

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08878

研究課題名(和文) 入浴死の病態と死因の解明：各臓器のアクアポリン，熱ショック蛋白の発現を指標として

研究課題名(英文) Investigation of pathophysiology of bath-related death: base on aquaporin and heat shock protein expressions

研究代表者

林 敬人 (HAYASHI, Takahito)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：40512497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：社会問題となっている入浴死の病態解明を目指して，温水溺死モデル及び剖検例の臓器を試料とした検討を行った。動物実験では，35及び38℃の温水溺死群では肺の水チャネルaquaporin(AQP)5 mRNA発現が低下し，38及び41℃の温水溺死群では熱ショック蛋白heat shock protein(HSP)70-5をコードするHSPa5 mRNA発現が上昇していた。実際の剖検例でも入浴中溺死例では肺のAQP5の発現が低下し，HSP70発現が上昇することを免疫組織学的に明らかにした。以上の結果から，AQP5及びHSP70発現の変動は，入浴中溺死の法医学的診断の有用な指標となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of clarifying pathophysiology of bath-related death, we next explored novel diagnostic marker of bathtub drowning using lungs obtained from animal experiment and forensic autopsy cases. In animal experiments, alveolar water channel, aquaporin(AQP)5 mRNA expression in hot water drowning mice (35, 38℃) was reduced significantly. Moreover, heat shock protein(HSP)a5 mRNA (HSP70 family) expression in hot water drowning mice (38, 41℃) was increased significantly. In forensic autopsy cases, we demonstrated a significant decrease in the expression of AQP5 and a significant increase in heat HSP70 expression in the lungs of bathtub-drowning using immunohistochemical analyses. Our results indicate that AQP5 and HSPa5 expression may be useful markers for the postmortem diagnosis of hot water drowning. We hope that our results can contribute to the advance of determining the cause of death in bath-related death and the prevention of these tragic deaths.

研究分野：法医学

キーワード：入浴死 法医学的死因診断 鑑別診断 アクアポリン 熱ショック蛋白 予防医学 社会問題

### 1. 研究開始当初の背景

わが国では、独特な入浴様式のため浴室内突然死（いわゆる、入浴死）が諸外国に比べて圧倒的に多く、特に高齢者に多く発生しているため、近年の高齢化社会を背景に年々増加傾向にあり、社会問題となっている。われわれはこれまで継続的に鹿児島県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 190 例前後もの入浴死が発生しているため、積極的な予防対策の必要性があることを報告してきた [1, 2]。入浴死解剖例の死因は、虚血性心疾患、脳血管障害、溺死が 3 大原因となっているが、死亡に至る病態は充分解明されていない。また、入浴中の虚血性心疾患などの発症が原因で水没し、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病因が絡み合っていることも少なくない。熱中症が溺死の原因と考える説もある。一方、溺死は一般にプランクトン検査にて肝臓、腎臓などの大循環系臓器から珪藻類が検出されることで確定診断されるが、浴槽内の水には通常、珪藻類が存在しないため、溺死の確定診断は困難な場合が大部分である。

ところで、われわれはこれまで淡水で溺死した場合には、肺における水輸送蛋白アキュアポリン(AQP)5 の発現が低下していることを見出した [3]。これは、AQP5 を通って肺胞上皮細胞から血管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 (図 1) 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と考えた。一方、AQP1 のように、全身の血管に存在し臓器浮腫 (水腫) に関与する AQP は心原性肺水腫の場合に発現が変化して入浴死における溺死と虚血性心疾患との鑑別にも応用できる可能性も考えられる。さらに、浴槽内の水は温水であるため熱ストレス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。そこで今回、動物実験並びに実際の剖検例の肺など各臓器における AQP s、HSP s の発現を検討する研究を企画した。

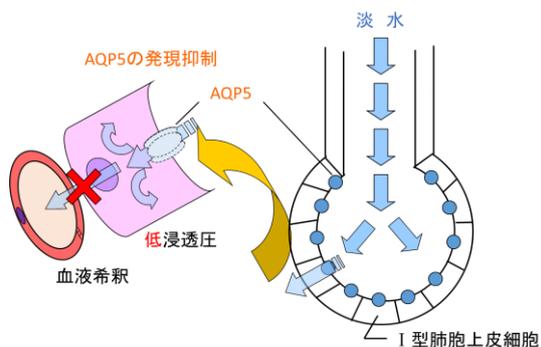


図 1. 淡水溺死における肺の AQP5 発現抑制機序 (仮説)

### 2. 研究の目的

本研究は、まず既報 [3, 4] の溺死モデルマウスを使用した動物実験によって、温水吸

引に基づいて肺など各臓器の AQP s や HSP s の発現に変化が生じるか否かについて検討し、さらに動物実験の結果に基づいて実際の入浴死剖検例の各臓器におけるそれらの分子の発現変化を検討することで、浴槽内溺死、すなわち温水吸引による溺死に特異的な病態を解明するとともに、法医実務に応用可能な確定診断法を開発することを目的とする。さらに、上述のように虚血性心疾患発症で発現変化が起こると推測される種類の AQP 並びに熱中症の病態に関与する可能性がある HSP s の発現変化についても検討し、入浴死における溺死と虚血性心疾患あるいは熱中症のそれぞれの鑑別診断法の開発を試みることで、入浴死の病態の解明と鑑別診断法を確立することを最終目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 温水溺死モデルを用いた入浴中溺死診断マーカーの解析

8 週齢の雄性 Balb/c マウスを 35, 38, 41°C 各温度に熱したホットプレート上に置き、直腸温が各温度に達した時点で、対照群は頸椎脱臼により安楽死させ、溺死群は各温度の蒸留水 30ml/kg を気管内に直接注入して溺死させた (図 2)。死亡 30 分後に肺を摘出し、肺における AQP s (AQP1, AQP5) 及び HSP s (HSP70 をコードする HSPa1a, HSPa5) mRNA 発現の変動を real-time PCR 法にて検討した。

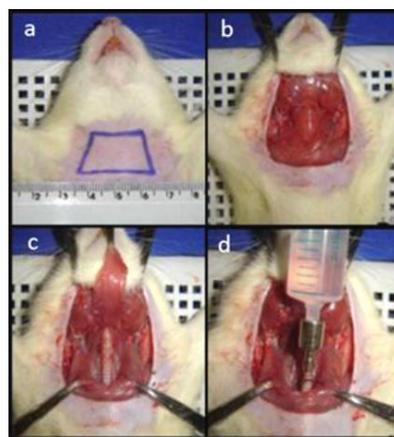


図 2. 温水溺死モデル作製方法 [3]. (a) 皮膚切開のためのマーキング, (b) 皮膚切開, (c) 気管の露出, (d) 水の注入

(2) 剖検試料を用いた入浴中溺死診断マーカーの解析

当分野内で解剖された事例のうち、死後 72 時間以内の入浴死 12 例 (原因不明の溺死 8 例, 虚血性心疾患による溺死 2 例, 溺死所見のない虚血性心疾患 2 例), 淡水 (河川) 溺死 9 例, 海水溺死 11 例, 入浴中ではない虚血性心疾患による死亡 8 例のホルマリン固定後パラフィン包埋肺切片を用いて、AQP s (AQP1, AQP5) 及び HSP70 に対する免疫染色を行い、各群で陽性率を比較した。

#### 4. 研究成果

(1) 温水溺死モデルを用いた入浴中溺死診断マーカーの解析

AQP1 mRNA 発現は、いずれの温度においても溺死群、対照群の間で有意な差は認められなかった。一方、AQP5 mRNA 発現は、35℃及び38℃溺死群で、各対照群に比べ有意に低値を示した。41℃では両群に有意な差はみられなかった (図3)。41℃溺死群で AQP5 mRNA 発現が低下しない原因としては、高温による AQP5 転写抑制の障害、あるいは逆に高温による AQP5 転写促進の可能性が考えられた。

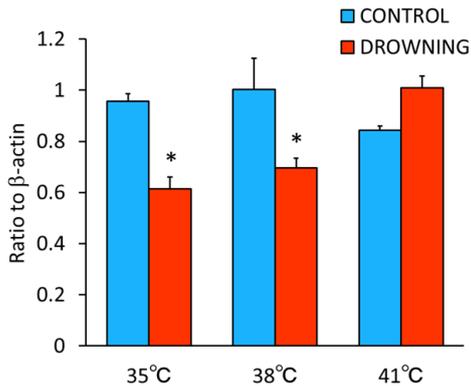


図3. 各温度での AQP5 mRNA 発現。  
\* $p < 0.05$ , vs. 対照群

HSPa1a mRNA 発現は、いずれの温度も溺死群で著明に高値を示した。しかしながら、対照群でも 38℃、41℃では有意な発現上昇が認められた。一方、HSPa5 mRNA 発現は、対照群では発現上昇はみられず、38℃、41℃の溺死群でのみ有意な発現上昇がみられた (図4)。

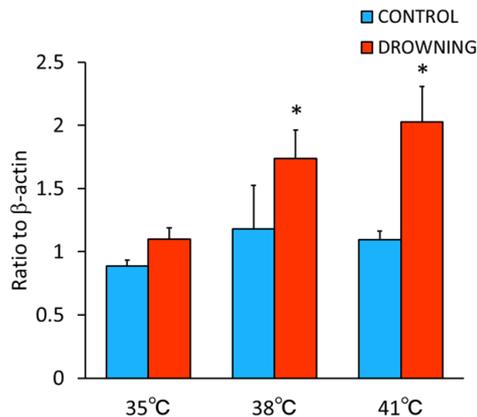


図4. 各温度での HSPa5 mRNA 発現。  
\* $p < 0.05$ , vs. 対照群

HSPa1a がコードする HSP70-1a は細胞質、核、リソソームといった細胞内の複数箇所に存在し、熱に限らず、低酸素、酸化ストレスなど様々な刺激に反応して、非特異的に発現が誘導される [5]。一方、HSPa5 がコードする HSP70-5 は小胞体にも存在し、小胞体ストレスのみに反応して発現が誘導される [5]。したがって、HSPa1a は溺死群、対照群いずれも単に身体を加温することで肺内の温度が上昇し、発現が誘導されたと考えられる。一

方、HSPa5 は対照群のように身体を加温だけでは発現誘導が起こらず、溺死群のように細胞内に高温水が直接流入することで蛋白が変性し、変性蛋白が細胞内に蓄積することで小胞体ストレスが生じ、発現が誘導されたものと考えられる。

38℃溺死群において、AQP5 mRNA 発現の低下、HSPa5 mRNA 発現の上昇という結果が得られたことから、温水溺死診断のための有用な指標となり得る可能性が示唆された。41℃溺死群で AQP5 mRNA 発現が低下しないという結果は、あまり高温過ぎると、AQP5 発現が抑制されず、血液希釈が起こりやすくなる可能性を示していると思われるので、入浴中溺死の病態解明の新たな手掛かりになる知見かもしれない。

入浴死の病態について温水溺死モデルを使用した動物実験によって基礎的データを収集した検討はこれまで殆どなく、入浴死の病態解明に向けて貢献する成果が得られたと考える。今後、温水溺死モデルに加えて、入浴死の死因候補として想定されている急性心不全や熱中症のモデルを作製し、同様の検討を行うことで、入浴死の鑑別診断方法を確立し、入浴死の病態解明にさらに貢献したいと考えている。

(2) 剖検試料を用いた入浴中溺死診断マーカーの解析

AQP5 は 1 型肺胞上皮細胞に発現し、淡水溺死と同様に入浴中溺死では、陽性率が他の群と比較して有意に低値を示した (図5)。一方、AQP1 は血管内皮細胞に発現し、AQP5 とは対照的に海水溺死、虚血性心疾患並びに入浴中の虚血性心疾患で陽性率が有意に低値を示した。

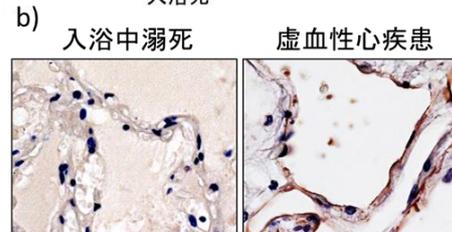
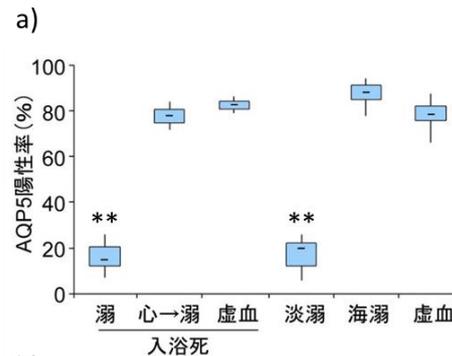


図5. 肺における AQP5 陽性率. a) 各群の陽性率の箱ひげ図. \*\* $p < 0.05$  vs. 他群. b) 代表的な AQP5 免疫染色像。

HSP70 は 1 型肺胞上皮細胞及び肺胞内マクロファージに発現し、入浴中溺死では肺胞上皮細胞の陽性率が他の群のいずれよりも有意に高値を示した (図 6)。これは、肺胞内に流入した温水の熱刺激によって発現が誘導されたものと考えられる。

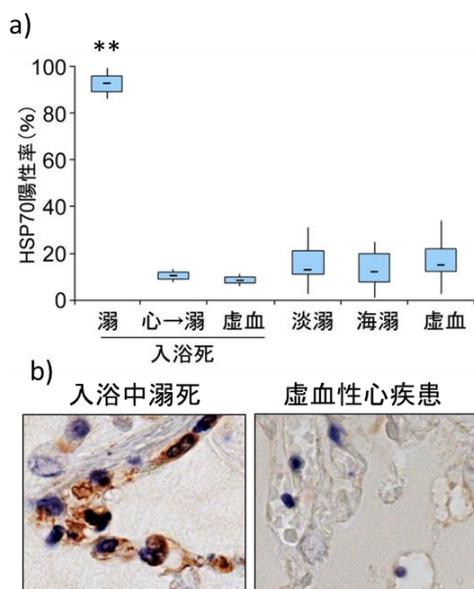


図 6. 肺における HSP70 陽性率. a) 各群の 1 型肺胞上皮細胞における陽性率の箱ひげ図.  $**p < 0.05$  vs. 他群. b) 代表的な HSP70 免疫染色像.

剖検試料を用いた検討で、入浴中溺死において AQP5 発現が低下し、HSP70 発現が上昇していたことは、動物実験の結果と一致するものであり、入浴中溺死の新たな診断マーカーとなり得る可能性が示唆された。一方、AQP1 発現は虚血性心疾患において低下していたことから、AQP1 及び AQP5 の両発現を検討することは、入浴中溺死と虚血性心疾患の鑑別診断に有用である可能性が示唆された。今後、前記各死因の動物モデルによる検討と平行して実際の剖検事例数を増やすことで、入浴死の鑑別診断法を確立していきたい。

#### <引用文献>

- [1] 小片, 林ら. 日温気物医誌 2008; 72: 46-49.
- [2] Hayashi et al. Med Sci Law 2010; 50(2): 11-14.
- [3] Locali et al. Acta Cir Bras 2006; 21: 203-206.
- [4] Hayashi et al. Int J Legal Med 2009; 123: 7-13.
- [5] 塩田ら. 日薬理誌 2014; 143: 310-312

#### 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 4 件)

- ① Yamamoto T, Hayashi T, Murakami T, Hayashi H, Murase T, Abe Y, Umehara T, Shimokawa I, Uetani M, Ogata M, Ikematsu. Postmortem imaging identified pneumomediastinum in two cases of diabetic ketoacidosis. J Forensic Radiol Imaging 2017;10:5-8. 査読有. DOI:10.1016/j.jofri.2017.06.001
- ② 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 2017;24: 24-31. 査読有. DOI: 10.1016/j.legalmed.2016.11.003
- ③ 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. 査読有. DOI:10.1016/j.forsciint.2016.03.055
- ④ 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 2015;129(5): 1085-1090. 査読有. DOI:10.1007/s00414-015-1245-8

[学会発表] (計 6 件)

- ① 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 年 11 月 24, 25 日. 那覇.
- ② 前田一輔, 林 敬人, 中前琢磨, 肥後恵理, 小片 守. 淡水溺死と海水溺死の鑑別診断に有用な miRNA の検索について. 第 67 回日本法医学会学術九州地方集会. 2017 年 11 月 24, 25 日. 那覇.
- ③ 林 敬人, 中前琢磨, 吾郷一利, 肥後恵理, 小片 守. てんかん発作に基づく死亡が疑われた 3 剖検例. 第 100 次日本法医学会学術全国集会. 2016 年 6 月 16, 17 日. 東京.
- 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.
- ⑤ 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.
- ⑥ 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.

[その他]

HP:<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~1egalmed/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

林 敬人 (HAYASHI Takahito)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：40512497

##### (2) 研究分担者

特になし

##### (3) 連携研究者

特になし

##### (4) 研究協力者

特になし