

平成 30 年 6 月 30 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08890

研究課題名(和文)メタボロミクスを用いた向精神薬多剤併用による突然死の病態解析と法医診断への応用

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of sudden death related with polypharmacy by metabolomics analysis and it's application to forensic diagnosis

研究代表者

佐藤 貴子 (SATO, TAKAKO)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10530420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：向精神薬多剤併用による突然死の法医診断マーカーおよびメカニズムの解明を目的に、GC-MS/MSを用いたメタボロミクス解析法で、単剤投与および多剤併用動物モデルの血漿中の代謝物の変化を経時的に検討した。多剤併用モデルにおいて93種類の代謝物が検出され、特に投与12時間後において解糖系、TCA回路、脂質代謝といったエネルギー産生に関係した代謝物に特徴的な変動を認めた。

研究成果の概要(英文)：In order to determination of biomarkers and the mechanism of action in sudden death related administration of multiple psychotropic drugs, we investigated changes of metabolites in plasma of rats injected with single or various combinations of representative psychotropic drugs by GC-MS/MS based plasma metabolic profiling over time. In multiple drug combination models, 93 metabolites were detected. Each time group was separated from one another on the PCA and PLS score plots, especially in 12 hours, and characteristic metabolites changes correlated with the energy production (glycolysis, TCA cycle, and lipid metabolism, etc.) were detected.

研究分野：法医学

キーワード：向精神薬 多剤併用 メタボロミクス GC-MS/MS

1. 研究開始当初の背景

法医解剖事例では、向精神薬を複数併用中に突然死をきたしたものの、解剖所見に特異的なものがなく、その薬物血中濃度も致死的でなく、病理学的検査、生化学的検査、遺伝子検査などを施行しても、死因の判断に苦慮する事例にしばしば遭遇する。分子生物学的手法や病理学的手法を用いてさまざまな研究がなされているが、死後に診断を行うにあたっての有用なバイオマーカーは確立されていない。

近年、生体分子の網羅的解析技術(omics)の進展は著しく、特にメタボロミクスは、生体内で酵素タンパク質によって高分子が分解されて産生される糖やアミノ酸、有機酸、脂肪酸といった一次代謝産物を網羅的に分析及び解析する技術であり、生体内の情報を包括的かつ鋭敏にとらえることができるため、疾患バイオマーカー探索の有力な手段であるといわれており、各分野で利用が進められている。

2. 研究の目的

今回、向精神薬多剤併用に関連する突然死に着目し、薬物によって生じる生体内の代謝物の質的および量的異常が網羅的に捕捉できれば、死因診断に特異的なバイオマーカーとなる可能性があるばかりか、その突然死にいたる病態メカニズムを解明する糸口になると考えられる。本研究では、質量分析によるメタボロミクスの手法を用いて、向精神薬(抗精神病薬・抗うつ薬・睡眠薬)併用時の生体内の代謝物の変化を解析し、向精神薬に関連した突然死の法医診断に有用な新たなバイオマーカーの探索および突然死にいたる病態メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 単剤投与モデル

動物は、Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット(16週齢)を用いた。Chlorpromazine(CPZ;10mg/kg), Clomipramine(CPM;10mg/kg), Paroxetine(PAR;10mg/kg), Flunitrazepam(FLU;3mg/kg)を、SD系雄性ラット(16週齢)にそれぞれ腹腔内投与し、投与前、投与1, 3, 6, 12, 24, 48時間後に採血し、速やかに血清を分離した。クロロホルム-メタノール溶液(2:5, v/v)で抽出を行い、メトキシアミンとMSTFAで誘導体化を行った。質量分析計GCMS-TQ8030(トリプル四重極型、島津製作所製) Metabolite database(ver. 2.0)を用い、代謝物データはSIMCA-P+(Umetrics, ver.13) JMP Pro software(ver.13, SAS Institute Japan Ltd.)で多変量解析を行った。

(2) 多剤併用投与モデル

単剤投与モデルと同様に、SD系雄性ラット

(16週齢)を用いた。

多剤併用モデルとして以下の3群(n=6~8)を作成した。

- CPM(3mg/kg)+PAR(3mg/kg)+FLU(1mg/kg)
- CPZ(3mg/kg)+CPM(3mg/kg)+FLU(1mg/kg)
- CPZ(3mg/kg)+PAR(3mg/kg)+FLU(1mg/kg)

薬物投与および分析については、単剤投与モデルと同様に行い、代謝物データについては、Human Metabolome Technologies社に委託し統計解析を行った。

4. 研究成果

(1) 単剤投与モデル

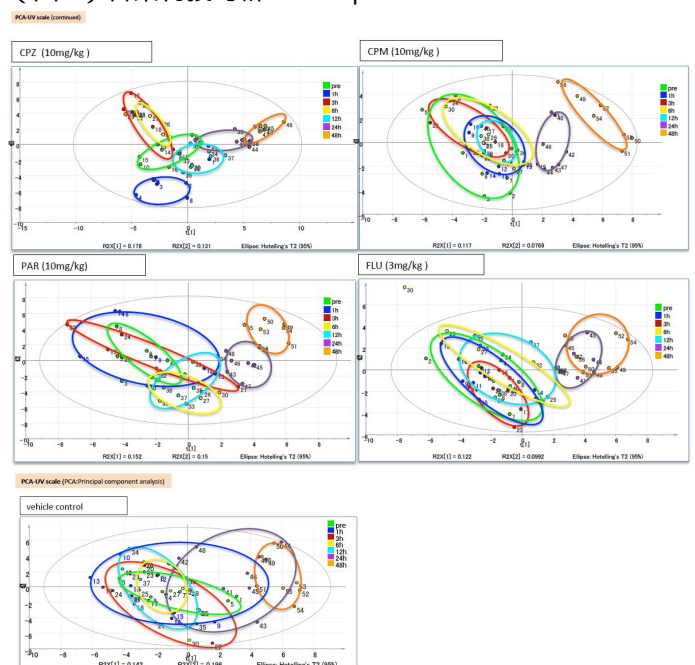
アミノ酸、糖類、脂肪酸、有機酸など合計93代謝物を同定した。

PCA(Principal component analysis)plotにおいて、薬物投与後経過時間にもなって、クラスターを形成し、それぞれの時間群で特徴的な代謝物の変化がみられることが示された。CPZ投与群においては、6時間群は3時間群に含まれていたが、その他は分離していた(図1)。

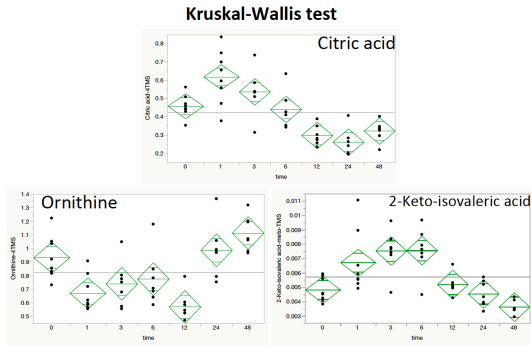
CPM、PAR、FLU投与群においては、24時間および48時間群がその他の群と比較的分離しており、その時点で代謝物の特徴的な変化が存在することが示唆された。

さらに、VIP(Variable importance in the projection) score>1.2, Kruskal-Wallis検定でp<0.05となる代謝物を検出したところ、CPZ、CPM、PAR、FLU投与群それぞれにおいて、28、21、32、23代謝物を認めた。それぞれに共通する代謝物はCitric acid, Ornithine, 2-keto-isovaleric acidであった。CPZ投与群における3代謝物の変化を別に示す(図2)。

(図1) 各薬物投与群のPCA plot



(図 2) CPZ 投与群



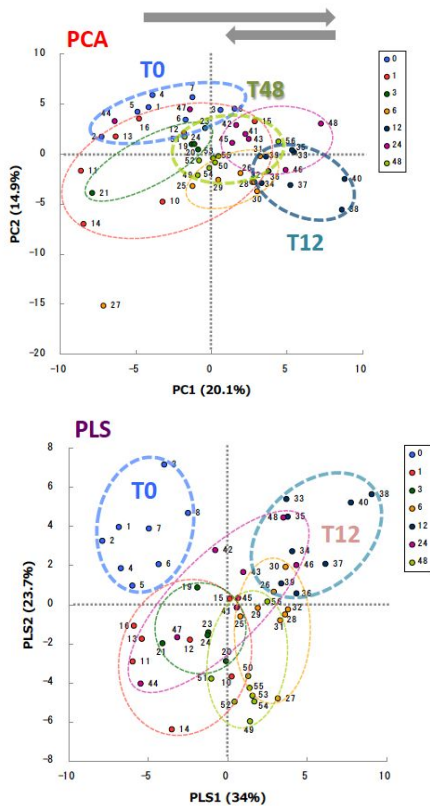
(2) 多剤併用投与モデル

アミノ酸、糖類、脂肪酸、有機酸など合計 93 代謝物を同定した。投与前、投与後 1,3,6,12,24,48 時間をそれぞれ T0, T1, T3, T6, T12, T24, T48 とした。

CPM+PAR+FLU 群

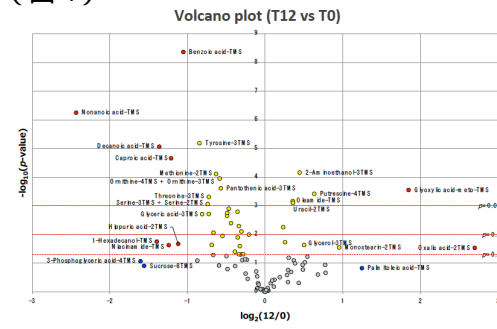
各時間群はクラスターを形成した。PCA および PLS(Partial Least Square regression) plot では、特に T0 と T12 は明確に分離しており、代謝物プロファイルに特徴的な差異が存在することが示唆された (図 3)。

(図 3)



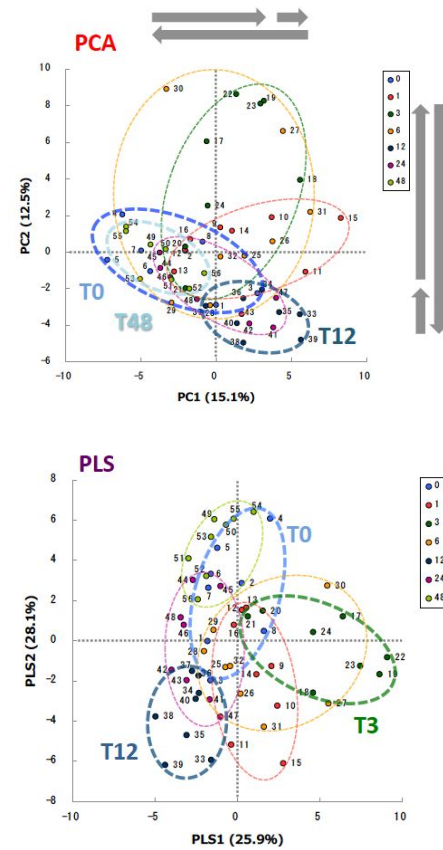
T0 および T12 群間で volcano plot を作成したところ、T12 において、各アミノ酸や脂肪酸の増減の傾向から、解糖系の阻害や脂質代謝の亢進が示唆された (図 4)。

(図 4)

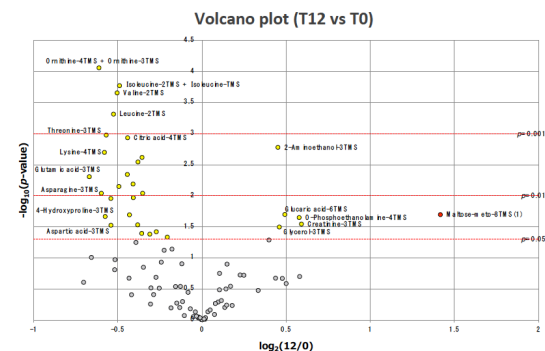


CPZ+CPM+FLU 群

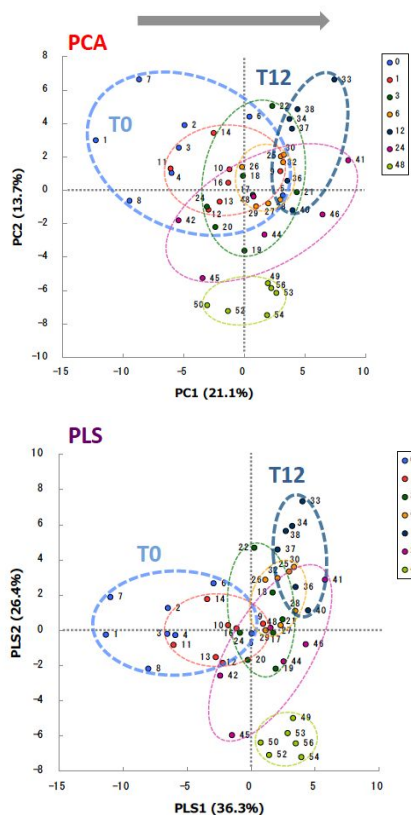
各時間群はクラスターを形成した。PCA および PLS plot では、特に T0 と T12 は比較的分離しており、代謝物プロファイルに特徴的な差異が存在することが示唆された (図 5)。



T0 および T12 群間で volcano plot を作成したところ、T12 において、TCA 回路を構成する成分やアミノ酸、脂肪酸の増減の傾向から、TCA 回路の阻害および脂質代謝の抑制が示唆された (図 6)。



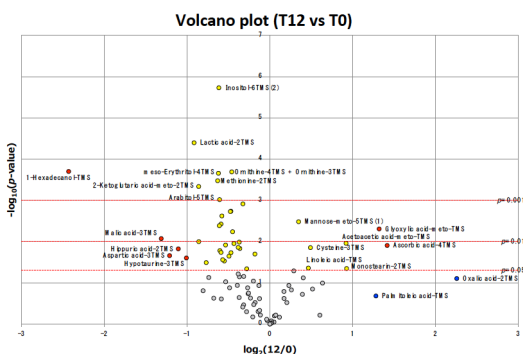
CPZ+PAR+FLU 群
各時間群はクラスターを形成した。PCA および PLS plot では、特に T0 と T12 は明確に分離しており、代謝物プロファイルに特徴的な差異が存在することが示唆された (図 7)。
(図 7)



T0 および T12 群間で volcano plot を作成したところ、T12 において、TCA 回路を構成する成分やアミノ酸、脂肪酸の増減の傾向から、TCA 回路の抑制および脂質代謝の亢進が示唆された (図 8)。

(図 8)

薬物血中濃度の分析も行っており、今後代謝



物変動との関連性についても検討を行う。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

佐藤貴子ら, 向精神薬多剤併用における

メタボロミクス解析にむけての基礎的検討, 第 101 次日本法医学会学術全国集会, 2017 年

Sato T. et. al. Analyses of plasma metabolomics after administration of psychotropic drugs in rats, 10th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2017

Sato T. et. al. Analyses of plasma metabolomics in combination use of psychotropic drugs in rats, 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine, 2018

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 貴子 (SATO Takako)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 1 0 5 3 0 4 2 0

(2) 研究分担者

財津 桂 (ZAITSU Kei)
名古屋大学・医学部・准教授
研究者番号: 3 0 7 0 0 5 4 6

土橋 均 (TSUCHIHASHI Hitoshi)
名古屋大学・医学系研究科・招聘教員
研究者番号: 4 0 5 9 6 0 2 9

鈴木 廣一 (SUZUKI Koichi)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号: 6 0 1 7 1 2 1 1