研究成果報告書 科学研究費助成事業

今和 4 年 6 月 2 1 日現在

機関番号: 10101

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2018~2021

課題番号: 18K10117

研究課題名(和文)化学的アプローチによる死後経過時間推定の新たな指標の開発応用

研究課題名(英文) Development and application of a new indicator for estimating postmortem interval using a chemical approach

研究代表者

神 繁樹 (Jin, Shigeki)

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号:60531845

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3.400.000円

研究成果の概要(和文):様々な死後経過時間の死体の体液を化学分析し,腐敗度の高い死体から得られた検体から高濃度の酪酸が検出されることを見出した.非腐敗の検体と比較して平均値で血液において100倍以上,尿においては300倍以上の濃度の酪酸が検出された.これらの結果から体液中の酪酸濃度は腐敗の指標として有用であることが期待される.また,中毒の紙字に注意が必要である。たべまされた。 チオ硫酸塩が高濃度で検出され、中毒の鑑定に注意が必要で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 これまで死体の腐敗の指標とされてきたのは死後産生されるエタノールと1-プロパノールの比率であったが,経験的に定められた指標に適合しない事例が多かった.これに対し,本研究で見出された酪酸については,血中および尿中濃度において腐敗と非腐敗で統計処理上有意な群間差(p <0.01)が示され,且つ群間の濃度範囲にオーバーラップも認められず指標として有用であると評価できる.また,硫化水素中毒死におけるチオ硫酸塩の濃度による鑑定では腐敗による濃度上昇に注意が必要であることが示された.

研究成果の概要(英文):We analyzed body fluids from cases at various postmortem intervals and found that high concentrations of n-butyric acid were detected in samples obtained from severely decomposed cases. n-Butyric acid was detected in decomposed cases at an average concentration more than 100 and 300 times higher than in non-composed cases, in blood and urine, respectively. These results suggest that the concentration of n-butyric acid in body fluids is a useful indicator of body decomposition. On the other hand, thiosulfate, a marker of hydrogen sulfide poisoning, was detected at high concentrations in severely decomposed cases that was not hydrogen sulfide poisoning, indicating the need for caution in the diagnosis of poisoning.

研究分野: 法中毒学

キーワード: 死後経過時間 腐敗 酪酸 LC-MS チオ硫酸塩 硫化水素中毒

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、研究者個人に帰属します。

1.研究開始当初の背景

法医学において死体の死後経過時間の推定は角膜混濁や死斑,身体の硬直,体温降下などの物理的現象の見地から行っている.これは鑑定者の経験や長年蓄積してきた知見に基づいている.そこで新たな推定法を探るべく,ごく最近では CT 画像における脳脊髄液の輝度値 (CT 値)を指標とする方法が提案された 1,2 が評価までには至っておらず議論となっている 3 .

現在,死後腐敗によるエチルアルコールの死後産生では指標として 1-プロパノールが用いられているが,その検出量は腐敗が進行している場合でもごくわずかである事例が度々見られた.また,死亡前の飲酒状況によりその数値(特にアルコールとの比率)が定まらないことがあり,アルコールの代謝産物である ethyl glucuronide や ethyl sulfate を測定してその結果を考慮する必要がある(法医学分野での ethyl glucuronide 測定例: $Vezzoli 6 ^{4}$).

一方,死体内における硫黄酸化物について、硫化水素中毒が原因の死亡者体内の血液や尿で多量のチオ硫酸塩が検出されることが報告されており50,以来チオ硫酸塩は硫化水素中毒の診断マーカーとして用いられている50.しかしながら近年,硫化水素中毒とは無縁の死体から硫化水素中毒の事例を超える量のチオ硫酸塩が検出されたとの報告があり50,議論が高まっている。この例では腐敗による硫化物の酸化がチオ硫酸塩の検出に繋がったものと推測している.そもそも硫黄化合物は生体内においてアミノ酸(メチオニンやシステイン,シスチンなど)を始めとして多く存在している.加えて,硫黄は化学的に非常に酸化されやすい性質を有しているため,生存中でも酸化物が常に生成しており,物質の代謝などに対して様々な役割を果たしている.死後においては腐敗によって硫黄化合物が生命活動とは異なった変化をしていると考えられ,それを調査することにより死後時間経過の推定や死因との関係が明らかになる可能性を秘めていると考える.

2.研究の目的

本研究は体内物質,特に低分子化合物について詳細な分析を行うことで死後変化を捉え,そのデータから死後時間経過推定の新たな指針・指標を提案することを目的とした.

3.研究の方法

様々な死後経過時間の死体の体液(血液,尿,髄液など)中の低分子化合物を網羅的に分析し,経過時間(もしくは腐敗度)により量的変化が見られる物質を探索した.量的変化が認められた物質について詳細な分析を行い,時間と量的関係性を解析した.得られたデータを基に特定物質の検出量によって死後経過時間の推定ができないか検討した.物質の分析は主に質量分析装置(LC-MS および GC-MS)を用い,物質の同定および定量を行った.

4.研究成果

(1) 死後経過時間・腐敗度によって採取できる体液サンプルが限られるため,主に血液および尿についてガスクロマトグラフ質量分析装置を用いた分析を行い,サンプル間の比較を行ったところ,腐敗度の高い死体の血液・尿から短鎖脂肪酸や芳香環を有する化合物,短鎖脂肪族アルコール類が高濃度で検出された.その中で特に顕著な差異を示したものは酪酸(*n*-butyric acid)であった.

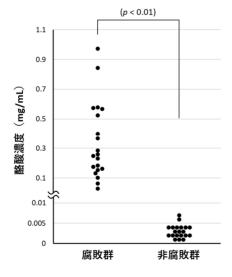


図1.血液中の酪酸濃度の群間差

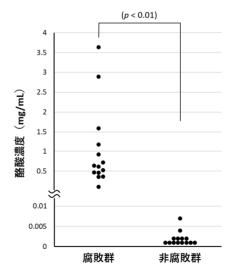


図2.尿中の酪酸濃度の群間差

2016 年から 2020 年にかけて当教室において法医解剖されたうち,肉眼的所見等から腐敗及び非腐敗と判断した事例で腐敗群(血液 20 例,尿 14 例),非腐敗群(血液 20 例,尿 14 例)を対象として,解剖時に採取された検体の酪酸濃度を測定して群間差を調査した.酪酸の測定は GC-MS では正確に測定できないことが判明したため,LC-MS を用いた.検体を固相抽出の後,3-ニトロフェニルヒドラジン塩酸塩による誘導体化を行い,選択反応モニタリング(SRM)による検出で測定を行った。).測定の結果,血液中の酪酸濃度は腐敗群で 0.343 ± 0.259 ($0.030\sim0.973$) mg/mL,非腐敗群では 0.003 ± 0.002 ($0.001\sim0.007$) mg/mL であり,腐敗群と非腐敗群の間で血液中の検出濃度に統計的有意な差 (p<0.01)が認められた(図 1). 同様に尿中の酪酸濃度は腐敗群で 1.035 ± 1.027 ($0.102\sim3.64$) mg/mL,非腐敗群では 0.002 ± 0.002 ($0.001\sim0.007$) mg/mL であり,平均で 500 倍以上の大幅な差が見られ,有意差 (p<0.01) も確認された(図 2).死後経過時間と酪酸濃度の相関は血液および尿のいずれにおいても認められなかった.酪酸濃度は腐敗度との相関が予想され,その腐敗度は気温や湿度などの環境により進行が異なることから,死後経過時間のみでの相関は認められなかったものと考えられる.

これまで腐敗の指標とされてきたのは死後産生されるエタノールと 1-プロパノールの比率であったが,経験的に定められた指標に適合しない事例が多かった.これに対し,本研究で見出された酪酸については,血中および尿中濃度において統計処理で有意な群間差(p <0.01)が示され,且つ群間の濃度範囲にオーバーラップも認められず指標として有用であると評価できる.

(2) 腐敗度の高い死体の検体ではチオ硫酸塩の濃度が高い傾向が認められた.これについて詳細な検討を行うため,検体採取の死体を腐敗度により3群に分けてチオ硫酸塩濃度を測定した.

2017 年から 2018 年にかけて当教室にお いて司法解剖された硫化水素中毒死では ない死体のうち,法医解剖所見から非腐敗 群と一部腐敗群,高度腐敗群に選別し、各 事例の心臓から採取した血液を試料とし た。チオ硫酸塩濃度の測定はチオ硫酸塩を Pentaf Iuorobenzy I 誘導体化して LC-MS/MS を用いた 9). 現在までに得られた結果では 高度腐敗群および一部腐敗群において硫 化水素中毒死で検出されるチオ硫酸塩濃 度と同程度の濃度で検出された事例があ った(図3).以上の結果から死後の腐敗に よってチオ硫酸塩が血液中に生じる事例 が示され,硫化水素中毒の診断に大きな影 響を与えると考えられる.したがって、硫 化水素中毒の指標としてチオ硫酸塩濃度 の測定を行う場合は腐敗の影響の有無を 慎重に考慮する必要がある.今後,更に事 例を増やして検証する予定である.

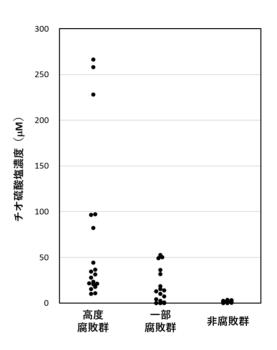


図3.血液中の酪酸濃度の群間差

< 引用文献 >

- 1) Hasegawa I, Shimizu A, Saito A, Suzuki H, Vogel H, Püschel K, Heinemann A, Evaluation of post-mortem lateral cerebral ventricle changes using sequential scans during post-mortem computed tomography, Int. J. Legal Med. 130, 2016, 1323-1328.
- 2) Koopmanschap DHJLM, Bayat AR, Kubat B, Bakker HM, Prokop MWM, Klein WM, The radiodensity of cerebrospinal fluid and vitreous humor as indicator of the time since death, Forensic Sci. Med. Pathol. 12, 2016, 248-256.
- 3) Morikawa K, Hyodoh H, Matoba K, Mizuo K, Okazaki S, Watanabe S, Time-related change evaluation of the cerebrospinal fluid using postmortem CT, Legal Med. 22, 2016, 30-35
- 4) Vezzoli S, Bernini M, Ferrari F, Ethyl glucuronide in vitreous humor and blood postmortem specimens: analysis by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and interpreting results of neo-formation of ethanol, Ann. Ist. Super. Sanità 51, 2015, 19-27.
- 5) Kage S, Nagata T, Kudo K, Determination of thiosulfate in body fluids by GC and GC/MS, J. Anal. Toxicol. 15, 1991, 148-150.
- 6) Kage S, Takekawa K, Kurosaki K, Imamura T, Kudo K, The usefulness of thiosulfate as an indicator of hydrogen sulfide poisoning: three cases, Int. J. Legal Med. 110, 1997, 220-222.

- 7) Miyazato T, Ishikawa T, Michiue T, Oritani S, Maeda H, Pathological and toxicological findings in four cases of fatal hydrogen sulfide inhalation, Forensic Toxicol. 31, 2013, 172-179.
- 8) Matoba K, Murakami M, Fujita E, Jin S, Ogasawara R, Matoba T, Takeuchi A, Haga S, Ozaki M, Hyodoh H, The usefulness of measuring n-butyric acid concentration as a new indicator of blood decomposition in forensic autopsy. Legal Med. 57, 2022, 102071.
- 9) Jin S, Murakami M, Matoba K, Matoba T, Haga S, Ozaki M, Takeuchi A, Hyodoh H, Sample preparation method with ultrafiltration for whole blood thiosulfate measurement, Legal Med. 47, 2020, 101765.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件(うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件)

「稚誌論又」 計2件(つら直読的論文 2件/つら国際共者 U件/つらオーノファクセス U件)	
1 . 著者名 Jin Shigeki、Murakami Manabu、Matoba Kotaro、Matoba Tomoko、Haga Sanae、Ozaki Michitaka、 Takeuchi Akiko、Hyodoh Hideki	4.巻 47
2.論文標題 Sample preparation method with ultrafiltration for whole blood thiosulfate measurement	5 . 発行年 2020年
3.雑誌名 Legal Medicine	6 . 最初と最後の頁 101765~101765
掲載論文のDOI(デジタルオプジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2020.101765	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	4.巻
Matoba Kotaro, Murakami Manabu, Fujita Emi, Jin Shigeki, Ogasawara Ryosuke, Matoba Tomoko,	57
Takeuchi Akiko, Haga Sanae, Ozaki Michitaka, Hyodoh Hideki	
2.論文標題	5 . 発行年
The usefulness of measuring n-butyric acid concentration as a new indicator of blood	2022年
decomposition in forensic autopsy	
3.雑誌名	6.最初と最後の頁
Legal Medicine	102071 ~ 102071
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
10.1016/j.legalmed.2022.102071	有
オープンアクセス	国際共著
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	-

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1.発表者名

神 繁樹,的場光太郎,兵頭秀樹

2 . 発表標題

薬毒物の迅速なスクリーニング ~探針エレクトロスプレーイオン化質量分析法を用いた分析の実際~

3 . 学会等名

第105次日本法医学会学術全国集会

4 . 発表年

2021年

1.発表者名

神 繁樹,的場光太郎,的場智子,兵頭秀樹

2 . 発表標題

血中チオ硫酸塩濃度の保存による変化について

3.学会等名

第104次日本法医学会学術全国集会

4.発表年

2020年

1.発表者名的場光太郎,奥谷菜穂子,神 繁樹,兵頭秀樹
2 . 発表標題 クロバエ科の蛆が薬物検査に有用であった一剖検例
3.学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4 . 発表年 2020年
1.発表者名 的場光太郎,神 繁樹,兵頭秀樹
2.発表標題 血液中のアルコール死後産生と酪酸濃度の関係について
3.学会等名 第21回日本法医学会学術北日本地方集会
4 . 発表年 2020年
1.発表者名 邵 旻蓉,的場光太郎,兵頭秀樹,的場智子,齋藤厚子,神 繁樹
2 . 発表標題 血中チオ硫酸塩測定における前処理法の改良
3.学会等名 第67回質量分析総合討論会
4.発表年 2019年
1.発表者名 神 繁樹,的場光太郎,兵頭秀樹
2 . 発表標題 チオ硫酸塩測定における血液サンプルの前処理の検討
3.学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4 . 発表年 2019年

1.発表者名 邵 旻蓉,藤田瑛美,山世真由美,兵頭秀樹,的場光太郎,神 繁樹
2 . 発表標題
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
3 . 学会等名
第24回日本質量分析学会北海道談話会・研究会
4.発表年
2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6.研究組織

	・ 1/1 プレポロ PM		
	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
	的場 光太郎	北海道大学・医学研究院・講師	
研究分担者	(Matoba Kotaro)		
	(00466450)	(10101)	

	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
	兵頭 秀樹	北海道大学・医学研究院・准教授	
研究協力者	(Hyodoh Hideki)		
	(30306154)	(10101)	

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
---------	---------