

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590675
 研究課題名（和文） 体組織中の内因性 γ -ヒドロキシ酪酸濃度の臨床法中毒学的解析に関する研究
 研究課題名（英文） Clinical and Forensic Toxicological Studies on Endogenous Gamma-Hydroxybutyric Acid in Body Fluids and Tissues

研究代表者
 守屋 文夫（MORIYA FUMIO）
 川崎医療福祉大学・医療福祉学部・教授
 研究者番号：40182274

研究成果の概要：生体では、尿中への内因性 γ -ヒドロキシ酪酸（GHB）の排泄量が尿の濃縮程度と pH に依存することが明らかとなった。遺体では、環境温度に依存して GHB が速やかに産生されるが、高熱が作用した焼損死体では、GHB の産生が抑制されることがわかった。動物実験により、死後早期における GHB の産生には、コハク酸を由来とする経路、 γ -アミノ酪酸（GABA）とプトレッシンを由来とする経路、および内因性 1,4-ブタンジオール（1,4-BD）を由来とする経路が関わっており、それらの GHB 産生寄与率はそれぞれ約 70%、約 10%および約 20%であることが判明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法中毒学、内因性 GHB、尿中排泄、pH、クレアチニン、死後産生機序、コハク酸セミアルデヒド脱水素酵素

1. 研究開始当初の背景

γ -ヒドロキシ酪酸（GHB）は、中枢神経系に微量に存在する内因性の抑制性神経伝達物質であり、その経口摂取により中枢神経系の強力な抑制作用が発現する。GHB は、 γ -アミノ酪酸_B（GABA_B）受容体と弱いながら親和性を有するとともに、シナプス前部にそれ自身の受容体を有することがわかっている。近年、米国を中心に GHB の濫用が蔓延し、大きな社会問題となっている。本邦においても、

GHB 関連事例が散見されるようになり、GHB は 2001 年 10 月に麻薬に指定され、その入手や取り扱いが厳しく規制されている。

私は、死体の体組織中薬毒物濃度の中毒学的評価、および救急病態把握への薬物体内動態の応用に関する一連の研究を行っている。近年、GHB 摂取の事実が全くないヒトの死体試料から相当量の GHB が検出される頻度が高いことに気づいたのを契機に、内因性 GHB に関する法中毒学的研究に取り組み、これまで

に、1) 体液中の GHB を気化平衡ガスクロマトグラフィーにより簡便・迅速に測定する方法および液-液抽出ガスクロマトグラフィーにより高感度に分析する方法、2) GHB 摂取の事実のない健常人から得られた血液では GHB は全て 0.5 µg/ml 未満であること、3) 剖検例では GHB 摂取の事実がないにもかかわらず、その約 9 割と極めて高率に無視できない量の GHB (1.33~44.3 µg/ml) が血液中から検出されること、4) 検出された GHB は主に死亡後解剖に至るまでの間に産生される可能性が高いこと、5) 焼損死体では他の死体よりも死後産生 GHB 量が少ない傾向があること、および 6) 内因性 GHB の産生がグルコース存在下でバクテリアの代謝により増強されうることを報告してきた。

今後、病態をも視野に入れた GHB の分析中毒学的研究を展開する上で、体組織における内因性 GHB と外来性 GHB を鑑別するためのより詳細な基礎データを集積する必要がある。また、死後早期における内因性 GHB の産生機序を解明することが不可欠である。

2. 研究の目的

(1) 生体における外来性 GHB と内因性 GHB との鑑別分析に資する基礎データを得るため、健常人の尿中内因性 GHB 濃度と尿中クレアチニン (CRE) 濃度、尿 pH および GABA 摂取との関連を明らかにする。

(2) 死体における外来性 GHB と内因性 GHB との鑑別分析に資する基礎データを得るため、法医剖検例の血液、尿および脳の内因性 GHB 濃度と死因や死後経過時間との関連を明らかにする。

(3) 死体における外来性 GHB と内因性 GHB との鑑別分析に資する基礎データを得るため、室温環境の微細変動が動物臓器における GHB の早期死後産生量に与える影響を明らかにする。

(4) 死後早期の組織における GHB の酵素的産生機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 研究の目的と試料の取り扱いに関する十分な説明をした上で同意が得られた健常成人 86 名 (男性 56 名、女性 30 名、年齢 21 - 45 歳) に、起床後数時間経過して採取した尿をそれぞれ 1 試料ずつ提供してもらった。そのうち 1 名の男性被験者には、約 4 ヶ月間に渡り尿を 1 日に 1 回ずつ提供してもらった。また、4 名の男性被験者には、就寝前に GABA 200 mg を 5 日間摂取してもらい、その期間中の早朝尿を提供してもらった。

尿中内因性 GHB 濃度の測定は、すでに我々

が考案した液-液抽出ガスクロマトグラフ法により実施した。また、尿の CRE および pH の測定は、それぞれ CRE-EN カイノスキットおよび簡易 pH メーターを使用して行った。

(2) 腐敗が軽微な法医解剖死体 65 例から一般薬毒物分析を目的に採取された血液、尿および大脳皮質の一部を内因性 GHB 分析に使用した。剖検例の内訳は、窒息死 8 例、焼死 15 例、溺死 5 例、凍死 3 例、出血死 7 例、頭蓋内出血 3 例、薬毒物中毒死 12 例およびその他 12 例であった。死後経過時間は 8 - 144 時間であった。

内因性 GHB の定量は、血液および尿は同量の精製水を加えて希釈し、また脳は 3 倍量の精製水を加えてホモジェネートとした後に、上記 (1) の液-液抽出ガスクロマトグラフ法により実施した。

(3) 雄性 ddY マウス (n=35) を頸椎脱臼により安楽死させた後、5 グループに分け、平均温度が 22.7 - 26.2°C の室内に放置し、その 24 時間後に脳、肝臓および腎臓を摘出した。

死後産生 GHB の分析は、各臓器に 3 倍量の精製水を加えてホモジェネートとした後に、上記 (1) の液-液抽出ガスクロマトグラフ法により実施した。

(4) 人体剖検例：生前に GHB を摂取した事実がなく、かつ腐敗が認められないか軽微であった法医解剖死体 32 例 (死後経過時間：7 - 50 h) の血液および肝臓の一部を GHB 分析に用いた。肝臓試料は右葉の深層から採取した。一部の症例では、肝臓右葉の表層からも採取した。32 例のうち、17 例は炭化死体 (死後経過時間：28.3 ± 11.7 h) で、15 例は非炭化死体 (死後経過時間：30.3 ± 11.6 h) であった。

動物実験：雄性日本白色家兔 (体重 3.0 - 3.6 kg, n=3) を二酸化炭素ガス吸入により安楽死させた。速やかに肝臓を採取し、使用するまで -35°C で凍結保存した。実験に際し、解凍した肝臓に同重量の 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を添加し、ホモジェネートを作製した。ディスポーザブル試験管にホモジェネートを 1 g 採取し、以下の酵素阻害剤をカッコ内に示す濃度に溶解したリン酸緩衝液のいずれかを 0.1 ml 添加した：塩酸ガバクリン (ガバクリンとして 1 mg/ml, GABA トランスアミナーゼ (GABA-T) 阻害剤)、バルプロ酸ナトリウム (バルプロ酸として 10 mg/ml, GABA-T 阻害剤)、N-ホルミルグリシン (1 mg/ml, コハク酸セミアルデヒド脱水素酵素 (SSADH) 阻害剤)、ピラゾール (1 mg/ml, アルコール脱水素酵素 (ADH) 阻害剤)、N,N-ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム (N,N-ジエチルジチオカルバミン酸として 1 mg/ml, アルデ

ヒド脱水素酵素 (ALDH) 阻害剤)、および N-ホルミルグリシンおよびピラゾール (各 1 mg/ml)。試験管にパラフィルムで蓋をし、30°Cのアルミヒーティングブロック中でインキュベートした。インキュベーション開始直前および2時間後における試料中のGHB濃度を測定した。対照には、阻害剤を含まないリン酸緩衝液 0.1 ml を肝臓ホモジェネートに添加したものを用いた。GHB 産生の阻害率 (%) は、 $100 - [(\text{阻害剤添加試料のインキュベーション2時間後の平均GHB濃度}) - (\text{阻害剤添加試料のインキュベーション直前の平均GHB濃度})] / [(\text{対照のインキュベーション2時間後の平均GHB濃度}) - (\text{対照のインキュベーション直前の平均GHB濃度})] \times 100$ により求めた。

GHB濃度の定量は、上記(1)の液-液抽出ガスクロマトグラフ法を若干改良して実施した。

4. 研究成果

(1)被験者 86 名の尿における内因性 GHB 濃度、CRE 濃度および pH は、それぞれ 0.03 - 2.1 $\mu\text{g/ml}$ (平均 $0.35 \pm 0.29 \mu\text{g/ml}$)、13.1 - 429 mg/dl (平均 $137 \pm 67 \text{ mg/dl}$) および 5.1 - 7.5 (平均 6.4 ± 0.6) であった。内因性 GHB 濃度が 0.03 - 1.2 $\mu\text{g/ml}$ の範囲において、同濃度と CRE 濃度との間に正の相関 ($r=0.59$) が認められた。GHB 濃度を CRE 濃度で補正した値 (CRE 補正值) は 0.08 - 3.9 mmol/mol (平均 $0.32 \pm 0.42 \text{ mmol/mol}$) であった。また、同一男性被験者から約 4 ヶ月間にわたって提供された尿試料による検討では、CRE 補正值と pH との間に比較的良好な正の相関 ($r=0.50$) が認められた (図 1)。GABA 摂取による内因性 GHB の尿中排泄パターンの変動は見られなかった。

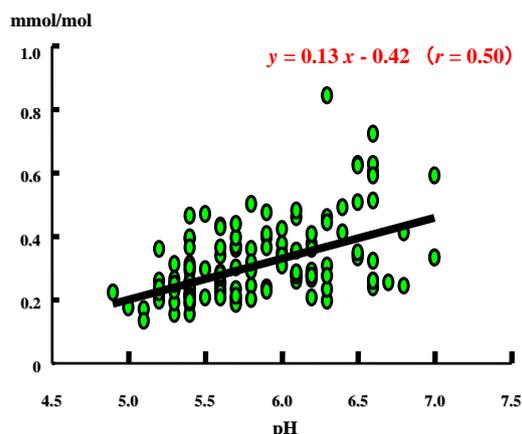


図1 同一被験者における尿中内因性GHB濃度のCRE補正值とpHとの関係

本研究により、内因性 GHB 濃度は尿の希釈／濃縮および pH の影響を受けやすいことが

示唆され、尿から低濃度の GHB を検出した際には、その由来を明らかにする上で尿の性状を考慮した解析が必要と思われた。ヒトにおける尿 pH に依存した GHB 排泄量の変化を捉えたのは本研究が初めてであり、臨床法中毒学的分野においてきわめて意義ある研究成果といえる。今後、尿 pH を考慮した尿中 GHB 濃度の解析が定着することが期待される。

(2)剖検例の体組織中の平均内因性 GHB 濃度は、血液 ($7.59 \pm 5.10 \mu\text{g/ml}$) > 尿 ($3.13 \pm 3.50 \mu\text{g/ml}$) > 脳 ($1.46 \pm 0.77 \mu\text{g/g}$) の順であった。各体組織の内因性 GHB 濃度と死後経過時間との間には正の相関 (血液: $r=0.354$ 、尿: $r=0.613$ 、脳: $r=0.506$) が認められたが、死後経過時間が類似している症例間での GHB 濃度のバラツキが大きかった。そこで、剖検例を家屋火災等により全身が高度に炭化した症例 (19 例、焼損群) と焼損群の死後経過時間に対応するその他の症例 (37 例、非焼損群) に分け、それらの血液、尿および脳の内因性 GHB 濃度を比較したところ、いずれの試料においても焼損群の GHB 濃度は非焼損群よりも有意に低い値を示した [血液: $3.51 \pm 2.74 \mu\text{g/ml}$ ($n=19$) vs. $8.99 \pm 4.59 \mu\text{g/ml}$ ($n=36$)、 $p<0.0001$; 尿: $1.37 \pm 0.98 \mu\text{g/ml}$ ($n=16$) vs. $3.44 \pm 3.38 \mu\text{g/ml}$ ($n=24$)、 $p<0.01$; 脳: $0.48 \pm 0.36 \mu\text{g/g}$ ($n=4$) vs. $1.53 \pm 0.42 \mu\text{g/g}$ ($n=8$)、 $p<0.002$]。非焼損群では死後経過時間が長くなるにつれて GHB 濃度が漸増したが、焼損群では GHB 濃度の増加傾向は認められなかった (図 2)。

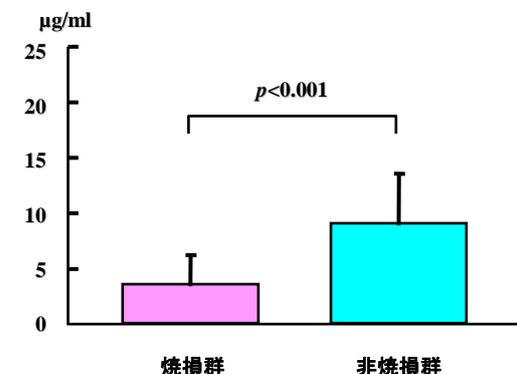
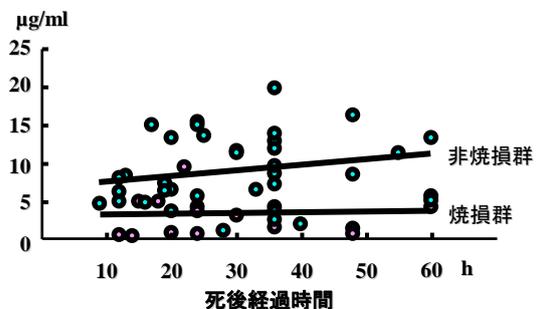


図2 焼損群と非焼損群における血中内因性GHB濃度の相違

本研究において、高度焼損により遺体残留酵素が失活し、死後早期の GHB 産生が抑えられることが示唆された。外来性 GHB と内因性 GHB を鑑別分析するための遺体試料としては、GHB 産生量が少ないという点で脳が有用と考えられた。本研究結果に基づき、より高度な遺体 GHB 分析結果の解析が期待される。

(3) 22.7 - 26.2°C という比較的狭い範囲での温度変化でも、各体組織における 24 時間後の GHB 産生量と温度との間には正の相関が認められた (肝臓: $r=0.368$; 腎臓: $r=0.633$; 脳: $r=0.883$)。脳組織における GHB 産生量と環境温度との相関がきわめて良好であること (図 3) から、その分析結果による環境温度を考慮した化学的な死後経過時間の一推定法の確立が期待される。

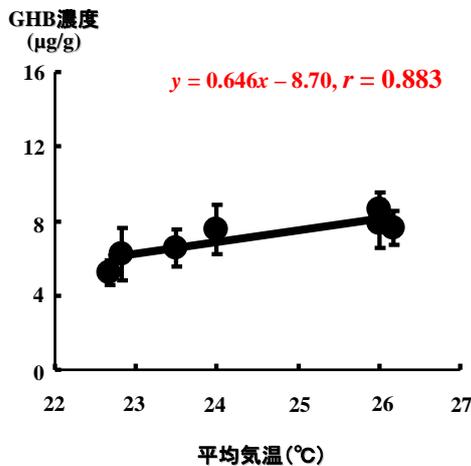


図 3 死後 24 時間の脳における内因性 GHB 濃度と実験時の気温との関係

(4) 人体剖検例: 血中内因性 GHB 濃度は、炭化死体 ($4.53 \pm 2.76 \mu\text{g/ml}$) の方が非炭化死体 ($11.7 \pm 7.44 \mu\text{g/ml}$) よりも有意に低値を示した ($p < 0.005$)。また、肝臓中内因性 GHB 濃度も、有意差は認められなかったものの、炭化死体 ($7.20 \pm 8.46 \mu\text{g/g}$) の方が非炭化死体 ($10.4 \pm 7.45 \mu\text{g/g}$) に比して低値となる傾向が認められた。同一症例において肝臓の深層とともに表層の内因性 GHB 濃度を測定したところ、非炭化死体 ($n=5$) では両試料の内因性 GHB 濃度に相違は見られなかった ($7.82 \pm 3.23 \mu\text{g/g}$ vs. $7.90 \pm 3.31 \mu\text{g/g}$)。一方、炭化死体 ($n=7$) では有意差は認められなかったものの、表層の内因性 GHB 濃度が深層に比べて低値を示す傾向が認められた ($2.41 \pm 1.99 \mu\text{g/g}$ vs. $3.88 \pm 3.48 \mu\text{g/g}$) (図 4)。

炭化死体でも内部組織は比較的正常な状態を保っていることが多く、肝臓のように大きな臓器では、表層と深層の熱の加わり方が大幅に異なるため残留酵素活性の差異も大

きくなり、内因性 GHB 濃度の部位依存性が生じたものと考えられた。

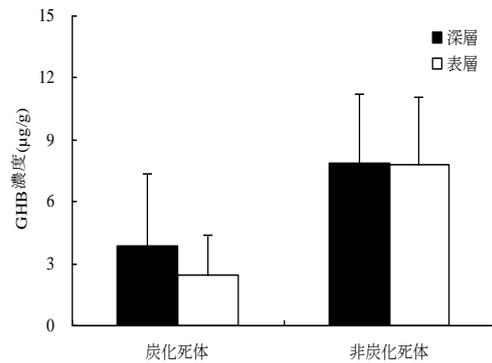


図 4 炭化死体(7例)および非炭化死体(5例)の肝臓中内因性 GHB 濃度の部位依存性

動物実験: インキュベーション 2 時間後における肝臓ホモジェネートの内因性 GHB 濃度は、ガバクリン添加試料で対照に比して有意な上昇が見られた ($p < 0.01$) が、他の酵素阻害剤を添加した試料では対照よりも有意に低かった ($p < 0.01 - 0.05$)。インキュベーション 2 時間後における GHB 産生量の阻害率は、バルプロ酸添加試料で 10.4%、N-ホルミルグリシン添加試料で 74.0%、ピラゾール添加試料で 17.7%および N,N-ジエチルジチオカルバミン酸添加試料で 12.8%であった。また、N-ホルミルグリシンとピラゾールを同時に添加した試料での阻害率は 91.1%に達した。

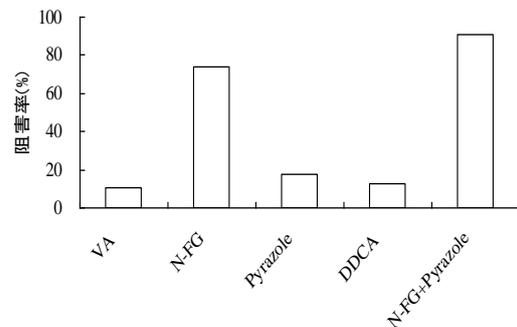


図 5 ウサギ肝臓ホモジェネートに諸種酵素阻害剤を添加したときの、インキュベーション 2 時間後における GHB 産生の阻害率

VA: バルプロ酸、N-FG: N-ホルミルグリシン、DDCA: N,N-ジエチルジチオカルバミン酸

死後早期の内因性 GHB は、以下の 3 つの経路から産生されると推定されている。1) 死後に TCA 回路が停止することで蓄積されるコハク酸 (SA) を由来とする GHB 産生経路: SA は SSADH によってコハク酸セミアルデヒド (SSA) に変換され、その後 SSA 還元酵素

(SSAR)によってGHBが産生される。2) GABAおよびプトレッシンを由来とするGHB産生経路: 末梢組織においてプトレッシンはジアミン酸化酵素によって4-アミノブチルアルデヒドを経由し、ALDHによってGABAに変換される。その後GABAはGABA-TによってSSAに変換され、さらにSSARによってGHBが産生される。3) 内因性1,4-BDを由来とするGHB産生経路: 1,4-BDは、ADHによって γ -ヒドロキシブチルアルデヒドに変換され、その後ALDHによってGHBが産生される。本研究の結果から、1)、2)および3)の経路がそれぞれ約70%、約10%および約20%の割合でGHBの死後産生に関わっていることが示唆された。これまで死後にSSADHによってSAからSSAへの還元反応が実際に行われているかどうかについては不明であった。生体では、SSADHによるSAからSAへの反応は速度論的に不可逆である。しかしながら、我々のin vitro実験においてSSADHの阻害剤であるN-ホルミルグリシンによってGHB産生が著明に阻害されたことから、死体ではSSADHによってSAからSSAへの逆反応が起こることが明らかとなった。これは死後のTCA回路の停止によるSAの蓄積や、 NAD^+ の枯渇に伴う、SSADHの逆反応に関わるNADHの蓄積などが要因となっているものと考えられる。なお、バルプロ酸とともにGABA-T阻害剤であるガバクリンによりGHB産生が阻害されず、逆に促進された原因については今後解明される必要がある。

本研究により、死後早期のGHB産生機序が明らかになったことから、剖検例における内因性GHBと外来性GHBの鑑別分析に関する新たな展開が期待される。

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1件)

- ① Hiroyuki Nishimura, Fumio Moriya, Yoshiaki Hashimoto. Mechanisms of γ -hydroxybutyric acid production during the early postmortem period. Forensic Toxicology, Vol. 27, 2009, 印刷中, 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 西村拓起, 守屋文夫, 古宮淳一, 中西祥徳, 橋本良明. γ -ヒドロキシ酪酸のマウス臓器における死後産生. 第92次日本法医学会総会, 2008年4月24日, 長崎市
- ② 西村拓起, 守屋文夫, 古宮淳一, 橋本良明. 内因性 γ -ヒドロキシ酪酸の尿中排泄特性. 第29回日本中毒学会総会・

学術集会, 2007年7月27日, 東京

- ③ 西村拓起, 守屋文夫, 古宮淳一, 橋本良明. 剖検例における血液, 尿および脳の内因性 γ -ヒドロキシ酪酸濃度. 日本法中毒学会第26年会, 2007年6月8日, 延岡市
- ④ 西村拓起, 守屋文夫, 古宮淳一, 中西祥徳, 橋本良明. 健常者における内因性 γ -ヒドロキシ酪酸(GHB)の尿中排泄動態: 飲酒、喫煙およびGABA摂取の影響について. 第91次日本法医学会総会, 2007年5月17日, 秋田市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守屋 文夫 (MORIYA FUMIO)

川崎医療福祉大学・医療福祉学部・教授
研究者番号: 40182274

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし