

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659340

研究課題名(和文) 剖検における動脈石灰化の評価と遺伝的背景

研究課題名(英文) Evaluation of arterial calcification in histology

研究代表者

大澤 資樹 (OSAWA, Motoki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90213686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈解離や虚血性心疾患といった突然死の基礎病変である動脈石灰化について、大動脈の組織切片に対し石灰化の性状を検討した。顕微鏡下での観察から、微小なびまん性石灰化、粥腫形成と共に塊状化したもの、核ないし骨髄形成を伴うもの等に大別され、5段階の石灰化評価法を新たに考案した。アテローム性硬化の評価法として米国心臓協会AHA分類が知られているが、石灰化の程度はこの分類とは必ずしも一致せず、進展した型と型では、様々な段階の石灰化が形成されていた。検査法としては、一般染色とコッサ染色を中心に石灰化病変を検出し、さらに抗MGP、抗AHSG抗体を用いた免疫組織化学を追加してゆくのが適当と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Arterial calcification is the basic lesion in which aortic dissection and ischemic heart diseases are developed. In the present study, we attempted to establish the histological evaluation procedure of the ectopic calcification. Laboratory staining and immunohistochemistry were performed to sections of paraffin-embedded aorta tissues obtained at autopsy. As the classification, five stages were evident such as diffuse apatite particles, massive calcification accompanied by atheroma, and nucleus or marrow formation. The calcification pattern was not consistent with atherosclerotic changes according to grades of the American Heart Association. In particular, advanced subjects displaying V and VI types exhibited a variety of calcification features. In addition to the common H&E staining, Kossa staining should be suitable at laboratory for evaluation of calcification in the sections. If necessary, immunohistochemistry using anti-MGP and anti-AHSG antibodies should be employed.

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：循環器 石灰化 動脈 ゲノム 病理学

1. 研究開始当初の背景

動脈石灰化は、大動脈解離や虚血性心疾患の原因となり、法医学領域で出会う機会が多い内因性急死の重要な基礎病変である。アテローム性動脈硬化の進行型ととらえられていた局所的な異所性石灰化が、全身的な炎症に続発する血清中のリン酸カルシウム結合タンパクである fetuin (AHSG) の濃度低下することに伴い、循環中でのアパタイトの形成と脈管への沈着が主な原因であることが解明されてきた。この研究では、これまで積極的に評価されてこなかった動脈石灰化について、剖検例からの動脈組織標本に一般染色、特殊染色、免疫組織化学を行い、顕微鏡下で形態学的評価法の確立をまず試みる。次に、次世代シーケンサーを用いて、異所性石灰化に関連するとされる 30 余の遺伝子の配列を一度に決定するシステムを確立し、動脈石灰化の進行型と判定された症例について、網羅的な遺伝子解析から異所性石灰化における個体差の遺伝的背景を調べることを目的とする。

2. 研究の目的

法医学領域においては、内因性急死の症例を剖検する機会が多い。これらの半数以上は心臓性突然死で、虚血性心疾患や大動脈解離など循環器系疾患に起因している。動脈の病変としては、高脂血症や高血圧を背景とするアテローム性動脈硬化が一般的であるが、石灰化も重大な病的変化である。典型的には人工透析が挙げられ、透析患者では静脈も含めた血管に広範な石灰化が生じることが大きな副作用とされ、この病態の解析から動脈石灰化のメカニズムが解明されてきた。

牛胎児血清から分離され、骨の細胞外マトリックスの主要構成成分であるフェチュイン (fetuin) と呼ばれる血清タンパクがあり、ヒトにおける相同タンパクは、AHSG (2-HS-glycoprotein) と呼ばれる。fetuin は、リン酸カルシウムに強く結合し、骨以外の組織においてリン酸カルシウムや炭酸カルシウムが沈殿しアパタイトを形成することを阻害する機能があり、異所性石灰化を防ぐとともに、骨組織でも骨代謝に関与する。このタンパクは炎症に際し肝臓で合成が大きく低下することが特徴で、人工透析や全身的な炎症状態になると、循環中の fetuin 濃度が低下し、リン酸カルシウムの可溶化能が低下し、血管にアパタイトが沈着するというのが動脈石灰化の基本的なメカニズムである。

今回の研究では、これまで積極的に評価されてこなかった動脈石灰化について、剖検例からの動脈組織標本に一般染色、特殊染色、免疫組織化学を行い、顕微鏡下で形態学的評価法の確立をまず試みる。次に、次世代シーケンサーを用いて、異所性石灰化に関連するとされる 30 余の遺伝子の配列を一度に決

定するシステムを確立する。そして、動脈石灰化の進行型と判定された症例について、網羅的な遺伝子解析から異所性石灰化における個体差の遺伝的背景を調べることを目的としている。

3. 研究の方法

2007～2010年の4年間に、東海大学医学部基盤診療学系法医学領域で実施した解剖例の中で、動脈硬化性変化を有する161例(男性99例、女性62例)の大動脈を検体とした。病歴としては、糖尿病(20例)、高血圧(18例)、腎不全(6例)を抽出し、剖検においては心肥大(47例)所見も併せて参考にした。大動脈を写真撮影の後、硬化性変化が集中する腹部から総腸骨動脈分岐部にわたる部位について、米国心臓協会(AHA)分類に従い、肉眼的に動脈硬化の程度を分類した。

1 検体につき、少なくとも4か所から切り出しを行い、ホルマリン固定後、さらにキレート剤にて脱灰処理を行い、パラフィン包埋した。薄切標本に対し、H&E染色を行い、さらにEVG染色、コッサ染色の特殊染色を追加した。一部の症例については、抗MGP(matrix Gla protein)、抗AHSG、抗MMP(matrix metalloproteinases)-1、抗MMP-3、抗MMP-9抗体を一次抗体として、免疫組織化学を間接的PAP法にて、DABを発色基質として石灰化部位を検出した。

本研究は、東海大学医学部医の倫理委員会の承認を得た上で、実施されている。

4. 研究成果

(1) 動脈硬化程度

今回の研究で対象としたのは、法医剖検161例の腹部大動脈で、年代は、10歳代1例、20歳代4例、30歳代6例、40歳代17例、50

表1 大動脈のAHA動脈硬化組織分類と年齢

| | 0 | 1 | b | a | a | b | a | ※ | 計 | | |
|-----|---|---|----|---|----|----|---|---|----|----|-----|
| ~19 | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| 20 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | 4 | | |
| 30 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | | | 6 | | |
| 40 | 1 | 2 | 3 | 1 | 5 | 4 | 1 | | 17 | | |
| 50 | 3 | 2 | 5 | 3 | 4 | 13 | 2 | 1 | 34 | | |
| 60 | | 3 | 2 | 9 | 20 | 2 | 1 | 2 | 6 | 46 | |
| 70 | | 2 | | 3 | 14 | 2 | 4 | 2 | 2 | 29 | |
| 80 | | | | 2 | 3 | | 4 | 2 | 6 | 17 | |
| 90~ | | | | | 2 | | 2 | | 2 | 7 | |
| 計 | 6 | 3 | 10 | 2 | 16 | 37 | 3 | 9 | 4 | 12 | 161 |

歳代 34 例、60 歳代 46 例、70 歳代 29 例、80 歳代 17 例、90 歳代 7 例である。まず、肉眼的所見及び H&E 染色に基づき、最も病変が進行した部位につき、AHA 動脈硬化組織分類に従い評価したところ、判定は表 1 のとおりとなった。

動脈硬化性変化を認めない 0 型は 6 例、早期病変 (I 型) は 6 例、I 型は 16 例、移行病変 (II 型) は 6 例、進行病変 (III 型) は 25 例、III 型のうち進展した fibroatheroma と石灰化を伴う ab 型は 5 例、b 型は 57 例と最も多く、III 型では表面に潰瘍を伴う a 型が 14 例、出血または血腫形成を伴う b 型が 7 例、潰瘍及び血腫・血栓形成を伴う abc 型は 2 例であった。60 才以上では、80% に石灰化を伴う b 型以上の粥状型動脈硬化性変化を認めた (図 1)。

既往歴として、高血圧症を有する 34 例 (平均 73 歳) では、b、ab、abc 型を観察し、糖尿病を有する 28 例 (平均 66.6 歳) も、b、a、ab、abc 型を認め、ほぼ同等であった。腎不全の既往歴を有する 8 例 (平均 72.8 歳) は、b、abc と、最も進行した石灰化を認めた。



図 1 典型的な大動脈石灰化のマクロ像。(A) 40 歳代女性、AHA I 型で塊状の脂質コア形成されるが石灰化を伴わない。(B)、70 歳代男性、AHA 分類 abc 型に相当し、潰瘍形成を伴う慢性腎不全患者。

(2) 組織切片の石灰化染色

次に、特殊染色を追加した上で、石灰化の程度について顕微鏡下で組織所見をとり、その分類を試みた。対象とした 161 例から 185 病変部位を詳細に観察した結果、大きく 5 段階に分類することが可能であった。これらを概略すると、第 1 度、粥腫内に少数の微細な石灰化を認めるもの (86 部位)、第 2 度、広範に微細な石灰化がびまん性に進展したもの (24 部位)、第 3 度、粥腫形成なく内膜下に広範な石灰化を認めたもの (24 部位)、第 4 度、塊状に石灰化し中膜の断裂を伴うもの (43 部位)、第 5 度、骨化及び骨髄形成に至っているもの (8 部位) と、段階的に分類し

てみた (図 2)。

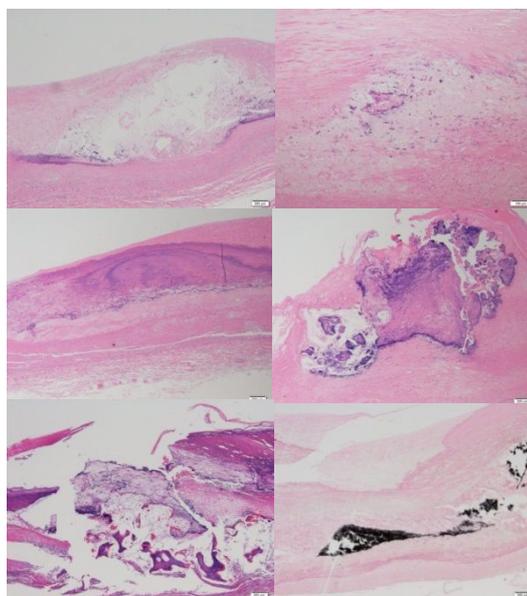


図 2 石灰化分類における典型的な組織像 (H&E 染色、コッサ染色) 粥腫内に少数の石灰化 (第 1 度) 粥腫内にびまん性微小石灰化 (第 2 度) 粥腫を認めない内膜石灰化 (第 3 度) 潰瘍形成を伴う石灰化 (第 4 度) 骨梁形成、骨髄形成 (第 5 度) コッサ染色像

(3) 免疫組織化学

石灰化の進展度から 58 病変部位を選択して、免疫組織化学検査による検討を行った。石灰化部分における陽性率は、MMP-1 36.2%、MMP-3 20.7%、MMP-9 36.2% であり、粥腫内では、MMP-1 50.0%、MMP-3 22.0%、MMP-9 63.8% 陽性であった。AHSG 82.8%、MGP 79.3% が石灰化部位に陽性であり、MGP および AHSG では、粥腫に 100% 陽性であった。(図 3) びまん性石灰化、粥腫を欠く石灰化、潰瘍形成部分では陽性率が高く、微小石灰化の部位では MMP-1、MMP-3、MMP-9、MGP、AHSG とともに陰性であった。

(4) 考察

動脈硬化は、病理学的に壁の肥厚・改築と弾性線維の消失を共通とする粥状硬化 (atherosclerosis)、Mönckeberg 型中膜硬化、細動脈硬化の 3 つの形態学的変化を含んだ概念である。動脈石灰化は、動脈硬化性変化の一形態ととらえられる場合が多く、石灰化のみに焦点を当てて所見をとることは、一般には行われていない。今回の研究では、腹部大動脈の肉眼所見と、顕微鏡下に観察した組織所見を中心に、石灰化の程度を評価する方法の確立を試みた。そして、組織学的には、第 1 度から第 5 度までに分類してみた。ただ

し、第2・4・5度は、必ず粥腫 atheroma 形成を伴っていたが、第3度に関しては、必ずしも粥腫形成を認めず、内膜下に薄く広く石灰化が進展しているものが多くを占めた。従って、第3度については、一連の動脈硬化性変化の中で経過的なものなのか、あるいは、異なる過程によるものなのか明確ではない。

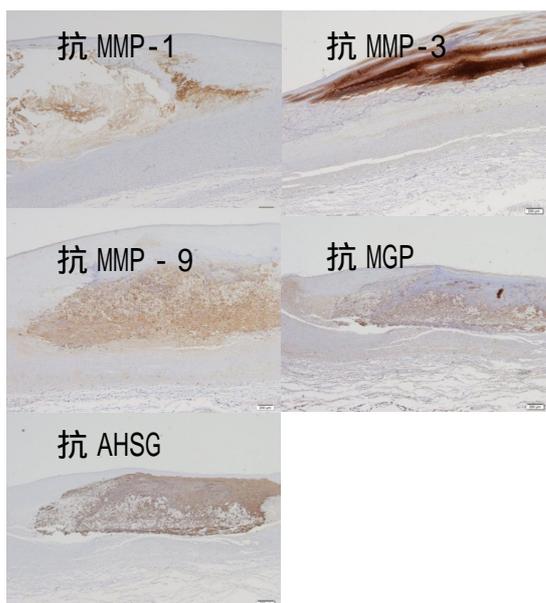


図3 大動脈断面の組織切片に対する5種類の抗体を用いた免疫組織化学 全般に粥腫内にびまん性ないし斑状に石灰化部位を検出する。

AHA 分類との関係では、型では全例で第2度石灰化相当の変化を認め、相関が強かった。しかし、型(ab, b)に第1、2、4、5段階と様々な変化を認め、型(a, ab, abc)では、第1、3、4段階に相当する変化を認めた。このことは、動脈硬化分類と石灰化の進行には、ある程度の相関性を認めるものの、動脈硬化進行例においては、様々な石灰化の段階が観察され、相関性は必ずしも高くはないことを示している。すなわち、動脈硬化性変化の評価とは別に、石灰化の評価も並行して行うことに意味があると考えられた。

免疫組織化学では、細胞外マトリックス (MMPs) 抗体染色において、第1、3、5度の石灰化に対して 20~30%程度陽性像を認め、陽性率は必ずしも高くはなかった。MMPs は、エラスチンの断片化した動脈壁において活性が上昇することが知られており、MMP-1 は血管内皮細胞や平滑筋細胞で発現、triple-helical collagen 分解に関わり、その分解産物は MMP-3, MMP-9 等によってさらに分解される。弾性線維が変性、断片化するとカルシウムとの親和性が高まり、石灰化が

促進すると考えられている。しかしながら、今回の検討では、粥腫部分で比較的高い陽性率を示したものの、石灰化部分全体に陽性像を検出し、特徴的な局在像を認めなかった。

MGP は骨基質蛋白の一つで、骨組織に加え動脈硬化巣にも広く分布していると報告されている。MGP と血管石灰化ないし動脈硬化との深い関連性が臨床的にも知られており、冠状動脈疾患の重症度が増すにつれて血清 MGP 濃度は低下する。今回は、MGP は石灰化病変部位の 79.3%に陽性像を認め、粥腫部位には全例で陽性であった。

AHSG は、MGP と同様に、石灰化抑制作用を持つ血清タンパクで、透析患者において AHSG の循環中濃度が有意に低下することが、動脈石灰化の原因であることが明らかとなっている。今回の検討では、AHSG は石灰化病変の 82.8%に陽性像を認め、粥腫病変にはやはり 100%陽性を認めた。微小石灰化、骨梁の形成以外では、石灰化病変の陽性率に違いは認めなかった。

今回の検討では、AHA 分類における型と型に、様々な程度の石灰化が観察され、動脈硬化の評価と石灰化は必ずしも一致せず、石灰化に焦点を当てた評価法も意味があると結論付けられた。また、石灰化検出の方法としては、脱灰後に薄切標本に対して H&E 染色をまず行い、石灰化部位を確実に判断するために、コッサ染色といった特殊染色を実施し、さらに必要ならば免疫組織化学検査を追加するのが適当と考えられた。

遺伝的背景については、骨代謝関連タンパクの多型現象と石灰化の程度との連鎖解析を試みたが、症例数が少なく、有意水準の結果をえることは難しかった。動脈石灰化は個体差が顕著で、遺伝的背景が想定されるので、今後の検討課題であろう。動脈石灰化は、法医学解剖でよく出会う大動脈解離や透析患者の基礎的病変であることから、適切な組織学的評価法を確立することには意味があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Satoh F, Nakamura T, Hayashi K, Ochiai E, Osawa M. Left ventricular non-compaction of myocardium in forensic autopsy. J Clin Pathol Forensic Med 査読有 2014;5(2):17-22.

Satoh F, Osawa M, Hasegawa I, Seto Y, Tsuboi A. "Dead in hot bathtub" phenomenon: accidental drowning or natural disease? Am J Forensic Med Pathol 査読有 2013;34(2):164-168.

Osawa M, Inaoka Y, Satoh F. Postmortem molecular testing to sudden death from unknown causes: variable single C

repetitive tract in KCNQ1. International Proceedings Division from the 22nd Congress of the International Academy of Legal Medicine 査読無 2013; 313-318. (ISBN 978-887587-676-0)

佐藤文子、大澤資樹:入浴中の急死の実態、賠償科学、査読無 2013;39(1), 39-45.

大澤資樹、稲岡齊彦、田村友紀、坪井秋男、佐藤文子:ゲノムワイド SNP データに基づく血縁関係推定の試み、DNA 多型、査読無 2013;21,224-227.

Satoh F, Seto Y, Hasegawa I, Osawa M. Fatal *Staphylococcus aureus* bacteremia in the Felty syndrome: A maltreatment-suspected case. Leg Med 査読有 2012;14(4):246-248.

[学会発表](計7件)

大澤資樹、稲岡齊彦、中留真人、佐藤文子、落合恵理子、的場梁次(2014.3.7)乳幼児突然死と喫煙との関連:ニコチン代謝個体差との連鎖解析。第20回日本SIDS・乳幼児突然死予防学会学術集会、大宮ソニックシティ(さいたま市)

大澤資樹、宮下京子、落合恵理子、佐藤文子(2013.11.23)原因不明の突然死に対する遺伝子検査。日本DNA多型学会第22回学術集会、戦後復興記念館(仙台市)

Osawa M, Suzuki S, Ozaki Y, Ochiai E, Miyashita K, Shiina T. HLA typing from sequence data originated by the advanced technology. (2013. 9. 5) 25th World Congress of the International Society for Forensic Genetics, Melbourne, Australia.

佐藤文子、長谷川巖、大澤資樹(2013.6.27)動脈石灰化の形態学的評価法の確立の試み。日本法医学会学術全国集会、ロイトン札幌(札幌市)

大澤資樹、稲岡齊彦、田村友紀、坪井秋男、佐藤文子(2012.11.8)ゲノムワイド SNP データに基づく血縁関係推定の試み。日本DNA多型学会第21回学術集会、京都教育文化センター(京都市)

大澤資樹、中留真人、稲岡齊彦、佐藤文子、中西亜由美(2012.10.24)原因不明の突然死に対する死後遺伝子診断の試み。日本人類遺伝学会第57回大会、東京プラザホテル(東京都)

Osawa M, Satoh F, Inaoka Y, Hasegawa I, Nakanishi A. Postmortem molecular testing to sudden deaths from unknown cause. (2012. 7. 5) 22th Congress of the International Academy of Legal Medicine, Istanbul, Turkey.

[図書](計1件)

「死体検案ハンドブック」(改訂3版、

2014)金芳堂、的場梁次、近藤稔和編、14章 乳幼児突然死症候群、pp. 218-223、大澤資樹分担

6. 研究組織

(1)研究代表者

大澤 資樹 (OSAWA MOTOKI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 90213686

(2)研究分担者

佐藤 文子 (SATO FUMIKO)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号: 70328128

(3)連携研究者

長谷川 巖 (HASAGAWA IWAO)

東海大学・医学部・助教

研究者番号: 00433912