

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19664

研究課題名（和文）死因究明に資する災害関連死メタボロミクス：低体温メタボロームの解析

研究課題名（英文）Exploration of metabolomics associated with disaster-related death: Analysis of metabolome with hypothermia

研究代表者

小椋 康光 (Ogra, Yasumitsu)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：40292677

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト肝がん由来細胞を30℃の低温条件下で培養することにより、不要な細胞死を誘導することなく低温下での応答が観察されることを確かめた。この培養条件下において、メタボローム解析を実施したところ、含硫アミノ酸の取り込みが亢進することが明らかになった。一方、死後にご遺体が低温下に置かれた場合の血中薬物濃度変化についても解析を行った。死後は生物学的な反応よりも、化学的反応が優先するため、生体では観察されない薬物変換体の同定に成功した。これらの知見を活用することにより、代謝物や薬物変換体の濃度から、死後経過時間を類推することが可能であることを示唆でき、法中毒学上の重要な知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、メタボローム解析を災害関連死の中でも、ご遺体の状況により死因や死亡時の状況を不確かなものとする低体温症・凍死に焦点を絞り、培養細胞を用いたメタボローム変動の分子機構の解明に裏付けられた定量的な死因究明に役立つ成果を挙げることができた。さらに、メタボローム解析を基盤技術として、死後の薬物の化学形態変化を明らかにし、生前の代謝とは異なる死後特有の薬物変化体の同定も行った。これらのことは、法中毒の実務においても有用な知見を得ることができたと考えている。

研究成果の概要（英文）：We successfully observed the cellular responses to hypothermia in human hepatoma cell line at 30°C without unexpected cell death. Under the culture condition, we evaluated the metabolome and observed that the uptake of sulfur-containing amino acids was enhanced. Meanwhile, post-mortem changes in blood drug concentrations were also evaluated under low temperatures. We observed chemical reactions specifically occurring in dead body. Namely, we successfully observed post-mortem specific chemical species of drugs. By utilizing these findings, it is possible to estimate the time elapsed after death from the concentrations of metabolites and post-mortem species of drug, thus we obtained important knowledge in forensic toxicology.

研究分野：法中毒学

キーワード：低体温症 災害関連死 メタボローム LC-MS 法中毒学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の地球温暖化に起因する風水害、巨大地震や火山噴火などの自然災害は、拡大/高度化した現代社会に甚大な人的被害を与える。このような甚大な自然災害を直接的な原因とする災害関連死は異常死ではあるものの、一見すると原因が明らかで、死者数も多数に及ぶことから、死因究明に必要な情報を必ずしも得ていないこともある。

メタボローム解析という手法が代謝産物を網羅的に探索することによって、疾患の発症機構の解明や病態の診断といった医療分野での応用がなされてきたように、この手法をご遺体から採取される血液などをはじめとする試料に適用し、死因究明に資する法中毒学的研究に応用しようとするのは、メタボローム解析の新たな応用として挑戦すべき意義があるものと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

上述の背景から、本研究では災害関連死の中で特に低体温症及び凍死に特に着目して研究を実施することとした。

低体温症とは、体熱が異常に放散されて低体温となり、全身性障害が発生した状態をいう。この低体温状態に伴い、生体は低体温に対する様々な防御反応を起こしたり、さらに病態状態へと進行したりする。このような生体防御反応や病態進行に伴い、メタボロームに多様な変化が生じるものと想定できるため、メタボロームの解析によって、低体温症や凍死のメカニズムをより詳細に解明できるものと考えられた。

さらに、生前に摂取した薬物は、死後に生前の代謝とは異なる薬物変化を引き起こすことがある。またこの死後の薬物変化は、化学的な変化に基づくことが多く、ご遺体の置かれている環境により著しく影響を受ける。寒冷環境に置かれたご遺体において、死後薬物変化がどのように起きているのかを解析することとした。

本研究チームが所属(併任)している千葉大学法医学教育研究センターでは、年間20~30例の凍死と推定される解剖事例がある。また、低体温症は培養細胞や実験動物を用いた検討が実験系を確立しやすいことも考慮して、低体温メタボローム解析を行うことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

1) 培養細胞を用いた *in vitro* の検討

低体温に対する最初の生体防御反応は、立毛筋の収縮による“鳥肌”であり、続いて骨格筋の震え(shivering)が起こる。さらに低体温が進行すると、意識混濁や意識消失が起こり、エネルギー代謝の低下も生じる。このような病態進行を考え、骨格筋細胞、神経細胞及び肝細胞を低温培養に用いることを計画した。これらの培養細胞を複数の低温条件下で培養し、それぞれのメタボロームをLC-MSにより解析することとした。

・メタボローム解析：各培養条件下で起こるメタボロームの変動の解析(non-target分析)に加え、低温条件下で変動を起こしやすいと想定できるエネルギー代謝機能に着目し、糖質、アミノ酸、核酸、脂質の代謝を構成する代表的な代謝物の定量的解析も行うこととした。標準的には逆相クロマトグラフィーにより分離を行うが、糖質や短鎖脂肪酸等の代謝物は親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)により分析を行うことを想定した。得られた結果について、主成分分析及び階層的クラスタリングによる統計解析を行う。さらに、PubChem/HMDBのデータベースを基にした代謝マップ上に定量値グラフで示すことにより、直感的なメタボローム変動を提示することとした。

今回の研究期間内においては、まず低温培養に比較的耐性の高いヒト肝がん細胞HepG2を用いた。そして特にアミノ酸の変動に着目して、網羅的な解析を行った。

さらに低温ストレスによる含硫アミノ酸の変化の機構を明らかにするため、以下の検討を行った。30の低温ストレス負荷をかけた哺乳類細胞では、細胞内シスチンの濃度増加が報告されており、そのメカニズムとして、シスチン/グルタミン酸トランスポーター(xCT)の発現上昇あるいは活性化が想定されている。セレノシスチン(SeCys₂)は、シスチン(Cys₂)と同様にxCT介して取り込まれることから、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)により高感度に検出可能なSeCys₂を用いることによって、xCTの評価が可能であると考えられた。そこで、低温ストレスによるヒト肝がん細胞HepG2へのSeCys₂の取り込み量と低温ストレスの間に関連があるかを評価した。すなわち、HepG2を通常培地で24hr培養した後、5μM SeCys₂を添加したCys₂フリー培地に置換して、37と30でさらに24hr培養した後の細胞内セレン濃度をICP-MSにより測定した。

2) 死後の薬物変化における低体温の影響評価

死後の薬物変化の機構として、ヘモグロビン(Hb)に含まれる鉄(II)を介したFenton反応が

起こり、薬物が死後変化を受けるメカニズムが報告されている。自殺目的で用いられる非ベンゾジアゼピン系睡眠薬ゾルピデム（ZOL）は死後に血中濃度が減少することが報告されているが、どのような機構で濃度減少するかは明らかになっていない。本研究では、ZOL の死後の濃度減少に Hb による Fenton 反応が関与しているかを明らかにするため、以下の検討を行った。

【方法】ZOL (10 $\mu\text{g/mL}$) に 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.4) に溶解した Hb 溶液 (100 mg/mL) 及び過酸化水素 (H_2O_2 , 300 $\mu\text{g/mL}$) を添加し、37 $^\circ\text{C}$ で 24 時間温置後、LC-Orbitrap-MS (Q-Exactive plus, Thermo Fisher Scientific) により残存する ZOL 濃度を測定した。さらに死後の ZOL 濃度減少に影響する要因として遺体の温度等の影響を検討した。また ZOL の Hb と H_2O_2 による変化機構を解明するため、反応前と反応後で差分析を実施し、網羅的に ZOL 変化体を探索した。最後に ZOL 服用死者血 (n=20) から ZOL の死後変化体と想定される 2-hydroxy-N,N-dimethyl-2-(6-methyl-2-(p-tolyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)acetamide (2-OH ZOL) を測定した。

3) 法医解剖検体を用いた検討

上述の通り、年間 20 ~ 30 例の凍死と推定される千葉大学法医学教育研究センターの解剖検体について、1) 及び 2) のメタボローム解析に準じて解析を行った。なお、解剖検体の使用については、千葉大学大学院薬学研究院の倫理審査を経て、オプトアウトを行った。

4. 研究成果

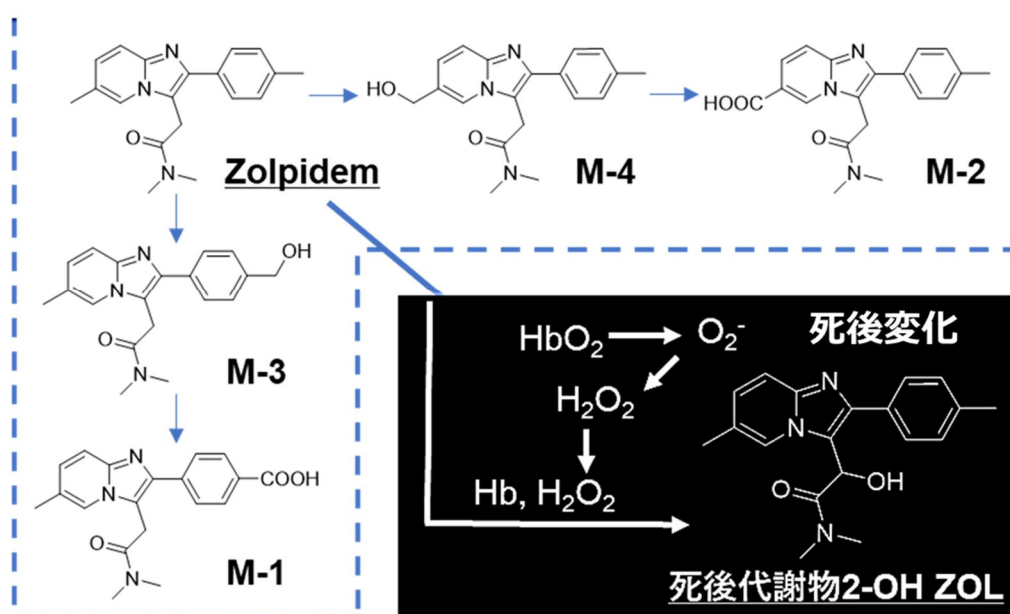
1) セレノシスチンを用いた低温ストレス評価法の開発

細胞内セレン濃度は、対照群で 14.4、低温ストレス群で 25.9 $\mu\text{g Se}/1.0 \times 10^6 \text{ cells}$ であり、低温ストレス群において有意に増加した。また、同一温度条件では通常培地群に比べて、Cys₂ フリー培地群における細胞内セレン濃度は有意に増加した。これらのことから、SeCys₂ と Cys₂ は取り込みにおいて競合しており、低温ストレス下では xCT を介した細胞内への Cys₂ の取り込みが増加していると考えられた。従って、ICP-MS により SeCys₂ に由来するセレンを定量することにより、低温ストレスを評価できる可能性を示唆できた。

2) 睡眠導入剤ゾルピデムのヘモグロビンによる血中死後変化と温度による影響

ZOL は Hb 溶液に H_2O_2 を加えた反応液中で最も有意に減少した。加えて、環境影響の一因である温度の影響が認められ、ZOL 濃度は 4 $^\circ\text{C}$ や 45 $^\circ\text{C}$ で減少した。一方で、pH の影響は小さく、ZOL 濃度の減少はほぼ同程度であった。さらに、 H_2O_2 濃度の影響が認められ、濃度依存的に減少した。差分析の結果、 m/z 324.1697 をもつ ZOL 死後変化体が抽出された。その死後変化体は MS/MS 結果より、2-OH ZOL であった。一部の ZOL 服用死者血 (20 例中 7 例) から 2-OH ZOL が検出された。これらのことから、Hb による ZOL の死後変化機構は、Hb 中の鉄 (II) を触媒とした Fenton 反応により生じた活性酸素種により、2-OH ZOL を生成するものと推察された。さらに 2-OH ZOL は、生前の代謝反応では生成されておらず、ZOL 服用死者血から特異的に検出されたため ZOL の死後変化のバイオマーカーとして使用できる可能性があると考えられた(下図)。

生体における代謝



図．生体による薬物代謝と遺体における死後代謝（死後変化）

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 1件）

1. 著者名 Y. Yamagishi, S. Nagasawa, H. Iwase, and Y. Ogra	4. 巻 47
2. 論文標題 Post-mortem interaction between methidathion and human serum albumin in blood	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Toxicol. Sci.	6. 最初と最後の頁 139-146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.47.139	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 -

1. 著者名 Y. Yamagishi, S. Nagasawa, H. Iwase and Y. Ogra	4. 巻 35
2. 論文標題 Evaluation of interaction between hemoglobin and oxime-type carbamate pesticides.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chem. Res. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 1110-1116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.chemrestox.2c00092	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 山岸由和、永澤明佳、小椋康光、岩瀬博太郎	4. 巻 -
2. 論文標題 法医学領域における法中毒学及び薬毒物検査の現状	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ぶんせき	6. 最初と最後の頁 103-109
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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 越智杏奈, 寺部千夏, 井上真男, 田中麻衣, 青野陸, 北山香織, 栗原達夫, 佐藤総一, 小椋康光, 三原久明
2. 発表標題 Aminobacter属細菌に新たに見つかったトリメチルセレノニウム・トリメチルスルフォニウム資化遺伝子群
3. 学会等名 ビタミン学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山岸由和, 永澤明佳, 岩瀬博太郎, 小椋康光
2. 発表標題 カーバメイト系殺虫剤の死後代謝に対するヘモグロビンの影響
3. 学会等名 法中毒学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山岸由和, 永澤明佳, 岩瀬博太郎, 小椋康光
2. 発表標題 プロマゼバムの死後代謝におけるヘモグロビンの影響
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山岸由和, 猪口剛, 星岡佑美, 永澤明佳, 岩瀬博太郎, 小椋康光
2. 発表標題 ヘモグロビン中の鉄を介したヒト血液中パリペリドンの死後代謝の解析
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山岸由和, 永澤明佳, 岩瀬博太郎, 小椋康光
2. 発表標題 睡眠導入剤ゾルピデムのヘモグロビンによる血中死後変化
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院薬学研究院法中毒学研究室website
https://www.p.chiba-u.jp/lab/houchu/index.html
千葉大学大学院薬学研究院予防薬学研究室website
https://www.p.chiba-u.jp/lab/yobou/index.html

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	永澤 明佳 (Nagasawa Sayaka) (30536735)	千葉大学・大学院薬学研究院・講師 (12501)	
研究分担者	山岸 由和 (Yamagishi Yoshikazu) (50834470)	千葉大学・大学院医学研究院・特任助教 (12501)	

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