

<研究課題> 高磁場マンガン造影 MRI による運動機疼痛機序の解明に関する研究

代表研究者 国立病院機構下志津病院整形外科医師 江口 和

共同研究者 千葉大学整形外科准教授 大鳥 精司  
放射線医学総合研究所チームリーダー 青木 伊知男

【まとめ】

マンガン造影 MRI を用い慢性痛の原因を可視化する手法を開発することを目的とした。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。また、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 造影剤を徐放し、毒性低減を達成した。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、徐放化による Mn 毒性低減により、今後、臨床応用が期待できる。

1. 研究の目的

疼痛はこれまで動物モデルによる免疫組織学的手法による検討が主体であり、生きたまま非侵襲的に可視化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だけでなく治療アプローチ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。本研究ではマンガン造影 MRI を用い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。

2. 研究方法と経過

2-1 膝関節脊髄投射路の可視化

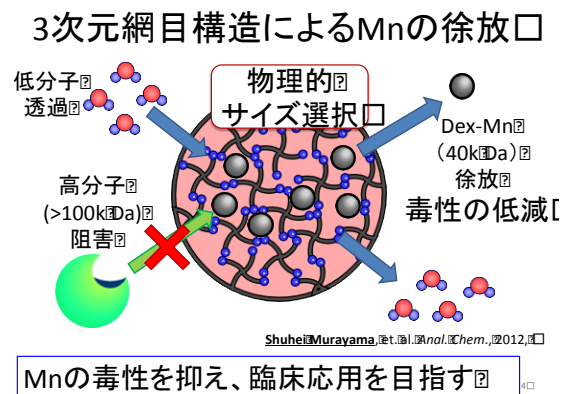
膝関節モデル: SD ラット 6 週齢雄を使用。イソフルラン吸入麻酔下、右膝関節内に生食 50 $\mu$ l 注入 (コントロール群)、MnCl<sub>2</sub> 造影剤 50 $\mu$ l (100 m mol) 注入 (MnCl<sub>2</sub> 群) の 2 群で比較する。24 時間後、イソフルラン吸入麻酔下、放射線医学総合研究所に設置された 7T-MRI (JASTEC/Bruker Biospin) を用いて T1 強調画像、T1 mapping を撮影する。検討項目として ①膝関節視診、②膝関節組織標本 (HE 染色)、③膝関節部 T1 強調像、④L1-L5 の神経根、脊髄、坐骨神経の T1 強調像を用いて T1 値を定量測定する。

2-2 Mn<sup>2+</sup> ナノ微粒子による drug delivery imaging

われわれは低毒性の 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 (Murayama, et al., Anal. Chem. 2012)。膝関節モデルに Dex-Mn-Gel 50 $\mu$ l (100 m mol) 注入し、神経 tracing の再現性、Mn<sup>2+</sup> ナノ微粒子の局所組織毒性の有無について HE 染色にて検討する。

図 1



2-3 椎間板脊髄投射路の可視化

椎間板モデル: SD ラット 6 週齢雄を使用。イソフルラン吸入麻酔下腹部正中切開し前方アプローチにて左側より L5/6 椎間板を展開し、生食 10 $\mu$ l 注入 (コントロール群)、MnCl<sub>2</sub> 造影剤を 10 $\mu$ l (100 m mol) 注入 (MnCl<sub>2</sub> 群) の 2 群で比較する。注入部を接着剤でシーリングする。24 時間後、イソフルラン吸入麻酔下 7T-MRI を用いて T1 強調画像を撮影する。検討項目として ①椎間板 T1 強調像、②L1-L5 の神経根、脊髄の T1 強調像を用いて T1 値を定量評価する。

3. 研究の成果

3-1 膝関節脊髄投射路の可視化

3-2 Mn<sup>2+</sup> ナノ微粒子による drug delivery imaging

ラット左膝関節内に造影剤を 50 $\mu$ l 注入し、MnCl<sub>2</sub> (M 群)、Dex-Mn-Gel (DMG 群)、および Control 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。ROI を骨盤部の両側坐骨神経 (N) と近傍の筋肉 (M) に置き、正規化信号強度 (T1 値 (N) / T1 値 (M)) を計算し評価した (図 2)。さらに膝関節の炎症所見を HE 染色にて評価した。

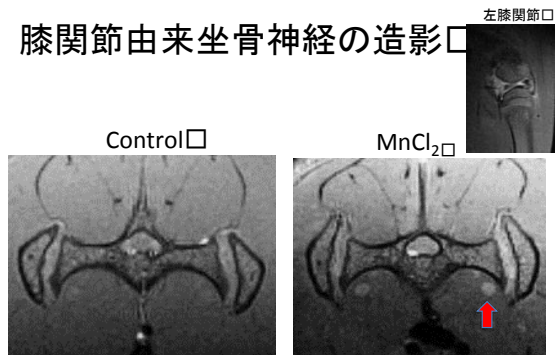
膝関節所見は M 群では造影側が腫脹したが、DMG 群では左右差を認めなかった(図 3)。膝関節 HE 染色では M 群の方が DMG 群より炎症細胞浸潤を強く認めた(図 4)。正規化信号強度は M 群(造影側, 反対側): 1.29, 1.19, DMG 群(造影側, 反対側): 1.25, 1.23, Control: 1.09 であり、両群とも造影側で Control より有意に造影効果をも認めた( $p < 0.01$ )(図 5)。膝関節造影側で坐骨神経造影効果をも認め神経トレーサーとして可視化できることが示された。また、Dex-Mn-Gel を構成するゲルの 3 次元網目構造によって高分子化 Mn 造影剤を徐放し、毒性低減を達成した。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、徐放化による Mn 毒性低減により、今後、臨床応用が期待できる。

### 3-3 椎間板脊髄投射路の可視化

椎間板モデルとして L4/5 椎間板へ Mn 造影剤  $10 \mu\text{l}$  を注入した。MnCl<sub>2</sub> (M 群)、Control 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。Control と比較し、M 群では矢頭が示すように L3/4 レベルにて椎間板由来脊髄後索が造影された(図 6)。

図 2

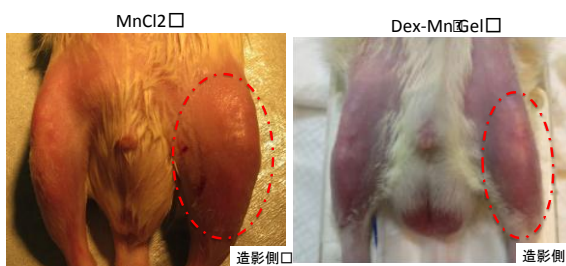
### 膝関節由来坐骨神経の造影



▶ 膝関節由来の坐骨神経が造影

図 3

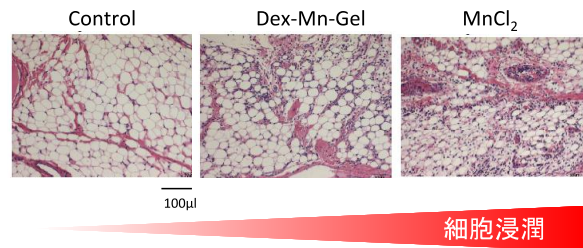
### 膝関節所見



▶ MnCl<sub>2</sub>: 膝関節腫脹 ▶ Dex-Mn-Gel: 膝関節差なし

図 4

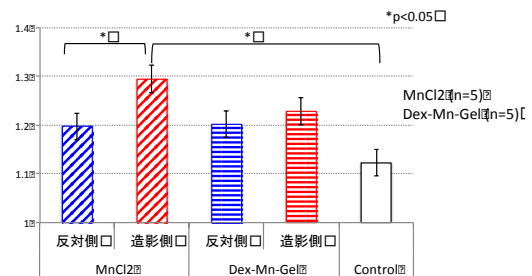
### 膝関節組織



▶ 組織破壊: MnCl<sub>2</sub> > Dex-Mn-gel

図 5

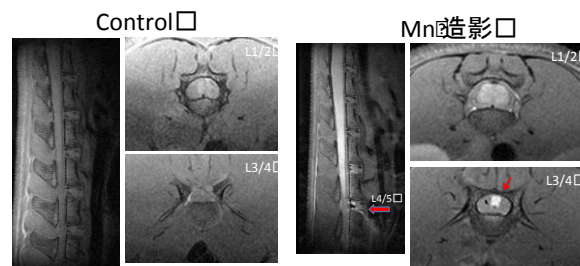
### 正規化信号強度(T1値(N)/T1値(M))



▶ MnCl<sub>2</sub>の造影側でControlより有意に造影効果  
反対側より有意に造影効果

図 6

### 椎間板(L4/5)造影



▶ 椎間板由来脊髄後索が造影

#### 4. 今後の課題

分子生物学的手法の発達により難知性疼痛の様々なメカニズムが報告されはじめているものの慢性腰痛、膝関節痛をはじめとする慢性運動器疼痛はいまだ疼痛機序が解明されておらず、治療方針も確立していないのが現状である。また欧米では慢性疼痛に対してオピオイド使用が加速度的に進行しており、慢性疼痛は患者のQOLを著しく低下させ、経済損失は著しく大きな社会問題となっている。さらに慢性運動器疼痛のイメージング研究は世界的にも例がない。本研究をさらに発展させヒト慢性疼痛の非侵襲的なイメージング技術の基礎的データを構築し、痛みの原因をリアルタイムに可視化出来れば、臨床において痛みの診断・治療に貢献が期待され、医療経済的意義は大きいと考える。

##### ①慢性運動器疼痛モデルを用いた疼痛の可視化

椎間板変性は腰椎椎間板穿刺モデル、尾椎椎間板穿刺、圧迫モデルを用いる (Orita et al., *Spine* 2009)。脊柱管狭窄症モデルは伊藤の方法に従い作成する (Ito et al., *Spine* 2007)。骨粗鬆症モデルは卵巣摘出後 27 週齢である (Orita et al., *Spine* 2010)。膝関節痛モデルは軟骨を選択的に破壊する Monoiodoacetate (MIA) 溶液を右膝関節内に注射する事により作成する (Orita et al., *BMC Musculoskelet. disord.* 2011)。変形性股関節は炎症物質を投与して作成する (Nakajima et al., *JBJS-Br* 2008)。様々なモデルに対し、疼痛行動を検討する。疼痛行動はキャットウォーク XT8.0(ノルダス社)システムを使用する。局所のサイトカイン量(IL1,6, TNF- $\alpha$ , NGF)は ELISA にて、また支配神経の高位、特性を免疫

組織学的、脊髄での *in vivo* パッチクランプの電気生理学的手法を用いて調べる。MnCl<sub>2</sub> 造影剤を局所または腹腔内投与し、賦活化した神経の可視化を試みる。

##### ②抗炎症薬投薬による除痛効果の可視化

膝関節モデルはMIA 1mgを左膝関節に注入後、3週間経過観察し、慢性疼痛モデルを作成する。アセトアミノフェン300mg/kgを24時間間隔でMIA処置日から3週間後MRI撮像日まで連日投与する。慢性疼痛モデルにアセトアミノフェンを投与し、除痛効果について、同様にMnCl<sub>2</sub>造影剤を局所または腹腔内投与し、賦活化した脊髄神経の造影効果を比較検討する。

#### 5. 研究成果の公表方法

①研究結果を英語論文にて投稿準備中である。

②第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2016/10 1/13-14、福岡国際会議場) にて報告予定

以上