

高感度・高精度な新規毛髪中覚せい剤分析法の開発

千葉県警察本部刑事部科学捜査研究所

三熊 敏靖

1. 緒言

薬物の乱用は依然として大きな社会問題の一つであり、その効果的な防止策を立てることは、国民の安全・安心を維持するうえでの重要課題と言える。対策には様々な方面からのアプローチがあるが、違法薬物の利用者に対し、厳しい罰を与えるという司法の制度が大きな役割を果たしていることは間違いない。薬物事犯においてその罪を問う場合、違法薬物の所持または使用を科学的に証明することが必要となり、この際、化学分析による薬物の検出が求められる。分析機器の性能向上によって、薬物分析の技法は日々高感度・高精度化してきており、裁判において誤判定や見逃しのない正確な判決を下すのに大きく貢献している。

次に、乱用される薬物の傾向に目を向けると、様々な種類の違法(脱法)薬物が利用されているが、国内では覚せい剤の乱用が最も根強く、ここ10年間、覚せい剤取締法違反による逮捕者は毎年1万人を上回っている[1]。覚せい剤事犯においてその使用を証明するためには、対象者の生体試料(尿、血液、毛髪など)を分析し、そこから覚せい剤を検出しなければならない。この際、注意すべき問題として、一部の医薬品を摂取すると、その有効成分が体内で代謝反応を受けて覚せい剤になってしまうことが知られている[2]。L-デプレニル(別名セレギリン)は、パーキンソン病の治療薬に含まれる有効成分であるが、代謝により覚せい剤であるL-メタンフェタミン(L-MA)を生じ、さら

なる代謝によりL-アンフェタミン(L-AM)を生じる(図1)。一方、国内で流通している覚せい剤のほとんどはd-メタンフェタミン(d-MA)であり、代謝によりd-アンフェタミン(d-AM)を生じる。生体試料からの覚せい剤検出において、d-体、l-体の識別を伴わない分析法を選択した場合、その医薬品を利用した者を「覚せい剤使用者」として証明してしまう危険性が生じる。このため、生体試料中の覚せい剤分析においては、d-体、l-体の識別を伴う分析法、すなわちキラル分析法を導入することが推奨されており、すでに多くの検査機関において採用されている。

一方、検査対象とする生体試料の選択も重要である。多くの場合、覚せい剤使用の証明には、対象者の尿が用いられる。尿は採取が容易であり、覚せい剤も検査に十分な量が含まれているなど多くの利点があるが、摂取から10日前後ですべての覚せい剤が排泄されてしまう。ゆえに、この期間よりもさかのぼって覚せい剤の使用を示すことはできない。一方、毛髪は長期間(数ヶ月以上)に渡る覚せい剤の使用履歴が残るほか、毛根側から一定の長さごとに分画して分析することにより、使用歴の推定がある程度可能とされるなど、優れた特徴を持つ試料である。ただし、毛髪に含まれる覚せい剤の量は他の生体試料に比べて著しく少なく、一般的に毛髪中覚せい剤の検査では、高価な高感度分析機器が必要となる。また含有量の少なさから検査は覚せい剤の検出に焦点が置かれ、

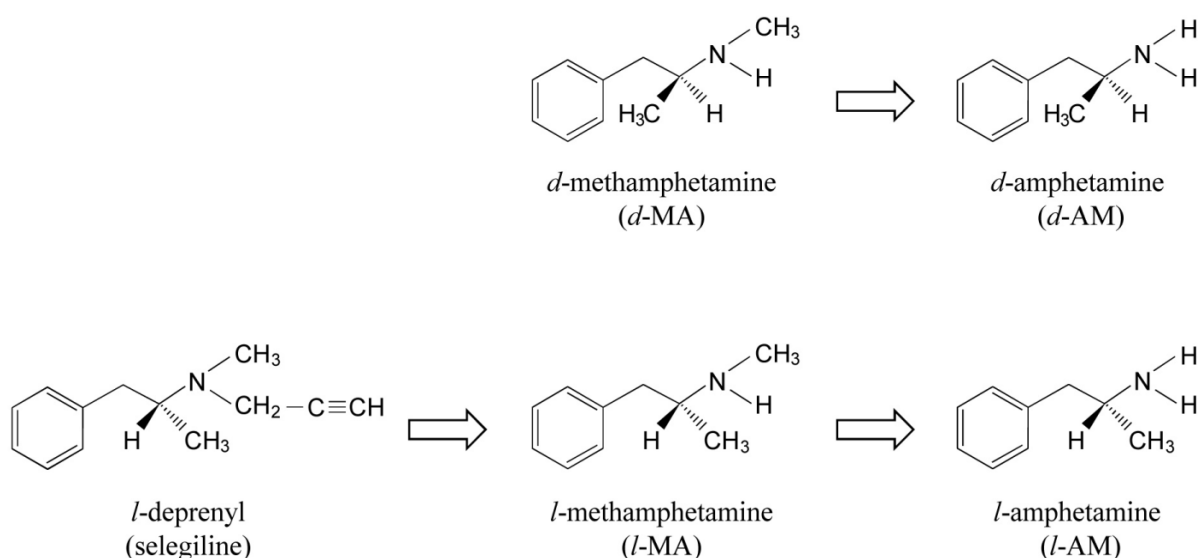


図1 *l*-デプレニルおよび覚せい剤の代謝経路 (一部)。矢印は代謝による変化を示す。

追加でキラル分析が導入されることはほとんどないのが現状である。

本研究では、キャピラリー電気泳動 (Capillary Electrophoresis : CE) に着目し、毛髪中覚せい剤のキラル分析法確立を試みた。CE では、試料を測定する際に同一機器内で濃縮を行う「オンライン濃縮法」を用いることができ、これにより高感度な覚せい剤の分析が可能になる。毛髪中の微量覚せい剤を検出するためには相当の濃縮効率が要求されるが、現在報告されている濃縮法の中でも効率が高いと評価されている「陽イオン選択的完全注入ースウィーピングミセル動電クロマトグラフィー (Cation-selective exhaustive injection and sweeping micellar electrokinetic chromatography : CSEI-sweeping-MEKC 法)」を用いることで、通常の測定に比べて数千～100 万倍程度の濃縮効率を得ることができ[3-5]、毛髪中の微量覚せい剤検出にも応用可能であることが報告されている[5]。一方 CE は、濃縮を考えずにキラル分析の実施だけを目的とした場合、非常に有用な手法であることが知られている。分離場であるキャピラリー内の泳動液を容易に置換することができ、ここにキ

ラル選択剤と呼ばれる試薬を溶液として導入することで、良好なキラル分析が可能になる。これらの知見から、上記オンライン濃縮法にキラル分離の要素を巧みに組み込むことで、毛髪中覚せい剤のキラル分析法を構築できると予測し、検討を行った結果、良好な分析法を得ることができたので報告する。

2. 実験

2.1. 試薬および試料

d-メタンフェタミン塩酸塩は大日本住友製薬から購入したヒロポンを、*l*-メタンフェタミン塩酸塩は厚生労働省から供与されたものを用いた。*d,l*-アンフェタミン硫酸塩は当研究所において合成したものを用いた。高度硫酸化- γ -シクロデキストリン (Highly sulfated- γ -cyclodextrin : HS- γ -CD) はベックマンコールター社から購入した 20 %溶液を用いた。その他の試薬は、いずれも特級試薬として購入したものを用いた。

ブランクの毛髪には、覚せい剤などの薬物を使用または接触したことのない人から供与された頭髪を用いた。覚せい剤摂取者の毛髪は、千葉県内で逮捕された者の頭髪である。

2.2. CE

キャピラリー電気泳動装置には HP^{3D}CE system (アジレントテクノロジー社) を用い、検出波長は 195 nm とした。キャピラリーには内径 50 μm、全長 64.5 cm (有効長 56 cm) のフューズドシリカキャピラリー (GLサイエンス) を用い、測定時の温度は 25 °C とした。繰り返し性向上のため、毎測定前にプレコンディショニングとして 1 M 水酸化

ナトリウム水溶液 3 分、メタノール 3 分、水 3 分、泳動液 6 分を順にフラッシュによりキャピラリーに通した。

CSEI-sweeping-MEKC 法による測定は以下のとおりに行った。泳動液には 20 %メタノールを含む 100 mM リン酸バッファー (pH 2.7) (電気伝導度の程度から Medium conductivity buffer : MCB と略す) を、濃縮用の高電気伝導度溶液 (High conductivity

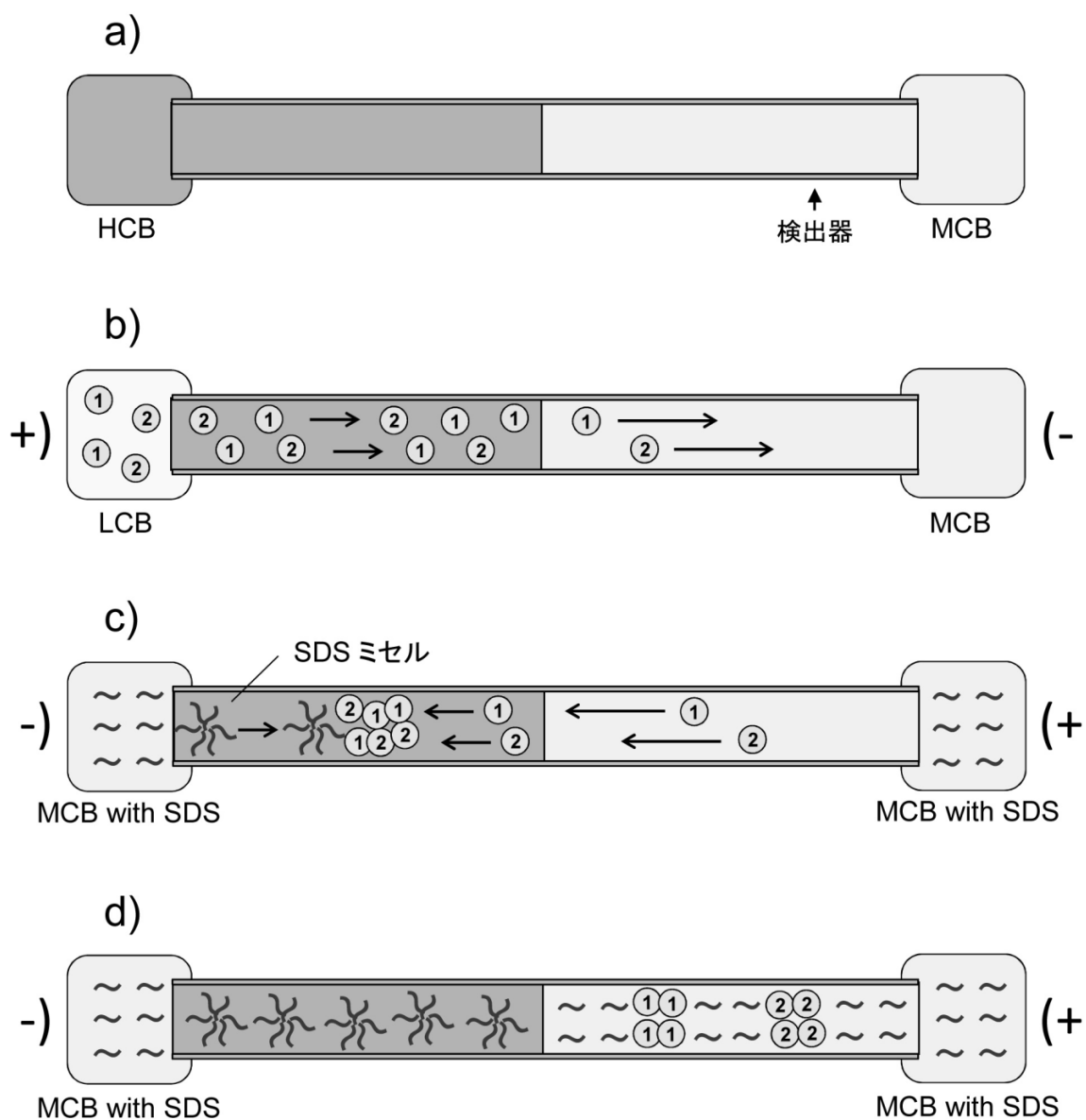


図2 CSEI-sweeping-MEKC 法。

図中の①、②は異なる分析対象物を模式的に示している。a)~d)の説明については本文に記載。

buffer : HCB) には 200 mM リン酸バッファー (pH 2.7) を用いた。ミセル溶液には 20 %メタノールおよび 20 mM ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecylsulfate : SDS) を含む 100 mM リン酸バッファー (pH 2.7) を用い、キラル分析時にはこれに HS- γ -CD を適当な濃度となるように加えた。HCB の注入は 34.5 mbar で 240 秒 (15 % filling)、試料注入は水を 34.5 mbar で 5 秒加えたのちに +18 kV で文中に示す時間行い、-18 kV で分析を行った。試料溶液はいずれも 1 mM リン酸バッファーにより調製した。

比較検討のために実施したオンライン濃縮なしの測定は以下のとおりに行った。泳動液には CSEI-sweeping-MEKC 法におけるミセル溶液と同様のものを用い、これをキャピラリー内に満たすことでミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) の原理により分析した。試料には 20 μ g/mL のラセミ MA 水溶液を用い、注入は 34.5 mbar で 3 秒行った。

分離メカニズム検討のために実施した測定は以下のとおりに行った。キャピラリー内を HCB または MCB で満たし、キャピラリー両端には CSEI-sweeping-MEKC 法と同様のミセル溶液をセットした。試料には 60 μ g/mL のラセミ MA 水溶液を用い、注入は 34.5 mbar で 3 秒行った。

2.3. 毛髪の前処理

2.3.1. 洗浄

毛髪を数 mm の長さに切断し、これに 1 % SDS 水溶液を加えて約 1 分間の超音波洗浄を行った。洗液を除去したのち、水およびメタノールで約 30 秒間ずつ超音波洗浄を行った。水及びメタノールによる洗浄は交互に 3 回実施し、終了後乾燥させて抽出用の試料とした。

2.3.2. 抽出

洗浄後の毛髪を 3 mg 秤量し、試験管に入れた。これに 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 1 mL を加え、

70 °C に 30 分置くことで毛髪を溶解した。溶解液を室温まで冷ましたのち、シクロヘキサンを 2 mL 加えて攪拌、遠心分離を行った。得られた有機層を分取し、濃塩酸-メタノール (1 : 20) 50 μ L を加えたのちに窒素気流下で溶媒を留去した。得られた乾固物を 1 mM リン酸バッファー 250 μ L に溶かし、ウルトラフリー (0.22 μ m) でろ過したものを分析用の試料とした。

2.4. CSEI-sweeping-MEKC 法

本研究のベースとして用いたオンライン濃縮法である CSEI-sweeping-MEKC 法の原理を模式的に示した (図 2)。キャピラリーに MCB を満たしたのち、HCB を部分注入する (図 2a)。次に、低電気伝導度溶液 (Low conductivity buffer : LCB) で調製した試料をセットし、正極性で電圧を印加することで分析対象物 (陽イオン) を電気的注入する (図 2b)。注入後、キャピラリー両端にミセル溶液 (MCB に SDS を加えたもの) をセットし、極性を反転させて電圧を印加、分析を開始する (図 2c)。SDS はマイナスの電荷を有しているため電気泳動によりキャピラリー内に導入され、一方、分析対象物は極性を反転させたことにより入り口側へと泳動する。この際、HCB の領域では SDS がミセルを形成しており、分析対象物を取り込みながら検出器側へ移動することで濃縮が行われる。SDS が MCB の領域に達すると、溶液の疎水性の高さからミセルが一部崩壊する。これにより、分析対象物の一部はミセルの外で泳動することになり、結果としてミセル内外での分配の程度によって物質の移動度が変わる MEKC 法の原理に基づき、分析対象物は分離して検出される (図 2d)。

3. 結果と考察

3.1. 試料注入時間の検討

CSEI-sweeping-MEKC 法では、試料注入時間を長くすることでピークが徐々に大きくなっていく (注入量が増える) が、ある時間までいくと飽和し

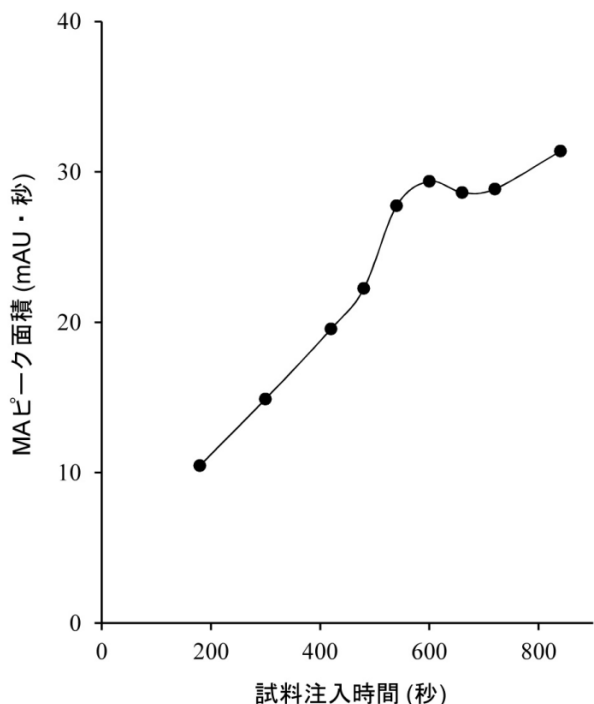


図3 試料注入時間に対する MA のピーク面積プロット。

てそれ以上増えなくなることが知られており[5-6]、その飽和に至る時間を最適注入時間に設定することが一般的である。キラル分離の要素を導入する前に最適な注入時間を決定するため、試料の注入時間を変化させながら CSEI-sweeping-MEKC 法により覚せい剤の分析を行った。ラセミ体の MA 水溶液 (2 ng/mL) を試料として測定し、注入時間に対して得られた MA のピーク面積をプロットしたところ (図 3)、およそ 600 秒の時点で面積値が飽和状態となったことから、この時間を最適値として以降の分析で使用した。CSEI-sweeping-MEKC 法 (注入時間 600 秒) による MA の測定から得られたエレクトロフェログラムを、オンライン濃縮なしの測定から得られたエレクトロフェログラムと合わせて図 4 に示す。濃縮なしの時 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に比べて

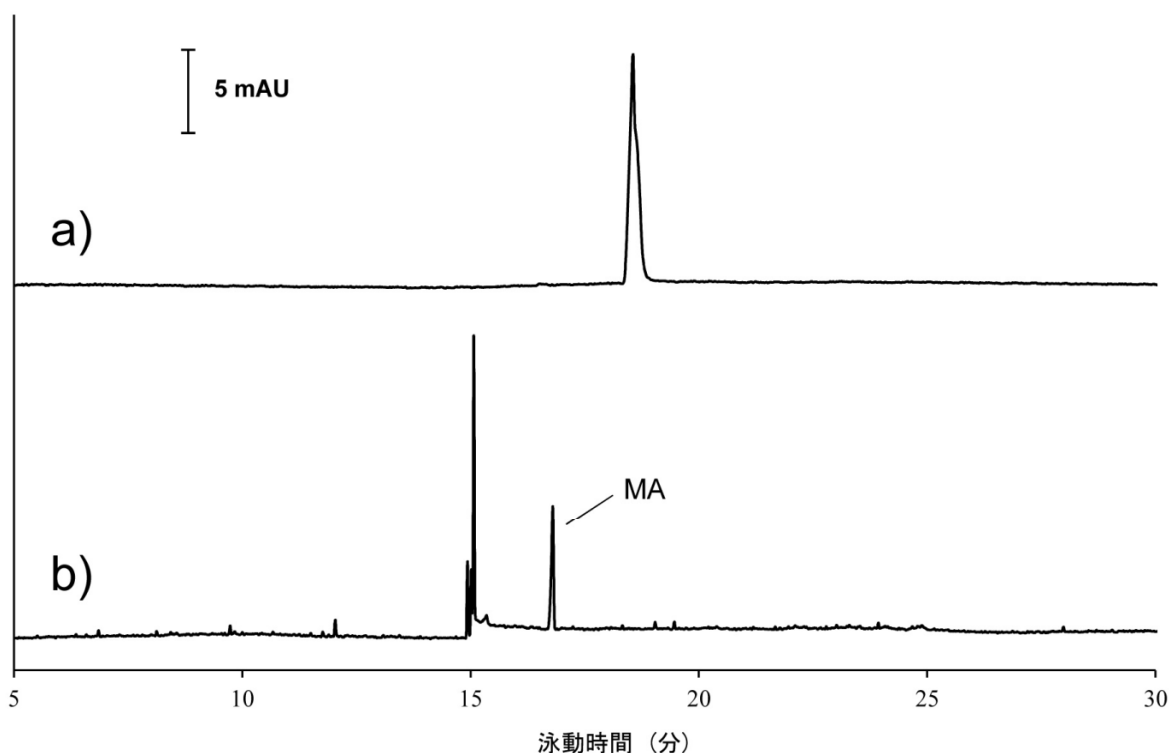


図4 MA の測定から得られたエレクトロフェログラム。

a) MEKC 法 (オンライン濃縮なし)、試料濃度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。b) CSEI-sweeping-MEKC 法、試料濃度 2 ng/mL。

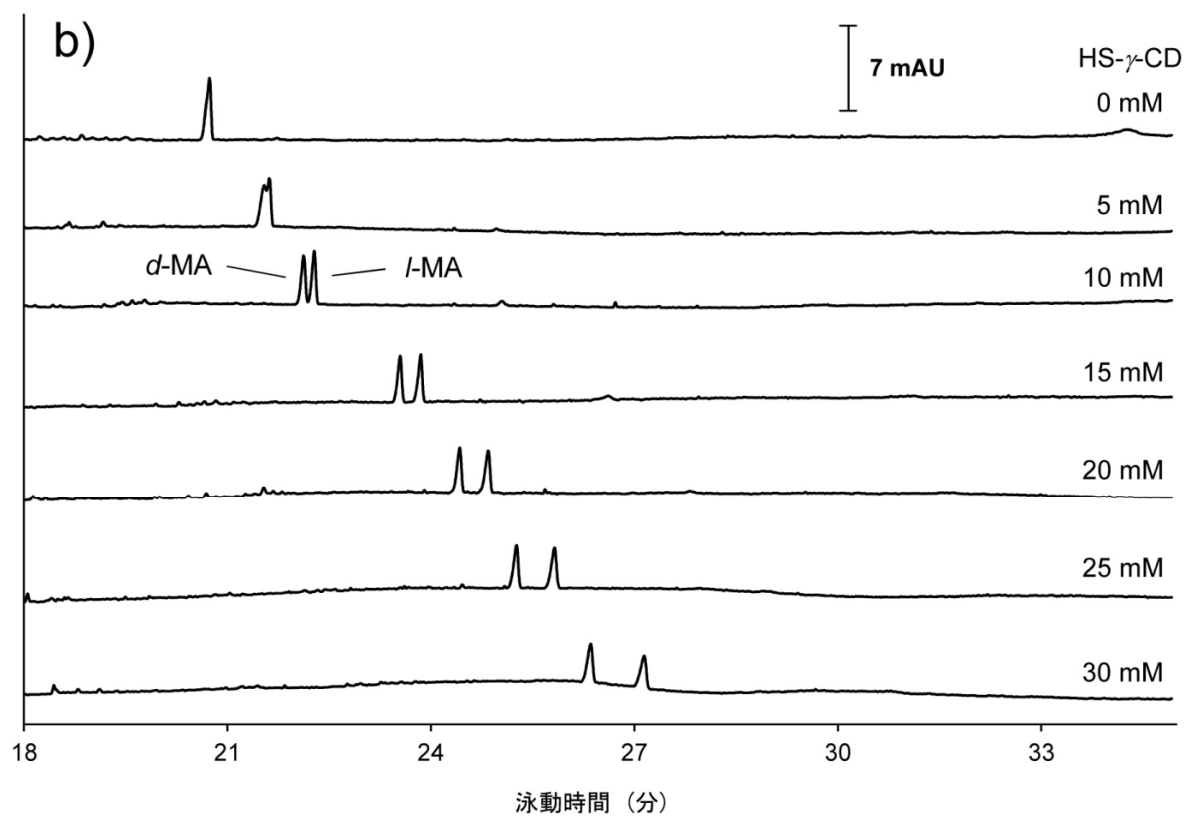
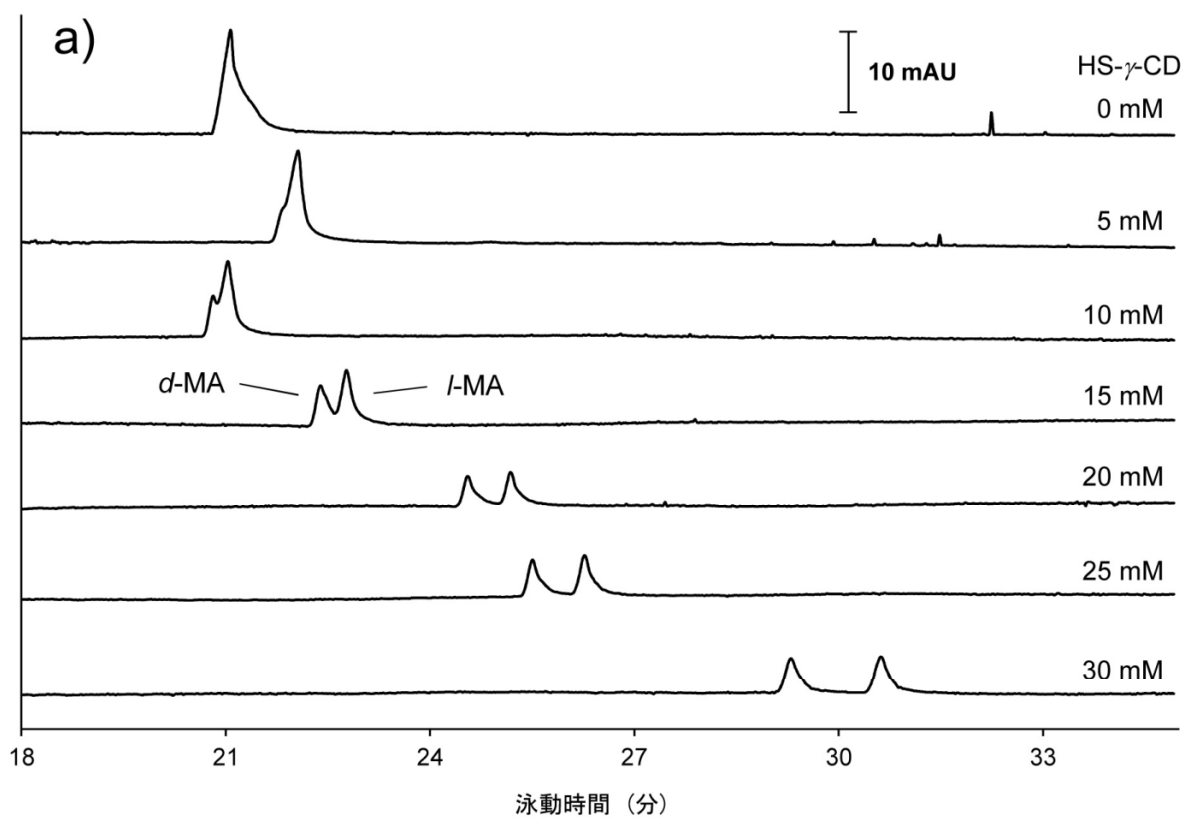


図5 キラル選択剤の添加によるMAのピークの変化。
a) MEKC法 (オンライン濃縮なし)。b) CSEI-sweeping-MEKC法。

CSEI-sweeping-MEKC 法では 1 万倍薄い試料 (2 ng/mL) を測定しているが、MA のピークが明確に検出されている。各分析法での検出下限濃度を求めたところ、オンライン濃縮なしで 0.27 $\mu\text{g/mL}$ 、CSEI-sweeping-MEKC 法では 42.7 pg/mL となり、濃縮効率は 6323 倍と算出された。この良好な効率値から、高濃縮を伴う分析が当研究所においても再現できたことが確認され、この条件をベースとしてキラル分析法の検討を行った。

3.2. キラル選択剤の添加

3.1 で得られた条件をベースとして、陰イオン性のキラル選択剤である HS- γ -CD をキャピラリー両端に位置するミセル溶液中に段階的に加えていき (0 mM ~ 30 mM)、MA のピークがどのように変化するかを観察した。また、オンライン濃縮なしの測定においても泳動液に HS- γ -CD を段階的に加えていき、CSEI-sweeping-MEKC 法の結果と比較した。得られたエレクトロフェログラムを図 5 に示す。オンライン濃縮なしの場合、HS- γ -CD を添加するにつれて MA のピークは徐々にキラル分離し、HS- γ -CD を 20 mM 添加した段階で、おおよそ *d*-体と *l*-体がベースライン分離する結果となった (図 5a)。MEKC 法において泳動液にキラル選択剤を添加した場合、適切な条件下であれば、分析対象物はミセルとキラル選択剤の双方に分配され、キラル分離が生じることが知られている。特にキラル選択剤にシクロデキストリン (CD) を用いた場合、この方法は CD-MEKC 法と呼ばれ、すでに多くの化合物に対してキラル分析の報告例がある [7-9]。本実験においても、MA がミセルとキラル選択剤の双方に分配されたものと考えられ、得られた結果は妥当なものであると考えられた。

一方 CSEI-sweeping-MEKC 法において、ミセル溶液に HS- γ -CD を添加した場合、オンライン濃縮なしの場合と同様に、添加濃度が増えるほどキラル分離が明瞭に生じた (図 5b)。注目すべき点とし

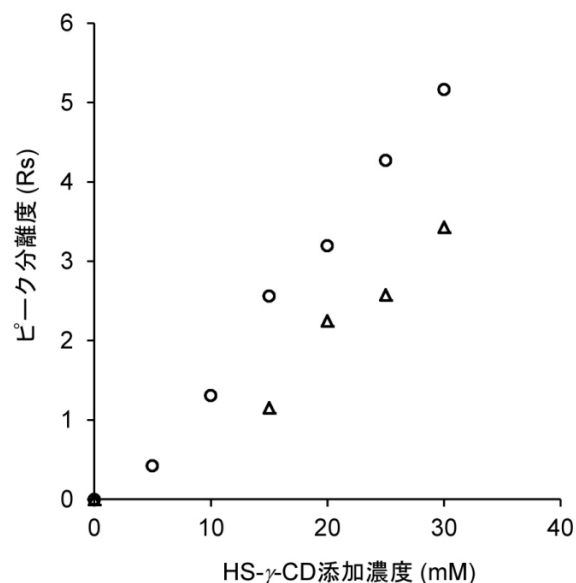


図 6 HS- γ -CD の添加濃度に対する MA ピークの分離度プロット。△ MEKC 法 (オンライン濃縮なし)。○ CSEI-sweeping-MEKC 法。

て、キラル分離が生じてピーク自体の形状や大きさはほとんど変わっておらず、このことは、数千倍の高濃縮が維持されたままキラル分離が生じていることを示している。HS- γ -CD の添加濃度に対して *d*-MA、*l*-MA の各ピークの分離度をプロットしたところ (図 6)、濃縮なし、ありのいずれにおいても、キラル選択剤の添加濃度が増えるに連れて分離度がおおよそ比例的に増加していることがわかった。CSEI-sweeping-MEKC 法では、高濃縮のために分析対象物を入り口側へ泳動させ、SDS にそれを取り込ませるなどの特別な操作を行っている。ゆえに、キラル分離の要素を加える際、濃縮のメカニズムに悪影響を与える、またはキラル分離が効果的に生じないなど、濃縮とキラル分離が双方に悪い作用をもたらすことも考えられたが、本実験では、高濃縮を維持したまま、キラル選択剤が添加濃度に応じて効果を現すという良好な結果が得られた。

3.3. 分離メカニズムの検討

CE においてオンライン濃縮とキラル分離を同

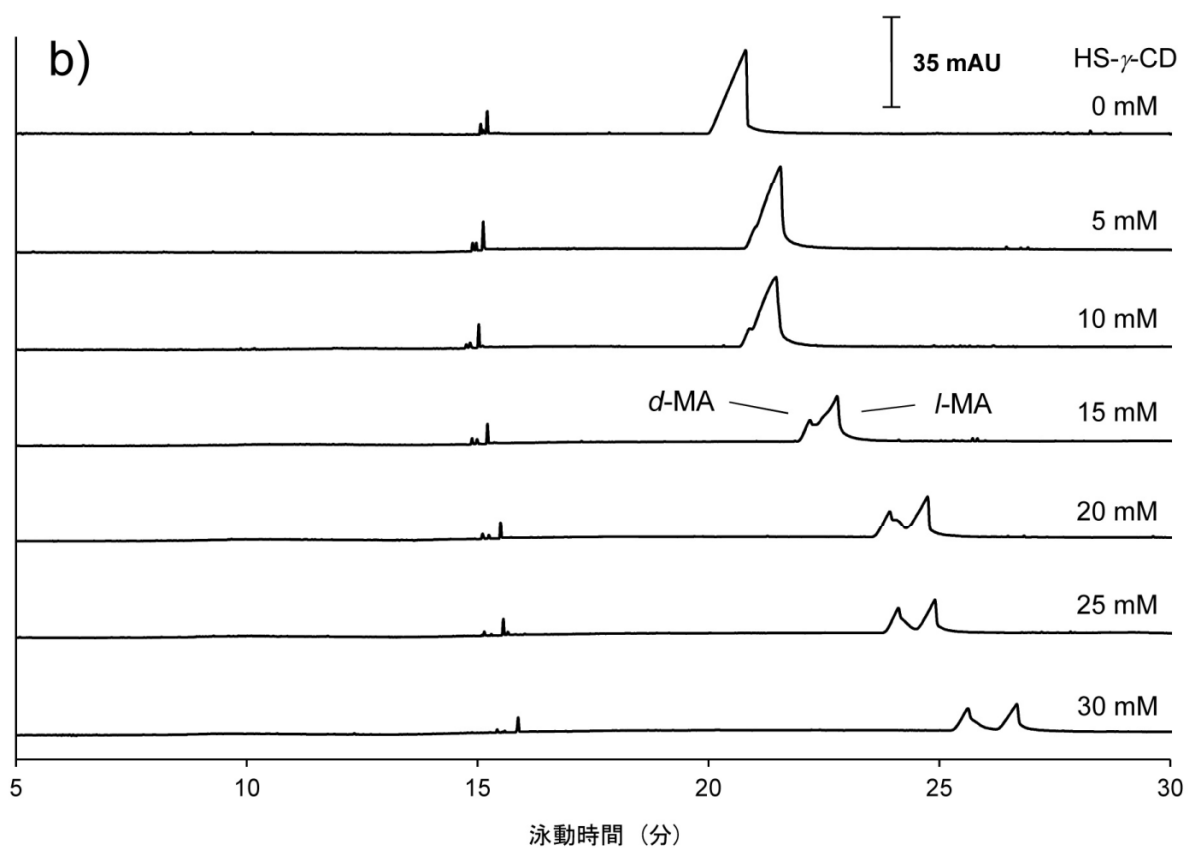
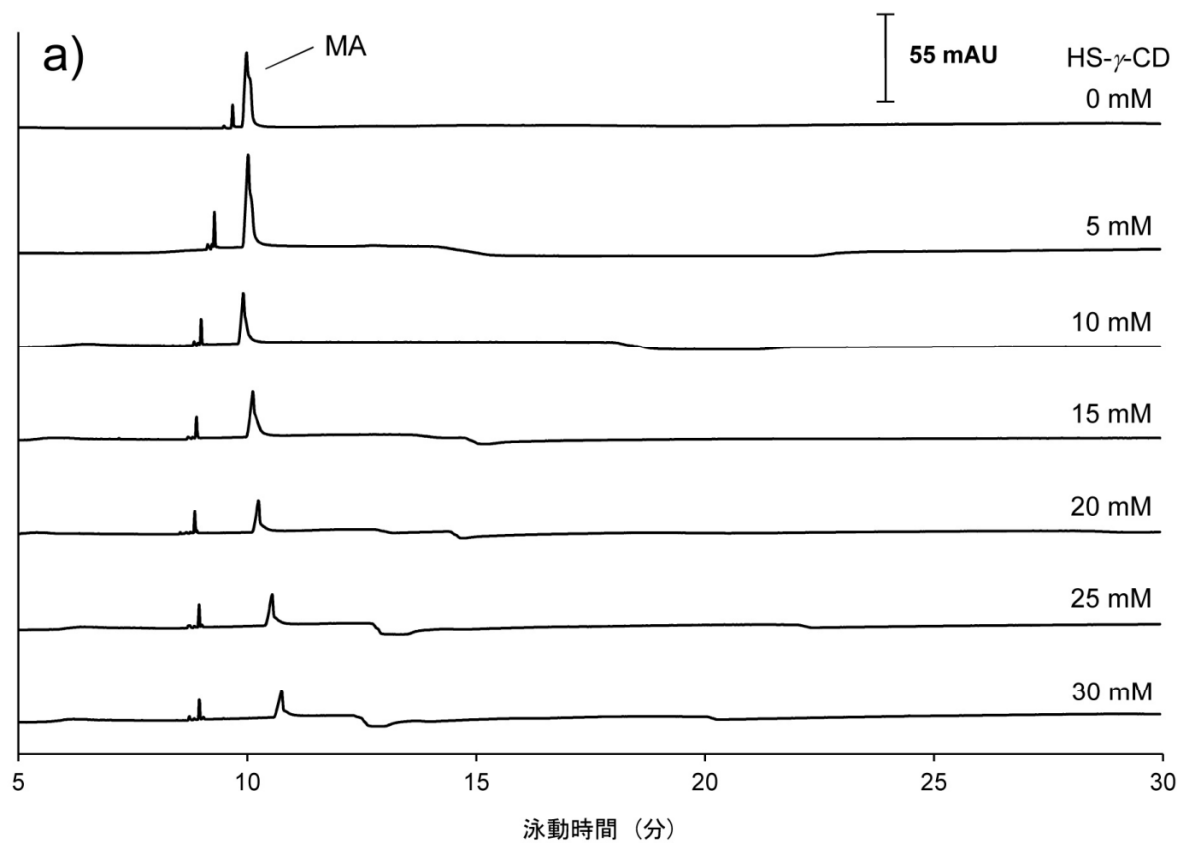


図7 キラル選択剤の添加によるMAのピークの変化。
 キャピラリー内を a) HCB で満たした状態、b) MCB で満たした状態。

時に行う場合、キャピラリー内で双方に必要なメカニズムが維持されなければならない。このため、本研究のようにオンライン濃縮法の系にキラル選択剤を添加するだけでは、互いに影響し合い、濃縮効率やキラル分離度にそれが反映されると予測された。しかし今回、高濃縮を維持したままキラル選択剤が添加濃度に応じて効果を現すという結果が得られ、また過去の研究例を調べても、CSEI-sweeping-MEKC 法を用いたキラル分析の報告は見当たらなかった。そこで、本分析法のメカニズムを解明する必要があると考え、以下の実験を行った。

MA がキャピラリー内部でどのように振る舞っているのか知るため、キャピラリーを濃縮用の溶液 (HCB) だけで満たした状態、または分離用の溶液 (MCB) だけで満たした状態にし、キャピラリー両端のミセル溶液にキラル選択剤を段階的に加えてどのような効果を示すのか観察した。得られた結果を図 7 に示す。HCB 中ではキラル選択剤はほとんど効果を現さず、MA は 1 本のピークとして検出された (図 7a)。一方 MCB 中では、キラル選択剤の添加濃度が増えるにつれてキラル分離が明瞭に生じた (図 7b)。このことは、HCB の領域ではキラル選択剤が効果を現さない、すなわち濃縮の邪魔をしないことを示している。HCB では SDS がミセルを形成しており、MA を取り込みながら検出器側へ移動する。この際、ミセルと MA との親和性が、HS- γ -CD と MA との親和性よりも十分に高いため、MA の大部分がミセル側へ取り込まれたと考えられる。SDS が MCB の領域に達すると、溶液の疎水性の高さからミセルが一部崩壊する。これにより、MA はミセルと HS- γ -CD の双方に分配されるようになり、CD-MEKC 法の原理に基づきキラル分離したものと考えられる。

3.4. 本分析法の評価

図 5b の実験結果から、HS- γ -CD の濃度が 20 mM

表 1 CSEI-sweeping-MEKC 法での各種パラメータ。

	キラル分離なし		キラル分離あり	
	MA	d-MA	l-MA	
相対標準偏差 (% , $n = 8$)				
泳動時間	0.8	0.5	0.5	
ピーク面積	3.1	5.7	4.7	
ピーク高さ	1.9	3.8	4.2	
検出下限濃度 (pg/mL)	42.7	77.9	88.8	
濃縮効率	6323	13094	11149	

あれば、毛髪分析において十分なキラル分離が達成されると考え、この条件で繰り返し性や検出下限濃度等を評価した。得られた各パラメータを、キラル分離なしの測定から得られた各パラメータと合わせて表 1 に示す。繰り返し性については、泳動時間、ピーク面積、ピーク高さのいずれにおいても、以降の毛髪分析に問題を生じないであろう良好な相対標準偏差値が得られ、また、キラル分離の導入前後で大きく変動もしなかった。検出下限濃度は、d-MA で 77.9 pg/mL、l-MA で 88.8 pg/mL であり、オンライン濃縮なしでの検出下限濃度がそれぞれ 1.02 μ g/mL、0.99 μ g/mL であったことから、濃縮効率は 13094 倍、11149 倍と算出された。検出下限濃度の低さから、本法は毛髪分析に応用可能であると考えられた。また、キラル分離を伴うオンライン濃縮法の研究において、濃縮効率が 1 万倍を超える報告が見当たらないことから[10-11]、本法は現状で最も高い濃縮効率を伴うキラル分析法であるとも言える。

3.5. 毛髪分析

毛髪での分析を検討するにあたり、毛髪自体から抽出される夾雑物が分析に与える影響を確認す

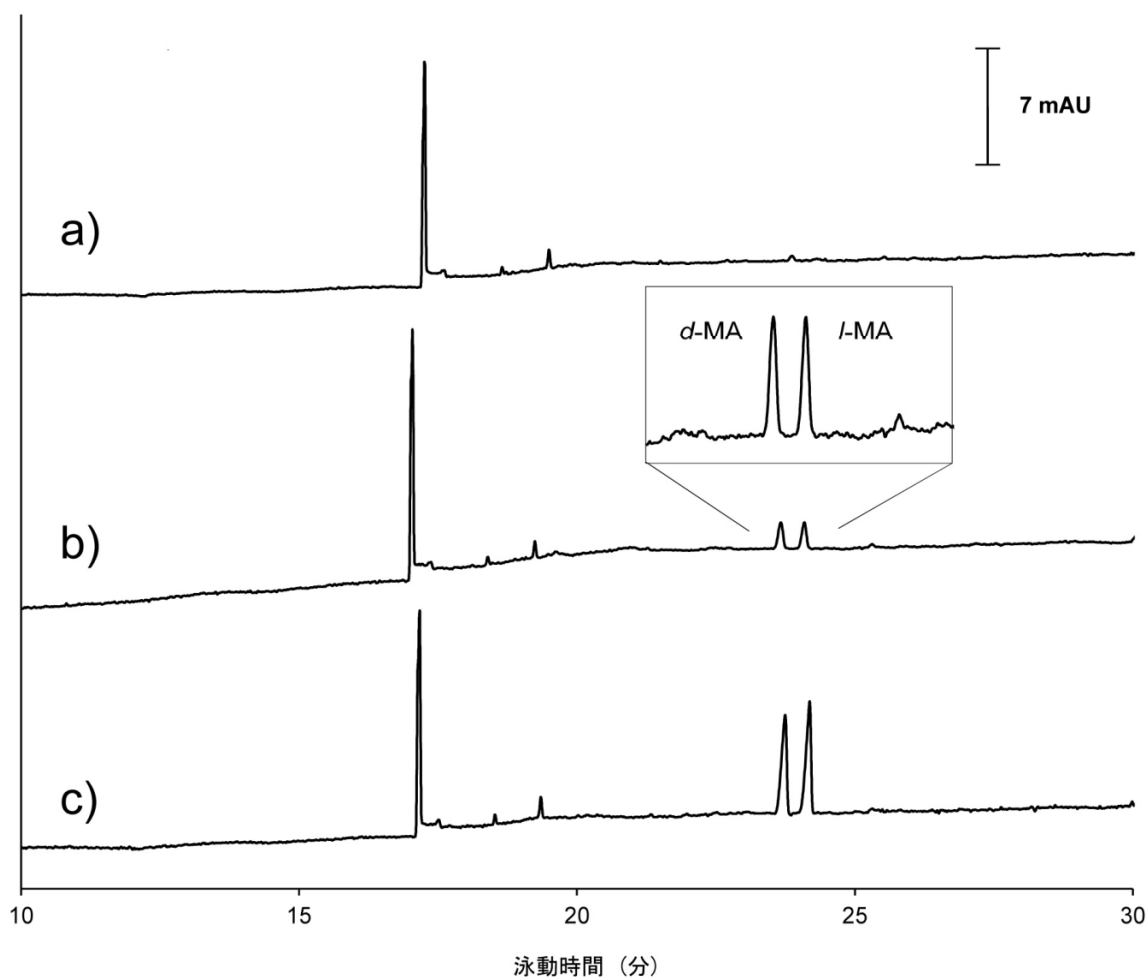


図8 ブランク毛髪を用いた実験から得られたエレクトロフェログラム。

MA 添加量 : a) 添加なし、b) 0.2 ng/mg、c) 1 ng/mg。

るため、ブランク毛髪に MA の標準品を適量添加し、前処理を施したのちに本法により分析した。その結果、添加濃度 0.2 ng/mg、1 ng/mg (毛髪中覚せい剤濃度として) のいずれにおいても、MA のピークがキラル分離して明確に検出された (図 8)。このことは、本研究で用いた毛髪の前処理法が夾雑物の除去に有効であることを示しており、本処理法を利用することで、毛髪中覚せい剤の分析が可能になると考えられた。また、生体試料中の覚せい剤分析法を構築する場合、「この濃度以上のものは検出できなければならない」といったカットオフ値を考慮しなければならない。毛髪中の覚せい剤分析については、Society of Hair Testing が

カットオフ濃度 0.2 ng/mg を推奨しており[12]、この濃度の試料が分析可能かどうか、適切な分析法確立における一つの指標となる。本実験結果においては、当該濃度の試料において明確に MA が検出されており、検出感度が十分確保されていることが確認された。

最後に、本法により覚せい剤摂取者の毛髪を分析し、その有用性を確認した (図 9)。d-MA、l-MA に加え、d-MA の代謝物である d-AM が検出され、実試料の分析に本法が応用可能であることが示された。各ピークの帰属については、実試料から調製したサンプルを適宜希釈し、これに標準品を加えて測定することで行った。得られた各ピークの

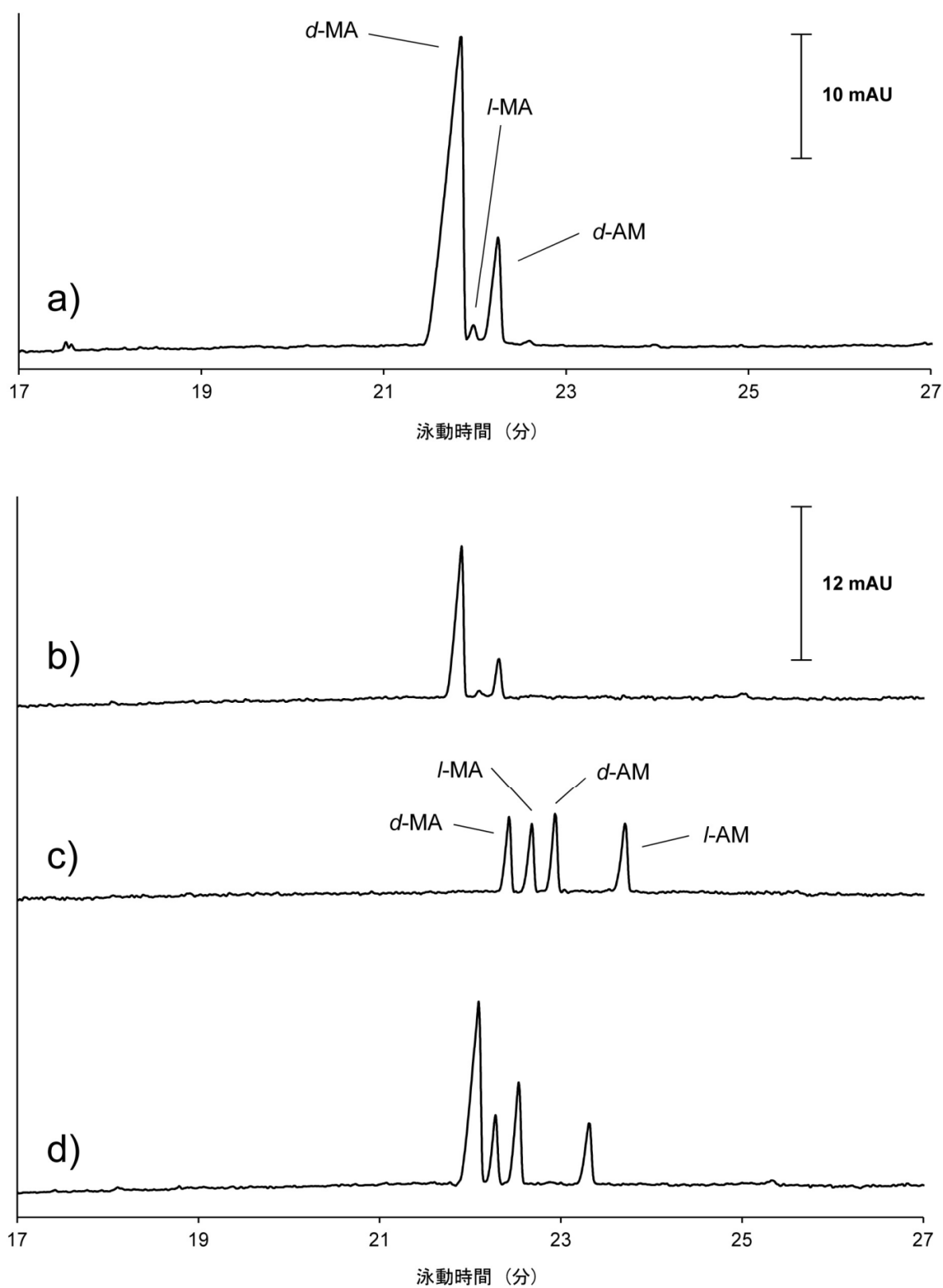


図9 覚せい剤摂取者の毛髪分析から得られたエレクトロフェログラムと各ピークの帰属法。

- a) 毛髪分析から得られた結果。b) a)の試料を5倍希釈して得られた結果。
 c) 標準品溶液の測定から得られた結果 (各 1 ng/mL)。d) b)と c)を足した試料から得られた結果。

強度は (図 9d)、標準品を加える前の測定で得られた各ピークの強度と(図 9b)、標準品溶液の測定で得られた各ピークの強度 (図 9c) を足したものと一致し、それぞれのピークの由来を帰属することが可能であった。

4. 結論

CE を用いた毛髪中覚せい剤のキラル分析法を新たに構築するため、オンライン濃縮法である CSEI-sweeping-MEKC 法をベースとし、これにキラル選択剤を加えることで測定条件の検討を行った。その結果、キャピラリーの両端に位置するミセル溶液に HS- γ -CD を添加することで、高濃縮とキラル分離が同時に達成されることがわかり、そのメカニズムについても知見を得ることができた。また、覚せい剤摂取者の毛髪を分析したところ、含有される微量覚せい剤がキラル分離して明確に検出され、本法が実試料の検査に応用可能であることが示された。今後、さらなる実試料の分析からデータを蓄積し、本法の有用性を確認していく予定である。

5. 文献

- [1] 警察白書 (平成 23, 24 年版), 警察庁.
- [2] “ 薬毒物試験法と注解 2006 ”, 日本薬学会編, 東京化学同人 (2006).
- [3] Quirino, J. P., Terabe, S., *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1023-1030.
- [4] Nunez, O., Kim, J. B., Moyano, E., Galceran, M. T., Terabe, S., *J. Chromatogr. A*, 2002, 961, 65-75.
- [5] Meng, P., Fang, N., Wang, M., Liu, H., Chen, D. D. Y., *Electrophoresis*, 2006, 27, 3210-3217.
- [6] Fang, N., Meng, P., Zhang, H., Sun, Y., Chen, D. D. Y., *Analyst*, 2007, 132, 127-134.
- [7] Ibrahim, W. A. W., Hermawan, D., Sanagi, M. M., *J. Chromatogr. A*, 2007, 1170, 107-113.
- [8] Liu, Y., Fu, X., Ma, C., Zhong, J., Liao, Y., Liu, H., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 393, 321-326.

- [9] Silva, M., *Electrophoresis*, 2013, 34, 141-158.
- [10] Wang, Z., Liu, C., Kang, J., *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 1775-1779.
- [11] Petr, J., Ginterova, P., Znaleziona, J., Knob, R., Lostakova, M., Maier, V., Sevcik, J., *Cent. Eur. J. Chem.*, 2013, 11(3), 335-340.
- [12] Society of Hair Testing, *Forensic Sci. Int.*, 2004, 145, 83-84.