

コンピュータによるブタ脳の内部構造三次元再構成

矢野 史子¹, 松本 俊郎², 坂下 勝則³

要旨

ブタ脳の特定部位にカニューレを挿入するために、脳内部構造のコンピュータ上での三次元再構成を試みた。脳内部構造としては、脳脊髄液の貯留場所である脳室を対象部位とした。体重約 10kg の LW 系雄子豚 (8 週齢) から採取した全脳を、約 2 週間 10% ホルマリンで固定後、脳底部から頭頂部にかけて、水平に 1mm のスライス厚で CT スキャン撮影し連続断層画像を得た。断層画像の脳表面および脳室の輪郭を Scion Image で三次元点座標として表わし、三次元構築ソフト COSMOS でコンピュータ上に立体再構成した。この再構成モデルによって、脳表面および脳室を線および面で立体表示できた。さらに、脳表面特定部位から脳室特定部位の 2 点の座標を用いて、2 点間の距離および挿入角度算出法を提示した。さらに、連続断層画像の脳室部分を着色後、三次元構築ソフト Image J および Delta Viewer でコンピュータ上に立体再構成し、ブタ脳内部での脳室の位置および形状を可視化した。これらの結果は、ブタ脳室内へのカニューレ挿入手術時に有用な情報を提供することとなった。

1. 結論

神経科学と行動学の研究を進めるには、実験動物を生理条件に近い状態で維持した上で、脳内の物質挙動と動物の行動を平行して解析する必要がある。個体レベルでの神経行動学研究に有用な手法である *In vivo* マイクロダイアリス法による脳内の神経伝達物質の経時的測定や、ミニポンプによる脳内への薬剤微量連続注入法は、主に脳地図⁽¹⁾が提供されているラット等の実験動物を用いて進められてきた。食欲や食行動に関する研究も、多くがラットを用いて行われており^(2, 3)、我々も、ラットを用いて食行動の研究を進めている^(4, 5)。しかし、齧歯動物で夜行性のラットのデータをヒトに外挿するのは適切であるとはいえない。そこで、我々は、非齧歯類の単胃動物で、雑食性・昼行性のブタを脳神経科学・行動学の研究に用いることとした。成家畜ブタやミニブタの脳地図^(6, 7)が公表されているが、ブタの脳特定部位にカニューレを正確に挿入するには体重や月齢によって頭骨や脳の大きさが異なるため適切な資料とはいえない。MRI や CT 等の医用機器を用いれば生体の脳の立体表示は可能ではあるが、ブタの撮影に同意してくれる機関が近隣にはなく、また、個別のコンピュータソフトが必要なため、カニューレーション手術現場では利用できないという難点がある。

本研究では、産業用 CT スキャナーで得た連続画像を基に、無料あるいは市販の安価なコンピュータソフトを用いて、ブタ頭骨内の脳の立体表示、脳内部構造の立体表示を行い、脳内部での脳室や神経核の位置や形状をコンピュータ上に再構成することを試みた。さらに、脳 CT 連続画像の輪郭抽出による三次元化を試みるが、これは三次元点座標から 2 点間距離を算出することで、大きさの異なるブタ脳へのカニューレーション手術の際に、ブタ頭骨と脳に関する有用な情報を提供するナビゲーションシステムとしてナビゲーションシステムとして活用するためのものである。

原稿受付 2005 年 11 月 17 日

本研究の一部は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.03-I-1,2004 および、科学研究費萌芽研究 (15658089) の助成を受けた。

1. Department of Biotechnological Science, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Department of Intelligent Mechanics, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

3. Industrial Technology Center of Wakayama Prefecture, Wakayama, 649-6261, Japan

2. 材料と使用機器

2.1 供試動物： Large White 系幼齢家畜ブタ(約 10kg) 6頭

動物は、和歌山市立食肉処理場で、電気刺激で昏倒させた後放血屠殺し、頭部から外部計測データを得た。1頭は頭部を切断し、マイナス 30 度で凍結保存した。4頭は全脳を取り出し 10%ホルマリン液中で2週間保管した。

2.2 産業用 X 線 CT 装置： TOSCANER-24200AV (和歌山県工業技術センター所有)

トラバースローテーション方式

X線出力 400kV, 透過能力 鉄 100mm、アルミ 300mm

スキャンエリア ϕ 150mm、 ϕ 300mm、 ϕ 600mm 可変

スライス幅 1.0mm、2.0mm、4.0mm 可変

再構成画素 512×512 または 1024×1024

2.3 ソフトウェア： ImageJ、画像革命、PhotoShop、Scion Image、Delta Viewer (フリーソフト) COSMOS (市販)

2.4 パーソナルコンピュータ： Windows、Macintosh

3. 方法と結果

3.1 頭部および脳試料データ

体重約 10kg の子ブタ頭部データは、耳～耳間が 50～68mm 目～目間 75～80mm 鼻端～頭頂間 105～120mm の範囲、脳の大きさは長さ 67～72mm、幅 53～55mm、高さ 38～41 mm の範囲であった。

3.2 CT 画像による三次元構築

3.2.1 脳部断層像撮影方法

脳部断層像 (CT 画像) は X 線断層撮影装置 (X 線 CT 装置) (TOSCANER-24200AV、東芝 FA システムエンジニアリング(株)) により撮影した。冷凍保存した脳を撮影前に自然解凍し本装置の回転テーブル上に置いた。脳底部を下にして眼耳平面と平行になるように、脳底部を発泡スチロールで調節した。撮影条件として、スライス可能エリアは ϕ 300mm、スライス厚さは 1.0mm とし再構成画素は 512×512 に設定した。図 3.2.1 において(a)は断層撮影した場所を示す。(b)、(c)および(d)は脳底部より 18mm, 22mm および 25mm における断層像をそれぞれ示す。前後方向に x 軸、頬舌方向に y 軸、および脳頭頂部方向に z 軸を設定した。凍結保存した頭部は、頸部から鼻端部にかけて水平に 1 mm のスライス厚で CT 連続画像 193 枚を得た。ホルマリン保存した脳は、約 2 週間後に脳内部のホルマリンを十分除去した上で、脳底部から頭頂部にかけて水平に CT スキャン撮影し、約 50 枚の連続画像を得た。

3.2.2 座標値の抽出

各 CT 画像を画像処理ソフト Scion Image を用いて図 3.2.2 に示すように 2 次元の座標データに変換した。図において点データに変換するために黄色で示されたアイコンを用いる。点の大きさはその下の線の太さを選ぶことにより変更が可能である。脳の輪郭を緑色で示された点で脳室の輪郭を赤色で示された点で示している。

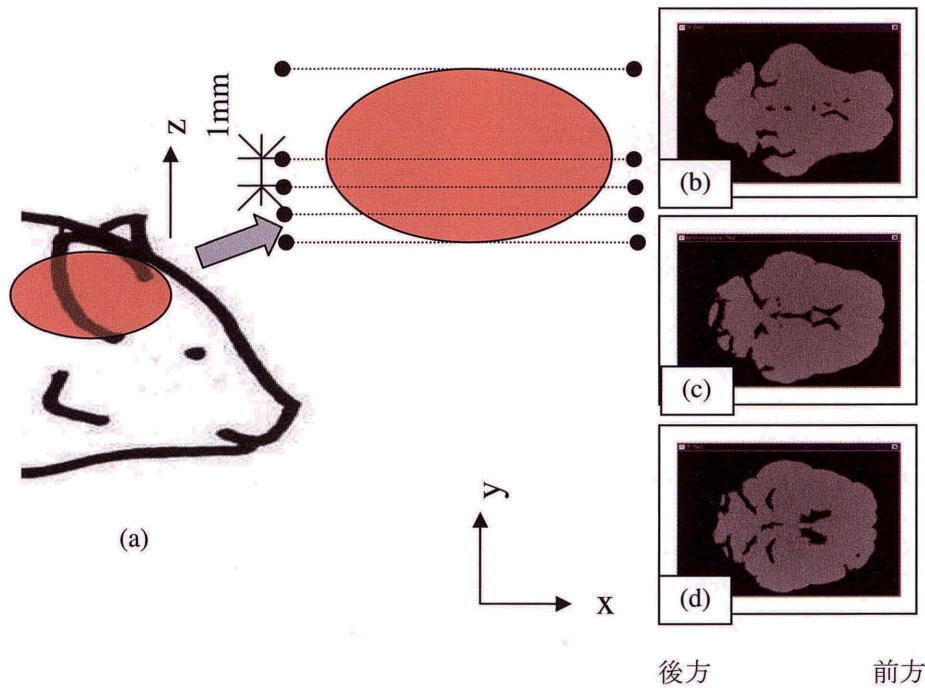


図 3.2.1 脳の断層像撮影場所—脳底部から脳頭頂部まで 1mm のスライス幅で撮影
(b), (c) および(d) は脳底部よりそれぞれ 18mm, 22mm および 25mm の各断層像を示す

3. 2. 3 三次元構築

変換したデータを有限要素解析ソフト COSMOS のモデリング機能を用いて二次元の座標データに変換した。図 3.2.3 に示すように隣接した CT 画像(a)および(b)から脳および脳室に相当する場所を示す点データについて線で結ぶ。この作業をスライスした画像に対して脳底部から脳頭頂部まで繰り返し立体モデルを作成する。図 3.2.4 に COSMOS の三次元再構成の機能を使用して得られた各出力を示す。図において(a)は点データ表示、(b)は線データ表示、(c)は面データ表示および(d)は立体表示を示している。

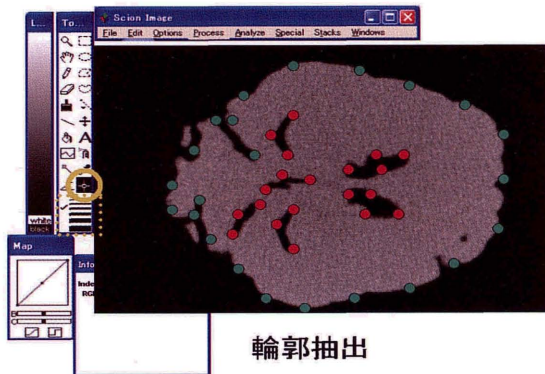


図 3.2.2 CT 画像 ($z=25\text{mm}$) における脳の外形
および脳室の各輪郭抽出

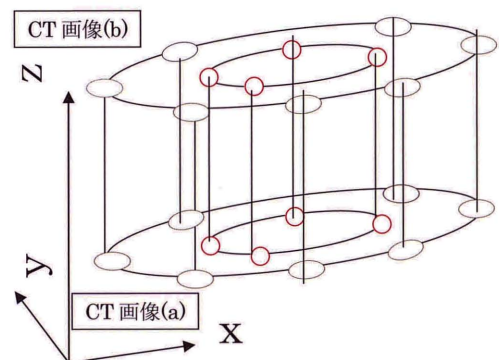


図 3.2.3 三次元モデル構築方法

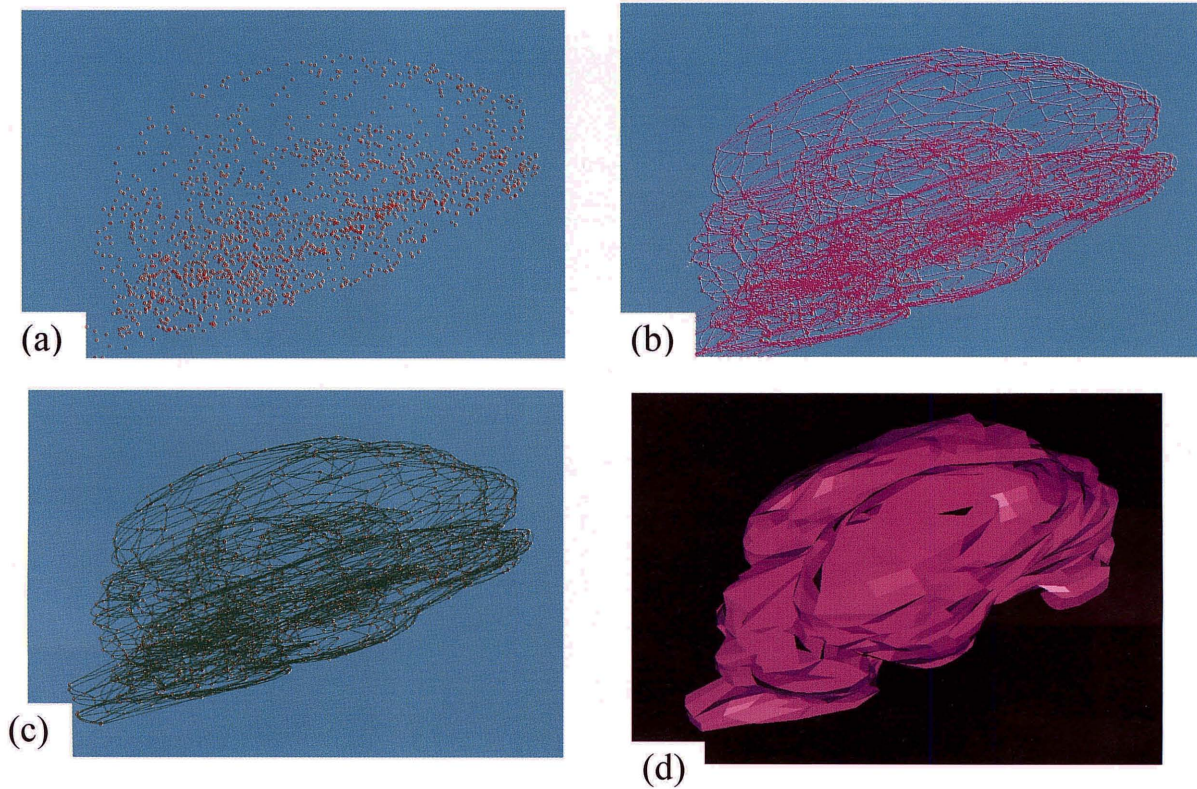


図 3.2.4 3次元構築された脳 (a)点データ表示, (b)線データ表示, (c)面データ表示, (d)立体表示

3.2.4 カニューレを挿入する方向と距離

図 3.2.5 において点 A、B は脳室および脳表面の各場所を示し、C はカニューレを B から挿入するベクトルを表す。点 A および B の座標をそれぞれ $A(x_1, y_1, z_1)$ 、 $B(x_2, y_2, z_2)$ とする。

点 A と B の間の距離つまりベクトル C の大きさは、

$$l = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2} \quad (1)$$

となる。O—xyz 座標系を平行移動して B 点に新座標系 B—XYZ を設定する。カニューレ挿入方向は、以下に示すように B 点で X 軸から角度 α 、Y 軸から角度 β をなす方向で長さは l となる。

$$\alpha = \cos^{-1}\left(\frac{x_2 - x_1}{l}\right), \beta = \cos^{-1}\left(\frac{y_2 - y_1}{l}\right) \quad (2)$$

そこで、実際に立体モデルから点 A および点 B を選び COSMOS 上での座標系による座標値を表 3.2.1

表 3.2.1 2点 A, B を結ぶ方向と距離の計算

座標	x	y	z
点 A	276	241	25
点 B	278	241	37
補正值	0.15	0.15	1.0

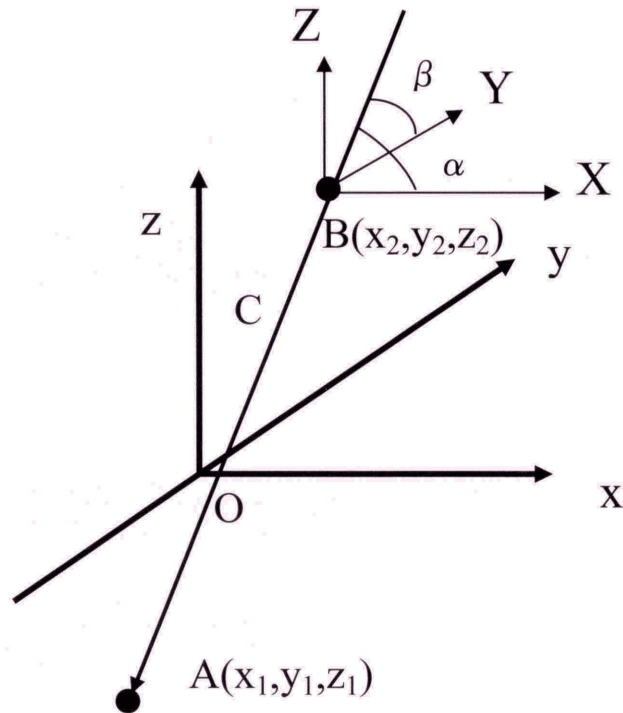


図 3.2.5 カニューレを挿入する方向と距離

でそれぞれ示す。これらを用いて2点間距離ならびに方向を計算する。 x, y , および z 各軸方向の縮尺をCT画像を得るために用いた実際の脳の断面抽出位置で実測しこの値で補正した。 x, y および z 各軸の数値にそれぞれ 0.15, 0.15 および 1.0 を乗じた数値を用いて距離、角度を求める。脳表面上、B点よりX軸から約 87° 、Y軸から 0° 、Z軸から約 12° の方向で距離として約12mmに対象となる脳室があることがわかる。

3.2.5 ワイヤフレームによる脳の三次元表示

輪郭抽出を行った画像から図 3.2.6 のように三次元画像を得た。図において(a)はワイヤフレームで脳頭頂部から見た画像を示している。また(b)は外側の輪郭を色づけした結果を示している。脳内での脳室の位置と形状を図 3.2.7 のように立体的に表示した。また、(b)において脳室のみを抽出して立体画像で表示した。第3および第4脳室、側脳室が示されていることがわかる。

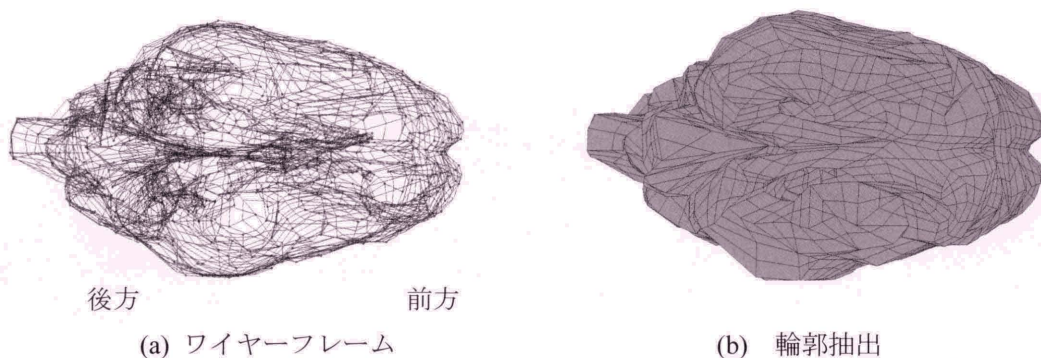


図 3.2.6 輪郭抽出法による脳表面表示

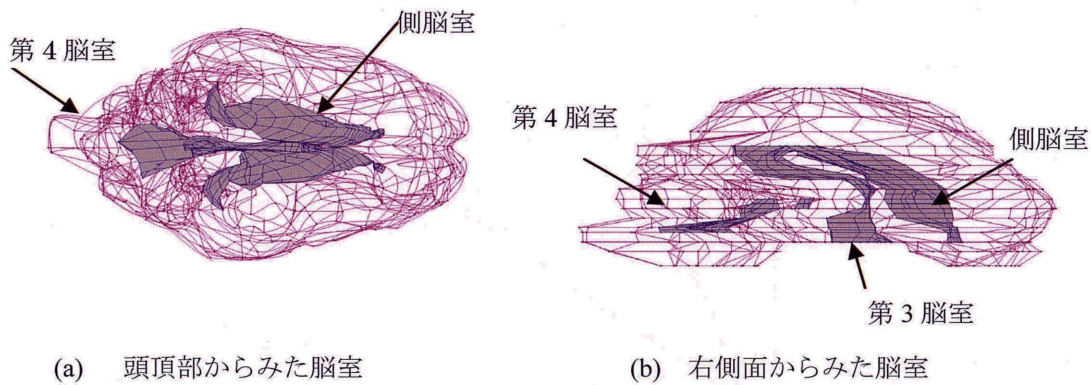


図 3.2.7 脳室のワイヤーフレーム表示

3.3 頭部表示

頭部の CT 画像から、頭骨表面および、頭骨透過画像を作成したが、CT スキャナーでは凍結試料の脳組織と脳室内の脳脊髄液を区別できず、脳内部構造は表示できなかった。(図 3.3.1)

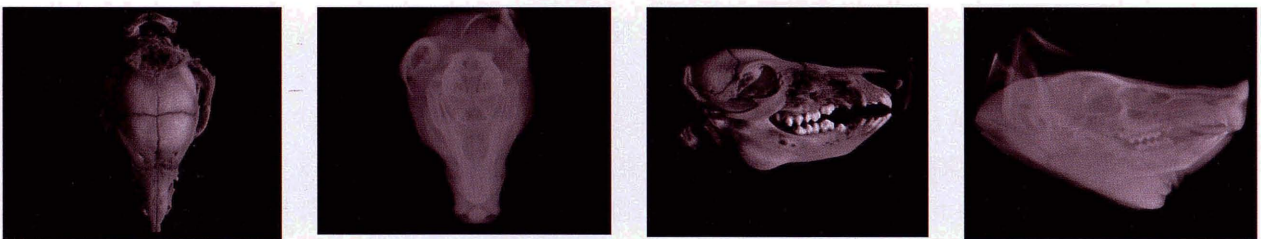


図 3.3.1 ブタ頭部 X 線 CT 画像 (頭骨表面と透過画像)

3.4 脳室着色による脳の三次元表示

ホルマリン保存脳の CT 画像では、脳の細部構造は明瞭ではないものの、脳室部分は X 線が透過しており脳実質との判別が可能であった。そこで、Photoshop で脳室部分を赤く着色した後(図 3.4.1)、Image J を用いて、三次元画像を得た。前後および左右に回転可能なこの画像は、脳実質部分の透過率を高めて、脳内での脳室の位置と形状を立体的に表示した。(図 3.4.2) また、Delta Viewer で脳室のみを抽出して立体画像で表示した。(図 3.4.3)

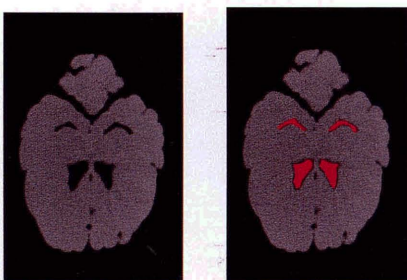


図 3.4.1 脳室の着色

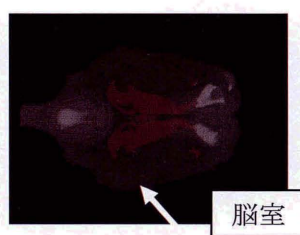


図 3.4.2 脳と脳室透過表示

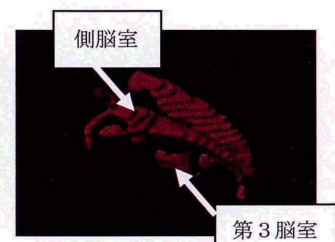


図 3.4.3 脳室立体モデル

4. 考察

コンピュータによる三次元再構成は、脳の内部構造を立体的に把握する研究に適している。Taguchi and Chida⁽⁸⁾はマウス全脳の組織切片から三次元再構成を行い、脳と脳室を立体表示した。また、A.C.Scallet and J.M.Meredith⁽⁹⁾はラット脳の正中線付近の組織切片を用いて、視床下部の性的二型神経核の雌雄差を立体図示し、さらにボクセル化することで体積を推定した。これらの報告では、組織をパラフィン包埋して、5 μ m~20 μ mの厚さで連続スライス後染色した標本から、デジタル画像を得て、立体再構成を行っている。家畜ブタの脳は、体重10kgの幼齢ブタでも、7×5×4 (L×W×H) cmの大きさであり、パラフィン包埋では時間を要し、凍結標本でも薄切には高度の技術や装置を必要とするため、組織切片を用いるのは適切な方法とはいえない。また、X線CT、MRIやPETを用いた連続画像は、生体を対象にしてコンピュータ上に脳の内部構造を表示するには良い方法であるが、生きた家畜ブタの頭部を撮影するには多くの困難が伴う。

そこで本研究では、構造物の非破壊内部検査に用いられている産業用のCTスキャナーを用いて、まずと殺後凍結したブタの頭部およびホルマリン保存した脳からCT連続画像を得て、立体再構成を試みた。凍結試料のX線CT画像は、硬組織である頭骨と軟組織である皮膚の区別はできたが、脳室内で凍結した脳脊髄液は脳軟組織と判別はつかず、脳の内部構造を区別することはできなかった。次に、新鮮脳ではX線CT撮影の際、ローテーションの移動時に組織が動くおそれがあるため、10%ホルマリン液に約2週間浸漬し全脳を固定した。脳室内の水分を十分除去した上でX線CTスキャナーで連続撮影したところ、X線が透過して脳室部分が黒くなった画像が得られた。これらの画像を用いて、2種類の方法で立体構成を行ったところ、脳内での脳室の位置・形状をコンピュータ上に立体表示できた。スライス厚が1mmなので、マイクロメーターオーダーの組織標本から得られるような精密さはないが、幼齢ブタの脳室の位置や形状を理解するには有用な情報が提供された。

また、脳および脳室の輪郭抽出をSion Imageにより行い、そのデータを用いて三次元のモデル化をCosmosで作成した。脳の外形表示ならびに脳室の色づけによってその部位を明確に示すことができた。

5. 結論

ブタの側脳室や脳特定部位へのカニューレション法については、いくつかの報告がある^(10,11)が、若いブタでは頭部の発達が早く、また頭骨の形状には個体差があるため、従来の脳地図では手術の際に十分な情報を提供できていなかった。本研究では、産業用のX線CTスキャナーを用いて、ブタ頭部および脳の連続画像から、脳と脳室をパーソナルコンピュータ上に立体再構成し、可視化できた。本試験で得られたモデルを用いると脳の二点間距離と方向を算出することができた。

さらに三次元点座標を用いた輪郭抽出法によって異なる大きさの脳でも二点間距離を算出できた。本試験の結果は、大きさの異なるブタで、頭部および脳への手術の際に貴重な情報を提供するものと考えられる。

参考文献

- (1) Paxinos, G. and Watson, C. (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd edition. Academic Press Inc. Amsterdam
- (2) Meguid, M.M., Fetissove, S.O., Varna, M., Sato, T., Zhang, L.H., Laviano, A. and Fanelli, F.R. (2000) Hypothalamic Dopamine and Serotonin in the Regulation of Food Intake. Nutrition 16:843~857

- (3) Minami, A., Takeda, A., Yamada, R. and Oku, N. (2002) Relationship between zinc and neurotransmitters released into the amygdalar extracellular space. *Brain Research*. 936:91~94
- (4) 丸山篤史、矢野史子 (2000) 亜鉛欠乏ラットの摂食周期と脳内セロトニン分泌量の関係 微量栄養素研究 第17集 25~29
- (5) 佐藤大介、矢野史子 (2003) 亜鉛欠乏ラットにおける摂食周期とセロトニンに関する研究 微量栄養素研究 第20集 105~108
- (6) Felix, B., Leger, M.E. and Fessard, D.A. (1999) *Stereotaxic atlas of the pig brain* Elsevier Amsterdam
- (7) Watanabe, H., Andersen, F., Simonsen, C. Z., Evans, S. M., Gjedde, A., Cumming, P., and the DaNex Study Group (2001) MR-Based Statistical Atlas of the Gettingen Minipig Brain *NeuroImage* 14:1089~1096
- (8) Taguchi, M and Chida, K. (2003) Computer reconstruction of the three-dimensional structure of mouse cerebral ventricles. *Brain Research Protocols* 12:12~15
- (9) Scallet, A and Meredith, J.M. (2002) Quantitative three-dimensional reconstruction; Feasibility for studies of sexually dimorphic hypothalamic development in rats. *Neurotechnology and teratology* 24: 81~85.
- (10) Barb, C.R., Estienne, M.J. and Rampacek G.B. (1993) Technique for the cannulation of the lateral ventricle of the brain in swine. *Kopf Carrier* 35:1~5
- (11) van Eerdenburg, F.J.C.M. and Dierx, J.A.J. (2003) A new technique for long term, stress free, cannulation of the lateral ventricle in postparturient, freely moving, pigs. *J. Neurosci. Method* 121: 13~20

英文抄録

Computer Reconstruction of the Three-dimensional Structure of Pig Brain

Fumiko Yano, Toshiro Matsumoto and Katsunori Sakashita

Neuroimaging studies are increasingly performed in various experiment animals, mouse, rats, and primates. An atlas of the pig brain has been published as stereotaxic drawings, however the stereoscopic structures of the pig brain are not visible from outside of the brain. In this experiment, the visualization of the cerebral ventricle's position and structure in the brain were studied in young pigs (LW, 10kgBW). The serial X-ray CT sections of pig whole brain were used for the two different techniques of computer reconstruction.

Firstly, the contours of brain and cerebral ventricles were extracted from continuous slices of CT images by using image processing software (Scion Image). The digitized data saved in JPEG format were imported to COSMOS 2.8 software for three-dimensional model reconstruction. In this process, serial drawings were manually layered in the sagittal axis. The distance and direction between the two points of brain surface and cerebral ventricles were calculated by using both three-dimensional coordinate data.

Secondary, the cerebral ventricles of CT sections were colored on the personal computer, and the three-dimensional structure of the brain surface and the cerebral ventricles are reconstructed on the personal computer using free softwares.

These templates are very useful to understand the cerebral ventricle position and structure in pig brain.