

# 皮膚創傷治癒課程におけるインターロイキン-10の発現とその法医学的応用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9439">http://hdl.handle.net/2297/9439</a>

## 皮膚創傷治癒過程におけるインターロイキン-10の 発現とその法医学的応用

金沢大学医学部医学科法医学講座 (主任: 大島 徹教授)

佐 藤 保 則

創傷治癒過程は炎症期, 増殖期, 成熟期という相互に重複する期間を有し, 炎症期においては損傷部に浸潤する好中球や単球/マクロファージが重要な役割を担っているが, 生体内での一連の修復機構が整然と進行するためには, 炎症反応を厳密に制御する因子が不可欠である. 本研究では, 第一に, 抗炎症性サイトカインであるインターロイキン (interleukin, IL)-10の皮膚創傷治癒過程における動態およびその生物学的意義について検討した. マウス皮膚損傷部におけるIL-10蛋白の発現量は, 損傷部に遊走する好中球が徐々に増加する炎症期早期 (受傷後3時間) にピークに達した後, 一旦は減少したが, マクロファージの集簇が最も著明となる炎症期極期 (受傷後72時間) に再びピークに達し, mRNAの発現もこれと良く相関していた. 組織内ハイブリッド形成 (in situ hybridization, ISH) 法および免疫染色の検討結果から炎症期早期においては表皮細胞が, さらに, 損傷部に浸潤する単核球および再生する表皮細胞がIL-10産生細胞の主体であることが実証された. IL-10の発現に2つのピークが認められたことから, IL-10中和抗体を損傷部局所に投与し, その効果を受傷後6および72時間目において判定した. 中和抗体投与により損傷部皮膚において炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ , IL-6, 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) およびC-Cケモカインである monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) と macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$  (MIP-1  $\alpha$ ) の過剰発現が認められた. さらに, 損傷部に浸潤する好中球とマクロファージ数の増加を認めた. IL-10の発現の2つのピークは, 各々が好中球およびマクロファージの遊走およびその機能制御と密接に関連しており, これらは過剰な炎症反応を抑制するための合目的な生体防御反応であると考えられた. 以上の成績から, 皮膚創傷治癒過程におけるIL-10の関与が明らかとなった. 次に, 法医学的な観点から, 損傷部皮膚での受傷後早期のIL-10 mRNAの発現量増加が, 生前損傷と死後損壊とを鑑別する上での鋭敏な指標となりうるか否かを検討した. すなわち, マウス皮膚損傷部におけるIL-10 mRNA発現量の変化を死後変化の影響も含めて, 受傷後0から180分の間, 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法を用いて半定量的に評価した. IL-10 mRNAは受傷後15分目から急激に増加し, 健常皮膚での発現量と比較した場合, 有意 ( $p < 0.05$ ) な増加が受傷後30から180分で認められた. この傾向は屠殺後5日間放置したマウスについても確認され, 一方, 死後損壊では有意な増加は認められなかった. これらの成績から, 皮膚損傷部におけるIL-10 mRNA発現量の増加が, 受傷後早期の生活反応の鋭敏な指標となりうることが示唆された. さらに, mRNAは一般に考えられている以上に死後変化に対して安定であることが示され, RT-PCR法によるmRNAの解析は実際の法医剖検例に充分応用可能であると思われた. 最後に, 炎症性サイトカインの遺伝子発現を生活反応あるいは受傷後経過時間推定の指標として応用するための基礎的成績を得る目的で, マウス皮膚創傷治癒過程におけるIL-1, IL-6およびTNF- $\alpha$  mRNAの経時的発現量の推移および組織切片上における局在を検討した. RT-PCR法により, 損傷部におけるIL-6 mRNAの発現量は受傷後6時間目, IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$  およびTNF- $\alpha$  mRNAは受傷後48から72時間目にかけてピークを有することが明らかとなった. ISH法を用いた検討によりこれらmRNA発現量の増加が, 主に損傷部に浸潤する単核球 (マクロファージ), 多核白血球 (好中球) や表皮細胞におけるサイトカインの誘導, すなわち局所における生活反応を反映していることが示された. IL-10 mRNAに加えて損傷部皮膚からこれら炎症性サイトカインのmRNAをRT-PCR法を用いて同時に検出することにより, 実際の法医剖検例における生活反応の指標としての有用性が向上するものと思われた. 以上のmRNA解析に関する成績は, 蛋白質レベルでの解析が主体であった従来の法医損傷論の研究分野において, 新たな展開をもたらすものと考えられた.

**Key words** wound healing, interleukin-10, inflammation, chemotaxis, forensic wound examination

平成11年7月15日受付, 平成11年9月1日受理

Abbreviations: CSIF, cytokine synthesis inhibitory factor; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; DEPC, diethylpyrocarbonate; DIG, digoxigenin; DTT, dithiothreitol; IL, interleukin; ISH, in situ hybridization; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MIP-1  $\alpha$ , macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$ ; PFA, paraformaldehyde; RT-PCR, reverse transcription-PCR; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$

創傷治癒は生体の恒常性を維持するための防御反応の一つであり、その過程において炎症期、増殖期、成熟期という相互に重複する期間を有する。ひとたび創傷が形成されると、同部に浸潤する好中球や単球/マクロファージは、様々なサイトカインや増殖因子を産生するという治癒過程での重要な役割を担っている<sup>1)</sup>。このうち炎症性サイトカインであるインターロイキン (interleukin, IL) -1, IL-6や腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) は主に活性化されたマクロファージより産生され、炎症反応における主要なメディエーターとして知られている<sup>2)~4)</sup>。また、IL-8, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$  (MIP-1  $\alpha$ ) などのケモカインは炎症細胞浸潤との関連が深い<sup>5)6)</sup>。このように、生体内での一連の修復機構が整然と進行するためには、これらサイトカインの過剰な発現や無秩序な炎症細胞浸潤を抑制し、炎症反応を厳密に制御する因子が不可欠である。

抑制性サイトカインであるIL-10は、Th1細胞のサイトカイン産生を抑制するTh2細胞由来の因子として同定されたものであり、当初はサイトカイン産生抑制因子 (cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF) と呼ばれていたが<sup>7)</sup>、その後の研究でCSIF活性以外にも多くの生物活性を有することが判明し、IL-10と改名された。IL-10はTh1細胞や単球/マクロファージに対しては抑制的に作用し、活性化されたマクロファージからの炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) の産生を強く抑制する一方で、B細胞や胸腺細胞、肥満細胞、細胞傷害性T細胞に対しては刺激性活性を有している<sup>8)</sup>。IL-10ノックアウトマウスもKühnら<sup>9)</sup>により作製されており、炎症性腸炎を併発することが知られている。疾患との関連では、リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、炎症性肺障害、敗血症性ショックなどの自己免疫疾患や炎症性疾患での関与が明らかとなっており<sup>10)</sup>、現在では免疫応答や炎症反応を制御する因子として、IL-10および関連物質の臨床応用への可能性も検討されている。

皮膚傷害とIL-10の関連については、Th2細胞より産生されるIL-4, IL-5, IL-13とともに免疫応答におけるTh1/Th2のバランスを制御するサイトカインとしての可能性が注目されており、実際に、IL-10はTh1優位の免疫応答である遅延型過敏症反応を抑制する作用を有し<sup>11)~13)</sup>、紫外線照射後の皮膚組織における免疫応答の抑制にもIL-10が関与しているとされる<sup>14)~16)</sup>。また、アトピー性皮膚炎<sup>17)18)</sup>、強皮症<sup>19)</sup>などの疾患との関連も解明されつつあり、Th1優位とされる乾癬に対してはリコンビナントIL-10の投与が有効であるという<sup>20)21)</sup>。IL-10はケラチノサイトやマクロファージから産生され、マクロファージや好中球からの炎症性サイトカインの産生抑制および抗炎症性サイトカインであるIL-1レセプターアンタゴニストの産生を誘導する活性を有し<sup>8)</sup>、また、MCP-1, MIP-1  $\alpha$ , KCなどのケモカインの産生抑制を通して炎症細胞の浸潤にも関与している<sup>22)23)</sup>。前述のIL-10ノックアウトマウスでは炎症部位へ遊走する好中球数が増加し、炎症部位においてC-CケモカインであるMCP-1やMIP-1  $\alpha$ が過剰に発現していることが報告され<sup>22)23)</sup>、さらに、これらのケモカインは皮膚の創傷治癒過程においてもマクロファージの重要な走化性因子の一つであることが指摘されている<sup>24)~26)</sup>。従って、IL-10は皮膚創傷治癒においてもこれら因子の生物活性を介して炎症反応を制御していることが予測されるが、これまでのところ、機械的な皮膚損傷治癒過程におけるIL-10の動態や生物学的意味については十分に検討されて

いない。

さて、創傷治癒にはこのように様々なメディエーターが関与しているが、法医学的な観点からは、それらの経時的な発現が損傷の受傷後経過時間あるいは生活反応の有無を反映する指標となりうるのではないかと、という仮説が成り立つ。法医学実務において損傷検査は最も重要な検査項目の一つであり、損傷の受傷後経過時間の推定や生活反応の有無の判断 (生前損傷・死後損傷の鑑別) を客観的に行うことが要求される。実際には、これらは創の肉眼的所見および組織学的な変化や治癒状況を考慮して判断されることが多いが、近年、サイトカインや細胞外マトリックス、接着分子などの損傷部局所における発現を評価し、法医損傷検査に応用しようとする試みが法医病理学者によって行われている<sup>27)~32)</sup>。これらの法医損傷論の分野における研究は、免疫組織化学的な手法を用いた蛋白質レベルでの解析が主体であり、炎症性サイトカインであるIL-1, IL-6やTNF- $\alpha$ に関しても、その免疫組織化学的な局在が受傷後経過時間の推定に有用であったという報告がなされている<sup>33)34)</sup>。

一方、RNAの解析を法医損傷検査に応用しようとする試みも過去になされている。Buris<sup>35)</sup>およびOehmichenら<sup>36)</sup>は損傷部におけるRNA合成の経時的推移をラットを用いて検討し、損傷部においてRNA合成が亢進していることを報告したが、mRNAの解析を応用した研究はこれまでのところ皆無である。この理由は、法医学の対象試料は多くの場合、種々の環境条件の下で死後変化の影響を受けているため、mRNAは死後比較的速やかに内在性のRNaseなどにより低分子化されてしまうという推測に基づくものと思われる。しかしながら、例えば死直前に成傷された生前の損傷と死直後に成された死後の損傷とを鑑別する場合、損傷部位における蛋白質の発現によって判断するよりは、むしろそれに先立って誘導されるmRNAを検出する方が、受傷後早期についてより鋭敏な生活反応の指標となることが予測される。

本論文において筆者は、まず、実験的にマウスの皮膚に切創を作成し、損傷部局所におけるIL-10の動態および抗炎症性サイトカインとしてのIL-10の生物学的な役割に関する検討を行った。次いで、mRNAの解析を法医損傷検査に応用するための予備的な検討として、死後変化の進行したマウスの皮膚試料からIL-10 mRNAの検出を試みて、それらが受傷後早期における鋭敏な生活反応の指標となりうるかどうか、その可能性についても検討した。加えて、炎症性サイトカインの遺伝子発現を受傷後経過時間推定の指標として応用するための基礎的成績を得る目的で、皮膚の創傷治癒過程におけるIL-1, IL-6およびTNF- $\alpha$  mRNAの経時的な発現量の推移および組織切片上における局在も併せて検討した。

## 材料および方法

### I. 皮膚創傷治癒過程におけるIL-10の関与

#### 1. 材料

実験動物として、Crj: CD-1 (ICR) 系雄性マウス (8週齢, 体重30~37 g, 日本チャールス・リバー, 横浜) を用いた。ネンブタール® (ダイナボット, 大阪) 腹腔内投与 (5  $\mu$ g/g) による麻酔下でマウス背部を剃毛し、外科用メスで長さ2 cmの皮膚全層にわたる切創を作成した。その後、マウスは室温24°C, 湿度60%の室内で飼育した。受傷後1, 3, 6, 12, 24, 72, 144, 240時間目にマウス (各時間5匹) を頸椎脱臼により屠殺し、創

縁から両端5 mmまでの皮膚を採取し試料とした。対照として損傷のないマウスの皮膚を用いた。動物実験は金沢大学宝町地区動物実験指針に従った。

## 2. 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法

### 1) 総RNAの抽出

皮膚試料 (重量 50 mg) からの総 RNA の抽出は、Chomczynski ら<sup>37)</sup>の方法に基づく RNA 抽出用試薬 ISOGEN (ニッポンジーン, 富山) を用いて行った。すなわち、皮膚試料を細切し 1 ml の ISOGEN を加えて攪拌し、室温で 5 分間放置した後、0.2 ml のクロロホルムを加えて激しく振盪した。4℃, 12,000×g で 15 分間遠心し、上清を回収しイソプロパノールを 0.5 ml 加え室温で 10 分間放置した後、4℃, 12,000×g で 10 分間遠心し RNA を沈澱させた。沈澱物は 80% エタノールで洗浄し減圧乾燥させた後、20 μl のジエチルピロカーボネート (diethylpyrocarbonate, DEPC) 処理を施した蒸留水に溶解した。RNA 濃度は 260 nm の吸光度により測定した。

### 2) cDNA の合成

総 RNA 2 μg を鋳型として First-strand cDNA synthesis kit (Life Science, St. Petersburg, USA) を用いて cDNA を合成した。まず、総 RNA にオリゴ (dT)<sub>12-18</sub> プライマー 0.5 μg を加え、70℃ で 10 分間反応させた。引き続き、10 mM ジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT), RNase 阻害剤 12.5 単位、逆転写反応緩衝液、トリ骨髄芽症ウイルス由来逆転写酵素 25 単位を含む反応液 25 μl を 41℃ で 1 時間反応させ、cDNA を合成した。反応終了後、95℃ で 5 分間保温し逆転写酵素を失活させた。

### 3) PCR

使用したプライマーの塩基配列を表 1 に示す。各プライマーは宝酒造 (草津) に委託合成したものを用いた。コントロールとしてハウスキーピング遺伝子の 1 つである β-アクチン mRNA 由来の cDNA を増幅した。PCR には 2 μl の cDNA を鋳型として用い、各 50 μM の dNTP、各 0.4 μM のプライマー、PCR 緩衝液 [10 mM Tris-塩酸 (pH 8.0), 50 mM 塩化カリウム, 1.5 mM 塩化マグネシウム], Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造) 5 単位を含む反応液 50 μl 中で増幅反応を行った。95℃, 3 分の初期変性後、94℃ で 1 分, 65℃ で 2 分, 72℃ で 1 分のサイクルを β-アクチンは 30 サイクル、IL-10 は 40 サイクル行った。反応終了後、6 分の 1 容量の色素液 (0.25% プロモフェノールブルー, 0.25% キシレンシアノール, 30% グリセロール) を添加した反応液 12 μl を、Tris-酢酸-EDTA 緩衝液 (pH 7.8) を用いて、2% アガロースゲル (ニッポンジーン) に定電圧 100 V 下で電気泳動した。エチジウムブロマイド染色を行った後、紫外線照射下で PCR 増幅産物を可視化した。

### 3. エンザイムイムノアッセイ (ELISA) 法

採取した皮膚試料を細切し、コラゲナーゼ (50 μg/ml, 和光純薬, 大阪) を含む 0.01 M PBS (pH 7.2) 中で 37℃, 1 時間保温した後、氷上でホモジナイズした。4℃, 12,000×g で 20 分間遠心した後、上清を採取し試料とした。上清中の IL-10 濃度は Mouse IL-10 ELISA kit (Endogen, Woburn, USA) を用いて測定した。すなわち、キットに添付されたマイクロプレートの各ウェルに 50 μl の上清またはマウス IL-10 標準液 (0~13.5 単位/ml) を加え、37℃ で 2 時間反応させた。5 回洗浄後、酵素標識抗体液を 100 μl ずつ加え、37℃ で 1 時間反応させた。さらに 5 回洗浄し、発色液を 100 μl ずつ加えて室温で 30 分反応させた

後、反応停止液を加えた。自動吸光度計を用いて各ウェルの 450 nm における吸光度を測定し、標準曲線をもとに上清中の IL-10 濃度を算出した。また、上清中の総蛋白濃度は Folin-Lowry 反応<sup>38)</sup>により測定した。皮膚組織における IL-10 発現量の評価は、皮膚単位重量あたりの総蛋白濃度に対する IL-10 濃度の比で行った。

## 4. 組織内ハイブリッド形成 (in situ hybridization, ISH) 法

### 1) 組織切片の前処理

採取した皮膚片より凍結切片 (10 μm 厚) を作製した。各凍結切片は風乾した後、4% パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) を含む PBS (pH 7.4) で 15 分間、前固定し、プロテナーゼ K (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany) (2.0 μg/ml, 37℃, 10 分間) で除蛋白処理を行い、4% PFA 加 PBS で 10 分間、後固定を行った。さらに、塩酸溶液 (0.2 N, 室温, 10 分間) で除蛋白処理を行い、非特異的なプローブの吸着防止のためにアセチレーション (0.1 M トリエタノールアミン塩酸, 0.25% 酢酸溶液) を室温で 10 分間行った後、エタノール系列で脱水、風乾した。各反応過程の間は PBS で充分洗浄した。

### 2) RNA プローブの作製

IL-10 mRNA に対する上記 RT-PCR の増幅産物 1 μl を鋳型として、表 1 に示す 5' 末端側に T7 および SP6 RNA ポリメラーゼに対するプロモーターを付加したプライマー対を用いてネステッド-PCR (nested-PCR) を行った。PCR 反応液の組成は上記の通りであり、95℃, 3 分の初期変性後、94℃ で 1 分, 60℃ で 2 分, 72℃ で 1 分 30 秒のサイクルを計 30 サイクル行った。この反応により得られた T7/SP6 プロモーターを含む増幅産物より、IL-10 mRNA に対するセンス鎖、アンチセンス鎖のジゴキシゲニン (digoxigenin, DIG) 標識 RNA プローブを DIG RNA labeling kit (Boehringer Mannheim Biochemica) を用いて合成した。すなわち、PCR 増幅産物 3 μl を鋳型として用い、各 1 mM の ATP, CTP, GTP, 0.65 mM の UTP, 0.35 mM の DIG-11-UTP, RNase 阻害剤 20 単位、転写反応緩衝液、T7 あるいは SP6 RNA ポリメラーゼ 20 単位を含む反応液 20 μl を 37℃ で 2 時間反応させ RNA を合成した。反応終了後、20 単位の DNase I を加え 37℃ で 15 分間保温し鋳型 DNA を分解した。75 μl のエタノール, 2.5 μl の 4 M 塩化リチウムを加え -80℃ で 2 時間静置した後、4℃, 15,000×g で 10 分間遠心し RNA を沈澱させた。沈澱物は 70% エタノールで洗浄し、4℃, 15,000×g で 5 分間遠心した後、DEPC 処理を施した 50 μl の蒸留水に溶解した。

### 3) ハイブリダイゼーション

前処理を終えた凍結切片を、100 μM DTT 加ハイブリダイゼーション溶液 [50% 脱イオン化ホルムアミド, 10 mM Tris-塩酸 (pH 7.6), デンハルト溶液, 10% デキストラン硫酸, 200 μg/ml 酵母 tRNA, 250 μg/ml サケ精子 DNA] で 37℃, 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。上記ハイブリダイゼーション溶液に DIG 標識 RNA プローブを添加し組織切片に滴下した後、ハイブリダイゼーションを湿潤箱中で 50℃, 16 時間行った。組織切片の洗浄は 50% ホルムアミド加 2×SSC で 50℃, 20 分間を 1 回, 2×SSC で 50℃, 30 分間を 2 回, 0.1×SSC で 50℃, 30 分間を 1 回行った。

### 4) ハイブリッドの免疫組織化学的検出

洗浄後の組織切片を、DIG 緩衝液 1 [100 mM Tris-塩酸 (pH 7.5), 150 mM 塩化ナトリウム] に 5 分間浸漬させた後、1.5%

ブロッキング試薬 (Boehringer Mannheim Biochemica) 加DIG緩衝液1により室温で1時間、ブロッキングを行った。アルカリホスファターゼ標識抗DIGポリクローナル抗体 (500倍希釈, Boehringer Mannheim Biochemica) を室温で1時間反応させた後、DIG緩衝液1で15分間、2回洗浄し、さらにDIG緩衝液3 [100 mM Tris-塩酸 (pH 9.5), 100 mM 塩化ナトリウム, 50 mM 塩化マグネシウム] により3分間平衡化した。アルカリホスファターゼの発色は、450  $\mu\text{g}/\text{ml}$  テトラニトロ青テトラゾリウム塩 (Boehringer Mannheim Biochemica) および175  $\mu\text{g}/\text{ml}$  5-ブromo-4-クロロ-3-インドキシル燐酸塩 (Boehringer Mannheim Biochemica) 加DIG緩衝液3を用い、遮光した湿潤箱中で行った。十分な発色を確認後、Tris-塩酸-EDTA緩衝液 [10 mM Tris-塩酸 (pH 7.6), 1 mM EDTA] で反応を停止し、水溶性封入剤で封入して速やかに写真撮影した。なお、陽性所見の特異性は、センス鎖のプロープを用いた染色で陽性所見が消失することにより確認した。

#### 5. 免疫組織化学

採取した皮膚片よりホルマリン固定パラフィン切片 (4  $\mu\text{m}$  厚) を作製した。各切片は脱パラフィンした後、0.3% 過酸化水素水加メチルアルコールに30分間浸漬し内因性ペルオキシダーゼをブロッキングし、さらに非特異的の化学結合反応を防止するために、2% 正常ウサギ血清 (Dako, Glostrup, Denmark) を室温で30分間反応させた。一次抗体としてヤギ抗マウスIL-10ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA) を100倍希釈で4 $^{\circ}\text{C}$ 、一晚反応させた。2次抗体として、ビオチン標識ウサギ抗ヤギIgG (200倍希釈, Dako) を室温で1時間反応させ、さらに、アビジン-ビオチン複合体法に基づくLSAB2酵素試薬 (Dako) を室温で10分間反応させた。免疫複合体反応物を0.01% 過酸化水素水加3,3'-ジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine, DAB, 同仁化学, 熊本) 溶液で可視化し、ヘマトキシリンにて核染後、脱水、封入した。各反応過程の間はPBS (pH 7.4) で充分洗浄した。なお、陽性所見の特異性は、一次抗体の代わりに一次抗体を予めIL-10に対するブロッキングペプチド (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) で吸収させた溶液を用いた染色 (吸収試験) で陽性所見が消失することにより確認した。

#### 6. IL-10中和抗体の投与効果

IL-10の生体内での役割を明らかにするために、IL-10の中和抗体を実験的に投与し、炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、C-CケモカインであるMCP-1、MIP-1 $\alpha$ の発現量の変化、および組織切片上における炎症細胞 (好中球、マクロファージ) 数の変化を受傷後6および72時間目において評価した。IL-10中和抗体としてラット抗マウスIL-10モノクローナル抗体 (Genzyme, Cambridge, USA) を使用し、マウス (5匹) の背部皮膚に損傷を作成した直後に中和抗体50  $\mu\text{g}$  を創縁近傍の皮下に投与した。対照群として等量のラットIgG1を投与したマウス (5匹) を用い、受傷後6時間目に各群のマウスより皮膚試料を採取した。同様に各群5匹のマウスに損傷を作成した直後に50  $\mu\text{g}$  のIL-10中和抗体またはコントロールIgG1を投与し、その24、48時間後に各抗体を皮下に追加投与し、受傷後72時間目に皮膚を採取し試料とした。

#### 1) RT-PCR

皮膚試料中における各サイトカインのmRNAの発現はIL-10の場合と同様のRT-PCR法を用いて評価した。使用したプライ

マーの塩基配列を表1に示す。なお、MCP-1 mRNAの発現は30サイクル、受傷後72時間目におけるIL-1 $\beta$  mRNAの発現は26サイクル、その他のサイトカインの発現は全て28サイクルのPCRにより評価した。

#### 2) ELISA

蛋白質レベルでの各サイトカインの発現量はIL-10の場合と同様のELISA法を用いて評価した。使用したELISAキットはIL-1 $\beta$  (Genzyme), IL-6 (Endogen), TNF- $\alpha$  (Endogen), MCP-1 (R&D Systems, Minneapolis, USA) およびMIP-1 $\alpha$  (R&D Systems) である。

#### 3) 組織学的評価

各々のマウスより採取した皮膚片よりホルマリン固定パラフィン切片 (4  $\mu\text{m}$  厚) を作製した。まず、受傷後6時間目において損傷部における好中球数を評価した。すなわち、各マウスの損傷皮膚より作製したパラフィンブロックより6枚の連続切片を作製し、ナフトールAS-Dクロロアセテートエステルゼ染色<sup>39)</sup>を施した。引き続き、各切片において創洞内に観察される好中球を光学顕微鏡下で任意に選択した200倍率の5視野において数え、その合計を算出した後、6枚の連続切片における平均値を算出した。受傷後72時間目においては好中球数に加えてマクロファージ数を評価した。好中球は同様の方法で創洞内におけるその数を算出し、マクロファージ数に関しては抗マクロファージ抗体を用いた免疫染色後に評価した。すなわち、各切片を脱パラフィンした後、0.3% 過酸化水素水加メチルアルコールに30分間浸漬し、さらに非特異的の化学結合反応を防止するために、2% 正常ヤギ血清 (ニチレイ, 東京) を室温で30分間反応させた。一次抗体としてウサギ抗マウスマクロファージ抗体 (Inter-Cell Technologies, Inc., Hopewell, USA) を500倍希釈で室温、1時間反応させた。引き続きEnVision+<sup>TM</sup> (Dako) を室温で30分間反応させ、免疫複合体反応物をDAB (同仁化学) 溶液で可視化し、ヘマトキシリンにて核染後、脱水、封入した。各反応過程の間はPBS (pH 7.4) で充分洗浄した。創洞内のマクロファージ数は好中球数と同様の方法により評価した。

#### 7. 統計学的検討

統計学的検討はStudentのt検定を用いて行い、危険率5%未満を以て有意差ありとした。

#### II. IL-10遺伝子発現の生活反応の指標としての可能性

##### 1. 受傷後早期におけるIL-10 mRNAの半定量的評価

マウスの背部皮膚に長さ2 cmの切創を作成し、受傷後0、5、15、30、60、180分目に頸椎脱臼により屠殺し (各時間5匹)、皮膚試料 (重量50 mg) を採取した。これらの皮膚試料より上記と同様に総RNAを抽出後、20  $\mu\text{l}$  のDEPC処理を施した蒸留水に溶解し、その2  $\mu\text{l}$  を用いてRT-PCRを行った。PCR増幅産物はアガロースゲルに電気泳動しエチジウムブロマイド染色を施した後、紫外線照射下で可視化しポラロイド写真撮影を行った。撮影したポラロイド写真をイメージスキャナを用いてコンピューターにデジタル画像として入力し、増幅産物のバンド強度を画像解析用プログラムNIH Imageにより数値化した。IL-10 mRNAの発現量を半定量的に評価するために、各々の受傷後経過時間においてIL-10と内部コントロールである $\beta$ -アクチンmRNA由来のPCR増幅産物のバンド強度の比を算出し、これをIL-10 mRNA発現量の指標とした。なお、PCR増幅産物の半定量的な評価を行う前に以下 (2および3) に示す予備的検討を行った。

## 2. NIH Imageの定量性に関する検討

NIH Imageによるバンド強度の定量値が、鋳型DNA量およびPCRサイクル数を反映するかどうかを予め検討した。すなわち、合成したcDNAの0.25, 0.5, 1, 2, 3  $\mu$ lを鋳型として上記PCRの温度条件下、 $\beta$ -アクチンに対するプライマー対を用いて増幅反応を行った。サイクル数は各鋳型cDNAの容量につき28, 30, 32, 34サイクルとした。NIH Imageによるバンド強度の定量を行った後、使用したcDNAの容量を横軸に、バンド強度の定量値を縦軸にプロットした。

## 3. サイクル数の解析

RT-PCR法を用いてmRNAの発現量を比較する際には、PCRがプラトーに達する以前の段階における増幅産物の量を評価する必要がある。そこで、IL-10および $\beta$ -アクチンに関してサイクル数の解析を行った。受傷後1時間目に採取した皮膚試料より合成したcDNA 2  $\mu$ lを鋳型として、上記PCRの条件の下で増幅反応を行った。サイクル数はIL-10に関しては34, 36, 38, 40, 42サイクル、 $\beta$ -アクチンについては28, 30, 32, 34, 36サイクルとした。NIH Imageによるバンド強度の定量を行った後、サイクル数を横軸に、バンド強度の定量値の対数を縦軸にプロットした。

## 4. 死後変化の進んだ皮膚組織からの $\beta$ -アクチン mRNAの検出

mRNAの死後変化に対する安定性を検討した。すなわち、損傷のないマウス(14匹)を屠殺し、室温24°C、湿度60%の室内に放置した。これらのマウスより屠殺後0から13日目まで1日

毎に皮膚を採取し試料とした。皮膚試料から上記の通り総RNAの抽出、cDNAの合成を行い、 $\beta$ -アクチンに対するプライマー対を用いてPCRを行った。PCR増幅産物はアガロースゲルに電気泳動しエチジウムブロマイド染色を施した後、紫外線照射下で可視化した。

## 5. IL-10 mRNAの生活反応の指標としての可能性

マウスに切創を作成し、受傷後0, 30, 60, 180分目に屠殺した(各時間3匹)。また、死後の損壊として、マウス(3匹)を頸椎脱臼により屠殺後、直ちに背部の皮膚に長さ2 cmの切創を加えた。これらのマウスを1群として、計4群のマウスを室温24°C、湿度60%の室内に放置した。屠殺後1, 2, 3, 5日目に各群のマウスより皮膚試料を採取した。これらの皮膚試料中におけるIL-10 mRNAの発現量は、上記の条件下でRT-PCR法により半定量的に評価した。統計学的検討はStudentのt検定を用いて行い、危険率5%未満を以て有意差ありとした。

## Ⅲ. 皮膚創傷治癒過程における炎症性サイトカインの遺伝子発現

皮膚創傷治癒過程におけるIL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6およびTNF- $\alpha$ のmRNAの発現を、RT-PCR法およびISH法を用いて評価した。使用した材料および方法はIL-10の場合と同様であるが、受傷後48時間の皮膚試料についても併せて検討した。PCRサイクル数は、表1に示す各サイトカインに対するプライマー対を用いてサイクル数の解析を行い、全てのサイトカインのサイクル数を30サイクルとした。また、各サイトカインに対するRNAプローブの作製に用いたプライマー対は表1に示した。

Table 1. Sequences of the primers used for PCR and nested-PCR

Molecule		Sequence (5' to 3')
IL-1 $\alpha$	Sense	TGGCCAAAGTTCCTGACTTGTGTTG
	Antisense	CAGGTCATTTAACCAAGTGGTGCT
	Sense *	TTCAAGGAGAGCCGGGTGACAG
	Antisense **	GGTAGGTGTAAGGTGCTGATCTGG
IL-1 $\beta$	Sense	ATGGCAACTGTTCTCTGAACCTCAACT
	Antisense	CAGGACAGGTATAGATTCTTTCTCTT
	Sense *	CGGACCCCAAAAAGATGAAGG
	Antisense **	GGTATTTTGTCTGTTGCTTGGTTCTCC
IL-6	Sense	CGTGGAATGAGAAAAGAGTTGTGC
	Antisense	ATGCTTAGGCATAACGCACTAGGTT
	Sense *	AGCCAGAGTCTTCAGAGAGATACAG
	Antisense **	GGTCCTTAGCCACTCCTTCTG
IL-10	Sense	CTGCTCTTACTGACTGGCATGAG
	Antisense	GACTCAATACACACTGCAGGTGT
	Sense *	CAGCCGGGAAGACAATAACTGCAC
	Antisense **	GAGGGTCTTCAGCTTCTCACCC
TNF- $\alpha$	Sense	CAGCCTCTTCTCATTCTGCTTGTG
	Antisense	CTGGAAGACTCCTCCAGGTATAT
	Sense *	GGCCTCCCTCTCATCAGTTC
	Antisense **	TTGACGGCAGAGAGGAGGTTGACT
MCP-1	Sense	ACTGAAGCCAGCTCTCTTCTCTC
	Antisense	TTCCTTCTGGGGTCAGCACAGAC
MIP-1 $\alpha$	Sense	GCCCTTGCTGTTCTTCTCTGT
	Antisense	GGCAATCAGTTCAGGTCACT
$\beta$ -actin	Sense	TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGC
	Antisense	CTCATAGCTCTTCTCCAGGGAGGA

\*, \*\* Primers used for the nested-PCR to prepare RNA probes with the addition of T7 (\*)- and Sp6 (\*\*)-RNA polymerase promoter to the 5' end.

成 績

I. 皮膚創傷治癒過程におけるIL-10の関与

1. RT-PCR

健常マウスの皮膚においても、IL-10 mRNAの発現が観察された(図1)。損傷部局所でのIL-10 mRNAの発現量は受傷後に増加し、受傷後1から6時間目にかけてその強い発現が認められた。受傷後24時間目までに一旦は健常レベルにまで低下する傾向にあったが、その後、再び増加する傾向が認められた。

2. ELISA

損傷部局所におけるIL-10の蛋白質レベルでの発現量の推移を図2に示す。IL-10の蛋白質レベルは受傷後3時間目でピークに達し、12から24時間目に健常レベルにまで回復していた。その後、再び増加し、受傷後72時間目に再びピークに達していた。この蛋白質レベルでの発現量の推移はmRNAの発現パターン(図1)と良く相関していた。

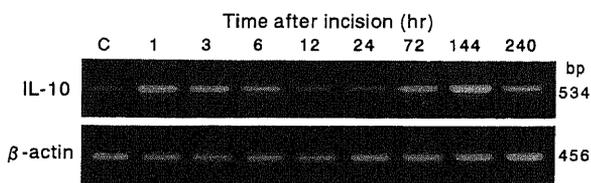


Fig. 1. RT-PCR analysis of IL-10 mRNA expression during cutaneous wound healing. Incised wounds were made on mice and the expression of IL-10 mRNA in skin specimens was examined using RT-PCR as described in Materials and Methods. The size in base pairs of the amplified cDNA fragments is indicated on the right. Lane C indicates the results of normal mice (control).

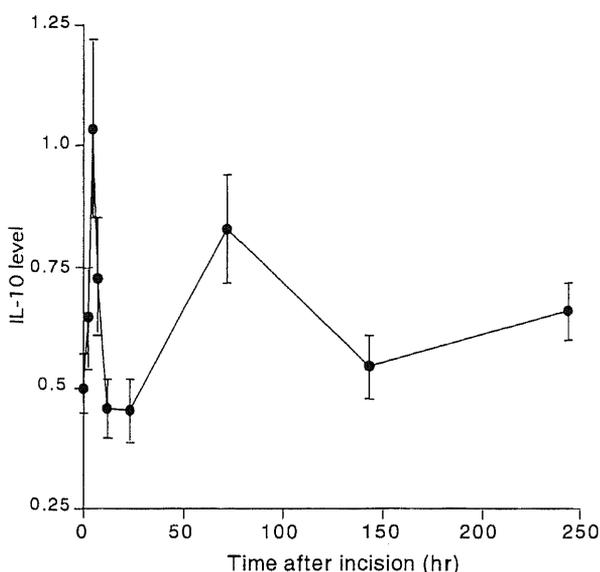


Fig. 2. Temporal expression of IL-10 protein during cutaneous wound healing. The protein levels in skin specimens were determined using ELISA as described in Materials and Methods. The results represent the  $\bar{x} \pm$  SEM of 5 mice per group. The data of 0 hr after incision represent the results obtained from normal mice.

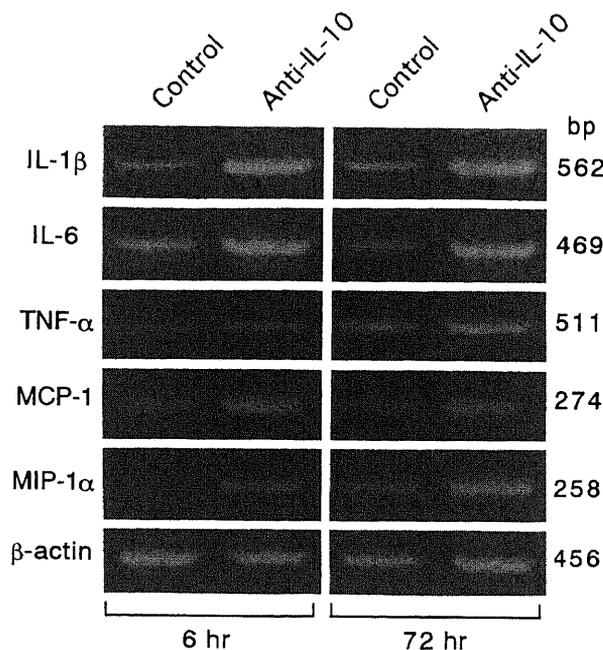


Fig. 4. Effects of anti-IL-10 treatment on mRNA expression of proinflammatory cytokines and chemokines. Mice were treated with either anti-IL-10 antibody or control IgG1 (50  $\mu$ g/day) by hypodermic injection into the proximal part of the wound margin. The mRNA expression of the cytokines in skin specimens was examined 6 and 72 hr after incision using RT-PCR as described in Materials and Methods. The size in base pairs of the amplified cDNA fragments is indicated on the right.

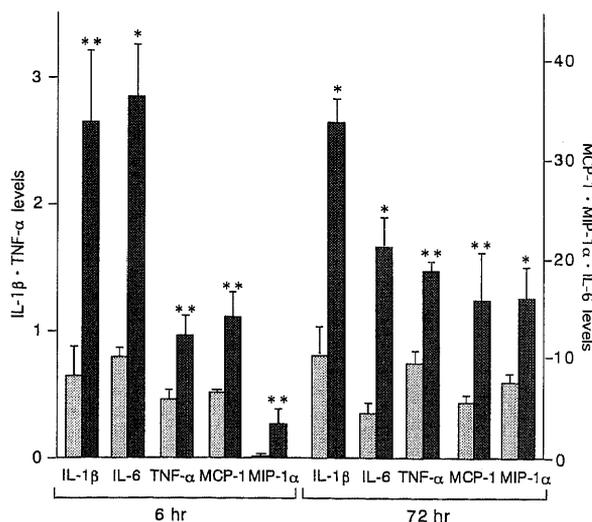


Fig. 5. Effects of anti-IL-10 treatment on the expression of proinflammatory cytokines and chemokines. The protein levels in skin specimens were determined using ELISA as described in Materials and Methods. The results represent the  $\bar{x} \pm$  SEM of 5 mice per group. □, control; ■, anti-IL-10 treatment. \*  $p < 0.01$ . \*\*  $p < 0.05$  (vs. control).

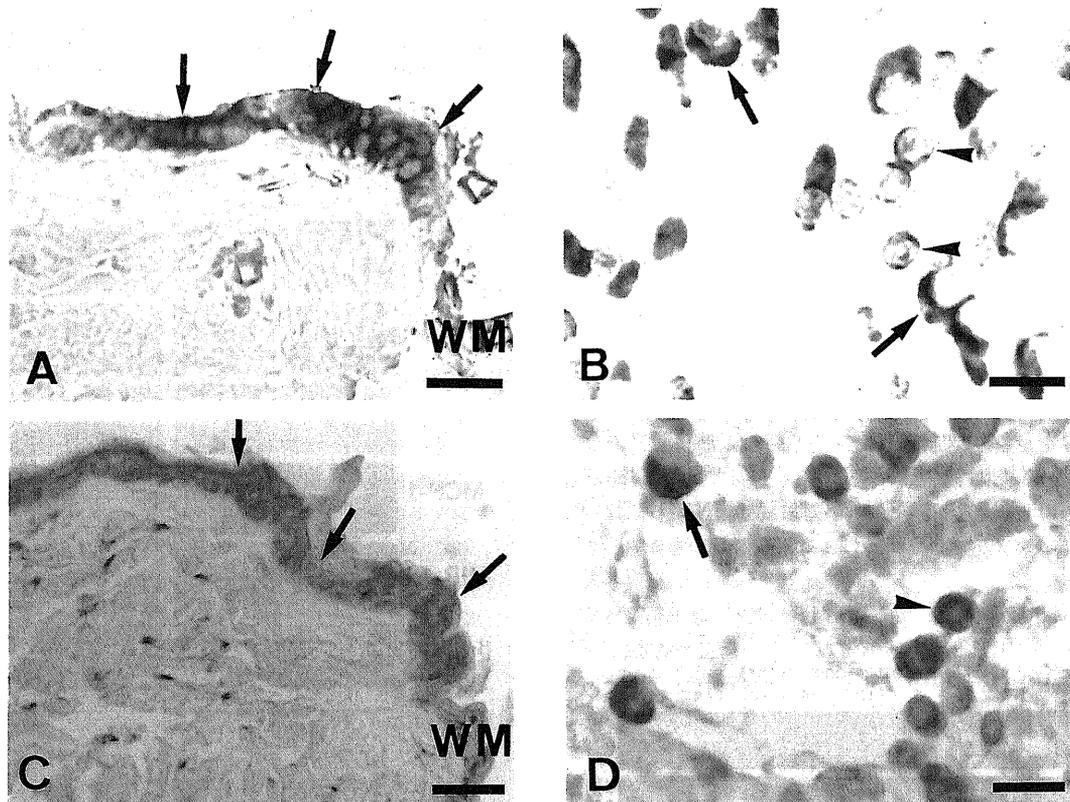


Fig. 3. In situ hybridization of IL-10 mRNA (A, B) and immunostaining of IL-10 protein (C, D) during cutaneous wound healing. (A) 1 hr after incision. Positive hybridization signals for IL-10 mRNA were detected in epidermal cells (arrows) of the wound margin (WM). (B) 3 days after incision. Two different types of infiltrating mononuclear cells (MNCs) (arrows and arrowheads) showed positive hybridization signals, probably macrophages and lymphocytes, respectively. (C) 3 hr after incision. Epidermal cells (arrows) were immunoreactive for anti-IL-10 antibody. (D) 3 days after incision. Two different types of MNCs (arrow and arrowhead), which corresponded with those of IL-10 mRNA-positive cells, were immunostained. Bar =  $30\ \mu\text{m}$  (A, C). Bar =  $20\ \mu\text{m}$  (B, D).

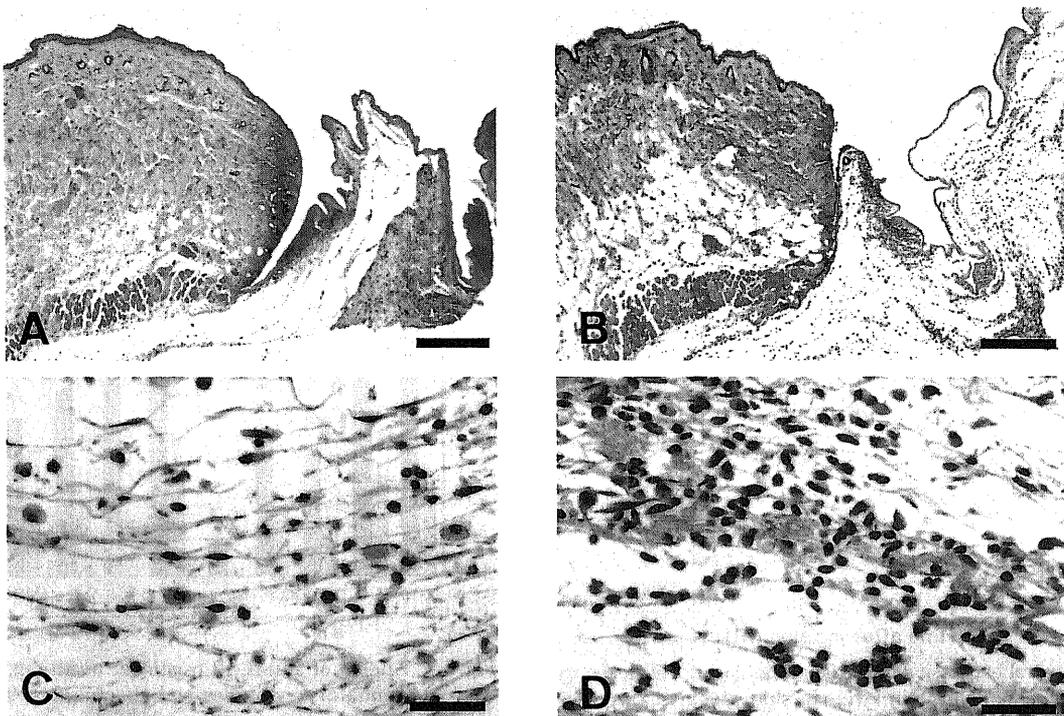


Fig. 6. Histological evaluation of cutaneous alterations following the anti-IL-10 treatment. (A) 6 hr after incision, untreated. (B) 6 hr after incision, anti-IL-10 treatment. (C) 72 hr after incision, untreated. (D) 72 hr after incision, anti-IL-10 treatment. Five mice in each group were examined and representative results from individual mice are shown. HE. Bar =  $250\ \mu\text{m}$  (A, B). Bar =  $40\ \mu\text{m}$  (C, D).

### 3. ISH

健康マウス皮膚においても、表皮細胞にIL-10 mRNAの陽性所見が観察されたが、これらの陽性所見は、創傷治癒過程においても常に表皮層に観察された。なお、センス鎖のプローブを用いた陰性対照では有意なシグナルは認められなかった。

受傷後1時間目では、創縁近傍の表皮層にIL-10 mRNAの強いシグナルを認めた(図3A)。受傷後1から3時間目にかけて組織間質の浮腫が著明となり、6から12時間目では損傷部位に多核白血球(好中球)の浸潤が認められたが、これら多核白血球ではIL-10 mRNAのシグナルは陰性であった。

受傷後24から72時間目にかけて、炎症細胞の主体は大型単核球(単球/マクロファージ)となった。72時間目では、大型単核球や小型単核球(リンパ球)の集簇が著明となり、表皮細胞は増殖し表皮層の肥厚が認められた。これらの単核球や表皮細胞にIL-10陽性所見が観察された(図3B)。

受傷後144時間目では肉芽組織形成が著明であり、紡錘形細胞(線維芽細胞)の集簇や血管新生を認めたが、これら細胞に陽性所見は認められなかった。創は受傷後240時間目に、再生した表皮細胞に完全に被われた。

### 4. 免疫組織化学

免疫染色におけるIL-10の局在は、表皮細胞および受傷後に創縁に集簇する単核球に認められ(図3C, 3D)、ISH法によるIL-10 mRNAの局在が観察された細胞と同様であった。なお、陰性対照として行った吸収試験においては、有意なシグナルは認められなかった。

### 5. IL-10中和抗体の投与効果

IL-10の発現に2つのピーク(図2)が認められたことから、IL-10中和抗体の投与効果を受傷後6および72時間目において判定した。コントロール群と比較した場合、中和抗体投与群では受傷後6および72時間において、TNF- $\alpha$ 以外のサイトカインのmRNA発現量が著明に増加していた(図4)。ELISA法による検討では、中和抗体投与群で全てのサイトカインの発現量増加が認められた(図5)。

HE染色による組織像を図6に示す。受傷後6時間目では中和抗体投与群で多数の好中球の浸潤を認め、さらに組織間質の浮腫が著明であった(図6B)。受傷後72時間目では、コントロール群で創洞内にマクロファージを主体とする炎症細胞が散在して認められたが(図6C)、中和抗体投与群では炎症細胞の浸潤が強く、依然として好中球が多数観察された(図6D)。組織切片上におけるこれら炎症細胞数を評価した結果を表2に示すが、中和抗体投与群で好中球、マクロファージ数ともに有意( $p < 0.05$ )な増加が認められた。

## II. IL-10遺伝子発現の生活反応の指標としての可能性

### 1. 受傷後早期におけるIL-10 mRNAの半定量的評価

受傷後0から180分における皮膚損傷部でのIL-10 mRNAの経時的発現を、RT-PCR法で解析した結果を図7、これらの結果

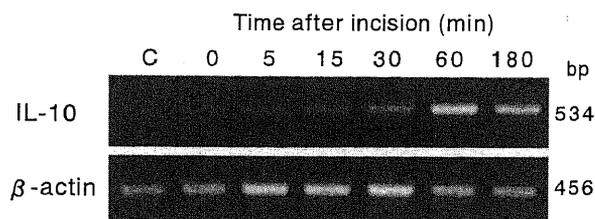


Fig. 7. RT-PCR analysis of IL-10 mRNA expression during the early phase of cutaneous wound healing in mice. The expression of IL-10 mRNA in skin specimens was examined using RT-PCR as described in Materials and Methods. Lane C indicates the results of normal mice (control).

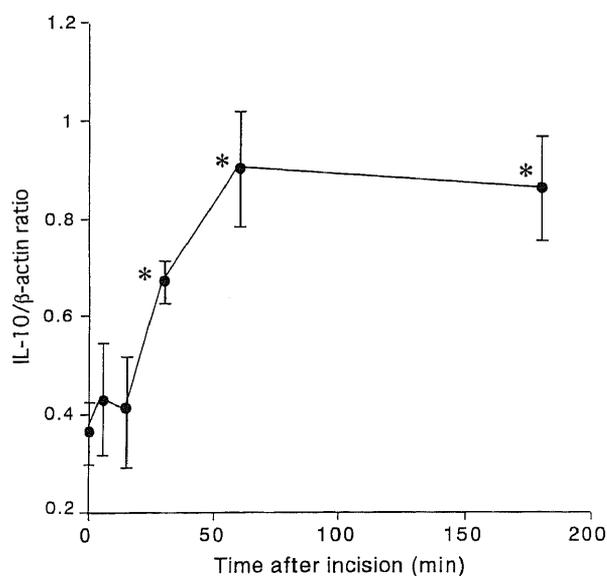


Fig. 8. Time-dependent expression of IL-10 mRNA during the early phase of cutaneous wound healing. The ratio of IL-10 to  $\beta$ -actin band intensity (Fig. 7) was determined at the survival time using Macintosh densitometry program NIH Image. The results represent the  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  of 5 mice per group. \*  $p < 0.05$  (vs. control).

Table 2. Number of infiltrating neutrophils and macrophages in the incised wound area of mice with and without anti-IL-10 treatment

Anti-IL-10 treatment	Time after incision (hr)	Number of mice	Number of neutrophils	Number of macrophages
-	6	5	252 $\pm$ 36	NE
+	6	5	713 $\pm$ 219	NE
-	72	5	76 $\pm$ 29	33 $\pm$ 10
+	72	5	331 $\pm$ 147	75 $\pm$ 21

The results represent the  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . NE, not examined. \*  $p < 0.01$ . \*\*  $p < 0.05$ .

を半定量的に評価したものを図8に示す。IL-10 mRNA発現量は受傷後15分目から急激に増加しており、1時間目でピークに達していた。健康皮膚での発現量と比較すると、IL-10 mRNAの有意 ( $p < 0.05$ ) な増加は受傷後30から180分において認められた。

なお、予め画像解析用プログラム NIH Imageの定量性に関して検討を行ったが、NIH ImageによるPCR増幅産物のバンド強度の定量値は、鋳型DNA量およびPCRサイクル数を良く反映していた。また、IL-10 mRNAレベルがピークに達する時間(受傷後1時間)に採取した皮膚試料を用いてサイクル数の解析を行ったが、IL-10、 $\beta$ -アクチンともPCR増幅反応はプラトーに

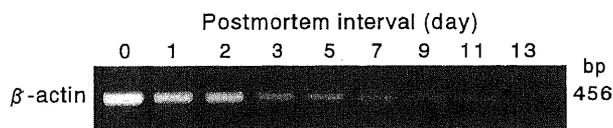


Fig. 9. Detection of  $\beta$ -actin mRNA from skin specimens with postmortem putrefaction by RT-PCR. Fourteen mice without incision were sacrificed and placed in an air conditioned room (temperature 24 °C). The skin specimens were excised on days 0 to 13 and the expression of  $\beta$ -actin mRNA was examined using RT-PCR as described in Materials and Methods.

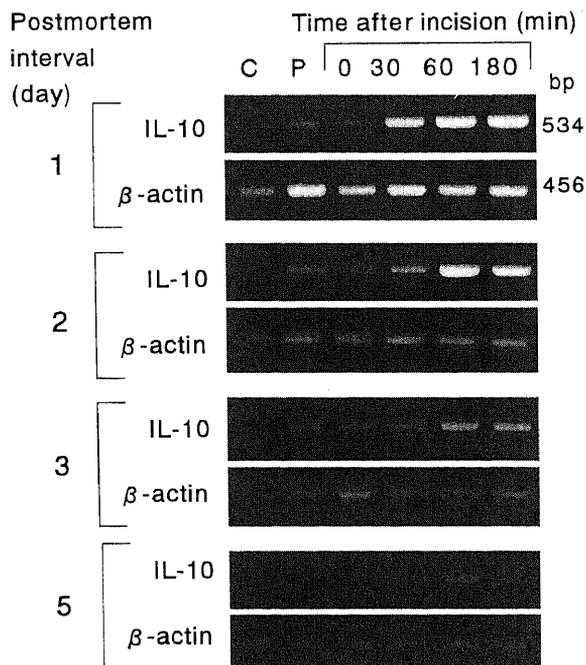


Fig. 10. RT-PCR analysis of IL-10 mRNA expression from putrefied skin specimens. Mice were sacrificed at 0, 30, 60 and 180 min after incision. A postmortem incision was also made on separate mice after sacrifice. These mice were placed in an air conditioned room. At 1, 2, 3 and 5 days postmortem, the skin specimens were excised and the expression of IL-10 mRNA was examined using RT-PCR as described in Materials and Methods. Lane C and lane P indicate the results of normal mice and those of postmortem-incised mice, respectively.

達しておらず、サイクル数の増加に伴って反応産物が増加しうる状態にあった。

## 2. 死後変化の進んだ皮膚組織からの $\beta$ -アクチン mRNAの検出

$\beta$ -アクチン mRNA由来のRT-PCR法による増幅産物は、エチジウムブロマイド染色を施したアガロースゲル上で、屠殺後11日目まで検出可能であった(図9)。しかし、屠殺後の経過日数とともにPCR増幅産物量は徐々に減少した。

## 3. IL-10 mRNAの生活反応の指標としての可能性

図7に示したIL-10 mRNAの発現量に関する傾向は、屠殺後5日間放置したマウスより採取した皮膚試料からも検出可能であ

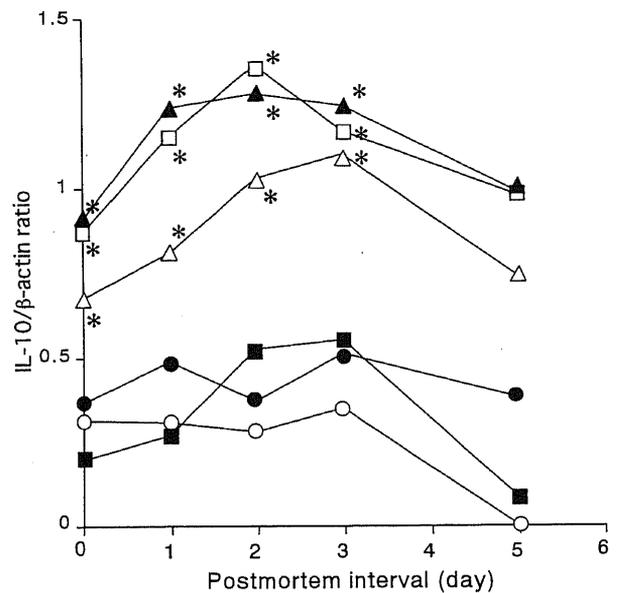


Fig. 11. Time course of IL-10 mRNA expression during the 5-day postmortem interval. The ratio of IL-10 to  $\beta$ -actin band intensity (Fig. 10) was determined at each time point. The results represent the  $\bar{x}$  of 3 mice per group.  $\circ$ , control;  $\bullet$ , 0 min post-incision;  $\triangle$ , 30 min post-incision;  $\square$ , 180 min post-incision;  $\blacksquare$ , postmortem damage. \*  $p < 0.05$  (vs. control).

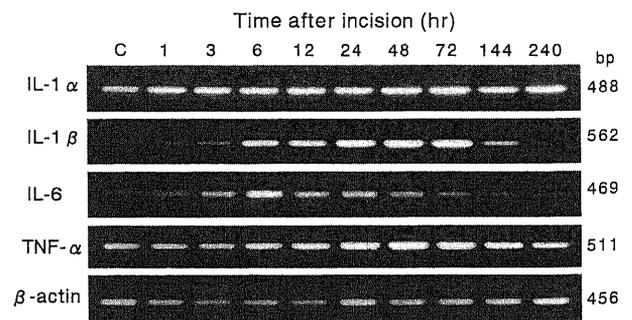


Fig. 12. RT-PCR analysis of mRNA expression of proinflammatory cytokines during cutaneous wound healing in mice. The mRNA expression of the proinflammatory cytokines in skin specimens was examined using RT-PCR as described in Materials and Methods. The size in base pairs of the amplified cDNA fragments is indicated on the right. Lane C indicates the results of normal mice (control).

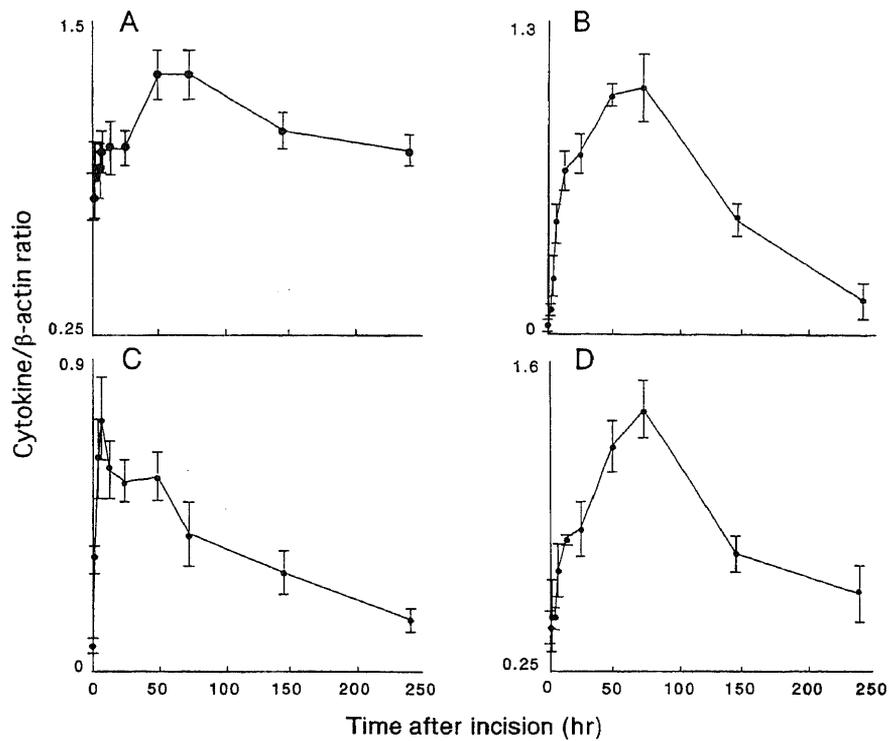


Fig. 13. Time-dependent expression of mRNA for proinflammatory cytokines during cutaneous wound healing. The ratio of cytokine to  $\beta$ -actin band intensity (Fig. 12) was determined at the survival time. The results represent the  $\bar{x} \pm$  SEM of 5 mice per group. The data of 0 hr after incision represent the results obtained from normal mice. (A) IL-1 $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$ , (C) IL-6, (D) TNF- $\alpha$ .

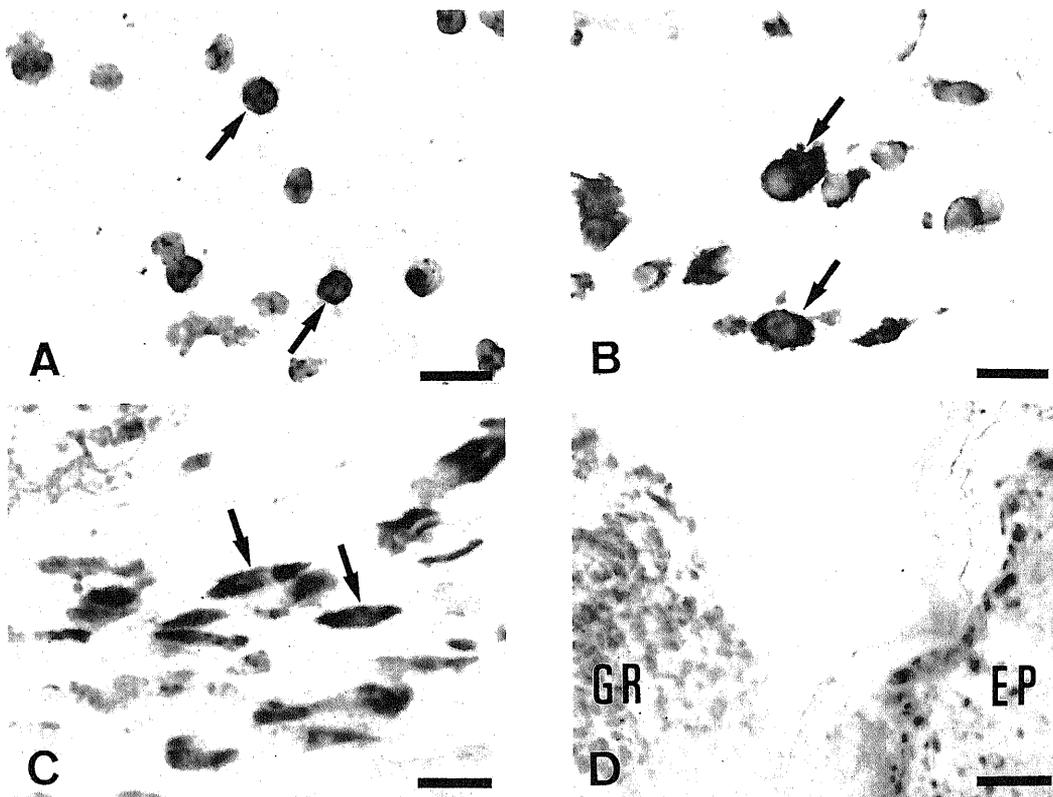


Fig. 14. In situ hybridization of mRNA for proinflammatory cytokines during cutaneous wound healing. (A) 12 hr after incision using TNF- $\alpha$  antisense probe. Arrows indicate polymorphonuclear cells, probably neutrophils. (B) 3 days after incision using IL-1 $\beta$  antisense probe. Arrows indicate relatively large mononuclear cells, probably macrophages. (C) 6 days after incision using IL-6 antisense probe. Arrows indicate spindle-shaped mesenchymal cells, probably fibroblasts. (D) 6 days after incision using IL-1 $\alpha$  antisense probe. Positive signals were detected in the epidermal layer (EP) and the granulation tissue (GR). Bar = 20  $\mu$ m (A, B, C). Bar = 50  $\mu$ m (D).

った(図10)。屠殺後5日間における皮膚試料中のIL-10 mRNAを半定量的に評価した結果が図11である。屠殺後の各経過日数において、健常皮膚での発現量と比較した場合、IL-10 mRNAの有意( $p < 0.05$ )な増加は受傷後30から180分の損傷皮膚に関して、屠殺後3日目まで認められた。IL-10/ $\beta$ -アクチン比は、屠殺後3日目まで経過日数とともに増加する傾向にあったが、死後損壊においては健常皮膚と比べても有意な増加は認めなかった。

### Ⅲ. 皮膚創傷治癒過程における炎症性サイトカインの遺伝子発現

#### 1. RT-PCR

各サイトカインのmRNA由来のPCR増幅産物は、受傷後240時間以内の全ての時間において検出された(図12)。健常マウスの皮膚においては、特に、IL-1 $\alpha$ とTNF- $\alpha$  mRNAの強い発現が観察された。受傷後、損傷部局所におけるサイトカインのmRNA発現量の増加が認められた。図13にこれらの発現量の変化を半定量的に評価した結果を示す。全てのサイトカインのmRNAレベルは受傷後、比較的急激に増加し、IL-6は受傷後6時間目、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ は受傷後48から72時間目にかけてピークに達していた。これら各サイトカインのmRNA発現レベルは、受傷後240時間目にはほぼ健常のレベルにまで回復していた。

#### 2. ISH

健常マウス皮膚において、表皮細胞にIL-1 $\alpha$ 、IL-6およびTNF- $\alpha$  mRNA陽性所見が観察された。しかしながら、IL-1 $\beta$  mRNA由来の陽性所見は表皮層および真皮層には認められなかった。受傷後早期には損傷部に遊走する多核白血球(好中球)にIL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA陽性所見(図14A)、さらにそれ以降では、大型単核球(単球/マクロファージ、図14B)および紡錘形細胞(線維芽細胞、図14C)に全ての炎症性サイトカインのシグナルを認めた。また、再生する表皮細胞にもIL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ の陽性所見が観察された(図14D)。

### 考 察

IL-10はTh2細胞より産生されるサイトカインとして同定されたが<sup>7)</sup>、マウスにおいてはTh2細胞に加えてB細胞、マクロファージ、ケラチノサイト、肥満細胞で産生されることが報告されている<sup>8)</sup>。本研究ではマウス皮膚の創傷治癒過程におけるIL-10の局在は、ISH法および免疫染色により表皮細胞および損傷部に集簇する単核球に観察され、従来の報告<sup>8)</sup>と矛盾せずIL-10が損傷部局所で産生されることが示された。なお、好中球がIL-10を産生するという報告もあるが<sup>40)</sup>、皮膚の創傷治癒過程では好中球がIL-10の産生細胞であることを支持する成績は得られなかった。一方、健常マウス表皮細胞においてもIL-10の局在が観察されたが、皮膚は常に外界から紫外線などによる刺激を受けるため、IL-10が皮膚の恒常性の維持にあたっているものと考えられる<sup>41)</sup>。

本研究の最も興味深い成績の一つは、損傷部局所におけるIL-10の経時的発現量の推移である。すなわち、IL-10蛋白は受傷後急激に増加し3時間目にピークに達した後、一旦は減少したものの、72時間目に再びピークに達した所見であり、mRNAの発現様式も蛋白レベルのそれと良く相関していた。受傷後3時間目のピークは表皮細胞でのIL-10産生、72時間目のピークは表皮細胞に加えて、損傷部に集簇する単核球でのIL-10産生

を反映しているものと考えられるが、受傷後3時間目は損傷部に遊走する好中球が徐々に増加する炎症期の早期、72時間目はマクロファージの集簇が最も著明となる炎症期の極期に相当する。この炎症期における2つの異なる相の各々でIL-10のピークが認められたことに基づき、抗炎症性サイトカインとしてのIL-10の生物学的役割をより明確にするため、IL-10の中和抗体を損傷部局所に投与し、その効果を受傷後6および72時間目で判定した。

受傷後6時間目では、IL-10中和抗体投与群で創洞内に好中球が多数認められ、損傷部で炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ )とC-Cケモカイン(MCP-1、MIP-1 $\alpha$ )が過剰に発現していた。炎症部位に遊走する好中球は局所で様々なサイトカインを産生し、炎症反応において重要な役割を担っている<sup>42)</sup>。IL-10自体は好中球の走化性に殆ど影響を与えないとされるが<sup>43)</sup>、好中球からのMIP-1 $\alpha$ やIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ の産生を抑制する<sup>44)45)</sup>。マウスにおいてMIP-1 $\alpha$ は強力な好中球の走化性因子であり<sup>46)48)</sup>、IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ も接着分子やケモカインの産生を促進し、間接的に好中球の遊走に関与している<sup>47)</sup>。従って、受傷後3時間目に認められたIL-10のピークは、創傷治癒過程の炎症期早期において、これらサイトカインの産生を抑制することにより無秩序な好中球の遊走を防止し、炎症反応を制御しているものと考えられた。

一方、好中球のIL-6、MCP-1産生能に関しては一定の見解が得られていないが<sup>25)26)42)</sup>、血管内皮細胞や線維芽細胞はこれらのサイトカインを産生することが報告されている<sup>48)50)</sup>。しかし、IL-10は血管内皮細胞からのIL-6、MCP-1産生を促進するといわれており<sup>48)</sup>、IL-10中和抗体投与後の受傷後6時間目にIL-6、MCP-1の過剰発現が認められたことは、少なくとも炎症期早期においては、血管内皮細胞がこれらサイトカイン産生の主座ではないことを示唆している。IL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ は線維芽細胞からのIL-6、MCP-1産生促進作用を有することから<sup>49)50)</sup>、中和抗体投与時のIL-6、MCP-1の過剰発現はIL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ の発現亢進を反映しているとも考えられる。また、ケラチノサイトもIL-6、MCP-1産生能を有しており、その関与についても否定出来ない<sup>25)50)</sup>。

さらに、生体内における炎症反応には血管透過性の亢進を伴うが、本研究の結果からIL-10が血管透過性に関与していることも示唆された。一般に血管透過性亢進には、ヒスタミンやセロトニン、プロスタグランジンE<sub>2</sub>、プロスタサイクリン、血小板活性化因子などが関与している。IL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ はプロスタグランジンE<sub>2</sub>、プロスタサイクリン、血小板活性化因子の産生を介した血管拡張作用や血管透過性亢進作用を有しており<sup>47)</sup>、また、リコンビナントMCP-1、MIP-1 $\alpha$ 投与がヒスタミン放出を介して組織間質の浮腫を増強させることも報告されている<sup>46)</sup>。さらに、IL-10ノックアウトマウスで炎症反応を誘発すると著明な組織の浮腫を生じ<sup>51)</sup>、遅延型過敏症反応においてもIL-10が浮腫を抑制することが示されている<sup>11)13)</sup>。この遅延型過敏症反応でのIL-10の血管透過性の抑制作用には局所におけるTh1サイトカイン(IL-2、インターフェロン- $\gamma$ )の発現レベルの減少が関与しているとされる<sup>11)</sup>。従って、皮膚創傷治癒過程においても、IL-10が血管作動性因子の発現抑制を介して、間接的に血管透過性を制御している可能性が示唆される。

受傷後72時間目において注目すべき成績は、中和抗体投与により創洞内マクロファージ数が増加していたことである。今

回検討した炎症性サイトカインおよびケモカインはマクロファージより産生され、IL-10がマクロファージからの炎症性サイトカイン産生を抑制することはよく知られている<sup>52)53)</sup>。また、IL-10はリポポリサッカライドやIL-1 $\beta$ により活性化されたマクロファージからのMCP-1やMIP-1 $\alpha$ 産生を抑制することも示されており<sup>49)54)55)</sup>、実際にIL-10中和抗体投与で全てのサイトカインの過剰発現を認めた。MCP-1やMIP-1 $\alpha$ はマクロファージに対する走化性因子であり<sup>6)46)</sup>、皮膚の創傷治癒過程においてもマクロファージの走化性因子としての重要性が指摘されていることから<sup>24)~26)</sup>、中和抗体投与によるマクロファージ数の増加はこれらケモカインの過剰発現が理由の一つと考えられる。

マクロファージは創傷治癒過程において非常に重要な役割を果たしており<sup>56)</sup>、マクロファージを創傷部の皮下に実験的に注射することで、治癒が促進されるとの報告<sup>57)</sup>がある一方、主にマクロファージで産生されるTNF- $\alpha$ が過剰発現した場合には、組織壊死や浮腫の増強、コラーゲン生合成阻害に基づく肉芽組織の形成阻害などによって創傷治癒が遅延することも知られている<sup>58)~60)</sup>。従って正常な創傷治癒過程では、マクロファージにおけるサイトカイン産生は巧妙に制御されているものと考えられるが、本研究から、創傷治癒過程においてIL-10がマクロファージの遊走を抑制し、さらにそのサイトカイン産生を制御する重要な因子であることが強く示唆された。なお、依然として中和抗体投与群で創洞内に好中球が多数認められたことは、中和抗体の投与により炎症反応が遅延した結果と見なすことも可能である。また、IL-10がリンパ球の走化性に及ぼす影響は今回検討していないが、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ の産生抑制を介してTリンパ球の浸潤を制御している可能性も考えられる<sup>61)62)</sup>。

以上の検討結果より、皮膚の創傷治癒過程におけるIL-10の関与が明らかとなり、特に、IL-10発現に2つのピークが存在することは、各々が好中球およびマクロファージの浸潤およびその機能の抑制と密接に関連した、過剰な炎症反応を抑制するための目的な生体防御反応であると考えられた。

さて、IL-10の蛋白質レベルでの増加に先立って、受傷後1時間目において既にIL-10 mRNAの強い発現が認められたが、これを法医学的な観点から捉え直し、IL-10 mRNAが法医学実務における生前の損傷と死後の損壊とを鑑別する上での鋭敏な指標となりうるのではないかと考えた。そこで、損傷部局所におけるIL-10 mRNA発現量の推移を死後変化の影響も含めて詳細に検討した。mRNAに対する死後変化の影響は現在まで全く検討されていないが、これはmRNAは死後比較的速やかに内在性のRNaseなどにより低分子化されるという推測に基づいたものと思われる。しかしながら、この推測に反し、 $\beta$ -アクチンmRNAは本研究のRT-PCR法の条件下で屠殺後11日目まで検出可能であった。法医学において取り扱う異状死体は様々な環境条件下で発見され、その死後変化の程度も様々であるため、mRNAに対する死後変化の影響を種々の環境条件下で検討する必要があるが、少なくとも一般に考えられている以上に、mRNAが死後変化に対して抵抗性を有していることが示された。

本研究ではIL-10 mRNA発現量の推移について、RT-PCR法により $\beta$ -アクチンを内部標準物質として半定量的に評価したが、一般にはmRNA発現量をRT-PCR法を用いてより正確に測定するためには、段階的に希釈した競合鋳型RNAとの増幅産物量を比較する競合RT-PCR法<sup>63)</sup>が望ましい。しかし、法医学にお

いて対象となる試料は多くの場合、死後変化の影響下にあり、IL-10と $\beta$ -アクチン発現量を比較する方法は、各々のmRNAに対する死後変化の影響が互いに相殺されるため、法医学実務への応用を考えた場合には非常に有用と考える。また、画像解析用プログラムNIH ImageによるPCR増幅産物のバンド強度の測定値は鋳型DNA量を良く反映することが既に報告されているが<sup>64)</sup>、本研究の条件下においても良い相関が得られた。

IL-10 mRNAは受傷後15分目より急激に増加しており、健常皮膚における発現量と比較した場合、有意な増加は受傷後30分から180分において観察された。さらに、この傾向は屠殺後5日間放置したマウスの皮膚試料からも検出可能であった。Oehmichen<sup>65)</sup>は損傷部における形態学的あるいは生化学的な現象を、受傷後経過時間や生活反応の新たな指標として用いる場合、以下の3つの要件を満たさねばならないとしている。すなわち、その現象が時間に依存していること、死後変化の進んだ試料からも測定・検出が可能であること、死後においても時間依存性が保たれていること、の3要件である。IL-10 mRNAに関してはこの条件を完全に満たしていた。IL-10/ $\beta$ -アクチン比は屠殺後3日目まで上昇する傾向にあったが、これは個体死の後も細胞レベルではIL-10 mRNAの誘導が継続しているために生じたものと考えられる<sup>66)</sup>。この上昇傾向は、屠殺直後に死後損壊を作成したマウス皮膚においても同様に認められたが、死後損壊と健常皮膚とを比較した場合、IL-10 mRNA発現量の有意な増加は認められなかった。これらの成績から、IL-10 mRNA発現量の増加が生活反応を反映する鋭敏な指標となりうるものと考えられる。

実際の法医損傷検査への応用としては、皮膚の損傷部位およびその部位よりやや離れた健常皮膚でのIL-10 mRNA発現量を比較し、その増加が認められた場合に生前の損傷である可能性が高いと判断される。損傷部位より離れた部位の健常皮膚は、損傷部位と同程度の死後変化を有しているため、内部対照として有用であるが、実務への応用を目指して、受傷後経過時間の明らかな損傷皮膚を試料として、さらに検討を重ねる必要がある。その際、IL-10 mRNAが受傷後12から24時間目にかけて、一旦は健常レベルにまで減少していることについての十分な注意が必要であり、今回の検討結果は、免疫組織化学的な手法を用いた研究が主体であった従来の法医損傷論の研究分野において、新たな展開をもたらす成績であると考えられる。

さて、炎症性サイトカインであるIL-1、IL-6やTNF- $\alpha$ に関しては、マウスに切創を作成したモデルを用いた検討で、その免疫組織化学的な局在やELISA法による損傷部局所における発現量の推移が受傷後経過時間の指標となりうる可能性が指摘されている<sup>33)</sup>。また、法医剖検例より採取した損傷皮膚を用いた検討においても、IL-1 $\alpha$ の免疫組織化学的な局在が受傷後経過時間の指標として有用であるという報告がなされている<sup>34)</sup>。そこで、これらの報告を受けて、炎症性サイトカインの遺伝子発現を受傷後経過時間推定の指標として応用するための基礎的な成績を得る目的で、マウス皮膚創傷治癒過程におけるIL-1、IL-6およびTNF- $\alpha$  mRNA発現量の推移および組織切片上における局在を検討した。

IL-1は、免疫、炎症、造血、内分泌、脳神経系などにおける様々な生体反応に関与しており、等電点の違いから $\alpha$ 型と $\beta$ 型に分類されている<sup>2)</sup>。IL-1の生物活性として、マクロファージからのIL-6やTNF- $\alpha$ の産生誘導、線維芽細胞やケラチノサイ

トの増殖促進などが知られている。これらの生物活性を介してIL-1は創傷治癒にも深く関わっていると考えられ、実際の皮膚の損傷部や滲出液中におけるIL-1レベルが上昇していたとする報告も多い<sup>67)~69)</sup>。本研究では、RT-PCR法で健常マウス皮膚にIL-1 $\alpha$  mRNAの強い発現が認められたが、受傷後はむしろIL-1 $\beta$  mRNA発現量の増加が顕著であり、IL-1 $\beta$  mRNAのピークが認められた受傷後72時間目で、大型単核球(マクロファージ)にIL-1 $\beta$  mRNAの強い陽性シグナルが観察された。単球やマクロファージは刺激を受けるとIL-1 $\alpha$ よりもIL-1 $\beta$ を多く産生することが示されているが<sup>70)</sup>、皮膚の創傷治癒過程においてもマクロファージより産生されるIL-1 $\beta$ が重要な役割を果たしていると考えられた。一方、IL-1 $\alpha$  mRNA陽性シグナルは、過去の報告<sup>71)</sup>に一致して健常皮膚、損傷皮膚とも表皮細胞に特に強く認められ、さらにリコンビナントIL-1 $\alpha$ 投与が表皮再生を促進したという報告もなされていることから<sup>72)</sup>、IL-1 $\alpha$ は皮膚の恒常性の維持および表皮の再生と密接に関連しているものと思われた。

IL-6は、B細胞の抗体産生細胞への最終分化を誘導する因子としてそのcDNAがクローニングされた物質であるが、免疫応答のみならず急性期反応や造血、脳神経系の細胞増殖や分化などにも関与している<sup>3)</sup>。皮膚の創傷治癒に関連して、Mateoら<sup>73)</sup>は浸出液中のIL-6のレベルは受傷後12時間目においてピークに達したとし、その理由として浸出液に含まれる好中球によるIL-6の産生を挙げているが、今回の検討では多核白血球にIL-6 mRNAの陽性所見は認められなかった。受傷後早期では表皮細胞にのみIL-6 mRNAの陽性所見を認めたことから、受傷後6時間目におけるIL-6 mRNAの発現量のピークは主に表皮におけるIL-6 mRNAの発現の増加を反映したものと考えたが、これはIL-1やTNF- $\alpha$ のピークが受傷後48から72時間目にかけて認められたことと対照的であった。IL-6の急性炎症を制御する因子としての重要性は既に指摘されているが<sup>74)</sup>、皮膚の創傷治癒においてもオートクリンやパラクリンなどの作用機序を介して炎症反応を制御している可能性が示唆された。しかしながら、IL-6の中和抗体の投与が創傷治癒に全く影響を及ぼさないとする報告もあり<sup>75)</sup>、IL-6も他のサイトカインと同様に一連のサイトカインネットワークと複雑に絡んでいるものと考えられる。

TNF- $\alpha$ は、腫瘍部位に出血性壊死を誘導する因子として見出されたが、最近では炎症を通した生体防御機構に広く関わるサイトカインとして理解されている<sup>4)</sup>。TNF- $\alpha$ は主にマクロファージにより産生され、創傷治癒と関連する生物活性として、好中球やマクロファージの活性化、IL-1、IL-6、IL-8の産生誘導や線維芽細胞の増殖促進などが知られているが、それらはIL-1 $\beta$ と共通する機能であることが多い<sup>4)</sup>。本研究においてTNF- $\alpha$  mRNAの発現量のピークはIL-1 $\beta$  mRNAと同様に受傷後72時間目に認められ、その経時的発現量の推移もIL-1 $\beta$ と類似していた。受傷後72時間は組織学的に損傷部での大型単核球の集簇が最も著明となる時期に一致していたが、ISH法を用いた検討でマクロファージと思われる単核球にTNF- $\alpha$  mRNAの陽性所見を認めた。以上のことから、皮膚の創傷治癒過程においてもマクロファージおよびその関連物質が非常に重要な役割を担っているものと考えられる。

これら炎症性サイトカインのmRNAの発現に関する成績は、法医損傷検査に応用可能であると考えられる。RT-PCR法によるmRNAの半定量的な評価を受傷後経過時間の推定に応用するこ

とは、IL-10 mRNAの場合と同様に死後におけるmRNA誘導があると考えられるため、実際には困難であると思われる。しかしながら、RT-PCR法を用いて損傷部における炎症性サイトカインのmRNA発現量の増加を検出することは、生活反応の指標となりうるものと考えられる。ISH法により損傷部に遊走した炎症細胞にこれらサイトカインの陽性所見を認めたことは、RT-PCR法によって検出されたmRNA発現量の増加が損傷部におけるサイトカインの誘導、すなわち局所における生活反応を意味している。特にIL-1 $\beta$ とIL-6 mRNAは、健常マウス皮膚における発現量と比較した場合に、受傷後の発現量の増加率が大きく、生活反応の指標として最も適していると思われる。本研究ではRT-PCR法によるIL-10 mRNA検出が、特に受傷後早期における生活反応の指標となりうる可能性を指摘したが、IL-10 mRNAに加えて損傷部皮膚からIL-1 $\beta$ とIL-6 mRNAを同時に検出することによって、一層、実際の法医剖検例における有用性が向上するものと思われる。

## 結 論

抗炎症性サイトカインであるIL-10の、皮膚創傷治癒過程における動態およびその生物学的意義について検討した。加えて、法医損傷検査に応用するため、IL-10および炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ )のmRNAの解析を行い、以下の成績を得た。

1. マウス皮膚創傷治癒過程において損傷部におけるIL-10蛋白の発現量は、損傷部に遊走する好中球が徐々に増加する炎症期早期(受傷後3時間)にピークに達した後、一旦は減少したが、マクロファージの集簇が最も著明となる炎症期極期(受傷後72時間)に再びピークに達し、mRNAの発現もこれと良く相関していた。ISH法および免疫染色の検討結果から炎症期早期においては表皮細胞が、さらに、損傷部に浸潤する単核球および再生する表皮細胞がIL-10産生細胞の主体であることが実証された。

2. IL-10の発現に2つのピークが認められたことから、IL-10中和抗体を損傷部局所に投与し、その効果を受傷後6および72時間目において判定した。中和抗体投与により損傷部皮膚において炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ )とC-Cケモカイン(MCP-1、MIP-1 $\alpha$ )の過剰発現が認められた。さらに、損傷部に浸潤する好中球とマクロファージ数の増加を認めた。IL-10の発現の2つのピークは、各々が好中球およびマクロファージの遊走およびその機能制御と密接に関連しており、これらは過剰な炎症反応を抑制するための合目的な生体防御反応であると考えられた。以上の成績から、皮膚創傷治癒過程におけるIL-10の関与が明らかとなった。

3. 受傷後早期のIL-10 mRNAの発現量増加が法医損傷検査における生活反応の指標となりうるか否かについて、マウス皮膚損傷部におけるIL-10 mRNA発現量の変化を死後変化の影響も含めて、受傷後0から180分の間、RT-PCR法を用いて半定量的に評価した。IL-10 mRNAは受傷後15分目から急激に増加し、健常皮膚での発現量と比較した場合、有意( $p < 0.05$ )な増加が受傷後30から180分で認められた。この傾向は屠殺後5日間放置したマウスについても確認され、一方、死後損壊では有意な増加は認められなかった。これらの成績から、皮膚損傷部におけるIL-10 mRNA発現量の増加が、受傷後早期の生活反応の鋭敏な指標となりうることが示唆された。さらに、mRNAは一般

に考えられている以上に死後変化に対して安定であることが示され、RT-PCR法によるmRNAの解析は実際の法医剖検例に充分応用可能であると思われた。

4. RT-PCR法を用いた検討で、マウス皮膚損傷部におけるIL-6 mRNAの発現量は受傷後6時間目、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$  mRNAは受傷後48から72時間目にかけてピークを有することが明らかとなった。ISH法を用いた検討によりこれらmRNA発現量の増加が、主に損傷部に浸潤する単核球(マクロファージ)、多核白血球(好中球)や表皮細胞におけるサイトカインの誘導、すなわち局所における生活反応を反映していることが示された。IL-10 mRNAに加えて損傷部皮膚からこれら炎症性サイトカインのmRNAをRT-PCR法を用いて同時に検出することにより、実際の法医剖検例における生活反応の指標としての有用性が向上するものと思われた。以上のmRNA解析に関する成績は、蛋白質レベルでの解析が主体であった従来の法医損傷論の研究分野において、新たな展開をもたらすものと考えられた。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部法医学講座大島 徹教授に深甚なる謝意を表します。また、ISH法に関して御指導、御助言を頂きました金沢大学医学部病理学第二講座中沼安二教授、原田憲一講師に深く感謝致します。最後に、本研究の遂行にあたり御協力と御支援を頂きました金沢大学医学部法医学講座教室員各位に厚く御礼を申し上げます。なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助金基盤研究B (No. 08457146)により助成を受けたことを付記し、謝意を表します。

本研究の各成績は、The 3rd World Congress on Inflammation (1997, Tokyo), 第27回創傷治癒研究会 (1997, 東京), 第82次日本法医学学会総会 (1998, 東京), 第19回日本炎症学会 (1998, 東京), 第83次日本法医学学会総会 (1999, 広島) The 4th International Symposium on Advances in Legal Medicine (1999, Mainz, Germany), The 78th Annual Meeting of the German Society of Legal Medicine (1999, Frankfurt, Germany) において発表した。

#### 文 献

- Martin P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276: 75-81, 1997
- Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK. There is more than one interleukin 1. *Immunol Today* 7: 45-56, 1986
- Hirano T. The biology of interleukin-6. *Chem Immunol* 51: 153-180, 1992
- Le J, Vilček J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 56: 234-248, 1987
- Luster AD. Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338: 436-445, 1998
- Haelens A, Wuyts A, Proost P, Struyf S, Opdenakker G, Van Damme J. Leukocyte migration and activation by murine chemokines. *Immunobiology* 195: 499-521, 1996
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170: 2081-2095, 1989
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11: 165-190, 1993
- Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263-274, 1993
- Goldman M, Marchant A, Schandené L. Endogenous interleukin-10 in inflammatory disorders: regulatory roles and pharmacological modulation. *Ann N Y Acad Sci* 796: 282-293, 1996
- Li L, Elliott JF, Mosmann TR. IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 153: 3967-3978, 1994
- Ferguson TA, Dube P, Griffith TS. Regulation of contact hypersensitivity by interleukin 10. *J Exp Med* 179: 1597-1604, 1994
- Powrie F, Menon S, Coffman RL. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity *in vivo*. *Eur J Immunol* 23: 2223-2229, 1993
- Barr RM, Walker SL, Tsang W, Harrison GI, Ettehadi P, Greaves MW, Young AR. Suppressed alloantigen presentation, increased TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1Ra, IL-10, and modulation of TNF-R in UV-irradiated human skin. *J Invest Dermatol* 112: 692-698, 1999
- Shreedhar V, Giese T, Sung VW, Ullrich SE. A cytokine cascade including prostaglandin E<sub>2</sub>, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *J Immunol* 160: 3783-3789, 1998
- Rivas JM, Ullrich SE. Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes. An essential role for keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* 149: 3865-3871, 1992
- Ohmen JD, Hanifin JM, Nickoloff BJ, Rea TH, Wyzykowski R, Kim J, Jullien D, McHugh T, Nassif AS, Chan SC, Modlin RL. Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions. *J Immunol* 154: 1956-1963, 1995
- Lester MR, Hofer MF, Gately M, Trumble A, Leung DYM. Down-regulating effects of IL-4 and IL-10 on the IFN- $\gamma$  response in atopic dermatitis. *J Immunol* 154: 6174-6181, 1995
- Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 24: 328-332, 1997
- Asadullah K, Döcke WD, Ebeling M, Friedrich M, Belbe G, Audring H, Volk HD, Sterry W. Interleukin 10 treatment of psoriasis. Clinical results of a phase 2 trial. *Arch Dermatol* 135: 187-192, 1999
- Asadullah K, Sterry W, Stephanek K, Jasulaitis D, Leupold M, Audring H, Volk HD, Döcke WD. IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. *J Clin Invest* 101: 783-794, 1998
- Ajuebor MN, Das AM, Virág L, Szabó C, Perretti M. Regulation of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  expression and function by endogenous interleukin-10 in a model of acute inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 279-282, 1999
- Ajuebor MN, Das AM, Virág L, Flower RJ, Szabó C, Perretti

- M. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *J Immunol* 162: 1685-1691, 1999
- 24) DiPietro LA, Burdick M, Low QE, Kunkel SL, Strieter RM. MIP-1  $\alpha$  as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J Clin Invest* 101: 1693-1698, 1998
- 25) Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Bröcker EB, Gillitzer R. Chemokines IL-8, GRO  $\alpha$ , MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol* 153: 1849-1860, 1998
- 26) DiPietro LA, Polverini PJ, Rahbe SM, Kovacs EJ. Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. *Am J Pathol* 146: 868-875, 1995
- 27) Dreßler J, Bachmann L, Koch R, Müller E. Estimation of wound age and VCAM-1 in human skin. *Int J Legal Med* 112: 159-162, 1999
- 28) Dreßler J, Bachmann L, Koch R, Müller E. Enhanced expression of selectins in human skin wounds. *Int J Legal Med* 112: 39-44, 1998
- 29) Dreßler J, Bachmann L, Kasper M, Hauck JG, Müller E. Time dependence of the expression of ICAM-1 (CD 54) in human skin wounds. *Int J Legal Med* 110: 299-304, 1997
- 30) Fieguth A, Kleemann WJ, von Wasielewski R, Werner M, Tröger HD. Influence of postmortem changes on immunohistochemical reactions in skin. *Int J Legal Med* 110: 18-21, 1997
- 31) Betz P, Nerlich A, Wilske J, Tübel J, Penning R, Eisenmenger W. Analysis of the immunohistochemical localization of collagen type III and V for the time-estimation of human skin wounds. *Int J Legal Med* 105: 329-332, 1993
- 32) Betz P, Nerlich A, Wilske J, Tübel J, Wiest I, Penning R, Eisenmenger W. Immunohistochemical localization of fibronectin as a tool for the age determination of human skin wounds. *Int J Legal Med* 105: 21-26, 1992
- 33) Kondo T, Ohshima T. The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: a preliminary study for possible wound age determination. *Int J Legal Med* 108: 231-236, 1996
- 34) Kondo T, Ohshima T, Eisenmenger W. Immunohistochemical and morphometrical study on the temporal expression of interleukin-1  $\alpha$  (IL-1  $\alpha$ ) in human skin wounds for forensic wound age determination. *Int J Legal Med* 112: 249-252, 1999
- 35) Buris L. Autoradiographic examinations in the early period of wound healing. *Acta Histochem* 48: 286-290, 1974
- 36) Oehmichen M, Lagodka T. Time-dependent RNA synthesis in different skin layers after wounding. Experimental investigations in vital and postmortem biopsies. *Int J Legal Med* 104: 153-159, 1991
- 37) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 38) Coakley WT, James CJ. A simple linear transform for the Folin-Lowry protein calibration curve to 1.0 mg/ml. *Anal Biochem* 85: 90-97, 1978
- 39) Yam LT, Li CY, Crosby WH. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am J Clin Pathol* 55: 283-290, 1971
- 40) Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Sero GD, Nicoletti I, Trinchieri G, Bistoni F, Puccetti P. Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. *J Immunol* 158: 5349-5356, 1997
- 41) Nickoloff BJ, Naidu Y, Michigan AA. Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J Am Acad Dermatol* 30: 535-546, 1994
- 42) Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16: 21-26, 1995
- 43) Vicioso MA, Garaud JJ, Réglier-Poupet H, Lebeaut A, Gougerot-Pocidal MA, Chollet-Martin S. Moderate inhibitory effect of interleukin-10 on human neutrophil and monocyte chemotaxis *in vitro*. *Eur Cytokine Netw* : 247-254, 1998
- 44) Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol* 152: 3559-3569, 1994
- 45) Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1  $\beta$  in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 178: 2207-2211, 1993
- 46) Alam R, Kumar D, Anderson-Walters D, Forsythe PA. Macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$  and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells *in vivo*. *J Immunol* 152: 1298-1303, 1994
- 47) Mantovani A, Dejana E. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol Today* 10: 370-375, 1989
- 48) Sironi M, Muñoz C, Pollicino T, Siboni A, Sciacca FL, Bernasconi S, Vecchi A, Colotta F, Mantovani A. Divergent effects of interleukin-10 on cytokine production by mononuclear phagocytes and endothelial cells. *Eur J Immunol* 23: 2692-2695, 1993
- 49) Seitz M, Loetscher P, Dewald B, Towbin H, Gallati H, Baggiolini M. Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. *Eur J Immunol* 25: 1129-1132, 1995
- 50) Paquet P, Piérard GE. Interleukin-6 and the skin. *Int Arch Allergy Immunol* 109: 308-317, 1996
- 51) Berg DJ, Leach MW, Kühn R, Rajewsky K, Müller W, Davidson NJ, Rennick D. Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med* 182: 99-108, 1995
- 52) Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147: 3815-3822, 1991
- 53) de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by

- monocytes. *J Exp Med* 174: 1209-1220, 1991
- 54) Berkman N, John M, Roesems G, Jose PJ, Barnes PJ, Chung KF. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$  expression by IL-10. *J Immunol* 155: 4412-4418, 1995
- 55) Yano S, Yanagawa H, Nishioka Y, Mukaida N, Matsushima K, Sone S. T helper 2 cytokines differently regulate monocyte chemoattractant protein-1 production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 157: 2660-2665, 1996
- 56) Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 78: 71-100, 1975
- 57) Danon D, Kowatch MA, Roth GS. Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2018-2020, 1989
- 58) Buck M, Hougum K, Chojkier M. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits collagen  $\alpha 1(I)$  gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. *Am J Pathol* 149: 195-204, 1996
- 59) Rapala K, Laato M, Niinikoski J, Kujari H, Söder O, Mauviel A, Pujol JP. Tumor necrosis factor alpha inhibits wound healing in the rat. *Eur Surg Res* 23: 261-268, 1991
- 60) Salomon GD, Kasid A, Cromack DT, Director E, Talbot TL, Sank A, Norton JA. The local effects of cachectin/tumor necrosis factor on wound healing. *Ann Surg* 214: 175-180, 1991
- 61) Roth SJ, Carr MW, Springer TA. C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon- $\gamma$  inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *Eur J Immunol* 25: 3482-3488, 1995
- 62) Jinquan T, Deleuran B, Gesser B, Maare H, Deleuran M, Larsen CG, Thestrup-Pedersen K. Regulation of human T lymphocyte chemotaxis in vitro by T cell-derived cytokines IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, and IL-13. *J Immunol* 154: 3742-3752, 1995
- 63) Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2725-2729, 1990
- 64) Becker A, Reith A, Napiwotzki J, Kadenbach B. A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. *Anal Biochem* 237: 204-207, 1996
- 65) Oehmichen M. Estimating wound age and distinguishing intravital from postmortem processes in forensic medicine – introductory remarks. *In* M Oehmichen, H Kirchner (eds), *The wound healing process – forensic pathological aspects –*, 1st ed, p15-21, Schmidt-Römhild, Lübeck, 1995
- 66) Oehmichen M, Zilles K. Postmortale DNS- und RNS-Synthese: Erste Untersuchungen an menschlichen Leichen. *Z Rechtsmed* 91: 287-294, 1984
- 67) Robertson FM, Pellegrini AE, Ross MS, Oberyzyzn AS, Boros LG, Bijur GN, Sabourin CK, Oberyzyzn TM. Interleukin-1  $\alpha$  gene expression during wound healing. *Wound Rep Reg* 3: 473-484, 1995
- 68) Fahey III TJ, Sherry B, Tracey KJ, van Deventer S, Jones II WG, Minei JP, Morgello S, Shires GT, Cerami A. Cytokine production in a model of wound healing: the appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1. *Cytokine* 2: 92-99, 1990
- 69) Ford HR, Hoffman RA, Wing EJ, Magee DM, McIntyre L, Simmons RL. Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. *Arch Surg* 124: 1422-1428, 1989
- 70) Turner M, Chantry D, Buchan G, Barrett K, Feldmann M. Regulation of expression of human IL-1  $\alpha$  and IL-1  $\beta$  genes. *J Immunol* 143: 3556-3561, 1989
- 71) Takács L, Kovacs EJ, Smith MR, Young HA, Durum SK. Detection of IL-1  $\alpha$  and IL-1  $\beta$  gene expression by in situ hybridization. Tissue localization of IL-1 mRNA in the normal C57BL/6 mouse. *J Immunol* 141: 3081-3095, 1988
- 72) Sauder DN, Kilian PL, McLane JA, Quick TW, Jakubovic H, Davis SC, Eaglstein WH, Mertz PM. Interleukin-1 enhances epidermal wound healing. *Lymphokine Res* 9: 465-473, 1990
- 73) Mateo RB, Reichner JS, Albina JE. Interleukin-6 activity in wounds. *Am J Physiol* 266: R1840-1844, 1994
- 74) Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 101: 311-320, 1998
- 75) Saba AA, Kaidi AA, Godziachvili V, Dombi GW, Dawe EJ, Libcke JH, Silva YJ. Effects of interleukin-6 and its neutralizing antibodies on peritoneal adhesion formation and wound healing. *Am Surg* 62: 569-572, 1996

**Expression of Interleukin-10 during Cutaneous Wound Healing and its Application to Forensic Wound Examination** Yasunori Sato, Department of Legal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 108, 486 — 502 (1999)

**Key words** wound healing, interleukin-10, inflammation, chemotaxis, forensic wound examination

#### Abstract

The wound healing process is characterized by acute inflammation, granulation tissue formation, matrix formation and remodeling. Neutrophils and macrophages migrate in an orderly fashion toward the site of injury, where they play critical roles in modulating the inflammatory response. Tight regulation of the *in vivo* inflammatory response is a crucial factor in successful wound repair and tissue regeneration. One of the aims of this study was to identify the role of endogenous interleukin (IL)-10 in cutaneous wound healing. The IL-10 protein levels in incised wounds in mice peaked 3 hr after incision, returned to normal levels by 24 hr, but increased again to another peak at 72 hr. The protein levels appeared to correlate with the induction and upregulation of IL-10 mRNA. *In situ* hybridization (ISH) studies and immunostaining revealed that epidermal cells and infiltrating mononuclear cells (MNCs) were the major source of IL-10. The early peak of IL-10 preceded the infiltration of neutrophils toward the injury site, while the later peak of IL-10 appeared to be temporally linked to maximal macrophage infiltration into the wound. To clarify the biological significance of each IL-10 peak, the effects of the administration of anti-IL-10 antibody were examined 6 and 72 hr after incision. Neutralizing antibody studies demonstrated that IL-10 inhibited *in vivo* overexpression of proinflammatory cytokines [IL-1  $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )] and C-C chemokines (monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$ ). IL-10 also inhibited the infiltration of neutrophils and macrophages toward the injury site. These results suggest that IL-10 may play an important regulatory role in the phase-specific infiltration of neutrophils and macrophages as well as cytokine production in the inflammatory response to cutaneous wound healing. From the view point of forensic pathology, this gives rise to the hypothesis that the rapid increase in IL-10 mRNA expression after incision could be an indicator for distinguishing between intravital wounds and postmortem damage. This hypothesis was thus tested by making incised wounds in mice, which were then variously sacrificed at 0, 5, 15, 30, 60 and 180 min later. The effect of postmortem changes on mRNA was also examined. A semi-quantitative measure of the initial amount of IL-10 mRNA in each skin specimen was obtained using reverse transcription-PCR (RT-PCR). At 15 min a rapid increase in IL-10 mRNA levels was observed and the elevation in expression of IL-10 mRNA was found to be significant between 30 and 180 min ( $p < 0.05$ ), peaking at around 60 min. The time-dependent increases in IL-10 mRNA expression were found to be maintained even in a group that was stored and tested at 5 days postmortem. Furthermore, no significant increase in IL-10 mRNA expression occurred in the postmortem damage control group. Therefore, increased expression of IL-10 mRNA in skin specimens can be considered a vital reaction. These results demonstrate the potential usefulness of mRNA analysis in forensic wound examination, with mRNA detectable by RT-PCR over a long postmortem time course. Finally, the temporal expression of mRNA for the proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) in incised wounds in mice was examined in terms of the forensic application as an indicator of wound vitality or wound age. RT-PCR analysis showed that the local IL-6 mRNA level peaked at 6 hr, while the peak levels of mRNA for IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$  and TNF- $\alpha$  occurred between 48 and 72 hr. A study using the ISH technique revealed that the increase in mRNA levels of the cytokines reflected local induction, i.e. a local vital reaction, in such cells as infiltrating MNCs, polymorphonuclear cells and epidermal cells. The simultaneous detection of mRNA for the proinflammatory cytokines and IL-10 using RT-PCR would be more useful when the determination of wound vitality is concerned in practical forensic cases. Since most studies on forensic wound examination have used immunohistochemical techniques, mRNA analysis may provide a novel tool in this field.