

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670346

研究課題名(和文) NMR技術を用いた死体髄液からの頭蓋内傷病変の診断法の新規開発

研究課題名(英文) Development of new diagnostic technique using nuclear magnetic resonance spectroscopy for detection of intracranial injury from postmortem cerebrospinal fluid

研究代表者

平川 慶子 (HIRAKAWA, KEIKO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30165162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、死体髄液を用いて、頭蓋内損傷の有無を鑑別できる、核磁気共鳴(NMR)分析を用いたデータ解析手法を開発した。死体髄液を視覚的に観察し、くも膜下出血や脳内出血か否かを観察していた従来の方法と比べて、我々の技術により診断できる疾患の範囲や、診断の特異度・感度の点で、発展性が見込まれる。我々の方法は、頭蓋内損傷の詳細な診断を行うには不十分であるが、この技術を更に改善させ、死体検案における診断精度の向上を図りたい。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the data processing technique using nuclear magnetic resonance spectroscopy for detection of intracranial injury from postmortem cerebrospinal fluid. Our technique may become useful to detect a variety of lesions and improve the specificity and sensibility of diagnosis, when compared with the conventional method in which cerebral hemorrhage and subarachnoid hemorrhage have been diagnosed merely by observation of cerebrospinal fluid. While our technique is not enough to diagnose intracranial injury precisely, further development of this technique may allow improvement of the accuracy of postmortem diagnosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：法医学

1. 研究開始当初の背景

死体検案では、髄液の採取と視覚的な観察はルーチン的な検査であり、血性であれば「くも膜下出血」や「脳室穿破の脳出血」と診断し、透明であればこれらの存在は否定的と判断する。しかし、透明髄液であっても、その他の頭蓋内傷病変の存在は否定できず、これらの確定には、最終的には解剖や画像検査が必要となる。一方、我が国では諸外国と比べて解剖率が低く、死亡時画像検査(Ai)も全異状死で実施できる体制ではない。法医実務的には、とりわけ、硬膜下血腫等の頭蓋内損傷の存在を的確に検出できるか否かが重要である。

我々は、以前より、基礎的研究として死後の動物の血清や脳・骨格筋をNMR (nuclear magnetic resonance、核磁気共鳴) 分析して死因や死後変化との関連について検討し (Legal Medicine 2009 11: S282 - S285.)、その成果のヒトへの応用をめざしてきた。一方、我々は、「生体試料をNMR計測値して一括処理してパターン認識する」解析技術を新規開発した。本技術を用いると、動物実験では、酸化ストレスや薬剤の組織・細胞への影響を良好に検出することができた (PLoS ONE 2010 5(6): e11172, BMC Medical Imaging 2012 12:28)。

また、我々は、小児科領域の臨床研究でも、上記の技術を用いることにより、従来法では早期診断が困難であった「複雑型熱性けいれん (重症型)」と「急性脳症 (インフルエンザ脳症を含む)」を、来院直後に採取した髄液を用いて早期鑑別することに成功した (右図、日本小児学会学術集会 2011/2012)。

以上、ヒト髄液試料をNMR計測することで診断的意義のある情報を取得する基本的な技術の開発に成功した経緯から、本技術が法医実務における死体髄液検査の新しい手法として応用できると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、死体検案で採取した死体髄液試料から、頭蓋内の傷病変の存否を識別する検査技術を開発することにより、検案診断の精度を高めると共に、解剖要否の判断根拠として活用できるようにすることを目的とした研究を行った。死体髄液をNMR計測し、我々が新規に開発した「NMR計測して一括処理してパターン認識する」解析技術を適用することにより、死因としての頭蓋内傷病変 (内因性の脳出血・脳梗塞や外傷性頭蓋内出血・脳浮腫) と頭蓋外傷病変 (心臓死など) が、法医学の診断実務上で鑑別できるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 髄液検体の剖検情報と解析対象の選択

平成 24~25 年に、東京都監察医務院ならび防衛医科大学校法医学講座における、死体検案・法医解剖の症例から、死体髄液を採取し、NMR計測を行った。死因、死後経過時間、生前の病歴や、主要な剖検所見・血液生化学検査結果などの剖検情報を取得し、後の解析で取り扱いが容易となるようにデータベース化した。剖検情報を詳細に検討し、本研究では、「頭蓋内傷病変」により死亡した事例群と、「心臓疾患などにより」死亡した事例群を解析対象とした髄液NMRデータの解析を中心に研究を行った。

(2) NMR計測およびデータ解析

① 検体の前処理・保存など

剖検死体より採取した髄液は遠心分離 (1、500ppm、5分) により細胞成分を除去し、 -80°C に保存した。NMR計測時に解凍して使用した。

② NMR測定試料の調整・NMR計測

解凍した髄液 $50\mu\text{L}$ に内部ロック用重水 (D_2O ISOTEC) $490\mu\text{L}$ およびケミカルシフト確認用内部標準物質 3-(トリメチルシリル)-2、2'、3、3'-テトラジュウテロプロピ

オン酸 (TMSP-d4, 1.0mM/D₂O 溶液) 60 μL を加え、5 mm 径ガラス性 NMR 試料管 (Wilmad-LabGlass) に入れた。

採取した髄液を NMR 計測 (水信号消去 1 次元測定 (低分子量の成分や高分子の両成分が重なって検出)、C PMG スピンエコー測定 (主として低分子量の成分が検出)) した。Alice2 for metabolome™ で、通常の NMR スペクトル処理と、観測周波数範囲の信号強度分布としてのデータの数値化を行い、Unscrambler X ver. 10.3 (CAMO 社) を用いて主成分分析 (PCA) による解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 髄液検体の剖検情報と解析対象の選択
髄液を採取した症例数は計 118 症例で、サンプルの内訳は表の通りであった。

男性 42例

年齢 61.8 ± 18.4 歳
死後経過時間 37.8 時間
(最大 241.3 時間, 最小 4.9 時間)
心拍再開 3例

女性 76例

年齢 71.5 ± 18.3 歳
死後経過時間 35.1 時間
(最大 121.7 時間, 最小 8.7 時間)
心拍再開 2例

この内、①頭部外傷による死亡、あるいは頭部外傷を併発している非頭部外傷死の事例を「頭部外傷例」、②頭蓋内傷病変の併発がない心疾患事例とした内訳は以下のとおりであった。

頭部外傷例

男性 4例 平均 70.0 歳
女性 1例 92 歳

心疾患例

男性 7例 平均 62.0 歳
女性 1例 84 歳

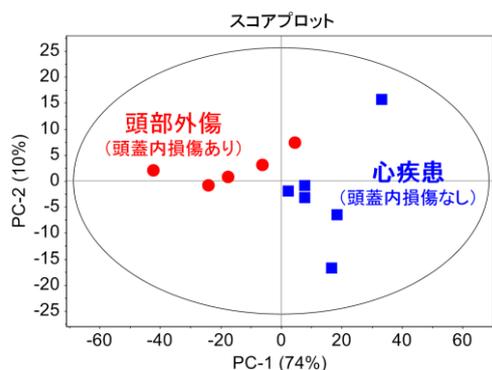
解析対象事例の詳細を下表に示した。

頭部外傷例					
No	9	161	237	240	243
性別	男性	男性	男性	男性	女性
年齢	79	59	51	91	92
死後経過時間	20.7	21.3	16.8	29.3	35.8
特記事項	転倒により頭部受傷。9日間入院して死亡。入院中意識は回復せず。	自転車で転倒して、病院へ搬送されたが、治療の甲斐なく死亡。	脂肪性肝硬変あり。布団内で容態急変していたのを発見。	自宅で死亡発見。	路上で転倒し脳挫傷・硬膜下血腫で入院。7日後入院中に急変死亡
死因	頭蓋内損傷(脳挫傷、硬膜下血腫、頭蓋骨骨折(くも膜下出血))、肺炎合併	頭蓋内損傷(硬膜下血腫、脳挫傷、脳浮腫)	外傷性頭蓋内損傷、硬膜下血腫・脳内血腫・脳浮腫あり	急性虚血性心不全、低体温と脳挫傷・硬膜下血腫の併発あり	肺動脈血栓塞栓症、頭部外傷の併発あり
病歴の有無	虚血性心疾患			有	有
	高血圧			有	有
	糖尿病			有	有
	脳梗塞			有	
	C型肝硬変		有		
心拍再開	なし	なし	有	なし	なし
BMI	21.2	18.0	17.7	19.5	21.8
脳重量	1460	1380	1530	1254	962
死亡時高体温	有	不明	有	なし	有
血液エタノール	×	0	0.1以下	0	0
尿エタノール	×	×	0.011	0	0.35

心疾患例									
No	61	87	126	182	188	211	286	179	
性別	男性	男性	男性	男性	男性	男性	男性	女性	
年齢	57	79	53	48	69	62	66	84	
死後経過時間	51.3	9.9	21.8	36.2	36.0	18.9	30.6	46.5	
特記事項	自宅で急変しているのを発見された。病歴なし。	自宅で急変。蘇生に反応せず。死亡確認。	ホルター心電図装着中の突然死。直接死因は明らかに不整脈死。	自宅で急変。病歴なし。	兄弟げんか直後に急変。	飲酒運転で他車と接触。直後に急変。	食事時の急変	単身独居。死亡前に、嘔吐、便秘あり。	
死因	急性虚血性心不全	急性虚血性心不全	急性虚血性心不全、致死性不整脈	急性虚血性心不全、心肥大を併発	急性虚血性心不全、心肥大を併発	急性虚血性心不全、心肥大を併発	急性虚血性心不全	虚血性心不全、結腸の虚血性変化を伴う	
病歴の有無	虚血性心疾患	有							
	高血圧		有			有	有	有	
	糖尿病		有			有	有		
	脳梗塞								
	C型肝硬変								
心拍再開	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	
BMI	29.3	23.3	27.8	27.6	32.0	23.3	25.8	15.8	
脳重量	1540	1189	1514	1600	1290	1270	1453	1104	
死亡時高体温	なし	なし	なし	なし	不明	不明	なし	なし	
血液エタノール	0.36	1.23	0	0	0.1以下	0.1以下	0	0	
尿エタノール	×	0.77	0	×	×	0.37	×	×	

(2) NMRデータ解析の結果
主成分分析 (PCA) の結果を下記に示す。

スコア



各サンプルの主成分1 (PC-1) スコアおよび主成分2 (PC-2) スコアを2次元プロット図で示した。(データサイズ: サンプル数 11 × 変数 (NMR データ) 230) 最終的に 48 変数に絞って解析した結果を図に示した。

虚血性心疾患例のうち、血液あるいは尿中のエタノール値が高いものは解析から除外した。(No. 87 および No. 211) 「頭部外傷群」と「心疾患群」はそれぞれクラスター化し、それぞれのグループは特に PC-1 軸方向で明らかに分離した分布を示した。

関連主成分負荷量 (correlation loadings)

PC-1 および PC-2 の関連主成分負荷量について、正負それぞれ上位 1 ~ 5 位の値を示した変数 (帯域の中心値) およびその関連主成分負荷量の値を表にまとめた。

PC-1

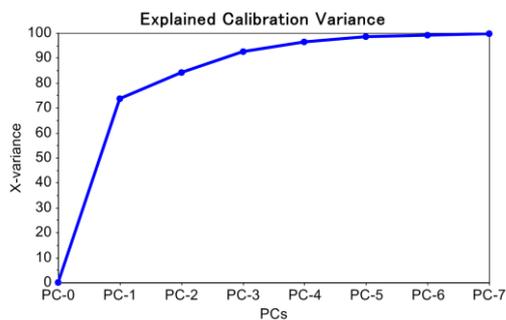
	NMR variables (chemical shift)	Correlation loadings		NMR variables (chemical shift)	Correlation loadings
1	3.86	-0.85	1	2.12	0.97
2	6.95	-0.81	2	3.97	0.92
3	8.11	-0.78	3	7.22	0.91
4	7.68	-0.77	4	2.16	0.90
5	6.38	-0.71	5	1.50	0.84

PC-2

	NMR variables (chemical shift)	Correlation loadings		NMR variables (chemical shift)	Correlation loadings
1	7.77	-0.71	1	3.42	0.49
2	5.96	-0.50	2	5.52	0.48
3	2.73	-0.41	3	1.50	0.46
4	2.16	-0.36	4	8.16	0.46
5	2.18	-0.36	5	3.72	0.44

累積寄与率

1 番目の主成分 (PC-1) から 7 番目の主成分 (PC-7) までの固有値の合計 (累積寄与率) を下記グラフに示した。



今回解析対象として選択した検体についてデータについては、我々が開発した「NMR計測して一括処理してパターン認識する」解析技術を適用することにより、死因としての頭蓋内傷病変と心疾患が識別可能である結果を得ることができた。頭蓋内損傷の詳細な診断を行うには不十分であるが、PLS 判別分析法や SVM 法など、クラス分類に用いるアルゴリズムを活用して、この技術を更に改善させ、死体検案における診断精度の向上を図りたい。

本技術は、死体髄液を視覚的に観察し、くも膜下出血や脳内出血か否かを観察していた従来の方法と比べて、診断できる疾患の範囲や、診断の特異度・感度の点で、発展性が期待できると考えている。

5. 主な発表論文等

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 :

混合物試料の特性を表現する方法、混合物試料の特性を評価する方法、混合物試料の属性を識別する方法、及び混合物試料に由来する電磁波信号を処理する方法

発明者 :

小池薫、平川慶子、大野曜吉、森山剛、森川秀行、村木秀樹

権利者 :

国立大学法人京都大学、学校法人日本医科大学、学校法人東京工芸大学、株式会社ニユフローズ

種類 : 特許権

番号 : 特願 2013-255181

(特開 2015-114157)

出願年月日 : 2013 年 12 月 10 日

国内外の別 : 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平川 慶子 (HIRAKAWA KEIKO)

日本医科大学 医学部 助教

研究者番号 : 30165162

(2) 研究分担者

金涌 佳雅 (KANAWAKU YOSHIMASA)

防衛医科大学校 医学教育部

助教

研究者番号 : 80465343

(3) 研究分担者

小池 薫 (KOIKE KAORU)

京都大学 医学 (系) 研究科(研究院)

教授

研究者番号 : 10267164

(4) 連携研究者

森山 剛 (MORIYAMA TUYOSHI)

東京工芸大学 工学部

准教授

研究者番号 : 80449032

(5) 連携研究者

大野 曜吉 (OHNO YOUKICHI)

日本医科大学 医学 (系) 研究科(研究院)

教授

研究者番号 : 70152220

(6) 連携研究者

金武 潤 (KANETAKE JUN)

防衛医科大学校 医学教育部

教授

研究者番号 : 90326661