

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460872

研究課題名(和文) 小児・高齢者への虐待に基づく好中球浸潤による臓器障害の解明と法医診断学的応用

研究課題名(英文) Pathophysiology of the neutrophil infiltrations into multiple organs due to physical abuse, and development of postmortem diagnostic methods for the physical abuse

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者及び小児の身体的虐待死でみられた各臓器，特に肺への好中球浸潤は虐待ストレス等に基づく肺胞マクロファージからのHMGB1放出を発端として，HMGB1-TLR4-NF- κ Bシグナルを介して肺胞マクロファージから好中球遊走因子IL-8が誘導されることで生じることを免疫組織学的手法を用いて証明した。また，好中球だけではなく，肺胞マクロファージもMMP9，iNOS等の組織障害因子を産生することで，直接的に組織障害を促進する可能性が示唆された。以上の検討によって，虐待から好中球浸潤を経て臓器障害に至るまでの全容がほぼ明らかとなり，より正確な虐待の法医病理学的証明法の確立に向けて大きく前進した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated immunohistochemically that neutrophil infiltrations into multiple organs, particularly into the lungs obtained from abused elderly and child autopsy cases are induced by HMGB1-TLR4-NF- κ B signals in the resident alveolar macrophages. In those cases, alveolar macrophages in addition to infiltrated neutrophils can also release inflammatory mediators such as MMP9 and iNOS, resulting in the tissue injury. We could elucidate the pathophysiology of the neutrophil infiltrations into multiple organs due to physical abuse, and it may be useful as a new complementary diagnostic indicator of physical abuse.

研究分野：法医学

キーワード：社会医学 身体的虐待 好中球浸潤 肺胞マクロファージ HMGB1 TLR4 NF- κ B MMPs

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児・高齢者・障害者に対する虐待防止法が施行されているにもかかわらず、現状では各虐待例とも増加の一途をたどり、法医解剖でも虐待の終末像をたびたび見せつけられている。われわれは解剖時に虐待行為を見逃さないための診断法の開発と各臓器への悪影響の解明を試みてきた。まず、1991年に小児の身体的虐待に基づく広範な皮下出血に由来するヘモグロビンが腎臓の尿細管細胞内に沈着することを証明した [文献①]。また、1994年から虐待を含めた頭部外傷に基づく軸索、膠細胞などの早期変化を検討し、受傷後の経過時間推定法を報告してきた [文献②]。さらに最近われわれは、虐待ストレスに対する副腎皮質系の反応による糖質コルチコイドの分泌促進と副腎肥大、材料である副腎内コレステロールの減少などを高齢者虐待剖検例 [文献③] や動物実験 [文献④] で明らかにしている。さらにまた、皮膚熱傷の経時的变化を動物実験で検討し、児童虐待にみられる新旧熱傷の形成時期判定法を検討している [文献⑤, ⑥]。加えて、高齢者 [文献⑦] や小児 [投稿中] の身体的虐待例では、広範かつ繰り返す外傷によって好中球遊走因子 interleukin (IL)-8 が産生され、次いで血管内皮細胞上の接着因子 P-selectin の発現が増加して各臓器に好中球浸潤が招来されることを各々のマーカーを用いて明らかにしてきた。

(2) われわれの検討のほかには、1990年最初に胸腺の退縮やユビキチンの臓器内発現が報告されたが、近年では小児虐待が各臓器に及ぼす変化に関する報告は海外を含めても少ない。高齢者に対する虐待を対象とした報告はさらに少ない。ましてや、虐待と好中球侵襲との関連を検討した研究や虐待を細胞分子レベルで検討した試みはほとんどない。

2. 研究の目的

前記のごとくこれまでわれわれは、身体的虐待による広範な外傷が炎症性メディエーターを動員し、多臓器に好中球が浸潤・侵襲することを報告してきた。今回さらに、虐待から好中球侵襲を経て臓器障害に至るまでの全容を検討する研究を企画した。すなわち身体的虐待死剖検例の各臓器において、好中球浸潤の前段階に関与するとされている damage-associated molecular patterns (DAMPs) 等の因子から、好中球が産生する matrix metalloproteinases (MMPs) 等の組織障害因子までの発現 (図 1) を総合的に解析して、法医実務に耐えうるより正確な法医病理学的虐待証明法や虐待期間推定法を確立するのが本研究の目的である。

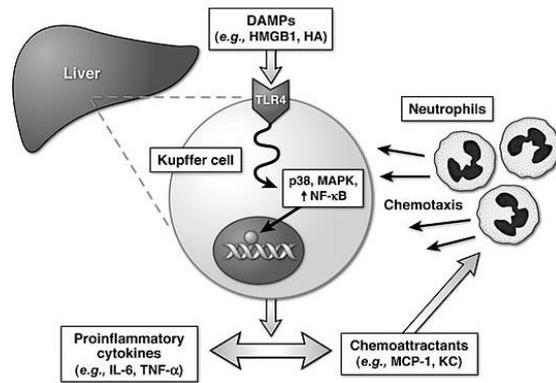


図 1. 外傷性ショック及び出血性ショックにおける臓器への好中球侵襲のメカニズム

(McGhan et al. *Injury, Int J Care Injured* 2012;43:129-136)

3. 研究の方法

(1) 研究試料

高齢者の身体的虐待死 11 例 (65 歳以上, 平均 77.5 歳, 男性 4・女性 7), 対照例 (鋭器損傷死, 単独の鈍器損傷死, 多発外傷死各 6 例) (65 歳以上, 平均 76.0 歳, 男性 10・女性 8) を研究対象とした。身体的虐待の程度は, Lund-Browder の公式を使用した体表面積に占める総損傷面積, 並びに Injury Severity Score (ISS) を算出することで評価した。なお, 本研究は所属機関の疫学研究等倫理審査委員会の承認を得て行った。

(2) 免疫組織学的検討

各事例から得たホルマリン固定後パラフィン包埋肺切片を試料として, DAMPs の 1 つである high-mobility group box1 (HMGB1), その受容体である Toll-like receptor (TLR) 4, 核内転写因子の 1 つである NF-κB, 炎症細胞が産生する組織障害因子の 1 つである MMPs (MMP2, 9), さらに炎症細胞が産生し, 炎症促進及び炎症抑制の両作用を併せ持つ分子である inducible nitric oxide synthase (iNOS) の各発現を免疫組織化学染色によって検討し, 身体的虐待死群と対照群の両群で比較した。また, 身体的虐待死群では, 各発現と損傷面積, ISS 並びに虐待期間との関係についても検討した。さらに, 蛍光二重免疫染色法によって MMPs 発現細胞の同定を行った。

(3) アポトーシス解析

各肺切片を試料として, TUNEL (TdT-mediated dUTP nick and labeling) 法を用いてアポトーシス細胞を計測し, 身体的虐待死群と対照群の両群で比較した。

4. 研究成果

(1) HMGB1-TLR4-NF-kB 発現について

肺において HMGB1 は肺泡マクロファージで発現が認められた。身体的虐待死群では HMGB1 の核から細胞質への移行が対照群と比較して有意に多く認められ (図 2), 身体的虐待死群では HMGB1 が細胞外に放出され, 炎症反応の惹起に關与した可能性が示唆された。また, HMGB1 の受容体の 1 つである TLR4 発現も肺泡マクロファージで認められ, その陽性率は身体的虐待死群では対照群と比較して有意に高値を示した。したがって, 肺泡マクロファージから放出された HMGB1 は TLR4 を介して肺泡マクロファージにオートクライン・パラクライン的に作用する可能性が示唆された。さらに, HMGB1-TLR4 シグナルを核内に伝達し, 好中球遊走因子 IL-8 や組織障害因子 MMPs 等の転写を促進する因子である NF-kB の発現を検討したところ, 肺泡マクロファージにおいて発現が認められ, その陽性率はやはり身体的虐待死群では対照群と比較して有意に高値を示した。なお, 身体的虐待死群における肺泡マクロファージでの HMGB1 の核から細胞質への移行率は損傷面積, 虐待期間の長さとの間には有意な相関関係は認められなかったが, ISS との間には有意な正の相関関係が認められた。

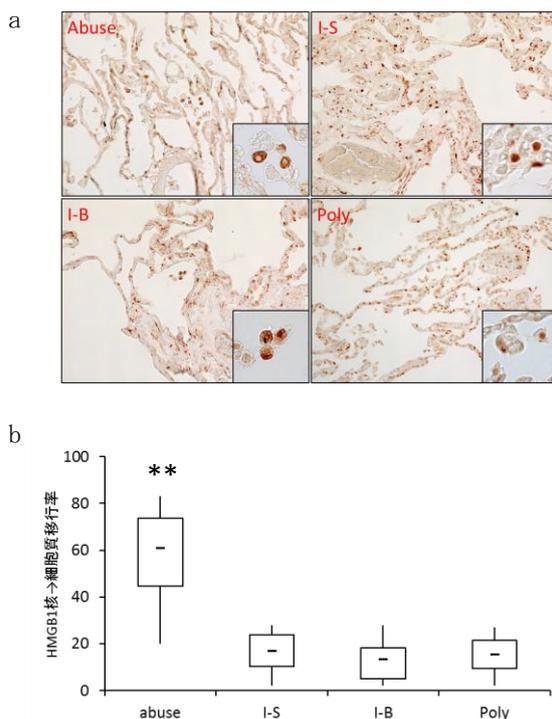


図 2. a) 各群の HMGB1 免疫染色像。原倍率, $\times 100$ (枠内は $\times 400$)。Abuse, 身体的虐待死; I-S, 鋭器損傷死; I-B, 単独の鈍器損傷死; Poly, 多発外傷死。b) 各群の HMGB1 の核から細胞質への移行率の比較。** $p < 0.01$

(2) 組織障害因子 MMPs, 炎症促進・抑制因子 iNOS 発現について

炎症時に産生され基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンを切断し, 組織破壊に導く酵素の 1 つである MMP2 及び MMP9 発現につい

て検討したところ, MMP2 は浸潤する好中球において認められ, その陽性細胞数は身体的虐待死群では対照群と比較して有意に高値を示した。一方, MMP9 は肺泡マクロファージにおいて認められ (図 3), 肺泡マクロファージにおける陽性率は, 身体的虐待死群では対照群と比較して有意に高値を示した。また, MMP2, MMP9 いずれも損傷面積, 虐待期間の長さとの間には有意な相関関係は認められなかったが, ISS との間には有意な正の相関関係が認められた。

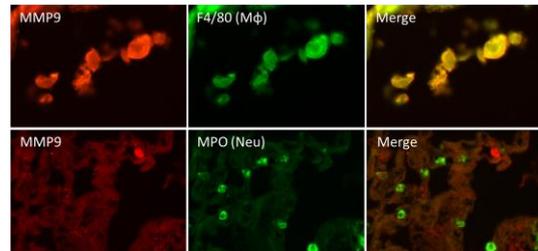


図 3. MMP9 発現細胞の同定 (蛍光二重免疫染色像)。左から 3 列目は 1 列目と 2 列目のマージ画像。

さらに, 炎症時に産生され血管拡張による炎症促進並びに炎症細胞のアポトーシス誘導による炎症抑制の両作用を併せ持つ分子である iNOS 発現について検討したところ, iNOS は肺泡マクロファージにおいて発現が認められ, 陽性率は身体的虐待死群では対照群と比較して有意に高値を示した (図 4)。iNOS 発現と損傷面積, 虐待期間の長さ, ISS との間にはいずれも有意な相関関係は認められなかった。

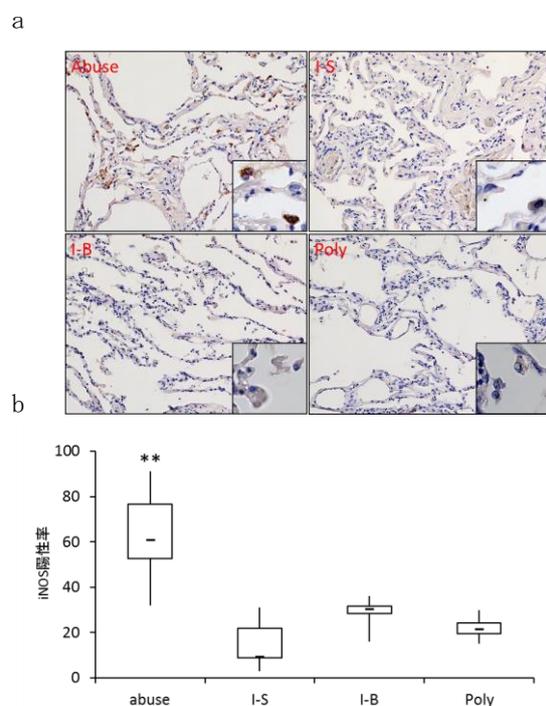
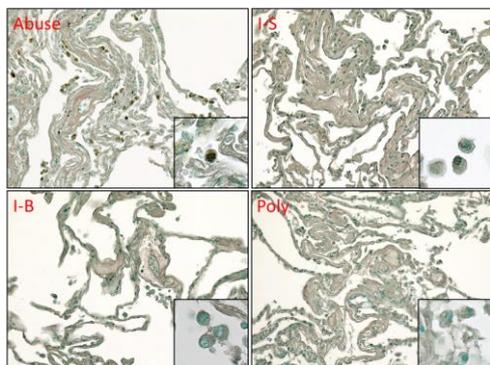


図 4. a) 各群の iNOS 免疫染色像。原倍率, $\times 100$ (枠内は $\times 400$)。Abuse, 身体的虐待死; I-S, 鋭器損傷死; I-B, 単独の鈍器損傷死; Poly, 多発外傷死。b) 各群の iNOS 陽性率の比較。** $p < 0.01$

(3) アポトーシス解析

TUNEL 法を用いて肺におけるアポトーシス細胞数を計測したところ、身体的虐待死群ではアポトーシスに陥った肺胞マクロファージ数が対照群と比較して有意に多く認められた(図5)。また、アポトーシス細胞率と損傷面積、虐待期間の長さ、ISS との間にはいずれも有意な相関関係は認められなかった。

a



b

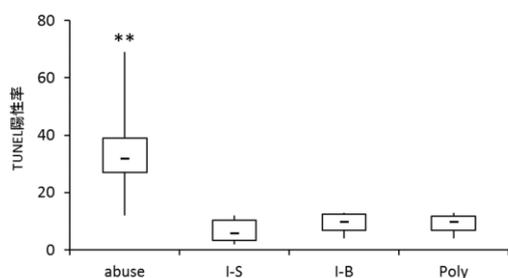


図5. a)各群のTUNEL法染色像。原倍率、×100(枠内は×400)。Abuse, 身体的虐待死; I-S, 鋭器損傷死; I-B, 単独の鈍器損傷死; Poly, 多発外傷死。b)各群のアポトーシス細胞率の比較。** $p < 0.01$

(4) 結論

われわれがこれまで報告してきた高齢者及び小児の身体的虐待死でみられた各臓器、特に肺への好中球浸潤は虐待ストレス等に基づく肺胞マクロファージからのHMGB1放出を発端として、HMGB1-TLR4-NF- κ Bシグナルを介して肺胞マクロファージから好中球遊走因子IL-8が誘導されることで生じることが明らかとなった。また、浸潤してきた好中球が産生する好中球エラスターゼやMMP2だけではなく、同シグナルを介して肺胞マクロファージ自身もMMP9やiNOSを産生することで、好中球と共に直接的に組織障害を促進する可能性が示唆された。以上の検討によって、虐待から好中球侵襲を経て臓器障害に至るまでの全容がほぼ明らかとなり、より正確な虐待の法医病理学的証明法の確立に向けて大きく前進したと考える。

<引用文献>

- ① Ogata M et al. Jpn J Legal Med 1991;45:201-204.
- ② Ogata M. Legal Med 2007;9:105-108.

- ③ Hayashi T, Ogata M et al. Am J Forensic Med Pathol 2011;32:368-371.
- ④ Hayashi T, Ogata M et al. Legal Med 2014;16(4):193-196.
- ⑤ Kubo H, Hayashi T, Ogata M et al. Legal Med 2014;16(1):8-13.
- ⑥ Kubo H, Hayashi T, Ogata M et al. Legal Med 2014;16(3):128-134.
- ⑦ Hayashi T, Ogata M et al. Forensic Sci Int 2010;202:17-25.

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5件)

- ① 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. doi:10.1016/j.forsciint.2016.03.055.
- ② Hayashi T, Ago K, Nakamae T, Higo E, Ogata M. Two different immunostaining patterns of beta-amyloid precursor protein (APP) may distinguish traumatic from non-traumatic axonal injury. Int J Legal Med, 査読有, 2015;129(5):1085-1090. doi: 10.1007/s00414-015-1245-8.
- ③ Hayashi T, Ikematsu K, Abe Y, Ihama Y, Ago K, Ago M, Miyazaki T, Ogata M. Temporal changes of the adrenal endocrine system in a restraint stressed mouse and possibility of postmortem indicators of prolonged psychological stress. Legal Med, 査読有, 2014;16(4):193-196. doi:10.1016/j.legalmed.2014.03.005.
- ④ Kubo H, Hayashi T, Ago K, Ago M, Kanekura T, Ogata M. Forensic diagnosis of ante- and postmortem burn based on aquaporin-3 gene expression in the skin. Legal Med, 査読有, 2014;16(3):128-134. doi: 10.1016/j.legalmed.2014.01.008.
- ⑤ Kubo H, Hayashi T, Ago K, Ago M, Kanekura T, Ogata M. Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. Legal Med, 査読有, 2014;16(1):8-13. doi: 10.1016/j.legalmed.2013.10.002.

[学会発表] (計10件)

- ① 林 敬人, 吾郷一利, 中前琢磨, 肥後恵理, 小片 守. 小児虐待死が疑われる事例における軸索損傷の検索-死亡事例からの法医学的アプローチ. 日本子ども虐待防止学会第21回学術集会にいがた大会. 2015年11月20日. 朱鷺メッセ(新潟県新潟市).
- ② 林 敬人, 肥後恵理, 吾郷一利, 中前琢磨, 小片 守. β -アミロイド前駆体タンパク質(APP)の免疫染色パターンに基づく外

傷性・非外傷性軸索損傷の鑑別法. 第 65 回日本法医学会学術九州地方集会. 2015 年 10 月 16 日. 宮崎県医師会館 (宮崎県宮崎市).

③ 林 敬人, 小片 守. 2014 年における鹿児島県の入浴死例の疫学的調査. 第 80 回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会. 2015 年 6 月 20, 21 日. 軽井沢プリンスホテル・ウエスト (長野県北佐久郡).

④ 林 敬人, 小片 守. 入浴死の死因解明－肺 aquaporin, heat shock protein 等の発現変化を指標として. 第 80 回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会. 2015 年 6 月 20, 21 日. 軽井沢プリンスホテル・ウエスト (長野県北佐久郡).

⑤ 林 敬人, 吾郷一利, 中前琢磨, 小片 守. 入浴死の死因解明－肺 aquaporin (AQP), heat shock protein (HSP) 70 の発現を指標として－. 第 99 次日本法医学会学術全国集会. 2015 年 6 月 11, 12 日. 高知市文化プラザかるぼーと (高知県高知市).

⑥ 林 敬人, 吾郷一利, 中前琢磨, 小片 守. 入浴死解明－肺 heat shock protein 70 等の発現を指標とした溺死と虚血性心疾患の鑑別－. 第 64 回日本法医学会学術九州地方集会. 2014 年 10 月 10, 11 日. 鹿児島県市町村自治会館 (鹿児島県鹿児島市).

⑦ 小片 守. 児童虐待の法医学診断と臨床への応用－虐待が各臓器に及ぼす障害を中心として－. 第 28 回鹿児島県小児保健学会. 2014 年 8 月 17 日. 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市).

⑧ Hayashi T, Ago K, Higo E, Ogata M. Immunohistochemical detection of interleukin (IL)-8 in cases of blunt head injury: its application as a diagnostic marker of axonal injury and time of injury determination. The 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM). 2014 年 6 月 16-20 日. 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).

⑨ 小片 守. 虐待に基づく臓器障害の検討と法医学診断への応用. 第 98 次日本法医学会学術全国集会. 2014 年 6 月 19 日. 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).

⑩ Hayashi T, Ogata M. Bath-related deaths in Kagoshima, Japan from 2006 to 2013: Differences in epidemiological factors between locations where the death occurred. 39th World Congress of International Society of Medical Hydrology and Climatology. 2014 年 5 月 11-14 日. 国立京都国際会館 (京都府京都市).

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

林 敬人 (HAYASHI TAKAHITO)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師
研究者番号: 40512497