

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：33920

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21152

研究課題名（和文）新規前処理法を用いた尿中薬毒物LC-MS/MS分析法開発

研究課題名（英文）Development of LC-MS/MS analysis method for drugs in urine using a novel pretreatment method

研究代表者

松尾 友仁（Matsuo, Tomohito）

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：00908824

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）： 遺伝子組換え β -グルクロニダーゼを用いることで、5種類の薬毒物（11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH), oxazepam, lorazepam, temazepam, amitriptyline)のグルクロン酸抱合体を室温3分の短時間で加水分解することができた。加えて、尿中夾雑成分除去カラム（ISOLUTE HYDRO DME+, Biotage）上で加水分解することができるため、前処理過程も短縮することができた。この前処理法を用いたLC-MS/MS分析法は、バリデーションでの妥当性も良好であり、法医解剖試料にも適用することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

摂取された薬毒物は内因性物質との抱合体として尿中に排泄され、遊離体や未変化体が微量にしか存在しないため、目的の薬毒物が検出できない場合がある。そのため、抱合体を加水分解し、目的の薬毒物の遊離体や未変化体を分析する必要がある。本研究で開発した前処理法では、前処理カラム上で直接、加水分解が可能であり、反応も室温3分で終わるため、従来の方法に比べてより簡便かつ効率的に尿中薬毒物の分析が可能である。従って、法医解剖試料での迅速で正確な尿中薬毒物の検出と定量の精度向上を目指すことができる点で意義深く、今後、法医実務においても非常に有用となることが期待される。

研究成果の概要（英文）： In this study, by using recombinant β -glucuronidase, glucuronide conjugates of five drugs (11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH), oxazepam, lorazepam, temazepam and amitriptyline) were hydrolyzed within 3 min at room temperature. Additionally, the pretreatment process was shortened by hydrolyzing the glucuronide conjugates on an ISOLUTE HYDRO DME+ column (Biotage). The LC-MS/MS analysis method, utilizing this pretreatment method, was well validated and successfully applied to forensic autopsy samples.

研究分野：法医学

キーワード：グルクロン酸抱合体 加水分解 LC-MS/MS 尿中薬毒物 β -glucuronidase ISOLUTE HYDRO DME+ B-one IMCSzyme RT

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。

1. 研究開始当初の背景

近年、死因究明への社会的要望が高まっており、解剖件数が増加傾向にある。また、乱用薬物の種類が著しく増加するのに伴い、薬毒物検査は重要性を増している。法医学解剖の事例において、薬物の服用の有無やその濃度を、外見や臨床症状だけで判断することは困難なことが多い。そのため、薬毒物分析には特異性が高く、高感度であり、かつ多項目の同時測定が可能な LC-MS/MS (Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometer, 液体クロマトグラフタンデム質量分析装置) が用いられている。しかし、法医学解剖試料は腐敗などの影響で劣化している場合が多いため、LC-MS/MS 分析に導入する際には、試料の前処理が非常に重要な過程となっている。

また、摂取された薬毒物は、グルクロン酸や硫酸塩等の内因性物質との抱合体として尿中に排泄されるため、遊離体または未変化体が尿中に微量しか存在せず、目的の薬毒物を検出できない場合がある。最も多くみられるグルクロン酸抱合体を直接検出する試みもあるが、それらの標準物質および安定同位体内部標準物質の入手が困難なことが多い。加えてコストなどの問題もある。従って、より正確な尿中薬毒物濃度を測定するためには、LC-MS/MS 分析前に抱合体を加水分解し、薬毒物の遊離体や未変化体を直接分析する必要がある。

抱合体の加水分解には従来、強酸や強塩基あるいは生物由来酵素を用いられており、それぞれ選択性が低い、長時間の加水分解反応が必要などの問題があった。そのため、加温条件、反応時間などをそれぞれの薬毒物に応じて最適化する必要があった。さらに、LC-MS/MS 分析前に加水分解に引き続いて、残留加水分解酵素や尿に含まれる水溶性マトリックス成分のような夾雑成分を除去する前処理が必要である。そのため、試料調整と前処理の煩雑さを改善し、その時間を短縮することで、法医学解剖試料での迅速で正確な薬毒物分析と死因究明に大きく貢献することが求められている。

2. 研究の目的

本研究は、尿中薬毒物の迅速かつ効率的な前処理法を開発し、LC-MS/MS により尿中薬毒物を高精度に分析することを目的としている。具体的には、室温で加水分解可能な遺伝子組換え β -グルクロニダーゼ (IMCSzyme RT, IMCS, または B-One, KURA biotech) を用いることで、従来の加水分解に比べ、加温を必要とせず、反応時間を短縮することができるかどうかを検討した。さらに、尿中夾雑成分除去カラム (ISOLUTE HYDRO DME+, Biotage) を用いることで、尿中の色素、塩、尿素、クレアチンおよび残留加水分解酵素のような夾雑成分を簡便に取り除くことができる。また、この前処理カラム内で加水分解することが可能なことから、処理過程の短縮化を検討し、効率的な前処理方法と分析方法を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、グルクロン酸抱合体が尿中の主な代謝物である 5 種類の薬毒物 (11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH), oxazepam, lorazepam, temazepam, amitriptyline) を対象として、2 種類の室温で加水分解が可能な遺伝子組換え β -グルクロニダーゼ: B-One (KURA biotech) または IMCSzyme RT (IMCS) と尿中夾雑成分除去カラム: ISOLUTE HYDRO DME+ (Biotage) を組み合わせた尿中薬毒物の迅速で簡便な前処理法を検討する。

(1) 加水分解条件の最適化 (反応温度、酵素量、反応時間)

反応温度: 25、37、50、60、70 での加水分解率について検討する。

酵素量: それぞれ 0 - 50 μ L の酵素量での加水分解率について検討する。

反応時間: 1 - 60 分間の反応時間での加水分解率について検討する。

さらに、ISOLUTE HYDRO DME+ 上で直接、加水分解を行った場合と加水分解後の試料を ISOLUTE HYDRO DME+ で前処理した場合の加水分解率について検討する。

(2) 前処理法、分析法のバリデーション

バリデーション (検出下限、定量下限、検量線、精度、真度、マトリックス効果、回収率、試料の安定性) を実施して、妥当性を検討し、分析法を確立する。

(3) 確立した前処理と分析法を用いた法医学解剖試料の分析

確立した前処理と分析法を用いて、12 の法医学解剖試料について分析する。

4. 研究成果

(1) 5種類の対象薬毒物のグルクロン酸抱合体を、25℃（室温）で十分に加水分解することができた。B-Oneでは3分、IMCSzyme RTでは10分と短時間で十分な加水分解が可能であった。さらに、加温が不要なため、ISOLUTE HYDRO DME+上で直接、加水分解を行った場合であっても、加水分解後の試料をISOLUTE HYDRO DME+で前処理した場合と同様に高い加水分解率を示した。

(2) B-Oneでは3分と短時間で加水分解できたことから、B-Oneを用いた加水分解での分析法のバリデーションを行った。その結果、回収率はTHC-COOH (56.1-60.4%)、oxazepam (66.4-79.6%)、lorazepam (70.2-80.1%)、temazepam (75.3-85.4%)、amitriptyline (92.6-104.5%)と良好な結果であった。マトリックス効果はTHC-COOH (80.8-109.2%)、oxazepam (86.3-100.1%)、lorazepam (93.5-126.9%)、temazepam (88.5-102.2%)、amitriptyline (78.9-93.7%)と良好な結果であった。検出下限(Limit of detection)、定量限界(Limit of quantification)はTHC-COOH (2 ng/mL, 5 ng/mL)、oxazepam (1 ng/mL, 2 ng/mL)、lorazepam (0.5 ng/mL, 2 ng/mL)、temazepam (0.1 ng/mL, 0.5 ng/mL)、amitriptyline (0.1 ng/mL, 0.5 ng/mL)であった。分析法はいずれも良好な直線性 ($r^2 = 0.99$)を示し、日内の真度 (Accuracy)・精度 (Precision)はそれぞれ、THC-COOH (99.5-101.8%, 1.6-2.8%)、oxazepam (101.9-109.7%, 0.8-2.9%)、lorazepam (96.0-101.0%, 1.0-3.1%)、temazepam (95.5-99.9%, 0.2-2.1%)、amitriptyline (93.7-102.4%, 1.3-2.5%)と許容範囲内であった。日間の真度・精度はそれぞれ、THC-COOH (102.3-105.2%, 3.5-6.7%)、oxazepam (101.9-109.7%, 0.8-2.9%)、lorazepam (96.0-101.0%, 1.0-3.1%)、temazepam (95.5-99.9%, 1.2-2.1%)、amitriptyline (93.7-102.4%, 1.3-2.5%)と許容範囲内であった。尿中のoxazepam、lorazepam、temazepam、amitriptylineのグルクロン酸抱合体は、室温4時間、-30℃と-80℃で28日間、凍結融解の3回繰り返しにおいても安定であった。しかし、THC-COOHのグルクロン酸抱合体は、室温4時間では安定であったものの、-30℃と-80℃で28日間、および凍結融解の3回繰り返しにおいては、60.6-79.7%と少し不安定であり凍結保存には注意する必要がある。

(3) 確立した前処理法と分析法を用いて法医解剖から得られた試料を分析した結果、それぞれの抱合率はTHC-COOH 42.5-82.0%、oxazepam 93.1-99.7%、lorazepam 99.0-99.3%、temazepam 95.9-99.8%、amitriptyline 82.2-96.0%であった。過去の報告と比較しても妥当な抱合率が得られた。

従って、室温で加水分解が可能な遺伝子組換えβ-グルクロニダーゼと尿中夾雑成分除去カラムを組み合わせることで、迅速かつ効率的な前処理法と分析法を確立することができた。本成果を、第7回日本医用マススペクトル学会西部会で発表し、論文発表に向けて準備を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松尾友仁, 小川匡之, 岩井雅枝, 久保勝俊, 近藤文雄, 妹尾洋
2. 発表標題 新規前処理法を用いた尿中薬毒物のLC-MS/MS分析法の開発
3. 学会等名 第7回日本医用マスペクトル学会西部会
4. 発表年 2022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
---------	---------