

# 新しい死後経過時間推定法

筑波大学大学院博士課程  
医学研究科

小橋慶彦

筑波大学

医学博士学位論文

河津  
小湊  
慶彦  
氏  
印

新しい死後経過時間推定法

1987

筑波大学医学研究科

小湊慶彦

S2005050

## 目次

1. 緒言	1 頁
2. 方法	4 頁
3. 結果	8 頁
4. 考察	12 頁
5. 総括	15 頁
6. 謝辞	16 頁
7. 文献	17 頁
8. 表 1～3	23 頁
9. 図の説明	28 頁
10. 図 1～6	31 頁

## 1. 緒言

死因と死後経過時間 (postmortem interval: PMI) の推定は、法医学に課せられた幾つかの問題のうち重要なものである。しかし、この両者は質的に異なる問題であって、前者は病理学的な検索やその他の方法によって客観的な判断が下せるのに対して、後者は死体現象の肉眼的観察、直腸内温度の測定、最終生存確認時間や死体発見時の状況 (季節、場所、新聞の取り込み等の死亡日時を暗示させるような周囲の様々な状況) との兼ね合いから経験的に推定することが多く、客観性に欠けるのが現状である。

特にPMIの推定は個人の死亡時の特定や、犯罪事件では犯人の追求に最も重要であり、多くの研究者が取り組んできた。

PMIを状況以外の事柄から推定しようとする試みの歴史は古い。これまでに報告された方法を概観すると、死体現象の観察に基づく方法、即ち、死斑、死体硬直、角膜混濁、腐敗等の程度を観察する方法 (1, 2)、体温を測定する方法 (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)、組織学的方法 (11)、生物生態学的方法 (死体に付着する蛆、ハエの発育状況) (12) 等があり、さらに化学的方法では、死後の臓器、組織及び体液中の無機及び有機物質の消長 (13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23)、酵素活性の変化等を利用する方法 (24) 等というように、実に様々な角度から検討が加えられている。しかし、死体現象に基づく方法、組織学的方法、生物生態学的方法などはいずれも定量的に表現することが困難であり、客観性に欠けるという難点がある。

このように多くの方法が発表されてきたにもかかわらず、現状では前述したように、PMI推定のためには経験的な方法が広く一般に使われているが、客観的方法のなかで実際使用されているものは体温下降を利用するものである。また血液、脳脊髄液、眼房水、硝子体液、心嚢液の無機および有機物質を利用する方法などもあるが、これらのうち硝子体液中のカリウム量の測定が現在のところ応用可能であると考えられている (13)。

死後の死体冷却は個体自身の条件 (年齢、肥満度、死因、損傷の状態等) と外的な種々の因子 (環境温度及び湿度、着衣等) に影響される。そのため種々の因子を

補正する幾つかの方法（計算式）が考案されてきた（3, 8, 9, 10）。しかし、これらの方法は死後20時間以内の推定には有効であるものの、それ以後は不適當であり、また通常の外気温の範囲内においてのみ有効である。また他の問題点は死亡時の体温に個人差があること（25, 26）、及び死亡直後に体温変化の下降しない時期—initial lag period—が存在するとされているが、体温が上昇する場合もある（26）ことなどから、1つの計算式ですべてを解決することは不可能であるように思われる。

硝子体液のカリウムを用いた死後時間推定方法は死後100時間まで推定可能であり、また外的条件に影響されないと報告されている（17）。しかしその後の追試では、標準誤差が時間とともに増大し、信頼限界は10時間以上であり、また最初の12時間のみ直線的にカリウムは増加するという報告もある（20）。この方法の第2の問題点は死亡時のカリウム濃度に個人差があるらしいことと、増加の機序が不明な点などである。

上述の方法のほとんどは死後の変化に基づいているが、その機序は不明なものが大部分である。最近報告された被殻の3-methoxytyramine（3-MT）の蓄積に基づく方法（27）はある程度説明がなされている。すなわち、酸素が十分にある状態ではドーパミンはアルデヒド中間体になり、次いで dihydroxy-phenylacetic acid（DOPAC）、最後に homovanillic acid（HVA）となるが、これらは酵素によって触媒される。しかし酸素がない状態ではドーパミンは3-MTになる。つまり、3-MTは死亡前においては僅かに存在するだけであり、死亡後増加すると考えられ、このことを用いて死後経過時間を推定するというものである。しかし、このことが当てはまるのは心疾患以外の死因による例であった。

したがって、現在まで1）長時間有効で、2）死亡前または死亡時の値に個人差がなく、3）死亡後の値の変化に個人差がなく、4）死後における変化の機序が明確であり、5）死因に影響されない、などの条件を満たす客観的な死後経過時間推定法はないと言える。従って、現在これらの条件の幾つか、少なくとも1つを満足する方法が求められている。

上の条件の少なくとも1つを満たす物質は補体第3成分（C3）である。C3は

放置血清中において自然分解することが知られている(29)。しかし、C3の分解産物は幾つかの例外を除いて生体内の血流中には存在しない。従ってC3の分解産物に着目すれば死亡前の値に個人差はないことになる。

C3は2つのジスルフィド結合したポリペプチド鎖( $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖)からなっている(28)。免疫電気泳動による分析において、新鮮血清は一本の沈降線( $\beta_1C$ )のみを示すが、放置血清は他の2本の沈降線( $\beta_1A$ ,  $\alpha 2D$ )をも示す(29)。それらはC3分解産物であると考えられている。最近の研究においてC3内部のチオエステル結合が加水分解され、溶血活性の失われたC3( $H_2O$ )になり(30)次いでH因子とI因子によってiC3( $H_2O$ )となり(31)、続いてプラスミン、エラスターゼ等の蛋白分解酵素や血清(32, 33)によって、C3cとC3d, gになるということが明らかとなった。前述の $\beta_1A$ は現在C3cと考えられている(39)。生体内においてはこれらの分解産物は急性糸球体腎炎(34)全身性エリテマトーデス、敗血症などの疾患を除いて、正常者の血流中には存在しない。以前我々は、交差免疫電気泳動法を用い、屍血中においては死後経過時間の経過とともに、C3の分解産物の率が増大することを報告した(35)。一般的に言って、酵素反応は酵素の触媒しない反応より十分速いと考えられること、及び上述の生化学的研究とを考えあわせると、C3内部のチオエステル結合の加水分解は酵素によって触媒されていないため、C3の分解過程の律速段階であることが予想される。従って、C3分解の動態は、 $dC/dt = -k t$ と表されるかもしれない。但し、Cは時刻tの時のC3の濃度、kは反応速度定数である。

本論文においては、交差免疫電気泳動法を用いて、放置血液中のC3の分解動態を調べ、前述の式が成り立つことを示す。次いで、この式とアレニウスの式と屍体冷却過程を表す式とを組合せることにより、屍血中のC3の分解率を計算し、交差免疫電気泳動像から求められた実際のC3の分解率と比較することによって、死後経過時間が推定できることを示す。また前回の報告(35)に若干の例数を加え、回帰直線を用いて、C3の分解率からの死後経過時間の予測を示す。

## 2. 実験材料と方法

### 1) 血液試料

補体第3成分(C3)の分解速度を試験管内及び屍体血中において測定した。20人の健康成人から採血された血液を37、30、23、14℃内に保存し、37、30℃では12時間毎に72時間後まで、23℃では24時間毎に5日後まで、14℃では48時間毎に10日後まで、その上清を採取した。上清を直ちに-80℃で凍結保存し、2週間以内に解凍後、交差免疫電気泳動に供された。

屍体血は、医師を含む目撃者によって死亡時刻が確認されている例から集められた心臓血、胸腔貯留血液を用いた。また同時に直腸温も測定した。採取された血液を直ちに0℃に保存し、3時間以内に遠沈(3000g, 30分間)し、その上清を採取し、-80℃に凍結保存した。2週間以内に解凍後、交差免疫電気泳動に供された。

血液試料の凍結解凍(1回)はC3の分解率に影響を及ぼさないことが確認されている(35)。

### 2) 抗 $\beta_1A$ 抗血清

$\beta_1A$ と同様に $\beta_1C$ と反応する抗 $\beta_1A$ 抗血清は筑波大学基礎医学系田村昇教授の御厚意により提供されたものを用いた。

### 3) 交差免疫電気泳動

$\beta_1A$ と $\beta_1C$ を定性的かつ定量的に分析するために、Week eの方法(36)に従い、若干の修飾を加えて用いた。

#### i) 装置

パワーサプライ、泳動槽、冷却装置

#### ii) 試薬

##### a. 緩衝液

pH 8.6

ペロナル 4.74 g

ペロナルナトリウム 0.68 g

EDTA 0.745 g



精製水を加えて1000 mlとした。

b. アガロース溶液

アガロース（半井化学、LEアガロース）は泳動に使用する緩衝液に溶解した。

c. 染色液

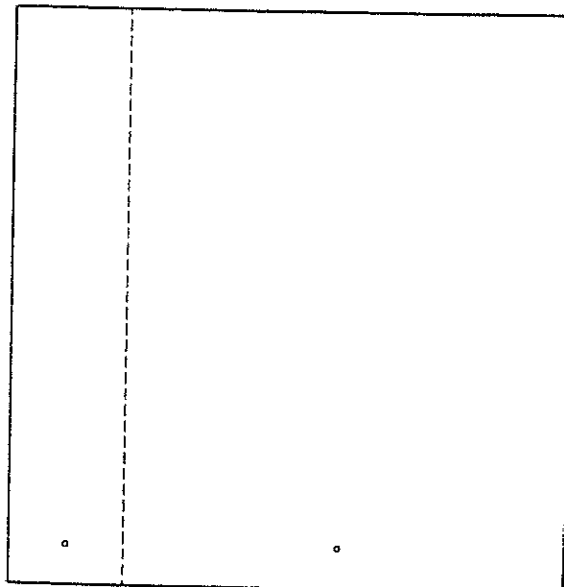
クマシーブリリント青	500 mg
エタノール 96%	500 ml
酢酸	100 ml
精製水	500 ml

d. 脱色液

エタノール	500 ml
酢酸	100 ml
精製水	500 ml

iii) 1回目のアガロース電気泳動法

50 mm × 50 mmのゲルポンドフィルム（LKB, USA）上に、使用する緩衝液に0.8%の割合に溶解したアガロース溶液3.5 mlを注ぎ、一様に広げ厚さ1 mmのゲル平板を作成した。ゲルが固まった後、下図のように直径2 mmの抗原孔を2つあけ、各々に被検材料2マイクロリットルとヘモグロビン溶液2マイクロリットルを注入した。ゲル平板を電気泳動槽にセットした後、5 V/cmの定電圧で通電をはじめ、ヘモグロビンの移動距離が2 cmに達したところで電気泳動を完了した。



iv) 2次元の電気免疫沈降法

ゲルを上図の破線の様に切り、試料の注入されている方を残し、他を捨てた。ゲルを水平台の上におき、約60℃の前述のアガロース溶液2.8mlに抗 $\beta_1A$ 抗血清25マイクロリットルを加えた溶液を流しこんだ。ゲルが固まった後、電気泳動槽にセットし、1回目の電気泳動の方向とは直交する方向に15時間定電圧で通電した(2V/cm)。泳動終了後ゲルを乾燥、染色、脱色した。

v)  $\beta_1C$ と $\beta_1A$ の定量

染色されたゲルを約2倍に拡大コピーし、HP1000接続タブレットデジタイザによって、 $\beta_1C$ 、 $\beta_1A$ の沈降峰下の面積を測定した。

4) データの計算方法

C3内部のチオエステル結合の加水分解は $\beta_1C$ から $\beta_1A$ への移行において律速段階であると考えられ、また加水分解は化学1次反応なので、この移行は以下の式があてはまると考えられる。

$$dC/dt = -k \times C \quad [1]$$

但し、Cは時刻tのときの $\beta_1C$ の濃度、kは反応速度定数。【1】式の解は、

$$C = C_0 \times \text{EXP}(-kt) \quad [2]$$

但し、 $C_0$ は時刻t=0のときの $\beta_1C$ の濃度。また $\beta_1A$ の濃度をAとすると

$$A = C_0 - C \quad [3]$$

となる。【2】式と【3】式より以下の式が導かれる。

$$x = A / (A + C) = 1 - \text{EXP}(1 - x) \quad [4]$$

ここで、xはC3の分解率であるが、xの値は $\beta_1C$ と $\beta_1A$ の沈降峰下の総面積に対する $\beta_1A$ の沈降峰下の面積の比として示される。【4】式は以下の様に書き直すことができる。

$$-1 \log(1 - x) = kt \quad [5]$$

即ち、反応速度定数kは時刻tに対して $-1 \log(1 - x)$ をプロットした時の回帰直線の傾きとして求められることが判る。反応速度定数kは絶対温度Tの関数であることが知られている(アレニウスの式)。

$$\log k = -E/RT + a \quad [6]$$

Eは活性化エネルギー、Rは気体定数、aは定数。従ってE/Rとaは絶対温度Tに対して $\log k$ をプロットした時の回帰直線の傾きとy切片として求められることがわかる。

### 3. 結果

#### 1) 試験管内における補体第3成分 (C3) の分解

C3の分解は交差免疫電気泳動によって調べられた。37℃内に保存された血液における $\beta_1A$ の増加の例を図1に示す。全血を保温する以前の新鮮血清においては $\beta_1C$ のみを認め(1)、以後保存時間の延長とともに $\beta_1C$ は減少し $\beta_1A$ が増加することがわかった(2-7)。

#### 2) C3の自然分解

C3の分解動態を調べるため、図1に示した交差免疫電気泳動像の $\beta_1C$ (C3)と $\beta_1A$ (C3の分解産物)の面積を測定し、それらの和に対する各々の比率を経時的に観察した。 $\beta_1C$ の減少と $\beta_1A$ の増加で表わされるC3の分解が緩徐に起ることが観察された(図2A)。図2Aのデータから $\beta_1C$ の比率の逆数の対数を時間に対してプロットすると(図2B)、両者の間に直線関係が成り立った。即ち、 $\beta_1C$ から $\beta_1A$ への分解は化学1次反応で近似できることがわかる。従って、加水分解は1次反応と考えられ、また加水分解の速度は酵素反応の速度より小であると考えられるので、C3の分解において内部のチオエステル結合の開裂が律速段階であると考えられる。図2Bから求められた反応速度定数は0.515%/hであった。

#### 3) C3分解の温度依存性

C3分解の動態に対する温度の影響を調べるため、全血を37, 30, 23, 及び14℃内に保存し、経時的に上清を採取した。 $\beta_1C$ の比率の逆数の対数( $-1.0 \log(1-x)$ )を時間に対してプロットした(図3A)。各温度におけるC3の分解は化学1次反応で近似されることがわかる。各温度における反応速度定数は37℃が0.515%/h、30℃が0.384%/h、23℃が0.186%/h、14℃が0.079%/hであった。これらの値からアレニウスプロットをおこなった(図3B)。絶対温度の逆数( $1/T$ )と反応速度定数の対数( $1.0 \log k$ )の間には直線関係が成り立つことがわかる。図から活性化エネ

ルギーと気体定数の比 ( $E/R$ ) 及び定数  $a$  が求められ、それぞれ 7790 と 19.7/h であった。

他 19 名から採血された全血についても上と同様の処理をした。20 例の、各温度における反応速度定数 ( $k$ ) の平均値、活性化エネルギーと気体定数の比 ( $E/R$ ) の平均値と定数  $a$  の平均値を表 1 に示す。これらの値は各温度において個人差はあるが、比較的狭い範囲にある。反応速度定数 ( $k$ ) は高い温度における方が大であり、37℃のそれは14℃のその約5倍である。以下の計算において、 $E/R$  と  $a$  の値はここで求められた値を用いた。

#### 4) 屍体血液中の C3 の分解 (実測値 $x$ )

屍血中の C3 の分解率 ( $x$ ) が交差免疫電気泳動像上の  $\beta_1 C$  と  $\beta_1 A$  の総面積に対する  $\beta_1 A$  の面積の比として求められた。表 2 に、死因、直腸温、死後経過時間 (死亡時刻と血液試料が 0℃に保存された時刻とのあいだの時間)、及び C3 の分解率 ( $x$ ) を示す。図 4 に死後経過時間 (PMI) と C3 の分解率の関係を示す。両者の間には正の相関があった ( $r = 0.724$ )。C3 の分解率 ( $x$ ) から 95% の信頼限界を求めると  $\pm 9.2$  時間であった (37)。死因は死後経過時間と C3 の分解率との関係に影響を及ぼしていないように考えられるが、直腸温度は C3 の分解率に影響を及ぼしているようである。例をあげれば、第 3 例と第 14 例、第 5 例と第 23 例、第 7 例と第 22 例などである。直腸温の高い方が分解率が高くなっている。直腸温が高いということは屍体冷却過程全体において、屍体冷却が小、即ち直腸内温度が高かったことを示唆していると考えられる。

#### 5) C3 分解率の実測値 $x$ と計算値 $x$ の比較

反応速度定数 ( $k$ ) は温度に依存するため、死後の体温下降は屍血中の C3 の分解率に影響を及ぼすであろう。しかし、死後の体温下降はほとんどの例で不明である。従って、それを推測する必要がある。屍体から血液試料が集められるときまで、直腸温がほぼ直線的に屍体温が下降したとすれば、ある時刻の体温は求められ、またその時の反応速度定数 ( $k$ ) も決定されうる。従って反応速度定数の経時的変化及び C3 の分解率の経時的変化も推定されうる。死亡時の直腸温を 37.6℃と仮

定すれば、任意の時刻の直腸温  $T(t)$  (絶対温度) は、

$$T(t) = (T(0) - 37.6) \times t / I + 310.6 \quad [7]$$

となる。但し、 $T(0)$  は屍血が採取されたときの直腸温度、 $I$  は死後経過時間である。

【1】、【6】、【7】式から  $c$  の分解率 (計算値  $x$ ) が求められた (表 2)。但し、 $E/R$  と  $a$  は上で求められた値 6690 と 16.4 を用いた。実測値  $x$  に対して、計算値  $x$  をプロットした (図 5)。実測値  $x$  は計算値  $x$  より大である傾向があり、また実測値  $x$  が 0 から 10 の範囲では、実測値  $x$  と計算値  $x$  の間には直線関係があった。しかし、実測値  $x$  が 10 以上では実測値が増加しても計算値  $x$  はほぼ一定であった。従って、実測値が 10 以下の例においては実測値と計算値を比較することによって、死後経過時間が推定されうると考えられる。

#### 6) 死後経過時間の推定

実測値  $x$  が 10 以下の例について死後経過時間の推定を試みた。【1】、【6】、【7】式に任意の  $I$  を用い、計算値  $x$  を求めた。但し、 $E/R$  と  $a$  は上で用いた 6690 と 16.4 を用いた。次に実測値  $x$  と上で求められた計算値  $x$  とを比較して、実測値  $x$  に最も近い計算値  $x$  を導きだす  $I$  を死後推定時間 (calculated PMI: 以下  $c$  PMI と略す) とした (表 3)。実際の死後経過時間 (PMI) との比較を図 6 に示す。両者の間には相関関係が成り立っていた ( $r = 0.824$ )。95% の信頼限界を求めると、 $\pm 9.1$  時間であった。また、両者の作る回帰直線は、

$$PMI(h) = 1.0 \times cPMI - 3.1$$

であった。

#### 7) 活性化エネルギー/気体定数 ( $E/R$ ) の値の検討

上の計算では活性化エネルギー/気体定数 ( $E/R$ ) と定数 ( $a$ ) は 6690 と 16.4 であったが、 $E/R$  を変化させ、 $a$  を一定とした場合の死後推定時間を計算した (表 3)。 $E/R$  が 6610, 6630, 6650, 6670, 6690 のとき、95% の信頼限界はそれぞれ  $\pm 7.3$ , , 7.0, 7.0, 7.9, 9.1 時間であった。

これらの結果から考えると、実際例への応用においては、 $E/R$ の値は6630から6650を用いることが望ましい（但し、定数  $a$  は16.4を用いた場合）。

#### 4. 考察

C<sub>3</sub> (β<sub>1</sub>C) から C<sub>3</sub> 分解産物 (β<sub>1</sub>A) への分解において、C<sub>3</sub> 内部のチオエステル結合の加水分解が律速段階であるという仮説は、健康成人から採血した全血を一定温度内に保存し、経時的にサンプリングし、β<sub>1</sub>C と β<sub>1</sub>A を定量、解析して得たデータとよく一致した。従って、C<sub>3</sub> の電気泳動上の分解動態は、

$$dC/dt = -k \times C$$

と表わせるであろう。但し、C は時刻 t における C<sub>3</sub> の濃度、k は反応速度定数。

ところで、C<sub>3</sub> の分解産物には溶血活性がないので、反応速度定数は単位時間あたりの失活程度を表わしていると考えられる。C<sub>3</sub> の溶血活性の減少に関する報告では 37℃ において 1 時間あたり 0.5% である (30)。この値は本研究において得られた値 0.56%/h にかなり近いと考えられる。

最近の生化学的研究と電気泳動像とを結ぶ研究がいくつかなされてきた。β<sub>1</sub>A はこれまで C<sub>3</sub>c と考えられてきたし (38)、また現在も考えられている。長沢らは、電気泳動上 C<sub>3</sub>b、iC<sub>3</sub>b、C<sub>3</sub>c は同じ移動度を示すことを示した (32)。また L a c h m a n らは、C<sub>3</sub> の分解産物として知られている β<sub>1</sub>A が iC<sub>3</sub>b であると報告している (39)。β<sub>1</sub>C から β<sub>1</sub>A への移行の速さが β<sub>1</sub>C の濃度に比例するという本研究の結果から考えると、β<sub>1</sub>C は C<sub>3</sub> のみから成り立っていないからならず、即ち、β<sub>1</sub>A は C<sub>3</sub> の分解産物 iC<sub>3</sub> (H<sub>2</sub>O)、C<sub>3</sub>c を含まねばならない。

生体内においては、C<sub>3</sub> の分解産物は循環血液中から除かれるため、急性糸球体腎炎、全身性エリテマトーデス、敗血症などの補体活性化状態以外では、流血中に C<sub>3</sub> 分解産物は存在しない。しかし死後、循環系が停止後は、分解産物を取り除かれないため、C<sub>3</sub> 内部のチオエステル結合は水分子と反応し、次いで酵素によって分解されてできた分解産物は時間とともに蓄積し、C<sub>3</sub> に対するその比率が時間とともに増加することが予想される。実際屍血中においては C<sub>3</sub> に対する分解産物の比率は死後経過時間とともに増加することが示された。

死後経過時間の推定のための客観的方法のなかで、硝子体液中のカリウムが最も実用的であると考えられてきた。死後経過時間と硝子体液中のカリウムの関係に関



する多くの研究は時間とともにカリウムが蓄積することを示したが、しかしその信頼性には幅がある。ある研究者たちは標準誤差が4.7時間であったと報告しているが(17)、他の研究者たちは大変個人差があるので信頼限界が10時間を越えたと報告している(20)。本研究の方法を用いた場合の95%の信頼限界は9.2時間であったが、これは死亡以前において、C3の分解率に個人差がないことによるのかもしれない。

また、【1】、【6】、【7】式と直腸温を用いて、任意の死後経過時間に対して計算された値(計算値 $x$ )と屍血中のC3の分解産物の割合(実測値 $x$ )との比較から死後経過時間が推定可能であることが示された。試験管内の実験から求められた活性化エネルギー/気体定数( $E/R$ )と定数( $a$ )を用いた時の95%の信頼限界は9.1時間であったが、6630から6650のあいだの $E/R$ を使用した場合は7.0時間であった。

死後屍体は冷却されるため、C3の分解速度(反応速度定数 $k$ )は死後経過時間とともに減少し、C3の分解率( $x$ )はプラトーに達すると考えられる。しかし、実際にはC3の分解率( $x$ )は増加し、プラトーを形成することはなかった。また、計算値( $x$ )は、実測値( $x$ )が10%までは実測値( $x$ )に比例して増加するが、以後プラトーに達する。以上の事実から屍血中のC3の分解はトリプシン(40)、プラスミン(41)、エラスターゼ(42)などの蛋白分解酵素、及び細菌によって促進されたことが推察される。急死例においては、血管壁からプラスミノゲンアクチベーターが放出されるため(43)、C3の分解は促進されるかもしれない。また、その促進の程度は死因よりもむしろ死亡過程に影響される可能性があるだろう。

実際例においては、屍体ごとにその冷却過程は異なる。しかし、その一般原理はすべてにあてはまる(9)。まず *initial lag period* があり、次いで体温が直線的に下降する時期があり、最後に対数的に下降する時期がある。これらの時期の長さは事例により異なる。【7】式においては、これらの時期を考慮に入れることは困難であり、また【7】式は死亡時高体温または低体温の事例には適当でない。これら【7】式のもつ欠点によって、実測値 $x$ と計算値 $x$ の差異が生じたのだろう。したがって、蛋白分解酵素、細菌、【7】式などの諸因子が実際の死後経過時間(PMI)と死後推定時間(c PMI)の差異の原因となった可能

性がある。

緒言で述べたように、放置血でのC3の分解過程は、蛋白分解酵素や細菌によって汚染された血液中での過程（C3は分解され、C3aとC3bとにわかれる）とは異なる。もしそのような因子が屍血中に混入したならば、C3の分解は2つの過程で進行する。従って、屍血中での活性化エネルギーは全体としてみれば減少したようにみえる。また、抗 $\beta_1A$ 抗血清を用いた交差免疫電気泳動法に基づいた活性化エネルギーは実際のそれより小になる。ゆえに死後経過時間推定の計算にあたって6630から6650の値のE/Rを用いることは適切なことかもしれない。ところで、実測値xが10以下の範囲においては実測値と計算値との間には有意の相関（ $r=0.79$ ， $p<0.01$ ）があるため、屍血中でのC3の分解は $dC/dt = -k \times C$  として近似できると推察される。

補体第3成分の分解に基づく死後経過時間の推定法は、1) 生前の個人差がないこと、2) 死後経過時間を信頼限界を明示して客観的に推定することができることなどの利点をもっている。従って補体第3成分の分解、即ち化学1次反応に基づく死後経過時間推定法は死亡時刻の推定に役立つことが示された。活性化エネルギーが小であればあるほど、反応速度定数すなわち、反応の速さへの温度の影響は小となることから、今後より活性化エネルギーの小である物質を探ることが、化学1次反応に基づく、より実用的死後経過時間推定法確立のために重要であると思われる。

## 5. 総括

1. 一定温度内における血清中の補体第3成分C3の交差免疫電気泳動上の分解動態は

$$dC/dt = -k \times C$$

と表わせることがわかった。但し、Cは時刻tにおけるC3の濃度、kは反応速度定数。

2. 反応速度定数kと温度（絶対温度）Tとの間には、アレニウスの式

$$\log k = -E/RT + a$$

が成り立つことがわかった。但し、Eは活性化エネルギー、Rは気体定数、aは定数。

3. 死亡時刻の明確な司法解剖例、行政解剖例、検死例の心臓血を試料として、死後経過時間とC3の分解率（ $\beta_1C$ と $\beta_1A$ の総面積に対する $\beta_1A$ の面積の比）との関係を調べた。両者の間には正の相関関係があった（ $r=0.724$ ）。C3の分解率から死後経過時間を推定することができ、95%の信頼限界は9.2時間であった。

4. 死後の体温下降過程は不明であるため、死亡時から直腸温がほぼ直線的に下降すると仮定した。任意の時刻の直腸温T(t)（絶対温度）は、

$$T(t) = (T(0) - 37.6) \times t / I + 310.6$$

となる。但し、T(0)は屍体血が採取された時の直腸内温度、Iは死後経過時間。

上の3式から、C3の分解率（計算値x）が得られた。電気泳動像から求められたC3の分解率（実測値x）と比較すると、実測値xが0から10%の範囲では、実測値xと計算値xの間には直線関係があったが、それ以上では実測値が増加しても計算値は一定であった。

5. 上の3式に任意のIを用い、計算値xを求め、実測値xに最も近い計算値xを導きだすIを死後推定時間とした。実際の死後経過時間と死後推定時間との間には相関関係があった（ $r=0.824$ ）。95%の信頼限界は、E/Rが6690のときは9.1時間であったが、E/Rが6630から6650のときには7.0時間であった。

6. 以上より、C3の分解を用いて、死後経過時間推定が可能であることが示唆された。

## 6. 謝辞

本研究の全般にわたって御指導下さった三澤章吾教授にお礼申し上げます。

補体に関する御助言、実験手法の御指導及び抗 $\beta_1A$ 抗血清をお与えくださった田村昇教授、藤田禎三助教授ならびに飯田恭子講師に心から謝意を表します。また本研究のヒントを与えて下さった原田勝二助教授、本研究の試料提供をしていただいた東京都監察医務院庄司宗介監察部長、Runge-kutta法に関する御助言をいただいた熊田薫先生、に深甚な感謝を表します。

本研究にあたり終始励ましていただいた永井淳、寛子先生御夫妻、Kenneth A. Brown教授、小池和子講師、伊藤清子技官、中村貴子技官、徐希平氏、安部井誠一先生、小島寛先生、佐野藤治氏および山崎健太郎先生にも感謝いたします。

また、論文作製にあたって種々の協力をして下さった田谷有子、James V. Ford氏のご好意に感謝いたします。

## REFERENCES

- [1] Van Den Oever, R., "A Review of the Literature as to the Present Possibilities and Limitations in estimating the Time of Death," *Medical Science and Law*. Vol.16, 1976, pp.269-276.
- [2] Polson, C. J. and Gee, D. J., *The Essentials of Forensic Medicine*, 3rd ed., 3, Pergamon, Oxford(1973)
- [3] Marshall, T. K. and Hoare, F. E., "Estimating the time of death. The rectal cooling after death and its mathematical expression," *Journal of Forensic Science*. Vol.7, 1962, pp.56-81.
- [4] Marshall, T. K., "Estimating the time of death. The use of the cooling formula in the study of postmortem body cooling," *Journal of Forensic Science*. Vol.7, 1962, pp.189-210.
- [5] Marshall, T. K., "Estimating the time of death. The use of body temperature in estimating the time of death," *Journal of Forensic Science*. Vol.7, 1962, pp.211-221.
- [6] Marshall, T. K., "Temperature methods of estimating the time of death," *Medical Science and Law*. Vol.5, 1965, pp.224-232.
- [7] Marshall, T. K., "The use of body temperature in estimating the time of death and its limitation," *Medical Science and Law*. Vol.9, 1969, pp.178-182.
- [8] Hiraiwa, K., Ohno, Y., Kuroda, F., Sebetan, I. M., and Oshida, S., "Estimation of postmortem interval from rectal temperature by use of computer," *Medical Science and Law*.

- Vol.20, 1980, pp.115-125.
- [9] Green, M. A. and Wright, J. C., "Postmortem interval estimation from body temperature data only," *Forensic Science International*. Vol.28, 1985, pp.35-46.
- [10] Henssage, C., "Nomogram-rectal temperature -time of death," THE MEETING of THE PAN AMERICAN ASSOCIATION OF FORENSIC SCIENCES(1st), 1987.
- [11] Satou, Y., Uchima, E., Kajiwara, M., Uema, Y., and Naganori, H., "Estimation of postmortem interval by organ cell viability(1).-Stability against nigrosin of cells in rat spleen and lymphonode," *Japan Journal of Legal Medicine*. Vol.39, 1985, pp.553-554.
- [12] Nishida, K., "Experimental studies on the estimation of postmortem intervals by means of fly larvae infesting human cadvers," *Japan Journal of Legal Medicine*. Vol.38, 1984, pp.24-41.
- [13] Henry, J. B. and Smith, F. A., "Estimation of the Postmortem Interval by Chemical Means," *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, Vol. 1, 1980, pp. 341-347.
- [14] Shonig, P. and Strafuss, A. C., "Postmortem biochemical changes in canine blood," *Journal of Forensic Sciences*. Vol.25, 1980, pp.336-343.
- [15] Shonig, P. and Strafuss, A. C., "Postmortem biochemical changes in canine cerebrospinal fluid," *Journal of forensic Sciences*. Vol.25, 1980, pp.60-66.
- [16] Rachut, E., and Doult, T. W., "Postmortem behavior of serum thyroxin, triiodothyronine, and paratharmone," *Journal*

- Forensic Sciences. Vol.25, 1980, pp.67-71.
- [17] Sturner, W. Q., and Ganter, G. E., "The postmortem interval," American Journal of Clinical Pathology. Vol.42, 1964, pp.137-144.
- [18] Hugh, W. M. H., "Levels of potassium in the vitreous humour after death," Medical Science and Law. Vol.5, 1965, pp.137-144.
- [19] Lie, J.T., "Changes of potassium concentration in the vitreous humour after death," American Journal of Medical Science. Vol.254, 1967, pp.150-156.
- [20] Coe, J. I., "Postmortem chemistries on human vitreous humour," American Journal of Clinical Pathology. Vol.51, 1969, pp.741-750.
- [21] Hansson, L., Uotila, U., Linford, R., and Laiho, K., "Potassium content of the vitreous body as an aid in determining the time of death," Journal Forensic Sciences. Vol.11, 1966, pp.390-394.
- [22] Adelson, L., Sunshine, I., Rushforth, N. B., and Mankoff, M., "Vitreous potassium concentration as an indicator of the postmortem interval," Journal of Forensic Sciences. Vol.8, 1963, pp.503-514.
- [23] Jaffe, F. A., "Chemical postmortem changes in the intraocular fluid," Vol.7, 1962, pp.231-237.
- [24] Lythgoe, A. S., "The activity of lactate dehydrogenase in cadaver sera: a comparison of different sampling sites," Medical Science and Law. Vol.20, 1980, pp.48-53.
- [25] Nokes, L. D. M., "The postmortem temperature plateau-factor

- fiction," Medical Science and Law. Vol.25, 1985, pp.263-264.
- [26] Hutchins, G. M., "Body temperature is elevated in the early postmortem period," Human Pathology. Vol.16, 1985, pp.560-561.
- [27] Sparks, D. L., Slevin, J. T., and Hunsaker, J. C., "3-methoxytyramine in the putamen as a guage of the postmortem interval," Journal of Forensic Sciences. Vol.31, 1986, pp.962-971.
- [28] Nillson, U. R., Mandle, R. J., and Jr.; McConnell-Mapes, J. A., "Human C3 and C5: subunit structure and modifications by trypsin and C42-C423," Journal of Immunology. Vol.114, 1975, pp.815-822.
- [29] West, C. D., Davis, N. C., Forristal, J., Herbst, J., and Spitzer, R., "Antigenic determinants of human beta 1C- and beta 1G-globulins," Journal of Immunology. Vol.96, No.4, 1965, pp.650-658
- [30] Panburg, M. K. and H. J. Muller-Eberhard, "Relation of a putative thioester bond in C3 to activation of the alternative pathway and the binding of C3b," Journal of Experimental Medicine. Vol.152, 1980, pp.1102-1114
- [31] Crossley, L. G. and Porter, R. R., "Purification of the human complement control protein C3b inactivator," Biochemical Journal. Vol.191, 1980, pp.173-182.
- [32] Nagasawa, S. and Stroud, R. M., "Mechanism of action of the C3b inactivator: requirement for a high molecular weight cofactor(C3b-C4bINA cofactor) and production of a new C3b derivative(C3b'), Immunochemistry. Vol.14, 1977, pp.749-



- [33] Carlo, J. R., Spitznagel, E. J., Conrad, D. H., and Ruddy, S. "Cleavage of membrane bound C3bi, an intermediate of the third component of complement, to C3c and C3d-like fragments by crude leucocyte lysosomal lysates and purified leucocyte elastase," *Immunology*. Vol.44, 1981, pp.381-391.
- [34] West, C. D., Winter, S., Forristal, J., McConville, J. M. and Davis, N. C., "Evidence for in vitro breakdown of beta 1C globulin in hypocomplementemic glomerulonephritis," *Journal of Clinical Investigation*. Vol.46, pp.539-548.
- [35] Kominato, Y., Harada, S., Yamazaki, K., and Misawa, S. "Estimation of postmortem interval based on C3 cleavage," *Journal of Forensic Sciences*. (in press).
- [36] Weeke, B., "Crossed Immunoelectrophoresis," *Scandinavia Journal of Immunology*. Vol.2, Supplement No.2, 1973, pp.47-56
- [37] Snedecor, G. and Cochran, W., *Statistical Methods*, Iowa State University Press, Ames. IA. 1980
- [38] Bokisch, V. A., H. J. Muller-Eberhard, and C. G. Cochrane, "Isolation of a fragment(C3a) of the third component of human complement containing anaphylatoxin and chemotactic activity and description of anaphylatoxin inactivator of human serum," *Journal of Experimental Medicine*. Vol.129, 1969, pp.1109-1130.
- [39] Davis, A. E., Harrison, R. A., and Lachmann, P. J., "Physiologic inactivation of fluid phase C3b: Isolation and structural analysis of C3c, C3dg(alpha 2D), and C3g,"

- Journal of Immunology. Vol.132, No.4, 1984, pp.1960-1971.
- [40] Nilsson, U. and Mapes, J., "Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) of reduced and dissociated C3 and C5: subunits and their modification by trypsin(TRY) and C42-C423," Journal of Immunology. Vol.111, 1973, pp.293-294.
- [41] Taylor, F. B. and Ward, P. A., "Generation of chemotactic activity in rabbit serum by plasminogen-streptokinase mixtures," Journal of Experimental Medicine. Vol.126, 1967, pp.149-158.
- [42] Johnson, U., Ohlsson, K., and Olsson, I., "Effects of granulocyte neural proteases on complement," Scandinavia Journal of Immunology. Vol.5, 1976, pp.421-431.
- [43] Mullerz, S., "A plasminogen activator in spontaneously active human blood," Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Vol.82, 1953, pp.291-295.

Table 1. The averages<sup>a</sup> of first-order rate constant(k) at each temperature, a ratio of an activation energy:gas constant(E/R), and a residual constant(a).

	Rate constant (%/h)				E/R	a
	37°C	30°C	23°C	14°C		
Average	0.560	0.334	0.215	0.103	$6.69 \times 10^3$	16.4
Standard deviation	0.171	0.074	0.068	0.026	$1.10 \times 10^3$	3.65

<sup>a</sup>Whole blood drawn from 20 healthy people was analysed as described in the text.

Table 2. Age, cause of death(COD), postmortem interval(PMI), rectal temperature(RT), measured percentage of C3 cleavage, and calculated percentage<sup>a</sup>

Case	Age, years	COD	Rectal temp. ('C)	PMI (h)	percentage of C3 cleaved	calculated percentage
1	66	OHD	31	4	2.4	1.86
2	86	OHD	33	4	5.1	1.99
3	73	OHD	23	21	8.2	7.36
4	50	DA	33	10	5.9	4.89
5	47	Asthma	31	14	6.8	6.36
6	53	OHD	29	17	9.8	7.2
7	79	Bronchitis	31	19	9.7	8.53
8	42	un	32	12	6.7	5.65
9	55	OHD	32	12	8.5	5.65
10	14	un	32	4	3.3	1.92
11	62	SAH	21	24	9.3	7.90
12	83	DA	30	16	7.3	7.00
13	42	OHD	32	7	7.5	3.34
14	75	SAH	28	21	9.3	8.55
15	55	Asphyxia	26	15	6.9	5.44
16	48	Gunshot	28	11	7.4	4.57
17	43	OHD	34	12	7.1	6.03
18	49	OHD	33	8	6.2	3.93
19	44	Drowned	28	15	7.1	6.19
20	43	un	28	8	6.0	3.35
21	1	Brain contusion	18	24	5.5	7.26
22	65	ICH	29	19	7.5	8.01

23	48	SAH	20	14	5.3	4.55
24	55	OHD	20	22	7.2	7.06
25	77	un	20	18	6.6	5.82
26	79	OHD	34	20	10.6	9.85
27	54	Bleeding	22	22	10.7	7.48
28	70	Pneumonia	28	23	13.3	9.33
29	76	OHD	23	16	10.5	5.66
30	50	un	23	21	13.0	7.36
31	70	OHD	26	19	10.7	7.31
32	62	OHD	26	21	15.6	8.05
33	63	Drowned	30	15	10.1	6.58
34	86	OHD	26	22	16.3	8.41
35	65	Asthma	24	23	10.8	8.27
36	43	Bleeding	16	25	12.3	7.15
37	39	un	26	27	15.7	10.2

Cause of death abbreviations:

OHD      organic heart disease  
 DA        dissecting aneurysm  
 Tx        transection  
 SAH      subarachnoideal hemorrhage  
 un        unknown cause

<sup>a</sup>Calculated percentages were determined using a ratio of activation energy : gas constant (E/R) of 6690 and a residual constant of 16.4.

Table 3. Age, cause of death(COD), actual postmortem interval(PMI), rectal temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), and calculated PMI<sup>a</sup> using varied ratios of activation energy:gas constant (E/R).

Case	COD	Rectal temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	PMI hours	calculated PMI					
				6690	6670	$\frac{E}{R}$ 6650	6640	6630	6610
1	OHD	31	4	5	5	5	4	4	4
2	OHD	33	4	10	10	9	9	9	8
3	OHD	23	21	23	22	21	20	19	18
4	DA	33	10	12	11	11	10	10	9
5	Asthma	31	14	15	14	13	13	12	12
6	OHD	29	17	23	22	21	20	19	18
7	Bronchitis	31	19	22	20	19	19	18	17
8	un	32	12	14	13	13	12	12	11
9	OHD	32	12	18	17	16	15	15	14
10	un	32	4	7	6	6	6	6	5
11	SAH	21	24	28	27	25	24	23	22
12	DA	30	16	17	16	15	14	14	13
13	OHD	32	7	16	15	14	14	13	12
14	SAH	28	21	23	22	20	20	19	18
15	Asphyxia	26	15	18	17	16	15	15	14
16	Gunshot	28	11	18	17	16	15	15	14
17	OHD	34	12	14	13	12	12	12	11
18	OHD	33	8	13	12	11	11	11	10
19	Drowned	28	15	17	16	15	15	14	13
20	un	28	8	15	14	13	12	12	11
21	Brain contusion	18	24	18	17	16	15	15	14

22	ICH	29	19	18	17	16	15	15	14
23	SAH	20	14	16	15	14	14	13	12
24	OHD	20	22	22	21	20	19	18	17
25	un	20	18	21	19	18	18	17	16
95% confidence (hours)				9.1	7.9	7.0	7.0	7.0	7.3
Correlation coefficient between PMI and calculated PMI				0.866	0.864	0.869	0.867	0.865	0.872

<sup>a</sup>The residual constant of 16.4 was used in the calculation.

<sup>b</sup>Abbreviations according to the key in Table 2.

## LEGEND

Fig.1 Crossed immunoelectrophoresis of aged blood at 37°C  
Whole blood was incubated at 37°C for 0 h (1), 12 h (2), 24 h (3), 36 h (4), 48 h (5), 60 h (6) or 72 h (7). Sera were harvested and stored at -80°C. Samples were subjected to crossed immunoelectrophoresis. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.

Fig.2 Spontaneous cleavage of C3 at 37°C.

Whole blood was incubated at 37°C for 0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, or 72h. Sera were taken and stored at -80°C. C3 cleavage was measured as a function of time by CIE analysis. The areas under the loops corresponding to beta 1C (circle open) or beta 1A (circle closed) in the immunoelectrogram are expressed as a ratio of the total area, shown in Panel A, though the ratio of beta 1A corresponds to the ratio of C3 cleaved (x), which is calculated by using the relationship:

Ratio of C3 cleaved(x)

$$=(\text{area under beta 1A})/(\text{area under beta 1A and beta 1C})$$

Therefore, a ratio of beta 1C represents 1-x.

In Panel B the results shown in Panel A were used to calculate the negative logarithm of ratio of beta 1C by using the relationship:

$$\text{Negative logarithm of ratio of beta 1C} = -\log(1 - x)$$

In Panel B, regression analysis of the points creates a line



with the equation :

$$- \log (1 - x) = 0.00864 + 0.515*t/100$$

The correlation coefficient is 0.988.

Fig.3 Spontaneous C3 cleavage:temperature dependence.

The kinetics of spontaneous cleavage of C3 were measured as a function of temperature (Panel A). Rate constants were calculated for each temperature. An Arrhenius plot is depicted in Panel B. The ratio of the activation energy:gas constant(E/R) and the residual constant(a) were calculated from the slope and y-intersection of this line.

Fig.4 Percentage of C3 cleavage(x) in cadaveric blood.

The measured percentage of C3 cleavage(x) in cadaveric blood was plotted against the respective PMI (hours). Regression analysis of the points creates a line with the equation :

$$\text{PMI (hours)} = 4.21 + 1.39 x$$

The correlation coefficient is  $r = 0.721$ .

Fig.5 The relationship between measured percentages and calculated percentages of C3 cleavage. The data from Table 2 were plotted as calculated percentage vs measured percentage of C3 cleaved in cadaveric blood.

Fig.6 The comparison between actual PMI and calculated PMI(cPMI).The calculated PMI (hours) are plotted against their respective actual PMI (hours). Regression analysis of the points creates a line with the equation:

$$\text{PMI (hours)} = 1.01 * \text{cPMI} - 3.07$$

The correlation coefficient is  $r=0.866$ .

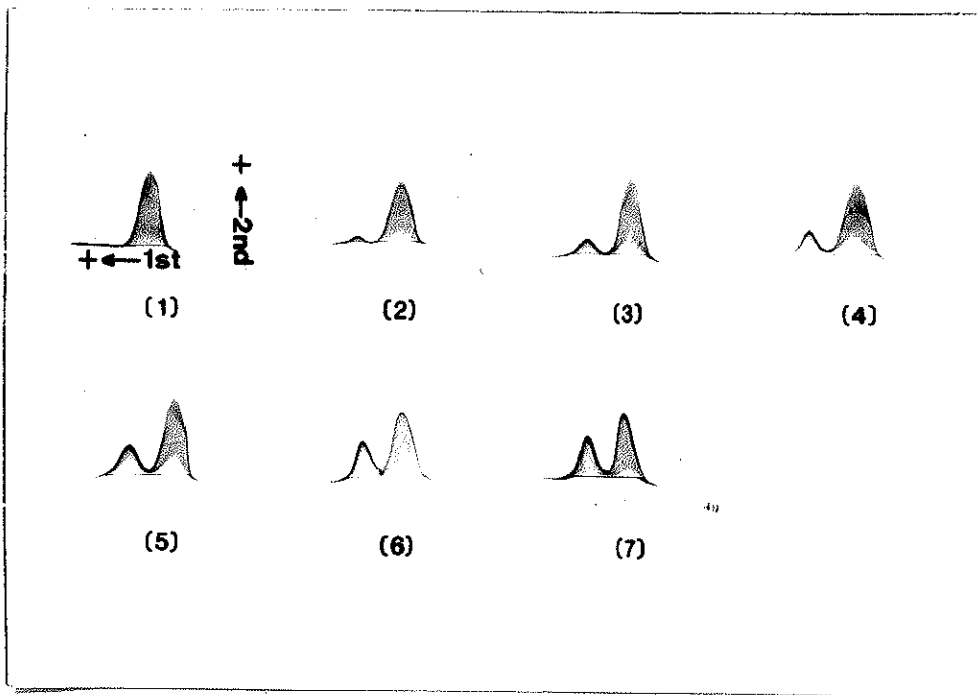


Fig. 1

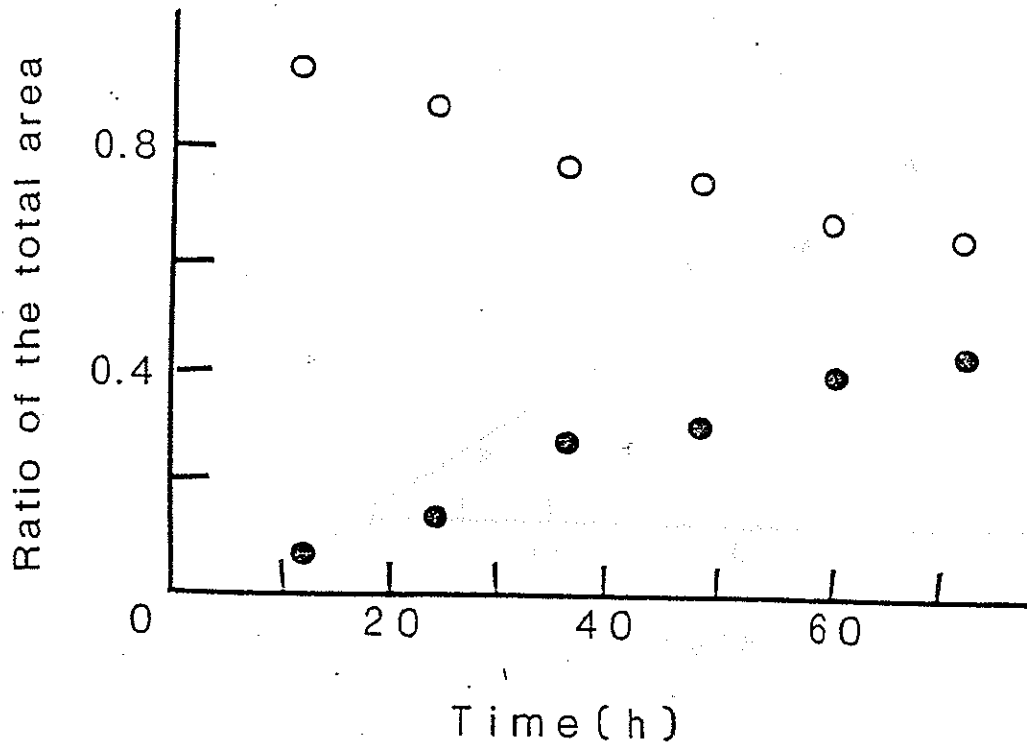


Fig.2 A

Negative logarithm of ratio of beta 1C

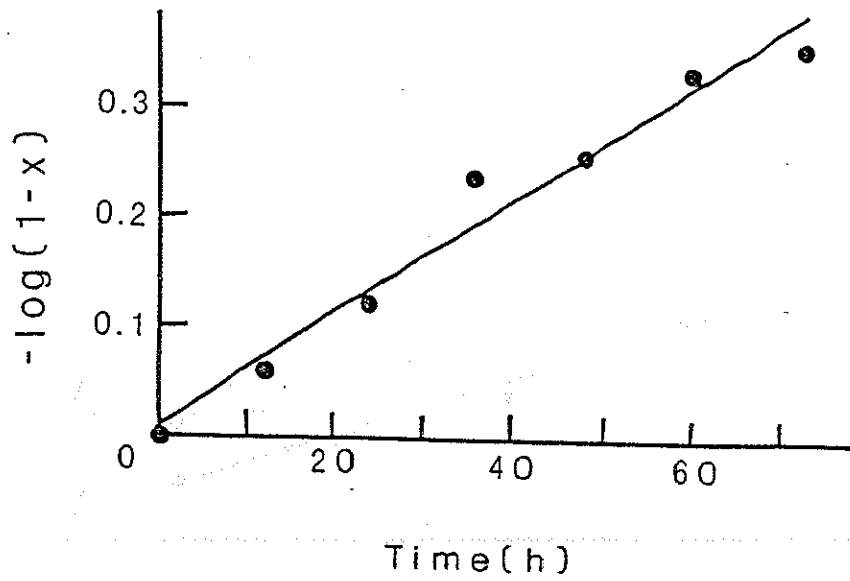


Fig.2 B

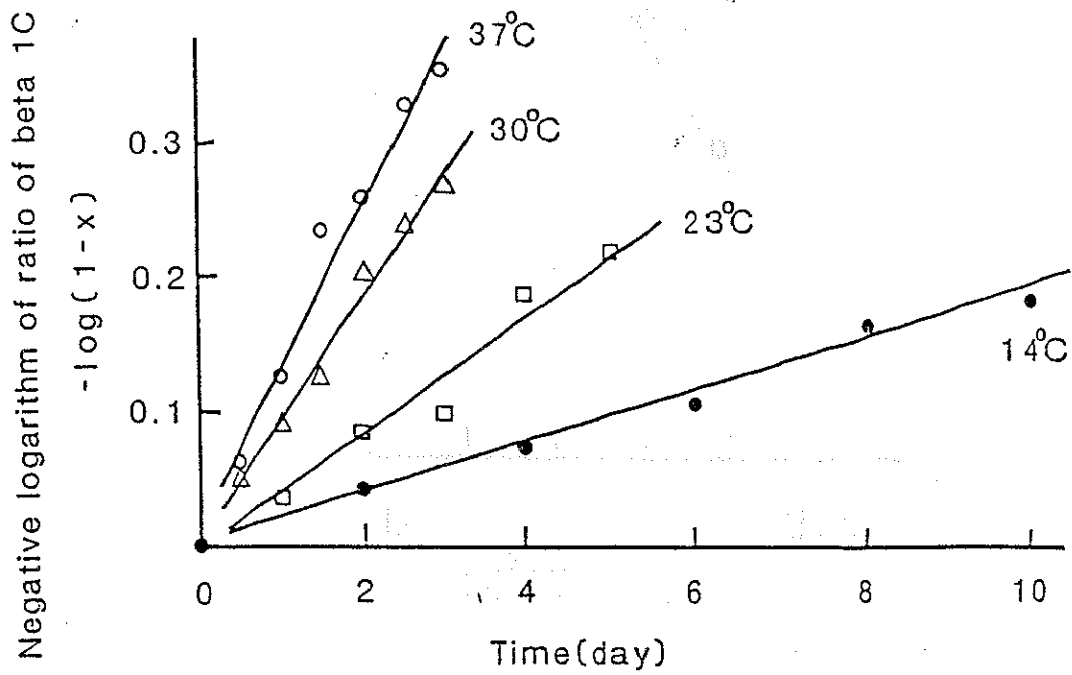


Fig. 3 A

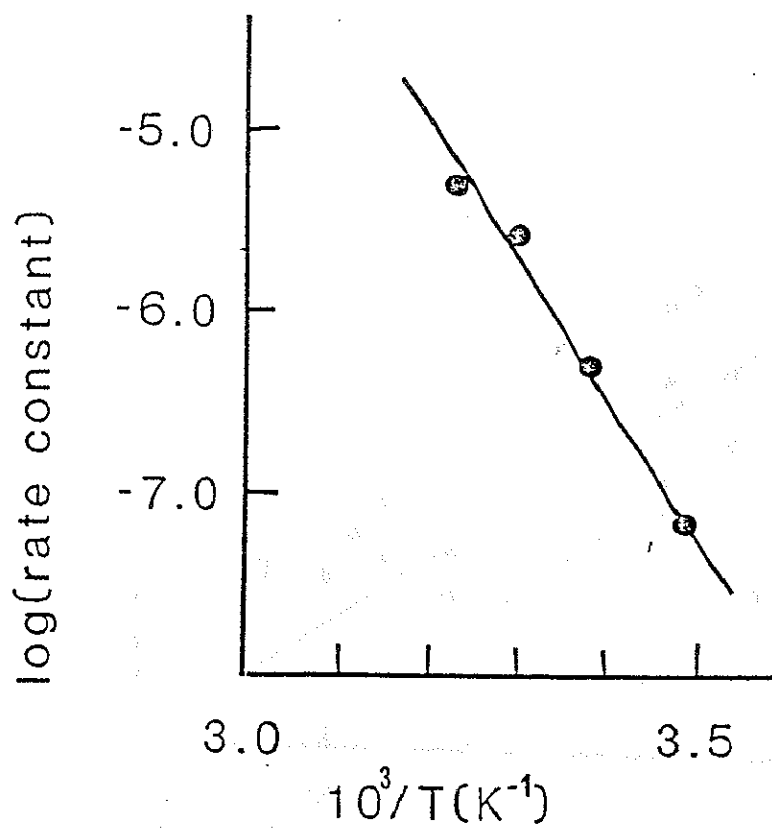


Fig.3 B

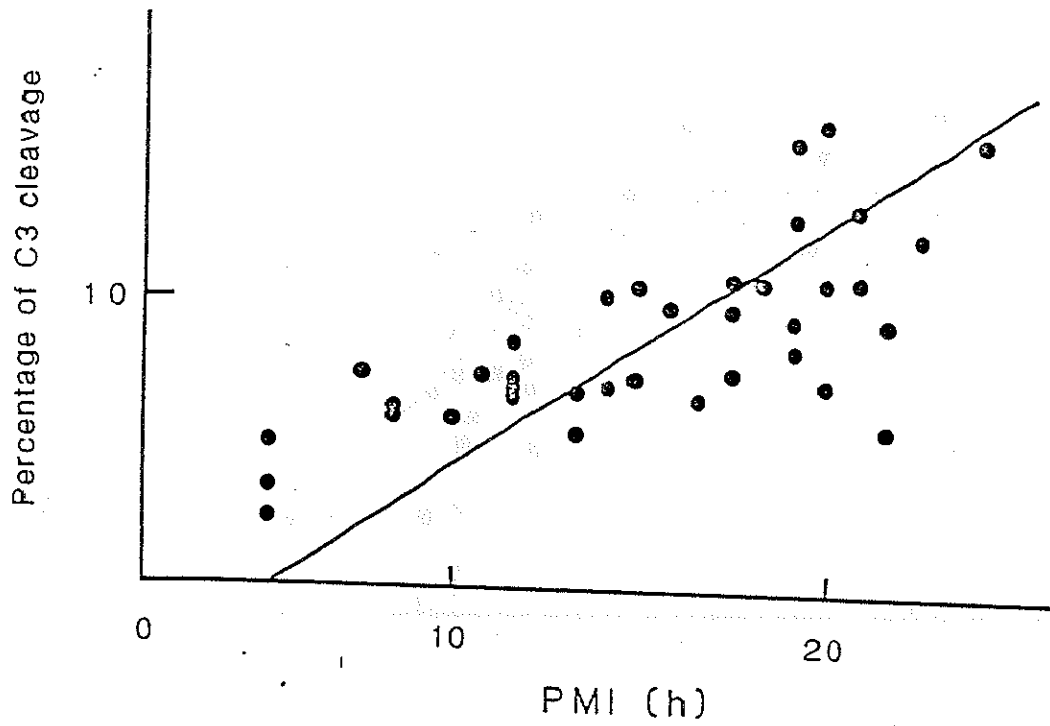


Fig.4



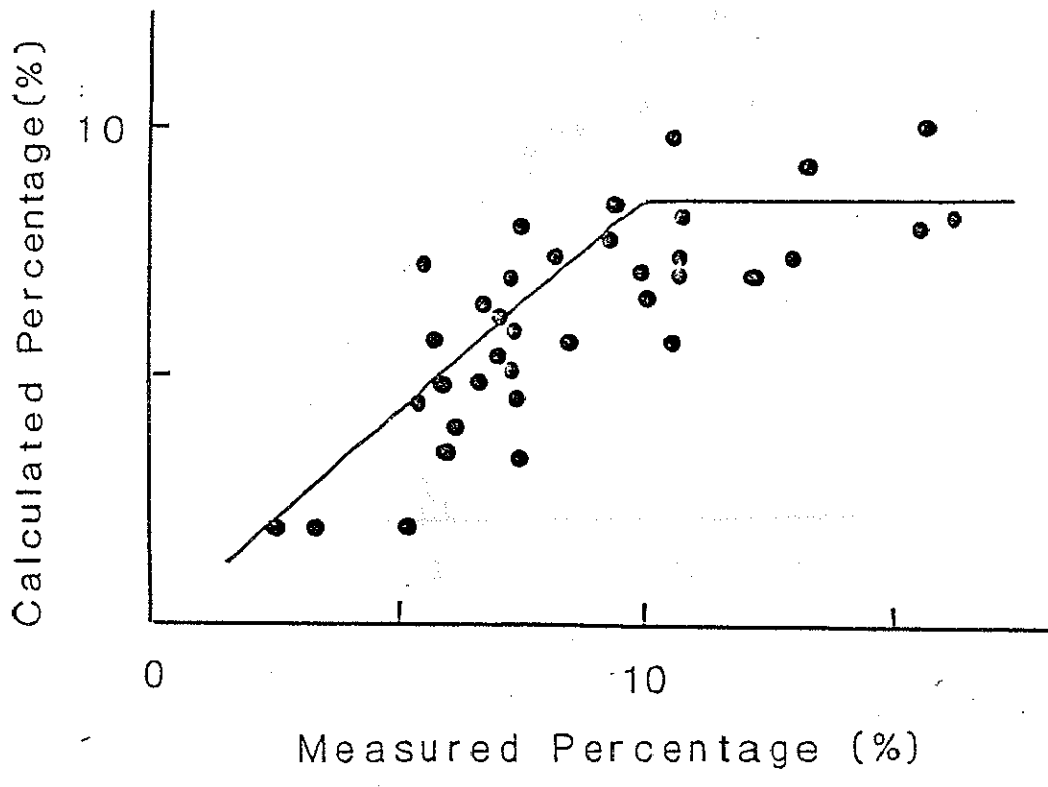


Fig.5

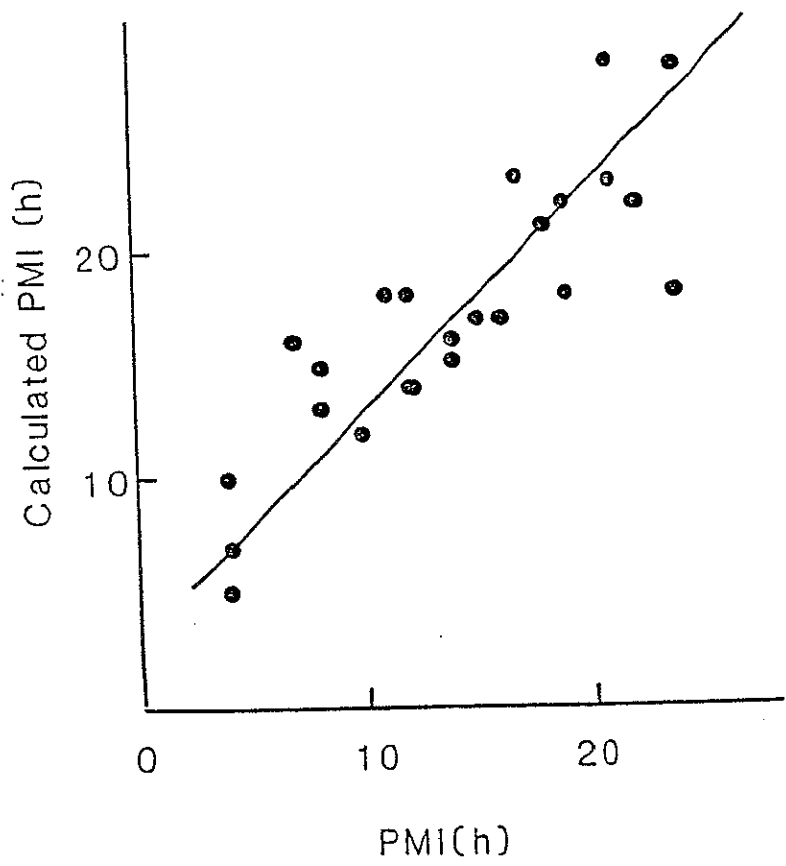


Fig.6