

平成 27 年 4 月 25 日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670345

研究課題名(和文)不整脈死の「可視化」：刺激伝導系の3次元画像解析・病理組織解析と遺伝子解析の融合

研究課題名(英文)To reveal "arrhythmia death" in forensic autopsy ; the collaboration between pathological investigations and gene analysis.

研究代表者

呂 彩子 (Ro, Ayako)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：50296555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：法医解剖123例の刺激伝導系心筋の病理形態解析の結果、水平法を用いた洞房結節の組織形態解析が有用であり、刺激伝導系心筋の密度は年齢と負の相関がみられた。房室結節の連続組織観察では心臓死、非心臓死例いずれも刺激伝導系心筋の病的所見が認められる例があり、所見の評価には慎重な判断が必要と考えられた。不整脈関連13遺伝子の全エクソン解析では、確認された4種の遺伝子変異がいずれも不整脈死例と非不整脈死例に認められたことから、確認された変異を直ちに不整脈死と関連づけるのは困難と考えられた。同時に実施した病理形態解析でも不整脈死を積極的に示唆する病理所見は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated serial histological sections of the cardiac conducting systems in 123 forensic autopsy cases. The sinus nodes observed in parallel with the conducting fibers revealed a negative correlation between the density of the conducting fibers and the patients' ages. The pathological lesions in the atrioventricular node were detected in 25% of the group of sudden death of unknown etiology and in 18% of the group of non-cardiac death. The whole exon analyses of 13 genes which were thought to be related to the diseases with fatal arrhythmia found that 4 gene mutations were detected among 7 cases. However the detected mutation were found both in the group of cardiac death and in the group of non-cardiac death.

These results indicated that both pathological investigations and gene analysis were not sufficient for confirming the diagnosis of fatal arrhythmia and that the measured judgments were required for the forensic diagnosis of the sudden death cases as arrhythmia death.

研究分野：法医病理学

キーワード：心臓刺激伝導系 突然死 法医病理学 遺伝子解析 致死性不整脈

1. 研究開始当初の背景

致死性不整脈は突然死の原因疾患のひとつとして法医学的に重要である。しかし剖検例において不整脈死を証明することは現代においても困難であり、原因や病態についても不明な点が多い。

不整脈の研究の代表的な手法に、病理形態学のアプローチと遺伝学的アプローチがある。病理組織解析の分野では、Lie JT (Circulation, 51:446-52,1975) や Nishida N(Int J Legal Med.116:334-9,2002)らが連続組織切片による刺激伝導系心筋の観察の重要性を報告している。遺伝子解析の分野では、致死性不整脈をきたす QT 延長症候群の原因遺伝子変異が報告され、本邦では共同研究者の水上(若手研究 B17790414)や Nishio H(Leg Med(Tokyo)S1:S119-20,2009)らが、突然死例における遺伝子変異の研究を行ってきた。

これらの研究分野で近年発展した検査手段に、病理形態解析では顕微鏡デジタルカメラ撮影と画像解析ソフトを用いた画像形態解析があり、遺伝子解析においては次世代シーケンサーの登場による不整脈関連遺伝子の網羅的解析がある。研究代表者は過去の循環器系突然死の病理形態学的研究の成果から、長さのある連続組織切片標本を用いた3次元画像解析法を確立した。これを刺激伝導系心筋の観察に応用すること、および共同研究者の水上の研究実績を踏まえ、病理形態解析と遺伝子解析を融合することで、致死性不整脈研究に関する新しい知見が得られると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題は、法医解剖例における不整脈の関与を病理形態解析、遺伝子解析の両面から検討し、不整脈性突然死の病態解明を試みることを目的とした。

また、研究の過程において刺激伝導系心筋の簡便かつ客観的な検索法および評価法を確立し、法医鑑定実務における応用を目指した。

3. 研究の方法

東京都監察医務院において実施された行政

解剖例 123 例(男性 88 名、女性 35 名、平均年齢 45.6 ± 22.5 歳)を対象とし、以下の病理組織解析および遺伝子解析を行った。また剖検記録より死因との病態の関連を考察した。

(1)病理形態解析

標本作製。剖検時に刺激伝導系心筋(洞房結節、房室結節から左右脚まで)を摘出しホルマリン固定後、伝導系心筋を一括包埋し、全域の $5 \mu\text{m}$ の連続組織切片を作製した。標本作製方向は、従来用いられる Lev 法に代表される伝導系心筋に垂直となる方向(垂直法)および近年有用性が提唱されている心筋の走向に沿った方向(水平法)のいずれかを用いた。標本はヘマトキシリンエオジン染色・エラスチカワンギーソン・アザン染色を行い、垂直法は 0.2mm 間隔、水平法は 0.1mm 間隔で観察した。

画像形態解析。アザン染色した標本を顕微鏡デジタルカメラで 1.25 倍で撮影し、以下の解析を行った。

洞房結節の観察。水平法によって得られた全標本のうち 1 枚のスライド上で洞房結節が最も広範囲に存在する画像を対象とし、画像解析ソフト ImageJ を用いて洞房結節の長さと幅を計測し実測値に換算した。次いで全標本における刺激伝導系心筋の出現枚数から洞房結節の厚みを算出して洞房結節全体の大きさを測定し、体積を算出した。さらに刺激伝導系心筋と間質のみの部位を抽出し、画像をチャンネル分解してグレースケール画像に変換し、単位あたりの刺激伝導系心筋の密度を測定した。

房室結節・His 束・左右脚部・房室結節動脈の観察。垂直法によって得られた全標本を観察し、房室結節から His 束、His 束から左右脚の分枝部位までの長さを出現枚数から算出した。

病理組織解析。各染色標本から刺激伝導系心筋の病理所見(線維化、脂肪化、走向異常)を観察し、症例の死因との関連を検討した。死因は、a 剖検によってもできない突然死(致死性不整脈・乳幼児突然死症候群など)、b 虚血性心疾患、c 上記以外の心疾患(心筋炎、心奇形等)、d その他の死因の 4 群に分類し、病

理所見の出現頻度を比較検討した。また房室結節動脈の走行、所見についても同時に観察した。

(2) 遺伝子解析

対象例のなかで遺族（代諾者）より研究の概要について承諾の得られた 7 例の遺伝子解析を行った。剖検時に採取し凍結保存した頸部リンパ節につき、DNA を抽出し、次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンスを行った。致死性不整脈疾患である QT 延長症候群や Brugada 症候群などとの関連が報告されている遺伝子 13 種類（CACNA1C、CACNB2、CASQ2、KCNE1、KCNE2、KCNE3、KCNH2、KCNJ2、KCNQ1、SCN1B、SCN3B、SCN5A、SCN7）の全エクソンを対象とし、TruSeq Custom Amplicon（illumina 社製）により、各検体のゲノム DNA のターゲット領域をハイブリダイゼーションし、PCR 増幅したものを Miseq（illumina 社製）によりオートメーションでシーケンスした。結果は、MiSeq Reporter Amplicon Viewer により解析を行った。

4. 研究成果

(1) 刺激伝導系心筋の病理形態解析法の検討結果

刺激伝導系心筋の病理組織検索法について垂直法 74 例、水平法 49 例を実施し、両法を法医学実務の観点から比較した。

まず標本作製時の技術的難度であるが、従来大きな包埋皿を自作するか複数ブロックに分け数百枚の標本作製が必要であった垂直法に比し、水平法を用いることで市販の包埋標本作製枚数を四分の一程度に減らす事が可能であった。

作製された標本から得られる情報の質に関しては、洞房結節では垂直法に比し水平法によって得られる情報が多かった。具体的には比較的長さのある洞房結節の全体像が 1 枚の切片で確認する事が可能となった。また、細長い伝導系心筋の形態変化が観察しやすくなった。このため、(2)に後述する加齢性変化による洞房結節の萎縮の定量的観察が水平法に

よって可能となった。

一方、房室結節においては、脂肪化などの病理所見の観察は水平法によっても過不足なく行えたものの、His 束から左右脚分枝までの連続性の確認については垂直法での観察が優れていた。

以上より、法医学実務における刺激伝導系心筋の病理形態検索には、明らかに不整脈が疑われる事例に関しては従来の垂直法による詳細な観察を検討する必要があるが、スクリーニングとしての検索もしくは技術上垂直法の実施が困難な施設では水平法による観察が簡便で有用な手段と考えられた。

(2) 水平法による洞房結節の画像解析結果

水平法により観察した洞房結節の大きさの平均は、長さ 15.4 ± 2.5 mm、幅 1.0 ± 0.4 mm、厚み 3.7 ± 1.2 mm、体積 55.8 ± 1.2 mm³であった。画像解析から得られた単位面積あたりの密度は平均 $46.2 \pm 13.9\%$ であった。上記の 5 因子につき、統計ソフト JMP11（SAS Institute）を用いて年齢との回帰分析を行ったところ、密度と年齢にのみ負の相関が認められた（ R^2 乗 = 0.3545、Spearman の順位相関係数 -0.6018 $p < 0.001$ ）。他の因子（長さ、幅、厚み、体積）に関しては、いずれも年齢との相関を認めなかった（ R^2 乗 < 0.1 ）。

従来より洞房結節では加齢変化によって刺激伝導系心筋細胞が萎縮し間質が増加することが指摘されていたが、垂直法では評価が困難であった。今回水平法の組織標本画像から洞房結節における刺激伝導系心筋の密度を簡便に解析する方法を確立し、洞房結節の加齢性変化の評価に有用であることがわかった。本測定法は、洞房結節が含まれる 1 枚の切片で測定可能で、必ずしも連続切片による観察を必要としないため、法医学実務に有用である。

(3) 垂直法による房室結節・His 束・左右脚部・房室結節動脈の病理形態解析結果

垂直法により観察した房室結節の長さの平均は、房室結節から His 束まで 4.1 ± 3.8 mm、His 束から右脚まで 3.2 ± 1.9 mm、His 束から左脚まで（His 束の全長） 10.9 ± 5.0 mm であった。刺激伝導系心筋の病理所見が 23%（17/74 例）

線維化 12 例、脂肪化 3 例、走行異常 2 例)に認められた。死因と病理所見の出現率との関係は、剖検によってもできない突然死群で 25% (3/12 例)、虚血性心疾患群で 45% (5/11 例)、上記以外の心疾患群で 15% (2/13 例)、その他の死因群で 18% (7/38 例)であった。

房室結節動脈に関しては、ほぼ全例が中心線維体走行部で平滑筋層が極端に消失し、中心線維体を通過した直後に内膜が高度に肥厚していた。このため、これらの変化は房室結節動脈の解剖学的な構造と考えられた。

以上の結果から、房室結節・His 束・左右脚部における刺激伝導系心筋の病理所見は不整脈死・非不整脈死で観察されるため、その所見のみをもって直ちに不整脈死と関連づけるのは困難と考えられた。また、病理所見は虚血性心疾患で最も多く認められたが、これは冠虚血に伴う線維化の影響と考えられた。房室結節動脈では、解剖学的に中心線維体通過直後に内膜が肥厚しているため、本所見が致死性の刺激伝導系心筋虚血を引き起こす可能性は低いと考えられた。

(4) 遺伝学解析と病理形態解析の結果

症例の背景

検討例は男性 6 名、女性 1 名。平均年齢は 20.2 ± 15.6 歳。死因は不整脈もしくは剖検後も原因疾患不明の突然死 3 例、不整脈に関係しない内因性疾患による突然死 4 例である。3 例に突然死の家族歴がみられた。1 例にブルガダ症候群の臨床診断があったほかは生前に不整脈を指摘されていた例はない。

遺伝子検索結果

・以下の 4 種の遺伝子変異が同定された。

ブルガダ症候群に関連するナトリウムチャンネル 1 サブユニット SCN1B 遺伝子の L210P 変異、ヘテロ 2 例。

QT 延長症候群 LQT 1 型に関連するカリウムチャンネル サブユニットの KCNQ1 遺伝子における A511T 変異、ヘテロ 3 例。

QT 延長症候群 LQT 3 型およびブルガダ症候群に関連するナトリウム・チャンネル サブユニットの SCN5A 遺伝子における H558R 変異、ヘテロ 2 例。

QT 延長症候群 LQT5 型に関連するカリウ

ムチャンネル サブユニットの KCNE1 遺伝子における S38G 変異、ホモ 5 例 ヘテロ 1 例。

・検討例全例に 1 つ以上の遺伝子変異が認められた。

・特に KCNE1 遺伝子 S38G 変異は 6 例 (86%) に認められ、うちホモが 5 例と死因に拘わらず高頻度に認められた。

・4 種の遺伝子変異はいずれも非不整脈死例にも認められ、突然死または不整脈死に特異的な遺伝子変異は認められなかった。

病理組織解析の結果との比較

・洞房結節には、全体の大きさ、密度などの形態変化、および脂肪化や線維化などの病理所見を認めなかった。

・房室結節・His 束・左右脚部では、非不整脈死 1 例に伝導系心筋の線維化、不整脈死 1 例に走向異常 (左右脚の分枝の不明瞭) が認められたが、病的異常と断定するには至らなかった。

(5) まとめ

以上の検討結果より、法医解剖例の刺激伝導系心筋の病理形態解析は水平法を用いることで鑑別かつ詳細な検討が可能とわかった。同法は特に洞房結節の形態観察および刺激伝導系心筋密度の画像解析に有用であった。房室結節の刺激伝導系心筋密度と年齢には負の相関がみられた。

房室結節・His 束・左右脚部・房室結節動脈に関しては、走向異常などの立体的な異常の評価には従来同様の垂直法が有用であった。しかし全域の連続切片を観察したところ、非心臓死例においても線維化や脂肪化などの病的所見が認められる例があり、所見の評価には慎重な判断が必要と考えられた。特に、従来不整脈の誘引のひとつと考えられていた房室結節動脈の内膜肥厚は、中心線維体を通過部で対象全例に認められ、解剖学的構造と考えられた。

不整脈関連遺伝子に関しては、確認された遺伝子変異 4 種がいずれも非不整脈死例にも認められたこと、突然死または不整脈死に特異的な遺伝子変異は認められなかったことなどから、検索した遺伝子異常を直ちに不整脈死と関連づけるのは困難と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

呂 彩子、景山則正、水上 創、朝倉久美子、森 晋二郎、福永龍繁。刺激伝導系心筋の走向に沿った組織標本による観察法。法医病理 21 卷 1 号 2015 (印刷中)

〔学会発表〕(計1件)

呂 彩子、景山則正、福永龍繁。伝導系心筋の走向に沿った連続組織観察。第 97 次日本法医学会学術全国集会。2013 年 6 月 26 日～6 月 28 日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

呂 彩子 (Ro Ayako)
東京女子医科大学・医学部 講師
研究者番号：50296555

(2)研究分担者

水上 創 (Mizukami Hajime)
東京医科大学・医学部 准教授
研究者番号：50384938