

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10133

研究課題名(和文) 入浴死の病態解明と死因診断法の開発：各病態モデルによる検討から実務応用に向けて

研究課題名(英文) Elucidation of the pathology and development of differential diagnosis of bath-related death: from investigations using various pathological models to practical applications.

研究代表者

林 敬人 (Hayashi, Takahito)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：40512497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：入浴死の病態解明及び鑑別診断法の開発を目指して温水を吸引して溺死する過程で変動する遺伝子をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、変動がみられた遺伝子について定量的RT-PCR法にて確認するとともに、法医解剖例の肺試料においても検討した。温水溺死マウスを作製して検討したところ、38℃温水溺死では793遺伝子、41℃温水溺死では743遺伝子に変動がみられた。そのうち、水チャネル[aqp5](#)及び熱ショック蛋白[hsp90aa/ab](#)についてはqRT-PCRにおいても同様の結果が得られた。さらに、法医解剖試料を用いた検討でも同様の結果となり、浴槽内溺死例の法医学的診断マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果によって浴槽内溺死の正確な診断方法の確立につながる可能性がある。これは、死因究明の新たな展開につながる可能性があり法医実務に多大な貢献をするばかりでなく、臨床現場においても浴室内から救急搬送された患者の正確な病態把握、適切な治療(二次予防)にも大きく貢献するものと考えられる。さらに、これまで囁望されてきた入浴死の発生予防対策法の確立(一次予防)にもつながる可能性があり、社会への貢献度も極めて大きいといえる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the pathology of bath-related deaths and develop a differential diagnosis, genes that fluctuate during drowning by hot water inhalation were comprehensively analyzed using DNA microarrays, and the genes that fluctuated were confirmed using quantitative RT-PCR and also examined using lung samples from forensic autopsy cases. In warm-water drowned mice, 793 genes were found to be altered in 38°C warm-water drowning and 743 genes were altered in 41°C warm-water drowning. Of these, similar results were obtained for water channel [aqp5](#) and heat shock protein [hsp90aa/ab](#) in qRT-PCR. Furthermore, similar results were obtained in forensic autopsy samples, suggesting that they may serve as forensic diagnostic markers in cases of drowning in bathtubs.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：法医病理学

キーワード：入浴死 鑑別診断 死因究明 水チャネル 熱ショック蛋白

1. 研究開始当初の背景

わが国では、おそらく独特な入浴様式のために浴室内突然死(いわゆる、入浴死)が諸外国に比べて圧倒的に多く、特に65歳以上の高齢者の発生率が高いため、今後の高齢化の進展に伴ってさらに増加するおそれがあり、深刻な社会問題となっている。著者らは、過去12年間(2006-2017年)にわたって継続的に鹿児島県内における入浴死について疫学的調査を行い、鹿児島県でも年間200例前後(警察が取り扱う異状死体の約10%)という相当数の入浴死者がみられるため、基礎的病態の解明と予防法の確立が急務であることを報告してきた。

監察医制度のもと入浴死例も行政解剖が行われている東京都23区内では、入浴死の死因は虚血性心疾患などの急性心臓死、溺死、脳血管障害が3大原因とされている。しかしながら、全国的には入浴死は解剖に伏される例が少なく、死亡に至る正確な病態は十分に解明されているとはいえない。また、入浴中の不整脈、脳内出血、熱中症などの発症、アルコール酩酊、薬物作用などが原因で水没し、最終的に溺死に至る例など、入浴死例における死因には複数の要因が絡み合っていることも少なくない。さらに、法医学的には溺死はプランクトン検査にて肺だけではなく、肝臓、腎臓などの大循環系臓器から水中に棲息するプランクトン(珪藻類)が検出されることで確定診断されているが、浴槽内の水(水道水)には通常、珪藻類が存在しないため入浴中溺死の確定診断は困難な場合が大部分である。

2. 研究の目的

著者らは剖検例の肺における水輸送蛋白アクアポリン(aquaporin; AQP)5の発現変化(減少)が淡水溺死と海水溺死の鑑別に有用であることを見出した。また、Anらも腎臓におけるAQP2の発現変化(減少)が鑑別に有用である可能性を報告している。これらの変化は、いずれもAQPを通して体内に淡水が流入することで起こる血液希釈を防ぐための生体反応と考えられるが、浴槽内の水も淡水であることから浴槽内溺死の診断にも応用できる可能性がある。さらに、浴槽内の水は温水であるため熱によって熱ショック蛋白heat shock proteins(HSP)s発現にも変化がみられる可能性もある。今回、これまで行ってきた動物実験による検討をさらに発展させて、入浴死の病態に關与する遺伝子を網羅的に解析し、複数の指標に基づく入浴死の分子生物学的診断法を開発することを目的として検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 温水溺死モデルの作製

8週齢の雄性Balb/cマウスを用いて、麻酔下に38及び41に熱したホットプレート上に置き加温する。直腸温が目標とする各温度に達した時点で、既報に従い前頸部の皮膚を切開し、気管を露出させた後に、26ゲージシリンジを用いて気管内に各温度の蒸留水30ml/kgを注入することで温水溺死モデルを作製した。対照は、麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させた。いずれの群もマウスが死亡してから30分間放置後に肺を摘出した。

(2) total RNA抽出並びに遺伝子の網羅的解析

凍結保存した肺を試料として、total RNAを抽出した。抽出したtotal RNAを試料として、タカラバイオの受託サービス(Agilent Array発現解析)を利用し、遺伝子発現をDNAマイクロアレイによって網羅的に解析した。Agilent Array発現解析は、対象として24321のコーディングRNA及び4576のノン・コーディングRNAを含んでいる。遺伝子発現が対照に比して1.5を上回る(発現増加)、あるいは0.66を下回る(発現減少)場合を有意な変動として評価した。

(3) qRT-PCR法による遺伝子発現解析

網羅的解析において有意な発現変化がみられた各遺伝子について、qRT-PCR法を用いてmRNA発現量を確認した。

(4) 法医解剖例の肺試料を用いた遺伝子発現解析

実際の法医解剖例(浴槽内溺死例、対照例)の肺試料からRNAを抽出し、動物実験において有意な発現変化がみられた各遺伝子について、qRT-PCR法を用いてmRNA発現量を各群間で比較した。

4. 研究成果

網羅的解析において有意な変動がみられた遺伝子は38温水溺死群で793遺伝子、41温水溺死群で743遺伝子であった。変動がみられた遺伝子のうち、温水溺死の病態への関与が想定されるものを(A)水チャネル/浸透圧受容体群、(B)熱ショック蛋白群、(C)低酸素誘導群の

3群に分けて抽出した(表1)。

(A)群では、水チャネル *aqp2*, *4*, *11* 並びに浸透圧受容体 *trpm1* の4遺伝子が同定された。*Aqp2* は38 温水溺死群で発現が減少, 41 群では逆に増加していた。*Aqp4* は38, 41 いずれの温水溺死群でも発現が減少していた。*Aqp11* 及び *trpm1* は38, 41 いずれの温水溺死群でも発現が増加していた。一方, これまで検討してきた *aqp5* については38 温水溺死群では発現が減少したが, 41 温水溺死群では変動がみられなかった。*Aqp5* について qRT-PCR によって発現を検討したところ, 同様の結果が得られた(図1)。

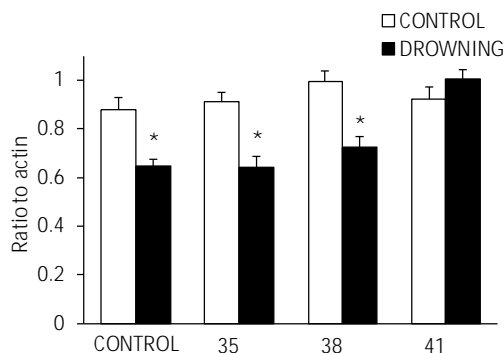


図1. *Aqp5* 遺伝子発現 (qRT-PCR). 平均値 ± SEM (n=5). $p^* < 0.05$, vs. 各対照群.

(B)群では, *fkbp5*, *hsp90ab1*, *hspa11*, *hspb1*, *hspb8* の5 遺伝子が同定され, いずれも発現が増加していた。これらのうち, *hsp90ab1* 及び *hspb1* について qRT-PCR にて発現を確認したところ, いずれも同様の結果が得られた。ただし, *hspb1* については, 加温のみの対照群でも発現の増加がみられた。

(C)群では, *hif1an*, *egln3* の2 遺伝子が同定された。*Hif1an* は38, 41 いずれの温水溺死群でも発現が増加し, *egln3* はいずれの群でも減少していた。これらの遺伝子については qRT-PCR による確認はまだ行っていない。

次に, 実際の法医解剖例の肺試料を用いて検討したところ, *aqp5* 発現は対照群に比して浴槽内溺死群で有意に低値を示し, 動物実験と同様の結果が得られた。一方, *hsp90aa/ab* 発現は浴槽内溺死群で有意に高値を示した。以上の結果から, *aqp5* 発現の低下, *hsp90aa/ab* 発現の上昇は, 実際の浴槽内溺死例における法医学的診断マーカーとなる可能性が示唆されたと考える。

表1. 変動がみられた遺伝子群

(A) Aquaporins/Osmoreceptors

Gene	38	41
<i>aqp2</i>	0.60669	1.769157
<i>aqp4</i>	0.483147	0.304123
<i>aqp11</i>	2.00672	1.511279
<i>trpm1</i>	3.683993	5.127992
<i>aqp5</i>	0.659248	0.757889

(B) Heat shock proteins

Gene	38	41
<i>fkbp5</i>	5.348661	5.674562
<i>hsp90ab1</i>	2.666148	1.836358
<i>hspa11</i>	4.865343	2.092416
<i>hspb1</i>	6.056521	4.250303
<i>hspb8</i>	1.884385	1.604319

(C) Hypoxia-inducible proteins

Gene	38	41
<i>egln3</i>	1.782401	1.628968
<i>hif1an</i>	0.599932	0.489461

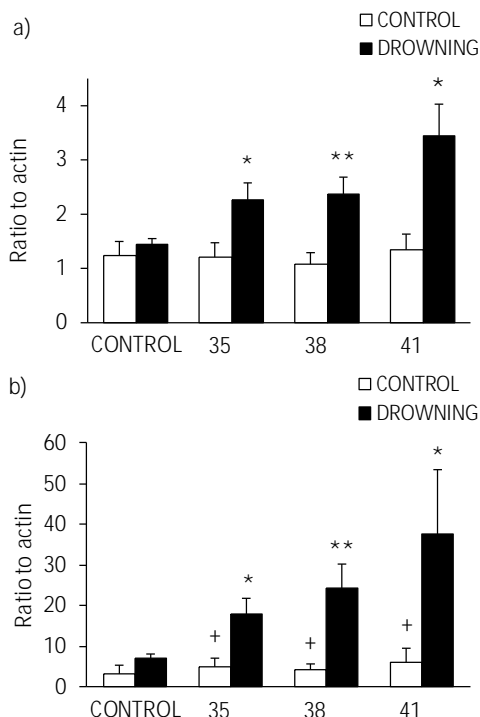


図2. *Hsp90ab1* (a), *hspb1* (b) 遺伝子発現 (qRT-PCR). 平均値 ± SEM (n=5). $p^{**} < 0.01$; $p^* < 0.05$, vs. 各対照群. $p^+ < 0.05$, vs. 非加熱対照群.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 林 敬人	4. 巻 -
2. 論文標題 入浴死の病態に関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	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本健康開発雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 27.Onitsuka D, Nakamae T, Katsuyama M, Miyamoto M, Higo E, Yatsushiro M, Hayashi T	4. 巻 -
2. 論文標題 Epidemiological analysis of intramuscular hemorrhage of respiratory and accessory respiratory muscles in fatal drowning cases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0261348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 林 敬人
2. 発表標題 入浴死予防に向けた法医学的戦略 - 疫学的解析と動物モデルによる解析
3. 学会等名 第85回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 敬人, 前田一輔, 中前琢磨, 小片 守
2. 発表標題 入浴死の死因解明（第4報） - 温水溺死で変動する遺伝子の網羅的解析.
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 敬人
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第83回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 敬人, 小片 守
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第83回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayashi T, Maeda K, Nakamae T, Ogata M
2. 発表標題 Intrapulmonary gene expression of aquaporins and heat shock proteins in a hot water drowning model: Postmortem diagnosis of bathtub-drowning
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM) / The 102nd Congress of the Japanese Society of Legal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 敬人, 前田一輔, 中前琢磨, 小片 守
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第68回日本法医学会学術九州地方集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayashi T
2. 発表標題 Investigation of epidemiology and morphopathophysiology of sudden death in the bathroom (bath-related death)
3. 学会等名 The 2nd Wakayama Medical University International Symposium of Forensic Molecular Pathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------