

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 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790599

研究課題名（和文）ストレスによる神経・内分泌・免疫系の変化に基づく虐待の診断及び期間推定法の確立

研究課題名（英文）Forensic diagnosis of abuse and determining the duration based on the changes of nervous・endocrine・immune systems by the stress

研究代表者

林 敬人 (HAYASHI TAKAHITO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：40512497

研究成果の概要（和文）：心理的虐待の動物モデルである長期拘束ストレスマウス及び小児虐待死剖検例において、視床下部－下垂体－副腎皮質系（HPA axis）の変動を解析した。動物実験、剖検例いずれも比較的短期間のストレスでは、糖質コルチコイドを産生するため副腎が肥大し、副腎内コレステロールが減少し、副腎へのコレステロール供給に関わる SR-BI, HMGR, HSL の副腎内の発現が増加していた。以上の結果から、副腎内分泌系の変動を解析することは小児虐待の法医病理学的診断及び虐待期間推定の指標となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined changes in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in a mouse restraint stress model of psychological abuse and in autopsy cases to determine a possible indicator for the diagnosis of child abuse. Both results of animal experiments and autopsy samples indicate that stress including abuse for relatively short periods causes adrenal hypertrophy due to the overproduction of glucocorticoids, decrease of adrenal cholesterol which is material for glucocorticoids, and increase of adrenal gene expression of SR-BI, HMGR and HSL that are related to cholesterol supply to the glands. Our results suggest that the analysis of the HPA axis may be useful for the diagnosis of child abuse and determining the duration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：児童虐待，長期拘束ストレス，視床下部－下垂体－副腎皮質系，糖質コルチコイド，副腎内コレステロール，副腎髓質系，法医病理学的診断

1. 研究開始当初の背景

小児に対する虐待は依然として社会問題であり、虐待防止法も施行されているが、今までのところ社会的対策は充分とはいえ、法医解剖においても虐待の終末像をた

び見せつけられている。ところで、小児虐待例で胸腺の退縮が見られることはよく知られている。胸腺の退縮は、ストレスに反応して副腎皮質から分泌される糖質コルチコイドが、胸腺のリンパ球をアポトーシスに導く

ために起こると考えられている。したがって、虐待による強いストレスが視床下部-下垂体-副腎皮質系 (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA axis) に影響を及ぼす可能性は充分考えられるが、現在までにその報告は少ない。最近われわれは、虐待期間が3ヶ月以内と比較的短期間の高齢者虐待例では、副腎重量の有意な増加と、病理組織学的に副腎皮質束状帯の細胞内コレステロール (糖質コルチコイドの材料) の減少を示す所見が認められることを報告した。その後さらに、副腎内コレステロール量が虐待期間により変動する可能性を示唆する所見を得た。したがって、虐待により HPA axis が影響を受け、さらに虐待期間による変動がみられることが強く示唆される。また、免疫学分野では最近、精神的ストレスにより脾臓の Th1/Th2 サイトカインの発現が変化することや、胸腺リンパ球のアポトーシスには interleukin-6, oncostatin M 等のサイトカインも関与することが報告され、虐待により免疫系にも変動がみられる可能性も充分考えられる。そこで、心理的虐待モデルとして長期拘束ストレスマウスを用い、ストレス下における HPA axis の変動、免疫系の変動、両者のクロストークの基礎的データを収集し、虐待剖検例への応用を試みることを着想するに至った。

2. 研究の目的

動物実験により、心理的虐待モデルとして長期拘束ストレスマウスを用いて長期ストレス下における HPA axis の動態解析、胸腺・脾臓などの免疫系臓器の細胞形態学的・機能的変化の解析、さらに神経・内分泌系、免疫系の応答に伴う各臓器の変化を種々のサイトカインの発現を中心に解析する。次いで、実際の虐待死解剖例についても同様の解析を行い、虐待ストレスによる各系の変化を明らかにする。それぞれの継時的な変化を検討し、各々を指標にした新たな法医病理学的虐待証明法と虐待期間推定法を確立するのが本研究の目的である。

さらに、得られた成果を臨床分野でも被虐待児の早期発見につながる指標として応用できるようにすることで、ひいては虐待被害者を減らすことが本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

(1) 長期拘束ストレスマウスにおける副腎内分泌系の変化について

7週齢の雄性 Balb/c マウスを用い、無麻酔下で空気穴を開けた 50ml フェルコンチューブ内に1日1回1時間入れる拘束ストレスを1日のみ、1, 2, 3, 4週間連続する5群 (各群 n=8) 用意する。最後の拘束処置終了後、1時間後に屠殺し、血清・副腎を採取した。各群の血清 ACTH 値、コルチコステロン値、

コルチゾール値を EIA 法にて測定した。副腎は、ホルマリン固定後に 1% Triton X-100 含有クロロホルム溶媒内にて副腎内コレステロールを抽出し、その量を EIA 法にて測定した。また、もう一側の副腎は、RNA を抽出し、Real-time PCR 法にて、副腎におけるコレステロール供給に関わる各種遺伝子 (Scavenger receptor-class B type I (SR-BI), Low density lipoprotein receptor (LDLR), HMG-CoA reductase (HMGR) 並びに、Hormone-sensitive lipase (HSL)) 発現及びクロモグラニン A (CgA) 遺伝子発現を検索した。

(2) 小児虐待死例における副腎内分泌系の変化について

剖検にて虐待と診断された 12 例 (入院後死亡例を除く) 及び対照 12 例を試料として、副腎重量 (体重, 身長, BMI で補正), 副腎内コレステロール量を測定した。また、副腎のホルマリン固定後パラフィン包埋切片において、画像解析ソフト Scion Image を用いて副腎皮質束状帯の細胞明度を数値化して評価した。さらに、副腎切片について抗 SR-BI 抗体, 抗 CgA 抗体をそれぞれ一次抗体として免疫染色を施し、陽性スコア (染色強度と陽性割合で算出) により発現程度を検討した。

4. 研究成果

(1) 長期拘束ストレスマウスにおける副腎内分泌系の変化についての結果

副腎重量は拘束処置 1, 2 週間群で対照と比べ有意に高値を示した。血清 ACTH は 1 日目をピークに以後は次第に減少し、3 週間群まで対照と比べ有意に高値を示した。血清コルチコステロン (図 1), コルチゾールはいずれも ACTH と同様に 1 日目をピークに以後は次第に減少し、それぞれ 2, 3 週間群まで対照と比べ有意に高値を示した。一方、副腎内コレステロール量は、糖質コルチコイドの変動と逆の傾向を示し、1 週間群では対照と比べ有意に低値を示し、4 週間群では高値を示した (図 2)。

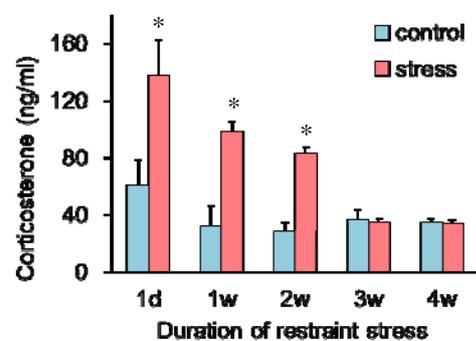


図 1. 各拘束期間後の血清コルチコステロン値, * $p < 0.05$ vs. control.

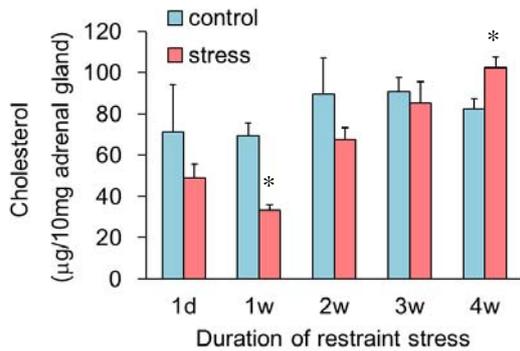


図 2. 各拘束期間後の副腎内コレステロール値, * $p < 0.05$ vs. control.

また、副腎における HDL 取り込み受容体である SR-BI 遺伝子発現は、1 日目から 2 週間群まで対照と比べ有意に増加していたが (図 3), LDL 取り込み受容体である LDLR 発現は拘束処置により変動は見られなかった。細胞内でのコレステロール生合成系の律速酵素である HMGCR 発現は、1 週間群をピークに、1 日目から 3 週間群まで対照と比べ有意に増加していた。細胞内のコレステロールエステル分解酵素である HSL 発現は、1 日目、1, 4 週間群で対照と比べ有意に増加していた。さらに、副腎髄質からアドレナリンと共分泌される CgA 発現は、1 日目から 2 週間群まで有意に増加し、3, 4 週間群では逆に低値を示した (図 4)。

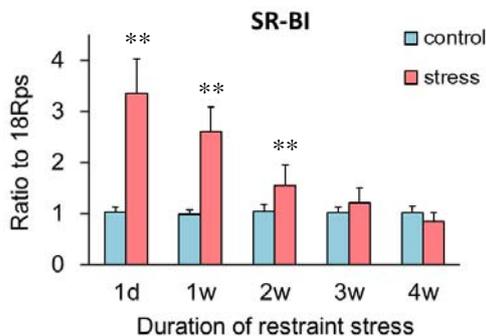


図 3. 各拘束期間後の副腎内 SR-BI 遺伝子発現, ** $p < 0.01$ vs. control.

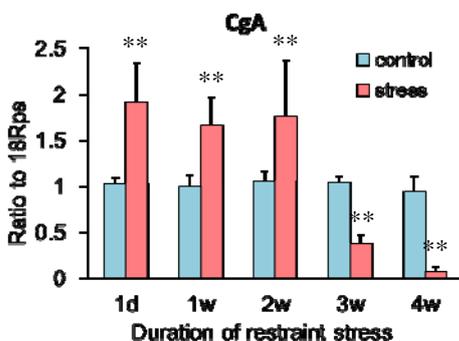


図 4. 各拘束期間後の副腎内 CgA 遺伝子発現, ** $p < 0.01$ vs. control.

(2) 小児虐待死例における副腎内分泌系の変化についての結果

副腎重量は体重、身長、BMI のいずれで補正した場合も対照例に比べ虐待死例で有意に高値を示し、副腎内コレステロール量は逆に虐待死例で有意に低値を示した。細胞明度は、副腎内コレステロール量と強く相関し ($p < 0.001$; 相関係数 0.787), 虐待死例で有意に低値を示した。SR-BI, CgA 発現は有意な差を認めなかった。そこで、虐待期間が判明した 6 例について虐待期間別に検討すると、数週間から 2 ヶ月の例では副腎重量は有意に高値を示し、コレステロール量及び細胞明度は有意に低値を示し、SR-RI 発現は有意に高値 (図 5) を示した。一方、CgA 発現は虐待期間が数ヶ月以上の例で有意に低値を示した。

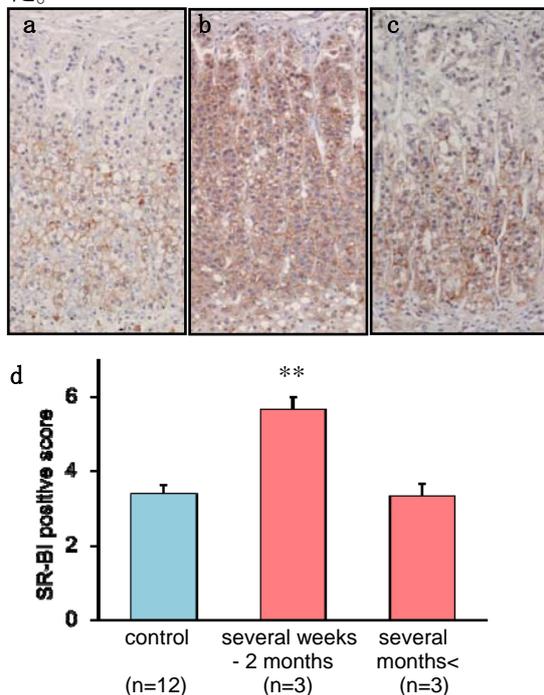


図 5. a-c) SR-BI の免疫染色像。(a) 対照例, (b) 虐待期間が数週間の例, (c) 虐待期間が数ヶ月の例。原倍率, $\times 50$ 。d) SR-BI 陽性スコア, ** $p < 0.01$ vs. control.

(3) 動物実験と剖検例のまとめ

動物実験の結果から、3 週間までの拘束ストレスでは、副腎皮質系の反応によって、血中糖質コルチコイドは上昇し、その材料である副腎内コレステロールは減少、コレステロールの供給に関わる SR-BI, HMGCR, HSL 遺伝子発現はいずれも増加した。また、2 週間までの拘束ストレスでは、副腎髄質系の反応によって CgA が上昇していた。したがって、副腎皮質系、副腎髄質系を含めた副腎内分泌系の変動を検索することで、ストレス暴露の証明と拘束期間推定のための指標となり得ることが示唆された。剖検例では、動物実験の

結果と同様に、虐待期間が数週間から2ヶ月の比較的短期間の例では、副腎重量が増し、コルチゾールを過剰に産生するために、その材料である副腎内コレステロールが減少し、副腎内SR-BI発現が増加していた。また、虐待期間が数ヶ月以上の長期間の例では、副腎内CgA発現が抑制されていた。したがって、副腎内分泌系の変化は虐待の法医病理学的証明並びに虐待期間推定のための指標の一つとなり得るものと考えられる。

本研究によって、虐待ストレスに基づく内分泌系の変化が明らかとなり、臨床分野においても虐待の証明法、ひいては治療法に応用できる可能性を秘めた有意義な結果が得られたものと考えられる。さらには、虐待予防の必要性を訴える有用な基礎的資料が得られ、社会に対しても価値ある研究成果といえる。

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2件)

- ① Hayashi T, Bunai Y, Ago K, Ago M, Ogata M. Thymus and adrenal glands in elder abuse. *Am J Forensic Med Pathol*, 査読有, 32, 2011, 368-371.
- ② Hayashi T, Ago K, Ago M, Yamanouchi H, Bunai Y, Ogata M. The infiltration of 'primed' neutrophils into multiple organs due to physical abuse to the elderly: An immunohistochemical study. *Forensic Sci Int*, 査読有, 202, 2010, 17-25.

[学会発表] (計6件)

- ① Hayashi T, Ikematsu K, Ihama Y, Ago K, Ago M, Miyazaki T, Nakasono I, Ogata M. Child abuse induces changes in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. 8th International Symposium Advances in Legal Medicine (8th ISALM). 27. September, 2011, Frankfurt.
- ② 久保秀通, 林 敬人, 吾郷一利, 吾郷美保子, 金蔵拓郎, 小片 守. Estimation of burn wound age on the expression of genes related to wound healing. 第95次日本法医学会学術全国集会. 2011年6月17日, 福島.
- ③ 林 敬人, 井濱容子, 久保秀通, 吾郷一利, 吾郷美保子, 宮崎哲次, 池松和哉, 安倍優樹, 中園一郎, 小片 守. 副腎糖質コルチコイド系の変化に基づく虐待の法医病理学的証明と虐待期間推定. 第95次日本法医学会学術全国集会. 2011年6月16日, 福島.
- ④ 林 敬人, 吾郷一利, 吾郷美保子, 山内

春夫, 武内康雄, 小片 守. 高齢者虐待死例の諸臓器への好中球浸潤の検討と虐待診断への応用. 第32回日本法医学会学術中部地方集会. 2010年10月23日, 富山.

- ⑤ 林 敬人, 井濱容子, 久保秀通, 吾郷一利, 吾郷美保子, 宮崎哲次, 池松和哉, 安倍優樹, 中園一郎, 小片 守. 小児虐待死例における副腎糖質コルチコイド系の変化. 第60回日本法医学会学術九州地方集会. 2010年10月16日, 福岡.
- ⑥ 久保秀通, 林 敬人, 吾郷一利, 吾郷美保子, 金蔵拓郎, 小片 守. 熱傷モデルマウスを用いた熱傷受傷後の経過時間推定の試み. 第60回日本法医学会学術九州地方集会. 2010年10月16日, 福岡.
- ⑦ 林 敬人, 池松和哉, 吾郷一利, 吾郷美保子, 中園一郎, 小片 守. 拘束ストレスに基づく臓器変化の検討～副腎皮質内分泌系の経時的解析を中心として～. 第94次日本法医学会学術全国集会. 2010年6月25日, 東京.

[その他]

ホームページ:

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~legalmed/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 敬人 (HAYASHI TAKAHITO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号: 40512497