

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19481

研究課題名（和文）インスリン中毒固有のバイオマーカーを用いた新たな剖検診断法の開発

研究課題名（英文）Development of a new autopsy diagnostic method using biomarkers specific to insulin intoxication

研究代表者

永澤 明佳（Nagasawa, Sayaka）

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：30536735

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：作成したインスリン中毒のマウスモデルとコントロールモデルの血液を用いた microRNA 解析の結果、両モデル群における発現種類及び発現量に有意な差はみられず、血液を用いたバイオマーカーの応用は困難であった。一方、申請後、新たに入手した解析ソフトを用い、LC-QFOT/MSを用いたインスリン製剤の分析法を検討したところ、現在市場で主に流通しているインスリン製剤5種を短時間で分離することが可能な分析方法を開発することができた。この分析法を用い、実際の解剖事例に応用し、定量分析を実施した結果、インスリン製剤の死因への関与を明らかにすることが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討では、microRNAを用いたインスリン中毒の新たな診断方法の確立を目的としていたが、これは達成されなかった。一方、インスリン製剤をLC-QTOF/MSにて迅速かつ高感度で定性・定量することが分析方法を確立することができた。この分析法が確立されたことで、解剖事例におけるインスリン製剤のスクリーニング及び定量が可能になった。実際この分析法を用いて、実際にインスリン中毒が疑われる事例に分析を実施し、インスリン製剤の死因への関与を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：The results of microRNA analysis using blood from a mouse model of insulin intoxication and a control model showed no significant difference in the type and amount of expression in the two model groups, making it difficult to apply the blood-based biomarker. On the other hand, after the application, we examined an analytical method for insulin preparations using LC-QFOT/MS using newly obtained analytical software, and were able to develop an analytical method capable of separating five types of insulin preparations that are mainly distributed in the market today in a short period of time. Using this analytical method, we applied it to an actual autopsy case and conducted quantitative analysis. As a result, it was possible to clarify the involvement of insulin preparations in the cause of death.

研究分野：法中毒学

キーワード：インスリン中毒 バイオマーカー LC-MS/MS

1. 研究開始当初の背景

近年、インスリン製剤を自殺や他殺の目的で故意に投与する事例が世界的に増加傾向にあり、このような事例では、死者の血液、尿、硝子体液を用いてインスリン、Cペプチドやグルコースの濃度を測定し、鑑定へ応用する。特に、Cペプチドを含まない外因性のインスリン製剤の投与では、インスリン濃度の上昇と比較し、生体Cペプチド値がネガティブフィードバックにより低下することから、他の死因と比較し、Cペプチド/インスリン(C/I)比の低下が起こるとされ、外因性インスリン投与が疑われる事例では、これが有用な診断方法の一つとして使われてきた。しかしながら、インスリンは溶血などの影響により死後短時間で分解されることが知られており、C/I比は死後経過時間や死体状況に大きく影響されるとされ、明確な診断値は未だ不明である。さらに、グルコースは死後嫌気的な解糖及び細胞からの再分布などにより、死後高濃度を示し、死体における正確な血糖値測定は困難である。従って、従来の生化学的検査だけでは正確な死因の判定は難しく、死因の特定は、死者の生前の治療歴や現場状況などから、除外診断にて行わざるを得ない。よって、より正確な死因究明を行うためには、生化学的検査と合わせて死因の究明を行える検査の開発が必要である。

Tong.Fらは注射痕下の皮膚組織・皮下脂肪組織内に残存するインスリンの免疫染色やインスリン多量投与時に引き起こされる低血糖により脳に生じる障害を利用した脳病理組織による病理診断が有用であることを報告した。しかし、注射痕は、現場状況等によりインスリン投与が疑われない場合や腐敗が進行している場合などでは見逃されてしまう可能性が高い。また、脳病理診断は他の低血糖を引き起こす死因との区別が明確にできないなどの問題があり、脳病理診断単独でインスリン中毒の診断は行えないことも述べている。また、インスリン製剤に含まれる添加剤やインスリン製剤の分解物を用いた検出法やQ-ToF/MSを用いてヒトインスリンとヒトインスリンの化学構造を一部変えて作られたインスリンアナログ製剤を分けて検出するシステムが研究、開発されつつあるが、どの方法も未だ研究段階であり、定量システムへ応用できていない。また、インスリンアナログ製剤においても、死後体内で分解や再分布が起こる可能性があり、解剖時検出された濃度が生前の濃度を反映していない可能性が考えられる。従って、インスリンアナログ製剤の死後経過時間に伴う薬剤の濃度変化を測定・分析するなどの課題が多く残る。何より、Q-ToF/MSなどの大型器機は機械及び試薬が高価であることから、全ての施設で所有、稼働できるわけではない。そのため、施設間での検出結果に差が出てしまうことが問題となっている。そこで、我々は、インスリン中毒を証明することができる新たなバイオマーカーとしてmicroRNA(miRNA)に着目した。

miRNAは、タンパク質をコードしない、いわゆる non-coding RNA の一種であり、その鎖長は18-25塩基と短い一本鎖のsmall RNAである。これらは真核生物に広く存在し、形態形成、アポトーシス、細胞増殖、生殖機能など非常に重要な生物学的機能を制御している。法医学分野においては、これまでもDNAやRNAを用いた検査方法が多く開発され、実際の鑑定においても重要な役割を果たしている。しかし、これらは死後分解が進んでしまうことから、死体状況や死後経過時間に大きく影響され、時には結果を有用活用できないこともある。一方、miRNAは鎖長が短いため、死後も比較的安定して検出が可能であるとされている。Kakimotoらは、DNAの検出が難しいとされていたホルマリン固定後包埋処理した死体検体から抽出したmiRNAを用いて、次世代シーケンサー解析が可能であることを報告している。また、Hnasonらは唾液、精液など各種ヒト体液痕を用いて痕跡特異的に発現しているmiRNAを検索同定し、9種のmiRNA

により体液の同定が可能であることを報告している。これらの報告により死後長時間経過しても miRNA 量が保存されていることが明らかになったことから、miRNA は、法医学鑑定にとって有用な手段になると考えた。さらに、インスリン中毒特有の miRNA 発現変化をバイオマーカーとして確立した後、以前より法医学分野で広く用いられている手法であり、様々なキットが販売されている SYBR Green 検出による miRNA のリアルタイム PCR 解析へ応用することが可能になれば、より簡易・安価で行える新たな鑑定システムの構築が可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、法医解剖において、インスリン中毒死に特異的な miRNA をバイオマーカーとして確立し、そのバイオマーカーを用いてインスリン製剤の死因への関与を証明できる新たな診断法を確立することである。そこで、今回我々は近年着目されつつ、未だ法医学分野において論文報告が少ない miRNA に着目した。本研究にて、インスリン中毒のバイオマーカーを解析・同定し、実際の鑑定への応用が可能になれば、今後、インスリン製剤だけでなく、その他様々な薬毒中毒モデルのバイオマーカーの検出・同定へ発展させられる可能性があり、今後の法中毒の発展へ欠かせない研究であると考え。また、確立されたバイオマーカーを用いて、より簡易で安価な検出法への応用が可能になれば、解剖時、スクリーニング検査として用いることで、今まで見逃されていたかもしれない様々な薬物中毒死の検出が可能になり、法医学全体の発展にも寄与することが可能である。さらに、miRNA の解析データは、法医学分野だけでなく、基礎・臨床分野においても未だすべてにおいて解明できていないわけではない。よって、本研究は、法医学的基礎データを蓄積していくだけではなく、将来臨床医学における miRNA 研究の展開へ寄与することが可能になる重要な研究になる。

3. 研究の方法

様々なインスリン投与方法による低血糖動物モデル及び種々の死因の動物モデルの作成

インスリン多量投与による死亡事例では、インスリンを治療薬として使用していたヒトでの多量投与や、今までインスリン製剤の使用歴がないヒトでの多量投与など様々なパターンで起こることが考えられる。それぞれのパターンにおいて、生体内における反応にも違いが出ると考えられる。そこで、動物モデルも同様に、様々な種類のインスリン中毒モデルを作成する。また、死因もインスリン中毒とまったく異なる経路を介して死亡する外因死や内因子と、インスリン中毒時に引き起こされる低血糖と同様脳に障害を起こすとされる低酸素性虚血など、様々な死因の動物モデルを作成し、これらのモデル間での miRNA 発現変化の違いの比較検討等を行う。

次世代シーケンサーを用いたmiRNAの網羅的解析及びストレスマーカーの検索

で作成したラットモデルの、血清、尿、各臓器を用いて、網羅的にmiRNAを観察するために、次世代シーケンサーを用いて網羅的解析を行う。動物モデルを安楽死させ、各試料より miRNeasy Mini Kit (QIAGEN)にて totalRNA を抽出し、得られた RNA の収量及び分解程度を Step One Plus™ (Thermo Foshier Science)にて確認を行った後、QIAseq miRNA Library Kit(QIAGEN) を用いてライブラリの構築を行う。さらに得られたライブラリを用いて、MiSeq (Illumina)を用いてシーケンス反応を行い得られたデータを QIAgene 社の無料クラウド解析システムにて解析する。各試料及び各動物モデルグループから得られた miRNA を比較・検討し、各群間の有意差の有無を確認する。発現量の多い上位 30 種までの miRNA について統計解析を行い、インスリン中毒特有のバイオマーカーとして確立する。

解剖検体への応用およびスクリーニング法の開発

において検出・同定できたバイオマーカーについて、実際のインスリン多量投与による死亡事例からも動物実験と同様安定して検出可能か、また、検出された miRNA が他の死因と比べ有意に検出されるか否かについて検討を行う。実際の事例においてバイオマーカーとして確立できた後は、より迅速・低コストでバイオマーカーの検出を可能にするため、miScript® miRNA PCR Array を使用し、SYBE Green 検出を用いた miRNA のリアルタイム PCR 解析へ応用し、実務におけるスクリーニングシステムとして確立する。

これら診断法を、これまで用いられてきた診断法と合わせ、整合性を確認し、インスリン多量投与による死亡事例におけるインスリン製剤の死因への関与を証明することが可能な死因診断法を確立する。

4 . 研究成果

マウスに生理食塩水を投与したコントロールモデル、インスリンヒューマリン注を中毒量 (0.75 U/kg) 単回で投与した急性の低血糖動物モデル及び、治療でインスリンを使用している間での急性中毒のモデルとして、5 日間治療量 (0.20 U/kg) を投与した後、単回中毒量を投与したモデルを作成し、中毒量投与 30 分後に安楽死させた後、解剖を実施し、血液及び脳、すい臓、肝臓、腎臓を採取した。そのうち、血液を用いて抽出した RNA について、QIAseq miRNA Library Kit(QIAGEN) を用いてライブラリの構築を行い、得られたライブラリを用いて、MiSeq (Illumina) を用いてシーケンス反応を行い得られたデータを QIAgene 社の無料クラウド解析システムにて解析した。その結果、コントロール及び中毒モデル間における miRNA 発現及び発現量に有意な差は確認できなかった。

そこで、miRNA の解析とは別に、申請時には有していなかった LC-QTOF/MS の解析ソフトを用いて、新たに LC-QTOF/MS を用いたインスリン製剤の分析法の開発を行った。ウシインスリンを内部標準物質 (IS) とし、全血試料 250 µL に酢酸/水/メタノール(1:3:6)混液、IS 液及び標準液を加えた後、ヘキサン 250 µL、N,N-ジメチルホルムアミド 250 µL を添加し攪拌後遠心分離、その上澄みを採取し、5%アンモニア溶液 900 µL を添加し、OASIS MAX を用いて固相抽出を行った。抽出液を Nexera X2(島津) TripleTOF™5600 (AB SCIEX 社製) 分析カラム : L-column3 ODS C18 Metal-free column (150 × 2.1 mm, 3 µm: 化学物質評価研究機構) を用い、イオン化法 : ESI +、MRM 条件 : インスリンアスパルト [M+5H]⁵⁺ 1165.9>248.2、インスリングルルギン [M+6H]⁶⁺ 1011.2>1179.4、インスリングルリジン [M+5H]⁵⁺1165.5>346.2、インスリンデテミル [M+5H]⁵⁺1184.2>454.4、インスリンリスプロ [M+5H]⁵⁺1162.4>217.1、ウシインスリン (IS) [M+5H]⁵⁺ 1147.5>1121.0 にて分析した。その結果、全血中のインスリンアナログ 5 種類及び内部標準品は、10 分以内での分離が可能であり、感度よく検出された。検出限界は 5 ~ 10 ng/mL であった。本法を用い、インスリン中毒が疑われた解剖事例の分析を実施した結果、多量投与としたと推定されたインスリングルルギン及びインスリンリスプロが検出され、定量的結果、高濃度のインスリングルルギンが検出され、インスリン製剤が死因に関与した可能性を示すことができた。

しかしながら、インスリンは死後ヘモグロビンにより分解されることが明らかになっており、インスリン製剤も同様に分解されることが示唆されている。また、これまでの事例報告が少ないことから正しい死後の濃度評価は難しいと考えられた。そのため、引き続き miRNA の解析を行い、インスリン製剤の定量及び死後血中濃度評価検討と合わせて、インスリン中毒のバイオマーカーの検索を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagasawa Sayaka, Yamaguchi Rutsuko, Chiba Fumiko, Torimitsu Suguru, Iwase Hirotarō	4. 巻 68
2. 論文標題 Identification, measurement, and evaluation of blood concentrations of insulin glargine and insulin lispro by <sc>UPLC?MS?MS</sc> in a dead body suspected of insulin overdose	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Forensic Sciences	6. 最初と最後の頁 704 ~ 710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1556-4029.15219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永澤 明佳、山口 るつ子、千葉 文子、鳥光 優、岩瀬 博太郎
2. 発表標題 インスリン製剤の過量投与により死亡した一剖検例
3. 学会等名 日本法中毒学会第41年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sayaka Nagasawa, Rutsuko Yamaguchi, Fumiko Chiba, Suguru Torimitsu, Hirotarō Iwase
2. 発表標題 An autopsy case of death due to insulin preparation overdose
3. 学会等名 59th Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------