

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10679

研究課題名(和文) in silico予測を用いたノンターゲット薬毒物スクリーニングの構築

研究課題名(英文) Development of a non-target drug screening system using in silico prediction

研究代表者

坂 幹樹 (SAKA, Kanju)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、in silico予測とLC-QTOF-MSを用いたノンターゲット薬毒物スクリーニングの構築に取り組み、次の成果が得られた。

1)バックグラウンドノイズが大きい血液サンプルのデータ解析を簡潔にするため、精密質量と予測保持時間とともに一致するピークのみを拾い上げる2次元一括検索の方法を構築した。2)巨大データベース(約98,000,000化合物)での検索は、候補薬物を絞り込むのを困難にしたため、法医学用の薬毒物データベースを作成し、より実践的な検索を可能にした。3)保持時間予測の方法を検討し、精度を上げるには、類似度の高い化合物群で予測方程式を作ることが重要であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、法医学ではGC-MSやLC-MS/MSを用いたターゲット薬毒物スクリーニングが一般化しつつあるが、保持時間やフラグメント情報がない新規薬物に対応することができない。このような状況から、ノンターゲット薬毒物スクリーニングへの要求は世界的に高まっている。我々の研究では、LC-QTOF-MSで得られた精密質量情報に加え、精度の高い保持時間予測、フラグメント予測といったin silicoを活用することにより、化学構造式という必要最低限の情報のみで、ノンターゲットスクリーニングを可能にした。さらに、我々独自のデータベースによって、新規薬毒物の迅速な登録及び実践での活用を可能にした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to build a non-target drug screening system using LC-QTOF-MS and in silico prediction, and achieved the following.

1) To simplify data analysis of blood samples with large background noise, we developed a two-dimensional search method that picks up only peaks that match both accurate mass and predicted retention time. 2) Because searching through a huge database (approximately 98 million compounds) made it difficult to narrow down candidate drugs, a drug database for forensic toxicology was created to enable more practical searches. 3) We investigated a method for retention time prediction and found that it is important to create prediction equations with a group of highly similar compounds to improve accuracy.

研究分野：法中毒学

キーワード：ノンターゲット薬物スクリーニング in silico 薬毒物データベース 保持時間予測 LC-QTOF-MS

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

法医薬毒物検査においては、近年、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS)、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた薬毒物スクリーニング検査が発展してきた (Kudo K, Saka K et al. *Forensic Toxicol.* 2014;32:97-104)。これらの検査は、数十~数百種の重要な薬毒物を選定し、それらにターゲットを絞って検出する“ターゲットスクリーニング”である。しかし、新規薬毒物や代謝物など標準品が入手困難である場合は対応することができない。また、スクリーニング検査は迅速・簡便であることが求められており、たとえ標準品が入手または合成できたとしても、今後、ターゲットとする薬毒物を永久に増やし続けるのは現実的ではない。今後の法医薬毒物スクリーニングの戦略としては、最重要な薬毒物を確実に同定する“ターゲットスクリーニング”と、それでは見逃してしまう未知の薬毒物を検出可能な“ノンターゲットスクリーニング”で構成されることが望ましいと思われる。薬毒物の関与が強く疑われる症例において、ターゲットスクリーニングで死因に寄与するような薬毒物が検出されない場合、ノンターゲットスクリーニングは極めて重要な手段となる。そこで、標準品がない薬毒物も検出可能な“*in silico* ノンターゲット薬毒物スクリーニング”の構築を検討するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、標準品が入手できない、かつ保持時間やフラグメント情報も得られない薬毒物にも対応できる“ノンターゲット薬毒物スクリーニング”の構築である。それを達成するために、  
(1) 高精度な保持時間予測法の確立  
(2) 新規の薬毒物を迅速に追加できる薬毒物データベースの作成  
(3) LC-MS 測定で得られた膨大な数のピークから効率的に薬毒物だけを抽出する解析法の確立  
この3つの課題を中心に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

装置：液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計 (LC-QTOF-MS、島津製作所 LCMS-9030)  
カラム：Kinetex XB-C18 (100 mm x 2.1 mm; 2.6  $\mu$ m)、40°C、0.3 mL/min  
移動相：10 mM ギ酸アンモニウム 0.1%ギ酸水溶液 (A)、10 mM ギ酸アンモニウム 0.1%ギ酸メタノール溶液 (B)、5-95% B (0-7.5 min)、95% B (7.5-10 min)、5% B (10.01-15 min)  
測定条件：Data dependent acquisition mode、Collision energy: 10-60 V、*m/z* 100-1000  
保持時間予測ソフトウェア：ACD/ChromGenius  
データベース作成ソフトウェア：ACD/Spectrus DB  
データ解析ソフトウェア：ACD/MS Structure ID Suite

#### (1) 保持時間予測

1,290 化合物の標準品を用いて保持時間を測定し、そのデータと化学構造式を ACD/ChromGenius に入力した。

化合物の物理化学的性質を表す descriptor は、log P、log D、polar surface area、molecule volume、molecule weight、molar refractivity、number of hydrogen bond donors、number of hydrogen bond acceptors の 8 種類を使用し、構造式より計算した。

予測対象薬毒物ごとに類似度上位の化合物群を構成し、予測モデルを作成した。

予測値と実測値が最も相関するように各パラメータの設定を検討した。

予測モデル構築後、予測保持時間のずれがどの程度かを検証した。

#### (2) 薬毒物データベースの作成

法医学で重要と考えられる薬毒物 (現在約 2,000 化合物) の構造式、化合物名、化学式、モノアイソトピック質量、予測 (または実測) 保持時間を ACD/Spectrus DB に入力し、データベースを作成した。これを薬毒物データベース (Drug DB) とする。

約 98,000,000 化合物を収容する ChemSpider+PubChem データベース (CS-PC DB、購入品) と Drug DB を用いて 7 種の薬物 (25B-NBOMe、25C-NBOMe、3-MeO-PCP、pentylone、-PHP、PV8、-PVP) のピークに対する検索を精密質量 (許容幅 0.01 Da) のみで行い、この結果から 2 つのデータベースの有用性を比較検討した。

#### (3) 解析法確立のための薬毒物添加実験

血液 0.5 mL に 7 種の薬物 (25B-NBOMe、25C-NBOMe、3-MeO-PCP、pentylone、-PHP、PV8、-PVP) をそれぞれ 10 ng ずつ添加し、QuEChERS 法で抽出後に LC-QTOF-MS で測定した。

質量数、保持時間が一致するピークをデータベースから検索した。

ノイズを減らし、かつ該当薬物を除かないフィルター条件を検討した。

フラグメント解析により、候補となる薬毒物をさらに絞り込めるか検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 保持時間予測

予測保持時間と実測保持時間の相関は図1に示すように、決定係数は、 $R^2 = 0.8719$ となった。ここで用いている予測モデルの作成は、quantitative structure-retention relationship(QSRR)と呼ばれ、ノンターゲットスクリーニングのように広範囲の化合物を対象とした場合、予測精度を高くするのが難しい。そこで、この研究の予測モデルは、実測値を持つ1,290化合物から予測対象薬毒物と類似構造をもつ化合物を類似度検索で抽出してからモデルを作るという方法を採用した。これにより、広範囲にわたる薬毒物の保持時間を高い精度で予測できた。1,290化合物のうち予測値の偏差が $\pm 1$ 分以内の化合物は90.0%、 $\pm 0.5$ 分以内の化合物は65.9%だった。予測精度は、単純に実測値データを増やすだけでは精度向上が乏しく、広範囲の物性データを揃えることが重要である。これにより広範囲の薬毒物に対応できるようになった。今後は現在所有していない物性を持つ化合物データを収集することにより、さらなる精度向上が期待できる。

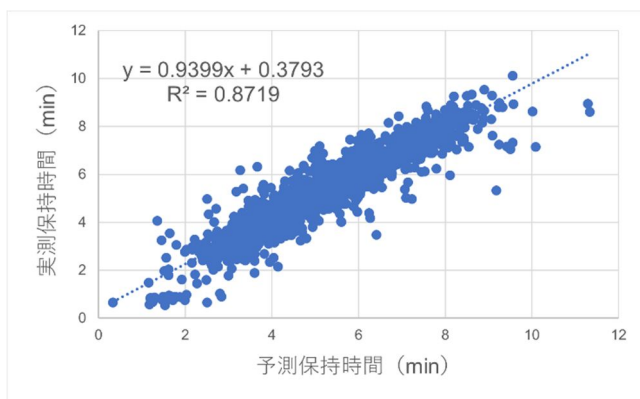


図1 予測保持時間 vs 実測保持時間

表1 データベースによる検索ヒット数の違い

Drug	CS-PC DB	Drug DB
Pentylone	35,219	1
$\alpha$ -PVP	20,253	4
$\alpha$ -PHP	14,825	2
3-MeO-PCP	12,506	4
PV8	16,510	3
25C-NBOMe	31,944	2
25B-NBOMe	17,751	1

### (2) データベースの比較

7種の薬物に対応するピークの精密質量をCS-PC DBとDrug DBで検索したところ表1に示すヒット数が得られた。CS-PC DBは、ほとんどの化合物を網羅しているという利点はあるものの、表1にあるように数万件ヒットしてしまうと、これを絞り込むためには膨大な時間と労力を必要とする。一方、Drug DBのヒット数は理想的であり、今後、データベースを拡張する予定ではあるが、この数倍ヒットしても実践的に活用できるレベルと考えられる。これらの結果から、薬毒物以外の化合物は最初からヒットしないDrug DBの方が実用的であることが分かった。さらに、Drug DBは化学構造式の情報のみで、新規薬毒物や代謝物などを迅速に追加できるメリットもある。

### (3) 血中薬毒物の解析法

7種薬物を添加した血液を抽出・測定し、抽出イオンクロマトグラム表示したものが図2aであり、18,006のピークが観測された。そこで、Drug DBを用いてモノアイソトピック質量と保持時間が同時に一致するものを検索すると図2bの結果となり、薬毒物候補となるピークを大幅に減らすことに成功した。その10個のピークそれぞれに対して、どのような薬毒物が候補となったかを示したのが表2であり、添加した薬物は全て検出できた。これから、1つのピークに対して複数の薬毒物が候補となることも珍しくはないことがわかる。この時のフィルター条件としては、ピーク高さ100,000以下をカットする設定とした。他のフィルターとしては、Formula Fit Quality index、12C/13C同位体比、シグナルノイズ比、質量誤差などが挙げられるが、今後の検討事項となった。

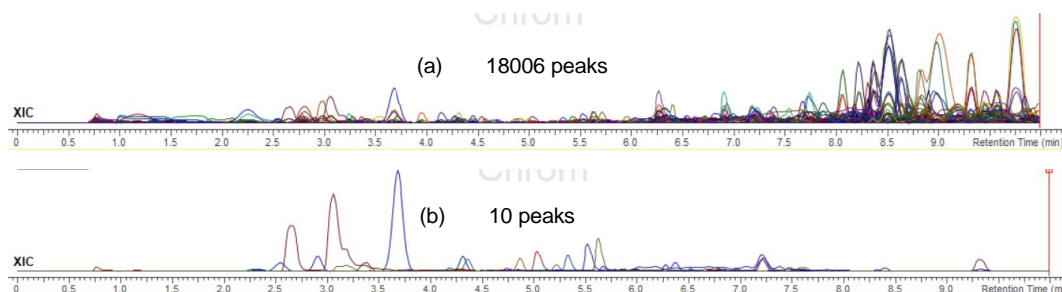


図2 血液抽出物の抽出イオンクロマトグラム、Drug DBで検索前(a)、検索後(b)

表 2 Drug DB においてモノアイソトピック質量と保持時間がどちらも一致した薬毒物  
 (添加した薬物を赤丸で示した)

No.	Peak Top Mass	tR (min) $\Delta$	Height (counts)	Color	Label
1	181.0743	3.057	828090	Red	Theophylline
2	180.0657	3.374	112483	Red	Cyclamic acid
3	195.0900	3.681	1256951	Blue	Caffeine
4	236.1285	4.313	186996	Blue	Pentylone
5	232.1698	4.356	157909	Green	MPBP, alpha-PVP
6	246.1856	4.860	161653	Olive	Dezocine, alpha-PHP
7	274.2170	5.038	236684	Red	2-MeO-PCP, 3-MeO-PCP, 4-MeO-PCP
8	260.2012	5.322	194880	Blue	MPHP, PVB
9	336.1367	5.521	326313	Blue	25C-NBOMe
10	380.0862	5.631	392045	Olive	25B-NBOMe

フラグメント解析はピークごとに実行する必要がある(このケースでは 10 回) それぞれ候補となった薬毒物の予測フラグメントとの一致度を ACD/MS Structure ID Suite を用いて計算した。しかし、一致度が低いからといって必ずしも除外できるとは限らなかった。フラグメント解析による絞り込みはある程度可能であったが、最終的な決定は、候補薬物を可能な限り絞り込み、その標準品を購入または合成して照らし合わせる必要があると考えられた。

本研究において、血液のようなバックグラウンドノイズの多いサンプルにおいても、精密質量と保持時間による 2 次元一括検索により、簡潔に薬毒物のピークを拾い上げることが可能となった。この方法は、法医薬毒物分析において、実践的なノンターゲットスクリーニング法であると言える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saka Kanju, Kudo Keiko, Namera Akira, Fujii Yusuke, Noritake Kanako, Torimitsu Suguru, Makino Yohsuke, Iwase Hirotarō	4. 巻 62
2. 論文標題 Simple and simultaneous quantification of cyanide, ethanol, and 1-propanol in blood by headspace GC-MS/NPD with Deans switch dual detector system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science & Justice	6. 最初と最後の頁 193 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scijus.2022.02.001	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 Kudo Keiko, Saka Kanju, Waters Brian, Hara Kenji, Matsusue Aya, Kashiwagi Masayuki, Kubo Shin-ichi	4. 巻 39
2. 論文標題 Effects of putrefaction on the quantitative analyses of diphenhydramine in blood and tissues: model experiments by the routine matrix-matched calibration method and standard addition method with different internal standards	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 437 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11419-021-00580-z	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 Nagasawa Sayaka, Yamaguchi Rutsuko, Saka Kanju, Torimitsu Suguru, Chiba Fumiko, Yajima Daisuke, Inokuchi Go, Motomura Ayumi, Kira Kei, Yamagishi Yoshikazu, Ogra Yasumitsu, Iwase Hirotarō	4. 巻 40
2. 論文標題 Ropinirole involved in a fatal case: blood and urinary concentrations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 173 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11419-021-00593-8	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 Nagasawa Sayaka, Saka Kanju, Yamagishi Yoshikazu, Yajima Daisuke, Chiba Fumiko, Yamaguchi Rutsuko, Torimitsu Suguru, Iwase Hirotarō	4. 巻 48
2. 論文標題 Association between sexual activity-related death and non-prescription use of phosphodiesterase type 5 inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2020.101815	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 工藤恵子、坂幹樹、久保真一	4. 巻 26
2. 論文標題 法医剖検診断のための質量分析計 (MS) を用いた薬毒物スクリーニングと定量検査 - 現在の流れと今後の方向性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 法医病理	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nara Akina, Yamada Chiho, Saka Kanju, Kodama Takanori, Yoshida Masaki, Iwahara Kaori, Takagi Tetsuya	4. 巻 64
2. 論文標題 A Fatal Case of Poisoning with Fentanyl Transdermal Patches in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Forensic Sciences	6. 最初と最後の頁 1936~1942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1556-4029.14127	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 Torimitsu Suguru, Makino Yohsuke, Saka Kanju, Fujii Yusuke, Abe Hiroko, Chiba Fumiko, Yamaguchi Rutsuko, Iwase Hirotarō	4. 巻 64
2. 論文標題 Olanzapine Induced Fatal Ketoacidosis with Pneumomediastinum and Subcutaneous Emphysema	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Forensic Sciences	6. 最初と最後の頁 930~933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1556-4029.13942	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4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 坂 幹樹
2. 発表標題 LC-QTOF-MS + in silico 予測を用いた血中薬毒物ノンターゲットスクリーニング法の構築
3. 学会等名 薬毒物分析Webinar ~薬毒物分析に悩めるあなたへ~ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂幹樹
2. 発表標題 状況に応じた定量分析-レボメプロマジン-
3. 学会等名 第10回法医中毒研究会セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saka K, Nakazono Y, Kudo K, Imoto E, Iida T, Minohata T, Furuta K, Fujii Y, Makino Y, Iwase H
2. 発表標題 Development of a non-target drug screening system in blood using LC-QTOF-MS with in silico approaches
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂幹樹, 工藤恵子, 奈女良昭, 太田瀬亮, 滝埜昌彦, 藤井祐介, 榎野陽介, 岩瀬博太郎
2. 発表標題 検出器スイッチングを用いたシアン化物、アルコール類、その他の揮発性化合物のヘッドスペースGCによる一斉分析
3. 学会等名 日本法中毒学会第38年会
4. 発表年 2019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
研究協力者	岩瀬 博太郎  (IWASE Hirotaro)		

6. 研究組織（つづき）

	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	藤井 祐介  (FUJII Yusuke)		

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