
脳腫瘍及び周囲組織の高分解能拡散テンソル磁気共鳴画像：

免疫組織化学標本との比較に関する総合的研究

1 5 5 9 1 2 6 7

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金

(基盤研究 (C) (2)) 研究成果報告書

滋賀医科大学附属図書館



2004012916

平成18年2月

研究代表者 井藤 隆太

滋賀医科大学医学部講師

研究組織

研究代表者：井藤 隆太 (滋賀医科大学医学部講師)

研究分担者：中洲 敏 (滋賀医科大学医学部助教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	1,400	0	1,400
平成 16 年度	1,800	0	1,800
総計	3,200	0	3,200

研究発表

(1) 口頭発表

井藤隆太 文圭三 中洲敏 森川茂廣 犬伏俊郎 村田喜代史

ラット N-エチル-N-ニトロソウレア誘発脳腫瘍の拡散テンソル磁気共鳴画像

第 64 回日本医学放射線学会総会・学術集会, 平成 17 年 4 月 10 日

Ito R, Bun K, Nakasu S, Morikawa S, Inubushi T, Mori S, Murata K. Diffusion tensor MR imaging of ethyl-nitrosourea-induced rat brain tumor, feasibility of in vivo imaging by comparison with ex vivo imaging. International Society for Magnetic Resonance in Medicine Workshop on Advances in Experimental and Clinical MR in Cancer Research, 16-18 October 2004 Manchester, England, UK

Bun K, Ito R, Kitahara S, Murata K. Isotropic Diffusivity Changes of Centrum Semiovale in Children with and without Developmental Delay: Diffusion MR Imaging with Segmentation-Based Measurement. American Society of Neuroradology 42nd Annual Meeting, June 7-11, 2004 Washington State Convention & Trade Center, Seattle, WA, USA.

Kitahara S, Ito R, Bun K, Murata K. Normal Maturation of Centrum Semiovale during Childhood: Diffusion Tensor MR Imaging with Segmentation-Based Measurement. American Society of Neuroradology 42nd Annual Meeting, June 7-11, 2004 Washington State Convention & Trade Center, Seattle, WA, USA.

(2) 学会誌等

Kitahara S, Nakasu S, Murata K, Sho K, Ito R. Evaluation of Treatment-Induced Cerebral White Matter Injury by Using Diffusion-Tensor MR Imaging: Initial Experience. AJNR Am J Neuroradiol. 26: 2200-2206, 2005.

研究成果

脳の拡散テンソル(Diffusion-Tensor、DT)磁気共鳴(MR)画像法は、脳組織内の水分子の拡散の大きさと方向性を非侵襲的に定量測定することで脳の発達、加齢、病変等を評価可能な手段として広く臨床応用されている。

拡散テンソル MR 画像法によって得られるいくつかのパラメーターの中の一つに異方性(水分子の拡散に一定の方向性が認められるもの)の指標がある。正常の脳梁をはじめとした白質は多くの場合のこの異方性を有しているが、ヒト新生児期脳の白質内水分子拡散異方性の増加が髄鞘化と時期的な関連を示すことから、白質内髄鞘構造がこの異方性に大きく寄与する事が考えられている他、軸索及びその走行形態の寄与も示唆されている。このことに着目し、脳白質内での水分子拡散の方向性を probe として用いることにより脳内神経束、神経路構造を可視化する拡散テンソル MR tractography が提案され、生体脳において脳内の各部分の連結性を調べる手段として研究が進んでいる。

これらの研究のなかに脳腫瘍性病変と周囲の神経束との関連を調べる試みが含まれており、大きくは神経束が腫瘍により押し退けられる(displacement)、腫瘍中を通り抜ける(infiltration)、腫瘍部分で途絶している(disruption) 3つの状態が存在することが観察され、腫瘍の悪性度との関係も含めて議論がなされている。

しかし、これらの臨床研究中使用されている数 mm レベルの解像度の画像で可視化されている神経束と考えられる腫瘍周囲の構造が実際は何を反映しているかという点についてはいまだ明らかではない。

本研究では、ENU(N-ethyl-N-nitrosourea)誘発 glioma を持つラットの標本脳拡散テンソル MR 画像から各画素内の水分子拡散の方向性とその大きさを可視化した高分解能 vector マップを作成し腫瘍と周囲脳組織の方向性を持つ構造との関係を描出した後に同じ断面の組織標本を作成し比較検討することで、vector マップの示す構造が組織学的にどのような構造に起因しているかを、特に neuro-filaments との関係に着目して明らかにすることで、DT MR 画像法が N-エチル-N-ニトロソウレア(ENU)誘発ラット脳腫瘍について、腫瘍と白質内神経線維構造との関係性を評価可能かどうか検討した。

材料及び方法

実験動物

経胎盤性に ENU(N-ethyl-N-nitrosourea)を投与し生後脳神経膠腫を発生させた Fisher-334 ラット 6 匹。

DT MR 画像撮像用標本

ENU 誘発脳腫瘍ラットを生後 231-258 日目に paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)で経心性に灌流した。取り出した脳のうち腫瘍が含まれた部分を 5mm 厚に切り出し 0.1 M phosphate buffer で満たした 10mm 径自

作撮像用チェンバーに封入し撮像した。

組織標本作製

DT MR 撮影後 4°C に保った固定液中で 3 日間固定後パラフィン包埋し、
Hematoxylin-eosin(HE)染色及び免疫組織染色(neurofilament)を施した。

当実験に実験動物を使用すること及び実験操作に伴う動物の取り扱いに関して
は滋賀医科大学動物実験委員会承認を受けた(2003-11-7)。

DT MR 画像撮像

(a)撮像装置

Horizontal 7T/40 cm magnet (Fig.1a)

(Japan Superconductor Technology Inc., Kobe, JAPAN)

12cm gradient set up to 400mT/m (Magnex Scientific Ltd., Abbingdon, UK)

UNITYINOVA NMR system (VARIAN Inc, Palo Alto, CA, USA)

a handmade coil with an inner diameter of 12mm (Fig.1b)

(b)収集画像及び撮像条件

(1)diffusion weighted images with diffusion sensitization of b-value = 1027
sec/mm² in six different noncolinear directions

(2)T2-weighted (b0) image without diffusion sensitization

2000/36/12-14 (TR msec / TE msec / averaging)

24 mm field of view, 0.5 mm slice thickness

256 x 256 scan matrix (0.094 x 0.094 x 0.5 mm³)

画像解析

(a)テンソル計算

6組のDW画像とT2強調画像データからボクセルごとの拡散テンソルの要素を多変量線形回帰をもちいて計算しこれを対角化することで3つの固有値と3つの固有ベクトルを得た。

(b)Color map 作成

各ボクセルの3つの固有値のうち、最も大きい固有値に関連した固有ベクトルが局所のベクトルの方向をあらわすと仮定した。異方性の指標として **fractional anisotropy (FA)** を使用し、**Color map** をこのFA値(輝度)と上記の最も大きい固有値に関連した固有ベクトルの3つの要素から作成した。

(c)Vector map 作成

color map 作成時の最も大きい固有値に関連した固有ベクトルの要素のうち、表示2次元画像の2軸に関連した2要素を用いてピクセル毎にベクトルの方向を線分で表示した **vector map** をFA値0.45以上のピクセルについて作成し、T2強調画像上に重ね合わせて表示した。

これらの画像作成に必要な計算や画像表示はプログラム開発用ツール IDL

(Interactive Data Language; Research Systems)を用いて作成した自作アプリケーションを使用した(Appendix)。

検討項目

vector map の線分が腫瘍による neurofilament (NF)構造の改変を反映しているかどうかを NF 免疫染色を施した組織標本と視覚的に比較することで検討した。また、T2 強調画像での信号変化との関係も検討した。

結果

- (1) vector map では、組織標本で認められる白質内の整列した太い NF 束を反映すると考えられる整列した線分群の描出が可能であった(Fig.2a,2b)。
- (2) T2 強調画像で正常白質の信号が失われている部分でも、組織標本で NF 束が保たれている部分は vector map で残存 NF 束を反映すると考えられる線分が認められた(Fig.3a,3b,4a,4b)。
- (3) 組織標本で認められる腫瘍-白質境界部の NF 束の膨隆、途絶は vector map で線分の連続性、整列性の途絶として明瞭に描出可能であった(Fig.5a,5b)。
- (4) 腫瘍中に散在性に残存する微細な NF 束は vector map では十分描出されなかった(Fig.2a,2b)。

考察

MR 画像は従来、コントラストとしてプロトン密度、T1 緩和や T2 緩和の差、流れの情報などを画像化してきたが、様々な因子が複雑に T1 緩和や T2 緩和に寄与するため、これらの画像から組織内に生じている病理学的な微細な構造変化を特定する事やさらに腫瘍の悪性度について確かな情報を提供することは容易ではなかった。

ヒト脳腫瘍における DT MR 画像法の利用法として、治療計画のための神経路と腫瘍との関係の評価、腫瘍部や腫瘍周囲の等方性拡散、異方性拡散を示す指標を計測することで tissue characterization の試みや転移性腫瘍と神経膠腫の鑑別の可否などが検討されている。しかし疾患の性格上、画像と組織標本との直接の比較検討は困難であることが多い。そこで ENU 経胎盤投与により誘発したラット脳腫瘍について組織標本と DT MR 画像法で得られた計算画像とを用いて、腫瘍と白質の神経線維構造との関係性を評価可能かどうか検討した。

T2 強調画像での白質内異常信号域は必ずしも単一の病理学的変化を示すのではなく、浮腫や腫瘍浸潤などの多様な変化を反映しているものと考えられているが、DT MR 画像法で得られた計算画像を用いて白質内線維構造を反映していると考えられる異方性の改変を評価することで、T2 強調画像では区別できないこの多様な変化を捉えられる可能性が示唆された。vector map は比較的まとまった NF 束の描出は可能と考えられたが、組織標本と計算画像の厚さに差がある上、断面の角度も完全には一致しておらず微細な NF 構造描出の詳細な比較は不可能であった。

高分解能 vector マップと組織標本とを詳細に比較することで、従来の MR 画像

法が提供できなかった腫瘍の悪性度に関する情報や腫瘍の周囲組織についての情報が得られるようになれば、治療の選択や外科的切除に際しての切除範囲の検討の際に新たな有用な情報を提供しうる可能性がある点で意義あるものと考えられる。

DT MR 画像法で得られた **vector map** は白質神経線維の様相を反映した画像を提供することで T2 強調画像では捉えられない脳腫瘍進展範囲の評価に利用できる可能性が示された。

Fig.1a MR unit

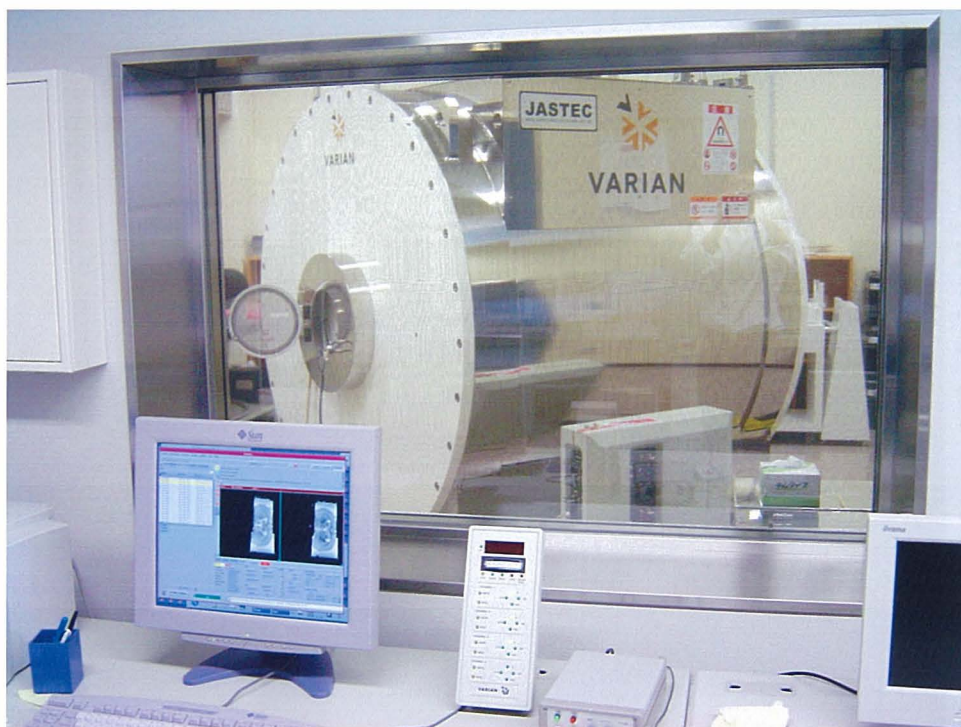
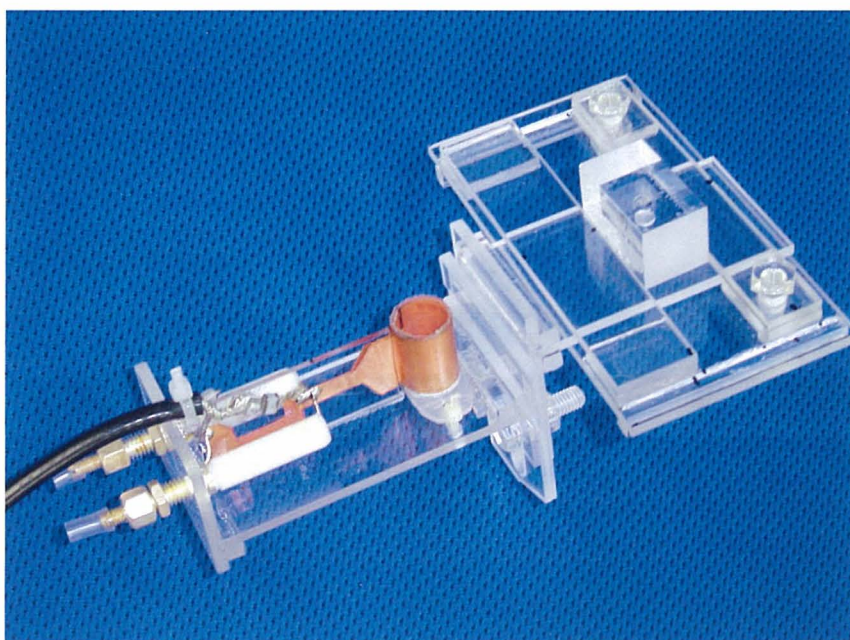
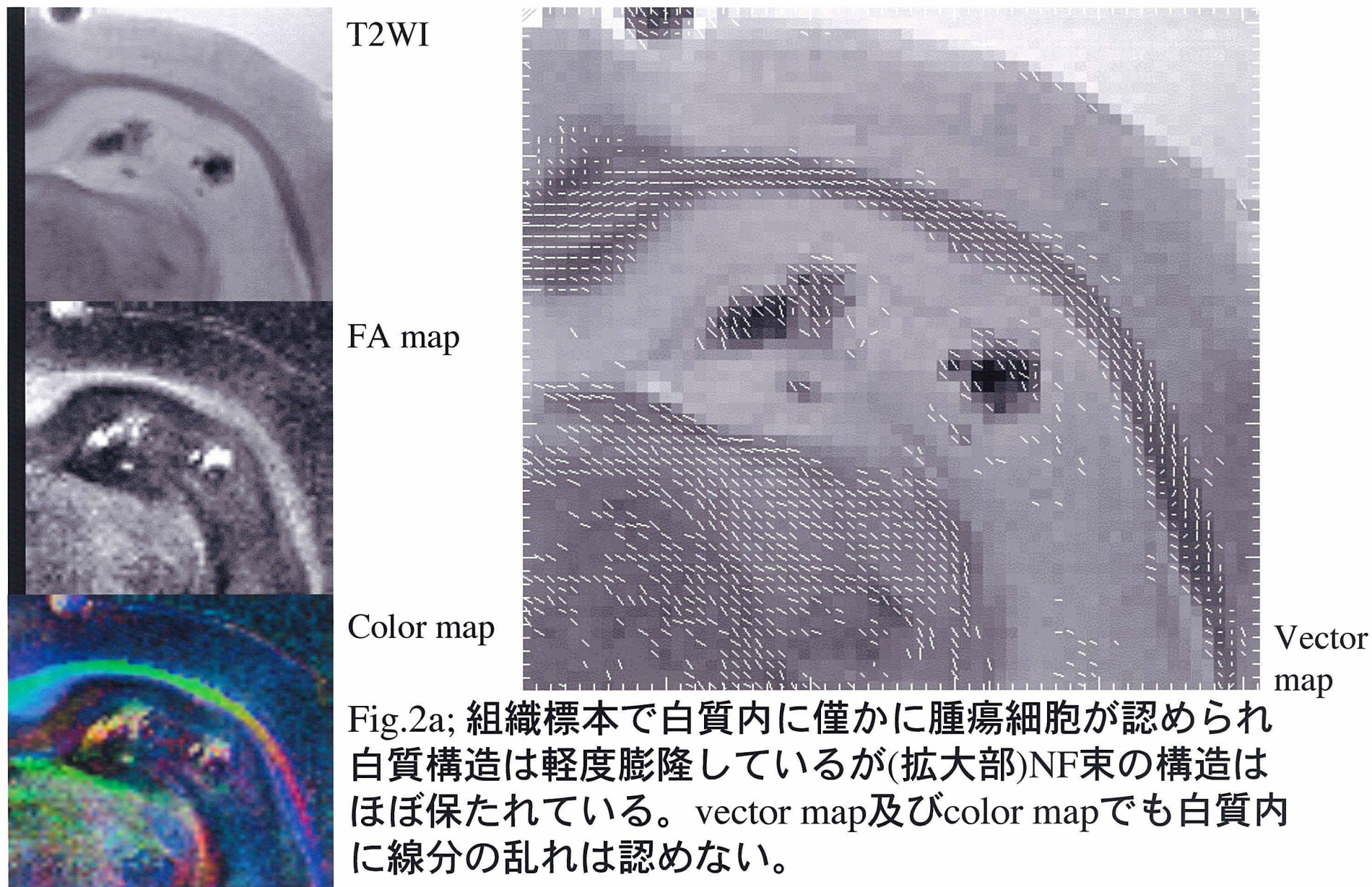


Fig.1b homemade coil





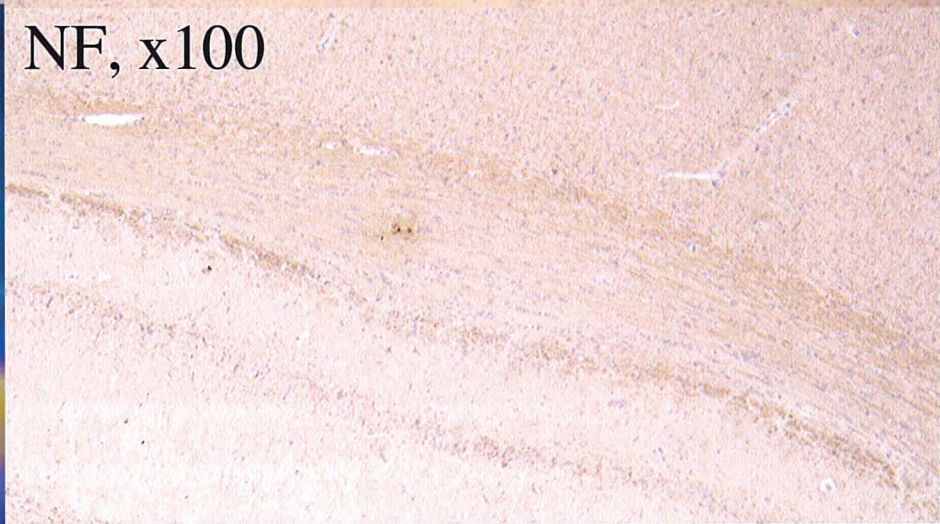
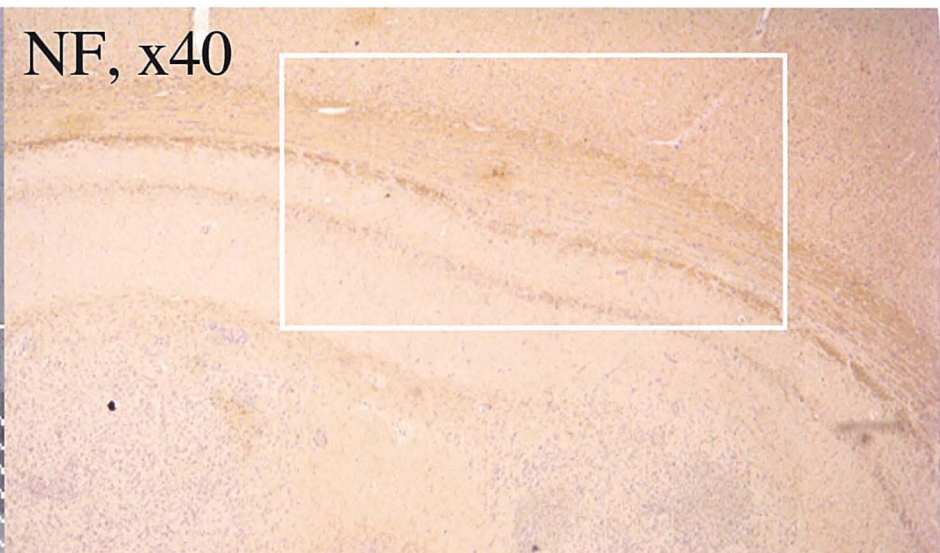
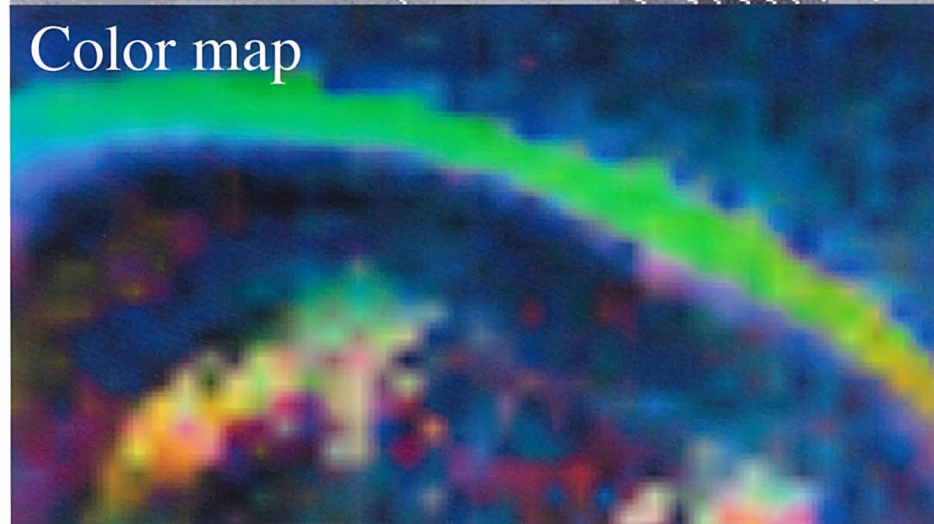
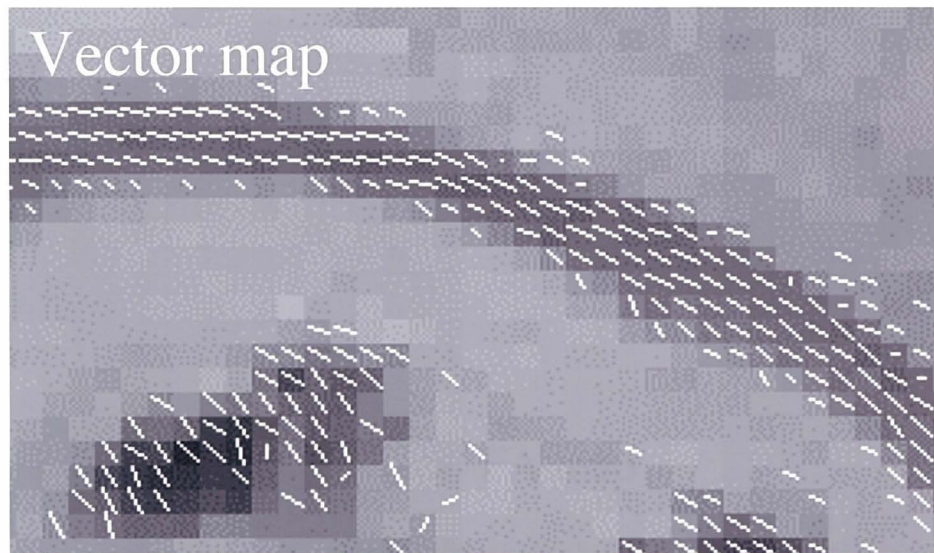
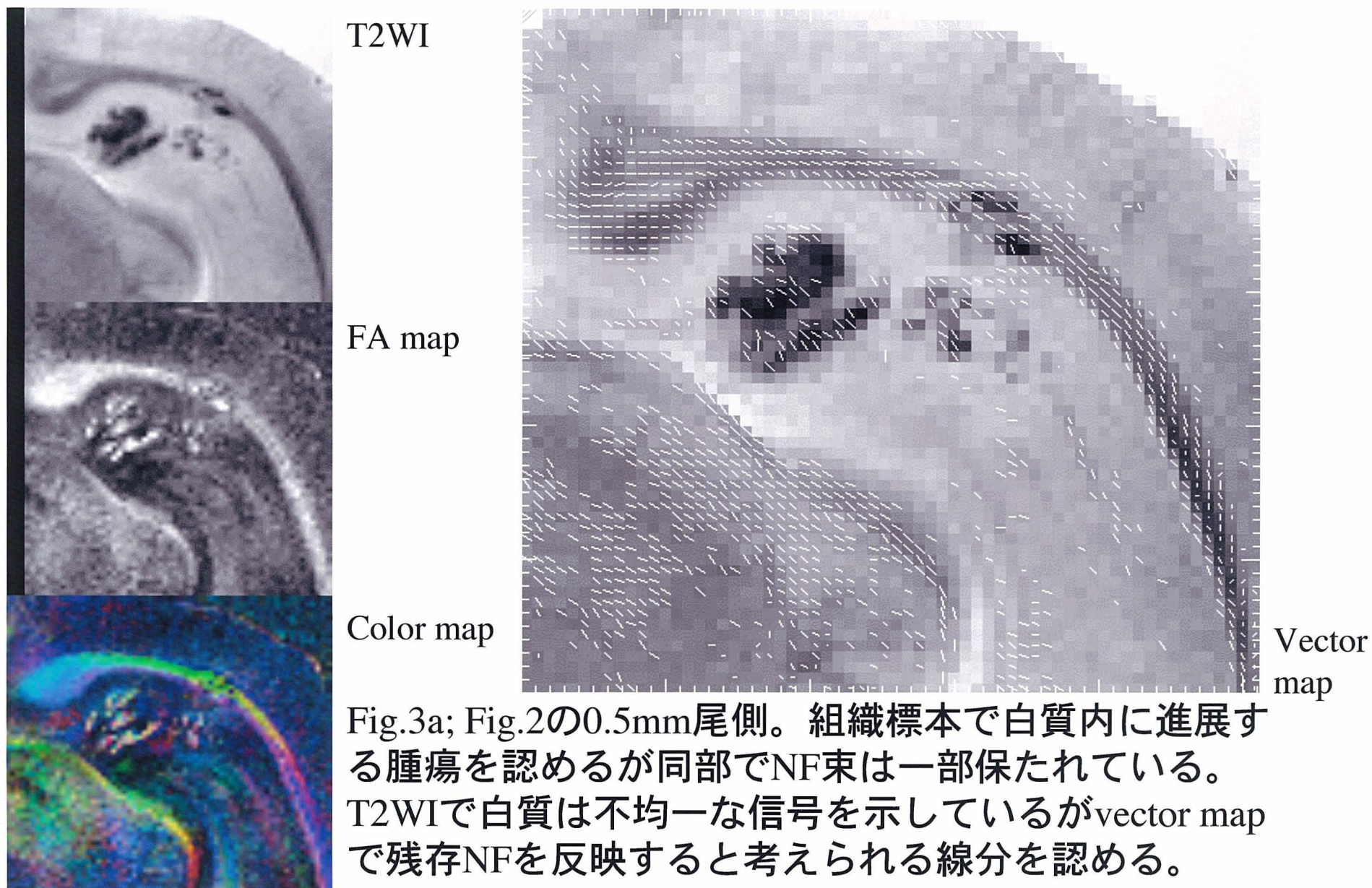


Fig.2b NF; neurofilament stain



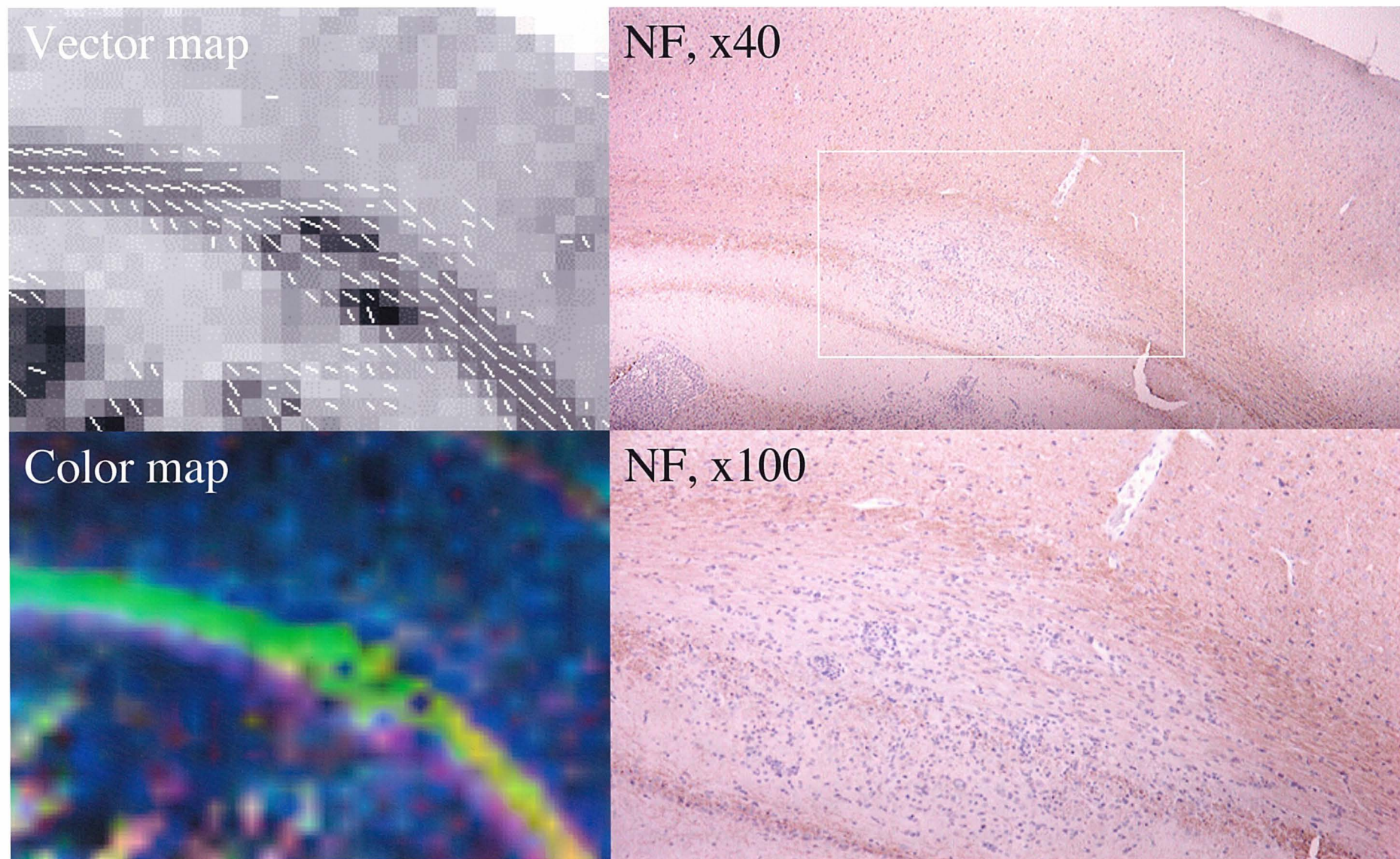
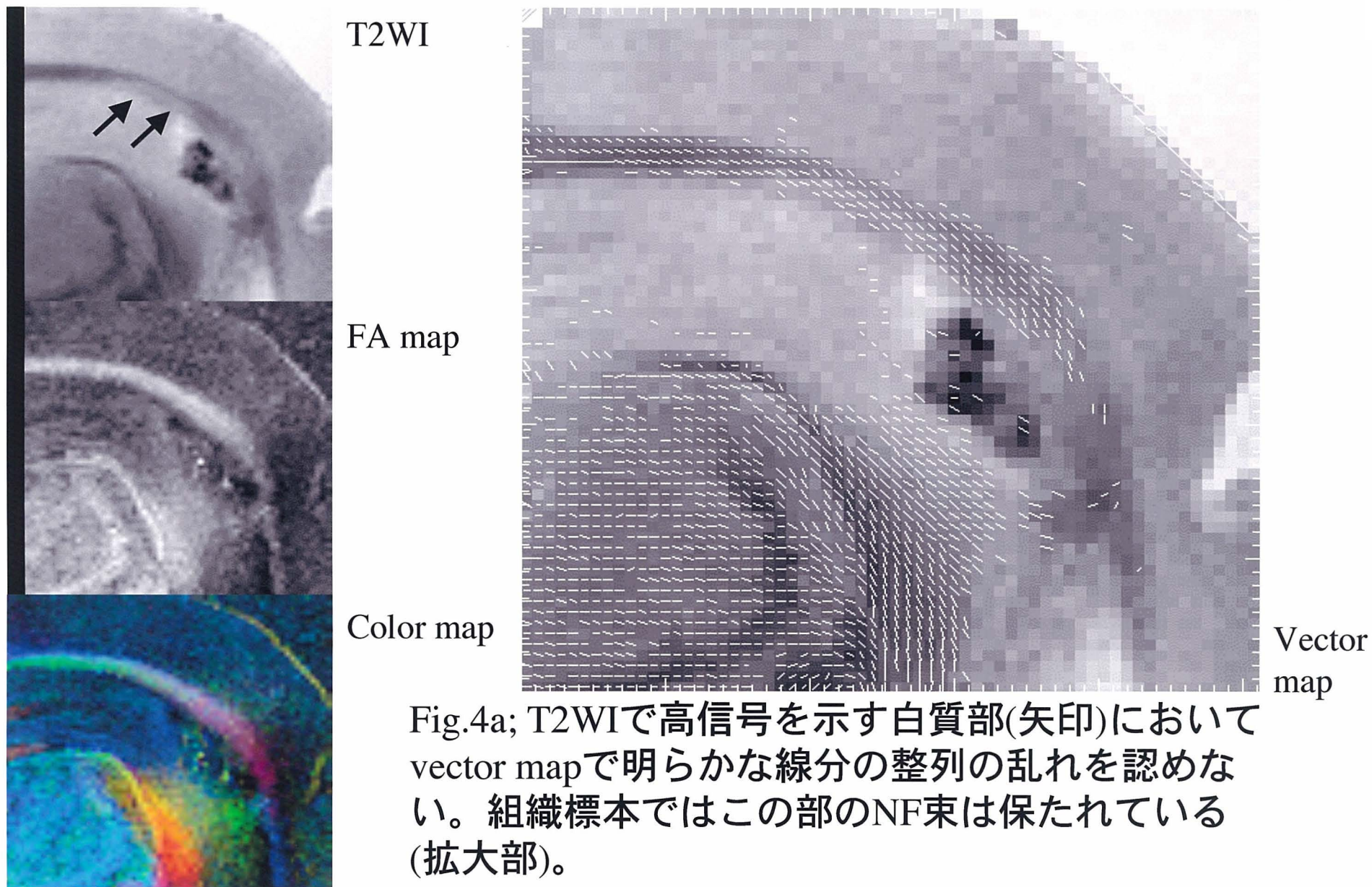


Fig.3b



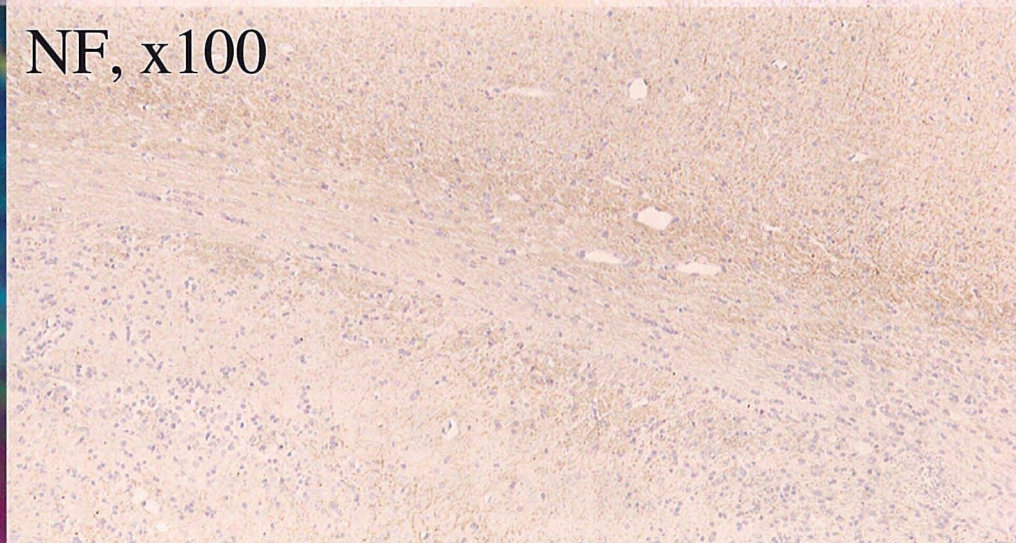
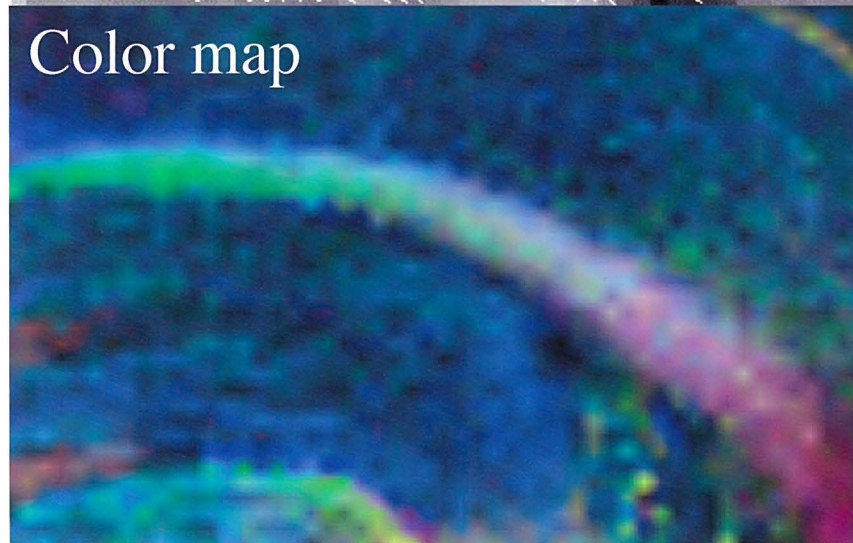
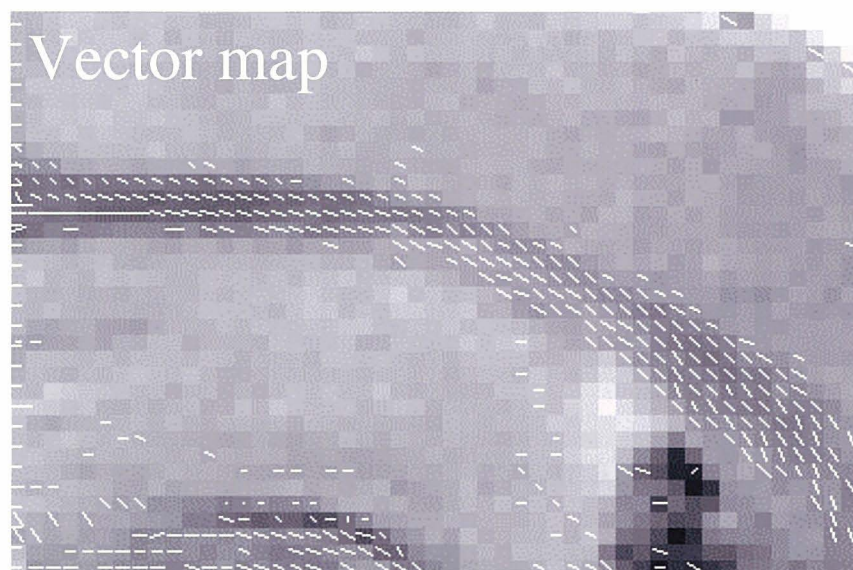
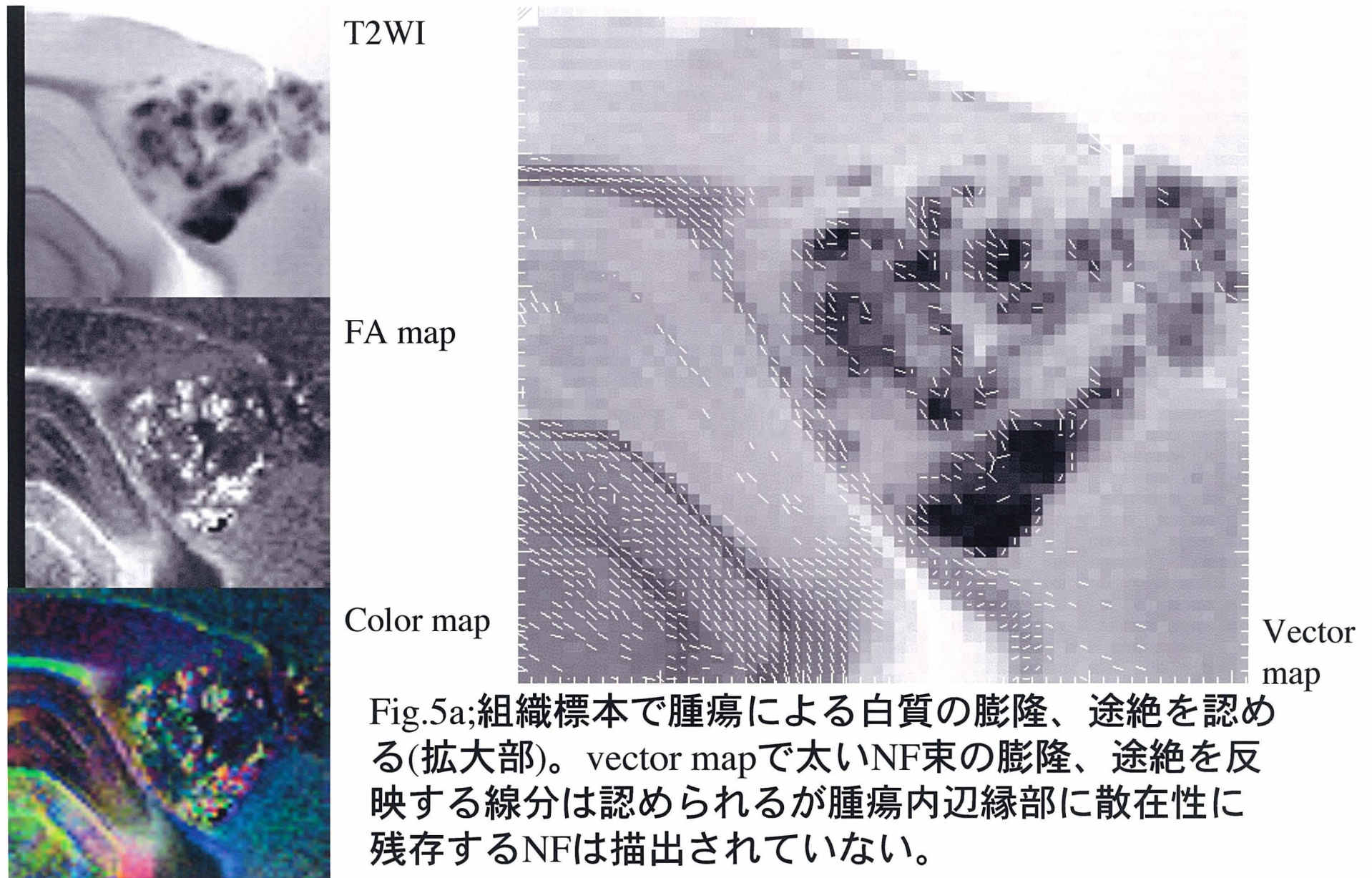


Fig.4b



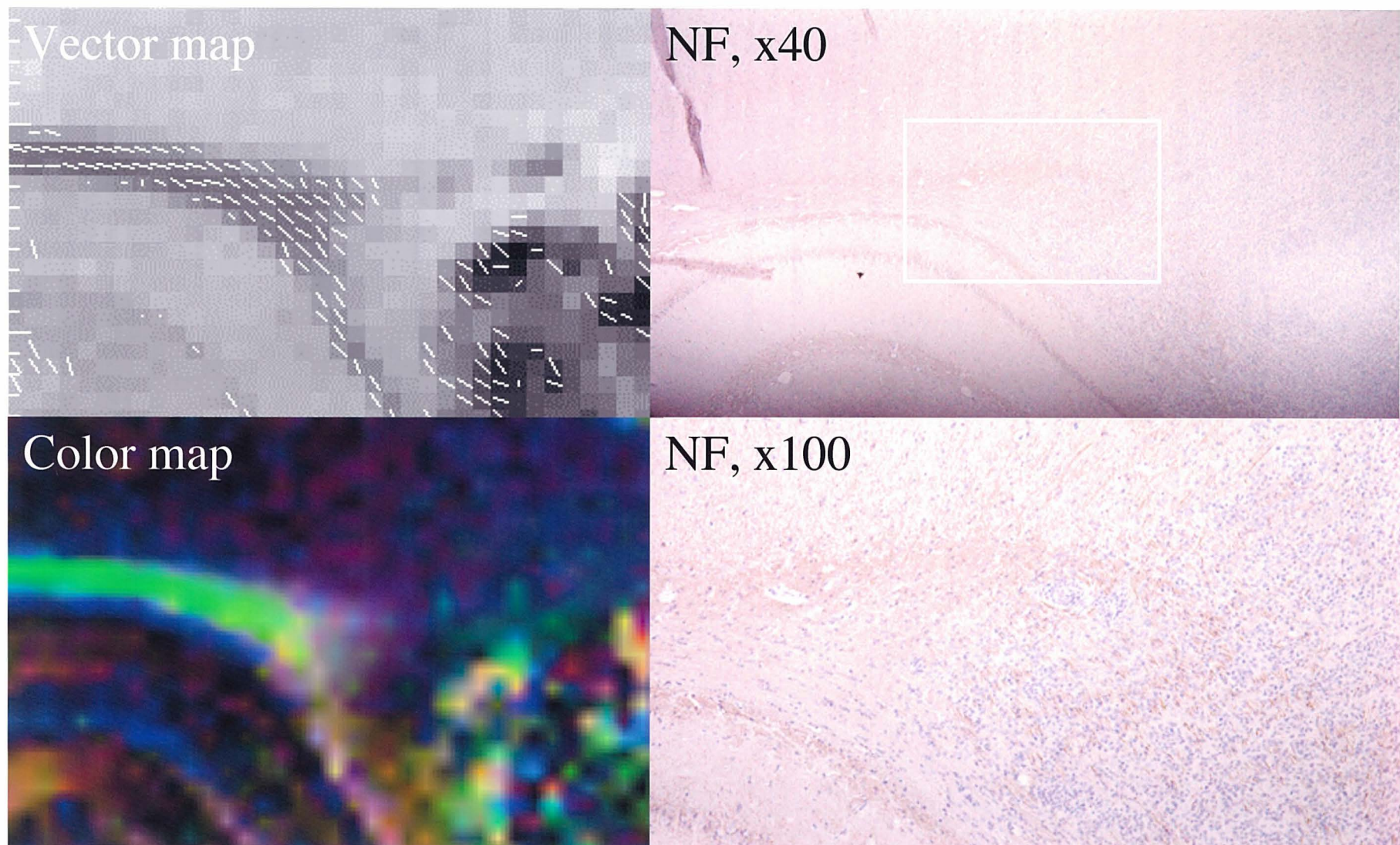


Fig.5b

Appendix: IDL program for generating and displaying vector map

```
pro vmap, v_d, a0, ani

; a part to display vector map
; for display of T2WI, Fa map, 2d vector map, and color map
; modification by R ITO, Jan 10/2005

; added the function for saving generated images
; modification by R ITO, Jan 24/2005

read,'x matrix = ',n1
;read,'y matrix = ',n2
n2 = n1
read,'num of slice = ',n3

slope = 1.5
intercep = 0.1

;fov=fltarr(3)
;read,'input fov x, y, and z = ',fov

;read_files

v_d = fltarr(3*n1,n2,n3)
a0 = fltarr(n1,n2,n3)
ani = fltarr(n1,n2,n3)

;***** read v_d *****
print,'read .vec file'
path_vec=dialog_pickfile(/read,path='/ ')
get_lun,unit
openr, unit,path_vec

for index=0,n3-1 do begin
d=assoc(unit,fltarr(3*n1,n2,/nozero))
v_d(*,*,index)=d(index)
end
close, unit
free_lun, unit

v_d = reform(temporary(v_d),3,n1,n2,n3)

;***** read ani *****
print,'read .ani file'
pieces=str_sep(path_vec,'.')
path_ani=strcompress(pieces(0)+'.ani')
get_lun,unit
openr, unit, path_ani

for index=0,n3-1 do begin
d=assoc(unit,fltarr(n1,n2,/nozero))
ani(*,*,index)=d(index)
end
close, unit
free_lun, unit

;***** read a0 *****
print,'read Odti.img file'
;pieces=str_sep(path_vec,'.')
;path_a0=strcompress(pieces(0)+'.ani')
pp=strpos(path_vec,'/',reverse_search)
dire=strmid(path_vec,0,pp+1)
path_a0=dialog_pickfile(/read,path=dire)
get_lun,unit
```

```

openr, unit, path_a0

for index=0,n3-1 do begin
d=assoc(unit,fltarr(n1,n2,/nozero))
a0(*,*,index)=d(index)
end
close, unit
free_lun, unit

;***** flip *****
tmp_v_d=v_d
tmp_v_d(0,*,*)=v_d(1,*,*)
tmp_v_d(1,*,*)=v_d(0,*,*)
tmp_v_d(2,*,*)=v_d(2,*,*)
v_d=tmp_v_d

;***** flip x-directin ***** for Philips?
v_d(0,*,*)=temporary(-v_d(0,*,*))

;*****

saji_kagen:
ani_thre=0.03
read, 'threshold of FA : ', ani_thre
a0t_thre=0.08

;***** chose planes *****

display:
read, "Input slice NO. : ", sl_no
    if (sl_no le 0) or (sl_no gt n3) then begin
        print, 'out of range!'
        goto, display
    endif
    imm=reform(a0(*,*,sl_no-1))
set_plot, 'x'
t3d,/reset

window, 0, ysize=512, xsize=512
tvsc1, congrid(imm, 512, 512, /interp)

conf_1:
dammy1=""
read, dammy1, prompt='Confirm? [y/n]: '
    if dammy1 eq 'n' then goto, display
    if dammy1 ne 'y' then goto, conf_1

    imm2=reform(ani(*,*,sl_no-1))
    aix = 0
    aiy = 1
    aiz = 2
    xxmag = 512/n1
    yymag = 512/n2
    a0tt = reform(a0(*,*,sl_no-1))
    vecimm=reform(v_d(*,*,sl_no-1))

xxmag=xxmag/1
yyimag=yyimag/1

;***** set area *****
sel_area:
wset, 0
xx0=0
yy0=0

```

```

nxx=128
nyy=128

x0=0
y0=0
nx=0
ny=0

box_cursor,xx0,yy0,128,128,/FIXED_SIZE
      x0=round(xx0/xxmag)
      y0=round(yy0/ymag)
      nx=round(nxx/xxmag)
      ny=round(nyy/ymag)
      tmp_imm=imm(x0:(x0+nx-1), y0:(y0+ny-1))

window,2,ysize=512,xsize=512
tvsc1,congrid(tmp_imm,512,512)

conf_2:
dammy2=""
read,dammy2,prompt='Confirm? [y/n]: '
      if dammy2 eq 'n' then goto,sel_area
      if dammy2 ne 'y' then goto,conf_2

im=tmp_imm

alimit = nx
blimit = ny

xmag = 512/nx
ymag = 512/ny

xmagg = round(512/nx)
ymagg = round(512/ny)

im2=imm2(x0:(x0+nx-1), y0:(y0+ny-1))
a0t=a0tt(x0:(x0+nx-1), y0:(y0+ny-1))
vecimmx=reform(vecimm(aix,*,*))
vecimmy=reform(vecimm(aiy,*,*))
vecim mz=reform(vecimm(aiz,*,*))
vecimx=vecimmx(x0:(x0+nx-1), y0:(y0+ny-1))
vecimy=vecimmy(x0:(x0+nx-1), y0:(y0+ny-1))
vecimz=vecim mz(x0:(x0+nx-1), y0:(y0+ny-1))

for i = 0, alimit-1 do begin
for j = 0, blimit-1 do begin

if (a0t(i,j) gt a0t_thre) then begin
if (im2(i,j) gt ani_thre) then begin

xxx=(1-vecimx(i,j))*xmag/2
yyy=(1-vecimy(i,j))*ymag/2

plot, [xmag*i+xxx,xmag*i+xxx+xmagg*vecimx(i,j)],[ymag*j+yyy,ymag*j+yyy+ymagg*vecimy(i,j)],$
/noerase,position=[0,0,512,512],/device,xstyle=1,ystyle=1,xrange=[0,512],yrange=[0,512]

endif
endif

endifor
endifor

;*****prepare color vector map*****

```

```

tempv = fltarr(3,nx,ny)
tempv(0,*,*)=vecimx(*,*)
tempv(1,*,*)=vecimy(*,*)
tempv(2,*,*)=vecimz(*,*)

tempani = im2

tempani = (tempani*slope)-intercep
here = where(tempani gt 1)
if here(0) ne -1 then tempani(here) = 1
here = where(tempani lt 0)
if here(0) ne -1 then tempani(here) = 0

tempv = tempv*255

tempv(0,*,*) = tempv(0,*,*) * tempani
tempv(1,*,*) = tempv(1,*,*) * tempani
tempv(2,*,*) = tempv(2,*,*) * tempani

window,3,xsize=768,ysize=256
temp=congrid(abs(tempv),3,256,256)
tv,temp,0,0,true=1

loadct,0
tvsc1,congrid(im2,256,256,/interp),1
tvsc1,congrid(im,256,256,/interp),2

select3:
sele3=""
read,sele3,prompt='save TIFF? [y/n] '
      if sele3 eq 'n' then goto, prefend
      if sele3 ne 'y' then goto, select3

tif_file:
print,'write .tif file'
wset,2
path_tif=dialog_pickfile(/write,path=/' ')
path_tif=strcompress(path_tif + '_vec.tif')
write_tiff,path_tif,TVRD()

wset,3
p=strpos(path_tif,'_',/reverse_search)
path_tif2=strmid(path_tif,0,p+1)

path_tif4=strcompress(path_tif2 + 'fa.tif')
write_tiff,path_tif4,TVRD()

path_tif3=strcompress(path_tif2 + 'col.tif')
write_tiff,path_tif3,temp

prefend:
ans = "
read,'finish? [y/n] : ',ans
if (ans eq 'y') then goto, end_of_program

goto, display

fend:

end_of_program:
t3d,/reset
set_plot,'x'
end

```

参考文献

- Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys J*. 1994; 66: 259-67.
- Basser PJ, Pierpaoli C. Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. *J Magn Reson B*. 1996; 111: 209-19.
- Pajevic S, Pierpaoli C. Color schemes to represent the orientation of anisotropic tissues from diffusion tensor data: application to white matter fiber tract mapping in the human brain. *Magn Reson Med*. 1999; 42: 526-40.
- Yamada K, Kizu O, Mori S, et al. Brain fiber tracking with clinically feasible diffusion-tensor MR imaging: initial experience. *Radiology*. 2003; 227: 295-301.
- Lu S, Ahn D, Johnson G, Cha S. Peritumoral diffusion tensor imaging of high-grade gliomas and metastatic brain tumors. *AJNR* 2003; 24: 937-41.
- Sinha S, Bastin ME, Whittle IR, Wardlaw JM. Diffusion tensor MR imaging of high-grade cerebral gliomas. *AJNR* 2002; 23: 520-7.