

Title	核医学的手法を用いたラット脳梗塞に対する骨髄間質細胞移植の治療効果判定法の確立
Author(s)	齋藤, 久泰
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第11216号
Issue Date	2014-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k11216
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/56176
Туре	theses (doctoral)
Note	配架番号:2088
File Information	Hisayasu_Saito.pdf



学位論文

核医学的手法を用いたラット脳梗塞に対する 骨髄間質細胞移植の治療効果判定法の確立

(Application of nuclear imaging in assessing therapeutic effects of bone marrow stromal cell transplantation for ischemic stroke in rats)

> 2014年3月 北海道大学 齋藤久泰 Hisayasu Saito

学位論文

核医学的手法を用いたラット脳梗塞に対する 骨髄間質細胞移植の治療効果判定法の確立

(Application of nuclear imaging in assessing therapeutic effects of bone marrow stromal cell transplantation for ischemic stroke in rats)

> 2014年3月 北海道大学 齋藤久泰 Hisayasu Saito

日	次
H	シン

発表論	文	目	録	お	よ	び	学	슻	発	表	目	録	•	•	•	•	•	•	•	1頁
緒言·	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	3頁
略語表	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	4頁
第一章		緒	言	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	5頁
		実	験	方	法	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	5頁
		実	験	結	果	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	7頁
		考	察	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	9頁
第二章		緒	Ì	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	11頁
		実	験	方	法	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	11頁
		実	験	結	果	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	17頁
		考	察	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	22 頁
考察·	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	23頁
総括お	よ	び	結	論	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	26頁
謝辞•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	27 頁
引用文词	献	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	28 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

Hisayasu Saito, Keiichi Magota, Songji Zhao, Naoki Kubo, Yuji Kuge, Hideo Shichinohe, Kiyohiro Houkin, Nagara Tamaki, Satoshi Kuroda. ¹²³I-Iomazenil Single Photon Emission Computed Tomography Visualizes Recovery of Neuronal Integrity by Bone Marrow Stromal Cell Therapy in Rat Infarct Brain: Stroke. 44(10): 2869-74, 2013

本研究の一部は以下の学会にて発表した.

 齋藤 久泰,黒田 敏,宮本 倫行,山内 朋裕,七戸 秀夫,趙 松 吉,孫田 惠一,久保 直樹,久下 裕司,玉木 長良,寶金 清博 演題名;骨髄間質細胞移植は脳梗塞周囲の受容体機能を改善させる ¹²³I-iomazenil SPECT による検討

学会名; 第11回日本再生医療学会総会, 2012年6月12日, 横浜

 齋藤 久泰,黒田 敏,宮本 倫行,山内 朋裕,七戸 秀夫,趙 松 吉,孫田 惠一,久保 直樹,久下 裕司,玉木 長良,寶金 清博 演題名;骨髄間質細胞移植は脳梗塞周囲の受容体機能を改善させる ¹²³I-iomazenil SPECT による検討

第13回日本分子脳神経外科学会,2012年9月20日,熊本

3. 齋藤 久泰, 黒田 敏, 宮本 倫行, 山内 朋裕, 七戸 秀夫, 趙 松 吉, 孫田 惠一, 久保 直樹, 久下 裕司, 玉木 長良, 寶金 清博 演題名; 骨髄間質細胞移植は脳梗塞周囲の受容体機能を改善させる-¹²³I-iomazenil SPECT による検討

学会名; 第52回日本核医学会総会, 2012年10月12日, 札幌

4. 齋藤 久泰,黒田 敏,宮本 倫行,山内 朋裕,七戸 秀夫,趙 松 吉,孫田 惠一,久保 直樹,久下 裕司,玉木 長良,寶金 清博 演題名;骨髄間質細胞移植は脳梗塞周囲の受容体機能を改善させる-¹²³I-iomazenil SPECT による検討

学会名;第71回日本脳神経外科学会総会,2012年10月17日,大阪 5. 齋藤 久泰,黒田 敏,宮本 倫行,山内 朋裕,七戸 秀夫,趙 松 吉,孫田 惠一,久保 直樹,久下 裕司,玉木 長良,寶金 清博 演題名;骨髄間質細胞移植は脳梗塞周囲の受容体機能を改善させる-¹²³I-iomazenil SPECT による検討

1

学会名;第24回日本脳循環代謝学会総会,2012年11月9日,広島

6. Hisayasu Saito, Satoshi Kuroda, Michiyuki Miyamoto, Tomohiro Yamauchi, Hideo Shichinohe, Songji Zhao, Keiichi Magota, Naoki Kubo, Yuji Kuge, Nagara Tamaki, Kiyohiro Houkin

演題名; Bone marrow stromal cells enhance the recovery of peri-infarct neuronal integrity by replacing the damaged neurons - A serial ¹²³I-iomazenil SPECT study

学会名; Joint Neurosurgical Convention 2013, January 29, 2013, Waikoloa, Hawaii

7. Hisayasu Saito, Satoshi Kuroda, Michiyuki Miyamoto, Tomohiro Yamauchi, Hideo Shichinohe, Songji Zhao, Keiichi Magota, Naoki Kubo, Yuji Kuge, Nagara Tamaki, Kiyohiro Houkin

演題名; Bone marrow stromal cells enhance the recovery of peri-infarct neuronal integrity by replacing the damaged neurons - A serial ¹²³I-iomazenil SPECT study

学会名; International Stroke Conference 2013, February 7, 2013, Honolulu, Hawaii

8. 齋藤 久泰, 黒田 敏, 宮本 倫行, 山内 朋裕, 七戸 秀夫, 趙 松 吉, 孫田 惠一, 久保 直樹, 久下 裕司, 玉木 長良, 寶金 清博 演題名;骨髄間質細胞移植は脳梗塞周囲の受容体機能を改善させる-¹²³I-iomazenil SPECT による検討

学会名;第38回日本脳卒中学会総会,2013年3月21日,東京

9. Hisayasu Saito, Satoshi Kuroda, Michiyuki Miyamoto, Tomohiro Yamauchi, Hideo Shichinohe, Songji Zhao, Keiichi Magota, Naoki Kubo, Yuji Kuge, Nagara Tamaki, Kiyohiro Houkin

演題名; Bone marrow stromal cells enhance the recovery of peri-infarct neuronal integrity by replacing the damaged neurons - A serial ¹²³I-iomazenil SPECT study

学会名;15th WFNS world congress of neurosurgery, September 9, 2013, Seoul, Korea 近年、細胞移植を中心とした再生医療が、脳梗塞を含む様々な中枢神経 疾患において、神経の機能的回復を促進させることが期待されている。こ れまでに胎性幹細胞(embryonic stem cell; ES cell)、神経幹細胞(neural stem cell)、骨髄間質細胞(bone marrow stromal cell; BMSC)などがド ナー細胞として有用視されて、数多くの研究がなされてきた^{1,2}。さらに近 年、人口多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPS cell)が開発 されてからは、新たなドナー細胞の候補として期待されている。なかでも、 BMSC は患者自身から採取することができるために免疫的・倫理的障壁が 少ないことや、腫瘍原性が認められないことなどの点から、臨床応用に最 も適した移植ソースであると考えられている^{3·12}。BMSC は移植されると 脳内に生着し、神経細胞やグリア細胞に分化すること^{13,14}、あるいは,損 傷組織の保護や修復効果を持つ数多くの液性因子を分泌することなどが証 明されており^{15,16}、BMSC は様々なメカニズムを介して傷害された神経機 能の改善に寄与していることがわかってきた。これらの結果を受けて,国 内外で小規模な臨床試験も展開されてきている¹⁷⁻²²。

しかしながら、臨床応用に先立って様々な解決すべき問題が残ってい るのが現状である^{11,23}。細胞移植治療において、その治療効果を評価する 際に、機能予後評価のほかに、移植された細胞の脳内分布や、ホスト脳の 機能変化を画像化できれば、より客観的な評価が可能になると考えられる。 最近、MRI や光イメージングが脳内に移植された細胞を追跡する方法とし て有用であることが報告された²⁴⁻²⁶。しかしながら、移植されたホスト脳 の機能変化をモニタリングする方法はほとんど報告されていない。

核医学イメージングは非常に高い感度と定量性を有する点で magnetic resonance imaging (MRI) などの他のイメージングに比べ有利である。 ¹²³I-iomazenil (IMZ) は中枢性ベンゾジアゼピン受容体に選択的に結合す る核種である。中枢性ベンゾジアゼピン受容体は神経細胞に特異的に発現 しているため、¹²³I-IMZ は single photon emission computed tomography

(SPECT)を用いることで、神経細胞の viability を画像化することがで きると言われており²⁷、てんかん、アルツハイマー病、虚血性脳血管障害 など、様々な中枢神経疾患において臨床応用されている²⁸⁻³²。

そこで、本研究では、ラット脳梗塞モデルに対して¹²³I-IMZ SPECT に より経時的に神経細胞の viability をモニタリングできうるか、また、 BMSC 移植治療効果を評価できうるか検証することを目的とした。

略語表

BMSC: bone marrow stromal cell

 CCA : common carotid artery

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

ES cell: embryonic stem cell

FCS: fetal calf serum

FDG: fluorodeoxyglucose

GABA_A: γ-aminobutyric acid type-A

GFP: green fluorescence protein

IMZ: iomazenil

iPS cell: induced pluripotent stem cell

MCA: middle cerebral artery

MRI: magnetic resonance imaging

ROI: regions of the interests

SPECT: single photon emission computed tomography

TTC: 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride

NeuN: neuronal nuclear antigen

pMCAO: permanent middle cerebral artery occlusion

PET: positron emission tomography

SHR-SP: stroke-prone spontaneous hypertensive rats

第一章 適切な¹²³I-IMZ SPECT の撮像条件の検討

【緒言】

前述のとおり、¹²³I-IMZ SPECT は神経細胞の viability を反映すると考 えられており、様々な中枢神経疾患において臨床応用されている。しかし ながら、ラットのような小動物では撮像対象が非常に小さく、ヒトを対象 とした SPECT 装置では評価に値する十分な画像を得ることができない。 近年、SPECT 装置(ガンマ線検出素子、collimator など)および画像再 構成技術の発展により小動物を対象とした十分な性能を有する SPECT 装 置が開発され、幾つかの施設に導入され始めている。

SPECT 撮像は、collimator などの撮像条件により画質が大きく変化する。目的とする部位における描出能および用いる放射性薬剤の集積率などにより、空間分解能とガンマ線検出感度のバランスを考慮した撮像条件の設定が重要である。そこで、本章では小動物用 SPECT 装置を用いたラットにおける適切な ¹²³I-IMZ SPECT 撮像条件を検討することを目的とした。

【実験方法】

以下すべての動物実験は、北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。8 週齢の Sprague-Dawley (SD)ラットに¹²³I-IMZ を投与し、小動物用 SPECT/CT (*Siemens* 社製 *Inveon*) (Figure 1)を用いて SPECT 画像の撮像を行った。この装置は、SPECT と computed tomography (CT)が共通のガントリーに備わっており、被験体を移動することなく両者の撮像が可能である。また、非常に高い空間分解能を有することが報告されている³³。Collimator は single pinhole と multi pinhole に大きく分類されるが、それぞれに複数の pinhole 径(aperture size)が存在し、感度、空間分解能などがそれぞれで異なる (Table 1)。傾向としては、pinhole 径が小さくなると空間分解能は良くなるが感度は悪くなる。

Collimator のホール径、Injection dose、Uptake time の条件を autoradiography による過去の報告を参考に設定し、Table 2 のごとく 8 種の条件で SPECT 撮像を行い、得られた画像を比較検討した。なお、multi pinhole collimator は十分なキャリブレーションが行われておらず、画像 にアーチファクトが発生するなどの事象が見られたため今回の対象からは 削除した。

核種は、麻酔の影響をなるべく避けるため、覚醒下でラットの尾静脈より経静脈投与し、SPECT 撮像中は 2.0% isoflurane にてラットに吸入麻酔

を行った。



Figure 1 The SPECT component has dual head detector geometry that is mounted on a rotating gantry, Each detector head contains a 68x68 pixelated scintillator array of 2.0x2.0x10 mm NaI-(Tl) crystals with 0.2-mm gap, in combination with a position-sensitive photomultiplier readout

Туре	Aperture size (mm)	RoR (mm)	FOV (mm)	Spatial resolution (mm)	Sensitivity (cps/MBq/Detector)
Single	0.5	35	39	1.0	21
Single	1.0	35	39	1.4	55
Single	1.5	50	72	2.1	36
Single	2.0	35	39	2.4	176
Single	3.0	35	39	3.4	377
5hole-multi	0.5	35	25	1.1	77
5hole-multi	1.0	35	44	1.4	221
3hole-multi	1.2	50	65	1.9	42
3hole-multi	1.8	50	65	2.3	84

Table 1 各種 Collimator の特性

	Injection dose (MBq)	Collimator	Scan time (min)	Uptake time (min)		
1	80	0.5-mm single	32	96		
2	80	0.5-mm single	38	126		
3	80	0.5-mm single	64	180		
4	80	1.0-mm single	64	270		
5	80	3.0-mm single	64	356		
6	80	2.0-mm single	64	60		
7	110	2.0-mm single	64	60		
8	110	3.0-mm single	64	196		

Table 2 SEPCT 撮像条件の振り分け

【結果】

いずれの画像も脳皮質に一致した領域に ¹²³I-IMZ の集積がみられた。 pinhole 径ごとの比較では、2.0mm 径で撮像された画像が 0.5mm、1.0mm、 3.0mm 径で撮像された画像に比べ視覚的に良好であった (Figure 2)。 Injection dose は 80MBq よりも 110MBq の方がより明瞭な画像が得られ た。すなわち、投与放射能が高い方が良好な画像が得られた (Figure 3)。 Uptake time の違いによる画質差は、60 min が最も良好であった (Figure 4)。Table 2 に示した 10 例中で最も視覚的に明瞭な画像が得られた条件は、 Injection dose 110 MBq、2.0mm single pinhole collimator、Scan time 64 分、Uptake time 60 分(Table 2-7、Figure 3 右)であった。



80 MBq Uptake 180 min

2.0-mm single





80 MBq Uptake 270 min

3.0-mm single



80 MBq Uptake 60 min



80 MBq Uptake 356 min

Figure 2 Collimator による ¹²³I-IMZ SPECT 画像の違い







80 MBq 1.0-mm single

80 MBq 3.0-mm single

Figure 4 Uptake time による ¹²³I-IMZ SPECT 画像の違い

【考察】

本章では、適切な SPECT 撮像条件を決定することを目的に、正常ラッ トを用いて生体下で¹²³I-IMZ SPECT を撮像した。緒言で述べたとおり、 従来の機械では、十分な空間分解能が得られないため、小動物の SPECT 撮像は困難であった。そのため、渉猟しうる限り、ラットの¹²³I-IMZ SPECT に関する報告は1例もみられなかった。この研究は、高分解能を 有する小動物用 SPECT/CT³³を用いて生体下でラットの ¹²³I-IMZ SPECT を撮像した初めての報告である。123I-IMZ SPECT は臨床では神経細胞の viability を反映し大脳皮質領域に集積がみられるが、本実験でもラットの 大脳皮質領域に¹²³I-IMZの集積がみられたことから、ヒト同様に神経細胞 の viability を反映した画像が得られる可能性が高いと考えられた。また、 この実験では、Injection dose 110 MBg、2.0mm single pinhole collimator の条件において、空間分解能および感度のバランスのとれた画質となった。 理論的には小さいホール径で大量投与すれば空間分解能および感度の両者 が優れた画像を得ることができると考えられるが、ラットの場合は循環動 態への負担から投与容量の限界があり次章の実験では Injection dose 80 MBq に抑えた。Uptake time による違いは、投与から時間が経過する程バ ックグランドとのコントラストが明瞭になり画質が向上するものと考えて いたが実際は時間が経過したことによるカウントの減少による統計ノイズ の増加による影響の方が大きかった。そのため、Uptake time は最小の 60 min を選択した。また、Scan time は長いほどより多くのカウントが得ら れ SPECT 画像の質が向上すると考えられるため、90 分に延長するプロト コールとした。

第二章 ラット脳梗塞モデルに対する BMSC 移植の治

療効果の検証-123I-IMZ SPECT 画像による評価

【緒言】

冒頭でも述べたように、脳梗塞に対する細胞移植療法においては、移植 されたホスト脳の機能変化を非侵襲的かつ経時的に画像で評価することが できれば、より客観的な治療効果判定が可能になると考えられる。

前章では、小動物用 SPECT/CT を用いて、¹²³I-IMZ SPECT がラットの 脳機能(神経細胞の viability)を画像化できることを確認した。本章では、 実際にラット脳梗塞モデルに BMSC を移植し、前章から得られた適切な SEPCT 撮像条件を使用して、移植前後で経時的に¹²³I-IMZ SPECT を撮 像することで、¹²³I-IMZ SPECT がホスト脳の機能変化を捉えることが出 来るか、すなわち¹²³I-IMZ SPECT が BMSC 移植治療効果の評価に有用で あるかを検証した。

【実験方法】

1) ラット BMSC の分離・培養

8 週齢の green fluorescence protein (GFP) 遺伝子組み換えラットより 以下の手順で BMSC を分離培養した。ラットを深麻酔下(4.0% isoflurane、 N₂O/O₂;70:30)に sacrifice した後、クリーンベンチ内で大腿骨を摘出し、 21 G 注射針・2.5 mL シリンジを用いて 10% fetal calf serum (FCS)、100 U / mL ペニシリン G (SIGMA)、10% ヘパリン溶液 (Mochida Pharmaceutical Co., Japan)を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Nissui, Japan)5 mL を注入し、骨髄液を回収した。 これを 2×10^3 rpm, 15°C, 5 分間遠心して上清を破棄し、上述の培養液を加 えよく攪拌し、 2×10^3 rpm, 15°C, 5 分間遠心した。上清を破棄し、上述の 培養液を加え 75 cm² collagen I coated flask に撒き 37°C, 5% CO₂ 下で 24 時間培養した.24 時間後、非接着細胞を除去するために培養液を交換した。 その後は 3 日毎に培養液を交換し、培養細胞が confluent になった時点で、 0.05% trypsin-EDTA (Gibco)で細胞を浮遊させ継代培養した。以下の実験 では 3 回継代培養させた細胞を使用した ³⁴。

2) ラット中大脳動脈永久閉塞モデルの作成

ラット中大脳動脈永久閉塞モデル^{35,36}を改良し、皮膚や頭蓋骨欠損を軽 減することで¹²³I-IMZ SPECT 画像での artifact を低減し、かつ脳の皮質 に限局した脳梗塞病変を作成した²⁵。8 週齢の SD ラットを 23 匹 CLEA Japan, Inc から購入した。全身麻酔は 4.0% isoflurane、N₂O/O₂ (70:30)で 導入し、2.0% isoflurane、N₂O/O₂ (70:30)で維持した。体温は 36.5-37.0°C で維持した。頚部腹側に正中切開を行い、両側の総頚動脈 (common carotid artery; CCA)を露出した (Figure 5A)。続いて、右眼および右耳の間に垂 直に 1.5cm の皮膚切開を行い (Figure 5B)、手術用顕微鏡下に側頭筋を側 頭骨より剥離翻転し、5 x 5 mm の側頭開頭を実施した (Figure 5C)。硬 膜を損傷しないように骨弁を外し、右中大脳動脈(middle cerebral artery; MCA)を硬膜上から、10-0 nylon 糸で結紮し切断し MCA 血流が途絶する のを視認した (Figure 5D, E)。続いて、両側の CCA を surgical microclip を用いて 1 時間遮断した。最後に骨弁を戻して骨窓を閉じ、頭部と頚部の 皮膚を 6-0 nylon 糸で縫合閉鎖した。この方法により、比較的安定した大 脳皮質の部分梗塞を作成することができる (Figure 6)。



Figure 5 Surgical procedure of permanent MCA occlusion model of rats



Figure 6 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) stain 24hr after permanent middle cerebral artery occlusion. A focal infarct in the cerebral neocortex was demonstrated.

3) BMSC の線条体への定位的移植

MCA 閉塞モデル作成後 7 日目に BMSC (n=10)、もしくは vehicle (n=8) を同側(右)の線条体に定位的に移植した(Figure 7)。前述と同様の方法 で全身麻酔を行い、頭頂部正中に皮膚切開をおき、bregma より 3 mm 右 側に dental drill を用いて burr hole を作成した。Hamilton シリンジを硬 膜から 6 mm 挿入し, 10 µl の細胞懸濁液 (1 x 10⁶ cells)、もしくは vehicle (phosphate-buffered saline)を、automatic microinjection pump を用 いて 5 分かけて注入した。髄液漏や移植細胞の漏出を防止するために, burr hole は骨膜で覆い、皮膚は 6-0 nylon 糸で縫合した。



Figure 7 The surgical procedure of stereotactic BMSC transplantation.

4) 運動機能評価

ロータロッド試験で、ラットの運動機能を継時的に評価した。Single Lane Rotarod (Muromachi Kikai Co., Ltd., Japan)を使用した (Figure 8)。 MCA 閉塞作成前、作成後1日、7日、14日、21日、28日、35日、42日 目に施行した。この運動試験は BMSC 移植群 (n=10) および vehicle 移植 群 (n=8) の全ラットに対し施行した。ローターロッドは3分間で4回転/ 分から40回転/分まで加速する設定とし、ローラーが回転し始めてからラ ットが床に落ちるまでの時間を測定した。それぞれ6回ずつ測定し、最大 値と最小値を除いた中間4回の平均値を記録した。



Figure 8 Motor function of the animals was serially assessed before and at 1, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days after the onset of ischemia, using a Rotarod treadmill.

5) ¹²³I-IMZ SPECT

前章で示した高い空間分解能を有する小動物用 SPECT/CT (*Siemens* 社製 *Inveon*)を用いて、¹²³I-IMZ の集積を半定量的に測定した。SPECT 撮像は、全ラットにおいて、脳梗塞作成後 6 日目、35 日目(すなわち BMSC 移植前日、移植後 28 日目)に施行した。麻酔の影響を排除するために、覚 醒下で 80MBq の ¹²³I-IMZ を尾静脈から経静脈的に投与した。投与後、ケ ージに戻し、60 分放置した後、2.0% isoflurane にて吸入麻酔を行い、90 分間 SPECT の撮像を行った。実験中は、市販の懐炉を用いて、ラットの 体温を 36.5 度から 37.5 度の間に維持した。SPECT の条件は、2.0 mm single pinhole collimator を用い、回転半径を 35 mm、360 度収集、60 投 影方向、1 投影当たりの撮像時間を 180 秒とした。画像再構成は、三次元 の逐次近似再構成法 (Iteration, 2; Subset, 6) であり、ボクセルサイズを 0.5×0.5×0.5 mm³に設定した。また、散乱線補正および減弱補正は行わ なかった。

画像解析には、IDL (Research Systems, Colorado, USA) と ASIPro VM (Concorde Microsystems, Knoxville, TN)を使用し、直径 1.5mm の円形 regions of the intersts (ROI)を脳梗塞周囲皮質、脳梗塞中心部、線条体の 3 か所に、左右対称になるように設定した (Figure 9)。各領域の画像カウ ントを測定し、患側/健側比を算出した。



Figure 9 Round-shaped region of the interests (ROIs; diameter, 1.5 mm) were symmetrically placed in the dorsal neocortex adjacent to infarct area, infarct core, and striatum.

6) 組織学的検討

移植した BMSC、および移植されたホスト脳を組織学的に検証し、先に 得られた¹²³I-IMZ SPECT 画像と照合するために、移植後 5 週間後に全ラ ットを安楽死させて大脳を摘出した。

大脳の摘出にあたっては、深麻酔下に左心室から 50ml の生理食塩水を 潅流し右心房から脱血した。続いて 50 ml の 4% paraformaldehyde を左 心室から潅流してから大脳を摘出し、さらに 4% paraformaldehyde に 2 日間浸漬して固定を完成させた。固定した大脳を 2 mm 厚の coronal slice としてパラフィン包埋を行い、細胞を移植した線条体のレベルで 4 μm 厚 の薄切切片を作成した。

ホスト脳の神経細胞の評価と移植した BMSC の分布を確認するために、 以下の 2 重蛍光免疫染色を実施した。各切片をキシレンに 30 分浸し,パ ラフィンの除去を行った. PH6.0 クエン酸緩衝液を蒸留水で 20 倍希釈し, 圧力鍋で加熱沸騰させ,切片を投じて 2 分間の加熱処理による抗原賦活を 行った. 10%正常ヤギ血清にて Blocking 後,一次抗体として,α1-6 subunit of γ-aminobutyric acid type-A (GABA_A) receptor (rabbit polyclonal, 1:50 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) および neuronal nuclear antigen (NeuN) (mouse monoclonal, 1:100 dilution; Millipore)を室温で1時間反応させ、 二次抗体として Alexa Fluor 594 (Molecular Probes Inc, Eugene, OR) を室温 で1時間反応させた。さらに、Zenon Alexa Fluor 488 (Mouse IgG Labeling Kit; Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA)で標識された GFP (mouse monoclonal, dilution 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)抗 体を室温で1時間反応させた。蛍光顕微鏡下に観察し、付属のデジタルカ メラで記録した。脳梗塞周囲皮質に 450×550 µm の ROI を、病側と健側 の2か所に対称的に設定した。それぞれ NeuN および GABA_A受容体陽性 細胞をカウントし、病側/健側比を算出した。BMSC 移植群では GFP と NeuN もしくは GABA_A受容体の2 重陽性細胞についてもカウントした。

さらに、治療前の¹²³I-IMZ SPECT 撮像と同時期の脳組織像を確認し、 SPECT 画像と照合するために、脳梗塞作成後6日目のラット (control 群、 n=5) に対して上記の組織学的検討を行った。

7) 統計学的解析

全データは、平均値±標準偏差で示した。2 群間の比較には, unpaired t test を用いた。P<0.05を統計学的に有意とした。





Figure 10 The experimental protocol in this study.

【結果】

1) 運動機能評価

Figure 8 に示す通り、すべてのラットは脳梗塞作成後から、重度の運動 機能低下を呈した。その時点では、BMSC 移植群と vehicle 移植群との間 に有意な差は認めなかった。その後、vehicle 移植群においては運動機能改 善が見られず、むしろ徐々に悪化する傾向が見られた。しかしながら、 BMSC 移植群においては治療後 4 週目と 5 週目に、vehicle 移植群と比べ て有意な運動機能の改善が得られた(P<0.05、Figure 11)。



Figure 11 Rota-rod treadmill performance. Line graph shows the temporal profile of functional recovery in vehicle- (blue) and bone marrow stromal cell (BMSC)-treated (red) rats subjected to permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO). * P < 0.05. sec, seconds.

2) ¹²³I-IMZ SPECT

脳梗塞作成後6日目と35日目に、SPECTを用いて¹²³I-IMZの集積を 判定量的に測定した。Figure 12に示すように、脳梗塞作成後6日目に病 側の大脳皮質における¹²³I-IMZの分布が著明に低下した。脳梗塞作成後 35日目、すなわち治療後28日目にも、vehicle移植群では、脳梗塞周囲皮 質における¹²³I-IMZ分布は変化が見られなかった。しかしながら、BMSC 移植群においては、同時期の脳梗塞周囲皮質における¹²³I-IMZ分布は改善 された。vehicle 群では、脳梗塞周囲皮質における¹²³I-IMZ 集積値の患側/ 健側比は、脳梗塞後6日目、35日目でそれぞれ、58.6±24.8%、および59.5 ±20.1% であった。両者間に有意な差は認められなかった(P=0.2665、Figure 13)。しかしながら、同値は、BMSC 治療群において、53.4±17.3%、およ び77.3±16.2%と、移植前に比べ移植後に有意な増加が認められた(P<0.01)。 また、脳梗塞後35日目に2群間で脳梗塞周囲皮質における¹²³I-IMZ 集積 値の患側/健側比を比較した場合も、両者に有意な差が認められた(P<0.05)。 脳梗塞中心部、線条体では同様の変化は見られなかった。



Figure 12 Representative findings of ¹²³I-iomazenil (IMZ) single photon emission computed tomography. White-and-black images of the vehicle- (A) and bone marrow stromal cell (BMSC)-transplanted rats (B). In both vehicleand BMSC-treated rats, a marked decrease in the uptake of ¹²³I-IMZ is observed in the ipsilateral neocortex at 6 days post-ischemia. The uptake of ¹²³I-IMZ significantly improves in the peri-infarct neocortex of the BMSC-transplanted rats at 35 days post-ischemia (arrow). The finding cannot be observed in the vehicle-transplanted rats.



Figure 13 Bar graphs show the ipsilateral-to-contralateral ratio of 123 I-iomazenil uptake in the dorsal neocortex adjacent to infarct area (A), infarct core (B), and striatum (C). ** P< 0.01 (Day 6 vs. Day 35), ¶ P<0.05 (vehicle vs. BMSC).

3) 組織学的評価

Figure 14 に病側および健側の脳梗塞周囲皮質の組織所見を示す。ヘマトキシリンエオジン染色では、control 群で、脳梗塞周囲皮質における神経細胞が数多く障害されていることが示されている。脳梗塞作成後6日目における NeuN 陽性細胞数の患側/健側比は 79.9 ± 7.3%だった。この結果は ¹²³I-IMZ SPECT の結果とよく相関していた。

脳梗塞作成後 42 日目の vehicle 移植群における同値は、78.2±16.9%で あり、control 群の値と近似していた。この結果から、脳梗塞周囲皮質にお ける神経細胞障害のプロセスが、6 日目までに完成していたことが示唆さ れた。一方、脳梗塞作成後 42 日目(治療後 35 日目)の BMSC 移植群にお ける同値は、89.9±10.8%であった。この値は、脳梗塞作成後 6 日目の control 群、および脳梗塞作成後 42 日目の vehicle 移植群と比較して、有意に高か った(P<0.05)。

同様に、脳梗塞作成後6日目の control 群における GABA_A 受容体陽性細胞の患側/健側比は75.4±3.6%だった。脳梗塞作成後42日目の vehicle移植群、および BMSC 移植群の同値は、それぞれ74.2±15.3%、および90.1±9.5%であった(Figure 15)。BMSC 治療群の値は、vehicle 移植群、および control 群の値と比較して、有意に高かった。

2 重蛍光免疫染色では、GFP 陽性細胞(26.4 ± 14.8/ROI)が脳梗塞周囲 に広く分布していることが確認された(Figure 16)。それらの中には NeuN や GABAA 受容体と共陽性を示す細胞も認められた(それぞれ 15.7 ± 7.5%、 7.6 ± 4.7%、Figure 17)。



Figure 14 (A) On HE staining, a significant number of neurons are damaged in the ipsilateral neocortex adjacent to cerebral infarct at 6 days post-ischemia. (B) Fluorescence immunohistochemistry against neuronal nuclear antigen (NeuN) demonstrates similar results at 6 days post-ischemia. The ipsi- to contralateral ratio of NeuN-positive cells is significantly lower in the vehicle-transplanted rats (C) than in the bone marrow stromal cell (BMSC)-transplanted rats (D) at 42 days post-ischemia. Scale bar = 125 μ m.



Figure 15 (A) Fluorescence immunohistochemistry against γ -aminobutyric acid type-A (GABA_A) receptor shows that the number of GABA_A receptor significantly decreases in the ipsilateral neocortex adjacent to cerebral infarct at 6 days post-ischemia. (B) The number does not recover in the vehicle-transplanted rats. (C) However, bone marrow stromal cell (BMSC) transplantation significantly increase the number of GABA_A receptor –positive cells at 42 days post-ischemia. Scale bar = 125 µm.



Figure 16 Double fluorescence immunohistochemistry revealed that the GFP-positive cells were widely distributed in the peri-infarct neocortex.



Figure 17 Photomicrographs of double fluorescence immunohistochemistry against neuronal nuclear antigen (NeuN) (A, red) or γ -aminobutyric acid type-A (GABA_A) receptor (B, red) and green fluorescence protein (GFP) (green) in the peri-infarct neocortex of bone marrow stromal cell (BMSC)-transplanted rats. The merged images show that some of GFP positive cells also express NeuN or GABA_A receptor. Scale bar = 30 µm.

【考察】

本章の実験結果に関する考察は、全体の考察と大部分が重複するため、 次項にて論じる。

考察

本研究では、まず予備実験(第1章)として、小動物用 SPECT/CT を 用いて、正常ラットの¹²³I-IMZ SPECT 撮像を行い、¹²³I-IMZ の集積、お よび画像の再構成が可能であるか確認し、より適切な撮像条件を検証した。 そして、その結果をもとに、¹²³I-IMZ SPECT 撮像条件の設定とプロトコ ールの作成を行い、本実験(第2章)を実施した。

この研究により、小動物用 SPECT/CT を用いて、ラット脳梗塞に対する BMSC 移植治療の効果を、継時的に ¹²³I-IMZ 集積で画像化できること が明らかになった。以下の各項目について考察する。

1) ¹²³I-IMZ SPECT について

前述した通り、123I-IMZ は中枢性ベンゾジアゼピン受容体と高親和性を 持つリガンドである。中枢性ベンゾジアゼピン受容体は後シナプスで GABA 受容体と複合体を形成しており、脳皮質の神経細胞に高濃度で存在 する²⁷。過去の研究では、¹²³I-IMZ はアルツハイマー病、てんかん、虚血 性脳血管障害など、様々な中枢神経疾患において、神経細胞の viability を 評価するために有用なトレーサーであることが報告されている ^{31,32,37-40}。 動物実験においても、123I-IMZ が神経細胞の viability のマーカーとして有 用であることが、autoradiography の手法で示されてきた。Kuge らは、 MCA 閉塞 4 時間後、24 時間後に、脳梗塞領域において ¹²³I-IMZ 集積が著 明に低下することを示した ³⁸。Kaji らは、¹²³I-IMZ 集積がまだ保たれてい る虚血領域では、神経細胞の DNA も保たれているを証明した 37。過去に 我々の研究グループでは、autoradiography の手法を用いて、脳梗塞マウ スに対し移植した BMSC が GABAA受容体に特異的なマーカーを発現し、 脳梗塞周囲の ¹²⁵I-IMZ 集積を有意に改善させたことを報告した ⁴¹。また、 同様の結果が脊髄損傷モデルラットにおいても得られた 42。しかしながら、 autoradiography は死後研究であり、1 個体につき、ある 1 時点でしか観 察できない。つまり、生体での継時的な評価ができないという欠点を持つ。 さらに、従来の SPECT 機械は、空間分解能の限界により、ラットのよう な小動物での SPECT 撮像が不可能だったため、これまで小動物の ¹²³I-IMZ SPECT *in vivo* イメージングは行われなかった。この研究で、優 れた空間分解能を有する小動物用 SPECT/CT を用いて、生体ラットで経 時的かつ非侵襲的に¹²³I-IMZ 集積を測定し、神経細胞の viability を反映 することで、細胞移植治療の効果を画像化することを初めて可能にした 33,43

2) BMSC 治療による神経細胞活性化と局所糖代謝改善の関連

最近、我々の研究グループでは、永久 MCA 閉塞モデルラットに対し ¹⁸F-fliorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG) positron emission tomography (PET) を施行し、BMSC 移植が脳梗塞周囲皮質における局所糖代謝の改善を増強 させることを明らかにした。すなわち、脳梗塞作成後6日目には脳梗塞周 囲での糖代謝は著しく低下した。脳梗塞作成後35日目には、vehicle移植 群である程度の糖代謝の改善が認められたが、BMSC 移植群では、同時期 の脳梗塞周囲皮質における糖代謝の改善が vehicle 移植群と比べ有意に増 強された 43。この 18F-FDG PET 研究と本研究の結果を合わせると、また、 神経細胞での糖代謝が非常に活発であることも踏まえると、BMSC は脳梗 塞周囲皮質の神経細胞の viability を改善させることにより、同部位の糖代 謝改善を増強させている可能性があると考えられる。つまり、BMSC 移植 治療は脳梗塞周囲皮質における神経細胞の viability と局所糖代謝を改善 させることで、神経機能改善に寄与している可能性がある。ただし、 ¹⁸F-FDG PET における脳梗塞作成後 35 日目の FDG 集積増加に、マクロ ファージの活性化やグリオーシスが影響している可能性も完全には否定し きれないことを追記しておく 44。

3) 組織学的検討を踏まえて

脳梗塞作成後 6 日目の組織像では、ヘマトキシリンエオジン染色と NeuN、GABAA受容体の免疫染色のいずれにおいても、脳梗塞周囲皮質に おける神経細胞の一部が選択的に障害されていた。その後も、vehicle 移植 群では組織学的に変化がみられなかったことに対し、BMSC 移植群では脳 梗塞後 42 日目に、NeuN あるいは GABAA受容体陽性細胞の密度が有意に 増加した。さらに、GFP 陽性細胞が脳梗塞周囲に広く分布しており、その 一部は NeuN や GABAA 受容体と共陽性を示した。すなわち、移植した BMSC の一部が神経細胞へと分化したことが示唆された。これまで、移植 した BMSC は様々なメカニズムを介して脳虚血後の機能改善に寄与する ことが報告されてきた。一部の移植細胞は、自身が神経系の細胞へ分化す ることにより障害された組織に置き換わる能力を持つ^{13,14}。また、他の細 胞は神経保護作用や神経成長作用を持つ液性因子を放出し、障害された神 経細胞を保護する^{15,16}。あるいは、ホスト脳由来の神経幹細胞を活性化す るのかもしれない^{45,46}。つまり、移植した BMSC は、自身の神経分化やホ スト脳の神経発生をサポートすることなど、複数の生物学的活動により、 脳梗塞周囲の神経細胞の viability を改善させている可能性がある。さらに、 我々の研究グループは、移植された BMSC の一部は、神経細胞だけではな く、脳梁においてアストロサイト系のマーカーを発現していたことも報告 した ⁴⁷。また、stroke-prone spontaneous hypertensive rats (SHR-SP)に対して 移植した BMSC は、神経細胞の基底膜とアストロサイト終末の間で neurovascular unit を保護することで、脳障害を軽減することもわかってい る ⁴⁸。

4) BMSC 移植治療の臨床応用に向けて

冒頭で述べたように、脳虚血に対する細胞移植治療の臨床応用を達成す るためには、まだ基礎研究と臨床研究の間に埋めなくてはならないギャッ プが存在するのが現状である。脳保護剤をターゲットとした臨床試験の多 くは、神経機能をエンドポイントとして利用してきたが、その限界は明白 であり、それを補完することで治療効果をより客観的に評価できる副次的 なパラメーターが必要である⁴⁹。すなわち、非侵襲的なイメージングの技 術により、生物学的に適切なエンドポイントを設定することが必要である と考えられる。この見地からも、¹²³I-IMZ SPECT は、ホスト脳における 細胞治療効果を継時的かつ非侵襲的に立証することで、細胞治療を科学的 に証明された治療法として確立させることに寄与するかもしれない。

総括および結論

1) 小動物用 SPECT/CT を用いて、ラットの ¹²³I-IMZ SPECT を撮像し、 神経細胞の viability を反映した脳機能イメージングを得ることに初めて 成功した。また、ラットの ¹²³I-IMZ SPECT の適切な撮像条件を示すこと ができた。

2)小動物用 SPECT/CT により、ラットの脳梗塞および脳梗塞周囲皮質 における¹²³I-IMZ 集積低下、および BMSC 移植治療後の脳梗塞周囲皮質 における¹²³I-IMZ 集積改善を検出することができた。

3) BMSC は、臨床的に適切な時期にラット脳梗塞に直接移植することで、 脳梗塞周囲皮質において神経細胞の viability を改善し、機能回復に寄与し た可能性がある。神経細胞の viability を改善させる機序として、移植した BMSC 自身の神経分化や様々な液性因子の放出によるホスト脳の神経発 生のサポート、神経保護など、複数の生物学的活動が関与している可能性 がある。

4)¹²³I-IMZ SPECT は、臨床においても、BMSC などの細胞治療の効果、 ホスト脳機能変化を科学的に証明するための有用なモダリティとなり得る と考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、共同で本研究を進めてくださり、ご指導、ご協力 を賜わりました北海道大学大学院医学研究科核医学分野教室員および関係 者の皆様に心より感謝申し上げます。また、本研究の機会をくださいまし た北海道大学大学院医学研究科脳神経外科学分野 寳金清博教授に謝意を 表します。併せて本研究全般にわたり、直接ご指導、ご鞭撻を賜りました 富山大学脳神経外科 黒田敏教授に深く感謝致します。また、最後に、本 研究にご協力いただきました四戸由美子実験助手、その他の脳神経外科教 室員および秘書の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Hoehn, M., *et al.* Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 99, 16267-16272 (2002).
- 2. Veizovic, T. *et al.* Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells. *Stroke* **32**, 1012-1019 (2001).
- Chen, J., et al. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. J. Neurol. Sci. 189, 49-57 (2001).
- 4. Chen, J.R., *et al.* Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke. *J. Anat.* **213**, 249-258 (2008).
- 5. Hokari, M. *et al.* Synergistic effects of granulocyte-colony stimulating factor on bone marrow stromal cell transplantation for mice cerebral infarct. *Cytokine* **46**, 260-266 (2009).
- 6. Maruichi, K., *et al.* Transplanted bone marrow stromal cells improves cognitive dysfunction due to diffuse axonal injury in rats. *Neuropathology* (2009).
- Yano, S., Kuroda, S., Shichinohe, H., Hida, K. & Iwasaki, Y. Do bone marrow stromal cells proliferate after transplantation into mice cerebral infarct?--a double labeling study. *Brain Res.* 1065, 60-67 (2005).
- Shichinohe, H., Kuroda, S., Yano, S., Hida, K. & Iwasaki, Y. Role of SDF-1/CXCR4 system in survival and migration of bone marrow stromal cells after transplantation into mice cerebral infarct. *Brain Res.* 1183, 138-147 (2007).
- Chiba, Y., et al. Transplanted bone marrow stromal cells promote axonal regeneration and improve motor function in a rat spinal cord injury model. *Neurosurgery* 64, 991-999; discussion 999-1000 (2009).

- Osanai, T., *et al.* Noninvasive transplantation of bone marrow stromal cells for ischemic stroke: preliminary study with a thermoreversible gelation polymer hydrogel. *Neurosurgery* 66, 1140-1147; discussion 1147 (2010).
- Abe, K., et al. Stem cell therapy for cerebral ischemia: from basic science to clinical applications. J. Cereb. Blood Flow Metab. 32, 1317-1331 (2012).
- 12. Prockop, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71-74 (1997).
- Azizi, S.A. *et al.* Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 3908-3913 (1998).
- Kopen, G.C., Prockop, D.J. & Phinney, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 10711-10716 (1999).
- Li, Y., *et al.* Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 59, 514-523 (2002).
- Hokari, M., *et al.* Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms. *J. Neurosci. Res.* 86, 1024-1035 (2008).
- Bang, O.Y., Lee, J.S., Lee, P.H. & Lee, G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol.* 57, 874-882 (2005).
- Mazzini, L., *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Exp. Neurol.* 223, 229-237 (2010).
- Pal, R., et al. Ex vivo-expanded autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in human spinal cord injury/paraplegia: a pilot clinical study. Cytotherapy 11, 897-911 (2009).
- 20. Saito, F., *et al.* Spinal cord injury treatment with intrathecal autologous bone marrow stromal cell transplantation: the first

clinical trial case report. J. Trauma 64, 53-59 (2008).

- Zhang, Z.X. et al. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury. *Cytotherapy* 10, 134-139 (2008).
- Honmou, O., *et al.* Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain* 134, 1790-1807 (2011).
- 23. Savitz, S.I., *et al.* Stem Cell Therapy as an Emerging Paradigm for Stroke (STEPS) II. *Stroke* **42**, 825-829 (2011).
- Kawabori, M., et al. Intracerebral, but not intravenous, transplantation of bone marrow stromal cells enhances functional recovery in rat cerebral infarct: an optical imaging study. Neuropathology 32, 217-226 (2012).
- Sugiyama, T., et al. Near-infrared fluorescence labeling allows noninvasive tracking of bone marrow stromal cells transplanted into rat infarct brain. *Neurosurgery* 68, 1036-1047; discussion 1047 (2011).
- Ito, M., *et al.* Validity of bone marrow stromal cell expansion by animal serum-free medium for cell transplantation therapy of cerebral infarct in rats - A serial MRI study. *Transl. Stroke Res.* 2, 294-306 (2011).
- 27. Nakagawara, J., Sperling, B. & Lassen, N.A. Incomplete brain infarction of reperfused cortex may be quantitated with iomazenil. *Stroke* 28, 124-132 (1997).
- Ogasawara, Y., et al. Preoperative 123I-iomazenil SPECT imaging predicts cerebral hyperperfusion following endarterectomy for unilateral cervical internal carotid artery stenosis. Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 2, 77-87 (2012).
- Sato, Y., et al. Preoperative central benzodiazepine receptor binding potential and cerebral blood flow images on SPECT predict development of new cerebral ischemic events and cerebral hyperperfusion after carotid endarterectomy. J. Nucl. Med. 52, 1400-1407 (2011).
- 30. Koizumi, H., *et al.* Recovered neuronal viability revealed by Iodine-123-iomazenil SPECT following traumatic brain injury. *J.*

Cereb. Blood Flow Metab. 30, 1673-1681 (2010).

- Saur, D., Buchert, R., Knab, R., Weiller, C. & Rother, J. Iomazenil-single-photon emission computed tomography reveals selective neuronal loss in magnetic resonance-defined mismatch areas. *Stroke* 37, 2713-2719 (2006).
- 32. Hatazawa, J., *et al.* Evaluation of cerebral infarction with iodine 123-iomazenil SPECT. *J. Nucl. Med.* **36**, 2154-2161 (1995).
- Magota, K., et al. Performance characterization of the Inveon preclinical small-animal PET/SPECT/CT system for multimodality imaging. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 38, 742-752 (2011).
- Lee, J., et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. Neuropathology 23, 169-180 (2003).
- Bederson, J.B., *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17, 472-476 (1986).
- Chen, S.T., Hsu, C.Y., Hogan, E.L., Maricq, H. & Balentine, J.D.
 A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17, 738-743 (1986).
- Kaji, T., et al. Characterisation of [123I]iomazenil distribution in a rat model of focal cerebral ischaemia in relation to histopathological findings. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 31, 64-70 (2004).
- Kuge, Y., et al. Characteristic brain distribution of 1-(14)C-octanoate in a rat model of focal cerebral ischemia in comparison with those of (123)I-IMP and (123)I-iomazenil. J. Nucl. Med. 44, 1168-1175 (2003).
- Prohovnik, I. Iodine-123-iomazenil SPECT in Alzheimer's disease.
 J. Nucl. Med. 39, 927 (1998).
- 40. Umeoka, S., *et al.* Usefulness of 123I-iomazenil single-photon emission computed tomography in discriminating between mesial and lateral temporal lobe epilepsy in patients in whom magnetic resonance imaging demonstrates normal findings. *J. Neurosurg.*

107, 352-363 (2007).

- 41. Shichinohe, H., et al. Improved expression of gamma-aminobutyric acid receptor in mice with cerebral infarct and transplanted bone marrow stromal cells: an autoradiographic and histologic analysis. J. Nucl. Med. 47, 486-491 (2006).
- 42. Yano, S., *et al.* Bone marrow stromal cell transplantation preserves gammaaminobutyric acid receptor function in the injured spinal cord. *J. Neurotrauma* **23**, 1682-1692 (2006).
- Miyamoto, M., et al. Bone Marrow Stromal Cell Transplantation Enhances Recovery of Local Glucose Metabolism After Cerebral Infarction in Rats: A Serial 18F-FDG PET Study. J. Nucl. Med. 54, 145-150 (2013).
- 44. Fukumoto, D., *et al.* Multiparametric assessment of acute and subacute ischemic neuronal damage: a small animal positron emission tomography study with rat photochemically induced thrombosis model. *Synapse* **65**, 207-214 (2011).
- Maltman, D.J., Hardy, S.A. & Przyborski, S.A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem. Int.* 59, 347-356 (2011).
- Otero, L., et al. Allogeneic bone marrow stromal cell transplantation after cerebral hemorrhage achieves cell transdifferentiation and modulates endogenous neurogenesis. Cytotherapy 14, 34-44 (2012).
- Lee, J.B., *et al.* A pre-clinical assessment model of rat autogeneic bone marrow stromal cell transplantation into the central nervous system. *Brain Res. Brain Res. Protc.* 14, 37-44 (2004).
- Ito, M., et al. Transplanted bone marrow stromal cells protect neurovascular units and ameliorate brain damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Neuropathology 32, 522-533 (2012).
- Savitz, S.I. & Fisher, M. Future of neuroprotection for acute stroke: in the aftermath of the SAINT trials. *Ann. Neurol.* 61, 396-402 (2007).