

— 原著論文 —

ヒト脳の中脳・橋断面における神経構造可視化のための簡便染色法

生野 泰彬<sup>1)</sup>, 周 明<sup>2)</sup>, 鈴木 良地<sup>2)</sup>, 勝山 裕<sup>1)</sup>, 瀧 公介<sup>1)</sup>

1) 滋賀医科大学解剖学講座神経形態学部門

2) 秋田大学大学院医学研究科形態解析学・器官構造学講座

A simple method for visualization of neural structures in the cut surfaces of the human midbrain and pons

Yasuaki IKUNO<sup>1)</sup>, Ming Zhou<sup>2)</sup>, Ryoji SUZUKI<sup>2)</sup>, Yu KATSUYAMA<sup>1)</sup>, and Kousuke TAKI<sup>1)</sup>

1) Department of Developmental Neuroscience, Shiga University of Medical Science

2) Department of Anatomy, Akita University Graduate School of Medicine

**Abstract** In brain anatomy lab (dissection training) in medical schools, it is essential to learn localization and shape of neural structures, such as fiber bundles and neuronal nuclei. Students learn these from not only text books, but also from observations of real human brain dissected from cadavers. Although some textbooks recommend to carry out these observations just in the cutting surface of the brainstem, discrimination of white and gray matter is difficult, especially when the size of the neural structures is between macroscopic and microscopic levels.

A staining method invented by Mulligan stains cerebral cortex of the human brain for macroscopic observations, and clearly distinguishes it from the white matter. However, reproducible results of staining were not obtained by the original protocol, when brain stem regions were examined. Here, we propose improvements in Mulligan staining method to be applicable to cross sections of the brain stem regions. Because we aim to use the method in training of macroscopic brain anatomy in medical schools, we made efforts to reduce steps and time for this staining. The images obtained by our modified Mulligan staining and Klüver-Barrera staining were compared in the midbrain and pons, and found that our method can identify some neural structures, which were difficult to identify without staining. Because our method use only three solutions and comprised by 6 steps, this method is useful for the training of macroscopic brain anatomy for undergraduate students.

**Keyword** Mulligan staining, macroscopic brain anatomy, brainstem, Klüver-Barrera staining

はじめに

ヒトの脳幹は錐体路を始めとする様々な神経路の通り道になっており、脳神経核やその他の機能的に重要な神経構造が多数存在する[1]。それら神経構造の理解は脳幹を灌流する動脈の閉塞・損傷時の症状を理解する上で臨床的な重要性を持ち、基礎医学科目である神経解剖学の学習においても重要である。

医学部・医科大学の学生が行う脳解剖実習における脳幹断面の観察では様々な神経核や神経路を同定することが望ましいが、切断面の微細な構造を染色などの処理を行わずに見分けることは難しい。神経細胞体と神経線維を染め分ける方法としては Klüver-Barrera 染色[2]が最も代表的である。Klüver-Barrera 法ではニュー

ロン<sup>1)</sup>の細胞質(ニッスル物質)がクレシルバイオレットで、髄鞘化された神経軸索がルクソールファストブルーで染色され可視化できる。しかし、Klüver-Barrera 染色のような本格的な組織染色を行うには脳の固定、包埋、ミクロトームを用いた薄切を行うため、技術の習得が必要である。またルクソールファストブルーによる染色を再現性よく行うためには経験が必要とされる。そのため、学生による解剖実習の限られた時間の中で行うことは現実的ではない。本研究では、簡便かつ明確に白質・灰白質を染め分ける方法を開発することを目的とした。

我々は学生実習室内の設備だけで短時間のうちに白質・灰白質の染め分けを行う手法として、Mulligan が

Received: January 11, 2017. Accepted: April 12, 2017.

Correspondence: 滋賀医科大学医学部解剖学講座神経形態学部門 瀧 公介

〒520-2192 大津市瀬田月輪町 taki@belle.shiga-med.ac.jp

1925年に報告した手法[3]に注目した。この染色法はタンニン酸と鉄ミョウバンによる反応を利用し、適当な前処理を行うことで灰白質のみを青黒く染める。原著では大脳皮質の白質と灰白質が良好なコントラストで染め分けられているが、脳幹部についてはここでは検討されていない。Mulligan法はしばしば学生実習用の染色法としての使用可能性を検討されてきた[4]。近年ではプラスチックと併用して観察に適した耐久性のある脳標本を作製するための染色法としてヒトまたは動物の脳で適用候補にあげられており[5-7]、肉眼観察に適した標本の作製において有用な選択肢となっているが、やはり脳幹部の染色状態については十分な検討がなされていないとは言えない。原法では再固定や高温での反応を行う煩雑なステップがあるが、1分ずつ浸潤するだけの簡便法で良好な分別像が得られるとする報告もある[8]。そこで我々は簡便法を基本として脳幹部の良好な分別像を得られる条件を探索し、Mulligan法の改良を試みた。本研究では中脳と橋の断面でのMulligan法を行い染色像を撮影したのちに、同じ組織断片で行ったKlüver-Barrera法の染色像と比較し、我々のプロトコルの評価を行った。

## 方法

### 1. 組織固定法

ヒト遺体は、36% ethanol (v/v), 6.5% formalin (v/v), 13.5% glycerol (v/v), 7.5%, phenol(w/v)を20リットル用いて大腿動脈から環流する一方で、頭蓋内には、上矢状静脈洞直上の皮膚から経頭蓋的に硬膜下に達する穿孔を作成し10%formalinを頭蓋内に注入した。固定から抜脳までの遺体の保存期間は10ヶ月以上26ヶ月以内である。脳は系統解剖実習の一環として頭蓋内より摘出され、まず流水中で3日以上留置し、固定液成分を除去した。

### 2. 染色法

Mulligan法改良のための条件検討については他で報告する(Taki et al., in preparation)。染色に用いる液の組成は文献[3]に従い、4%フェノール、0.5%硫酸銅、0.125%塩酸(A液)、2%タンニン酸(B液)、2%硫酸第二鉄アンモニウム(C液)を作製した。

摘出脳から脳幹部を切り分け、脳刀で2~3mm厚の中脳と橋のレベルで横断面の切片を作製した。

Mulligan染色の変更法1：室温で中脳もしくは橋の切片の切断面をA液に1分間浸した後、流水中で1分間洗浄した。次にB液に切断面を1分間浸し、ふたたび流水中で1分間の洗浄を行った。最後にC液に切断面を浸し、発色させた。C液に浸漬している間は発色が進行し、最終的には組織の切断面の全体が黒く染まってしまうため、適当な濃さの発色が得られた時点で反応を停止した。具体的には、期待される濃さの発色を得る手前で流水中に組織を移し、流水洗浄中に若干発色が進み良好なコントラストもった染色を得た時点で観察を行った。

Mulligan染色の改良法2：断面標本の流水洗浄を一晚行った。断面標本を10%ホルマリン溶液に8時間以上浸漬し再固定した。前もってA液を60℃にしておき、ここに組織片を浸した。B液に1分間浸漬後の流水洗浄を1分間行った。最後にC液に切断面を浸した。発色が適当な濃度になるまで浸漬した。

良好なコントラストの結果が得られた切片については、PBSに30%ショ糖を溶かした液で置換し、凍結薄切法で25 $\mu$ mの薄切切片を作成した。切片をスライドグラスに貼り付けてから、乾燥、エタノール系列での脱水、キシレンでの透徹を行い、さらにエタノール系列を逆に進めて70%エタノールの段階まで進め、再親水化した。95%エタノールに5分浸漬した後、ルクソール・ファストブルー溶液(武藤化学株式会社)に浸漬して60℃で12時間保温した後に空冷して室温になるまで放置した。95%エタノールですすぎ、蒸留水と0.05%炭酸リチウム液に交互につけて分別した。ルクソールファストブルーでの染色が理想のコントラストをみせるのを顕微鏡で確認した後に70%エタノールに10分浸漬、蒸留水で5分浸漬し、0.1%クレシルバイオレット液(武藤化学株式会社、使用前に酢酸添加)中で37℃15分保温し、95%エタノール(200mlに10%酢酸2滴添加)で分別した。その後通常の脱水・透徹・封入作業を行った。Klüver-Barrera染色像とMulligan法による染色像の写真を比較し、脳幹部構造の同定を行ってMulligan法染色の有効性を評価した。

## 結果

### 1. 染色法に関して

簡便なMulligan染色変更法1での染色では、報告されていたように大脳皮質では灰白質と白質の分別が明瞭であったが、同一検体の中での不均一な染色も多く見られた(data not shown)。このような染色像となる原因として脳の固定とその後の水洗における不均一性をまず考慮する必要がある。そのためMulligan法の原著[3]においても染色する断面を作成後に再固定することが推奨されている。そこで、条件検討を行った結果、一晚の再固定、60℃でのA液浸漬、B液浸漬後の流水洗浄時間10分という条件のMulligan染色変更法2を見だし、このプロトコルで最も良好なコントラストが得られることが分かった(図1B, 図2B)。次にMulligan染色変更法2を行った標本を用いて薄切切片を作成しKlüver-Barrera法で染色したところ、Mulligan染色変更法2において得られた染色のコントラストが実際の神経構造を示していることが確認できた(図1C, 図2C)。

### 2. 切断面の解剖学的観察

#### (1) 下丘レベル

下丘レベルの中脳の切断面の改良Mulligan染色像(図1B)では中心灰白質と脚間核がはっきりした境界をもって強く染まっていた。脚間核と上小脳脚線維領域の境界は染色を行わない断端でもわかりやすい(図

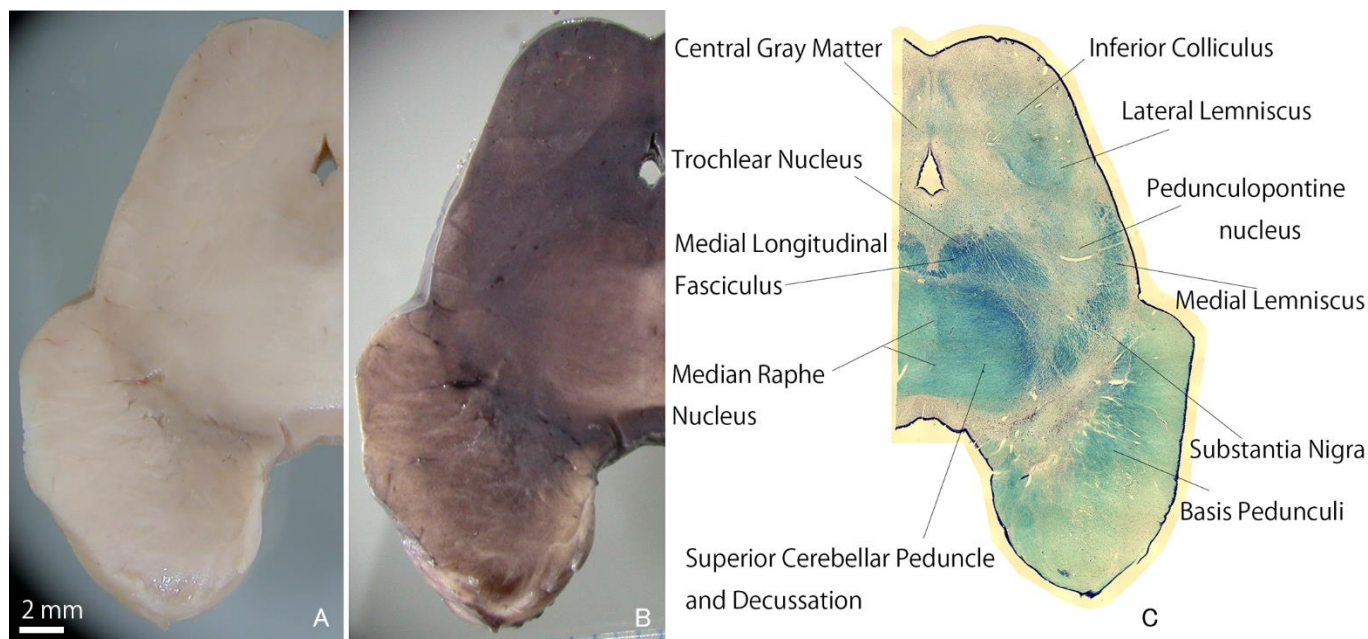
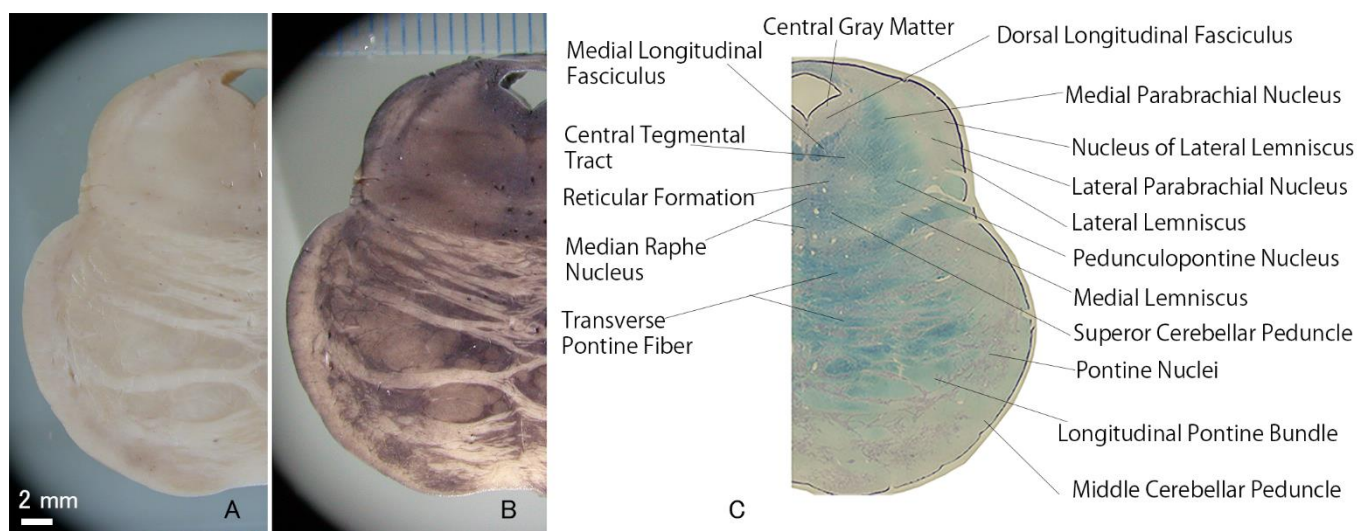


図 1. 中脳下丘レベルでの横断面. A: 染色前, B: Mulligan 法 (改良法 2) 染色後, C: 同じ標本の断面付近から作成した Klüver-Barrera 染色薄切切片. 各神経構造はクリューバー・バレラ染色像を基準に同定した



1A). しかし, 中心灰白質の外周境界の特に背側縁は染 (図 1B). 内側毛帯や三叉神経毛帯, 内側縦束, 中心被

図 2. 橋 (上部) レベルでの横断面. A: 染色前, B: Mulligan 法 (改良法 2) 染色後, C: 同じ標本の断面付近から作成したクリューバー・バレラ染色薄切切片. 各神経構造の同定については図 1 と同様にを行った.

色を行わない断端では明瞭に識別することができない. 中心灰白質の腹側に有対性により濃く染まる小領域が見られたが, Klüver-Barrera 染色像(図 1C)と比較すると, ここが滑車神経核であることがわかる. 下丘核と黒質は中程度の染色がみられた. 下丘核の外側に染色性が比較的弱い背腹軸にそって細長い領域が視認できたが, ここは外側毛帯であることが示唆される.

黒質は緻密部だけでなく網様部までよく染色された(図 1B). 下丘は腹外側から入る外側毛帯とともに線維を多く含むため隣接する中心灰白質の領域などに比較してやや白く抜ける傾向があった(図 1B). 白質では大脳脚, 上小脳脚交差などの大きな構造物がもっとも染色性が弱く明瞭に神経構造を同定することができた

蓋路も周囲との染色性の差が観察され同定することができた(図 1B). 内側毛帯の背側に比較的強く染色された小領域が見られたが, ここは二丘傍核(parabigeminal nucleus)であると考えられる. また動眼神経核と思われる構造物も観察可能であった.

#### (2) 橋レベル

橋レベルの断面においては, 腹側部では横橋線維と中小脳橋がほとんど染まらず(図 2B), 染色を行う前の断面(図 2A)と比べて, さらに構造を明確にすることができた. 縦橋線維は横橋線維に比べると濃く染まったが, より濃く染色された橋核とは明確に区別が可能であった(図 2B). 背側部では神経路である内側縦束, 内側毛帯, 外側毛帯の染色性の弱さが明確に白質である

ことを示唆している(図 2B)。中心灰白質, 内側結合腕傍核, 外側結合腕傍核, 外側毛帯核や脚橋被蓋核は強く染まり同定可能であった(図 2B)。正中縫線核を含む内側部分の橋網様体については染色性が弱い周囲の白質から良好に区別できた。一方, 青斑も弱い染色が観察されたが, 明瞭ではなかった。内側縦束や内側毛帯, 外側毛帯, 中心被蓋路といった比較的小さい領域を占める神経路や網様体と脚橋被蓋核は我々の改良 Mulligan 染色がない切断面(図 2A)では観察がであったものが改善されている。このように中脳下丘レベル, 橋レベルの脳幹切断面で, 染色前でも同定可能な神経構造(図 1A,2A)は改良 Mulligan 法(図 1B,2B)によって, さらに明瞭に観察できただけでなく, 小さい構造の多くが染色の濃淡の違いはあるもののはっきりと同定できるようになった。

## 考察

本研究は, 解剖実習用に固定した遺体から摘出した脳組織を一晩流水洗浄した後に再固定するという前処理を行うことにより, 簡便 Mulligan 法を用いた白質と灰白質の明瞭な染め分けが可能になることを明らかにした。このように, 脳刀による脳の切断面を3種類の溶液に順番に浸していくだけの簡便な染色方法は, 解剖実習において学部学生自身が実施できる手技であると考えられる。脳解剖実習は多くの場合, 数日をかけて行う。広く採用されている脳解剖実習手引書 [9,10] では, 中脳で切断し, 脳幹を大脳部分から分ける。このステップの後に大脳の観察を行っている間に, 脳幹部の洗浄と再固定を行えば, 次回の脳解剖の時には我々が作成した簡便な Mulligan 染色を行うことができ, 既存の実習書のスケジュールを乱すことはない。

これらのことから, 本研究によって作成された染色プロトコルを解剖学学生実習に導入することにより, あらかじめ用意されていた脳のプレパラートを顕微鏡で観察するといった実習の不連続性を回避することができる。本染色法を用いてマクロ解剖的な観察を行った後に, 顕微鏡を用いて Klüver-Barrera 法などによって染色された脳プレパラートを観察することによって, さらに脳解剖の理解が深まることが期待される。今後は, より小さく重要な働きをもつ神経構造が多く含まれる延髄や多数の神経核によって構成される視床, 視床下部においても本染色法を試み, どの程度の神経構造の同定に汎用性があるかを確かめる必要がある。

## 謝辞

この研究を遂行するにあたって, 脳標本を採取した献体の固定と保存を担当した解剖技術職員, 柏原市朗氏と木村隆宏氏に謝意を表します。

## 文献

- [1] Ghez C, Krakauer J. The organization of movement. Principles of neural science, 4/e (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM ed), New York, USA,

McGraw-Hill, 663-668, 2000.

- [2] Klüver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the Nervous system. J Neuropath Exp Neurol, 12:400-403, 1953.
- [3] Mulligan JH. A method of staining the brain for macroscopic study. J Anatomy, 65(4):468-472, 1931.
- [4] Meneses MS, Montano Pedroso JC, Fuzza RF, Milano JB. Comparative analysis of human brain slices with three different staining techniques. Arq Neuropsiquiatr, 62(2A):276-81, 2004.
- [5] Baeres FM, Möller M. Plastination of dissected brain specimens and Mulligan-stained sections of the human brain. Eur J Morphol, 39(5):307-11, 2001.
- [6] Vibulchan P, Cheunsuang O. Comparison of Mulligan's, Alston's and Prussian Blue Reaction's Methods for Staining Dog Brain Slices Prior to Plastination. Thai J Vet Med. 44(4): 547-551, 2014.
- [7] Mumtaz SN, Sagoo MG. Comparative staining methods with room temperature plastination (15 - 18°C) of brain specimens, using Biodur™ S10 / S3. J Plast. 26(2):21-29, 2014.
- [8] 山田 致知, 萬年 甫. 実習解剖学. 東京, 南江堂, 634-635, 1985
- [9] 寺田 春水, 藤田 恒夫. 解剖実習の手びき. 改訂 11 版, 東京, 南山堂, 342-385, 2004.
- [10] 千田 隆夫, 小村 一也. プラクティカル解剖実習脳. 東京, 丸善出版, 2012

## 和文抄録

医学部, 医科大学の神経解剖学教育では脳の様々なレベルの断面でみられる神経構造を教科書のみでなく実際のヒト脳を用いた解剖実習でも学ぶ必要がある。ヒト脳の断面で白質と灰白質の区別を要求されるが, 実際には脳幹の神経核などの小さな構造を神経解剖実習で同定するのは極めて難しい。

タンニン酸を使った古典的な染色の一つである Mulligan 法はヒト脳の断面で大脳皮質の灰白質を極めて明瞭に染め, 内部の白質と明確な区別を可能にする。我々はこの染色法の改良プロトコルを作成し, 染色にかかる時間と手数を大幅に少なくした。興味深いことに我々のプロトコルは大脳皮質のみならず脳幹の断面でも白質と灰白質の区別もより明瞭にすることがわかった。ここでは中脳と橋の染色像を報告する。Mulligan 染色を行った組織片を薄切し作成したプレパラートの Klüver-Barrera 染色像と対比することで, 神経構造を同定し, それらが今回提案した Mulligan 変法で識別可能であることを示した。この染色法は極めて簡便であるので, 学生のための脳解剖実習での利用が期待できる。

キーワード: Mulligan 法, マクロ脳解剖, 脳幹, Klüver-Barrera 染色