

197-204 (1993).

7) D. R. Jones et al., *J. Chromatogr. B.*, 678(1),
105-111 (1996).

8) B. Schmid et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 38(6),
618-624 (1985).

9) A. Kupfer et al., *Xenobiotica*, 16(5), 421-433
(1986).

10) M. Hildebrand et al., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*,
36(3), 315-318 (1989).

11) T. Zysset et al., *Biochem. Pharmacol.*, 37(16),
3155-3160 (1988).

12) N. L. Kerry et al., *Biochem. Pharmacol.*, 45(4),
833-839 (1993).

G 健康危機情報

特になし.

H. 研究発表

論文発表

特になし

学会発表

1. 河村麻衣子, 花尻 (木倉) 瑠理, 合田幸広: 毛髪を中心としたラット生体試料 dextromethorphan 及び levomethorphan の LC-MS/MS を用いた光学異性体分析について, 日本薬学会第 130 年会 (2010.3.28-30, 岡山).

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし.

2. 実用新案登録

特になし.

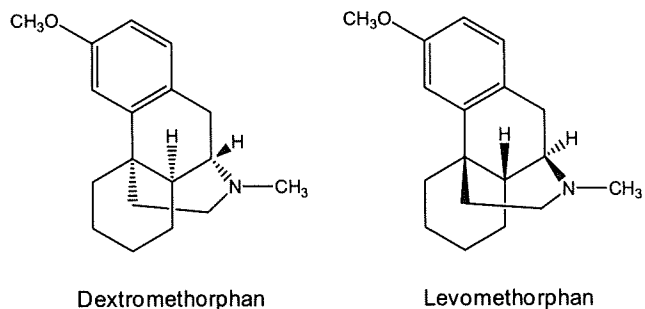


Fig.1 Chemical structures of dextromethorphan and its optical isomer, levomethorphan

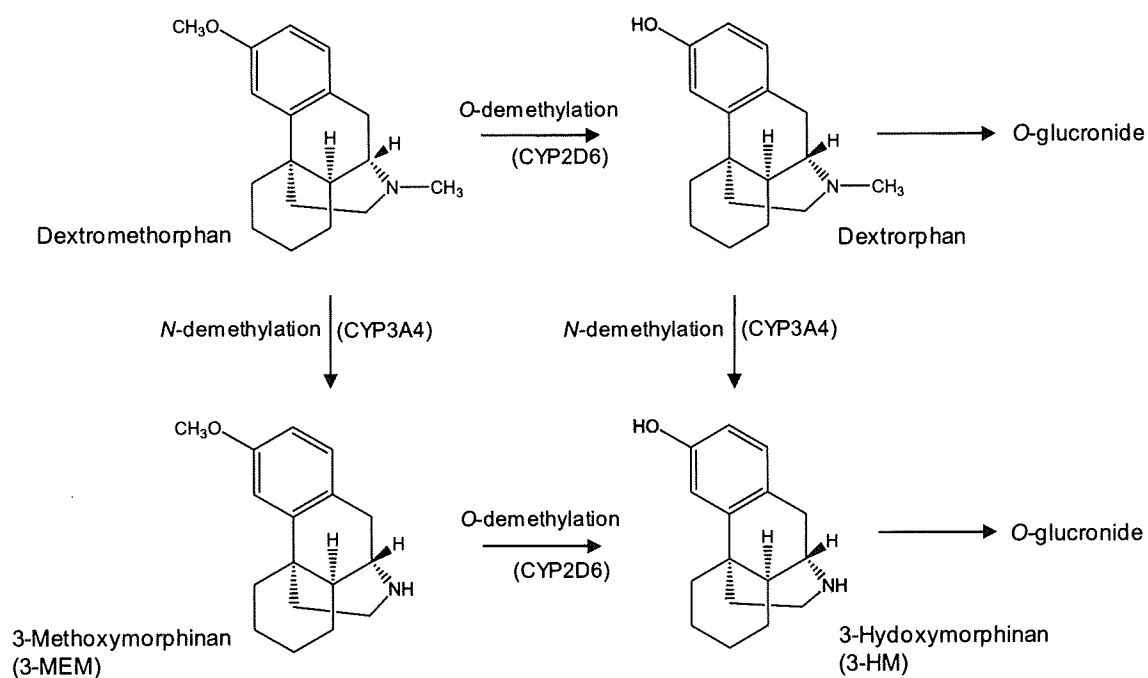


Fig. 2 Main metabolic pathway of dextromethorphan in man

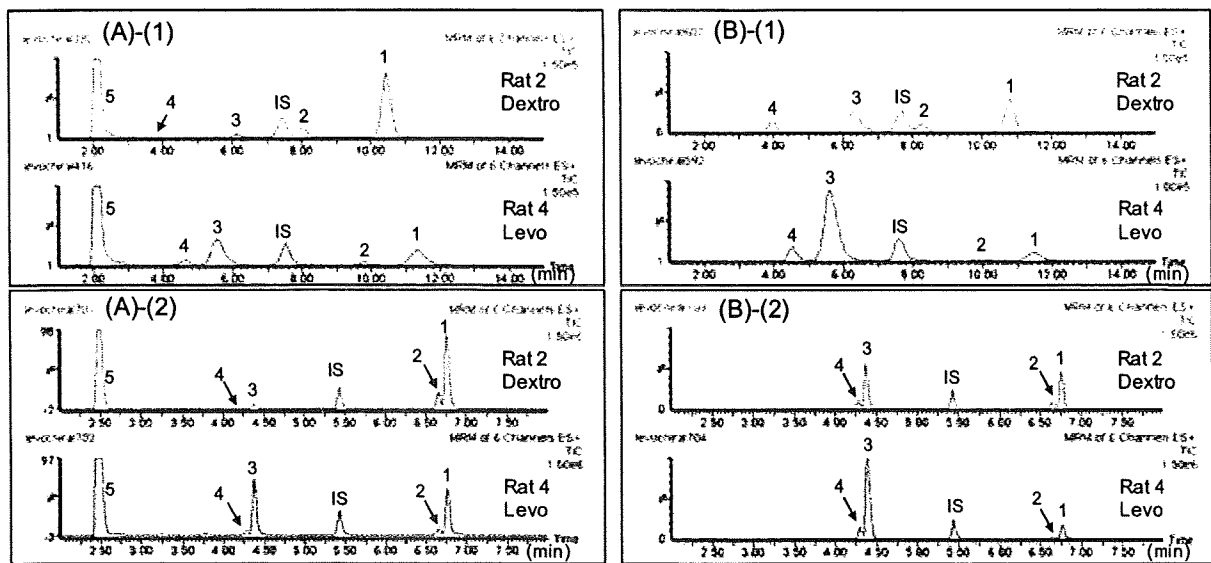


Fig. 3 LC-MS/MS total ion chromatograms (MRM mode) of extracts from rat plasma (Rat 2/ Rat 4, 30 min) treated without (A) and with (B) glucuronidase using Chiral CD-Ph column (1) and UPLC T3 HSS column (2). 1: dextrometorphan /levomethorphan, 2: (+)/(-)-3-MEM, 3: dextrorphan/ levorphanol, 4: (+)/(-)-HM, 5: dextrorphan/ levorphanol-*O*-glucuronide

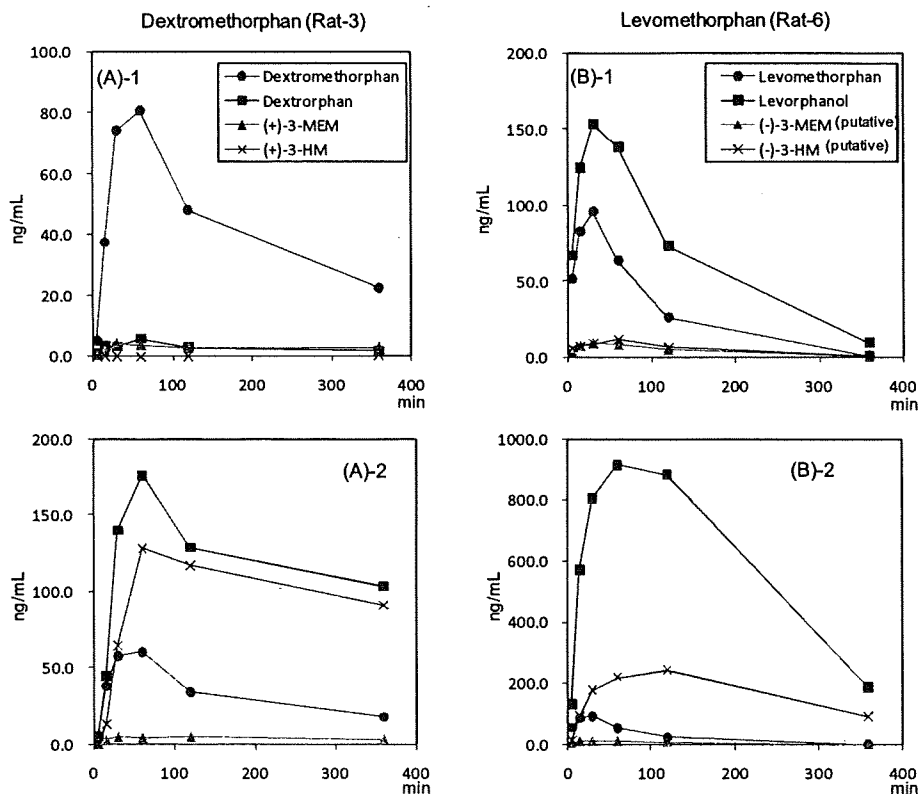


Fig. 4 Time courses of rat plasma drug concentrations after the first administration of dextrometorphan (A) and levomethorphan (B) (Rat 3 and Rat 6, 5 mg/kg, i.p.). (A)-1 and (B)-1 correspond to the glucuronidase-untreated samples and (A)-2 and (B)-2 are the glucuronidase-treated samples.

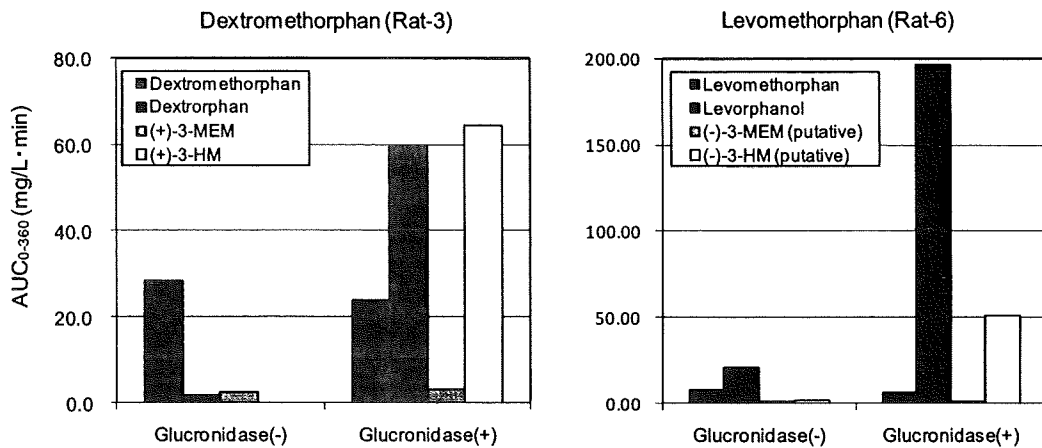


Fig. 5 $AUC_{0-360min}$ of rat plasma drug concentrations after the first administration of dextromethorphan (A) and levomethorphan (B) (Rat 3 and Rat 6, 5 mg/kg, i.p.). The glucuronidase-untreated samples (-) and treated samples (+) are shown.

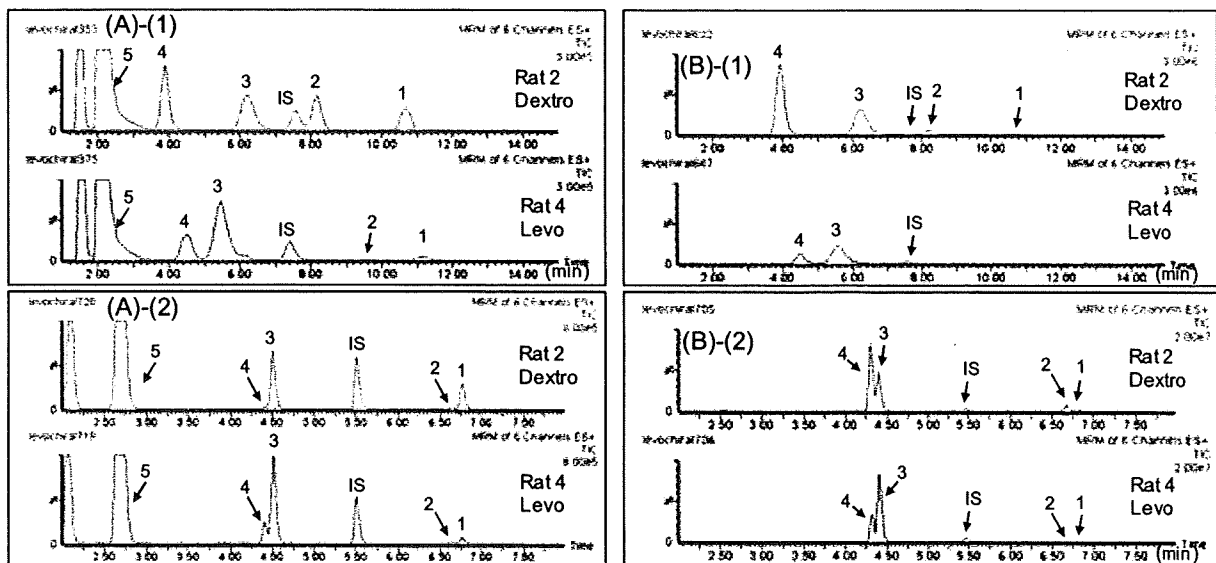


Fig. 6 LC-MS/MS total ion chromatograms (MRM mode) of extracts from rat urine (Rat 2/ Rat 4, 0-24 h) treated without (A) and with (B) glucuronidase using Chiral CD-Ph column (1) and UPLC T3 HSS column (2). 1: dextromethorphan /levomethorphan, 2: (+)/(-)-3-MEM, 3: dextrorphan/ levorphanol, 4: (+)/(-)-HM, 5: dextrorphan/ levorphanol-*O*-glucuronide

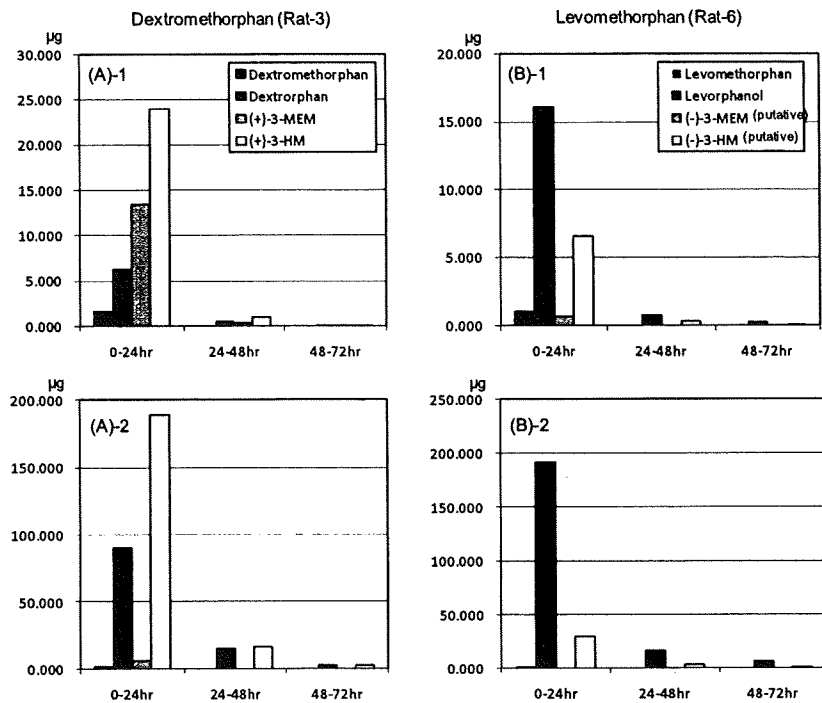


Fig. 7 Time courses of excretion of the parent compounds and their metabolites into the urine of rats (Rat 3 and Rat 6) administered with dextrometorphan (A) and levometorphan (B). (A)-1 and (B)-1 correspond to the glucuronidase-untreated samples and (A)-2 and (B)-2 are the glucuronidase-treated samples.

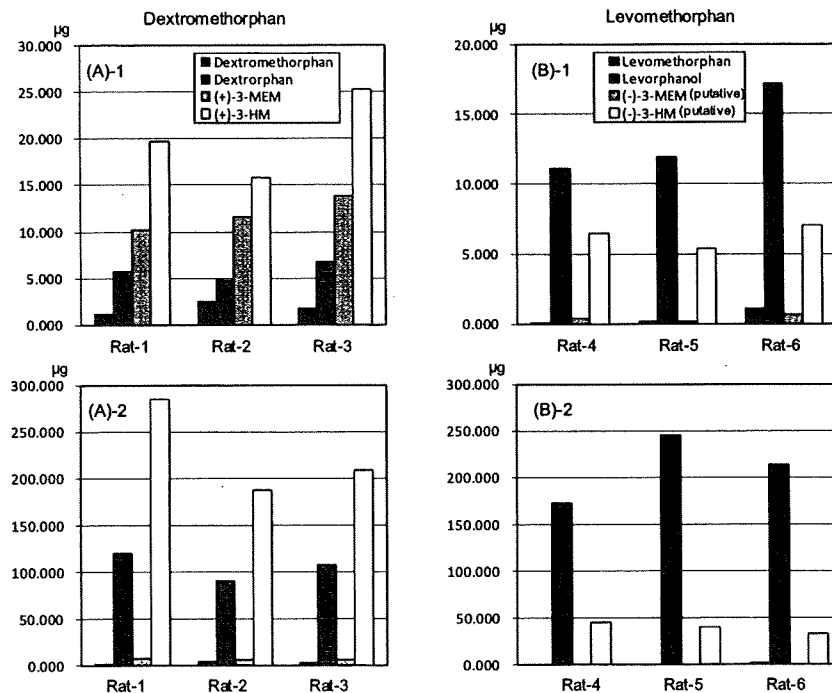


Fig. 8 Total excretion (0-72 h) of the parent compounds and their metabolites into the urine of rats administered with dextrometorphan (A) and levometorphan (B). (A)-1 and (B)-1 correspond to the glucuronidase-untreated samples and (A)-2 and (B)-2 are the glucuronidase-treated samples.

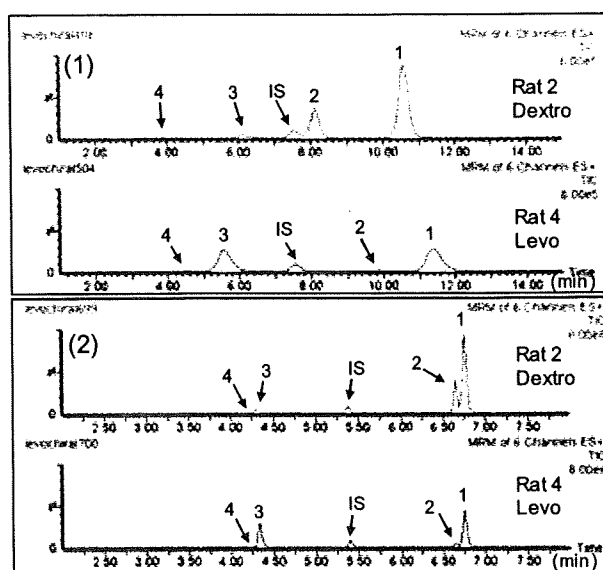


Fig. 9 LC-MS/MS total ion chromatograms (MRM mode) of extracts from the Rat -2/ Rat 4 hair collected 4 weeks after the first administration of dextrometorphan/ levomethorphan (5 mg/kg, i.p., 10 days), The chromatograms were obtained using the Chiral CD-Ph column (1) and the UPLC T3 HSS column (2), respectively.

1: dextrometorphan /levomethorphan, 2: (+)/(-)-3-MEM, 3: dextrophan/ levorphanol, 4: (+)/(-)-HM

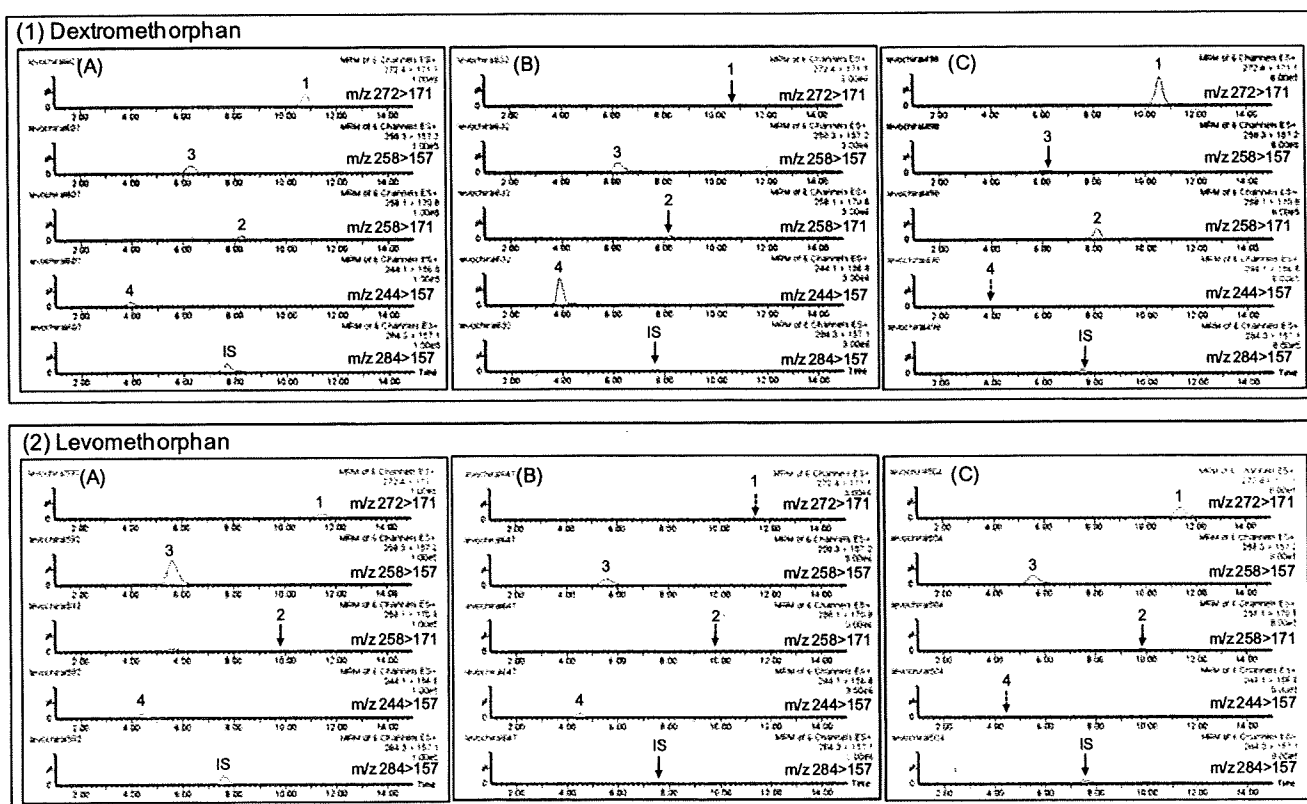


Fig. 10 LC-MS/MS MRM chromatograms of the extracts from (A) plasma (30min), (B) urine (0-24 h) and (C) hair of rats administered with (1) dextrometorphan (Rat 2) and (2) levomethorphan (Rat 4).

1: dextrometorphan /levomethorphan, 2: (+)/(-)-3-MEM, 3: dextrophan/ levorphanol, 4: (+)/(-)-HM

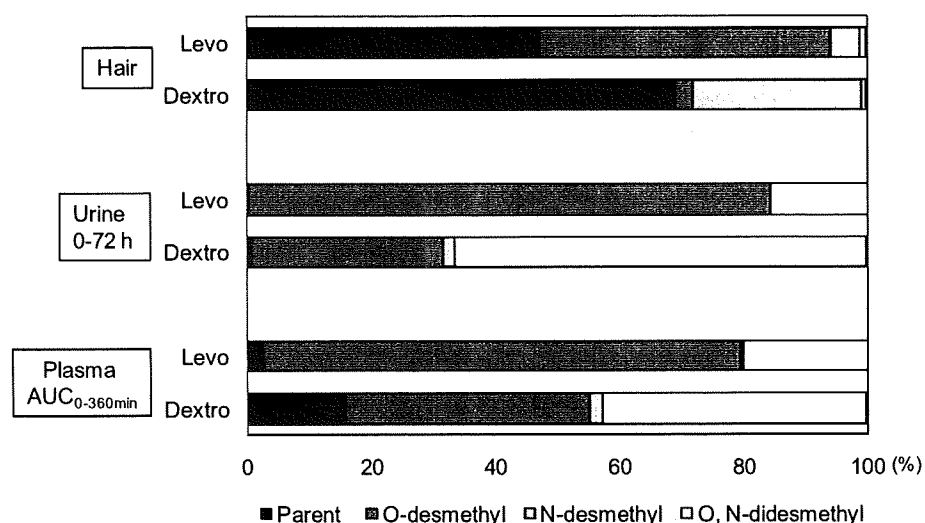


Fig. 11 A comparison of the ratios of the parent compounds and their metabolites in the plasma, urine and hair of rats administered with dextrometorphan and levometorphan.

Table 1 Analytical conditions of LC-MS/MS using the UPLC T3 HSS column

	Retention time min	Parent m/z	Cone Voltage V	Daughter m/z	Collision Energy eV
Dextromethorphan / Levomethorphan	6.7	272	30	171	40
Dextrorphan / Levorphanol	4.4	258	30	157	35
3-MEM	6.6	258	30	171	35
3-HM	4.2	244	30	157	35
Dextrorphan-O-glu	2.5	434	30	258	30
Levallorphan(IS)	5.4	284	30	157	40

Table 2 Analytical conditions of LC-MS/MS using the Chiral CD-Ph column

	Retention time min	Parent m/z	Cone Voltage V	Daughter m/z	Collision Energy eV
Dextromethorphan	10.6	272	40	171	45
Dextrorphan	6.1	258	45	157	40
(+)-3-MEM	8.1	258	40	170	35
(+)-3-HM	3.9	244	30	156	35
Dextrorphan-O-glu	2.1	434	35	258	30
Levomethorphan	11.3	272	40	171	45
Levorphanol	5.5	258	45	157	40
(-)-3-MEM (putative)	9.8	258	40	170	35
(-)-3-HM (putative)	4.5	244	30	156	35
Levallorphan (IS)	7.5	284	40	157	40

Table 3 Validation of results of the LC-MS/MS analysis of dextrometorphan/levometorphan and their metabolites in rat plasma, urine and hair samples

		LOD	LOQ	Linear ranges	Calibration curves	Recoveries (%)		Precision (%) (n=5)				Accuracy (%) (n=5)		
		(S/N>3)	(S/N>10)			80 ng/mL	2.0 ng/mL	20 ng/mL	200 ng/mL	2.0 ng/mL	20 ng/mL	200 ng/mL		
		(ng/mL)												
Plasma (50 µL)	Dextrometorphan	0.8	1.0	1.0-400	y=0.015346x+0.00372 r2=0.9997	106.1	22.1	9.3	1.5	-19.2	5.5	-0.2		
	Dextrorphan	0.4	0.8		y=0.115346x+0.00370 r2=0.9989	81.7	10.2	3.8	1.5	10.2	2.2	-3.6		
	(+)-3-MEM	0.8	1.0		y=0.008346x+0.00371 r2=0.9986	110.5	15.0	3.2	2.5	23.5	2.1	2.6		
	(+)-3-HM	0.8	1.0		y=0.007681x+0.000957 r2=0.9967	92.5	15.7	6.1	1.8	13.7	-8.3	2.9		
	Levomethorphan	0.8	1.0	1.0-400	y=0.010467x+0.00638 r2=0.9996	100.8	8.6	4.9	2.5	21.6	-4.4	-5.7		
	Levorphanol	0.8	1.0		y=0.008656x+0.00185 r2=0.9995	90.7	15.9	4.1	2.3	-10.6	-5.6	-3.6		
Urine (100 µL)	Dextrometorphan	1.0	2.5	5.0-10000	y=0.001698x-0.117686 r2=0.9967	90.2	9.7	0.8	2.6	-4.8	-5.2	-4.8		
	Dextrorphan	1.0	2.5		Y=0.001653x+0.069180 r2=0.9978	106.1	23.6	4.6	3.2	-17.9	11.1	-3.3		
	(+)-3-MEM	2.5	5.0		y=0.001428x-0.106299 r2=0.9960	102.5	19.7	6.1	4.2	10.4	-5.8	2.7		
	(+)-3-HM	2.5	5.0		y=0.000878x-0.050165 r2=0.9967	91.3	24.6	5.1	2.6	1.6	-9.9	1.5		
	Levomethorphan	1.0	5.0	10-10000	y=0.000799x-0.081311 r2=0.9966	94.6	10.9	9.5	2.6	-4.3	-17.0	-2.2		
	Levorphanol	1.0	5.0		y=0.000839x-0.087228 r2=0.9993	93.1	4.8	4.5	4.6	18.6	-8.0	6.8		
Hair (10 mg)	Dextrometorphan	0.025	0.05	0.1-50	y=0.2047x+0.0178 r2=0.9996	84.2	11.5	4.5	2.8	4.6	18.8	-6.6		
	Dextrorphan	0.025	0.05		y=0.2421x+0.0146 r2=0.9991	99.8	6.4	2.6	2.7	3.7	15.4	-3.5		
	(+)-3-MEM	0.025	0.05		y=0.0812x+0.0038 r2=0.9998	83.8	18.6	3.9	1.5	4.7	0.6	-2.2		
	(+)-3-HM	0.025	0.1		y=0.1005x+0.0012 r2=0.9958	91.4	11.2	6.2	2.8	4.6	18.8	-6.6		
	Levomethorphan	0.025	0.1	0.1-50	y=0.1655x-0.0366 r2=0.9948	98.1	9.9	9.8	5.5	0.1	-2.3	-5.1		
	Levorphanol	0.025	0.05		y=0.1398x+0.0041 r2=0.9987	112.2	8.8	2.8	4.2	11.9	1.3	-3.8		

Table 4 Rat plasma AUC_{0-360min}, total excretion into rat urine and concentrations in rat hair of dextrometorphan/levometorphan and their metabolites

		Plasma		Urine		Hair
		AUC ₀₋₃₆₀ (mg/L·min)		Total excretion 0-72 h (µg)		Concentration (ng/mg)
		Glucronidase(-)	Glucronidase(+)	Glucronidase(-)	Glucronidase(+)	
Dextrometorphan (Rat1-Rat3)	Dextrometorphan	28.3	23.8	1.78	2.13	63.4 ± 4.6
	Dextrorphan	1.60	59.4	5.74	106.1	2.70 ± 0.04
	(+)-3-MEM	2.37	3.10	11.9	6.95	25.1 ± 1.9
	(+)-3-HM	0.10	64.3	20.3	226.9	0.70 ± 0.11
Levomethorphan (Rat 4-Rat 6)	Levomethorphan	7.83	6.90	0.42	0.59	24.5 ± 5.3
	Levorphanol	21.3	197.1	13.4	210.5	24.6 ± 2.4
	(-)-3-MEM (putative)	1.33	1.47	0.42	0.13	2.57 ± 0.71
	(-)-3-HM (putative)	1.77	51.5	6.31	39.0	0.49 ± 0.09

分担研究報告書

分担研究課題 薬物の分析と同定に関する研究

分担研究者 花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

ラット毛髪を中心としたクエン酸フェンタニル及びその代謝物である

ノルフェンタニルの UPLC-MS/MS を用いた生体試料中の分析法

研究協力者 最所和宏 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

要旨 近年、医療従事者による違法な摂取が報道された麻薬であるクエン酸フェンタニル及びその代謝物であるノルフェンタニルの UPLC-MS/MS を用いたラット生体試料中の分析法を検討した。超音波抽出下酵素消化法の緩衝液、抽出温度、抽出時間を最適化することにより、クエン酸フェンタニル及びノルフェンタニルの毛髪中の分析法として、迅速な分析が可能となった。メタノール/5M 塩酸 (20/1) 溶液による抽出後、固相抽出により精製する方法で、毛髪中のフェンタニル及びノルフェンタニルともに精度良く分析することができた。また、酵素消化法による抽出でも同様に精度良く分析することができた。低濃度薬物投与 (0.1mg/kg) ラットの毛髪中より、フェンタニル 3.72 - 6.58 ng/mg hair、及びノルフェンタニル 0.15 - 0.37 ng/mg hair 検出された。また、血漿試料についても毛髪試料と同一の精製法を適応し、精度良く分析できることが確認された。薬物投与ラットの毛髪中及び血漿中薬物濃度より、従来から薬物の毛髪への移行性の指標としていた ICR 値 (薬物毛髪中濃度/薬物血中濃度) を算出した。クエン酸フェンタニルの ICR 値は 0.22 であり比較的高い ICR 値を示した。薬物の使用証明の方法として、クエン酸フェンタニルの毛髪分析が適していることが示唆された。

A. 研究目的

1960年代より、モルヒネの代用薬として、合成鎮痛薬であるクエン酸フェンタニル（麻薬）が鎮痛・麻酔の目的で利用されてきた¹⁾。欧米では、ヘロインのデザイナードラッグとして、違法に使用され、その過剰摂取による事故が起こっている。近年、日本においても、ニュースや新聞紙上で、医療従事者による違法な摂取による事故が報道されるようになった。麻薬には、所持罪だけでなく使用罪も適用されるため、薬物の使用証明が必要となる。現在、薬物の使用証明は、主に被疑者の尿中薬物の検出により行われている。しかし、通常、尿中からは使用後1週間程度で、薬物が消失し、長期にわたる薬

物情報を得ることができない。そこで、長期の薬物乱用情報が得られる手段として、毛髪試料が注目され、様々な薬物の毛髪中の分析法が報告されてきた²⁾。クエン酸フェンタニルの毛髪試料中の GC-MS による分析については、幾つか報告され、2D-GC-MS³⁾、GC-MS/MS⁴⁾ により分析されている。しかし、2D-GC-MS 及び GC-MS/MS は、現在のところ、あまり普及している機器ではないと考えられる。一方、LC-MS/MS による分析は、Schneider ら⁵⁾ により報告されている。代謝物を同時に検出することは、受動的に毛髪に付着したのではなく、能動的に摂取したことへの証明になるが、彼等の報告ではノルフェンタニルを含む代謝物の分析は行っていない。よ

って、フェンタニルの主代謝物であるノルフェンタニルも合わせて、近年普及してきた UPLC-MS/MS を用いて、迅速・高感度なラット毛髪中の分析法を検討し、昨年度、本研究班に報告した。今年度は、超音波抽出下酵素消化法の最適化による抽出効率の向上、低濃度投与での毛髪中から薬物の検出について検討した。また、同時に血漿試料を採取し、血漿中の薬物濃度を測定し、毛髪への移行性についても検討した。

B. 研究方法

1. 試薬

クエン酸フェンタニル及びクエン酸ノルフェンタニルは cerilliant 社製の 1mg/mL メタノール溶液を使用した。クエン酸フェンタニル重水素化体は cerilliant 社製の d5 体の 100µg/mL メタノール溶液を使用した。dithiothretiol (DTT) 及び tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) は Aldrich 社製、Ponase E (ストレプトマイセス、生化学用、>400 万 U/g) はメルク社製を使用した。

2. 動物実験及び分析試料採取法

Dark-Agouti (DA) ラット (♂、5 週齢、日本エスエルシー) の背部の毛を、動物用電気バリカンで刈り取り、この毛をコントロール毛髪試料とした。背部の毛を刈り取った DA ラット 3 匹ずつクエン酸フェンタニル 0.1mg/kg を 10 日間連続して腹腔内投与した。薬物の初回投与 28 日後、新たに生えた毛を採取して毛髪試料とした。毛髪試料を 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム溶液、水で各 3 回、1 分間ずつ超音波下洗浄した後、乾燥した。ハサミを用いて、乾燥した毛髪試料を 0.5 mm 程度に細片化した。また、薬物の初回投与後、5、15、30、60、120、360 分後にラットの眼窩静脈叢より採血し、10000rpm で 3 分間遠心分離して、上清を血漿試料とした。得られた血漿試料は分析直前まで、-20℃で保存した。コントロール血漿試料は日本エスエルシーより購入したものをを用いた。

(倫理面の配慮)

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所「動物実験に関する指針」を遵守し、当所動物管理者の協力得て、動物福祉、愛護の精神に基づいて、適切な実験計画及び適正な実験手技の基で実施した。

3. 分析法

3.1. 毛髪試料の分析法

3.1.1. 毛髪試料からの薬物の抽出法

3.1.1.1. メタノール/5M 塩酸抽出法⁶⁾

細片化した毛髪試料 20 mg に、内部標準溶液としてクエン酸フェンタニル重水素化体 (IS) のメタノール溶液 (10µg/mL) 10 µL 添加し、メタノール/5M 塩酸 (20/1) 溶液 1 mL を加えて、超音波下 1 時間抽出し、さらに一晩放置した。抽出溶液をろ過した後、窒素気流下で乾固した。残渣を、0.1M 塩酸 2 mL に溶解して固相抽出溶液とした。

3.1.1.2. 超音波抽出下酵素消化法⁷⁾

細片化した毛髪試料 20 mg に、IS のメタノール溶液 (10µg/mL) 10 µL 添加し、DTT/1.4M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 20 mg/mL を 500 µL 添加し、Pronase E/1.4M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 2.5 mg/mL を 500 µL 添加し、超音波抽出下、35℃で 60 分間抽出を行った。抽出溶液を遠心分離して不溶物を取り除いた後、少量の 5M 塩酸を加えて液性を pH3 程度にして、固相抽出溶液とした。

3.1.2. 固相抽出

固相抽出カラムは OASIS HLB (3 cc、60 mg、waters) を用いた。MeOH、水 2 mL ずつを順に流して活性化しておいたカラムに、固相抽出溶液をアプライし、0.1M 塩酸 1 mL で洗いこみをした。10%メタノール溶液で洗浄後、2%ギ酸メタノール溶液にて、薬物を溶出させた。

3.1.3. UPLC-MS/MS 分析

3.1.2. の溶出液を窒素気流下で乾固し、0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (85/15) 300 µL に溶解し、UPLC-MS/MS 分析試料とした。UPLC-MS

/MS 分析は、ACQUITY UPLC PREMIA (waters) を用いて、以下の分析条件で測定した。

LC/MS/MS 分析条件

カラム：ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 x 100 mm、
1.8 μ m、Waters)

移動相 A 液：0.1%ギ酸溶液

移動相 B 液：0.1%ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント条件 (A 液/B 液)：85/15 (0-1 min)
-80/20 (6 min) - 10/90 (10 min)

流速：0.3 mL/min

カラム恒温槽温度：40 $^{\circ}$ C

検出器：質量分析計

注入量：2 μ L

イオン化法：ESI ポジティブモード

乾燥ガス流量：800 L/hr

コーンガス流量：50 L/hr

乾燥ガス温度：450 $^{\circ}$ C

キャピラリー電圧：3000 V

コーン電圧：35 V (フェンタニル、IS)、25 V (ノルフェンタニル)

コリジョン電圧：25 V (フェンタニル、IS)、20 V (ノルフェンタニル)

MRM モード：m/z 337.1 \rightarrow 187.9 (フェンタニル定量)、337.1 \rightarrow 104.8 (フェンタニル定性)、233.1 \rightarrow 83.8 (ノルフェンタニル定量)、233.1 \rightarrow 149.8 (ノルフェンタニル定性)、342.1 \rightarrow 187.9 (IS)

3. 2. 血漿試料の分析法

血漿試料 20 μ L に、IS のメタノール溶液 (10 μ g/mL) 10 μ L 添加し、0.1M 塩酸 3 mL を加えて、固相抽出溶液とした。固相抽出及び LC/MS/MS 分析は、固相抽出の溶出液を窒素気流下で乾固し、0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (85/15) 20 μ L に溶解した以外は 3.1. 毛髪試料の分析法に従って分析した。

3. 3. 尿試料の分析法

尿試料 20 μ L に、IS のメタノール溶液 (10 μ g/mL) 10 μ L 添加し、0.1M 塩酸 3 mL を加えて、固相抽出溶液とした。固相抽出及び LC/MS/MS

分析は、固相抽出の溶出液を窒素気流下で乾固し、0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (85/15) 20 μ L に溶解した以外は 3.1. 毛髪試料の分析法に従って分析した。

4. 分析法バリデーション

検量線はコントロール毛髪試料 20 mg に 0.1、1、10、25、50、100 ng/mg hair となるように各々の薬物及び内部標準溶液を加え、前述の分析法に従って分析し、IS に対する各薬物のピーク面積比から作成した。真度及び精度は、コントロール毛髪試料に各薬物濃度 0.1、1、10 ng/mg hair 添加し、全分析操作の各 3 回ずつの繰り返し測定を行い算出した。同様に、血漿試料についても 0.02、0.2、2、10、20 μ g/mL の添加試料より検量線を作成し、0.2、2、20 μ g/mL 添加試料について精度を検討した。

C. 研究結果

1. 毛髪試料の分析法の検討

薬物の毛髪試料からの抽出法には、さまざまな方法が報告されている。その中で、主に、アルカリによる毛髪そのものを可溶化してから抽出及び酸性メタノールでの抽出が、行われ昨年度、酸性メタノールでの抽出法で良い結果が得られた。また、近年、酵素消化による薬物の毛髪試料からの抽出法が報告されており、特に、超音波抽出下酵素消化法は、その他の抽出法に比較して極めて短時間に処理できる利点がある。そこで、酵素消化抽出法及び超音波抽出下酵素消化法を検討した結果、酵素消化抽出法は十分な結果が得られたが、超音波抽出下酵素消化法は定量法としては、回収率の観点から不十分なものであった。しかし、昨年度は数種類の薬物の最適であった抽出条件をそのまま適応し、条件検討は行っていなかった。よって、今年度は超音波抽出下酵素消化法の最適化による抽出効率の向上を検討した。まず、酸性メタノールでの抽出法によって、0.1 mg/kg 投与ラットの毛髪フェンタニル及びノルフェン

タニルを分析し、フェンタニル 3.98 ng/mg hair 及びノルフェンタニル 0.15 ng/mg hair (表 1、RAT1) であった。この測定結果を基準に超音波抽出下酵素消化法の最適化を検討した。表 2 に示したように、抽出温度を 30、35、40°C で抽出を行った結果 30°C よりも 35 及び 40°C での回収率が良かった。よって抽出温度は 35°C でおこなうことにした。次に、表 3 に示すように、Tris-HCl 緩衝液の pH (6.5、7.0、7.4、8.0、8.5) を変化させたところフェンタニル及びノルフェンタニルともに pH8.0 での回収率が若干良かった。次に、抽出時間について検討した。15、30、45 分と長くするに従って回収率が上昇し、60 分以降の変化は認められなかった。回収率は、各々、フェンタニル 96.2% 及びノルフェンタニル 92.3% であり、超音波抽出下酵素消化法は 3.1.1.2. に記載の条件で定量法として十分なものであると考えられた。

3. 固相抽出

固相抽出条件については、昨年度、十分な結果が得られているので 3.1.2. 固相抽出に記載の条件で行った。

4. 分析法バリデーション

表 5 に超音波抽出下酵素消化法による毛髪試料の直線性、精度及び真度を示した。本分析法を用いて、毛髪試料の検量線を作成した結果、フェンタニル ($Y=0.0066X-0.0004$, $R^2=0.9999$) (検出限界 $S/N>5$, 0.2 pg/mg)、ノルフェンタニル ($Y=0.014X+0.00007$, $R^2=0.9999$) (検出限界 $S/N>5$, 0.1 pg/mg) が得られ、0.1~100 ng/mg hair において直線性が認められた。コントロール毛髪試料からは、いずれの薬物も妨害するピークは認められなかった。精度については、毛髪試料の 10、1 及び 0.1 ng/mg hair 添加で、フェンタニル 2.50-3.69% 及びノルフェンタニル 2.25 - 8.67% が得られた。真度については、いずれも 20% 以下であった。表 6 に、血漿試料の直線性、精度及び真度を示した。血漿試料の検量線を作成した結果、フェンタニル

($Y=0.369X-0.00071$, $R^2=0.9927$)、ノルフェンタニル ($Y=0.3439X+0.00038$, $R^2=0.9911$) が得られ、0.02 - 20 ng/mg hair において直線性が認められた。コントロール血漿試料からは、いずれの薬物も妨害するピークは認められなかった。精度については、血漿試料の 20、2 及び 0.2 µg/mL 添加で、フェンタニル 2.22-4.63% 及びノルフェンタニル 4.31-6.89% が得られた。真度については、いずれも 15% 以下であった。

5. 分析結果

クエン酸フェンタニル 0.1mg/kg を 10 日間腹腔内投与した DA ラットの毛髪試料を UPLC-MS/MS で測定した。ラット毛髪からは、フェンタニルが 3.72 - 6.58 ng/mg hair、ノルフェンタニルが 0.15 - 0.37 ng/mg hair 検出された。図 3 にクエン酸フェンタニルの血漿中薬物濃度変化を示した。最高血漿中薬物濃度は投与後 60 分から採取した試料であり、0.41 - 0.70 µg/mL であった。また、AUC 値の平均値は $19.3 \pm 6.2 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ であった。

D. 考察

超音波抽出下酵素消化法を最適化することにより定量法として十分なものとなった。本法により、短時間に処理できる毛髪試料中のフェンタニル及びノルフェンタニルの定量法が確立された薬物添加コントロール毛髪試料を用いて、本分析法のバリデーションを検討したところ、良好な結果が得られた。我々は、毛髪への移行のしやすさの指標として、薬物の毛髪中濃度/AUC 値を Drug Incorporation Rates into Hair (ICR) と定義し、様々な薬物について ICR 値を求め、毛髪分析に適した薬物を検索してきた。本実験から得られたフェンタニルの ICR 値は 0.22 ± 0.01 となった。代表的な乱用薬物の ICR 値は、11-tetrahydrocannabinol -9-carboxylic acid の約 0.001 からコカインの約 3.6 まで幅広い値を示すが⁸⁾、フェンタニルの I

CR 値 0.22 は、毛髪への移行率が比較的良いほうであり、フェンタニルは毛髪分析に適した薬物であると考えられた。クエン酸フェンタニルを摂取したヒトでの試料は入手できなかったため、ヒト試料には本分析法を適応できなかったが、ラット試料の結果から、ヒトでのクエン酸フェンタニル使用量を推定するための手段として、本分析法が適応可能であることが示唆された。

E. 健康危機情報

特になし。

F. 研究発表

特になし。

参考文献

1. Downes J. J., Kemp R. A., Lambertsen, J. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 1967, 158, 416-417
2. Kikura-Hanajiri R, Hayashi M, Saisho K, Goda Y., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2005, 825(1), 29-37
3. Moore C., Marinetti L., Coulter C., Crompton K., *Forensic Sci. Int.*, 2008, 176(1), 47-50
4. Kintz P., Villain M., Dumestre V., Ciriemele V., *Forensic Sci. Int.*, 2005, 153, 81-84
5. Schneider S., Ait-M-Bark Z., Schummer C., Lemmer P., Yegles M., Appenzeller B., Wennig R, *J. Anal. Toxicol.*, 2008, 32(3), 260-4
6. Nakahara Y, Kikura R, *Biol. Pharm. Bull.*, 1995, 18, 267-72
7. Scott PM, Weber D, Kanhere SR, *J. Chromatogr. A*, 1997, 765, 255-63
8. Nakahara Y, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 1999, 733(1-2), 161-80.

表1 メタノール/5M 塩酸抽出法によるクエン酸フェンタニル (0.1 mg/kg x 10 日間) 投与ラット毛髪中の薬物濃度 (n=3)

Compounds	RAT1		RAT2		RAT3	
	(ng/mg hair ± SD)		(ng/mg hair ± SD)		(ng/mg hair ± SD)	
fentanyl	3.98	± 0.08	3.72	± 0.09	6.58	± 0.11
norfentanyl	0.15	± 0.01	0.25	± 0.01	0.37	± 0.01

表2 抽出温度 (°C) による超音波抽出下酵素消化法におけるクエン酸フェンタニル (0.1 mg/kg x 10 日間) 投与ラット1毛髪中からの薬物の回収率の変化 (%)

temperature	30	35	40
fentanyl	65.2	75.6	72.4
norfentanyl	85.4	89.4	88.3

表3 Tris-HCl 緩衝液の pH による超音波抽出下酵素消化法におけるクエン酸フェンタニル (0.1 mg/kg x 10 日間) 投与ラット1毛髪中からの薬物の回収率の変化 (%)

pH	6.5	7	7.5	8	8.5
fentanyl	29.4	65.6	65.2	69.9	68.7
norfentanyl	48.3	80.4	85.4	90.2	87.3

表4 抽出時間 (分) による超音波抽出下酵素消化法におけるクエン酸フェンタニル (0.1 mg/kg x 10 日間) 投与ラット1毛髪中からの薬物の回収率の変化 (%)

time	15	30	45	60	75
fentanyl	35.2	69.9	82.3	92.3	92.5
norfentanyl	45.5	90.2	93.5	96.2	95.6

表 5 超音波抽出下酵素消化法によるラット毛髪試料中薬物分析における直線性、精度及び真度

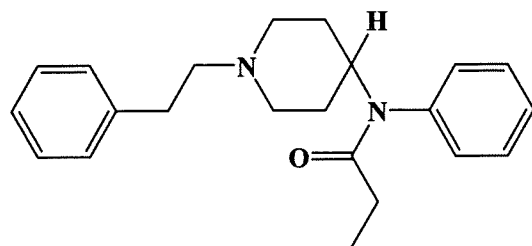
Compounds	Linear range (ng/mg hair)	Linearity	Precision (%)		Accuracy (%)	
			(ng/mg hair)	%	(ng/mg hair)	%
fentanyl	0.1-100	y=0.0066x+0.0004 R ² =0.9999	10	3.69	10	1.53
			1	2.50	1	-1.76
			0.1	3.52	0.1	-14.89
norfentanyl	0.1-100	y=0.014x-0.0007 R ² =0.9999	10	3.52	10	-2.21
			1	2.25	1	0.52
			0.1	8.67	0.1	-15.6

表 6 ラット血漿試料中薬物分析における直線性、精度及び真度

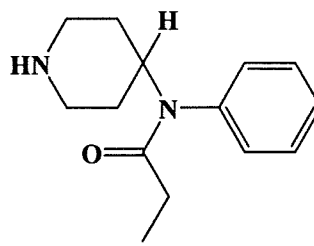
Compounds	Linear range (µg/mL)	Linearity	Precision (%)		Accuracy (%)	
			(µg/mL)	%	(µg/mL)	%
fentanyl	0.02-20	y=0.369x+0.00071 R ² =0.9927	20	3.41	20	-7.39
			2	2.22	2	5.26
			0.2	4.63	0.2	-14.2
norfentanyl	0.02-20	y=0.3439x+0.00038 R ² =0.9911	20	6.89	20	2.56
			2	4.31	2	-0.58
			0.2	6.23	0.2	-14.2

表 7 超音波抽出下酵素消化法によるクエン酸フェンタニル (0.1 mg/kg x 10 日間) 投与ラット毛髪中の薬物濃度 (n=3)

Compounds	RAT1 (ng/mg hair ± SD)	RAT2 (ng/mg hair ± SD)	RAT3 (ng/mg hair ± SD)
fentanyl	3.67 ± 0.10	3.68 ± 0.09	6.52 ± 0.21
norfentanyl	0.14 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.36 ± 0.01



フェンタニル



ノルフェンタニル

図1 フェンタニル及びノルフェンタニルの構造

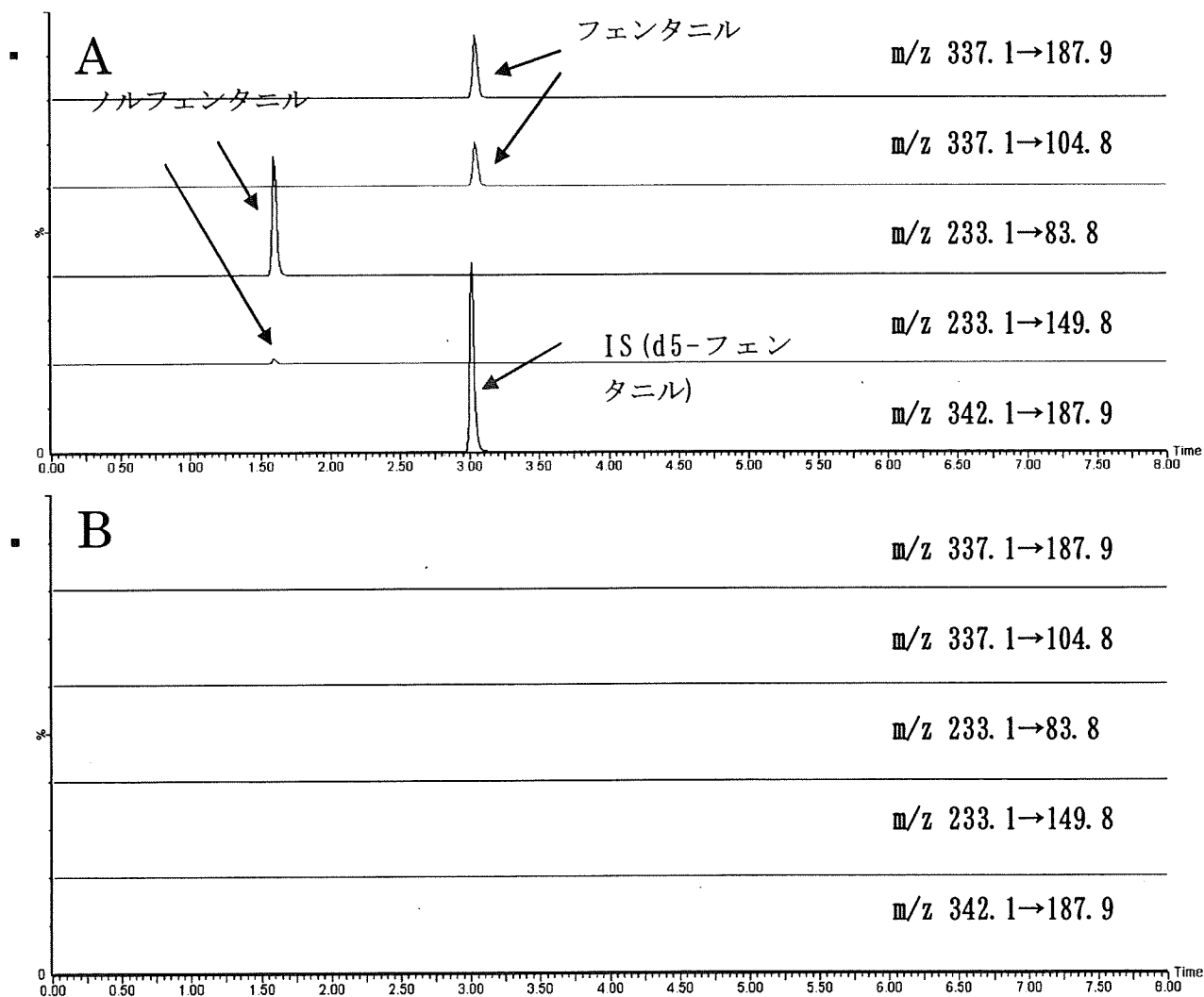


図2 フェンタニル及びノルフェンタニル (各 50 ng/mg hair) 添加ラット毛髪試料抽出物のクロマトグラム (A)、ラットコントロール毛髪試料抽出物のクロマトグラム (B)

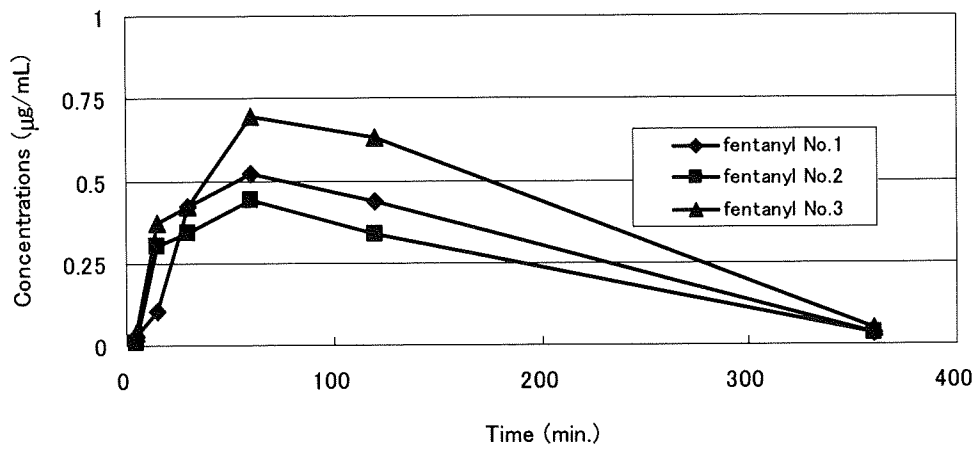


図3 0.1 mg/kg 投与ラット血漿中の薬物濃度変化

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

研究分担課題 薬物の分析と同定に関する研究
研究分担者 花尻 瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

覚せい剤中毒患者頭髪中薬物の分析事例について

研究要旨 我々は本研究において、依存性薬物使用歴推定における毛髪試料の有用性を明らかにすることを目的とし、薬物中毒患者の頭髪及びそれ以外の部位の体毛について、試料中の様々な薬物の分析法を検討し、測定データを蓄積している。今年度は、医療機関で採取された覚せい剤乱用患者の頭髪試料について、1 cm ごとに分画し、メタンフェタミン（MA）及び代謝物アンフェタミン（AP）濃度を測定して、頭髪中の薬物の分布状態を検討した。

研究協力者
河村麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

A. 研究目的

近年、長期の薬物乱用情報を得る手段として毛髪試料が注目されている。薬物を摂取した際、血液中の薬物が毛根部分から毛髪中へ取り込まれ、細胞の角化に従ってその部位に固定され、毛髪の成長とともに毛根側から先端に移動していくことが知られている。一度毛髪に取り込まれた薬物は比較的安定なため、毛髪試料を用いた薬物分析では、血液や尿など他の生体試料中から完全に薬物が消失した後でも、場合によっては数年間にわたる薬物モニタリングが可能である。最近では裁判化学の分野でも、データの蓄積が多い頭髪が薬物使用歴推定のための生体試料として使用されている。

我々は、本研究において、依存性薬物使用歴推定における毛髪試料の有用性を明らかにすることを目的とし、薬物中毒患者の頭髪及びそれ以外の部位の体毛について、試料中の様々な薬物の分析法を検討し、測定データを蓄積している。今年

度は、医療機関で採取された覚せい剤乱用患者の頭髪試料について、1 cm ごとに分画し、メタンフェタミン（MA）及び代謝物アンフェタミン（AP）濃度を測定して、頭髪中の薬物の分布状態を検討した。

B. 研究方法

1) 試料

国立医薬品食品衛生研究所研究倫理委員会で承認された方法に従い、独立行政法人国立病院機構下総精神医療センターにおいて採取した覚せい剤を乱用した患者の頭髪試料を使用した。

【試料情報】

頭髪の長さ：11-23 cm，根元から5 mm程度のところで採取

頭髪の状態：パーマ，染色あり

覚せい剤の使用期間：中断時期もあり不明

覚せい剤の依存の強度：中程度

覚せい剤以外の使用薬物：有機溶剤

その他：入院後約40日後に頭髪採取

2) 分析法

分析は、過去にバリデーションされた方法¹⁾で

行った。

I. 頭髪試料 21 本を毛根側より 1 cm 間隔で分画して (10 cm 以上はまとめて) 11 分画し (各画分約 2 mg 程度), 表面洗浄として 0.1% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液 3 回, 続いて水 3 回で超音波洗浄を各 1 分間ずつ行った。洗浄後乾燥させた毛髪を 2 mm 程度に細片化し, 重量を計測した。

II. 試験管に毛髪と, 内部標準物質として MA, AP 重水素標識体 (MA-d4, AP-d4) の 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合メタノール溶液を 50 μL , メタノール-5M 塩酸 (20:1) 溶液 1 mL を加え, 超音波抽出を 1 時間行い, さらに室温で一晩放置した。

III. I の溶液をろ過し, 毛髪を取り除いた抽出液を窒素気流下で乾固させ, 無水ペンタフルオロプロピオン酸と酢酸エチルを 100 μL ずつ加え, 60°C で 20 分間加温した。反応液を窒素気流下で穏やかに濃縮した後, 酢酸エチル 50 μL に溶解し測定試料とした。

3) GC-MS 測定条件

装置 : HP 5890 Series II Plus / HP 5972 MSD

カラム : HP-1MS(0.25 mm I.D.×30 m, 0.25 μm , Agilent)

カラム温度 : 60°C(1 min)-20°C/min-120°C-8°C/min-200°C-20°C/min-280°C(5 min)

注入量 : 1 μL , Splitless, 注入口温度 : 200°C

キャリアガス : He, 1.0 mL/min

測定モード : Scan モード及び SIM モード,
モニタリングイオン
 m/z : 190(PFP-AP), 194(PFP-AP-d4),
204(PFP-MA), 208(PFP-MA-d4)

4) 検量線及び QC (quality control) サンプル

毛髪中薬物分析は, GC-MS における各薬物のベースピークイオン (m/z : 190(AP), 194(AP-d4), 204(MA), 208(MA-d4)) をモニタリングすることによって行った。検量線は健康人頭髪 (control hair) 2 mg を測りとり, 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ hair となるように, それぞれ AP 及び MA の標準

メタノール溶液を加えて前述した方法で分析操作を行い, 内部標準物質 (各薬物の重水素標識体) に対する薬物のピーク面積比から作成した

(PFP-MA; $y=1.23x+0.0284$, $r^2=0.999$, PFP-AP; $y=1.16x+0.00737$, $r^2=1.000$)。患者頭髪試料分析に先立ち, ブランクサンプル及び QC サンプル (MA, AP を各 0.25, 1.0, 25.0 ng/mg hair となるようにコントロール頭髪試料に添加した試料, $n=3$) を分析し, QC サンプルの精度 (CV 値) 及び真度 (抽出操作における回収率と添加した各化合物の量の差) が 20% 以内であることを確認した。なお, 検量線において, 直線性を示し, かつ真度及び精度が 20% 以下となる下限値 0.1 ng/mg hair を MA 及び AP の定量限界とした。

<倫理面の配慮> ヒト頭髪試料採取及びその取り扱い, 国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会による倫理審査の承認を経て, 倫理委員会の定める規定に則り, 遵守すべき規準に従って実施した。

C. 研究結果及び考察

頭髪試料中の 0-6 cm の画分から, MA 及びその代謝物である AP の両化合物が検出された。特に, 1-4 cm の画分では MA 濃度は 10 ng/mg 以上と高い濃度を示したが, 0-1 cm の画分においては低濃度であった。また, 6-8 cm の画分においては, MA は検出されたが, AP は検出されなかった。頭髪中の MA 及び AP は, 分析用標品の保持時間及び主なフラグメントイオンとの比較で確認した。なお, 今回測定した頭髪試料からは, 覚せい剤以外の法規制化合物は検出されなかった。図 1 に, 頭髪試料 (画分 2-3 cm) のメタノール抽出物の PFP 誘導体化合物のスキャン分析におけるトータルイオンクロマトグラム及び保持時間 8.79 分のピークのマススペクトルを示した。また, 図 2 に同試料の SIM 分析におけるトータルイオンクロマトグラム及び各イオンクロマトグラム (m/z 190;

PFP-AP, m/z 194; PFP-AP-d4, m/z 204; PFP-MA, m/z 208; PFP-MA-d4) を示した。さらに、表 1 に頭髪試料の各画分の MA 及び AP 濃度を、図 3 に頭髪試料の各画分における MA 及び AP 濃度変化を示した。

D. 結論

以上の測定結果より、頭髪試料の根元から 2-3 cm の画分をピークとして、主に 1-6 cm の画分を中心に覚せい剤 MA 及び代謝物 AP が検出された。個人差や採取部位の差、また各頭髪の成長段階の差等があるが、通常、頭髪は 1 ヶ月に 1.1 cm 程度成長することが報告されている。頭髪試料が患者の頭皮より 5 mm 程度の部位から採取されたことを考慮すると（さらに頭皮より毛根の先端までは 5 mm 程度）、試料採取の 3-4 ヶ月前頃をピークとして、主に 2~6 ヶ月前に覚せい剤に接していた可能性が考えられる。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働科学研究費補助金, 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「薬物の分析鑑定法の開発に関する研究」平成 16 年度研究分担報告「体毛中の薬物分析に関する研究」(花尻瑠理)。

F. 研究発表

特になし。

G. 知的所有権の取得状況

特になし。