

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08887

研究課題名(和文) 平滑筋分化マーカーを用いた脳血管における平滑筋形質転換の観察と法医鑑定への応用

研究課題名(英文) Observation of smooth muscle cell transformation in cerebral blood vessel using differentiation marker and its application to forensic examination.

研究代表者

呂 彩子 (Ro, Ayako)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50296555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管破裂による突然死の法医鑑定に有用な組織形態学的特徴につき、血管中膜平滑筋細胞の形質転換に着目して検討した。椎骨動脈解離例では検索した全例に原因病変としての分節性動脈中膜壊死を認めた。解離部位には反応性の間葉系細胞が認められ、外傷性椎骨動脈破裂例との鑑別に有用な所見と考えられた。嚢状動脈瘤例では中膜平滑筋細胞の性状と分布によって動脈瘤の成長経過の推察が可能であり、臨床経過が不明なことが多い法医解剖例において、事例毎に経過が異なる動脈瘤症例の生前の病態把握に有用である。

研究成果の概要(英文)：Histopathological features of cerebral arteries focusing on the medial smooth muscle cells for forensic diagnosis of sudden death due to cerebral arterial rupture were examined. In cases of vertebral artery dissection, segmental arterial mediolysis was observed as a causative lesion in all examined cases. The response of mesenchymal cells found at the rupture site was considered to be a useful finding for distinguishing from traumatic vertebral arterial rupture. In the cases of a saccular aneurysm, the morphology and distribution of the medial smooth muscle cells enables to evaluate growth course of the aneurysm. That is useful for forensic practice in the point of grasping the case's prenatal course.

研究分野：法医病理学

キーワード：脳血管 クモ膜下出血 脳動脈瘤 平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)脳血管の破綻はクモ膜下出血による突然死を来すため、法医学的に重要な病態のひとつである。脳血管破綻の原因はいくつか存在するが、内因性では脳嚢状動脈瘤・脳動脈解離が多い。クモ膜下出血は生前に血管病変の診断のないまま死亡し、解剖によって初めて診断がつく事例が多く、これらの疾患のメカニズムには不明な点が多い。

また、外因性では頸部の過伸展などによって外傷性脳血管破裂が生じることがある。この場合、平手打ちなどの比較的軽微な外力によっても血管が破裂することがあるため、死亡前に頭頸部に外力が加わったような状況での突然死の場合、内外因の法医学的鑑別が求められる事例も少なくない。

(2)椎骨動脈は内因性脳動脈解離および外傷性動脈破裂の両者の好発部位である。また脳動脈解離は紡錘状を呈することが多いため、嚢状動脈瘤と比し肉眼所見のみで動脈解離と動脈破裂を鑑別することは困難である。研究代表者は過去に、椎骨動脈破裂例の破綻部血管外膜の伸展の有無によって内因外因を組織形態学的に鑑別する方法を報告した。

また、研究代表者は内因性椎骨動脈解離例50例全例に脳血管の中膜平滑筋細胞の融解壊死を確認し、脳動脈解離が腹腔内筋性動脈解離で多くみられる Segmental arterial mediolysis (SAM: 分節性動脈中膜融解) と同様の機序で発生する可能性を指摘した。

(3)脳嚢状動脈瘤は、内因性クモ膜下出血の原因として最も多く、突然死予防の観点から重要な疾患である。近年では脳血管造影や脳血管内治療により多くの臨床例が報告されている。嚢状動脈瘤は破裂例と未破裂例があるが、それぞれの相違点や、動脈瘤の発生から成長・破裂に至るメカニズムについては不明な点が多い。自験例の嚢状動脈瘤の瘤壁には通常の血管壁には認められない脱分化した合成型中膜平滑筋がしばしば確認される。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究の目的は、中膜平滑筋に着目した脳血管の病理組織学的検討による脳血管破綻に至る各種病態の成因解明および法医学的鑑別への応用とした。

具体的には、第一に椎骨動脈解離例の中膜平滑筋を観察し、脳動脈解離の病態解明を目指すと共に椎骨動脈破裂例の法医学的鑑別への応用を検討した。第二に嚢状動脈瘤例の中膜平滑筋を検討し、非動脈瘤例と比較することで脳嚢状動脈瘤形成・破裂の病態解明を目指すと共に法医学的鑑別への応用を検討した。

3. 研究の方法

東京都監察医務院における法医解剖例の脳血管をホルマリン固定・EDTA脱灰処理後パラフィン包埋を行ったのち、脳血管が横断面に

なる方向で0.1mm間隔の連続組織標本を作製した。全例に0.1mm間隔の一般組織染色(ヘマトキシリン・エオジン染色、エラスチカワンギーソン染色)を行い、脳血管の基本構造を観察した。酵素抗体法を用いた免疫組織染色は1mm間隔で行い、中膜平滑筋細胞および関連マーカーの分布を観察した。ただし後述の椎骨脳底動脈検索については病変の長軸が長い場合、0.2mm間隔の一般組織染色および2mm間隔の免疫組織染色を行った。

染色標本は顕微鏡デジタルカメラで撮影し、複数箇所組織所見の比較検討を行った。また、連続切片で所見が存在する標本枚数から各種血管病変の長軸方向の長さを算出した。

(1) 椎骨動脈解離例の検討

椎骨動脈解離破裂によるクモ膜下出血例で腹腔内動脈解離の破裂を伴った4例につき、破裂部位を含む左右椎骨脳底動脈の0.2mm間隔の連続組織切片を作製した。一般組織染色で破裂部の長さおよび破裂部・非破裂部新旧の動脈解離の有無を観察した。さらに2mm間隔で抗SMA抗体、抗S100A4抗体を用いた免疫染色を行い、中膜平滑筋の性状と間葉系細胞の反応を観察した。腹腔内破裂血管は3mm間隔の組織標本を用いて観察した。

(2) 脳嚢状動脈瘤・非動脈瘤例の検討

破裂前大脳動脈瘤の病理形態学的検討
前大脳・前交通動脈部の嚢状動脈瘤破裂37例につき、前大脳動脈・前交通動脈の太さや合流形態を肉眼的に観察した。その後0.1mm間隔の連続組織切片標本を作製して一般組織染色を行った。標本から動脈瘤の大きさ(高さ)頸部(ネック)径を算出した。さらにネックの存在部位、ワイドネックの有無、ベクトルとの関係について観察した。

破裂脳嚢状動脈瘤例の中膜平滑筋の免疫組織学的検討

破裂脳嚢状動脈瘤25例(破裂部:前大脳動脈11例・内頸後交通部5例・中大脳動脈5例・脳底動脈3例・椎骨動脈1例)につき、破裂部血管の0.1mm間隔の連続組織切片標本を作製して一般組織染色で動脈瘤の大きさを計測した。1mm間隔の組織標本に抗SMA抗体・抗S100A4抗体・抗CD68抗体を用いた免疫染色を行い、中膜平滑筋細胞の性状および関連所見の観察を行った。

脳嚢状動脈瘤例・非脳動脈瘤例の中膜平滑筋の免疫組織学的検討

破裂脳動脈瘤7例、未破裂脳動脈瘤5例、非脳動脈瘤15例につき、瘤とその母動脈・脳動脈瘤(分岐部嚢状動脈瘤)の好発部位である4箇所(前大脳動脈-前交通動脈 内頸動脈-後交通動脈 中脳動脈M1末端部 椎骨脳底動脈合流部)の1mm間隔の組織標本に抗SMA抗体・抗S100A4抗体・抗Iba1抗体を用いた免疫染色を行い、中膜平滑筋細胞の

性状および関連所見の観察を行った。

4. 研究成果

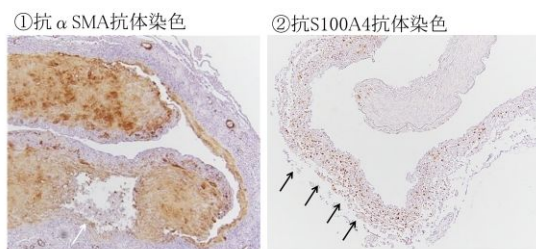
(1) 椎骨動脈解離例の検討

検討例の破裂部位の椎骨動脈・腹腔内筋性動脈にはいずれも中膜平滑筋の融解壊死があり、SAMによる急性動脈解離と判断された。

連続標本から計測した椎骨動脈破裂部の長さは、外膜破裂がいずれも2.4mm以下で内弾性板断裂が5.4-11mmであった。検討例全例に非破裂部位の動脈解離が存在し、うち3例は器質化した陳旧性動脈解離を伴っていた。

免疫染色の結果、抗 SMA 抗体染色で頭蓋内・腹腔内動脈の破裂部位に局所的な中膜融解壊死を認めた(図1)。3例で椎骨動脈解離部位の血管外膜に抗 S100A4 抗体染色陽性の間葉系細胞の出現を認めた(図1)。腹腔内動脈解離部での間葉系細胞の出現は認めなかった。

図1. 破裂椎骨動脈の免疫組織所見



以上の結果から、検討例は全例が中膜平滑筋疾患であるSAMを背景とした多発性動脈解離であり、頭蓋内動脈解離におけるSAMでの関与が示唆された。椎骨動脈解離がSAMであるならば、破裂部位に加え、脳動脈の非破裂部や腹腔内筋性動脈の組織標本の作製により中膜平滑筋脱落の所見を確認することで、SAMの診断精度が高まるとともに、外傷性椎骨動脈破裂との鑑別に有用と考えられた。

また、免疫染色の結果、4例中3例で椎骨動脈破裂部の外膜に間葉系細胞の浸潤がみられた。これは、動脈解離によって破裂前に既に伸展した外膜への修復反応と考えられる。外傷性椎骨動脈破裂であれば、脳血管は全層破裂により直ちに致死性のクモ膜下出血となるため間葉系細胞の反応は認められないと考えられる。今後、外傷性椎骨動脈における破裂部外膜の間葉系細胞の反応の有無を、新たな椎骨動脈破綻例の内因・外因の鑑別法に応用する可能性が示唆された。

(2) 脳嚢状動脈瘤・非動脈瘤例の検討

破裂前大脳動脈瘤の病理形態学的検討

破裂前大脳動脈瘤37例のうち、前大脳動脈の変異は4例(11%)あり、内訳はTriple ACA 3例、Bihemispheric ACA 1例であった。前大脳動脈の直径の左右差は21例(57%)に認められ、程度は軽度9例・高度12例であった。

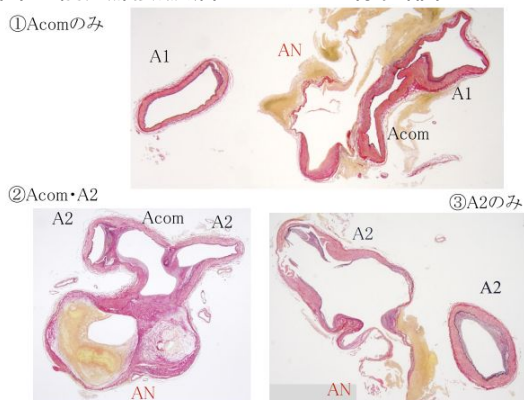
前交通動脈との合流形態はH型(前交通動脈が独立して存在する)14例、X型(左右前

大脳動脈合流後ただちにA2に分岐する)が19例、その他3例であった。

連続組織標本から算出した動脈瘤の大きさ(高さ)は13-14.2mm、平均 4.1 ± 2.2 mmであった。一般的に破裂リスクと言われる5mm以上の例は9例(24%)のみであった。

動脈瘤のネック径は0.4-3.4mm、平均 1.4 ± 0.6 mmであった。9例(24%)がワイドネックであった。ネックの存在部位は前交通動脈のみ4例、前交通動脈・前大脳動脈A2部13例、前大脳動脈A2のみ11例であった(図2)。ネックは全例が血流からみて正のベクトルに存在していた。

図2. 前大脳動脈瘤のネックの存在部位



Acom: 前大脳動脈 A1: 前大脳動脈 A1 部
A2: 前大脳動脈 A2 部 AN: 動脈瘤

前大脳動脈は他部位の動脈瘤と比し、破裂の危険が高く、動脈瘤の形成には変異の多い血管および合流形態が関与していると考えられている。検討した破裂例においても変異や左右差が半数以上に認められた。

ネックは動脈瘤の初期形成部位を示すと考えられる。一般に前大脳・前交通動脈部動脈瘤は、前交通動脈に形成されると考えられているが、詳細な組織構造から確認すると、多くが前交通動脈とともに分岐後の前大脳動脈A2部を巻き込んでいた。しかしながら前交通動脈分岐以前の前大脳動脈A1部にネックが存在する例はなく、ネックの部位はいずれも血流に対して正のベクトルに存在した。動脈瘤の形成における血流によるストレスの関与が示唆された。

破裂脳嚢状動脈瘤例の中膜平滑筋の免疫組織学的検討

脳動脈瘤25例の組織標本から計測した瘤の大きさは1.1-12.1mm(平均 4.9 ± 2.6 mm)で、5mm以上の例は10例(40%)であった。

23例(92%)の瘤壁に抗 SMA 抗体陽性の平滑筋細胞が存在した。多くは紡錘型の収縮型平滑筋細胞であったが、そのうち11例では抗 SMA 抗体で星形に染色される合成型平滑筋細胞が確認された。この23例の瘤壁には同時に抗 S100A4 抗体陽性の合成型平滑筋細胞が存在した。しかし、抗 SMA 抗体染色と抗 S100A4 抗体染色の陽性部位は一致してい

なかった。22例(88%)で、瘤壁に局所的な抗 SMA 抗体陽性細胞の欠損部位を認めた。このうち 18 例では欠損部位の外膜側を中心に抗 CD68 抗体陽性のマクロファージの浸潤がみられた。マクロファージによる炎症性変化が瘤壁の菲薄化や破裂に関与する一方で、形成された瘤壁には合成型平滑筋による修復反応が認められ、両者のバランスが瘤の経過に影響を与えたと考えられた。

脳動脈瘤例・非脳動脈瘤例の中膜平滑筋の免疫組織学的検討

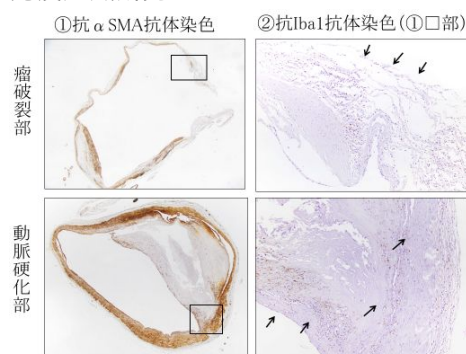
破裂脳動脈瘤・未破裂脳動脈瘤・非動脈瘤のいずれも、動脈瘤や動脈硬化性病変のない部位の血管壁の性状は共通しており、中膜には抗 SMA 抗体陽性の収縮型平滑筋が層状に規則的に配列していた。

動脈硬化性病変は、非動脈瘤 15 例中 13 例(87%)に認められた。血管壁には粥腫による内膜肥厚部を中心とした抗 Iba1 抗体陽性のマクロファージ浸潤がみられ、中膜平滑筋細胞の減少を認めた。動脈瘤 12 例の動脈硬化性病変は、破裂 2 例(17%)の瘤部、10 例(83%)の非瘤部に認められ、その性状は非動脈瘤例と同様であった。

動脈瘤壁では、基本構造である層状の中膜平滑筋細胞構造を欠くが、動脈瘤壁の肥厚部位を中心に合成型中膜平滑筋が存在しており、さらに収縮型に再分化した抗 SMA 抗体陽性細胞も観察された。

破裂瘤例では破裂部の外膜を中心としたマクロファージ浸潤が全例に認められた。未破裂瘤例では瘤の外膜にマクロファージが認められる例とそうでない例があり、出現程度は破裂例に比し軽度であった。抗 S100A4 抗体陽性の間葉系細胞の分布は、概ねマクロファージの存在部位に一致していた。

図 3. 破裂動脈瘤例の破裂部位・非破裂部位の免疫組織所見



結果から、動脈瘤例と非動脈瘤例に基礎的な血管構造の違いはなく、局所的な形態変化が生じて動脈瘤の発生に至ると考えられる。動脈瘤部にはマクロファージの浸潤が認められ、動脈硬化と同様に炎症性の血管壁障害が形成に関与していると考えられる。しかしながら炎症細胞浸潤の局在は動脈硬化部位と瘤部では異なっており、両者の発生は別の

病態と考えられた。動脈瘤の血管外膜における炎症反応が特に破裂例において特徴的に認められ、動脈瘤壁の脆弱化や破裂に関与していることが示唆された。

以上の結果から、嚢状動脈瘤例では中膜平滑筋細胞の性状と分布によって動脈瘤の成長経過の推察が可能とわかった。法医解剖例では臨床経過が不明なことが多いため、事例毎に経過が異なる動脈瘤症例の生前の病態把握に有用である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

RO Ayako, KAGEYAMA Norimasa, MUKAI Toshiji .Pathomorphological Examination of Patients with the Simultaneous Rupture of Dissecting Intracranial Vertebral and Intraperitoneal Arteries: Involvement of Segmental Arterial Mediolysis in Intracranial Artery Dissection. Journal of Neuroendovascular Therapy (EN) , 12(4) 161-168, 2018 (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

呂 彩子、景山則正．脳血管の免疫組織学的性状と動脈瘤との関係．第 43 回日本脳卒中学会総会、2018 年．

呂 彩子、景山則正．破裂・未破裂脳動脈瘤剖検例における血管壁の免疫組織学的観察．第 33 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会学術総会、2017 年．

呂 彩子、景山則正、千葉正悦、井川 亨、大出 透乃、福永龍繁、向井敏二．破裂脳動脈瘤における瘤壁構造の病理組織学的検討．第 101 次日本法医学会学術全国集会、2017 年．

呂 彩子、景山則正．脳底動脈嚢状脳動脈瘤の病理形態学的特徴．第 42 回日本脳卒中学会総会、2017 年．

呂 彩子、景山則正．椎骨動脈解離破裂によるクモ膜下出血に腹腔内動脈解離破裂が同時に認められた 4 剖検例：SAM との関連について．第 32 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会学術総会、2016 年

呂 彩子、景山則正．髄膜炎波及による感染性動脈瘤と考えられる脳底動脈破裂によるクモ膜下出血の 1 剖検例．第 41 回日本脳卒中学会総会、2016 年．

呂 彩子、景山則正．病理組織からみた前大脳・前交通動脈合流部の破裂嚢状動脈瘤における母動脈と瘤の形態的特徴．第 31 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会学術総会、2015 年．

6. 研究組織

(1) 研究代表者

呂 彩子 (RO, Ayako)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50296555