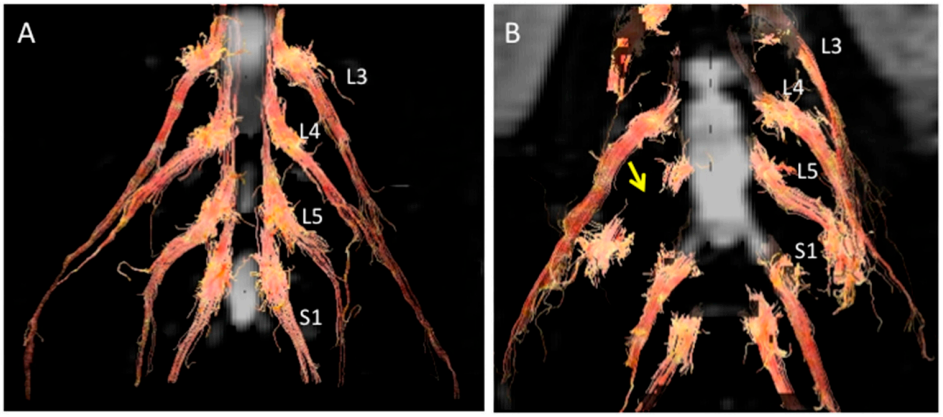
70　慢性運動器疼痛の非侵襲的イメージングに関する研究	大鳥　精司

【目的】本研究ではマンガン造影 MRI、拡散テンソル画像など最先端の MRI を駆使して、慢性痛の原因を可視化する手法を開発し、慢性痛機序解明に寄与することを目的とした。

【方法】①ラット膝関節内にマンガン造影剤を投与し膝関節由来の坐骨神経を可視化を試みた。新たな低毒性の MRI 用神経経路トレーサーとして、Mn 錯体にデキストラン分子を結合して高分子化し、ナノ粒子ゲルの網目構造内に高濃度で封入した Dex-Mn-Gel を開発した。ラット左膝関節内に造影剤を 50 μl 注入し、MnCl2（M 群，n = 5）、Dex-Mn-Gel（DMG 群，n＝5）、および Control（n＝3）で比較した。24 時間後、7T-MRI を用いて T1 強調画像を撮影した。②生体組織内の水分子の拡散の方向性を強調化したものが拡散テンソル画像であり、神経を可視化できる。Voxel size を小さくする手法 reduced field of view（rFOV）を用いた高分解法と従来法と比較した。

【結果】①膝関節所見は DMG 群の方が M 群より炎症所見が少なかった。両群とも造影側で Control より有意に造影効果を認めた。膝関節造影側で坐骨神経造影効果を認め神経トレーサーとして可視化できることが示された。本研究からマンガン造影 MRI は非侵襲的に疼痛メカニズムを可視化できる可能性があり今後、臨床応用が期待できる。②高分解テンソル画像は、は従来法に比べて、腰神経を鮮明に描出でき、検者間・検者内信頼性が高く、Signal-to-noise（SNR）が高かった。高分解テンソル画像により制度の高い神経病変の可視化・定量化が可能となり臨床応用が期待できる。

腰椎神経のテンソル画像　A）健常者，B）椎間孔狭窄患者
狭窄部を可視化できる（矢印）



70. 慢性運動器疼痛の非侵襲的イメージングに関する研究

大鳥　精司

千葉大学 大学院医学研究院 整形外科学

Key words：慢性疼痛，マンガン造影 MRI，拡散テンソル画像

緒　言

腰痛、関節痛の生涯罹患率は 85～90%とされ、共に男性、女性 1 位にランクされる国民愁訴である。日本の総人口のうち約 13%が何らかの慢性痛を持っているとの報告もされている。慢性痛は臨床の場において治療に難渋し、慢性痛の機序を解明することは急務である。

我々は慢性腰痛の発生機序として、腰椎椎体終板や椎間板線維輪周囲の疼痛伝達神経が椎体終板・椎間板内部に進入（Nerve ingrowth）することを世界で始めて報告し［1］Nerve ingrowth には神経栄養因子（NGF）や腫瘍壊死因子（TNF alpha）等のサイトカインが影響していることを報告した［2］。これまで疼痛メカニズムの解明は動物モデルを用いた免疫組織学的手法に基づくものであり、生きたまま非侵襲的に疼痛機序を解明する手法は皆無であった。痛みの原因をリアルタイムに可視化出来れば痛みの診断・治療においても有用な手段と成り得る。

近年 MRI 装置の高磁場化やパルスシーケンスの改良に伴い、高分解能のニューロイメージングが可能になった。MRI を用いて生体組織内の水分子の拡散の方向性を強調化した拡散テンソル画像（diffusion tensor imaging：DTI）が登場し、非侵襲的に神経線維を可視化できるようになった。我々は DTI により腰神経障害を可視化できることを報告した［3～5］。

本研究では当教室で蓄積された腰痛、関節痛の基礎研究および臨床研究をもとにマンガン造影 MRI［6］、拡散テンソル画像など最先端 MRI を駆使して、慢性疼痛の非侵襲的イメージング技術を開発し、疼痛患者における疼痛メカニズム解明を目的に以下の検討を行った。

方　法

1. マンガン造影 MRI によるラット坐骨神経の可視化

Sprague-Dawley（SD）ラット 6 週齢 13 匹♂（体重：250～300 g，Japan SLC，Inc.，Tokyo，Japan）を使用した。イソフルラン吸入麻酔下（2%）、左膝関節内に造影剤（$MnCl_2$，Dex-Mn-Gel）を注入した。$MnCl_2$（M 群，100 mM，50 µL，n＝5）、Dex-Mn-Gel（DMG 群，100mM，50 µL，n＝5）、および Control（n＝3）で比較した。The $MnCl_2$ was dissolved in saline and adjusted osmotic pressure.　造影剤投与 24 時間後、7T-MRI（Magnet：Kobelco，Japan；Console：Bruker Avance I，Germany）を用いて T1 強調画像を撮影した。イソフルラン吸入麻酔下（2%）、ラットを MRI ボア中心部に仰臥位で固定し体温を 36.5℃に保持した。Region of interest（ROI）を骨盤部の両側の坐骨神経（N）と近傍の筋肉（M）に置き、正規化信号強度（T1 値（N）/T1 値（M））を評価した（図 1）。Dex-Mn-Gel はわれわれの先行研究に沿って作製した［7～10］。400 mM（Mn^{2+}）Dex-Mn 50 µl，100 mg/mL PEG-Ac 200 µl，16 mg/mL DAB-Ac 50 µl，2 mg/mL rhodamine 50 µl，0.1 mM APS 25 µl，0.1 mM TEMED 25 µl を混合して作製した。MRI 撮像後、各群における膝関節を摘出し HE 染色標本を作製した。

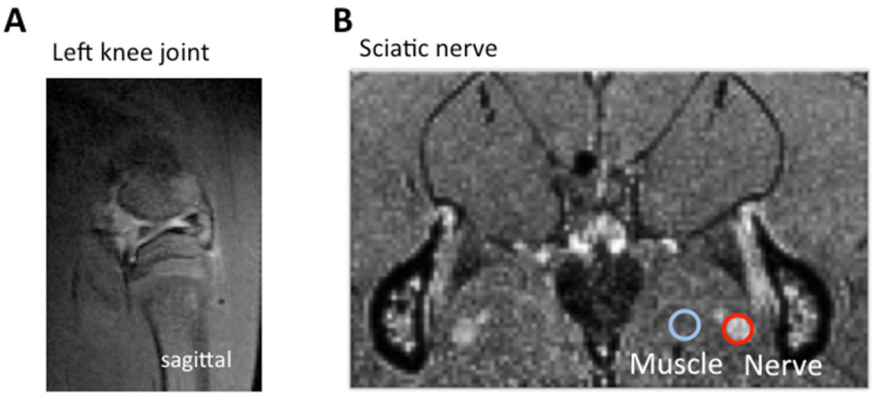


図 1. 膝関節（A）と正規化信号強度（Normalized Mn signal intensity）の計測（B）
Region of interest（ROI）を T1 強調画像上の坐骨神経（red circle）と近傍の筋肉（white circle）に置いた。神経の輝度を筋肉の輝度で除した値を計測した。

2. 高分解拡散テンソル画像による腰神経の可視化

3Tesla（T）MRI の登場により短時間に高解像度画像が得られるようになったが、磁化率効果、motion artifact 増大により信号のむら、歪みが生じ、神経追跡に限界があった。Voxel size を小さくする手法 reduced field of view（rFOV）を用いて高解像画像を得る事が可能である。3T MRI を用いて rFOV 法による高解像 DTI を開発し、脊髄神経疾患に応用することを目的とした。3.0T MRI（GE healthcare 社製）を用いて Focus（局所励起）を併用した FOV（Field of view）を絞った reduced-FOV（rFOV）と従来法の DTI を健常者 10 人で比較する。FOV の大きさは、従来法 32×25.6 cm（時間：4 m 54 s）、rFOV（mini）10×6 cm（時間：7 m 18 s）とした。また region of interest（ROI）を L5 神経内側、神経根、外側の 3 カ所に設定し fractional anisotrophy（FA）値、apparent diffusion coefficient（ADC）値を DTI に精通した 2 人で計測する。評価項目① FA map，Tractograpy の解像度を 5 段階（1：No root、2：poor、3：satisfactory、4：good、5：excellent）で Score 化し平均値を計測した。 ② FA 値、ADC 値の検者内・検者間信頼性について spearman 相関係数を用いて検討する。③ 信号雑音比 signal to noise ratio（SNR）の検討を行った。SNR の測定方法は多数報告されている［4〜6］。測定方法は single ROI 法、次式により測定した。SNR=SI（Signal indensity）/SD（Standard Deviation：標準偏差）L4/5 レベルで、ROI を脊柱管、左右腸腰筋へ設定し測定 rFOV と従来法で比較した。

結　果

1. マンガン造影 MRI によるラット坐骨神経の可視化

膝関節所見は M 群では造影側が腫脹したが、DMG 群では左右差を認めなかった（図 2）。

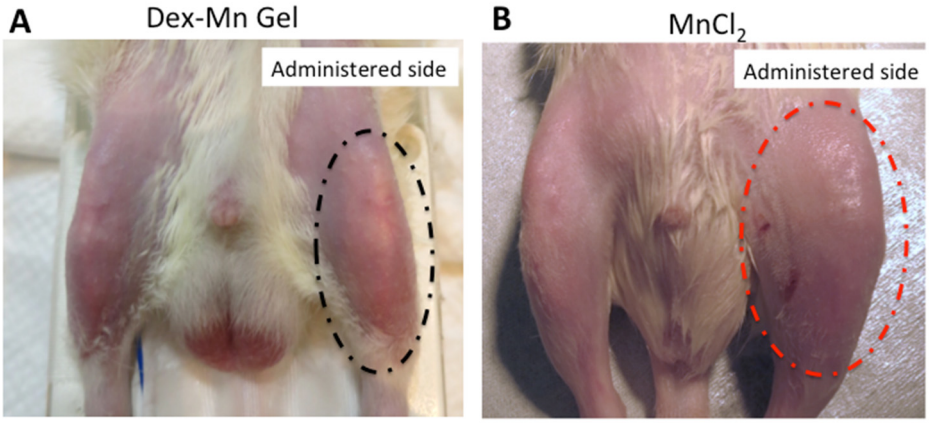


図 2. 膝関節の所見

$MnCl_2$（B）では左膝（造影側）が腫脹した（赤点線）が、Dex-Mn-Gel（A）では左膝関節（造影側）の腫脹を認めなかった（黒点線）。

膝関節 HE 染色を図 3 に示す。DMG 群、M 群では Control に比べ好中球浸潤を認め、M 群の方が DMG 群より好中球浸潤を強く認めた。炎症細胞数は Control に比べ、M 群、DMG 群で有意に高かく、DMG 群では M 群に比べ、炎症細胞数は有意に低かった（図 3）。

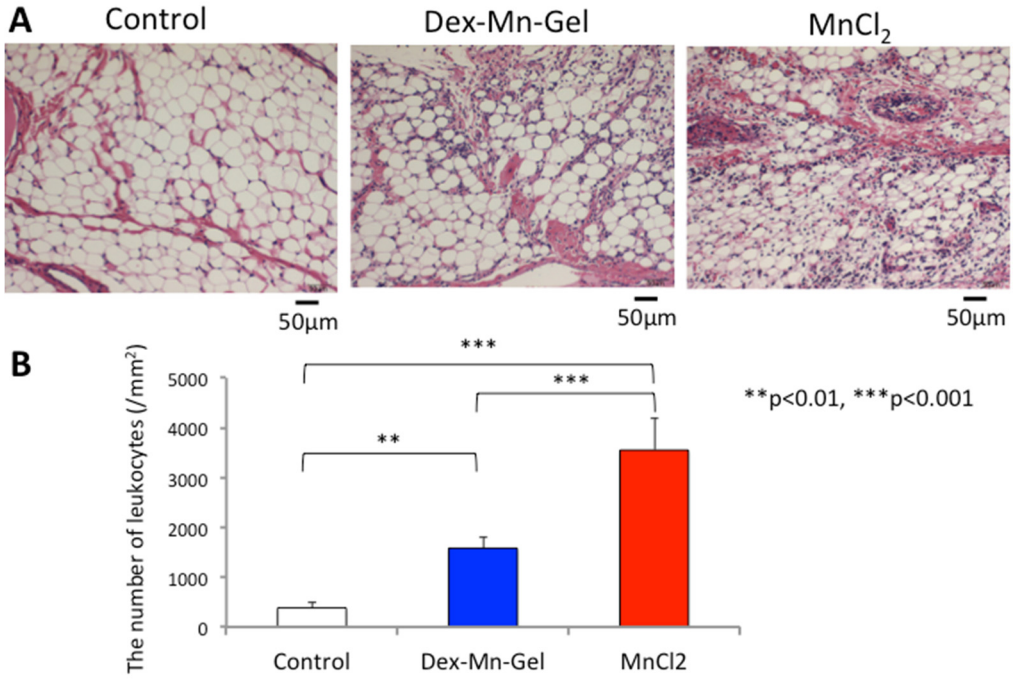


図 3. 膝関節の HE 染色（A）と好中球数（B）

Dex-Mn-Gel、$MnCl_2$ では Control に比べ好中球の浸潤を認めた（A）。好中球数（B）は Control に比べ、M 群、DMG 群では炎症細胞数は有意に高かく、DMG 群では M 群に比べ、炎症細胞数は有意に低かった。

正規化信号強度は M 群（造影側，反対側）：1.295±0.070，1.198±0.039、DMG 群（造影側，反対側）：1.272±0.090，1.260±0.083、Control：1.129±0.019 であり、M 群（$p < 0.01$）、DMG 群（$p < 0.05$）とも造影側で Control より有意に造影効果を認めた（図 4，5）。統計は Post-hoc test を用いた。

また Dex-Mn-Gel は Mn イオンが漏れること無く内包し、神経に取り込まれることが判明した。

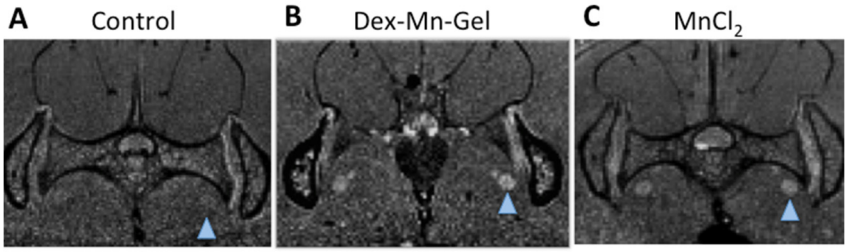


図4. 膝関節と骨盤近傍の坐骨神経のMR images

Control（A）に比べ、Dex-Mn-Gel（B）、$MnCl_2$（C）では左側坐骨神経（造影側）が造影されている（矢頭）

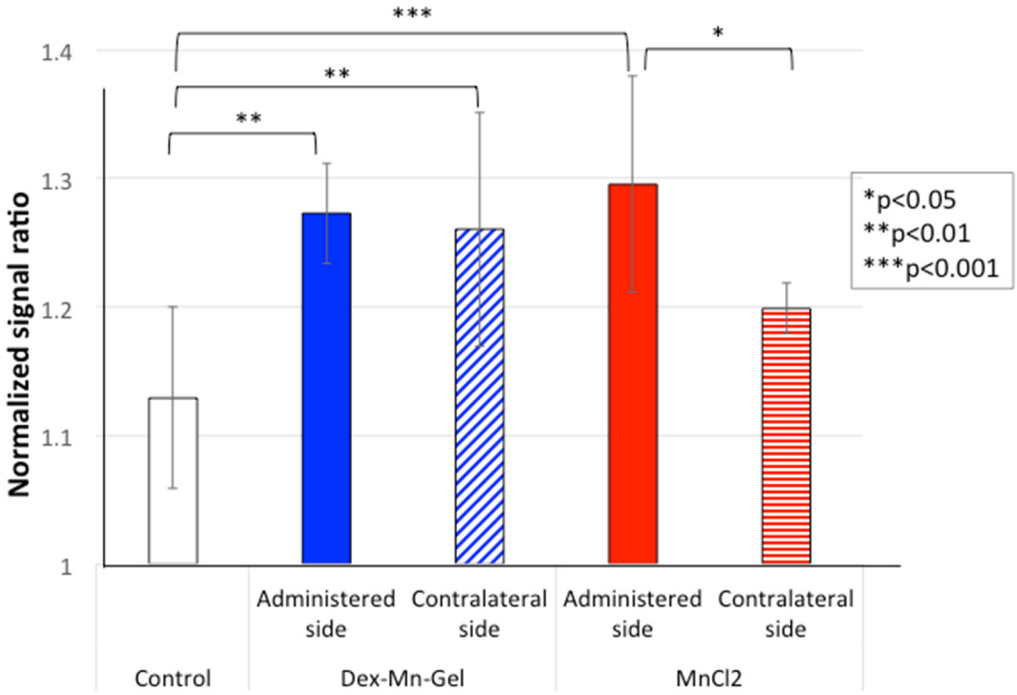


図5. 正規化信号強度（The normalized Mn signal intensity）

M群（造影側，反対側）：1.295±0.070，1.198±0.039、DMG群（造影側，反対側）：1.272±0.090，1.260±0.083、Control：1.129±0.019であり、M群（$p < 0.01$）、DMG群（$p < 0.05$）とも造影側でControlより有意に造影効果を認めた。統計はPost-hoc testを用いた。

2. 高分解拡散テンソル画像による腰神経の可視化

全ての症例で従来法に比べてrFOV法によるTractographyは鮮明にL5神経を描出できた（図6）。画像解像度は、Tractgraphyではr FOV法：4.80、従来法：2.00（$P < 0.05$）、FA mapではrFOV法：4.80、従来法：1.60（$P < 0.05$）とrFOV法の方が有意に高かった（図7）。

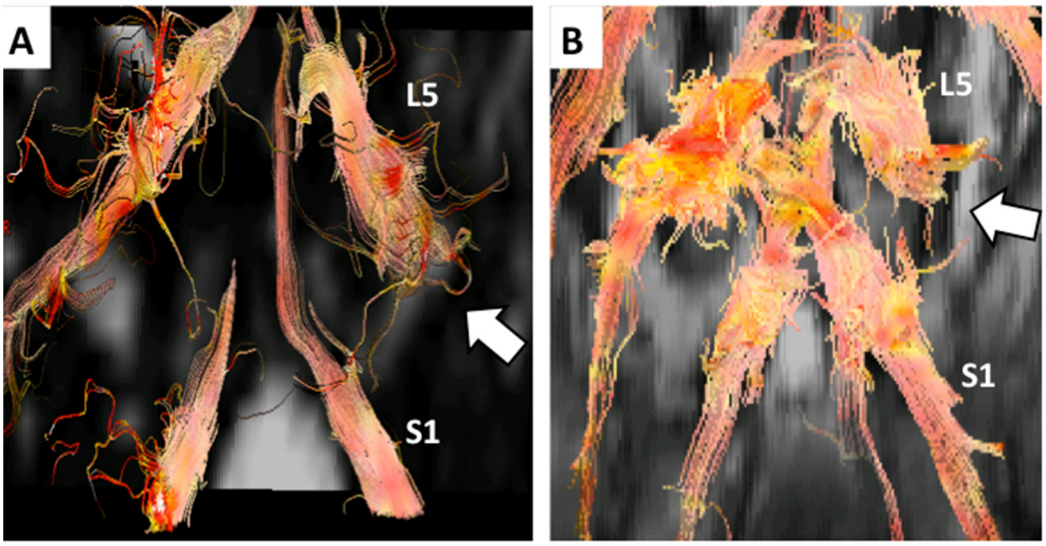


図 6. 腰神経の Tractography

従来法に比べて rFOV 法による Tractography は鮮明に L5 腰神経を描出できた（矢印）

従来法では fiber count が少なく、神経根を描出するのに不十分であった。検者内信頼性（rFOV vs 従来法）は FA 値（r = 0.983 vs 0.980 : p = 0.302）、ADC 値（0.960 vs 0.885 : p < 0.05）と FA 値は有意差を認めなかったが ADC 値は有意差を認めた。また検者間信頼性（rFOV vs 従来法）は FA 値（r = 0.948 vs 0.891 : p < 0.05）、ADC 値（0.974 vs 0.797 : p < 0.05）とともに従来法に比べ、rFOV 法の方が信頼性が高かった。脊柱管では fFOV : 1.840±0.777、rFOV : 4.866±3.703 と従来法と比較し高分解法では高い SNR が得られた（p < 0.05）。しかし従来法の方が収束していた。左右腸腰筋では左（高分解 vs 従来法）: 4.203±1.800 vs 4.584±1.537、右（高分解 vs 従来法）: 4.429±1.843 vs 5.166±0.913 と SNR に有意差は認められなかった（図 8）。

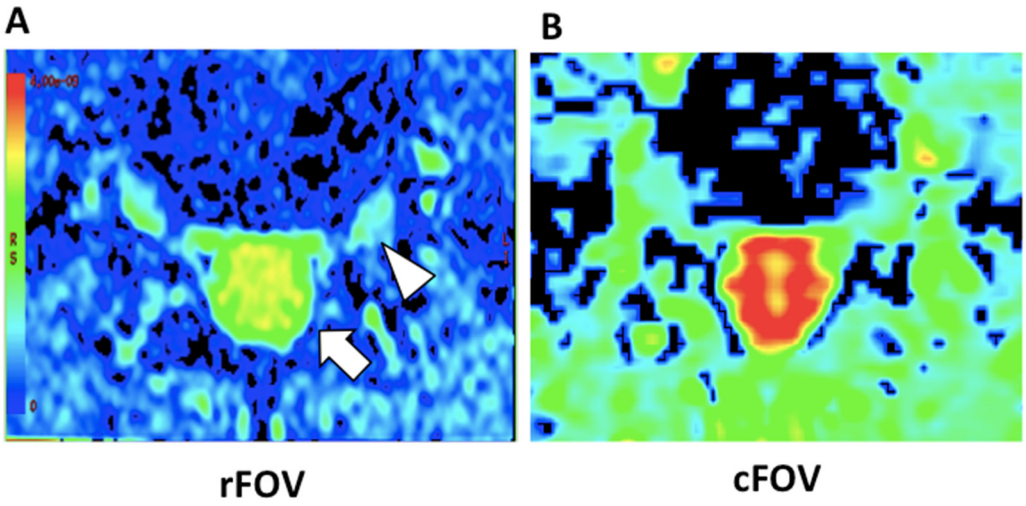


図 7. 高分解法 rFOV（A）および従来法 cFOV（B）による FA map（横断像）

cFOV 法（B）に比べ、rFOV 法（A）では神経根（矢頭）、脊柱管（矢印）が描出できた

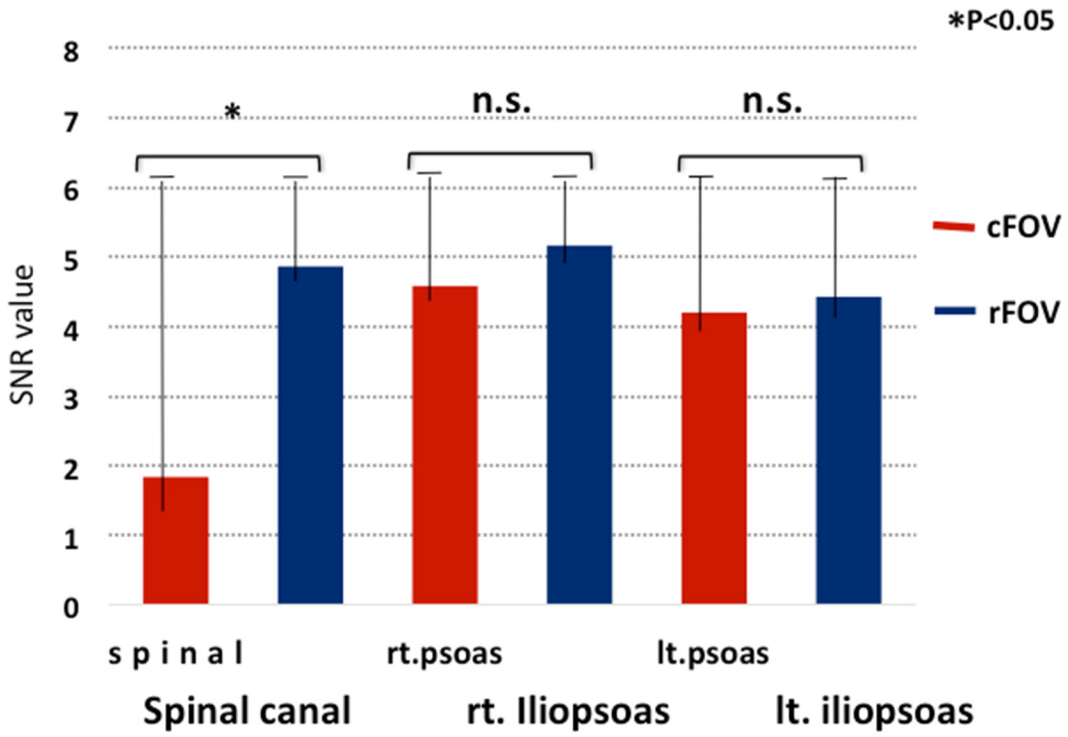


図 8. 信号雑音比 signal to noise ratio（SNR）

脊柱管では fFOV：1.840±0.777、rFOV：4.866±3.703 と従来法と比較し高分解法では高い SNR が得られた（$p < 0.05$）。 統計は student's-t test を用いた。

考　察

マンガン造影 MRI により膝関節由来の坐骨神経投射路の可視化を試みた。膝関関節造影側で坐骨神経の造影効果を認めた。Dex-Mn-Gel を構成するゲルの 3 次元網目構造によって高分子化 Mn 造影剤を内包し、組織毒性低減を達成した。マンガン造影 MRI は非侵襲的に疼痛メカニズムを可視化できる可能性があり、Dex-Mn-Gel は Mn 毒性低減により、今後、臨床応用が期待できる。一方、拡散テンソル画像 DTI により神経の可視化と痛みの定量化が可能となってきた。しかし脊髄神経 DTI は技術的側面により臨床上広く普及した検査とは言い難い。本研究から高分解拡散テンソル画像を開発することにより、今後、脊髄神経病変の可視化や疼痛の定量化をさらに精度高く診断出来る可能性があり、神経障害の機能診断など更なる飛躍が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究にあたり、終始ご指導いただきました放射線医学総合研究所分子イメージング青木伊知男先生に深謝いたします。

文 献

1) Shinohara H. Lumbar disc lesion, with special reference to the histological significance of nerve endings of the lumbar discs. Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi. 1970 Aug;44(8):553-70. PMID:5530069.

2) Inoue G, Ohtori S, Aoki Y, Ozawa T, Doya H, Saito T, Ito T, Akazawa T, Moriya H, Takahashi K. Exposure of the nucleus pulposus to the outside of the anulus fibrosus induces nerve injury and regeneration of the afferent fibers innervating the lumbar intervertebral discs in rats. Spine (Phila Pa 1976). 2006 Jun 1;31(13):1433-8. PMID:16741451 DOI:10.1097/01.brs.0000219946.25103.db

3) Eguchi Y, Ohtori S, Orita S, Kamoda H, Arai G, Ishikawa T, Miyagi M, Inoue G, Suzuki M, Masuda Y, Andou H, Takaso M, Aoki Y, Toyone T, Watanabe A, Takahashi K. Quantitative Evaluation and Visualization of Lumbar Foraminal Nerve Root Entrapment by Using Diffusion Tensor Imaging: Preliminary Results. American Journal of Neuroradiology. 2011 ; 32 (10) 1824-1829. DOI: https://doi.org/10.3174/ajnr.A2681.

4) Eguchi Y, Oikawa Y, Suzuki M, Orita S, Yamauchi K, Suzuki M, Aoki Y, Watanabe A, Takahashi K, Ohtori S. Diffusion tensor imaging of radiculopathy in patients with lumbar disc herniation: preliminary results. Bone Joint J. 2016 Mar;98-B(3):387-94. PMID:26920965. DOI: 10.1302/0301-620X.98B3.36036.

5) Kanamoto H, Eguchi Y, Suzuki M, Oikawa Y, Yamanaka H, Tamai H, Kobayashi T, Orita S, Yamauchi K, Suzuki M, Aoki Y, Watanabe A, Takahashi K, Ohtori S. The diagnosis of double-crush lesion in the L5 lumbar nerve using diffusion tensor imaging. Spine J. 2016 Mar;16(3):315-21. Epub 2015 Dec 1. PMID:26592484. DOI: 10.1016/j.spinee.2015.11.003.

6) Aoki I, Wu YJ, Silva AC, Lynch RM, Koretsky AP. In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. Neuroimage. 2004 Jul;22(3):1046-59.PMID:15219577. DOI:10.1016/j.neuroimage.2004.03.031.

7) Murayama S, Kato M. Photocontrol of biological activities of protein by means of a hydrogel. Anal Chem. 2010 Mar 15;82(6):2186-91. PMID:20155976. DOI:10.1021/ac1003757

8) Murayama S, Ishizuka F, Takagi K, Inoda H, Sano A, Santa T, Kato M. Small mesh size hydrogel for functional photocontrol of encapsulated enzymes and small probe molecules. Anal Chem. 2012 Feb 7;84(3):1374-9. Epub 2012 Jan 17. PMID:22243285. DOI: 10.1021/ac2023603.

9) Murayama S, Jo J, Shibata Y, Liang K, Santa T, Saga T, Aoki I, Kato M. The simple preparation of polyethylene glycol-based soft nanoparticles containing dual imaging probes. J. Mater. Chem. B, 2013; 1:4932-38. DOI:10.1039/C3TB20828A.

10) Murayama S, Nishiyama T, Takagi K, Ishizuka F, Santa T, Kato M. Delivery, stabilization, and spatiotemporal activation of cargo molecules in cells with positively charged nanoparticles. Chem Commun (Camb). 2012 Dec 4;48(93):11461-3.Epub 2012 Oct 23. PMID: 23091821 DOI: 10.1039/c2cc35567a