局所的な信号対雑音比の不均質性を考慮した
2 光子レーザー顕微鏡画像の定量解析

1642007 須貸拓馬

電気通信大学　情報理工学研究科　工学博士

2021 年 12 月

局所的な信号対雑音比の不均質性を考慮した

2 光子レーザー顕微鏡画像の定量解析

博士論文審査委員会

正本和人　教授

宮脇陽一　教授

小池卓二　教授

庄野　逸　教授

小泉憲裕 准教授

Abstract

T I T L E	Quantitative analysis of two-photon laser scanning microscopy images considering local signal-to-noise ratio inhomogeneity
N A M E	Takuma Sugashi

In this study, the blood vessel shape is reconstructed into a three-dimensional image using images related to mouse cerebral microvessel morphology captured with a two-photon laser scanning microscope (2PLSM), and morphological information such as volume, length, and diameter is automatically quantified. We examined the analysis method for this. Conventionally, the captured image has a problem that it is difficult to extract the captured object under uniform conditions because the signal-to-noise ratio (SNR) is inhomogeneous in the tissue to be observed. In this study, using a phantom model that simulates the optical characteristics of living tissue, calibration lines that give appropriate binarization thresholds for various SNRs are created in advance, and the binarization thresholds are created according to the SNR at the local image. The problem was solved by correcting.

Furthermore, we aimed to develop a semi-automatic image analysis method for long-term observation of structural changes imaged by 2PLSM angiography and quantitative analysis of the amount of deformation of blood vessels. Each blood vessel was characterized by classifying the central point cloud into one blood vessel segment in the blood vessel region and indexing the point cloud in order. The diameter of the blood vessel on the blood vessel cross section was analyzed by applying the corrected binarization threshold for SNR obtained by the phantom experiment in the XY plane on each point. Finally, all vascular segments were manually classified into five types of vessels: arteries and veins on the surface of the cortex, perforating arterioles and venules that connect to the tissue, and capillaries. By automatically measuring the blood vessel diameter, it has become possible to analyze the capillary network structure, which was difficult to reproduce in the past, up to the shape of each blood vessel.

It is expected that the proposed method will dramatically advance the three-dimensional simulation of cerebral blood flow and preclinical tests for dementia and stroke.

和文概要

論文題目	局所的な信号対雑音比の不均質性を考慮した 2 光子レーザー顕微鏡画像の定量解析
氏　　名	須貸　拓馬

本研究では 2 光子レーザー走査型顕微鏡で撮像したマウス大脳微小血管形態に関する顕微鏡画像を用いて血管形状を 3 次元画像再構成し血管体積や長さ・径などの形態情報を自動で定量化するための解析手法について検討した．従来，撮像された画像は，信号対雑音比（SNR）が観察対象の組織内で不均質であるため，撮像されたオブジェクトを一律の条件で抽出するのが困難であるという問題があった．本研究では生体組織の光学特性を模擬したファントムモデルを用いて，様々な SNR に対して適切な二値化閾値を与える校正線を予め作成し，画像局所での SNR に応じて二値化閾値を補正することで問題点を解決した．提案法によって脳血流の 3 次元シミュレーションや認知症・脳卒中に対する前臨床試験が飛躍的に進むことが期待される．

Table of Contents

1.　序論

昨今の Coronavirus disease（COVID-19)による世界規模のパンデミックにより経済は著しく減退し，日本においては感染者数 280,775 例，死亡者は 3,996 名である（Jan. 10th 2021 reported to Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan）．一方で日本国内の年代別の死因を比べると，70～80 代は悪性新生物（29.6～43.7%），心疾患（13.0～16.1%），脳血管疾患（8.2~11.6%）の順に高いのに対して 20～30 代の死因トップは自殺（31.8～49.8%）で先進国の中でも異常な自殺率となっている．これらの背景にあるのは精神疾患（近年では脳機能障害と名前を変えている:岩舘敏晴 et al. 1996）が大きく関わっていると考える． これは精神疾患という言葉が持つ社会的イメージの払拭を払う意味合いも含まれていると考えられるが，近年の非侵襲診断装置の開発とそれらを用いた長期観察による研究の結果により脳が正常に働いていないことがわかってきたこともある(João Data-Franco et al. 2017).

ここで，生体イメージングの分野の歴史を簡単に振り返ると，医学や生物学において非侵襲（非破壊，工学的にはこちらの言葉が親しいと考える）で人体のマクロ的な構造を診断するための技術として確立し約 50 年が経った．1963 年，物理学者の A .M .Cormack が線積分による関数を発表し(Cormack, 1963)，1973 年に G.Hounsfiels らによる X -ray CT スキャナ(X-ray 断層撮影装置)を発表したのが最初の幕開けである(Hounsfield G.N., 1973). 彼らの功績はその他の電磁波や音響を使った非侵襲イメージングに応用され，MRI，PET，SPECT，超音波診断装置，光拡散トモグラフィーが開発された．さらに近年では生きた状態における細胞レベルの分解能で断層画像が取得できる，蛍光イメージング，光音響イメージングなどが存在する．近年，これらの測定装置を用いた脳を対象とした医学生物学の研究が急増しているが細胞間の親和性や神経血管カップリングのメカニズムに関する具体的な機序はようやくその一歩が垣間見えてきた程度であり，未だ広大なブルーオーシャンが存在すると思われる脳という臓器の研究開発はそこまで盛んに行われているものではない．例えば脳の細胞と血管の構造が作られる上でのメカニズム，発達もしくは劣化の機序，これ

らの研究が進めば病気の進行を遅らせ，より多くの人間が経済活動を行えるようになる．そしてこれらの技術が応用されまた新たな技術が生まれることが想像できる．

1.1. 背景および目的

認知症や脳機能障害による脳疾患はそれらに密接に関わる神経細胞の周囲の血流低下が観察されることから，神経細胞の機能不全や機能低下によるものと考えられている．実際に認知症における微小血流の変化は本人が自覚し，病気としての症状が出始める 5～10 年ほど前から低下の兆候が観察される．さらに，脳血流を増加させる適度な運動等を行っている人の方が，病気の進行を遅らせられることもわかっている．現代においては治療医学も重要ではあるが，予防医学に焦点が当てられているのもこのことからである．さらに脳機能障害の双極性障害においてもミクログリアの働きに関係性があることが示された(Data-Franco, el at. 2017)．グリアと血管の互いの関係性，相互に働きかける機序，これらをグリア血管カップリングと言う．このような認知症や脳機能障害に加えて脳血管障害は日本国内における死因率も高く，社会的なダメージが大きい．しかし，これらのメカニズムや脳微小領域における神経血管カップリングやグリア血管カップリングの相互作用機序は未だ不明である．

脳の微小領域における細胞と血管を同時に観察できる方法として二光子顕微鏡による *In vivo* イメージング法がある．この方法を用いて得られた血管と細胞の定量形状評価および動態解析による相互作用機序の理解を深めるための基礎データ取得を本研究の目的とした．

1.2. 論文構成

第 1 章は序論である．近年の事柄に基づいてなぜ脳微小領域の生体観測の研究に進んだかを述べた．第 2 章は方法と原理に関する基礎事項をまとめた．一般的な工学部の学生が読んでもわかりやすくするために生体医工学分野における特に脳の微小領域に関しての基礎知識をまとめた．なお，本論文においては Color Universal Design (CUD: Masataka Okabe, el at. 2002)を心掛けたが，歴史的にも見やすいなどの理由でカラーはそのままの図があるが了承していただきたい．第3章は蛍光ビーズファントム実験について二光子顕微鏡の最も基礎となる撮像の特性に関してまとめた．第4章は微小血管ネットワーク構造の定量化と題し，3次元ボリューム血管構造の半自動解析法に関する提案法についてまとめた．第5章では微小血管ネットワーク構造の追跡評価についてボリュームと時系列データからなる４次元の血管構造の解析法を提案した．6章で本論文の結論を述べ，7章に今後の展望についてまとめた．

2. 基礎事項

2.1. 生体イメージング法

生体イメージング法は撮像の原理によって以下の３つに主として大別される．

１．放射性核のイメージング（X -ray, PET, SPECT）

２．磁気共鳴のイメージング（MRI）

３．光イメージング（共焦点レーザー顕微鏡，蛍光顕微鏡，NIRS など）

さらに，光音響イメージングなど光を用いて分子にエネルギーを加え，熱を発生させるときの音響波を観察する方法も 1990 年代頃より盛んに研究されている．また光イメージングは生物発光イメージング（BLI）と蛍光分子イメージング（FMI）に分かれる．本研究では主に FMI について実験を行っているため次節により詳細に述べる．BLI はルシフェラーゼ遺伝子を導入して特定の細胞を標識し，発光の基質となる酵素と反応することで発光する．ルシフェラーゼとは生物が発光する際の化学反応を触媒する作用を持つ酵素のことである．それぞれのイメージング法について，特に重要なのが分解能と検出深さ・厚さ限界，さらに装置の大きさと価格帯だと考える．

2.2. 生体医工学における光の扱い

基本原理として，観測データにはグリーン関数と呼ばれるものが畳み込まれ，さらにノイズ成分が加わる．デジタルデータの取得に関して言えば，ナイキスト-シャノンの定理により，観測対象よりも２倍の周波数（解像度）で取得する必要がある．

生体内に入射する光は可視域および近赤外域で強い散乱と弱い吸収を受ける．特に紫外域の短波長側での吸収は散乱と同等，あるいは散乱よりも強くなる．巨視的に見ると，光の散乱は粒子群による多重散乱の単なる足し合せではなく，細胞膜や細胞間での屈折・反射，あるいは各々の細胞内に含まれる微小な粒子や器官による散乱，赤血球による散乱などの

ような様々な光学現象が複雑に絡み合った結果である．そのため，微視的な光学現象を積分して巨視的な現象を記述することは生体細胞の複雑さゆえにまだ解明されていない．多くの場合，微視的な現象は省き，組織のある一定の体積要素における光学特性のみについて議論をしている．

2.3. 二光子励起と蛍光

二光子レーザー走査型顕微鏡法（二光子顕微鏡法）は，生きたまま生体組織の三次元画像を得る方法として広く活用されている．その最大の特徴は *in vivo* 生体標本へのダメージを抑えつつも，空間解像度の高い深部断層画像を得ることができるという点である．一般的な蛍光体の蛍光波長は可視領域の波長であるため，通常の蛍光顕微鏡（一光子励起）で蛍光観察を行う場合には蛍光波長よりも短い波長，即ちエネルギーの高い紫外領域に近い波長域を励起光として用いなくてはならない．この場合，光毒性の高い紫外領域の光は生体標本にダメージが大きいため長時間の観察は困難となる．一方，二光子顕微鏡では同じ蛍光体の蛍光を得るために通常の蛍光顕微鏡で用いられる励起波長の約 2 倍の波長を用いる．生体組織による光の散乱は波長が長くなるほど弱くなるため二光子顕微鏡法で用いる波長は生体透過性の高い近赤外領域の波長となる（図 2.1）．この近赤外領域の波長は生体へのダメージが少なく長時間の観察を行っても細胞機能を損なう可能性が一光子励起の場合に比べて非常に少なくなる．

二光子顕微鏡法で取得した画像再構成上の問題点として，光軸方向（焦点面に垂直な方向）の分解能が水平方向の分解能に比べて著しく低い点がある．光軸方向の伸びはレンズの開口数に依存する．一般的に二光子顕微鏡では組織深部の観察を行うことを目的の一つとしているため，レンズ下の作動距離を大きくとる必要がある．そのため余り大きい開口数のレンズを使用することができない．光軸方向の伸びが大きいため，大脳皮質の深さに応じて撮像した二次元のスライス画像をそのまま 3 次元再構成すると，撮像されたオブジェクトが深さ方向に伸びてしまい，偽の画像が再構成されることが問題となる．また，組織内を伝播

する励起光及び蛍光が脳組織や血中のヘモグロビンによる散乱吸収等の光学的特性の影響を受けるため，取得した画像の局所によってシグナルノイズ比（SNR）が不均質になるという事が問題となる．このことにより，従来オブジェクトの形状解析に用いられた単一の閾値（例えば，SNR の半値全幅）で画像をセグメント分割すると，画像内あるいは光軸方向に撮像した複数の画像間において，抽出したオブジェクトの大きさが撮像した画像の SNR に依存し歪められることが問題となる．

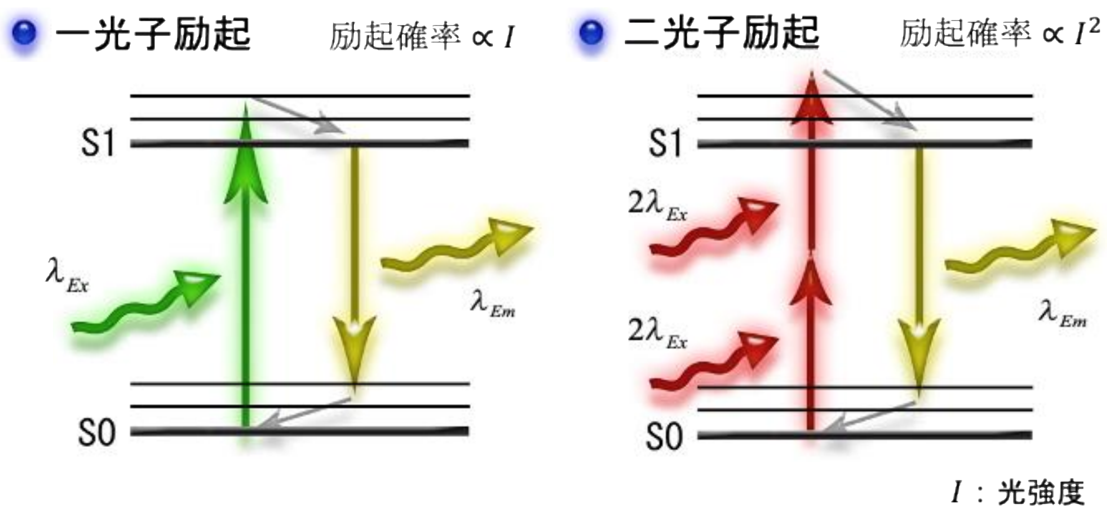


図 2.1　一光子励起と二光子励起の比較

一光子励起(左)では基底状態 S0 と励起状態 S1 間のエネルギーに相当する波長の光子(λ_{EX})を蛍光分子が吸収することで蛍光分子は励起され，基底状態に戻る際に蛍光(λ_{Em})を発する．二光子励起(右)では一光子励起で用いる約 2 倍の波長（エネルギーは半分）の光子(2λ_{EX})を 2 つ同時に蛍光分子が吸収することで一光子励起のときに得られるエネルギーと同等のエネルギーを吸収し，一光子励起同様に蛍光(λ_{Em})を発する．このとき，励起確率は一光子励起では励起光の強度 I に比例するのに対し，二光子励起では強度の二乗 I^2 に比例する．

2.4. 大脳皮質における脳微小血管と細胞の層構造

大脳皮質には6層の構造が存在する（Duvernoy, et al., 1981）．大別すると比較的細胞が少なく血管の密度も低いI・II層，細胞の数が増加し血管密度が高いIII・IV層，大脳皮質直下を潜る層へと続くV・VI層である．血管構造はこのレイヤー毎に構造が異なり，酸素や栄養の需要を効率良く補う形でネットワークを組んでいる（図2.2）．

二光子顕微鏡画像から血管の定量評価は多くが手動の二値化（Watanabe, N. et al. 2020）を行い径の解析を行っている．マウス大脳皮質の血管径解析をして得られる血管の体積比率は先行研究より動脈が11.8%，静脈が48.0%そして毛細血管が40.2%（Gagnon, L., et al. 2015）である．

ここで，臨床に用いられているPETやMRIなどの大域を計測できる研究結果では年齢によって脳血液量（CBF）が低下する（Nagata, K. et al., 2016）ことが知られている．しかし，大域を計測するPET，MRIでは計測の最小単位である1 voxelsが1 mm^3である．ミクロ領域での現象は動物実験での検証が続けられているが，これらミクロ領域の変化がどのようにマクロに伝播していくのかはわかっていない．

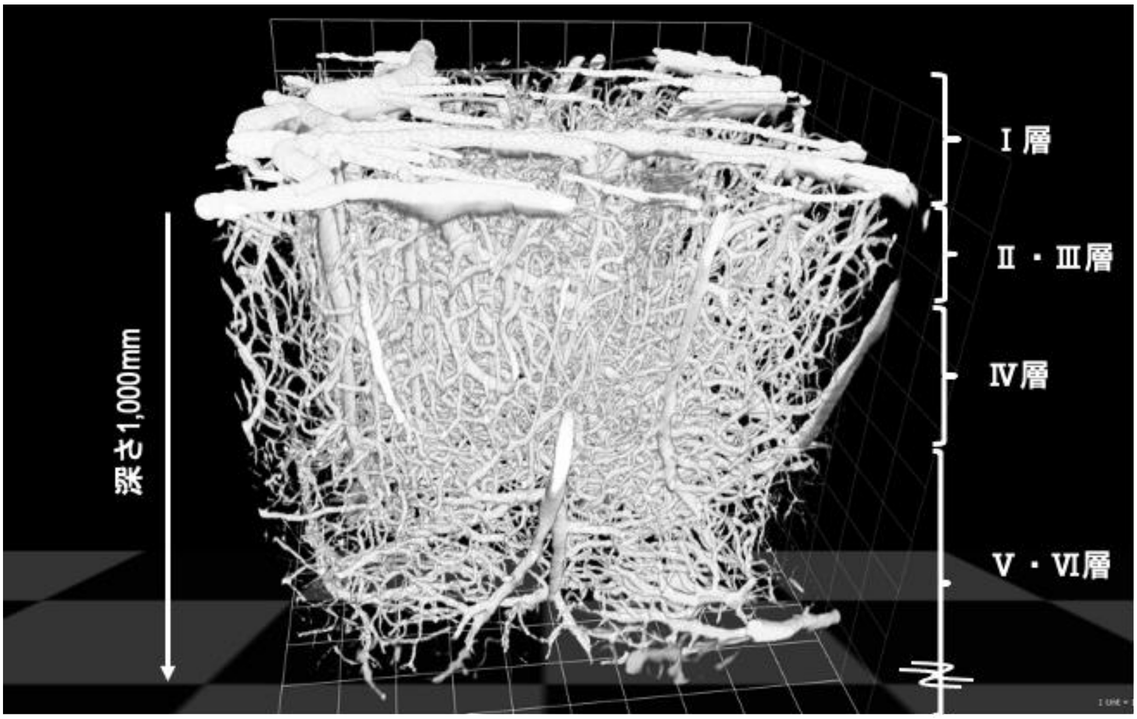


図 2.2　マウス大脳皮質における脳微小血管の 3 次元再構成画像と対応する細胞層構造(I-VI 層)に関する概念図

血管の 3 次元再構成画像は血漿を蛍光造影し，二光子顕微鏡によってマウス大脳皮質の 508 x 508 μm の領域を 4 箇所撮像したものをコンピュータ上で解析し繋ぎ合わせた．脳表面の画像にはスライドガラスの反射やその他雑音が多く含まれるため，手動で血管領域のみを抽出した．3 次元の描写には Volocity©を使用した．皮質表面からの深さ毎に対応する各々の細胞層（I-VI 層）を目安として表記した．

2.5. 画像解析におけるコンピュータの仕様

本研究ではスライス画像の断層構造としてコンピュータ上では3次元のボリューム画像として解析を行う．従って，汎用コンピュータの仕様では解析が困難なため，必要最小限の仕様と推奨仕様をまとめた（表 2.1）．尚，これらの仕様に加えて MATLAB2018b が動作する事が不可欠である．

MATLAB 上での並列計算を多用するため，1 Woker（コア・スレッド）あたり約 500 MB の空きメモリが必要となる．GPGPU 計算が組み込まれている処理は通常 1, 2 分で処理が可能であるが，これを CPU で行った場合約 1, 2 時間必要である．OS は Java が動く OS であればなんでも可能であるが，より安定性の高い Linux を推奨する．

表 2.1 必要最小限と推奨仕様

	必要最小限	推奨仕様
CPU コア／スレッド数	1	8 以上
メモリ	16 GB	64 GB 以上
GPU	内臓 GPU で可能	GPU メモリが 8 GB 以上の Nvidia 製 GPU
OS	Windows, Mac, Linux	Linux

3.　蛍光ビーズファントム実験

3.1.　序論

生物医学分野の基礎研究のために 2 光子レーザー走査蛍光顕微鏡（2PLSM）が発明されてから，ほぼ 30 年になる（Denk et al., 1990）．それ以来，脳内の細胞構造と機能を調べるために生きている実験動物を使用して多くの研究が行われてきた（Svoboda et al., 1997; Kleinfeld et al., 1998; Helmchen et al., 1999; Charpak et al., 2001; Chaigneau et al., 2003; Svoboda and Yasuda, 2006; Shih et al., 2012; Tran and Gordon, 2015; Lecoq et al., 2019）．取得した画像データを数値情報に変換するためには画像化されたオブジェクトを定量化するために適切な二値化閾値を適用しオブジェクトの領域を抽出する必要がある．先行研究では，2PLSM 血管造影図の連続 XY スライス画像（すなわち，XYZ スキャン）に基づいて 3 次元微小血管構造を定量化した例がいくつか報告されている（Vérantetal., 2007; Park et al., 2008; Kozai et al., 2010; Chinta et al., 2012; Lindvere et al., 2013; Sekiguchi et al., 2013; Yoshihara et al., 2013; Sugashi et al., 2014; Steinman et al., 2017）．ただし，従来の 2PLSM を使用したこの手法は，光軸方向の解像度が低いため（Sun et al., 2019; Ye et al., 2020），微小血管容積の正確な定量化に関しては制約がある．実際には 2PLSM 血管造影画像の場合，この制約は血管系の解剖学的特徴にも依存する．血管の構造は局所的な光学特性が異なる組織中においてさまざまな太さや長さを有する 3 次元（3D）ネットワーク構造として観察される（Chaigneau et al., 2011; Weber et al., 2011; Al-Juboori et al., 2013; Yoshida et al., 2015; Miller et al., 2017）．したがって，関心領域（ROI）ベースで信号対雑音比（SNR）に応じて二値化閾値を可変にしてオブジェクトを抽出する従来法を適用することは，血管ネットワーク全体を一貫した方法で正確に抽出するのには適していない．つまり従来の解析方法のように目視による二値化や FWHM などの径の解析では血管ネットワーク全体の解析には不向きである．

そこで本研究では二光子顕微鏡を用いた脳イメージングに特有となる局所的な光学的特性の不均質性を考慮し，SNR に基づいて二値化閾値を適用する手法を提案し，そのための二値化閾値に関する校正を大きさ既知の蛍光ビーズを用いたファントム実験により検証することを目的とした.

3.2.　方法

ゼラチン溶液に撹拌固溶させた蛍光マイクロビーズで構成されるファントムモデルを使用し, 2PLSM 画像のセグメンテーションに対する光学特性の影響を特徴付けた. 2PLSM で画像化されたオブジェクトは，励起光と蛍光の両方がサンプルの内部を拡散伝播するため，測定されたサンプルの光学特性による影響を強く受ける（So et al., 2003; Helmchen and Denk, 2005; Wei et al., 2012; Wang et al., 2019）.

動物の脳の光学特性を模倣するために，ファントムモデルは蛍光マイクロビーズ（FluoSpheres®，直径 9.9 μm もしくは直径 1.1 μm，励起 508 nm，蛍光 605 nm）とラテックスビーズ（IMMUTEX®，直径 0.45 μm）を混合して作成した．これらを 5%ゼラチン溶液で固定し，ラットの脳組織に関する文献値（van der Zee，1992）に従って，ファントムの換算散乱係数を 800 nm の波長で 2.33 mm^{-1} に調整した．この実験では，*in vivo* 実験で使用される蛍光波長（スルホローダミン 101; 586 nm 励起および 605 nm 蛍光）に近づけるために，赤色の蛍光マイクロビーズを使用した．また組織散乱の影響を評価するためにラテックスビーズ（IMMUTEX®，直径 0.5 μm）の濃度を変えた 4 つのファントムモデル（濃度 0%，0.3%，0.6%，および 1.2%）を用意し，換算散乱係数をそれぞれ 0.04，1.17，2.33，および 4.66 mm^{-1} に調整した（800 nm の波長で計算）.

撮像には，Ti：サファイアレーザー（MaiTai HP，Spectra-Physics，米国カリフォルニア州サンタクララ）と対物レンズを備えた 2 光子顕微鏡（TCS-SP5MP，Leica Microsystems GmbH，Wetzlar, ドイツ）を使用した（対物レンズ 20x，NA = 1.0，水浸，Leica Microsystems GmbH）．蛍光はバンドパスフィルター（610/75 nm）を通して光電子増倍管（PMT）で検

出し，波長 910 nm で励起した．予備実験において，励起波長が変化してもマイクロビーズ信号の空間範囲の検出に違いがないことを確認した（図 3.1）．

XYZ スキャンモードで，深さ 581 µm（ステップサイズ 1.0 µm，面内ピクセル解像度 0.45 µm）まで，合計 589 枚の画像（撮像領域 456 µm×456 µm）を取得した．励起レーザのパワーは一定とし，すべての 2PLSM 画像はデジタル化された 12 ビットで保存され，HKLoadLif（Leica image format file loader, Hiroshi Kawaguchi©, version 1.0, 21st Apr. 2010, from MATLAB Central）を使用してボリュームマトリックスとして MATLAB で 16 ビット（uint16 クラス）に変換した．

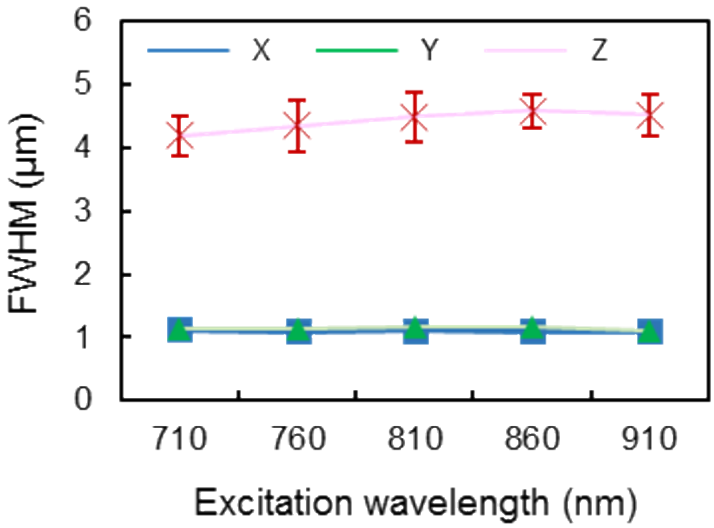


図 3.1　励起光に対する半値全幅の比較

二光子励起波長の影響を評価するために 5 %ゼラチン溶液で固定した蛍光マイクロビーズ（FluoSpheres®, 直径 1.1 μm, 励起 508 nm, 蛍光 605 nm）を一定のパワーで励起した（710, 760，810，860，および 910 nm）．画像（1024 x 1024 ピクセル）は，ピクセル解像度 0.04 μm で表面から 0.2 mm の深さまで 0.4 μm のステップサイズで取得し，強度プロファイルの半値全幅（FWHM）によって測定された空間的広がりは励起波長に依存しないことを確認した．

3.3. 画像解析

すべての画像解析には開発に優れたインタープリタ言語である MATLAB©を使用した．最初に光軸に垂直な XY 平面に対し，5×5 カーネルのメディアンフィルターを適用してバックグラウンドノイズを除去し，ガウスローパスフィルター（7×7 カーネル，$\sigma = 1.8$，毛細血管のオブジェクト抽出に最適化された値）によって空間平滑化した．次に，スライス画像内でのピクセル輝度に関する最頻値をバックグラウンド強度（つまり，ノイズレベル）と定義し，画像内の最大輝度値でピクセル輝度値を正規化（スライス画像の 0（ノイズ）から 255（最大輝度値）の間のクラス 8 ビットに線形に）した．最頻値が最大輝度値と一致する場合は，バックグラウンド強度は二番目に頻度が高い輝度値として再定義した．マイクロビーズ構造の内部を埋めるために，8 ピクセル（デフォルト設定）の円形カーネルサイズのオープニングプロセスを適用した．このプロセスは画像の最大強度を変更するため，強度の正規化の手順を再実行した．

すべてのスライスを含むボリューム画像を P タイル法で 2 値化し，XYZ ボリューム内のピクセル（ボクセル）輝度の上位 20%を抽出して，マイクロビーズ構造を大まかに抽出した（図 3.2A）．次に，26 個の隣接する接続されたボクセルのラベリングプロセスを適用し，各オブジェクトの重心の位置を決定した．

2PLSM 画像に対する光散乱の影響を特徴づけるために，点像分布関数（PSF; マイクロビーズの重心周辺の強度プロファイル）を X 軸，Y 軸，および Z 軸に沿って推定し，ファントム画像の深さ全体で比較した．XY 平面上においてレーザーの操作方向と平行に蛍光ビーズの重心を通る線を X 軸として定義し，その直交方向を Y 軸，深さ方向（つまり，レーザー照射の軸方向）を Z 軸として定義した（図 3.2B）．次に，これらの 3 つの軸に沿った輝度分布を各オブジェクトで測定した．蛍光輝度の広がりに関する半値全幅（FWHM）を計算するために，重心の周りのピーク輝度は重心を含む重心周りの 27 ボクセル（3 × 3 × 3）

のピクセル輝度を平均することによって決定した．信号強度はピーク輝度とし，バックグラウンド強度は，重心を含む 240,448 ボクセル（つまり，オブジェクトの重心周りの約 30 µm×30 µm×50 µm）内でのピクセル輝度の最頻値とした．次に，X 軸，Y 軸，および Z 軸の FWHM を計算した（図 3.2C）．この測定では，マイクロビーズの重心が画像の端から 10 µm 以内，XYZ 画像の上部または下部から 30 µm 以内にある場合，または画像化されたマイクロビーズが凝集している場合は解析対象から除外した．

測定された直径をマイクロビーズの実際のサイズ（直径 9.9 µm）と比較することにより，断面 XY 画像からマイクロビーズの実際の直径を与える二値化閾値を決定した．最初に，単一のマイクロビーズの重心を含む XY 画像（68×68 ピクセル）を選択し，次にマイクロビーズの直径を，SNR で補正した二値化閾値を適用して得られた楕円の短径として求めた．

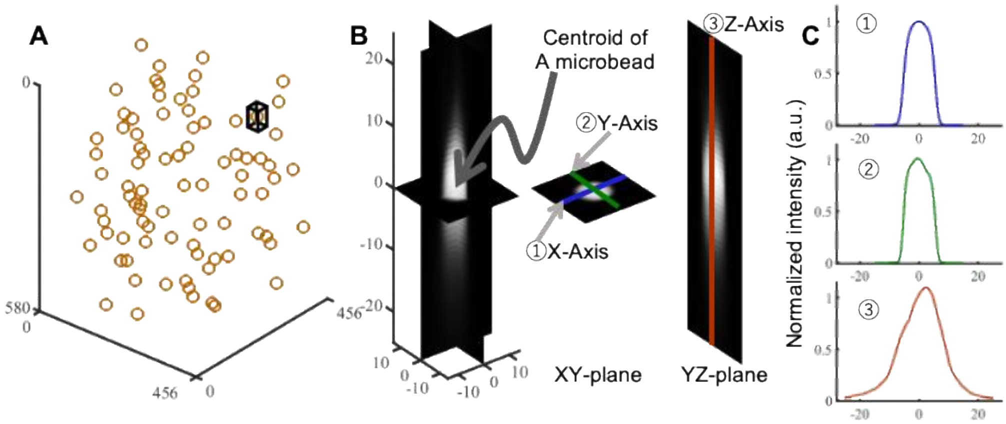


図 3.2 ファントムモデル実験方法

A）ファントムモデルの代表的な 3 次元分布画像． マイクロビーズ（橙色）はゼラチン溶液中において均質に分布した．図右上の黒い ROI が個々のマイクロビーズを切り出した大きさに相当する．B）PSF 推定のための FWHM の測定方法概略図． マイクロビーズの重心を通る輝度プロファイルは，重心の周りの平均信号（3×3×3）と ROI 内の最頻値で正規化され，各 X，Y，および Z 軸の FWHM をピークの 50%で測定した．C）解析によって得られた正規化された輝度プロファイル代表例．上の青いライン①が X 軸，中央の緑のライン②が Y 軸，下の赤いライン③が Z 軸上のそれぞれの輝度プロファイルを示す．光軸方向である Z 軸がラジアル方向の X,Y 軸に対して，著しく輝度の拡がりが大きい事がわかる．

3.4.　結果

組織中の散乱効果の増加に伴い，二光子顕微鏡で観察される深さが減少した（図 3.3）．一方，半値全幅（FWHM）で測定された点広がり関数は，XY 平面では換算散乱係数に関係なく一定に保持されたが，Z 方向では散乱効果の増大に伴い広がりが小さくなった．図 3.3 左下のパネルの白い点が，３D 再構成された蛍光マイクロビーズの位置を示す．

つぎにオブジェクト周囲の SNR にあわせて，既知の画像領域を抽出する最適な二値化閾値を求めた．さまざまな換算散乱係数値（0.04，1.17，2.33，および 4.66 mm^{-1}）に対して，すべてのファントムモデルに一貫した線形近似線を決定した：$y = 0.0112\,x + 0.35$（$n = 26$ マイクロビーズ，左上），$y = 0.0007\,x + 0.40$（$n = 17$，右上），$y = 0.0004\,x + 0.42$（$n = 23$，左下），および $y = 0.0007\,x + 0.44$（$n = 10$，右下）．結果より，補正された閾値の約 5％の誤差が，1.17 mm^{-1} と 4.66 mm^{-1} の間の組織の光学特性の変化によって引き起こされることが分かった．

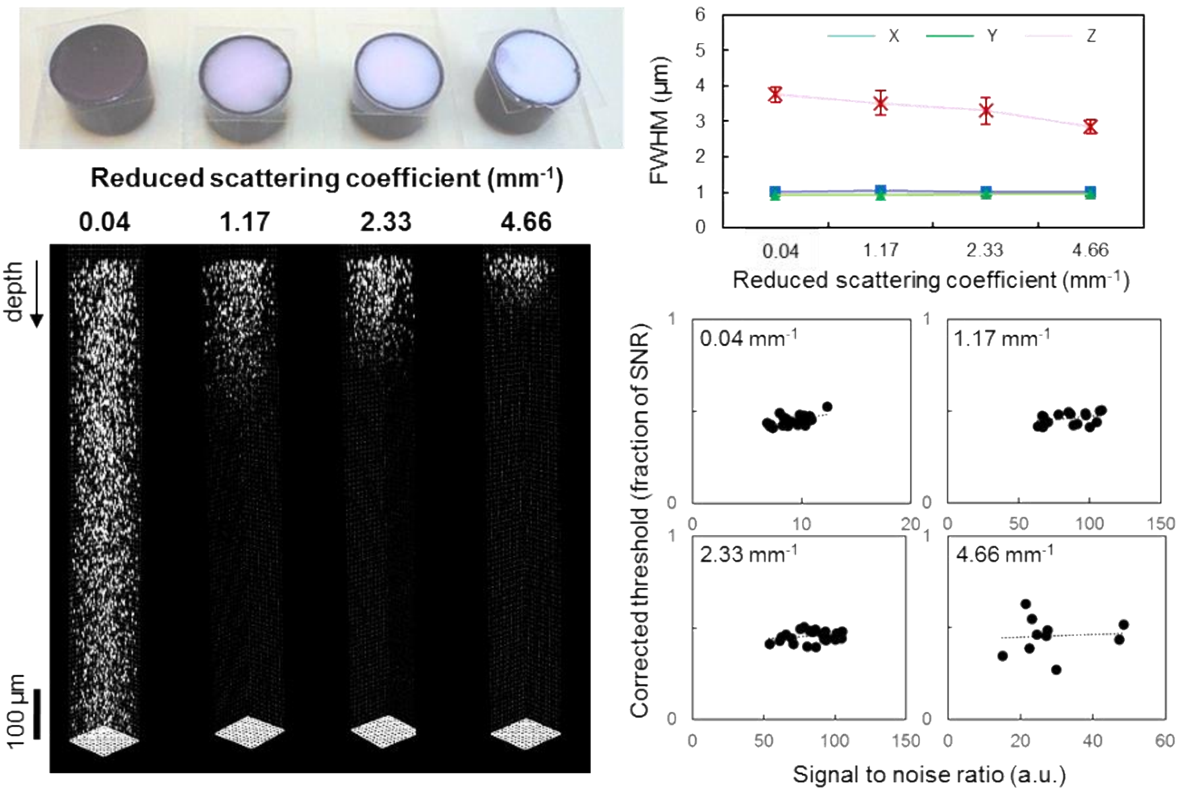


図 3.3 異なる換算散乱係数に対する蛍光ビーズ画像の広がりに関する比較結果
左上）作成した蛍光ビーズファントムの写真．左から換算散乱係数が 0.04，1.17，2.33，および 4.66 mm^{-1} を指す．左下）それぞれのファントムの検出限界を比較するため，撮像した蛍光ビーズ画像（白点）を 3 次元再構成した．換算散乱係数が高いほど，二光子励起の蛍光検出限界が浅い事がわかる．右上）それぞれのファントムにおける X,Y,および Z 軸の輝度プロファイルより解析される FWHM の結果．右下）それぞれのファントムにおける SNR と蛍光ビーズ径を正しく抽出するための二値化閾値との関係．

ラット大脳の換算散乱係数を模擬した条件で撮像したファントム画像の代表例を図 3.4A に示す．画像の上部から一定出力の励起レーザーを照射した．深さ全体にわたる検出光の減衰のため，ファントム表面からの深さが増すにつれて画像化されたマイクロビーズは薄くなった．信号強度は深度の増加とともに指数関数的に減少したが，励起レーザーのパワーが一定のためバックグラウンド強度は撮像深さによらず一定であった（図 3.4B）．結果的に SNR が深度に依存して減少するため，マイクロビーズは深い場所（>約 500 μm の深度）で検出不可となった．視覚化の目的で，信号強度は各 XY 画像の最大強度で正規化した画像を示す（図 3.4A 右）．こちらの図からは，SNR が深度全体に可変であることが分かる．

抽出した個々のマイクロビーズの断面図は，XY 平面上で同様の丸い形状を示したが，深さによらず Z 軸方向への大きな伸びを確認した（図 3.4CD）．マイクロビーズの形状の歪みは，深い場所に比べて表面の場所でより明白であった．

画像の SNR は深さに対して単調減少を示した（図 3.5A）．このことから深さに対してマイクロビーズの検出が可能な SNR は，2 dB（=約 1.6 [a.u.]）であることがわかった（図 3.5B）．X 軸と Y 軸の測定で FWHM はそれぞれ 9.7±0.4 μm と 9.8±0.4 μm（n = 64 マイクロビーズ）とほぼ同等を示し，この値はマイクロビーズの実際の直径サイズ（9.9 μm）に近い値が得られた．対照的に，Z 軸の測定値は XY 平面の測定値と比較して大きな FWHM（13±1.5 μm）を示した（図 3.5B）．その結果，XY 平面での PSF は 0.1±0.4 μm であり，Z 軸方向は大幅に拡張された（2.9±1.5 μm）．つぎに XY 平面画像上で画像化されたマイクロビーズの実際のサイズを与える理想的な閾値と SNR の関係をプロットした（図 3.5C）．言い換えると，マイクロビーズのサイズは，6.3-10.3 dB（=約 4.2-10.6 [a.u]）の SNR の範囲内で撮像したときに，従来法である FWHM 法で正確に抽出されるといえる．一方，SNR が 4.2 未満もしくは 10.6 を超える場合, FWHM 法では画像化されたオブジェクトの過小もしくは過大評価がそれぞれ生じることが示された（図 3.5D）．これらのエラーを修正するために，近似線形回帰に基づいて，SNR に応じて修正された閾値（th）を定義した（th =

$0.00111 \times SNR + 0.485$; 図 3.5C）.

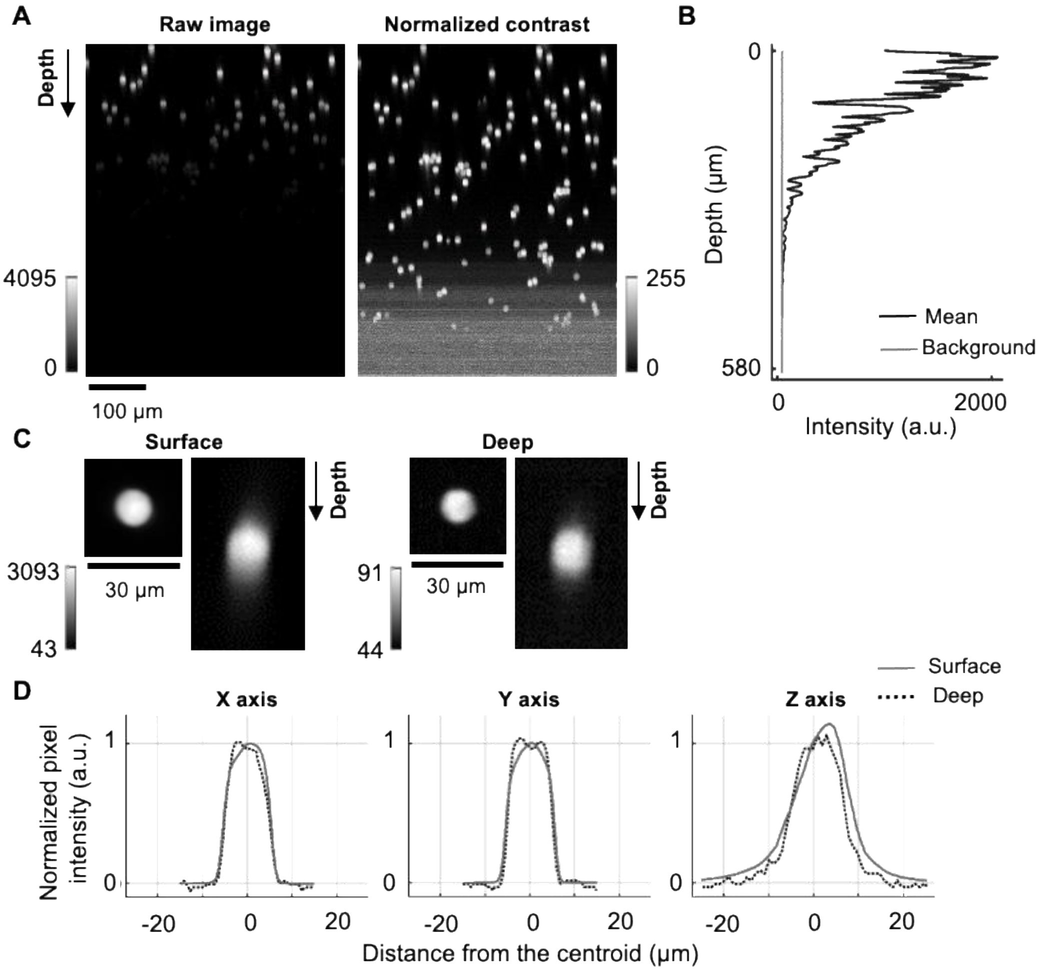


図 3.4　代表的なファントム画像とマイクロビーズのラインプロファイル

A）ファントム画像の再構成画像．画像は生画像（左）とコントラスト調整画像（右）の XZ 平面上での最大値投影法（MIP）として表され，視覚化の目的でピクセル強度を各 XY 平面のピーク強度で正規化した．撮像領域（FOV）は XY 平面（0.45 μm /pixels）で 456×456 μm^2 であり，光軸方向の Z 軸方向に 580 μm の深さから 0 μm の深さまで計測した（ステップサイズは 1 μm）．B）ラテックスビーズの光の散乱効果により蛍光シグナル（黒線）は表面から指数関数的に減少したが，バックグラウンド強度（灰色）は比較的一定（つまり，平均 42～45 [a.u.]）であった．C）表面（左）と深部（右）の位置から抽出された代表的な単一マイクロビーズ．表面では，信号強度は背景の信号強度と比較して著しく高かった．一方，深部ではビーズの信号が低く検出できなくなった（つまり，バックグラウンドノイズと同等）． D）X 軸，Y 軸，および Z 軸（左から右）にわたる断面輝度プロファイルの比較．同様の強度プロファイルが X 軸と Y 軸に対して観察されたが，Z 軸プロファイルは大きく拡大した．

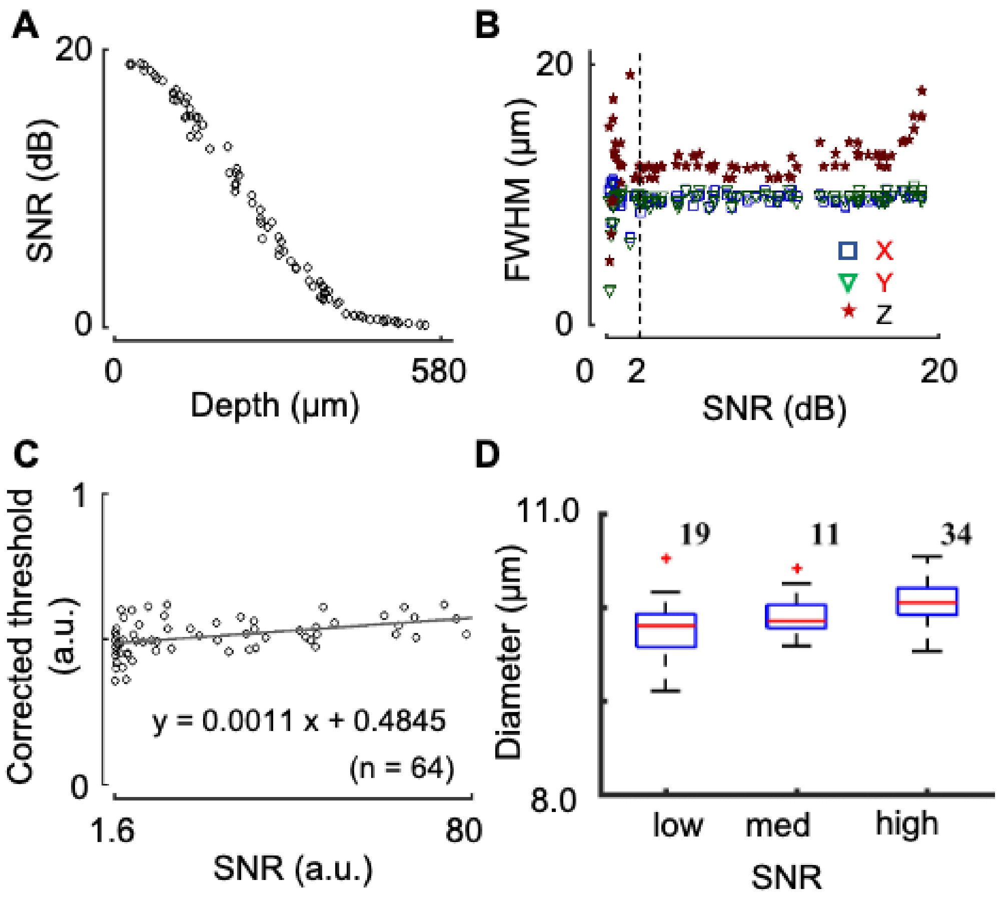


図 3.5　ファントム実験結果

A）ビーズファントムの XYZ 画像における信号対雑音比（SNR）の深さ方向に対する減衰．B）推定された点広がり関数の比較．輝度プロファイルから半値全幅（FWHM）を解析し，すべてのマイクロビーズ（n = 64 ビーズ）の X（青い四角），Y（緑の三角），および Z（赤い星）軸に沿って解析した結果．SNR が 2dB 未満の場合，正しく解析できないことを示す．C）マイクロビーズの大きさに関して真値を与える 2 値化閾値．線形近似線（y = 0.0011 x + 0.486）は，2 値化閾値を画像の SNR に合わせて線形に補正する必要があることを示す．また，SNR が 8.3 dB の画像では，FWHM で求めた閾値によって正しく二値化ができることを示す． D）FWHM によって二値化されたマイクロビーズのサイズと SNR の関係．マイクロビーズのサイズは，SNR が 4.2～10.6 [a.u.]（6.3～10.3 dB，中程度の SNR）の画像において正しく抽出された．対照的に，低 SNR（< 4.2 [a.u.]）または高 SNR（> 10.6 [a.u.]）で測定された画像では，マイクロビーズのサイズはそれぞれ過小または過大評価された．図中の数字は，測定されたマイクロビーズの数を示す．

3.5. 考察

ファントムモデル実験の結果は，撮像の焦点面内での PSF が回折限界に近いことを示した．一方，光軸方向（つまり Z 軸）への 3〜5 μm の延長は，対物レンズの種類やタイプ，組織の屈折率，光学的特性に依存する．本研究で得られたこれらの結果は，先行研究の報告とよく一致した．例えば，スライス内半径方向の幅および軸方向分解能は，水浸対物レンズで測定して，それぞれ 0.44 μm および 1.8 μm（40 倍，NA = 0.8; Drew et al., 2010），あるいは 1.9 μm および 7-12 μm（20 倍，NA = 0.6; Kobat et al., 2011）と報告されている．光軸方向の PSF の広がり効果によって引き起こされる画像の歪みは，2PLSM に固有であり，2PLSM 画像の 3D 再構成にとって重要である．理論的研究ではさらに光軸方向の PSF が組織散乱効果の増加とともに狭くなることが示されており（Blanca and Saloma，1998; Dunn et al., 2000），この結果は本研究で得られたファントム実験によっても再現された．

このような画像の伸びを補正するために，先行研究では，2PLSM 画像の 3D 再構成のためのデコンボリューション法が提案されている（Dao et al., 2015; Boorboor et al., 2018）．ただし，この方法では，光軸方向の PSF に関する先見情報が必要であり，また観察対象内の PSF が均質であることが仮定される必要がある．実際の生体組織中での観察では，光軸方向の PSF は，組織の解剖学的構造に応じて大きく変動すると考えられる．

これらの制約を克服するために本研究では，組織の光学特性（SNR）に関係なく，焦点面内での PSF の精度と安定性が高いことを利用し，XY 面画像を使用した断面直径の測定に基づく 3D 画像再構成法を提案した．提案法の有用性は，画像中の SNR が空間および時間にわたって変化する病態モデルにおいて反復の 2PLSM 血管造影で取得された微小血管ネットワークの定量解析に適用できることである．

4. 微小血管ネットワーク構造の定量化

4.1. 序論

これまでに 2 PLSM を用いた脳微小血管ネットワークの長期観察によって，低酸素症や虚血における脳血管の形態学的適応と機能的変化について調べられている（Yoshihara et al., 2013; Takuwa et al., 2013; Masamoto et al., 2014; Selkiguchi et al., 2014; Tajima et al., 2014）．これらの研究では，約 1 mm x 1 mm の面内領域を厚さ 0.4～0.8 mm で皮質の同じ場所を反復撮像した．3 週間の実験において，画像の SNR は動物の生理学的変化を反映して大きく変化した（Yoshihara et al., 2013）．このことは，異なる時間で画像化された血管ネットワークを一貫した二値化閾値で画像抽出し，血管容積の経時的な変化を統計的に比較することを困難にしている．さらに，測定された大脳皮質は，いくつかの層から成る機能的なユニット構造（いわゆるバレル構造）を呈しており（Durham and Woolsey，1985; Reyes-Puerta et al., 2015; Narayanan et al., 2017），組織の光学的特性は局所的に不均質である（Masamoto et al., 2004）．また，慢性実験において繰り返し測定を行うことで，大量の画像データ（通常数百メガバイトから数十ギガバイト）が生成されるため，画像分析と画像オブジェクトの定量化のための自動化された方法が必要である．

これらの制約を克服し，2PLSM 血管造影で撮像された微小血管ネットワークにおける構造の長期変化を定量化し統計的に解析するために，ソフトウェアベースの半自動画像解析法の開発を目指した．

4.2. 方法

4.2.1. 動物実験

インビボイメージング実験は，イソフルラン（空気と酸素ガスの混合物中 1%）麻酔下で，オスとメスの C57BL / 6 マウス（2～3 か月，21～23 g，N = 3 匹）の体性感覚野で実施した．動物の使用と実験プロトコルは，放射線医学総合研究所の施設内動物管理使用委員会によって承認された．スルホローダミン 101（生理食塩水中 5～10 mM; Masamoto et al., 2012）の腹腔内注射によって血しょうを蛍光造影した．大脳皮質微小血管の XYZ 画像（456 μm×456 μm，ピクセル解像度 0.45 μm /ピクセル）を，脳表から皮質深さ約 800 μm までを 5.0 μm のステップサイズで二光子顕微鏡（TCS-SP5MP）によって撮像した．励起レーザーの出力を撮像深さで調整し，深さ全体にわたる蛍光の減衰を補正した．深さ 0 μm は軟膜血管の底面とした（表面の動脈と静脈の平均直径は，それぞれ 15.7±7.7 μm と 12.2±2.7 μm であった）．すべての 2PLSM 画像は，デジタル化された 12 ビット強度データとして保存され，HKLoadLif を使用してボリュームマトリックスとして MATLAB で 16 ビット（uint16 クラス）に変換した．

4.2.2. 画像解析

すべての画像解析には MATLAB©を使用した．インビボ画像における SNR の不均質性は，組織における光の散乱効果に加えて，生体組織内の血液による光の吸収が強く影響する．血漿に溶解した蛍光色素の濃度は血管内において一定であると想定されるが血管内の信号強度は，深さとともに大幅に減少し，また同一焦点面内においても大きく変動する．

マウスの脳微小血管を撮像した予備実験では，脳毛細血管の最小直径が 2 μm であったため，まず半径 2 ピクセルの円盤状カーネルを備えたメディアンフィルターを適用し，「F 画像」と名付けた．3D ガウスフィルター（XY 方向と Z 方向にそれぞれ $\sigma = 3.8$ と 0.85，毛細血管の抽出用）を F 画像に適用し，クラス uint16 / integer を単一/半浮動小数点に変更

して拡張した．次に，別の 3D ガウスフィルター（XY 方向と Z 方向にそれぞれ $\sigma = 19$ と 0.85，放射状に分布する穿通動脈・静脈の抽出用）を F 画像に適用し，クラス uint16 /整数を単一/半浮動小数点に変更した．これらのフィルターを適用した後，各 XY 平面において最大輝度値を測定し，その画像を「GF 画像」と名付けた．最後に，画像内の信号強度の不均質性をカーネルサイズ 510（経験値）の 2D ガウスフィルター（$\sigma = 128$）で平滑化した．次に，ピクセル輝度を各スライス画像の最大輝度値とバックグラウンド強度で正規化し，これらの画像を「NSGF 画像」と名付けた．

X 軸，Y 軸，および Z 軸上でのピクセル解像度が等方性となる画像を作成するために，8 つの隣接するボクセルに線形補間を適用することで，ボクセル解像度をボクセルあたり 1 μm に再スケーリングした．456 x 456 x 805 ボクセルで再構成された GF 画像と NSGF 画像を，それぞれ R1 画像と R2 画像と名付けた．

信号強度は，各 XY 平面画像のすべてのピクセル輝度の最大値から 5%の平均値（四捨五入）として定義し，背景輝度（ノイズレベル）は，最大値と最小値を除く画像内のピクセル輝度の分布に関する最頻値で定義した．二値化処理を R1 および R2 画像に適用し，「BW 出力」画像を，R1 または R2 画像の真のピクセル領域に重ねた．得られた 2D スライス画像と 3D ボリューム画像の両方に充填プロセスをさらに適用した（つまり，1 で囲まれた強度 0 は，BW 出力の強度 1 に置き換えた）． 次に，7 ピクセル（経験値）の球形カーネルを使用したクロージング処理を適用し，画像は「cBW-images」と名付けた．次に，MATLAB（ver. 2018a または最新）関数 bwskel [MATLAB bw-skeleton 1,2]を適用し（Lee et al.，1994; Kerschnitzki et al.，2013），画像の名前を「Skel-images」とした．

細線化画像をさらに処理し，次のルールに従って単一の血管セグメントに分割した．すべての中心線ボクセルは，最初に 4 つのグループに分類した．i）26 個の隣接するボクセル内に 1 つ以下の他のボクセルが存在するエンドポイント，ii）26 個の隣接するボクセル内に 3 つ以上の他のボクセルが存在する分岐点候補，iii ）分岐点．分岐候補の重心を割り当てる

ことによって 1 つのボクセルを定義した，iv）その他のボクセル．以上の処理によって血管の中心線が 2 つの端点または両端の 1 つの端と 1 つの分岐点に接続している単一の血管セグメントを抽出した．次に，血管セグメントは，方向情報と終点から終点まで，または終点から分岐点までのユークリッド距離からなるベクトルデータとして特徴付けた．セグメントの長さは，ベクトルデータから計算した．

4.2.3. 偽血管セグメントの消去

細線化処理により，実際の長さよりも短い偽血管セグメントが誤って生成された．これらの短いセグメントで，20 µm 未満のものは自動的に削除した．またこのプロセスでは，1 つの分岐点から伸びるセグメントが 2 つ以上ある場合，最も長いセグメントのみを残した．各画像に対して 1 回または 2 回同様の処理を繰り返し，両端に 2 つの分岐点を持つ血管セグメントのみを解析対象と定義した．

4.2.4. 血管のセグメンテーション

血管 1 本 1 本の形状や径を評価するため，分岐から端点もしくは分岐から分岐に分類するため分岐点に基づくセグメンテーションを行った．MRI での白質繊維の抽出にはトラクトグラフィー（Silvestro, M., et al. 2021）なる手法があるが，血管は方向性がランダムであり，また血管径を忠実に解析したいのでトラクトグラフィーの手法は血管の抽出には不向きであった．また，時間的に連続で撮像した血管構造の重ね合わせに血管中心線の方向性（ベクトル）の情報を加えて解析する手法（Chinta, L. et al. 2012B）のように，時間情報がない単一のボリューム画像から，血管ネットワークを 1 本単位でセグメンテーションを行うことだけが目的ではなく，径の変動や形状までを評価できるようにするため，点群をインデックス化しベクトル情報として各解析点上に定義した．

4.2.5.　血管径の解析

浮動小数点を線形補間することにより，細線化画像のボクセル解像度を F 画像のボクセル解像度に調整し，血管セグメントの中心線を F 画像上に重ねて表示した（図 4.1A）．血管の中心線に沿って，血管の直径は XY 平面画像上で自動的に決定した．二値化処理において，信号強度はターゲットとなる血管中心点周りの 26 個の近傍ボクセルの平均値とし，背景強度は，各 XY スライス画像内での最小および最大輝度を除くすべてのピクセル輝度分布の最頻値とした．

次に，血管の中心線に沿って，長さ 70 μm の断面線上のピクセル強度を測定した．同様の輝度分布の測定を血管横断面上で任意の 0 度から 179 度まで中心点周りを π/ 180 ラジアンの回転ステップで繰り返した（図 4.1B）．次に，ファントム実験で求めた SNR に対する補正された二値化閾値（図 4.1C）を適用し，血管断面上の各角度における血管の幅を測定した．最後に，断面の最小幅を，ターゲットとなる血管の中心点上で解析された血管の直径と定義した（図 4.1D）．血管の中心線に対する法線の幅ではなく最小幅を定義したのは，血管のすべての中心点に沿って信頼できる断面直径が測定できるからである．これは，血管の中心線の方向が常に血管壁に平行であるとは限らないためである．この時血管は微小領域で連続的な円柱を仮定すると，光軸に並行あるいは斜めに走行する血管は XY 平面による断面の形状が真円あるいは楕円形状を呈する．そこで，XY 平面上で中心点周りの最小直径を解析することで理論的に径の決定が可能である．

最後にカスタム作成のビューアソフトウェアを使用して，セグメント抽出された血管を目視で検査し，元画像とは異なって抽出された血管セグメントは削除した．さらに，すべての血管セグメントは，皮質表面の大きな動脈と静脈（SA と SV），組織内に連絡する穿通細動脈と細静脈（PA と PV），および毛細血管（Cap）の 5 種類の血管に分類した．血管タイプは，ユーザーが 3D 再構成画像を使用して目視で割り当てた SA または SV のいずれかから追跡することによって自動的に決定した．次に，ソフトウェアによって，表面からの血管

構造を追跡しセグメントの直径が最初に 8 μm 未満を示した血管以降を毛細血管領域と定義した.

ソフトウェアへのデータ入力には，ボクセル解像度情報，セグメントデータ，各スライスのピクセル強度，および 3D 再構成された元の画像ファイル（たとえば，本研究の NSGF 画像）が含まれた．次に，平均直径/長さ，セグメントの総体積，およびセグメンテーション境界位置（つまり, 分岐および/または端）を含む血管タイプ（SA, SV, PA, PV，および Cap）に関する 3 つのパラメーターを各セグメントに対して表示した．ソフトウェアは，血管の中心線に沿ったピクセルごとの直径と, 信号値, ノイズ, および SNR を自動的に計算した. 456 μm x 456 μm x 800 μm の領域にわたる *in vivo* イメージングデータの場合，2 つの 2 D もしくは 3 D ガウスフィルターを適用する過程に Xeon Intel（R）E5-2630v4（2.20 GHz）を使用すると約 2～3 時間を要した．セグメンテーションには数時間，直径測定にはさらに約 3 時間要した. ガウスフィルタリングに GPGPU 処理を適用した場合, 高速 CPU（Ryzen 2700X，約 3.9 GHz）でのセグメンテーションには約 200 秒（GTX 1070），もしくは約 900 秒かかり，順次処理によりサイクルレートが速くなった．さらに，血管径の解析は再スケーリングによってピクセル解像度を補間した画像を用いた．またマトリックスはメモリが許す限り作成した．全体の計算は約 2～3 時間以内に完了した.

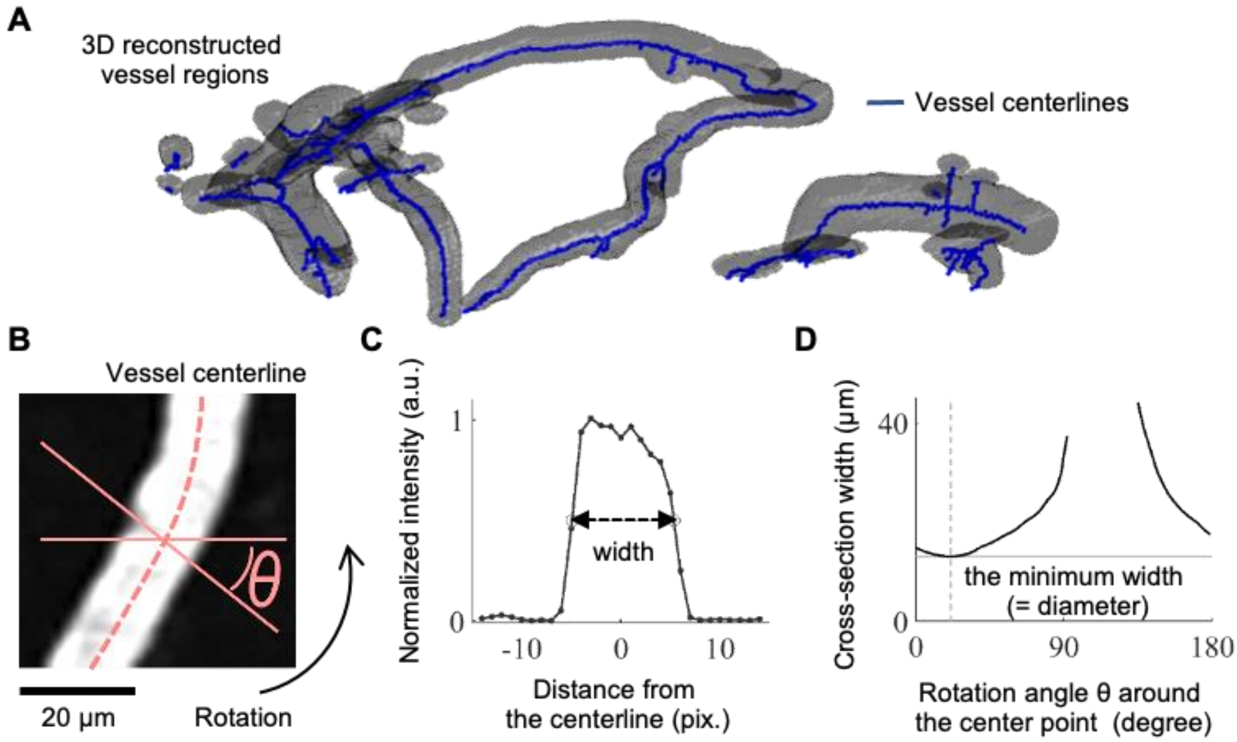


図 4.1　血管径の解析に関する提案法

A）解析した 3 次元微小血管ネットワークの代表画像．　血管領域は血管の中心線を決定するために，2 値化処理によってまず大まかに決定した．　画像の青い線は，抽出された血管の中心線を示す．B）ターゲットの中心点周辺の強度プロファイルの解析概略図．血管断面を通る直線上（長さ 70 μm）で，0 から 179 度まで π / 180 [rad]の回転ステップでターゲットの中心点周りに輝度プロファイルを取得した．　C）各角度において血管の幅を補正されたしきい値を使用して決定した．D）全角度に対して最小となる血管幅を，ターゲット中心点での血管径として定義した．

4.3. 結果

図 4.2 に二値化方法の検討を行った結果を示す．（A）は *in vivo* マウス大脳皮質を対象に 2PLSM を使用して撮像されたオリジナルの元画像（FOV：深さ 200 µm でスキャンされた 108×108 µm，ボクセル解像度 0.2×0.2×1.0 µm）を XY 平面（上）および XZ 平面（下）上に投影した画像を示す．最大輝度を投影した XZ 平面画像（下）では SNR の局所的な不均質性は明らかであった．このような不均質性は，ヘモグロビンによる吸収効果と組織中の散乱効果の混合によって生じた．(B-D) に血管領域の抽出に関して，大津の 2 値化法 (B)，フランジフィルター法（C），および提案法（D）で比較した．次に，これらの血管画像を使用して直径に関する測定値を，目視で抽出した画像に基づいて測定された真値と比較した（E）．画像から抽出された 36 セグメントに対して得られた直径の平均誤差は，大津（B），フランジ（C），およ提案法（C）に関してそれぞれ 3.5±2.8 µm，-2.6±1.0 µm，および 0.3±0.5µm となった．このことから，クラス間強度分散を最大化する閾値を採用する大津の方法（大津，1979）および血管のエッジを検出するフランジフィルター（Frangi et al.，1998）と比較して，画像内の SNR に対して補正された二値化閾値を用いる提案法は，高精度で血管の抽出が可能であることがわかった．

2PLSM（FOV：456 µm×456 µm×805 µm）を用いてマウス大脳皮質の *in vivo* で測定された微小血管ネットワーク画像の一例を図 4.3 に示す．各 XY 画像（NSGF 画像）におけるピクセル輝度の正規化により深部の微小血管の視認性が向上した（図 4.3A 右）．測定された皮質の深さ 0〜700 µm で，画像の SNR はセグメント全体で約 20 倍変化した．一方，背景強度は，皮質の中間層でわずかに高かった（図 4.3B）．これは，励起レーザー出力の調整や微小血管密度の違いに部分的に起因している可能性を示す．

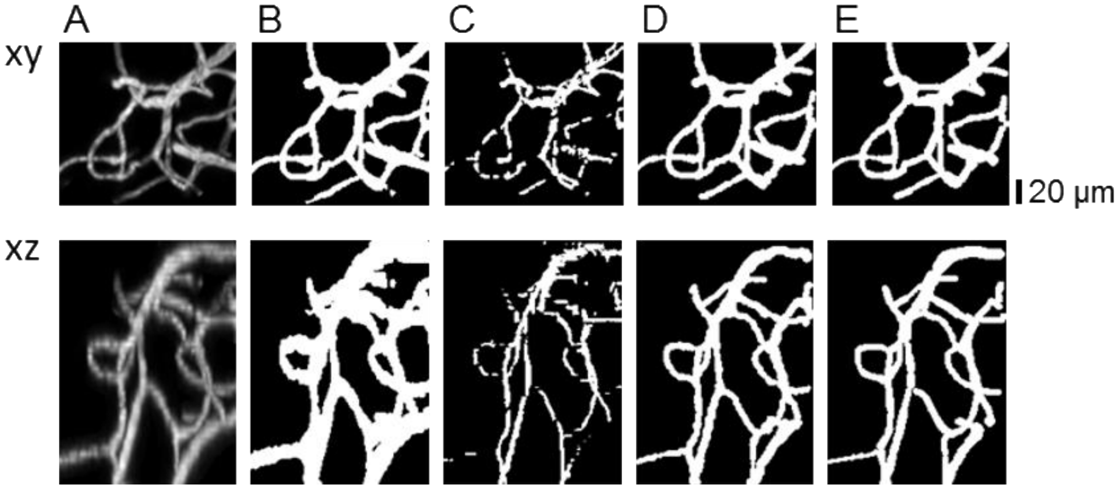


図 4.2　二値化法に関する比較

各種二値化処理法に関して二値化の精度を比較した．上が XY 平面への血管画像の最大値投影図，下が XZ 平面への最大値投影図．FOV は 108 x 108 µm の深さ約 200 µm．A)元画像，B)大津の二値化法, C)フランジフィルター法, D)提案法, E)手動解析による二値化画像

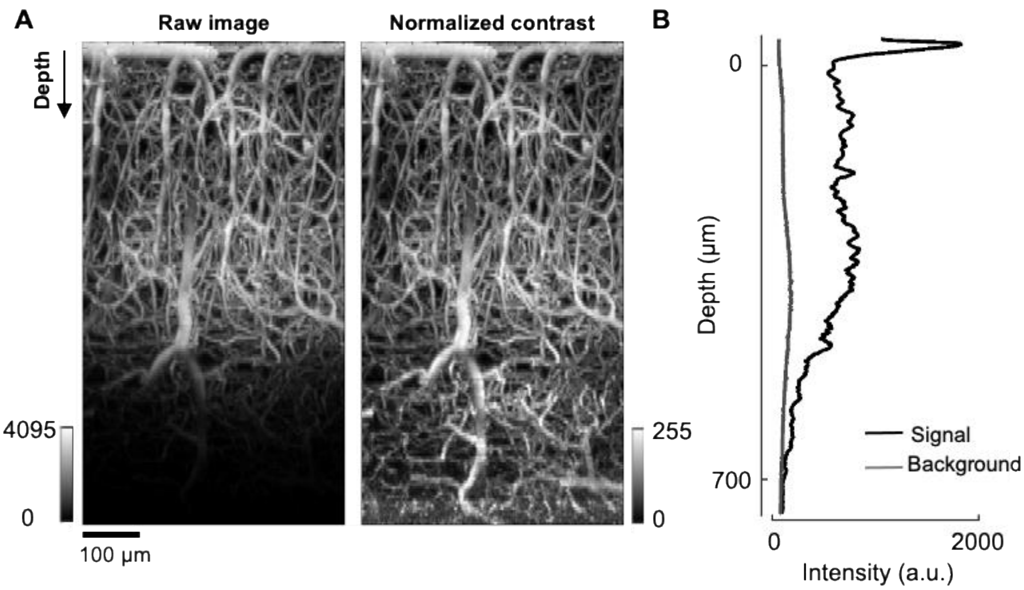


図 4.3 *In vivo* 血管画像の一例

A）2PLSM でマウス大脳皮質微小血管構造を撮像した再構成画像．　画像は元画像（左）とコントラスト調整された画像（右）の XZ 平面上での MIP 画像．信号強度は各スライスで正規化した．FOV は XY 平面（解像度 0.45 μm /pixel）で 456×456 μm^2 であり，深さ方向には 5 μm のステップサイズで約 800 μm の深さまで取得した．B）蛍光強度の深さプロファイル．各 XY スライス画像上で抽出された血管領域に含まれるピクセル間で平均化された信号強度（黒）は深度とともに減少した．組織領域で平均化された背景強度（灰色）は比較的一定であった．ただし，中程度の深さ（300〜500 μm の深さ）の皮質層は，他の層よりもわずかに高い強度を示した．これは，励起レーザー出力を調整する装置関数によると考えられる．

血管抽出に関する提案法の精度を目視による真値と比較した（図 4.4）．測定されたボリューム画像（約 0.2 mm×0.2 mm×0.2 mm;図 4.4A-ii）から合計 36 のセグメント（n = 1,465 の中心点）が抽出された．セグメントの長さは 10.3～164 µm（図 4.4A-iii）の範囲で，平均直径と SNR はそれぞれ 5.7±1.3 µm（図 4.4A-iv）と 22±6（図 4.4A-v）であった．長さが短い毛細血管と比較して，長いものではより径が小さい傾向がみられた（図 4.4B）．次に，測定された直径を同一セグメントにおける目視での測定結果と比較した（n = 1,103 の中心点; 図 4.4C）．その結果，提案法によって求めた平均直径が目視で求めた直径と統計的に有意に相関した（R = 0.96，p <0.001）．

より広域の二光子顕微鏡画像（図 4.5A）では，特に大きな血管が脳の表面を覆っている領域の深層での血管領域の誤判定が多くなる傾向がみられた．図 4.5 では細線化された血管中心点の数は約 100,000 点を識別した（図 4.5B）．このうち，誤判定されたセグメントを削除した結果，抽出された血管中心点は計 84,895 点となった（図 4.5C）．これらを，さらに 5 つの血管タイプ（SA，SV，PA，PV，および Cap）に分類したところそれぞれのセグメント数は 6，8，1，6，および 2,131 セグメントとなった．毛細血管のすべてのセグメントに対する平均直径は 6.1±1.0 µm（n＝2,131 セグメント）であり，平均セグメント長は 55±41 µm であった（図 4.5D）．

最後に，提案法によって求めた微小血管容積に関する深さ方向の分布を 3 匹の動物に対してプロットした（図 4.5 E）．個体によって SNR が低い画像もあり，セグメンテーションが不完全であったため，脳表から 500 µm の深度までで比較した．深さ 0～500 µm の平均血管容積は，撮像した容積（約 0.1 mm^3）に対して 3.1%±0.3%（N＝3 匹）となった．このうち動脈の容積（0.8%±0.7%）は深さ全体で比較的一定であったが，毛細血管容積（1.7%±0.5%）は深さとともに増加し，静脈容積（0.6%±0.3%）は減少した．血管容積全体に対して毛細血管は，動脈（26%±22%）および静脈（19%±7%）と比較して最大の体積（55%±20%）を占めた（図 4.5F）．

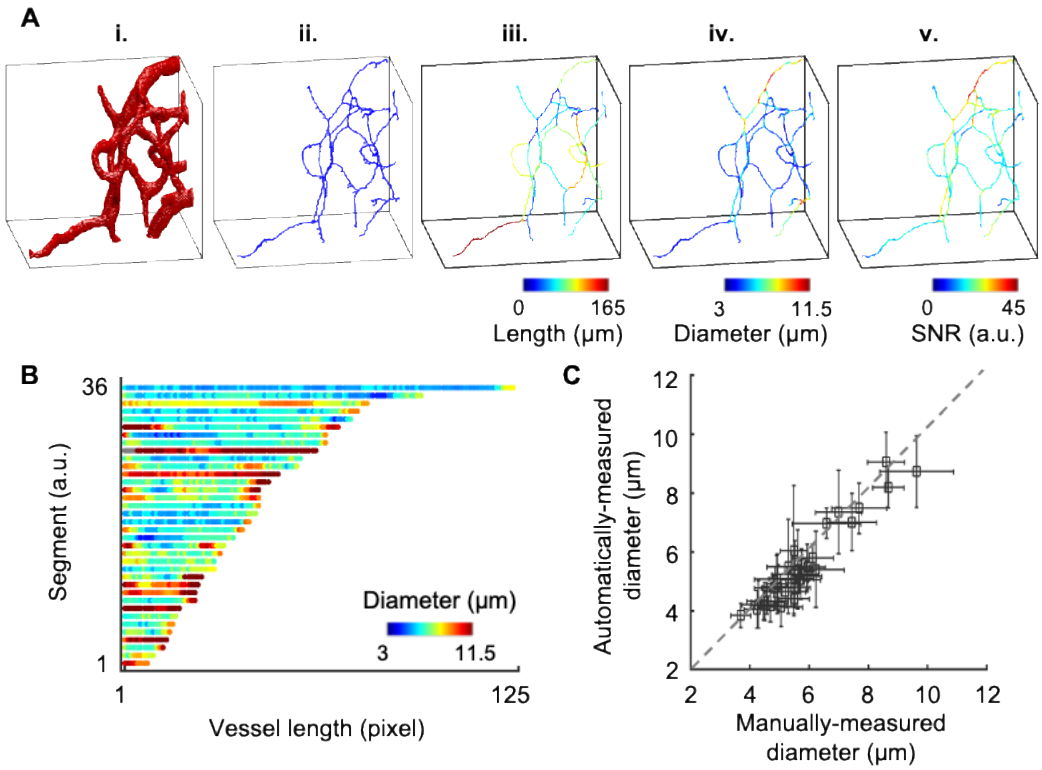


図 4.4　目視解析と提案法の比較

A）微小血管の長さ，直径，および SNR の自動測定に関する代表画像．（i）図 4.3 に示す画像データの一部から抽出されたサンプルボリューム画像（約 0.2×0.2×0.2 mm^3）．（ii）血管中心線の抽出画像．大まかに抽出された血管（i）は，血管の中心線を決定するために 3D スケルトン化された．（iii）分岐点に基づくセグメンテーション．色はセグメントの長さを示す．（iv）測定された直径画像．色は，各血管中心点（n = 1,465 中心点）で本ソフトウェアを使用して自動的に測定された直径を示す．（v）SNR 画像．色は各血管中心点上での SNR を示す．B）セグメント化された毛細血管は，分岐点間のユークリディアン距離として測定されたセグメントの長さに従って順序付けた．色は各点での直径を示す． C）ソフトウェアおよび手動検査によって測定された直径のセグメントごとの比較．これらの 2 つの測定値では，統計的に有意な相関（R = 0.96，p <0.001，n = 36 セグメント）が観察された．

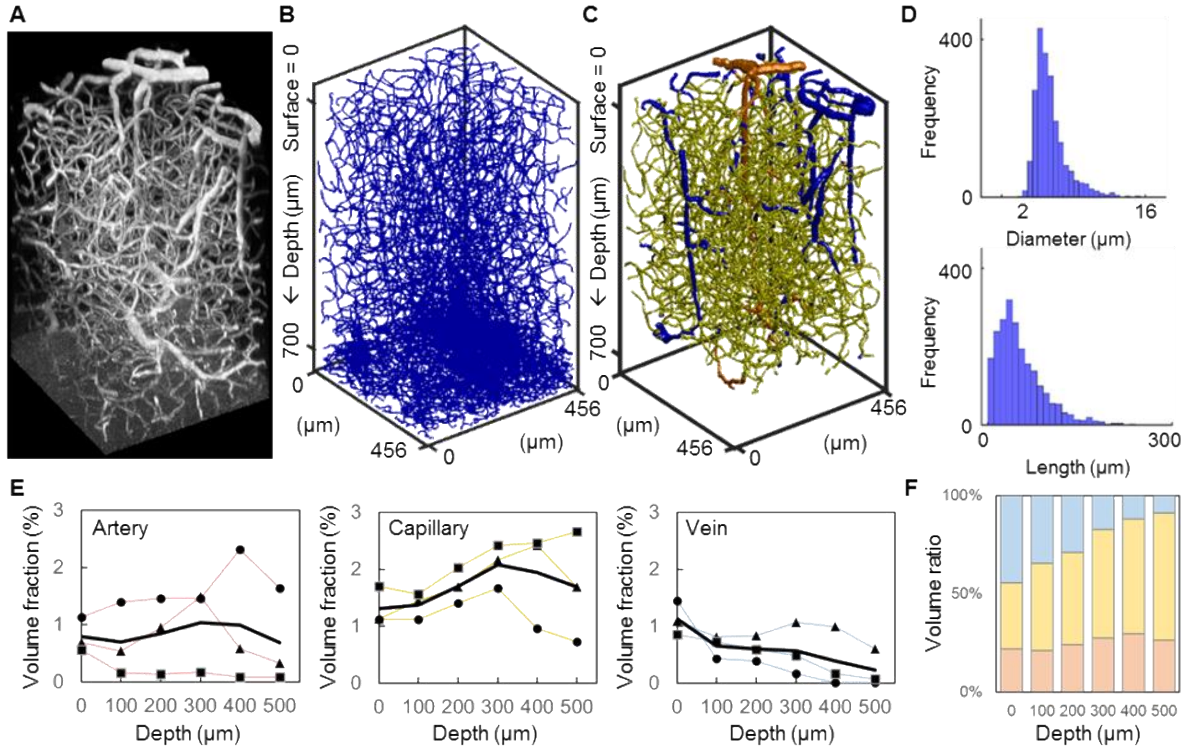


図 4.5　*In vivo* 実験による解析結果

A）マウス大脳微小血管の 3 次元再構成画像．B）A に示した 3 次元再構成画像に対する 3 次元の細線化画像．C) STL 形式で実行された血管径の測定値に関する 3 次元再構成ボリューム画像．抽出された血管セグメントに対する手動の分類は，血管タイプ（つまり，それぞれ赤，黄，青の順で動脈，毛細血管，静脈）に分類した．D）キャピラリーセグメント（直径 ＜8 μm）の場合，平均直径（上）とセグメント長（下）はそれぞれ 6.1±1.0 μm と 55±41 μm（n＝2131 セグメント）であった． E）血管容積と深さの比較．解析された直径は，微小血管ネットワークの 3 次元再構成に使用され，動脈（オレンジ)，毛細血管（黄色)，および静脈（青）の血管容積に関して 0～500 μm の深さで比較した（N = 3 匹）．3 匹の平均値を黒い太線で示した．手動検査により，SNR が低いため，500 μm より深い場所から血管セグメントを抽出できないことを確認した．抽出されていない血管セグメントに対する解析の結果はこの図には含まれていない． F）動脈（オレンジ)，毛細血管（黄色)，静脈（青）における各セグメント間の平均体積比を，各 100 μm 毎の深さで比較した．毛細血管の体積分率は，皮質表面から 500 μm の深さまでの深さが増すにつれて比較的増加した．

4.4. 考察

提案法と目視解析の比較結果により，目視解析の方がやや大きい値に分布が偏って見えるが，これは高い SNR の血管を解析の対象としていることが要因の一つだと考える．高 SNR の蛍光ビーズを目視で測定した場合は実際の大きさよりも大きく見える事がわかっており目視による画像解析の欠点が反映されていると考える．

提案法による血管径の解析誤差は，±0.3 µm であった（図 4.4C）．このことは，理論的に推定される光の回折限界による分解能 0.37 µm（NA = 1.0 および 605 nm の発光波長; Rayleigh，1896）とほぼ等しい．また提案法によって求めた血管容積は，スキャンされた容積に対して 3.1%±0.3%であった（図 4.5E）．しかしこの値は，脳の領域に応じて変動する可能性があり，また解析面では両端が終点ではない血管（つまり，表面血管を除く閉ループ）のみを解析対象としているため，取りこぼしによって過小評価されている可能性がある．例えば，小さな FOV 内では，FOV の外側に接続する微小血管の一部は本研究の解析対象に含まれていない．さらに，2PLSM 血管造影は，吸収効果による信号損失が大きい，脳表に太い血管が密に分布している領域は含んでいない．そこで今後はより広い FOV を解析対象としたメゾスコピックイメージングを補間的に使用することで，脳血管の容積をより正確に測定することが可能になり，将来的に臨床における脳灌流データとリンクすることで，臨床への知見の提供が可能になると考えられる（Kanno and Masamoto，2016）．

本研究では脳微小血管の計測情報をボクセル単位から血管１本１本のセグメント単位のベクトルデータに変換した．これにより血管の形態情報は圧縮されたベクトル情報をもとに血管のねじれやカーブといった形態情報を算出することが可能となった．この成果は研究室内で進行中の別のプロジェクトである指先の毛細血管形状の評価にも例えば形状情報に基づいた疾患の診断方法開発に応用できると考える．

従来法と提案法との比較について表 4.1 に簡易的にまとめた．従来法では血管１本１本におけるミクロン単位での解析は困難であった．血管セグメントごとに ID を振り分け，位置

情報をベクトル化したインデックスで保存する提案法はネットワーク内のミクロン単位での解析を可能にした．また個別のセグメントに関して位置ベクトルの情報を用いて血管の形状（曲率やねじれ）を解析することも可能である．これらの解析手法はランドマークとしての分岐点が決定されれば動静脈からの分岐数を自動カウントするツリー構造の解析（T, Matsuzaki. et al. 2015）を可能とする．

３次元の細線化の精度を検証するため，目視解析によって再構築された血管の二値化データ(図4.2E)と提案法による自動解析によって再構築された血管の二値化データ(図4.2D)を混合行列で比較した（図 4.5）．その結果，偽陰性と真陽性からなる精度は 99.78%であった．このことから細線化の位置ずれによる影響はほとんど無いと考えられる．

ソフトウェアの現行バージョンでは，3D で表される血管の中心線の抽出に関して目視での確認が必要であり，これにより半自動解析に制限されている．血管径の解析までは自動で実行されるが，偽血管の除去と抽出血管の分類は目視での確認が必要である．よって全自動化に向けた今後の課題は，偽血管の自動除去と抽出された血管の自動分類である．また本研究では目視での検査を目的とし，元画像を参照してターゲットセグメントを迅速に比較するためベクトル化されたラベリングデータを組み込む工夫を施した．

マウスの大脳皮質における血管容積の占有比は先行研究によって動脈が 12%，静脈が 48%そして毛細血管が 40%であると報告されている（Gagnon, L., et al. 2015）．それに対して本研究では深さ方向にばらつきはあるものの表層から深さ 500 μm で平均するとそれぞれ 26%±22%，19%±7%，55%±20%となり，やや動脈の割合が高く静脈の割合が低い結果となった．先行研究との違いは本研究では撮像時に太い静脈を避けて撮像したことが関係している可能性がある．そこで撮像領域によるバイアスを避けるため，現在より広い 1 mm 四方の領域において同様の血管容積の分布について解析を進めている．

二光子顕微鏡法を用いた従来研究においては，大脳皮質の血管容積の解析に関して深さ方向の輝度拡がりの影響が考慮されていなかった（Vérant, P., et al., 2007）．また，二光子

顕微鏡で撮像した血管ネットワークの構造画像に関して，機械学習を用いた血管のセグメンテーション法が提案されている（Tahir, W, et al., 2020）．しかし，教師データとなる二値化データがそもそも深さ方向の伸びを含んだものを使用しているため，深さ方向の輝度の広がりの影響を考慮できているのか，厳密な検証が必要である．一方，提案法は，血管の形状が円柱であると仮定することで解像度の高い焦点面の断面形状のみを用いて血管形状のセグメンテーションおよび3次元再構成することを可能にした．今後の展望として分岐点の検出が自動化されれば，分岐点をランドマークとして脳の接続性に関する解析手法であるコネクトーム解析（Honey, C.,J., et al., 2010）やニューロン同士の局所的な構造のつながりを調べる統計手法等を利用した微小血管のネットワーク構造の解析が可能になると考える．

表 4.1 従来法，類似研究(Vérant, P., et al., 2007，Tahir, W., et al., 2020)との比較

	血管の平均径	ミクロン単位での血管径	血管の長さ	血管の形状	ランドマークとしての分岐点検出	動静脈からの分岐数(分類)
従来法，類似研究	●	▲	●	×	▲	▲
提案法	●	●	●	●	▲	▲

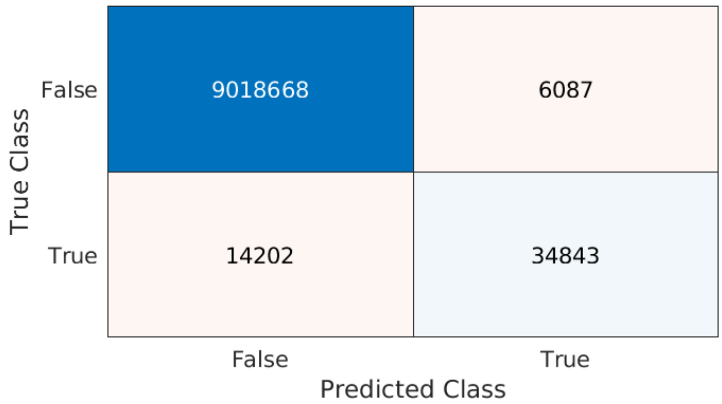


図 4.5 細線化の精度検証結果

評価ボクセル 213x213x200 [voxels]の領域を対象に，目視解析によって再構成された二値化データを真値とし，自動解析によって再構成された二値化データを予測値として混合行列チャートによる精度の検証を行った．

5. 微小血管ネットワーク構造の追跡評価

5.1. 序論

大脳皮質は複数の細胞種で構成され一般に 6 層から成る．各層において細胞の活動や密度が異なるため，皮質内のエネルギー需要も層によって異なる（K.Zilles et al., 1995）．エネルギー需要の不均質な分布に対し，血液の供給は異なる層間でバランスされ巧妙に調節されていると考えられる．特に組織への酸素供給は血液中を流れる赤血球（RBC）の分配に依存するため，動脈から静脈に至る皮質微小循環の 3 次元ネットワーク全体を知ることが重要である．

これまでに，2 光子顕微鏡血管造影法を用いて皮質内に連絡する穿通動脈と静脈の形態学的特徴と数密度を定量化した(第 4 章)．しかし，組織と血液との間の酸素交換が毛細血管で主に生じる事を考慮すると，毛細血管の形態を把握することが重要である．マウスの大脳では，1 mm^3 の立方体内に約 1.8 万本の毛細血管が存在する．したがってこのような大規模な血管構造を抽出し，さらに需要供給の変化に伴う時系列での構造変化を追跡するのは技術的に困難である．

そこで本章では，単一の動物において 2 光子レーザー走査型顕微鏡（2PLSM）を繰り返しイメージング取得された大脳皮質毛細血管のボリューム画像を定量化し，さらにエネルギーの需要供給バランスを変化させた際の血管構造の変化を追跡することを目的とした．

5.2. 方法

5.2.1. 実験動物

解析に用いた画像データの一部は，以前に公開された論文(K. Yoshihara et al., 2013)より引用し再解析した．実験は放射線医学総合研究所および電気通信大学の実験動物委員会によって承認された．C57BL / 6 雄マウス（8〜12 週間）をイソフルランで麻酔した．頭蓋骨を取り除いた後，頭蓋窓（直径 3〜4 mm）を左頭頂葉に取り付けた(Y. Tomita et al., 2005)．撮像の直前に，スルホローダミン 101（生理食塩水中 5-10 mM）を動物の腹腔内に注射し，血漿を蛍光標識した(K. Masamoto et al., 2012)．微小血管の構造は，2PLSM（TCS SP5MP, Leica Microsystems）を用いて 610/75 nm のバンドパスフィルターを通して画像化し，Ti：Sapphire レーザー（900 nm, MaiTai HP, Spectra-Physics, CA）で励起した．ピクセル輝度は 12 ビットのグレースケールで表し，各画像は 1024 x 1024 ピクセル，ピクセル解像度 0.45 μm で撮像した．各場所で z スタック画像を皮質表面から 800 μm の深さまで 5 μm のステップサイズで取得した．

5.2.2. ファントム実験

既知のサイズの蛍光ビーズとラテックスビーズの混合物を含むファントムモデルを使用し，画像の関心領域（ROI）内の信号対雑音比（SNR）に従って 2 値化閾値を調整した．すべての解析には，MatLab-R2018b を使用しボリュームマトリックスに 2 次元画像を再構成した． 前処理では，メディアンフィルター（カーネルサイズ 5 x 5）をすべてのスライス画像に適用した． 次に，3D ガウスフィルター（XY 平面で $\sigma = 3.8$ ピクセル，Z 軸で 0.85 ピクセル）で血管領域を強調するために適用し，コントラストノイズレベルが深度全体で一定になるようにスライス毎に正規化した．

5.2.3.　血管ネットワークの解析

血管領域を抽出した後，各血管は分岐点で自動的にセグメント化し，セグメント長を測定した． 信号レベルは，中心位置（3×3×3 ボクセル内）周辺のピクセル強度の平均値と定義し，ノイズレベルは ROI 内のピクセル強度のモード値とした． 血管中心軸上の各位置において，血管径を測定した．

5.2.4.　時系列データの解析

2PLSM の繰り返しイメージング画像データから毛細血管の構造変化を追跡するために，グラフィカルユーザーインターフェイス（GUI）を使用して撮像間の位置ずれを手動で補正した．基準となる 0 日目に撮像した血管中心軸と比較し，対象画像を 7 軸に沿って自由に移動させた．時間の経過とともに XYZ 軸に沿った位置偏差は顕著になり，深さに応じて 3 つの軸の周りで回転偏差も生じた．これらの偏差は脳組織の膨張または収縮によって生じたと考えられる．

血管の中心位置は，2PLM 画像上で灰色の点として示した（図 5.1a)．分岐点が同定され，分岐から分岐または終点までをセグメントとして定義した．セグメント内の位置は，いずれかの分岐点（端点）から近い順番に再配置しベクトル化した．解析対象となるピクセル間のユークリッド距離の累積合計を，セグメントの長さ（白い矢印の線）として定義した． ノイズ値は，XY 平面画像内の輝度ヒストグラムのモード値として定義した（図 5.1b)．

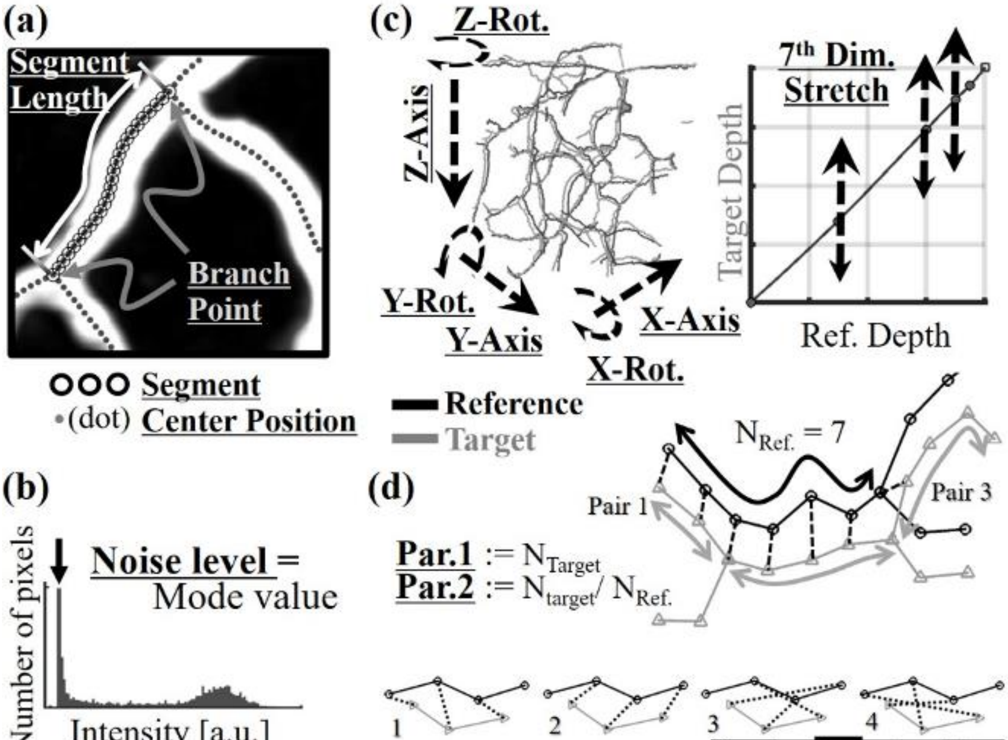
レーザーのスキャン方向を X 軸とし，光軸（Z 軸）と X 軸に垂直な軸を Y 軸とした．位置あわせのために X，Y，Z 軸周りにそれぞれ X，Y，および Z 軸を中心として回転させた（図 5.1c-左)．加えて Z 軸方向におけるターゲットの膨張と収縮を考慮した（図 5.1c-右)．

サポートベクターマシン（SVM）とガウスカーネル（動径基底関数：RBF）を備えた機械学習分類器(Kecman V. et al 2005 ; Christianini N et al,. 2000 ; Hastie T. et al., 2008)を使用し，さまざまな時間に撮影された 1,000 の血管セグメントを識別（0 日目の画像を参照し異なる日に測定されたかどうか）した．トレーニングデータとして，0 日目と他の日に撮像さ

れた同一のセグメントを追跡するために 1 つの代表的なボリュームデータを選択し，画像の各ペアの正しさを目視で判断し，合計 5807 ペアのセグメントを使用した．ペア候補は，0 日目のセグメントの中心位置の数に関して追跡される元のセグメントに最も近いセグメントを選択した．次に，SVM への入力パラメータとして次の 4 つのパラメータ（真のペアセグメント内の重複の数，0 日目のセグメントの中心位置の数に対する重複の比率，中心位置の数の差の最小標準偏差，およびそれらの差の平均値）を計算した．

以下，計算の手順を示す．まず参照セグメントの中心位置から最も近いターゲット中心位置を見つけ，その中心位置（Par.1）がターゲットセグメントの中心位置の数であるターゲットセグメントとペアを作成した．パラメータ 2(Par.2)は，参照セグメントの中心位置との比率とした（図 5.1d-上）．ペアである 2 つのセグメントの中心位置の数が異なる場合は，1 つずつ順番にシフトしたときの中心位置間の平均距離と標準偏差を計算した．ベクトルの方向性を考慮するために，中心位置の数が少ない順に変更し，平均距離と標準偏差を計算した．パラメータ 3(Par.3)は，得られた標準偏差の最小値とし，パラメータ 4(Par.4)は，パラメータ 3 の平均距離とした（図 5.1d-下）．

最後に，GUI を使用して各セグメントのデータを目視で確認した．血管および組織の体積に関して，すべての血管径の測定に基づいて 1 µm/ボクセルの分解能で 3 次元再構成した．



	1	2	3	4	···	n
Ave.	A_1	A_2	A_3	A_4	···	A_n
S.D.	S_1	S_2	S_3	S_4	···	S_n

図 5.1 血管ネットワークの追跡に使用したパラメータの定義

血管の中心位置は 2PLM 画像から（a）の灰色の点群とし取得した．次に分岐から分岐または終点までのセグメントを 1 セグメントとして定義した．セグメント内の位置は，いずれかの分岐点から最も近い順序で順番にラベル化した．解析点間のユークリッド距離の累積合計値をセグメント長（a，白い矢印線）として定義した．ノイズ値は，点（b）の Z 座標での XY 平面上での輝度ヒストグラムのモード値として定義した．ボリュームデータ間のずれを補正するために，以下の 7 軸を定義し目視で位置合わせを行った．X，Y，および Z 軸における平行移動とそれぞれの軸を中心とした回転である X，Y，Z-回転（c-左），Z 基準軸に対するターゲットの膨張と収縮（c-右）の 7 軸である．SVM に入力される 4 つのパラメータは，図の特定の例とともに定義した．参照セグメントの中心位置から最も近いターゲット中心位置を見つけ，その中心位置であるパラメーター1 がターゲットセグメントの中心位置の数であることを含むターゲットセグメントとペアを作成した．パラメータ 2 は，参照セグメント（d-upper）の中心位置との比率である．ペアになっている 2 つのセグメントの中心位置の数が異なる場合は，1 つずつ順番にシフトしたときの中心位置間の平均距離と標準偏差を計算した．ベクトルの方向性を考慮するために，中心位置の数が少ない順序を変更し，

平均距離と標準偏差を計算した．パラメータ 3 は，得られた標準偏差が最小値となる値とした．パラメータ 4 は，パラメータ 3 の平均距離である（d-下）．

血管の中心位置は，2PLM 画像から（a）の灰色の点群として解析される．分岐点が計算され，分岐から分岐または終点までをセグメントとして定義した．セグメント内の位置は，いずれかの分岐点から最も近い順序で順番にインデックス化され，ベクトル化した．ポイント間のユークリッド距離の累積合計は，セグメント長（a，白い矢印線）として定義した．ノイズは，点 (b) の Z 座標での XY 平面の輝度ヒストグラムのモード値として定義された．ボリュームデータ間のずれを補正するために，以下の 7 軸を定義し，目視による補正を行った． X，Y，Z-回転（c-左）は，それぞれ X，Y，および Z 軸を中心とした回転である．Z 基準軸に対するターゲットの膨張と収縮は，膨張と収縮としてそれぞれに定義された（c-右）．

5.3. 結果

同一血管の異なる時系列データによる血管群の識別に対して，トレーニングデータを用いた SVM 分類器で 5 fold Cross-Validation の結果 87%の精度が達成され，13%の不一致を示した．トレーニングデータを作成するために用意した 5807 ペアを目視で判別するのに約 6 時間かかったが，SVM を用いることで約 4000 から 5000 のセグメントで構成される画像間での同一血管の識別は計 30 分に短縮された．

2 PLSM による繰り返し撮像によって得られた同一の毛細血管セグメントを皮質深さ 0 ～500 µm にわたって毛細血管の直径の変化を，低酸素または高酸素に適応したマウス群に対して比較した（図 5.2）．その結果，酸素環境への適応が見られた 2 週間の間で，毛細血管の直径は低酸素で有意に増加（1.5 倍）し，高酸素では変化は認められなかった．低酸素適応において，毛細血管径の中央値は低酸素 0，7，14，および 21 日目において 5.8, 8.4, 9.0, および 8.4 µm（N = 1，n = 2193, 1231, 859，および 1094 セグメント）と増加し，高酸素下では 0，7，14，21，および 32 日目においてそれぞれ 5.4, 5.7, 5.4, 6.0 および 6.1 µm（N = 1，n = 1025, 593, 361, 294, 407 セグメント）となりほぼ一定値を示した．

さらに，組織領域に関する長期的な変化を両群で比較した．図 5.3 に示されるように，組織空間の最頻値は正常状態で約 13 μm であった．高酸素適応後，組織空間の検出可能な変化はみられなかったが，低酸素では組織空間のわずかな収縮（4 μm）が検出された．

2PLSM 血管造影画像の直径測定結果を使用して Matlab ボリュームマトリックス上で血管画像を 3 次元再構築し，各組織のボクセル位置における血管からの距離に関するヒストグラムを皮質の深さ 0～500 μm にわたる組織セグメント内のすべてのボクセルについて計算した．

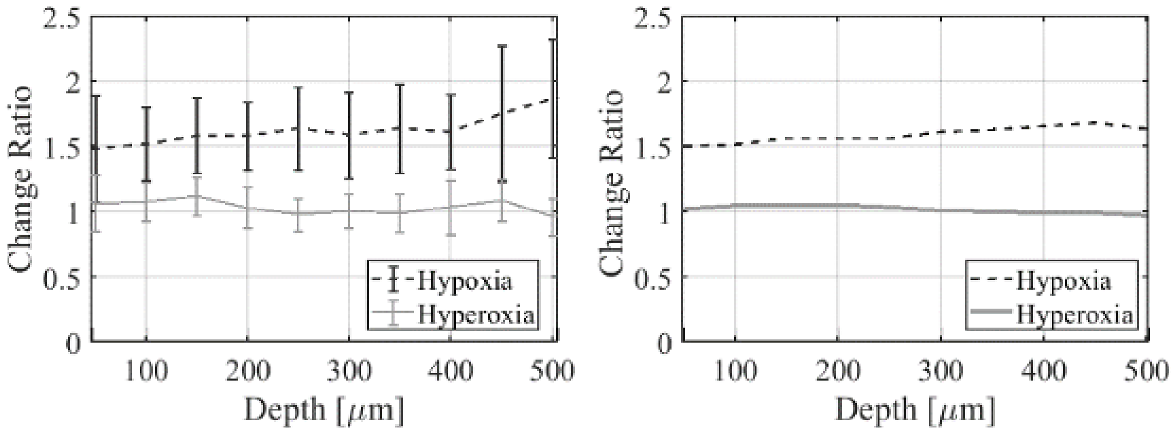


図 5.2　皮質深さ 0～500 μm での低酸素症（黒）と高酸素症（灰色）における毛細血管径の変化率に関する比較

左は 0 日目に対する 14 日目で測定された追跡セグメントの毛細血管径の相対的変化．右は 0 日目に対する 14 日目の変化率に関する中央値を示す．

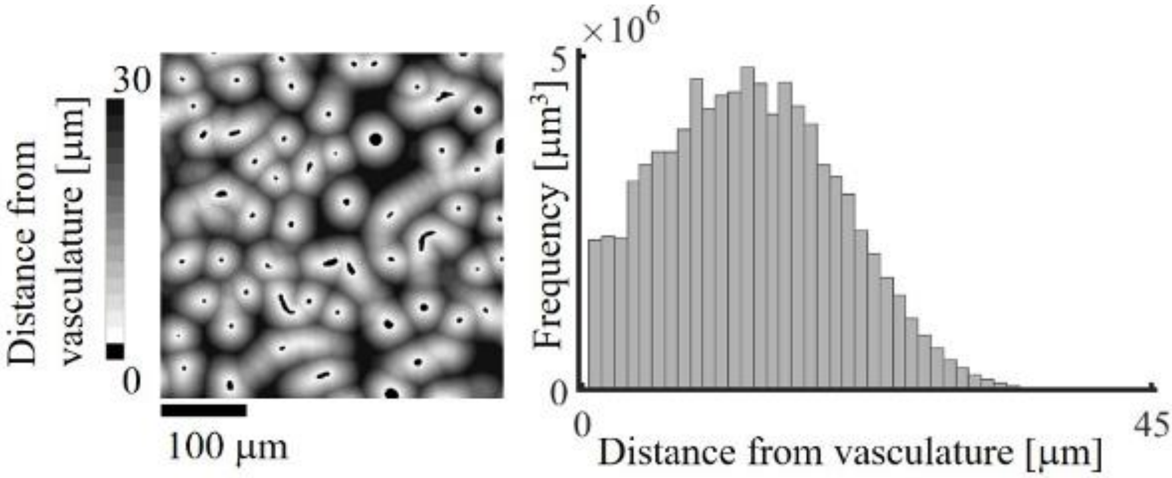


図 5.3　すべての組織ボクセルにおける血管からの距離分布

2PLSM 血管造影画像を用いた径解析の結果を使用して，Matlab ボリュームマトリックス上で血管径を再構築し，血管からの距離（左，1 スライス例）のヒストグラムを，皮質の深さ 0〜500 μm にわたる組織セグメント内のすべてのボクセルについて計算した（右）.

5.4. 考察

マウス大脳皮質の 3D 毛細血管ネットワークは，2PLSM による繰り返し計測で得られた時間方向のボリューム画像間での同一のセグメントを追跡し，さらに SVM を適用することで対象のセグメント毎に分析することが可能になった．目視での検査を支援し，大規模な 2PLSM 画像データの自動分析を容易にするために，本研究では Matlab ベースのビューアーソフトウェア（Matlab R2018b 以上）を開発した．

脳微小血管の低酸素曝露による血管径の拡張に関して，低酸素曝露前の血管径に対する低酸素曝露 2 週間後の変化率に関して有意な負の相関がみられた（図 5.4）．直径 8 μm 未満の毛細血管に関して，低酸素曝露前の血管径が小さいほど径が大きく拡張することが示された（$p=0.0013$）．これらの変化率は，計測のばらつきや安静時の血管径の揺らぎに比べて明らかに大きいことからも，短期間に変動する筋活動による径の機能的な変化とは異なり，長期間で形成される解剖的な構造変化であると考えられる．また低酸素曝露による血管ネットワークの変形は血流の増加に伴うせん断応力の増加によるリモデリングとも考えられる．しかし，血流の増加は低酸素曝露後一過性に生じることが知られているので，血管の変形と時間のフェーズが異なる．一方，低酸素曝露によって大脳皮質全体が徐々に収縮したので，時間的推移を考慮すると組織の変形によって見かけ上血管ネットワークが変形したと考えられる．実際に低酸素暴露で大脳皮質が収縮し，何が起こっているかは今回の *in vivo* の実験ではわかっていない．しかし血管が拡張した上で血流の増加により血管外への圧力が高くなっているかは，低酸素で脳圧が上昇する報告がないため定かではない．血管の形状が変わることで血流にどのような影響があるかについては，今後の検討課題である．予想として，低酸素暴露前に酸素濃度が低かった箇所において酸素がより届きやすくなっていると考えられる．これは血管の長さやねじれなどの形状情報を考慮し、血液の流れと組織への酸素輸送についてシミュレーションモデルを用いて比較することで新たな知見が得られる可能性がある．

技術的な考慮事項に関しては，現在の追跡アルゴリズムにはいくつかの未解決の問題がある．まず，本研究で用いた自動分類の手法は，トレーニングデータによって作成された分類器の精度に依存する．このため，分類器の精度をさらに向上させることが重要であり，そのために，大量のデータセットが必要である．第二に，組織領域と血管領域との間のユークリッド距離を使用し，時間方向の 2PLSM 画像から同一の毛細血管セグメントを追跡したため，提案法では撮像中の形態変化やモーションアーチファクトによる血管位置のずれが検出精度に大きく影響する．誤検出を抑えるために，前処理で目視による位置合わせが必要であり，それについての精度に関してさらなる評価も必要である．また CT 血管造影による肺血管の追跡アルゴリズム[Zhou, C. et al. 2012] では，ランドマークを使用した同一血管の追跡技術に組み合わせや DTW などのパラメータを追加することが重要である．

また本研究では 3 次元の細線化の過程で生じた偽血管が誤判定の要因になる．偽血管は主に SN が約 6 a.u.以下の画像に生じるが，ねじれの位置にある血管が深さ方向に伸びた場合にも生じる．現在の方法では 20 µm 以下の長さの分岐点から端点に伸びる偽血管は自動的に除去し，残りは目視により除去している．こうした偽血管を正確にかつ自動で除去することで血管構造のトラッキング精度がさらに向上すると考える．

これらの制限を克服するために，異なる画像セッションで同一である血管の空間的位置関係に影響されないパラメータを利用するのも一つの方法と考える．たとえば，穿通動脈または静脈の位置に基づいて割り当てる方法が考えられる．これは，血管の立体構造が長期において比較的安定に維持され，異なるセッション間での位置合わせの目印として使用できるためである．将来的には，提案法をさらに大規模な（1 mm^3 の立方体で撮像された血管造影画像）データの定量解析に適用し，大脳皮質の局所および大域での血流シミュレーションに実装することが期待される．

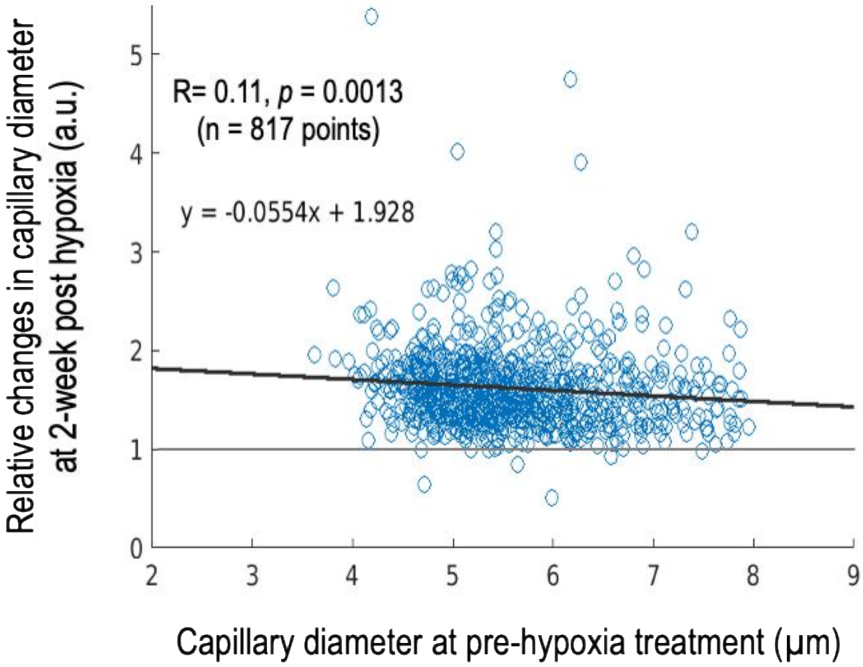


図 5.4 低酸素曝露前の毛細血管の径と曝露後の径の変化率に関する相関

低酸素曝露前の毛細血管径（8 μm 未満）に対する低酸素曝露後 2 週間における径の変化率を比較した．低酸素曝露前の血管径が小さいほど大きく拡張し，変化率と曝露前の血管径との間に統計的に有意な負の相関がみられた．

6. 結論

第３章では大きさ既知の蛍光ビーズを用いたファントムモデルを作成する事で，2PLSM の輝度拡がりを定量的に評価し，光軸方向への伸びが 3〜５μm であることを確かめた．第４章では光軸に垂直なラジアル方向に対する適切な閾値を局所の SNR に応じて補正することにより生体組織内での光学的特性の不均質性の影響を軽減する領域抽出法を提案した．その結果，本顕微鏡システムを用いた二光子イメージングでは取得画像の SNR が 4.2~10.6 [a.u.] の範囲であれば，従来の FWHM 法による二値化閾値の設定が可能であることを示した．さらに提案法によって抽出した血管画像データより 3 次元的に血管中心軸を決定し焦点面の２次元平面内で血管径を自動解析することで，光軸方向の伸びに影響されずに血管ネットワークの 3 次元画像再構成が可能であることを示した．その結果，従来不可能であった 1 mm^3 に約１〜２万本含まれる毛細血管ネットワークの定量解析が可能になると期待される．

以上の方法論に関する検討結果を踏まえて，第 5 章では，提案法を用いてさらに血管中心点群をベクトル情報として捉えることで 3 次元の体積画像に関する時系列変化を特徴付け，SVM を用いた自動判別によって異なる撮像日に取得した同一血管の追跡，すなわち４次元の変化を 84%の精度で追跡することができることを示した．

7.　今後の展望

生体画像を取り扱う上で，予期せぬ雑音（例えば低酸素負荷による組織の散乱増加など）や信号の欠如（例えば太さ約 40 μm 以上の表層血管による励起光減衰の影響など）は実験時と画像処理の両方で克服すべき課題であると考える．画像処理の観点からすれば現状局所的なコントラストの調整を行った上で扱うことのできる Deep Learning（Tahir, W. et al. 2020）を用いた血管領域の抽出精度の向上が課題である．これは低酸素曝露や高速撮像した画像に対して，空間解像度の低い血管画像を用いた学習を繰り返すことで精度の改善が可能であると考える．

また，血管の解剖学的特徴としての SA, PA, Cap, PA, SV などのクラス分けには，血管中心軸を抽出する際に生じるフェイク血管の除去が課題である．現状，目視で判別しているが，フェイク血管には形態的特徴があり，また大脳皮質の血管構造にもそれぞれのクラスに特徴があるため，今後自動化してそれぞれを識別できると期待される．

本研究の成果は全脳循環のシミュレーション分野で，従来得られなかったよりリアルな生体の脳微小血管構造が実装されることで，ミクロ領域での血液の流れがどのようにマクロの血流情報に伝播するのかについて新しい知見が得られることを期待する．ミクロ領域での赤血球を含む粒子が混合した懸濁液として血液の流れを計算することで，毛細血管の数が減少することが知られている慢性脳虚血やアルツハイマー病などの病態でのマクロ視点で血流の分布をシミュレーションし，臨床での病態の解釈に役立つことが期待される．このようなシミュレーションにはリアルな血管ネットワーク構造と血球の形状（変形を含む）を考慮すると，それらの計算コストは 1 立方ミリメートルあたりに毛細血管は 1 万 5 千から 2 万本存在し，一本一本の血管の長さの最頻値は 35 μm であるため，血球の大きさに相当する 4 μm ステップで 12 角形の多角形で血管を近似した場合 $1.6\text{~}2.1\times10^{6}$ の計算コストが必要と見積もられる．また 1 立方ミリメートルの空間範囲を対象とした血管構造の再構

成ができればメゾスコピック領域での解析が可能であると考える．インピーダンスや血管抵抗にパラメータを単純化して計算コストを下げる試みも必要だが，複雑に絡みあう血管ネットワークをサブミクロンの分解能で観察し，観察可能な最大の大きさで表現することで，１ネットワークの欠落がマクロの血流計測に及ぼす影響やそれが臨床で観察することが可能かを判断することができると考える．また健常と病態の判別を目的とした場合，脳虚血では毛細血管数の減少が観察されるため，解析最小単位は動脈から静脈のネットワークを観察できる 1 辺が 500 μm の立方体の領域になると予想される．これによって MRI でのサブミリメートルの空間分解能に相当した現象の比較が可能であると考える．低酸素実験の結果より病態時では健常時に比べて血管のねじれ度や曲率が変化すると考えられ，それらの形状変化を考慮した上でのマクロな血流量や血流分布について予想できれば臨床的にも有用であると考える．

これらミクロ領域での解析結果はマクロ領域においては 1 ボクセルの血流量に相当する．したがって細動脈や細静脈に入力または出力する血液量を計測しシミュレーション結果と比較することで，シミュレーションによって求めた血流量の予想制度について検証が可能である．また本研究では脳の体性感覚野における血管構造のみを対象としたが，脳虚血やアルツハイマー病などの脳微小血管全体で血管が脱落する病態ではマクロで計測された血液量の分布について、ミクロ領域でのネットワークの欠落と比較することで現象の解釈が可能になると考える．

謝辞

ご指導頂いた，主指導教員の正本和人先生，副指導教員の宮脇陽一先生，そしてデータ取得とデータ分析にご協力いただいた新澤智也さん，蜂谷亮太さん、武田寛史さん、結城浩弥さん，深澤稔さん、星川椋さん、山口大貴さん、吉原浩一さんに深く感謝する。

この研究は日本学術振興会特別研究員制度（JP201710551）の助成を受けたものである.

参考文献

１―４章

岩舘敏晴，牛島定信，大野裕，岡上和雄，金吉晴，堺俊明，薩美由貴，佐藤光源，染矢俊幸，高木俊介，中根允文，森山公夫, 1996. Schizophrenie の訳語の歴史. 精神神經學雜誌 = Psychiatr. Neurol. Jpn. 98, 239–244.

Al-Juboori, S.I., Dondzillo, A., Stubblefield, E.A., Felsen, G., Lei, T.C., Klug, A., 2013. Light scattering properties vary across different regions of the adult mouse brain. PLoS One 8, e67626. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067626

Blanca, C.M., Saloma, C., 1998. Monte carlo analysis of two-photon fluorescence imaging through a scattering medium. Appl. Opt. 37, 8092–102. https://doi.org/10.1364/ao.37.008092

Boorboor, S., Jadhav, Ananth, M., Talmage, D., Role, Kaufman, A., 2018. Visualization of Neuronal Structures in Wide-Field Microscopy Brain Images. IEEE Trans. Vis. Comput. Graph. 25, 1018–1028. https://doi.org/10.1109/TVCG.2018.2864852

Chaigneau, E., Oheim, M., Audinat, E., Charpak, S., 2003. Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 13081–13086. https://doi.org/10.1073/pnas.2133652100

Chaigneau, E., Wright, A.J., Poland, S.P., Girkin, J.M., Silver, R.A., 2011. Impact of wavefront distortion and scattering on 2-photon microscopy in mammalian brain tissue. Opt. Express 19, 22755. https://doi.org/10.1364/oe.19.022755

Charpak, S., Mertz, J., Beaurepaire, E., Moreaux, L., Delaney, K., 2001. Odor-evoked calcium signals in dendrites of rat mitral cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 1230–1234. https://doi.org/10.1073/pnas.021422798

Chinta, L. V, Lindvere, L., Dorr, A., Sahota, B., Sled, J.G., Stefanovic, B., 2012. Quantitative estimates of stimulation-induced perfusion response using two-photon fluorescence microscopy of cortical microvascular networks. Neuroimage 61, 517–24. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.04.009

Chinta, L. V, Lindvere, L., Stefanovic, B., 2012. Robust quantification of microvascular transit times via linear dynamical systems using two-photon fluorescence microscopy data. J. Cereb. Blood Flow Metab. 32, 1718. https://doi.org/10.1038/JCBFM.2012.86

Cormack, A.M., 1963. Representation of a function by its line integrals, with some radiological applications. J. Appl. Phys. 34, 2722–2727. https://doi.org/10.1063/1.1729798

Dao, L., Glancy, B., Lucotte, B., Chang, L.-C., Balaban, R.S., Hsu, L.-Y., 2015. A Model-based approach for microvasculature structure distortion correction in two-photon fluorescence microscopy images. J. Microsc. 260, 180–93. https://doi.org/10.1111/jmi.12281

Data-Franco, J., Singh, A., Popovic, D., Ashton, M., Berk, M., Vieta, E., Figueira, M.L., Dean, O.M., 2017. Beyond the therapeutic shackles of the monoamines: New mechanisms in bipolar disorder biology. Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry 72, 73–86. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.09.004

Denk, W., Strickler, J.H., Webb, W.W., 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. Science (80-.). 248, 73–76. https://doi.org/10.1126/science.2321027

Drew, P.J., Shih, A.Y., Driscoll, J.D., Knutsen, P.M., Blinder, P., Davalos, D., Akassoglou, K., Tsai, P.S., Kleinfeld, D., 2010. Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull. Nat. Methods 7, 981–4. https://doi.org/10.1038/nmeth.1530

Dunn, A.K., Wallace, V.P., Coleno, M., Berns, M.W., Tromberg, B.J., 2000. Influence of optical properties on two-photon fluorescence imaging in turbid samples. Appl. Opt. 39, 1194–201. https://doi.org/10.1364/ao.39.001194

Durham, D., Woolsey, T.A., 1985. Functional organization in cortical barrels of normal and vibrissae-damaged mice: a (3H) 2-deoxyglucose study. J. Comp. Neurol. 235, 97–110. https://doi.org/10.1002/cne.902350108

Duvernoy, H.M., Delon, S., Vannson, J.L., 1981. Cortical blood vessels of the human brain. Brain Res. Bull. 7, 519–579. https://doi.org/10.1016/0361-9230(81)90007-1

Gagnon, L., Sakadžić, S., Lesage, F., Musacchia, J.J., Lefebvre, J., Fang, Q., Yücel, M.A., Evans, K.C., Mandeville, E.T., Cohen-Adad, J., Polimeni, J.R., Yaseen, M.A., Lo, E.H., Greve, D.N., Buxton, R.B., Dale, A.M., Devor, A., Boas, D.A., 2015. Quantifying the Microvascular Origin of BOLD-fMRI from First Principles with Two-Photon Microscopy and an Oxygen-Sensitive Nanoprobe. J. Neurosci. 35, 3663. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3555-14.2015

Helmchen, F., Svoboda, K., Denk, W., Tank, D.W., 1999. In vivo dendritic calcium dynamics in deep-layer cortical pyramidal neurons. Nat. Neurosci. 2, 989–96. https://doi.org/10.1038/14788

Helmchen, F., Denk, W., 2005. Deep tissue two-photon microscopy. Nat. Methods. https://doi.org/10.1038/nmeth818

Honey, C.J., Thivierge, J.P., Sporns, O., 2010. Can structure predict function in the human brain? Neuroimage 52, 766–776. https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2010.01.071

Hounsfield, G.N., 1973. Computerized transverse axial scanning (tomography): I. Description of system. Br. J. Radiol. 46, 1016–1022. https://doi.org/10.1259/0007-1285-46-552-1016

Kanno, I., Masamoto, K., 2016. Bridging macroscopic and microscopic methods for the measurements of cerebral blood flow: Toward finding the determinants in maintaining the CBF homeostasis. Prog. Brain Res. 225, 77–97. https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.03.002

Kerschnitzki, M., Kollmannsberger, P., Burghammer, M., Duda, G.N., Weinkamer, R., Wagermaier, W., Fratzl, P., 2013. Architecture of the osteocyte network correlates with bone material quality. J. Bone Miner. Res. 28, 1837–1845. https://doi.org/10.1002/jbmr.1927

Kleinfeld, D., Mitra, P.P., Helmchen, F., Denk, W., 1998. Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 15741–15746. https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15741

Kobat, D., Horton, N.G., Xu, C., 2011. In vivo two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex. J. Biomed. Opt. 16, 106014. https://doi.org/10.1117/1.3646209

Kozai, T.D.Y., Marzullo, T.C., Hooi, F., Langhals, N.B., Majewska, A.K., Brown, E.B., Kipke, D.R., 2010. Reduction of neurovascular damage resulting from microelectrode insertion into the cerebral cortex using in vivo two-photon mapping. J. Neural Eng. 7, 046011. https://doi.org/10.1088/1741-2560/7/4/046011

Lecoq, J., Orlova, N., Grewe, B.F., 2019. Wide. Fast. Deep: Recent Advances in Multiphoton Microscopy of In Vivo Neuronal Activity. J. Neurosci. 39, 9042–9052. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1527-18.2019

Lee, T. C., Kashyap, R. L., & Chu, C. N., 1994. Building Skeleton Models via 3-D Medial Surface Axis Thinning Algorithms. CVGIP: Graphical Models and Image Processing, 56(6), 462–478. https://doi.org/10.1006/cgip.1994.1042

Lindvere, L., Janik, R., Dorr, A., Chartash, D., Sahota, B., Sled, J.G., Stefanovic, B., 2013. Cerebral microvascular network geometry changes in response to functional stimulation. Neuroimage 71, 248–59. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.01.011

Masamoto, K., Kurachi, T., Takizawa, N., Kobayashi, H., Tanishita, K., 2004. Successive depth variations in microvascular distribution of rat somatosensory cortex. Brain Res. 995, 66–75. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.09.055

Masamoto, K., Takuwa, H., Seki, C., Taniguchi, J., Itoh, Y., Tomita, Y., Toriumi, H., Unekawa, M., Kawaguchi, H., Ito, H., Suzuki, N., Kanno, I., 2014. Microvascular sprouting, extension, and creation of new capillary connections with adaptation of the neighboring astrocytes in adult mouse cortex under chronic hypoxia. J. Cereb. Blood Flow Metab. 34, 325–31. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.201

T, Matsuzaki, M, Oda, T, Kitasaka, Y, Hayashi., K, Misawa, K, Mori, 2015. Automated anatomical labeling of abdominal arteries and hepatic portal system extracted from abdominal CT volumes. Med. Image Anal. 20, 152–161. https://doi.org/10.1016/J.MEDIA.2014.11.002

Miller, D.R., Jarrett, J.W., Hassan, A.M., Dunn, A.K., 2017. Deep Tissue Imaging with Multiphoton Fluorescence Microscopy. Curr. Opin. Biomed. Eng. 4, 32–39. https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.09.004

Nagata, K., Yamazaki, T., Takano, D., Maeda, T., Fujimaki, Y., Nakase, T., Sato, Y., 2016. Cerebral circulation in aging. Ageing Res. Rev. 30, 49–60. https://doi.org/10.1016/J.ARR.2016.06.001

Narayanan, R.T., Udvary, D., Oberlaender, M., 2017. Cell Type-Specific Structural Organization of the Six Layers in Rat Barrel Cortex. Front. Neuroanat. 11, 91. https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00091

Masataka Okabe, K.I., 2002. Color Universal Design (CUD) / Colorblind Barrier Free [WWW Document]. URL https://jfly.uni-koeln.de/color/ (accessed 3.25.21).

Park, S.-H., Masamoto, K., Hendrich, K., Kanno, I., Kim, S.-G., 2008. Imaging brain vasculature with BOLD microscopy: MR detection limits determined by in vivo two-photon microscopy. Magn. Reson. Med. 59, 855–65. https://doi.org/10.1002/mrm.21573

Rayleigh, 1896. XV. On the theory of optical images, with special reference to the microscope . London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci. 42, 167–195. https://doi.org/10.1080/14786449608620902

Reyes-Puerta, V., Sun, J.-J., Kim, S., Kilb, W., Luhmann, H.J., 2015. Laminar and Columnar Structure of Sensory-Evoked Multineuronal Spike Sequences in Adult Rat Barrel Cortex In Vivo. Cereb. Cortex 25, 2001–21. https://doi.org/10.1093/cercor/bhu007

Sekiguchi, Y., Masamoto, K., Takuwa, H., Kawaguchi, H., Kanno, I., Ito, H., Tomita, Y., Itoh, Y., Suzuki, N., Sudo, R., Tanishita, K., 2013. Measuring the vascular diameter of brain surface and parenchymal arteries in awake mouse. Adv. Exp. Med. Biol. 789, 419–425. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7411-1_56

Shih, A.Y., Driscoll, J.D., Drew, P.J., Nishimura, N., Schaffer, C.B., Kleinfeld, D., 2012. Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. J. Cereb. Blood Flow Metab. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.196

Silvestro, M., Tessitore, A., Caiazzo, G., Clemente, F.S. di, Trojsi, F., Cirillo, M., Esposito, F., Tedeschi, G., Russo, A., 2021. Disconnectome of the migraine brain: a "connectopathy" model. J. Headache Pain 22, 102. https://doi.org/10.1186/S10194-021-01315-6

So, P.T.C., Dong, C.Y., Masters, B.R., 2003. Two-photon excitation fluorescence microscopy [WWW Document]. Biomed. Photonics Handb. https://doi.org/10.1201/b17290-16

Steinman, J., Koletar, M.M., Stefanovic, B., Sled, J.G., 2017. 3D morphological analysis of the mouse cerebral vasculature: Comparison of in vivo and ex vivo methods. PLoS One 12, e0186676. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186676

Sugashi, T., Yoshihara, K., Kawaguchi, H., Takuwa, H., Ito, H., Kanno, I., Yamada, Y., Masamoto, K., 2014. Automated image analysis for diameters and branching points of cerebral penetrating arteries and veins captured with two-photon microscopy. Adv. Exp. Med. Biol. 812, 209–215. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0620-8_28

Sun S, He M, Zhang Z, Wang W, Yang X, Kuang C, Liu X. Enhancing the axial resolution of two-photon imaging. Appl Opt. 2019 Jun 20;58(18):4892-4897. doi: 10.1364/AO.58.004892. PMID: 31503805.

Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D., Tank, D.W., 1997. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. Nature 385, 161–165. https://doi.org/10.1038/385161a0

Svoboda, K., Yasuda, R., 2006. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. Neuron 50, 823–39. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.05.019

Tahir, W., Kura, S., Zhu, J., Cheng, X., Damseh, R., Tadesse, F., Seibel, A., Lee, B.S., Lesage, F., Sakadžic, S., Boas, D.A., Tian, L., 2020. Anatomical modeling of brain vasculature in two-photon microscopy by generalizable deep learning. BME Frontieers 2020, 8620932, 12 pages. https://doi.org/10.34133/2020/8620932

Tran, C.H.T., Gordon, G.R., 2015. Astrocyte and microvascular imaging in awake animals using two-photon microscopy. Microcirculation 22, 219–27. https://doi.org/10.1111/micc.12188

Vérant, P., Serduc, R., Van Der Sanden, B., Rémy, C., Vial, J.C., 2007. A direct method for measuring mouse capillary cortical blood volume using multiphoton laser scanning microscopy. J. Cereb. Blood Flow Metab. 27, 1072–1081. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600415

Wang, M., Kim, M., Xia, F., Xu, C., 2019. Impact of the emission wavelengths on in vivo multiphoton imaging of mouse brains. Biomed. Opt. Express 10, 1905. https://doi.org/10.1364/boe.10.001905

Watanabe, N., Noda, Y., Nemoto, T., Iimura, K., Shimizu, T., Hotta, H., 2020. Cerebral artery dilation during transient ischemia is impaired by amyloid β deposition around the cerebral artery in Alzheimer's disease model mice. J. Physiol. Sci. 2020 701 70, 1–10. https://doi.org/10.1186/S12576-020-00785-8

Weber, J.R., Cuccia, D.J., Johnson, W.R., Bearman, G.H., Durkin, A.J., Hsu, M., Lin, A., Binder, D.K., Wilson, D., Tromberg, B.J., 2011. Multispectral imaging of tissue absorption and scattering using spatial frequency domain imaging and a computed-tomography imaging spectrometer. J. Biomed. Opt. 16, 011015. https://doi.org/10.1117/1.3528628

Wei, L., Chen, Z., Min, W., 2012. Stimulated emission reduced fluorescence microscopy: a concept for extending the fundamental depth limit of two-photon fluorescence imaging. Biomed. Opt. Express 3, 1465. https://doi.org/10.1364/boe.3.001465

Ye S, Yin Y, Yao J, Nie J, Song Y, Gao Y, Yu J, Li H, Fei P, Zheng W. Axial resolution improvement of two-photon microscopy by multi-frame reconstruction and adaptive optics. Biomed Opt Express. 2020 Oct 22;11(11):6634-6648. doi: 10.1364/BOE.409651. PMID: 33282513; PMCID: PMC7687969.

Yoshida, K., Nishidate, I., Ishizuka, T., Kawauchi, S., Sato, S., Sato, M., 2015. Multispectral imaging of absorption and scattering properties of in vivo exposed rat brain using a digital red-green-blue camera . J. Biomed. Opt. 20, 051026. https://doi.org/10.1117/1.jbo.20.5.051026

Yoshihara, K., Takuwa, H., Kanno, I., Okawa, S., Yamada, Y., Masamoto, K., 2013. 3D analysis of intracortical microvasculature during chronic hypoxia in mouse brains. Adv. Exp. Med. Biol. 765, 357–363. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4989-8_50

Zee, P. Van Der, 1992. Measurement and Modelling of the Optical Properties of Human Tissue in. Med. Phys. 19, 1–302.

５章

Christianini, N., and J. C. Shawe-Taylor. An Introduction to Support Vector Machines and Other Kernel-Based Learning Methods. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2000

Hastie, T., R. Tibshirani, and J. Friedman. The Elements of Statistical Learning, Second Edition. NY: Springer, 2008.

Kecman V., T. -M. Huang, and M. Vogt. “Iterative Single Data Algorithm for Training Kernel Machines from Huge Data Sets: Theory and Performance.” In Support Vector Machines: Theory and Applications. Edited by Lipo Wang, 255–274. Berlin: Spring-er-Verlag, 2005.

K. Masamoto, Y. Tomita, H. Toriumi, I. Aoki, M. Unekawa, H. Takuwa, Y. Itoh, N. Su-zuki, I. Kanno, Repeated longitudinal in vivo imaging of neuro-gliovascular unit at the peripheral boundary of ischemia in mouse cerebral cortex, Neuroscience, Vol. 212, pp. 190-200, 2012.

K. Yoshihara, H. Takuwa, I. Kanno, S. Okawa, Y. Yamada, K. Masamoto, 3D analysis of intracortical microvasculature during chronic hypoxia in mouse brains, Adv Exp Med Biol, Vol. 765, pp. 357-363, 2013.

K. Zilles, A. Wree, Cortex: Areal and laminar structure, In: the Rat Nervous System 2nd edition (G. Paxinos, Ed.), Acadmic Press: San Diego, pp. 649-685, 1995.

Sugashi T, Yoshihara K, Kawaguchi H, Takuwa H, Ito H, Kanno I, Yamada Y, Masamoto K., Automated image analysis for diameters and branching points of cere-bral penetrating arteries and veins captured with two-photon microscopy, Adv Exp Med Biol. Springer,812:209-215,2014

Y. Tomita, N. Kubis, Y. Calando, A. Tran Dinh, P. Méric, J. Seylaz, E. Pinard, Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia, J Cereb Blood Flow Metab, Vol. 25, No. 7, pp. 858-867, 2005.

Zhou, C., Chan, H.-P., Chughtai, A., Patel, S., Hadjiiski, L.M., Wei, J., Kazerooni, E.A., 2012. Automated coronary artery tree extraction in coronary CT angiography using a multiscale enhancement and dynamic balloon tracking (MSCAR-DBT) method. Comput. Med. Imaging Graph. 36, 1. https://doi.org/10.1016/J.COMPMEDIMAG.2011.04.001

７章

Tahir, W., Kura, S., Zhu, J., Cheng, X., Damseh, R., Tadesse, F., Seibel, A., Lee, B.S., Lesage, F., Sakadžić, S., Boas, D.A., Tian, L., 2020. Anatomical modeling of brain vasculature in two-photon microscopy by generalizable deep learning. bioRxiv 2020. https://doi.org/10.1101/2020.08.09.243394

本研究に関する発表

関連論文の印刷公表の方法及び時期

（１）Sugashi T, Niizawa T, Suzuki H, Takuwa H, Unekawa M, Tomita Y, Kanno I, Masamoto K.
論文題目「Time series tracking of cerebral microvascular adaptation to hypoxia and hyperoxia imaged with repeated in vivo two-photon microscopy.」
2021 年 5 月，Adv Exp Med Biol. 1269: 323-327.（本文との関連，第 5 章）

（２）Sugashi T, Yuki H, Niizawa T, Takuwa H, Kanno I, Masamoto K.
論文題目「Three-dimensional microvascular network reconstruction from in vivo images with adaptation of the regional inhomogeneity in the signal-to-noise ratio.」
2021 年 5 月（オンラインは 2021 年 3 月），Microcirculation. e12697. (12 pages).（本文との関連，第 3，4 章）

参考論文の印刷公表の方法及び時期

（1） Sugashi T, Yoshihara K, Kawaguchi H, Takuwa H, Ito H, Kanno I, Yamada Y, Masamoto K.
論文題目「Automated image analysis for diameters and branching points of cerebral penetrating arteries and veins captured with two-photon microscopy.」
2014 年 3 月，Adv Exp Med Biol. 812: 209-215.

（2）Niizawa T, Hachiya R, Sugashi T, Terao S, Nagai M, Ishikawa M, Masamoto K.
論文題目「Mapping of flow velocity using spatiotemporal changes in time-intensity curves from indocyanine green videoangiography.」
2021 年 2 月，Microcirculation. 28(4): e12685. (11 pages)

（３）Suzuki H, Sugashi T, Takeda H, Takuwa H, Kanno I, Masamoto K.
論文題目「Error evaluation for automated diameter measurements of cerebral capillaries captured with two-photon laser scanning fluorescence microscopy.」
2021 年 5 月，Adv Exp Med Biol. 1269: 241-245.

著者略歴

学　　　歴

平成 24 年 3 月 31 日　　電気通信大学　電気通信学部　知能機械工学科　卒業
平成 24 年 4 月 1 日　　電気通信大学　情報理工学研究科　知能機械工学専攻
修士課程入学
平成 26 年 3 月 31 日　　同上修了
平成 28 年 10 月 1 日　　電気通信大学　情報理工学研究科　機械知能システム学専攻
博士課程入学
令和 3 年 3 月 31 日　　同上単位修得のうえ退学

職　　　歴

平成 26 年 4 月 1 日　　日立オートモティブシステムズ株式会社　入社
平成 28 年 6 月 31 日　　同社退職
令和 3 年 4 月 1 日　　電気通信大学　脳・医工学研究センター　非常勤研究員
現在に至る