科学捜査における質量分析イメージング[†]

鎌田 徹・佐々木啓子・志摩典明・三木昭宏・片木宗弘

大阪府警察本部刑事部 科学捜査研究所 ☎ 541-0053 大阪府大阪市中央区本町 1 丁目 3-18

(2017 年 3 月 13 日受付；2017 年 5 月 22 日掲載決定)

Mass Spectrometry Imaging in Scientific Crime Detection

Tooru KAMATA, Keiko SASAKI, Noriaki SHIMA, Akihiro MIKI and Munehiro KATAGI

Forensic Science Laboratory, Osaka Prefectural Police H.Q., 1-3-18 Hommachi, Chuo-ku, Osaka 541-0053

(Received March 13, 2017 ; Accepted May 22, 2017)

Hair analysis for detection of drug(s) is one of forensic analyses which are carried out in forensic science laboratories of each prefectural police in Japan. Longitudinal drug distribution in hair provides very important information to understand use history of the drug. The authors applied mass spectrometry imaging technique to a drug incorporated in hair. Methoxyphenamine, a noncontrolled analogue of methamphetamine, was systemically administered to volunteers as the model compound, and hair samples were collected from them at appropriate intervals. Imaging of methoxyphenamine in hair achieved by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry applied to longitudinal section cropped out by freeze-sectioning using a rotary microtome. Methoxyphenamine-positive regions were specifically observed to shift toward tips of hair according to its growth. Detailed investigation of methoxyphenamine distribution in hair suggested strongly that its incorporation occur at not only the hair bulb but also the tissue of the upper dermis.

KEYWORDS : mass spectrometry imaging, matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), illicit drug, hair analysis, scientific crime detection

1. は じ め に

各都道府県警察に設置されている科学捜査研究所では、事件・事故に関連する、あるいは関連が疑われる種々の対象物について、各種科学技術を駆使して鑑定が行われており、その結果は捜査や公判で客観証拠として取り扱われる。

科学捜査研究所で行われている鑑定の一つに薬物鑑定があり、違法薬物が含有するか否かを知る目的で行われる鑑定は、粉末や液体等の物品に対する鑑定（所持の取締り）と尿や血液等の生体試料に対する鑑定（使用の取締り）に大別される。使用され、体内に入った薬物は、代謝や排泄によって体内濃度が低下し、尿では使用から数日程度、血液では半日程度で検出不能となる。それに

対し毛髪は、成長の過程において、血流に乗った薬物を取り込み、保持するため (Fig. 1), 体内薬物濃度が低下した後でも薬物の検出が可能である。よって、毛髪は過去の薬物使用を知るうえで貴重な試料であり、違法薬物を対象とした毛髪中薬物分析の報告も数多くなされている^{1~10)}。

Fig. 1. (color online). Schematic diagram of drug incorporation into hair.

[†] 第 36 回表面科学学術講演会 (2016 年 11 月 29 日～12 月 1 日) にて発表

E-mail : t-kamata@mahoroba.ne.jp

Fig. 2. (color online). Current fraction hair analysis that is affected by individual differences in estimation of drug use history.

毛髪はさらに、その成長速度が一日あたり平均 0.4 mm と知られていることから、その伸長方向における薬物の分布が、使用の履歴を探る上で貴重な情報となる。しかしながら、毛髪に取り込まれる薬物はごく微量であるため、従来の鑑定では 100 本程度の毛髪がまとめて用いられ、また、分画分析を行う場合であっても、操作性の面から 1~2 cm 程度の長さで裁断することが一般的であった。その場合、各毛髪の成長速度の差異も影響し、使用履歴推定は月単位の大まかなものにとどまっていた (Fig. 2)。

一方、平面試料上の化学物質分布を可視化 (画像化) する新規技術として、「質量分析イメージング」が普及しつつある。質量分析イメージングとは、試料表面から脱離してきたイオンの m/z 値と位置情報の両方を得ることにより、化学種ごとの分布状況を画像化する分析手法^{11~13)}で、得られた画像と試料の光学画像を重ね合わせることで、試料上での分布状況を視覚的に捉えることができる。写真や画像の「解像度」に相当する「空間分解能」については、毛髪の直径 (日本人の頭髪で 40~100 μm) をはるかに上回る装置も複数開発されている。

そこで我々は、毛髪に取り込まれた薬物の分布を可視化することで、詳細な薬物使用履歴を知ることができるのではないかと考え、毛髪中薬物鑑定の高度化を目指し、単一の毛髪に適用可能な質量分析イメージング法を開発するとともに、毛髪中薬物分布の挙動について解析した。

2. 方法

2.1 薬物摂取者毛髪の収集

薬物のモデル化合物として、メトキシフェナミンを選

Fig. 3. (color online). Collection method of hair specimens after single administration (a) and multiple administration (b).

択した。メトキシフェナミンは、覚醒剤メタンフェタミンの *o*-メトキシ体であるが、OTC 医薬品に含まれる咳止め薬である。倫理審査を経た後、下に示すように、ボランティアにメトキシフェナミンを計画的に投与し、単回投与後毛髪および複数回投与後毛髪を収集した。

単回投与は、20 代から 50 代の男女 5 名に対して行った。メトキシフェナミン塩酸塩 50 mg (メトキシフェナミンとして 41.5 mg に相当) を単回投与し、投与前と、投与後 24 時間、3 日、7 日、14 日に、毛髪を頭皮から引き抜いて採取した。引き抜く際には、頭皮表面に相当する部位を毛抜きで強く掴むことで、その跡を毛髪表面に残し、分析時に頭皮表面の位置がわかるようにした (Fig. 3 (a))。

複数回投与は、30 代、40 代、50 代の男性各 1 名に対して行った。1 日あたりの投与量はメトキシフェナミン塩酸塩 150 mg (メトキシフェナミンとして 125 mg に相当) とした。投与の間隔を 3 日ごと、7 日ごとおよび 11 日ごととし、いずれの間隔でも投与は計 3 日行った。毛髪の採取は最終投与から 14 日後に行った。採取時に、取り込まれたメトキシフェナミンの分布部位は頭皮の外に出ていると考えられることから、ボランティアの負担を軽減するため毛髪は引き抜かず、頭皮直近で切除して採取した (Fig. 3 (b))。

2.2 質量分析イメージング

質量分析法として、マトリックス支援レーザー脱離イオン化—飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS) を用いた。

毛髪を導電性粘着テープでスライドガラスに貼り付けた後、氷で固定し、日本マイクローム研究所製 RM-S 型マイクロームを用いて表面を連続的に削ることで、縦断面を露出させた。その後、毛髪を粘着テープごと導電性スライドガラスに載せ替え、Bruker Daltonics 社製 ImagePrep を用いて、縦断面にマトリックスを塗布した。

マトリックス溶液には、7 mg/ml α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸-0.2% トリフルオロ酢酸含有 50% アセトニトリル溶液を用いた。

測定は、Bruker Daltonics 社製 ultrafleXtreme を用いて行った。測定モードは CID-LIFT, プリカーサーイオンはメトキシフェナミンのプロトン化分子に相当する m/z 180.1, 空間分解能は 100 μm とした。

陽性対照毛髪として、ブランク毛髪をメトキシフェナミン溶液に浸漬した後に表面を洗浄したものを用いた。

2.3 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析を用いた毛髪中メトキシフェナミンの定量

メトキシフェナミン投与後毛髪について、表面を洗浄した後、毛根側末端から 1 cm の部分を、メスで 1 mm 長に分画した。次いで、各分画について、トッケン製 TK-AM5 型粉碎装置を用いて、緩衝液中で粉碎抽出を行った後、さらに有機溶媒抽出を行った。得られた抽出物を、Sciex 社製 QTRAP 5500 システムにより分析し、各分画中のメトキシフェナミンを定量した。

3. 結 果

3.1 毛髪中薬物分布の画像化の達成

あらかじめ、MALDI-TOF-MS によるメトキシフェナミン分析の条件検討を行った結果から、マトリックスには α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸を選択した。また、タンデム質量分析においては、 m/z 180.1 をプリカーサーイオンとしたとき、 m/z 149.1 のプロダクトイオンの強度が比較的高かった。

メトキシフェナミン投与後毛髪を分析するにあたり、陽性対照毛髪を、そのまま導電性粘着テープを介して導電性スライドガラスに固定し、マトリックス塗布後に MALDI-TOF-MS を行ったところ、メトキシフェナミン由来のイオンは検出されなかった。その理由として、毛髪の表面がキューティクルで覆われており、その撥水性も高いため、内部に浸透したメトキシフェナミンが毛髪表面に抽出されず、マトリックスとの混晶を形成しにくいためと考えられた。

そこで、それらの問題点を解決するため、毛髪を縦断し、その断面にマトリックスを塗布することとし、縦断の方法について検討した。まず、カッターナイフと拡大鏡を用いて手作業で縦断したが、断面は一定にならず、作業にかかる時間も膨大であった。続いて、微細な切断加工に用いられるレーザー光による縦断を試したところ、断面の形状は非常に良好であったが、MALDI-TOF-MS を行っても目的のイオンは検出されなかった。これは、切断の際に断面が高温になることによると予想された。最終的に本法で採用したのは回転式マイクロトームを

Fig. 4. (color online). Images of m/z 149.1 generated from precursor ion m/z 180.1 obtained from hair specimens collected from the singly administered 20 s male volunteer. Triangle indicates the position of the scarp surface.

Fig. 5. Product ion spectra with regards to Fig. 4.

用いた縦断¹⁴⁾で、粘着テープ上で氷漬けにした状態で毛髪の表面を長さ方向に連続的に削るものである。試料台の駆動距離は約 2 cm である。縦断面が毛髪を中心付近に達するまで削った後に、粘着テープ上の毛髪を MALDI-TOF-MS に供した。

単回投与を行った 20 代男性の、投与前から投与後各時点の毛髪について、マイクロトームによる縦断を行った後、MALDI-TOF-MS を行った。各測定位置での m/z 149.1 のイオンの検出強度を色で表現し、毛髪の光学画像と重ねたところ、Fig. 4 に示す画像が得られた。画像の左が毛球、右が毛先側、三角は頭皮表面に相当し、毛髪の周りの点線は測定した範囲を示している。色の着いた測定位置（陽性部位）と着いていない測定位置（陰性部位）でのプロダクトイオンスペクトルや、陽性対照毛髪で得られたスペクトルを比較すると、Fig. 5 に示すよ

うに、陽性部位では m/z 149.1 に加えて m/z 121.1 のイオンも観察されて陽性対照と同様であり、陰性部位ではこれらのイオンは観察されなかった。これらの結果から、 m/z 149.1 のイオンは毛髪に取り込まれたメトキシフェナミンに由来すると考えられ、毛髪に取り込まれた薬物の分布の画像化が達成された^{15,16)}。

3.2 単回投与後毛髪での画像の解析

Fig. 4 に示すように、投与から時間が経過するにしたがって、イオンの検出部位が毛根側から毛先側に移動する様子が明らかに観察された。さらに、その検出部位は、移動とともに長さが伸びていくことも観察された。単回投与を行った残り4名の毛髪についても測定を行ったところ、検出部位の挙動は年齢や性別を問わず、5名で共通していた。観察された検出部位の長さは、毛髪への薬物の取り込みが血中薬物濃度の変化を反映しながら毛球部でのみ起こっている、とするには長すぎるものであった。そこで、取り込みの様態について、複数回投与後毛髪での画像から検討した。

Fig. 4 で、投与から24時間後の毛髪に着目すると、検出部位は毛球側末端から約4 mmの長さに及んでいる。これはちょうど、頭皮表面から毛球までの深さに相当している。これまで、薬物の取り込み部位は毛球部と考えられていたが、毛球部から毛髪が4 mm 成長するためには、10日間程度かかるはずである。また、取り込まれた薬物は、毛髪組織と三次元的に結合して安定であり、毛髪内での分子拡散が起こっているとは考えにくい。よって、この部位に存在するメトキシフェナミンは、毛球から取り込まれたものではなく、まさに検出部位の近く、すなわち頭皮に植わっている部位で取り込まれたものだと考えられた。

一方、毛球部からの取り込みも起こっていることが、画像からも読み取れた。イオンの検出部位は、投与から採取までの時間が長くなると、その長さが伸びていくことを前述したが、これは、毛球部からの取り込みが、血中濃度が低下した後、何日にもわたって起きている結果だと考えることができる。

さらに、Fig. 4 中7日後毛髪のように、伸長方向に長い検出部位の途中で強度が低くなっているものが、各ボランティアの毛髪で見られた。この観察結果を検証するため、投与から7日後に採取した毛髪について、1 mm 長に分画したうえで定量分析を行い、その結果を画像と対照した。また、比較のため、投与から24時間後に採取した毛髪についても同様に定量・対照した。

その結果、Fig. 6 に20代男性での例を示すように、7日後の毛髪では検出量に二つのピーク（3~4 mm 分画における54 pg および5~6 mm 分画における30 pg）が

Fig. 6. (color online). Comparison of images with methoxyphenamine content in 1-mm segments.

見られ、画像での結果が定量値からも裏付けられた。この二つのメトキシフェナミン分布は、頭皮部で取り込まれた後に、毛髪の成長とともに検出部位が毛先側に移動したものと、毛球部から徐々に取り込まれたもの、と説明できる。

また、投与から24時間後に採取した毛髪では、頭皮部で検出量の山が一つ見られただけでなく、毛球側末端で突出してメトキシフェナミンが検出された。この、毛球側末端での検出量について、画像では捉えられていなかった。この検出状況の相違の理由として、毛球部は、他の部位と異なり採取時にゼリー状であったため、試料調製の際に氷やマトリックス溶液によって膨潤と収縮を繰り返したことが等が、MALDI-TOF-MSでの測定に悪影響を与えたことが考えられた。

3.3 複数回投与後毛髪での画像の解析

違法薬物の使用は、たとえ一度であっても許されないが、繰り返しての使用はより悪質性が高い。よって、薬物使用履歴の推定では、使用回数の判断も期待される。毛髪中薬物の分布が複数見られ、相互に分離していれば、複数回の薬物使用が示唆されるが、使用間隔が短いと、複数回の使用であっても分布が重なってしまうことが容易に予想される。そこで、どの程度使用間隔が空けば検出部位が分離するのか、複数回投与後毛髪での画像から検討した。

投与日の間隔を3日とした場合には、投与した3名いずれでもイオンの検出部位は分離しなかった。それに対し、7日間隔では一部の毛髪で三つの検出部位があるように見え、11日間隔では3名いずれでも検出部位が分離した (Fig. 7)。この結果から、検出部位が分離して複数回使用が示される最短の使用間隔は、11日あるいはそれ以上と推定された。

また、7日間隔投与では、三つの検出部位に加えて、

Fig. 7. (color online). Images of product ion m/z 149.1 obtained from hair specimens collected from the multiply administered male volunteers (50 s (a), 30 s (b) and 40 s (c)).

毛根側に強度の低いもう一つの検出部位が見られた。これを、薬物の取り込み部位を絡めて解釈すると、1日目の投与で、頭皮部 (Dermis) での取り込みと毛球部 (Bulb) での取り込みが起こり、2日目の投与で頭皮部での取り込みが1日目における毛球部での取り込みと重なるとともに、毛球部での取り込みが起こる。同様に、3日目の投与で頭皮部での取り込みが2日目における毛球部での取り込みと重なり、低強度の部位は3日目の毛球部での取り込みである、と考えた。したがって、投与間隔の長短と、検出部位の分離/非分離との相関についても、取り込みが頭皮部でも起こっているとすると矛盾しなかった。

4. ま と め

毛髪中薬物鑑定的高度化を目指し、メトキシフェナミンをモデル化合物として、質量分析イメージングによる毛髪中薬物分布の可視化を達成し、従来の鑑定法よりもはるかに高い空間分解能で、分布を知ることができるようになった。ただし、分布を知る前提となる、毛髪に薬物が含有することの証明については、本法のみでは行えないため、実鑑定では従来法との併用が必須である。

単回投与後毛髪を用いた検討からは、毛髪へのメトキシフェナミンの取り込み部位に関して、新たな知見が得られた。単回の薬物使用であっても、毛髪中での分布

は、これまで考えられていた範囲よりも広くなる可能性が示されたことは、毛髪鑑定の結果から薬物の使用履歴を推定するうえで、不可欠な情報である。

本法は、単毛髪に適用できる点や、1回の測定で広い範囲の薬物分布を知ることができる点で、非常に有利である。よって、質量分析イメージングを用いることで、個々の毛髪の間で薬物分布を比較することが、これまでよりも格段に容易になった。現在、同一時期に採取された複数の毛髪での測定と解析を進め、本法で得られた結果を薬物使用履歴推定へ適用するための検証を行っている。

文 献

- 1) Y. Nakahara, K. Takahashi, M. Shimamine and Y. Takeda : J. Forensic Sci. **36**, 70 (1991).
- 2) A. Miki, M. Katagi and H. Tsuchihashi : J. Anal. Toxicol. **27**, 95 (2003).
- 3) A. Miki, M. Katagi and H. Tsuchihashi : J. Health Sci **49**, 325 (2003).
- 4) C. Hoelzle, F. Scheufler, M. Uhl, H. Sachs and D. Thime : Forensic Sci. Int. **176**, 13 (2008).
- 5) L. Micolini, R. Mandrioli, B. Saladini, M. Conti, C. Baccini and M.A. Raggi : J. Pharm. Biomed. Anal. **48**, 456 (2008), doi : 10.1016/j.jpba. 2008.02.007.
- 6) N. Harun, R.A. Anderson and P.A. Cormack : Anal. Bioanal. Chem. **396**, 2449 (2010), doi : 10.1007/s00216-009-3404-6.
- 7) F. Pragst, S. Broecker, M. Hastedt, S. Herre, H. Andresen-Streichert, H. Sachs and M. Tsokos : Ther. Drug Monit. **35**, 737 (2013), doi : 10.1097/FTD. 0b013e31829a78c3.
- 8) J. Kim, D. Ji, S. Kang, M. Park, W. Yang, E. Kim, H. Choi and S. Lee : J. Pharm. Biomed. Anal. **89**, 99 (2014), doi : 10.1016/j.jpba. 2013.10.041.
- 9) R.A. Koster, J.W. Alffenaar, B. Greijdanus, J.E. VanDernagel and D.R. Uges : Ther. Drug Monit. **36**, 234 (2014), doi : 10.1097/FTD. 0b013e3182a377e8.
- 10) M.M. Madry, M.M. Bosshard, T. Kraemer and M.R. Baumgartner : Bioanalysis **8**, 953 (2016), doi : 10.4155/bio-2016-0019.
- 11) R.M. Caprioli, T.B. Farmer and J. Gile : Anal. Chem. **69**, 4751 (1997), doi : 10.1021/ac970888i.
- 12) 平 修 : ぶんせき **2013**, 429 (2013).
- 13) 鎌田 徹 : ぶんせき **2015**, 394 (2015).
- 14) T. Nakanishi, T. Nirasawa and T. Takubo : J. Anal. Toxicol. **38**, 349 (2014), doi : 10.1093/jat/bku032.
- 15) A. Miki, M. Katagi, T. Kamata, K. Zaitu, M. Tatsuno, T. Nakanishi, H. Tsuchihashi, T. Takubo and K. Suzuki : J. Mass Spectrom. **46**, 411 (2011), doi : 10.1002/jms. 1908.
- 16) T. Kamata, N. Shima, K. Sasaki, S. Matsuta, S. Takei, M. Katagi, A. Miki, K. Zaitu, T. Nakanishi, T. Sato, K. Suzuki and H. Tsuchihashi : Anal. Chem. **87**, 5476 (2015), doi : 10.1021/acs. analchem. 5b00971.