

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 7日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590633

研究課題名（和文） 過酸化脂質及びオキシステロールの法医診断への応用

研究課題名（英文） Lipid hydroperoxides and oxysterols as markers of oxidative stress and their application for forensic diagnosis

研究代表者

浅野 水辺 (Asano Migiwa)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90283879

研究成果の概要（和文）：

剖検時に採取した大動脈粥状硬化病変においてオキシステロールおよびマロンジアルデヒド、ヘキサノイルリジンが増加していることを明らかにした。さらに、動脈硬化病変部の 7-ketocholesterol およびヘキサノイルリジンの免疫染色を行い、脂質過酸化物が大動脈内膜に局在することを明らかにした。また、剖検事例における赤血球中のヘキサノイルリジンが飲酒の指標となる可能性、腎糸球体における heat shock protein 70 の発現パターンが低温環境での死亡の指標となる可能性を示した。以上より、オキシステロール等が酸化ストレスのマーカ―として剖検診断に応用可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We showed oxysterols, malondialdehyde and hexanonyl lysine were increased in atherosclerotic lesions of human aorta. In addition, we found 7-ketocholesterol and hexanonyl lysine were accumulated in inner media of aorta by immunohistochemical analysis. Moreover, we showed that in autopsied cases hexanonyl lysine in red blood cells and expression patterns of heat shock protein 70 in glomerular podocytes were useful markers as habitual drinking and death associated with exposure to cold respectively. These results suggest the possibility that such oxidative stress markers involving oxysterols were applied for forensic diagnosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：酸化ストレス、過酸化脂質、オキシステロール、動脈硬化、免疫染色、定量分析、アルコール

1. 研究開始当初の背景

オキシステロールはコレステロール酸化物の総称である。我々はこれまでにコレステロール過酸化物 (7 α -hydroperoxycholesterol, 7 β -hydroperoxycholesterol) および三種のオキシステロール (7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol) の化学発光-高速液体クロマトグラフィーまたは紫外吸収-高速液体クロマトグラフィーによる定量法を確立し、アルコール性脂肪肝で過酸化脂質が増加すること、アルコール性臓器障害モデルラットの肝臓・骨格筋・心臓等で過酸化脂質およびオキシステロールが増加すること等を明らかにした。しかし、これまでの測定法は検出感度が十分でなく、剖検試料中のこれらの化合物を定量するには改善すべき点があった。また、臓器あるいは組織で過酸化脂質が増加していることは示されたが、その局在については不明であった。

そこで、本研究では過酸化脂質およびオキシステロールの法医診断への応用をめざし、オキシステロール等の高感度分析法の開発ならびに定量的酸化ストレスマーカーの探索、免疫組織学的手法を用いた酸化ストレスの局在解明を試みた。

2. 研究の目的

酸化ストレスが種々の病態に関与していることが知られており、生体においては、血清や尿を試料として比較的簡便に酸化ストレスを評価する方法が確立されつつある。しかし、剖検試料における酸化ストレスの評価法は確立されていない。この理由のひとつとして、法医解剖は少なくとも死後数時間以上経過した後に行われるため、検体として剖検試料を用いる場合には死後変化が無視できないことが考えられる。死後に起こる自動酸化または酸化生成物の分解などのため、剖検試料中の酸化生成物の量的評価は困難であるが、死因あるいは病態解明のために、酸化ストレスを評価することは、法医実務においても必要である。

本研究の目的は、オキシステロールや過酸化脂質が法医実務に応用可能な酸化ストレスマーカーとなる可能性を検討することである。また、死亡状況の推定に有用なバイオマーカーの探索も合わせて行う。

3. 研究の方法

(1) 大動脈粥状硬化病変におけるオキシステロール

剖検で採取した腹部大動脈の粥状硬化病変および肉眼的に肥厚斑を認めない大動脈

壁(正常血管)から Folch 法で脂質を抽出し、コレステロール分画を精製、オキシステロールの定量を行った。当初、液体クロマトグラフ質量分析法 (LC-MS/MS) による高感度分析法の確立をめざしたが、十分な感度と回収率の再現性が得られなかった。このため、紫外吸収-高速液体クロマトグラフィー

(UV-HPLC) での定量を行った。HPLC による分離は逆相で行い、検出波長は 7 α -hydroxycholesterol および 7 β -hydroxycholesterol は 210 nm とし、7-ketocholesterol は 245 nm とした。19-hydroxycholesterol を内部標準として、これらを定量した。

(2) 大動脈粥状硬化病変における過酸化脂質

剖検で採取した腹部大動脈の粥状硬化病変および肉眼的に肥厚斑を認めない大動脈壁(正常血管)をホモジナイズし、そこから Folch 法で脂質を抽出、得られた脂質抽出物中のマロンジアルデヒドおよびヘキサノイルリジンに酵素標識免疫測定法 (ELISA) で定量した。

(3) 動脈硬化病変における過酸化脂質の免疫組織学的検討

剖検で腹部大動脈を採取し、粥状硬化病変部および肉眼的に肥厚斑を認めない動脈壁(正常血管)について、抗 7-ketocholesterol 抗体を用いた酵素抗体法による免疫染色を行い、オキシステロールの局在を検討した。また、同様に抗ヘキサノイルリジン抗体で免疫染色を行いその局在についても検討した。

(4) 飲酒マーカーとしてのヘキサノイルリジン

飲酒習慣が明らかで且つ死因に関係する内因性疾患がない剖検例を対象とし、心臓血から血清および赤血球膜を調整、ヘキサノイルリジンを ELISA で測定した。対象を飲酒習慣により三群 (A群: 飲まない、B群: 時々飲む、C群: ほぼ毎日飲む) に分け、血清および赤血球のヘキサノイルリジンの濃度を比較した。

(5) 寒冷環境における死亡のバイオマーカーの検索

剖検例を寒冷環境群 (凍死および冬季の屋外での溺死等)、高温環境群 (浴槽内での死亡、火災死等)、常温環境群の三群に分け、HE 染色、PAS 染色により病理学的所見を確認すると同時に、抗 heat shock protein 70 (HSP70) 抗体を用いた酵素抗体法による免疫染色を行い、その発現強度を検討した。さ

らに、HSP70 の発現箇所をより詳細に検討するため、糸球体上皮細胞 (podocyte) を特異的に染める抗 WT-1 抗体による免疫染色を合わせて行った。

4. 研究成果

(1) 大動脈粥状硬化病変におけるオキシステロール

腹部大動脈の粥状硬化病変部からは 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol, 27-hydroxycholesterol が検出された。一方、正常血管壁からは 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol は検出されなかった。粥状硬化病変部では 7-ketocholesterol, 27-hydroxycholesterol が正常部に比べ増加していた。病変部位でオキシステロールが増加していることは、同部への酸化ストレス負荷と脂質酸化の亢進を示唆する。

(2) 大動脈粥状硬化病変における過酸化脂質

粥状硬化病変ではマロンジアルデヒドおよびヘキサノイルリジンがともに増加していた。マロンジアルデヒドは脂質過酸化の最終産物、ヘキサノイルリジンは脂質過酸化の初期段階の生成物であると考えられている。オキシステロールの増加と合わせて、動脈硬化症の発症への酸化ストレスの関与が示唆された。

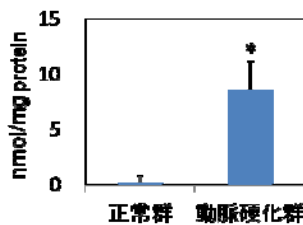


図1. 腹部大動脈中のマロンジアルデヒド. *P<0.05 vs 正常群

(3) 動脈硬化病変における過酸化脂質の免疫組織学的検討

腹部大動脈の粥状硬化病変部では、7-ketocholesterol は血管内膜に強く発現していた。肉眼的に肥厚斑のない正常動脈壁においても 7-ketocholesterol の発現は認められたが、その範囲は狭く、また発現強度も弱かった。ヘキサノイルリジンも 7-ketocholesterol と同様の傾向を示した。

動脈硬化病変部ではオキシステロールおよび脂質過酸化関連化合物が量的に増加していたが、これらは内膜に局在していることが明らかとなった。7-ketocholesterol および

ヘキサノイルリジンの発現部位は泡沫細胞の集簇部位と一致するので、大動脈粥状硬化病変で増加している 7-ketocholesterol をはじめとする脂質の酸化・過酸化物は低比重リポタンパク質中のコレステロール或いは脂質由来である可能性が考えられる。

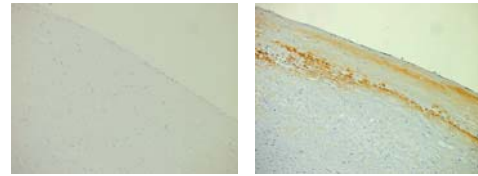


図2. 剖検で採取した腹部大動脈の抗 7-ketocholesterol 抗体による免疫染色 (x100) 左: 正常大動脈、右: 大動脈粥状硬化

(4) 飲酒マーカーとしてのヘキサノイルリジン

血清中ヘキサノイルリジンは三群間に統計的有意差を認めなかった。赤血球膜中ヘキサノイルリジンはA群に対してC群で有意に増加した。赤血球中ヘキサノイルリジンの増加は飲酒による酸化ストレスを反映していると考えられ、常習的飲酒のマーカーとなる可能性が示された。一方で、血清中ヘキサノイルリジン値は個体間でバラツキが大きかったが、その原因として死後経過時間等の飲酒習慣以外の要因が考えられた。

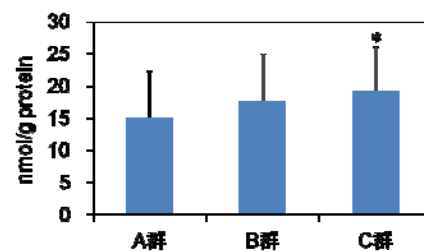


図3. 赤血球中のヘキサノイルリジン. A群: 飲まない、B群: 時々飲む、C群: ほぼ毎日飲む. *P<0.05 vs A群

(5) 寒冷環境における死亡のバイオマーカーの検索

HSP70 は糸球体上皮細胞に発現していた。また、寒冷環境群では上皮細胞の核が濃染される傾向が確認され、他の二群に比較し極めて高発現していることが明らかとなった。

これにより、HSP70 が寒冷環境での死亡を示すバイオマーカーとなる可能性が示唆

された。

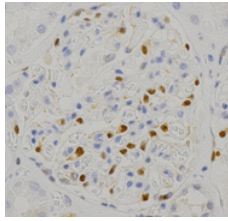


図 3. 凍死剖検事例の腎臓の抗 HSP70 抗体による免疫染色 (x 400)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ① Sakurada M, Asano M, Takahashi M, Kuse A, Morichika M, Nakagawa K, Kondo T, Ueno Y. Estimates of exposure to cold before death from immunohistochemical expression patterns of HSP70 in glomerular podocytes. Int J Legal Med, 査読有, published online: 18 December 2012. (DOI 10.1007/s00414-012-0806-3)

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 櫻田誠、浅野水辺、長崎靖、久世亜澄、森近舞、中川加奈子、近藤武史、高橋玄倫、上野易弘。腎糸球体における HSP70 発現と死亡時環境温度測定マーカーへの応用の試み。第 96 次日本法医学会学術全国集会，2012 年 6 月 9 日，アクトシティ浜松（浜松市）
- ② 浅野水辺、森近舞、近藤武史、高橋玄倫、久世亜澄、中川加奈子、上野易弘。剖検事例における血中ヘキサノイルリジンは飲酒習慣を反映するか。第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会，2012 年 6 月 7 日，あわぎんホール（徳島市）
- ③ 櫻田誠、浅野水辺、長崎靖、久世亜澄、中川加奈子、森近舞、近藤武史、谷野真理、上野易弘。免疫組織化学染色による入浴中急死に関する法医学的研究。第 94 次日本法医学会学術全国集会，2010 年 6 月 24 日，タワーホール船堀（東京都）

〔その他〕

ホームページ等

神戸大学大学院医学研究科法医学分野ホー

ムページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/legal/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 水辺 (Asano Migiwa)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90283879

(2) 研究分担者

上野 易弘 (Ueno Yasuhiro)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30184956