

ジストニア脳アトラスによる  
淡蒼球内節機能異常の検索と新規ターゲッティング法の確立に関する研究

山田 和慶 熊本大学医学部附属病院 機能神経外科先端医療寄附講座 特任准教授

研究要旨

ジストニア症例に対する淡蒼球内節刺激を施行し、ターゲッティングに用いたデータを蒐集し、刺激条件とその効果について検討した。

A. 研究目的

日常臨床において遭遇するジストニア症例に対して、確立された治療法である淡蒼球内節刺激術を施行し、刺激部位と刺激条件およびその効果を評価する。手術に必須の過程である、ターゲッティングのデータを蒐集し、本研究事業の目的に資するものとする。

B. 研究方法

①研究対象

平成 22 年度に熊本大学医学部附属病院脳神経外科を受診し、淡蒼球内節(GPi)刺激術(DBS)の適応になった患者を対象とした。

②症状評価方法

術前術後の重症度を Burke-Fahn-Marsden (BFM)スコアにて評価した。

③手術方法

- 1) 全身麻酔の導入
- 2) レクセル式定位脳手術フレーム装着
- 3) CT 撮像
- 4) ターゲッティング

FrameLink システムにより MRI 画像と上記 CT 画像を融合し、前交連-後交連線を基準に、その中点より 2mm 前方、20mm 外側、3mm 腹側の点を仮想目標とした。

この際 3D-FLAIR 画像において低信号に描出される GPi を直接法において同定し、仮想目標の修正を行った。

5) 術中に電気生理学検査を行い、GPi の腹側境界を同定した。

6) 術中レントゲンを参考に DBS 電極(model 3387) を精確に挿入した。

7) 一期的にパルス発生装置を前胸部皮下に埋め込んだ。

④ターゲッティングデータの蒐集

手術のターゲッティングに用いた 3D-MRI と 3D-CT の DICOM データを CD-ROM に保存した。術後 MRI は患者の危険防止のため施行せず、CT の DICOM データを取得し、術前 MRI と fusion することにより電極位置を同定することにした。

⑤刺激条件の記録

治療に用いた電極、刺激幅、刺激頻度、刺激強度を記録した。

(倫理面への配慮)

この研究はジストニアに対して確立された治療法である GPi-DBS の過程で生じる臨床データをもとに行うものであり、研究により対象者の不利益が増大することはない。手術には、脳出血、感染など一定のリスクを伴うため、手術に当たってはインフォームドコンセントを行い文書による承諾を得ている。

熊本大学では、MRI により誘発される DBS 電極周囲の脳損傷を防ぐため、術後の MRI は施行せず、CT と術前 MRI の

Fusion による電極位置の評価を行う方針としている。

## C. 研究結果

### ①平成 22 年度の症例

- 1) 53 歳 男性：全身性ジストニア
- 2) 35 歳 女性：全身性ジストニア
- 3) 17 歳 女性：半身ジストニア
- 4) 35 歳 男性：分節型ジストニア

手術による頭蓋内出血、意識障害、神経学症状の悪化などの合併症なし。

### ②BFM スコアによる術後症状改善

BFM スコアの平均は術前 34.9 点から術後 1 ヶ月で 11.5 点に改善し数ヶ月以上維持している（改善率 67.0%）。

### ③刺激電極

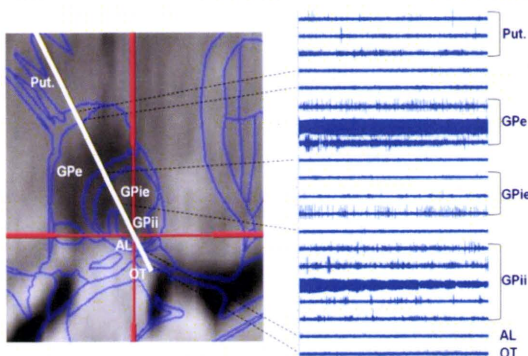
全ての症例で最も腹側の contact 0 が使用され、contact 1 が追加された例もあった。

### ④刺激条件

全ての電極の平均で表すと、刺激幅：450 $\mu$  秒、刺激頻度：130Hz、刺激強度：1.51V であった。術後に評価した contact の位置や刺激条件と改善効果の関係については、主任研究者とともに今後検討する。

### ⑤術中電気生理学所見

下図は、症例 3 の術中電気生理学所見である。



(AL: レンズ核ワナ、GPe: 淡蒼球外節、GPi: 淡蒼球内節、GPie: 淡蒼球内節外側部、GPii: 淡蒼球内節内側部、OT: 視索、Put: 被殻)

左は FrameLink システムにより 3D-FLAIR 画像と Schaltenbrand-Wahren の脳ア

トラスを superimpose した画像で、淡蒼球内節の hypointensity area がアトラスと良く一致している。白線は電極の刺入路である。Vitek らにより報告された "grouped discharge" が、GPe から GPi にかけて、今回用いた multiunit recording においても確認できる(右)。

## D. 考察

平成 22 年度の症例には DYT-1 ジストニア例は含まれていなかった。また診断未確定の二次性全身ジストニア、あるいは心因要素をもつ発作性ジスキネジア例も存在した。しかしこれらの患者群であっても GPi-DBS は有効であった。

熊本大学の GPi-DBS は長い刺激幅、即ち 210 $\mu$  秒あるいは 450 $\mu$  秒を用いることが多い。これは術後の条件調整過程において多い。これは術後の条件調整過程において長い刺激幅がより有効であることから必然的に導かれたものである。しかしこの条件は電力消費が大きく、バッテリー寿命が 2 年程度と短いことが欠点である。

今後、挿入電極位置の解析と刺激条件および効果についての検討が本研究事業により推進されることには大きな意義があると考えられる。可能であれば、術中の電気生理学所見の解析により、GPi 機能異常と症状との関連を解明したい。

## E. 結論

GPi-DBS はジストニアに対し、安全で有効な治療法である。本研究事業のデータ解析し、より有効な新規ターゲティング方の確立を目指すべきである。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kiyotoshi Hamasaki, Kazumichi Yamada, Tadashi Hamasaki, Jun-ichi Kuratsu: GPi-pallidal stimulation to treat generalized dystonia in Cockayne syndrome. *Movement Disorders* 25:656-658, 2010

Tadashi Hamasaki, Kazumichi, Yamada, Toshinori Hirai, Jun-ichi Kuratsu: A positive correlation between fractional white matter volume and the response of Parkinson disease patients to subthalamic stimulation. *Acta Neurochir* 152:997-1006, 2010

Kazumichi Yamada, Shin-ya Shiraishi, Tadashi Hamasaki, Jun-ichi Kuratsu: Cardiac 123I-MIBG scintigraphy as an outcome- predicting tool for subthalamic nucleus stimulation. *Acta Neurochir* 152:2063-2068, 2010

山田和慶, 長谷川 雄, 倉津純一: 不随意運動症に対する定位脳手術とその治療ターゲット① *脳神経外科速報* 20:1405-1411, 2010

## 2. 学会発表

櫻間智孝, 山田和慶, 曾山直宏, 等 泰之, 高島大輝, 倉津純一: 虚血後ミオクロームス(Lance-Adams 症候群)に対する淡蒼球内節刺激術. 第 49 回日本定位・機能神経外科学会, *機能的脳神経外科* 49(1):56-57, 2010

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

ジストニア脳アトラスによる  
淡蒼球内節機能異常の検索と新規ターゲティング法の確立に関する研究  
遺伝性ジストニアに対する脳深部刺激療法

横地 房子 都立神経病院 脳神経内科 医員

研究要旨：遺伝性ジストニアに対する脳深部刺激療法の予後についての検討。

#### A. 研究目的

ジストニアは様々な原因や出現部位、様式などにより分類される。発症様式をもとに一次性・二次性・他疾患に伴うもの・偽性など、出現部位によって全身性・局所性・分節性、あるいはジストニアの徴候をもとに姿勢ジストニア・動作性ジストニア・ジストニア運動などに分類される。

本報告書では当院で脳深部刺激治療（deep brain stimulation, DBS）を施行した遺伝性ジストニア例について予後を含めて検討したので報告する。

#### B. 研究方法

症例は15例で、DYT-1: 11例、non DYT-1: 2例、DYT-3: 1例、DYT-11: 1例である。DYT-1およびnon DYT-1例の手術時年齢は12才～30才、男性6例、女性7例、DYT-3は男性で47才、DYT-11は女性、42才であった。

ほとんどの例が全身性ジストニアの臨床徴候をていしたので、DBSのターゲットは淡蒼球内節を選択した。術前にジストニアの種類、出現部位などを神経学的所見や表面筋電図で詳細に検討した。

手術は、全例とも全身麻酔で施行した。術前にレクセルフレームを装着してMRIを撮像し、視索の上縁を仮想ターゲットとした。Trackingルートは脳室を通るルートは避け、脳正中線に対して約10度で刺入するように設定した。Microrecordingを用いて、tracking通過中の細胞活

動を記録し、電極留置部位は淡蒼球内節後腹側部で、視索をとらえて、視索に刺激電流が及ばないことを試験刺激で確認して治療用電極を留置した。数日後に全身麻酔下で両側胸部に刺激発生装置を留置した。

術後は電極位置を確認し、淡蒼球腹側部を加えて淡蒼球内部を広く刺激した。

#### C. 研究結果

全身性ジストニア例の術後の経過は一様ではない。しかし、ほぼいずれも刺激開始後はじめにジストニア運動が改善・消失して、徐々にジストニア姿勢が改善した。その改善は術後6年を経た例でも安定して認める。

一次性ジストニア例は全例GPI-DBSで症状が改善し、ジストニアのみでなく、ADLも介助から自立、社会的自立へと改善した。またその改善経過は刺激開始後すぐに出現せず徐々に現れ、DBSによる治療中にこれらのジストニア症状は一様な症状軽減でなく、ジストニア運動 → ジストニア姿勢 → 動作性ジストニアの順に軽快した。

全例ともに術前のADLは一部介助、全介助であった例が多かったが、その後自立した社会生活をおくっている例が多く、社会復帰あるいは社会で活躍をしている。

#### D. 考察および結論

遺伝性ジストニアに対する脳深部刺激療法の効果は驚くほどの有効性を示すことが知られている。我々が経験した症例のうち、最長8年に

わたり治療を受けている症例もあり、特段の副作用もなく経過している。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

川崎 隆, 辛 正廣, 谷口 真, 高橋宏, 横地房子, 沖山亮一, 浜田生馬, 海津敬倫, 石塚典生, 塩川芳昭: ヒト脚橋被蓋核の解剖学的検討: PP N-DBSは可能か? *機能的脳神経外科* 49:152-156, 2010

### 2. 学会発表

Yokochi F, Kimura K, Taniguchi M, Nakagawa Y, et al: "Long-term outcome of patients with hereditary dystonia treated with bilateral pallidal deep brain stimulation" First international congress on treatment of dystonia, May 2010, Hannover

#### IV. 研究成果の発刊に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
宮城 靖, 福田孝一, 諸岡健一 他	デジタル画像処理技術を用いた脳座標アトラス作成法.	機能的脳神経外科	49(1)	82-83	2010
宮城 靖, 福田孝一, 諸岡健一, 陳献, 早見武人, 岡本 剛, 砂川賢二, 飛松省三, 吉浦敬	ヒト脳座標アトラス作成におけるデジタル画像技術の応用.	機能的脳神経外科	49(2)	136-141	2010
宮城 靖, 諸岡健一, 福田孝一, 倉岡晃夫, 砂川賢二, 岡本 剛, 吉浦敬, 陳献, 早見武人, 飛松省三	ジストニアやパーキンソン病の定位脳手術支援のための脳座標アトラス	平成22年度日本生体医工学会九州支部学術講演会論文集		59	2011
Fukuda T, Morooka K, Miyagi Y	A simple but accurate method for histological reconstruction of the large-sized brain tissue of the human that is applicable to construction of digitized brain database.	Neuroscience Research	67(3)	260-265	2010
Miyagi Y, Morooka K, Fukuda T, Okamoto T, Sunagawa K	Construction of Brain Simulator System for Computer-Aided Diagnosis and Therapy: Progress Overview FY2010.	The Second International Symposium on the Project Computational Anatomy	1	136-139	2011
Kobayashi K, Katayama Y, Otaka T, Obuchi T, Kano T, Nagaoka T, Kasai M, Oshima H, Fukaya C, Yamamoto T	Thalamic deep brain stimulation for the treatment of action myoclonus caused by perinatal anoxia.	Stereotactic and Functional Neurosurgery	88	259-263	2010

Nishikawa Y, Kobayashi K, Oshima H, Fukaya C, Yamamoto T, Katayama Y, Ogawa A, Ogasawara K	Direct relief of levodopa-induced dyskinesia by stimulation in the area above the subthalamic nucleus in a patient with Parkinson's disease--case report.	Neurologia Medico-Chirurgica (Tokyo)	50	257-259	2010
Hamasaki K, Yamada K, Hamasaki T, Kuratsu J	GPI-pallidal stimulation to treat generalized dystonia in Cockayne syndrome	Movement Disorders	25	656-658	2010
Hamasaki K, Yamada K, Hirai T, Kuratsu J	A positive correlation between fractional white matter volume and the response of Parkinson disease patients to subthalamic stimulation	Acta Neurochirurgica	152	997-1006	2010
Yamada K, Shiraishi S, Hamasaki T, Kuratsu J	Cardiac 123I-MIBG scintigraphy as an outcome-predicting tool for subthalamic nucleus stimulation	Acta Neurochirurgica	152	2063-2068	2010
山田和慶, 長谷川雄, 倉津純一	不随意運動症に対する定位脳手術とその治療ターゲット①	脳神経外科速報	20	1405-1411	2010
川崎 隆、辛 正廣、谷口 真、高橋 宏、横地房子、沖山亮一、浜田生馬、海津敬倫、石塚典生、塩川芳昭	ヒト脚橋被蓋核の解剖学的検討: PPN-DBS は可能か?	機能的脳神経外科	49	152-156	2010



V. 平成22年度研究成果に関する刊行物

## デジタル画像処理技術を用いた脳座標アトラス作成法

宮城 靖<sup>1,2</sup> / 福田 孝一<sup>3</sup> / 諸岡 健一<sup>1</sup> / 陳 猷<sup>1</sup> / 早見 武人<sup>1</sup> / 岡本 剛<sup>1</sup>  
砂川 賢二<sup>1</sup> / 飛松 省三<sup>4</sup> / 吉浦 敬<sup>5</sup> / 佐々木 富男<sup>2</sup>

## Application of digital imaging technique for the construction of stereotactic human brain atlas

Yasushi Miyagi<sup>1,2</sup> / Takaichi Fukuda<sup>3</sup> / Ken-ichi Morooka<sup>1</sup> / Xian Chen<sup>1</sup> / Taketo Hayami<sup>1</sup> / Tsuyoshi Okamoto<sup>1</sup>  
Kenji Sunagawa<sup>1</sup> / Shozo Tobimatsu<sup>4</sup> / Takashi Yoshiura<sup>5</sup> / Tomio Sasaki<sup>2</sup>

**Abstract:** An ideal human brain atlas must provide the universal coordinates of standard healthy brain. Morphology of human brain contains considerable inter-individual variety; however, the classical human brain atlases have been made from a limited number of materials. A large organ such as human brain is subject to mechanical deformation and the production of stereotactic human brain atlases is still time-consuming and needs special instruments, environments and skills. To achieve both the spatial consistency and high histological quality for stereotactic human brain atlases, we have established a novel technique for constructing the stereotactic brain atlas using a formalin-fixed cadaver brain of the Japanese, blade-oscillation microslicing and digital imaging techniques. Our method enabled the accurate reconstruction of human brain histological slices with the three-dimensional consistency necessary for the stereotactic atlases of human brain, as well as the successful preservation of original macroscopic shape and cytoarchitecture.

**Keywords:** Human brain atlas; Histological section; Stereotactic functional neurosurgery

- 九州大学デジタルメディスン・イニシアティブ [Division of Digital Patient, Digital Medicine Initiative, Kyushu University] 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1 / Tel: 092-642-6693 / Fax: 092-642-6693
- 九州大学大学院医学研究院 脳神経外科 [Department of Neurosurgery, Kyushu University, Graduate School of Medical Sciences]
- 九州大学大学院医学研究院 神経形態学 [Department of Anatomy and Neurobiology, Kyushu University, Graduate School of Medical Sciences]
- 九州大学大学院医学研究院 臨床神経生理学 [Department of Clinical Neurophysiology, Kyushu University, Graduate School of Medical Sciences]
- 九州大学大学院医学研究院 臨床放射線科学 [Department of Clinical Radiology, Kyushu University, Graduate School of Medical Sciences]

機能的脳神経外科 49(2010)82-83

## はじめに

個人差の大きい脳を一つのアトラスで表し手術で用いるのは明らかに危険である。なるべく多数の脳標本から形状を平均化した標準脳によるアトラスや、各個体形状に応じて内部座標を補正できるテイラーメイド脳アトラスが望まれる。しかしヒト脳のように柔らかく大きな臓器を、変形させることなく切片化し、なおかつ良質の組織像を得るためには、特殊な機材と熟練、そして膨大な時間を要する。そのため、視床や基底核・脳幹部など深部構造に限られた狭い範囲を座標化するか、機械的変形を無視して脳半球全体を座標化するかの選択に迫られる。我々は三次元的整合性と細胞構築を両立させる、より簡便なヒト脳アトラスの作成法を確立した。

## 方 法

解剖実習に用いられる献体から選別された脳(89歳、男性)に関しては、本研究への利用について御遺族の承諾を得た。これらの献体は死後10%ホルマリン5リットルを大腿動脈から注入し12時間経過した後、エタノール・ホルマリン溶液に数週間浸潤させた後、実習開始まで4℃に保存したものである。頭蓋から摘出した脳はホルマリ

ンでよく固定されており、萎縮は軽度で肉眼的に健康な脳であった。くも膜や脳表血管を除去した後、非接触型3次元デジタルタイザーを用いて脳全体の初期形状を記録した。正中から脳半球に分割し、全体を3% agar に包埋し、正確に平行切断し1 cm厚にブロック化した。一度にマイクロスライスできるブロックサイズは最大7×7 cmであるため、必要に応じてさらに分割した。次に agar を除去し、ブロックを10%ゼラチン溶液に入れ気泡を除去して包埋後、ブロック全体を4%パラフォルムアルデヒドで一晩固定し、ゼラチンの外枠部分4ヵ所に垂直に針を刺入しマーキングした。振動刃マイクロスライサーを用いて100 μmの切片を作成した。組織切片をニッスル染色および髄鞘染色して、スキャナで電子化し、3Dニューロン再構築解析ソフトウェア (NeuroLucida TM) を用い手動的に組織構造の輪郭をトレースし、3D再構築した。再構築画像を初期形状と比較して標本作製に伴う変形の有無を検証し、さらに細胞構築の保存状況を検証した。

## 結 果

Fig.1に脳ブロックの一つから得た再構築像を異なる方向から示す。レンダリング等の改変は加えていない。ヒト大脳皮質に特有の深い脳溝や複雑な脳回が正確に再現

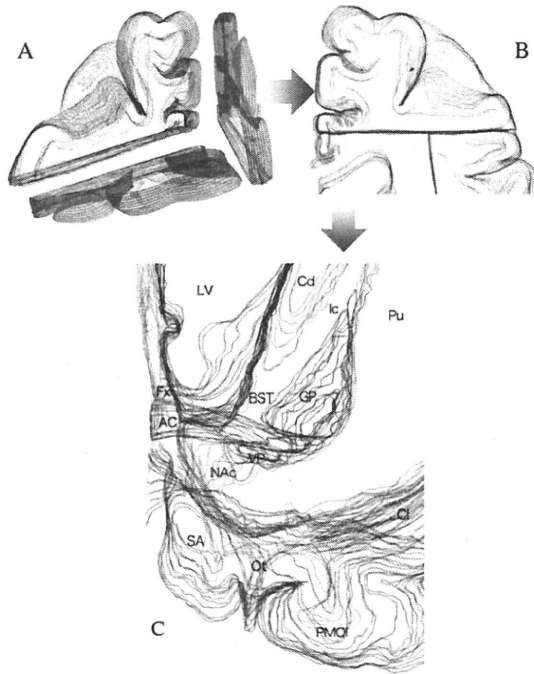


Fig.1 The contours of serial histological microslices were successfully reconstructed (A). The blocks could be put side by side and assembled into large block without any correction or revision (B). Contours of anterior basal ganglia could be clearly demonstrated according to cytoarchitecture (C). [LV, lateral ventricle; Cd, caudate nucleus; Ic, internal capsule; Pu, putamen; Fx, fornix; AC, anterior commissure; BST, bed nucleus of stria terminalis; GP, globus pallidus; VP, ventral pallidum; NAc, nucleus accumbens; SA, subcallosal area; Ot, olfactory tract; Cl, claustrum; PMOI, posteromedial orbital lobule]

されている (Fig.1-A)。3つのブロックから得たトレース像をそれぞれ拡大縮小や変形することなく限りなく近づけ、一つの像に組み合わせると、ブロック断面で矛盾はなく高い整合性が得られた (Fig.1-B)。このブロック内部の様々な領域はトレースの過程で組織の顕微鏡観察により同定できた (Fig.1-C)。

さらに再構築に用いた献体脳の帯状回 Brodmann area 32 の光顕像 (ニッスル染色, Fig.2) では、第 III 層の大錐体細胞や第 IV 層の有棘星状細胞が明瞭に確認され、大脳皮質層構造に特異的な細胞構築がよく保たれていることがわかった。

### 考 察

ヒト大脳アトラスは、Schaltenbrand & Wahren アトラス<sup>1)</sup> が最も広く手術支援ソフトウェア (SurgiPlan, FrameLink, StereoPlan, Cerefy など) に利用されている。しかし実際の脳形状は個人差に富み、Talairach グリッドで補正できるほど容易ではないため、機能的定位脳手術においては侵襲的な微小電極記録で標的神経核を生理学的に確認する作業が求められる。個体差に対応できる正確なアトラスであれば、微小電極記録という侵襲的操作を行わずに機能的定位脳手術が可能となるはずである。Yelnik ら<sup>2)</sup> は、スライス前に MRI で脳形状を記録し、作成した凍結固定スライス標本を検証し、補正に用いた。作製されたスライス標本では脳室が潰れ肉眼的に大きく変形し、特に周

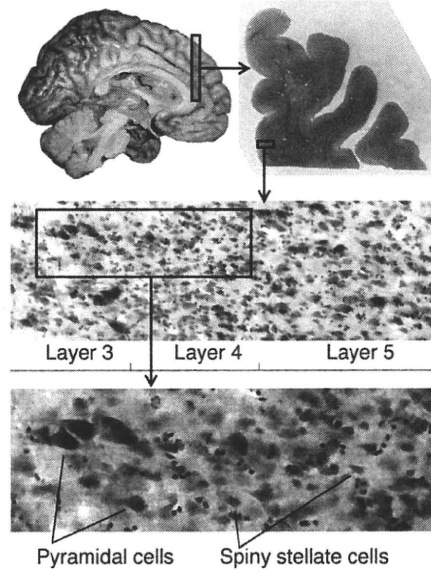


Fig.2 Nissl-staining of the section used for brain atlas reconstruction. Histological sections included in this partially reconstructed brain atlas provided the excellent preservation of area-specific cytoarchitecture of cerebral cortex; Brodmann area 32 was discriminated by the presence of large pyramidal neurons in deep layer III and spiny stellate neuron in layer IV in cadaver brain.

辺部 (脳表や脳室壁) は凍結固定に伴う損傷が激しい。この方法でも基底核や視床に局限したアトラスは作製可能かもしれないが、細胞構築が保たれていないため亜核などの同定は不可能である。このような先行研究からも、ヒト大脳という巨大で柔らかい組織を変形なく細胞構築を温存し全体を連続標本にすることの困難さがわかる。

我々の開発した方法では、脳は頭蓋から取り出す前に (in situ) 十分ホルマリン固定されている上、3次元デジタルで正確に脳表の形状保存ができ、agar で周囲を支持することでブロック化に伴う肉眼的変形を防ぎ、振動刃マイクロスライサーで細胞構築を保ちつつスライスすることにより、3次元の整合性と美しい組織染色画像を両立できることがわかった。

ヒト脳アトラス作成の第一段階として、完全に普遍的な形状モデルを得ることが目標である。将来のニューロモデレーションにおいて、様々な機能的脳疾患に対し、様々な治療標的 (神経核や神経線維) が開発される可能性を想定すると、皮質や脳幹も含めた、脳全体の座標アトラスを作成することが望まれる。

### 結 論

デジタル画像処理技術を応用し、ブロック間やブロック・半球間の3次元の整合性が保たれ、標本作製に伴う変形が全くなく、細胞構築が非常に良く保たれた再構築画像を得ることに成功した。

### 文 献

- 1) Schaltenbrand G et al: Atlas for stereotaxy of the human brain. Thieme, Stuttgart, 1977.
- 2) Yelnik J et al: A three-dimensional, histological and deformable atlas of the human basal ganglia I. Atlas construction based on immunohistochemical and MRI data. NeuroImage 34: 618-638, 2007.

# ヒト脳座標アトラス作成におけるデジタル画像技術の応用

宮城 靖<sup>1</sup> / 福田 孝一<sup>2</sup> / 諸岡 健一<sup>1</sup> / 陳 献<sup>1</sup> / 早見 武人<sup>1</sup>  
岡本 剛<sup>1</sup> / 砂川 賢二<sup>1</sup> / 飛松 省三<sup>3</sup> / 吉浦 敬<sup>4</sup>

抄 録：機能的定位脳手術ではヒト脳座標アトラス (Schaltenbrand & Wahren 1977) を参考に標的神経核の仮座標が定められることが多い。しかし個人差の大きい脳を一つのアトラスで表しその座標を機能的定位脳手術で用いるのは危険である。多数の脳標本から形状を平均化した標準脳でアトラスを作成し、これを各個体の脳形状に応じて non-rigid に内部座標を補正できるテラメイド脳アトラスが望まれる。ヒト脳のように大きく柔らかな臓器を、変形させずに切片化し、なおかつ良質の組織像を得るためには、特殊な機材と熟練、そして膨大な時間を要する。そのため、視床や基底核・脳幹部など深部構造に限られた狭い範囲を座標化するか、機械的変形を無視して脳半球全体を座標化するかの選択に迫られる。我々は三次元的整合性と細胞構築を両立させる、より簡便なヒト脳座標アトラスの作成法を検討した。日本人の献体脳を用い、非接触型3次元デジタイザーで脳全体の初期形状を記録した後、正確な平行切断で1 cm厚にブロック化、振動刃ミクロトームを用いて100 μmの切片を作成、組織切片をニッスル染色後、スキャナで電子化し、3D再構築解析ソフトウェアで用手的に組織構造の輪郭をトレースし再構築した。これらの手法により標本作製に伴う機械的変形が全くない、三次元的整合性と細胞構築を両立させる、より簡便なヒト脳アトラスの作成法を確立できた。

索引用語：デジタル画像処理技術；ヒト脳座標アトラス；機能的定位脳手術；基底核

- 1 九州大学デジタルメディスン・イニシアティブ  
〔〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1 / Tel.092-642-6693 / Fax.092-642-6693〕
- 2 九州大学大学院 医学研究院 神経形態学分野
- 3 九州大学大学院 医学研究院 臨床神経生理学分野
- 4 九州大学大学院 医学研究院 臨床放射線科学

機能的脳神経外科 49(2010)136-141

## はじめに

機能的定位脳手術は解剖学的標的設定と電気生理学的同定が必要とされる。古くから機能的定位脳手術の解剖学的指標として最も使用されてきた脳アトラスは Schaltenbrand & Bailey, Schaltenbrand & Wahren<sup>13)</sup> や Talairach & Tournoux<sup>14)</sup> で、これらをもとに手術用にデジタル化もなされている<sup>11)</sup>。Schaltenbrand & Wahren アトラス<sup>13)</sup>では3方向からの肉眼組織画像が提示されているが、各切片が等間

隔ではなく、観察方向によって個体が異なるため座標の整合性がない。また再構成した神経核は三次元的に不自然な形状を呈し、冠状断切片は交連間線に垂直ではなく7°傾斜している<sup>6,7)</sup>。しかし最も実用的でない点は、個人の脳に適應するための変形が単純な変倍操作のみで自由度がないことである。その結果、臨床応用するには脳画像に合わせてかなりの縮尺調整を行う必要があるが、現在の変倍操作では個体差に対応した変形ができずテラメイド手術ができない。また同一個体内であっても殆どの場合左右対称ではなく、術前MRIで左右の脳半球～視

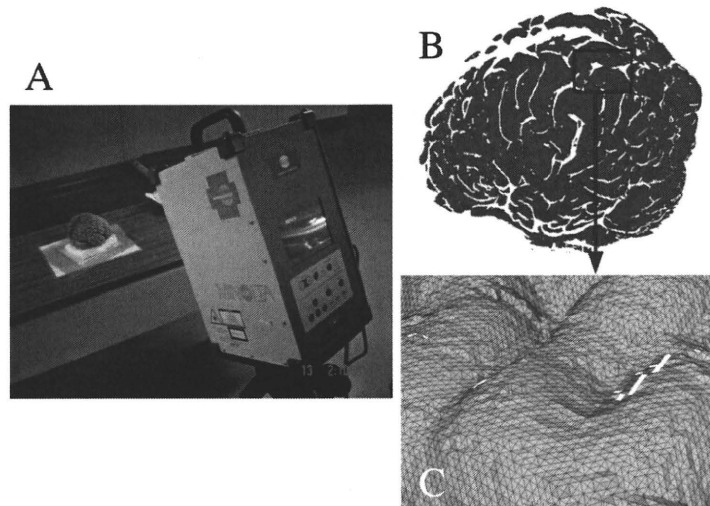


Fig.1 Digital recording of the surface data of human brain. (A) After removing the arachnoid membrane, the whole surface of the brain was scanned by a non-contact 3D digitizer [VIVID910, Konica, Minolta, Sakai, Japan]. (B) The multiple range images acquired from different views were registered to convert them into a unified coordinate system. The Iterative Closest Point (ICP) algorithm was used to find the relationship between two different coordinates. (C) The mesh surface of the integrated brain model was reproduced with considerably high resolution and precision.

床・中脳にねじれ(回転変形)した症例に遭遇することも非常に多い。個人差の大きい脳形状を一つのアトラスで表し手術で用いるのは明らかに危険であり、なるべく多数の脳標本から形状を平均化した標準脳によるアトラスや、各個体の脳形状に応じて内部座標を補正できる、全く新しいティラーメイト脳アトラスが望まれる<sup>9)</sup>。しかしヒト脳のように柔らかく大きな臓器を、変形させることなく切片化し、なおかつ高画質の組織像を得るためには、特殊な機材と熟練、そして膨大な時間を要する。そのため視床や基底核・脳幹部など深部構造に限られた狭い範囲を精密に座標化するか、ある程度の機械的変形や細胞構築の描出を無視して脳半球全体を座標化するかの選択に迫られる。我々は三次元的整合性と細胞構築を両立させる、より簡便なヒト脳アトラスの作成法を確立した。

## 方 法

解剖実習に用いられる献体から選別された脳(89歳, 男性)を用いた。献体の利用に関しては、御遺族に本研究の主旨を説明した上で、献体の脳半球を実習と同時に研究利用することに対して文書で承諾を得た。これらの実習用献体は死後10%ホルマリン5

リットルを大腿動脈から注入し12時間経過した後、エタノール・ホルマリン溶液に数週間浸潤させた後、実習開始まで4℃に保存したものである。頭蓋から摘出した脳はホルマリンでよく固定されており、萎縮は軽度で肉眼的には健康な外観であった。くも膜や脳表血管を除去した後、非接触型三次元デジタイザ(VIVID 910, コニカミノルタ センシング, Fig.1-A)を用いて脳全体の初期形状を記録した。正中から脳半球に分割し、全体を3% agar に包埋し、正確に平行切断し1 cm厚にブロック化した。一度にスライスできるブロックサイズは最大7×7 cmであるため、必要に応じてさらに分割した。次に agar を除去し、ブロックを10%ゼラチン溶液に入れ気泡を除去して包埋後、ブロック全体を4%パラフォルムアルデヒドで一晩固定し、ゼラチンの外枠部分4ヵ所に垂直に針を刺入しマーキングした。振動刃マイクロスライサ(DTK-3000W, 堂阪)を用いて100 μmの切片を作成した。組織切片をニッスル染色および髄鞘染色して、スキャナで電子化し、3Dニューロン再構築解析ソフトウェア(NeuroLucida™, MicroBrightField Bioscience, Inc., USA)を用いて組織構造の輪郭を用手的にトレースし再構築した。再構築画像を初期形状と比較して標本作製に伴う変形の有無を検証し、さらに細胞構築の保存状況を検証した。

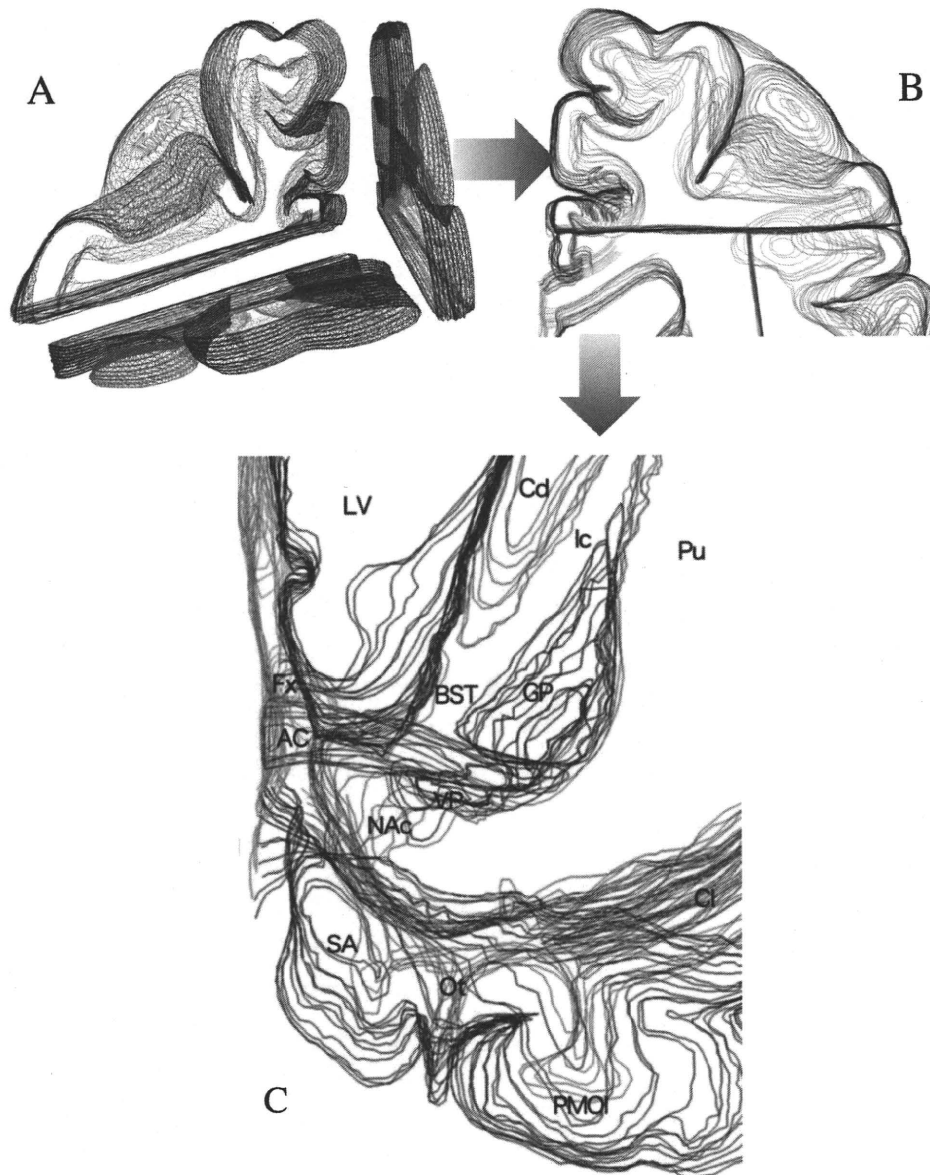


Fig.2 The contours of serial histological microslices were successfully reconstructed (A). The blocks could be put side by side and assembled into large block without any correction or revision (B). Contours of anterior basal ganglia could be clearly demonstrated according to cyto-architecture (C). [LV, lateral ventricle; Cd, caudate nucleus; lc, internal capsule; Pu, putamen; Fx, fornix; Ac, anterior commissure; BST, bed nucleus of stria terminalis; GP, globus pallidus; VP, ventral pallidum; NAc, nucleus accumbens; SA, subcallosal area; Ot, olfactory tract; Cl, claustrum; PMOI, posteromedial orbital lobule]

## 結 果

非接触型三次元デジタイザの空間分解能は0.456 mmである。一方、最新のMRIやCTでも0.5 mm厚の医用画像を取得できるが、この時の三次元空間分解能は1.12 mmである。またMRIやCTではsegmentationの閾値設定により脳の形状はいくらでも変化する。これらを比較すると、デジタイザで得

られる形状データは最新の医用画像より密で高精度であることがわかる。カメラから観測可能な物体表面のみの形状データが得られるが (Fig.1-B), 対象物の姿勢を変えながら異なる視線方向から物体の全周表面を計測し、全計測データを貼りあわせることで全周表面形状モデルの生成を試みた。具体的に、各計測データはそのデータを取得した視線方向に依存した座標系で記述されている。これらの座標系の位置合わせを、ICP (Iterative Closest Point) アルゴリズム

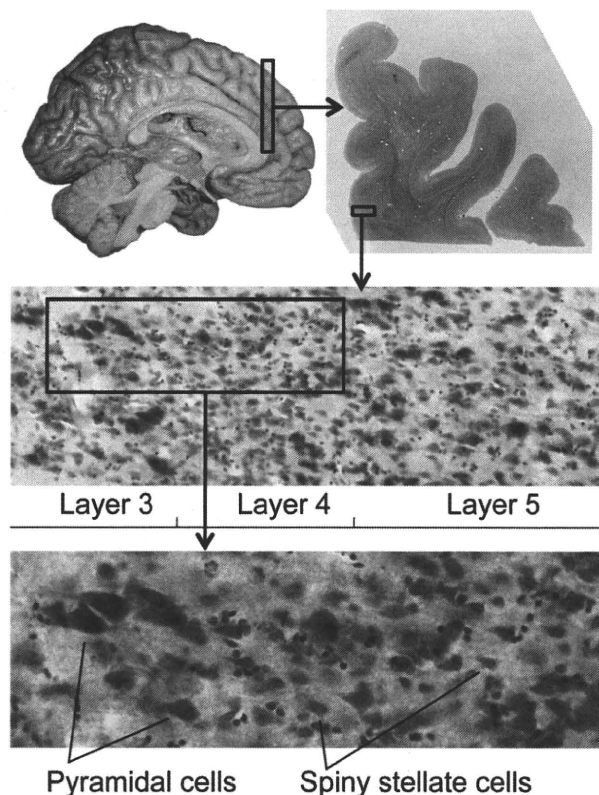


Fig.3 Nissl-staining of the section used for brain atlas reconstruction. Histological sections included in this partially reconstructed brain atlas provided the excellent preservation of area-specific cytoarchitecture of cerebral cortex; Brodmann area 32 was discriminated by the presence of large pyramidal neurons in deep layer III and spiny stellate neuron in layer IV in cadaver brain.

ムを用いて行い、その結果から全計測データを統一した世界座標系に変換する。ICP アルゴリズムは、ある物体表面領域のデータを異なる方向から取得し、その領域内の対応関係に基づいて位置合わせを行う。そのため冗長なデータが存在しているため、このようなデータを削除するとともに、表面再構築を行わなければならない。Morooka らが提案した手法にもとづきデータ統合と表面再構築を行い<sup>5)</sup>、最終的に非常に滑らかな表面形状を復元できた (Fig.1-C)。

脳ブロックの一つから得た再構築像を異なる方向から示す (Fig.2)。レンダリング等の改変は加えていない。ヒト大脳皮質に特有の深い脳溝や複雑な脳回が正確に再現されている (Fig.2-A)。3つのブロックから得たトレース像をそれぞれ拡大縮小や変形することなく限りなく近づけ、一つの像に組み合わせると、ブロック断面で矛盾はなく高い整合性が得られた (Fig.2-B)。このブロック内部の様々な領域はトレ

スの過程で組織の顕微鏡観察により同定できた (Fig.2-C)。

さらに再構築に用いた献体脳の帯状回 Brodmann area 32 の光顕像 (ニッスル染色, Fig.3) では、第 III 層の大錐体細胞や第 IV 層の有棘星状細胞が明瞭に確認され、大脳皮質層構造に特異的な細胞構築がよく保たれていることがわかった。

## 考 察

機能神経外科手術においてヒト脳アトラスは、Schaltenbrand & Wahren アトラス<sup>13)</sup>が最も広く応用されており、現在のような最先端医療におけるコンピュータ技術の貢献を予見し、Yoshida は初めて大脳アトラスの電子化を試みた<sup>16)</sup>。現在では Talairach グリッド<sup>14)</sup>で3軸の単純変倍操作を加えながら<sup>10)</sup>、患者の MRI 画像に適合できるよう、殆どの定位機能神経外科手術支援ソフトウェア (SurgiPlan, FrameLink, StereoPlan, Cerefy など) に搭載されている。しかし実際の脳形状は個人差に富み、Talairach グリッドで補正できるほど容易ではないため<sup>8)</sup>、機能的定位脳手術においては侵襲的な微小電極記録で標的神経核を電気生理学的に確認する作業が求められる。しかしヒト脳の場合、電気生理学的研究の対象は不随意運動や難治性疼痛などの機能的脳疾患の特定の神経核に限られており、それら以外の神経核・白質の電気生理学的知見は殆どない。個体差に対応できる正確なアトラスであれば、微小電極記録という侵襲的操作を必要せず、新規の神経核を標的とした機能的定位脳手術が期待できるが、そのためには複数体から得られる平均的・普遍的な解剖情報 (座標) が必要になる。

また脳のサイズや形状には明らかな人種差があり、東アジア人の脳や神経頭蓋は西洋人に比較して前後径が短く幅が広く球体に近い形状となっている<sup>12)</sup>。脳内構造の人種差は全く未知の領域であるが、少なくとも西洋人単一個体の脳を普遍化するのは無理で、ましてや単純な変倍操作によって日本人の脳内座標を決めるのは非常に危険である。この不正確さを補うためには侵襲的な電気生理学的検索が必要であるが、それでも精度には限界があり脳内出血など合併症のリスクがつかまとうことになる。

病理検査や外科治療の際に得られる知見を除き、本邦ではヒト脳が解剖学的研究材料として扱われることはほとんどない。ヒト脳のように柔らかく大きな臓器を変形させることなく切片化し、なおかつ良質の組織像を得るためには、セロイジン樹脂(現在入手不能)固定を要するが、樹脂が組織全体に浸透するのは膨大な時間(数ヵ月～1年がかり)を要する作業であり、さらに大型マイクロームなど特殊な機材・環境と熟練を要する。そのため大脳半球全体ではなく、視床や基底核・脳幹部など深部構造に限られた狭い範囲で凍結標本を作成し精密に座標化する<sup>1,3,4)</sup>、ある程度の機械的変形や微細細胞構築の破壊を無視して大脳半球全体の凍結標本で座標化するかの選択に迫られる。Yelnikら<sup>15)</sup>は、死後のMRIで脳形状を記録し、作成した凍結固定スライス標本を検証し補正に用いた。しかし固定処理前に頭蓋から摘出されたため重力の影響で凍結前に変形しており、作製されたスライス標本では脳室が潰れ肉眼的に大きく変形している。また表面部(脳表や脳室壁)は凍結固定に伴う組織損傷が著しい。肉眼的変形は摘出前MRIを指標とした補正処理を行えば、一応、基底核や視床に限局したアトラスは作製可能である。しかし微細な細胞構築が保たれていないため垂核構造などの同定は不可能である。このような先行研究からも、ヒト大脳という巨大で柔らかい組織を変形なく細胞構築を温存し全体を連続標本にすることがいかに困難なのかがわかる。

我々の開発した方法では、脳は頭蓋から取り出す前に(*in situ*)十分ホルマリン固定されている上、三次元デジタイザで正確に脳表の形状保存ができ、agarで周囲を支持することでブロック化に伴う肉眼的変形を防ぎ、振動刃マイクロスライサで細胞構築を保ちつつスライスすることにより、三次元的整合性と美しい組織染色画像を両立できることがわかった<sup>2)</sup>。

ヒト脳アトラス作成の第一段階として、大脳全体を用いてより普遍的な形状モデルを得ることが目標である。将来の機能的定位脳手術において、様々な機能的脳疾患に対し、様々な治療標的(神経核や神経線維)が開発される可能性を想定すると、皮質や脳幹も含めた広範囲で、三次元的に自由に形状を調整できる次世代型座標アトラスを作成することが望まれる。

## 謝辞

本研究は、平成19年度九州大学教育研究プログラム・研究拠点形成プロジェクト「デジタルブレイン教育・研究拠点の形成」、平成20年度医科学応用財団研究助成金(鈴木健三記念財団)「安全・正確な脳手術のための次世代型デジタルヒト脳図譜の開発」、平成21年度日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究C(一般)21591873「日本人脳による定位脳手術用デジタル脳座標アトラスの開発」、平成22年度文部科学省科学研究費補助金新学術領域「医用画像に基づく計算解剖学の創成と診断・治療支援の高度化」公募研究22103510「診断治療支援のための脳シミュレータの構築」による助成を受けた。

## 文献

- 1) Chakravarty MM et al: The creation of a brain atlas for image guided neurosurgery using serial histological data. *NeuroImage* 30: 359-376, 2006.
- 2) Fukuda T et al: A simple but accurate method for histological reconstruction of the large-sized brain tissue of the human that is applicable to construction of digitized brain database. *Neurosci Res* 67: 260-265, 2010.
- 3) Hirai T et al: Distribution of tachykinin- and enkephalin-immunoreactive fibers in the human thalamus. *Brain Res Rev* 14: 35-52, 1989.
- 4) Morel A et al: Multiarchitectonic and stereotactic atlas of the human thalamus. *J Comp Neurol* 387: 588-630, 1997.
- 5) Morooka K et al: Self-organizing Deformable Model: A new method for fitting mesh model to given object surface. *International Symposium on Visual Computing, LNCS 3804*, pp.151-158, 2005.
- 6) Niemann K et al: Verification of the Schaltenbrand and Wahren stereotaxic atlas. *Acta Neurochir (Wien)* 129: 72-81, 1994.
- 7) Niemann K et al: One atlas- three anatomies: Relationships of the Schaltenbrand and Wahren microscopic data. *Acta Neurochir (Wien)* 141: 1025-1038, 1999.
- 8) Niemann K et al: A brainstem stereotactic atlas in a three-dimensional magnetic resonance imaging navigation system: first experiences with atlas-to-patient registration. *J Neurosurg* 90: 891-901, 1999.
- 9) Niemann K et al: The Morel stereotactic atlas of the human thalamus: Atlas-to-MR registration of internally consistent canonical model. *NeuroImage* 12: 601-616, 2000.
- 10) Nowinski WL: Anatomical targeting in functional neurosurgery by the simultaneous use of multiple Schaltenbrand-Wahren brain atlas microseries. *Stereotact Funct Neurosurg* 71: 103-116, 1998.
- 11) Nowinski WL et al: *The Cerefy Clinical Brain Atlas on CD-ROM*. New York, Thieme, 2004.
- 12) Rushton JP et al: Brain size, IQ, and racial-group differences: Evidence from musculoskeletal traits. *Intelligence* 31: 139-155, 2003.
- 13) Schaltenbrand G et al: *Atlas for stereotaxy of the human brain*. Thieme, Stuttgart, 1977.
- 14) Talairach J et al: *Co-planner stereotactic atlas of the human brain*. Thieme, New York, 1988.



- 15) Yelnik J et al: A three-dimensional, histological and deformable atlas of the human basal ganglia I. Atlas construction based on immunohistochemical and MRI data. *NeuroImage* 34: 618-638, 2007.
- 16) Yoshida M: Creation of a three-dimensional atlas by interpolation from Schaltenbrand- Bailey's atlas. *Appl Neurophysiol* 50: 45-48, 1987.

---

## Application of digital imaging technique for the construction of stereotactic human brain atlas

Yasushi Miyagi<sup>1</sup> / Takaichi Fukuda<sup>2</sup> / Ken-ichi Morooka<sup>1</sup> / Xian Chen<sup>1</sup> / Taketo Hayami<sup>1</sup>  
Tsuyoshi Okamoto<sup>1</sup> / Kenji Sunagawa<sup>1</sup> / Shozo Tobimatsu<sup>3</sup> / Takashi Yoshiura<sup>4</sup>

1 Digital Medicine Initiative, Kyushu University

2 Department of Anatomy and Neurobiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

3 Department of Clinical Neurophysiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

4 Department of Clinical Radiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

**Abstract:** An ideal human brain atlas must provide the universal coordinates of standard healthy brain. Morphology of human brain contains considerable inter-individual variety; however, the classical human brain atlases have been made from a limited number of materials. A large organ such as human brain is subject to mechanical deformation and the production of stereotactic human brain atlases is still time-consuming and needs special instruments, environments and skills. To achieve both the spatial consistency and high histological quality for stereotactic human brain atlases, we have established a novel technique for constructing the stereotactic brain atlas using a formalin-fixed cadaver brain of the Japanese, blade-oscillation microslicing and digital imaging techniques. Our method enabled the accurate reconstruction of human brain histological slices with the three-dimensional consistency necessary for the stereotactic atlases of human brain, as well as the successful preservation of original macroscopic shape and cytoarchitecture.

**Keywords:** Human brain atlas; Histological section; Stereotactic functional neurosurgery

---

受付：2010年9月30日

# ジストニア・パーキンソン病の定位脳手術支援のための脳座標アトラス

○宮城 靖<sup>1,5</sup> 諸岡健一<sup>2</sup> 福田孝一<sup>3</sup> 倉岡晃夫<sup>4</sup> 砂川賢二<sup>5</sup> 岡本 剛<sup>6</sup>

吉浦 敬<sup>7</sup> 陳 猷<sup>8</sup> 早見武人<sup>9</sup> 飛松省三<sup>10</sup>

1. 医療法人貝塚病院機能神経外科 2. 九州大学システム情報科学研究院情報知能工学部門実世界ロボティクス  
3. 熊本大学大学院生命科学研究部形態構築学 4. 九州大学医学研究院系統解剖学 5. 九州大学医学研究院心臓血管病態制御学 6. 九州大学医学研究院 7. 九州大学病院臨床放射線科 8. 山口大学大学院医学系研究科応用医工学 9. 岡山大学大学院自然科学研究科産業創成工学 10. 九州大学医学研究院臨床神経生理

## Digital brain atlas for the stereotactic neurosurgery of Dystonia and Parkinson's disease

Yasushi Miyagi, Ken-ichi Morooka, Takaichi Fukuda, Akio Kuraoka, Kenji Sunagawa, Tsuyoshi Okamoto, Takashi Yoshiura, Xian Chen, Taketo Hayami, Shozo Tobimatsu

### 1. 緒言

ジストニアやパーキンソン病など不随意運動に対する機能的定位脳手術では、精密なヒト脳アトラス<sup>1)</sup>を参考に第3脳室の交連間線と Talairach グリッドで補正を加えた上で手術部位が計画される。しかし実際の脳形状は個人差に富むため、侵襲的な微小電極記録で標的神経核を確認する作業が求められる。特に現在の脳アトラスは欧米人脳から作成されているため、我が国の機能的定位脳手術において日本人に特化した脳アトラスが求められる。我々は工学的手法を応用し、ヒト大脳アトラスの開発に着手した。我々の理想とする脳アトラスは日本人のホルマリン脳を材料とし、三次元的整合性を持ち、脳形状の個体差に対応して自由に変形に可能で、年齢や脳疾患による部位依存性萎縮要素を加味し、複数の位置情報と機能情報を統合し格納・更新できるデジタルアトラスである。

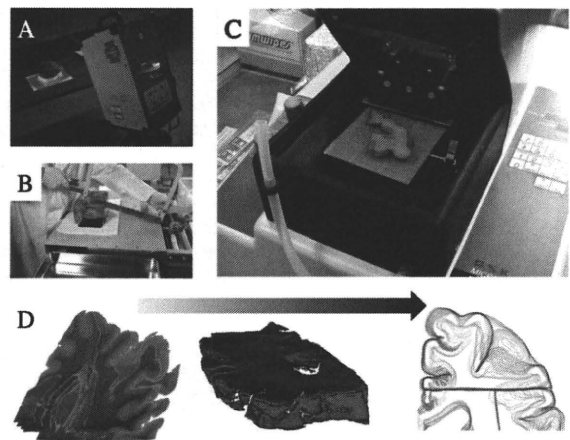
### 2. 対象と実験方法

日本人脳は正常解剖実習用のホルマリン固定脳を用いた。非接触型3次元デジタイザーを用い、標本作製に伴う変形・欠損を補正するために脳全体の初期形状を記録した(Fig.1A)。まず3% agar に包埋した脳を正確に平行切断し1cm厚にブロック化する方法を開発した(Fig.1B)。切断後にいったん agar を除去し、再度、非接触型3次元デジタイザーで各ブロックの形状を記録した。次にブロックをゼラチンに包埋後、全体を4%パラホルムアルデヒドで一晩固定し、大型の振動刃マイクロトームを用いて組織学標本用の連続切片を作成した(Fig.1C)。また包埋したゼラチンの外枠部分4ヶ所に垂直に針を刺入しマーキングすることで連続切片から3次元再構築する際のリファレンスを得た(Fig.1D)。

### 3. 結果

最終的な切片標本において、マーキング間の長さを測定し、変動係数(coefficient of variance)が0.005と標本作製に伴う変形がごくわずかであることが分かった。

Figure 1



### 4. 今後の展開

今回確立した大型組織標本作製法で一体分の日本人脳の完全な連続標本を作成し電子化する(デジタルアトラス)。また第二段階として複数体の脳MRI画像から得た脳形状デジタルデータを平均化し、より標準的な形状を作成する(ハイブリッドアトラス)。また第三段階(デフォーマブルアトラス)として、標準脳形状を各ジストニアやパーキンソン病患者のMRI画像に対応し三次元的に自由に変形できるアルゴリズムを開発し、第四段階として淡蒼球内節や視床下核など手術標的を正確に提示できるテイラーメイドアトラスとして検証する。第五段階で脳内座標に対し機能情報を格納し、文献検索やデータマイニングのできるデータベースアトラス、開頭手術計画や手術訓練に用いるシミュレータアトラスへ発展させたい。

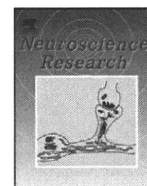
### 参考文献

1) Schaltenbrand G, Wahren W: Atlas for stereotaxy of the human brain. Thieme, Stuttgart, 1977



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neures](http://www.elsevier.com/locate/neures)

## Technical note

# A simple but accurate method for histological reconstruction of the large-sized brain tissue of the human that is applicable to construction of digitized brain database

Takaichi Fukuda<sup>a,\*</sup>, Ken'ichi Morooka<sup>b</sup>, Yasushi Miyagi<sup>b</sup><sup>a</sup> Department of Anatomy and Neurobiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan<sup>b</sup> Digital Medicine Initiative, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 January 2010

Received in revised form 3 March 2010

Accepted 11 March 2010

Available online 18 March 2010

## Keywords:

Human brain

Atlas

Histology

Reconstruction

Cytoarchitecture

Database

## ABSTRACT

Research on the human brain has undoubted significance, but our knowledge on its detailed morphology is still limited. We have developed a simple method for reconstruction of large-sized brain tissues of the human. Fixed brains were cut into blocks (maximum size 7 cm × 7 cm × 1 cm), embedded and post-fixed in gelatin just one overnight before obtaining complete serial sections with a vibrating microtome. Quality of stained materials was sufficient to create three-dimensional histological maps, where digital reconstructions from adjoining blocks could be accurately combined. The present method will facilitate both direct examination of the human brain and construction of its histological database.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

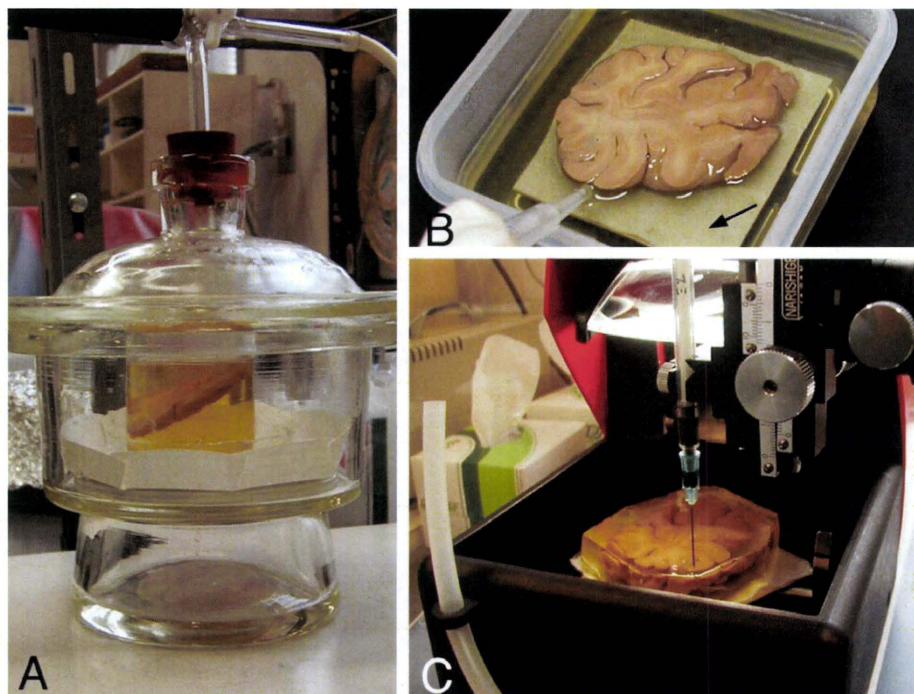
## 1. Introduction

Most neuroscientists in any research field would agree that one of the ultimate goals of our study is to know the human brain even though we do not directly handle it. Animal experiments are thus designed to address various issues through the sophisticated methods that are difficult to conduct in humans, and the obtained results are expected to be applied to the human nervous system. However, structures of the brain show substantial interspecies differences such that even non-human primates have the brains that are different from ours (Foxman et al., 1986; Caminiti et al., 2009). Therefore some cautiousness is necessary when one interprets animal data in relation to human brain functions in either normal or pathological condition. In this context there is a critical problem that quantity of our knowledge about brain anatomy shows profound differences between humans and experimental animals. The vast majority of modern neuroanatomical studies have been executed in animals, whereas structural details in many anatomical regions of the human brain still remain in the range of what were described in classical studies. Therefore more investigations are necessary to illuminate the internal architecture of the human brain in light of the recent findings in other fields. The rapid progress in functional

imaging studies particularly requires updating our knowledge on human brain anatomy.

One practical reason for the difficulty in investigating human brains would be their extraordinary large size. For an in-depth analysis of a particular anatomical region, observations of serial sections covering its entire field as well as its surround are essential. However, for that purpose a huge microtome and exceptionally large slides must be prepared, an extremely long period is necessary for dehydrating and embedding large brain blocks, and the proficiency in craft works of a rather old-fashioned style is another requirement. All these conditions are incompatible with modern laboratories where mouse brains are most frequently used. Although a few big projects aiming at preparing serial frozen sections from the whole cadaver such as Visible Human Project are in progress, a large amount of funds as well as specially made machineries are prerequisite. These circumstances would lead to few opportunities of detailed examination of human brain structures despite the availability of the materials; most traditional medical schools would have the donation program for cadavers used in their education of gross anatomy. We therefore intended to develop a simple method that enables researchers in conventional anatomical laboratories to prepare and analyze complete serial sections of the human brain covering large region of the brain. The obtained histological specimens had sufficient quality to construct image database of the human brain at the light microscopic level that cannot be prepared by radiological methods.

\* Corresponding author. Tel.: +81 92 642 6053; fax: +81 92 642 6059.  
E-mail address: [fukuda@a3rd.med.kyushu-u.ac.jp](mailto:fukuda@a3rd.med.kyushu-u.ac.jp) (T. Fukuda).



**Fig. 1.** Embedding of the brain block into gelatin. (A) The block is soaked in gelatin solution and lightly depressurized to replace the air trapped in the deep part of the tissue with gelatin. (B) The brain block is laid on a 3 mm-thick layer of gelatin that was hardened and immobilized beforehand through the MAGICTAPE® (arrow) stuck on the metal stage, then gelatin solution is poured over the whole block. (C) The reference tracks are made into the surrounding gelatin by applying India ink through the vertical needle.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subject

A brain of a cadaver, 89-year-old male Japanese, was used in the present study. The cadaver was donated to Kyushu University Faculty of Medicine by the donation scheme of cadavers, 'Shiragiku-Kai (White Chrysanthemum Society)', that includes the understanding and written consent of each member of the Society. The documented acceptance of the storage of histological materials was further obtained from the bereaved family. The conventional procedures of preparing materials for gross anatomy practical course were performed. Thus 5 liters of 10% formalin were injected through the femoral artery, the body was left untouched for 12 h, then immersed in an alcohol solution (Solmix H-11) for several weeks. Thereafter the body was stored at 4 °C before use in the practical course for medical students. The brain was removed during the course and stored at 4 °C in phosphate-buffered saline containing 0.1% sodium azide. After removing the arachnoid membrane the whole surface of the brain was scanned by a non-contact 3D digitizer (VIVID910, Konica Minolta, Sakai, Japan). By this method the shape of the brain was accurately measured and digitally stored before histological preparations. Subsequently the brain was sagittally cut into two halves and each hemisphere was embedded in 10% agar. Using the specially designed brain-cutting tool (Visceracut VC-600, Meiko Medical, Munakata, Japan), the brain embedded in agar was cut into serial coronal slices, each 1 cm in thickness.

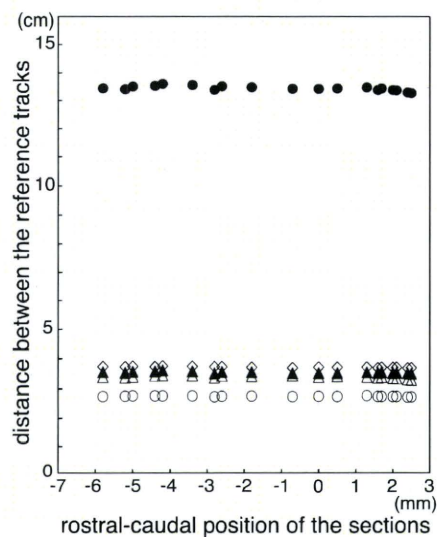
### 2.2. Embedding procedures

The surrounding agar and the remaining membranous tissues and blood vessels on the surface of the slice were carefully removed under operation microscope. As the maximum size of histological sections available in the present method was 7 cm × 7 cm, each slice was further divided into 2 or 3 blocks when necessary. The block was soaked in 10% gelatin (~40 °C) and lightly depressurized to replace the air trapped in the deep part of the tissue with gelatin (Fig. 1A). In order to cut complete serial sections from the whole block, tissues were embedded in gelatin as follows (Fig. 1B): adhesive tapes with hook and loop fasteners (MAGICTAPE®; Kuraray, Osaka, Japan) were applied on the metal surface of the sample stage (7 cm × 7 cm) of the microtome, a 3 mm-thick layer of gelatin was poured and hardened on the MAGICTAPE®, tissue block was laid on it, then gelatin solution was again poured over the tissue block. The entire tissue was thus put inside the gelatin that was made immobile on the sample stage, and the serial sectioning was continued until tissues at the bottom surface of the block were collected. To make reference tracks for reconstructions a 23G needle attached to a tuberculin syringe was vertically penetrated into the surrounding gelatin (but not inside the tissue) at 4 points using stereotaxis manipulator (Narishige, Tokyo, Japan) and applying India ink. The gelatin block

was further hardened by fixation with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline overnight before sectioning.

### 2.3. Histology

Serial sections were cut with a vibrating microtome (DTK-3000W, Dosaka, Kyoto, Japan) at 100 μm thickness. Each fourth section was mounted on a slide coated with gelatin and chromium alum, dried and processed for Nissl staining using thionin. To improve staining quality, the following procedure that removes lipid by mimicking paraffin embedding was effective (Fukuda et al., 1993): sections were dehydrated with ascending ethanol, cleared in xylene, then rehydrated before



**Fig. 2.** Deformity-free preparation of the serial sections. The distance between the reference tracks was measured in individual sections and compared along the rostral-caudal position of the sections. Both the distances between each pair of the 4 tracks (bottom) and the sum (perimeter of the square; top) are kept constant throughout the serial sections.