

[症例報告]

全身屍蠟化した死体から薬物を検出した法医剖検事例

笠井 謙多郎*, 田中 敏子, 佐藤 寛晃

産業医科大学 医学部 法医学教室

要 旨：特殊環境下で約5年が経過した検体から薬物を検出することができた事例を経験した。一部が白色から黒褐色に変色して硬く、いわゆる“屍蠟化”の状態であった大腿筋および骨髄を試料として、QuEChERS法による抽出の後、高速液体クロマトグラフィー質量分析装置(LC-MS/MS)により薬毒物スクリーニング検査を行ったところスルピリドおよびエスタゾラムを検出できた。大腿筋でのスルピリドとエスタゾラムの濃度を測定するとそれぞれ10.6ng/gおよび39.9ng/gであった。本結果は死因診断のみならず、両薬物の同時服薬履歴から身元特定にもつながった。薬毒物分析技術の進歩により、以前であれば薬毒物を検出することが困難であった陳旧な検体や特殊環境下の検体からも薬毒物を検出できるようになりつつあるが、本事例のように経過時間が5年とかなり長く屍蠟化した検体からの薬毒物検出の報告はない。薬毒物分析技術の進歩に伴いその結果は死因の診断のみならず個人識別の分野への応用が可能である。

キーワード：屍蠟化, QuEChERS法, 高速液体クロマトグラフィー質量分析装置, 薬毒物スクリーニング。

(2018年11月14日 受付, 2018年12月26日 受理)

はじめに

近年薬毒物分析技術が進み、微量の試料からの薬毒物検出や、試料中の微量薬毒物の同定・定量が可能となってきた。分析技術の進歩は、環境衛生や中毒学の発展に寄与するとともに、救急医療にも多大な貢献をしている。法医学における死因診断にも薬毒物分析は欠かせないもので、以前であれば検出が困難であった陳旧な検体からも薬毒物が検出されたとの報告が散見されるようになった[1, 2]。今回、約5年間にわたり特殊環境下にあったにも拘わらず薬物を検出することができ、死因診断のみならず服薬状況から身元特定につながった事例を経験した。微量の検体や特殊な状態の検体から薬毒物の検出や定量を実施する重要性を示す事例と考え、考察も併せて報告する。

事 例

身元不明の男性。山中の貯水池に浮遊しているところを発見された。全身は高度に屍蠟化して死因が不明であったため法医解剖に付された。

解 剖 所 見

全身は白色から黒褐色に変色して硬く、いわゆる“屍蠟化”の状態で、一部で骨を露呈していた。全身の諸臓器も屍蠟化または高度に軟化しているが器質的病変は見当たらない。全身の筋肉もほぼ屍蠟化しているが、硬化した皮膚の下に一部赤褐色調の筋肉が残っていた。左右の胸腔内には褐色から赤褐色の液それぞれ約850mlを容れ、溺死体に特徴的な所見の1つではあるが、屍蠟化および高度な軟化のため、溺死に特徴的な肺の所見は確認できなかった。

*対応著者: 笠井 謙多郎, 産業医科大学 医学部 法医学教室, 〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1, Tel: 093-691-7432, Fax: 093-601-6257, E-mail: kasai@med.uoeh-u.ac.jp

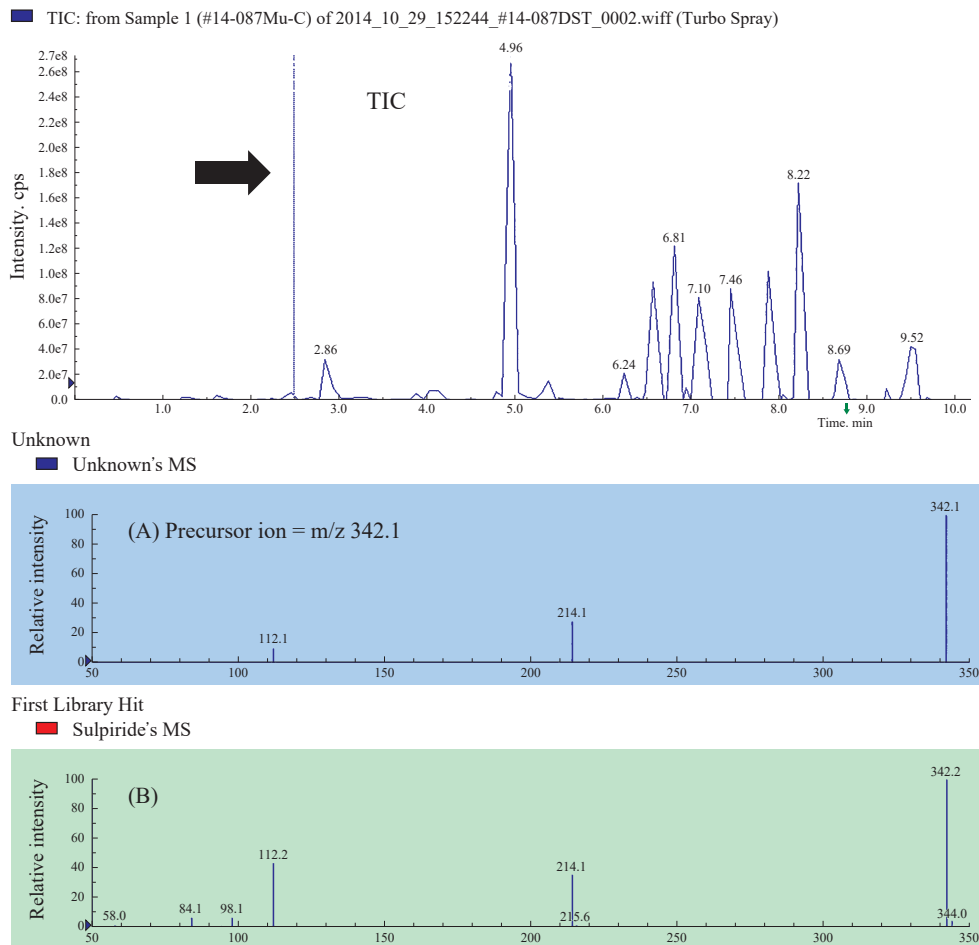


Fig. 1. Total ion chromatogram (TIC) and product-ion mass spectrums of sulpiride from the femoral muscle (A) and standard sample (B). The ion spectrums of sulpiride were observed at the arrow point in TIC.

検査所見

薬毒物スクリーニング検査

一部が死蝻化した大腿筋 (0.5 g) および大腿骨の骨髓 (0.1 g) を試料として薬毒物スクリーニングを行った。各試料に倍量の水を加え破砕装置 (TOMY, Micro Smash MS-100R) にて粉碎後, QuEChERS 法による抽出を行い, 高速液体クロマトグラフィー (Shimadzu, Prominence) およびリニアイオントラップ型質量分析装置 (Sciex, 3200 QTRAP) を用いて Multiple Reaction Monitoring (MRM) による薬毒物 250 成分のターゲット分析ならびにスキャン分析を行った。Cliquid[®] ソフトウェア (Sciex) を使用して全スペクトルを Sciex 社製薬毒物 Library と照合した。その結果大腿筋および骨髓よりスルピリド (精神・情動安定薬) (Fig. 1) およびエスタゾラム (睡眠薬) を検出した (Fig. 2)。

薬毒物定量検査

スルピリド (和光純薬), エスタゾラム (武田薬品工業) をメタノールに溶解し, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 標準液を作成した。標準液を 50% アセトニトリル溶液で 1/10 および 1/100 に希釈し添加用標準液を作成した。希釈標準液をブタ筋肉に添加し, 薬物濃度を 100, 50, 10, 1 および 0.5 ng/g となるように調整し, 検量線作成用の試料とした。スクリーニング検査と同様に QuEChERS 法により薬物の抽出を行い, 抽出液の 10 μl を LC-MS/MS で分析した。MRM モードで測定を行い, 測定イオン (precursor ion/product ion) はスルピリド (342.1/112.2, 342.1/214.1), エスタゾラム (295.1/205.1, 295.1/267.1), 内部標準物質 (I.S.): ジアゼパム-D5 (290.0/198.2, 290.0/154.1) とした。得られたプロダクトイオンのピーク面積から, 内部標準物質のイオンピーク面積との比を算出し検量線を作成した。同様に遺体より採取した大腿筋を試料として分析を行い, 検量

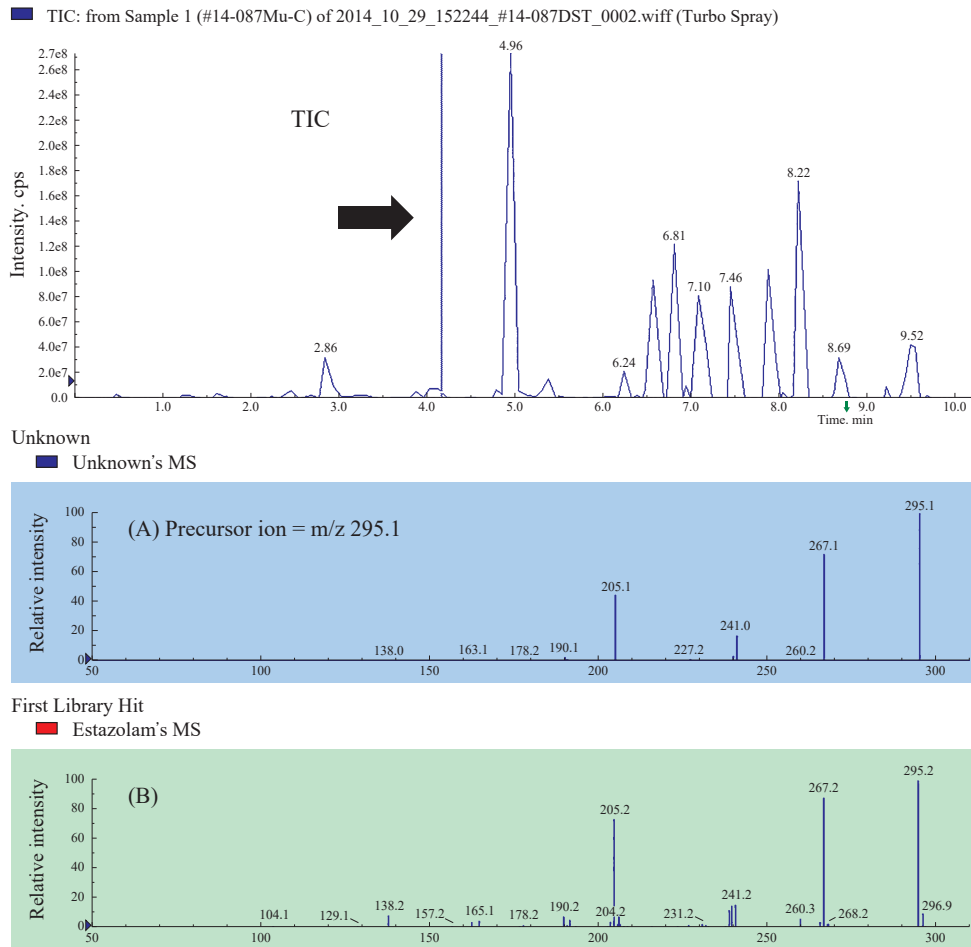


Fig. 2. Total ion chromatogram (TIC) and product-ion mass spectrums of estazolam from the femoral muscle (A) and standard sample (B). The ion spectrum of estazolam were observed at the arrow point in TIC.

線から薬物濃度を算出すると、筋肉中の濃度はスルピリド 10.6ng/g およびエスタゾラム 39.9ng/g であった。

プランクトン検査

屍蠟化または高度に軟化した左右肺、肝および腎臓の 10~30g を試料として、発煙硝酸を適量加え加熱して有機物を懐機し冷却後に遠心・洗浄し、沈査に含まれるプランクトンを鏡検し分類すると、貯水池に生息する種類とほぼ同じプランクトンが検出された (Table 1)。水中に存在するプランクトンは、水分と共に肺に取り込まれ、肺胞壁を通過して血液中に入る。この時血液循環があれば、それらは全身の臓器に分布する。左右肺のみならず肝臓および腎臓からもプランクトンが検出されたことから、生前に貯水池の水を吸引し死亡したと判断された。

Table 1. The diatom counts from lake water and the cadaver

	Water of Lake	Lung (left)	Lung (right)	Liver	Kidney
Merosira	****	*****	*****	****	****
Cyclotella	**	*****	**	**	**
Fragilaria	***	***		*	*
Achnanthes	**				*
Cocconesiss		**		*	
Gyrosigma			*		
Navicula	****	*	**	*	**
Cymbella	***	***	**	**	*
Nitzschia	***	***	**	**	*

*: 10~49 count/g, **: 50~99 count/g, ***: 100~249 count/g, ****: 250~500 count/g, *****: 500~ count/g

死因の診断

多量の胸水貯留は死亡直前に肺に多量の液分があったことを示唆する。また、各臓器から発見場所の貯水池のプランクトンが検出され、生前に貯水池の水を吸引し死亡したと判断されることも併せ、死因を「薬物服用下での溺死」と診断した。

身元の特定

スルピリドおよびエスタゾラムは精神科領域で使用される例が多いことから、近隣の医療機関に照会を行ったところ5年前から消息不明となった男性が浮上し、身元の特定につながった。

考 察

薬毒物分析技術は、職業災害、環境衛生から薬物中毒の診断など多岐にわたり実施されている[3-6]。かつては薬毒物分析により検出できた薬毒物の種類や濃度は限定されており、薬毒物の人体への影響は臨床症状や服薬状況に依存していた。近年、薬毒物分析技術が向上し、迅速かつ高感度の分析が可能となってきている。法医学においても薬毒物分析技術の進歩は目ざましく、陳旧な検体や特殊環境にあった検体からの薬毒物検出が報告されている[1, 2]。一般に薬毒物は経口投与によって体内に吸収されると血液中で可逆的にタンパク質と結合して全身を循環するが、遊離状態となった段階で筋肉や骨髄を含む全身の組織中に拡散して蓄積される[7]。しかしながら、薬物とタンパク質の結合率などの理化学的な性質はそれぞれの薬物に固有なものである。また組織中の薬物の蓄積度合いは薬物の油/水分配率やpHに依存するため、全身組織への分布状態は薬物の種類によって大きく異なる。一方、死後経過時間が短ければ血液を試料として薬毒物分析が可能であるが、死後経過時間が長いと、腐敗などによる組織の崩壊のため、血液中の薬物は、体内の組織への死後の拡散、さらには体外への消失の可能性が存在する。そのため死後経過時間が長い遺体の場合には、比較的腐敗の影響を受けにくい筋肉や骨髄などの組織を試料として薬毒物分析を行うのが一般的である。筋肉や骨髄を試料として薬毒物分析を行う場合、試料を破碎したのち様々な抽出溶媒を使用した液-液抽出や固層抽出を組み合わせて抽出した後、濃縮、精製してから分析装置で測定する。本事例のように死後経過時間が5年とかなり長い検体の場合、筋肉や骨髄であっても組織成分自体も分解される。その際に組織中の薬毒物も体外へと流出するため、現在の分析技術をもってしても

薬毒物の検出は困難である場合がほとんどである。

本事例は全身が屍蠟化していた。屍蠟化とは特殊な環境下で生じる死体現象のことで、皮膚や筋肉などの組織の状態は通常的环境下にあったものとは大きく異なる。屍蠟化の形成には1)腐敗による屍体の分解が抑制された状況であること、さらに2)脂肪を加水分解し、脂肪酸のけん化および不飽和脂肪酸への水素添加を進行させるための水分とCa、Mgなどの金属イオンが存在する状況であることが必要である[8]。本事例は山中の貯水池に沈んだ状態であったため、大気と接触することもなく低温に保たれ腐敗が進行しづらく、発見場所に水分とミネラルが豊富で脂肪の加水分解と脂肪酸のけん化および不飽和脂肪酸への水素添加に適した環境であったと考えられた。

薬毒物スクリーニング検査の結果、大腿筋および骨髄よりスルピリドおよびエスタゾラムを検出した。一部屍蠟化した筋肉より生前に摂取したと思われる薬物を検出した報告はこれまで見当たらない。上記の説明の通り、微量の薬毒物が長期に渡り筋肉に存在していたのは、特殊な環境で腐敗が進行しにくく、屍蠟化したために皮膚を通じて体外へ死後拡散することを防いだものと考えられた。大腿筋を試料として定量検査を行ったところ、スルピリド10.6ng/gおよびエスタゾラム39.9ng/gであり、血中濃度であったとするといずれも治療域に達していない濃度であった[9]。

筋肉中の薬物の濃度と死因との関係を考察するのは極めて困難である。先にも述べた通り、血液中の薬物濃度と組織中の薬物濃度の関係は対象となる薬物の理化学的な性質に依存しており、薬物の種類によって大きく異なる。さらに本事例の場合、長期間にわたり水中にあったと考えられ、腐敗現象がほとんど進行していない状態ではあるが、体外に薬物が拡散していないとは言い難い。このことは、よりいっそう死亡時の血中薬物濃度の推定を困難なものとしている。そのため組織中の薬物濃度の評価は、通常参考値程度に留めざるを得ない。しかしながら、死体組織中に薬物の存在を証明することは、生前にそれらの薬物を摂取したことの証明となる。

今回、抽出法としてQuEChERS法を選択した。QuEChERS法とは、アセトニトリルを抽出溶媒として試料に加えて抽出液とし、塩を加えて遠心分離することにより水層とアセトニトリル層とに分離させ、上層のアセトニトリル層に粉末状の固相を加えて振とうすることにより、余分な成分を吸着・除去するので、いわゆる分散固相抽出法(Fig. 3)で、2003年にAnastassiadesらによって開発された方法である[10]。

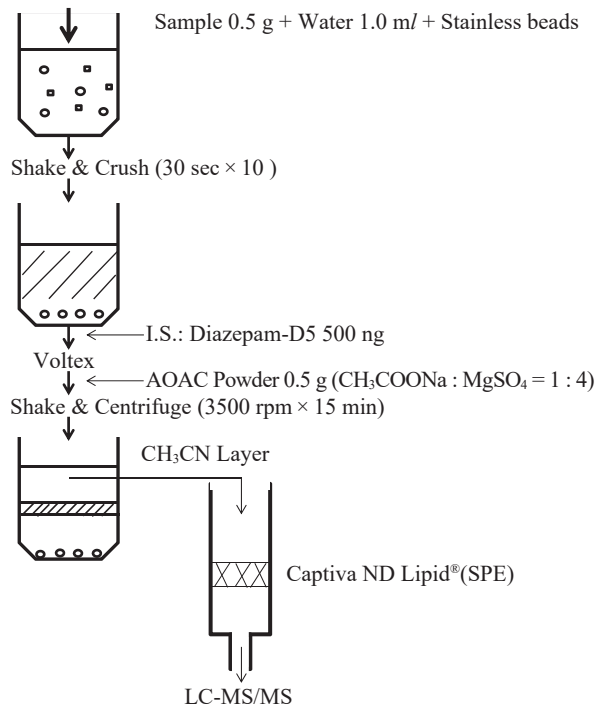


Fig. 3. A schematic diagram of drug analysis by a QuEChERS method in the present case. ○: stainless beads, ■: muscle sample, X: solid phase extraction (SPE)

特にガスクロマトグラフ質量分析装置(GC-MS)やLC-MS/MSを用いた薬毒物分析のためのQuick(速い)Easy(簡単)Cheap(廉価)Effective(効果的)Rugged(堅牢)Safe(安全)な抽出法として有用である。法医学の分野でも目的に応じて改良された方法が広く使用されている[11-13]。従来行われてきた液-液または液-固抽出の組み合わせは、それぞれの操作における目的物の回収率は高くなるように設計されている。しかし不純物を除き精製度合いを高めるために複数の抽出操作を組み合わせると、必然的に回収率は低下する。また、得られた多量の抽出溶媒は濃縮操作を必要とする。これらの操作は抽出時間の延長と複雑化、さらに目的物質の分解や消失の可能性をもっている。一方QuEChERS法ではこれらの問題を解決するために抽出過程および精製過程を最小限の操作で行うように設計されている。抽出対象を弱電解質に絞った方法であるために、ほとんどの薬物は効率よく抽出されるが、薬物によっては抽出に適さないものもある。しかし操作が簡略であるために回収率はほとんどの薬物で十分に高く、機器分析に耐え得る程度の生成がなされている。このような抽出方法の性質が筋肉に微量残った薬物の検出を可能にしたと考える。

本事例の場合、筋肉の薬毒物濃度から死亡時の血中濃度を明確にすることは困難である。しかしながら、筋肉中の薬物の存在は生前に薬物を摂取していたことの証明となり、その量も一定濃度存在していたものと考えられる。さらに多量の胸水貯留や臓器からのプランクトンの検出を踏まえると、死因は「薬物服用下での溺死」と診断される。さらに、スルピリドおよびエスタゾラムの服用状況から、身元の特定につながった。薬毒物分析技術の進歩によって、法医診断を向上させることができた事例であった。

薬毒物の検査方法は分析機器の高感度化と新たな分析技術の開発により日々進歩を続けている。法医学においても薬毒物分析技術の進歩は、陳旧な死体や特殊環境にあった死体の死因診断精度の向上に貢献し、さらに本事例のように服薬状況などの個人情報の特定にも有用となる可能性が考えられた。薬毒物分析技術の進歩に併せてその成果を幅広い分野へと応用を試みるべきと考える。

利益相反

本論文について親告する利益相反はなし。

引用文献

1. Nozawa H, Minakata K, Yamagishi I, Hasegawa K, Wurita A, Gonmori K, Suzuki O & Watanabe K (2015): MALDI-TOF mass spectrometric determination of eight benzodiazepines with two of their metabolites in blood. *Leg Med (Tokyo)* 17: 150-156
2. Maseda C, Hayakawa A, Okuda K *et al* (2017): Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of thiosulfate in human blood and urine as an indicator of hydrogen sulfide poisoning. *Leg Med (Tokyo)* 24: 67-74
3. Postigo C, de Alda MJ & Barceló D (2008): Fully automated determination in the low nanogram per liter level of different classes of drugs of abuse in sewage water by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 80: 3123-3134
4. Swortwood MJ, Bartock SH, Scheidweiler KB *et al* (2018): Quantification of ethyl glucuronide, ethyl sulfate, nicotine, and its metabolites in human fetal liver and placenta. *Forensic Toxicol* 36: 102-112
5. Ambroziak K & Adamowicz P (2018): Simple screen-

- ing procedure for 72 synthetic cannabinoids in whole blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol* 36: 280–290
6. Yamada M, Lee XP, Fujishiro M *et al* (2018): Highly sensitive determination of alendronate in human plasma and dialysate using metal-free HPLC-MS/MS. *Leg Med (Tokyo)* 30: 14–20
 7. Riviere JE (1994): Absorption and distribution. *In: Introduction to Biochemical Toxicology*. 2nd ed. (Hodgson E & Levi PE, *ed*). Appleton & Lange, Connecticut pp 11–48
 8. 石山昱夫(1975): 特殊な死体现象. 現代の法医学. 医学書院, 東京 pp 22–24
 9. Schulz M, Iwersen-Bergmann S, Anderson H & Schmoldt A (2012): Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Crit Care* 16: R136
 10. Anastassiades M, Lehotaý SJ, Stajnbaher D & Schenck FJ (2003): Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *JAOAC Int* 86: 412–431
 11. Mizuno S, Lee XP, Fujishiro M *et al* (2018): High-throughput determination of valproate in human samples by modified QuEChERS extraction and GC-MS/MS. *Leg Med (Tokyo)* 31: 66–73
 12. Lehmann S, Schulze B, Thomas A, Kamphausen T, Thevis M, Rothschild MA & Mercer-Chalmers-Bender K (2018): Organ distribution of 4-MEC, MDPV, methoxetamine and α -PVP: comparison of QuEChERS and SPE. *Forensic Toxicol* 36: 320–333
 13. Dybowski MP & Dawidowicz AL (2018): Application of the QuEChERS procedure for analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and its metabolites in authentic whole blood sample by GC-MS/MS. *Forensic Toxicol* 36: 415–423
-

A Forensic Autopsy Case in which Sulpiride and Estazolam Were Detected in an Adipoceratous Cadaver by LC-MS/MS

Kentaro KASAI, Toshiko TANAKA and Hiroaki SATOU

*Department of Forensic Medicine, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan.
Yahatanishiku Kitakyushu 807-8555 Japan*

Abstract : We had a forensic autopsy case in which drugs were detected in a cadaver that had been stored in a cold and wet condition for 5 years. The skin of the cadaver was hard, and the color was partly whitish or dark brown. Though the cadaver had transformed into adipocere in the wet and cold condition, QuEChERS extraction and LC-MS/MS revealed the presence of sulpiride and estazolam in the femoral muscle and bone marrow. The concentrations of sulpiride and estazolam in the femoral muscle were 10.6 ng/g and 39.9 ng/g, respectively. The result of a drug screening test led not only to the cause of death but also to the personal identification of the cadaver. The individual had a history of drug taking, which had been stored in his medical records at the hospital for a long time. The fact of taking sulpiride and estazolam at the same time was characteristic, and it was useful in identifying the cadaver in this case. The progress in analytical technology has made possible the detection of particle drugs from old or adipoceratous cadavers, but there have been no reports of particle drugs being detected in a cadaver that had been dead for 5 years and had transformed to adipocere, as in our present case. The analytical results by LC-MS/MS were certainly important for the diagnosis of the cause of death, and, moreover, they were useful for the purpose of personal identification.

Key words: adipocere, QuEChERS extraction, LC-MS/MS, drug screening test.