

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09279

研究課題名(和文)ホルマリン保存試料中の薬物分布・代謝物・分解物の予測・検索データベースの構築 -

研究課題名(英文) Construction and verification of a database library of drugs and metabolites detected in formalin tissues and fixatives utilizing in silico analysis

研究代表者

植草 協子 (UEKUSA, Kyoko)

日本医科大学・医学部・マネジメントサポート・スタッフ

研究者番号：50409215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ホルマリン臓器の薬物分析強化のためLC/Q-TOF分析・ソフト解析を行い、検出された薬物、代謝物、他の化合物のDatabase Library(DL)を構築した。ACD/Meta Senseで保存肝Q-TOFデータの代謝物を予測した。Personal Compound DL(PCDL)に推定登録した未同定化合物確認のため4種の予測代謝物の標準品を使用した。更新PCDL検証のため既存Q-TOFデータで代謝物を検索するとクエチアピンの予測代謝物3種が同定された。In silico 解析を介した代謝物のQ-TOFデータの更新によりホルマリン臓器の薬物、代謝物検索に有用なDL構築が可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト臓器中の法医薬毒物分析は解剖直後あるいは凍結保存した組織などで実施するのが通例であるが剖検時に薬物使用が疑われず、その後の捜査等で薬物の関与が判明し長期間経過後に薬物分析検査やその分析結果の解釈について意見を求められる場合がある。ホルマリン臓器中の薬物分析では臓器と保存液の保存期間や代謝物をも鑑みた分析が重要である。本研究ではQ-TOF分析・解析ソフトにより薬物と代謝物の検索を実施した。In silico 解析を活用し代謝物のQ-TOFデータの更新と抽出法改良によってホルマリン臓器中の薬物および代謝物の検索により有用なデータベースライブラリの構築が可能であり、法医実試料への適用を目指す。

研究成果の概要(英文)：To enhance the analysis of drugs in tissues following formalin fixation, using Q-TOF analysis software, we constructed a database library of drugs, metabolites, and other compounds detected in formalin-fixed liver and fixative. Existing Q-TOF data for fixed liver tissues from drug-positive cases were analyzed in silico to predict metabolites using ACD/Meta Sense software. Four predicted metabolites were newly used as standards for verification of unidentifiable compounds registered as estimations in Personal Compound Database Library(PCDL). Using updated PCDL, a drug and metabolite search was performed with the previous Q-TOF data. This search returned good library search scores. The predicted three types of quetiapine were identified from the product ion spectrum. This study demonstrated the feasibility of constructing a database library to search for drugs and metabolites in formalin-fixed tissues via in silico analysis incorporating updated Q-TOF data for metabolites.

研究分野：法医中毒学

キーワード：ホルマリン保存 代謝物解析 Q-TOF クエチアピン S酸化 酸素付加体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト臓器中の法医薬毒物分析は司法・行政解剖後すぐに、あるいは凍結保存した組織などで実施するのが通例である。しかしながら現在においても剖検時に薬物使用が疑われず、その後の捜査により薬物の関与が判明し、剖検から長期間経過した後に薬物分析検査が求められる場合やまたその分析結果の解釈について意見を求められる場合がある。この場合、分析対象はホルマリンで保存された状態の組織である場合が多く、薬物は分解・変性などホルマリンの作用を少なからず受けていると考えられる。このため、ホルマリン液と保存臓器における薬物の分析法の確立、ホルマリン保存臓器および保存液中の薬物分析の実施により、薬物レベルの動向ならびに薬物とその代謝物・分解物の予測・検索を実施し分析値の解釈を強化できるエビデンスが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、従前実施してきた GC-MS を用いたホルマリン保存臓器中の薬物分析において、種々の臓器・組織とその保存液における、複数の保存時期での代謝物や分解物を含めた分析が重要と考えた。このためホルマリン臓器中の薬毒物の代謝物ならびに分解物の予測と検索には、LC/Q-TOF 分析を実施し、GC-MS でホルマリン保存試料から検出し得なかった薬物ならび代謝物についても解析ソフトによる代謝物解析・予測を実施し、獲得したデータからデータベースライブラリを構築し、薬物および代謝物検索を実施して推定で登録している情報を確認・検証することを目的とした。本研究は日本医科大学倫理委員会の承認を得て実施した。

3. 研究の方法

(1) 材料と標準品の選択：薬物陽性例の肝を小片に分割し 15%ホルマリン液に個別に浸漬し分析時期 (1・3・6・13 か月後) まで室温保存した。保存液溜去しホモジナイズした肝を凍結保存したものを融解して抽出処理した。各分析時期の保存液も同様に処理した。薬物陰性例のホルマリン保存肝ホモジネートならびにホルマリン液にスクリーニングで検出された薬物の標準品を一定量添加し室温で 5 年保存したものを抽出した。

標準品：データベースライブラリ初回構築時および再構築時に使用
プロマゼパム、クロルプロマジン、フルニトラゼパム、フルボキサミン、レボメプロマジン、メタンフェタミン、ミルナシプラン、プロメタジン、クエチアピン、スルピリド
レボメプロマジン S 酸化物、クロルプロマジン S 酸化物
標準品：データベースライブラリ再構築時に使用
クエチアピン S 酸化物、クエチアピン N 酸化物、クエチアピン-7-水酸化物、クロルプロマジン-7-水酸化物

(2) 抽出・前処理の改良：肝ホモジネートおよび保存液に内部標準物質として d5-ジアゼパムを添加し、0.1M ホウ酸緩衝液 (pH9.0) と 1-クロロブタンにて液-液抽出したものと QuEChERS 法抽出後に Captiva ND Lipids を通過させたもの (1・6 か月後) を分析試料とした。標準品添加したのものについては後者の抽出のみ行った。

(3) 分析条件：装置は 6530 Q-TOF LC/MS system (Agilent)、Agilent 6546 LC/Q-TOF system (Agilent) Impact および ELUTE UHPLC (Bruker) カラムは ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent, 100 mm, 2.1 mm, 1.8 μm および 50mm, 4.6mm, 1.8 μm)、移動相は 5mM 酢酸アンモニウム (A) とメタノール (B) によるグラジエント [10% B-(30min)-100% B および 10% B-(20min)-100% B] で溶出、Q-TOF 測定した。

(4) データベース作成：Personal Compound Database Library (PCDL) 上に標準品添加の肝ホモジネートの Q-TOF 分析により検出された薬物および推定される代謝物の精密質量、検出された化合物の保持時間のデータベースとプロダクトイオンスペクトルライブラリを初回構築し、各ホルマリン保存試料中のこれら化合物の有無を検索した。

(5) ACD/MetaSense (ACD/Labs) による解析を実施し、代謝マップが自動描出され、代謝物の候補として列挙された予測化合物の中から代謝物選択 (標準品) を行った。同様に抽出、LC/Q-TOF 測定し、データベースライブラリを再構築し、推定で登録している情報を確認・検証した。

(6) 保存肝ホモジネートと保存液における化合物の回収率およびマトリクス効果について算出した。

4. 研究成果

(1) Q-TOF データ分析で液-液抽出の保存液で 13 か月までクエチアピン(QTP)、クロルプロマジン(CLP)、クロルプロマジン S 酸化物とレボメプロマジン S 酸化物が検出された。QuEChERS 法抽出の肝と保存液ではスルピリドと QTP が検出され、さらに精密質量より QTP 酸素付加体と考えられるピークが 2 本確認された。CLP とレボメプロマジン(LVP)についても、それぞれの酸素付加体と組成式が同一で保持時間(RT)の異なるピークが 2 本検出され、RT の速いピークが S 酸化物の標準品と RT が一致したため他方は水酸化物と考えられた。QTP 酸素付加体については S 酸化物あるいは水酸化物のいずれかであると考えられた。室温で 5 年保存した標準薬物のホルマリン液中からも QTP、LVP とその S 酸化物が検出された。

(2) Q-TOF データの一部を代謝物解析ソフト ACD/MetaSense で解析したところ、予測された QTP 芳香環の水酸化物や酸化物が代謝物の候補として挙げられ代謝マップが自動描出された(図 1)。標準品の代謝物選択に際し ACD/MetaSense による解析結果を使用することができた(3. (1)(5)および表 1)。これによりホルマリン臓器中の薬物と代謝物の分析では、Q-TOF 分析と代謝物解析ソフトの併用が代謝物の検索の進展に有用と考えられた。

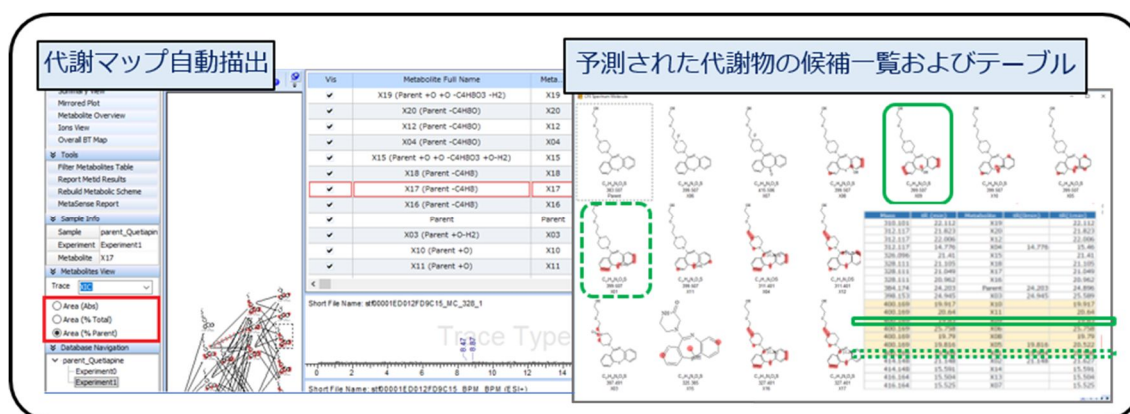


図 1 ACD/MetaSense での肝保存液 Q-TOF データの代謝物解析例

(3) 標準品 および を添加したホルマリン保存肝ホモジネートの LC/Q-TOF 測定データにより PCDL 上に再構築データベースライブラリにて初回作成時の LC/Q-TOF データから薬物および代謝物を検索した。

表 1 PCDL 上に登録した検出化合物のリスト(抜粋)

Name	Formula	Mass(M)	Rt(min)	Peak No.	Rt(min)	Mass(M+H)	Mass Accuracy	
							Relative Mass Error (ppm)	Score
Sulpiride	C15H23N3O4S	341.1409	6.72	1	9.18	342.1485	0.87	99
Methamphetamine	C10H15N	149.1205	8.78	2	11.28	150.1278	0.76	100
Milnacipran	C15H22N2O	246.1732	15.33	3	17.59	247.1806	0.68	100
Levomepromazine-S-oxide	C19H24N2O2S	344.1559	16.95	4	19.07	345.1634	0.93	96
Chlorpromazine-S-oxide	C17H19ClN2OS	334.0907	17.75	5	19.79	355.0981	0.17	100
Bromazepam	C14H10BrN3O	315.0007	18.08	6	20.53	316.0082	0.47	100
est 7-Hydroxy-quetiapine	C21H25N3O3S	399.1617	19.85	7	21.53	400.1692	0.52	96
est Quetiapine-S-oxide	C21H25N3O3S	399.1612	18.57	9	22.06	400.1692	0.57	100
est Quetiapine-N-oxide	C21H25N3O3S	399.1612	18.57	10	22.82	400.1694	1.09	96
est 7-Hydroxy-chlorpromazine	C17H19ClN2OS	334.0907	25.91	11	23.10	335.0982	0.17	100
Fluvoxamine	C15H21F3N2O2	318.1555	21.75	12	23.56	319.1630	0.65	100
Promethazine	C17H20N2S	284.1347	24.12	13	26.02	285.1422	0.55	100
Quetiapine	C21H25N3O2S	383.1668	24.22	14	26.28	384.1744	0.81	96
Levomepromazine (methotrimeprazone)	C19H24N2OS	328.1609	24.59	15	26.43	329.1685	0.74	96
Chlorpromazine	C17H19ClN2S	318.0958	25.89	16	27.61	319.1032	0.14	100

左: 初回作成時 薬物陽性例のホルマリン保存肝と保存液
 右: 再構築時 薬物陰性例のホルマリン保存肝ホモジネートに標準品を添加したもの

(4) 使用装置の違いによりプロダクトイオンスペクトルが若干異なるもののライブラリ検索スコアはいずれも 97.8%以上であった(図 2)。

予測された代謝物のうちプロダクトイオンスペクトルによりクエチアピン代謝物 3 種は同定可能であった。クロルプロマジン-7-水酸化物については標準品とは異なるプロダクトイオンスペクトルパターンを示した。

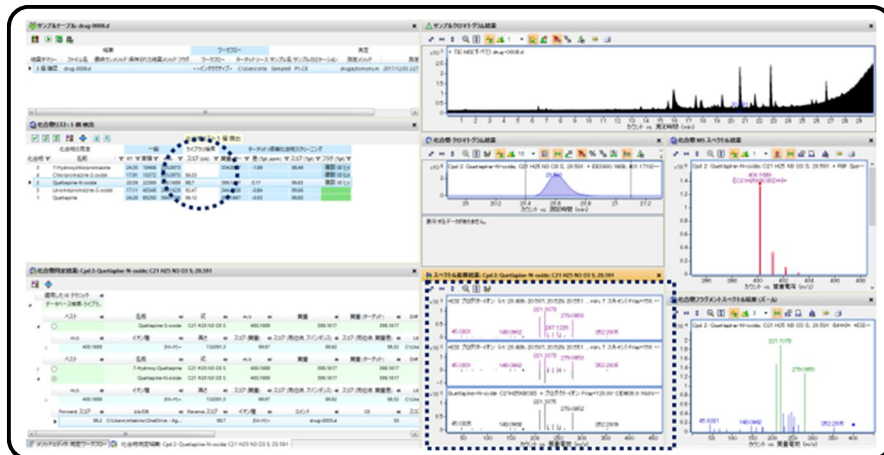


図 2 再構築 PCDL での予測代謝物の検索 (スコアとスペクトル差異)

(5) 回収率は親化合物より代謝物で高値を示した(表 2)。マトリクス効果は保存液中の親化合物で低く、イオン阻害によるものと考えられた。

表 2 回収率とマトリクス効果

Compound Name	Recovery(%)				Matrix effect(%)			
	Liver homogenate		Fixatives		Liver homogenate		Fixatives	
Amount spiked (μg)	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1
Sulpride	75	60	48	66	69	65	48	48
Methamphetamine	65	53	59	62	77	66	91	80
Milnacipran	82	66	62	74	92	83	98	79
Quetiapine	83	73	64	82	99	92	101	80
Bromazepam	66	63	40	82	99	78	102	76
Promethazine	74	44	61	46	97	83	92	79
Levomepromazine	78	52	63	72	98	93	101	83
Fluvoxamine	79	59	59	42	86	71	97	77
Chlorpromazine	71	44	52	40	93	89	101	84
7-Hydroxyquetiapine	89	26	74	84	86	86	95	83
Quetiapine-S-oxide	90	27	76	79	82	76	94	79
Chlorpromazine-S-oxide	78	22	76	64	86	106	101	114
Levomepromazine-S-oxide	84	20	76	70	88	94	98	97
Quetiapine-N-oxide	85	28	70	79	85	85	97	86
7-Hydroxychlorpromazine	80	18	72	71	86	92	98	97

今後 *in silico* 解析を活用した代謝物の Q-TOF データの更新と抽出法改良によりホルマリン臓器中の薬物および代謝物の検索に有用なデータベースライブラリの構築が可能であり、本研究成果は、法医実試料への適用を強化するものといえる。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Namera Akira, Uekusa Kyoko, Saito Takeshi, Yoshimoto Kanji, Ishiuchi Naoki, Murata Kazuhiro, Nagao Masataka	4. 巻 59
2. 論文標題 A method for determining valproic acid in human whole blood and urine via gas chromatography-mass spectrometry and small-scale inter-laboratory trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102133 ~ 102133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2022.102133	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 MINAGAWA YUKI, ISHINO KOUSUKE, WADA RYUICHI, KUDO MITSUHIRO, NAITO ZENYA, TAKESHITA TOSHIYUKI, OHASHI RYUJI	4. 巻 40
2. 論文標題 High Expression of p21 as a Potential Therapeutic Target in Ovarian Clear-cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5631 ~ 5639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14576	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 Totsuka Y, Lin Y, He Y, Ishino K, Sato H, Kato M, Nagai M, Elzawahry A, Totoki Y, Nakamura H, Hosoda F, Shibata T, Matsuda T, Matsushima Y, Song G, Meng F, Li D, Liu J, Qiao Y, Wei W, Inoue M, Kikuchi S, Nakagama H, Shan B	4. 巻 32
2. 論文標題 DNA Adductome Analysis Identifies N-Nitrosopiperidine Involved in the Etiology of Esophageal Cancer in Cixian, China	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 1515 ~ 1527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.chemrestox.9b00017	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 該当する
1. 著者名 Ishino K, Kudo M, Peng WX, Kure S, Kawahara K, Teduka K, Kawamoto Y, Kitamura T, Fujii T, Yamamoto T, Wada R, Naito Z	4. 巻 501
2. 論文標題 2-Deoxy-D-glucose increases GFAT1 phosphorylation resulting in endoplasmic reticulum-related apoptosis via disruption of protein N-glycosylation in pancreatic cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 668-673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.05.041	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 Kondo R, Ishino K, Wada R, Takata H, Peng WX, Kudo M, Kure S, Kaneya Y, Taniai N, Yoshida H, Naito Z	4. 巻 54
2. 論文標題 Downregulation of protein disulfide-isomerase A3 expression inhibits cell proliferation and induces apoptosis through STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1409-1421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2019.4710	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 Arai Hiroki, Wada Ryuichi, Ishino Kousuke, Kudo Mitsuhiro, Uchida Eiji, Naito Zenya	4. 巻 52
2. 論文標題 Expression of DNA damage response proteins in gastric cancer: Comprehensive protein profiling and histological analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 978-988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4238	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14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kousuke Ishino, Mitsuhiro Kudo, Akira Matsushita, Hiroshi Yoshida, Ryuji Ohashi
2. 発表標題 Metabolic disorder by 2-deoxyglucose induces endoplasmic reticulum stress-related apoptosis in pancreatic cancer cells
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kyoko UEKUSA, Masahiko TAKINO, Kousuke ISHINO, Yoshimasa KANAWAKU
2. 発表標題 Verification of a database library of drugs and metabolites detected in formalin tissues and fixatives constructed utilizing in silico analysis
3. 学会等名 100. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (第100次ドイツ法医学会) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石野孔祐、工藤光洋、大橋隆治
2. 発表標題 肝癌細胞株において2-デオキシ-D-グルコースはヘキサミン合成経路を介して小胞体ストレス関連細胞死を誘発する
3. 学会等名 第89回日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植草協子、滝埜昌彦、石野孔祐、金涌佳雅
2. 発表標題 In silico 解析を活用し構築したホルマリン臓器中の薬物および代謝物のデータベースライブラリの検証
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 植草協子、石野孔祐、内藤善哉、金涌佳雅
2. 発表標題 In silico 解析を活用したホルマリン臓器中の薬物および代謝物のデータベース検索
3. 学会等名 第 87 回日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植草協子、滝埜昌彦、中園裕紀子、石野孔祐、林田真喜子、大野曜吉
2. 発表標題 QTOF解析ソフトを用いたホルマリン臓器中の薬物および代謝物の検索
3. 学会等名 第87回 日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takino M, Hayashida M, Uekusa K, Abe H, Ohno Y
2. 発表標題 Comprehensive screening of Aconitum alkaloids in Aconitum plants by high resolution LC-QTOF Mass Spectrometry
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石野孔祐、工藤光洋、彭為霞、吳壯香、和田龍一、内藤善哉
2. 発表標題 肝癌細胞株において2-デオキシ-D-グルコースはGFAT1リン酸化を介して小胞体ストレス関連細胞死を誘発する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石野孔祐、前迫侑也、内藤善哉、戸塚ゆ加里
2. 発表標題 質量分析データに基づくDNA付加体データベースの整備
3. 学会等名 日本環境変異原学会 第47回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林田眞喜子、滝埜昌彦、安部寛子、植草協子、大野曜吉
2. 発表標題 トリカブト植物体のQTOF分析
3. 学会等名 第101次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奈女良昭、植草協子、林田眞喜子、斎藤剛、村田和大、大野曜吉、長尾正崇
2. 発表標題 バルブロ酸の簡易GC/MS分析法の開発と施設間誤差の検討
3. 学会等名 第101次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林田眞喜子、植草協子、大野曜吉、小原 浩
2. 発表標題 ネット通販より購入したトリカブト塊根によるアコニチン中毒症例
3. 学会等名 日本法中毒学会第36年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石野孔祐、工藤光洋、彭為霞、呉壮香、河本陽子、手塚潔、藤井雄文、恩田宗彦、和田龍一、内藤善哉
2. 発表標題 液状検体で利用可能な新規膵がん腫瘍マーカーのタンパク質網羅的探索
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kousuke Ishino, Mitsuhiro Kudo, Akira Matsushita, Hiroshi Yoshida, Ryuji Ohashi
2. 発表標題 Metabolic disorder by 2-deoxyglucose induces endoplasmic reticulum stress-related apoptosis in pancreatic cancer cells
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

- 1) Rechtsmedizin 31,381-382,2021年,https://doi.org/10.1007/s00194-021-00521-5
2) 日本法医学雑誌 73(2),151-151,2019年.

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	石野 孔祐 (ISHINO Kousuke) (60584878)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	

	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
研究協力者	滝埜 昌彦 (TAKINO Masahiko)		
連携研究者	林田 眞喜子 (HAYASHIDA Makiko) (60164977)	日本医科大学・大学院医学研究科・特別研究生 (32666)	2017-2018

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