

脳機能の解明を目指すマルチモーダルイメージングの技術開発に関する研究

著者	合瀬 恭幸
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/00136558



博士學位論文

論文題目 脳機能の解明を目指すマルチモーダル
イメージングの技術開発に関する研究

.....
.....
.....
.....
.....

提出者 東北大学大学院医工学研究科
医工学専攻

氏名合瀬 恭幸.....

指 導 教 員	渡部 浩司 (教授)・准教授
審 査 委 員 (○印は主査)	○ <u>渡部 浩司</u> 教授 1 <u>芳賀 洋一</u> 教授 2 <u>本間 経康</u> 教授 3 _____ 4 _____ 5 _____ 6 _____

修了年度	2022 年度	課程	博士課程後期 3 年の課程
英文 Abstract			
Title:	The development of multimodal imaging techniques for the investigation of brain functions		
Author:	Takayuki OSE		
Supervisor:	Hiroshi WATABE		
<p>Accurate brain structure and function mapping in neuroscience require multimodal image registration techniques accounting for the species. Differences in image modality, contrast uniformity, and resolution reduce registration accuracy. Moreover, in animal neuroscience, it is common to study the function and connectivity of brain regions using stereotactic atlases with cranial landmarks of single individuals. However, whether this method is suitable for the common marmoset, a small primate, is unclear.</p> <p>This study developed a registration method using novel multimodal reference markers, including a tungsten solution. Furthermore, we developed a multimodal targeting system specifically for marmosets, investigated their inter-individual variability, and applied it to marmoset brain surgery as a proof of concept.</p> <p>The novel multimodal marker showed high contrast on MR T1-, T2-weighted, CT, and PET/Tx images. The registration method developed in this study was more accurate in image registration than software-only methods. And using this system, it was suggested that there are significant individual differences in marmoset brain and skull landmarks and that accurate targeting of marmosets requires positioning based on individualized neuroimaging. The combination of this system and robot-guided surgery provided for targeting deep brain structures with an accuracy of 0.2 mm.</p>			
和文アブストラクト			
論文題目：	脳機能の解明を目指すマルチモーダルイメージングの技術開発に関する研究		
提出者氏名：	合瀬 恭幸		
指導教員：	渡部 浩司		
<p>神経科学において、脳の構造や機能を正確にマッピングするためには、生物種を考慮したマルチモーダルな画像位置合わせ技術と評価が必要である。しかし、画像のモダリティ、コントラスト、解像度の違いにより位置合わせの精度が低下する。また、動物神経科学では、単一個体の頭蓋ランドマークを用いた定位アトラスを用いて脳領域の機能や結合性を研究することが一般的であるが、この方法が小型霊長類であるコモンマーモセットに適しているかは不明である。</p> <p>本研究では、タングステン溶液を含んだマルチモーダルマーカーを開発・評価し、またこのマーカーを用いた画像位置合わせ法を開発した。さらに本手法の応用として、マーモセット専用のマルチモーダル脳ターゲティングシステムを開発し、このシステムを用いてマーモセットの個体間変動を調べ、概念実証としてマーモセットの脳外科手術に適用した。</p> <p>新規マルチモーダルマーカーは、MR の T1 強調、T2 強調、CT、Transmission 画像で高いコントラストを示し、今回開発した位置合わせ法は、ソフトウェアのみの方法より正確な画像位置合わせが可能であった。本研究で開発したシステムを用いて、マーモセットの脳や頭蓋骨のランドマークには大きな個体差があり、正確な脳内部位特定には個体別の神経画像に基づく位置決めが必要であることが示唆された。また、このシステムとロボット誘導手術の組み合わせにより、0.2mm の精度で脳深部構造物の標的に成功した。</p>			

目次

略語一覧

図目次

表目次

第1章 序論

1.1 マルチモーダルイメージング	-1-
1.1.1 画像撮像装置の基本的な撮像原理	-1-
1.1.2 マルチモーダル脳画像の位置合わせ	-4-
1.2 マーモセット専用マルチモーダル脳ターゲティングシステムの開発	-6-
1.2.1 脳研究の対象となる小型霊長類 コモンマーモセット (Callithrix jacchus)	-6-
1.2.2 Human connectome project (HCP) パイプライン	-7-
1.2.3 脳外科手術と脳神経イメージング研究で用いられる座標系の違い	-8-
1.2.4 脳神経イメージング研究に特化した座標系 (grayordinate)	-9-
1.3 研究動機	-12-
1.4 本研究の全体構成	-12-
第2章 マルチモーダルイメージングマーカーの開発	-14-
2.1 マーカー溶液調製	-14-
2.2 撮像プロトコル	-16-
2.3 溶液のコントラストや特性の評価方法	-18-
2.4 タングステン水溶液のコントラストと特性結果	-19-
2.5 考察	-23-
第3章 新規マルチモーダルマーカーを用いた位置合わせ法の開発	-24-
3.1 マーカー容器のデザイン	-24-
3.2 撮像実験プロトコル	-26-
3.3 新規マルチモーダルマーカーを用いたマーカー基準の位置合わせ法 (marker-based fiducial registration : MBFR)	-28-
3.3.1 MBFR 法	-28-
3.3.2 ソフトウェアのみの位置合わせ方法	-30-
3.4 MBFR 法とソフトウェアのみの方法の位置合わせ精度の比較	-30-
3.4.1 位置合わせ精度比較方法	-30-
3.4.2 結果	-31-
3.5 考察	-36-
3.5.1 マーカーの構成	-36-

3.5.2	位置合わせ精度と大脳皮質表面マッピング	-36-
3.5.3	現在のマルチモーダルマーカー位置合わせの限界点	-37-
第4章	マーモセット専用マルチモーダル脳ターゲティングシステムの開発	-38-
4.1	マーモセット研究のための画像位置合わせ精度について再度検討	-38-
4.1.1	実験プロトコル	-38-
4.1.2	位置合わせ精度評価法	-41-
4.1.3	結果	-41-
4.2	HCP-NHP パイプラインを用いたシステムの開発	-44-
4.2.1	異なる座標系間の位置合わせワークフロー	-44-
4.2.2	MBFR と BBR によるマルチモーダル画像位置合わせ	-44-
4.2.3	HCP-NHP パイプライン	-46-
4.2.4	マーモセットの脳と頭蓋骨の AC-PC template	-49-
4.3	考察	-51-
4.3.1	MBFR による初期化と BBR での微調整による高精度位置合わせ	-51-
4.3.2	マーモセット専用 HCP-NHP パイプライン	-51-
第5章	マルチモーダル脳ターゲティングシステムを用いた評価	-53-
5.1	異なる脳座標系における頭蓋骨の個体間変動の違い	-53-
5.1.1	個体間変動評価方法	-53-
5.1.2	結果	-53-
5.2	AC-PC native 座標における個体間変動	-56-
5.2.1	個体間変動評価方法	-56-
5.2.2	結果	-58-
5.3	脳定位固定位置決め精度と再現性	-64-
5.3.1	実験プロトコル	-64-
5.3.2	再現性評価方法	-66-
5.3.3	結果	-66-
5.4	考察	-68-
5.4.1	ブレグマの個体間変動	-68-
5.4.2	大脳皮質ランドマークの個体間変動	-70-
5.4.3	脳定位水平面と AC-PC 水平面	-70-
5.4.4	定位固定法の再現性	-71-
第6章	本システムの画像誘導型脳神経外科手術への応用	-72-
6.1	動物実験での脳内ターゲットに合わせた手術戦略	-72-
6.2	実験プロトコル	-74-
6.3	ターゲット誤差推定方法	-76-

6.4 結果	-76-
6.5 考察	-79-
第7章 結語	-80-
7.1 本論文の結論	-80-
7.2 今後の展望	-81-
参考文献	-83-
謝辞	-106-
研究業績	-107-

略語一覧

AC-PC	前交連-後交連 : Anterior commissure-posterior commissure
BBR	境界ベース位置合わせ : Boundary-based registration
BP	結合能 : Biding Potential
Cau	尾状核 : Caudate nucleus
CIFTI	コネクティビティ・インフォマティクス・テクノロジー・イニシアチブ' : Connectivity InFormatics Technology Initiative
COV	変動計数 : Coefficient of variation
CSF	脳脊髄液 : Cerebrospinal fluid
CT	コンピュータ断層撮影 : Computed Tomography
DAT	ドーパミントランスポーター : dopamine transporter
DAT-IR	ドーパミントランスポーター免疫反応 : dopamine transporter-immunoreactivity
EM	エミッション撮像 : Emission scan
FEF	前頭眼野 : Frontal eye field
FLIRT	FMRIB's Linear Image Registration Tool
FMRIB	Functional Magnetic Resonance Imaging of the Brain
FNIRT	FMRIB's Nonlinear Image Registration Tool
FOV	視野 : Field-of-view
Gd_DTPA	ガドペンテト酸メグルミン : Gadolinium-diethylene triamine pentaacetic acid
GIFTI	Geometry format under the Neuroimaging Informatics Technology Initiative
HCP	Human Connectome Project
IPS	頭頂間溝 : Intraparietal sulcus
LST	リチウムヘテロポリタングステン酸塩 : lithium heteropolytungstate
MarmosetRIKEN20 MRI & CT template	リケン・マーモセット MRI・CT template : RIKEN marmoset MRI & CT template
MBFR	マーカーを基準とした位置合わせ法 : Marker-based fiducial registration
MI	相互情報量 : Mutual information
MRE	マーカー位置合わせエラー : Marker registration error

MRI	磁気共鳴画像法 : Magnetic Resonance Imaging
MSM Matching	マルチモーダルサーフェスマッチング : Multi-modal Surface-
MT	MT 野 : Middle temporal area
NHP	非ヒト霊長類 : Non-human primate
HCP-NHP	human connectome project non-human primate
NMI	正規化相互情報量 : Normalized mutual information
PET	陽電子放出断層撮影 : Positron Emission Tomography
EM	エミッション撮像 : Emission scan
Tx	トランスミッション撮像 : Transmission scan
SN	黒質 : Substantia nigra
SPECT tomography	単一光子放射線断層撮影 : Single photon emission computed
SPT	ナトリウムポリタングステン酸塩 : Sodium Polytungstate
TE	信号収集時間 : Echo time
TR	繰り返し時間 : Repetition time
T1w	T1 強調 MRI : T1-weighted MRI
T2w	T2 強調 MRI : T2-weighted MRI
V1	一次視覚野 : primary visual cortex
[¹¹ C] PE2I	N-(3-iodoprop-2E-enyl)-2β-carbomethoxy-3β-(4-methylphenyl)nortropane

図目次

図 1.1 画像撮像装置の基本原理	-3-
図 1.2 SPT による重水の作成 (密度 2.8g/mL)	-5-
図 1.3 社会性をもつ小型霊長類コモンマーモセット	-7-
図 1.4 小動物用脳定位固定装置	-8-
図 2.1 SPT 水溶液の室温 25°Cでの濃度と密度の関係	-15-
図 2.2 溶液充填したサンプルチューブと撮像モダリティごとの配置	-18-
図 2.3 緩和能と線形減衰係数の結果	-20-
図 2.4 T1w、T2w、CT、Tx の信号強度レベル間の比較	-22-
図 3.1 マルチモーダルマーカのデザインと貼り付け図	-25-
図 3.2 MBFR による位置合わせのワークフロー	-29-
図 3.3 ソフトウェアのみと MBFR による位置合わせの比較	-32-
図 3.4 MBFR 法による高精度 PET 大脳皮質表サーフェスマッピング	-35-
図 4.1 マルチモーダルマーカ、ヘッドホルダーの設計と構造	-40-
図 4.2 マルチモーダルマーカ溶液充填方法	-40-
図 4.3 画像位置合わせ方法による正確性と精度の比較	-43-
図 4.4 位置合わせパイプライン (スキャナー座標、AC-PC 座標、定位座標、grayordinates)	-48-
図 4.5 MarmosetRIKEN20 のマルチモーダル template (AC-PC 座標系および grayordinates)	-50-
図 5.1 マーモセットの AC-PC と定位座標の個体間変動	-55-
図 5.2 脳内でのそれぞれの距離とランドマーク位置の概要	-57-
図 5.3 マーモセットにおける頭蓋縫合とブレグマの変動	-58-
図 5.4 マーモセットにおけるランドマークの変動	-60-
図 5.5 脳定位固定器具のデザイン	-65-
図 5.6 脳定位固定のバイアスと再現性	-67-
図 5.7 動物種間比較 (ブレグマの変動と脳容積)	-69-
図 6.1 マーモセット脳内ターゲットに合わせた手術戦略	-73-
図 6.2 画像誘導型脳神経外科手術への応用例	-77, 78-

表目次

表 1.1	神経科学におけるげっ歯類やヒトの脳神経座標の種類	-11-
表 2.1	ポリタンゲステン酸水溶液と一般的な MRI コントラスト剤の特徴	-15-
表 2.2	本実験で用いたマルチモーダルコントラスト溶液候補の濃度	-16-
表 2.3	撮像条件	-17-
表 2.4	ポリタンゲステン酸溶液の緩和率および線減衰係と従来の MRI 造影剤との比較	-21-
表 3.1	撮像条件	-27-
表 3.2	MBFR とソフトウェアのみの位置合わせ法における MRE の比較	-33-
表 4.1	撮像条件	-40-
表 5.1	頭蓋と大脳皮質のランドマーク座標の個体間変動 (N = 20)	-61-
表 5.2	脳と大脳皮質下構造の体積とランドマークの距離の個体間変動 (N = 20)	-62, 63-
表 6.1	撮像条件	-75-

第 1 章 序論

1.1 マルチモーダルイメージング

マルチモーダルイメージングとは機能画像と形態画像による機能局在化のため、モダリティの異なる画像どうしを融合させる技術の 1 つである。機能画像と形態画像の融合は生体の複雑な構造を理解し、臓器の病変の診断に有用である。マルチモーダルイメージングに使用される代表的な医療装置として、機能的画像が得られる陽電子放出断層撮影 (Positron Emission Tomography: PET) 装置, 単一光子放射線断層撮影 (Single photon emission computed tomography: SPECT) 装置, 解剖学的画像取得には磁気共鳴画像法 (Magnetic Resonance Imaging: MRI) 装置やコンピュータ X 線断層撮影 (Computed Tomography: CT) 装置がある。

1.1.1 画像撮像装置の基本的な撮像原理

マルチモーダルイメージングで用いられている撮像装置の撮像原理は様々である。本研究で使用する 3 種類の装置 (CT, MRI, PET) について基本原理を説明する (図 1.1)。

CT の基本的な撮像原理は、被写体の周りを X 線管球が回転し、被写体を透過した後の X 線の投影データを用いて画像再構成を行い被写体の断面像が得られる。1990 年初頭には、連続回転方式高速 (ヘリカル) 撮影という管球の連続回転と寝台の移動を同時に行う撮像法が開発され広範囲にわたる撮影を短時間で行えるようになった。従来の X 線写真と比較して、CT 画像はより詳細な X 線減弱の違いが検出できることにより軟部組織の解剖学的構造や骨構造を描出することが可能である。しかし、CT 撮像による X 線被ばくは避けられず、CT 検査 1 回あたりの被ばく線量は 20~30mSv である¹⁾。

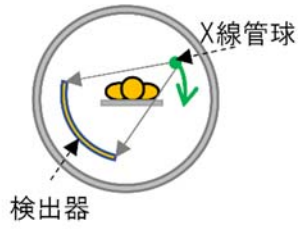
MRI の撮像原理は、生体内に大量に存在する水素原子は強力な磁場の中に置かれた時に、外部から共鳴周波数の電磁波を照射すると共鳴して励起される。照射をやめることで励起された水素原子が定常状態に戻る際に発生する MR 信号を受信し画像再構成により画像化される。撮像時の信号収集時間 (Echo time: TE) と信号収集の繰り返し時間 (Repetition time: TR) の組み合わせを変化させることで画像にコントラストが生じる。一般的な臨床用 MRI 装置は、永久磁石 (0.1T~0.4T) または超電導磁石 (1.5T~3.0T) による 2 種類の磁場空間、電磁波を送信する高周波コイル、磁場に変化を与える傾斜磁場コイル、MR 信号を受信

する受信コイルなど様々なコイルから構成されている。様々な撮像法があることも MRI の特徴の 1 つであり、T1 強調画像 (T1-weighted MRI: T1w)、T2 強調画像 (T2-weighted MRI: T2w) などの形態画像以外にも機能画像である拡散強調画像 (Diffusion weighted Imaging: DWI) や機能的 MRI (Functional MRI: fMRI) などがある。しかし、撮影に要する時間が比較的長く撮像中に被験者の動きある場合はアーチファクトの原因となる。

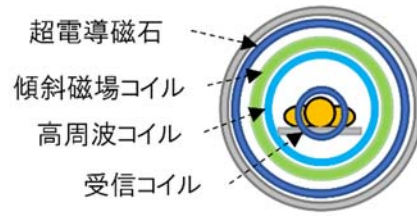
PET 装置の基本的な撮像原理は、生体内に投与された放射性薬剤が特定の臓器に分布した放射性同位元素から放出された陽電子がその周りの電子と結合して対消滅を起こすと同時に 511keV のエネルギーを有した約 180 度の方向に 2 本の消滅放射線を放出する。この 1 対の消滅放射線を同時計測することにより放射線源の体内集積度を画像再構成する。PET 画像の特徴として定量性が高いことがあげられるが、そのためには上記のエミッション (Emission scan: EM) と呼ばれる撮影以外に、その減弱補正用のトランスミッション (Transmission scan: Tx) 撮影が必要となる。Tx 撮影では、外部線源 (^{68}Ge - ^{68}Ga や ^{137}Cs) が被検体の周りを回転することで、被写体を透過した後の γ 線の投影データを測定する。21 世紀になり、この PET 専用装置に置き換わって PET/CT 装置が多くの施設で使用されるようになった。PET と CT の融合画像が得られることが最大の利点であり、Tx の代わりに CT を減弱補正用データとして用いるので撮像時間も短縮される。しかし、CT と EM 撮影間では寝台もしくはガントリの移動が伴うので撮像後の位置合わせは必要となる。

本研究では、前臨床の研究として主に動物専用撮像装置を用いて新規マーカー開発を行った。PET では動物用 PET 専用装置にて EM 撮影と Tx 撮影を、CT では小動物用 CT 装置にて CT 撮影を行った。MRI ではヒト用 3T MRI 装置と動物種ごとに開発された頭部用受信コイルを用いて撮像を行った。

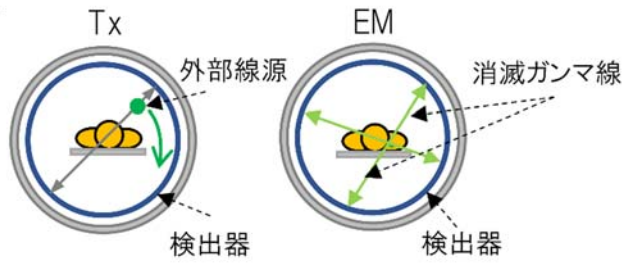
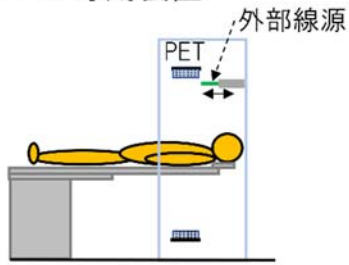
● CT装置



● MRI装置



● PET専用装置



● PET/CT装置

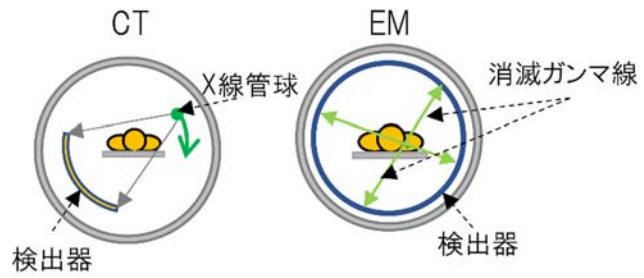
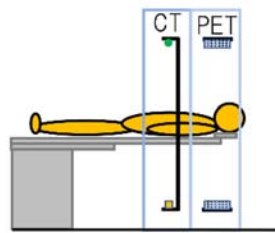


図 1.1 画像撮像装置の基本原理

1.1.2 マルチモーダル脳画像の位置合わせ

マルチモーダル脳イメージングにおいて、異なる画像モダリティ間の正確な位置合わせは、撮像対象の統合的な情報を獲得するのに必須である。広く使用されている画像位置合わせ技術は、画像のボクセル強度または信号の類似性に基づくソフトウェアを使用した技術である（以降、この方法を「ソフトウェアのみ」の位置合わせ法とする）。相互情報量 (mutual information: MI) アルゴリズム^{2,3}は、最大の相互依存性（すなわち、類似性）に基づく最適な位置を求めることにより、マルチモーダル画像の位置合わせに一般的に使用されている。しかしながら、一般的にソフトウェアのみの位置合わせ法の精度は、画像の質、初期位置や画像同士のコントラストの類似度、均質性や解像度に依存し、また他の方法による検証もほとんど行われていない。そして、求められる位置合わせ精度に関しては対象となる標的組織のサイズによっても異なる。例えば、最近開発されたマルチモーダル大脳皮質マッピング技術⁴では、大脳皮質の厚さがとても薄い（最小皮質厚 ヒト: 1.6 mm, マカクザル: 1.0 mm）ため、PET と MRI の間に高レベルの位置合わせ精度が必要である。ソフトウェアのみのマルチモーダル脳イメージングの位置合わせはセグメント化された境界を使用してきめ細かく最適化はされているが⁵、依然として、画像上での脳の初期位置やセグメント化は位置合わせを成功させる重要な決定要因である。最近の PET/CT や PET/MRI などのハイブリッド撮像装置の進歩により、異なるモダリティの脳画像を同時に所得することが可能になった。しかし、ハイブリッド撮像装置の品質保証のためには、機械的な位置ズレの精度を他の方法で検証する必要がある。

ソフトウェアのみのマルチモーダル脳イメージング位置合わせの代替法として、マーカーを用いた位置合わせ法がある⁶⁻¹²。これまでの研究では、PET 画像のマーカー素材として放射性物質^{6,7,11}を使用していたが、T1w, T2w や CT など他のモダリティにおいて高いコントラストを有してはいない。また放射性マーカーは取り扱いが煩雑であり、その使用者と被検者の両方の被ばくが避けられないなどの問題があった。そこで本研究では、非放射性マーカー候補として、2種類のポリタングステン酸塩、すなわち、ナトリウムポリタングステン酸塩 (SPT)¹³とリチウムヘテロポリタングステン酸塩 (LST)¹⁴を提案する。SPT は、水溶性が高く（密度 3.1 g/mL/cm³, 25°C）、他の鉱物から分離するのに十分であり、毒性が低い^{13,15-17}ため、地理学分野でよく使用されている（図 1.1）。LST も SPT と同様の目的で使用されることが多く、液体の製品 (heavy liquid, Central Chemical Consulting, WA, Australia) として商品化されている。ポリタングステン酸塩

は高密度溶液として X 線や CT で適度なコントラストを生成する能力を持ち，PET 画像再構成に使用する transmission (Tx) においても十分なコントラストを有する可能性がある。また，従来の MRI 造影剤は常磁性をもつことが多く^{18,19}，常磁性のタングステンの磁化率は $0.32 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$ でタングステン化合物としての SPT と LST は MRI 造影剤として有効である可能性がある。



図 1.2 SPT による重水の作成 (密度 2.8g/mL)

1.2 マーモセット専用マルチモーダル脳ターゲティングシステム の開発

1.2.1 脳研究の対象となる小型霊長類 コモンマーモセ ット(*Callithrix jacchus*)

本研究では、げっ歯類とヒトとの中間に位置する小型霊長類であるコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) に対しての個体間変動が脳神経科学研究の結果に及ぼす程度を調べる。マーモセットは、これまで数多く研究されているげっ歯類と比較して進化的にヒトに近いこと²⁰、複雑な社会行動²¹などから、神経科学や生物医学研究においてますます重要な非ヒト霊長類 (Non-human primate: NHP) 実験モデルである。また、遺伝子操作²²、機能イメージング²³⁻²⁶、神経トレース²⁷、細胞マッピング²⁸等の最近の発展により、本種において行動の変動が脳・機能分離・多様性といかに関連しているかが証明できるものと期待される。しかし、マーモセットのような小型霊長類では依然として個体間変動の有無やその影響に関しては不明確である。例えば、マーモセットの脳容積は、近交系実験動物系統のネズミよりも変動が大きいと考えられる。脳容積の変動係数 (COV) は、マウスで 2.3%²⁹、ラットで 3.2%³⁰、マーモセットでは 6.6%³¹である。そして、マーモセットの頭蓋骨・脳ランドマークの位置変動についてはほとんど分かっていない。確かに、脳回脳溝構造のすくないマーモセットの脳の個体間変動は、神経解剖学や機能領域の観点から低いと考えられるが、ほとんど未解明である。霊長類の行動によって脳の組織がどのように変化するのか、興味深い問題である³²⁻³⁴。



図 1.3 社会性をもつ小型霊長類コモンマーモセット

1.2.2 Human connectome project(HCP)パイプライン

本研究では、近年 MRI 研究において注目されている HCP パイプライン³⁵を利用した。アメリカの NIH が中心となりヒト脳の構造的・機能的コネクトームを構築することを目的としたプロジェクトである Human connectome project^{36,37}によって提供されたパイプラインである。HCP パイプラインは画像データ処理や解析、そして標準化を自動で行えるフレームワークである。灰白質領域の解析を行うために、シート状の脳皮質は 2 次元構造として、体積をもつ皮質下構造物は 3 次元構造として扱う³⁵。脳皮質の位置合わせはその形状ではなく機能的な特徴を利用することで従来の脳画像法と比較して空間的位置精度が向上した^{38,39}。また、理化学研究所の研究グループとワシントン大学が中心となり、HCP パイプラインを NHP であるマカクザル用⁴⁰とマーモセット用⁴¹に改良したパイプラインを開発した。本研究では、マーモセット用 HCP-NHP パイプラインを用いてマーモセット専用マルチモーダル脳ターゲットングシステムの開発を行った。

1.2.3 脳外科手術と脳神経イメージング研究で用いられる座標系の違い

脳空間座標系は、細胞、構造、機能のマッピングを通じて脳を理解するための基本的な枠組みである。しかし、脳外科手術と脳神経イメージング研究で用いられる座標系は特に動物実験に関しては一般的に異なっている。

脳外科手術を行う際に用いる脳定位装置によって（図 1.2）、特定の脳領域をマッピングし、ターゲットを絞るための座標である脳定位座標系が得られる⁴²⁻⁴⁶。定位座標系のアトラスは、一般的に単一個体の生体外脳組織学データに基づいている^{42, 47-50}。定位アプローチの背後にある仮定は、各脳構造が頭蓋骨ランドマーク（例えば、ブレグマ、耳介間線、眼窩下隆起）に対して個体間で一貫した座標を持っているということである⁵¹。この仮定は、脳の構造や機能の個体間の変動が少ないげっ歯類では成り立つかもしれないが、ヒトやマカクザルといった霊長類³¹では個体間変動が大きく定位座標系が適しているとは言い難い。



図 1.4 小動物用脳定位固定装置

一方、脳神経イメージング研究では前交連-後交連 (AC-PC)座標系が用いられる、この座標系は、もともと人間の脳外科手術のために開発されたもう一つのアプローチで、現在では人間の脳神経イメージングに日常的に使用されているものである。Tarailach らの先駆的な研究は、X線脳室造影法を用いたヒトの脳深部手術にこの方法を用いたもので、2つのランドマーク間の距離などに基づいて脳を一連の座標に標準化した⁵²。この脳内ランドマークを用いた脳の再定位と再スケールリングは、脳の大きさや形状の変動を軽減するのに有効であった。AC-PC 座標の原点は、AC (中心または後縁など) が正中矢状面と交差する位置で定義される。このアプローチは、脳神経イメージング技術、特に MRI の改良により、臨床および基礎神経科学の両方において、脳の位置特定とターゲティングの精度が向上したことにより、精緻化されたものである。また、個体の変動の補正は、線形および非線形アルゴリズムによる脳の自動位置合わせ^{53,54}を用いて行われ、ヒトの神経イメージングで広く使用されている MNI (モントリオール神経研究所) 152 ヒト template が誕生した。類似の集団ベースの template とアトラスも、マカクザルの MRI を使用して開発された⁵⁵⁻⁵⁷。同様のアプローチは、ごく最近、Allen Institute for Brain Science (AIBS) にて ex-vivo データを使用してげっ歯類にも適用された⁵⁸⁻⁶⁰。

1.2.4 脳神経イメージング研究に特化した座標系 (grayordinate)

脳神経イメージングに基づくシステムでは、すべての構造的特徴 (灰白質, 白質, CSF) を用いて個体間の位置合わせを行うが、実際には、大脳皮質の折りたたみの複雑さと変動性のために、ヒトの大脳皮質の位置合わせを正確に行うことは稀である。このため、大脳皮質を2次元のシート状構造として扱い、正確なセグメンテーションと大脳皮質サーフェス再構成を行うことで対処してきた^{61,62}。このアプローチにより、大脳皮質解剖学の標準化、褶曲パターンと大脳皮質の厚さの評価が大幅に改善された。Glasser ら³⁵はさらに、大脳皮質シートの2D トポロジー (有限の厚さは考慮しない) と球状の脳深部灰白質構造の3D volume 構造の両方を考慮した 'grayordinate' システムを開発した。さらなる進歩としてミエリン含有量と fMRI ベースの安静時ネットワークを用いた areal-feature-based 位置合わせの適用がある、このことによってインビボのヒト脳における大脳皮質領域の定義に成功した⁶³。また、脳神経イメージングは、脳外科手術のための脳領域の高度なターゲティングシステムの開発の引き金となった。しかし、マーモ

セットのような小型の霊長類に、脳神経イメージングデータの処理、解析や統合を自動的に行えるパイプラインが必要であるかどうかは確立されていない。非ヒト霊長類（NHP）では、脳定位水平面と AC-PC 水平面が互いに平行であることが示唆されているが^{50,64}、我々の知る限り、これは厳密に評価されたことはない。マーモセットの脳皮質は、哺乳類のシステム神経科学（すなわち、げっ歯類とヒト）における2つの極端の間であると考えられるが、神経解剖学および機能的ターゲティングの最大限の精度を達成するためにどのアプローチが最も適しているかは依然として不明である。

現在、神経科学の分野で利用可能な脳の座標系は、以下の4種類に分類される（表 1.1）。1) 3次元空間における定位座標は、主に単一個体における生体外の脳や頭蓋骨のランドマーク（例えば、ブレグマ線や耳介間線）に基づき、集団や AC-PC や正中線などの脳のランドマークにはあまり使用されない。2) 生体内のニューロイメージに基づく3次元 template 空間における標準座標（AC-PC 線と正中矢状面を主に用い、場合によっては頭蓋骨ランドマークを用いる）、3) ニューロイメージデータに基づく Freesurfer による脳皮質シートのみの座標、4) ニューロイメージデータに基づく灰白質に基づく脳皮質サーフェスおよび脳皮質下 volume 座標（grayordinate）。皮質彎曲のないげっ歯類は、単一個体で作成した定位座標（座標タイプ 1）で解析するのが一般的なのに対し、最近の研究では、皮質彎曲のあるヒトやマカクザルは grayordinate システム（タイプ 4）で解析するのが最も正確だと言われている^{31, 35, 36, 40, 65}。

表 1.1 神経科学におけるげっ歯類やヒトの脳神経座標の種類

Type of brain coordinates	Landmarks	Data used	Subject(s)	References
Stereotactic	Cranial landmarks (bregma, auditory canals, infraorbital line) with an origin of bregma or mid-infraorbital point	Anatomy and histology	Individual	Rodents ^{48,49} , Marmoset ^{42-46,66} , Macaque ^{50,51,67-69}
		Ex-vivo MRI	Population	Rodents ^{59,60} , Marmoset ⁷⁰
	3 rd ventricle, AC-PC and midsagittal interhemispheric plane with an origin of AC	Anatomy and Histology	Individual	Macaque ^{71,72} , Human ^{52,73}
		Anatomy and Histology	Population	Rodents ⁵⁸
Brain volume (3D image-based)	Cranial landmarks (bregma, auditory canals, infraorbital line)	Neuroimaging	Individual	Marmoset ⁷⁴
			Population	Marmoset ^{64,75,76}
	AC-PC midsagittal plane	Neuroimaging	Population	Rodents ⁷⁷ , Macaque ⁵⁵⁻⁵⁷ , Human ⁷⁸⁻⁸²
Surface-based	Freesurfer surface coordinates	Neuroimaging	Population	Macaque ⁶² , Human ⁶¹
Grayordinates (3D image and 2D surface-based)	AC-PC, midsagittal plane, grayordinates	Neuroimaging	Population	Marmoset ⁴¹ , Macaque ^{40,65} , Human ³⁵

1.3 研究動機

脳構造や機能を正確にとらえるために以下の2つの問題に取り組む。マルチモーダルイメージングの位置合わせ技術に関して、ソフトウェアのみのマルチモーダル脳イメージング位置合わせの代替法として用いられている放射性マーカーの代わりに、ポリタングステン酸塩溶液を含むマルチモーダル位置合わせ用の非放射性マーカーを提案する。そのために、ポリタングステン酸水溶液の基本的な特性、特にマルチモーダルマーカーとして必要となる、密度、緩和性などの特性を調べ、実際にMR、CTとTxにおける画像コントラストを調べる。そして、これらのマーカーの適用性をテストするために中型霊長類であるマカクザルによるイメージング実験と位置合わせ精度の解析を行い、これらのマーカーのマルチモーダル位置合わせへの適用性を検証する。次に、実験種ごとの個体差を考慮したシステムの必要性を調べるために、本研究で開発したマーカーを利用して、脳研究の対象として注目されている小型霊長類であるマーモセットに特化したマルチモーダル脳ターゲティングシステムを開発する。そして、このシステムを用いてマーモセットの大脳皮質や頭蓋骨ランドマークの変動を調べ、神経科学で用いられている脳の座標系（定位やAC-PC）の違いと脳定位精度の影響について検討し、マーモセットの脳神経外科手術に応用することで概念実証を行う。

1.4 本研究の全体構成

本研究においては、第1章では本論文の序論としてマルチモーダル脳イメージング、マーモセット専用マルチモーダル脳ターゲティングシステム開発の背景について述べる。また、本論文の動機と構成について説明する。第2章と3章では、脳構造や機能を正確にマッピングするために必要な、マルチモーダルイメージングの位置合わせ技術の開発について述べる。特に、第2章ではマルチモーダルマーカー素材の基本特性について、第3章では新規マルチモーダルマーカーを用いたマーカー基準の位置合わせ法の開発とマカクザルを用いたマルチモーダル撮像実験による位置合わせの精度評価を行う。第4章からは、小型霊長類であるマーモセットについて個体間変動が脳神経科学研究の結果に及ぼす程度を調べる。第4章では、マーモセット専用のマルチモーダル脳ターゲティングシステムの開発について述べる。そして、本システムを用いて行った様々な評価実験について第5章で述べ、第6章において本システムの概念実証としてマーモセットの

脳神経外科手術への応用の結果を示す。最後に、本論文のまとめとして第7章で結論と今後の展望を述べ、本論文を結ぶ。

第 2 章 マルチモーダルイメージングマーカ の開発

CT や MRI のコントラストとして重要な濃度と緩和能といった SPT と LST 溶液の基本的な特性について検討した。緩和能とは、溶液の縦緩和 ($1/T_1$) と横緩和 ($1/T_2$) が濃度の関数として変化する割合のことであり、MRI のコントラストに重要である。まず、SPT、LST とその他の 4 つの MRI 造影剤を様々な濃度に調製した溶液を用意した。次に、さまざまな種類と濃度に調整した溶液を含む全てのチューブの撮像を 4 つのモダリティ (T_{1w} , T_{2w} , CT, および T_x) で行い、各チューブ内溶液の画像コントラストを推定した。マーカー溶液調製の詳細については 2.1 節、撮像プロトコルの詳細については 2.2 節、溶液コントラストの評価については 2.3 節と 2.4 節でそれぞれ述べ、2.5 節で考察を行う。

2.1 マーカー溶液調製

本実験で試した溶液は SPT、LST および従来から MRI に使用されている 4 種類の MRI 造影剤；ガドペンテト酸ジメグルミン ($Gd-DTPA$)、塩化マンガン ($MnCl_2$)、硫酸銅 ($CuSO_4$)、および硫酸ニッケル ($NiSO_4$) である。表 2.1 に試験物質とその密度および水への溶解度の一覧を示す。LST は、その主成分がリチウムまたはリチウム/ナトリウム α -タングステンシリケートであり、その組成が不明であったのでリストに含めなかった¹⁴。

ファントム実験に使用するために、ポリタングステン酸塩および従来の MRI 造影剤をさまざまな濃度の溶液に調製した (表 2.2)。溶液の密度を測定することにより、質量密度の関数を用いて SPT 溶液のモル濃度を決定した (図 2.1)。LST の化学的性質に関しては分子量や質量密度関数などの正確な値が不明であるため、SPT と同じであると仮定した。調整した溶液はすべてプラスチック製のサンプルチューブ内 (2 mL cryogenic vial, Sumitomo Backelite Co., Ltd.) に保存し、コントラストと緩和能評価するための撮像実験に使用した。また、溶液との比較溶液として蒸留水を同様のサンプルチューブに保存し使用した。

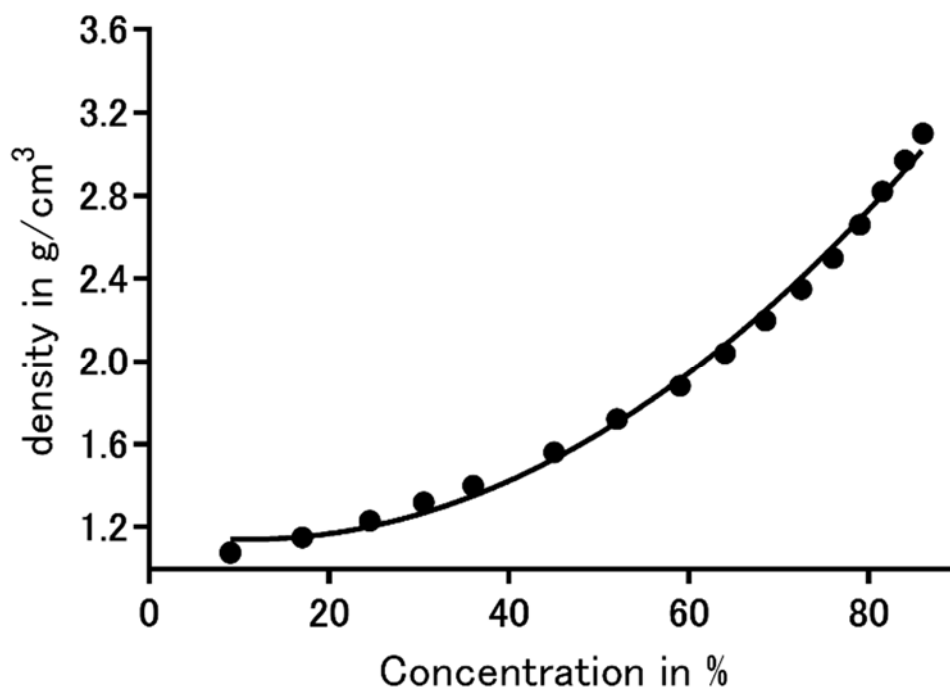


図 2.1 SPT 水溶液の室温 25°Cでの濃度と密度の関係

表 2.1 ポリタングステン酸水溶液と一般的な MRI コントラスト剤の特徴

化合物	常磁性金属	重量		水への溶解度	
		化合物 [g]	モル濃度 [mM]	密度 [g/mL]	測定温度 [°C]
Gd-DTPA	Gd	742.89	5.00×E01	1.37	20.00
MnCl ₂	MnCl	197.84	3.74×E03	1.74	20.00
CuSO ₄	Cu	159.61	1.10×E03	1.18	20.00
NiSO ₄	Ni	154.75	2.87×E03	1.44	20.00
SPT	W	2986.01	1.07×E04	3.12	25.00
LST	W	データなし	データなし	2.90	25.00

水への溶解度は一般的な MRI コントラスト剤については溶解度表を用い、ポリタングステン酸塩については密度と濃度の関係グラフ（図 2.1）から推定した。

表 2.2 本実験で用いたマルチモーダルコントラスト溶液候補の濃度

化合物	常磁性金属のモル濃度 [mM]
Gd-DTPA	1×E-01, 5.00×E-01, 1.0×E00, 5.00×E00, 1.0×E01, 5.00×E01, 1.00×E02
MnCl ₂	1×E-01, 5.00×E-01, 1.0×E00, 5.00×E00, 1.0×E01, 5.00×E01, 1.00×E02
CuSO ₄	1×E-01, 5.00×E-01, 1.0×E00, 5.00×E00, 1.0×E01, 5.00×E01, 1.00×E02
NiSO ₄	1×E-01, 5.00×E-01, 1.0×E00, 5.00×E00, 1.0×E01, 5.00×E01, 1.00×E02
SPT	2.02×E01, 4.06×E01, 8.20×E01, 2.11×E02, 3.90×E02, 5.30×E02, 9.65×E02, 2.03×E03, 4.58×E03, 7.64×E03, 9.61×E03
LST*	2.02×E01, 4.06×E01, 8.20×E01, 2.11×E02, 3.90×E02, 5.30×E02, 9.65×E02, 2.03×E03, 4.58×E03, 7.64×E03, 9.61×E03

* LST は推定値

2.2 撮像プロトコル

サンプルチューブをチューブホルダーに固定し (図 2.2), MRI, Tx および CT の撮像を行った (表 2.3)。MRI 撮像は 3T MRI (MAGNETOM Prisma, Siemens AG, Erlangen, Germany) 装置と市販の頭部と頸部用コイル (Head/Neck 20, Siemens AG, Erlangen, Germany) を用いて行った。MRI 撮像を可能にするためには十分なプロトン信号が必要であり, そのためにチューブホルダーを水槽内に配置した。MRI 撮像プロトコルには画像コントラスト評価用に T1w と T2w と, 縦緩和時間および横緩和時間測定用に inverse recovery (IR)^{83,84} と Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)^{85,86} シーケンスを用いた。T1w には, the magnetization-prepared rapid acquisition with gradient echo (MPRAGE) シーケンス, T2w には, the Sampling Perfection with Application optimized Contrast using different flip angle Evolution sequence (SPACE) シーケンスを用いた。Tx 撮像には中心部の空間分解能が 1.75 mm 半値全幅⁸⁷である動物用 PET 装置 (microPET Focus220, Siemens Co., Ltd., Knoxville, TN, USA) を使用した。Tx データは⁶⁸Ge-⁶⁸Ga 点線源 (511 keV) を使って 30 分間の撮像より得られ, 再構成アルゴリズム ordered subset-expectation maximization (OS-EM) を使用して画像化した。CT 撮像は X 線フラットパネルディテクター搭載の動物用コンビーム CT (R_mCT2, RIGAKU, Japan) を用いて行った。画像データは管電圧 90 kVp, 管電流

0.2mA の設定で 2 分間の撮像より得られた。CT 画像は Feldkamp cone-beam アルゴリズムを使用して再構成した。

表 2.3 撮像条件

撮像法	パルス シーケ ンス	TR (ms)	TE (ms)	TI* (ms)	撮像時 間 (分)	ボクセルサイズ (mm)	マトリックス (mm)
T1w	MPRA GE	2400	2.19	1060	22.9**	1×1×1	256×192×256
T2w	SPACE	3200	564	—	4.8	1×1×1	256×192×256
Tx	—	—	—	—	30	0.95×0.95×0.80	256×256×95
CT	—	—	—	—	2	0.12×0.12×0.12	512×512×512
T1 Relaxation	IR	5000	8.4	***	386	1×1×5	256×256×1
T2 Relaxation	CPMG	5000	****	—	21.5	1×1×5	256×256×1

*TI: Inversion time, ** 加算回数 4 回,

*** a variable TI = 21, 30, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, and 3000

**** a variable TE = 8.5, 17, 25.5, 34, 42.5, 51, 59.5, 68, 76.5, 85, 93.5, 102, 110.5, 119, 127.5, and 136

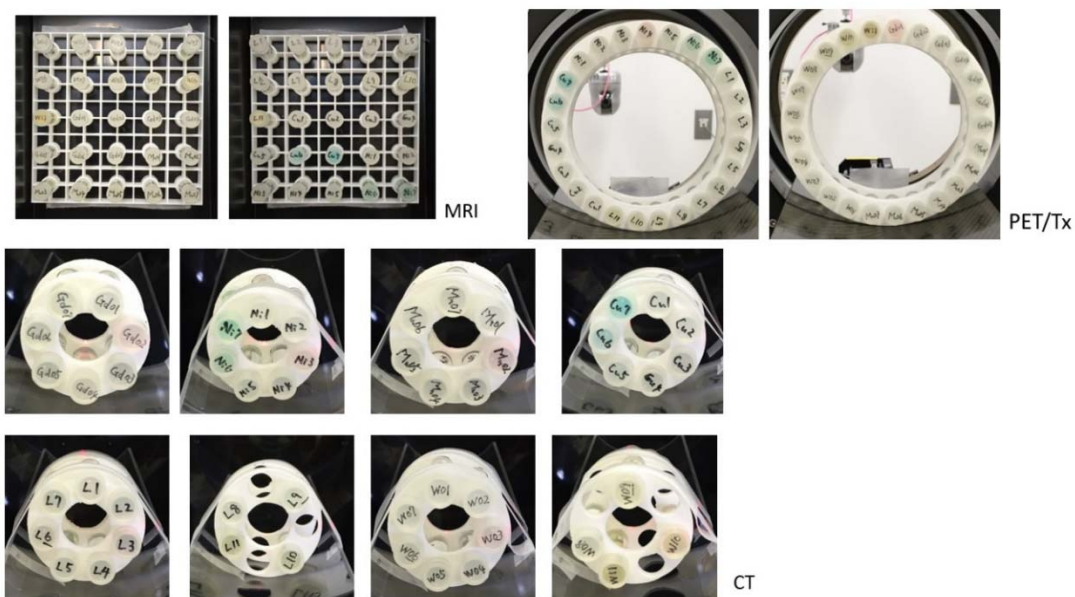


図 2.2 溶液充填したサンプルチューブと撮像モダリティごとの配置

2.3 溶液のコントラストや特性の評価方法

作成した溶液の画像上でのコントラストを4つの画像モダリティ (T1w, T2w, CT, および Tx) それぞれにおいて推定した。画像コントラストとは蒸留水の信号値に対する溶液の信号値と定義した。溶液コントラスト画像は、各モダリティ (T1w, T2w, CT, および Tx) における蒸留水画像の平均信号レベルを使用して溶液の画像をスケージングすることによって作成した。画像の計算には FSL mathematical image manipulation tool, FSLMATHS (FMRIB Image Analysis Group, Oxford, UK) を使用した。すべてのモダリティタイプの画像を trilinear 補間による等方性ボクセルサイズ ($0.5 \times 0.5 \times 0.5$ mm) に再スライスした後、チューブ内の溶液の断面積の 75% をカバーする 2 次元の関心領域 (ROI) で平均信号と標準偏差 (SD) を算出した。ROI 計算には AMIDE (<http://amide.sourceforge.net/>) を使用した。また、縦磁化緩和 (T1) および横磁化緩和 (T2) の物理的特徴も評価した。これらの値は次に示す縦磁化の回復曲線と横磁化減衰の式より算出した。

$$M_z = M_0 \times \left(1 - 2\exp\left(-\frac{TI}{T_1}\right) \right) \quad (2, 1)$$

$$M_{xy} = M_0 \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) \quad (2, 2)$$

ここで、 M_z と M_{xy} は縦磁化および横磁化を示し、 M_0 は熱平衡状態の磁化、 T_1 と T_2 はコントラスト剤の縦磁化緩和時間と横磁化緩和時間、そして、 TI と TE は、それぞれ反転回復時間とスピンエコー時間を示す。パラメータ (T_1 と M_0) または (T_2 と M_0) は、Microsoft Excel を用いて上記の曲線の最小二乗法により推定した。T1 緩和能 (r_1) と T2 緩和能 (r_2) は、次の式に基づいて算出される。

$$r_1 = \frac{1}{[c]} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_1(w)} \right); r_2 = \frac{1}{[c]} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_2(w)} \right) \quad (2, 3)$$

ここで、 $[c]$ は溶液濃度、 $T_1(w)$ と $T_2(w)$ は蒸留水での縦緩和時間と横緩和時間を示す。(2, 3) 式の右側はさまざまな濃度での緩和能の変化を表す。つまり、緩和能は縦軸に緩和率、横軸に溶液濃度をプロットして得られた回帰直線の傾き ($R^2 \geq 0.9$) として得られる。また、光子 (γ 線, X 線) の通過を変化させる減衰率である線減衰係数 μ (1/cm) も評価した。各溶液の化学式と組成比を XCOM データベース (NIST, USA, <https://www.nist.gov>) に入力することにより各溶液の μ (1/cm) 値を取得した。

2.4 タングステン水溶液のコントラストと特性結果

2つのポリタングステン酸塩溶液 LST と SPT および従来の MRI 造影剤 (Mn, Ni, Cu, Gd) のコントラストと濃度の関係を図 2.3 に示す。赤色で示す2つのポリタングステン酸塩溶液は、T1w (図 2.3a), T2w (図 2.3b), CT (図 2.3c), および Tx (図 2.3d) を含むすべてのモダリティで非常に高濃度 ($> 10^2$ mM) でのみ高いコントラストを示した。対照的に、青色で示す従来の MRI 造影剤は、非常に低い濃度 (それぞれ約 10 mM および約 10^{-1} mM) で T1w (図 2.3a) および T2w (図 2.3b) で最も高いコントラストを示し、その濃度以上で急激に低下したが、SPT および LST はこのように低濃度で全くコントラストが示さなかった。LST と SPT は、従来の MRI 造影剤が溶解度の制限から水に溶解しない濃度 (T1w, $> 10^3$; T2w, $> 10^1 \sim 10^3$ mM) でも高い造影性を示した。CT と Tx (図 2.3c, d) では、ポリタングステン酸溶液は高濃度 ($> 10^3$ mM) で明らかにコントラストが高く、従来の MRI 造影剤はどの濃度でもコントラストを示さないことが確認された。

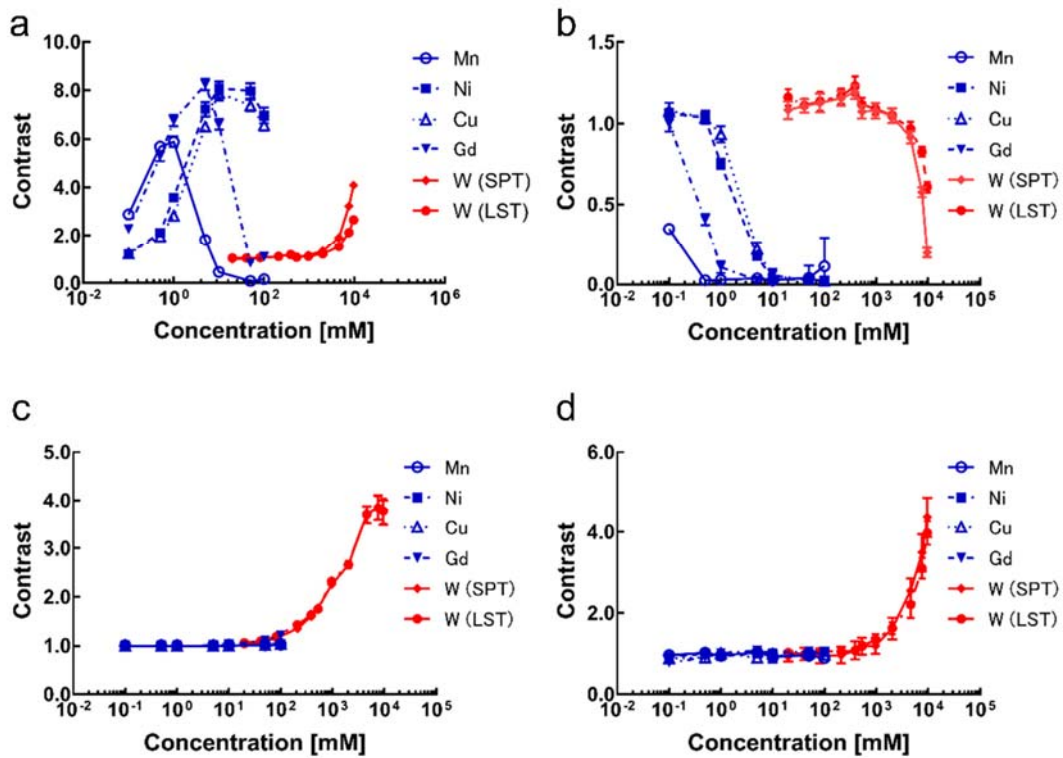


図 2.3 緩和能と線形減衰係数の結果

緩和能および線減衰係数の測定結果を表 2.4 に示す。MRI 造影剤として広く用いられている常磁性体金属の Gd と Mn は非常に高い T1 緩和能の値を示したが（それぞれ $4.09 \text{ mM/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $7.33 \text{ mM/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ），前述のように線形関係は低濃度でしか見られなかった（それぞれ $0.10 \sim 5.00 \text{ mM}$, $0.10 \sim 1.00 \text{ mM}$ ）。また，Cu や Ni といった他の金属についても， $0.10 - 5.00 \text{ mM}$ の低濃度域で同様のパターンの T1 緩和能が見られた（それぞれ $0.63 \text{ mM/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $0.62 \text{ mM/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ）。一方，W の T1 緩和能は非常に小さく（ $0.43 \times 10^{-3} \text{ mM/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ），直線性は非常に高い濃度（ $4.58 \times 10^3 \sim 9.60 \times 10^3 \text{ mM}$ ）でのみ見られた。T2 緩和能については，磁場帯磁率アーチファクトのため正確に評価できなかった Mn を除くすべての造影剤で同様の傾向がみられた。ポリタングステン酸溶液の CT における線吸収係数は，従来の MRI 造影剤の 10 倍（CT レベル：70keV）または 34 倍（Tx レベル：511keV）であった。

表 2.4 ポリタングステン酸溶液の緩和能および線減衰係数と従来の MRI 造影剤との比較

常磁性 体金属	水溶液濃度		緩和率 [mM/L ⁻¹ ・s ⁻¹]		線減衰係数 [μ]	
	濃度	密度	r ₁	r ₂	CT レベル	T _x レベル
	[mM]	[g/mL]				
Gd	5.00	1.00	4.09	5.46	0.20	0.10
Mn	1.00	1.00	7.33	—*	0.19	0.10
Cu	5.00	1.00	0.63	0.78	0.19	0.10
Ni	5.00	1.00	0.62	0.88	0.19	0.10
W	9.60×10 ³	2.88	0.43×10 ³	0.61×10 ³	19.70	0.34

水溶液濃度は緩和能測定可能範囲内での最大値とした。*)Mn は磁化率アーチファクトのため緩和能を評価することができなかった。

図 2.4 は、T1w, T2w, CT, Tx において、ポリタングステン酸溶液の画像コントラストを従来の MRI 造影剤と比較したものである。6 本の異なる金属溶液をサンプルチューブに充填し円筒のチューブホルダーに設置した (図 2.4a)。それぞれの溶液は T1w コントラストが高かった濃度に設定した (W-1: SPT 9.6 M, W-2: LST 9.6 M, Gd: Gd-DTPA 1.0 mM, Cu: CuSO₄ 10.0 mM, Ni: NiSO₄ 10.0 mM, Mn: MnCl₂ 0.5 mM)。ポリタングステン酸溶液 (黄色の矢印) は、T1w では従来の MRI 造影剤よりもわずかにコントラストが劣るが、他の画像モダリティ (T2w, CT, Tx) では驚くほど高いコントラストを示した (図 2.4b)。これらの結果から、ポリタングステン酸溶液は、従来の MRI 造影剤と比較して、4 つのモダリティにおいて、より明確に識別可能なコントラストを提供する可能性があることが示された。

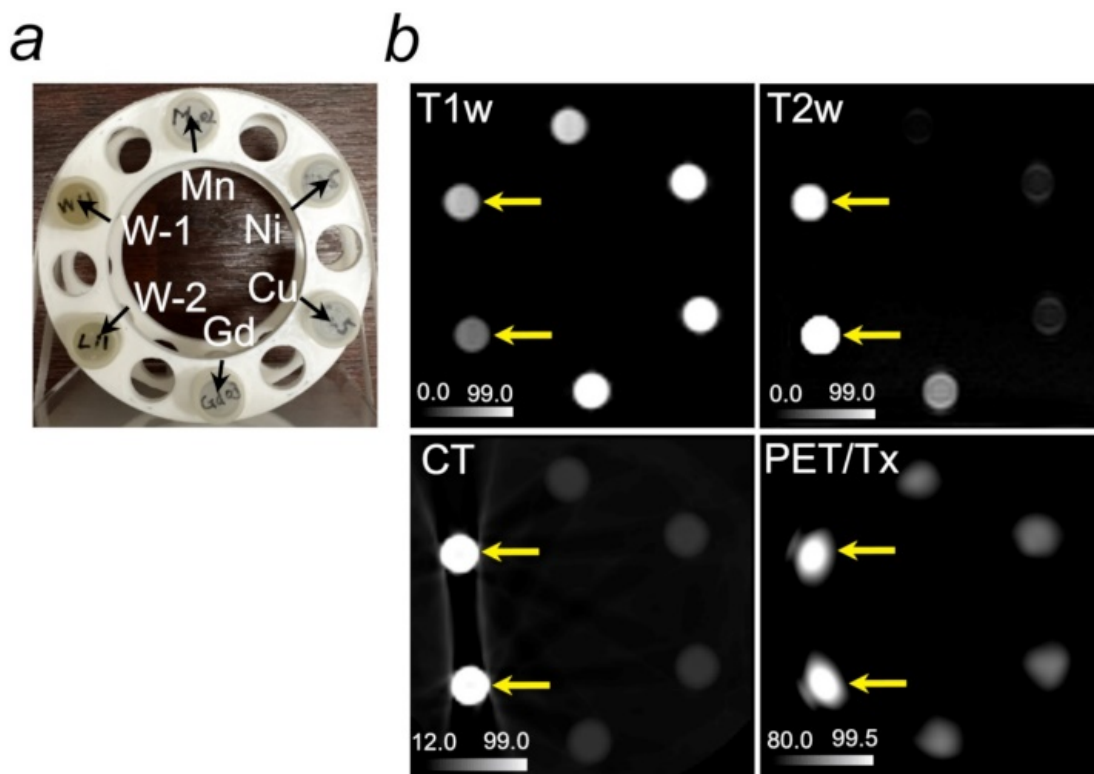


図 2.4 T1w, T2w, CT, Tx の信号強度レベル間の比較

(a) 6 本のサンプルチューブの写真 (b) T1w では全ての MRI 造影剤が明瞭に見えるが、タングステン溶液 (SPT と LST) (黄色矢印) のみ (黄色矢印) は T2w, CT, Tx 画像で高いコントラストを示した。

2.5 考察

本研究では、MRI、CT、Tx などの複数のイメージングモダリティにおいて高コントラストを有するポリタングステン酸溶液を含む新規フィデューシャルマーカを開発した。これら3つの画像モダリティ全てにおいて高いコントラストを有する薬剤の報告は確認でない。このマーカが T1w, T2w, CT で高いコントラストを示すことは特筆すべきことで、従来の造影剤ではほとんど見られないことである。この特性は タングステンの緩和能が非常に低いことと、タングステン塩の溶解度（それ故に高い分子密度）が原因であると思われる。また、このマーカが特に高い密度（ $\sim 3.0\text{g/mL}$ ）を有していたことも注目に値する。その結果、マーカは Tx において著しいコントラストを示すようになった。

このマーカの主な特徴は、含有するポリタングステートが高溶解度・高密度であり、高濃度では高い磁気特性を持つことであった。Tx や CT では、電波（ γ 線や X 線）の吸収率が高く、高密度の材料が高いコントラストを実現する。ポリタングステン酸溶液の線減衰係数は他の溶液に比べて大幅に高く、これはポリタングステン酸化合物の高い溶解度に起因する（表 2.1）。MRI では、市販の MRI 造影剤と比較してポリタングステン酸は T1w, T2w の両画像で優れた信号強度を示すことを見出した。この緩和特性はポリタングステン酸そのものが生成している可能性もあるが、水溶液の粘性に関係していると考えている⁸⁸。LST と SPT の粘度は、密度 2.86g/cc で約 12cP 、 2.8g/cc で約 28cP であるが、調査した他の造影剤は水に近い粘度レベルであった。

第3章 新規マルチモーダルマーカを用いた 位置合わせ法の開発

異なるモダリティ画像間の位置合わせに必要なポイントベースの位置合わせ法を提示する。これらのマーカを用いたマルチモーダル位置合わせ、特に PET と MRI 間の高精度な位置合わせが必要な大脳皮質サーフェスマッピングへの適用性を検証するために、マカクザルを用いた画像実験と位置合わせの精度解析を行った。マカクザル用マーカ容器の設計について 3.1 節で、マルチモーダル撮像実験プロトコルに関しては 3.2 節で述べる。今回使用した位置合わせ方法について 3.3 節で説明し、その位置合わせ精度評価結果に関しては 3.4 節で述べる。実験から得られた結果からこのシステムの有用性や他の応用例などを 3.5 節で考察する。

3.1 マーカ容器のデザイン

外部マーカを用いた位置合わせ研究において重要なことは、マーカをどのように被検体に固定するかということである。そこで、今回はマカクザルを用いた PET, MRI 実験に特化したマーカ容器を設計および固定を行った (図 3.1ab)。容器は 2 つの部分からなり、1 つは球状 (外径: $\Phi 12$ mm, 内径: $\Phi 10$ mm) でタングステン酸塩溶液を充填する部分、もう 1 つは対象物 (例えば頭皮) の表面に取り付けて球状部分を支え、Tx などの投影画像での被写体とマーカの重なりを防ぐために対象物の表面から十分な隙間を維持する支柱である。容器は 3DCAD ソフトウェア (Rhinoceros 3D v5.0, McNeel&Associates, 米国) で設計し、3D プリンタ (Agilista, キーエンス, 大阪, 日本) を用いて作製した。今回は液体として市販されている LST 液は SPT 粉末より扱いやすいことからマーカ溶液に LST 液を使用した。頭皮の伸縮でマーカの位置ずれが起きることを防ぐために、事前に伸縮性テープの包帯でマカクザルの頭部を包み込んだ。5 つのマーカを頭部に貼り付けた、1 つのマーカは撮像中にマカクザルの頭と固定装置の間での動きがあるかどうか評価するために固定装置に取り付けた (図 3.1b)。

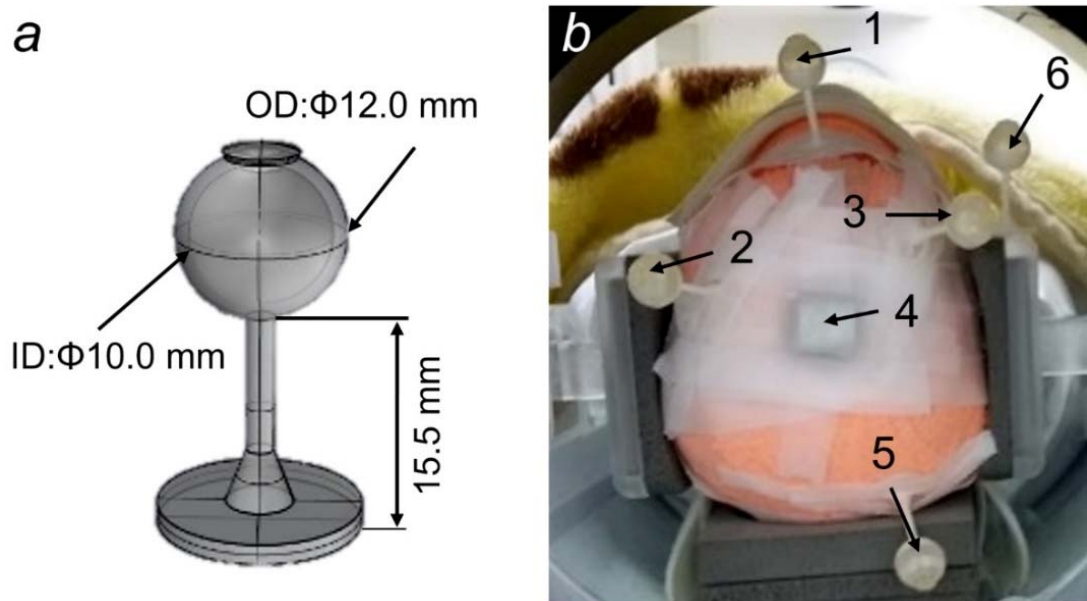


図 3.1 マルチモーダルマーカのデザインと貼り付け図

- (a) マーカは 3D プリンタを用いて製作し、マーカ溶液を充填した球体部と、個体とマーカとの間に十分な隙間を発生させる支柱部で構成されている。(b) マカクザルの頭部を弾性包帯（オレンジ色）で覆い、包帯表面に 5 個のマーカ（1～5）をテープで取り付けた。1 個のマーカ（6）は固定具に取り付けた。OD は外径，ID は内径。

3.2 撮像実験プロトコル

初めに、マカクザルの全身麻酔を行うための前麻酔処置を行った。気道内分泌を減少させるための硫酸アトロピン (0.1mg) の筋肉内注射を行い、その 20 分後に鎮静化のためのケタミン (6mg/kg) とデクスメデトミジン ($4.5 \mu\text{g/kg}$) の筋肉内注射を行った。鎮静化させたサルの咽頭と喉頭に局所麻酔薬 (リドカインポンプスプレー, 8%) をスプレーし挿管チューブを挿管した。呼吸状態の確認および維持には人工呼吸器 (Cato, Dräger, Germany) を使用した。次に、持続麻酔と PET トレーサーの投与のための静脈内ラインを確保した後に、PET と MRI 撮像の両方で使用可能な固定装置上にサルを固定し、上記のようにサルの頭と固定装置にマーカーを取り付けた (図 3.1b)。撮影中の麻酔深度はイソフルラン (0.6%) の吸入とデクスメデトミジン ($4.5 \mu\text{g/kg}$) の静脈内注入の組み合わせで維持した。撮像中のマカクザルの体温は全身を毛布で覆うことで $36 \pm 0.5^\circ$ に維持した。

PET 撮像実験では、Tx に続いて EM を行った。Tx は、 ^{68}Ge - ^{68}Ga ポイントソースを使用した単一フレームの 30 分間の撮像を行った。EM には、ドーパミントランスポーター (dopamine transporter: DAT) リガンドである N-(3-iodoprop-2E-enyl)-2 β -carbomethoxy-3 β -(4-methylphenyl)nortropine ($[^{11}\text{C}]$ PE2I)⁸⁹ を使用した。EM の開始と同時に静脈内に ($[^{11}\text{C}]$ PE2I) (400MBq) 投与し、90 分間の撮像を行った。Tx は、ordered subset-expectation maximization (OS-EM) アルゴリズム (Subset 1, Iteration 10) を使用し再構成した。Tx データを使用して減衰を補正した後、標準の 2D Filtered Back-projection (FBP) 法 (フィルタ: Hanning, カットオフ周波数: 0.4 cycle/pixel) を用いて EM を再構成した。PET データ取得後、サルを固定用ベッドに固定したまま PET 室から MRI 室に移した。マーカー溶液の基本特性のための撮像実験と同じ 3T MRI 装置と Head/Neck 20 コイルを用いて T2w 画像を取得した。大脳皮質サーフェスマップ (Cortical surface map) を取得するために、別日に MRI 撮像実験をマカクザル専用にカスタマイズされた 24 チャンネルコイルを用いて実施した。T1w には MPRAGE シーケンスを、T2w では SPACE シーケンスを使用した (表 3.1)。

表 3.1 撮像条件

撮像法	パルスシーケンス	TR (ms)	TE (ms)	撮像時間 (分)	ボクセルサイズ (mm)	マトリックス (mm)
Tx	-	-	-	30.0	0.95×0.95×0.80	256×256×95
EM	-	-	-	90.0	0.95×0.95×0.80	256×256×95
T2w	SPACE	3000	538	8.5*	0.80×0.80×0.80	256×256×208
T1w	MPRAGE	2200	2.2	17.5**	0.50×0.50×0.50	256×256×224

* 加算回数 2 回, **加算回数 3 回

3.3 新規マルチモーダルマーカーを用いたマーカー基準 の位置合わせ法 (marker-based fiducial registration : MBFR) 法

3.3.1 MBFR 法

Tx をインプット画像, T2w をリファレンス画像として位置合わせを行った。位置合わせの前処理として両画像を 0.2 mm ボクセルサイズにリスライスした。位置合わせは以下の 3 つのプロセスで構成される。 1) 対応するマーカーの座標の識別 : それぞれの画像においてしきい値, 二値化処理を行いマーカー領域の識別をおこなった後にマーカーの重心を計算した。そして, 対応するマーカーをそれぞれの画像上で特定した。 2) ポイントベースによる位置合わせ : 対応するマーカーの座標は, ポイントベースの位置合わせ用の Kabsch アルゴリズムを使用して Tx と T2w の間で位置合わせを行った⁹⁰。 3) リスライス : EM は, ステップ 2 で計算された Tx から MRI への変換行列を使用して MRI に位置合わせした。画像位置合わせには, FSL ツールと Python で書かれたスクリプトを使用した。

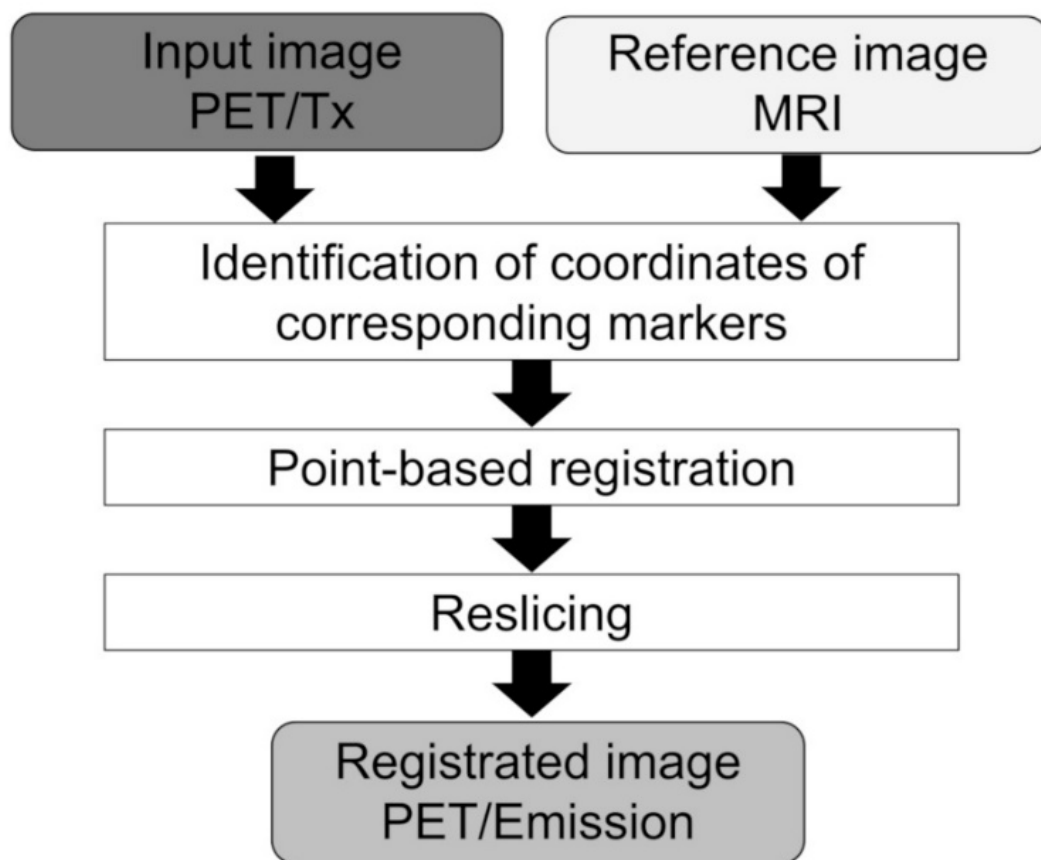


図 3.2 MBFR による位置合わせのワークフロー

Tx 画像のマーカースの中心点は、ペアとなるマーカースの座標を特定した後、ポイントベースのアルゴリズムを用いて MR 画像の対応するマーカースの中心点に位置合わせされる。次に、この過程で計算された PET から MRI への変換行列を用いて、EMEM 画像を MR 画像に位置合わせする。

3.3.2 ソフトウェアのみの位置合わせ方法

MBFRによる位置合わせ方法の性能評価するために、PET画像とMR画像といった異なるモダリティ画像間の位置合わせ法において一般的に使用されているソフトウェアのみを用いた手法でもPETとMR画像の位置合わせを行った。具体的には、EMを時間平均したMean EMとT2w間の位置合わせを剛体変換（コスト関数：相互情報量（mutual information）、自由度6）を用いて行った。ソフトウェアのみの位置合わせを行うためには画像上のマーカの影響を排除する必要があり、事前に画像上からマーカのコントラスト部分の消去を手動で行った。そして、上記の剛体変換で得られた変換行列を元のEMデータに適用して位置合わせされたEMデータを取得した。ソフトウェアのみの位置合わせには線形位置合わせツールFLIRT（FMRIB's Linear Image Registration Tool）を使用した。

3.4 MBFR法とソフトウェアのみの方法の位置合わせ精度の比較

3.4.1 位置合わせ精度比較方法

MBFRによる位置合わせ方法の性能を、広く使用されているソフトウェアのみの方法と比較することで検討した。位置合わせの成功の指標として、marker registration error (MRE)を用いて算出した。MREは、位置合わせTx画像と参照MR画像の各対応マーカ点（1, 2, …, n）の重心間の距離（ d ）の二乗平均平方根として決定される。

$$MRE = \sqrt{\frac{1}{n}(d_1^2 + d_2^2 + \dots + d_n^2)} \quad (3, 1)$$

MREの推定精度には限界があることが知られているが^{91,92}、我々の経験では、位置合わせ精度や位置合わせ方法の比較のためには貴重な指標となる。位置合わせされたEM画像における¹¹C] PE2Iの結合能（Binding Potential: BP）値の脳皮質サーフェスマップをMBFRとソフトウェアのみの方法それぞれで作成した。位置合わせは、MBFRの方法またはソフトウェアのみの方法のいずれかを使用して行った後に、boundary-based registration (BBR)によって最終的な最適化を行った⁵。BP画像は、Partial Volume Correction (PVC)⁹³としてRegion-based voxel-wise (RBV)補正および動的データの区画解析（IchiseのMultilinear

Reference Tissue Model 2 : MRTM 2) により計算された。大脳皮質サーフェス推定と PVC には, FreeSurfer 5.3.0-HCP (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>)⁴ を使用した。BP は大脳皮質サーフェスに沿って平滑化 (ガウスクアーネル関数, $\sigma = 1.25$ mm) した。

MBFR 法とソフトウェアのみの方法から得られた大脳皮質 BP 値を, 過去の研究⁹⁴の対応する dopamine transporter-immunoreactivity (DAT-IR) と比較した。BP 値と DAT-IR の相関関係を調べるために, ノンパラメトリック検定 (Spearman の rho 検定) が実施した。以前の研究で DAT-IR について測定された 20 の ROI (2, 9, 10, 11, 12, 13, 46d, 46v, 7A, 8B, 8l, 8m, 8r, F1, F2, FST, INSULA, MST, V1, V2) を, M132 アトラス^{94,95}から選択した。図 3.4f は, 内側の 2 つの ROI (9 と 10) を除いた半球の外側の 18 の ROI の位置を示している。

3.4.2 結果

図 3.3 は, T2w 画像 (図 3.3a) と Tx 画像 (図 3.3b) の間で, ソフトウェアのみと MBFR による 2 種類の位置合わせを行った結果である。位置合わせ後の 2 種類の融合画像 (図 3.3c, d) を比較してもマカクザル頭部からの情報では位置ずれの判断は難しいが、マーカー部分の拡大図を見れば、ソフトウェアのみの方法より MBFR による位置合わせ方法の精度が高いことが確認できる。

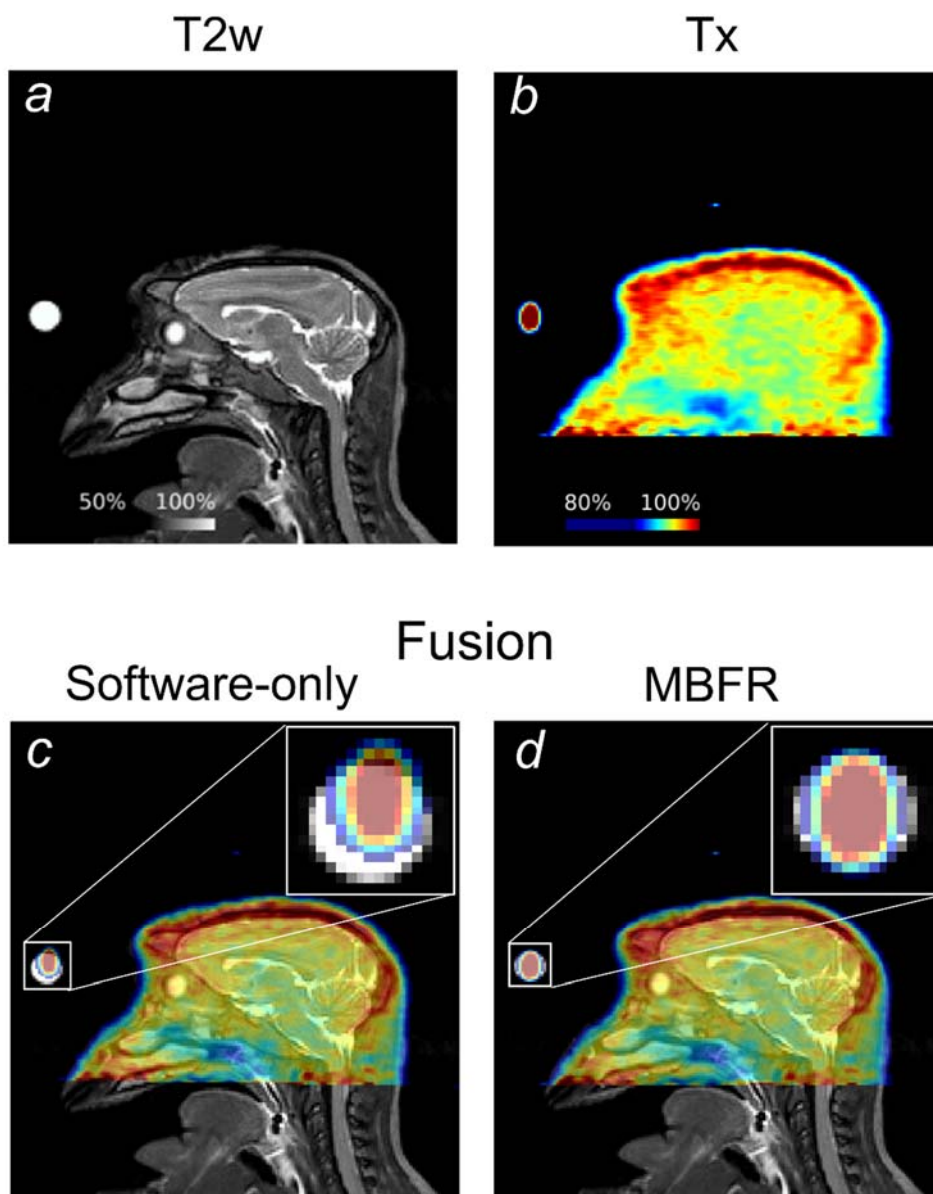


図 3.3 ソフトウェアのみと MBFR による位置合わせの比較
ソフトウェアのみの位置合わせでは正確な位置合わせができないが、マーカーを用いた位置合わせでは正確な位置合わせができることがマーカー部分拡大図 (c, d) から判断できる。

ソフトウェアのみによる位置合わせと MBFR による位置合わせの MRE の計算結果を表 3.2 に示した。マーカーの 1 つ（番号 4）は Tx の視野（FOV）外であったため、このマーカーは FRE の計算から除外した。そこで、マカクザルの頭部に取り付けた 4 個のマーカーと、別途、固定装置に取り付けた 1 個のマーカーを用いて FRE 計算を行った（5 個のマーカー）。4 個の MBFR を用いた場合の FRE は、ソフトウェアのみの位置合わせに比べて大幅に小さくなった（それぞれ 7.30×10^{-8} mm vs. 2.35 mm）。これはマーカーの MRE においても同様であった（それぞれ 0.27 vs. 2.51）。しかし、5 個のマーカーでの MRE は 4 個のマーカーでの MRE よりも両方法で大きく、これは 5 番目のマーカー（固定装置に取り付けられた）の位置が同じではなく、MRI と Tx 撮像実験の間で固定装置に対してマカクザルが相対的に移動した可能性があることを示唆するものである。

表 3.2 MBFR とソフトウェアのみの位置合わせ法における MRE の比較

位置合わせ方法	Marker registration error (MRE) [mm]	
	4 つのマーカー (マカクザル)	4 つのマーカー (マカクザル) + 1 つのマーカー (固定装置)
ソフトウェアのみ	2.35	2.51
MBFR	7.30×10^{-8}	0.27

図 3.4 は、PET 画像の脳皮質サーフェスマッピングにおける正確な画像位置合わせの重要性を示している。図 3.4a, b, c の体積断面図と図 3.4d, e の脳皮質サーフェスマップにおいて、ソフトウェアによる位置合わせと MBFR による位置合わせの間に、微妙ではあるが顕著な差異が検出された。なお、ソフトウェアのみの位置合わせでは島皮質（図 3.4d の白丸）で高い BP 値が得られたが、これはおそらく被殻（図 3.4b の白矢印）の位置合わせの誤りに起因するものである。一方、MBFR を用いた位置合わせでは、白質サーフェスでのこのような BP の交差は見られなかった。これらの微妙な位置合わせの違いにより、脳皮質サーフェスマップの島嶼部における $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ BP に大きな違いが生じた（図 3.4d, e）。Lewis ら⁹⁴の表 1 の脳皮質 ROI を使用して、 $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ BP 値と DAT-IR 軸索の相対密度を比較すると、MBFR による位置合わせ ($\rho = 0.48$, $p = 0.03$) には有意な関連があったが、ソフトウェアのみの位置合わせ ($\rho = 0.15$, $p = 0.52$) では関連はなかった。DAT-IR が最も高い脳皮質領域は一次運動野（図 3.4f の F1）であり、これは F1 の BP 値が MBFR による位置合わせでは高く（図 3.4e の黄色丸）、ソフトウェアのみの位置合わせでは低い（図 3.4e の黄色丸）ことから明らかである。しかし、下側頭葉皮質領域は、脳皮質サーフェスの両方の位置合わせで異常に高い BP を示した（図 3.4d, e の矢印）ことに注意しなければならない。これは、骨髄の高い活動からの残存部分体積とスピルオーバー効果に起因する可能性がある。

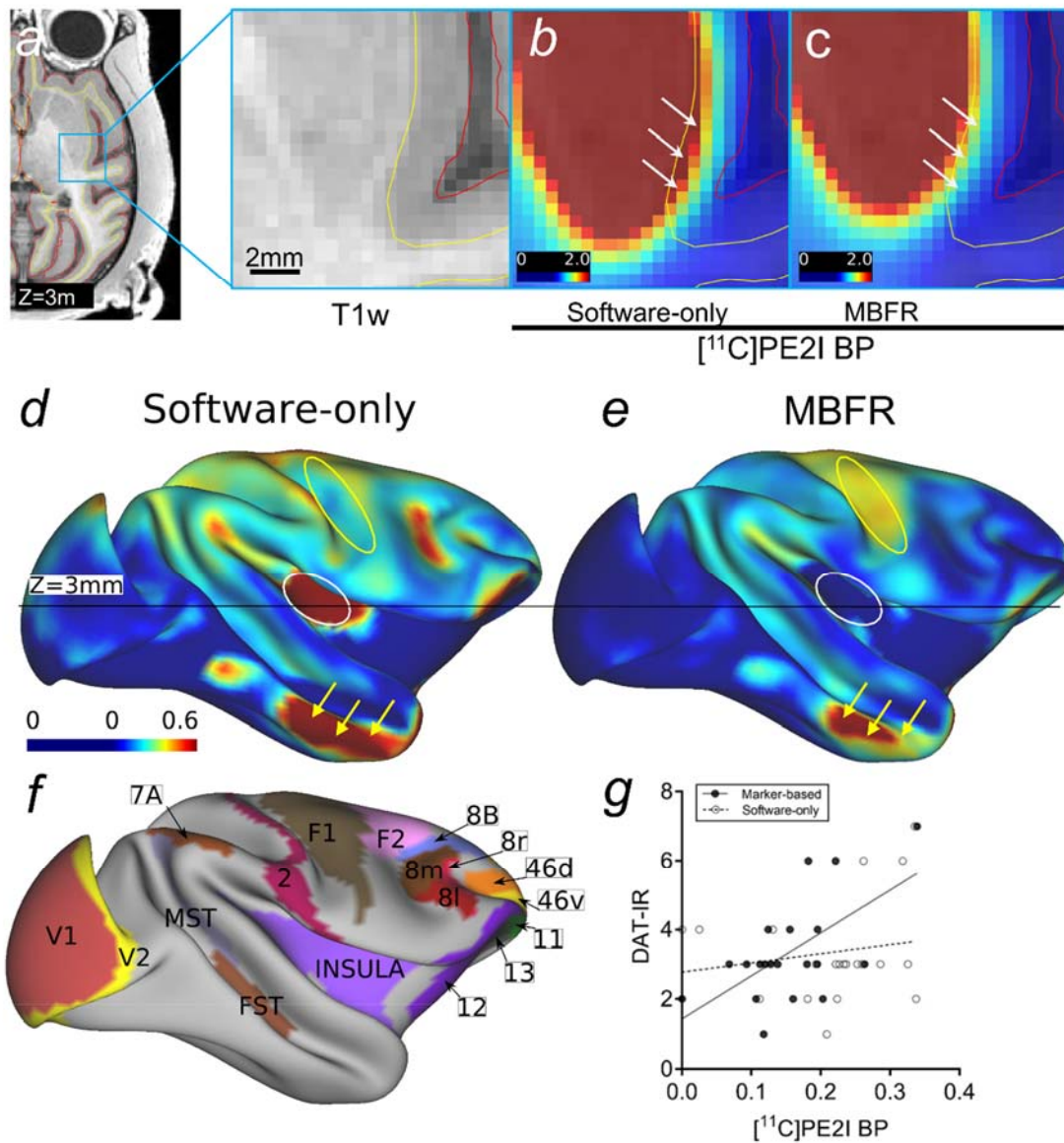


図 3.4 MBFR 法による高精度 PET 大脳皮質サーフェスマッピング

3.5 考察

3.5.1 マーカーの構成

今回作成したマーカーは、容器と支柱の2つのパーツからなり、3Dプリンタで設計・製造した。容器に高濃度溶液を封入した後に蓋で接着することで蒸発防止を図った。支柱に関しては、マーカーの輪郭と付着物の区別が付き画像上でマーカーの正確な位置を特定できるように、マーカーの容器が皮膚や骨に直接付着しないように設置した。

マーカーを用いた位置合わせ方法を検証するためにファントム実験を行った結果、画像取得中や取得間にマーカーが被写体に対して動かない限り、本システムはうまく機能することがわかった。最も堅牢で正確な方法は、標的臓器に近い頭蓋骨や骨に直接マーカーを固定する^{9,10}ことだが侵襲的で開腹手術が必要となるため、術中での位置合わせや実験動物での使用に限定されると思われる。そこで本研究では、自己粘着性の伸縮包帯を頭部に巻き、包帯にマーカーを貼り付けることで、皮膚の動きによるマーカーのズレを防いでいる。マーカーを直接皮膚に貼り付ける場合^{11,12,96,97}は、皮膚が緩んだり伸びたりしたときにマーカーが移動する可能性があるため、実験者は注意する必要がある。

3.5.2 位置合わせ精度と大脳皮質表面マッピング

ポリタングステン酸マルチモーダルマーカーによる位置合わせシステムは、ミリメートル以下の精度の画像位置合わせを提供し、DATの大脳皮質表面分布の神経生物学的な測定を可能にした(図3.4)。組織学的な“ground truth”として、DAT特異的な神経細胞マーカーであるDAT抗体を用いて推定したDAT-IR軸索の密度⁹⁴を用い、DATに対して高い親和性と選択性を持つPE2IのBP値と比較した。Lewis et al. (2001)のTable 1で選択した大脳皮質領域のDAT-IR値を解析したところ、MBFRを用いたDAT-IR軸索との有意な相関($\rho=0.48$, $p=0.03$)が見られたが、ソフトウェアのみの位置合わせ法では見られず($\rho=0.15$, $p=0.52$)、その結果、最も大きなDAT-IRを示す領域である一次運動野(F1)は、マーカーを用いて正確な位置合わせを行った場合、大脳皮質表面で明らかに高いBP値を示した。これらの結果は、PETデータの大脳皮質マッピングには正確な位置合わせが必須であり、マーカーは微細なレジストレーションに重要な最適初期位置の特定に有用であることを示唆している。また、下側頭葉のBP値が異常に高かったが、これは残存部分体積と骨髄からの波及効果によると考えられる

(Fig. 3. 4d, e)。このように、マカクザルの脳外組織をより正確にパーセレーションし、PVC化するためには、さらなる最適化と発展が必要である。

3.5.3 マルチモーダルマーカー位置合わせの限界

マルチモーダル画像位置合わせの主な限界は、位置合わせの精度がターゲットへのマーカーの厳密な固定に依存することである。したがって、画像撮像中あるいは撮像間のターゲット（例えば、頭部）に対するマーカーの動きは、位置合わせエラーにつながる可能性がある。本研究では、動物が麻酔されているため、実験内の頭部の動きは最小限であると予想されるが、マーカーが頭部に対して移動する可能性がある。そのため、今後の応用では、マーカーを対象物に強固に固定し、さらにシステムを最適化することが重要であると思われる。また、非常に高い密度や磁気の影響により、マーカー位置が不明瞭になる可能性があることも制約の一つである。例えば、非常に高い密度を有するマーカーは、CT 画像において「ストリーク」または「ビームハードニング」アーチファクトを引き起こす可能性があり、これによりマーカーの位置を正確に特定することが困難となる場合がある。しかし、ビームハードニングアーチファクトを補正する方法^{98,99}がいくつか提案され、最近の CT 装置で実装されている。最近の臨床用 PET 装置では、減衰補正に CT 撮像を用いることが多いため、Tx ではなく CT で使用するためだけにマーカーの最適密度を低下させることが可能である。MRI では、タングステン溶液は B_0 磁場不均一を引き起こし、磁化率アーチファクトや画像の局所的な歪みや信号損失を誘発することがあるが、 B_0 磁場マップデータとの組み合わせにより補正できる可能性がある¹⁰⁰。

第 4 章 マーモセット専用マルチモーダル脳ターゲ ティングシステムの開発

本章では、これまでに述べた MBFR 法による画像位置合わせ法をマーモセット専用のマルチモーダル脳ターゲティングシステムへの応用を行うために、マーモセット研究目的に沿った画像位置合わせ精度について再度検討する (4.1)。そして、HCP-NHP パイプラインに、開発マーカーによる高精度画像位置合わせ技術を用いて、マルチモーダル脳ターゲティングシステムの開発を行った。

4.1 マーモセット研究のための画像位置合わせ精度について再 度検討

4.1.1 実験プロトコル

マルチモーダル脳ターゲティングシステムのための画像位置合わせ精度を 2 つのモダリティ (CT と MRI) を用いて評価した。合計 10 頭のマーモセット (雄 N = 7, 雌 N = 3, 年齢 4.0 ± 2.2 歳, 体重 354 ± 33 g) それぞれに対して同日に 2 つのモダリティ撮像を連続で約 2 時間かけて行った。2 つの撮像実験の間は、マーモセット頭部にはマルチモーダルマーカーを装備した特注プラスチック製ヘッドホルダーを取り付けた。マーモセットの前処置としてケタミン (30 mg/kg) およびデクスメデトミジン ($5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$) + 硫酸アトロピン ($50 \mu\text{g}/\text{kg}$) の筋肉内注射を施した。マーモセットが鎮静し呼吸が安定した後、イソフルラン (0.5 %) 吸入とデクスメデトミジン ($5.0 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$) の静脈内注入で麻酔レベルを維持した。生理機能はパルスオキシメーター (7500F0, Nonin, MN, USA) を用いてモニターし、麻酔ガスの流量を調節して脈拍 (120 bpm/min) および酸素飽和度 (94 ~ 98 %) を維持した。直腸温をモニターし (Model 1030; SA Instruments, Inc., Stony Brook, NY, USA), 特注の温水循環システムにより約 34°C に維持した。

マルチモーダルマーカーを装備できるプラスチック製ヘッドホルダーは、マーカー容器 (図 4.1a) とヘッドホルダー (図 4.1b) からなり、3D ソフトウェア (Rhinoceros 3D v5.0, McNeel & Associates, USA) で設計し、3D プリンタ (Agillista, Keyence, Osaka, Japan) で製作したものである。また、今回使用

した小動物用 CT 装置のガントリ（ボア径 19 cm, FOV 径 7.3 cm）への使用が可能でヘッドホルダーを装着した状態のマーモセットが固定できるコンパクトな脳定位装置も製作した（図 5.5）。円筒形のマーカー容器の外形寸法は直径 3.2 mm, 長さ 3.55 mm, 内形寸法は直径 2.0 mm, 長さ 2.0 mm, キャップの寸法は直径 3.2 mm, 長さ 0.45 mm であった。マーカー容器には, 皮質骨の密度¹⁰¹に近くなるように密度 (1.9g/mL) を調整したタングステン溶液 (LST) を充填した。マーカー容器内への気泡の混入によるマーカー中心の同定精度の低下を避けるために, 円筒マーカー容器とキャップをタングステン溶液に浸した状態で密着させ（図 4.2a）, 接合には紫外線硬化型樹脂 (Bondic®, Laser Bonding Tech, Inc.) を使用して液体の蒸発を防いだ（図 4.2b）。しかし, マーカー容器が小さいこと、マーカー溶液の粘度が高いことで気泡の混入を完全に取り除くことは困難であった。原理的に MBFR の利用は 3 個以上のマーカーがあれば可能であるが, 十分な数の良品マーカーを位置合わせに使用するためにマーカー容器は最低 6 個用意した（図 4.2c）。ヘッドホルダーの形状（図 4.1b）は, マーモセット (N = 10) の中で最も大きな頭部サイズであったマーモセット（雄, 年齢 5.1 歳, 体重 407g）の MR 画像をもとに作成した。脳に対して効率よくマーカーを配置するために, 3 つのマーカーが同一平面上にならないようにマーカー容器を配置した（図 4.1b, 黄色の円柱）。頭部固定具は, 局所麻酔（リドカイン, 2%, 0.05 ml）後に 8~12 本の樹脂製ネジ (RENY Pan head machine screw M2.6, SUNC0 Industries co.ltd, Japan)（長さ: 2~8 mm）を用いて皮膚・頭蓋骨に固定した。この処置は比較的非侵襲的であり, ヘッドホルダーを取り外した後も, 皮膚や骨に目立った損傷はなかった。ヘッドホルダーを装着したマーモセットはそのまま MRI 室に移動し, 3T MRI 装置とマーモセット専用 16ch ヘッドコイル¹⁰²を用いて T1w と T2w 画像を取得した。次に, マーモセットを MRI 室から CT 室に移して動物用マイクロ CT 装置を用いて CT 撮像を実施した。MRI と CT 撮像のパラメータを表 4.1 に示す。

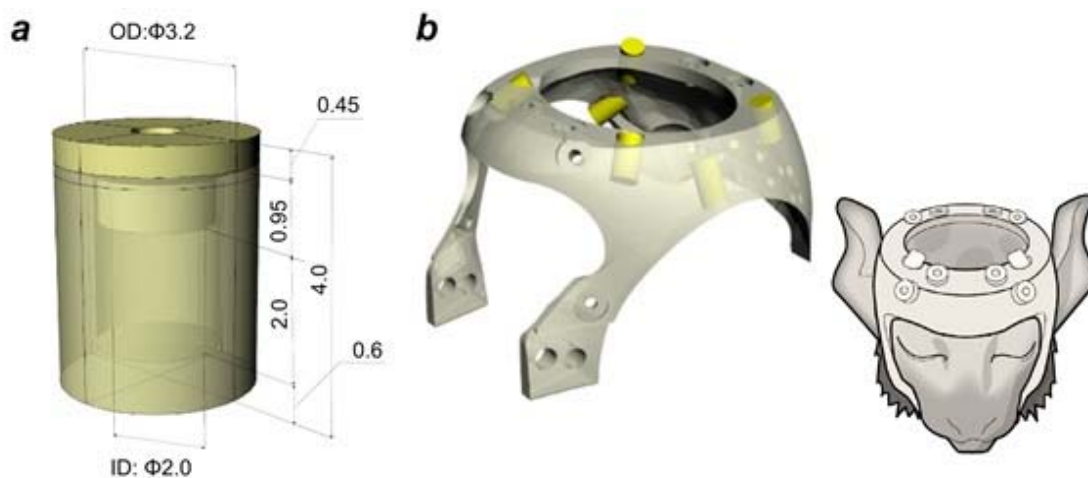


図 4.1 マルチモーダルマーカ―，ヘッドホルダーの設計と構造

表 4.1 撮像条件

撮 像 法	パルスシ ーケンス	TR (ms)	TE (ms)	TI (ms)	撮像時間 (分)	ボクセルサイズ (mm)	マトリックス (mm)
T1w	MPRAGE	2200	2.58	700	17.8*	0.36×0.36×0.36	70×59×46
T2w	SPACE	3000	558	-	6.2	0.36×0.36×0.36	70×59×46
CT	-	-	-	-	2	0.12×0.12×0.12	512×512×512

* 加算回数 3 回

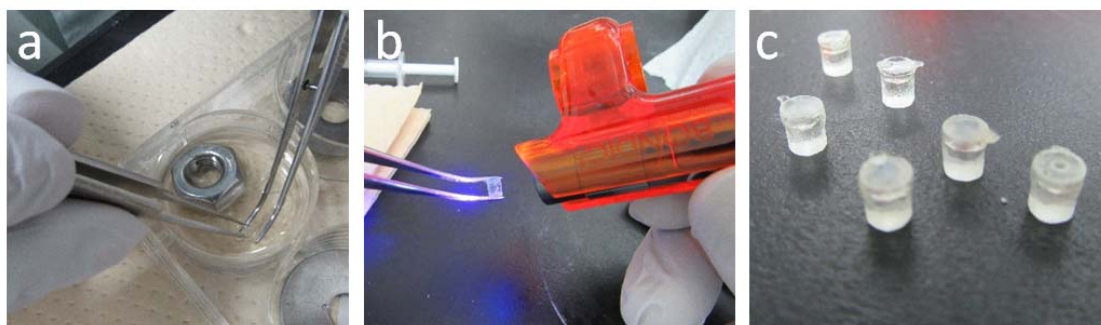


図 4.2 マルチモーダルマーカ―溶液充填方法

4.1.2 位置合わせ精度評価法

CT 画像と MR 画像の位置合わせ精度は、3.4.1 項でも使用した marker registration error (MRE) を用いて算出した。MRE は、MBFR、正規化相互情報量 (normalised mutual information : NMI)、境界ベース位置合わせ (boundary-based registration : BBR)⁵、および MBRF と BBR の組み合わせの間で比較した。位置合わせを行う際の関心領域の指定方法として、何も前処置を行わない full FOV と背景を除去するために閾値を設定した partial FOV (部分的 FOV と閾値処理) のいずれかを用いて実施した。背景 (空気) をゼロとするための閾値処理を MRI では 2、CT では -1000 とした。partial FOV はマーモセットの頭部を囲むように設定した。位置合わせの成功率を評価するために、今回は多くのマーモセット研究の目的にとって許容できない誤差の MRE が 1 mm より大きい場合は、位置合わせは「失敗」であるとみなした。位置合わせに失敗する確率は、失敗した試行の数を位置合わせの総数で割ることによって計算した。この失敗確率は、異なる位置合わせ方法の間で評価・比較した。

4.1.3 結果

CT 画像から MR 画像間の位置合わせの指標である MRE を位置合わせ方法 (NMI, BBR, MBFR) の違いで比較を図 4.3 に示す。MBFR w/o BBR では MRE は非常に小さく (0.15 ± 0.04)、一方、ソフトウェアのみの位置合わせ (NMI または BBR) では、すべての条件で有意に大きかった (p 値 ≤ 0.05 , One-way repeated measures ANOVA) (図 4.3a)。大きな MRE 誤差 (> 1.0 mm) は、初期の位置合わせの失敗によるものであると考えられる⁵。初期の位置合わせ失敗確率 (MRE > 1.0 mm を閾値とする) は、ソフトウェアベースの手法では 0.3~1.0 (NMI (full FOV) で 0.7, NMI (partial FOV) で 1.0, BBR (full FOV) で 0.3, BBR (partial FOV) で 0.7 と非常に高かったが、MBFR ではゼロであった。ソフトウェアのみの手法での初期化の失敗が多いのは、マーモセットの頭部が球状であることに起因すると思われる。BBR では位置合わせに失敗した場合、最小コストが高くなる (0.8 以上) が、位置合わせに成功した場合のコストは適度に小さかった (Full FOV では平均 0.56 ± 0.06 , Partial FOV では 0.59 ± 0.06)。MBFR に続いて BBR を行った場合、どの個体にも失敗はなく、最小コスト (0.68 ± 0.05) が少なかった。重要なことは、この MBFR+BBR アプローチは MBFR のみのアプローチと比較して MRE の値が比較的高くはなかったが、この失敗のない初期化の後に生体情報から

の BBR 法を行うことで、10 頭全てのマーモセットにおいて脳と頭蓋骨の位置関係が改善されたことである (図 4.3b, c)。つまり、これらの結果はソフトウェアのみの位置合わせと比較して MBFR+BBR アプローチの頑健性と精度を実証するものである。

MBFR は初期の位置合わせ成功率 100%を示し、CT と MR 画像の重ね合わせもかなり良好であったが、注意深く検査すると、一部のマーモセットで頭蓋骨と脳の界面で微妙な (潜在的な) 位置のずれが見つかった (図 4.3b, 拡大した断片を参照)。これはおそらく、マーカーに基づく位置合わせの精度が、マーカー重心の正確な同定に依存するためである。この限界を克服するために、頭蓋骨境界と頭部画像を位置合わせする BBR を用いた第 2 段の位置合わせを適用したところ、脳と頭蓋骨の境界について優れた画像位置合わせができた (図 4.3c)。このように、MBFR に続いて BBR を用いた 2 段階の位置合わせは、CT 画像と MR 画像の間で最も頑健かつ正確な位置合わせを達成した。

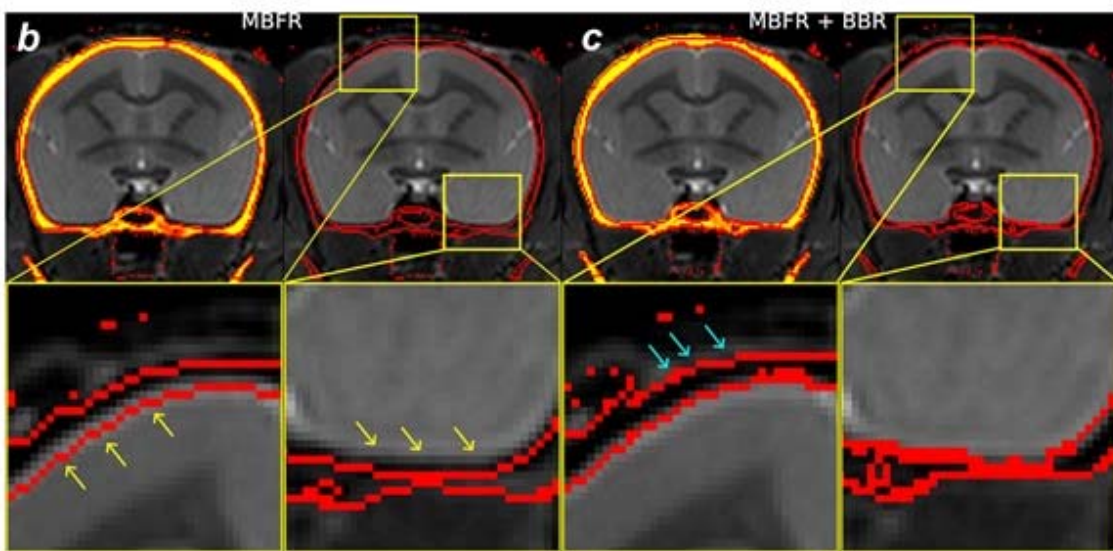
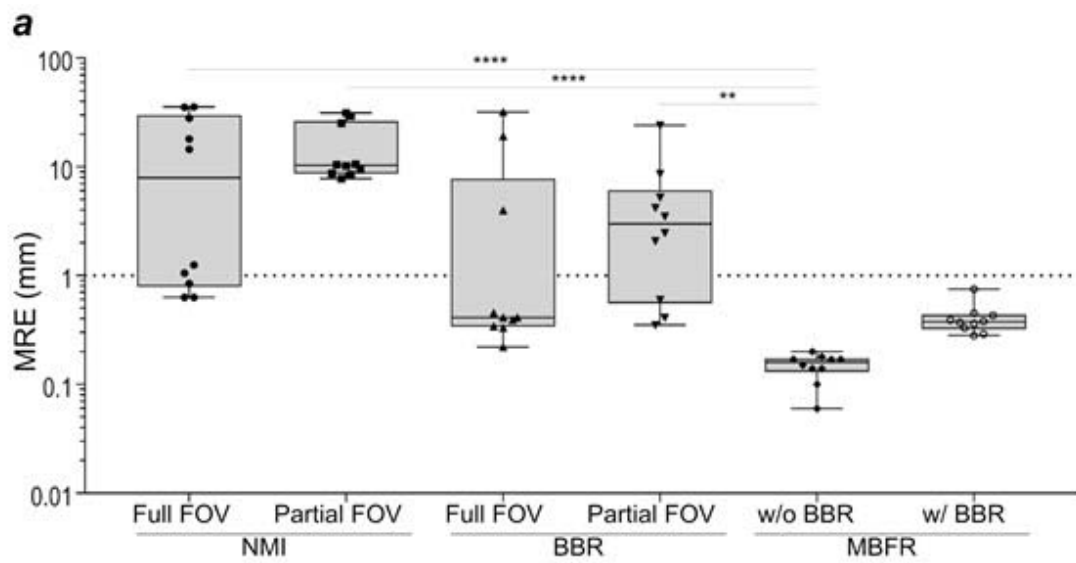


図 4.3 画像位置合わせ方法による正確性と精度の比較

4.2 HCP-NHP パイプラインを用いたシステムの開発

本節では、マーモセット専用マルチモーダル脳ターゲットングシステムの構成について説明する。このシステムは、ニューロイメージデータに基づく大脳皮質サーフェスおよび大脳皮質下 volume 座標に対応するために、他の霊長類（ヒト、チンパンジー、サル）に適用済みの grayordinates 解析パイプライン（HCP-NHP パイプライン）^{31, 35, 40, 65} を利用している。そして、本研究で作製したマーモセットのマルチモーダル（頭蓋骨と脳）template と grayordinate のアトラスからなる“MarmosetRIKEN20”について述べる。

4.2.1 異なる座標系間の位置合わせワークフロー

異なる座標系間の正確な位置合わせを可能にするマルチモーダル脳ターゲットシステムの構成を図 4.4 で示す。CT 画像は MBFR と BBR を用いて MR 画像に正確に位置合わせをするための前処理を行った（図 4.4a, 左列）。また、MR 画像は、HCP-NHP パイプライン（図 4.4a, 右列）を用いて処理した^{31, 65}

（<https://github.com/Washington-University/NHPPipelines>）。このパイプラインには 3 つの構造パイプライン（PreFreeSurfer, FreeSurfer, Post-FreeSurfer）が含まれ、各マーモセット半球の大脳皮質サーフェスモデルを生成し、CIFTI (Connectivity Informatics Technology Initiative) 形式（図 4.4d）で標準 grayordinate メッシュに位置合わせした。CIFTI 形式とは、大脳皮質とその他の灰白質構造のみを含み、関心のないもの（内側壁、白質、脳脊髄液）を除外した、複数の離散的灰白質構造からの脳データを同時に扱いやすくするために最近標準化されたデータファイルである³⁵。

4.2.2 MBFR と BBR によるマルチモーダル画像位置合わせ

Original CT 画像（CT 装置座標）を Original MR 画像（MRI 装置座標）である T2w に MBFR で位置合わせし、その後 BBR で位置合わせの微調整を行った。MBFR では、マーカーと背景の分類のために、閾値処理を行い二値化後にマーカー重心を計算して、各 CT および MRI 上の両方で対応しているマーカーの座標を特定した。そして、点による位置合わせのために Kabsch アルゴリズム⁹⁰

を用いて Original CT を original T2w に最初の位置合わせ（初期位置の特定）を行った。この位置合わせ計算の過程で、Original CT から Original T2w への初期変換行列とリスライスされた CT（initialised CT）が生成された。MBFR を実行するために使用したカスタムスクリプトである 'point_reg.py' は一般に公開している (<https://github.com/RIKEN-BCIL/MultimodalRigidTransform>)。一方、MRI 前処理の最初のステップである PreFreeSurfer パイプラインを用いて、Original T1w および Original T2w（MRI 装置座標）を、FSL（FMRIB's Linear Image Registration Tool）の FLIRT で剛体変換（自由度 = 6）を用いて個体の AC-PC native 座標（図 4.4b）に位置合わせした。AC-PC 線は、AC と PC の中心位置を結ぶ線と定義した¹⁰³。そして、initialised CT 画像の微調整はこの T2w（AC-PC native 座標）に対して BBR を用いて行った。初めに、initialised CT 画像は、軟組織と骨のボクセルを含むような閾値（-250）処理後、FSL FAST を用いて骨部のみをセグメンテーション処理で抽出させた。このセグメンテーション骨 CT 画像を T2w への BBR 位置合わせに境界情報として与え、コスト関数である BBR slope はデフォルト値(-0.5)を使用した。CT 画像と T2w 間の BBR は、FSL の epi_reg の入力に CT 画像を <whole head T1w image>, T2w を <EPI image> として指定し、epi_reg を使用した。T2w は頭蓋骨の内側と外側の境界が明瞭であることから、T1w よりも T2w の方が CT と MR 画像の位置合わせに適しているという予備的な解析結果に基づいて、T2w を使用することになった。位置合わせの評価には、schedule file (\$FSLDIR/etc/flirtsch/measurecost1.sch) を用いて、FSL BBR の最小コストを算出した。各個体の CT 画像由来の頭蓋骨ランドマークを基に、水平ゼロ平面が眼窩下隆起と耳間線（外耳道の中心）の両側を通り、耳間線が中矢状面と交差する点を原点とする "ground truth" として画像ベース定位座標を決定した（図 4.4c）。定位座標と AC-PC 座標の間の回転と並進の偏りを評価するために（図 4.4b, c）、CT 画像を FSL Nudge を用いて、頭蓋骨ランドマーク（外耳道と眼窩下縁）を基に、画像ベース定位座標に手で位置合わせした。その結果、X, Y, Z = 254, 254, 136 の大きさで、等方性ボクセルサイズ 0.2 mm で原点座標が X, Y, Z = 25.4, -15.4, -4.4 mm である画像ベース定位座標系に CT 画像を埋め込んだ（図 4.1b のプロセス#4）。これらの "ground truth" 画像ベース定位座標は、手動定位による位置決めの系統的偏りや再現性を測定するための基準座標としても使用した（第 5 章 3 節参照）。

4.2.3 HCP-NHP パイプライン

PreFreeSurfer パイプラインは、MRI 装置座標から AC-PC native 座標への剛体変換を行った後に、AC-PC native 座標の T1w から後述の AC-PC MarmosetRIKEN20 template 座標への非線形位置合わせを FSL の FNIRT (<http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/FNIRT>) で行った。また、種特異的な脳の構成を調べるためにサイズに依存した変数でのスケージングも行った³¹。Original から AC-PC native への線形変換と AC-PC native から AC-PC template へのワープフィールドを組み合わせて、Original の MRI 装置座標から AC-PC template 座標への単一のワープフィールドを形成し、これを Original CT 画像にスプライン補間で適用して AC-PC template 座標の CT 画像を生成することができた。

MarmosetRIKEN20 template は、20 匹のマーモセット（オス 20 匹、年齢 5.5 ± 2.8 歳、体重 380.0 ± 61.0g）を用いた高解像度 T1w と FNIRT による個体間の非線形位置合わせから作成された。マーモセット脳の本来の位置に近似するために位置合わせを 3 回反復と、位置合わせで発生しうる平均空間位置の ‘drift’ の除去をその都度行った³⁷。結果として得られた T1w template は、X, Y, Z=254, 254, 136 の寸法、0.2 mm の等方性ボクセルサイズ、X, Y, Z = 25.4, -26.4, -14.8 mm での原点を持つ AC-PC 座標系に埋め込まれた。

FreeSurfer パイプライン (FreeSurfer ver. 5.3-HCP) は、AC-PC native 座標で位置合わせした T1w および T2w を、脳信号の均質性補正、白質と灰白質のセグメンテーション、大脳皮質白質サーフェスと軟膜サーフェスの再構成を行った。この段階では、FreeSurfer が大脳皮質下のセグメンテーション、そして白質サーフェスの高解像度推定を行えるように、マーモセット脳を元のサイズより 5 倍に拡大した。画像は FSL-FAST と FreeSurfer の正規化アルゴリズムを用いて信号の不均質性を補正した。大脳皮質下のセグメンテーションは、FreeSurfer Gaussian Classifier Atlas¹⁰⁴を用いてマーモセットの確率的 template をカスタマイズして行った。白質セグメンテーションは、カスタマイズされた白質スケルトン^{31,40}を用いてさらに調整することで、特に前側頭葉および後頭葉の薄い白質ブレードにおいて白質サーフェスの推定が大幅に改善することができた。白色サーフェスは、HCP 用にカスタマイズした FreeSurfer プログラム (mris_make_surface, in FreeSurfer 5.3-HCP)³⁵を用いて推定し、FreeSurfer mris_register でマーモセット特有の距離 (= 20, デフォルト 5), 最大探索角 (= 50, デフォルト 68) のオプションを用いて個体間で位置合わせを行って脳回欠損型であるマーモセット脳に適合した³¹。脳サーフェ

ス位置合わせの基準として、`mris_make_template` スクリプト¹⁰⁵ を使用して、マーモセット用のカスタム集団平均脳サーフェス曲率マップを作成した。その後、脳ボリュームと脳サーフェスを AC-PC native 座標に再尺度化し、高解像度 T1w および T2w を使用して軟膜サーフェスを推定した。`mris_make_surface` を使用し、オプション引数として最大大脳皮質厚 = 3 mm を与えた。

PostFreeSurfer パイプラインは、FreeSurfer ベースの native サーフェスマッシュを GIFTI フォーマットに変換し、GIFTI フォーマットの 164k, 32k, 10k, 4k メッシュにリサンプリングした。FreeSurfer ベースの解剖学的脳サーフェス（軟膜と白質）は、標準的な AC-PC template 座標に 3D で非線形にワープされた。19 区画の大脳皮質下セグメンテーションを 0.8 mm 等方性の空間分解能を持つ volume に再サンプリングした。FreeSurfer の最初の大脳皮質サーフェス位置合わせは、マルチモーダル脳サーフェスマッチング (MSM) および折りたたみマップ (FreeSurfer 'sulc') を使用して、左および右半球にわたるグループ位置合わせ³⁶ と連結した^{38,39}。個体からグループへの平均位置合わせは、20 匹のマーモセット脳から作成した average folding map に folding maps (FreeSurfer 'sulc') に基づく穏やかな gentle nonlinear registration (MSMSulc) を用いて実施した。T1w を T2w で割った画像は、リファレンスのミエリンマップとの差を平滑化して低空間周波数の強度バイアスを除去した後、大脳皮質ミエリンマップの生成に用いた^{35,106}。すべての脳サーフェスマトリックス（ミエリン、厚さ、溝、曲率）は、MSMSulc 脳サーフェス位置合わせによって整列された脳サーフェスのメッシュ（164k, 32k, 10k, および 4k）に再サンプリングされた。左右半球の 4k メッシュを組み合わせ、各半球で 2840 頂点（内側壁面を除く）、大脳皮質下構造で 4056 ボクセルからなる CIFTI grayordinates を作成した（図 4.5d）。4k メッシュの平均頂点間隔は AC-PC template 座標の平均 midthickness 上で 0.62 ± 0.18 mm, 大脳皮質厚中央値は 1.6 mm（最大 = 2.6 mm, 最小 = 0.5 mm）、平均大脳皮質サーフェスの面積は $9.9 \pm 0.5 \text{cm}_2$ ³¹ であった。

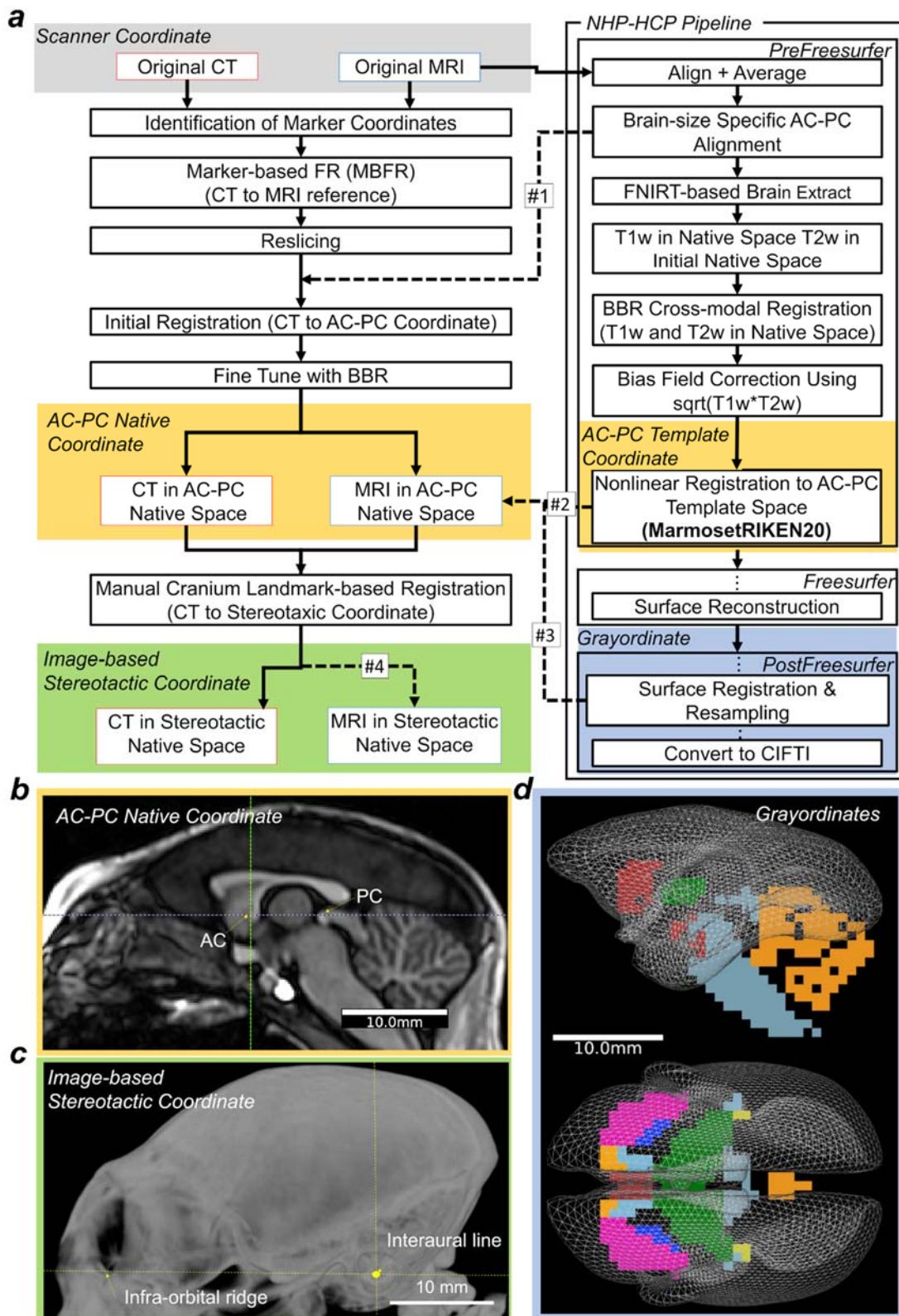


図 4.4 位置合わせパイプライン (装置座標, AC-PC 座標, 定位座標, grayordinates)

4.2.4 マーモセットの脳と頭蓋骨の AC-PC template

マルチモーダルイメージングとして MRI (N = 20) および CT (N = 10) の AC-PC template を作成した (図 4.5)。これらの template は、脳と頭蓋骨の詳細な位置関係を提供する。興味深いことに、CT template には生理的石灰化も認められ、MRI template では淡蒼球と歯状核の両側で共局在していた (図 4.5a, 緑とシアンの矢印)。図 4.5b は MarmosetRIKEN20 (version 1.) の大脳皮質下パーセレーションを示し、大脳皮質下灰白質 21 領域 (caudate, putamen, external segment of globus pallidus, internal segment of globus pallidus, nucleus accumbens, stria terminalis, claustrum and end-piriformis, thalamus, habenular nucleus, red nucleus, subthalamic nucleus, substantia nigra, superior colliculus, inferior colliculus, lateral geniculate nucleus, medial geniculate nucleus, amygdala, hippocampus, periaqueductal grey, dorsal raphe nucleus, cerebellar cortex) および前・後交連を含む。また、template には T1w/T2w ミエリンマップ (図 4.5c) と、116 の大脳皮質領域を含むマーモセット大脳皮質分割アトラス⁴⁴ のサーフェスバージョン (図 4.5d) も含まれている。大脳皮質ミエリンの分布は、MT, 体性運動野 (4ab), 体性感覚野 (3a, 3b), 視覚野 (V1) の機能分離と高いミエリン信号が共局在し、前頭葉眼野 (FEF, 領域 8av) と比較的高いミエリンがあることがわかった (図 4.5e)。

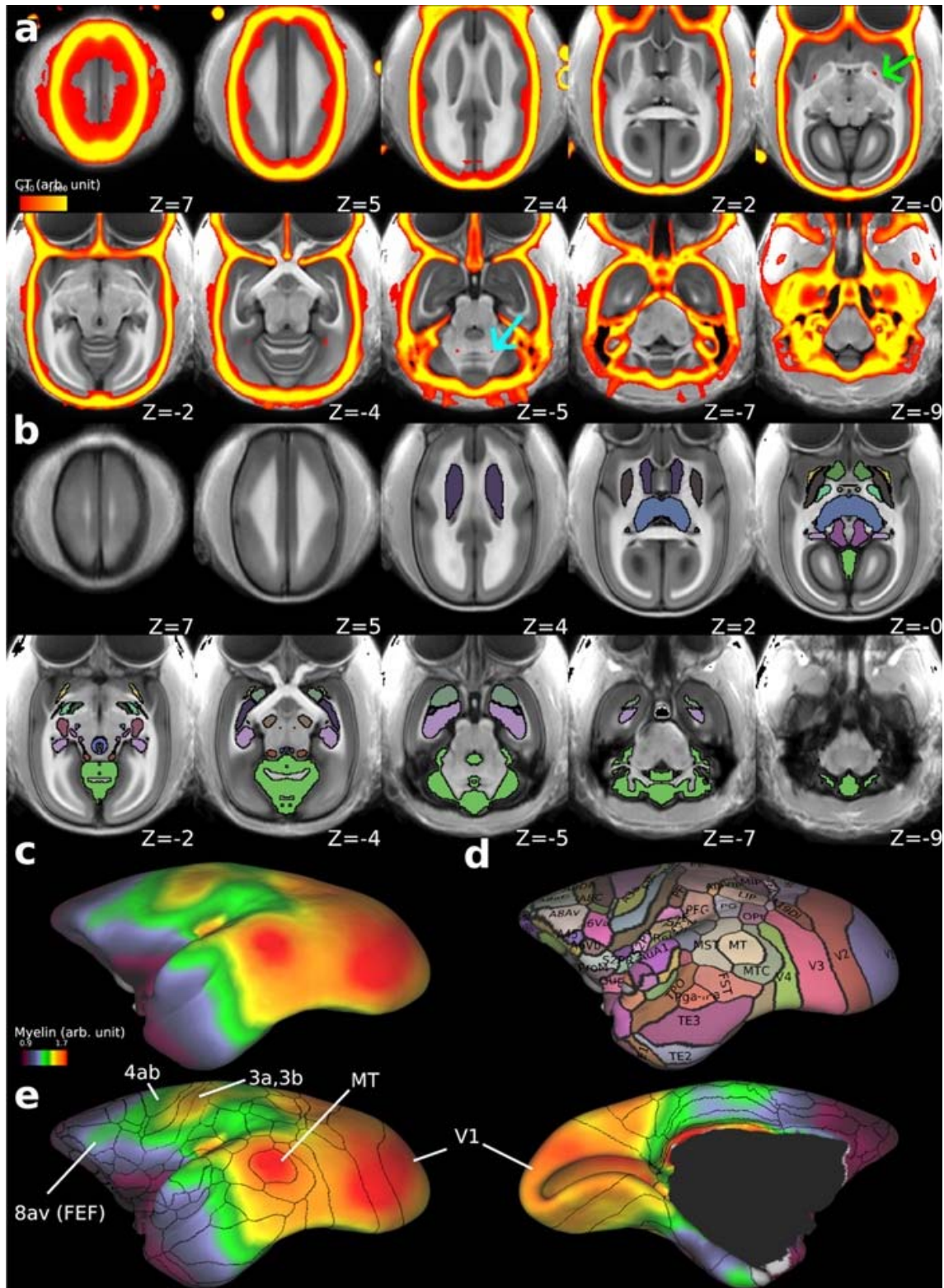


図 4.5 MarmosetRIKEN20 のマルチモーダル template (AC-PC 座標系および grayordiantes)

4.3 考察

4.3.1 MBFR による初期化と BBR での微調整による高精度位置合わせ

MBFR は、ソフトウェアベースの位置合わせでしばしば問題となる頑健な初期化に有効であった^{5,107}。実際に本研究においても、ソフトウェアベースの位置合わせでは初期化に失敗することが多かった (図 4.3a)。これに対し MBFR は失敗がない。このように、ソフトウェアベースの位置合わせは初期化の精度に依存するのに対し、MBFR はマーカー重心の決定精度にのみ依存する。MBFR の後に BBR を適用すると、大脳皮質表面と骨の位置合わせの精度がさらに向上した (図 4.3b, c)。MBFR+BBR の位置合わせ誤差は MBFR 単独より大きくなったが、これは画像解像度やマーカーの非対称性に依存するマーカー中心の同定誤差と、MRE 自体がマーカーを基準に計測されるという方法の循環化に起因していると考えられる。BBR のコスト関数はすべてのケースで適度に低く、高い信頼性と精度を示している。

4.3.2 マーモセット専用 HCP-NHP パイプライン

大脳皮質の曲率と総表面積の個体間変動を考慮するため、マーモセットの CIFTI grayordinate 空間³⁵を導入した。grayordinate 空間の主な目的は、大脳皮質シートのトポロジーを尊重し、脳にしわが有る無しに関わらず、大脳皮質下灰白質構造を明示的に識別すること³⁵、および大脳皮質データを標準化された 2D サーフェスにマッピングすることである。このアプローチは既にマカク脳に適用されており^{40,108}、種を超えて大脳皮質の特徴を直接比較することが可能である。また、大脳皮質サーフェスアプローチは、Multi-modal Surface-Matching (MSM) アルゴリズム^{38,39}を用いて、個体間でより正確な位置合わせを可能にする。マーモセットにおけるこの grayordinate ベースのアプローチは、大脳皮質の折り畳み (例えば IPS, 図 5.4b, c) および機能領域の個体変動を処理するためにも有利であると考えられる³⁷。

マーモセットのマルチモーダル template と grayordinate および volume 空間におけるアトラスを作成した。template には標準化された CT と MR 画像が含まれており、平均化された template 空間で頭蓋骨と脳の両方のランドマークが見えるようになっている。ヒトの脳で見られるように、CT template では淡蒼球と小脳核に非常に小さな生理的石灰化が見られるが¹⁰⁹、ブレグマは個体のばらつきに

より明確に見えない (図 4.5)。 大脳皮質面および大脳皮質下体積のパーセレーションは、T1w と T2w の画像コントラストと Paxinos らの組織学アトラスを基に作成した⁴⁴。その結果、ミエリンコントラスト (T1w を T2w で割った値) と大脳皮質パーセル (e.g. visual, somatosensory, auditory, MT, and FEF) の類似性、および大脳皮質下の volume 構造 (e.g. basal ganglia, thalamus, periaqueductal grey, habenular nucleus, lateral and medial geniculate nucleus) の T1w, T2w コントラストが類似することが判明した。しかし、今後の研究では、ヒトで行われているような機能的結合データだけでなく、組織学データ⁷⁰を組み合わせて、大脳皮質での機能の分割のさらなる検証が必要である³⁷。そのためには、2D-組織学データの 3D 脳神経イメージングデータへの空間マッピング^{31,60,70}、大脳皮質サーフェス³⁸や脳体積¹¹⁰のマルチモダルデータに基づく個体間位置合わせといった点で技術の洗練が必要かもしれない。

第 5 章 マルチモーダル脳ターゲティングシステム を用いた評価

マルチモーダル脳ターゲットシステムを用いて、マーモセットの脳、頭蓋骨およびランドマークの個体間変動について調べた。5.1 節では、脳座標系の違い（AC-PC native 座標，AC-PC template 座標および画像ベース定位座標）が及ぼす個体間変動の違いについて述べる。次に、AC-PC native 座標におけるランドマーク位置，距離，関心領域の個体間変動については 5.2 節で，脳定位固定装置を用いた脳固定手技の精度や再現性については 5.3 節で述べる。最後に，5.4 節にてマーモセットの個体間変動や脳定位固定法の再現性について考察する。

5.1 異なる脳座標系における頭蓋骨の個体間変動の違い

5.1.1 個体間変動評価方法

頭蓋骨の体積と形状の個体間変動を評価するために，AC-PC native 座標と AC-PC template 座標および画像ベース定位座標における頭蓋骨輪郭を調べた。また，AC-PC 座標の pitch 回転角（前頭部下向き）を画像ベース定位座標と比較して評価した。脳容積と頭蓋骨内容積は，それぞれセグメント化された T1w 画像と CT 画像から AC-PC native 座標で求めた。さらに，定位手術基準点（bregma）および cephalometric（inion, rhinion, and zygion）点を，以前に記載した方法⁴⁸に基づき，native AC-PC 座標で CT 画像から特定した。ランドマークの変動は，マーモセットの大規模な集団（N = 20）から生成された平均的な大脳皮質白色および軟膜サーフェスを基準として表示した。また，ブレグマの位置を視覚化し，各個体の X-Y 平面を定義できるように，CT 画像の最大強度投影を計算した。

5.1.2 結果

脳および頭蓋頭蓋腔体積の測定値は，脳が $6,180 \pm 524 \text{ mm}^3$ ，頭蓋腔が $6,912 \pm 470 \text{ mm}^3$ であった。マーモセット間の変動（変動係数）は，それぞれ 8.5%，6.8%であった。頭蓋骨の輪郭は，画像ベース定位座標（図 5.1a）および AC-PC native 座標（図 5.1b）の両方で，個体間で大きな変動があった。特に，画像ベース定位座標（図 5.1a）における頭蓋骨の位置は，AC-PC native 座標（図

5.1b) から著しく回転しており，前頭部が平均 $10.0 \pm 1.3^\circ$ のピッチ (X 軸周りの回転) で下向きになっており ($N = 10, p = 0.02$)。回転の偏りはロール (Y 回転) やヨー (Z 回転) でもわずかではある ($0.6 \pm 0.1^\circ, p = 0.002$) が見られた。個体間で非線形に位置合わせした結果，AC-PC template 座標において，個体間で頭蓋骨輪郭が適度に位置合わせできた (図 5.1c)。定位位置の外耳道非対称性は，ロール (Y 回転) $1.1 \pm 0.5^\circ$ と確認され，これは眼窩隆起骨と外耳道の皮膚・軟部組織の非対称性を反映していると思われる。“ground truth”である画像ベース定位座標 (すなわち対称的な外耳道) と AC-PC template (すなわち対称的な脳) の間に有意なロール ($0.6 \pm 0.1^\circ$) が示されたように，対称的な脳に対して「聴覚管」の非対称性があるようである。

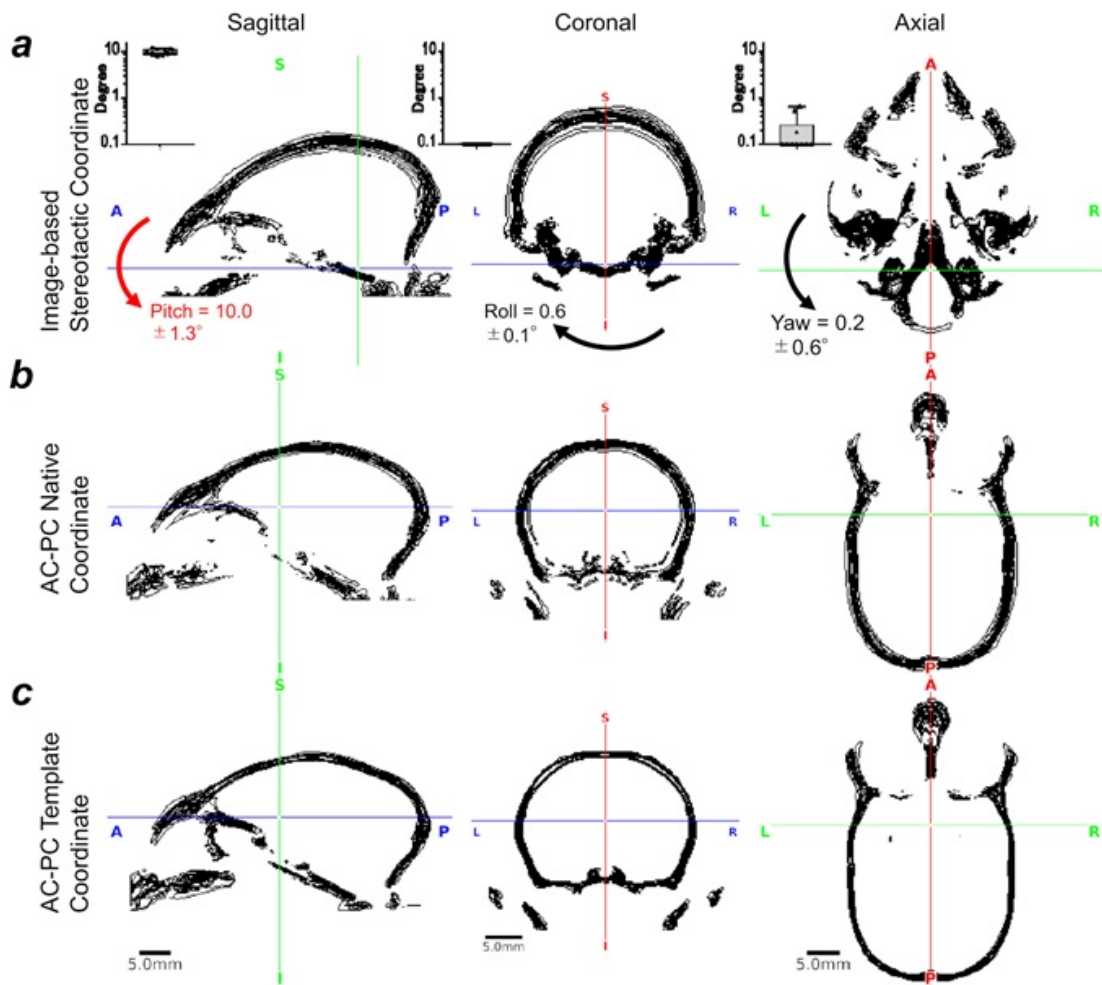


図 5.1 マーモセットの AC-PC と定位座標の個体間変動

5.2 AC-PC native 座標における個体間変動

5.2.1 個体間変動評価方法

大脳皮質サーフェスランドマークの個体間変動を調べた。特に, intraparietal sulcus (IPS) はマーモセットで認識可能なランドマーク^{44,111}であるためこれに着目した(図 5.4b 右写真)。各個体の 32k メッシュにおける FreeSurfer の ‘sulc’ measure の値に基づいて IPS の存在を定量的に定義し, 4 つの頭頂内領域 (anterior intraparietal [AIP], medial intraparietal [MIP], lateral intraparietal [LIP], and ventral intraparietal [VIP] areas) からなる関心領域の局所最小値を特定した。これらの頭頂内領域は, AC-PC template 座標に非線形にワープし, 脳サーフェスにマッピングされた Paxinos アトラスの volume データ⁴⁴から作成された ROI において sulc の最小値が -0.37 より小さい場合, IPS が存在すると判断した。また, 厚み方向のサーフェスにおいて, sulc の最小値を持つ頂点の 3 次元座標を, 個体の 32k AC-PC native 座標で同定した。また, 全マーモセット (N = 20) の T1w の AC-PC native 座標において, calcarine sulcus と lateral sulcal terminations (extrema)の座標を同定し, 平均値と標準偏差を算出した。

また, 大脳皮質下領域の体積について, 個体間の平均と変動を評価した。大脳皮質下アトラス 11 領域 (amygdala, habenular nucleus, inferior colliculus, internal pallidum, lateral geniculate nucleus, medial geniculate nucleus, nucleus accumbens, red nucleus, stria terminalis, subthalamic nucleus) に対して高解像度非線形位置合わせワープフィールドを適用し, 各動物の T1w の AC-PC native 座標に埋め込んだ。そして, 各動物で体積と重心座標を評価し, マーモセット (N = 20) 全体の平均と標準偏差を算出した。また, 6 つのランドマーク間の距離 (brain length, brain width, anterior-posterior length of corpus callosum, anterior tip of frontal pole to anterior tip of temporal pole, anterior tip of temporal pole to posterior tip of lateral sulcus, anterior to posterior tip of calcarine sulcus) (図 5.2) も, 個体間で評価した。

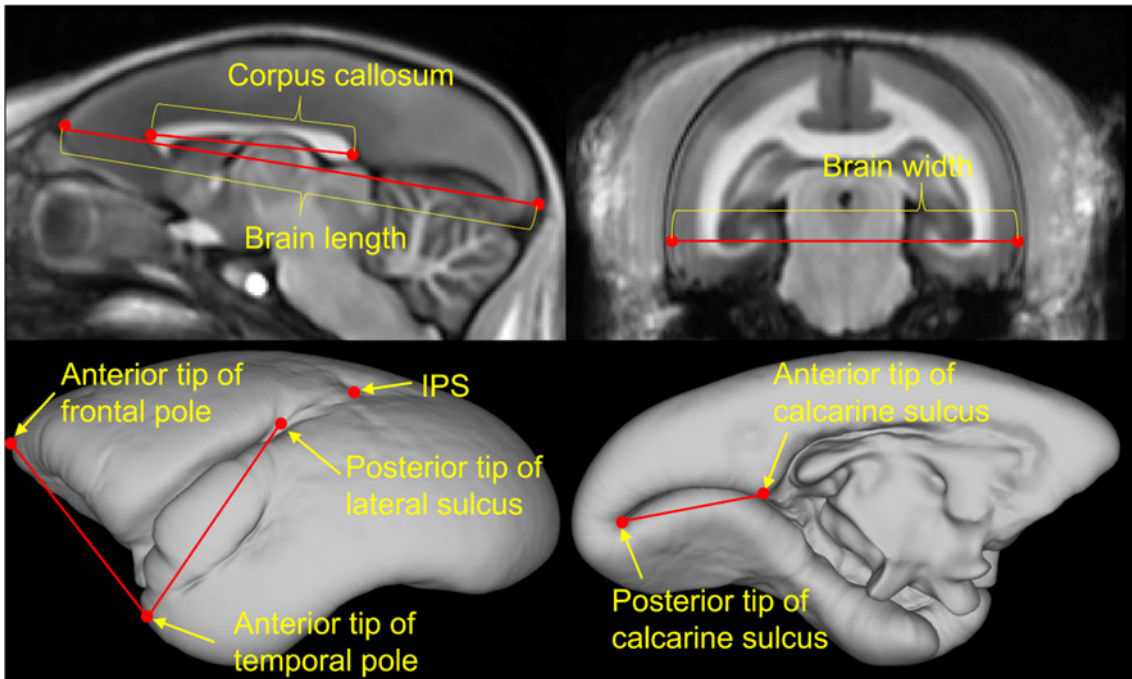


図 5.2 脳内でのそれぞれの距離とランドマーク位置の概要

5.2.2 結果

頭蓋骨の上下方向に見たブレグマの位置の個体間変動を図 5.3 に、その他の頭蓋骨・大脳皮質ランドマークを図 5.5a にそれぞれ示す (N = 10)。調査したランドマークのうち、AC-PC 座標で前後方向のブレグマに最大の変動 (± 1.0 mm, SD, 表 6.1, 図 5.3, 図 5.4) が見られた。この変動幅の大きさは、AP 方向 (Y 軸方向) におけるマーモセットの平均脳長 (31 ± 0.8 mm, N = 10) の 5%以上に相当し、注目すべきものである。また、ブレグマの形状が個体によって大きく異なることにも注目したい (調べた全個体の頭蓋骨の最大強度の投影図は図 5.3 参照)。さらに、上下方向 (Z 軸方向) のイニオンと鼻骨、前後方向 (Y 軸方向) の右頬骨では、中程度の高い変動 ($\pm 1.0 \sim 1.1$ mm) が見られた。

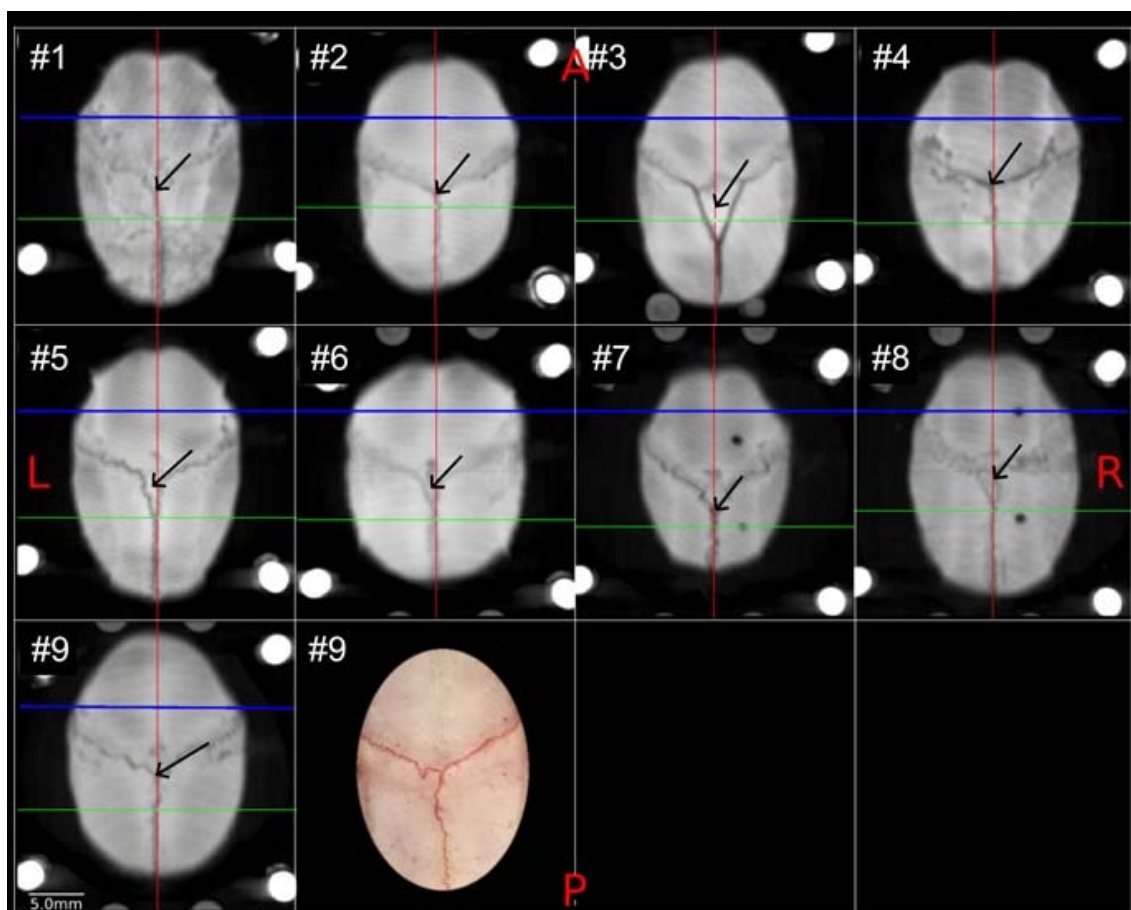


図 5.3 マーモセットにおける頭蓋縫合とブレグマの変動
ランドマークの座標は T1w AC-PC native 空間で特定した。

大脳皮質ランドマーク (IPS) の個体間変動を図 5.4b, c に示す。全個体 (N = 20) のほとんどにおいて IPS を両半球で確認することができなかった, 両半球で確認できたのは 5% の個体 (N = 1), 右半球にのみ確認できたのが 10% (N = 2), 左半球にのみ確認できたのが 30% (N = 6) であった。IPS の最深部の位置は個体によって異なり (図 5.4b, 表 6.1, N = 20), 前後方向 (右半球, 左半球でそれぞれ 2SD = 1.6, 2.0 mm) に中程度の変動があり, 次に左右方向 (2SD = 1.0, 1.2 mm), 下上方 (それぞれ 0.6, 0.6 mm), 各方向で平均脳長の 4~5%, 4%, 3% に相当する。IPS の変動の一例を, 代表的な 2 個体で示す (図 5.4c)。IPS が明瞭な個体 (図 5.4c 左図) では, IPS の識別が容易で, 大脳皮質 midthickness の最深部も容易に識別できる (黄色線) のに対し, 個体 2 (図 5.4c 中央図) では, IPS の識別が困難で, 大脳皮質 midthickness (水色) は比較的滑らかで浅いことがわかる。なお, この 2 名の個体の midthickness サーフェスを, AC-PC native 座標から AC-PC template 座標にワープフィールドした後, 個体間平均体積上に表示すると (図 5.4c, 右図), IPS の最深部は上下方向に約 0.5 mm 異なることがわかった。また, 側溝の端, 踵骨溝の前端と後端の位置も評価した (表 5.1)。側溝の Y 方向の変動は IPS と同等であったが, 踵骨溝端の座標の変動は AC-PC native 座標, 定位空間ともに若干小さかった (表 5.1)。また, 脳と大脳皮質下構造の体積の個体間平均と変動を表 5.2 に示す。また, AC-PC native 座標による重心の座標と, 脳内ランドマークの距離を示す。その結果, 領域体積の個体全体の変動は変動係数 (COV) により 5~12%, 他のランドマークの距離の変動は 3~8% であった。

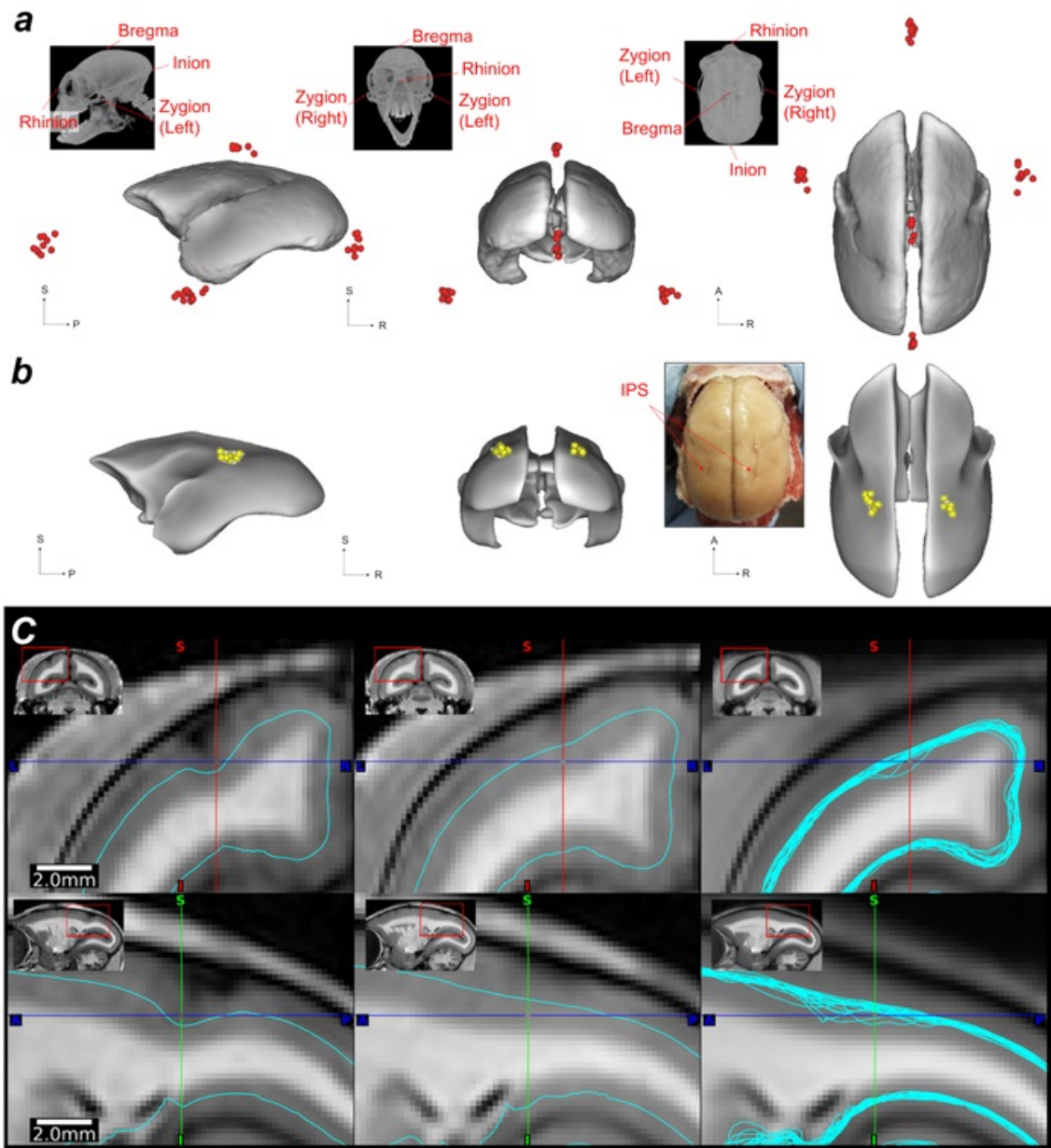


図 5.4 マーモセットにおけるランドマークの変動

表 5.1 頭蓋と大脳皮質のランドマーク座標の個体間変動 (N = 20)

	Side	AC-PC Native 座標			画像ベース定位座標		
		X	Y	Z	X	Y	Z
Cranial							
Bregma	-	-0.1±0.1	-7.0±1.0	10.0±0.3	-0.3±0.2	6.0±1.1	20.4±0.5
Inion	-	0.1±0.1	-23.0±0.5	-3.0±1.1	-0.2±0.2	-12.0±0.7	10.5±1.2
Rhinion	-	-0.1±0.3	19.6 ± 0.9	-3.2±1.0	0.1 ± 0.2	29.9±0.8	2.9 ± 0.5
Zygion	L	-15.1±0.4	-0.2±0.8	-10.0±0.5	-15.1±0.5	9.4±0.6	-0.4±0.1
	R	14.9±0.7	-0.1±1.1	-10.0±0.5	14.9±0.5	9.2±0.8	-0.3±0.3
Cortical							
IPS	L	-5.5±0.5	-10.3±0.8	5.5±0.3	-5.5±0.5	2.3±0.8	16.4±0.3
	R	4.8±0.5	-10.0±0.6	5.6±0.4	4.8±0.5	2.5±0.7	16.4±0.3
Posterior tip of lateral sulcus	L	-7.8±0.6	-6.8±0.9	4.3±0.7	-7.7±0.6	5.5±0.8	14.7±0.8
	R	7.8 ± 0.5	-6.5 ± 0.7	4.1 ± 0.4	7.8 ± 0.5	5.7 ± 0.7	14.4±0.4
Anterior tip of calcarine sulcus	L	-1.8±0.3	-11.4±0.3	1.6±0.7	-1.8±0.3	0.5±0.3	12.9±0.4
	R	1.8±0.3	-11.5±0.3	1.7±0.2	1.8±0.3	0.4±0.3	12.9±0.2
Posterior tip of calcarine sulcus	L	-2.2±0.3	-20±0.4	-1.2±0.4	-2.2±0.3	-8.6±0.4	11.6±0.4
	R	2.0±0.3	-20.2±0.3	-1.3±0.5	2.0±0.3	-8.7±0.4	11.5±0.4

表 5.2 脳と大脳皮質下構造の体積とランドマークの距離の個体間変動 (N=20)

体積 / 関心距離	Side	mean±SD (mm ³ /mm) (COV%)	重心座標位置		
			X	Y	Z
Whole brain	-	7683.2±440.2 (6)	-	-	-
Amygdala	L	43.2±2.3 (5)	-5.2±0.2	-0.4±0.4	-5.2±0.3
	R	42.8±2.0 (5)	5.2±0.2	-0.4±0.3	-5.2±0.3
Habenular nucleus	L	1.5±0.1 (8)	-0.9±0.1	-6.5±0.3	1.2±0.1
	R	1.4±0.1 (8)	0.9±0.1	-6.5±0.3	1.2±0.1
Inferior colliculus	L	8.3±0.5 (6)	-2.6±0.1	-10.3±0.3	-2.7±0.3
	R	8.4±0.7 (8)	2.5±0.1	-10.2±0.2	-2.7±0.3
Internal pallidum	L	5.0±0.4 (8)	-4.2±0.1	-2.1±0.3	-1.3±0.2
	R	4.3±0.3 (7)	4.2±0.2	-2.0±0.3	-1.4±0.2
Lateral geniculate nucleus	L	13.9±0.8 (6)	-6.4±0.1	-5.5±0.3	-1.6±0.2
	R	14.1±1.0 (7)	6.5±0.2	-5.5±0.2	-1.7±0.2
Medial geniculate nucleus	L	2.6±0.2 (9)	-4.9±0.1	-6.4±0.3	-2.1±0.2
	R	2.5±0.2 (9)	4.8±0.2	-6.4±0.2	-2.2±0.2
Nucleus accumbens	L	17.8±1.0 (6)	-2.3±0.1	2.2±0.4	0.1±0.2
	R	16.5±1.2 (7)	2.3±0.1	2.2±0.4	0.1±0.2
Red nucleus	L	1.0±0.1 (12)	-1.2±0.1	-6.3±0.3	-4.1±0.3
	R	1.0±0.1 (10)	1.3±0.1	-6.3±0.3	-4.1±0.3
Stria terminalis	L	2.8±0.2 (7)	-1.7±0.1	-0.8±0.3	0.7±0.2

	R	2.8±0.3 (11)	1.6±0.1	-0.8±0.3	0.7±0.1
Subthalamic nucleus	L	0.7±0.0 (6)	-3.3±0.1	-3.6±0.3	-2.2±0.2
	R	0.8±0.1 (10)	3.4±0.1	-3.6±0.3	-2.2±0.2
Brain length	-	32.7±0.8 (3)	-	-	-
Brain width	-	24.2±0.6 (3)	-	-	-
Anterior-posterior length of corpus callosum	-	13.5±0.5 (4)	-	-	-
Anterior tip of frontal pole - anterior tip of temporal pole	L	12.7±0.4 (3)	-	-	-
	R	12.8±0.5 (4)	-	-	-
Anterior tip of temporal pole - posterior tip of lateral sulcus	L	13.7±1.0 (8)	-	-	-
	R	13.4±0.6 (5)	-	-	-
Anterior to posterior tip of calcarine sulcus	L	9.2±0.5 (5)	-	-	-
	R	9.2±0.5 (6)	-	-	-

5.3 脳定位固定位置決め精度と再現性

マーモセットの‘gold-standard’である定位座標の個体間変動，脳定位装置を用いた動物固定手技の再現性を調べ，これらが MarmosetRIKEN20 の AC-PC 座標系とどのように異なるかを評価した。本節では，再現性評価のための実験プロトコルとその評価方法そして結果を示す。

5.3.1 実験プロトコル

これまでのマーモセットを用いた研究では，‘gold-standard’である脳定位固定の再現性は報告されていない。本研究では CT 画像を用いて，脳定位固定法のバイアスと再現性の厳密な評価を行った（雌 2，雄 3，年齢 5.7 ± 2.4 歳，体重 $420 \pm 42\text{g}$ ）。マーモセットの頭部を固定する脳定位装置（図 5.5b）は，一般に市販され実験に使用されているもの^{42,43,45,46}に基づいており，外耳道にしっかりと挿入されたイヤバー，眼窩骨の上にアイバーを密着させ，バイトバーで上あごを押し上げ頭蓋骨を確実に固定できるように設計した。この固定により，水平ゼロ平面と前後ゼロ平面が定位装置に対して垂直になるようにした（図 5.5a）。イヤバーの先端は，外耳道の直径（ $\sim 2\sim 3\text{ mm}$ ）¹¹²に基づき，直径 2.4 mm に設定した（図 5.5c）。マーモセット実験のエキスパート

(A.K.) により，マーモセット頭部をイヤバー，バイトバー，アイバーで脳定位装置に固定し，頭部と脳定位装置の両方の CT 撮像を行った（ヘッドホルダーの装着は無し）（図 5.5）。その後，マーモセットを撮像装置のガントリおよび脳定位装置から取り外した。同じ手順（位置決め，撮像（2 分間），取り外し）を各個体に対して 1 セッションで 5 回繰り返した（総セッション時間約 1 時間）。これらの実験中，マーモセットは定期的なイソフルラン（3.0 %）吸入で十分な麻酔深度に保たれた。

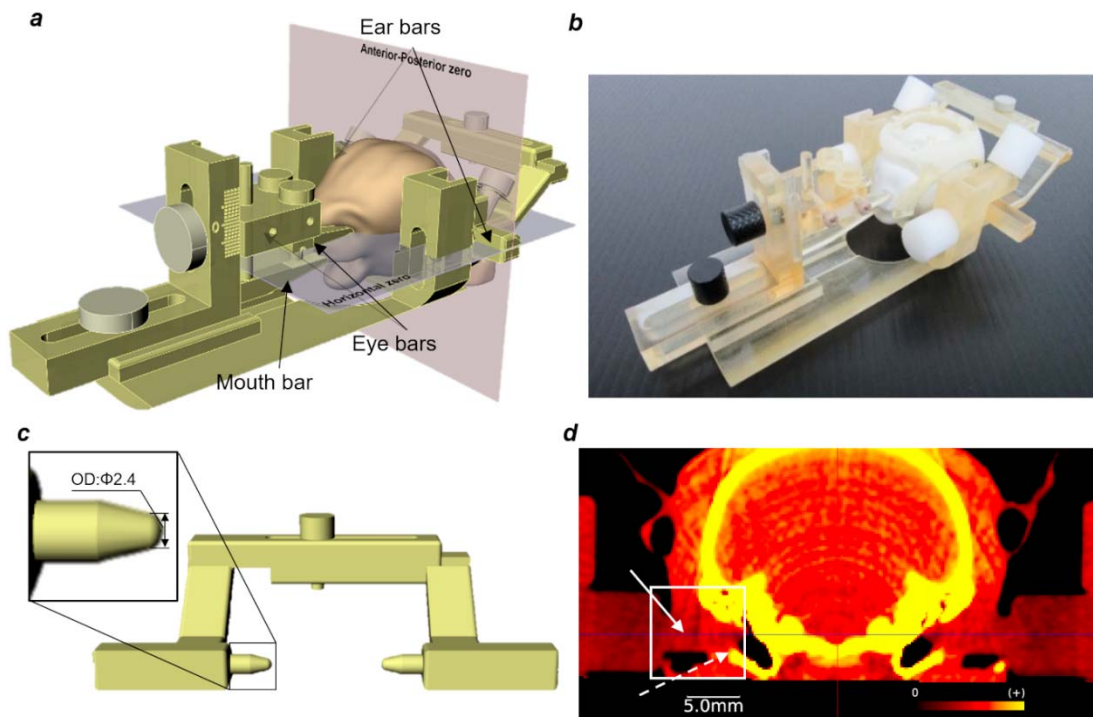


図 5.5 脳定位固定器具のデザイン

(a) 小動物用 CT (FOV=直径 73 mm×高さ 57 mm) に対応するように設計した。マーモセットの頭部は、バイト、アイ、イヤーバーを使って脳定位装置に装着される。(b) マーモセットファントムにヘッドホルダーを装着させた状態で脳定位固定装置にしっかりと固定可能。(c, d) イヤーバーの先端がマーモセットの聴管に一致する。(d) コロナル CT 画像。実線と破線の矢印がそれぞれイヤーバーと外耳道を示す。

5.3.2 再現性評価方法

脳定位装置内での頭蓋骨の手動位置決め（装置ベースの定位座標）の再現性を調べるために反復試験（ $N = 5$, $n = 5$ ；計 25 実験）を行った，そして，“ground truth”（画像ベース）定位座標との比較により偏りを判定した。マーモセットを脳定位装置への固定した後，マーモセット頭部と脳定位装置を CT で撮像した。すべての CT 画像は，脳定位装置に対するマスクの重み付けによる剛体変換を用いて位置合わせされ，その結果，脳定位装置に対して同じ位置となり，これを実験者の固定手技の誤差を含む装置ベース定位座標と呼ぶことにした。次に，FSL Nudge と剛体変換（3 軸それぞれの回転と並進，図 6.1a 参照）を用いて，装置ベースと“ground truth”画像ベースの定位座標の誤差を推定した。各動物（ $N = 5$ ）の代表値として，繰り返しポジショニングの平均データを用いて変換パラメータの平均値と 95%信頼区間を算出し，Wilcoxon signed rank test を用いて装置ベースの定位座標の偏りを評価するために解析した。装置ベースの定位座標の再現性を評価するため，R パッケージ「psych」¹¹³を用いて，変換パラメータの反復測定 of intraclass correlation coefficient（ICC, type 1, 1）¹¹⁴を算出した。

5.3.3 結果

頭蓋骨の手動位置決め誤差を図 5.6 に示す。手動で位置決めした装置ベースの定位座標（図 5.6a）で評価すると，頭蓋骨輪郭の変動は，個体内変動（実験者の位置決め再現性など）と個体間変動（動物の頭蓋骨の形状や大きさなど）の両方に起因していることがわかる。そのため，輪郭の変動は頭蓋骨の背面凸部だけでなく，耳介周辺にも見られる（図 5.6a）。一方，画像ベースの定位座標の輪郭誤差は，ほぼ個体間の変動を示し，個体内の変動は見られない（図 5.6b）。図 5.6c は，手動で位置決めした装置ベースの定位座標の“ground truth”画像ベースの座標に対する偏りを示している。ピッチ（ $1.6 \pm 0.4^\circ$ ， $p = 0.06$ ）とロール（Y 軸の回転）（ $1.1 \pm 0.5^\circ$ ， $p = 0.06$ ）には回転バイアスの傾向が見られたが，ヨー（Z 軸の回転）（ $-0.2 \pm 0.7^\circ$ ， $p = 0.8$ ）には見られなかった（図 5.6c，左）。並進については有意な偏りは見られなかった（図 5.6c，右）。個体内再現性の指標である ICC（1, 1）は，X 回転（ -0.11 ）と Z 方向並進（ 0.33 ）が悪く，X と Y 方向並進は中程度（それぞれ 0.80 と 0.84 ），Y と Z 回転は良好（ 0.93 と 0.1 ）であった（図 5.6d）。

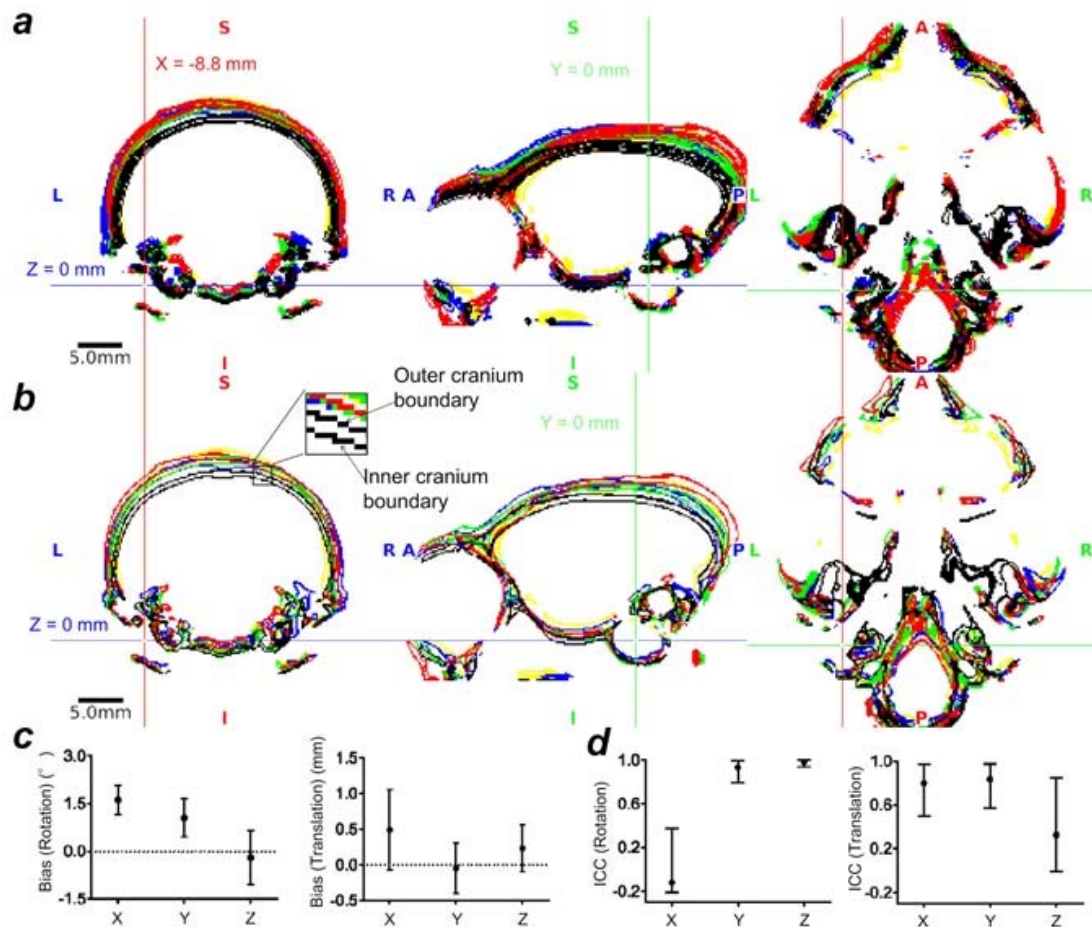


図 5.6 脳定位固定のバイアスと再現性

手動で位置決めした装置による定位座標で、5 個体に繰り返し位置決めしたときの頭蓋輪郭。各色は個体の頭蓋輪郭を示し、十字はイヤーパーの先端の中心を示す。頭蓋輪郭は、個体内（実験者の位置決め再現性など）と個体間（動物の頭蓋の形状や大きさなど）の両方でばらつきがあることが確認された。特に外耳道から遠い頭蓋の背側凸部では輪郭のばらつきが顕著であることに注意。(b) "ground truth"画像ベースの定位座標における5 個体の頭蓋の輪郭。外耳道と眼窩隆起の定点は個体間でよく一致しているが、頭蓋輪郭の位置は個体間で大きく異なっていることに注意。(a)と(b)では、色は異なる個体を示している。また、各色の線は、頭蓋外側と頭蓋内側の境界を示す。(c) 画像に基づく定位座標に対する、固定機器に基づく定位座標の回転（左）、並進（右）の変動（ $N = 5$ ）。(d) 装置を用いた定位座標の回転と並進のクラス内相関（ $ICC(1, 1)$ ）（ $N = 5, n = 5$, 計 25 実験）誤差バーは 95%信頼区間を示す。

5.4 考察

5.4.1 ブレグマの個体間変動

マルチモーダル脳ターゲッティングシステムを用いて、頭蓋と脳のランドマーク、特にブレグマの個体間変動があることを実証した。この個体間変動は、従来の定位手術における不確実性の原因となる。ブレグマの位置はマーモセット間で前後方向に 2.0 mm (2SD) の変動がある (表 5.1, 図 5.3, 図 5.4a)。げっ歯類の先行研究では、ラットで約 0.6 mm⁴⁹, マウスで 0.5 mm⁴⁸と、はるかに小さな変動 (2SD) が報告されている。マーモセットブレグマの個体間変動が大きいのは、頭蓋サイズが大きいためか、げっ歯類よりも個体差が大きいためと考えられるが、前者の可能性は低いと考えている。スケールと寸法の違いを正規化するために、本研究では脳のスケールと変動の等尺比を計算した³¹ (図 5.7)。その結果、マーモセットは他の齧歯類 (ラット 1.2, 1.6, マウス 1.0, 1.0) に対して、ブレグマの変動性 (4.0), 脳容積 (3.6) が大きいのに対し、脳の大きさは 2 倍の差 (マーモセット 2.3, ネズミ 1.4, マウス 1.0) であることが明らかとなった。これらのことから、マーモセットではブレグマの個体間位置変動と脳の大きさの変動が実験用げっ歯類に比べて約 3~4 倍大きく、霊長類では脳のスケールが大きいうより、個体間変動が大きいことが大きな原因であることがわかった。

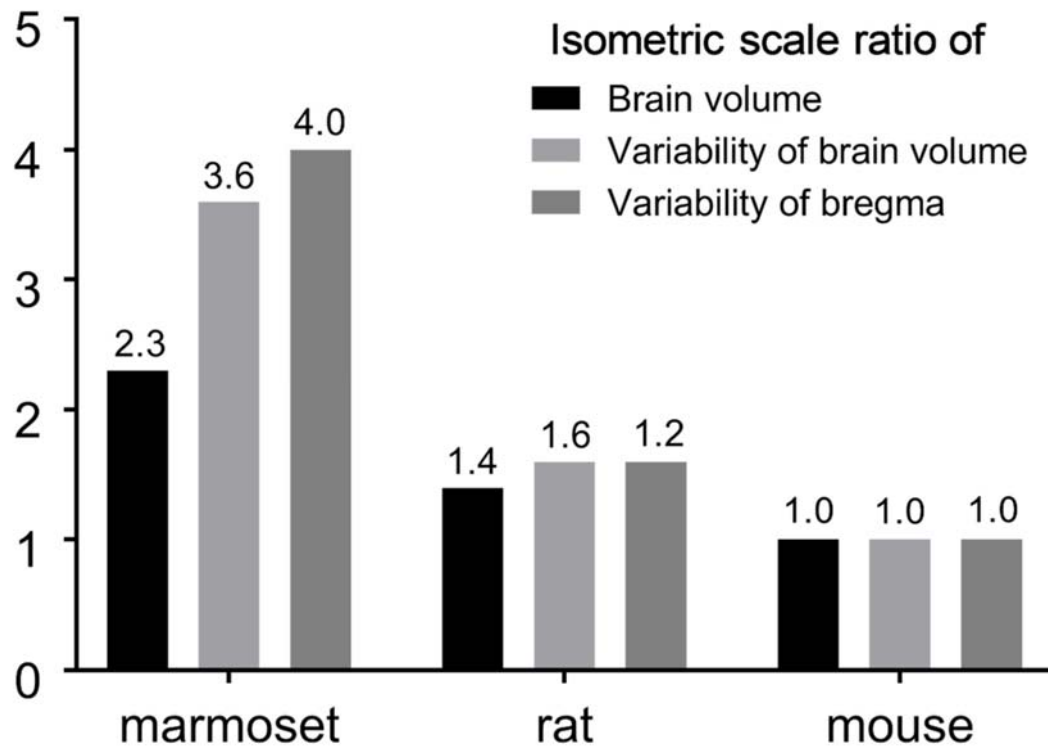


図 5.7 動物種間比較 (ブレグマの変動と脳容積)

5.4.2 大脳皮質ランドマークの個体間変動

また、大脳皮質ランドマークの個体間変動もマーモセットでは大きい。社会行動や性格が大きく変化するこの種では、脳組織の変動性が特に注目される^{21, 34, 115, 116}。下頭頂部の主な機能には、運動調整、空間知覚、視覚的減衰、社会的知覚などがあり¹¹⁷、下頭頂部の構造的・機能的変動は被験者固有の行動能力にも影響を与える可能性がある³²⁻³⁴。本研究の結果は、マーモセットの IPS の位置と存在も個体や半球によって有意に異なることを示した。IPS の非対称性は、ヒトの脳の分枝パターンにも見られることから¹¹⁸、今後の研究では、マーモセットの大脳皮質機能領域や形態の変動を調べることが興味あるところである。マーモセットの電気生理学的記録¹¹⁹⁻¹²¹やトレーサー注入^{122, 123}では、針を刺す際に大脳皮質ランドマーク（IPS, calcarine sulcus, lateral sulcus, superior temporal sulcus など）がよく利用される。しかし、これらのランドマークの正確な座標は、大脳皮質シート上の正確な空間位置で定義することは容易ではない。例えば、IPS は半数以下の動物にしか確認することができなかった（5.2.2）。また、IPS の最深部の位置は、個体間で Y 方向に平均脳サイズの前後長さの 5%以上のばらつきがあり（表 5.1）、これはヒトにおけるもの（中央および上側頭溝の Y 方向の位置のばらつきは脳の 10-14 %）と同等である¹²⁴。また、社会的行動に関わる領域である側溝の終端や上側頭溝の溝深さにも有意な個体間変動が見られた（データは示していない）¹²⁵。

5.4.3 脳定位水平面と AC-PC 水平面

従来の定位ランドマークと脳内ランドマーク（AC-PC）の間に脳内座標の大きな偏りがあることがわかった。マーモセットの定位水平面は AC-PC 水平面に対して $+10.0^\circ \pm 1.3$ ピッチ（すなわち前頭部下方向 10.0° ）傾いている（図 5.1）。この結果は、これらの座標系が同じ方向を持つという先行報告⁶⁴と相反するものである。重要なのは、このピッチの偏りが種によって異なることで、マカクザルの脳定位水平面は AC-PC 水平面に対して $-3 \sim -15^\circ$ ピッチ（すなわち、前頭部が $3 \sim 15^\circ$ 上方）傾いている^{126, 127}ことである。さらに、ヒトの場合、脳定位水平面は AC-PC 水平面に対して約 -10° pitch（すなわち前頭部上方向 10° ）傾いている¹²⁸。このような種による座標系の偏りは、脳の大きさに対する眼球の大きさや、頭蓋や顔の形などの他の要因に由来するものと推測される。例えば、脳の大きさに対して眼球が大きい種（マーモセットなど）は、AC-PC 水平面に対する定位座標のピッチ（前頭部下方向）が大きい、あるいは正方向になる傾向があり、一方、比較的眼の小さい種（ヒト、サルなど）はピッチ（前頭部上方向）が小さい、あるいは負方向になる傾向がある。実際、

眼球と脳の体積比は、マカクザル (3%)¹²⁹ やヒト (0.4%)¹³⁰ に比べてマーモセットでは大幅に大きい (10%)¹³¹。

5.4.4 定位固定法の再現性

“ground truth”画像ベースの座標に対する手動で位置決めした装置ベースの定位座標の偏りを回転と並進について調べた。回転の偏りは、眼窩隆起部や聴管骨の皮膚や軟部組織、および/または聴管の非対称性に由来するものと思われる。並進について、X軸方向の回転とZ軸方向の並進の再現性が低いのは、眼窩隆起部での固定具の位置決め精度が悪いか、皮膚や軟部組織の変動によるものと思われる (図 5.6e)。

第 6 章 本システムの画像誘導型脳神経外科手術への応用

6.1 動物実験での脳内ターゲットに合わせた手術戦略

動物を対象とした脳神経外科手術には、ターゲットによってその戦略は異なってくる。ここでは、大脳皮質または大脳皮質下をターゲットとする場合の脳神経外科戦略を図 6.1 に示す。まず、大脳皮質下の神経外科手術（右）では、3D 座標（template または native 座標）を選択し、ターゲットを個体の AC-PC native 座標にワープさせる。Brainsight などのロボットは、この座標をオンラインで外科手術用の native な定位座標に変換することができる。一方、大脳皮質神経外科手術の場合は（左）、まずターゲットを grayordinate 座標の cortical midthickness surface の頂点とその 3 次元座標を個体の AC-PC native 座標で特定する。その後、ロボットが手術用定位座標で座標を提供する。

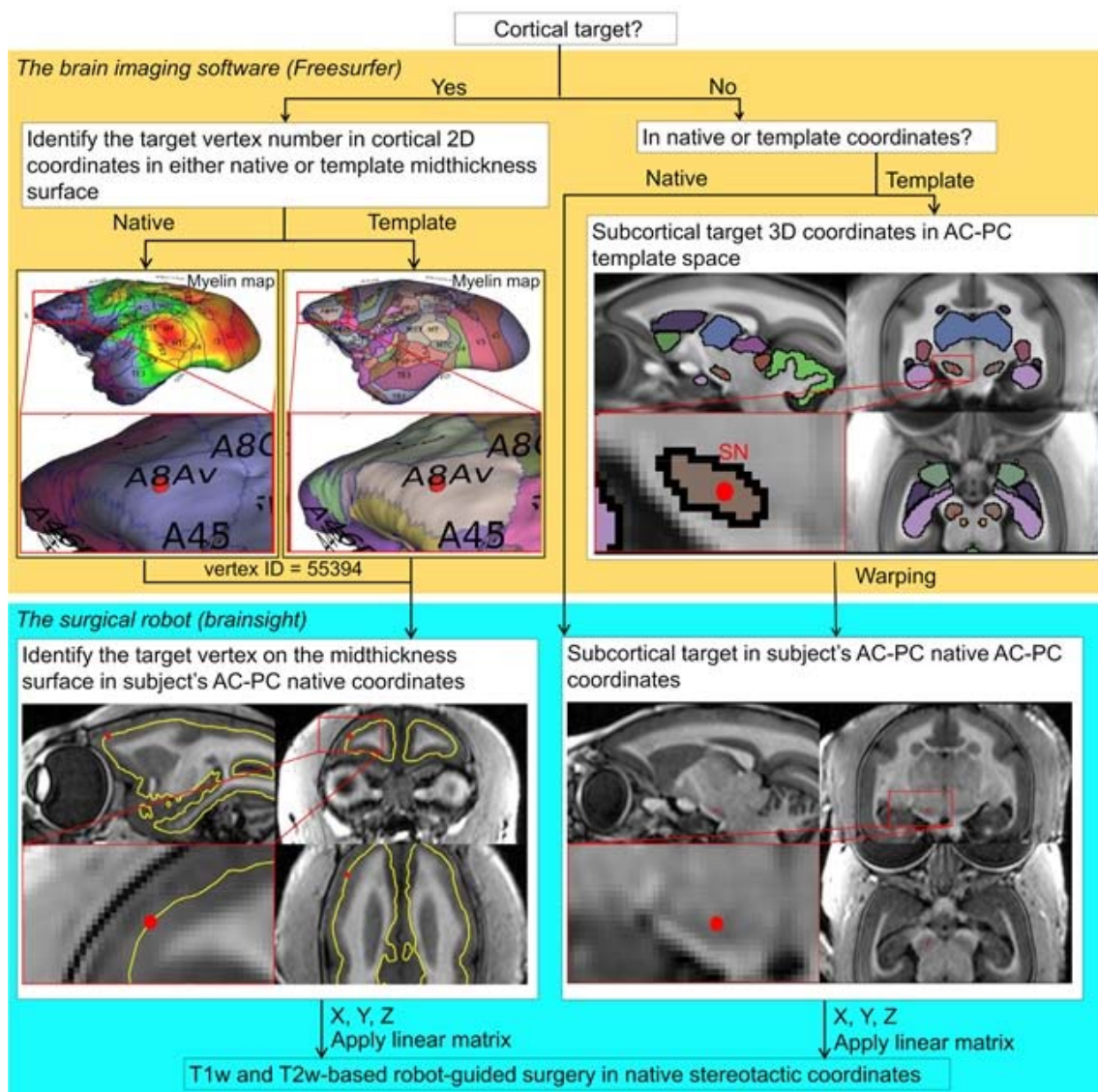


図 6.1 マーモセット脳内ターゲット合わせた手術戦略

大脳皮質手術の場合、まず大脳皮質 2D 座標 (native または template の midthickness のいずれか) でターゲットを確認する。次に、注目する頂点番号に対応する 3 次元座標を、動物個体の AC-PC native 座標で読み取る。大脳皮質下手術の場合、3 次元座標系 (template 座標系または native 座標系) でターゲットを特定する。template 座標系を使用する場合、ターゲットの 3 次元座標は動物の AC-PC native 座標にワープされる。ロボットガイド下脳外科手術では、この 3 次元座標を、動物の AC-PC native 座標から定位座標に変換して利用する。

6.2 実験プロトコル

このマルチモーダル脳ターゲティングシステムをマーモセットの画像誘導脳外科手術に適用し，脳深部構造へのターゲティングの空間精度を評価した。具体的には，マーモセットのパーキンソン病様症状を誘発するために，尾状核 (Cau) または黒質 (SN) にガイドカニューレを挿入して α -シヌクレインを投与する^{132, 133} 手術にこのシステムを用いた。

手術前に，手術計画の指針となる MRI と CT の実験を行った。撮像プロトコルは表 6.1 に示す。MR 画像は標的部位 (Cau と SN) を特定し，外科手術の投影軌道を決定し，頭蓋骨サーフェスを再構築するために使用した (図 6.2)。CT 画像は，頭蓋骨サーフェスの再構成と初期化ランドマークの同定に使用した。MRI および CT 撮影の際，マーモセットにはヘッドホルダーを装着し，マルチモーダルマーカーを用いた MBFR および BBR で画像間の位置合わせを行った。

カニューレ留置手術では，マーモセットの全身麻酔をメドミジン (0.12 mg/kg)，ミダゾラム (0.6 mg/kg)，ブトルファノール (0.8 mg/kg) の組み合わせで行った (i.m)。手術中は2時間ごとに初回麻酔量の半量を投与して麻酔レベルを維持した。マーモセット頭部をマイクロサージェリーロボット

(Brainsight, Rogue Research Inc., Montreal, Canada) の定位カセットに固定した。ロボットを構成する2台のカメラやロボットアーム間の位置合わせなどの校正はマーモセットを定位カセットに固定する前に行った。マーモセット頭部の皮膚を切開し頭蓋骨を露出させた後，ロボットのレーザーポイントによる実空間と CT 画像の両方で2つの頭蓋骨ランドマークを識別して術野と CT 画像との間の位置合わせの初期化を行った。次に，ロボットのレーザーポイントを用いて露出した頭蓋骨全体の撮像をした点群データセットから頭蓋骨サーフェスを再構築した。また手術計画時に作成していた CT 画像由来の頭蓋骨面 (頭蓋骨のセグメント処理) との位置合わせは，ロボットのコンピュータを使用して行った。今回の手術のターゲットは，個々の脳の実際の物理的な AC-PC native 座標 (SN: X, Y, Z = 2.2, -5.6, -4.9 mm, Cau: X, Y, Z = 3.2, -0.3, 1.9 mm) で決定し，ロボット座標へ変換した。ロボットのコントローラを用いて挿入針の軌道を計画し，SN と Cau の適切な進入孔と経路を決定した。SN と Cau にそれぞれガイドカニューレを挿入するため，前頭部内側と頭頂部にそれぞれ直径 1 mm の穴を開け，頭蓋骨に穴をあけた。ターゲットまでの軌道は，側脳室を通過することで脳を変形させたりしないように¹³⁴，側脳室を避けるように計画した。硬膜に 26 ga の針を刺し，0.01 mm/sec の速度でガイドカニューレと針を脳内に挿入した。挿入されたガイドカニューレは樹脂で頭蓋骨に固定され，頭皮は縫合された。手術

終了後、拮抗薬であるアチメパゾール（アンチセダン，0.35 mg/kg，i.m.）をマーモセットに投与して麻酔から覚醒させた。すべての外科的処置は滅菌された部屋で滅菌された器具を用いて行われた。

カニューレ留置手術が終了後、ターゲット（CauまたはSN）に対するカニューレの位置を評価するためにMRI実験を行った。カニューレを留置したマーモセット頭部はマーモセットヘッドコイルの内寸よりも大きかったため、もともとマカクザル用に設計されたより内径の大きな24チャンネルのヘッドコイル⁴⁰を用いてT1w撮像を行った（表6.1）。MRI撮像中の麻酔の維持や生理学的モニタリングのやり方は上記の手順で行われた（4.1節を参照）。

表 6.1 撮像パラメータ

撮 像 法	パルスシ ーケンス	TR (ms)	TE (ms)	撮像時 間 (分)	ボクセルサイズ (mm)	マトリックス (mm)	使用コイル
T1w	MPRAGE	2200	2.58	17.8	0.36×0.36×0.36	70×59×46	マーモセット用 16ch ヘッドコイル
T2w	SPACE	3000	558	6.2	0.36×0.36×0.36	70×59×46	マーモセット用 16ch ヘッドコイル
CT	-	-	2	-	0.12×0.12×0.12	51×512×512	-
T1w	MPRAGE	2200	2.23	35*	0.50×0.50×0.50	56×101×97	マカクザル用 24ch ヘッドコイル

* 加算回数 6 回

6.3 ターゲット誤差推定方法

操作精度（ガイドチューブを脳に挿入する）は，SNにおける術前計画と術後のガイドカニューレの軌道との距離として定義されるターゲット誤差によって推定した。目標位置は術前 MR 画像で決定し，ガイドカニューレの軌跡は術後 MR 画像で評価した。術前のターゲットと実際の手術の軌跡との直角距離を算出しターゲット誤差を推定した。

6.4 結果

位置合わせガイドによる手術計画と術後 MR 画像を比較すると，ガイドカニューレが脳深部に正確に挿入されていることがわかる（図 6.2）。Brainsight を用いて頭蓋骨の native surface を基準にカニューレ挿入位置を同定し，native MRI 空間に従ってカニューレ挿入軌道を Cau と SN にそれぞれ計画した（図 6.2b）。SN と Cau へのカニューレの冠状面はそれぞれ垂直方向から 12° ， 1° 後方へ傾けた（図 6.2c）。術後の MR 画像では，ガイドカニューレ先端からターゲットまでの距離が 1.6 mm であることが確認でき，薬物送達のための正確な注入カニューレ挿入が可能となった（図 6.2d）。また，SN におけるターゲットの誤差は 0.2 mm であった。しかし，この実験は 1 個体に対してのみ行われたため，このような精度を達成できる一貫性を推定することはできない。

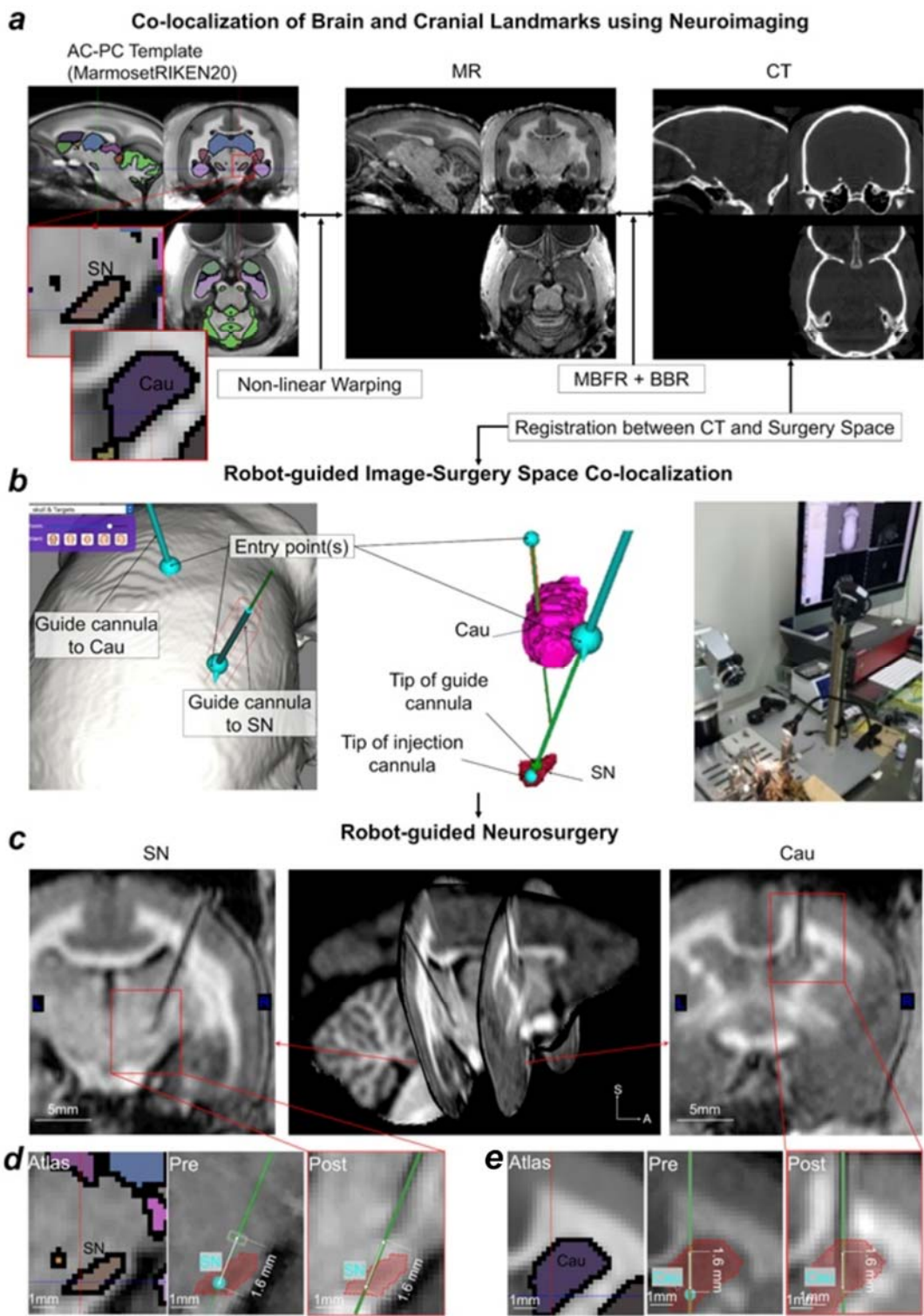


図 6.2 画像誘導型脳神経外科手術への応用例

ターゲットは AC-PC template 座標の黒質 (SN) と尾状核 (Cau) に設定した。template は Paxinos atlas⁴⁴ と重ね合わせた。ターゲット位置は、マーモセットの AC-PC native 座標に非線形にワープした (左図から中央図)。マーモセットの MR および CT 画像は、MBFR+BBR により位置合わせした。(中央および右図)。ニューロナビゲーションロボットは、マーモセットの AC-PC native 座標で MR または CT 画像を取り込み、手術空間内のターゲットにナビゲートする。(b) 頭蓋表面上の位置を基準としてカニューレ挿入位置を特定した。Cau (ピンク) と SN (赤) をターゲットとして手術前の軌道を native MRI 空間で示す。SN へのカニューレ挿入軌道は Cau と脳室を避けていることに注意 (中央図)。(c) 術後 MR 画像。SN および Cau へのガイドカニューレ挿入を確認。薬剤投与に使用する針がカニューレ先端から 1.6 mm 伸びるため、カニューレ先端は標的から 1.6 mm の位置に計画されている。(d) 大脳皮質下アトラス (カラー) を AC-PC native 座標に位置合わせし、SN の目標位置 (シアン点, 中央図), 術前 MR 画像における計画軌道 (緑線, 中央図), 術後 MRI におけるカニューレ位置 (矢頭) と計画軌道 (緑線) の位置を示したもの (右図)。(e) AC-PC native 座標に位置合わせした大脳皮質下アトラス (カラー)。AC-PC native 座標における Cau の目標位置 (シアンポイント, 中央図), 術前 MR 画像における計画軌道 (緑線, 中央図), 術後 MRI におけるカニューレ位置 (矢印の先) および計画軌道 (緑線) を示す (右図)。

6.5 考察

脳神経外科手術では、小さな領域や部位を高い精度で位置合わせすることが重要である。マーモセット大脳皮質半球の平均表面積は 9.9 cm^2 ³¹、皮質領域の数は約 116⁴⁴なので、大脳皮質領域の平均サイズは約 8.5 mm^2 （最小値は area 25 の 0.18 mm^2 ）であることがわかった。このことから、最小の大脳皮質領域を狙うには、 $0.4 \times 0.4 \text{ mm}$ の精度が必要であることがわかった。今回のマイクロサージェリーの概念実証は、このような精度が脳深部の構造に対しても達成され得ることを示唆している（誤差約 0.2 mm ，図 6.2）。例えば，マカクザルの大脳皮質半球の平均面積は 106 cm^2 ³¹，大脳皮質領域の推定数は約 130-140³⁶，大脳皮質領域の平均サイズは約 70 mm^2 （最小 5 mm^2 ）⁴⁰であると言われている。固定器無しのニューロナビゲーションシステムの手術のエラーはマカクザルで $1.05 \sim 1.2 \text{ mm}$ であるため¹³⁵⁻¹³⁷，平均大脳皮質面積に対するターゲティングの手術精度はマカクザルとマーモセットで同等であると考えられる（error / average cortical area $\approx 2\%$ ）。しかし，最終的なターゲティング精度の要件は，ターゲットのサイズに依存し，アプリケーション（例えば，電気生理学的記録，微小電極刺激，または薬物，トレーサー，ウイルスベクターの注入）間で異なる場合があることにも留意する必要がある。例えば，溶液の注入は，注入される試薬のサイズに依存すると思われる。ウイルスベクターの場合，体積の広がりには注入される溶液の体積と同じか少し大きい（1.5倍）¹³⁸が，ムシモールなどの低分子薬剤で使用するとはるかに大きく（20～30倍）¹³⁹なる。電気生理では，単一ニューロンの記録の空間サイズは $100 \mu\text{m}$ 以下と思われるが，局所電界電位（LFP）のそれは 0.5 から 3 mm と大きいことが報告されている¹⁴⁰。

全体的に，画像誘導型ロボットマイクロサージェリーは，様々な介入実験手順における実用性，柔軟性，精度を向上させた。同様のMRI誘導アプローチが最近マーモセットで実証されたが⁷⁴，このアプローチでは，手術中に脳定位装置の同じ位置を確保するために，MRI撮像後すぐに手術を行う必要があった。また，定位注入は限られた角度範囲でしか行えず，操作の自由度が制限される。例えば，カニューレの軌道が側脳室を迂回する必要がある場合（SNをターゲットとする場合，図 6.2）には，操作範囲が重要な要素となる。脳室を通過するカニューレは，脳を何度も通過することでターゲット誤差を増大させる可能性があるため¹⁴¹，ここでは脳室を最適な角度で回避して手術を計画し，SNのターゲティングに成功した。

第 7 章 結語

7.1 本論文の結論

本研究では、ポリタングステン酸溶液を含有する新規フィデューシアルマルチモーダルマーカを開発した。このマーカは、非侵襲性、非放射性で取り扱いが容易であり、PET, CT, MRI などの複数の医療用画像診断装置で高いコントラストを示す。本マルチモーダルマーカを用いることで、PET や MRI を用いた DAT の正確な大脳皮質マッピングに有用であることを確認した。また、ソフトウェアのみの位置合わせの精度検証にも有用であることが明らかとなり、近年のハイブリッド撮像装置における共焦点化精度の検証にも有用である可能性が示唆された。

実験種ごとの個体差を考慮した正確な脳領域の局所化を目指し、マーモセット脳ターゲティングシステムを構築した。このシステムはマルチモーダル画像の位置合わせ、HCP-NHP パイプラインと MRI を用いての大脳皮質サーフェス再構成と AC-PC 座法への位置合わせや CT 画像ベースの頭蓋骨ランドマークを用いた定位座標への位置合わせを可能にする。また、MBFR の初期化と BBR の微調整を組み合わせた画像位置合わせは、ソフトウェアのみ、あるいはマーカのみの方と比較して、よりロバストかつ正確な位置合わせを可能にすることを実証した。MBFR と BBR を組み合わせることで、互いの弱点（初期化依存性やマーカ セントロイド）を補い合い、高精度な位置合わせを実現することができた。

マルチモーダル脳ターゲティングシステムを用いて、異なる脳座標系における頭蓋骨の個体間変動と AC-PC native 座標におけるランドマーク位置、距離、関心領域の個体間変動を調べた。画像ベース定位座標では AC-PC native 座標と比べて頭蓋骨が平均 $10.0 \pm 1.3^\circ$ のピッチで下向きに回転していることが分かった。そして、AC-PC native 座標において、マーモセットの頭蓋骨・脳ランドマークおよび脳と大脳皮質下構造の位置や体積の変動の割合がげっ歯類と比べ大きいことが分かった。このように、マーモセットの脳と頭蓋のランドマークには、個体間で大きなばらつきがある。特に、頭蓋ランドマーク（bregma, interauricular line など）の変動は、外科手術の際に脳の向きを偏らせるのに十分な大きさであることがわかった。そのため、脳画像や頭蓋ランドマークを空間的な位置決めを利用することが推奨される。また、今回作成したマーモセットでは初となる集団ベースの体積・表面 template とアトラスは、今後、機能データと組織データを正確に組み合わせるための基礎となる可能性がある。

7.2 今後の展望

この MBFR を用いたシステムには、いくつかの応用の可能性がある。まず、現在の MBFR を用いたシステムは、個体にマーカーを固定する最適な方法を開発すれば、単一施設内だけでなく、複数の施設にまたがって利用することが可能である。CT や MRI に比べて動物 PET の施設は比較的少ないので、動物の頭部に装着できるフィデューシャルマーカーを作れば、異なる施設での異なるモダリティの画像間の空間の共時性を検証するのに有効であろう。また、ヒトの研究においても、近年、ビッグデータを用いた脳疾患の理解・予測に向けて、施設間で調和した脳神経イメージングデータの収集が試みられている¹⁴²。また、施設間でマーカーの共局在性は、画像の FOV 内の歪みのない空間を検証するための重要な情報を提供すると考えられる。

第二に、本マーカーは、異なるイメージングモダリティにわたる画像位置の較正及び保証のために使用することができる。例えば、PET/CT 及び PET/MRI などの最近のハイブリッド撮像装置の位置精度をテストするために必要とされる場合がある。マーカーは任意の画像モダリティで可視化できるので、ユーザは、システム構成、位置合わせエラー、及び画像歪みによって偏る可能性があるマーカー位置の共局在性を評価することができる。また、B0 フィールドの均質性による MRI の FOV 内の歪みを評価することもでき、このような「3D Distortion ファントム」から得られるデータは、ターゲット画像のポストプロセスによる歪み補正に使用することができる。

第三に、本マーカーは、直接体内に留置もしくは取り込みによって画像誘導定位手術や治療薬と組み合わせると有用である可能性がある。これらの目的のために使用されるマーカーはいくつかあり、例えば、TrueBeam システム¹⁴³、オイルカプセル¹⁴⁴、金粒子¹⁴⁵、硫酸コパー¹⁴⁶、ゲル (Medtronic® DISP 960-991 fiducial markers) である。しかし、これらのマーカーの多くは、単一のイメージングモダリティでのみコントラストを示し、マルチモーダルイメージングで使用すると高いコントラストを示すことはない。本研究マーカーは、脳の構造的・機能的マッピングによってしばしば達成される、局所的な脳領域を特異的に狙うために使用すると、特に有用であると考えられる。例えば、脳腫瘍は、¹⁸FFLT および/または ¹⁸F-FDG PET 撮像によって検出することができ、トレーサー取り込みの正確な位置は高解像度構造 MRI によって共局在化することができる¹⁴⁷⁻¹⁴⁹。また、パーキンソン病患者の脳深部への刺激¹⁵⁰や治療用移植片の移植¹⁵¹にも応用できる可能性がある。

概念実証ではあるが、マルチモーダルマーカーを用いたマルチモーダル脳ターゲティングシステムをマーマセットの脳外科手術に適用することができた。今後

の研究では、より多くの症例と注入部位の組織学的検証により、画像誘導下マイクロサージェリーの効果を評価する必要がある。また、より正確なターゲティングのために、より微細な介入技術（例えば、極細のカニューレや針など）の開発も必要である。実験者が MR や CT を直接利用できない場合でも、マルチモーダル template は、脳定位空間と AC-PC 空間の偏りを考慮することで、より正確なターゲティングに有効であると考えられる。

参考文献

1. Semelka, R. C., Armao, D. M., Elias, J. & Huda, W. Imaging strategies to reduce the risk of radiation in CT studies, including selective substitution with MRI. *J Magn Reson Imaging* **25**, 900–909 (2007).
2. Maes, F., Collignon, A., Vandermeulen, D., Marchal, G. & Suetens, P. Multimodality image registration by maximization of mutual information. *Studholme* **16**, 187–198 (1997).
3. Studholme, C., Hill, D. L. G. & Hawkes, D. J. An overlap invariant entropy measure of 3D medical image alignment. *Pattern Recognition* **32**, 71–86 (1999).
4. Greve, D. N. *et al.* Cortical surface-based analysis reduces bias and variance in kinetic modeling of brain PET data. *Neuroimage* **92**, 225–236 (2014).
5. Greve, D. N. & Fischl, B. Accurate and robust brain image alignment using boundary-based registration. *Neuroimage* **48**, 63–72 (2009).
6. Evans, A. C., Marrett, S., Torrescorzo, J., Ku, S. & Collins, L. MRI-PET correlation in three dimensions using a volume-of-interest (VOI) atlas. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **11**, A69-78 (1991).

7. Guo, W.-Y. *et al.* Merging molecular and anatomical information: a feasibility study on rodents using microPET and MRI. *Nucl Med Commun* **28**, 804–812 (2007).
8. Kessler, M. L., Pitluck, S., Petti, P. & Castro, J. R. Integration of multimodality imaging data for radiotherapy treatment planning. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **21**, 1653–1667 (1991).
9. Kremser, C. *et al.* Image registration of MR and CT images using a frameless fiducial marker system. *Magn Reson Imaging* **15**, 579–585 (1997).
10. Maurer, C. R. *et al.* Registration of head volume images using implantable fiducial markers. *IEEE Trans Med Imaging* **16**, 447–462 (1997).
11. Somer, E. J. R. *et al.* PET-MR image fusion in soft tissue sarcoma: accuracy, reliability and practicality of interactive point-based and automated mutual information techniques. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **30**, 54–62 (2003).
12. Wu, T.-H., Wang, J.-K., Lee, J. J. S., Liu, R.-S. & Guo, W.-Y. An imaging co-registration system using novel non-invasive and non-radioactive external markers. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **30**, 812–818 (2003).
13. Plewinsky, B. & Kamps, R. Sodium metatungstate, a new medium for binary and ternary density gradient centrifugation. *Lauffer* **185**, 1429–1439 (1984).

14. Patrick, J. M. & Patrick, V. A. Heavy liquid for material separations. (1997).
15. Callahan, J. A Nontoxic Heavy Liquid and Inexpensive Filters for Separation of Mineral Grains: RESEARCH METHOD PAPER. *Journal of Sedimentary Research* **57**, (1987).
16. Gregory, M. R. & Johnston, K. A. A nontoxic substitute for hazardous heavy liquids—aqueous sodium polytungstate ($3\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 9\text{WO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) solution (Note). *New Zealand Journal of Geology and Geophysics* **30**, 317–320 (1987).
17. Hoover, M. D., Finch, G. L. & Castorina, B. T. Sodium metatungstate as a medium for measuring particle density using isopycnic density gradient ultracentrifugation. *Journal of Aerosol Science* **22**, 215–221 (1991).
18. Lauffer, R. B. Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design. *Chem. Rev.* **87**, 901–927 (1987).
19. Runge, V. M., Clanton, J. A., Lukehart, C. M., Partain, C. L. & James, A. E. Paramagnetic agents for contrast-enhanced NMR imaging: a review. *AJR Am J Roentgenol* **141**, 1209–1215 (1983).
20. Miller, C. T. *et al.* Marmosets: A Neuroscientific Model of Human Social Behavior. *Neuron* **90**, 219–233 (2016).

21. Okano, H. *et al.* Brain/MINDS: A Japanese National Brain Project for Marmoset Neuroscience. *Neuron* **92**, 582–590 (2016).
22. Sasaki, E. *et al.* Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature* **459**, 523–527 (2009).
23. Hori, Y. *et al.* Comparison of resting-state functional connectivity in marmosets with tracer-based cellular connectivity. *Neuroimage* **204**, 116241 (2020).
24. Liu, C. *et al.* Anatomical and functional investigation of the marmoset default mode network. *Nat Commun* **10**, 1975 (2019).
25. Liu, C. *et al.* A resource for the detailed 3D mapping of white matter pathways in the marmoset brain. *Nat. Neurosci.* **23**, 271–280 (2020).
26. Sadakane, O. *et al.* In Vivo Two-Photon Imaging of Dendritic Spines in Marmoset Neocortex. *eNeuro* **2**, (2015).
27. Majka, P. *et al.* Open access resource for cellular-resolution analyses of corticocortical connectivity in the marmoset monkey. *Nat Commun* **11**, 1133 (2020).
28. Murakami, T. C. *et al.* A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing. *Nat. Neurosci.* **21**, 625–637 (2018).

29. Ma, Y. *et al.* In Vivo 3D Digital Atlas Database of the Adult C57BL/6J Mouse Brain by Magnetic Resonance Microscopy. *Front Neuroanat* **2**, 1 (2008).
30. Hasegawa, M., Kida, I. & Wada, H. A volumetric analysis of the brain and hippocampus of rats rendered perinatal hypothyroid. *Neurosci. Lett.* **479**, 240–244 (2010).
31. Hayashi, T. *et al.* The nonhuman primate neuroimaging and neuroanatomy project. *Neuroimage* **229**, 117726 (2021).
32. Mikula, S., Trotts, I., Stone, J. M. & Jones, E. G. Internet-enabled high-resolution brain mapping and virtual microscopy. *Neuroimage* **35**, 9–15 (2007).
33. Pomberger, T., Risueno-Segovia, C., Gultekin, Y. B., Dohmen, D. & Hage, S. R. Cognitive control of complex motor behavior in marmoset monkeys. *Nature Communications* **10**, 3796 (2019).
34. Yokoyama, C. *et al.* Comparative connectomics of the primate social brain. *Neuroimage* **245**, 118693 (2021).
35. Glasser, M. F. *et al.* The minimal preprocessing pipelines for the Human Connectome Project. *Neuroimage* **80**, 105–124 (2013).

36. Van Essen, D. C. *et al.* The Human Connectome Project: a data acquisition perspective. *Neuroimage* **62**, 2222–2231 (2012).
37. Glasser, M. F. *et al.* The Human Connectome Project’s neuroimaging approach. *Nat Neurosci* **19**, 1175–1187 (2016).
38. Robinson, E. C. *et al.* Multimodal surface matching with higher-order smoothness constraints. *Neuroimage* **167**, 453–465 (2018).
39. Robinson, E. C. *et al.* MSM: a new flexible framework for Multimodal Surface Matching☆. *Neuroimage* **100**, 414–426 (2014).
40. Autio, J. A. *et al.* Towards HCP-Style Macaque Connectomes: 24-Channel 3T Multi-Array Coil, MRI Sequences and Preprocessing. *Neuroimage* 116800 (2020) doi:10.1016/j.neuroimage.2020.116800.
41. Ose, T. *et al.* Anatomical variability, multi-modal coordinate systems, and precision targeting in the marmoset brain. *Neuroimage* **250**, 118965 (2022).
42. Hardman, C. D. & Ashwell, K. W. S. *Stereotaxic and Chemoarchitectural Atlas of the Brain of the Common Marmoset*. (CRC Press, 2012).
43. Palazzi, X. & Bordier, N. *The Marmoset Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Springer, 2009).

44. Paxinos, G., Watson, C., Petrides, M., Rosa, M. & Tokuno, H. *The Marmoset Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Elsevier Academic Press, 2012).
45. Stephan, H., Baron, G. & Schwerdtfeger, W. K. *The Brain of the Common Marmoset (Callithrix jacchus): A Stereotaxic Atlas*. (Springer Science & Business Media, 1980).
46. Yuasa, S. *et al. Stereotaxic Atlas of the Marmoset Brain*. (National Institute of Neuroscience (JP), 2010).
47. Bowden, D. & Martin, M. *Primate Brain Maps: Structure of the Macaque Brain: A Laboratory Guide with Original Brain Sections, Printed Atlas and Electronic Templates for Data and Schematics*. (2000).
48. Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Academic Press, 2019).
49. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Compact*. (Academic Press, 2017).
50. Saleem, K. S. & Logothetis, N. K. *A Combined MRI and Histology Atlas of the Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates - 1st Edition*.
<https://www.elsevier.com/books/a-combined-mri-and-histology-atlas-of-the->

- rhesus-monkey-brain-in-stereotaxic-coordinates/saleem/978-0-12-372559-2
(2006).
51. Horsley, V. & Clarke, R. H. THE STRUCTURE AND FUNCTIONS OF THE CEREBELLUM EXAMINED BY A NEW METHOD. *Brain* **31**, 45–124 (1908).
52. Talairach J., Tournoux P. & Rayport M. *Co-planar stereotaxic atlas of the human brain : 3-dimensional proportional system : an approach to cerebral imaging*. (G. Thieme , Thieme Medical Publishers , For distribution in Japan, Igaku Shoin, 1988).
53. Evans, A. C. *et al.* Anatomical mapping of functional activation in stereotactic coordinate space. *Neuroimage* **1**, 43–53 (1992).
54. Fonov, V. *et al.* Unbiased average age-appropriate atlases for pediatric studies. *NeuroImage* **54**, 313–327 (2011).
55. Frey, S. *et al.* An MRI based average macaque monkey stereotaxic atlas and space (MNI monkey space). *Neuroimage* **55**, 1435–1442 (2011).
56. Rohlfing, T. *et al.* The INIA19 Template and NeuroMaps Atlas for Primate Brain Image Parcellation and Spatial Normalization. *Front Neuroinform* **6**, 27 (2012).

57. Seidlitz, J. *et al.* A population MRI brain template and analysis tools for the macaque. *NeuroImage* **170**, 121–131 (2018).
58. Hawrylycz, M. *et al.* Digital atlasing and standardization in the mouse brain. *PLoS Comput Biol* **7**, e1001065 (2011).
59. Kuan, L. *et al.* Neuroinformatics of the Allen Mouse Brain Connectivity Atlas. *Methods* **73**, 4–17 (2015).
60. Wang, Q. *et al.* The Allen Mouse Brain Common Coordinate Framework: A 3D Reference Atlas. *Cell* **181**, 936-953.e20 (2020).
61. Dale, A. M., Fischl, B. & Sereno, M. I. Cortical surface-based analysis. I. Segmentation and surface reconstruction. *Neuroimage* **9**, 179–194 (1999).
62. Van Essen, D. C. & Maunsell, J. H. Two-dimensional maps of the cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* **191**, 255–281 (1980).
63. Glasser, M. F. *et al.* A multi-modal parcellation of human cerebral cortex. *Nature* **536**, 171–178 (2016).
64. Risser, L. *et al.* In vivo localization of cortical areas using a 3D computerized atlas of the marmoset brain. *Brain Struct Funct* (2019) doi:10.1007/s00429-019-01869-x.

65. Donahue, C. J. *et al.* Using Diffusion Tractography to Predict Cortical Connection Strength and Distance: A Quantitative Comparison with Tracers in the Monkey. *J Neurosci* **36**, 6758–6770 (2016).
66. Woodward, A. *et al.* The Brain/MINDS 3D digital marmoset brain atlas. *Sci Data* **5**, 180009 (2018).
67. Paxinos, G., Huang, X.-F. & Toga, A. W. *The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Academic Press, 1999).
68. Hartig, R. *et al.* The Subcortical Atlas of the Rhesus Macaque (SARM) for neuroimaging. *Neuroimage* **235**, 117996 (2021).
69. Saleem, K. S. *et al.* High-resolution mapping and digital atlas of subcortical regions in the macaque monkey based on matched MAP-MRI and histology. *Neuroimage* 118759 (2021) doi:10.1016/j.neuroimage.2021.118759.
70. Majka, P. *et al.* Histology-Based Average Template of the Marmoset Cortex With Probabilistic Localization of Cytoarchitectural Areas. *Neuroimage* **226**, 117625 (2021).

71. Francois, C., Percheron, G. & Yelnik, J. Localization of nigrostriatal, nigrothalamic and nigrotectal neurons in ventricular coordinates in macaques. *Neuroscience* **13**, 61–76 (1984).
72. Percheron, G. A reliable system of ventricular coordinates for the cartography and stereotaxy of the amygdala (and anterior hippocampus) in macaques. *J. Neurosci. Methods* **75**, 5–14 (1997).
73. Mai, J. K., Majtanik, M. & Paxinos, G. *Atlas of the Human Brain*. (Academic Press, 2015).
74. Mundinano, I.-C., Flecknell, P. A. & Bourne, J. A. MRI-guided stereotaxic brain surgery in the infant and adult common marmoset. *Nat Protoc* **11**, 1299–1308 (2016).
75. Hikishima, K. *et al.* Population-averaged standard template brain atlas for the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neuroimage* **54**, 2741–2749 (2011).
76. Liu, C. *et al.* Marmoset Brain Mapping V3: Population multi-modal standard volumetric and surface-based templates. *Neuroimage* **226**, 117620 (2021).

77. Papp, E. A., Leergaard, T. B., Calabrese, E., Johnson, G. A. & Bjaalie, J. G. Waxholm Space atlas of the Sprague Dawley rat brain. *NeuroImage* **97**, 374–386 (2014).
78. Holmes, C. J. *et al.* Enhancement of MR images using registration for signal averaging. *J Comput Assist Tomogr* **22**, 324–333 (1998).
79. Mazziotta, J. *et al.* A probabilistic atlas and reference system for the human brain: International Consortium for Brain Mapping (ICBM). *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **356**, 1293–1322 (2001).
80. Rohlfing, T., Zahr, N. M., Sullivan, E. V. & Pfefferbaum, A. The SRI24 multichannel atlas of normal adult human brain structure. *Hum Brain Mapp* **31**, 798–819 (2010).
81. Shattuck, D. W. *et al.* Construction of a 3D probabilistic atlas of human cortical structures. *Neuroimage* **39**, 1064–1080 (2008).
82. Tzourio-Mazoyer, N. *et al.* Automated anatomical labeling of activations in SPM using a macroscopic anatomical parcellation of the MNI MRI single-subject brain. *Neuroimage* **15**, 273–289 (2002).

83. Meiboom, S. & Gii, D. Modified Spin - Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Review of Scientific Instruments* **29**, 688–691 (1958).
84. Vold, R. L., Waugh, J. S., Klein, M. P. & Phelps, D. E. Measurement of Spin Relaxation in Complex Systems. *The Journal of Chemical Physics* **48**, 3831–3832 (1968).
85. Carr, H. Y. & Purcell, E. M. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Phys. Rev.* **94**, 630–638 (1954).
86. Hahn, E. L. An Accurate Nuclear Magnetic Resonance Method for Measuring Spin-Lattice Relaxation Times. *Phys. Rev.* **76**, 145–146 (1949).
87. Sato, K. *et al.* Performance evaluation of the small-animal PET scanner ClairvivoPET using NEMA NU 4-2008 Standards. *Phys Med Biol* **61**, 696–711 (2016).
88. Bloembergen, N., Purcell, E. M. & Pound, R. V. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Phys. Rev.* **73**, 679–712 (1948).
89. Emond, P. *et al.* Synthesis and ligand binding of nortropane derivatives: N-substituted 2beta-carbomethoxy-3beta-(4'-iodophenyl)nortropane and N-(3-iodoprop-(2E)-enyl)-2beta-carbomethoxy-3beta-(3',4'-disubstituted

- phenyl)nortropine. New high-affinity and selective compounds for the dopamine transporter. *J. Med. Chem.* **40**, 1366–1372 (1997).
90. Kabsch, W. A discussion of the solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallographica Section A* **34**, 827–828 (1978).
91. Danilchenko, A. & Fitzpatrick, J. M. General Approach to First-Order Error Prediction in Rigid Point Registration. *IEEE Trans. Med. Imaging* **30**, 679–693 (2011).
92. Fitzpatrick, J. M. Fiducial registration error and target registration error are uncorrelated. in *Medical Imaging 2009: Visualization, Image-Guided Procedures, and Modeling* vol. 7261 726102 (International Society for Optics and Photonics, 2009).
93. Thomas, B. A. *et al.* The importance of appropriate partial volume correction for PET quantification in Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **38**, 1104–1119 (2011).
94. Lewis, D. A. *et al.* Dopamine transporter immunoreactivity in monkey cerebral cortex: Regional, laminar, and ultrastructural localization. *J. Comp. Neurol.* **432**, 119–136 (2001).

95. Markov, N. T. *et al.* A weighted and directed interareal connectivity matrix for macaque cerebral cortex. *Cereb. Cortex* **24**, 17–36 (2014).
96. Barnden, L. *et al.* Validation of fully automatic brain SPET to MR co-registration. *Eur J Nucl Med* **27**, 147–154 (2000).
97. Soma, T. *et al.* Behaviors of cost functions in image registration between 201Tl brain tumor single-photon emission computed tomography and magnetic resonance images. *Ann Nucl Med* **22**, 825–832 (2008).
98. Joseph, P. M. & Ruth, C. A method for simultaneous correction of spectrum hardening artifacts in CT images containing both bone and iodine. *Med Phys* **24**, 1629–1634 (1997).
99. Kyriakou, Y., Meyer, E., Prell, D. & Kachelriess, M. Empirical beam hardening correction (EBHC) for CT. *Med Phys* **37**, 5179–5187 (2010).
100. Jezzard, P. & Balaban, R. S. Correction for geometric distortion in echo planar images from B₀ field variations. *Magn Reson Med* **34**, 65–73 (1995).
101. White, D. R., Booz, J., Griffith, R. V., Spokas, J. J. & Wilson, I. J. Report 44. *J ICRU* **os23**, NP-NP (1989).

102. Hori, Y. *et al.* Translating the Human Connectome Project to Marmoset Imaging: 16-Channel Multi-Array Coil and HCP-Style MRI Protocols and Preprocessing. in (2018).
103. Schaltenbrand, G., Wahren, W. & Hassler, R. G. *Atlas for stereotaxy of the human brain.* (Thieme, 1977).
104. Fischl, B. *et al.* Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron* **33**, 341–355 (2002).
105. Fischl, B., Sereno, M. I., Tootell, R. B. & Dale, A. M. High-resolution intersubject averaging and a coordinate system for the cortical surface. *Hum Brain Mapp* **8**, 272–284 (1999).
106. Glasser, M. F. & Van Essen, D. C. Mapping human cortical areas in vivo based on myelin content as revealed by T1- and T2-weighted MRI. *J Neurosci* **31**, 11597–11616 (2011).
107. Hill, D. L., Batchelor, P. G., Holden, M. & Hawkes, D. J. Medical image registration. *Phys Med Biol* **46**, R1-45 (2001).

108. Donahue, C. J., Glasser, M. F., Preuss, T. M., Rilling, J. K. & Van Essen, D. C. Quantitative assessment of prefrontal cortex in humans relative to nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, E5183–E5192 (2018).
109. de Brouwer, E. J. M. *et al.* Histology and computed tomography of incidental calcifications in the human basal ganglia. *Neuroradiology* **63**, 1145–1148 (2021).
110. Lange, F. J., Ashburner, J., Smith, S. M. & Andersson, J. L. R. A Symmetric Prior for the Regularisation of Elastic Deformations: Improved anatomical plausibility in nonlinear image registration. *Neuroimage* **219**, 116962 (2020).
111. Chaplin, T. A., Yu, H.-H., Soares, J. G. M., Gattass, R. & Rosa, M. G. P. A conserved pattern of differential expansion of cortical areas in simian primates. *J. Neurosci.* **33**, 15120–15125 (2013).
112. Kurihara, S. *et al.* Anatomical and Surgical Evaluation of the Common Marmoset as an Animal Model in Hearing Research. *Front Neuroanat* **13**, 60 (2019).
113. William, R. *psych: Procedures for Psychological, Psychometric, and Personality Research.* (2020).
114. Shrout, P. E. & Fleiss, J. L. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull* **86**, 420–428 (1979).

115. Yokoyama, C., Kawasaki, A., Hayashi, T. & Onoe, H. Linkage between the midline cortical serotonergic system and social behavior traits: positron emission tomography studies of common marmosets. *Cereb Cortex* **23**, 2136–2145 (2013).
116. Miller, K. L. *et al.* Multimodal population brain imaging in the UK Biobank prospective epidemiological study. *Nat Neurosci* **19**, 1523–1536 (2016).
117. Sui, J., Liu, M., Mevorach, C. & Humphreys, G. W. The Salient Self: The Left Intraparietal Sulcus Responds to Social as Well as Perceptual-Saliency After Self-Association. *Cerebral Cortex* **25**, 1060–1068 (2015).
118. Zlatkina, V. & Petrides, M. Morphological patterns of the intraparietal sulcus and the anterior intermediate parietal sulcus of Jensen in the human brain. *Proc Biol Sci* **281**, 20141493 (2014).
119. Rosa, M. G., Fritsches, K. A. & Elston, G. N. The second visual area in the marmoset monkey: visuotopic organisation, magnification factors, architectonical boundaries, and modularity. *J. Comp. Neurol.* **387**, 547–567 (1997).
120. Rosa, M. G. & Elston, G. N. Visuotopic organisation and neuronal response selectivity for direction of motion in visual areas of the caudal temporal lobe of the

- marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): middle temporal area, middle temporal crescent, and surrounding cortex. *J. Comp. Neurol.* **393**, 505–527 (1998).
121. Rosa, M. G. & Schmid, L. M. Visual areas in the dorsal and medial extrastriate cortices of the marmoset. *J. Comp. Neurol.* **359**, 272–299 (1995).
122. Burman, K. J., Bakola, S., Richardson, K. E., Reser, D. H. & Rosa, M. G. P. Patterns of afferent input to the caudal and rostral areas of the dorsal premotor cortex (6DC and 6DR) in the marmoset monkey. *J. Comp. Neurol.* **522**, 3683–3716 (2014).
123. Reser, D. H. *et al.* Contrasting patterns of cortical input to architectural subdivisions of the area 8 complex: a retrograde tracing study in marmoset monkeys. *Cereb. Cortex* **23**, 1901–1922 (2013).
124. Steinmetz, H., Fürst, G. & Freund, H. J. Variation of perisylvian and calcarine anatomic landmarks within stereotaxic proportional coordinates. *American Journal of Neuroradiology* **11**, 1123–1130 (1990).
125. Suzuki, W. *et al.* Functional columns in superior temporal sulcus areas of the common marmoset. *NeuroReport* **26**, 1133–1139 (2015).

126. Jung, B. *et al.* A comprehensive macaque fMRI pipeline and hierarchical atlas. *Neuroimage* **235**, 117997 (2021).
127. Klink, C. *et al.* *Combined Brain Perturbation and Neuroimaging in Non-human Primates*. <https://osf.io/z4x89/> (2020) doi:10.31219/osf.io/z4x89.
128. Park, J. S. *et al.* A proposal of new reference system for the standard axial, sagittal, coronal planes of brain based on the serially-sectioned images. *J Korean Med Sci* **25**, 135–141 (2010).
129. Atsumi, I., Kurata, M. & Sakaki, H. Comparative study on ocular anatomical features concerning the breed and age differences in rabbits. *Anim. Eye Res.* 35–41 (2013).
130. Heymsfield, S. *et al.* Adult human ocular volume: scaling to body size and composition. *Anatomy & Physiology: Current Research* **6**, 1–9 (2016).
131. Korbmacher, B. *et al.* Feasibility of intravitreal injections and ophthalmic safety assessment in marmoset (*Callithrix jacchus*) monkeys. *Primate Biol* **4**, 93–100 (2017).
132. Eslamboli, A. *et al.* Long-term consequences of human alpha-synuclein overexpression in the primate ventral midbrain. *Brain* **130**, 799–815 (2007).

133. Shimozawa, A. *et al.* Propagation of pathological α -synuclein in marmoset brain. *Acta Neuropathol Commun* **5**, 12 (2017).
134. Starr, P. A. *et al.* Subthalamic nucleus deep brain stimulator placement using high-field interventional magnetic resonance imaging and a skull-mounted aiming device: technique and application accuracy. *J. Neurosurg.* **112**, 479–490 (2010).
135. Frey, S., Comeau, R., Hynes, B., Mackey, S. & Petrides, M. Frameless stereotaxy in the nonhuman primate. *Neuroimage* **23**, 1226–1234 (2004).
136. Sudhakar, V. *et al.* Development of a novel frameless skull-mounted ball-joint guide array for use in image-guided neurosurgery. *J Neurosurg* **132**, 595–604 (2019).
137. Zhu, G.-Y. *et al.* The Accuracy and Feasibility of Robotic Assisted Lead Implantation in Nonhuman Primates. *Neuromodulation* **22**, 441–450 (2019).
138. Watakabe, A. *et al.* Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. *Neurosci Res* **93**, 144–157 (2015).
139. Murata, Y. *et al.* Temporal plasticity involved in recovery from manual dexterity deficit after motor cortex lesion in macaque monkeys. *J Neurosci* **35**, 84–95 (2015).

140. Logothetis, N. K. The underpinnings of the BOLD functional magnetic resonance imaging signal. *J Neurosci* **23**, 3963–3971 (2003).
141. Zrinzo, L. *et al.* Avoiding the ventricle: a simple step to improve accuracy of anatomical targeting during deep brain stimulation. *J Neurosurg* **110**, 1283–1290 (2009).
142. Casey, B. J. *et al.* The Adolescent Brain Cognitive Development (ABCD) study: Imaging acquisition across 21 sites. *Dev Cogn Neurosci* **32**, 43–54 (2018).
143. Shiinoki, T. *et al.* ‘Evaluation of a combined respiratory-gating system comprising the TrueBeam linear accelerator and a new real-time tumor-tracking radiotherapy system: A preliminary study’ [JACMP, 17(4), 2016]. *J Appl Clin Med Phys* **18**, 238 (2017).
144. Gilbert, J. W. *et al.* Guidance of magnetic resonance imaging and placement of skin-marker localization devices. *J Neurosurg Sci* **55**, 85–88 (2011).
145. Cho, J.-H. *et al.* Development of a novel imaging agent using peptide-coated gold nanoparticles toward brain glioma stem cell marker CD133. *Acta Biomater* **47**, 182–192 (2017).

146. Glud, A. N. *et al.* A fiducial skull marker for precise MRI-based stereotaxic surgery in large animal models. *J. Neurosci. Methods* **285**, 45–48 (2017).
147. Owen, T. J., Chen, A. V., Frey, S., Martin, L. G. & Kalebaugh, T. Transsphenoidal surgery: accuracy of an image-guided neuronavigation system to approach the pituitary fossa (sella turcica). *Vet Surg* **47**, 664–671 (2018).
148. Ulin, K., Urie, M. M. & Cherlow, J. M. Results of a multi-institutional benchmark test for cranial CT/MR image registration. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **77**, 1584–1589 (2010).
149. Zhao, F. *et al.* (18)F-Fluorothymidine PET-CT for resected malignant gliomas before radiotherapy: tumor extent according to proliferative activity compared with MRI. *PLoS ONE* **10**, e0118769 (2015).
150. Chen, S.-Y. *et al.* Targeting the subthalamic nucleus for deep brain stimulation--a comparative study between magnetic resonance images alone and fusion with computed tomographic images. *World Neurosurg* **75**, 132–137; discussion 22-24, 29–31 (2011).
151. Kikuchi, T. *et al.* Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature* **548**, 592–596 (2017).

謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教官として終始多大なご指導を賜った 東北大学 サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター 放射線管理研究部の渡部浩司教授に深謝致します。また、社会人博士課程での学位取得を御理解ご支援していただいた 理化学研究所 生命機能科学センター 脳コネクトミクスイメージング研究チーム 林拓也チームリーダーに心より感謝の意を表します。本研究・実験・論文化を進めるにあたり数々の御教示いただきました。そして、数多くの実験に御協力ならびに御助言いただいた 脳コネクトミクスイメージング研究チームの皆様および他機関の方々に深く感謝いたします。最後に、研究活動を支え続けてくれた家族に感謝の意を表します。

研究業績

(1) 学位論文に関する研究業績

・ 学術雑誌論文 (査読付)

1. Ose, T., Autio, J.A., Ohno, M., Nishigori, K., Tanki, N., Igesaka, A., Mori, T., Doi, H., Wada, Y., Nakajima, I., Watabe, H., Hayashi, T., 2019. A novel Tungsten-based fiducial marker for multi-modal brain imaging. J. Neurosci. Methods. (学位論文第2章, 第3章)
2. Ose, T., Autio, J.A., Ohno, M., Frey, S., Uematsu, A., Kawasaki, A., Takeda, C., Hori, Y., Nishigori, K., Nakako, T., Yokoyama, C., Nagata, H., Yamamori, T., Van Essen, D.C., Glasser, M.F., Watabe, H., Hayashi, T., 2022. Anatomical variability, multi-modal coordinate systems, and precision targeting in the marmoset brain. Neuroimage 250, 118965. (学位論文第4章, 第5章, 第6章, 第7章, 第8章)

・ 国際会議

1. Takayuki Ose, Hiroshi Watabe, Joonas Autio, Nobuyoshi Tanki, Ami Igesaka, Hisashi Doi, Yasuhiro Wada, Takuya Hayashi. Image fusion using a novel multi-modal imaging marker, NRM 2016, Boston Mass, United States July 14-16 (2016) (学位論文第2章, 第3章)

・ 国内学会

1. 合瀬恭幸, マルチモーダルマーカーによる診断画像の位置合わせに関する研究, 第5回核医学画像解析研究会, 東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター, 宮城県, 日本, 12月12日 (2015) (学位論文第2章, 第3章)
2. Ose Takayuki, Autio Joonas, Ohno Masahiro, Kawasaki Akihiro, Takeda Chiho, Hori Yuki, Nishigori Kantaro, Nakako Tomokazu, Yokoyama Chihiro, Nagata Hidetaka, Yamamori Tetsuo, Watabe Hiroshi, Hayashi Takuya. The maker-based localization system and individual variability of marmoset brain, 第3回ヒト脳イメージング研究会, 玉川大学, 東京, Japan September 6, (2019) (学位論文第4章, 第5章, 第6章, 第7章, 第8章)
3. Ose T., Autio J., Ohno M., Kawasaki A., Takeda C., Hori Y., Nishigori K., Nakako Tomokazu., Yokoyama C., Nagata Hidetaka., Yamamori Tetsuo., Watabe Hiroshi., Hayashi T. The development of maker-based localization system, estimation of individual brain variability. 第9回日本マーモセット研究会大会, 舞子ビラ, 神戸, Japan February 14 (2020) (学位論文第4章, 第5章, 第6章, 第7章, 第8章)