2版

様　式　C－19、F－19、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 27 年　6 月 22 日現在

機関番号： 34401
研究種目： 基盤研究(C)
研究期間： 2012～2014
課題番号： 24590065
研究課題名（和文） 薬物摂取歴推定の高度化のための単毛髪質量イメージング法の開発と取込機構の解明

研究課題名（英文） Mass spectrometry imaging of single hair specimens for the reliable chronological estimation of drug abuse, and for the investigation of the mechanism of drug incorporation into hair

研究代表者
土橋　均（Tsuchihashi, Hitoshi）

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40596029

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：質量分析イメージングによって、毛髪中に取り込まれた薬物の分布を可視化する革新的な分析法を確立した。覚醒剤のモデル薬物として市販薬メトキシフェナミンを摂取した被験者の単頭髪の縦断面試料を調製して分析した結果、摂取時期に成長した頭髪部位に陽性部位が観察され、従来よりも高精度で薬物の使用歴を推定できることを実証した。さらに同薬物を単回摂取後、一定日数毎に毛根付きで採取した単毛髪試料を分析し、毛髪への取り込み状況を可視化し、その機序についても考察した。

研究成果の概要（英文）：A novel mass spectrometry imaging procedure was established for the visualization of drugs incorporated into hair. Mass spectrometry imaging was performed on the longitudinal sections of single scalp hair shafts from volunteers who took an OTC medicine containing methoxyphenamine, a model drug of methamphetamine. Drug positive bands were observed on the hair specimens in accordance with their schedule of administration. To investigate the mechanism of drug incorporation into hair, single hair specimens were collected by plucking out with the roots intact, and analyzed by the established method.

研究分野： 法医学

キーワード： 毛髪　乱用薬物　質量分析　イメージング

１．研究開始当初の背景

覚醒剤等の乱用は今なお深刻な社会問題である。その取締りや死因究明、事件捜査等において薬物の使用を証明するためには、尿、血液等からの検出が必要であるが、代謝及び排泄のため検出可能期間は摂取後1日～数日程度に止まる。毛髪はこれを補う可能性を秘めた貴重な試料である。摂取した薬物は成長過程の毛髪組織に極微量ながらバンド状に取込まれ、その成長に伴って１か月に約１cmのスピードで毛先側に移動するため、毛髪は薬物の使用歴を記録した磁気テープにも例えられ、注目されて来た。しかし、毛髪への薬物の取込み機序については未だ不明な点が多く、一般的に以下の機構の複合的な関与が考えられている。

- ✧ 機構 1 血中の薬物が毛細血管から毛球部で成長過程の毛髪に取り込まれる。
- ✧ 機構 2 汗や皮脂中に排泄された薬物が頭皮付近の毛髪に浸透し、取り込まれる。
- ✧ 機構 3 毛髪に付着した薬物が毛髪に浸透する。（受動汚染）

ここで、薬物使用歴を顕著に反映し得るのは機構1であり、使用したタイミングに沿って「薬物バンド」が形成されると考えられる。しかし、機構2および3による取込みでは、ブロードに広がった薬物バンドを形成するものと考えられる。毛髪は1ケ月に約1cm成長することから、束ねた毛髪試料を毛根側から２cm 毎などに分画し、各分画毎に薬物を抽出して定量し、経時的な傾向を探る分画分析が従来から行われて来た。しかし、分画分析では機構 1～3 によって取込まれた薬物を区別して評価することも、使用歴を正確に評価することも困難である。特に、覚醒剤やコカインは炙り使用（気化させて吸引）するケースも多く、機構3の受動汚染によって、覚醒剤を使用していない同室者の頭髪からも相当量の覚醒剤が検出される恐れもある。さらに、毛髪一本毎に成長速度差がある（バラツキは最大40%に上り、かつ10–15%が成長休止期にある）ため、毛髪試料（通常、50本以上を束ねた状態）を細分画化することの意義にも限界がある。したがって、従来からの分析法は、多数の頭髪の採取を必要とするも、薬物使用歴の推定精度は必然的に低いという問題点を抱えていた。

近年、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）質量分析イメージング（MSI）によって、生体試料切片中の薬物等を直接検出し、その分布を可視化する技術が急速に発展してきた。我々は MSI の毛髪中薬物の分析への応用を目指し、覚醒剤乱用者の毛髪中の覚醒剤メタンフェタミン（MA）の MSI を試み、その有効性を示唆するデータを既に得ていた。

２．研究の目的

本研究では、「単毛髪質量分析イメージング法」による薬物分析について詳細な検討を行い、汎用的かつ証明力の高い分析法として確立することを目的とした。さらにこれを用いて、覚醒剤のモデル化合物として気管支拡張剤メトキシフェナミン（MOP）を服用したボランティアの頭髪中の薬物の分布を経時的に追跡することにより、未だ不明な点が多い毛髪への薬物の取込み機序についても考察した。

３．研究の方法

⑴ 毛髪試料

大阪医科大学における倫理審査を経て、インフォームドコンセントの後、50mg の MOP 塩酸塩を含む市販薬を単回または複数回、所定のスケジュールで服用したボランティアの頭髪を用いた。頭髪の採取は、摂取後所定の間隔で、頭頂後部領域から抜去（ピンセットを用いて毛根付で採取）または頭皮直近でカットして採取した。分析条件の検討には、ブランク毛髪を MOP 塩酸塩のジメチルホルムアミド溶液に1昼夜浸漬後、表面を除染して調製した添加毛髪を用いた。

⑵ MSI 測定用毛髪試料の調製

単毛髪試料（約 2–3 cm 長）を導電性スライドグラス上に導電性両面テープを介して貼り付け、軽く押さえて若干包埋したうえ、蒸留水を薄く塗布して凍結させた。　これをミクロトーム（微調整が可能な拡大鏡および凍結ユニットを装備、日本ミクロトーム研究所製）を用いて、凍結切片法によって長さ 2cm に渡ってスライスし、毛髪の縦断面試料を作成した。作成した頭髪の縦断面試料について、CHCA 系のマトリックス溶液を約 120 分かけて塗布した。

⑶ MSI 分析装置

下記の2方式3機種を用いて比較検討した。

- ✧ TOF-MS：autoflex speed （“Fast-SRM” モード，PSD）および ultra-fleXtreme （TOF/TOF モード, CID）
- ✧ フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴（FTICR）-MS：solariX 7.0T

の3機種［いずれもブルカーダルトニクス社製、Smart beam™-II laser（固体レーザー, 355 nm, 1000 Hz］を装備）

⑷ MSI 測定条件（TOF/TOF モードによる MOP の測定条件を例示）

加速電圧 19 kV、反射電圧 21 kV。TOF/TOF データセットは、CID による *m/z* 180.1 ＞149.1 のトランジションをモニターし、画像取得のために、100µm のラスタ幅を選択し、1000Hz で 500 回積算した。画像解析およびデータの可視化は、flex 4.0 imaging ソフトウェア（ブルカーダルトニクス社製）を用いた。

４．研究成果

(1) 単毛髪の縦断面試料の調製法の確立

予備実験として、MA 使用者の毛髪試料について、「丸太状態」のまま測定した場合とカミソリ刃で縦断面を出した場合について、MSI を試みたところ、断面を出さず毛髪表面を測定した場合にはMAはほとんど検出できなかった。その原因としては、以下の事項が考えられた。

- ✧ MA 等の塩基性薬物はメラノサイトに結合しているが、メラミンはキューティクルには含まれず、毛髪の髄とその周りに分布している。
- ✧ 分析対象薬物を MALDI によってイオン化するためには、マトリックスを塗布し、薬物がマトリックスに染み出し、共結晶が生成する必要がある。マトリックス溶液を塗布する際に、撥水性のあるキューティクルに覆われた毛髪表面よりも、削ぐことによって多孔質な毛髪組織が露出し、かつ水平となった地肌の方がうまく馴染む。
- ✧ MALDI-MS の測定においては、試料の平面性が重要である。
- ✧ 丸太のまま分析した場合、例え薬物が検出されたとしても、表面汚染の可能性を排除し難い。

よって、毛髪中に取り込まれた薬物の質量分析イメージングには、縦断面試料の調製が不可欠との結論を得た。

(2) 縦断面試料の調製方法の比較

下記の 4 法について検討した。

- ✧ 手作業でカミソリ刃を水平に滑らせて削ぐ方法： 操作が極めて困難であり、熟練しても 1 cm 長程度の毛髪を削ぐのに約 1 時間を要し、毛髪の破断が頻繁に発生した。歩留まりが悪く、断面にもササクレや凹凸が多数発生し精度（平滑性）も劣悪で、MALDI-MS の測定に支障を生じた。
- ✧ レーザー光線によるマイクロダイセクション： 切開の精度と平滑性は極めて良好であったが、電子顕微鏡で観察すると発熱のため断面が焼け爛れ気泡が発生していた。毛髪中の薬物は変化、消失したためか、ほとんど検出されなかった。
- ✧ サンドペーパーによるスクラッチ法； 迅速簡便で、操作も容易であるが、断面の平滑性が悪く、微粉末状の毛髪の削りカスが毛髪断面の組織に入り込み、汚染の発生が危惧された。
- ✧ 凍結切片法： マウント微調整装置、顕微鏡を装着する等によって毛髪用にカスタマイズしたミクロトームの使用により、約 2 cm 長に渡り毛髪（角質化した部分）のみならず、毛根部を含めた縦断面試料が比較的安定して得られる技法を確立した。相当の熟達を要するものの、断面の平面性も良好であった。以降の実験は、本法によって行った。なお、本操作による薬物の流失や拡散は特段認められなかった。

(3) 各種 MALDI-MS 測定法による添加毛髪中の MOP の直接検出

添加毛髪試料（LC-MS/MS 分析による MOP の実測定量値：26 ng/mg）を分析試料として、実験の項に記載の 3 種の測定法によって毛髪中 MOP の直接検出について比較検討した。

- ✧ Fast-SRM モードでの測定は、MALDI に起因する PSD（飛行中の日和見的な開裂）によるフラグメントイオンをリフレクトロンで反射する際に分離して検出することにより、疑似 SRM による MSI を行うものである。１マス毎の完全な分離は困難であり、特異性に欠けるが、毛髪中のMAの検出限界は 2 ng/mg 程度であり、覚醒剤常用者の毛髪中の MA のイメージングについては、その概ねの傾向を知ることは可能と思われた。
- ✧ TOF/TOF モードでの測定は、PSD に加え、CID セルで積極的に開裂させ、LIFT（再加速）して、TOF/TOF によるイメージングを行えるものである。これによって特異性が向上し、１マス単位の分離が可能であった。また、LIFT によってエネルギー上がるため、検出感度が向上し、毛髪中 MA の検出限界は 0.5 ng/mg 程度に向上し、単回使用によって毛髪中に取り込まれる MA 等を検出できる感度と特異性が得られた。
- ✧ 高分解能 MS については、有効数字 6 桁以上での精密質量の測定とイメージングが可能であり、その圧倒的な分解能と SN 比によって同位体の質量数による MSI が併せて行え、信頼性の高いイメージング分析が可能であった。検出限界は薬物よって異なり、毛髪中 MA は 0.5 ng/mg 程度と、TOF/TOF 測定と同レベルと見られた。なお、本法の最大の欠点は異性体を識別できない点であり、薬物の同定にはこの点に留意が必要であった。

以上の検討結果を踏まえ、以降の MSI 分析は TOF/TOF 測定によって行うこととした。

(4) MOP 摂取者の頭髪の MSI 測定の結果

MOP 塩酸塩 50 mg を単回摂取した被験者から一定間隔で採取した単毛髪試料（毛根付）について MSI 分析を行った結果を図１（A）に示す。（被験者 5 名の内、１名分を例示）摂取直前に採取した頭髪からは MOP に相当するイオンは検出されなかったが、5 名の被験者いずれの 24 時間検体についても、毛球部および真皮上層ゾーンに顕著な MOP 陽性領域が観察された。しかし、MSI の定量性については確立されていないため、同時に採取した単毛髪試料について LC–MS/MS を用いた従来法を改良して高感度化し、毛根側から１mm毎の分画分析を行った。その定量結果を図１（B）に示す。

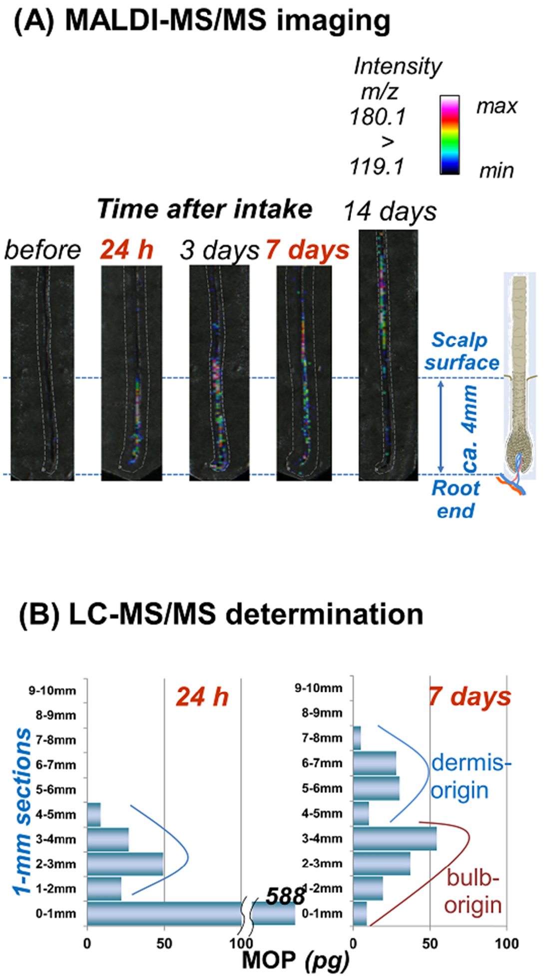

図１　MOP 塩酸塩 50 mg を単回経口摂取した被験者から、摂取後一定間隔で採取した単毛髪試料の MALDI–MS/MS による質量分析イメージング（MSI）の結果（A）、並びに摂取 24 時間後及び 7 日後に採取した単毛髪試料の LC–MS/MS による毛根から 1mm 毎の分画分析の結果（B）

(5) 毛髪への MOP の取込み状況の可視化

図 1 に示す通り、MOP 摂取 24 時間後に採取した頭髪の毛球部分には高濃度の MOP の集積が観察された。しかし、最終的に頭髪中に取り込まれて定着したのはその一部のみであり、テーリングを伴う 2–3mm 長の薬物陽性バンドを形成することが観察された。また、これに匹敵する量の MOP が真皮上層領域における角質化した頭髪中に取り込まれ、別の 2mm 長のバンドを形成することが判明した。これら 2 つのバンドは弱い陽性部位でつながって 6–7mm 長の陽性部位を形成し、これが頭髪の成長に従って毛先側に移動するのを、我々が知る限り世界で初めて、特異的かつ明瞭に可視化出来た。

(6) まとめ

本研究によって、単毛髪中の薬物のイメージング質量分析法を、新しい視点に立った効果的な毛髪中薬物の分析法として確立した。本法は、毛髪中に取り込まれた薬物の分布を可視化することによって、その使用歴等を探る高度な分析法として、今後の活用が期待される。

さらに本研究では、これを用いて毛髪への薬物の取込み状況の可視化を試みた。その結果、初めてこれに成功し、図 2 に示す様に、摂取した薬物の頭髪への取り込みは、主に 2 つの領域で起こることが直接的かつ視覚的に証明された。

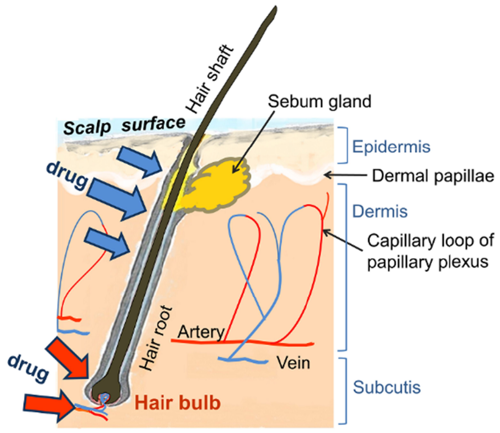

図 2　毛根部の構造と推定されるメトキシフェナミンの毛髪への取込み領域（矢印で示す 2 領域）

これによって、頭髪への薬物使用歴の記録には重なりが生じ、その時間的な分解能を劣化させていることも判明した。

本研究によって判明した上記の結果は、今後あらゆる毛髪中薬物分析の結果の解釈において是非考慮されるべき重要な知見と考えられる。今後は、多岐にわたる薬物の性質（水溶性/脂溶性、用量等）の相違が毛髪への取込み機序にどの様に影響するか等について、より詳細な検討を進める予定である。

5．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

① Tooru Kamata, Noriaki Shima, Keiko Sasaki, Shuntaro Matsuta, Shiori Takei, Munehiro Katagi, Akihiro Miki, Kei Zaitsu, Toyofumi Nakanishi, Takako Sato, Koichi Suzuki, Hitoshi Tsuchihashi、“Time-Course Mass Spectrometry Imaging for Depicting Drug Incorpora-

tion into Hair", Analytical Chemistry, 査読有、2015, DOI:10.1021/acs.analchem .5b00971 .

② 三木 昭宏、中西 豊文、土橋 均、「毛髪の質量分析イメージングで探る薬物使用歴」、臨床化学、査読有、42 巻 No.4、2013、311–316.

〔学会発表〕（計 8 件）

① Noriaki Shima, "Time-Course Mass Spectrometry Imaging for Depicting Drug Incorporation into Hair", TIAFT (The International Association of Forensic Toxicologists) 2014 Meeting, 平成 26 年 11 月 11 日, Buenos Airis（アルゼンチン）

② 三木 昭宏、質量分析イメージングによる毛髪中薬物の分析、日本法中毒学会第 33 年会（シンポジウム講演）、平成 26 年 7 月 4 日、名古屋大学（名古屋市）

③ Akihiro Miki, "Hair Analysis for Drugs by Mass Spectrometry Imaging: A New Perspective to Investigate Drug Use History", TIAFT (The International Association of Forensic Toxicologists) 2013 Meeting, 平成 25 年 9 月 5 日, Funchal（ポルトガル）

④ 鎌田 徹、「イメージング質量分析による毛髪中メトキシフェナミンの画像化」、日本法中毒学会第 32 年会、平成 25 年 7 月 5 日、さわやか千葉県民プラザ（千葉県柏市）

⑤ Tooru Kamata, "Imaging Hair Analyses for Drugs: A New Perspective to Investigate Drug Use History", 第 19 回国際質量分析会議（MSIC）、平成 24 年 9 月 17 日 京都国際会館（京都市）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等：無し

６．研究組織

(1)研究代表者

土橋 均（TSUCHIHASHI Hitoshi）
大阪医科大学 医学部 准教授
研究者番号：40596029

(2)連携研究者

中西 豊文（NAKANISHI Toyofumi）
大阪医科大学 医学部 准教授
研究者番号：10247843

佐藤 貴子（SATO Takako）
大阪医科大学 医学部 講師
研究者番号：10530420

(3)研究協力者

三木 昭宏（MIKI Akihiro）
大阪医科大学 法医学 特別協力研究員

鎌田 徹（KAMATA Tooru）
大阪医科大学 法医学 特別協力研究員

志摩 典明（SHIMA Noriaki）
大阪医科大学 法医学 特別協力研究員

財津 桂（ZAITSU Kei）
大阪医科大学 法医学 特別協力研究員

片木 宗弘（KATAGI Munehiro）
大阪府警察本部 科学捜査研究所 主席研究員