

令和元年6月18日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19805

研究課題名(和文) 新たな溺死診断手法の開発に関する研究

研究課題名(英文) Research on development of new drowning diagnosis method

研究代表者

林 徳多郎 (HAYASHI, Tokutaro)

信州大学・医学部・特任助教

研究者番号：50600607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、溺死体の血液などから藍藻類の毒素を検出する新たな溺死診断方法の開発である。溺死の死因究明は、一般的に臓器内から珪藻類を検出する方法で行われている。ところが、強酸を使用するため、安全面、環境面などに大きな問題があり、これに代わる方法が求められている。そこで、藍藻類が産生する毒素マイクロシスチンに着目し、LC-MS/MSで検出するシステムを構築して有効性を確認した。さらに溺死体66体の血液、臓器、溺水では、珪藻類は確認したがマイクロシスチンは検出しなかった。本研究は進行中であり、EDTA抽出、MMPB法などの手法を加えて引き続き研究を進めているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犯罪のみならず、自殺、病死、事故などの死因を明らかにすることは、故人や遺族の権利を守り、社会の安全を維持するうえで欠かせないことである。本研究では、溺死診断で古くから行われているプランクトン検査を発展させ、より安全で環境面に配慮した新たな溺死診断手法の開発を行い、確実な溺死診断によって犯罪の見逃しを防ぐことを目的としている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a new method of diagnose the cause of death that to detected cyanobacterial toxins from blood of the drowned body. In general, methods for detecting diatoms in organs are used to investigate the cause of death due to drowning. However, this procedure needs strong acids, there are major problems in terms of safety and environment, so alternative methods are required. Therefore, focusing on the toxin microcystin produced by cyanobacteria, a system for detection by LC-MS / MS was constructed to detect microcystin, and its effectiveness was confirmed. Further, when blood, organs and waters of 66 the bodies of drowned were examined, diatoms were confirmed but microcystin was not detected. The study is now proceeding and we are continuing research with the addition of methods such as EDTA extraction and MMPB.

研究分野：法医学

キーワード：死因究明 溺死診断 プランクトン ミクロシスチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、いわゆる「誤認検視」による犯罪の見逃し事案が大きな社会問題となって取り上げられた。これは、犯罪死であるにもかかわらず、病死などと判断した事案が立て続けに発覚したことから警察庁が全国の警察本部を通じて調査したところ、平成 10 年以降に発覚しているものだけでも 43 件もあった。その中には絞殺、扼殺などの明らかな犯罪死であるにもかかわらず、心臓死や脳出血などの病死が死因と判断していたものが半数を占めていた。さらには、鼻口閉塞、薬物中毒死であったのに溺死と判断し、あるいは溺死ではあるが突き落とし、頭部の押さえつけなどの犯罪性を見落とすなど、溺死に関する犯罪の見逃し事案はこれに次いで多くを占めていた。

溺死の一般的な診断は、溺死肺と気道内の白色細小泡沫の確認であるが、これらの所見は時間の経過とともに不明確になっていき判定が困難になってくる。しかし、溺死では溺死体が死後に水中に投げられたか否かの評価が非常に重要であるため、溺死診断には古くから、溺死体内から溺水中の珪藻類を検出するプランクトン検査が行われている。検査方法は一般的には、肺臓、肝臓などの臓器を発煙硝酸、濃硫酸を使って有機物を分解し、臓器内に残留する珪藻を確認する「壊機法」が主流である。ところが、この「壊機法」では、危険な強酸を使用し、また専用のドラフトなど特殊な大型設備を必要とするなど、設備面、環境面、危険性などリスクの多い検査を行っている。このような観点から、安全で容易かつ確実に溺死診断を行う新たな溺死診断手法を構築し、溺死事案の適正な死因究明を果たしていくことが求められている。

2. 研究の目的

死因究明を行う究極の目的は、犯罪死の見逃しを防止することである。そのためには、検案・検視体制の強化など制度の改革が必要であるが、それ以上に精度の高い鑑定が求められていて、日々の鑑定技術の開発が重要な位置を占めている。特に溺死は、犯罪性の有無の判断が極めて難しい事案のひとつで、確実な溺死診断は、常に死因究明現場で求められているところである。そこで本研究は、溺死体内から珪藻類のプランクトンを検出する手法を発展させ、これまでの「壊機法」に変わる新たな手法の開発に取り組んだ。これは、淡水の湖沼、河川などによく見られるアオコと呼ばれている藍藻類はミクロシスチンという毒素を産生することに着目し、溺死者の血液、臓器からミクロシスチンを検出して、溺水時の生死の有無を判断する手法である。

3. 研究の方法

(1) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるミクロシスチン検出システムの構築

試薬

ミクロシスチン LR は和光純薬工業株式会社 (大阪市)、アセトニトリル、メタノールは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) の高速液体クロマトグラフィー用を用い、超純水はミリポアのミリ Q システムから得た。その他の試薬は分析試薬グレード、特級を用いた。

試料の調製

試料は標準品のミクロシスチン LR をメタノールに溶解して 1mg/mL に調製し標準原液として -80 で保存した。標準溶液は、標準原液をメタノールで連続希釈して使用した。

測定条件

分析は、オートサンブラ SIL-20AC および送液ユニット LC-20AD を含む Shimadzu Prominence LC System (京都市) で実施した。クロマトグラフィー分離用の LC カラムは、L-column ODS (150mm × 2.1mmID × 5 μ m 化学物質評価研究機構) と Kinetex EVO C18 (100mm × 2.1mmID × 2.6 μ m Phenomenex) を使用し、カラム温度は 40 に維持して比較した。移動相は、移動相 A は 10% ギ酸・10mM ギ酸アンモニウム水溶液、移動相 B は 10% ギ酸・10mM ギ酸アンモニウムアセトニトリル溶液で、L-column ODS 使用時のグラジエントは、5% 95% (移動相 B) 0 15 分、95% (移動相 B) 15 20 分、95% 5% (移動相 B) 20 20.01 分、5% (移動相 B) 20.01 30 分で総運転時間は 30 分、また Kinetex EVO C18 使用時のグラジエントは、5% 95% (移動相 B) 0 7.5 分、95% (移動相 B) 7.5 10 分、95% 5% (移動相 B) 10 10.01 分、5% (移動相 B) 10.01 13 分で総運転時間は 13 分で実施した。

検出には、フォトダイオードアレイ検出器 (PDA) SPD-M20A (Shimadzu・京都市) とタンデム質量分析器 (MS/MS) 3200QTRAP (AB Sciex・Foster City, CA, USA) を用いた。MS/MS では、シリンジポンプを使用して標準溶液を持続注入して各種パラメータの自動最適化を行い、またフローインジェクションアナリシスによりイオンソースのパラメータを最適化した。

(2) 湖沼水からのミクロシスチン検出

試料の調製

諏訪湖岸に採水地点を設け、採水後は可能な限り早期に 4 で保存し、1 日以内に検査した。試料 20mL を遠心管に取り、酢酸 1mL を加えて 10 分間超音波洗浄機にかけた。メタノール 1mL、水 1mL でコンディショニングした Oasis HLB に通し、5% メタノール 2mL で洗浄し、メタノール 1mL で溶出した。溶出した試料は窒素気流下で蒸発乾固し、アセトニトリル 200 μ L で再溶解してフィルターにかけ、測定試料とした。

(3) 血液、臓器からのマイクロシスチン検出と壊機法による珪藻検出との比較

測定試料

測定試料は、2013年1月1日から2017年12月31日までに信州大学医学部法医学教室で施行した法医学解剖で保存している解剖試料のうち、溺死体の血液、肺臓、肝臓、腎臓で、壊機法では左右肺臓各上下、肝臓、腎臓、死体発見場所付近で採取した対照水を66例、マイクロシスチン法では血液66例、肝臓13例、2017年以降に採取した対照水19例である。

前処理

マイクロシスチン検出のための前処理

血液は2mLを、肝臓は2mgを計り、水2mL、ステンレスビーズとともにビーズクラッシャー (TAITEC μ T-12・越谷市) で破碎したものを Oasis HLB に通し、3. (2) と同様の方法で測定試料とした。また、対照水は3. (2) と同様の方法で測定試料とした。

壊機法によるプランクトン (珪藻) の検出

肝臓2gをケルダールフラスコに入れて発煙硝酸10mLを加え加熱する。沸騰が始まったところで硫酸4mLを加えて再び加熱する。黒色液に変わり白煙が充満して液量が減少したところで過酸化水素水を滴下して激しく発泡させ、液が透明になってから冷やして遠心管に入れる。蒸留水を加えて3000rpmで10分間遠心したのち上清を除去して再び蒸留水を加えて遠心する操作を数回繰り返し、残渣をカバーグラスに滴下して蒸発乾固し、プレパラートを作成して検鏡した。

4. 研究成果

(1) HPLCによるマイクロシスチン検出システムの確立

淡水の湖沼・河川に存在するプランクトン藍藻類が産生する毒素の一種であるマイクロシスチンLRをHPLCにより検出するシステムの構築に成功した。検出器はフォトダイオードアレイ検出器 (PDA) とタンデム質量分析計 (MS/MS) で比較したところ、MS/MSがPDAより高感度で検出することが確認できた。MS/MSの検出はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) プローブを備えているため、ESIによるPositiveモードで行い、その条件は図1のとおりである。

イオン源パラメータ	数値
Curtain Gas (CUR)	15
Collision Gas (CAD)	10
IonSprey Voltage (IS)	5000
Temperature (TEM)	500
Ion Source Gas1 (GS1)	30
Ion Source Gas2 (GS2)	70

図1 ESIの条件

マイクロシスチンLRの標準溶液を5 μ g/mLに調製してインフュージョンにより測定したMRMトラッキングとMS/MSパラメータは図2のとおりである。

物質名	測定イオン		DP (v)	EP (v)	CEP (v)	CE (v)	CXP (v)
	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)					
マイクロシスチンLR	995.613	135.300	101.1	10.5	36.0	95.0	4.0

図2 MRMトラッキングとMS/MSパラメータ

LCカラムは、L-column ODS と Kinetex EVO C18 で比較したところ、いずれも良好に分離した。このうち、L-column ODSを使用したマイクロシスチンLRの代表的なクロマトグラムとスペクトルは図3のとおりである。

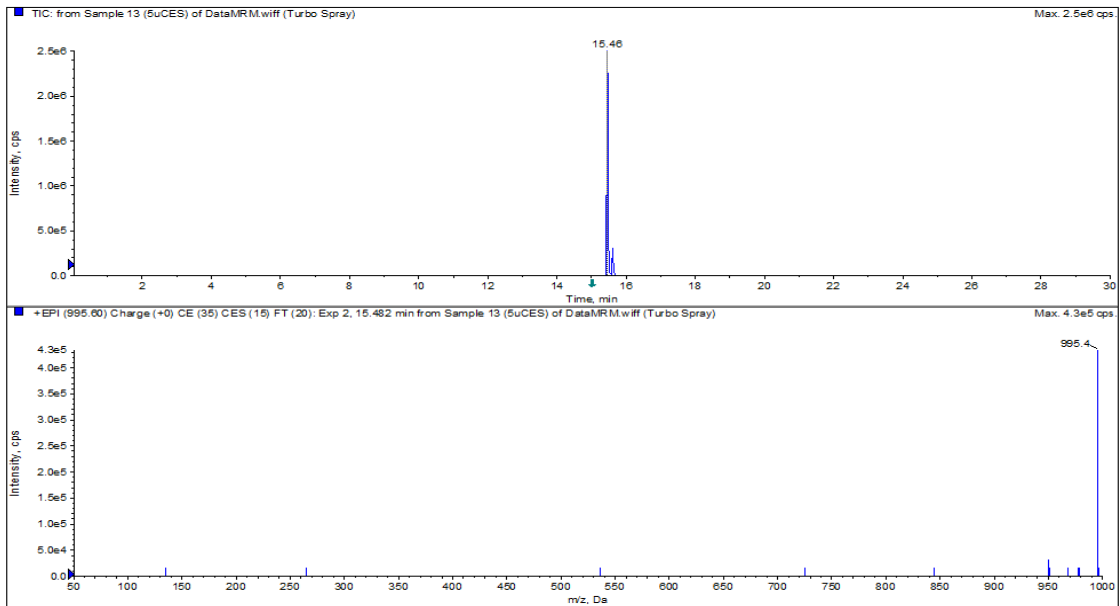


図3 ミクロシスチンLRのクロマトグラム(上)とスペクトル(下)

(2) 湖沼水の測定結果

諏訪湖から採取した水 20mL に酢酸を加え超音波洗浄機にかけた後、Oasis HLB により抽出して溶出した測定試料を構築したマイクロシスチン検出システムで測定した。その結果、マイクロシスチンLRの標準溶液と同じクロマトグラムを示し、マイクロシスチンLRを検出した。これにより、本マイクロシスチン検出システムによるマイクロシスチンLRの検出が確認できた。測定結果のクロマトグラムは図4のとおりである。

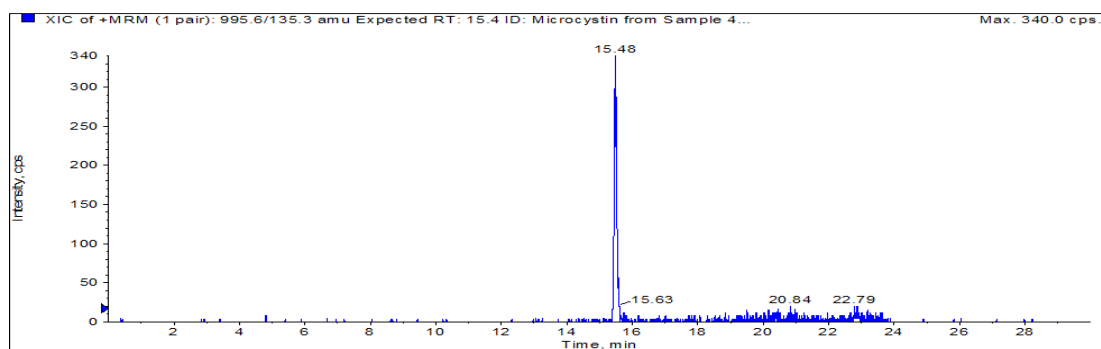


図4 湖沼水のクロマトグラム

(3) 血液・臓器等からのマイクロシスチン検出と壊機法による珪藻検出との比較結果

2013年から2017年までの5年間に信州大学医学部法医学教室で施行した司法解剖の保存試料のうち、溺死の66例について血液、臓器からのマイクロシスチンLRの検出と壊機法による珪藻

検出状況	壊機法						
	左肺上	左肺下	右肺上	右肺下	肝臓	腎臓	対照水
一視野多数	21	17	20	24	0	0	47
一視野数個	12	19	16	15	2	6	10
数視野1個	26	27	24	24	41	38	8
検出しない	7	3	6	3	23	22	1

図5 壊機法による珪藻類検出結果

検出状況	マイクロシスチン法			
	血液	肺臓	肝臓	対照水
検出	0	0	0	0
検出しない	66	66	66	66

図6 マイクロシスチンの検出結果

類の検出を行って比較した。その結果は、図5、図6のとおりである。壊機法では、肺臓の55%、肝臓の3%、腎臓の9%、対照水の86%で一視野当たり多数若しくは数個の珪藻類を検出しているが、マイクロシスチン法では、血液、肺臓、肝臓、対照水ともマイクロシスチンを検出しなかった。壊機法により、臓器内から珪藻類を確認しているのに溺水を吸引していることは明らかであるが、マイクロシスチンLRが検出されなかった原因として、測定試料の濃度が検出限界以下であることがまず考えられる。湖沼水などは100から500倍ほどに濃縮して測定する方法が通常行われているが、溺死体から採取する試料の量は、血液で数mL、臓器で数gと限られており、濃縮を行ってもわずかであることが障害になっている。また、マイクロシスチンは、酸化分解して生成したマイクロシスチンの同族体が100種類以上あり、本研究ではこの中のマイクロシスチンLRのみをターゲットにして検出してきた。現在、すべてのマイクロシスチンに共通する部分的な化学構造である2-メチル-3-メトキシ-4-フェニル酪酸(MMPB)を測定するMMPB法により実験を進めている。また、試料からマイクロシスチンの抽出にEDTAを使用するなど、溺水とともに体内に混入したマイクロシスチンの検出を引き続き進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：浅村 英樹

ローマ字氏名：ASAMURA, hideki

所属研究機関名：信州大学

部局名：学術研究院医学系

職名：教授

研究者番号(8桁): 80324250

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。