

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K10131

研究課題名(和文) テネascin Cによる脳組織傷害受傷の経過時間推定法の応用に向けて

研究課題名(英文) Estimation of Post-traumatic interval using TN-C expression

研究代表者

大津 由紀(OHTSU, YUKI)

熊本大学・技術部・技術専門職員

研究者番号：90404342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：法医学領域において、内因的もしくは外因的な脳組織損傷の受傷時期を推定することは死因診断の補助として重要である。現状では、主に剖検所見やエピソードによって脳組織傷害の受傷時期を推測している。
本研究は「脳組織傷害事例の受傷時期の推定法」を目的とし、出血性ショックモデルラットを用いて、損傷(出血)が組織循環障害を引き起こす可能性を、創傷治癒に関わるTN-Cや出血の線溶系反応に関わるPAI-1の免疫組織化学染色にて、全身臓器の発現状態を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医学領域において、内因的もしくは外因的な脳組織損傷の受傷時期を推定することは死因診断の補助として重要である。
本研究は研究期間中に出血性ショックモデルラットの全身臓器の病理標本作製、TN-CやPAI-1の免疫組織化学染色における抗原賦活化至適条件の検討を行い、その条件下で各臓器の薄切片についてTN-C抗体による免疫組織化学染色を試みた。

研究成果の概要(英文)：In the field of forensic medicine, it is important to estimate the post-traumatic interval for the diagnosis of cause of death. Post-traumatic interval after injury is estimated usually via episodes and macro-and micro-findings of autopsy.
In this study, we tried to examine the immunohistochemical staining for TN-C, which is involved in wound healing, and PAI-1 against the organs of rat hemorrhage models.

研究分野：Forensic Medicine

キーワード：Tenascin C 出血性ショックモデル 免疫組織化学染色 脳組織傷害 PAI-1 抗原賦活化至適条件

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

法医学領域において、内因的もしくは外因的な脳組織損傷の受傷時期を推定することは死因診断の補助として重要である。現状では、主に剖検所見やエピソードによって脳組織傷害の受傷時期を推測している。

本研究は研究代表者が以前、死体血における組織傷害バイオマーカーである細胞外マトリックス糖蛋白の1つである「テネイシン C (TN-C)」の血清中の濃度を ELISA で測定し、死因を大きく分類して統計学的に検定したところ、頭部外傷において血清中の TN-C が上昇する傾向があったことを報告した^[1]。そこで、頭部外傷やその他の外傷による TN-C への影響を明らかにするため、この研究によって TN-C 濃度が「脳組織傷害事例の受傷時期の推定法」の指標として客観的評価ができ、エビデンスに基づいた大いなる活用可能になることを目的とした。そのため、さらに詳しく 組織傷害受傷症例について検討する必要があったが、解剖症例では頭部外傷群の症例が少なく、また受傷機序が多様であったため、まずはある程度条件の調整できるラットモデルの作製が必要と考えた。そこで、本研究者の研究協力者が別研究で作製した「出血性ショックモデルラット」を用いて、出血性ショックによる各臓器での特に TN-C の発現と「プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 (plasminogen activator inhibitor-1 ; PAI-1)」の発現を検討することとした。

2. 研究の目的

出血性ショックモデルラットを用いて、損傷(出血)が組織循環障害を引き起こす可能性を、病理学的所見(HE染色、免疫組織化学染色)で、TN-C等の全身臓器発現と損傷(出血)との関係を検討する。

3. 研究の方法

【出血性ショックモデルラットの作製および病理標本の作製】

本研究は熊本大学法医学講座において、研究協力者が作製した雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた「出血性ショックモデル」^[2]の実験で用いた後のラットの各臓器試料である。

今回の検討に用いた組織検体の使用に関しては、熊本大学動物実験等に関する規則(承認番号 A2020-67 :「動物モデルを用いた出血による局所的循環傷害の評価と血液凝固機能への関与の研究」)の承認を得て行っている。

出血性ショックの出血群については、ラット(SDラット、300-339g、male)にイソフルラン吸入による麻酔を行い、15分経過後に右大腿動脈(FA)にカテーテルを挿入し、ヘパリン生理食塩水(10 unit/mL)で満たし、総出血量を全身推定血液量の40-60%(Pos-FA群)とした。また出血操作については急速な出血群(Rapid bleeding:出血速度約1.4 mL/min)で、まずは30%(約6 mL)を5分以内で出血させた後、10分おきに5%(約1 mL)の出血操作を2回実施(出血操作は合計3回、出血処置の時間は30分)して出血性ショックを誘発し、最後の出血操作から60分間観察を行った後、サンプル採取を実施した。対照群はカテーテル挿入のみ(Neg-C群)を行い、出血操作は実施しなかった。なお、麻酔濃度は、導入時は4%、カテーテル挿入時は3%、出血処置及び経過観察時は1.5-2.0%とした。

なお、総出血量を全身血液量の割合(%)に応じて、出血量40%(Pos-FA-40)群、出血量50%(Pos-FA-50)群、出血量60%(Pos-FA-60)群、カテーテル挿入のみの対照群(Neg-C)に分類した。

研究協力者の実験終了直後、引き続き、各出血群の死亡したラットの脳、肺臓、肝臓、心臓、脾臓を氷上で摘出し、15%緩衝ホルマリン液にて固定を行い、後日パラフィン包埋ブロック、合計 58 症例(x3 ブロック)のブロックを作製した。

そのパラフィン包埋ブロックで各出血群、各臓器の 3 μm 連続薄切切片を作製し HE 染色および免疫組織化学染色(Immunohistochemistry; IHC)に用いた。

【抗原賦活化処理の至適条件の検討】^[3]

1 次抗体

今回の検討には、創傷治癒に関わる TN-C についてはウサギ由来モノクローナル抗体「Anti-Tenascin C antibody」[EPR4219] (abcam108930) を用いた。

また、出血の線溶系反応に関わる PAI-1 については、ウサギ由来ポリクローナル抗体「Anti-PAI1 抗体」(ab66705) およびウサギ由来モノクローナル抗体 Anti-PAI1 抗体[EPR21850-82] (ab222754)を用いて、抗原賦活化処理の至適条件の検討のみ行った。

抗体の希釈濃度については添付のデータシートに記載されている推奨の希釈率(x500)を用いた。

抗原賦活化の方法

次の検定 a) -d)に必要な 10 枚のパラフィン切片を準備、b) -d)の抗原賦活化を行った。

a) 抗原賦活化なし(1 枚)。

b) タンパク質分解誘発抗原賦活(PIER): Proteinase K (Dako)を室温 3 分間(1 枚)。

c) 通常の熱誘導抗原賦活(HIER): 家庭用電子レンジの沸騰下で 500W 5 分間、マイクロウェーブ(MW) 1 回照射。

クエン酸緩衝液(CB)、pH6 (三菱化学メディエンス)(1 枚)、Target Retrieval Solution (TRS) (Dako)、1 枚、1mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)pH8 (自家製)、1 枚、抗原賦活化液 pH9 (ニチレイバイオサイエンス)(1 枚)。

d) 強めの HIER: 加圧熱処理として抗原賦活処理用プレッシャーチャンバー Pascal (PCP) (Dako) にて 125 、30 秒間。緩衝液は上記と同じ 4 種類を用いた(4 枚)。

免疫染色(抗原賦活化条件検討および各抗体による IHC 共通)

組織切片を脱パラフィン、脱キシレン、流水水洗後、抗原賦活用緩衝液に浸して熱による抗原賦活処理を行った。その後、0.3%過酸化水素水・メタノールに室温で 30 分間反応させて、内因性ペルオキシダーゼ活性を取り除いた。リン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline, PBS, pH7.2)になじませた後、非特異的な反応のブロッキングを目的に、5% 正常ヤギ血清(富士フィルム和光純薬)を組織片に滴下し湿潤箱に 15 分間放置した。続いて、1 次抗体を湿潤箱内で 4 の条件下に置いて一晩反応させた。PBS で洗浄後、2 次抗体にはシンプルステイン MAX-P0 (R) (ニチレイバイオサイエンス)を滴下し、室温湿潤箱で 30 分間反応させ、その後、発色基質であるシンプルステイン DAB 基質キット(ニチレイバイオサイエンス)で約 5 分で発色し、流水水洗した。さらに、マイヤーのヘマトキシリンで 20 秒間核染色を行い、5 分間の色出し水洗後、脱水、透徹、封入した。

【組織切片の作製】

そのパラフィン包埋ブロックで各出血群、各臓器(脳、心臓、肺臓、肝臓、腎臓、脾臓)の 3 μm 連続薄切切片を作製し HE 染色および IHC に用いた。

採取した臓器で脳については、ホルルの脳を 3 分割(前頭葉、大脳中央、小脳)、心臓については横断面および心筋の縦断面、肺臓については左肺の一部、肝臓については左区域の一部、腎臓については左腎の腎盂を中心とした横断面、脾臓については横断面及び縦断面の

パラフィン包埋ブロックを作製し、薄切し、HE 染色および TN-C 抗体による IHC を行った。
結果

【抗原賦活化処理の至適条件の検討】

TN-C については、肝臓の切片に対して、前述の 1 次抗体を用いた免疫染色を行った。TN-C は緩衝液として EDTA pH8 または抗原賦活化液 pH9 を用いた PCP による加圧熱処理が抗原賦活化法として適していた(Fig.1)。

また、PAI-1 (ポリクローナル) は緩衝液に抗原賦活化液 pH9 を使用し、PCP での熱処理で、さらに PAI-1 (モノクローナル) は EDTA pH8 または抗原賦活化液 pH9 を緩衝液に使用した PCP での熱処理が良好な染色性を示した(Fig.2)。従って、本研究者の各出血群、各臓器への各抗体に対する抗原賦活化処理には『抗原賦活化液、pH9 を用いた PCP による加圧熱処理』を抗原賦活化法として行うこととした。

【各出血群の TN-C の免疫組織化学染色】

各出血量群を出血量 40% (Pos-FA-40) 群、50% (Pos-FA-50) 群、60% (Pos-FA-60) 群、対照 (Neg-C) 群に分類し、各臓器の薄切切片について TN-C 抗体による IHC を行って検鏡した。概要としては、小脳では皮質が TN-C 陽性に、肝臓の類洞において各群間で一部 TN-C 陽性、脾臓ではマクロファージが TN-C 陽性の可能性がある。腎臓では集合管の周囲が TN-C 陽性に染色されており、特に Pos-FA 群で強く染色されている傾向が見られた (Fig.3)。ただし、染色性の差の影響もあり、さらなる検討が必要である。

4 . 研究成果

本研究は創傷治癒に関わる各臓器の TN-C や出血の線溶系反応に関わる PAI-1 を中心に HE 染色や IHC を施して、「出血性ショック」によってどのような組織学的変化が起きているかを観察し、評価方法の検討を行った。

当初に実施していた脳の固定方法が適していなかったことが終盤に判明したため、その後再度試料を採取する必要があるため、研究期間を延長して新たに試料を固定し、脳の適切な固定法の検討を行った。

各抗体の免疫組織化学染色の賦活化至適条件のプロトコールを他研究室のラボの協力で作成したが、本研究者のラボで揃えられる試薬や機器が異なっている部分があったので、安定して継続できるプロトコールの再検討を引き続き現在も行っている。

参考文献

[1] Ohtsu Yuki, Sasao Ako, Yonemitsu Kosei, Nishitani Y. Postmortem serum tenascin-C (TN-C) concentrations in forensic autopsy cases: A pilot study. *Legal Medicine*. 15(2),61-5, 2013.

[2] Shota Furukawa, Ako Sasao, Kosei Yonemitsu, Yuki Ohtsu, Hiroshi Tsutsumi, Kazuaki Taguchi, Masaki Otagiri and Yoko Nishitani. Effects of arterial hemorrhage speed on the blood coagulation/fibrinolysis system and hemodynamics in rats, *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2020, 31:198-206.

[3] Takenobu Nakagawa, Koji Ohnishi, Yui Kosaki, Yoichi Saito, Hasita Horlad, Yukio Fujiwara, Motohiro Takeya, Yoshihiro Komohara, Optimum immunohistochemical procedures for analysis of macrophages in human and mouse formalin fixed paraffin-embedded tissue samples., *J Clin Exp Hematop*. 2017;57(1):31-36.

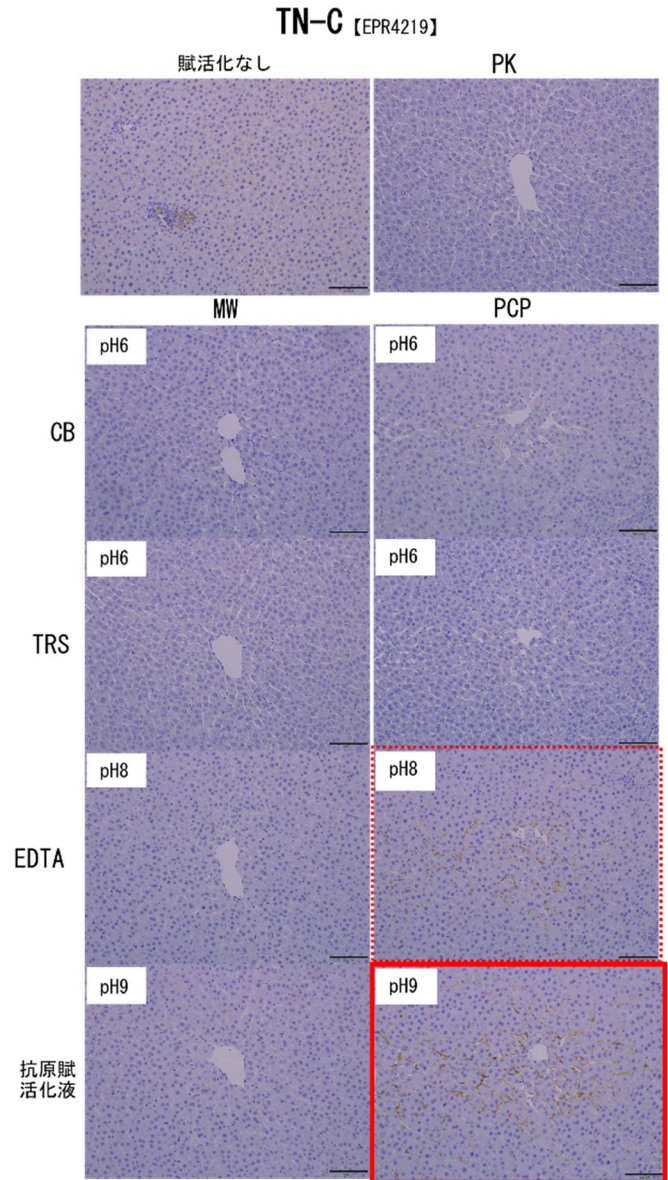


Fig.1 抗原賦活化処理の至適条件の検討 (肝臓)

PK : Proteinase K (室温, 5min)、MW : マイクロウェーブ (沸騰, 5min)、PCP : Pascal (125 , 30sec)、CB : クエン酸緩衝液, pH6、TRS : Target retrieval solution、EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid, pH8、抗原賦活化液, pH9。 _ 100μm

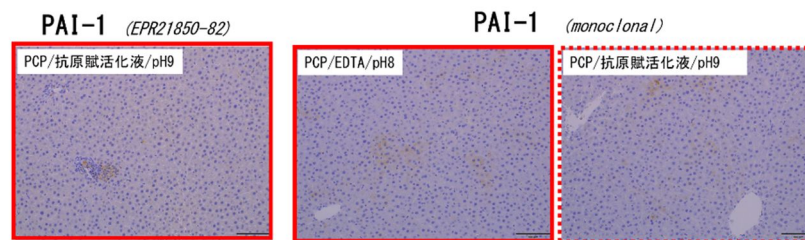


Fig.2 PAI-1 の抗原賦活化処理の至適条件 (肝臓)

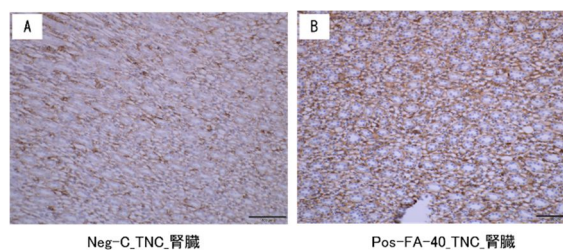


Fig.3 TN-C の腎臓における免疫組織化学染色像 (A: 対照群群、B: 出血量 40% 群)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------