

背景：

肝臓型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) は、臨床的に慢性腎疾患の進行を監視し、予測したり、急性腎損傷や急性冠症候群を診断したりするバイオマーカーとして報告されている。8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) は活性酸素による細胞障害を反映するバイオマーカーとして知られ、仕事、喫煙、疾病など様々なストレスとの関係が明らかになってきている。

死体における化学的検査において、尿は血液の代用物にはなり得ないが、実際の法医解剖例では血液が得られない場合がしばしばあり、バイオマーカーの中には、血中濃度より、尿中濃度の方がより安定して定量できる物質もあることが確認できている。

目的：

本研究では、尿中の L-FABP と 8-OHdG の濃度を測定することが、死者の生前の病態生理学的状態、特に死戦期の状態の解明に繋がるバイオマーカーとなり得るかを検討することを目的とした。

対象と方法：

福岡大学医学部法医学教室で実施した法医解剖 196 例の尿を試料とした。死後経過時間 1 週間以内とし、明らかな腎疾患症例は除外した。尿の遠心分離後の上清は-30℃で保管した。受傷（発症）後生存期間が判明している 170 症例は、その期間別に群別した。1 時間以内 (A 群) は 118 例、24 時間以内 (B 群) は 29 例、24 時間以上 (C 群) は 23 例であった。なお、本研究は福岡大学医に関する倫理委員会の承認 (第 389 号) を得て行った。

L-FABP は CMIC 社製の L-FABP ELISA kit を用い、8-OHdG は日研ザイル社製の 8-OHdG ELISA kit を用いて測定した。クレアチニンはペルオキシダーゼ共役反応に関する酵素法で測定した。L-FABP と 8-OHdG の各尿中濃度はクレアチニン (Cr) 濃度で補正した。

尿中 L-FABP/Cr と尿中 8-OHdG/Cr の分布は、性別、死因別の評価に、マンホイットニー順位和検定を行った。相関分析はスピアマン順位相関を用いた。死因別の群間比較、受傷（発症）後生存期間別の群間比較は、クラスカル-ワーリス検定後に、多重比較でステューラー-デュワス検定を用いた。

尿中 L-FABP/Cr と尿中 8-OHdG/Cr の評価のための標準値は、受信者動作特性 (ROC) 曲線を利用して、カットオフ値として求めた。

結果：

尿中 L-FABP/Cr の中央値は 11.8 $\mu\text{g/g Cr}$ 、尿中 8-OHdG/Cr の中央値は 14.9 $\mu\text{g/g Cr}$ であった。いずれも性別による有意差はなく、年齢、死後経過時間との相関も認められなかった。尿中 L-FABP/Cr と尿中 8-OHdG/Cr の間に相関は認められず、血中、尿中アルコール濃度とも相関はなかった。

尿中 L-FABP/Cr、尿中 8-OHdG/Cr のいずれも、外因死に比べて内因死で有意に高値であったが、死因別の多重比較では有意差は得られなかった。

受傷(発症)後生存期間別の尿中 L-FABP/Cr は、A 群の中央値は 1.0 $\mu\text{g/g Cr}$ 、B 群の中央値は 104.9 $\mu\text{g/g Cr}$ 、C 群の中央値は 335.9 $\mu\text{g/g Cr}$ であった。受傷(発症)後生存期間別の尿中 8-OHdG/Cr は、A 群の中央値は 13.2 $\mu\text{g/g Cr}$ 、B 群の中央値は 16.6 $\mu\text{g/g Cr}$ 、C 群の中央値は 30.9 $\mu\text{g/g Cr}$ であった。受傷(発症)後生存期間別で多重比較を行ったところ、尿中 L-FABP/Cr は B 群と C 群のいずれも A 群より有意に高値であった。尿中 8-OHdG/Cr は C 群が A 群、B 群のいずれよりも有意に高値であった。

ROC 曲線で検討したところ、受傷(発症)後生存期間が 1 時間以内であるかを推測するための尿中 L-FABP/Cr のカットオフ値は 31.3 $\mu\text{g/g Cr}$ 、24 時間以内であるかを推測するための尿中 8-OHdG/Cr のカットオフ値は 17.8 $\mu\text{g/g Cr}$ と判断した。

考察：

受傷(発症)後生存期間が長くなると、尿中 L-FABP/Cr、尿中 8-OHdG/Cr のいずれも増加することが明らかとなった。尿中 L-FABP/Cr は受傷(発症)後生存期間が比較的短い症例でも上昇していた。一方、尿中 8-OHdG/Cr はより長い症例で上昇していた。L-FABP は腎血流の低下、近位尿細管の障害により、尿中に排泄されるが、8-OHdG は損傷を受けた DNA の修復機序により、損傷臓器から血中へ移行し、尿中へ排泄されると考えられる。従って、死因につながる障害が発生して短時間で尿中 L-FABP/Cr が上昇した後、遅れて尿中 8-OHdG/Cr が上昇するものと考えられる。

尿中 L-FABP/Cr、尿中 8-OHdG/Cr のカットオフ値を検討した結果、尿中 L-FABP/Cr が 31.3 $\mu\text{g/g Cr}$ 以下の場合には、受傷(発症)後生存期間は 1 時間以内、尿中 8-OHdG/Cr が 17.8 $\mu\text{g/g Cr}$ 以下の場合には、受傷(発症)後生存期間は 24 時間以内と判断できると考えられる。

尿中 L-FABP/Cr、尿中 8-OHdG/Cr を測定することは受傷(発症)後生存期間を解明するのに有用であると考えられる。

結論：

(1) 尿中 L-FABP/Cr、尿中 8-OHdG/Cr は性別、年齢、死後経過時間の影響をうけない安定したマーカーである。

(2) 尿中 L-FABP/Cr が低値であれば、受傷(発症)後生存期間は短いと考えられ、尿中 8-OHdG/Cr が高値であれば長いものと考えられる。

(3) 尿中 L-FABP/Cr、尿中 8-OHdG/Cr は、受傷(発症)後生存期間の良好な指標と考える。

審査の結果の要旨

法医剖検診断において、直接死因となった病態のみならず、死に至る経過、受傷（発症）から死亡までの経過を知ること、極めて重要である。

本論文は、法医剖検例のうち、様々な死因や、受傷（発症）から死亡までの時間が異なる症例から得た尿を試料として、尿中の L-FABP (liver-type fatty acid-binding protein) 、 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)、Cr (creatinine)の濃度を測定し、死者の生前の病態生理学的状態、特に死戦期の状態の解明に繋がるマーカーとなり得るかを検討したものである。その結果、尿中 L-FABP/Cr、尿中 8-OHdG/Cr は性別、年齢、死後経過時間の影響をうけない安定したマーカーであること、尿中 L-FABP/Cr が低値であれば、受傷（発症）後生存期間は 1 時間以内と考えられ、尿中 8-OHdG/Cr が高値であれば 24 時間以上と考えられること、尿中 L-FABP/Cr、尿中 8-OHdG/Cr は、受傷（発症）後生存期間の良好な指標と考えられることを明らかにしている。

1. 斬新さ

本研究は、尿中 L-FABP、8-OHdG、Cr の濃度を測定し、これらのマーカーが、受傷（発症）後死亡までの生存期間の良好な指標になることを明らかにした点において斬新な研究である。

2. 重要性

法医剖検診断では、臨床経過をはじめ、死亡前の状況や病態が不明の場合がほとんどであり、剖検所見や、剖検試料の分析結果・検査から死亡に至る病態を判断するしかない。そのため、病態の解明に繋がる検査項目の検討、剖検補助診断の開発は、極めて重要である。

3. 実験方法の正確性

本研究では、尿中の L-FABP、8-OHdG、Cr の測定は、確立した測定系と機器を使用して行っており、繰り返し測定し、再現性も確認している。また、統計解析においても、対象症例の内容、測定結果の分布等を考慮し、適切な解析法を選択し、科学研究領域で一般的に使用されている統計解析ソフトを用いて分析しており、正確なものとする。

4. 表現の明瞭性及び結論

本研究では、得られた結果は表として一覧できるように表現している。また結果は、多角的に統計解析しており、解析結果も図解されており、視覚的に理解しやすく工夫されており、表現は明瞭かつ分かりやすいものとなっている。

5. 主な質疑応答

Q1 採尿後の尿試料の取り扱い、検体の遠心条件等は？沈渣は観察しているか？

A1 3000rpm で遠心分離した上清を試料とした。死後変化もあり、沈渣は観察していない。

Q2 対象症例から腎疾患を除外しているが、その基準は？

A2 生前の腎疾患の病歴、病理所見から腎疾患が疑われる症例を除外している。

Q3 受傷（発症）後生存期間は群別のみでなく、時間を点としてプロットすることはできないか？

A3 正確な生存期間が判明しているわけではないので、群別で判断した。

Q4 陽性的中率、陰性的中率などは死因分類等の母集団での割合によって変わると思われるが、今回のカットオフ値は、法医解剖全般に応用可能か？

A4 剖検施設ごとに症例の死因の割合が違う可能性があるので、応用できるかの判断は難しいが、症例を増やし検証する必要があると考える。

Q5 受傷（発症）後の生存期間が1時間か24時間かなどを区別することでどのようなメリットがあるのか？

A5 法医解剖例は死亡前の状態が全くわからない症例が多く、死因判断のための補助診断としても有用である。

Q6 腎臓のマーカーでなぜ L-FABP を選んだのか？他のマーカーとの比較は？

A6 臨床で一般的な NAG や β 2-MG などは尿細管の組織障害後に検出されるが、L-FABP は組織障害を起こす前に尿中に排泄されるので、より迅速に反応するマーカーであると考え採用した。他のマーカーとの比較は今後検討したい。

Q7 腎毒性のある薬物や溺水は、L-FABP に影響があると思うが？

A7 中毒症例や溺水では L-FABP が上昇していたが、有意差はなかった。

Q8 Cr は筋肉傷害で増加するが、Cr 値補正する意義はどうか？

A8 法医剖検試料も随時尿なので、一般的に Cr 補正を行っている。補正前の値では有意差は認められなかった。

法医解剖は、死因究明に大きな役割を担っており、死亡原因のみならず、死亡前の病態の解明は重要である。本研究は、受傷（発症）から死亡に至る生存期間の解明に繋がるもので、学位論文に値すると評価された。