

201128077A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

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

平成 23 年度 総括研究報告書

研究代表者 宮 城 靖

平成 24 年 (2012) 3 月

## 目次

### I. 班員構成員名簿

### II. 総括研究報告

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

九州大学大学院医学研究院心臓血管病態制御学講座

医療法人貝塚病院 機能神経外科

宮城 靖

### III. 分担研究報告

ジストニア治療の標的となる淡蒼球内節の組織構築を詳細に解析し未知の亜区域を内節内部に見いだす

熊本大学大学院生命科学研究部形態構築学

福田 孝一

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

東京女子医科大学 脳神経外科

平 孝臣

ジストニアに対する淡蒼球内節刺激の長期効果に関する研究

日本大学医学部 脳神経外科

深谷 親

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

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 山田 和慶

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

都立神経病院 脳神経内科

横地 房子

### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

### V. 研究成果の刊行物・別刷

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  
研究班

平成 23 年度 班員

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	宮城 靖	九州大学医学研究院 循環器内科学分野 心臓血管病態制御学講座 医療法人貝塚病院 機能神経外科	共同研究員 部長
研究分担者	福田孝一	熊本大学大学院 生命科学研究部 形態構築学分野	教授
	平 孝臣	東京女子医科大学 脳神経外科	臨床教授
	横地房子	東京都立神経病院 脳神経内科	医員
	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
	深谷 親	日本大学医学部 脳神経外科	准教授
研究協力者	飛松省三	九州大学医学研究院 臨床神経生理学	教授
	諸岡健一	九州大学システム情報科学研究院 実世界ロボティクス講座	准教授
	岡本 剛	九州大学医学研究院 先端医療医学部門	准教授
	梶 龍兒	徳島大学病院 医学部 神経内科	教授
	梅村 淳	名古屋市立大学大学院医学研究科 脳神経外科	准教授
	上利 崇	岡山大学病院 脳神経外科	助教
	杉山憲嗣	浜松医科大学 脳神経外科	准教授
事務局	徳間博倫	九州大学医系学部等学術協力課研究戦略係 〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1 TEL 092-642-6780 FAX 092-642-6776 e-mail ijksenryaku@jimu.kyushu-u.ac.jp	係長
経理事務 担当者	都々木 明	九州大学医系学部等財務課経理第一係 TEL 092-642-6006 FAX 092-642-6022 e-mail ijzkeiril@jimu.kyushu-u.ac.jp	係長

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

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

研究代表者 宮城 靖 九州大学大学院医学研究院心臓血管病態制御学講座 共同研究員  
医療法人貝塚病院 機能神経外科 部長

研究要旨

全身性ジストニアは難治性の脳基底核疾患で、局所や全身の筋緊張異常や不随意運動を呈する。有効な治療薬はなく定位的淡蒼球内節手術が唯一の有効な治療法であるが、その成績は著効から無効まで多様性に富む。本研究では、ジストニア患者の脳局所解剖および機能局在の特殊性に着目し、開発中の日本人専用定位脳手術アトラスを用いて、ジストニア患者の脳基底核、特に淡蒼球内節の高精度医用画像と定位脳手術で得られた電気生理学データを解析し、手術成績を左右する脳内構造の個体差・疾患特異性を明らかにして、治療に有効な治療計画法を確立する。平成23年度は、数少ないジストニア手術データを国内の主要手術施設から集積し、医用画像からGPi内の刺激電極位置を特定し手術成績との関連を調査した。その結果、GPi後外側部を中心とした刺激電極の分布が得られたが、ジストニア症状の改善度とGPi内の刺激部位に明らかな関連性は認められず、個々の手術データからは罹病期間、罹患部位、手術時年齢など様々な因子が関与していることがわかった。収集し得たMRIデータからジストニア脳の3Dモデルを継続して作成しており、脳組織座標アトラスを応用して、個々のジストニア症例に対応できるGPiの新規ターゲッティング法を引き続き開発中である。

分担研究者

福田孝一

熊本大学大学院生命科学研究部  
形態構築学分野・教授

平 孝臣

東京女子医科大学脳神経外科学・  
臨床教授

深谷 親

日本大学医学部脳神経外科・准教授

横地房子

東京都立神経病院脳神経内科・医員

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

研究協力者

諸岡 健一

九州大学大学院システム情報科学研究院  
実世界ロボティクス講座・准教授

岡本 剛

九州大学大学院医学研究院・准教授

飛松 省三

九州大学大学院医学研究院

臨床神経生理学・教授

梶 龍兒

徳島大学医学部神経内科・教授

梅村 淳

名古屋市立大学脳神経外科・准教授

上利 崇

岡山大学病院脳神経外科・助教

杉山憲嗣

浜松医科大学脳神経外科・准教授

A. 研究目的

本研究では、ジストニア定位脳手術のデータと実際のヒト脳基底核の組織標本を用いて刺激電極の留置される淡蒼球内節(GPi)の細胞構築を明らかにし、大脳全体の形状から、最も治療効果の高いGPi座標を算出する新規ターゲッティング法を確立する。したがって、以下の3要素より構成される。1) 各分担研究施設における個々のジストニア手術症例から得られた知見を統合し、淡蒼

球内節内の機能異常およびその座標を推定することにより手術成績との関連を調べる。2) ジストニア症例の画像データを集積しジストニア特異的標準脳モデルを作成し、より安全・確実なターゲットング法開発の基盤とする。本年度は研究協力者を3名増員し、各施設からジストニア定位脳手術データを追加集積し解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. ジストニアにおける電極位置と治療効果

国内の主要定位脳手術施設の参加・協力を得て、GPi-DBSを経験した日本人ジストニア患者の手術用3D-MRI脳画像データ、臨床データを集積する。明らかな中枢神経疾患や外傷がなく、薬剤抵抗性のジストニアで全身性または分節性分布を示し、手術対象となる重症例である。解析は年齢、性、罹病期間、DYT1遺伝子異常の有無、罹患部位、刺激部位、使用電極、刺激条件（極性設定、パルス幅、周波数、刺激電圧）である。刺激効果は、著効、中等度有効、やや有効、不変、悪化の5段階で行なった。

### 2. ヒト淡蒼球内節亜核区分の再検討

#### ①日本人脳座標アトラスの作成

医学部解剖学教育のために献体されたご遺体(59才男性：神経系疾患の既往なし)の脳を用い、遺族の同意の下に組織学標本を作成した。左側大脳半球の全体と脳幹の大部分を含む厚さ100 $\mu$ mの完全連続切片を作成し、4枚ごとにNissl染色を行った。スキャナーにより得た組織標本画像を、三次元画像解析ソフト(Neurolucida)を用いてトレースし、脳座標アトラスの作成を行った。

#### ②淡蒼球内節内部構造の探索

ヒト副内髄板を境界とするmedial partとlateral partの同定を組織標本で試み、さらにNeurolucidaによりそれぞれの部位の位置座標データを得て、GPi内部位による細胞構築の違いの有無を検討した。

#### ③簡易脳スライス作成法の開発

多数の脳から3~5mm厚の正確なスライスを作成する簡便な方法を開発し、①と②のデータを補完する方法を検討した。

#### ④免疫組織化学的検索

ヒトGPiの内部における未知の亜核区分を見いだす目的で、ヒトおよびマウスの組織切片における免疫組織化学染色を行い、淡蒼球内部の染色パターンの多様性を検討した。

### 3. ジストニア患者脳3Dモデル作成

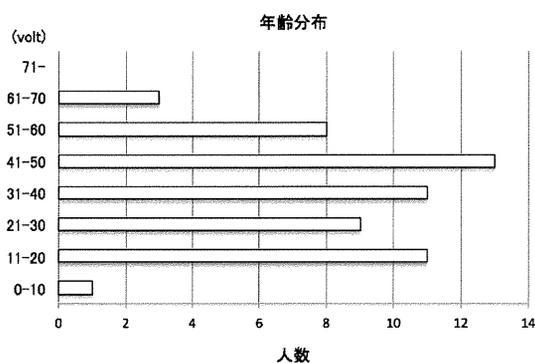
本年度も正常ヒト大脳半球組織標本からGPiの機能分画を明らかにするとともに、ジストニア患者脳MRI画像をもとにジストニア三次元脳モデルを作成し、標準(日本人脳で作成した定位脳手術用)アトラス上に投影し、脳内刺激部位とその手術成績(刺激効果)、微小電極記録法で得られたGPiの発火パターンのデータベースを構築する。

## C. 研究結果

### 1. ジストニアにおける電極位置と治療効果

本年度は、定位脳手術の多い国内7施設(熊本大学医学部、日本大学医学部、東京女子医科大学、浜松医科大学、名古屋市立大学医学部、岡山大学医学部、東京都立神経病院、医療法人貝塚病院)から、淡蒼球刺激療法症例の臨床データを集積した。

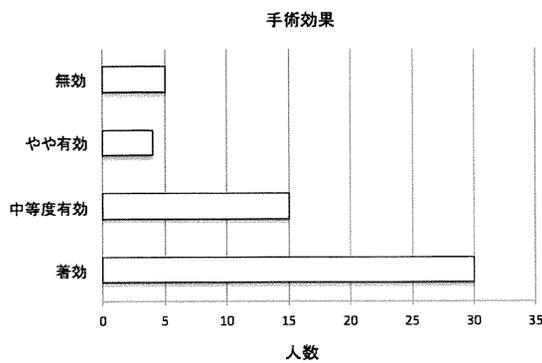
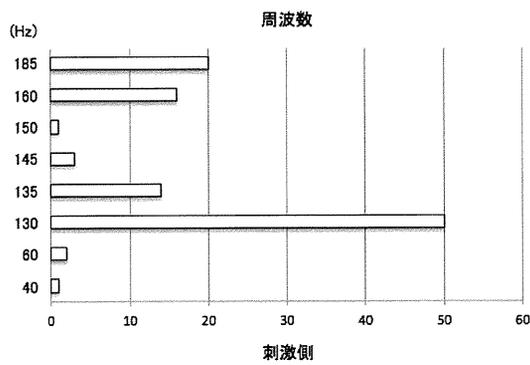
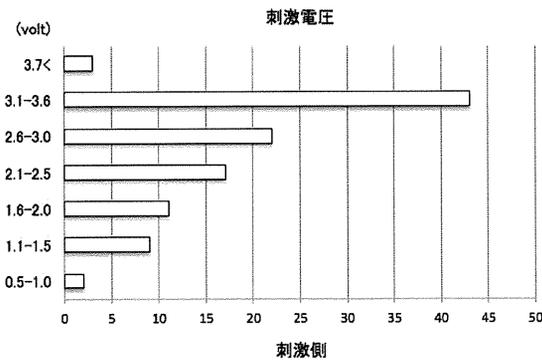
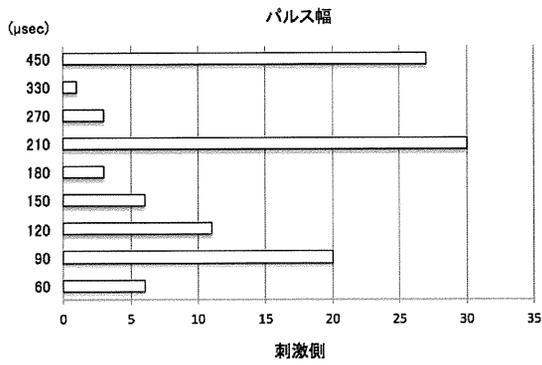
集積した症例数は56症例(両側51、片側5)の合計107側であった。症例の内訳は年齢 $37\pm 15$ 歳、男性37名、女性19名であった。遺伝子解析では10例のDYT1ジストニアが含まれた。罹病期間は $10.6\pm 11.3$ 年、症状局在分布では全身型38例と分節型8例であった。年齢分布は以下の通りである。



使用電極は3389が18側、3387が89側。刺激方法は単極刺激が40側(左22右18)、双極刺激が67側(左33右34)、陰極として接触子を1個使用した例は52側(左28右24)、複数使用した例は55側(左27右28)。

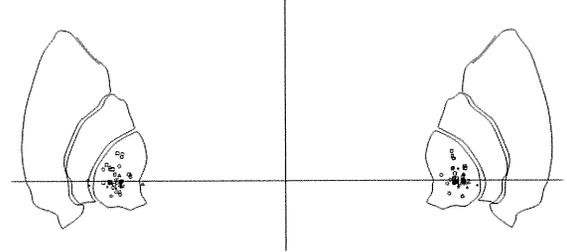
刺激パラメータは施設によりさまざまであったが、各施設で長期に観察しながら最適

化した上での条件である。パルス幅( $\mu\text{sec}$ )は  $229 \pm 140$  (60-450)、刺激頻度(pulse per second)は  $143 \pm 26$  (40-185)、刺激電圧(volt)は  $2.7 \pm 0.8$  (0.8-4.2)であった。パラメータの分布および手術効果は以下の分布図に示す。

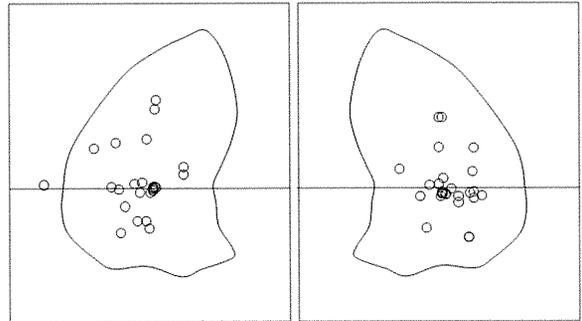


下図に GPi 内の刺激部位 (陰極座標) の分布とジストニア症状の全般改善度 (○: 著効、□: 有効、△: やや有効×: 不変) との相関を示す。悪化症例はなかった。有効刺激部位は冠状断では副内髓板あるいはその外側へばらつく分布を示した。

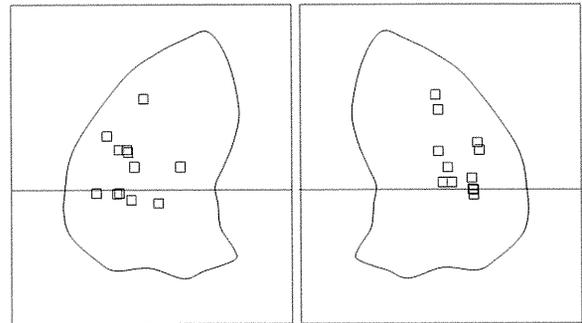
全症例の刺激部位 (冠状断)



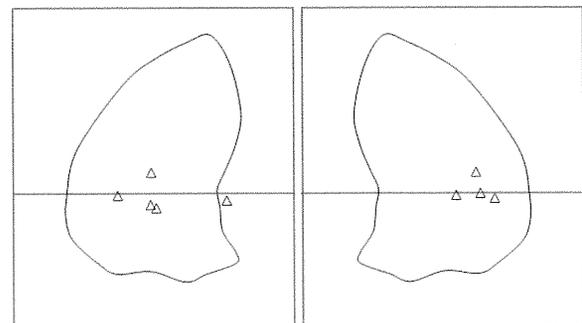
著効例



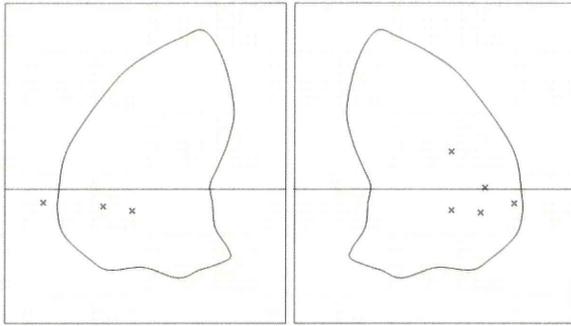
中等度有効例



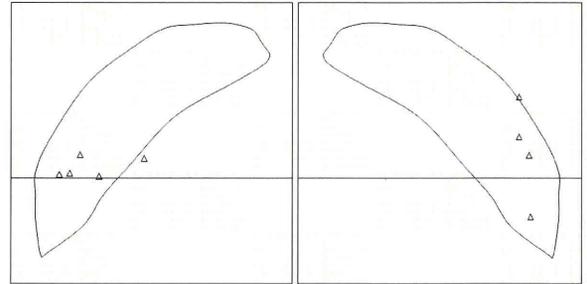
やや有効例



無効例

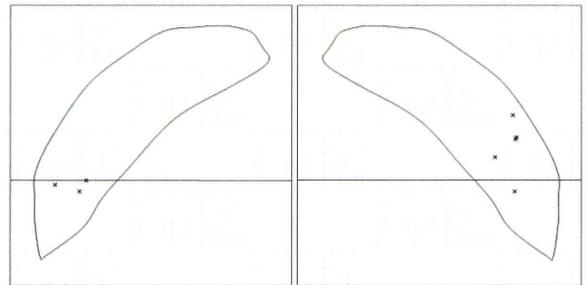


やや有効例

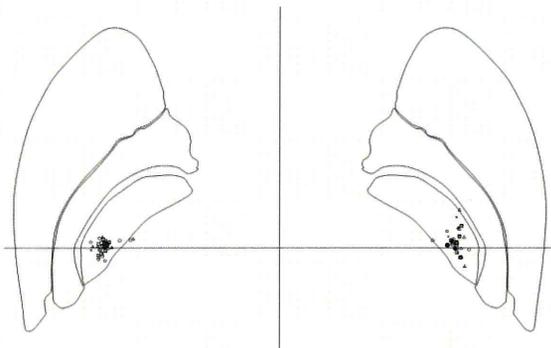


また交連間線に平行な水平断で前内側へ約45度の角度で存在するGPIに対し、有効刺激部位は後外側4分の1を中心に分布していた。ただし著明改善、中等度改善、やや改善、無効の如何にかかわらず重複する分布を示していた。

無効例



全症例の刺激部位 (水平断)

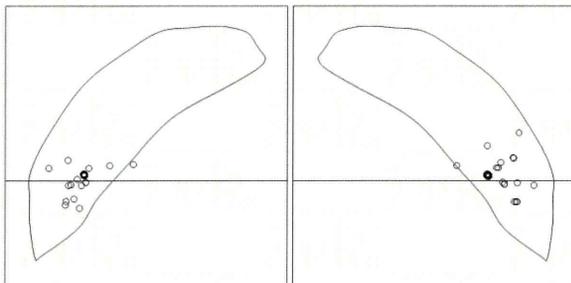


## 2. ヒト淡蒼球内節内の垂核区分の再検討

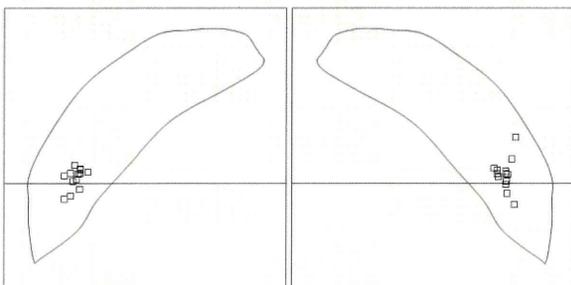
### ①日本人脳座標アトラスの作成

我々が開発した標本作成法では切片作成に伴う変形がほとんどなく、レンダリングやスケーリング等の画像操作なしでも非常に滑らかな三次元的トレースが得られた。

著効例



中等度有効例



交連間線を基準とする三次元座標に登録した GPi 周囲のトレースを冠状断で示した。



特に視床内の亜核分画は細胞構造レベルでの作業となるため、通常の顕微鏡作業では年単位で行なわれる。この作業をスピードアップするため、現在、情報工学的に座標変換し、任意の角度で切断面を作成しトレース間を補完・修正するプログラムを鋭意作成中である。既存のアトラスを任意の角度で切断できるよう加工した上で、作業人員を大幅に追加して解析し、随時データを追加していく予定である。

#### ②淡蒼球内節内部構造の探索

ヒトの副内髄板は、レンズ核ワナの走向に従い GPi の腹側へと向かうが背側方向へは伸びておらず、そのため副髄板を境界とみなして内節を **medial part** と **lateral part** の二つに区分する場合、背方では二区分が連続していることが判明した。細胞構築上も **medial part** と **lateral part** との間に明らかな差は認められず、両者は背方で連続的に移行していた。上の写真ではジストニアで有効な刺激部位であったヒト GPi 後部の細胞構築を示す。(A)ではヒト GPi 最尾部で、副内髄板に平行に配列する紡錘状ニューロンの集団を発見した。(B)は GPi で一般的に見られるニューロンである。

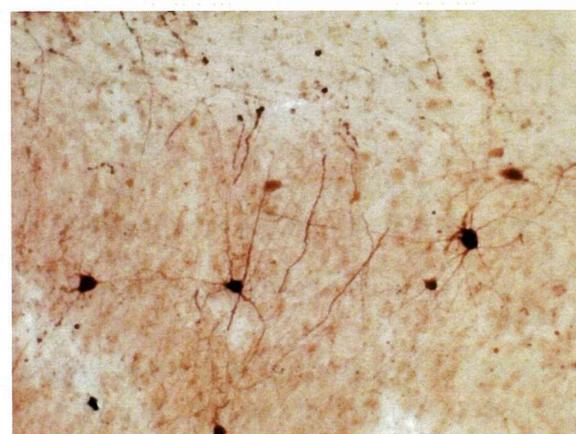
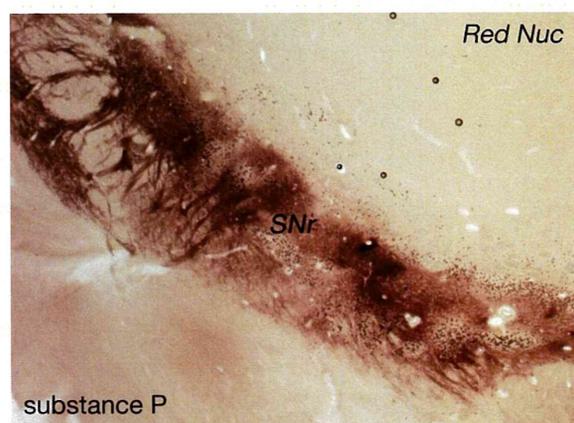
#### ③簡易脳スライス作成法の開発

組織アトラス作成により得られるデータを補完する目的で、脳を3~5mmの厚さで正確に裁断する方法を開発した。これらのスライ

スから100 $\mu$ mの連続切片を作ることも可能であり、肉眼的スライスから得る脳全体の位置座標マップの中に、GPi近傍の詳細な組織アトラスを組み込むことを多数の脳で計画している。

#### ④免疫組織化学的検索

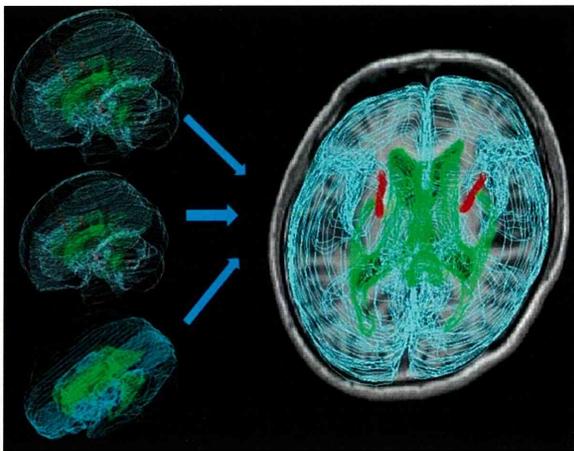
動物組織での結果を基に、GPiを描出するサブスタンスPおよびGPiニューロンの多数を構成するカルシウム結合蛋白 parvalbumin(PV)含有型GABAニューロンの免疫組織化学をヒト脳組織に試み、特異的染色を得ることに成功している。図は黒質網様部(上)と海馬のスライス(下)。



同時にマウスでの詳細な解析を行い、GPiにPV陰性のニューロンが存在していることをつきとめた。この結果をヒト淡蒼球の染色に応用することにより、GPi内部における不均一性をニューロン構成の観点から実証し、連続切片再構築により亜核区分の三次元的構成を明らかにする研究の確かな道筋が得られた。

#### 3. ジストニア患者脳3Dモデル作成

刺激装置本体を植込んだ患者に対し新たな MRI 撮影が困難なことから、殆どの施設で 3D-MRI を得ることはできなかった。保存されている日本人ジストニア患者の手術用 3D-MRI 脳画像データ(DICOM 形式) 13 例を収集した。さらに対照として脳疾患のない日本人成人健常者の 3D-MRI データ 19 例を収集した。それぞれについて神経再構築ソフトウェア(NeuroLucida)を用い、脳表、脳室、線条体(尾状核・被殻)、白質、脳梁など、高解像度 MRI で確実に同定可能な構造を手動的に抽出し、個々に対し 3D 脳モデルを作成した。



個々の 3D 脳モデルは標本数が整い次第(N=20)、各分画形状を平均化し、成人健常者脳に対するジストニア脳の局所変形率を計算中である。これらのデータは標準アトラスをジストニア手術用にテイラーメイド変形するためのパラメータとして用いる予定である。

#### D. 考察

局所性ジストニアはアメリカの小規模の疫学調査で人口 10 万人当たり 29.5 人とされ、日本国内にも 2 万人はいると推定(難病情報センター:ジストニアの診断及び治療方法の更なる推進に関する研究班)されている。小児発症例では正常の発育成長が妨げられ、正常な知能にも関わらず重度運動障害のために特別支援学級へ入学を強いられ、成人発症例では社会復帰が妨げられる。しかし全身性～分節性ジストニアの場合、外科治療の有効性が知られていないため社会から隔離されていることも多く、正確な有病率は分かつ

ていない。ちなみに貝塚病院の 2000-2008 年での手術例ではパーキンソン病 550 例に対し全身性～分節性ジストニアは 45 例だった。

治療薬が豊富にあるパーキンソン病とは異なり、一部のジストニアを除き有効な中枢神経作動薬はない。現状では大量の抗精神病薬、筋弛緩薬、抗パーキンソン病薬が漫然と投与されている。ボツリヌス毒素療法は局所性ジストニアに有効であるが、広範囲に渡る全身性～分節性ジストニアの場合 QOL 改善には全く無力である。現在唯一有効性が確立されているのは定位的 GPi 手術(凝固または刺激)であるが、海外の報告でも著効から無効までその成績はさまざまである。

山田ら(共同研究者)は、GPi に留置した最も腹側の電極で、長いパルス幅(210~450 $\mu$ 秒)の高頻度刺激(130Hz)を行い、BFM スコアでの長期改善(平均改善率 67.0%)を得ている。横地ら(共同研究者)は、術後症状の改善経過について検討した。GPi-DBS の効果は治療開始後やや遅れて徐々に発現し、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改善する傾向を指摘し、遅発効果が基底核回路の再編成(re-organization)による可能性を示唆した。また深谷ら(共同研究者)は、一次性的全身性・分節性ジストニア症状に GPi-DBS は非常に有効であっても、口部で発語・嚥下障害が高度な症例では効果発現が遅延するため、少なくとも 1 年以上の観察が必要としている。このようにジストニアに対する GPi-DBS 効果は体部位や発現形式によって即効から月単位と様々で、その評価の解釈を困難にしている。

我々は成長期前の小児ジストニア 2 例に対し GPi-DBS を行ったが、一旦症状が著明に改善した後に徐々に再燃し、1 年で手術前の状態に戻り、うち 1 例は再手術の直後にジストニア重責(status dystonicus)で死亡した。成長段階の未熟脳で GPi-DBS を行なったため、刈込みされるべき GPi 内の未熟なシナプス結合に側副路形成が生じ、異常発火パターンが再発した可能性がある。このような遺伝性ジストニアでは世代継承に伴い発症が低年齢化する傾向があり、今後は手術時年齢をも考慮に入れる必要もある。

現在、殆どの施設では GPi-DBS の仮ター

ゲット座標を交連間点から2mm前、3-4mm下、外側19-22mmとしている。実際にはFLAIR画像でGPiの低信号や視索上縁を目印に個別に修正されるが、視索は前内側から後外側に走るため、視索を外側座標の目印にした場合、前方への修正で内側へ、後方への修正で外側へシフトする。したがって脳全体の非対称性が非常に大きい場合、上記の間接的ターゲティング法の手術精度を大きく左右する。平ら（共同研究者）は、全身性～分節性ジストニアのGPi-DBS症例で、通常のGPiとその前内側3mmにおいた電極のどちらが有効かを検討した結果、20%の例で前内方の電極がより有効であった。

第三脳室の拡大や非対称性などで脳形状の個体差・変形が大きい場合、GPi座標をどう計画すべきか、最初から複数の電極を留置すべきか、その場合どの方向に並べるべきか、ヒトGPi内の細胞構築の不均一性の意義、およびその不均一な内部で異常発火パターンを修正するためにカバーすべき範囲、その座標をMRIでどのように決定すべきか、低年齢での手術も同様に計画すべきか等、今後の課題は非常に多い。

## E. 結論

本邦の全身性～分節性ジストニアの手術用 3D-MRI 脳画像データ、刺激部位と術後成績の解析から、至適刺激部位の多くは冠状断でGPiの中心からやや外側に位置し、水平断でGPiを4等分すると後端から4分の1に存在した。ただしGPi-DBSの治療成績はGPi内の電極位置のみで決まる訳ではなく、他にも影響の大きい因子が多数存在する。このように本研究は当初の予想を上回る進展が得られた。現在、工学的手法でジストニア脳3Dモデルの統合・平均化を急いでおり、新規ターゲティング法を確立するに足るジストニア画像データを集積することができ、概ね計画通りの進展が得られた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Miyagi Y, Morooka K, Fukuda T, Okamoto T, et al: Three-dimensional reconstruction of human

brain histological section and the development of digital brain atlas of the Japanese. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Digital Manufacturing*, pp153-158, 2011

### 2. 学会発表

Miyagi Y: Application of digital imaging technique for the construction of stereotactic human brain atlas. The second international symposium on the project computational anatomy, Nagoya, March 2011

Miyagi Y, Fukuda T, Morooka K, Okamoto T, Samura K, Sunagawa K: Three-dimensional reconstruction of human brain histological section and the development of digital brain atlas of the Japanese. The 8th Asian Australasian Society of Stereotactic & Functional Neurosurgery Scientific meeting (AASSFN2011), Korea, June 2011

Miyagi Y, Samura K, Okamoto T, Hayami T: Clinical implication of short circuit in DBS. The 8th Asian Australasian Society of Stereotactic & Functional Neurosurgery Scientific meeting (AASSFN2011), Korea, June 2011

宮城 靖, 福田孝一, 諸岡健一, 左村和宏, 岡本 剛, 砂川賢二, 陳 献, 早見武人, 吉浦 敬, 飛松省三: 新しいヒト脳図譜の開発～安全・正確な定位脳手術のために～ 日本脳神経外科学会 第70回学術総会(東京) 2011年10月

左村和宏, 宮城 靖, 上加世田和文, 岡本 剛, 早見武人: 脳深部刺激療法術後の長期予後における Short circuit の診断・臨床的意義とその対応. 日本脳神経外科学会 第70回学術総会(東京) 2011年10月

Miyagi Y, Morooka K, Fukuda T, Okamoto T, et al: Three-dimensional reconstruction of human brain histological section and the development of digital brain atlas of the Japanese. The 3rd International Symposium on Digital Manufacturing 2011 (ISDM2011), Kitakyushu, November 2011

宮城 靖, 上加世田和文: 成長期前の淡蒼球刺激は無効か? 小児 DYT1 ジストニアの2例. 第196回日本神経学会九州地方会, 沖縄) 2011年12月

宮城 靖：淡蒼球刺激療法の効果が一過性だった小児全身性ジストニア 第51回日本定位・機能神経外科学会（東京）2012年1月20日

左村和宏, 宮城 靖, 上加世田和文, 岡本 剛, 早見武人：Short circuitの診断・臨床的意義とその対応 第51回日本定位・機能神経外科学会（東京）2012年1月20日

宮城 靖, 福田孝一, 諸岡健一, 左村和宏, 岡本 剛, 砂川賢二, 陳 献, 早見武人, 吉浦 敬, 飛松省三：機能的定位脳手術における脳座標アトラスの役割 第51回日本定位・機能神経外科学会（東京）2012年1月21日

#### G. 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.

## Ⅱ. 分担研究報告

ジストニア治療の標的となる淡蒼球内節の組織構築を詳細に解析し未知  
の亜区域を内節内部に見いだす

福田孝一 熊本大学大学院生命科学研究部形態構築学 教授

研究要旨

淡蒼球内節内部の亜区域の存在をマウスで実証した。さらにその成果を直ちにヒト淡蒼球に応用できる免疫組織化学法を確立した。ヒト淡蒼球内節の広がり全体を精密に調べ、その三次元位置情報をデジタル脳アトラスに書き込むことも達成確実な段階に至った。以上からジストニア治療の進展の基盤となる形態学的研究成果が得られた。

A. 研究目的

全身性ジストニアに対し唯一有効な治療法である深部脳刺激療法(DBS)は淡蒼球内節を標的とするが、刺激有効例と無効例の刺激部位はかなり重複する分布を示しており、治療上の大きな問題となっている。その要因として、ヒト淡蒼球内節の内部構造が十分には明らかになっていないこと、さらに、そもそも内節の三次元的広がり全体像がわかっていない点あげられる。加えて、DBSで一般に用いられる脳アトラスは若いドイツ人の脳に基づくもので、本邦患者のMRI画像に適用すると、しばしば位置が大きすぎてしまう。我々はこれらの問題点を解決するために、日本人の脳全体から完全連続切片を作成し、得られる組織学標本に基づくデジタルアトラスを開発中である。平成22年度における本研究課題で、一側大脳半球の脳組織標本作成をほぼ終了した。またその組織構築の顕微鏡観察から、ヒト淡蒼球内節の内部構造が均一ではなく、亜区域に分けられる可能性が示唆された。さらに免疫組織化学染色を用いてより詳細な区分の検討を行うために、適正な染色条件を設定しやすい実験動物(ネコ)の脳を用いた検討を行い、やはり淡蒼球内節内部が均質ではない可能性を見いだした。

平成23年度の研究目標は、(1)前年度までに作成したヒト脳連続切片を用い、脳の輪郭および内部構造をコンピュータを用いてトレースし、淡蒼球内節およびその内部区分の位置座標を決定するためのデジタルデータを取得する。(2)前年度にその端緒となる所見を得た、ヒト淡蒼球内節内部の細区分

をより客観的に行うために、免疫組織化学染色をヒト脳に適用する。染色の再現性やクオリティにおいて良好な結果を得ることが実験動物に比べて格段に難しいヒト死後脳で、それらを達成するための方法論を確立する。

(3)平行して実験動物(マウス)を用い、淡蒼球内節内部における亜区域を、免疫組織化学により追究する。亜区域の存在は動物の脳でも未解明であるため、動物で亜区域を発見し、その所見を参照しながら、ヒト脳での淡蒼球内節の組織構築を検討する。

B. 研究方法

①日本人脳座標アトラスの作成

医学部解剖学教育のために献体されたご遺体(59才男性：神経系疾患の既往無し)の脳から作成した左側大脳半球全体の連続切片(厚さ100 $\mu$ m)から4枚ごとにNissl染色を行った。スキャナーにより得た組織標本画像を、三次元画像解析ソフト(Neurolucida)を用いてトレースし、脳座標アトラスの作成を行った。

②ヒト脳における免疫組織化学

淡蒼球内節の内部における未知の亜核区分を客観的に見いだす目的で、いくつかの物質に対する免疫組織化学をヒト脳切片で試みた。特に淡蒼球内節ではパルブアルブミン(PV)含有GABAニューロンが主となるニューロンであるため、PVおよびGABA合成酵素GADに対する免疫染色を実施した。また淡蒼球内節を周囲の組織から明瞭に区別するためのマーカー蛋白として有用な物質の探索を行った。

### ③マウス脳における淡蒼球内節亜区域の追究

最適な染色条件を得られやすい実験動物の脳の組織切片で免疫組織化学染色を行い、淡蒼球内部の染色パターンの多様性を検討した。コンピュータと連動して顕微鏡ステージを動かしながらビデオカメラにより画像を取り込むことと、定量的解析を行うことを可能にするシステムであるNeurolucidaを用いて、内節およびその周囲構造に関するデジタルデータを取得した。

(倫理面への配慮)

ヒト脳デジタルアトラス作成に用いた脳は、生前の意思に基づき医学教育・研究のために献体されたご遺体からの脳であり、さらにそこから組織学切片を作成することについて遺族に説明し、納得いただいた上で書面による同意を得ている。マウスを用いた動物実験は、熊本大学動物実験委員会の承認のもとに実施した。

## C. 結果

### ①日本人脳座標アトラスの作成

前年度作成したヒト大脳半球の連続切片をNissl染色し、Neurolucidaを用いて輪郭や内部構造のトレース作業を実施した。脳実質の萎縮や脳室拡大はなく、また組織学的に顕著な病変も存在していなかった。トレースは、標本の大きさや枚数の多さから膨大な作業であるため、研究補助員を加えながら現在も鋭意継続中であるが、順調に進行している。すなわち、我々が開発した標本作成法により、切片作成に伴う変形がほとんどなく(Fukuda *et al.*, *Neurosci Res* 67:260-265, 2010)、レンダリングやスケーリング等の画像操作を加えなくても非常に滑らかな三次元的トレースが得られている(図1)。現在、厚さ1cmの組織ブロックごとに得た連続切片標本に由来するこれらのデジタルデータを、さらに単一の脳としてのデータに統合する研究を、共同研究者である九州大学工学部諸岡健一博士が取り組んでいる。

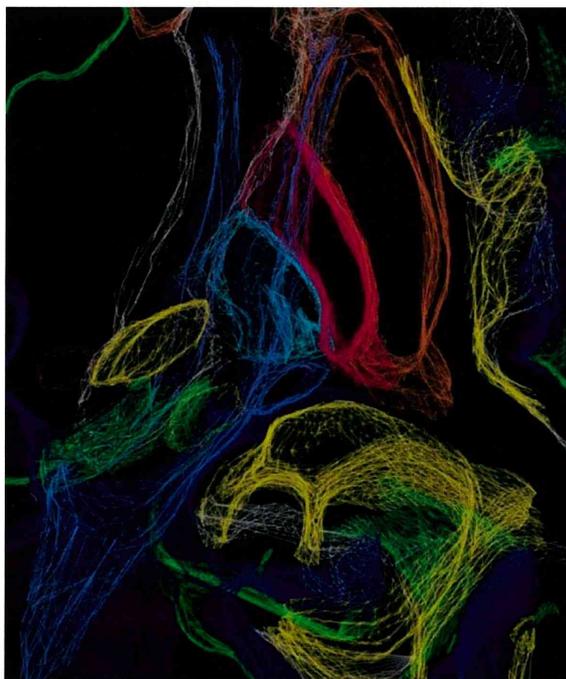


図1 ヒト大脳半球連続切片に基づき三次元再構成したトレース画像。中央水色が淡蒼球内節。

### ②ヒト脳における免疫組織化学

淡蒼球内節を構成するニューロンはすべて、前述のPV含有GABAニューロンと広く信じられている。実は後で述べるように、少なくともマウスではそうではないことを今年度の研究で明らかにしつつあるが、まずは定説に従いPVおよびGABAの合成酵素GAD(グルタミン酸脱炭酸酵素)の免疫染色をヒトで試みた。後者はGABAニューロンを同定するもっとも確実なマーカーである(Fukuda *et al.*, *Brain Res* 764: 237-243, 1997)。

ヒト脳組織はさまざまな制約から、実験条件を最適に設定できる動物とは異なり、良好な染色を得ることが容易ではない。しかし数多くの試行の結果、一部の個体において比較的良い染色が得られた。この場合研究の進め方として、研究対象である淡蒼球内節はあえて温存し、PVニューロンが多数存在する海馬と新皮質を含む標本において、実験条件の検討を行った。図2～4で示すように、ヒト脳組織においてPVニューロンを明瞭に可視化することに成功した。

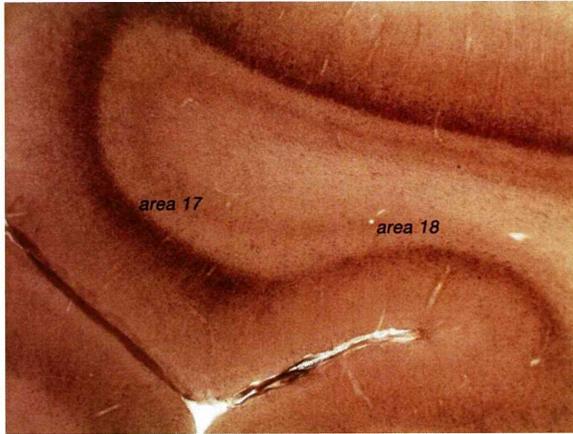


図2 ヒト一次視覚皮質（17野）周囲におけるPV免疫組織化学染色。図3に一部を拡大する。

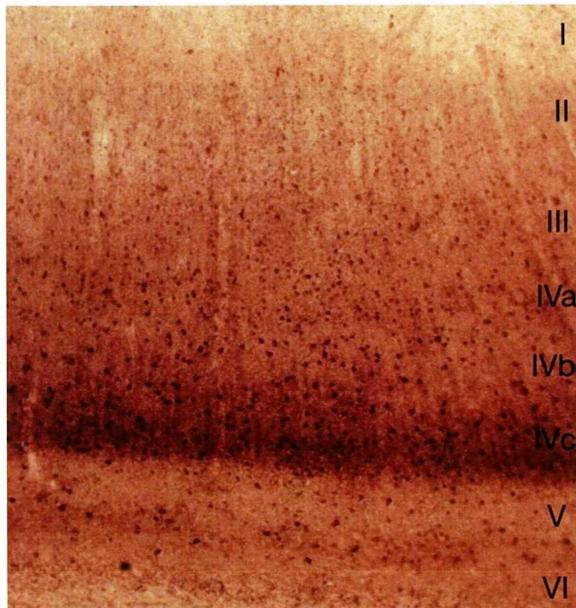


図3 ヒト一次視覚野の PV ニューロン。右のローマ数字は層を示す。

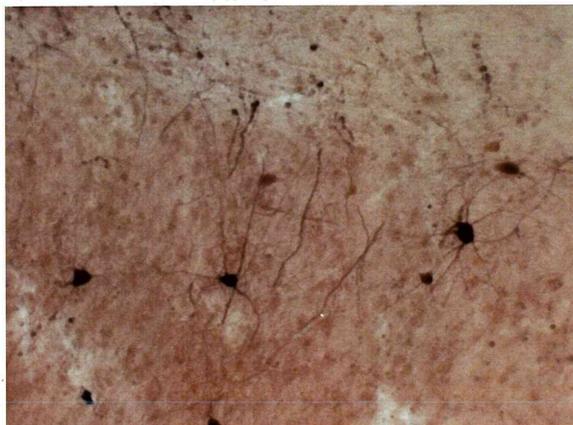


図4 ヒト海馬 CA1 領域の PV 免疫陽性のインターニューロン。

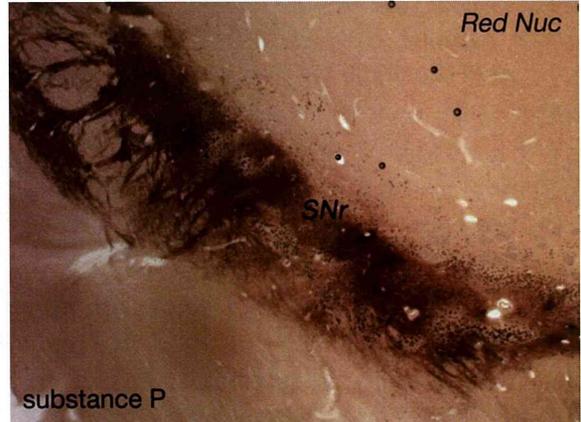


図5 ヒト黒質網様部 (SNr)におけるサブスタンスPの免疫組織化学染色。図の右が内側、上が背側。線条体由来の軸索終末が陽性像としてSNrを描出する。付近に散在する黒質緻密部のドーパミンニューロンは免疫陰性であるが、特有の黒色素のために識別できる。Red Nuc: 赤核。

次に淡蒼球内節の範囲を正確に同定するための免疫染色の方法を検討した。内節は線条体のいわゆる間接路ニューロンが投射する標的であり、間接路ニューロンが持つサブスタンスP(SP)が軸索終末で示す免疫染色が内節の同定に利用できる可能性がある。ここでも条件検討のために、淡蒼球内節と相同の組織である黒質網様部を用いたが、非常に良好な染色結果を得た(図5)。

これらの結果を、淡蒼球内節を含む完全連続切片に適用することにより、組織レベルでの客観的同定に基づいた内節の三次元的広がり「全体像」を、初めて捉えることが可能になった。

### ③マウス脳における淡蒼球内節亜区域の追究

マウスでは淡蒼球内節に該当する領域が内包の中に存在し *entopeduncular nucleus* (EPN: 脚内核) と呼ばれる。意外なことに、実験動物においても EPN の研究は黒質網様部に比して極端に少ないことが判明した。したがって EPN 内部の亜区域の存在を追究する前に、まずその三次元的広がり全体像を知ることから始める必要があった。

そのために淡蒼球内節を免疫組織化学的に正確に同定するためには、どのような物質をマーカーとして用いれば良いかを検討し、三種類の抗体による同定が妥当であると結論した。すなわち、DARPP32 (dopamine and

cAMP-related protein phosphatase 32)、エンケファリン(Enk)、SPの三重免疫蛍光染色を行うと、淡蒼球の外節と内節の両者を包含する染色マーカーとしてDARPP32が、外節を描出するにはEnkが、そして内節を同定するにはSPが妥当であり、DARPP32がEnkとSPを組み合わせた陽性染色領域にほぼ一致することが分かった(図6)。

DARPP32は線条体medium spiny neuronに特異的に発現する細胞内シグナル伝達蛋白であるが、細胞体と樹状突起だけでなく、軸索終末も描出されることを、以前に電子顕微鏡により確認している(未発表データ)。そ

れゆえmedium spiny neuronの軸索終末が分布する淡蒼球外節と内節の全体がDARPP32陽性領域として明瞭に描出された。また線条体から淡蒼球内節に投射する直接路ニューロンはSPを軸索終末に含有し、一方外節に投射する間接路ニューロンはEnkを軸索終末に含有することが知られているが、今回の結果はそれを利用して外節と内節(EPN)の領域を区別することで、マウスにおけるこれら二領域の広がりをも正確に同定する方法を得た(図6)。

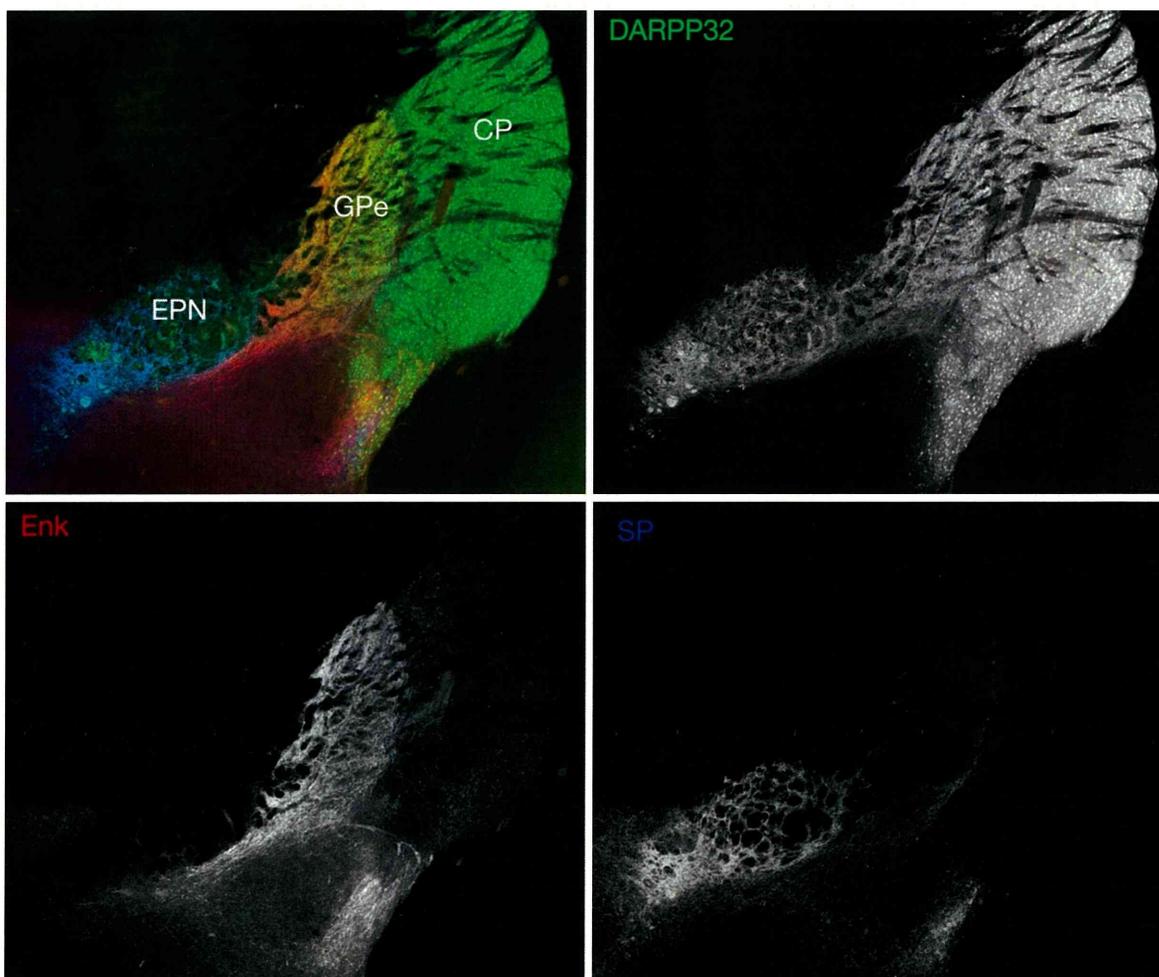


図6 淡蒼球内節の広がりをも客観的に知るためのマーカー物質の探索。マウス線条体ニューロンが持つDARPP32が淡蒼球内節と外節において軸索終末として免疫反応性を示す。外節におけるEnk含有軸索終末の分布と内節に置けるSP含有軸索終末の分布がDARPP32陽性領域にほぼ一致する。

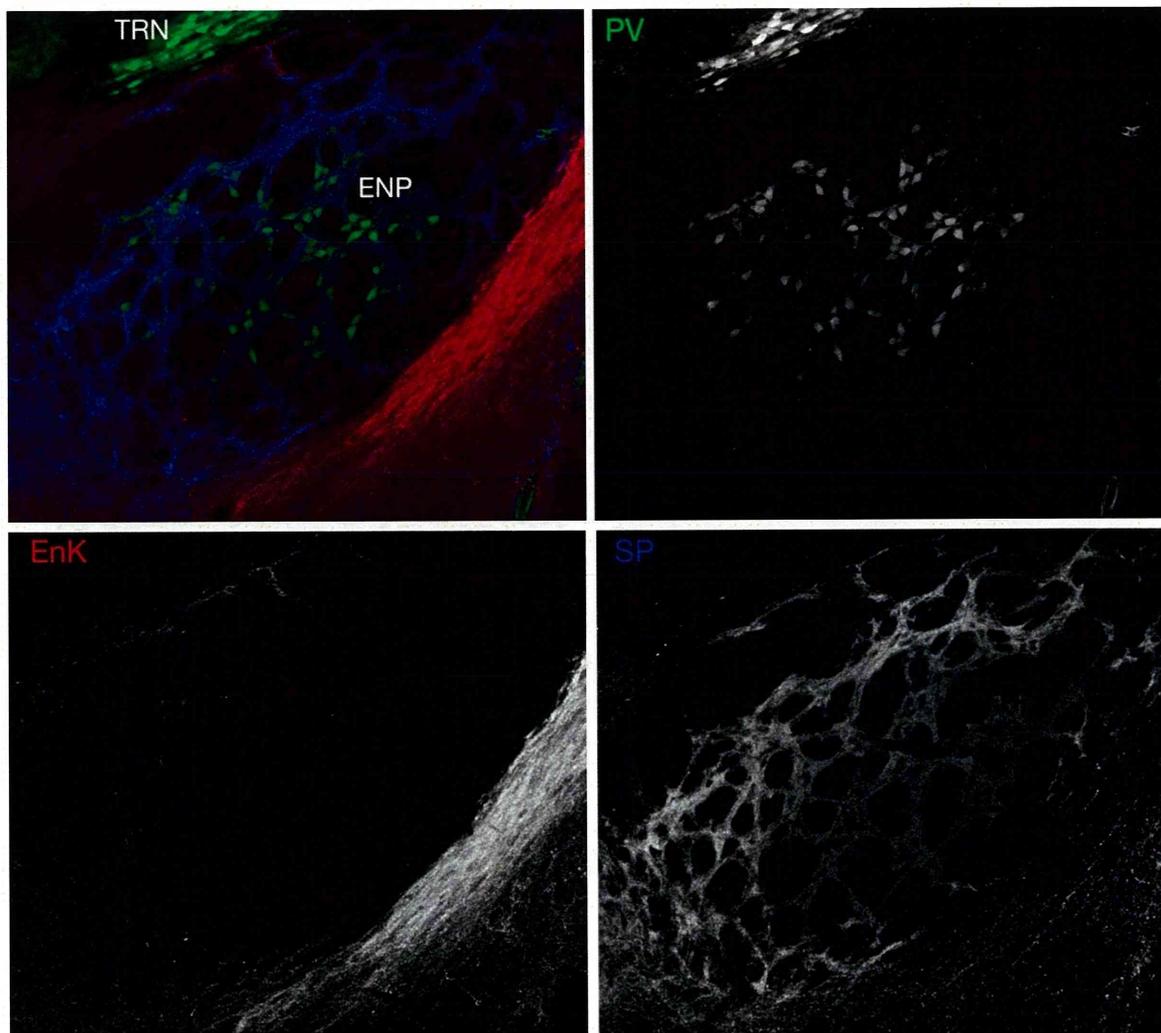


図7 マウス淡蒼球内節 (EPN) 内部の不均一性。PV 陽性ニューロンは中心部にクラスター状に分布する。PV ニューロンが乏しい周辺領域では SP の染色性がむしろ高く、SP 含有軸索終末を受ける PV 陰性ニューロンの存在を示唆する。

この結果をもとに、EPNの広がりを生後8週令のC57BL6Jマウス(雄)脳の冠状断連続切片で検討した。前交連から後方へおよそ-1200ミクロンから-1800ミクロンまでの範囲にEPNが存在し、前後軸に沿って約600ミクロンの広がりを持つことが分かった。

次にEPN内部の組織構築を検討した。図7で明らかなように、SP陽性領域であるEPNの内部に、PVニューロンがクラスター状に存在するコアの部分と、PVニューロンに乏しい周辺領域の二つの部分が区別できる可能性が示唆された。さらにSPの免疫染色像をよく見ると、SPの染色性はコア部分で弱く、逆

に周辺領域で強いシグナルがあり、このSP染色性が高い部分とPVニューロンが疎である範囲はほぼ合致していた。さらにEPN内部におけるPVニューロンの分布を、前後軸に沿って幅広く観察した。40ミクロン厚の連続切片を6枚ずつのセットにし、各セットの中の5枚を、SP、PV、DARPP32、Enk、calbindin (CB)の免疫染色に使用し、DABで発色し可視化した。残り一枚はNissl染色に供した。SPおよびEnkで同定できる淡蒼球内節と外節の輪郭をNeurolucidaでトレースし、さらにPV陽性ニューロンとCB陽性ニューロンの位置をトレースを重ねてプロットした。

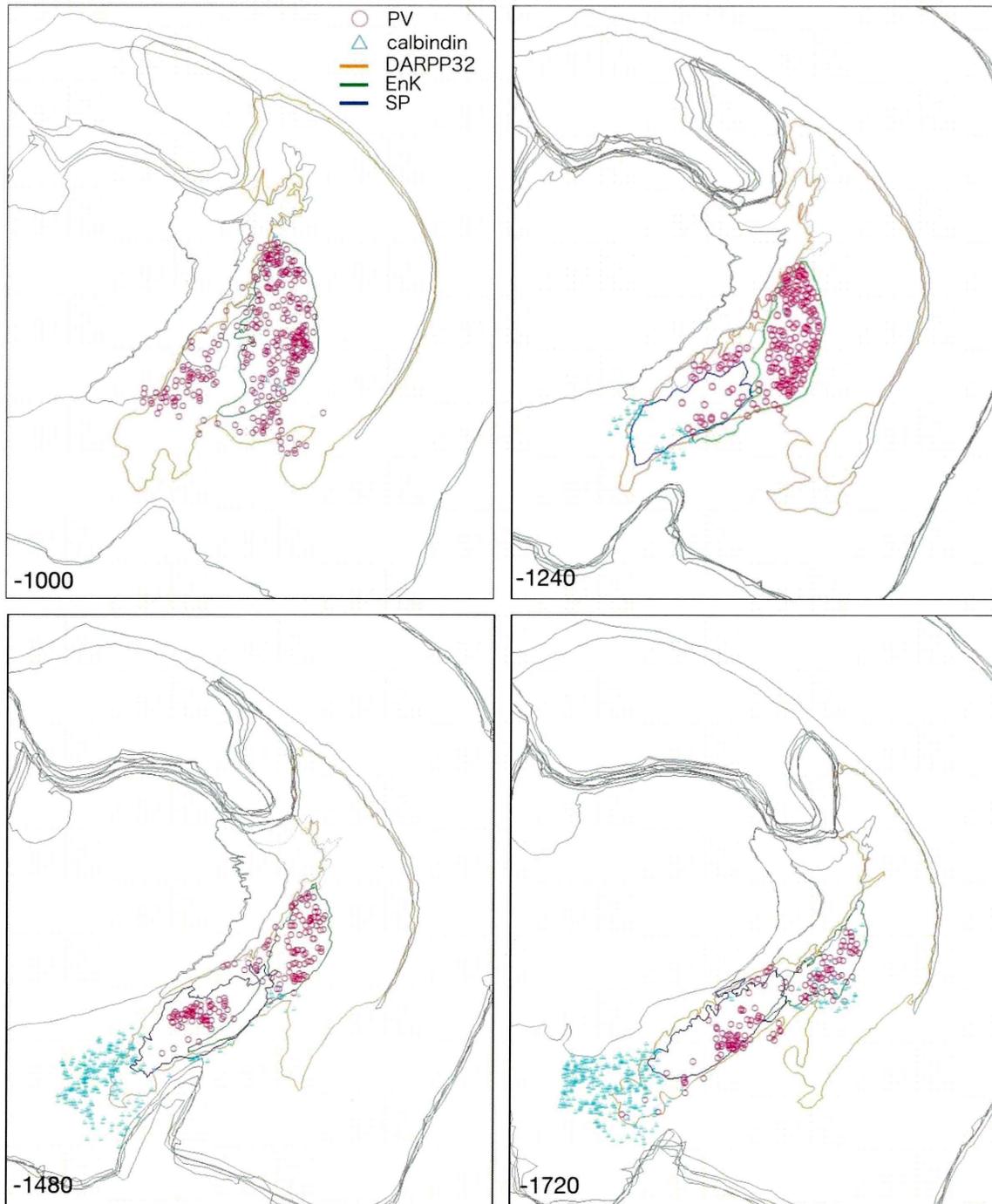


図8 マウス淡蒼球におけるPV陽性ニューロンの分布。数字は前交連から後方への距離をミクロン単位で示す。EnK陽性領域として同定できる淡蒼球外節ではPVニューロンがほぼ均等に分布している。一方SP陽性領域として同定できる淡蒼球内節 (entopeduncular nucleus) ではPVニューロンは主として中心領域にクラスター状に集積している。

図8に4つの異なる位置での結果を示すが、Enk陽性領域（緑色の境界線内部）で示される淡蒼球外節では、PVニューロンがほぼ全体に均等に分布していることがわかる。ところがSP陽性領域（青色の境界線内部）で

示される淡蒼球内節(EPN)では、PVニューロンの不均一な分布が明らかであった。PVニューロンはEPNの中心部分にクラスター状に存在していたが、周辺部分では少数の細胞体しか確認できなかった。

しかしながら、EPNの中でPVニューロンに乏しい周辺領域は、元々ニューロンが存在していない場所にすぎない可能性もある。そ

こで隣接切片のNissl染色像を確認すると、この周辺領域にもニューロンの特徴を示す細胞が多数存在していた。

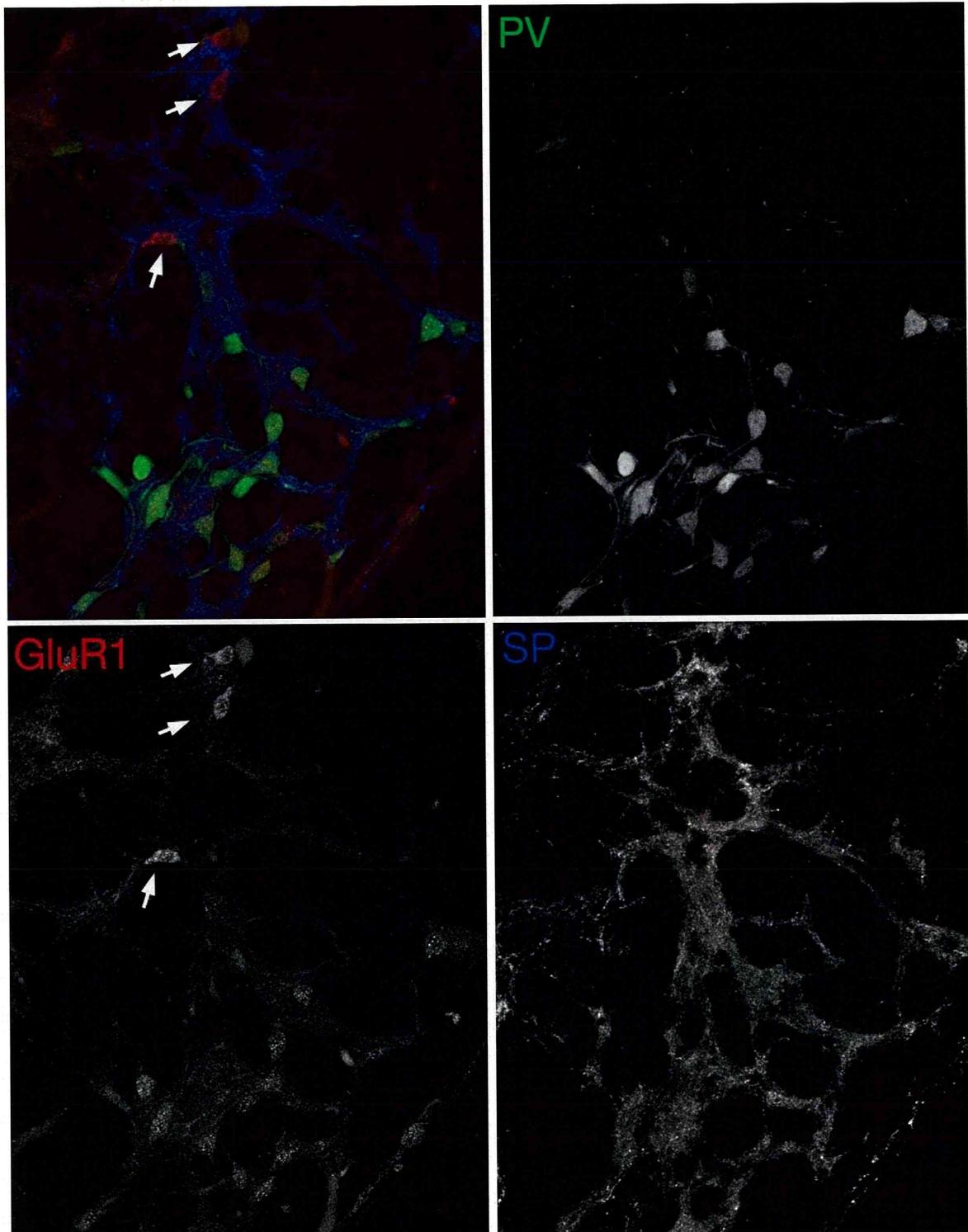


図9 マウス淡蒼球内節(EPN)に見いだされた二つの坵区域。中心部分ではPV陽性ニューロンがクラスター状に分布しているのに対し、周辺領域ではGluR1で同定されるPV陰性のニューロン(矢印)が存在している。後者の周囲にもEnk陽性の染色が認められ、線条体直接路ニューロンの投射を受ける淡蒼球内節に属していることが分かる。