

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K08894

研究課題名(和文) 単毛髪微小断片の超高感度質量分析による毛髪内薬物挙動の解明及び薬物摂取日の特定

研究課題名(英文) Determination of drug intake day by micro-segmental hair analysis

研究代表者

桑山 健次 (Kuwayama, Kenji)

科学警察研究所・法科学第三部・主任研究官

研究者番号：40356233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、単毛髪を0.4 mm(毛髪の1日の平均的な成長に相当する長さ)の微小断片に輪切りにし、超高感度な質量分析計を用いて各断片から薬物を検出する方法を開発した(マイクロ分画分析と命名)。さらに、毛髪採取の数週間前に一定間隔で指標物質(市販薬)を被験者に摂取させ、薬物(摂取日不明)及び指標物質(摂取日既知)が検出される毛髪断片間の距離から、毛髪の成長速度を加味して薬物の摂取日を推定する方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の毛髪中薬物の分画分析では、十分な検出感度を得るために数十本の毛髪を束ねた上で数cm間隔に分画するので、数か月単位での薬物摂取時期の推定しかできなかった。単毛髪のマイクロ分画分析の開発により、被疑者の供述、被害者の記憶等によらず科学的に日数単位での薬歴を把握でき、毛髪中薬物鑑定の証明力を向上させることができる。

研究成果の概要(英文)：In this study, a method to detect drugs in 0.4-mm hair segments, corresponding to the hair growth length of a day, using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (micro-segmental analysis) was developed. Moreover, the day of drug intake was determined using micro-segmental hair analysis based on ingestion of internal temporal markers before hair collection.

研究分野：薬物分析

キーワード：毛髪 薬物 質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

摂取した薬物は血液中を循環し、その一部は毛根付近の毛細血管を介して毛母細胞に取り込まれ、毛髪の成長とともに薬物の存在位置も毛髪の成長方向に移動する。その現象を利用し、毛髪の分画分析による薬物摂取時期の推定が行われている(図1)。しかしながら、分画分析の結果が、実際の薬物摂取時期と完全には一致しないこともある。その主な原因として、以下のことが考えられる。

- 【原因1】数十本の毛髪をまとめて一つの分析試料とするが、毛髪ごとに成長速度が異なる。
- 【原因2】頭皮に近い位置で毛髪を切断し、その切断位置を分画の基準線とするが、毛根から切断位置までの長さが毛髪ごとに異なる。
- 【原因3】毛髪への薬物の主な取り込み経路は、血液由来、皮脂・汗由来及び外部からの付着であるが、それらの取り込み経路の違いを識別することは難しい。
- 【原因4】一旦毛髪に取り込まれた薬物が毛髪内で拡散したり、毛髪から消失したりする可能性がある。

原因1及び2については、単毛髪を用いて分画分析を行えば解決できるが、毛髪中の薬物濃度は血液や尿中の薬物濃度と比べて著しく低く(数 pg/mg)、数十本の毛髪を束ねて数 cm 間隔に分画したもの(数 mg)を一つの分析試料とし、分析装置に注入する薬物の絶対量を稼がなければ、低濃度の薬物検出は困難である。

2. 研究の目的

最近の質量分析計は検出感度が目覚ましく向上し、従来不可能であった単毛髪、更にはその0.5 mm 以下の断片(0.005 mg 以下)からの薬物検出も現実味を帯びてきたことから、本研究では、単毛髪を0.5 mm 以下(1日の成長速度に相当する長さ程度)の微小断片に輪切りにし、超高感度な質量分析計を用いて各断片から薬物を検出する方法を開発する。

さらに、毛髪採取の数週間前に一定間隔で指標物質を摂取させ、薬物(摂取日不明)及び指標物質(摂取日既知)が検出される毛髪断片間の距離から、毛髪の成長速度を加味して薬物の摂取日を推定する方法を開発する。

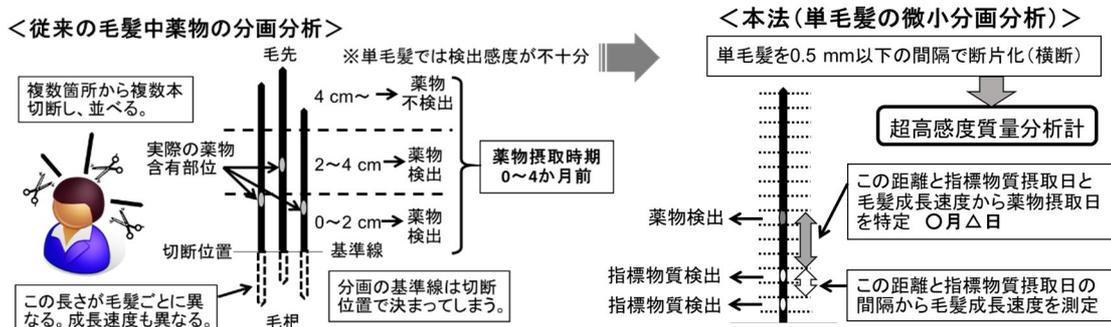


図1 毛髪分画分析の高度化

3. 研究の方法

(1) 単毛髪の微小断片中の薬物濃度測定

1本の毛髪をマイクロメーター付きスライサーのステージ上に両面粘着テープで直線状に貼付した(図2)。毛根側末端から0.4 mm 間隔(毛髪の1日の平均的な成長速度に相当する長さ)で切断し、1断片ずつ先細綿棒で採取し、別個のチューブに回収した。各チューブに抽出液を添加し、10分間超音波処理を行った後、24時間静置して断片中の薬物を抽出した。抽出液の一部を採取し、LC-MS/MSにより各断片中の薬物濃度を測定した。この一連の方法をマイクロ分画分析と命名した。



図2 毛髪断片作製装置

(2) 薬物摂取日推定法

被験者に数種類の市販薬(通常の1回量)を順に単回摂取させ、数週間休薬した。薬物摂取と休薬を数回繰り返した後、毛髪を頭皮から引き抜いて採取した。単毛髪のマイクロ分画分析により各断片中の薬物濃度を測定し、各薬物について、薬物濃度 - 毛髪断片曲線を描いた(図3)。この曲線上のピーク位置及び指標物質(2回目以降に摂取した薬物)の摂取日をもとに、最初に摂取した薬物の摂取日を推定した。

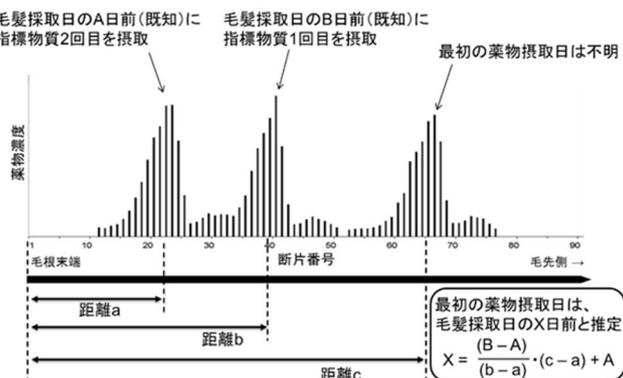


図3 マイクロ分画分析を用いた薬物摂取日推定法

4. 研究成果

(1) 単毛髪のマイクロ分画分析法の開発

まず、1本の毛髪を0.5 mm以下の長さで正確に等間隔に断片化する方法を検討した。マイクロメーター付きスライサーを用いることで、0.1 mm程度まで正確に毛髪を切断することができた。本研究では、切断する断片の長さを1日の平均的な成長速度に相当する長さである0.4 mmに設定した。次に、0.4 mm毛髪断片を1個ずつ確実にマイクロチューブに回収する方法を検討した。微小断片の視認性に優れ、断片紛失の可能性を軽減できる先細綿棒が適していた。0.4 mm毛髪断片からの薬物抽出法を4種類の方法(超音波、マイクロ波、粉碎、アルカリ溶解)で比較したところ、超音波処理後、抽出液に長時間浸す方法が、薬物抽出率及び複数試料の同時処理の点で最適であった。このような一連の方法により、0.4 mm間隔(1日の平均的な成長速度に相当する長さ)での毛髪内の薬物分布測定に世界で初めて成功した[1]。

(2) 薬物間での毛髪内薬物分布の違い

被験者に様々な市販薬を単回摂取させ、マイクロ分画分析による毛髪内薬物分布測定を行った。毛髪から顕著に検出された5つの薬物及び2つの代謝物について、その分布を比較したところ、5つの薬物をほぼ同時期に摂取したにもかかわらず、薬物の種類によって分布様式が異なっていた(図4)。

エピナスチン、フェキソフェナジン、ジヒドロコデイン、クロルフェニラミン及びその代謝物デスメチルクロルフェニラミンは、毛髪内に高濃度部位が2か所存在し、その位置関係から毛根側の主要なピークは血液由来、毛先側の小さいピークは皮脂・汗由来であると考えられた。一方、メチルエフェドリン及びその代謝物エフェドリンは、高濃度部位が1か所のみであり、他の化合物の毛先側のピークに近い位置に存在した。これらの結果から、薬物の種類により、毛髪への主な取込み経路が異なることが示唆された[2]。

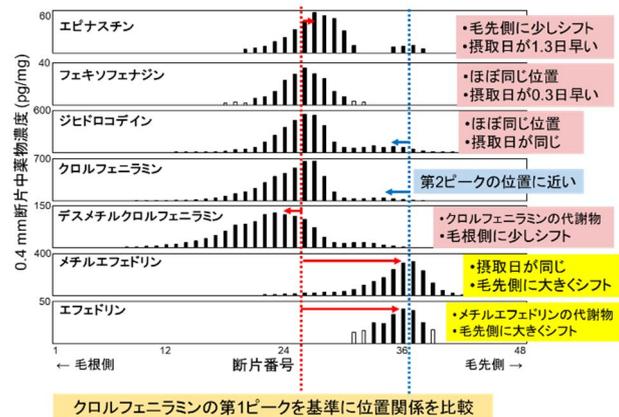


図4 薬物間での毛髪内薬物分布の違い

(3) 指標物質を用いたマイクロ分画分析による薬物摂取日の推定

毛髪の成長速度は1本1本異なること、毛根末端から採取時の切断位置までの正確な距離が不明であることなどから、1本の毛髪を細かく断片化しても、単毛髪内の薬物分布から薬物摂取日を精度よく推定することはできない。そこで、あらかじめ指標物質を複数回摂取させた後に毛髪を採取することにより、毛髪内に基準日を刻み込む方法を考案した。

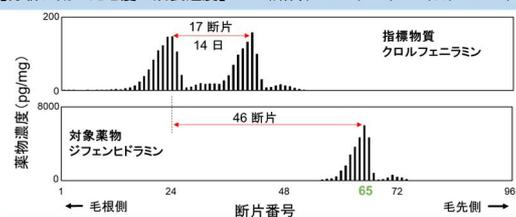
数週間おきに薬物を摂取した後、毛髪を採取し、マイクロ分画分析を行ったところ、図3のような分布が得られた。最初に摂取した薬物の摂取日が不明であると仮定し、2回目以降に摂取した薬物(摂取日既知)を指標物質として、各ピークの位置関係から最初に摂取した薬物の摂取日を推定する計算方法を検討した。指標物質のピーク間の距離と摂取間隔から分析に用いた毛髪の成長速度を算出し、かつ指標物質の摂取日を基準日にして、図3の計算式により薬物摂取日を推定することで、実際の摂取日との誤差を2日以内に抑えることができた[3]。

(4) 指標物質クロルフェニラミンを用いた睡眠薬ジフェンヒドラミンの摂取日推定

実際の睡眠薬悪用犯罪を想定し、市販の睡眠薬ジフェンヒドラミンの摂取日を推定した。ジフェンヒドラミンを単回摂取した人に、指標物質としてクロルフェニラミンを2週間間隔で2回摂取してもらった後、毛髪を採取した。図5に示す毛髪内薬物分布が得られ、対象薬物と指標物質が異なる場合であっても、高精度で摂取日を推定できることが実証された[4]。

本研究により開発されたマイクロ分画分析は、被疑者の供述、被害者の記憶等によらず科学的に日数単位での薬歴を把握でき、毛髪中薬物鑑定の証明力を向上させることができる。既に、実際の毛髪中薬物鑑定に応用されている。

【分析に用いた毛髪の成長速度】= 17(断片) × 0.4(mm) / 14(日) = 0.49(mm/日)



【毛髪採取日と薬物摂取日間の推定日数】

$$= \text{【薬物ピークと指標物質ピーク間の距離】} / \text{【毛髪の成長速度】} + \text{【基準日】}$$

$$= 46 \times 0.4 / 0.49 + 24 = 61.9$$

実際のジフェンヒドラミンの摂取日は、毛髪採取日の62日前

図5 マイクロ分画分析による薬物摂取日の推定

< 引用文献 >

- [1] K. Kuwayama, et al., Anal Chim Acta (2016) 948:40-47. [2] K. Kuwayama, et al., Drug Test Anal (2018) 10:750-760. [3] K. Kuwayama, et al., J Appl Lab Med (2018) 3:37-47. [4] K. Kuwayama, et al., Forensic Sci Int (2018) 288:23-28.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuwayama Kenji, Miyaguchi Hajime, Iwata Yuko T., Kanamori Tatsuyuki, Tsujikawa Kenji, Yamamuro Tadashi, Segawa Hiroki, Inoue Hiroyuki	4. 巻 37
2. 論文標題 Strong evidence of drug-facilitated crimes by hair analysis using LC-MS/MS after micro-segmentation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 480-487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11419-019-00472-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuwayama Kenji	4. 巻 139
2. 論文標題 Development of High-resolution Methods for the Analysis of Drug Distribution in Biological Tissue Samples and Their Applications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1063 ~ 1070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kuwayama Kenji, Nariai Maika, Miyaguchi Hajime, Iwata Yuko T., Kanamori Tatsuyuki, Tsujikawa Kenji, Yamamuro Tadashi, Segawa Hiroki, Abe Hiroko, Iwase Hirotaro, Inoue Hiroyuki	4. 巻 288
2. 論文標題 Micro-segmental hair analysis for proving drug-facilitated crimes: Evidence that a victim ingested a sleeping aid, diphenhydramine, on a specific day	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Forensic Science International	6. 最初と最後の頁 23 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.forsciint.2018.04.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuwayama Kenji, Nariai Maika, Miyaguchi Hajime, Iwata Yuko T., Kanamori Tatsuyuki, Tsujikawa Kenji, Yamamuro Tadashi, Segawa Hiroki, Abe Hiroko, Iwase Hirotaro, Inoue Hiroyuki	4. 巻 133
2. 論文標題 Estimation of day of death using micro-segmental hair analysis based on drug use history: a case of lidocaine use as a marker	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 117 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00414-018-1939-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuwayama Kenji, Nariai Maika, Miyaguchi Hajime, Iwata Yuko T., Kanamori Tatsuyuki, Tsujikawa Kenji, Yamamuro Tadashi, Segawa Hiroki, Abe Hiroko, Iwase Hirotaro, Inoue Hiroyuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Accurate Estimation of Drug Intake Day by Microsegmental Analysis of a Strand of Hair by Use of Internal Temporal Markers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Applied Laboratory Medicine	6. 最初と最後の頁 37 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1373/jalm.2017.025346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuwayama Kenji, Miyaguchi Hajime, Iwata Yuko T., Kanamori Tatsuyuki, Tsujikawa Kenji, Yamamuro Tadashi, Segawa Hiroki, Inoue Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Different localizations of drugs simultaneously administered in a strand of hair by micro-segmental analysis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Drug Testing and Analysis	6. 最初と最後の頁 750 ~ 760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dta.2259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyaguchi Hajime, Kuwayama Kenji	4. 巻 1519
2. 論文標題 Enantioselective determination of (R)-zopiclone and (S)-zopiclone (eszopiclone) in human hair by micropulverized extraction and chiral liquid chromatography/high resolution mass spectrometry	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 55 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2017.08.058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Kuwayama, Hajime Miyaguchi, Yuko T. Iwata, Tatsuyuki Kanamori, Kenji Tsujikawa, Tadashi Yamamuro, Hiroki Segawa, Hiroyuki Inoue	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Time-course measurements of drug concentrations in hair and toenails after single administrations of pharmaceutical products	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Drug Testing and Analysis	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dta.1991	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Kuwayama, Hajime Miyaguchi, Yuko T. Iwata, Tatsuyuki Kanamori, Kenji Tsujikawa, Tadashi Yamamuro, Hiroki Segawa, Hiroyuki Inoue	4. 巻 948
2. 論文標題 Three-step drug extraction from a single sub-millimeter segment of hair and nail to determine the exact day of drug intake	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 40-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2016.10.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 桑山健次, 宮口一, 岩田祐子, 金森達之, 辻川健治, 山室匡史, 瀬川尋貴, 井上博之
2. 発表標題 毛髪を用いた睡眠薬悪用犯罪の証明: 高分解能質量分析による薬物スクリーニングとマイクロ分画分析による薬物摂取日の特定
3. 学会等名 日本法中毒学会第38年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑山健次
2. 発表標題 法科学における毛髪中薬物分析の有用性
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑山健次, 宮口一, 金森達之, 辻川健治, 山室匡史, 瀬川尋貴, 岩田祐子
2. 発表標題 マイクロ分画分析を用いた毛髪及び爪内薬物分布に基づく薬物取込み経路の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑山健次, 成相舞花, 宮口一, 岩田祐子, 金森達之, 辻川健治, 山室匡史, 瀬川尋貴, 安部寛子, 岩瀬博太郎, 井上博之
2. 発表標題 単毛髪のマイクロ分画分析を利用した死亡日推定
3. 学会等名 日本法中毒学会第37年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桑山健次
2. 発表標題 微小分画分析による体組織内の薬物の高解像度分布測定法の開発と応用
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桑山健次, 宮口一, 岩田祐子, 金森達之, 辻川健治, 山室匡史, 瀬川尋貴, 井上博之
2. 発表標題 睡眠薬悪用犯罪の証明力強化 - 毛髪のマイクロ分画分析による薬物摂取日の特定 -
3. 学会等名 日本法科学技術学会第24回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桑山健次, 宮口一, 岩田祐子, 金森達之, 辻川健治, 山室匡史, 瀬川尋貴, 井上博之
2. 発表標題 毛髪及び爪を用いた薬物摂取日特定法の開発 - 毛髪及び爪の成長速度等のデータ収集 -
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑山健次, 成相舞花, 宮口一, 岩田祐子, 金森達之, 辻川健治, 山室匡史, 瀬川尋貴, 安部寛子, 岩瀬博太郎, 井上博之
2. 発表標題 マイクロ分画分析による同時摂取した薬物間の毛髪内分布の違い
3. 学会等名 日本法中毒学会第36年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮口一, 桑山健次
2. 発表標題 ワンチューブマイクロ粉碎抽出法とキラル液体クロマトグラフィー/高分解能質量分析による毛髪中ゾピクロンの定量分析
3. 学会等名 日本法中毒学会第36年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 桑山健次, 成相舞花, 宮口一, 岩田祐子, 金森達之, 辻川健治, 山室匡史, 瀬川尋貴, 安部寛子, 岩瀬博太郎, 井上博之
2. 発表標題 単毛髪のマイクロ分画分析による薬物摂取日の高精度推定法の開発
3. 学会等名 日本法科学技術学会第23回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 桑山健次, 成相舞花, 宮口一, 岩田祐子, 金森達之, 辻川健治, 山室匡史, 瀬川尋貴, 安部寛子, 岩瀬博太郎, 井上博之
2. 発表標題 指標物質を用いた単毛髪のマイクロ分画分析による薬物摂取日推定法の実用化に向けた評価
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Kuwayama, Hajime Miyaguchi, Yuko T. Iwata, Tatsuyuki Kanamori, Kenji Tsujikawa, Tadashi Yamamuro, Hiroki Segawa, Hiroyuki Inoue
2. 発表標題 Time-course measurements of drug concentrations in hair and nails after single administrations of pharmaceutical products by LC/MS/MS
3. 学会等名 Asia Pacific Mass Spectrometry 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 桑山健次、宮口一、岩田祐子、金森達之、辻川健治、山室匡史、瀬川尋貴、井上博之
2. 発表標題 微小分画分析による毛髪及び爪内の薬物分布測定
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮口 一
2. 発表標題 毛髪中の薬物分析
3. 学会等名 第77回分析化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hajime Miyaguchi, Kenji Kuwayama
2. 発表標題 Comparison of extraction methods for highly accumulated zolpidem in Japanese black hair
3. 学会等名 TIAFT meeting 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 桑山 健次、山室 匡史、辻川 健治、宮口 一、金森 達之、岩田 祐子、井上 博之
2. 発表標題 尿や血液の代替資料からの薬物検査 唾液、皮膚分泌物、毛髪、爪
3. 学会等名 日本法中毒学会第34年会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 宮口 一、桑山 健次
2. 発表標題 毛髪中ソルピデム分析における2つの落とし穴：蓄積挙動の人種差と前処理法の抽出能力について
3. 学会等名 日本法中毒学会第34年会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 桑山 健次、瀬川 尋貴、山室 匡史、辻川 健治、金森 達之、岩田 祐子、井上 博之
2. 発表標題 単回摂取された薬物の毛髪及び爪中濃度の経時変化
3. 学会等名 日本薬学会第136年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	宮口 一 (Miyaguchi Hajime) (10370884)	科学警察研究所・法科学第三部・室長 (82505)	