

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860492

研究課題名(和文) 虐待ストレスによる脳及び内分泌系の変化の解明と虐待診断への応用

研究課題名(英文) Investigation of nervous and endocrine system changes due to stress: practical application for the postmortem diagnosis of abuse

研究代表者

林 敬人(Hayashi, Takahito)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：40512497

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)：虐待ストレスに基づく内分泌系変化がもたらす神経系並びに免疫系の変化について包括的に検討した。まず、心理的虐待モデルである拘束ストレスマウス及び小児虐待死剖検例の検討によって、虐待ストレスによって副腎内分泌系に変動がみられ、それらを解析することは小児虐待の法医病理学的診断及び虐待期間推定の指標となり得る可能性が示唆された。神経系については、有意な結果は得られなかった。免疫系については、ストレスによる胸腺の萎縮には免疫系の分子CCR5発現が関与していることが示唆され、小児虐待の法医病理学的証明の新規マーカーとなる可能性、さらには虐待による胸腺萎縮を予防する標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated nervous and immune system changes attributed to endocrine system ones by abuse stress. At first, abuse stress causes adrenal endocrine system changes from the investigation using a mouse restraint stress model of psychological abuse and forensic autopsy cases. Our results suggest that the analysis of the changes may be useful for the diagnosis of child abuse and determining the duration. We could not show significant changes of the nervous system caused by endocrine system ones in elderly abuse cases. As for the immune system, CCR5 expression was up-regulated in the thymus of child abuse cases and therefore, CCR5 may be a novel marker for the diagnosis of child abuse and therapeutic marker for thymic atrophy.

研究分野：法医学

キーワード：児童虐待 高齢者虐待 拘束ストレス 副腎内分泌系 胸腺萎縮 CCR5 法医病理学的診断

1. 研究開始当初の背景

小児虐待例では胸腺が萎縮し、免疫系に異常を来すことはよく知られている。胸腺萎縮は、ストレスによって視床下部-下垂体-副腎皮質系 (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA axis) を介して副腎皮質から分泌される glucocorticoid (GC) が、胸腺リンパ球をアポトーシスに導くために起こると考えられている。したがって、虐待による強いストレスが HPA axis に影響を及ぼす可能性が十分考えられる。一方、近年、小児虐待は成人後のいくつかの精神疾患(うつ病、PTSD、境界型人格障害、統合失調症、反社会性人格障害)発症の危険因子と言われている。精神疾患発症の機序には、胸腺と同様に虐待ストレスに反応して分泌される GC によって前頭葉、海馬、脳梁、小脳等の脳各部位の容積が著明に減少することが関与すると考えられており、虐待ストレスが内分泌系の変化を介して神経系にも影響を及ぼすことが示唆される。そこで、今回の研究では、虐待ストレスによる内分泌系の変化の全体像を解明するとともに、内分泌系変化に伴う神経系の変化、さらには免疫系の変化を包括的に解明する研究を企画した。

2. 研究の目的

まず、心理的虐待の動物モデルとして長期拘束ストレスマウスを用いて長期ストレス下における HPA axis の動態解析を行い、その結果を実際の虐待死剖検例に応用することで虐待の法医学的証明に有用であるか否かを検討する。次に、虐待ストレスによる内分泌系変化がもたらす神経系の変化について、虐待死剖検例の各脳組織における神経細胞死の有無を中心に検討する。さらに、内分泌系変化が免疫系にもたらす変化について、拘束ストレスマウス及び実際の虐待死剖検例を用いて、炎症においてマクロファージの遊走等に関わる CC ケモカイン受容体の 1 つである CCR5 発現に注目した検討を行った。以上の検討で得られた成果を臨床分野でも被虐待児の早期発見につながる指標として応用できるようにすることで、ひいては虐待被害者を減らすことが本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

(1) 長期拘束ストレスマウスにおける副腎内分泌系の変化について

7 週齢の雄性 Balb/c マウスを用い、無麻酔下で空気穴を開けた 50ml ファルコンチューブ内に 1 日 1 回 1 時間入れる拘束ストレスを 1 日のみ、1, 2, 3, 4 週間連続する 5 群 (各群 n=8) を用意する。最後の拘束処置終了後、1 時間後に安楽死させ、血清・副腎を採取した。各群の血清 ACTH 値、コルチコステロン値、コルチゾール値を EIA 法にて測定した。副腎は、ホルマリン固定後に 1% Triton X-100 含有クロロホルム溶媒内にて副腎内コ

ルステロールを抽出し、その量を EIA 法にて測定した。また、もう一側の副腎は、RNA を抽出し、Real-time PCR 法にて、副腎におけるコレステロール供給に関わる各種遺伝子 (Scavenger receptor-class B type I (SR-BI), Low density lipoprotein receptor (LDLR), HMG-CoA reductase (HMGR) 並びに Hormone-sensitive lipase (HSL)) 発現及びクロモグラニン A (CgA) 遺伝子発現を検索した。

(2) 小児虐待死例における副腎内分泌系の変化について

入院後死亡例を除く小児の虐待死 12 例 (身体的虐待 4 例、ネグレクト 8 例) 及び対照 12 例を試料として、副腎重量 (体重、身長、BMI で補正)、副腎内コレステロール量を測定した。また、副腎切片について SR-BI、CgA に対する免疫染色を行い、陽性スコア (染色強度と陽性割合で算出) により発現程度を検討した。

(3) 高齢者虐待死例における神経系変化について

高齢者の身体的虐待死 11 例、対照 18 例の前頭葉切片を試料として、glucocorticoid receptor (GR) の発現について免疫染色を行い、発現程度を比較した。また、TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法によりアポトーシス細胞数についても両群で比較した。

(4) 内分泌系変化がもたらす免疫系変化について

拘束ストレスマウスにおける検討

拘束ストレスマウスの胸腺切片を試料として、CCR5 免疫染色を行い、CCR5 発現細胞数を対照マウスと比較した。また、蛍光二重免疫染色によって CCR5 発現細胞の同定を行った。さらに CCR5 ノックアウト (KO) マウスと野生型マウスで拘束ストレス後の胸腺重量、TUNEL 法によってアポトーシス細胞数を比較した。

小児虐待死剖検例における検討

小児の身体的虐待死 8 例、対照 7 例の胸腺切片を試料として CCR5 免疫染色を行い、CCR5 発現細胞数を両群で比較した。また、また、蛍光二重免疫染色によって CCR5 発現細胞の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 長期拘束ストレスマウスにおける副腎内分泌系の変化について (発表論文 1 より一部抜粋)

In control mice, there was no significant temporal change in any markers within the experimental periods. In restraint stressed mice, the weight of the adrenal gland showed a significant increase at 1 week and 2 weeks in comparison to that of

control mice. Serum levels of ACTH showed a significant increase with 1 day to 3 weeks of stress. Corresponding to the change of ACTH, serum levels of corticosterone and cortisol showed a significant increase with 1 day to 2 weeks, and 3 weeks of stress, respectively. In contrast, the adrenal cholesterol content showed a significant decrease with 1 week of stress. All of these changes returned to control levels after 4 weeks. According to "Selye's stress theory" and recent investigators, the adrenal glands are enlarged due to overproduction of glucocorticoids through activation of the HPA axis in the early phase of chronic stress, which Selye termed the "alarming reaction (A-R) stage". Subsequently, in the later phase, which Selye termed the "resistance stage", the production of glucocorticoids is reduced to the lowest levels for resisting the stress. Therefore, our results suggest that restraint stress for 1 day to 3 weeks and for 4 weeks may correspond to the "A-R stage" and "resistance stage". These temporal changes may be useful markers for not only proving prolonged psychological stress experience but also for the estimation of stress duration.

As a practical application of these results to forensic casework, an initial evaluation of adrenal weights would be appropriate because of its simple and routine examination. In contrast, the diagnostic assessment of postmortem serum hormone levels is controversial. Therefore, we performed a quantitative analysis of adrenal cholesterol, a starting material for glucocorticoids. Actually, the cholesterol was decreased significantly in mice restrained for 1 week in our study. Supportingly, intracellular lipid-droplet depletion in the zona fasciculata, implying an exhaustion of cholesterol, has been observed in the early phase of chronic stress. Moreover, Halliday reported that cholesterol values in autopsy liver samples were unaffected by formalin fixation for at least 200 days. Thus, measurement of adrenal cholesterol content can be substituted for that of serum glucocorticoid levels.

In restrained mice, adrenal gene expression of 3 molecules (SR-BI, HMGR and HSL) involved in cholesterol supply showed a significant increase with 1 day to 2 weeks of stress. In contrast, LDLR gene expression showed no temporal change from 1 day to 4 weeks of stress. The 3

up-regulated molecules were SR-BI, a receptor mediating uptake of plasma HDL-cholesteryl esters (CE), HMGR, a rate-limiting enzyme in the process of de novo synthesis, and HSL, a fatty acyl hydrolase liberating free cholesterol from CE. Since the transcription of all 3 molecules is regulated by ACTH, each expression was increased synchronically. In addition, the gene expression of CgA, one of the markers for postmortem assessment of chronic stress, showed a significant increase with 1 day to 2 weeks of stress, and a significant decrease with 3 to 4 weeks of stress. The later phase corresponds with the "resistance stage", and the SA axis was suppressed to prevent potential adverse effects including arrhythmia and hypertension. Unique suppression of CgA expression may be a feasible marker indicative of relatively long duration. Several lines of evidence implied the practical availability of examination of mRNA levels even in forensic field, although postmortem degradation of mRNA is inevitably taken into consideration.

Our results suggest that the analysis of adrenal endocrine systems based on the combination of several markers related to the HPA axis and SA axis would be useful for not only proving prolonged psychological stress but also determining its duration. Further, it should be checked whether the restraint stress model is applicable to child abuse/neglect cases, since such children are likely to suffer from prolonged psychological stress.

(2) 小児虐待死例における副腎内分泌系の変化について

副腎重量は体重, 身長, BMI のいずれで補正した場合も対照例に比べ虐待死例で有意に高値を示し, 副腎内コレステロール量は逆に虐待死例で有意に低値を示した。両群で SR-BI, CgA 発現は有意な差を認めなかった。そこで, 虐待期間が判明した 6 例について虐待期間別に検討すると, 数週間から 2 ヶ月の例では副腎重量は有意に高値を示し, コレステロール量は有意に低値を示し, SR-BI 発現は有意に高値を示した。一方, CgA 発現は虐待期間が数ヶ月以上の例で有意に低値を示した。したがって, 副腎内分泌系の変化は虐待の法医病理学的証明並びに虐待期間推定のための指標の一つとなり得るものと考えられる。

(3) 高齢者虐待死例における神経系変化について

高齢者身体的虐待死, 対照例のいずれも皮

質，層の神経細胞に GR 発現を認めたが，両群で GR 陽性細胞数に有意な差はみられなかった。また，虐待死例，対照例ともに頭部外傷受傷後の生存時間が比較的長い例においてアポトーシスを起こした神経細胞がみられたが，両群でアポトーシス細胞数に有意な差はみられなかった。

以上の結果から，高齢者剖検例においては虐待による内分泌系変化をもたらす神経系変化について証明することはできなかった。今後，小児剖検例において同様の検討を行い，虐待によって神経系変化が起こっている可能性を証明し，社会に対して虐待予防の必要性を訴えていきたい。

(4) 内分泌系変化をもたらす免疫系変化について

拘束ストレスマウスにおける検討

野生型マウスに拘束ストレスを加えると，胸腺における CCR5 発現細胞数が有意に増加した(図 1)。蛍光二重免疫染色によって CCR5 発現細胞の大部分はマクロファージであることが確認された。そこで，CCR5 ノックアウト(KO)マウスと野生型マウスとの間で拘束ストレスに対する胸腺の変化を検討したところ，野生型マウスと比較して CCR5 KO マウスでは胸腺リンパ球のアポトーシス細胞数が有意に少なく(図 2)，胸腺重量の減少も有意に軽減しており，胸腺の萎縮が抑制されていた。

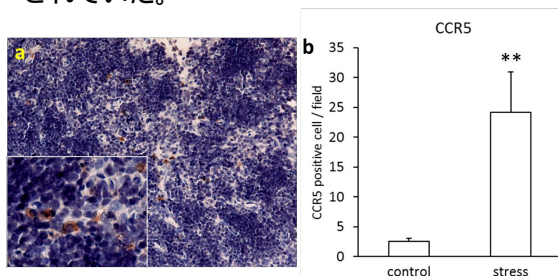


図 1 (a) 拘束ストレスマウスの胸腺における CCR5 免疫染色像(原倍率 100x, 枠内は 400x)。(b) 対照マウスと拘束ストレスマウスの胸腺における CCR5 陽性細胞数の比較。 ** $p < 0.01$

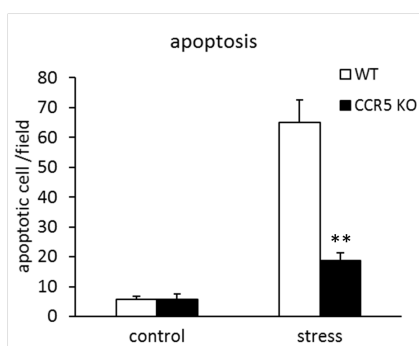
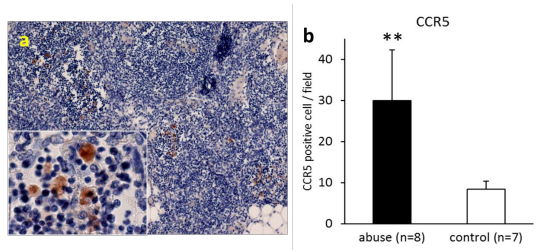


図 2 野生型マウスと CCR5KO マウスの拘束ストレス後の胸腺におけるアポトーシス細胞数の比較。 ** $p < 0.01$

小児虐待死剖検例における検討

動物実験の結果と同様に対照例と比較して小児虐待死例では CCR5 発現細胞が有意に増加しており(図 3)，発現細胞の大部分はマクロファージであることが確認された。

図 3 (a) 小児虐待死例の胸腺における CCR5



免疫染色像(原倍率 100x, 枠内は 400x)。(b) 小児虐待死例と対照例の胸腺における CCR5 陽性細胞数の比較。 ** $p < 0.01$

以上の結果から，ストレスによる胸腺の萎縮には CCR5 発現が関与していることが示唆され，虐待死例の胸腺においても CCR5 の高発現が確認されたことから，小児虐待の法医病理学的証明の新規マーカーとなる可能性，さらには虐待による胸腺萎縮を予防する標的マーカーとなる可能性が示唆された。

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 3 件)

1. Hayashi T, Ikematsu K, Abe Y, Ihama Y, Ago K, Ago M, Miyazaki T, Ogata M. Temporal changes of the adrenal endocrine system in a restraint stressed mouse and possibility of postmortem indicators of prolonged psychological stress. *Legal Med* 2014;16(4):193-196. doi:10.1016/j.legalmed.2014.03.005. 査読有
2. Kubo H, Hayashi T, Ago K, Ago M, Kanekura T, Ogata M. Forensic diagnosis of ante- and postmortem burn based on aquaporin-3 gene expression in the skin. *Legal Med* 2014;16(3):128-134. doi:10.1016/j.legalmed.2014.01.008. 査読有
3. Kubo H, Hayashi T, Ago K, Ago M, Kanekura T, Ogata M. Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. *Legal Med* 2014; 16(1): 8-13. 査読有

[学会発表](計 8 件)

1. 林 敬人, 吾郷一利, 中前琢磨, 小片 守. 入浴死解明 - 肺 heat shock protein 70 等の発現を指標とした溺死と虚血性心疾患の鑑別 - . 第 64 回日本法医学会学術九州地方集会, 鹿児島市(鹿児島市町村自治会館), 2014 年 10 月 10 日.
2. Hayashi T, Ago K, Higo E, Ogata M. Immunohistochemical detection of

interleukin (IL)-8 in cases of blunt head injury: its application as a diagnostic marker of axonal injury and time of injury determination. The 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM), Fukuoka city (Fukuoka Convention Center), 2014年6月18日.

3. 林 敬人, 井濱容子, 吾郷一利, 吾郷美保子, 宮崎哲次, 池松和哉, 安倍優樹, 小片 守. 児童虐待に基づくストレスによる副腎内分泌系の変化 - 死亡事例からの法医学的アプローチ. 日本子ども虐待防止学会第19回学術集会信州大会, 松本市(松本市民芸術館大ホール, 信州大学松本キャンパス), 2013年12月14日.
4. Hayashi T, Ago K, Ago M, Higo E, Ogata M. Immunohistochemical detection of interleukin (IL)-8 in cases of blunt head injury and its application for wound age determination. 92nd Annual Meeting of the German Society of Legal Medicine, Saarbruecken (Germany), 2013. 9. 20.

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~legalmed/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 敬人 (HAYASHI TAKAHITO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号: 40512497