

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09272

研究課題名(和文) ラマン分光法を用いた心臓突然死の診断

研究課題名(英文) Diagnosis of sudden cardiac death using Raman spectroscopy

研究代表者

井戸田 望 (Idota, Nozomi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20722870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの心筋梗塞モデルを用い、ラマン分光法で、死後にも心筋梗塞の診断が可能かどうか検討した。本研究では、ラットを4群に分けた。すなわち、冠状動脈を結紮する群としない群を作成し、死後0時間又は死後24時間で心臓を採取した。死後24時間のピーク比較及び二次微分比較では、一部のピークスベクトルで有意差を認め、死後診断に使用できる可能性が示唆された。今後、虚血時間や死後経過時間を変化させ、診断に耐えうる条件を明らかにすることにより、法医実務へ応用の可能性について評価できると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の死因統計の第2位は心疾患であるが、解剖による心臓突然死の死後診断は極めて困難である。診断方法の確立は、法医学にとっての悲願である。既に生体や対外診断としてその手法や結果が確立されつつあるラマン分光法を、心臓突然死を始めとしたさまざまな死後診断に用いることができれば、今まで明らかにできなかった死因を解明することが可能となり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We used Raman spectroscopy to examine whether it could diagnose myocardial infarction even after death, using a rat myocardial infarction model. We divided rats into 4 groups. We performed coronary artery occlusion or sham operation in rats and harvested its heart 0 or 24 hours after death. The peak analysis and the second differential analysis showed significant differences in some peaks of their spectrogram between two groups of 24 hours after death. Those suggest that Raman spectroscopy could be useful for post-mortem diagnosis. In the future, we will modify the ischemic time or the postmortem time to clarify the conditions that can withstand diagnosis. Then, we can evaluate the possibility of application in forensic practice.

研究分野：法医学

キーワード：心臓突然死 ラマン分光法 死後診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の死因統計の第2位は心疾患である。中でも、法医鑑定で死後診断が困難なのは心臓突然死である。心臓突然死の原因は急性心筋梗塞などによる虚血性心疾患や不整脈が多く、生前であれば心電図異常や心筋逸脱酵素・心筋マーカー上昇などが診断に有用であるが、死後診断には使用できない。他に死後診断に使用可能なものとして、心筋組織を2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) や免疫組織学的に染色する方法のほか、蛋白電気泳動等があるが、これらは、死亡直後の新鮮な組織、細胞に対して用いることができても、死後一定程度の時間が経過した組織診断には利用出来ない。様々な方法が試みられているが、死後診断の有効な方法がない。不整脈の原因として、心筋虚血以外にいくつかの薬剤も知られているが、薬剤の心毒性により死亡したかどうか死後診断方法が確立されていない。

近年、ラマン分光は、医学生物学への応用が広がりつつある。心筋虚血におけるラマン分光法の応用は、Ohta らが酸素化したタイロド液を用いたランゲンドルフ灌流装置下のラットの心臓に励起波長 532nm の励起光を当て、灌流を停止 (~120 分) して全心臓虚血とし、虚血が長くなるとともに還元型シトクロムのバンド (750, 1127, 1337, 1582 cm^{-1}) および還元型ミオグロビンのバンド (1556 cm^{-1}) が増強することを明らかにしている (Ohira et al. Sci. Rep. 2017;7:42401)。このラマン分光法を心臓突然死を始めとしたさまざまな死後診断に用いることができれば、今まで明らかにできなかった死因を解明することが可能となり、社会的意義は大きいと考える。

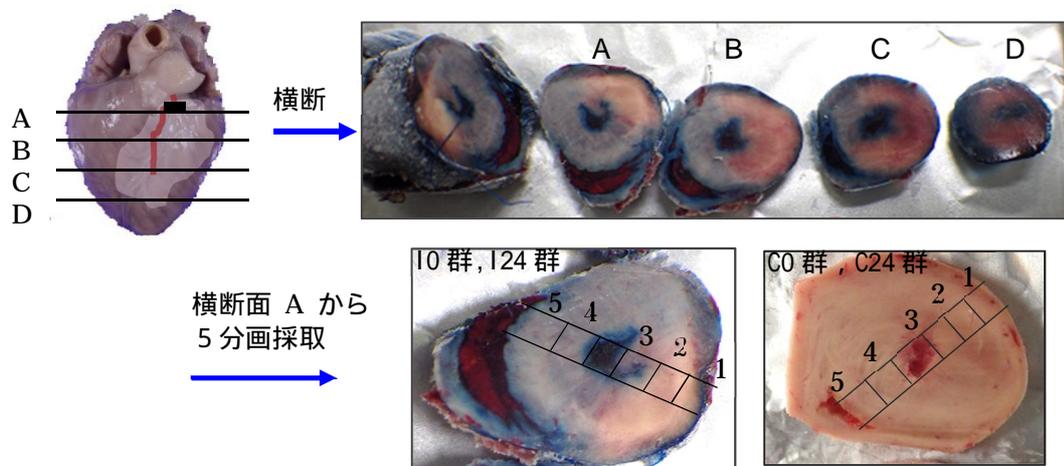
2. 研究の目的

ラマン分光法を用いて死後の心臓においても心筋虚血を識別できるかどうかを検討する。また、虚血性変化だけでなく、心毒性を有する薬毒物による心筋障害も識別できるかどうか検討し、新しい診断方法を確立することを目的としている。

3. 研究の方法

全身麻酔したラットを以下の4群に分けた、開胸後、左冠状動脈を結紮し20分経過後安楽死させ、直ちに心臓摘出(虚血群; I0群) 開胸20分後安楽死させ、直ちに心臓摘出(コントロール群; C0群) 開胸後、左冠状動脈を結紮し20分経過後安楽死させ、閉胸し24時間後に再開胸して心臓摘出(虚血群24時間後; I24群) 開胸20分後安楽死させ、閉胸し24時間後に再開胸して心臓摘出(コントロール群24時間後; C24群)。I0群とI24群の虚血群には、安楽死直前に右心房内にエバンスブルーを注入した。エバンスブルーは血流のある組織を青く染め、血流の無い組織は染色されない。摘出した心臓は液体窒素下で急速凍結し、その後は-80の冷凍庫内で保管した。ラマン分光測定前日に、心臓横断面を作成し、I0群、I24群はエバンスブルー非染色部の左心室を3分割(心外膜側、中央、心内膜側) 染色部の心室中隔を2分割(左室腔側、右室腔側) 計5分画を採取した。C0とC24群は、虚血群と同様の部位から5分画を採取した(図1)。採取後、直ちに1分画ずつ個包装し、再度-80に凍結した。

測定には、LabRAM HR Evolution (HORIBA scientific, Ltd., Kyoto, Japan) を用いた。測定条件は、レーザー波長 532nm Edge、対物レンズ 10 倍、Acquisition time 10s × 積算回数 3 回、分光器中心スペクトル 1200 cm^{-1} 、共焦点ホール 200 を用いた。1 匹のラットにつき採取された 5 分画の検体に対し、各検体の中で場所を変えて 3~4 か所測定を行った。

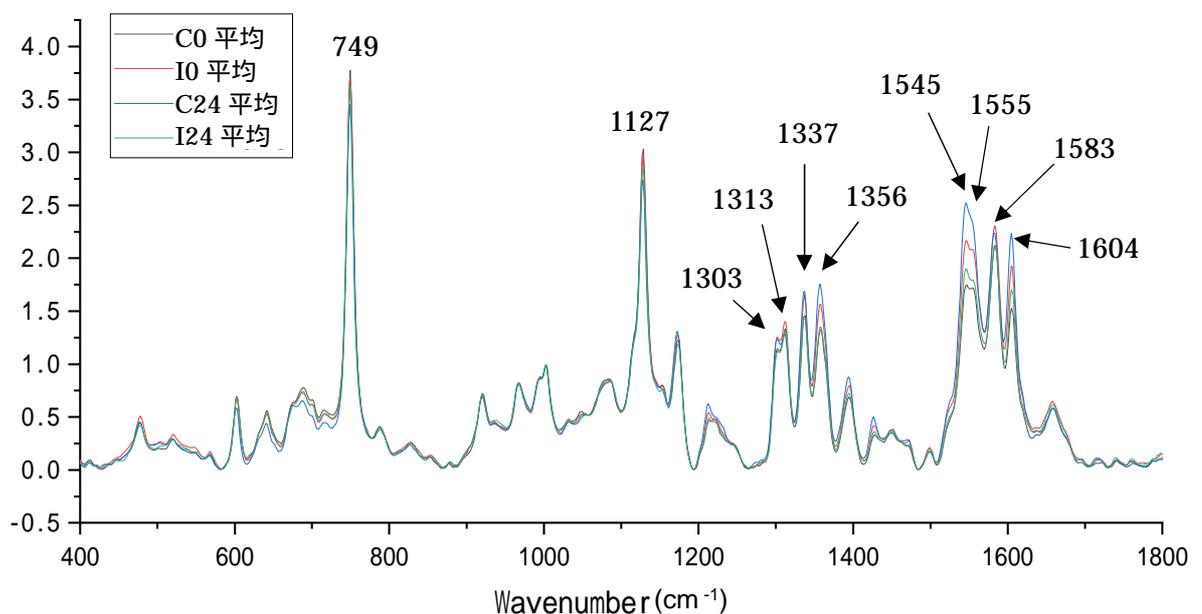


【図1】 測定検体の作成方法、測定部位。虚血群（I0群、I24群）には青色色素を循環させ、血流のある部位（染色部）と無い部位（非染色部）を染め分けている。コントロール群（C0群、C24群）には青色色素は使用せず。

データの処理、解析は分光測定装置専用ソフトウェア LabSpec6 (HORIBA Ltd., Kyoto, Japan) を用いた。ベースライン処理の後、フェニルアラニンのピークである 1000 cm^{-1} 前後の最大ピーク値を1とする規格化を行い、上記4群間のラマンスペクトルの結果を、比較した。比較の際には、 749 cm^{-1} （還元型シトクロム）、 1127 cm^{-1} （還元型シトクロム）、 1303 cm^{-1} （還元型シトクロム）、 1313 cm^{-1} （還元型シトクロム）、 1337 cm^{-1} （還元型シトクロム）、 1355 cm^{-1} （還元型ミオグロビン）、 1545 cm^{-1} （還元型シトクロム）、 1555 cm^{-1} （還元型ミオグロビン）、 1583 cm^{-1} （酸化ミオグロビン、還元型シトクロム）、 1604 cm^{-1} （還元型ミオグロビン）の10点のピークに着目した。4群間のピークの差は、Steel-Dwass 多重比較検定を用い、 $p < 0.05$ の有意差があるものを選出した。有意差があった場合に、ROC 曲線からカットオフ値候補を求めた。

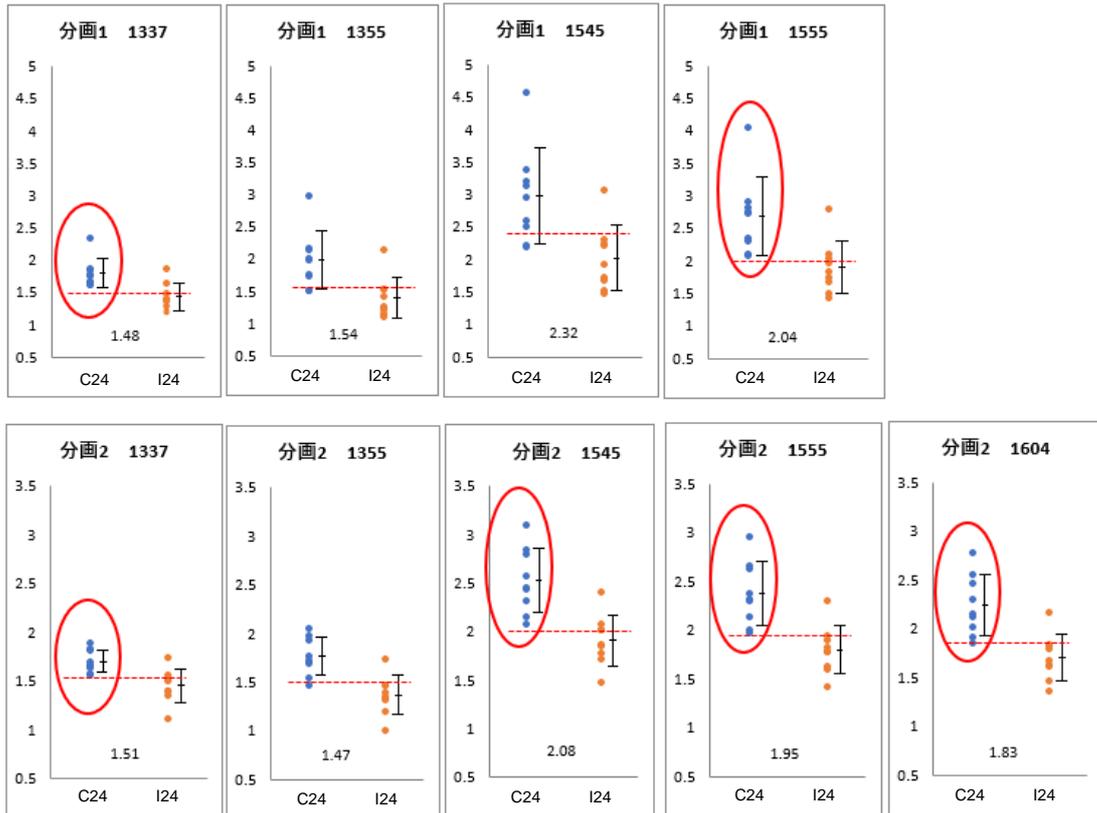
4. 研究成果

(1)規格化後のピーク値：一例として分画2の4群の平均値比較を示す。



【図2】 4群のラマンスペクトログラムの比較。縦軸は規格化後のピーク値。

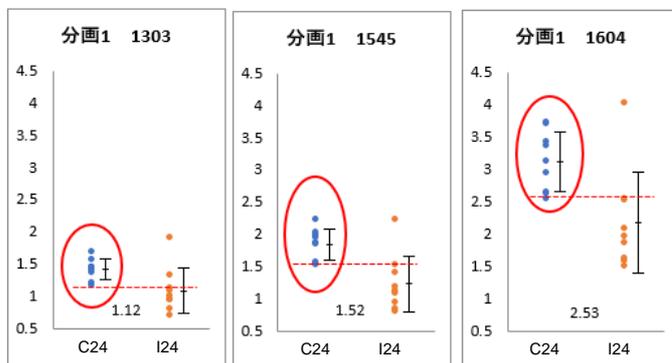
C0 群、10 群間では、既報と異なり、10 点のいずれのピークにおいても有意差は認めなかった。C24 群、I24 群間では、分画 1 および 2 で 1337, 1355, 1545, 1555 cm^{-1} に、分画 2 で 1604 cm^{-1} に有意差を認めた。うち、分画 1 では 1337, 1555 cm^{-1} 、分画 2 では 1337, 1545, 1555, 1604 cm^{-1} で C24 群がカットオフ値をまたがなかった (図 3)。分画 3、4、5 では、C24 群、I24 群間で有意差を認めるピークはなかった。



【図 3】Steel-Dwass 多重比較検定を用い、 $p < 0.05$ の有意差があった場合に、ROC 曲線からカットオフ値候補 (図内の数値と赤の点線) を求めた。赤丸の記された 6 つのピークでは、C24 群がカットオフ値をまたがなかった。縦軸は、規格化後のピーク値。

(2) 二次微分のピーク値

C0 群、10 群間では、10 点のいずれのピークにおいても有意差は認めなかった。C24 群、I24 群間では、分画 1 で 1303, 1545, 1604 cm^{-1} に有意差を認め、C24 群がカットオフ値をまたがなかった (図 4)。分画 2、3、4、5 では、C24 群、I24 群間で有意差を認めるピークはなかった。



【図 4】Steel-Dwass 多重比較検定を用い、 $p < 0.05$ の有意差があった場合に、ROC 曲線からカットオフ値候補 (図内の数値と赤の点線) を求めた。分画 1 の 3 つのピークで、C24 群がカットオフ値をまたがなかった。縦軸は、規格化後のピーク値。

(3)主成分分析

334 ~ 1715 cm^{-1} のスペクトル領域を用いて主成分分析を実施した。4成分に分離したローディングスペクトル(PC1~4)を用いて各スペクトルをプロットし、PC1~4の2成分ずつプロットしたが、4群を分離することが難しかった。

以上(1)(2)の結果から、一部のピークの値を比較することで、死後24時間後の心筋組織で生前の心筋虚血を診断できる可能性が示唆された。しかしながら(1)(2)の結果が一致しないことから、実験プロトコールの修正が必要と考えられた。虚血時間や死後経過時間を変更することにより、精度の高い診断方法を得る条件が明らかになり、法医実務への応用の可能性について評価できると考える。

なお、機器の度重なる故障等により研究の進捗に遅れが出て、薬毒物による心毒性の解析にまで手が回らなかった。

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
研究分担者	池谷 博 (Ikegaya Hiroshi) (30292874)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	新谷 香(石田香) (Shintani-Ishida Kaori) (50345047)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	

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