

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590855

研究課題名(和文)ダイビング剖検診断における血管内気泡の意義：加圧・減圧モデルからのアプローチ

研究課題名(英文) Autopsy diagnosis of decompression illness in rats by quantifying pulmonary emphysema

研究代表者

宮崎 哲次 (MIYAZAKI, TETSUJI)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10144825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では減圧障害の診断基準を確立することを目的とした。非肥満ラットと肥満ラットを用いて生前減圧群(AD)死後減圧群(PD)対照群の3群に分け、それぞれの群における血管内気泡と組織学的所見を比較した。特に肺の気腫性変化は画像処理ソフトを用いて定量評価した。血管内気泡はADとPD両方に確認された。AD群では、高圧負荷時間とともに血管内気泡と肺の気腫性変化が高度になり、死亡群ならびに肥満ラットにおいて変化がより著明となった。本研究では肺の気腫性変化の定量評価によって生前減圧と死後減圧を鑑別できる可能性を示した。本結果は、実際に減圧障害を含むダイビング関連死亡の剖検診断に役立つと考えている。

研究成果の概要(英文)：We aimed to clarify autopsy findings that would aid the diagnosis of DCI. Non-fatty and fatty rats were categorized into 3 groups: antemortem decompression group (AD), postmortem decompression group (PD), and controls, and we compared intravascular bubbles and histopathological findings. Pulmonary emphysema was quantified using ImageJ software. Intravascular bubbles were observed in both AD and PD groups. In group AD, prolonged hyperbaric exposure increased mortality, intravascular bubbles, and pulmonary emphysema, with fatty rats showing more marked changes than non-fatty rats. Intravascular bubbles and pulmonary emphysema in the dead rats were quantitatively greater. In fatty rats, pulmonary emphysema was quantitatively significantly greater in group PD than that in the dead rats of group AD. Our results indicate that the quantitative evaluation of pulmonary emphysema can potentially distinguish postmortem decompression from antemortem decompression.

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：スキューバダイビング 減圧症 法医解剖 剖検診断 肺気腫 脂肪塞栓

1. 研究開始当初の背景

当講座では、減圧障害を含め多くのダイビング関連死亡の解剖を経験している。当法医学講座が開設された1982～2012年度の31年間のダイビング関連死亡の剖検例について表1にまとめた。

表1 ダイビング関連死亡解剖の推移

	解剖数 (1年あたり)	平均年齢	病死の割合
I期	15 (1.2) 体	35.4歳	13.3%
II期	25 (2.1) 体	45.2歳	40.0%
III期	22 (3.7) 体	53.9歳	45.5%
合計	62 (2.0) 体	45.9歳	35.5%

期間中、62体のダイビング関連死亡の剖検例があり、近年では増加傾向を示している。また、解剖症例の平均年齢は上昇傾向を示し、それに伴ってダイビング中の病死の割合が増加している。ダイビング中に発症した心筋梗塞や脳卒中などによる病死は、解剖を行わなければ見逃される可能性が高い。適切な事故防止対策を行うためには、死因を究明して危険因子を明らかにする必要がある。解剖の重要性は益々増加すると考えている。

2. 研究の目的

減圧障害を含むダイビング関連死亡において、死亡状況の解明は診断に大きく寄与するが、法医解剖事例では死亡状況が明らかでない場合も少なくない。

本研究では、ダイビング関連死亡例の剖検所見から死亡時の状況を推定することはできないかと考えた。具体的には、減圧障害を含む生前減圧と死後減圧とを鑑別し、さらに、生前減圧のなかでも、減圧障害による死亡とそれ以外とを見分ける方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

減圧障害モデルラットを作製し、肉眼的・組織学的所見から死亡時の状況を推測する可能性について検討した。その指標として、肺の気腫性変化を定量評価することを検討した。また、肥満ラットと非肥満ラットに対して様々な条件の加圧・減圧を行い、減圧障害のリスクファクターについて検討した。さらに、加圧・減圧中の生理学的データを採取

し、加圧・減圧の負荷によって、生体内にどのような変化が生じているのかについても検討を行った。

なお、本研究は、学内の動物実験に関する倫理委員会の承認を得て実施した。

(1)装置：内径16cm、全長50cmの高圧チャンバーを作成して実験を行った(図1)。チャンバー内の圧力はリアルタイムで表示され、チャンバーに接続する吸気バルブ、排気バルブによって加圧・減圧をコントロールする。加圧空気はコンプレッサーから送られ、チャンバー内の空気を循環させながら圧力状態を保持することができる。



図1 高圧チャンバー

(シン・コーポレーション社製)

(2)実験動物：非肥満モデルとしてWistar系ラット(12週齢, 396±22g)、肥満モデルとしてZUC-Lepr(13～15週齢, 587±15g)を使用した。

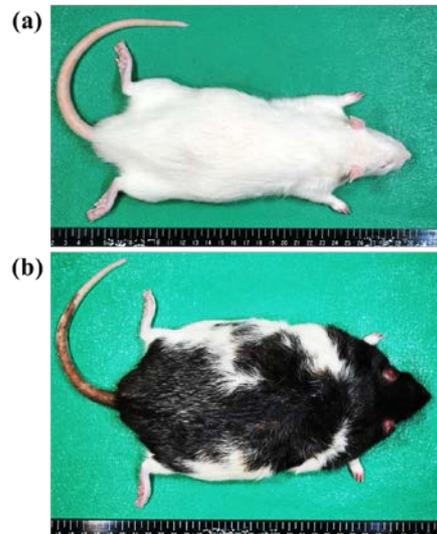


図2 (a)非肥満ラット (b)肥満ラット

(3)実験群：ダイビング関連死亡の死亡状況に合わせて以下の3つの群とした。

- ①生前減圧群：ダイビング中、浮上した後に死亡したモデル
- ②死後減圧群：ダイビング中、浮上する前に死亡したモデル
- ③コントロール群：加圧・減圧負荷がない、すなわち海面を浮遊するだけで潜水していないモデル

実際のダイビングでの潜水・浮上速度を参考にして、加圧・減圧の速度は0.1MPa/分として、0.6MPa（水深約50m相当）で規定時間観察した後0.1MPa/分の一定速度で減圧した。

- ①生前減圧群では、加圧後0.6MPaで1, 2, 3時間観察する3グループを作った。減圧終了後20分まで観察を行いその時点で生存しているものはCO₂にて安楽死させた。死亡例は心停止まで観察した。
- ②死後減圧群では、加圧後0.6MPaを3時間保った後、加圧状態でCO₂で安楽死させた。その後に0.1MPa/分で減圧した。
- ③コントロール群は、加圧・減圧を行わずに大気圧（0.1MPa）で3時間放置し、その後、CO₂で安楽死させた。

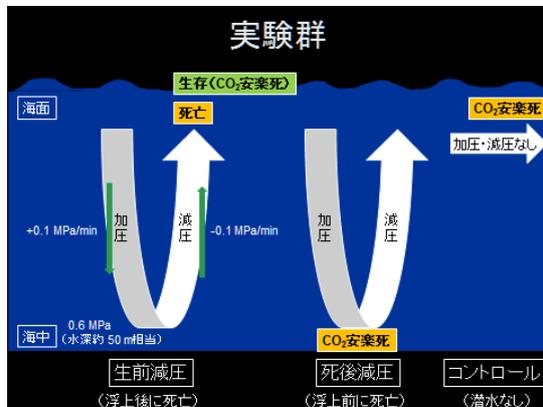


図3 各実験群と実際の潜水イメージ

(1) 剖検所見について

①血管内気泡の評価：

各群において、腹壁血管ならびに大血管における血管内気泡を点数化して評価する。点数化の基準は気泡量に応じて0～3点とした（図4）。

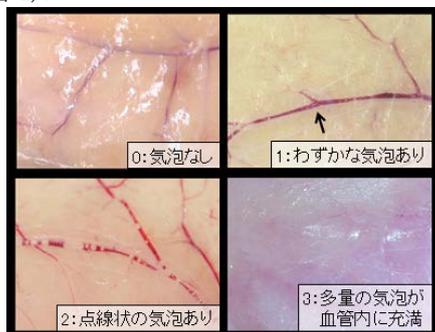


図4 血管内気泡の評価

②組織学的検討：

各群に対して肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、大脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。パラフィン包埋後に3μm厚で薄切し、HE染色を行った。さらに、脂肪塞栓の検索のため、凍結包埋後に10μm厚で薄切して、Oil red O染色を行った。

③肺気腫性変化の定量評価：

左右肺下葉の中枢部（図5(a)）と末梢部（図5(b)）の合計4視野を選択して、各群における肺の気腫性変化を定量評価した。

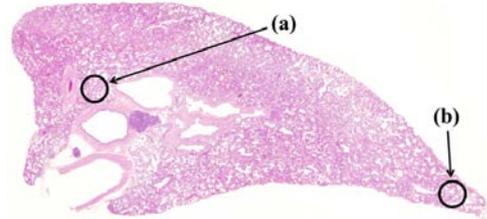
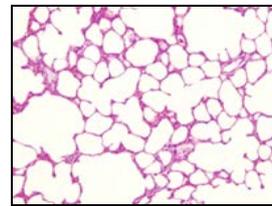
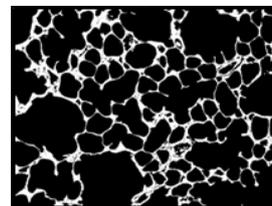


図5 肺の組織写真

対象視野について、光学顕微鏡下で倍率100倍、感度ISO 800、解像度4140×3096 pixelで撮影し、画像処理ソフトImageJを用いて処理を行った。



①カラー写真をOtsuの方法により二値化（白黒化）する。肺胞腔が黒、肺胞壁が白となる。



②各視野の組織全体の面積に占める、肺胞腔（黒）の面積の割合を算出する。（肺胞腔/組織全体=%Area）。



%Areaの値が大きいほど、肺の気腫性変化の程度が強いことを示すことになる。

左右肺の中枢部と末梢部の計4視野の%Areaの平均値を気腫性変化の定量評価として使用した。

(2) 減圧障害のリスクファクターについて

①加圧時間による影響：

生前減圧群において、加圧時間による影響を評価するために、加圧持続時間を1, 2, 3時間とする3グループを作製した。それぞれのグループにおける死亡率、剖検所見、生理学的変化（後述）について検討した。

②肥満の影響：

同じ加圧・減圧条件（加圧保持時間3時間）を負荷して、肥満ラットと非肥満ラットの死亡率、剖検所見、組織学的所見ならびに生理学的変化（後述）を比較した。

(3)加圧・減圧時の生理学的変化について

各群に対して、加圧開始から実験終了まで、心電図、心拍数、呼吸運動をモニターして比較検討を行った。

4. 研究成果

それぞれの検討項目についての結果を表2, 3にまとめた。なお、生前減圧群の死亡例は、死亡経過および解剖所見から全て減圧障害によって死亡したと判断した。

表2 非肥満ラットの実験結果

Groups of non-obese rats	n	Mortality (%)	Degree of bubbles	%Area (%)	
AD	1 h	6	17	0.8	54.0
	Survival	5	-	0.6	48.3
	Death	1	-	2.0	82.5
	2 h	6	50	1.3	60.0
	Survival	3	-	0.3	51.1
	Death	3	-	2.3	68.9
3 h	6	33	1.2	62.2	
	Survival	4	-	0.5	52.1
	Death	2	-	2.5	82.3
	PD	3	-	1.7	80.5
Control	3	-	0.0	40.9	

表3 肥満ラットの実験結果

Groups of obese rats	n	Mortality (%)	Degree of bubbles	%Area (%)	
AD	1 h	6	50	1.0	51.8
	Survival	3	-	0.0	49.3
	Death	3	-	2.0	54.2
	2 h	6	100	2.5	61.5
	Survival	0	-	-	-
	Death	6	-	2.5	61.5
3 h	6	100	3.0	58.9	
	Survival	0	-	-	-
	Death	6	-	3.0	58.9
	PD	6	-	2.3	77.3
Control	6	-	0.0	45.4	

AD：生前減圧群 / PD：死後減圧群

(1)剖検所見について

①血管内気泡：

生前減圧群において気泡量を比較すると、加圧負荷時間が1時間のものよりも、2, 3時間のものが気泡量が多い結果であった。また、同じ加圧負荷時間であっても生存例に比較して死亡例において気泡量が多い傾向が

ある。さらに、生前減圧群の生存例よりも死後減圧群の方が気泡量が多い傾向があった。なお、コントロール群で気泡を認めたものはなかった。

また、同じ加圧負荷時間で比較すると非肥満ラットと肥満ラットでは、肥満ラットの気泡量が多い結果であった。

②組織学的検討：

観察した諸臓器において、変化が最も著明に認められた臓器は肺であった。血管内気泡の量に相関して、肺には肉眼的ならびに組織学的に気腫性変化が認められた。

加圧を行った生前減圧群ならびに死後減圧群では、程度の差こそあれ全てに肺胞の拡大が認められた(図7(a)(b)(c))のに対して、加圧負荷のない対照群では肺の含気が乏しかった(図7(d))。さらに、生前減圧群の生存例(図7(b))よりも死亡例のほうが気腫性変化が強くと(図7(a))、また、生存例(図7(b))よりも死後減圧群(図7(c))のほうが気腫性変化が強いことが明らかとなった。肺の組織学的所見の相違は、ある程度、死亡時の状況を反映していることが示された。

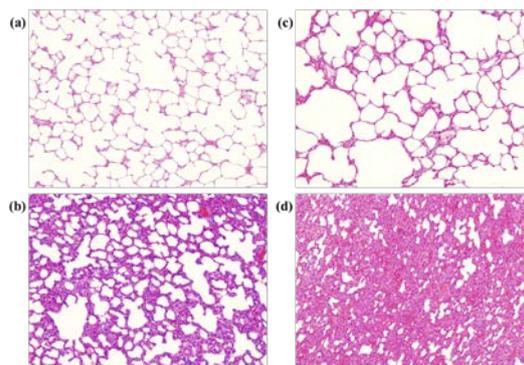


図7 肺の気腫性変化の比較

(a)生前減圧群・死亡例 (b)生前減圧群・生存例
(c)死後減圧群 (d)対照群

一方、文献的には減圧障害に伴って肺の脂肪塞栓が生じることが報告されている。本研究でも、肺脂肪塞栓が減圧障害の剖検診断の一助となる可能性を考えて脂肪塞栓の検索を行った。まず、Wistar系ラットでは、脂肪塞栓が全く認められなかった。一方、肥満ラットでは、対照群にも肺脂肪塞栓を認めた。結果として、肺脂肪塞栓を減圧障害の剖検診断として使うには不適當な結果であった。

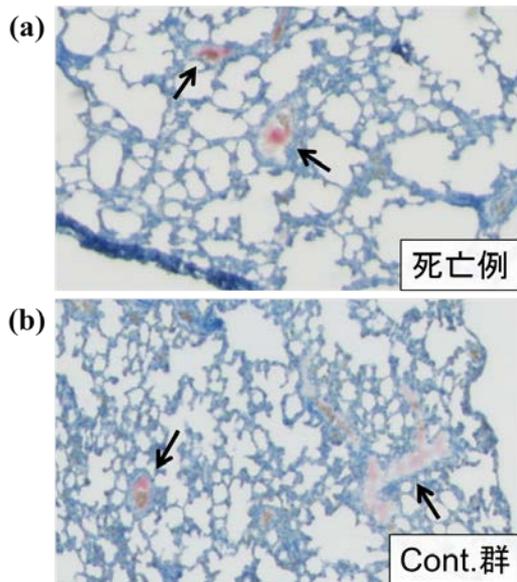


図8 肺脂肪塞栓 (Oil red O 染色)

③肺気腫性変化の定量評価：

肺の組織学的所見によって、ある程度、死亡時の状況が推測できる可能性が示されたため、その変化を定量化して検討を行った(図9, 10)。

肉眼的、組織学的に違いが明らかであった、対照群と比較すると、生前減圧群の死亡例、および死後減圧群は有意に大きな%Area, すなわち強い気腫性変化を認めた(図9)。さらに、同様に明らかな差を認めた、生前減圧群の生存例と比較すると、生前減圧群の死亡例および死後減圧群のほうが有意に大きな%Area, 強い気腫性変化を認めた(図9)。一方、気腫性変化がともに強かった生前減圧群の死亡例と死後減圧群とを比較すると、非肥満ラットでは有意差を認めなかったが、肥満ラットでは生前減圧群の死亡例よりも死後減圧群の方が、有意に大きな%Area, 強い気腫性変化が認められた。

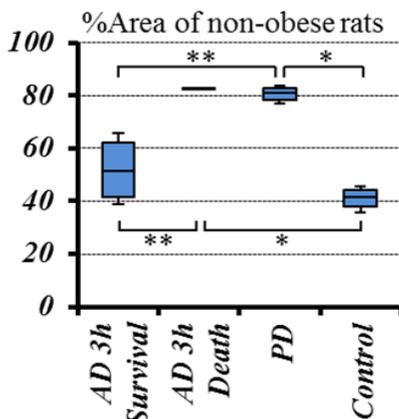


図9 気腫性変化の定量評価 (非肥満ラット)

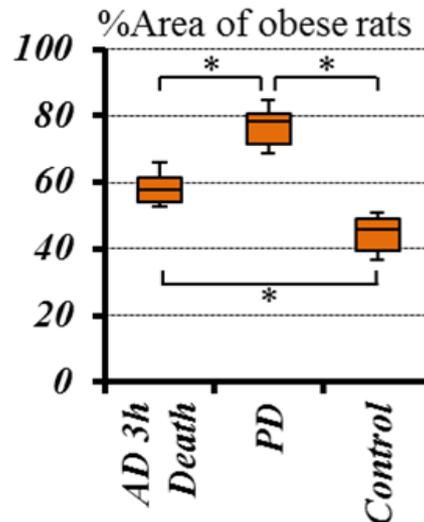


図10 気腫性変化の定量評価 (肥満ラット)

(2)減圧障害のリスクファクターについて

①加圧負荷時間による影響：

生前減圧群の死亡率について検討すると、加圧負荷時間が1時間のものよりも、2, 3時間のものの方が死亡率が高い結果であった(表2, 3)。

②肥満の影響：

減圧障害のリスクファクターには様々なものがあるが、肥満もその一つとされている。表2に示したように、肥満ラットでは2時間、3時間負荷群の全例が死亡した。同じ加圧負荷時間においても、非肥満ラットと肥満ラットを比較すると、肥満ラットの方が死亡率が高い結果であった。また、死亡率と血管内気泡量は相関しており、非肥満ラットに比較して肥満ラットの気泡量は多い傾向があった。

(3)加圧・減圧時の生理学的変化について

生理学的データは個体差が大きく、定量的な評価は困難であったが、全体としては共通した変化が観察された。生前減圧群の典型的なグラフを図11に示した。

まず、バイタルサインが安定するまで観察し、その後一定速度(0.1MPa/分)で加圧した。0.6MPaを保持している間は、心拍数がゆるやかな上昇傾向を示した例が多かったが、全体としては安定したバイタルサインを示した。規定の加圧保持時間が経過した後、一定速度(-0.1MPa/分)で減圧したところ、全例で減圧時に不整脈や呼吸異常が認められた。特に、浅い水域に相当する0.2→0.1MPaへの減圧で、図11に示すような著しい不整脈や呼吸運動の異常が多発した。これらの異常は、生存例、死亡例を問わず発現した。

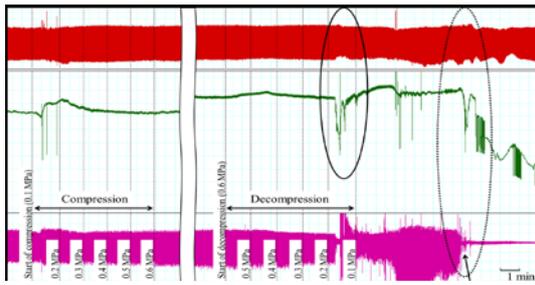


図 11 生理学的データ
上から心電図, 心拍数, 呼吸運動を示す

(4)まとめ

気泡量や気腫性変化の程度を定量評価することにより, 生前減圧群の生存例と死亡例, さらに死後減圧群と対照群とを鑑別できる可能性が示された. この結果は, 気泡量や気腫性変化の程度を定量評価することにより, ダイバーの死亡状況, すなわち, ダイビング中, 浮上した後に死亡したのか, 浮上する前に死亡したのかを明らかにすることができる可能性を示しており, 実際のダイビング関連剖検例において実務応用できると考えている.

肥満ラットと非肥満ラットとを比較することによって, 肥満ラットでは加圧・減圧負荷による減圧障害の発生率, 死亡率が有意に高いことが示された. 減圧障害の発症, 予後には, 潜水中に体内に溶存する窒素の量が大きな影響を及ぼす. 窒素の溶解度は脂肪組織において非常に高く, 他組織の5倍以上であるとされている. したがって, 同一条件の加圧・減圧であれば脂肪量の多い肥満ラットではより多くの窒素が体内に溶け込むことになり, 減圧とともに大量の気泡が体内に発生することになる. この結果は, 肥満ダイバーへの啓発を行う上で貴重な資料となると考えている.

生理学的データでは, 生死にかかわらず, 浅い水域に相当する 0.2→0.1 MPa への減圧で, 図 11 に示すような著しい不整脈や呼吸運動の異常が多発した. その理由はボイルの法則「一定の温度下では, 気体の体積は圧力に反比例する」によって説明される. つまり, 気体体積の変化率は深い水域でよりも浅い水域の方が大きくなることから, 浅い水域では気泡がより大きくなることになる. 確かに, 深い水域でのダイビングは減圧障害のリスクであるが, 本研究では浅い水域でのダイビングが必ずしも安全でないことを示し, 実務的にも広く周知されるべきであると考え

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Maki Fukasawa, Yoko Ihama, Kenji Ninomiya, Yuka Kawakami, Takumi Nagai, Chiaki Fuke, Tetsuji Miyazaki: Autopsy diagnosis of decompression illness in rats by quantifying pulmonary emphysema. Romanian Journal Legal Medicine 2013(21)263-270 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 深沢真希, 井濱容子, 二宮賢司, 永井匠, 福家千昭, 宮崎哲次 「Morphological investigation of decompression illness in a rat model」第 97 次日本法医学会学術全国集会, 2013. 6. 27 (札幌)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 哲次 (MIYAZAKI TETSUJI)
琉球大学・医学研究科・教授
研究者番号: 10144825

(2) 研究分担者

井濱 容子 (IHAMA YOKO)
琉球大学・医学研究科・助教
研究者番号: 80347137

(3) 連携研究者

なし