

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293164

研究課題名(和文) 頭部外傷による急死の機序解明のための脳幹部損傷の診断方法の考案

研究課題名(英文) Identification of mechanisms of immediate death after blunt force impact to the head

研究代表者

木林 和彦(Kibayashi, Kazuhiko)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：20244113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：頭部外傷の受傷直後に死亡した患者では脳浮腫や脳ヘルニアが形成されていなく、死因診断が困難である。頭部外傷による受傷直後の急死のメカニズムを外傷性脳損傷モデル動物と法医剖検例で解析した。モデル動物では頭頂部に外力が作用した場合に高頻度に心停止が生じ、頭部外傷直後に心停止を来した剖検例は何れも頭頂部に損傷が認められたことから、頭頂部の打撲が受傷直後の心停止による死亡に関係していることが考えられた。また、外傷性脳損傷モデル動物では脳幹部中脳に神経細胞変性が生じ、老化細胞が外傷性脳損傷の増悪に関係していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Patients with brain injury may die immediately after receiving the impact to the head. Forensic diagnosis of cause of death in such patients is difficult, because edema and herniation may not have developed in the brain due to short survival period of time. This study was performed to identify the mechanisms of immediate death after head trauma. Experimental studies using animal models and analyses of autopsy cases revealed that blunt force impact to the parietal region of the head relates to the cardio-pulmonary arrest and immediate death after the impact. In addition, experimental studies using animal models identified neuronal degeneration in the brain stem after receiving impact to the head and suggested that senescent cells relate to the mechanisms of progression of traumatic brain injury.

研究分野：法医学

キーワード：外傷性脳損傷 頭部外傷

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭部外傷は、交通事故、労災事故、事件などによる重大な人体損傷であり、死亡や後遺障害の主要な要因である。頭部外傷による頭蓋内損傷には硬膜外血腫、硬膜下血腫、脳挫傷がある。頭蓋内損傷による致死機序としては受傷後に時間と共に脳浮腫や脳ヘルニアを来して脳幹部が圧迫されて死亡する。しかし、頭部外傷患者の中には受傷直後に死亡する患者がある。受傷直後に死亡した患者では脳浮腫や脳ヘルニアが形成されていなく、法医解剖で頭部外傷を死因とすることが困難である。頭部外傷による受傷直後の急死のメカニズムが判れば、法医学実務に貢献できる。また、受傷直後の救急救命にも役立ち、患者の救命にも寄与できる。

(2) 頭部外傷による受傷直後の急死のメカニズムとしては循環呼吸中枢のある脳幹部の損傷による心停止・呼吸停止が考えられている。事実、頭部外傷の直後に心停止を来している患者がある。また、酩酊状態で頭部外傷を受傷した際に急死することがあり、頸部と脳幹部の過伸展による呼吸停止が死亡のメカニズムとされ、脳幹部の延髄に軸索の腫大があるとの報告もある。これらの病態は *Comotio Medullaris: sudden neurological death syndrome* と言われている。さらに、頭部外傷の実験モデル動物では頭部に外力を加えた直後に呼吸停止を来すことが多い。しかし、頭部外傷による脳幹部の損傷は組織形態学的に証明されていない。脳幹部損傷を検出する方法があれば、頭部外傷による急死のメカニズムの解明に役立つ。

(3) 頭部外傷の受傷直後に加え、受傷後に会話が可能な程度に意識レベルが保たれていても、その後に予期せず死亡する場合があり、臨床的に「talk and die」と呼ばれている。頭部外傷後の予期しない死亡では死亡の機序が不明な場合が多い。受傷直後には死亡しないと家族に説明していたために治療の妥当性について疑義が生じることもある。

(4) 頭部外傷に基づく急死の機序の解明は、頭部外傷の病態並びに致死機序の解析につながり、頭部外傷患者の救命治療にも応用されることが期待できる。本研究は頭部外傷の実験動物を用いて頭部外傷による急死の機序を解析するものであり、国内外で類似の研究は少ない。頭部外傷は交通事故損傷などによる後遺障害と致死の主要な原因であり、本研究を通じて基礎研究の成果を社会に還元できる。

2. 研究の目的

(1) 頭部外傷による受傷直後の急死のメカニズムの解明のために、本研究では脳幹部の損傷に焦点を当てた研究を行う。頭部外傷による脳幹部損傷を神経細胞の変性と神経膠細胞の変化を指標として組織形態学的に検索し、また、タンパクと遺伝子発現の変化を捉えることで、頭部外傷による急死の機序を

解明する。

(2) 本研究では、頭部外傷による急死の機序をより詳細に検討するため、当初の計画に加えて、びまん性脳損傷モデル動物を用いた研究を追加した。また、人の頭部外傷の法医解剖例を収集し、頭部外傷の程度と受傷後の経過の関係について調査し、人における外傷による急死の機序の解析を追加した。

3. 研究の方法

(1) 脳損傷モデル動物の作成

局所性脳損傷モデルの作成：ウイスター系ラットまたは C57BL/6J マウスにイソフルラン吸入とペントバルビタール腹腔内投与による深麻酔を行い、頭頂部の頭皮を小切開して頭蓋骨の一部を露出した。頭頂骨後部に骨窓を形成し、脳挫傷作成装置 (pneumatic impact device) を用いて硬膜を介して大脳皮質に衝撃を与えて脳挫傷を形成し、小切開創を縫合した (controlled cortical impact model)。

びまん性脳損傷モデルの作成：C57BL/6J マウスにイソフルラン吸入とペントバルビタール腹腔内投与による深麻酔を行い、頭頂部の頭皮を小切開して頭蓋骨の一部を露出し、重しを頭蓋骨の上に落下させて脳挫傷を形成し、切開創を縫合した (Marmarou's weight drop model)。

(2) 神経機能評価：脳損傷群とコントロール群を受傷後 0.5、1、3、5、7 日目に解析して比較した (各群各時間 n=5~7)。神経学的な異常の程度を行動解析の標準的な手法で評価し、モリス水迷路試験で神経機能の変化を評価した。また、小動物用 MRI 装置を用いて全身麻酔下のマウスの脳の MRI 画像を撮影し、脳損傷の部位、脳挫傷の面積を解析した。

(3) 免疫組織化学染色：ラットとマウスをペントバルビタール 100 mg/kg の腹腔内投与で全身麻酔する。心臓右心房切損による放血を行い、リン酸緩衝生理食塩水を還流して安楽死させ、リン酸緩衝ホルマリンで還流固定し、脳を摘出してマイクロライザーで 3mm 厚の前額断を作成した。脳の凍結切片を作成し、神経細胞、星状膠細胞、小膠細胞のマーカーの抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、蛍光顕微鏡 (オリンパス社製バイオイメージングナビゲータ FSX100Advanced セット) または共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(4) in situ ハイブリダイゼーション：脳の凍結切片について RNA プローブを用いた in situ ハイブリダイゼーションを行い、正立顕微鏡で観察した。

(5) リアルタイム PCR：ラットまたはマウスをペントバルビタールの腹腔内投与で全身麻酔し、心臓右心房切損による放血を行い、リン酸緩衝生理食塩水を還流して安楽死させた。未固定の脳組織から RNA を抽出し、プライマーを設計し、リアルタイム PCR 装置を用いて mRNA の発現を定量した。

(6) ウエスタンブロット：未固定の脳からタ

ンパクを抽出し、抗体を用いたウエスタンブロットで発現を定量した。

(7) 平成 20~26 年度に東京女子医科大学医学部法医学講座で当研究者による法医解剖が行われた患者 440 例から頭部外傷の事例 67 例を抽出した。患者情報から性別、年齢、生前の健康状態、受傷状況、受傷後の臨床経過の調査を行った。また、解剖検査記録から身長、体重、解剖結果(剖検所見、組織検査所見、血液生化学検査結果、中毒検査結果、死因、死因の種類)の調査を行った。さらに、頭蓋内損傷を頭蓋内血腫と脳損傷(脳挫傷とびまん性脳損傷)に分類した。また、受傷機転(事故車両の速度、転落の高さ、受傷部位)、既往歴・現病歴(高血圧や糖尿病などの血管を傷害する疾患、飲酒や薬物摂取などの出血傾向を来す病態等)の有無、頭蓋内損傷の重傷度と受傷後の臨床経過(受傷後死亡までの経過日数等)を調査し、頭蓋内損傷の重傷度と受傷後の臨床経過に及ぼす要因を検討した。さらに、非典型的な経過を辿った事例を抽出し、頭部外傷による死亡の機序を考察した。なお、本研究は東京女子医科大学倫理委員会の承認を受けて実施した(承認番号 3396)。

4. 研究成果

(1) 局所性脳損傷モデルのラットまたはマウスの受傷直後の心肺停止は 20%の動物に生じたが、びまん性脳損傷モデルのマウスでは 50%に認められた。局所性脳損傷モデルでは脳の外側から打撃が加わるが、びまん性脳損傷モデルでは頭頂部に打撃を加えている。従って、頭頂部の打撃は心肺停止による急死を来しやすいと考えられた。モリス水迷路試験等による神経機能評価は脳損傷群のほうが外傷のないコントロール群と比較して有意に低下していた。小動物用 MRI 装置による画像から得られた脳損傷の体積は受傷後に増大した。

(2) 局所性脳損傷モデルのラットまたはマウスの脳幹部では免疫組織化学染色、*in situ* ハイブリダイゼーション、リアルタイム PCR、ウエスタンブロットの各方法によって中脳にドーパミントランスポーターの発現低下が生じることが見出された。従って、頭部外傷は脳幹部を損傷することが判明し、急死の機序とともに、外傷後パーキンソン症候群の発症にも関係していると考えられた。

(3) 局所性脳損傷モデルラットの頭部外傷群では sham 群と比べ、serotonin transporter (SERT) の mRNA とタンパクの発現量は受傷後 7 日目に有意に減少した。SERT は細胞外のセロトニンを取込む働きをするため、頭部外傷での SERT の減少は、受傷後に脳内セロトニン量の変化が生じていることを示すと考えられた。頭部外傷後の鬱には脳内セロトニン量の異常が関与していると考えられた。

(4) 局所性脳損傷マウスでは大脳の損傷側

に損傷後 4 日目に細胞老化のマーカである酸性 -ガラクトシダーゼ(酸性 -gal)の発現が増加し、7 日目に発現はピークとなり、14 日目に発現は減少した。また、脳損傷マウスでは損傷後 4、7、14 日目に大脳の損傷側に細胞老化のマーカである p16 (cyclin dependent kinase inhibitor 2A)の発現が認められた。一方、脳損傷マウスの大脳非損傷側、Sham マウスとコントロールマウスの大脳には観察期間を通じて酸性 -gal の発現増加は認められなく、p16 の発現も認められなかった。細胞老化は癌遺伝子の活性化や酸化ストレスなどにより DNA 損傷が生じて不可逆的に増殖が停止した状態であり、細胞老化を来した細胞は炎症性サイトカインや細胞外マトリックス分解酵素を産生し、慢性炎症を惹起するなど生体に傷害をもたらす。従って、外傷性脳損傷では大脳に細胞老化のマーカが発現することが確認され、細胞老化が外傷性脳損傷の増悪機序に関係していることが示唆された。

(5) びまん性脳損傷モデルのマウスでは海馬の CA3、CA4 の錐体細胞に神経細胞死が認められた。

(6) 頭部外傷の法医解剖 67 例のうち、高度な脳損傷の例を除いて、非典型的な経過を辿った頭部外傷例として、受傷直後に心停止の状態であった患者は 3 例であった。3 例について心停止の要因を検討したところ、何れも頭頂部に損傷があり、1 例でびまん性脳損傷が認められた。また、2 例で頸部の過伸展を示す所見、血中のアルコールが認められた。従って、頭頂部打撲によるびまん性脳損傷、頸部過伸展及び飲酒酩酊が受傷直後の心停止に関係することが考えられた。

今回の頭部外傷の実験動物では頭頂部に外力が作用した場合に高頻度に心停止が生じることを確認した。また、今回検討した頭部外傷直後に心停止を来した 3 例は何れも頭頂部に損傷が認められた。従って、頭頂部の打撲が心停止に関係していることが考えられた。また、動物実験では脳幹部中脳に神経細胞変性が生じることが観察され、頭部外傷による脳幹部損傷を形態的に捉えることができた。

今回の剖検例の検討では、1 例でびまん性脳損傷が認められ、2 例で頸部過伸展を示す所見、血中のアルコールが認められた。従って、頭頂部打撲によるびまん性脳損傷、頸部過伸展及び飲酒酩酊が受傷直後の心停止に関係することが考えられた。飲酒酩酊下での軽度な頭部外傷は脳震盪による急死を来することが知られている。1 例は事故現場に居合わせた人による心肺蘇生が行われ、病院で心拍が再開していた。他の 2 例は事故現場で心肺蘇生は行われなく、心拍は再開しなかった。頭部打撲によって心停止を来した人にはその場に居合わせた人による心肺蘇生 (bystander CPR) が重要と考えられた。一方、頭部打撲の直後に心停止して死亡した患

者では、脳挫傷が脳浮腫や脳ヘルニアを伴っていない、死因の診断に苦慮することがある。今回の3症例においても脳損傷自体は軽度であり、頭部以外に重度な損傷は認められず、頭蓋内圧の上昇を示す所見も認められなかった。頭部外傷直後に心停止を来した後に死亡した患者の法医解剖では高度な脳損傷が認められないことを死因診断で考慮すべきである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

Nakao K, Tatara Y, Kibayashi K. Quantification of methamphetamine in mouse thighbones buried in soil. J Forensic Sci (E-pub ahead of print) 査読有

DOI:10.1111/1556-4029.13458

Ezaki J, Shimada R, Shibuya M, Kibayashi K. Hippocampal neuronal degeneration in the traumatic brain injury mouse: non-trivial effect of scalp incision. Neurol Res, 38, 9-pub 94-1002, 2016 査読有

DOI:10.1080/01616412.2016.1228746

Machida M, Taki T, Shimada R, Kibayashi K. Investigation of single nucleotide polymorphism loci susceptible to degradation by ultraviolet light. J Forensic Legal Med, 43, 120-125, 2016 査読有

DOI:10.1016/j.jflm.2016.08.002

Ezaki J, Ro A, Kibayashi K. The histopathological structures of the extrapleural hematoma wall: A case report. Forensic Sci Int, 266, e68-70, 2016 査読有

DOI:10.1016/j.forsciint.2016.05.021

Ezaki J, Ro A, Hasegawa M, Kibayashi K. Fatal overdose from synthetic cannabinoids and cathinones in Japan: Demographics and autopsy findings. Am J Drug Alcohol Abuse, 42, 520-529, 2016 査読有

DOI:10.3109/00952990.2016.1172594

Abe K, Shimada R, Okada Y, Kibayashi K. Traumatic brain injury decreases serotonin transporter expression in the rat cerebrum. Neurol Res, 38, 358-63, 2016 査読有

DOI:10.1080/01616412.2015.1110402

Utsuno H, Kageyama T, Uchida K, Kibayashi K, Sakurada K, Uemura K. Pilot study to establish a nasal tip prediction method from unknown human skeletal remains for facial reconstruction and skull photo superimposition as applied to a Japanese male populations. J Forensic

Leg Med, 38, 75-80, 2016 査読有

DOI:10.1016/j.jflm.2015.11.017

Taki T, Kibayashi K. Characterization of cellular and extracellular DNA in saliva. Legal Med, 17, 471-474, 2015 査読有

DOI:10.1016/j.legalmed.2015.10.003

Nakao K, Ro A, Kibayashi K. Evaluation of the morphological changes of gastric mucosa induced by a low concentration of acetic acid using a rat model. J Forensic Legal Med, 22, 99-104, 2014 査読有

DOI:10.1016/j.jflm.2013.12.016

Utsuno H, Kageyama T, Uchida K, Kibayashi K. Facial soft tissue thickness differences among three skeletal classes in Japanese population. Forensic Sci Int, 236, 175-180, 2014 査読有

DOI:10.1016/j.forsciint.2013.12.040

Shimada R, Abe K, Furutani R, Kibayashi K. Changes in dopamine transporter expression in the midbrain following traumatic brain injury: An immunohistochemical and in situ hybridization study in a mouse model. Neurol Res, 36, 239-246, 2014 査読有

DOI:10.1179/1743132813Y.0000000289

Taki T, Kibayashi K. A simple ABO genotyping by PCR using sequence-specific primers with mismatched nucleotides. Legal Med, 16, 168-172, 2014 査読有

DOI:10.1016/j.legalmed.2014.02.007

Kibayashi K, Shimada R, Nakao K. Fatal traffic accident and forensic medicine. IATSS Research, 38, 71-76, 2014 査読有

<https://doi.org/10.1016/j.iatsr.2014.07.002>

〔学会発表〕(計9件)

Kibayashi K, Shimada R, Shibuya M. Expression of novel markers of senescence after traumatic brain injury in a mouse controlled cortical impact model. International Brain Injury Association's 12th World Congress on Brain Injury, March 29 - April 1, 2017, New Orleans, LA, USA Kibayashi K, Shimada R, Shibuya M. Senescence-associated

-galactosidase expression after traumatic brain injury in a mouse controlled cortical impact model. The 34th Annual Symposium of the National Neurotrauma Society (NEUROTRAUMA 2016), June 26 - 29, 2016, Lexington, KY, USA Nakao K, Kibayashi K. Comparison of

cocaine concentration in heart blood, thigh muscles, and thigh bones. 68th Annual Scientific Meeting of American Academy of Forensic Sciences, February 22-27, 2016, Las Vegas, NV, USA

Kibayashi K, Shimada R. Mechanisms of death due to inadvertent administration of ionic hypertonic contrast media into the subarachnoid space. 68th Annual Scientific Meeting of American Academy of Forensic Sciences, February 22-27, 2016, Las Vegas, NV, USA

Kibayashi K, Shimada R, Ezaki J. Neurological complications due to a subarachnoid injection of hypertonic contrast media in rat. The 33rd Annual Symposium of the National Neurotrauma Society (NEUROTRAUMA 2015), June 28 - July 1, 2015, Santa Fe, NM, USA

Nakao, K, Kibayashi K. Methamphetamine Concentrations in Thighbones Buried in Soil. 67th Annual Scientific Meeting of American Academy of Forensic Sciences, February 16-21, 2015, Orlando, FL, USA

Kibayashi K, Shimada Y. Decreased serotonin transporter expression after traumatic brain injury in a rat controlled cortical impact model. 32th Annual Conference of National Neurotrauma Society. June 30 - July 2, 2014, San Francisco, FL, USA

Machida M, Kibayashi K. Autosomal SNP genotyping of artificially degraded DNA by using UV irradiation. The 20th World Association of the International Association of Forensic Sciences, Oct 12-18, 2014, Coex, Seoul, Korea

Utsuno H, Kageyama T, Uchida K, Kibayashi K. Establishing a method for predicting the nasal tip position in unknown human skeletal remains for facial reconstruction and skull-photo superimposition: a pilot study in Japanese men. The 20th World Association of the International Association of Forensic Sciences, Oct 12-18, 2014, Coex, Seoul, Korea

[図書](計1件)

Kibayashi K, Moriya T, Takahashi M. Traffic safety and medicine. in. Traffic and Safety Sciences, 89-99, International Association of Traffic and Safety Sciences, 2015
<http://www.iatss.or.jp/en/publication/commemorative-publication/>

[その他]

ホームページ等

国際学会ワークショップ Diagnosis of and research on traumatic brain injury for medico-legal death investigation
http://www.tmd.ac.jp/med/legm/houshi_IACI_j_spworkshop.html
http://www.tmd.ac.jp/med/legm/houshi_IACI_j_spworkshop.html

東京女子医科大学業績データベース
<http://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?kozac=C11300000000&year=2016>
東京女子医科大学医学部法医学講座ホームページ

<http://www.twmu.ac.jp/Basic/legal-m//>

国際交通安全学会誌 IATSS Review 特集号「交通事故と法医学」(40巻1号、平成27年1月)

http://www.iatss.or.jp/ebook/review/Review40-1_book/_SWF_Window.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木林 和彦 (KIBAYASHI, Kazuhiko)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号： 20244113