

原 著 HILIC-MS/MS 法によるヒト涙液中 tegafur および 5-fluorouracil の高感度分析法

¹⁾ 昭和大学医学部法医学講座

²⁾ 昭和大学医学部眼科学講座

³⁾ 昭和大学医学部内科学講座 (腫瘍内科学部門)

⁴⁾ 昭和大学医学部耳鼻咽喉科学講座

⁵⁾ 昭和大学腫瘍分子生物学研究所

小 淵 律子^{1,2)} 李 曉 鵬^{*1)} 石 田 博 雄³⁾

熊 澤 武 志¹⁾ 池 田 賢 一 郎⁴⁾ 藤 城 雅 也¹⁾

藤 田 健 一⁵⁾ 佐 藤 淳 一¹⁾ 澤 口 聡 子¹⁾

高 橋 春 男²⁾ 佐 藤 啓 造¹⁾

抄録：経口抗癌薬 TS-1[®]は、テガフル (5-fluoro-1-[(2RS)-tetrahydrofuran-2-yl] uracil, FT), ギメラシル (5-chloro-2,4-dihydroxypyridine, CDHP) およびオテラシルカリウム (monopotassium 1,2,3,4-tetrahydro-2,4-dioxo-1,3,5-triazine-6-carboxylate, Oxo) の合剤である。TS-1[®] は、主成分である FT が 5-fluorouracil (5-FU) のプロドラッグで、肝臓で活性代謝体である 5-FU に代謝されて抗腫瘍効果を示し、がん治療における化学療法の一つとして、幅広く使用されている¹⁾。TS-1[®] の主な副作用には、骨髄抑制、口内炎、消化管障害、肝機能障害、色素沈着、発疹がある¹⁻³⁾。近年、TS-1[®] 療法における角膜炎、涙道閉塞などの眼合併症が報告されている⁴⁻⁷⁾。TS-1[®] 療法により、涙液中の FT や 5-FU が高濃度となり、眼合併症の発症に関与していると指摘されている^{5,7)}。涙液中の FT および 5-FU の定量は眼毒性の成因を知るためや適切な治療法の選択のために不可欠である。今まで、TS-1[®] 投与後 FT および 5-FU について、血漿中からの分析報告^{8,9)} はあるものの、涙液の分析は坂本らの濾紙法での報告⁷⁾ があるだけである。本研究では、ヒト涙液中 FT および 5-FU について、簡便な液-液抽出法および高感度親水性相互作用液体クロマトグラフィー (Hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) 法とタンデム質量分析 (MS/MS) 法を組み合わせる新しい HILIC-MS/MS 分析システムの開発を試みた。本法は、10 μ l という微量涙液を簡単な前処理を行った後、抽出液を直接 HILIC-MS/MS 装置に注入する簡便かつ高感度ハイスループットな分析法であった。本法は、定量性・再現性に優れ、また、TS-1[®] 投与患者の涙液中 FT および 5-FU の分析にも応用が可能であった。

キーワード：テガフル、5-フルオロウラシル、涙液、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC)、タンデム質量分析 (MS/MS)

研究方法

1. 材料・試薬

5-FU および 5-Chlorouracil (内部標準物質; IS) は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) から、FT は和光純薬工業 (大阪) から、人工涙液として

用いたティアール W[®] は オフテクス (神戸) からそれぞれ購入した。アセトニトリル、超純水およびその他の試薬は LC-MS 用または試薬特級に相当するものを使用した。涙液採取に用いた Drummond Microcaps[®] ガラス毛細管 (長さ 65 mm, 外径 0.97 mm, 内径 0.70 mm, 容量 25 μ l) は、フナコシ

*責任著者

Table 1 Optimized MS/MS parameters

Compound	MRM transitions (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Tegafur	199 → 42	-50	-10	-30	-6
5-FU	129 → 42	-50	-10	-29	-5
5-chlorouracil (IS)	145 → 42	-51	-10	-29	-5

DP, Declustering Potential; EP, Entrance Potential; CE, Collision Energy; CXP, Collision Exit Potential

(東京) から購入した。

2. 標準液および品質管理 (QC) 試料の作製

FT, 5-FU および IS 各標準液は、何れかの薬物を精密秤量した後、メタノールで溶解し保存用標準液 (1 mg/ml) とした。さらに、この保存用標準液をメタノールで希釈し、0.05 ~ 100 ng/10 μ l の範囲の標準液を作製し、4°C で保管して使用した。また、検量線用の薬物添加試料は、人工涙液 10 μ l 当たり 0.4 ~ 40 ng の濃度範囲で作製した。なお、検量線 (0.04 ~ 4.0 μ g/ml) は内部標準法によって作製し、5-Chlorouracil を IS として使用した。QC 試料は検量線と同様の方法で、人工涙液 10 μ l 中 0.4 ~ 40 ng の薬物濃度範囲で作製した。

3. サンプルの作製

人工涙液は、市販点眼薬ティアール W[®] を用いた。薬物添加試験では、はじめに人工涙液 10 μ l に FT, 5-FU および IS を添加し、さらに 2 M 酢酸アンモニウム溶液 40 μ l, 2% ギ酸アセトニトリル 250 μ l を加え混和した。その涙液試料は 19,600 \times g で 3 分間遠心分離を行い、上清 15 μ l を分析システムにアプライした。

4. 分析装置および条件

本分析システムには UFLC (島津, 京都) およびトリプル四重極とリニアイオントラップ機能を搭載した API4000 Q Trap MS/MS 装置 (AB Sciex, Framingham, MA, USA) を用いた。

HILIC 分析条件は、以下の設定で行った。分析カラム: Imtakt 社製の順相カラム UK-Amino (長さ 50 mm, 内径 3 mm, 粒径 3 μ m), カラム温度: 40°C, 移動相: 10 mM 酢酸アンモニウム溶液 (pH 6.8, 溶媒 A), アセトニトリル (溶媒 B), リニアグラジエント (B%): 90% (0 min) \rightarrow 88% (1 min) \rightarrow 30% (2 min), カラム流量: 0.7 ml/min, 試料注

入量: 15 μ l.

質量分析は、大気圧化学イオン化法 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) の負イオンモードで行った。MS インターソース各種設定は、イオンソース電圧: -4,500 V, イオンソース温度: 500°C, ネブライザーガス圧 (高純度空気): 60 psi, ヒーターガス圧 (高純度空気): 50psi, カートンガス圧 (高純度窒素): 12 psi, フルスキャンモードにおける質量範囲: m/z 50 ~ 350, データ取り込み時間: 250 ms, peak 半値幅: 0.6 ~ 0.75, コリジョンガスは窒素ガスを使用した。多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring, MRM) トランジションは各薬物に対応した MS/MS パラメーターの最適値を設定 (Table 1) し、データ解析は Analyst 1.5.1 ソフトウェア (AB Sciex) を用いて行った。

5. 検量線の作成

検量線は、検量線用標準液 (0.04, 0.08, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μ g/ml) および IS (1.0 μ g/ml) を人工涙液に添加して前処理を行い、上清を HILIC-MS/MS の MRM 測定を利用して検討した。また、検量線は既知濃度 (x) に対し、各薬剤/IS のピーク面積比 (y) を最小 2 乗法による直線回帰分析 (重み付け weight = 1) で算出した。検出限界は、シグナル/ベースラインノイズとの比 (S/N 比) が 3 のときを検出限界 (limit of detection, LOD) とした。定量下限濃度 (lower limit of quantitation, LLOQ) および定量上限濃度 (upper limit of quantitation, ULOQ) は、FDA の生体試料分析に関するガイドライン¹⁰⁾ に従って、精度が 15% を超えず、真度が 80 ~ 120% の範囲内にある濃度とした。本研究では、ULOQ には FT が 4.0 μ g/ml, 5-FU が 0.2 μ g/ml をそれぞれ設定した。

6. 精度と真度

本分析法の日内変動・日間変動は、FT および 5-FU がそれぞれ 2 種類濃度の QC 試料 MRM 測定し、精度・真度を用いて評価した。日内変動は同一日に人工涙液サンプルを 6 回測定し、日間変動は 6 日間にわたって測定して精度と真度を算出した。精度は相対標準偏差 (relative standard deviation, RSD) を用いて評価し、真度については、人工涙液サンプル濃度 (理論値) に対する測定値の相対誤差 (relative error, RE %) が $\pm 15\%$ 以内を許容基準とした¹⁰⁾。

7. 回収率およびマトリックス効果

人工涙液からの回収率は、2 種類の濃度 QC 試料を各 6 回分析し、その MRM クロマトグラムのピーク面積 (A) と初期移動相に添加し分析で得られた面積 (B) を比較して計算した ($A/B \times 100$)。マトリックス効果は上記 B と人工涙液サンプルを前処理 (希釈・遠心) した後、それぞれ同じ濃度を添加して得られた面積 (C) とを比較して算出した [($C/B - 1$) $\times 100$]。

8. 試料保存の安定性

保存試料の安定性 (Stability) に関する検討では、2 種類濃度の QC 試料を 4°C で 48 時間、 -80°C で 4 週間ならびに 12 週間の条件でそれぞれ保存後、MRM 測定し涙液中の薬物の安定性 (Stability) を評価した。

9. 臨床への応用

本研究で構築した分析システムを患者から採取した実際の涙液に応用した。本研究は、昭和大学医学部医の倫理委員会 (承認番号 1475 号)、昭和大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会 (承認番号 188 号) および大学病院医療情報ネットワーク研究センター (University hospital Medical Information Network; UMIN Center) (ID: UMIN000015415) の承認を得て実施した。対象とした被験者は、昭和大学病院および昭和大学病院附属東病院の外来および入院中の TS-1[®] 投与患者である。被験者に対し、涙液から薬物分析に関する意義など本研究の試験内容について書面を用いて十分説明し、自由意志による同意を得た。涙液は、昭和大学病院および昭和大学病院附属東病院の外来並びに病棟において、結膜など組織に傷つけたり感染を起こしたりすることのないよう細心の注意を払い、滅菌された毛細

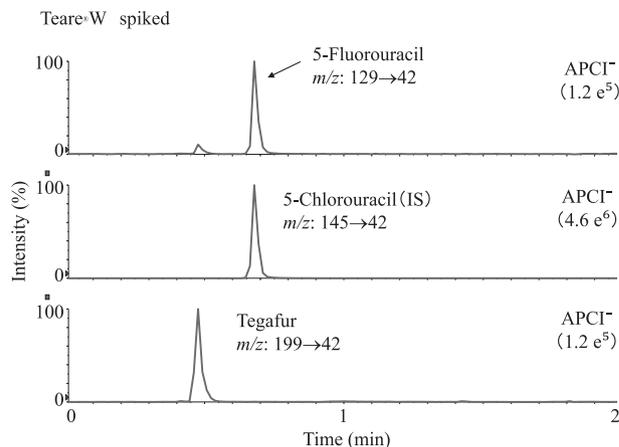


Fig. 1 MRM chromatograms for 5-fluorouracil, tegafur and 5-chlorouracil (IS) in artificial tear solution (ATS) by HILIC-MS/MS. A 10- μl of ATS (Teare[®] W) was spiked with 2 ng of 5-fluorouracil and tegafur, and 10 ng of IS, respectively.

管を用いて被験者の下眼瞼結膜囊より採取 (10 ~ 20 μl) した。採取した涙液は、直ちに -80°C で凍結保存した。

結 果

1. マススペクトルおよび MRM クロマトグラム
負イオン APCI 法を用いた MS 測定では、何れの薬物も脱プロトン化分子 $[M-H]^{-}$ である m/z 199 (FT), m/z 129 (5-FU) および m/z 145 (IS) が感度良く検出された。また、MS スキャンで得られた上記脱プロトン化分子をプリカーサーイオンとして MS/MS 分析したところ、プロダクトイオンは FT が m/z 199, 128, 42 (ベースピーク), 5-FU が m/z 129, 86, 59, 42 (ベースピーク), IS が m/z 145, 102, 42 (ベースピーク) が観察された。この結果から HILIC-MS/MS 法を用いた涙液中 FT, 5-FU の同時定量分析における MRM トランジションは、FT が m/z 199 \rightarrow 42, 5-FU が m/z 129 \rightarrow 42 および IS が m/z 145 \rightarrow 42 にそれぞれ設定した (Table 1)。人工涙液を用いた添加試験で得られた MRM クロマトグラムを Fig. 1 に示す。何れの薬物ピークも 1 分以内に感度良く検出され、バックグラウンドノイズはほとんど検出されない良好な結果が得られた。FT および 5-FU の保持時間は、それぞれ 0.5 分、0.7 分であった。

Table 2 Regression equations, LODs, LLOQs and ULOQs

Compound	$y = ax + b$ ^a		Correlation coefficient (r)	Concentration range ($\mu\text{g/ml}$)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LLOQ ($\mu\text{g/ml}$)	ULOQ ($\mu\text{g/ml}$)
	$a \pm \text{SD}$	$b \pm \text{SD}$					
FT	0.1178 ± 0.0032	0.0021 ± 0.0007	0.9993	0.08-4.0	0.04	0.08	4.0
5-FU	0.1003 ± 0.0028	0.0025 ± 0.0003	0.9978	0.04-0.2	0.04	0.04	0.2

^a The slope (a) and intercept (b) are expressed as mean values \pm SD with six different calibrators (0.04, 0.08, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 $\mu\text{g/ml}$), on 6 consecutive days. The calibration curves were constructed by plotting peak area ratios of a test compound to an internal standard against drug concentrations.

Table 3 Precision and accuracy for 5-FU and FT in QC samples

Compound	Intraday ($n = 6$)				Interday ($n = 6$)		
	Concentration added ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration detected ($\mu\text{g/ml}$)	Precision (CV, %)	Accuracy (%)	Concentration detected ($\mu\text{g/ml}$)	Precision (%)	Accuracy (%)
FT	0.5	0.51 ± 0.012 ^a	2.4	103	0.52 ± 0.009	1.8	103
	4.0	3.89 ± 0.097	2.5	97	3.95 ± 0.068	1.7	99
5-FU	0.04	0.046 ± 0.0008	1.7	115	0.043 ± 0.0024	5.2	108
	0.2	0.210 ± 0.0053	2.5	105	0.204 ± 0.0034	1.7	102

^a The values are means \pm SD.

Table 4 Matrix effect and recovery

Compound	Spike ($\mu\text{g/ml}$)	Matrix effect (%)	Recovery (%) (mean \pm SD)	CV (%)
FT	0.5	10.0	128 ± 3.4	2.6
	4.0	7.3	116 ± 0.7	0.6
5-FU	0.04	6.4	110 ± 3.1	2.8
	0.2	0.6	99 ± 1.1	1.1

Positive values account for signal enhancement.

2. 分析法バリデーション

内部標準法を用いた検量線は、FT が 0.08 ~ 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 、5-FU が 0.04 ~ 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で相関係数 0.9978 以上の良好な直線性が得られた (Table 2)。検出限界は 0.04 $\mu\text{g/ml}$ で、定量下限濃度および定量上限濃度はそれぞれ 0.04 ~ 0.08 $\mu\text{g/ml}$ および 0.2 ~ 4.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。

Table 3 は日内変動および日間変動の精度および真度を示す。FT および 5-FU の日内変動については精度が 1.7 ~ 2.5%、真度が 97 ~ 115% であった。

日間変動は精度が 1.7 ~ 5.2%、真度が 99 ~ 108% で、何れも良好な結果を示した。

本分析システムにおける回収率およびマトリックス効果を Table 4 に示す。回収率は FT が 116 ~ 128%、5-FU が 99 ~ 110% であった。また、FT および 5-FU のマトリックス効果は、それぞれ 7.3 ~ 10%、0.6 ~ 6.4% で、2つの薬物はイオンエンハンスメントによる感度上昇が見られた。

人工涙液サンプルにおける保存の安定性は、FT および 5-FU は 4°C、48 時間保存が 95 ~ 106%、

Table 5 Stability in QC samples at 4°C and -80°C

Compound	Concentration added ($\mu\text{g/ml}$)	Stability (%) ^a		
		4°C (48 h)	-80°C (4 weeks)	-80°C (12 weeks)
FT	0.5	105 \pm 5.9 ^b	100 \pm 3.4	98 \pm 0.9
	4.0	95 \pm 6.4	107 \pm 5.2	101 \pm 1.3
5-FU	0.04	100 \pm 3.1	93 \pm 1.1	96 \pm 2.3
	0.2	106 \pm 2.5	109 \pm 4.7	97 \pm 0.7

^a The values obtained from QC samples freshly prepared and analyzed immediately were set at 100%.

^b Each value is mean \pm SD (n = 4).

-80°C, 4週間および12週間保存がそれぞれ93~109%および96~101%であった (Table 5). これらは, 何れも \pm 15%以内と良好な安定性を示した.

3. 臨床への応用

今回確立した分析法を用いて, 60歳代と70歳代のTS-1[®]投与患者2名の涙液検体について, FTおよび5-FUの分析を行った (Fig. 2およびTable 6). 眼合併症は, 有害事象共通用語規準 v4.0日本語訳 JCOG版¹¹⁾を用いてグレード評価を行った結果, 患者Aがグレード3の流涙, 患者Bがグレード2の角膜炎をそれぞれ認めた. また, TS-1[®] 60 mgを最終投与してから5時間後に採取した涙液中FTおよび5-FUの濃度は, 患者Aがそれぞれ3.0 $\mu\text{g/ml}$ および0.57 $\mu\text{g/ml}$ で, 患者Bがそれぞれ3.1 $\mu\text{g/ml}$ および0.44 $\mu\text{g/ml}$ であった.

考 察

TS-1[®] (FT・CDHP・Oxo合剤)は, 本邦で開発され1999年の承認以来, 各種悪性腫瘍の治療に使用されている経口抗癌薬である. FTは, 肝臓において薬物代謝酵素であるCYP2A6により活性体5-FUに代謝され, 抗腫瘍効果を発揮する¹⁻³⁾. また, CDHPは5-FUの異化経路における律速酵素であるdihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)の阻害薬で, DPDによる5-FUの解毒的代謝を阻害することから, 5-FU血中濃度は長時間維持される. Oxoは消化管に高濃度に分布し, 5-FUの活性化酵素であるリン酸化酵素を可逆的に拮抗阻害して消化器毒性を抑制する作用がある¹⁾.

近年, TS-1[®]を使用する患者が増加している. 一方, 眼合併症の報告も増えている. 眼合併症として,

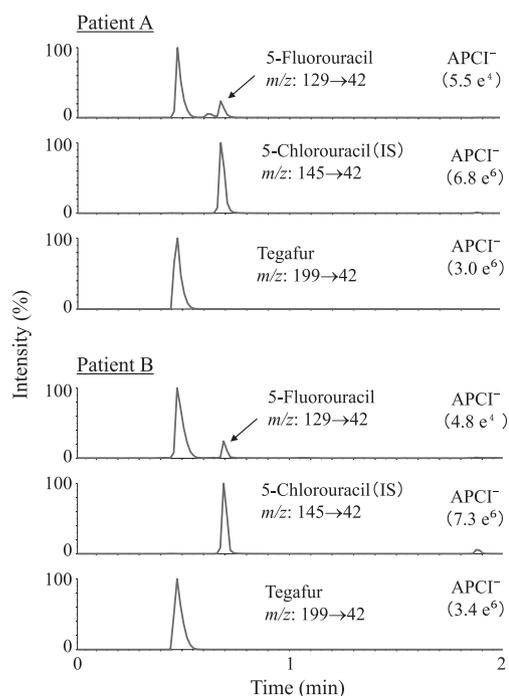


Fig. 2 MRM chromatograms obtained by present method from the tear samples of two cancer patients 5 h after receiving TS-1[®] (120 mg/day in 2 divided) medication. The amount of 5-chlorouracil (10 ng) was spiked as the IS.

海外では2005年にEsmaeliらが涙道障害, 本邦では2006年に伊藤らが角膜障害や涙道障害をそれぞれ報告した^{4,5)}. またMatsumotoらは結膜炎, マイボーム腺炎, ドライアイ, 角膜炎, 涙道閉塞などTS-1[®]による眼障害を報告した⁶⁾. さらに, 坂本らは, TS-1[®]の眼障害が難治となった例を報告した⁷⁾.

Table 6 Concentrations of FT and 5-FU in human tear samples obtained from two cancer patients after receiving TS-1[®] medication

Patient	Gender	Height (cm)	Weight (kg)	Histology	Dosage (mg/day)	Time after administration (h)	Concentration (µg/ml)	
							FT	5-FU
A	Male	166	49	Hypopharyngeal cancer	120 mg/day (in 2 divided)	5	3.0	0.57
B	Female	155	47	Gastric cancer	120 mg/day (in 2 divided)	5	3.1	0.44

2012年には、涙道閉塞がTS-1[®]の重大な副作用として添付文書に記載され注目されている。これらの眼合併症の発症要因としては、涙液中のFT、CDHPまたは5-FUの関与が考えられている^{5,7)}。

現在行われているTS-1[®]療法による眼合併症治療は、合併症発症後の涙液中の薬物濃度を下げる目的で、人工涙液等の点眼や涙道閉塞に対する涙道チューブ挿入などの治療が行われている。しかし、何れの治療も患者の主訴に依存し、治療が遅れ重症化することが臨床で問題となっている⁷⁾。本研究は涙液中のFTおよび5-FUの高感度分析により、眼合併症の発症を事前に予測し、最適な治療を行うことを可能にしているもので、QOLの向上に寄与すると考えられる。

これまで、人体試料からのFT、5-FU、CDHPについての分析法は、血漿を用いた報告^{8,9)}はあるものの、涙液を用いた報告は、坂本らの濾紙法での報告⁷⁾があるだけで、定量分析の報告は見当たらない。HILIC-MS/MSを用いた涙液中FT、5-FUの高感度分析は本研究が最初の報告である。

通常、人体試料からの薬物分析法開発、さらに分析法バリデーションの評価には血漿、尿などのドラッグフリーサンプルが必須である。しかし、涙液については、健常人でも涙液量は約5~10 µlと微量であるため、採取が難しく、入手が困難であった。そのため、人工涙液 (the artificial tear solution, ATS) などが代用されている¹²⁾。本研究では、市販点眼薬である、New マイティアCL[®]、ソフトサンティア[®]、0.1%ヒアレイン[®]、アイリスCL-Iネオ[®]およびティアアレ W[®]の5種類について、MRM測定上のバックグラウンドノイズを検討したところ、FTと5-FU分析にはティアアレ W[®]

が最適であった。一方、廣澤らは、涙液中非ステロイド消炎鎮痛薬の分析には人工涙液としてソフトサンティア[®]が最適と報告している¹³⁾。このように、最適な人工涙液が分析薬物により異なるのは、異なる点眼液の組成が、HILIC-MS/MS分析において、バックグラウンドノイズおよびマトリックス効果などの違いに大きく関与するためと考えられる。涙液中薬物分析を行う際には、人工涙液について予備試験で検討を行い、最適な選択を行うべきである。

これまで行われてきた涙液採取方法には、毛細管法とシルマー法がある。シルマー法に比べ毛細管法は、涙液量が正確で、MS/MSを用いた定量分析に最適である。本研究では、容積、長さ、外径、内径の異なる6種類のガラス毛細管について予備試験を行った結果、粘性涙液も採取可能であるDrummond Microcaps[®]ガラス毛細管を滅菌処理した上で涙液の採取に用いた。

FTおよび5-FUはフツ化ピリミジン系構造を有し、そのままでは逆相系カラムを用いたHPLC分析では薬物の保持分離が困難である。従来、ヒト体液中FTおよび5-FUの分析法としては、4-ブロモメチル-7-メトキシクマリン (4-bromomethyl-7-methoxycoumarin) 等による誘導体化が必要なうえ、液-液抽出などの前処理にも煩雑な操作や多量の有機溶媒が必要であるなどの欠点が問題点として指摘されている¹⁴⁾。

順相クロマトグラフィーの一種であるHILICは、水とアセトニトリルなど有機溶媒の混合移動相、さらに高極性固定相 (シリカ) を併せた相互分配作用による分離モードである。これは古典的な順相クロマトグラフィーに必須な非水溶性有機溶媒を必要としない新しい分析方法として注目されている^{15,16)}。

移動相はアセトニトリルのような水と混ざりうる溶媒による水系が使用され、高極性化合物の保持分離も優れている。さらに、HILICモードは有機溶媒比がリッチであるため、イオン化効率も向上し、高感度質量分析が期待できる。本研究で用いたImtakt社製アミノ系シリカカラムであるUK-Aminoカラムは親水性の相互分配作用とイオン交換相互作用を両方備えており、従来の順相カラムには不可能な水系移動相100%によるカラム洗浄が可能であるため、バックグラウンドノイズの少ない質量分析を可能としている¹⁷⁾。また、同時にこのカラムは耐久性にも優れていることを既に報告している¹⁷⁾。本分析に用いたUK-Aminoカラムは、アセトニトリルによるリニアグラジエント(90→88%)を1分間行った後、10mM酢酸アンモニウム溶液70%で洗浄した。その結果、バックグラウンドノイズがほとんど見られないきれいなMRMクロマトグラム並びに約300回分析可能なカラム寿命が得られた。それによって、再現性ならびに安定性に優れた迅速かつ高感度な質量分析が可能であった。

本法は10μlという微量の涙液試料を少量の溶媒を用いて希釈・遠心を行った後、上清をそのままHILIC-MS/MSにダイレクトに注入するだけの簡便な分析法である。また、本法は従来の報告に比べ、迅速かつ高感度なFTおよび5-FUの定量分析が可能であった。分析バリデーションの検証において、本法は良好な定量性および回収率、低いLODおよびLLOQと高い安定性が得られた。さらに、本法を臨床サンプルの分析に応用したところ、簡便・迅速・高感度分析ができることが明らかとなった。今後、血漿中のFTおよび5-FUの定量法も開発することにより、血漿中濃度と涙液中濃度との関係、体液中濃度と眼合併症との関係などを明らかにしていきたいと考えている。

本研究で確立した分析システムは、ヒト涙液中FTおよび5-FUのハイスループット分析だけでなく、他の薬毒物への応用も期待でき、眼科を始めとする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。

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Bruke A, Smyth E, FitGerald GA. Analgesic-antipyretic agents; pharmacotherapy of gout. In Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, eds. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Eleventh edition.* New York: McGraw-Hill; 2006. pp671-715.
- 2) 伊藤国夫. 市販開始直後の抗悪性腫瘍剤の安全性確保対策の実例 安全性モニタリングを実施したTS-1カプセル全例使用成績調査の経験. 癌と化療. 2006;33:55-67.
- 3) Ikeda K, Yoshisue K, Matsushima E, et al. Bioactivation of tegafur to 5-fluorouracil is catalyzed by cytochrome P-450 2A6 in human liver microsomes in vitro. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4409-4415.
- 4) Esmali B, Golio D, Lubecki L, et al. Canalicular and nasolacrimal duct blockage: an ocular side effect associated with the antineoplastic drug S-1. *Am J Ophthalmol.* 2005;140:325-327.
- 5) 伊藤 正, 田中敦子. 経口抗がん剤S-1による角膜障害の3例. 日眼会誌. 2006;110:919-923.
- 6) Matsumoto Y, Dogru M, Sato EA, et al. S-1 induces Meibomian gland dysfunction. *Ophthalmology.* 2010;117:1275.
- 7) 坂本英久, 坂本真季, 濱田哲夫, ほか. カラー臨床報告 抗癌剤TS-1内服による角膜障害の1例. 臨眼. 2008;62:393-398.
- 8) Liu HY, Ding L, Yu Y, et al. Comparison of three derivatization reagents for the simultaneous determination of highly hydrophilic pyrimidine antitumor agents in human plasma by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012;893-894:49-56.
- 9) Gu Y, Lu R, Si D, et al. Simultaneous determination of tegafur and gimeracil in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Sci.* 2009;25:1211-1215.
- 10) U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, et al. Guidance for industry: bioanalytical method validation. 2001. (2016年1月4日アクセス) <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.
- 11) 有害事象共通用語規準 v4.0 日本語訳 JCOG版. 2009年5月28日. (2016年1月4日アクセス) <http://www.jcog.jp/doctor/tool/CTCAEv4j-20130409.pdf>.
- 12) Mirejovsky D, Patel AS, Rodriguez DD, et al. Lipid adsorption onto hydrogel contact lens

- materials. Advantages of Nile red over oil red O in visualization of lipids. *Optom Vis Sci.* 1991;68:858-864.
- 13) Hirosawa M, Sambe T, Uchida N, *et al.* Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human tear and plasma samples using ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Jpn J Ophthalmol.* 2015; 59:364-371.
- 14) Wang K, Nano M, Mulligan T, *et al.* Derivatization of 5-fluorouracil with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin for determination by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectr.* 1998;9:970-976.
- 15) Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr.* 1990;499:177-196.
- 16) Nguyen HP, Schug KA. The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *J Sep Sci.* 2008;31:1465-1480.
- 17) Nemoto T, Lee XP, Kumazawa T, *et al.* High-throughput determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by HILIC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;88:71-80.

HIGHLY SENSITIVE ANALYSIS OF TEGAFUR AND 5-FLUOROURACIL IN HUMAN TEARS BY HILIC-MS/MS

Ritsuko OBUCHI^{1,2)}, Xiao-Pen LEE¹⁾, Hiroo ISHIDA³⁾,
Takeshi KUMAZAWA¹⁾, Kenichiro IKEDA⁴⁾, Masaya FUJISHIRO¹⁾,
Ken-ichi FUJITA⁵⁾, Junichi SATO¹⁾, Toshiko SAWAGUCHI¹⁾
Haruo TAKAHASHI²⁾ and Keizo SATO¹⁾

¹⁾ Department of Legal Medicine, Showa University School of Medicine

²⁾ Department of Ophthalmology, Showa University School of Medicine

³⁾ Division of Medical Oncology, Department of Medicine, Showa University School of Medicine

⁴⁾ Department of Otorhinolaryngology, Showa University School of Medicine

⁵⁾ Institute of Molecular Oncology, Showa University

Abstract — TS-1[®] is composed of tegafur (FT), gimeracil and oteracil potassium. In the liver, FT is converted to 5-fluorouracil (5-FU) with antitumor activity. Many complaints of ocular side effects have been reported in patients receiving TS-1[®]. However, few studies have analyzed the concentrations of FT and 5-FU in human tears obtained from patients receiving TS-1[®]. A simple, rapid and sensitive method was developed. Here, we validate this method of hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-tandem mass spectrometry (MS/MS) for the analysis of FT and 5-FU in tears. After simple liquid-liquid extraction of tears (10 μ l) spiked with FT, 5-FU and 5-chlorouracil (IS), the clear supernatant (15 μ l) obtained by centrifugation was directly injected into the HILIC-MS/MS, and each drug was separated on a Unison UK-Amino column. Quantification was performed by multiple reaction monitoring (MRM) with negative-ion atmospheric pressure chemical ionization (APCI). Distinct peaks appeared for the drugs on each channel within 1 min. The regression equations showed good linearities in the range of 0.04 ~ 4.0 μ g/ml ($\gamma > 0.9978$) for FT and 5-FU. Recoveries of the drugs were 99–128%, and the coefficient of variation (CV) was $\leq 5.2\%$. When the method was applied to simultaneous determination of FT and 5-FU levels in tears obtained from patients receiving TS-1[®], both the parent drug, FT, and also the active metabolite, 5-FU, were successfully identified and quantified with only a 10- μ l sample. This method will be useful clinically for the simultaneous determination of FT and 5-FU in small amounts of body fluids.

Key words: tegafur, 5-fluorouracil, tear, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), tandem mass spectrometry (MS/MS)

[受付：1月14日，受理：1月21日，2016]