

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：26301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16957

研究課題名(和文) アスピリンの副作用を回避する新たな取り組み - ゲンチジン酸の比色定量法の開発 -

研究課題名(英文) New Attempt to Avoid the Side Effects of Aspirin: Development of the Colorimetric Method for Detection of the Gentisic Acid

研究代表者

徳原 康哲 (TOKUHARA, YASUNORI)

愛媛県立医療技術大学・保健科学部・講師

研究者番号：60746329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：抗血小板剤や解熱鎮痛剤として広く処方されているアスピリン(アセチルサリチル酸)の代謝産物を正確に測定する臨床検査法は確立されていない。そのため、本研究では、アスピリンの代謝産物の一つであるゲンチジン酸(GA)に着目し、酸化剤である次亜塩素酸ナトリウム五水和物結晶(結晶次亜塩素酸ソーダ)を用いたGAの発色法を原理とする新たな比色定量法を考案した。その結果、結晶次亜塩素酸ソーダおよび水酸化ナトリウム水溶液をGA水溶液に添加すると、GA水溶液は褐色に変化し、500 nm付近にピークをもつ吸収曲線を示すことが明らかとなった。さらに、質量分析法や分光法によりGAの発色反応の詳細を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、GAの発色法を利用した比色定量法を開発し、GA濃度とアスピリンの副作用との関係を明らかにすることである。

血栓予防や消炎鎮痛のため、長期的にアスピリンを服用している患者は多い。しかし、アスピリンの体内動態を正確に測定する臨床検査法が確立されていないため、現状では、出血や肝・腎機能低下などの副作用が生じた後にアスピリンの投与量が調整されている。本研究により、アスピリンの代謝産物であるGAの濃度と肝機能や出血傾向との関連性が示されれば、副作用が起こる前にGA濃度を測定することでアスピリンの投与量を調整できる。

研究成果の概要(英文)：Aspirin (acetylsalicylic acid, ASA) is widely used as an anticoagulant or to control pain, inflammation, and fever. However, clinical examination methods to measure the metabolites of ASA precisely have not been established. Therefore, we developed a novel detection method of Gentisic acid (GA), one of the metabolites of ASA, using a spectrophotometer. In the present study, we observed changes in the absorption spectra of GA following the addition of sodium hydroxide (NaOH) with sodium hypochlorite pentahydrate (NaOCl · 5H₂O). The results obtained indicated that GA solution had a unique absorption spectrum with a peak at approximately 500 nm through an oxidation reaction following the addition of NaOH with NaOCl · 5H₂O. We also measured absorbance values at 500 nm to investigate the detection range of GA and examined color changes in GA solution using liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (LC/TOF-MS).

研究分野：内科学一般関連

キーワード：アスピリン ゲンチジン酸 次亜塩素酸ナトリウム五水和物結晶 結晶次亜塩素酸ソーダ 分光法

1. 研究開始当初の背景

抗血小板剤や解熱鎮痛剤として広く処方されているアスピリンは、腸管で吸収、肝臓で代謝されたのち、その代謝産物であるゲンチジン酸(GA)やサリチル酸が、血中から尿中に排泄される。アスピリンは、肝臓の代謝能の違いから、同じ服用量でも薬効には個人差があるため、出血や肝機能障害などの副作用を起こす場合もあり、アスピリンの体内動態の観察が重要となる。しかしながら、アスピリン代謝能を検査するうえで次の2点の問題がある。

- (1) 現在、血中アスピリン濃度の評価には、その代謝産物であるサリチル酸の濃度を測定する酵素法が利用されているが、アスピリンとの交差性が高く、測定値に正の影響を与えるため、従来の酵素法ではアスピリンの代謝産物を正確に測定できない。
- (2) GAの測定法については、濃度を定量する簡便な臨床検査法が確立されていない。

これらの問題があるため、アスピリンの代謝産物と副作用の関係が明らかになっておらず、アスピリンの副作用を未然に防ぐための臨床検査項目が確立されていないのが現状である。

これまでの先行研究では、酸化による有機物質の合成法に関する様々な検討が行われてきた。その中で、四酢酸鉛といった酸化剤によりGAを酸化させると、褐色調のカルボキシベンゾキノンが生成されることが報告されている¹⁾。しかし、GAの酸化発色反応を利用した比色定量法についての研究は行われていない。

以上の研究背景から、本研究では、近年開発された新しい酸化剤である次亜塩素酸ナトリウム五水和物結晶(結晶次亜塩素酸ソーダ)を用いたGAの発色法を原理とする新たな比色定量法を考案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、GAの発色法を利用した比色定量法を開発し、GA濃度とアスピリンの副作用との関係を明らかにすることである。今回は、分光法によるGA発色法の検出濃度の測定、質量分析法(LC/TOFMS)による発色反応の解析、そして可視光領域と紫外線領域における吸光度測定の有用性に関する比較検討を行ったので報告する。

3. 研究の方法

(1) 測定機器、試薬

測定機器

分光光度計 U-2900(日立ハイテクサイエンス), Nexera X2 UHPLC System (島津製作所), maXis 4 G (Bruker Daltonics)。

試薬

次亜塩素酸ナトリウム五水和物結晶(結晶次亜塩素酸ソーダ)(カネカ), ゲンチジン酸(GA), 1M 水酸化ナトリウム水溶液(NaOH), アセチルサリチル酸(ASA), サリチル酸(SA), アスコルビン酸(AA)(以上、富士フイルム和光純薬)。

(2) 解析方法

分光法による検出濃度の測定

各濃度(60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800 mg/L)のGA水溶液 800 μ L に、1M NaOH 1 mL に結晶次亜塩素酸ソーダ 20 mg を溶解した水溶液 10 μ L を添加し、5分後の吸光度を分光光度計 U-2900 により測定した。

質量分析法(LC/TOFMS)による発色反応の観察

400 mg/L GA 水溶液 800 μ L に、1M NaOH 1 mL に結晶次亜塩素酸ソーダ 20 mg を溶解した水溶液 10 μ L を添加し、発色時のGAの変化を、Nexera X2 UHPLC System および maXis 4G を用いて解析した。

可視光領域(380-800 nm)の測定

400 mg/L GA 水溶液 800 μ L および ASA・SA・GA の混合液 800 μ L (400 mg/L) に、1M NaOH 1 mL に結晶次亜塩素酸ソーダ 20 mg を溶解した水溶液 10 μ L を添加し、5分後の吸光度を分光光度計 U-2900 により測定した。

紫外線領域(250-380 nm)の測定

50 mg/L ASA 水溶液 800 μ L, 50 mg/L SA 水溶液 800 μ L, 各濃度(2, 5, 8, 10, 20, 50, 100, 120, 130, 140, 150 mg/L)のGA水溶液 800 μ L, そして ASA・SA・GA の混合液 800 μ L (50 mg/L) をそれぞれ用いて、分光光度計 U-2900 により吸光度を測定した。

4. 研究成果

濃度による GA の吸収曲線の変化

水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH) および結晶次亜塩素酸ソーダ添加後の GA 水溶液は褐色に変化し、500 nm 付近にピークをもつ吸収曲線を示した (図 1)。さらに、濃度変化とともに、500 nm 付近のピークも変化した (図 1)。

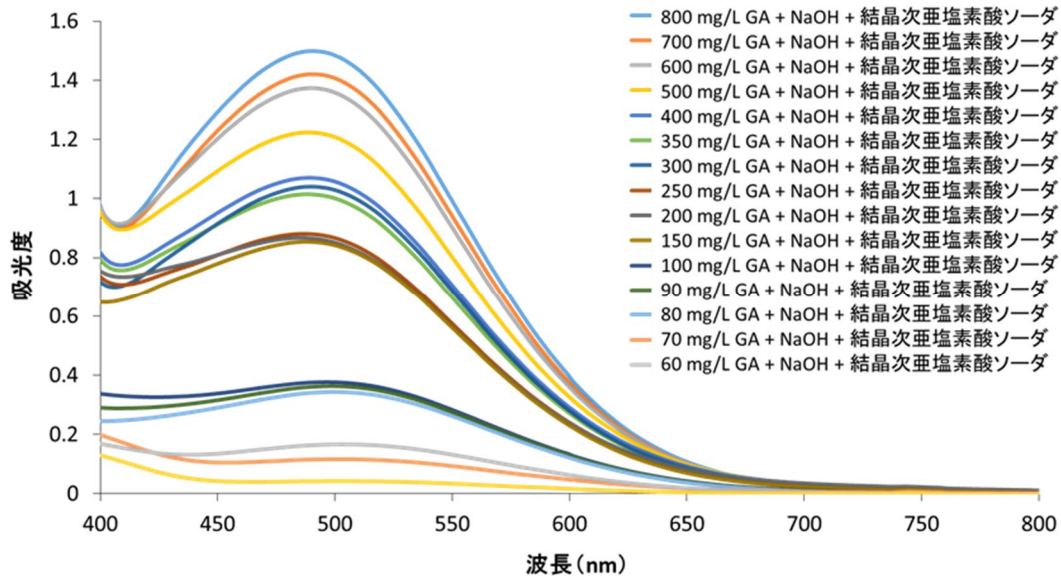


図 1. 各濃度の GA 水溶液の吸収曲線

GA 濃度による吸光度の変化

NaOH および結晶次亜塩素酸ソーダ添加後、褐色に変化した各濃度の GA 水溶液を用いて、500 nm の吸光度を測定した結果、1 ~ 120 mg/L までは直線性を示したが、130 mg/L 以上となると吸光度は安定しなかった (図 2)。

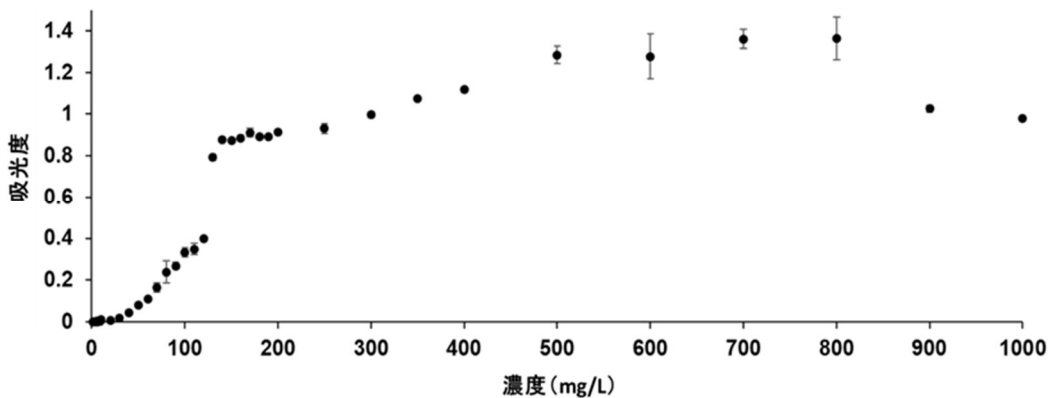


図 2. GA 水溶液の濃度による吸光度の変化 (500 nm)

質量分析 (LC/TOFMS)

NaOH および結晶次亜塩素酸ソーダ添加前の無色透明の GA 水溶液は、153 m/z にマススペクトルを示し(図 3),NaOH および結晶次亜塩素酸ソーダ添加後に褐色変化した GA 水溶液では、123 m/z に新たなマススペクトルが出現した(図 3)。

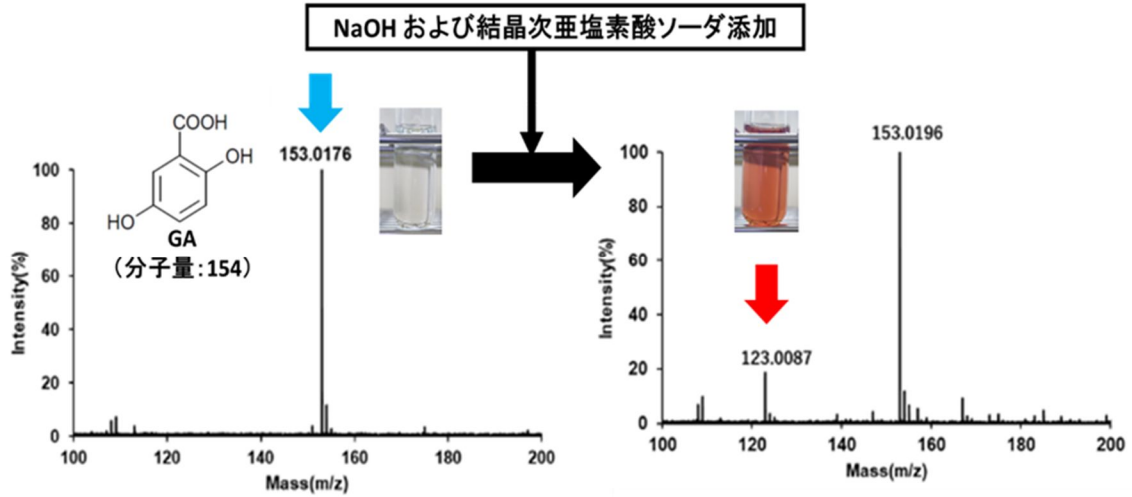


図 3 . 色調変化による GA 水溶液のマススペクトルの変化 (LC/TOFMS)

発色特異性の検討

次に、ASA 水溶液、SA 水溶液、GA 水溶液、そして ASA と SA と GA の混合液に、NaOH および結晶次亜塩素酸ソーダをそれぞれ添加し、発色性の確認後に吸光度を測定した(図 4). NaOH および結晶次亜塩素酸ソーダの添加後に、褐色変化したのは GA 水溶液のみであり、さらに、ASA と SA と GA を混合し発色させても、GA のみと同程度の褐色変化と吸光度のピーク (500 nm) を示した(図 4)。

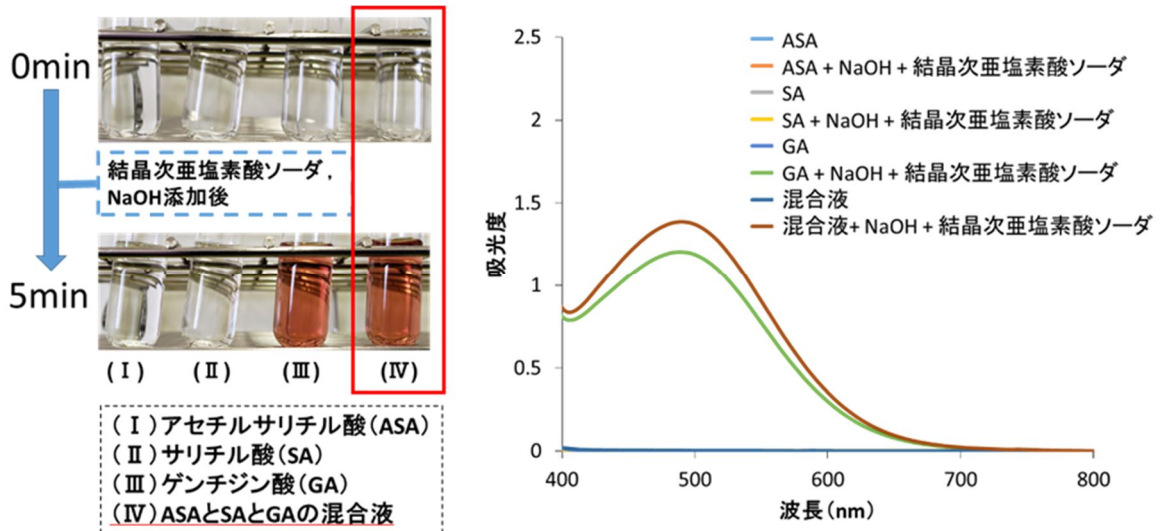


図 4 . アセチルサリチル酸 (ASA)、サリチル酸 (SA)、ゲンチジン酸 (GA) の発色性

紫外線領域における吸光度

過去の研究報告では、GA は紫外線領域である 320 nm にピークを示すことが報告されている²⁾。そこで、分光法による紫外線領域 (250-380 nm) 測定の有用性の検討を行った(図 5, 6)。その結果、過去の報告²⁾と同様、無色透明の GA 水溶液は 320 nm にピークを示したが、紫外線領域では、GA 濃度が 120 mg/L 以上となると、320 nm 付近のピークが不安定であった(図 5)。さらに、ASA は 294 nm、SA は 296.5 nm、GA は 320 nm、ASA と SA と GA の混合液は 317 nm にそれぞれピークを示した(図 6)。

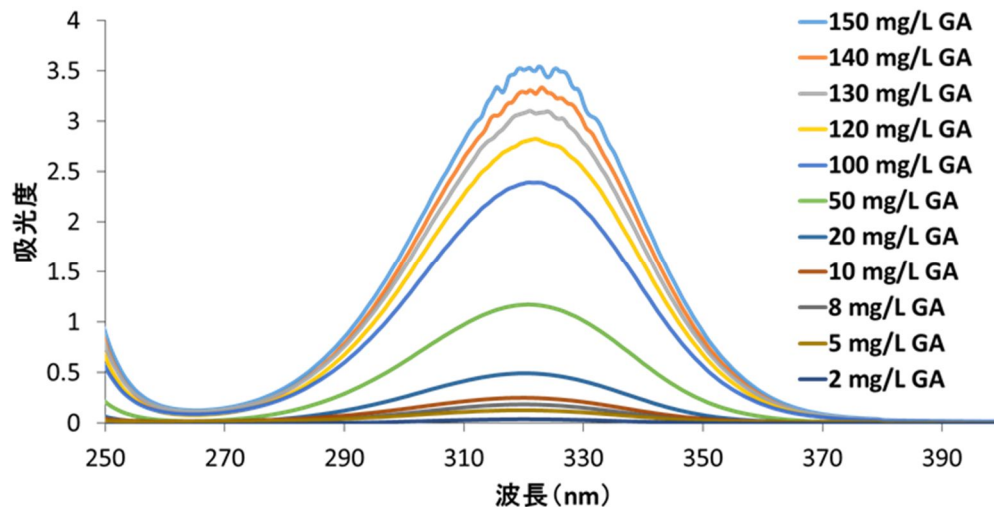


図 5 . 紫外線領域 (250-380 nm) における GA の吸収曲線

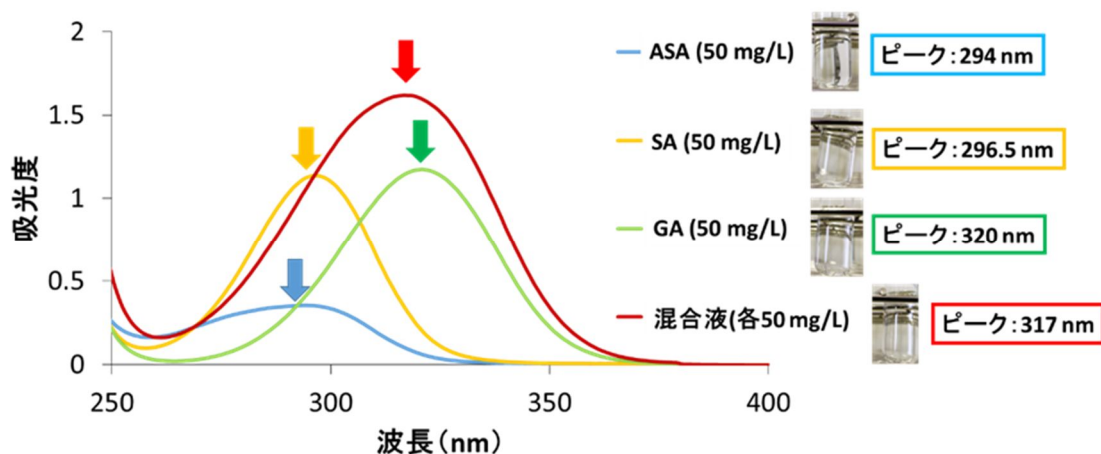


図 6 . 吸収曲線 (紫外線領域)

以上、本研究では、分光法や質量分析法を用い、GA の発色反応の解析を行った。その結果、NaOH と結晶次亜塩素酸ソーダを用いて GA を褐色に発色させることにより出現する 500 nm 付近の吸光度は、濃度依存的に変化した。さらに、GA の褐色変化に伴い、123 m/z に新たなマススペクトルが出現した。また、紫外線領域 (250-380 nm) では、ASA、SA、GA はそれぞれ特有のピークを示したが、ピーク波長が近いので、吸光度のみで GA のみを検出するのは困難である。一方、我々が開発した GA 発色法では、ASA および SA は発色せずに GA のみが発色し、可視光領域 (380-800 nm) である 500 nm 付近にピークを示した。以上の結果より、検体中の GA の測定には、褐色に発色させ、可視光領域 (500 nm 付近) で吸光度を測定する方法が有用である。

< 引用文献 >

- 1) Holmes TJ, John V, Vennerstrom J, Choi KE. Solution characterization of carboxybenzoquinone and the isolation of derived quinhydrone, J Org Chem, 1984.49(24):4736-8.
- 2) Kapp EM, Coburn AF. URINARY METABOLITES OF SODIUM SALICYLATE, J Biol Chem, 1942.145 (2):549-65.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hosokawa Sho, Shukuya Kenichi, Sogabe Keisuke, Ejima Yasukazu, Morinishi Tatsuya, Hirakawa Eiichiro, Ohsaki Hiroyuki, Shimosawa Tatsuo, Tokuhara Yasunori	4. 巻 15
2. 論文標題 Novel absorbance peak of gentisic acid following the oxidation reaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0232263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0232263	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳原康哲, 細川翔, 宿谷賢, 下澤達雄
2. 発表標題 アスピリンの代謝産物であるゲンチジン酸の発色法の考案
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

・受賞 - 日本臨床検査医学会 若手研究者奨励賞 『次亜塩素酸Na五水和物を用いた検査法考案』

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

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