

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08925

研究課題名（和文）遮断薬のLC/MS/MSを用いた一斉分析法の開発

研究課題名（英文）Development of sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of beta blockers

研究代表者

殿岡 恵子（窪田恵子）（Tonooka-Kubota, Keiko）

横浜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20521884

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：救急医療分野において、急性薬物中毒の原因薬物を究明することは、治療法の選択や治療方針を決定する上で重要であり、また、法医中毒分野における薬物中毒症例の死因究明への貢献も期待され、迅速簡便な薬毒物の分析法の確立が必要である。本研究では、種々の受容体遮断薬に着目し、生体内試料からの受容体遮断薬やその代謝物のLC/MS/MSによる一斉分析法の開発を目的とした。研究は、血清、尿試料からの種々の受容体遮断薬(17種)およびその代謝物(3種)の固相抽出用カラムを用いた最適抽出条件を検討し、生体試料から抽出分離した受容体遮断薬および代謝物のLC/MS/MSによる一斉分離分析条件を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

救急医療分野において、急性薬物中毒の原因薬物を究明することは治療法の選択や治療方針を決定する上で重要となり、迅速簡便な薬毒物分析法の確立が必要である。現代の高齢化社会において、高齢者は基礎疾患の多様性から処方薬による相互作用や薬物代謝の加齢変化から、定期処方薬でも薬物中毒を引き起こしえる。今後さらに増加が予想される高齢者の急性薬物中毒原因薬物の一つである、受容体遮断薬についてのLC-MS/MSによる一斉分析法は、スクリーニング法としての有用性が高く、中毒医療や救急領域分野において重要な意義があり、また法医中毒分野における薬物中毒症例の死因究明への貢献も期待される。

研究成果の概要（英文）：In the field of emergency medicine, it is important to identify the causative agent of acute drug poisoning in order to select a treatment method and determine the course of treatment, and it is also expected to contribute to the investigation of the cause of death in drug poisoning cases in the field of forensic poisoning. This study focused on various beta blockers and aimed to develop a simultaneous LC/MS/MS method for the analysis of beta blockers and their metabolites from in vivo samples. The study investigated the optimum extraction conditions using solid-phase extraction columns for various beta blockers (17 drugs) and their metabolites (3 drugs) from serum and urine samples, and established conditions for simultaneous LC/MS/MS analysis of beta blockers and metabolites extracted and separated from biological samples.

研究分野：中毒学

キーワード：急性中毒学 分析化学 救急医学 中毒医療 受容体遮断薬

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

救急医療分野において、急性薬物中毒の原因薬物を究明することは治療法の選択や治療方針を決定する上で重要であり、また、法医中毒分野における薬物中毒症例の死因究明への貢献も期待されることから、迅速簡便な薬毒物の分析法の確立が必要である。これまでに我々は種々の薬物中毒に着目し、LC/MS/MS を用いた一斉分析法の開発を行ってきた。現代の高齢化社会において、高齢者は、内服薬の種類が多いことや自己管理の困難さから、定期処方薬でも薬物中毒を引き起こしえる。その原因として、基礎疾患の多様性から処方薬が増え、定期内服薬自体に相互作用を起こす危険性や、薬物代謝の加齢変化(薬物代謝能力の低下、腎排泄低下)などがある。基礎疾患関連の薬剤、特に事後的要素による薬物中毒で、より重篤な症状を呈し死亡の原因とされるのは、循環器系薬剤である。循環器系薬剤である 受容体遮断薬による過去の中毒事例として、プロプラノロールの過剰投与による心停止やメトプロロール中毒による心血管毒性の発現、アナフィラキシーショックの治療に 受容体遮断薬が影響を及ぼし心肺停止に陥った症例、アテノロール過剰服用後の難治性心原性ショックおよび房室ブロックなどが報告されている。現在の救急臨床現場では、簡便性から、薬物スクリーニングキットが汎用されている。しかし、スクリーニングキットでは、睡眠薬や抗うつ薬は検出可能であるが、循環器系薬剤(受容体遮断薬)や抗てんかん薬は検出できない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、現代の高齢化社会に伴い増加が予想される高齢者の薬物中毒に着目し、種々の 受容体遮断薬(選択的₁受容体遮断薬、非選択的₁受容体遮断薬、内因性交感神経刺激作用・Intrinsic Sympathomimetic Activity; ISA の有無、₁受容体遮断薬)やその代謝物に関する、LC/MS/MS を用いた一斉分析法(迅速スクリーニング法)を開発することを目的とした。生体内試料からの 受容体遮断薬およびその代謝物の LC/MS/MS による一斉分析法を確立することは、救急医療分野で重要な意義があり、適用も多いに期待され、さらに、法医中毒分野における、薬物中毒症例の死因究明への貢献も期待される。

3. 研究の方法

本研究では、生体試料からの LC/MS/MS による 17 種・ 受容体遮断薬(アテノロール、カルテオロール、ナドロール、ピンドロール、チモロール、アセプトロール、アロチノロール、メトプロロール、エスモロール、セリプロロール、ラベタロール、ピソプロロール、プロプラノロール、アレプレノロール、ベタキシロール、ベバントロール、カルベジロール)およびその 3 種の代謝物(α -ヒドロキシメトプロロール、O-デスメチルメトプロロール、4-ヒドロキシプロプラノロール)について、新規一斉分離分析法の開発を試みた。

(1) 17 種の 受容体遮断薬およびその代謝物の LC/MS/MS による一斉分離分析条件の確立
抽出効率および精度管理に関して、HPLC 分析において検討し、 β 受容体遮断薬の LC/MS/MS 分析のための一斉分離分析条件(分析カラムの選択、移動相)についても同時に検討した。LC/MS/MS 分析において、 β 受容体遮断薬の一斉分離分析に最適なカラムを検討した(Inertsil ODS-2、Inertsil C18、Mightysil RP-18、Mightysil RP-18GP、L-column 2 ODS、Unison UK-C18 等)。

また、同時に最適移動相の検討も行った。(移動相の種類、濃度、pH 等)。

(2) 固相抽出用カラムを用いた生体試料(血清または尿試料)からの 17 種の 受容体遮断薬およびその 3 種の代謝物についての最適抽出条件の検討

市販されている血清または尿試料に、17 種・ 受容体遮断薬およびその 3 種の代謝物を添加し、固相抽出用カラム(Oasis; PRiME HLB カラム)を使用し、抽出溶媒(溶媒の種類、濃度、pH)、洗浄溶媒(溶媒の種類、濃度、pH、回数)等を検討し、 β 受容体遮断薬の最適抽出条件を検討した。

(3) 新規に開発した本分析法の有用性を確立

開発した本分析法を救急分析試料へ適用し、 β 受容体遮断薬のスクリーニング法として本法の有用性に関して検討する。改善点が必要な場合はさらに再検討し、新規に開発した本分析法の有用性を確立する。

4. 研究成果

(1) 17 種・ 受容体遮断薬およびその代謝物の LC/MS/MS による一斉分離分析条件の確立
抽出効率および精度管理を検討し、LC/MS/MS 分析のための一斉分離分析条件(最適なカラム、最適移動相)の検討を行った結果、最適カラム: Mightysil RP-18 MS (2.0 mm i.d. \times 150 mm、粒子径 5.0 μ m)、最適移動相: A 液 10 mmol/L 酢酸 - 10 mmol/L 酢酸アンモニウム (2:3)、B 液 アセトニトリル; グラジエント: 10% B (0.1 min), 10% B ~ 60% B (10 min), 60% B ~ 0% B (5 min), 0% B (1 min), 10% B (19 min)、流速: 0.2 mL/min となり、12 分内に相互分離された。

(2) 固相抽出用カラムを用いた生体試料(血清、尿試料)からの 17 種・ 受容体遮断薬およびその 3 種の代謝物(メトプロロールの代謝物 2 種 1、プロプラノロールの代謝物 1 種)についての最適抽出条件

正常ヒト血清または尿 0.5 mL に蒸留水 0.5 mL と各薬物を添加し、Oasis® PRiME HLB カートリッジ (Waters 社) にロードした。カートリッジを洗浄、溶出後、溶出液を減圧下で留去し、残渣を移動相 (0.2mL) に溶解したものを (10 µL) を LC/MS/MS で分析した (図 1)。

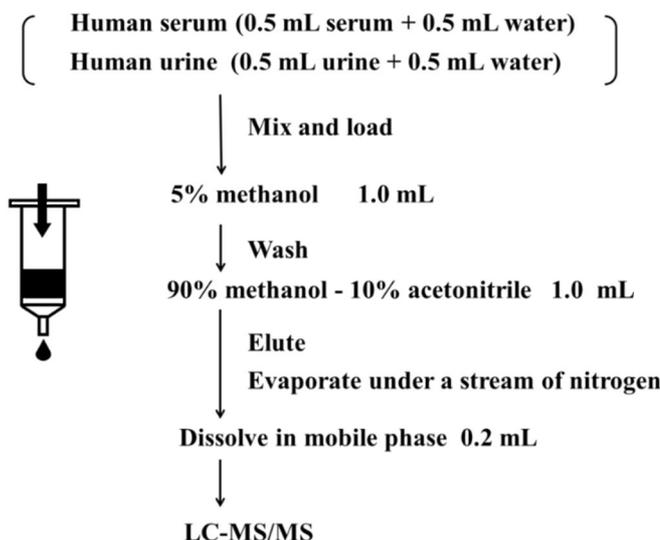


図 1 生体試料からの固相抽出用 (Oasis® PRiME HLB) カートリッジを用いた抽出方法

本研究では、固相抽出用カラムに Oasis® PRiME HLB カートリッジを用いる方法により、精度な一斉分析を可能とした。さらに、血清中の 17 種・受容体遮断薬の血清中における検量線は、20 ng/mL ~ 400 ng/mL で良好な直線性が得られ、検出限界 (LOD) は約 0.003 ng/mL ~ 1.6 ng/mL、定量検出濃度は、ほぼ治療濃度域で検出可能であり、生体試料中の夾雑成分 (マトリックス) の影響を簡易的に排除し、再現性においても良好な結果が得られ、LC-MS/MS 分析における 17 種・受容体遮断薬の迅速な一斉分析が可能となった (図 2)。また、尿中の 2 種・受容体遮断薬 (メトプロロール、プロプラノロール) およびその 3 種の代謝物の検出限界 (LOD) は 0.08 ~ 1.3 ng/mL、定量限界 (LOQ) は 2.0 ng/mL (4-ヒドロキシプロプラノロール: 10 ng/mL を除く) であり、受容体遮断薬が臨床的に使用される治療血中濃度範囲をカバーすることが可能である (図 3)。回収率の低かった、ベバントロール、カルベジロール、4-ヒドロキシプロプラノロールについては、抽出効率について現在再検討中である。

Drugs	Recovery (n = 6)			LOD (ng/mL) (S/N = 3)	LOQ (ng/mL)
	Amount add (ng)	Average (%)	C.V. (%) (Coefficient of Variation)		
Atenolol	100.0	90.2	2.0	0.048	20.0
Carteolol	100.0	90.3	1.4	0.016	20.0
Nadolol	100.0	89.4	1.0	0.044	20.0
Pindolol	100.0	84.3	1.0	0.0034	20.0
Timolol	100.0	90.6	1.3	0.14	20.0
Acebutolol	100.0	88.5	0.7	0.040	20.0
Arotinolol	100.0	66.1	0.5	0.040	20.0
Metoprolol	100.0	85.7	1.9	0.017	20.0
Esmolol	100.0	76.7	4.8	1.6	20.0
Celiprolol	100.0	78.1	6.1	0.013	20.0
Labetalol	100.0	85.0	2.9	0.11	20.0
Bisoprolol	100.0	93.5	0.9	0.026	20.0
Propranolol	100.0	85.1	3.6	0.036	20.0
Alprenolol	100.0	73.3	4.1	0.033	20.0
Betaxolol	100.0	85.9	1.2	0.22	20.0
Bevantolol	100.0	37.5	2.9	0.03	20.0
Carvedilol	100.0	26.2	7.0	0.040	20.0

図 2 LC/MS/MS による血清からの 17 種 受容体遮断薬の回収率、検出限界 (LOD) および定量限界 (LOQ)

Drugs	Extraction yield (n = 5)				
	Amount add (ng)	Average (%)	C.V. (%) (Coefficient of Variation)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
α -Hydroxy metoprolol	50.0	98.7	1.4	1.00	2.0
O-Desmethyl metoprolol	50.0	98.8	1.6	0.09	2.0
Metoprolol	50.0	99.0	0.6	0.65	2.0
4-Hydroxy propranolol	50.0	55.1	4.1	0.71	10.0
Propranolol	50.0	93.8	1.4	0.17	2.0

図 3 LC/MS/MS による尿からの 受容体遮断薬とその代謝物の回収率、検出限界 (LOD) および定量限界 (LOQ)

(3) 新規に開発した本分析法の有用性を確立

回収率の低かった、ベバントロール、カルベジロール、4-ヒドロキシプロプラノロールの抽出効率について再検討すると同時に、新規に開発した本分析法を薬物中毒剖検症例へ適用し、受容体遮断薬とその代謝物のスクリーニング法としての有用性について検討するために、現在調査中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kabashima Tsutomu, Hamasaki Nana, Tonooka Keiko, Shibata Takayuki	4. 巻 71
2. 論文標題 A Facile Method to Determine Prolidase Activity Using a Peptide-Specific Fluorometric Reaction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 15~18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c22-00467	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 殿岡（窪田）恵子, 寺田賢, 篠塚達雄	4. 巻 47(12)
2. 論文標題 中毒医療分野における 受容体遮断薬の一斉分析法の開発 ; Development of a simultaneous determination method for beta-blocker drugs in clinical toxicology.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 52-54
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 無
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 Obossou Etienne Kochole, Shikamoto Yasuo, Hoshino Yuki, Kohno Hayato, Ishibasi Yukiko, Kozasa Tohru, Taguchi Maho, Sakakibara Iwao, Tonooka Keiko, Shinozuka Tatsuo, Mori Kazuya	4. 巻 36
2. 論文標題 Effect of manuka honey on human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Natural Product Research	6. 最初と最後の頁 1552~1557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14786419.2021.1880403	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 Tsutomu Kabashima, Keiko Tonooka, Makoto Takada, Masaaki Kai and Takayuki Shibata	4. 巻 9
2. 論文標題 Simultaneous assay for protease activities of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus based on fluorescence detection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports-Nature	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-45711-0	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 Keiko Tonooka-kubota*, Keita Takanashi, Tetsuji Hosono, Masaru Terada, Tatsuo Shinozuka	4. 巻 34
2. 論文標題 Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of seventeen beta blockers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxicologie Analytique & Clinique	6. 最初と最後の頁 s173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxac.2022.06.299	査読の有無 無
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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 殿岡 恵子、寺田 賢、篠塚 達雄
2. 発表標題 LC-MS/MS による血清および尿中からの 受容体遮断薬およびその代謝物の分析
3. 学会等名 第66回 日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 殿岡 (窪田) 恵子、柏原篤那、高梨馨太、寺田賢、篠塚達雄
2. 発表標題 LC-MS/MS を用いた血清および尿中からの 受容体遮断薬 (メトプロロール) およびその代謝物の分析
3. 学会等名 第43回日本中毒学会総会・学術集会 (2021年9月、Web開催・山形)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 殿岡恵子 (窪田恵子)、寺田賢、柏原篤那、篠塚達雄
2. 発表標題 LC-MS/MS を用いた 受容体遮断薬およびその代謝物の分析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (2021年3月、Web開催・広島)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 殿岡恵子(窪田恵子)、寺田賢、佐々木千寿子、佐藤文子、篠塚達雄
2. 発表標題 LC-MS/MS による 17種・ 受容体遮断薬の一斉分析法の開発
3. 学会等名 第42回日本中毒学会総会・学術集会(2020年9月、Web開催・鹿児島)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiko Tonooka, Tatsuo Shinozuka
2. 発表標題 Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of thirteen beta blockers.
3. 学会等名 57th The International Association of Forensic Toxicologists Annual Meeting (Birmingham, United Kingdom of great Britain and Northern Ireland) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 殿岡(窪田)恵子、篠塚達雄
2. 発表標題 薬毒物試験法 - 19 受容体遮断薬試験法・追加
3. 学会等名 日本薬学会第140年会(2020年3月、京都)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiko Tonooka, Tatsuo Shinozuka
2. 発表標題 Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of nine beta blockers.
3. 学会等名 56th The International Association of Forensic Toxicologists Annual Meeting (Ghent, Belgium) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 殿岡恵子、篠塚達雄
2. 発表標題 毒物試験法 - 19 受容体遮断薬試験法
3. 学会等名 日本薬学会第139年会(2019年3月、千葉県・幕張)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Tonooka-kubota*, Chizuko Sasaki, Keita Takanashi, Tetsuji Hosono, Masaru Terada, Fumiko Satoh and Tatsuo Shinozuka
2. 発表標題 Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of beta blockers and their metabolites from serum and urine
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)2023 -Rome, Italy (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 殿岡 恵子、佐々木千寿子、寺田 賢、佐藤文子、篠塚 達雄
2. 発表標題 LC-MS/MS による血清および尿中からの 受容体遮断薬(メトプロロール、プロプラノロール)とその代謝物の分析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 薬毒物試験法編集委員(篠塚達雄、その他)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 公益社団法人 日本薬学会 環境・衛生部会	5. 総ページ数 22
3. 書名 薬毒物試験法と注解 2017 追補2020	

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究の成果を、雑誌社であるSeparation Science Plusに、現在投稿中である。

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	篠塚 達雄 (Sinozuka Tatsuo) (70095610)	横浜薬科大学・薬学部・特任教授 (32723)	

	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	寺田 賢 (Terada Masaru)		
研究協力者	佐々木 千寿子 (Sasaki Chizuko)		
研究協力者	佐藤 文子 (Satoh Fumiko)		
研究協力者	梶島 力 (Kabashima Tsutomu)		

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