

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19782

研究課題名(和文) 運動後の制圧中に起こる突然死の原因解明に高分解能飛行時間型質量分析計を用いる

研究課題名(英文) A study using a high-resolution time-of-flight mass spectrometer to elucidate the cause of sudden death during post-exercise control

研究代表者

舟山 真人 (Funayama, Masato)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40190128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究目的は「興奮性せん妄」の診断基準となるようなバイオマーカーの探索である。研究ではラット生体試料から高速液クロマトンデム型高分解能質量分析装置による網羅的メタボロミクス解析を試みた。

その結果2000種以上の成分が検出され、最終的に119成分(ポジティブ)、および149成分(ネガティブ)が残った。それを公開データベース等を用いて化合物同定し多変量解析を行ったところ、キサントシンがマーカーの候補として最も適していると思われた。アルコール摂取の有無でも代謝物の増減変化に違いが観察されており、メタボロミクスにおいては生体の少しの変化が代謝物の種類・発現量に大きな影響を及ぼしていることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究の最も大きな成果はG-Met分析を用いることによって、死直前のストレスの違いを識別できた点である。これはもちろんラットを用いた動物実験でのことではあるが、これまで同様なモデルで検討されてきたmiRNA等のマーカーよりも非常に鮮明に違いを表していた。しかしながら、法医試料への応用には今回は検討していない死後変化の影響を加味する必要がある。さらに、運動・抑制以外のストレスや疾患の影響等も考慮しなければならないであろう。現段階では、剖検試料からの判断は難しいと思われるが、さらにデータを重ね、バイオマーカーとしての精度を高めることができればヒトへの応用が十分可能であると思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to search for biomarkers that can be diagnostic criteria for "excited delirium". We attempted comprehensive metabolomics analysis of rat samples using a high speed liquid chromatogram - tandem mass spectrometer.

As a result, more than 2000 kinds of components were detected, and 119 components (positive) and 149 components (negative) remained. When compounds were identified using a public database and subjected to multivariate analysis, xanthosine appeared to be the most suitable marker candidate. Differences in the increase and decrease of metabolites were observed with and without alcohol intake, and it was confirmed that in metabolomics, slight changes in the body had a great influence on the types and expression of metabolites.

研究分野：法医学

キーワード：興奮性譫妄 突然死 ストレス 飛行時間型質量分析 主成分分析 制圧 飲酒

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

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は興奮性譫妄の原因究明のために行われるものである。ちなみに興奮性譫妄とは法医学の中だけに使われる死因用語である。一般臨床では使用される「譫妄」はあくまでも意識障害の症状であり、死に至るものでない。一方で、法医に使用される興奮性譫妄とは、典型像として、青壮年が逃走あるいは激しいもみ合い中の制圧下で急死、しかし剖検上は死因となる所見がないような場合に使用される。不整脈の関与がいられているが、真の原因は未だ不明である。

研究代表者の所属する法医学分野では、解剖試料の薬物分析に質量分析計を用いている。本研究ではこの中の一台である最新の高分解能 LC-QTOF (液体クロマトグラフ-ハイブリッド/飛行時間型) 質量分析計を、法医学的にしばしば問題となる、激しい体動後の制圧中に突然死を引き起こす興奮性譫妄による死亡の原因究明に利用する。研究代表者による先行研究 (萌芽: 26670354) では、ストレス負荷の違いによってある種の microRNA 発現量の違いが得られているが、同時にこのマーカーだけでは実務応用に限界がみられた。本研究では全く視点を変え、同機器から得られた 50,000 イオン数というビックデータを成分スコアプロットとローディングプロットを利用した多変量変動解析から、この生成物質の探索を行おうというものである。なお、興奮性譫妄による死亡例あるいはそのモデルに対し同手法を用いた研究はこれまで内外にはない (機器が高価であることと、他の医学関係者は生体の疾患や予防医学的観点からメタボローム解析を試みているためである)。ちなみに従来の質量分析計では、分子量がほぼ同じな2つの物質があった場合、その区別は困難であった。しかし、今回使用する LC-QTOF 質量分析計は、組成が違えば両者の区別が可能であり、従来の質量分析計よりも定性能力が極めて高い。よってこの機器を用いることでストレス負荷により短時間でラットが生み出す化合物の変動が何かを明らかにしたい、というのが本研究の背景・経緯である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、剖検によってもその死因判断に苦慮する、いわゆる興奮性せん妄の診断基準となるような新規のバイオマーカーの探索である。RNA やタンパク質等の物質は、残念ながら死後変性によりバイオマーカーとしての意味をなさない。そのため生体試料から高速液体クロマトグラフトンデム型高分解能質量分析装置 (LC-QTOF-MS) による網羅的メタボロミクス解

析(global metabolomics, G-Mat 解析)を試みた。これは、生体内の代謝物質を網羅的に解析することでその挙動を把握し、その背景にある生化学的機序を理解しようとする解析方法である。分子量が 1000 程度の有機化合物であれば死後変化の影響も受けづらく、肉眼的には診断に苦慮する興奮性せん妄例においても、何らかの代謝物の増減から生前のストレス度合の数値化が可能となることが期待される。実際これまでに、ラットを用いてトレッドミルによる運動を行った群と、そうでないコントロール群間での G-Mat 解析では複数の代謝物の増減が確認され、運動によるストレスのバイオマーカー候補が発見されている。研究では運動によるストレスに加え、メタノール接種、水袋による体幹の抑制というストレスも加えている。これは、よく報告される興奮性せん妄が疑われる事例において、アルコール飲酒後、暴れているところを警察官等に抑制されている最中に発生することが多いことから、それを模した動物実験モデルとしたためである。

### 3. 研究の方法

最初にラットを用いてトレッドミル運動させた群とコントロール群の二つに分けて基礎的実験の確認を行った。次にラットの大きさに合わせて 21%エタノール (3.8g/kg) を飲酒させ、30 分後にトレッドミルにて走行運動 (30cm/sec) を 30 分行った。これらの群と、さらに 2kg の水袋にて体幹を窒息しない程度に 30 分間抑圧するストレスを加えた群、そして何も行わないコントロール群での比較となる。ストレス終了後、(コントロール群はそのまま)過剰麻酔による安楽死を行い、心臓血を採取し、その血清を試料とした。除タンパク処理を行った血清試料を、LC-QTOF-MS である TripleTOF5600 システム(SCIEX, USA)によりポジティブおよびネガティブ測定モードにて代謝物の測定を行った。得られたデータを MarkerView ソフトウェア(SCIEX)で解析し、代謝物の同定および試料群間における検出量増減比較を行った。

なお、本研究は東北大学医学系研究科動物実験倫理委員会の承認を得ている(2019 医動-047)。

### 4. 研究成果

トレッドミル運動の有無で両データを比較した結果、LC-QTOF-MS のネガティブ測定モードでは、質量数/電荷(m/z)が 277.2166 の物質がコントロール群と比較して高発現していた。これはリノレン酸と推察され、トレッドミルの運動により不飽和脂肪酸が代謝分解され、生成した

ものと思われた。また、ポジティブ測定モードでは、(m/z)が 104.07 の物質が高発現し、逆に (m/z)175.0863 のものが低発現で観察された。前者はギャバ(γ-アミノ酪酸)であろうと推察され、これは主に脳や脊髄で「抑制性の神経伝達物質」として働いており、興奮を鎮めたり、リラックスをもたらしたりする役割を果たしていると考えられる。すなわち運動時の興奮を抑えるために発現が促され、血中に高濃度に流入したのではないかと思われた。また、低発現となったのはリン脂質類であろうと推察され、いずれの分子もラットのトレッドミルによる運動が原因で観察されたことに矛盾はないと考えられた。

エタノール飲酒群ではポジティブおよびネガティブ両モードとも 2000 種以上の成分が検出されたが、ピーク強度が低い不安定な代謝物を除くなどの処理を行い、最終的にはそれぞれ 119 成分、および 149 成分が残った。Human Metabolome Database (HMDB)、Lipidmaps、Chemspider 等を用いて化合物同定を行い、その結果を用いて多変量解析を行った。主成分分析の結果からは、ポジティブモード測定による群の分離に寄与する成分が検出できたが(図 1)、ネガティブモードでは分離が困難であった(図 2)。同定された物質の中では、キサントシン <http://nonlinear.com/redirect/outbound?p=hmdb&param=HMDB0000299> がマーカーの候補として最も適していると思われた(これは、プリンヌクレオチドの一種であり、アデニン、グアニンというプリン塩基が代謝されることで生成されるものである。また、ジビドウリジン <http://nonlinear.com/redirect/outbound?p=hmdb&param=HMDB0000497> の変化も非常に興味深いものであった。この物質は tRNA の構成成分であるウリジンが還元されたものであり、この修飾を受けることで tRNA の柔軟性が向上し、始めてその機能を発揮することが可能となる。また、その一方でこの物質は悪性腫瘍にも多く見られることから、疾患との関連性もあるとされている。その他にもいくつかの物質が同定されたが、アルコールを摂取していない場合の運動と比較して、代謝物の増減変化にも大きな違いが観察されており、メタボロミクスにおいては生体の少しの変化が、代謝物の種類および量に大きな影響を及ぼしていることが再確認された。

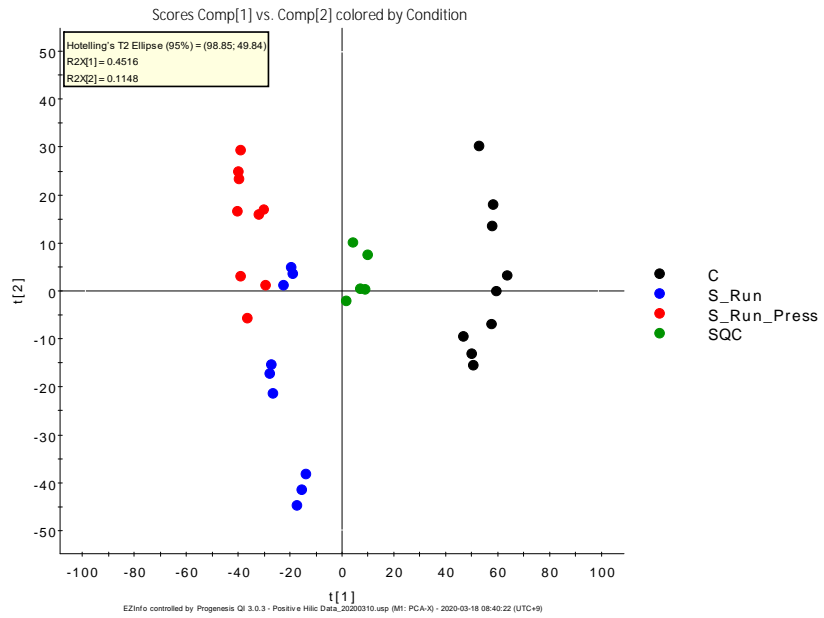


図1 主成分分析 (score plot) 親水性相互作用クロマトグラフィー positive (陽イオン) モードの結果. C:コントロール群、S Run: 飲酒後トレッドミル群、S Run Press: 更に拘束群、SQC: 全サンプルを混合したコントロール群。各群を分けることが可能であった。

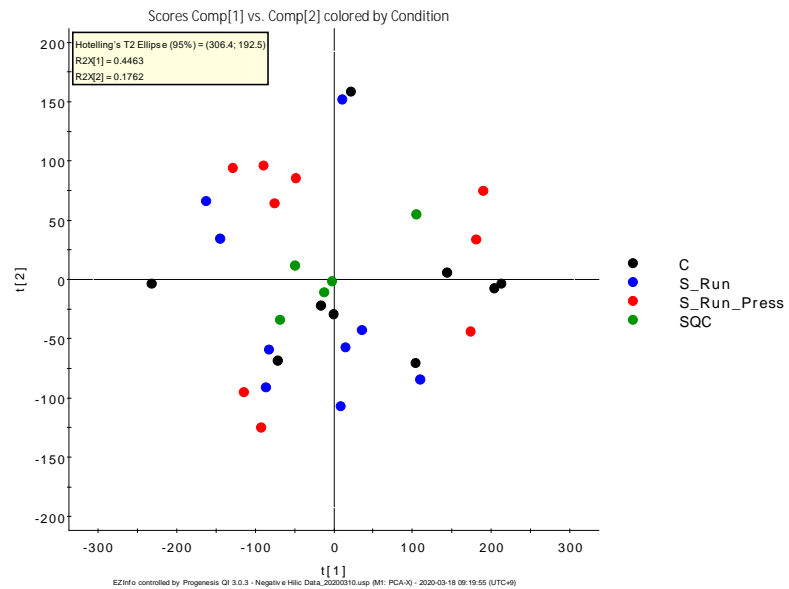


図2 主成分分析 (score plot) 親水性相互作用クロマトグラフィー negative (陰イオン) モードの結果. 群は図1と同じ。各群を分けることはできない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Usui K, Murata T, Fujita Y, Kamijo Y, Hanazawa T, Yoshizawa T, Funayama M	4. 巻 10
2. 論文標題 Direct detection of the psychoactive substance MT-45 in human tissue samples by probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Drug Test Anal.	6. 最初と最後の頁 1033-1038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dta.2390. Epub 2018 May 3	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 -

1. 著者名 Usui K, Fujita Y, Kamijo Y, Kokaji T, Funayama M.	4. 巻 42
2. 論文標題 Identification of 5-Fluoro ADB in Human Whole Blood in Four Death Cases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Anal Toxicol.	6. 最初と最後の頁 e21-e25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jat/bkx088.	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 -

1. 著者名 Igari Y, Takahashi S, Usui A, Kawasumi Y, Funayama M.	4. 巻 52
2. 論文標題 Sudden death in a child caused by a giant cavernous hemangioma of the anterior mediastinum.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Forensic Leg Med	6. 最初と最後の頁 93-97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.jflm.2017.08.008.	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0件

〔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
研究分担者	橋谷田 真樹 (Hashiyada Masaki) (40374938)	関西医科大学・医学部・准教授  (34417)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	臼井 聖尊  (Usui Kiyotaka)		