

図 2

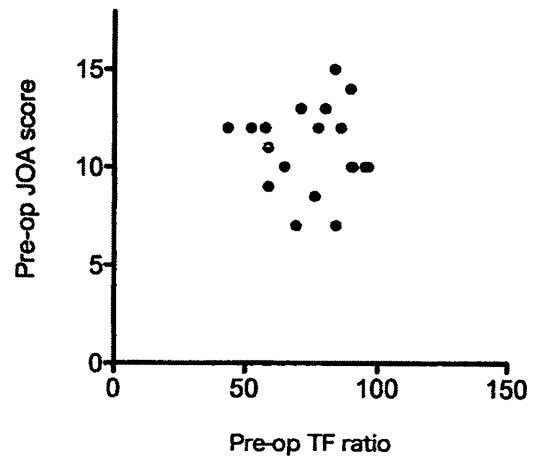


図 4

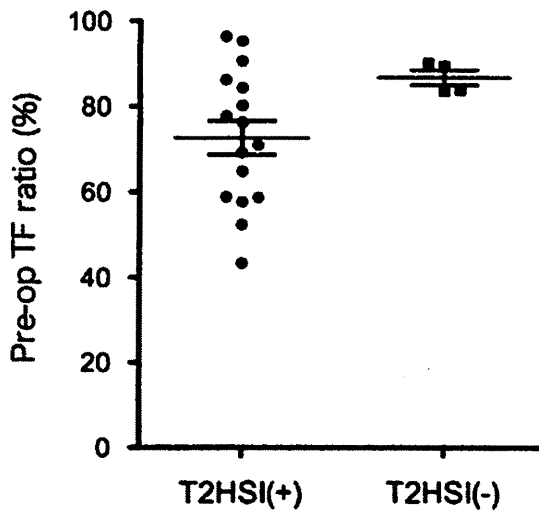


図 3

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)。

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)。

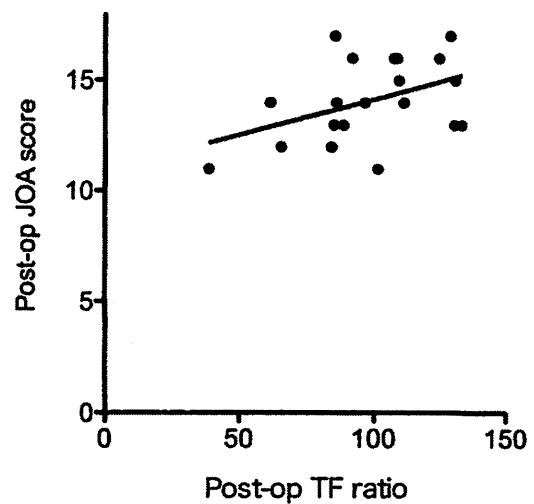


図 5

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)。

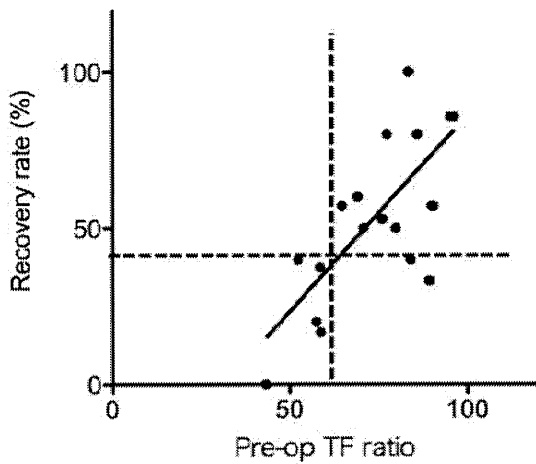


図 6

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 fiber 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7）。

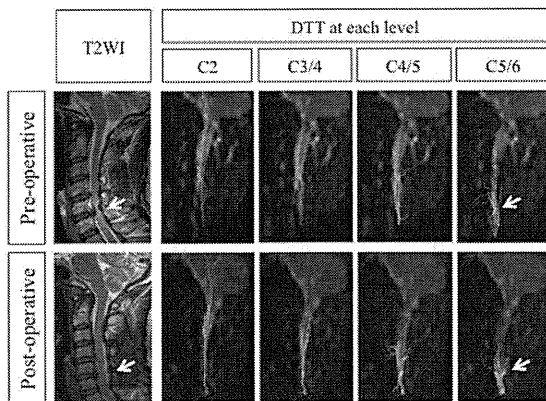


図 7

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。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、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、T2HSI+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、グリア瘢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

1. 論文発表

Takano M, Komaki Y, Hikishima K, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. *In vivo* tracing of neural tracts in *twy* mice by diffusion tensor tractography. (in submission)

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)

著書 (総説)

安田明正, 辻収彦, 藤吉兼浩, 戸山芳昭, 岡野栄之, 中村雅也:【脊髄損傷治療の現状とこれから】 人工多能性幹(iPS)細胞を用いた脊髄損傷治療 *脳* 21 14:126-132, 2011

向野雅彦, 中村雅也 損傷脊髄の再生医療: *Journal of Clinical Rehabilitation* 20:456-459, 2011

辻収彦, 戸山芳昭, 中村雅也:【脊髄損傷-その研究成果と臨床の現状】脊髄損傷の基礎研究 細胞関連 iPS 細胞由来神経幹細胞. *Bone Joint Nerve* 1:439-445, 2011

辻収彦, 三浦恭子, 中村雅也, 岡野栄之:【iPS細胞の再生医療の実現へ向けた動向】 iPS細胞の安全性と脊髄損傷への応用. *細胞* 4:371-375, 2011

小林喜臣, 海苔聡, 安田明正, 岡田洋平, 藤吉兼浩, 辻収彦, 戸山芳昭, 中村雅也, 岡野栄之:【iPS細胞の臨床応用の展望】 iPS細胞を用いた脊髄再生医療の最前線. *BIO Clinica* 26:781-786, 2011

海苔聡, 辻収彦, 戸山芳昭, 岡野栄之, 中村雅也: iPS細胞由来神経幹細胞移植による脊髄損傷治療. *整災外* 54:1132-1133, 2011

高橋勇一郎, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: 整形外科領域における蛍光イメージング

脊髄再生関連 神経幹細胞の蛍光発光標識によるイメージングと応用. 臨整外 47:7-15, 2012

船尾陽生, 石井賢, 蔵本哲也, 塩野雄太, 吉岡研之, 石濱寛子, 中村雅也, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄 誌上シンポジウム 整形外科領域における蛍光イメージング 整形外科の基礎研究における蛍光・バイオイメージング法 感染症領域への応用. 臨整外 47:43-49, 2012

4. 学会発表: (国内)

海苔聡, 岡田洋平, 辻収彦, 高橋勇一郎, 安田明正, 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40回日本脊椎脊髄病学会 (2011, 4)

安田明正, 辻収彦, 芝田晋介, 藤吉兼浩, 高橋勇一郎, 海苔聡, 小林喜臣, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: 脊髄損傷に対する神経幹細胞移植後の機能回復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解析-. 第40回日本脊椎脊髄病学会 (2011, 4)

小林喜臣, 岡田洋平, 岩井宏樹, 西村空也, 海苔聡, 許斐恒彦, 藤吉兼浩, 辻収彦, 山中伸弥, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: サル脊髄損傷に対するヒト iPS細胞由来神経前駆細胞移植. 第40回日本脊椎脊髄病学

会 (2011, 4)

藤吉兼浩, 辻収彦, 疋島啓吾, 岩井宏樹, 西村空也, 小林喜臣, 許斐恒彦, 松本守雄, 千葉一裕, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: 霊長類同種神経幹細胞移植による脊髄再生メカニズムの検討. 第40回日本脊椎脊髄病学会 (2011, 4)

許斐恒彦, 藤吉兼浩, 疋島啓吾, 辻収彦, 高橋勇一郎, 海苔聡, 安田明正, 小林喜臣, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: Q-space imagingを用いた霊長類圧挫脊髄損傷の機能的予後予測. 第40回日本脊椎脊髄病学会 (2011, 4)

許斐恒彦, 藤吉兼浩, 疋島啓吾, 辻収彦, 高橋勇一郎, 海苔聡, 安田明正, 小林喜臣, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: 拡散テンソル解析 (DTI) を用いた脊髄圧挫損傷後のワーラー変性の描出. 第40回日本脊椎脊髄病学会 (2011, 4)

中村雅也, 許斐恒彦, 藤吉兼浩, 辻収彦, 細金直文, 渡辺航太, 辻崇, 石井賢, 百島祐貴, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄: 拡散テンソル投射路撮影による頸髄疾患の予後予測. 第40回日本脊椎脊髄病学会 (2011, 4)

藤吉兼浩, 中村雅也, 許斐恒彦, 辻収彦, 疋島啓吾, 小牧祐司, 戸山芳昭, 岡野栄之: 脊髄損傷モデルおよび再生過程における軸索および髄鞘の可視化の試み 第26回学術

集会 神経組織の成長・再生・移植研究会
(2011, 6)

安田明正, 辻収彦, 芝田晋介, 海苔聡, 高野盛登, 小林喜臣, 高橋勇一郎, 藤吉兼浩, 戸山芳昭, 岡野栄之, 中村雅也: 脊髄損傷に対する神経幹細胞移植後の機能回復における再髄鞘化の重要性 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 (2011, 10)

海苔聡, 岡田洋平, 安田明正, 辻収彦, 高橋勇一郎, 小林喜臣, 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26回日本整形外科学会基礎学術集会 (2011, 10)

岩井宏樹, 海苔聡, 安田明正, 高橋勇一郎, 辻収彦, 原央子, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: マウス脊髄損傷モデルに対する神経幹細胞移植の至適部位の検討 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 (2011, 10)

許斐恒彦, 藤吉兼浩, 疋島啓吾, 辻収彦, 安田明正, 海苔聡, 小林喜臣, 高野盛登, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: 霊長類圧挫損傷脊髄の残存神経線維の定量化 拡散テンソルトラクトグラフィ (DTT) を用いて 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 (2011, 10)

高野盛登, 高橋勇一郎, 安田明正, 海苔聡,

辻収彦, 戸山芳昭, 岡野栄之, 中村雅也: 老年マウス脊髄損傷における神経幹細胞移植治療の検討 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 (2011, 10)

小林喜臣, 岡田洋平, 岩井宏樹, 西村空也, 海苔聡, 許斐恒彦, 藤吉兼浩, 辻収彦, 山中伸弥, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: サル脊髄損傷に対するヒトiPS細胞由来神経前駆細胞移植の有効性の検討 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 (2011, 10)

西村空也, 安田明正, 岩井宏樹, 海苔聡, 辻収彦, 高橋勇一郎, 戸山芳昭, 岡野栄之, 中村雅也: マウス慢性期脊髄損傷モデルに対する神経幹細胞移植の検討 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 (2011, 10)

藤吉兼浩, 許斐恒彦, 辻収彦, 疋島啓吾, 松本守雄, 千葉一裕, 百島祐貴, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: 非侵襲的髄鞘可視化法 "Myelin map" の精度検証と臨床応用. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 (2011, 10)

岩井宏樹, 海苔聡, 辻収彦, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: マウス損傷脊髄に対する神経幹細胞移植の至適移植部位に関する検討 第46回日本脊髄障害医学会 (2011, 11)

名越慈人, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: 脊髄損傷における自己修復機構-内在性シ

ユワン細胞の寄与- 第46回日本脊髄障害医学学会 (2011, 11)

(海外)

Nagoshi N, Shibata S, Matsuzaki Y, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Schwann cell plasticity after spinal cord injury shown by neural crest lineage tracing. Cervical Spine Research Society Asian Pasific section 2nd Annual meeting, oral poster (Busan, 2011,4)

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 patients with cervical compressive myelopathy after laminoplasty. Cervical Spine Research Society Asian Pasific section 2nd Annual meeting, oral presentation (Busan, Korea, 2011,4)

Shimada H, Okada Y, Tomioka I, Sasaki E, Nakamura M, Okano H Efficient derivation of neural stem cells from common marmoset ES cells and iPS cells. ISSCR2011, poster (Toronto, Canada, 2011,6)

Kobayashi Y, Okada Y, Iwai H, Nishimura S, Nori S, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H Pre-evaluated safe human iPS clone derived neural stem cells promoted functional recovery after spinal cord injury without tumorigenicity in adult common marmosets. ISSCR 2011,

poster (Toronto, Canada, 2011,6)

Yasuda A, Tsuji O, Shibata S, Nori S, Kobayashi Y, Takano M, Takahashi Y, Fujiyoshi K, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Significance of remyelination by grafted neural stem/progenitor cells into the injured spinal cord. ISSCR2011, poster (Toronto, Canada, 2011,6)

Takano M, Takahashi Y, Yasuda A, Nori S, Tsuji O, Toyama Y, Okano H, Nakamura M Transplantation of neural stem cells improves outcome from spinal cord injury in aged mice. ISSCR 2011, poster (Toronto, Canada, 2011,6)

Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H Transplantation of human iPS cell-derived neurospheres for the treatment of spinal cord injury in nod-scid mice. ISSCR 2011 (Toronto, Canada, 2011,6)

Shimada H, Okada Y, Tomioka I, Sasaki E, Nakamura M, Okano H Differentiation into neural lineage cells which are the most appropriate for transplantation into spinal cord injury model from common marmoset (*Callithrix jacchus*) ES / iPS cells, ISSCR2011, poster (Toronto, Canada, 2011,6)

Yasuda A, Tsuji O, Shibata S, Nori S, Takano M, Kobayashi Y, Takahashi Y, Fujiyoshi K, Toyama Y, Nakamura M, Okano H Significance of re-myelination by neural stem/progenitor cells grafted into the injured spinal cord 41st Annual meeting Neuroscience 2011, poster (Washington DC, USA 2011,11)

Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H Transplantation of human iPSC-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in NOD-scid mice 41st Annual meeting Neuroscience 2011, poster (Washington DC, USA, 2011,11)

Iwai H, Nori S, Tsuji O, Yasuda A, Takahashi Y, Hara C, Toyama Y, Nakamura M, Okano H Investigation of the optimal transplantation site of neural stem/progenitor cells for spinal cord injury in adult mice. 41st Annual meeting Neuroscience 2011, poster (Washington DC, USA, 2011,11)

Konomi T, Fujiyoshi K, Hikishima K, Komaki Y, Tsuji O, Yasuda A, Nori S, Kobayashi Y, Takano M, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Nakamura M Quantitative tracing of spared fibers after contusive spinal cord injury by diffusion tensor tractography in common marmosets 41st Annual meeting Neuroscience 2011, poster (Washington DC, USA, 2011,11)

Takano M, Takahashi Y, Yasuda A, Nori S, Tsuji O, Toyama Y, Okano H, Nakamura M Comparative study of neural stem cell transplantation for spinal cord injury in between young and aged mice. 41st Annual meeting Neuroscience 2011, poster (Washington DC, USA, 2011,11)

Kobayashi Y, Okada Y, Iwai H, Nishimura S, Nori S, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H.

Pre-evaluated safe human iPSC-derived neurospheres promote functional recovery after spinal cord injury without tumorigenicity in adult common marmosets 41st Annual meeting Neuroscience 2011, poster (Washington DC, USA, 2011,11)

Nishimura S, Yasuda A, Iwai H, Nori S, Tsuji O, Takahashi Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Comparative study of sub-acute and chronic neural stem cell transplantation for spinal cord injury in adult mice 41st Annual meeting Neuroscience 2011, poster (Washington DC, USA, 2011,11)

Tsuji O, Konomi T, Fujiyoshi K, Yasuda A, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Okano HJ, Okano H, Nakamura M. In vivo imaging of neuropathic pain using novel transgenic mice 41st Annual meeting Neuroscience 2011, poster (Washington DC, USA, 2011,11)

Shimada H, Okada Y, Tomioka I, Sasaki E, Nakamura M, Okano H. Efficient derivation of neural stem cells from common marmoset ES cells and iPS cells. 41st Annual meeting Neuroscience 2011, poster (Washington DC, USA, 2011,11)

Fujiyoshi K, Tsuji O, Hikishima K, Yamada M, Kitamura K, Momoshima S, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. q-space MR imaging depict demyelination after spinal cord injury in non-human primate 41st Annual meeting Neuroscience 2011, poster (Washington DC, USA, 2011,11)

Takano M, Takahashi Y, Yasuda A, Nori S, Tsuji O, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Comparative study of neural stem cell transplantation for spinal cord injury in between young and aged mice. Cervical Spine Research Society 39th Annual Meeting, poster (Arizona, USA, 2011,12)

Konomi T, Fujiyoshi K, Hikishima K, Komaki Y, Tsuji O, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Quantitative tracing of spared tract fibers after contusive spinal cord injury by in vivo diffusion tensor tractography: non-human primates study. Cervical Spine Research Society 38th Annual Meeting, poster (Arizona, USA, 2011, 12)

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 myelopathy after laminoplasty. Cervical Spine Research Society 38th Annual Meeting, poster (Arizona, USA, 2011,12)

Konomi T, Fujiyoshi K, Hikishima K, Komaki Y, Tsuji O, Toyama Y, Okano H, Nakamura M, In vivo Myelin map can predict functional prognosis after contusion spinal cord injury in common marmosets. Cervical Spine Research Society 38th Annual Meeting, poster (Arizona, USA, 2011,12)

Tsuji O, Fujiyoshi K, Miura K, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Yamanaka S, Okano H, Nakamura M, Therapeutic potential of

appropriately evaluated 'safe' induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. Cervical Spine Research Society 38th Annual Meeting, poster (Arizona, USA, 2011,12)

Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H, Transplantation of human iPSC-derived neurospheres for the treatment of spinal cord injury in NOD-scid mice. Cervical Spine Research Society 38th Annual Meeting, poster (Arizona, USA, 2011,12)

Kobayashi Y, Okada Y, Iwai H, Nishimura S, Nori S, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama Y, Yamanaka S, Okano H, Nakamura M, Pre-evaluated safe human iPS clone derived neural stem cells promoted functional recovery after spinal cord injury without tumorigenicity in adult common marmosets. Cervical Spine Research Society 38th Annual Meeting, oral presentation (Arizona, USA, 2011,12)

Tsuji T, Watanabe K, Hosogane N, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y, Matsumoto M, Selective open-door laminoplasty reduce postoperative c5 palsy by reducing excessive posterior shift of spinal cord. Cervical Spine Research Society 38th Annual Meeting, oral presentation (Arizona, USA, 2011,12)

Fujiyoshi K, Tsuji O, Konomi T, Hikishima K, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Okano H, Nakamura M, A novel in vivo myelin MR imaging elucidated the mechanism of spinal cord injury. Cervical Spine Research Society 38th

Annual Meeting, oral presentation (Arizona,
USA, 2011,12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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

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、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)を介して、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に配位固定化した。次に、 Gd^{2+} 配位固定化デキストランに痛み物質に対する抗体を化学導入した。抗体導入率ならびに DTPA 導入率により異なる Gd^{3+} イオン配位デキストランを作製できた。

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關与する特

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。加えて、炎症・疼痛物質に対する抗体をMRIプローブ固定化デキストランに化学導入することで、痛みの可視化を目指す。

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,N³カルボジイミダソール(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。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。

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 活性法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。

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。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。

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。生理活性をもつ抗体導入を用いることで、化学導入後においても、その認識活性をもっていることが確認された。今後は、この DDS 化条件の最適化を行い、動物を用いた痛みの可視化効率を検討することが必要となる。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

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）

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—

研究分担者 石井 賢 慶應義塾大学医学部整形外科 講師

研究要旨:近年の高齢化社会を背景に腰椎感染症が増加傾向にある。腰椎感染症は激しい腰痛症状のみならず時に重篤な神経障害を呈する。本年度は腰椎感染症による炎症の可視化、診断、治療に焦点を置き研究を実施した。われわれは感染周囲の血管内皮に発現するEセレクトリンに注目し、同分子を標的分子としたシアリルルイスXを表面修飾したリポソームを開発し、バイオイメージングの手法を用いて感染症に伴う炎症の特異的可視化に成功した。さらに同リポソームに抗生物質（バンコマイシン）を内包し、傍脊柱MRSA感染症マウスモデルに投与してその治療効果を検証した。その結果、抗生物質の通常投与量の約1万分の1という極微量バンコマイシンで通常投与より強力な治療効果を得た。さらに通常投与量で出現する腎障害などの抗生物質の副作用を抑制することも観察された。

A. 研究目的

メチシリン耐性菌感染症は治療に難渋する症例が少なくない。その原因として抗生剤の感染巣への不十分なデリバリーや副作用の出現などがある。今回我々は、MRSA感染症に対する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、感染巣血管内皮に発現するEセレクトリンを特異的に認識するバンコマイシン（VC）含有プローブ（VCプローブ）の開発を試みた。また、開発したVCプローブのマウスMRSA感染症モデルにおける治療効果を評価した。

B. 研究方法

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 μ l (8 \times 10⁷CFU/ μ l) 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 \Rightarrow 15mg/kg、iv 2x/日)、VC プローブ投与群 (VC220g/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。

(倫理面への配慮)

本研究に関わるすべての動物実験は慶應義塾大学動物実験規則 (指針) に遵守して実施した。

C. 研究結果

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 セレクチン染色領域が 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 MRSA 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。

D. 考察

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¹⁾、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²⁾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^{3) 4)}。

E. 結論

VC プローブを用いた MRSA 感染症に対する抗生物質ターゲティング療法に成功した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

G. 発表

論文

Haruki Funao, Ken Ishii, Shigenori Nagai, Aya Sasaki, Tomoyuki Hoshikawa, Mamoru Aizawa, Yasunori Okada, Kazuhiro Chiba, Shigeo Koyasu, Yoshiaki Toyama, Morio Matsumoto. Establishment of a Real-time Quantitative and Reproducible Mouse Model of Staphylococcal Chronic Osteomyelitis using Bioimaging Techniques. *Infection and Immunity*. 80:733-741, 2012.

学会発表

1. 蔵本哲也, 石井賢, 船尾陽生, 永井重徳, 佐々木文, 岡田保典, 千葉一裕, 小安重夫, 戸山芳昭, 松本守雄. バイオイメージングを用いた傍脊柱筋感染に伴う炎症部位の可視化の試み.

第40回日本脊椎脊髄病学会; 2011 4月21日-5月9日; web.

2. 船尾陽生, 石井賢, 永井重徳, 佐々木あや, 干川智之, 相澤守, 岡田保典, 千葉一裕, 小安重夫, 戸山芳昭, 松本守雄. 定量的マウス慢性骨髄炎モデルを用いた新規抗菌インプラントの開発. 第3回in vivo micro CTフォーラム(慶應大学病院); 2011 8月26日; 東京.
3. 蔵本哲也, 石井賢, 平井政彦, 船尾陽生, 永井重徳, 相澤守, 佐々木文, 岡田保典, 千葉一裕, 小安重夫, 戸山芳昭, 松本守雄. 抗生物質ターゲティング療法の確立へ向けた抗生剤含有・炎症プローブの開発. 第33回日本バイオマテリアル学会; 2011 11月21日-22日; 京都.
4. 蔵本哲也, 石井賢, 平井政彦, 船尾陽生, 永井重徳, 相澤守, 佐々木文, 岡田保典, 千葉一裕, 小安重夫, 戸山芳昭, 松本守雄. 整形外科領域耐性菌感染症に対する新規治療法の開発—抗生物質ターゲティング療法—. 第33回日本バイオマテリアル学会; 2011 11月21日-22日; 京都.
5. 蔵本哲也, 石井賢, 平井政彦, 船尾陽生, 永井重徳, 佐々木文, 岡田保典, 千葉一裕, 小安重夫, 戸山芳昭, 松本守雄. 骨軟部組織感染症における抗

生物質ターゲティング療法の確立へ
向けて—抗生剤含有・炎症プローブの
開発—。日本整形外科基礎学術集
会；群馬

1. 蔵本哲也、石井賢、永井重徳、船尾陽生、平井政彦、佐々木文、岡田保典、千葉一裕、小安重夫、戸山芳昭、松本守雄。整形外科領域耐性菌感染症に対する新規治療法の開発—抗生物質ターゲティング療法—。日本整形外科基礎学術集会；群馬
2. 石井賢。定量的マウス慢性骨髄炎モデルを用いた新規抗菌インプラントの開発。第3回 in vivo CTフォーラム；2011 8月26日；東京。
3. 石井賢。腰部脊柱管狭窄症の薬物療法。東京都病院薬剤師会臨床薬学研究会；2011 9月14日；東京。
4. 石井賢。New MIS pedicle screw system: illico se. 第18回日本脊椎・脊髄神経手術手技学会；2011 9月23日-24日；浦安。
5. 石井賢。MIS手技へのパラダイムシフト。第18回日本脊椎・脊髄神経手術手技学会；2011 9月23日-24日；浦安。
6. 石井賢。Glycolipo™を用いた炎症の可視化と新規感染症治療の確立。共同利用機器室主催 テクニカルセミナー「標的指向性リポソームを用いたin vivo 蛍光イメージングとDDS」；2011 9月28

日；東京。

7. 石井賢。最小侵襲脊椎内視鏡固定術の基本手技とピットホール。5th Chiba Spine Youth Meeting；2011 10月1日。
8. 石井賢。低侵襲手術。第20回日本脊椎インストゥルメンテーション学会；2011 10月26日-29日；久留米。
9. 石井賢。MIS-TLIF手技。第20回日本脊椎インストゥルメンテーション学会；2011 10月26日-29日；久留米。
10. 石井賢。S-wireの開発経緯と有用性。第2回MIS研究会；2011 11月5日；伊香保。

H. 財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：未取得
2. 実用新案登録：未取得
3. その他：特になし

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

研究分担者 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

研究要旨：我々は前年度および今年度で、腰痛患者の腰部に圧刺激を与えて腰痛を再現した場合の脳機能イメージング（福島県立医科大学報告）および視覚情報によって腰痛の仮想体験を生じさせた場合の脳機能イメージング（愛知医科大学）について検討した。今年度は、腰痛の仮想体験に関する研究の報告を行うとともに、実際の腰痛を感じている場合とどのような相違があったかについて検討したので報告する。

腰痛経験群では、視覚情報によって **virtual low back pain** と表現できるような不快な情動体験を経験した。視覚情報による **virtual low back pain** 経験中の脳神経活動を調べたところ、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とは島、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、不快な情動体験や防御収縮などに関わると考えられる。また、**virtual low back pain** では身体図式の保持に関わる後部頭頂葉で、実際の腰痛では腰痛の強度と関係があるとされている前頭前皮質で、それぞれ特徴的に活動がみられた。

しかし、ふたつの実験のデザインには相違点が多く存在するため、**virtual low back pain** と実際の腰痛との比較にはさらなる詳細な検討が必要である。

A. 研究目的

痛み、特に慢性痛は局所の器質的要素に加えて個々人の心理的要素や社会的要素によって複雑な病態を形成するとされている。心理的要素が痛みに及ぼす影響に関して、近年のイメージング研究によって、過去の痛み体験によって健常者やCRPS患者で視覚情報から **virtual pain** と表現できる不快な情動体験を経験することが報告されている。我々は、運動器の疼痛であり、日常の診療においても多く遭遇する慢性腰痛において

も同様に、過去の痛み体験によって、実際の侵害刺激がなくとも **virtual low back pain** を経験するという仮説に基づき、それを検証するために fMRI を用いた実験を行った（平成 22, 23 年度）。そこで今回は、腰痛の仮想体験についての検討を報告する。また、我々の実験の結果と、腰痛患者の腰部に圧刺激を加えて実際の腰痛を再現した際の脳神経活動を調べた研究（福島医科大学グループ）の結果と比較を行い、腰痛の仮想体験と実際の腰痛の共通点と相違点に

ついて報告する。

B. 研究方法（腰痛の仮想体験）

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。

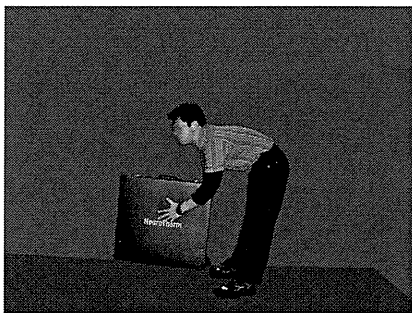


図 1 提示した写真

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。

C. 研究結果

腰痛経験群では写真提示により全員が不快感を経験し、さらに実際に痛みを訴えた被験者もいた（表 2）。腰痛非経験群では不快感、痛みともに訴える者はいなかった。fMRI による解析では、腰痛経験群は腰痛非経験群に比べて、前運動野、補足運動野、視床、島、後帯状回、小脳、海馬、後部頭頂葉などで有意な脳神経活動がみられた（図 2）。

表 2 提示された写真を見た際の痛みおよび不快感（NRS）

腰痛経験群		腰痛非経験群	
痛み	平均 2.1 / 10 (0-6)	痛み	0 / 10
不快感	平均 3.5 / 10 (1-6)	不快感	0 / 10

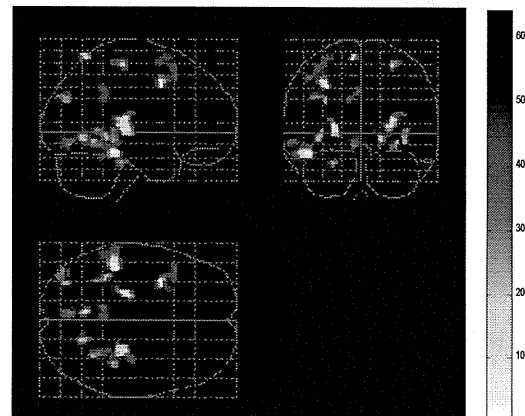


図2 提示された写真を見たときの脳神経活動

D. 考察

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を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（図3、上段）。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（図3、下段）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。

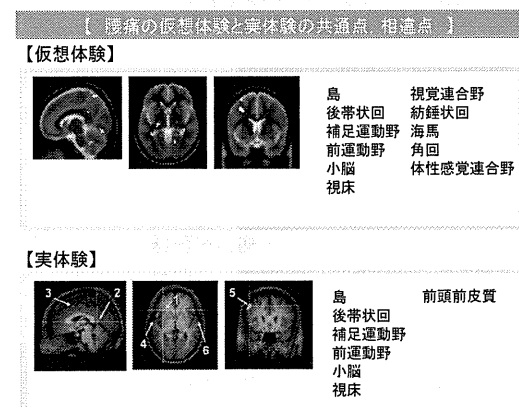


図3 LBP 腰痛の仮想体験，実体験に関わる脳神経活動