



Adipocere formation via hydrogenation of linoleic acid in a victim kept under dry concealment

主田, 英之

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-12-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2967

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002967>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	主田 英之
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 2021 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付	平成 19 年 12 月 12 日

【 学位論文題目 】

Adipocere formation via hydrogenation of linoleic acid in a victim kept under dry concealment（リノール酸水素化を経た無水密閉環境における死蝋生成機序）

審 査 委 員

主 査	教 授	西尾 久英
	教 授	林 祥剛
	教 授	中村 俊一

1. 導入

死蟻は肉眼的に容易に識別でき、埋葬環境因子、埋葬方法等の死蟻形成への影響が研究され、死蟻の組成や生成機序が報告されている。死蟻の多くは湿潤な土壌内や水中で形成されるが、乾燥密閉下でも形成される。今回我々は、死蟻形成において、前者を典型的状態、後者を非典型的状態と呼ぶ。本研究では、非典型的状況で形成した死蟻を用い、ガスクロマトグラフィ質量分析計 (GC-MS) を使用して、非典型的状況下で形成される死蟻と対照脂肪組織の間で脂肪酸組成の違いを明らかにすることを目的とした。

2. 試料と方法

・試料

約 4 年間、衣装箱に密閉された 77 歳女性の死体から死蟻組織を採取した。対照群として、死後経過 25 時間以内の遺体 6 例から腹部皮下脂肪組織を採取した。

本研究は、神戸大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得ている。

・抽出法

死蟻と対照群脂肪を計量後、破砕し、Folch の方法により抽出した。溶媒を濃縮し、窒素流下で乾燥した。脂肪酸分画を、ウォーターズ社シリカカラムを用い固相抽出法によって総脂質から分離した。少量のクロロホルムで溶解した総脂質をカラムに加え、クロロホルムとイソプロパノールの混合溶液で洗浄した後、脂肪酸を 3ml メタノールで溶出し、濃縮、乾燥した。析出物をメタノール加塩化水素で溶解し、110℃で 1 時間加熱しメチル・エステルに変換し、クロロホルムで溶解した。

・GC-MS と GC

GC-MS は島津 QP-5000 を、分離用カラムは DB-5MS シリカカラムを用いた。カラム温度は、140℃2 分間—毎分 4℃昇温—310℃5 分間と設定した。注入器温度は 270℃、分離器温度は 240℃にした。脂肪酸のピークは、それらのリテンションタイム (滞留時間、RT) と質量スペクトルによって確認した。定量は、選択イオンモニタリング (SIM) によって行った。校正曲線は、10、50、500g/ml の 10-OH 18:0 と 25、250g/ml の cis-12-18:1 の SIM 分析を用い、良好な直線性が得られた。精密質量分析は G-3000GC を接続した日立 M-4000 質量分析計を用いた。GC は島津 GC-14B を用い、脂肪酸エステルは、UA-1 キャピラリーカラムで分離した。キャリアーガスには毎分 30ml のヘリウム、カラム温度は 140℃2 分間—毎分 4℃昇温—310℃5 分間とし、注入器と検出器の温度は、240℃に設定した。脂肪酸の個々のピークの領域は、島津 Model C-R8A クロマト・パックによって算出した。

3. 結果

GC-MS による死蟻と対照脂肪組織の総イオン・クロマトグラム (TIC) において、対照と死蟻の脂質は、ミリスチン酸 (14:0)、palmitoleic acid (16:1)、パルミチン

酸 (16:0)、オレイン酸 (18:1)、ステアリン酸 (18:0) を主成分とする脂肪酸を含むが、arachidonic acid (20:4)、docosahexaenoic acid (22:6)、ベヘン酸 (22:0)、lignoceric acid (24:1)、nervonic acid (24:0) は殆ど含まなかった。一方、死蟻では、X、Y、1 と 2 というピークを確認した。ピーク 1、2 と標準 10-Hydroxyoctadecanoic acid (10-OH 18:0) の質量スペクトルを比べると、RT24.2 分に現れたピーク 1 は、m/z 292 と 250 と M+イオン m/z 324 を断片イオンとして含み、Cis-11-eicosenoic acid (20:1) の標準品と一致していた。標準 10-OH 18:0 の質量スペクトルにおいて、分子イオン (m/z 314) はなく、メタノール (m/z=32) と水 (m/z=18) の喪失による m/z M-50 である m/z 264 という顕著なイオンを確認した。さらに、m/z 201、172、169 のイオンがあり、それぞれ、CH₃-O-CO (CH₂) 8-CHOH-、[CH₃-O-CO (CH₂) 8-]+H、[-CO (CH₂) 8-CHOH-]+H と考えられた。ピーク 2 は、断片イオン、RT の一致により、10-OH 18:0 と同定した。

次に、10-OH 18:0 濃度を SIM で測定した結果、最高濃度は右大腿で 52.4g/mg 脂質、次いで右上腕で 33.2g/mg 脂質であり、一方、最低濃度は胸膜腔の 5.2g/mg 脂質で、次いで腸間膜脂肪 8.6g/mg 脂質であった。対照試料からは検出されなかった。

死蟻と対照脂肪の GC-MS による RT19-21 分間の TIC においては、ともに RT19.87 分で、ピーク X が出現した。対照試料には、リノール酸が検出されたが、死蟻にはほとんど現れなかった。死蟻には、RT19.98 分に、ピーク Y を認めた。RT19.98 分の標準 cis-12-octadecenoic acid (cis-12-18:1)、RT19.90 分の標準 trans-9-octadecenoic acid (エライジン酸、trans-9-18:1) と 18:0 の TIC、及び、ピーク X と Y、標準 cis-12-18:1 と標準 trans-9-18:1 の質量スペクトルを比較した。ピーク X と Y は m/z 296 の分子イオン (M+) を持ち、これは cis-12-18:1 と trans-9-18:1 を構造異性体を持つオレイン酸、octadecenoic acid の分子イオンである。ピーク X の質量スペクトルで発現したイオンは、ピーク Y と類似し、さらに、オレイン酸とも類似していた。死蟻から抽出した脂質の 2 つの構成要素 (ピーク X と Y) 及び、cis-12-18:1 と trans-9-18:1 の標準品の精密質量分析を行った。測定の結果は、これらの構造式は何れも C₁₉H₃₆O₂ であると計算された。つまり、ピーク X と Y は、octadecenoic acid (18:1) である。ピーク Y は、RT より cis-12-18:1 と同定された。SIM で測定される cis-12-18:1 濃度は、63.4~98.4g/mg 脂質であった。ピーク X は trans-9-18:1 であった。

死蟻と対照試料の GC で測定した脂肪酸組成 (%) を計算すると、死蟻の 14:0、16:1、16:0、18:1、18:0 と X では、対照脂肪に類似していた。しかしながら、死蟻の多くが 18:2 を含まず、含むもので 4.1% が最高であった。ところが、対照試料において、18:2 は 10% 以上存在した。この割合は、死蟻中の Y の割合と類似していた。

4. 考察

本研究では、4 年間密閉容器に保存された死体組織を GC-MS 分析し、死蟻の主成

分である 10-OH 18:0 を含んでいる事から、死蝟が形成されたことを確認した。
また、10-OH 18:0 濃度を定量すると、最高でも 50g/mg 脂質であった。各部位で濃度を比較すると、皮下脂肪の死蝟は、内臓脂肪より多く、死蝟は身体の外側から変性すると考えられた。

水中で形成された死蝟での 10-OH 18:0 の構成率は時間とともに増加すると報告されている。それらの結果と比較して、本研究での構成率は、典型的条件の 4 年間の約 10 分の 1 に等しく、また、4 ヶ月間のものより少なかった。従って、非典型的状態下での死蝟形成は典型的状態下より 10 倍以上遅いと言うことができる。
次に、脂肪酸組成を分析した。本研究で、高度不飽和脂肪酸、超長鎖脂肪酸は、死後 25 時間以内の対照脂肪中で既に消失していた。また、死蝟は、対照脂肪にはない未確認の脂肪酸を含んでいた。標準合成物を用いた GC-MS 分析により、それが cis-12:18:1 であることを同定した。様々な埋葬環境で形成される死蝟中の脂肪酸組成は、多くの報告があるが、死蝟中で cis-12:18:1 を同定したのは本研究が初めてである。

最後に、水素化機序を考えると、リノール酸から octadecenoic 酸 (18:1) またはステアリン酸への経路は、以下で概説される。リノール酸(a)の 12 位の二重結合が水素付加されると (ルート H1)、cis-9:18:1 (b、オレイン酸) が形成され、(a)の 9 位の二重結合が水素付加される (ルート H2) と cis-12:18:1(c)が形成される。(b)または(c)は、水素添加されてステアリン酸(e) (ルート H3 と H4) を形成する。(b)は異性化され trans-9:18:1(d)となる (ルート I)。死蝟形成の水素化反応は、一般にルート H3 と言われている。本研究において、死蝟と対照試料の間に(b)と(e)の組成に違いはなかった。さらに、死蝟では、(a)がほとんどなく、(c)は増加した。(d)は、死蝟だけでなく対照脂肪組織中にも存在し、量の著明な違いがなかった。このように、乾燥密閉の死蝟形成における水素化に関して、リノール酸は cis-12:18:1 に水素付加される。

5. 結論

我々は、GC と GC-MS を用いて乾燥密閉下で形成された死蝟の脂質を分析した結果、死蝟の主成分である 10-OH 18:0 を検出した。
脂肪酸中の 10-OH 18:0 の組成比率から、死蝟は無水密閉環境では水中より非常に遅く形成することが判明した。

また、GC-MS のクロマトグラムの未知のピークを cis-12:18:1 と同定した。更に、この脂肪酸の量は、対照群からリノール酸の損失量とほぼ同じであり、死蝟形成の際、リノール酸は主に第 9 位の二重結合に水素付加されたと考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 2026 号	氏 名	主田 英之
論文題目 Title of Dissertation	Adipocere formation via hydrogenation of linoleic acid in a victim kept under dry concealment リノール酸水素化を経た無水密閉環境における死蝟生成機序		
審査委員 Examiner	主 査 西尾久英 Chief Examiner 副 査 林 祥剛 Vice-examiner 副 査 中村 俊一 Vice-examiner		
審査終了日	平成 19 年 11 月 21 日		

(要旨は 1, 000 字～2, 000 字程度)

1. 緒言

死蟬は肉眼的に容易に識別でき、埋葬環境因子、埋葬方法等の死蟬形成への影響が研究され、死蟬の組成や生成機序が報告されている。死蟬の多くは湿潤な土壌内や水中で形成されるが、乾燥密閉下でも形成される。死蟬形成において、前者を典型的状態、後者を非典型的状態と呼ぶ。申請者らは、ガスクロマトグラフィ (GC) およびガスクロマトグラフィ質量分析計 (GC-MS) を使用して、非典型的状況で形成した死蟬と対照遺体の脂肪組織とを比較し、脂肪酸組成の違いを明らかにした。

2. 試料と方法

- ・試料：約 4 年間、衣装箱に密閉された 77 歳女性の死体から死蟬組織を採取した。対照群として、死後経過 25 時間以内の遺体 6 例から腹部皮下脂肪組織を採取した。本研究は、神戸大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得ている。
- ・抽出法：死蟬と対照群脂肪を計量後、破碎し、Folch の方法により総脂質を抽出した。脂肪酸分画は、固相抽出法によって総脂質から分離した。
- ・GC-MS および GC による測定：GC-MS は島津 QP-5000 を、分離用カラムは DB-5MS シリカカラムを用いた。脂肪酸のピークは、それらのリテンションタイム (滞留時間、RT) と質量スペクトルによって確認した。定量は、選択イオンモニタリング (SIM) によって行った。精密質量分析は G-3000GC を接続した日立 M-4000 質量分析計を用いた。GC は島津 GC-14B を使い、脂肪酸エステルは、UA-1 キャピラリーカラムで分離した。

3. 結果

GC-MS による死蟬と対照脂肪組織の総イオン・クロマトグラム (TIC) において、対照と死蟬の脂肪酸組成を比較して、4 ピーク (X、Y、1、2) を詳細に検討した。

ピーク 1、2 と標準品の質量スペクトルを比べた。ピーク 1 は、Cis-11-eicosenoic acid (20:1) の標準品と一致していた。ピーク 2 は、10-Hydroxyoctadecanoic acid (10-OH 18:0) の標準品と一致していた。10-OH 18:0 濃度を SIM で測定した結果、最高濃度は右大腿で 52.4g/mg 脂質、最低濃度は胸膜腔の 5.2g/mg 脂質であった。対照試料からは検出されなかった。

死蟬と対照脂肪の TIC においては、ともにピーク X が出現した。また、死蟬では、ピーク Y を認めた。ピーク X と Y について、標準 cis-12-octadecenoic acid (cis-12-18:1)、標準 trans-9-octadecenoic acid (エライジン酸、trans-9-18:1) の TIC、質量スペクトルを比較した。さらに、精密質量分析を行った結果、ピーク X と Y の構造式は何れも C₁₉H₃₆O₂ であると計算された。つまり、ピーク X と Y は、octadecenoic acid (18:1) である。ピーク Y は、RT と標準品との比較検討より、cis-12-18:1 と同定された。一方、ピーク X は、RT と標準品との比較検討より、trans-9-18:1 と同定された。

死蟬と対照試料の GC で測定した脂肪酸組成 (%) を計算すると、死蟬の 14:0、16:1、16:0、18:1、18:0 と X では、対照脂肪に類似していた。しかしながら、死蟬の多くが 18:2 を含まず、含むもので 4.1% が最高であった。ところが、対照試料において、18:2 は 10% 以上存在した。この割合は、死蟬中の Y の割合と類似していた。

4. 考察

本研究では、4 年間密閉容器に保存された死体組織を GC-MS 分析し、死蟬の主成分である 10-OH 18:0 を含んでいることから、死蟬が形成されたことを確認した。

本例における死蟬形成時の脂肪酸水素化機序を考えると、リノール酸から octadecenoic 酸 (18:1) またはステアリン酸への経路は、以下で概説される。リノール酸(a)の 12 位の二重結合が水素付加されると (ルート H1)、cis-9-18:1 (b、オレイン酸) が形成され、(a) の 9 位の二重結合が水素付加される (ルート H2) と cis-12-18:1(c) が形成される。(b) または (c) は、水素添加されてステアリン酸(e) (ルート H3 と H4) を形成する。(b) は異性化され trans-9-18:1(d) となる (ルート I)。死蟬形成の水素化反応は、一般にルート H3 と言われている。本研究において、死蟬と対照試料の間に(b)と(e)の組成に違いはなかった。さらに、死蟬では、(a)がほとんどなく、(c)は増加した。(d)は、死蟬だけでなく対照脂肪組織中にも存在し、量の著明な違いがなかった。このように、乾燥密閉の死蟬形成における水素化に関して、リノール酸は cis-12-18:1 に水素付加される。

5. 結論

申請者らは、GC と GC-MS を用いて乾燥密閉下で形成された死蟬の脂質を分析した結果、死蟬の主成分である 10-OH 18:0 を検出した。また、GC-MS のクロマトグラムの未知のピークを cis-12-18:1 と同定した。更に、死蟬形成の際、リノール酸は第 9 位の二重結合に水素付加されたと考えられた。

本研究は、無水密閉環境下での死蟬について、その脂肪酸組成を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった死蟬形成時の脂肪酸水素化機序について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。