

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10563

研究課題名(和文) 入浴中の急死における脳神経細胞の虚血性変化についての検討

研究課題名(英文) Study on ischemic changes of brain neurons in sudden death during bathing

研究代表者

佐藤 文子 (Sato, Fumiko)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70328128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：入浴中の死亡事故は高齢者に頻発し、小脳のプルキンエ細胞に虚血性変化を認めるかを、免疫染色を用いて検討を行った。入浴中の急死例31例、多発外傷21例、溺死11例、循環器系疾患21例を、Calbindin-D28k、HIF-1、VEGF抗体を用いて、免疫染色を行ったところ、プルキンエ細胞の陽性率を表した。抗Calbindin-D28k抗体では、入浴中の突然死例は、各々80%以上と高い値を示し、溺死のみ30%代の低い値を示した。溺死では入浴中の急死例と比較して $p>0.05$ と有意差を認めず、脳虚血が発生する前に、お風呂の湯の温熱効果で意識を消失、もしくは不整脈等で、溺死を吸引し死亡したと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

入浴中の急死は日本では、冬場に高齢者に多発している。企業は、脱衣場や、浴室に暖房を付けたりし、冬期に浴室や脱衣所を暖め、部屋と浴室の気温差をなくしたり、浴槽を浅くしたり、手すりをつけたりして、浴槽内での溺死を予防している。しかし、入浴中の急死は、高齢社会の日本では、高齢者の人数が増加しており、死亡者が減少しているかは疑問である。研究者が少ない分野であり、脳虚血がどの程度発生しているかを明らかにして、発生原因に考察できたことは価値があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Fatalities during bathing occur frequently in the elderly.

We investigated whether ischemic changes in Purkinje cells of the cerebellum were observed using immunostaining. 31 cases of sudden death while bathing, 21 cases of multiple trauma. Eleven cases of drowning and 21 cases of circulatory system disease were immunostained with Calbindin-D28k, HIF-1, and VEGF antibodies to show the percentage of positive Purkinje cells. The anti-Calbindin-D28k antibody showed a high value of more than 80% for each of the cases of sudden death during bathing, while only drowning showed a low value in the 30%'s. The anti-Calbindin-D28k antibody showed a low value in the 30%'s. The difference was significant at  $p>0.05$  in the case of drowning compared to the cases of sudden death during bathing. It is thought that the patients died from inhalation of drowning water before cerebral ischemia occurred, due to loss of consciousness by the thermal effect of the bath water, or arrhythmia, etc.

研究分野：法医病理学

キーワード：入浴中の急死 Calbindin-D28k VEGF HIF-1 溺死 免疫染色 法医解剖

## 1. 研究開始当初の背景

入浴は、全世界で親しまれ、リラックス効果がある全国的に実施されている。厚生省の調査によると、日本全国での入浴中の死亡事故者は毎年 19000 人程度発生していると推定されている[1]。不幸なことに、たくさん入浴中の突然死が発生し、報告されている[2-7]。家庭の浴槽内での死亡者数はこの 10 年で約7割も増加し、9割が 65 歳以上の高齢者であることが報告されている[1]。我々の研究では、入浴中の急死例の中で器質的疾患が認められず、薬毒物検査が陰性であり、アルコールは検出されないが、溺水吸引により死亡している事例が 20-30%程度認められる。それらの中に、立ち上がる際に脳虚血発作が発生し、浴槽内に倒れ、溺水吸引を起こしている事例があると仮説を立てている。脳虚血性発作は、お湯で体に水圧がかかっている状態から急に立つことで体にかかっていた水圧がなくなり圧迫されていた血管が一気に拡張し、脳への血流が減少し、脳血流減少により脳が貧血をおこし、脳虚血発作を起こす。加齢性変化である全身の動脈硬化症、高血圧が関連して高齢者に発生する頻度が高くなると考えられる。一過性脳虚血発作が発生し、溺没して死亡した根拠を発見することはしばしば困難である。脳の一過性脳虚血発作が発生したことが、形態学的に判断できれば、溺水吸引に至った原因を明らかにできる可能性がある。

## 2. 研究の目的

虚血に弱い細胞として、小脳のプルキンエ細胞が挙げられ、低酸素状態や虚血状態に非常に脆弱である[8]。解剖時に病理組織学検査のため、採取した小脳半球の病理標本を鏡検し、プルキンエ細胞を指標として、虚血の程度を図ることを目的とする。比較検討するために、心臓疾患で死亡した症例、溺死で川や湖で死亡した例、多発外傷で死亡した例をコントロール例とし、細胞の形態と、また、CABPD-28K、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF を一次抗体に用いて、各症例について免疫組織化学的に検討して、発現の頻度を比較検討した。

## 3. 研究の方法

### 1) 対象

北里大学医学部法医学で、2010 年 1 月 1 日から 2021 年 5 月 31 日まで、施行した法医解剖例の中で、入浴中の急死(溺死)と考えられた例 31 例、内訳は、器質的疾患(心臓病・血管疾患・その他)9 例、非器質的要因(薬毒物・アルコール)9 例、溺水の吸引の所見のみ 13 例である。入浴中の急死は、気管、肺に溺水を吸引している例をのみとした。

コントロール症例は4つのグループに分類した。多発外傷により短時間に死亡 20例。このグループは直ちに急死した例で、進行性の脳の低酸素状態、高度は脳のダメージを伴った症例は除く。溺死 10 例、循環器系疾患 21 例を対象とした。死因は病歴、剖検結果、毒物学的分析に基づく。死後間隔(PMI;死亡から剖検までの間隔)は、午後 12 時間から 5 日で、中央値は 2 日であった。腐敗の兆候が見られた症例は除外した。表 1 に症例プロフィールを示す。

表 1. 入浴中の急死例と 3 つのコントロールグループ、合計 90 例。

死因	N	男/女	年齢		PMI		中央値
			中央値	最小	最大	範囲	
病気を有した入浴中の溺水吸引	9	6/3	75	52	96	1-4	2
アルコールを飲んで入浴中に溺水吸引	9	6/3	76	47	87	0.5-3	1
入浴中の溺水吸引	17	2/15	77	64	93	0.5-4	2
コントロール症例 1: 多発外傷	22	19/3	65	28	83	1-4	1
コントロール症例 2: 溺死(河川や湖)	11	11/0	56	10	73	1.5-4	2
コントロール症例: 心臓疾患	22	16/6	68	46	84	1-4	2

### 2) Immunohistochemistry

#### a. Calbindin-D28k

Calbindin-D28k 抗体を用いて脳の切片を用いて CaBP-D28k で免疫染色するために、脳組織の切片は、クエン酸塩で前処理した。小脳のパラフィン切片をクエン酸緩衝液で煮沸してエピトープを回収する前処理を行った。一次モノクローナル抗体(抗 CalbindinD28k 抗体、R&D Systems, Minneapolis, MN) とインキュベートした。その後、切片を触媒増幅検出システム(CSA) で処理した。反応はジアミノベンジジン/ペルオキシダーゼ水素(DAB) で可視化され、標的抗原の部位に褐色の沈殿が生じた。

#### b. HIF-1 $\alpha$ と VEGF

HIF-1 $\alpha$  を用いた染色では、切片をクエン酸緩衝液で煮沸してエピトープを回収した。モノクローナル抗体(抗 HIF-1 $\alpha$

抗体、R&D Systems, Minneapolis, MN) とインキュベートする前に、切片をクエン酸緩衝液で煮沸することでエピトープを回収した。VEGF 免疫染色の場合は、前処理にプロナーゼを用い、ポリクローナル抗体 (抗 VEGF 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を適用した。発色剤には DAB を用いた。

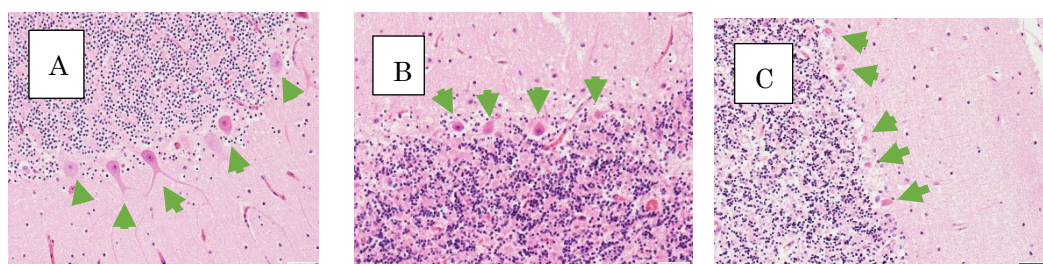
### 3) 評価と統計解析

#### プルキンエ細胞の壊死性変化

の壊死性変化 (細胞膨潤、収縮を伴う自己溶解性壊死、好酸性) のグラディエーション、収縮、好酸性挙動、暗色細胞変性) を H&E 染色で分類した。(図 1)。PC 周囲の免疫組織化学的染色の免疫組織化学的染色は、半定量的に免疫反応陽性 (+) とした。として半定量的に分類した。陽性反応陽性反応性は、褐色染色と定義した。それ以外是非反応とした (図 2)、

組織切片は、平均値が算出された。CaBP-D28k 陽性ニューロンの数は、手作業でカウントし、プルキンエ細胞を 5 つの非重複野 (倍率 100) に分類することによって決定した。プルキンエ細胞を高倍率で 5 視野鏡検し、100 個鏡検し、100 個のプルキンエ細胞を鏡検し、1-49 個を+, 50-100%を++と分類した。プルキンエ細胞は手作業でカウントし、5 つの非重複フィールドに分類することによって決定した (倍率 100)。すべての統計計算はすべて SPSS for Windows 11.5.0 を用いて行った。免疫組織化学的染色、およびサブグループごとの低酸素性変化の卒業異なるサブグループにおける低酸素性変化の卒業度を分析するために、Mann-WhitneyU 検定が用いられた。p<0.05 は統計的に有意な差を示すものとした。PMI の長さとの相関を調べた。HIF-1 $\alpha$ および VEGF 免疫染色の場合、それ以上の評価および統計解析は不可能であった。

図 1. ヒト小脳の組織標本におけるプルキンエ細胞の細胞学的変化の異なるカテゴリーの特徴 (HE、倍率 100 倍)。



A: PC の核と細胞の形態は明瞭。軸索もはっきり見える。  
B: PC の核と細胞質は不明瞭である。細胞質は好酸性である。  
C: PC の細胞質は非常に萎縮している。周囲は白く見える。

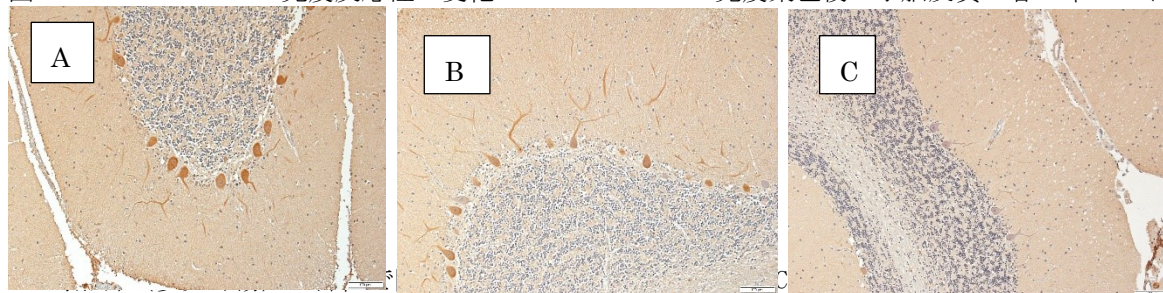
#### 4. 研究成果

HE 染色では、無作為に選んだ 5 視野で計数した PC 数の平均値は、入浴中の突然死では 8.6~1 個/視野、平均値は 12 個/視野であった。これらの所見のうち、70%は PC タイプ I と定義され、残りの細胞は PC タイプ II に相当する細胞学的変化を示した。飲酒後の入浴中の突然死では、平均値は 13.2~16.2 個/field、平均値は 14.3 個/field であった。このうち 88.9%が PC I 型、11.1%が PC II 型であった。溺水入浴中の突然死では、平均値は 9.6~16.8/圍場、平均値は 11.7PC/圍場であった。これらの所見のうち、91.7%が PC 型と定義され、PC 型 II を示す PC は 8.3%であった。対照群 1 (多発外傷) では、平均値は 8.4~18.6 個/field、平均値は 13.1 個/field であった。これらの所見のうち 85%は PC タイプ I と定義され、残りの細胞は PC タイプ II に相当する細胞学的変化を示した。対照群 2 (川や湖での溺水) では、平均細胞数は 5~11.2PC/field、平均値は 12.3PC/field であった。対照群 3 (心臓病) では、平均細胞数は 8.6~15.9 PC/field、平均値 12.3 PC/であり、80%の症例がほぼ正常であった。

免疫組織化学的には、100 個の PC を数え、Calbindin-28D 抗体陽性細胞の割合を百分率で表した。病気を有した入浴中突然死、飲酒後の入浴中突然死、入浴中の溺水吸引については、対照 2 (川や湖での溺水) と統計学的に有意な差がみられた (p<0.05)。浴槽での突然死は、いずれも他の 2 つの対照群と統計学的有意差はなかった (図 2)。

HIF-1 $\alpha$  の染色では、すべての症例で微弱な陽性免疫染色が認められたが、VEGF の免疫反応は陰性または微弱な陽性であった。その結果、HIF-1 $\alpha$  と VEGF の免疫染色のさらなる解析は行わなかった。

図 2. Calbindin-D28k 免疫反応性の変化: Calbindin-D28k 免疫染色後の小脳皮質の各フィールドの顕微鏡写真。



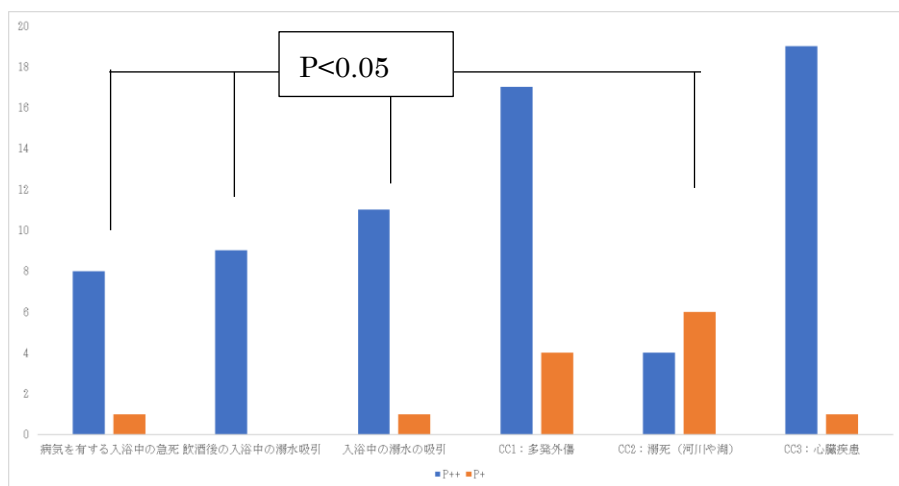
B: 対照群 (心臓疾患) では約半数のプルキンエ細胞が陽性免疫反応を示す。  
C: 対照群 (川や湖での溺水) のプルキンエ細胞の免疫反応は陰性。



表 2. 100 倍の倍率で数えたプルキンエ細胞の平均数。

死因	最小	最大	平均	中央値
病気を有した入浴中の溺水吸引	8.6	15	12	11.8
アルコールを飲んで入浴中に溺水吸引	13.2	16.2	14.3	14
入浴中の溺水吸引	9.6	16.8	11.7	12.3
コントロール症例 1：多発外傷	8.4	18.6	13.1	12.8
コントロール症例 2：溺死（河川や湖）	5	11.2	8	8
コントロール症例：心臓疾患	8.6	15.9	12.3	12.6

図 3. 浴槽内突然死症例における Calbindin-D28k 強陽性および弱陽性症例の割合と 3 つの対照群との比較。



### 考察

小脳プルキンエ細胞は、急性低酸素状態や虚血状態に非常に脆弱である [8]。小脳プルキンエ細胞はカルシウムを豊富に含んでおり、神経細胞の細胞質および核におけるカルシウムの病的な上昇は、低酸素・虚血による細胞死に重要な役割を果たし、アポトーシス細胞死やいくつかの変性酵素経路を活性化することによって、Calbindin-D28k は、EF-ハンド型カルシウム結合タンパク質ファミリーに属するタンパク質であり、ほとんどの脳領域のニューロンの細胞質に発現している [9]。これらのタンパク質は、過剰なカルシウムを緩衝することで、神経細胞を細胞外毒性やアポトーシスから守っていると考えられている [10]。動物モデルでは、酸化ストレスのいくつかの症例で、神経細胞全般、特に PC における CABPD-28k の濃度低下が観察されている [11]。急性低酸素症のヒト症例に関する研究は、まだ不十分である。酸素の利用可能性はまた、低酸素誘導因子-1a (HIF-1a) と血管内皮増殖因子 (VEGF) の制御にも重要であり、制御している [12, 13]。HIF-1a は正常酸素状態ではほとんど存在せず、VEGF の発現を促進し、低酸素虚血脳領域での新生血管形成を刺激する [16, 17]。HIF-1a の発現増加は、皮質および海馬の錐体ニューロンにおける低酸素症によって誘導されることが見いだされた [18]。

入浴中に突然死した 3 つの症例群の小脳のプルキンエ細胞は、病気を有する入浴中の突然死、入浴前にアルコールを摂取した入浴中の突然死、入浴中の溺水に関連するほとんどのプルキンエ細胞は虚血性形態変化を示さなかった。多発外傷と心臓病の対照例では、PC 細胞の 80% 近くが I 型であり、虚血性形態変化は観察されなかった。湖や川での溺死の対照症例群では、PC の 60% が II 型であり、虚血性変化を示した。入浴中の疾患による突然死、入浴中のアルコールによる突然死、入浴中の溺水による突然死群では、PC 細胞の半数以上が Calbindin-D28k であった。入浴中の突然死 3 群では、PC 細胞の半数以上が Calbindin-D28k 陽性であった。湖や川で溺死した対照例と比較して、陽性細胞数に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。湖や川での溺水症例の半数以上がプルキンエ細胞に虚血性変化を認めた。ほとんどの症例で Calbindin-D28k は陰性であった。浴槽での突然死の症例では、溺水が吸引され、剖検所見が即死させるほど病的でなかった症例でも、PC 細胞における低酸素症の発生は、川や湖での事故による溺死の症例に比べて有意に低かった。脳虚血性変化が出現する前に短時間で死亡した可能性がある。その結果、これらの症例には、浴槽で溺れ、温水の影響下で水を吸引し、不整脈の発現と温熱の影響により意識レベルが低下した人が含まれていた可能性が示唆された [3]。

### 参考文献

- [1] T. Hayashi, K. Ago, M. Ago, M. Ogata. Bath-related deaths in Kagoshima, the southwest part of Japan. *Med Sci Law* 2010, 50:11-14.
- [2] N. Yoshioka, T. Chiba, M. Yamauchi, T. Monma, K. Yoshizaki. Forensic consideration of death in the bathtub. *Leg Med (Tokyo)* 2003, 5:S375-81.

- [3] T.Chiba, M. Yamauchi, N. Nishida, T.Kaneko, K.Yoshizaki, N.Yoshioka. Risk factors of sudden death in the Japanese hot bath in the senior population. *Forensic Sci Int.* 2005,10;149:151-158.
- [4] F. Satoh, M.Osawa, I. Hasegawa, Y. Seto, A. Tsuboi. "Dead in hot bathtub" phenomenon: accidental drowning or natural disease? *Am J Forensic Med Pathol.* 2013, 34:164-168.
- [5] H. Suzuki, W. Hikiji, T. Tanifuji, N.Abe, T. Fukunaga. Characteristics of sudden bath-related death investigated by medical examiners in Tokyo, Japan. *J Epidemiol.* 2015, 25:126-132.
- [6] M.Suzuki, T. Shimbo, T. Ikaga, S. Hori. Sudden Death Phenomenon While Bathing in Japan - Mortality Data. *Circ J* . 2017, 81:1144-1149.
- [7] F.Satoh, W. Irie, C.Sasaki. Assessing age-related heart changes by comparing cases of sudden death during bathing and control cases in Japan. *Leg Med (Tokyo).* 2022, 57:102057.
- [8] R. Hausmann, S. Seidl, P. Betz, Hypoxic changes in Purkinje cells of the human cerebellum, *Int J Legal Med.* 121,2007: 175-183.
- [9] C.D. Katsetos, E. Spandou, A. Legido, M.L. Taylor, S.A. Zanelli, J.P. de Chadarevian, S.Christakos, O.P. Mishra, M. Delivoria-Papadopoulos, Acute hypoxia-induced alterations of calbindin-D28k immunoreactivity in cerebellar Purkinje cells of the guinea pig fetus at term, *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001, 60:470-482.
- [10] M. Laure-Kamionowska, D. Masłowska, Calbindin positive Purkinje cells in the pathology of human cerebellum occurring at the time of its development, *Folia Neuropathol.* 2009, 47:300-305.
- [11] T.F. Freund, G. Buzsáki, A. Leon, K.G. Baimbridge, P. Somogyi, Relationship of neuronal vulnerability and calcium binding protein immunoreactivity in ischemia, *Exp. Brain Res.* 1990, 83:55-66.
- [12] J. B. Pampón, S.A. G. Rivero, X.L. O.Cepeda, A. V.Boquete, J.F. Vila, R. H.Fonseca, Immunohistochemical expression of HIF-1alpha in response to early myocardial ischemia, *J. Forensic Sci.* 2006, 51: 120-124.
- [13] T. Hellwig-Bürgel, D.P. Stiehl, A.E. Wagner, E. Metzen, W. Jelkmann, Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions, *J Interferon Cytokine Res.* 2005, 25:297-310.
- [14] X. Fan, C.J. Heijnen, M.A. van der Kooij, F. Groenendaal, F. van Bel, The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury, *Brain Res. Rev.* 2009, 62: 99-108.
- [15] J. Lopez-Barneo, R. Pardal, P. Ortega-Saenz, Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol.* 2001, 63:259-287.
- [16] B.L. Zhu, S. Tanaka, T. Ishikawa, D. Zhao, D.R. Li, T. Michiue, L. Quan, H. Maeda, Forensic pathological investigation of myocardial hypoxia-inducible factor-1 alpha, erythropoietin and vascular endothelial growth factor in cardiac death, *Legal Med. (Tokyo)* 2008, 10: 11-19.
- [17] R.X. Aviles-Reyes, M.F. Angelo, A. Villarreal, H. Rios, A. Lazarowski, A.J. Ramos, Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited neuronal death in rats: implications for sleep apnea. *J Neurochem.* 112 (2010) 854-869.
- [18] M. Horn, W. Schlote, Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia, *Acta Neuropathol.* 1992, 85:79-87.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fumiko Satoh, Wataru Irie, Chizuko Sasaki	4. 巻 57
2. 論文標題 Assessing age-related heart changes by comparing cases of sudden death during bathing and control cases in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102057
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2022.102057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井上日菜子、佐藤文子、入江渉、佐々木千寿子、落合恵理子、中丸尚美、阪本桃子、長門純平、斎藤準一郎
2. 発表標題 入浴中の急死における脳神経細胞の虚血性変化についての検討
3. 学会等名 第90回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumiko Satoh, Wataru Irie, Chizuko Sasaki, Hinako Inoue, Junichiro Saito, Maho Kondo, Naomi Nakamura, Momoko Sakamoto, Junpei Nagato
2. 発表標題 Relation Between sudden death during bathing and age-related change in the heart
3. 学会等名 100. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft Fur Rechesmedizin
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumiko Satoh, Hinako Inoue, Wataru Irie, Chizuko Sasaki, Eriko Ochiai.
2. 発表標題 Ischemic changes of cerebellar Purkinje cells in Japanese cases of sudden death during bathing.
3. 学会等名 International Academy of Legal Medicine 2024（国際学会）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	入江 渉  (Irie Wataru)  (80597352)	北里大学・医学部・講師   (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------