

令和元年5月21日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19857

研究課題名（和文）数時間前の飲酒の証明に挑戦する：新たな飲酒マーカー・腸管を経由した酒類成分の探索

研究課題名（英文）A new method to prove alcoholic beverage ingestion using alcohol markers

研究代表者

原 健二（Hara, Kenji）

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：00090738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：エタノールに替わる新たな飲酒マーカーで、飲酒後長時間経過しても尿中から確認できる飲酒マーカーの探索に取り組んだ。酒類に含有される各種化学成分の検出に取り組んだが、その結果、醸造酒に比較的高濃度に存在するエチルグルコシドEGが尿中から検出されることを確認した。そこで、GC-MSによる精度の高い分析を目指して、試料調製法を確立した。その結果、EG異性体、 の分離分析が可能になった。本研究で開発したEGの分析法は、新たな尿中の飲酒マーカーのみならず、EG異性体の含有が異なる日本酒、ワイン、ビールの飲酒を識別できる方法にもなることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

事件、事故が発生した場合、当該事件、事故に飲酒や薬物の関与が問題となる。特に、交通事故の場合、飲酒の有無は重要である。現在、飲酒の証明は、被疑者の試料からエタノールを検出することである。しかし、酒類以外の商品にエタノールが含まれていることがあり、試料中のエタノールが飲酒によるものか、否かの区別することはできない。さらに、事件発生後、時間が経過した場合、エタノールは検出できない場合もある。本研究で開発された尿中EGの分析法は、エタノールに替わる飲酒マーカーとなり得るものと考えられる。さらには飲酒した酒類の鑑別にも要項となる可能性が期待でき、社会的意義も高いものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Aim of the study is the search of the new drinking marker, which replaced the ethanol, and is able to be detect from the urine even if a long time had passed since it drank. Various chemical compositions contained in alcohol beverage had been found. Within those chemicals, it was confirmed that ethyl glucoside EG that existed comparatively in a high concentration in the urine. Then, the sample preparation was established for the analysis with high accuracy by GC-MS. Also, the separation of the EG isomer and became possible. The assay of EG developed in the present study is expected to become not only the new drinking marker instead of ethanol in the urine but also a method by which the drinking of sake, wine, and the beer with a different content of the EG isomer can be identified.

研究分野：法医学

キーワード：酒類成分 飲酒マーカー 尿 GC-MS分析 エチルグルコシド

## 1. 研究開始当初の背景

法医解剖に関わる薬物検査では、死因や生前の病態に関係するあらゆる化学物質を検出できなければならない。我々は、これまで酸性から塩基性までの広範囲の化学物質を検出することを目的として、GC-MS、LC-MS/MS による分析方法の開発に取り組んできた。最近では、イオン交換固相抽出カラム（カートリッジ）を利用した試料調製法を開発し、GC-MS、LC-MS/MS による簡便かつ迅速な方法を提案した [Legal Medicine, 21(2016)85-92]。その結果、剖検試料（血液、尿、体組織）の薬物スクリーニング分析を実務的に行っている。この方法により、薬物・化学物質を広範囲で分析できるようになったため、従来の薬物の検査では検出できなかった化学物質が検出されるようになった。例えば、糖尿病性ケトアシドーシスのマーカーの 1 つである 3-ヒドロキシ酪酸、米麴の代謝産物であるエチル  $\alpha$ -D-グルコシド、N-フェニルアセチルグルタミン等が検出されるようになった。我々は、これら新たに検出可能となった化学物質について、法医学的意義を解明する研究に取り組んでいる。これまで検出された化学物質のうち、エチル  $\alpha$ -D-グルコシドは、日本酒中に特徴的に含まれる成分であることが判明した。そこでエチル  $\alpha$ -D-グルコシドが飲酒を証明するマーカーにならないかと考え、検討することにした。

エチル  $\alpha$ -D-グルコシドは、日本酒中に比較的大量に含まれていて、尿中に排泄されるとの報告がある。ラットの実験でも、腸から吸収され、尿中から排泄される。我々は、剖検試料の分析の結果、エタノールの血中濃度は極めて低いにもかかわらず、尿中からエチル  $\alpha$ -D-グルコシドが明確に検出されることが明らかとなった。剖検例においても、腸管から吸収されるエチル  $\alpha$ -D-グルコシドは、飲酒後、長時間に渡って尿に排出されると考えられた。

飲酒運転して、ひき逃げを行った被疑者が、事故時に飲酒していたかを証明することは社会的に重要なことである。我々は、エタノールが僅かしか検出されない被疑者の尿から、酒類に含まれる化学物質を長時間に渡って検出できれば、事故時の飲酒（酒気帯び）の証明ができると考え、本研究構想に至った。

## 2. 研究の目的

飲酒運転事故の被疑者が逃亡、いわゆるひき逃げ、当逃げし、事故後数時間を経過して身柄を拘束される場合、エタノールが検出されない限り、飲酒を証明することはできない。我々は、エタノールに代わる飲酒マーカーを探索し、被疑者から採取した試料（尿）からマーカーを分析することで、事故当時の飲酒を、科学的に証明できることを目的とする。

即ち、エタノールに代わる新たな飲酒マーカーを探索することが目的である。飲酒後、腸内容中に保持され、腸管から吸収され、尿中に排泄される酒類成分、例えば、エチル  $\alpha$ -D-グルコシドを分析し、新たな飲酒マーカーとなり得るかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 尿中に存在する酒類成分の探索

我々が開発している試料調製（2種のポリマーミックスイオン交換固相抽出カラムを使った方法）による実務試料の GC-MS 測定後、データ解析を行い、酒類成分を検索する。検出した酒類の成分の中で、頻繁に検出される化合物を研究対象とする。

### (2) (エチルグルコシドの抽出法ならびに検出条件の検討

1) で検出された化学物質のうち、エチルグルコシドは、日本酒、ワイン、ビールなどに含まれていることから、飲酒マーカー候補として、最も期待できる。そこで、尿試料中のエチルグルコシドの定量分析法の開発が、本研究の遂行において重要である。エチルグルコシドは、親水性、極性化合物であるので、GC-MS 測定のために、一般的に行われている試料調製や測定条件では、精度の高い測定は困難である。この問題を解決する方法を考案し、精度の高い方法の開発を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 尿中に存在する酒類成分の探索

#### ① 薬物スクリーニングのための試料処理法の改良

現在、実務で実施している薬物スクリーニングのための前処理法を簡素化、実務的に操作できるよう改良し、本研究への応用を図った。即ち、塩基性薬物群、酸性薬物群のそれぞれを特異的に分析できるように改良した。一般的な試料処理は、GC-MS 測定を行うため、化合物を疎水状態にして行われるが、酒類中に含まれる化合物は、親水性が高いので、本研究では、ある程度の親

水性化合物も抽出される条件を得ることを試みた。GC での分離に使われるカラムも、親水性のある極性化合物が分析できるよう、中極性の Rtx-200 を用いた。一般的に、官能基をもつ化合物の GC 分析には、化合物を誘導体化する 경우가多いが、本研究では、処理されたカラムを使用した。

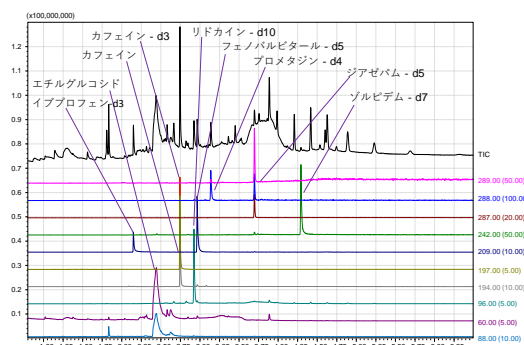


図1. 薬物スクリーニングにおいて、エチルグルコシドが検出された例（尿試料）

500mg/3mL を通す。この通過液を濃縮乾涸し、GC-MS 測定を行う。この方法により、強酸性薬物以外の一般的な薬物とエチルグルコシドなどの薬物を同時に検出することが可能になった。この方法を利用して、検出される化学物質の由来を調べ、飲酒に関連する化学物質を探索している。

本法により、明瞭に検出された酒類由来成分は、エチルグルコシドのみであった。

### ③エチルグルコシドが飲酒マーカーになりうるか

尿を分析し、エチルグルコシドとエチルアルコールの濃度を求め、エチルグルコシドとエチルアルコールの相互の濃度の関係を検討した。

尿試料から、簡単な試料調製法と、その尿中濃度の概算値を求めることを検討した。エチルグルコシドは、水に溶けるが、イオン性はないので、アセトニトリルのみで希釈するだけの方法を試みた。具体的には、尿 0.2 ml に内部標準物質を添加、ウレアーゼ処理後、アセトニトリル 7 ml で希釈、遠心して、不溶物を除去する。アセトニトリル抽出液を窒素気流下濃縮乾涸し、上記と同じカラムを使って、GC-MS 測定を行う。内部標準物質には、n-オクチル β-D-グルコシドを使用した。内部標準物質とエチルグルコシドのピークの面積比を、標準品添加試料の分析から求めた検量線に当てはめて、尿中濃度を概算する。表 1 に、剖検尿（4 例）を分析した例と挙げている。4 例のみであるが、エチルアルコール濃度とエチルグルコシド濃度には、殆ど関連性はないと思われる。このような関係を明らかにするため、飲酒実験を行い、飲酒後の尿中エチルグルコシドを調べることで、エチルグルコシドが、体内に長時間残存することを証明することができ、この表 1 を評価することができると思う。

表 1 尿中の EG 濃度とエチルアルコール濃度

Sample ID	EG $\mu\text{g/ml}$	EtOH mg/mL
No.1	58.5	2.50
No.2	166.9	0.01
No.3	61.6	2.15
No.4	<10	3.98

本研究で問題となったのは、分析に使ったカラムが新しいときは、エチルグルコシドのピークが、定量分析に十分な形状を保ったが、使用回数が多くなると、ピーク形状の再現性が悪くなった。分析カラムの障害、定量の再現性の問題について、その理由を仮定する。

理由 1. エチルグルコシドは親水性が高く、アセトニトリルで抽出できるが、水に溶けている

電解質が分析カラムに残り、エチルグルコシドのピークに影響を与える。  
理由2. 内部標準物質が界面活性剤の性質があり、高濃度では、均一な溶液にならない。  
この仮定の障害を取り除くことを、考え、次項目の試料調製の開発を検討した。

## (2) エチルグルコシドの抽出法ならびに検出条件の検討

### ① エチルグルコシドの抽出法（試料調製法）ならびに検出条件

項目(1)で、試料調製法での問題点に、電解質の影響を上げた。一般的な薬物抽出であれば、抽出溶液を脱水剤により、脱水すれば、電解質の除去はできる。しかし、エチルグルコシドは親水性が高く、脱水剤を使った方法では、エチルグルコシドも水に吸収される恐れがある。そこで、脱水剤の代わりに、イオン交換を使う検討を行った。さらに、GC-MS測定部の吸着を抑えるために、アセチル化をおこなった。GC-MS測定分析カラムには、前述のRTx-200を用いた(図2は、選択イオンモニタリング測定)。より正確な測定を行うため、GC-MS/MSによる多重反応モニタリング(MRM)を使って、測定した。本条件において、エチルグルコシドは、 $\alpha$ と $\beta$ の異性体を分離した形で検出された(図3)。この方法の定量性は、良好で、これまでの報告にはない、血液中的エチルグルコシドを定量的に検出することを可能になった。

### ② 今後の展望

当初、尿の分析から、酒類中に含まれる成分を検出し、飲酒証明の強力なマーカーを示そうとしていた、しかし、飲酒後、長時間経過して得られる尿の分析から、検出される酒類中成分は少なく、エチルグルコシドが著明に検出されたのみであった。エチルグルコシドのGC-MS測定再現性が低く、この分析は実務への応用には困難かと思われた。主流となっている脱水剤を使用した方法を諦め、従来、脱塩に使用されているイオン交換法を取り入れることで、GC-MS測定を改善することができた。またアセチル誘導体化を行うことで、GC-MS測定検出感度を高めることができ、血液試料からの検出も可能になる。また、エチルグルコシドの2つの異性体を分離して、検出することが可能になったことから、血液、尿中のエチルグルコシドの分析が、飲酒した醸造酒すなわち、日本酒、ワイン、ビールの識別分析に、有効となることが期待される。

酒類には、植物由来のフェノールもしくはポリフェノール系化合物が含まれている。今回のGC-MSによる研究では、十分な検出感度が得られなかった。今後は、より高収率の試料調製を検討するなど、エタノールに替わる飲酒マーカーの研究を続ける予定です。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

- ① Brian Waters, 原 健二, 池松夏紀, 松末 綾, 高山みお, 柏木正之, 久保真一. GC-MS/MSによる法医剖検試料からのエチルグルコシド異性体の定量分析法の開発. 第103次日本法医学学会学術全国集会. 2019, 仙台.
- ② 原 健二, Brian Waters, 柏木正之, 松末 綾, 高山みお, 池松夏紀, 久保真一. 飲酒の証明としての尿中エチルグルコシド異性体の検出法について. 第68回日本法医学学会学術九州地方集会. 要旨集. 2018; p14, 佐賀.
- ③ Hara K, Waters B, Ikematsu N, Kashiwagi M, Matsusue A, Takayama M, Kubo S. Analysis of ethyl glucoside in urine by Gas chromatography / Mass spectrometry as a marker of drinking alcohol. 19th World Congress of International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA2018). 要旨集. 2018; 22A, Kyoto, Japan.

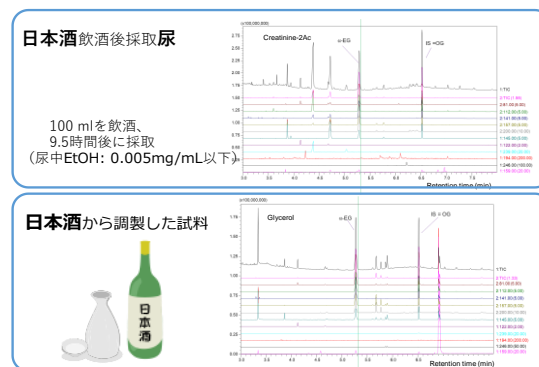


図2 飲酒後採取された尿と酒の分析例

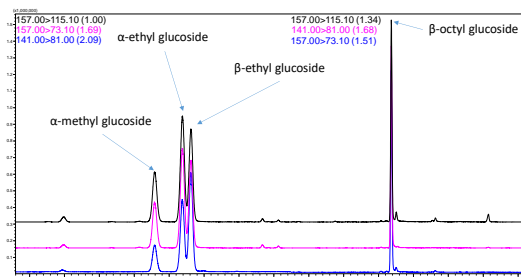


図3 本方法により試料調製、MRMにより測定されたクロマトグラム例(血液にグルコシドを添加。それぞれ 50  $\mu\text{g/ml}$ )

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：ウォーターズ ブライアン

ローマ字氏名： Waters Brian

所属研究機関名：福岡大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：00609480

研究分担者氏名：久保 真一

ローマ字氏名： Kubo Shin-ichi

所属研究機関名：福岡大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：10205122

研究分担者氏名：柏木 正之

ローマ字氏名： Kashiwagi Masayuki

所属研究機関名：福岡大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70301687

研究分担者氏名：松末 綾

ローマ字氏名： Matsusue Aya

所属研究機関名：福岡大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：70309920

研究分担者氏名：高山 みお

ローマ字氏名： Takayama Mio

所属研究機関名：福岡大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：40804802

(2)研究協力者

研究協力者氏名：池松 夏紀

ローマ字氏名： Ikematsu Natsuki