

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460887

研究課題名(和文) 動脈石灰化の形態学的分類と遺伝子多型との関連性について

研究課題名(英文) Relation of the morphologic classification and genetic polymorphism of the arterial calcification

研究代表者

佐藤 文子 (Satoh, Fumiko)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70328128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：動脈石灰化の組織学的分類法の確立を試みた。法医解剖で得られた大動脈の石灰化の強い部分について標本作製し、1)びまん性石灰化、2)微細石灰化、3)内膜のびまん性石灰化、4)石灰化部位が骨化もしくは骨髄形成に大別した。急性動脈解離例の内膜亀裂部位の組織所見と、コントロール例の大動脈組織所見を比較検討した。両者についてCystic medial necrosis、Elastin fragmentation、Fibrosis、Medionecrosisについて半定量化した。大動脈解離の発症に、進行した粥状硬化症による中膜の脆弱性との関連性は否定できないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We tried to establish a histologic method of arterial calcification. We produced a specimen for a strong part of aortic calcification obtained through forensic autopsy and classified areas roughly as 1) diffuse calcification, 2) tininess calcification, 3) diffuse calcification of endosporium, or 4) ossification or myelogenesis. We examined the histology of the intimal tear site of the acute aortic dissection case and the aorta histology of the control case. For both, we semiquantified on cystic medial necrosis, elastin fragmentation, fibrosis, and medionecrosis. Results show that advanced atherosclerosis and weakness of media by calcification have an undeniable relation to the onset of aortic dissection and aortic aneurysms.

研究分野：法医病理学

キーワード：動脈石灰化 粥状硬化症 急性大動脈解離 大動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

法医学領域で取り扱う異状死体の約60-70%は内因性急死であり、その約半数は心臓性突然死で、虚血性心疾患、大動脈解離や大動脈瘤など循環器系疾患に起因している。ヒト動脈硬化は、内膜の肥厚性病変、粥状硬化症であるが、動脈の石灰化も重大な病的変化である。血管石灰化は老化に伴う病態の一つであり、以前から動脈硬化の末期に起こる動脈壁の変性・壊死過程と理解されてきた。主な血管石灰化病変として、動脈硬化(アテローム硬化)による新生内膜のプラークに起こる石灰化(動脈硬化性石灰化)と加齢、糖尿病および慢性腎不全(透析を含む)に伴う中膜の石灰化(メルケベルグ型中膜石灰化)が知られている^{1)~3)}。

血管の石灰化は、細胞を介して調節されている。以前は加齢による細胞破壊の終末像として、石灰化は防ぎようのない現象と考えられてきた。しかし、現在では、血管壁でも石灰化は発生学的な、骨形成と類似した機序で起こることが明らかになっている。血管の石灰化過程では、血管壁の内部でいくつかのプロセスが同時に進行している。血管石灰化の過程で、沈積する無機物はヒドロキシアパタイトである。血管壁ではすでに基質小胞が同定されており、血管壁内に骨が形成されていることから細胞を骨形成に関与させるシグナルが存在すると考えられる。

動脈石灰化は、虚血性心疾患のリスクが増大する病態である。腎臓内科、循環器系内科からの関心が高く、研究もこれらの分野からのものが多い。特に、冠状動脈についての動脈石灰化の研究は循環器内科領域で研究が進んでいる。これらの研究は、臨床生化学検査などによる評価が中心で、形態学的にもエコーや電子コンピューター断層撮影(EBCT)など非観血的検査法により、石灰化の進行状態による測定が主流となっている。病理組織学的観点や、実際の血管の石灰化組織を構成成分から直接評価する研究は少ない。

動脈硬化症の組織学的分類はAHA分類が存在するが、石灰化についての分類はないことから、新たな評価法の作成を試みたい。

対象とするのは、剖検例で採取した大動脈であり、我々が確立した評価法に基づき分類し、年齢を調整した上で動脈石灰化群と非石灰化群に分ける。これらの血液などより抽出したDNAにつき、次世代シーケンサーを用いてゲノムワイドなSNP解析を行い、二群間で有意の相違を認めるSNP座位を検索していくことを計画していた。しかし、諸事情により、次世代シーケンサーによるSNP解析は行わず、病理学的手法を用いて、血管の石灰化と大動脈解離及び大動脈瘤との関係性について調べることとした。

2. 研究の目的

第一に動脈石灰化の病理組織学的評価法を確立すること目的とした。第二に、動脈の

疾患の中で、急性大動脈解離で死亡した剖検例を収集し、急性大動脈解離と動脈石灰化との関係性について調査を行った。

3. 研究の方法

(1)動脈石灰化の病理組織学的評価法の確立

2007~2013年の6年間で、東海大学医学部基盤診療学系法医学で実施した司法解剖および承諾解剖例の中で、動脈硬化性変化を有する大動脈を検体とした。糖尿病、高血圧等の病歴および心肥大も併せて参考にした。大動脈を写真撮影の後、10%ホルムアルデヒド水様液にて固定、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、AHA分類に従い動脈硬化を分類した。少なくとも4か所の切り出しを行い、キレート剤にて脱灰処理後、パラフィン包埋した。薄切切片に対し、H&E染色、EVG染色、コッサ染色の特殊染色を行った。死後経過時間の短い一部の症例については、抗MGP、抗AHSG、抗MMP-1、抗MMP-3、抗MMP-9抗体を一次抗体に用いて、間接法にて免疫組織化学検討を行った。

(2)大動脈解離と動脈石灰化との関連性について

1994年から2016年までの21年間で、東海大学医学部法医学および北里大学医学部法医学で施行した法医解剖例の中で、大動脈解離と診断された症例を対象とし、動脈石灰化と動脈解離との関係性を調査した。大動脈解離例の性別、年齢、既往歴、病型、直接死因、心臓重量、内膜亀裂の長さ、石灰化の有無について調べた。対象は剖検報告書、臓器撮影写真、病理組織標本を用いた。

調査した大動脈解離例の中で、内膜亀裂部の標本が保存されている例のパラフィンブロックを対象とした。コントロール例として、東海大学医学部法医学および北里大学医学部法医学で2012年から2016年までの3年半の期間に施行した法医解剖例の中で、死後経過時間の短い例を対象とし、動脈硬化の最も強い部位(主に腹部大動脈)のパラフィン切片とした。各のブロックを再薄切し、HE、EVG、Alcian blue染色を行い、Cystic medial necrosis, Elastin fragmentation, Fibrosis, Medionecrosisについて半定量し、Grade1-3に分類した。統計学的有無について、 χ^2 検定を行った⁴⁾。

4. 研究成果

(1)動脈石灰化の病理組織学的評価法の確立

①マクロ所見について

対象症例182例中、AHA動脈硬化組織分類(表1)では、全く動脈硬化の見られない例(0型)7例、早期病変(I型)は3例、II型は13例、移行病変(III型)は2例、進行病変(IV型)は27例、V型では、進展したアテローム病変に相当するType Va病変は2例、

石灰化を伴う Type Vab は 111 例、Vb 型は 37 例、脂質コアがなく、線維性結合織を主とするものを伴う Type Vabc を 1 例認めた。VI 型では表面に潰瘍を伴う Type VIa が 6 例、出血または血腫形成を伴う VIb 型が 7 例、両者を伴う Type VIab 8 例、潰瘍及び血腫形成・血栓形成を伴う VIabc 型は 4 例であった。年代は、10 歳代 1 例、20 歳代 4 例、30 歳代 6 例、40 歳代 19 例、50 歳代 38 例、60 歳代 50 例、70 歳代 36 例、80 歳代 21 例、90 歳代 7 例で、特に、60 才以上では、90%に石灰化を伴う Vb 型以上の粥状硬化症を認めた。高血圧症を有する全例（平均 73.5 歳）は Vab、Vb、VIab、VIb、VIabc 型であった。糖尿病を有する全例（平均 68.0 歳）が、Vb、VIa、VIab、VIabc 型であった。腎不全の既往歴を有する例（平均 72.8 歳）は、Vb、VIabc と最も高度な石灰化を認めた。（図 1A, B）

図 1A, B 大動脈マクロ像



A. 48 歳、女性、IV型、塊状の脂質コア形成。

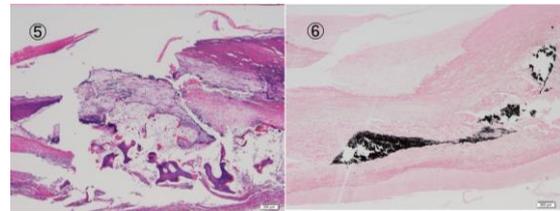
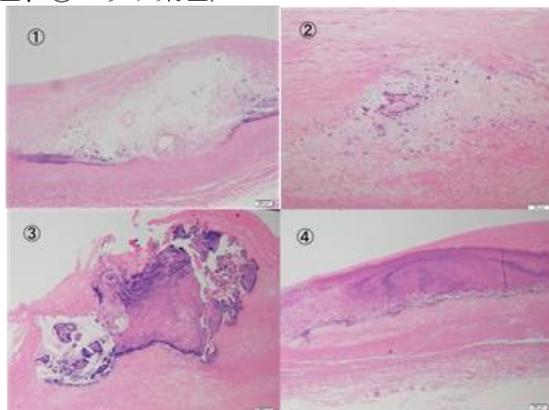


B. 77 歳、男性、VIabc 型、慢性腎不全、表層の亀裂、潰瘍形成

②組織所見について

組織所見上、大動脈の石灰化の所見は、大きく分けて 1) 粥腫内に見られるびまん性石灰化、2) 粥腫内に見られる微細石灰化、3) 粥腫を欠き、内膜にびまん性に石灰化がみられたもの、4) 石灰化部分が骨化もしくは骨髄形成が見られた物に大別された。（図 2①-④）

図 2 代表的な大動脈ミクロ像（①-⑤HE 染色、⑥コッサ染色）



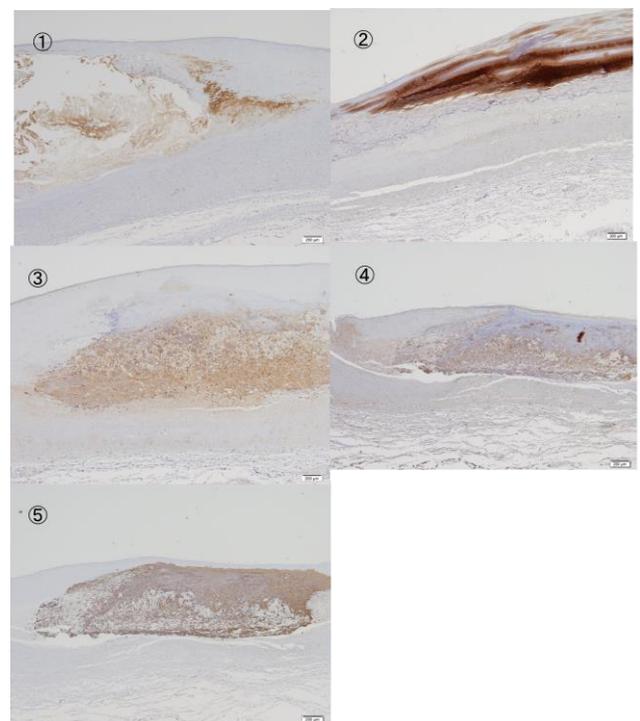
- ①粥腫にびまん性石灰化。
- ②粥腫内に見られる微細石灰化。
- ③潰瘍形成を認める石灰化。
- ④粥腫を認めない内膜石灰化。
- ⑤骨梁形成、骨髄形成。
- ⑥石灰化部位が黒色に染色される。

149 例に粥腫形成を認め、粥腫にびまん性石灰化を伴うものが 124 例、微細石灰化を伴うものが 37 例、83 例、45%に中膜の断裂を認めた。一方で、粥腫を欠いても内膜に広範な石灰化を認めたものが 24 例、骨化及び骨髄形成を認めるものが 8 例認められた。

③免疫組織化学的検討について

182 例のうち 79 例について、免疫組織化学的検討を行った。陽性率は石灰化部分では、MMP-1 22 例 (27.8%)、MMP-3 13 例 (16.4%)、MMP-9 26 例 (32.9%) であり、粥腫内では、MMP-1 41 例 (51.9%)、MMP-3 14 例 (17.7%)、MMP-9 46 例 (58.2%) 陽性であった。AHSG 64 例 (81.0%)、MGP 67 例 (84.8%) 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。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 とも陰性であった。（図 3）

図 3. 大動脈に対する免疫組織化学



①抗 MMP-1 抗体：石灰化の一部と粥腫に陽

- 性。②抗 MMP-3 抗体：石灰化部分に陽性。
- ③抗 MMP-9:石灰化の一部と粥腫に陽性。
- ④抗 MGP 抗体：石灰化の一部に陽性。
- ⑤抗 AHSg 抗体：石灰化部分に陽性。

免疫組織化学では、MMPs (matrix metalloproteinases) 染色で、①粥腫内のびまん性石灰化、③潰瘍形成を伴う石灰化、④粥腫形成を認めない内膜石灰化に 10-30%程度陽性像を認めた。細胞外マトリックス 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いるが、今回は石灰化パターンと陽性率に大きな相違を認めなかった。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。今回の検討でも、粥腫部分で比較的高い陽性率を示した。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。臨床的に、MGP は血管石灰化および動脈硬化と深く関係しており、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 は石灰化病変の 84.8%に陽性像を認め、粥腫病変には 100%陽性を認めた。AHSg は、MGP と同様に、石灰化抑制作用を持つ血清タンパクで、臨床的に AHSg の血清濃度が透析患者で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。今回は AHSg は石灰化病変の 81.0%に陽性像を認め、粥腫病変には 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Ⅳ型とⅥ型に、様々な石灰化変化が観察され、動脈硬化の評価と石灰化は必ずしも一致しないと結論付けられる。石灰化の検出法として、特殊染色や免疫組織化学などいくつか検討してみたが、どれが適当な方法なのか、決めかねる結果であった。

(2) 大動脈解離と動脈石灰化との関連性について

東海大学医学部法医学では、平成 6 年から 26 年の 20 年間で、6231 例の法医学解剖が施行された。その中で大動脈解離が原因で死亡した症例が 57 例存在した (年間平均 3 例、0.9%)。男性 44 例、女性 13 例、男女比は 3:1、平均年齢は 61.3±14.0 歳であった。全例が急性大動脈解離で、慢性大動脈解離の再破裂例が 1 例存在した。40 歳以下の症例が 4 例存在、1 例に大動脈二尖弁、2 例に Marfan 症候群を疑う所見 (高身長、くも様指趾など) が認められた。

①病歴について

病歴が明らかであった症例は 36 例であり、最も頻度の高い病歴は高血圧症 (36.8%)

であった。高血圧の治療を受けていたのは 22 例中 12 例 (54.5%) であった。その他の既往歴については表 1 に示す。

表 1 既往歴について

| 既往歴 | 症例数 |
|---------|-----|
| 高血圧 | 22 |
| その他の心疾患 | 4 |
| 胃潰瘍 | 4 |
| 狭心症 | 3 |
| 脳出血 | 3 |
| 脳梗塞 | 2 |
| 大動脈解離術後 | 2 |
| 慢性腎不全 | 2 |
| 脂質異常症 | 2 |
| 悪性腫瘍 | 2 |
| 糖尿病 | 2 |
| 心筋梗塞 | 1 |
| その他の疾患 | 5 |

②DeBakey 分類による病型、死因について

DeBakey 分類による病型では、I 型 35 例 (61.4%)、II 型 15 例 (26.3%)、IIIa 型 1 例 (1.7%)、IIIb 型 3 例 (5.3%)、Ⅲ逆行型 3 例 (5.3%) であった。

死因は心タンポナーデ 49 例 (85.9%)、胸腔内出血 6 例 (10.5%)、急性大動脈解離 (未破裂) 1 例 (1.8%)、急性心筋虚血 1 例 (1.8%) であった。

③心臓重量について

大動脈解離例 57 例の心臓重量の平均値 459 ± 121g であり、39 例に心肥大を認めた (68.4%)。

④内膜亀裂について

大動脈解離例 57 例の内膜亀裂 (Intimal tear) の長さの平均値は 3.1 ± 1.9cm であった。リエントリーが存在した例は 57 例中 6 例 (10.5%) であり、左総腸骨動脈 3 例、総腸骨動脈 1 例、腕頭動脈 2 例存在した。

⑤動脈硬化症との関係性について

内膜亀裂が存在する部位の動脈硬化症による石灰化の有無を調査したところ、内膜亀裂部位に石灰化が見られた例は 4 例であり、内膜亀裂が存在する部位の動脈硬化の進行程度 AHA 分類にて分類した (表 2)。

表 2. 内膜亀裂部の AHA 分類

| AHA 分類 | 症例数 | 割合 (%) |
|----------|-----|--------|
| I 型 | 1 | 1.7 |
| II 型 | 5 | 8.8 |
| III 型 | 22 | 38.6 |
| IV 型 | 7 | 12.3 |
| V ab 型 | 15 | 26.3 |
| VI abc 型 | 3 | 5.2 |
| 不明 | 4 | 7.0 |

⑥急性大動脈解離の組織学的特徴

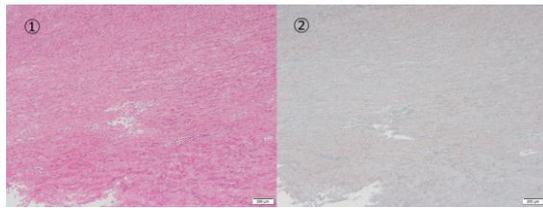
急性大動脈解離例で組織ブロックが作成してある症例 14 例を対象とした。HE、EVG、Alcian blue 染色標本を鏡検し、Cystic medial necrosis, Elastin fragmentation, Fibrosis, Medionecrosis について半定量し、Grade1~3 に分類した。

表 3. 急性大動脈解離例の組織学的変化

| | Grade 1 | Grade 2 | Grade 3 | Total |
|------------------------|---------|---------|---------|-------|
| Cystic medial necrosis | 7 | 5 | 2 | 14 |
| Elastin fragmentation | 1 | 10 | 3 | 14 |
| Fibrosis | 6 | 5 | 3 | 14 |
| Medionecrosis | 8 | 6 | 0 | 14 |

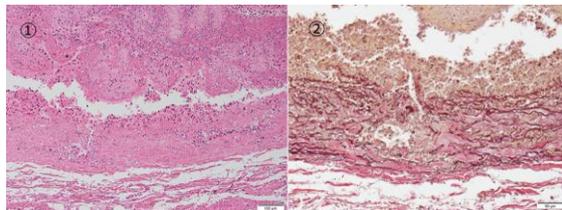
図 4. 大動脈解離の組織像

A. Cystic medial necrosis



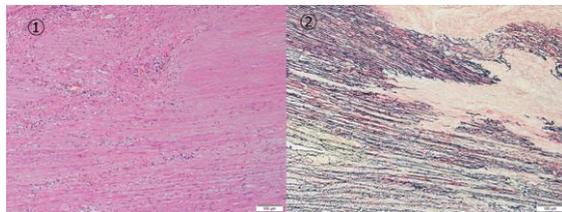
①HE 染色：中膜内に嚢胞状の壊死を認める。
②アルシアンブルー染色：嚢胞壊死部に陽性像を認める。

B. Elastin fragmentation の組織像



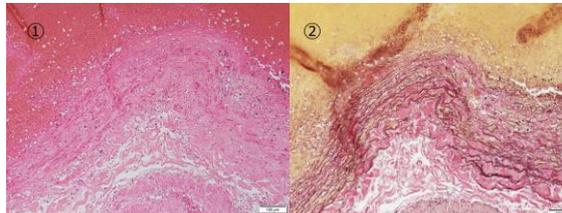
①HE 染色②EVG 染色：中膜の断裂像、解離した中膜にエラスチンの断裂像を認める。

C. Fibrosis



①HE 染色：中膜に高度の線維化と軽度の慢性炎症細胞浸潤を認める。
②EVG 染色：一部弾性線維が膠原線維に置換される。

D. Medionecrosis



①HE 染色：Medionecrosis では、中膜の壊死

と周囲に炎症細胞浸潤を認める。
②EVG 染色：壊死部付近の弾性線維が断裂する。

コントロール例は 22 例で、20-92 歳までの各年代より症例を無作為に選択した。

10 歳代：1 例、20 歳代：2 例、30 歳代：3 例、40 歳代：2 例、50 歳代：2 例、60 歳代：1 例、70 歳代：4 例、80 歳代：2 例、90 歳代：2 例であった。

コントロール例の動脈硬化の最も進行している部位（主に腹部大動脈）の組織学的変化を年代別に表に分類した。

表 4. コントロール例の組織学的変化

| 年齢 | Grade 1 | Grade 2 | Grade 3 | Total |
|-------------------------------|-----------|----------|----------|-----------|
| Cystic medial necrosis | | | | |
| 0-20 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 21-40 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| 41-60 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| 61-80 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| 81-100 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| Total | 22 | 0 | 0 | 22 |
| Elastin fragmentation | | | | |
| 0-20 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 21-40 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| 41-60 | 3 | 2 | 0 | 5 |
| 61-80 | 2 | 3 | 1 | 6 |
| 81-100 | 0 | 8 | 1 | 4 |
| Total | 12 | 8 | 2 | 22 |
| Fibrosis | | | | |
| 0-20 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 21-40 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| 41-60 | 3 | 2 | 0 | 5 |
| 61-80 | 2 | 4 | 0 | 6 |
| 81-100 | 2 | 1 | 1 | 4 |
| Total | 14 | 7 | 1 | 22 |
| Medionecrosis | | | | |
| 0-20 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 21-40 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| 41-60 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| 61-80 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| 81-100 | 2 | 2 | 0 | 4 |
| Total | 20 | 2 | 0 | 22 |

大動脈解離例において、Medial cystic necrosis が Grade 2 以上であった事例は 7 例 (50%) で、コントロール例と比較して優位 ($p < 0.01$) に発現が見られた。大動脈解離例において、Elastin fragmentation が Grade 2 以上であった事例は 13 例 (92%) 認められ、コントロール例と比較して優位 ($p < 0.05$) に発現が見られた。大動脈解離例において、

Fibrosis が Grade2 以上であった事例は、6 例 (43%) に認められ、コントロールの高齢者の動脈に 8 例認められた。統計学的有意差は認めなかった。大動脈解離例で Medionecrosis が Grade2 以上が 6 例 (42.9%) 確認され、コントロール例の高齢者の動脈硬化の高度な事例に 2 例認められた。有意差は認められなかった。

大動脈解離例では、非解離例の動脈と比較して有意差を持って、Cystic medial necrosis と Elastic fragmentation が認められた。これは、発症時に中膜が解離した際に二次的に発生したと予想された。

コントロール例では、40 歳代以上の症例で、Elastin fragmentation を半数程度に認めた。大動脈解離の発症に、進行した粥状硬化症による中膜の脆弱性との関連性は否定できないと考えられた。

参考文献

1. Goodman WG, London G, Amann K, et. al. Vascular calcification in chronic kidney disease. Am J Kidney Dis 43:571-549, 2004.
2. 塩井淳. 血管石灰化とその調節機構. Clin Calcium 12:1059-1066, 2002.
3. Budisavljevic MN, Cheek D, Ploth DW. Calciphylaxis in chronic renal failure. J Am Soc Nephrol. 7:978-982, 1996.
4. Bode-Janisch S, Schmidt A, Gunther D, Stuhmann M, Fieguth A. Aortic dissecting aneurysm-Histopathological finding. Forensic Science International 214, 13-17:2012.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

①佐藤文子、入江渉、中丸尚美、阪本桃子、村上千香子、佐々木千寿子、大澤資樹、急性大動脈解離の組織学的所見について-粥状硬化症との比較-、第 106 回日本病理学会総会、2017 年 4 月 27 日～4 月 29 日、京王プラザホテル (東京都新宿区)。

②佐藤文子、瀬戸良久、坪井秋男、松島裕、落合恵理子、垣本由布、大澤資樹、法医解剖

例における大動脈瘤破裂例について、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 12 日～5 月 15 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)。

③佐藤文子、瀬戸良久、坪井秋男、松島裕、落合恵理子、宮下京子、垣本由布、大澤資樹、急性大動脈解離により交通事故が発生し外傷性大動脈損傷で死亡した一剖検例、2015 年 10 月 24 日、第 48 回日本法医学会学術関東地方会、日本歯科大学生命歯学部 (東京都千代田区)。

④佐藤文子、瀬戸良久、坪井秋男、松島裕、落合恵理子、垣本由布、大澤資樹、大動脈解離剖検例の検討、2015 年 4 月 30 日～5 月 2 日、第 104 回日本病理学会総会名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 文子 (SATO, Fumiko)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70328128