

## 自己評価報告書

平成23年4月25日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20689015

研究課題名(和文) 敗血症特異的に応答するケモカインシステムの検索とその法医診断学への応用

研究課題名(英文) Examination of chemokine roles in CLP-induced sepsis model and its application for forensic diagnosis.

研究代表者

石田 裕子 (YUKO ISHIDA)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10364077

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：敗血症，法医診断学，ケモカイン，マウス，cecal ligation and puncture (CLP)

## 1. 研究計画の概要

敗血症は全身性の炎症性疾患であり，法医実務においてしばしば遭遇する死因の一つである．しかしながら，法医剖検例において，正確且つ客観的な敗血症の法医診断法は確立されていない．実務応用可能な敗血症の診断法を確立するためには，敗血症の病態生理の解明が必要不可欠である．特に，敗血症では組織・臓器の障害は多岐にわたり複雑であるため，局所性及び全身性の生活反応を包括的に検索することが重要である．そこで本研究では，近年，基礎並びに臨床応用の両面で盛んに研究が行われている炎症性生理活性物質であるケモカイン及びケモカインレセプターに着目し，敗血症の病態形成における種々のケモカイン・ケモカインレセプターの動態を検索し，これらの発現動態が，法医実務において敗血症診断のための有用な指標となるか否かを検討し，敗血症の新たな法医診断法を確立することを目的とする．

## 2. 研究の進捗状況

(1) マウス敗血症モデルの作製および生存率の検討：野生型マウスを用いて，cecal ligation and puncture (CLP) 手術を施し腹膜炎誘発敗血症を惹起した．CLP 手術後，12 時間ごとに生存率を検討したところ，7 日目までに約 35% が死亡した．

(2) 血液生化学検査：CLP 手術後，経時的に血液を採取して ALT, AST, BUN, およびクレアチニンを測定したところ，いずれも CLP 手術 6 時間以降において著明に上昇しており，肝臓および腎臓が著明に障害されていることが判明した．

(3) ケモカインのタンパク発現の検討：CLP 手術後，経時的に採取した腹腔洗浄液を

用いて，種々のケモカイン濃度を ELISA 法で測定したところ，CCL3, および CX3CL1 が著明に増加していることが判明した．

(4) ケモカインレセプターの遺伝子発現の検討：CLP 後増加が認められたケモカインに着目し，それらのレセプター (CCR1, CCR5, ならびに CX3CR1) 発現について検討を加えた．CLP 後経時的に採取した腹腔洗浄液より得られた cell pellet から RNA を抽出し，RT-PCR 法により各ケモカインレセプターの遺伝子発現を検討したところ，いずれも著明に亢進していた．

(5) 「1～4」の結果に基づき，CX3CR1, CCR1, CCR5, CCL3 の各遺伝子欠損マウスならびに野生型マウスに CLP を施して生存率を検討したところ，野生型と CCR1 欠損マウスでは 7 日目までに約 35% が死亡したのに対し，CCR5 欠損，CCL3 欠損，CX3CR1 欠損マウスでは約 75% が死亡した．したがって，CCL3-CCR5 および CX3CL1-CX3CR1 システムが CLP 誘発敗血症において防御的な役割を担っていることが明らかとなった．

(6) 法医実務への応用研究として，敗血症ならびに敗血症以外の剖検例の各種臓器を採取し，ケモカインレセプターの発現を検討した．免疫染色により，CCR2 および CX3CR1 のタンパク発現を検討したところ，敗血症群の肺では，コントロール群と比べて CCR2 および CX3CR1 発現が有意に亢進しており，また，その局在は主にマクロファージであることが判明した．したがって，CCR2 および CX3CR1 は敗血症における分子法医診断基準になり得る可能性が示唆された．

### 3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

(理由)

本研究は、敗血症におけるケモカインシステムの病態生理学的役割を解明することにより、ケモカインシステムを指標とする敗血症の分子法医学診断法を確立することを最終目的とするもので、具体的には、実験的研究と実務的研究に大別される。前者では、マウス腹膜炎誘発敗血症モデルを用いた基礎的実験を行い、敗血症における種々のケモカインやケモカインレセプターの発現様態を検討し、さらに、遺伝子欠損マウスあるいは中和抗体を用いた実験において、いくつかの敗血症特異的に応答するケモカイン及びケモカインレセプターを見つけ出す。後者では、実際の法医学剖検事例で収集した血清及び各種臓器について、実験的研究によって見つけだされた敗血症特異的ケモカイン・ケモカインレセプターの動態を検索し、ある種のケモカインやケモカインレセプターの発現動態の検索が、敗血症の死因判定に有用な指標となり得るか否かについて検討する。これまで、実験的研究と実務的研究について、おおむね順調に進展していると考えられる。

### 4. 今後の研究の推進方策

本研究は、ケモカイン及びケモカインレセプターの発現動態を指標とする敗血症の分子法医学診断学確立の可能性を検討するものであり、動物実験による基礎的データの収集と、剖検試料を用いた実務的検討から成る。具体的には、マウスに実験的に腹膜炎誘発敗血症を惹起し、その後の生存率や局所並びに全身で起こる現象を分子病理学的に解析して、敗血症発症時のケモカインシステムの生物学的意義を解明する。さらに、動物実験で得られた結果に基づき、実際の法医学剖検例で得られた試料について、種々のケモカイン・ケモカインレセプターの発現量及び局在を検索し、法医学実務においてこれら分子の発現動態が敗血症の剖検における有用な分子指標となり得るか否かについて評価する。このように、実験的研究と実務的研究の2つを進行させることにより、法医学診断学において指標となり得る物質を効率的かつ効果的に検索することが可能である。

### 5. 代表的な研究成果

(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1件)

① An JL, Ishida Y, Kimura A, Tsokos M, Kondo T. Immunohistochemical detection of CCR2 and CX3CR1 in sepsis-induced lung injury. *Forensic Sci Int.* 2009 Nov

[学会発表] (計1件)

① 石田裕子, 林 敬人, 木村章彦, 向田直史, 近藤稔和. マウス敗血症性腹膜炎における CX3CL1-CX3CR1 の病態生理学的役割解析. 第29回日本炎症・再生医学会, 2008年7月9日. 東京