

令和元年5月30日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09216

研究課題名(和文) 法医剖検例における膵臓被膜下・間質内出血の意義と膵臓関連ホルモンとの関連性

研究課題名(英文) Significance of pancreatic interstitial bleeding and pancreatic hormone dynamics in hypoxic conditions

研究代表者

石川 隆紀 (ISHIKAWA, TAKAKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50381984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：剖検例において、膵臓の間質内に実質傷害を伴わない出血を観察することがある。その病態生理学的意義について検討した。その結果、窒息死群は、他死因群比較して高頻度に認められた。血中インスリン(Ins)濃度は、その他死因群(中央値 3.1 μ IU/ml)に比較して窒息死(中央値 9.4 μ IU/ml)で高値を示した。一方、血中グルカゴン濃度における差はなかった。ラット膵臓培養細胞を用いた低酸素実験の結果、Ins遺伝子発現が顕著となり、Ins濃度も高値であり、ミトコンドリアの膨化も認められた。よって、低酸素状態では、細胞内小器官の脆弱性ととも、Ins分泌が促進されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、低酸素下におけるインスリン分泌能亢進と低酸素下における微小血管障害に依存しているものと思われる。そのことから、ラット膵臓培養細胞を用いて研究した結果、インスリンの遺伝子発現は、低酸素下10分で高値を示し、培養液中のインスリン濃度も低酸素下10分で高値を示した。また、低酸素下における細胞の微小変化として、血中濃度が低下してくる低酸素下15分において、ミトコンドリアの膨張、細胞傷害の所見が現れた。それら結果から、低酸素下においては、インスリンの発現が増加するものの、低酸素状態が遷延すると、細胞傷害により、インスリン分泌能が低下を示すものと思われる。

研究成果の概要(英文)：During autopsy, bleeding in the pancreatic stroma is occasionally observed in the absence of injury to the parenchyma. The current study examined the pathophysiological significance of this bleeding. The results revealed that such bleeding was more prevalent in individuals who died from suffocation than in individuals who died from other causes. Blood insulin (Ins) levels were higher in individuals who died from suffocation (median: 9.4 μ IU/ml) than those who died from other causes (median: 3.1 μ IU/ml). In contrast, there were no differences in blood glucagon levels in the two groups. Results of a hypoxia experiment using cultured rat pancreatic cells revealed marked expression of the Ins gene, high Ins levels and swelling of mitochondria with hypoxia. These findings revealed that hypoxia renders organelles more fragile and promotes Ins secretion.

研究分野：法医学

キーワード：低酸素 虚血 膵臓被膜下・間質下出血 インスリン グルカゴン 培養細胞 mRNA 内分泌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開発当初の背景

法医学解剖・鑑定における頸部圧迫や鼻口閉塞などによる窒息の診断は重要で、内因性急死や中毒死さらには溺死などの外因性死亡との鑑別に苦慮することも少なくない。これまで法医学病理学のみならず血液生化学や分子生物学的観点から窒息に関する種々の検討がなされてきた。具体的には、頸部圧迫に伴う皮膚変色を病理組織学的に証明する方法や甲状腺ホルモンなどの頸部諸器官から分泌される変化についての検討が報告されていた。

一方、法医学解剖例において、膵臓に組織学的実質傷害を伴わないにもかかわらず、肉眼病理学的に被膜下・間質内に出血を観察することがある。この膵臓間質内出血の意義について系統的に検討された報告はない。これまでに我々は膵臓外分泌酵素であるアミラーゼと α -グルタミルトランスフェラーゼについて報告したことはあるものの、膵臓被膜下・間質内出血と死因や死亡過程における病態生理との関係、さらには、インスリンやグルカゴンなどの内分泌系ホルモンとの関係および血糖動態との関連性について検討してことはなく、剖検時における膵臓間質内出血の意義について、一定の見解を得ていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「法医学解剖例における膵臓被膜下・間質内出血の意義と膵臓関連ホルモンとの関連性」について「低酸素・虚血」の観点から解析することにある。法医学解剖例において、低酸素・虚血病態時に、肉眼的に膵臓の実質傷害を伴わずに膵臓間質内出血を観察することがある。この膵臓間質内出血の意義について系統立てて検討された報告はない。そこで申請者らは、膵臓の被膜下・間質内出血の意義について、内分泌ホルモンおよび血糖動態との関連性についてのみならず、生化学的・分子生物学的観点からの検討のみならず、微細形態学的観点からも膵臓における低酸素虚血病態における変化について系統的に調査することとした。本研究結果は、法医学分野における窒息死診断上の意義のみならず、全身性低酸素・虚血状態における血糖値を含めた内分泌および外分泌機能を明らかにすることで、膵臓における病態生理を明らかにできる基礎的資料になることが期待される。

3. 研究の方法

“法医学解剖例における膵臓被膜下・間質内出血の意義と膵臓関連ホルモンおよび血糖値との関連性を明らかにする目的”で下記の4点について研究を施行した。

剖検例における膵臓被膜下・間質内出血の死因別・受傷後経過時間別などの発生頻度を調査し、その発生要因について調査する。剖検例における膵臓を中心とした視床下部・下垂体・甲状腺・副腎などの内分泌関連臓器の病理組織および免疫組織化学的变化について調査する。剖検例における血中膵臓関連ホルモン(インスリンおよびグルカゴン)および血糖値などの計測を行う。膵臓培養細胞を用いた低酸素状態および各種薬物における影響について膵臓関連ホルモンの変化について検討を行う。膵臓培養細胞の微細形態変化について、低酸素および低酸素継続時間、また薬物の影響について調査を行う。

4. 研究成果(和文)

剖検例において、膵臓の間質内に実質傷害を伴わない出血を観察することがある。しかし、その出血の意義と膵臓関連ホルモンの分泌との関連性について検討した報告は少ない。そこで膵臓被膜下・間質内出血の意義について、インスリン・グルカゴン分泌の変化とともに分析することとした。【対象・方法】当教室の剖検例(72例, 6歳~91歳(中央値63.5歳)のうち、鋭器損傷(5例)、鈍器損傷(15例)、火災関連死(23例)、窒息(16例)、溺死(6例)、心臓性突然(7例)について分析した。各例において膵臓間質内出血の程度を死因ごとにスコア化、さらに免疫組織化学的手法を用いて膵臓におけるインスリンおよびグルカゴン陽性細胞の変化について検討し、さらに血中インスリンおよびグルカゴンの測定を行った。また、膵臓間質内出血が窒息死例に高頻度に認められたことから、ラット膵臓培養細胞を用いて低酸素下(酸素5%)実験を行い、電子顕微鏡にて形態観察するとともに、Ins 遺伝子発現を RT-PCR により解析し、インスリン分泌についても ELISA を用いて測定した。【結果・考察】膵臓間質内出血を死因群別に分析すると、窒息死群では、他死因群比較して高頻度に認められた。血中インスリン濃度は、その他死因群(0.3 - 50.9 μ IU/ml, median 3.1 μ IU/ml)に比較して急性窒息死(3.9 - 15.4 μ IU/ml, median 9.4 μ IU/ml)で高値を示し、遷延性窒息死(0.3 - 3.7 μ IU/ml, median 0.8 μ IU/ml)では低値を示した。一方、血中グルカゴン濃度において死因間の差は明らかでなかった。インスリンおよびグルカゴン陽性細胞率に死因間の顕著な差はなかった。ラット膵臓培養細胞を用いた低酸素実験の結果、低酸素後10分で Ins 遺伝子発現が顕著となり、培養上清中インスリン濃度も高値を示した。低酸素状態におけるラット膵臓培養細胞を電子顕微鏡で観察するとミトコンドリアの膨化所見が認められた。これらの結果より、低酸素状態では、細胞内小器官の脆弱性ととも、インスリン分泌が促進されることが明らかとなった。これら結果から、血中インスリン分泌量が低酸素状態評価の指標となる可能性が推測された。

研究成果(英文)

Purpose: Although pancreatic interstitial bleeding without parenchymal damage is occasionally

observed in autopsy cases. We investigated the significance of pancreatic interstitial bleeding based on analysis of the changes in insulin and glucagon secretion. **Materials and Methods:** We examined 72 autopsy cases in our department. The causes of death were sharp instrument injury, blunt injury, fire fatality, asphyxiation, drowning, and sudden cardiac death. We scored the degree of pancreatic interstitial bleeding in each case based on the cause of death, assessed the changes in insulin- and glucagon-positive cells in the pancreas with immunohistochemical staining, and measured the blood insulin and glucagon levels. Because interstitial bleeding was frequently observed in deaths due to asphyxiation, we conducted a hypoxia (O₂ 5%) experiment with cultured rat pancreatic cells. We observed the morphology under an electron microscope, studied the insulin gene expression using a RT-PCR, and used ELISA to measure insulin secretion. **Results and Discussion:** We analyzed pancreatic interstitial bleeding based on the cause of death and found that it most frequently occurred in the death due to asphyxiation group compared to all other causes of death. The blood insulin level was the highest in the deaths due to acute asphyxiation (median, 9.4 μIU/mL) and lowest in the deaths due to prolonged asphyxiation (median, 0.8 μIU/mL) compared to all other causes of death (median, 3.1 μIU/mL). In contrast, there was no difference in blood glucagon levels and insulin- and glucagon-positive cells among the causes of death. The results of the hypoxia experiment using cultured cells demonstrated that insulin gene expression was notable after 10 min of low oxygen conditions. The insulin level in the culture supernatant was also high. Observing the cultured cells under hypoxic conditions with an electron microscope revealed mitochondrial swelling, which indicated that hypoxic conditions debilitated intracellular organelles and stimulated insulin secretion.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Tani N, Ikeda T, Shida A, Aoki Y, Oritani S, Ishikawa T. Postmortem water contents of major organs with regard to the cause of death. *J Forensic Leg Med*, 査読有, 11, 2019 May 48-54. DOI: 10.1016/j.jflm.2019.05.003.

Tani N, Ikeda T, Watanabe M, Toyomura J, Ohyama A, Ishikawa T. Prolactin selectively transported to cerebrospinal fluid from blood under hypoxic/ischemic conditions. *PLoS One*, 査読有, 13, 2018, e0198673. DOI: 10.1371/journal.pone.0198673.

Tani N, Ikeda T, Aoki Y, Shida A, Oritani S, Ishikawa T. Pathophysiological significance of clock genes BMAL1 and PER2 as erythropoietin-controlling factors in acute blood hemorrhage. *Hum Cell*, 査読有, 2019. DOI: 10.1007/s13577-019-00248-2.

Matusue A, Kubo SI, Ikeda T, Tani N, Maeda T, Kashiwagi M, Hara K, Waters B, Takayama M, Ikematsu N, Ishikawa T. VNTR polymorphism in the monoamine oxidase A promoter region and cerebrospinal fluid catecholamine concentrations in forensic autopsy cases. *Neurosci Lett*, 査読有, 14, 2019, 71-76. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.02.029.

Matusue A, Ikeda T, Tani N, Waters B, Hara K, Kashiwagi M, Takayama M, Ikematsu N, Kubo SI, Ishikawa T. Association between cytochrome P450 2D6 polymorphisms and body fluid methamphetamine concentrations in Japanese forensic autopsy cases. *Forensic Sci Int*, 査読有, 289, 2018, 33-39. DOI: 10.1016/j.forsciint.2018.05.018.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Ishikawa T, Tani N, Ikeda T, Morioka F, Oritani S, Michiue T. Prolactin concentration in blood and cerebrospinal fluid during low-oxygen conditions. 26 Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin(Region Süd), June 2017, Freiburg, Germany. Abstract Book. 2017:3 .
2. Ishikawa T, Tani N, Ikeda T, Morioka F, Oritani S, Michiue T. Relationship between expression of clock genes and erythropoietin in hemorrhagic shock and traumatic shock: A pilot study. 26 Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin(Region Süd), June 2017, Freiburg, Germany. Abstract Book. 2017:3 .
3. Tani N, Ikeda T, Morioka F, Oritani S, Michiue T, Ishikawa T. Relationship between expression of clock genes and erythropoietin in hemorrhagic death/shock. 10th International Symposium on Advances in Legal Medicine. September, 2017, Dusseldorf, Germany. *Rechtsmedizin*. 2017;27:318 .
4. 森岡郁哉, 谷 直人, 池田知哉, 道上知美, 織谷茂樹, 池田沙有子, 石川隆紀. 臍臓における被膜下・間質内出血の意義 低酸素虚血の観点から . 第 24 回法医病理セミナー兼第 1 回和歌山県立医科大学国際シンポジウム-法医分子病理学-, 平成 29 年 9 月, 和歌山 . 抄録集: 25 .
5. Morioka F, Tani N, Ikeda T, Michiue T, Oritani S, Ikeda S, Ishikawa T. Significance of pancreatic interstitial bleeding and pancreatic hormone dynamics in hypoxic condition. 第 35 回日本ヒト細胞学会学術集会, 平成 29 年 10 月, 種子島 . 抄録集: 108-109 .
6. Ishikawa T. Application of blood biochemistry to forensic pathologist analysis. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM) Fukuoka, Japan.

〔図書〕(計 1 件)

1. Ishikawa T. Forensic Medicine and Human Cell Research New Perspective and Bioethics. Springer, 2019.11. 1-164

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 連携研究者: 道上 知美

ローマ字氏名: Tomomi Michiue

所属研究機関名: 和歌山県立医科大学

部局名: 法医学

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 00529240

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。