

38. Takahashi Y, Tsuji O, Hara C, Kumagai G, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Comparative study of different administrations of the neural stem/progenitor cells for spinal cord injury in mice. Stem cell symposium (Tokyo, Japan, 2009, 5)

39. Takahashi Y, Okada Y, Kumagai G, Tsuji O, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Transplantation of human embryonic stem cell derived-neural stem/progenitor cells for spinal cord injury in adult NOD/Scid mice. Stem cell symposium (Tokyo, Japan, 2009, 5)

40. Takahashi Y, Nakamura M, Tsuji O, Hara C, Kumagai G, Okano H, Toyama Y. Comparative study of different administrations of the "mouse fetal neural stem/progenitor cells"

for spinal cord injury in mice. 7th annual meeting International Society for Stem Cell Research (Barcelona, Spain, 2009, 7)

41. Takahashi Y, Okada Y, Nakamura M, Kumagai G, Tsuji O, Toyama Y, Okano H. Transplantation of "human embryonic stem cell derived-neural stem/progenitor cells" for spinal cord injury in adult NOD/Scid mice. 7th annual meeting International Society for Stem Cell Research. (Barcelona, Spain 2009, 7)

42. Takahashi Y, Tsuji O, Hara C, Kumagai G, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Comparative study of different administrations of the neural stem/progenitor cells for spinal cord injury in mice. 36th International Congress of Physiological Science.

(Kyoto, Japan, 2009, 7)

43. Takahashi Y, Okada Y, Kumagai G, Tsuji O, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Transplantation of human embryonic stem cell derived-neural stem/progenitor cells for spinal cord injury in adult NOD/Scid mice. society for Neuroscience annual meeting 2009. (Chicago, USA, 2009,10)

44. Kanehiro Fujiyoshi, Osahiko Tsuji, Keigo Hikishima, Masayuki Yamada, Kazuya Kitamura, Suketaka Momoshima, Matsumoto Morio, Kazuhiro Chiba and Hideyuki Okano, Yoshiaki Toyama, Masaya Nakamura. Analysis of spinal cord injury in non-human primates using high b value q-space imaging. The 39th annual meeting of the Society for Neuroscience (Chicago, USA, 2009.10)

45. Takagi T, Nakamura M, Yamada M, Hikishima K, Momoshima S, Fujiyoshi K, Shibata S, Okano HJ, Toyama Y, Okano H: Diffusion tensor tractography of peripheral nerve after contusive injury. Peripheral Nerve Society 2009 Biennial Meeting (Wurzburg, Germany, 2009, 7)

46. Takagi T, Ishii K, Shibata S, Yasuda A, Nagoshi N, Saito H, Okano HJ, Toyama Y, Nakamura M, Okano H: Establishment of a novel Schwann cell culture system derived from injured adult peripheral nerve. Society for Neuroscience 2009 (Chicago, IL, USA, 2009, 10)

47. Takagi T, Nakamura M, Yamada M, Hikishima K, Momoshima S, Fujiyoshi K, Shibata S, Okano HJ, Toyama Y,

Okano H: Diffusion tensor peripheral nerve tractography - its properties and limitations -. Radiological Society of North America 2009 (Chicago, IL, USA, 2009, 10)

48. Takagi T, Ishii K, Shibata S, Yasuda A, Nagoshi N, Saito H, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Nakamura M: Analysis of sphere derived from injured adult peripheral nerves - Establishment of a novel Schwann cell culture system derived from injured adult peripheral nerve -. American Society for Peripheral Nerve 2010 Annual Scientific Meeting (Boca Raton, FL, USA, 2010, 1)

49. Takagi T, Yamada M, Hikishima K, Momoshima S, Fujiyoshi K, Shibata S, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Nakamura M: Diffusion tensor peripheral

nerve tractography Histological Changes and Diffusion Anisotropy ~. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (New Orleans, LA, USA, 2010, 3)

50. Takagi T, Ishii K, Shibata S, Yasuda A, Nagoshi N, Saito H, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Nakamura M: Analysis of Sphere Derived from Injured Adult Peripheral Nerves. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (New Orleans, LA, USA, 2010, 3)

51. Takagi T, Ishii K, Shibata S, Yasuda A, Nagoshi N, Saito H, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Nakamura M: Analysis of Sphere Derived from Injured Adult Peripheral Nerves. 3rd Vienna Symposium on Present state of peripheral nerve surgery and how

to achieve further improvement (Vi
enna, Austria, 2010, 3)

II. 分担研究報告書

分担研究報告書

腰痛の診断、治療法に関する研究：

痛み・しびれの可視化技術の確立並びに、MRIを用いた脊髄投射路及び末梢神経

イメージング法の確立に関する研究

脊髄・末梢神経の投射路の可視化（基礎研究）

研究分担者 中村雅也 慶應義塾大学整形外科 講師

石井 賢 慶應義塾大学整形外科 講師

玉置憲一 実験動物中央研究所 副所長

研究要旨：MRI 拡散テンソル投射路撮影(DTT) は、拡散強調 MRI の画像データから神経線維の方向性や走行を視覚化する画期的な画像解析手法であり、従来の神経トレーシングなどの病理組織学的解析と比較して非侵襲的であることから臨床応用が期待されている。今回の検討から、DTT を用いてコモンマーモセットの圧挫損傷脊髄を生存させたまま同一動物で経時的に評価することにより、損傷脊髄内白質内投射路の変化を通じて、間接的にはあるが脊髄損傷後の運動機能を評価できる可能性が示唆された。

A. 研究の目的

われわれはコモンマーモセット頸髄半切モデルを用い、拡散テンソルトラクトグラフィ（diffusion tensor tractography:以下DTT）が組織を反映すること、投射路を選択的に描出するこ

とを報告してきた (Fujiyoshi et al., Journal of Neuroscience, 2007)。今回はDTTの臨床応用を見据え、より臨床に近い脊髄圧挫損傷モデルを用いて同一動物で経時的な評価を行い、その有用性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究の方法

成体雌コモンマーモセット4匹を使用し、第5頸椎高位に重錐落下による圧挫損傷を作製した。2匹は損傷前、損傷後2, 4, 15週において全身麻酔下に拡散MRIを撮像し、損傷後15週で灌流固定を施行した (Liveモデル)。残る2匹は損傷後2週で還流固定を施行した後に拡散MRIを撮像した (死後モデル)。装置は小動物用7T-MRI (Bruker Biospin社製、PharmaScan70/16) に、内径6cmの送受信ボリウムコイルを組み合わせ、拡散テンソル撮影シーケンスには拡散強調SE法を使用した。拡散の強さの指標であるb valueは1000sec/mm²とした。拡散テンソル画像解析ソフトはVolume One とdTV IISRを使用し、拡散の強度を表すFractional anisotropy (FA)とトラクトライン数による定量評価を施行した。トラクトラインの定量的評価は損傷部頭側部と尾側部の両方に関心領

域を設定し、その両者を通過するものをspared fiberと定義した (図1)。

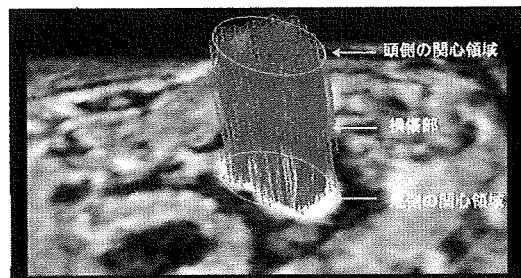


図1 spared fiberの定義

24時間の赤外線モニタリングによる3次元運動量についても解析を行った。還流固定後、凍結切片を作成しhematoxylin-eosin (HE) と、髄鞘染色であるLuxol fast blue (LFB) によって染色した。また、免疫染色には皮質脊髓路(corticospinal tract: 以下CST)を同定するための1次抗体として抗Calmodulin-dependent protein kinaseII- α (以下CaMKII- α) 抗体 (Zymed), 2次抗体としてビオチン付の抗体 (goat anti-mouse IgG 抗体) を用い、DAB染色で発色させた。

C. 研究成果

死後モデル、Liveモデルのいずれの
圧挫損傷脊髄においても明瞭な白質お
よび投射路選択的なDTTの描出に成功
した（図2）。

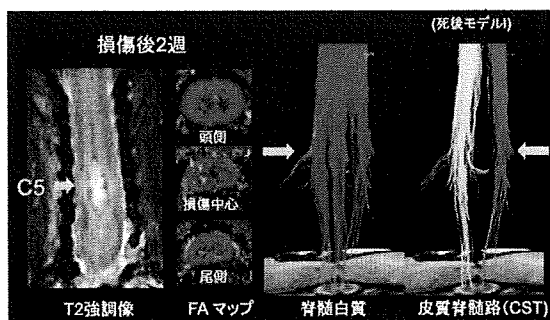


図2 損傷後2週MRI像（左：T2強調画
像、中央：FAマップ、右：DTT）

FAマップとDTTで描出された白質投射
路は、損傷中心においては白質の辺縁
部に残存し、さらに尾側部に達してい
た。これらの所見はLFB染色による残存
髄鞘と一致していた。損傷部より尾側
においては、CaMK II α 染色によるCST
の染色性の低下を認めた（図3）。

CAMK2a染色

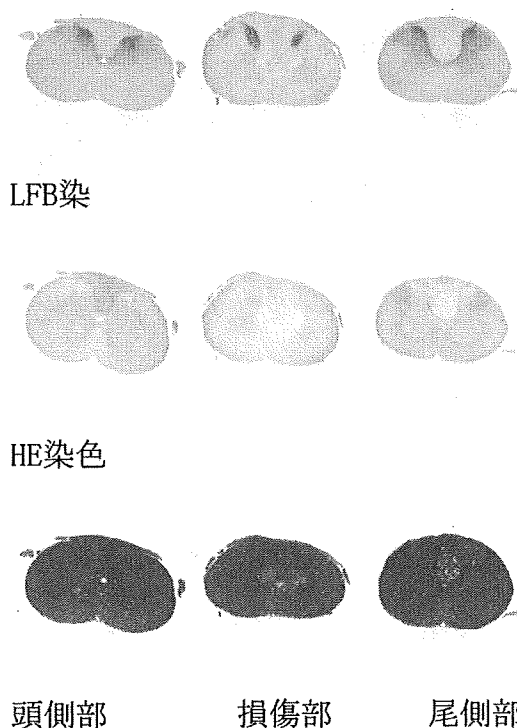


図3 病理組織学的検討

損傷部の頭尾側の両方の関心領域を通
過するトラクトライン (spared fiber)
は、損傷前2349本が損傷後2週で221本
まで低下し、4週後には680本まで回復
を認め、それ以降は大きな変化が見ら
れなかった（図4）。

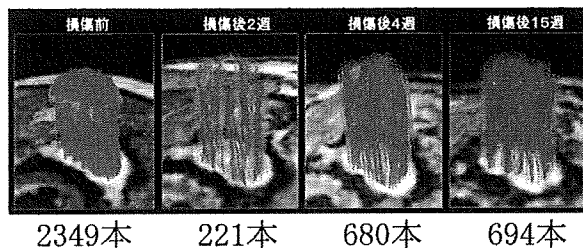


図4 トラクトライン数の経時的変化

トラクトライン数の変化は、赤外線モニターによるケージ内の3次元自発運動量の経時的変化と対応していた。すなわち、損傷後2～3週までは損傷前の約5%前後で推移し、4週以降に15%前後まで回復したが、その後プラトーに達し、改善はみられなかった(図5)。

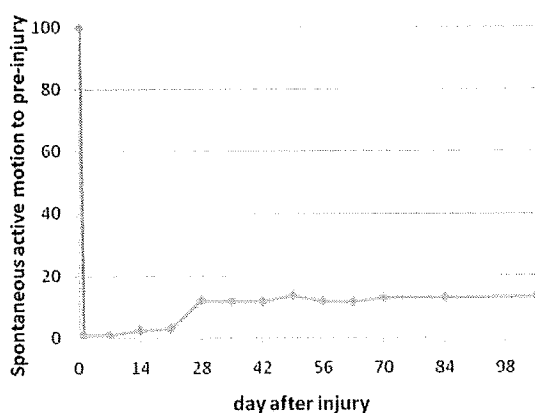


図5 3次元自発運動量の経時的変化

D. 考察

DTTは、拡散強調MRIの画像データから神経線維の方向性や走行を視覚化する画期的な画像解析手法である。本法は従来の神経トレーシングなどの病理組織学的解析と比較して非侵襲的で効率的な手法であり、近年脊髄における有用性の検討が試みられている。今回の結果から、この手法を用いてコモンマーモセットの圧挫損傷脊髄を生存させたまま同一動物で経時的に評価することにより、DTTが損傷脊髄内白質内投射路の変化を通じて、間接的にはあるが脊髄損傷後の運動機能の変化をよく反映していた。

E. 結論

DTTによる霊長類脊髄圧挫損傷の*in vivo* imagingに成功した。DTTは脊髄損傷の新たな診断ツールとなる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

ety for Neuroscience (Chicago, USA,
2009.10)

G. 研究発表

1. 論文発表

Takagi T, Nakamura M, Yamada M, Hikishima K, Momoshima S, Fujiyoshi K, Okano HJ, Toyama Y, Okano H. Visualizing for Peripheral Nerve Degeneration and Regeneration: Monitoring with Diffusion Tensor Tractography. Neuroimage 44: 884-892, 2009

Takagi T, Nakamura M, Yamada M, Hikishima K, Momoshima S, Fujiyoshi K, Shibata S, Okano HJ, Toyama Y, Okano H: Diffusion tensor tractography of peripheral nerve after contusive injury. Peripheral Nerve Society 2009 Biennial Meeting (Wurzburg, Germany, 2009, 7)

2. 学会発表

Kanehiro Fujiyoshi, Osahiko Tsuji, Keigo Hikishima, Masayuki Yamada, Kazuya Kitamura, Suketaka Momoshima, Matsumoto Morio, Kazuhiro Chiba and Hideyuki Okano, Yoshiaki Toyama, Masaya Nakamura. Analysis of spinal cord injury in non-human primates using high b value q-space imaging.

Takagi T, Nakamura M, Yamada M, Hikishima K, Momoshima S, Fujiyoshi K, Shibata S, Okano HJ, Toyama Y, Okano H: Diffusion tensor peripheral nerve tractography - its properties and limitations -. Radiological Society of North America 2009 (Chicago, IL, USA, 2009, 10)

The 39th annual meeting of the Soci

Takagi T, Yamada M, Hikishima K, M

omoshima S, Fujiyoshi K, Shibata S,

Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Nakamura M: Diffusion tensor peripheral nerve tractography Histological Changes and Diffusion Anisotropy ~.

56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (New Orleans, LA, USA, 2010, 3)

藤吉兼浩、疋島啓吾、山田雅之、辻収彦、小牧裕司、百島祐貴、八木一夫、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也. q-space imaging を用いた脊髄再生メカニズムの解明 ～再生医療への応用～. (第37回日本磁気共鳴医学会大会、横浜、2009, 10)

疋島啓吾、藤吉兼浩、山田雅之、辻収彦、小牧裕司、百島祐貴、八木一夫、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也. q-space imaging を用いたmyelinの可視化ー脱髓モデルによる検証. 第37回日本磁気共鳴医学会総会 (2009年10月, 横浜)

藤吉兼浩、疋島啓吾、辻収彦、山田雅之、渡辺航太、辻崇、石井賢、松本守雄、千葉一裕、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也. Development of the Myelin map in non-human primates after SCI using QSI. (第37回日本脊椎脊髓病学会 神戸、2009,

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

腰痛の診断、治療法に関する研究：

痛み・しびれの可視化技術の確立並びに、MRIを用いた脊髄投射路及び末梢神経

イメージング法の確立に関する研究

分担研究報告書

脊髄・末梢神経の投射路の可視化（臨床研究）

研究分担者 中村雅也 慶應義塾大学整形外科 講師

百島祐貴 慶應義塾大学放射線診断科 講師

研究要旨： MRI 拡散テンソル投射路撮影(DTT)による神経投射路の可視化を行い、高齢者の腰痛や神経障害をきたす疾患の早期診断、病態の解明、予後予測などを可能とする画像診断技術の確立を目指した。術前 DTT で病巣高位におけるトラクトライン数は顕著に減少し、疾患別の術前重症度とトラクトライン数の相関を調べると、頸髄症において正の相関がみられた。DTT は脊髄脊椎疾患において従来の MRI では捉えられなかった情報を提供している可能性がある。

A. 研究目的

脊髄脊椎疾患におけるMRIは臨床の現場で不可欠な検査法であることは言うまでもない。通常MRI(T1・T2強調画像)でも、髄内の病変自体(腫瘍、炎症、出血、空洞など)は描出

可能である。しかし、患者さんの機能的予後に最も大きな影響を与える脊髄投射路に関する情報は従来の撮像法では得ることができなかった。そこで、MRIの新しい撮像法である拡散テンソル投射路撮像法（以下DTT）

を用いて、脊髄脊椎疾患における脊髄内投射路を手術前後に描出し、画像上の変化と神経症状の変化とを比較検討することにより、その臨床的意義を明らかにすることが本研究の目的である。DTTとは生体内の水分子の拡散という性質に着目し、方向性の強い組織を可視化する方法論である。その有用性は脳神経外科の領域では既に確立されており、実際の臨床の現場や手術のナビゲーションにも使用されている。しかし、さまざまな要因（size、磁化率およびmotion artifactなど）により脊髄領域における臨床応用は困難であるとされてきたが、近年のMRIハードウェアおよびソフトウェアの技術革新にともない臨床応用の可能性が報告されてきている。DTTによる脊髄投射路の可視化が成功すれば、脊髄・脊椎疾患における手術治療選択の時期、術式選択、機能的予後の予測などが可

能となる可能性が高いため、臨床において非常に有意義な情報が得られる。

B. 研究方法

整形外科で頸髄・頸椎疾患の診断を受け、手術治療を行う症例のうち、同意の得られた45症例をエントリーし、術前及び術後6～12ヶ月にMRIによるDTTを撮像した。拡散テンソル画像解析ソフトはVolumeOne とdTV II SRを使用し、拡散の強度を表すFractional anisotropy (FA)とトラクトライン数により定量的に評価した。DTTによるトラクトライン数をC2-3, 3-4, 4-5, 5-6, 6-7の各椎体高位に関心領域を設定して、2つの関心領域を通過するトラクトライン数を計測した。手術前と比較した術後6～12ヶ月の時点の神経症状の変化は、日本整形外科学会頸髄症判定基準（JOA score）により行った。

(倫理面への配慮)

適切なインフォームド・コンセント、身体的安全性、プライバシーの保護など対象患者の尊厳および人権を尊重する。研究協力の任意性と撤回の自由を保障し、患者はDTTの撮像を拒否することによりなんら診療上の不利益を被らない。

C. 研究結果

患者の疾患の内訳は、頸髄症23例、頸部椎間板ヘルニア8例、後縦靱帯骨化症7例、頸髄腫瘍6例、頸髄損傷1例であった。

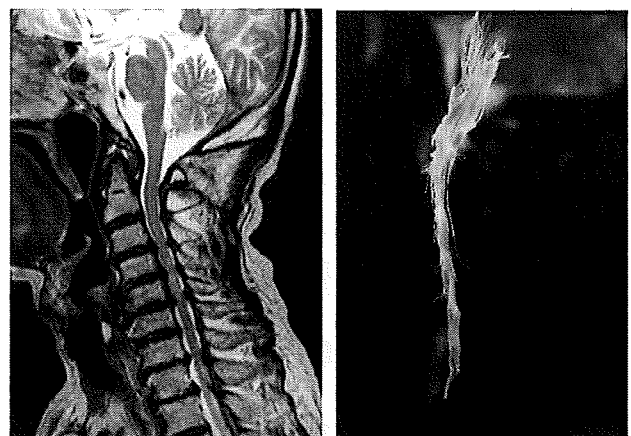
いずれの疾患においても、術前の病巣高位（最狭窄部位、腫瘍発生高位、損傷高位）でトラクトライン数は顕著に減少していた。疾患による違いを考慮し、疾患別の術前重症度（JOA score）とトラクトライン数の相関を調べると、頸髄症において正の相関がみられた。他の疾患については今後症例数を

増やして検討する必要がある。

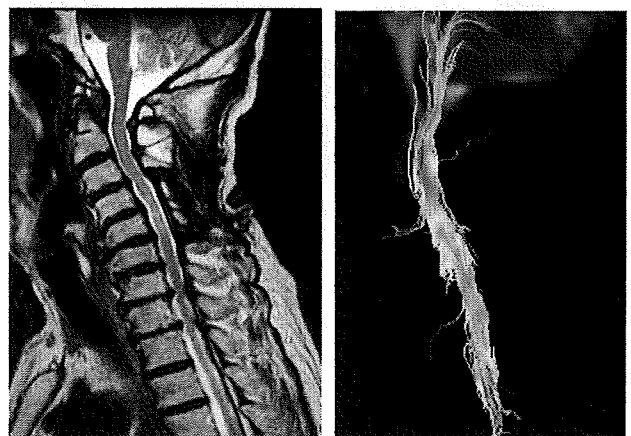
また、術後のDTTによるトラクトライン数の変化と神経症状の改善率を検討する予定である。

代表症例

68歳 男性。頸髄症により歩行障害、手指巧緻運動障害が出現した。



左：術前MRI/T2強調像、右：術前DTT



左：術後MRI/T2強調像、右：術後DTT

図1

術前JOA scoreは9点であった。第3～7頸椎の後方除圧術を施行した。術後トラクトライン数は顕著に増加し、神経症状もJOA score 15点まで改善した（図1）。

しかし、術前の脊髄圧迫部位が多椎間に存在する場合や、高度な圧迫を呈する場合は、トラクトラインが顕著に減少するため、評価が困難な場合がある。今後術後DTTによる再評価を行い、DTTの所見が必ずしも通常のMRI所見と一致しない場合にはその要因を明らかにすることが重要である。また、術前に認められた DTTの異常所見が術後に改善する例としない例があり、術後の予後予測としてのDTTの意義を、臨床所見、手術所見との相関を現在検討中である。

D. 考察

脊椎脊髄疾患における神経症状発現には、髄節障害と索路障害が関与して

いることが知られている。中でも索路障害は、歩行障害や手指の巧緻運動障害をきたし、患者の日常生活活動性に大きな影響を及ぼす。従来のMRIによる評価では、脊髄の圧迫の高位や程度を知ることは可能であったが、索路障害を評価する方法はなかった。DTTは、拡散強調MRIの画像データから神経線維の方向性や走行を視覚化する画期的な画像解析手法である。本法は従来の神経トレーシングなどの病理組織学的解析と比較して非侵襲的で効率的な手法であり、今後の臨床応用が期待されている。本研究の結果より、DTTは脊椎脊髄疾患において従来のMRIでは捉えられなかった情報を提供している可能性があり、術前術後の病態把握に有用と考えられるが、さらに詳細な検討が必要である。

E. 結論

脊椎脊髄疾患に対するDTTにより描

出されたトラクトライン数は、術前の重症度を反映する可能性が示唆された。今後、術前後のDTTの比較検討により、DTTによる機能的予後予測が可能か否かを検討する予定である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

G. 研究発表

論文発表

該当なし

学会発表

・正島啓吾他. q-space imagingを用いたMyelinの可視化－脱髄モデルによる検証. 第37回日本磁気共鳴医学会総会 (2009年10月, 横浜)

・藤吉兼浩他. q-space imagingを用いた脊髄再生メカニズムの解明－医療再生への応用. 第37回日本磁気共鳴医学会総会 (2009年10月, 横浜)

参考資料 1

脊椎脊髄疾患における拡散テンソル投射路撮影 の有用性について

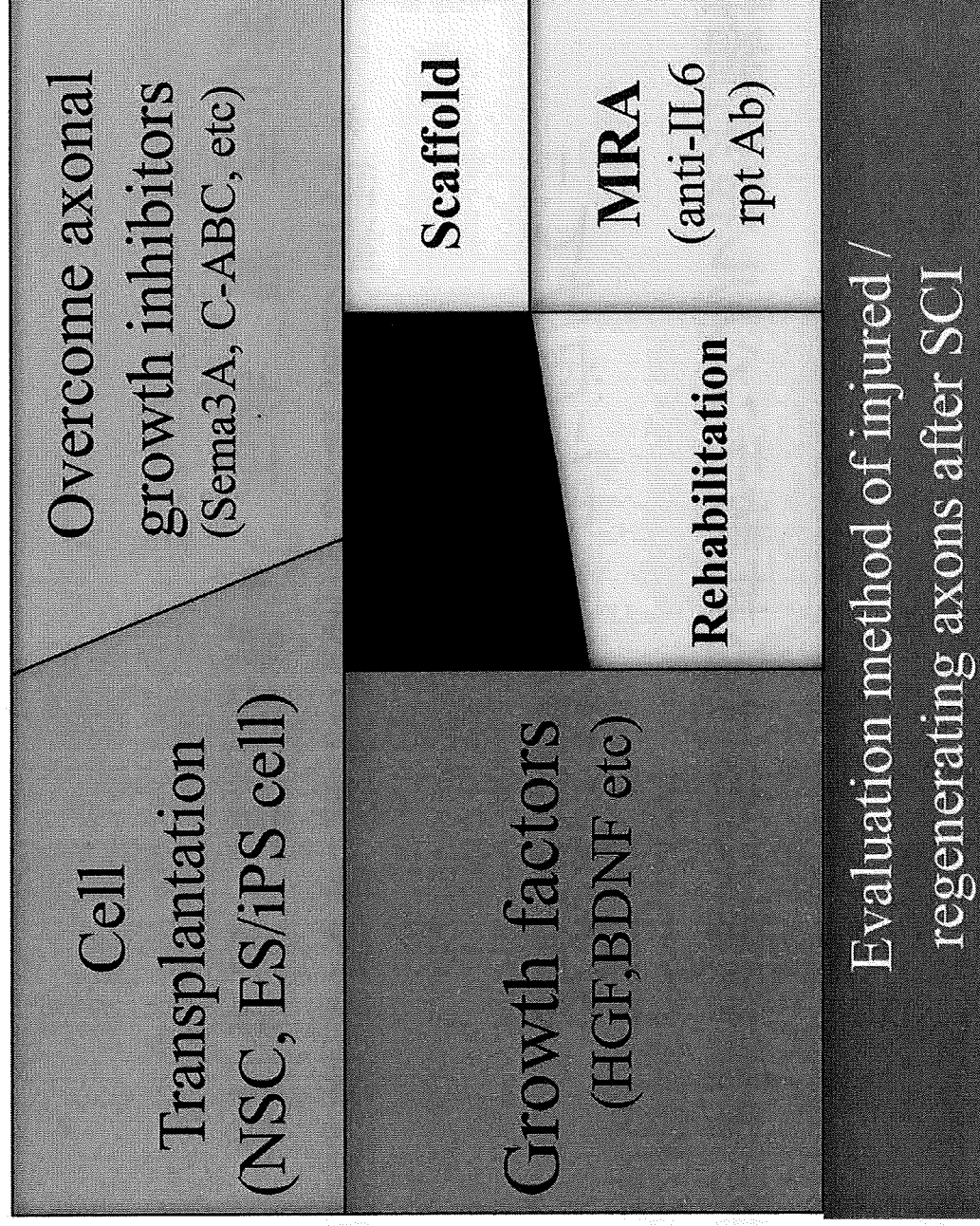
－ 基礎から臨床応用に向けて－

慶應義塾大学 整形外科 放射線診断科*

中村雅也 百島祐貴* 石井 賢 戸山芳昭

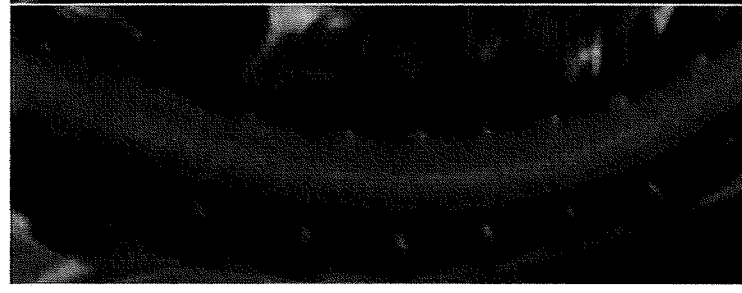
平成21年度厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業合同成果報告会

Challenge toward regenerating damaged spinal cord



MR images of spinal cord in common marmoset

Pre-injury



T1WI

T2WI

Post-injury

2 weeks



T1WI

T2WI

8 weeks



T1WI

T2WI