HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Description	配架番号：2088
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11216号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11216
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56176
Type	doctoral thesis
File Information	Hisayasu_Saito.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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

目　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・　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　緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・　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. ^{123}I-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.

1. 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－^{123}I-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

2. 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－^{123}I-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－^{123}I-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－^{123}I-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－^{123}I-iomazenil SPECT による検討

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 ^{123}I-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 ^{123}I-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－^{123}I-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 ^{123}I-iomazenil SPECT study
学会名；15th WFNS world congress of neurosurgery, September 9, 2013, Seoul, Korea

緒言

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。^{123}I-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、^{123}I-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 ^{123}I-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 ^{123}I-IMZ SPECT の撮像条件の検討

【緒言】

前述のとおり、^{123}I-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 ^{123}I-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 ^{123}I-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

Type	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 ^{123}I-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。

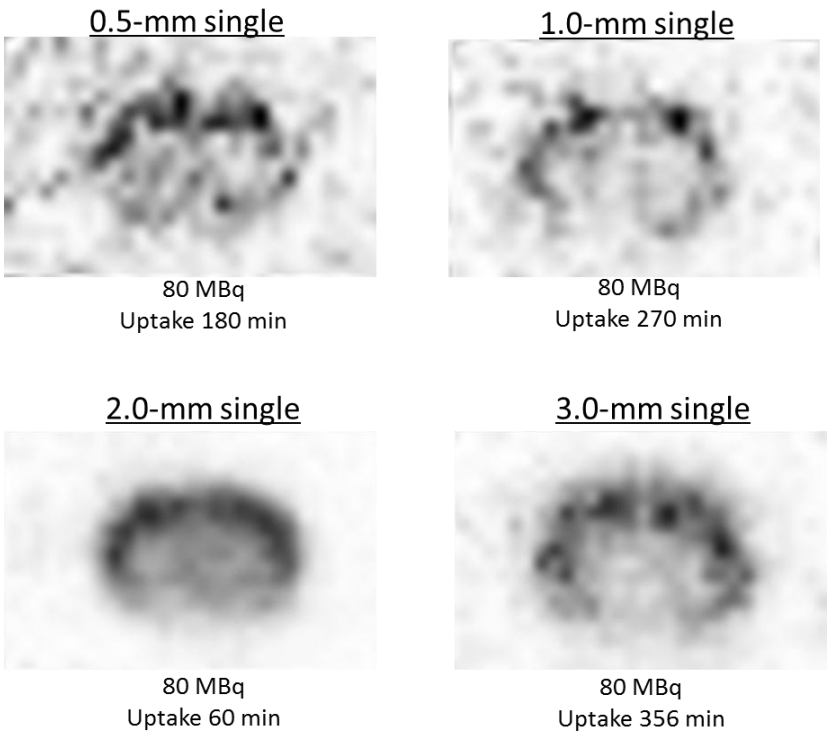


Figure 2　Collimator による ^{123}I-IMZ SPECT 画像の違い

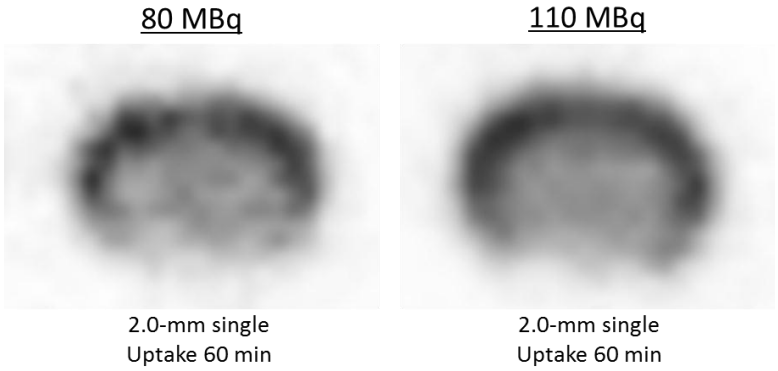


Figure 3　Injection dose による ^{123}I-IMZ SPECT 画像の違い

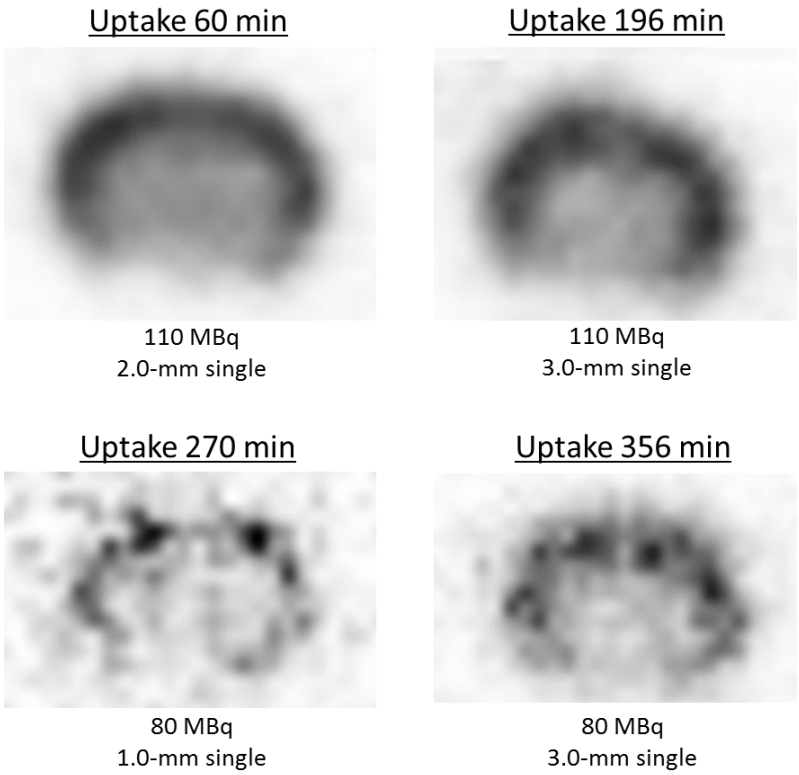


Figure 4　Uptake time による ^{123}I-IMZ SPECT 画像の違い

【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 ^{123}I-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 ^{123}I-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/CT[33] を用いて生体下でラットの ^{123}I-IMZ SPECT を撮像した初めての報告である。^{123}I-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 ^{123}I-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 MBq、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－^{123}I-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、^{123}I-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 ^{123}I-IMZ SPECT を撮像することで、^{123}I-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 ^{123}I-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、N_2O/O_2 ;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℃, 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、2×10^3rpm , 15℃, 5 分間遠心した。上清を破棄し、上述の培養液を加え 75 cm^2 collagen I coated flask に撒き 37℃, 5% CO_2 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[123]I-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、N_2O/O_2 (70:30)で導入し、2.0% isoflurane、N_2O/O_2 (70:30)で維持した。体温は 36.5-37.0℃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)。

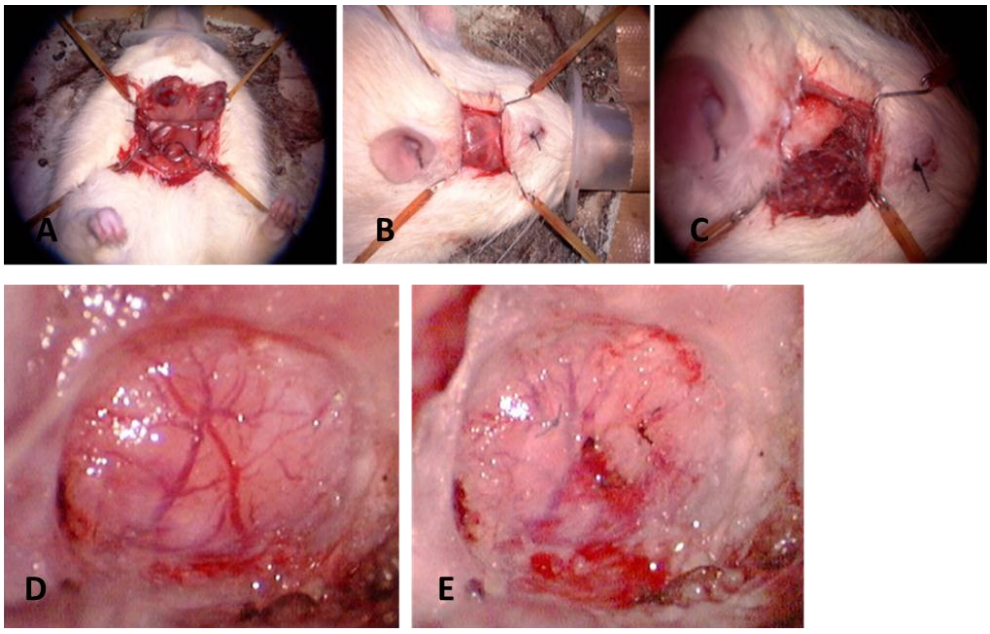


Figure 5 Surgical procedure of permanent MCA occlusion model of rats

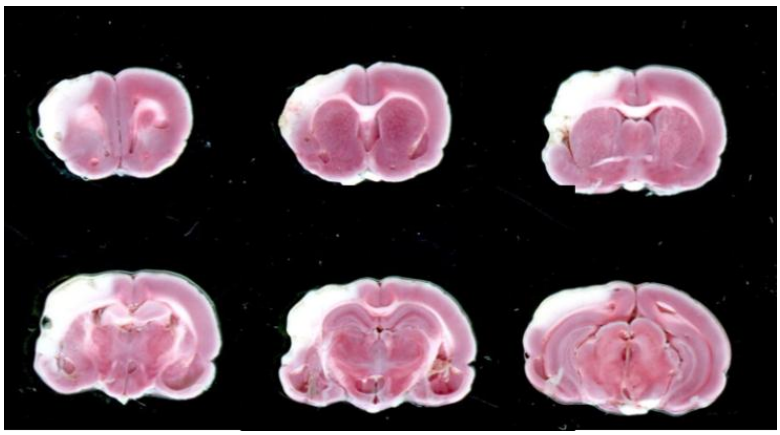


Figure 6 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) stain 24hr after permanent middle cerebral artery occlusion. A focal infarct in the cerebral neocortex was demonstrated.

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 10^6 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。

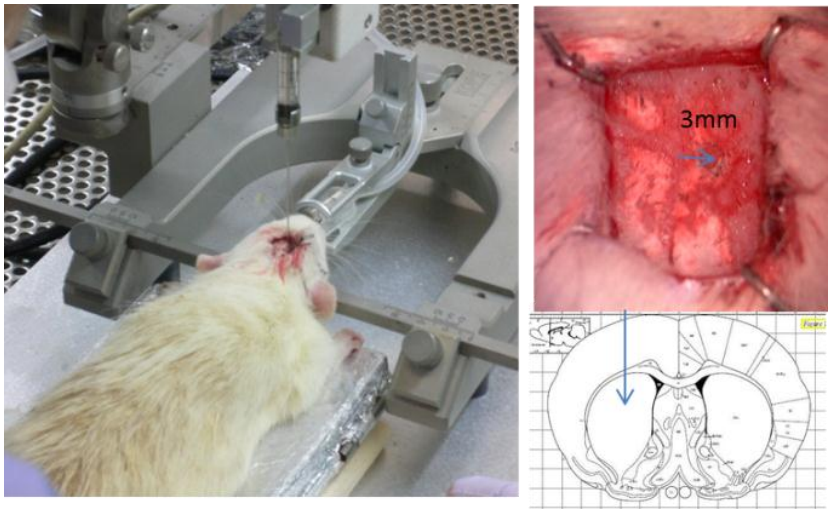


Figure 7 The surgical procedure of stereotactic BMSC transplantation.

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。

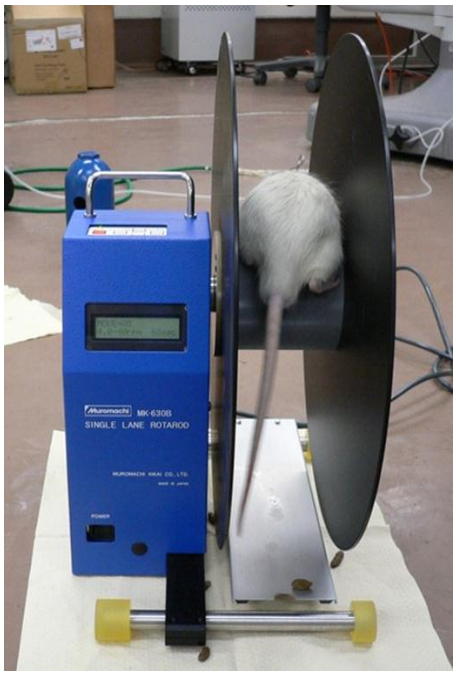


Figure 8 Motor function of the animals was serially assessed before and at 1, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days after the onset of ischemia, using a Rotarod treadmill.

5） ^{123}I-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、^{123}I-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 ^{123}I-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 mm^3 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。

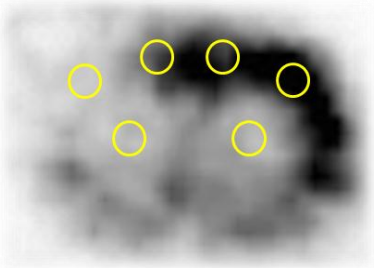


Figure 9　Round-shaped region of the interests (ROIs; diameter, 1.5 mm) were symmetrically placed in the dorsal neocortex adjacent to infarct area, infarct core, and striatum.

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 ^{123}I-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 ^{123}I-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。

最後に、本章における実験プロトコールのシェーマを Figure 10 に示す。

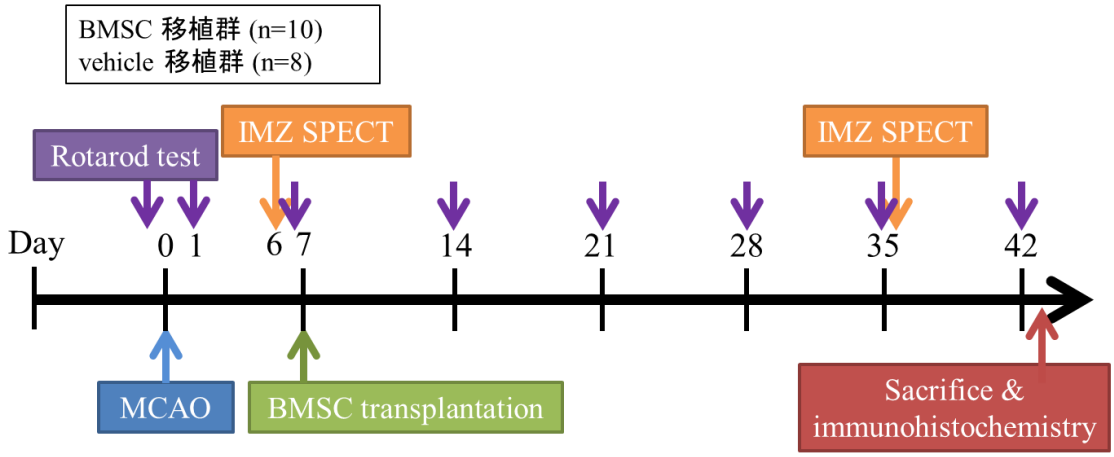


Figure 10 The experimental protocol in this study.

【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）。

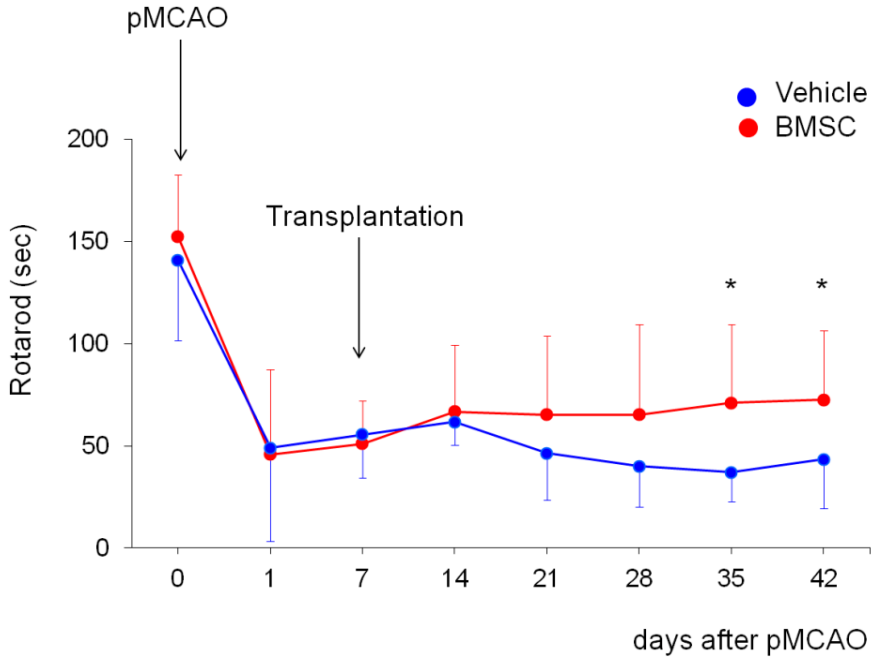


Figure 11　Rota-rod treadmill performance.　Line graph shows the temporal profile of functional recovery in vehicle- (blue) and bone marrow stromal cell (BMSC)-treated (red) rats subjected to permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO).　* P< 0.05.　sec, seconds.

２）^{123}I-IMZ SPECT

脳梗塞作成後 6 日目と 35 日目に、SPECT を用いて ^{123}I-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 ^{123}I-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 ^{123}I-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 ^{123}I-IMZ 分布は改善

された。vehicle 群では、脳梗塞周囲皮質における ^{123}I-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 ^{123}I-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。

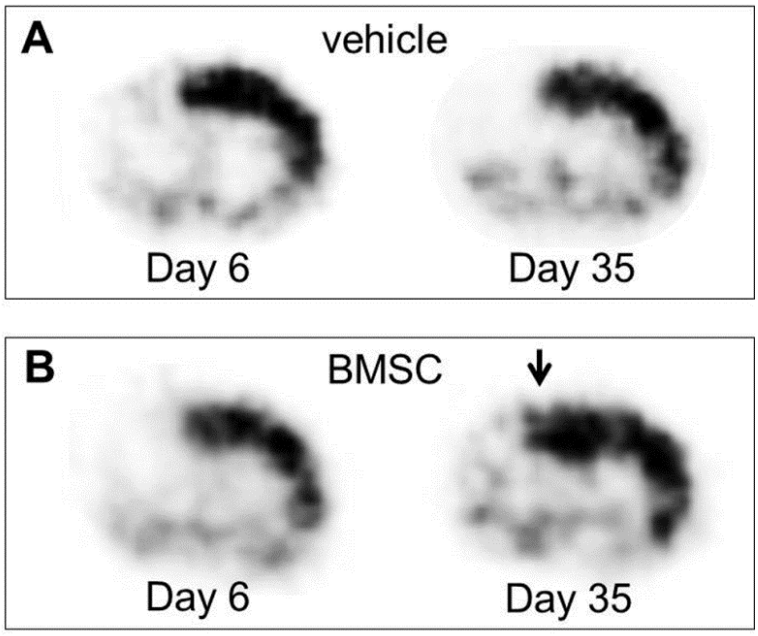


Figure 12 Representative findings of ^{123}I-iomazenil (IMZ) single photon emission computed tomography. White-and-black images of the vehicle- (A) and bone marrow stromal cell (BMSC)-transplanted rats (B). In both vehicle- and BMSC-treated rats, a marked decrease in the uptake of ^{123}I-IMZ is observed in the ipsilateral neocortex at 6 days post-ischemia. The uptake of ^{123}I-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.

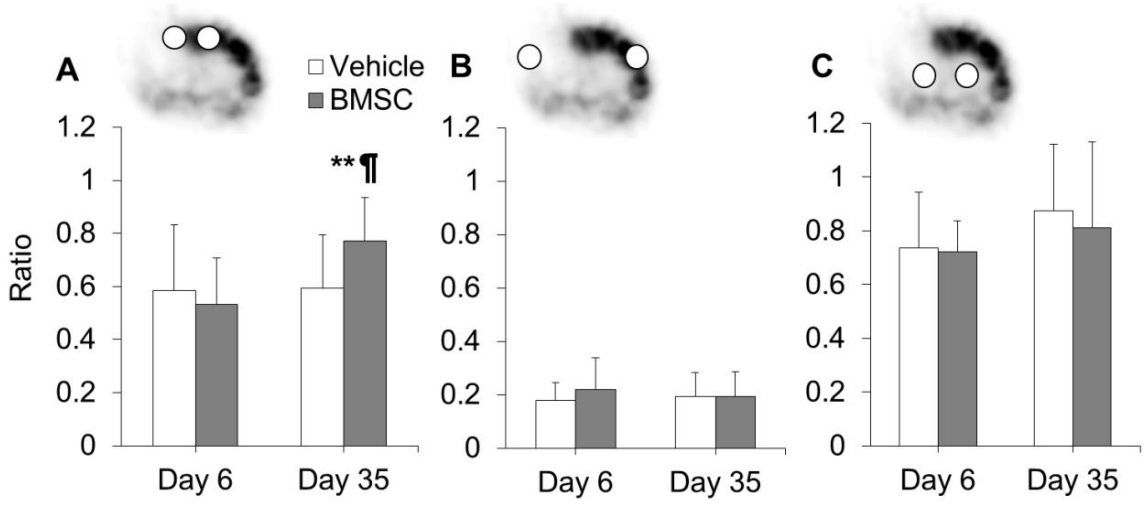


Figure 13　Bar graphs show the ipsilateral-to-contralateral ratio of ^{123}I-iomazenil uptake in the dorsal neocortex adjacent to infarct area (A), infarct core (B), and striatum (C).　** P< 0.01 (Day 6 vs. Day 35), ¶ P<0.05 (vehicle vs. BMSC).

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 ^{123}I-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 $GABA_A$ 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）。

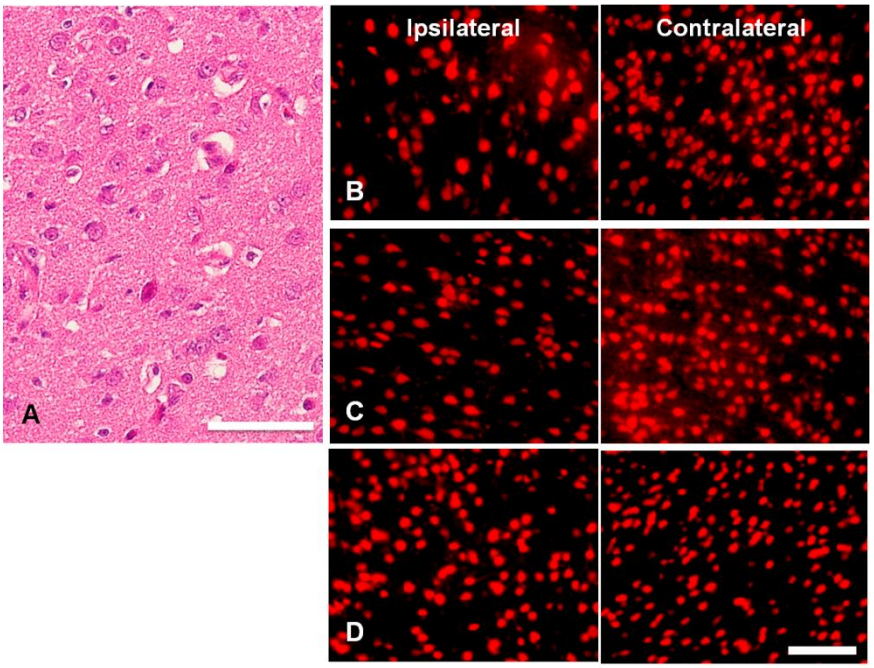


Figure 14　(A) On HE staining, a significant number of neurons are damaged in the ipsilateral neocortex adjacent to cerebral infarct at 6 days post-ischemia. (B) Fluorescence immunohistochemistry against neuronal nuclear antigen (NeuN) demonstrates similar results at 6 days post-ischemia.　The ipsi- to 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 μm.

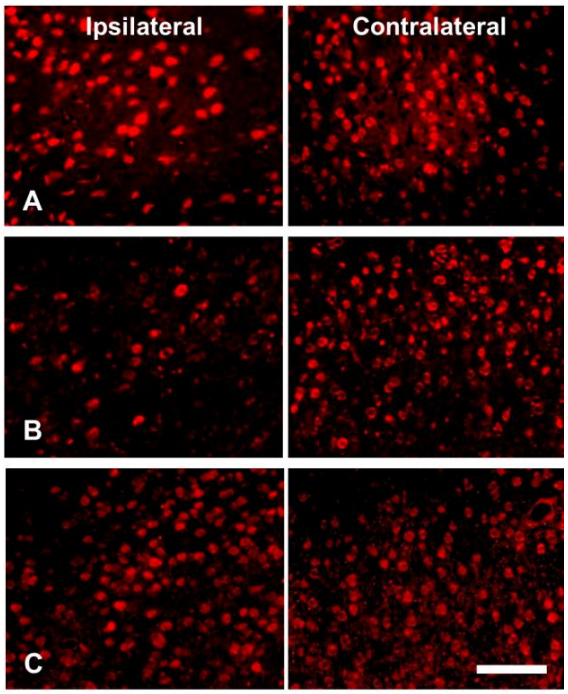


Figure 15 (A) Fluorescence immunohistochemistry against γ-aminobutyric acid type-A ($GABA_A$) receptor shows that the number of $GABA_A$ receptor significantly decreases in the ipsilateral neocortex adjacent to cerebral infarct at 6 days post-ischemia. (B) The number does not recover in the vehicle-transplanted 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.

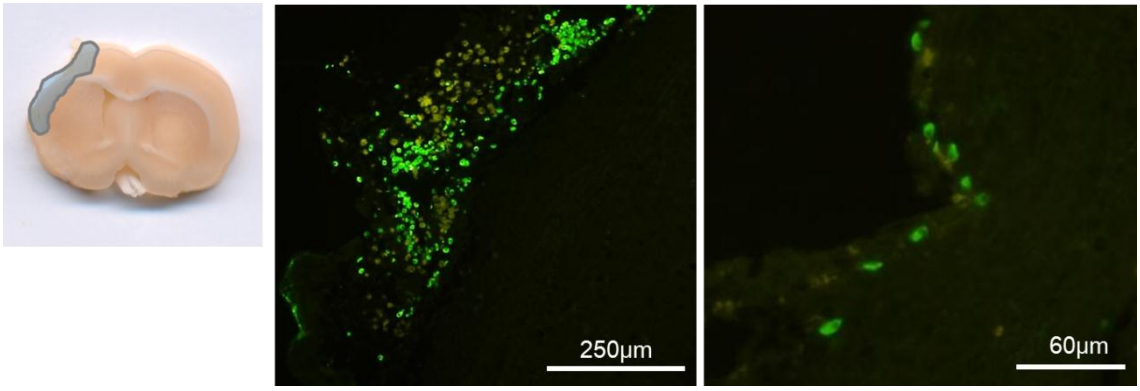


Figure 16 Double fluorescence immunohistochemistry revealed that the GFP-positive cells were widely distributed in the peri-infarct neocortex.

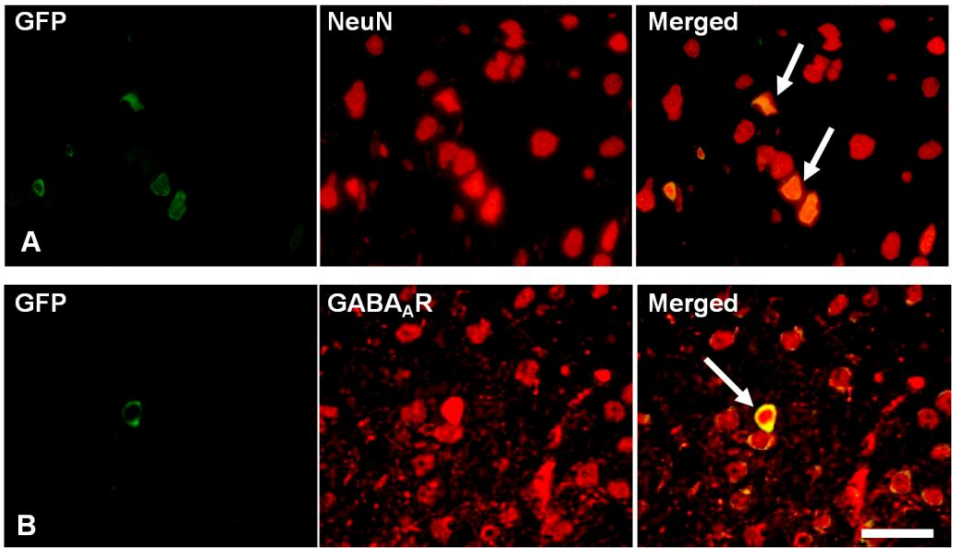


Figure 17　Photomicrographs of double fluorescence immunohistochemistry against neuronal nuclear antigen (NeuN) (A, red) or γ-aminobutyric acid type-A ($GABA_A$) receptor (B, red) and green fluorescence protein (GFP) (green) in the peri-infarct neocortex of bone marrow stromal cell (BMSC)-transplanted 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 ^{123}I-IMZ SPECT 撮像を行い、^{123}I-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、^{123}I-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 ^{123}I-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）^{123}I-IMZ SPECT について

前述した通り、^{123}I-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、^{123}I-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、^{123}I-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 ^{123}I-IMZ 集積が著明に低下することを示した [38]。Kaji らは、^{123}I-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 $GABA_A$ 受容体に特異的なマーカーを発現し、脳梗塞周囲の ^{125}I-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 ^{123}I-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 ^{123}I-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 ^{18}F-fliorodeoxyglucose (^{18}F-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 ^{18}F-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、^{18}F-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、$GABA_A$ 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 $GABA_A$ 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 $GABA_A$ 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、^{123}I-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 ^{123}I-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 ^{123}I-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 ^{123}I-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 ^{123}I-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）^{123}I-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　寶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

1. 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. U S A.* **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).
3. 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).
7. 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).
8. 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).
9. 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).

10. 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).
11. 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).
13. 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. U S A.* **95**, 3908-3913 (1998).
14. 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. U S A.* **96**, 10711-10716 (1999).
15. Li, Y., *et al.* Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* **59**, 514-523 (2002).
16. Hokari, M., *et al.* Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms. *J. Neurosci. Res.* **86**, 1024-1035 (2008).
17. 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).
18. Mazzini, L., *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Exp. Neurol.* **223**, 229-237 (2010).
19. 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).
21. 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).
22. 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).
24. 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).
25. 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).
26. 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).
28. 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).
29. 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).
31. 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).
33. 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).
34. 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).
35. 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).
36. 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).
37. 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).
38. 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).
39. 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).
43. 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).
45. 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).
46. 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).
47. 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).
48. 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).
49. Savitz, S.I. & Fisher, M. Future of neuroprotection for acute stroke: in the aftermath of the SAINT trials. *Ann. Neurol.* **61**, 396-402 (2007).