

緒言

催眠薬(hypnotics)とは正常の睡眠と似た中枢神経抑制状態を起こす薬をいい、睡眠薬(sleeping pills)とも呼ぶ。化学構造による分類では、ベンゾジアゼピン系催眠薬、ハルピツール酸系催眠薬、非ハルピツール酸系催眠薬に分けられる。ハルピツール酸系、非ハルピツール酸系催眠薬は少量で鎮静、中等量で催眠、多量で麻酔、過量で昏睡から死に至らしめる中枢神経抑制作用をもつ。一方、ベンゾジアゼピン系催眠薬は副作用が少なくより安全な薬として不眠症の第一選択薬となっている。

ベンゾジアゼピン系催眠薬はいずれも消化管からよく吸収され、治療量では1～3時間で最高血中濃度に達する。排泄は一般に遅く、数日間にわたり徐々に尿中に排泄される。長時間型にはハロキサゾラム、(haloxazolam)、フルラゼパム(flurazepam)、中間型にはエスタゾラム(estazolam)、ニトラゼパム(nitrazepam)、ニメタゼパム(nimetazepam)、フルニトラゼパム(flunitrazepam)、短時間型にはトリアゾラム(triazolam)、ロルメタゼパム(larmetazepam)、リルマザフォン(rilmazafone)が知られている¹⁾。

作用機序はベンゾジアゼピン系催眠薬がベンゾジアゼピン結合部位に結合することにより、レセプターが刺激されクロライドイオンの透過性が増し、細胞内外の電位差が小さくなり、神経伝達が抑制されることによる(Fig 1)。

多くのベンゾジアゼピン系催眠薬の中で、毒性や薬物乱用の面から問題となるのは、ハルシオンとしても有名なトリアゾラム(TZ)である。TZは他のベンゾジアゼピン系催眠薬と異なり、血漿中の半減期が短く、0.125mg以下の量で催眠作用を示す。TZを催眠薬として使用する場合には、0.125mg以下の投与量としているが、0.25mgを経口投与すると、投与後、45分～15時間で最大に達し、血漿濃度の平均値は30μg/Lである。吸収は早く、直ちに催眠作用を示し、速やかに体内より消失する即効性の優れた薬物であるが^{2)~6)}、過去においては大量服用による死亡例も多数みられる⁷⁾⁸⁾。また、1998年には、伝言ダイヤルを利用し、この薬剤を服用させた犯罪が報道されたことは記憶に新しいことである。このように、TZは裁判化学的にも重要なものの一つである。

Fig 2 にベンゾジアゼピン系催眠薬のヒトにおける代謝経路を示す。ここに示

したように、肝臓でチトクローム P-450 により酸化される。酸化された後、速やかにグルクロン酸抱合体として尿中に排泄される⁹⁾。

TZ は、体内で水酸化体とその抱合体に代謝される。代謝物としては、1-hydroxymethyltriazolam(1-OH TZ)、4-hydroxytriazolam(4-OH TZ)、1-hydroxymethyl-4-hydroxytriazolam(1,4-diOH TZ)などがある¹⁰⁾。また、尿中には少量の未変化体の TZ と多量のグルクロン酸抱合体が排泄される(Fig 3)。48 時間以内に投与量の約 80%が尿中に、72 時間後には約 7%が糞便中に排泄される^{11)~13)}。

裁判科学、中毒学、ドーピング検査、臨床検査などにおける麻薬・覚せい剤に代表される依存性薬物の使用証明には、これまで血液と尿が主に用いられている。毛髪が用いられるのは今のところ特殊な場合のみである。尿試料の場合は、ルーチン検査に適しているが、代謝・排泄などにより比較的検出可能な期間が短いこと(1週間程度)、採尿時のトラブル(尿提出拒否など)、衛生面や輸送・保管の点での問題がある。また、血液試料は、代謝・排泄などにより薬物の検出時間がさらに短いこと、試料採取に痛みを伴うこと、試料の輸送・保管に冷凍を要することなどの難点がある。これらに対して毛髪試料は、種々の面で血液や尿試料の欠点を補うことのできる試料として注目されている。特に、毛髪は長期間薬物を蓄積するので、薬物使用歴を数ヶ月から数年前まで遡って調べることができること、使用時期を長期に渡って大まかに特定できるなど有利な点が多々ある¹⁴⁾。その上、他の生体試料に比べ、保存や輸送にも適している。

法中毒学における毛髪中薬物分析は、1979 年、Baumgartner らがラジオイムノアッセイにより、ヘロイン中毒者の毛髪からナノグラムレベルでのモルヒネの検出を報告した時より始まると言われている。現在までに 400 を超える毛髪中薬物分析に関する報告が見られるが、その主な分析対象薬物は、コカイン、モルヒネ/ヘロイン、覚醒剤、乱用薬物が圧倒的に多い。最近、環境汚染物質、ドーピング剤、ニコチン、制癌剤などの報告も見られる^{15)~20)}。今後、多くの薬物情報を提供する毛髪の利用が増すことが予想される。

これまでベンゾジアゼピン系薬物を毛髪中から高感度で検出した例は少なく、超微量測定法の開発が望まれていた。そこで本研究では、ベンゾジアゼピン系薬物の毛髪分析を液体クロマトグラフィー(HPLC)及びマススペクトルメーター

(MS) を用いて検討した。今回分析対象とした薬物を Fig 4 に示す。

第 1 章では TZ 及びその代謝物の HPLC-ESI/MS による測定法の検討、第 2 章では毛髪分析法の確立及び TZ とその代謝物の測定、第 3 章では毛根中 TZ の経時変化、第 4 章ではベンゾジアゼピン系向精神薬の毛髪分析、第 5 章ではヒト毛髪分析への応用を試みた。

第 1 章 TZ 及びその代謝物の HPLC-ESI/MS による測定条件の検討

1-1 緒論

ベンゾジアゼピン系催眠薬の中でも TZ は即効性の優れた薬物であるが、過去にはしばしば重大な事故を引き起こした危険な薬物でもある。そこで初めに TZ を測定対象物質とし、測定条件の検討を行った。

TZ を含めたベンゾジアゼピン系催眠薬の検出には操作が簡単な免疫化学的な方法が使用されるが、この方法では交差反応により、親化合物と代謝物を識別するのは困難である^{21)~24)}。分離分析法としては、薄層クロマトグラフィー(TLC)やガスクロマトグラフィー(GC)あるいは液体クロマトグラフィー(HPLC)が利用される。TLC は安価な方法であるが、類似した物質の分離は困難である上に一般に検出感度が低い。GC 法は感度が高く、短時間で測定できるが、分析に先立ち揮発性とするための誘導体化や加水分解操作などが必要となる。もちろんこの方法によれば、親化合物とその代謝物を分離検出することが可能である^{25)~30)}。HPLC 法は GC 法と比較して分離条件が緩和であり、熱に不安定な化合物に適しているため、様々な物質の分析に用いられている。ベンゾジアゼピン系催眠薬の分離分析についても例外ではなく、多くの報告がある^{31)~36)}。

TZ の分析としては、電子捕獲型検出器(ECD)や N、P 選択的検出器(NPD)を装備した GC が TZ 構造中の N、Cl を特異的に検出できるので優れている。また代謝物を含めた分析には、溶出時間の差により分離分析できる HPLC が用いられる。ガスクロマトグラフィー/マススペクトル(GC-MS)法は^{37)~40)}、生体試料中の TZ 及びその代謝物のイオンを選択的かつ高感度で測定できる方法であり、微量分析に適しているが、試料中に混在する不純物を厳密に取り除かなければならない上に、揮発性にするための誘導体化処理が必要となり、必ずしも高感度測

定が可能とは限らない。これに対して HPLC-MS 法では、一般的には厳密な前処理や誘導体化操作を必要としない^{41)~42)}。本章ではこの HPLC-MS を用いて毛髪中の TZ 及びその代謝物を高感度で分離定量できる測定法の確立を目指し、そのためにまず TZ 及びその代謝物の分離分析条件の検討をおこなった。

1-2 実験材料及び装置

1-2-1 試薬及び試液

標準物質として、Triazolam (TZ, Upjohn Farmocimica, S A)、1-hydroxymethyltriazolam (1-OH TZ, BIOMOL)、4-hydroxytriazolam (4-OH TZ, BIOMOL)、内標準物質として、1-hydroxymethyltriazolam d4 (1-OH TZ d4, Radian International)を使用した。溶媒として、acetonitrile(CH₃CN・関東化学)、methanol(MeOH, 関東化学)、acetic acid(AcOH・関東化学)、formic acid(HCOOH, 関東化学)、trifluoroacetic acid (TFA・関東化学)、水(精製水)を使用した。試薬類は特に記載がない限り、すべて特級品を使用した。

1-2-2 固相抽出装置

固相抽出装置には、固相抽出用 GL-SPE 吸引マニホールドキット (GL Science)を用い、固相抽出カラムには、疎水性陽イオン交換樹脂を充填した Bond Elut Certify (GL Science) を使用した。

1-2-3 測定装置

LC system として Hewlett Packard HP1100 series (送液ポンプ、デガッサー、カラムサーモスタット、オートサンプラー、DAD) を使用し、カラムには ODS-3 (150mm×4.6mm i.d., 5µm, GL Science)、データ解析には HP ChemStation (Yokogawa Analytical Systems)を用いた。イオントラップ型質量分析計は、LCQ (Finnigan MAT)を使用し、データ解析に、LCQ Rev 1.1 SPI (Thermo Quest, USA)を使用した。測定は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法のポジティブイオンモードで行った。

1-3 実験方法

1-3-1 移動相溶媒の決定

測定条件として、移動相が H₂O/CH₃CN の場合は 65/35、H₂O/MeOH の場合は 45/55 の isocratic 法を用い、送液ポンプの流速は 1ml/min とした。TZ、1-OH TZ、4-OH TZ の測定波長は UV 240nm とした。ESI 加熱キャピラリー温度と電圧はそれぞれ 275℃と 3.0kV に設定した。Source 電圧と電流はそれぞれ 4.8kV、100μA、tube lens offset を 20.0V に設定した。Collision gas はヘリウム(He)を用い、collision energy は 30%とした。質量スペクトルの測定は positive-ion mode より、測定範囲は m/z 300-500 とした。

1-3-2 前処理法の検討

MeOH、0.1M リン酸 buffer (pH 6.0) (各 2ml)で予めコンディショニングした固相抽出用カラムに 0.1M リン酸 buffer (pH 6.0) 2ml に溶解させた TZ (2nmol/ml)を保持させ、洗浄操作を行なった場合と行わなかった場合について、MeOH、CH₃CN、H₂O-MeOH(50/50)、H₂O-CH₃CN(50/50)、0.1% TFA-MeOH、0.1% TFA-CH₃CN、MeOH-28% NH₄OH(98/2)の溶出溶媒での回収率を測定した。

1-4 実験結果及び考察

TZ 及びその予想される代謝物は、その構造中に三級アミンが数個存在することから、MS での検出は positive-ion mode で行うのが適切であると考えられ、HPLC の溶出溶媒は酸性が有利である。LC/MS による分析では、TZ、1-OH TZ、4-OH TZ いずれの化合物も [M+H]⁺のイオンが最も強く検出された。この結果から、[M+H]⁺=343 (TZ)、[M+H]⁺=359 (1-OH TZ、4-OH TZ)がモニタリングイオンとして最適と判断し、以後、毛髪試料分析の検出イオンとした。またこれら 3 種の化合物は、Cl を有する化合物に特徴的な [M+2H]⁺、[M+3H]⁺のアイソトープパターンを示した。

1-4-1 移動相溶媒の決定

酸性度の異なる3種類のカルボン酸(キ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸)を移動相に添加し、MS感度の比較を行った。Fig 5にはTZ、1-OH TZ及び4-OH TZの各溶出溶媒におけるMS感度を内標準物質(1-OH TZ d4)との比較により示した。この図から明らかなように、TZ及びその代謝物(1-OH TZ、4-OH TZ)では添加した酸及び溶媒の種別により感度に差が見られた。MSのイオン量はアセトニトリルよりもメタノールの方が多かったか、バックグラウンドノイズレベルも高く、注入した標品の濃度に対して安定なイオン量が得られず、シグナル-ノイズ比から考えると、1-OH TZでは1%酢酸含有のアセトニトリルが最も安定で感度が高く、4-OH TZでは1%キ酸含有のメタノール、TZでは0.05%TFA含有のメタノールが最適であった。しかし、内標準物質(1-OH TZ d4)のリテンションタイムと同一である1-OH TZの感度が一番信用できるとと思われる。また、毛髪中の代謝物の量はTZに比較し微量と予想されたため、HPLCの溶出溶媒は代謝物に対して感度の良い1%酢酸含有のアセトニトリルとした。

1-4-2 固相抽出による前処理法の検討

HPLC-MSを行う場合には、適切な分離条件を設定すれば厳密な前処理を必要としないか、MSイオン源の汚染を避けるために、試料由来の不純物を取り除くための前処理法を、固相カートリッジカラムを用いて検討した。標品を用いた検討では、洗浄操作を行わない場合について検討した。酸性の抽出溶媒では、全くTZをカラムから溶出させることができなかったか、塩基性の抽出溶媒では、ほぼ定量的に回収することができた。しかし、試料中の不純物を除去することを想定し、洗浄過程を加えた場合には、最も回収率の良かったMeOH-28%NH₄OH(98:2)でも回収率はわずか10%程度に低下した。これは各洗浄過程におけるTZの漏出や樹脂、チューブ等への吸着が考えられたので、以後の毛髪分析の実験では固相抽出による前処理を行わないことにした。

第2章 毛髪分析法の確立及びTZとその代謝物の測定

2-1 緒論

毛髪は、皮膚の外に出ている毛幹部と皮膚の中にある毛根部に別れているか、

毛根部にはまだ角質化していない生きた細胞の毛球があり、ここで毛母細胞が造られ、角質化しながら上方に押し上げられる。血中の栄養分は毛乳頭を経て毛球に入っていくが、血中薬物も同様にこの経路で取り込まれると考えられる(Fig 6)。

薬物の毛髪への移行性は薬物の種類によって 1000 倍以上の差があると報告されている⁴³⁾。コカイン、フェンシクリジンなどは毛髪への移行性は高く、モルヒネなどは移行性が低い。血中からの毛髪への移行は薬物の物性（脂溶性、メラニン親和性、塩基性など）に影響を受けることが証明されている。

TZ では、現在まで GC 法、HPLC-UV 法など多くの分析法が報告されており⁴⁴⁾、血漿中の定量など実際試料への適用がなされてきた。しかし、未だ毛髪中に TZ あるいはその代謝物を検出したと言う報告はない。そこで DA 系ラットを用いてその体毛及び毛根を試料とする測定法を検討した。

2-2 実験材料及び装置

2-2-1 試薬及び試液

標準物質の TZ(Uppjohn Farmocquímica, S A)、1-OH TZ(BIOMOL)、4-OH TZ(BIOMOL)、内標準物質の 1-OH TZ d4 (Radian International)、溶媒の acetonitrile(CH_3CN ・関東化学・特級試薬)、acetic acid(AcOH ・関東化学・特級試薬)、水(精製水)は 2-1-1 と同様である。

毛髪洗浄用として Sodium dodecylsulfate(SDS・関東化学・特級試薬)、抽出用として dichloromethane (CH_2Cl_2 ・関東化学・特級試薬)を使用した。

2-2-2 実験動物

日本 SLC より購入した DA 系雄性ラット(5weeks、ca 100g)を使用した。なお、実験動物は室温の飼育室で固形飼料及び水道水を自由に摂取させたものを使用した。

2-2-3 測定装置

LC system として Hewlett Packard HP1100 series (送液ポンプ、デガッサー、カラムサーモスタット、オートサンプラー、DAD) を使用し、カラムには

Mightysil RP-18 (100mm×20mm i.d., 3μm, 関東化学)、データ解析には HP ChemStation (Yokogawa Analytical Systems)を用いた。イオントラップ型質量分析計は、LCQ (Finnigan MAT)を使用し、データ解析に、LCQ Rev 1.1 SPI (Thermo Quest, USA)を使用した。測定は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法で行った。ESI 加熱キャピラリー温度と電圧はそれぞれ 225℃と 17V に設定した。電圧と電流はそれぞれ 4.25kV、100μA、tube lens offset 50.0V に設定した。collision gas はヘリウム(He)を用い、collision energy は 30%とした。質量スペクトルの測定は positive-ion mode を用い、測定範囲は m/z 300-500 とした。なお、アセチル化体の測定範囲は、m/z 150-800 とした。

2-3 実験方法

2-3-1 セミマイクロカラムを用いた HPLC 条件の検討及び検量線の作成

溶出条件は H₂O CH₃CN AcOH(75:25:1) から、gradient elution を H₂O CH₃CN AcOH (74:26:1)までに 7 分間、isocratic elution で 10 分間、gradient elution を H₂O CH₃CN AcOH (65:35:1)までに 7 分間、isocratic elution で 9 分間、gradient elution を H₂O CH₃CN AcOH (10:90:1)まで 7 分間として分離分析をおこなった。なお gradient 条件はすべて linear である。また、この方法を使用し、検量線を作成した。内標準物質(1-OH TZ d4)の濃度は 5ng/injection である。

Table1 Concentrations of calibration curves

	NO 1	NO 2	NO 3	NO 4	NO 5	NO 6
TZ	2.57	1.72	0.86	0.43	0.17	0.09
1-OH TZ	1.00	0.50	0.25	0.13	0.05	0.03
4-OH TZ	2.50	1.75	1.25	0.75	0.50	0.25

ng/injection

2-3-2 動物実験操作法

投与開始前に背部の毛を刈り取った DA 系の雄性ラット (5weeks, ca 100g) に TZ を投与し、毛髪中の親化合物と代謝物の検出を行った。ethanol saline(4:6)

の溶液に TZ を溶解させ 3mg/ml の溶液を作りこれを試料とした。この試料を 1 日 2 回、5 日間腹腔内投与し、5 日目の投与 2 時間後に毛根を採取した。又、最終投与日から 7 日後に体毛を刈り取り毛髪試料とした。3 匹のラットには計 3mg/kg 投与し、他の 3 匹には計 6mg/kg 投与した。

2-3-3 体毛及び毛根の前処理法

先の実験(2-3-2 動物実験操作法)より得られた体毛に 0.1% sodium dodecylsulfate 1ml を加え超音波で一分間処理後、溶液除去。この操作を三回繰り返した。次に、精製水 1ml を加え超音波で一分間処理後、溶液除去。この操作を三回繰り返し、体毛を洗浄した。その後、体毛の水分をろ紙で軽くふき取り、デシケーターで乾燥し、1mm 以下になるまで細切した。この体毛を約 10mg 正確に量りとり、内標準物質 (1-OH TZ d4, con 100ng/ml) 200 μ l を入れ、 CH_2Cl_2 -MeOH-NH₄OH (20 80 2) 2ml を加えた。その後、超音波処理を一時間行い、室温にて一昼夜放置した。遠心分離(3000rpm、5min)の後上清を分取した。次いで遠心エハポレーターで溶媒留去し、LC の移動相 (H_2O CH_3CN =70 30) 200 μ l に再溶解させ、その 50 μ l を LC/MS で測定した。毛根の場合は目的物質及びその代謝物が一部除去される可能性を考慮し、洗浄過程を省き細断し(1mm 以下)、約 2mg を正確に量り取り、以後体毛の場合と同様に行なった。(Fig 7)

2-3-4 ラット肝ミクロソームによる TZ の代謝実験

5 週齢のラットを気絶させ、頸動脈を切って血を抜き、肝臓を摘出した。この肝臓を、1.15% KCl、1mM EDTA を含む水溶液 40ml で灌流し 5g 切り取り、1.15% KCl、1mM EDTA を含むリン酸緩衝液 10ml 加え、十分にホモジナイズし、遠心チューブ 4 本に各 3ml 分配した。13,000 rpm (9,000 \times g、1 $^\circ$ C)、20min で遠心分離し、上清を採り、各 1ml 遠心チューブ 2 本に移した。44,000 rpm、105,000 \times g、1 $^\circ$ C、60min で遠心し、上清を除去、沈澱物を 2 回、1.15% KCl、1mM EDTA を含んだリン酸緩衝液で洗い、2 本の遠心チューブの沈澱物を 1 本の試験管に集め、TZ 200 μ g を溶解させた [1.15% KCl、1mM EDTA、0.5mM β -NADP⁺、3.75mM DL-Isocitric Acid Lactone、1 unit/ml NAD⁺ 5mM MgSO₄] リン酸緩衝液 3ml 加え、ホモジナイズし、37 $^\circ$ C、20min インキュベートした後、3 $^\circ$ C で

一晚放置した。その後、酢酸エチル 3ml 加えよく振り混ぜ、3000 rpm (600×g)、10min 遠心にかけて抽出し、有機層を採り、N₂ ガスで溶媒を留去した。この抽出作業を 3 回繰り返した。得られた残渣を 200 μl の溶液(H₂O CH₃CN=7 3)に溶かし、十倍希釈後その 50 μl を LC/MS にて測定した。

2-3-5 未知代謝物の構造確認

先の操作(2-3-4 参照)で分取し、N₂ ガスで留去した TZ 代謝物(1-OH TZ、4-OH TZ、1,4-diOH TZ)の残渣に無水酢酸 ピリジン=1 2 溶液 100 μl を加えてよく混和し、65℃、1hr 反応させた。反応液を減圧下溶媒留去し、残渣を 200 μl の溶液(H₂O CH₃CN=7 3)に溶かし、50 μl を LC/MS にて測定した。1-OH TZ 及び 4-OH TZ の標準物質も同様の操作を行い、50 μl、LC/MS にて測定した。

体毛・毛根抽出物の場合は、2-3-3 の操作で抽出し、減圧下溶媒留去した体毛・毛根抽出物の残渣に無水酢酸 ピリジン=1 2 溶液 400 μl を加えてよく混和し、65℃、12hr 反応させた。反応液を減圧下溶媒留去し、残渣を 200 μl の溶液(H₂O CH₃CN=7 3)に溶かし、その 50 μl を LC/MS にて測定した(Fig 8)。

2-4 結果及び考察

2-4-1 TZ 及びその代謝物の検量線

1-3-1 で示した分離分析条件では 2 種の水酸化体 (1-OH TZ、4-OH TZ)の分離が不十分であり、gradient 法を用いて検討したが、分析時間に 1 時間を要した。そこで、更に効率の良い分析法とするため、また毛髪中の不純物による MS 汚染を考慮し、セミマイクロカラムを使用し、TZ 及び 2 種の水酸化体 (1-OH TZ、4-OH TZ)の HPLC 条件を再度検討した。溶出条件は、H₂O CH₃CN AcOH (75 25 1)から H₂O CH₃CN AcOH (10 90 1)までの linear gradient 法とした。この時の TZ、1-OH TZ、4-OH TZ の保持時間(RT)はそれぞれ、30.5min、21min、22min となった(Fig 9)。

次に、この測定条件を用いて検量線を作成した。ピーク面積比により得られた検量線とピーク高さの比により得られた検量線、いずれも良好な直線性を示した。どちらを用いても定量可能であったか、体毛・毛根の定量では、ピーク面積比を

用いて行った。TZ では 10ng/200 μ l、1-OH 体では 40ng/200 μ l、4-OH 体では 10ng/200 μ l の測定範囲まで、いずれも良好な直線性を示した(Fig 10)。

2-4-2 ラット体毛及び毛根の測定結果

毛髪由来の成分を出来る限り除去するとともに、毛髪中の薬物を効率良く抽出するための条件検討は、毛髪分析の最も重要なステップである。抽出方法には、1) アルカリ可溶化後、有機溶媒による方法、2) 有機溶媒による方法、3) 酸又は酸性 MeOH による方法、4) 酵素処理 (β -グルクロニダーゼ、アрилサルファターゼ)、などが報告されている。1) のアルカリ可溶化法は、毛髪が溶けて、粘度の高い液体となるので、尿抽出と同様に処理できるが、夾雑物が比較的多量に抽出される欠点がある。3) の方法は、塩基性薬物に対し抽出効率も良く、抽出物の中に毛髪の常成分が比較的少ない点や後処理が容易といった利点があるが、TZ が分解する可能性がある。4) の酵素処理は酵素反応の不安定さにより抽出効率が一定しない。これらの理由から TZ 及びその代謝物の抽出には 2) の有機溶媒で抽出する方法を使用した。

抽出効率は溶媒の液性に影響されると考えられる。そこで、有機溶媒に酸性又は塩基性の化合物を添加し抽出率を測定した。酸性化合物には TZ を分解しない TFA を用いた MeOH-TFA(50:1)を使用した。塩基性溶媒には 1-4-2 の結果より、抽出効率が最も良かった MeOH-28%NH₄OH(98:2)に CH₂Cl₂ を加えた MeOH-CH₂Cl₂-NH₄OH(80:20:2)を使用した。また、ベンゼン、酢酸エチル、50%MeOH、50%CH₃CN でも同様に抽出率を測定した。Blank の体毛(洗浄、細断済み)に、TZ を 34ng、1-OH TZ、4-OH TZ をそれぞれ 2ng、内標準物質として 1-OH TZ d₄ を 20 ng 加え、前述の抽出法(2-3-3 参照)による抽出操作を行い抽出効率を比較した。TZ の抽出効率は MeOH-TFA(50:1)が最も良かったが、代謝物である 4-OH TZ を分解することがわかった。MeOH-CH₂Cl₂-NH₄OH(80:20:2)は 1-OH TZ、4-OH TZ すべてにおいて抽出効率が最も良く、以後これを抽出溶媒として使用することとした。

6mg/kg 投与のラット毛根・体毛、3mg/kg 投与のラット毛根・体毛を測定した時の典型的なマスクロマトグラムとマススペクトルを Fig 11~Fig 14 に示した。標品との比較により、1-OH TZ、4-OH TZ、未変化体の TZ を確認すること

かてきた。さらにこれら 3 種以外に、RT が 13min と早く、1-OH TZ、4-OH TZ より極性の高い化合物($[M+H]^+=375$)が検出され、1,4-d₁OH TZ と推測した。

Table 2 には、毛根・体毛中の TZ、1-OH TZ、4-OH TZ、及び 1,4-d₁OH TZ と思われる代謝物の測定値を示した。いずれの試料でも 4-OH TZ が主代謝物として、未変化体及び 1-OH TZ と共に検出された。これは、体内で速やかに水酸化を受けた TZ が、体毛・毛根に移行したものと考えられた。また、1,4-d₁OH TZ と思われる代謝物は、1-OH TZ の検量線を用いて概算すると毛根で 10mg あたり ng オーダーと比較的高濃度で見い出された。

2-4-3 アセチル化による水酸化代謝物の確認

毛根・体毛中の 1,4-d₁OH 体の同定をするために、3 種類の TZ 代謝物(1-OH TZ、4-OH TZ、1,4-d₁OH TZ)を無水酢酸を用いてアセチル化し LC/MS での確認を試みた。アセチル化により、1-OH TZ 及び 4-OH TZ のスペクトルは分子量が 42 増えた $[M+H]^+=401$ で測定され、1,4-d₁OH TZ のスペクトルは分子量が 84 増えた $[M+H]^+=459$ で測定されると予想される。標品での 1-OH TZ、4-OH TZ それぞれのアセチル化体は 34.5min、33.8min にピークが検出され、 $[M+H]^+$ は 401 であった(Fig 15)。

体毛・毛根抽出物の 1,4-d₁OH TZ であると思われる化合物のアセチル化体を測定したマスキロマトグラムを Fig 16 に示した。RT は 13min から 39.5min に移動し、スペクトルは分子量が 84 増えた $[M+H]^+=459$ で測定されたことからこの化合物は水酸基を 2 つもつことが確認された。一方、ラット肝ミクロソームから得られた 1,4-d₁OH TZ と思われる代謝物を同様にアセチル化したところ、HPLC のクロマトグラムにおいて、類似のピーク移動が観察され、またマススペクトルパターンが同一であった。更に、アセチル化物のスペクトルも CI 特有のアイソトープパターンを示したことから、未知の代謝物は 1,4-d₁OH TZ であると判断した。

体毛・毛根抽出物には夾雑物が多量に存在しており、この夾雑物との反応により目的物質との反応が速やかに進行しないと考えられるので、体毛・毛根抽出物のアセチル化では、標品の場合と異なり反応時間を長くし、試薬の量を多く用いた。

第3章 毛根中 TZ の経時変化

3-1 緒論

毛髪は排泄器官であり、同時に蓄積器官でもある。薬物は血液からゆっくりと毛髪に入ると考えられていたが、比較的速やかに毛髪に取りこまれる事が最近の研究で確認されている⁴⁶⁾⁴⁷⁾。それゆえ、毛根中の薬物は、血漿中の薬物モニタリングと同様に薬物投与直後から検出することが可能である。それにより、毛根中の薬物モニタリングを通じて、血液では得られない比較的長い期間の薬物の分布・消長の情報を引き出し得ることが期待される。本章では、TZ 投与のラット毛根中における TZ 及び代謝物の濃度の経時変化を測定した。

3-2 実験材料及び装置

3-2-1 試薬及び試液

試薬及び試液は、前述のものを使用した。(2-1-1 参照)

3-2-2 測定装置

LC system、MS system 共に前述のものを使用した。(2-2-3 参照)

3-2-3 実験動物

実験動物は、前述のものを使用した。(2-2-2 参照)

3-3 実験方法

3-3-1 測定条件の検討及び検量線の作成

前述(第2章)までの MS 測定では Full MS で測定していたが、今回は経時変化の測定を行うので、これまでよりもさらに低濃度の TZ 及びその代謝物を測定しなければならない。そこで、MS 測定法を Full MS から SIM に変えて測定することとした。選択イオンは TZ が $[M+H]^+=343.2\pm 0.5$ 、1-OH TZ、4-OH TZ が

[M+H]⁺=359.2±0.5、1,4-OH TZ が [M+H]⁺=375.2±0.5、IS(1-OH TZ d4) が [M+H]⁺=363.2±0.5 とした。

また、検量線作成における試薬の濃度は、前述(2-3-1 参照)と同様である。

3-3-2 TZ 投与ラット毛根の測定

DA 系の雄性ラット(6weeks、ca 110g)に TZ を投与し、毛髪中の TZ と代謝物の検出を行った。ethanol saline(4:6)の溶液に溶解し、試料溶液とした(2.5mg/ml)。この溶液を二匹のラットにそれぞれ 2.5mg/kg、5mg/kg 腹腔内投与し、投与 30 分、1 時間、2 時間、6 時間、24 時間、48 時間後に毛根を採取した。

得られた毛根は、TZ 及びその代謝物が一部除去される可能性を考慮し、洗浄過程を省き細断し(1mm 以下)、約 2mg 正確に量り取った。次に内標準物質 200 μl (1-OH TZ d4、con 100ng/ml)、及び CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH (20:80:2) 2ml を加えた。これを、超音波処理一時間、その後室温で一昼夜放置し、遠心分離(3000rpm、600_g、5min)の後上清を分取した。これを遠心エバポレーターで溶媒留去し、LC の移動相と同じ組成の溶液 (H₂O:CH₃CN =70:30) 200 μl に再溶解させ、そのうちの 50 μl を LC/MS で測定した。

また、洗浄による影響を調べるために、洗浄操作を加えた場合は、得られた毛根を 0.1% sodium dodecylsulfate 2ml を加え一分間攪拌し溶液除去。この操作を三回繰り返した。次に、精製水 2ml を加え一分間攪拌し溶液除去。この操作を三回繰り返し、以後 2-3-3 と同様に抽出操作を行った。

3-3-3 TZ 投与ラット血漿の測定

DA 系の雄性ラット(6weeks、ca 110g)に TZ を投与し、血液中の TZ とその代謝物の検出を行った。ethanol saline(4:6)の溶液に TZ を溶解させ 2.5mg/ml の溶液を作りこれを試料とした。この試料を 5 匹のラットにそれぞれ 5mg/kg 腹腔内投与し、投与 15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間後の血液を採取した。

得られた血液は、13,000 rpm(9,000×g)、1℃、10min で遠心分離し、血漿を分取した。この血漿 200μl に内標準物質 200 μl (1-OH TZ d4、con 100ng/ml)、CH₂Cl₂-ヘキサン (50:50) 1ml を加え十分攪拌し、3,000 rpm(600×g)、10min で遠心分離し、上清の有機相を分取した。この抽出操作を 3 回繰り返して抽出液を

減圧下留去し、LC の移動相 (H₂O CH₃CN =70 30) 200 μl に再溶解させ、そのうちの 50 μl を LC/MS で測定した。

3-4 結果及び考察

3-4-1 測定条件の検討及び検量線の作成

SIM による測定条件を用いて検量線の作成を行った。ピーク面積比により得られた検量線とピーク高さの比により得られた検量線、いずれも良好な直線性を示した。どちらを用いても定量可能であったが、経時変化の測定では、SIM を用いた事によりベースラインが安定したためピーク高さ比を用いた。TZ の直線範囲は 10ng/200μl、1-OH 体は 4.0ng/200μl、4-OH 体は 10ng/200μl であった (Fig 17)。

3-4-2 毛根中の TZ 及びその代謝物の経時変化

TZ を 2.5mg/kg、5mg/kg 投与後の毛根の経時変化を、Fig 18 に示した。TZ、1-OH TZ、4-OH TZ の 3 種類とも投与 30 分後が最も高く、その後は経時的に減少し、投与 24 時間後からは測定不能となった。TZ、4-OH TZ に関しては、2.5mg/kg と 5mg/kg 投与の比較により濃度に約 2 倍の差があり、これは予想通りの結果であった。1-OH TZ の量は投与量によってあまり変化がなかった。また、1,4-d₁OH TZ はピークが小さいため測定不可能であった。

次に洗浄による影響を調べるため、洗浄操作を加えた毛根について測定した。毛根に完全に取り込まれた TZ 及びその代謝物の測定では、TZ、4-OH TZ の検出が安定せず、定量するには至らなかった。これは、洗浄操作が一定でなく、洗浄が強すぎた時に毛根に吸着した薬物までも取り除いてしまったためであると考えられた。この事より、洗浄操作の更なる検討の必要性が示唆された。ちなみに 1-OH TZ、1,4-d₁OH TZ は検出できなかった。

3-4-3 血漿中の TZ 及びその代謝物における経時変化

前述までの結果から毛根・体毛中の主代謝物は 4-OH TZ である事がわかったが、この結果が本当に血中濃度を反映しているか疑問がのこる。もしかしたら、

薬物の毛髪への移行性の強弱や毛根内での代謝などによる影響も考えられる。そこでこれらの疑問を解決するために血漿中の TZ 及びその代謝物の経時変化を測定した。

Fig 19 に示したように、TZ、1-OH TZ、4-OH TZ、1,4-d₁OH TZ の 4 種類とも投与 15 分後に最大となり、その後は経時的に減少してゆき、投与 4 時間後にはほぼ測定不能となった。グラフの形は、毛根の場合と同様で 4-OH TZ が主代謝物であった。この事からも、毛髪中の TZ と代謝物の濃度比は血中濃度比を反映しているものと考えられた。

第 4 章 ベンゾジアセピン系向精神薬の毛髪分析

4-1 緒論

第 1 章から第 3 章までは、ベンゾジアゼピン系向精神薬の中でも TZ に焦点を絞って分析を行ってきたが、TZ だけが向精神薬として使用されているわけではなく、他のベンゾジアセピン系向精神薬も使用法を一步間違えば危険な薬物となりうる。そこで、さらに他のベンゾジアセピン系薬物 Midazolam(MDZ)、Alprazolam(ALP)、Estazolam(EST)の 3 種類についても同様に毛髪分析を試みた。

4-2 実験材料及び装置

4-2-1 試薬及び試液

標準物質として、MDZ(Radian International)、ALP(Radian International)、EST(Radian International)、 α -hydroxyalprazolam(1-OH ALP、Radian International)、内標準物質として Estazolam d5(Radian International)、 α -hydroxyalprazolam d5(1-OH ALP d5、Radian International)を使用した。HPLC の移動相は 2-1-1 と同様である。

4-2-2 実験動物及び測定装置

実験動物は 2-2-2 と同様の物を使用した。また、LC system、MS system とも 2-2-3 と同様である。

4-3 実験方法

4-3-1 動物実験投与方法

体毛試料 投与開始前に背部の毛を刈り取った DA 系の雄性ラット(5weeks、ca 100g)に ALP、EST、MDZ をそれぞれ 2.5、5、10mg/kg 投与し、体毛中の親化合物と代謝物の検出を行った。ethanol saline(4.6)の溶液に ALP、EST、MDZ をそれぞれ溶解させ 2.5mg/ml の試料溶液とした。この溶液を1日2回、5日間腹腔内投与し、初回投与日から 15 日後の新たに生えた体毛を刈り取り体毛試料とした。

毛根試料 DA 系の雄性ラットに ALP、EST、MDZ を投与し、毛根中の薬物の経時変化を調べた。ethanol saline(4.6)の溶液に ALP、EST、MDZ をそれぞれ溶解させ 2.5mg/ml の溶液を作りこれを試料とした。この試料を 10mg/kg 腹腔内投与し、投与 15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、9 時間、24 時間後に毛根を採取し毛根試料とした。

4-3-2 体毛及び毛根の前処理法

体毛試料は第 2 章(2-3-3 参照)の前処理法に準じて行った。また毛根の場合でも第 3 章(3-3-2 参照)の前処理法に準じて行った。内標準物質は ALP 投与のラット毛根・体毛の場合、1-OH ALP d5 を、EST、MDZ 投与のラット毛根・体毛の場合は EST d5 をそれぞれ使用した。

4-3-3 測定条件の検討

TZ、ALP、EST、MDZ の 4 種について一斉分離条件の検討を行った。溶出条件は第 2 章(2-3-1 参照)の分析条件と同様である。

4-4 結果及び考察

4-4-1 分離・分析条件の検討

毛髪分析に先立ち、標品の TZ、ALP、EST、MDZ の HPLC を用いた一斉分離条件及び ALP、1-OH ALP、EST、MDZ それぞれの MS 検出条件を検討した

(Fig 20)。その結果、ALP の RT は 28.8min、1-OH ALP は 20min、EST は 23.3min、MDZ は 4.4min に溶出し、一斉分離は可能であると判断した。また、検出イオンは ALP が $[M+H]^+=309$ 、1-OH ALP が $[M+H]^+=325$ 、EST が $[M+H]^+=295$ 、MDZ が $[M+H]^+=326$ という結果になった。しかし、この分離条件(2-3-1 参照)では MDZ の RT が早すぎ、妨害物質により十分に定量できない可能性を考慮し、以後 MDZ は H₂O CH₃CN AcOH(85:15:1)を移動相に使用した isocratic 法を用いて測定した。

4-4-2 ALP 投与ラットの体毛及び毛根分析

ALP 投与の体毛及び毛根の測定では、ALP は 29min、1-OH ALP は 20.5min に検出された(Fig 21)。また 1-OH ALP のピークの前に(RT=18min)分子量が $[M+H]^+=325$ のピークが見られ、Cl を有する特徴的なアイソトープパターンを示したことから TZ の場合と同様に 4-hydroxyalprazolam(4-OH ALP)であると推測した。さらに TZ の場合と同様 1,4-d₁OH ALP が検出できるか否かを調べたが、1,4-d₁OH ALP は確認できなかった。この結果と TZ の結果を基に ALP の構造から予想される代謝経路を Fig 22 に示した。

投与量の違いにおける毛髪移行性の結果を Fig 23 に示した。4-OH ALP、1-OH ALP は投与量の増加に伴い増加した。ALP では、2.5mg/kg、5mg/kg 投与の場合で変化はなかったが、10mg/kg 投与の場合では増加が見られた。4-OH ALP は 1-OH ALP よりも高濃度で検出され、この結果よりラットにおける主代謝物は ALP の場合では 4-OH ALP であると推測した。また、投与量が少ないときには ALP が主に体毛から検出され、投与量が増加すると 4-OH ALP が主に検出された。

毛根試料の場合では、投与終了後から 15 分という早い時点で毛根を採取したため、毛根の表面に薬物が付着していることが予想され、毛根内に取り込まれた薬物のみを測定するには洗浄が必要となると考えられた。そこで、毛根を洗浄後、及び未洗浄時の濃度の比較を試みた。

Fig 24 に示すように、未洗浄の場合、ALP は投与 15 分後から経時的に減少し、1-OH ALP 及び 4-OH ALP と思われるものは投与 1 時間後に最高濃度となり、その後経時的に減少していった。洗浄をした場合では、ALP は投与 30 分後

に最高濃度となり、その後経時的に減少していった。また、代謝物の 1-OH ALP は、未洗浄の時と同様に投与 1 時間後に最高濃度となった。4-OH ALP と思われるものは投与 4 時間後に最高濃度となった。洗浄をした場合と未洗浄の最大値のずれは、洗浄した場合、毛球表面に付着しているだけで完全に吸収されていない物質は除去されてしまう事によると考えられる。また、4-OH ALP では洗浄によりピークが 3 時間も遅くなっていた。これは TZ の結果を元にして推測すると、時間の経過に伴い、主代謝物である 4-OH ALP の血中濃度が上昇し、毛根中に移行したためと考えられた。

4-4-3 EST 投与ラットの体毛及び毛根分析

Fig 25 に示すように、EST 投与の体毛及び毛根の測定では EST は 22.8min に検出された。また、EST のピークの後 (RT=29min) に、 $[M+H]^+$ が 311 と EST の分子量に 16 増えた分子量のピークが検出され、Cl を有する特徴的なアイソトープパターンを示したことから EST の代謝物であると推測された。しかし、水酸基を有する物質は極性が上がり RT は早くなると予想されたが、今回見つかった代謝物のピークは EST よりも溶出時間が遅いということから水酸化体ではなくオキサイドではないかと思われた。そこでこの化合物を O-EST と仮に呼ぶこととした。また、EST の分子量に 32 増えた $[M+H]^+=327$ を示すピークが RT=16min に検出された。これを仮に diOH EST と呼ぶことにした。しかし、diOH EST は水酸基を 2 つ持つことになり EST の構造から不可能であり、尚且つ予想よりも溶出時間が遅かった。そこでこの化合物は水酸基を 1 個有し且つオキサイドを一つ持った代謝物ではないかと予想された。TZ の結果を基に EST の構造から予想される代謝経路を Fig 26 に示した。

Fig 23 の結果から EST と diOH EST は投与量の増加に伴い増加することか解った。O-EST は 2.5mg/kg、5mg/kg 投与の場合で変化はなかったが、10mg/kg 投与の場合では増加が見られた。また、投与量に関係なく O-EST が主に体毛から検出されたことから、EST 投与の場合では、O-EST が主代謝物であると推測した。

EST の経時変化も、毛根を洗浄したものと、洗浄しなかったものをそれぞれ測定した (Fig 27)。未洗浄の場合、EST は投与 15 分後から経時的に減少し、O-

EST、diOH EST と思われるものは投与 1 時間後、投与 6 時間後に最高濃度となり、その後経時的に減少していった。洗浄をした場合では、EST は投与 15 分後に最高濃度となり、その後経時的に減少していった。O-EST と思われるものは投与 2 時間後に、diOH EST と思われるものは投与 9 時間後に最高濃度となった。diOH EST と思われるものは、EST が代謝を受け、その後毛根へ移行するものと考えられるので、この結果はある程度予想できた。

4-4-4 MDZ 投与ラットの体毛及び毛根分析

4-4-1 にも述べた通り MDZ の分析条件は新たに作成したものを使用した。MDZ 投与の体毛及び毛根の測定では、MDZ は 18min に検出された(Fig 28)。また、MDZ の前後に水酸化体の $[M+H]^+=341$ を示すピークが見られた。極性の違いより、RT=13min のピークは OH-MDZ であり RT=21min のピークはオキシサイト(O-MDZ)ではないかと予想された。さらに、水酸基 2 個を有した $[M+H]^+=358$ を示すピークが OH MDZ と MDZ の間の RT=15min に見られた。これも EST の時と同様、水酸基を 1 個有し且つオキシサイトを一つ持った代謝物ではないかと予想された。しかしこれらのピークは、検出できる時と、検出できない時があり一定しなかった。TZ の結果を基に MDZ の構造から予想される代謝経路を Fig 29 に示した。

Fig 23 の結果から、MDZ は投与量の増加に伴い増加することか解った。しかし、他の薬物(ALP、EST)と比較すると約 1/3 と極端に検出量が少ないことが解った。毛髪への移行性は、薬物の脂溶性、塩基性、メラニン親和性によるといわれている。MDZ は Fig 20 の結果からも解るとおり、他のベンゾジアゼピン系薬物(TZ,ALP,EST)と比較してもとりわけ極性が高い。そのために体毛中の薬物濃度は低くなってしまったと考えられる。

MDZ の経時変化も、毛根を洗浄したものと、洗浄しなかったものをそれぞれ測定した(Fig 30)。未洗浄の場合、投与 15 分後に最高濃度となり、投与 1 時間後まではほぼ一定であり、その後経時的に減少していった。洗浄をした場合では、はっきりとしたピークがなかった。これもまた、MDZ の極性の高さによるものと思われる。

第5章 ヒト毛髪分析への応用