

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15405

研究課題名（和文）ヒト頭部外傷事例における脳弓下器官損傷の病理組織学的検討

研究課題名（英文）Histopathological analysis of subfornical organ in the human brains following traumatic head injury

研究代表者

原田 一樹（Harada, Kazuki）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・法医学・准教授

研究者番号：00253146

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の主な目的は、法医解剖中の頭部外傷事例のヒト剖検脳を用いて、電解質コントロールに関して重要な役割を担っている脳弓下器官の形態学的変化を、病理組織学的に検討することである。期間中に必要な事例数を集積することはできなかったが、ルーチン染色標本から得られた正常組織所見は、神経病理学及び神経解剖学領域に有益な情報を提供することができる。また、複数の頭部外傷事例で脳弓下器官に微小出血が認められたことは、頭部への回転加速衝撃に対する脳弓下器官の脆弱性を示唆する所見である。今後も本実験を継続して行く予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳弓下器官は、大きさわずか1ミリの脳の微小器官であり、電解質コントロールに関して重要な役割を担っていると考えられている。通常、頭部外傷事例を解剖する機会を持つのは、（病理医ではなく）法医病理医である。したがって、法医解剖からのみ得られるヒト頭部外傷の剖検例を用いて脳弓下器官の解析を行う研究には前例がなく独創的であり、大きな学術的意義を持つ。

得られた結果は、頭部外傷患者の電解質コントロールのために有益となり得るため、法医病理学領域のみならず、臨床医学への貢献も期待できる。また、現時点で乏しい脳弓下器官の正常組織学データに有益な情報を提供することも期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to histopathologically analyze the morphological changes of subfornical organ, which plays an important role in the control of electrolyte balance, in the human brains following traumatic head injury. Although the required cases of head injury could not be accumulated during the study period, the normal histological findings would be useful in the field of neuropathology and neuroanatomy. In addition, minute hemorrhages in the subfornical organs following traumatic head injury suggest the vulnerability of subfornical organ following rotational impact to the head. This research of great interest will be proceeded with.

研究分野：法医神経病理

キーワード：頭部外傷 法医神経病理 神経病理 脳弓下器官

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

電解質異常は頭部外傷後に生じる主要な合併症の一つであり、不整脈を惹起したり脳浮腫を増強したりすることによって患者の致死率や予後を大きく左右することが知られている。したがって、電解質異常を速やかに補正することは頭部外傷患者の重要な治療方針の一つである。

頭部外傷後に出現する電解質異常の原因としては、下垂体後葉の損傷によって生じる抗利尿ホルモンであるバソプレッシンの分泌異常やカテコラミンの上昇による Na-K ポンプの刺激が知られている。また、頭蓋内圧亢進や脳浮腫を軽減するための浸透圧利尿薬投与によって電解質異常が医原性に引き起こされることもある。しかし、頭部外傷後の多彩な電解質異常パターンのすべてが、これらの機序で説明可能な訳ではない。

脳室周囲器官は、血液脳関門を欠く有容性毛細血管及び特殊な上皮細胞を有し、「脳の窓」とも呼ばれる特殊な神経組織群である。その組織群の一つである脳弓下器官は、第三脳室前壁に位置するわずか1mm大の微小な構造であるにも関わらず、飲水行動、バソプレッシン分泌などを介して体液恒常性を制御する重要な中枢である。したがって、この微小構造が頭部外傷によって損傷を受けた場合には電解質異常が引き起こされると思われる。また、脳弓は脳梁と同様に左右の大脳半球を繋ぐ構造であるが、脳梁が頭部外傷時の脳の回転加速・減速によって剪断力を受けやすい部位であることを考えると、脳弓及び脳弓下器官も剪断力を受けやすい部分であることが予想される。

このように、脳弓下器官は特殊な構造を持つ重要な器官であるにも関わらず、大脳深部に位置する微小な器官であることもあって、頭部外傷などの侵襲時の変化に関して現在まで検討されて来なかった。結果として、現時点でヒト剖検脳を用いて脳弓下器官の正常構造を検討した報告は少なく、年齢別の構造の違いを検討した報告はない。本研究では、ヒトの頭部外傷事例において、電解質の制御中枢である脳弓下器官の損傷を、損傷の経時的変化(修復過程)を含めて病理組織学的に解析する。このような研究は、ヒト剖検脳を用いたもののみならずヒト以外の動物を用いたものを含め皆無であり、この点において本実験は斬新であり、大きなチャレンジ性を有している。さらに、通常、頭部外傷事例を解剖する機会を持つのは、(病理医ではなく)法医病理医であるため、本研究は法医学分野からしか発信し得ない研究である。

### 2. 研究の目的

本研究では、前述の背景を踏まえ、頭部外傷事例及びコントロール事例(age-matched controls)の剖検脳において、光学顕微鏡的(免疫組織科学的手法を含む)を用いて以下を明らかにする。

(1)ヘマトキシリン・エオジン(HE)やクリューバ・バレラ(KB)などのルーチン染色及び免疫組織化学染色によって、コントロール事例の脳弓下器官の構造の詳細な観察を行う。個人差や年齢別の構造の違いについても検討する。

(2)ルーチン染色及び免疫組織化学染色によって、頭部外傷事例における脳弓下器官の形態学的変化及び受傷後の経時的変化(修復過程)を検討する。

(3)脳弓下器官損傷の程度や性質と頭部外傷の強度やタイプとの関連について検討し、考察する。

得られた結果から、様々な頭部外傷と脳弓下器官の病理組織学的変化との関連性を検討し、頭部外傷患者の電解質コントロールのために有益となり得る情報を、法医学領域より提供することを旨とする。

本研究が成功した場合にヒト脳から得られる情報は、法医学分野のみならず、神経病理分野にとっても有益である。また、脳神経外科などの臨床分野における頭部外傷患者の重要な治療目的の一つである“電解質コントロール”に関して有益な情報を提供することができる。結果として、「死者から得た情報を生きた人に還元する」という法医学の重要な目的の一つを実践することができる。

### 3. 研究の方法

#### (1)対象事例の集積、標本の切り出し・包埋

頭部外傷事例(年間20~30症例と予想)は、硬膜外・硬膜下血腫、クモ膜下出血、脳挫傷、びまん性軸索損傷を含む。コントロール事例としては内因性突然死(脳出血や脳梗塞などの中枢神経系の疾患により死亡した場合を除く)や縊死(遷延性に死亡した事例を除く)を選択する。中枢神経系疾患や頭部外傷の既往を有する事例は除外する。脳弓下器官はわずか1mmの微小構造である。したがって通常の病理業務で用いられるスタンダードな組織カセットを用いて、脳弓下器官を標的として組織切り出しを行った場合、標的部分を逃してしまう可能性も考えられる。そこ

で、本研究では厚さ8~9mmの試料に用いられる組織カセット(ティッシュ・テック ユニ・カセット メガタイプ)を用いて、脳弓下器官を左右の視床下部を含めて厚めのブロックで切り出して包埋する。頭部外傷後の電解質異常に寄与する可能性がある下垂体も包埋して組織スライドを作製する。

#### (2) 脳弓下器官の連続組織切片作製

脳弓下器官及び左右の視床下部を包埋したメガタイプの組織カセットを用いて厚さ5 $\mu$ mの連続切片を作製する。微小な脳弓下器官を取りこぼさないようにするために最初は多めに組織スライドを作製するが、研究が進行して脳弓下器官の位置がより明確に把握できれば、作業効率を上げるために連続切片スライドの作製数を減らすことを検討する。

#### (3) ルーチン染色(HE染色、KB染色、ゴルジ染色、EVG染色など)

(2)で作製された組織切片から、HE染色・KB染色・ゴルジ染色標本を作製する。また、血管に富む脳弓下器官の脈管構造の損傷の検討のために、エラスチカ・ヴァン・ギーソン(EVG)染色標本を作製する。

#### (4) 免疫組織化学染色

使用予定の主な1次抗体(カッコ内は抗体の持つ意義)

- ・GFAP(グリア細胞マーカーであるが上衣細胞でも陽性になる)
- ・Cytokeratin(上衣細胞を含む上皮系細胞のマーカー)
- ・Vimentin(間葉系細胞のマーカー)
- ・Ki-67(細胞増殖マーカー)
- ・NeuN(成熟ニューロンのマーカー)
- ・Aquaporin(水輸送に関連した膜蛋白で、上衣細胞に豊富に存在する)
- ・CD31もしくはCD34(血管内皮細胞のマーカー)

#### 免疫染色(酵素抗体法)

脱パラ及び抗原賦活化した切片を前記の1次抗体、及び適切な動物種を用いて作成された2次抗体と反応させた後、ABC試薬(Vectastain $\&$ ABC Kit、Vector Laboratories社製)及びDAB(3,3'-ジアミノベンジジン)を使用して発色させる。

#### 画像解析

染色像には、画像解析ソフトウェアHistoQuant(株式会社マイクロ・エッチ・インストルメント製)を用いて、染色強度、陽性細胞数などに関して解析を行う。

#### (5) まとめ

以上の実験結果を総合的に検討して、頭部外傷事例及びコントロール事例の脳弓下器官の形態学的変化を観察し、損傷の程度・特徴と頭部外傷の強度やタイプとの関連、損傷後の修復過程の経時的変化について解析、考察する。

## 4. 研究成果

前述のように、本研究の主な目的は、法医解剖中の頭部外傷事例(及び対象事例)のヒト剖検脳を用いて、電解質コントロールに関して重要な役割を担っていると考えられている脳弓下器官の形態学的変化などを、病理組織学的に検討することである。さらに研究で得られた結果から、頭部外傷患者の電解質コントロールのために有益となり得る情報を法医学領域より提供することを目指した。

本研究遂行のために重要なプロセスは、解析に必要な数の頭部外傷事例、及び対象事例の集積であったが、補助事業期間において頭部外傷事例の解剖数が予想より少なく、2017年(平成29年)には諸事情によって約4ヶ月間解剖室が使用できなくなり、その間司法機関からの解剖依頼を断らざるを得なかったことも予定解剖数の減少に影響した。また、いくつかの事例は、死後変化が進行していたために本研究から外さざるを得なかった。以上より、補助事業期間中に、統計的検討に必要な事例数を集積することはできず、期間終了時には、ルーチン染色標本を用いた形態学的変化の検討を行うに留まった。なお、大きさを問わず1ミリの微小器官である脳弓下器官の切り出し・包埋・薄切には技術的な困難さを伴い、当初の予定と異なる切り出し方法や包埋方法などを試すなど、手技の安定に時間を要したことも反省すべき点である。

しかし、複数の事例のルーチン染色標本の検討により得られた正常組織所見は、脳弓下器官の乏しい組織データベースに有益な情報を提供できると考えている。脳弓下器官の組織データから得られた正常変異 normal variant の所見や、年齢別の構造の違いなどのデータを速やかにまとめ、解剖学もしくは神経病理学領域の雑誌に投稿する予定である。また、複数の頭部外傷事例では、脳弓下器官に微小出血が認められたが、これは頭部への回転加速衝撃に対して、脳の正中構造である脳弓下器官が脆弱であることを裏付ける所見であり、さらに事例を集積

して統計的に検討した上で報告する。

補助事業期間中には、頭部外傷、法医病理、神経病理、神経解剖、神経画像診断に関する多くの学会やセミナーに参加したが、今後の実験継続に必要とされる最新の情報を得るために非常に有益であった。科学研究費助成事業の助けによって得られたデータを土台として本実験を継続して行く予定である。

<引用文献>

Promeranz et al., Acta Neurochi 97, 62-66, 1989

Mai JK and Paxinos G, The Human Nervous System, 3<sup>rd</sup> ed., Academic Press, 2011

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
--	---------------------------	-----------------------	----