

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460888

研究課題名(和文) サ-ファクタントを指標とした、血液生化学的・形態学的溺死診断の試み

研究課題名(英文) A novel forensic method for diagnosing drowning using immunohistochemistry and surfactant blood biochemistry

研究代表者

岩楯 公晴 (Iwadate, Kimiharu)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90251222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の高齢者に特有で頻度が高い浴槽内における溺死例について、サ-ファクタントを指標として、血液生化学検査と、形態学的検査の両面から新しい剖検診断法の開発を試みた。

左心血、右心血、大腿動・静脈血中のサーファクタントプロテインA (SP-A)、サーファクタントプロテインD (SP-D)濃度を比較したところ、SP-A、Dともに溺死例では左心血中の濃度が右心血中の濃度より高値を示す傾向が認められた。諸臓器に対する抗サーファクタントアポプロテインA抗体を用いた免疫染色では、有意の所見は認められないように思われた。

ただし、現時点では予備的な研究の段階であり、今後さらにデータの蓄積が必要である。

研究成果の概要(英文)：A pilot study was performed to explore a novel forensic method for diagnosing fresh water drowning, especially bathtub deaths which are a frequent cause of mortality among elderly Japanese. Serum levels of surfactant proteins A (SP-A) and D (SP-D) were compared among blood specimens obtained from the left ventricle, right ventricle, femoral artery, and femoral vein. In drowning cases, both serum SP-A and SP-D levels within the left ventricular blood were noticeably higher than those found within right ventricular blood, compared with control cases. Immunostaining using anti-surfactant apoprotein A antibody were performed on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of lungs, kidneys and livers obtained from drowning and control cases; however, no significant between-group differences were realized. This pilot study was limited by its small cohort size; therefore, further studies are needed to determine the utility of this novel method for diagnosing fresh water drowning.

研究分野：法医学病理学

キーワード：溺死 法医診断 サーファクタント

### 1. 研究開始当初の背景

いわゆる水中死体が発見された場合の死因診断、すなわち溺死診断は、法医学領域における重要な問題の一つである。現在、最も汎用されている溺死診断のための検査法は、壊機法によるプランクトン検出であるが、その感度や特異性に関しては議論がある。すなわち、肺からプランクトンを検出することは比較的容易であるが、死後に水中に遺棄された死体でも肺までは水が侵入するとされており、その特異性には疑問がある。一方、肝、腎、骨髄等、その他の臓器から検出された場合は、血液の循環が維持されているうちに溺水を吸引したことの証明になるため、溺死の確定診断になりうるが、プランクトンのように大きなものが肺胞の毛細血管中に入り、体循環から諸臓器に達するのは容易でないと考えられ、検出感度の点で問題がある。

そのため、感度、特異性とも高い新たな溺死診断法が求められるようになり久しいが、現在まで必ずしも十分な成果が得られているとはいえない。理論的には、プランクトンの代替物質として、何らかの水中にのみ存在する物質が肺以外の臓器から検出されれば溺死診断は可能となるため、現在我々は、水棲細菌に固有の DNA を、PCR 法を用いて諸臓器から検出することによる溺死診断法の開発を試みているが、日本の高齢者に多い浴槽内での溺死例への応用は困難である。

しかし、例えばプランクトンが肺胞毛細血管内に吸収され諸臓器に達するのであれば、肺胞内のその他の物質も同時に吸収され諸臓器に分布するはずである。広大な肺胞の内腔を裏打ちしているサ-ファクタントが溺水時に肺胞壁から洗い流され、低酸素血症の原因となることは定説となっているが、その一部が毛細血管内に吸収され全身を循環し、末梢血中から、あるいは肺以外の臓器において検出できるのであれば、溺死診断に有用なのではないかと考え、本研究を着想するに至った。

### 2. 研究の目的

日本人に特有で頻度が高いにもかかわらず、有用な診断(検査)法のない浴槽内における溺死例について、サ-ファクタントを指標として、血液生化学検査(血中サ-ファクタント濃度の測定)と、形態学的検査(サ-ファクタントに対する抗体を用いた免疫染色)の両面から新しい診断法を開発することを目的とした。具体的には、溺死症例において、血中サ-ファクタントプロテイン濃度を血液の採取部位ごとで比較するとともに、肝、腎等の諸臓器を抗サ-ファクタント抗体を用いて免疫染色し、陽性反応を示すことがあるのかを調べた。右心血より左心血中のサ-ファクタント濃度が高値であれば、肺胞内に遊離したサ-ファクタントが肺胞毛細血管に吸収されたことを示し、大腿動脈血より大

腿静脈血のサ-ファクタント濃度が低値であれば、左心血から全身循環に入ったサ-ファクタントが、各組織に分布した後、静脈還流中では再び低値になったことが疑われ、免疫染色で陽性反応を示せば、実際に各組織にサ-ファクタントが分布したことを形態学的に証明できると考えたためである。

### 3. 研究の方法

本研究は東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認を得て行った(26-215)。

実験開始時までに東京慈恵会医科大学法医学講座で司法解剖ないし準行政解剖(承諾解剖)が施行され、浴槽内および一部河川内での溺死と判断された症例のうち、比較的死後経過時間の短い症例を対象とした。

(1)解剖時に採取した左心血、右心血、大腿動脈血、大腿静脈血中のサ-ファクタントプロテイン A (SP-A)、サ-ファクタントプロテイン D (SP-D)濃度を、(株)SRL に委託して測定した。

(2)剖検時に採取した肺、腎臓、肝臓のパラフィンブロックを 2~3µ に薄切、通常の HE 染色の他、抗サ-ファクタント・アポプロテイン A 抗体(DAKO)を用いた免疫染色を施行した。

### 4. 研究成果

(1)血液中のサ-ファクタント濃度測定は、予備的研究として、溺死例 8 例、コントロール群 3 例に対して行った。対象者は、男性 7 例、女性 4 例、年齢 17~80 歳(平均 57.5 歳)。コントロール群の死因は、心筋梗塞、急性薬物中毒、頭部損傷である。

予備的研究の段階であり、症例数も少なく、統計学的な検定や、グラフ化等には意味がないため、実際の測定結果を表 1、2 にそのまま示す。

表 1 SP-D の測定結果

溺死群				
No.	右心血	左心血	大腿 A	大腿 V
1	23.1	100		
2	78.3	332		
3	*	849	37.2	*
4	31.7		31.1	30.3
5	*	1110	127	*
6	93.4		99.2	101
7	17.5		24	*
8	68.7	1440		
コントロール群				
9	181	200		
10	61.4	138		
11	18.8	23.2		

大腿 A: 大腿動脈、大腿 V: 大腿静脈

\*: 測定基準値以下

空欄: 検体なしまたは不良のため測定不能

表 2 SP-A の測定結果

溺死群				
No.	右心血	左心血	大腿 A	大腿 V
1	40.5	102		
2	116	391		
3	38.8	119	28.8	36.2
4	21.6		24.2	21.2
5	11	222	32.9	12
6	37.1		33.8	36.3
7	13.7		19.3	14.4
8	23.8	234		
コントロール群				
9	37.5	41		
10	8.7	26.2		
11	11.5	18.2		

大腿 A: 大腿動脈、大腿 V: 大腿静脈  
空欄: 検体なしまたは不良のため測定不能

SP-A、SP-D とも、特に溺死群では右心血に比して左心血で高値を示す傾向が見られた。一方、大腿動脈血と静脈血には大きな差は見られないように思われた。

(2) 免疫染色に関しては、陽性コントロールとして肺に陽性所見が見られたのは当然であるが、その他の臓器には通常の免疫染色では明らかな陽性反応は見られなかった。DAKO 社の高感度免疫染色キット (CSA システム) を用いると、腎の尿細管などに陽性反応を示す例もあった。溺死例 15 例について、染色結果を陰性 (-) から (+++) まで 4 段階に半定量定期的に評価した結果を示す。

表 3 腎における免疫染色の結果

No.	腎の染色結果
12	+++
13	+++
14	+++
15	-
16	+
17	+++
18	+++
19	-
20	+++
21	-
22	+++
23	+
24	++
25	+++
26	++

予備的な研究として、免疫染色における諸臓器の染色性を調べたかったため、左右心臓血、大腿動・静脈血の保存の有無とは無関係に淡水中の溺死例 (浴槽内死亡 13 例、河川

内死亡 2 例) について、死後変化が少なく臓器の保存状態のよい症例を選択した。したがって、血液生化学検査の結果 (表 1、2) とは症例は重複していない。

15 例中 12 例で陽性反応がみられたが、高感度の免疫染色システムを用いているため、非特異的な反応も強くなり、染色結果の評価は難しい印象を受けた。また、コントロール群においても、(本来であれば陽性反応を示さない) 腎尿細管に非特異的な染色が見られることがあり、少なくとも予備的研究の段階においては、免疫染色の有用性は高いとは言えないように思われた。

(3) 浴槽内の死亡例は、40 前後の高温で死体が維持されることが多く、死後変化が進みやすいことは知られていたが、死後変化のために組織学的な精査に絶えられない症例が予想以上に多かった。一方、左右心臓血と大腿動静脈血すべてが採取、保存されていた症例も少なく、さらに、血液がすべて採取可能であり、しかも臓器の保存状態が良好な症例となるとごく少数と言わざるを得なかった。したがって、必ずしも十分な結果ではなかったが、ある程度の方向性が見られる形で予備的研究は終了した (論文、学会発表する段階には至っていない)。

今後、左右心臓血、大腿動・静脈血すべてが採取可能ではなかった症例も対象に加え、また、臓器の死後変化についてもある程度は許容する形で、可能な限り症例を拡大し、今回は別々の症例群に対して行った血液生化学的検査と免疫組織化学検査を同一の症例群に対して行い、両者の結果を比較検討するための本格的な研究に着手する予定であったが、残念ながら研究者の業務多忙のため着手できていない。研究費の残余金はすべて返却した上で、あらためて仕切り直して研究を再開したいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
特になし。

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

岩楯 公晴 ( IWADATE, Kimiharu )

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90251222