

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K19705

研究課題名（和文）死後髄液のNMRモード解析を用いた頭蓋内傷病変の新規検査法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel analytical method for intracranial injuries and diseases Using NMR modal analysis of postmortem cerebrospinal fluid.

研究代表者

平川 慶子（Hirakawa, Keiko）

日本医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30165162

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：死体検案で採取できる死後髄液は、血性が透明か否かでクモ膜下出血の有無を判定する法医診断に有用な試料である。法医実務では、死後髄液をルーチンに採取することが多いため、診断のため発展的な活用が期待される。本研究では、死体検案や法医解剖事例から採取した、死因が判明している死後髄液を用いて、NMR（核磁気共鳴）モード解析を実施し、死因との関連について検証した。本研究では取得された死後髄液の持つNMRモード解析の結果のみからでは、各事例の死因の詳細な関連付けは困難ではあった。しかし、死後髄液をNMRモード解析し、死因すなわち死亡前の病態として内因死、炎症疾患および外因死を識別できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異状死の死因究明は、法医学における重要な使命であるが、法医解剖や死後画像診断は必ずしも十分に普及しているとは言いがたいのが現状である。死後髄液の採取自体は容易で特別な装置を要するものではないので、死後髄液のNMRモード特性から、頭蓋内病変の有無、死因との関連性の情報を抽出できれば、法医実務への貢献は大きいと考える。解剖検査による死因究明を凌駕する精度は困難ではあるが、死体検案での信頼度の高い死因究明の方法として、社会的意義は高いだろう。また本研究を通じた、死後髄液の死因の病態生理学的分析は、法医学の基礎研究の新たな対象試料として髄液が期待できる可能性を示唆させる学術的意義を有すると認める。

研究成果の概要（英文）：Postmortem cerebrospinal fluid (CSF), which can be collected during postmortem examination, is a useful sample for forensic diagnosis to determine the presence or absence of subarachnoid hemorrhage by whether it is bloody or clear. Since postmortem CSF is often routinely collected in forensic practice, it is expected to be utilized developmentally for diagnosis. In this research, postmortem CSF from postmortem examinations and forensic autopsies, in which the cause of death is known, was used to perform NMR modal analysis to verify its association with the cause of death. It was difficult to make a detailed association of cause of death in each case based solely on the results of NMR modal analysis of the postmortem CSF obtained in this study. However, NMR modal analysis of the postmortem CSF suggested the possibility of identifying sudden death, death due to inflammatory disease, and death from external causes as the cause of death, i.e., the pathological condition prior to death.

研究分野：法医学

キーワード：死体 髄液 NMR モード解析

1. 研究開始当初の背景

法医実務における死体検案時には髄液検査が日常的に行われている。血性髄液であれば「クモ膜下出血」等の頭蓋内傷病変の存在を疑うが、髄液が透明な場合でも頭蓋内傷病変の存在は否定できない。このため、諸外国と比べて法医解剖率が低い現状もあることから、死因究明に有用な死後髄液を用いた新たな検査法が開発できれば、法医実務における利用価値は極めて高い。

我々は、これまでの研究 (Jap J Legal Med. 1994; 48, Legal Med 2009; 11, Legal Med 2014; 16, Legal Med 2017; 25) では、血清や髄液等の NMR データに関してスペクトル解析を行ってきたが、FID 信号のフーリエ変換は、信号に含まれる水素原子核の運動性に関する情報が喪失してしまうことが課題とであった。そこで、振動工学におけるモード解析の概念から着想を得て、NMR 分析による新規体液検査法 (NMR モード解析法) を開発した (特許第 6281973 号)。

振動工学の分野では、建物の耐震性や機械劣化を評価する際に、加振検査にて構造物固有の動的性質 (モード) を決定する。NMR 信号を同様の手法で解析し、血清や髄液の動的な構造特性を NMR モードとして決定し、NMR モードを新たな体液診断マーカーとして利用できるものと考えた (表 1 参照)。具体的には、FID 信号を時間周波数解析し、血清や髄液固有の動的性質 (血清のモード) を決定するものであり、本法は NMR メタボロミクスなどの化学分析とは全く異なる発想に基づく分析手法である。

表 1 振動工学から着想した髄液の NMR モード解析

	対象	インパルス	インパルス応答	解析結果
振動工学	建造物・機械など (固体の構造物)	加振 (パルス波)	振動信号 (共振波)	振動モード
我々の技術	髄液 (超分子的構造を持つ液体)	ラジオ波照射 (パルス波)	NMR 信号 (共鳴波)	NMR モード

我々は、早期診断が難しいとされる熱性けいれんと脳症を、来院時に採取した小児の髄液を NMR モード解析することで識別できる結果を示すことができた (Pediatr Res 2015; 77:70-74) 他、予備的検討により、死因が頭蓋内損傷であるか虚血性心不全であるかを死後髄液から識別できる可能性 (図 1) が示唆されていた。

これらの背景を踏まえ、NMR モード解析法を用いて死後髄液検査を行うことで、頭蓋内傷病変の有無や種類さらには重症度が評価できれば、異状死の死因解明率の向上に役立つと考え、本研究を計画した。

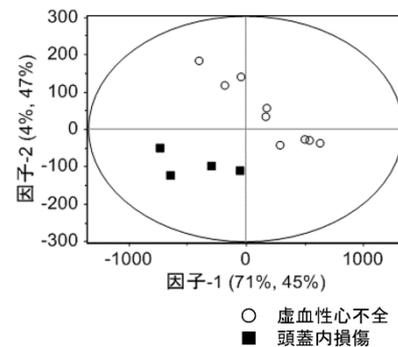


図 1 予備的検討の結果

2. 研究の目的

本課題の当初の目的は、法医学と脳神経外科学および神経内科学の研究者が連携し、死後髄液を NMR モード解析することにより、目的 1) 頭蓋内傷病変の傷病名を識別できるか、目的 2) 死因が、脳浮腫、脳ヘルニア、脳死、神経細胞傷害、脳循環代謝障害などの重篤な頭蓋内病態であると推定できるか、検討することであった。

3. 研究の方法

(1) 研究開始当初の研究計画

目的 1 を明らかにするために、研究計画 1 として、死因が頭蓋内傷病変である剖検事例 50 例について、死後髄液から頭蓋内傷病変の傷病名を識別できるか検討する。

目的 2 のため、研究計画 2 として、脳神経外科において、脳浮腫や神経細胞傷害などの「重篤な頭蓋内病態」を有する患者 50 例を対象とし、手術時に採取した髄液から「重篤な頭蓋内病態」の有無を識別できるか検討する。同様に、神経内科においても急性脳症等、検査目的で患者から採取した髄液について、病態の有無が識別できるか検討する。

さらに研究計画 3 では、研究計画 1 で取得した死後髄液 NMR データに研究計画 2 で作成した生前識別モデルを適用し、脳浮腫や神経細胞傷害などの「重篤な頭蓋内病態」が死亡時に存在したかを死後髄液から推定できるか、剖検所見と照合しながら検討する。

NMR モード解析と識別モデルの作成方法としては、血清を 7 テスラ FT-NMR 装置 (JEOL) にてプロトン測定を行い、時間周波数解析し、結果をスペクトログラム表示する。数値化して出力後、

PLS-DA 法などによる解析を行い、髄液属性の識別モデルを作成する。各検体に付随する剖検所見や臨床情報や病理所見などに関しては、インターネット非接続の専用 PC に登録して解析する。

(2) 倫理委員会の承認申請に伴う研究計画の見直しとコロナ禍等による研究の遅延について

研究期間中、新型コロナウイルス感染症の蔓延による研究自粛や、本学 NMR 装置等のリニューアル工事の影響から、研究計画の本学中央倫理委員会承認までに想定以上の時間を要してしまったことなどを理由に、本研究は期間を 3 年延長して実施した。

本研究は、ヒトおよびヒト死体由来の試料、病歴情報等を取り扱うため、検体を採取する東京都監察医務院、学校法人日本医科大学臨床研究審査委員会の承認を経て実施する必要がある。本研究の予備的検討における死後髄液の入手に関しては、本研究開始前に東京都監察医務院の倫理委員会の承認（番号：28-2）を得て実施したが、その後新しい研究計画にそって内容変更を行い、承認申請を行った（番号：継29-2）。

日本医科大学においては、本研究で取り扱う死後髄液の研究対象者は全て死者であることから、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」の規定に基づき、研究対象者等が拒否できる機会を保障する措置（オプトアウト）を講ずるものとした。また、**研究計画 2**に関しては、「臨床検体としての髄液」を法医学分野の研究に使用する特殊性から、審査申請前に本学研究統括センターの助言も受け、研究者間で協議を重ねた結果、本研究期間中に十分数の検体を採取することが困難であると予想されたため、**研究計画 2**の実施を断念し、本研究は「死後髄液」のみを対象として行うこととした。令和 3 年 8 月 30 日に日本医科大学中央倫理委員会に申請、令和 3 年 10 月 2 日に承認を受けることができた（M-2021-001）。本研究の開始に想定以上の時間を要してしまったことから、平成 30 年度～令和 3 年度上半期は、本研究実施に必要な髄液検体の収集活動および NMR 計測等、本研究に必要な髄液 NMR データの収集を開始することができなかった。加えて、令和 2 年度上半期は、主たる研究実施場所である磁気共鳴分析室のリニューアル工事が実施されたため、NMR 装置を用いた実験研究を行うこともできなかった。令和 3 年後半には、日本医科大学法医学教室においても本格的な髄液検体の採取体制が整ったが、残念ながら、期間内に「頭蓋内傷病変」を死因とする髄液サンプルを入手することができず、研究開始当初の目的を達成することはできなかった。

(3) 「死後髄液の NMR モード解析」に必要な要素技術の開発

我々が開発した「NMR モード法」は、基本原理は論文等で認知されるところになったが、本法を検査技術として実用化するためには、いくつかの技術的な問題点を解決しなければならないことがこれまでの研究で明らかとなった。そこで、「死後髄液」を用いた本格的な研究開始に備え、「NMR モード法」の技術向上を目指し、サンプルの前処理、計測パラメータ、解析条件等について基礎的検討を行った。「NMR モード解析法」を新しい髄液検査技術として実用化するために解決すべき技術的な課題を洗い出し、ヒト血清アルブミン溶液やヒト標準血清、予備的検討で使用した髄液サンプルの残余を用いて、「死後髄液の NMR モード解析」に必要な要素技術の開発を行った。またモード解析用プログラムの改良にも着手した。

(4) 研究計画 1 の実施

①死後髄液試料の採取および検案・剖検情報の取得

日本医科大学法医学教室又は東京都監察医務院で検案・解剖検査が行われた 20 歳以上の事例の内、研究代表者が担当した事例について死後髄液を採取し、検案・剖検情報を収集した。通常検査として採取した死後髄液の残余分（2～3mL）を廃棄せず、研究用試料として利用した。試料 NMR 測定に供するまで凍結保管（-80℃）した。

②NMR 測定

試験管に測定サンプルそれぞれ 100 μ L と重水 500 μ L を加えて混和し、全量をガラス製 5mm 径 NMR 試料管にパスツールピペットで移した。ECZ™ FT-NMR 装置（日本電子（株）製）（プロトン共鳴周波数 400 MHz（9.4 Tesla）、を使用し、装置に搭載された自動測定プログラムを用いて二次元プロトン NMR 測定を行った。すべてのデータは JDF 形式で保存した。

③スペクトル解析

ALICE 10 bn FOR WINDOWS 10（バイオネット研究所）を用いてスペクトル解析を行った。

④モード解析

JDF 形式で保存されたすべてのデータを、二次元の行列として ASCII 形式に変換後、LabVIEW™2015（NI 社製）上に作成したプログラムを用いて、時間周波数解析（STFT）し、得られたスペクトログラムデータセットを Unscrambler X（Camo 社製）に取り込み、主成分分析による解析を行った。

4. 研究成果

(1) 死後髄液の検案・剖検情報

本研究で使用した死後髄液試料に関する検案・剖検情報を表2にまとめた。

表2 死後髄液試料の検案・剖検情報の概要

検体No.	検案・解剖の別	死後経過日数	性別	年齢	死因	死因の分類
CSF01	検案	死後1日	男	76	高血圧性心不全(推定)	内因死
CSF02	検案	死後1日	男	36	不詳(検査中)	不明
CSF03	検案	死後1日	男	81	急性虚血性心不全	内因死
CSF04	解剖	死後3日	男	20	致死性不整脈の疑い	内因死
CSF05	解剖	死後2日	女	44	Gastromalacia→腹膜炎	内因死
CSF06	解剖	死後2日	女	81	肺炎	内因死(炎症)
CSF07	解剖	死後6日	女	84	大動脈狭窄症→心肥大→うっ血性心不全	内因死
CSF08	解剖	死後3日	男	19	溺水吸引	外因死
CSF09	解剖	死後7日	女	80	熱中症	外因死
CSF10	解剖	死後3日	男	75	十二指腸潰瘍穿孔による腹膜炎	内因死(炎症)

(2) 死後髄液のNMR スペクトルおよびスペクトログラム

死後髄液試料(CSF01)の¹H-NMR スペクトルを図2に、スペクトログラムを図3に示した。

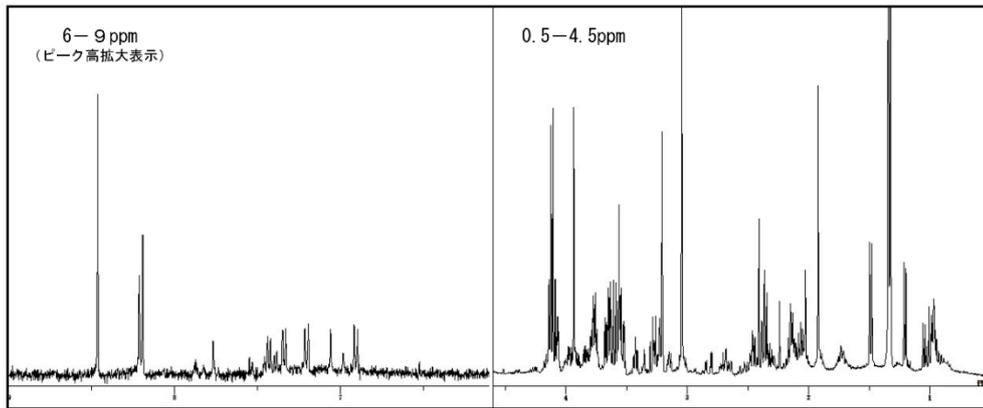


図2 死後髄液(CSF01)の¹H-NMR スペクトル

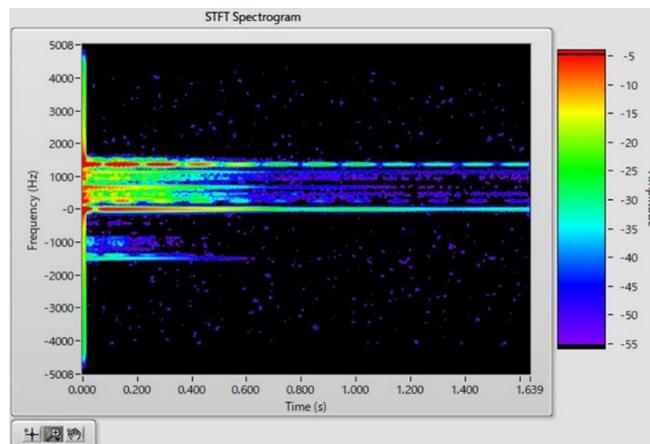


図3 死後髄液(CSF01)の¹H-NMR スペクトログラム

(2) モード解析（主成分分析）

表2に示した死後髄液試料について、死因が不詳である試料（CSF02）を除いた9例のスペクトログラムデータを用いて主成分分析を行った。スコアプロット上で各試料の死因を「外因死」、「内因死」、「内因死（炎症）」に分類してラベル表示（図4）したところ、「内因死（炎症）」の2例は、主成分2（PC-2）スコアによって他の「内因死」5例とは異なるNMRモードとして特徴づけられる結果が示された。

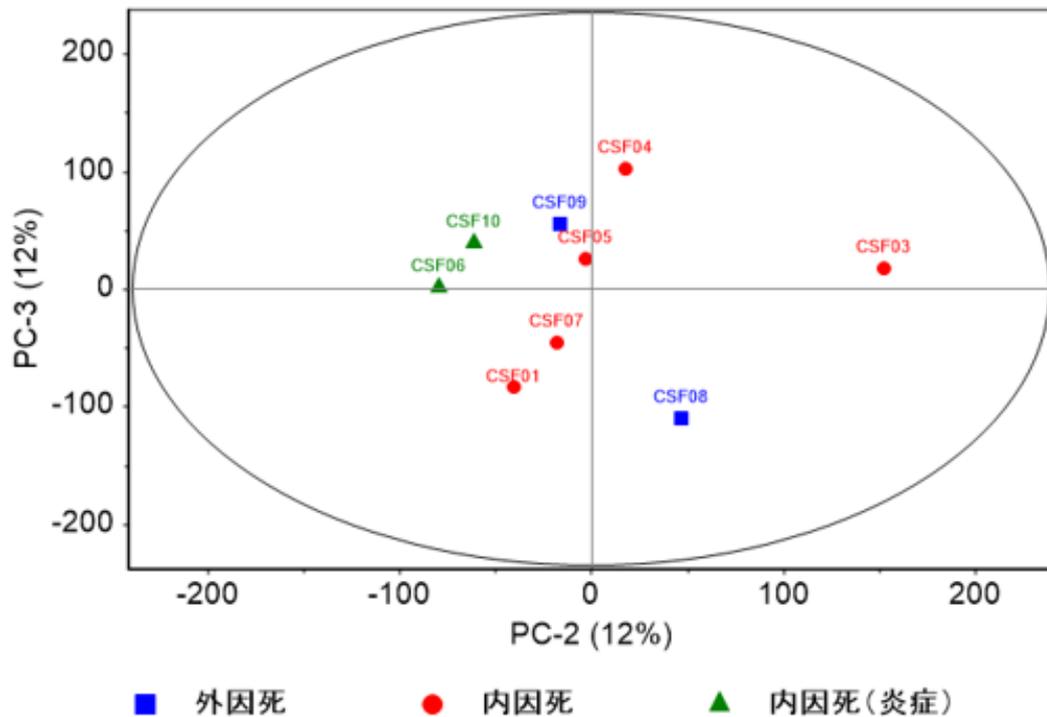


図4 主成分分析の解析結果（スコアプロット）

(2) まとめ

本研究では、死体検案や法医解剖事例から採取した、死因が判明している死後髄液を用いて、NMRモード解析を実施し、死因との関連について検証した。残念ながら、本研究期間中に、「頭蓋内傷病変」を死因とする髄液サンプルを入手することができず、研究開始当初の目的を達成することはできなかった。また、取得された死後髄液の持つNMRモード解析の結果のみからでは、各事例の死因の詳細な関連付けは困難であった。しかし、死後髄液をNMRモード解析し、死因すなわち死亡前の病態として内因死、炎症疾患および外因死を識別できる可能性が示唆された。

異状死の死因究明は、法医学における重要な使命であるが、法医解剖や死後画像診断は必ずしも十分に普及しているとは言いがたいのが現状である。死後髄液の採取自体は容易で特別な装置を要するものではないので、今後更なるデータ蓄積を行うことで、死後髄液のNMRモード特性から、頭蓋内病変の有無、死因との関連性の情報を抽出できれば、法医実務への貢献は大きいものと考えられる。本法のみで解剖検査による死因究明を凌駕する精度を得ることは難しいと思われるが、実用化できれば、死体検案における信頼度の高い死因究明の方法として、社会的意義は高い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	金涌 佳雅 (KANAWAKU YOSHIMASA) (80465343)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	
研究分担者	小池 薫 (KOIKE KAORU) (10267164)	京都大学・医学研究科・名誉教授 (14301)	
研究分担者	足立 好司 (ADACHI KOJI) (00231928)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	
研究分担者	山崎 峰雄 (YAMAZAKI MINEO) (10277577)	日本医科大学・医学部・教授 (32666)	
研究分担者	早川 秀幸 (HAYAKAWA HIDEYUKI) (10373052)	日本医科大学・大学院医学研究科・研究生 (32666)	
研究分担者	柚木 知之 (YUNOKI TOMOYUKI) (50639094)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

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