

氏 名 藤木 康久

学位(専攻分野) 博士(学術)

学位記番号 総研大甲第 1673 号

学位授与の日付 平成26年3月20日

学位授与の要件 複合科学研究科 統計科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 ラット脊髄断面における解剖学的標準化手法の開発と局所麻酔
薬の薬理作用の統計的評価

論文審査委員 主 査 教授 田村 義保
准教授 三分一 史和
准教授 瀧澤 由美
講 師 染谷 博司 東海大学
医 長 岡田 泰昌
(独)国立病院機構村山医療センター
教授 越久 仁敬 兵庫医科大学
名誉教授 石黒 真木夫

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

過去 20 年の間、脳の空間活動パターンを評価するために様々な映像技術が開発されてきた。これらの技術の中で、機能的磁気共鳴画像法(functional magnetic resonance imaging: fMRI)や陽電子放射断層撮影 (positron emission tomography: PET) は、ヒトの脳の神経活動のマッピングを行うために広く適用されている。これらの手法を用いて撮影したイメージングデータについて、神経活動を定量的に評価するために、一般的には、実験課題下における賦活を推定することを目的とした回帰分析や、細胞間の機能的結合を推定することを目的とした相互相関分析が用いられる。しかし、通常、サンプルによって脳の形状やサイズは異なるため、複数のサンプルにおける神経活動の空間情報を統合し、統計的に評価することは困難であった。この問題を解決するために、個々のイメージングデータを標準座標系に変換し、それらを標準的な脳地図 (標準脳) の上に投射することで、全てのイメージングデータにおける解剖学的位置を標準脳上で一致させることが試みられた。これを標準化と呼ぶ。これまで標準化手法として、脳における様々な解剖学的標準化法 (ランドマークの位置を合わせるポイントベースの標準化法 (Human Brain Atlas) や画像の値を合わせる強度ベースの標準化法 (Statistical Parametric Mapping Method, Michigan 法)) が提案されている。これらの標準化法を複数のイメージングデータに適用することで、サンプル間でグループ分析を行うための統計検定や、統計的価値のある標準座標系への神経活動のマッピングを行うこと可能となる。また、脳だけでなく肝臓や胸部の画像解析を目的とした標準化法もいくつも提案されている。

一方で、動物を対象とした実験においては、脳や脊髄における電気的な神経活動の時空間パターンを解析するために、膜電位イメージングが広く適用されている。膜電位イメージングとは、膜電位感受性色素を用いて計測部位を染色し、それに励起光を照射することで、膜電位感受性色素を励起し、発する蛍光を受光デバイスで受光することで神経活動を観察する映像技術である。膜電位イメージングによって得られるイメージングデータは、時間・空間分解能が非常に高く、神経活動を多点同時計測する方法として広く利用されている。もちろん、脊髄において、膜電位イメージング法は非常に有効な計測手法であり、脊髄の感覚システムに適用した研究報告も多数されている。しかし、動物の脳や脊髄における膜電位イメージングのための **Registration** や標準化手法はこれまで提案されていない。

これまで、イメージングデータを解析するための一般的な方法は、正常時におけるデータと研究対象となる条件下におけるデータの比較であった。しかし、サンプルによって対象部位の大きさや形状は当然異なり、また、同一のサンプルであってもその形態が変化する場合もあるため、複数のサンプルから得られたデータを単純に比較することは困難であった。そのため、これまでの膜電位イメージングを用いた研究では、あらかじめ注目する解剖学的部位を決め、各サンプルについてその部位に該当するピクセルを選択し、それらのピクセルがもつ時系列データについて解析を行ってきた。そうすることで各条件のデータを定量的に比較することができる。

複数のイメージングデータにおいて、解剖学的に同じ位置にあたるピクセルを選択し、そ

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

これらのピクセルがもつ時系列データを解析し、比較する方法には、大きな 3 つの問題を含んでいる。1 つ目の問題点は、注目する解剖学的位置のピクセルについてのみ時系列解析を行っている点である。膜電位イメージング法は、撮影箇所全体の神経活動を高い時空間解像度で同時に観察することができる点が最大の利点である。しかし、選択した数ピクセルのみを解析するという事は、つまり選択していないピクセルを全て無視するという事であり、その利点を最大限活用できていない。2 つ目の問題点は、解析者が、注目するピクセルを時系列データの波形の定性的な性質に基づいて目視で選択するため、解析結果について客観性を失う点である。複数の神経核を含む膜電位イメージングの空間解像度は $30 \times 30 \mu\text{m}/\text{pixel}$ 程度であり、NeuN 染色した組織画像の解像度 $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}/\text{pixel}$ と比べて低いため、注目する解剖学的部位が存在するピクセルを正しく選択できない可能性がある。3 つ目の問題点は、大量のサンプルからデータを取得した場合、全てのデータに対して注目ピクセルを選ぶ必要があるため、大きな手間がかかる点である。これらの問題を解決するために、本研究では、はじめにラット脊髄断面画像における標準化手法の開発を行った。脊髄断面画像における標準化の主な目的は、白質と灰白質を詳細に描写し、また灰白質の内部構造を Lamina I~X に分類し、それぞれを同一座標上で一致させることである。しかし、膜電位イメージングによって得られた脊髄断面画像からは、かろうじて中心管の位置を確認できるものの、内部の解剖学的構造の境界が明白でないため、灰白質の各層を識別することは困難である。そこで、我々は、脊髄の外形および中心管の位置を用いて灰白質の内部構造を一致させる標準化法として、アフィン変換 (AT)、角度依存変換 (ADT) およびそれらを組み合わせた変換手法 (AT+ADT) の 3 つの標準化手法を提案した。これらの標準化手法について、NeuN 染色による組織画像を用いて標準化のパフォーマンスを比較したところ、AT+ADT は AT と ADT のそれぞれの欠点を補う形で高い層構造分別パフォーマンスを発揮することが分かった。

次に、標準化法を適用したイメージングデータ解析の一例として、脊髄断面の膜電位イメージングデータを用いた局所麻酔薬の薬効分析を行った。局所麻酔薬を投与していないコントロールグループと局所麻酔薬を投与したグループの膜電位イメージングデータを作成した後、標準化法 (AT+ADT) を適用することで、組織画像から作成した標準画像と一致するように変換することができた。また、標準化されたデータを各条件で加算平均することで、各条件下における標準的な電位変化を示すことができた。加えて、コントロールグループと局所麻酔薬を投与したグループで統計的仮説検定を行い、局所麻酔薬の薬理効果のある部位を定量的に特定することができた。

博士論文の審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

提出された論文は全 87 頁で 4 つの章と 2 つの付録からなり、日本語で執筆されている。

第 1 章では生体画像解析に関する研究の背景を与え、標準化画像の概要と重要性、ならびに本研究の位置づけを述べている。第 2 章はラット脊髄断面画像の標準化手法の開発に関するものである。脳神経のイメージングデータは、サンプル毎に組織の形状やサイズが異なるために、部位の特定はサンプル毎に目視で行う必要があり、実験者によって選択する部位が異なるという主観性を排除することができない。また、解析結果は特定の部位に関する統計値などに限られるので、イメージングデータという空間情報を生かせないという問題がある。本章ではこのような問題点を解決するために申請者により開発されたアフィン変換と極座標系における動径方向の拡大縮小をシーケンシャルに行う方法について述べられている。また、方法が適切か否かについてのデモンストレーションも行われている。

第 3 章では実際のデータへの適用例として、麻酔の影響下で計測された膜電位イメージングデータに第 2 章で開発した画像変換法を用いて標準画像上へ変換を行い、麻酔薬の種類(リドカイン、ブピバカイン)と濃度の違いによる神経賦活の時空間パターンの変化を調べている。脊髄のどの部位に麻酔がどのように作用するかについて明らかにしている。第 4 章では、本論文全体の結論と今後の展望について述べている。

本論文では、脊髄断面画像の外形と中心管の座標の情報を用いて、個々のサンプルの画像を標準画像上へ射影する方法を新たに提案し、生体断層画像一般への適用可能性を示している。従来の方法と本論文で提案した方法のマッチング性能を脊髄断面の各層毎に統計評価を行っている点にも独自性が認められる。3 章で述べられている実際のデータへの適用例ではブピバカインはリドカインと比較して、より広範に、長時間麻酔の薬理作用が持続する傾向があることを明らかにし、統計量の空間マッピングの有用性を示している。これは、麻酔科、整形外科領域における基礎医学研究に貢献するものである。

学位申請論文の第 2 章の内容は査読付学術誌 PlosOne に筆頭著者として掲載されている。(題名 Standardization of Size, Shape and Internal Structure of Spinal Cord Images: Comparison of Three Transformation Methods, PlosOne 8(11): e76415. doi:10.1371/journal.pone.0076415-8, 2013)。また、第 3 章の内容は薬理学関係の論文誌へ投稿準備中であるが、審査員の中の基礎医学の研究者から成果について、非常に高い評価を得ている。

以上から、博士論文審査委員会は、出願者の学位請求論文が学位に十分値する水準にあると全員一致で判定した。