

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10689

研究課題名（和文）エタノール依存症マーカーを用いた法医解剖例の飲酒状況推定法の開発

研究課題名（英文）Estimation of ethanol history using alcoholic marker

研究代表者

中前 琢磨（Nakamae, Takuma）

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：20453409

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：法医検体における生前のエタノール摂取歴の詳細な推定を可能にするために、LC-QTOF-MSによるエタノール抱合体の簡易同時分析法の検討および、先行研究において法医検体への有用性を示した尿中5-HTOL/5-HIAA比の腐敗症例への影響の検討を行った。エタノール抱合体の分析はアセトニトリル除タンパク及びイオン交換カラムを用いた前処理により簡便な分析が可能となり、法医検体でも有効であった。5-HTOL/5-HIAA比は腐敗症例に適応したところ、エタノールの消失例では基準値を下回るものがあつたものの、概ね高値を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医解剖におけるエタノール分析は直接的な死因への影響だけでなく、酩酊状態での事件事故を明らかにすることから、重要な検査項目の一つである。しかし法医検体の分析では代謝により事件、事故時に酩酊状態であってもエタノールが消失してしまっている場合や、腐敗によりエタノール濃度が上昇している場合があり、解釈が困難な場合も多い。本研究ではエタノールが体内より消失後も検出かのとされるエタノール依存症マーカーの分析により「法医検体における生前のエタノール摂取歴の詳細な推定」が可能になり、死因究明に大きな寄与をもたらすものと考えている。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to make able to estimate detailed ethanol history in forensic autopsy samples by analysis of alcoholic marker. This time, we developed analytical method of ethanol conjugates, ethyl glucuronide and ethyl sulfate, by LC-QTOF-MS, and examined affection of postmortem ethanol production in urinary 5-HTOL/5-HIAA ratio, by analyzing corrupt forensic samples. Analytical method of ethanol conjugates was developed using acetonitrile deproteinization and purification by cation exchange column. This method is satisfactory for forensic autopsy samples. Results of urinary 5-HTOL/ 5-HIAA suggest that evaluation of the urinary 5-HTOL/ 5-HIAA ratio may be a biomarker for ethanol intake even in cases affected by postmortem ethanol production.

研究分野：法医中毒学

キーワード：エタノール依存症マーカー HPLC蛍光検出 LC-QTOF-MS

1. 研究開始当初の背景

エタノールは多くの疾患の原因となるほか、酩酊状態において事件、事故を引き起こすことも多く、生前のエタノールの影響を調べることは法医学解剖において重要である。しかし、法医学検体においては代謝半減期が短いため事件、事故が発生してから死亡するまでに時間が経過した場合に体内から消失してしまう場合や、一方で腐敗に伴ってエタノールの産生し、血中アルコール濃度が高く測定されてしまう場合もあることから、分析結果の解釈が困難になることも多い。一方、エタノール依存症マーカーといわれる物質がこれまでにいくつか報告されており、エタノール未変化体に比べて長期間の検出が可能とされ、多くの臨床研究において飲酒者の体内からエタノールが消失した後も検出であることが報告されている。

2. 研究の目的

申請者は先行研究においていくつかのエタノール依存症マーカーの法医学検体における有用性を示したが、その際に蛍光誘導体化を用いたことから多検体になった場合に操作手順が煩雑になる点、また腐敗に伴って当該の指標が変化する可能性などに関して検討が不十分な点も多い。本研究ではより法医学実務に応用するために、これらの点に関して検討を行った。

以上の研究により、従来のエタノールのみの分析では不可能であった「法医学検体における生前のエタノール摂取歴の詳細な推定」が、エタノール依存症マーカーの分析により可能になり、死因究明に大きな寄与をもたらすものと考えている。

3. 研究の方法

(1)腐敗症例における 5-HTOL/5-HIAA 比の検討

尿中の 5-Hydroxytryptophol (5-HTOL) /5-hydroxy acetic acid (5-HIAA)比は臨床研究において飲酒後 24 時間程度 5-HTOL の上昇と 5-HIAA の低下に伴い比率が pmol/nmol で 15 以上を示すことが知られている [1, 2]。先行研究において尿中 5-HTOL/5-HIAA 比は腐敗を伴わない法医学検体における有用性を示していたことから、本研究では腐敗症例における影響の検討を行った [3]。当教室で法医学解剖を行った症例より、GC-FID によるアルコール分析においてエタノールおよび腐敗の指標である n-プロパノールが全血または尿から検出された症例のうち(A)飲酒後短時間で死亡が疑われる 3 例、(B)日常的な飲酒が疑われるものの死亡直前の飲酒は疑われない 3 例、(C)飲酒歴がないと思われる 3 例に関して尿中の 5-HTOL、5-HIAA の分析を行った。試料の前処理は遠心した尿をβ-glucuronidase 処理を行った後に、ベンジルアミン、フェリシアン化カリウムを用いた蛍光誘導体化を行い分析試料とした。HPLC-蛍光検出はリン酸緩衝液 (pH2.6) アセトニトリル系、カラムは ODS 系カラムを用い、励起波長 340 nm、蛍光波長 470 nm に設定し、分析を行った。

(2)LC-QTOF-MS による EtG、EtS の迅速分析法の検討

臨床において広く用いられているエタノールのグルクロン酸抱合体である Ethyl glucuronide (EtG)および硫酸抱合体である Ethyl sulfate (EtS)に関して、迅速分析法の検討を行った [4]。血清 100 μL に等量のアセトニトリルを添加、上清を分取し水 800 μL を加え混和した後に、メタノール、水で前処理した Oasis MCX カラム (3 cc, 60 mg) に通じ、LC-QTOF-MS に注入した。LC は移動相に 10 mmol/L ギ酸アンモニウム、メタノール (95 : 5) を用いカラムは ODS 系 (1.5 mm × 150 mm、5 μm) を 25 で用いた。QTOF-MS 分析はネガティブ ESI による MRM

分析(EtG : 221.06 → 75.0088、 EtS : 124.99 → 96.9600)を行った。

4 . 研究成果

(1)腐敗症例における 5-HTOL/5-HIAA 比の検討

飲酒後短時間での死亡が疑われる症例では全例で 5-HTOL/5-HIAA (pmol/nmol)比がいずれもい飲酒の指標となる 15 を上回っており、飲酒が疑われない症例では前例で 15 を下回っていた(Fig.1, Table1)。日常的な飲酒が疑われるものの死亡直前の飲酒は疑われない症例では 2 例が 15 を上回り、1 例が 14.0 とわずかに下回ったが、非飲酒例の 3 例(1.4-8.4)比べて高値を示していたことから腐敗症例においても有用であることが示唆された。今後分析例を増やすとともに、in vitro での実験により腐敗による各種物質濃度の経時変化を調べることで死後変化の進行による基準値の変化などに関しても検討を行いたい。

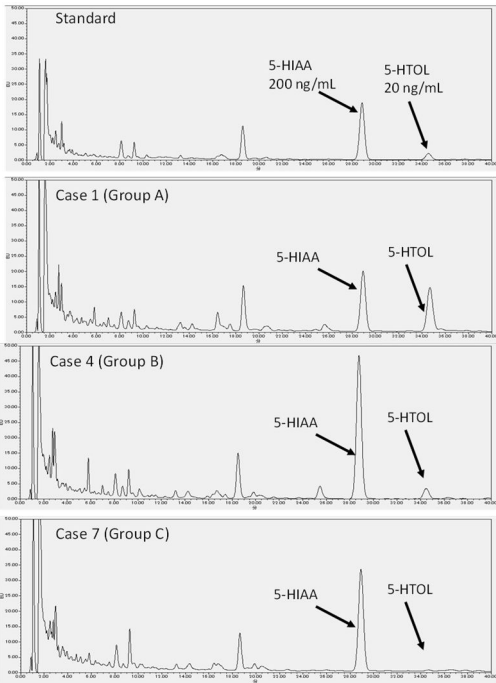


Fig.1 5-HIAA、5-HTOL 分析時のクロマトグラム

Table1. 5-HTOL、5-HIAA の分析結果

	Case	5-HTOL (ng/mL)	5-HIAA (ng/mL)	5-HTOL/5-HIAA (pmol/nmol)	Ethanol in blood (mg/mL)	n-Propanol in blood (mg/mL)	Ethanol in urine (mg/mL)	n-Propanol in urine (mg/mL)
A	1	142	214	718	2.3	nd	3.8	0.046
	2	229	346	716	1.3	0.043	1.4	0.050
	3	144	244	638	4.1	>0.01	4.8	0.014
B	4	30.5	562	58.6	not tested	not tested	0.53	0.042
	5	18.2	986	20.0	nd	nd	0.085	0.017
	6	3.50	270	14.0	1.0	0.032	0.77	0.052
C	7	2.99	384	8.38	nd	nd	0.039	0.010
	8	2.36	1800	1.41	nd	>0.01	0.14	0.013
	9	1.32	414	3.43	nd	nd	0.094	>0.01

(2)LC-QTOF-MS による EtG、EtS の迅速分析法の検討

標準血清に EtG および EtS を 100 ng/mL となるように添加し分析を行ったところ、検出可能であり夾雑物質との分離も充分であった。また(a)飲酒後短時間での死亡例、(b)前日の飲酒が確認されているエタノール非検出例、(c)エタノール非摂取例 (Fig. 2)に対して同様に分析を行ったところ(a)、(b)では検出されたが、(c)では EtG、EtS は検出されなかった (Fig. 2)。本分析法は法医検体における飲酒歴の有無の判定に十分な感度と精度を有していると考えられ、前処理も簡便であることから非常に有用である。今後、EtG、EtS の分析を多検体に対して適用し、法医

検体におけるマーカーとして確立していきたい。

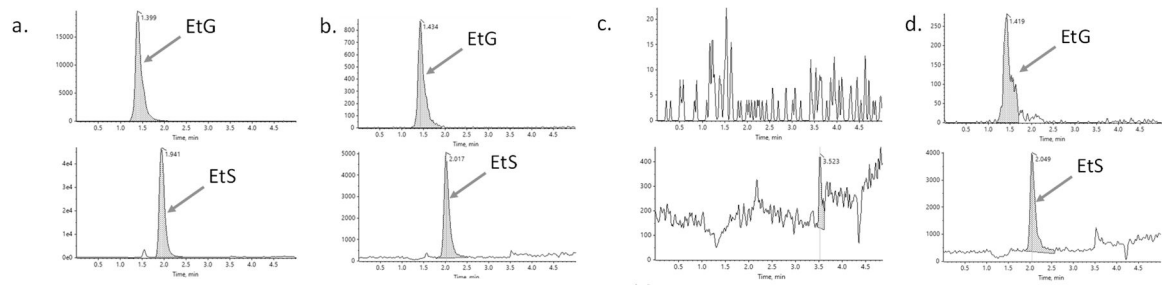


Fig.2 EtG、EtS 分析時の MRM クロマトグラム

a. 飲酒後短時間での死亡例, b. 飲酒歴, c. 飲酒歴なし, d. 標準物質

[1] Svensson et al. Eur. J. Biochem. 262, 324-329 (1999)

[2] Helander et al. Drug Alcohol Depend. 56, 33-38 (1999)

[3] 中前ら. 日法医誌. 70, 80 (2016)

[4] Albermann et al. Int. J. Legal Med. 126, 757-764 (2012)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------