

ナーゼ K 処理後、液液抽出に夜方法か最も高い結果をもたらしたか、代謝物の抽出効率はプロテイナーゼ K が最も悪く、メタノール-アセトン-濃アンモニア水 (10:10:1) 抽出が最適であった。総合的に考慮して、2 化合物の同時分析にはメタノール-アセトン-濃アンモニア水 (10:10:1) を抽出溶媒として選んだ。

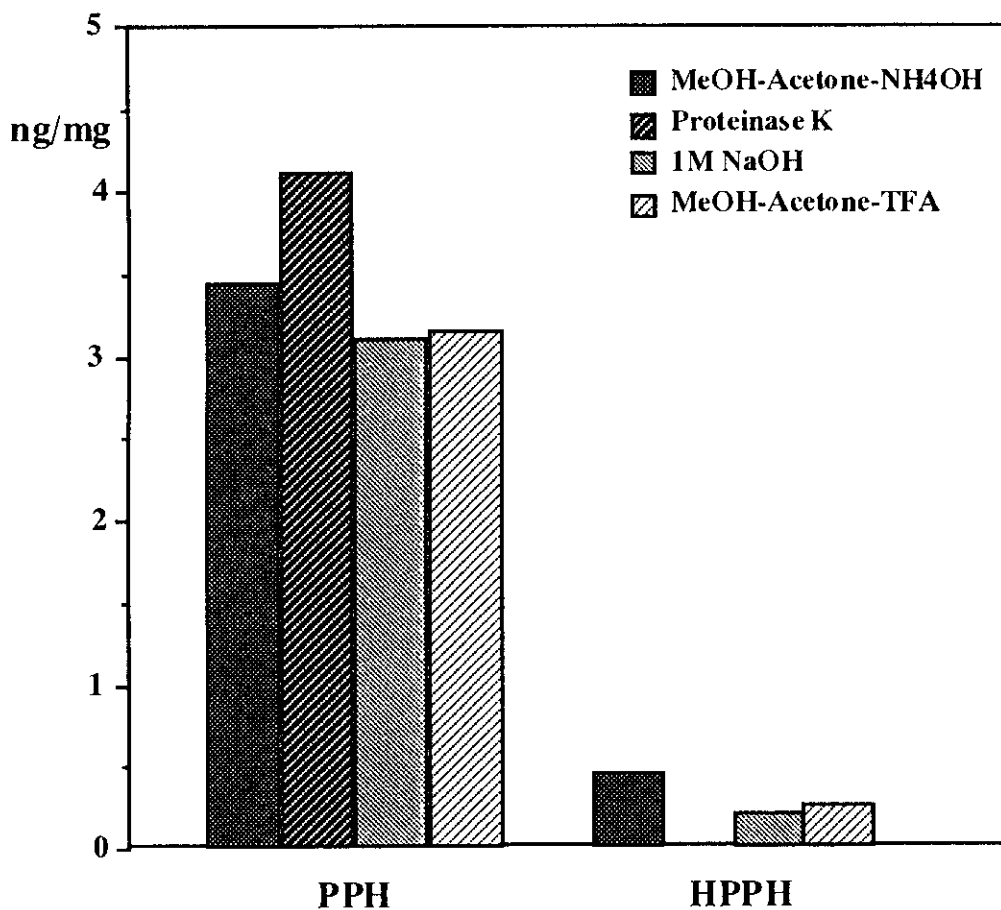


図5 4種の溶媒系による薬物の抽出効率

ラット毛髪からのPPHと代謝物の検出

ラットコントロール毛髪からの抽出物のSIMクロマトグラム (図6) にはPPHのメチル化体に相当するピークはなく、PPH投与のラット毛髪からの抽出物のメチル化体のGC-MS分析の結果、SIMクロマトグラム上の10.46分にピークを示し (図7)、その保持時間は標準品PPHのメチル化体のそれと一致し、 m/z 280, 203及び194の主イオンの確認において、PPHであると同定した。

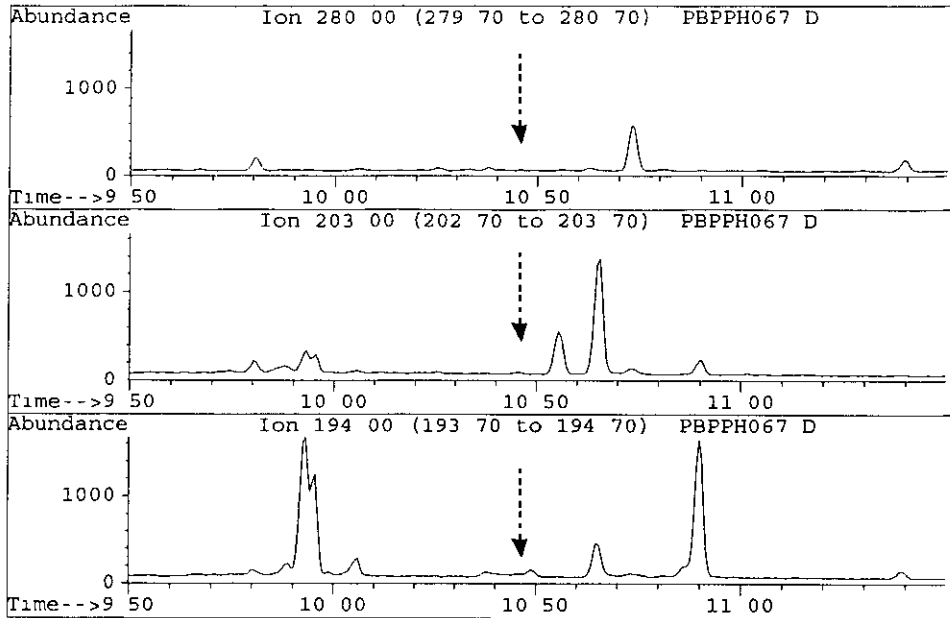


図6 ラットコントロール毛髪からの抽出物のGC-MSクロマトグラム

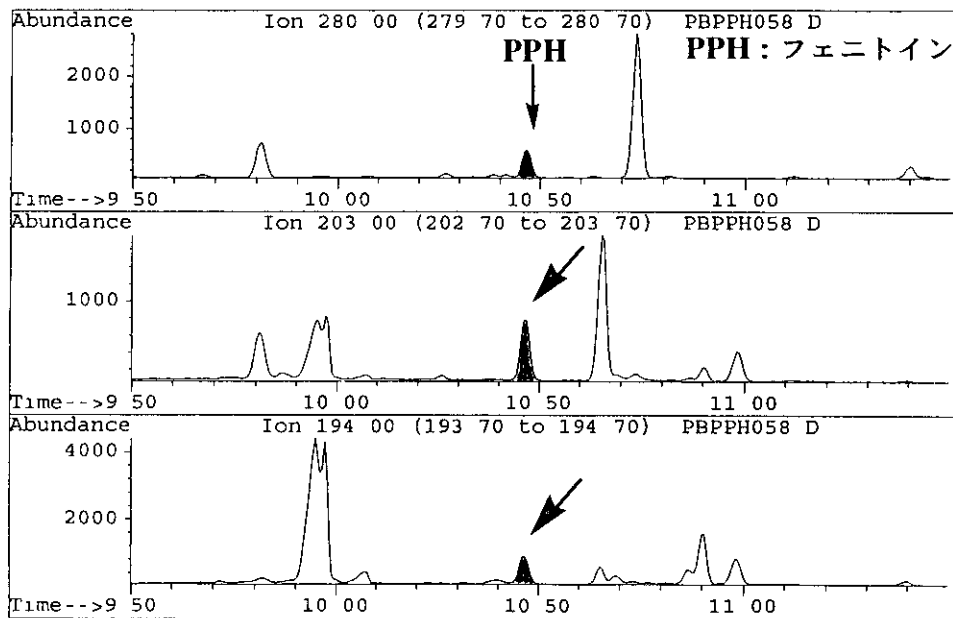


図7 PPH投与のラット毛髪からの抽出物のGC-MSクロマトグラム (PPHの同定)

また、ラットコントロール毛髪からの抽出物のSIMクロマトグラム (図8) にはPPHのメチル化体に相当するピーク (1184分) はなく、PPH投与のラット毛髪からの抽出物のメチル化体のGC-MS分析の結果、SIMクロマトグラム上の1184分にピークを示し (図9)、その保持時間は標準品 pHPPH のメチル化体のそれと一致し、 m/z 310 及び 233 の主イオンが観測され、pHPPH であると確認した。

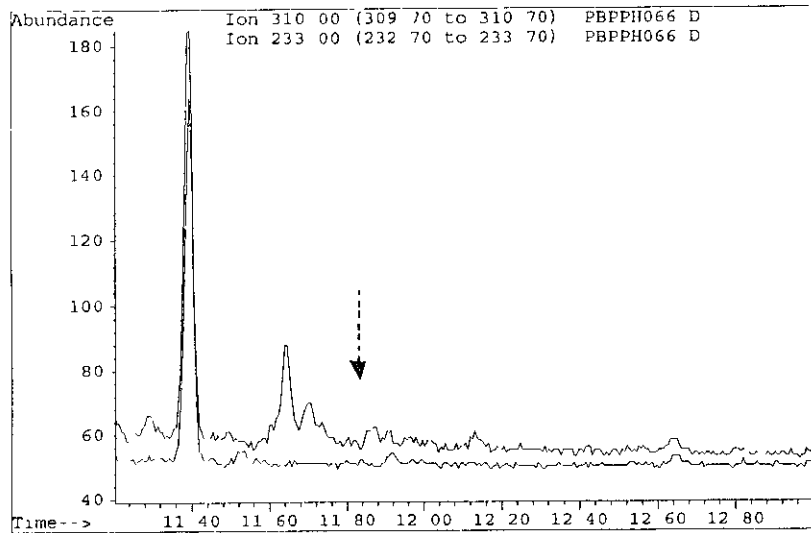


図8 ラットコントロール毛髪からの抽出物のGC-MSクロマトグラム

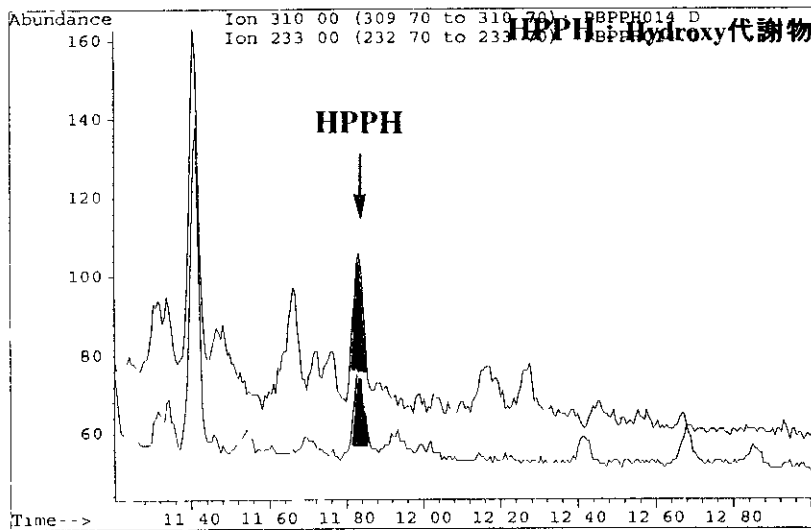


図9 PPH投与のラット毛髪からの抽出物のGC-MSクロマトグラム（HPPHの同定）

ラット毛髪中のPPH濃度

ラット毛髪中のPPH濃度は、25 mg/kg, ip injection, 5日間で平均4.3 ng/mgで、15 mg/kg, oral, 5日間で平均2.6 ng/mgであった。また、毛髪中のhydroxy代謝物濃度は、25 mg/kg, ip injection, 5日間で平均0.4 ng/mgで、15 mg/kg, oral, 5日間で平均0.2 ng/mgであった。

表1 ラット毛髪中のPPH濃度とp-HydroxyPPH濃度

	PPH濃度 (ng/mg)	p-HydroxyPPH濃度 (ng/mg)
25 mg/kg, ip, 5 days		
Rat-1	4.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1
Rat-2	3.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2
Rat-3	4.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1
Average (ng/mg)	4.3 ± 0.6	0.4 ± 0.1
15 mg/kg, oral, 5 days		
Rat-1	2.6 ± 0.2	0.2 ± 0.1
Rat-2	2.7 ± 0.2	0.2 ± 0.2
Rat-3	2.5 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Average (ng/mg)	2.6 ± 0.1	0.2 ± 0.1

この表から見ると、腹腔内注射と経口投与では大きな差が見られず、むしろ投与量に依存した毛髪濃度が見られた。次項で示すように、フェノバルビタールでも同様の傾向が見られた。

ラット血中及び毛根中のPPH及びHydroxy代謝物の濃度変化

PPH 25mg/kgの経口投与における血中と毛根中のPPH及びhydroxy代謝物の濃度変化を調べた。その結果を図10のA,Bに示す。血中のPPHは、2時間でピークを示し、その後なだらかな減少が見られたが、hydroxy代謝物濃度はPPHの1/20以下で、4時間でピークを示した。一方、毛根中のPPHは、同じく2時間でピークを示し、その後顕著に減少し、24時間後には、ピーク時の約1/8に減少した。hydroxy代謝物濃度はPPHの1/10程度で、6時間でピークを示し、24時間後にはピーク時の約1/4に減少した。

毛根中におけるこの現象は非常に興味深い。我々が先に報告した¹¹⁾アンフェタミン系薬物を用いた毛根中の経時的変化の研究結果によれば、塩基性薬物であるアンフェタミン類は投与4-6時間後にピークを示すが、24時間後でもピーク時の60-70%を保っていた。弱酸性物質であるPPHの場合は、24時間後ではピーク時の12%程度に減少した。この減少度の大きな違いは毛髪中のメラニンの寄与か考えられる。毛髪中での薬物（特に塩基性薬物）とメラニンの親和性相互作用は多くの研究¹²⁻¹⁶⁾で実証されている。一般に、メラニンは酸性物質であり、塩基性化合物と引き合う性質があり、メラニンの保持力が毛

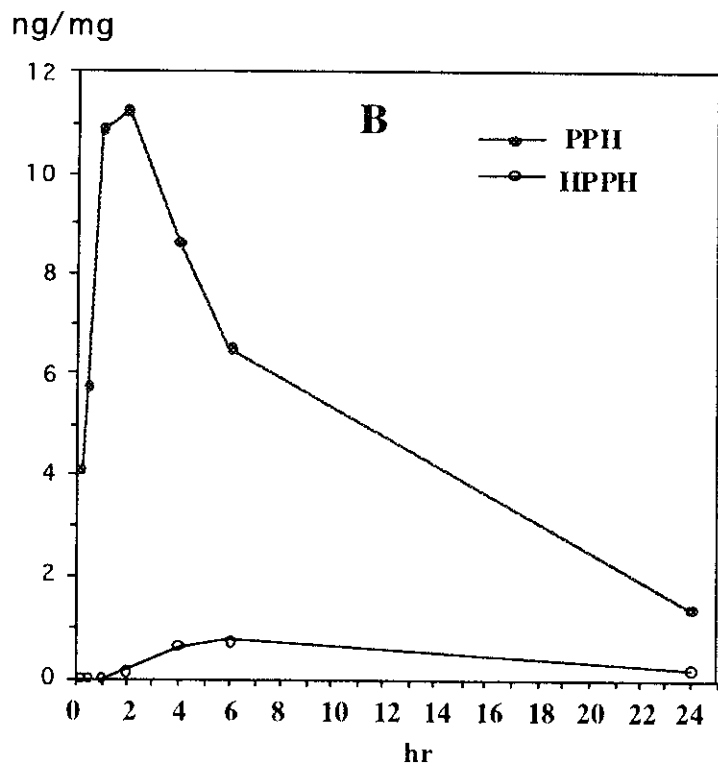
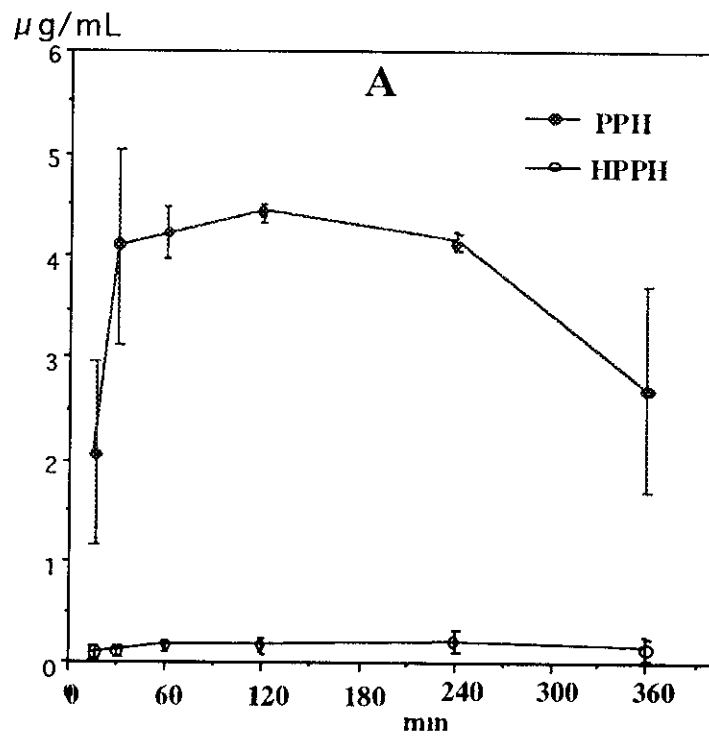


図10 PPH及びHydroxy代謝物の血中(A)と毛根中(B)の経時変化

髪中の濃度の高低を左右すると考えられる。逆に、薬物が中性、酸性物質の場合、メラニンとの親和性は弱く、毛髪中の保持が弱いため、それらの毛髪濃度は塩基性物質に比べ低い¹²⁾。毛根中のPPHで見られたピーク時からの大きな減少は、毛髪濃度を決定する主要なファクターであるとした我々の仮説¹¹⁾を支持するものである

ヒト毛髪からのPPHの検出

ボランティアに1日1回、フェニトイン顆粒錠（PPHとして100mg含有）を5日間服用を依頼し、最終使用日の7日後に頭皮に近い位置でハサミ切断して、頭皮側の5mmを分析試料とした。

毛髪からの抽出物はメチル化後、GC-MS分析の結果、SIMクロマトグラム上の1045分にピークを示し（図11）、その保持時間は標準品PPHのメチル化体のそれと一致し、 m/z 280, 203及び194の主イオンを明確に観測し、PPHであると確認した。このPPH濃度は333ng/mgであった。なお、Hydroxy代謝物も微量ながら存在することを認めた。

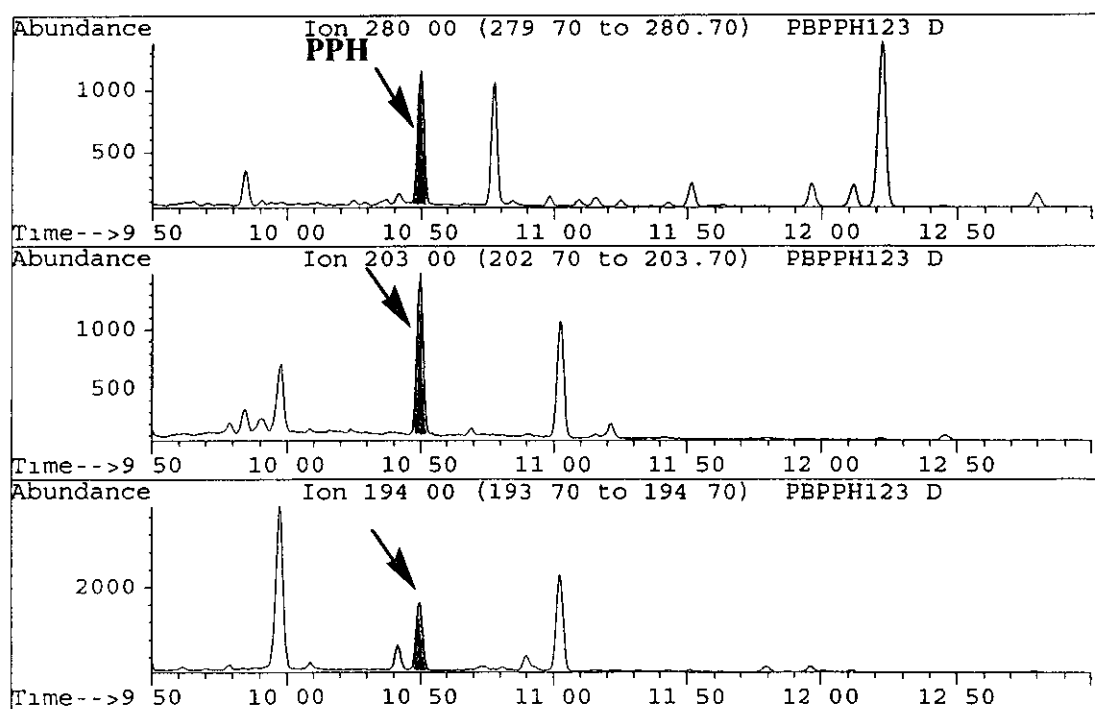


図11 フェニトイン使用者の毛髪からのフェニトインの検出例

(4) おわりに

PPH投与のラット毛髪 毛根及びヒト頭髪からPPHを検出した。ラット毛髪からは微量なから代謝物 para-hydroxy PPH を検出したか、毛髪中では親化合物のPPHが圧倒的に主成分であった。

今回、PPH使用者の頭髪を分析することかてきた。しかし、健常人のホランティアのため、常用量の1/2～1/3であったため、中毒レベルに比へかなり少量の使用であったか、267 ng/mg の値を得た。これで、PPH使用者の毛髪からPPHを検出てくることかわかったのて、今後、毛髪試料の活用か期待てきる。

参考文献

- 1) A W Pruitt et al , A complex pattern of disposition of phenytoin in severe intoxication Clin Pharm Ther , 18 112-120 (1975)
- 2) H Tenckhoff et al , Acute diphenylhydantoin intoxication Am J Dis Child 116 422-425 (1968)
- 3) G L Gellerman et al , Fatal ventricular fibrillation following intravenous sodium diphenylhydantoin therapy J Am Med Asso 2000 337-338 (1967)
- 4) J D Robinson et al , Pharmacokinetics of a single dose of phenytoin in man measured by radioimmunoassay Brit J Clin Pharm , 2 345-349 (1975)
- 5) B J Wilder et al , Plasma diphenylhydantoin levels after loading and maintenance doses Clin Pharm Ther , 14 797-801 (1973)
- 6) 佐藤孝道 編、妊娠と薬、薬事時報社、1992, p 91
- 7) J M Letteri et al , Diphenylhydantoin metabolism in uremia New Eng J Med 285. 648-652 (1971)
- 8) A J Glazko, Diphenylhydantoin metabolism Drug Met Disp , 5 711-714 (1973)
- 9) T Inaba et al , Determination of the major urinary metabolite of diphenylhydantoin by high-performance liquid chromatography J Chrom 80 161-165 (1973)
- 10) A J Atkinson et al , Identification of 5-metahydroxyphenyl-5-phenylhydantoin as a metabolite of diphenylhydantoin Biochem Pharm 19 2483-2491 (1970)

4. Phenobarbitalの毛髪分析と診断

(1) 緒言

フェノバルビタール(PB)は1912年以来、鎮静剤及び、抗けいれん剤として広く使われている。PBは薬物代謝酵素のインテューサーであり、薬物の血中濃度を下げる結果となる。他のバルビチレートに比べ、親油性が低く、脳への蓄積が遅く、代謝も少ない。この薬物は遊離酸又はナトリウム塩の液剤か錠剤で、15-65 mg 経口で使われるか、又は65-130 mg/mLの筋肉注射か静脈注射で用いられる。しばしば気管支拡張剤、血管拡張剤、鎮痛剤、抗コリン抑制剤などの組合せで用いられる。一般に、てんかん患者に毎日60-200 mg 経口投与され、しばしば他の抗てんかん剤と併用される。

長期PB使用者で、血中濃度が40 µg/mLを越える場合、中毒作用が現れる。反射作用が残っている昏睡患者の血漿中濃度は65-117 µg/mLを示したが、反射作用を示さない患者では100-114 µg/mLであった¹⁾。あるオーバードズの患者は253 µg/mLの血漿中濃度を示したが、幸運にも生き返った²⁾という報告もある。

6 g以上のPBを飲んだ急性中毒死のケースで、PB血中濃度は78-116 µg/mLで、肝臓の濃度は89-266 mg/kgであった。あるてんかん患者のPB死亡例での臓器分布は、血液で64 µg/mL、脳で63 µg/mL、尿で38 µg/mL、肝臓で138 µg/g、腎臓で84 µg/g、脂肪組織で46 µg/gであった³⁾。

妊娠中にPBを投与された患者の中に、奇形児を出産した例が非投与者に比べて多いと報告されている。妊娠マウス7-17日にPB 20-80 mg/kg/dayを経口投与した実験で、80 mg/kgで、胎児の体重の低下が認められ、外表異常は認められなかったが、心臓血管系の奇形が認められている⁴⁾。特に、フェニトインなどとの併用において、奇形発生率が多いことが報告されている。

3人の被験者にPBを1回30 mg 経口投与したところ、平均最高血清濃度は0.7 µg/mLで、21日連続投与では、8.1 µg/mLであった⁵⁾。PBは自己の代謝促進よりむしろ、繰り返し使用により、半減期が長くなるようである。PB 600 mg 経口投与4.5時間で、1.8 µg/mL (12-26 µg/mL) の平均最高血中濃度を示した⁶⁾。また、てんかん患者への毎日200 mg 長期投与の場合、血中濃度は2.9 µg/mLを示した⁷⁾。

PBの主代謝経路はN-glucuronidationとp-水酸化(HPB)とそのグルクロン酸抱合

体である。マイナー代謝物として、エポキシ中間体から生成される3,4-dihydrodihydroxy-phenyl体が知られている⁸⁾。単回投与のヒト尿に、投与量の78-87%が16日までに排泄され、未変化体(25-33%)、N-glucuronide(24-30%), free & conjugate p-hydroxy PB(18-19%)であった⁹⁾。長期PB治療の患者では、投与量の平均25%(12-55%)が24時間以内に未変化で尿に排泄される。8%が遊離のPB、9%がG-抱合体として尿に排泄される¹⁰⁾。600mg単回投与の被験者において、最初の21時間で未変化体は投与量の2%が排泄され、尿中最高濃度は8-22 μ g/mLであった⁶⁾。

本研究は、フェノバルビタールをラットに投与し、ラット毛髪(有色毛)中のフェノバルビタールとその代謝物を検出する方法を検討し、それらの毛髪濃度とフェノバルビタール中毒との関係を考察する。

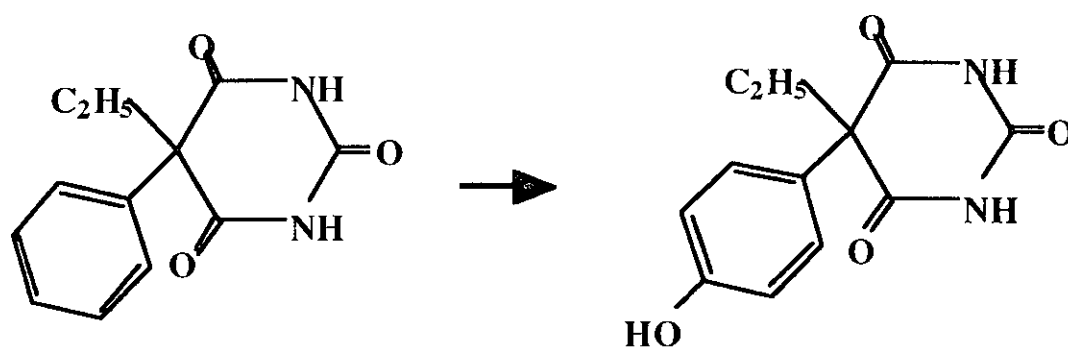


図1 フェノバルビタールとp-Hydroxy 代謝物(HPPH)の化学構造

(2) 実験材料と実験方法

2-1 薬品と動物

Phenobarbital (PB) は和光純薬から、p-hydroxy PBはSigma社(米国)から、bis-(trimethylsilyl)-acetamide(BSA)はAldrich社(米国)から購入し、他の薬品は試薬特級を用いた。

雄性 Dark Agouti(DA) ラットはSLC社(静岡)から5週齢を購入し、1週間の馴化飼育後、薬物投与の実験を行った。

2-2 毛髪試料

ラット毛髪 ラットの背部の毛を薬物投与前に動物用電気バリカンで予め刈っておく。1群3匹の雄性 Dark Agouti(DA) ラット（茶褐色の毛、6週齢）に1日1回、5日間 25 mg/kg のPBを経口投与した後、最終投与日から17日後に新たに生えてきた背部の毛髪を電気バリカンで採取し、毛幹試料として分析を行った。

ヒト毛髪試料 フェノバルビタール中毒が推定された救急患者（男性）の頭髪を毛根から引き抜いて採取した。検査には5本を用いた。

2-3) 抽出条件の検討

毛髪からの薬物の抽出の最適化を見いだすために、4種の抽出溶媒 [メタノール-アセトン-濃アンモニア水 (10 10 1), プロテイナーゼ K, 1M 水酸化ナトリウム及びメタノール-アセトン-トリフルオロ酢酸 (25 25 1)] による抽出効率を、PPH投与のラット毛髪試料を用いて、比較 検討した。

2-4) 分析法

ラット毛髪試料は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(5-(methylphenyl)-5-phenylhydantoin の1 µg/mL MeOH solution) を100 µLを加え、1.5 mLの methanol-acetone-NH₄OH(10 10 1) 中で超音波下に1時間抽出し、室温で一夜放置した。毛髪をろ去後、溶媒は窒素で40°C以下で留去し、残さに1 mLリン酸緩衝液 (pH 6.0) と1 mL dichloromethane-isopropanol(5 1)を加えてボルテックス抽出し、有機層を分離して、これを窒素気流下に留去した。残渣を100 µLのacetonitrilに溶かし、20 µLの20% tetramethylammonium hydroxide/methanol solution と30 µLの methyl iodideを加えて、70 °C、10分間加温した。反応溶液を窒素気流下に留去し、0.2 mLリン酸緩衝液 (pH 6.0) と1 mL dichloromethane-isopropanol(5 1)を加えてボルテックス抽出し、有機層を分離して、これを窒素気流下に留去した。残差を50 µL acetoneに溶かし、GC-MSを測定した。

なお、ラット毛髪中のHydroxy代謝物を同定する場合、上記のメチル化体ではGC-MSにおいてピークの妨害を生じたので、methyl iodideの代わりにethyl iodideを用いて、エチル化を行った。

GC-MS測定条件

装置 Hewlett-Packard Model 5890 series-II/MSD5971,

カラム TC-1 capillary column (GL Science), 0.25 mm x 30 m with a 0.25 μ m film thickness

キャリアガス ヘリウム(流速, 4.5 psi),

温度条件 注入口, 200°C, 検出器, 280°C

昇温条件, 90°C (0.5-min hold) から 280°Cまで 20°C/分

オートインジェクター Hewlett-Packard Model 7673A autosampler

図2-4にPBとHPBのメチル化体のマスクロマトグラム及びマススペクトルを示す。定量は、内標準PB-d5 (m/z 237) を用い、選択イオンモニタリングによりPBは m/z 232、HPBは m/z 261のイオンで定量した。

PB: フェノバルヒタール, **HPB:** Hydroxy代謝物, **IS:** 内標準

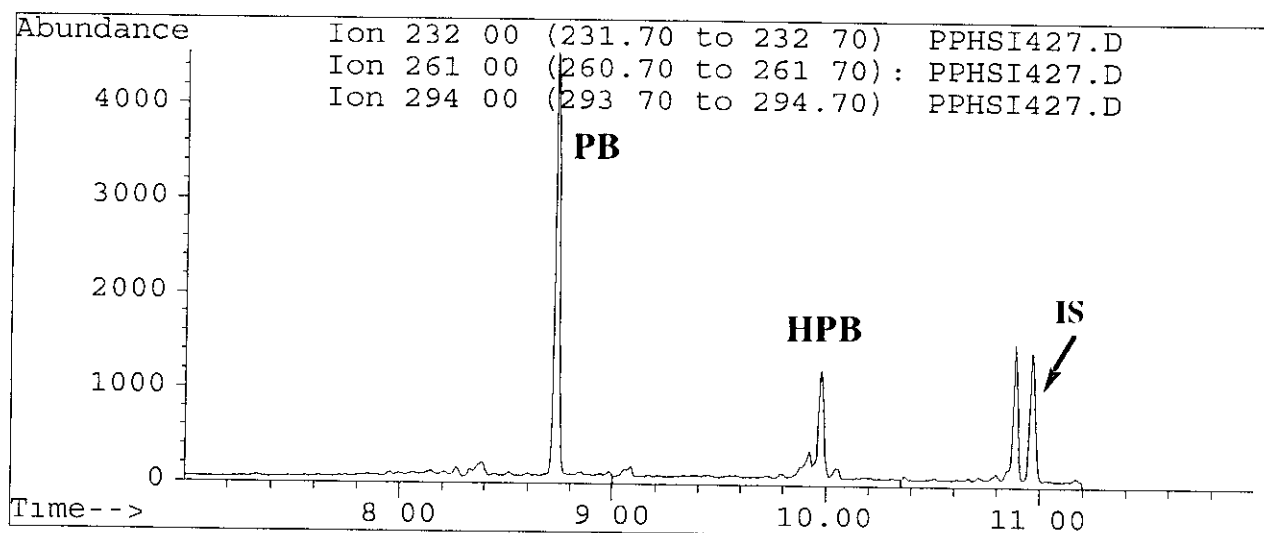


図2 フェノバルヒタールとHydroxy代謝物のマスクロマトグラム

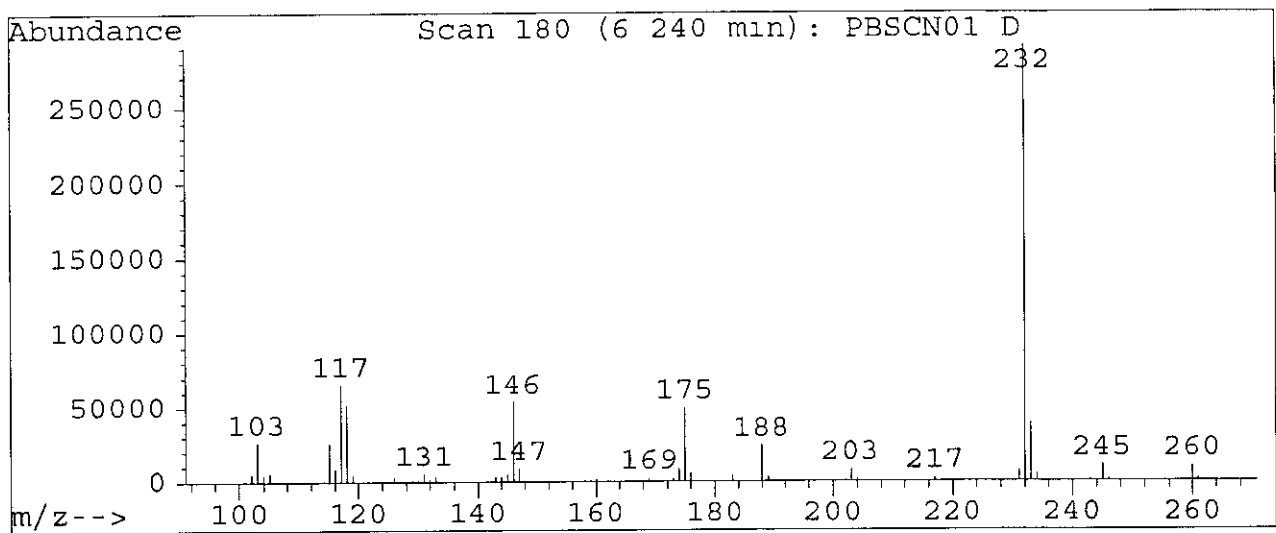


図3 フェノバルビタールのメチル化体のマススペクトル

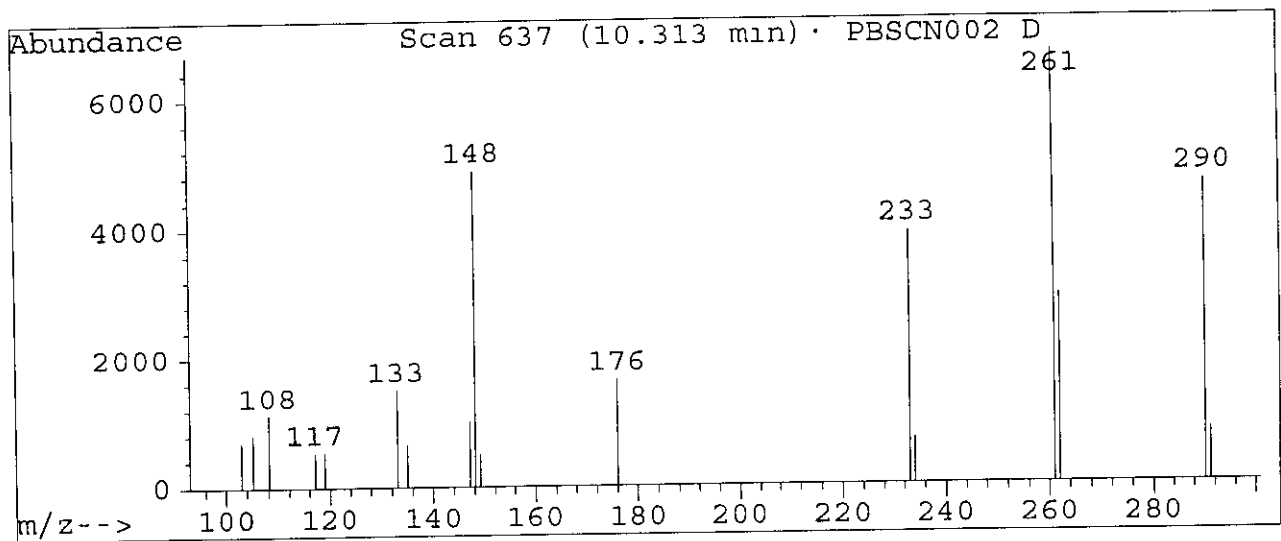


図4 Hydroxy代謝物のメチル化体のマススペクトル

(3) 結果と考察

抽出の最適化

毛髪からの薬物の抽出の最適化を見いたすために、4種の抽出溶媒 [メタノール-アセ

トニー濃アンモニア水 (10 10 1), プロテイナーセ K, 1M 水酸化ナトリウム及びメタノール-アセトン-トリフルオロ酢酸 (25 25 1)] による抽出効率を、PB投与のラット毛髪試料を用いて、比較 検討した。図*に示すように、PBの抽出効率は、プロテイナーセ K処理後、液液抽出に夜方法が最も高い結果をもたらしたが、代謝物の抽出効率はプロテイナーセ Kが最も悪く、メタノール-アセトン-濃アンモニア水 (10 10 1)抽出が最適であった。総合的に考慮して、2化合物の同時分析にはメタノール-アセトン-濃アンモニア水 (10 10 1)を抽出溶媒として選んだ。

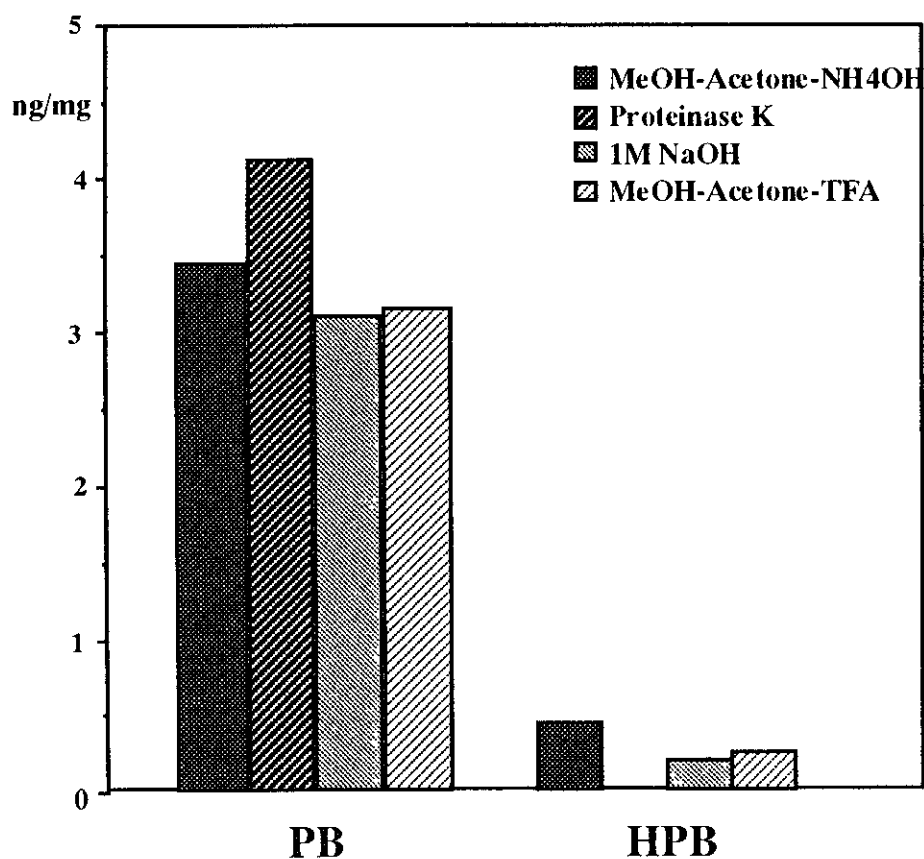


図5 4種の溶媒系による薬物の抽出効率

ラット毛髪からのPBと代謝物の検出

ラットコントロール毛髪からの抽出物のSIMクロマトグラム (図6) にはPBのメチル化体に相当するピークはなく、PB投与のラット毛髪からの抽出物のメチル化体のGC-MS分析の結果、SIMクロマトグラム上の8.75分にピークを示し (図7)、その保持

時間は標準品PBのメチル化体のそれと一致し、 m/z 260, 232及び175の主イオンの確認において、PBであると同定した。

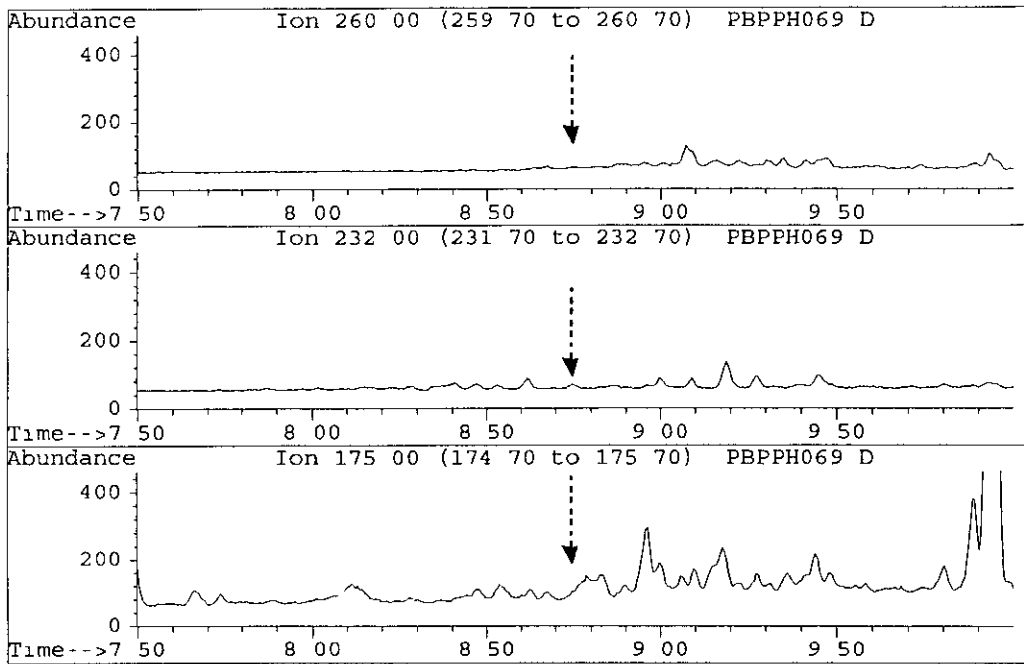


図6 ラットコントロール毛髪からの抽出物のGC-MSクロマトグラム

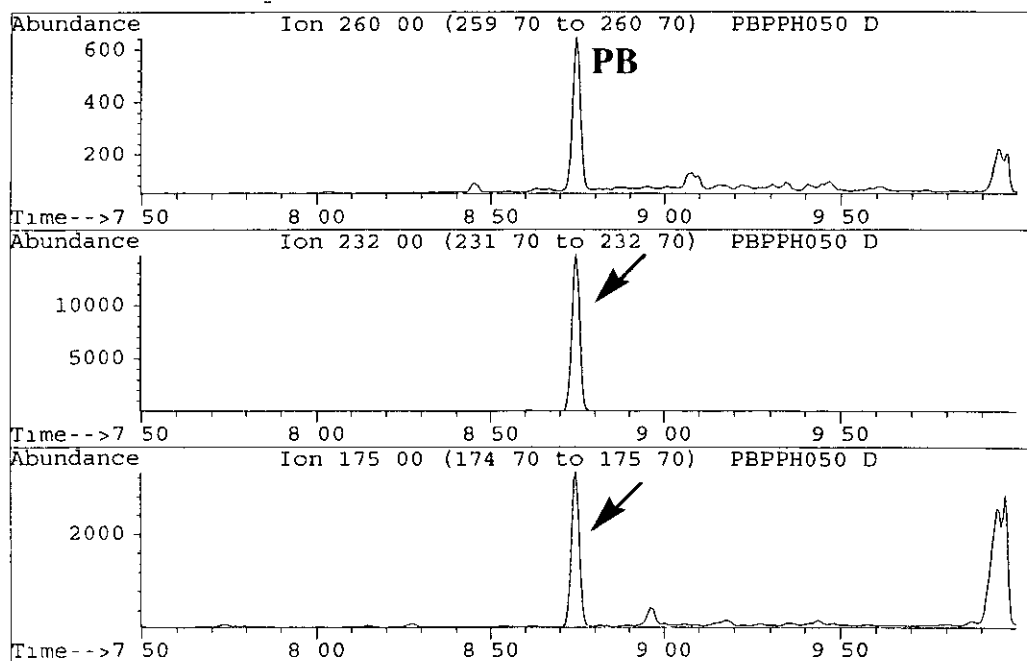


図7 PB投与のラット毛髪からの抽出物のGC-MSクロマトグラム (PBの同定)

また、ラットコントロール毛髪からの抽出物のSIMクロマトグラム（図8）にはHPBのエチル化体に相当するピーク（143分）はなく、PB投与のラット毛髪からの抽出物のエチル化体のGC-MS分析の結果、SIMクロマトグラム上の143分にピークを示し（図9）、その保持時間は標準品HPBのエチル化体のそれと一致し、 m/z 304及び332の主イオンが観測され、HPBであると確認した。

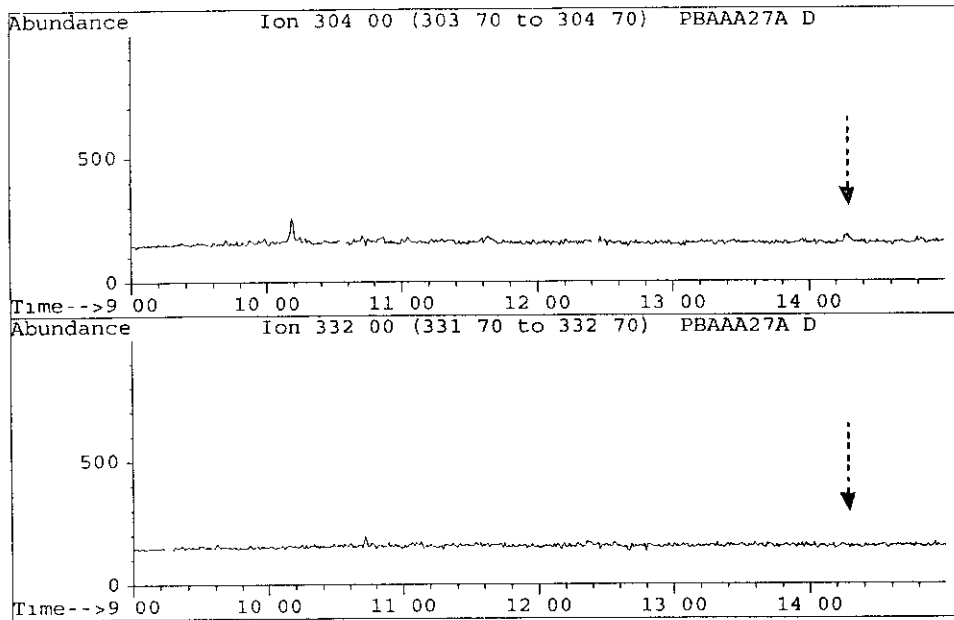


図8 ラットコントロール毛髪からの抽出物のGC-MSクロマトグラム

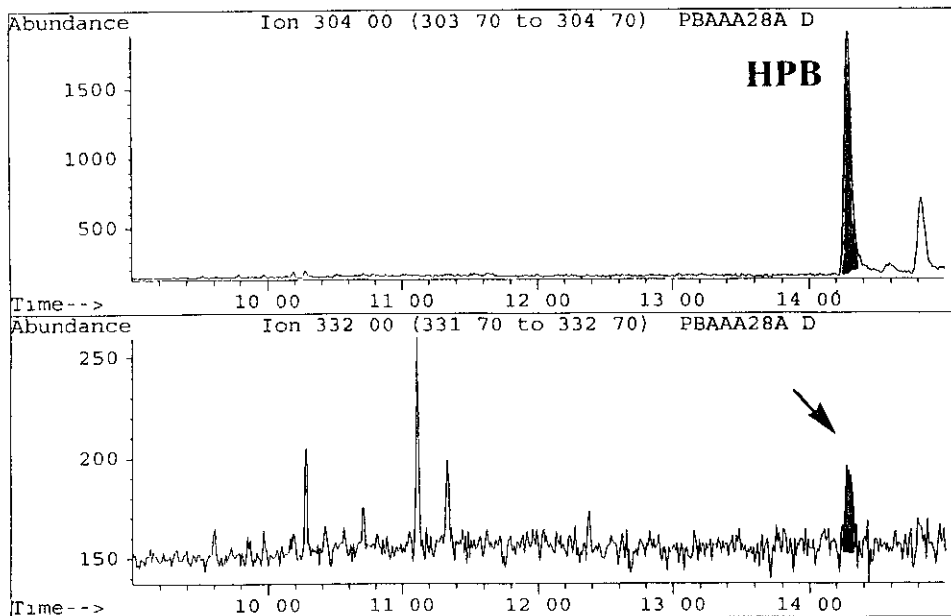


図9 PB投与のラット毛髪からの抽出物のGC-MSクロマトグラム（HPBの同定）

ラット毛髪中のP B濃度

表1 腹腔内及び経口投与によるラット毛髪中P B濃度

	P B濃度 (ng/mg)	平均 (ng/mg)
50 mg/kg, ip, 5 days		
Rat-1	49.2 ± 7.4	47.3 ± 5.8
Rat-2	39.6 ± 5.8	
Rat-3	53.1 ± 4.5	
15 mg/kg, oral, 5 days		
Rat-1	18.2 ± 2.1	19.4 ± 1.0
Rat-2	20.1 ± 0.3	
Rat-3	19.8 ± 1.0	

ラット毛髪中のP B濃度は、50 mg/kg, ip injection, 5日間で平均47.3 ng/mgで、15 mg/kg, oral, 5日間で平均19.4 ng/mgであった。なお、経口投与による毛髪中のhydroxy代謝物濃度は、平均1.7 ng/mgであった。

この表から見ると、腹腔内注射と経口投与では大きな差が見られず、むしろ投与量に依存した毛髪濃度が見られた。前項で示したように、フェニトインでも同様の傾向が見られた。

ヒト毛髪からのP Bの検出

意識不明で救急病院に運び込まれたP B中毒患者の頭髪を採取し、測定した。

毛髪からの抽出物はメチル化後、GC-MS分析の結果、SIMクロマトグラム上の8.83分にピークを示し（図10）、その保持時間は標準品P Bのメチル化体のそれと一致し、m/z 280, 203及び194の主イオンを明確に観測し、P Bであると確認した。その濃度は16.2 ng/mgであった。また、9.99分にm/z 233及び261のピーク（図11）が見られ、標品Hydroxy代謝物のメチル化体の保持時間と主要イオンと一致することから、このピークはHydroxy代謝物と推定した。

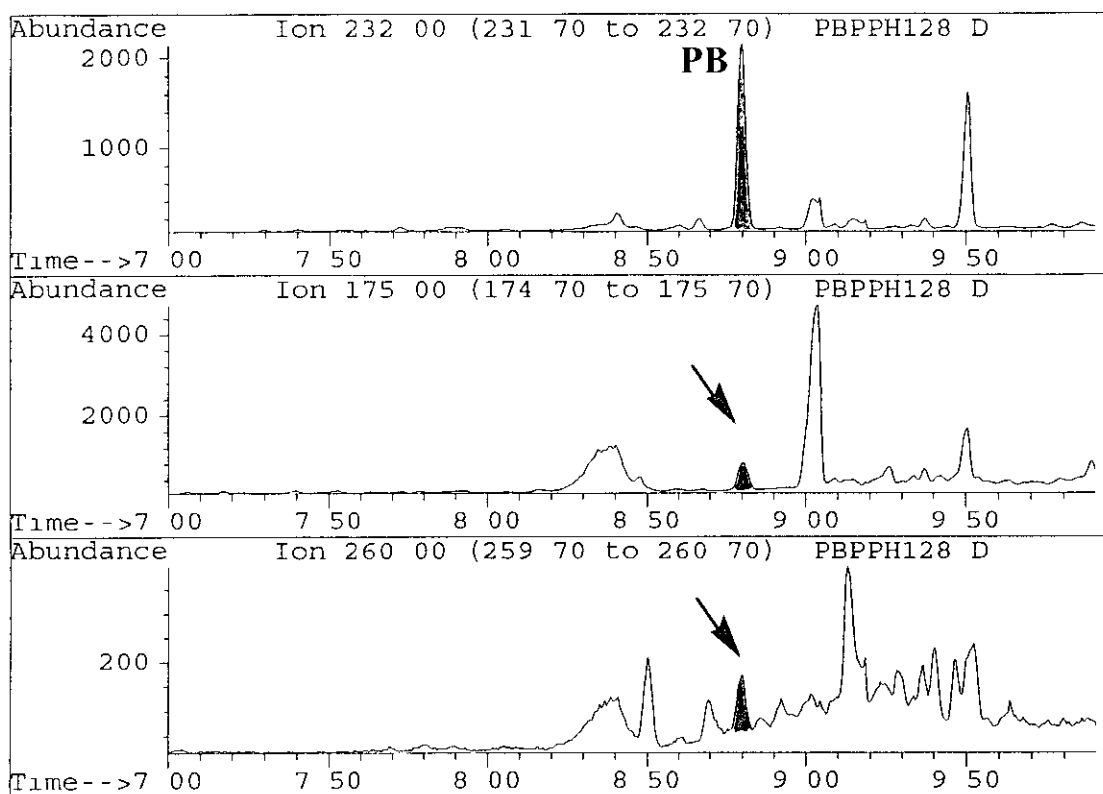


図10 P B中毒患者の頭髪の分析例（P Bの同定）

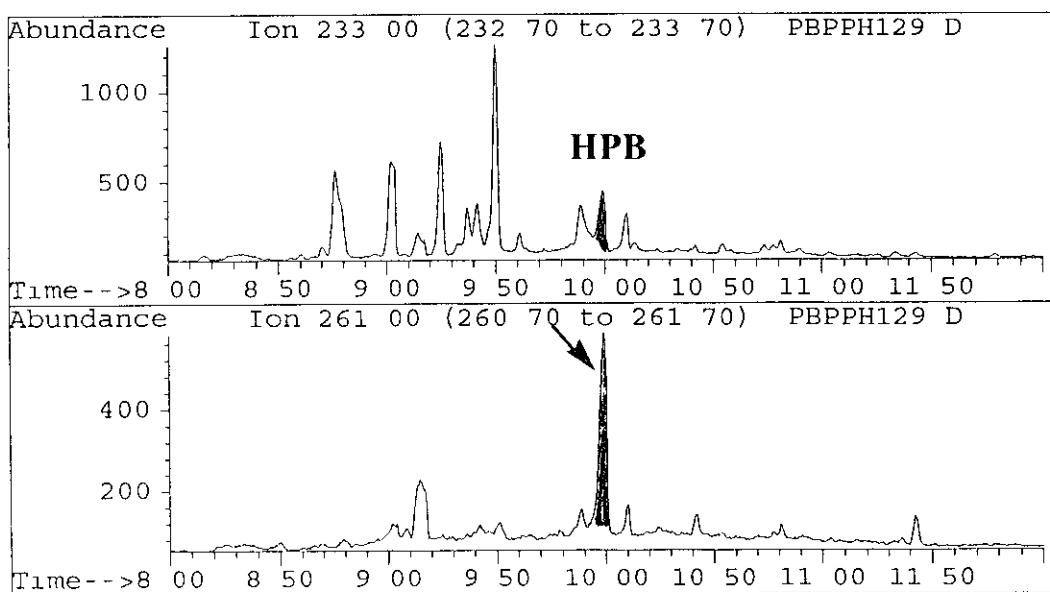


図11 P B中毒患者の頭髪の分析例（H P Bの同定）

(4) おわりに

P B投与のラット毛髪 毛根及びヒト頭髪からP Bを検出した。ラット毛髪からは微量ながら代謝物 para-hydroxy P Bを検出したが、毛髪中では親化合物のP Bが圧倒的に主成分であった。

また今回、P B中毒の患者頭髪を分析することかできた。5本の毛髪検体を分析したところ、P Bが16.2 ng/mg 検出された。また、微量ながらpara-hydroxy P Bも検出した。これで、P B使用者の毛髪からP Bを検出できることかわかったので、今後、毛髪試料の活用が期待できる。

参考文献

- 1) I Sunshine, Chemical evidence of tolerance to phenobarbital J Lab Clin Med , 50: 127-133 (1957)
- 2) J.B Costello et al , Treatment of massive phenobarbital overdose with dopamine diuresis Arch Int Med , 141 938-940 (1981)
- 3) A M.Bruce et al , The investigation of phenobarbitone, phenytoin and primidone in the death of epileptics Med Sci Law 17 195-199 (1977)
- 4) 佐藤孝道 編、妊娠と薬、薬事時報社、1992、p.97
- 5) C T Viswanathan et al , Pharmacokinetics of phenobarbital following single and repeated doses J Clin.Pharm , 19 282-289 (1979)
- 6) K D Parker et al., Blood and urine concentrations of subjects receiving barbiturates, meprobamate, glutethimide, or diphenylhydantoin Clin Tox. 2 131-145 (1970)
- 7) G L Plaa et al , Hydantoin and barbiturate blood levels observed in epileptics Arch Int Pharm Ther , 128 375-383 (1960).
- 8) D J Harvey et al , Detection of a 5-(3,4-dihydroxy-1,5-cyclohexadien-1-yl)-metabolite of phenobarbital and mephobarbital in rat, guinea pig and human Res Comm Chem Path Pharm 3 557-565 (1972)
- 9) B K Tang et al., Metabolic fate of phenobarbital in man Drug Met Disp , 7 315-318 (1979)
- 10) M P.Whyte et al , Metabolic fate of phenobarbital Drug Met Disp , 5 63-70 (1977).

5. メチルフェニデートの毛髪分析と診断

(1) 緒言

メチルフェニデート(MPD Pentazocine)は鬱病、ナルコレプシー、小児過運動症に用いられるフェネチルアミン系薬物である。MPDは1944年に合成され、threo-ラセミ体塩酸塩で市販されるようになった。経口剤として、1回5-20mg、1日20-60mg投与される。MPDの乱用は知られており、錠剤を水に溶かして、静脈注射により乱用される。

MPDを20mg経口で2人の女性に与えたとき、摂取1及び3時間後に血清濃度はそれぞれ1.9及び3.6ng/mLとなり、代謝物のRitalinic acid(RTA)は1.51及び1.20ng/mLであったと報告されている¹⁾。4人の子供に10-15mg経口投与3-6時間後の血漿濃度はPTCで4~2.5ng/mLで、RTAで80-250ng/mLであり、MPDの血漿半減期は2.6時間であった²⁾。

MPDは代謝は速く、加水分解により不活性のRTAになる。この加水分解はアルカリ水溶液中でも、血液中でも起こり、酸やEDTAの添加で少しは抑制される。MPD投与量の80%は24時間以内に尿に排泄され³⁾、主に、RTA(60-81%)、6-oxo-a-phenyl-2-piperidineacetic acid(5-12%)となり、投与量の1%以下が尿に未変化体として排泄される⁴⁾。

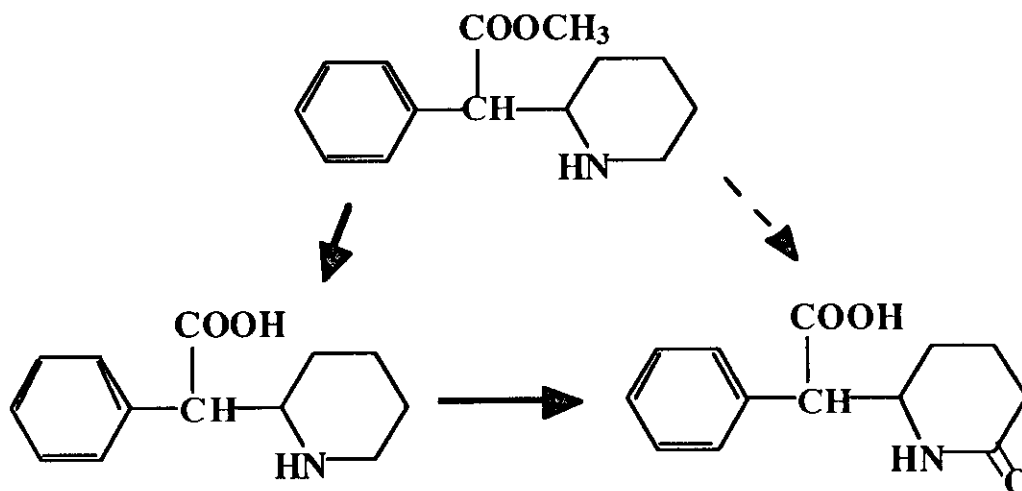


図1 メチルフェニデートの主代謝経路

MPDのオーハートースにより、吐き気、嘔吐、アシテーション、震え、うすき、妄想、幻視、発汗、皮膚の充血、頭痛、心悸亢進、高熱、心臓不整脈、けいれん、昏睡を引き起こす。MPD静脈注射乱用が進行すると、肉芽腫症を引き起こし、死に至る。MPDを使用して運転した6人のトライハーの尿に0.8-40 µg/mLのMPDが検出されている⁵⁾。また、MPD 40 mgを静脈注射して1時間後に心臓停止で死亡した女性の死後の血液及び肝臓中のMPD濃度はそれぞれ2.8及び2.1 µg/mLであった⁶⁾。

本研究はメチルフェニテート投与のラット毛髪から検出できる薬物とその濃度レベルを明らかにすることが目的である。

(2) 実験材料と実験方法

2-1 薬品と動物

メチルフェニテート(MPD)及びヒリタリン酸(RTA)はSigma社(米国)から、bis-(trimethylsilyl)acetamide(BSA)とpentafluoroisopropanol(PFIP)はAldrich社(米国)購入し、Phenmetrazineは我が研究室で合成し、他の薬品は試薬特級を用いた。

雄性 Dark Agouti(DA)ラットはSLC社(静岡)から5週齢を購入し、1週間の馴化飼育後、薬物投与の実験を行った。

2-2 毛髪試料

ラット毛髪 ラットの背部の毛を薬物投与前に動物用電気バリカンで予め刈っておく。1群3匹の雄性 Dark Agouti(DA)ラット(茶褐色の毛、6週齢)に1日1回、5日間50 mg/kgのMPDを腹腔内に注射した後、最終投与日から17日後に新たに生えてきた背部の毛髪を電気ハリカンで採取し、毛幹試料として分析を行った。

2-3 分析法

ラット毛髪試料は2 mLの0.1% SDSで2回、2 mLの蒸留水で2回、それぞれ1分間ホルテックスミキサーで洗浄した。乾燥後、約10 mgの試料に内標準液(Phenmetrazine 1 µg/mL in methanol)を100 µLを加え、2 mLのmethanol-