

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659656

研究課題名(和文) 頭蓋骨基準点を含むミニブタ拡張標準脳の作成

研究課題名(英文) The development of the extended normalized brain data, which includes reference points on the skull.

研究代表者

渡辺 英寿 (Watanabe, Eiju)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50150272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ミニブタが脳研究に用いられるようになってきたが、脳アトラスなどのミニブタの脳の研究基盤はいまだ十分とは言えない。そのため、我々はミニブタの拡張標準脳の作成を試みた。脳とその周辺の頭蓋骨を含む構造の標準化を行うため6頭のミニブタのCTとMRI画像を基に、CTデータから頭蓋骨の特徴点を抽出した。脳の特徴点は脳の標本で検証する必要があったため、現在も作業中であるが、これを確立すれば標準脳を作成することができると思われる。

研究成果の概要(英文)：The pig is increasingly used in neuroscience research because of the advantages of pig brain compared to that of rodents. The pig brain is more gyrencephalic than rodent brain and is large enough for neurosurgery or imaging techniques. However, the basic information about miniature pig for the brain research is not established yet.

We tried to make the extended normalized brain data of miniature pig, which contained the brain data and the skull data around the brain. We took the CT and MRI of six Mexican hairless pigs' heads, and established the fusion protocol of CT and MRI data using new marker. In order to make normalized data, we need to set reference points on the brain and the skull. From CT data, we selected 6 constant points from 21 candidates on the skull surface as the reference points for the transformation. The reference points of the brain are now under investigation. After the brain reference points are decided, the normalized data can be made by our protocols.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：トランスレーショナルリサーチ ミニブタ標準脳 ニューロナビゲーション

1. 研究開始当初の背景

脳科学研究の成果を脳神経外科学分野における臨床に応用するためには、ヒトでの応用の前段階としてモデル動物の存在が重要となってくる。基礎研究の進むマウス・ラットのようなげっ歯類は取り扱いが比較的簡便だが、長径が3cm程度という脳の大きさや、大脳皮質の表面に皺がない滑脳という形態などで実験に向かない場合も多い。一方、霊長類はヒトへの適用性が高いが、感染症対策や供給施設などの理由により取り扱いが難しい。これらの解決策として従来、ネコやイヌなどの大型実験動物が用いられてきたが、次第に高まりつつある動物愛護への配慮等の倫理的な理由により、その利用は制限を受けつつある。そこで、新たな選択肢として、頭蓋腔の容積がカニクイザルと同程度で、霊長類より扱いやすいブタが着目されてきている。

しかし、ブタの脳研究はまだ黎明期にあり、アトラスや脳機能の分布についても十分な情報が得られているとはいえない。また、研究に使用されている品種も、家畜豚・ミニブタなど多岐に渡っている。このため基盤データの整備が必須となっている。

脳研究で動物を使う場合、対象となる実験部位を特定するために脳定位置置を使用する。このとき、ラット・ネコ・サルなどは左右の外耳道にイヤーパーをあてがい頭部を固定する。これは左右の外耳道が直線状になっているため、この方法で左右方向の座標軸を確定できるからである。しかしブタの場合、左右の外耳道が直線状になっていないため脳定位置置の一般化が難しかった。この状況に対して我々はヒトの脳手術に用いられるニューロナビゲーションシステムを適用する方法を考えた。脳神経外科の臨床で用いられるニューロナビゲーションシステムでは、患者の頭部MRIやCTをあらかじめ撮影しておいてそれをデータとして活用する。動物実験で個体ごとにMRIやCTを撮影することは不可能ではないが麻酔などによる動物の負担を考えるとこの点は簡略化できたほうが良い。そのため、標準的な頭部・脳のデータを構築すれば、個体ごとにあらかじめCTやMRIの撮影を行わなくてもニューロナビゲーションシステムが利用できるようになると考えられた。

標準脳の適用範囲はナビゲーションシステムばかりではない。ヒト脳研究において各種イメージング機器が用いられるようになってきているが、それらを比較・統合するには基準となる空間的なプラットフォームとして、MRI画像を基にTalairach標準脳、MNI標準脳等が作成され脳研究の推進に活用されている。実験に適した品種のブタについてこのような基盤情報が整備されれば脳研究におけるブタの利用がさらに促進されると考えられた。

2. 研究の目的

イヌ、ネコ、サル等の利用に制限が進む中、代替大型実験動物として脚光を浴びつつあるブタであるが、研究基盤の整備が喫緊の課題となっている。特に、ミニブタを用いた脳研究を促進し、脳神経外科学への臨床応用に資するためには、研究基盤としてミニブタの標準脳が必要である。

従来の標準脳は基礎データの集積としての位置づけであるが、脳外科手術のシミュレーターとしての有用性を考慮し、脳だけでなく周囲の頭蓋骨基準点を含む拡張標準脳の実現が有益であると考えられた。これによって、基礎データへの参照とニューロナビゲーション等先端技術との融合が可能になる。

本研究は、ミニブタを対象として、頭蓋骨基準点を含む拡張標準脳を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) データの収集

予備実験を通して我々は頭蓋骨の大きさが比較的均質なミニブタの系統(メキシカンヘアレス)を選定した。この系統のミニブタ6頭についての頭部CT及びMRI画像を撮影した。撮影に先立ち、次項に記述したマーカーの選定と作成を行った。さらに、実験の終了した個体の頭蓋骨標本作製した。また、一部の個体については脳標本作製した。頭蓋骨標本の作製にあたっては、他の研究で用いたミニブタの頭部も利用した。

(2) CT画像とMRI画像の合成

本研究で作成する標準脳の一番の特徴は脳だけではなく周囲の頭蓋骨の情報も含めて標準化することである。そのためには頭蓋骨と脳の画像データが必要であるので16列ヘリカルCT装置と1.5T MRI装置を使用して頭部の画像を撮影した。

これらは別の装置を使用したデータであるため、必要な画像データを作成するためにそれぞれの画像を合成する必要があった。合成は手作業でも可能であるが、効率と人の手による誤差を除くという観点からマーカーを用いることにした。ミニブタ頭部の画像を画像処理するのに最適なマーカーの種類と、適切に位置を指定できる場所の選定を行い、撮影を行った。

(3) 特徴点の設定とばらつきを検証

脳の標準化には特徴点を決めてそれを基準にしてアフィン変換で変形する作業が必要である。MRI/CT画像、頭蓋骨・脳標本それぞれから標準脳を作成するための特徴点を選定し、その有効性を図るために画像上の座標値を求めてその分布を検証した。

4. 研究成果

(1) データの収集

6頭のミニブタ(メキシカンヘアレス)が

ら CT/MRI 画像を撮影した。他の実験等で使われた同系統及び他の系統(クラウン、KCG、マイクロミニプタ 各3頭)のミニプタの層体を手し、CT撮影と頭蓋骨標本を作製した。

(2) CT画像とMRI画像の合成

我々の作成する標準脳においては頭蓋骨の形態情報も必要となる。CTは頭蓋骨が詳細に撮影できるが脳の形態を同じ精度で撮影できない、一方、MRI画像は脳の撮影には適しているが頭蓋骨はほとんど撮影できないという組織の種類による制約があった。そのため、脳の形態情報を得るためのMRIデータと頭蓋骨の形態情報を得るためのCTデータの合成が必要である。合成を行うためにCTやMRIでも明瞭に計測できるマーカーの種類と位置を選定した。

本研究で利用した系統のミニプタは脳の直近の頭蓋骨と皮膚が比較的薄かったが、それでも頭皮上のマーカーでは撮影時に皮膚や組織に力が加わり位置が動くことが分かった。そのため皮膚を一部切開し、頭蓋骨上にマーカーが固定されるように半球状のくぼみを作り、直接マーカーを設置することにした。CTとMRIで位置の特定が可能であり、長期間留置する場合に備えて滅菌可能とするため、直径4mmの球形のEPA製剤を樹脂でコーティングしたマーカーを作成した。

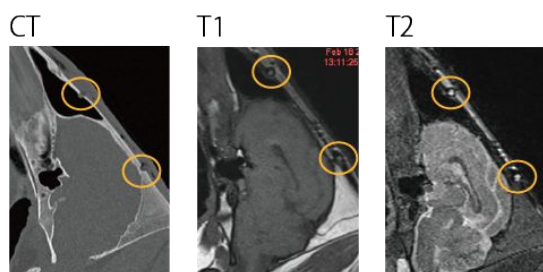


図1 . マーカーを設置した脳周辺撮影画像
左からCT、MRI (T1)、MRI (T2)のそれぞれで撮影したもの。印の部分にマーカーが設置されている。

MRI画像とCT画像の合成はマーカー座標を決定した後画像を座標変換することで実現した。

(3)特徴点の選定

頭蓋骨の特徴点

マーカーを適切かつ効率よく配置するため、頭蓋骨の標準化を行うために頭蓋骨の特徴点を選定した。脳を取り囲む配置にあることが望ましいが、マーカー設置のためには頭皮から少ない侵襲で位置を特定できる場所であることも要求される。どの個体でも特定できるように、頭蓋骨の接合部や構造上の特徴を持つ点で頭皮の表面から比較的浅いところにある部位を、正中面内に5か所、左右対称となる点を8組選定した。

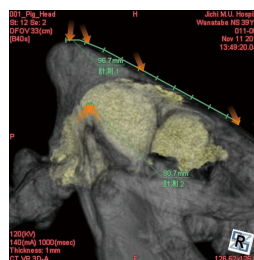


図2 . ミニプタ頭部CT3次元画像(頭蓋腔を黄色で強調) オレンジ色の矢印が特徴点の一部。

ミニプタ頭蓋骨のCTデータから特徴点の座標を計測、その座標をもとに、"IF point"¹を中心に原点と座標軸を調節した。"IF point"は我々の研究で比較的個体差が少ないと判断した特徴点である。座標軸を調整したうえで各特徴点のばらつきを計測した。座標値及びSD、変動係数(100×SD/平均値)を比較した結果、正中面内の2点及び左右対称に設定できる2組を変動係数が少なく安定的に頭蓋骨の構造を特定できる頭蓋骨の特徴点として確定した。

脳の特徴点

ブタの脳の標準化の試みは幼若な家畜ブタで実施されているが、成体のミニプタではまだ行われていない。

脳の標準化を行うための特徴点の選定が必要であったが、ミニプタの脳は長径100mm前後でヒトよりは小さいため1.5TのMRI画像では形態の微細な点を特定することが難しく、誤差が大きくなることが考えられた。ミニプタの脳アトラスははまだ確定したものが存在しないため、ミニプタの脳の薄切標本(Nissle染色)を作り、その薄切標本をもとに特徴点を検証したうえで、該当する特徴点をMRI画像から特定することとした。

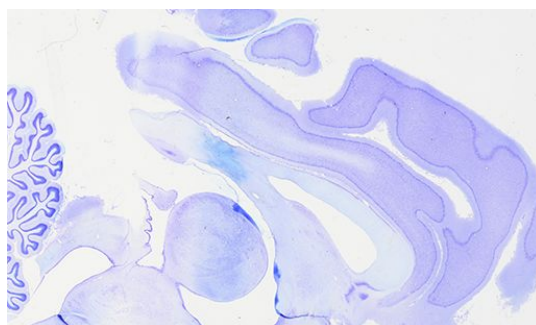
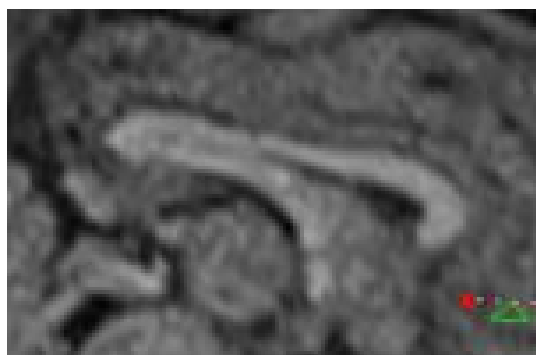


図3 . ブタ脳のMRI画像と薄切標本(Nissle) MRI画像(上)で判定が難しい構造を、薄切標本(下)で検証して特徴点を同定する。

薄切標本作成作業に時間がかかり本研究期間内に脳の特徴点を選定することができなかつた。薄切標本の作製作業は継続して行っており、その経過を踏まえて将来的に脳の特徴点を反映させた標準化を行うことを予定している。

本研究において、標準脳を作成するための作業と検証を行った。CT/MRI 画像の合成は、ブタの頭皮が厚く頭蓋骨の厚みが不均一であるため、臨床で用いられている方法をそのまま適用できないなど、改めて検討する必要が出てくるものが多かつたが、プロトコルを確立するための多くの段階で有効な手順を決定することができた。また、脳の構造的特徴点の抽出など、解決するためにまだ時間と作業を要する課題があることも明確になった。そのため、研究期間中の標準脳確立は難しかつたが、課題が解決し必要なデータが得られれば将来的にはミニブタの標準脳の確立は可能になると考えられる。

参考文献

1. Saito T, Uga M, Tsuzuki D, Yokota H, Oguro K, Yamamoto T, Dan I, Watanabe E. Evoked potential mapping of the rostral region by frameless navigation system in Mexican hairless pig. *J Neurosci Methods*. 2013 Jan 15;212(1):100-5. doi: 10.1016/j.jneumeth.2012.09.027.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 英寿 (WATANABE, Eiju)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号： 50150272

(2)研究分担者

宇賀 美奈子 (UGA, Minako)

自治医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号： 40624789

(3)連携研究者

檀 一平太 (Ippeita, Dan)

中央大学・理工学部・教授