

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23615011

研究課題名(和文) 科学鑑定に資する毛髪中薬毒物の迅速・高感度分析法の開発

研究課題名(英文) Development of rapid and sensitive methods for the forensic analysis of xenobiotic substances in hair

研究代表者

宮口 一 (Miyaguchi, Hajime)

科学警察研究所・附属鑑定所・主任研究官

研究者番号：10370884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：殺人や性犯罪などに悪用される催眠鎮静薬の摂取を毛髪から証明するための実用的な分析法の開発を行った。毛髪分析で正しい定量値を得るためには抽出効率が極めて重要であるため、実際の薬物摂取者の毛髪を用いて抽出効率の最適化を行った。最終的に、13種類の代表的な催眠鎮静薬についての毛髪分析法を確立した。これまでに報告されている分析法と比較した結果、本開発法は抽出時間が最も短い(10分)うえで、「必要な毛髪量×定量下限」が最も小さく(5 pg)、既存の分析法よりも優れた方法であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We established a new sample preparation method for the analysis of 13 sedative-hypnotics. Following micropulverized extraction with 3.0 M ammonium phosphate, a QExactive hybrid mass spectrometer was used to identify the analytes. The sample size requirement was reduced to 5 mg. The lower limits of quantification (LLOQ) were 1 pg/mg for brotizolam, diazepam, N-desmethyldiazepam, estazolam, flunitrazepam, nitrazepam, triazolam, ramelteon and zolpidem, and 4 pg/mg for alprazolam, N-desmethyfludiazepam, etizolam and zopiclone. Accuracy and precision of the repeated analyses for all the analytes met FDA guideline at three concentrations. The developed method was applied to hair samples from four patients with sleep disorders. Compared with earlier methods, the present method requires a smaller amount of sample and is complete within a shorter analytical time. These method improvements will be helpful for detecting administration of sedative-hypnotics from hair samples of victims of DFSA.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：安全環境計測法

キーワード：科学捜査 毛髪中薬物分析 催眠鎮静薬 マイクロ粉碎抽出法

1. 研究開始当初の背景

毛髪中薬物分析は、麻薬・覚醒剤など乱用薬物の摂取履歴の推定に広く用いられている。その一方で、殺人や性犯罪などに用いられる催眠鎮静薬の摂取証明については、投与量や毛髪への蓄積量が乱用薬物よりはるかに少ないために、かつては分析装置の感度の点において困難であった。特に性犯罪については、血液や尿から消失した後に被害を訴えるケースがあることから、毛髪分析は実務上の大きな課題であった。近年、液体クロマトグラフィー/質量分析の一層の高感度化が進み、2005年にはベンゾジアゼピン系催眠薬の投与を毛髪から証明するための実用的な分析法が報告された。高感度装置の普及が進んだ2010年ごろからは、毛髪中催眠鎮静薬の分析に関する報告が増加し、現在までに多くの前処理法が提案されている。

毛髪分析の場合、抽出効率が定量結果に直接影響することから、高い抽出効率を担保することは極めて重要である。それにもかかわらず、前処理における抽出効率を実試料で精査した論文は見当たらず、同一の薬物で比較しても、前処理法によって報告される毛髪中濃度が大きく異なるため、前処理法が確立しているとは言いがたい状況であった。

研究代表者である宮口らは、毛髪中薬物鑑定の高スループット化を図るため、毛髪分析のための新たな前処理法であるマイクロ粉砕抽出法 (Micropulverized Extraction) の開発を行ってきた。マイクロ粉砕抽出法は、水系抽出溶媒の存在下で毛髪の微細化と抽出を同時に行い、従来一晩を要していた固-液抽出を数分間で完了させる抽出方法である。我々はこれまで覚醒剤など乱用薬物分析への応用について報告しており、他の薬物への応用例も国内外のいくつかのグループから報告されていた。ところが、覚醒剤で用いているプロトコルをベンゾジアゼピン系薬物に適用しても、高い抽出効率は得られなかった。

2. 研究の目的

本研究では、我々のオリジナル技術であるマイクロ粉砕抽出法の適用範囲を乱用薬物以外の薬物にも広げ、毛髪中薬物分析の迅速化と簡便化を達成し、毛髪中薬物分析の標準的な方法として確立させることを目指した。特に、犯罪鑑識の観点から特に重要な催眠鎮静薬を主なターゲットとし、毛髪中薬物の定量分析において極めて重要なファクターである抽出効率を可能な限り向上させることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 疎水性や塩基性が高い薬物に対応した毛髪中薬物抽出法の開発

アミトリプチリン (AMIT)、プロマゼパム、プロチゾラム、フルニトラゼパム (FLUN)、ロフラゼパムエチル、ミアンセリン (MIAN)

およびゾルピデム (ZOL) を長期投与されている患者1名から頭髪の提供を受け、抽出効率最適化のための試料とした。それら化合物の原体及び代謝物の中から、毛髪に蓄積が確認され、さらに内部標準物質 (IS) として用いるための重水素化体が入手可能な7化合物 (AMIT、ノルトリプチリン (NORT)、FLUN、7-アミノフルニトラゼパム (AF)、MIAN、デスアルキルフルラゼパム (NF)、ZOL) をアナライトとした。分析は液体クロマトグラフ-タンデム四重極型質量分析計 (LC/MS/MS、サーモフィッシャー製 TSQ Quantum Ultra、ESI+, SRM モード) で行った。

前処理法としては、まず 0.1 M ギ酸 90% アセトニトリル溶液によるマイクロ粉砕抽出 (10分)、3.0 M リン酸アンモニウム溶液 (pH 8.4) による固-液抽出 (19時間)、メタノールによる固-液抽出 (19時間) の3つの方法について、相対抽出効率を比較した。次に、とを組み合わせさせた方法 (: 図1参照) を実施した。

(2) メンブレンフィルターへの薬物吸着ロスの評価

試料抽出物から微粒子を除去するために利用されているメンブレンフィルターは、多孔性で表面積が大きいためにアナライトの吸着が起こりやすい。そこで、催眠薬関連化合物14種類の溶液 (各 50 ng/mL) を、種々のメンブレンフィルターを内蔵した遠心ろ過デバイスでろ過し、薬物吸着ロスについて評価した。

(3) 毛髪中ゾルピデムの分析

下図のプロトコルで前処理を実施し、LC/MS/MS で ZOL の定量分析を行った。

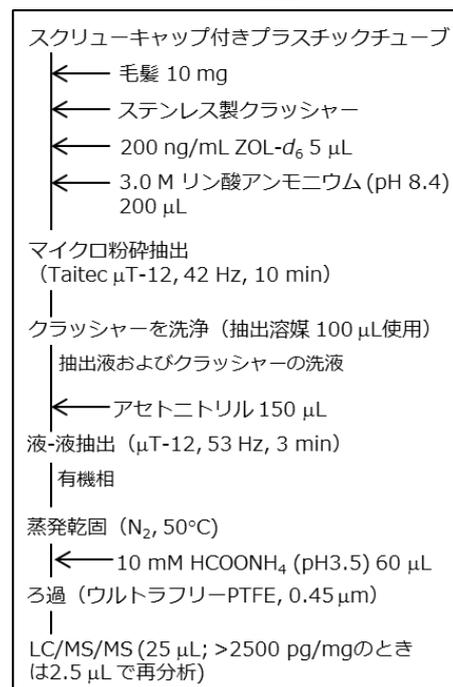


図1 前処理プロトコル (ゾルピデムの定量分析)

(4) 液体クロマトグラフィー / 四重極 - オビトラップ型質量分析計を用いた毛髪中催眠鎮静薬の一斉分析

前項の分析法について、ターゲットを 13 種類の代表的な睡眠導入剤に拡大すると共に、高分解能質量分析が可能な四重極 - オビトラップハイブリッド型質量分析計 (QExactive) を用いて、選択性の向上と高感度化を試みた (下図)。

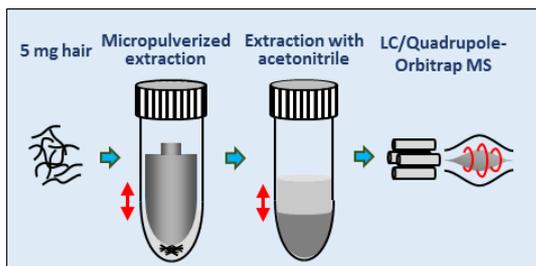


図 2 完成した分析法の概念図

4. 研究成果

(1) 抽出方法の最適化について

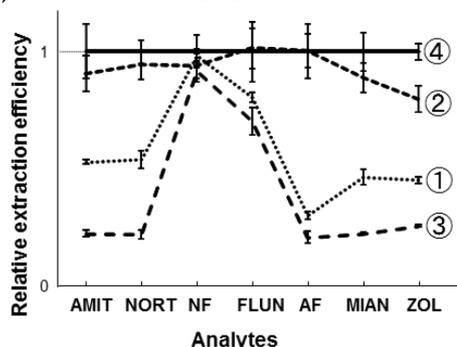


図 3 各方法の相対抽出効率の比較

各方法の相対抽出効率を図 3 に示す。は迅速・簡便であるものの、抽出効率は低かった。は抽出に一晚を要するものの、抽出効率は最も高く、事前に毛髪を粉砕することで抽出効率はさらに向上した。は抽出に一晚を要するうえに、抽出効率が最も低かった。そこで、迅速な と抽出効率の高い を組み合わせたとこころ ()、抽出速度と抽出効率の点において最も優れた結果となった。

(2) 抽出時間について

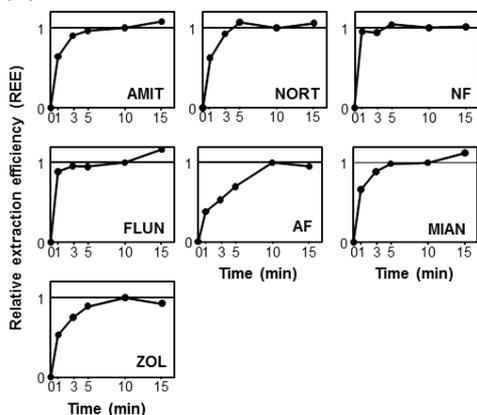


図 4 抽出時間の検討

方法 における相対抽出効率の経時変化を図 4 に示す。抽出効率がプラトーに達する時間は、化合物によって 3~15 分と大きく異なったが、すべてのアナライトを対象とした場合は 10 分間の抽出が最適と考えられた。

(3) メンブレンフィルターの選択

フィルター別の回収率を下表に示す。

催眠薬関連化合物 14 種類の回収率 (抜粋) *

メーカー	材質	孔径 (μm)	回収率 (%)	
			平均	最低
Ciro	PTFE (予備湿潤処理)	0.2	98.1	93.0
Millipore	PTFE (Omni-pore)	0.45	96.9	92.9
Ciro	ポリプロピレン	0.2	94.0	62.3
Pall	ナイロン	0.45	93.8	64.6
Ciro	ポリエーテルスルホン	0.2	89.6	67.9
Pall	親水性ポリプロピレン	0.45	87.3	62.4
Ciro	PVDF	0.2	42.7	1.7
Millipore	PVDF (Durapore)	0.45	42.1	4.6

*溶媒は 0.1 M 酢酸 / 10% アセトニトリル, n=5

ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) の回収率は総じて高かった一方で、フッ化ポリビニリデン (PVDF) は全般に低い回収率となり、特にクロルプロマジンやアミトリプチリンを強く吸着した。

PVDF は分子内に強い電気双極子モーメントを有しており、微視的に疎水部位を有しながらも、巨視的には合成樹脂の中でも水の濡れ性が比較的高い (水の接触角 82°)。低分子化合物に対する吸着性の高さはこれらの性質に由来すると考えられた。一方、PTFE は低誘電性かつ高撥水性 (水の接触角 114°) であり、水溶液に対する低い濡れ性が PTFE の高回収率に寄与していると考えられた。

(4) 毛髪中ゾルピデムの定量分析

ZOL 添加毛髪の実験から、3 つのプロダクトイオンが全て観測された 1.0 pg/mg を検出限界とした。ZOL 酒石酸塩 10 mg 単回投与後の毛髪中 ZOL 濃度は 1.8~9.8 pg/mg と報告されていることから、本法は ZOL 単回投与を毛髪から検出可能であると考えられる。

検量線を作成したところ、1~25,000 pg/mg の範囲で直線性が得られた ($R^2=0.9985$)。

再現性について検証した結果、1.0 pg/mg においては、正確さが日内 19.9%、日間 8.8%、精密さ (相対標準偏差) が日内 2.6%、日間 8.1% であり (n=5)、一般的な定量下限の基準に適合した。100 pg/mg および 10,000 pg/mg においては、日内・日間共に、正確さは 10% 以内、精密さは 5% 以内に収まった。

科警研倫理審査委員会の許可を得て、不眠症患者の毛髪を分析した。ZOL 酒石酸塩 (マイスリー) 10 mg を毎日服用している患者 A の毛髪中 ZOL 濃度は 11,400 pg/mg であった。同じ服用量の患者 B については、黒髪で 18,300 pg/mg、白髪で 119 pg/mg となり、ZOL の毛髪への取り込みにメラニンが関与していることが確認された。時々 (週 1~2 回程

度)服用している患者 C の毛髪中 ZOL 濃度は 78.9 pg/mg であった。

(5) 毛髪中催眠鎮静薬(13種類)の定量分析(4)で必要な試料量は 10 mg であったが、装置の感度向上などにより、5 mg で可能となった。その場合の定量限界は 1~4 pg/mg(薬物によって異なる)であった。ジアゼパム、FLUNおよびZOLに対するバリデーション結果について、これまでに報告されている 12 報の毛髪分析法と比較したところ、本法は抽出時間が最も短いうえに、実質的な感度を表す「必要な毛髪量×定量下限」が最も小さく、これまでの毛髪分析法よりもそれらの点で優れていることが明らかとなった。

科警研倫理審査委員会の承認を得て、本法を用いて不眠症患者の毛髪を分析した結果、プロチゾラム、ロフラゼパ酸エチル、FLUN、ZOL を毎日服用している患者 A の黒髪からは、プロチゾラムが 8.8 pg/mg、ロフラゼパ酸エチルの代謝物であるデスメチルフルジアゼパムが 443 pg/mg、FLUN が 46.0 pg/mg、ZOL が 10.2 pg/mg 検出された。週 1 回程度エチゾラム(ETI)と ZOL を服用している患者 B からは、60.0 pg/mg の ZOL が検出されたが、ETI については定量下限(4 pg/mg)未満の小さなピークしか観測されなかった。週 1 回程度 ETI を服用している患者 C からは、ETI が 4.9 pg/mg 検出された。ゾピクロン(ZOP)を毎日服用している患者 D の ZOP 濃度は、黒髪においては定量上限の 10 ng/mg 以上であったが、白髪においては 187 pg/mg と黒髪より大幅に低かったことから、ZOP もメラニンに依存して毛髪に取り込まれることが確認された。

これまでの研究により、毛髪中の乱用薬物および催眠鎮静薬について、迅速で簡便かつ高い抽出効率を備えた分析法を構築し、実際の薬物摂取者の毛髪の定量分析を行うことに成功した。これらの成果について、自ら実際の犯罪鑑識実務に応用するのはもちろんのこと、科捜研や法医学教室など国内の他の分析機関や、論文を通じて海外にも普及させることによって、薬物使用犯罪の解明に貢献したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Determination of sedative-hypnotics in human hair by micropulverized extraction and liquid chromatography/quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. Miyaguchi, H. *Anal Methods* (2014). in press (published online). DOI: 10.1039/C4AY00505H.

Determination of zolpidem in human hair by micropulverized extraction based on the evaluation of relative extraction efficiency of seven psychoactive drugs from an incurred human hair specimen. Miyaguchi, H. *J*

Chromatogr A, 1293, 28-35 (2013).

DOI: 10.1016/j.chroma.2013.04.007

毛髪中覚せい剤の自動化と高感度化を目指したガスクロマトグラフィー/質量分析システムの開発 宮口一, 杉山 茂, 樋口 美代子, 柳堀 あや子, 宮川 治彦, 井上 博之 *日本法科学技術学会誌*, 17, 27-34 (2012).

DOI: 10.3408/jafst.17.27

〔学会発表〕(計 6 件)

メンブレンフィルトレーションにおける薬物吸着ロスの評価 宮口一, 岩田祐子 *日本法科学技術学会第 19 回学術集会* (2013 年 11 月 14 日, 東京都港区・フロラシオン青山)

Determination of thirteen sedative/hypnotics in human hair by micropulverized extraction and liquid chromatography/quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. H. Miyaguchi, The 11th Indo Pacific Association of Law, Medicine and Science Congress (INPALMS2013) (2013 年 10 月 8 日, クアラルンプール・Shangri La Hotel)

マイクロ粉砕抽出法による毛髪中ゾルピデムの迅速定量分析 宮口一 *日本法中毒学会第 32 年会* (2013 年 7 月 5 日, 千葉県柏市・さわやかちば県民プラザ)

毛髪中催眠薬・抗不安薬・抗うつ薬の高速抽出法の開発 宮口一 *日本法科学技術学会第 18 回学術集会* (2012 年 11 月 15 日, 東京都港区・フロラシオン青山)

Significant acceleration of sample preparation for several psychoactive drugs in human hair by micropulverized extraction. Miyaguchi, H. 17th Annual Meeting of the Society of Hair Testing (2012 年 6 月 26 日, トロント・Hospital for Sick Children)

Identification of amphetamine-type stimulants in hair based on full scan mass spectra from a modified GC/MS system. Miyaguchi, H., Inoue, H., Sugiyama, H., Miyagawa, H., The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologist (2012 年 6 月 4 日, 静岡県浜松市・アクトシティ浜松)

6. 研究組織

研究代表者

宮口一 (MIYAGUCHI, Hajime)

研究者番号: 10370884