

2014/9071A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

次世代拡散テンソルイメージング(DTI)
を用いた聴覚系描出法の確立と
その臨床応用研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤岡 正人

平成 27(2015)年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

次世代拡散テンソルイメージング (DTI)
を用いた聴覚系描出法の確立と
その臨床応用研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

目 次

I. 総括研究報告 次世代拡散テンソルイメージング (DTI) を用いた聴覚系描出法の確立と その臨床応用研究 藤岡 正人	1
II. 分担研究報告	
1. DTIを用いたヒト固定側頭骨のMR-histologyに関する研究 藤岡 正人、岡野 ジェイムス洋尚、疋島 啓吾、大石 直樹、畑 純一、 小牧 裕司、太田 裕貴、栗原 渉、河合 良訓 (資料) DTIによる蝸牛内の部位別の神経走行の追跡	4
2. DTIを用いたヒト生体における聴覚中枢の描出に関する研究 藤岡 正人、疋島 啓吾、大石 直樹、畑 純一、小牧 裕司 (資料) DTIによる聴覚系の神経線維走行追跡	9
3. 小型霊長類コモンマーモセット難聴モデル 岡野 ジェイムス洋尚、藤岡 正人、栗原 渉、原田 竜彦 (資料) コモンマーモセット飼育システム	11
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	13

総括研究報告

においては施行施設の動物実験委員会の承認を得て、NIH ガイドラインに則ったプロトコルで行った。

C. 研究結果

①固定側頭骨の画像評価

9.4T-MRI (クライオプローブ装備)で蝸牛神経、前庭神経、顔面神経内での神経線維走行描出、蝸牛内での神経走行、MRI での擬似 surface preparation、内耳道内 4 神経線維の定量化、極めて細い連絡線維の描出に成功した。頂回転/基底回転の分離のみならず 500Hz 幅での各周波数毎の神経線維の蝸牛神経内における tonotopic な走行を描出し得た。これらの結果は当初の研究計画を遙かに超えており、側頭骨病理を凌駕しうる情報量を MRI で得られるようになった。

②ヒト生体での DTI 撮像

初年度に生体側頭骨(内耳神経)の高解像度 DTI 撮像を試みたが予想していた精度の神経線維描出は得られなかった。予備実験で用いた小型霊長類のマーモセットと異なりヒトにおいては乳突蜂巣が発達していることが磁化率アーチファクトを上げているためと考えられた。そこで H26 年度は聴覚上位中枢の神経回路描出に特化し、また臨床応用を念頭に現実的な磁場 (1.5T, 3T-MRI) で臨床応用に最適化したシークエンスを確立した。その結果、蝸牛神経核から 1 次聴皮質 (BA 41) さらに関連皮質野への線維連絡を極めて高精度の DTI で描出することに成功し、臨床応用に最適化したシークエンスを構築した。

③小型霊長類コモンマーモセットを用いた前臨床研究

橋渡し研究に向けたマーモセット研究では、全自動化 DP-OAE プログラムを構築し、耳科研究用の霊長類飼育設備と難聴モデル構築用ハードウェアの準備をほぼ終えた。中耳手術や内耳への薬剤局所投与プロトコルを確立した。来年度より前臨床研究(難聴に対する非臨床 POC 取得研究)に応用しうる研究プロトコルの樹立を目指す。

D. 考察

昨年度の結果に基づき、ヒト DTI については固定標本側頭骨と生体聴皮質の解析を中

心に、霊長類モデルとしてのマーモセット研究については橋渡し研究の基礎データ蓄積を進めた。

ヒト固定側頭骨標本での検討から 9.4T MRI で固定御遺体における側頭骨内神経走行の詳細な解析が十分可能であることが判明し、特に内耳道内での 4 神経の分離描出に十分だった。この結果は側頭骨病理の分野に応用可能と思われ、新たな展開が期待できる。さらに本年度のクライオプローブ (cryogenic probe) を用いた解析から、内耳道内神経の分離描出のみならず蝸牛内の神経走行についても極めて高解像度で精細な画像を撮ることに成功し、蝸牛内の回転ごとの神経走行を追跡することが可能だった。このことは蝸牛レベル、蝸牛神経レベルさらには中枢レベルでの周波数別地図 (tonotopic-map) を MRI 撮像のみによって作製できる可能性を示唆しており、側頭骨病理のみならず今後聴覚医学領域に新しいアプローチを提示できるものと思われた。昨年度、ヒト生体画像での聴覚中枢ネットワークの解析を行い比較的良好な聴覚中枢の可視化ができたことを受け、本年度は臨床試験に向けた準備を整え、3T MRI での撮像条件の最適化を行った。来年度は難聴症例に加えて末梢での聴覚改善症例における聴覚中枢神経ネットワークの変化を画像解析で捉えられるか検討する。

小型霊長類コモンマーモセットを用いた前臨床研究レベル疾患モデルの樹立においては、分担研究として慈恵医科大学内の動物研究施設を整備し、難聴モデル作製とその治療についての非臨床 POC 取得に向けたプラットフォーム樹立を終えた。現在動物搬入中であり引き続き解析を進めていく。

E. 結論

一部、当初の予定から変更を余儀なくされたが、2年間の解析で全体としての進捗状況は概ね順調に進んでいる。側頭骨病理に応用可能な高解像度 DTI と、臨床機 MRI での聴覚中枢神経回路の詳細な描出系の確立の二点で、臨床応用に近いところまで到達している。現時点では前臨床研究であり非臨床 POC に相当する研究段階だが、最終年度に臨床症例で実地に即した検討を行いたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
（分担）研究報告書

DTIを用いたヒト固定側頭骨のMR-histologyに関する研究

分担研究者 藤岡 正人 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科 助教

分担研究者 岡野 ジェイムス洋尚 東京慈恵会医科大学再生医学研究部 教授

分担研究者 疋島 啓吾 実験動物中央研究所 研究員

分担研究者 大石 直樹 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科 専任講師

研究協力者 畑純一 慶應義塾大学医学部生理学教室 特任助教

研究協力者 小牧裕司 実験動物中央研究所 研究員

研究協力者 太田裕貴 東京慈恵会医科大学大学院医学研究科 血管外科

研究協力者 栗原渉 東京慈恵会医科大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科

研究協力者 河合良訓 東京慈恵会医科大学解剖学教室 教授

研究要旨： 9.4T MRI にクライオプローブ(cryogenic probe)を装備し、ヒト固定御遺体標本を ex vivo で撮像して DTI で神経走行の描出を試みた。昨年度までの検討で cryogenic probe なしでも内耳道内の 4 神経の良好な分離描出とその末梢までの追跡が可能な反面、蝸牛内蝸牛神経線維走行の描出における解像度不足が課題だった。cryogenic probe を用いたところ、内耳道内神経の分離描出のみならず蝸牛内の神経走行についても極めて高解像度で精細な画像を撮ることに成功し、蝸牛内の回転毎、部位毎の神経走行を追跡することが可能だった。このことは蝸牛レベル、蝸牛神経レベルさらには中枢レベルでの周波数別地図 (tonotopic-map) を MRI 撮像のみによって作製できる可能性を示唆しており、側頭骨病理のみならず今後聴覚医学領域に新しいアプローチを提示できるものと思われた。

A. 研究目的

MRI の高磁場化によりこれまで描出不可能だった様々な構造が撮像可能になってきている。我々は拡散強調画像による神経描出 (Diffusion Tensor Tractography: DTT) を用いた聴覚系の神経回路ネットワークの描出に特化してきた。昨年度までの検討で 9.4T MRI を用いれば内耳道内の 4 神経の良好な分離描出とその末梢までの追跡が可能な反面、蝸牛内蝸牛神経線維走行の描出における解像度不足が課題だった。今回はクライオプローブ(cryogenic probe)を装備し、特に蝸牛内の神経線維走行描出に焦点を当てて固定御遺体を用いて解析を行った。

B. 研究方法

ヒト固定御遺体（カルボール液による経心

灌流固定標本）から側頭骨を含む側頭部を摘出し、ex-vivo で解析した。撮像には 9.4T MRI (Bruker BioSpec®) を使い、クライオプローブ(cryogenic probe)を装備した。撮像条件の最適化の後に画像を取得した。本検討は、東京慈恵医科大学解剖学講座との共同研究で、多大な助言とご厚意をいただいた。撮像は同大学地下動物実験施設内にある画像撮像施設を用いた。

（倫理面への配慮）

固定御遺体は東京慈恵医科大学解剖学講座のご協力のもと、医学教育・研究のために篤志でいただいた献体を用いた。この場を借りて深謝申し上げます。

C. 研究結果

9.4T MRI での解析で、十分に良好な解像度

で側頭骨の各構造を描出し得ることができ、もっとも小さな構造のひとつである蝸牛管内のライスネル膜の描出されていた。DTTにおいては内耳道内神経の分離描出と、その末梢までの追跡に成功した。さらにクライオプローブを装備し、蝸牛神経、前庭神経、顔面神経内での神経線維走行描出、蝸牛内での神経走行、MRIでの擬似 surface preparation、内耳道内4神経線維の定量化、極めて細かい連絡線維の描出に成功した。蝸牛に関しては頂回転/基底回転の分離のみならず500Hz幅での各周波数毎の神経線維の蝸牛神経内における tonotopic な走行を描出し得た。

D. 考察

ヒト用7T MRIの普及に伴い、側頭骨画像の7T画像が国内外で報告されつつある。我々は今回クライオプローブ装備9.4T MRIの側頭骨画像を撮像した。これにより昨年の研究において、プローブなし9.4T MRIでは描出し得なかった蝸牛内の神経走行を詳細に描出することに成功した。関心領域(ROI)の設定により、任意の空間を通過する線維走行を追跡することが可能である。付図のよう、今回各周波数に対応する神経線維が、蝸牛神経内でどの部分を走行するかについても追跡が可能であった。これにより、tonotopicなmappingが可能である。この研究結果は、側頭骨病理や剖検に大き

な影響を与える可能性がある。米国にはNIH/NIDCD主体の側頭骨レジストリシステムがあり国家レベルで側頭骨の収集と解析が行われるが、本邦では死生観の違いもあり十分な側頭骨数を得づらい。本研究成果がこの現状に変化をもたらす可能性がある。また責任周波数ごとの神経線維走行を蝸牛神経内、ないしそのさらに中枢で追跡できることから、より些細な聴覚領域への応用が可能になることが予想される。来年度はこの結果をまとめるとともに、Nを増やして神経走行の統計的解析を試みたい。また機会があれば難聴症例での神経線維分布走行について検討したい。

E. 結論

クライオプローブ装備9.4T MRIでの検討によりヒト固定側頭骨の構造描出と神経描出走行に関し、蝸牛内での神経走行や周波数毎の神経分布を描出する撮像方法を得た。今後側頭骨病理や聴覚医学領域への応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 : 9.4T MRI (クライオプローブなし) T2 強調画像による側頭骨内構造の描出

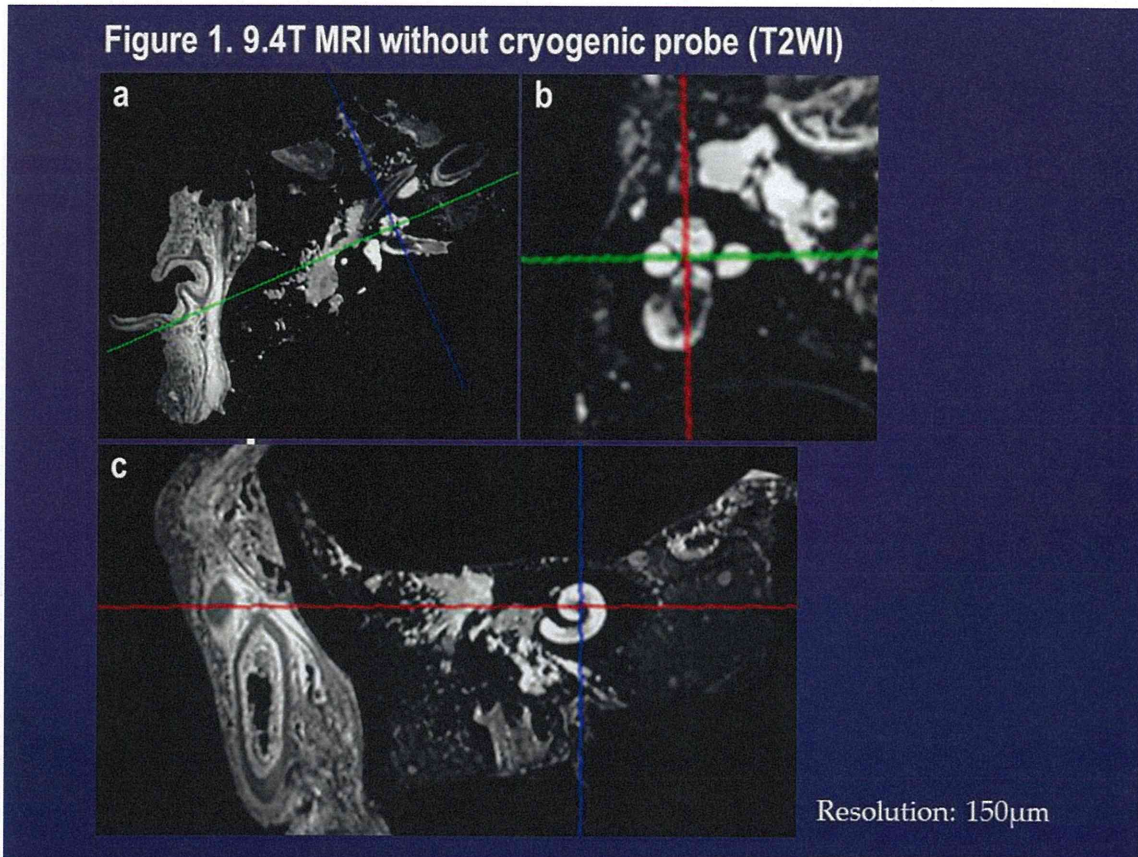


図2 : 内耳道底を通過する線維走行の追跡により 4 神経を描出し得た

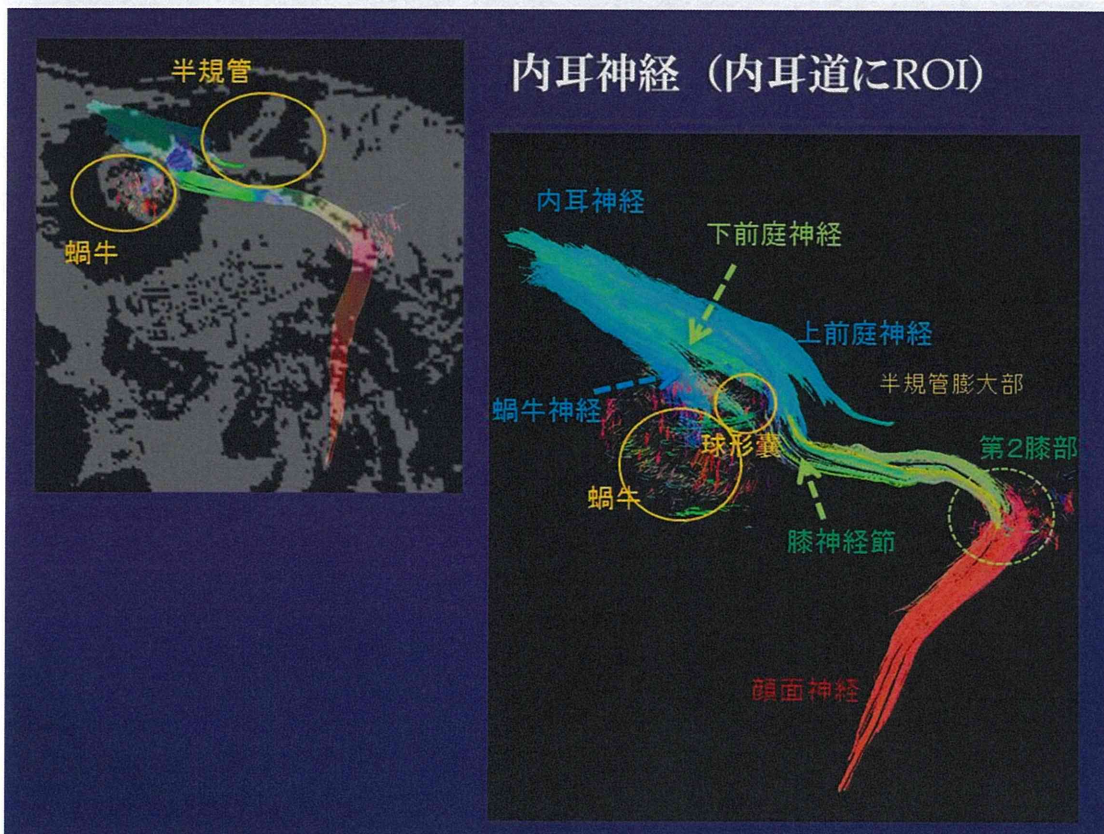


図3：各神経の末梢までの描出（CTとの重ね合わせ像）

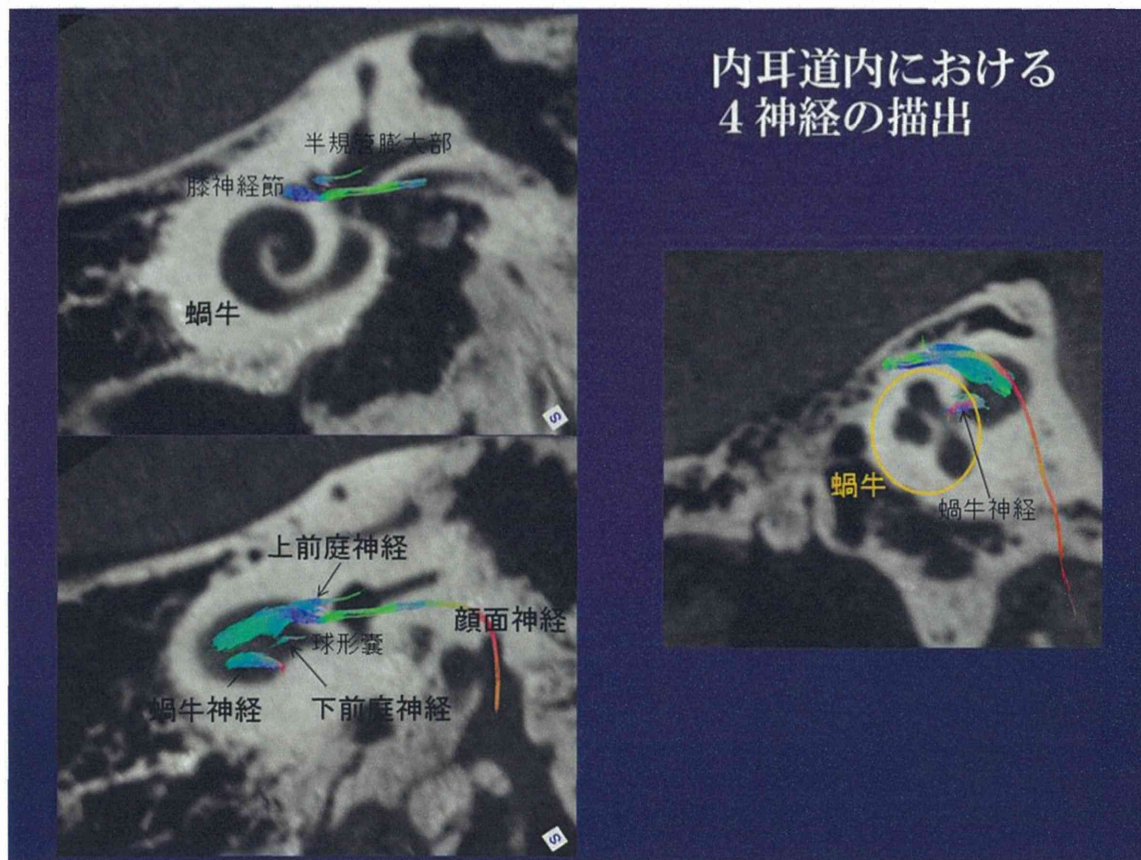


図4： μ CTによる蝸牛の描出

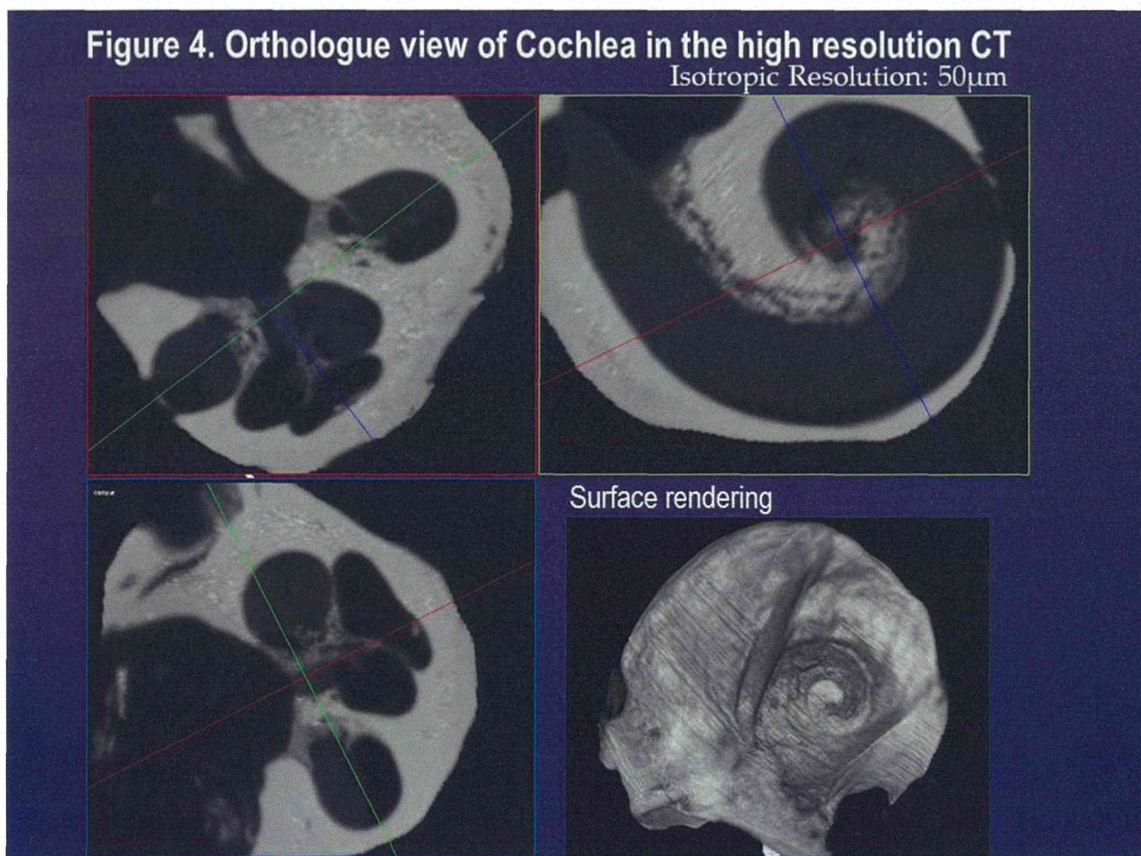


図5：クライオプローブ装備 9.4T MRI による蝸牛、および蝸牛神経の描出

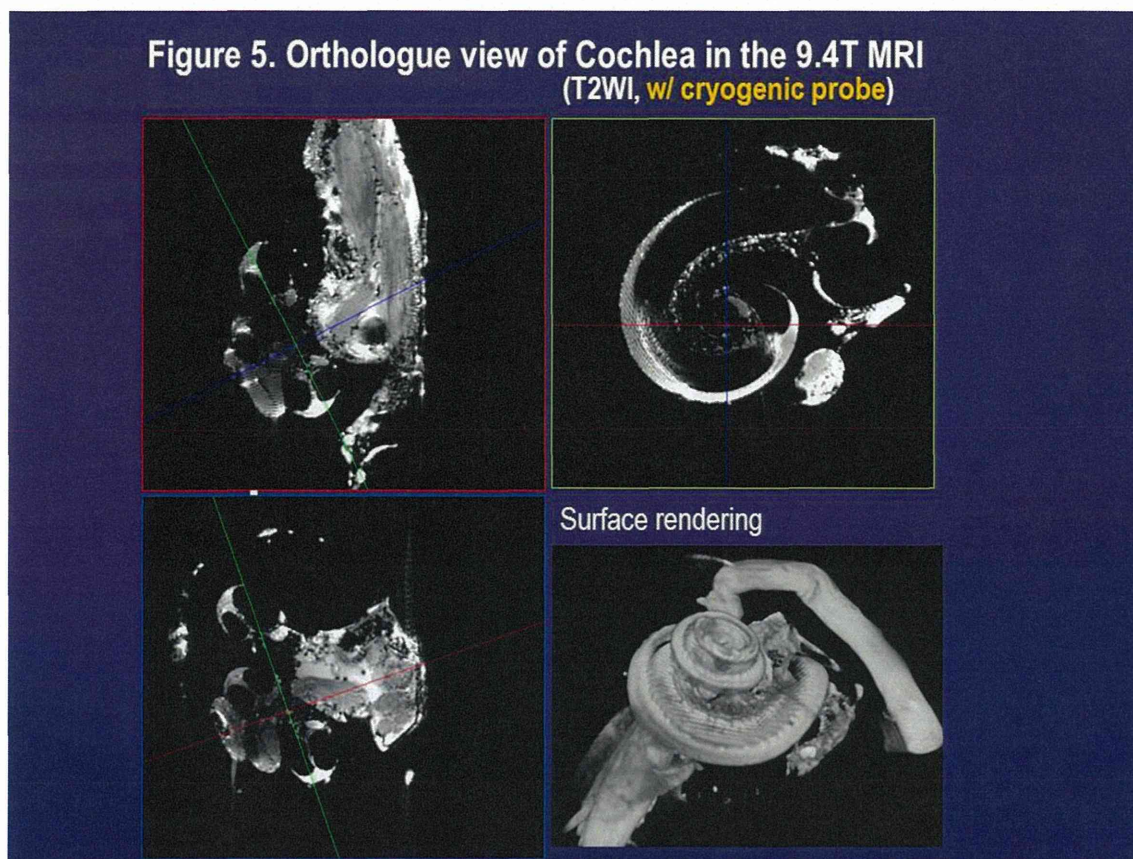
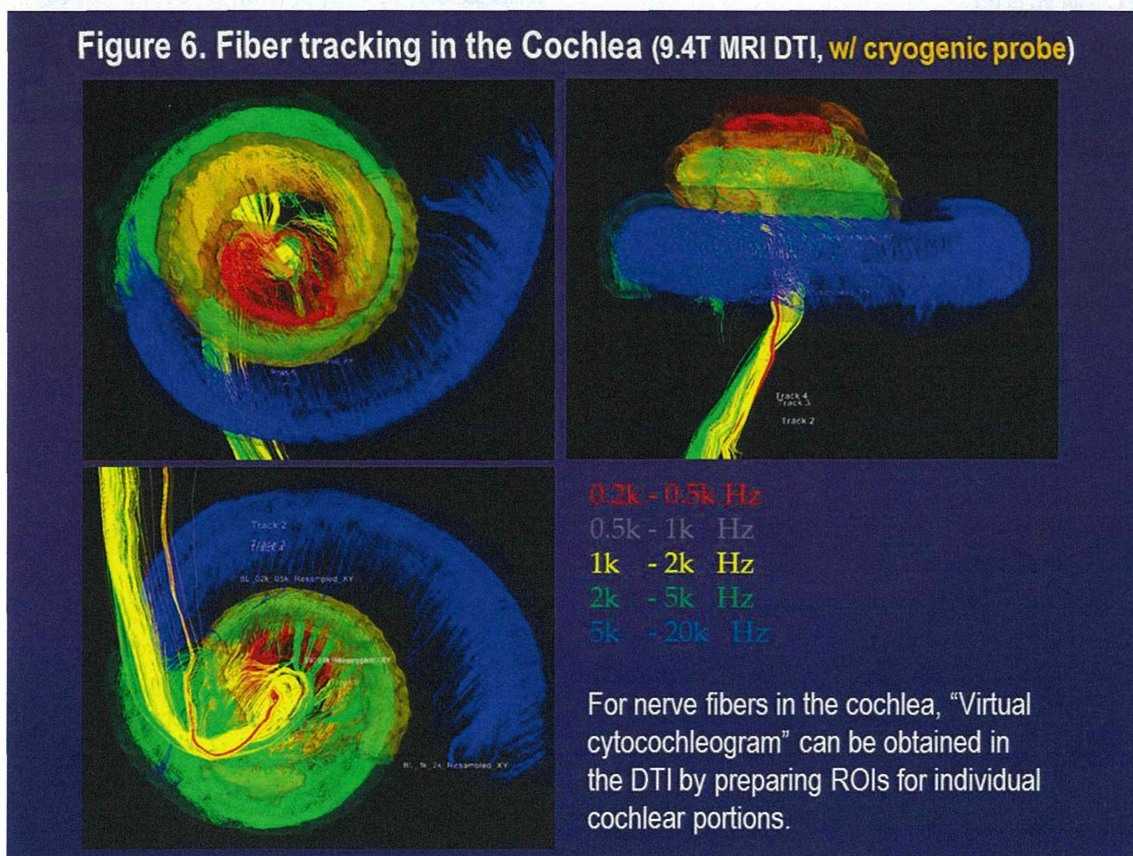


図6：蝸牛内の部位別に関心領域（ROI）を設定することにより、神経内での周波数別線維走行を分離描出しえることに成功した



厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
（分担）研究報告書

DTIを用いたヒト生体における聴覚中枢の描出に関する研究

研究代表者 藤岡 正人 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科 助教
分担研究者 疋島 啓吾 実験動物中央研究所 研究員
分担研究者 大石 直樹 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科 専任講師
研究協力者 畑 純一 慶應義塾大学医学部生理学教室 特任助教
研究協力者 小牧 裕司 実験動物中央研究所 研究員

研究要旨

ヒト生体ボランティア健常人の頭部において DTI 向けに撮像パラメータを調整した。昨年度までに 1.5T MRI 臨床機で予備データを取得し、中脳レベルでの ROI の設定によって、蝸牛神経核から中脳下丘、外側膝状体から聴放線を経て聴皮質まで追跡した。本年度はこの結果に基づき、3T MRI 臨床機を用いて、30 軸による拡散テンソル強調画像と fMRI を短時間で順次撮像する撮像シーケンスおよびプロトコルを確立した。この撮像法を用いて次年度は生体画像の情報蓄積と難聴症例、および聴覚再獲得前後での変化を検討する予定である。

A. 研究目的

多臓器で CT, MRI, 核医学的検査を生理検査と組み合わせた革新的な総合的診断法が開発・実用化されている中、聴覚系の神経解析は微細な構造と線維ネットワークが本質であるために画像診断手法が立ち後れている。聴覚中枢に関しては fMRI, resting-state fMRI を用いた MRI 画像解析が多く試みられており、また Ca イメージングも手がけられている。本研究では昨年度の 1.5T MRI を用いた健常人聴覚中枢の撮像の基礎データを元に、3T MRI での描出を検討した。

B. 研究方法

健常人男性の頭部を GE 社の 3T MRI を用いた。撮像は 3DTI 強調像、拡散テンソル MRI、fMRI (resting state のみ) の 3 条件を順次撮るシーケンスとした。複数の撮像パラメーターの調整においてそれぞれ計測を試み、20 分前後で、時空間解像度が実際の解析に耐える撮像条件を検討した。

(倫理面への配慮)

画像撮像とその解析に際しては予め被験者の同意のもとで行った。

C. 研究結果

全脳での神経走行ネットワークを十分な解像度で得ることができる撮像シーケンスを確立した。撮像時間は20分51秒であった。

D. 考察

臨床応用を念頭において画像撮像法を構築する際、たとえば補聴器を使うような高齢の方や認知症の方では体動の問題によるアーチファクトの問題もあり、限られた検査時間で撮像する必要がある。また、1次聴覚中枢よりさらに高位の中枢まで変化を追うことを将来的に考えると、撮像範囲は全脳をカバーすることが望ましい。さらに解剖学的な評価に加えて時空間的な脳機能を検討するためには、症例検討への発展性を考えてfMRI撮像も視野に入れたい。この状況から、今回は撮像法を①3DTI強調画像、②DTI法 (3T, 30軸) による拡散テンソル強調画像、③resting state fMRIを順次行った。

次ページに撮像結果の一部を示すが、極めて良好な解像度での撮像結果を得ている。この結果を基にすでに慶應義塾大学病院にて、臨床応用に向けた倫理申請を含めた撮像体制の確立を終えたため、次年度では疾患症例や治療介入前後での検討を進める予定である。

E. 結論

聴覚中枢の評価系としてのMRI撮像の可能性を検討すべく、今回、聴覚系を含めた高解像度画像撮像シーケンスを確立した。今後症例毎での介入による変化を検討する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Ex vivo MR histology of nerve fibers in a human temporal bone by high resolution diffusion tensor imaging using 9.4 T MRI

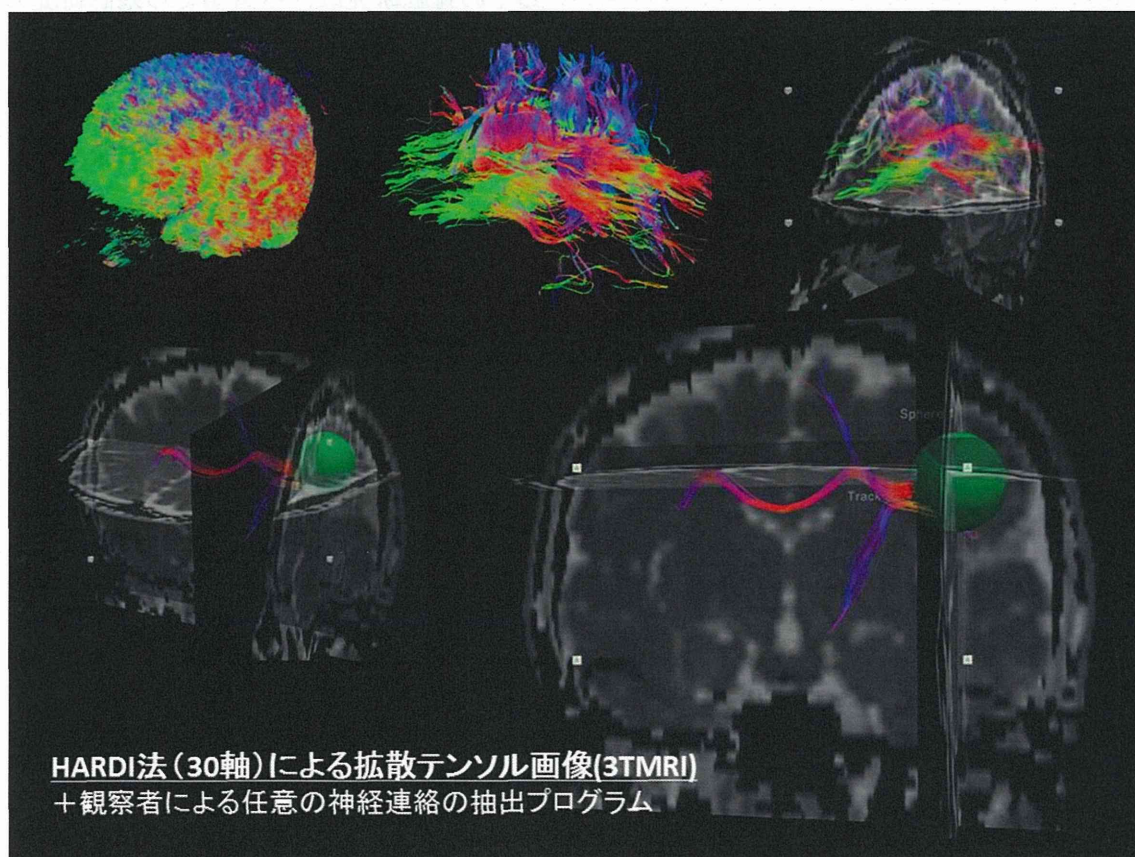
Fujioka M, Hikishima K, Oishi N, Ohta H, Kawai Y, Kawaura M, Ogawa K, Okano H J. Inner Ear Biology Workshop Kyoto 2014/11/3 京都国際会館

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

図1：30軸拡散テンソル画像(3TMRI)によるヒト生体の聴覚中枢描出



厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
（分担）研究報告書

小型霊長類コモンマーモセット難聴モデル

分担研究者 岡野 ジェイムス洋尚 東京慈恵会医科大学再生医学研究部 教授

研究代表者 藤岡 正人 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科 助教

研究協力者 栗原 渉 東京慈恵会医科大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科

研究協力者 原田 竜彦 国際医療福祉大学熱海病院 教授

研究要旨

コモンマーモセット(*Callithrix jacchus*) は小型で温和な扱いやすい霊長類であり、かつ遺伝子改変動物が作成可能な実験動物である。本研究では聴覚系の前臨床研究ツールとして、コモンマーモセットの疾患モデル樹立を目指している。

A. 研究目的

橋渡し研究が重視される今日において、聴覚系の臨床研究では前臨床段階の解析ツールが依然として不十分である。この現況において我々の研究グループでは数年来、小型霊長類であるコモンマーモセットを用いた耳科学・聴覚研究を推進している。本年度はマーモセットの聴覚測定機器の開発とともに、内耳疾患に対する新規治療法を検討するための非臨床 POC 取得に向けたマーモセット飼育施設を設立した。

B. 研究方法

昨年度の検討から、マーモセットの聴力測定には高音域も含めた幅広い周波数帯で安定して測定できるシステムが望ましいと考えられていた。そこで米国ハーバード大と同等の動物用OAE/ABRシステムを導入中であった。本年度はそのハード面の確立と、全自動キャリブレーションを備えたソフトウェアの新規開発を行った。また、慈恵医科大学動物施設内に、マーモセット飼育施設を敷設した。

C. 研究結果

次ページに写真で供覧する如く、東京慈恵会医科大学 大学一号館地下1階に、9.4T MRI、CT、デジタル・サブトラクション血管造影血管造影装置を備える施設を設立した。手術室と同施設・同フロアにこれらの機器は設置されている。獣医2名と実験動物2級技術者4名の飼育体制を敷いている。

D. 考察

多くの難聴研究はげっ歯類での基礎研究の結果をもとに橋渡し研究が展開されるが、残念ながら霊長類との間には大きな種差がある。とくに中枢神経系での差異は著しく、聴覚中枢に介入をもたらす新規治療法の開発での非臨床POC取得の際に大きな問題となる。今回我々は遺伝子改変も可能な霊長類のコモンマーモセットを用いた聴覚研究系を樹立し、遺伝学的アプローチも含めた霊長類での前臨床研究を展開する。すでに同種ではbrain project (コネクトーム解析) も進展しており、今後耳鳴や聴覚リハビリ等への同モデルを用いた前臨床研究の展開が期待できる。

E. 結論

マーモセット内耳障害モデル樹立に向けたハード面での準備が整った。9.4T MRI撮像も併せて、特に聴覚リハビリ時における聴覚中枢の再構築などを可視化することで、げっ歯類では評価困難な聴覚中枢に対する治療の効果を観られるという点でより意義があると思われる。次年度より疾患モデルを作製し検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

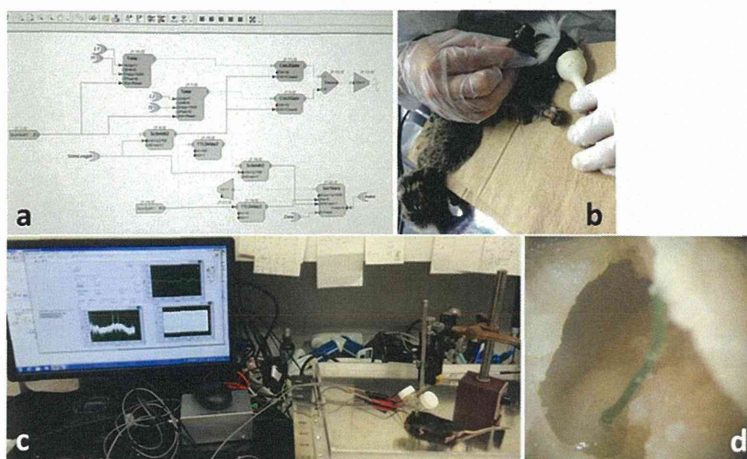
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

図 1 : 小動物用新規全自動 OAE 測定装置



マーモセットin vivo研究(準備中)

a) DPOAEプログラム:全自動でマーモセット可聴域を低周波～高周波までsweepし閾値同定が可能 b) 聴力測定は吸入麻酔下で行う c) 聴力測定装置の全貌(この写真はマウスを測定中) e) 乳突腔から後鼓室開放を行うと正円窓膜までが明視下に置ける

図 2 : マーモセット飼育室 概略図 (飼育ケージは今後適宜造設予定)

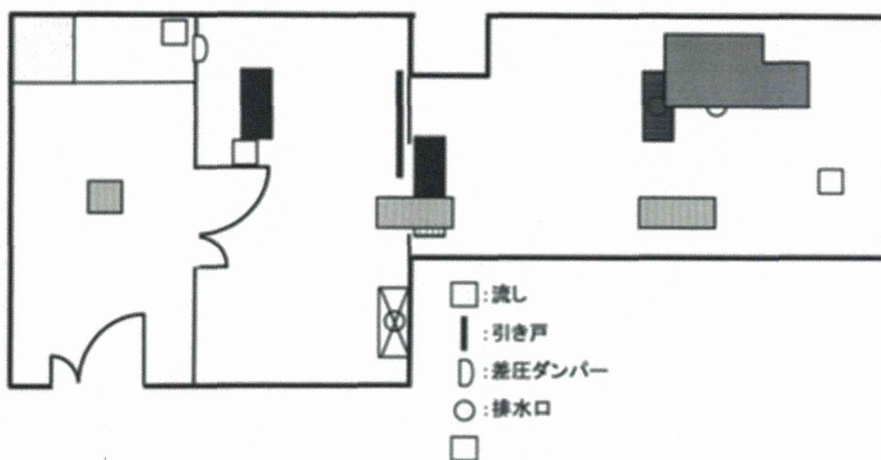


図 3 飼育室の実際 (左: 前室からの写真 右: 飼育ケージ)



研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版年	ページ
高橋良輔 編集 (岡野ジェイムス洋尚 分担)	遺伝子医学 MOOK 26号 「脳内環境-維持機構と破綻がもたらす疾患研究」	株式会社メディカルドゥ	2014	48-53

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hikishima K, Ando K, Yano R, Kawai K, Komaki Y, Inoue T, Itoh T, Yamada M, Momoshima S, Okano HJ, Okano H.	Parkinson Disease: Diffusion MR Imaging to Detect Nigrostriatal Pathway Loss in a Marmoset Model Treated with 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.	Radiology	275(2)	430-7	2015
Hikishima K, Ando K, Komaki Y, Kawai K, Yano R, Inoue T, Itoh T, Yamada M, Momoshima S, Okano HJ, Okano H	Voxel-based morphometry of the marmoset brain: in vivo detection of volume loss in the substantia nigra of the MPTP-treated Parkinson's disease model.	Neuroscience			In press
Zhou Z, Kohda K, Ibata K, Kohyama J, Akamatsu W, Yuzaki M, Okano HJ, Sasaki E, Okano H	Reprogramming non-human primate somatic cells into functional neuronal cells by defined factors	Mol. Brain	7	24	2014
Kuwako K, Nishimoto Y, Kawase S, Okano HJ, Okano H.	Cadherin-7 regulates the circuit connectivity of the cerebellar mossy fiber.	Cell Rep	9	311-323	2014
Takemi, M Kondo T, Yoshino-Saito K, Sekiguchi T, Kosugi A, Kasuga S, Okano HJ, Okano H, Ushiba J	Three-dimensional motion analysis of arm-reaching movements in healthy and hemispinalized common marmosets	Behav Brain Res	275	259-268	2014

Kondo T, Yoshihara Y, Yoshino-Saito K, Sekiguchi T, Kosugi A, Miyazaki Y, Nishimura Y, Okano HJ, Nakamura M, Okano H, Isa T, Ushiba T	Histological and electrophysiological analysis of corticospinal pathway to forelimb motoneurons in common marmosets.	Neurosci Res				In press
Fujioka M, Okano H, Edge ASB.	Manipulating cell-fate in the cochlea: a feasible therapy for hearing loss	Trends in Neurosci	38(3)	139-44		2015
稲垣洋三, 大石直樹, 神崎晶, 若林聡子, 藤岡正人, 渡部高久, 渡邊麗子, 和佐野浩一郎, 山田浩之, 小島敬史, 新田清一, 小川郁.	一側性音響刺激を用いたTRT単独療法の2年以上の長期効果	日本耳鼻咽喉科学会会報	117(2)	116-121		2014
神崎晶, 満倉靖恵, 高山慧, 大石直樹, 山田浩之, 稲垣洋三, 小島敬史, 若林聡子, 平賀良彦, 渡部高久, 細谷誠, 小川郁	耳鳴に対する客観的検査機器の開発	Audiology Japan	58(1)	69-74		2015
大石直樹, 井上泰宏, 鈴木隆史, 神崎晶, 渡部高久, 稲垣洋三, 若林聡子, 山田浩之, 小島敬史, 平賀良彦, 細谷誠, 神崎仁, 小川郁	神経線維腫症2型の自然聴力経過	Otology Japan	25(1)	58-64		2015
大石直樹, 小川郁	長期経過を経て中頭蓋底に進展した再発性真珠腫症例	JOHNS	30(12)	1801-04		2014
神崎晶	誌上ディベート・耳を鍛える? 鍛えない? 耳を鍛える	アンチエイジング医学	4月号			2015
岡本康秀, 神崎晶, 貫野彩子, 中市健志, 森本隆司, 原田耕太, 久保田江里, 小川郁	老人性難聴における時間分解能測定	Audiology Japan	57	694-702		2014