

## VoxBlastによるX線マイクロCT断層像の

### 三次元再構築と解析

—卵巣摘出マウスの腰椎に対するラロキシフェンの効果について—

齋藤 勇 松渕志帆<sup>1)</sup> 浜田節男<sup>1)</sup>

## 3-D Reconstruction and Analysis of X-ray Micro-CT Images

by Using VoxBlast Software

—The Effect of Raloxifene on the Lumbar Vertebrae in Ovariectomized Mice—

Isamu SAITO, Shiho MATSUBUCHI<sup>1)</sup> and Setsuo HAMADA<sup>1)</sup>

To evaluate the skeletal efficacy of raloxifene on the osteoporosis in ovariectomized mice model, the sixth lumbar vertebrae was scanned by X-ray micro-CT, and these resulting 8-bit gray-scale images were analyzed by using commercial three-dimensional (3-D) reconstruction software (VoxBlast™ Mac, VayTek, Inc., USA).

In this paper, it is described how to use VoxBlast software practically for processing sequential datasets from CT scanners.

Furthermore, we demonstrate in 3-D visualization that new trabecular bones build compact bridge constructions in the lumbar vertebrae after the treatment with raloxifene.

Key words : VoxBlast, 3-D reconstruction, image analysis, raloxifene, ovariectomized mice

### はじめに

X線CT装置は、生体あるいは物体の非破壊検査が迅速に行える機器として、工業や医療など様々な現場で頻用されている。近年、ミクロンオーダーの空間分解能を有するX線マイクロCTスキャナーが開発され、小動物の組織・器官などを高分解能で観察することが可能になってきた<sup>1,2)</sup>。

本研究は、椎骨骨梁の変化を指標とした卵巣摘出マウスに対するラロキシフェンの効果を検証する目的で、X線マイクロCTスキャナーで撮影し

たマウス腰椎の断層写真を三次元再構築ソフトウェアVoxBlastで解析し、併せてその手技を検討したものである。

### 材料および方法

#### 1. 実験材料

ICR雌性マウスを12週齢で卵巣摘出し、17週齢から25週齢までの間、ラロキシフェンraloxifene (1.0mg/kg) あるいは溶媒 (cone oil) を週5回経口投与したマウスの腰椎を実験に供した。

受付：平成19年8月7日，受理：平成19年10月17日  
奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座口腔微細構造学分野  
奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座歯科薬理学分野<sup>1)</sup>

Division of Oral Fine Structure and Dental Pharmacology<sup>1)</sup>  
Department of Oral Medical Science, Ohu University School of Dentistry

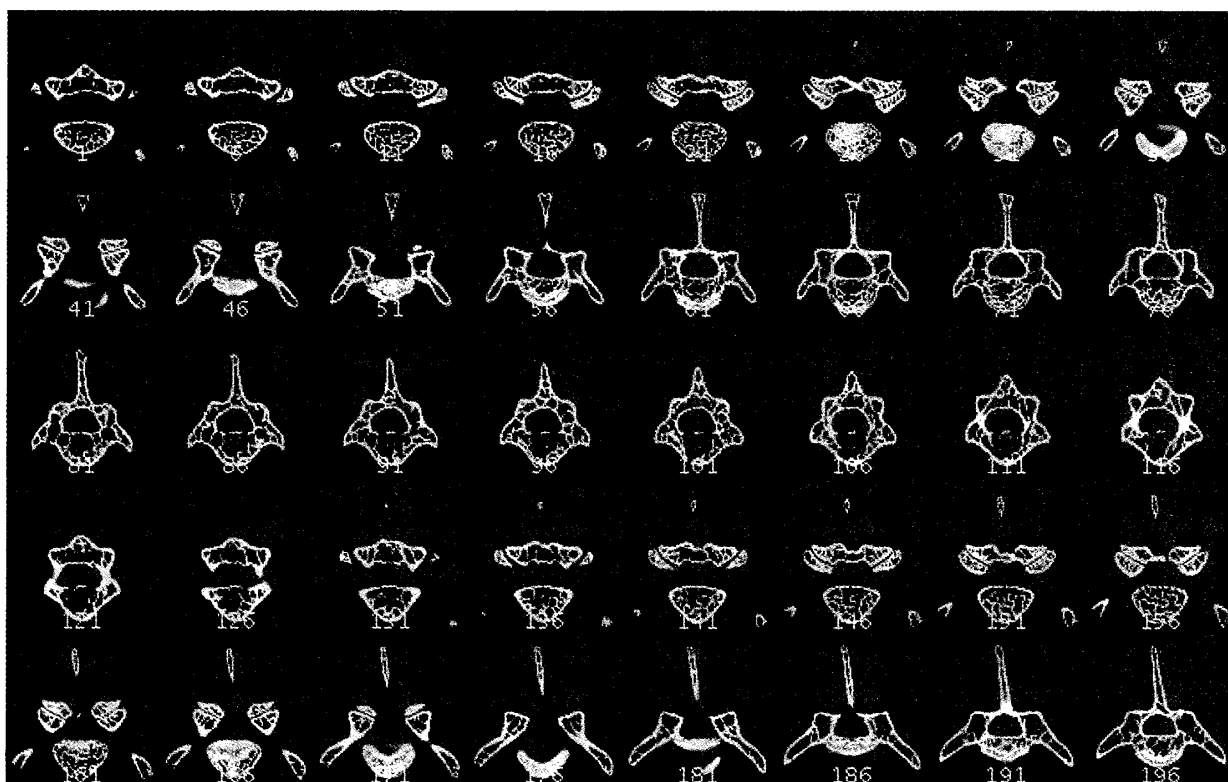


図1 X線CT断層像

第6腰椎を中心として得られた連続200スライスの軸位断層写真を5枚ごとに並べたモンタージュ像。

## 2. 解析方法

### 1) X線CT断層写真の前処理

- ① Stack: スタック化
- ② Rotation: 回転角度の調整
- ③ Trimming: 不要部分の削除

### 2) VoxBlastによる解析方法

- ① データセットの読み込み: 定義ファイルの作成
- ② 3D像の作成
  - ・視点変更: 観察する角度の調整
  - ・透視パレットの設定: 標的物を透かしてみせるための調整
  - ・照明モデルの調整: 照明の角度・方向・強度の調整
  - ・レンダリング実行: 3D像の作成
- ③ 直交座標での切り出し: 直交する任意の軸でカットした断面像の表示
- ④ カッティングプレーンの表示: 2つの面に異なったLUT/透視度を設定

⑤ ムービーファイルの作成: 任意の方向に回転させた像をムービーとして作成

⑥ 自動ボリューム計測: カラー識別化させた部分の体積を自動計測

## 3. 使用機器

### 1) X線CT装置

福島県ハイテクプラザ所有のマイクロフォーカスX線CT装置(最小焦点 $4\mu\text{m}$ , X線管30~225kV, SMX-225CT-SV3 特型, 島津製作所)で, マウス第6腰椎の軸位断層写真(200スライス,  $380 \times 380$  pixel, 8bit TIFF)を撮影した。撮影条件は, X線管電圧80kV, 電流 $50\mu\text{A}$ , SID 800mm, SOD 60mm, ピクセル当量長 $18.8\mu\text{m}/\text{pixel}$ , スライス厚さ $27.0\mu\text{m}$ であった。

### 2) 画像解析ソフトウェア

CT断層写真の解析用ソフトウェアには, 奥羽大学電子顕微鏡研究施設所有のVoxBlast™ for Mac/v2.2J(輸入販売元; 株式会社ソリューションシステムズ, VayTek Inc.), NIH Image/v

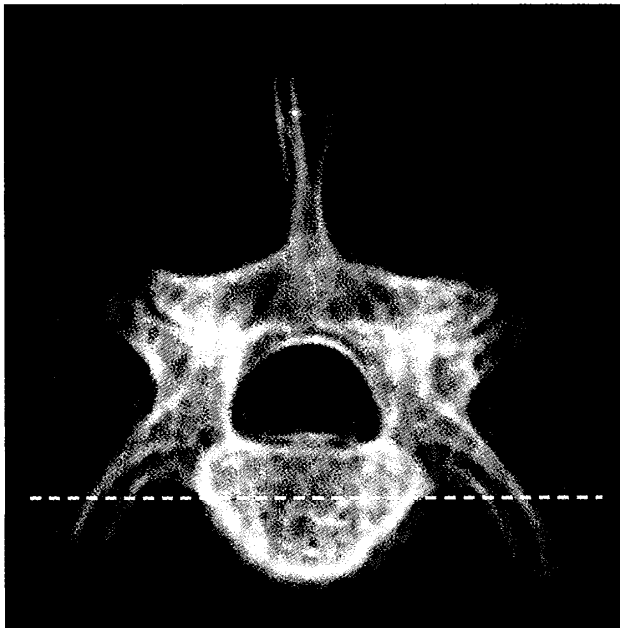


図2 NIH Image "Average" 像  
200スライスの軸位断面像を NIH Image で "Stack"  
化し, "Average" とした像。

1.63 (NIH) あるいは ImageJ/v1.37 (NIH) を使用した。

### 3) コンピューター

画像解析用のコンピューターには, 奥羽大学電子顕微鏡研究施設所有のPower Macintosh 9600/350 (MacOS 9.2, Apple Inc.) を使用した。

## 結 果

### 1. 画像の前処理

第6腰椎を中心として軸位断で得られた連続200スライスのX線CT断層写真(図1)を, NIH ImageあるいはImageJ<sup>3)</sup>で読み込み, "Stack"化したのち, 腹側から観察した像とするために "Rotation" を施して角度を調整し, さらに "Trimming" で不要な部分を削除した。

NIH Imageの "Average" でスタックの画像を平均化して合成した像においては, 第5~7腰椎の棘突起や関節突起が重なり合って観察され, 細部の構造が不明瞭となった(図2)。また, 軸位断面と直交する座標における "Reslice" を施して冠状断面でのスライス像を作成し(図3, 上段), 同一部位をVoxBlastで三次元再構築した像(図3, 下段)と比較した。VoxBlastの3D像におい

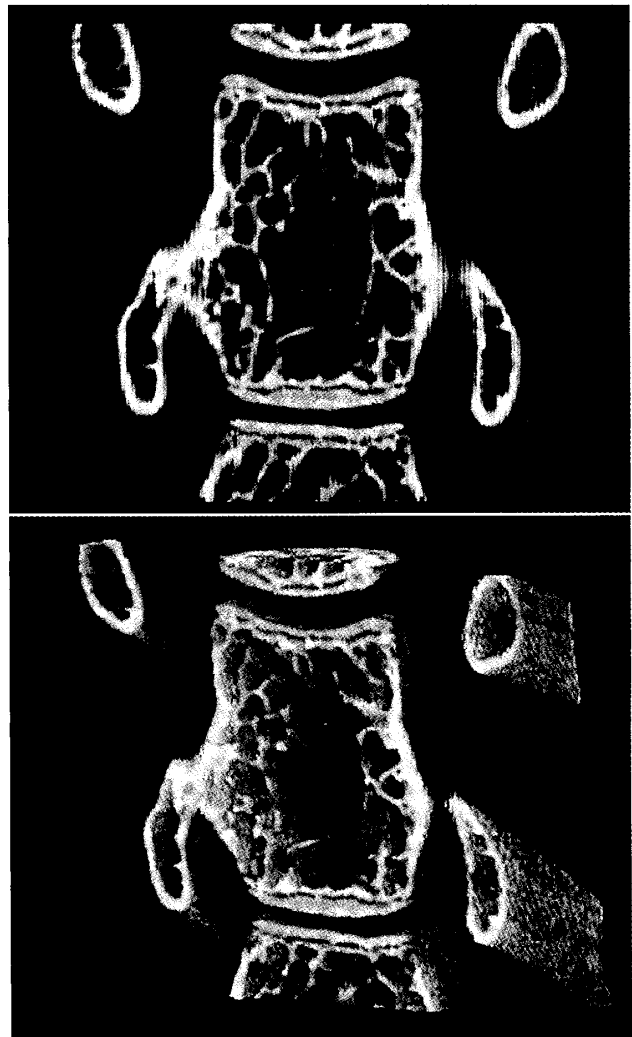


図3 2D/3D像  
図2の白い破線部において NIH Image で "Reslice"  
した2D像(上段)とVoxBlastで立体再構築した同  
部位の3D像(下段)。

ては, 椎骨や横突起内の立体構造を確認することが可能となり, 視覚的情報量を格段に向上させることができた。

### 2. VoxBlastの解析手技

#### 1) データセットの読み込み

はじめにVoxBlastを起動させて, データセット(200スライスをスタック化したファイル)を読み込むための定義ファイルを新規作成した(図4)。本例ではこのダイアログに, テンプレート名はStack2.tif, エンドスライス番号は200, 単位はmicron, データタイプはTIFF, XY画素分解能は18.8230  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , Z方向間隔は27.0  $\mu\text{m}$ と記入した。

図4 定義ファイルの設定ダイアログ

読み込みに必要なテンプレート名、ファイルの枚数や大きさの較正值、データタイプなどを記入する。

なお、TIFF (Tagged Image File Format) ファイルの場合は、画素数、ライン数、ヘッダーなどの項目を記入する必要性が生じなかった。

## 2) 3D像の作成と透視パレット

実際にデータセットを読み込ませて、モニター画面にムービー関連以外のウィンドウを全て表示させた(図5)。左上がメインのコントロールウィンドウで、ワイヤーフレームを動かして視点の変更やレンダリングの品質、スピードやモードの切替えなどを行う。画面中央にはレンダリングされた"3D Image"と断面像の"2D Image"が表示された。その他には、照明調節の"Lightning Model"、ヒストグラムや直線上のプロファイル表示の"Plots"、計測の"Measurements"、ボリューム計測の"Autosegment"、二次元カットプレーン調節の"2D Image Control"、カラーパレットと透視度の設定"Palette Editor"などが表示された。

3D像を作成するとき最も重要な設定項目は、透視度の調整を行う"Palette Editor"であった(図6, 左)。透視度(黒矢印の線)を調整しない場合は、目標物となる椎骨が暗いベールに埋もれて、全体像を観察することができなかつた(図6, 右)。

"Palette Editor"には左右のテーブルに分かれて同じ設定項目が存在する。本例では、右テーブル"Edit"の"Alpha"のみにチェックをいれてグラフ上の線(黒矢印)を調整することで、透視度が変化して椎骨全体が浮き出てみえるようになり(図7-a,b,c)、さらに透視度を調整すると、骨の内部が透けてみえるような透過像が得られた(図7-d)。

透視度調整のポイントは、原図の濃度分布を示す曲線(図6, 白抜き矢印)と"Alpha"線(図7, 黒矢印)とが、どの位置で交差(図7, 破線の円)するように設定されるかであった。そこで実際には、レンダリング結果を確認しながら最適な設定を探さなければならなかつた。

## 3) ムービーファイルの作成

透視度を調整して椎骨全体が観察できるようになった3D像を、水平に360°回転させるムービーファイルを作成し、角度60°ごとの各コマを配したモンタージュ像とした(図8)。各視点から椎骨を観察できるようになり、骨表面に開口する栄養孔の位置、関節突起の重なり具合及び突起の形状などを明らかにすることができた。

## 4) 直交座標での切り出し

X-Y-Z軸それぞれの直交座標において、任意の位置でボリュームをカットすることができる。その設定ダイアログ(図9)と、実際に正中矢状断でレンダリングされた3D像をムービーに作成し、モンタージュ像とした(図10)。切断像をさまざまな角度から観察すると、骨梁の架橋状態や椎孔面側に開口する大きな栄養孔の存在などを確認することができた。

## 5) カuttingプレーンの表示

任意の面にCuttingプレーンを作成して、両面に別々のLUT/透視度を設定することができる。ここでは左右の透視パレットを使用して、右半分は「青色」で透視度はやや低く、左半分は「緑色」で透視度が高くなるように設定した(図11, 上段)。さらに、直交座標の切り出しパレットを使用し、冠状断あるいは正中矢状断にカットして椎体内部を観察した(図11, 下段)。

## 6) カラーパレットの適用

予め用意された15種類のカラーサンプルがあり、

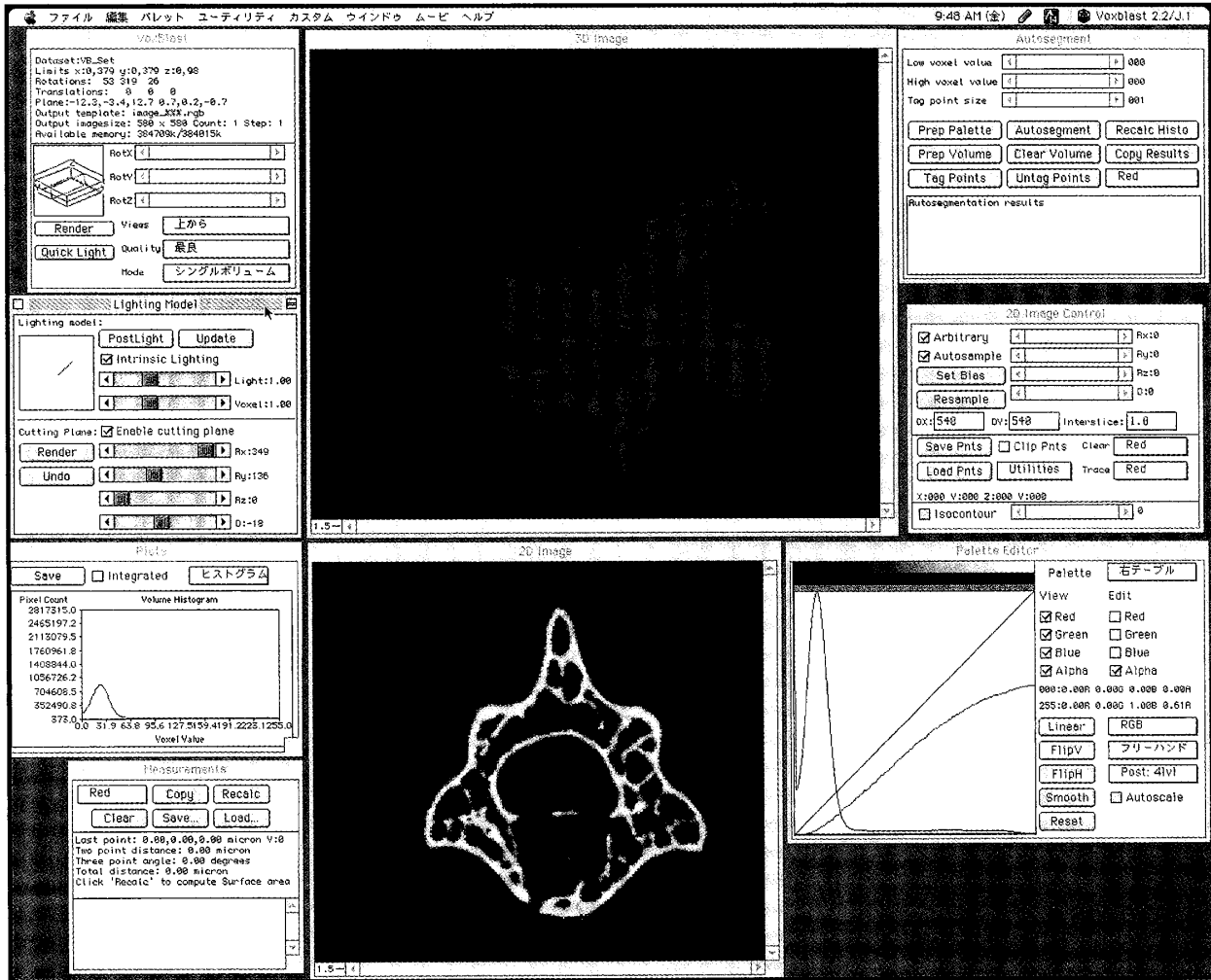


図5 VoxBlastの各種ウィンドー表示  
画面中央上に "3D Image" と "2D Image" が表示され、周囲に各種設定ウィンドーが配される。

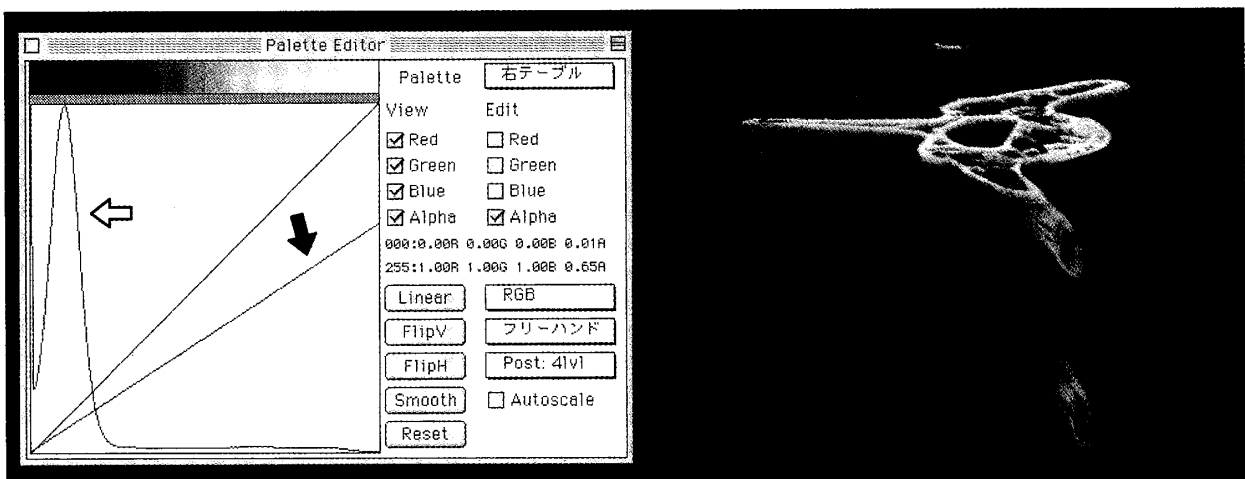


図6 透視パレットと3D像  
透視度を調整しない場合は、腰椎はボールに埋もれて全体像が観察できない。白抜き矢印：原図の濃度分布曲線，黒矢印：Alpha線。

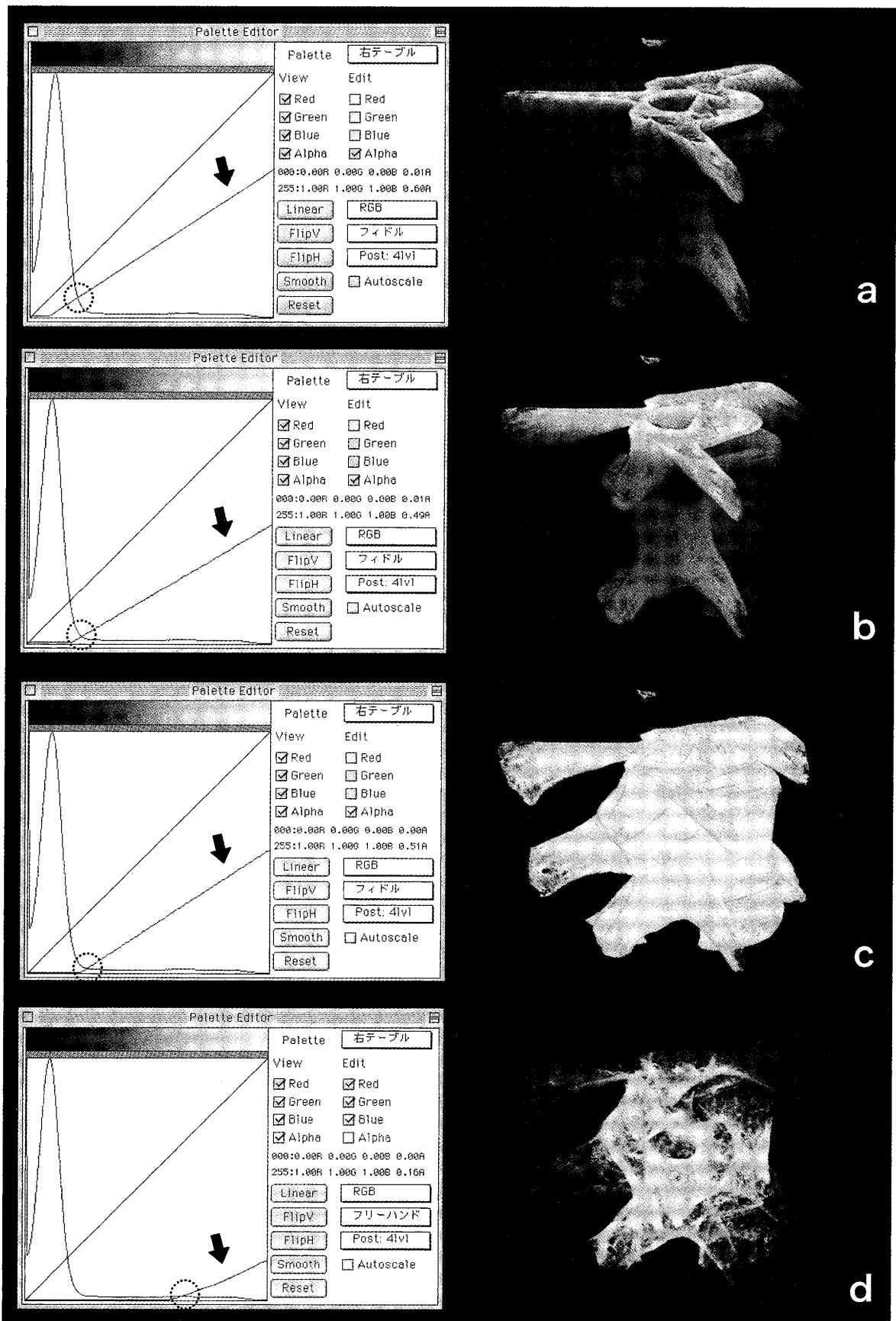


図7 透視度調整と3D像の変化

透視パレット/右テーブルのAlpha線(黒矢印)を編集し、透視度を変更することにより骨の全体像(c)や透過像(d)が得られる。破線の円は設定ポイントとなる交差位置を示す。

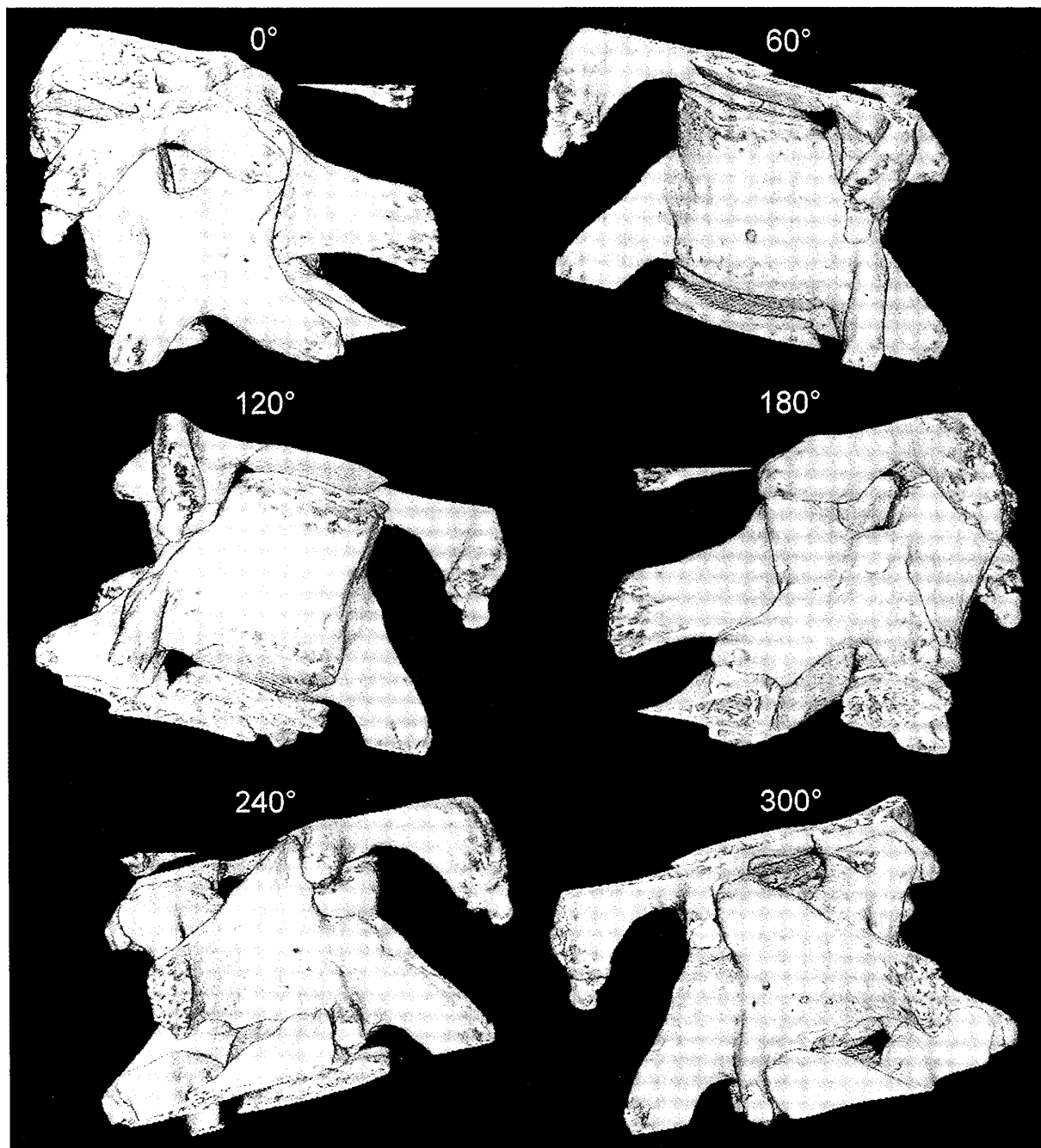


図8 全体像のムービー作成  
水平に1回転させたムービーから、角度60°ごとの各コマを配したモンタージュ像。

本例では "Blue-Red-Yellow" という設定を適用した。椎骨表面の最も明度の高い部分は「黄色」に、骨内部のやや明度の低い部分は「朱色」に、最も暗い背景部分は「青色」に表示された(図12)。

#### 7) 自動ボリューム計測

VoxBlastには、2D像上では面積や周囲長など、3D像上では体積などを自動で計測する機能が備

えられている。第6腰椎のみをカラー(緑色)指定して識別させ(図13)、その体積を自動計測させた。その結果は $10.74\text{mm}^3$ であった。しかしながら、皮質骨と骨梁との間に明瞭な濃度差がなかったため、骨梁のみの自動計測はできなかった。

#### 3. 卵巣摘出マウス腰椎の解析

ラロキシフェン投与群(Ral)と溶媒を投与し

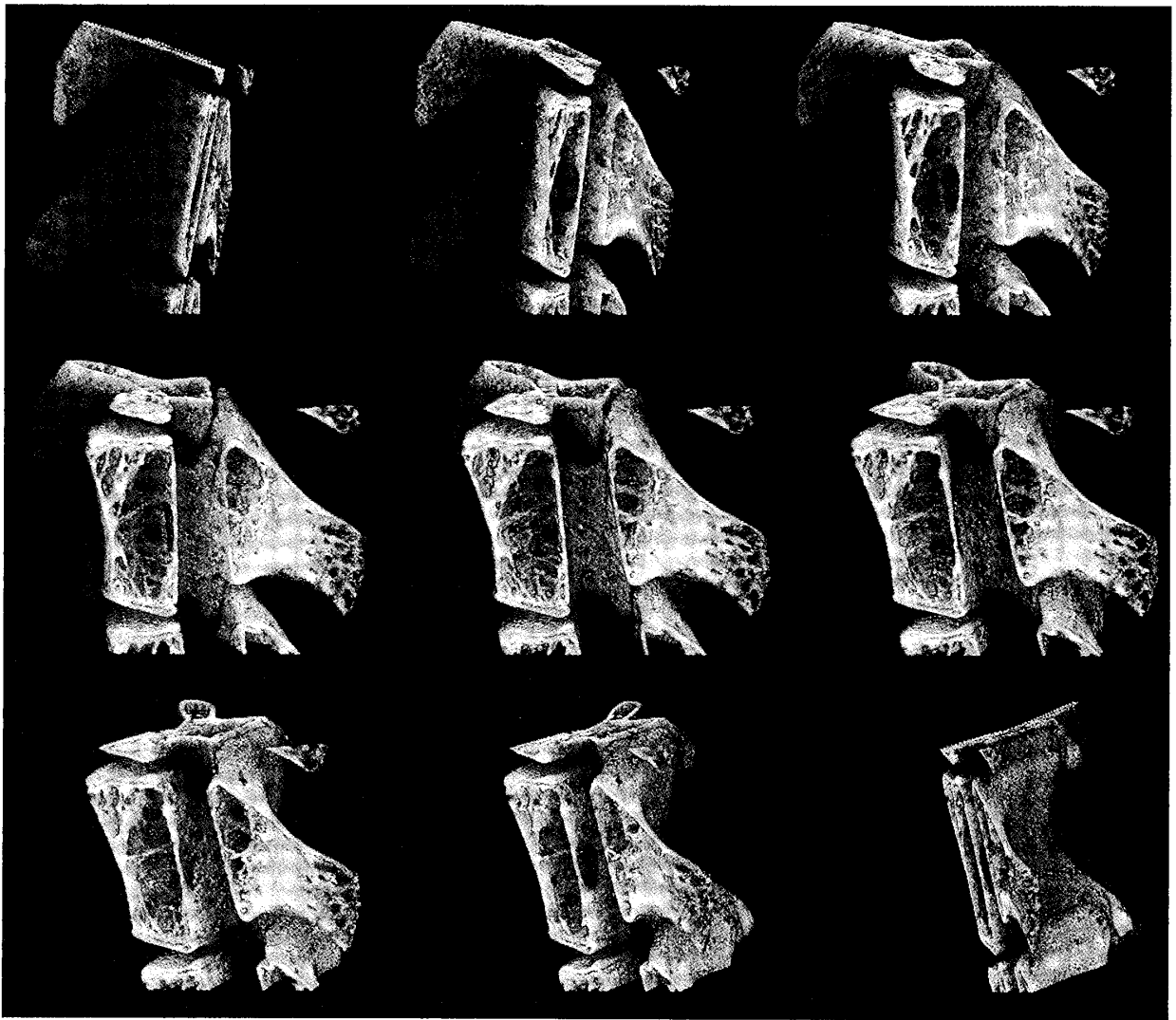


図10 正中矢状断面像のムービー作成

正中矢状断面像を水平に180°回転させたムービーの各コマを配したモンタージュ像。骨梁の架橋状態や椎孔面側に開口する大きな栄養孔などが確認できる。

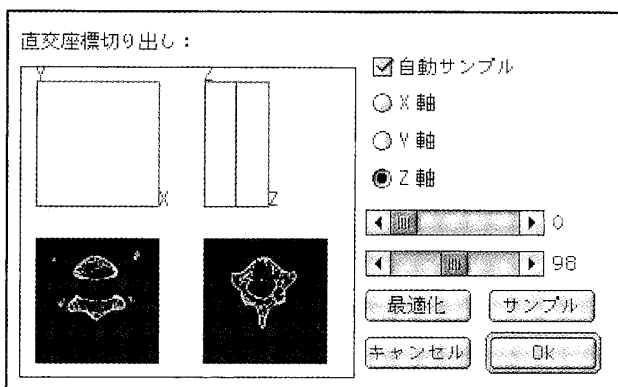


図9 直交座標の切り出しダイアログ

X-Y-Z軸それぞれについて任意の面で断面像を再構築できる。

た対照群 (Veh) の腰椎を比較してみると, NIH Imageによる矢状断の2D像においては, 椎体内部及び突起内部を水平に走る細かな骨梁が, ラロキシフェン投与群では多く, 対照群では少ないことが明らかになった (図14)。

VoxBlastによる3D像を観察すると, 冠状断においては椎体内部の髓腔部分がラロキシフェン投与群では狭くなっており, 対照群では広く大きく開いているのが確認された。一方, 正中矢状断においては, 椎体内部及び突起内部を水平に走る細かな骨梁がラロキシフェン投与群では多く, 対照群では少なかった (図15)。また, 椎骨内部を垂直ないし斜めに走る骨梁は, ラロキシフェン投与



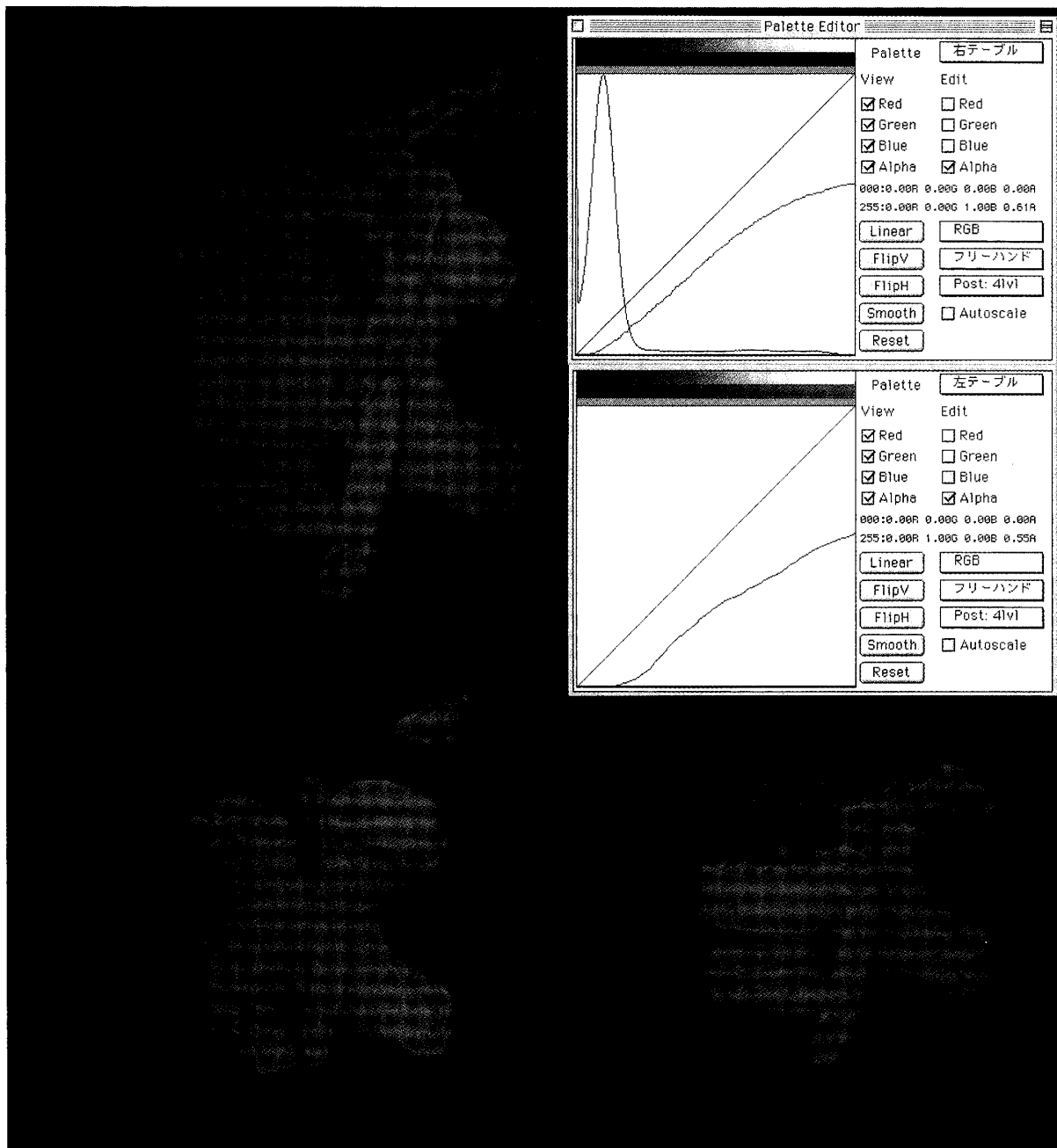


図11 カットングプレーン設定と直交座標での切り出し  
 左右テーブルに異なる透視度及びカラーを設定した像と設定パレット（上段）。直交座標で冠状断（下段左）と軸位断（下段右）に切り出した像。

群では密な架橋構造を形成していたが、対照群ではすう疎となっていた。

### 考 察

VoxBlastは三次元空間に分布するボクセルデータを元にして、ボリュームレンダリングすなわち三次元再構築像を作成し、表面ばかりではな

く内部構造を可視化することのできるソフトウェアである<sup>4)</sup>。本学には、電子顕微鏡研究施設のNikon共焦点レーザー顕微鏡の画像解析用に導入されたものであるが、画素数が同数の連続した画像を取り込み立体構築処理ができることから、X線CT断層像や病理組織標本の連続切片などを解析するためにも利用されている。

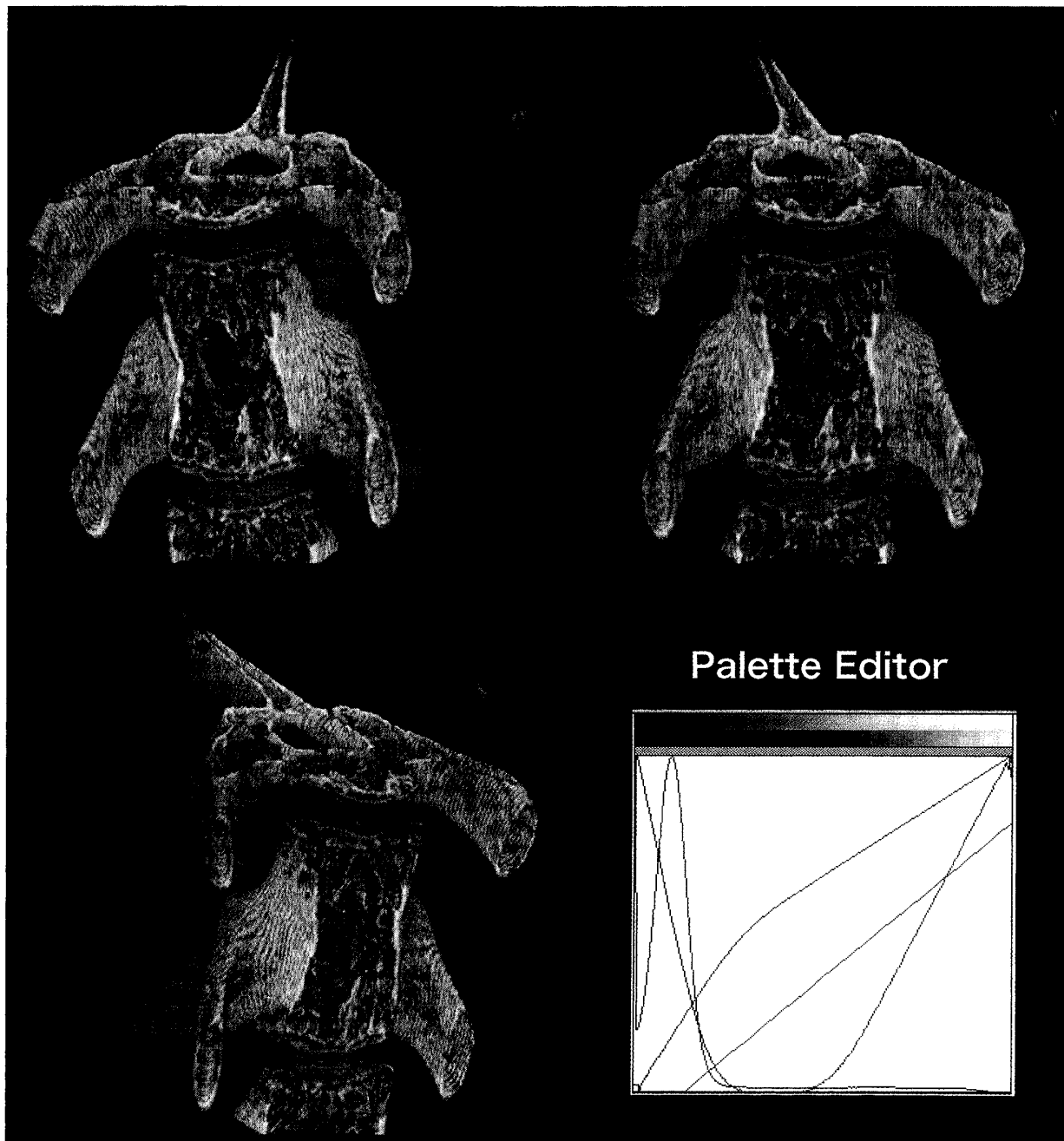


図12 カラーパレットの適用

予め用意されたサンプルのカラー "Blue-Red-Yellow" をムービーに適用した像。右下はそのカラーパレットの設定状況。

本ソフトウェアには、視覚的情報量を高めるためのプログラムや形態計測のための機能も備えられている。その一つはカラーパレットである。"Blue-Red-Yellow" という設定で「黄色」に表示された最も明度の高い部分は「骨皮質」に、「朱色」に表示された明度がやや低い部分は「骨梁」などに相当すると思われ、明度ばかりではな

く色の違いで目標物を識別しやすくすることができる。しかしながら、正確に骨梁のみを識別できるわけではないので、ボリューム計測に適用できる程の精度は得られない。

二つめは、任意の面に異なるLUT/透視度を与えることができるカッティングプレーンである。回転させると色と透視部位が変化するために視覚

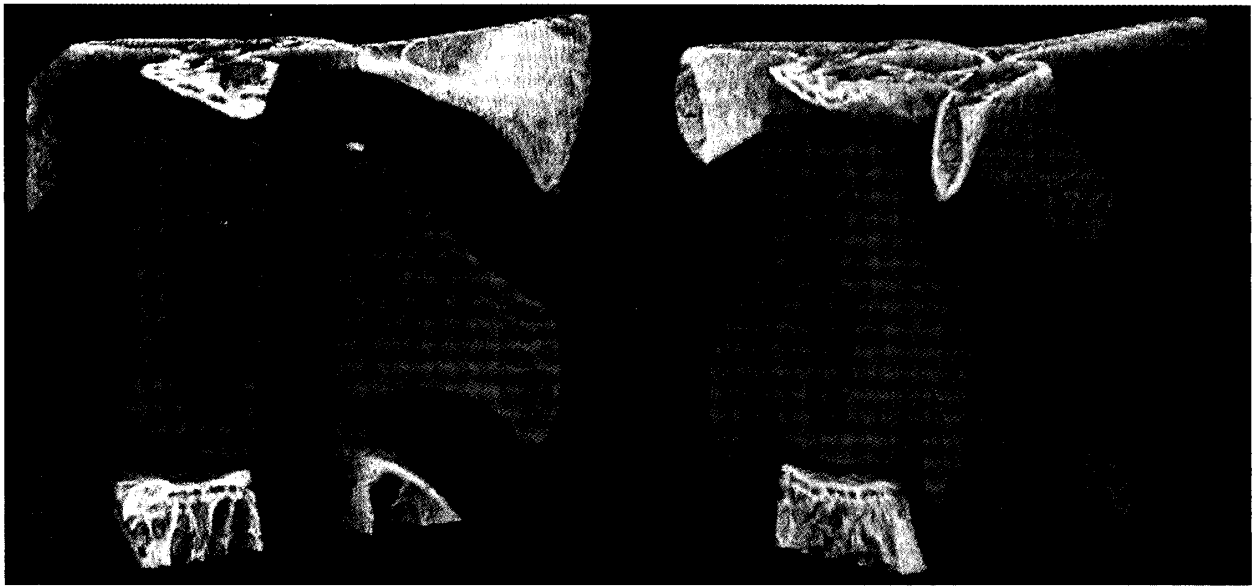


図13 目標物のカラー識別化  
体積測定のために第6腰椎のみを別カラー（緑色）で識別した像。皮質骨と骨梁との区別はできない。

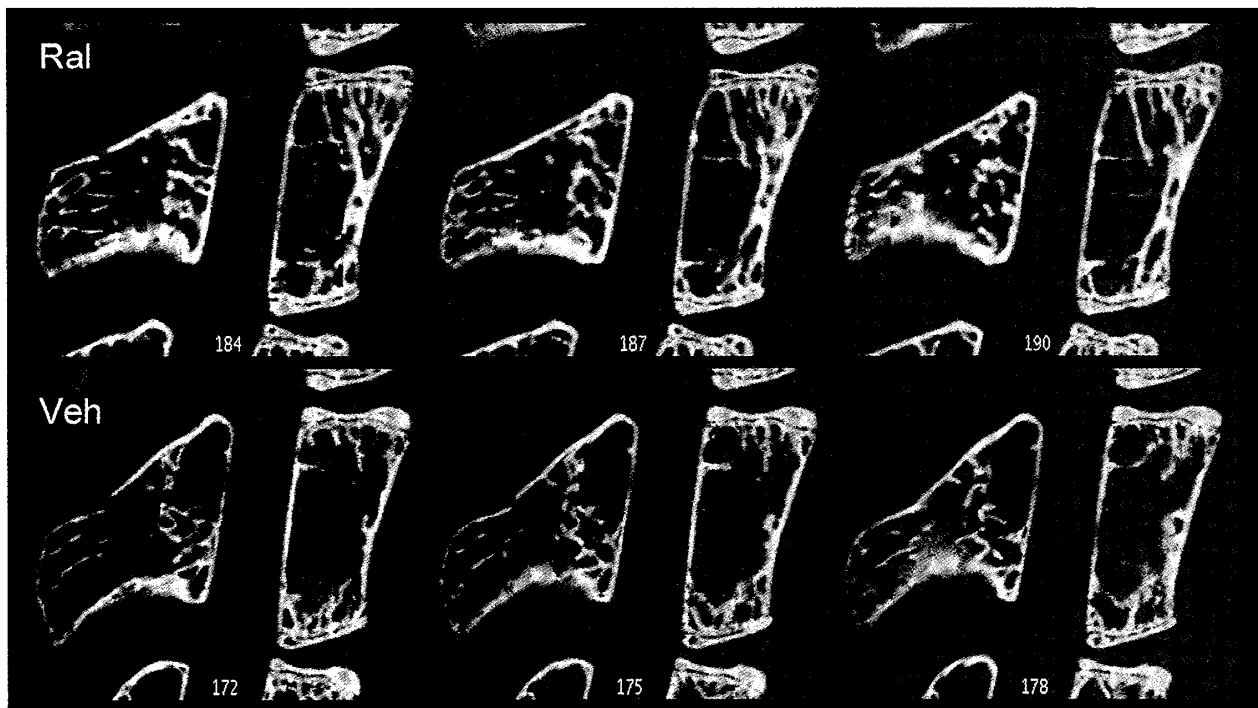


図14 NIH Image/2D像による腰椎骨梁の比較  
正中部より連続した3枚の矢状断2D像。ラロキシフェン投与群では水平に走る骨梁が多数認められ、対照群では非常に少ない。Ral：ラロキシフェン投与群，Veh：対照群。

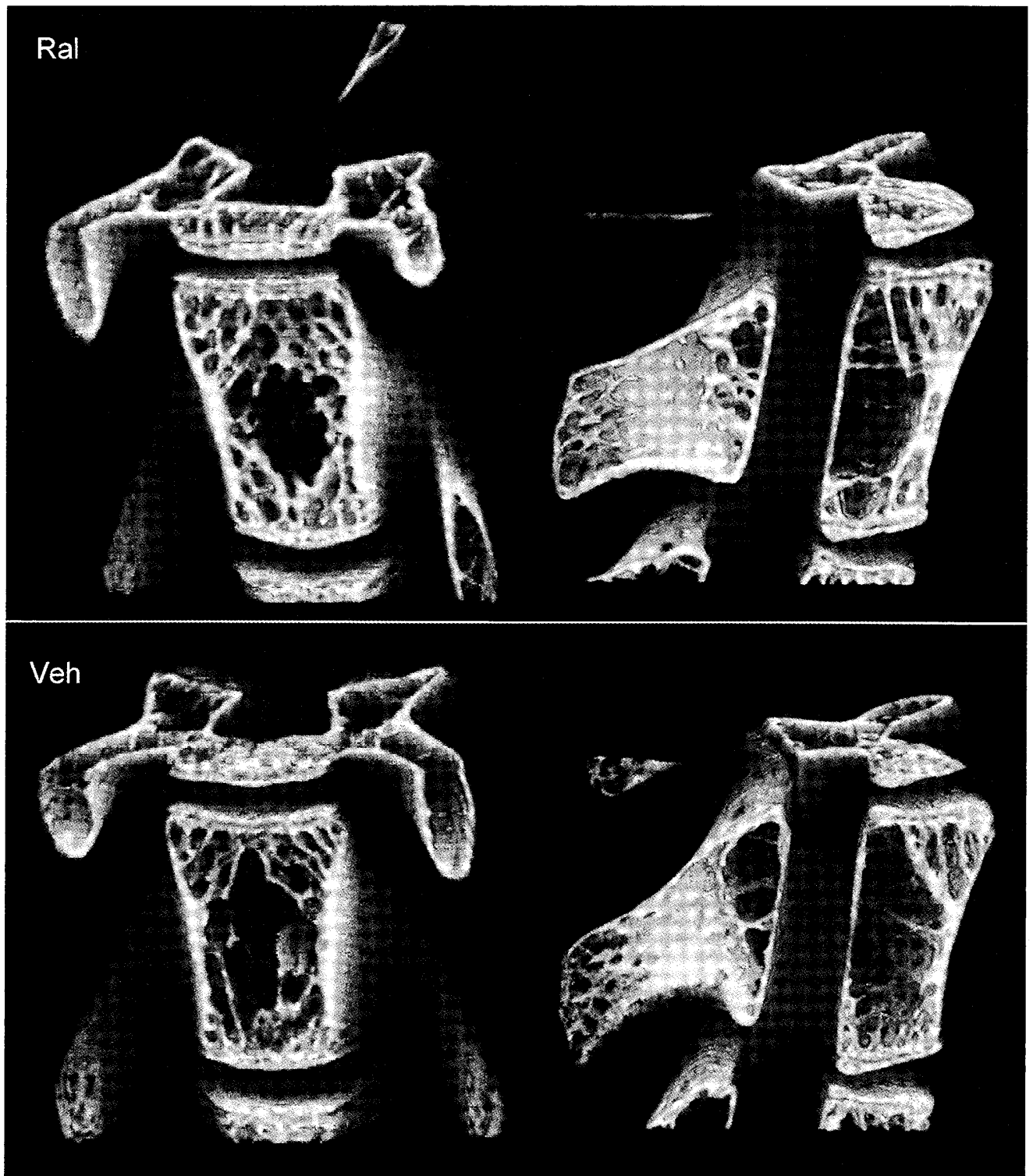


図15 VoxBlast/3D像による腰椎骨梁の比較

冠状断及び正中矢状断における3D像。ラロキシフェン投与群では骨梁が増加し、緻密な網目構造を形成しているが、対照群ではすう疎となり髓腔が開大している。Ral：ラロキシフェン投与群，Veh：対照群。

的效果は格段に向上する。この機能は、プレゼンテーションを行う際に極めて有用となる。

今回、閉経後骨粗鬆症の実験モデルとして卵巣摘出マウスを用い、ラロキシフェン投与群と溶媒を投与した対照群との間で骨梁の形態的差異が生じるか否かについて、X線マイクロCT装置で撮影された腰椎断層写真をVoxBlastで解析した。投与した塩酸ラロキシフェンは骨吸収抑制作用を有する骨粗鬆症の治療薬として多くの研究に使用されているものである<sup>5,6)</sup>。解析の結果、腰椎の椎体内部及び突起内部を垂直ないし斜めに走る骨梁についてはラロキシフェン投与群で若干の増加傾向が認められた。一方、水平に走る細い骨梁についてはラロキシフェン投与群では多数観察されたが、対照群ではほとんど認められなかった。そのため、椎骨中央に位置する髓腔部分の大きさに明らかな差違が認められた。すなわち、ラロキシフェン投与により骨吸収が抑制され、骨梁が増加したために髓腔部分の狭小化が生じたものと推測される。

次に骨梁の形態計測を試みた。しかし、自動ボリューム計測を実施して明らかにされたことは、はっきりとした明度の異なる部分でなければ正確な計測ができないということである。本研究においては、石灰化程度の高い皮質骨と石灰化程度の低いと思われる骨梁との間に、明瞭な濃度差が生じるようにX線CT装置で撮影しなければならなかったのだが、我々の意図とした写真は得られなかった。現在は骨密度や骨量の測定に特化した、骨解析用のソフトウェアを装備したX線マイクロCTが製品化されているので、そのような装置で使用しているソフトウェアのアルゴリズムを研究する必要もあるだろう。現状において行える解決策としては、計測範囲を個別に指定して骨梁部分を手動で計測する方法がある。しかしながら、この方法は立体再構築した3D画面上には適用できず、2D像のスライスを一枚一枚手動で計測することになるので今回は実施しなかった。

おわりに、VoxBlastにはデータセットの加工（拡大/縮小、指定範囲のリサンプリング）やコマンドラインによるスクリプトの実行などの機能も備えられており、連続した画像データを解析す

るために大変有用なソフトウェアであるが、形態計測に関しては目的に応じた画像処理の重要性が再確認された。

## 結 論

卵巣摘出マウスに対する骨粗鬆症治療薬ラロキシフェンの効果を検証する目的で、マウス腰椎のX線マイクロCT断層写真を三次元再構築ソフトウェアVoxBlastで解析した結果、以下の結論を得た。

1. ラロキシフェン投与により、腰椎の椎体内部及び突起内部を垂直ないし斜めに走る骨梁については若干の増加傾向が認められた。
2. ラロキシフェン投与により、椎体内部を水平に走る細かな骨梁の増加が認められ、髓腔部分の狭小化が生じた。

以上のことから、骨粗鬆症の改善にラロキシフェンは有効であることが確認された。また、VoxBlastはX線CT断層写真の解析に適しているが、自動計測機能については、識別すべき対象物の濃度分布に強く依存することが明らかになった。

## 文 献

- 1) Kim, I., Paik, K. S. and Lee, S. P. : Quantitative evaluation of the accuracy of micro-computed tomography in tooth measurement. *Clin Anat* **20** ; 27-34 2007.
- 2) De Clerck, N. M., Meurrens, K., Weiler, H., Van Dyck, D. *et al.* : High-resolution X-ray microtomography for the detection of lung tumors in living mice. *Neoplasia* **6** ; 374-379 2004.
- 3) 齋藤 勇 : NIH Image のマクロによる共焦点レーザー顕微鏡の画像解析. *奥羽大歯学誌* **34** ; 51-58 2007.
- 4) Manconi, F., Markham, R., Cox, G., Kable, E. *et al.* : Computer-generated, three-dimensional reconstruction of histological parallel serial sections displaying microvascular and glandular structures in human endometrium. *Micron* **32** ; 449-453 2001.
- 5) 北村文月, 黒川 清, 今本喜久子 : 卵巣摘出ラットにおける尿中NTXの推移と腰椎の骨密度および組織的变化の関係. *形態・機能* **5** ; 89-95 2007.
- 6) Lees, C. J., Register, T. C., Turner, C. H.,

Wang, T. *et al.* : Effects of raloxifene on bone density, biomarkers, and histomorphometric and biomechanical measures in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Menopause* **9** ; 320-328 2002.

著者への連絡先：齋藤 勇, (〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座  
Reprint requests : Isamu SAITO, Department of Oral Medical Science, Ohu University School of Dentistry. 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan