

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10699

研究課題名(和文)尿毒素としての腸内細菌産生フェニルアセチルグルタミンの法医剖検診断の意義の解明

研究課題名(英文)Diagnostic meaning of enterobacillus phenyl acetyl glutamine as uremic toxin in forensic autopsy case.

研究代表者

久保 真一(Kubo, Shin-ichi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：10205122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：法医解剖188例の尿中PAGをGC-MSで分析した。尿PAG/Cr、性別、年齢、死後経過時間、生存期間、死因との関係を統計的に解析した。PAG/Crの中央値は0.12であった。PAG/Cr比は、性別、生存期間と有意差を認めなかった。死因では、外傷性脳損傷群のPAG/Crは中毒群より有意に高かった($p=0.023$)。脳血管疾患群は、いずれの死因群に対しても有意差はなかった。しかし、外傷性脳損傷と脳血管障害を1つの死因群CNS損傷として解析したところ、中毒群より高かった($p=0.062$)。尿中PAG/Crは、外傷性脳損傷だけでなく、生前のCNS損傷のバイオマーカーになりうるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医剖検診断では、生前の病態を把握することは重要である。尿中PAGについては、尿毒素として知られているが、法医剖検例におけるPAGの意義については知られていない。

本研究は、PAGの法医剖検例における意義を解明することを目的とした。

本研究の成果は、(1)法医剖検例の尿中PAG/Crの濃度を明らかにしてことで学術的な意義がある。(2)尿中PAGが中枢神経障害の指標となる可能性を明らかにした本研究の学術的意義は大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：PAG is a metabolite that is excreted in human urine. We are currently studying PAG as a urinary biomarker in forensic autopsy cases. Urine samples were collected from 188 forensic autopsy cases and the urinary PAG concentration was analyzed quantitatively using GC-MS. Statistically, the relationship between urine PAG/Cr, sex, age, postmortem interval, survival duration, and cause of death was statistically analyzed. The median of PAG/Cr was 0.12. The PAG/Cr showed no significant relationship to sex or survival duration. Regarding the cause of death, traumatic brain injuries had a significantly higher ratio than intoxication ($p=0.023$). When traumatic brain injuries and cerebrovascular accidents are combined as one cause of death group, the PAG/Cr value of CNS damages was not significant but higher than that of intoxication ($p=0.062$). Urinary PAG/Cr might be a biomarker not only for traumatic brain injuries but also for antemortem CNS damages.

研究分野：法医学

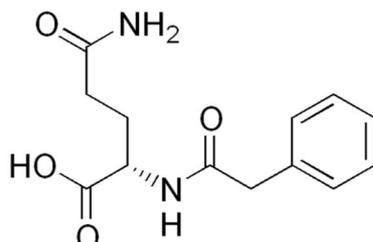
キーワード：フェニルアセチルグルタミン クレアチン 尿毒素 腸内細菌 死因 法医解剖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フェニルアセチルグルタミン(PAG)は、アミノ酸であるフェニルアラニンから腸内細菌が産生する物質で、慢性腎不全の際に尿中、血中に出現することから尿毒素の一種として知られている。我々も、これまで法医解剖例の薬物分析において、血中PAGが高値を示す症例を経験してきた。そのなかには慢性腎臓病以外の症例も含まれていた。そこで、法医解剖例における血中PAGは、どのような意味があるのか。どのような生前の病態を反映しているのかという疑問(「問い」)が生じた。

Fig. 1 Chemical structure of phenylacetylglutamine (PAG)



2. 研究の目的

本研究は、法医解剖例におけるPAGの病態生理、診断意義を解明することを目的とする。さらには、剖検診断への応用を図る。

3. 研究の方法

(1) 尿試料

2017年1月から2020年12月までの間に福岡大学法医学講座で解剖された423件の症例のうち尿が採取できた188例の尿をサンプルとして使用した。すべての尿は使用するまで-30℃で保管した。188例の性別、年齢、死後間隔(PMI)、生存期間(SD)および死因(COD)を表1に示す。

Table 1 Summary of examined 188 forensic autopsy cases

Sex		Age		PMI*		SD**		Cause of death		
Group	n	Group	n	Group	n	Group	n	Group	n	
male	141	0-19	5	< 12 hrs	6	sudden	0	Internal	Cardiac death	15
female	47	20-29	16	< 24 hrs	48	< 1 hr	91	External	Infection	9
		30-39	21	< 48 hrs	70	< 6 hrs	17		Cerebrovascular disease	5
		40-49	25	< 1 week	27	< 24 hrs	26		Other internal	16
		50-59	19	< 10 days	20	< 1 week	3		Burned	16
		60-69	34	< 1 month	12	< 10 days	2		Intoxication	23
		70-79	33	> 1 month	5	< 1 month	5		Hypothermia	14
		80-89	32			> 1 month	2		Asphyxia	11
		90-	3			unknown	42		Drowning	45
										Traumatic brain injuries
							Traumatic shock	11		
							Other external	5		
							Unknown	10		

PMI*: postmortem interval

SD**: survival duration

(2) 尿中PAGの分析

尿0.1mLと脱イオン水0.3mL、内部標準液(PAG-d5)とウレアーゼ溶液0.04mLを混合した。30分後、アセトニトリル2mLと酢酸0.05mLを混合し、抽出カラムを通した。続いて、2mLアセトニトリルと0.1mLのアモンニア水を通液した。溶出液を回収した0.3mLの酢酸が入ったガラス試験管に入れ、窒素流下で蒸発させた。残渣をメタノール:酢酸プロピル(5:1)に溶解した。GC-MS分析は、タンデムカラムを使用し、キャリアガスはヘリウムを180cm/sの一定の線速度で供給した。オープンの温度プログラムは、最初に90℃で0.5分間設定され、70℃/minで200℃まで上昇し、最後に320℃まで上昇した。50℃/分で320℃を6分間保持した。注入温度、界面温度、イオン源温度は、それぞれ290℃、290℃、230℃であった。選択したモニタリングイオン(SIM)は内部標準としてPAGではm/z 246、PAG-d5ではm/z 251を採用した。同様にCrもGC-MSで分析した。

(3) 統計処理

尿中PAG/Crの統計分析には、JMP Pro 15.0.0ソフトウェアプログラムを使用した。尿PAG/Cr(各濃度の比)、性別、年齢、死後間隔(PMI)、生存期間(SD)、死因(COD)との関係を統計的に解析した。

4. 研究成果

(1) 尿中PAG/Cr比

私たちは、188例の剖検例から得られた尿中PAG/Crのデータを箱ひげ図で検討した。尿中PAG/Cr

の中央値（範囲）は 0.12（0.002-3.26）、四分位範囲 [IQR]は 0.058-0.218 であった。尿中 PAG/Cr の正常値に関しては、健常成人のデータがあるが、法医剖検症例についてのデータはない。法医解剖症例における尿中 PAG/Cr の正常範囲は明らかでない。そこで、箱ひげ図を使用して 188 症例の分布を検討した。この研究では、第 3 四分位レベル 0.218 を超える PAG/Cr 値を、相対的に異常に高い値として定義した。

(2) 尿中 PAG/Cr 比と基本統計項目

尿中 PAG/Cr 比は、性別または PMI と有意な関係を示さなかった。

(3) 尿中 PAG/Cr 比と死因

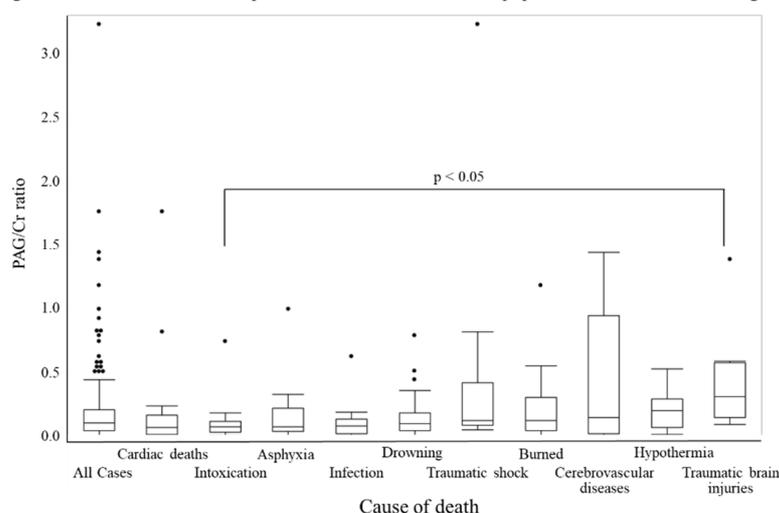
各死因群における尿中 PAG/Cr 異常高値を占める症例の割合を表 2 に示す。

Table 2 Number of cases with abnormally high PAG/Cr in each cause of death groups

Cause of death	Urinary PAG/Cr		%
	> 0.218	< 0.218	
Cardiac death	3	12	20.0
Infection	1	8	11.1
Cerebrovascular disease	2	3	40.0
Burned	5	11	31.3
Intoxication	1	22	4.3
Hypothermia	7	7	50.0
Asphyxia	3	8	27.3
Drowning	8	37	17.8
Traumatic brain injuries	5	3	62.5
Traumatic shock	4	7	36.4
Other	8	23	25.8
Total	47	141	25.0

死因に関しては、外傷性脳損傷群は中毒よりも有意に高い比率を持っていました ($p=0.023$)。脳出血やくも膜下出血などの脳血管疾患は、どの死因グループに対しても有意差は認められませんでした。しかし、外傷性脳損傷と脳血管障害を 1 つの死因グループとして組み合わせると、CNS 損傷の PAG/Cr 値は中毒の値よりも有意に高いことが明らかとなった ($p=0.062$)。

Fig. 2 The box-and-whisker plot of PAG/Cr ratios in whole population and cause-of-death groups



結論: 尿中の PAG/Cr は、外傷性脳損傷だけでなく、生前の CNS 損傷のバイオマーカーになりうる可能性が考えられた。

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 0件）

1. 著者名 Natsuki Ikematsu, Kenji Hara, Brian Waters, Aya Matsusue, Mio Takayama, Masayuki Kashiwagi, Shin-ichi Kubo	4. 巻 -
2. 論文標題 Urinary phenylacetylglutamine as a possible biomarker for central nervous system disorders in forensic autopsy cases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2023.102274	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ikematsu N, Hara K, Waters B, Matsusue A, Takayama M, Kashiwagi M, Kubo S.
2. 発表標題 Urinary phenylacetylglutamine as a possible biomarker for central nervous system disorders.
3. 学会等名 Der 100 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fuer Rechtsmedizin. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Natsuki Ikematsu, Kenji Hara, Brian Waters, Aya Matsusue, Mio Takayama, Masayuki Kashiwagi, Shin-ichi Kubo
2. 発表標題 Diagnostic meaning of urinary phenylacetylglutamine in forensic autopsy cases.
3. 学会等名 99. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fuer Rechtsmedizin (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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	原 健二 (Hara Kenji) (00090738)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	

6. 研究組織（つづき）

	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	ウォータース ブライアン (Waters Brian) (00609480)	福岡大学・医学部・助教 (37111)	
研究分担者	高山 みお (Takayama Mio) (40804802)	福岡大学・医学部・助教 (37111)	
研究分担者	柏木 正之 (Kashiwagi Masayuki) (70301687)	福岡大学・医学部・准教授 (37111)	
研究分担者	松末 綾 (Matsusue Aya) (70309920)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	
研究分担者	池松 夏紀 (Ikematsu Natsuki) (20848410)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (18001)	

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