

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 25 年 5 月 28 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2010 ～ 2012
 課題番号： 22790595
 研究課題名 (和文) 肺免疫染色を用いた死亡前における全身状態の病理組織学的評価法に関する研究
 研究課題名 (英文) Histopathological evaluation of ante-mortem general condition using immunohistochemically-stained lung
 研究代表者
 井上 裕匡 (INOUE HIROMASA)
 三重大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号： 50363338

研究成果の概要 (和文)：

熱暴露およびオレイン酸静注によって生じた急性肺傷害において、肺組織で炎症関連サイトカイン IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MIP2、IL-10 は短時間で誘導された。また、IL-1 β は熱暴露後のオレイン酸静注で相乗的に増加した。すなわち、肺脂肪塞栓による急性肺傷害は先行する病態の程度によってその程度が変化する可能性が示唆された。一方、急性肺傷害に関与している *vegfa*、*tgfb1*、*gm-csf* の各 mRNA は短時間で上昇し、蛋白レベルで TGF- β 1 の上昇が認められた。これらの蛋白は短時間で死亡した事例における全身状態の指標として利用できる可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：

In acute lung injury (ALI) induced by heat exposure and/or venous injection of oleic acid, IL-1 β , IL-6, TNF- α , MIP2 and IL-10, which are related to inflammatory reaction, were increased at short times. In addition, IL-1 β expressions of mRNA and protein were synergistically increased by venous injection of oleic acid after heat exposure, which suggested that prognosis of ALI induced by pulmonary fat embolization would be deteriorated by the severity of precedent injuries and/or diseases which can induce to pulmonary fat embolization. Moreover, mRNA expressions of *vegfa*, *tgfb1* and *gm-csf* were also induced at short times after the insults, and TGF- β 1 was significantly expressed as well as mRNA. These proteins would be available for evaluating general condition in forensic autopsy cases where the individual suddenly dies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

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：法医病理学

1. 研究開始当初の背景

法医実務において、死因の診断が困難である急死例は未だ存在する。一方、肺は様々な病態において極めて影響の受けやすい臓器であり、例えば Acute respiratory distress syndrome (ARDS) は外傷や感染症など様々な状態の最終像であり ARDS へと進行する外傷や疾病は死因となる可能性がある。しかし、逆に言えば短時間で死亡した事例においても肺には何らかの変化が生じている可能性が考えられる。すなわち、短時間で死亡した事例であっても肺の病理学的、分子生物学的変化を捉えることで死因を推定できるかもしれない。

2. 研究の目的

死因判断に苦慮する短時間で死亡した事例において、肺の分子病態学的変化より死因が判断可能か否かを検討する。具体的には診断の指標となる可能性のある複数の蛋白を同定し、これらの組み合わせによって死のメカニズムが解明できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

1) モデルの作成

10 週齢 Wistar 系雄ラットを熱暴露群と非熱暴露群に分類し、各群において尾静脈からオレイン酸を投与し肺脂肪塞栓を生じさせる肺脂肪塞栓群、脂肪製剤を投与する非脂肪塞栓群の 4 群を作成する。すなわち、熱暴露 + 肺脂肪塞栓 (H+F+) の群、熱暴露のみ (H+F-) の群、肺脂肪塞栓のみ (H-F+) の群、およびコントロール (H-F-) 群となる。熱暴露 (もしくは常温放置) 1 時間後にオレイン

酸 (もしくは脂肪製剤) を投与し 1 時間放置し、ペントバルビタール腹腔内過量投与によって安楽死させ、肺組織を採取した。

2) 検出対象となる蛋白の同定

炎症関連サイトカインである Interleukin (IL) -1 β 、IL-6、IL-10、Tumor Necrosis Factor (TNF) - α 、Macrophage Inflammatory Protein (MIP) -2、さらに急性肺傷害に関連する Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) α 、Transforming Growth Factor (TGF) - β 1、Granulocyte Macrophage -Colony Stimulating Factor (GM-CSF)、ストレス蛋白である Heat Shock Protein (HSP) 70 をコードする各遺伝子について、肺から抽出した mRNA における発現量を定量的 RT-PCR 法 (StepOne™、Life Technologies Corp.) により測定した。

3) 肺内蛋白発現定量

2) で定量した 9 遺伝子のうち HSP70 を除いた 8 遺伝子がコードする蛋白について、肺組織抽出液内の発現量を、マルチプルアッセイシステム (MAGPIX® System、Luminex Corp.) により測定した。

4) 統計処理

各群の定量値について、2 元配置分散分析法により統計処理し、 $p < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

1) 遺伝子発現

熱暴露により *Il-1b*、*Tnfa*、*Vegfa*、*Tgfb1*、*hsp70*、オレイン酸投与により *Il-1b*、*Il-6*、*Tnfa*、*Mip2*、*Gm-csf* が有意に増加した。また、*Il-1b*

は相乗的に増加した。

2) 蛋白発現

熱暴露によって、IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 が有意に増加した。一方、オレイン酸投与では炎症関連サイトカインに加え、TGF- β 1 が有意に増加した。さらに、遺伝子発現と同様に、IL-1 β は相乗的に増加した。

3) 考察

オレイン酸投与は急性肺傷害のモデルとして適した方法と言われており、本研究において急性肺傷害によって炎症性サイトカインに変動が見られることは実験モデルとして特に問題がないことを示している。

急性肺傷害により、遺伝子レベルでは *Gm-csf* に、蛋白レベルでは TGF- β 1 に有意な増加が認められることは、短時間死亡例において肺傷害の程度を評価に適した蛋白としては、GM-CSF および TGF- β 1 が候補に挙げられる。GM-CSF は肺胞マクロファージに機能調整や肺組織保護作用を有することより、肺傷害における肺組織保護作用を目的として発現したものと考えられる。本研究において受傷後 1-2 時間程度で発現したことを考慮すれば、法医実務においては短時間で死亡事例であっても肺組織に発現している可能性は十分考えられる。一方、TGF- β 1 は肺傷害の程度に比例して発現することが知られており、急性肺傷害そのものの指標として短時間で発現する蛋白として法医実務で応用可能であると考えられる。

以上より、法医実務において短時間で死亡に至った事例では、病態の把握に TGF- β 1 および GM-CSF が指標となる可能性が考えられる。

なお、以前に我々は「肺脂肪塞栓の予後は

その原因となった損傷（および疾病）の重篤度に起因する」という仮説を立てた。本研究では、熱暴露後のオレイン酸静注によって引き起こされた肺脂肪塞栓では、炎症性サイトカイン IL-1 β が相乗的に増加していた。IL-1 β は炎症早期に発現する炎症性サイトカインであることより、経時的にその他の炎症性サイトカインが相乗的に惹起される可能性が考えられる。すなわち、本研究によって我々の仮説が部分的に証明された。

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 4 件）

① Inoue H, Nakagawa Y, Ikemura M, Usugi E, Nata M. Molecular-biological analysis of acute lung injury (ALI) induced by heat exposure and/or intravenous administration of oleic acid. *Legal Med* 2012; 14 (6): 304-8. 査読有

② Inoue H, Nakagawa Y, Ikemura M, Shinone K, Okada K, Nata M. A subacute epidural haematoma extending over the occipital region and posterior cranial fossa due to a laceration in the transverse sinus. *Int J Legal Med* 2012; 126 (3): 467-71. 査読有

③ Inoue H, Kamphausen T, Bajanowski T, Trübner K. Massive retroperitoneal haemorrhage after extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL). *Int J Legal Med* 2011; 125 (1): 75-9. 査読有

④ Inoue H, Nakagawa Y, Ikemura M, Shinone K, Nata M. Cerebral infarction due to aortic dissection which developed immediately after traffic accident. *J Forensic Legal Med* 2010; 17 (4): 224-5. 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

① 井上裕匡. 学術奨励賞受賞講演：肺脂肪塞栓による熱中症診断法の開発～動物実験から法医学実務への応用～. 第 95 次日本法医学会学術全国集会. 福島. 2011.6.16.

② 井上裕匡、中川泰久、池村真弓、篠根光太郎、岡田華奈、那谷雅之. 肺脂肪塞栓症の分子病態学的検討. 第 32 回日本法医学会学術中部地方集会. 富山. 2010.10.13.

〔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

井上 裕匡 (INOUE HIROMASA)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号： 50363338

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：