修正大血管転位症例の房室伝導系組織
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本茉莉, 李曉鵬 他
2. 発表標題 死体内の血栓と凝血塊の判別におけるメトヘモグロビン濃度の有用性
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川智華, 李曉鵬 他
2. 発表標題 UFLC-MS/MS分析を用いたヒト唾液中コルチゾールの高感度分析
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 熊澤武志, 李曉鵬 他
2. 発表標題 ELISA法を利用した唾液中コルチゾール分析の妥当性
3. 学会等名 第4回日本ワンヘルスサイエンス学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 養原沙和, 李曉鵬 他
2. 発表標題 UPLC-Q-ToF-MSを用いたヒト血漿中アミノグリコシド系抗菌薬の高感度・高精度分析
3. 学会等名 日本法中毒学会第39年会
4. 発表年 2020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
研究分担者	藤城 雅也 (Fujishiro Masaya) (00527161)	昭和大学・医学部・講師 (32622)	
研究分担者	熊澤 武志 (Kumazawa Takeshi) (00186470)	聖隷クリストファー大学・看護学部・教授 (33804)	

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
---------	---------