

(第3号様式)

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 中林 ゆき

論 文 名 新規死後経過時間推定方法：  
サポシン D の増加と海馬ニューロンの変化

---

### 学位論文要旨

【背景・目的】死体検案および法医学解剖において、死後経過時間を推定することは非常に重要である。これは、矛盾のない死因究明を行うことはもちろん、事件性のある症例に関しては法廷で決定的な証拠として求められる可能性があるからである。死後経過時間 (postmortem interval : PMI) 推定のために、様々な死後変化が利用される。例えば、死後早期には死後冷却・死後硬直・死斑・超生体反応などの死後変化が、死後比較的後期には節足動物の活動などによる物理変化や腐敗融解等の生理学的変化などが挙げられる。しかしながら、いずれの方法にしても死体の状況や置かれていた環境などにより変化の程度が左右されるため、PMI 推定は総合的に判断された概算となってしまうのが実状である。

本研究は、客観的で普遍的な死後経過時間変化を発見して新規死後経過時間推定方法を開発することを目的とした。最近では生体分子の死後分解が注目されており、タンパク質や RNA、DNA についての研究が散見される。我々は、死後分解により減少するのみならず増加する生体分子を検索することにした。そこで、プロサポシンおよびその分解産物であるサポシン A/B/C/D というタンパク質に着目した。プロサポシンは約 66kDa の糖タンパク質でサポシン A/B/C/D の前駆体であり、さらにこれ自体が神経栄養因子としても機能する。我々は、死後においてもプロサポシンは分解され新たにサポシン A~D を産生するのではないかと仮説を立てた。また、組織学的変化についても同時に観察した。対象臓器として脳を選択した。これは、脳が頭蓋骨という物理的な壁でその全体を守られており、さらに通常生存時には無菌であるため細菌等による腐敗変化の影響を減じられるからである。

【方法】生後 8 週目の雄 Wister ラットを使用した。この実験は愛媛大学動物実験委員会によって承認され、ARRIVE ガイドラインおよび愛媛大学動物実験ガイドに従って実施した。各ラットを二酸化炭素吸入により安楽死させ、21°C に設定された恒温庫でそのまま保存した。それぞれ死後 0・3・6・12 時間、1・2・3・5・7 日間で解剖し、組織を採取した。

氏名 中林 ゆき

**①タンパク質の量的死後変化** 各ラットの脳のうち半分をホモジナイズし遠心分離で得られた上清を用い、プロサポシン特異抗体、抗サポシン D 抗体、および細胞骨格を形成する一般的なタンパク質 ( $\alpha$  tubulin,  $\beta$  catenin, GAPDH) に対する抗体でウェスタンブロッティングを行った。

**②脳の組織学的変化** 各ラットの脳の残り半分のうち、MAP2 抗体、プロサポシン特異抗体を用いた免疫組織的手法により海馬 CA1 領域での錐体細胞およびプロサポシンの発現を観察した。海馬 CA1 領域では錐体細胞が整列し同側へ長い先端樹状突起を伸ばすため、形態変化を見るのに適していると考えた。

【結果】

**①タンパク質の量的死後変化** プロサポシンやそのほか一般的なタンパク質は死後経時的に減少した。一方で、サポシン D のみ、死後経時的に増加した。

**②脳(海馬、CA1)の組織学的変化** 錐体細胞において全体像および細胞体、先端樹状突起、基底樹状突起それぞれに分けて観察したところ、死後様々な時点で各部位に変化が出現した。死後 6 時間後で基底樹状突起の減少が出現し、次いで 12 時間後に先端樹状突起が痩せ細っていった。その後も徐々に各樹状突起は減少していくが、細胞体は長く残存しており 5 日後に崩壊した。プロサポシンは通常組織全体に発現しているが、死後 2~3 日後をピークに核内に局在化していき、その量は増加した。

【結語】ラットの脳において、仮説の通りプロサポシンは死後経時的に減少しサポシン D は増加するという特徴的な結果が得られた。これまで、死後のウェスタンブロッティングによってタンパク質分解産物のバンドが得られたという報告はあるが、これら分解産物に特異的な抗体は存在しなかった。本研究では、分解産物である Saposin D そのものの特異抗体があるため、これまでの報告よりもより変化に鋭敏な結果が出せる可能性がある。

また、海馬での形態学的死後変化も時間を追って確認することができた。なお、プロサポシンは死後経過とともに核移行していると示唆される結果を得たが、これまでにこのような現象の報告はなく、この局在性についてはまだ解明する余地がある。

今後はサンプル数を増やし信頼できる死後変化のデータを構築し、将来的には愛媛大学大学院医学系研究科等医学研究倫理委員会に申請してヒト検体を用いた調査もを行い、新規 PMI 推定方法の開発につなげていく。また、今回の実験では死後 21°C の恒温庫で保存していたが他の環境 (温度、水中や土中など) には対応していない。今後条件やサンプル数を増やし精度を高める必要がある。なお、プロサポシンの発現量は海馬に多いと言われるが、虚血やてんかんの際にその発現量は増加すると考えられている。生前の病態にも検証が必要である。

キーワード (3~5)	死後経過時間、死後変化、海馬、プロサポシン、免疫組織学的染色
-------------	--------------------------------