

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	舟山 一寿
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大博 (医) 第 1825 号
学位授与の日付	令和5年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	Detection and morphological analysis of micro-ruptured cortical arteries in subdural hematoma: three-dimensional visualization using the tissue-clearing clear, unobstructed, brain/body imaging cocktails and computational analysis method. (硬膜下血腫における皮質動脈微小破裂の検出と形態解析: CUBIC 法による組織透明化を用いた3次元画像化)
論文審査委員	主査 教授 上野 将紀 副査 教授 吉原 弘祐 副査 准教授 清水 宏

博士論文の要旨

【背景と目的】

急性硬膜下血腫は一般的に重症頭部外傷による脳挫傷や架橋静脈の破裂によって生じるとされているが、一方で”非外傷性”又は”特発性”硬膜下血腫と呼ばれる、ごく軽微な外力による又は外力によらない皮質動脈の破裂を原因とした硬膜下血腫が存在することも知られている。皮質動脈破裂による硬膜下血腫はこれまでに198例報告されているが、剖検によって詳細な病理組織学的検査が行われたのは8例のみであり、そのうち2例は申請者らの報告である。剖検例が少ない原因について、破裂が生じる皮質動脈は微小であるため、剖検において肉眼的に指摘することができず見逃されている可能性について言及した上で、死後血管造影CT (Computed Tomography) と摘出後の脳に対する動脈内液体注入が皮質動脈破裂の検出に有用であることをその報告で指摘した。しかし破裂部位の病理組織学的検索は1,000枚を超える連続切片作成を要し、さらに膨大な連続切片を用いても破裂部位の詳細な3次元的解析は不可能であることから、この硬膜下血腫の病態解明には新しい手法の必要性が判明した。

そこで申請者らは、脳組織ブロックを組織透明化法の一つであるCUBIC (clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis) 法によって透明化した上で、ライトシート型蛍光顕微鏡 (light sheet fluorescence microscopy : LSFM) を用いて皮質動脈の形態を画像化し、破裂した皮質動脈の形態解析を行い、従来の肉眼的解析及び病理組織学的解析と比較することで、皮質動脈破裂の形態解析におけるCUBIC法の有用性と限界について検証した。

【方法】

2017年から2019年にかけて当院で行われた法医解剖例のうち、病理組織学的に皮質動脈破裂が検出された硬膜下血腫6例すべてを対象とした(64~95歳, 平均86.7歳, 男性1名, 女性5名)。剖検中に死後血管造影

CTや動脈内液体注入によって皮質動脈破裂部位を肉眼的に推定した。剖検時に摘出した全脳をホルマリン固定後、皮質動脈破裂が推定された部位の肉眼的形態を写真撮影により画像化した。同部を含む組織ブロックに切り出し、既報の文献の手順に従いCUBIC法による脳組織サンプルの透明化を行い、LSFMを用いて脳組織サンプルの血管形態を3次的に画像化した。その後脳組織サンプルは連続切片を作成し、光学顕微鏡で皮質動脈の破裂を特定し、病理組織学的形態を画像化した。画像解析ソフトを用いてLSFMで得られた画像データから、病理組織学的検査で特定された動脈破裂部位の3次元画像と2次元断層画像を作成し、肉眼的形態及び病理組織学的形態について画像を比較した。

【結果】

症例1~5では、シルビウス裂付近の皮質動脈の小分枝の分岐部またはその付近で動脈の破裂が生じていることが病理組織学的に確認された。そのうち4例ではCUBIC法で得られた画像によって動脈の破裂を明瞭に可視化することができたが、うち1例では破裂した小分枝の一部が不明瞭であった。症例5では破裂部がCUBICの撮影範囲外にあったため画像化できなかった。症例6では、皮質下の小血腫内に小さな動脈断裂が病理組織学的に確認されたが、CUBIC法では血腫の透明化が不十分であったため断裂した動脈は可視化されなかった。CUBIC処理によって一部の症例で脳実質内に小さな亀裂を生じたものの、血管の病理組織学的検索を困難にするような影響は認められなかった。

【考察と結論】

本研究の結果、皮質動脈破裂の検出及び形態解析においてCUBIC法は病理組織学的検査と遜色なく精細に動脈構造を可視化できること、また従来の検索方法と比較していくつかの利点があることが示唆された。

まず、CUBIC法は肉眼的検索では破裂と認識しにくい事例においても、破裂を明確に可視化することができ、動脈破裂の検出感度を向上させることが示唆された。

また、CUBIC法は3次的な動脈破裂の形態解析を高精細に行うことができた。さらに3次元画像データからは、任意の2次元断層画像を得ることができ、組織ブロックを破壊することなく仮想の組織切片を作成することで、病理切片の作成を最適化できることが示唆された。この利点は皮質動脈破裂という特殊な状態に限定されるものではなく、脳動脈瘤や椎骨動脈解離などの他の脳血管障害や、法医病理学で最も重要な病態の一つである冠動脈疾患にも適用できる可能性がある。

一方でCUBIC法にはいくつかの限界があることも判明した。血腫はCUBIC法では十分に透明化されず、その内部および周囲の構造がLSFM撮像で不明瞭になってしまう。また脳ブロックは透明化する過程でゼリーのように柔らかくなるため、破損しないように慎重に取り扱う必要がある。本研究では動脈に対しては深刻な影響はなかったが、脳実質の一部に破壊が生じた。より脆弱な組織へのCUBIC法の適用は、非破壊的検査である本法の本来の利点とは逆の破壊的検査になってしまう可能性もある。

硬膜下血腫における出血源としての動脈破裂の検討では、例外はあるものの、CUBIC法では2次元および3次的に動脈破裂が明確に可視化された。CUBIC法は非破壊的な形態解析法であり、従来の肉眼的検索、病理組織学的検索にCUBIC法を組み合わせることで、動脈破裂の形態をより詳細に解析することが可能となり、硬膜下血腫の病態解析に有用である。

審査結果の要旨

硬膜下血腫は、脳挫傷や非外傷性、特発性に皮質動脈の破裂が起こり生じる。破裂した皮質動脈は微小なため肉眼的な同定が難しく、病理組織学的検査で同定された報告も少ない。また病理学的検索は連続切片作成を要し3次元の解析が難しい。これまで死後血管造影CTや動脈内液体注入による検出の有用性を示してきたが、硬膜下血腫の病態の可視化には新たな手法が求められている。そこで本研究では、組織を透明化できるCUBIC法を用いた皮質動脈破裂の形態解析法の有用性と限界を検証した。硬膜下血腫の法医解剖6例を対象に、血管

造影 CT や動脈内液体注入で皮質動脈破裂部位を推定し、ホルマリン固定後、同部位を CUBIC 法で透明化し、ライトシート型蛍光顕微鏡で撮影し、血管形態を 3 次元的に解析した。その後連続切片を作成し、皮質動脈の破裂を病理学的に特定した。5 例で、シルビウス裂の皮質動脈の小分枝分岐部等で破裂が病理学的に確認され、うち 4 例で CUBIC 法は動脈破裂を明瞭に可視化できた。1 例は破裂部が撮影範囲外で画像化できなかった。他 1 例は血腫の透明化が不十分で破裂部は可視化されなかった。本研究の結果、CUBIC 法は、血腫を透明化できない課題が残ったものの、2 次元、3 次元的に精細に動脈構造を可視化、同定できることがわかった。本研究により、肉眼、病理学的検索に加え、組織透明化法による硬膜下血腫の動脈破裂の同定法を明らかにした点に、学位論文としての価値を認める。