



Histological validation of cerebral white fiber fixation methods

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-06-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山田, 昌幸 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000262

論文内容要旨

しめい 氏名	やまだ まさゆき 山田 昌幸
学位論文題名	Histological validation of cerebral white fiber fixation methods. (白質解剖のための脳処理法の組織学的検証)
背景：脳の白質解剖は脳の構造を学ぶために非常に有用な方法であり、白質解剖を行うための方法論は 1930 年代に発表されたもの（クリングラー法）が現在も使用されている。しかし、その脳の処理方法を科学的に検証したものは現在に至るまで存在せず、脳処理方法の最適条件についての知見は得られていない。そこで、我々はクリングラー法で用いられている脳の凍結処理に注目し、脳の凍結期間や解凍・再凍結処理の回数の変化が脳の組織にどのような影響を与えているかを評価し、脳処理方法の最適条件を求めた。 方法：当院解剖学教室に献体された匿名の右脳半球を 6 つ用意した。各脳半球の中心溝の前後で 5mm の厚さで 6 スライス切り出し、それぞれ異なる凍結条件（1 週間連続凍結、2 週間連続凍結、3 週間連続凍結、1 週間凍結毎に解凍し合計 2 週間凍結、1 週間凍結毎に解凍し合計 3 週間凍結）で凍結処理を行った。処理後の脳を投射繊維と U-fiber を含むように 3 カ所切り出し、それぞれ 5 μm の厚みで切片を作成し、HE 染色を施した。これを Keyence BZ-X700（Keyence Corporation, Osaka, Japan）で画像データとして取り込み、凍結処理によってできた氷の結晶がどの程度白質繊維の間を剥離しているかを評価した。評価の指標として、白質繊維間にできた間隙の面積の割合と、間隙の平均離心率を求めた。この評価のための画像処理および計算は MATLAB[®] Image Processing Toolbox[™]（MathWorks, Natick, MA, USA）を用いて行った。間隙面積および間隙離心率の統計分析は maximum contrast method を用いて、組織変化の peak を評価した。 結果：連続凍結標本では 1 週間で白質繊維間の間隙面積および、間隙の平均離心率が最大となり、2 週間、3 週間と凍結期間を延長しても結果は変わらなかった。凍結・再解凍処理を加えると著しく白質繊維間の間隙面積および平均離心率が大きくなったが、解凍処理を複数回加えても結果に差は見られなかった。 考察：単純な凍結では、最初に発生する微小結晶は小さく、成長と凝集での増大反応速度は遅いため 3 週間程度では差が出ないと推測された。解凍・再凍結処理を行うと、最初の氷晶形成で間隙ができ、再凍結処理によりそこに大小異なる氷晶形成がなされ、それが Ostwald ripening 現象を引き起こして氷晶増大を加速させることが考えられた。間隙は結晶の成長とともに離心率の増大が見られ、氷晶の成長は白質に沿った方向性を持って成長していることが示された。 結論：白質解剖のための脳処理方法について組織学的検証を行った初めての研究である。我々の研究では、1 週間の凍結後に解凍し、更に 1 週間凍結を行う処理方法が白質繊維の分離が最大になり、これ以上の凍結処理は必要が無いことを明らかにした。	

学位論文審査結果報告書

平成 31 年 1 月 31 日

大学院医学研究科長様

下記のとおり学位論文の審査を終了したので報告いたします。

【審査結果用紙】

氏 名 山田 昌幸

学位論文題名 Histological validation of cerebral white fiber fixation methods.
(白質解剖のための脳処理法の組織学的検証)

「ネットワークの臓器」である脳の複雑な白質線維構造を知るには MRI だけでは不十分であり、直に白質解剖を行うことにより白質線維構造に精通していることが、脳神経外科手術による合併症を回避するうえで重要である。白質解剖の手法として、ホルマリン固定脳の凍結・解凍操作により白質線維間を解し線維剖出を容易にする Klingler 法が長く用いられてきたが、凍結処理等の条件に関して客観的に検証した研究はこれまで乏しかった。

本研究ではまず、従来の方法でホルマリン固定した右大脳半球 6 点について、前額断 5mm 標本スライスを、凍結条件を変えて対象検体とした [条件：ホルマリン固定のみ (P1)、1 週間 (P2)・2 週間 (P3)・3 週間連続凍結 (P4)、(1 週間連続+解凍)×2 回 (P5)、(1 週間連続+解凍)×3 回 (P6)]。各スライスから投射線維と U-fiber を含むように腹側弁蓋部・側頭葉・背側弁蓋部の H&E 染色標本作製し、これらをデジタル画像化・グレースケール化した。氷晶によって生じた間隙の形状を楕円と仮定し、遠心率 0.95 以上のものを保存、間隙集団を標本画像上にベクトル表示させ、氷晶形成の程度確認のため、白質面積に対する間隙の面積の割合を計算し、凍結・解凍等条件と氷晶形成による線維間解離との関係性を評価した。

その結果ホルマリン固定のみの標本 (P1) には線維間の解離はみられなかったが、凍結処理を施した標本 (P2~P6) は氷晶形成によってそれぞれ異なる程度の線維間解離を認め、P5 で白質解離効果が最大となることが示されたという。

本研究は, 組織構築の変化を数値化することにより **Klingler** 法における準備条件の客観的評価を試みたユニークな内容であり, 得られた知見は白質解剖における脳処理法の確実性と効率性の改善に寄与し, 臨床と脳神経外科医の教育に資するものと考えられることから学位授与に値するものと判断された.

論文審査委員	主査	黒田	直人
	副査	本間	俊作
	副査	植村	武文