

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-52322

(P2014-52322A)

(43) 公開日 平成26年3月20日 (2014. 3. 20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/62 (2006. 01)	GO 1 N 27/62 Y	2 G O 4 1
GO 1 N 33/50 (2006. 01)	GO 1 N 33/50 H	2 G O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	GO 1 N 33/48 R	2 G O 5 2
GO 1 N 1/04 (2006. 01)	GO 1 N 1/04 X	
GO 1 N 27/64 (2006. 01)	GO 1 N 27/62 V	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-198042 (P2012-198042)
 (22) 出願日 平成24年9月10日 (2012. 9. 10)

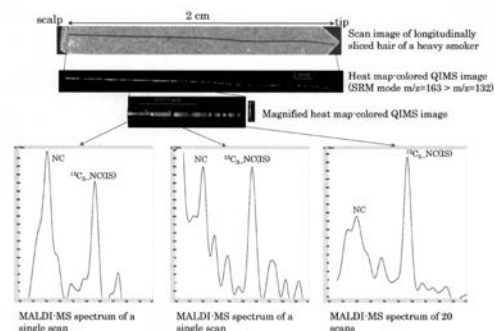
(71) 出願人 502437894
 学校法人大阪医科大学
 大阪府高槻市大学町2番7号
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72) 発明者 中西 豊文
 大阪府高槻市大学町2-7 学校法人大阪
 医科大学医学部総合医学講座・臨床検査医
 学内
 Fターム(参考) 2G041 CA01 DA04 EA12 FA10 FA22
 GA06 JA08 LA08
 2G045 BB22 BB46 CB16 DA80 FB07
 2G052 AA28 AB16 AD12 AD32 AD52
 BA16 EC03 GA24

(54) 【発明の名称】 毛髪中に含まれる生理活性物質の解析方法

(57) 【要約】

【課題】毛髪の成分を定量的かつ連続的に解析する。
 【解決手段】毛髪中に蓄積された生理活性物質の解析方法であって、以下の工程
 工程1：毛髪を長軸方向にスライスし、髄質を露出させる工程
 工程2：工程1で露出した表面に内部標準物質を適用する工程
 工程3：工程2で得られた表面についてイメージング質量分析 (IMS) を行い、毛髪中の生理活性物質を連続的かつ定量的に検出する工程
 を含むことを特徴とする、毛髪中に蓄積された生理活性物質の解析方法。

【選択図】 図1d



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

毛髪中に蓄積された生理活性物質の解析方法であって、以下の工程

工程 1：毛髪を長軸方向にスライスし、髄質を露出させる工程

工程 2：工程 1 で露出した表面に内部標準物質を適用する工程

工程 3：工程 2 で得られた表面についてイメージング質量分析 (IMS) を行い、毛髪中の生理活性物質を連続的かつ定量的に検出する工程

を含むことを特徴とする、毛髪中に蓄積された生理活性物質の解析方法。

【請求項 2】

前記生理活性物質が違法薬物である、請求項 1 に記載の解析方法。

10

【請求項 3】

IMS が MALDI-TOFMS を用いて行われる、請求項 1 又は 2 に記載の解析方法。

【請求項 4】

工程 1 の毛髪のスライスをマイクロームにより行う、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の解析方法。

【請求項 5】

工程 1 の毛髪のスライスを凍結及び固定された毛髪に対して行う、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の解析方法。

【請求項 6】

IMS が走査型 IMS である請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の解析方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、毛髪中の生理活性物質のイメージング技術に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、毛髪中の薬物・嗜好品等の測定は、数十本の毛髪から対象物質を抽出・濃縮後、クロマトグラフィー/質量分析計にて定量測定されて来た。しかし、その測定結果は非連続/一定期間平均値であり、外部汚染/受動摂取の可能性を完全に回避する事はできなかった。

30

【0003】

特許文献 1 は、毛髪を溶媒抽出して毛髪中の生理活性物質を分析する方法を記載する。

【0004】

非特許文献 1 は、毛髪中のメタアンフェタミンのバーコード状の分析を記載する。

【0005】

非特許文献 2 は、毛髪中のコカインの分析を記載する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】特開2008-232674

40

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献 1】J. Mass Spectrometry, 46, 411-416, 2011.

【非特許文献 2】Anal. Chem., 83(11): 4266-72, 2011

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

特許文献 1 は、非連続かつ定性的な化学物質の分析のみが可能である。

【0009】

非特許文献 1, 2 によれば、毛髪中のメタアンフェタミン、コカインなどのバーコード

50

状の分析は可能であるが、定量的な分析はできないので、違法薬物使用の証拠として不十分であった。

【0010】

本発明は、毛髪中の生理活性物質を使用時期と使用量を特定できる分析技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、以下の毛髪の解析方法を提供するものである。

項1．毛髪中に蓄積された生理活性物質の解析方法であって、以下の工程

工程1：毛髪を長軸方向にスライスし、髄質を露出させる工程

工程2：工程1で露出した表面に内部標準物質を適用する工程

工程3：工程2で得られた表面についてイメージング質量分析（IMS）を行い、毛髪中の生理活性物質を連続的かつ定量的に検出する工程

を含むことを特徴とする、毛髪中に蓄積された生理活性物質の解析方法。

項2．前記生理活性物質が違法薬物である、項1に記載の解析方法。

項3．IMSがMALDI-TOFMSを用いて行われる、項1又は2に記載の解析方法。

項4．工程1の毛髪のスライスをマイクロームにより行う、項1～3のいずれかに記載の解析方法。

項5．工程1の毛髪のスライスを凍結及び固定された毛髪に対して行う、項1～4のいずれかに記載の解析方法。

項6．IMSが走査型IMSである項1～5のいずれかに記載の解析方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、マイクロームなどの装置を用いて毛髪を長軸方向にスライスすることで、毛髪中の生理活性物質を解析できるため、毛髪試料の作製が迅速であり、再現性もよい。生理活性物質の解析に白髪、染毛、くせ毛、長さ、太さなどの毛髪の性状は無関係であり、表面の汚染物質の影響を受けない。

【0013】

毛髪の空間的解像度は約50 μ mであり、これは毛髪の2～3時間の成長に相当する。すなわち、生理活性物質の連続的な解析を2～3時間単位で行うことができ、麻薬、覚醒剤などの違法薬物の使用履歴を正確に反映させることができ、裁判においても十分な証拠能力を有する。

【0014】

本発明で解析される生理活性物質は、違法薬物、医薬品、嗜好品（ニコチン等）など生体外から摂取する化学物質に限らず、生体内タンパク質/ペプチド/脂質/核酸などが含まれ、毛髪中に蓄積し得る生理活性物質を広く解析することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1a】凍結ユニットを備えた回転式マイクロームシステムTMにより調製された毛髪表面でのニコチン（NC）の定量的質量バーコード状イメージング（QMBI）無傷の毛髪、手動のスクラッチ及び機械的にスライスした毛髪の電子顕微鏡写真

【図1b】凍結ユニットを備えた回転式マイクロームシステムTMにより調製された毛髪表面でのニコチン（NC）の定量的質量バーコード状イメージング（QMBI）SRMモードにおけるNC及びNC-¹³C₃のMALDI-TOFマススペクトル

【図1c】凍結ユニットを備えた回転式マイクロームシステムTMにより調製された毛髪表面でのニコチン（NC）の定量的質量バーコード状イメージング（QMBI）1 ng/mL～50 ng/mLのNC含量における検量線。3重測定（ \bar{x} 、 s 、 σ ）で、平均値が「X」を意味する。

【図1d】凍結ユニットを備えた回転式マイクロームシステムTMにより調製された毛髪表面でのニコチン（NC）の定量的質量バーコード状イメージング（QMBI）ヘビースモーカ

10

20

30

40

50

ーの2cm長の長さ方向にスライスした毛髪のNCのQIMS及びMALDI-TOFマスペクトル。QIMSイメージの着色したヒートマップは、50 μm毎の空間的解像度でのNC含量の追跡可能性を示す。

【図2 a】スライスされた毛髪試料のNC含量のQIMSイメージの着色したヒートマップ 7名の常用ヘビースモーカー及び3名の非喫煙者からの長さ方向にスライスされた毛髪におけるQIMSイメージの着色したヒートマップ

【図2 b】スライスされた毛髪試料のNC含量のQIMSイメージの着色したヒートマップ Comparison of QIMS images between 3名のヘビースモーカーの長さ方向にスライスされた毛髪及び無傷の毛髪のQIMSイメージの比較 (HS-3, 8及び10)

【図3】3処理法(未処理、スポンジ研磨材による剥離法、マイクロトームによる超薄切法)での比較

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、試料として毛髪の超薄切断面を使用し、手段として質量イメージング(IMS)を組み合わせることで毛髪内に存在・蓄積した生理活性物質の連続追跡を可能にする。

【0017】

毛髪は、毛髄質(メデュラ)の周囲にコルテックス領域、さらに最外層にキューティクル領域がある。本発明の方法において、毛髪は、毛髄質(メデュラ)が露出するまでキューティクル領域とコルテックス領域を長軸方向にスライスする。この操作の前に毛髪の表面に付着した汚染物質を洗浄するための洗浄工程を行ってもよいが、毛髪表面に付着した汚染物質は、毛髪の表面をスライスするときに同時に除かれるので、毛髪の洗浄操作は必ずしも行う必要はない。

【0018】

毛髪の長軸方向のスライス工程は、マイクロトームを用いて行うことができる。マイクロトームとしては、例えばガラスナイフを装着したマイクロトームが例示できる。毛髪をスライスする装置はマイクロトームに限定されず、毛髪を非常に薄くスライスできる装置であれば全て使用可能である。本発明では毛髪中の生理活性物質を連続的かつ定量的に解析するので、スライスは高精度で行い、毛髪の髄質の部分が均質にスライス表面に露出していることが好ましい。

【0019】

毛髪のスライス操作は、凍結させた毛髪をマイクロトームなどに固定して行うのが好ましい。毛髪をパラフィンなどに包埋後にマイクロトームを使用すると、IMSの際にパラフィンなどのピークが強くなるため、目的物質の定量が難しくなる。

【0020】

次に毛髄質(メデュラ)が露出した毛髪に対し、標識された内部標準物質を含む溶液を噴霧などによりアプライした後、イメージング質量分析(IMS)を行う。IMSは、走査型IMSが好ましい。内部標準物質の標識は、 ^{13}C により好ましく行うことができるが、 ^{15}N 、 ^{17}O などの他の安定同位体により標識した内部標準物質を用いてもよい。標識された内部標準物質は、MALDIなどのマトリクス支援レーザーイオン化方法を用いる場合には、マトリクスと一緒にスライスした毛髪にアプライすることが好ましい。

【0021】

IMSで、毛髪中の目的物質と標識された目的物質の比を求めることで、目的物質の定量を行うことができる。

【0022】

毛髪は50 μm成長するのに2~3時間かかり、1mmでは40~60時間、20mmでは800~1200時間(約33日~50日)の生理活性物質の使用履歴を解析するため、違法薬物を含む嗜好品/医薬品等の使用履歴を立証できる。また、毛髪内に移行・蓄積する生理活性物質であれば、連続的/経時的に定量することができる。その結果、疾患起因/関連分子が生体内でどの程度の量でどの程度の期間存在したのかについても解析できる。

10

20

30

40

50

【0023】

本発明に使用する試料としてはヒトの頭髪が最も好ましいが、頭髪以外の体毛（陰毛、脇毛、睫毛、眉毛、髭など）や、牛、馬、犬、猫、マウス、ラットなどの動物毛も「毛髪」に含まれる。本発明は、1本の毛髪で毛髪中の生理活性物質を十分に定量及び連続的に解析することができる。

【0024】

本発明により解析可能な毛髪中の物質は、特に限定されないが、例えば、覚せい剤、麻薬、向精神薬、違法薬物、スポーツドーピング規制薬物、あるいはその他の薬物、特に法規制薬物もしくはその代謝物、タンパク質（酵素、ホルモン、受容体、サイトカインなど）、ペプチド（ホルモンなど）、脂質（中性脂肪、ワックス、セラミド、リン脂質、スフィンゴリン脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質、リポタンパク質、スルホ脂質、テルペノイド、ステロイドなど）が例示される。また、農薬、動植物毒物、環境汚染物質、有害元素、放射性物質、その他の有害物質や毒物も例示される。より具体的には、たとえば、覚せい剤であるメタンフェタミンおよびアンフェタミン、麻薬であるMDMA、MDA、モルヒネ、コカインおよびヘロイン、大麻成分であるTHC、医薬品であるトリアゾラムおよびジアゼパム、スポーツドーピング禁止薬物であるテストステロン、メタノール摂取の指標となるエチルグルクロニド、農薬であるメソミル、MEPおよびパラコート、動植物毒であるテトロドトキシンおよびアコニチン、環境汚染物質であるダイオキシン、PCBおよびベンゼン、有害元素であるヒ素、水銀、鉛およびタリウム、化学兵器や放射性物質、ニコチンなどのその他の有害物質、並びにこれらの代謝物等が挙げられる。

10

20

【実施例】

【0025】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

実施例 1

(1) 毛髪表面の洗浄

毛髪（2cm程度）を栓付き試験管に入れ、

- 1) 0.5% SDS溶液中で1分間超音波洗浄後、SDS溶液を吸引
- 2) 精製水中で1分間超音波洗浄後、精製水を吸引
- 3) メタノールで1分間超音波洗浄後、メタノールを吸引
- 4) 2) 3) を2回繰り返す
- 5) 洗浄毛髪を試験管より取り出し、キムワイブ上で乾燥

30

【0026】

(2) 毛髪処理法

1) スポンジ研磨材による剥離法（従来法）

* 洗浄毛髪の両端を固定し、スポンジ研磨材（住友スリーエム（株）：超極細目#1500）で実体顕微鏡下、観察しながら表面キューティクルを擦り取る（25回程度）。

* 髄が顕微鏡下で確認出来た時点で終了し、湿らせた脱脂綿等で表面のゴミを軽く拭き取る。

* ITOスライドガラス（Bruker Daltonics社：237001）に導電性両面テープ（日東電気（株）：No.5601）を張り付け、その上に擦り面が上になる様に毛髪をしっかりと固定し、IMS解析に供する。

40

2) ミクロトームによる超薄切法（本発明法）

* 洗浄毛髪を導電性両面テープ（日東電気（株）：No.5601）に張り付け、ガラススライドに固定し、生物試料凍結ユニット（（株）日本ミクロトーム研究所）を用いて毛髪を氷結（-20℃）させる。

* 生物試料凍結ユニットを実体顕微鏡付き手動式ミクロトームシステム（（株）日本ミクロトーム研究所）に取り付け-20℃下、ガラスナイフにて2μm毎凍結毛髪を削いで行く。

* 実体顕微鏡で観察しながら髄が出現した時点で、終了する。平均ヒト毛髪直径を100μmと仮定すると、25サイクル（2μm×25=50μm）すればよい。

50

* 終了後、生物試料凍結ユニットを室温に戻し、導電性両面テープ上の水滴を軽く拭き取った後、ユニットからガラススライドを取り外す。

* ガラススライド上の導電性両面テープを慎重に剥がし、ITOスライドガラスに移し、IMS解析に供する。

【 0 0 2 7 】

(3) 毛髪断面走査定量質量イメージング解析法

1) MALDI-TOFMS機器

使用機器 : Autoflex speed (Bruker Daltonics社製smart beamII)

SRM定量解析 : モニターイオンはParent ion:163.2>Fragment ion:132.2

NCは $m/z=132.2$ 、 $^{13}\text{C}_3\text{-NC}$ は $m/z=135.2$ をモニターし、 $132.2 / 135.2$ のピーク高さ比より定量する。 10

2) マトリックス

シアノ-4-ヒドロキシ安息香酸 (CHCA: SIGMA社製c2020、Lot No : MKBH1245V) を0.2 %トリフルオロ酢酸 / 50%アセトニトリル溶媒にて7mg/mLに調整し、ImagePrepTM (Bruker Daltonics社製) にて毛髪断面に噴霧する。

3) 内部標準物質

$^{13}\text{C}_3\text{-NC}$ (CIL社 : CLM-3914-0.1) のメタノール溶液を希釈し、上記CHCA溶液に終濃度50ng/mL添加し、マトリックスと共に毛髪断面上に噴霧する。

4) ImagePrep操作

Bruker Daltonics社指定のファイル「HCCA_nsh05」にて噴霧操作を実施。 20

5) 定量計算

毛髪1cm長 ($=0.04\text{mm}^3$) のピーク高さ比から「pg/mg Hair」値を算出

$$\text{計算式} = (132 / 135) \times 25 \times 50$$

【 0 0 2 8 】

(4) 結果

1) 本法でのNC値の再現性 (長期喫煙者毛髪 : >30本 / 日、>20年間)

9.5 +/- 1.2 ng/mg Hair

34.5 +/- 2.8 ng/mg Hair CV =10%前後

2) 従来法との比較 : NC溶液 (0.1、1.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$) を添加した非喫煙者毛髪

本法 : 0.22、0.36 ng/mg (従来法 : 0.21 ng/mg)

0.60、1.13 ng/mg (従来法 : 0.97 ng/mg) 30

3) 3処理法 (未処理、スポンジ研磨材による剥離法、マイクロームによる超薄切法) での比較 (図 3) 試料毛髪 : NC 1.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 添加毛髪

未処理法 : 0.23 ng/mg

剥離法 : 0.58 ng/mg

超薄切法 : 1.13 ng/mg

結果を表1及び図1～3に示す。

【 0 0 2 9 】

【表 1】

NC contents in longitudinally sliced hairs by QIMS

Sample	Sex	*NDCC	History	Color	NC contents (ng/mg hair)
**HS-1	F	10	>20y	Brown	15
-2	F	20	>20y	Black	4
-3	M	20	>20y	Black	26
-4	M	20	>20y	Black	21
-5	F	10	>15y	Brown	7
-6	M	20	>50y	White	7
-7	F	20	>40y	Brown	15
-8	M	20	>20y	Black	34
-9	M	20	>20y	Black	20
-10	M	30	>20y	Black	53
-11	M	30	>20y	Black	71
-12	M	10	>40y	Black	2
-13	F	20	>20y	Brown	8
-14	F	20	>20y	Brown	5
-15	M	20	>35y	White	2
***NS-1	M	0	0	Black	<0.1
-2	F	0	0	Black	<0.1
-3	F	0	0	Black	<0.1
-4	M	0	0	Black	<0.1
-5	M	0	0	Black	<0.1
-6	F	0	0	Brown	<0.1
-7	F	0	0	Brown	<0.1

*NDCC : Number of daily consumed cigarettes;

HS : heavy smoker; *NS : non-smoker

NC contents calculated as follows;

$$NC (ng/mg) = (\text{peak height ratios of NC/NC}^*) \times 50 \times 10$$

【0030】

Table 1. 15名のヘビースモーカーと7名の非喫煙者の長さ方向にスライスした毛髪サンプルにおけるNC含量 (ng/mg hair)

【0031】

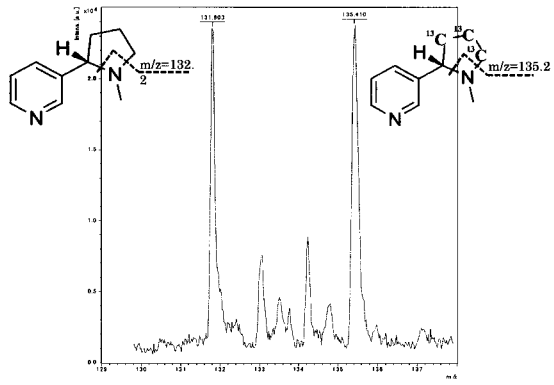
(5) 考察

今回、標識安定同位体を内部標準に用い、毛髪断面走査定量イメージング解析法を新規開発し、喫煙者毛髪中ニコチン (NC) 定量に応用した。本法は、毛髪表面のキューティクル層をガラスナイフ付きマイクロームにて剥ぎ落とし、NC特有のMSイオン (m/z=163 / 132) を指標に毛髪断面 (超薄切) 上を連続走査することで時間毎 / 数ヶ月間NC値の連続追跡が出来き、更に標識安定同位体 ($^{13}\text{C}_3\text{-NC}$: m/z=166 / 135) を内部標準とし、高精度・高感度定量測定が可能となった。

【0032】

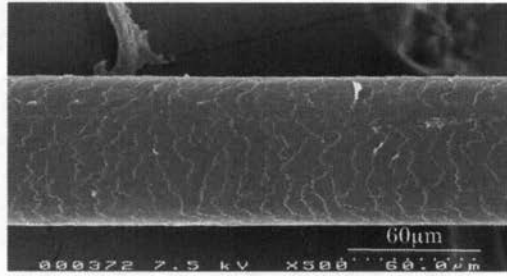
本法は、NC以外に医薬品・嗜好品・補助食品・化粧品等、非生体分子からタンパク質・ペプチド・糖質・脂質などの生体分子までその応用範囲は広く、更に人毛以外に実験動物体毛にも適用可能。

【 図 1 b 】

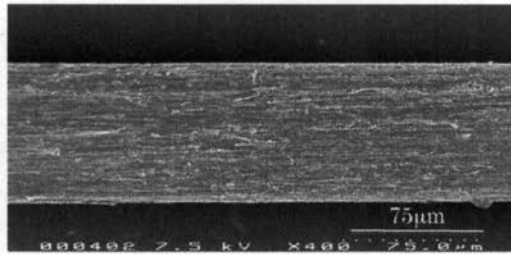


【 図 1 a 】

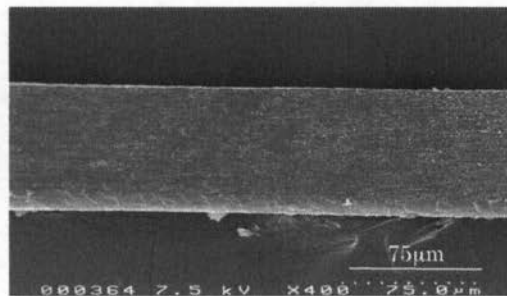
Intact Hair



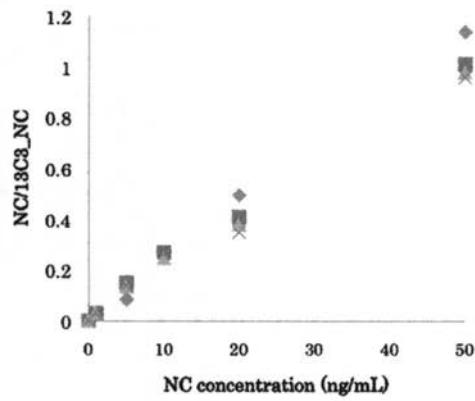
Manual scratching



Mechanical slicing

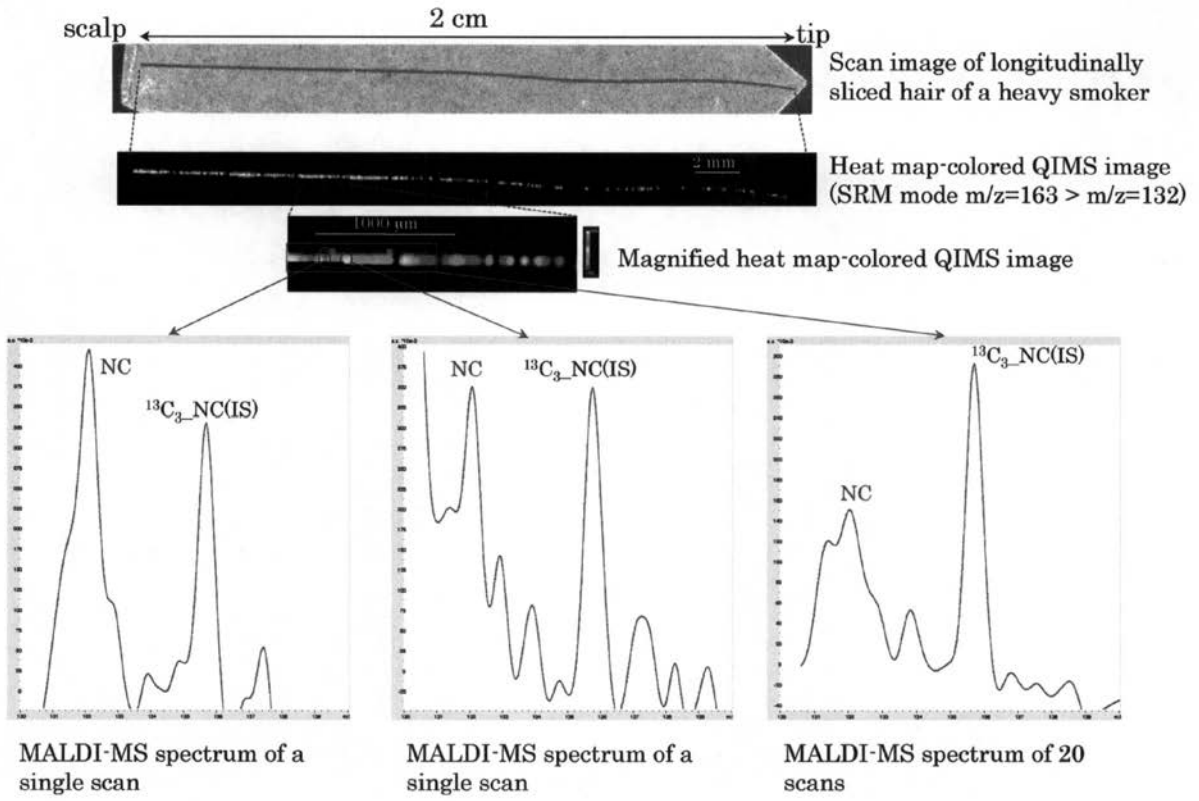


【 図 1 c 】

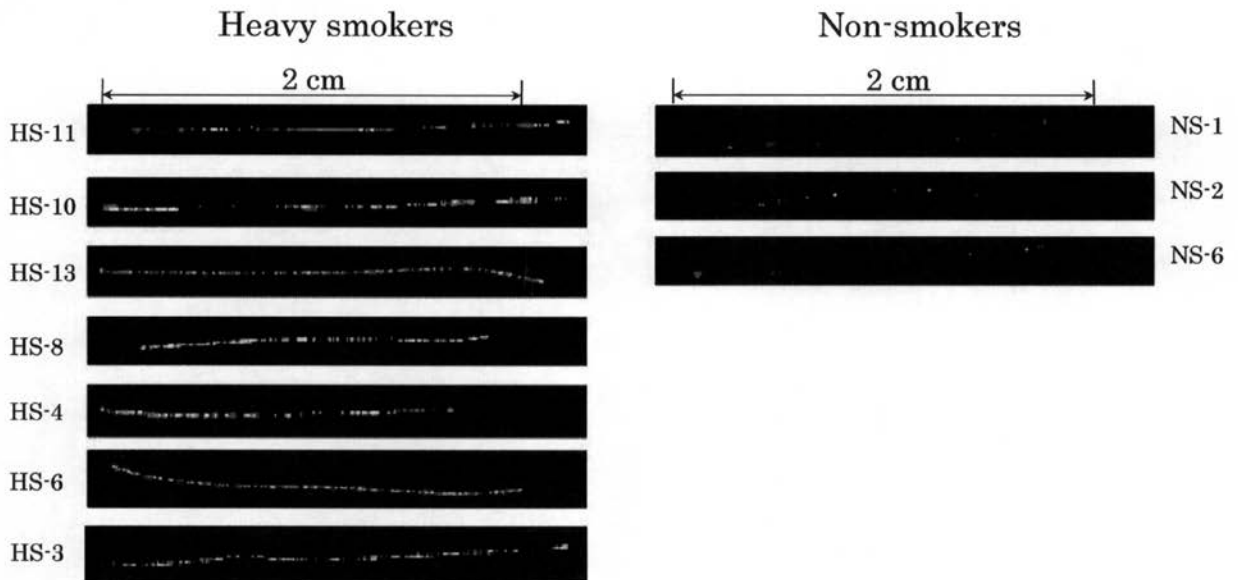


Calibration curve of NC
($y=0.0201X + 0.0225$)

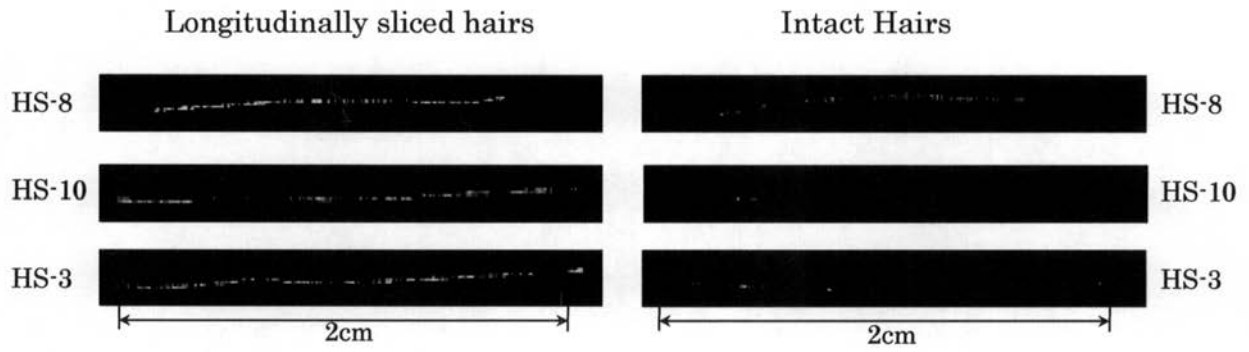
【 図 1 d 】



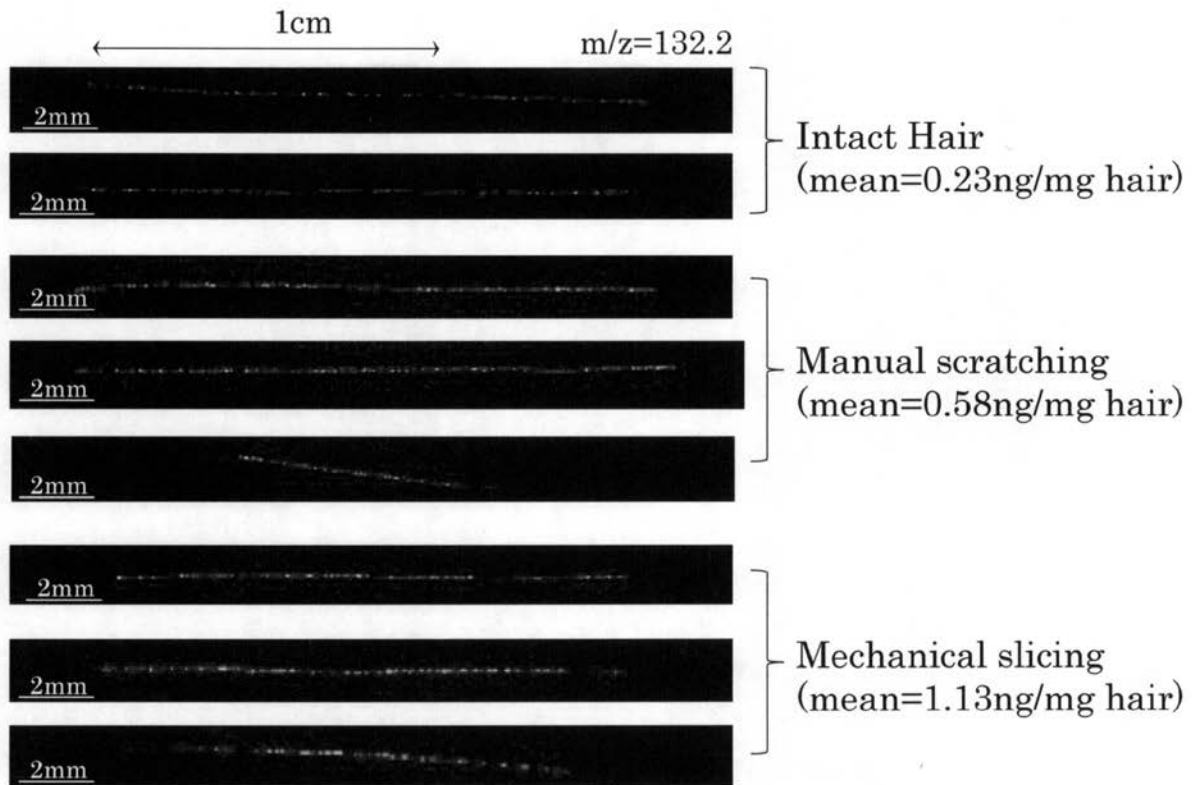
【 図 2 a 】



【 図 2 b 】



【 図 3 】



Heat-map colored QIMS images ($m/z=132.2$) of NC ($1\mu\text{g/mL}$) added hairs prepared with three different treatments.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 27/64

B

G 0 1 N 27/62

K

G 0 1 N 27/62

F