

201128077B

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ッティング法の確立

平成 22～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 宮 城 靖

平成 24 年 (2012) 3 月

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
研究班

平成 22 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 生命科学研究所 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	熊本大学医学部付属病院 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
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 〒 8 1 2 - 8 5 8 2 福岡県福岡市東区馬出 3 - 1 - 1 T E L 0 9 2 - 6 4 2 - 6 7 8 0 F A X 0 9 2 - 6 4 2 - 6 7 7 6 e-mail ijksenryaku@jimu.kyushu-u.ac.jp	係長
経理事務 担当者	藤川真一	九州大学医系学部等財務課経理第一係 T E L 0 9 2 - 6 4 2 - 6 0 0 6 F A X 0 9 2 - 6 4 2 - 6 0 2 2 e-mail ijzkeiri1@jimu.kyushu-u.ac.jp	係長

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
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	熊本大学医学部付属病院 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 〒 8 1 2 - 8 5 8 2 福岡県福岡市東区馬出 3 - 1 - 1 TEL 0 9 2 - 6 4 2 - 6 7 8 0 FAX 0 9 2 - 6 4 2 - 6 7 7 6 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 0 9 2 - 6 4 2 - 6 0 0 6 FAX 0 9 2 - 6 4 2 - 6 0 2 2 e-mail ijzkeiril@jimu.kyushu-u.ac.jp	係長

目次

I. 総合研究報告

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

II. 分担研究総合報告書

ジストニアの深部脳刺激療法に寄与する日本人専用脳アトラスデータベースの
整備と淡蒼球内節における未知の亜核領域の組織学的探索

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

都立神経病院 脳神経内科

横地 房子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総合研究報告

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、我々が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(GPi)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有効なGPiのターゲティング法の確立を目的とする。平成22～23年度にかけて、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て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示唆された。またヒトGPiの組織学的研究では、GPi内部の不均一性と後外側に分布する特異な細胞構築が発見され、DBS作用部位としての関連性が示唆された。収集し得たMRIからジストニア脳3Dモデルを継続して作成しており、ジストニアの安心・安全・正確な定位脳手術を実現するGPiの新規ターゲ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

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 龍児
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

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

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、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) ジストニア定位脳手術の標的となるヒトGpiの機能分画および周囲神経核との関係を明らかにし、特に刺激に有効な部位を解剖学的に推定する。3) 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・確実なターゲッティング法開発の基盤とする。平成23年度からは研究協力者を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、臨床データを集積した。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

平成22年度は、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 μ mの完全連続切片を作成し、4枚ごとにNissl染色を行った。平成23年度は、スキャナーにより得たその組織標本画像を、継続して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

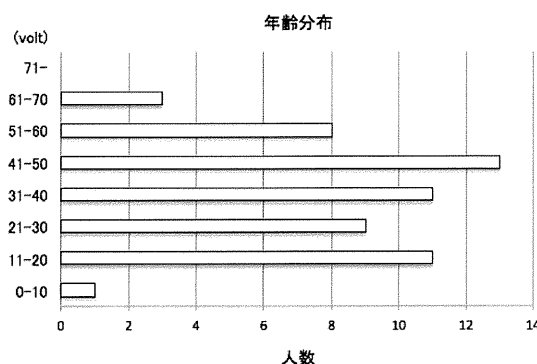
正常ヒト大脳半球組織標本からGpiの機能分画を明らかにするとともに、ジストニア患者脳MRI画像をもとにジストニア三次元脳モデルを作成し、標準（日本人脳で作成した定位脳手術用）アトラス上に投影し、脳内刺激部位とその手術成績（刺激効果）、微小電極記録法で得られたGpiの発火パターンのデータベースを構築する。

C. 研究結果

1. ジストニアにおける電極位置と治療効果

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。

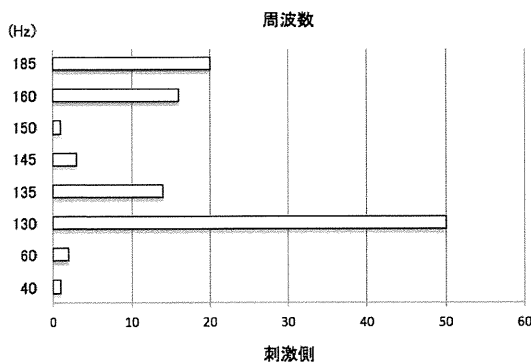
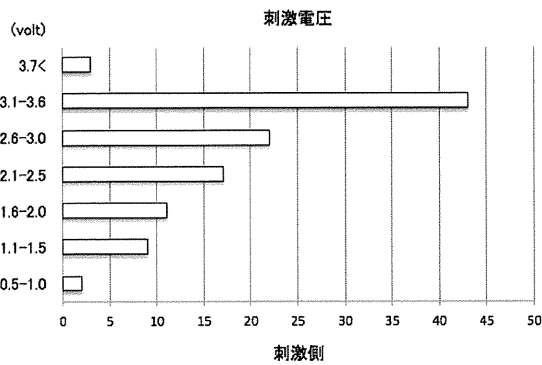
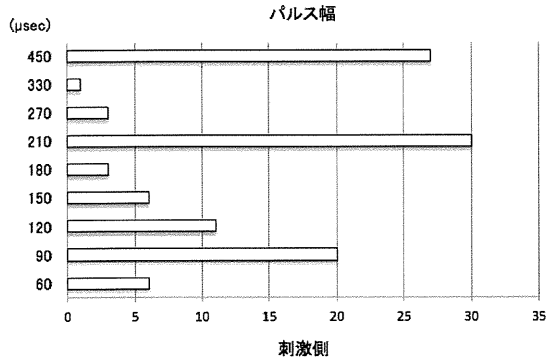
集積した症例数は56症例（両側51、片側5）の合計107側であった。症例の内訳は年齢 37 ± 15 歳、男性37名、女性19名であった。遺伝子解析では10例のDYT1ジストニアが含まれた。罹病期間は 10.6 ± 11.3 年、症状局在分布では全身型38例と分節型8例であった。年齢分布は以下の通りである。



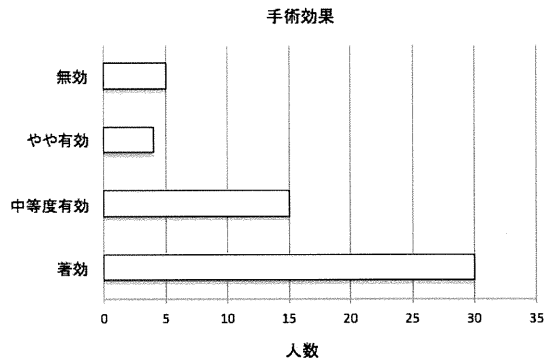
使用電極は3389が18側、3387が89側。刺激方法は単極刺激が40側（左22右18）、双極刺激が67側（左33右34）、陰極とし

て接触子を1個使用した例は52例(左28右24)、複数使用した例は55例(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(μsec)は 229 ± 140 (60-450)、刺激頻度(pulse per second)は 143 ± 26 (40-185)、刺激電圧(volt)は 2.7 ± 0.8 (0.8-4.2)であった。

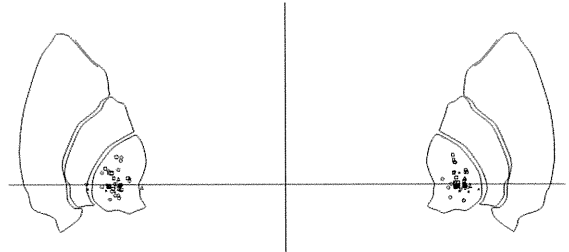


パラメータの分布および手術効果は以下の分布図に示す。著効30例、中等度有効30例、やや有効4例、無効5例で、悪化例はなかった。なお両側手術例では、両側で一つの手術成績としてまとめ左右の電極位置を示した。



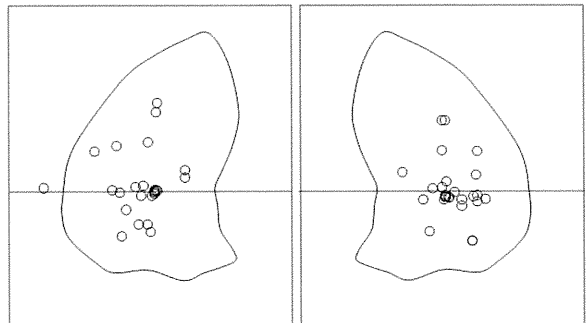
下図に GPi 内の刺激部位 (陰極座標) の分布とジストニア症状の全般改善度 (○: 著効、□: 有効、△: やや有効 ×: 不変) との相関を示す。

全症例の刺激部位 (冠状断)

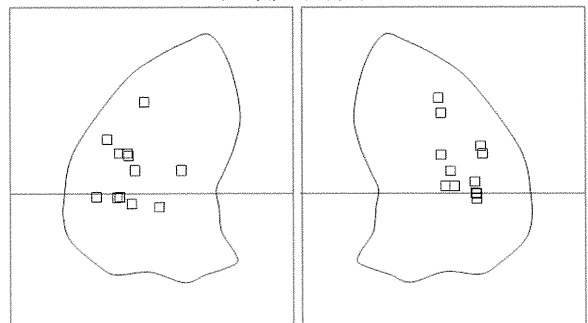


以下に効果別に GPi 内の電極位置を示す。

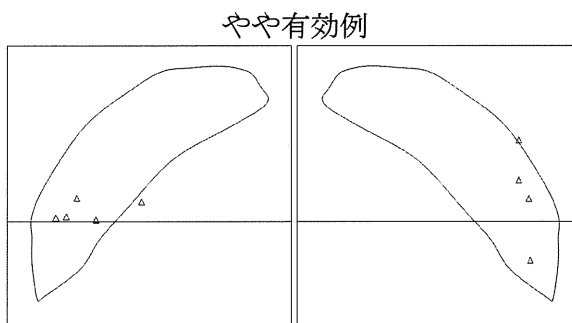
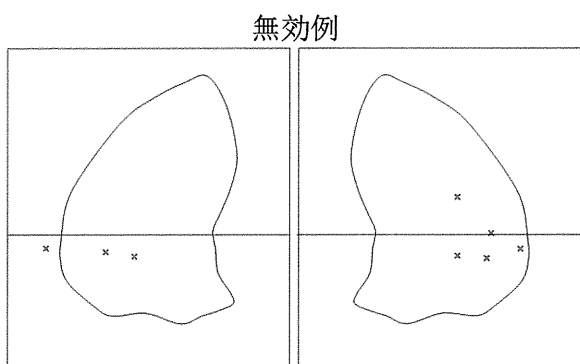
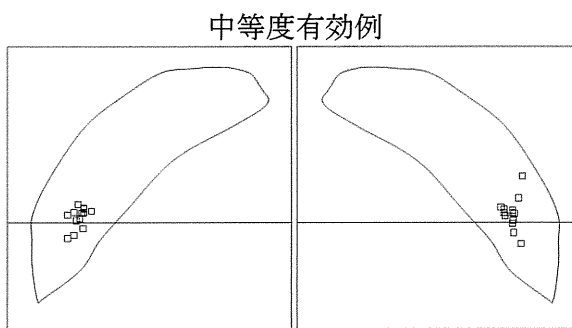
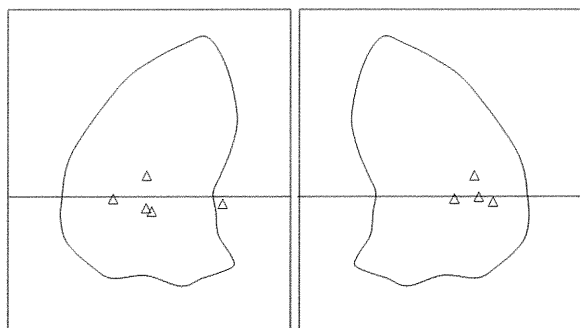
著効例



中等度有効例

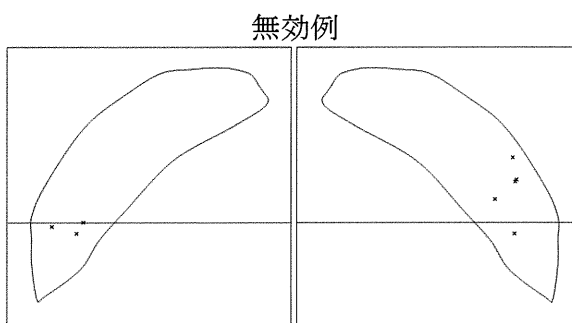


やや有効例

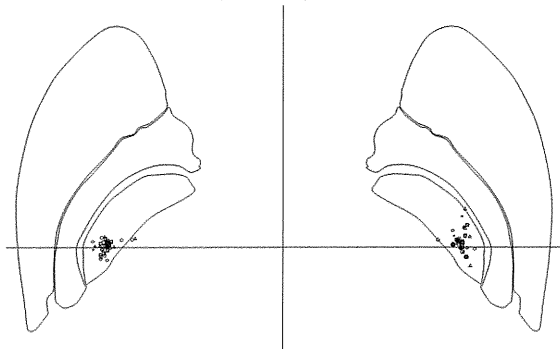


有効刺激部位は冠状断では副内髄板あるいはその外側へばらつく分布を示した。

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。



全症例の刺激部位（水平断）



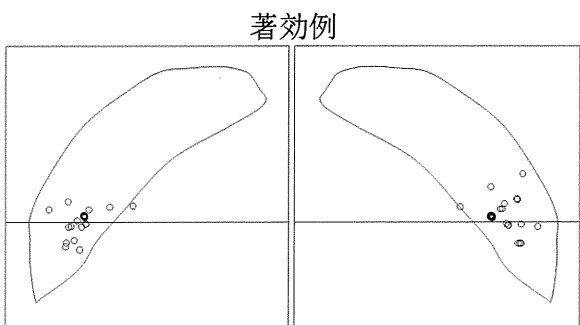
これらの結果から、GPi内の電極位置は著効、中等度有効、やや有効、無効の如何にかかわらず重複する分布を示していることが明らかになった。

2. ヒト淡蒼球内節内の亜核区分の再検討

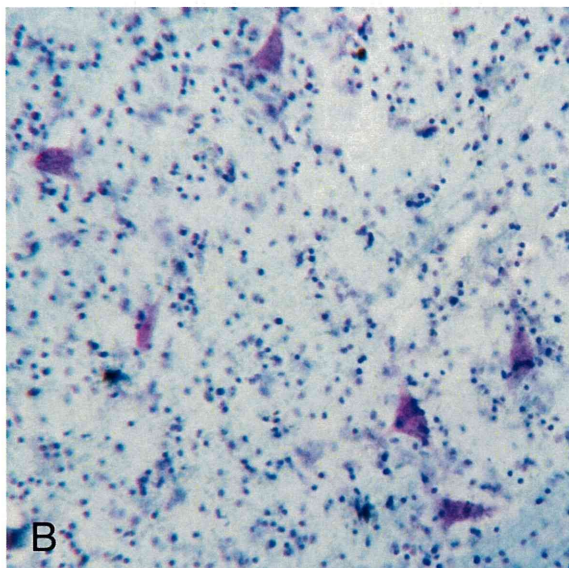
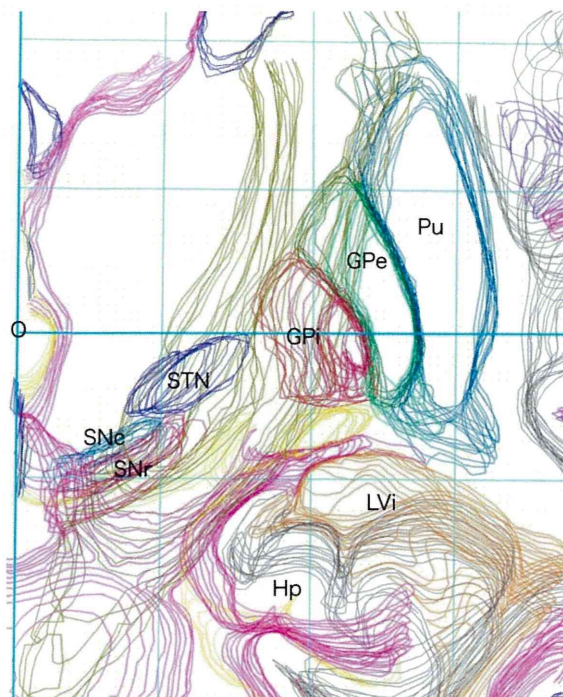
①日本人脳座標アトラスの作成

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ル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。

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



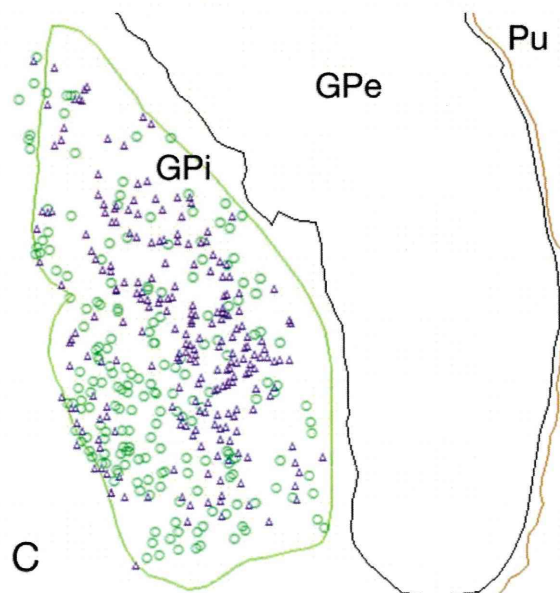
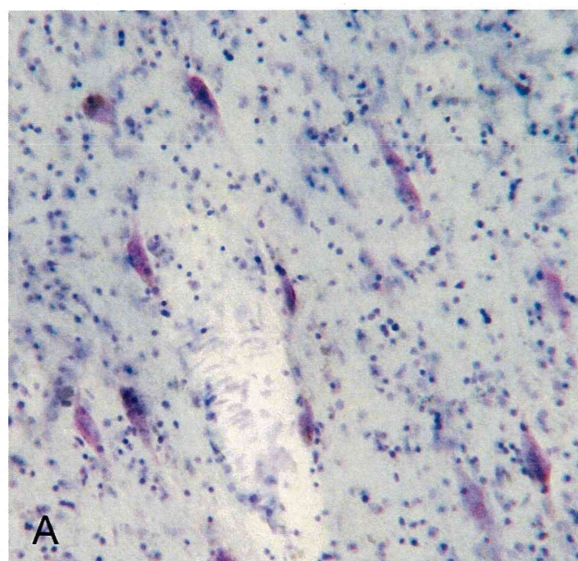
る。既存のアトラスを任意の角度で切断できるよう加工した上で、作業人員を大幅に追加して解析し、随時データを追加していく予定である。



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。

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。

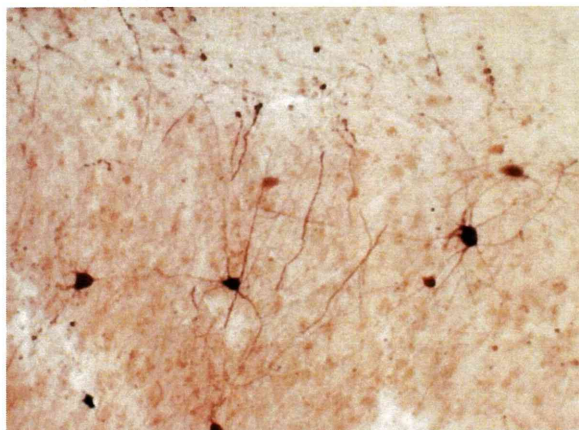
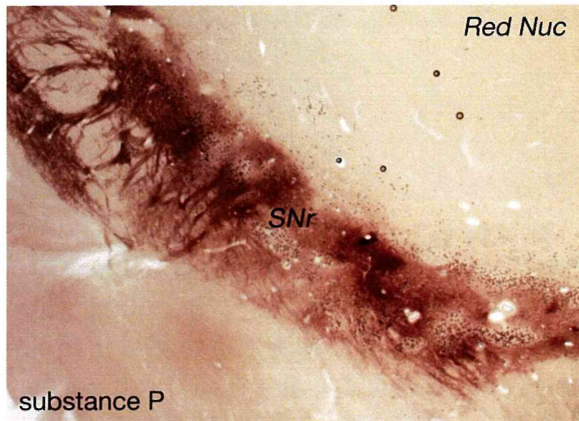


(A)のニューロンを△で示すと、これらのニューロンは **GPi** の外側寄りに位置していた。この尾側レベルでは副内髄板が不明瞭化するため、この集団が **medial part** と **lateral part** のどちらに位置するのかは今後の検討を要する。ただし、より吻側で **medial part** と **lateral part** が明瞭な場所では、このような

紡錘状ニューロンの集合は認められなかった。したがって、未知の第三の区分に相当する可能性が考えられた。

③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た。

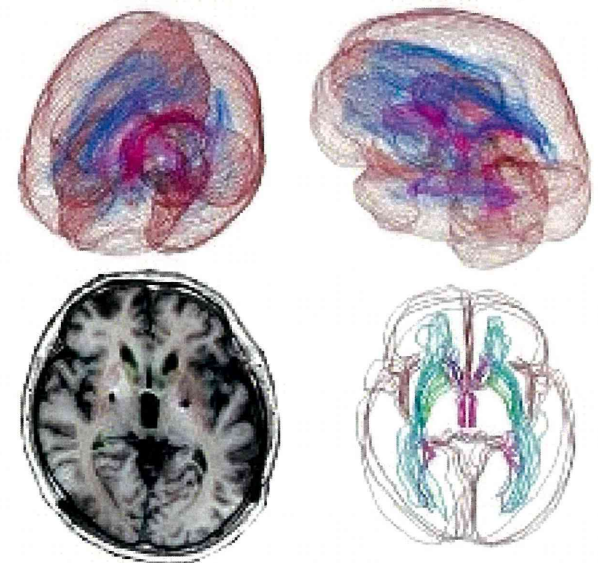
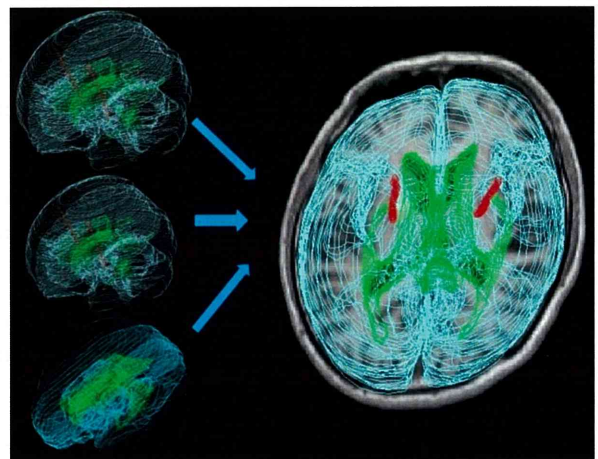


同時にマウスでの詳細な解析を行い、GPI に PV 陰性のニューロンが存在していることをつきとめた。この結果をヒト淡蒼球の染色に応用することにより、GPI 内部における不均一性をニューロン構成の観点から実証し、連続切片再構築により亜核区分の三次元的構成を明らかにする研究の確かな道筋が得られた。

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殊学級への入学を強いられ、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絶されていることも多く、正確な有病率は分かっていない。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 μ 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ット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。本研究は難治性神経症候のジストニアに対し、臨床研究・基礎医学研究・医工連携研究の3本の柱を中心に治療法を開発するという画期的な試みである。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、今後の継続的研究の進展が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

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, 2010

宮城 靖 他: 視床下核刺激後の薬物療法: 進行期パーキンソン病非運動性症状の観点から. *機能的脳神経外科* 49(1):54, 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

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. *Neurosci Res* 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*, pp136-139, 2010

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

宮城 靖, 諸岡健一, 福田孝一, 陳献, 早見武人, 岡本 剛, 砂川賢二, 飛松省三, 吉浦敬: デジタル画像処理技術を用いた脳座標

アトラス作成法. 第49回日本定位・機能神経外科学会 (大阪) 2010年1月

村上信哉, 宮城 靖, 他: パーキンソン病に対するSTN-DBSにおける刺激極性による刺激部位の比較. 第49回日本定位・機能神経外科学会 (大阪) 2010年1月

宮城 靖: DBSの刺激部位と臨床神経生理. 第40回日本臨床神経生理学会学術大会 (岡山) 2010年11月

宮城 靖, 他: 脳深部刺激療法における回路の短絡について. 第192回日本神経学会九州地方会 (鹿児島) 2010年12月

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 (福岡) 2011年1月

宮城 靖, 上加世田和文, 石橋秀昭, 古賀広道: 脊髄刺激療法が有効であった Levator ani syndrome の一例. 第50回日本定位・機能神経外科学会 (広島) 2011年1月

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. 分担研究総合報告書

ジストニアの深部脳刺激療法に寄与する日本人専用脳アトラスデータベースの整備 と淡蒼球内節における未知の亜核領域の組織学的探索

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

日本人脳の一側全体を組織標本化する過程を完了し、組織像のトレースに基づく正確な脳構造のデータベース作成が順調に進行している。特にジストニア治療の標的である淡蒼球内節の精細な位置座標データが得られた。免疫組織化学により内節内部に未知の亜区域が存在することをマウスの脳で見いだした。その知見をヒト脳組織に応用してヒト淡蒼球内節を客観的に細区分するための方法論の確立を終了した。

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。その要因の一つとして、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があげられる。そのため作業仮説的に内節内部の位置を区分し、刺激効果判定がなされているが、目印となる位置座標は、実質上Shaltenbrandによるアトラスの数枚の断面図に求められるのみである。しかも若いドイツ人の脳に基づくこのアトラスを本邦患者のMRI画像に適用すると、しばしば位置が大きすぎてしまい、現状では淡蒼球内節の小さなサイズの中で有効な刺激部位を決定することには依然として困難が伴う。

我々はDBS一般においても問題となるこれらの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。このデジタルアトラスは、患者の脳の形態に合わせて自由変形を行う機能を盛り込む計画である。私が担当する研究では

- (1) 組織標本に基づくデジタルブレインアトラスを作成する
- (2) 特に正常ヒト脳淡蒼球内節および周囲の神経核の詳細な位置座標データを得る
- (3) 淡蒼球内節内部に亜区域が存在する可能性を組織学的に追究する

(4) 内節内亜区域の存在が明らかになれば、その客観的区分法を見だし、各々の亜区域の位置座標をデジタルアトラスに組み込む。これによりDBS成績と電極部位との相関を再検討する形態学的基盤を提供する。以上を主な目的とする。

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 μ 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、脳表面と脳内部の構造の位置に関するデジタルデータの取得を行った。

②ヒト淡蒼球内節内部構造の探索

ヒト淡蒼球内節の解剖学的内部構造について文献的にはごく簡単な記載しかないが、そこで言及されている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た。次にNissl染色標本の観察に基づく、部位による細胞構築の違いの有無を、内節内部で検討した。

③簡易脳スライス作成法の開発

上記の組織標本に基づくアトラス作成は、非常に正確なデジタルデータが得られる反

面、膨大な時間と手間を要する。そこで多数の脳から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

淡蒼球内節の内部における未知の亜核区分を見だし、かつその境界線を客観的に定める目的で、いくつかの物質に対する免疫組織化学を脳切片で試みた。ただしヒトの脳標本ではやむをえないことであるが、実験動物標本に比べて最適な染色条件を得られにくく、結果の解釈を難しくする可能性がある。そこでまず実験動物（マウス）の脳組織切片において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。平行して、マウスで用いたものと同じ抗体によるヒト脳での免疫組織化学の実験方法の確立を行った。

（倫理面への配慮）

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

組織標本の作成は、後頭極の小部分を残し一側大脳半球のほぼ全体について終了した。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は今のところ認めていない。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では切片作成に伴う変形がほとんどなく (Fukuda, Morooka and Miyagi, *Neurosci Res* 67:260-265, 2010)、レンダリングやスケール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)。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

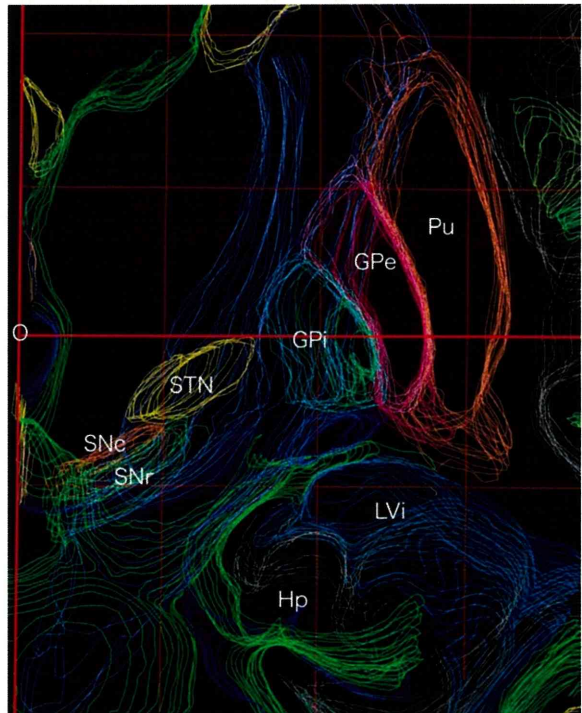


図1 ヒト淡蒼球内節(GPi)周囲のトレース。トレース上の各点の三次元座標はデジタルデータとして記録されている。

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。

②淡蒼球内節内部構造の探索

淡蒼球周囲のトレースを図1に示す。DBSで標準的に用いられているShaltenbrandアトラスと比較した場合、かなり近い座標が得られている。ただしそれとは若干の位置の違いも認められるが、これはヒトの脳の形態に個体差があるので当然起きるべき差違である。

DBSにおいても問題となる副内髄板の同定はNissl染色の目視によってもある程度可能であったが、さらにスキャンした画像を画像処理し、染色性をカラーコード化することで、客観的な線引きを実現した。

各断面における副内髄板は、レンズ核ワナの走向に従い淡蒼球内節の腹側へと向かっている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。

一方、内節の最尾側領域において、内髄板・副内髄板に平行な向きに配列する紡錘状

のニューロンの集団の存在に気づいた（図2）。これらのニューロンは内節の外側寄りに位置していたが、この最尾側領域では副内髄板が不明瞭化するため、この集団がmedial partとlateral partのどちらに位置するのかは、今後免疫組織化学染色（後述）も適用しながら検討を加える。ただし、より吻側のレベルでmedial partとlateral partが明瞭な場所では、このような紡錘状ニューロンの集合は認められなかった。従って、未知の第3の区分に相当する可能性も考えられる。

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ないし5mmの厚さで正確に裁断する方法を開発した。一側の脳全体を寒天に包埋し、これまで用いていた脳切断機(Visceracut VC-600)に改良を加え、良好なスライスを得た。また包埋時に真空ポンプを用いて脳室内部に残存する空気を除去し寒天をすみずみまで充填することが有用であった。図3にスライス断面を直接スキャンした画像を示す。組織切片と同様にNeurolucidaを用いれば、間隔は粗くても正確な三次元デジタルデータが脳全体から得られる。さらにこれらのスライスから100 μ 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、淡蒼球内節近傍の詳細な組織アトラスを組み込むことを、今後多数の脳で計画している。

④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、カルシウム結合蛋白であるパルブアルブミン(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が、今回の研究で初めて明らかになった。しかし、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。

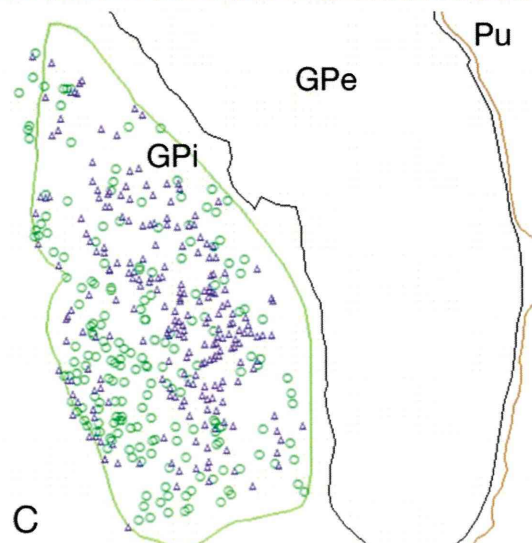
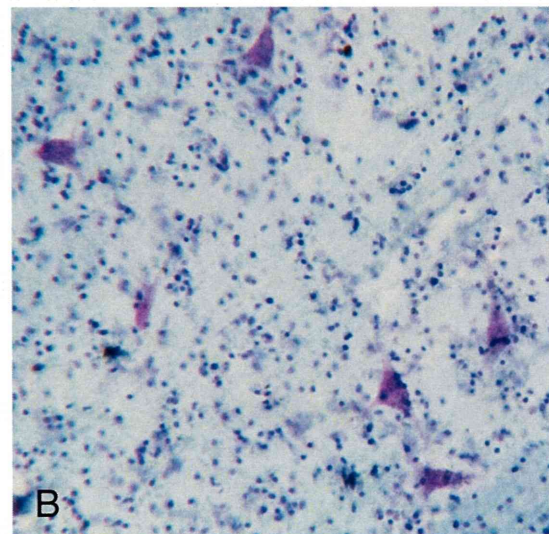
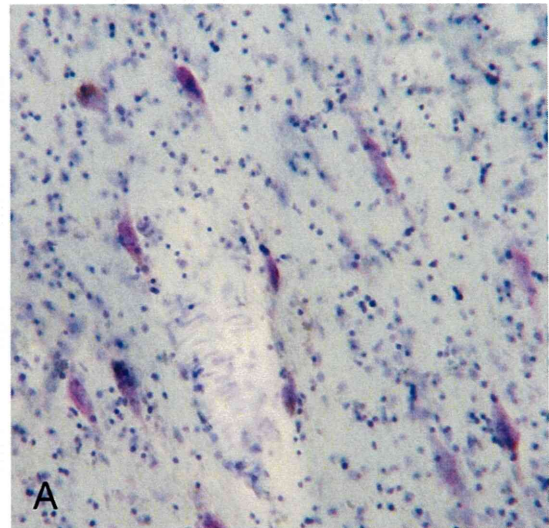


図2 (A)淡蒼球内節最尾部に存在し、副内髄板に平行に配列する紡錘状ニューロンの集団。(B)内節で一般的に見られるニューロン。(C)ΔはAで示すタイプのニューロンの淡蒼球内節における分布。○はそれ以外。

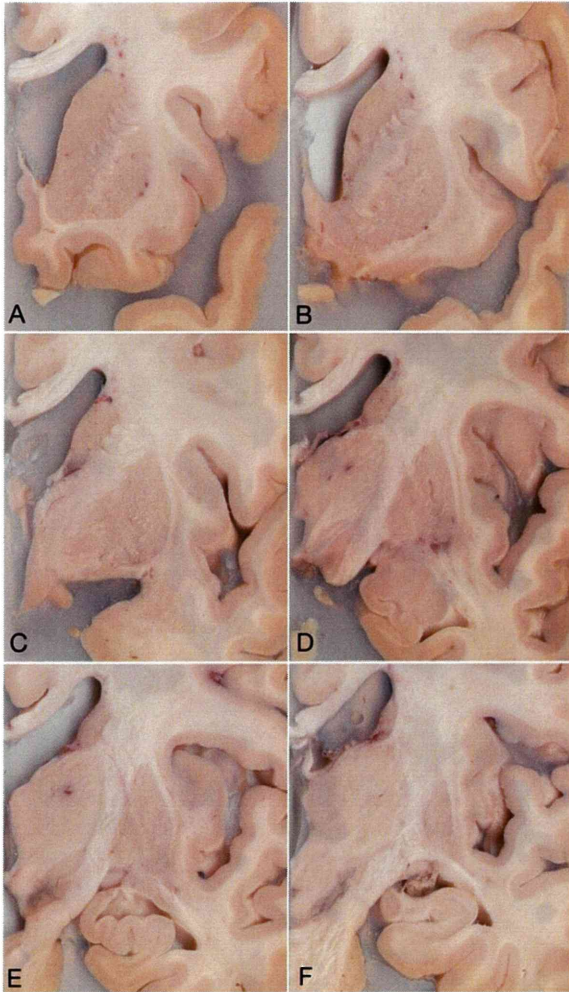


図3 組織アトラスを補完する脳スライス。寒天に包埋し3~5 mmの厚さで作成。表面の構造がよく保たれており、直接スキャンした像を示す。

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4~6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。

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は、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

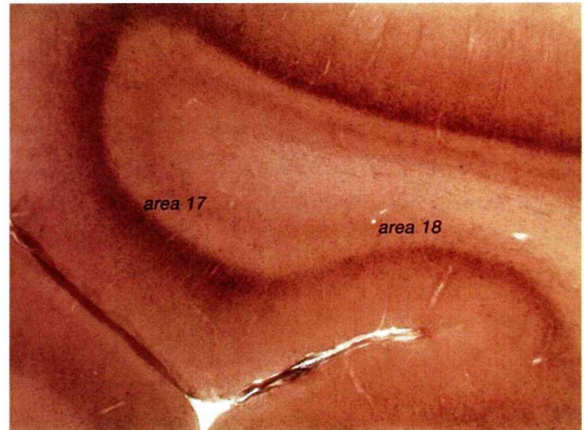


図4 ヒト一次視覚皮質 (17野) 周囲におけるPV免疫組織化学染色。図3に一部を拡大する。

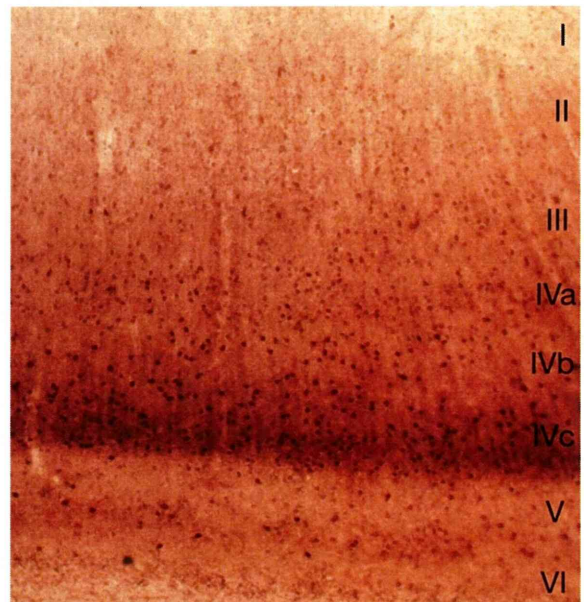


図5 ヒト一次視覚野のPVニューロン。右のローマ数字は層を示す。

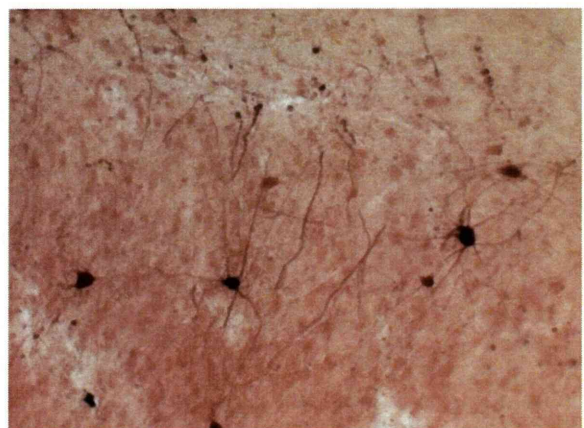


図6 ヒト海馬 CA1 領域の PV 免疫陽性のインターニューロン。

良好な染色結果を得た(図7)。また淡蒼球外節を同定するエンケファリンの免疫染色も得られた。

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ヒト淡蒼球内節の三次元的広がり「全体像」(それは全く知られていない)を、初めて捉えることが可能になった。

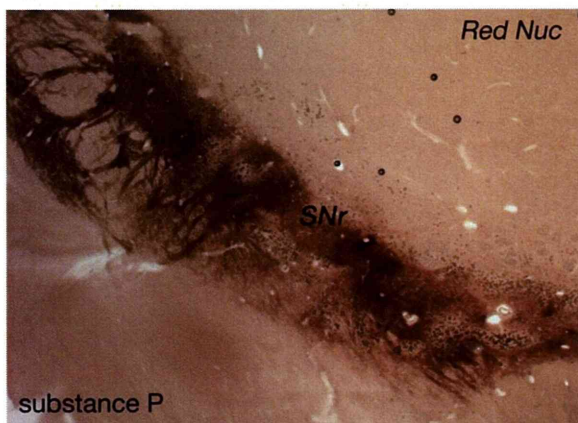


図7ヒト黒質網様部(SNr)におけるサブスタンスPの免疫組織化学染色。図の右が内側、上が背側。線条体由来の軸索終末が陽性像としてSNrを描出する。付近に散在する黒質緻密部のドーパミンニューロンは免疫陰性であるが、特有の黒色素のために識別できる。Red Nuc: 赤核。

⑤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8)。

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正確に同定する方法を得た(図8)。

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9で明らかのように、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10に4つの異なる位置での結果を示す