

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)。

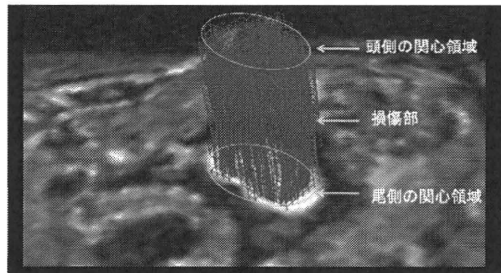


図1 spared fiberの定義

MRI撮像に後組織学的検討を行った。組織学的評価は髄鞘染色であるLFB (Luxiol Fast Blue)染色とHE染色、神経線維マーカーであるRT97 (NF200 kd) を用いておこなった。DTTの解析と表示はdTV II SRとvolume one (Masutani et al.2003)を用いた。損傷部より4mm頭側と尾側の脊髓冠状断面に関心領域 (ROI) を設定し、fiber tracking機能を用いて2つのROIを通過する線維をspared fiber(残存線維)と定義し、異なるFA (拡散異方性) 閾値で経時的に計測し、運動機能との相関を検討した。

C. 研究成果

死後モデル、Liveモデルのいずれの圧挫損傷脊髓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)。

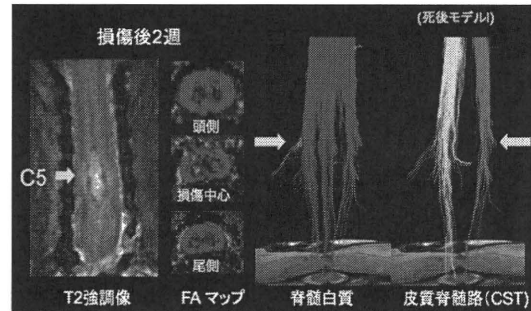


図2 損傷後2週MRI像(左:T2強調画像、中央:FAマップ、右:DTT)

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、RT97染色による神経繊維の染色性の低下を認めた(図3)。

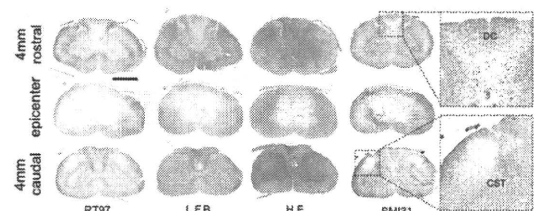
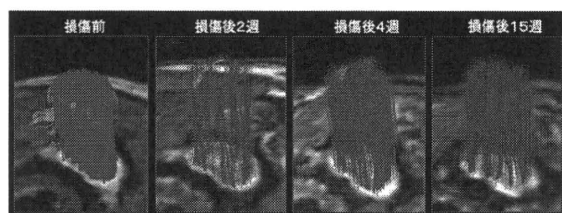


図3 病理組織学的検討

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)。



2349本 221本 680本 694本
図4 トラクトライン数の経時的変化

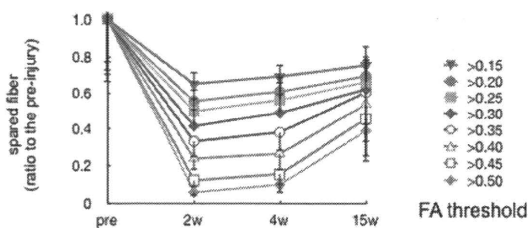


図 5

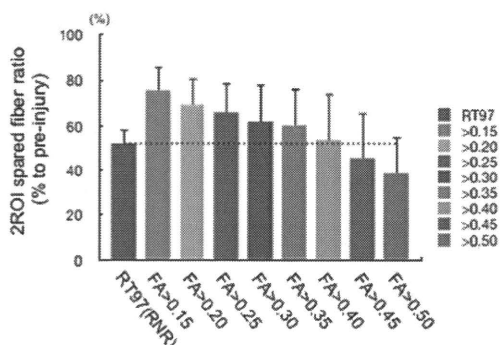


図 6

spared fiberは損傷後2週にかけて減少し、その後徐々に回復したが15週後も設定したFA値により、損傷前の50～80%であった(図5)。

損傷後15週の損傷中心部の脊髄と正常脊髄でのRT 97染色所見から残存神経線維面積比(residual neurofilament ratio: RN比)を定義し、また、損傷後15週の損傷部を通過するspared fiber数と損傷前のfiber数から残存線維比(spared fiber ratio: SF比)を定義し、両者を比較した。RN比は52.1%でFA閾値を0.4に設定した時のSF比とほぼ相同であった。以上の結果より至適FA閾値を0.4に決定した(図6)。

運動機能評価では、いずれの評価スコアでも損傷後重度の四肢麻痺をきたしたが、その後徐々に改善し6週でほぼプラトーに達した(図7)。これらの機能評価とFA閾値を0.4に設定しspared fiberとの相関を解析したところ、open field score, cage-climbing test, 24時間運動量で強い正の相関がみられた(図

8)。

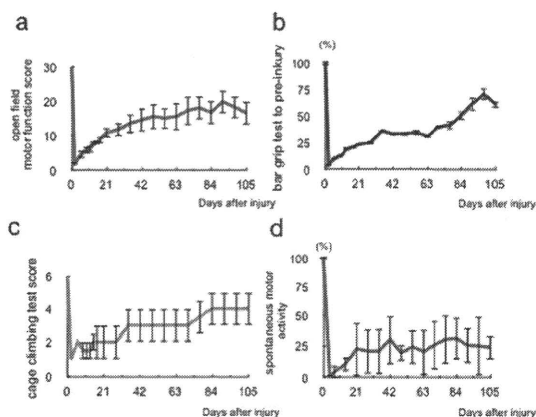


図 7

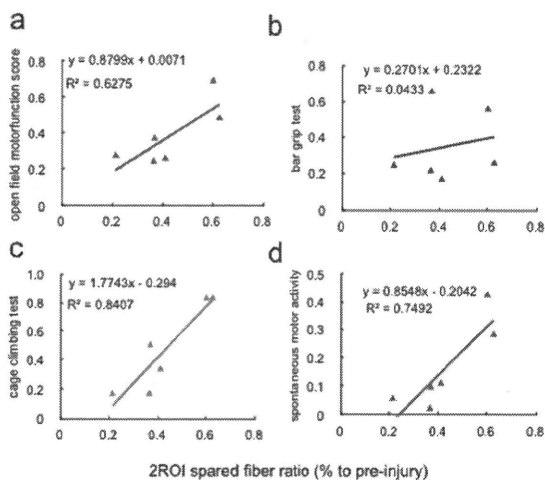


図 8

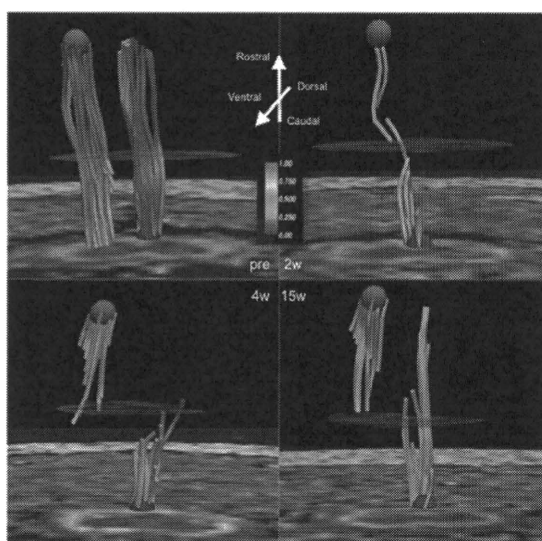


図 9

さらに、本手法をvoxelごとに詳細な検討を行うと、投射路ごとのFA値の変化を経時的に捉えることが可能となった(図9)。その結果、下行路である皮質脊髄路では損傷部尾側部で、後索部では頭側部でFA値の著明な低下がみられ、ワーラー変性をとらえたものと考えている。興味深いことにその後のFA値の回復は皮質脊髄路よりも後索で顕著にみられ、投射路ごとの再生能力の違いをとらえている可能性が示唆された。

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、脊髄損傷後慢性期にかけて損傷を免れる神経線維がわずかではあるが増加しており、白質神経線維の再生が慢性期に起きている可能性が示唆された。これらDTTの結果は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

G. 研究発表

論文発表

1. Shibata S, Yasuda A, Renault-Mihara F, Suyama S, Katoh H, Inoue T, Inoue YU, Nagoshi N, Sato M, Nakamura M, Akazawa C, Okano H. Sox10-Venus mice: a new tool for real-time labeling of neural crest lineage cells and oligodendrocytes. *Mol Brain*. 2010 Oct 31;3(1):31.
2. Mukaino M, Nakamura M, Yamada O, Okada S, Morikawa S, Renault-Mihara F, Iwanami A, Ikegami T, Ohsugi Y, Tsuji O, Katoh H, Matsuzaki Y, Toyama Y, Liu M, Okano H. Anti-IL-6-receptor antibody promotes repair of spinal cord injury by inducing microglia-dominant inflammation. *Exp Neurol*. 2010
3. 岡野栄之、辻収彦、三浦恭子、岡田洋平、藤吉兼浩、高木岳彦、金子慎二郎、戸山芳昭、山中伸哉、中村雅也:中枢神経系と末梢神経系の再生戦略. *Peripheral Nerve 末梢神経* 21, 2010
4. Takahashi Y, Tsuji O, Kumagai G, Hara CM, Okano HJ, Miyawaki A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M.: Comparative study of methods for administering neural stem/progenitor cells to treat spinal cord injury in mice. *Cell Transplant*. in press. 2010
5. Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Nagai T, Katoh H, Kohda K, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury *PNAS* 2010; 107: 12704-12709

6. Munehisa Shinozaki, Yuichiro Takahashi, Masahiko Mukaino, Nobuhito Saito, Yoshiaki Toyama, Hideyuki Okano, and Masaya Nakamura. Novel Concept of Motor Functional Analysis for Spinal Cord Injury in Adult Mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. In Press

著書 (総説)

1. 藤吉兼浩、疋島啓吾、辻収彦、戸山芳昭、岡野栄之、中村雅也、拡散テンソル tractography, 脊椎脊髄ジャーナル 24(3)、2010
2. 辻収彦, 名越慈人, 藤吉兼浩, 戸山芳昭, 岡野栄之, 中村雅也. 脊髄損傷に対する iPS 細胞および神経堤幹細胞移植 脊椎脊髄 2010; 23: 818-827.
3. 辻収彦, 中村雅也, 岡野栄之 iPS 細胞を利用した神経再生. 細胞 2010; 11月号
4. 熊谷玄太郎, 岡田洋平, 藤哲, 戸山芳昭, 中村雅也, 岡野栄之. 脊髄損傷に対する E S 細胞由来神経幹細胞一移植. 脊椎脊髄ジャーナル. 123,835-845, 2010.

2. 学会発表: (国内)

1. 金子慎二郎、桑子賢一郎、Zhigang He、町田正文、塩田匡宣、竹光正和、福田健太郎、池上健、加藤裕幸、飯塚慎吾、名越慈人、五十嵐一峰、山岸正明、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也: 脊髄損傷後の皮質脊髄路軸索再生へ向けた新たなstrategy-neuron intrinsic signalとしてのJak/STAT3活

性化-. 第9回日本再生医療学会(広島、2010, 03)

2. 金子慎二郎、Jing Wang、Zhigang He、町田正文、塩田匡宣、竹光正和、福田健太郎、池上健、加藤裕幸、飯塚慎吾、名越慈人、五十嵐一峰、山岸正明、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也: 神経変性疾患に於ける軸索保護へ向けた新たなstrategy-多発性硬化症モデルEAEに於けるNADを用いた軸索保護-. 第9回日本再生医療学会(広島、2010, 03)
3. 金子慎二郎、Ying Chen、Kai Liu、Zhigang He、町田正文、塩田匡宣、竹光正和、福田健太郎、池上健、加藤裕幸、飯塚慎吾、名越慈人、五十嵐一峰、山岸正明、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也: Activin/TGF β signalによる脊髄後根神経節neuronの軸索伸長/再生能の制御-target/皮膚に由来するsignalの関与-. 第9回日本再生医療学会(広島、2010, 03)
4. 金子慎二郎、桑子賢一郎、Zhigang He、町田正文、塩田匡宣、竹光正和、福田健太郎、池上健、加藤裕幸、飯塚慎吾、名越慈人、五十嵐一峰、山岸正明、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也: 脊髄損傷後の皮質脊髄路の軸索再生へ向けた新たなstrategy-neuron 軸索のintrinsic signalとしてのJak/STAT3 signalの活性化-第39回日本脊椎脊髄病学会(高知、2010, 4)
5. 金子慎二郎、Ying Chen、Zhigang He、町田正文、塩田匡宣、竹光正和、福田健太郎、池上健、加藤裕幸、飯塚慎吾、名越慈人、五十嵐一峰、山岸正明、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也: Activin/TGF β signalによる脊髄後根神経節neuronの軸索伸長/再生能

- の制御-target/皮膚に由来するsignalの関与-. 第39回日本脊椎脊髄病学会(高知、2010,4)
6. 金子慎二郎、Jing Wang、Zhigang He、町田正文、塩田匡宣、竹光正和、福田健太郎、池上健、加藤裕幸、飯塚慎吾、名越慈人、五十嵐一峰、山岸正明、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也: Neuronの軸索障害を伴う疾患に於ける軸索保護へ向けた新たなstrategy -NeuronのNADレベルを維持/上昇させる事による軸索保護- 第39回日本脊椎脊髄病学会(高知、2010,4)
 7. 金子 慎二郎、町田 正文、塩田 匡宣、竹光 正和、福田 健太郎、池上 健、加藤 裕幸、飯塚 慎吾、名越 慈人、五十嵐 一峰、山岸 正明: 感染性脊椎炎に伴う後弯変形に対する前方固定術(noninstrumentation)(単独)による後弯変形矯正力及び矯正位維持力に関する検討.第39回日本脊椎脊髄病学会(高知、2010,04)
 8. 海苔聡、岡田洋平、辻収彦、高橋勇一朗、山中伸弥、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也: 免疫不全マウス脊髄損傷に対するヒトiPS細胞由来神経幹細胞移植の検討、第39回日本脊椎脊髄病学会、(高知、2010,04)
 9. 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: QSI を用いた霊長類脊髄損傷における髄鞘可視化法の開発、第 39 回日本脊椎脊髄病学会(高知、2010,04)
 10. 金子慎二郎、町田正文、塩田匡宣、竹光正和、福田健太郎、池上健、加藤裕幸、飯塚慎吾、名越慈人、五十嵐一峰、山岸正明: 結核性脊椎炎に伴う後弯変形に対する前方固定術(non-instrumentation)(単独)による後弯変形矯正力及び矯正位維持力に関する検討. 第33回日本骨・関節感染症学会(東京、2010,6)
 11. 金子慎二郎、町田正文、塩田匡宣、竹光正和、福田健太郎、池上健、加藤裕幸、飯塚慎吾、名越慈人、五十嵐一峰、山岸正明: 非典型的馬尾腫瘍の1例.第24回多摩脊椎脊髄カンファレンス(東京、2010,06)
 12. 金子慎二郎、町田正文、塩田匡宣、竹光正和、福田健太郎、池上健、加藤裕幸、飯塚慎吾、名越慈人、五十嵐一峰、山岸正明: 脊椎カリエスに伴う後弯変形に対する前方固定術(non-instrumentation 単独)による後弯変形矯正力に関する検討(第2報) 第24回多摩脊椎脊髄カンファレンス(東京、2010,06)
 13. 海苔聡、岡田洋平、辻収彦、高橋勇一朗、藤吉兼浩、安田明正、小林喜臣、戸山芳昭、山中伸弥、中村雅也、岡野栄之: Transplantation of human iPS cell-derived neurospheres for the treatment of spinal cord injury in NOD-scid mice 免疫不全マウス脊髄損傷に対するヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植の検討、Neuro2010(神戸、2010,09)
 14. Takahashi, Y. Tsuji, O. Hara, C. Kumagai, G. Toyama, Y. Nakamura, M. Okano, H. Neuro2010(神戸、2010,09)
 15. Zhang L, Kaneko S, Sano A, Maeda M, Kishino A, Mukaino M, Toyama Y, Liu M, Nakamura M, Okano H,[ラット脊

- 髓完全切断モデルに対する semaphorin3A 阻害剤と treadmill 訓練の併用療法の有効性に関する検討], Society for Young Researchers on Neuroscience, kobe, Japan(神戸、2010, 09)
16. Zhang L, Kaneko S, Sano A, Maeda M, Kishino A, Mukaino M, Toyama Y, Liu M, Nakamura M, Okano H, 「Combining extensive treadmill training with a selective semaphorin3A inhibitor treatment enhances locomotor functional recovery by wiring regenerated axons in adult spinal cord-transected rats, neuro 2010, kobe, Japan(神戸 2010,09)
 17. Renault-Mihara F., Mukaino M., Shinozaki M., Nakamura M., Toyama Y. and Okano H: 'Role and Mechanisms of reactive astrocytes' migration after spinal cord injury'. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Sept 2nd-4th 2010, Kobe, Japan. Poster presentation: (神戸、2010,09)
 18. 安田明正、辻収彦、芝田晋介、海苔聡、高橋勇一郎、藤吉兼浩、戸山芳昭、中村雅也、岡野栄之： 損傷脊髄の再生において再髄鞘化が及ぼす影響の検討 —神経幹細胞移植療法における行動機能回復メカニズムの解析— Neuro2010 (第33回日本神経科学大会) (神戸、2010,09)
 19. 金子慎二郎、町田正文、塩田匡宣、竹光正和、福田健太郎、池上健、加藤裕幸、飯塚慎吾、名越慈人、五十嵐一峰、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也: Neuronの軸索障害を伴う疾患に於ける軸索保護へ向けた新たな strategy- NeuronのNADレベルを維持/上昇させる事による軸索保護-第25回日本整形外科学会基礎学術集会 (京都、2010, 10)
 20. 藤吉兼浩、辻収彦、疋島啓吾、石井賢、松本守雄、千葉一裕、百島祐貴、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也： 拡散 MRI を用いた新たな髄鞘可視化法の開発と脊髄再生メカニズムの解明, 第25回日本整形外科学会基礎学術集会 (シンポジウム) (京都、2010,10)
 21. in vivo QSI を用いた霊長類脊髄損傷モデルにおける損傷強度別経時的 Myelin map 許斐 恒彦, 藤吉 兼浩, 疋島 啓吾, 岡野 栄之, 戸山 芳昭, 中村 雅也 第25回日本整形外科学会基礎学術集会 (京都、2010,10)
 22. 海苔聡、岡田洋平、辻収彦、高橋勇一郎、山中伸弥、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也：免疫不全マウス脊髄損傷に対するヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植の検討、第25回日本整形外科学会基礎学術集会 (京都、2010,10)
 23. 高橋勇一郎、岡田洋平、熊谷玄太郎、辻収彦、海苔聡、安田明正、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也マウス脊髄損傷モデルにおけるヒト ES細胞由来神経幹細胞移植の有効性の検討 第25回日本整形外科学会基礎学術集会 (京都、2010,10)
 24. 辻 収彦、岡野ジェイムス洋尚^{*}、神吉浩明^{*}、原 央子^{*}、藤吉兼浩、許斐恒彦、安田明正、石井賢、松本守雄、千葉一裕、岡野栄之^{*}、戸山芳昭、中村雅也: 新規遺伝子改変マウスを用いた神経因性疼痛のライブイメージング 【第1報】第25回日本整形外科学会基礎学術集会 (京都、2010,10)

25. 安田明正、辻収彦、海苔聡、高橋勇一朗、藤吉兼浩、高野盛登、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也：損傷脊髄への神経幹細胞移植療法における再髄鞘化の重要性—先天性脱髄マウス由来神経幹細胞を用いた検討— 第25回日本整形外科学会基礎学術集会（京都、2010,10）
26. 辻収彦 中村雅也 藤吉兼浩 戸山芳昭 千葉一裕 松本守雄「脊髄血管芽細胞腫の臨床像と手術成績」第45回脊髄障害医学会（松本、2010,10）
27. Renault-Mihara, Takeshi Ikegami, Akio Iwanami, Hiroyuki Katoh, Yoshiaki Toyama, Masaya Nakamura, Hideyuki Okano: Stimulation of reactive astrocytes' migration by specific inhibition of GSK-3 enhances locomotor recovery after spinal cord injury. 29th Naito Conference. GLIA WORLD - Dynamic Function of Glial Cells in the Brain. Oct 5th-8th 2010, Shonan, Japan.（神奈川、2010,10）
28. 金子慎二郎、町田正文、塩田匡宣、竹光正和、福田健太郎、池上健、加藤裕幸、飯塚慎吾、名越慈人、五十嵐一峰、臼井宏、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也: Neuronの軸索障害を伴う疾患における軸索保護へ向けた新たなstrategy-NeuronのNADレベルを維持/上昇させる事による軸索保護. 第64国立病院総合医学会学会(福岡、2010, 11)
29. 金子慎二郎、町田正文、塩田匡宣、竹光正和、福田健太郎、池上健、加藤裕幸、飯塚慎吾、名越慈人、五十嵐一峰、山岸正明: 結核性脊椎炎に対する前方搔爬固定術による後弯変形矯正に関する検討. 第64国立病院総合医学会学会(福岡、2010, 11)
30. 金子 慎二郎、塩田 匡宣、町田 正文、竹光 正和、福田 健太郎、八木 満、加藤 裕幸、飯塚 慎吾、名越 慈人、五十嵐 一峰、臼井 宏: 近傍椎体に陳旧性骨折を有する骨粗鬆症性椎体圧潰に対する前方固定術. 第25回多摩脊椎脊髄カンファレンス(東京、2010, 11)
31. Kanehiro Fujiyoshi, Keigo Hikishima, Tunekiko Konomi, Yoshiaki Toyama, Hideyuki Okano & Masaya Nakamura: In vivo myelin visualization using q-space MR imaging in SCI of marmoset, The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, December 1 – 2, 2010, Tokyo, Japan（東京、2010, 12）
32. Zhang L, Kaneko S, Sano A, Maeda M, Kishino A, Mukaino M, Toyama Y, Liu M, Nakamura M, Okano H: Combining extensive treadmill training with a selective semaphorin3A inhibitor treatment enhances locomotor functional recovery by wiring regenerated axons in adult spinal cord-transected rats, BMB 2010, Kobe, Japan(神戸、2010,12)
33. Osahiko Tsuji, Hiroataka James Okano, Kanehiro Fujiyoshi, Yoshiaki Toyama, Hideyuki Okano, and Masaya Nakamura. In vivo imaging of neuropathic pain using novel transgenic mice. The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience（東京、2010,12）

34. 海苔聡、岡田洋平、辻収彦、高橋勇一朗、藤吉兼浩、安田明正、戸山芳昭、山中伸弥、中村雅也、岡野栄之：免疫不全マウス脊髄損傷に対するヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植の検討、第6回慶應義塾先端科学技術シンポジウム、第4回人間知性研究センターシンポジウム「こころを生み出す神経基盤の解明」・（慶應義塾大学三田キャンパス 東京、2010,01）
35. 高橋勇一朗 岡田洋平 熊谷玄太郎 中村雅也 戸山芳昭 岡野栄之：脊髄損傷モデルにおけるヒト ES 細胞由来神経幹細胞の有効性の検討こころを生み出す神経基盤の解明（慶應義塾大学三田キャンパス 東京、2010,01）
36. 安田明正 辻収彦 藤吉兼浩 高橋勇一朗 海苔聡 戸山芳明 岡野栄之 中村雅也 脊髄損傷において再髄鞘化が及ぼす影響の検討—脊髄損傷に対して神経幹細胞移植療法で得られる行動機能回復メカニズムの解析—(ポスター) GCOE共催シンポジウム「こころを生み出す神経基盤の解明」第6回慶應義塾先端科学技術シンポジウム 第4回人間知性研究センターシンポジウム（慶應義塾大学三田キャンパス 東京、2010,01）
37. Satoshi Nori, Yohei Okada, Osahiko Tsuji, Yuichiro Takahashi, Kanehiro Fujiyoshi, Akimasa Yasuda, Yoshiaki Toyama, Shinya Yamanaka, Masaya Nakamura, Hideyuki Okano : Transplantation of human iPS cell-derived neurospheres for the treatment of spinal cord injury in NOD-scid mice. GCOE 幹細胞医学のための教育拠点 成果報告シンポジウム Global COE Program Symposium 2010 Education and Research Center for Stem Cell Medicine (慶應義塾大学信濃町キャンパス リサーチパーク 1階ラウンジ・東京、2010,02)
- 学会発表：(海外)
1. Takahashi, Y. Tsuji, O. Hara, C. Kumagai, G. 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. EuroSpine2010, 2010/9/16 * session 915-17 (Vienna, Austria, 2010,09)
 2. Tsunehiko Konomi, Kanehiro Fujiyoshi, Keigo Hikishima, Fumika Toyoda, Yuichiro Takahashi, Satoshi Nori, Akimasa Yasuda, Yoshiaki Toyama, Masaya Nakamura, Hideyuki Okano: Myelin map after graded spinal cord injury in adult common marmosets. 40th Annual meeting Neuroscience 2010, (San Diego, CA, USA, 2010,11)
 3. S. Nori, Y. Okada, O. Tsuji, Y. Takahashi, K. Fujiyoshi, A. Yasuda, Y. Kobayashi, Y. Toyama, S. Yamanaka, M. Nakamura, H. Okano : Transplantation of human iPS cell-derived neurospheres for the treatment of spinal cord injury in NOD-scid mice, 40th Annual meeting Neuroscience 2010 (San Diego, CA, USA, 2010,11)
 4. Osahiko Tsuji, Kyoko Miura, Yohei Okada, Kanehiro Fujiyoshi, Morio Matsumoto, Kazuhiro Chiba, Shinya Yamanaka, Yoshiaki Toyama, Masaya Nakamura, Hideyuki Okano Therapeutic potential of appropriately evaluated ‘safe’ induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. Neuroscience meeting 2010, (San Diego, CA, USA, 2010,11)

5. Yasuda, A., Tsuji, O., Shibata, S., Fujiyoshi, K., Takahashi, Y., Nori, S., Kobayashi, Y., Toyama, Y., Nakamura, M., Okano, H. "Significance of re-myelination after NS/PC transplantation to SCI." Neuroscience 2010, (San Diego, CA, USA, 2010,11)
6. Francois Renault-Mihara, Takeshi Ikegami, Akio Iwanami, Hiroyuki Katoh, Yoshiaki Toyama, Masaya Nakamura and Hideyuki Okano: 'Stimulation of reactive astrocytes' migration by specific inhibition of GSK-3 enhances locomotor recovery after spinal cord injury. 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November 13-17, 2010. San Diego, CA, USA.

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 Tract fiber ratio (最狭窄部 tract fiber 数/C2 高位 tract fiber 数 x100)は JOA 改善率と高い正の相関を認め、術前 Tract fiber ratio が約 70 以上の場合はほぼ 50%以上の JOA 改善率が期待できることから、術前 Tract fiber ratio が術前の予後予測、さらには手術適応を考慮するうえで有用な情報をもたらすものと期待している。

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。今年度は昨年度よりさらに患者数を増やし統計学的処理を行った。

B. 研究方法

当院で手術を施行した頸髄症15例、後縦靭帯骨化症5例の計20例で全例に片開き式脊柱管拡大術を施行した。術前・術後1年にDTTを撮像した。DTTの解析と表示はdTVIISRとvolume oneを用いた。関心領域を最狭窄部と狭窄のない第2頸椎高位におき、各々の関心領域を通過する線維数をFA閾値を0.3に設定して算出した。最狭窄部と第2頸椎高位の線維数の比を術前後で算出し各々術前・術後tract fiber ratio (TF ratio)と定義した。これらの値と術前後の日本整形外科学会頸髄症判定基準 (JOA score) とJOA改善率の相関を調べた。さらにconventional MRIでのT2強調画像における髄内高信号の有無 (T2HSI+群、T2HSI-群) も併せて検討した。

(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

1) 術前MRIの髄内高信号の有無と術前JOA scoreを検討すると、T2HSI+群はT2HSI-群より術前JOA scoreは有意に低かった (図1)。しかしJOA改善率は、T2HSI+群のばらつきが広く、2群間に統計学的有意差はみられなかった (図2)。

2) 術前TF ratioを髄内高信号の有無で比較検討すると、T2HSI+群のTF ratioはばらつきが広く、2群間に有意差はみられなかった (図3)。

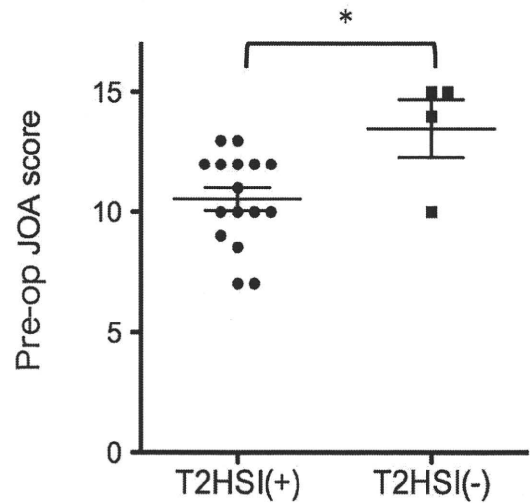


図1

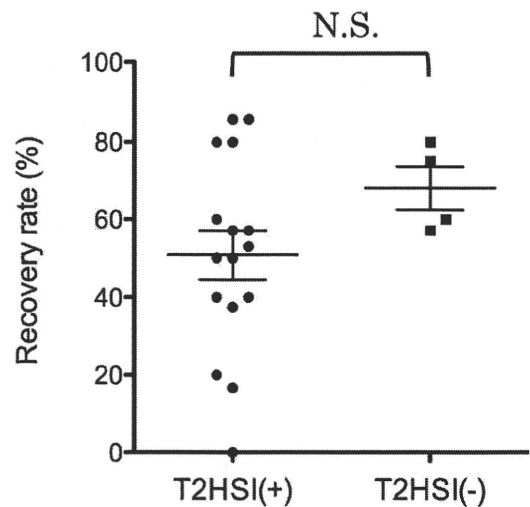


図2

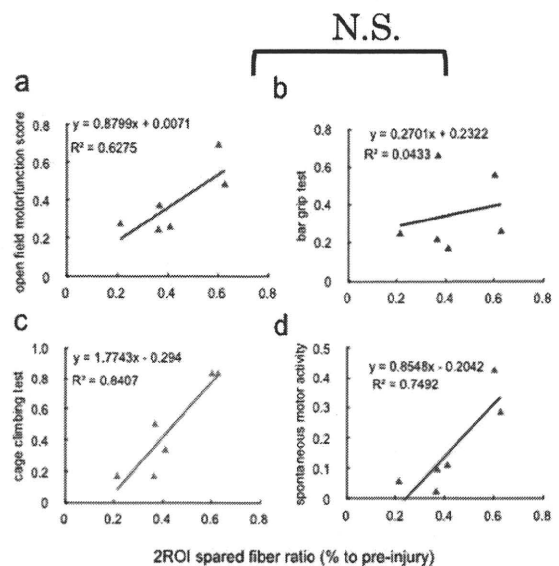


図3

2) 術前後JOA scoreとTF ratioの比較
 検討：術前JOA scoreと術前TF ratioの
 相関を検討すると、2群間に有意な相関
 はみられなかった (図4)。

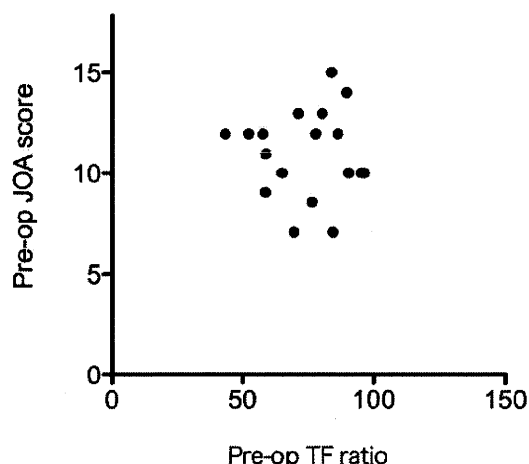


図4

しかし、術後JOA scoreと術後TF ratio
 の相関を調べると、弱い相関が見られ
 た (図5)。

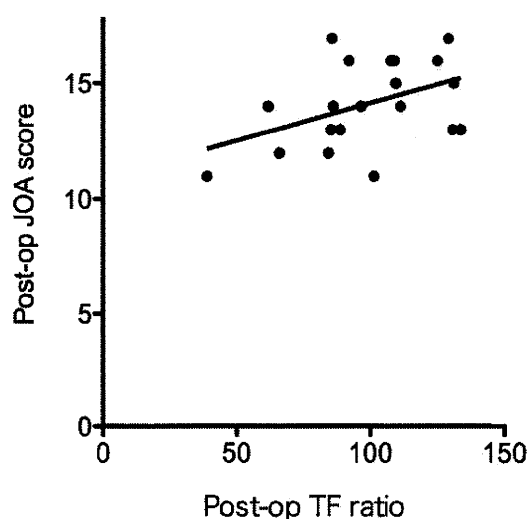


図5

3) 術前TF ratioとJOA改善率の相関

術前TF ratioとJOA改善率の相関を
 調べると、きわめて高い正の相関を認
 めた (図6)。

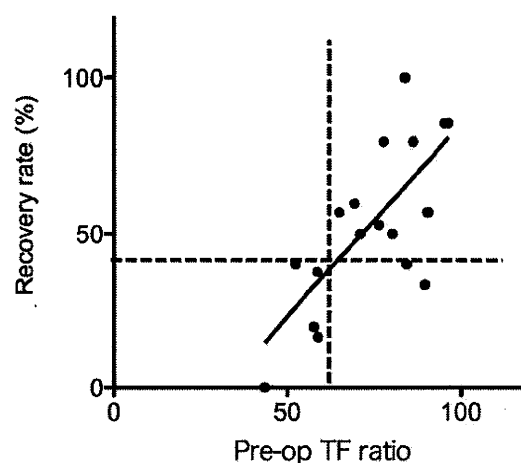


図6

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。頸髄症
 の予後予測としてT2強調画像における
 髄内高信号の有無が報告されている。
 今回の検討で、T2HSIの有無による術
 前JOA scoreと改善率を2群間で検討し、
 術前JOA scoresに有意差がみられたこ
 とからも、T2像内高信号がない場合は
 重症度は低いといえる。しかし、T2HS
 I+群の改善率はばらつきが大きく有意
 差はみられなかった。これはT2強調像
 での髄内高信号が、浮腫、炎症などの
 可逆的な変化から、空洞、グリア癒痕
 などの不可逆的な変化まで様々な病態を
 反映している可能性を示唆するものと
 考えている。

一方、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。今回の検討より、術前FTratioがJOA改善率と高い正の相関を示し、さらに術前FT ratioが約70以上の場合はほぼ50%以上のJOA改善率が期待できることから、術前FT ratioが術前の予後予測、さらには手術適応を考慮するうえで有用な情報をもたらすものと期待している。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、術後の機能的予後予測が可能となる可能性が。

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

該当なし

参考資料 1

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
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

MRI を用いた痛みの可視化のための drug delivery system の開発

研究分担者 田畑泰彦 京都大学再生医科学研究所
生体組織工学研究部門 生体材料学分野 教授

研究要旨: 磁気共鳴イメージング(MRI)プローブの濃縮および血中安定性の向上を目的として、MRI プローブの Gd^{3+} イオンを水溶性高分子であるデキストランと組み合わせることを試みた。 Gd^{3+} イオンと配位するキレート残基であるジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)を化学導入したデキストランを作製、これを水溶液中で Gd^{3+} イオンと混合することにより、 Gd^{3+} イオンをデキストランへ配位させた。DTPA 導入率により

A. 研究目的

超高齢者社会を迎え、高齢者の介護予防や健康保持のために、運動器疾患への取り組みが重要な課題になってきた。なかでも腰痛や神経障害による身体活動性の低下、閉じこもりは要介護となる原因の一つであり、高齢者の腰痛や神経障害をきたす疾患の病態解明と早期診断技術の確立は急務といえる。しかし、従来の画像診断技術では神経の物理的な圧迫の描出はできるが、脊髄や馬尾の機能を反映する投射路や疼痛の原因である神経障害部位の炎症を可視化したり、椎体の運動を三次元的に評価したりすることはできなかった。そこで、本研究では MRI 拡散テンソル投射路撮影による神経投射路の可視化、分子標的イメージングによる神経障害部位の炎症ならびに疼痛の可視化、functional MRI を用いた腰痛に対する脳内変化の可視化、3D-MRI を用いた腰椎変性疾患における腰椎の生体力学的

解析を行い、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す。

神経障害部位の炎症ならびに疼痛の可視化や診断は、その病態を解明するための基礎研究の進歩に重要となるだけでなく、それが可能となれば、臨床におけるその必要性和意義はきわめて大きい。その実現のためには、疼痛の原因となる神経障害による炎症部位に特異的に発現する分子に注目し、同部位へのドラッグデリバリーシステム(DDS)を確立することが必要不可欠である。本研究の目的は、神経障害部位の炎症や疼痛に関与する特異分子に対する抗体を Gd^{3+} イオンなどのMRIプローブと組み合わせ、炎症・疼痛部位へのtargetingを行い、炎症や痛みのMRIによる可視化を行うことである。本研究では、MRIプローブを水溶性高分子

へ修飾することを考えた。水溶性高分子を用いることで、MRIプローブの濃縮と血中安定性の向上が可能となる。その結果として、MRIプローブの可視化効果の増強が期待できる。

B. 研究方法

水溶性高分子としてすでに臨床応用されているデキストランを用いた。まず、MRIプローブである Gd^{3+} イオンを配位させるために、デキストランへのキレート残基の化学導入を行った。デキストラン（重量平均分子量：40,000）の脱水ジメチルスルホキシド溶液へ、反応触媒としてのジメチルアミノピリジン、続いてキレート残基である DTPA 無水物を異なる量（デキストランのヒドロキシル基に対して0.01から1.0モル当量）を加えた。この混合溶液を、室温、18時間の条件で反応することで、デキストランのヒドロキシル基に対して DTPA を化学導入した。この反応溶液を水に対して2日間透析、凍結乾燥することにより DTPA 導入デキストランを得た。デキストランのヒドロキシル基に対する DTPA 導入率は、電気伝導度滴定により算出した。得られた DTPA 導入デキストランと異なる量の塩化ガドリニウム(Gd^{3+} イオン, DTPA に対して0.5, 1.0, 3.0, 5.0, および10.0モル当量)とをモルホリノエタン硫酸(MES)緩衝液(pH 6.0)中で室温、3時間の条件で混合した。この混合液を脱塩カラムにて精製、 Gd^{3+} イオン配位 DTPA デキストランを得た。デキストランへの Gd^{3+} イオン配位量は原子吸光法による Gd^{3+} イオンの測定により算出した。

次に、痛み部位へのターゲティングを目的として、疼痛物質に対する抗体をデキストランに導入することが必要となる。この抗体導入のための条件決めを行った。用いた抗体は市販の IgG 抗体である。同様のデキストランの脱水ジメチルスルホ

キシド溶液に N,N^3 -カルボジイミダゾール (CDI) (デキストランのヒドロキシル基に対して0.1および0.5モル当量)を加えた。この混合液を12時間、定温で反応させることで、ヒドロキシル基を活性化した。この活性化デキストランと IgG 抗体とを PM6.5 のリン酸緩衝溶液中で混合、4・12時間攪拌することで IgG 抗体のデキストランへの化学導入を行った。得られた IgG 抗体結合デキストランの280nmの吸光度を測定すること IgG 抗体導入量を算出した。

C. 研究結果

デキストランへの DTPA 導入率は、加える DTPA 無水物の量によって変化した。デキストランのヒドロキシル基に対して0.01から1.0モル当量の異なる濃度の DTPA を反応させることによって、DTPA 導入率は 0.2 ± 0.01 から 21.6 ± 0.62 モルパーセント範囲で変化した。導入率5.0モルパーセントの DTPA 導入デキストランを用いた場合、その Gd^{3+} イオン配位量は加える Gd^{3+} イオン量の増加とともに増加し、DTPA に対して1.0モル当量以上の Gd^{3+} イオン量で一定となった。導入率10.4モルパーセントの DTPA 導入デキストランを用いた場合には、DTPA に対して1.0モル当量以上の Gd^{3+} を加えると沈殿が生じた。これは、 Gd^{3+} イオンによる DTPA 導入デキストランの分子間架橋が原因であると考えられる。

CDI 活性化によりデキストランへの IgG 抗体の導入反応を行うことが可能となった。CDI 濃度の増加とともに、抗体導入率は増加した。今回は、特別な生物活性をもつ抗体を用いていないので、抗体導入量のみの測定を行った。

D. 考察

本研究では、水溶性高分子としてデキ

ストランを選択した。デキストランは、代用血漿としてすでに臨床応用されている。また、デキストランは多数のヒドロキシル基をもつため、化学修飾が容易である。今後、デキストランの分子量を変化させることによって、 Gd^{3+} イオンの配位量だけではなく、配位した Gd^{3+} イオンの体内動態をコントロールすることも可能となると考えられる。導入率 10.4 モルパーセントの DTPA 導入デキストランで 0.5 モル当量の Gd^{3+} イオンを加えた場合、デキストラン 1 分子へ Gd^{3+} イオンが 43.5 分子、配位、濃縮されたものを得ることができた。CDI 活性法はデキストランへの抗体の化学導入を可能とした。この方法と DTPA 導入法とを組み合わせることで、リガンド認識能をもつ Gd^{3+} 導入 DDS 化デキストランの作製が可能となると考えられる。今後は、この Gd^{3+} イオン配位 DTPA 導入デキストランへ神経障害部位の炎症や疼痛に関与する物質に対する結合認識活性をもつ抗体を導入する予定である。デキストランを用いることにより抗体の導入量を変化させることも可能であり、その修飾条件の最適化により神経障害部位の炎症や疼痛の可視化効率を増強させることが可能となるであろう。

E. 結論

水溶性高分子のデキストランを用いて MRI プローブの Gd^{3+} イオンの濃縮と抗体導入を行うことができた。今後は、この DDS 技術を基盤として生物活性をもつ抗体について検討する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

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）
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抹消神経
イメージング法の確立に関する研究

過去の痛み経験が慢性腰痛へ及ぼす影響 —fMRIを用いた若年成人での検討—

研究分担研究者	牛田享宏	愛知医科大学学際的痛みセンター	教授
研究協力者	下 和弘	愛知医科大学学際的痛みセンター	
研究協力者	池本竜則	土佐市民病院整形外科	
研究協力者	谷 俊一	高知大学医学部整形外科教室	

研究要旨：本研究では、慢性腰痛患者に「痛みのためとりたくない動作」の動画を視認させることで腰痛を仮想体験させ、慢性腰痛の神経心理学的な因子の関与を検討した。スポーツ活動を通常に出来る若年成人でも、腰痛経験群では腰痛を想起する写真を視認するだけで痛みや不快感が引き起こされることが明らかとなった。fMRI の解析では腰痛経験者と腰痛非経験群の比較を行うと前頭眼野、補足運動野、側頭皮質、視覚連合野、視床、島、後帯状回、小脳などでは前者で有意に活動していることが明らかとなった。

A. 研究目的

腰痛についての研究はこれまで局所の病態やそれに伴う疼痛発生メカニズムに主眼がおかれてきた。しかし、慢性腰痛においては局所の病態だけでは説明がつかないことも多く、脊髄・脳における痛覚伝達回路に引き起こされた歪みが慢性的に痛みを起す要因になっているものと考えられている。その歪みの一因には、心理学的機序の関与が知られており、患者に記憶された痛みや繰り返す疼痛行動がADL低下⇔痛みの増悪という悪循環の要因になっていることも多いと考えられる。一方、functional MRI(以下 fMRI)は脳における神経活動部位を同定する方法であり

近年広く行われている。

今回の研究では、慢性腰痛患者に「痛みのためとりたくない動作」の動画を視認させることで腰痛を仮想体験させ、慢性腰痛の神経心理学的な因子の関与を明らかにしたい。

B. 研究方法

①対象

対象は11名の非特異的腰痛保持者(男性6名、女性5名、平均年齢20.36±1.12)と11名の腰痛非保持者(男性5名、女性6名、平均年齢21.45±2.77)とした(図1)。

すべての参加者には、あらかじめODI(Oswestry Disability Index 2.0 日本語版)およびRDQ(Roland-Morris Disability Questionnaire)に回答させた。また、腰痛

保持者は問診にて神経学的所見や手術歴が無いことを確認し、腰痛歴を聴取した（平均 4.2 年）。また、参加者に脳血管障害や頭部外傷の既往がないことを確認した。参加者には十分に説明を行った後、文書にて同意を得た。実験を開始する前に、T2 画像にて脳に異常がないかを確認した。

②fMRI の撮像方法と条件とタスク

全脳を GE 社製 SIGNA 3T、TR 3000ms、EPI 法にて撮像を行った。

図 1

腰痛経験群	
11名(男性6名, 女性5名)	
平均年齢 20.36 ± 1.12歳	
平均罹患期間 4.2年	
RDQ 平均 3.1点(0-9点)	
ODI 平均 19.76%(10 - 35%)	
腰痛非経験群	
11名(男性5名, 女性6名)	
平均年齢 21.45 ± 2.77歳	
罹患期間 0年	
RDQ 0点	
ODI 0%	

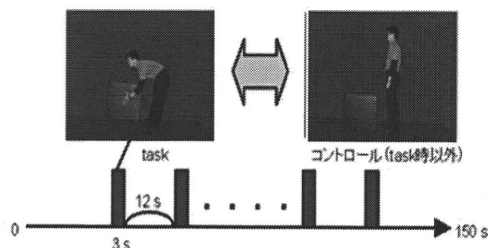


図 2

virtual low back pain を惹起させる視覚刺激として、「床に置いてある荷物を持ち上げる写真」を用いた。また、コントロールには直立位の写真を用いた（図 2）。

③関連脳 fMRI のデータの解析

fMRI のデータを解析用ソフト: SPM2

(statistic parametric mapping) software (Wellcome Department of Cognitive Neurology: Institute of Neurology, London: <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>) を用いて標準脳に変換し、Blood Oxygen Level Dependent 法に基づいて脳のどの部位が統計学的に活動性の亢進がみられているかを識別し、痛みを想起する写真を視認した際（以下タスク）の脳活動部位について各個人解析を行った（Voxel ベースの解析 $p < 0.0005$ ）。その後更に、グループ分析を行い、タスクに反応した脳部位の解析を行った（ $p < 0.05$ ）。タスクの視認によって引き起こされる痛みおよび不快感 Numeric Rating Scale (NRS)、提示された写真を見たときの脳神経活動、RDQ、ODI、痛み、不快感と関連のある脳神経活動部位について、健常者との相違について検討を行った。

C. 研究結果

腰痛未経験群ではタスクの視認によって痛みや不快感を生じた被験者はみられなかった。一方、腰痛経験群においてはタスクの視認によって、NRS で平均 2.1 / 10 (0 - 6) の痛みを経験し、同時に平均 3.5 / 10 (1 - 6) の不快感を生じていた。

fMRI の解析の結果

①腰痛経験群と腰痛非経験群の比較

タスクを視認した際の脳活動について腰痛経験群と腰痛非経験群を比較解析すると、前頭眼野、補足運動野、側頭皮質、視覚連合野、視床、島、後帯状回、小脳などで有意な脳神経活動がみられることが明らかとなった（図 3）。

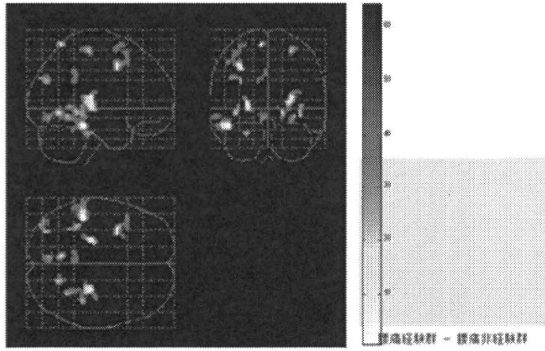


図 3

②各指標との相関

1) ODI (Oswestry Disability Index) との相関

ODI との相関は右 Insura (島) に認められた (図 4)。

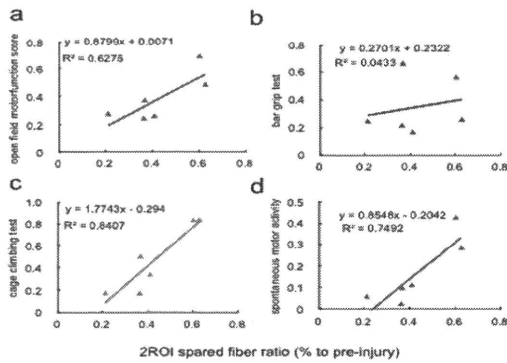


図 4

2) RDQ (Roland-Morris Disability Questionnaire) との相関

RDQ のスコアとの相関は左の帯状回に認められた (図 5)。

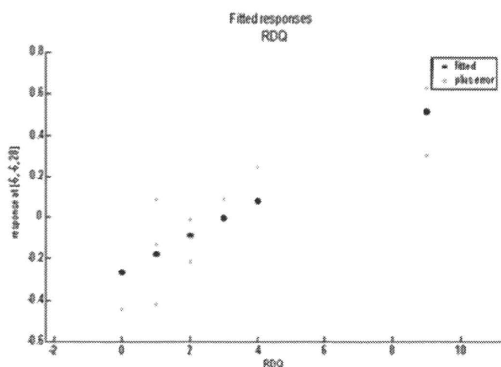


図 5

3) 痛み強さの程度との相関

痛みの強さとの相関を右視床に認めた (図 6)。

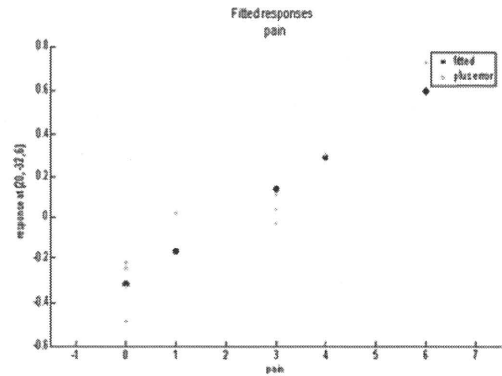


図 6

4) 不快感の程度との相関

不快感の程度と右視床外側腹側核の活動に相関が認められた (図 7)。

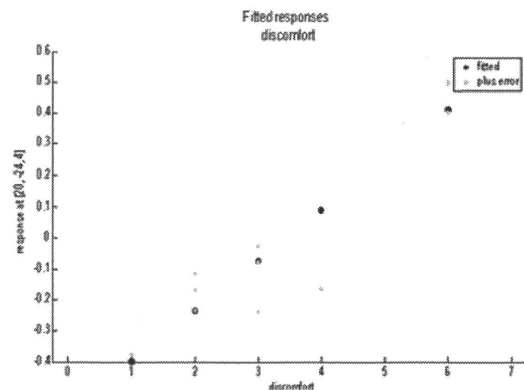


図 7

D. 考察

スポーツ活動を通常に出来る若年成人でも、腰痛経験群では腰痛を想起する写真を視認するだけで痛みや不快感が引き起こされることが明らかとなった。fMRI の解析では腰痛経験者と腰痛非経験群の比較を行うと前頭眼野、補足運動野、側頭皮質、視覚連合野、視床、島、後帯状回、小脳などでは前者で有意に活動していることが明らかとなった。Kobayashiらは腰痛患者の腰部に圧刺激を加え、腰痛を再現したところ、前前頭皮質、補足