

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ～ 2010

課題番号：19590672

研究課題名 (和文) 髪は知っている－規制薬物摂取の履歴－

研究課題名 (英文) Hair has known the history of drugs abused

研究代表者

西田 まなみ (NISHIDA MANAMI)

広島大学・技術センター・技術専門員

研究者番号：60379914

研究成果の概要 (和文)：

規制薬物の摂取を証明するために、体内に比較的長い時間滞留する毛髪を検査試料とした。毛髪中の覚せい剤を誘導体化したのち、固相に吸着・濃縮する方法により検出感度を高め、覚せい剤 (メタンフェタミンとアンフェタミン) の検出下限はそれぞれ、20pg および 50pg となった。覚せい剤摂取者の毛髪 1cm、1 本から充分検出可能となり、頭髪や陰毛等の蓄積状態を検査することにより、概ね摂取時期を反映できた。微量の試料を検査することから、被験者の身体的苦痛を軽減し、複数回検査することにより信頼度を高めることが可能となった。

研究成果の概要 (英文)：

The drug abuse is a serious problem in the world. Analysis of the drugs in human hair is very important to reveal the history of the drug abuse. So far, there has no report of a high sensitive determination method for determination of methamphetamine and amphetamine from a limited material such as a small piece of human hair. We developed a high sensitive and accurate method by using headspace solid phase microextraction. As a result, it was possible to determine the drugs from one piece of hair (1cm). The detection limit of this method was 20 and 50 pg for methamphetamine and amphetamine, respectively. The proposed method will be helpful to judge the period of the drug abuse without a pain for a patient.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：薬物分析

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：分析化学、乱用薬物、覚せい剤、毛髪、固相マイクロ抽出

1. 研究開始当初の背景

薬物の乱用防止は法治国家としての安寧秩序を維持するためには不可欠であり、国民の安全・安心を維持するうえで重要課題の一つである。体内に取り込まれた化学物質を毛髪から検出し、曝露状況（履歴）から、健康維持、惹いては社会秩序を維持することは、社会医学上大切である。

本研究は髪が知っていることを裁証学的に明らかにすることである。すなわち、早急な対策が望まれる薬物乱用に焦点を当て、1cmの毛髪（頭髪、陰毛、腋毛等）1本から覚せい剤と合成麻薬等を検出し、毛髪中に残された薬物の使用歴を明確にし、乱用薬物の不正使用抑止となる研究を行う。

2. 研究の目的

本研究では、社会医学上重要な課題である薬物乱用に焦点を当て、覚せい剤と合成麻薬の不正使用の抑止力となる基礎研究を行う。体内に取り込まれた薬物は、血流によって体内を循環して尿や汗から排泄されることが知られている。また、薬物は毛髪に取り込まれることが知られており、1ヶ月に1cm程度伸長するため、どの部分に多く取り込まれているかが判明すれば、薬物の摂取時期が特定でき、使用履歴が明らかとなる。

誘導体化-固相マイクロ抽出（Solid Phase Microextraction: SPME）法を活用し、1cmの毛髪（頭髪、陰毛、腋毛等）1本から覚せい剤および合成麻薬等を高感度かつ正確に検出し、薬物の使用履歴を把握して犯罪関与の未然防止に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 誘導体化法の検討

覚せい剤を始めとするアミン類のGC分析では、注入口やカラム内での吸着により検出感度や再現性の低下が懸念されるため、誘導体化法が一般的である。誘導体化法はシリル化、アシル化、アルキル化等の様々な方法が知られており、適宜判断する必要がある。本検討では、BSTFA（N, O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide）によるシリル化、無水トリフルオロ酢酸および塩化ギ酸アルキルによるアシル化、臭化ペンタフルオロベンジルによるアルキル化を検討した。

SPMEでの誘導体化-抽出法は、①試料中に誘導体化試薬を添加し、試料中で誘導体化された対象薬物をSPMEで抽出するin-matrix SPME法と②SPMEで対象薬物を抽出し、SPME上で誘導体化するon-fiber SPME法を検討した。

(2) 毛髪からの抽出条件の検討

覚せい剤を始めとするアミン類は、毛髪中ではメラニン色素と結合するとされている。そのため、水や有機溶剤に浸すだけでは効率的な抽出は困難である。そこで、アルカリ性および酸性溶液による抽出（浸出）と浸出時間を検討した。浸出溶液量はこれまでの方法を参考に1.0mLとした。

(3) 抽出ファイバーの検討

抽出ファイバーは、ポリジメチルシロキサン（100 μ m, PDMS）、ポリアクリレート（85 μ m, PA）、ポリジメチルシロキサン/ジビニルベンゼン（65 μ m, PDMS/DVB）、カーボワックス/ジビニルベンゼン（65 μ m, Carbowax/DVB）の3種類を用いた。いずれもスペルコ（シグマ アルドリッチ ジャパン（株））より購入した。

(4) 分析法の確立

SPME法、特に気相からの抽出の際には加熱温度、ファイバーの曝露時間が抽出効率を左右する重要なパラメータとなる。本検討では、各薬物の抽出に適した温度と時間を検討し、加熱温度は60~100 $^{\circ}$ C、曝露時間は5~60分とした。GC注入口内での脱着時間は過去の報告を参考に3分間とした。

全自動分析の検討には、CombiPAL（CTC製）を用い、加熱温度や抽出時間の設定は付属のPCより制御した。GC/MS分析には、6890GC/5973MSD（アジレント・テクノロジー製）を用いた。分析カラムはHP-5MS（30m, 0.25mm, 0.25 μ m）を用い、50 $^{\circ}$ Cから280 $^{\circ}$ Cまでの昇温条件とし、キャリアーガスはヘリウムを用い、流速1.0mL/分の定流量で流した。MSの検出はEI法で行い、m/z 50~450までのデータを取り込んだ。

(5) 実際例への応用

覚せい剤摂取の疑われる者（および本検討への同意の取れた者）の毛髪を1cm単位で切断し、本課題にて確立した方法にて1本ずつ分析した。

(6) 至適毛髪の検討

覚せい剤を始めとするアミン類は、毛髪中ではメラニン色素と結合するとされているため、着色および脱色した毛髪、白髪等について、本法を適用して対象薬物の分布を検証した。

(7) 薬物使用履歴の判断

本法で分析して得られた毛髪中薬物の分布と薬物摂取の履歴とを照合し、薬物使用履歴の判断材料となりうるかを検証するとともにその整合性を評価した。

4. 研究成果

(1) 誘導体化法の検討

覚せい剤を始めとするアミン類の BSTFA によるシリル化、無水トリフルオロ酢酸および塩化ギ酸アルキルによるアシル化、臭化ペンタフルオロベンジルによるアルキル化を検討し、何れの誘導体化剤においても誘導体化された薬物のピークが検出できた。

①in-matrix での誘導体化では、BSTFA および無水トリフルオロ酢酸は不向きであった。常に水分が存在するため、少量の水分と反応して活性が低下したと考えられる。また、塩化ギ酸アルキルは、アルカリ条件下では効率よく誘導体化されたが、酸性条件下では誘導体化されなかった。反応中に発生する酸を除去するため塩基の存在が不可欠であるが、アルカリ条件下での反応は早く、自動化に向く誘導体化法であると考えられる。臭化ペンタフルオロベンジルによるアルキル化では、反応速度が遅く、他の誘導体化剤と比べて反応に時間を要した。

②on-fiber での誘導体化では、誘導体化剤を浸漬させたファイバーを試料液中に曝露させて誘導体化させる方法と薬物を吸着させたファイバーを誘導体化剤の入ったバイアル瓶中（気相）に曝露させる方法を検討した。この on-fiber 誘導体化法ではファイバーの腐食や摩耗が激しく、ルーチンワークには不向きであると判断した。また、ファイバーの細孔に誘導体化剤および誘導体が進入してキャリーオーバーの原因となり、再現性に影響を与えたため、on-fiber 誘導体化法は不採用とした。

(2) 毛髪からの抽出条件の検討

浸出液に低濃度（～0.2M）のアルカリ溶液を使用した場合、毛髪は断片化するものの抽出効率は低く抑えられた。0.5～2M のアルカリ溶液では、毛髪は溶解して均一の溶液となった。薬物の抽出効率は 100%に達し、抽出条件として十分な結果であった。高濃度（～10M）のアルカリ溶液では、毛髪は溶解後に再凝集して粒子状を呈した。回収率に影響は認められなかったが、SPME ファイバーへの腐食の懸念もあったため、アルカリ溶液は 1M が適していると判断した。

浸出液に酸を使用した場合、毛髪の形状を維持したままであったが、薬物は溶出していた。しかし、その後は気相からの抽出を目的として反応溶液をアルカリ性とする必要があるため、操作工程を増やすことや自動化に支障が出ることになり、これ以上の検討は行わなかった。

(3) 抽出ファイバーの検討

アンフェタミンの回収率（絶対回収量）は、

PDMS/DVB>PA>Carbowax/DVB の順で上昇した。しかし、バックグラウンドも上昇したため、S/N（シグナル/ノイズ比）を考慮すると高感度化は困難であった。

(4) 分析法の確立

前項までの検討の結果と自動分析を考慮し、毛髪からの覚せい剤の抽出は、塩化ギ酸プロピルによる in-matrix 誘導体化-SPME 法で行うこととした。1cm に切断した毛髪と 1M 水酸化ナトリウム溶液（アルカリ溶液）をバイアル瓶に入れて加温し、その後、塩化ギ酸プロピル（誘導体化剤）を添加して加温する。加熱を継続しながら SPME ファイバーを気相中に曝露して覚せい剤の誘導体を吸着させる。吸着終了後、SPME ファイバーを GC の注入口に差し込み、覚せい剤の誘導体を脱離させて分析を行う。しかし、現有の機器では、誘導体化剤の添加が自動で行えないため、アルカリ溶液を用いた毛髪からの覚せい剤の溶出と誘導体化が同時に行えないか、最初からアルカリ溶液と誘導体化剤をバイアル瓶に入れて in-matrix 誘導体化-SPME 法が実施できないかを検討した。その結果、大差のない結果が得られたので、最初からアルカリ溶液と誘導体化剤を加える方法を採用することとした。

次に、加熱温度と抽出時間の最適化を目的に温度（60～100℃）と曝露時間（5～60分）を組み合わせ、至適条件の検討を行った。加熱温度の上昇とともに覚せい剤の吸着量は増加したが、70℃付近で最大となり、それ以上の温度では吸着量が減少した。また、抽出時間が長くなるに従って吸着量も増加したが、20分付近で最大となり、それよりも長時間抽出しても吸着量は増加せず、僅かながらではあるが減少傾向となった。SPME での抽出機構は、吸着と脱着の平衡を利用したものであるが、加熱温度の上昇と抽出時間の長時間化でファイバーが加温され、平衡状態が脱着側へと移行することに寄ると考えられる。

本検討の結果、70℃で加熱、20分間抽出することにより、覚せい剤の誘導体を気相中から PDMS（100μm）ファイバーで効率よく抽出することができた。本法により、0.05ng/hair まで検出できるようになり、既報と比べても遜色ない方法が確立できた。内部標準物質として重水素置換体の methamphetamine を用いた時のばらつきは 1.04-26.4%となり、アンフェタミンの低濃度域ではばらつきが大きくなった。

さらに、検査試料中のメタンフェタミンとアンフェタミンを効率よく気化させ、ファイバー上に効率良く捕集するために、塩析効果（塩の種類、濃度、温度等）を検討した。これまでの成績で、メタンフェタミンに比べてアンフェタミンの抽出効率が芳しくなかったため、特にアンフェタミンについて検討し

たが、有意な検出感度の上昇は得られなかった。これまで検討した水酸化ナトリウム濃度、70℃による加温条件が良好であることが認められた。

分析に使用する毛髪を溶解に用いるアルカリ濃度および温度、ファイバーの種類、固相マイクロ抽出時の加温等、最適条件における分析は、アンフェタミンの低濃度域を除いてばらつきは小さく、毛髪1cmあたりのアンフェタミンとメタンフェタミンの検出下限は50pgと20pgであった。

合成麻薬MDMA、MDAや麻酔薬ケタミンについても塩化ギ酸プロピルを用いた誘導體化—固相マイクロ抽出法で検討を行った。覚せい剤類は70℃で加温することにより、気相中からSPMEファイバーに抽出可能であったが、MDMA、MDA、ケタミンは70℃では不十分であり、90℃程度まで昇温させる必要があった。ケタミンは塩化ギ酸プロピルによる誘導體化を行わなくとも検出できたが、ケタミンを特定するフラグメンテーションは、誘導體化した場合の方が明瞭であった。本法により、0.05ng/hairまで検出できるようになり、既報と比べても遜色ない方法が確立できた。

(5) 実際例への応用

覚せい剤摂取者の毛髪を1cm単位で切断し、本課題にて確立した方法にて分析を行ったところ、毛髪中の覚せい剤分布は、概ね摂取時期を反映した結果となった。

(6) 至適毛髪の検討

脱色・染色した毛髪中の覚せい剤は減少傾向にあることが報告され、本検討においても同様の結果が得られた。覚せい剤摂取者においても自然脱落した毛髪中に覚せい剤が検出困難な場合があった。それ故に、同一摂取者から採取した毛髪を複数本検査することや本処置が及ばない陰毛を同時に分析することで、より精度の高い結果が得られると考える。また、検査結果のみを過信するのではなく、採取した試料（毛髪等）の状態に異常がないか等、注意深く観察することも必要と考える。

(7) 覚せい剤等の薬物使用履歴の判断

毛髪の生え替わる周期等を考慮すると、単に採取した毛髪中の覚せい剤分析結果のみから摂取時期を確定することは困難と考えられる。また、覚せい剤摂取直後の毛髪からの検出は困難である等、尿や血液等他の試料中の覚せい剤濃度等を総合的に判断する必要があると考えられる。

覚せい剤等規制薬物の摂取者が矯正施設で一応の治療成果を上げ、保護司による経過観察となるが、薬物を断ち切ることは非常に困難であり、再発の可能性が高いと報告されて

いる。本研究の目的には開発した技術を摂取者の更正に寄与することも含まれている。しかし、毛髪を採取することに関係者から難色を示された。薬物の摂取が検査で明らかとなれば、早期に指導し、重症化を防ぐ効果があると考えていたが、関係者は被験者の人権を保護する立場から検査実施には消極的であった。

以上、本研究期間に検討した成果により、簡便かつ精度良く毛髪中覚せい剤およびMDMA等の乱用薬物の分析が可能となった。これまで一般的に行われてきた「毛髪50～100本の抜去」という試料採取による検査法の改善に寄与すると期待される。

本法の活用により、体内に取り込まれた化学物質を毛髪から検出し、曝露状況（履歴）から、健康維持、惹いては法治国家としての安寧秩序を維持することが可能となり、国民の安全・安心を維持するうえでの重要課題解決に繋がると考える。

また、裁判員制度が継続されていることから、薬物乱用を科学的、裁証学的に明確に証明することが重要で、本研究成果は早急な対策が望まれる薬物乱用に焦点を当て、1cmの毛髪（頭髪、陰毛、腋毛等）1本から覚せい剤および合成麻薬等を検出し、毛髪中に残された薬物の使用履歴を明確にし、乱用薬物の不正使用抑止に資することが期待される。

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0件）

〔学会発表〕（計1件）

1. 西田まなみ, 法医鑑定および保護観察対象者における薬物使用の検証, 第55回質量分析総合討論会, 2007.5.15, 広島

〔図書〕（計3件）

1. A. Nakamoto, M. Nishida, T. Saito, A. Namera, Nova Science Publishers Inc., Chromatography: Types, Techniques and Methods, 2010; 457-68.

2. A. Namera, A. Nakamoto, T. Saito and M. Nishida, Nova Science Publishers Inc., Chromatography: Types, Techniques and Methods, 2010; 469-82.

3. M. Nishida, M. Yashiki, A. Namera, K. Kimura, Nova Scientific Publishers Inc., New Research on Methamphetamine Abuse, 2007; 123-41.

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 まなみ (NISHIDA MANAMI)
広島大学・技術センター・技術専門員
研究者番号：60379914

(2) 研究分担者

奈女良 昭 (NAMERA AKIRA)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：30284186
(H19→H20)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：