

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460880

研究課題名(和文) 熱中症の法医確定診断-メタボロミクスを用いた診断に有用なバイオマーカーの検討

研究課題名(英文) Forensic diagnosis for heatstroke-a search for useful biomarkers by metabolic profiling

研究代表者

鈴木 廣一 (Suzuki, Koichi)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：60171211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：熱中症の法医診断マーカーの確立を目的に、GC-MS/MSを用いたメタボロミクス解析法で熱ストレス動物モデルの血漿中の代謝物の変化を検討した。72種類の代謝物が検出され、そのうちの18種類(アミノ酸9種、有機酸6種、単糖3種)が体温上昇と強い相関をもっていた。これらは生体内のエネルギー産生と関係していた。さらに、将来的に法医実務に応用するためには、死後経過時間が代謝物の変化に与える影響について理解する必要があるため、死後経過時間にもなう代謝物の変化について検討した。その結果、精度の良好な回帰モデルを構築することができた。

研究成果の概要(英文)：To search for biomarkers of heatstroke, we demonstrated by GC-MS/MS based plasma metabolic profiling that various endogenous metabolites changed with elevated body temperatures in heat-stressed animal models. We detected 72 metabolites, of which 18 metabolites (9 amino acids, 6 organic acids, and 3 monosaccharides) were found to be statistically correlated with raised body temperatures. These metabolites had a relationship with the energy productions. In addition, in order to understand the effect of postmortem interval (PMI) on those metabolites in plasma, we investigated the change of metabolites with time after death towards the future forensic casework. As a result, we constructed a PLS regression model which could successfully predict each PMI.

研究分野：法医学

キーワード：メタボロミクス 熱中症 死後経過時間

1. 研究開始当初の背景

熱中症の剖検は特異的所見に乏しく、死因は発見時の状況等から総合的に判断せざるをえないことが多い。熱中症は全身性炎症反応にともなう多臓器不全とされるが、それに到る病態は不明な点が多く、これまでも動物モデルを用いて重要臓器における遺伝子発現の変動を検討した報告等が散見される。

生体に熱ストレスが加わると細胞内代謝は促進するといわれるが、今回我々は網羅的分析技術の一つであるメタボロミクス的手法を用いて、熱ストレスモデル動物血漿中の代謝物の変化について検討した。

2. 研究の目的

熱中症の法医診断マーカーの確立を目的に、網羅的分析技術の一つであるメタボロミクス的手法を用いて、熱ストレスモデル動物血漿中の代謝物の変化を検討した。ところで、将来的に法医解剖実務に応用するためには、前提として死後経過時間ともなう代謝物の変動を把握しておく必要がある。そのため、死後経過時間ともなう血漿中代謝物の変動を検討し、ついで、熱ストレスモデル動物血漿中の代謝物の変動について検討した。

3. 研究の方法

① 死後経過時間に伴う代謝物の変動

SD系雄性ラット(10週齢)36匹を6群に分け、CO<sub>2</sub>で安楽死後、それぞれ、死亡直後、死後3、6、12、24、48時間後に血液採取を行い、速やかに血漿を分離して試料とした。

② 熱ストレスに伴う代謝物の変動

SD系雄性ラット(10週齢)24匹を4群に分け、イソフルラン吸入麻酔および心電図モニター下に、保温マットにて直腸温度がそれぞれ37、40、42、44℃になるまで加温した。目標温度の時点でペントバルビタールを腹腔内投与し安楽死させたのち血液を採取し、速やかに血漿を分離し試料とした。

得られた血漿試料は、クロロホルム-メタノール溶液(2:5, v/v)で抽出を行い、メトキシアミンとMSTFAで誘導体化を行った。分析装置は島津製作所製GCMS-TQ8030(トリプル四重極型)を用い、データはSIMCA-P+(Umetrics,

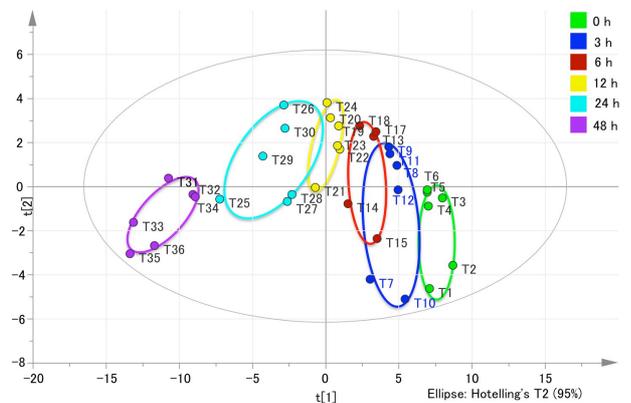
ver.13)で多変量解析を行った。

4. 研究成果

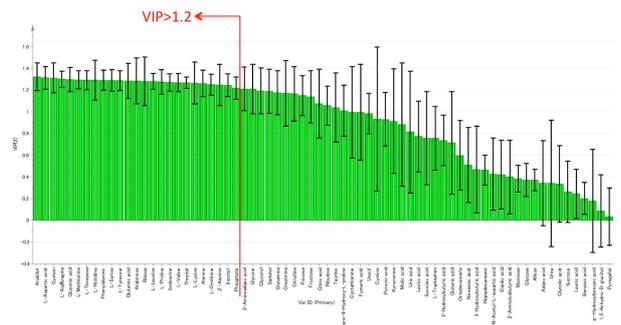
① 死後経過時間に伴う代謝物の変動

血漿中から70種類の代謝物を同定した。主成分分析では、6群は比較的明瞭に分離し、死後経過時間とともに変動する代謝物の存在が示された(1)。その結果、統計学的に死後経過時間と優位な関連性をもって変動していると判断された25成分を選出し、PLS回帰法を用いて予測モデルを作成することができた(2, 3)。さらに、新たに各群n=3としてvalidation studyを行った結果、構築した予測モデルの有効性が示された(4)。

1) PCA(Principal component analysis)-UV scale

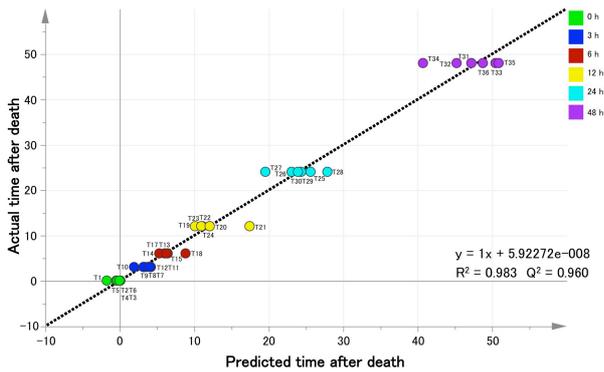


2) VIP(Variable importance in the projection) score plot



VIP>1.2かつKruskal-Wallis test ( $P < 0.05$ )となる代謝物は25成分であった。

3) PLS(Partial least squares (or projection to latent structure) regression model



#### 4) Validation study

No.	Actual time after death (h)	predictive time (h)	Mean±SD
V1	0	-0.19	0.19±0.81
V2		-0.37	
V3		1.11	
V4	3	7.25	4.04±2.81
V5		2.00	
V6		2.86	
V7	6	5.76	7.22±1.50
V8		7.15	
V9		8.75	
V10	12	9.60	10.51±1.02
V11		10.31	
V12		11.62	
V13	24	27.53	20.70±5.99
V14		18.20	
V15		16.37	
V16	48	54.91	48.50±5.73
V17		46.71	
V18		43.87	

#### ② 熱ストレスに伴う代謝物の変動

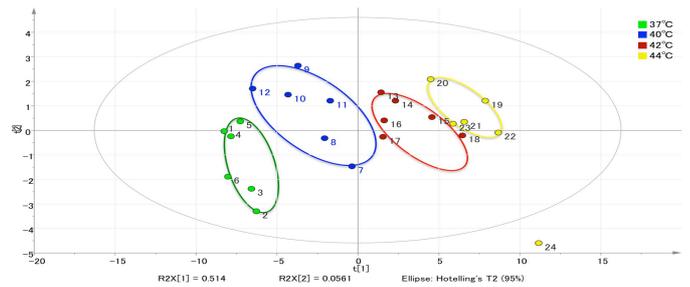
ラットの直腸温度が 40℃、42℃、44℃ に達するのに要した時間は、それぞれ 17.7±3.1 分、28.7±3.0 分、33.3±1.8 分であった。

血漿中から 72 種類の代謝物を同定した。主成分分析では 4 群は明瞭に分離した (5)。

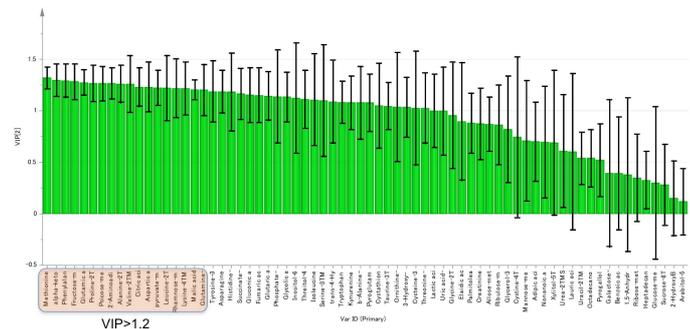
統計学的に、18 種類 (アミノ酸 9 種、有機酸 6 種、単糖 3 種) が体温上昇と強い相関をもって増加していた (6)。それら 18 成分はいずれも TCA cycle をはじめとしたエネルギー産生経路に関わっており、体温上昇とともにエネルギー産生が亢進している可能性が示唆された。

さらに、心臓、肝臓、腎臓、筋肉といった臓器についても検討しており、解析を進めることによってより詳細な情報を得ることが出来ると期待される。

#### 5) PCA-UV scale



#### 6) VIP score plot



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- ① Sato T, Zaitzu K, Tsuboi K, Nomura M, Kusano M, Shima N, Abe S, Ishii A, Tsuchihashi H, Suzuki K. A preliminary study on postmortem interval estimation of suffocated rats by GC-MS/MS-based plasma metabolic profiling. *Anal Bioanal Chem*. 査読あり、407(13):3659-65 (2015)  
doi: 10.1007/s00216-015-8584-7

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① Sato T, Zaitzu K, Tsuboi K, Nomura M, Shima N, Iwata M, Abe S, Ishii A, Tsuchihashi H, Suzuki K. Postmortem interval estimation of suffocated rats by plasma metabolic profiling. 9<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Legal Medicine. 16<sup>th</sup>~20<sup>th</sup> June, 2014, Fukuoka (Japan)
- ② 佐藤貴子、財津 桂、坪井健人、野村和克、岩田美佐、志摩典明、阿部俊太郎、石井晃、土橋 均、鈴木廣一  
ラット熱中症モデルにおけるメタボロミクス解析  
第 99 次日本法医学会学術全国集会  
2015 年 6 月 10~12 日

高知市文化プラザかるぼーと（高知市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 廣一 (SUZUKI Koichi)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60171211

(2) 研究分担者

佐藤 貴子 (SATO Takako)  
大阪医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10530420

土橋 均 (TSUCHIHASHI Hitoshi)  
名古屋大学・医学系研究科・招聘教員  
研究者番号：40596029