—原著—

**9,10-Phenanthrenequinone (PQ) を誘導体化試薬として用いた
ヒト血漿中アセトアルデヒド測定法の検討**末房優子¹, 大谷直由², 和久田浩一², 佐藤京子³, 倉成正恵³, 上村尚人²¹大分県警察本部刑事部科学捜査研究所

〒870-1117 大分県大分市高江西二丁目二番

²大分大学 医学部 臨床薬理学講座

〒879-5593 大分県由布市挾間町医大ヶ丘 1-1

³大分大学 医学部附属病院 総合臨床研究センター

〒879-5593 大分県由布市挾間町医大ヶ丘 1-1

**Examination of method for the measurement of acetaldehyde in human plasma
by using 9,10-phenanthrenequinone as a derivatizing agent**Yuko Suefusa¹, Naoyuki Otani², Hirokazu Wakuda², Kyoko Sato³,
Masae Kuranari³ and Naoto Uemura²¹*Criminal Investigation Laboratory, Oita Prefectural Police H.Q.**2-2, Takaenishi, Oita, Oita, 870-1117 Japan*²*Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Oita University Faculty of Medicine
1-1, Hasama-machi idaigaoka, Yufu, Oita, 879-5593 Japan*³*General Clinical Research Center, Oita University Faculty of Medicine
1-1, Hasama-machi idaigaoka, Yufu, Oita, 879-5593 Japan**(Received 11 November 2020; accepted 6 January 2021;**Published online 26 February 2021 in J-STAGE DOI: 10.3408/jafst.804)*

Blood acetaldehyde levels are often measured to elucidate individual differences and pharmacokinetics of alcohol metabolism due to the gene polymorphisms of aldehyde dehydrogenase (ALDH2). Blood acetaldehyde levels are of great interest in the field of addictive behaviors, particularly drunk driving behaviors. Conventional blood acetaldehyde concentration measurements are direct and derivatization analyses. Because direct analysis is problematic in that acetaldehyde disappears during storage due to its high volatility and reactivity, derivatization analysis is often performed for acetaldehyde determination in biological samples. The conventional derivatizing method using 2,4-dinitrophenylhydrazine for determination of aldehydes unfortunately produces interfering substances from ketones and carboxylic acids. Therefore, we applied the derivatization method using 9,10-phenanthrenequinone (PQ), reported recently for the interference-free determination of aldehydes. As a result of optimizing the derivatization conditions, a linear calibration relation-

ship ($R^2=0.9994$) in the range of 3–100 μM indicated strong results. The limit of detection and quantification was 1 μM and 3 μM , respectively. The intra- and inter-day precision were both below 13.0% and accuracy was in the range of -8.5% to 2.5% . The extraction recoveries of acetaldehyde in human plasma ranged from 80.4% to 106.8%. The derivative was stable at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 2 days. When acetaldehyde was added in human plasma and derivatized with PQ, acetaldehyde could be quantified by liquid chromatography-mass spectrometry. However, after drinking alcohol, acetaldehyde was measured in healthy subjects with *ALDH2**1/*2, but not with *ALDH2**1/*1. Acetaldehyde was difficult to detect in subjects with *ALDH2**1/*1, as they are rapid metabolizers of acetaldehyde resulting in low concentrations of acetaldehyde. Acetaldehyde was detected in those subjects with *ALDH2**1/*2, however, the measured acetaldehyde levels varied between the analytical methods.

Key words: Acetaldehyde, 9,10-Phenanthrenequinone, Derivatization, Human plasma

緒 言

日本における飲酒運転による死亡事故は、飲酒運転に対する厳罰化などにより減少してきたが、依然として交通死亡事故の約6%が運転者の飲酒によるものであり、事故の減少率は下げ止まり傾向にある。また、飲酒運転の死亡事故率は、飲酒なしの死亡事故率と比較すると約7.9倍と極めて高く、飲酒運転は交通死亡事故につながる危険性が高いことが示唆されている¹⁾。アルコールの影響下で自動車を運転した場合、血液中のアルコール濃度 (blood alcohol concentration: BAC) が高くなるにつれて交通事故の発生リスクが急激に上昇し、BAC 0%と比較すると、BAC 0.03%では交通事故リスクは1.03倍、BAC 0.08%では2.69倍に増加する²⁾。2002年に改正された道路交通法では、処罰対象となる呼気中アルコール濃度の最低基準が0.15 mg/L (BAC 0.03%に相当) に引き下げられた。

一方、呼気中アルコール濃度が法規制以下の値となる飲酒であっても、自動車運転に非常に大きな影響を与え、交通事故発生の危険性を上昇させる可能性がある報告も散見され^{3,4)}、アルコールのみならず、代謝物であるアセトアルデヒドや他の物質の影響もあるのではないかと考えられた。そこで我々は、アセトアルデヒドの測定に注目した。

経口摂取されたアルコールは、空腹時では約25%

が胃から、残りは空腸から吸収される。アルコールの90%以上は代謝され、残りの2~10%は未変化体のまま尿や汗、呼吸中などに排泄される⁵⁾。アルコールは主に酸化系経路によって代謝される。まず、エタノールは肝臓でアルコール脱水素酵素 (alcohol dehydrogenase: ADH) などの酵素により酸化され、アセトアルデヒドが生成される。さらにアセトアルデヒドはアルデヒド脱水素酵素 2 (aldehyde dehydrogenase 2: ALDH2) により、酢酸へと酸化される。このALDH2には遺伝子多型が存在し、日本人の約40~45%がALDH2の酵素活性がない遺伝子 (*ALDH2**2) をもち、アセトアルデヒドの蓄積によって顔面紅潮や低血圧、動悸などのフラッシング反応を生じる⁶⁾。ALDH2の酵素活性がある*ALDH2**1遺伝子型の人では、飲酒後の血液中アセトアルデヒド濃度が5 μM 以下であるが、酵素活性が低い*ALDH2**2遺伝子型の人では、血液中濃度が10~100 μM に上昇するとの報告がある⁷⁾。

血液中アセトアルデヒドの測定方法は、1980年代までにいくつかのヘッドスペースガスクロマトグラフィ法 (HS-GC) が確立され、飲酒後の濃度が報告されてきた。HS-GCでは、全血を除タンパクし、アセトアルデヒドを測定する方法⁸⁾と血球を除いた血漿中のアセトアルデヒドを測定する方法⁹⁾の2つがあるが、前者の一手法である improved per-

chloric acid (PCA) 法が簡便で一般的に使用されている^{10,11)}。

Improved PCA 法は採取した血液を速やかに氷冷した過塩素酸-生理食塩水溶液に加え、除タンパクし、その上清を HS-GC 装置で分析する。Improved PCA 法は、生理食塩水溶液で調整した過塩素酸を使用することで、除タンパク中に起こるエタノールからの非酵素的なアセトアルデヒドの産生を極力抑える方法であり、血液を過塩素酸に加えてから除タンパクを終了するまでの時間が大きく関係し、できるだけ早く除タンパクをする必要がある⁸⁾。一方、除タンパクした血液を 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) で誘導体化し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) で測定する方法 (DNPH 法) もある¹²⁻¹⁴⁾。

血液中アセトアルデヒド測定は、アセトアルデヒドの揮発性、反応性が高いことによる採血後の急速な消失、血液中のエタノールからの非酵素的なアセトアルデヒド産生、血球に結合したアセトアルデヒドの遊離などの問題がある^{10,11,15)}。Improved PCA 法では前処理後、バイアルに密封する。バイアルで保存中にアセトアルデヒドが消失するので測定まで 4℃で保管し、速やかに測定する必要があるが^{8,11)}、多数の試料を連続分析する際には HS-GC 装置のオートサンプラー上に注入までの間、常温で保管しなければならない。また、DNPH による誘導体化法は、感度は高いが、操作が煩雑になるため処理中に消失する可能性があり、アルデヒド類以外にもケトンなどとも反応することから選択性に乏しい。我々は同時に多数の試料の処理を迅速に行うため、前処理が簡便かつ選択性・安定性があり、新規のアセトアルデヒド測定法を考案できないかと考え、近年報告された血清中の中鎖脂肪酸アルデヒドを測定対象として 9,10-phenanthrenequinone (PQ) と酢酸アンモニウムにより誘導体化し、液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-MS) で測定する方法 (PQ 法)¹⁶⁾により従来法の問題の改善を試みた。PQ 法を血液中アセトアルデヒド測定に適用できるか検討するため、ブランク血漿にアセトアルデヒドを添加し、PQ と酢酸アンモニウムにより誘導体化を行い、LC-MS で測定した。次に、実際に被験者

にアルコール飲料を飲酒させ、採取した血液を試料として、血液中のアセトアルデヒドが測定できるか検討した。

材料および方法

1 実験材料

アセトアルデヒド (無水)、アセトアルデヒド-2,4-DNPH 溶液 (認証済標準品) は Sigma-Aldrich 社製の試薬を使用し、9,10-phenanthrenequinone (純度97%)、酢酸アンモニウム (特級)、60%過塩素酸 (精密分析用)、アセトニトリル (LC/MS 用)、ブチルアルデヒド (和光一級) はいずれも富士フイルム和光純薬社製の試薬を使用した。2,4-dinitrophenylhydrazine (特級) は関東化学社製の試薬を使用した。その他の試薬は特級試薬以上の規格のものをを用いた。アセトアルデヒドは、使用直前に脱気した超純水 (Merck Millipore 社製超純水製造装置 Milli-Q Integral 5 で製造したもの) で希釈して用いた。

試験飲料については、厚生労働省が健康日本21において、「節度ある適度な飲酒」の量は1日平均純アルコールで約20g程度であると提言していることから¹⁷⁾、アルコール度数5%の「サッポロ生ビール黒ラベル® 500 ml」(純アルコール量として19.8g)を使用した。

アルコール感受性遺伝子検査キットは、イービーエス株式会社から購入した。

2 臨床試験

本研究の臨床試験は、大分大学ヒトゲノム研究倫理審査委員会で承認を得て、UMINに登録し (UMIN000036717)、大分大学医学部附属病院のCTU (Clinical Trial Unit) 内で研究計画書を遵守して、かつ文部科学省・厚生労働省が定める「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して2019年1月1日～2020年3月31日の間に実施した。

(1) 被験者

被験者は、試験参加同意取得日の年齢が20歳以上55歳未満、肥満係数 (BMI) が18.5 kg/m²以上30.0 kg/m²以下の体型で、医師の診察により健康であると判断された日本人の男性を対象とした。アルコー

ルに対して過敏症の既往歴およびアルコールの代謝・排泄に影響を及ぼすと思われる疾患・手術歴のない志願者の中から、研究責任医師が研究参加に適格と判断した者を被験者として選択した。

(2) アルコール飲料摂取および採血

被験者に対し、10時間以上の絶食下、試験飲料を投与した。試験飲料摂取後1時間は絶飲とし、摂取後4時間は、絶食とした。採血は、試験飲料摂取前、試験飲料摂取から1時間後および4時間後に行った。

(3) アルコール感受性遺伝子検査

アルコール感受性遺伝子検査キットで被験者の口腔粘膜を採取し、ADH1B 遺伝子 Arg47His 多型 (rs1229984) と ALDH2 遺伝子 Glu48Lys 多型 (rs671) を判定した。

3 測定方法

臨床試験で被験者から採取した血液中のアセトアルデヒド測定に PQ 法が適用できるか検討し、従来の方法である improved PCA 法、DNPH 法との比較を行った。

(1) PQ 法

血漿200 μL を氷冷したアセトニトリル390 μL に加え、除タンパクした。試料を4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離し、得られた上清に内部標準の100 μM ブチルアルデヒド-アセトニトリル溶液10 μL を添加した。上清100 μL をスクリーバイアルに取り、4 mM PQ-アセトニトリル溶液50 μL および2 M 酢酸アンモニウム-酢酸溶液50 μL を加え、70 $^{\circ}\text{C}$ で15分間反応させた。反応液を乾固し、LC 初期移動相に溶解後、Merck 社製マイレクス® PTFE 膜0.2 μm でフィルターろ過したものを以下の条件で LC-MS により測定し、内部標準法で定量を行った。

バリデーションについては、アセトアルデヒドを添加したブランク血漿を用いた。誘導体化した試料を LC-MS に注入し、検出下限と定量下限を求めた。検量線は5点(3, 10, 30, 60, 100 μM)で作成し、3点(3, 30, 100 μM)の濃度について添加回収率、正確度および精度(日内・日間変動、それぞれ $n=5$)を求めた。

装置: Agilent Technologies 社製1260 Infinity LC および6540A UHD Accurate Mass Q-TOF LC/

MS, カラム: Agilent Technologies 社製 Poroshell 120 EC-C18 (100 mm $\times$ 2.1 mm i.d., 粒子径2.7 μm), ガードカラム: 化学物質評価研究機構製 L-column Guard Column (5.0 mm $\times$ 2.0 mm i.d., 粒子径5.0 μm), カラム温度: 25 $^{\circ}\text{C}$, 移動相: (A) 20 mM 酢酸アンモニウム (pH 4) — (B) メタノール, グラジエント条件: (B) 50% (0 min) $\rightarrow$ 100% (3 min, 7 min 保持), 流速: 0.2 mL/min, イオン化法: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) ポジティブモード, 測定モード: スキャン (m/z 100–1000)

(2) improved PCA 法

血液250 μL を氷冷した0.6 M 過塩素酸-生理食塩水溶液1 mL に速やかに加えた。試料を4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離し、その上清500 μL をヘッドスペースバイアルに密封し、以下の条件で HS-GC 装置により測定し、絶対検量線法で定量を行った。また、血液中のエタノールの定量も同装置で行った。

装置: Perkin Elmer 社製 Turbo Matrix40 および島津製作所製 GC-2010, HS オープン温度: 70 $^{\circ}\text{C}$, バイアル保温時間: 15 min, カラム: Agilent Technologies 社製 HP-INNOWAX (30 m $\times$ 0.32 mm i.d., 膜厚0.50 μm), キャリアガス: He, カラム流量: 5 mL/min, カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$ (5 min) $\rightarrow$ 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow$ 200 $^{\circ}\text{C}$, スプリット比: 1:5, 検出器: 水素炎イオン化検出器, 検出器温度: 220 $^{\circ}\text{C}$

(3) DNPH 法

血漿100 μL を氷冷した3 M 過塩素酸-生理食塩水溶液300 μL に加え、除タンパクを行い、3 M 酢酸ナトリウム水溶液800 μL で液性を pH 4 に調整した。遠心分離し、得られた上清に2 mM DNPH 溶液(ジメチルスルホキシド:1 M 塩酸=5:1)を500 μL 加え、室温で10分間反応させた。反応液は、メタノール2 mL および超純水2 mL でコンディショニングした固相抽出カートリッジ(ウォーターズ社製 Sep Pak plus C18)に通液した。カートリッジを超純水1 mL, 50%メタノール水溶液で順次洗浄し、過剰な DNPH を除去した。洗浄後、メタノール2 mL で溶出した¹⁴⁾。溶出液を乾固し、HPLC 移動相100 μL に溶解後、Merck 社製マイレクス® PTFE 膜0.2 μm でフィルターろ過したものを以下の条件で HPLC により測定し、絶対検量線法

で定量を行った。

装置：Thermo Fisher SCIENTIFIC 社製 Ultimate 3000 HPLC，カラム：化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS（150 mm × 4.6 mm i.d.，粒子径 3.0 μm），ガードカラム：化学物質評価研究機構製 L-column Guard Column（5.0 mm × 2.0 mm i.d.，粒子径 5.0 μm），カラム温度：40 °C，移動相：アセトニトリル：水（50：50，アイソクラティック），流速：1.0 mL/min，測定波長：360 nm

結果および考察

1 PQ によるアセトアルデヒド測定方法の検討

(1) アセトアルデヒド誘導体の定性分析

アルデヒド類を PQ のような α-ジケトンおよび酢酸アンモニウムと反応させると，フェナントレンキノンジイミンを経て，反応させたアルデヒドの置換基を 2 位にもつイミダゾール誘導体が生成する^{16,18-21)}．このイミダゾール誘導体は，LC-MS の ESI ポジティブモードで効率的にイオン化され，選択的に定量できると報告されている¹⁶⁾．そこで，アセトアルデヒドに PQ および酢酸アンモニウムを添加し，加熱してフェナントロイミダゾール誘導体とし¹⁶⁾（Fig. 1），反応生成物を液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析装置（LC-Q-TOF-MS）で測定した．その結果，クロマトグラム上の保持時間 7.1 分にピークが得られ（Fig. 2a），そのマススペクトルは m/z 233.1070 にメインピークを有しており， m/z 233.1070 をプリカーサーイオンとして衝突誘起解離（コリジョンエネルギー 30 V）によるプロダクトイオンを測定したところ， m/z 165.0701 および m/z 192.0801 のイオンが観察された（Fig. 2b）．プリカーサーイオンの精密質量から推定した組成式は $C_{16}H_{13}N_2$ （計算精密質量 m/z 233.1079）であり，

Fig. 1 に示すフェナントロイミダゾール誘導体の一価のプロトン付加分子イオン（ $[M+H]^+$ ）と推定された（Fig. 2c）．また，プロダクトイオンの精密質量から組成式および部分構造式を推定すると m/z 165.0703 は $C_{13}H_9$ （計算精密質量 m/z 165.0704）， m/z 192.0801 は $C_{14}H_{10}N$ （計算精密質量 m/z 192.0813）と考えられた（Fig. 2c）．El-Maghraby らは脂肪族アルデヒドの PQ 誘導体の $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとし，衝突誘起解離させて測定すると m/z 164.8 および m/z 192.0 のプロダクトイオンが観察されると報告していることから¹⁶⁾，保持時間 7.1 分のピークは PQ-アセトアルデヒド誘導体と判断した．

(2) 測定対象試料の検討

測定対象試料として全血と血漿について検討した．全血を直接除タンパクし，PQ 法により誘導体化したものは，血漿を除タンパクしたものに比べて回収率が悪く，測定値のばらつきが大きかったため（データは示さず），血漿試料を測定対象試料とした．全血を直接除タンパクする際に血球成分への結合などの影響があったと考えられた．なお，DNPH 法についても同様であったため，血漿試料を用いた．

(3) 誘導体化反応条件の最適化

アセトアルデヒド標準液に 1～8 mM の範囲で調整した PQ-アセトニトリル溶液および 0.1～4 M の範囲で調整した酢酸アンモニウム-酢酸溶液を加え，100 °C で 30 分間加熱した結果，Fig. 3 に示すように PQ-アセトニトリル溶液の濃度が 2 mM 以上，酢酸アンモニウム-酢酸溶液の濃度が 2 M 以上で PQ-アセトアルデヒド誘導体の検出強度が同程度であったが，検出強度が最大であった 4 mM PQ-アセトニトリル溶液，2 M 酢酸アンモニウム-酢酸

Fig. 1 Reaction scheme for acetaldehyde derivatized by PQ and ammonium acetate¹⁶⁾.

Fig. 2 Detection of the PQ-acetaldehyde derivative using LC-Q-TOF-MS. (a) Extracted ion chromatogram (m/z 233.1079), (b) product ion spectrum of the peak detected at 7.1 min (precursor ion: m/z 233.1070, collision energy: 30 V) and (c) the proposed structures of the fragment ions¹⁶⁾.

溶液の条件に決定した。さらに、反応温度および反応時間について検討した結果、Fig. 4 に示すように 70 °C 以上かつ 15 分以上加熱した PQ-アセトアルデヒド誘導体の検出強度に変化は見られなかったもので、反応温度は 70 °C、反応時間は 15 分間が最適であると考えられた。

(4) 分析バリデーション

アセトアルデヒドを添加したブランク血漿を前処理し、PQ 法により誘導体化して得られたアセトア

ルデヒド誘導体について分析バリデーションを行った。

飲酒後の血液中アセトアルデヒド濃度は、*ALDH2*1* 遺伝子型の人では 1~2 μM 程度であり、*ALDH2*2* 遺伝子型の人では血液中濃度が 10~100 μM に上昇するという報告があることから、血液中アセトアルデヒド測定では 1~100 μM の濃度を測定できるかが問題となる⁷⁾。アセトアルデヒドは試薬や環境中に広く存在するため、前処理中の混

Fig. 3 Derivatization of acetaldehyde with various PQ concentrations (1, 2, 4 and 8 mM) and various ammonium acetate concentrations (0.1, 1, 2 and 4 M).

Fig. 4 Derivatization of acetaldehyde with various reaction times (5, 10, 15, 20, 30 and 40 min) and various temperature conditions (60, 70, 80, 90 and 100 °C).

入を完全に避けることはできず、ブランク試験を行ったところ、微量のアセトアルデヒド誘導体が検出された。ブランク値から求めた検出下限は $1 \mu\text{M}$ 、定量下限は $3 \mu\text{M}$ であった。検量線は $3 \sim 100 \mu\text{M}$ の範囲で良好な直線性 ($y = 0.070x + 0.2364$, $R^2 = 0.9994$) を示した。Table 1 に示すように回収率、正確度および精度も良好な結果が得られた。

なお、今回検討した improved PCA 法および DNPH 法の定量範囲は、それぞれ $1 \sim 100 \mu\text{M}$ および $2 \sim 80 \mu\text{M}$ であった。

(5) 選択性および安定性

アルデヒドの誘導体化を行う DNPH 法は、アルデヒドだけではなくケトンやカルボン酸とも反応し、選択性に乏しいが、PQ 法では、アセトンのようなケトン類、反応触媒として用いている酢酸による妨害は見られないと報告されている¹⁶⁾。実際にアセトンを添加したブランク血漿を PQ 法により誘導体化させて分析したところ、アセトンに由来する妨害ピークは見られず（データは示さず）、PQ 法はアセトアルデヒドに対する選択性があると確認された。

また、Fig. 5 に示すようにアセトアルデヒド誘導体は 4°C 保管で 2 日間安定であり、オートサンプラー上で安定した連続分析が可能であることが示された。

2 臨床試験による検討

(1) アルコール感受性遺伝子検査の結果

血漿に添加したアセトアルデヒドは PQ 法により測定できることを確認した。さらに、飲酒後、生体内で代謝されたアセトアルデヒドの測定に適用できるか検討した。臨床試験では、治療中の疾患がなく、医薬品を服用していない者を選択し、条件を満たす 4 名（男性、年齢： 44.5 ± 5.1 歳、体重： 66.4

Table 1 The recovery, accuracy and precision data of acetaldehyde spiked into blank plasma ($n=5$).

Spiked concentration (μM)	Recovery (%)	Intraday		Interday	
		Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)
3	83.7	0.4	6.1	-8.5	13.0
30	80.4	-5.1	1.3	1.0	3.5
100	106.8	0.7	1.0	2.5	2.3

Fig. 5 Stability of the PQ-acetaldehyde derivative at 4 °C.

Table 2 ADH1B and ALDH2 genotype of the subjects.

Subject number	ADH1B		ALDH2	
	Genotype	Activity	Genotype	Activity
1	*2/*2	High activity	*1/*1	Active
2	*2/*2		*1/*1	
3	*1/*2	Active	*1/*1	Low activity
4	*1/*2		*1/*2	

±3.3 kg, BMI : 22.7±0.4) を被験者とした。被験者のアルコール感受性遺伝子検査の結果を Table 2 に示す。ALDH2 の遺伝子タイプは活性型 (*ALDH2**1/*1 型) が 3 名, 低活性型 (*ALDH2**1/*2 型) が 1 名であった。

(2) 血液試料の測定結果

Fig. 6 に示すように全ての被験者は飲酒開始から 1 時間後の血液中エタノール濃度が 0.3 mg/mL 程度となり, 飲酒開始から 4 時間後で 0.03 mg/mL 程度まで低下した。

in vitro で血液とエタノールを混合すると非酵素的な酸化により微量のアセトアルデヒドが産生される。予備実験として, ブランク血液にエタノールを添加して 0.3, 0.03 mg/mL になるように調整したものを前処理し, エタノールからの非酵素的な産生分

Fig. 6 Blood ethanol concentrations after drinking in each subject measured by HS-GC.

を調べ, 試料のアセトアルデヒド濃度から減算した。

*ALDH2**1/*1 型被験者 3 名の飲酒開始から 1 時間後および 4 時間後の血液中アセトアルデヒド濃度は, いずれの方法でも定量下限値以下であった。アセトアルデヒドの代謝が速い *ALDH2**1/*1 型被験者では, 今回の飲酒量により生成されるアセトアルデヒドの量は少なく, 低濃度領域では, 非酵素的なアセトアルデヒド産生分を減算すると不検出になるものもあり, 測定が困難であった。

*ALDH2**1/*2 型被験者 1 名の血液中アセトアルデヒド濃度は, PQ 法では飲酒開始から 1 時間後が 3.3 μM, 4 時間後は定量下限値以下であった。Improved PCA 法では飲酒開始から 1 時間後が 7.9 μM, 4 時間後が 4.0 μM であった。DNPH 法では飲酒開始から 1 時間後が 3.6 μM, 4 時間後は定量下限値以下であった。*ALDH2**1/*2 型は *ALDH2**1/*1 型よりもアセトアルデヒドの代謝が遅いため, *ALDH2**1/*2 型被験者の飲酒から 1 時間後の血液中アセトアルデヒド濃度は, いずれの方法でも測定できたと考えられた。

*ALDH2**1/*2 型被験者の飲酒開始から 1 時間後および 4 時間後の血液中アセトアルデヒド濃度を測定法別に比較した (Fig. 7)。PQ 法は DNPH 法と近い値を示したが, improved PCA 法と比較すると測定値に 2 倍程度の差が見られた。

Fig. 7 Comparison of acetaldehyde concentrations after drinking in subject 4 with *ALDH2*1/*2* measured by PQ method, improved PCA method and DNPH method.

PQ法とDNPH法では、全血を直接除タンパクすると回収率や精度が悪かったため、採血後に血球成分を遠心分離して除去し、得られた血漿について誘導体化を行った。血漿を測定する方法では前処理中の非酵素的なアセトアルデヒド産生の影響を抑えることができるが、遠心分離に時間がかかるとアセトアルデヒドが激減してしまう欠点がある^{9,10)}。今回の結果から、PQ法とDNPH法では主に遠心分離中のアセトアルデヒド消失があったと考えられた。また、アセトアルデヒドは反応性が高く、血液中に存在するシステインなどのSH化合物・アミノ類・アミノ酸と結合したり、血球に存在するアルデヒド脱水素酵素により酸化されたりするため、試料を採取してから測定するまで時間がかかると消失する可能性がある¹¹⁾。アセトアルデヒド消失を防ぐため、採血後の遠心分離を迅速に行い、 $3\mu\text{M}$ 以下の低濃度域を測定できるように、誘導体化するまでの時間を短縮し、ブランク値を低減させるなど前処理方法を再検討する必要が示唆された。

結 語

PQを誘導体化試薬として用いる脂肪族アルデヒドの測定方法を血液中のアセトアルデヒド測定に適用できるか検討し、実際にアルコール飲料を摂取した被験者の血液中アセトアルデヒド測定を行った。

ブランク血漿にアセトアルデヒドを添加し、PQで誘導体化したものについては、アセトアルデヒド誘導体が検出され、LC-MSにより定量が可能であった。

一方、アルコール飲料を摂取した被験者の血液の測定については、アセトアルデヒドの代謝が遅い*ALDH2*1/*2*型の被験者の血液でアセトアルデヒドを測定することができたが、今回検討した方法では、採血後に全血をただちに除タンパクするimproved PCA法と比較して低い値を示したため、採血から遠心分離により血漿を得るまでの時間にアセトアルデヒドの消失があったと考えられた。

PQ法は、簡便な前処理でアセトアルデヒドを測定可能であり、選択性や安定性があることも確認された。血液中アセトアルデヒド測定の難点である採血後の前処理について今後さらに検討することで、新たな血液中アセトアルデヒド測定法の一つとして提案できると考えられた。

利益相反

申告すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 警察庁交通局，令和元年中の交通死亡事故の発生状況及び道路交通法違反取締り状況等について，available from [https://www.e-stat.go.jp/]，accessed Nov 5, 2020.
- 2) Blomberg, R. D., Raymond C. P., Herbert M., Marcelline B. and Dary F., Crash risk of alcohol involved driving: a case-control study. Dunlap and Associates, Connecticut, 2005.
- 3) 科学警察研究所交通安全研究室，低濃度のアルコールが運転操作等に与える影響に関する調査研究，available from [https://www.npa.go.jp/koutsuu/kikaku/insyuunten/kakeiken-kenkyu.pdf]，accessed Nov 5, 2020.
- 4) 中村信次，アルコール摂取が認知課題遂行に及ぼす影響—飲酒運転はドライバーの認知判断能力を如何に阻害するのか？—，日本福祉大学情報社会科学論集，**10**, 21–26, 2007.
- 5) Lieber C. S., Metabolism of alcohol. *Clin.*

- Liver Dis.*, **9**, 1–35, 2005.
- 6) Higuchi S., Matsushita S., Muramatsu T., Murayama M. and Hayashida M., Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and drinking behavior in Japanese. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **20**, 493–497, 1996.
 - 7) Mizoi Y., Tatsuno Y., Adachi J., Kogame M., Fukunaga T., Fujiwara S., Hishida S. and Ijiri I., Alcohol sensitivity related to polymorphism of alcohol-metabolizing enzymes in Japanese. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **18**, 127–133, 1983.
 - 8) Eriksson C. J. P., Mizoi Y. and Fukunaga T., The determination of acetaldehyde in human blood by the perchloric acid precipitation method: the characterization and elimination of artefactual acetaldehyde formation. *Anal. Biochem.*, **125**, 259–263, 1982.
 - 9) Pikkarainen P. H., Salaspuro M. P. and Lieber C. S., A method for the determination of “free” acetaldehyde in plasma. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **3**, 259–261, 1979.
 - 10) 福永龍繁, 山本秀孝, 種子島章男, ヒト血液中アセトアルデヒド濃度測定法, 日本アルコール・薬物医学会雑誌, **33**, 190–199, 1988.
 - 11) 大洞弓子, 藤宮龍也, 血中アルコール及びアセトアルデヒド測定法とその留意点, 臨床検査, **47**, 627–631, 2003.
 - 12) Lynch C., Lim M., Thomas M. and Peters T. J., Assay of blood and tissue aldehydes by HPLC analysis of their 2,4-dinitrophenylhydrazine adducts. *Clin. Chim. Acta*, **130**, 117–122, 1983.
 - 13) Pezzoli C., Galli-kienle M., Padova C. D. and Stramentinoli G., HPLC method for the evaluation of blood acetaldehyde without ethanol interference. *J. Liq. Chromatogr.*, **7**, 765–778, 1984.
 - 14) Kozutsumi D., Arita M., Kawashima A., Adachi M. and Takami M., An improved method for acetaldehyde determination in blood by high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction. *J. Chromatogr. Sci.*, **40**, 477–482, 2002.
 - 15) Fukunaga T., Sillanaukee P. and Eriksson C. J. P., Problems involved in the determination of endogenous acetaldehyde in human blood. *Alcohol Alcohol.*, **28**, 535–541, 1993.
 - 16) El-Maghrabey M., Kishikawa N. and Kuroda N., 9,10-Phenanthrenequinone as a mass-tagging reagent for ultra-sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay of aliphatic aldehydes in human serum. *J. Chromatogr. A*, **1462**, 80–89, 2016.
 - 17) 厚生労働省, 健康日本21 (アルコール), available from [https://www.mhlw.go.jp/www1/topics/kenko21_11/], accessed Nov 5, 2020.
 - 18) Davidson D., Weiss M. and Jelling M., The action of ammonia on benzil. *J. Org. Chem.*, **2**, 319–327, 1937.
 - 19) 境野芳子, 都丸芳子, 柿沢 寛, 楠見武徳, 9,10-フェナントレンキノンと第一級アミンの反応によるフェナントロイミダゾールおよびフェナントロオキサゾール誘導体の生成, 日本化学会誌, **10**, 1587–1590, 1976.
 - 20) Bu L., Sawada T., Shosenji H., Yoshida K. and Mataka S., Crystallographic structures and solid fluorescence behaviors of crystals of a 2-(9-anthryl)phenanthroimidazole-type clathrate host, *Dyes Pigments*, **57**, 181–195, 2003.
 - 21) Kishikawa N., Wada M., Ohba Y., Nakashima K. and Kuroda N., Highly sensitive and selective determination of 9,10-phenanthrenequinone in airborne particulates using high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, **1057**, 83–88, 2004.