

八木 洋一 論文内容の要旨

主論文

Immunohistochemical detection of CD14 and combined assessment with CD32B and CD68 for wound age estimation

CD14 の免疫組織化学的検出並びに CD14、CD32B 及び CD68 の組合せ判定による受傷時期の推定

八木洋一、村瀬壮彦、賀川慎一郎、鶴屋伸一郎、中原綾、山本琢磨、梅原敬弘、池松和哉

Forensic Science International · In press 2016

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：池松和哉教授)

【緒言】

法医学実務において、創傷の受傷時期の推定は、重要な検査事項の一つである。現在、受傷時期の推定には受傷後 1 週間程度から出現するとされるベルリン・ブルー染色法が汎用されている。しかし、法医学解剖における外表検査での判断が困難で、ベルリン・ブルー染色法では推定不可能な受傷後早期、特に受傷後 1～5 日程度を示す有用な推定マーカーの報告は少ない。

以前、我々は、マウス皮膚において、CD14 mRNA が受傷後 12-24 h に発現ピークがあることを報告した。そこで、今回、我々は、その遺伝子産物である CD 14 蛋白質が、受傷後 1～5 日程度を示す発現マーカーになり得るか否かを調べるために、受傷時期が異なるマウス損傷皮膚及びヒト損傷皮膚について検討した。さらに、ヒト損傷皮膚について、CD14 と同様、炎症細胞に発現する膜蛋白質である CD32B 及び CD68 を加えた 3 種類の発現結果を組み合わせ、受傷時期を推定する手法の有用性を評価した。

【対象と方法】

1 マウス損傷皮膚

6 週齢 BALB/C マウスを使用して、麻酔下で背部に 4 mm の打ち抜き損傷を作製した。成傷後 0 分 (コントロール)、1、2、3、5、7、9 日経過後にマウスを安楽死させ、損傷周辺皮膚を採取した。採取した皮膚から総蛋白質を抽出し、ウエスタンブロット法によって、CD14 の相対的発現量を測定した。内因性リファレンス因子は、 β -tubulin を用いた。また、採取した皮膚を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋後、CD14 の酵素抗体法による免疫組織化学染色を行った。さらに、CD14 の発現細胞を調べるため、CD14 とマクロファージマーカーとして用いられる F4/80 または CD14 と好中球マーカーである Ly6G6C の蛍光抗体法による二重免疫染色を行った。

2 ヒト損傷皮膚

法医解剖時に採取した受傷時期の異なる損傷皮膚及び同一個人の損傷していない皮膚（コントロール）を10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後、CD14、CD32B及びCD68の免疫組織化学染色を行った。損傷皮膚はgroup 1（受傷後1日未満群）、group 2（受傷後1～5日群）、group 3（受傷後7日以上群）に分類した。

【結果】

1 マウス損傷皮膚

CD14の相対的発現量は、受傷後1日で増加し始め、受傷後2～5日でピークに達し、受傷後7日以降ではほぼコントロールと同等まで減少した。また、CD14陽性細胞は、受傷後1日で痂皮の直下及びその周囲で認められ始め、受傷後2～5日で損傷周囲の幅広い範囲で認められ、受傷後7日以降ではほとんど認められなかった。さらに、CD14発現細胞は、受傷後1日では好中球のみ、受傷後2、3日では好中球とマクロファージの両方、受傷後5日ではマクロファージのみであった。

2 ヒト損傷皮膚

CD14の陽性率は、group 2において、group 1、3よりも有意に高く、CD14⁺は、受傷後1～5日であることを感度100%、特異度87.2%で示した。CD32Bの陽性率は、group 2において、group 1、3よりも有意に高く、CD32B⁺は、受傷後1～5日であることを感度64.0%、特異度72.3%で示した。CD68の陽性率は、group 2、3において、group 1よりも有意に高く、CD68⁺は、受傷後1日以上であることを感度78.0%、特異度92.1%で示し、CD68⁻は、受傷後1日未満であることを感度92.1%、特異度78.0%で示した。

また、CD14⁺/CD32B⁺/CD68⁻の組合せは、group 2のみで認められ、受傷後1～5日であることを感度20.0%、特異度100%で示した。CD14⁻/CD32B⁻/CD68⁺の組合せは、group 3のみで認められ、受傷後7日以上であることを感度55.6%、特異度100%で示した。CD14⁻/CD32B⁻/CD68⁻の組合せは、ほぼgroup 1のみで認められ、受傷後1日未満であることを感度68.4%、特異度98.3%で示した。

【考察】

CD14はマウス損傷皮膚において、受傷後1～5日のマーカーとして機能することが示され、ヒト損傷皮膚においても、受傷後1～5日であることを高感度、高特異度で示唆することが判明した。また、マウス損傷皮膚において、更にCD14発現細胞の種類を調べることによって、受傷時期推定の精度が高まることが示唆された。一方、ヒト損傷皮膚においては、CD14に加えて、CD32B、CD68の免疫組織化学染色をそれぞれ実施した結果、CD32BとCD68はいずれも受傷時期推定マーカーとして機能することが示唆された。また、これら3マーカーの発現結果を組合せることによる受傷時期推定の有用性を検討した結果、単独マーカーによる検査よりも感度は下がるものの、特異度は上がるため、受傷時期推定の確定診断に有用であり、推定受傷時期の絞り込み（CD68⁺；受傷後1日以上→CD14⁻/CD32B⁻/CD68⁺；受傷後7日以上）にも有用であった。これらの結果は、法医実務における受傷時期推定に活用できるものと考えられる。