

19980069

②総括研究報告書

③分担研究報告書

厚生科学研究

薬物中毒、薬害、農薬中毒等の予防と原因解明のための毛髪診断研究

平成10年度研究報告書

平成11年3月

厚生科学研究

薬物中毒，薬害，農薬中毒等の予防と原因解明のための毛髪診断研究

平成10年度研究報告書

付属文書

1. Life Sci., 63: 883-893 (1998)
2. ファルマシア, 34(9): 820-826 (1998)
3. 中毒研究, 12: 43-50 (1999)

平成11年3月

目 次

| | |
|----------------------------------|----|
| 研究班構成員氏名一覧表 | 1 |
| Ⅰ.研究目的 | 3 |
| Ⅱ.研究班活動概要 | 3 |
| Ⅲ.研究成績概要(分担研究別) | 5 |
| Ⅳ.平成10年度における研究成績(分担研究) | 7 |
| 1.毛髪中の薬物の挙動に関する基礎研究(中原班) | 9 |
| (1)死亡ラットと生存ラットの毛根中の薬物の挙動 | 11 |
| (2)アミノピリンと代謝物の毛髪への取込 | 23 |
| (3)中毒症例と毛髪検査 | 31 |
| 2.トリアゾラム及びその代謝物の毛髪分析(豊岡班) | 39 |
| 3.毛髪からのパラコート分析(大野班) | 71 |
| 付属文書 | 97 |
| 1. Life Sci., 63: 883-893 (1998) | |
| 2. ファルマシア, 34(9): 820-826 (1998) | |
| 3. 中毒研究, 12: 43-50 (1999) | |

研究班構成員氏名及び主たる担当分野

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所

中原 雄二 (統括)
(解熱鎮痛剤)

分担研究者 静岡県立大学薬学部

豊岡 利正 (向精神薬)

日本医科大学法医学教室

大野 曜吉 (農薬)

研究協力予定者

日本医科大学法医学教室

仁平 信

同

林田 真喜子

国立下総療養所

小沼 杏坪

墨東病院

清田 和也

埼玉県警科学捜査研究所

関根 均

国立医薬品食品衛生研究所

木倉 瑠理

国立医薬品食品衛生研究所

坂本 知昭

I. 研究目的

有害物質には、即座に毒性が現れる物（急性中毒）と、ある期間を経て毒性が現れる物（慢性中毒）がある。前者の検査は比較的確立されているが、後者の慢性中毒に対する検査は立ち後れている。毛髪は他の生体試料に比べて、検出ウインドー（期間）が広く、投与数分から1年以上の過去にさかのぼって原因物質を追求できるので、慢性中毒を診断するための貴重な検査試料となることが期待される。その上、急性中毒に対しても毛根を検査することにより、血液に匹敵する薬物定法が得られることを筆者らは証明している。しかし、現在のところ毒性原因物質の検査試料として、毛髪を利用することは血液・尿試料に比べ極めて少ない。その理由は、毛髪への薬物分布に関する研究データが少ないことが挙げられる。尿や血液への薬物分布・排泄・動態・代謝に関する研究は多くなされており、それらの生体試料を用いた検査から得られる分析結果は安心して解釈でき、その後の患者の治療や措置を適切に行える。一方、毛髪から得られる量的、質的薬物情報を正確に解釈し、その後の措置に用いるには現在のところ、データの蓄積や検討が少なすぎ、毛髪検査で得られる結果を安心して用いるためには、多くの基礎研究・応用研究を必要とする。中毒事故が多発している昨今、従来の中毒検査と異なり、毛髪には、数ヶ月から1年以上も過去の薬物歴が残るという非常に良い利点がある。本研究班は、薬害や食品・環境からの害を診断する毛髪臨床検査の実用を可能とするために、薬物の毛髪への移行や毛髪中での挙動を明らかにする目的で基礎研究及び応用研究を遂行する。

II. 研究活動概要

本研究班は平成9年度から活動を開始し、平成11年度までの3年間にわたり研究を行い、当初の目的の達成を目指している。

初年度は基礎実験として薬物のラット毛根中の挙動を研究すると共に、毛髪分析の研究報告を整理した。

2年度目は、基礎実験として中毒量の薬毒物を投与し、毛髪中の薬物の挙動を観察し、中毒死と毛髪中の薬物濃度の変化を明らかにするとともに、用量及び使用期間の違いと毛髪中の薬物及び代謝物の量的変化を探求した。応用研究としては、毛

髪中ハルシオン及びパラコートの検出・診断法を検討した。さらに、中毒で救急病院に搬入された患者の毛髪を分析し、原因物質を同定するとともに、実用性を確かめた。

最終年度は、中毒事故の多い薬毒物として、アセトアミノフェンやカルバマゼピンを追加し、動物モデル実験をさらに進めるとともに、中毒状態の患者の毛髪検査を数多く行い、中毒原因物質を迅速に解明する方法を確立し、毛髪に含まれる中毒状態の診断に必要な情報を究明し、臨床現場への導入を試みる。

研究用毛髪試料

本研究の遂行のため、下記の3度にわたり国立衛研でラットに薬物（アミノピリン、トリアゾラム、パラコート等）を投与し、経時的に毛根及び28日後の毛幹を採取し、各分担研究班に配布した。

第1回動物実験：平成10年5月

第2回動物実験：平成10年12月

第3回動物実験：平成11年2月

研究班会議

平成11年1月29日（月） 於国立医薬品食品衛生研究所会議室

分担研究についての中間報告会を行うとともに、今後の研究計画について話し合った。

平成11年3月9日（月） 於国立医薬品食品衛生研究所会議室

研究結果についての検討会をもった。

Ⅲ. 平成10年度研究成績概要

中原班員（国立衛研）は中毒量のメタンフェタミンをラットに投与し、5分後から経時的に毛根を採取し、毛根中の親化合物と代謝物の経時変化を調べた。その結果、薬物は投与5分後には毛根に達し、4-5時間で最高濃度となり、血中から薬物が消失した後も長期間にわたり検出可能であること、中毒で死亡した場合、薬物の取込が停止するとともに、代謝活動が停止することなどを見だし、毒性発現により毛根中の薬物の挙動が影響されることを明らかにした。また別途、アミノピリン投与のラット毛髪中にアミノピリンの他に、代謝物のモノメチルアミノアンチピリン、4-アミノアンチピリン(4AA)、アセチルアミノアンチピリンの検出・同定に成功した。特に、主代謝物である4AAの毛髪中に取り込まれる量的、質的な変化に及ぼす影響を調べるために、50mg/kg-1回投与、10mg/kg-5回投与、5mg/kg-10回投与の3種の投与における毛髪中の薬物濃度分布を測定した。その結果、親化合物はあまり変わらないのに反し、代謝物の4-AAは5mg/kg-10回投与の場合に顕著に増加し、長期投与ほど代謝物の生成が促進されることが観察された。アミノピリンとアセトアミノフェンとの併用で毒性が増すといわれているが、併用の方が代謝が活性代謝物が増加する現象が毛髪分析で確認された。いずれも、代謝酵素の活性化の影響を現していると考えられた。今後は、中毒事故の多い、アセトアミノフェンやカルバマゼピンの毛髪への取込や毛髪中の挙動を調べる。

豊岡班員（静岡県大薬）はトリアゾラム投与のラット毛髪中にトリアゾラムの他に1-水酸化体と4-水酸化体の検出・同定に成功した。特に、ラット毛髪中主成分は4-水酸化トリアゾラムであることを確認した。今後は、トリアゾラム中毒のヒト毛髪中のトリアゾラム代謝物の分布について研究を進めていく予定である。

大野班員（日医大）はパラコート投与のラット毛根中にパラコート検出にHPLC及びLC-MSで成功した。今後、パラコート中毒のヒト毛髪中のパラコートの検出について研究を進めていく予定である。

IV. 平成10年度における研究成績（分担研究）

1. 毛根中の薬物の挙動に関する基礎研究

国立医薬品食品衛生研究所 中原 雄二

2. トリアゾラム及びその代謝物の毛髪分析

静岡県立大学薬学部 豊岡利正

3. 毛髪からのパラコート分析

日本医科大学 大野 曜吉

毛髪中の薬物の挙動に関する基礎研究

国立医薬品食品衛生研究所

中原 雄二

目次

研究成果

(1) 死亡ラットと生存ラットの毛根中の薬物の挙動

1. 緒言
2. 実験材料と実験方法
 - 2-1. 薬品
 - 2-2. 毛髪試料
 - 2-3. 分析法
3. 結果と考察
 - 3-1. ラット死亡時間と投与量の関係
 - 3-2. ラット毛髪からMA及びAPの検出
 - 3-3. ラット毛根中のMAの経時変化
 - 3-4. 洗浄後のMAの残存量
 - 3-5. ラット死亡前後のAP/MA (代謝物/親化合物) 比
 - 3-6. 急性覚せい剤中毒死亡者の毛根からのMA 及びAP 検出

参考文献

(2) 毛根中Aminopyrine とその代謝物の挙動に関する基礎研究

1. 緒言
2. 実験材料と実験方法
 - 2-1. 薬品と試薬
 - 2-2. ラット毛髪
 - 2-3. 分析法
3. 結果と考察
 - 3-1. アミノピリン(Diemthylaminoantipyrine) の代謝
 - 3-2. 毛髪中からのDMAA及び代謝物の検出
 - 3-3. 毛髪中の代謝物/親化合物比に及ぼす投与量と投与期間の影響
 - 3-4. 毛髪中の代謝物/親化合物比に及ぼすアセタミノフェンの併用の影響

おわりに

参考文献

(3) 中毒症例と毛髪診断 (実用例)

1. クロルプロマジン, カルバマゼピン急性中毒
2. Acetaminophen, Methylephedrine 急性中毒
3. Diphenhydramine (トラベルミン中毒)
4. フラゼパム急性中毒
5. Methylephedrine 中毒
6. 妊娠中ブロン・覚せい剤中毒 (胎児への影響)

研究成果

1. 死亡ラットと生存ラットの毛根中の薬物の挙動

1) 緒言

我が国において、覚せい剤中毒による死亡事故は最近増加している。東京23区内だけで、1年間に数十人の覚せい剤中毒死亡が確認されている。山本ら[1]は、覚せい剤の回し打ちで、3人が死亡したケースを報告し、森ら[2]も急性覚せい剤中毒例を3例、勝又ら[3]は覚せい剤とアルコール併用による急性死の例を報告している。日本同様に現在覚醒剤乱用が問題となっている台湾においても、覚せい剤中毒死亡例が報告[4]されている。このように、覚せい剤による急性中毒の事故は想像以上に多く、いろいろな面からこの問題を研究することは意味があると思われる。

我が研究室において、覚せい剤の急性中毒の動物モデル実験を行い、毛根中のメタンフェタミン(MA)とその代謝物(アンフェタミン: AP)の検出と毛根中の分布・挙動を調べた。さらに、覚せい剤中毒で死亡したヒトの毛根を分析し、動物実験で得られた分布・挙動を基に中毒状態の解析を試みた。

2) 実験材料と実験方法

2-1. 薬品

塩酸methamphetamine (MA)は大日本製薬(Osaka, Japan).から購入した。MA-d4, AP and AP-d4 はすでに報告した方法[5]で合成したものをを用いた。Pentafluoropropionic anhydride はAldrich Chemical Co.から購入し、他の薬品は試薬特級を用いた。

2-2. 毛髪試料

ラット毛髪: ラットの背部の毛を薬物投与7日前に動物用電気バリカンで予め刈っておく。1群6匹の雄性 Dark Agouti(DA) ラット(茶褐色の毛、6週齢), に40, 60, and 100 mg/kg の塩酸 MA を腹腔内に注射した後、新しく生えてきた毛を毛抜きで、投与後5分、15分、0.5, 1, 2, 6 and 24 時間に毛根から引き抜いて、

研究成果

1. 死亡ラットと生存ラットの毛根中の薬物の挙動

我が国において、覚せい剤中毒による死亡事故は最近増加している。東京23区内だけで、1年間に数十人の覚せい剤中毒死亡が確認されている。山本ら[1]は、覚せい剤の回し打ちで、3人が死亡したケースを報告し、森ら[2]も急性覚せい剤中毒例を3例、勝又ら[3]は覚せい剤とアルコール併用による急性死の例を報告している。日本同様に現在覚醒剤乱用が問題となっている台湾においても、覚せい剤中毒死亡例が報告[4]されている。このように、覚せい剤による急性中毒の事故は想像以上に多く、いろいろな面からこの問題を研究することは意味があると思われる。

我が研究室において、覚せい剤の急性中毒の動物モデル実験を行い、毛根中のメタンフェタミン(MA)とその代謝物(アンフェタミン:AP)の検出と毛根中の分布・挙動を調べた。さらに、覚せい剤中毒で死亡したヒトの毛根を分析し、動物実験で得られた分布・挙動を基に中毒状態の解析を試みた。

2) 実験材料と実験方法

2-1. 薬品

塩酸methamphetamine (MA)は大日本製薬(Osaka, Japan).から購入した。MA-d4, AP and AP-d4 はすでに報告した方法[5].で合成したものをを用いた。Pentafluoropropionic anhydride はAldrich Chemical Co.から購入し、他の薬品は試薬特級を用いた。

2-2. 毛髪試料

ラット毛髪: ラットの背部の毛を薬物投与7日前に動物用電気バリカンで予め刈っておく。1群6匹の雄性 Dark Agouti(DA) ラット(茶褐色の毛、6週齢), に40, 60, and 100 mg/kg の塩酸 MA を腹腔内に注射した後、新しく生えてきた毛を毛抜きで、投与後5分、15分、0.5, 1, 2, 6 and 24 時間に毛根から引き抜いて、

採取した。毛根試料は分析時まで冷蔵庫に保存した。

2-3. 分析法

ラット毛根試料は2つのグループ（未洗浄、洗浄）に分ける。洗浄試料を調製するために、ラット毛根試料は2 ml の0.1 % SDSで2回、2 ml の蒸留水で2回、それぞれ1分間ボルテックスミキサーで洗浄した。乾燥後、約10mgの試料に内標準液を100 μ l を加え、2 ml のmethanol-5N HCl(20:1) 中で室温、ボルテックス下に14時間抽出した。毛根をろ去後、溶媒は窒素で40°C以下で留去し、残さを100 μ l のpentafluoropropionic anhydride(PFPA) 中で55°C、20分間加温し、溶媒を留去、50 μ l のethyl acetate に再溶解して、GC/MS [Hewlett-Packard Model 5890 series-II/MSD5971; TC-1 capillary column (GL Science Inc., Tokyo), 0.25 mm x 20 m with a 0.25 μ m film thickness using helium carrier gas(4.5 psi), 200°C injection temperature and temperature-programmed from 60°C (0.5-min hold) to 280°C(5-min hold) at 20°C/min) equipped with 7673A autosampler] で測定した。定量は、選択イオンモニタリングで行い、それぞれ PFP-MA at m/z 204, for PFP-AP at m/z 190, for PFP-MA-d₄ at m/z 208 and for PFP-AP-d₄ at m/z 194のイオンを用いた。

3) 結果と考察

3-1. ラット死亡時間と投与量の関係

ラットの3群はそれぞれ20, 40及び60 mg/kgの塩酸MAを腹腔内注射により投与した。60 mg/kgと四群のすべてのラット(6匹)は60分(32 to 59分)までに死亡した。40 mg/kg投与群では、1匹は38分で、2匹は91分で、他の3匹は200～300分で死亡した。20 mg/kg投与群では、83分まですべてのラットは生存していたが、その2匹は83と94分で、他の2匹は125と160分で、2匹は生存し続けた。これらの結果は、MAの致死中毒能は比較的高いこと、投与量に従って、死亡数が増加した典型的な現象が見られた(図1)。

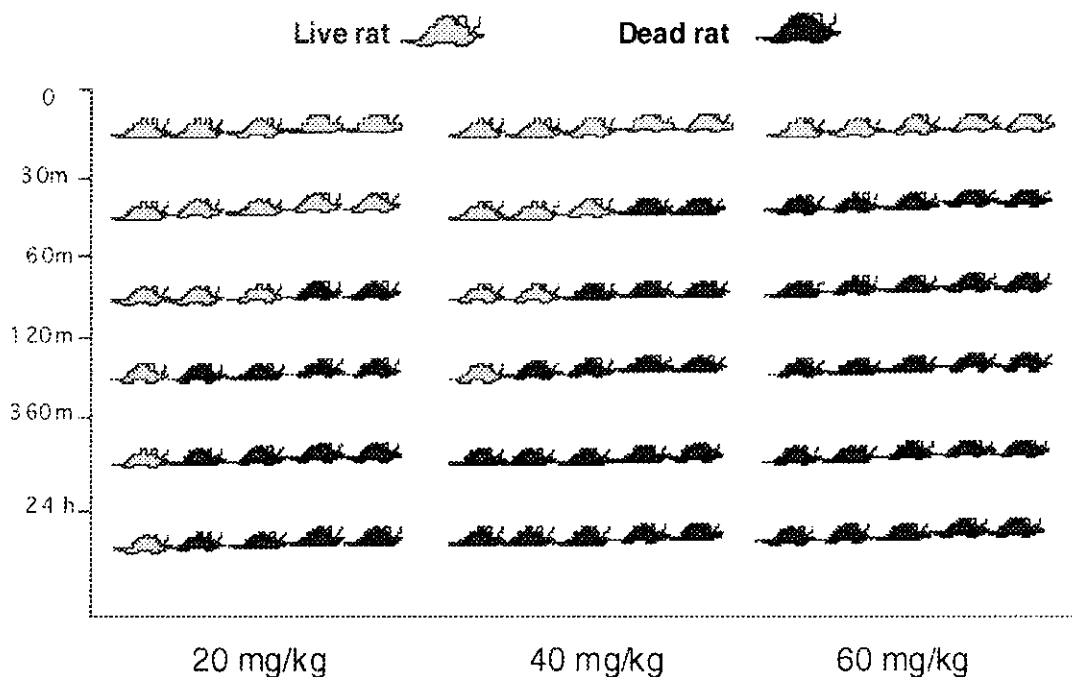


図1 投与量別ラット死亡時間と死亡数

3-2. ラット毛髪からMA及びAPの検出

DA系雄性ラットに20, 40, 60 mg/kgのメタンフェタミン(MA)を腹腔内に投与し、5分後から経時的に毛根を採取し、毛根中の薬物をGC-EIMSで検出・同定を試みた。同定には標品のMA及びアンフェタミン(AP)の保持時間とマススペクトルの一致で確認した。その上、薬物を投与しないコントロールのラット毛髪にはMA及びAPが現れる保持時間にはピークがない(図2A)ことから裏付けられる。図2に代表的なクロマトグラムを示す。コントロールにはMA(5.38 min)及びAP(4.66 min)のピークを妨害するものは存在しなかった(図2A)。20 mg/kg投与後、5分(図2B)の未洗浄の毛根中に11.1 ng/mgのMAが検出され、予想された以上に速く、薬物が毛根に達することが確認された。図2Cには、40 mg/kg投与後2時間の洗浄毛根試料からの抽出物の分析例を示しているが、32.3 ng/mgのMAと4.9 ng/mgのAPが検出された。その他の代謝物として、p-hydroxymethamphetamine やp-hydroxyamphetamine が血中や尿中で見られ

るが、毛髪中には確認できる濃度レベルでは検出できなかった。

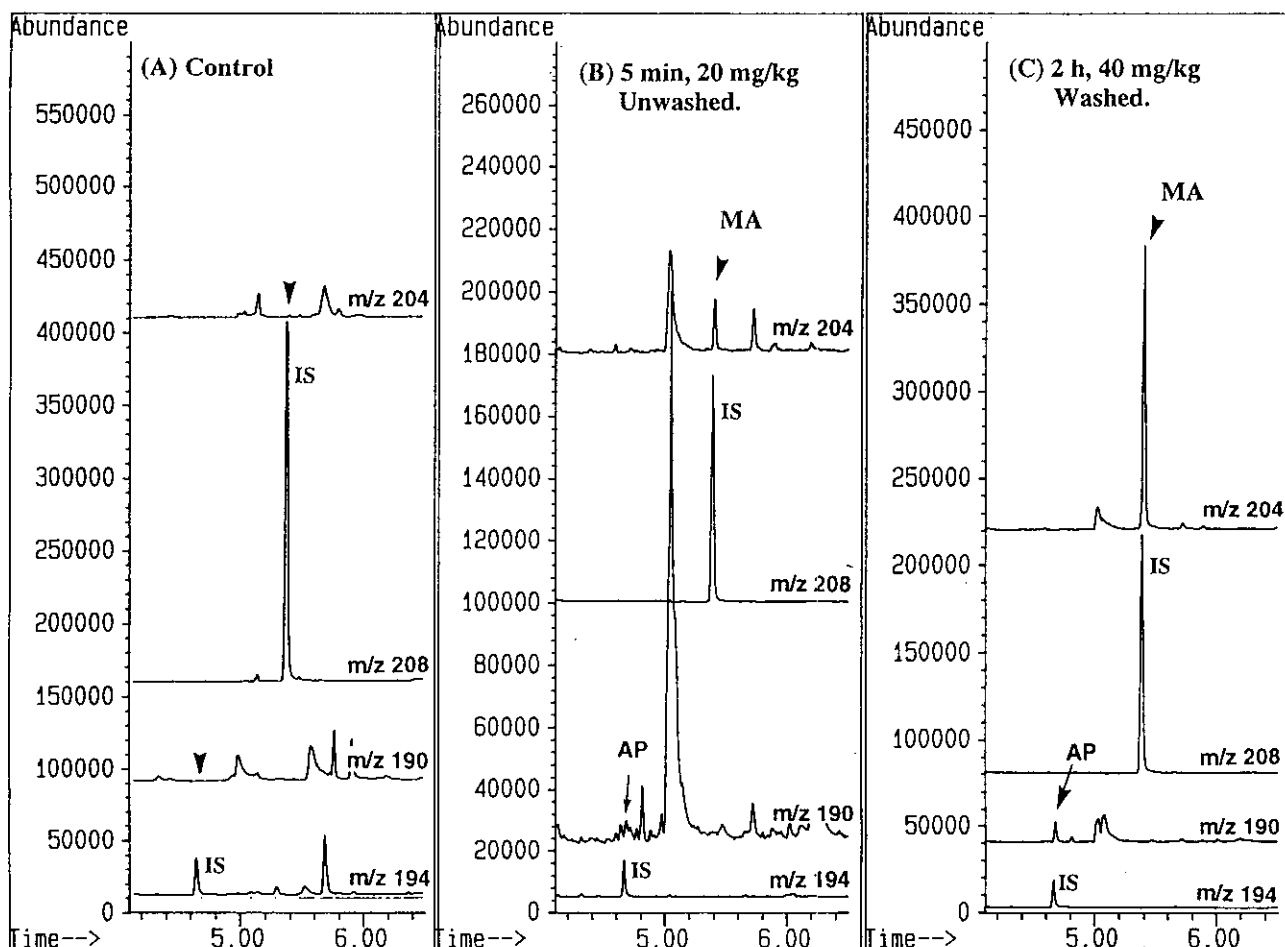


図2 メタンフェタミン投与のラット毛根試料のGC-MSクロマトグラム
 (A) コントロールラット毛根, (B) 20mg/kg 投与5分後の未洗浄毛根,
 (C) 40mg/kg 投与2時間後の洗浄毛根.

3-3. ラット毛根中のMAの経時変化

投与後5分、15分、30分、1, 2, 6 and 24 時間のMA 及び AP の毛根中の濃度が測定された。毛根中の薬物濃度レベルは未洗浄、洗浄いずれも投与量に従って上昇したが、洗浄により、毛髪濃度は顕著に低下した(図3)。未洗浄の試料では(図3A), 投与30分後の濃度は40 から 100 ng/mg で、2時間後に最大濃度は(72 ~ 148 ng/mg)を示した。その後、24時間まで徐々に減少し、34 ~ 91 ng/mg.でほぼ定常状態となった。濃度の減少は主に薬物の再分布と毛髪の成長による分母の増大の

ためと考えられる。洗浄試料では(図3B), 投与後30分で、6.0から13.2 ng/mgで、2時間後に最高濃度(19~32 ng/mg)を示した。その後、24時間も出、徐々に減少し、13~20 ng/mgの濃度で定常となった。未洗浄と洗浄の試料中の濃度を比較すると、未洗浄試料の濃度は洗浄のものとは比べて、4~5倍高い値を示したが、時間が経つにつれて、その差が小さくなった。この現象は、毛根の周りに血液等の付着があり、投与後始めの間は薬物濃度が高いこと、毛根部に入った薬物も初期はまだ固定されずにあり、洗浄で容易に洗い除かれることなどが推定された。

5分後の未洗浄の毛根中のMA濃度は20, 40及び60 mg/kgで、それぞれ11.1, 12.3及び13.2 ng/mgであった。この結果を見ると、薬物は非常に早く(5分以内)毛根に達することがわかった。しかし、5分後の毛根試料を洗浄すると、MA濃度はほとんどゼロとなり、洗浄で容易に溶離する事も明らかとなった。この現象は早い時期では、薬物はまだ毛髪にしっかりと取り込まれていないことを示している。しかしながら、急性中毒の検査には、未洗浄の毛根試料を用いれば、非常に有効であると思われた。

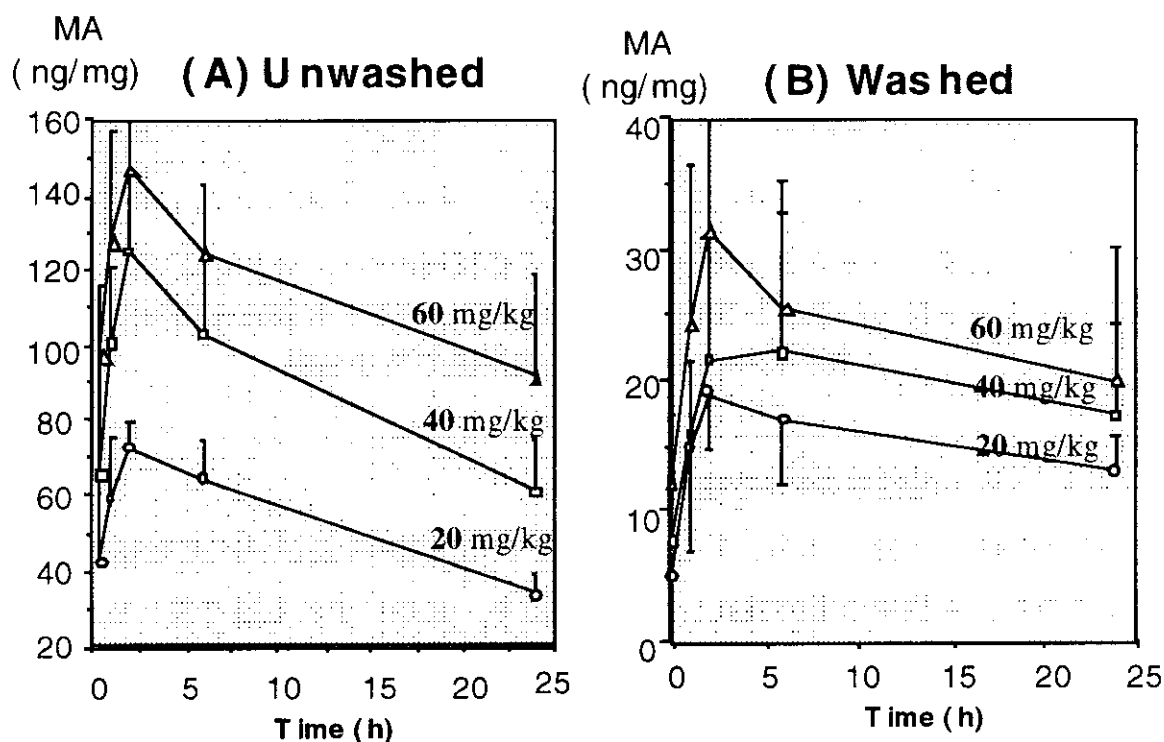


図3 未洗浄及び洗浄毛根中のMA濃度の経時変化

3-4. 洗浄後のMAの残存量

洗浄した毛髪中の MA 濃度は毛幹（一部毛根部を含む）に取り込まれた薬物量を現していると考え留ことはてもおかしくはない。図4に示すように、未洗浄のMA濃度に対する洗浄試料中の残存 MA 濃度の比の経時変化を見ると、すべての投与量で、時間の経過とともにその比は顕著に増加した。しかし、ラットが死亡した後は、その比の傾斜は減少し、ついには、ほぼ一定となった。24時間後の残存比は投与量に反比例した。これは多分、高投与量ほど早く死亡したため、薬物の取込が早く停止し、結果的に低濃度で一定となったためと考えられる。薬物濃度は生存時間により多く関係するものと理解される。

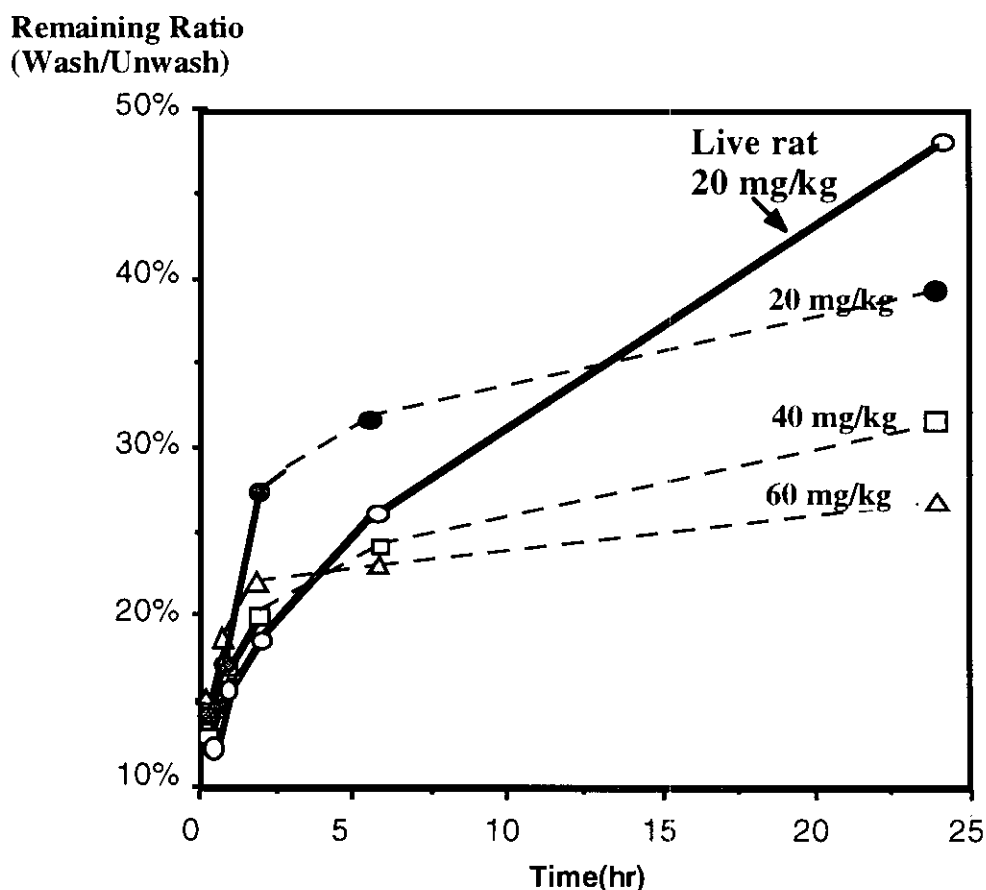


図4 洗浄後の毛髪残存率の経時変化-生存ラットと死亡ラットの比較

24時間以上生存したラットにおいては、MA残存比は時間とともに増加し、24時間ではほぼ50%にまでに達した。このことは、毛根に入ったMAは徐々に角質化していく毛幹内部に取り込まれていく挙動を示すものである。

3-5. ラット死亡前後のAP/MA（代謝物/親化合物）比

中毒状態の動物の薬物代謝活動を逐一モニターできれば、非常におもしろい体内の活動の変化を知ることができる。血液や尿の場合では、中毒末期から死亡までそれらの採取は非常に困難となる。強いて採血や採尿を強行すると、薬毒物による死亡モデルは壊れ、試料採取により死亡を早めることは必至である。毛髪（毛根）の採取は動物に対し、それほど強い刺激を与えたり、生命活動を脅かすことはない。今回、中毒量のメタンフェタミンを投与して、経時的に毛根を採取し、毛根中の親化合物と代謝物の量比を見た。図5は、20 mg/kg (図5 A) と 40 mg/kg (図5 B) における毛根中のAP/MA の経時変化を示している。実線は死亡前、破線は死亡後を示す。

AP/MA 比は、生存ラットにおいて、AP/MA 比は6時間まで直線的に上昇した(図5 A)。一方、死亡ラットでは、死亡後、明らかにAP/MA 比は上昇が停止し、死亡時の値でほぼ一定になった。この現象はラットの死後、生命活動の停止に伴い、薬物取込停止を意味するものである。一般に、死亡しても、肝臓や毛髪成長の活動はすぐには停止しないと考えられている。従って、分単位でその現象を捉えることは難しいが、大雑把であれば、薬物摂取から死亡に至るまでの時間と代謝物の生成率 (AP/MA 比) はある関係が見られるはずである。さらなる研究が必要であるが、毛根を使って、AP/MA 比や洗浄後の MA 残存率から使用から死亡時間での時間を推定することができるかもしれない。

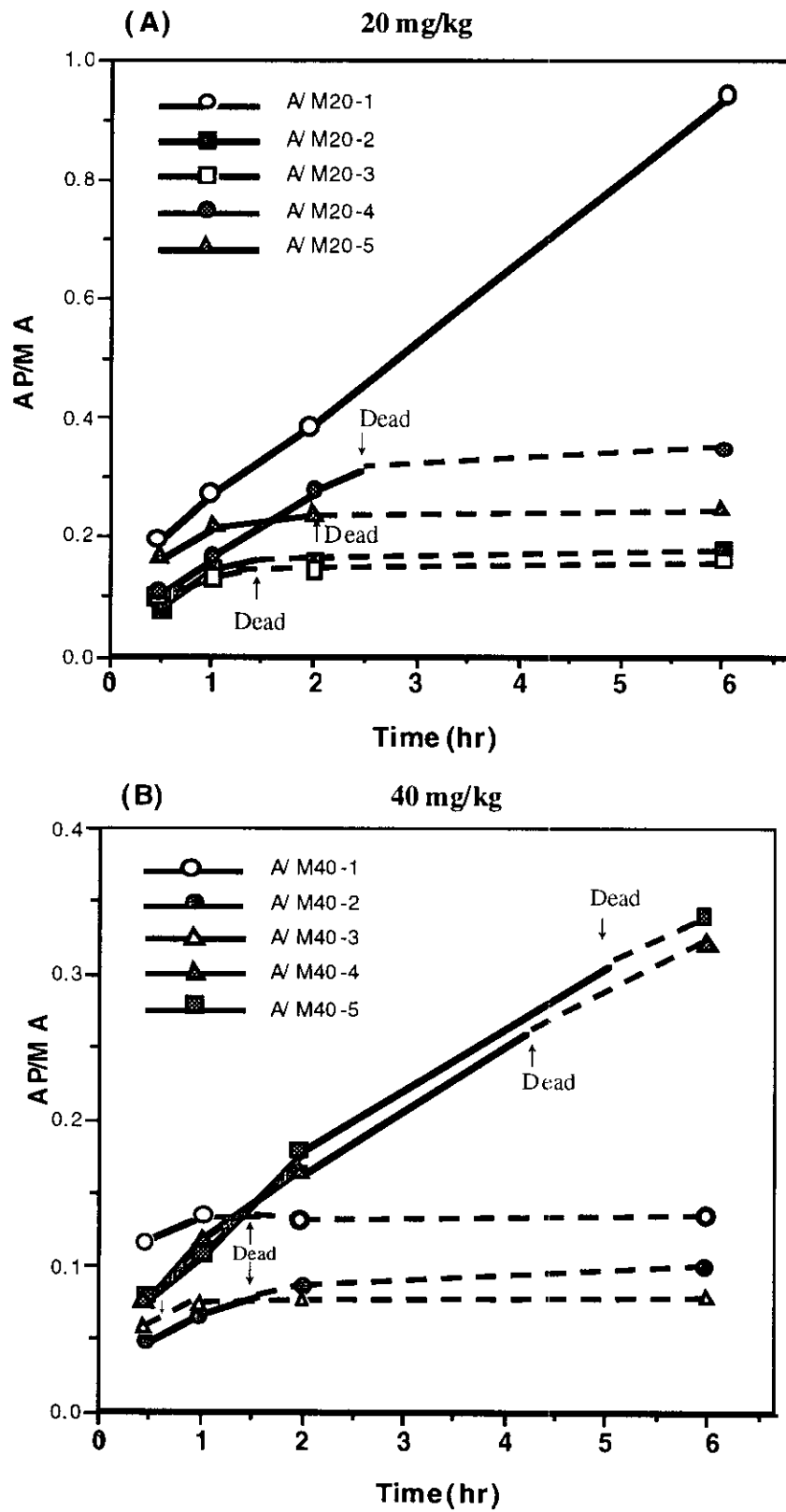


図5 A : 20 mg/kgにおける毛根中の代謝物/親化合物比, B : 40 mg/kgにおける毛根中の代謝物/親化合物比

3-6. 急性覚せい剤中毒死亡者の毛根からのMA 及びAP 検出

動物実験において、毛根が急性覚せい剤中毒の証明に有効な分析試料であることが実証できたが、毛根分析がヒトの覚せい剤中毒検査に利用できるかどうかを確かめる必要がある。そこで、急性覚せい剤中毒が主な死因であるヒトの毛根を採取し、分析を試みた。その結果、毛根中に覚せい剤 (MA) 及び代謝物(AP)を検出できた。それぞれ毛根中のMA濃度は非常に高く、41.7, 110.8, 171.1 及び 250.8 ng/mg であり、代謝物 AP, は 3.7, 4.6, 5.9 及び 14.6 ng/mgであった(表 1)。

表1 覚醒剤中毒で死亡した4人のヒトの毛根中MA及びAP濃度

| 試料番号 | 性別 | 年齢 | 未 洗 浄 | | 洗 浄 | |
|---------|----|----|-------|-----|------|-----|
| | | | MA | AP | MA | AP |
| (ng/mg) | | | | | | |
| 94590 | M | 57 | 134.6 | 9.0 | 41.0 | 1.3 |
| 94647 | M | 45 | 30.5 | 1.2 | 7.1 | 0.2 |
| 94691 | M | 34 | 97.6 | 4.1 | 9.3 | 0.5 |
| 94955 | M | 44 | 34.4 | 4.9 | 16.8 | 1.3 |

顕微鏡下で確認して、Anagen phase (成長期) の毛根を10本用いたが、濃度はかなり高く、1本の毛根でも多くの場合、検出が可能であると思われた。

ヒト毛根中のAP/MA 比(0.03—0.06) は#94955を除いて、ラット毛根のそれ(0.1—1.0)と比べかなり低く、以前我々が報告している覚せい剤乱用者の毛幹中のAP/MA 比(0.11—0.20) [6,7]よりかなり低い値であった。このことは、死亡により代謝が停止したため、その比の上昇が早く停止したためと理解される。#94955のAP/MA 比(0.12)のみはやや高く、他の死亡者よりも生存時間が長かったものと推測される。しかし、結論を得るためには、もっと多くのデータの蓄積と、データ解析が必要であろう。