



図2 カスタムメイド型人工骨 (CT-Bone) の作製過程

患者の欠損部に適合する人工骨を作製するため、まず、それぞれの患者の3D石膏モデル上で、ワックスを用いて人工骨のデザインを形成する。CTを撮影し、形成したワックス部分の形状をDICOMデータとして取り込み、3Dインクジェットプリンターを用いてCT-Boneを作製する。

法である。このように、再生医療は必ずしも目新しい治療というわけではなく、従来から行われている治療にも、再生医療の概念を利用した治療法が散見される。

骨再生医療の基礎的研究

自家骨移植では採骨部への侵襲は避けられず、採取量にも限界があるため、米国を中心とした諸外国では、死体から採取した凍結保存の他家骨移植が盛んに行われている。他家骨では、採取する骨の量や形態は問題とならず、移植予定の患者も、採骨が不要となるため負担が軽減する。凍結により細胞は死に、基質内の成長因子の活性も低下してはいるものの、やはり天然の骨であり機能的には優れている。しかし、感染の懸念や倫理的問題のため、本邦ではリン酸カルシウムをベースとした人工骨の使用が盛んである⁴⁾。リン酸カルシウムが頻用される理由としては、骨の一成分であるため生体適合性、生体安全性に優れていること、また、石灰岩とリン鉱石から合成されるため、供給量に制限がないことなどがあげられる。形状としては、通常、緻密体や多孔性のブロック、顆粒、ペーストなどが使用される。顆粒とペーストに関しては、形状の保持を単独で行うことが出来ないため、閉鎖腔の充填に用いられている。一方、緻密体や多孔性ブロックを用いれば形状の保持は可能となるが、術者が形態を切削する必要があるため、操作性や精度に課題が残る。特にセラミック製人工骨は、硬いために削合は困難であり、また母床骨と癒合しないために顎顔面領域ではしばしば露出を経験する。従って、现阶段の人工骨は、強度、形状、操作性、分解吸収、再生誘導能などの機能面において自家骨には及ばず、これらの課題を克服する新たな人工骨の開発が求められている。

われわれは、東京大学工学系研究科/医学系研究科鄭雄一教授と連携し、生体が元来有している骨形成能を最大限に引き出せるようなスcaffolds、すなわち、自己の骨に置換するような人工骨の開発を検討してきた。CT画像から骨欠損・変形部位に適合するカスタムメイド型の人工骨 (CT-Bone) を作製して移植する技術を確立

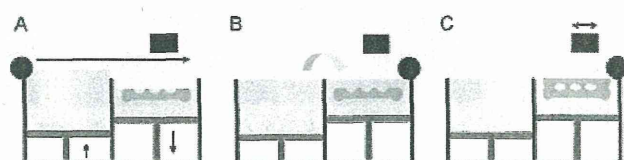


図3 3次元インクジェットプリンターを用いたカスタムメイド型人工骨 (CT-Bone) の作製 (許諾の上、文献5より抜粋)

図2で示したDICOMデータを利用し、3次元インクジェットプリンターを用いてCT-Boneを作製する。A. 左側の材料供給源のテーブルが上がり、右側の造形エリアのテーブルが下がる。B. 材料供給エリアから、一層分の α リン酸三カルシウム粉末を、ローラーで造形エリアへ運ぶ。C. インクヘッドが造形エリアを通過する際に硬化液を噴射する。 α リン酸三カルシウム粉体の表面に硬化液を噴射する過程を繰り返すことにより、望みの形状を有するCT-Boneが作製される。

し、複雑な顎顔面形態も容易に再現可能となった^{5,6)}。CT-Boneの作製手順としては、まず、患者の3D石膏モデル上で、ワックスを用いて人工骨のデザインを形成する。次いでCTを撮影し、形成したワックス部分の形状をDICOMデータとして取り込んだ後、3Dインクジェットプリンターを用いた粉体積層造形法で作製する(図2)。3Dインクジェットプリンターを用いた粉体積層造形法では、 α リン酸三カルシウム粉体の薄層(0.1mm)を作り、その上から硬化液をプリントするという過程を繰り返すことにより、外部形状のみならず、内部構造も自由に制御可能な人工骨を作製することが可能である(図3)。

カスタムメイド型人工骨 (CT-Bone) の臨床応用

大型実験動物を用いた前臨床研究を経て、先天異常、外傷、腫瘍切除などにより非荷重部位に顎顔面陥凹変形を有する患者を対象に、2006年3月から7月にCT-Boneの臨床研究を10例、2008年10月から2009年9月に治験を約20例行った(図4, 5)⁴⁾。患者のCT画像をもとに人工骨を作製するため、患部への適合も良好で、術者による形状調整がほぼ不要であった。また、造形後の焼結を行うことなく、十分に手術に耐えられる強度(20MPa)を有して

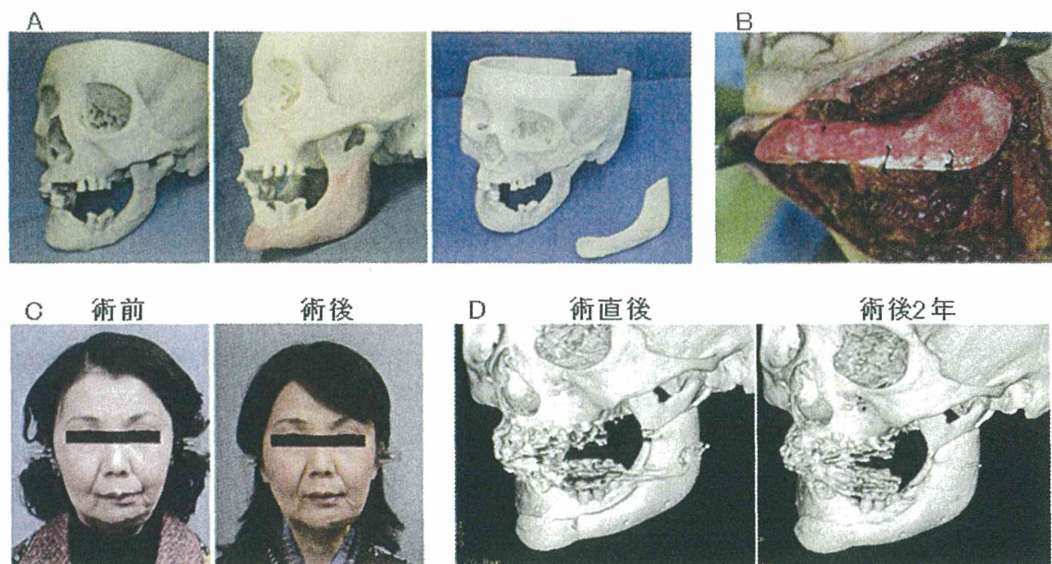


図4 カスタムメイド型人工骨 (CT-Bone) の臨床応用 (1) (許諾の上, 文献4より抜粋)
 A. 3D石膏模型上(左)で, CT-Boneのデザインをワックス形成した(中央)。CTを撮影した後, ワックス部分の形状をDICOMデータで取り込み, 3Dインクジェットプリンターを用いてCT-Boneを作製した(右)。B. CT-Boneを移植した術中写真。C. 術前および術後の患者の顔貌写真。D. 術直後および術後2年のCT所見。術後2年で, 母床骨とCT-Boneとの界面では, 骨癒合が観察された。

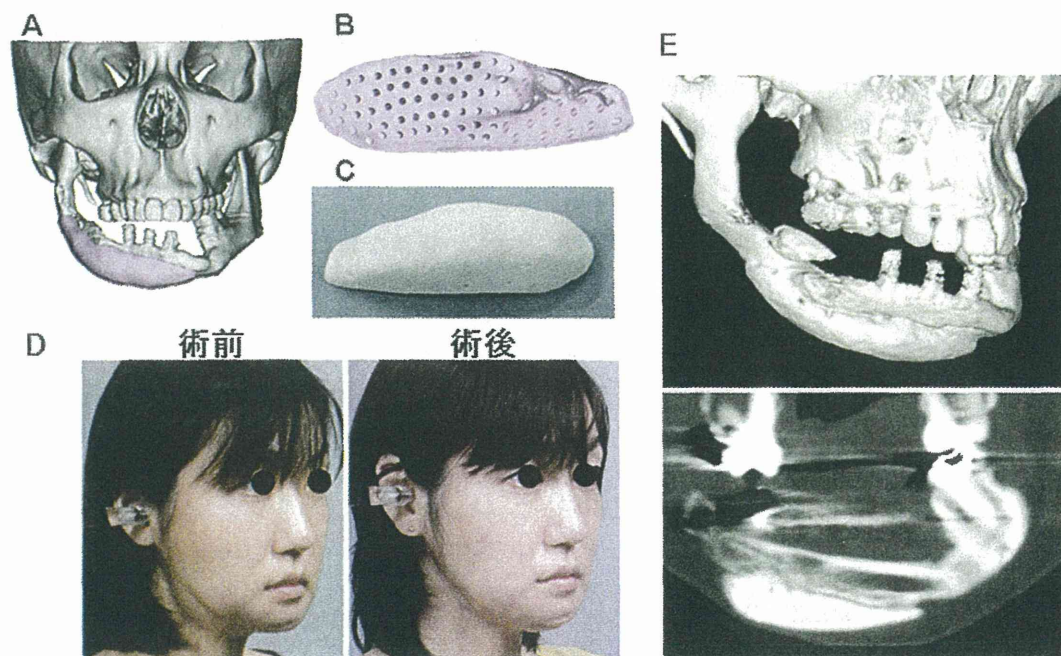


図5 カスタムメイド型人工骨 (CT-Bone) の臨床応用 (2) (許諾の上, 文献6より一部抜粋)
 A. 3D石膏模型上で欠損部の形態をワックスで復元し, CTを撮影した後, CT boneのデザインをDICOMデータで取り込んだ。B. 最終的なCT-Boneのデザイン。骨に接する面は, 気孔を有する構造となっている。C. 3Dインクジェットプリンターを用いて作製したCT-Bone。D. 術前および術後の患者の顔貌写真。E. 術後1年のCT所見。

いるため, 優れた操作性を示すことも明らかとなった。これまでのところ安全面での問題はなく, 人工骨と母骨との癒合も速やかに起こっていることが確認されている(図4,

5)。使用において注意すべき点としては, 移植時点では異物であるという点においては他の人工骨と差は無く, 放射線照射野や感染部位に移植することは避けるべきであるこ

とも判明した。

今後は荷重部への適応拡大を目指し、金属など他材料とのハイブリッド化や、骨誘導シグナルとの融合などによる高機能化人工骨を開発していく必要があると考え、研究開発を継続している。また、CT-Bone は強度の点で課題を有するため、母床骨の陥凹変形に対する augmentation 目的での利用が妥当であり、下顎骨の区域切除後の再建等には使用することは困難である。こうした骨再建に対しては新たな骨再生法を検討している。

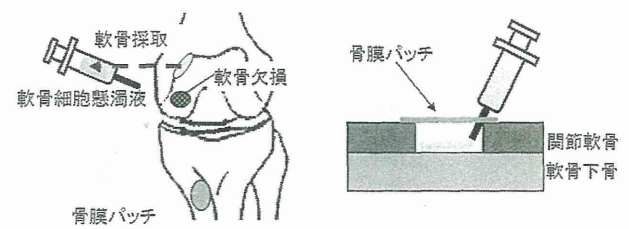
軟骨再生医療

軟骨は、関節や椎間板のほか、頭頸部領域の鼻、耳、気管などにも存在し、形態保持や生活動作を行う上で重要な役割を果たしている。一般に軟骨組織は自己修復能に乏しく、いったん傷害を受けると自然回復は望めない。そのため、関節軟骨損傷などの外傷や変形性関節症などの加齢性疾患、関節リウマチなどの炎症性疾患を患うと、歩行などの生活動作に支障をきたすことになる。治療としては、人工関節置換術や自家軟骨移植などが行われているが、耐久性、ゆるみ、感染、採取部位の侵襲などの課題が残されており、軟骨再生医療の開発に期待が寄せられている。

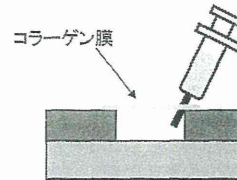
軟骨再生医療は、皮膚や角膜などとともに再生医療のなかでも比較的臨床応用が進んでいる領域で、自家軟骨細胞移植 (autologous chondrocyte implantation : ACI) が、欧米を中心に医療として普及している⁷⁾。ACI 原法は、関節軟骨の局所的な欠損に対し、非荷重部の関節軟骨から軟骨細胞を単離し、培養増殖させた後に細胞懸濁液として欠損部に投与し、さらに漏出を防ぐために骨膜パッチで被覆する (図6)。しかしその適応範囲は依然として限局的で、層剝離、骨膜パッチの肥厚やグラフト逸脱などの問題点も指摘されている⁸⁾。また、既存の治療法と比較した際に、明らかな臨床上の優位性が認められないなど治療成績の限界も報告されている⁹⁾。本邦においても、広島大学整形外科の越智教授のグループが、軟骨細胞をコラーゲンゲルで包埋培養した後、一塊で移植する方法を開発した¹⁰⁾。同技術は (株) ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングに移転された後、自家培養軟骨ジャックとして2013年4月1日付で保険適応となっている。顎顔面領域における軟骨再生医療としては、隆鼻術後のシリコンインプラント抜去例や鞍鼻などに対して、患者の軟骨組織から単離した軟骨細胞を増殖培養させた後、皮下ポケットなどに注入して皮下再生軟骨を得るといった方法が報告されている¹¹⁾。

しかし、膝関節にしても鼻部にしても、現行の軟骨再生医療は局所的な軟骨欠損の補填を目的とするため、移植される細胞は液状あるいはゲル状であり、顎顔面領域に適応可能な3次元形状を有する軟骨組織の開発が必要である。

A. 自家軟骨細胞移植 (原法)



B. コラーゲン膜の使用



C. 一塊で移植する方法

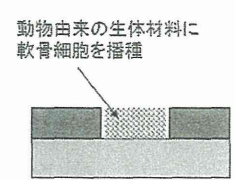


図6 自家軟骨細胞移植

自家軟骨細胞移植 (autologous chondrocyte implantation : ACI) は、欧米を中心に医療として普及している。A. ACI 原法では、関節軟骨の局所的な欠損に対し、非荷重部の関節軟骨から軟骨細胞を単離し、培養増殖させた後に細胞懸濁液として欠損部に投与し、さらに漏出を防ぐために骨膜パッチで被覆する。B. 骨膜の代わりにコラーゲン膜を用いて被覆する方法。C. 軟骨細胞をコラーゲンゲルで包埋培養した後、一塊で移植する方法。

軟骨再生医療の基礎的研究

われわれは、再生医療の3要素、すなわち細胞、成長因子、足場の観点から詳細な検討をすすめ、口唇口蓋裂に伴う重度の鼻変形 (唇裂鼻変形) に適応可能な3次元形状を有する再生軟骨の開発に取り組んできた。

細胞としては、軟骨組織由来の軟骨細胞、組織幹細胞に分類される種々の細胞のほか、胎生幹細胞 (ES 細胞) あるいは人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) などが候補となりうる。このうち、①細胞培養により旺盛に増殖する¹²⁾、②移植後自然に成熟する、③免疫拒絶や癌化のリスクが低い、④採取が比較的容易である、⑤倫理的に特に問題とならない、という特性を有する自家耳介軟骨細胞の活用が実用的であり、早期の臨床導入に展開可能であると考えた。

成長因子に関しては、効率の良いヒト耳介軟骨細胞の増殖培養を行う組み合わせを選択するため、医薬品として既に安全性が確立されている12種類の成長因子・ホルモン (FGF-2, IGF-I, insulin, BMP-2 など) を、統計学的手法 fractional factorial design を用いて検討した。その結果、単剤では5%ヒト血清に FGF-2 (100ng/mL) を添加した場合が最も増殖効率が高かったが、更にインスリン (5 μ g/mL) を組み合わせることにより飛躍的に増殖効率が増加し、ヒト軟骨細胞を3週間で1000倍程度増殖させることが可能となった¹³⁾。

再生軟骨用の足場材料としては、ハイドロゲルと多孔体を併用し、両者の利点をいかせるような複合体の足場素材

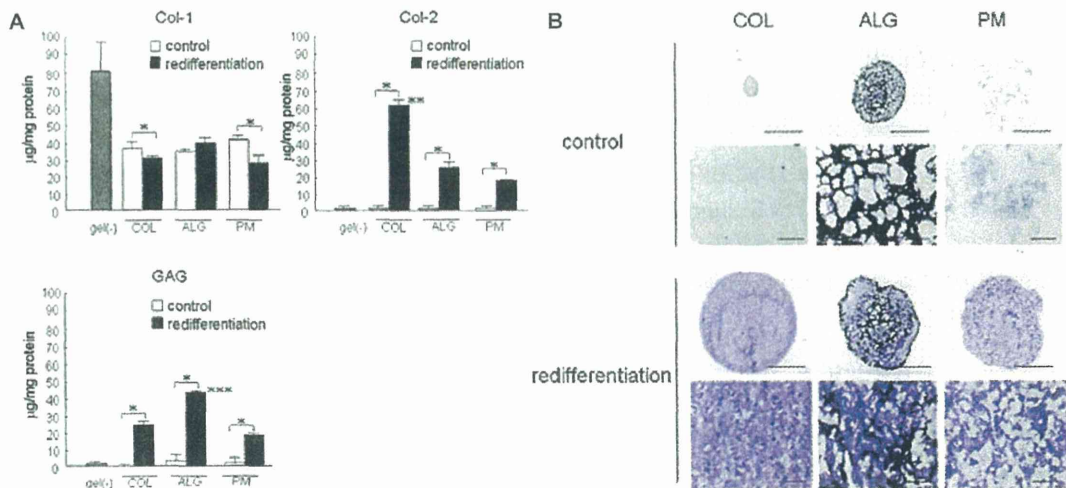


図7 インプラント型再生軟骨に用いる足場素材(ハイドロゲル)の検討(許諾の上, 文献14より抜粋)
 A. アテロコラーゲン(COL), アルジネート(ALG), PuraMatrix(PM)の3種類のハイドロゲルに軟骨細胞を包埋培養し, 基質産生能を検討した。すべてのハイドロゲルで, 軟骨分化誘導培養液(redifferentiation)を用いた際に, II型コラーゲン(Col2)や glycosaminoglycan(GAG)の増加が観察された。一方, I型コラーゲン(Col1)の発現量は, アテロコラーゲン(COL), アルジネート(ALG)で減少した(*: $p < 0.01$ control vs. redifferentiation; **: $p < 0.01$ when compared with alginate and PuraMatrix(PM); ***: $p < 0.01$ when compared with collagen and PuraMatrix)。B. ハイドロゲルに軟骨細胞を包埋し, トルイジンブルー染色を行った。軟骨分化誘導培養液(redifferentiation)を用いたアテロコラーゲン群で, 良好なメタクロマジーが観察された。COL, atelopeptide collagen; ALG, alginate. Low magnification, bar 1 mm; high, 100µm.

の開発を目指した。まずハイドロゲルには, 細胞の保持能が高く, 軟骨基質の発現・産生を促進し, かつ既に医療用具として臨床で使用されているアテロコラーゲンを選択することとした(図7)¹⁴⁾。多孔体の選択においては, 接合用のプレートやスクリューの素材として臨床実績があるポリ乳酸(poly-L-lactic acid: PLLA), 手術用吸収糸の素材であるポリグリコール酸(poly-glycolic acid: PGA)や乳酸・グリコール酸共重合体(poly-lactic acid/glycolic acid: PLGA)などの生分解性ポリマーを用いて, 気孔径や気孔率, 製造法に関して詳細に検討を行った¹⁵⁾。その結果, sugar-leaching method法で作成した気孔径0.3mm, 気孔率95%のPLLAおよびPLGA多孔体が良好な力学的特性を示すことが明らかとなった。上記の軟骨細胞培養液を用いて増殖させたヒト耳介軟骨細胞をこれらの多孔体へ播種して再生軟骨組織を作製し, ノードマウスへ皮下移植したところ, PLGA多孔体を用いた場合に組織学的, 生化学的にも最も良好な軟骨再生が示唆された(図8)。しかし, ビーグル犬を用いた大型動物実験において, 8か月齢オスの耳介軟骨細胞を多孔体に投与して作製した再生軟骨組織を, 同一個体の背部皮下へ自家移植したところ, PLGA製再生軟骨組織ではマクロファージの密な集積が認められ, 移植後2か月以降に組織は収縮した。一方, PLLA多孔体を用いた再生軟骨では, 移植1か月でPLLA間隙に再生軟骨が観察され, 移植後6か月でも再生軟骨が維持されることが示された¹⁶⁾。ノードマウスで良好な結果を示した

PLGA製再生軟骨組織が, ビーグル犬の自家移植の実験系では不良であった原因は, 両者の組織反応の差にあるのではないかと推察している。生分解が緩徐なPLLAとは異なり, PLGAでは移植後急速に分解が進行し, 起炎性の高い分解産物が組織中に放出される。正常な免疫系を有するビーグル犬では, PLGAの分解産物により過剰な組織反応が惹起され, 軟骨再生に対して阻害的に作用したものと考えられた。従って, PLLA多孔体(気孔径0.3mm, 気孔率95%)を, インプラント型再生軟骨の足場材料として選定することとした。

インプラント型再生軟骨の臨床応用

以上の検討から, われわれは, 患者由来の耳介軟骨細胞を5%自己血清, FGF-2(100ng/mL), インスリン(5µg/mL)を組み合わせた培養液で増殖させ, 医療用具として使用実績のあるアテロコラーゲン(高研)に懸濁し, PLLA多孔性足場素材に播種して作製するインプラント型再生軟骨を確立した(図9)。口唇口蓋裂に伴う重度の鼻変形(唇裂鼻変形)に適応するよう, PLLA足場素材は長さ5cm, 幅6mm, 高さ3mmのドーム状の形状をしている。

前臨床試験においてインプラント型再生軟骨の有効性と安全性を確認し, 厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に基づいて, 学内臨床研究審査委員会および厚生科学審議会の審議を経て, 2011年3月に厚生労働

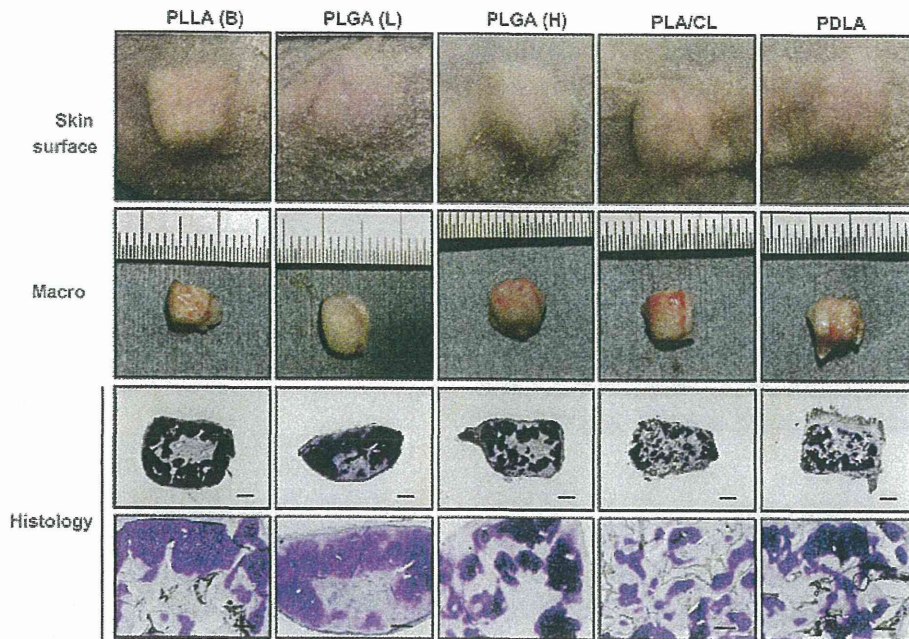


図 8 インプラント型再生軟骨に用いる足場素材(多孔体)の検討(許諾の上, 文献15より抜粋) 様々な生分解性ポリマー多孔体(4×4×3 mm)に, アテロコラーゲンに懸濁した軟骨細胞(1×10⁶cells/mL)を投与し, BALB/c-nu/nu マウスへ移植した。生分解性ポリマーは, poly-L-lactide (PLLA, Mw 2×10⁵), poly-L-lactide-co-glycolide (PLGA, LA : GA = 30 : 70, (L) Mw 10⁵, (H) Mw 2×10⁵), poly (L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLA/CL, Mw 2×10⁵), poly-D-lactide (PDLA) で比較した。移植後2か月で, 移植部の皮膚に異常を示す多孔体はなく, 移植された再生軟骨の表面性状はすべて滑沢であった。どの多孔体を用いた再生軟骨組織でも, トルイジンブルー染色でメタクロマジーを示したが, PLGA (L) でメタクロマジー領域の比率が高かった。Macro and macroscopic images (bar = 2 mm); histology, bar = 1 mm (lower magnification) and 500μm (higher magnification)。

インプラント型再生軟骨組織

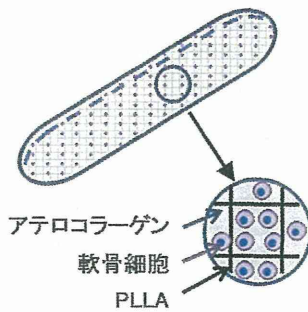


図 9 インプラント型再生軟骨の構成
インプラント型再生軟骨は, 培養耳介軟骨細胞を PLLA 多孔体に投与して作製する。細胞が多孔体から漏れ出さないように, アテロコラーゲンを粘剤として使用する。長さ5 cm, 幅6 mm, 高さ3 mm のドーム状の形状をしている。

インプラント型再生軟骨の製造プロトコール

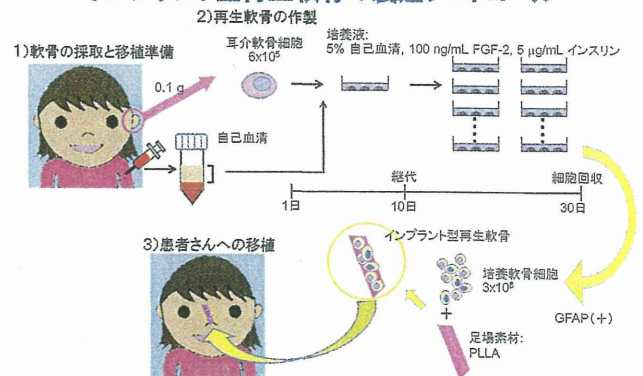


図 10 インプラント型再生軟骨の自主臨床研究プロトコール
再生軟骨の製造と治療の流れを示す。外来で自己血清を400mL採取した後, 初回入院で耳介軟骨0.1gを採取するとともに, 必要に応じて口唇鼻修正を追加した。その後, 東大病院細胞プロセッシングセンターで, 採取した耳介組織から軟骨細胞を単離し, 約1か月間培養増殖させた。2回目の入院では, 手術当日に回収した細胞を用いて再生軟骨を作製し, 唇裂鼻変形を有する患者の鼻背に移植した(3症例)。

大臣の同意ならびに機関承認を受けた。その後, 東京大学医学部附属病院口腔外科にて, 安全性の確認を主要評価項目として, 唇裂鼻変形の患者3名に対しインプラント型再生軟骨移植の自主臨床研究を行った(図10)¹⁷⁾。インプラ

ント型再生軟骨の製造と移植のプロトコールとしては、まず、細胞培養に用いるための自己血清を外来で400mL採取し、初回入院で耳介軟骨0.1gを採取した。東大病院細胞プロセッシングセンターで軟骨細胞を単離し、約1か月間増殖させた。2回目の入院で、手術当日に回収した細胞を用いて再生軟骨を作製し、患者の鼻背に移植した。2011年7月に1例目の患者に移植手術を行い、約2年半経過を観察しているが、現在に至るまですべての症例で抜去にいたるような重大な有害事象もなく、経過良好である。今後は、東京医科歯科大学や山形大学と連携して、有効性評価法の検討や搬出入技術の確立、製造プロセス・品質管理の簡略化を検討し、多施設臨床研究を実施する予定である。

今後の展開

インプラント型再生軟骨は、足場素材の形態を調整することにより目的とする3次元形態を付与することが可能であり、軟骨組織としての十分な力学的特性を有している。また、現在行っている自主臨床研究で、移植後にも安定した経過をたどることが確認されたことから、われわれはインプラント型再生軟骨の適応拡大、具体的には、気管や関節への応用を検討している。

再生気管軟骨に関しては、気管狭窄症などの症例への移植を想定している。PLLA多孔体部分に培養自己耳介軟骨細胞を播種して軟骨を再生させると同時に、PLLA多孔体の内面に微細加工を施して、周囲組織からの粘膜再生を誘導したいと考えている。現在、ウサギやビーグル犬を用いた自家再生気管軟骨移植実験で、安全性および有効性の確認を行っている。来年度から、気道再建が必要な患者6例に対し、医師主導治験を行う予定である。

インプラント型再生軟骨の再生関節への応用としては、変形性膝関節症への移植にも耐えうるような構造と強度を有する再生関節(NeoJointと称する)の開発を行っている。NeoJointの軟骨部分は、細胞保持用のハイドロゲルに混和した細胞をPLLA足場素材に投与し、軟骨下骨の部分にはTCP人工骨を配置している。現在、細胞源に間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells: MSC)とiPS細胞を用いて、クラウン系ミニブタでの自家移植実験を行っているが、どちらの細胞を用いた場合でも、肉眼的、組織学的に良好な軟骨修復、骨修復が観察されている。

われわれのグループは長年にわたり、口蓋裂や小耳症の子供たちの治療に携わってきた。小耳症の再建では、患者から採取した肋骨を、術者が耳介の形態を細工していくという術式が施行されることが多いが、侵襲性、審美性の点からも、再生医療の導入が有用になると考えている。3次元造形を活用して作製された足場素材とiPS細胞を用いて、子供たちに負担が少なく、且つ見た目にも満足がいく

耳介再建が実現できるような日が来ることを、切に願っている。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導ご協力をいただいた東京大学工学系研究科/医学系研究科 鄭雄一教授、株式会社ネクスト21、富士ソフト株式会社に感謝申し上げます。

本論文の内容は、第67回日本口腔科学会学術集会(2013年5月、宇都宮)において、宿題報告として報告した。

文献

- 1) Langer R. and Vacanti J.P.: Tissue engineering. *Science* 260 : 920-926, 1993.
- 2) Iino M., Fukuda M. et al.: Evaluation of 15 mandibular reconstructions with Dumbach Titan Mesh-System and particulate cancellous bone and marrow harvested from bilateral posterior ilia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107 : e1-8, 2009.
- 3) Iino M., Mori Y. et al.: [Clinical application of bone regeneration by in vivo tissue engineering]. *Clin Calcium* 18 : 1757-1766, 2008.
- 4) Saijo H., Igawa K. et al.: Maxillofacial reconstruction using custom-made artificial bones fabricated by ink-jet printing technology. *J Artif Organs* 12 : 200-205, 2009.
- 5) Igawa K., Mochizuki M. et al.: Tailor-made tricalcium phosphate bone implant directly fabricated by a three-dimensional ink-jet printer. *J Artif Organs* 9 : 234-240, 2006.
- 6) Saijo H., Kanno Y. et al.: A novel method for designing and fabricating custom-made artificial bones. *Int J Oral Maxillofac Surg* 40 : 955-960, 2011.
- 7) Marlovits S. and Trattinig S.: Cartilage repair. *Eur J Radiol* 57 : 1-2, 2006.
- 8) Wood J.J., Malek M.A. et al.: Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *J Bone Joint Surg Am* 88 : 503-507, 2006.
- 9) Ruano-Ravina A. and Jato Diaz M.: Autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 14 : 47-51, 2006.
- 10) Ochi M., Uchio Y. et al.: Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 84 : 571-578, 2002.
- 11) Yanaga H., Yanaga K. et al.: Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast Reconstr Surg* 117 : 2019-2030; discussion 2031-2012, 2006.
- 12) Asawa Y., Ogasawara T. et al.: Aptitude of auricular and nasoseptal chondrocytes cultured under a monolayer or three-dimensional condition for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 15 : 1109-1118, 2009.

- 13) Takahashi T., Ogasawara T. et al.: Three-dimensional microenvironments retain chondrocyte phenotypes during proliferation culture. *Tissue Eng* 13 : 1583-1592, 2007.
- 14) Yamaoka H., Asato H. et al.: Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A* 78 : 1-11, 2006.
- 15) Tanaka Y., Yamaoka H. et al.: The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage. *Biomaterials* 31 : 4506-4516, 2010.
- 16) Asawa Y., Sakamoto T. et al.: Early stage foreign body reaction against biodegradable polymer scaffolds affects tissue regeneration during the autologous transplantation of tissue-engineered cartilage in the canine model. *Cell Transplant* 21 : 1431-1442, 2012.
- 17) Hoshi K., Fujihara Y. et al.: Recent trends in cartilage regenerative medicine and its application to oral and maxillofacial surgery. *Oral Sci International* 10 : 15-19, 2013.

歯科口腔外科と再生医療

Regenerative medicine in oral and maxillofacial surgery

高戸 毅 藤原夕子 星 和人

! Point

- 歯、歯周組織、骨、軟骨、粘膜、唾液腺、神経など、歯科口腔外科領域の再生医療の研究分野は多岐にわたる。
- マウスにおいて、歯、歯根膜、歯槽骨で構成される再生歯ユニットの作製と、顎骨への移植が報告されている。
- 歯周病治療として、歯根膜シート、培養骨膜シート、骨髄由来間葉系幹細胞などの移植が臨床応用されている。
- 顎骨再建を目的としたβリン酸三カルシム(βTCP)の骨補填材や、自己骨髄由来細胞に多血小板血漿などを組み合わせた移植材料、骨欠損部に適合するカスタムメイド型の人工骨などが開発されている。強度に課題がある。
- 適切な3次元形態と強度を有する再生軟骨が、鼻変形の治療目的で臨床導入されている。

はじめに

足場素材(スcaffolds)に細胞を播種し、成長因子の存在下で組織形成を誘導するというtissue engineering(組織工学)の概念が、ハーバード大学 Dr. J. P. Vacanti とマサチューセッツ工科大学の Dr. R. Langer¹⁾により提唱されたのは、1993年のことである。当時、彼らが報告したマウスの背中に乗ったヒトの耳の写真は、世界のマスコミで広く取り上げられ、再生医療を一躍有名にした。そのうち、再生医療分野における研究は著しく発展し、京都大学 山中伸弥教授のノーベル生理学・医学賞の受賞により、わが国においてもiPS細胞や再生医療の動向に注目が集まっている。近年の再生医療研究の発展は目覚ましいが、歯科口腔外科領域においても、う蝕、歯周病による歯や歯周組織の喪失、口唇口蓋裂などの先天異常や腫

瘍、外傷による骨・軟骨および軟部組織の欠損、ドライマウスなど、ほぼすべての疾患が再生医療の研究対象となっている。本稿では、歯科口腔外科領域の再生医療に関して、わが国での取り組みを中心に概説する。

歯の再生

歯は、歯冠表層のエナメル質とその下層の象牙質、歯根の表層を覆うセメント質や内部に存在する神経(歯髄)など、高度に複雑化した3次元構造をとっている。したがって、歯を再生することを考えた場合、構成するすべての細胞を、本来の形態で3次元的に配置することは困難である。そこで、未分化な上皮・間葉性の幹細胞の相互作用で誘導される歯胚を生体外で再生し、欠損部へ移植したのちに分化と萌出を促すといった、発生過

たかと つよし、ふじはら ゆうこ、ほし かずと：東京大学医学部附属病院 顎口腔外科・歯科矯正歯科
(〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

(連絡先) 高戸毅：東京大学医学部附属病院 顎口腔外科・歯科矯正歯科

程を模倣したアプローチが試みられてきた²⁾。東京理科大学 辻らのグループは、歯胚を再生する新しい技術として、高細胞密度の上皮細胞と間葉細胞を3次元的な細胞操作技術により区画化して再配置する器官原基法を開発した³⁾。マウスにおいて、抜歯後の歯槽骨にドリルで穴を形成し、再生歯胚を移植したところ、49日目には対合歯と咬合するような歯が再生されたと報告している⁴⁾。この再生歯は組織学的、力学的にも天然歯に匹敵し、天然歯と同等の咀嚼機能を回復させることが可能であった。しかし最大の課題は、再生歯胚の成熟、機能化に時間を要することであり、ヒトの永久歯であれば5年は要すると見積もられている。また、再生歯が咬合、咀嚼などの機能を果たしていくためには、メカニカルストレスを感知するための歯根膜や、歯を支える歯槽骨など、周囲組織と連動、協調した構造をとる必要性もある。辻らは、形態を制御するデバイスの中に再生歯胚を挿入して腎被膜下に移植すると、約1か月で歯に歯根膜、歯槽骨を伴った再生歯ユニットが形成されたと報告している⁵⁾。再生歯ユニットを、マウスの抜歯後歯槽骨へ移植すると生着することから、歯周組織を含めた包括的な歯の再生の可能性が示唆される。今後の課題としては、再生歯胚を形成する細胞源の確保や、生体外で再生歯胚を培養する技術開発が望まれる。

歯周組織の再生

歯は、歯根膜を介した歯槽骨との連結により、咬合力に耐える強さと弾性力を発揮している。したがって、歯周病により炎症性の骨吸収をきたした場合には、単なる骨の再生ではなく、歯(セメント質)–歯根膜–歯槽骨の連結という複雑な組織再生を実現する必要がある。

歯周組織の再生医療の歴史は古く、従来から、上皮の歯根への増殖を抑制し、歯根膜由来細胞の増殖を促進する骨組織誘導再生療法(guided bone regeneration: GBR法)やエムドゲイン®(プタエナメル由来蛋白製剤)を用いた再生が試みられてきた。GBR法とは、歯周炎の炎症巣を除去したのち、侵入してくる線維芽細胞や上皮細胞を遮断す

る膜(GTR膜)を用いることにより、歯根膜細胞や骨芽細胞による歯根膜、歯槽骨の造成を誘導する方法である。GBR膜としては、GoreTex®などポリテトラフルオロエチレン膜が頻用され、膜下に骨補綴材を埋入し、歯槽骨の再生を促すこともある。

近年では、東京女子医科大学の岩田らのグループが、抜去歯の歯根膜から採取した幹細胞を用いて歯根膜シートを作製し、 β TCPと併用して歯周組織欠損部へ移植する自主臨床研究を行っている⁶⁾。また、培養骨膜シートや、培養した骨髄由来間葉系幹細胞をアテロコラーゲンゲル®(高研、東京)と混和して歯周組織欠損部に移植する方法なども試みられている。

歯槽骨の再生

歯周病の進行や、腫瘍切除や嚢胞摘出、外傷、先天異常などにより、歯槽骨が欠損すると、残存する歯槽骨の量が不十分なために、そのあとの補綴処置に難渋することがある。そのような際には、欠損部への自家骨移植などが行われるが、低侵襲治療としての再生医療の導入も試みられている。

具体的には、前述のGTR法のほか、骨髄由来間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)の移植などがある。歯科口腔外科領域では上顎洞底挙上術、歯槽底形成や二次的顎裂骨移植などに対し、MSCを用いた臨床研究が実施されている^{7,8)}。自家骨移植と同等程度の良い骨形成が観察され、安全性や有効性も確認されている。

成長因子を用いた試みとしては、大阪大学の村上らが、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: FGF-2)を、歯槽骨の欠損部位に局所投与する歯槽骨再生療法に取り組んでいる。ビーグル犬を用いた検討では、歯槽骨のみならず、セメント質や歯根膜の新生も観察されたとしている⁹⁾。また、2005~2008年にかけて、24施設で第II相治験が実施され、FGF-2含有ハイドロキシプロピルセルロースが、統計的に有意な歯槽骨再生を誘導することが示された¹⁰⁾。海外では、骨形成蛋白(bone morphogenetic protein: BMP)¹¹⁾、血小板由来成長因子(platelet-derived growth fac-

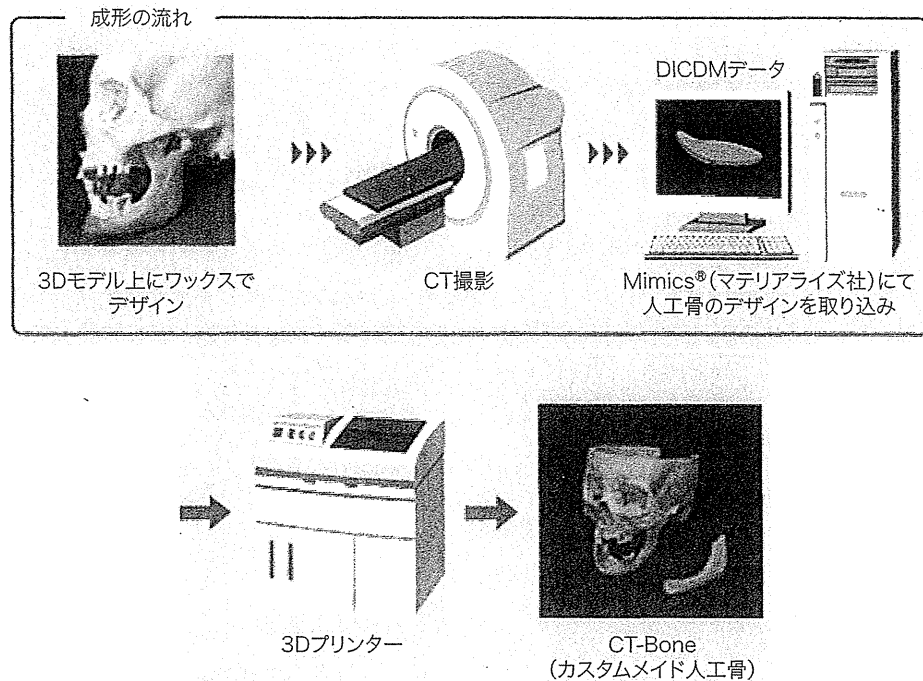


図1 カスタムメイド型人工骨 (CT-Bone) の作製過程

患者の欠損部に適合する人工骨を作製するため、まず、それぞれの患者の3D石膏モデル上で、ワックスを用いて人工骨のデザインを形成する。CTを撮影し、形成したワックス部分の形状をDICOMデータとして取り込み、3Dインクジェットプリンタを用いてCT-Boneを作製する。

(文献16から引用)

tor: PDGF)¹²⁾などを用いた検討もなされている。

顎骨の再生

比較的大型な顎骨欠損に対しては、遊離骨移植や血管柄付き骨移植などの再建術が適応となる。安定した治療実績をもつ術式ではあるが、複雑な形態を有する顎顔面領域で、審美的に十分に満足がいく再建を行うことは難しく、採骨部への侵襲性も低くはない。再生医療の導入が有用になると考えられるが、歯周病などに起因する歯槽骨欠損とは欠損の大きさにも違いがあり、再生医療によるアプローチもその分ハードルが高くなる。

再生医療の概念を利用した治療法として、近年、腸骨から採取した骨髄海綿骨 (particulate cancellous bone and marrow: PCBM) とチタンメッシュトreyによる骨再建法が多用されている。この方法では、トreyを適切に整形することにより、より自然な形態修復が可能であり、義歯やインプラ

ントなどを併用した良好な咬合回復も期待できる。移植骨そのものの生着を目的とした従来の骨移植とは異なり、PCBM移植は生体に備わった骨形成能を引き出すことを目的とした、いわゆる *in situ tissue engineering* である¹³⁾。小下顎症の治療などで用いられる骨延長術も、骨切り部が治癒する過程で生じる仮骨をゆっくりと牽引することにより骨形成を誘導する治療法であり、*in situ tissue engineering* に基づく方法であるといえる。

足場素材のみを用いた骨再生としては、ハイドロキシアパタイトなどのリン酸カルシウム系の骨補填材がある。特にβリン酸三カルシウム (βTCP) は、移植後の生体内で徐々に吸収され、骨に置換されていくため、よく用いられる。cm単位の大きな欠損に使用されることもあるが、血行が付与されていないため感染には弱い。

名古屋大学の日比らのグループは、自己骨髄由来の骨形成性細胞に多血小板血漿、トロンピン、塩化カルシウムを組み合わせ、自家骨に代わる移

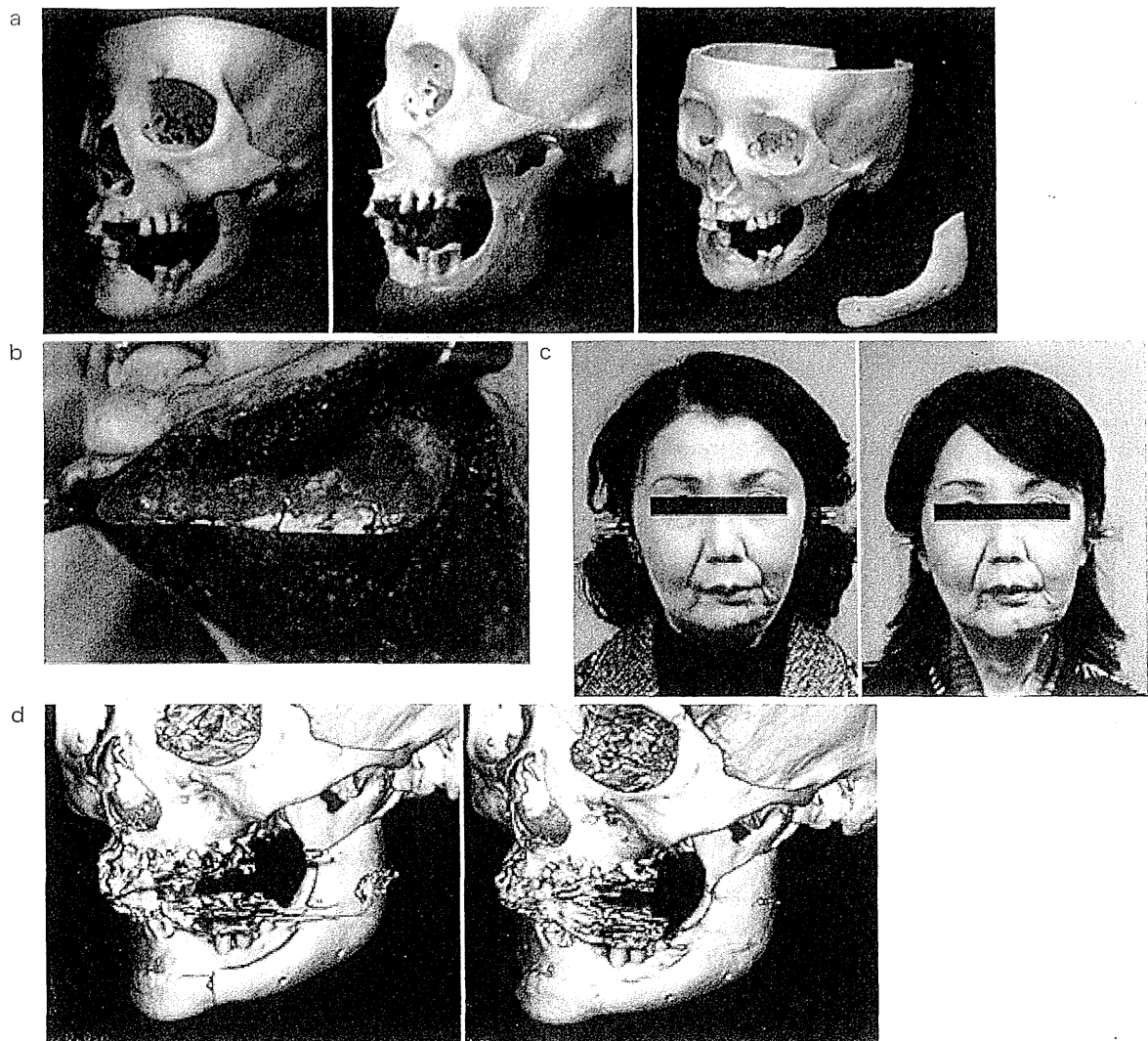


図 2 カスタムメイド型人工骨 (CT-Bone) の臨床応用

a : 3D 石膏模型上 (左) で, CT-Bone のデザインをワックス形成した (中央)。CT を撮影したのち, ワックス部分の形状を DICOM データで取り込み, 3D インクジェットプリンタを用いて CT-Bone を作製した (右)。

b : CT-Bone を移植した術中写真。

c : 術前 (左) および術後 (右) の患者の顔貌写真。

d : 術直後 (左) および術後 2 年 (右) の CT 所見。術後 2 年で, 母床骨と CT-Bone との界面では骨癒合が観察された。
(文献 17 から引用)

植材料として顎骨の先天性欠損に応用している¹⁴⁾。自家骨移植と遜色ない結果が得られているが, 下顎骨区域切除後のような大きな欠損での実績はない。

われわれは, 本学 工学系研究科/医学系研究科 鄭雄一教授らと連携し, 生体が元来有している骨形成能を最大限に引き出せるような人工骨の開発を検討してきた¹⁵⁾。CT 画像から骨欠損・変形部

位に適合するカスタムメイド型の人工骨 (CT-Bone) を作製して移植する技術を確立し, 複雑な顎顔面形態も容易に再現可能となった (図 1)¹⁶⁾。先天異常, 外傷, 腫瘍切除などにより非荷重部位に顎顔面陥凹変形を有する患者を対象に, 2006 年に CT-Bone の臨床研究を 10 例, 2008~2009 年に治験を約 20 例行った (図 2)¹⁷⁾。患者の CT 画像をもとに人工骨を作製するため, 患部への適合も

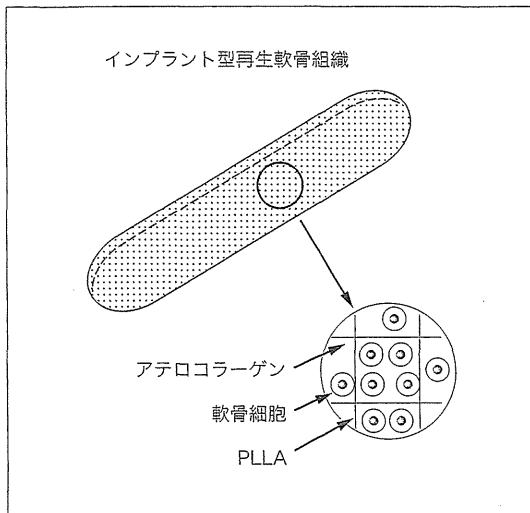


図3 インプラント型再生軟骨の構成
インプラント型再生軟骨は、培養耳介軟骨細胞を PLLA 多孔体に投与して作製する。細胞が多孔体から漏れ出さないように、アテロコラーゲンを粘剤として使用する。長さ 5 cm、幅 6 mm、高さ 3 mm のドーム状の形状をしている。

(文献 16 から引用)

良好で、術者による形状調整がほぼ不要であった。また、十分に手術に耐えられる強度 (20 MPa) を有しているため、優れた操作性を示すことも明らかとなった。これまでのところ安全面での問題はなく、人工骨と母骨との癒合も速やかに起こっていることが確認されている。使用において注意すべき点としては、移植時点では異物であるという点においてはほかの人工骨と差はなく、放射線照射野や感染部位に移植することは避けるべきであることも判明した。今後は荷重部への適応拡大をめざし、金属など他材料とのハイブリッド化や、骨誘導シグナルとの融合などによる高機能化人工骨を開発していく必要があると考え、研究開発を継続している。

粘膜の再生

癌切除後や先天異常などで生じる大きな粘膜欠損に対しては、植皮が行われることも多い。しかし粘膜と皮膚では表面性状に違いがあり、採取部の侵襲も避けられない。培養口腔粘膜の場合、角化細胞のみの上皮シートでは破れやすく、母床と

も接着しにくいいため、結合組織との 2 層構造を用いるほうが望ましいとされる。新潟大学の研究グループでは、ヒト無細胞性、非免疫原性新鮮屍体真皮 AlloDerm® (LifeCell, Branchburg, New Jersey) に自家口腔粘膜角化細胞を播種し、重層化させた全層口腔粘膜 (EVPOME®) を開発し¹⁸⁾、2000 年から臨床応用を開始している。EVPOME® は、無血清培養が可能であり、AlloDerm® で裏装されているため取り扱いやすく、血管新生も促進されやすいなどの特徴を有している。一方、近年のバイオマテリアルの進歩は著しく、ポリグリコール酸 (polyglycolic acid : PGA) 不織布およびフィブリノゲン製剤を用いた創傷被覆療法が、口腔粘膜再建の良好な臨床成績を収めている¹⁹⁾。今後は、再生医療とバイオマテリアルを用いた再建治療の両者を上手に使い分け、それぞれの利点を生かす選択を行っていく必要があるだろう。

軟骨の再生と気管再生への応用

軟骨再生医療は、皮膚や角膜などとともに再生医療のなかでも比較的臨床応用が進んでいる領域で、自家軟骨細胞移植 (autologous chondrocyte implantation : ACI) が、欧米を中心に医療として普及している。ACI 原法は、関節軟骨の局所的な欠損に対し、非荷重部の関節軟骨から軟骨細胞を単離し、培養増殖させたのちに細胞懸濁液として欠損部に投与し、さらに漏出を防ぐために骨膜パッチで被覆する。しかし、現行の軟骨再生医療は局所的な軟骨欠損の補填を目的とするため、移植される細胞は液状あるいはゲル状であり、唇口蓋裂に伴う重度の鼻変形 (唇裂鼻変形) などへの適応は困難である。そこでわれわれは、適切な強度と 3 次元形状を有する再生軟骨の開発に取り組み、患者由来の耳介軟骨細胞を 5% 自己血清、FGF-2 (100 ng/mL)、インスリン (5 µg/mL) を組み合わせた培養液で増殖させ、医療用具として使用実績のあるアテロコラーゲン® に懸濁し、ポリ乳酸 (poly-L-lactic acid : PLLA) 多孔性足場素材に播種して作製するインプラント型再生軟骨を開発した (図 3)^{16,20)}。前臨床試験において有効性と安全性を確認し、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究

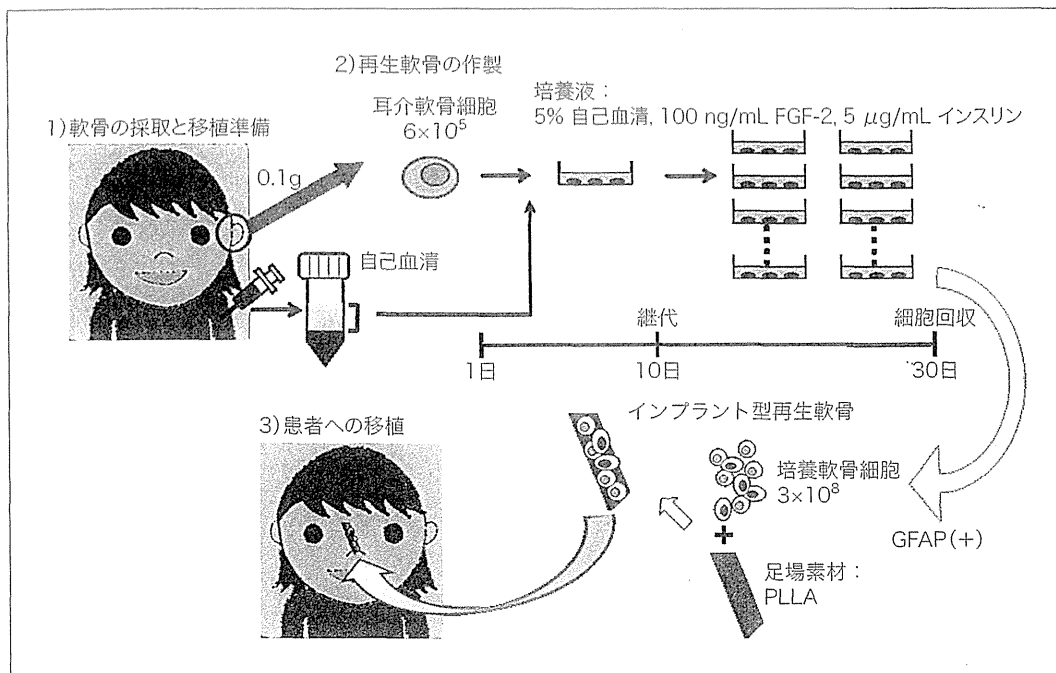


図 4 インプラント型再生軟骨の自主臨床研究プロトコール

再生軟骨の製造と治療の流れを示す。外来で自己血清を 400 mL 採取したのち、初回入院で耳介軟骨 0.1 g を採取するとともに、必要に応じて口唇鼻修正を追加した。そののち、東京大学病院細胞プロセッシングセンターで、採取した耳介組織から軟骨細胞を単離し、約 1 か月間培養増殖させた。2 回目の入院では、手術当日に回収した細胞を用いて再生軟骨を作製し、唇裂鼻変形を有する患者の鼻背に移植した (3 症例)。

(文献 16 から引用)

に関する指針」に基づき、安全性の確認を主要評価項目に、唇裂鼻変形の患者 3 名に対し自主臨床研究を行った (図 4)²⁰⁾。2011 年 7 月に 1 例目の患者に移植手術を行い、約 2 年半程度経過を観察しているが、すべての症例で抜去に至るような重大な有害事象もなく、経過良好である。今後は、東京医科歯科大学や山形大学と連携して、多施設臨床研究を実施する予定である。

インプラント型再生軟骨は、足場素材の形態を調整することにより目的とする 3 次元形態を付与することが可能であり、軟骨組織としての十分な力学的特性を有している。また、現在行っている自主臨床研究で、移植後も安定した経過をたどることが確認されたことから、われわれはインプラント型再生軟骨の適応拡大、具体的には、気管や関節への応用を検討している。再生気管軟骨に関しては、気管狭窄症などの症例への移植を想定している。PLLA 多孔体部分に培養自己耳介軟骨細胞を播種して軟骨を再生させると同時に、

PLLA 多孔体の内面に微細加工を施して、周囲組織からの粘膜再生を誘導したいと考えている。現在、ウサギやビーグル犬を用いた自家再生気管軟骨移植実験で、安全性および有効性の確認を行っている。

おわりに

歯科口腔外科の再生医療に関して、わが国で行われている試みを中心に概説した。口腔外科領域はさまざまな組織から構成されるため、再生医療の研究ターゲットも幅広い。また、紙面の都合上紹介できなかったが、歯髄幹細胞の神経再生効果なども報告されており²¹⁾、再生医療における細胞源としても注目を集めている。

われわれのグループは長年にわたり、口蓋裂や小耳症の子どもたちの治療に携わってきた。小耳症の再建では、患者から採取した肋骨を、術者が耳介の形態へ細工していくという術式が施行され

ることが多いが、侵襲性、審美性の点からも、再生医療の導入が有用になると考えている。3次元造形を活用して作製された足場素材と iPS 細胞を用いて、子どもたちに負担が少なく、かつ見た目にも満足がいく耳介再建が実現できるような日が来ることを、期待している。

文献

- 1) Langer R, et al : Tissue engineering. *Science* 260 : 920-926, 1993
- 2) Ikeda E, et al : Growing bioengineered teeth from single cells : potential for dental regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* 8 : 735-744, 2008
- 3) Nakao K, et al : The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* 4 : 227-230, 2007
- 4) Ikeda E, et al : Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 : 13475-13480, 2009
- 5) Oshima M, et al : Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS One* 6 : e21531, 2011
- 6) 鷺尾 薫・他 : 再生医学のいま 基礎研究から臨床への展開に向けて 自己歯根膜細胞シートを用いた歯周病治療. *治療* 93 : 2130-2135, 2011
- 7) Yamada Y, et al : Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation : clinical application report from a 2-6-year follow-up. *Tissue Eng Part A* 14 : 1699-1707, 2008
- 8) Shayesteh YS, et al : Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106 : 203-209, 2008
- 9) Murakami S, et al : Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontol* 34 : 425-430, 1999
- 10) Murakami S : Periodontal tissue regeneration by signaling molecule (s) : what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol* 2000 56 : 188-208, 2011
- 11) Triplett RG, et al : Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 67 : 1947-1960, 2009
- 12) Howell TH, et al : A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 68 : 1186-1193, 1997
- 13) Iino M, et al : Evaluation of 15 mandibular reconstructions with Dumbach Titan Mesh-System and particulate cancellous bone and marrow harvested from bilateral posterior ilia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107 : e1-8, 2009
- 14) Kinoshita K, et al : Promoted new bone formation in maxillary distraction osteogenesis using a tissue-engineered osteogenic material. *J Craniofac Surg* 19 : 80-87, 2008
- 15) Igawa K, et al : Tailor-made tricalcium phosphate bone implant directly fabricated by a three-dimensional inkjet printer. *J Artif Organs* 9 : 234-240, 2006
- 16) 高戸 毅・他 : 顎顔面領域における骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究. *口科誌* 63 : 207-215, 2014
- 17) Saijo H, et al : Maxillofacial reconstruction using custom-made artificial bones fabricated by inkjet printing technology. *J Artif Organs* 12 : 200-205, 2009
- 18) Izumi K, et al : Development of a tissue-engineered human oral mucosa : from the bench to the bed side. *Cells Tissues Organs* 176 : 134-152, 2004
- 19) Takeuchi J, et al : Clinical evaluation of application of polyglycolic acid sheet and fibrin glue spray for partial glossectomy. *J Oral Maxillofac Surg* 71 : e126-131, 2013
- 20) Hoshi K, et al : Recent trends in cartilage regenerative medicine and its application to oral and maxillofacial surgery. *Oral Sci International* 10 : 15-19, 2013
- 21) Sakai K, et al : Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest* 122 : 80-90, 2012



Axon Diameter and Intra-Axonal Volume Fraction of the Corticospinal Tract in Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus Measured by Q-Space Imaging

Kouhei Kamiya^{1,4*}, Masaaki Hori¹, Masakazu Miyajima², Madoka Nakajima², Yuriko Suzuki^{1,3}, Koji Kamagata¹, Michimasa Suzuki¹, Hajime Arai², Kuni Ohtomo⁴, Shigeki Aoki¹

1 Department of Radiology, Juntendo University Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan, **2** Department of Neurosurgery, Juntendo University Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan, **3** Philips Electronics Japan, Ltd., Tokyo, Japan, **4** Department of Radiology, Graduate School of Medicine, the University of Tokyo, Tokyo, Japan

Abstract

Purpose: Previous studies suggest that compression and stretching of the corticospinal tract (CST) potentially cause treatable gait disturbance in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus (iNPH). Measurement of axon diameter with diffusion MRI has recently been used to investigate microstructural alterations in neurological diseases. In this study, we investigated alterations in the axon diameter and intra-axonal fraction of the CST in iNPH by q-space imaging (QSI) analysis.

Methods: Nineteen patients with iNPH and 10 age-matched controls were recruited. QSI data were obtained with a 3-T system by using a single-shot echo planar imaging sequence with the diffusion gradient applied parallel to the antero-posterior axis. By using a two-component low-q fit model, the root mean square displacements of intra-axonal space (= axon diameter) and intra-axonal volume fraction of the CST were calculated at the levels of the internal capsule and body of the lateral ventricle, respectively.

Results: Wilcoxon's rank-sum test revealed a significant increase in CST intra-axonal volume fraction at the paraventricular level in patients ($p < 0.001$), whereas no significant difference was observed in the axon diameter. At the level of the internal capsule, neither axon diameter nor intra-axonal volume fraction differed significantly between the two groups.

Conclusion: Our results suggest that in patients with iNPH, the CST does not undergo irreversible axonal damage but is rather compressed and/or stretched owing to pressure from the enlarged ventricle. These analyses of axon diameter and intra-axonal fraction yield insights into microstructural alterations of the CST in iNPH.

Citation: Kamiya K, Hori M, Miyajima M, Nakajima M, Suzuki Y, et al. (2014) Axon Diameter and Intra-Axonal Volume Fraction of the Corticospinal Tract in Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus Measured by Q-Space Imaging. PLoS ONE 9(8): e103842. doi:10.1371/journal.pone.0103842

Editor: Christophe Lenglet, University of Minnesota, United States of America

Received: February 17, 2014; **Accepted:** July 2, 2014; **Published:** August 5, 2014

Copyright: © 2014 Kamiya et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was partly supported by a Research Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (2011-Nanchi-018) and a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (Comprehensive Brain Science Network) from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following conflicts: Yuriko Suzuki is an employee of Philips Electronics Japan. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* Email: kkamiya-ky@umin.ac.jp

Introduction

Idiopathic normal pressure hydrocephalus (iNPH) is a clinical entity of unknown cause and is characterized by the triad of gait disturbance, cognitive deterioration, and urinary incontinence [1]. It is also associated with ventricular enlargement, flattening of high-convexity sulci, and periventricular T2-weighted image hyperintensity in the absence of elevated cerebrospinal fluid (CSF) pressure [2]. Gait disturbance is the most frequent symptom of iNPH [3] and is treated by CSF shunting [4]. Although the etiology of gait disturbance in iNPH is not completely understood, a plausible explanation is that the corticospinal tract (CST) is distorted by expansion of the lateral ventricles [1,5,6].

Diffusion tensor imaging (DTI) has been applied to neurological and psychological diseases and is useful to detect brain abnormalities that can not be recognized by conventional T1- or T2-

weighted images [7,8]. Previous studies conducted with DTI revealed increases of fractional anisotropy (FA) and axial diffusivity values in the CST in patients with iNPH [9–17], which tended to return to normal after placement of a ventriculoperitoneal (VP) shunt [9–12]. The increases in FA and axial diffusivity have been suggested to result from ventricular enlargement that mechanically compresses the tract and yields more directional water diffusion along it. Diffusion MRI is expected to become a non-invasive method for diagnosing iNPH and predicting the response to surgery [12,17].

Q-space imaging (QSI), a diffusion MRI technique that does not assume that the displacement probability of diffusing water molecules has a Gaussian distribution, can provide quantitative tissue architecture information at cellular dimensions [18–22]. Recently, analysis of axon diameter of neural fibers by using diffusion MRI is becoming a topic for investigation of microstruc-

tural alteration in neurological disease [23–28], although assessment of axonal architecture usually requires high gradient amplitudes and long scanning times, which are not clinically applicable. A two-component low- q fit model for QSI analysis, proposed by Ong et al. [29], enables measurement of the axon diameters of neural fibers with a reasonable scanning time. Briefly, QSI provides a molecular displacement probability density function (PDF), which reflects the axonal architecture, such as axon membranes and myelin sheath acting as barriers to diffusing molecules. In the white matter, the dominant diffusion barrier is the axonal membrane, and the spacing between barriers can be regarded as mean axonal diameter [19]. A two-component low- q fit model used in this study has the following two merits; 1) it accounts for signal from extra- and intra-axonal spaces and has better correlations with pathological findings than a single-component model, 2) it does not require very high gradient amplitudes [29]. The limitation of this method is that it requires prior knowledge of the fiber orientation, because the diffusion gradient must be applied perpendicular to the fiber direction.

The purpose of this study is to investigate alterations in the axonal architecture of the CST in patients with iNPH by using a two-component low- q fit analysis of QSI.

Materials and Methods

Ethics Statement

This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of Juntendo University Hospital and all persons gave their written informed consent prior to their inclusion in the study.

Patients

Nineteen patients with iNPH (10 males and 9 females; 74.3 ± 6.2 years old) and 10 age-matched control subjects (3 males and 7 females; 75.8 ± 5.2 years old) were recruited. Diagnosis of iNPH was made according to the diagnostic criteria of probable iNPH [30]. Those who had a history of neurological disease or any significant findings (as observed on routine MR images) that might affect the brain were excluded. Normal control subjects were required to be >60 years of age and have no neurological or psychological symptoms, history of neurologic diseases, or apparent abnormalities observed on conventional MR images.

QSI data acquisition and processing

QSI data were obtained with a 3-T unit (Achieva, Philips Healthcare, Best, The Netherlands) by using a single-shot echo planar imaging (EPI) sequence. The patient was positioned so that the anterior commissure–posterior commissure (AC-PC) line is parallel to the scanner's x-y plane. The scan parameters were: repetition rate/echo time (TR/TE) = 4500/99 ms, field of view (FOV) = 240×240 mm², matrix size = 96×96 , slice thickness = 5 mm, 10 axial sections including the level of internal capsule, number of excitations (NEX) = 2, half-Fourier factor = 0.667, 16 b-values (0, 1000, 2000, ... 15000 s/mm², applied in sequential order), and acquisition time = 828 s. The gradient duration (δ) and time between the two leading edges of the diffusion gradient (Δ) were 39.3 and 48.7 ms, respectively. We did not apply any distortion corrections, because correction was difficult especially at high b values and resulted in severe signal defect in some of the patients.

The two-component low- q fit method for axon diameter analysis necessitates a diffusion gradient perpendicular to the fiber tract to be measured. Ideally, the appropriate direction of diffusion gradient can be determined in each patient by performing

tractography of the CST, though it is not realistic in clinical examinations. Instead, we applied diffusion gradient parallel to the antero-posterior axis of the scanner's coordinate system, as the known course of CST [52,53] is substantially perpendicular to the scanner's x-y plane. Examples of the acquired images are shown in Figure 1. By applying the diffusion gradient parallel to the antero-posterior axis, the CST could be identified as a hyperintense tract running from the precentral gyrus to the cerebral peduncle through the posterior limb of the internal capsule [31]. Each ROI was placed manually so that it includes the brightly-appearing CST, using $b = 1000 \sim 4000$ s/mm² images. The cranial and caudal sections were also used as references for continuity of the tract. Measurements were performed at two levels. The first section was selected so that it contains the posterior limb of the internal capsule. The second one was selected as two or three sections cranial to the first one, where the CST runs closest to the lateral ventricle. By using in-house software developed in Matlab (R2011b; MathWorks, Natick, MA, USA), the root mean square displacements (RMSDs) of the intra-axonal space (= axon diameter) and intra-axonal volume fraction of the CST were calculated by fitting the echo attenuations (normalized to the maximum value at the $q=0$) to equation (1) with a nonlinear least squares algorithm: $E(q) = (1-f_1) \exp(-2\pi^2 q^2 Z_E^2) + f_1 \exp(-2\pi^2 q^2 Z_I^2) \dots (1)$ where f_1 is the relaxation-weighted intra-axonal volume fraction, and Z_E and Z_I are the RMSDs of diffusing molecules in the extra- and intra-axonal spaces, respectively.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed by using JMP software (ver. 10.0.2; SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). The axon diameter and intra-axonal volume fraction values of the CST from both hemispheres were compared between the patients and controls. To minimize type I errors with multiple comparisons, Bonferroni's correction was applied. The significance level ($p=0.05$) was therefore reduced to an adjusted p level of 0.006.

Results

Excellent fitting was obtained in all ROIs ($R^2 > 0.95$). Shapiro-Wilk's test was performed to test the hypothesis that the data satisfied Gaussian distribution (the significance level was set at $p=0.05$). As it was revealed that the assumption of Gaussian distribution was not satisfied in the measurements of axon diameter at the internal capsule level ($p=0.004$), Wilcoxon's rank-sum test was used for the following group analyses. At the paraventricular level, the CST intra-axonal volume fraction was significantly higher in patients with iNPH than in the controls (right, 0.43 ± 0.04 for the controls, 0.53 ± 0.05 for the patients, $p=0.0002$; left, 0.43 ± 0.06 for the controls, 0.54 ± 0.06 for the patients, $p=0.0005$), whereas no significant difference was observed in the CST axon diameter. At the level of the internal capsule, no significant differences were observed between the two groups in either axon diameter or intra-axonal volume fraction (Table 1, Figs. 2, 3). There were no statistically significant differences in ROI sizes between the patients and the controls (Student's t -test; the internal capsule level, 43.6 ± 4.8 mm² for the controls and 43.3 ± 7.3 mm² for the patients, $p=0.83$; the paraventricular level, 43.0 ± 9.6 mm² for the controls and 41.9 ± 7.4 mm² for the patients, $p=0.66$).

Discussion

A two-component low- q fit analysis of QSI revealed that the CST intra-axonal volume fraction in areas near the ventricles was

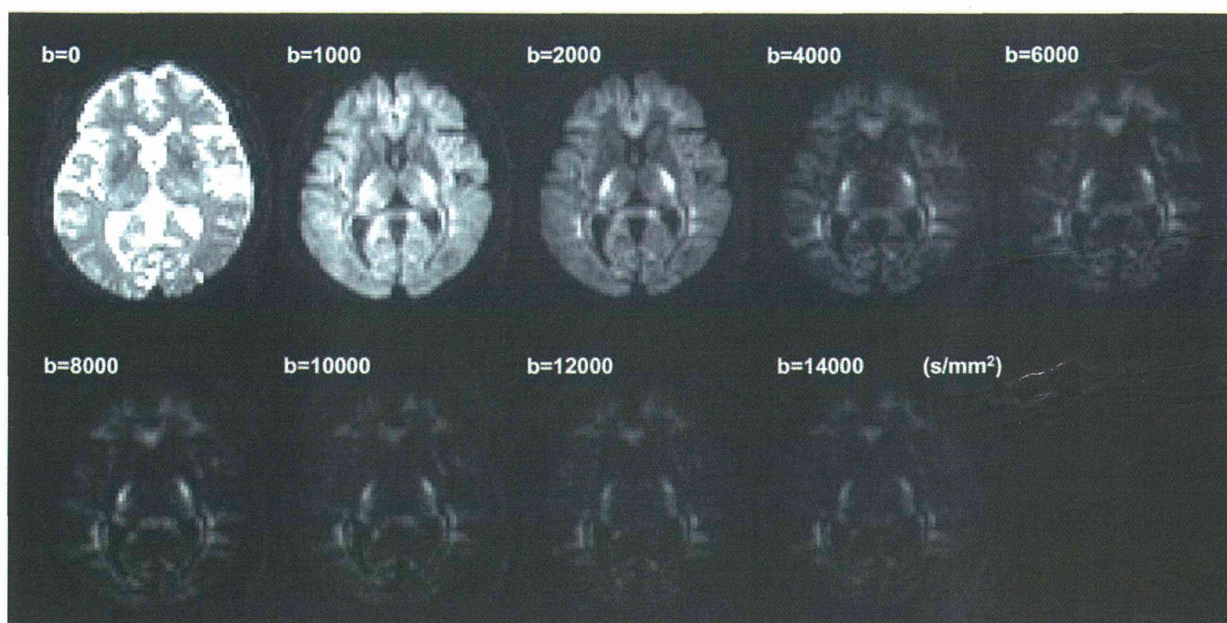


Figure 1. Examples of the acquired diffusion weighted images.
doi:10.1371/journal.pone.0103842.g001

increased in iNPH patients compared with controls, whereas the CST axon diameter was unaltered. Neither CST axon diameter nor intra-axonal volume fraction differed significantly at the level of the internal capsule. Our results are in line with previous DTI studies showing increased diffusion anisotropy of the CST in iNPH, presumably due to compaction of neuronal fibers [9–17]. The increase in CST intra-axonal volume fraction was limited to areas near the lateral ventricle in our study, suggesting that it results from compression by the enlarged ventricles. The unaltered axon diameter of the CST suggests that the iNPH patients involved in this study did not have irreversible axonal damage of the CST.

The exact pathogenesis of the gait disturbance in iNPH is not entirely understood. Though our results suggest that the axons are densely packed in the CST with reduced extra-axonal space, there is no readily available explanation why such situation results in the characteristic gait disturbance in iNPH. A classical hypothesis that remains plausible is that the CST is compressed and/or deformed because of enlargement of the lateral ventricles [1,5,6]. Other pathological changes observed in the brains of patients with iNPH, such as ischemia and gliosis due to transependymal diapedesis of

the CSF, may to some extent be related to gait disturbance [32–36]. However, the reversibility of symptoms after shunt surgery even after a long period suggests that irreversible axonal damage is unlikely to be the sole cause of gait disturbance [4]. The “compression hypothesis” is also supported by the fact that the fibers of the legs are closest in proximity to the lateral ventricles [37–39]; this explains why gait disturbance is the most prominent neurological feature in iNPH. Moreover, a detailed tract-specific analysis of the CST demonstrated that the increase in FA was limited to areas near the lateral ventricle [15], an observation consistent with CST compression by the ventricular enlargement.

Analyses of the axon diameter and axon density by using diffusion MRI could have a significant impact on our understanding of white matter architecture and connectivity, neuroanatomical changes that occur in white matter disorders, and changes that occur in white matter during normal and abnormal development. These indices are more straightforward and easier to interpret than other diffusion metrics, such as the mean diffusivity, fractional anisotropy, directional diffusivity, and directional kurtosis, each of which must be interpreted in combination with one or more of the others to understand the microstructural

Table 1. Results of the measurement of CST axon diameter and intra-axonal volume fraction.

| | controls | | iNPH patients | |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | right | left | right | left |
| Internal capsule level | | | | |
| axon diameter (μm) | 2.07 \pm 0.35 | 2.00 \pm 0.31 | 2.00 \pm 0.53 | 2.16 \pm 0.28 |
| intra-axonal volume fraction | 0.47 \pm 0.05 | 0.46 \pm 0.06 | 0.49 \pm 0.09 | 0.53 \pm 0.08 |
| Paraventricular level | | | | |
| axon diameter (μm) | 2.09 \pm 0.12 | 2.04 \pm 0.14 | 2.10 \pm 0.16 | 2.11 \pm 0.15 |
| intra-axonal volume fraction | 0.43 \pm 0.04 | 0.43 \pm 0.06 | 0.53 \pm 0.05 | 0.54 \pm 0.06 |

doi:10.1371/journal.pone.0103842.t001

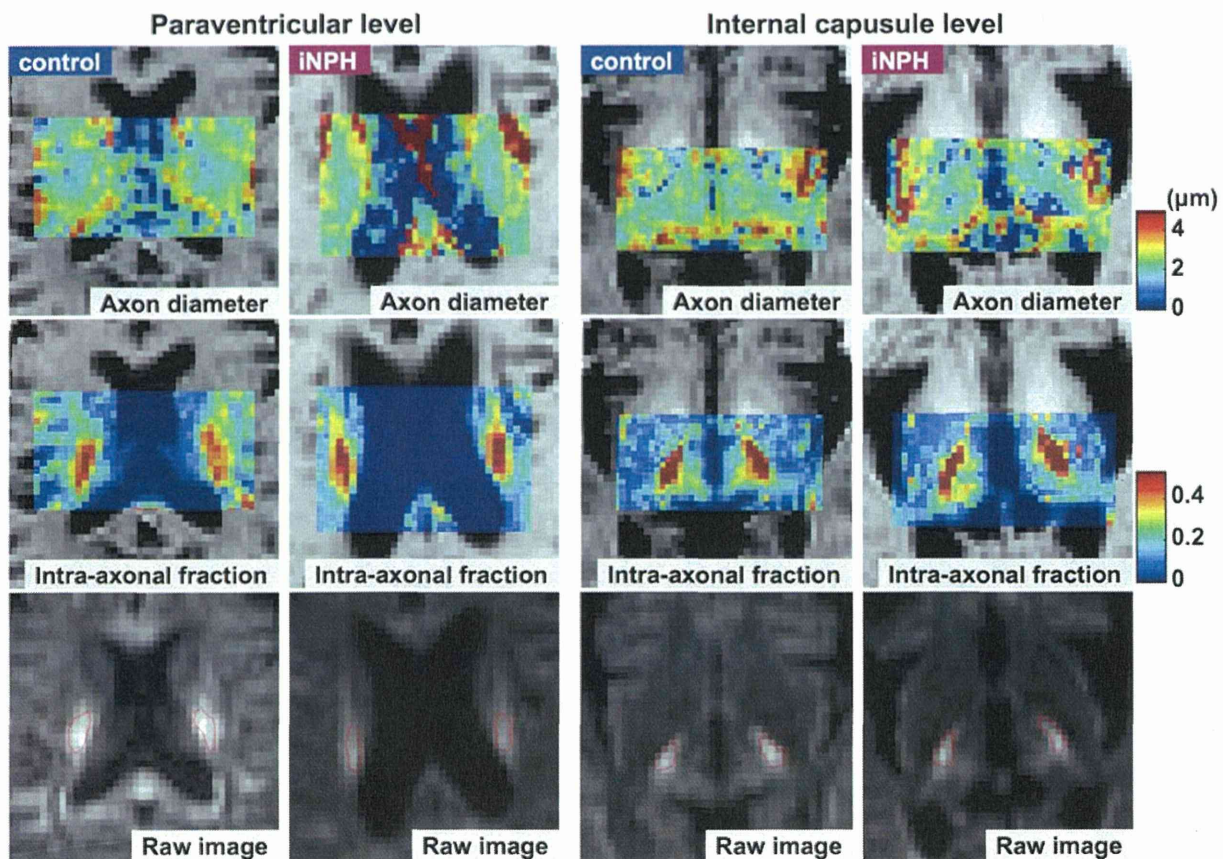


Figure 2. Examples of axon diameter maps (top row) and intra-axonal volume fraction maps (middle row). ROIs are shown in the raw diffusion image (bottom row, $b=2000$ s/mm²). doi:10.1371/journal.pone.0103842.g002

changes [40,41]. Because axon diameter determines conduction velocity, this metric and the axon density provide information about the role and performance of white matter pathways [42–44]. Axon diameter analysis would also provide a means of testing hypotheses that assume changes in the diameter distribution in diseases such as amyotrophic lateral sclerosis [45], multiple sclerosis [46], and autism [47].

The present results need to be interpreted carefully and hopefully validated by more dedicated experiments, because the short gradient pulse (SGP) approximation ($\Delta \gg \delta$) was not satisfied in this study. In principal, SGP approximation needs to be fulfilled for accurate compartment size measurement by QSI. However, with clinical scanners, high q -values can only be obtained with long diffusion gradient pulses because of the relatively weak gradients [20,48,49]. The previous experimental studies reported that the diffraction minima is pushed towards higher q values and the extracted compartment size becomes smaller than the real size when the SGP approximation is violated ($\Delta/\delta \sim 1$) [50]. Though the situation becomes more complicated when there are more than two compartments [50], we speculate that the intra-axonal volume fraction in this study is larger than the real value, as the echo attenuation curve vs q values shifts to the right. Mathematical calibration with the ideal Δ/δ settings [50], or the use of a double-pulsed gradient sequence [51], may be useful to overcome this issue.

The other limitations to this study include the following. First, interpretation of the increase in intra-axonal volume fraction is

somewhat ambiguous as it is not directly equal to axonal density. Though we speculate the increased intra-axonal volume fraction reflects that the neural fibers are densely packed with reduced extra-axonal space, other conditions, such as changes in the distribution of axon diameter (i.e., increase of large- and small-diameter axons with few middle-sized axons), may yield similar results. In addition, the intra-axonal volume fraction obtained by the two-component low- q fit method is not completely proven to correlate with that obtained from pathological analyses [29]. Second, the determination of diffusion gradient direction was approximative, and it could have been slightly different from what it should be (perpendicular to the CST). Also, previous DTI studies in iNPH have typically reported increased FA in the CST and decreased FA in the corpus callosum, suggesting regionally dependent microstructural alterations [9,11,13,15]. Therefore, our results require validation by an orientationally invariant method for measuring the axon diameter [25,54]. Lastly, owing to the small sample size and lack of post-operative imaging, the clinical relevance of the QSI measures, such as in monitoring the effect of surgery or pre-operatively predicting the response to surgery, could not be established.

Conclusions

In this study, an analysis of axon diameter and intra-axonal volume fraction demonstrated that in patients with iNPH, the

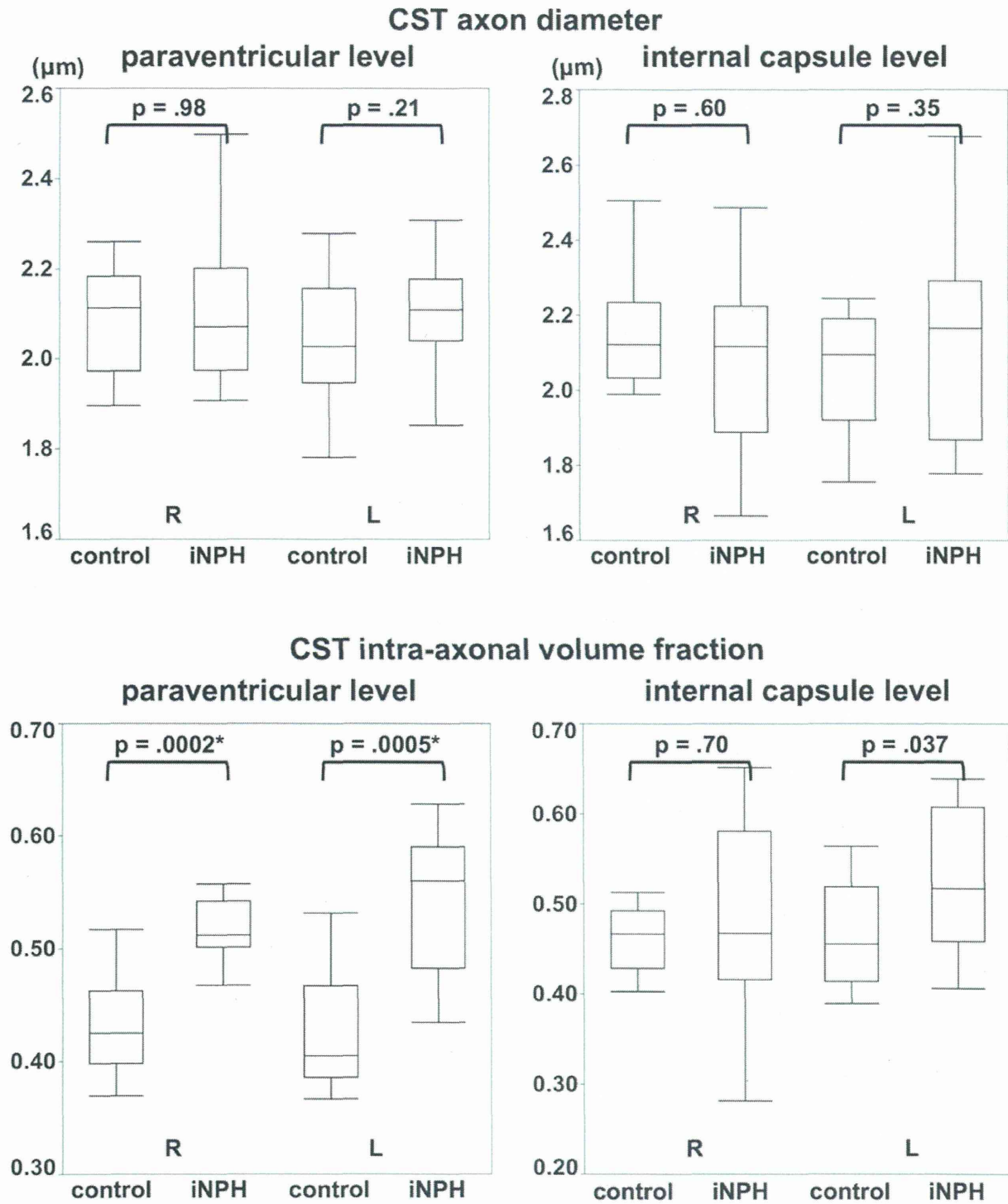


Figure 3. Boxplot comparing the CST axon diameter and intra-axonal volume fraction between the controls and iNPH patients. Statistical analyses revealed a significant increase in CST intra-axonal volume fraction at the paraventricular level in the patients, whereas no significant difference was observed in the axon diameter. At the level of the internal capsule, neither axon diameter nor intra-axonal volume fraction differed significantly between the two groups. * The significance level was set at $p=0.006$ (Bonferroni's correction for multiple comparison). doi:10.1371/journal.pone.0103842.g003

CST is compressed by the ventricular enlargement but does not undergo irreversible axonal damage. The axon diameter and intra-axonal volume fraction obtained by QSI yield insights into

microstructural alterations in iNPH. Their potential use in predicting the response to surgery or in post-operative monitoring requires further investigation.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: K. Kamiya MH MM MN K. Kamagata HA KO SA. Performed the experiments: K. Kamiya MH MM MN YS K. Kamagata HA MS. Analyzed the data: K. Kamiya MH YS K.

References

- Relkin N, Marmarou A, Klinge P, Bergsneider M, Black PM (2005) Diagnosing idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *Neurosurgery* 57: S4–16; discussion ii–v.
- Sasaki M, Honda S, Yuasa T, Iwamura A, Shibata E, et al. (2008) Narrow CSF space at high convexity and high midline areas in idiopathic normal pressure hydrocephalus detected by axial and coronal MRI. *Neuroradiology* 50: 117–122.
- Marmarou A, Young HF, Aygok GA, Sawauchi S, Tsuji O, et al. (2005) Diagnosis and management of idiopathic normal-pressure hydrocephalus: a prospective study in 151 patients. *Journal of Neurosurgery* 102: 987–997.
- Meier U, Lemcke J (2006) Clinical outcome of patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus three years after shunt implantation. *Acta Neurochir Suppl* 96: 377–380.
- Hakim S, Venegas JG, Burton JD (1976) The physics of the cranial cavity, hydrocephalus and normal pressure hydrocephalus: mechanical interpretation and mathematical model. *Surgical Neurology* 5: 187–210.
- Adams RD, Fisher CM, Hakim S, Ojemann RG, Sweet WH (1965) Symptomatic Occult Hydrocephalus with “Normal” Cerebrospinal-Fluid Pressure. A Treatable Syndrome. *New England Journal of Medicine* 273: 117–126.
- Shizukuishi T, Abe O, Aoki S (2013) Diffusion tensor imaging analysis for psychiatric disorders. *Magnetic resonance in medical science* 12: 153–159.
- Inglese M, Bester M (2010) Diffusion imaging in multiple sclerosis: research and clinical implications. *NMR in Biomedicine* 23: 865–872.
- Assaf Y, Ben-Sira L, Constantini S, Chang LC, Beni-Adani L (2006) Diffusion tensor imaging in hydrocephalus: initial experience. *AJNR American Journal of Neuroradiology* 27: 1717–1724.
- Jang SH, Ho Kim S (2011) Diffusion tensor imaging following shunt in a patient with hydrocephalus. *Journal of Neuroimaging* 21: 69–72.
- Scheel M, Diekhoff T, Sprung C, Hoffmann KT (2012) Diffusion tensor imaging in hydrocephalus—findings before and after shunt surgery. *Acta Neurochirurgica* 154: 1699–1706.
- Jurcoane A, Keil F, Szelenyi A, Pfeilschifter W, Singer OC, et al. (2013) Directional diffusion of corticospinal tract supports therapy decisions in idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *Neuroradiology*.
- Hattingen E, Jurcoane A, Melber J, Blasel S, Zanella FE, et al. (2010) Diffusion tensor imaging in patients with adult chronic idiopathic hydrocephalus. *Neurosurgery* 66: 917–924.
- Hattori T, Yuasa T, Aoki S, Sato R, Sawaura H, et al. (2011) Altered microstructure in corticospinal tract in idiopathic normal pressure hydrocephalus: comparison with Alzheimer disease and Parkinson disease with dementia. *AJNR American Journal of Neuroradiology* 32: 1681–1687.
- Hattori T, Ito K, Aoki S, Yuasa T, Sato R, et al. (2012) White matter alteration in idiopathic normal pressure hydrocephalus: tract-based spatial statistics study. *AJNR American Journal of Neuroradiology* 33: 97–103.
- Nakanishi A, Fukunaga I, Hori M, Masutani Y, Takaaki H, et al. (2013) Microstructural changes of the corticospinal tract in idiopathic normal pressure hydrocephalus: a comparison of diffusion tensor and diffusional kurtosis imaging. *Neuroradiology* 55: 971–976.
- Kim MJ, Seo SW, Lee KM, Kim ST, Lee JI, et al. (2011) Differential diagnosis of idiopathic normal pressure hydrocephalus from other dementias using diffusion tensor imaging. *AJNR American Journal of Neuroradiology* 32: 1496–1503.
- Cohen Y, Assaf Y (2002) High b-value q-space analyzed diffusion-weighted MRS and MRI in neuronal tissues - a technical review. *NMR in Biomedicine* 15: 516–542.
- Assaf Y, Mayk A, Cohen Y (2000) Displacement imaging of spinal cord using q-space diffusion-weighted MRI. *Magnetic Resonance in Medicine* 44: 713–722.
- Farrell JA, Smith SA, Gordon-Lipkin EM, Reich DS, Calabresi PA, et al. (2008) High b-value q-space diffusion-weighted MRI of the human cervical spinal cord in vivo: feasibility and application to multiple sclerosis. *Magnetic Resonance in Medicine* 59: 1079–1089.
- Farrell JA, Zhang J, Jones MV, Deboy CA, Hoffman PN, et al. (2010) q-space and conventional diffusion imaging of axon and myelin damage in the rat spinal cord after axotomy. *Magnetic Resonance in Medicine* 63: 1323–1335.
- Hori M, Fukunaga I, Masutani Y, Taoka T, Kamagata K, et al. (2012) Visualizing non-Gaussian diffusion: clinical application of q-space imaging and diffusional kurtosis imaging of the brain and spine. *Magn Reson Med* 11: 221–233.
- Assaf Y, Blumenfeld-Katzir T, Yovel Y, Basser PJ (2008) AxCaliber: a method for measuring axon diameter distribution from diffusion MRI. *Magnetic Resonance in Medicine* 59: 1347–1354.
- Dyrby TB, Sogaard LV, Hall MG, Pfito M, Alexander DC (2013) Contrast and stability of the axon diameter index from microstructure imaging with diffusion MRI. *Magnetic Resonance in Medicine* 70: 711–721.
- Alexander DC, Hubbard PL, Hall MG, Moore EA, Pfito M, et al. (2010) Orientationally invariant indices of axon diameter and density from diffusion MRI. *Neuroimage* 52: 1374–1389.
- Assaf Y, Alexander DC, Jones DK, Bizzi A, Behrens TE, et al. (2013) The CONNECT project: Combining macro- and micro-structure. *Neuroimage* 80: 273–282.
- McNab JA, Edlow BL, Witzel T, Huang SY, Bhat H, et al. (2013) The Human Connectome Project and beyond: initial applications of 300 mT/m gradients. *Neuroimage* 80: 234–245.
- Morozov D, Bar L, Sochen N, Cohen Y (2013) Modeling of the diffusion MR signal in calibrated model systems and nerves. *NMR in Biomedicine* 26: 1787–1795.
- Ong HH, Wehrli FW (2010) Quantifying axon diameter and intra-cellular volume fraction in excised mouse spinal cord with q-space imaging. *Neuroimage* 51: 1360–1366.
- Mori E, Ishikawa M, Kato T, Kazui H, Miyake H, et al. (2012) Guidelines for management of idiopathic normal pressure hydrocephalus: second edition. *Neurologia Medico-Chirurgica* 52: 775–809.
- Schaefer PW, Grant PE, Gonzalez RG (2000) Diffusion-weighted MR imaging of the brain. *Radiology* 217: 331–345.
- Akai K, Uchigasaki S, Tanaka U, Komatsu A (1987) Normal pressure hydrocephalus. *Neuropathological study. Acta Pathologica Japonica* 37: 97–110.
- Del Bigio MR (1993) Neuropathological changes caused by hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 85: 573–585.
- Di Rocco C, Di Trapani G, Maira G, Bentivoglio M, Macchi G, et al. (1977) Anatomic-clinical correlations in normotensive hydrocephalus. Reports on three cases. *Journal of the Neurological Sciences* 33: 437–452.
- Bradley WG Jr, Whittemore AR, Watanabe AS, Davis SJ, Teresi LM, et al. (1991) Association of deep white matter infarction with chronic communicating hydrocephalus: implications regarding the possible origin of normal-pressure hydrocephalus. *AJNR American Journal of Neuroradiology* 12: 31–39.
- Krauss JK, Regel JP, Vach W, Droste DW, Borremans JJ, et al. (1996) Vascular risk factors and arteriosclerotic disease in idiopathic normal-pressure hydrocephalus of the elderly. *Stroke* 27: 24–29.
- Kim JS, Pope A (2005) Somatotopically located motor fibers in corona radiata: evidence from subcortical small infarcts. *Neurology* 64: 1438–1440.
- Holodny AI, Gor DM, Watts R, Gutin PH, Ulug AM (2005) Diffusion-tensor MR tractography of somatotopic organization of corticospinal tracts in the internal capsule: initial anatomic results in contradistinction to prior reports. *Radiology* 234: 649–653.
- Zolal A, Vachata P, Hejcl A, Bartos R, Malucelli A, et al. (2012) Anatomy of the supraventricular portion of the pyramidal tract. *Acta Neurochirurgica* 154: 1097–1104; discussion 1104.
- Jensen JH, Helpert JA (2010) MRI quantification of non-Gaussian water diffusion by kurtosis analysis. *NMR in Biomedicine* 23: 698–710.
- Wu EX, Cheung MM (2010) MR diffusion kurtosis imaging for neural tissue characterization. *NMR in Biomedicine* 23: 836–848.
- Ritchie JM (1982) On the relation between fibre diameter and conduction velocity in myelinated nerve fibres. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 217: 29–35.
- Aboitiz F, Scheibel AB, Fisher RS, Zaidel E (1992) Fiber composition of the human corpus callosum. *Brain Research* 598: 143–153.
- Lamantia AS, Rakic P (1990) Cytological and quantitative characteristics of four cerebral commissures in the rhesus monkey. *Journal of Comparative Neurology* 291: 520–537.
- Cluskey S, Ramsden DB (2001) Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Pathology* 54: 386–392.
- DeLuca GC, Ebers GC, Esiri MM (2004) Axonal loss in multiple sclerosis: a pathological survey of the corticospinal and sensory tracts. *Brain* 127: 1009–1018.
- Conturo TE, Williams DL, Smith CD, Gultepe E, Akbudak E, et al. (2008) Neuronal fiber pathway abnormalities in autism: an initial MRI diffusion tensor tracking study of hippocampo-fusiform and amygdalo-fusiform pathways. *Journal of the International Neuropsychological Society* 14: 933–946.
- Assaf Y, Ben-Bashat D, Chapman J, Peled S, Biton IE, et al. (2002) High b-value q-space analyzed diffusion-weighted MRI: application to multiple sclerosis. *Magnetic Resonance in Medicine* 47: 115–126.
- Mayzel-Oreg O, Assaf Y, Gigi A, Ben-Bashat D, Verchovsky R, et al. (2007) High b-value diffusion imaging of dementia: application to vascular dementia and Alzheimer disease. *Journal of the Neurological Sciences* 257: 105–113.
- Bar-Shir A, Avram L, Ozarslan E, Basser PJ, Cohen Y (2008) The effect of the diffusion time and pulse gradient duration ratio on the diffraction pattern and the structural information estimated from q-space diffusion MR: experiments and simulations. *Journal of Magnetic Resonance* 194: 230–236.