

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590850

研究課題名(和文) 生体試料からの薬物抽出において最適な抽出条件を導く回収率予測式の構築

研究課題名(英文) Building of the equation predict an optimal condition for drug analysis in biological sample

研究代表者

坂 幹樹 (SAKA, Kanju)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・技術専門職員

研究者番号：30447388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：GC-MS測定において生じる“マトリックスエンハンスメント効果”という現象に着目し、定量的構造物性相関(QSPR)の解析手法を用いてマトリックス効果予測モデルを構築した。この予測式によって、実験をせず計算のみでマトリックス効果の大きさを予測することが可能になった。また、「水素結合供与体の数」、「分子の体積」といったパラメータがこの現象に大きく寄与していることを突き止めることができた。

研究成果の概要(英文)：We developed the predictive model for the phenomenon "matrix enhancement effect" in gas chromatography-mass spectrometry. The model was built using quantitative structure-property relationship (QSPR). The predictive equation allows the matrix-effect prediction without experimental measurements. In addition, the parameters such as "the number of H-bond donors" and "molecular volume" were found to be significant in this phenomenon.

研究分野：分析化学

キーワード：薬毒物分析 定量的構造物性(活性)相関 予測モデル 法医学 生体試料

1. 研究開始当初の背景

生体試料(血液・尿・臓器など)中の薬物分析は法医学、臨床医学、製薬業界など様々な分野で行われてきた。しかし、法医解剖で得られる試料は腐敗・溶血など状態の悪いものが多く、十分な量を採取できないケースも多い。覚せい剤類、ベンゾジアゼピン類、モルヒネ類の一斉分析などの論文は多数発表されているが、現実には異なったカテゴリーに属する薬物が混在している試料が多いため、複数の薬物を同時に抽出・分析する最適な方法はその都度、実験による試行錯誤によって検討され、多大な時間と労力及び費用を必要とした。

一方、生体試料中の夾雑物(対象薬物以外の全ての化合物)は、法医薬毒物分析で用いられている分析機器、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)におけるマトリックスエンハンスメント効果、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)におけるイオンサプレッションのような現象を引き起こし、定量分析の結果に多大な影響を与えることも少なくない。

このように、試料の状態や測定対象物質の組み合わせなどがケースによって大きく変わるといった状況において、新たなアプローチが必要であると考えた。近年、*in silico* と呼ばれる計算で結果を予測する手法の需要が高まってきており、創薬における高速スクリーニングや毒性研究における発がん性予測など様々な分野で用いられるようになってきた。この手法は、実験を行わない、もしくは最小限の実験で済ませることができることから、時間・労力・費用・環境などの点で大きなメリットがある。また、要因解析を行うことによって、より現象の本質に迫ることも可能となる。そこで、本研究のテーマである抽出条件の最適化を検討するにあたって *in silico* の手法を用い、薬物・抽出溶媒・pH における法則性を見出すことは法医実務上非常に有益なことであると考えた。この法則性から、多種薬物の組み合わせの変化や試料マトリックスの多様な変化に対して、WET な実験を行わず、DRY 実験により最適な条件を高速に導き出すことが可能になると考えた。

2. 研究の目的

薬毒物分析において発生する様々な現象について、*in silico* の一手法である定量的構造物性(活性)相関(QSPR/QSAR)を用いて、化学構造式と結果の関連性を解析し、現象を支配する要因を突き止めるとともに、予測式を作成し、実験をせず計算のみで結果を予測できる予測モデルを構築することを目的とした。

一方、GC-MS 測定においては“マトリックスエンハンスメント効果”という定量を誤らせる現象が起こる。GC-MS では注入口やカラムなどに活性点と呼ばれる分子が吸着しやすい部位が発生するが、夾雑物の多いサン

ルを流すと、夾雑物が活性点を覆い、相対的に測定対象物質が検出器に到達し易くなり、そのレスポンスが増加する現象である。私達は、この現象について研究を重ね論文を発表してきたが[1,2]、特定の薬物に関するものであり、化合物全般に関する普遍的な見解には至っていなかった。よって、QSPR を用いて、マトリックスエンハンスメント効果を引き起こし易い化合物の特徴を解析することにした。まず、QSPR のテーマとしてマトリックス効果を選んだのは、モデル作成には統計的処理のみならず化学的な知見が必要だからである。つまり、化学的な多変量解析を行うにあたって、良いテーマであると考えたからである。

3. 研究の方法

法医学において重要と思われる中枢神経作用薬を中心とした薬物 58 種類を対象物質とした。ブランク血清を Oasis HLB で抽出し、乾燥させた残渣を酢酸エチルで溶かした溶液を“マトリックス溶液”とした。それぞれの薬物標準品をマトリックス溶液で溶かしたものを(A)、純酢酸エチルで溶かしたものを(B)を作成した。それぞれの薬物ピークの面積値を GC-MS で測定、面積比 A/B をマトリックス効果を表す値とし、58 種それぞれについて実験値を求めた。活性点に吸着しない薬物は A/B がほぼ 1 に近い値となり、吸着し易い薬物は A/B の値が大きくなる。次に、ADMEWORKS/ModelBuilder(富士通ソフトウェア)を用いて、58 化合物それぞれについて 400 種の descriptor (物性値)を計算した。その 400 種からマトリックス効果と関連性の強い descriptor を様々な特徴抽出を用いて絞り込み、重線形回帰によってマトリックス効果予測モデルを構築した。モデルは、決定係数(R^2)、平均二乗誤差、 F 統計量、leave-one-out クロスバリデーションの数値で検証された。

4. 研究成果

本研究において作成されたマトリックス効果予測モデルは、8 つの descriptor、Number of H-bond donors (nHD)、Molecular volume (MV)、Most negative partial charge on H-atom (NPCH)、Octanol-water partition coefficient (LogP)、Quaternary sp^3 carbon count (4SP³)、Heat of formation (HF)、Molecular mass of rigid atoms (MMRA)、Primary sp^3 carbon count (1SP³) が選択され、下記の方程式で表された。予測値 (ME_{pre}) と実測値 (ME_{exp}) の相関は、 $R^2 = 0.807$ となり直線性が得られた。

$$ME_{pre} = 0.193 + 0.314(nHD) + 0.0155(MV) + 6.42(NPCH) - 0.131(LogP) - 0.205(4SP^3) + 0.00122(HF) - 0.00189(MMRA) - 0.0568(1SP^3)$$

選択された 8 つの descriptor の t -統計量(絶対値が大きいとモデルへの寄与が高い)は下記 Table のようになり、nHD は非常に重要な

パラメータであることが示された。言い換えると、アミノ基や水酸基を持つ化合物はマトリックス効果を増加させる傾向にあると言える。しかし、アミノ基を持つ化合物でもマトリックス効果の小さな化合物もあり、これらは、MV が小さい値であった。アミノ基を含んでも小さな分子は注入口での滞在時間が短いため吸着しにくいのではないかと考えられた。また、LogP、4SP³、1SP³の符号がマイナスであることから、これら疎水性を示すパラメータはマトリックス効果を減少させる方向に働くことが示された。

Table *t*-Statistic for the eight selected descriptors

Descriptor	<i>t</i> -Statistic
nHD	9.60
MV	6.19
NPCH	5.39
LogP	-5.12
4SP ³	-4.02
HF	3.96
MMRA	-3.05
1SP ³	-2.68

このように、マトリックス効果予測モデルの構築によって、実験をせずにマトリックス効果を予測することが可能になった。正確な定量分析をするためには、内部標準物質の選定が重要であり、マトリックス効果が同程度の化合物を選ぶべきである。また、マトリックス効果の高い化合物は誘導体化などにより、吸着しにくい化合物に変えてから定量分析に臨んだ方が良い場合もある。これら定量分析のストラテジーを計算のみで行えることは、実験時間・費用を大幅に節約でき、実務上非常に有意義である。

今後の展望としては、現在研究中である生体試料からの薬物抽出における“回収率予測モデル”の実験及び解析を進め、論文発表を行う予定である。また、法医薬毒物分析において生じる他の現象についても、QSPR/QSARを用いた解析によって本質的な要因の解明及び予測モデルの構築を行うつもりである。

引用文献

- Saka K, Uemura K, Shintani-Ishida K, Yoshida K. Determination of amobarbital and phenobarbital in serum by gas chromatography-mass spectrometry with addition of formic acid to the solvent. *J Chromatogr B* 2008; 869: 9-15.
- Saka K, Uemura K, Shintani-Ishida K, Yoshida K. Acetic acid improves the sensitivity of theophylline analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2007; 846: 240-244.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

(雑誌論文)(計9件)

Yoshida K, Saka K, Shintani-Ishida K, Maeda H, Nakajima M, Hara S, Ueno M, Sasaki K, Iwase H, Sakamoto T. A case of fatal intoxication due to the new designer drug 25B-NBOMe. *Forensic Toxicol.* 2015 *in press.* 査読有
DOI: 10.1007/s11419-015-0276-7

Shintani-Ishida K, Saka K, Yamaguchi K, Hayashida M, Nagai H, Takemura G, Yoshida K. MDMA induces cardiac contractile dysfunction through autophagy upregulation and lysosome destabilization in rats. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842: 691-700. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.01.013

Nagai H, Saka K, Nakajima M, Maeda H, Kuroda R, Igarashi A, Tsujimura-Ito T, Nara A, Komori M, Yoshida K. Sudden death after sustained restraint following self-administration of the designer drug α -pyrrolidinovalerophenone. *Int J Cardiol.* 2014; 172 (1): 263-265. 査読有
DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.12.262

Kudo K, Usumoto Y, Usui K, Hayashida M, Kurisaki E, Saka K, Tsuji A, Ikeda N. Rapid and simultaneous extraction of acidic and basic drugs from human whole blood for reliable semi-quantitative NAGINATA drug screening by GC-MS. *Forensic Toxicol.* 2014; 32: 97-104. 査読有
DOI: 10.1007/s11419-013-0215-4

Saka K, Kudo K, Hayashida M, Kurisaki E, Niitsu H, Terada M, Yamaguchi K, Yoshida K. Relationship between the matrix effect and the physicochemical properties of analytes in gas chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2013; 405: 9879-9888. 査読有
DOI: 10.1007/s00216-013-7433-9

Hikiji W, Yamaguchi K, Saka K, Hayashida M, Ohno Y, Fukunaga T. Acute fatal poisoning with Tolfenpyrad. *J Forensic Leg Med.* 2013; 20: 962-964. 査読有
DOI: 10.1016/j.jflm.2013.08.012

Fujii Y, Funakoshi T, Uchida K, Watanabe M, Saka K, Uemura K. An autopsy case of acute carbon monoxide poisoning with fatal hypnotic drugs in the blood. *Int Med J.* 2013; 20(5): 587-588. 査読有
<http://connection.ebscohost.com/c/articles/92572638/autopsy-case-acute-carbon-monoxi>

de-poisoning-fatal-hypnotic-drugs-blood

Kuroda R, Nakajima M, Nagai H, Maeda H, Kashima J, Saka K, Shintani-Ishida K, Igarashi A, Yoshida K. Small focal coagulation necrosis in the myocardium of a young methamphetamine user. Int J Cardiol. 2013; 164: e5-e6 査読有
DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.09.145

Yamaguchi K, Hikiji W, Takino M, Saka K, Hayashida M, Fukunaga T, Ohno Y. Analysis of tolfenpyrad and its metabolites in plasma in a tolfenpyrad poisoning case. J Anal Toxicol. 2012; 36(7): 529-537. 査読有
DOI: 10.1093/jat/bks060

〔学会発表〕(計2件)

坂幹樹 他、危険ドラッグ 25B-NBOMe 中毒事例における血中濃度の経時測定、第99次日本法医学会学術全国集会、2015年6月12日、高知市文化プラザ かるぼーと(高知県高知市)

坂幹樹 他、MDMA 及びその活性代謝物(DHMA, DHA)のLC-MS/MS同時定量のための前処理法の検討、第82回日本法医学会学術関東地方会、2013年10月19日、はまぎんホールヴィアマーレ(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計1件)

坂幹樹 他、日本医事新報社、薬毒物情報インデックス、2014、716

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂 幹樹 (SAKA, Kanju)
東京大学・大学院医学系研究科・
技術専門職員
研究者番号：30447388

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

吉田 謙一 (YOSHIDA, Ken-ichi)
東京医科大学・医学科・教授
研究者番号：40166947

新谷 香(石田 香)

SHINTANI, Kaori (ISHIDA, Kaori)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・
准教授
研究者番号：50345047