

3 ヒト毛髪への取り込みについて -頭毛の採取部位による差の検討-

1) 試料の調製

Hair-1. 84歳, 女性 マイゼット (PQ 5%, DQ 7%) 服用後死亡

試料が少ないため, 採取部位による差の検討を優先し, 毛根部, 毛幹部に分けず毛髪全部を用い, 未洗浄にて測定した。用いた頭毛試料は以下の5つの部位から採取した

- i) 前頭部 3.3mg (長さ約6cm前後, 5本)
- ii) 左側頭部 4.1mg (長さ約6cm前後, 8本)
- iii) 右側頭部 3.3mg (長さ約6cm前後, 5本)
- iv) 頭頂部 7.0mg (長さ約6cm前後, 12本)
- v) 後頭部 4.3mg (長さ約6cm前後, 8本)

上記試料はラット体毛と同様に処理し, LC/MSにより測定した。

2) 測定条件

前章[1]で定めた条件で行った

3) 測定結果

PQ服用死体(Hair1)の毛髪中PQ量についての成績を, 以下の表に示した。PQ・DQとも前頭部で最も高い濃度を示し, 次いで, 頭頂部>後頭部>左側頭部>右側頭部の順であった。DQ濃度は右側頭部が左側頭部より高かった以外はPQと同様の傾向を示した。また, PQ濃度は右側頭部以外はDQ濃度より高値を示した。PQ・DQの毛髪中濃度は, 頭髪において他の薬物と同様に採取部位による差が認められ, 左右の側頭部で低値を示した。PQ・DQ中毒の際に, 採取部位によりPQ・DQ濃度の差があるものの, 毛髪からPQ・DQを検出することにより, PQ・DQ中毒を証明することが可能となった。

表. パラコート服用死体(Hair1)の毛髪中パラコート量

	毛髪重量(mg)	パラコート量 (ng/mg)	ダイコート量 (ng/mg)
Hair1 AW1 前頭部	3.3	586.9	432.3
Hair1 AW2 左側頭部	4.1	218.0	97.0
Hair1 AW3 右側頭部	3.3	98.0	194.0
Hair1 AW4 頭頂部	7.0	494.0	357.9
Hair1 AW5 後頭部	4.3	430.0	278.7

さらに、上記の高濃度を示した頭頂部(Hair1 AW4)について、LC/MS法SCANモードで、PQ・DQが確認された 標準品PQ・DQと同様の、PQの[M-1] であるm/z185, DQの[M-1] であるm/z183が検出された(Fig.20, 21)

4 PQ・DQ投与ラットの血清中のPQ・DQの経時的変化

1) 試料の調製

PQ・DQ投与ラットの血清中の濃度を測定し、参考として示した(Fig. 22)

PQ・DQ 40mg/kg群 DAラット(♂, 6週齢)にPQ・DQ各40mg/kgを経口にて1日1回, 5日間投与し, 最終投与15分, 30分, 1時間, 2時間, 4時間および6時間後に採血し, その血清を試料とした(各群3匹).

PQ・DQ 20mg/kg群・DAラット(♂, 6週齢)にPQ・DQ各20mg/kgを経口にて1日1回, 5日間投与し, 最終投与15分, 30分, 1時間, 2時間, 4時間および6時間後に採血し, その血清を試料とした(各群3匹)

血清0.2mlを用いて, 10%トリクロロ酢酸0.3mlを加え, 良く混和し3,000rpm 5分遠心後, 上清をとり, 10%炭酸ナトリウム0.2mlを加え, pH11に調整しSepPak C18 light(Waters製)カラムを用いて体毛(毛髪)と同様に精製した 測定はHPLCにて, イソニコチン酸を外部標準として測定した.

2) 測定条件

前年度のヒト血清中のPQ・DQ測定と同じ

測定装置: Jasco PU-980, CO-965, UV-970

カラム: Inertsil ODS-2 (5 μ m, 25cmx4.0mm I.D.)

カラム温度, 30 $^{\circ}$ C

移動相 0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)+0.05%ペンタフルオロ酪酸(PFBA)+0.1%トリエチルアミン(TEA), 流速, 0.8ml/min

検出波長: UV 260nm(PQ), UV 310nm(DQ)

External Standard(ES): 25 mMイソニコチン酸

3) 測定結果

PQ・DQ 40mg/kg投与群で, 死亡したラットでは1時間後に急激なPQ濃度上昇が認められた. PQ・DQ 20mg/kg投与群でも, 死亡したラットでは2時間後に急激なPQ濃度上昇とDQの1時間後の上昇が認められた 血清中PQ・DQはほぼ同じ濃度を示し, 6時間後でもかなりのPQ・DQが血清中で検出された. この傾向は人や他の動物実験でも認められている 本実験では体毛が採取されておらず, 体毛中への移行が測定出来なかったのは残念であった. 血中濃度と体毛への移行程度の関係は今後の課題として重要と思われる.

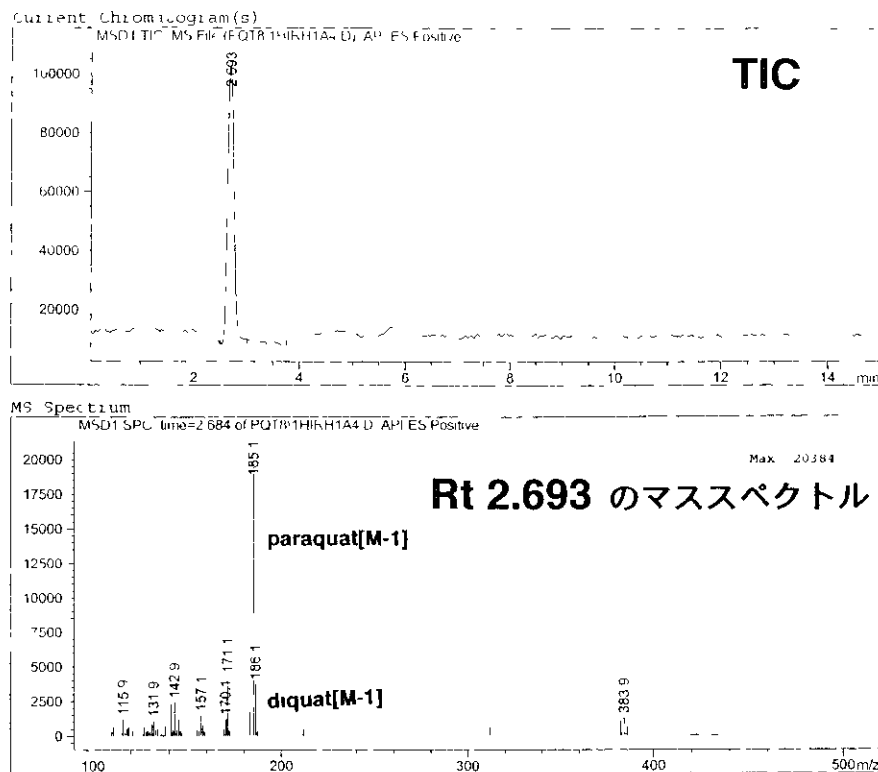


Fig 20. パラコート服用死体の頭頂部毛髪から得られたLC/MSクロマトグラムならびにLC/MSスペクトル(SCAN mode)

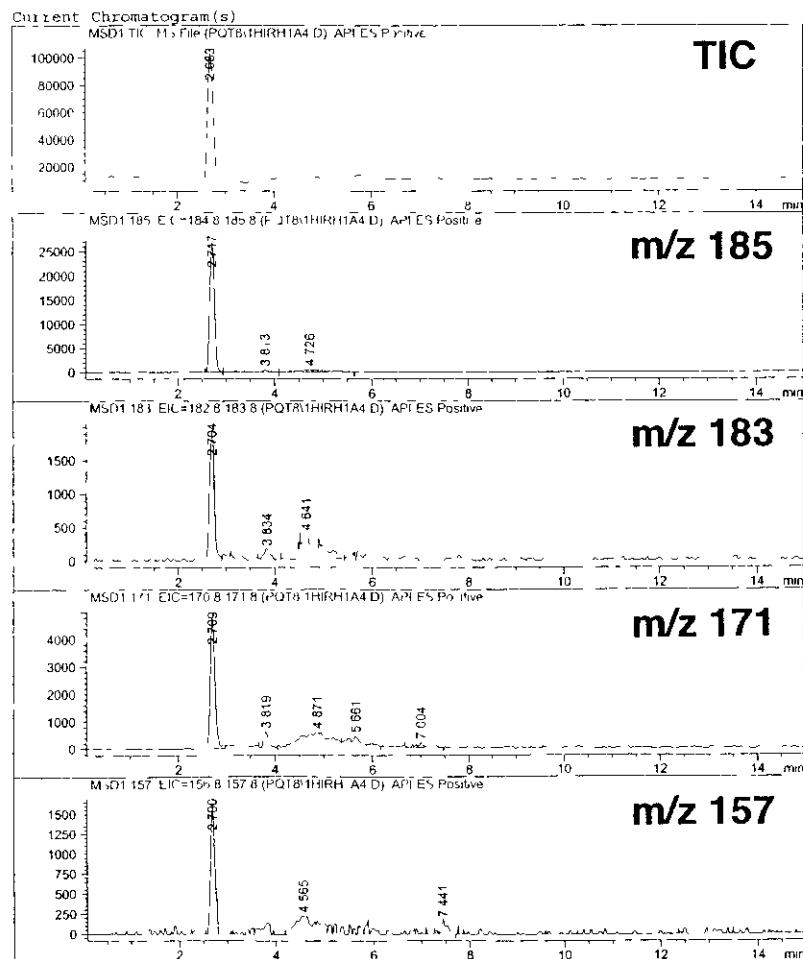


Fig 21 パラコート服用死体の頭頂部毛髪から得られたm/z185, 183, 171, 157のLC/MSクロマトグラム(SCAN mode)

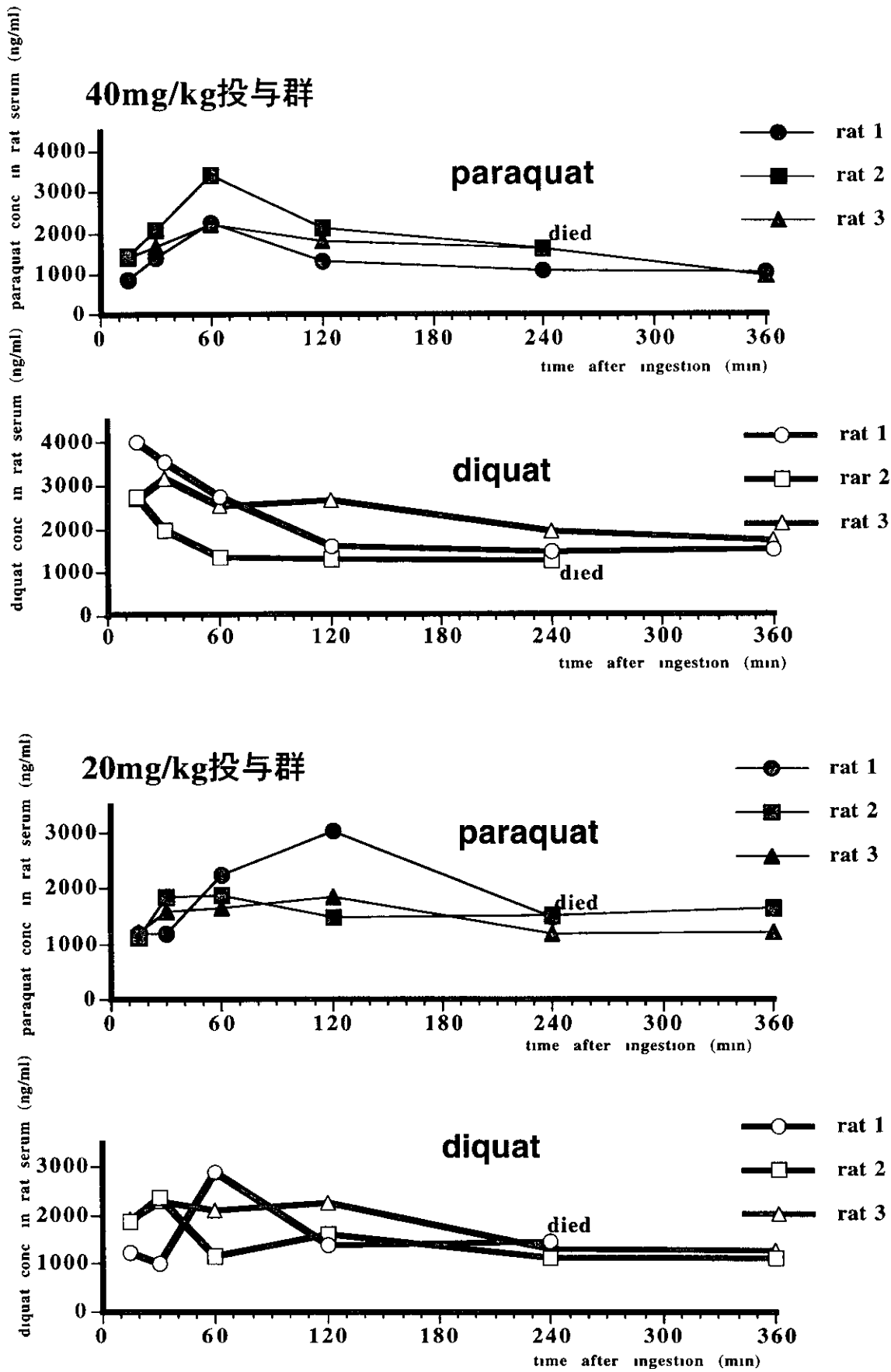


Fig. 22 PQ・DQ 40mg/kg(上)ならびに20mg/kg(下)投与ラット血清中PQ・DQ濃度の経時的変化

[3] 結論ならびに今後の課題

1 毛髪からのPQ・DQのLC/MSによる分析法を開発した

2 PQ・DQ中毒例の毛髪からPQ・DQが検出され、PQ・DQの服用を証明しえた

3 毛髪の常在成分との重なりについて

毛髪に取り込まれるPQ・DQは微量であるため、LC/MS法ではSIMモードで測定しなければ検出されがたい。その際に、PQはm/z 185、DQはm/z 183をモニターイオンとすると、PQ・DQを服用させていないラット体毛や服用していない健常人の毛髪からの抽出操作により、同じRt値を持つm/z 185、m/z 183のイオンが検出された。これは0.1% SDSによる洗浄によっても消失せず、毛根部、毛幹部でも同様に検出された。これらは個体を変えても検出され、例数が少なく結論は出せないが、個体による差は余り認められない傾向であった。これらのブランク毛髪(体毛)をSCANモードで測定すると、m/z 185、m/z 183をベースピークとする単一の成分ではなく、広範囲の質量数の集積であった。

今後、毛髪分析によってPQ・DQ服用を証明するためには、個体数を増やして、中毒量と断定できる域値を設定して行く必要かあろう。同時に、毛髪中の常在成分の影響を排除できる抽出法あるいは精製法を検討する必要がある。

4. PQ・DQ中毒の際の毛髪分析の有用性について

PQ・DQ中毒の際に、多量服用の場合(例、Hair-1)には毛髪からPQ・DQを検出することにより、毛髪からPQ・DQ中毒を証明することは可能となった。今後、他の薬物と同様に、毛根部からの1cm毎の分析を行うことにより、その人のPQ・DQ服用歴あるいは暴露歴が把握出来る可能性が考えられる。もし、その個体に非暴露(非服用)期間があるのなら、その部分は毛髪の常在成分のコントロールとして使用できる可能性があり、その値を域値として用いることができよう。

5. PQ・DQ血中濃度と毛髪濃度の相関について

血中濃度の経時的変化と毛髪濃度の経時的変化を比較することにより、毛髪におけるPQ・DQ濃度の意義がより明らかとなるであろう。

[4]参考文献

R.Gill, S.C.Qua and A.C.Moffat High-performance liquid chromatography of paraquat and diquat in urine with rapid sample preparation involving ion-pair extraction on disposable cartridges of octadecyl-silica. J.Chromatogr , 255, 483-490 (1983)

細井要一, 神津 公 高速液体クロマトグラフィーによる血中パラコートの定量 衛生化学, 31(4), 251-255 (1985)

鶴飼茂夫, 河瀬章司 : パラコート中毒と裁判化学 衛生化学, 31(5), 283-297 (1985)

三浦 修, 佐々木智, 他 血清中パラコートの迅速簡易定量法 衛生化学, 32(3), 167-170 (1986)

加藤晴代, 磯野秀夫, 藤田 進・生体試料中パラコートの定性・定量のための除蛋白剤の検討について. 衛生化学, 32(6), 460-463 (1986)

山本好男, 龍野嘉紹 逆相高速液体クロマトグラフィーによる血液中パラコートの迅速定量法 中毒研究, 2, 419-424 (1989)

福家千昭, 飴野 清, 白川洋一, 他 高速液体クロマトグラフィーによる体液および臓器・組織中パラコートとジクワットの同時分析法と中毒例への応用 中毒研究, 5, 387-393 (1992)

T.Yoshioka, T.Sugimoto, N.Nishioka.et al・Effect of concentration reduction and partial replacement of paraquat by diquat on human toxicity : a clinical survey Hum.Experiment Toxicol , 11, 241-245 (1992)

古沢世理子, 本庄弘次, 米満孝聖, 恒成茂行 血液中パラコートの定量分析-試料の前処理方法と分析方法の評価 日法医誌, 47(1), 57-62 (1993)

福家千昭, 飴野 清, 飴野節子, 他 : in vitro代謝実験法によるパラコートとジクワットの代謝に関する研究-パラコートとジクワットの代謝産物について- 日法医誌, 47(1), 33-45 (1993)

K.Ameno, C Fuke, Y.Shirakawa, et al. Different distribution of paraquat and diquat in human poisoning cases after ingestion of a combined herbicide. Arch Toxicol , 68, 134-137 (1994)

C.Fuke, K Ameno, S Ameno, et al . Detection of two metabolites of diquat in urine and serum of poisoned patients after ingestion of combined herbicide of paraquat and diquat Arch.Toxicol , 70, 504-507 (1996)

S.Kage, K.Kudo, S Fukushima and N Nagai Selective determination of paraquat and diquat in blood by high-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry Jpn J Forensic Toxicol , 16(1), 34-41 (1998)

付属文書

(平成11年度の本研究により得られた刊行物)

1. J.Chromatogr. B, 733 161-180 (1999).
2. 医学のあゆみ, 190 1051-1055 (1999)

19990034

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので P.173 の「附属文書」をご参照ください。