

免疫組織化學與死後間隔時間評估

(Immunohistochemical Evaluation to Estimate the Time Since Death)

臺大醫學院法醫學科暨研究所/台大醫院病理部 吳木榮醫師

◆ 前言

決定死亡時間是法醫病理學領域最重要的課題之一，有助於法醫病理醫師們的科學性死因調查 (scientific medicolegal investigation)、尋找司法犯罪偵查線索及決定審判品質良窳。精準的死後間隔時段 (postmortem interval; PMI)，是法醫病理醫師們每天需要面對的重要挑戰，對司法調查與審判影響甚鉅。錯誤的死後間隔評估，對一般謀殺、殺人、自殺和意外事件的法醫調查過程，常有歧異性偏差結果的重大影響！¹(圖一)



圖一、死後間隔時間 (postmortem interval; PMI)

死亡學 (thanatology) 是一門利用肉眼巨觀和顯微觀察來評估死者屍體的一種檢驗科學，主要是觀察各種人體死後因缺氧、生化合成、代謝崩壞過程和細胞變性、自溶變化的降解過程。所謂的死後間隔時間乃指人體死後所經歷過的生理、生化和腐敗過程的時間區段，是一個極其複雜的死後生理過程，它會受到各種內生性因素和外因素（譬如環境溫度、濕度，或身體健康狀況）的影響，必須考量到各式各樣變量因素的複雜又多重交互影響。

有鑑於此，正確、可靠且精準的死後間隔時間判斷是每個法醫案例中必要的知識和技能，不但可以決定死亡時窗 (window of death) 或是死亡時間 (time of death) 成為科學性死因調查的基礎，也是法醫病理醫師們日常法醫實務中的一項重大挑戰，更是司法犯罪偵查和刑責審判的重要依據！

一般而言，除了傳統的法醫學觀察如物理或物理化學變化（如角膜混濁、屍冷、屍斑、屍僵、胃排空時間、放射性碳測年齡等）、細胞化學崩壞（自溶）、微生物學分解（腐敗）、昆蟲學繁殖生活史以及植物學榮枯凋零的

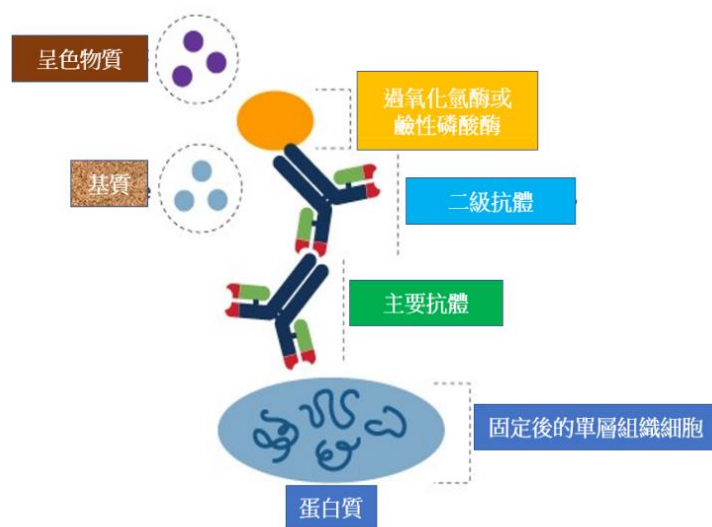
參數之外，更需要開發新的現代生物學證據。因此，法醫學界便需要多方位地應用現代分子生物學的知識和技術，不斷地發展、開發出對遺體死後間隔時間判斷更好的生物證據，讓傳統的法醫學日新又新，不斷地進步，如此才能順應現代法醫學的世界潮流和進步！

從西元一九八〇年代，隨者分子生物學實驗室技術的突飛猛進，針對人類身體內蛋白質、DNA、RNA 等大、小分子的降解模式，抑或是法醫界對生物體液（例如血液、腦脊髓液和眼睛的玻璃體內液）的物質成分析，以及偵測人體組織抗原成分，不斷創新的免疫組織化學染色技術，都逐漸地被廣泛應用於研究人體死後間隔時間判斷。

免疫組織化學 (immunohistochemistry) 是一種研究細胞層次中的抗原蛋白或癌變基因蛋白的生物化學，免疫組織化學染色 (immunohistochemical staining) 是屬於一種免疫染色 (immunostaining)，在抗體上結合螢光或可呈色的化學物質，利用經修飾過的特異性抗體與生物組織中本來就具有的抗原結合的一種免疫學結合染色，選擇性地標示出單層組織切片或塗片細胞中的特殊抗原，來檢測此一單層細胞或組織中是否具有「目標抗原」的存在。此方式不只可以用來測知人體組織抗原的表現形態和量的多寡，也可觀察抗原所出現的細胞位置，進而提高組織病理診斷的靈敏度和特異性。

在免疫組織化學染色的過程中，我們使用經人為製備及修飾純化後的特異性抗體來標附具有顯色劑抑或是標記，如：胜肽酶、金屬離子、螢光或同位素等；而存在於檢測的細胞或組織的目標抗原，則是偵測任何能讓抗體結合的物質，也就是具有抗原性的物質，這些物質包括蛋白質、多胜肽、核酸、多醣類、脂蛋白或是病原體等。透過免疫學的抗原及抗體反應和後繼的組織化學的呈色反應，在光學顯微鏡下便可做出病理組織細胞診斷和組織抗原結合狀態的分佈和分析，進而也可以對組織或細胞的抗原進行定位、定性及定量觀察和分析。

簡而言之，免疫組織化學染色的優點在於組織抗原的專一性、靈敏度、簡便快速以及染色成本低，所以廣為病理和醫學界採用，通常是使用特定的腫瘤標記來偵測組織中的抗原、癌症基因或突變基因，是基礎醫學上不可或缺的研究工具，也是病理學診斷、治療上相當重要的一個檢驗方法。(圖二)



圖二、免疫組織化學染色（immunohistochemical staining）方法圖解。

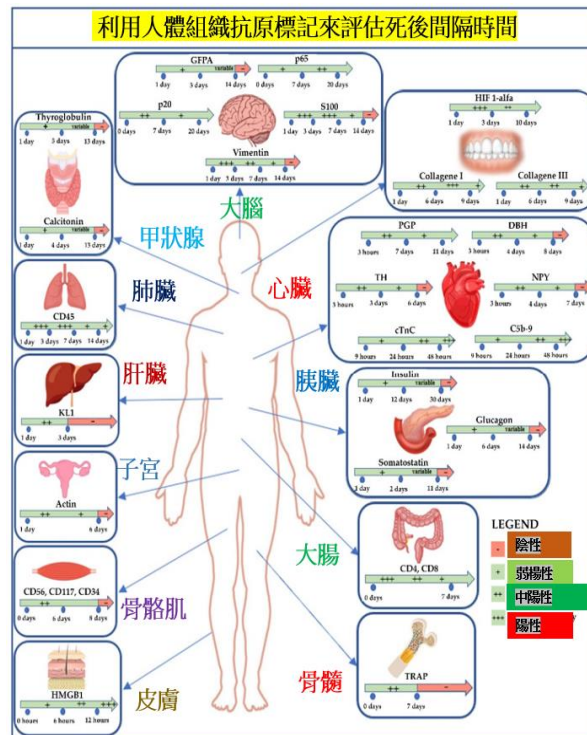
◆ 文獻回顧

從西元一九九八年至二〇二二年的二十五年間，我們透過艾思薇爾出版集團提供的全球最大規模的摘要和引文資料庫 --- 思斯科帕 (scopus) 搜尋引擎，加上美國公共醫療搜尋引擎 (PubMed) 及美國國立衛生研究院內提供的國家醫學圖書館即時醫學文獻分析和檢索系統，一共搜尋到十六篇英文文獻涉獵到利用人體組織進行免疫組織化學染色結果來評估法醫案例中死後間隔時間。在這十六篇參考文獻中，共有一六〇二案例的免疫組織化學染色結果可用於進一步歸納、分類、闡釋和分析。

其中，每篇研究文章的案例數量各不相同，其中以 Ceausu 等人描述的案例最少，為四例；而 Wehner 等人研究的案例數最多，為五〇〇例。研究案例中的死亡原因複雜多樣，大多數案例的死因是心因性猝死、創傷性腦損傷或是和腫瘤性疾病有關。

在這些研究當中，其死後間隔時間範圍為小於一小時至最長為四十五日。而用於估計死後間隔時間的人體標本也來自不同的器官，譬如大腦組織、甲狀腺、胰臟、牙齦組織、皮膚、心臟、大腸、女性子宮、骨髓、骨骼肌、肺臟以及肝臟等。所有病例都經過嚴謹的死因調查，並透過調查後知道每位死者的死後間隔時間。在有些研究中，描述了保存屍體的方法，屍體保存在太平間的冰箱中，其儲存溫度為 0°C 至 4°C 之間。對於這些人體組織，不同的作者分別使用不同的組織抗原標記來進行相關的免疫組織化學染色研究，

並沒有任何重疊或重複的情形。(如圖三所示)



圖三、應用免疫組織化學染色表現評估死後間隔時間

◆ 研究死後間隔時間所應用的組織化學抗原標記

免疫組織化學染色發明於一九四〇年代，現已發展成為透過使用特定分子標記用來鑑定異常細胞和癌組織的重要工具。此外，它也是一種分析特定生物組織背景中，生物標記和表達差異性蛋白質分佈和定位的絕佳工具。

每個抗原標記都會與死後間隔時間有關，從免疫組織化學表現的變化強弱有關，透過傳統方法來評判死後間隔時間之後，還是有必要使用合適的免疫組織化學染色標記，儘可能準確地估計死後間隔時間。任何死後間隔時間有疑義的案例，均可進行免疫組織化學的抗原染色分析，尤其是在死後的前二周內判定最有價值！以下是各種組織中使用的抗原抗體縮寫：

PGP: 蛋白質基因產物

DBH: 多巴胺羥化酶

TH: 酪氨酸羥化酶

NPY: 神經肽 Y

GFAP: 神經膠質纖維酸性蛋白

Somatostatin: 生長抑素或生長素抑制激素

Caspase-3 (p20): 凋亡蛋白酶 (caspase 是 cysteine—containing aspartate-specific protease 的縮寫) 是半胱氨酸的蛋白酶

NF- κ B (p65): 核因子- κ B

TRAP: 酒石酸鹽抗酸性磷酸酶

HIF 1- α : 缺氧誘導因子數 1- α

cTnC: 心臟肌鈣蛋白 C

HMGB1: 高遷移率族蛋白-1

KL1: 角質蛋白-1

Collagen I: 第一型膠原蛋白

Collagen III: 第三型膠原蛋白

大腦組織的抗原: GFAP; S100; Vimentin; p20; p65

甲狀腺的抗原: Thyroglobulin; Calcitonin

胰臟的抗原: Somatostatin; Glucagon; Insulin

心臟的抗原: PGP; DBH; TH; NPY; cTnC; C5b-9

肺臟的抗原: CD45 (檢測 T 淋巴球)

肝臟的抗原: KL1 (檢測膽小管上皮)

橫紋肌抗原: CD56; CD7; CD34

骨髓抗原: TRAP

大腸: CD4; CD8 (檢測 T 淋巴球)

牙齦: Collagen I, Collagen III, HIF 1- α

◆ 人體組織抗原表現的死後時間區段研究演變

西元一九九八年，英國的 Chow 等人使用抗蛋白基因產物 (PGP)，抗多巴胺羥化酶 (DBH)，抗酪氨酸羥化酶 (TH) 和抗神經肽 Y (NPY) 分析了五具沒有心血管疾病的死者的大腦組織。其蛋白基因產物 (PGP) 顯示免疫組織化學染色從死後第七天開始降低表現，到第十一天減少到初始樣品的三分之一左右。另外，酪氨酸羥化酶 (TH) 的抗原染色表現，在死後第五天開始下降，逐漸變弱，隨後在第九天消失，無法檢測。而抗神經肽 Y (NPY) 的免疫組織化學染色表現，則在死後 3-4 天開始下降，在第 7-8 天無法偵測到。

西元二〇〇六年，中國大陸的 Tao 分析了 47 具屍體 (35 例為創傷性腦損傷 (TBI) 後死亡，8 例為對照病例)。在大腦中的腦神經細胞中的半胱天冬酶 -3 (caspase-3; p20) 和核因子 Kappa B (NF- κ B; p65)，其死後間隔時間為 0 至 20 天。在創傷性腦損傷 (TBI) 實驗組中，半胱天冬酶-3 的免疫染色在死後 12 小時增加，伴隨著核因子 Kappa B (NF- κ B; p65) 染色的陽性增加趨勢。自死後 7 天開始，核因子 Kappa B 陽性開始增加，然後在 20 天達到最高峰。

在同一年（西元二〇〇六年）裏，德國的 Wehner 團隊發表了一項研究，評估了最多的遺體大腦樣本。其死後時段落在 1 至 24 天之間的抗生長抑素和抗神經膠質纖維酸性蛋白（GFAP）抗體表現，總計在 500 具屍體的胰臟和大腦組織中，陳述了這兩種組織的免疫組織化學染色表現變化。在胰臟中，所有案例均在死後前 2 天內可以檢測到生長抑素免疫染色反應，但超過 11 天後則轉變為陰性。在腦組織中，神經膠質纖維酸性蛋白（GFAP）的免疫化學染色在死後 3 天內始終為陽性，但是 14 天後則變為陰性。

另外，德國的 Wehner 團隊自西元一九九〇年起，便針對死者的胰腺組織，使用抗胰高血糖素和抗胰島素抗體標記進行死後胰臟的免疫組織化學染色研究。德國的 Wehner 發現，對胰高血糖素的陽性反應總是存在於死後 6 天的胰臟中，但是超過 14 天後就呈現陰性反應。作者也陳述道，所有案例在死後 12 天內均為胰島素陽性，30 天後便轉為陰性反應。

除此之外，西元二〇〇〇年德國的 Wehner 利用抗降鈣素抗體研究了 136 具屍體中甲狀腺免疫組織化學染色表現，證明該標記在所有受試者死亡後 4 天內均會出現陽性反應，而從 13 天起開始出現陰性反應。最後，西元二〇〇一年同樣的研究團隊人員在 147 位死者的甲狀腺組織中，觀察抗甲狀腺球蛋白抗體的染色表現，其染色反應顯示 5 天後至 13 天的時間性區段陽性表現。

西元二〇一二年，德國的 Boehm 等人對 74 名死者進行酒石酸鹽抗性酸性磷酸酶（TRAP）抗原標記在骨髓中表現的時間變化。TRAP 抗原一般存在於破骨細胞中，這些細胞可以檢測到恆定的強度，直到死後的第七天之後，免疫組織化學反應會突然完全變為陰性。

西元二〇一六年，在義大利羅馬的 Ceasu 等人評估了四具屍體橫紋肌組織中 CD56，CD 117 和 CD34 的免疫組織化學染色漸進性變化，觀察到在死後 6 天之前免疫染色均呈陽性，8 天後則所有標記都變為陰性。

西元二〇一八年，德國的 Lesnikova 發表了同時評估大腦組織、肝臟和肺臟等組織中不同生物標記的研究，其所使用的抗體是 KL1、CD45、Vimentin 和 S100 抗體，分別染色 120 具屍體的膽管上皮、肺淋巴細胞、腦血管內皮細胞的神經膠質細胞和神經髓磷脂，在所有組織中檢測出這些抗體的明顯陽性表現長達 3 天。當時間大於 3 天時，觀察到所有組織中染色率逐漸降低。在大腦和肺臟組織中，免疫組織化學染色可長達 7 天，當死後 14 天，便發現肺臟內 CD45 抗原是唯一陽性的反應。

西元二〇一八年，義大利的 Mazzotti 和 Fais 評估了 13 名死者（10 例創傷性死亡和 3 例對照者）遺體牙齦組織中缺氧誘導因子 HIF-1 α 蛋白的免疫組織化學染色表現，其結果為死後時區範圍為 0 至 9 天。在創傷性死亡中，其染色反應在前 3 天達到峰值陽性，之後逐漸減少。在對照組中，染色則均為陰性。

西元二〇一九年，義大利的 Mazzotti 團隊針對牙齦組織中膠原蛋白 I 型和膠原蛋白 III 型抗體標記表現分析發現，1 至 3 天之間的組中檢測到強烈且廣泛分佈的信號。在“中等”死後時區組（死後 4-6 天），第 I 型膠原蛋白染色信號高於前一組，而第 III 型膠原蛋白陽性性卻不那麼強烈。在 7-9 天組實驗組中，第 I 型膠原蛋白陽性率便大大降低，而第 III 型膠原蛋白則陽性較弱，第 I 型和第 III 型膠原蛋白陽性分別表現較弱及中度陽性程度。

有關心臟組織的死後組織抗原的研究，主要發表於西元二〇二一年杜拜的 Elazeem 研究團隊的研究結果，其實驗著重於心臟的免疫組織化學研究。Elazeem 等人的研究使用抗 C5b-9 和抗心臟肌鈣蛋白 C (cTnC) 抗體針對 70 具屍體進行免疫組織化學染色（20 具為非心臟相關死亡，50 具為死於槍枝或刺傷導致心臟創傷）。他們的研究結果顯示死後 24 小時內，所有的心肌案例均檢測到這兩種標記有輕度反應，在死後 24 至 48 小時之間，兩種標記的表達逐漸增加，尤其是在刺傷分組中的免疫組織化學染色。經過 48 小時後，出現強烈的陽性免疫反應，特別是在暴力相關死亡導致心臟病變的實驗群組。

西元二〇二一年，埃及的 El-Din 等人評估了抗原標記 --- 高遷移率組 Box-1 (HMGB1) 在皮膚組織中高達 24 小時的的免疫組織化學染色表現，另外，他們也觀察到死後 3 小時內少數角質形成細胞的細胞質中出現微弱陽性反應，並且在接下來的幾個小時內免疫組織化學染色表現逐漸增加。死亡後 24 小時在幾種角質形成細胞的細胞質中存在強烈的陽性反應。

西元二〇二一年，波蘭的 Zadka 等人發現，在死後 2 至 7 天的 8 具屍體的大腸粘膜中，CD4，特別是 CD8 淋巴細胞 T 標記抗原表達顯著降低。然而，在他們的研究中，CD3 和 CD45 的免疫組織化學染色表現沒有顯示出統計學上的顯著變化。

西元二〇二一年，烏克蘭的 Olkhovsky² 等人發表肌成纖維細胞、平滑肌細胞和子宮組織血管中肌動蛋白 (actin) 的免疫組織化學染色表現，隨著死後時間的增加而逐漸降低，死後 6 天免疫染色始終為陰性。

◆ 人體組織抗原表現與死後時間區段的研究成果

如上所述，法醫學研究者對人體不同的器官或組織進行了免疫組織化學染色並觀察其染色的表現（陽性或陰性）與死後間隔間的相對長短，但是，這些研究成果均屬各個年代的片段成就，缺乏縱向整合和歸納出可以實際上應用於法醫實務上的知識，以及呈現於法庭上的法律證據，但由於與組織抗原結合的不同抗體標記表現有異質性相關，因此，很難得到確切不同的速率降解結果。

本文的系統性綜述之中，包括 16 項研究的分析顯示，不同的作者分別使用了 18 種不同的抗體標記，研究評估 9 種死者的人體組織中的免疫組織化學染色表現，配合死後區段時間長短而逐步驗證。因此，本次系統性文獻綜述中發現，大多數研究主要使用人體組織為大腦組織，其次是胰腺組織。

綜合各文獻中死後器官組織的免疫化學染色檢驗內容、結果和死後間隔時間內容整理如下：(圖四)

遺體器官組織	組織抗原抗體標記	死後間隔時段
肺臟	CD45	3 天
甲狀腺	Calcitonin	4 天
甲狀腺	Thyroglobulin	5 天
骨骼肌	CD56, CD117, CD34	6 天
心臟	TH	6 天
子宮	Actin	6 天
骨髓	TRAP	7 天
心臟	NPY	7 天
心臟	DBH	8 天
牙齦	Collagen I, III	9 天
牙齦	HIF 1-alpha	10 天
胰臟	Somatostatin	11 天
胰臟	Insulin	12 天
胰臟	Glucagon	14 天
大腦	GFAP	14 天

圖四、人體死後器官組織抗原的免疫化學染色表現與死後時間的相關圖表

◆ 結論

人類遺體免疫組織化學染色分析是過去二十五年中，漸進性的應用於評估死後間隔時間的一種組織病理學方法之一，特別是在死後間隔時間較長的屍體中。比較之下，以前法醫病理醫們常用於評估死亡時間的傳統法醫病理學方法，主要適用於死後的最初幾個小時或三天之內，才較為準確。因此，三天以上死後時間的評估延伸，便是法醫病理醫師們亟需學習的重要課題！

基於法醫實務上的考量，使用死者遺體中組織的抗原標記，來判斷死後時間是一種方便、有效的食用方法，有助於更精確的法醫學判斷，幫助刑事鑑識人員、律師和司法人員，判斷死者真正的死亡時間，完成法醫事件的六要素，並且可以在適當的情況下，用於現場重建、刑事偵查抑或是司法交互詰問及審判。事實上，正確估計死亡後的時區段（或稱死後年齡），也是科學性死因調查過程中的重要環節，更可提供刑事和司法人員的參考依據，扶傾司法正義。

近年來，人們對免疫組織化學用染色於應用於估計死後間隔時間的興趣日益增加，並且不斷地測試各種抗原標記來進行研究。然而，儘管免疫組織化學染色技術在評估死後間隔時間方面取得了一些進展，但實際上最近已發表的科學文獻和數據極少，且很少有陽性檢測報告發表，因而侷限其應用性。可是，由本文從最近二十五年間的研究文獻中，歸納彙編的數據結果，顯示出法醫病理學上死亡時間的一線曙光！

但是，遺體免疫組織化學用染色結果所表達的微觀變化，仍然奠基於下列前提事實，即蛋白質抗原的三級結構隨著死後時間區段的延伸而變動，死後的組織蛋白質逐漸變性、崩壞和溶解，使得原本免疫組織化學染色由原本的陽性表現，逐漸由強變弱、繼而逐漸轉為陰性。人體蛋白質水解過程的發展是抗原標記物質表達變化的先決條件，尤有甚者，很大程度上是取決人體的內在因素與外在因素，譬如死亡現場環境溫度、濕度、衣物、保存狀況、細菌和黴菌的繁殖等變異因素。在一年中最熱月份中發現的遺體，其組織中的抗原性很快便會分解消逝。另外，眾所周知，人體抗原蛋白質的分解也和人體內生性的分解代謝過程或膿毒發炎、免疫及感染、傷害過程息息相關，如敗血症遺體的腐敗影響。

雖然研究人體組織蛋白質降解的方法很廣泛，但在實驗方法、組織種類和標靶蛋白方面均有所不同。然而，直到今天，這些技術仍然很少應用於常規檢查法醫病理學檢查。基於以下幾個原因，大多數作為「死後間隔時段評估的新方法」題目發表的內容，實際上並沒有超過一般非常基礎的研究階段。但一般評判其應用性的標準如下：

- (1)、是否常規應用於法醫學判斷?
- (2)、技術和方法的參考文獻有否存在巨大的異質性，因此限制了結果的可行性?
- (3)、可否理解方法影響的細節，例如影響因素和排除標準?

基於以上闡釋理由，文獻上這些人體死後器官組織抗原的免疫組織化學表現與死後時間區段的相關研究結果，具有可應用於常規的法醫病理學檢查的實用性；另外，透過法醫解剖過程，法醫病理醫師們可以很容易地就立即取得人類遺體器官組織以進行免疫組織化學染色檢查，參考配合上文獻所整理歸納的結論性死後間隔時間時段後，不但可以更精確地探知死後間隔時間，同時也可以知道使用這種方法的應用時段、局限性和會影響的因素。

◆ 參考文獻

1. Salerno M., Cocimano G., Rocuzzo S. and Russo I. et al, New Trends in Immunohistochemical Methods to Estimate the Time since Death: A Review. *Diagnostics* 2022, 12, 2114-22.
2. Olkhovsky, V.O., Grygorian, E.K., Myroshnychenko, M.S., and Kozlov, S.V. et al, Morphological features of the uterus in women at different time intervals of the postmortem period as diagnostic criteria for establishing the postmortem interval. *Wiad. Lek.* 2021, 74, 821–827.
3. Pittner, S., Merold, V., Anders, S., Lohner, L. et al. A standard protocol for the analysis of postmortem muscle protein degradation: Process optimization and considerations for the application in forensic PMI estimation. *Int. J. Legal Med.* 2022; *Int J Legal Med.* 2022 Nov;136(6):1913-1923.