

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15874

研究課題名(和文) LC-MS/MSを用いたチオ硫酸測定による硫化水素中毒診断の確立

研究課題名(英文) The development of hydrogen sulfide poisoning diagnosis method by measuring thiosulfate concentration with LC-MS/MS

研究代表者

的場 光太郎 (Matoba, Kotaro)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：00466450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：血液中のチオ硫酸塩濃度は硫化水素中毒の指標として注目されている。本研究では従来のGC-MSによる測定法に代わるLC-MS/MSによるチオ硫酸塩濃度測定法を確立し、3種の検体(血液・尿・心臓液)について死後腐敗によるチオ硫酸塩濃度の変化を調査した。硫化水素中毒ではない場合でも3種の検体とも腐敗事例では高濃度のチオ硫酸塩が検出されることが多く、腐敗していない場合の硫化水素中毒事例と同等のレベルで検出されることが多かった。この結果から硫化水素中毒診断の指標としてチオ硫酸塩を用いる場合には腐敗の影響を十分に考慮する必要があることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のチオ硫酸塩の測定は前処理が煩雑であるため、硫化水素中毒が疑われない場合は、検査が実施されないことが多いので硫化水素中毒が見逃されている可能性がある。本研究で確立したチオ硫酸塩濃度測定法は簡便迅速であり、法医解剖で得られた検体の測定が行われることで、硫化水素中毒の見逃しを未然に防ぎ、事故の再発防止が可能となることが期待される。また、死後腐敗によるチオ硫酸塩濃度の上昇が確認されたことにより、硫化水素中毒の診断において腐敗の程度を考慮することが必要であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The thiosulfate concentration in blood has been recognized as a marker of hydrogen sulfide poisoning in forensic medicine. In this study, we established a new method of quantitative analysis of thiosulfate concentration using LC-MS/MS instead of GC-MS, and studied the changes in thiosulfate concentration caused by postmortem decomposition of 3 kinds of body fluids (blood, urine, and pericardial effusion) collected from forensic autopsy cases. The thiosulfate concentration in each body fluid in the decomposed cases (non-hydrogen sulfide poisoning cases) was detected at a high level, at the same level as that in hydrogen sulfide poisoning cases. Therefore, thiosulfate in body fluids is produced by postmortem decomposition regardless of hydrogen sulfide poisoning, and it is necessary to consider the influence of postmortem decomposition in the diagnosis of hydrogen sulfide poisoning based on thiosulfate concentration.

研究分野：法医学

キーワード：チオ硫酸塩 硫化水素中毒 死後変化 法医学

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

### 1. 研究開始当初の背景

硫化水素は、吸入された量が微量であれば体内で代謝して無毒化することが可能であるが、基本的に猛毒であるシアンと同じようにシトクロム c オキシダーゼの阻害による細胞呼吸障害が起きる非常に毒性の強いガスである。天然には火山性ガスとして存在し、登山者や温泉の入浴者に中毒が発生することがある。家畜の尿尿処理施設、下水処理施設や化学工場においても、労働災害として中毒が発生する。近年では硫黄系の農薬と塩酸系の洗浄液の市販薬品類を混ぜて人工的に硫化水素を発生させて自殺する例も多発している。最近の硫化水素中毒を見逃した検視事例では 2013 年から 2014 年にかけて北海道十勝地方の同じ温泉地で硫化水素中毒とみられる事故が 3 件発生した。その内最後の 1 名は硫化水素中毒と診断されたが、先の 2 名は硫化水素中毒を検視官や医師が疑わなかったために、死因究明のための法医解剖は実施されず、1 名は溺死、もう 1 名は虚血性心疾患と誤って診断されていた。最初の被害者が亡くなった段階で迅速に血液や尿中のチオ硫酸塩分析が行われていれば、死因が硫化水素中毒と判断され、以降の被害者を防げた可能性がある。

硫化水素中毒は急死した場合は特異的な所見に乏しく、検視における外表検査で診断することは困難である。死後早期であれば硫化水素は血液から検出することもあるが、体内で容易に酸化されるため、硫化水素中毒を証明する指標としては信頼性が低い。したがって、法医学分野では、硫化水素の代謝物であるチオ硫酸塩を測定することで、硫化水素中毒診断が可能になるとされている。

チオ硫酸塩の分析法として、約 20 年前に日本国内で、Kage らはチオ硫酸塩を、ペンタフルオロベンジルブロマイド (PFBB<sub>r</sub>) でアルキル化し、ヨウ素で酸化してジスルフィド体としてガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) で分析する方法を報告した (Kage S, et al. J Forensic Sci 1998; 43: 908-910)。現在、世界中でチオ硫酸塩の測定はこの分析法がスタンダードとなっており、最近までの硫化水素に関する症例報告や原著論文では、この分析法が用いられている。日本法医学会が作成した薬毒物検査マニュアルにおいても血液中のチオ硫酸塩分析に関して、この分析法が推奨されている。一方で近年、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) が目覚ましく発展しており、タンデム装置 (MS/MS) の登場により特異性と感度が特に向上していることから、法中毒学の分野においても睡眠導入剤、向精神薬、麻薬などの薬毒物分析に利用されている。当研究グループでは、この LC-MS/MS を用いたチオ硫酸塩の分析法の開発に着手しており、報告を実施しているところである (Jin S, Hyodoh H, Matoba K, et al. Legal Med 2016; 22: 18-22)。従来の GC-MS による分析法では、検体の前処理が煩雑であり、定量値の再現性が低く、定量で用いるよりは定性に重点を置いているように見える。それに対し、LC-MS/MS では (検体) 溶液中のイオンそのものを分析・測定するため前処理は簡便なもので良く、正確な定量が可能である。そこで、LC-MS/MS を用いた簡便迅速な分析法の開発が期待される。

硫化水素中毒によって死亡した事例においては、血液中のチオ硫酸塩を測定することが有効であることは前述の通りであるが、それは血液中のチオ硫酸塩は死後安定であると過去に報告されていることによるものである。しかし、現在、硫化水素中毒ではない事例 (コントロール群) で腐敗を認めた 2 事例において中毒域を超えるチオ硫酸塩が検出されたとの報告があり議論になっている (Miyazato T, et al. Forensic Toxicol 2013; 31: 172-179)。血液中のチオ硫酸塩の濃度によって、硫化水素中毒の診断がされている現状を考慮すると、チオ硫酸塩の死後変化による影響の有無に関する検討は急務であると考えられる。

### 2. 研究の目的

- (1) 血中チオ硫酸塩の測定において LC-MS/MS を用いて、従来法である GC-MS よりも簡便迅速で正確な定量方法を開発し、検体前処理や測定方法の改良を推進する。
- (2) 死後にチオ硫酸塩の産生が示唆される報告もあることから、硫化水素中毒における心臓内血液 (心血) 中チオ硫酸塩の濃度に対する死後変化による影響の有無について検討する。
- (3) 法医学分野にて実施されている法医解剖で採取される血液以外の検体 (尿、心嚢液) について、硫化水素中毒事例に加えて、多数の硫化水素中毒ではないコントロール群の事例についても測定を行い、死後経過時間や腐敗現象とのチオ硫酸塩濃度の関連を検討し、チオ硫酸塩に対する死後変化による影響の有無に関する評価・検証を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) LC-MS/MS を用いたチオ硫酸塩の分析法の確立

LC-MS/MS を用いたチオ硫酸塩の分析法は血清について既に先行研究 (Jin S, Hyodoh H, Matoba K, et al. Legal Med 2016; 22: 18-22) により完成しつつあったが法医検体では全血を用いることが一般的であり、その方法での全血分析は血球成分などが分析に悪影響を及ぼすことが判明している。そこで本研究は検体の前処理に注目し、その悪影響を及ぼす成分の排除方法を検討した。

#### (2) チオ硫酸塩の死後変化による影響の有無に関する検討及びチオ硫酸塩の測定の際の適切な検体の採取部位の解明

チオ硫酸塩の濃度に対する死後変化による影響を検討するために、硫化水素中毒ではない事例の検体のチオ硫酸塩の濃度を前項で確立した分析法を用いて測定した。腐敗を認めた群と認

めなかつた群に分けて考察することにより、チオ硫酸塩の濃度に対する死後変化による影響を検討した。また、法医解剖で採取される血液以外の検体（尿および心嚢液）についても測定を行い、同様に死後変化による影響の有無を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) LC-MS/MS を用いたチオ硫酸塩の分析法の確立

一般的に薬物分析での検体の前処理は固相抽出が主流であるが、それは薬物の極性によって振り分ける方法であり比較的低極性の物質に有効である。チオ硫酸塩は高極性物質であり、逆相の固相担体では吸着せず、順相担体では非常に高濃度の酸を用いなければ溶出させられず、固相抽出には適さないことが分かっている。そこで種々の検討を行ったところ、物質の粗精製に限外濾過膜を使用することをヒントに、それを応用できないか検討した。チオ硫酸塩は分子サイズが小さいため、夾雑物をできるだけ排除することを考えると限外濾過膜の排除サイズは小さいほど好ましい。当初、既存の限外濾過膜で最小のもの（排除サイズ、3 kDa）を用いたが限外濾過膜の目詰まりが発生し濾過に長時間を費やさなければならなかった。その対応策として、あらかじめ比較的大きい排除サイズの濾過膜（50 kDa）を用いて濾過することで大きめの粒子や分子を排除し目的の最小サイズの限外濾過がスムーズにできるようになった。分析法の各種バリデーションテストでは良好な結果が得られ、全血の測定法が可能となった。この前処理法は先行研究で測定した血清にも適用できることが確認され、さらに尿や胸水などの他の体液においても適用可能であると考えられ、今後の研究推進に有用性が高いと考えられる。

##### (2) 法医解剖検体におけるチオ硫酸塩濃度の測定

法医解剖において採取部位の異なる検体3種（心血、心嚢液、尿）について、硫化水素中毒ではない事例を対象として、それぞれ腐敗した死体（腐敗群）と腐敗していない死体（非腐敗群）から採取してチオ硫酸塩濃度を測定して検討を行った。

測定結果は表1にまとめた。いずれの採取部位の検体においても非腐敗群に対して腐敗群で明らかな高濃度のチオ硫酸塩が検出され、平均値で比較すると心血で平均約160倍、尿で約18倍、

心嚢液では約28倍であった。正常な場合の血液や心嚢液中のチオ硫酸塩は4 μmol/L以下とされているが、腐敗群において心嚢液の濃度は0.53~277.12 μmol（平均51.52 μmol/L）であり、心血の濃度は15.07~358 μmol/L（平均81.55 μmol/L）であった。以上から導き出される結論として、死後変化によりチオ硫酸塩が産生・増加していることが示されており、その変化は心嚢液と比較した場合に心血（心臓内血液）において特に著しいことが分かった。尿に関しては、チオ硫酸塩は代謝産物であるため、正常な場合でも尿中では血液中や心嚢液中より高く検出されることが多く報告されており、正常では35 μmol/L以下（硫黄を含む食材を多く食べた場合は65 μmol/L以下）とされている。腐敗群では尿のチオ硫酸塩濃度は10.59~465.28 μmol/L（尿平均93.21 μmol/L）であり、大部分が正常値よりも上昇していた。

表1. 法医解剖検体のチオ硫酸塩濃度測定結果

	非腐敗群 (μmol/L)	腐敗群 (μmol/L)
心血	0.51±0.35 (n=16)	81.55± 87.05 (n=16)
尿	5.17±0.35 (n=17)	93.21±114.68 (n=17)
心嚢液	1.86±1.18 (n=14)	51.52± 70.85 (n=13)

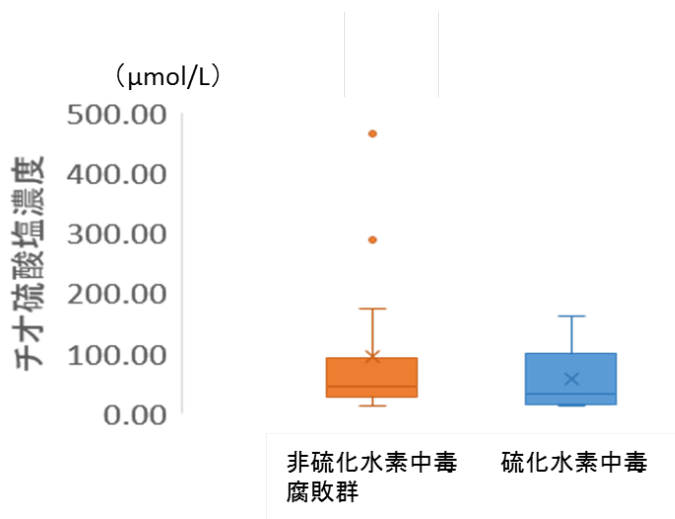


図1. 非硫化水素中毒の腐敗群（本研究）と硫化水素中毒における尿中チオ硫酸塩の比較

以上の結果のうち尿と血液については、文献などの硫化水素中毒例との比較検討を行った。硫化水素中毒群は近年の報告 (Maseda C, et al. Legal Med 2017;24:67-74) の数値を用いた。尿について報告では硫化水素中毒 (7例) の尿チオ硫酸濃度は 12.2~160.0  $\mu\text{mol/L}$  であり、本研究の非硫化水素中毒の腐敗群の測定結果 10.6~465.3  $\mu\text{mol/L}$  の範囲に含まれることが示された (図1)。血液についても文献値 (10例) 30.2~331.8  $\mu\text{mol/L}$  に対して腐敗群では 15.1~358.0  $\mu\text{mol/L}$  であった。

#### 【まとめ】

死後腐敗により体液中でチオ硫酸塩濃度が上昇することが判明した。これは死後に硫化物の酸化がなされることに起因していると考えられ、硫化水素中毒の指標としてチオ硫酸塩を用いる時には腐敗の影響を十分に考慮する必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. 的場光太郎、神繁樹、兵頭秀樹、死後変化による腐敗が血液中のチオ硫酸塩濃度に与える影響について、日本法医学会、2019年
2. 邵旻蓉、藤田瑛美、山世真由美、兵頭秀樹、的場光太郎、神繁樹、LC-MS/MSによる尿および血中の酪酸の測定と死後腐敗における関係、第24回日本質量分析学会北海道談話会・研究会、2018年

〔図書〕(0件)

〔産業財産権〕

出願状況(0件)

取得状況(0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：兵頭 秀樹

ローマ字氏名：Hyodoh Hideki

研究協力者氏名：神 繁樹

ローマ字氏名：Jin Shigeki

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。