

5-1 緒論

毛髪には、メラニン豊富に含む黒毛や、メラニンの欠損した白髪がある。メラニン、特にユーメラニンは薬物取り込みの毛髪中のホスト化合物として重要な役割を果たしていることが報告されている。薬物毛髪取り込みに及ぼすメラニンの寄与に関しては多くの報告が見られ、薬物とメラニンの親和性を裏付ける証拠が示されている^{48)~50)}。そこで、本法の有用性、ならびに毛髪臨床検査法の可能性を検討するため、TZ 常用者の黒毛、白髪を用いたヒト毛髪分析を試みた。

5-2 実験材料及び装置

5-2-1 試薬及び試液

試薬及び試液は、前述のものを使用した。(2-2-1 参照)

5-2-2 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)

5-2-3 ヒト毛髪

毎日一錠、ハルシオン(TZ 含有量は 0.125mg)を常用していて、自殺死した男性(76 歳)の毛髪を測定した。毛髪は死後 12 時間後に採取した。また、ハルシオンの最終摂取は死亡 4 時間前頃であった。

5-3 実験方法

5-3-1 測定条件の検討及び検量線作成

前述(第 3~4 章)までの MS 測定では SIM で測定していたが、今回はヒト毛髪の測定を行うので、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 SIM から MS/MS に変えて測定することにした。選択イオンは TZ が $m/z=308.2\pm 0.5$ 、1-OH TZ、4-OH TZ が $m/z=341\pm 0.5$ 、IS(1-OH TZ d4) が $m/z=345\pm 0.5$ とした(Fig 31)。

また、この方法を使用し、内標準法により検量線を作成した。内標準物質(1-OH TZ d4)の濃度は 5ng/50 μ l injection であり、検量線作成に使用した薬物濃度は Table3 に示した。

Table3 Concentrations of calibration curves

| | NO 1 | NO 2 | NO 3 | NO 4 | NO 5 | NO 6 |
|---------|------|------|------|-------|-------|--------|
| TZ | | | 0 09 | 0 043 | 0 009 | 0 0009 |
| 1-OH TZ | 2 50 | 1 25 | 0 25 | 0 125 | 0 025 | 0 0025 |
| 4-OH TZ | 2 50 | 1 25 | 0 25 | 0 125 | 0 025 | 0 0025 |

ng/50 μ l injection

5-3-2 毛髪の前処理法

得られた毛髪は、黒毛の毛根部分(約 1cm)、黒毛の体毛部分、白髪の 3 種類に分類した。そのうち黒毛の体毛部分と白髪は、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。黒毛の毛根部分は洗浄過程を省き 2-3-3 と同様に抽出操作を行った。

5-4 結果及び考察

5-4-1 測定条件の検討及び検量線の作成

初めに MS/MS による検出イオンの検討を行った。Fig 31 に示したとおり、TZ、4-OH TZ、IS(1-OH TZ d4)のフラグメントイオンでは Cl や H₂O が抜けたことを示す m/z=308.2、m/z =341、m/z =345 が最も強く検出されたので、以後これらを TZ、4-OH TZ、IS(1-OH TZ d4)の検出イオンとした。1-OH TZ では m/z=382 が最も強く検出されたが、これは Na が結合したものと判断し、次に強度の大きい m/z=341 を検出イオンとした。

これら MS/MS による測定条件を用いて検量線の作成を行った。ピーク高さの比により得られた検量線は TZ では 0.343ng/200 μ l、1-OH TZ では 10ng/200 μ l、4-OH TZ では 10ng/200 μ l まで良好な直線性を示し、SIM では検出限界が TZ、

1-OH TZ、4-OH TZ それぞれ 0.05、0.1、0.05ng/200 μ l であったのが MS/MS では TZ、1-OH TZ、4-OH TZ それぞれ 0.005、0.01、0.01ng/200 μ l と、約 5~10 倍検出感度が向上した(Fig 32)。

5-4-2 ヒト毛髪分析

黒毛の体毛部分を測定した時の典型的なマスキロマトグラムを Fig 33 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 を確認することができた。

Table 4 には TZ、1-OH TZ、4-OH TZ、の測定値を示した。いずれの試料でも TZ が数十 pg というオーダーで検出された。黒毛の体毛部分からは 4-OH TZ 及び 1-OH TZ が検出された。これまでの論文では、ヒトでの主代謝物は 1-OH TZ であると言われて来たが、この結果では 4-OH TZ が主代謝物であった。これは、毛髪への移行性やメラニンとの親和性が関係しているものと予想された。また、黒毛の体毛では、4-OH TZ は TZ の約 10 倍の濃度で検出されたが、これは蓄積量の違いによると考えられた。

総括

毛髪は、薬物の使用状態を長期的にモニターし記憶するテープであると言える。多くの生体試料のうち、毛髪ほど投与数分後から 1 年以上、薬物使用の長期的な情報を保持できる生体試料はないであろう。しかも採取が容易で、長期保存が可能であるなど非常に有用な生体試料である。本研究ではベンゾジアゼピン系向精神薬の毛髪分析を実施した。

まず初めに、HPLC-ESI/MS を用いた TZ 及びその代謝物(1-OH TZ、4-OH TZ) の分離分析条件の検討を行った。カラムには逆相セミマイクロカラムを、移動相には 1%酢酸含有の水、アセトニトリルの混液を使用することによって TZ の検出限界が 0.25pmol/injection と高感度分析が可能となった。

次に、TZ を投与した DA ラットの体毛及び毛根から、未代謝の TZ の他に 1-OH TZ、4-OH TZ、1,4-d₁OH TZ を確認した。また、ヒトでは 1-OH TZ が主代謝物であると言われているが、DA ラットでは 4-OH TZ が主代謝物であること

もわかった。これまで、実験動物を含めた体毛及び毛根にこれら一連の化合物が検出されたと言う報告はなく、新規な知見である。

DA ラットで TZ 投与後の経時変化について検討してみたところ、血中濃度と毛根中の濃度を比較することにより、毛根試料は血液濃度比を反映していることが示唆された。また、体毛からは 1 週間前の、毛根からは投与数分後の TZ 及びその代謝物が検出されたことにより毛髪分析の有用性がさらに示唆された。

他のベンゾシアゼピン系薬物(MDZ、ALP、EST)についても同様に、体毛及び毛根中の親化合物及び代謝物の測定を行った。

ALP 投与のラット体毛・毛根からの未代謝物の検出は TZ の場合と同様に可能であり、代謝物としては、標品との比較により 1-OH ALP が検出された。また、TZ の場合と同様 4-OH ALP が検出され、主代謝物であることがわかった。

EST 投与のラット体毛・毛根からは、未代謝物の EST の他に、代謝物では RT 及び MS からオキサイト(O-EST)又は水酸基とオキサイトが両方結合している化合物(d₁OH EST)が検出された。EST の場合 O-EST が主代謝物であることがわかった。

MDZ 投与のラット体毛・毛根からは、未代謝物の MDZ 以外に、代謝物では RT 及び MS から水酸化体(OH MDZ)、オキサイド(O- MDZ)又は水酸基とオキサイトが両方結合している化合物(d₁OH MDZ)が検出された。

これらの親化合物、代謝物は投与量の増加にほぼ比例し、毛根・体毛 10mg あたり ALP は 2~3ng、EST は 0.5~3ng、MDZ は 0.2~0.6 の濃度で検出された。しかし、代謝物の中には安定して検出てこないものもあり、詳細な検討が必要である。

毛髪臨床検査法の可能性を検討するため、ヒト毛髪分析を試みた。ハルシオン常用者の毛髪からは、未代謝の TZ の他に 1-OH TZ、4-OH TZ を確認した。黒毛の体毛部分からは 4-OH TZ が主に検出され、白髪、黒毛の毛根部分からは TZ のみ検出された。ヒトでは 1-OH TZ が主代謝物であることから、毛髪への移行性・蓄積性は薬物の脂溶性又は塩基性によるメラニン親和性が関係しているものと考えられた。

以上のことから毛根測定は血中濃度を反映し、急性中毒の指標となり、体毛測定では慢性中毒の指標となりうることも推測された。

本法は、操作法が簡便である上、高感度分析が可能であり、ヒト毛髪への応用できる有用な方法であると思われる。今後は未知の化合物の構造確認を行い、代謝物の挙動を明らかにし、薬物の物性又はメラニン親和性を検討し、毛髪移行性を研究することによって、毛髪臨床検査法への応用が十分可能であるものと期待される。

参考文献

- 1) 田中 千賀子,加藤隆一,NEW 薬理学,328-331,南江堂
- 2) Baktır,G ,Fisch,H V ,Huguenin,P ,Bircher,J ,Clin Pharmacol Ther ,24, 195(1981)
- 3) S K Gupta, E H Ellinwood, A M Nikaïdo and D G Heatherly Pharm Res 7 570-576(1990)
- 4) P D Kroboth, R B Smith, T Rosanske, D H Van Thiel and R.P Juhl J Clin Pharmacol 27 555-560(1987)
- 5) P D Kroboth, R B Smith, T Rosanske, J M Hamilton, J W McAuley, F J Kroboth and R.P Juhl Pharm Res 3 110s(1986)
- 6) R.P Vanderveen, J L Jirak, G R Peters, S R Cox and P A Bombardt Clin Pharmacol 10 539-543(1991)
- 7) J.P Sunter, T S Bal and W K Cowan BMJ 297 719(1988)
- 8) K R Olson, L Yin, J Osterloh and A Tanı Am J Emerg Med 3 210-211(1985)
- 9) Skinner MH, Thompson DA, South Med J 1992,85 1207-1219
- 10) T Inoue and S Suzuki J Chromatogr 422 197-204(1987)
- 11) Eberts,Jr ,F S ,Philopoulos,Y ,Reineke,L M ,Vliek,R W ,Clin Pharmacol Ther ,29,81(1981)
- 12) Coassolo,P ,Auberts,C ,Cano,J P ,J Chromatogr ,274,161(1983)
- 13) F S Eberts, YPhilopoulos, L M Reineke and R W Vliek Clin Pharm Ther 29 81-93(1981)
- 14) 中原雄二,ぶんせき,1995,823
- 15) Baumgartner A M et al ,J Nucl Med ,20,748(1979)

- 16) 中原雄二, et al ,法中毒,12,168(1994)
- 17) Nakahara Y ,Forensic Sci Inter ,70,135(1995)
- 18) Kikura R ,Nakahara Y ,Biol Pharm Bull ,18,267(1995)
- 19) Kikura R ,Nakahara Y ,Biol Pharm Bull ,18,1696(1995)

- 20) P Kintz, V Cirmelle, F Vaysette and P Mangin J Chromatogr B
677 241-244(1996)
- 21) R Dixon, R Lucek, R Young, R Ning and A Darragh
Life Sci 25 311-316(1979)
- 22) A D Fraser J Anal Toxicol 11 263-266(1987)
- 23) H Ko, M E Royer, J B Hester and K T Jonston
Anal Lett 10 1019-1040(1977)
- 24) M E Jolly J Anal Toxicol 5 236-240(1981)
- 25) M Konishi, Y Mori and K Hira J Chromatogr 229 355-363(1982)
- 26) A G de Boer, J Rost-Kaiser, H Sracht and D D Breimer
J Chromatogr 145 105-114(1978)
- 27) L Kingas J Chromatogr 172 273-278(1979)
- 28) B J 't Jart and J J Chromatogr 424 403-409(1988)
- 29) Y C Sumiratapura, C Aubert and J P Cano Arzneimittel
Forsch 32 252-257(1982)
- 30) G Baktir, J Bircher, H U Fisch and G Karlaganis
J Chromatogr 339 192-197(1985)
- 31) B Moore, G Nickless, C Hallett and A G Howard J Chromatogr 137
215(1977)
- 32) Y C Sumiratapura, C Aubert, P Coassolo and J P Cano
J Chromatogr 232 111-118(1982)
- 33) J P Weijers-Everhard, J Wijker, R Verrijk, H H Van Rooij and
W Soudijn, J Chromatogr 374 339-346(1986)
- 34) H Kelly, A Huguet and S Dawling Clin Chem 28 1478-1481(1982)
- 35) K Suzuki, I Johno and S Kitazawa J Chromatogr 425 435-440(1988)

- 36) W J Adams, U M Rykert and P A Bombardt
Anal Lett 13 149-161(1980)
- 37) K M Hold, D J Crouch, D G Wilkins, D E Rollins and R A Maes
Forens Sci Int 84 201-209(1997)
- 38) V Cirimele, P Kintz, C Staub and P Mangin Forens Sci Int
84 189-200(1997)
- 39) V Cirimele, P Kintz and B Ludes J Chromatogr B 700 119-129(1997)
- 40) M Yegles, F Merch and R Wenning Forens Sci Int 84 211-218(1997)
- 41) D B Barr and D L Ashley J Anal Toxicol 22 96-104(1998)
- 42) N Senda, K kohta, T Takahashi, K Shizukuishi, T Miura, T Fujita
and M Nakayama Biomed Chromatogr 9 48-51(1995)
- 43) Nakahara, Y et al , Arch Toxicol , 70 841(1996)
- 44) Boukhabza, A , Lugnier, A A J , Kintz, P , Mangin, P , J Anal Toxicol ,
15, 319(1991)
- 45) L L Von Moltke, D J Greenblatt, M M Cotreau-Bibbo, S X Duan,
J S Harmatz and R I Shader J Pharmacol Exp Ther 268
1278-1283(1994)
- 46) Nakahara Y et al , Forensic Sci Inter , 84 157(1997)
- 47) Nakahara Y et al , Biol Pharm Bull, 20 969(1997)
- 48) LPotsch, G Skopp, G Rippin, Int-J-Legal-Med 110, 55-62(1997)
- 49) R E Joseph, Tsung-Pihg Su, E J Cone, J Anal Toxicol 20, 338-344(1996)
- 50) Uematu, M , Miyazawa, N , Okazaki, O , and Nakashima, J Pharm Sci ,
81, 45, 1992

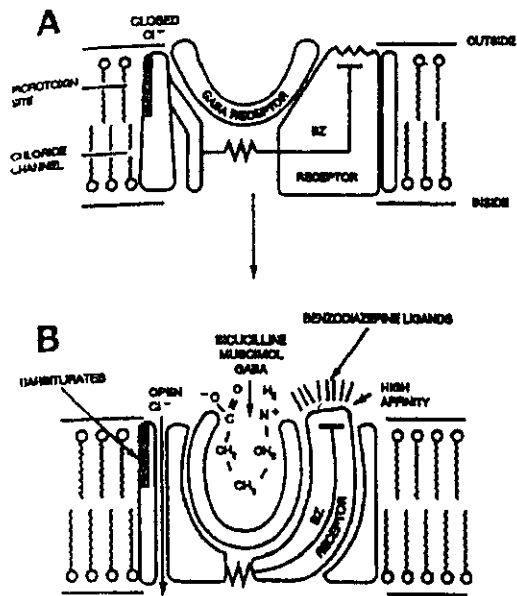
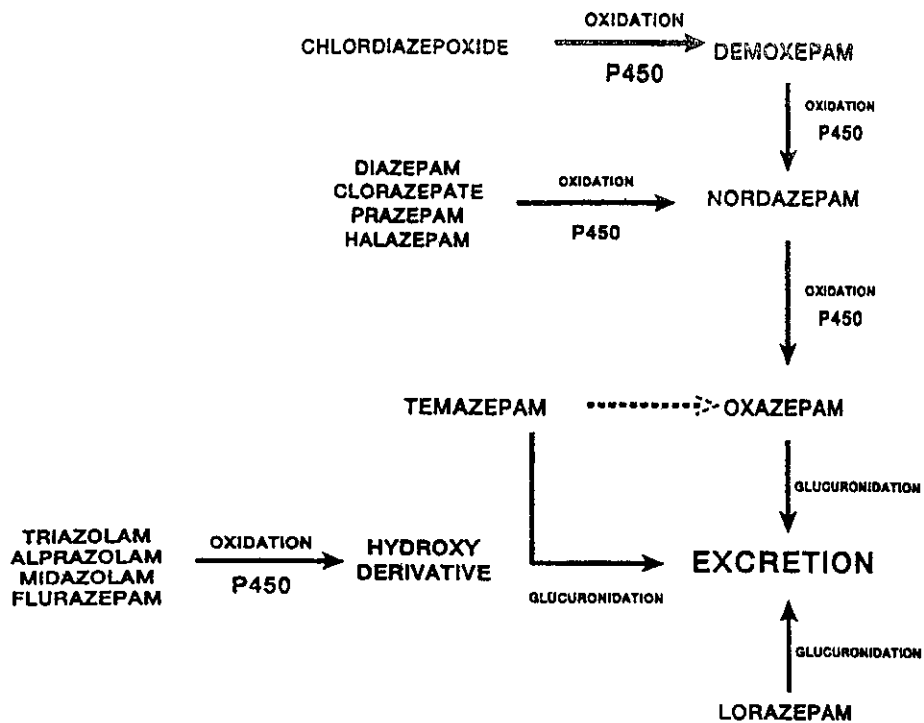


Fig.1 Reaction of benzodiazepine to the receptor



Basic metabolic pathways leading to benzodiazepine elimination in humans. Oxidation P450 indicates metabolism by hepatic cytochrome P450 mixed-function oxidase system. Broken arrow indicates possible metabolic pathway. Compared with oxidation, glucuronidation is generally rapid and unaffected by impaired liver function. (From Skinner MH, Thompson DA. Pharmacologic considerations in the treatment of substance abuse. South Med J 1992;85:1207-1219.)

Fig 2 Possible metabolic pathways leading to benzodiazepine elimination in man

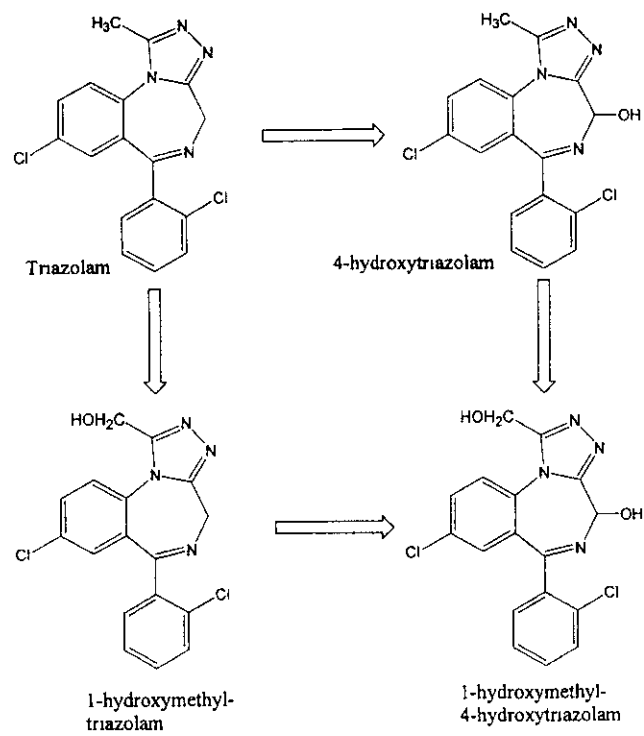
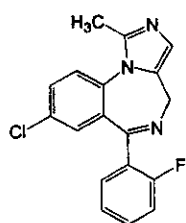
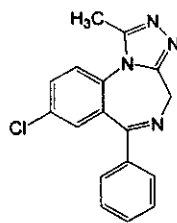


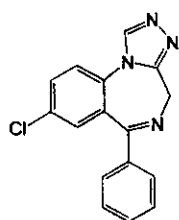
Fig 3 Metabolic pathways of triazolam in man



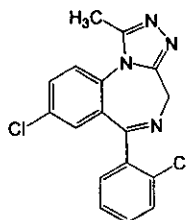
Midazolam
MW.325.7



Alprazolam
MW.308.7



Estazolam
MW 294.7



Triazolam
ME.343.2

Fig.4 Structures of benzodiazepine hypnotic agents

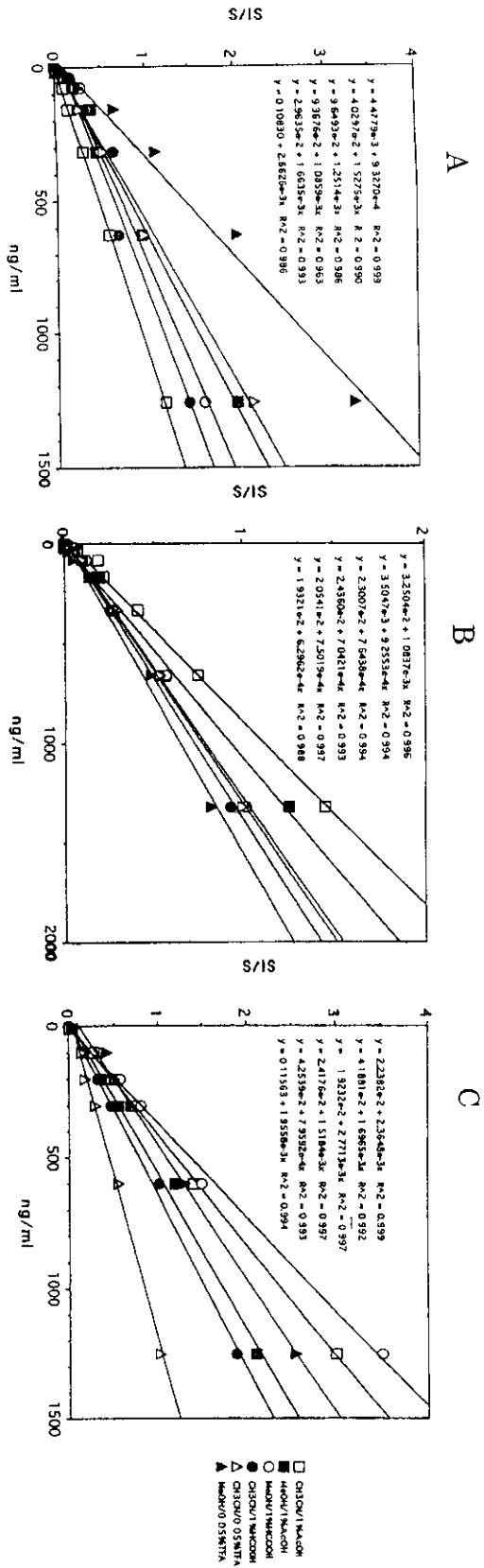


Fig 5 Effect of solvents on the determination of TZ, 1-OH TZ and 4-OH TZ
 A. TZ, B 1-OH TZ, C 4-OH TZ,
 IS 1-OH TZ d4 (12.4ng/injection)

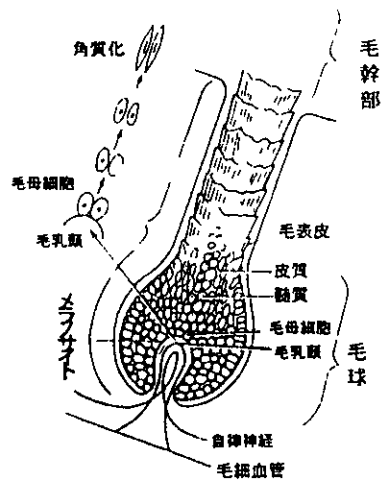


Fig 6 Hair root and hair shaft

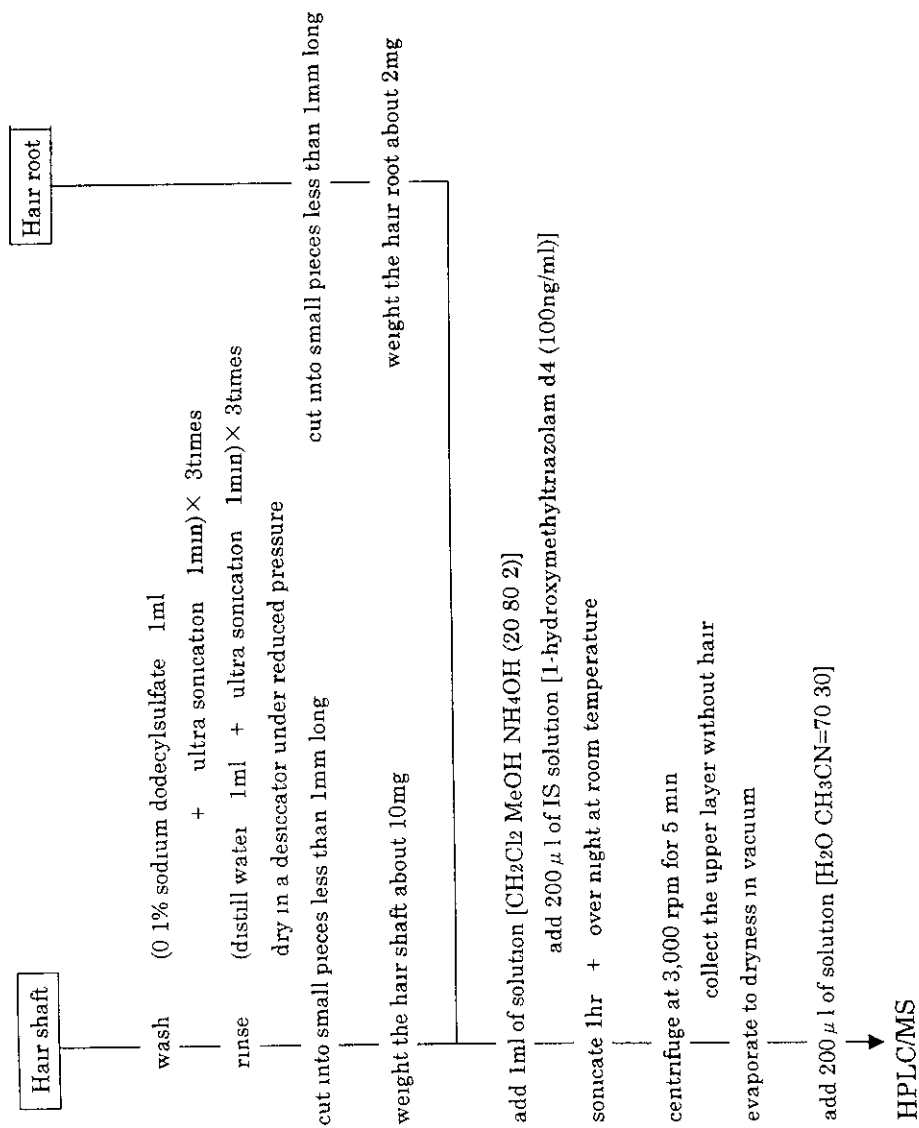


Fig 7 Proposed procedure for pretreatment of hair root and hair shaft

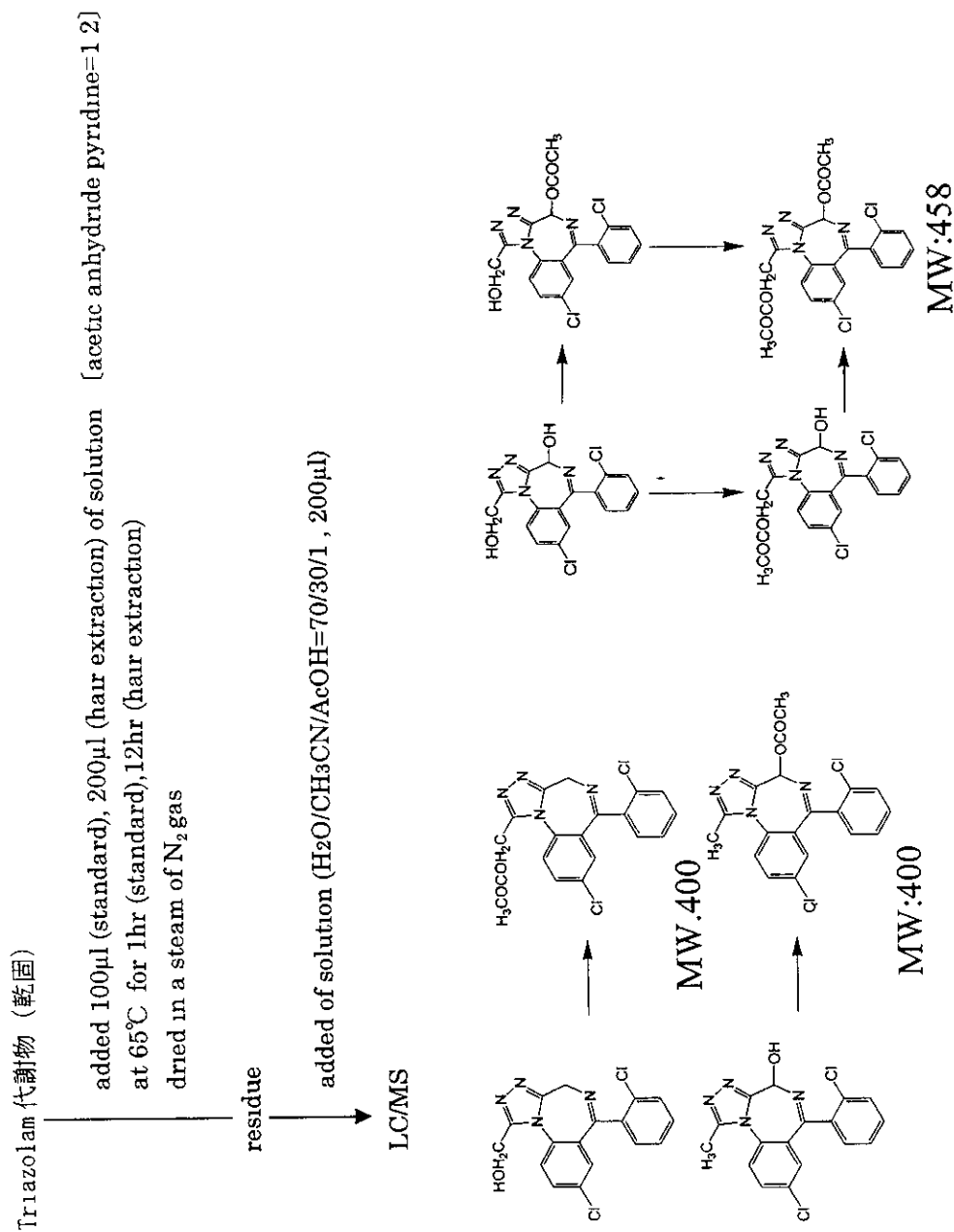


Fig 8 Procedure for acetylation of hydroxy metabolites

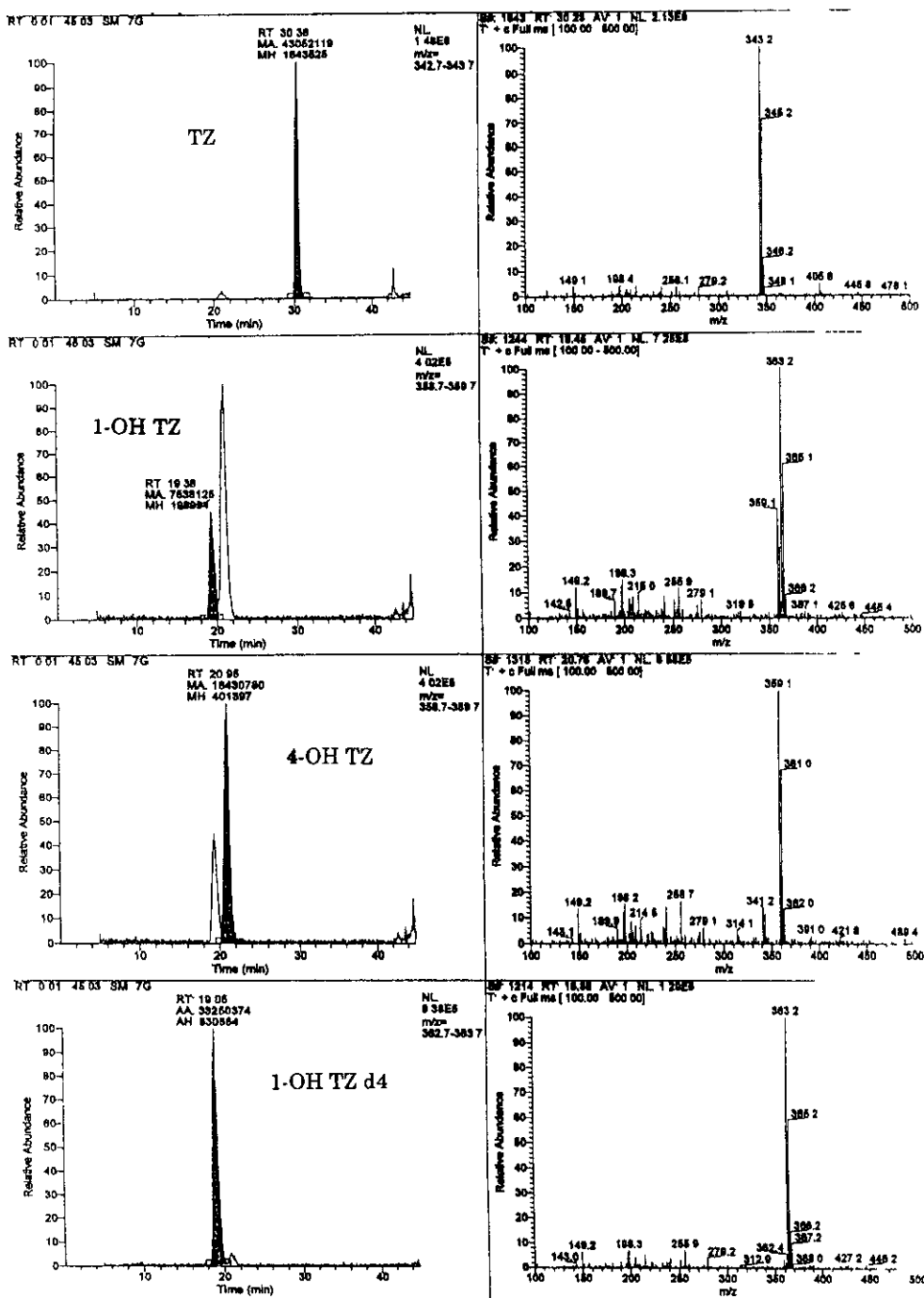


Fig 9 Mass spectra and mass chromatograms of mixture of authentic TZ, 1-OH TZ and 4-OH TZ

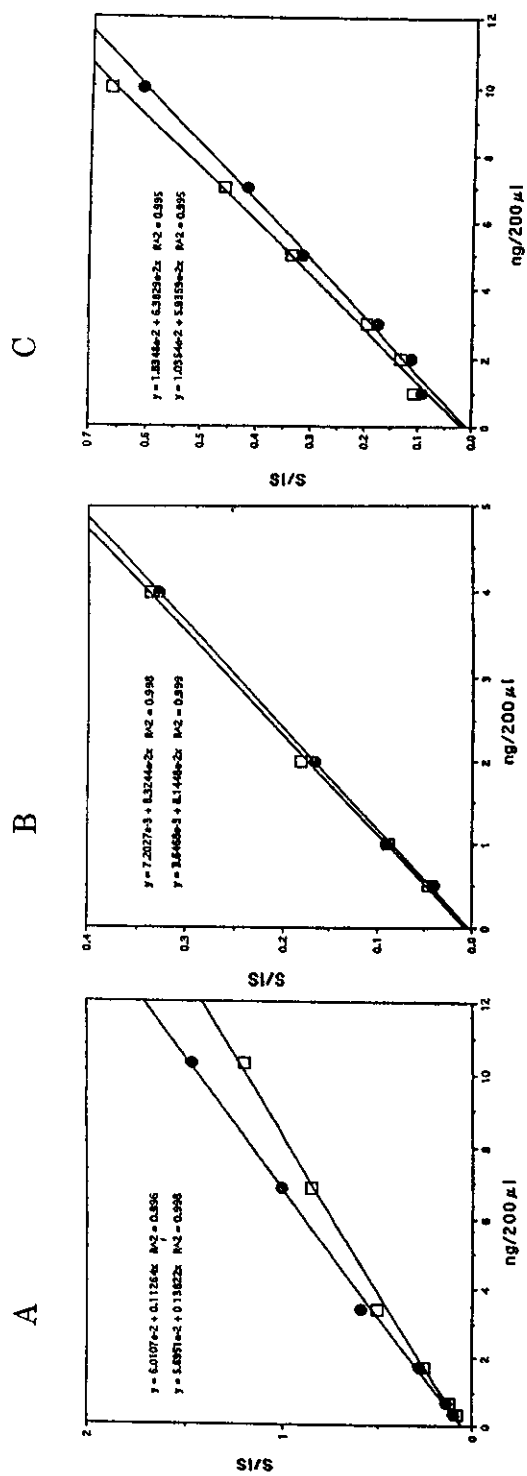


Fig 10 Calibration curves of TZ, 1-OH TZ and 4-OH TZ
 A TZ, B 1-OH TZ, C 4-OH TZ,
 IS . 1-OH TZ d4 (5ng/injection)

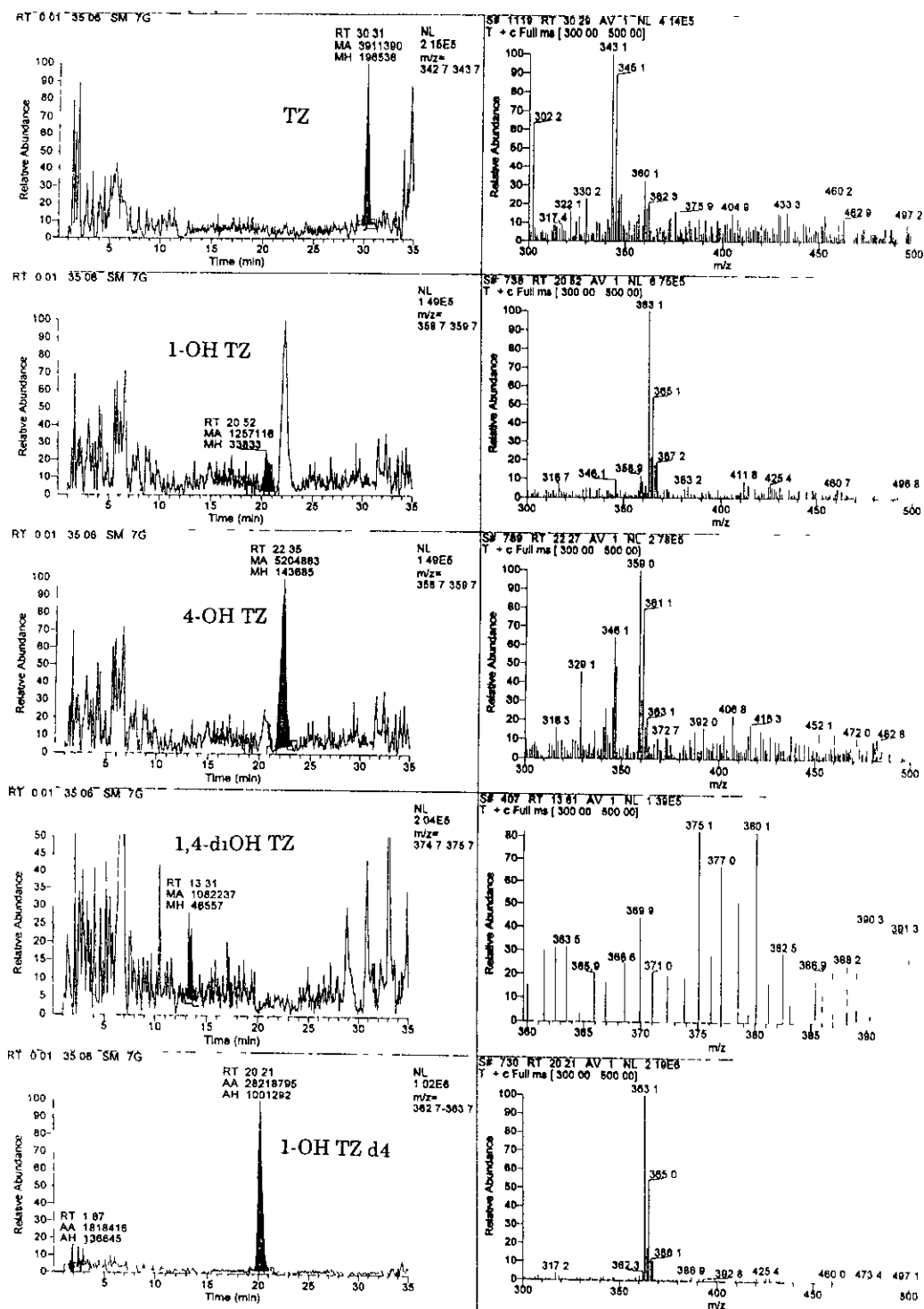


Fig 11 Typical mass chromatograms and mass spectra obtained from rat hair shaft after administration at 6mg/kg i p injection

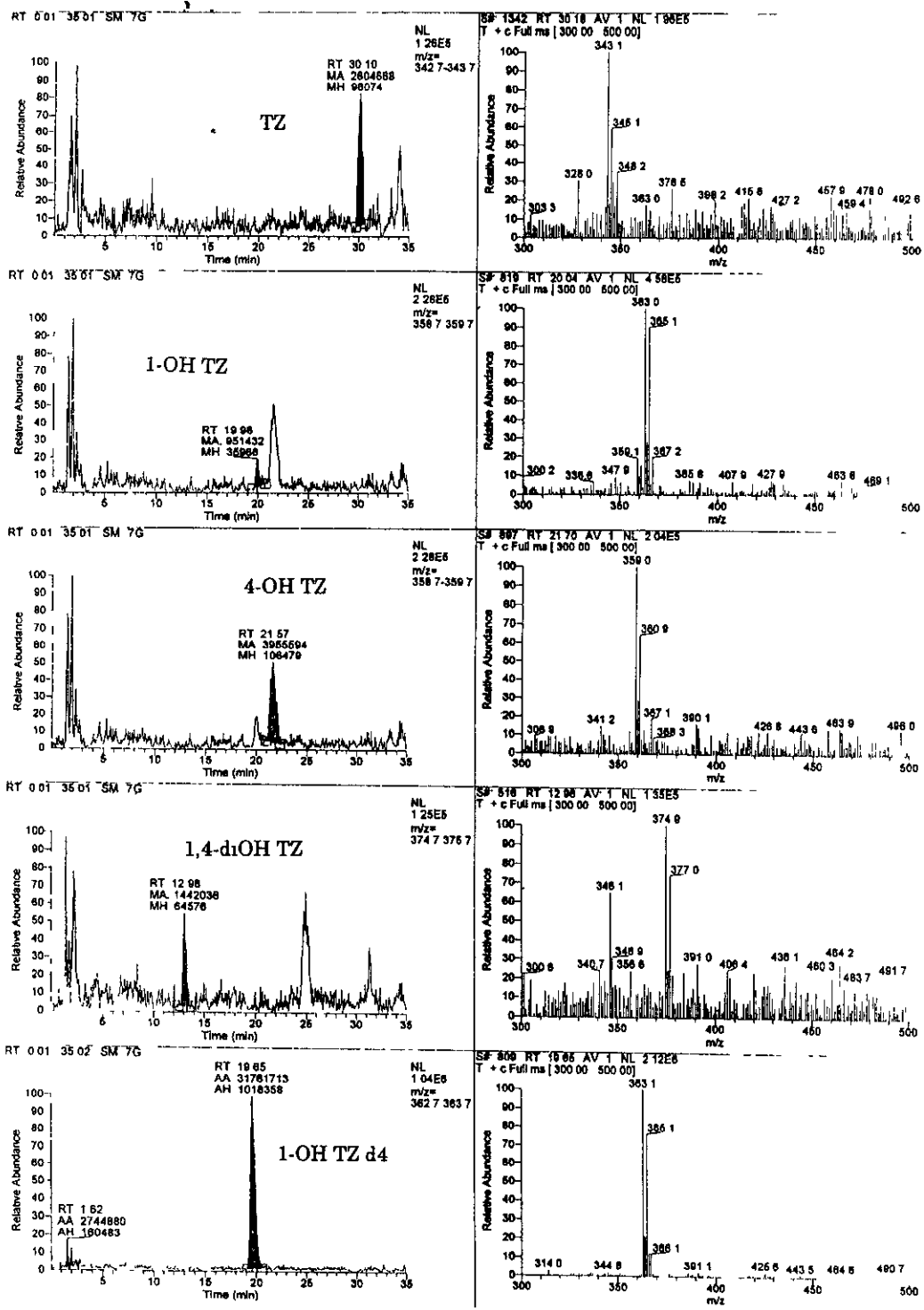


Fig 12 Typical mass chromatograms and mass spectra obtained from rat hair root after administration at 6mg/kg i.p. injection

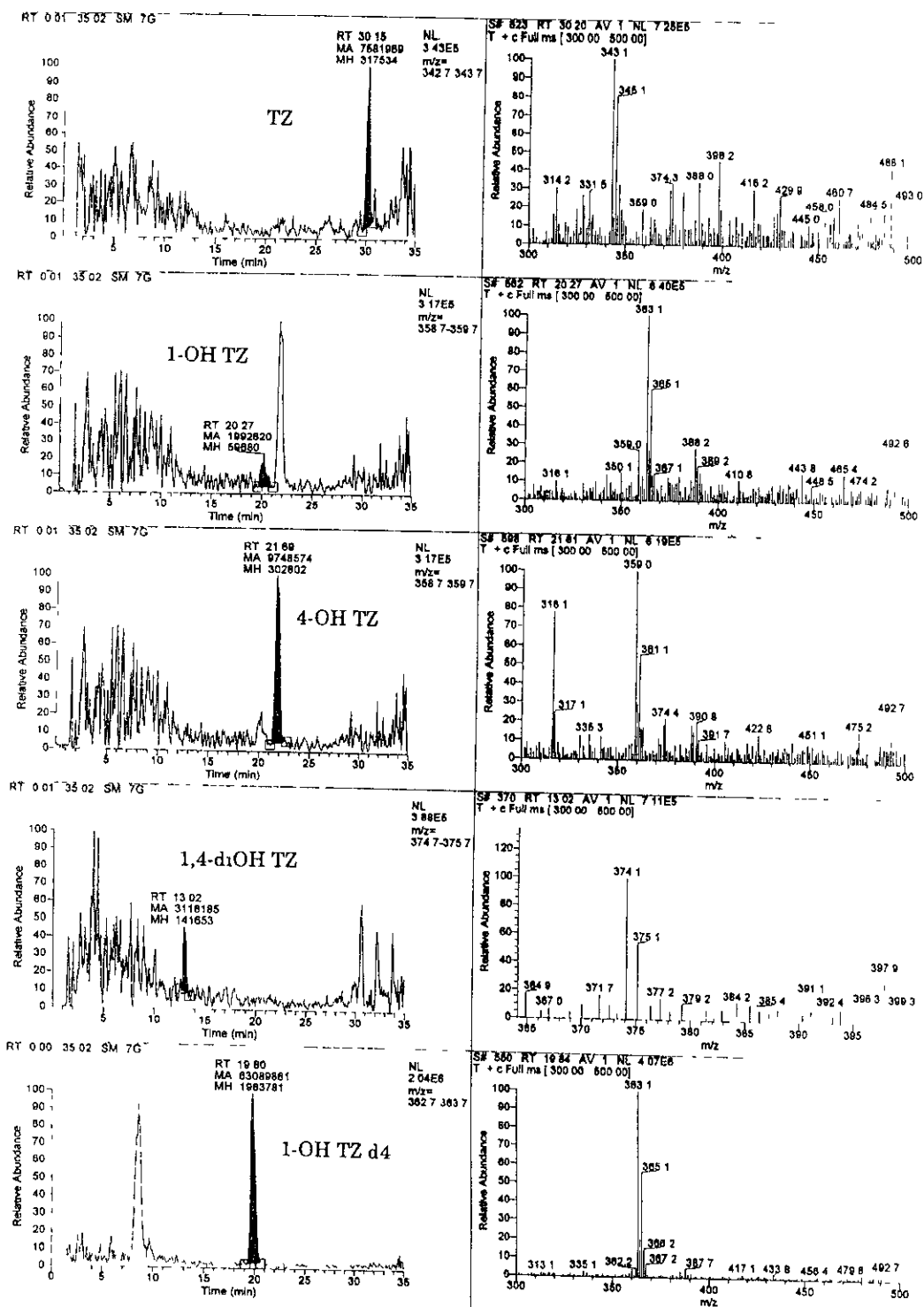


Fig 13 Typical mass chromatograms and mass spectra obtained from rat hair shaft after administration at 3mg/kg i p injection