

# 医学研究使用のための剖検脳組織の凍結保存 —国立精神・神経センター病院での取り組み—

国仲伸男 橋本洋二 渡司博幸 杉村有司 齊藤祐子 有馬邦正\*

IRYO Vol. 63 No. 9 (577-582) 2009

## 要旨

脳神経疾患は、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症など、原因がまだ解明されていない難病が数多く存在する。これらの疾患の確定診断は病理組織学的診断が必須であるが、遺伝子解析なども併用した診断が必要な場合もある。さらに、その疾患の病態や治療法の解明のために研究資源として蓄積していくことが重要であり、剖検で摘出した脳組織を最適な条件下で処理をして長期保存することがきわめて重要になる。

国立精神・神経センター病院では1997年から、ブレインバンクに準じた剖検検体情報ネットワーク：Research Resource Network (RRN)を開始しているが、共同研究を目的とするブレインバンクを運営するためには、十分なインフォームド・コンセントとバンク運営の整備が必要であり、剖検にかかわる病理部門の役割は重要になってくる。とくに、剖検脳凍結—長期保存—検体情報管理の流れを円滑にするために剖検脳保存システムを構築したので、当院の運用状況と併せて報告する。

キーワード 剖検脳, ブレインバンク, 剖検検体情報ネットワーク, 凍結保存, プログラムフリーザー

## はじめに

脳神経疾患は、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症など、原因がまだ解明されていない難病が数多く存在する。これらの疾患の確定診断は病理組織学的診断が必須であるが、遺伝子解析なども併用した診断が必要な場合もある。さらに、その疾患の病態や治療法の解明のために研究資源として蓄積していくことが重要であり、剖検で摘出した脳組織を

最適な条件下で処理をして長期保存することがきわめて重要になる。しかしながら、脳を研究資源とするなかで剖検の承諾なしには蓄積することは困難である。しかも剖検率は世界的にみても減少傾向にあり、わが国も例外ではない<sup>1)</sup>。

国立精神・神経センター病院（以下、当院）では、剖検脳凍結検体を1980年代から総計174例保存しており、1997年にはブレインバンクに準じた剖検検体情報ネットワーク<sup>2)</sup>である Research Resource Net-

国立精神・神経センター病院 臨床検査部 \*第一病棟部

別刷請求先：国仲伸男 国立精神・神経センター病院 臨床検査部 〒187-8551 東京都小平市小川東町4-1-1  
(平成20年12月22日受付, 平成21年9月11日受理)

Retention of Autopsy Brain Tissue for Biomedical Research, Current Situation and Perspectives

Nobuo Kuninaka, Yoji hashimoto, Hiroyuki Watashi, Yuji Sugimura, Youko Saito and Kunimasa Arima\*, National Center Hospital of Neurology and Psychiatry ;

Development of Clinical Laboratory, \*Development of Psychiatry

Key Words: autopsy brain tissue, brain bank, research resource network, cryopreservation, program freezer

表1 剖検脳保存症例（平成20年12月現在）

筋萎縮性側索硬化症	19
アルツハイマー病	10
遺伝性歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症	5
マチャド・ジョゼフ病	3
パーキンソン病	7
多系統萎縮症	9
進行性核上性麻痺	4
大脳皮質基底核変性症	4
Tau N279K変異	2
プリオン病	8
（ 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病	6 ）
（ ゲルストマン・シュトロイラー・シャインカー病	1 ）
（ 致死性家族性不眠症	1 ）
筋強直性ジストロフィー	19
その他の筋ジストロフィー	5
ミトコンドリア脳筋症	4
統合失調症	11
その他	64
合計	174

表2 RRN 登録施設と件数

登録施設（平成20年12月現在）	件数
NHO さいがた病院	196
国立精神・神経センター病院	174
NHO 下総精神医療センター	138
NHO 兵庫中央病院	114
NHO 東名古屋病院	107
国立国際医療センター国府台病院	75
NHO 肥前精神医療センター	72
NHO 東埼玉病院	57
NHO 南岡山医療センター	56
NHO 西多賀病院	45
NHO 鳥取医療センター	17
NHO 刀根山病院	9
NHO まつもと医療センター中信松本病院	3
NHO 東京病院	1
NHO 広島西医療センター	1
その他（NHO施設，ナショナルセンター）	318
合計	1,383
NHO：独立行政法人国立病院機構	

work (RRN) を設立し、自施設の蓄積と同時に RRN にもデータベース登録している（表1）。剖検から適切な処理、管理運営を行うためには病理部門の役割が重要であり、これらの流れを円滑にするために剖検脳保存システムを構築したので報告する。

### ブレインバンクとは

ブレインバンクはヒトの精神・神経疾患の病態解明と診断・治療法の開発（以下、医学研究と総称）に使用することを目的に剖検脳を系統的に凍結保存し、外部の研究者に提供する機構である<sup>3)</sup>。

### わが国におけるブレインバンク

わが国においては、自施設で剖検脳を凍結保存する“*Institutional Collection*”が中心であり、外部に剖検脳を提供する活動が乏しかった。また、剖検率の減少も影響し症例数や正常コントロールとする剖検脳などは、海外に依存せざるを得なかった。最近では、道義的問題や知的所有権の問題などからパテント申請を日本の研究者は認められないことも出てきたため、日本国内にブレインバンクの構築が急務となった<sup>4)</sup>。

わが国でブレインバンクとして外部提供を可能に

しているところは、1997年12月に福島県立医科大学に創設された系統的な精神疾患死後ブレインバンクがあり、生前同意を前提に献脳カードを発行している。1993年に創設された福祉村病院長寿医学研究所ブレインバンクでは、神経変性疾患や認知症が中心であるが、遺族同意を基に蓄積している。東京都老人総合研究所高齢者ブレインバンクでは、老化にともなう運動・認知障害の克服を目指し1999年から半脳凍結保存を開始している<sup>4)</sup>。

ブレインバンクに準ずるものとして、当院のRRNがある。RRNは、一部の国立病院機構とナショナルセンターで保存している剖検脳の検体情報を共有化し研究資源として蓄積・提供できるバンクである（表2）。参加登録施設以外は剖検検体情報を見ることができないが、国内でブレインバンクネットワークとして機能しているのはRRNのみである。実際にRRN外の研究者に提供し研究された実績（2004-2008年）は疾患別に、統合失調症、アルツハイマー病、ピック病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ミトコンドリア脳筋症、多系統萎縮症、大脳皮質基底核変性症で各1題ずつ、パーキンソン病/びまん性レビー小体病、進行性核上性麻痺で各2題ずつ、筋萎縮性側索硬化症/運動ニューロン疾患が3題、多発性硬化症、Tau 遺伝子変異をとともなう前頭側頭型認知症が各4題ずつで合計22題に上り、幅

広い疾患で研究が行われている。

### 諸外国におけるブレインバンク の活動状況

ブレインバンクは1961年に米国のロサンゼルス退役軍人病院に National Neurological Research Specimen として開設されたのが始まりとされている<sup>5)</sup>。

現在、米国では、100以上のブレインバンクが存在し、約半数は“Institutional Bank”であり比較的大きな規模を持ち、病院あるいは研究施設を母体としている。また、半数は小さな“Private Bank”であるが、北米のネットワークをつなげる American Brain Banking Network があり定期的なワークショップを開催している<sup>6)</sup>。英国では、Medical Research Council (MRC) が1991年から準備を開始し、1993年以降 MRC の助成によるブレインバンクが組織された。また、欧州では2001年に EU 研究費による19のブレインバンクが参加する Brain Net Europe が設立されている<sup>5)</sup>。

### ブレインバンクを運営するための 法的・倫理的配慮

剖検脳はご遺体の一部であり、剖検病理検体である死後脳組織は「死体解剖保存法」と「病理解剖指針」（昭和63年11月7日医道審議会死体解剖資格審査部会申し合わせ）に従って適正に保存され研究使用される必要がある<sup>3)</sup>。また、病理検体の帰属については、「病理臓器および病理標本は検体由来者や家族から病院長もしくは施設長が信託 (trust) を受け、病理医は二者の管理権と使用权を得る」という見解がある<sup>7)</sup>。自施設の中であれば、trust を基に実施できるが、他施設との共同研究も目的とするブレインバンクを運営するためには、インフォームド・コンセントとバンク運営の整備が重要である。

剖検脳を使う医学研究には、「ヒトゲノムおよび遺伝子解析研究に関する倫理指針」（2001年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示）に従って、インフォームド・コンセントを得なければならない<sup>8)</sup>。これに従い、当院の倫理審査委員会に審査対象として「ヒトを直接扱う医学研究および医療行為」（受付番号13-2 平成13年8月23日承認）の承認を得て、「病理解剖、病理検体の保存とその診断使用・

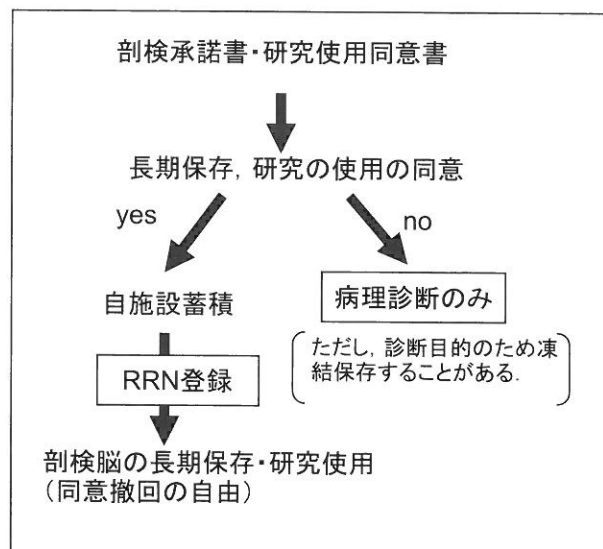
研究使用についての承諾書の改訂」（承認番号17-2-事12 平成17年8月1日承認）、「病理解剖、病理検体の保存とその診断使用・研究使用についての承諾書の組織機構の変更に伴う病院名等の改訂」（承認番号20-1-事7 平成20年5月27日承認）と適時見直しを行い更新している。承認された解剖承諾書は、死体解剖保存法に従った病理解剖の同意、DNA 診断に関する同意、ゲノム解析研究を明記した医学研究使用に関する同意、検体情報ネットワークへの登録に関する同意の4項目に分けられており、ご遺族の同意の選択範囲を広げる配慮がなされている。

### 当院の運営方法

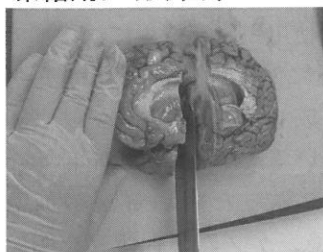
剖検にあたってご遺族に「病理解剖、病理検体の保存とその診断使用・研究使用についての承諾書」に関する説明をする。これは、病理解剖のみか、または病理解剖と併せて研究目的の使用が可能かご遺族から同意を得るためである。同意が得られた剖検脳に関しては RRN に登録するが、いつでも同意の撤回が可能であることも併せて説明する（表3）。

摘出した脳は剖検担当医が肉眼観察しマクロ写真で記録する。脳幹を含む左半球をホルマリン固定し、右大脳半球を保存用としている。保存する大脳は約7mm厚で前額断のスライスを作る。小脳は5mm厚で矢状断、脳幹は5mm厚で水平断、脊髄も追加する。これらを肉眼観察後、プラスチックシャーレに載せてマクロ写真を記録する。病理診断が第一の

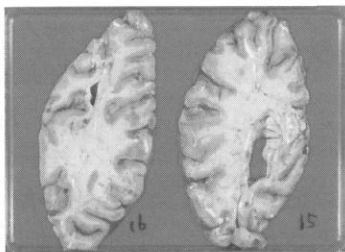
表3 当院の剖検の流れ



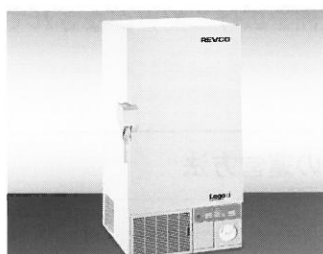
原則的に右大脳半球を凍結用に切り出す



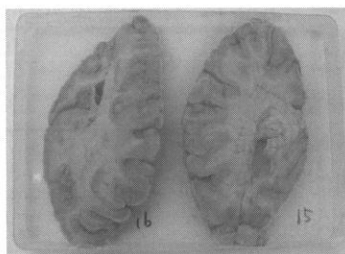
マクロ観察と撮影



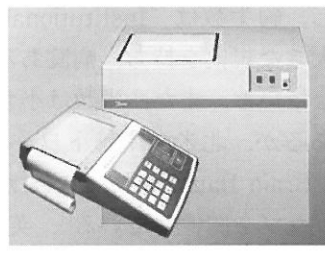
プラスチックシャーレごとラックに入れる



超低温槽へ保存



凍結完了



凍結プログラムスタート

図1 切り出しから凍結保存までの手順

優先であるため凍結保存する部位は症例によって変更している。

保存用の剖検脳は、プログラムフリーザー（PLANER社）を使って凍結し、一つずつフリーザーパックに入れて、 $-80^{\circ}\text{C}$ の超低温槽に保存する（図1）。また、凍結検体管理システム（日本BRADY）を使って検体情報と超低温槽内のロケーションを確定する。

### 剖検脳保存システムの構築

#### 1. プログラムフリーザーを使用した脳凍結保存法

凍結方法の主流は液体窒素である。われわれも以前は液体窒素で凍結していたが、過冷却による組織の亀裂などや多くのスライスを凍結しなければならない煩雑さもあり、プログラムフリーザーを使って脳組織を凍結する方法を試みた。プログラムフリーザーを使って臓器を凍結する方法は国内外に例をみないため、ブタ肝臓などを用いて予備実験を行った。現在は、表4に示すプログラムで剖検脳を凍結している。また、脳凍結の一部を戻してパラフィン切片によるヘマトキシリン・エオジン染色や電子顕微鏡用のエポキシ樹脂によるトルイジン青染色をそれぞれ行ったが、いずれも氷晶などのアーティファクトはみられなかった（図2, 3）。

表4 凍結プログラム

氷点降下前に $4^{\circ}\text{C}$ 10分間温度を一定にして組織を安定させる。次に、 $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ずつ $-50^{\circ}\text{C}$ まで降下させ5分間保つ。さらに、 $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ずつ $-100^{\circ}\text{C}$ まで降下させる。全工程約40分程度で終了する。

Start temp $+4^{\circ}\text{C}$		
#1	hold 10 mins	
#2	$-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$	to $-50^{\circ}\text{C}$
#3	hold 5 mins	
#4	$-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$	to $-100^{\circ}\text{C}$

#### 2. 超低温槽の管理

超低温槽は横型、縦型を合わせて7台保有している。温度管理は朝夕2回の温度チェックと記録紙による管理を行っている。また、不測の事態に備えすべての超低温槽に $\text{CO}_2$ 補助冷却装置を取り付けている。さらに内4台は温度が異常（ $-65^{\circ}\text{C}$ 以上）になった場合、各担当者の携帯電話へ通知する機能を設置した。通知の条件は、警報信号が10分以上継続されたときに、院内LANを経由して登録したメールアドレスに配信するシステムになっている（図4）。警報がさらに10分以上入力されれば、再度メールを配信する設定になっている。





図2 ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色)  
8 mm 厚のブタ肝臓を凍結後、ホルマリンに戻してパラフィン包埋した。写真は肝臓中心部の組織像。組織構築は保たれており氷晶などのアーティファクトはみられない。

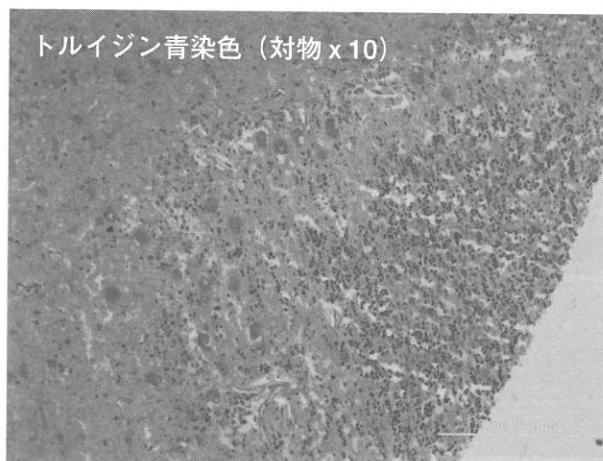
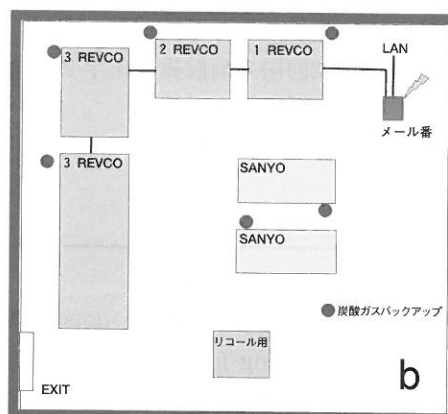


図3 トルイジン青染色

小脳凍結後の小片を2.5%グルタルアルデヒドに戻してエポキシ樹脂にて包埋した。組織構築は保たれており氷晶などのアーティファクトはみられない。



a : 超低温槽室とアラーム通報機 (メール番)



b : 4 台の超低温槽はネットワークでつないでおり、異常警報時は院内ネットワークを介してメール送信する。

図4 超低温槽室と各超低温槽のネットワーク

### 3. 凍結検体管理システム

凍結脳は経時的に増え続けていくため、整然とした保存管理が要求される。わかりやすい配置にするため凍結検体管理システムを利用した。システム構成は、ノート型パーソナルコンピュータ、バーコードリーダー、バーコードプリンターがあり、Freezer-Manager Ver. 2 を使って管理する (図5)。まず、保存する庫内のロケーションをあらかじめ設定する。入庫する際は、設定したラック位置に患者情報を入力する。バーコードを発行しフリーザーパックと台帳にそれぞれ貼り付けて設定どおりの位置に保存する。取り出す場合は、剖検番号を入力することで、超低温槽と内部のロケーションが一目でわ

かるようになっており容易に取り出しが可能である (図6)。

## 結 語

剖検脳の保存と管理運営の流れがスムーズに行くように当院独自の剖検脳保存システムを構築した。全国的に剖検率の低下が著しいなかで、数少ない剖検脳は病態解明のための貴重な資源となる。病院独自の蓄積は重要であるが、施設特有の疾患や年齢層、正常脳コントロールの有無など偏りが生じる可能性がある。それを補うために研究資源の共有化は不可欠であり、より優れた研究資源の蓄積のためにはブ

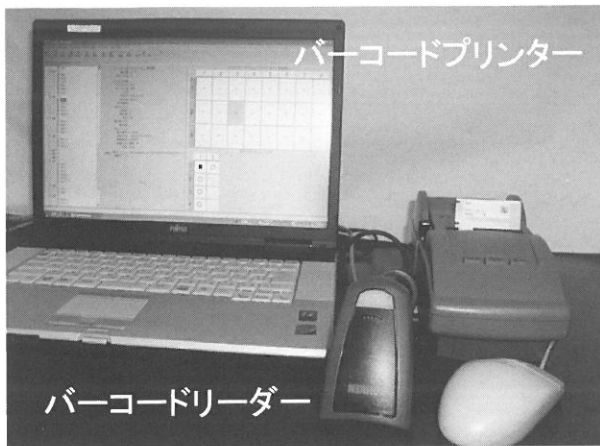


図5 凍結検体管理システム

専用のノート型パーソナルコンピュータとバーコードリーダーとバーコードプリンターを備えている。

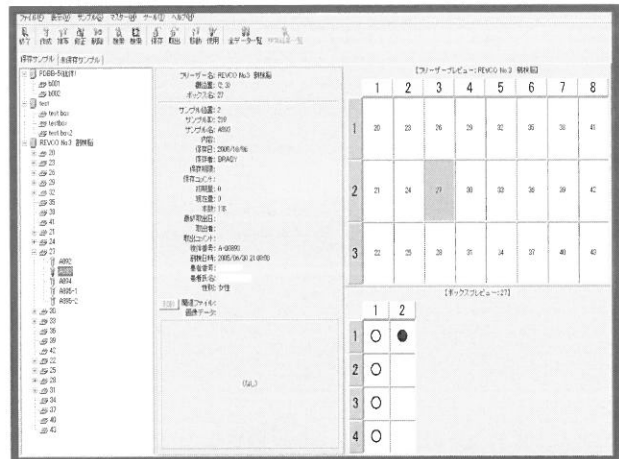


図6 フリーザー内のロケーション管理システム  
管理ソフトFreezer Manager Ver. 2の画面で、超低温槽 No.と内部のロケーションがひと目でわかるようになっている。

レインバンクネットワークのさらなる拡大が望まれる。

(要旨については第62回国立病院総合医学会で報告した)

[文献]

- 1) Hans Kretzchmar. Brain banking: opportunities, challenges and meaning for the future. Nat Rev Neurosci 2008; 10: 70-8.
- 2) 有馬邦正. 神経・筋疾患と慢性精神疾患等のリサーチリソース (剖検脳等の組織) の確保とそのシステム (主任研究者 有馬邦正). 総括研究報告書 (平成16年-18年度) 2007: p1-7.
- 3) 有馬邦正. ブレインバンク. In: 樋口輝彦編 KEY WORD 精神 第3版 東京: 先端医学社: 2003:

p222-3.

- 4) 村山繁雄, 齊藤祐子. ブレインバンク. 脳と神経 2006; 58: 1075-84.
- 5) 有馬邦正. 日本におけるブレインバンクの現状-日本神経病理学会と国立精神・神経センターのブレインバンク推進活動. 日本生物学的精神医学会 2009; 20: 11-6.
- 6) 新井信隆, 熊西俊郎, 長嶋和郎ほか. 日本神経病理学会ブレインバンク検討委員会 調査報告書 諸外国のブレインバンクの運営状況. 日本神経病理学会 1999.
- 7) 日本病理学会. 倫理委員会報告. 日病理学会 会報 2004; 201号: 2-3.
- 8) 池本桂子, 國井泰人, 和田明ほか. 精神疾患に関するブレインバンクの運営とその問題点. 精神医 2008; 50: 1015-9.