

令和元年6月5日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09212

研究課題名(和文) 外傷性・非外傷性軸索損傷の形成機序の解明と法医学的鑑別診断法への応用

研究課題名(英文) Investigation of postmortem differential diagnosis between traumatic and non-traumatic axonal injury

研究代表者

小片 守 (OGATA, Mamoru)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：10152373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：鈍的頭部外傷死及び対照(各44例)の脳梁を用いて、-APPに加えて、ケモカインIL-8、神経栄養因子BDNF、NGF、再生阻害因子MAG、オートファジー関連指標ULK1に対する免疫染色を行い、両群で比較した。IL-8は対照で陽性が認められず、外傷性を示唆するAPP染色パターン1型のみが陽性を示すことから、外傷性軸索損傷の診断の新たな指標となる可能性が示唆された。また、生存時間が3日以上で陽性となるため、受傷後生存時間の推定にも有用である可能性が示唆された。その他の指標については、軸索損傷に特異的な陽性所見が認められなかった。今後、複数の指標に基づく軸索損傷の法医学的診断法の確立を目指したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で少なくともIL-8発現は、外傷性・非外傷性軸索損傷の鑑別診断に有用となる可能性が示唆されたことから、法医学領域では正確な死因診断につながり、法医実務に大いに貢献できると思われる。また、IL-8は髄鞘再生に関与すると報告されていることから、新たな治療法の開発にもつながるため可能性があり、臨床にも還元できる成果といえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the expression of IL-8 as a chemokine, BDNF and NGF as neurotrophic factor, MAG as an axonal regeneration inhibitory factor and of ULK1 as an autophagy associated marker immunohistochemically in sections of corpus callosum obtained from deceased patients with blunt head injury and from equivalent control tissue (n=44, respectively). As a result, IL-8 immunoreactivity was detected in 7 APP immunoreactive and in 2 non-APP immunoreactive head injury cases, but was not detected in any of the 44 control cases. The IL-8 immunoreactive cases had survived from 3 to 24 days. Moreover, IL-8 was detected as Pattern 1 axons only which indicate traumatic axonal injury. There were no specific immunoreactivities of injured axons in other markers that we investigated in this study. In future, we would like to establish forensic diagnosis of traumatic axonal injury based on various molecular markers.

研究分野：法医学

キーワード：びまん性軸索損傷 外傷性・非外傷性 法医学的鑑別診断法 神経栄養因子 再生阻害因子 炎症性サイトカイン オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

びまん性外傷性軸索損傷は、回転加速度が頭部に加わった際に白質内の軸索がびまん性に断裂して生じるもので、予後の悪い病態である。局所性脳損傷に乏しいため、その診断には組織病理学的検査が必須であるが、軸索損傷を示す球状変性像 retraction ball が通常の染色法 (HE・鍍銀染色) で検出できるのは受傷後 15~18 時間以上生存した例に限られる。そのため、これまで受傷後早期に死亡した例の軸索損傷の診断法に関する研究が試みられ、近年では β -amyloid precursor protein (APP) に対する免疫染色が有用な方法として広く受け入れられている。しかしながら、APP は受傷後 2~3 時間の生存例で検出できるものの、それより早期の死亡例では診断できず、また、低酸素/虚血等に起因する非外傷性軸索損傷との鑑別ができない等の問題点も指摘されている [1]。後者に対して、これまで APP 染色パターンの違いに基づく鑑別法に関する研究がなされ、Graham ら [2] は、“Z”-shaped pattern は虚血に起因する軸索損傷を示す可能性があるとしており、Oehmichen ら [3] は、wave-like pattern は外傷性、irregularly aggregated pattern は低酸素性をそれぞれ示す可能性があるとして報告している。最近、応募者らも脳梁の APP 染色パターンは 2 種類存在し、神経線維束の走行に沿って染色される 1 型 (索状配列型) が外傷性、神経線維束の走行に沿わず不規則に染色される 2 型 (不規則型) が非外傷性をそれぞれ示す可能性があることを報告した [4, 5]。外傷性軸索損傷は、剪断作用によって物理的に細胞骨格が断裂することで形成されるため、外力の作用方向に一致して神経線維束に沿った配列を示す可能性がある。一方、脳の低酸素/虚血等に起因する非外傷性軸索損傷では、脳浮腫による物理的な伸張作用だけではなく、低酸素に基づく細胞内代謝障害、微細構造変化、細胞膜障害等の複数の因子が関与するといわれているため、それらに対して脆弱な部位に軸索損傷が分布すると考えられる。また、応募者らはこれまで APP の他にも軸索内輸送蛋白 neuron-specific enolase (NSE) [6] や髄鞘再生に関与するとされる炎症性サイトカイン interleukin (IL)-8 を指標とした軸索損傷の新規診断マーカー及び受傷後経過時間推定法の開発に関する検討を行ってきた。軸索の再生は、再生促進因子である neurotrophins (神経栄養因子) と再生阻害因子のバランスのもとに起こるとされ [7]、中枢神経系では損傷軸索から生じる myelin debris に多量の再生阻害因子を含むため再生が起こりにくいとされている。非外傷性軸索損傷では前記のように髄鞘を形成するオリゴデンドログリアの細胞死が損傷の引き金となることから、外傷性軸索損傷と比較して脱髄の程度が大きいいため生じる myelin debris 量も多く、結果として再生阻害因子が優位となる等、外傷性・非外傷性軸索損傷とでは再生過程にも相違があるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、純粋頭部外傷死例の脳梁における軸索の再生に関与する IL-8 等の炎症性サイトカイン、neurotrophin 等の再生促進因子並びに myelin associated glycoprotein (MAG) 等の再生阻害因子の発現を経時的に検討することで、軸索損傷の形成機序の相違点を再生過程に至るまでより深く解明したい。これらの検討により、外傷性と非外傷性の鑑別診断法に応用するのみならず、軸索損傷の新規診断マーカー並びに受傷後経過時間推定法をも確立したい。

3. 研究の方法

純粋頭部外傷死 44 例 (受傷後生存時間: 短時間~90 日間) 及び頭部外傷のない対照 44 例 (虚血性心疾患、窒息、失血、中毒等) の脳梁切片を用いて、APP に加えて、炎症性サイトカイン IL-8、再生促進因子である神経栄養因子のうち brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、nerve growth factor (NGF)、再生阻害因子のうち MAG、さらにオートファジー関連の指標である unc-51-like kinase 1 (ULK1) に対する免疫染色を行い、各指標の陽性率、陽性細胞、分布様式等を両群で比較した。

4. 研究成果

(1) IL-8 発現について

頭部外傷死例では、44 例中 9 例で IL-8 陽性の軸索変性像が検出され、受傷後生存時間が 3 日以上 24 日以内の例であった。また、IL-8 は APP 染色パターン 1 型のみで陽性を示した (図 1, [8])。さらに、IL-8 陽性の変性軸索周囲のオリゴデンドログリアにおいても IL-8 発現が認められた。一方、対照例では全例で IL-8 陽性所見は認められなかった。

以上の結果から、ケモカイン IL-8 は、受傷後 3 日目頃から軸索損傷周囲のオリゴデンドログリアが産生し、髄鞘の再生を促進するために損傷された軸索に集積したものと考えられる。

IL-8 は対照例で陽性

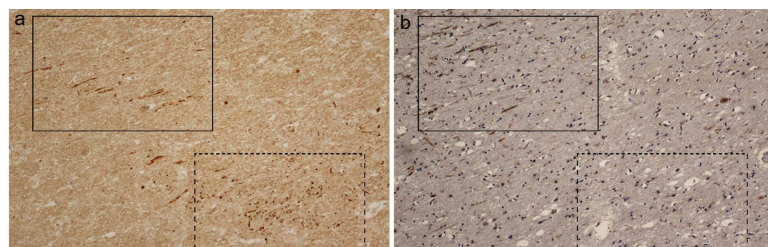


図 1 頭部外傷例 (受傷後 9 日間生存) における APP 免疫染色像 (a)、IL-8 免疫染色像 (b)。実線で囲まれた部分は 1 型、破線で囲まれた部分は 2 型を示す。文献 [8] より引用。

所見が認められず，外傷性を示唆する APP 染色パターン 1 型のみが陽性を示すことから，外傷性軸索損傷の法医病理学的診断の新たな指標となる可能性が示唆された。また，生存時間が 3 日以上で陽性となることから，受傷後生存時間の推定にも有用である可能性が示唆された。

(2) 神経栄養因子 BDNF，NGF 及び再生阻害因子 MAG 発現について

BDNF，NGF 並びに MAG のいずれも頭部外傷死例では，局所損傷部（挫傷部，出血部など）の周囲のグリア細胞等に陽性所見が認められたが，APP 陽性の軸索損傷部には陽性所見は認められなかった。また，対照例では全例で陽性所見は認められなかった。したがって，BDNF，NGF，MAG 発現についてはいずれも軸索損傷の法医学的診断には有用ではないと思われる。

(3) オートファジー関連の指標である ULK1 発現について

ULK1 は，頭部外傷死例において APP 陽性の軸索損傷部（axonal bulbs，varicose axons，wavy axons）に陽性所見がみられたものの，その他の局所損傷部にも陽性所見を認め，軸索損傷に特異的なものではなかった。したがって，ULK1 発現については軸索損傷の法医学的診断には有用ではないと思われる。

< 引用文献 >

Ogata M. Early diagnosis of diffuse brain damage resulting from a blunt head injury. *Legal Med* 2007;9:105-108.

Graham DI, Smith C, Reichard R, Leclercq PD, Gentleman SM. Trials and tribulations of using beta-amyloid precursor protein immunohistochemistry to evaluate traumatic brain injury in adults. *Forensic Sci Int* 2004;146:89-96.

Oehmichen M, Meissner C, von Wurmb-Schwark N, Schwark T. Methodical approach to brain hypoxia/ischemia as a fundamental problem in forensic neuropathology. *Leg Med* 2003;5:190-201.

Hayashi T, Ago K, Ago M, Ogata M. Two patterns of beta-amyloid precursor protein (APP) immunoreactivity in cases of blunt head injury. *Legal Med* 2009;11:S171-173.

Hayashi T, Ago K, Nakamae T, Higo E, Ogata M. Two different immunostaining patterns of beta-amyloid precursor protein (APP) may distinguish traumatic from nontraumatic axonal injury. *Int J Legal Med* 2015;129:1085-1090.

Ogata M, Tsuganezawa O. Neuron-specific enolase as an effective immunohistochemical marker for injured axons after fatal brain injury. *Int J Legal Med* 1999;113:19-25.

Kocsis JD, Lankford KL, Sasaki M, Radtke C. Unique in vivo properties of olfactory ensheathing cells that may contribute to neural repair and protection following spinal cord injury. *Neurosci Lett* 2009;456:137-142.

Hayashi T, Ago K, Nakamae T, Higo E, Ogata M. Interleukin (IL)-8 immunoreactivity of injured axons and surrounding oligodendrocytes in traumatic head injury. *Forensic Sci Int* 2016;263:48-54.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

林 敬人 . 入浴死の病態に関与するバイオマーカーの網羅的解析：入浴事故を減らすための基礎的研究 . *日本健康開発雑誌* . 査読無 . 2019 (in press)

Yamamoto T, Hayashi T, Murakami T, Hayashi H, Murase T, Abe Y, Umehara T, Shimokawa I, Uetani M, Ogata M, Ikematsu K. Postmortem imaging identified pneumomediastinum in two cases of diabetic ketoacidosis. *J Forensic Radiol Imaging*. 査読有. 2017;10:5-8.

Hayashi T, Nakamae T, Higo E, Ikematsu K, Ogata M. Primed neutrophil infiltrations into multiple organs in child physical abuse cases: a preliminary study. *Legal Med*. 査読有. 2017;24:24-31.

Hayashi T, Ago K, Nakamae T, Higo E, Ogata M. Interleukin (IL)-8 immunoreactivity of injured axons and surrounding oligodendrocytes in traumatic head injury. *Forensic Sci Int*. 査読有. 2016;263:48-54.

〔学会発表〕(計 11 件)

Hayashi T. Investigation of epidemiology and morphopathophysiology of sudden death in the bathroom (bath-related death). The 2nd Wakayama Medical University International Symposium of Forensic Molecular Pathology, 2019

林 敬人, 前田一輔, 中前琢磨, 小片 守 . 入浴死の死因解明 (第 3 報) - 温水溺死肺における複数の heat shock protein (HSP) 発現検索 . 第 68 回日本法医学会学術九州地方集会, 2018

Hayashi T, Maeda K, Nakamae T, Ogata M. Intrapulmonary gene expression of

aquaporins and heat shock proteins in a hot water drowning model: Postmortem diagnosis of bathtub-drowning. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM) / The 102nd Congress of the Japanese Society of Legal Medicine, 2018

林 敬人, 小片 守. 2017 年における鹿児島県の入浴死例の疫学的調査と今後の課題. 第 83 回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会, 2018

林 敬人. 入浴死の疫学的検討と病態解明を目指した法医学的アプローチ. 第 83 回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会, 2018

林 敬人, 前田一輔, 中前琢磨, 小片 守. 入浴死の死因解明(第 2 報) - 温水溺死モデルの肺における aquaporin(AQP)及び heat shock protein(HSP)発現変化. 第 67 回日本法医学会学術九州地方集会, 2017

林 敬人, 中前琢磨, 前田一輔, 肥後恵理, 小片 守. 高齢者の身体的虐待に基づく多臓器への好中球浸潤の機序解明: 肺胞マクロファージの役割を中心として. 第 101 次日本法医学会学術全国集会, 2017

Hayashi T, Maeda K, Nakamae T, Higo E, Ogata M. Exploring novel markers for postmortem diagnosis of the elder maltreatment. The 1st Wakayama Medical University International Symposium of Forensic Molecular Pathology, 2017

Hayashi T, Abe Y, Nakamae T, Maeda K, Higo E, Ikematsu K, Ogata M. Effects of the adrenal endocrine system in a restraint stressed mouse and application to postmortem indicators of child and elder maltreatment. The 1st Japanese-German International Symposium Forensic Medicine & Sciences, Child Abuse and Domestic Violence, 2016

Ogata M, Hayashi T, Nakamae T, Maeda K, Higo E. Forensic Diagnosis of Child and Elder Abuse Based on Impairment of Various Organs: Potential Clinical Application. The 1st Japanese-German International Symposium Forensic Medicine & Sciences, Child Abuse and Domestic Violence, 2016

林 敬人, 中前琢磨, 前田一輔, 肥後恵理, 小片 守. 高齢者の身体的虐待に基づく臓器への好中球浸潤の機序解明: 虐待の法医病理学的証明への応用に向けて. 第 66 回日本法医学会学術九州地方集会, 2016

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 林 敬人

ローマ字氏名: Takahito HAYASHI

所属研究機関名: 鹿児島大学

部局名: 医歯学域医学系

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 40512497

(2)研究協力者

研究協力者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。