

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790648

研究課題名(和文)MR組織学技術を用いたヒト剖検脳の組織構築画像による病理診断法の開発

研究課題名(英文)Development of histopathological diagnosis method by MR histology image of a postmortem human brain using

## 研究代表者

金涌 佳雅(Kanawaku, Yoshimasa)

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・医学教育部医学科専門課程・助教)

研究者番号：80465343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ホルマリン固定臓器を撮像対象としたMR組織学の法医実務への応用について検討することを目的に、我々は法医解剖で摘出した臓器を対象に、緩和時間の測定、臨床用MR装置を用いた画像撮像、海馬領域に特化したMR画像と病理組織標本との比較検討を実施した。固定臓器の緩和時間はホルマリンの影響があることが判明したがこの実験は今後の研究への予備的検討として捉えるべきであった。一方、臨床用MR装置でも法医実務に有用と考えるMR組織学画像等の撮像は可能であった。MR組織学画像の撮像方法と診断活用法については引き続き検討されるべき点が多いが、法医実務への応用性は高いと期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the feasibility of MR histology, which deals with formalin-fixed samples, to forensic practice. The tissues taken in forensic autopsy were used for experiments. In addition to the measurement of relaxation times of the fixed samples, we performed the MR histology scanning with a clinical MR equipment and comparison MR histology images and pathological specimens of the hippocampal region. Though we found that the relaxation time of the fixed organ is able to be affected to the formalin fixation process, it is considered that the measurement result must be regarded as a preliminary data for the future of research. It is found that MR histology image acquired with clinical MR apparatus can be valuable for forensic practice and research. Although the scanning technique and diagnostic application of MR histology image will continue to be considered, MR histology would be expected to be applied of the forensic practice

研究分野：法医学

キーワード：法医学 MR組織学 画像診断 法医解剖 ホルマリン固定

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 法医学におけるCTとMRIの利・活用状況

法医学において死因等の診断に活用されているコンピューター断層撮影(CT)検査は、硬組織や占拠性病変や出血などの有無には有効ではあるが、軟組織の描出には適さないという欠点がある。一方、臨床で広く普及している画像検査の一つである磁気共鳴画像(MRI)は、CTと異なり、軟組織描出に圧倒的に優位である。

ちなみに、空間分解能という観点からは、一般にCTの方が有利とされるが、MRIでも100 $\mu$ m以下の高解像度画像による組織レベルの撮像も可能ではある。しかし、研究開始当初の段階では、高解像度MRI撮像には、特別な装置・機器・方法が必要であり、実験研究レベルの域は出ていない。

### (2) 高解像度MRI撮像の学術的背景

ところで、MRIでは、ホルマリン固定臓器を撮像対象とした高解像度のMR画像を撮像する技術であるMR組織学という最先端の分野がある。生体を撮像対象としないので、長時間の撮像が可能である。また高濃度のMRI造影剤に浸漬させた後に撮像できる特徴もあり、組織レベルの高解像度画像の撮像に、特別な装置等は必要としないことも可能である。

もともとは、実験動物を用いた研究で、齧歯類の脳などの病変や形態学的表現型の解析のために用いられることが多かった技術分野である。しかし、もし非破壊的にヒト死体内部の組織所見が観察可能であれば、法医学解剖のみならず、病理解剖や、系統解剖、発生学研究での貢献は計り知れない技術になりうると考えられた。

### (3) MR組織学に関する先行研究

この分野での特記すべき先行研究として、Zhangらの報告<sup>引用文献</sup>が挙げられる。Zhangらは、ゴルジ染色液である重クロム酸カリウムとガドリニウム系MRI造影剤の混合溶液に5日間浸漬させたマウス固定脳をMRI撮像し、高解像度・高信号の画像の取得に成功している。また吉岡らは、ラット灌流固定脳にMRI造影剤を添加して撮像することで、低倍率の光学顕微鏡像と同じ組織構築像の描出を可能とする方法を報告<sup>引用文献</sup>している。Zhangらや吉岡らの報告は、実験動物の固定脳によるものであったが、このようなMR組織学の技法が、ヒト剖検摘出脳でも適応が可能であれば、脳の神経組織構築像を非破壊的に撮像(病理技術における薄切に相当)できる他、連続撮像した画像の三次元構築(病理技術における連続切片に相当)がコンピューター上で処理可能になる。これは、全身解剖が必須の法医学解剖での、神経病理所見の採取の緻密化に大変有用な剖検検査手法

として今後進展が期待でき、法医学実務における診断精度の向上にもつながるものと考えられた。

### (4) MR組織学の法医学的応用の可能性

MR組織学による画像(以下、MR組織学画像と呼ぶ)は、組織構築の描出にとどまり、個々の細胞病変の観察のためには、既存の神経病理学検査による情報は今後も必要である。しかし、ヒト脳の場合であっても、Zhangらの報告のように、摘出から撮像までの時間が短期間で達成できるならば、MR組織学は脳病変観察のスクリーニング的検査としても活用できる。また、MR組織学画像の撮像後は、一般の病理組織標本の作製が可能という点もあり、MR組織学は、法医学解剖における実務応用性が極めて高いと期待される。

## 2. 研究の目的

### (1) ヒト剖検臓器のMR組織学画像撮像法の確立

撮像条件等についてはZhangらの方法を参考とするが、より適切な撮像条件についても探索する必要があると思われる。これについては、検体の種類、固定・撮像条件、撮像装置スペック等がMR組織学画像にどのような影響を与えるか、基盤的な研究開発を進めている。加えて、撮像条件や装置側要因以外の医学的な条件、すなわち、死因や死後経過時間、既往歴等が、撮像の精度に与える影響について評価する。

### (2) MR組織学連続撮像画像の三次元構築法とその病理診断法の開発

MR組織学の法医学診断上の応用として、神経変性疾患、脱髄疾患、奇形等の病変部のMR組織学画像を連続撮像したものを三次元的に立体構築することにより、神経組織の三次元構築画像として再構成し、病変の定量的診断の手法を開発する。

### (3) ヒト剖検脳のMR組織学画像と病理組織標本との比較検討

ヒト剖検脳のMR組織学画像が撮像されても、これを神経病理学的にどのように読影・所見把握・組織診断すべきか明らかではない。従って、MR組織学画像を撮像した部位の病理組織標本を作製し、両者の形態像を比較検討し、MR組織画像の病理組織学的な再現性を分析・評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) 固定臓器の緩和時間

ヒト剖検臓器の適切なMR組織学画像の撮像のために、固定臓器の緩和時間の測定実験を実施した。

検体の処置

検体は、法医解剖(男 12 例(平均年齢 53.4 歳)、女 2 例(平均年齢 49.0 歳))で摘出した左心筋、肝臓、皮下脂肪、大脳の一部(1.5 × 1.5 × 3.5 cm 大)をそれぞれ 10 個収集した。摘出した臓器に、肉眼的・組織学的に病変がないものを確認した。死後経過の平均日数は 2~3 日であった。

更に検体を未固定群と固定群に分類した。未固定群の検体は、Fluorinert™ FC-43 (3M Japan Ltd., Tokyo, Japan)を充満した 15 ml polypropylene チューブに挿入し、23 に設定した実験室で MR 撮像した。一方、固定群検体は 15-20% 中性緩衝ホルマリンにて室温下で固定(平均 10-13 日)、未固定群と同様に撮像した。

#### MR 撮像と緩和時間の測定

未固定群・固定群の検体は、以下の条件で MR 撮像を実施した。

MR 装置 : vertical-bore 8.6-Tesla Bruker AVANCE400WB imaging spectrometer with a 30 mm 1H coil、シミング : 自動調整、シーケンス : sixteen rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) images with four different TR and four different TE (RAREVTR\_bas)、パラメータ : field of view = 2.0 × 2.0 cm (心筋、肝、脂肪組織)、4.0 × 4.0 cm (脳)、slice thickness = 2.0 mm、number average = 1、acquisition matrix = 128 × 128、interslice distance = 4 mm、TR = 500, 1000, 2000, 10000 ms (心筋、肝、脳)、360, 750, 1200, 5000 ms (脂肪組織)、TE = 14, 42, 70, 98 ms, Flip angle = 180.0 deg、撮像時間 : 1 サンプルにつき約 20 分。

1 サンプルにつき取得した 16 枚の MR 画像は、MR 画像専用のソフトである ParaVision® ver. 4.0 (Bruker BioSpin K.K., Kanagawa, Japan) を用いて、解析した。

まず関心領域(ROI、面積: 0.01 ~ 0.02 cm<sup>2</sup>)を検体画像に任意に設定するが、脈管系があるところは回避した。その結果、各検体の T1・T2 値が計測されることになる。

本実験では、(イ)未固定群と固定群の緩和時間の基本統計、(ロ)未固定群の緩和時間と死後経過時間の相関関係、(ハ)固定効果の指数値([固定検体の緩和時間 - 未固定時間の緩和時間]/固定検体の緩和時間)と固定時間の相関関係、(ニ)固定群の緩和時間とホルマリン濃度の相関関係を解析した。

#### (2)臨床MR装置によるMR組織学画像撮像

##### 検体処置

法医解剖により摘出された全脳が本実験で使用された。摘出された脳は、未固定のまま解剖当日にMR撮像した他、3つの異なる固定液の1つに浸漬した後、MR撮像した:(1)20%ホルマリン;(2)プロハンス(一般

名ガドデリトール)を 2mL/L の割合で混合した 20%ホルマリン;(3)プロハンスを 4mL/L の割合で混合した 20%ホルマリン。

MR imaging 後、検体は神経病理学的手法に従い、前額断にて割断し、各部位の写真を撮影した。未固定検体は、撮像後、十分ホルマリン固定した後に割断した。

#### MR imaging

固定液に浸漬した脳検体は、水道水を満たした容器に脳底面を上、穹隆面を下にして入れ替え、次のシーケンスを撮像した。撮像前に水道水に浸漬していた時間は、おおよそ 4~6 時間であった。

使用した MR 装置 : Philips MR Systems Achieva 3.0T Medical System、コイル : 8-channel headcoil。

実験で使用したシーケンスと撮像パラメータは次のとおりである ;

MPRAGE(GR): TE=3.5ms, TR=7.8ms, Average=1, SlicesThickness = 0.5mm, Matrix=480 × 480, Flip Angle=8, FOV=240 × 240mm, TSE factor=384, pixel size = 0.5 × 0.5 mm.

T1W VISTA(SE): TE=12.7ms, TR=500ms, Average=1, SlicesThickness=1.0mm, Matrix 256 × 256, Flip Angle=90, FOV=256 × 256, TSE factor=20, pixel size=1.0 × 1.0 mm.

T2W VISTA(SE): TE=124.8ms, TR=4000ms, Average=1, SlicesThickness=1.0mm, Matrix=256 × 256, Flip Angle=90, FOV=256 × 256, TSE factor=85, pixel size=1.0 × 1.0 mm.

#### 分析項目

撮像された MR 画像を読影し、信号強度や灰白質 - 白質間のコントラストの強弱について、シーケンスや造影剤の有無によってどのように変化するかを視覚的に判断した。

#### (3) 海馬

上記(2)の方法に加えて、次のシーケンスを追加し撮像し、同部の病理組織標本像と比較検討した。

T2W HIPPOSENSE(SE): TE=90.0ms, TR=4000ms, Average=2, Slices Thickness=1.0mm, Matrix=576/573, Flip Angle=90, FOV=230 × 230mm, TSE factor=3, pixel size=0.4 × 0.4 mm.

## 4. 研究成果

### (1)緩和時間

#### 結果の概要

未固定と固定の各臓器の緩和時間の平均値と標準偏差が解析された。脂肪組織を除き、T1 値はホルマリン固定によっていずれも減少がみられた。T2 値も同様の減少がみられ、脂肪組織では若干の T2 値の上昇がみられた。

緩和時間と死後経過時間については白質で負の相関関係( $r = -0.65$ )が、固定時間と

固定効果指数については脂肪組織の T1 値で正の相関関係( $r = 0.90$ )と白質・灰白質の T2 値( $r = -0.83$ ・ $r = -0.67$ )でみられた。本実験のホルマリン濃度の範囲では、緩和時間とその濃度の間に相関性はなかった。

#### 考察

本実験からホルマリンが組織に与える影響、およびそれに伴う MR 画像上の変化について評価することができた。特に脂肪組織の緩和時間の変化が、他の組織と比べて小さいことが分かったことは、今後の MR 組織学の撮像条件を決定していく上での重要な知見の一つと考えられる。

ただ、本実験の測定・解析に関わる系は、緩和時間を具体的な値として提示するにはまだ不十分な点も多く、予備的検討として本実験を捉えて、今後実施されるべき本格的な実験に向けての検討資料として活用するに留めるべきと考えられる。

### (2)臨床用装置

#### 結果の概要

剖検時の死後経過の平均日数は  $1.2 \pm 0.4$  日であった。固定日数は 9 日前後であった。いずれの検体も、肉眼的に傷病変がないものを選択した。

#### ア．T1W VISTA 画像

未固定脳では高信号画像であるが、灰白質-白質間のコントラストは乏しかった。加えて、未固定脳であるため、脳の変形が避けられなかった。一方、固定により、信号強度は白質で半減し、灰白質で僅かな減少があったことから、コントラストが幾分みられるようになった。

ProHance 混合ホルマリン固定脳では、灰白質-白質境界とコントラストは良好であった。

#### イ．T2W VISTA 画像

未固定脳・固定脳では、灰白質の信号強度は灰白質よりも高く、コントラストは乏～中程度と認められたが、固定脳画像のコントラストは未固定脳のものに比べて減少していた。ProHance 混合ホルマリン固定脳では、被殻の信号強度が高かったが、その他の領域では信号強度は低く、コントラストも乏しかった。更に、ホルマリン固定脳と ProHance 混合ホルマリン固定脳では解剖学的な領域の同定は困難であった。

#### ウ．MP-RAGE 画像

未固定脳では、灰白質・白質の信号強度の大小関係が、他の 2 つのシーケンス画像とは逆転する現象がみられた。コントラストは高かった。

固定脳では、白質よりも灰白質の信号強度が高く、未固定脳の信号強度よりも増大していた。コントラストは良好であった。

ProHance 混合ホルマリン固定脳では、灰白質の信号強度は白質のそれよりも高く、コントラストも良好で、灰白質-白質境界は未固定・固定脳と比べて明瞭であった(図 1)。

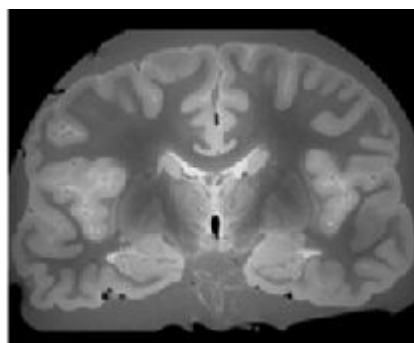


図 1 . ProHance 混合ホルマリン固定脳の MP-RAGE 画像

ProHance 混合ホルマリン固定脳の MP-RAGE 画像は様々な断面を再現することが可能であり、図 2 に示すように小脳半球の微細な構造や橋の横走神経が明瞭に可視化されている。

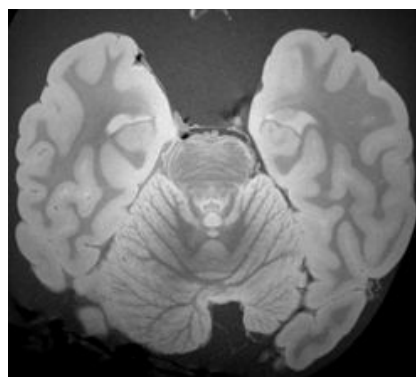


図 2 . 図 1 の画像の水平断

#### 考察

MR 組織学は、一般に高磁場の研究用 MR 組織を用いることが一般的であった。しかし、MR 造影剤の浸漬固定により、臨床用 MR 装置でも、ルーペレベルでの脳画像を撮像することができた。ルーペレベルであり、従来の MR 組織学のマイクロメートルオーダーの空間分解能と比べると粗い画像ではあるが、臨床用装置で 20 分程度の撮像時間で済むこと、全脳の撮像が可能であること、固定の処置が容易であること、画像の立体構築や容量解析がスムーズであることから、法医学実務での実用性は極めて高いと期待される。

### (3)海馬

#### 結果の概要

撮像された MR 画像は、海馬の基本的構築像を明瞭に再現していた(次頁図)。その画像は、ルーペレベルでの病理組織標本像に十分対応可能と認められるものであった。



### 考 察

本実験での撮像シーケンスから、海馬硬化症などの病変を相当明瞭に可視化できることが期待される。病理組織標本では特定領域の萎縮を平面的に理解するに留まるが、本実験の撮像方法を活用することで、海馬硬化症の立体的把握がより容易になるものと期待される。

#### (5)研究の総括

本研究は、MR 組織学の法医学への応用・導入に向けた基礎的な実験を行うことを目的としている。それらの研究を通じて、形態学的所見を重要な根拠とする法医診断においては、MR 組織学は非常に有用にツールとなり得るだろうと予想される。

ただし、今後いくつかの点で検討しなければならない点も多い。

まず本研究では、マイクロメートルオーダーの画像分解能をもった MR 組織学画像の撮像は試みていない。空間分解能は良好であればあるほど優れているという印象をうけるだろうが、使用する装置の性能に加えて、撮像時間という制約を考慮すると、分解能という点で粗い画像であっても、実務上無意味とは限らない。

また本研究では、病変の撮像は対象としていない。出血・梗塞、腫瘍といった病変部位を固定した後、MR 撮像するとどのような画像として観察されるかは、網羅的に検討する必要はあるかと考える。

今後はこのような検討を通じて、法医実務へ応用できる MR 組織学画像撮像の一助になろう。もっとも大きな問題は、その画像を通じて何を診断できて、どのようにしたいかである。つまり、従来の病理診断と異なる方法や利点があれば MR 組織学画像の意義が明確になるものと考えられる。

現状では、細胞レベルでの病変の有無は、病理組織学の方が明確に可視化するという点で、圧倒的に有利となっているし、今後もその優勢は変わらないであろう。それでも、病理組織学よりも MR 組織学画像が有利な点としては、三次元構築が極めて容易であること、任意の断面での剖面を得られること、そして、デジタルデータとして画像を保存できることが挙げられることが、本研究を通じて実感したことである。

三次元構築については、従来の病理組織学でも可能ではあるが、連続切片標本の作製は大変手間暇のかかるものであり、ルーチンの

に行うのは必ずしも容易とは言えない。MR 組織学画像であれば、現状では病理組織標本レベルの空間分解能ではないものの、容易に三次元構築が可能である。そして、その三次元構築像から任意の剖面像を観察することができ、病変の理解の多様性が広まると考える。

また、画像データそのものはデジタルデータで永久保存が可能であり、切り出し前のバックアップという観点からも活用することができる。

このように MR 組織学の利点を十分に活かしつつ、更に飛躍を進めるには、本研究のような基礎的な実験と共に、実際例でも MR 組織学画像を撮像し、病理診断学との比較検討を進める実践的な研究を通じて、実務上の応用の図ることが重要だろうと考えている。

#### <引用文献>

Zhang X et al, Magn Reson Med. 63:1391-7. 2010

福永、森、吉岡. 第 39 回日本磁気共鳴医学会大会)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

金涌 佳雅 (KANAWAKU, Yoshimasa)  
防衛医科大学校・医学教育部・助教  
研究者番号：80465343

〔雑誌論文〕(計2件)

Kanawaku Y、Yanase T、Hayashi K、Harada K、Kanetake J、Fukunaga T.、An autopsy case of otogenic intracranial abscess and meningitis with Bezold's abscess: Evaluation of inflammatory bone destruction by postmortem cone-beam CT、Legal Medicine、15 巻、2013、323-328、査読有り

Kanawaku Y、Someya S、Kobayashi T、Hirakawa K、Shiotani S、Fukunaga T、Ohno Y、Kawakami S、Kanetake J.、High-resolution 3D-MRI of postmortem brain specimens fixed by formalin and gadoteridol、Legal Medicine、16 巻、2014、218-221、査読有り

〔学会発表〕(計3件)

金涌佳雅、平川慶子、福永龍繁、金武潤、大野曜吉、ヒト剖検摘出臓器のMRI技術の基礎的研究(第一報): 死後変化とホルマリン固定が緩和時間に与える影響、第40回日本磁気共鳴医学会大会、2012年9月6日~8日、国立京都国際会館(京都市)

金涌佳雅、染谷聡香、小林智哉、平川慶子、早川秀幸、大野曜吉、中津海学子、原田一樹、塩谷清司、金武潤、剖検摘出固定脳のMRI撮像法の検討、第97次日本法医学会学術全国集会、2013年6月26~28日、ロイトン札幌(札幌)

金涌佳雅、染谷聡香、小林智哉、河上早、早川秀幸、平川慶子、塩谷清司、大野曜吉、福永龍繁、原田一樹、金武潤、海馬領域を対象としたホルマリン固定脳のMR画像検査の検討、第41回日本磁気共鳴医学会大会、2013年9月19~21日、アスティとくしま(徳島)

金涌佳雅、原田一樹、金武潤、新井信隆、竹内千仙、望月葉子、福永龍繁、認知機能障害が急速に進行した成人Down症候群者にみられた肺動脈血栓塞栓症、第83回日本法医学会関東地方会、2014年11月8日、東京女子医科大学構内(東京)

〔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〕

特になし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者