

第 12 回法医中毒研究会

総会・勉強会

日時: 2024 年 6 月 5 日 (水)

会場: 岡山コンベンションセンター コンベンションホール(A 会場)

主催: 法医中毒研究会

第12回法医中毒研究会総会・勉強会 プログラム

2024年6月5日（水）

司会者：川崎医科大学 法医学 吉留 敬

法医中毒研究会総会 16:30（日本法医学会評議員会終了後）～17:00（予定）

開会の挨拶

【審議事項】

1. 活動報告
2. 会計報告
3. その他

法医中毒研究会総会・勉強会 17:00～18:30

テーマ：血中・尿中ケトン体の意義～分析と病態～

座長：

菅野 さな枝 先生（名古屋市立大学）
加藤 菜穂 先生（福島県立医科大学）

分析について

- ・池松 夏紀 先生（琉球大学）
- ・原田 和生 先生（大阪大学）

病態について

- ・一萬田 正二郎 先生（富山大学）
- ・星岡 佑美 先生（千葉大学）

情報交換会 19:00～21:00

場所:

CASUAL ITALIAN BAGGIO カジュアル イタリアン バッジオ

岡山県岡山市北区幸町6-33 幸町旭ビル 1f

会費 5,000 円 当日集金させていただきます。



勉強会：血中・尿中ケトン体の意義～分析と病態～

座長：

菅野 さな枝 先生名（古屋市立大学）
加藤 菜穂 先生（福島県立医科大学）

日常業務で行うエタノール分析で、その他の揮発性物質を同時に分析している機関もある。その目的は、腐敗産生の指標となる物質の検出やその他の揮発性物質中毒、特殊な病態のスクリーニングなど様々であると思われる。その分析においてアセトンが検出された経験をお持ちの先生方は多いと思う。アセトンは腐敗産生以外にはケトアシドーシスでも產生される。ケトアシドーシスは糖尿病の悪化やアルコール摂取に関連する病態など死亡に至る病態と関連することもあり、死因判断の参考になることがある。ケトアシドーシスの診断にはケトン体の検出が必要であるが、その中の1つであるアセトンは薬毒物分析の過程で検出することができ、重要な病態に気づく端緒となることがある。今回の勉強会では、その分析方法や病態についての基本的知識を共有したいと思う。

分析について

揮発成分分析によるケトアシドーシススクリーニング

池松 夏紀 先生（琉球大学）

血中・尿中のケトン体について～3-hydroxybutyrate の分析～

原田 和生 先生（大阪大学）

病態について

核下空胞を示す症例の法医病理学的特徴の検討－ケトアシドーシスの病理診断精度向上を目指して

一萬田 正二郎 先生（富山大学）

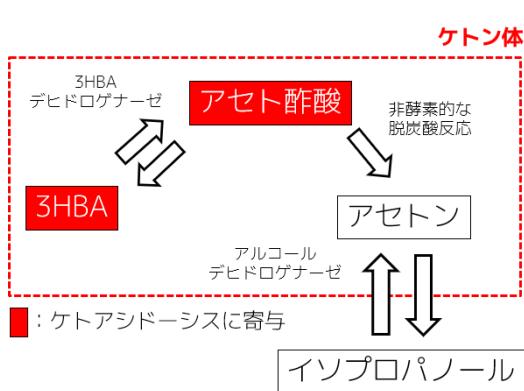
アルコール検査にてアセトンが検出されうる病態と当教室での検出事例の概要

星岡 佑美 先生（千葉大学）

揮発成分分析によるケトアシドーシススクリーニング

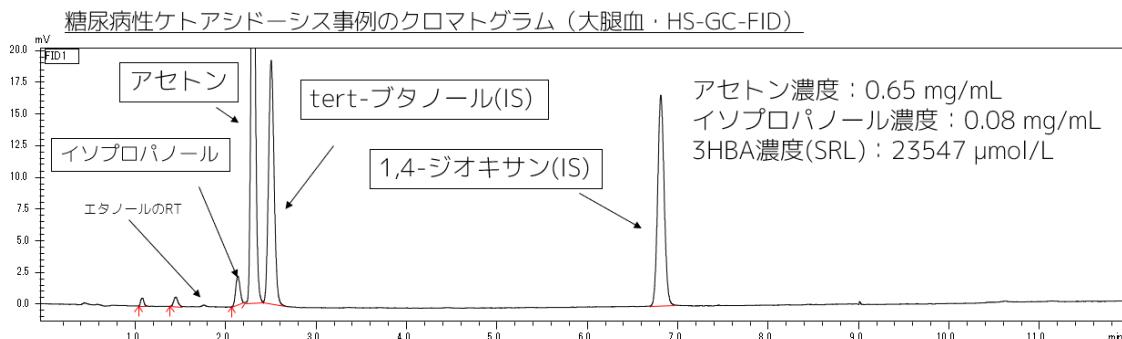
琉球大学大学院医学研究科法医学講座

池松夏紀



ケトン体とは、アセト酢酸、3ヒドロキシ酪酸(3HBA)およびアセトンを総称したものである。ケトン体のうちケトアシドーシスに関与するのは3HBAとアセト酢酸で、アセト酢酸は死後不安定であることから、ケトアシドーシスの判断には3HBAの定量が必要である。ケトアシドーシスにおける3HBAとアセトンには正の相関があるため、エタノール分析を主目的としたGC-FIDによるルーチンの揮発

成分分析において検出可能なアセトンは、ケトアシドーシスのスクリーニングマーカーとして利用できる。またアセトンのマイナーな代謝ルートとしてイソプロパノールへの代謝が知られ、ケトアシドーシス事例ではイソプロパノールも検出される場合がある。今回はアセトンおよびイソプロパノールの、実事例での検出を文献値と共に紹介する。



ケトアシドーシス事例において

- ・アセトンはイソプロパノールよりも検出割合が高く、濃度も高い
- ・アセトンとイソプロパノールが未検出でも3HBA濃度が高値の場合がある
→事例背景から疑わしければ3HBA分析を行う必要がある

【スライド中の参考文献】

- Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 12th Edition
- Palmiere et al. Blood, urine and vitreous isopropyl alcohol as biochemical markers in forensic investigations. Leg Med 2012;14(1):17-20.
- Midtlyng et al. Relationship between betahydroxybutyrate (BHB) and acetone concentrations in postmortem blood and cause of death. Forensic Sci. Int. 2021;321,110726.

血中・尿中のケトン体について ～3-hydroxybutyrateの分析～

原田和生, 阪本由佳里, 吉田春陽, 久世春樹, 西堀汰一, 玉川輝 (阪大薬)
片田竜一, 松本博志 (阪大)

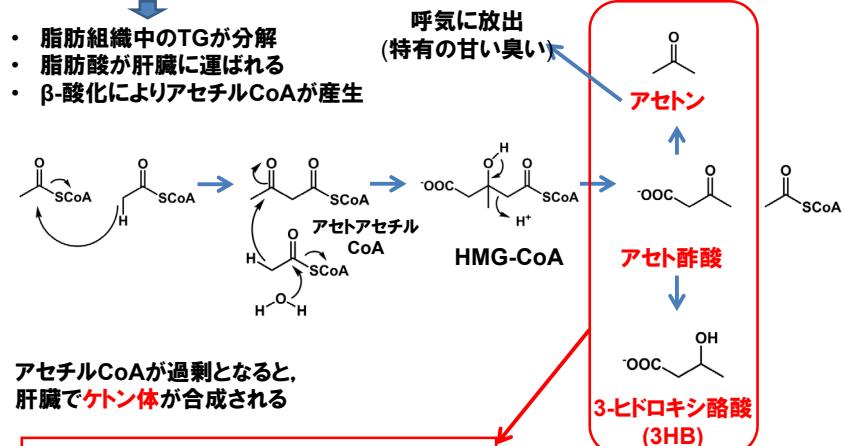
第12回法医中毒研究会勉強会
2024年6月5日

筆頭発表者のCOI開示
演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある企業・団体などありません。

ケトン体

- 糖質摂取が少ない(飢餓)
- 糖が利用されない(糖尿病)

- 脂肪組織中のTGが分解
- 脂肪酸が肝臓に運ばれる
- β-酸化によりアセチルCoAが産生



アセチルCoAが過剰となると、
肝臓でケトン体が合成される

- 筋肉組織、心臓、腎臓に運ばれ、アセチルCoAに変換され、エネルギー源となる。
- 過剰となるとアシドーシスとなり、脱水や昏睡を引き起こす。(ケトーシス)

ケトアシドーシスの診断

ケトアシドーシスの目安 3HB 250 µg/mL以上

Iten & Meier (2000) *J. Forensic Sci.*

Elliot et. al. (2010) *Forensic Sci. Int.*

3HBがケトアシドーシスの目安である250 µg/mL以上存在する場合。

アセトンは0.200 mg/mL以上存在している。

Elliot et. al. (2010) *Forensic Sci. Int.*

Sadones (2017) *Forensic Sci. Int.*

3HB の分析

- メトキシ化・TMS化 – GC/MS
- 3-NPH化 – LC/MS/MS
- HILIC/MS/MS

Sample preparation methyl-oxime / TMS

Dunn (2011) *Nature Protocols* 6, 1060-1083

Blood 50 μ L

- add 50 μ g/mL 3-HB-d₄ in MeOH 10 μ L, 10 mM ribitol in MeOH 13 μ L
- add MeOH 300 μ L
- Vortex 15 sec
- 15,000 x g, 15 min
- 250 μ L supernatant transfer to Safe-lock tube 2.0 mL (Eppendorf)



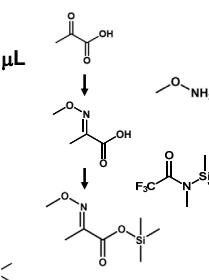
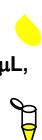
- centrifugal concentration over night
- add 1 mg/mL methoxyamine in pyridine 50 μ L
- Thermomixer 1,500 rpm, 80°C, 15 min
- Add N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) 50 μ L
- Thermomixer 1,500 rpm, 80°C, 15 min
- 15,000 x g, 15 min



Chan (2011) *Nature Protocols* 6, 1483-1499

Urine 200 μ L

- Urease suspension 20 μ L
- incubation 37°C, 1 hr
- add 50 μ g/mL 3-HB-d₄ in MeOH 10 μ L, 10 mM ribitol in MeOH 13 μ L
- add MeOH 1.7 mL
- 15,000 x g, 15 min
- 1.5 mL supernatant transfer to Safe-lock tube 2.0 mL (Eppendorf)



GC/MS analytical conditions

Instrument : Shimadzu GCMS QP2010 SE, AOC-20i

Column : SGE BPX5 0.25 mmI.D. X 30 m, 0.25 μ m (Trajan)

Oven Temp. Gradient : 60°C (2 min) – 15°C/min – 330°C (3.3 min) (Total 23.3 min)

Carrier gas : He

Column velocity : 39.0 cm/sec

Split ratio : 1:30

Injection : 1 μ L

Inlet Temp. : 250°C

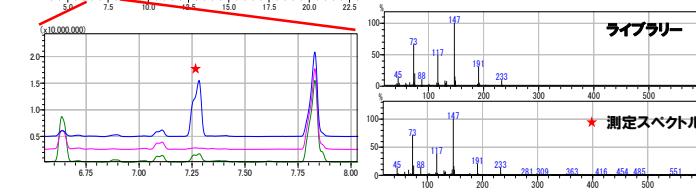
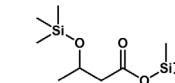
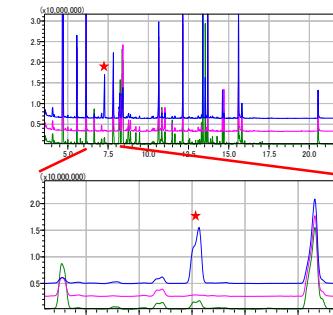
Source Temp. : 200°C

Interface Temp. : 280°C

Ionization : EI

Scan range : m/z 45 - 600

Scan ratio : 3,333 m/z/sec



ライブラリー

測定スペクトル

症例1 概要

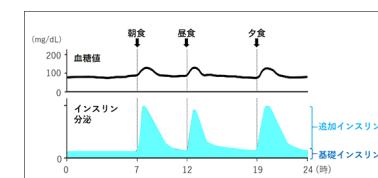
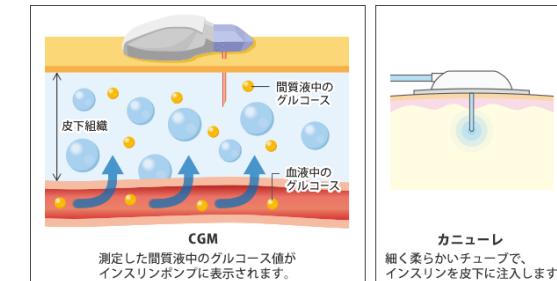
- 12月下旬
- 50歳代女性
- 18年前にI型糖尿病を発症。
- 10年前交通事故、脳脊髄液漏出症等を患い、以後障害年金を受けながら自宅で生活。
- 体調が良い時は杖について動けるが、調子が悪い時は全身疼痛で動けない状態。
- 1か月前にCSII装置が不具合を起こし、その際インスリン注射器を使用。
- 発見8日前にも携帯電話にCSII装置レンタル会社への発着信履歴が残る。
- 当日、夕方、4日前から単身赴任先へ出かけ戻ってきた夫が施錠された扉を解錠して室内へ入ると、布団の上にうつ伏せて倒れている死者を発見。硬直を認め病院不搬送。
- 机の上に普段置かれていないインスリン注射器が3本、疊上にCSII装置取扱説明書が置かれていた。

CSII療法 / CGM / SAP療法

CSII :
Continuous Subcutaneous
Insulin Infusion

CGM :
Continuous Glucose
Monitoring

SAP :
Sensor Augmented Pump



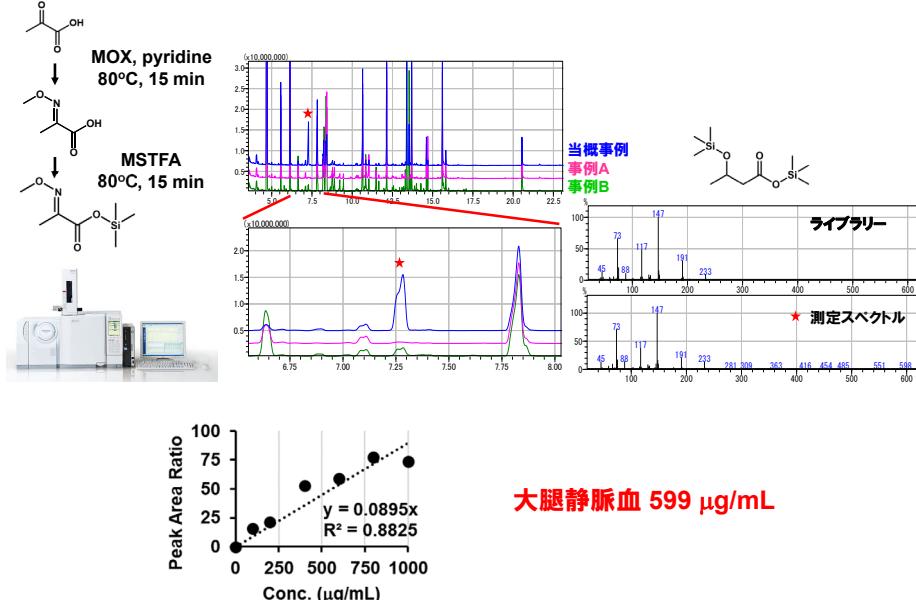
アルコール、血液生化学検査

	エタノール	n-ブロパノール	アセトン
大腿静脈血	0.037	0.007	0.211
胃内容	0.153	0.023	0.234
尿	0.025	0.007	0.433

単位 (mg/mL)

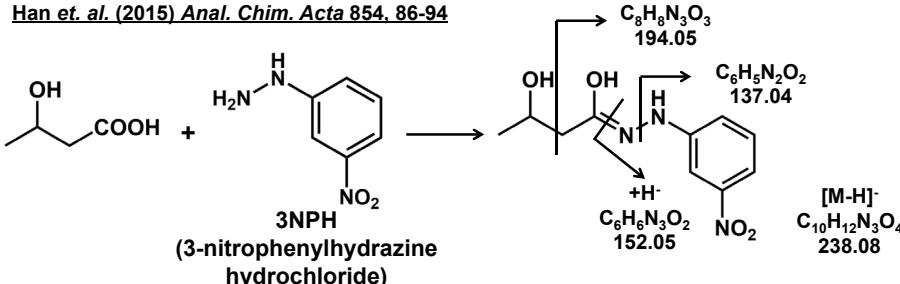
・血液生化学検査 LDH : >900 U/L, Glc : 375 mg/dL,
CRP : 7.0 mg/dL, HbAc1 : >14.0%

3HB 定量結果



Derivatization by 3-NPH

Han et. al. (2015) Anal. Chim. Acta 854, 86-94



Blood 100 μL

- 100 μL AcCN
- 15,000 × g, 10°C, 3 min
- collect supernatant

Sample solution

- 10-fold vol. 50%AcCN
- suspension
- 3,000 × g, 10°C, 10 min
- collect supernatant

Sample solution

Sample solution 40 μL

- 200 mM 3NPH in 50% AcCN 20 μL
- 120 mM EDC in 6% pyridine in 50% AcCN 20 μL
- 40°C, 30 min
- 10%AcCN 2 mL
- collect 50 μL and mix with 50 μL of IS mix*

LC-MS/MS

IS mix* : Derivatized with ¹³C₆-NPH in advance

LC/MS/MS analytical conditions

Instrument : LC/MS 8060 (Shimadzu)

Column : Kinetex C18, 1.7 μm, 2.1 mm i.d. X

150 mm (Phenomenex)

Eluent : A 0.1% formic acid in H₂O, B AcCN

Flow rate : 0.350 mL/min

Column Temp. : 40°C

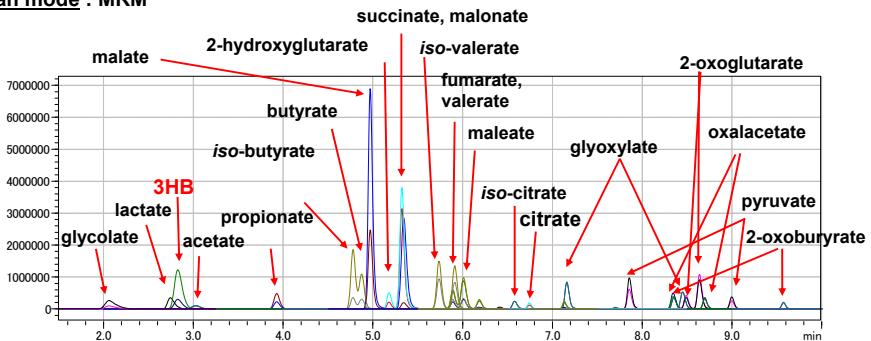
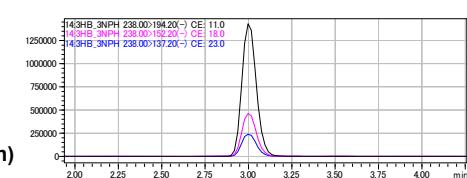
Gradient : B(%) 15 (0.0 - 0.5 min) –
95 (15 - 18 min) – 15 (18.5 - 22 min)

Injection volume : 1 μL

Ionization method : DUIS ESI/APCI (+)

Scan mode : MRM

3HB



症例2 概要、解剖所見

- 20代男性、12月上旬
- コンクリート製造会社で稼働しながら、同社の寮で同僚と共同生活
- 死亡前日、職場に現れず、社員が様子を見に行くと、ベット上でぐったりしているのを発見
- 病院にかかったが、熱は36.6°Cで風邪か胃腸炎と診断、点滴治療、解熱剤と抗生素が処方され帰宅
- その後も、嘔吐を繰り返し、AM 1:15ベット上で意識消失しているのを同僚が発見
- AM 2:53 病院搬送されるもAM 3:12死亡確認

解剖所見

- 死斑発現高度 •眼結膜・心外膜・肺胸膜・腎盂粘膜に溢血点
- 心臓内に暗赤色流動血多量 •諸臓器うつ血 •脾臓腫大
- 血液生化学検査 LDH : 732 U/L, Glc : > 600 mg/dL, HbAc1 : 5.9%

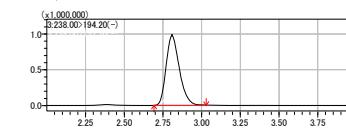
アルコール検査

	エタノール	n-ブロパノール	アセトン
大腿静脈血	0.006	非検出	0.223
胃内容	0.002	非検出	0.180
尿	0.001	非検出	0.227

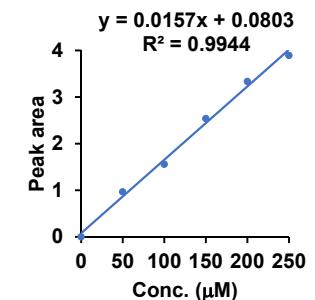
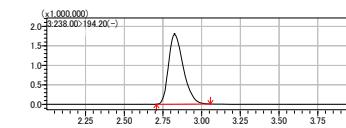
単位 (mg/mL)

3HB 定量結果

標準品(250μM)

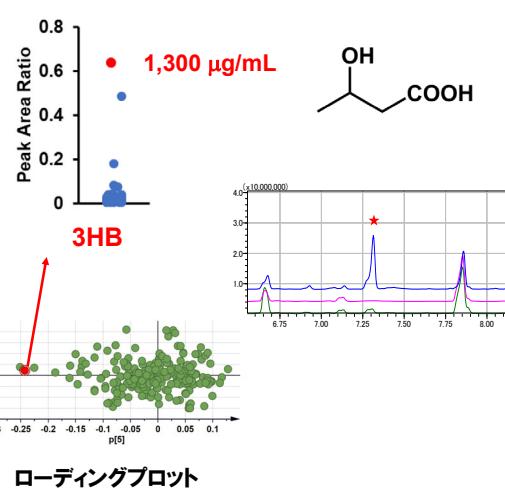
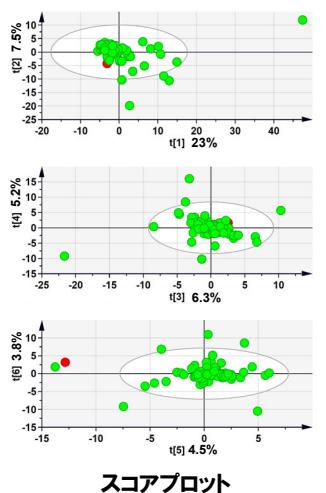


大腿静脈血 (10倍希釈)



3HB血中濃度: 1,050 μg/mL

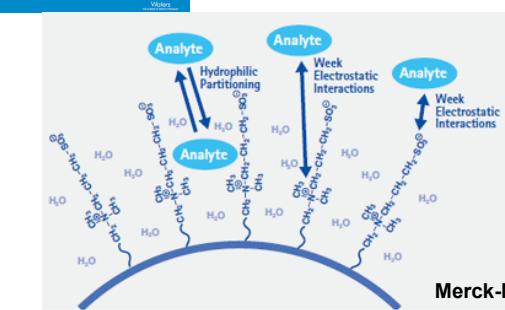
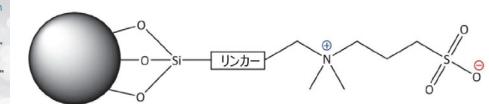
症例2 メトキシ化・TMS化 - GC/MS 定量結果



ローディングプロット

HILIC/MS/MS

- ターゲットが3HBのみであれば、もっと簡単に済ませたい
- 誘導体化なし
- 50 mmカラム、アイソクラティック、5 min程度で



HILIC/MS/MS analytical conditions

Instrument : LC/MS 8060 (Shimadzu)

Column : Atlantis Premier BEH Z-HILIC 2.1 X 100 mm, 1.7 μ m (Waters)

Eluent : A: 0.1% HCOOH, 10 mM HCOONH₄ in H₂O, B: AcCN (5 / 95)

Isocratic elution, 4.5 min

Flow rate : 0.400 mL/min

Column Temp. : 40°C

Injection volume : 2 μ L

Ionization : DUIS ESI/APCI (-)

MRM

Q1(*m/z*) / Q3(*m/z*) : 103.10 / 59.05

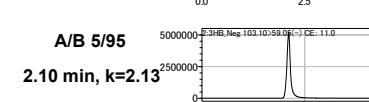
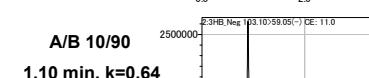
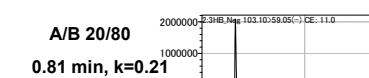
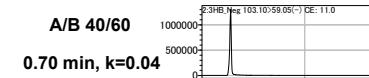
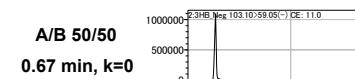
Q1 Pre Bias : 19 V CE : 11 eV Q3 Pre Bias : 13 V Dwell : 10 msec

Sample (Blood) 50 μ L

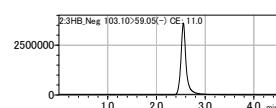
- add AcCN containing IS (3-HB-d₄) 950 μ L
- vortex
- 15,000 x g, 3 min
- collect supernatant

LC/MS/MS

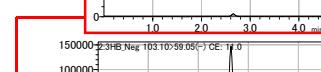
HILIC/MS/MS



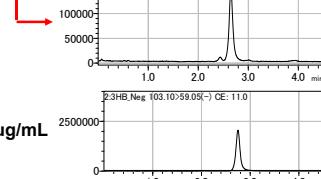
STD_10 ug/mL



Blank_Blood



Blood+STD_10ug/mL



Recovery 46.4%

演題名：核下空胞を示す症例の法医病理学的特徴の検討－ケトアシドーシスの病理診断精度向上を目指して

ケトアシドーシスは様々な背景疾患に合併し、しばしば突然死を来し得る。血清中のケトノ体濃度の測定が確定診断に必須である一方、病理組織学的に腎臓の尿細管基底側に脂肪滴が集簇する basal vacuolization (BV) を証明することが後方視的にケトアシドーシスの存在を疑う上で重要である [1]。しかしながら、本所見を示す症例の臨床病理学的特徴を後方視的に検討した報告はなかった。

本講演では、BV が証明された 16 例の法医解剖例における詳細な臨床病理学的所見の解析結果を解説する。また、脂肪染色が行えない症例（凍結材料や非パラフィン包埋材料が入手困難な症例）におけるアディポフィリンに対する抗体を用いた免疫染色の有用性に関しても提示する。さらに、BV と鑑別が必要となる病理所見、特にコルヒチン中毒時にみられる腎臓尿細管内のがまん性 vacuolization の症例を提示し、その違いを解説する [2]。

参考文献：

1. Arch Pathol Lab Med. 2022; 146: 1102–1113.
2. J Toxicol Pathol. 2022; 35: 255–262.

アルコール検査にてアセトンが検出されうる病態と当教室での検出事例の概要

千葉大学大学院医学研究院法医学
星岡佑美

アセトンは脂肪酸代謝時に産生されるケトン体の一種である。ヒトにおいて「ケトン体」というとアセトン、アセト酢酸(AA)、3-ヒドロキシ酪酸(ないし β -ヒドロキシ酪酸、BHB)の3種類を指す。ケトン体の基質となるアセチルCoAは、解糖や脂肪酸の β 酸化により産生されるが、体内のグルコースを十分に利用可能なときはミトコンドリア内でクエン酸回路に乗ってエネルギーを产生する。一方、グルコース利用障害時や飢餓時にはアセチルCoAが蓄積し、肝臓のミトコンドリア内でケトン体に変換される。アセチルCoAは酵素反応によりAAとなり、AAは非酵素的にアセトンに分解され、アセトンは呼気中や尿中に排泄される。またAAは可逆的にBHBに変換される。AAとBHBは血液に乗って肝臓以外の臓器に運ばれ、特に脳、心臓、腎臓、骨格筋において重要なエネルギー源となる。一方でこれらは酸であるため、多量に産生されると体内がアシドーシスとなる。これがケトアシドーシスである。よって、血液や尿からアセトンが検出されるということは、体内でグルコース利用障害や飢餓によりケトン体が過剰に産生されている可能性、更にはケトアシドーシスになっている可能性を示唆する。ケトアシドーシスは進行すると意識障害を来し、死亡しうる病態であり、法医学においても内因死の鑑別として重要な病態の一つである。

当教室で2020年1月から2023年8月に法医解剖を施行され、アルコール検査とケトン体検査の両方が施行された1026例のうち、アセトンの検出あるいはケトン体の上昇が死因の説明で指摘された70例について、死因と検査結果を検討した。疑いや競合を含む死因として、糖尿病性ケトアシドーシスが9例（以下平均濃度、血中アセトン0.27mg/mL、尿中アセトン0.36mg/mL、血中総ケトン体(KB=AA+BHB)8260.5μmol/L、尿中KB15580.5μmol/L）、アルコール性ケトアシドーシスが17例（血中アセトン0.088mg/mL、尿中アセトン0.093mg/mL、血中KB6573.5μmol/L、尿中KB18833.6μmol/L）、低体温あるいは低体温+低栄養・脱水が9例（血中アセトン0.061mg/mL、尿中アセトン0.089mg/mL、血中KB4928.4μmol/L、尿中KB21376.6μmol/L）、低栄養・脱水が15例（血中アセトン0.059mg/mL、尿中アセトン0.085mg/mL、血中KB3801.0μmol/L、尿中KB4120.2μmol/L）などが見られた。ほかに、薬物の副作用による糖尿病性ケトアシドーシスが知られているが、本検討で薬物がケトン体の上昇に関与したと指摘された事例は1例のみであった。また、死因の説明でアセトンやケトン体への言及はないが、血中あるいは尿中ケトン体が上述の事例らと同程度に高い事例においても、低体温や低栄養・脱水が死因に関与したとされた事例や、背景に糖尿病やアルコール使用障害がある事例が見られた。

法医学ではこのような背景をもつご遺体を扱うことが多いと考えられ、アルコール検査におけるアセトンの検出は死因診断に有用であると考えられる。薬物検査を担当している先生方には、アセトンを検出した際には執刀医にご一報、ご助言いただけないと幸いである。