

**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**

藤木 康久

# 目次

## 第 1 章

### はじめに

1.1	研究背景	5
1.2	膜電位イメージング法	7
1.3	研究目的	8

## 第 2 章

### 脊髄断面画像の標準化手法の開発

2.1	概要	10
2.2	使用データ	13
2.3	方法	16
2.3.1	外形の抽出方法	16
2.3.2	テンプレートの作成	19
2.3.3	アフィン変換 (Affine Transformation)	22
2.3.4	角度依存変換 (Angle dependent transformation)	24
2.3.5	AT, ADT 混合法 (AT+ADT)	25

2.3.6	画素値のピクセル補間と平滑化法	26
2.3.7	人工テンプレート画像によるベンチマークテスト	28
2.4	結果	32
2.5	考察	42

## 第3章

### ラット脊髄断面サンプルによる局所麻酔薬の薬理作用の統計解析

3.1	概要	45
3.1.1	背景	45
3.1.2	研究目的	46
3.2	使用データ	47
3.2.1	オプティカルレコーディング	47
3.2.2	神経活動の誘発と局所麻酔薬の投与	50
3.3	方法	51
3.3.1	空間フィルタによる画像の平滑化	53
3.3.2	トレンド成分の除去	55
3.3.3	z変換によるノイズレベルの正規化	56
3.3.4	電気刺激入力に対する応答レベルの正規化	59

---

3.3.5	膜電位イメージングデータの標準化	60
3.3.6	データの区間平均	61
3.3.7	局所麻酔薬による薬理効果の統計解析	62
3.4	結果	64
3.5	考察	75
第4章		
総論		
4.1	まとめ	77
4.2	今後の課題	78
謝辞		81
参考文献		82
付録1 フーリエ級数の最小二乗法		87
付録2 MATLAB による角度依存変換 (ADT) のプログラム		91

# 第 1 章

## はじめに

### 1.1 研究背景

過去 20 年の間、脳活動の空間パターンを評価するために様々な画像計測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、一般的には刺激や心理課題遂行時における賦活部位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、被験者によって脳の形状やサイズは異なるため、複数の被験者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、個々の被験者のイメージングデータを標準的な脳地図（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てきた。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（解剖学的特徴点の位置を合わせるポイントベースの標準化法（Human Brain Atlas [1, 2]）や画像の強度の空間分布パターンを合わせる強度ベースの標準化法（Statistical Parametric Mapping Method [3, 4] Michigan 法 [5]）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し、標準座標系への神経活動のマッピングを行うことで、被験者間でグループ分析を行うための統計検定が可能となる。同一被験者における PET と MRI などの異なる装置で得られた画像や画像を同じ装置で複数回計測された画像を共通の座標系に射影する方法として Registration が用いられ、様々な非線形変換手法が提案されている [6-12]。また、脳だけでなく肝臓や胸部の超音波画像といった様々な種類の画像診断を目的とした標準化法も提案されている [13-16]。

一方で、動物を対象とした実験においては、脳と脊髄 [17-24] で電氣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ものの、動物の脳または脊髄サンプルにおける膜電位イメージングのための Registration や解剖学的標準化手法はこれまで提案されていない。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うことで各条件のデータを定量的に比較してきた[17-24].

## 1.2 膜電位イメージング法

1968 年に神経活動によってある種の蛍光色素の蛍光効率が影響されることが、田崎らによって発見された[25]. また、1972 年に Cohen らの研究によって Merocyanine 540 という色素が膜電位に比例した蛍光変化と吸光変化を示すことが発表された. 1980 年代後半以降、Hildesheim や Loew らが多数の色素を積極的に合成した. それらの色素を総称して膜電位感受性色素と呼ぶ. 膜電位イメージングとは、この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、発する蛍光を感光デバイスで受光することで行われる. 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・空間分解能が高く、脳内のニューロン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. 脊髄においても、膜電位イメージング法は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なされている.

### 1.3 研究目的

複数の膜電位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、比較する方法は、大きく 3 つの問題を含んでいる。一つ目の問題点は、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ことは、選択していないピクセルを全て無視するということであり、その利点を最大限活用することができていない。例えば、注目ピクセル以外のピクセルで生理学的に重要な神経活動があった場合、それを無視してしまう可能性があり、部位間の結合性などの空間的情報も得られない。二つ目の問題点は、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が保証されない。膜電位イメージングは空間解像度が  $30 \times 30 \mu\text{m}/\text{pixel}$  程度であり、特に脳や脊髄の場合は 1 ピクセルに複数の神経細胞が含まれることが多いため、解剖学的構造を詳細に把握することが困難となる。そのため、時系列データを参考に、注目する解剖学的部位付近のピクセル群の中から 1 つのピクセルを選択されることがある。その場合、注目する解剖学的部位について、解析者によって異なるピクセルが選択さ

れる可能性がある。三つ目の問題点は、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、膨大な作業量になってしまう点である。

これらの問題を解決する方法として標準化は非常に有効で手法であると考えられる。標準化は異なる形状のイメージングデータを定量比較するために、それぞれのイメージングデータを標準的な地図上に投射し、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。つまり、標準化を適用することで、注目するピクセルを目視で選択する必要はなく、全ピクセルを同時に定量比較することが可能となるため、これらの問題を全て解決することができる。そこで本研究では、脊髄の感覚システムの研究でしばしば利用されるラット脊髄断面における膜電位イメージングデータの標準化手法の開発を行う。さらに、標準化法を適用した解析のデモンストレーションとして、脊髄に局所麻酔薬を投与したサンプルの膜電位イメージングデータについて標準化法を適用し、複数のサンプルにおける統計的な評価を行う。

## 第 2 章

# ラット脊髄断面画像の標準化手法の開発

### 2.1 概要

脊髄の断面は、おもに神経細胞の軸索で構成される白質が神経細胞体の細胞を豊富に含む灰白質を囲む構造となっている。中央には第 4 脳室と結合している中心管がみられ、脳脊髄液で満たされる。灰白質部分は、前角、側角、後角に分れる。灰白質は、存在する神経細胞の性質によって分類される。前角には遠心性神経（運動性神経）の細胞体があり、脳と接続する運動に関わる神経は脊髄前角で下位運動ニューロンにシナプスを作って結合する。後角には末梢から入る求心性神経とシナプスを形成する神経細胞体（知覚神経）がある。腰髄・胸髄だけに側角があり、ここには交感神経（自律神経線維）の神経細胞体がある。灰白質はさらに組織学的に幾つかの部分に分類される。灰白質を分類する際は、Lamina I～Xまでの 10 層に分ける層分類が最も広く用いられている（図 2.1）。

本研究では、脊髓断面における複数の膜電位イメージングデータについて、灰白質の層構造の座標をサンプル間で一致させるために、標準座標系に変換する標準化手法の開発を行う。脊髓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、灰白質の内部構造を Lamina I～X で分類し、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の脊髓断面画像からは、中心管の位置を確認することはできるものの、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。さらに、ピクセル強度の空間分布パターンはサンプルによって大きく異なるため、各サンプル画像の強度の空間分布パターンを合わせる強度ベースの変換手法は膜電位イメージングの脊髓断面画像に適用するのに適切ではない。他のアプローチとして、各サンプルの画像における特徴点をテンプレートの特徴点に合わせるポイントベースの線形変換手法がある。しかし、脊髓断面の輪郭は形状が単純であり、特徴的な点を定めるための十分な情報をもたないため、この方法による標準化法では十分な正確さは期待できない。したがって、膜電位イメージングにおいては、強度ベースでもなくポイントベースでもない変換手法を適用するのが望ましいと考える。これらを考慮して、脊髓の外形および中心管の位置を用いた標準化法を開発する。一般的な画像変換手法としてアフィン変換 (Affine transformation: AT) がある。これは、平行移動、回転、拡大縮

小およびせん断の一次結合によって各画像をテンプレート画像に一致させる手法である。アフィン変換は画像全体の線形の歪みを補正することを可能とする一方で、部分的な非線形の歪みを補正することができないため、アフィン変換による画像変換の正確さは決して十分とはいえない。そこで、我々は極座標系における原点を中心とし、角度によって異なる拡大率を与え、動径方向に拡大縮小を行う非線形変換手法を提案する。この手法を角度依存変換（Angle Dependent Transformation: ADT）と呼ぶことにする。ADT手法は、個々の画像の外形をテンプレートの外形に合わせる外形ベースの標準化手法である。この方法によって、外形の特徴を点としてではなく連続外形関数として描写されることが可能であるため、より灰白質層構造の識別精度の高い標準化が可能となることが期待される。

本研究では、脊髄の層構造の境界を識別するために、脊髄横断スライスを神経細胞に特異的なタンパク質である NeuN (neuron-specific nuclear protein) で染色した組織画像を使用し、AT、ADT およびそれらを組み合わせた手法（AT+ADT）の三つの手法の精度を比較することによって、標準化精度の評価を行う。各手法を比較するために、各層に正しく識別されたピクセルの比率および leave-one-out Cross-validation (LOOCV) を用いたエラー率の2つの指標を用いる。

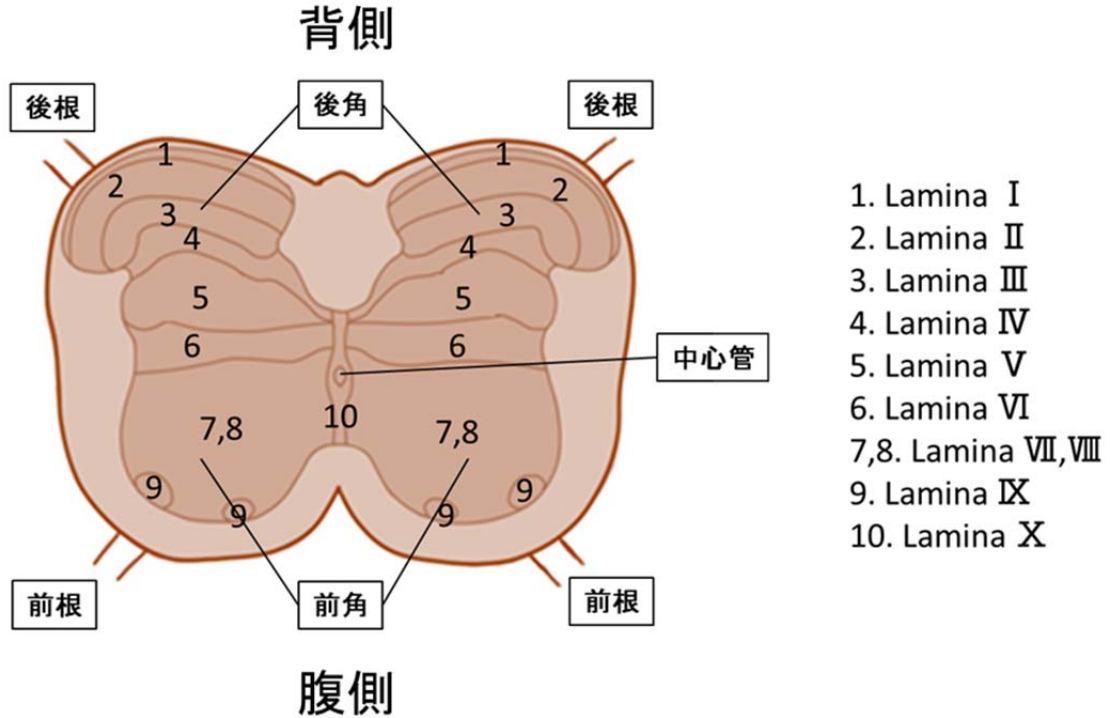


図 2.1 脊髓断面図

脊髓は神経細胞で構成される白質が神経核である灰白質を囲む構造となっている。灰白質は組織学的に Lamina I ~ X までの 10 層に分類される。

## 2.2 使用データ

脊髓横断スライス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、灰白質の内部構造を Lamina I ~ X に識別し、同一座標上で一致させることである。本研究では、膜電位イメージングデータに標準化法を適用することを前提としているため、標準化手法の評価は当然膜電位イメージングデータを用いるべきである。しかし、膜電位イメージングデータからは解剖学的

構造の境界が明白でないため脊髄の灰白質の層構造を確認することが困難である。それゆえ、標準化によって灰白質の内部構造がどの程度一致しているかを膜電位イメージングデータのみから正確に評価することは極めて困難である。そこで、標準化法のベンチマーク画像として、脊髄の断面で NeuN を染色した組織画像を島根大学の横田茂文講師から提供いただいた。図 2.2 に示す通り、組織画像の解像度は膜電位イメージングデータのそれと比較して約 20 倍も高く、灰白質の内部構造を識別することが可能であるため、標準化の精度を評価するのに適している。

NeuN 染色の組織学的な技術は [17] に記載されている。新生ラット（ウイスターラット、生後 4-5 日）を、抱水クロラルの腹腔内注射によって深麻酔し、4%のパラホルムアルデヒドを含有するリン酸塩緩衝液の静脈内注射により固定を行った。その後、脊髄を摘出し、同一組成の固定液でさらに脊髄組織の固定を行った。その後、凍結ミクロトーム上で、 $40\mu\text{m}$  の厚さで、おもに第 4 頸髄（C4）から複数（5-8 枚）の断面サンプルを切りだし、マウス抗 NeuN 抗体を用いた NeuN 免疫染色を実施した。NeuN 染色の組織学的方法の詳細は文献[17]に記載されている通りである。NeuN 染色によって組織化学的に着色したあと、作成過程で損傷を受けたセクションに対応する画像 3 枚を除外し、計 21 枚の画像を作成した。そして、標準画像を左右対称にするために、さらに

左右反転させた鏡像画像 21 枚を追加し, 計 42 枚の画像を用意した. 各々の組織画像のフォーマットは RGB のビットマップ画像で, 解像度と画像サイズはそれぞれ 72dpi と 1280×960 ピクセルとした (図 2.3).


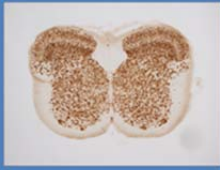
		
	膜電位イメージングデータ	組織画像
Temporal information	<b>Yes</b> (max 500Hz)	<b>No</b>
Spatial resolution	<b>Low</b> 88*60 pixel 30*30 μm/pixel	<b>High</b> 1280*960 pixel 1.5*1.5 μm/pixel
Clearness of outline	<b>Enable to distinguish</b>	<b>Enable to distinguish</b>
Gray matter structure	<b>Difficult to distinguish</b>	<b>Enable to distinguish</b>
Inter sample variety	<b>Large</b> <b>Difficult to integrate</b>	<b>Large</b> <b>Difficult to integrate</b>

図 2.2 膜電位イメージングデータと組織画像の比較

脊髄断面全体を撮影した膜電位イメージングデータは空間解像度が 88×60pixel であり, 灰白質の内部構造を確認することが難しい. 一方, 組織画像の空間解像度は 1280×960pixel と膜電位イメージングデータと比較して非常に高く, 灰白質が染色されるため, 灰白質の内部構造を容易に識別することができる.

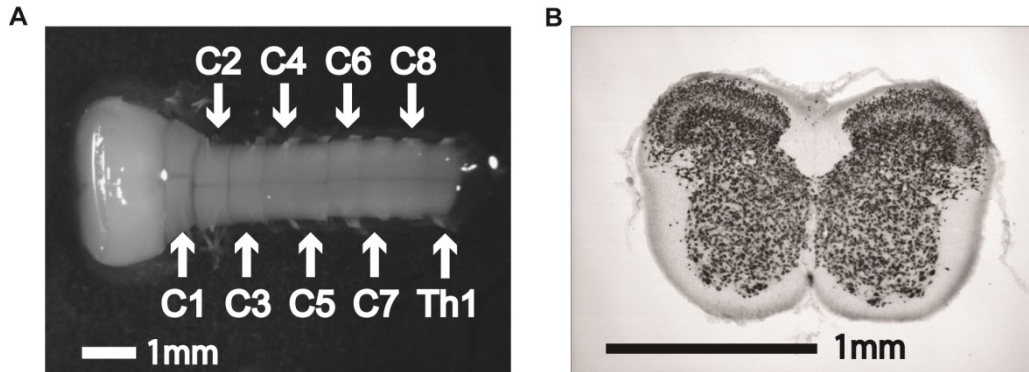


図 2.3 脊髄の摘出標本 (A) と C4 におけるスライス標本の組織画像 (B)

脊髄神経は脊椎の椎間孔ごとに一對ずつ分岐し、頸椎の間から分岐するものを頸神経 (cervical nerve)、胸椎の間から分岐するものを胸神経 (thoracic nerve) と呼ぶ。それらを上から順に番号を付けた略号で、C1~C8 (第1頸神経~第8頸神経)、Th1~Th12 (第1胸神経~第12胸神経) と呼ばれる。NeuN 染色したスライス標本の組織画像は、脊髄の灰白質の層構造が明確に観察できるので、灰白質の層の境界を引くことが容易である。

## 2.3 方法

### 2.3.1 脊髄断面の外形輪郭線の抽出方法

横断された脊髄の組織画像における切片の外形輪郭線および灰白質の各層の境界線は、神経解剖学の専門家である島根大学横田茂文講師に描画して頂いた。外形輪郭線を描画する際、コンピュータ画面上でマウスを用いて描画することによる手振れに起因するノイズが発生するため、描画された外形曲線についてフーリエ級数を用いて平滑化を行った。

脊髄の中心に位置する代表的な解剖学的部位である中心管の座標を極座標系の原点として選択した。原点から外形までの半径および  $x$  軸からの角度はそれ

ぞれ  $r$  と  $\theta$  で表す (図 2.4 A). 脊髓断面の形状は単純であり, あらゆる半径が外形輪郭線と必ず一点で交わるため, 外形曲線は, 関数として定義することが可能である (図 2.4 B).

$p$  次のフーリエ級数は次式で定義される.

$$r_k(\theta) = \frac{a_0}{2} + \sum_{i=1}^p (a_i \cos i\theta + b_i \sin i\theta), \quad (0 \leq \theta < 2\pi) \quad (2.1)$$

ここで,  $k$  はサンプル番号を示す. 次数  $p$  の決定を行う際, モデル選択手法を用いることができる. モデル選択手法の中でも赤池情報量規準 (Akaike Information Criterion: AIC) は一般的によく利用される手法の一つであり, AIC を用いることでフーリエ級数の次数を最適化することが可能である.

図 2.4 A および図 2.4 B はそれぞれサンプルから描画された外形輪郭線あるいはそれを  $r-\theta$  空間に変換した外形関数を示している. 各サンプルの外形関数は, AT, ADT およびこれらを組み合わせた手法 (AT+ADT) を適用することでテンプレート画像 (図 2.5) の外形に合うように変換することが可能となる.

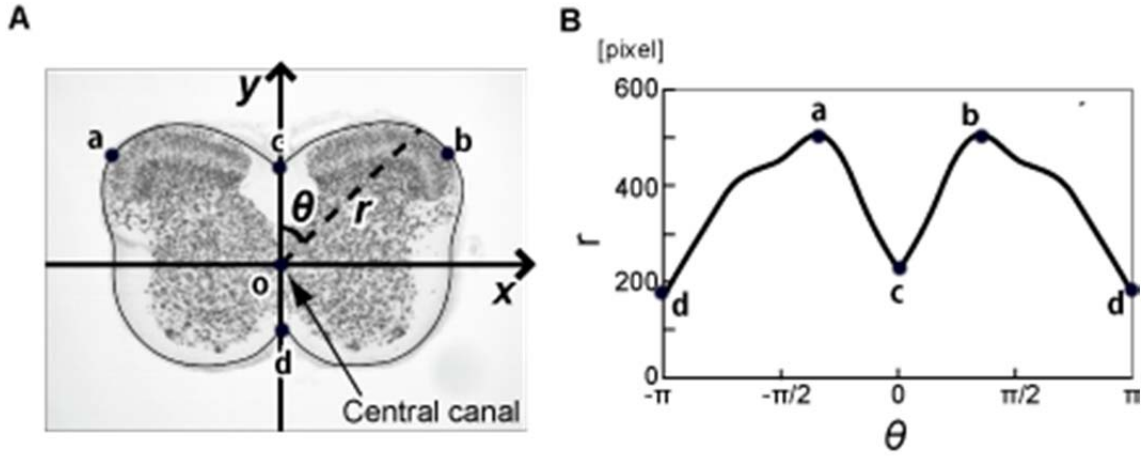


図 2.4 外形の抽出の概略図 (A) と  $r-\theta$  空間における外形関数 (B)

点 a と点 b は外形関数の極大値であり, 点 c と点 d は外形関数の極小値である. これらの点は AT のパラメータ推定時に必要な Ground Control Point (GCP) として用いる.

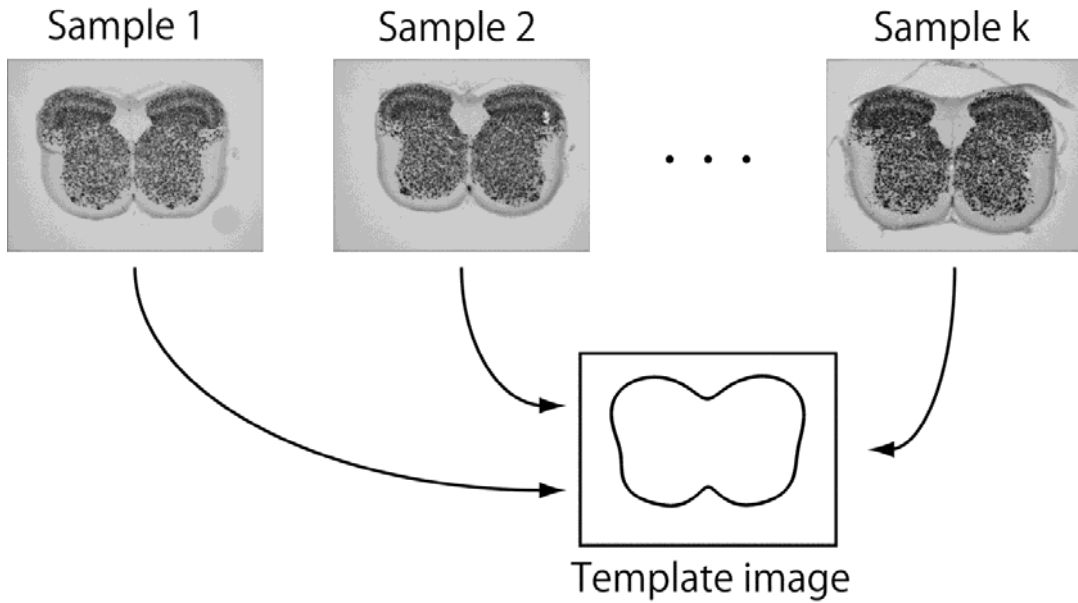


図 2.5 標準化の概略図

個々の画像はアフィン変換 (AT), 角度依存変換 (ADT) あるいはそれらを組み合わせた手法 (AT+ADT) を適用することでテンプレート画像と形状が一致するように座標変換される.

### 2.3.2 テンプレートの作成

異なる形状をもつ生体画像を標準化するために、一般的には形状を合わせるための基準となるテンプレートが使用される。過去の研究において、PET や CT 等で利用するための動物の脳のテンプレート画像を作成に関する研究は行われている (ex. ヒヒ [26], マカク [27], ラット [28])。しかし、ラットの脊髄におけるテンプレートについては、膜電位イメージングのためのものに限らずこれまで提案されていない。そこで我々はラットの脊髄断面におけるテンプレートの作成を行った。

本研究では外形輪郭線と中心管の位置を利用して標準化を行うため、本研究における標準化手法に必要なテンプレートは標準的な脊髄の形状を示す外形関数となる。また、左右対称のテンプレートを作成するため、脊髄横断スライスの組織画像 21 枚、さらにそれらを左右反転したミラー画像 21 枚を加えた計 42 枚の画像を用意した。はじめに、各サンプルにおける脊髄の外形輪郭線を 10 次のフーリエ級数に近似することでスムージングを行った。次に 42 枚の画像のうちの 1 枚をターゲット画像として指定し、残りの 41 枚についてターゲット画像に合せるように形状保存変換 (rigid-body transformation) を適用した。形状保存変換とは、平行移動、拡大・縮小および回転の一次結合による変換である。変換パラメータの定義は以下の通りである。極座標系における原点を中心

とした回転は、 $r-\theta$ 空間における $\theta$ 軸方向への平行移動と同義である。ターゲット画像と $k$ 番目の画像における外形関数および $k$ 番目の回転パラメータをそれぞれ $r'(\theta)$ 、 $r_k(\theta+\varphi_k)$ 、 $\varphi_k$ とすると、回転パラメータ $\varphi_k$ は、 $r'(\theta)$ と $r_k(\theta+\varphi_k)$ の誤差分散を最小化するように最適化することで求められる（図 2.6 A, B）。また、 $k$ 番目の画像の拡大率は、次式で示すように $r_k(\theta)$ と $r'(\theta)$ の半径の平均の長さの比として定義した。

$$\alpha_k = \frac{\int_0^{2\pi} r'(\theta) d\theta}{\int_0^{2\pi} r_k(\theta) d\theta} \quad (2.2)$$

ここで、形状保存変換された外形関数をサンプル間平均したものをテンプレートの外形関数として定義する。テンプレートの外形関数は次式で示される。

$$r_t(\theta) = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \alpha_k r(\theta + \varphi_k) \quad (2.3)$$

この方法によって作成されたテンプレート画像のサイズはターゲット画像の選択に依存するが、選択したターゲット画像によってテンプレートの形状が大きく変わることはない。図 2.6 C はテンプレート画像の外形関数を示している。

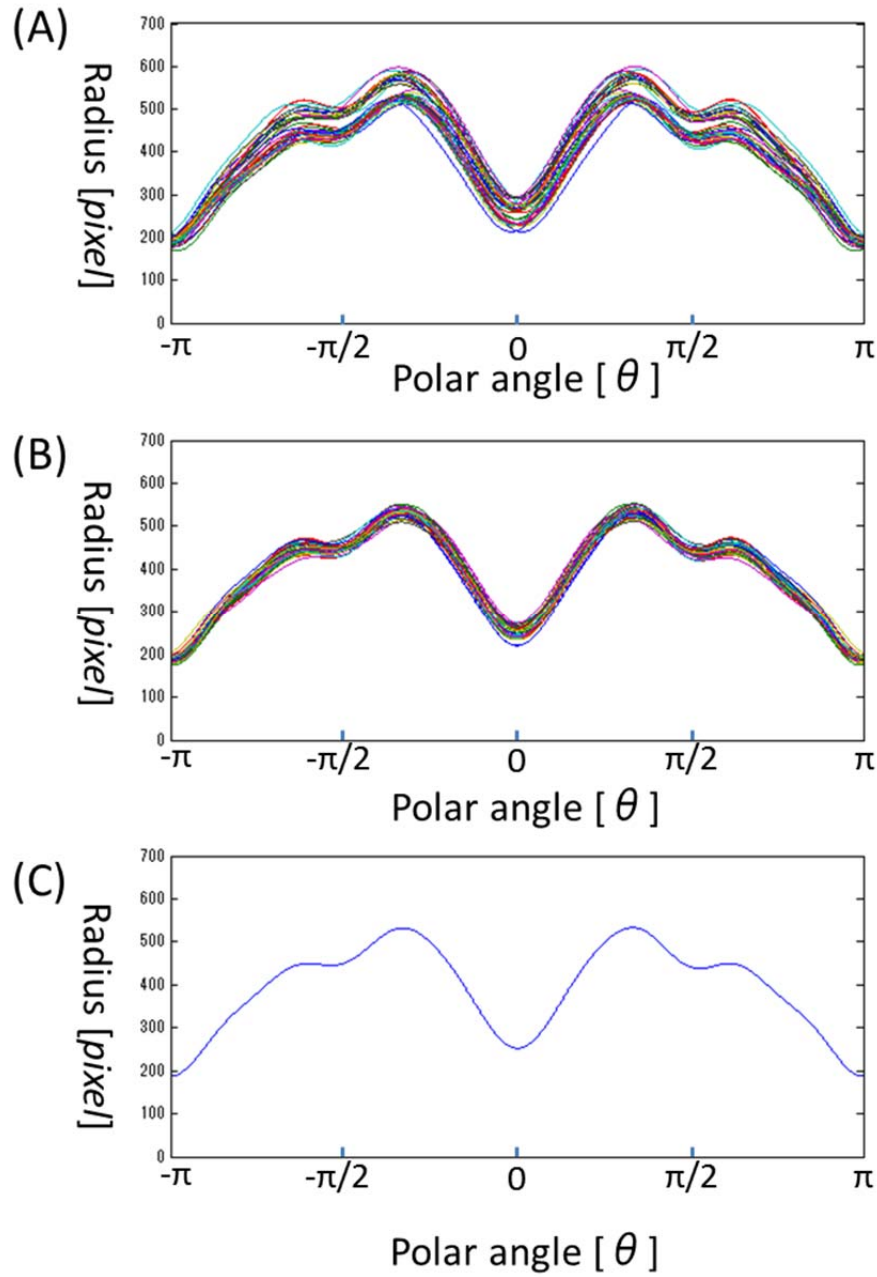


図 2.6 外形関数テンプレートの作成

各サンプルから抽出された外形関数 (A) に形状記憶変換を適用することで外形関数 (B) を作成し、それらを加算平均することでテンプレートの外形関数 (C) を得た。

### 2.3.3 アフィン変換 (Affine Transformation)

アフィン変換とは、幾何学の分野における平行移動、拡大・縮小、回転、せん断の一次結合による線形変換手法である（図 2.7）。 $n$  番目の入力ピクセル  $T(i_n, j_n) = (i'_n, j'_n)$  におけるアフィン変換は、以下の行列によって示すことができる。

$$\begin{bmatrix} i'_l \\ j'_l \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} m_{11} & m_{12} \\ m_{21} & m_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} i_l \\ j_l \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} m_{13} \\ m_{23} \end{bmatrix}. \quad (2.4)$$

ここで、各パラメータは最小二乗法によって最適化することができる。アフィン変換では、最小二乗法で 6 つのパラメータを測定するために、少なくとも 3 組の制御点 (Ground Control Point: GCP) をあらかじめ指定する必要がある。このとき、最適化を安定化するために GCP 間の距離を十分とることが望ましい。

ここで  $q$  個の GCP を各サンプルおよびテンプレート画像の外形輪郭線上に指定すると、最小二乗誤差は次式で示される。

$$\begin{aligned} \Phi_i &= \sum_{k=1}^q \left\{ i'_k - (m_{11}i_k + m_{12}j_k + m_{13}) \right\}^2 \\ \Phi_j &= \sum_{k=1}^q \left\{ j'_k - (m_{21}i_k + m_{22}j_k + m_{23}) \right\}^2. \end{aligned} \quad (2.5)$$

ここで、 $\Phi_i$  に関して各パラメータで偏微分を行い、偏導関数が 0 となるパラメータを求める。

$$\begin{cases} \frac{\partial \Phi_i}{\partial m_{11}} = \sum_{k=1}^q 2i_k (m_{11}i_k + m_{12}j_k + m_{13} - i'_k) = 0 \\ \frac{\partial \Phi_i}{\partial m_{12}} = \sum_{k=1}^q 2j_k (m_{11}i_k + m_{12}j_k + m_{13} - i'_k) = 0 \\ \frac{\partial \Phi_i}{\partial m_{13}} = \sum_{k=1}^q 2(m_{11}i_k + m_{12}j_k + m_{13} - i'_k) = 0 \end{cases} \quad (2.6)$$

上の記連立方程式を解くことで、最適化されたパラメータ  $m_{11}$ ,  $m_{12}$  および  $m_{13}$  を求める。また,  $\Phi_j$  についても同様に上記手順を踏むことでパラメータ  $m_{21}$ ,  $m_{22}$  および  $m_{23}$  を最適化する。そして、これらの推定されたパラメータを式 (2.4) に代入することで、各サンプル画像の任意のピクセルをテンプレート画像上に投射することができる。

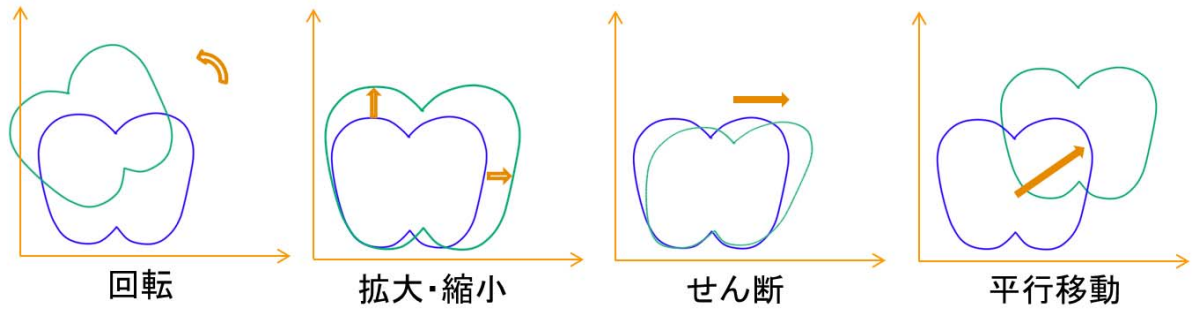


図 2.7 アフィン変換

アフィン変換は回転, 拡大・縮小, せん断, 平行移動の一次結合による変換手法である。

### 2.3.4 角度依存変換 (Angle Dependent Transformation)

角度依存変換 (ADT) は極座標系に基づいた回転および角度依存スケーリングによる非線形変換手法である (図 2.8). 角度依存スケーリングとは, 角度によって異なる拡大率を与え, 動径方向に線形に拡大縮小を行うことである. 角度依存スケーリングパラメータ  $\alpha_k(\theta)$  は各  $\theta$  について  $r_k(\theta + \varphi_k)$  と  $r_t(\theta)$  の比によって正確に求めることができる.

$$\alpha_k(\theta) = \frac{r_t(\theta)}{r_k(\theta + \varphi_k)} \quad (2.7)$$

ここで変換後の座標  $r'$  および  $\theta'$  は次式で表される.

$$\begin{cases} r' = \alpha_k(\theta') r \\ \theta' = \theta + \varphi_k \end{cases} \quad (2.8)$$

直交座標系から極座標系に変換するとき,  $r$  と  $\theta$  および  $r'$  と  $\theta'$  は直交座標系の座標  $(i, j)$  および  $(i', j')$  を用いることでそれぞれ

$$\begin{cases} r = \sqrt{i^2 + j^2} \\ \theta = \tan^{-1}\left(\frac{j}{i}\right) \end{cases} \quad \begin{cases} r' = \sqrt{i'^2 + j'^2} \\ \theta' = \tan^{-1}\left(\frac{j'}{i'}\right) \end{cases} \quad (2.9)$$

と表される. ここで 式 (2.9) を 式 (2.8) に代入すると,  $(i, j)$  と  $(i', j')$  の関係は,

$$\begin{cases} i' = \alpha_k \left( \tan^{-1} \left( \frac{j}{i} \right) + \varphi_k \right) \sqrt{i^2 + j^2} \cos \left( \tan^{-1} \left( \frac{j}{i} \right) + \varphi_k \right) \\ j' = \alpha_k \left( \tan^{-1} \left( \frac{j}{i} \right) + \varphi_k \right) \sqrt{i^2 + j^2} \sin \left( \tan^{-1} \left( \frac{j}{i} \right) + \varphi_k \right) \end{cases} \quad (2.10)$$

と表すことができ、各サンプルの任意のピクセルをテンプレート画像上に投射することができる。

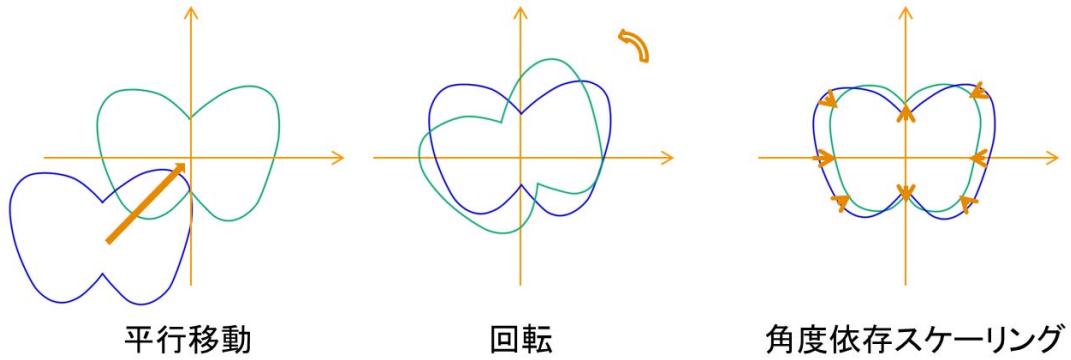


図 2.8 角度依存変換

角度依存変換は平行移動、回転、角度依存スケーリングによる座標変換法である。平行移動によって原点を合わせた後、回転、角度依存スケーリングの順に変換パラメータを求める。

### 2.3.5 AT, ADT 混合法 (AT+ADT)

サンプルによる断面画像の外形の違いは、大きく分けて二種類に区別することができる。サンプル作成時において脊髄を横に切断した際におきる歪みや、画像撮影時において断面に対して斜め上からカメラで撮影した際におきる歪みなどのサンプル作成時の環境要因による形状の違いとサンプルの個体差による

サンプル固有の形状の違いである。このような二種類の歪みを順に補正する場合、後発的に発生するサンプル作成時の環境要因による歪みを先に補正した上でサンプル固有の歪みを補正することが望ましい。本研究では、AT はサンプル作成時の環境要因による形状の違いを補正することを想定しており、サンプル固有の形状の違いについてはADTによってできる限り補正することが可能であると仮定する。それゆえ、AT+ADT 法では最初に AT による変換を適用し、その後 ADT を適用した。

### 2.3.6 画素値のピクセル補間と平滑化法

一般的に (2.16) や (2.21) で定義される変換式に従って画像の変換を行う場合、二つの問題を引き起こす。一つ目の問題は、座標変換を行う際に入力画像より変換後の画像サイズが大きい場合、入力画像の 1 ピクセルに対応するピクセルが 1 点で求まるため、変換後の画像に画素値を持たない欠損ピクセルが発生することである。もう一つの問題は、ビットマップ形式の画像は整数値の座標系で構成されていることによる。入力画像の座標は必ず整数値となるが、変換式によって求められた変換後の座標は必ずしも整数値になるとは限らないため、変換後のビットマップ画像がもつピクセルの画素値を正確に求めることが困難となることである。これらの問題を解決する方法として、画像変換を逆

問題として解いて変換後のピクセルに対応する元画像の座標を求める。そうすることで変換後の全ピクセルについて対応する元画像の座標を求めることが可能となり、また計算で求めた元画像の座標が小数値である場合も、求めた座標の周辺のピクセルの画素値から補間することで、任意の対応する座標の画素値を求めることができる。画素値の補間法として、対応する座標から最も近い位置にあるピクセルの画素値を参照するニアレストネイバー法、対応する座標の周辺の  $2 \times 2$  ピクセルから補間することで画素値を求めるバイリニア補間法、対応する座標の周辺の  $4 \times 4$  ピクセルから補間することで画素値を求めるバイキュービック補間法などがある。本研究においては、ピクセル補間法として計算コストに対して高い平滑化の効果が得られるバイリニア補間法を採用した。バイリニア補間では、 $(i', j')$  に対応する座標  $(i, j)$  の画素値を周辺の  $2 \times 2$  ピクセルから補間することで画素値を求める。 $i$  および  $j$  の整数部分（小数点切り捨て）を  $[i], [j]$  とすると  $(i, j)$  の画素値  $f(i, j)$  は周辺ピクセルの画素値  $f([i], [j])$ ,  $f([i+1], [j])$ ,  $f([i], [j+1])$ ,  $f([i+1], [j+1])$  を用いて、

$$\begin{aligned}
 f(i, j) = & ([i]+1-i)([j]+1-j)f([i], [j]) \\
 & + ([i]+1-i)(j-[j])f([i], [j]+1) \\
 & + (i-[i])([j]+1-j)f([i]+1, [j]) \\
 & + (i-[i])(j-[j])f([i]+1, [j]+1)
 \end{aligned} \tag{2.11}$$

と表すことができる（図 2.9）。

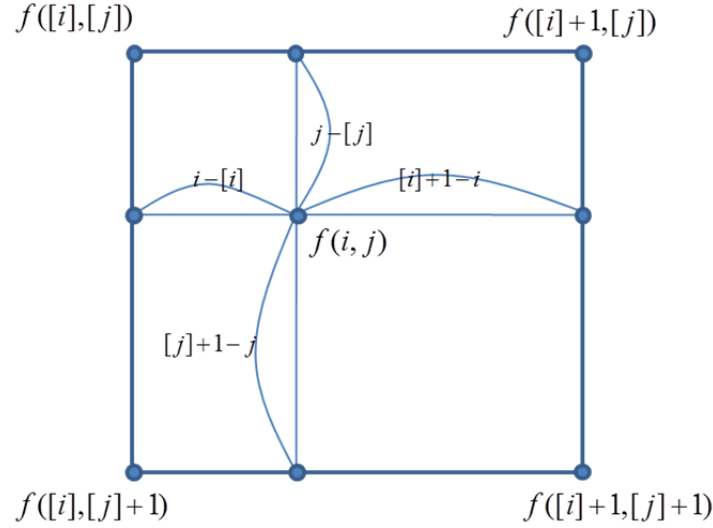


図 2.9 バイリニア補間法

バイリニア補間法は、座標  $(i, j)$  の画素値を周辺の  $2 \times 2$  ピクセルの画素値  $f([i], [j])$ ,  $f([i+1], [j])$ ,  $f([i], [j+1])$ ,  $f([i+1], [j+1])$  の重み付け平均によって補間で行う。

### 2.3.7 人工テンプレート画像によるベンチマークテスト

AT と ADT および AT+ADT 手法の長所と短所を明白にするために、我々は人工的なテンプレート画像とベンチマーク画像を準備した。テンプレート画像は、脊髄断面の形状を模した外形関数、

$$r(\theta) = 200 + 100 \cos(2\theta) \quad (2.12)$$

によって作製され、これは  $\theta = 0, \pi$  で二つの極大値と  $\theta = \pi/2, 3\pi/2$  で二つの極小値をもつ。このテンプレート画像を  $\pi/12$  ラジアンで回転変換し、さらに水平方向に  $\pi/18$  のせん断変換によってゆがめ、その後角度依存変換パラメー

タ,

$$\alpha(\theta) = 1 + 0.05 \cos(6\theta), \quad (0 \leq \theta < 2\pi) \quad (2.13)$$

によって角度依存変換を行った。

図 2.10 (a) と (b) は, 人工テンプレート画像とベンチマーク画像を示す。点 A, 点 B, 点 C および点 D は  $r-\theta$  空間における外形関数の極大値と極小値に対応した点であり, それぞれの点は十分な距離を保っている。それゆえ, AT 手法のパラメータを推定するための GCP として, これらの点を使用した。

我々は, AT, ADT と人工テンプレート画像にあわせるよう AT, ADT および AT+ADT 手法を用いてベンチマーク画像を変換し, それぞれの変換手法の精度を評価して比較を行った。また, どの程度空間歪曲が補正されたかを確認するために, テンプレート画像の背景に  $4/\pi$  ごとに中心から動径方向へのびる直線と同心円からなる基準線を描画し, ベンチマーク画像を作成した時と同様の手順によって歪めた基準線をベンチマーク画像の背景として描画した。

歪められた同心円は, 角度依存スケーリングによって元の同心の円に補正できる。また, 不等間隔で中心から動径方向へのびる直線は, 回転とせん断によって補正することができる。AT は, 不等間隔で中心から動径方向へのびる直線を等間隔に補正ことができた。しかし, 変換した外形輪郭線の形状は人工テンプレート画像の形状とは大きく異なり, また歪められた同心円は AT によって

変換した後もテンプレート画像の背景とは異なる形状に変換された。これは、AT が角度依存スケーリングによる歪みを補正できなかったことが原因である（図 2.10 (c)）。一方、ADT は歪められたベンチマーク画像の外形輪郭線を補正することができたが、不等間隔で中心から動径方向に伸びる直線は補正されなかった。（図 2.10 (d)）。これは、ADT は AT におけるせん断の補正機能を有していないからである。AT+ADT 法によって補正された画像は、人工テンプレート画像に似ていることがわかる（図 2.10 (e)）。変形した同心円と放射方向に伸びる直線は、AT や ADT によって補正された画像と比較してより人工テンプレートに近い形状に補正されたことがわかる。このように、AT+ADT 手法は、互いに欠損している機能を補完しあっているといえる。

また、図 2.10 の (d) および (e) において、点 A 付近の外形輪郭線が歪んでいることがわかる。これは外形輪郭線を極座標変換する際に点 A を始点および終点をとした座標データについてフーリエ級数近似を行ったことが原因である。フーリエ級数近似によって閉曲線に必要な周期性は確保されるが、周期の始点および終点付近ではフーリエ級数近似による外形輪郭線と実際の外形輪郭線とのずれが大きかったために、角度依存スケーリングによってフーリエ級数近似による外形輪郭線はテンプレートと一致させたものの、実際の外形輪郭線はテンプレートの外形輪郭線と完全に一致しなかった。

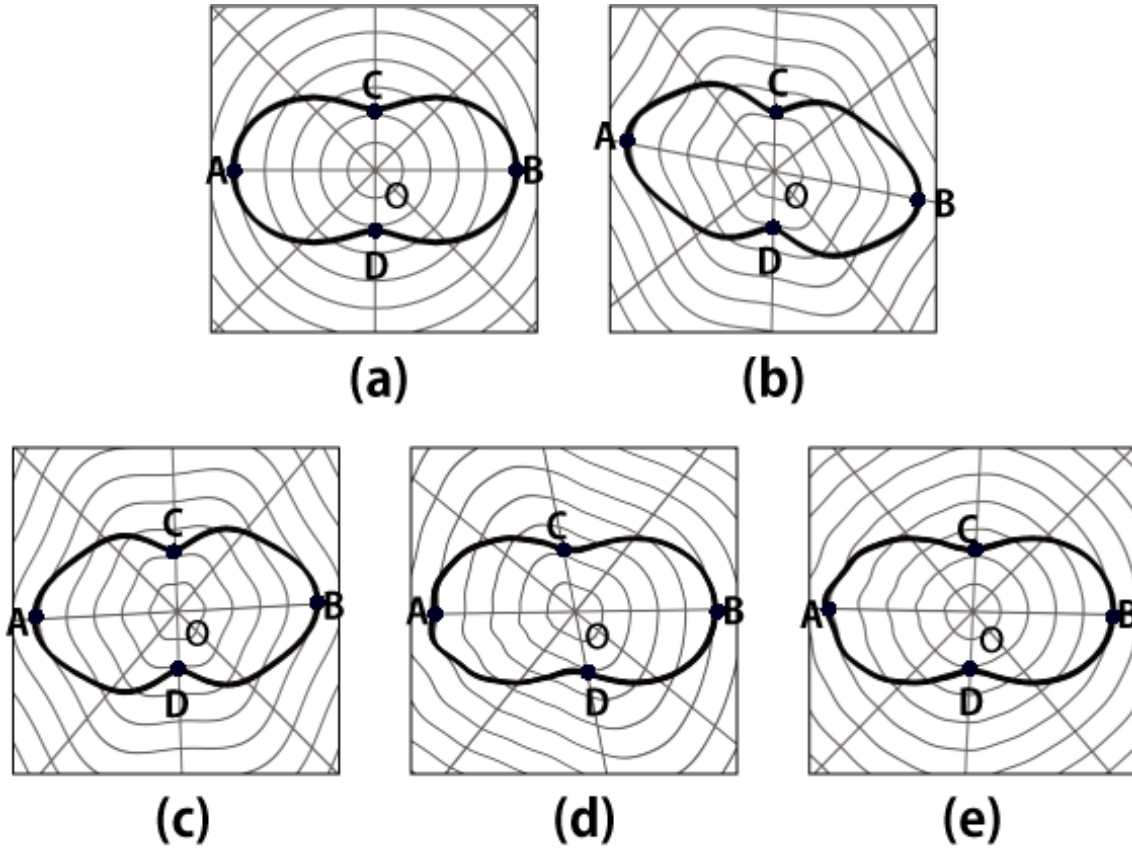
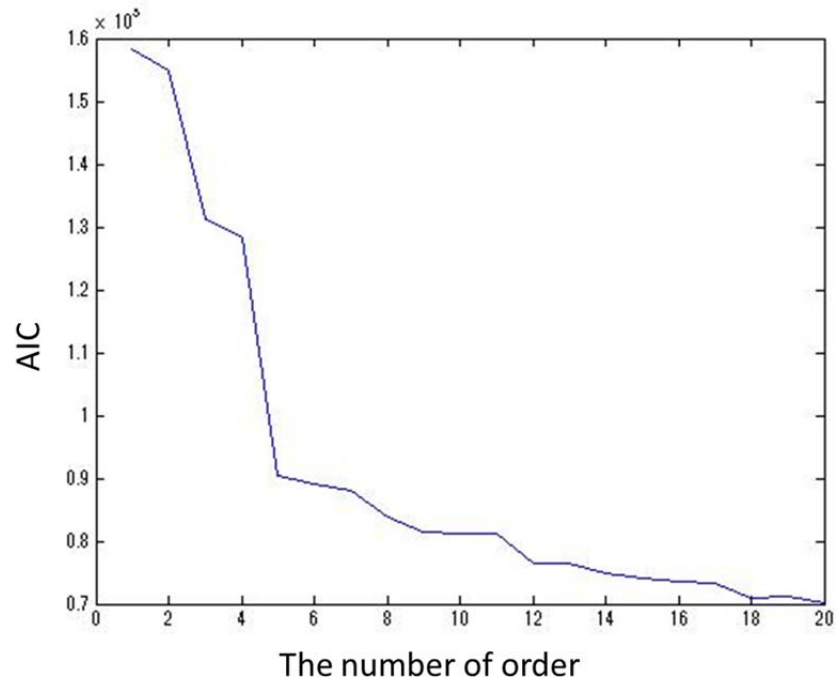


図 2.10 各手法の精度評価

人工テンプレート画像 (a), ベンチマーク画像 (b), AT によって修復されたベンチマーク画像 (c), ADT によって修復されたベンチマーク画像 (d), AT+ADT によって補正されたベンチマーク画像 (e) を示す。

## 2.4 結果

はじめに、各サンプル画像から抽出した外形輪郭線をフーリエ級数で近似することで平滑化を行った。式(2.1)におけるフーリエ級数の次数を決定する場合、外形輪郭線がもつ情報を失わないために、次数を十分大きい値に設定することが重要である。一方、次数を大きく取りすぎると、オーバーフィッティングの問題を引き起こし、手振れノイズにも適合してしまうことで平滑化を悪化させる問題がある。そこで、次数の決定に際し、モデル選択手法を用いた。モデル選択手法の中でも赤池情報量規準 (Akaike Information Criterion: AIC) は一般的によく利用される手法の一つであり、AIC を用いることでフーリエ級数の次数を最適化することが可能である。本研究では、サンプルごとに次数  $p$  の値を増加させながら AIC の値の変化をみたところ、サンプルによって若干傾向は異なるものの、ほとんどのサンプルで  $p \geq 7$  のときの AIC の値は大きく変化しなかった (図 2.11)。また、次数  $p$  の値を 1 から 20 まで増加しながら数値解析を繰り返したところ、 $p \geq 10$  で結果にほとんど変化はなく、外形関数が十分に平滑化されていることが分かった。そこで、我々は全てのサンプルにおいて  $p = 10$  を選択し外形のフーリエ級数近似を行った。

**図 2.11 フーリエ級数の次数の決定**

あるサンプルの外形輪郭線を各次数におけるフーリエ級数で近似したときの AIC を示す。 $p < 5$  では AIC が大きく減少し、 $p \geq 5$  では AIC は徐々に減少するものの大きく変化していないことがわかる。

次にアフィン変換を行うために  $r-\theta$  空間における外形関数の極小値 2 点、 $0 \leq \theta < \pi$  の区間の極大値 2 点および極座標系の原点の計 5 点を GCP として設定した (図 2.4 を参照)。

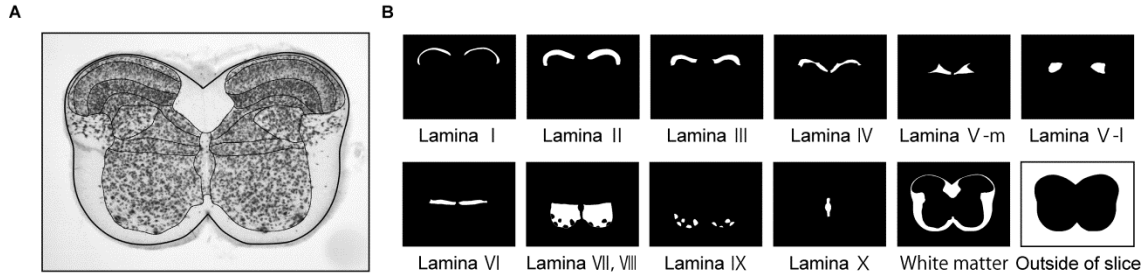


図 2.12 組織画像から層ごとの二値画像への変換

内部構造の境界を描画した組織画像 (A) と層ごとに作成された二値画像 (B)。任意のピクセルについて、そのピクセルがある層に属している場合、対応する層の二値画像上に白く塗りつぶされ、それ以外は黒く塗りつぶされる。

それぞれの標準化手法における灰白質の層識別精度を調べるために、我々はサンプルごとに各層の二値画像を作成した (図 2.12)。二値画像について、点  $(i, j)$  におけるピクセルの画素値は、

$$I_{l,k}(i, j) = \begin{cases} 1 & \text{(if pixel } (i, j) \text{ is included in the } l\text{-th layer)} \\ 0 & \text{(else)} \end{cases} \quad (2.14)$$

と表される。ここで  $l$  と  $k$  はそれぞれ層とサンプルの番号である。同様に、対応する変換画像のピクセルの画素値を  $I_{l,k}(i', j')$  とした。

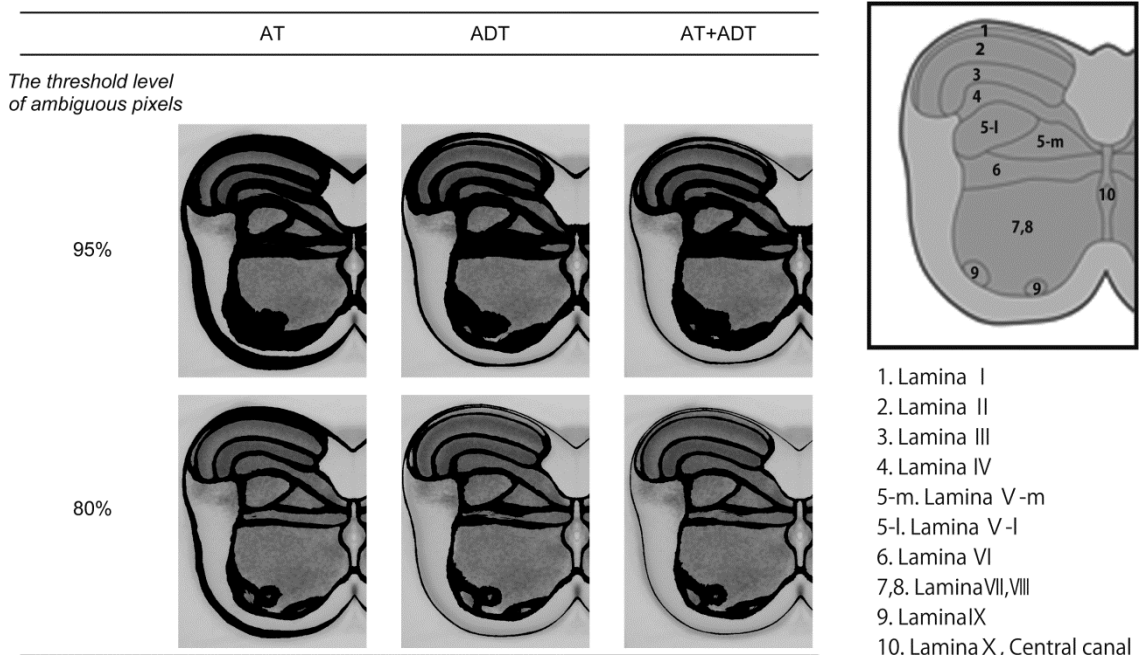
次に、次式で示す通り、二値画像について層ごとにサンプル間平均を求めた。

$$\bar{I}_l(i', j') = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n I_{l,k}(i', j'). \quad (2.15)$$

ピクセルの平均画素値は必ず 0 から 1 の間の値をとり、入力画像を変換した時にテンプレート画像の対象のピクセルが Lamina  $l$  に属している確率を示す。こ

の平均値を百分率に変換したものを頻度比率 (frequency ratio) と呼ぶことにする。例えば、頻度比率が 100%となる場合、入力画像のピクセルは全てのサンプルで正確に同じ層に変換されることを示す。逆に頻度比率が 0%となる場合、入力画像のピクセルは全てのサンプルで対象の層以外の層に変換されたことを示す。従って、頻度比率はこれらの変換手法の精度を評価する適切な指標であり、頻度比率の空間分布は頻度比率マップ (frequency ratio map) を構成する。

次に、画像全体をみたときの変換手法の精度を評価するために、各層の頻度比率マップを統合することを考えた。我々は、頻度比率マップに関して適当な閾値を与え、いずれかの層における頻度比率が閾値より高くなったピクセルを Categorized pixel とし、全ての層の頻度比率が閾値以下となったピクセルを Ambiguous pixel と定義した。Categorized pixel はいずれかの層に識別されたピクセルを意味し、Ambiguous pixel は、どの層に属するか明確でないピクセルであることを意味する。はじめに、我々は閾値を 95%にしたときの Ambiguous pixel の空間分布図を作成した。さらに、閾値を 95%から 50%まで 5%刻みで減少させて Ambiguous pixel の空間分布図を確認していったところ、閾値を 80%まで下げたときに Ambiguous pixel の領域サイズが大きく減少し、各手法間で顕著な差が見られた。閾値を 95%と 80%に設定したときの Categorized pixel と Ambiguous pixel の空間分布図を図 2.13 に示す。



**図 2.13 Categorized pixel と Ambiguous pixel の空間分布**

黒塗りの領域はそれぞれ 95%（上段）と 80%（下段）の閾値より低い確率で識別された Ambiguous pixel を示し、その他の領域は閾値より高い確率で識別された Categorized pixel を示している。この図から、各手法の空間的な識別精度を確認することができる。

**表 2.1 頻度比率が閾値を超えたピクセルの数と外形テンプレートの内部に存在するピクセルの数に対する割合**

Threshold level of ambiguous pixels	95%						80%					
Transformation method	AT		ADT		AT+ADT		AT		ADT		AT+ADT	
Lamina I	32	0.01%	3570	0.68%	5055	0.97%	1379	0.26%	8886	1.70%	9878	1.89%
Lamina II	259 73	4.98%	34227	6.57%	33510	6.43%	36397	6.98%	42756	8.20%	41540	7.97%
Lamina III	105 04	2.01%	13945	2.67%	14722	2.82%	19606	3.76%	22835	4.38%	22197	4.26%
Lamina IV	870 7	1.67%	12299	2.36%	12077	2.32%	20063	3.85%	23694	4.54%	22570	4.33%
Lamina V-m	547 1	1.05%	4852	0.93%	5422	1.04%	8250	1.58%	9189	1.76%	8888	1.70%
Lamina V-l	115 17	2.21%	12248	2.35%	11024	2.11%	16303	3.13%	17231	3.31%	16859	3.23%
Lamina VI	316 3	0.61%	2702	0.52%	3121	0.60%	13852	2.66%	10535	2.02%	13715	2.63%
Lamina VII, VIII	961 35	18.44 %	99707	19.12 %	94886	18.20 %	11315 8	21.70 %	11928 0	22.88 %	11255 6	21.59 %
Lamina IX	0	0.00%	503	0.10%	377	0.07%	1696	0.33%	2784	0.53%	2350	0.45%
Lamina IX	394 7	0.76%	4842	0.93%	4751	0.91%	5467	1.05%	6309	1.21%	5977	1.15%
White matter	890 97	17.09 %	12162 0	23.33 %	12039 8	23.09 %	11845 5	22.72 %	14220 1	27.28 %	13800 2	26.47 %
Total of categorized pixels	254 546	48.82 %	31051 5	59.56 %	30534 3	58.57 %	35462 6	68.02 %	40570 0	77.82 %	39453 2	75.67 %
Inside of the outline template	521 351	100.0 %	52135 1	100.0 %	52135 1	100.0 %	52135 1	100.0 %	52135 1	100.0 %	52135 1	100.0 %

表 2.1 は、それぞれの閾値を設定した時、変換画像において頻度比率が閾値を超えたピクセルの数を層別に示している。Categorized pixel を全ての層で合計した値は、閾値 90%および 80%の両方で AT 法が最小となった。これは、AT 法が層の識別精度が 3 つの変換手法の中で最も低かったことを意味する。識別精度に関して大きな差が表れたのは、Lamina I, II, III, IV, VIおよびIXである。Lamina I と Lamina IXは閾値に関係なく、AT 法によって十分に識別されなかった。これとは反対に Lamina VIの識別されたピクセルの数は ADT 法で最小だった。Lamina VIに関して、中心管から近い領域においては各手法によ

る差はほとんどみられなかったものの、中心管から遠い領域では ADT が他手法と比較して Ambiguous pixel が多く分布することが分かった。

さらに、我々は Leave-One-Out Cross-Validation 法によって各変換手法の層識別能力を統計学的に評価した。42 枚の組織画像の中から 1 枚を抜き出し、それを  $k$  番目の画像として、上で説明した手順によって残りの 41 枚の画像を用いて frequency ratio map を作成した。ここで、抜き出した画像と比較するために、作成した frequency ratio map を灰白質の各層および白質ごとの二値画像に変換した。任意の座標において frequency ratio が最も高かった層に対応する二値画像の画素値に 1 を代入し、それ以外の層に対応する二値画像のピクセルには 0 を代入することで二値画像への変換を行った。作成された二値画像は、AT 法、ADT 法および AT+ADT 法によって逆変換され、抜き出した画像に一致するように各手法における変換パラメータの最適化を行った。そして、逆変換された画像と抜き出した画像がどの程度一致しているかの評価を行った。

変換画像では対象の層に識別されたが、抜き出した画像においてはその層に識別されなかったピクセルは Type 1 error を引き起こす。また、抜き出した画像では対象の層に識別されたが、変換画像ではその層に識別されなかったピクセルは Type 2 error を引き起こす。Type 1 error および Type 2 error はそれぞれ、

$$dp_{l,k} = \frac{Sp_{l,k} - S_{l,k}}{Sp_{l,k}} , dr_{l,k} = \frac{Sr_{l,k} - S_{l,k}}{Sr_{l,k}} \quad (2.16)$$

で定義する。  $Sr$  と  $Sp$  はそれぞれ

$$Sr_{l,k} = \sum_i \sum_j I_{l,k}(i, j) , Sp_{l,k} = \sum_i \sum_j I_{l,k}'(i, j) \quad (2.17)$$

で定義され、それぞれ  $I_{l,k}(i, j)=1$  および  $I_{l,k}'(i, j)=1$  の条件を満たすピクセルの総数を示す。  $I_{l,k}'(i, j)$  は  $k$  番目の画像における第  $l$  層に関する二値画像の座標  $(i, j)$  の画素値である。はこの手順を全画像 ( $k=1, \dots, n$ ) について繰り返すことで type 1 error および type 2 error の平均エラー率を、それぞれ

$$dp_l = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n dp_{l,k} , dr_l = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n dr_{l,k} \quad (2.18)$$

で求めることができる。これらの平均エラー率について、灰白質の各層と各変換手法の二要因分散分析を行ったところ、2つの要因による主効果および交互作用の全てに  $p < 0.05$  で有意差が見られた。その後、各変換手法における平均エラー率の差について、灰白質の層ごとにボンフェローニ補正による多重比較（有意水準  $p < 0.05$ ）を行った（図 2.14）。

Type 1 error の場合、Lamina I, II, IIIにおいて AT+ADT 法のエラー率が AT 法のエラー率に比べて有意に低く、Lamina IV, V-I, IX, Xについては有意水準を満たさなかったものの、AT+ADT 法で最もエラー率が低くなる傾向

が見られた。Type 2 error の場合, Lamina I, II において AT+ADT 法のエラー率が AT 法のエラー率に比べて有意に低い, 他の層については各変換手法間に有意な差はみられなかった。AT+ADT 法では, Type 1 error および Type 2 error の両方のエラー率について, 全ての層で最も高いエラー率を示すことはなかった。

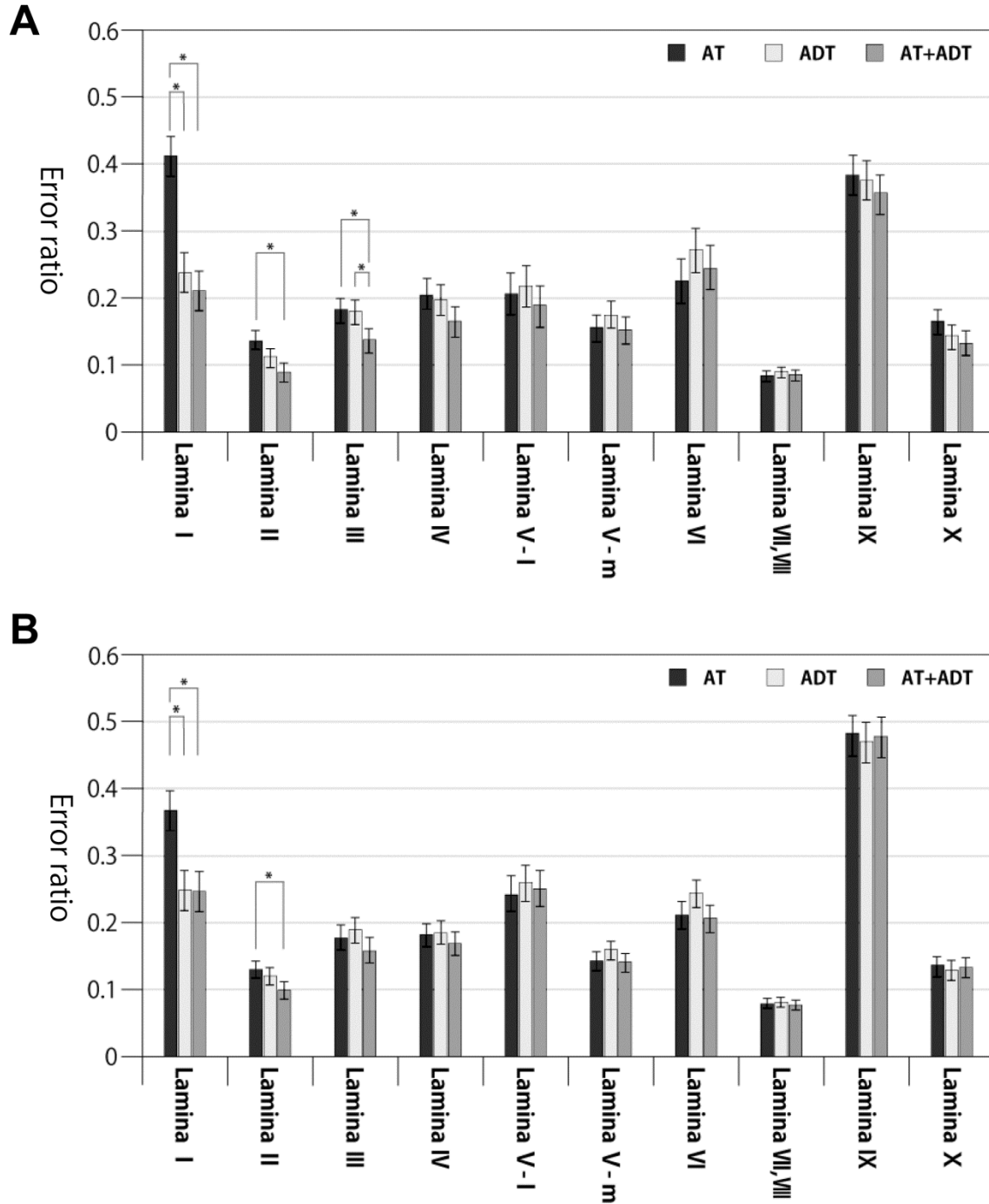


図 2.14 Type 1 error の多重比較 (A) と Type 2 error の多重比較 (B)

平均エラー率についてボンフェローニ補正による多重比較を行い, 有意水準  $p < 0.05$  (ボンフェローニ補正後  $\alpha < 0.05 / 3 = 0.017$ ) で有意差がみられた組み合わせを\*で示す。

## 2.5 考察

本研究において、層構造の識別に関して3つの標準化手法（AT, ADT および AT+ADT）の精度の比較を行ったところ、層識別の精度は層構造の位置によって各手法でばらつくことが分かった。入力画像をテンプレート画像に合うように変換したとき、ADT 法は AT 法と比べて第 I 層をより高い精度で識別することができ、Type 1 error と Type 2 error の両方のエラー率は有意に低くなることがわかった。また、同様の傾向が Lamina II でもみられた。これは、ADT 法はピクセルを角度依存スケーリングによって動径方向に補正するために、Lamina I, II といった円周方向に分布している層の識別に高い精度を得られたと考えられる。しかし、ADT 法は単独でせん断による歪みを補正することができないため、せん断による歪みがある場合は ADT を適用する前に AT を適用する必要があると考えられる。AT+ADT 法は Lamina I, II, III, IV で精度を向上させた。これは、組み合わせ手法がそれぞれの手法の不利な点を補い合ったからだと考えられる。

また、Lamina V の中心管に近い領域や Lamina VII, VIII および Lamina X で各変換手法間に有意差が見られなかった。これは、中心管の位置を AT では GCP として、ADT では極座標系の原点として利用しているため、中心管の近傍のピクセルは変換した際に大きく移動することはないからであると考えられる。ま

た, Lamina VII, VIIIの Type 1 error と Type 2 error のエラー率が他の層よりも低かったのは, Lamina VII, VIIIの領域サイズが他の層と比べて非常に大きいことが原因と考えられる. Lamina IXでは, どの変換手法を適用した場合でも他の層と比べて Type 1 error と Type 2 error の両方のエラー率が非常に高くなった. これは, Lamina IXが他の層と比較して領域サイズが小さく, またサンプルによってばらつきが大きかったからだと考えられる. しかし, 境界の ambiguous pixel の領域サイズは大きかったものの, Lamina IXを適切に識別することができた. また, 標準化した組織画像をサンプル間平均することによって, 灰白質の層構造を鮮明に描写することができた (図 2.15).

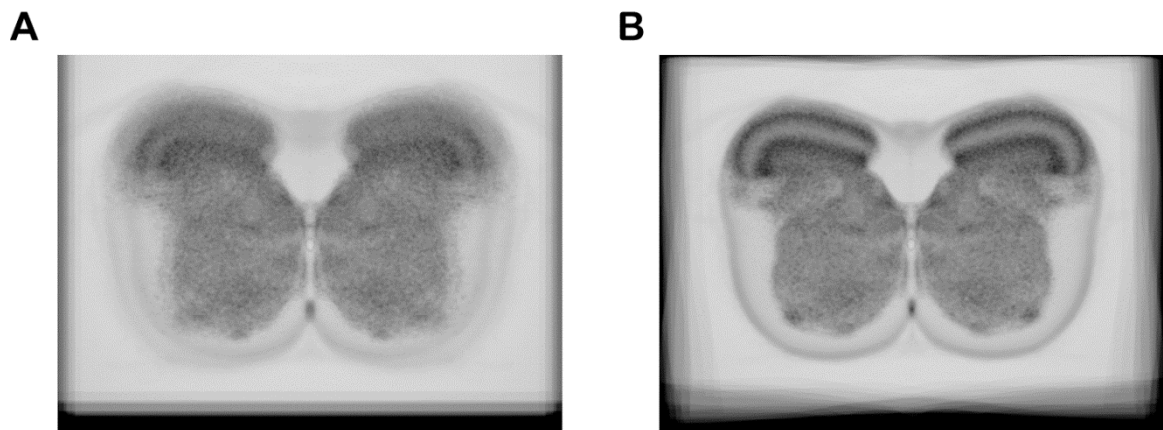


図 2.15 加算平均画像

中心管の位置のみを合わせて単純加算平均した画像 (A) と AT+ADT によって変換された画像を加算平均した画像 (B)

膜電位イメージングは、現在、脳と脊髄における全体的な電気活動を記録するための一般的な技術である。膜電位イメージング技術は、例えば、脊髄における呼吸の中枢パターン発生器や脊髄における感覚システムに対して適用されてきた。また、膜電位イメージングによって得られる時空間データから、より効果的に神経活動を見出すための数学的手法も開発されてきた。しかし、膜電位イメージングによって見出された神経活動を解剖学的に定義された部位に関連づけることは困難であった。本研究はこの問題の解決方法を提供する。

本章では、個々の画像を共通のプラットフォーム画像上（例えば脊髄の標準的な地図上）に投射するための標準化法を提案した。その中でも AT+ADT 手法は、本研究で提案した 3 手法の中で最も正確に神経活動を解剖学的に定義された層構造に関連づけることが可能であることがわかった。本研究で提案した画像標準化手法は、膜電位イメージングのような光記録データに適用することができ、神経活動に関して複数のサンプルにおける神経活動を統計的に評価することが可能である。

## 第3章

# ラット脊髄断面サンプルによる標準化法を用いた局所麻酔薬の薬理効果解析

### 3.1 概要

#### 3.1.1 背景

皮膚末梢に与えられた痛覚刺激は、1次感覚神経線維の末梢端で受容される。この痛覚情報は、脊髄後角に延びているその神経線維の中枢端まで活動電位として伝搬した後、脊髄を上行して大脳に運ばれて痛みとして感じられる。

この痛覚を抑制する方法として、脊椎麻酔がしばしば利用される。脊椎麻酔は、局所麻酔薬を脊髄くも膜下腔の脳脊髄液内に注入し、脊髄神経を麻酔し、痛覚、運動、交感の各神経線維を一時的に遮断することで痛覚を抑制する方法である。脊椎麻酔は1884年に米国のCorningが犬の実験でコカインを用いて実施したことに始まり、その臨床応用に初めて成功したのは1899年のドイツのBierである。日本においては1900年に北川が初めて脊椎麻酔を施行し、1930

年 McLelland は高比重液の局所麻酔薬を脊椎麻酔に使用，脊椎麻酔の安全性が一気に高まった[30]．そして，1940 年代に脊椎麻酔の基礎ができあがった．現在，脊椎麻酔は下肢と下腹部の手術でしばしば実行されている．麻酔薬としてはリドカイン，ブピバカイン，テトラカイン，プロカイン等を用いられることが多い．局所麻酔薬は，電位依存性ナトリウム（Na）チャンネルに作用し，活動電位の伝搬を遮断することで局所麻酔作用を発揮する．脊髄においては，局所麻酔薬は脊髄神経根に作用するという仮説がある[31]．局所麻酔薬の脊髄への効果に関する報告はなされているものの，サンプル間における効果の統計的評価および効果に関する空間情報は不十分であり，後角の侵害受容ニューロンのネットワークにおける局所麻酔薬の正確な薬理作用は完全には理解されていない[32, 33]．

### 3.1.2 研究目的

脊髄における局所麻酔薬の薬理作用を解明するために，本研究では膜電位イメージング法を用いて，脊髄のスライスサンプルにおいて局所麻酔薬投与前と投与後について神経後根に電気刺激を与えた際の脊髄後角における電位変化をそれぞれ記録し，それらのデータの解析を行う．膜電位イメージングデータは条件ごとに複数のサンプルから作成され，また条件ごとに異なるサンプルを用

いて作成される。当然，サンプルが異なると脊髄の形状や内部構造が異なるため，単純に条件間の比較を行うことが困難である。それを解決するために前章で提案した標準化手法を適用し，各サンプルの膜電位イメージングデータを組織画像から作成した標準画像上に投射することで全データを標準画像上で統合する。これによって，各サンプルの解剖学的特徴点が標準画像の同一ピクセル上で一致するため，複数のサンプルのイメージングデータをピクセル毎で解析することができ，全ピクセルを同時に統計解析することが可能となる。

## 3.2 使用データ

### 3.2.1 オプティカルレコーディング

脊髄スライス標本は，国立病院機構村山医療センター岡田泰昌医長に提供を受けた。脊髄スライス標本を作る手順は[17]と同様である。簡潔に述べると，両性の幼少ラット（ウィスター，生後 4-6 日）についてジエチルエーテル吸入による深麻酔を行い，頸髄を素早く分離した。後根を含む頸髄の横断スライス（C4, C5 および C6 レベル; 単一区分の厚さ ; 800-1000  $\mu$ m）は，人工脳脊髄液内でブレインスライサー（Microslicer DTK-1000; 堂阪 EM, 日本）および眼科用剪刀を用いた手作業によって準備した。オプティカルレコーディングのためのスライス標本は，膜電位感受性色素（di-4-ANEPPS; Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA) ( 0.1-0.2 mg/ml ) を含む, ガス ( 95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub> ) を 30 分間通気させた人工脳脊髄液に浸すことで染色を行った. スライス標本は水平にレコーディングチャンバー (Volume 2ml) に置かれ, 95%の O<sub>2</sub> と 5%の CO<sub>2</sub> の混合ガスで平衡された人工脳脊髄液 (mock CSF pH 7.4) を 4ml/min の灌流した下で維持された. 人工脳脊髄液の成分は, 126mM NaCl, 5mM KCl, 26mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 11mM ブドウ糖である.

電気刺激によって誘発される後角の活動は, 光記録システム (MiCAM01 (BrainVision) を使用して分析された. レコーディングチャンバーは, 落射蛍光顕微鏡 (Eclipse E600FN; Nikon, Tokyo, Japan) の4倍対物レンズ (Plan Apo, NA=0.2, Nikon) の下に置かれた. 標本は安定した DC 電源 (PD36-20; Kenwood, 日本国東京) で作動するハロゲン電球 (250 W; Oriel, Stratford, CT, USA) によって励起フィルタ ( $\lambda=535\pm10$  nm) を通して照射された. エピフロレッセンス (落射蛍光) は, MiCAM01-CCD カメラ (空間分解能 60×90 ピクセル) を用いて蛍光フィルタ (ロングパス  $\lambda 610$ nm) を通して検出された. 各々のピクセルの最初の蛍光強度 (F) と比較して蛍光強度の変化量 ( $\Delta f$ ) は 1frame/2ms のレートで記録された. 光計測は 10 秒間隔で 10 回繰り返し, 信号の加算平均を行った.

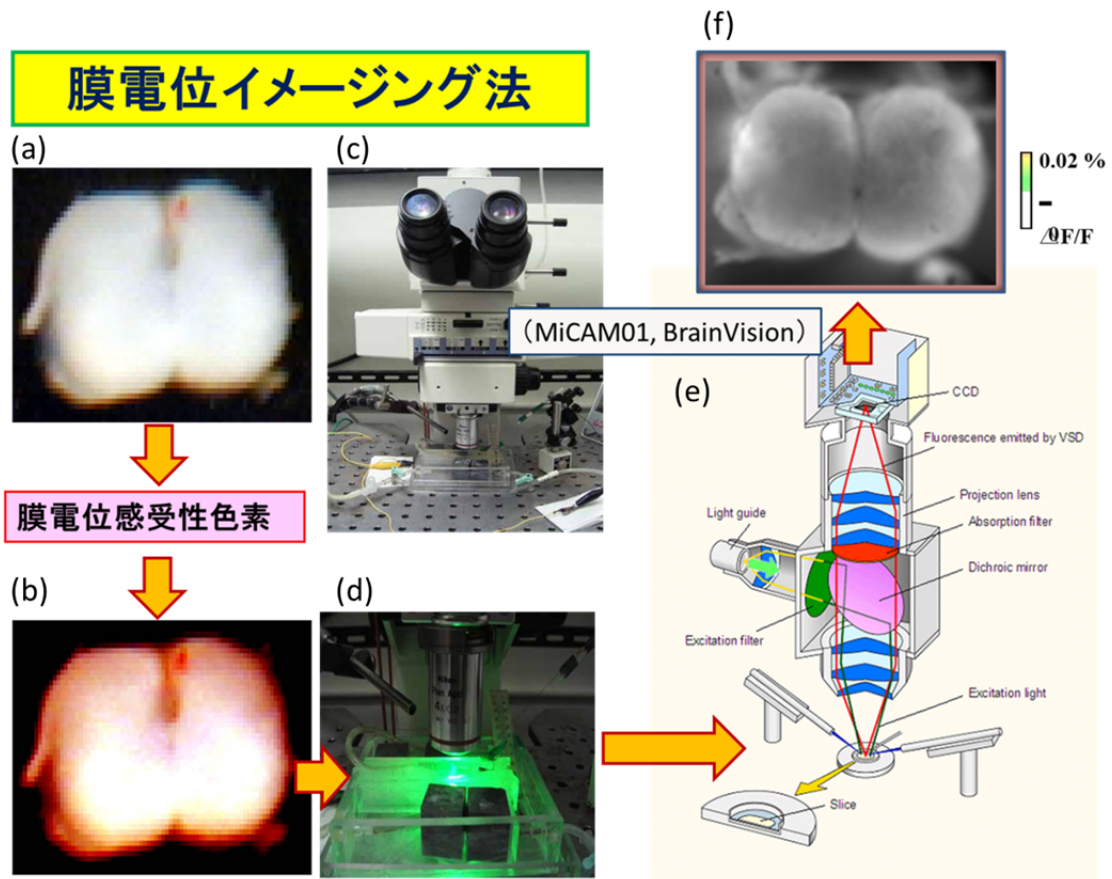


図 3.1 膜電位イメージング法

(a) 脊髄スライス標本, (b) 膜電位感受性色素で染色されたサンプル, (c) 膜電位イメージング装置, (d) 膜電位感受性色素によって染色されたサンプルへの励起光の照射, (e) 膜電位イメージング装置の概要説明図 (f) 膜電位イメージングデータ. 膜電位感受性色素は, 染色した組織の膜電位が神経活動に応じて変化する時, その吸光度や蛍光強度が比例的に変化するという特徴を持っている. 膜電位イメージングでは, 膜電位感受性色素をケミカルプローブとして利用し, その光量変化を高速撮影素子でとらえることで, 神経活動をリアルタイムでイメージングすることが可能である.

### 3.2.2 神経活動の誘発と局所麻酔薬の投与

本研究では、局所麻酔薬の効果を判定するために、局所麻酔薬投与前と投与後のそれぞれの条件について、脊髄スライス標本における後角の神経活動を誘発した際の電位変化を膜電位イメージング装置によってオプティカルレコーディングを行った。

後角の神経活動は後根の電気刺激によって誘発された。脱分極性の矩形波電流（振幅 1.5mA, 区間 50 $\mu$ sec）は、電気刺激装置（SEN-7103; 日本光電）を用いて片側の後根にガラス吸引電極を通して加えられた [22, 25]。本実験において、後根の電気刺激は擬似的に痛覚を誘発し、A 線維と C 線維を活性化することを考慮している。

局所麻酔薬はリドカインおよびブピバカインを用意した。はじめに全サンプルについて局所麻酔薬の投与前に control 条件のオプティカルレコーディングを行った。リドカインおよびブピバカインはそれぞれ 2 種類の濃度（10  $\mu$  M, 100  $\mu$  M）を用意した。次に各条件の濃度の局所麻酔薬を標本に投与した後、10 分間隔でオプティカルレコーディングを行った。サンプル数はそれぞれの条件に対して 2～7 匹である。

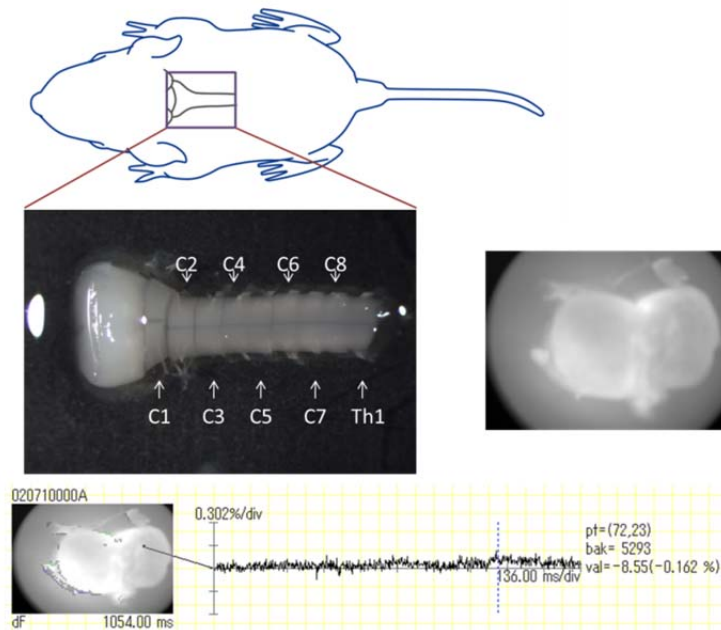


図 3.2 ラット脊髄スライス（C4）における膜電位イメージングデータ

ラット脊髄を摘出画像（中段左図）と C4 部位における横断スライスの膜電位イメージングデータ（中段右図および下段図）を示す．膜電位イメージングデータの空間解像度は  $88 \times 60$  であり，680 フレーム（周波数 500Hz）の時系列データが各ピクセルに対応する．

### 3.3 方法

膜電位イメージングデータの解析は図 3.3 に示すフローチャートに従って行った．膜電位イメージング法によって得られたデータは多くのノイズやアーチファクトを含んでいるため，それらを可能な限り除去し S/N 比を向上させるために多くの前処理を必要とする．ノイズ除去の前処理として，空間フィルタ，トレンドの成分の除去（Detrend）および z 変換を順に適用した．その後，前章で述べた標準化法をイメージングデータに適用した．その後，局所麻酔薬の効

果を評価するために、時系列情報を区間平均によってパラメータ化した後、それらに対してピクセル毎で統計解析を行った。

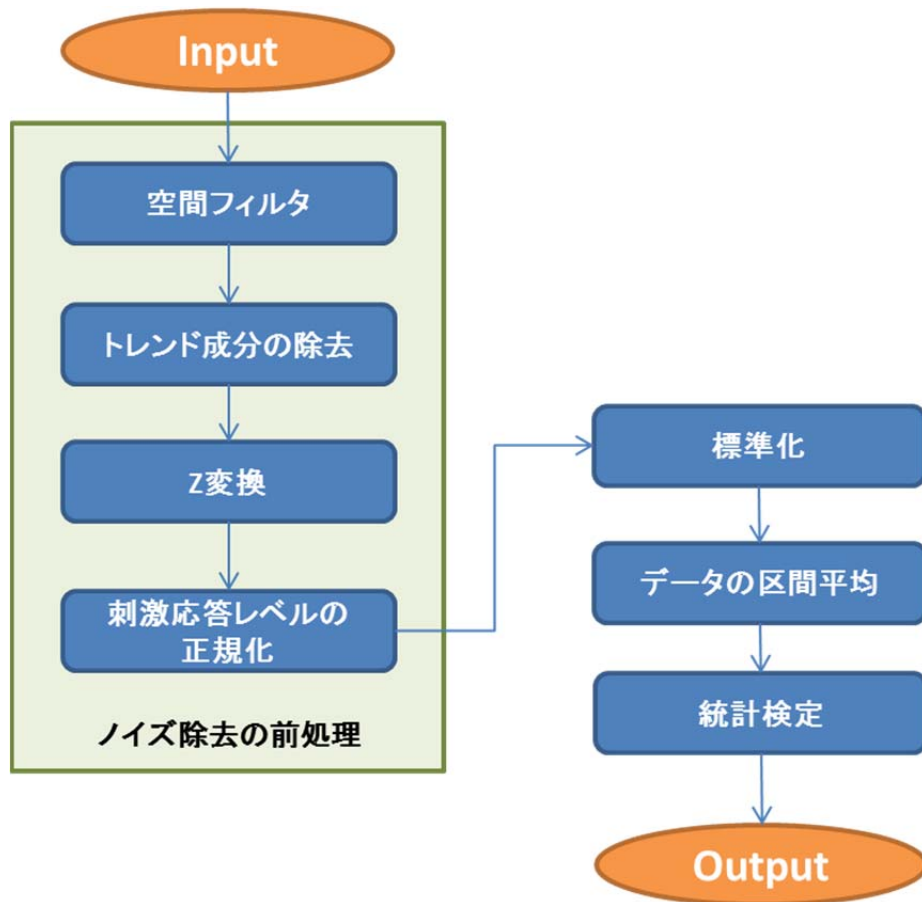


図 3.3 解析のフローチャート

記録された膜電位イメージングデータを Input とし、フローチャートに従ってノイズ除去の前処理、標準化およびデータの区間平均によって統計検定のためのパラメータマップを作成する。それらのパラメータマップについて条件間で統計検定を行い、その検定結果である統計量を標準画像上にマッピングした統計量マップを Output として得る。

### 3.3.1 空間フィルタによる画像の平滑化

膜電位イメージングデータは、空間フィルタを適用することで大幅にノイズを軽減することができる。空間フィルタとは、任意のピクセルを中心とした  $M$  行 $\times$  $N$  列の近傍画素値を用いて、対象のピクセルの画素値を変換するフィルタのことである。ここでは空間フィルタの一つであるガウシアンフィルタを適用することで平滑化を行った。ガウシアンフィルタは、ピクセルの空間的配置を考慮して、注目ピクセルに近いピクセルに大きな重みを、注目ピクセルから遠いピクセルに小さな重みを付けた重み付き平均を取り、ガウス分布の関数、

$$f(i, j) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp\left(-\frac{i^2 + j^2}{2\sigma^2}\right) \quad (3.1)$$

に従って重みを決定する。今回、フィルタ行列は以下に示す  $5 \times 5$  の行列を利用した。

$$\frac{1}{256} \begin{bmatrix} 1 & 4 & 6 & 4 & 1 \\ 4 & 16 & 24 & 16 & 4 \\ 6 & 24 & 36 & 24 & 6 \\ 4 & 16 & 24 & 16 & 4 \\ 1 & 4 & 6 & 4 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.2)$$

この  $5 \times 5$  の行列は、画像工学の分野で最もよく利用される行列である。空間フィルタ適用前と適用後のイメージングデータを図 3.4 に示す。図 3.4 は電気刺激入力直後のタイムフレームにおけるイメージングデータの空間分布と電気刺

激入力位置の近傍ピクセルにおける時系列を示している。図から確認できるように、空間フィルタ適用前はノイズレベルが非常に高いため、電気刺激による応答信号を十分に識別することが困難であった。しかし、空間フィルタを適用することで、イメージングデータの空間分布だけでなく、時系列データのノイズレベルを大きく減少させることができた。

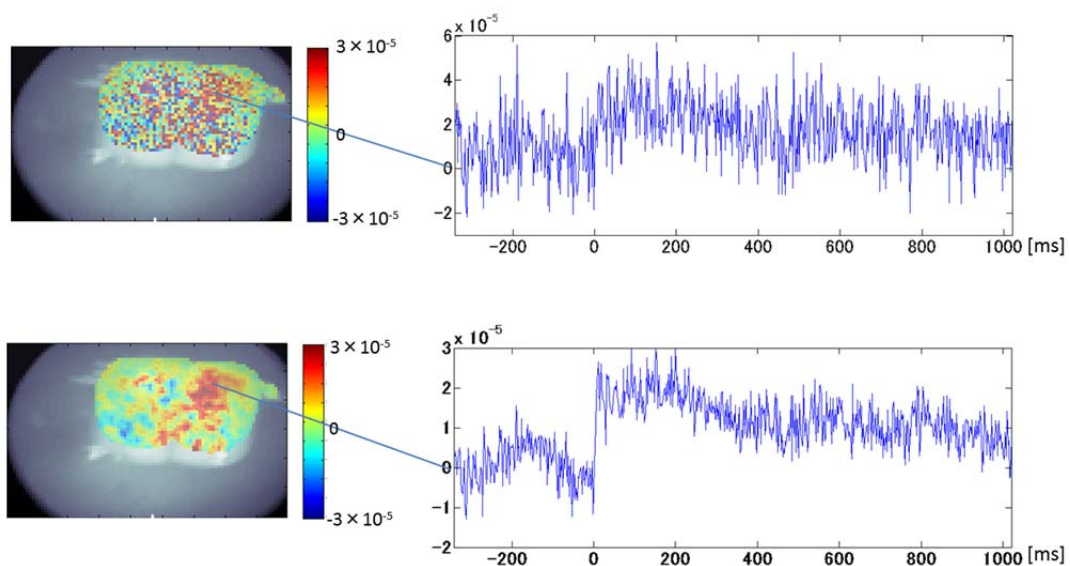


図 3.4 空間平均によるノイズの軽減

電気刺激入力直後のタイムフレームにおけるイメージングデータの空間分布と電気刺激入力位置の近傍ピクセルにおける時系列。5×5 のガウシアンフィルタの適用前（上段）と適用後（下段）のイメージングデータの空間分布と時系列を示している。

### 3.3.2 トレンド成分の除去

膜電位イメージングデータの座標 $(i, j)$ について, 時刻 $t$ のときのガウシアンフィルタ適応後の信号 $F'_{i,j}(t)$ は,

$$F'_{i,j}(t) = V_{i,j}(t) + \varepsilon_{i,j}(t) + \tau_{i,j}(t) \quad (3.3)$$

で表される.  $V_{i,j}(t)$ と $\varepsilon_{i,j}(t)$ および $\tau_{i,j}(t)$ はそれぞれ時刻 $t$ における刺激応答成分とノイズ成分およびトレンド成分を示す. 撮影したイメージングデータについて, 電気刺激による応答がないと考えられるピクセルを複数選択し, 時系列データを確認したところ, トレンド成分を回帰直線で推定が可能であることが確認された. このトレンド成分が回帰直線

$$\tau_{i,j}(t) = a_{i,j}t + b_{i,j} \quad (3.4)$$

である仮定すると, 差分 $F'_{i,j}(t) - \tau_{i,j}(t)$ をとることでトレンド成分を除去することができる. 回帰直線のパラメータ $a_{i,j}$ ,  $b_{i,j}$ は最小二乗法によって推定することができる. トレンド成分を推定する際, 電気刺激による応答がない区間(つまり $V_{i,j}(t) = 0$ となる区間)で推定することが望ましい. よって, 我々は電気刺激入力前の区間 $t < 0$ および電気刺激による応答が十分に減衰したといえる区間 $t > 800$ のデータを用いてトレンド成分の回帰直線を推定した.

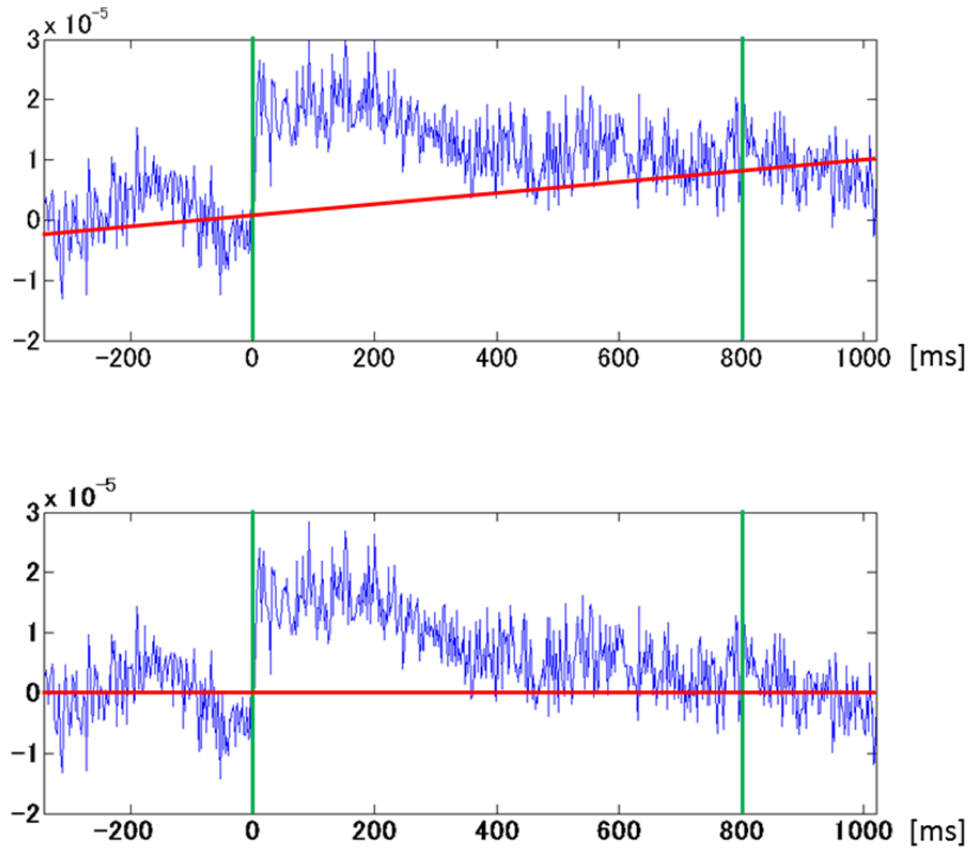


図 3.5 トレンドの除去

トレンド除去前（上段）と除去後（下段）の電位変化を示す．赤線は  $340 < t < 0, 800 < t < 1020$  の区間に含まれるデータを用いて推定したトレンド成分  $\tau_{i,j}(t)$  を示しており，トレンド成分除去後は  $\tau_{i,j}(t) = 0$  となる．

### 3.3.3 z 変換によるノイズレベルの標準化

膜電位イメージングデータはピクセルによってノイズの大きさが異なる．一部のピクセルに異常に大きなノイズが乗ってしまっていると，信号の値が高いピクセルであっても，それが電気応答によるものかノイズによるものかの区別がつかなくなる．そのため，膜電位イメージングデータ全体のノイズレベルを

標準化する必要がある。そこで我々は、ノイズレベルを標準化するために  $z$  変換を適用した。

$z$  変換とは、データが正規分布に従うとき、データを平均 0, 分散 1 の正規分布になるように変換する手法である。 $z$  変換は、

$$z = \frac{x - \hat{\mu}}{\hat{\sigma}} \quad (3.5)$$

で定義される。時刻  $t$  における  $(i, j)$  の信号について、トレンド成分を除去した値  $F''_{i,j}(t)$  は、

$$F''_{i,j}(t) = V_{i,j}(t) + \varepsilon_{i,j}(t) \quad (3.6)$$

で表される。このノイズ成分  $\varepsilon_{i,j}(t)$  が平均 0, 分散 1 になるように  $F''_{i,j}(t)$  の  $z$  変換を行う。電気刺激入力前のデータは  $V_{i,j}(t) = 0$  であり、 $F''_{i,j}(t) = \varepsilon_{i,j}(t)$  となると考えられるため、 $(i, j)$  におけるノイズ成分の平均  $\hat{\mu}_{i,j}$  および分散  $\hat{\sigma}_{i,j}$  は電気刺激入力前 ( $t < 0$ ) のデータから推定することができる。そして、推定されたパラメータ  $\hat{\mu}_{i,j}$ ,  $\hat{\sigma}_{i,j}$  を用いて、全区間のデータに  $z$  変換を適用した。図 3.6 から確認できるように、電気刺激前および刺激後について  $z$  変換を適用することで、イメージングデータ全体の信号のばらつきを低減させることができた。電気刺激直後のデータでは、電気刺激応答による信号を識別することが容易となった。

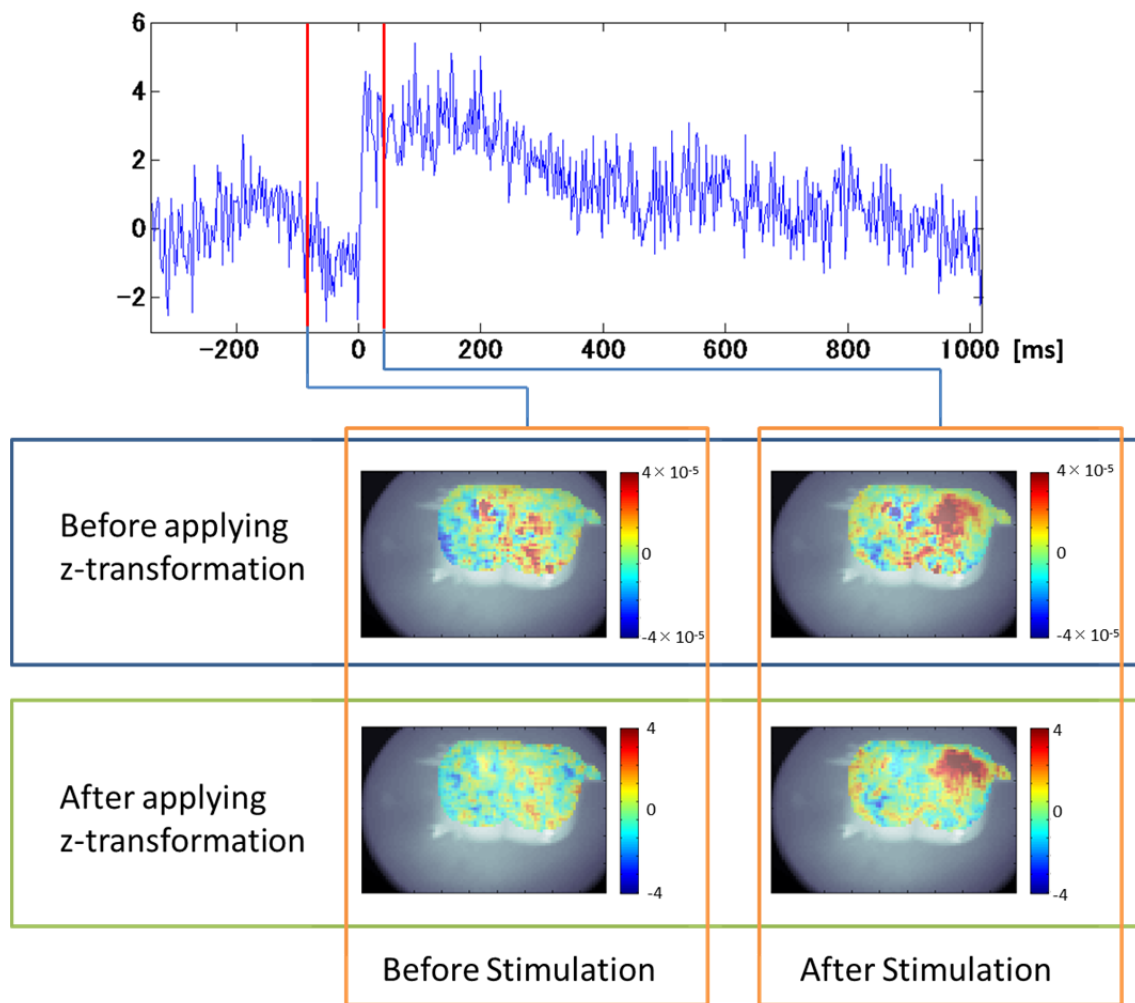


図 3.6 z 変換によるノイズレベルの正規化

電気刺激入力近傍のピクセルにおける z 変換後のイメージングデータの時系列（上段）と電気刺激入力前と入力後のイメージングデータの空間分布（下段）を示す。

### 3.3.4 電気刺激入力に対する応答レベルの標準化

全サンプルデータのイメージングデータを観察すると、全サンプルに対して一定の電圧による刺激を与えているものの、その電気刺激による応答の感度はサンプルによって異なることがわかった。例えば、低濃度の麻酔薬を投与したデータであっても、そのサンプルの電気刺激による応答の感度が非常に低い場合、高濃度の麻酔薬を投与したサンプルよりも電気刺激による応答レベルが低くなることも考えられる。そういった場合、本来は局所麻酔薬の薬効に関して濃度による主効果があるにもかかわらず、統計解析によって濃度による主効果がないと判定されることも十分に起こりうる。そのため、電気刺激入力による応答レベルをサンプル間で標準化することは非常に重要である。

今回撮影したデータは、全サンプルに対して局所麻酔薬を投与する前の control データを取得している。この control データについて、電気刺激入力直後の 0ms から 20ms の区間におけるイメージングデータの最大値が 5 となるように比例変換することで標準化を行った。また、各 control データに対応する局所麻酔薬投与後のデータについても、各 control データで標準化変換したときのパラメータによってデータの標準化を行った。

### 3.3.5 膜電位イメージングデータの標準化

今回、膜電位イメージングデータの標準化法として、前章で最も高い評価を得た AT+ADT の組み合わせ手法を採用した。はじめに、膜電位イメージングデータの背景画像から脊髄スライスの外形輪郭線を抽出する必要がある。具体的に、外形輪郭のトレースは脊髄の断面と外界もしくは脊髄側面の境界のピクセルを選択し、そのピクセルの座標情報をサンプリングすることで外形関数を得る。このとき、膜電位イメージングデータは組織画像と比較して空間解像度が非常に低いため、膜電位イメージングデータの背景画像から外形輪郭をトレースすると外形座標のサンプリング数が非常に少なくなり、正確に外形関数に近似するフーリエ級数のパラメータを推定することができない。そこで、はじめに空間解像度  $60 \times 88$  の膜電位イメージングデータを縦横等倍率（12 倍）で拡大し  $1056 \times 720$  に変換した。この際、ピクセル補間法として前章で解説したバイリニア補間法を採用した。その後、拡大した膜電位イメージングデータの背景画像から脊髄の外形輪郭をトレースし、外形座標のサンプリングを行い、フーリエ級数、

$$r_k(\theta) = \frac{a_0}{2} + \sum_{i=1}^p (a_i \cos i\theta + b_i \sin i\theta), \quad (0 \leq \theta < 2\pi) \quad (3.7)$$

について、次数  $p=10$  で近似した。次に、各サンプルから得られた外形関数を用

いて AT と ADT の変換パラメータを求め、膜電位イメージングデータの標準化を行った。このときテンプレートとして使用した外形関数は、前章で作成した組織画像 42 枚によって作成した標準画像の外形関数である。また、膜電位イメージングデータは時系列情報をもつため、標準化は各サンプルの外形関数から求めた変換パラメータを用いて、タイムフレームごとに標準化をおこなった。

### 3.3.6 データの区間平均

刺激による応答信号は、刺激直後から 20ms の区間でピークを形成し、その後 800ms までの区間で刺激前のレベルまで減衰する。局所麻酔薬の効果を検証するために、刺激直後から 20ms における応答信号のピーク値と、信号の減衰区間にある 200ms と 400ms における信号値の計 3 つの値について条件間での比較を行った。ノイズの影響を抑制するために、3 つの点についてそれぞれイメージングデータの各ピクセルについて 8ms-20ms, 150ms-250ms, 350ms-450ms の区間における平均値を求めた（データ区間は[17]を参考）。さらにそれらを標準画像上にマッピングすることで、各々のサンプルでそれぞれの区間ごとの区間平均マップを作成した（図 3.7）。

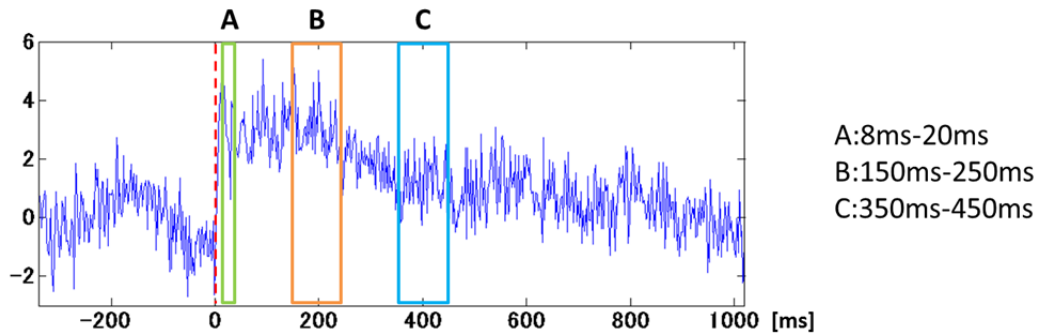


図 3.7 データの区間平均

膜電位イメージングデータの各ピクセルについて、刺激直後から 20ms における応答信号のピーク値(区間 A における平均値)と信号の減衰区間にある 200ms の信号(区間 B における平均値)および 400ms の信号(区間 C における平均値)の計 3 つの値を標準画像上にマッピングすることで、各区間における区間平均マップを作成した。

### 3.3.7 局所麻酔薬による薬理効果の統計解析

膜電位イメージングデータの区間平均マップについて、条件間の多重比較をピクセル毎で行った。このとき、標準画像上の各ピクセルに帰無仮説を立て、有意水準  $\alpha$  で検定を行うことになるが、そうすることによって棄却されてはいけない真の仮説を多く棄却してしまう。この場合、Type 1 error の確率である FWER (Familywise error rate) は有意水準  $\alpha$  を超えてしまう。FWER を保障するための方法の 1 つがボンフェローニ補正である。しかし、ボンフェローニ補正は非常に保守的であり、ピクセルごとに多重比較を行うと、帰無仮説の数が膨大となり検出力が著しく下がってしまう。そこで、有意水準  $\alpha$  を調整するための方法として FDR (False Discovery Rate) の調整を行った。FDR とは False

Discovery Rate の略で、真の帰無仮説を棄却した割合の期待を表す。FDR を制御する方法として、BH (Benjamini and Hochberg) 法がある。

BH 法では、仮説  $H_1, \dots, H_m$  がそれぞれの仮説に対応した  $p$  値  $P_1, \dots, P_m$  を持つと仮定する。本研究において、 $m$  は分析対象となるピクセル数である。さらに昇順で並べ替えられた  $p$  値を  $P_{(1)} \leq \dots \leq P_{(m)}$  と表し、 $P_{(i)}$  に相当する帰無仮説を  $H_{(i)}$  と表す。また FWER での有意水準に対応する FDR の割合を全体としてどれぐらいに抑えたいのかという基準となる値を  $q^*$  とする。このとき、BH 法は以下の手順である。

**手順1**  $i = m$  とする。

**手順2**  $P_{(i)} \leq \frac{i}{m} q^*$  を満たすならば、 $k = i$  として次へ進む。そうでなければ  $i-1$  を改めて  $i$  とおき、この手順を繰り返す。ただし、 $i=1$  まで達したのなら、どの仮説も棄却することなく終了する。

**手順3** 仮説  $H_{(i)}; i=1, 2, \dots, k$  を全て棄却する。

## 3.4 結果

リドカイン  $100\ \mu\text{M}$  を投与したサンプルの control データ ( $n=4$ ) について三つの区間で区間平均を行い、それぞれの区間平均マップについてサンプル間平均を行った。その結果を図 3.8 に掲載する。図 3.8 からわかる通り、標準化法を適用することで、局所麻酔薬の効果について標準画像上でサンプル間平均を適用することができた。また、後根の電気刺激によって誘発された活動電位を、内部構造を詳細まで確認することが可能な標準画像上で確認することができた。

電気刺激直後の 8ms-20ms の区間平均において、特に Lamina II, III で強い電気刺激応答が見られた。150ms-250ms の区間平均においては減衰傾向が見られるものの、まだ強い電気刺激応答が残存していることがわかる。しかし、さらに時間経過した 350ms-450ms の区間平均においては電気刺激応答が大きく減衰し、Lamina III 以外の層では応答信号がほとんど検出されなかった。

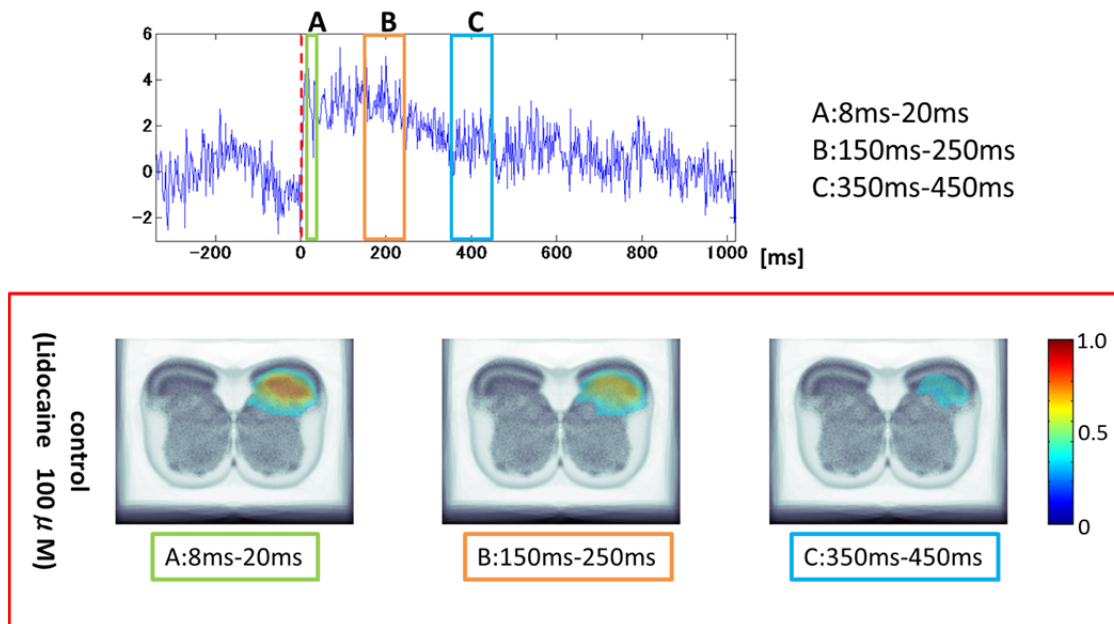


図 3.8 区間平均マップ

リドカイン 100  $\mu$ M の control データについて、それぞれのサンプルでノイズ軽減の処理を適用した後、標準化を行った。それぞれの標準化されたイメージングデータは 8ms-20ms, 150ms-250ms, 350ms-450ms の 3 区間で区間平均され、それぞれの区間のマップをサンプル間平均することで上図の区間平均マップを得た。

次に、各条件の麻酔薬を投与した際の区間平均マップを図 3.10～3.13 に示す。それぞれの条件に対して、さらに control, 投与から 10 分後、投与から 20 分後の 3 条件に分けて区間平均マップを作成した。

図 3.10 はリドカイン 100  $\mu$ M を投与した際の結果を示している。リドカイン 100  $\mu$ M 投与後、電気刺激による応答が全体的に低下していることがわかった。電気刺激後の 8-20ms の区間では、リドカイン投与後、全体的に信号強度が低下しているだけであったが、150-250ms の区間においては、後根から離れた領

域の電気信号は検出されず、後根に近い領域の信号は残存することが分かった。250-350ms の区間に置いては、リドカイン投与後、電気信号が完全に消失していることがわかる。

図 3.11 はリドカイン  $10\mu\text{M}$  を投与した際の結果を示している。濃度が低いため、 $100\mu\text{M}$  のリドカイン投与時と比較して減衰は少ない傾向であった。しかし、その中でも 150ms-250ms の区間は比較的減衰傾向が強く見られた。但し、サンプルによる形状のばらつきが非常に大きかったため、 $100\mu\text{M}$  のデータと比較して刺激に対する応答部位が大きく異なった。

図 3.12 はブピバカイン  $100\mu\text{M}$  を投与した際の結果を示している。ブピバカイン  $100\mu\text{M}$  では、リドカイン  $100\mu\text{M}$  投与時と同様に、電気刺激による応答が全体的に低下していることが分かった。また、150-250ms および 350-450ms の区間において特に強い減衰傾向が見られた。

図 3.13 はブピバカイン  $10\mu\text{M}$  を投与した際の結果を示している。ブピバカイン  $10\mu\text{M}$  投与時では、かろうじて 8ms-20ms の区間において減衰が見られたが、全体的に局所麻酔薬による減衰傾向が見られなかった。

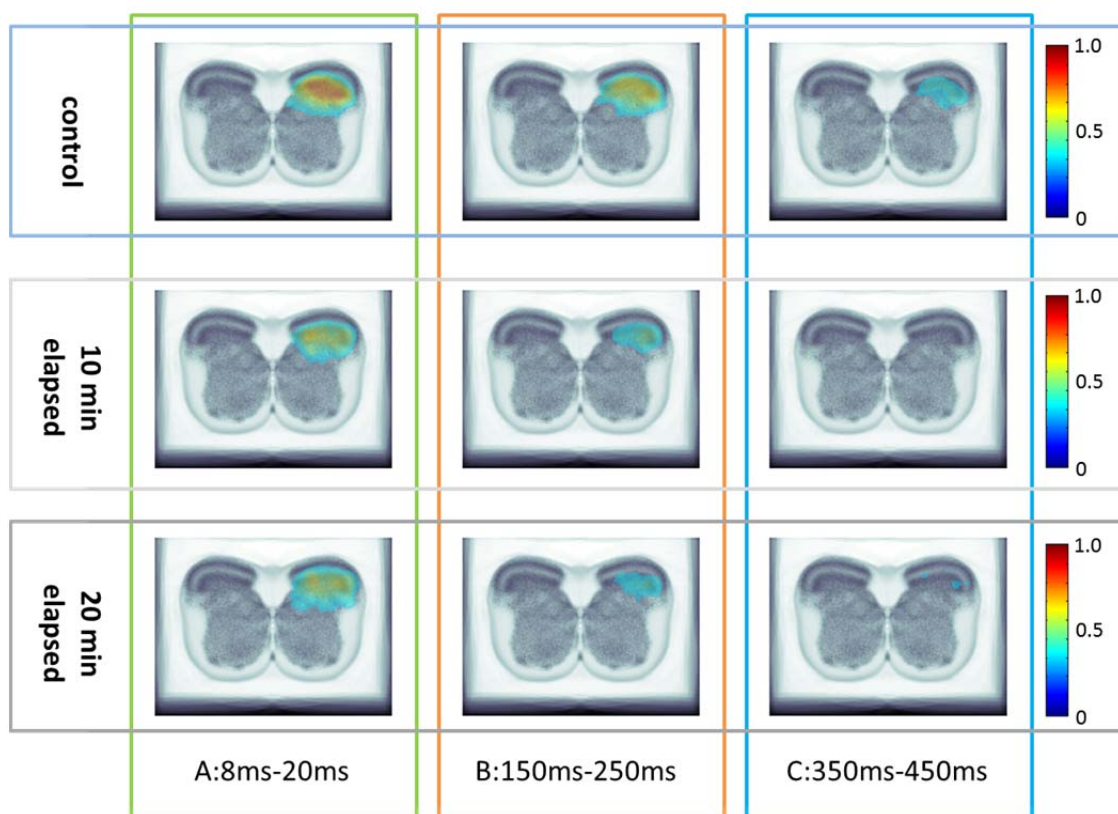


図 3.10 リドカイン  $100 \mu\text{M}$  投与時の区間平均マップ

リドカイン  $100 \mu\text{M}$  の control, 投与 10 分後, 投与 20 分後のデータについて, それぞれの標準化されたイメージングデータは 8ms-20ms, 150ms-250ms, 350ms-450ms の 3 区間で区間平均され, それぞれの区間のマップをサンプル間平均することで上図の区間平均マップを得た。

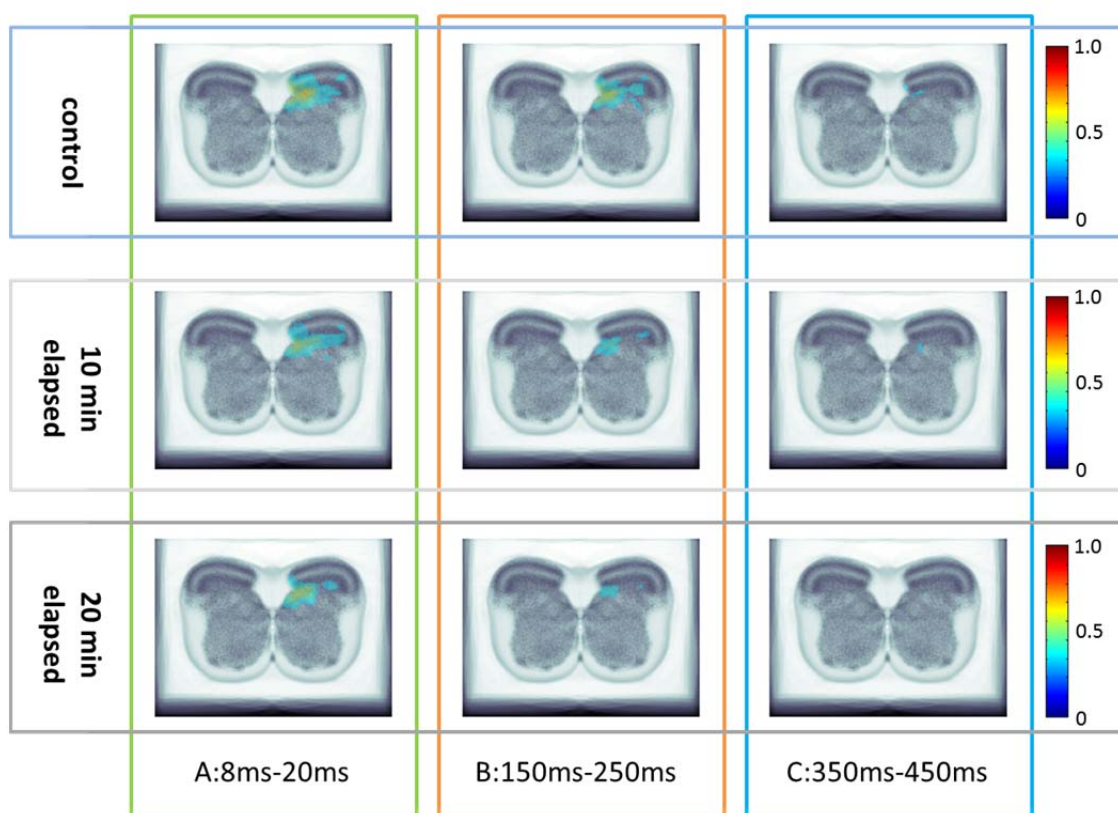


図 3.11 リドカイン  $10 \mu\text{M}$  投与時の区間平均マップ

リドカイン  $10 \mu\text{M}$  の control, 投与 10 分後, 投与 20 分後のデータについて, それぞれの標準化されたイメージングデータは 8ms-20ms, 150ms-250ms, 350ms-450ms の 3 区間で区間平均され, それぞれの区間のマップをサンプル間平均することで上図の区間平均マップを得た。

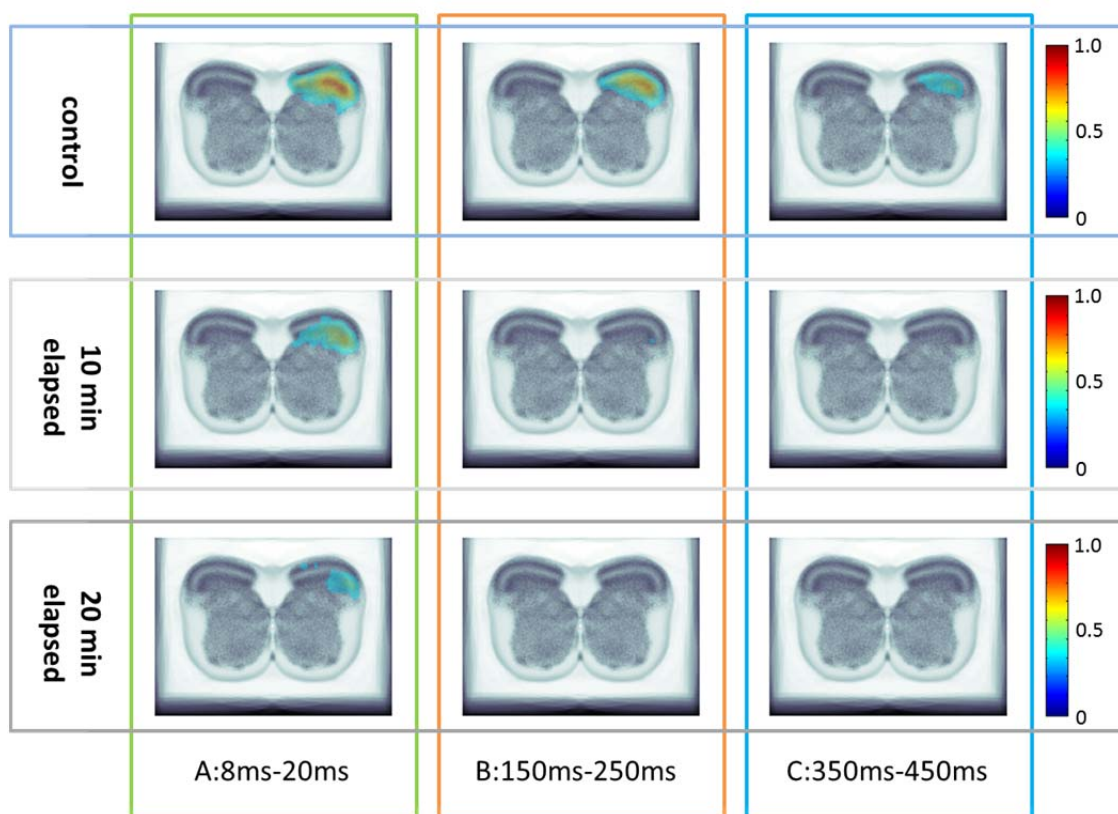


図 3.12 ブピバカイン 100  $\mu$  M 投与時の区間平均マップ

ブピバカイン 100  $\mu$  M の control, 投与 10 分後, 投与 20 分後のデータについて, それぞれの標準化されたイメージングデータは 8ms-20ms, 150ms-250ms, 350ms-450ms の 3 区間で区間平均され, それぞれの区間のマップをサンプル間平均することで上図の区間平均マップを得た。

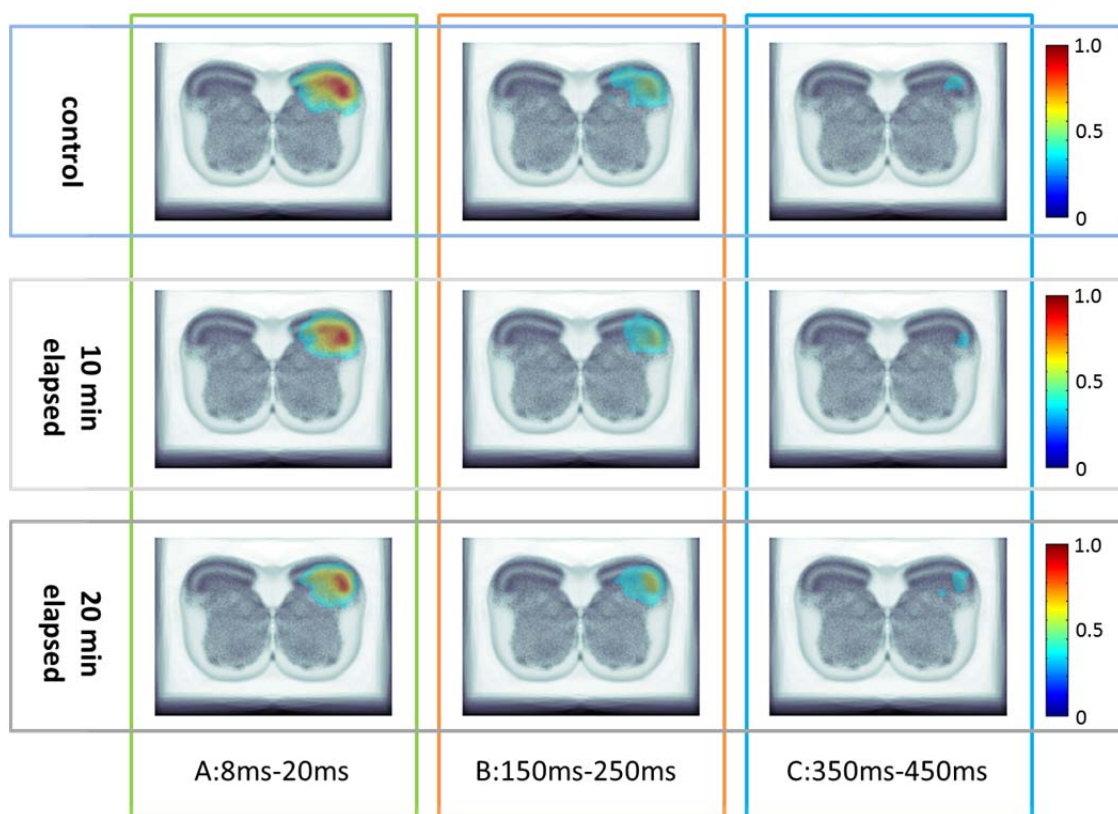


図 3.13 ブピバカイン  $10 \mu\text{M}$  投与時の区間平均マップ

ブピバカイン  $10 \mu\text{M}$  の control, 投与 10 分後, 投与 20 分後のデータについて, それぞれの標準化されたイメージングデータは 8ms-20ms, 150ms-250ms, 350ms-450ms の 3 区間で区間平均され, それぞれの区間のマップをサンプル間平均することで上図の区間平均マップを得た。

次にリドカイン  $100\ \mu\text{M}$  の区間平均マップに関して, control, 投与から 10 分後, 投与から 20 分後の 3 条件間の多重比較  $t$  検定を行った.  $t$  検定は標準画像上の Lamina I ~ VI (片側) のピクセル毎で行った. このとき, BH 法による FDR の調整を適用している ( $q^* = 0.05$ ). 図 3.14 は各条件間で多重比較を行った際に, 有意差のあるピクセルについて  $t$  値を標準画像上にマッピングした  $t$ -map を示している.

リドカイン  $100\ \mu\text{M}$  のデータにおいて, 条件間で有意差のあるピクセルが多く見られたのは, control 対投与から 10 分後と control 対投与から 20 分後であった. 特に区間 8-20ms および 150ms-250ms において, 広い領域で有意差がみられた. 一方, 区間 350ms-450ms においては, 有意差のあるピクセルはほとんど見られなかった.

同様にブピバカイン  $100\ \mu\text{M}$  の区間平均マップに関して, control, 投与から 10 分後, 投与から 20 分後の 3 条件間の多重比較  $t$  検定を行った. 図 3.15 は各条件間で多重比較を行った際の  $t$  値を標準画像上にマッピングした  $t$ -map を示している. リドカイン  $100\ \mu\text{M}$  のデータと同様に, ブピバカイン  $100\ \mu\text{M}$  のデータについても条件間で特に有意差のあるピクセルが広域で見られたのは control 対投与から 10 分後の条件と control 対投与から 20 分後の条件であっ

た。ただし、ブピバカインは区間 8-20ms および 150ms-250ms だけでなく 350ms-450ms の区間においても広域で有意差のあるピクセルが見られた。

これらの結果から、リドカインとブピバカインを比較した際、ブピバカインはリドカインと比較して、刺激後 8-20ms および 150-250ms の区間だけでなく、350-450ms の区間にも局所麻酔薬の薬理作用が働く傾向がみられた。また、リドカインは後根の近傍の Lamina I～Ⅲについては、control 対投与から 10 分後の条件で有意差のあるピクセルがほとんどみられないが、ブピバカインについては control 対投与から 10 分後の条件で後根の近傍でも有意差のあるピクセルがみられた。

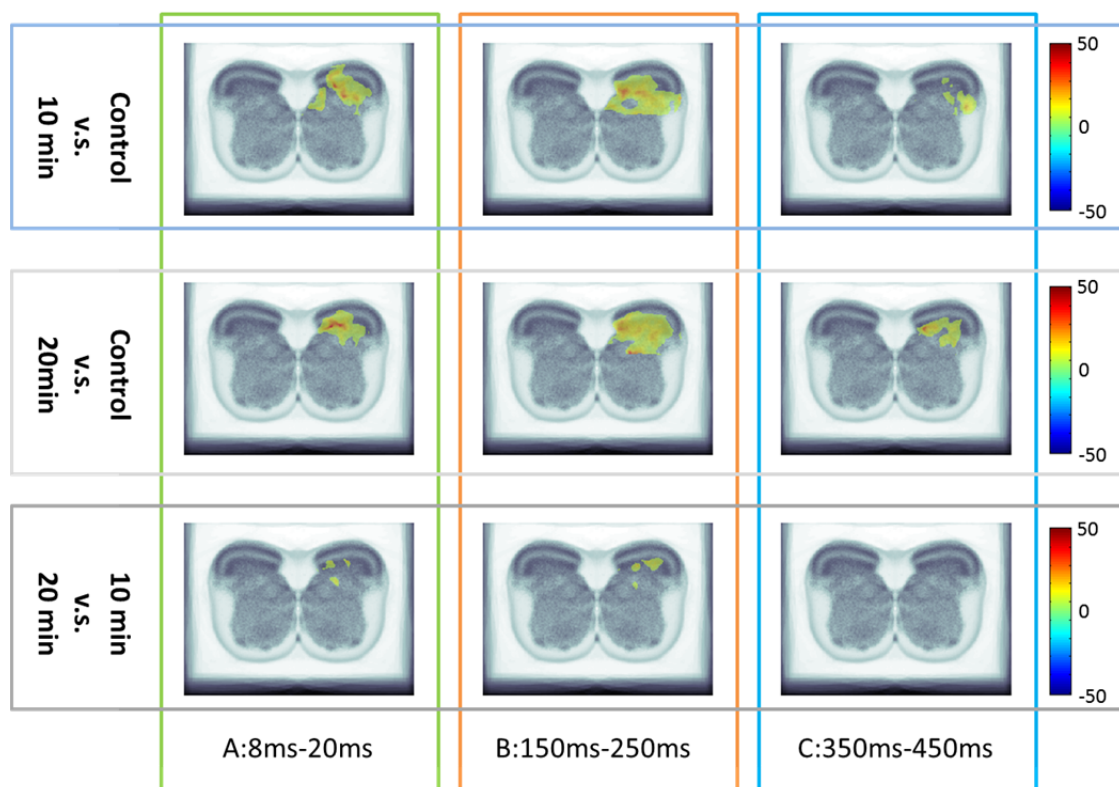


図 3.14 リドカイン  $100 \mu\text{M}$  投与時の区間平均マップの多重比較

Control, 投与から 10 分後, 投与から 20 分後の 3 条件間の多重比較  $t$  検定を行った. 上図は各条件間で多重比較を行った際に BH 法によって  $q^* < 0.05$  で有意差が見られたピクセルについて  $t$  値を標準画像上にマッピングしている.

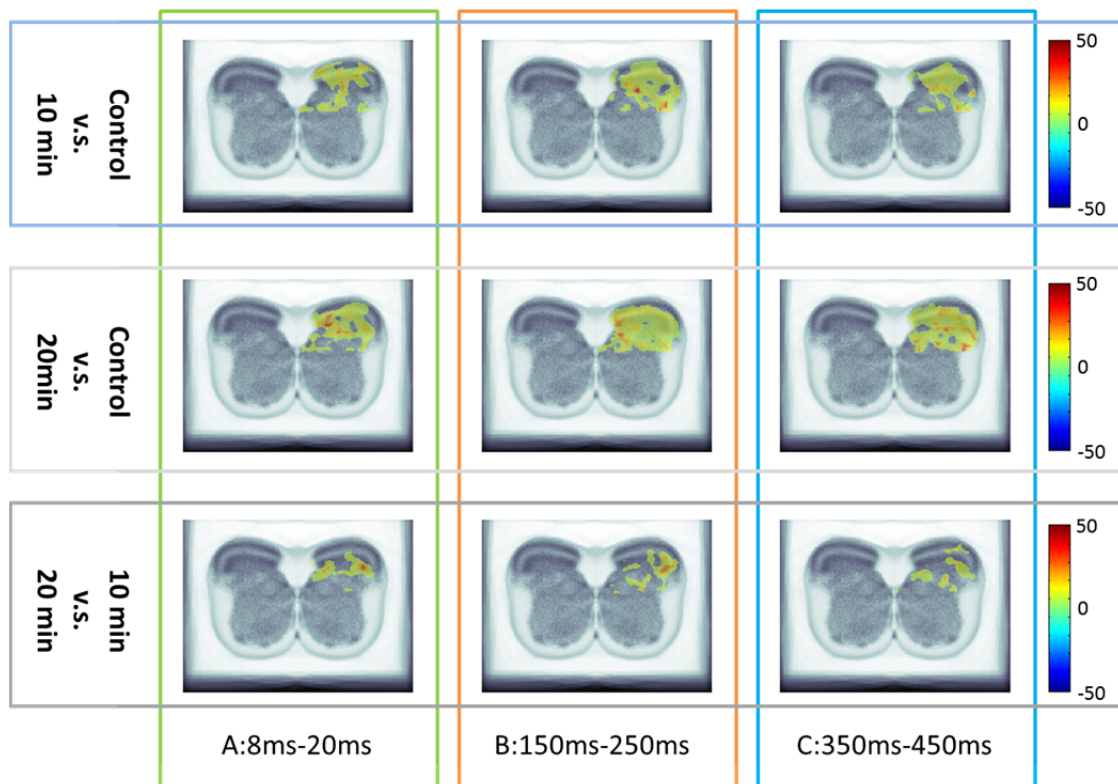


図 3.15 ブピバカイン 100  $\mu$  M 投与時の区間平均マップの多重比較

Control, 投与から 10 分後, 投与から 20 分後の 3 条件間の多重比較  $t$  検定を行った. 上図は各条件間で多重比較を行った際に BH 法によって  $q^* < 0.05$  で有意差が見られたピクセルについて  $t$  値を標準画像上にマッピングしている

## 考察

膜電位イメージング法によって得られたデータは多くのノイズやアーチファクトを含んでいるため、それらを可能な限り除去するために様々なノイズ軽減処理を適用した。これらの前処理を適用することで、後角の電気刺激によって誘発された神経活動の信号をより鮮明に確認することができた。

膜電位イメージングデータにおいて、複数のサンプルの形状を一致させるために、全てのイメージングデータについて AT+ADT 法を適用した。標準化によって全てのサンプルのイメージングデータは標準画像上に投射され、同じ条件のサンプルにおける標準化されたデータを加算平均することで、標準的な電気刺激による電位変化を示すことができた。また、局所麻酔薬の薬理効果の統計的評価に関しては、同一の局所麻酔薬かつ同一の濃度といった条件間でサンプルに対応がある場合には、標準化適用後に多重比較をすることによって統計的評価をすることができた。

これまでの脊髄断面における膜電位イメージングを利用した研究では、脊髄の灰白質構造を明確に描写することができなかったため、灰白質のどの部位が賦活していたかを理解することは困難であった。本研究において、灰白質構造が鮮明な組織画像による標準画像を用いて標準化することで、神経活動を灰白質の層構造と紐づけることができた。

しかし、異なる種類、濃度の局所麻酔薬といった条件間でサンプルに対応がない場合には、サンプル数が非常に少なく、局所麻酔薬投与前（control）のイメージングデータの空間分布に大きなばらつきがあったため、統計的評価をすることが困難であった。これは、サンプル数を増やすことで解決できる問題である。各条件のサンプル数を増やす場合、同様の前処理を適用し、標準化することで、容易にデータの追加が可能である。今後は、サンプルを追加し、標準化法を用いて解析することで、さらなる局所麻酔薬の薬理効果の解明を目指したい。

## 第 4 章

### 総論

#### 4.1 まとめ

本研究では, はじめに脊髓断面画像における解剖学的標準化法の開発を行った. 脊髓断面画像における解剖学的標準化法では, 灰白質の各層を同一ピクセル群上で一致させることが重要であった. しかし, 膜電位イメージングデータ上からは灰白質の層構造を確認することは難しかったため, 外形輪郭線と中心管の座標のみの情報を用いて座標変換を行う標準化法 3 種 (AT, ADT, AT+ADT) を提案した. さらにそれらの手法組織画像を用いて評価したところ, AT+ADT は AT と ADT のそれぞれの欠点を補う形で高い層構造識別能力を発揮することが分かった.

次に脊髓における局所麻酔薬の薬理作用を解明するために, 膜電位イメージング法を用いて脊髓における局所麻酔薬投与前と投与後の電位変化を記録し, それらのデータの解析を行った. その際, 複数のサンプルの形状を一致させるために全ての膜電位イメージングデータについて AT+ADT 法を適用した. 標準

化によって全てのサンプルのイメージングデータは標準画像上に投射され、同じ条件のサンプルにおける標準化されたデータを加算平均することで、標準的な電気刺激による電位変化を示すことができた。

これまでの脊髄断面における膜電位イメージングを利用した研究では、脊髄の灰白質構造を明確に描写することができなかったため、灰白質のどの部位が賦活していたかを理解することは困難であった。しかし、本研究において、灰白質構造が鮮明な組織画像による標準画像を用いて標準化することで、神経活動を灰白質の層構造と紐づけることができた。

局所麻酔薬の薬理効果に関しては、同一の局所麻酔薬かつ同一の濃度といった条件間でサンプルに対応がある場合には、標準化適用後に多重比較をすることによって統計的評価をすることができた。しかし、異なる種類、濃度の局所麻酔薬といった条件間でサンプルに対応がない場合には、サンプル数が非常に少なく、局所麻酔薬投与前（control）のイメージングデータの空間分布に大きなばらつきがあったため、統計的評価をすることが困難であった。

## 4.2 今後の課題

本研究では、ラット脊髄断面画像の解剖学的標準化法の開発を行った。特に日齢 4~5 日の幼少ラットを用い、脊髄の断面は C4 に限定して標準画像を作成

し、標準化法の識別精度の評価を行った。当然、脊髄の位置によって灰白質の内部構造は異なり、また年齢によって脊髄の内部構造は大きく変化する。よって、C4 以外の位置のデータや異なる年齢のラットを用いたデータを標準化する場合には、それらの条件に合った標準画像を使用する必要がある。

また、我々は脊髄の横断面における外形輪郭線を、画像処理技術を用いた自動抽出ではなく手動によって抽出した。これは、膜電位イメージングデータに応用する際に膜電位イメージングデータの空間解像度がとても低かったため、脊髄の外形を自動抽出することが困難であったためである。例えば断面に対して斜め上方からカメラで撮影した場合、脊髄の横断面と側面が画像上に写るが、解像度が低いため断面と側面の境界を見分けることが困難であるため、いくつかのエッジ自動抽出技術を適用したものの外形の輪郭線の抽出精度は手動に遠く及ばなかった。外形の輪郭線手動抽出は非常に手間がかかる作業であるため、自動化技術を開発することは非常に重要であることから、今後は膜電位イメージングデータにおける脊髄断面の外形輪郭線自動抽出アルゴリズムを開発していきたい。

3.2.7 節の標準化手法のベンチマークテストにおいて、外形輪郭線をフーリエ級数近似で行う際に、周期の始点および終点付近ではフーリエ級数近似による外形輪郭線と実際の外形輪郭線とのずれが大きくなりやすく、その付近での角

度依存スケーリングによる補正が十分に機能しないことが分かった。そのため、外形輪郭線の平滑化法を改善する必要がある。閉曲線に必要な周期性および周期の始点および終点付近のずれを少なくする方法の一つとして、楕円フーリエによる近似が考えられる。

本研究の標準化法を脳へ適用する場合は、中心管の代わりに中心点として、脳構造を定めることができる。具体的には、延髄と橋では第四脳室底の正中部の窪んだ点 (the midline of the fourth ventricle floor) , 中脳では中脳水道 (Aqueduct of Sylvius) , それよりも吻側の脳 (間脳) では第三脳室の腹側正中部の窪んだ点 (the midline of the third ventricle floor) を、それぞれ「中心点」として、脳にも応用できるであろう。

局所麻酔薬の薬理効果の評価では、各条件のサンプル数が非常に少なかったため、サンプルに対応のない条件間で統計的評価を行うことが困難であった。これは、サンプル数を増やすことで解決できる問題である。各条件のサンプル数を増やす場合、同様の前処理を適用し標準化することで、容易にデータの追加が可能である。今後は、サンプルを追加した上で標準化法を用いて解析することで、さらなる局所麻酔薬の薬理効果の解明を目指したい。

## 謝辞

本研究の遂行および論文の執筆にあたり、主任指導教員である複合科学研究科統計科学専攻三分一史和准教授には、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました。謹んで感謝の意を表します。2010年3月をもって御退職されるまで主任指導教官をして頂きました石黒真木夫教授には、本研究の遂行にあたり、貴重なご助言を頂きました。心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、国立病院機構村山医療センター岡田泰昌医長、兵庫医科大学越久仁敬教授、島根大学横田茂文講師、複合科学研究科統計科学専攻田村義保教授から数々の貴重なご助言とご指導を賜りましたこと、深謝申し上げます。さらに、島根大学横田茂文講師からはラット脊髄断面の組織画像を、国立病院機構村山医療センター岡田泰昌医長からは局所麻酔薬実験のデータを提供して頂きました。これらのデータは本研究を遂行するために必要不可欠であり、データ提供がなければ本研究を始めることはできませんでした。心より御礼申し上げます。

本論文の審査過程において、総合研究大学院大学および統計数理研究所の田村義保教授、石黒真木夫名誉教授、瀧澤由美准教授、三分一史和准教授、国立病院機構村山医療センター岡田泰昌医長、兵庫医科大学越久仁敬教授、東海大学染谷博司講師には、ご多忙中貴重な時間を割いて本論文の審査員を引き受けてくださり、適切な助言を頂きましたことを、厚く御礼を申し上げます。

また、著者が総合研究大学院大学に在籍中には、統計数理研究所の皆様、総合研究大学院大学統計科学専攻の皆様に大変お世話になりました。ここに感謝の意を表します。

## 参考文献

1. Sugiura M, Kawashima R, Sadato N, Senda M, Kanno I, et al. (1999) Anatomic validation of spatial normalization methods for PET. *J Nucl Med* 40: 317-322.
2. Roland PE, Graufelds CJ, Wählin J, Ingelman L, Andersson M, et al. (1993) Human brain atlas: For high-resolution functional and anatomical mapping. *Hum Brain Mapp* 1: 173-184.
3. Friston KJ, Ashburner J, Frith CD, Poline JB, Heather JD, et al. (1995) Spatial registration and normalization of images. *Hum Brain Mapp* 3: 165-189.
4. Friston KJ, Holmes AP, Worsley KJ, Poline JP, Frith CD, et al. (1994) Statistical parametric maps in functional imaging: A general linear approach. *Hum Brain Mapp* 2: 189-210.
5. Minoshima S, Koeppe RA, Frey KA, Kuhl DE (1994) Anatomic standardization: linear scaling and nonlinear warping of functional brain images. *Journal of nuclear medicine. J Nucl Med* 35: 1528-1537.
6. Jenkinson M, Smith S (2001) A global optimisation method for robust affine registration of brain images. *Med Image Anal* 5: 143-156.
7. Cachier P, Mangin J-F, Pennec X, Rivière D, Papadopoulos-Orfanos D, et al. (2001) Multisubject non-rigid registration of brain MRI using intensity and geometric features. In: Niessen M, Viergever W, editors. *MICCAI 2001, LNCS 2208*. Berlin/Heidelberg: Springer. pp. 734-742.
8. Gaens T, Maes F, Vandermeulen D, Suetens P (1998) Non-rigid multimodal image registration using mutual information. In: Wells W, Colchester A, Delp S, editors, *MICCAI 1998, LNCS 1496*.

- Berlin/Heidelberg: Springer. pp. 1099-1106.
9. Chui H, Rangarajan A (2003) A new point matching algorithm for non-rigid registration. *Comput Vis Image Underst* 89: 114-141.
  10. Davatzikos C (1997) Spatial Transformation and Registration of Brain Images Using Elastically Deformable Models. *Comput Vis Image Underst* 66: 207-222.
  11. Hartkens T, Hill D, Castellano-Smith A, Hawkes D, Maurer C, et al. (2002) Using points and surfaces to improve voxel-based non-rigid registration. *MICCAI 2002, LNCS 2489*. In: Dohi T, Kikins R, editors, Berlin/Heidelberg: Springer, pp. 565-572.
  12. Dinggang S, Davatzikos C (2002) HAMMER: hierarchical attribute matching mechanism for elastic registration. *IEEE Trans Med Imaging* 21: 1421-1439.
  13. Krücker JF, Meyer CR, LeCarpentier GL, Fowlkes JB, Carson PL (2000) 3D spatial compounding of ultrasound images using image-based nonrigid registration. *Ultrasound Med Biol* 26: 1475-1488.
  14. Shekhar R, Zagrodsky V (2002) Mutual information-based rigid and nonrigid registration of ultrasound volumes. *IEEE Trans Med Imaging* 21: 9-22.
  15. Schnabel J, Rueckert D, Quist M, Blackall J, Castellano-Smith A, et al. (2001) A Generic Framework for Non-rigid Registration Based on Non-uniform Multi-level Free-Form. *MICCAI 2001, LNCS 2208*. In: Niessen W, Viergever M, editors, Berlin/Heidelberg: Springer, pp. 573-581.
  16. Schnabel JA, Tanner C, Castellano-Smith AD, Degenhard A, Leach MO, et al. (2003) Validation of nonrigid image registration using

- finite-element methods: application to breast MR images. *IEEE Trans Med Imaging* 22: 238-247.
17. Aoyama R, Okada Y, Yokota S, Yasui Y, Fukuda K, et al. (2011) Spatiotemporal and anatomical analyses of P2X receptor-mediated neuronal and glial processing of sensory signals in the rat dorsal horn. *Pain* 152: 2085-2097.
  18. Yoshida H, Okada Y, Maruiwa H, Fukuda K, Nakamura M, et al. (2003) Synaptic blockade plays a major role in the neural disturbance of experimental spinal cord compression. *J Neurotrauma* 18: 1365-1376.
  19. Fukuda K, Okada Y, Yoshida H, Aoyama R, Nakamura M, et al. (2006) Ischemia-induced disturbance of neuronal network function in the rat spinal cord analyzed by voltage-imaging. *Neuroscience* 140: 1453-1465.
  20. Oku Y, Masumiya H, Okada Y (2007) Postnatal developmental changes in activation profiles of the respiratory neuronal network in the rat ventral medulla. *J Physiol* 585: 175-186.
  21. Oku Y, Kimura N, Masumiya H, Okada Y (2008) Spatiotemporal organization of frog respiratory neurons visualized on the ventral medullary surface. *Respir Physiol Neurobiol* 161: 281-290.
  22. Okada Y, Masumiya H, Tamura Y, Oku Y (2007) Respiratory and metabolic acidosis differentially affect the respiratory neuronal network in the ventral medulla of neonatal rats. *Eur J Neurosci* 26: 2834-2843.
  23. Miwakeichi F, Oku Y, Okada Y, Kawai S, Tamura Y, et al. (2011) Detection and visualization method of dynamic state transition for biological spatio-temporal imaging data. *IEEE Trans Med Imaging* 30:

- 859-866.
24. Kawai S, Oku Y, Okada Y, Miwakeichi F, Tamura Y, et al. (2009) A novel statistical analysis of voltage-imaging data by structural time series modeling and its application to the respiratory neuronal network. *Neurosci Res* 63: 165-171.
  25. Tasaki I, A Watanabe, R. Sandilin, and L. Carnay (1968) Changes in fluorescence, turbidity, and birefringence associated with nerve excitation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 61: 883-888.
  26. Black KJ, Snyder AZ, Koller JM, Gado MH, Perlmutter JS (2001) Template images for nonhuman primate neuroimaging: 1. Baboon. *Neuroimage* 14: 736-743.
  27. Black KJ, Koller JM, Snyder AZ, Perlmutter JS (2001) Template images for nonhuman primate neuroimaging: 2. Macaque. *Neuroimage* 14: 744-748.
  28. Schweinhardt P, Fransson P, Olson L, Spenger C, Andersson JL (2003) A template for spatial normalisation of MR images of the rat brain. *J Neurosci Methods* 129: 105-113.
  29. Akaike H (1973) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Information Theory*, In: Petrov B N, Caski F, editors, Budapest: Akadimiai Kiado, pp.267-281.
  30. 松木明知 (1990) 日本麻酔科学史資料 4 克誠堂出版
  31. Stoleting RK. (1999) *Pharmacology and physiology in anesthetic practice*. 3rd ed.
  32. Furutani K, Ikoma M, Ishii H, Baba H, Kohno T. (2010) Bupivacaine inhibits glutamatergic transmission in spinal dorsal horn neurons. *Anesthesiology* 112 (1) : 138-143.

33. Stephan K, Corinna M, Eberhard K, Matthias E, Rainer H, Gerhard R (2012) Xenon attenuates hippocampal long-term potentiation by diminishing synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor currents. *Anesthesiology* 116 (3) : 673-682

## 付録 1 フーリエ級数の最小二乗法

区間 $[0, 2\pi]$ で定義された外形関数 $R(\theta)$ について, フーリエ級数,

$$r_k(\theta) = \frac{a_0}{2} + \sum_{i=1}^p (a_i \cos i\theta + b_i \sin i\theta) \quad (1)$$

最小二乗法で近似することを考える.  $R_k(\theta)$ と $r_k(\theta)$ の二乗平均誤差を

$$E_k(a_0, \dots, a_p; b_1, \dots, b_p) = \int_0^{2\pi} [R_k(\theta) - r_k(\theta)]^2 d\theta \quad (2)$$

と定義したとき,  $E_k(a_0, \dots, a_p; b_1, \dots, b_p)$ を最小とするようなフーリエ級数のパラメータ $a_0, a_1, \dots, a_p$ および $b_1, \dots, b_p$ を求める.  $E_k(a_0, \dots, a_p; b_1, \dots, b_p)$ の最小値は, それぞれのパラメータで偏微分した値が0になるときに得られる. つまり,

$$\begin{aligned} \frac{\partial E}{\partial a_0} = 0, \frac{\partial E}{\partial a_1} = 0, \dots, \frac{\partial E}{\partial a_p} = 0 \\ \frac{\partial E}{\partial b_1} = 0, \dots, \frac{\partial E}{\partial b_p} = 0 \end{aligned} \quad (3)$$

を満たすような $a_k$ および $b_k$ を求めればよい.

準備として,  $a_k$ および $b_k$ を求めるために重要な三角関数の公式を以下に示す.

$$\int_0^{2\pi} \cos nx \cos mx dx = \int_0^{2\pi} \sin nx \sin mx dx = \begin{cases} \pi (n = m) \\ 0 (n \neq m) \end{cases} \quad (4)$$

$$\int_0^{2\pi} \sin nx \cos mx dx = 0 \quad (5)$$

$$\int_0^{2\pi} \sin nx dx = \int_0^{2\pi} \cos nx dx = 0 \quad (6)$$

はじめに二乗誤差が最小となる  $a_0$  を求める.

$$\frac{\partial E}{\partial a_0} = -\frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} 2 \left[ R_k(\theta) - \left\{ \frac{a_0}{2} + \sum_{i=1}^p (a_i \cos i\theta + b_i \sin i\theta) \right\} \right] \frac{1}{2} d\theta \quad (7)$$

式 (6) より,

$$\begin{aligned} &= -\frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \left\{ R_k(\theta) - \frac{a_0}{2} \right\} d\theta \\ &= -\frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} R_k(\theta) d\theta + \frac{a_0}{2} = 0 \end{aligned}$$

となる. ゆえに,

$$a_0 = \frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} R_k(\theta) d\theta \quad (8)$$

となる.

次に二乗平均誤差が最小となる  $a_k$  ( $k=1, \dots, p$ ) を求める.

$$\frac{\partial E}{\partial a_k} = -\frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} 2 \left[ R_k(\theta) - \left\{ \frac{a_0}{2} + \sum_{i=1}^p (a_i \cos i\theta + b_i \sin i\theta) \right\} \right] \cos k\theta d\theta \quad (9)$$

式 (2.5), (2.6), (2.7) を用いると,

$$\begin{aligned}
&= -\frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} R_k(\theta) \cos k\theta d\theta + \frac{a_k}{\pi} \int_0^{2\pi} \cos k\theta \cos k\theta d\theta \\
&= -\frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} R_k(\theta) \cos k\theta d\theta + a_k = 0
\end{aligned}$$

したがって,

$$a_k = -\frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} R_k(\theta) \cos k\theta d\theta \quad (10)$$

となる.

同様に, 二乗平均誤差が最小となる  $b_k$  ( $k=1, \dots, p$ ) を求めると,

$$\begin{aligned}
\frac{\partial E}{\partial b_k} &= -\frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} 2 \left[ R_k(\theta) - \left\{ \frac{a_0}{2} + \sum_{i=1}^p (a_i \cos i\theta + b_i \sin i\theta) \right\} \right] \sin k\theta d\theta \quad (11) \\
&= -\frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} R_k(\theta) \sin k\theta d\theta + b_k = 0
\end{aligned}$$

となり,

$$b_k = -\frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} R_k(\theta) \sin k\theta d\theta \quad (12)$$

となる.

一般的に、外形輪郭のトレースによって得られる  $R_k(\theta)$  は離散値となるため、フーリエ級数近似における各パラメータの推定は数値積分によって求める必要がある。今回、フーリエ級数の各パラメータは外形輪郭をトレースしたデータに対して台形公式を用いることで推定した。台形公式は、フーリエ係数の計算フーリエ係数の計算に対して最良公式であるといわれている。本研究において、台形公式を用いてフーリエ級数の各パラメータを求める場合、外形輪郭のトレースによって外形輪郭上の座標をより多くサンプリングすることで、高い精度での定積分の近似計算をすることができる。ただし、画像データの空間解像度が非常に低い場合、サンプリング可能な外形輪郭上の座標が非常に少なくなってしまうため、一度、画像データを拡大することで空間解像度を上げ、外形輪郭上の座標のサンプリング数を増やすことが望ましい。

## 付録2 Matlab による角度依存変換 (ADT) のプログラム

以下に Matlab で作成した角度依存変換 ADT のプログラムを掲載する.

=====

```
clear all
```

```
% 変換するファイル名の読み込み
```

```
FID = fopen ('./VSDI image/filelist.txt') ;
```

```
% 変換するファイル数を指定
```

```
FN = 15;
```

```
% 外形輪郭データの読み込み
```

```
for i = 1:FN
```

```
    filename = fgets (FID) ;
```

```
    filename = strcat ('./VSDI image/paper/bmp_edge/', filename, '.bmp') ;
```

```
    [xx, yy (i, :) , edge] = cul_rfitagraph (filename) ;
```

```
End
```

```
fclose (FID) ;
```

```
% 外形関数をフーリエ級数で近似
```

```
% Fourier (yy, p, FN) : 外形関数をフーリエ級数で近似する関数
```

```
[yy_f, delta_theta] = Fourier (yy, 20, FN) ;

% 外形関数について回転補正をする

for i = 1:FN
    for j = 1:62832
        rotation2 (i) = pi_domain ( (j - 31415) * 0.0001 + yy_theta (i) ) ;

        yy_f2 (i, j) = yy_f (i, rotation2 (i) ) ;

    end
end

% 標準テンプレートの作成

yy_mean = mean (yy_f2) ;

% 角度依存スケーリングパラメータの設定

for i = 1:FN
    yy_r (i, :) = yy_f2 (i, :) ./ yy_mean ;
end

% 外形関数のプロット

subplot (2, 2, 1) ; plot (xx, yy_f) ;

subplot (2, 2, 2) ; plot (xx, yy_f2) ;

subplot (2, 2, 3) ; plot (xx, yy_mean) ;
```

---

```

subplot (2, 2, 4) ;plot (xx, yy_r) ;

% 画像変換用の配列を定義する.

% 生データから縦横それぞれ12倍のピクセル数を用意する.

% データ変換に必要な極座標系の原点は用意した配列の中心とする.

x_temp = 960;
y_temp = 1280;

o_temp = [480, 640];

FID = fopen ('./VSDI image/filelist.txt') ;

for h = 1:FN
h

% IMG_TEMP (x, y, K) : 画像変換用の配列

% K = 1 ~ 11 : 各レイヤー

%      12 : r
%      13 :  $\theta$ 
clear IMG_TEMP IMG_TEMP2
clear IMG_OPE

IMG_TEMP = zeros (x_temp, y_temp, 3) ;

IMG_TEMP2 = zeros (x_temp, y_temp, 2) ;

```

```

filename = fgets (FID) ;

filename = strcat (filename, '.bmp') ;

% 生画像データを読み込む.

filename_edge = strcat ('./VSDI image/paper/mat_raw_ma3x3_detrend_n_parameter_zoom/',

filename) ;

filename_edge

filename_edge = strrep (filename_edge, 'bmp', 'mat') ;

load (filename_edge) ;

IMG_RAW2 = o_data;    %

filename_edge = strcat ('./VSDI image/paper/bmp_edge/', filename) ;

% 生画像データの極座標系の原点座標を読み込む

IMG = imread (filename_edge, 'bmp') ;

[x, y, z] = size (IMG) ;

IMG_OPE = double (IMG) ;

% エッジ画像の座標を保存する.

% red : エッジの座標

```

```
% green : 基準点となる座標

% blue : r-θ座標系の原点となる座標

for i = 1:x
    for j = 1:y
        if IMG_OPE (i, j, 3) > 200

            blue = [i, j];

        end
    end
end

% 画像変換の主要部

for i = 1 : x_temp
    for j = 1 : y_temp

        % 変換用配列のrとθを定義する.

        % ピクセル数を10*10倍しているので, rは1/10倍する.

        %IMG_TEMP (i, j, 4) = 0.1 * sqrt ( (o_temp (1) -i) ^2+ (j-o_temp (2) ) ^2) ;

        IMG_TEMP2 (i, j, 1) = sqrt ( (o_temp (1) -i) ^2+ (j-o_temp (2) ) ^2) ;

        IMG_TEMP2 (i, j, 2) = atan2 (o_temp (1) -i, j-o_temp (2) ) ;

        % 変換用配列のrとθに変換係数を乗算する.

        theta_temp = IMG_TEMP2 (i, j, 2) ;

        %theta_temp2 = pi_domain (theta_temp) ;
```

---

```

% pi_domain :  $\theta$ を定義域内 ( $-\pi < \theta < \pi$ ) に収まるように変換し,

% その $\theta$ に対応する配列番号を返す関数.

rr_temp = yy_r (h, pi_domain (theta_temp-2*delta_theta (h) ) ) *IMG_TEMP2

(i, j, 1) ;

xx_temp = rr_temp * sin (theta_temp+yy_theta (h) ) ;

yy_temp = rr_temp * cos (theta_temp+yy_theta (h) ) ;

xx_temp = - xx_temp + blue (1) ;

yy_temp = yy_temp + blue (2) ;

%ニアレストネイバー補間

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% if xx_temp >= 1 && xx_temp <= x_temp && yy_temp >= 1 && yy_temp <= y_temp
%         for k = 1:12
%
%             IMG_TEMP(i,j,k) = IMG_RAW2(round(xx_temp),round(yy_temp),
k) ;

%         end
%     end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%バイリニア補間

```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
if xx_temp >= 1 && xx_temp <= x_temp && yy_temp >= 1 && yy_temp <= y_temp

    dx = xx_temp - floor (xx_temp) ;

    dy = yy_temp - floor (yy_temp) ;

    for k = 1:3

        A = IMG_RAW2 (floor (xx_temp) , floor (yy_temp) , k) * (1-dy) +

IMG_RAW2 (floor (xx_temp) , ceil (yy_temp) , k) * dy;

        B = IMG_RAW2(ceil(xx_temp),floor(yy_temp),k) * (1-dy) + IMG_RAW2

(ceil (xx_temp) , ceil (yy_temp) , k) * dy;

        IMG_TEMP (i, j, k) = A* (1-dx) + B* dx;

    end
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
end
end

% 変換した画像の配列を定義する

%IMG_NEW = zeros (x_temp, y_temp, 3) ;

%for i = 1:3

%    IMG_NEW (:, :, i) = IMG_TEMP (:, :, i) ;

%end

% 内部データをdouble型からuint8型に変換する.

%IMG_NEW = uint8 (IMG_NEW) ;

```

```
%figure;

%imshow (IMG_NEW) ;

filename_trans = strcat ('./bmp/graymat/', filename, '_trans.bmp') ;

%imwrite (IMG_NEW, filename_trans, 'BMP') ;

    pm = IMG_TEMP (:, :, 1:3) ;

    filename3 = strcat ('./VSDI
image/paper/mat_raw_ma3x3_detrend_n_parameter_zoom_trans/', filename) ;

    filename3 = strrep (filename3, 'bmp', 'mat') ;

    filename3
    save (filename3, 'pm') ;

end

fclose (FID) ;

=====
```