

Application News

No. B75

イメージング質量顕微鏡

モデル毛髪試料中の薬物イメージング - 薬物摂取履歴の観察に向けて -

イメージング質量分析法は様々な分野で、ますます盛んに活用されています。毛髪は成長する際に、その時に摂取した薬物を極微量ずつ取り込んでいくため、薬物の使用歴を記録した「磁気テープ」的な試料として注目を浴びています。実際、毛髪から抽出した薬物の分析がLCMSなどを用いて行われていますが、抽出操作によって毛髪中における分布情報が損なわれる点が問題となっていました。毛髪の長さ方向の断面のイメージング質量分析が可能となれば、その成長に沿った薬物の分布状況、すなわち使用履歴の可視化が実現し、法医学、臨床医学、投薬管理及び科学捜査等の分野での活用が大いに期待されます。

E. Matsuo, T. Yamamoto

■ 薬物摂取モデル毛髪試料の作製

モデル化合物（分析対象）として、覚せい剤（メタンフェタミン）に構造の類似する、市販の咳止め薬の成分であるメトキシフェナミン（MOP）を選定しました（図1）。本来は、経口摂取した薬物が血液循環により毛根や頭皮まで運ばれてから毛髪に取り込まれたものを観察するところ、表1に示すプロトコルに従ってMOPを添加した「モデル毛髪試料」を作成しました。具体的には、薬物を摂取していない人の毛髪をMOP水溶液（複数濃度に調製）に浸漬して物理的に吸収させることにより、高濃度（A）、低濃度（B）のモデル毛髪試料、及びMOPを含まない水で処理した陰性コントロール試料（C）を作成し、分析に供しました。

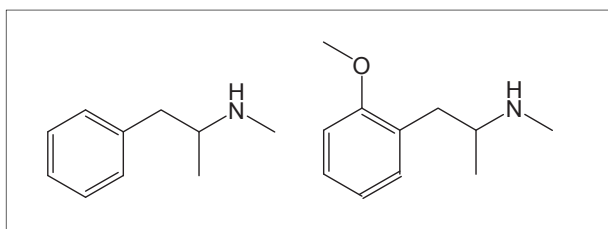


図1 メタンフェタミン（左）・メトキシフェナミン（MOP）（右）の構造式

表1 モデル毛髪作成のプロトコル

MOP（メトキシフェナミン塩酸塩水溶液）を下記の濃度に調整	
試料 A :	100 μ g/mL
試料 B :	10 μ g/mL
試料 C :	0 μ g/mL (negative control)
毛髪を 2 cm 程度に切断	
↓	
毛髪 50-100 本程度を上記溶液に浸漬	
↓	
37 °Cにて 24 時間静置（途中、1-2 回攪拌）	
↓	
これら毛髪を試験法*に従って洗浄	

* 薬毒物試験法と注解 2006 -分析・毒性・対処法-【7・2・4 毛髪試料からの試験（メタンフェタミンおよびその代謝物の試験）】

■ モデル毛髪試料の前処理と定量評価

モデル毛髪試料 A 及び B の表面を洗浄した後、試験法*に従って MOP を抽出し、液体クロマトグラフィーによって分析しました。その結果、毛髪中の MOP の含有量は、モデル毛髪試料 A では 83.1 ng/mg、B では 20.0 ng/mg と定量され、実際に MOP や覚せい剤を摂取したヒトの毛髪検体からの検出濃度として報告されている値と大きな乖離がないことが確認されました。

■ メトキシフェナミン標準品の分析

モデル毛髪試料の分析に先立って、MOP の標準溶液（50 pmol/mL）を用いて、ドロップレットの質量分析を行いました（図2）。マトリックスとして汎用されている CHCA を用いて測定したところ、 $[M+H]^+$ に相当する m/z 180.14 にピークが観察されました（図2上▼）。これを precursor として MS/MS 測定を行って得られたスペクトルが図2下になります。今回は、今後の実検体への適用を念頭に、特異性の高い MS/MS 測定（ m/z 180.14 > 149.10）によりイメージング質量分析を行いました。

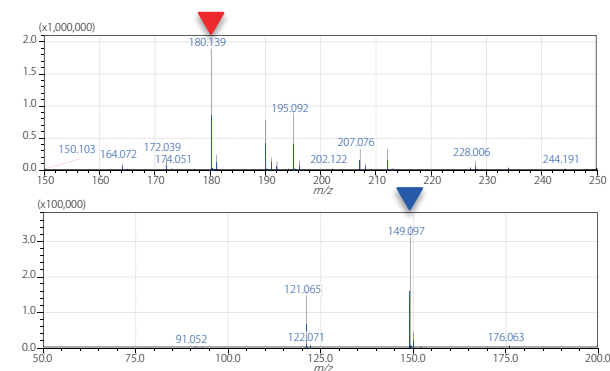


図2 メトキシフェナミン（MOP）標準品の MS（上）および、MS/MS（下）におけるマススペクトル



図3 iMScope TRIO（左）と iMLayer（右）

表2 イメージング質量分析の測定条件

測定ピッチ (空間分解能)	: 10 / 50 [μm]
イオン種	: 正イオン
測定範囲	: Precursor m/z 180.14 \rightarrow m/z 50 ~ 190
積算回数	: 2 [回/pixel]
サンプル電圧	: 3.50 [kV]
検出器電圧	: 2.0-2.1 [kV]
レーザー照射回数	: 50-100 [shots]
レーザー周波数	: 1000 [Hz]
レーザー照射径設定値	: 1 (約 10 μm) / 4 (約 50 μm)
レーザー強度	: 21.7-30.0 / 56.4-63.0

■ イメージング質量分析用毛髪切片の作製と分析結果

モデル毛髪を導電性両面テープを用いて固定し、マイクロームで慎重にスライスを進めていき、毛髪の直径のおよそ半分程度まで削ぎ落とすことにより、毛髪の縦割り切片としました。これに iMLayer (図3右) で CHCA を蒸着したうえ、iMScope TRIO (図3左) を用いて表2に示す条件で測定を行いました。

まず、比較的大きなレーザー径 (50 μm) で測定を行い、全体的なイメージング像を取得しました (図4)。光学画像で毛髪が見られるところにのみ目的の m/z にピークが検出され、陰性コントロール試料では薬剤由来のシグナルが見られないことも確認できました (図4c)。毛髪は、表面から順に、キューティクル (Cuticle)、皮質 (Cortex)、髄 (Medulla) という三重構造よりなっています。しかし、50 μm の空間分解能では、直径 50~150 μm とされる毛髪内の構造別局在を分析することはできません。一方、iMScope TRIO の誇る高空間分解能 (レーザー径の最小設定 5 μm) で測定を行えば、さらに詳細な薬物の分布 (局在) が可視化できると期待されます。そこで次に、レーザー径 10 μm での測定を行いました (図5)。その結果、今回作成した添加毛髪では、キューティクルから皮質にかけて薬剤が局在しており、中心部の髄にはほとんど分布しないことが判明しました。

上記で用いた「蒸着法」は、高い空間分解能を保ったままの測定が可能となる反面、感度的には不利となる場合もあります (アプリケーションニュース No. B62 参照)。そこで、この試料に対して「二段階法」として蒸着後に更にスプレーを追加する方法でマトリックスを塗布し、イメージング測定を行いました。その結果、図6に示すように、検出シグナルの強度 (BGのピークで補正後の値) は約 3~6 倍向上し、薬物の局在状況をより明瞭に画像化することができました。

■ 考察

今回、添加毛髪サンプルを用いて、高空間分解能でのイメージング質量分析を行い、毛髪中薬物の分布を示す詳細なイメージング像を得ることができました。

毛髪は、成長する際に、血液中の薬物等を毛根部で取り込みながら、1ヶ月で約1cmの速度で成長します。そのため、毛髪は薬物の使用歴を記録した磁気テープにも例えられ、法医学や科学捜査に活用されてきましたが、今後は投薬管理、ドーピング検査等、より広い分野への応用が期待されます。

さらに、本アプリケーションニュースに記載の添加毛髪試料の作成方法は、シャンプー、トリートメント、整髪料や毛染めといった頭髪ケア製品の使用状況とも共通点が多いため、上記の分析技術は、これら製品の開発と評価、さらには髪美容・健康の向上にも貢献するものと考えています。

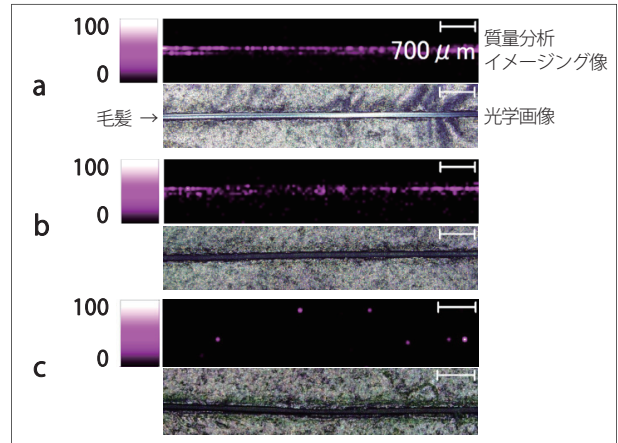


図4 レーザー径 50 μm での毛髪試料 A (a)、試料 B (b)、試料 C (c)、それぞれの薬剤イメージング

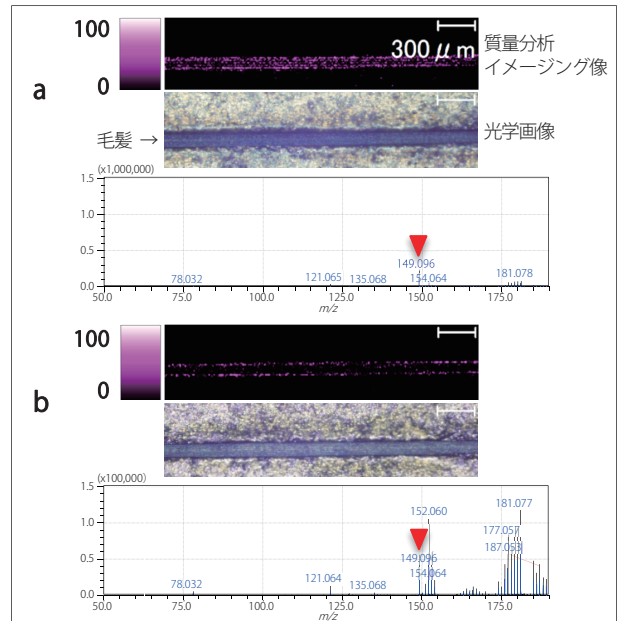


図5 レーザー径 10 μm での毛髪試料 A (a) および試料 B (b) の薬剤イメージング

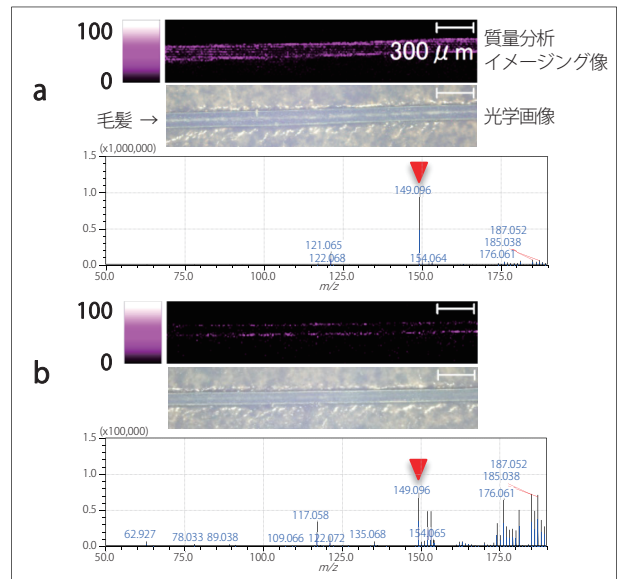


図6 二段階法 (蒸着+スプレー) によるレーザー径 10 μm での毛髪試料 A (a) および試料 B (b) の薬剤イメージング