

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28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 (ISHIDA YUKO)  
 和歌山県立医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：10364077

研究成果の概要（和文）：野生型マウスに盲腸結紮穿孔刺(CLP)による敗血症性腹膜炎を惹起させたところ、腹腔内においてCCR2 および CX3CR1 発現の亢進を認めた。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、マクロファージにおけるCCR2 および CX3CR1 の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有意に発現が亢進していた。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。

研究成果の概要（英文）：We examined CCR2 and CX3CR1 expression in sepsis-induced lung injury. Morphometrically, the average of CCR2- and CX3CR1-positive macrophages was significantly increased in sepsis group compared with control group in double-color immunofluorescence analysis. Immunohistochemical detection of CCR2 and CX3CR1 expression in the lungs can be considered as valuable diagnostic tools for the postmortem diagnosis of sepsis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
総計	19,900,000	5,970,000	25,870,000

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. 研究開始当初の背景

ケモカインは、炎症や感染等の侵襲病態に際し反応性に産生される。敗血症のようなSIRS状態では、ケモカインは局所のみならず器官・組織・細胞レベルで産生が亢進し、血流により全身に循環する。したがって、法医学的にケモカインやケモカインレセプターの動態は、局所性並びに全身性の生活反応の分子指標であり、敗血症の法医診断のための有用な指標となる可能性がある。敗血症の病態形成の分子機構を解明し的確

に把握することは、より客観的且つ正確な死因の判断に寄与し、法医診断学の新たな展開につながるものと考え、本研究を発案した。

## 2. 研究の目的

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。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。

### 3. 研究の方法

本研究は、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。

### 4. 研究成果

(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 手術後 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 Bio-Plex サスペンションビーズアレイシステムにて測定したところ、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、real time 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。

(7) 敗血症の病態形成機構に関わるケモカインシステムについては、現在までに国内外を通じて断片的な研究しかなされておらず、また、これらを敗血症の法医診断学に応用した研究は全くみられない。したがって、本研究は敗血症におけるケモカインやケモカインレセプターの役割を包括的に解析し、敗血症特異的ケモカインシステムの同定とその法医診断学への応用を目指した他に類を見ない独創的な研究である。また、実験的研究と実務的研究とを組み合わせた包括的研究により、精度の高い分子法医診断学の確立を可能にするものと考えられる。

### 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 石田裕子. 侵襲と生体反応～サイトカイン・ケモカインの病態生理学的役割～. 和歌山医学 査読有 63, 2012, 7-14.

② An JL, Ishida Y, Kimura A, Tsokos M, Kondo T. Immunohistochemical detection of CCR2 and CX3CR1 in sepsis-induced lung injury. Forensic Sci Int. 査読有 192, 2009, e21-5.

③ Ishida Y, Hayashi T, Goto T, Kimura A, Akimoto S, Mukaida N, Kondo T. Essential involvement of CX3CR1-mediated signals in the bactericidal host defense during septic peritonitis. J Immunol. 査読有 181, 2008, 4208-18.

〔学会発表〕（計2件）

①An JL, **Ishida Y**, Nosaka M, Kawaguchi M, Kimura A, Tsokos M, Kondo T. Immunohistochemical detection of CX3CR1 and CCR2 in sepsis-induced lung injury. 7<sup>th</sup> International Symposium Advances in Legal Medicine, Sep 1-5, 2008. Osaka

②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

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 裕子 (ISHIDA YUKO)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10364077

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

