

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10127

研究課題名(和文)メトヘモグロビン血症の原因分析とその病態解析

研究課題名(英文)Cause and pathophysiological analysis of methemoglobinemia

研究代表者

木下 博之(Kinoshita, Hiroshi)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：00284357

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)：異常ヘモグロビンの一つであるメトヘモグロビン(MetHb)は、酸化剤などの化学物質の摂取による中毒の際にも増加することがある。MetHb自体には酸素との結合能がないため、MetHb血症の病態や重症度評価にはMetHbを指標としている。MetHbはオキシメータで測定を行っており、オキシメータの法医学的応用に関連して、これまでに得られたデータを取りまとめて発表した。MetHbの増加が中毒による場合、原因物質の特定も法医学的には不可欠である。そこで、硝酸、亜硝酸、塩素酸、次亜塩素酸などの陰イオン化合物を中心に、生体試料からの測定法の確立と病態メカニズムの解析とその評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病態や重症度評価の指標となるメトヘモグロビン(MetHb)の測定に用いられているオキシメータは、近年法医学領域でも活用されているが、MetHbについての報告はまだ少なく、法医学実務への貢献は大きいと思われる。MetHb血症の原因の一つである中毒の際に、原因となる陰イオン化合物の分析についても、実務での応用の報告は少なく、適切な試料の選択とその前処理が重要である点については、今後の応用への展開が期待できると思われる。

研究成果の概要(英文)：Methemoglobin (MetHb), one of the abnormal hemoglobins, may be increased during poisoning due to ingestion of chemical substances such as oxidants. As MetHb itself does not have the ability to bind oxygen, MetHb is used as an index for evaluating the pathophysiology and severity of Methemoglobinemia. MetHb is usually measured by the oximeter and has compiled and published the data obtained so far in relation to the forensic application of the oximeter. The identification of the causative agent is also essential, when the increase of MetHb in blood is due to poisoning. Therefore, we established a measurement method from biological samples, analyzed the pathological mechanism, and evaluated it, focusing on anionic compounds such as nitric acid, nitrite, chloric acid, and hypochlorous acid.

研究分野：法医学

キーワード：メトヘモグロビン血症 イオンクロマトグラフィー 中毒 陰イオン 亜硝酸塩 オキシメーター 重症度 病態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) メトヘモグロビン (MetHb) は、血液の赤血球中のヘモグロビンの2価の鉄イオンが酸化され、3価の鉄イオンに変化することで生じる。ヘモグロビンの酸化は、生体内でも常に一定割合で生じていることが知られているが、生成した MetHb を還元する酵素 (NADH シトクロム還元酵素) が存在し、通常、健常成人の MetHb 量は1%以下にコントロールされている。この MetHb が先天性 (NADH シトクロム還元酵素の欠損) もしくは後天性の原因で増加した状態が MetHb 血症であり、圧倒的に後天性の原因が多いといわれている。

(2) 後天性の要因としては、ニトログリセリンなどの狭心症薬や、局所麻酔薬などの薬剤摂取に伴う例も報告されているが、亜硝酸塩などの強力な酸化剤の摂取による中毒の際には、生体に備わっている還元能力の限界を超えてしまうため、血液中の MetHb が著しく増加する。MetHb 自体は酸素運搬能がないため、MetHb の増加に伴い末梢組織での酸素不足に陥る。法医学領域で取り扱う中毒死事例の中には、過塩素酸や亜硝酸塩など MetHb 血症をきたすものがいくつか報告されているが、体内での分解が比較的早いことや、網羅的に分析する手法が確立されていないこともあり、それらの濃度を直接測定した報告は少ない。

(3) 近年、医薬品などの比較的分子量の大きい有機化合物による中毒の定性、定量分析方法に関しては、液体クロマトグラフィー質量分析法などの技術革新に伴い長足の進歩を遂げ、法医学の実務にも次々と応用されている。しかしながら、MetHb 生成の原因となるような無機イオン化合物については、法医学での中毒学的検査においてイオンクロマトグラフの活用が進んでいないこともあり、MetHb 血症についても網羅的検索についての報告は少なく、まだ発展の余地がある。また、MetHb についても、従来から報告されている分光光度法での測定を含めても報告が少なく、MetHb の評価自体も検討する必要がある。そこで、本研究では、MetHb 血症に関して、法医学での事例を中心に、その測定法も含めて検討を進めることとした。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではまず、MetHb 血症の評価について検討する。法医学領域では従来から分光光度法による MetHb の測定が行われている。一方、近年、法医学領域では実務においてオキシメータの活用が進められている。オキシメータでは簡便な操作で直接 MetHb 値が得られることから、実務における MetHb 値の活用についても検討を行うこととした。

(2) MetHb 血症をきたす各種無機イオン化合物の測定法について、イオンクロマトグラフを用いる方法を確立する。特に、測定に当たっては、測定に用いる試料の選択と、その前処理が大きな課題になると思われる。生体由来の試料に含まれている成分が分析の妨害になることもあり、それらについても検討する。さらに、ラットを用いた実験的 MetHb 血症モデルを作成し、原因となる化学物質との関連と病態メカニズムについて検討する。

3. 研究の方法

(1) MetHb 血症の評価

オキシメータによる MetHb 値と従来から用いている分光光度法を比較した。

血液に亜硝酸ナトリウムを添加し、ヘモグロビンを MetHb に変性させ、段階的に希釈することで試料溶液を作成した。オキシメータと分光光度法で MetHb を測定し、両者を比較した。さらに、試料の安定性を検討するため、作成後3日、7日間4℃で保管した試料についても同様に測定を行い、保管期間の影響についても検討した。

法医学実務で測定を行った火災の事例の試料について、一酸化炭素ヘモグロビン飽和度の高い群と低い群で比較を行った。

(2) イオンクロマトグラフを用いた無機イオン化合物の測定

電気伝導度検出器を使用したイオンクロマトグラフを用いた。また、分離カラムと検出器の間にサプレッサーを配置したサプレッサー方式を用いた。

試料中の亜硝酸イオン、硝酸イオンを測定するため、亜硝酸ナトリウムおよび硝酸ナトリウムの溶液を作成し、段階的に希釈して用いた。また、塩素酸イオンおよび次亜塩素酸イオンについても、同様に試験溶液を作成して用いた。

生体由来の試料を用いる場合に、分析の際にタンパクや脂質などの夾雑物が測定に際して問題となることがあり、血液や尿に試験溶液を添加して試料の前処理についても検討した。

(3) 動物を用いた実験的 MetHb 血症モデル

麻酔下のラットに亜硝酸ナトリウムを投与する。

動物の死後、採血および胃内容試料を採取し、得られた試料の亜硝酸イオン測定を行う。

4. 研究成果

(1) MetHb 血症の評価

今回用いたオキシメータは、試料注入から約 10 秒程度で MetHb 値が得られ、またその値は従来から用いている分光光度法での値とよく相関した。オキシメータでの測定は MetHb 飽和度が 70% 以下に限定されるが、その有用性は高い。

冷蔵 (4) 保存における MetHb の安定性は、段階希釈したいずれの試料においても 3 日後、7 日後とも徐々に低下がみられた。NADH シトクロム還元酵素の作用によるものと考えられ、MetHb の測定にあたっては、試料採取後速やかな測定が求められる。

法医学実務で測定を行った火災の事例の試料について、試料の採取部位 (左心血、右心血、大腿静脈血) による差はなかった。また、一酸化炭素ヘモグロビン飽和度の影響もみられなかった。火災の事例では、吸引した煙に含まれる窒素酸化物の影響で MetHb 飽和度が上昇することが報告されており、精度の高い診断を行う上では MetHb 値の測定が必要と思われる。

MetHb の測定にあたっては、速やかな測定が求められるため、採取した試料をその場 (on-site) で測定することが望ましい。法医学実務における on-site 検査について取りまとめた。また、オキシメータの法医学的活用についてもまとめた。

(2) イオンクロマトグラフを用いた無機イオン化合物の測定

サプレッサー方式では、溶離液を電気伝導度の低い溶液に変換することで、イオンの高感度検出が可能となる。試料中の亜硝酸イオン、硝酸イオンは十分検出可能であった。

血液や胃内容に関して、前処理には試料を希釈し、孔径の小さいフィルターを用いることで測定が可能であった。イオンクロマトグラフの生体試料への応用は少なく、法医学領域での応用が可能なが明らかになった。

塩素酸イオンおよび次亜塩素酸イオンについても、同様に検出可能であった。

(3) 動物を用いた実験的 MetHb 血症モデル

胃内容からの亜硝酸イオンの検出は可能であった。

血液からは亜硝酸イオンは十分検出できなかったが、体内での分解が早いことも一つの要因として考えられる。胃内容を試料とした場合には、実務にも十分使用可能であると思われる。

今回の結果から、イオンクロマトグラフの法医学的有用性が明らかになった。今回検討したイオン以外についても、法医学的応用については検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka N, Takakura A, Kumihashi M, Jamal M, Ito A, Kimura S, Tsutsui K, Ameno K, Kinoshita H.	4. 巻 26
2. 論文標題 Application of portable oximeter for the determination of methemoglobin in forensic practice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rom J Leg Med.	6. 最初と最後の頁 295-297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Kinoshita H, Tanaka N, Jamal M, Ito A, Kumihashi M, Yamashita T, Kimura S, Kimura Y, Tsutsui K, Matsubara S, Ameno K.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Nova Science Publishers, Inc,	5. 総ページ数 184
3. 書名 Closer look at autopsies.	

1. 著者名 Tanaka N, Kinoshita H, Jamal M, Ito A, Yamashita T, Kumihashi M, Ameno K.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Nova Science Publishers, Inc.	5. 総ページ数 228
3. 書名 Advances in health and disease (Volume 33)	

〔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	田中 直子 (Tanaka Naoko) (60700052)	香川大学・医学部・講師 (16201)	

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