

学 位 論 文 題 名

メラトニン測定による死亡時刻の推定に関する研究

学位論文内容の要旨

I 研究目的

法医学解剖において、死後経過時間の推定は最も重要な診断事項の一つであり、主として発現している死体現象の種類とその進行程度の観察により行われている。

そこで松果体から分泌されるメラトニン (MT) のサーカディアンリズムを法医学的に応用し、今までのように死後経過時間を推定するのではなく、直接、死亡時刻を推定することが可能かどうかを検討した。

MT は夜間に合成が著しく増加し、昼間にはこれがほとんど認められない。したがって、死体の MT 濃度を測定することによって、死亡時刻の昼夜の判別が可能になると考えられる。

今回、筆者は死亡時刻の明らかな剖検例についてその松果体中、血清中および尿中の MT 量をラジオイムノアッセイ (RIA) を用いて測定し、死亡時刻推定への応用を試みた。

II 実験材料および方法

1. 実験材料

平成元年1月から平成3年11月までの間、北海道大学医学部法医学講座で解剖された44死体のうち男性24体(年齢4歳~90歳、うち不明を1体含む)、女性20体(年齢4歳~76歳)また、平成3年7月から10月までの間、東京大学医学部法医学講座および東京都監察医務院で解剖された41死体のうち男性28体(年齢21歳~88歳)、女性13体(年齢21歳~94歳)、合計85体の松果体、血液および尿を調べた。これらのうち死亡時刻の明確な死体から松果体(75例)、血液(27例)および尿(14例)を採取し試料とした。

2. 実験方法

1) MT の抽出

松果体試料を0.1N HCl 2 ml 中に入れ1分間ホモジナイズし、デカンテーションを行って上清を採取した。これに3倍容となるように0.05Mリン酸緩衝生理的食塩水(pH7.4)を加えた

後、中性にし、0.5mlを別の遠沈管にとり3.0mlのジエチルエーテルでMTを抽出した。

2) RIA

標識抗原として [125 I] - MT (Specific Activity 9.25 KBq/ml) を用いて、競合法により行った。

3) MT量の死後変化を知るためのモデル実験

死体試料の死後経過時間が種々なので、その影響を調べるために以下に述べるようなモデル実験を行った。

松果体のモデルとしてヒトの脳の灰白質を5g採取し、蒸留水20mlを加え、MT100pg/ μ lのエタノール溶液を50 μ l入れホモジナイズした。1mlずつ9本の試験管に分注し、2000Gで10分間遠沈した。微濁した上清は吸引除去し、試験管口をパラフィルムで覆った。0.5h, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 2d, 4dおよび7dの各期間、室温で暗所に放置した。

また血液及び尿は、それぞれ5.5mlにMT5.5mg入れ、脳と同様に0.5h~7dの9本の試験管に分注した。これらの死後変化モデル試料についてMT量をRIAで測定した。

III 結 果

1. MTの回収率

MTの回収率は松果体中で32.4~79%, 血清中で44.3~98.4%, 尿中で40~100%, 平均値はそれぞれ, 55.8%, 77.6%, 80.9%であった。

2. 死亡時刻とMT量の関係について

1) 松果体中のMT量

(1) 松果体1個あたりのMT量

松果体中のMT量には昼間低く夜間に高いというサーカディアンリズムを認め、最低0.099ng/PB(時刻12:00), 最高63.158ng/PB(時刻2:00)であった。

(2) 松果体1mg当たりのMT量

松果体1mg当たりのMT量(pg/mg)も(1)と同様に、MT量には昼間低く夜間に高い傾向を認め、最低1.2pg/ml(11:24), 最高609.6pg/ml(2:00)であった。

2) 血清中のMT量

血清中のMT量は、夜間におけるMT量の分布範囲が広く39~205pg/ml, 昼間は38~86.5pg/mlの幅をもっていて、昼夜のサーカディアンリズムが弱いながらも認められ、最低11pg/ml(19:40), 最高205pg/ml(1:00)であった。

3) 尿中の MT 量

尿中の MT 量は昼間少なく夜間に多く、最低7.8pg/ml (12:00)、最高137.5pg/ml (21:00)であった。

4) 死後変化モデル実験

脳中 MT の経時的变化は、開始後24時間は漸次減少し、24時間以後はほぼ一定であり、始めの約 $\frac{1}{3}$ の量に止まった。血中及び尿中の MT 量の経時的变化はほとんど認められなかった。

IV 考 察

1. 松果体中の MT 量

ヒト以外の種々の動物における松果体 MT のサーカディアンリズムは、ニワトリ、ラット、ウズラについてその存在が認められており、それぞれ0.6~11.1, 0.5~6.8, 0.5~3.2ng/PBと昼間に低く、夜間に高いことが報告されている。本研究においてヒト松果体 MT のサーカディアンリズムの存在が認められた。

松果体1個あたりの MT 量と死亡時刻の関係から、その推定基準は次のようになる。

- ① 0.2ng 以下 : 11:00~17:00死亡
- ② 0.2~0.3ng : 7:00~20:00死亡
- ③ 0.3~1 ng : 死亡時刻の推定は不可能
- ④ 1~4 ng : 16:00~10:00死亡
- ⑤ 4~8 ng : 20:00~8:00死亡
- ⑥ 8 ng 以上 : 20:00~5:00死亡

2. 血清中の MT 量

本実験での結果から、死亡時刻の推定基準を考えると100pg/ml以上で22:00~1:00死亡というものだけになり、松果体中の MT 量よりは有用性が低い。

3. 尿中 MT 量

尿中 MT 量から考えられる一般的問題点についての第1は、MT の膀胱内蓄積時間の問題である。例えば、昼間死亡しても前夜から排尿がなされていなければ、夜間の MT 量が昼間のそれに反映してしまい、死亡時刻の推定を誤ってしまうおそれがある。

第2は、MT の代謝物質の問題である。MT は、肝臓で6-Sulphatoxymelatonin (aMT 6s) と glucuronide 6-hydroxy melatonin に代謝され、腎臓から尿中へ排泄されるが、その主たる代謝物質は aMT 6s である。本実験でも尿中 MT として aMT 6s を測定しているものと

考えられた。

また、肝内での MT の代謝が極めて速いことから死亡時血清 MT 量を尿中の 6-OHMT 量が反映すると考えられる。本実験における尿中 MT 量と血清中 MT 量の相関は、 $Y=0.951X+21.164$ (Y : 血清中 MT 量, X : 尿中 MT 量), 相関係数 $r=0.65$ と比較的高い相関を示した。

尿中 MT 量における死亡時刻の推定基準を考えると,

- ① $0\sim 35\text{pg/ml}$: 死亡時刻の推定は不可能
- ② 35pg/ml 以上: 18:00~6:00に死亡と推定できる。

4. 死後変化モデル実験について

脳中 MT の経時的变化をもとに MT 量 (ng/PB) の補正を行い、死亡時刻の推定基準を求めた。しかし、このモデル実験では脳の灰白質を用いており、松果体の場合ではどうなるか全く不明である。したがって、補正した基準を用いた方がよいとも思われるが、かえって推定を誤る可能性もある。死体現象から推定された死後経過時間をもとに補正した ng/PB 値から上の基準を用いて推定を試み、補正しないで行った推定とつき合わせて判断するのがよいと考えられる。

また、血清・尿のモデル実験では MT 量の死後変化は認められなかったので、推定基準は補正せずに用いることができるものと考えられる。

V 結 論

札幌 ($N43^{\circ} 4'$, $E141^{\circ} 21'$) で解剖された44体、東京 ($N35^{\circ} 39'$, $E139^{\circ} 44'$) で解剖された41体の合計85体のうち、死亡時刻の明らかなものから松果体76例、血清27例、尿14例の MT 量を RIA で測定した。松果体の MT 量については、最高値と最低値で指数関数的な変化量を認め、松果体 1 個当たりでは $0.099\sim 63.158\text{ng}$ 、松果体 1 mg 当たりでは $1.2\sim 609.6\text{pg/mg}$ の昼夜差がありサーカディアンリズムが認められた。

また血清中 MT 量については $11\sim 205\text{pg/ml}$ 、尿中 MT 量については $7.5\sim 137.5\text{pg/ml}$ の昼夜差のリズムが認められた。

これらの結果から三者の各々について死亡時刻の判定基準を得ることができ、さらにこれらを総合的に用いることによって、推定域を更に狭めることができ、法医実務上大変有用であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 寺 沢 浩 一
副 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

死亡時刻の推定は従来、死後経過時間を死体現象の進行程度を根拠として推定することにより行われてきたが、1日のうちのどの時間帯に死亡したかを推定する試みは今まで行われてきていなかった。

申請者の行ったのは、概日リズムを有する体内物質であるメラトニンを測定することによる死亡時刻そのものの推定法の開発の試みである。

すなわち、

① 死亡時刻の判明している85体の法医解剖に付された死体の松果体、血液及び尿に含まれるメラトニンをラジオイムノアッセイにより測定した。

② メラトニンレベルの死後変化の有無・程度を知るために脳組織・血液及び尿にメラトニンを加えて放置し、その変化を観察した。

その結果、

① 松果体、血清及び尿中のメラトニン量には個体差が大きいものの、昼間低く夜間に高いという概日リズムが認められ、次のようにメラトニン量から死亡時刻を推定する基準を求めることができた。

② 松果体1個あたりのメラトニン量については、

0.2ng以下であれば11時から17時の間に死亡、0.2~0.3ngであれば7時から20時の間に死亡、0.3~1ngであれば死亡時刻の推定は不可能、1~4ngであれば16時から10時の間に死亡、4~8ngであれば20時から8時の間に死亡、そして8ng以上であれば20時から5時の間に死亡というものであり、血清については、100pg/ml以上であれば22時から1時の間に死亡とだけ推定でき、尿については35pg/ml以上であれば18時から6時の間に死亡したと推定できる。

③ メラトニンは7日間の観察の結果、死後に時間が経過しても血液及び尿中では減少しないが、松果体中では約3分の1に減少することが示唆された。松果体中のメラトニン量から死亡時刻を推定する場合にはこの点も考慮に入れるべきであることが判明した。

口頭発表時の試問に際し、本間教授より死亡時刻を推定する際に、死体現象の進行程度を用い

るよりも松果体中のメラトニンを測定するほうが有用性が高いか否か、また薬物などの影響によりメラトニンのリズムが変化して推定を誤る可能性があるか否か、そして死後のメラトニン量の変化について、藤本教授より、メラトニンのリズムと性差、年齢、生活様式による影響、並びにデータの統計学的処理法について、加藤教授より、死亡した場所の明るさによるメラトニン量の変化について、古館教授より、データの統計学的処理法について質問がなされたが、申請者は概ね適切な回答をしたものと考えられる。

また副査の本間教授・藤本教授に学位論文に関して個別に試問を受け、学位授与について可の判定がなされた。

本論文は死亡時刻の化学的推定法に関して、有用性の高い試みを行ったものであり、学位の授与に値するものと判定される。