

平成 22 年 4 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390186

研究課題名（和文） 脳内異物による脳病態の解析を通じた法医神経病理学の展開

研究課題名（英文） Development of forensic neuropathology through a study on brain changes after intracerebral implantation of foreign body

研究代表者

木林 和彦（KIBAYASHI KAZUHIKO）

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：20244113

研究成果の概要（和文）：穿通性頭部外傷では脳内に異物が残留することがあり、残留した異物は脳障害の原因となることが考えられる。鉛球を脳内に一定期間留置したモデル動物を作製し、脳の経時的な変化を組織学的・生化学的に解析した。ラットに全身麻酔を施し、大脳内に鉛球または硝子球 1 個を挿入した。12 時間～4 週間後に脳を摘出し、パラフィン切片を作製し、免疫染色とアポトーシス細胞の検出を行った。また、大脳皮質のグルタミン酸受容体遺伝子発現を解析した。その結果、脳組織には NeuN 陽性神経細胞の減少、炎症細胞の出現、アポトーシス細胞の出現、メタロチオネイン陽性星状膠細胞の増加等が観察された。また、鉛球留置で遺伝子の発現量が抑えられた。従って、脳内の鉛球は脳を障害することが判明した。

研究成果の概要（英文）： In cases of open head injuries, a foreign body may remain in the brain for a period of time after the trauma and causes brain dysfunction. We developed an animal model incorporating a foreign body in the brain. A lead or a glass ball was implanted in the cerebral cortex of rats. Brains were analyzed at various times between 12 hours and 4 weeks after implantation. The immunoreactivity of metallothionein, a metal binding protein, increased significantly in the brain with increasing time after implantation of a lead ball. Apoptotic cells were identified at 2 weeks, but had mostly disappeared at 4 weeks after implantation of a lead ball. Moreover, N-methyl-D-aspartate receptor genes were significantly suppressed at 1 to 3 weeks after implantation of a lead ball. This study showed that lead leached from a lead ball induces metallothionein expression, apoptosis and N-methyl-D-aspartate receptor gene suppression in the brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

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：法医病理学、法医神経病理学

1. 研究開始当初の背景

脳内異物は穿通性脳損傷によって生じる。銃創では弾丸が脳内に達することがあり、棒による穿通創では木片や金属片が脳内に残留することがある。これらの脳内異物は手術によって除去されることもあるが、異物の部位によっては除去されずに残留することもある。

生体は脳内異物に対して異物反応を生じるので、急性期には炎症細胞浸潤、その後は神経膠細胞と小膠細胞の反応が生じることが考えられる。しかし、脳内異物に対する脳の異物反応に関する研究は少ない。また、弾丸が散弾銃の鉛弾の場合、脳内に残留した鉛弾から鉛成分が滲み出し、血中の鉛濃度が上昇して鉛中毒となることがある。鉛中毒は貧血、腹痛、腎障害の他に、成人では頭痛や記憶障害、小児では脳症や知能低下を来すので、鉛異物は神経病理学的異常を来すと考えられる。しかし、鉛弾から滲み出した鉛による弾丸周囲の脳組織の障害についての研究は少ない。

2. 研究の目的

本研究では脳内異物に対する脳の反応と傷害に着目し、脳内異物の脳内病態について脳内の細胞障害、鉛などの異物成分の脳内濃度と細胞傷害、タンパクと遺伝子の発現を形態学と分子生物学の両方の観点から捉え、異物による脳内病態を解析し、脳内異物を有する患者の救命に寄与することを目的としている。

また、穿通性脳損傷の事例は法医解剖の対象となることがあり、本研究によって穿通性脳損傷に基づく脳内異物による形態学的・生化学的变化が明らかになれば、法医鑑定の実務にも貢献できる。穿通性脳損傷による脳損傷自体については従来から研究されているが、異物に対する脳組織の反応を調べた研究は少ない。本研究は、脳内異物で特異的に発現する蛋白と遺伝子を同定するものであり、国内外で類似の研究は行われていなく、十分な独創性と先駆性を備えた課題である。法医解剖の実務と密接に関係した課題であり、本研究を通じて法医神経病理学の基礎研究の成果を社会に還元することもできる。

3. 研究の方法

6週齢雄性ウィスター系ラットにペントバルビタールによる全身麻酔を施した上で頭皮を切開し、頭頂骨に骨窓を開け、プレグマ後方4mm、正中線右方2mm、大脳表面から深さ1.5mmの所に直径1mmの鉛球(純度99.9%)

1個を、対照群には同径のガラス球を1個挿入した。0.5、7、14、21、28日後(n=4)に灌流固定を行い、脳と鉛球あるいはガラス球を摘出した。

まず、鉛球周囲の脳を高純度硝酸に60で2時間溶解させた溶液中の鉛濃度をグラファイトファーネス型原子吸光光度計で測定した。

また、パラフィン切片を作製し、各種抗体を用いた免疫染色(GFAP、NeuN、CD68、ニューロフィラメント、メタロチオネイン)、TUNEL法によるアポトーシス細胞の検出、エステラーゼ二重染色法による好中球の検出を行った。画像解析は、光学顕微鏡より取り込んだ画像からImage J(ver. 1.42)を用いて各種免疫染色の染色強度を算出した。鉛球群と硝子球群の染色強度の差を統計解析した。

さらに、鉛球または硝子球挿入部の大脳からRNAを抽出し、N-methyl-D-aspartic acid receptor(NR)のサブタイプNR1、NR2A、NR2BのmRNA量をRT-PCRにより解析した。

4. 研究成果

鉛球を挿入した脳では鉛が検出され、鉛球から脳組織への鉛の溶出が確認された。また、鉛の量は時間と比例して増加していた。

鉛球とガラス球による脳の組織学的変化を比較したところ、鉛球ではNeuN陽性神経細胞の減少、アポトーシス細胞の出現、好中球の出現、CD68陽性マクロファージの出現、メタロチオネインの発現が優位に認められた(図1・2)。GFAP陽性神経膠細胞数とニューロフィラメントの染色強度には鉛球とガラス球で有意な差は認められなかった。

遺伝子解析では、鉛球を留置した脳ではNRのサブタイプ全ての発現量に有意な減少が認められた。また、NRの発現量の減少はアポトーシス細胞の出現の時期と関係が認められた。

脳内異物の鉛球は鉛球から溶出した鉛によって炎症反応、アポトーシス、遺伝子抑制を来し、神経細胞死を招来することが判明した。また、メタロチオネインは、抗アポトーシス作用があり、鉛による障害を抑制していると考えられた。従って、脳内異物が鉛である場合は、鉛の周囲の神経組織に障害を生じることが示された。

また、硝子による脳内細胞の変化は鉛によるものと異なっており、異物の種類によって脳の障害は異なることも判明した。今後、異物による脳の障害を明らかにするためには他の材質の異物を用いた実験も必要である。

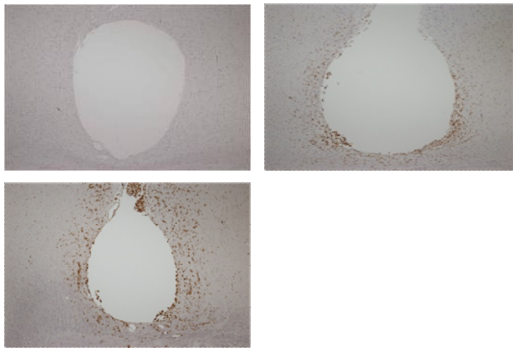


図1．鉛挿入後の脳の CD68 陽性マクロファージの増加(左上 12 時間後、右上 2 週間後、左下 4 週間後)

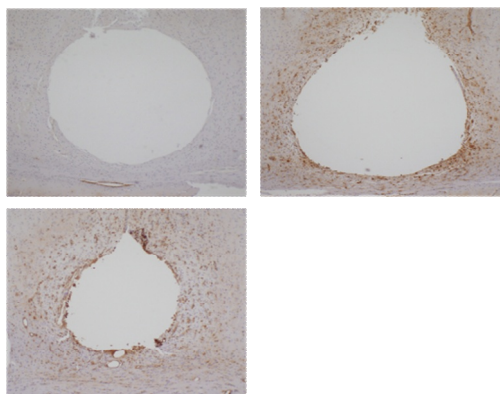


図2．鉛挿入後の脳のメタロチオネイン陽性星状膠細胞の増加(左上 12 時間後、右上 2 週間後、左下 4 週間後)

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 6 件)

1. Kibayashi K, Nakao K, Shojo H. Hyperthermia combined with ethanol administration induces c-fos expression in the central amygdaloid nucleus of the mouse brain. A possible mechanism of heatstroke under the influence of ethanol intake. *International Journal of Legal Medicine*, 123, 371-379, 2009 査読有
2. Kibayashi K, Sugita Y, Shojo H, Sumida T. Brain germinoma in a young adult male with suspicion of fatal neglect. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 30, 180-182, 2009 査読有
3. Sumida T, Kibayashi K, Shojo H, Nakao K. Effects of tissue fixation on the

inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity in immunoperoxidase methods. *Journal of Histotechnology*, 31, 165-168, 2008 査読有

4. Kibayashi K, Sumida T, Shojo H. An unusual case suspected of accidental death from head-down position. *Acta Criminologicae et Medicinae Legalis Japonica*, 74, 31-35, 2008 査読有
5. Kibayashi K, Sumida T, Shojo H, Tokunaga O. Unexpected death due to intestinal obstruction by a duplication cyst in an infant. *Forensic Science International*, 173, 175-177, 2007 査読有
6. Kibayashi K, Sumida T, Shojo H, Hanada M. Dementing diseases among elderly persons who suffered fatal accidents: a forensic autopsy study. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 28, 73-79, 2007 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Kibayashi K, Nakao K, Shimada R: Brain tissue responses after traumatic brain injury in animal models. 62nd Annual Scientific Meeting of American Academy of Forensic Sciences, Seattle, Washington, February 22-27, 2010.
2. Nakao K, Kibayashi K, Taki T: Changes of the brain after intracerebral implantation of foreign body. The 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Yokohama, Japan. 2009. 12. 9.
3. 中尾賢一郎, 多木 崇, 木林和彦: 脳内異物留置モデルを用いた脳組織の形態解析. 第 78 回日本法医学会学術関東地方集会. 東京, 2009. 10. 31.
4. 中尾賢一郎, 木林和彦: 鉛局所曝露モデルを用いた脳組織変化の検討. 第 59 回日本法医学会学術九州地方集会. 佐賀, 2009. 10. 2.
5. 中尾賢一郎, 木林和彦: 脳内異物による脳の組織化学的変化の比較検討. 第 93 次日本法医学会学術全国集会. 大阪, 2009. 5. 14.
6. 中尾賢一郎, 多木 崇, 木林和彦: 脳内に留置した鉛球による脳組織の変化. 第 77 回日本法医学会関東地方会. 東京, 2008. 11. 1.
7. 中尾賢一郎, 猩々英紀, 木林和彦: 脳内異物による脳病態の解析. 第 91 次日本法医学会総会. 長崎, 2008. 4. 24.
8. Kibayashi K: Traumatic brain injury in animal models. Symposium organized by The Japanese Association of Forensic Pathology. Head injury. 7th In

ternational Symposium Advances in Legal
Medicine. Osaka, Japan. 2008. 9. 4. (招
待講演)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.twmu.ac.jp/Basic/legal-m/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木林 和彦 (KIBAYASHI KAZUHIKO)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：20244113

(2) 研究協力者

中尾 賢一郎 (KEN-ICHIRO NAKAO)

佐賀大学・大学院医学研究科・博士課程