

氏名	いけまつ なつき 池松 夏紀		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1763 号		
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 14 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Diagnostic meaning of blood <i>p</i> -cresol concentration in forensic autopsy cases (法医剖検例における血中 <i>p</i> -cresol の診断意義について)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	久保 真一
	(副査) 福岡大学	教授	松永 彰
	福岡大学	教授	中島 衡
	福岡大学	准教授	升谷 耕介

## 内容の要旨

### 【目的】

法医解剖の際に行う薬毒物スクリーニング検査において、血液よりしばしば高濃度の *p*-cresol を検出することがある。*p*-cresol (4-methylphenol、MW 108.1 Da) は 3 種類の cresol 異性体のうち、生体内で産生される唯一の異性体で、腸内細菌によって作られ、腸管粘膜と肝臓を通過する過程でそのほとんどが硫酸抱合体、少量がグルクロン酸抱合体となり、尿中へと排泄される。*p*-cresol の抱合体は尿毒素として知られ、慢性腎不全患者においては排泄が遅れ体内に蓄積することが知られており、血中 *p*-cresol 濃度は、腎機能障害、死亡率に影響することが知られている。また、*p*-cresol は蛋白結合が強いことから、人工透析でフィルター濾過できず、透析患者においても体内で蓄積するとされる。

本研究では、法医剖検例における血中 *p*-cresol の診断意義を検討した。

### 【対象と方法】

2015 年から 2017 年までの間に福岡大学法医学教室で行われた法医解剖 251 例のうち、死後経過時間が 48 時間以内であった 110 例と、対照として健康成人ボランティア 10 例の血液を対象とした。死後変化、特に腸内細菌増殖の影響を排除するために、死後経過時間は 48 時間以内とした。各血液試料に内部標準物質として *p*-cresol- $d_8$  を加え、抽出処理後、シリル化剤で誘導体化し GC-MS/MS で測定した。各血液を抽出する際に、前処理としてフィルター濾過による除タンパクと酸熱処理による脱抱合を組み合わせることで、未変化体 (F)、抱合体 (非蛋白結合型 : C、蛋白結合型 : PC) の *p*-cresol 濃度を個別に

求めた。GC-MS/MS の MRM モードによって検出された *p*-cresol と *p*-cresol- $d_8$  のエリア比から濃度を算出した。年齢、性別、BMI、食後経過時間、障害発生後生存時間、死後経過時間、死因、肝臓・腎臓・心臓の各重量、各動脈の狭窄ないし硬変の有無、組織学的検査において観察された形態的变化の有無でグループ化し、各群における *p*-cresol 濃度を、JMP 13.2.1 software program を用いて統計学的に解析した ( $p < 0.05$ )。また、剖検血液のうち健康成人の血中濃度の平均+2SD 以上を異常高値とし、22 症例を詳細に検討した。

### 【結果】

Total *p*-cresol 濃度はそれぞれ、健康成人血で  $1.39 \pm 0.86 \mu\text{g/ml}$  [mean  $\pm$  SD]、死体血で  $1.18 (0.19-18.80) \mu\text{g/ml}$  [median (range)] であった。Total *p*-cresol 濃度は、年齢、性別、食後経過時間、障害発生後生存時間、死後経過時間のいずれにおいても有意差は認められなかった。死因分類では、内因性死 4 群、外因性死 8 群、合計 12 群でいずれの 2 群間においても有意差はなかった。

臓器重量の群間比較では、心臓、腎臓において標準重量群と比較して有意差は認められなかった。肝臓では低重量群が標準重量群と比較して、F、C、PC、Total のいずれの *p*-cresol 濃度とも有意に高かった ( $p < 0.01$ )。

動脈硬化（狭窄）の群間比較では、C *p*-cresol 濃度が脳底動脈、腎動脈で「アテローム性変化のある」群が「ない」群に対し有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。また冠状動脈に「狭窄がある」群でも、「ない」群に比べて有意に高濃度を示した ( $p < 0.01$ )。C *p*-cresol は血管内皮細胞を障害し、慢性腎不全患者における循環器疾患の死亡率に影響があると知られている。本研究でも C *p*-cresol の血管系への影響が示唆された。

病理学的変化の群間比較では、心臓と肝臓の線維化の有無で特に有意差はなかった。肝臓の脂肪変性のある群は、ない群に対して F、PC、Total *p*-cresol は有意に低かった ( $p < 0.05$ )。腎臓の糸球体硝子様変性のあった群では、F 以外の *p*-cresol が全て高値を示していた ( $p < 0.05$ )。この結果は、*p*-cresol 腎排泄能の低下が濃度に反映されたものと考えた。

BMI が低い群では標準体重の群に対し、F、C ( $p < 0.05$ )、PC、Total ( $p < 0.01$ ) *p*-cresol 濃度は有意に高かった。低 BMI 群では年齢も有意に高かった。高齢者では *p*-cresol を産生する腸内細菌が増加すること、また絶食状態では腸管内容物の通過時間が延長され *p*-cresol の産生と吸収の増加につながることは良く知られている。本研究においても腸内環境や腸管からの吸収量の変化などが血中 *p*-cresol 濃度に影響した可能性が考えられた。

異常高値であった 22 症例について、高 *p*-cresol の発生機序を検討した。22 例には 4 例の透析患者が含まれていた。3 例は多臓器不全の症例で、障害発生後、数日間生存した後死亡した症例であった。多臓器不全では腎機能と肝機能の低下、更には腸内環境の変化が、血中 *p*-cresol 濃度に影響した可能性が考えられた。4 例は絶食あるいは便秘症例であった。これらの症例では腸内滞留物からの *p*-cresol 産生・吸収が促進された可能性が考えられた。4 例は悪性腫瘍で、内 3 例は低栄養状態であった。2 例は腎臓癌と肝臓癌で、腎機能、肝機能障害によるものと考えられた。*p*-cresol の各分画の比率を検討したところ、Total に対する C *p*-cresol の割合が高比率（約 50%）を示した 2 症例は、肝臓癌あるいは多臓器不全によっていずれも黄疸を認めた。肝機能不全が C *p*-cresol の蛋白結合に影響した可能性が考えられた。

以上の結果から、*p*-cresol の産生・代謝・排泄に関係する腸内環境の異常、肝機能・腎機能を障害する病態では、*p*-cresol が異常値を示すものと考えられた。

#### 【結論】

血中 *p*-cresol は、その産生、代謝、循環そして排泄に影響を与える疾患、病態、健康状態の指標となると考えられた。*p*-cresol 濃度を測定することは生前の病態を知る上で、貴重な情報を提供するものとする。

### 審査の結果の要旨

本論文では、法医剖検例における血中 *p*-cresol の診断意義を検討した。血中 *p*-cresol の分析法の検討では、血液試料に内部標準物質として *p*-cresol-d<sub>3</sub> を加え、抽出処理後、GC-MS/MS で測定した。抽出する際に前処理として、フィルター濾過による除タンパクと酸熱処理による脱抱合を組み合わせることで、未変化体 (F)、抱合体 (非蛋白結合型 : C、蛋白結合型 : PC) の *p*-cresol を個別に分析測定することが可能であった。

診断意義の検討では、法医解剖 110 例と、対照として健康成人ボランティア 10 例の血液を対象とした。動脈硬化 (狭窄) の群間比較では、動脈硬化がある群がない群に対し、C *p*-cresol 濃度が有意に高値を示し、C *p*-cresol の血管系への影響が示唆された。腎臓の糸球体硝子様変性のあった群では、F 以外の *p*-cresol が全て高値を示した。この結果は、*p*-cresol 腎排泄能の低下が濃度に反映されたものと考えた。BMI が低い群では標準体重の群に対し、全ての *p*-cresol 濃度が有意に高く、腸内環境や腸管からの吸収量の変化などが血中 *p*-cresol 濃度に影響した可能性が考えられた。更に、異常高値であった 22 症例について、高 *p*-cresol の発生機序を検討した。*p*-cresol の産生・代謝・排泄に関係する腸内環境の異常、肝機能・腎機能を障害する病態では、*p*-cresol が異常値を示すものと考えられた。

以上のように、血中 *p*-cresol 濃度を測定することは生前の病態を知る上で、貴重な情報を提供するものと考えられた。

#### 1. 斬新さ

*p*-cresol の抱合体は尿毒素の一種で、慢性腎不全患者において排泄が遅れ体内に蓄積する。血中 *p*-cresol の研究は、腎不全患者を対象とするものが多く見られる。本論文は、血中 *p*-cresol が、腎不全症例以外に、肝機能障害、腸内環境の変化、腸管における吸収促進およびこれらの原因となる病態でも異常値を示すことを明らかにしたもので、極めて斬新である。

#### 2. 重要性

本論文は、法医剖検例 110 例における血中 *p*-cresol 濃度を測定し、そのデータを提示すると共に、高濃度となる機序を考察した。その結果、法医解剖における血中 *p*-cresol (濃度)は、死亡前の病態を反映するものと考えられた。法医剖検例における血中 *p*-cresol の診断意義の解明において、非常に重要な研究と考える。

#### 3. 研究方法の正確性

本論文は、血中 *p*-cresol 濃度を GC-MS/MS 装置によって定量検査したものである。分析方法についてはバリデーション (分析法の妥当性評価) も行われており、正確性は確保されている。

#### 4. 表現の明瞭性

*p*-cresol 濃度の定量値は、統計学的に適切に解析されている。その結果は、表やグラフを用い明瞭かつ分かり易く表現されている。

#### 5. 主な質疑応答

Q1 解剖症例 110 例と健常人 10 例の測定値で、*p*-cresol 濃度の中央値が健常人の方で高い値となっている。解剖症例が健常人より低くなる理由があるのか。

A1 中央値で見るとそうだが、2 群で差がないものと判断している。健常人では n 数が少なく、また年齢にも偏りがあるため、解剖症例が健常人より低くなったものとする。

Q2 透析患者における尿毒素は 30 種類ある。*p*-cresol の他の尿毒素はスクリーニングで検出できないのか。アミノ酸の分解で産生されるもので、*p*-cresol よりももっと有名な物質もある。そちらは測定しないのか。*p*-cresol の方が、濃度が高いから測定しているのか。

A2 本研究は、当研究室のスクリーニング検査で検出される物質を対象としているため、代表的な尿毒素、インドキシル硫酸はスクリーニング検査では検出されないため、研究の対象とならなかった。インドキシル硫酸に比べて *p*-cresol の方が高濃度というわけではない。

- Q3 タンパク結合するか否かの要因は何によって決まるのか。結合率を決める要因はあるのか。
- A3 タンパク質の量は限られており、血中 *p*-cresol 濃度が上がるにつれ、タンパク結合していない抱合体が多くなるものとする。
- Q4 タンパク結合型と遊離型の抱合体を区別するために限外濾過で分子量によるふるい分けをしたという認識でよいか。
- A4 その通りで、遊離型の抱合体がより有害とされる情報を受けて、その区別をつけることが重要であると考えたため、分子量によってふるい分けをした。
- Q5 分画を分けて結果を出していたが、その増減はほとんど同じ動きをすると考えて良いか。
- A5 ほぼ差がないと判断している。しかし、動脈の硬変・狭窄の有無による群間比較においては、C *p*-cresol のみが有意差を示したため、心血管系に関連するのはC *p*-cresol のみと考えている。
- Q6 血管病変は年齢が関係しているのではないか。年齢と共に狭窄も多くなる。BMI もまた年齢と関係している。C *p*-cresol が循環器疾患と直接関与しているとは言い難いのではないか。
- A6 血管病変とC *p*-cresol の関係に有意差を認めたが、年齢の影響は否めない。
- Q7 急性腎不全の症例はなかったのか？血清クレアチニン値は測定しないのか？急性腎不全の判定が出来たら興味深い。
- A7 血中クレアチニン値は、死後、筋肉からの拡散などで生体血とは大きく値が異なってくるため、測定していない。本研究の結果は、死後の急性腎不全の診断に有効である可能性があるとする。
- Q8 腎臓の病理で硝子様変性があるが、糸球体硬化のことか。病理所見の有無で群分けするのは適切か。加齢変化でも糸球体は硬化する。被膜下ではなく、深部では加齢による硬化は出ないかもしれない。
- A8 硝子様変性は糸球体硬化のことで相違ない。病理検査報告書を元に2群に分けた。病理所見は、腎盂から被膜下まで、広い範囲で観察している。
- Q9 3種類の *p*-cresol の異性体を区別できたというが、3本のピークはどうやって分離されているのか。異性体のうち、血中には *p*-cresol しかないという認識でよいか。
- A9 MS/MS で cresol のみを対象物質とし、更にカラムでの保持時間の差によって、3種類

を区別して検出している。3本のピークを分離しているのはカラムとの親和性の違いである。血中に存在する異性体は *p*-cresol のみである。

Q10 死因が溺水の症例では、BMI の評価は正確か。

A10 水を吸引しているため、BMI は少し大きい値になると考える。

Q11 *p*-cresol はどのくらいの時間で測定できるのか。多数の試料を測定できるか？

A11 抽出から測定まで、少ないサンプル数であれば1日で測定できる。ある程度試料数が増えても対応できる。

法医剖検診断において、死亡原因のみならず、死亡前の病態を知ることは重要である。本論文は、法医剖検例における血中 *p*-cresol (濃度) が、死亡前の病態を反映することを明らかにしたものである。法医剖検例における血中 *p*-cresol の診断意義の解明において、非常に重要な研究で、学位論文に値すると評価された。