

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659136

研究課題名（和文） 興奮譫妄による急死の全国調査と病態解明に関する研究

研究課題名（英文） The study of excited delirium based on the questionnaire survey and molecular biology method.

研究代表者

舟山 真人 (FUNAYAMA MASATO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40190128

研究成果の概要（和文）：

全国の法医学教室にアンケート調査票を送り調査したところ、興奮性譫妄はその認識度も低く、法医学者の経験数も少ないことが判明した。そもそも剖検を行ったとしても興奮性譫妄の診断は困難である。そこで、興奮性譫妄の診断の一助として最近注目されている microRNA(miRNA)に着目した。ラットを用いた動物実験を行ったところ、miRNA は死後もかなりの種類が残存しており、ストレスマーカーとして利用可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

We sent a questionnaire about excited delirium to all forensic laboratories in Japan. The results revealed poor knowledge of the entity. In addition, many forensic pathologists have little experience of autopsy. In the first place, it is difficult to diagnose the entity, even if one performs complete autopsy. We were focused on the miRNAs which were count on as the biomarker to help to diagnose of excited delirium. The rat experience revealed that some miRNA were still remained after death. It indicated that miRNAs were might be available as biomarker of excited delirium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000円	0円	1,500,000円
2011年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000円	330,000円	2,930,000円

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，興奮性譫妄

## 1. 研究開始当初の背景

剖検上、致死性病変が確認されない場合、直接死因として急性循環不全として診断されることが多い。ただ法医学上問題になるのは死の直前に外的なストレスが加えられている点である。研究代表者が経験した例では「青年が酔って騒い

でいたため、警察官が制圧。暫く抵抗していたが急に力が抜けたようになり、話すと虚脱状態であり、蘇生にも反応せず死亡。剖検では死を説明する所見は見いだせなかった。」というものである。同様な事例は全国でも散見され、マスコミの話題となる。最近では2011年9

月10日に名古屋高裁が、2004年に起きた警察官制圧中に死亡した事件で、警察官の違法性を認定している。このように死の直前に外的ストレスが加えられていると、司法の場では、刑事・民事いずれにせよ、ストレスと死の因果関係を問われることになる。欧米の法医学者の一部にはこのような死を「興奮性譫妄下での急死」という概念でとらえるべきであるとしている。これは「死亡前に加えられた外的ストレスが交感神経系や視床下部-下垂体-副腎系といったストレス反応系に異常を引き起こし、血圧上昇や不整脈を介し、突然死に至るという考え方である。しかしこの考え方は臨床医学に基づくだけの推測にすぎない。少なくとも剖検上はその根拠を示すことができない。しかも死亡前に加えられたストレスが、交感神経系、並びに視床下部-下垂体-副腎系といったストレス反応系そのものにどのような変化を引き起こすのか、に関しての報告はほとんどなかった。そこで、本研究では2つの視点、すなわち第一に全国法医学教室にアンケートを行い、具体的にどのような事例があるのか、第二に生理病態学的アプローチとして身体的ストレスに対する実験系を組み、ストレスと交感神経系との定量的関係を明らかにする、というマクロとミクロのアプローチからこのような死の解明に迫ろうというものである。

## 2. 研究の目的

法医学者の中にもその概念があまり知られていない、興奮性譫妄 (Excited Delirium) に対し、全国法医学教室にアンケート調査を行う。それとともにラットを用いての動物実験、すなわちラットに薬物 (アルコール) を投与した後、身体を拘束し microRNA (miRNA) を中心とした分子生物学的探索を行うことで、興奮性譫妄の病態解明を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) アンケート調査

全国 83 大学の法医学教室にアンケート調査票を送付し、回答してもらった。その内容は、

- 問1. 法医解剖の執刀歴をお答えください
- 問2. ご自身の昨年の法医解剖数をお答えください。
- 問3. 興奮性譫妄 (Excited Delirium) とは何かご存知ですか
- 問4. (問3で補助経験があるまたは執刀経験があると答えた方のみ次の質問にお答えください。) 補助経験あ

るいは執刀経験がある場合、合わせて何例でしょうか

(疑い、あるいは推定診断を含みませ)

という内容である。

### (2) 分子生物学的病態解明アプローチ

#### ① 死後経過時間と miRNA

死後も miRNA は測定可能なのか、また経過時間と共に miRNA はどのように変化するのか、ラットを用いて各臓器で強発現している miRNA をターゲットとして検証した。

約10週のSDラット (平均426g) 8匹を過麻酔で安楽死させた後、2匹ずつ4グループ (死亡直後、死後6時間、12時間、24時間) に分けた。それぞれの個体から胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、すい臓、各100mgを採取し、ホモジナイズ後 mirVana™ MicroRNA Isolation Kit (Ambion) を用いて miRNA を抽出した。

抽出した miRNA は TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて RT-PCR を行い、その後、TaqMan 法による比較定量を行った。

ターゲットとした miRNA は次のとおりである。

- ・ let-7a (全体的に一定レベルで発現)
- ・ miR-16 (腎臓で強発現)
- ・ miR-26a (肺で強発現)
- ・ miR-1 (心臓で強発現)
- ・ let-7b (すい臓で強発現)
- ・ miR-122 (肝臓で強発現)

また、内部標準として snoRNA、および U6snRNA を用いた。

#### ② 死後変化に伴う miRNA の網羅的解析

ラット miRNA は400種におよぶ種類が報告 (miRBase ver10) されてはいるが、その中から350種を選別し、マイクロアレイ技術を用いて、死後ラット miRNA を網羅的に解析した。

約10週のSDラット (平均439g) 6匹を過麻酔で安楽死させた後、2匹ずつ3グループ (死後24時間、48時間、72時間) に分けた。それぞれの個体から心臓および肝臓をそれぞれ100mg採取し、ホモジナイズ後 mirVana™ MicroRNA Isolation Kit (Ambion) を用いて total RNA を抽出した。その後、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) を用いて抽出し totalRNA の確認を行った。

マイクロアレイによる解析は、miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent) を用いて miRNA を Cy3 で標識した後、DNA

MicroArray Scanner(Agilent)にてスキャンを行った。

さらに、新たなSDラット10週齢16匹(平均430g)を、死亡直後(n=3)、12時間後(n=3)、24時間後(n=3)、36時間後(n=3)、48時間後(n=4)に分け、それぞれの心筋を用いて、同様にマイクロアレイによる網羅的解析を行った。心筋のみを試料としたのは、興奮性譫妄による死亡は、心臓の機能が急に失われることが原因であり、将来的に心臓のmiRNA発現に注目すべきであろうと考えたからである。

#### 4. 研究成果

##### (1) アンケート調査結果

アンケートの結果を以下に示す。

- ・回答あり：59機関(回収率63%)
- ・興奮性譫妄を知らない：19機関(36.5%)
- ・用語だけは知っている：26機関(50%)
- ・そういった病態の解剖補助経験がある：1機関
- ・解剖執刀経験がある：6機関(11.5%)

興奮性譫妄という概念は法医医師の間ですらあまり知られていないということが判明した。これは、遺体の剖検情報からだけでは明らかな病態として判断しにくいとためであろうと思われる。

##### (2) 分子生物学的病態解明アプローチ

###### ① 死後経過時間とmiRNA

死後、新たにmiRNAが発現することは考えにくいことから、どれだけmiRNAが残存するのが実験の焦点となる。

各臓器において、前述の6種のmiRNAについて解析を行ったところ、死後24時間が経過した心臓ではmiR-1、肝臓ではmiR-122の発現がそれぞれ顕著であり、他の臓器ではいずれもmiR-16が高値を示した。この傾向は死亡直後の試料でも変わらず、死後24時間を経過してもmiRNAの保存状況は変わらないことが判明した。図1に心臓の、図2に肝臓の解析結果を示す。

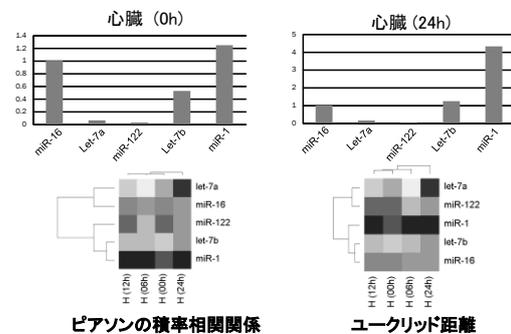


図1. ラット心臓のmiRNA解析結果

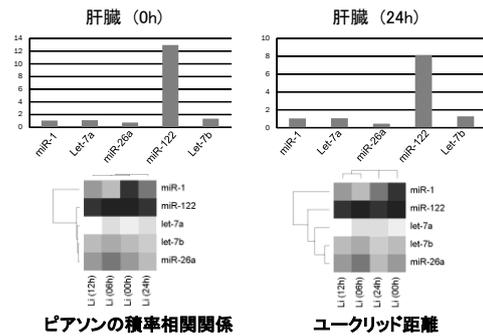


図2. ラット肝臓のmiRNA解析結果

グラフではより高い方が、相関図では色の濃い方が発現量の大きさを表している。

###### ② 死後変化に伴うmiRNAの網羅的解析

死後24時間も特定のmiRNAの存在が確認されたことから、死後72時間後まで測定時間を延ばし、検査対象miRNAも350種を同時に行うマイクロアレイを用いることで網羅的に解析を行った。

対象臓器は心臓と肝臓であり、その結果を図3に示す。

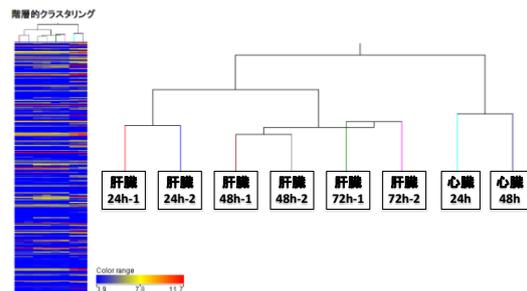


図3. 階層的クラスタリングによる発現miRNAの分類

色の濃い部分は発現が低い(残存していない)miRNAであるが、クラスターは24時間、48時間、72時間の肝臓でそれぞれ分かれている。心臓も肝臓とは異なるクラスターに属しているのがわかる。

次にK-Means法による350種のmiRNAの肝臓における発現強度と死後経過時間の関係を図4に示す。

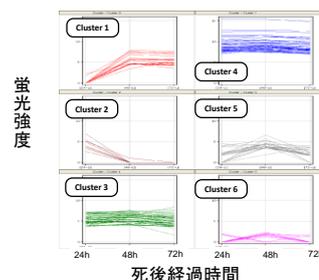


図4. K-Means法による発現miRNAの分類

死後経過時間の移り変わりと共に miRNA は 6 種類(cluster)に分類され、さらに大きく 3 つのグループに分類された。

Group 1 : Cluster 3, 5, 6

死後 24 時間以降、発現量が検出限界付近化それ以下であり、法医学的には応用が困難なもの。これには 350 種中 278 種(約 8 割)の miRNA が相当した。

Group2 : Cluster 4

死後 24 時間以降も高い発現量を示すもの。350 種中 45 種の miRNA。この中から、生前の病態を反映するもの、つまり、ストレスがかかることであ上昇し、死後もその量が保たれていれば、新たなストレスマーカーとして法医学的に利用可能となる。

Group3 : Cluster 2

死後 24 時間までは保存されているが、それ以降は急激に検出限界以下となるもの。350 種中 8 種の miRNA。これらは死後経過時間と推定に利用可能だと思われる。

Group4 : Cluster 1

死後 24 時間から 48 時間でその発現量を増やし、72 時間後までその量を保つもの。350 種中 19 種の miRNA。これらは独特な挙動を示し、リアルタイム等での精査が必要となる。

さらに、死亡直後から死後 48 時間までの心筋について、同様に 350 種の miRNA について解析を行った。その結果を図 5 に示す。

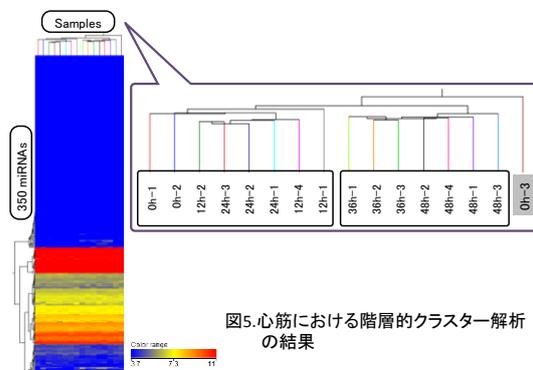


図5.心筋における階層的クラスター解析の結果

図 3 と同様に、色の濃い部分は検出限界以下の miRNA である。しかし、死亡直後から 24 時間までの早い段階のグループ、と死後 36 時間から 48 時間までの遅い段階のグループの 2 つに分類することができ、両者には miRNA の発現状況に違いがあることが判明した。

さらに、K-Means 法による 350 種の miRNA の心臓における発現強度と死後経過時間の関係を図 6 に示す。

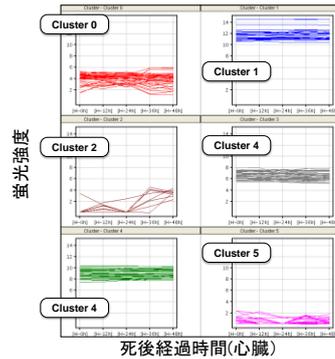


図6. K-Means法による心筋発現miRNA分類

これまた肝臓の場合と同じように 6 つの cluster に分類されると同時に、さらに大きく 3 つのグループに分けられた。

Group 1 : Cluster 0, 5

死後 24 時間以降、発現量が検出限界付近化それ以下であり、法医学的には応用が困難なもの。これには 350 種中 237 種(67.7%)の miRNA が相当した。

Group2 : Cluster 1, 3, 4

死後 48 時間まで高い発現量を示すもの。350 種中 105 種(30.0%)の miRNA。この中から、新たなストレスマーカーとして法医学的に利用可能となるものを選択することになる。肝臓の場合よりも種類が多いのは、やはり肝臓では miRNA の分解が早く死後の応用が困難になるためであると思われる。心筋では比較的保たれており、興奮性譫妄による心不全を示すマーカーが発見される可能性が示された。

Group3 : Cluster 2

死後の挙動が不安定な miRNA 8 種である。単に減少するだけでなく、48 時間を過ぎると増加したり、その残存量が不安定である。単に測定上のエラーなのか、新たな miRNA の発現はないはずなので、分解等何らかの反応でそれまで測定できない状態であったものが、死後経過時間と共に測定可能となったのであろうか、原因は今のところ不明である。今後の精査が必要である。

肝臓、心臓を中心に 350 種に及ぶラット miRNA を検索したところ、死後も測定が可能であるものが多数存在することが確認された。今後は動物実験により、生前にストレスをかけ、その後に心臓、肝臓、副腎等の miRNA 発現を解析することにより、新たなストレスマーカーが確立されることとなるであろう。

しかし、問題となるのは miRNA がどの messengerRNA (mRNA) をターゲットとしているかである。心筋での解析の際、不安定な発現状態を示していた 10 種の miRNA について、

どの mRNA に影響を与えているか, TargetScan Analysis ([http://www.targetscan.org/mmu\\_50/](http://www.targetscan.org/mmu_50/))を行ったところ, 1,648 種の mRNA がリストアップされた. 単に配列上のマッチングであり, その働きも多種多様なものであった. これらの中からストレスマーカーとして絞り込みを行うためにも, やはり, ストレスをかけた動物実験が必要となるであろう.

#### 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 10 件)

- (1) Kawasumi Y, Hosokai Y, Usui A, Saito H, Ishibashi I, Funayama M. Postmortem computed tomography images of a broken piece of a weapon in the skull. *Jpn J Radiology* 査読有 2011 (12.22 published online)
- (2) Hashiyada M, Usui K, Hayashizaki Y, Sakai J, Funayama M. Postmortem behavior of rat microRNA (miRNA) as determined by comprehensive microarray analysis. *Forensic SciInt: Genetics Suppl* 査読有 2011; 3: e210-211.
- (3) Usui K, Hayashizaki Y, Okubo Y, Hashiyada M, Funayama M. A case of death after ingestion of an agrochemical spreading agent. 査読有 *Forensic SciInt* 2011; 210 :117-21.
- (4) Hayashizaki Y, Usui K, Moriya T, Hashiyada M, Usui A, Hosokai Y, Kawasumi Y, Saito H, Funayama M. 査読有 *Legal Med* 2011; 13:193-297.
- (5) Takahashi S, Kinoshita H, Funayama M. Usefulness of catheter wires for identifying sites of vascular injuries. *Am J Forensic Med Pathol* 査読有 2011; 32: 319-320.
- (6) Usui K, Hayashizaki Y, Nakano A, Hashiyada M, Funayama M. Detection of inhaled butane in body samples following 4 days' medical treatment. *Res PractForens Med* 査読有 2011; 54: 247-250.
- (7) 臼井聖尊, 林崎義映, 橋谷田真樹, 舟山真人. ビニール袋に包まれ 5 年経た成人死体の剖検例. *法医学の実際と研究* 査読有 2011;54: 81-87.
- (8) 林崎義映・臼井聖尊・臼井章仁・細貝良行・川住祐介・齋藤春夫・橋谷田真樹・舟山真人. 同時多発性脳内出血の一例. *法医学の実際と研究* 査読有 2011;54: 77-80.
- (9) 橋谷田真樹, 高橋識志, 境 純, 臼井聖尊, 舟山真人. 死後変化が進行した死体

からの硬組織を用いた DNA 抽出の検討. *DNA 多型 査読有 Vol.18 p176-178, 2010.*

- (10) 先天性代謝異常症が死の機転に関与した可能性がある乳児急死の一例. 林崎義映, 大久保愉一, 森谷卓也, 臼井聖尊, 橋谷田真樹, 境純, 舟山真人. *法医学の実際と研究 査読有 第 53 集 p93-98, 2010.*

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 林崎義映, 臼井聖尊, 橋谷田真樹, 境 純, 舟山真人. 左右の冠状動脈に新鮮血栓がみられた一剖検例. 第 12 回日本法医学会学術北日本地方集会・法医学談話会第 98 回例会. 2011.10.21-22. 弘前
- (2) 舟山真人, 林崎義映, 臼井聖尊, 橋谷田真樹, 境 純, 中野杏里, 高根侑美, 佐々木勝博, 坂上和弘. 第 12 回日本法医学会学術北日本地方集会・法医学談話会第 98 回例会. 2011.10.21-22. 弘前
- (3) Hashiyada M, Usui K, Hayashizaki Y, Sakai J, Funayama M. Postmortem behaviour of rat microRNA (miRNA) as determined by comprehensive microarray analysis . 24th World Congress of the International Society for Forensic Genetics. 2011, Aug.29-Sep.3. Vienna, Austria.
- (4) 舟山真人. 本当になにもないところからどのようにして今を構築したか. 公開シンポジウム 地方における死因究明制度の構築. 第 95 次日本法医学会学術全国集会. 2011.6.15-17. 福島.
- (5) 橋谷田真樹, 臼井聖尊, 大久保愉一, 林崎義映, 境 純, 舟山真人. 死後変化に伴う microRNA(miRNA)の網羅的解析. 第 95 次日本法医学会学術全国集会. 2011.6.15-17. 福島.
- (6) 橋谷田真樹, 臼井聖尊, 大久保愉一, 林崎義映, 境 純, 舟山真人. 新たな STR マーカーによる日本人データベースの構築. 第 95 次日本法医学会学術全国集会. 2011.6.15-17. 福島.
- (7) Kawasumi Y, Hosokai Y, Usui A, Sato M, Takane Y, Saito H, Ishibashi T, Funayama M. What Information from Postmortem Computed Tomography should the Radiologist give to the Forensic Pathologist? 23rd European Congress of Radiology (ECR). 2011, March.2-6. Vienna, Austria.
- (8) Kawasumi Y, Hosokai Y, Usui A, Sato M, Takane Y, Saito H, Ishibashi T, Funayama M. Hanging: Post-mortem Computed Tomography. 23rd European Congress of Radiology (ECR).

2011, March.2-6.Vienna, Austria.

- (9) Kawasaki Y, Hosokai Y, Usui A, Sato M, Takane Y, Saito H, Ishibashi T, Funayama M. Vertebral Injuries: Post-mortem Computed Tomography. 23rd European Congress of Radiology (ECR). 2011, March.2-6.Vienna, Austria.
- (10) 白井章仁, 川住祐介, 齋藤春夫, 細貝良行, 高根侑美, 田村元, 町田好男, 森一生, 石橋忠司, 境 純, 高橋識志, 舟山眞人. 法医解剖前 CT 検査が剖検従事者の結核感染予防に有用であった 2 例、第 8 回オートプシー・イメージング (Ai) 学会. 2011.2.5. 千葉

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

東北大学大学院医学系研究科法医学分野

<http://www.forensic.med.tohoku.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

舟山 眞人 (FUNAYAMA MASATO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 40190128

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：