

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K17412

研究課題名（和文）組織透明化技術「CUBIC」で急性硬膜下血腫の皮質動脈破綻を網羅的に検索する

研究課題名（英文）Exhaustive detection of micro-ruptured cortical arteries in subdural hematoma using the tissue-clearing CUBIC (clear, unobstructed, brain/body imaging cocktails and computational analysis) method

研究代表者

舟山 一寿 (Funayama, Kazuhisa)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：80568486

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の結果、皮質動脈破裂による急性硬膜下血腫に対して頭部死後血管造影CTは半数以上の症例/破裂部位に対して、皮質動脈の破裂部位を指摘することが可能で、肉眼的に認識困難な皮質動脈破裂部位の同定を確実に行うための方法の一つとして有用な方法であることが判明した。また本研究の結果、CUBIC法はこれまでの肉眼的観察に比し容易に皮質動脈の破裂部位の検出が可能で、さらに高精細の3次元の形態解析や病理組織像と同等な2次元の形態解析が可能であることから、実際の病理組織切片作成の際のガイドツールや、複数の仮想的な病理組織切片を合成することで病理組織学的所見の補完ツールとして有用であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって硬膜下血腫の解剖において出血源として皮質動脈の破裂を検出し、破裂部位の詳細な病理組織学的検索を実行することが可能となった。硬膜下血腫の解剖において出血源として皮質動脈の破裂を検出し、破裂部位の詳細な病理組織学的検索を行った2症例について、1950年以来71年ぶりに症例報告を行うことができた。病理組織学的知見の蓄積が不十分なために未解明であった皮質動脈破裂の詳細な病態について、病理組織学的知見が蓄積され解明されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Our study demonstrated the utility of head postmortem angiographic CT for identifying cortical artery rupture sites in cases of acute subdural hematoma, successfully identifying the rupture site in over half of the cases. This technique proves to be a valuable method for reliably locating these lesions, which can be challenging to detect macroscopically. Furthermore, our findings revealed that the CUBIC method offers superior ease of detection compared to traditional macroscopic observation. Additionally, CUBIC enables high-definition three-dimensional and two-dimensional morphological analysis equivalent to pathological tissue images, making it a valuable tool for guiding the preparation of actual pathological tissue sections and complementing pathohistological findings by synthesizing multiple hypothetical histological sections.

研究分野：法医学

キーワード：皮質動脈破裂による硬膜下血腫 組織透明化/3次元イメージング技術「CUBIC」 死後頭部造影CT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性硬膜下血腫(Subdural Hematoma;SDH)は全頭部外傷の1~3%に発生し、頭部外傷入院の10~20%を占めるとされるが、成人における死亡率は50~60%高く、特に65歳以上の死亡率は82%に達するとされ、急性硬膜下血腫は高齢者における頭部外傷死亡例の病態として重要であるといえる。一般的に急性硬膜下血腫は、重症頭部外傷で生じた脳挫傷や架橋静脈の破綻によって生じるとされているが、頭部外傷が極めて軽微、或いはまったく頭部外傷を伴わない症例での単一の皮質動脈の破裂を出血源とした硬膜下血腫が存在することも知られている。臨床的特徴として高齢者に多く、急性硬膜下血腫に占める皮質動脈破裂(皮質動脈破裂による硬膜下血腫、以下本症)の頻度は1.6~11%と報告によって差が大きい、開頭血腫除去術施行例の22%に認められたとの報告もある。高齢者においては重症硬膜下血腫の頻度が高いことから、本症はまれな病態ではないと考えられるが、本症を開頭血腫除去術で診断した症例の報告は比較的多数ある一方、解剖例の報告は7編36症例しかなく、さらにそのうち皮質動脈の破裂そのものを解剖で証明した報告は70年以上前の1編6例のみであった(文献)。報告されている殆どの手術例では十分な病理組織学的検索がなされておらず、皮質動脈破裂部位の病理組織学的検索が行われている症例はごく少数に限られており、本症の病理組織学的知見の蓄積が不十分なため、その結果として皮質動脈破裂の詳細な病態については未解明という現状があった。

本症の病態解明には皮質動脈破裂部位の病理組織学的知見の蓄積が必要であり、そのためには本症の解剖を行うことによって詳細な病理組織学的検索を行う必要があるが、前述の通り本症の解剖例の報告はごく少数に限られ、さらに解剖症例のごく一部でしか本症の病態の核心である皮質動脈破裂の病理組織学的検索が行えていなかった。研究代表者は本症の解剖例がほとんど報告されていない原因が、硬膜下血腫の解剖において《皮質動脈の破裂があったとしても認識できず見逃され皮質動脈破裂による硬膜下血腫の診断に至らなかった》ことにあるのではないかと推測した。高齢化の進行が継続している日本において、高齢者の急性硬膜下血腫は増加の一途をたどっており、それに伴い本症も増加していくと考えられることから、本症の病態解明は緊要な課題である。本症の病態解明のためには急性硬膜下血腫、特に高齢者の重症頭部外傷所見のない解剖例において皮質動脈の破裂部位を確実に同定することで、本症を見逃すことなく診断し、詳細な病理組織学的検索を蓄積することが必要かつ重要であると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、本症に対する解剖における実行可能な診断法を確立することである。具体的には以下の2点に集約される。

- (1)肉眼的に認識困難な皮質動脈破裂部位の同定を確実にを行うための方法論の確立
- (2)破裂した皮質動脈の形態的・病理組織学的解析の方法論の確立

3. 研究の方法

- (1)肉眼的に認識困難な皮質動脈破裂部位の同定を確実にを行うための方法論の確立

肉眼的に認識困難な皮質動脈破裂部位の同定を確実にを行うための方法として、頭部の死後血管造影CTの有用性について検証を行った。具体的な方法としては、解剖前に死後CTを行い、硬膜下血腫が確認された場合には、解剖において開頭を行う前に内頸動脈、外頸動脈及び椎骨動脈を剖出し、硬膜下血腫と同側の内頸動脈以外をクランプし、同側の内頸動脈より適切な濃度に調整した造影剤を手動的に注入し、頭部CTを撮影した後、開頭を行った。開頭後、大脳円蓋部を露出させ、造影剤の注入と同様の手技でリン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline; PBS)を注入し、皮質動脈からのPBSの漏出の有無について確認した。撮影した頭部CT画像における皮質動脈からの造影剤の漏出部位と、開頭後の皮質動脈からのPBSの漏出部位について解剖所見に基づいて比較検討した。

- (2)破裂した皮質動脈の形態的・病理組織学的解析の方法論の確立

破裂した皮質動脈の形態的・病理組織学的解析の方法として、破裂した皮質動脈を含む脳組織ブロックに対して、破壊検査である病理組織検査に先立ち、組織透明化法の一つであるCUBIC(clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis)法とライトシート蛍光顕微鏡(Light sheet fluorescence microscopy; LSFM)を用いて3次元画像データ取得し、肉眼的形態や病理組織的形態との比較検討を行った。具体的な方法としては剖検時に摘出した全脳をホルマリン固定後、死後血管造影CTや肉眼的観察によって推定された皮質動脈の破裂部位について肉眼的形態を写真撮影により画像化した。同部を含む脳組織サンプルを切り出し、既報の文献()の手順に従いCUBIC法による脳組織サンプルの透明化を行い、LSFM(MVX10-LS; Olympus社製)を用いて脳組織サンプルの血管形態を3次元的に画像化した。脳組織サンプルは最終的に連続切片を作成し、光学顕微鏡で皮質動脈の破裂を特定し、病理組織学的形態を画像化した。画像解析ソフト(Imaris v9.5.1; Bitplane社製)を用いてLSFMで得られた画像データから、病理組織学的検査で特定された皮質動脈の破裂部位について3次元画像と2次元断面画像を作成し、肉眼的形態及び病理組織学的形態について画像を比較した。

4. 研究成果

(1)肉眼的に認識困難な皮質動脈破裂部位の同定を確実に行うための方法論の確立(文献)

皮質動脈破裂による硬膜下血腫 10 例(62~96 歳、男性 6 例、女性 4 例)で頭部死後血管造影 CT と開頭後の PBS 注入を行ったところ、10 例全例で皮質動脈からの PBS 漏出が確認された。7 例ではそれぞれ 1 部位のみから PBS 漏出が認められたが、2 例ではそれぞれ 2 部位、1 例では 4 部位から PBS 漏出が確認され、10 例で合計 15 部位から PBS 漏出が確認された。PBS 漏出 15 部位のうち 1 部位が解剖所見に基づいてアーチファクトによる破裂(開頭術による死後の血管損傷)、14 部位が生前の破裂(硬膜下血腫の出血源)と判断した。4 部位から PBS 漏出が確認された例では、4 部位全てが生前の破裂で頭部死後血管造影 CT によってそれぞれの部位に一致した造影剤漏出が確認された(図 1)。2 部位から PBS 漏出が確認された 2 例のうち、1 例は 1 部位がアーチファクトによる破裂で 1 部位が生前の破裂であり、アーチファクトの部位には造影剤漏出が確認されず、生前の破裂の部位には造影剤漏出が確認された。もう 1 例は 2 部位いずれも生前の破裂であったが、1 部位では PBS 漏出部位に一致した造影剤漏出が確認されたものの、他の 1 部位では造影剤漏出が確認されなかった。1 部位から PBS 漏出が確認された 7 例については全て生前の破裂であったが、3 例では PBS 漏出部位に一致した造影剤漏出が確認されたものの、残りの 4 例では造影剤漏出が確認されなかった。結果として生前の破裂を認めた 10 例の 14 部位のうち 6 例(60.0%)の 9 部位(64.3%)について頭部死後血管造影 CT で皮質動脈の破裂を造影剤の漏出として検出可能であり、開頭術による死後の血管損傷を認めた 1 例の 1 部位では造影剤漏出が確認されなかった。生前の破裂を認めたにも関わらず頭部死後血管造影 CT で皮質動脈の破裂を造影剤の漏出として検出できなかった例が存在したのは、硬膜下血腫の死亡例では当然ながら脳圧が著しく亢進していることが推測され、高い脳圧下にある硬膜下の血腫が動脈の破裂部位を閉塞し、造影剤が漏出するための十分な灌流圧を与えられなかったためと考えられた。また頭部死後血管造影 CT で造影剤漏出が認められた場合には、造影剤漏出部位(生前の破裂部位)を避けて開頭術の部位を設定することで、生前の破裂部位に対して開頭術による死後の血管損傷というアーチファクトが重複することを防止することが可能であると考えられた。

これらの結果から、皮質動脈破裂による急性硬膜下血腫において頭部死後血管造影 CT は全例ではないものの半数以上の症例/破裂部位に対して、開頭術による死後の血管損傷が生じる以前に、皮質動脈の破裂部位を指摘することが可能であり、さらにその後の開頭術の部位を適切に設定できることから、頭部死後血管造影 CT は皮質動脈破裂による急性硬膜下血腫に対して肉眼的に認識困難な皮質動脈破裂部位の同定を確実に行うための方法の一つとして有用な方法であると考えられた。



図 1: 頭部死後血管造影 CT 画像における皮質動脈からの造影剤の漏出() (文献 より)

(2)破裂した皮質動脈の形態的・病理組織学的解析の方法論の確立(文献)

皮質動脈破裂による硬膜下血腫 6 例(64~95 歳、男性 1 例、女性 5 例)で CUBIC 法と LSFM を用いて 3 次元的画像データ取得し、肉眼的形態や病理組織的形態との比較検討を行ったところ、4 例で皮質動脈の破裂部位の可視化が可能であった。破裂部位が極めて微小なために肉眼的に皮質動脈の破裂であると認識困難であっても、CUBIC 法による 3 次元画像では形態的に破裂部位の検出をすることが容易であった。また皮質動脈の表面に薄い血腫が膠着し、皮質動脈そのものの肉眼的観察が困難であっても、CUBIC 法では血管のみを 3 次元画像化することが可能であり、破裂部位の検出をすることが可能であった。また CUBIC 法による 3 次元画像では、皮質動脈の破裂そのものだけでなく、破裂部から分岐した微小な分枝を含めた高精細な 3 次元画像を作成することが可能であった(図 2)。更に、CUBIC 法による 3 次元画像データから任意の方向に対して高精細な 2 次元断層画像を作成することが可能で、破裂部位や血管だけでなく周囲の構造物についても病理組織像の形態をほとんどそのままに再現することが可能であり、また複数の 2 次元断層画像を互いの位置関係を保ったまま 1 枚の画像として合成することがあった。一方で、破裂部周囲にある程度の血腫が存在した場合に、血腫の透明化が不十分なため、1 例では破裂部位そのものの検出は可能であったものの、破裂部から分岐した微小な分枝の断端が十分に画像化できず、1 例では破裂部位そのものの検出が不能であった。また LSFM の撮像範囲に制限があるため、画像化できる脳組織サンプルの範囲にも制限が生じ、1 例では脳組織サンプルが大きすぎたため、皮質動脈破裂部位が LSFM の撮像範囲外となってしまう、皮質動脈破裂部位の画像化ができなかった。また CUBIC 法による透明化の過程で脳実質内に亀裂を生じることがあったが、CUBIC 法によって血管そのものの病理組織学的検索に重大な影響は生じなかった。

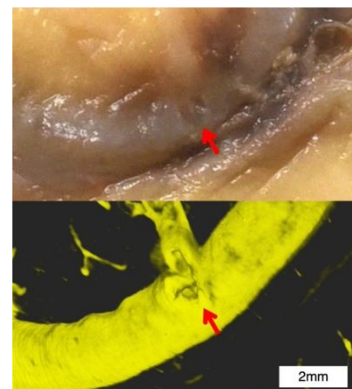


図 2: 皮質動脈の破裂()の肉眼像(上)と CUBIC 画像(下)の比較(文献 より)

これらの結果から、これまでの肉眼的観察による破裂部位の検索法では見逃されてきたと考えられる皮質動脈の破裂を CUBIC 法では容易に検出が可能であり、CUBIC 法は皮質動脈破裂の検出において従来の肉眼的検索法に比べ高感度な方法であると考えられた。また従来の肉眼的・病理組織学的検索法では困難であった高精細の 3 次元的形態解析が CUBIC 法で可能となると考えられた。さらに CUBIC 法では病理組織像と同等な 2 次元的形態画像を任意の方向に作成することが可能で、予め仮想的な病理組織切片を作成することで、実際の病理組織切片作成の際のガイドツールとしての役割や、複数の仮想的な病理組織切片を合成することで病理組織学的所見の補完ツールとしての役割を担うことが可能であると考えられた。

硬膜下血腫の解剖において上記の方法を用いることで、出血源として皮質動脈の破裂を検出し、破裂部位の詳細な病理組織学的検索を 2 例で実行し症例報告を行った(文献)。硬膜下血腫の解剖において出血源として皮質動脈の破裂を検出し、破裂部位の詳細な病理組織学的検索を行った症例の報告はこの 2 例の他に、70 年以上前に 6 例報告されたのみである。

<引用文献>

VANCE BM. Ruptures of surface blood vessels on cerebral hemispheres as a cause of subdural hemorrhage. *AMA Arch Surg*. 1950;61(6):992-1006.

doi:10.1001/archsurg.1950.01250021002002

Funayama K, Koyama A, Katsuragi-Go R, et al. Bleeding-Source Exploration in Subdural Hematoma: Observational Study on the Usefulness of Postmortem Computed Tomography Angiography. *Diagnostics (Basel)*. 2023;13(13):2286. Published 2023 Jul 6. doi:10.3390/diagnostics13132286

Funayama K, Tainaka K, Koyama A, et al. Detection and Morphological Analysis of Micro-Ruptured Cortical Arteries in Subdural Hematoma: Three-Dimensional Visualization Using the Tissue-Clearing Clear, Unobstructed, Brain/Body Imaging Cocktails and Computational Analysis Method. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(11):2875. Published 2022 Nov 20. doi:10.3390/diagnostics12112875

Funayama K, Harada K, Koyama A, et al. The usefulness of postmortem computed tomography angiography for subdural hematoma caused by rupture of the cortical artery: A report of two autopsy cases and a literature review. *Leg Med (Tokyo)*. 2021;53:101941. doi:10.1016/j.legalmed.2021.101941

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Funayama Kazuhisa, Tainaka Kazuki, Koyama Akihideo, Katsuragi-Go Rieka, Nishikawa-Harada Natsumi, Higuchi Ryoko, Aoyama Takashi, Watanabe Hiraku, Takahashi Naoya, Takatsuka Hisakazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Detection and Morphological Analysis of Micro-Ruptured Cortical Arteries in Subdural Hematoma: Three-Dimensional Visualization Using the Tissue-Clearing Clear, Unobstructed, Brain/Body Imaging Cocktails and Computational Analysis Method	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 2875 ~ 2875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics12112875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Funayama Kazuhisa, Harada Kazuki, Koyama Akihideo, Katsuragi-Go Rieka, Nishikawa-Harada Natsumi, Higuchi Ryoko, Aoyama Takashi, Watanabe Hiraku, Takahashi Naoya, Takatsuka Hisakazu	4. 巻 53
2. 論文標題 The usefulness of postmortem computed tomography angiography for subdural hematoma caused by rupture of the cortical artery: A report of two autopsy cases and a literature review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 101941 ~ 101941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2021.101941	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Funayama Kazuhisa, Shimizu Hiroshi, Tanaka Hidetomo, Kawachi Izumi, Nishino Ichizo, Matsui Kou, Takahashi Naoya, Koyama Akihideo, Katsuragi-Go Rieka, Higuchi Ryoko, Aoyama Takashi, Watanabe Hiraku, Kakita Akiyoshi, Takatsuka Hisakazu	4. 巻 38
2. 論文標題 An autopsy case of peliosis hepatis with X-linked myotubular myopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 77 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2019.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Funayama Kazuhisa, Koyama Akihideo, Katsuragi-Go Rieka, Aoyama Takashi, Watanabe Hiraku, Takahashi Naoya, Takatsuka Hisakazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Bleeding-Source Exploration in Subdural Hematoma: Observational Study on the Usefulness of Postmortem Computed Tomography Angiography	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 2286 ~ 2286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics13132286	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 舟山 一寿	4. 巻 879
2. 論文標題 皮質動脈破裂による硬膜下血腫	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 新潟県医師会報	6. 最初と最後の頁 2~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 舟山 一寿、原田 一樹、小山 哲秀、葛城 梨江香、西川 夏実、樋口 涼子、青山 崇、渡邊 拓、高橋 直也、高塚 尚和
2. 発表標題 死後造影CTによって皮質動脈の破裂を描出した硬膜下血腫の2剖検例
3. 学会等名 第19回Ai学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 舟山 一寿、原田 一樹、小山 哲秀、葛城 梨江香、西川 夏実、樋口 涼子、青山 崇、渡邊 拓、高橋 直也、高塚 尚和
2. 発表標題 皮質動脈破綻による硬膜下血腫の2剖検例：死後造影CTと連続切片による動脈破綻の検索
3. 学会等名 第43回日本法医学会学術中部地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 舟山 一寿
2. 発表標題 硬膜下血腫の出血源：剖検における皮質動脈破裂の検索
3. 学会等名 第2回 ヒト剖検脳研究に関する勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuhisa Funayama
2. 発表標題 An autopsy case of subacute subdural hematoma caused by tiny rupture of the cortical artery
3. 学会等名 The Forth Education Center for Forensic Pathology and Science Symposium & Japan and Korea Forensic Pathology Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 舟山 一寿、田井中 一貴、小山 哲秀、葛城 梨江香、青山 崇、渡邊 拓、高橋 直也、高塚 尚和
2. 発表標題 硬膜下血腫における皮質動脈破裂の検出と形態解析：CUBIC法による組織透明化を用いた3次元画像化
3. 学会等名 第108次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2024年

〔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
研究協力者	田井中 一貴 (Tainaka Kazuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------