

20115010A

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

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 戸山 芳昭

平成24年（2012年）4月

目 次

I. 総括研究報告

- 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 ----- 3
戸山 芳昭

II. 分担研究報告

1. 脊髄・末梢神経の投射路の可視化に関する研究 ----- 29
(基礎研究) 中村 雅也, 玉置 憲一

(臨床研究) 中村 雅也, 百島 祐貴
2. 脊髄末梢神経由来の疼痛の可視化：MRIを用いた痛みの可視化のための drug delivery systemの開発に関する研究 ----- 50
田畑 泰彦
3. 脊髄・末梢神経由来の疼痛・炎症の可視化 —傍脊柱起立筋の炎症（感染）と治療効果の可視化— ----- 54
石井 賢
4. 脊髄末梢神経由来の疼痛の可視化：痛みに対する脳内反応の可視化 仮想腰痛痛み経験タスクによる脳活動部位の解析 ----- 58
牛田 享宏
5. 脊髄末梢神経由来の疼痛の可視化：痛みに対する脳内反応の可視化 慢性腰痛患者に対する疼痛刺激による脳内反応の変化 ----- 62
紺野 慎一
6. 痛みの発生機序の生体力学的解析に関する研究 ----- 65
岩崎 幹季

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 71

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 77

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

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

研究代表者 戸山芳昭 慶應義塾大学医学部整形外科 教授

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、分子標的イメージングによる神経障害部位の炎症・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-CT 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し研究を行った。

靭帯骨化モデルマウス脊髄に対する DTT、また頸髄疾患患者に対する術前の DTT により障害された脊髄の機能予後を評価できることが示唆された。MRI による炎症と疼痛の可視化に必要な分子標的プローブの基盤となる Gd^{3+} イオン配位 DTPA デキストランの作製に成功した。functional MRI を用いた腰痛に対する脳内変化は、腰痛患者では仮想腰痛タスクを視認した際に健常者とは異なるパターンの脳活動が検出され、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、小脳などで有意に活動していることが明らかとなった。さらに疼痛刺激に対する脳賦活部位は後帯状皮質で認められ、腰痛を不快感の強い痛みと感じていることが示唆された。fMRI は慢性疼痛の客観的評価法の 1 つになりうる可能性がある。3D-CT を用いたボリュームレジストレーション法

(VR 法) により、従来の modality では限界のあった生体腰椎の微細な椎間運動を 3 次元的高精度で捉えることができ、腰椎固定術後の隣接椎間や仙腸関節に生じる生体内 3 次元動態変化を捉えることに成功した。

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することはできなかった。そこで本研究では、1) 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、2) 分子標的イメージングによる神経障害部位の炎症・疼痛の可視化、3) functional MRI を用いた腰痛に対する脳内変化の可視化、4) 3D-CT 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。

B. 研究方法

1) DTTによる神経投射路の可視化

①基礎研究として、頸椎靭帯骨化症モデルとして*twy*マウスを用いて、同一個体における骨化進行と神経変性を高画質動物用MRIにて撮影することにより、その病態をDTTで明確に評価できるかを検討することである。*twy* マウス(n=5)を経時的に6、15、20週齢でDTTを施行した。MRI撮影時における体位は軽度頸椎前屈位、麻酔はイソフルラン吸入麻酔下、モニタリング管理にて行った。MRI装置は7.0テスラ小動物用MRI Biospec 70/16, CryoProbeを使用し、計算上最大で21テスラによる高解像度撮影を行った。DTI解析はDiffusion Toolkit TrackVisにて行った。最終DTT撮影後に組織学的検討(HE染色、RT-97染色、CaMK2染色)を行った。また運動機能評価として、Digigaitによる歩行解析、Rotarod treadmillにおける歩行能力を定量的に評価した。

②臨床研究として、手術治療を要する頸椎・頸髄疾患患者20名の頸髄拡散MRIを術前と術後1年に撮像しDTTを用いて神経投射路を描出し、画像で得られたトラクトライン数と術前後の神経症状の重症度、改善率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。なお本臨床研究は

慶應義塾大学倫理委員会で既に承認を受けている(承認番号:19-84)。

2) 分子標的イメージングによる神経障害部位の炎症・疼痛の可視化

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Gd³⁺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(Gd³⁺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、Gd³⁺イオン配位DTPAデキストランを得た。デキストランへのGd³⁺イオン配位量は原子吸光法によるGd³⁺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°C12 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。この抗体導入反応の結果を基に、痛み物質に対する抗体をデキストランに化学導入した。その導入率は同様の方法で定量した。

3) 傍脊柱起立筋の炎症 (感染) と治療効果の可視化

リン脂質とコール酸ナトリウムをメタノール・クロロホルム溶液に溶解し真空乾燥でリピッドフィルムを作製後、Cy5.5 蛍光色素と VC 溶液を加え、超音波処理、限外濾過、シアリルルイス X の表面修飾を行い、蛍光標識 VC プローブを作製した。VC プローブの薬剤効果の評価のために内包量 (力価) を穿孔寒天平板法で測定し、か

つ長期保存後の薬剤安定も VC 漏出率と力価で評価した。また、正常と骨軟部組織感染マウスモデルを用いて VC プローブの感染部位への特異的な集積をバイオイメージングと組織切片で評価した。

次に成体雄 BALB/c マウスの浅殿筋にルシフェラーゼを発現する MRSA 5 \square 1 (8x10⁷CFU/ \square 1) を注入し浅殿筋感染モデルを作製した。細菌生着後に各種薬剤を連日投与し、MRSA とプローブ発光の経時的動態をバイオイメージングで観察し、経時的な組織学的検討も行った。治療群は VC 投与群 (VC110mg/kg, sc 2x/日 \approx 15mg/kg、iv 2x/日)、VC プローブ投与群 (VC22 \square g/kg 含有、iv 1x/日)、コントロール群 (C 群、VC 未含有プローブ、iv 1x/日) の 3 群とした。なお各プローブは Cy5.5 蛍光色素で標識した。

4) functional MRI を用いた腰痛に対する脳内変化の可視化

① 仮想腰痛痛み経験タスクによる脳活動部位の解析：若年成人 22 名を対象とし、問診および腰痛関連質問票 (Rolland - Morris Disability Questionnaire 日本語版, Oswestry Disability Index 2.0 日本語版) に回答させ、腰痛経験群と腰痛非経験群に分類した (表 1)。但し、明らかな神経学的所見を有する者や手術歴のある者は除外した。床に置いてある荷物を中腰姿勢で持ち上げる写真 (図 1) を提示した際に視覚情報によ

り誘発された脳神経活動を fMRI にて撮像した。また撮像後、写真提示によって生じた不快感および痛みを NRS (0-10) を用いて調べた。fMRI の解析には SPM2 を用いた。

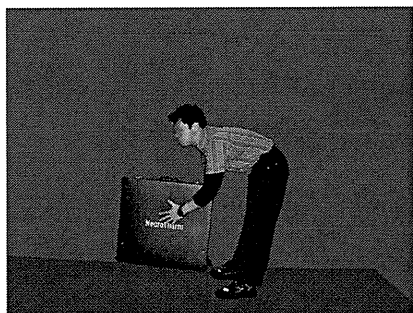


図 1 提示した写真

表 1 被験者特性

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

(倫理面への配慮)

本研究は愛知医科大学および高知大学医学部倫理委員会の審査を受けて実施した。また、対象には十分に説明を行い、文書による同意を得て実験を行った。

②慢性腰痛患者に対する疼痛刺激による脳内反応の変化：

シリーズ2：慢性腰痛患者8名と正常ボランティア10名を対象とした。包括席 QOL 尺度である SF-36、腰痛特異的 QOL 尺度 (RDQ) と精神医学的問題の簡易質

問票 (BS-POP) に回答してもらい、得点を算出し2群間を解析した。圧迫部位は、シリーズ1と同様で、圧迫力は、統一した圧迫力 (300kPa, 400kPa, 500kPa) に設定し、ブロック型パラダイム法で行った。MRI は、3.0 テスラ高速 MRI スキャナーを使用した。高速エコープランナー法による脳の T2 強調 MRI スキャンを行い、解析ソフトウェア Brain voyager を用いて、血中酸素濃度依存的 (BOLD) 信号を解析した。

本研究は、当該研究施設の倫理委員会にて承認されている。対象者の人権擁護として、研究の承諾の取り消しはいつでも行うことができる。対象者の不利益を一切被らない。個人情報を保護するために、匿名化したデータで解析を行う。以上の内容を含む研究参加説明書を用いて、研究内容を説明し、研究参加への承諾を得た。

5) 痛みの発生機序の生体力学的解析

腰椎変性疾患で固定術を予定している症例を対象とする。臨床評価パラメータとして術前と術後6カ月に神経学的所見、JOA スコア、腰痛、下肢症状の有無について調査する。CT 撮影は中間位、最大前後屈位、最大両回旋位の5ポジションで行い、PC ソフトウェアによる画像解析処理 (VR 法) により腰椎椎間運動の3次元解析を行う (図2)。



図 2

動作解析に関しては、術前の罹患変性椎間や術後の隣接椎間における正常動態との相違に注目する。各評価パラメータと椎間可動域との関連性についても検討を行う。

(倫理面への配慮)

①撮影により脊椎由来の症状が悪化する危険性への対策として、全撮影に必ず分担研究者が立会い、症状の変化に注意を払いながら撮影を行うこととし、症状に異変を生じた場合は速やかに撮影を中止する。

②X線被曝の問題。治療上CT撮影の必要な症例のみを対象としており、複数回の撮影でも中間位以外では撮影線量を1/5に低減して全被曝量の増加を抑えるようにしている。

(CTを用いたVR法の動作解析精度)

新鮮凍結ブタの脊椎を用いて動作解析手法の精度を検証した(図3)。

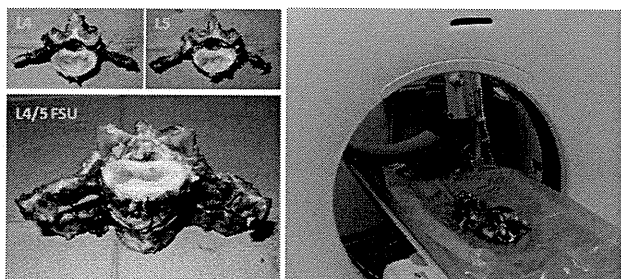


図 3

ブタ L4, L5 椎体を用いて、各骨内に tantalum ball を 8 個打ちこみ CT を撮影、marker-based registration により得られた値を正解値として、8 種類の椎間動作を VR 法による測定値と比較し、その誤差を RMSd として算出した。下表の如く非常に高い精度が得られた。

C. 研究結果

1) 脊髄・末梢神経の投射路の可視化

① *twy* マウス全ての個体(n=5)で経時的に DTT を撮影することに成功した。各 *twy* マウスにおける靭帯骨化の進行、程度、方向の個体間差も詳細に確認でき、経時的に進行する病変が描出可能であった。

MRI 横断像における脊柱管内の骨化占拠率を病理組織像における脊髄占拠率と比較検討すると、強い負の相関がみられた(図4)。同一個体の経時的な DTT 解析により、骨化占拠部の増大に伴い、脊髄内 tract fiber 数の減少がみられた(図5)。定量的解析のために、非圧迫部の tract fiber 数に対する圧迫部位の tract fiber 数の比率を tract fiber ratio として算出した。週齢の増加に伴い、15週から20週齢において有意に tract fiber ratio の減少がみられた(図6 A, B)。さらに圧迫部位の神経線維を免疫染 (RT97, SMI31) を行い定量すると、tract fiber ratio と強い正の相関がみられた(図6 C-F)。

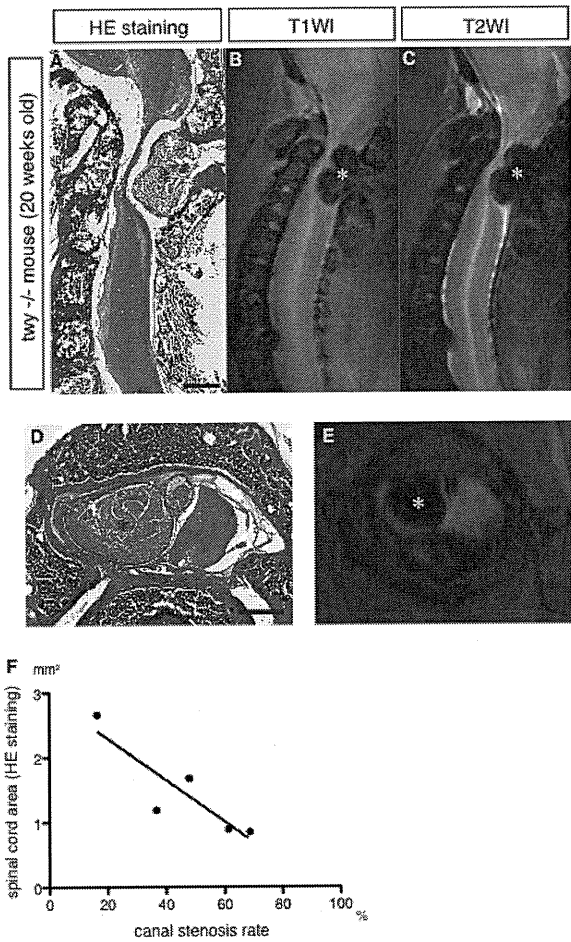


図 4

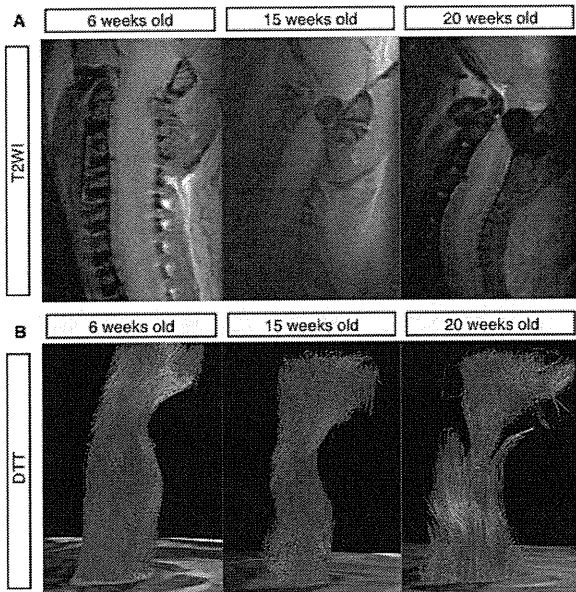


図 5

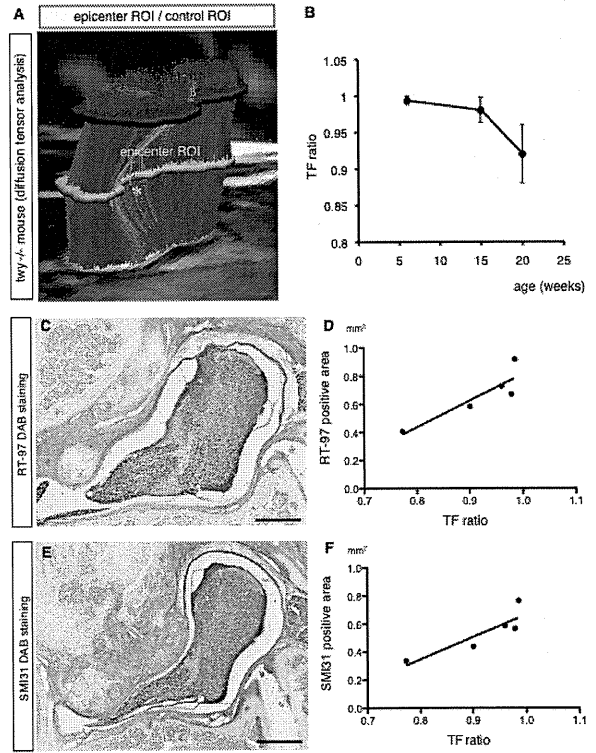


図 6

次に、tract fiber ratioと脊柱管狭窄率の経時的変化をみると、脊柱管狭窄率が50%を超えると急速にtract fiber ratioは減少した(図7)。

Digigait, rotarod treadmillによる運動機能評価の定量値は骨化占拠率、tract fiber ratioと相関を認めた。特に脊柱管狭窄率が60%を超えると運動機能の著しい低下をきたしていた(図8)。

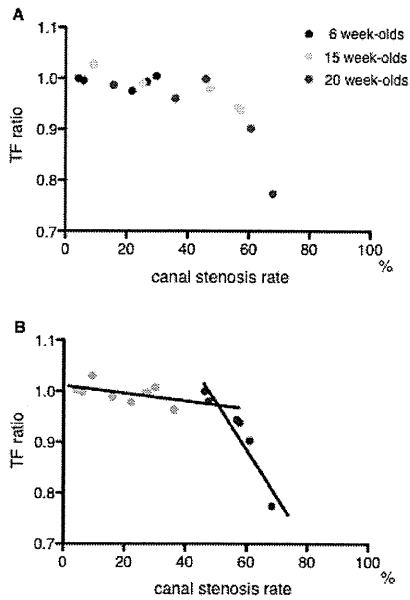


図 7

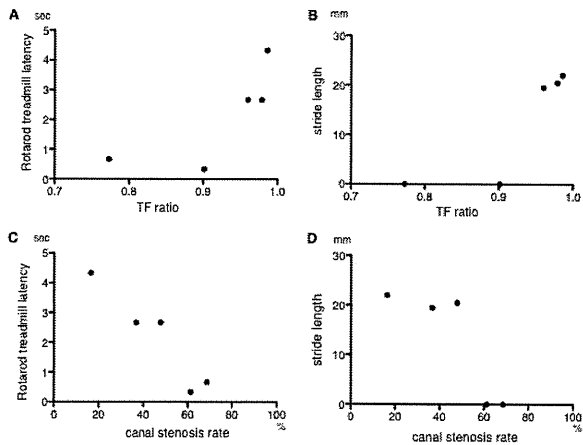


図 8

② 頸髄圧迫性脊髄症患者の脊髄投射路の可視化

術前Tract Fiben(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9)。

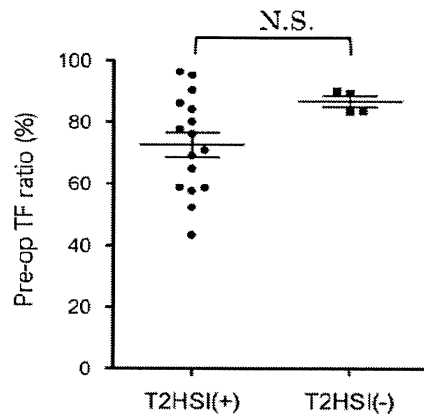


図 9

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10)。

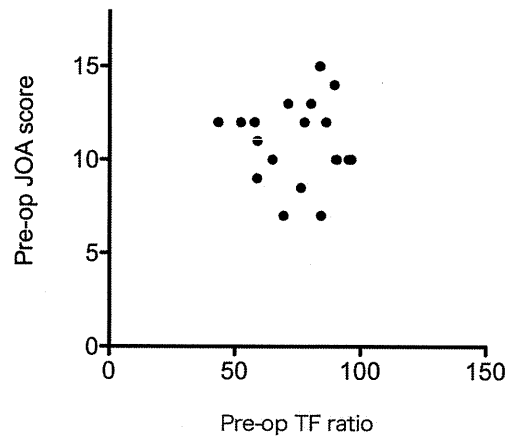


図 10

しかし、術後JOA scoreと術後TFratioの相関を調べると、弱い相関が見られた(図11)。

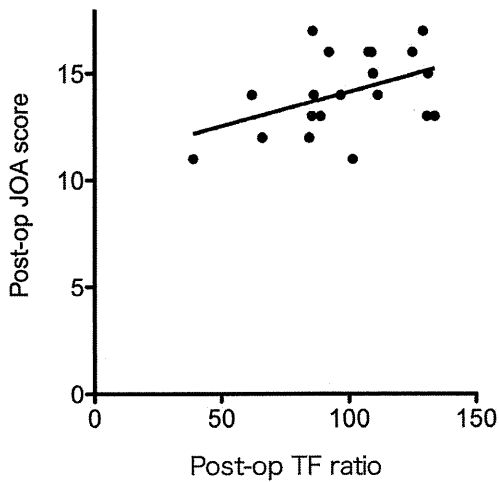


図 1 1

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 1 2)。

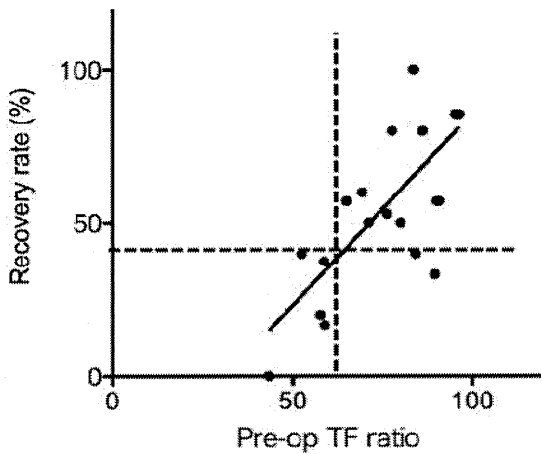


図 1 2

代表症例：54歳、男性で歩行障害と右上肢の巧緻運動障害が主訴であった。MRIでC5/6高位に脊髄圧迫を認めた。C4-6の片開き式脊柱管拡大術を行った。C5/6のtract fi

ber ratioは68%から86%へ増加し、JOA scoreも術前12点から16点へと改善した(図 1 3)。

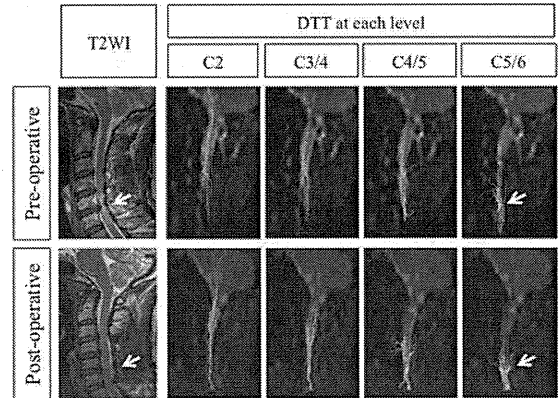


図 1 3

2) 炎症・疼痛の分子イメージング

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。痛み物質に対する IgG 抗体を用いて、デキストランへの導入反応を行った。活性のない IgG 抗体を用いた時と同様に抗体の導入が確認できた。また、導入反応条件を変えることによって、IgG 抗体導入率は変化することがわかった。

3) 傍脊柱起立筋の炎症（感染）と治療効果の可視化

VCプローブは30-40 μ g/mlのVCMを含有し、穿孔寒天平板法での*in vitro*評価では十分な抗菌効果を示した。4 $^{\circ}$ Cで1年間保存したVCプローブは、VC漏出率が皆無でかつ力価も変わらず維持されていた。*In vivo*評価では、正常マウスに投与したVCプローブは局所に集積することなく約2週間全身を循環し、消失した。一方で、感染マウスではVCプローブの静脈注射による単回投与直後より感染部位に特異的に集積し、約1週以上にわたり停滞していた。組織切片ではEセレクトリン染色領域がVCプローブのCy5.5蛍光部位に一致していた。

VCプローブ群とC群では、プローブ投与直後より蛍光色素が感染部位に特異的に集積していた。C群では投与開始後もMRS Aが2週以上にわたり発光強度を維持していた。一方、VC群とVCプローブ群では、共に投与開始後12時間から発光強度が減

弱し、VCプローブ群では投与開始7日目で発光が消失した。

4) 痛みに対する脳内反応の可視化

①仮想腰痛痛み経験タスクによる脳活動部位の解析：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14)。

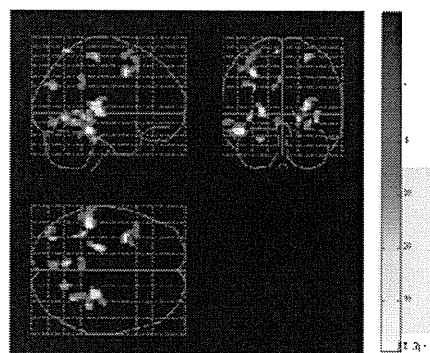


図14

2. 各指標との相関

a) ODI との相関は右 Insura (島) に認められた (図 15)。

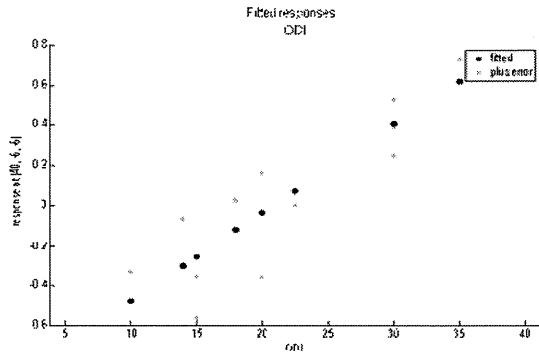


図 15

b) RDQ との相関は左の帯状回に認められた (図 16)。

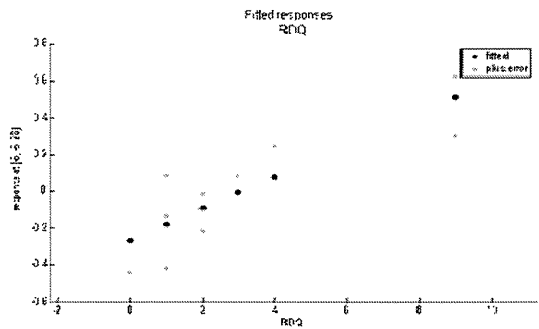


図 16

c) 痛み強さの程度との相関を右視床に認められた (図 17)。

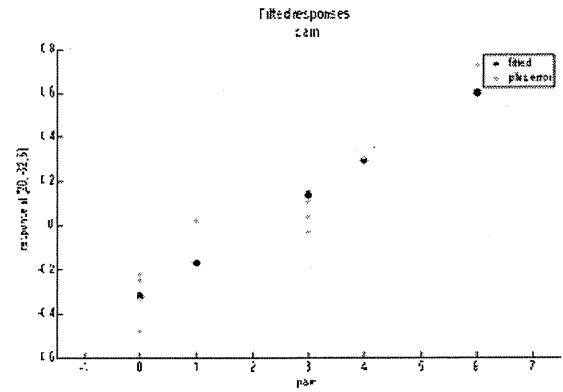


図 17

②慢性腰痛患者に対する疼痛刺激による脳内反応の変化

シリーズ 2 : 対象者の背景として、腰痛患者では、SF-36 のすべての下位尺度で有意に QOL が低下していた。また、腰痛関連 QOL も腰痛患者で低下しており、国民平均値より高得点で、腰痛有訴者のなかでは、本研究の対象者は、より QOL の低かった。腰痛患者の全例で、BS-POP 値が高値で精神学的問題を有していた。疼痛の程度は、圧迫の強さに従って、対象者の感じる疼痛の強さが有意に強くなった。しかし、2 群間で差が認められなかった。慢性腰痛患者の後帯状皮質での BOLD 信号は、健常者と比較して、有意に増大した (図 18)。

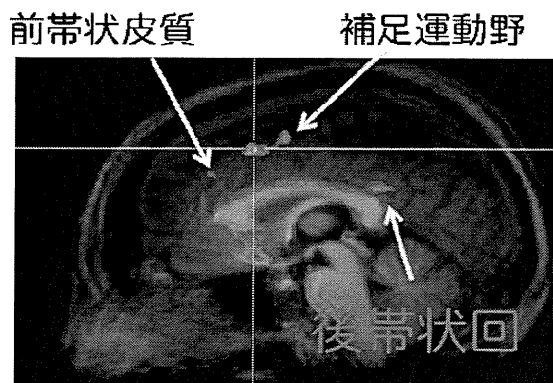


図 1 8

経時的な変化を解析したところ、BOLD 信号が、健常者では後帯状皮質の賦活が低下していたが、腰痛患者では、後帯状皮質の脳賦活が増大し、腰部圧迫刺激に対する反応の乖離が認められた (図 1 9)。

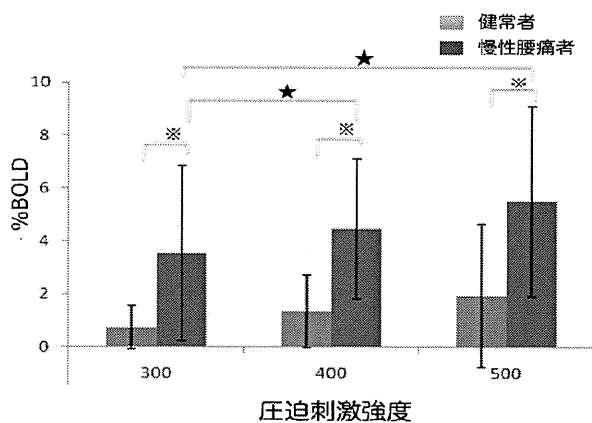


図 1 9

5) 痛みの発生機序の生体力学的解析

最終年度までに39例の撮影を終了した。疾患内訳は、変性すべり症21例、変性側弯6例、分離すべり症4例、腰椎固定術後隣接椎間障害3例、仙腸関節障害2例、腰部脊柱管狭窄症2例、L5形成不全性すべり症1例である。さらに、術後6カ月時の画像取得まで終了した症例は18例である。検討を容易にするため対象をL4腰椎変性すべり症に限定した。今回中でもL4/5にPLIF (posterior lumbar interbody fusion)を施行した6症例に関して、術前後での3次元動態の変化について検討した。椎間可動域変化率は、 $\Delta(\%) = (\text{術前} - \text{術後}) / \text{術前} \times 100$

と定義してangulation、translationを算出した。

1. 固定椎間(L4/5)における動態変化

症例	前後屈(°)		回旋(°)	
	術前	術後	術前	術後
1 66 ♀	14	2.4	7.6	2.5
2 58 ♀	12	1.2	6.8	1.4
3 69 ♂	6.1	6.8	8.0	2.4
4 69 ♂	8.2	3.6	0.4	0.9
5 46 ♀	15	0.7	4.0	0.5
6 61 ♂	6.6	0.8	4.7	1.3
平均	10.3	2.5	5.3	1.5

固定椎間では術後概して前後屈、回旋ともに可動域は減少していたが、可動域の残存する症例が少なからず存在した。

2. 固定隣接椎間(L3/4, L5/S)における動態変化

固定隣接上位椎間における術前後可動域変化(angulation)

症例	固定隣接上位椎間変化率			固定隣接下位椎間変化率		
		前後屈	回旋		前後屈	回旋
1 66 ♀	L3/4	-80% -7.5° (9.3°→1.8°)	-6% -0.1° (1.6°→1.5°)	L5/S	-7% -0.9° (11.5°→10.6°)	+100% +0.5° (0.5°→1.0°)
2 58 ♀	L3/4	+72% +13.2° (4.8°→18°)	-4% -0.1° (2.4°→2.3°)	L5/S	-55% -7.9° (14.3°→6.4°)	0% ± 0° (0.3°→0.3°)
3 69 ♂	L3/4	-1% -0.1° (9.7°→9.6°)	+14% +0.1° (1.1°→1.2°)	L5/S	+12% +0.7° (8.4°→9.1°)	+100% +0.3° (0.4°→0.7°)
4 69 ♂	L3/4	-46% -3.3° (7.2°→3.9°)	-62% -0.9° (1.5°→0.6°)	L5/S	+68% +3.4° (5.0°→8.4°)	-58% -0.6° (1.1°→0.5°)
5 46 ♀	L3/4	10% +1.1° (10.3°→11.4°)	234% +0.4° (0.2°→0.6°)	L5/S	-12% -1.8° (15.0°→13.2°)	172% +1.2° (0.5°→1.8°)
6 61 ♂	L3/4	5% +0.7° (11.7°→12.4°)	-24% -0.6° (2.5°→1.9°)	L5/S	+156% +7° (4.5°→11.5°)	-7% -0.1° (1.3°→1.2°)
平均		-6.7% +0.68°	+25% -0.2°		-27% +0.08°	+51% +0.22°

固定隣接上下位椎間における術前後可動域変化 (translation)

症例	固定隣接上位椎間変化率		固定隣接下位椎間変化率	
		前後屈		前後屈
1 66 ♀	L3/4	+350% +0.7mm (0.2mm→0.9mm)	L5/S	+45% +0.5mm (1.1mm→1.6mm)
2 58 ♀	L3/4	+180% +1.8mm (0.1mm→1.9mm)	L5/S	+62% -1.5mm (2.4mm→0.9mm)
3 69 ♂	L3/4	-73% -2.2mm (3.0mm→0.8mm)	L5/S	+100% +0.1mm (0.1mm→0.2mm)
4 69 ♂	L3/4	-78% -0.47mm (0.6mm→0.13mm)	L5/S	+30% +0.3mm (1.0mm→1.3mm)
5 46 ♀	L3/4	+63% +0.5mm (0.8mm→1.3mm)	L5/S	+340% +0.68mm (0.02mm→0.7mm)
6 61 ♂	L3/4	+350% +0.7mm (0.2mm→0.9mm)	L5/S	+350% +0.7mm (0.2mm→0.9mm)
平均		+115% +0.17mm		+155% +0.13mm

固定上下隣接椎間では、前後屈運動、回旋運動ともに概して術後には可動域が増加する傾向を認めた。

D. 考察

1) 脊髄・末梢神経の投射路の可視化:

*twy*マウスは自然発症靭帯骨化モデルであり、もし生きたままでの骨化や脊髄の経時的評価が可能となれば、慢性圧迫性脊髄障害の病態解明に大きな知見をもたらすことができる。本研究において世界で始めて*twy*マウスの同一個体を経時的に観察することにより、骨化進行と神経変性をMRIとDTTにより詳細に検討することができた。DTTによる解析結果が、RT-97,CaMK2陽性神経線維の組織学的評価、運動機能評価と相関が認められたことから、脊柱靭帯骨化による慢性圧迫脊髄障害を解析するのに有用な方法であると考えられた。骨化による脊髄圧迫が狭窄率50%を超えると、急速に脊髄内のtract fiber ratioが低下し、その後60%を超えると運動機能障害が出現したことから、DTTにより運動機能障害が出現する前段階で脊髄内の変化を捉えうる可能性が示唆された。臨床においても、脊柱靭帯骨化症の手術適応のタイミングを考える上で重要な情報をもたらすものと考えている。

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。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。今回の検討より、術前FT ratio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。

本研究により神経投射路の可視化が可能になれば、神経障害の早期診断や予防、さらには手術治療の適応のタイミングや予後予測につながり、脊椎脊髄による神経機能障害を軽減できる可能性があり、高齢者社会を向かえ重要な問題である要介護の原因である身体活動性の低下、閉じこもりを軽減することにより、国民の保健・医療・福祉の向上につながるものと確信している。

2) 疼痛・炎症の分子イメージング：

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。痛み物質に対する抗体を用いて CDI 活性法によってデキストランへの抗体導入が可能となり、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できることがわかった。 Gd^{3+} イオン配位固定デキストランへ化学導入された痛み物質に対する抗体の結合活性を調べたところ、痛み物質を認識できる活性を保持していることが確認された。しかしながら、抗体導入の最適化は行っておらず、抗体の導入反応の条件を変化させることなどによって、その修飾条件神経障害部位の炎症や疼痛の可視化効率を増強は可能となるであろう。

3) 傍脊柱起立筋の炎症（感染）と治療効果の可視化

整形外科領域におけるメチシリン耐性菌感染症は治療に難渋する事も多い。その原因には抗生物質の感染部位への不十分なデリバリーや副作用の出現などがある。我々は白

血球が感染や炎症が起きた部位の血管内皮に発現する E セレクチンを特異的に認識して血管外に遊走・集積する原理に着目し、E セレクチンを標的分子とするリポソームを用いたバイオイメージングによる炎症の定量的可視化に成功し、MRSA 感染症の特異的な抗生物質のデリバリー（抗生物質ターゲティング療法）の確立へ向けて、リポソームにバンコマイシン（VC）を含有させ、マウス感染症モデルで治療効果を実証した。VC プローブ治療では VC 投与量の約 1 万分の 1 という極低用量にもかかわらず、同等もしくはそれ以上の治療効果が得られた事から、VC プローブは体内を循環し、感染による炎症部位に発現する E セレクチンを特異的に認識して感染部位に遊走・集積し、局所の VC 濃度を上昇させることにより細菌増殖を抑制したと推測された。本法は MRSA 感染症に対する新たな治療法として大いに期待できる新技術である。

4) 痛みに対する脳内反応の可視化

腰痛を経験することで、通常であれば特別な感情や印象を引き起こさないような視覚情報から不快な情動体験が引き起こされることが示唆された。さらに、この不快な情動体験が起きているときの脳神経活動は、前運動野、補足運動野、視床、島、後帯状回、小脳、海馬、後部頭頂葉でみられた。福島医科大学グループが報告している腰痛患者の腰部に圧迫刺激を加えて腰痛を再現した際の

脳神経活動領域は前前頭皮質、補足運動野、前運動野、視床、島、後帯状回であり、これらを LBP matrix と表現している。腰痛の仮想体験と、実際の腰痛では、後帯状回、補足運動野、前運動野、小脳、視床で共通の活動がみられ、これらの部位は慢性痛患者の不快情動や、防御収縮に関連すると考えられる。また、腰痛の仮想体験と実体験の相違点に関して腰痛の仮想体験では刺激として視覚情報を用いていることから視覚連合野の活動や、視覚情報に人の顔（表情は隠されている）が含まれることから紡錘状回の活動がみられたと考えられる。一方、実際の腰痛を再現した際の脳神経活動では前頭前皮質の活動がみられたが腰痛の仮想体験ではみられなかった。前頭前皮質は、慢性腰痛を含めた多くの慢性痛において、慢性痛に伴う認知機能の変化との関連が示唆されている部位である。腰痛の仮想体験においても、認知機能の変化が関与するものと予想されるが、今回の実験結果からは腰痛の仮想体験では前頭前皮質の活動はみられなかった。前頭前皮質は腰痛の強度と関連があると報告する先行研究があり、今回の腰痛の仮想体験と実体験の被験者特性の違いが影響しているのではないかと考える。また、被験者特性のみでなく、今回の 2 実験間（腰痛の実体験に関しては福島医科大学の報告を参照）では撮像姿勢や撮像プロトコルに違いがあるため、厳密な比較については困難である。しかし、これまでに先行研究において、実際の痛み刺激と、痛み

刺激を与えられると予想する際の脳神経活動が類似することが示唆されていることから、腰痛の仮想体験と実体験では類似した脳神経活動がみられることが予想される。今後はより詳細な比較を行うために、腰痛の仮想体験および実体験に関する共通の実験プロトコルを作成し、それらに関わる脳神経活動の検索が必要と考える。

本研究の結果から、慢性腰痛患者では、圧迫刺激に対して、不快感の強い腰痛を感じていることが示唆された。さらに、感じている疼痛の程度が同じであっても、慢性腰痛患者では、脳賦活が増大していることから、fMRIが客観的評価法の1つになりうる可能性が示唆された。また、脳結合性の機能障害が示唆される所見が認められたことから、さらに後帯状皮質を含むネットワークの脳賦活とドーパミンシステムに関連する脳部位を検討する必要がある。

5) 痛みの発生機序の生体力学的解析

CTを用いたVR法では非常に高い精度で椎間運動の3次元動的動態の計測ができ、かつアニメーションによる動態の可視化により質的評価も可能である。これまで腰椎疾患や腰椎手術例などの病的な椎間に対する生体内3次元動的動態解析はこれまでほとんどな報告がなく、このような背景において今回初めて腰椎変性疾患に対する治療介入前後の生体内3次元動的動態変化を捉えることに成功した。

今回、固定椎間における動態変化の検討では、PLIF術後6か月の時点では、CTで一見骨癒合が認められると判断されるような椎間でも、椎間可動域が残存していることが詳細な可動域計測により判明した。PLIF後の骨癒合に関する報告に関して、大和田ら¹⁾はCFRP (carbon fiber reinforced polymer) cage併用PLIFでは18例全例に6か月以内で骨癒合が得られたと報告している。しかし我々の動作解析によると、術後6か月の段階では前後屈平均2.5° 回旋平均1.5° の可動性は残存しており、骨癒合は不完全と考えられる。固定術後の骨癒合判定はCTを以ってしても困難な場合がある。本法では微小な可動域を計測することが可能であり、今後術後様々な時期のPLIF術後症例複数を対象に横断的に本法による固定椎間の可動域測定値とCT画像上の骨癒合所見との相関を調査することで、将来的にはCT画像上から正確な骨癒合を判断できるような基準を設定したいと考えている。

腰椎固定手術後の隣接椎間障害については多くの報告があり、Parkらのreviewによれば、腰椎固定術後、隣接椎間に変性所見の出現・増強などの画像所見が認められる頻度は5.2%~100%であり、隣接椎間への追加手術の頻度は0~27.5%と報告されている²⁾。生体力学的な研究でも、椎間固定による可動椎間減少によりその隣接上下椎間に可動性亢進などの変化をきたすこと

が示されている³⁾。そしてこの可動性の変化は、インストルメントの長さや剛性の高さに比例する⁴⁾と報告されている。本研究でも隣接上下椎間の可動域は概して増加する傾向を認め、今後解析症例を増やして固定椎間の長さの違いによる隣接椎間可動性変化の相違についても検討を加える予定である。またOkudaらはL4/5 PLIFの術後症例において、隣接上位椎体椎弓の傾きや隣接上位椎間関節の関節面角度左右差が大きいことを隣接上位椎間障害の危険因子として明らかにしているが^{5,6)}、今回隣接上位椎間において回旋、前後屈ともに可動性が増加している症例も認められ、我々は隣接椎間における術後早期の前後屈、回旋各可動域増加が隣接椎間障害発症に関与していると推察している。本件についても引き続き症例数を増やして現在検討を続けているところである。

本手法の限界として、①腰椎可動域の再現性の問題：治療介入後の動態変化を捕捉するには、本来ならば一定可動域内における動態を比較することが望ましい。しかし、腰椎では体表からのランドマークが少なく、装具などで腰椎運動を規定しても、腰下肢痛の程度や患者の意欲、装具のフィッティングなどの影響を受け、高い再現性を保ちながら一定可動域を形成することが困難であった。結局本研究ではこの再現性の問題をクリアするために装具作成などにかかなりの労力を要した。②撮影範囲の間

題：前屈位での撮影では、体幹～頭部がCTの筐体に接触し、上位腰椎の撮影範囲はかなり患者の体格や姿勢により変化してしまっただけで、今回腰椎可動域の検討はL3/4高位以遠でしか行えなかった。

E. 結論

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、分子標的イメージングによる神経障害部位の炎症・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-CTを用いた腰椎変性疾患における腰椎の生体力学的解析などの最新のイメージング技術を駆使することにより、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、予後予測などの可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

- ・ DTT による神経投射路の可視化（臨床研究）：脊髄・脊椎疾患に対するMRIは通常の診療で既に確立された検査法である。通常のT1・T2強調画像に加えて、DTTを撮像することにより危険性や合併症は特にないと考える。

- ・慢性腰痛患者に対する疼痛刺激による脳内反応の変化：本研究では、MRI撮影による危険はない。撮影時の腰部圧迫刺激により、通常腰痛のない正常ボランティアに腰痛が出現する可能性がある。また、慢性腰痛患者には、現在ある腰痛が増強する可能性がある。

実際に生じた場合または、生じると予知し得た場合の対応は、鎮痛薬の投与で速やかに除痛する。この危険性または不利益と対応策については、研究参加説明書に明記し説明を行った。本研究では、腰痛が出現または増強した対象者はいなかった。

・痛みの発生機序の生体力学的解析における3D-CT撮影により脊椎由来の症状が悪化する危険性への対策として、全撮影に必ず分担研究者が立会い、症状の変化に注意を払いながら撮影を行うこととし、症状に異変を生じた場合は速やかに撮影を中止する。X線被曝の問題に関しては、治療上CT撮影の必要な症例のみを対象としており、複数回の撮影でも中間位以外では撮影線量を1/5に低減して全被曝量の増加を抑えており、危険性や合併症は特にないと考えている。

G.研究発表

1.論文発表

Shimo K, Ueno T, Younger J, et al.: Visualization of painful experiences believed to trigger the activation of affective and emotional brain regions in subjects with low back pain. PLoS One 6: e26681, 2011

Nagamoto Y, Ishii T, Sakaura H, Iwasaki M, Morimoto H, Kashii M, Yoshikawa H, Sugamoto K. In vivo three-dimensional kinematics of the cervical spine during head rotation in patients with cervical spondylosis. Spine 36:778-783, 2011

Fujimori T, Iwasaki M, Okuda S, Nagamoto Y, Sakaura H, Oda T, Yoshikawa H. Patient satisfaction with surgery for cervical myelopathy due to ossification of the posterior longitudinal ligament. J Neurosurg Spine. 14:726-733, 2011.

Hattori T, Sakaura H, Iwasaki M, Nagamoto Y, Yoshikawa H, Sugamoto K. In vivo three-dimensional segmental analysis of adolescent idiopathic scoliosis. Eur Spine J. 20:1745-1750, 2011.

Fujimori T, Iwasaki M, Nagamoto Y, Ishii T, Sakaura H, Kashii M, Yoshikawa H, Sugamoto K. Three-dimensional measurement of growth of ossification of the posterior longitudinal ligament. J Neurosurg Spine. 16:289-295, 2012

Nakamura M, Fujiyoshi K, Tsuji O, Konomi T, Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Momoshima S, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Clinical significance of diffusion tensor tractography as a prognostic predictor of functional recovery in cervical compressive myelopathy patients after laminoplasty. J Neurosurg 2012 (in press)

Funao H, Ishii K, Nagai S, Sasaki A, Hoshikawa T, Aizawa M, Okada Y, Chiba K, Koyasu S, Toyama Y, Matsumoto M. Establishment of a Real-time Quantitative and Reproducible Mouse Model of Staphylococcal Chronic Osteomyelitis using Bioimaging Techniques. Infection and Immunity 80:733-741, 2012.