

犬の脊髄損傷に対する嗅神経鞘細胞移植療法のための基盤研究

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

博士課程

関口 尚希

2021

目次	2-3
略語集	4-6
序章	7-29
1. 脊髄損傷 (Spinal cord injury : SCI)	8-13
2. 犬の胸腰部椎間板ヘルニア	14-18
3. 嗅神経鞘細胞 (Olfactory ensheathing cells : OECs) と脊髄再生医療	19-24
4. コンドロイチナーゼ ABC (Chondroitinase ABC : ChABC) と脊髄再生医療	25-27
5. 犬の自然発症 SCI 症例に対する OECs ならびに ChABC による脊髄再生医療の問題点と本研究の目的	28-29
第1章 磁気共鳴 Heavily T2 強調画像を用いた胸腰部椎間板ヘルニア罹患犬の予後判定の検討	30-62
1.1. 序論	31-35
1.2. 材料・方法	36-42
1.3. 結果	43-53
1.4. 考察	54-59
1.5. 補足情報	60-61
1.6. 小括	62
第2章 犬嗅粘膜由来嗅神経鞘細胞の純化培養法の検討	63-87
2.1. 序論	64-66

2.2. 実験 1	67-77
2.2.1. 材料・方法	67-71
2.2.2. 結果	72-74
2.2.3. 考察	75-77
2.3. 実験 2	78-86
2.3.1. 材料・方法	78-81
2.3.2. 結果	82-84
2.3.3. 考察	85-86
2.4. 小括	87
第 3 章 慢性期脊髄損傷モデルラットへのコンドロイチナーゼ ABC 産生-犬嗅神 経鞘移植による運動機能回復の検討	88-112
3.1. 序論	89-90
3.2. 材料・方法	91-101
3.3. 結果	102-107
3.4. 考察	108-110
3.5. 補足情報	111
3.6. 小括	112
第 4 章 総括	113-114
謝辞	115
引用文献	116-140

略語集

BBB : Basso, Beattie, Bresnahan

Cd : Caudal (尾側)

cdT2W:L2 : 尾側脊髄 T2 高信号領長の第 2 腰椎比

cdCSF:L2 : 尾側 CSF 信号減衰長の第 2 腰椎比

ChABC : Chondroitinase ABC (コンドロイチナーゼ ABC)

ChABC-OEC : コンドロイチナーゼ ABC 産生-犬嗅神経鞘細胞

CSF : Cerebrospinal fluid (脳脊髄液)

CSF:L2 : CSF 信号減衰長の第 2 腰椎比

CS-GAG : Chondroitin sulfate glycosaminoglycan

(コンドロイチン硫酸グリコサミノグリカン)

CSPG : Chondroitin sulfate proteoglycans (コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)

Cr : Cranial (頭側)

crT2W:L2 : 頭側脊髄 T2 高信号領長の第 2 腰椎比

crCSF:L2 : 頭側 CSF 信号減衰長の第 2 腰椎比

Ct : Control (コントロール)

Cy3 : Cyanine 3 (シアニン 3)

DAPI : 6-diamidino- 2-phenylindole (ジアミジノフェニルインドール)

DICOM : Digital imaging and communications in medicine

DMEM : Dulbecco modified Eagle medium (ダルベッコ改変イーグル培地)

DPP : Deep pain perception (深部痛覚)

ECM : Extradural compression materials (硬膜外圧迫物質)

ECML:L2 : 硬膜外圧迫物質第 2 腰椎比

E-NCAM : Embryonic neural cell adhesion molecule

FASE : Fast advanced spin echo (2次元高速スピンエコー)

FITC : Fluorescein isothiocyanate (フルオレセインイソチオシアネート)

Fn : Fibronectin (ファイブロネクチン)

FOV : Field of view (撮像視野)

G-CSF : Granulocyte-colony stimulating factor (顆粒球コロニー刺激因子)

GM : Growth medium (血清含有培地)

HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution (ハンクス平衡塩溶液)

HE : Hematoxylin Eosin (ヘマトキリシン・エオジン)

IVDE : Intervertebral disc extrusion (椎間板脱出)

IVDP : Intervertebral disc protrusion (椎間板突出)

L : Left (左)

L-15 : Leiboviz's L-15 medium (ライボビッツ L-15 培地)

L2 : The second lumbar vertebrae (第2腰椎)

MPSS : Methylprednisolone sodium succinate (メチルプレドニゾロン)

MR : Magnetic resonance (磁気共鳴)

MRI : Magnetic resonance image (磁気共鳴画像)

msec : millisecond (ミリ秒)

OccR : Occupancy ratio (硬膜外圧迫物質による脊柱管の占有率)

OECs : Olfactory ensheathing cells (嗅神経鞘細胞)

OMBM : Olfactory mucosal cell basic medium (嗅粘膜粘膜培養基礎培地)

PBS : Phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)

PEG : Polyethylene glycol (ポリエチレングリコール)

PM : Progressive myelomalacia (進行性脊髄軟化症)

PTP σ : Protein tyrosine phosphatase sigma

(プロテインチロシンホスファターゼシグマ)

p75 : p75 neurotrophin receptor/low-affinity nerve growth factor receptor

(低親和性神経成長因子受容体)

R : Right (右)

SCI : Spinal cord injury (脊髄損傷)

SD : Standard deviation (標準偏差)

Sf-GM : Serum free growth medium (血清非含有培地)

TC : Toe clearance (つま先のクリアランス)

TE : Echo time (エコー時間)

TR : Repetition time (繰り返し時間)

T1W : T1 weighted (T1 強調)

T2W : T2 weighted (T2 強調)

T2W:L2 : 脊髄 T2 高信号領域の第 2 腰椎比

序論

1. 脊髄損傷 (Spinal cord injury: SCI)

1.1. 人ならびに犬における SCI の原因とその疫学

現在、世界中で 2700 万以上の人々が、SCI により身体的に不自由な生活を余儀なくされており、また、SCI 後の多大な医療費により経済的な負担を抱えている (Adriaansen J. J. E. et al. 2016; Gamblin A. et al. 2019; GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators, 2019)。人における SCI の多くが転倒や転落、交通事故などによる物理的な外傷に起因し、毎年その患者数は増加している (GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators 2019)。

人と同様に、犬においても交通事故や椎間板ヘルニアなどに起因する SCI の発生は多く、重度 SCI 症例に対する有効な治療法は確立されていない。これら重度 SCI の犬では、肢の完全麻痺や排泄障害などの神経機能不全を呈することで生涯にわたり不自由な生活を余儀なくされるか、あるいは安楽死処置を選択されることもある (Olby N. et al. 2003; Smith P. M. & Jeffery N. D. 2006)。犬において急性の椎間板ヘルニア (Hansen I 型) に起因する SCI が最も一般的であり、米国内の調査では年間 20,000~30,000 頭の犬が新たに椎間板ヘルニアに罹患していることが報告されている (Moore S. A. et al. 2016; Moore S. A. et al. 2018)。

1.2. 齧歯類における SCI の病態メカニズム

1.2.1. SCI の病態メカニズム

SCI の病態は、人や犬との SCI 病態の類似性と研究の汎用性の高さから、齧歯類 (主にラット) の SCI モデルを用いた研究によって、SCI の病態メカニズムが解明されてきた (Tator C. H. et al. 1995; Kjell J. et al. 2016; Ahuja C. S. et al. 2017a)。SCI はその病態メカニズムから一次損傷と二次損傷に分類される (Tator C.H. et al. 1995; McDonald J. W. et al. 2002)。一次損傷とは、脊髄の圧迫や挫傷などの直接的

かつ物理的な脊髄組織への損傷により、脊髄を構成する神経細胞、軸索、髄鞘（オリゴデンドロサイト）や血管などが損傷することを指す（McDonald J. W. et al. 2002; Ahuja C. S. et al. 2017a; Ahuja C. S. et al. 2017b）。一次損傷に続発する二次損傷では、一次損傷による血液脊髄関門の破綻の結果、マクロファージやリンパ球、好中球などの炎症細胞が損傷組織に浸潤し、腫瘍壊死因子（TNF- α ）やインターロイキンなどのサイトカインを放出することで炎症を惹起し、SCIの範囲を拡大させる（Nakamura M. et al. 2003; Uldreaj A. et al. 2016）。また、炎症細胞からの活性酸素の放出や破壊された細胞からの興奮性アミノ酸の放出増加により、さらなる細胞死が誘発され、SCIの範囲が拡大する（Li S. & Stys P. K. 2000）。さらに、一次損傷後の脊髄組織のイオンの恒常性の喪失によって、細胞死が誘発されることも二次損傷に含まれる（Schanne F. A. et al. 1979; Tator C. H. et al. 1995）。中枢神経の髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトは、このイオン恒常性の不均衡により生ずるアポトーシスの影響を受けやすいため一次損傷により物理的細胞損傷を免れた場合でも、脱髄が引き起こされる（Dong H. et al. 2003）。

1.2.2. グリア瘢痕の形成

この二次損傷の波及を防ぐための生理反応として、損傷した脊髄においてグリア瘢痕が形成される。一次損傷後に活性化したミクログリアからのシグナリングによって反応性アストロサイトが増殖かつSCI周囲に密集し、主にコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（Chondroitin sulfate proteoglycans : CSPG）などの細胞外マトリックスを分泌することでグリア瘢痕を形成する（McKeon R. J. et al. 1991; Silver J. & Miller J. H. 2004）。形成されたグリア瘢痕により損傷部と周囲正常組織とが隔てられることで、炎症の波及などの二次損傷を防ぐことができる（Sofroniew M. & Vinters H. V. 2010; Kawano H. et al. 2012）。しかし、グリア瘢痕

は二次損傷を防ぐ一方、グリア瘢痕周囲（損傷周囲）に密集したアストロサイトによる物理的な障壁や CSPG などの細胞外マトリックス（軸索伸展抑制因子として機能）によってグリア瘢痕を跨いだ軸索再生も抑制される（McKeon R. J. et al. 1991）。結果、グリア瘢痕が SCI の不可逆的な病態を形成することで脊髄は再生することができず、損傷部位よりも下位の神経機能不全が永続する。

1.2.3. SCI 病期の分類について

SCI 後の時間経過とその病態を関連付けた分類が以下のように用いられている（Ahuja C.S. et al. 2017b; Kjell J. et al. 2016）。

- i) 急性期（SCI 後 0～24 時間）：SCI（一次損傷）後の浮腫、出血、虚血、炎症細胞の浸潤、細胞毒性産物の放出および細胞死によって特徴づけられる二次損傷のカスケードが誘導される時期。一次損傷ならびに二次損傷の誘導により、神経細胞やグリア細胞の細胞死により神経回路が破綻する。
- ii) 亜急性期（SCI 後 2～4 日）：継続的な浮腫、血管の血栓により、さらなる虚血が起こる。持続的な炎症細胞の浸潤により、細胞死がさらに進行する。加えて、アストロサイトが増殖し、細胞外マトリックス分子を周囲に沈着させる。
- iii) 中間期（SCI 後 1～2 週間）：アストロサイトの増殖と細胞外マトリックス分子の沈着が続き、グリア瘢痕が成熟へ向かう。
- iv) 慢性期（SCI 後 2～3 週間）：軸索は引き続き変性し、グリア瘢痕は成熟して強力な軸索再生の阻害要因となる（Kjell J. et al. 2016; Ahuja C. S. et al. 2017）。

1.3. 犬における SCI の病態メカニズム

犬における SCI の原因で最も多い脊髄疾患は、Hansen I 型の椎間板ヘルニア（Intervertebral disc extrusion : IVDE）である（Moore S. A. et al. 2018）。IVDE は

変性した髄核の脱出によって脊髄の圧迫と挫傷を引き起こす (Jeffery N. D. et al. 2013)。IVDE は胸腰部脊椎に好発するため (Olby N. et al. 2003; Moore S. A. et al. 2018)、圧迫と挫傷による脊髄白質の軸索の断裂と脱髄により神経回路を破綻させて、胸腰部 SCI を引き起こす。齧歯類で実験的に再現した SCI とは異なり、犬では、脊髄疾患によって SCI が「自然発生」する。そのため、犬の IVDE による SCI は、齧歯類 SCI モデルよりも人の外傷性 SCI に類似した病態を示すと考えられており、齧歯類 SCI モデルを用いた SCI 治療の研究で得られた知見を、人の外傷性 SCI の臨床試験に応用する前の「臨床モデル」になると考えられている (Jeffery N. D. et al. 2005; Granger N. et al. 2012)。

犬における SCI も、人や齧歯類と同様に、一次損傷とそれに続く二次損傷の病態をとる。一次損傷後の SCI 急性期には、出血、軸索のスフェロイド形成、グリア細胞の膨潤、脊髄白質の浮腫、軸索の脱髄が観察される (Griffiths I. R. 1978; Smith P. M. & Jeffery N. D. 2006)。最終的に壊死や脊髄実質内の空洞形成、グリア性瘢痕の形成に至る (Alisauskaite N. et al. 2017)。犬の場合、グリア瘢痕の成熟にかかる正確な時間は不明であるが、実験的な犬の脊髄挫傷モデルでは、SCI 後 1～4 週間には損傷組織の HE 染色にてグリオシスが認められ (Hu R. et al. 2010; Nakamoto Y. et al. 2021)、SCI 後 12 週間にはグリア線維性酸性タンパク質の抗体を用いた免疫染色にて重度のアストログリオシス (反応性アストロサイト増殖) が認められている (Liu C. B. et al. 2019)。

1.4. 人や犬の SCI 症例に対する現在の治療

現在、人医療および獣医療においても、重度 SCI 症例に対する有効な治療法はまだ確立されていない。人における損傷後の緊急措置として、脊髄の圧迫や炎症性の浮腫による損傷部組織の虚血状態を解消することを目的とした損傷後早期

(24 時間以内) の圧迫物質除去による減圧手術 (Lenahan B. et al. 2010) や、損傷部の血液灌流量を保持するための昇圧剤投与や輸液療法による平均血圧の上昇と維持 (85~90mmHg 以上を損傷後 7 日間) (Wilson J. R. et al. 2013)、メチルプレドニゾロン (Methylprednisolone sodium succinate : MPSS) や顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-colony stimulating factor : G-CSF)、ポリエチレングリコール (Polyethylene glycol : PEG) などの投与による抗炎症及び神経細胞の保護 (Bracken M. B. et al. 2012; Zhang Y. et al. 2020) などが報告されているが、いずれも破綻した脊髄の神経回路を治癒するには至っていない。犬においても、主に IVDE に起因する SCI 症例において、重度な SCI 症状の発症後 48 時間以内の脊髄圧迫物質除去による減圧手術や、MPSS や PEG の投与が報告されているが、減圧手術までの時間と MPSS や PEG の投与が機能回復に影響するかは議論がなされている (Jeffery N. D. et al. 2016; Olby N. J. et al. 2016)。近年、犬の IVDE 症例において、SCI 後の脊髄浮腫による硬膜内圧の上昇によって引き起こされる脊髄血液灌流低下の改善を目的として、圧迫物質除去と広範囲の硬膜切開による外科的処置が報告されており、予後の改善が期待されている (Jeffery N. D. et al. 2020; Takahashi F. et al. 2020)。

1.5. SCI に対する再生医療

前述の通り、SCI 後の破綻した神経回路はグリア瘢痕の形成によりその再生は抑制され、また有用な治療法が確立していないことから神経回路の破綻は永続的に継続し、結果、機能障害も持続する (Silver J. & Miller J. H. 2004)。したがって、軸索の再生、SCI 後のグリア瘢痕、神経保護と栄養因子の供給、消失した細胞成分の補填が、SCI に対する再生医療で解決すべき課題となっている。これらの課題に対して、コンドロイチナーゼ ABC (Chondroitinase ABC : ChABC) や抗

Nogo 抗体、Rho キナーゼ阻害薬などの薬剤投与や、シュワン細胞や嗅神経鞘細胞 (Olfactory ensheathing cells : OECs)、間葉系幹細胞、神経幹・前駆細胞、胚性幹細胞、人工多機能性幹細胞などの細胞移植の研究が行われている (Ahuja C. S. et al. 2017b; Assinck P. et al. 2017)。

2. 犬の胸腰部椎間板ヘルニア

2.1. 胸腰部椎間板ヘルニアと SCI

犬の胸腰部椎間板ヘルニアは最も一般的な脊髄疾患であり、第 12 胸椎から第 2 腰椎の間で好発する (Hansen H. J. et al. 1952; Aikawa T. et al. 2012)。椎間板ヘルニアは、変性した椎間板の髄核が断裂した線維輪から脊柱管に脱出する Hansen I 型 (IVDE) と、突出した線維輪が脊髄を圧迫する Hansen II 型 (Intervertebral disc protrusion: IVDP) とに分類される (Hansen H. J. 1952; Jeffery N. D. et al. 2013)。IVDE は若齢から中年齢の軟骨異栄養犬種での発生が多く、IVDP は高齢の非軟骨異栄養犬種での発生が多い傾向にある (Bray J. P. et al. 1998)。IVDE に罹患した犬では、急速に脱出した髄核により脊髄が挫傷および圧迫されることで、急性かつ重度の SCI を引き起こすことが多い (Hansen H. J. 1952; Jeffery N. D. et al. 2006, Jeffery N. D. et al. 2013)。一方、IVDP に罹患した犬では、慢性進行性に線維輪が膨隆することで徐々に脊髄を圧迫することで神経機能不全の原因となる (Hansen H. J. 1952; Jeffery N. D. et al. 2013; Crawford A. H. & De Decker S. 2017)。こうした発生機序の違いから、IVDE (特に胸腰部 IVDE) は犬における SCI のおもな原因となっており、IVDE と SCI は関連づけて研究されている (Moore S. A. et al. 2018; Lewis M. J. et al. 2020; Spitzbarth I. et al. 2020)。

2.2. 胸腰部 IVDE の症状と重症度分類

前述した通り IVDE に罹患した犬では急性発症の症状を呈することが多く、胸腰部 IVDE に罹患した犬では、背部痛のみの軽度な症状を呈する場合や、後肢 (完全) 麻痺のように重度な神経症状を呈することもあり、その症状は多岐にわたる。治療法の選択や予後判定のために、IVDE に罹患した犬は、その症状によって一般的に 5 段階の重症度に分類されている (Penning V. et al. 2006, Aikawa T. et al.

2012; Henk D et al. 2013)。

- Grade 1 : 背部痛 (背部知覚過敏)
- Grade 2 : 起立ならびに歩行可能な後肢不全麻痺
- Grade 3 : 起立ならびに歩行不能な後肢不全麻痺
- Grade 4 : 後肢の (完全) 麻痺。深部痛覚*は残存

* 深部痛覚 (Deep pain perception : DPP) とは指端や骨の圧迫により生じる痛覚

- Grade 5 : 後肢 (完全) 麻痺。深部痛覚の消失

この重症度分類は、脊髄白質における SCI と相関があることが報告されており、Grade 5 の犬においては重度 SCI を生じている可能性が考えられている (Henk D. et al. 2013)。胸腰部 IVDD に罹患し、Grade 3 よりも重度の症例 (起立/歩行不能な症例) においては、一般的に外科療法 (減圧術ならびに圧迫物質の除去) が行われる (Moore A. et al. 2016)。外科療法により Grade 3 ならびに Grade 4 の 90% 以上の症例で後肢運動機能が回復し、起立/歩行が可能となる (Langerhuus L. & Miles J. 2017)。しかし、Grade 5 の症例に関しては、外科療法を実施しても約 30 ~50%の症例において運動機能の回復は認められない (Langerhuus L. & Miles J. 2017)。

2.3. 予後不良の症例に対する脊髄再生療法の検討

前述のように Grade 5 の症例においては従来の外科療法により神経機能の回復を認めない予後不良の症例が比較的多く存在するため、これらの症例では胸腰部 IVDE により重度 SCI を生じていると考えられている。また Grade 3 や Grade 4 の症例においても従来の外科療法により神経機能が回復しない場合があり、

Grade 5 の症例と同様、これらの症例においては IVDE に起因した重度 SCI を生じていると考えられる。現在の獣医療では重度 SCI を生じた犬に対する有効な治療はなく、車いすでの生活や随意排泄ができないことから膀胱炎や皮膚炎（尿やけによる）を併発するなど生活の質が低下する。また家族のサポートも必要となり、家族の生活の質も低下する可能性がある。したがって、重度 SCI を生じた犬に対しては、これらの神経機能回復のために脊髄再生医療が必要だと考えられる。

2.4. 胸腰部 IVDE の犬の予後判定因子

2.4.1. シグナルメントならびに重症度による予後判定

胸腰部 IVDE に罹患した犬において、現在の獣医療で最も汎用されている予後判定因子は DPP の有無である。つまり、術前に DPP を消失している犬 (Grade 5) では、後肢の神経機能が回復しない可能性がある（～50%程度）(Olby N. et al. 2003; Ito D. et al. 2005; Aikawa T. et al. 2012; Jeffery N. D. et al. 2016)。過去の報告では、胸腰部 IVDE 発症から歩行不能までの時間 (Scott H. W. & McKee W. M. 1999) や胸腰部 IVDE から手術までの時間 (Scott H. W. & McKee W. M. 1999; Loughin C. A. et al. 2005) が予後に影響を及ぼすことが示されているが、現在はこれらの因子は予後に影響がないと考えられている。

2.4.2. 画像診断による予後判定

DPP を消失した胸腰部 IVDE の犬の脊髄造影 X 線画像において、重度の脊髄浮腫を疑う所見がある場合 (Duval J. et al. 1996) や脊髄軟化症を疑う所見がある場合 (Lu D. et al. 2002) は、予後不良であると考えられている。ただし、脊髄造影 X 線検査は症例への侵襲性があることや手技的に難易度があることから実施

できる施設は限られ、また MRI とは異なり脊髄実質の評価が困難である。近年、MRI 所見により胸腰部 IVDE の犬の予後判定について報告されている (Ito D. et al. 2005; Levine J. M. et al. 2009)。MRI 検査により脊髄実質内の評価を実施することができ、広範囲に脊髄実質内に炎症/浮腫や出血を疑う所見がある場合は予後不良であると考えられている。しかし、磁場の強さや MRI の機器によって所見が異なることが報告されている (Wang-Leandro A. et al. 2017)。

2.4.3. 術中所見ならびに術後経過による予後判定

手術中の肉眼的所見により脊髄実質内の出血や脊髄軟化が認められた場合、神経機能学的に予後不良と考えられている (Jeffery N. D. et al. 2020; Takahashi F. et al. 2020)。また Grade 5 の症例において術後に起立・歩行が回復した予後良好の犬では、術後 3 ヶ月以内に後肢の運動機能の回復が認められたと報告されている (Olby N. et al. 2003)。ただし、これらの予後判定因子は術前に評価することができない問題点がある。

2.5. 脊髄再生医療の適応症例選択に関する課題

前述したように IVDE により重度 SCI を生じた場合、その神経機能障害は永続的であるため脊髄再生医療の対象となる。しかし、現在、IVDE に罹患した重症な犬 (特に Grade 5) において決定的な予後判定方法がないため、早期にその症例を選択することができない。現状では、外科療法後 3 ヶ月の時点で神経機能の回復が認められない症例、もしくは回復が不完全な症例に対して脊髄再生医療を検討することになる。この期間は、犬の SCI の病期にあてはめると慢性期 SCI の症例が脊髄再生医療の対象となることを意味している。仮に IVDE に起因する重度 SCI の予後判定を急性期に行うことが可能となれば、より効果的な脊髄再生

医療を実施できる可能性がある。前述したように慢性期にはグリア瘢痕が形成されることにより、脊髄軸索の再生や細胞の遊走が抑制される。また齧歯類の急性期 SCI モデルに対して脊髄再生を試みた多くの研究において、その効果が報告されている (Fehlings M. G. & Vawda R. 2010; Assinck P. et al. 2017; Reshamwala R. et al. 2019)。

3. 嗅神経鞘細胞 (Olfactory ensheathing cells : OECs) と脊髄再生医療

3.1. OECs と嗅神経の再生

OECs は嗅粘膜の粘膜固有層や嗅球の嗅神経層に存在するグリア細胞の一種である。哺乳類において嗅神経は生涯を通じて生理的に再生を繰り返しており、OECs は嗅神経の軸索伸展を支持している (Mackay-Sim A. & Kittel P. 1991; Chuah M. I. & West A. K. 2002; Moreno-Flores M. T. et al. 2002; Field P. M. et al. 2003; Skinner A. P. C. et al. 2004; Williams S. K. et al. 2004.)。健全な哺乳類の嗅粘膜において、嗅神経 (末梢神経) は基底膜細胞から分化されると考えられている。OECs は軸索伸展因子を放出することで、成長した嗅神経の軸索を嗅粘膜から嗅球へと誘導する (Li Y. et al. 2005; Raisman G. & Li Y. 2007)。さらに OECs は嗅球の糸球体層 (中枢神経) へと遊走し、アストロサイトと相互作用することによって、嗅神経 (末梢神経) の軸索が中枢神経内でシナプス形成することを助けている。OECs が嗅神経の軸索伸展を支持する分子メカニズムについての詳細は完全には解明されていないが、OECs は軸索伸展因子として L1、E-NCAM、ラミニン、フィブロネクチン、IV 型コラーゲンやアミロイド前駆体タンパク質などの膜結合型および分泌型の接着分子を発現し (Franceschini I. A. & Barnett S. C. 1996; Moreno-Flores, 2003; Gómez R. M. et al. 2017)、また、ニューロトロフィン などの栄養因子を分泌して (Kafitz K. W. & Greer C. A. 1999)、嗅神経の軸索の再生や伸展を支持している。

OECs が有する i) 軸索伸展因子の放出、ii) アストロサイトとの相互作用、そして iii) 髄鞘の形成 (Imaizumu T. et al. 2000; Sasaki M. et al. 2004; Sasaki M. et al. 2007) というこれらの特徴から、OECs は SCI に対する再生医療のための移植細胞として有力視されている。

3.2. 齧歯類における OECs の研究

3.2.1. OECs の初代培養と純化培養

齧歯類における SCI モデルに対して、損傷した脊髄実質内に OECs を移植することで組織学的に軸索や髄鞘が再生し、この再生に伴い神経機能が回復することが報告されている (López-Vales R. et al. 2007; Coutts D. J. et al. 2013)。移植に必要な OECs は嗅粘膜あるいは嗅球から初代培養することができるが、OECs 以外の線維芽細胞やグリア細胞 (嗅球の場合) などの細胞が混入している (純度: ~50%) (Jani H. R. & Raisman G. 2004)。これらの混入細胞を除外し、OECs 純化培養をするために Immunopanning 法や磁気抗体ビーズ、フローサイトメトリーを用いた方法が報告されている (純度: 71~95%) (Lopez-Vales R. et al. 2006; Lakatos A. et al. 2003; Rizek, P. N. et al. 2006)。また、齧歯類における別の純化培養法では、OECs の細胞接着性が他の混入細胞より乏しいという性質を利用した方法が報告されている (純度: 73~93%) (Nash H.H. et al. 2001; Georgiou N. et al. 2018)。これは混入細胞がフラスコの培養面に接着した時に、培養液中に浮遊している未接着の OECs を回収し、新たなフラスコで培養することで、OECs の割合を向上させる培養方法である。

3.2.2. 胸腰部 SCI モデルに対する OECs 移植による脊髄再生とその成果

嗅球由来 OECs は嗅粘膜由来 OECs よりも *in vivo* で軸索伸展や再髄鞘化を促す傾向にあることが報告されている (Richter M. W. et al. 2005; Paviot A. et al. 2011; Mayeur A. et al. 2013) が、それらの再生能は OECs の精製具合にの影響を受ける (Lakatos A. et al. 2003; Mayeur A. et al. 2013)。嗅球由来 OECs と線維芽細胞を 50 : 50 の割合で組み合わせた混合物を移植した際には、高純度 (97%以上) の嗅球由来 OEC の移植と比べて、グリア瘢痕内へ伸展した軸索が少ないと報告され

ている (Toft A. et al. 2013)。一方で、嗅球由来 OECs と線維芽細胞を 70 : 30 で組み合わせた混合物を移植した際には、50 : 50 の混合物や高純度 (94%) の嗅球由来 OECs よりも多くの再髄鞘化された軸索が認められている (Lakatos A. et al. 2003)。嗅粘膜由来 OECs に関して、線維芽細胞との割合と神経再生能の関係を検討した報告はなく、移植に適した割合は不明である。しかし、純化していない嗅粘膜由来 OECs においても軸索の伸展の誘導が認められることから (Mayeur A. et al. 2013)、嗅粘膜由来 OECs においても線維芽細胞細胞との共移植に純化した OECs よりも神経生性能をもつ可能性がある。

嗅球または嗅粘膜から培養した齧歯類の OECs を、様々な齧歯類 SCI モデルの損傷急性期 (Ramon-Cueto A. et al. 2000; Lu J. et al. 2001; García-Alías G. et al. 2004) または慢性期 (López-Vales R. et al. 2006; López-Vales R. et al. 2007) に投与して、OEC 移植による脊髄の軸索再生と再髄鞘化が認められ、歩行や把持といった運動機能の改善が報告されている。

3.3. 犬における OECs の研究

3.3.1. OECs の初代培養と純化培養

齧歯類と同様に犬の OECs は嗅球と嗅粘膜に存在し、どちらの組織からも OECs の初代培養が可能であることが報告されている (Smith P. M. et al. 2002; Skinner A.P.C. et al. 2005; Ito D. et al. 2006)。齧歯類の SCI モデルに対する OECs 移植による再生医療の検討から換算すると、犬の SCI 症例に対して OECs 移植を考慮した場合、OECs の割合は 70%程度、細胞数は 5×10^6 /head 程度が理想的だと考えられている (Lakatos A. et al., 2003, Jeffery N. D. et al. 2005)。犬の嗅球由来 OECs の初代培養では、OECs の割合は 75%程度、細胞数は 30×10^6 の OECs を得ることができるため OECs 初代培養の材料として理想的であるものの、犬の臨

床例において嗅球摘出後に合併症としててんかん発作（10%）を生じたり、摘出時の侵襲性（開頭術）が必要であったりと簡便性に欠ける。一方、嗅粘膜は鼻腔内視鏡やキーホールアプローチ法（小さな骨窓を開ける方法）などにより、嗅球採取と比較すると侵襲性が低い方法で採取できることが報告されているため、臨床応用を考慮する場合には理想的である（Ito D. et al. 2019）。しかし、嗅粘膜由来 OECs の初代培養では、培養期間の経過とともに混入細胞（主に線維芽細胞）の割合が増加し、全細胞あたりの OECs の割合が低下することが報告されている（培養 7 日目：約 40%、培養 21 日目：約 25%）（Ito D. et al. 2006）。したがって、嗅粘膜由来 OECs を移植材料として臨床応用するためには純化培養が必須となる。しかし、齧歯類で実施されている Immunopanning 法などの免疫標識による OECs の純化培養法は、移植対象に有害な免疫有害反応を誘発する可能性があり、臨床的に用いるには不適切だと考えられる。線維芽細胞の増殖を抑制し、嗅粘膜由来 OECs を純化するために、血清非含有培地での培養を組み合わせた方法が開発され、OECs の割合を向上させ、移植に必要な細胞数を得ることに成功している（約 80%、細胞数： 7.2×10^6 ）（Ito D. et al. 2008）。しかし、後の報告では、この培養方法においても、OECs の割合にばらつき（平均：70%、範囲：10%未満～95%以上）が生じることが報告されている（Ito D. et al. 2019）。さらに近年、齧歯類と同様に細胞接着性の違いを利用した方法が報告されているが、OECs の割合にばらつき（おおよそ 10%未満～90%以上）が認められている（Granger N. et al. 2012）。

3.3.2. 犬の自然発症 SCI 症例に対する OECs 移植の臨床応用とその成果

犬の胸腰部 SCI に対する嗅球由来 OECs または嗅粘膜由来 OECs の自家移植の臨床研究が既に行われている（Jeffery N. D. et al. 2005; Granger N. et al. 2012）。嗅

球由来 OECs の移植を行った報告では、約 10%の犬で嗅球採取後の合併症としててんかん発作が認められたが、嗅球採取時、OECs 移植時ならびに移植後に関連するその他の有害事象は認められなかった。この臨床研究では 5.0×10^6 /head の細胞（うち嗅球由来 OECs の割合：72%）が移植された。移植後の機能回復については、症例ごとにばらつきはあるものの 9 頭中 8 頭で運動機能の改善が認められた。嗅粘膜由来 OECs 移植を行った臨床研究では、採取時の鼻出血を除いては、OECs 移植時ならびに移植後に関連するその他の有害事象は認められていない。この報告では平均 6.24×10^6 /head の細胞（うち嗅粘膜由来 OECs：49.4%）が移植され、移植後、前後肢の協調性が有意に改善している。なお、これまでに実施された OECs 自家移植治験においては、採取時の合併症を除き、安全性が担保されている。

3.3.3. 犬 OECs 移植に関する現状の問題点

前述のように、犬の SCI 症例に対し OECs 移植を考慮するうえで、OECs の割合は 70%程度、移植細胞数の総数は 5×10^6 程度が理想的であると考えられている。嗅球を OECs 初代培養の材料とした場合にはこの点は問題とならないが、臨床応用を考慮する場合、合併症のリスクや侵襲性を考慮すると理想的ではない。したがって嗅粘膜由来 OECs を移植材料として考慮することが理想であるが、既存の嗅粘膜由来 OECs 純化培養法では、その純度にばらつきがある。先の嗅粘膜由来 OECs の臨床研究の報告では、移植した OECs の割合は平均 49.4%であったが、症例ごとに OECs の割合は 10%未満～90%以上とかなりのばらつきが認められた。この報告においても、症例ごとの移植した OECs のばらつきを無くし、かつ理想の細胞割合に調整することで、より良い運動機能の改善が検出できた可能性がある。したがって、今後、OECs を犬の SCI 症例へ移植する際には、嗅粘膜

由来 OECs を安定して供給できる純化培養法の確立が必要であると考えられる。

4. コンドロイチナーゼ ABC (Chondroitinase ABC : ChABC) と脊髄再生医療

4.1. ChABC とグリア瘢痕の分解

ChABC は、グリア瘢痕の主要な構成要素であり、SCI 後の軸索再生の阻害因子である CSPG を分解することのできる酵素である (Karousou E. G. et al. 2004; James D. N. et al. 2015)。CSPG は、1 本以上の共有結合したコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカン (Chondroitin sulfate glycosaminoglycan : CS-GAG) 鎖を持つコアタンパク質からなり、軸索上の CS-GAG の受容体であるプロテインチロシンホスファターゼシグマ (Protein tyrosine phosphatase sigma : PTP σ) に作用することで軸索の成長を阻害する (Shen Y. et al. 2009; Fry E. J. et al. 2010)。ChABC は、CSPG のコアタンパク質から CS-GAG 鎖を分解・遊離させることで、軸索成長阻害の作用を減少させ、軸索の再成長を促すことが期待される (Bradbury E.J. & Carter L. M. 2011)。

4.2. 齧歯類における ChABC の研究

挫傷 SCI モデルラットの損傷部に ChABC を吸収させた止血用スポンジを留置したところ、SCI 病変部のグリア瘢痕の範囲が減少し、同時に投与部位に CSPG の分解産物が確認された。この事から ChABC がグリア瘢痕を形成する CSPG を分解し、グリア瘢痕を縮小化することが明らかになった (Lemons M. L. et al. 1999)。また、挫傷または切断 SCI モデルラットを用いた実験では、脊髄実質内への ChABC の投与後のグリア瘢痕の縮小及び CSPG の分解産物の出現の他、断裂した軸索の再伸展が確認され、同時に運動機能が回復する事が報告された (Iseda T. et al. 2008; Cheng C. H. et al. 2015)。この結果より、ChABC の SCI 部位への投与による脊髄機能の回復が期待されることとなった。

しかし、ChABC は生体の体温で 24~72 時間で急速に失活することも明らかに

なっている (Tester N. J. et al. 2007)。それゆえ、ChABC を持続的に SCI 部位に供給し、グリア瘢痕縮小化の効果を期待するためには、損傷部周辺にくも膜下カテーテル留置し、このカテーテルを通して ChABC を損傷部位に継続して投与するか、または、脊髄内に反復して ChABC を投与する必要がある (Tester N. J. et al. 2007; Lee H. et al. 2010)。しかしながら、これらの方法は脊髄への侵襲や感染のリスクが高く、実際の投与方法として、臨床的には適さないと考えられる (Lee H. et al. 2010; Bartus K. et al. 2014; Carwadine D. et al. 2016)。そのため、ChABC にトレハロースを添加して ChABC が温度に対して失活しにくくする対策を施し、脊髄への ChABC の投与回数を減らす方法や、レンチウイルスベクターを用いて OECs に ChABC 産生遺伝子の導入し、この細胞に ChABC を分泌させ、移植部位における ChABC の持続的な供給を目指す方法が研究されている (Carwadine D. et al. 2016; Carwadine D. et al. 2017)。

4.3. 犬における ChABC の研究

犬においては、慢性期の胸腰部 SCI の犬の脊髄内に熱耐性 ChABC を投与した臨床研究が近年報告され、ChABC を投与した犬は対照群に比べて前後肢の協調性が改善し、そのうち 10% で介助なしの歩行が可能となった (Hu H. Z. et al. 2018)。この結果から、犬の SCI 例においても、齧歯類と同様に ChABC を脊髄内へ投与することで脊髄機能が改善される可能性が示唆された。

一方、レンチウイルスベクターを用いて ChABC 産生遺伝子を導入した犬 OECs (ChABC-OECs) が開発された (Carwasine D. et al. 2016)。ChABC-OECs は細胞自体が ChABC を分泌するため、この細胞が移植した部位で生存する間、持続的に移植部位に ChABC を供給することができる。同時に、OECs 自身の特性である損傷した軸索に対する再生の誘導も期待できる。現在までのところ、すでに、

この ChABC-OECs を急性期の頸部挫滅 SCI ラットへ移植した研究が報告されている。その結果、移植部位でのグリア瘢痕の縮小化、CSPG の分解産物の確認、さらに、OECs 移植したラットの脊髄よりも多くの軸索の再生が報告されている (Carwasine D. et al. 2017)。

5. 犬の自然発症 SCI 症例に対する OECs ならびに ChABC による脊髄再生医療の問題点と本研究の目的

5.1. 症例選択

現在までのところ、SCI 症例に対して OECs を移植した研究において、齧歯類ほどには、犬では軸索の再生や運動機能の回復が認められていない (Granger N. et al. 2012)。これは、齧歯類では急性期または亜急性期の SCI モデルに OECs を移植し軸索の再生や運動機能の回復に良好な結果が得られているのに対し (Reshamwala R. et al. 2019)、犬では、動物倫理の観点から、移植の対象となる症例が確実に予後不良であると判断された犬に限定されていたために、発症から移植適応と判断されるまで長期の経過観察が必要で、移植時期が SCI の慢性期となっていたことが一因と考えられる。この問題を解決するためには、SCI 後早期に予後が不良であるか否かを予測することが必要となる。今までに、MRI の T2 強調画像上の脊髄高信号の有無及びその長さや、X 線脊髄造影画像上でのくも膜下腔狭小化の長さなどから、犬の IVDE の予後の予測が可能であるとの報告がなされているが、それぞれ、感度及び特異度、ならびにそれぞれの問題点を考慮すると十分なものとは言えない。そこで本研究の第 1 章では、犬の SCI の原因として最も一般的な疾患である胸腰部 IVDE の症例における早期の予後判定法としての Heavily T2 強調画像の有用性について検討を行なった。

5.2. OEC の純化培養法の再検討

犬の SCI 症例へ OECs を自家移植する場合、自己の嗅粘膜から純化培養された OECs を用いる。しかし、過去に報告されている嗅粘膜からの OECs 培養法では、採取される OECs の割合にばらつきが生じ、症例によっては移植時に必要と考えられている細胞数を確保することができない場合があることが確認されている。

そこで第2章では、移植時に移植に必要な OECs 数を確実に供給できるように、培養によって採取される OECs の割合のばらつきを抑えることを目的として、新たな犬嗅粘膜由来 OECs の純化培養法の検討を行なった。

5.3. 慢性期の胸腰部脊髄挫傷モデルラットに対する犬 ChABC-OECs 移植による運動機能回復に関する検討

過去の報告で、急性期の頸髄挫滅 SCI モデルラットへ ChABC-OECs を移植したところ、CSPG の分解及び軸索の再生が確認された。しかし、慢性期の SCI モデルラットへの ChABC-OECs 移植は未だ、行われておらず、ChABC-OECs 移植による効果は不明である。犬の SCI 臨床例に対して ChABC-OECs を移植する時期は、現在のところ、慢性期の SCI と考えられるため、慢性期の SCI モデルラットに対する ChABC-OECs の移植効果を明らかにすることは重要である。そこで第3章では、慢性期の胸腰部脊髄挫傷 SCI モデルラットに ChABC-OECs を移植し、その後の運動機能の回復の有無について検討した。

第 1 章

磁気共鳴 Heavily T2 強調画像を用いた
胸腰部椎間板ヘルニア罹患犬の予後判定

1.1. 序論

胸腰部椎間板ヘルニアは犬で最も一般的な脊髄疾患の一つであり、Hansen I 型と呼ばれる、変性した椎間板髄核の脊髄側への脱出（Intervertebral disc extrusion : IVDE）による脊髄の挫傷と圧迫は、犬の SCI の最も主要な原因となっている（Smith P. M. & Jeffery N. D. 2006; Jeffery N. D. et al. 2013; Moore S. A. et al. 2018）。胸腰部 IVDE の症状は、背部痛のような軽度なものから 後肢の深部痛覚（Deep pain perception : DPP）の消失を伴う完全麻痺といった重度なものまで多岐に渡ることが（Penning V. et al. 2006; Henke D. et al. 2013）、重症度の高い症例はより重篤な脊髄白質への組織的損傷を持つことが明らかになっている（Henke D. et al. 2013）。加えて、重症度の最も高い症例（すなわち後肢の DPP 消失を伴う完全麻痺の症例）では、減圧術などの既存の外科的な治療を行っても、約 30-50%の症例で運動機能の回復が認められない（Langerhuus L. & Miles J. 2017）。これらの予後不良症例では再生医療による治療が期待されるが、過去の齧歯類を用いた細胞移植の研究では、急性期または亜急性期に移植を施した報告で成績が良いとされている（序章参照）。現在、犬の IVDE 症例では予後不良を確定するためには、外科治療後 3 カ月の観察が必要とされているため、慢性期 SCI の症例が移植対象となっている。慢性期 SCI の臨床例に細胞移植を施した報告では、運動機能の回復は限定的であった（Granger N. et al. 2012）。もし、早期に予後の判定ができれば、SCI 後早期の細胞移植によって、機能回復の成績が改善する可能性がある。

近年、磁気共鳴画像（Magnetic Resonance Image : MRI）や脊髄造影 X 線画像の所見を利用した予後予測の方法が報告されている（De Risio L. et al. 2009; Duval J. et al. 1996; Ito D. et al. 2005; Levine J. M. et al. 2009）。IVDE による髄内出血、浮腫、炎症、壊死による脊髄の腫脹は、T2 強調（T2W）MRI では脊髄実質内高信

号として (Ito D. et al. 2005; Levine J. M. et al. 2009)、脊髄造影 X 線画像ではなくも膜下造影ラインの減衰として認識され (Duval J. et al. 1996)、予後不良と関連していることがわかっている。正中矢状断 MRI での脊髄実質内 T2W 高信号領域、または脊髄造影 X 線画像でのくも膜下造影減衰が、それぞれ第 2 腰椎椎体 (L2) の長さの 3 倍または 5 倍以上ある犬は、予後不良と関連していた (Duval J. et al. 1996; Ito D. et al. 2005)。一方で、MRI で脊髄実質内 T2W 高信号領域が限られた範囲 (L2 の長さ未満) で認められた症例、または脊髄実質内 T2W 高信号領域がない症例は、外科的減圧術後の予後が良好であった (Ito D. et al. 2005)。また、胸腰部 IVDE の犬では、脊髄実質内 T2W 高信号領域の有無とその長さが神経学的重症度と関連することが報告されている (Boekhoff T. M. et al. 2012; Ito D. et al. 2005)。しかし、脊髄造影 X 線検査での予後予測においては、感度 (74%) と特異度 (61%) が決して高くはなく (Duval J. et al. 1996)、また、造影剤投与時に侵襲を伴い、10-20%の症例で検査後に発作を起こすリスクがあり (Lewis D. D. & Hosgood G, 1992; Barone G. et al. 2002)、致死的な脳くも膜下出血を起こした症例の報告もなされている (Packer R. et al. 2007)。一方で、脊髄実質内 T2W 高信号による予後予測では、その高信号の描出感度が撮影に用いる MRI 機器の磁場強度によって異なることが報告されている (Wang-Lwandro A. et al. 2017)。したがって、現在のところ、画一した予後判定の方法はなく、新たな予後判定の方法が必要である。

そこで、我々は、MRI の一つである Heavily T2W 画像に着目した。シングルスライスの Heavily T2W MRI を用いた画像診断では、造影剤を使わずにくも膜下腔の解剖学的情報を得ることができる (Nagayama M. et al. 2002)。Heavily T2W シーケンスでは、エコータイム (TE) が大幅に長くなるため、T2 の短い分子 [脳

脊髄液（Cerebrospinal fluid : CSF）などの水を除く体内のほぼすべての組織] からの横方向の磁化がほぼ完全に失われ、信号がない状態になる。水は T2 緩和時間が長いため、横方向の磁化のほとんどを保持することが可能で、引き続き高信号として描出される (Duncan S. M. & Amrhein T. J. 2012)。そのため、いわゆる”MR ミエログラフィー”画像では、くも膜下腔の CSF が高信号で“白く”写り、背景（脂肪、骨、傍脊椎軟部組織）の信号は抑制される。人の研究では、シングルスライス MR ミエログラフィーは、1 枚の厚いスライス（約 50 mm）を用いて行われ (Agarwal A. et al. 2012; Nagayama M. et al. 2002)、後処理を必要とせず、背景信号の抑制に優れた画像が得られる。また、シングルスライス MR ミエログラフィー画像は 30 秒という短時間で取得できるため、人の脊椎のルーティーン MRI 検査に容易に追加することができる (Agarwal A. et al. 2012; Nagayama M. et al. 2002)。IVDE、進行性脊髄軟化症 (Progressive myelomalacia : PM)、脊髄腫瘍、くも膜憩室、髄膜炎などの脊髄疾患を有する犬では (Gilmour L. J. et al. 2017, Guillem Gallac R. et al. 2011; Ito D. et al. 2020; Mankin J. M. et al. 2012; Pease A. et al. 2006; Seilar G. S. et al. 2012)、本シーケンスの利用が報告されている。IVDE の犬では、Heavily T2W 矢状画像を用いて、脱出椎間板物質による硬膜外圧迫によって生じる CSF 信号の減衰を確認することで、臨床的に重要な病変部位を特定することができる (Guillem Gallac R. et al. 2011; Mankin J. M. et al. 2012)。他の 2 つの研究では、胸腰部 IVDE と PM を併発した犬は、PM を伴わない犬と比較して、Heavily T2W 画像における CSF 信号の減衰がより広範囲に及ぶことが示されている (Castel A. et al. 2017; Gilmour L. J. et al. 2017)。しかし、胸腰部 IVDE の犬において、Heavily T2W 画像での CSF 信号の減衰が神経学的重症度や外科的減圧術後の予後と関連するかどうか、また、減衰の根本的なメカニズム（硬膜外物質のみによる圧迫、または脊髄の腫脹による圧迫）を評価した先行研究はない。

そこで私は、PM の症例で認められるように (Gilmour L. J. et al. 2017)、T2W 画像で広範囲の脊髄実質高信号を有する DPP を持たない犬では、Heavily T2W 画像での CSF 信号の減衰の長さが長くなると仮定した。T2W 高信号の所見は、椎間板物質の脱出による脊髄挫傷後の脊髄腫脹を示している可能性があり、広範囲の脊髄腫脹の存在は、くも膜下腔を狭め、Heavily T2W 画像における CSF 信号の減衰をもたらす可能性がある。一方で、T2W 画像において脊髄実質内高信号領域がない、または限局している犬では、Heavily T2W 画像での CSF 信号の減衰は局所的であり、脱出した椎間板物質による硬膜外の脊髄圧迫が原因であると考えられる。

髄膜炎の犬では、CSF 中のタンパク質濃度の上昇や細胞数の増加、またはその両方が起こることにより、Heavily T2W 画像において、脊髄くも膜下腔の CSF 信号が減衰することが報告されている (Pease A. et al. 2006)。したがって、胸腰部 IVDE の犬、特に T2W 画像で広範囲の脊髄実質内高信号が認められる犬において CSF 組成に変化があった場合は、この CSF 組成の変化が Heavily T2W 画像上の CSF 信号の減衰に影響を与え、その結果、脊髄実質内で T2W 高信号を呈する領域と Heavily T2W 画像にて CSF 信号が減衰する領域とにズレが生じる可能性がある。

本章では、Heavily T2W 画像における CSF 信号の減衰の長さが、i) 脊髄実質内の T2W 高信号領域の長さ、ii) 脊柱管内の硬膜外圧迫物質 (Extradural compression materials : ECM) による脊髄の圧迫の程度、iii) 神経学的重症度と相関するかを調べた。加えて、脊髄実質内に T2W 高信号領域を有する犬では、iv)

T2W 高信号領域の位置と Heavily T2W 画像における CSF 信号の減衰領域の位置が各症例で一致するかを評価した。さらに、v) Heavily T2W 画像における CSF 信号の減衰の長さが、減圧手術後の予後と関連するかを評価した。

1.2. 材料・方法

1.2.1. 動物

2011年1月から2019年12月までの間、自立歩行不能な後肢不全麻痺または後肢完全麻痺を呈し、日本大学動物病院神経科にて胸腰部IVDEと診断され、外科的治療を受けた犬の診療記録を再評価した。シグナルメントの他、術前の神経学的検査、術前MRI検査、外科的に摘出した組織の病理組織学検査、手術後6ヵ月以降の追跡調査のデータが得られた症例を本研究に組み入れた。術前MRI検査所見及び摘出した組織の病理組織学的所見に基づき、胸腰部IVDEと診断した。IVDEにPMを併発している犬の多くは予後不良である(Okada M. et al. 2010; Castel A. et al. 2017)ため、通常、外科手術の適応と見なされない。そのため、PM併発と診断された犬に関しては、手術実施の有無に関わらず本研究に組み入れた。PMと診断した基準は、過去に報告されている通り、L2椎体の長さの6倍以上の脊髄の脊髄実質内T2W高信号(Okada M. et al. 2010)、進行性の上行性および下行性の神経学的障害(例:筋反射、会陰反射、皮筋反射の消失/低下、前肢の姿勢反応の進行性消失、呼吸不全)が認められた場合、あるいは剖検時の脊髄病理組織学的検査より脊髄の軟化壊死所見が認められた場合とした。また、複数の病変および/または水和した髄核の脱出がある症例は本研究より除外した。

1.2.2. シグナルメント及び身体検査所見

犬種、性別、年齢、体重、神経学的検査所見、病変の解剖学的位置及び発症からMRI検査、MRI検査から手術及び発症から手術までに要した時間に関するデータを診療記録より記録した。本研究に組み入れた症例の術前の神経学的重症度はGrade分類の3から5に相当する(歩行不能の不全麻痺:Grade 3、DPPが

残存する完全麻痺：Grade 4、DPP 消失を伴う完全麻痺：Grade 5)。DPP の消失については、後肢の全ての指の骨または尾を鉗子で圧迫したときに、鳴く、頭を回す、噛むなどの行動や反応がないことと定義した。CSF の組成の変化が Heavily T2W 画像上の CSF 信号の減衰に影響するかを調査するために、CSF 検査結果が入手可能な場合は、CSF の色調、細胞数、比重、pH、タンパク質とグルコースの濃度及び血液の混入の有無を記録した。

1.2.3. 脊髄 MRI 検査

脊髄 MRI 検査は、1.5T の MRI 装置 (EXCELART Vantage、キャノンメディカルシステムズ株式会社、日本) と脊髄用表面コイル (CTL-array coil, キャノンメディカルシステムズ株式会社、日本) を用いて行った。MRI 検査中の犬の体位は背臥位であった。T2W 及び T1W の矢状断像及び横断像は次のパラメータで取得した。矢状断像 (反復時間 (TR) : 3500 [T2W] または 450 [T1W] msec、TE : 120 [T2W] または 15 [T1W] msec、FOV : 30-35cm × 25cm、マトリックス : 224 × 384、スライス厚 : 2 mm)、横断像 (TR : 4000-5000 [T2W] または 590-735 [T1W] msec、TE : 120 [T2W] または 15 [T1W] msec、FOV : 18 cm × 18 cm、マトリックス : 256 × 256、スライス厚 : 3 mm)。T2W 及び T1W の横断像は病変部位を中心に頭尾側方向に連続して撮影した。背側断 Heavily T2W 画像は 2 次元高速スピネコー (FASE : キャノンメディカルシステムズ株式会社のシーケンスのブランド名) シーケンスを用いて撮影した (他の MRI メーカーの同等のシーケンスのブランド名は補足情報を参照)。FASE の撮影パラメータは以下の通りである。TR : 6000 msec、TE : 1000 msec、スライス厚 : 50 mm、FOV : 30 cm × 30 cm、マトリックス : 512 × 512、撮像時間 : 約 50 秒。できるだけ長い距離の矢状断正中画像を取得するためには脊髄の位置を正確に把握する必要がある。それゆえ、こ

の背側断 Heavily T2W 画像を日本大学動物病院では脊髄 MRI 検査を受けるほぼ全ての犬で撮影している。

1.2.4. MRI の評価

解剖学的な病変部位の位置以外、患者の情報を知らされていない2名の神経科医と1名の放射線科医が、個々にすべての画像の評価を行った。画像の評価には市販の DICOM ビューア (OsiriX ver.24, Pixmeo, Switzerland) を用いた。評価者は、矢状断 T2W 画像を用いて L2 椎体、脊髄実質内 T2W 高信号及び ECM の頭尾側方向の長さ (以下、それぞれ、脊髄 T2W 高信号長または ECM 長) を、背側断 FASE 画像を用いて CSF 信号が減衰した長さ (CSF 信号減衰長) を、さらに、横断 T2W 画像を用いて ECM の面積 (ECM 面積) 及び脊柱管の面積を測定した。各測定者は各測定項目を1回ずつ測定し、3人の評価者が各々測定した値の平均値を統計に用いた。

脊髄 T2W 高信号の長さは以下の通りに測定した。矢状断 T2W 画像上、健常部位の脊髄と比較して脊髄実質内の信号が高信号を呈した範囲を脊髄 T2W 高信号長とした。脊髄 T2 高信号長は、最も頭側から最も尾側までの長さ (全体の脊髄 T2W 高信号)、病変中心 (脊髄が ECM によって最も圧迫された部位) から最も頭側または最も尾側までの長さ (それぞれ、頭側脊髄 T2W 高信号長、尾側脊髄 T2W 高信号長) を測定した。評価者が矢状断像上において脊髄実質内 T2W 高信号の有無を判断できない場合には、横断 T2W 画像を用いて脊髄実質内 T2W 高信号の有無を評価した。脊髄実質が T2W 高信号を呈していると判断された全ての横断像の中で、最も頭側に位置する断面と最も尾側に位置する断面の間の長さを正中矢状断 T2W 画像上で測定した。

IVDE の犬において脊髄実質が T2W 高信号を呈した場合、その長さが L2 椎体の長さ以上になると予後不良となり、逆に、脊髄内の T2W 高信号が L2 椎体の長さ以下に限局していた場合は予後が良好になる傾向にあるという報告がある (Boekhoff T. M. et al. 2012; Ito D. et al. 2005)。そこで、本研究では脊髄実質が T2W 高信号を呈した犬を、脊髄 T2W 高信号長の長さに応じて、以下の 2 つの群、広範囲高信号群 (脊髄 T2W 高信号長が L2 椎体長よりも長い) または限局高信号群 (脊髄 T2W 高信号長さが L2 椎体長以下である) のサブグループに分類した。脊髄実質内に T2W 高信号を認めない犬は無高信号群とした。評価者の 1 人でも脊髄実質内に T2W 高信号を認めないと判断した場合は、無高信号群に分類した。

ECM 長及び総、頭側及び尾側脊髄 T2W 高信号長は L2 椎体の長さに対する比率とし、統計解析に用いた (それぞれ、ECML:L2、T2W:L2、crT2W:L2、cdT2W:L2)。

病変部の連続した横断 T2W 像の中で、最も EMC によって脊髄が圧迫されている断面を用いて ECM 及び脊柱管の面積を測定した。統計解析には、ECM の面積を脊柱管の面積で除した ECM による脊柱管内占有率 (Occupancy ratio: OccR) を用いた。

FASE 画像上、CSF 信号が最も長く連続して減衰している箇所は頭側から尾側までの長さを総 CSF 信号減衰長として測定した (図 1)。FASE 画像では椎体や軟部組織の位置が確認できないため、病変中心 (最も EMC によって脊髄が圧迫されている箇所) を特定できない。そのため、DICOM ビューア上にて横断 T1W

像と背側断 FASE 画像をリンクさせて、FASE 画像上に病変中心を示し、総 CSF 減衰長のうち、病変中心から最頭側までの長さを頭側 CSF 信号減衰長と、また、病変中心から最尾側までの長さを尾側 CSF 信号減衰長とした。総、頭側及び尾側 CSF 信号減衰長は L2 椎体の長さに対する比率とし、統計解析に用いた（それぞれ、CSF:L2、crCSF:L2、cdCSF:L2）。

FASE 画像上で CSF 信号が減衰した部位と T2W 画像上で脊髓実質が高信号を呈した部位が一致しているかを評価するために、crCSF:L2 と crT2W:L2、または、cdCSF:L2 と cdT2W:L2 に差があるかを比較した。それぞれ、長さの差が 1 以下だった場合、FASE 画像上で CSF 信号が減衰した部位と T2W 画像上で脊髓実質が高信号を示した部位が「一致」と定義し、その差が 1 を超える場合は「不一致」と定義した。

1.2.5. 手術と予後

術者の判断により、小範囲片側椎弓切除術または片側椎弓切除術のいずれかが選択され実施された。予防的な椎間板開窓術に関しても、術者の判断で、必要とされた場合には実施された。

1.2.6. 予後

医療記録または飼い主からの聞き取りから、術後の経過を判断した。その結果、i) 10 歩以上介助なしで歩行可能となった、ii) 自発的に排尿・排便が可能となった、さらに、Grade 5 に分類された犬においては iii) DPP が回復した場合、「予後良好」と判断した。一方、先にあげた 3 つの項目のいずれかでも欠けた場合、または、PM と診断された場合は「予後不良」とした。

1.2.7. 統計解析

統計解析は、市販の統計ソフト（GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA）を用いて行った。全ての解析において、 $P < 0.05$ を統計学的に有意とした。

CSF 信号減衰長と脊髄 T2W 高信号長、ECM 長及び ECM 面積の間に相関が認められるかを検討するために、Spearman の順位相関係数を用いて、CSF:L2 と T2W:L2、CSF:L2 と ECML:L2 並びに CSF:L2 と OccR を比較した。この解析では、研究に組み入れられた全ての犬を対象とした解析の他、広範囲高信号群または限局高信号群の犬を対象とした解析を行った。

神経学的重症度、または、脊髄 T2W 高信号サブグループの違いにより CSF 信号減衰長と脊髄 T2W 高信号長が異なるかを検討するため、Kruskal-Wallis 検定を用いて、神経学的重症度 Grade 間、脊髄 T2W 高信号サブグループ間にて CSF:L2 および T2W:L2 を比較した。神経学的重症度 Grade 5 の犬の中で、PM と診断された犬の CSF 信号減衰長と脊髄 T2W 高信号長は、それ以外の犬よりも有意に長いことが過去に報告されている（Castel A. et al. 2017; Gilmour L. J. et al. 2017）。それゆえ、PM と診断された犬の CSF:L2 と T2W:L2 が Grade 5 全体の CSF:L2 と T2W:L2 を増加させる可能性がある。そこで、PM と診断された犬とそれ以外の犬の CSF:L2 と T2W:L2 を Mann-Whitney U 検定を用いて比較し、その結果、両者の間に有意な差が認められた場合、Grade 5 から PM と診断された犬を除外し、再度、神経学的重症度 Grade 間の CSF:L2 および T2W:L2 を比較した。

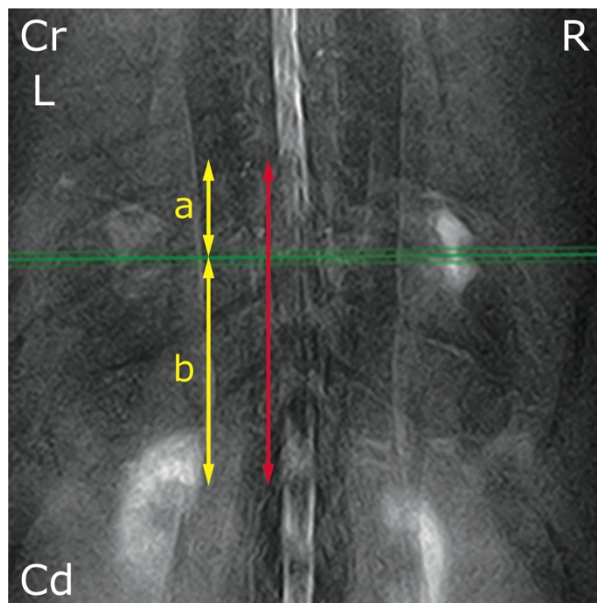


図 1 : 胸腰部 IVDE の犬の背側断 FASE 画像。緑線は、脊髄が最も圧迫されていた部位（病変中心）を示す。CSF 信号が減衰している部位の頭側から尾側までの長さ（総 CSF 信号減衰長、赤線）、頭側から病変中心までの長さ（頭側 CSF 信号減衰長、黄線 a）及び病変中心から尾側までの長さ（尾側 CSF 信号減衰長、黄線 b）を測定した。[L : 左、R : 右、Cr : 頭側、Cd : 尾側]

1.3. 結果

1.3.1. 動物

55頭の犬が本研究に組み入れられた。品種は、ミニチュア・ダックスフンドが48頭、トイ・プードルが2頭、ミニチュア・シュナウザー、ペキニーズ、シーズー、ビション・フリーゼ、ミニチュア・ダックスフンドとトイ・プードルの雑種犬が各1頭であった。性別は雄が37頭(内、去勢雄22頭)、雌が18頭(内、避妊雌12頭)であった。病変中心の解剖学的位置は第11-12胸椎間が3頭、第12-13胸椎間が9頭、第13胸椎-第1腰椎間が18頭、第1-2腰椎間が14頭、第2-3腰椎間が6頭、第3-4腰椎間が4頭、第4-5腰椎間が1頭であった。年齢は中央値9.3歳(4~15歳)、体重は中央値6.1kg(4.4~10kg)であった。発症からMRI検査まで、MRI検査から手術まで、発症から手術までの期間は、それぞれ、中央値8日(0~44日)、0日(0~12日)、9日(0~44日)であった。神経学的重症度は、Grade 3が9頭、Grade 4が33頭、Grade 5が13頭であった。Grade 5に分類された犬13頭中4頭がPMと診断され、このうち2頭には外科的治療は行わなかった。手術を受けた53頭中、51頭には小範囲片側椎弓切除術を、1頭には片側椎弓切除術を行った。残りの1頭は小範囲片側椎弓切除術と広範囲硬膜切開を組み合わせた術式で治療した。この症例は別の研究(Jeffery N. D. et al. 2020)に組み入れられているため、本研究には重症度に関連する評価にのみ組み入れ、予後に関連する評価からは除外した。予後に関しては、Grade 3のすべての犬、Grade 4の33頭中31頭、Grade 5の12頭中2頭で予後良好と判断された。症例の年齢や体重などのシグナルメントの他、発症からMRI、MRIから手術、または発症から手術までの時間、及び各測定値をGradeごとに表1にまとめた。CSF検査結果が得られたのは7頭で、その詳細を表2にまとめた。

表 1 : 神経学的重症度ごとのシグナルメンと数値データ

項目	Grade 3 (n = 9)		Grade 4 (n = 33)		Grade 5 (n = 13)	
	中央値(平均値)	範囲(最小値;最大値)	中央値(平均値)	範囲(最小値;最大値)	中央値(平均値)	範囲(最小値;最大値)
年齢	9.70 (9.75)	5.45 ; 12.86	9.88 (9.42)	4.16 ; 15.65	6.00 (7.37)	4.69 ; 13.4
体重 [kg]	5.76 (6.20)	4.80 ; 8.95	5.85 (6.40)	4.35 ; 10.5	6.60 (6.49)	5.06 ; 7.70
発症からMRI検査までの時間 [日数]	12.0 (15.6)	4 ; 44	9.00 (10.03)	0 ; 44	4.00 (7.15)	1 ; 31
MRI検査から手術までの時間 [日数]	0 (0.44)	0 ; 2	0 (0.70)	0 ; 10	2 (3.64)	0 ; 12
発症から手術までの時間 [日数]	12.0 (16.0)	4 ; 44	9.00 (10.73)	0 ; 44	7.00 (11.36)	1 ; 36
CSF:L2	1.92 (1.91)	0.64 ; 3.44	2.05 (2.27)	0.36 ; 6.41	5.75 (7.46)	2.38 ; 16.50
T2W:L2	0.66 (0.71)	0.45 ; 1.27	0.86 (1.49)	0.27 ; 6.36	4.25 (6.64)	0.83 ; 17.67
ECML:L2	0.42 (0.54)	0.26 ; 1.11	0.42 (0.51)	0.27 ; 1.24	0.42 (0.56)	0.24 ; 0.97
OccR [%]	44.0 (45.9)	16.7 ; 70.6	47.1 (44.1)	13.5 ; 74.0	60.0 (49.2)	6.84 ; 80.8

神経学的重症度分類 ; Grade 3 : 起立不能の不全麻痺、Grade 4 : 深部痛覚が残存する完全麻痺、Grade 5 : 深部痛覚の消失を伴う完全麻痺。CSF:L2 : FASE 画像での脳脊髄液信号消失域長の第 2 腰椎 (L2) 比、T2W:L2 : 脊髄 T2W 高信号長の L2 比 (脊髄 T2W 高信号を認めた 36 症例で算出 ; Grade 3 : n = 5、Grade 4 : n = 19、Grade 5 : n = 12)、ECML:L2 : 硬膜外圧迫物質の頭尾側方向の長さの L2 比、OccR : MR 横断面画像における硬膜外圧迫物質の脊柱管内占有率。MRI 検査から手術までの時間と発症から手術までの時間の Grade 5 のデータは、2 頭の Grade 5 の症例が外科的治療を受けていないため、11 頭の症例のデータから算出した。

表 2：脳脊髄液検査の結果が得られた 7 症例の画像所見と脳脊髄液検査の結果

症例	1	2	3	4	5	6	7
神経学的重症度	4	5	5	5	5	5	5
CSF:L2	6.41	2.38	4.77	4.81	16.44	5.03	16.50
T2W:L2	6.36	3.50	4.70	3.80	17.67	6.39	15.99
画像所見の一致/不一致	一致	不一致	一致	不一致	一致	不一致	一致
進行性脊髄軟化症の併発	無	無	無	無	有	有	有
脳脊髄液検査の結果							
色調	黄色透明	黄色透明	黄色透明	黄色透明	無色透明	黄色透明	黄色透明
有核細胞数 (/ μ L)	4	1	1	4	1	2	
パンディー試験	P	P	P	P	N	No data	
比重	1.010	1.010	1.009	1.016	1.006	No data	No data
pH	8	8	8	8	6	8	
タンパク質濃度 (mg/dl)	Over 100	Over 30	Over 1000	Over 300	Over 300	Over 300	
グルコース濃度 (mg/dl)	Over 250	Over 250	Over 250	Over 250	Over 250	Over 100	
ヘモグロビン/潜血	P/P	P/P	P/P	P/P	N/N	P/P	

神経学的重症度；Grade 4：深部痛覚が残存する完全麻痺、Grade 5：深部痛覚消失を伴う完全麻痺。CSF:L2：FASE 画像での脳脊髄液信号消失域長の第 2 腰椎 (L2) 比、T2W:L2：脊髄 T2W 高信号長の L2 比。画像所見の一致/不一致；FASE 画像で脳脊髄液信号が減衰した部位と脊髄 T2W 高信号の部位の一致と不一致。パンディー試験及びヘモグロビン/潜血；P：陽性、N：陰性。No data：データ無し。

1.3.2. CSF 信号減衰長とその他の MRI 所見との関連

解析結果は表 3 にまとめた。T2W 画像にて、55 頭中 36 頭で脊髄実質内に高信号領域が認められた。そのうち、21 頭 (Grade 3 : 1 頭、Grade 4 : 9 頭、Grade 5 : 11 頭) が広範囲高信号群に、15 頭 (Grade 3 : 4 頭、Grade 4 : 10 頭、Grade 5 : 1 頭) が限局高信号群に分類された。

研究に組み入れられた全ての犬を対象とした解析では、CSF:L2 と T2W:L2 及び CSF:L2 と ECML:L2 の間に有意な相関が認められた (それぞれ、 $R=0.782$ 、 $P<0.0001$ 、 $R=0.412$ 、 $P=0.0018$)。広範囲高信号群において、CSF:L2 は T2W:L2 との間に有意な相関が認められた ($R=0.718$ 、 $P=0.0002$) が、ECML:L2 及び OccR とは相関が認められなかった。一方、限局高信号群において、CSF:L2 は ECML:L2 との間に有意な相関が認められた ($R=0.639$ 、 $P=0.0103$) が、T2W:L2 及び OccR とは相関が認められなかった。無高信号群においては、CSF:L2 は ECML:L2 との間に有意な相関が認められたが ($R=0.483$ 、 $P=0.0364$)、OccR との間に相関は認められなかった。

CSF:L2 は脊髄 T2W 高信号サブグループ間で有意な差が認められ ($P<0.0001$)、広範囲高信号群の CSF:L2 は、限局高信号群や無高信号群のそれよりも有意に大きかった (それぞれ $P<0.001$ 、 $P<0.05$)。

FASE 画像上で CSF 信号が減衰していた位置と T2W 画像上脊髄実質内で高信号を呈していた位置との一致については、広範囲高信号群に分類された 21 頭中 12 頭 (Grade 3、1/1 頭、Grade 4、6/9 頭、Grade 5、5/11 頭) と、限局高信号群 15 頭中 10 頭 (Grade 3、3/4 頭、Grade 4、7/10 頭、Grade 5、0/1 頭) が「一致」

に分類された。

表 3 : 脳脊髄液信号減衰所見と他の MRI 所見の相関性の統計学的解析の結果

項目 (対 CSF:L2)	全体 (n = 55)		脊髄T2W高信号長のサブグループ					
	R	(P値)	広範囲高信号群 (n = 21)		限局高信号群 (n = 15)		無高信号群 (n = 19)	
	R	(P値)	R	(P値)	R	(P値)	R	(P値)
T2W:L2	0.782 [†]	(<0.0001) ^{***}	0.718	(0.0002) ^{***}	0.364	(0.1819)	-	
ECML:L2	0.412	(0.0018) ^{**}	0.114	(0.6218)	0.639	(0.0103) [*]	0.483	(0.0364) [*]
OccR	0.234	(0.0856)	-0.022	(0.9243)	0.482	(0.0687)	0.111	(0.6524)

CSF:L2 : FASE 画像での脳脊髄液信号消失域長の第 2 腰椎 (L2) 比、T2W:L2 : 脊髄 T2W 高信号長の L2 比、ECML:L2 : 硬膜外圧迫物質の頭尾側方向の長さの L2 比、OccR : MR 横断面画像における硬膜外圧迫物質の脊柱管内占有率。R :

Spearman R 値。† : 全体の T2W:L2 と CSF:L2 の比較では 36 頭で比較を行った。

* : P < 0.05、** : P < 0.01、*** : P < 0.001。

1.3.3. 神経学的重症度と MRI 所見との関連

神経学的重症度の Grade の間で CSF:L2 に有意な差が認められた ($P<0.0001$; 図 2 及び表 1)。Grade 5 の犬の CSF:L2 は、Grade 3 及び Grade 4 の犬の CSF:L2 よりも有意に大きかった (いずれも $P<0.001$)。一方、Grade 3 と Grade 4 の間では有意な差は認められなかった。同様に、Grade 5 の犬の T2W:L2 は、Grade 3 や Grade 4 の犬のそれよりも有意に大きかった (それぞれ $P<0.01$)。

Grade 5 の犬の中で PM と診断された犬とそれ以外の犬を比較すると、PM と診断された犬の CSF:L2 及び T2W:L2 は、それ以外の犬よりも有意に大きかった (CSF:L2 ; それぞれの中央値 15.72, 4.81, $P=0.0336$ 、T2W:L2 ; それぞれの中央値 15.18, 3.43, $P=0.004$)。

従って、PM と診断された犬を Grade 5 より除外して、再度、統計解析を実施した。その結果、PM と診断された犬を除外しても、CSF:L2 と T2W:L2 は神経学的重症度の Grade 間で有意な差を認めた (それぞれ $P=0.0003$ 、 $P=0.0054$)。Grade 5 に分類された犬の CSF:L2 および T2W:L2 は、Grade 3 または Grade 4 に分類された犬のそれよりも大きかった (CSF:L2 ; Grade 3 と Grade 5 では $P<0.01$ 、Grade 4 と Grade 5 では $P<0.001$ 、T2W:L2 ; Grade 3 と Grade 4 では $P<0.01$ 、Grade 4 と Grade 5 では $P<0.05$)。

1.3.4. 予後と MRI 所見との関連

本研究に組み入れられた症例の数が少なく、MRI 所見と予後との関連を評価することはできなかった (表 4)。しかし、予後不良であった犬の CSF:L2 は、予後良好であった犬のそれと比べて大きい傾向にあった (Grade 4 ではそれぞれの中

央値が 3.93, 2.05、Grade 5 ではそれぞれの中央値が 5.91, 3.72)。また、Grade 5 に分類された犬では、予後不良であった犬の T2W:L2 は予後良好であった犬のそれと比べて大きい傾向にあった（それぞれの中央値 4.70, 1.40）。逆に、Grade 4 に分類された犬では、予後良好であった犬の T2W:L2 が予後不良であった犬のそれよりも大きい傾向にあった（それぞれの中央値 1.00, 0.54）。

表 4 : 予後と MRI 所見の測定値

項目	予後					
	良好			不良		
	頭数	中央値 (平均値)	範囲 (最小値;最大値)	頭数	中央値 (平均値)	範囲 (最小値;最大値)
CSF:L2						
Grade 4 (n = 33)	31	2.05 (2.16)	0.36;6.41	2	3.93 (3.93)	1.54;6.31
Grade 5 (n = 12)	2	3.72 (3.72)	3.65;3.80	10	5.91 (8.34)	2.38;16.50
T2W:L2						
Grade 4 (n = 19)	17	1.00 (1.60)	0.43;6.36	2	0.54 (0.54)	0.27;0.81
Grade 5 (n = 11)	2	1.40 (1.40)	0.83;1.96	9	4.70 (7.91)	1.41;17.67

Grade 4 : 深部痛覚が残存する完全麻痺、Grade 5 : 深部痛覚消失を伴う完全麻痺。CSF:L2 : FASE 画像での脳脊髄液信号消失域長の第 2 腰椎 (L2) 比、T2W:L2 : 脊髄 T2W 高信号長の L2 比。

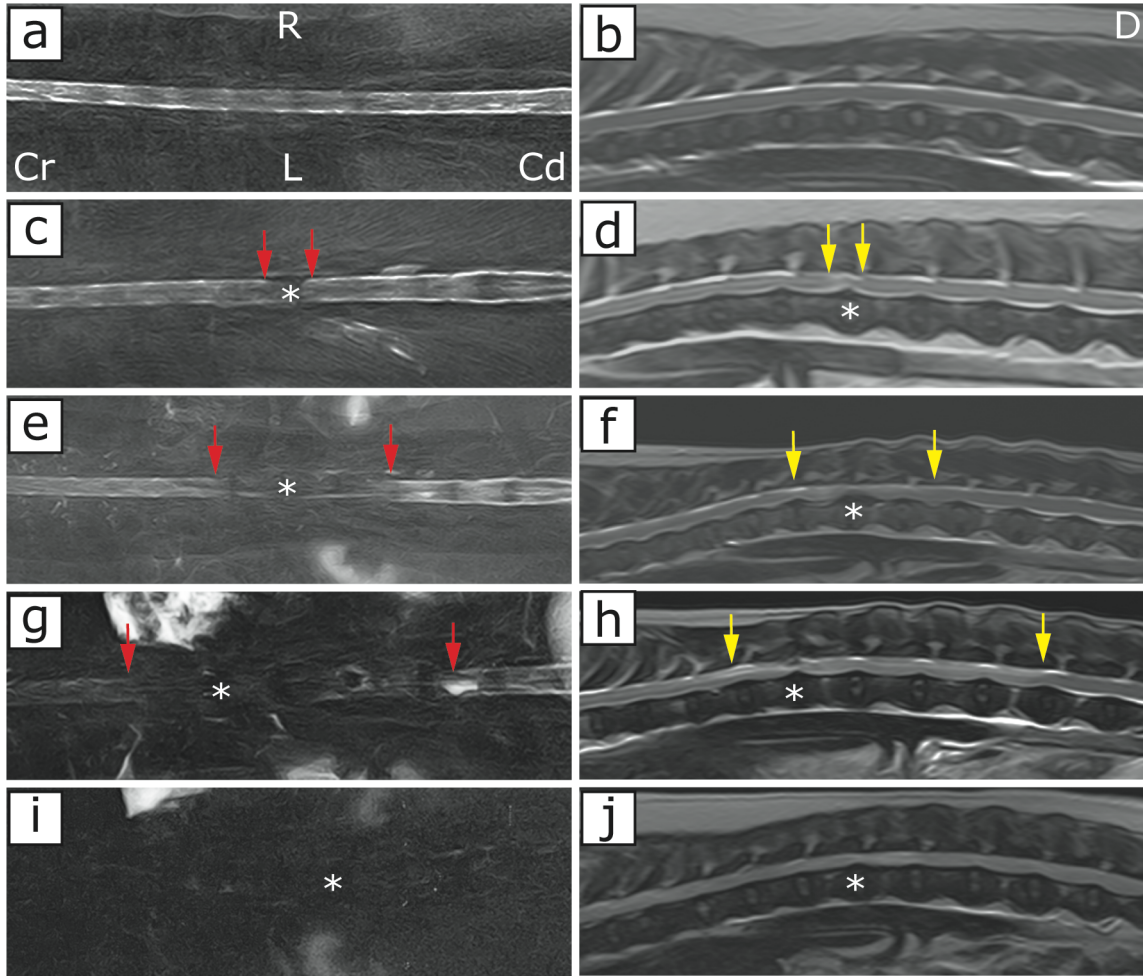


図 2：代表的な背側断 FASE 画像（a, c, e, g, i）及び左列と同じ犬の矢状断 T2W 画像（b, d, f, h, j）

（a, b） 脊髄に器質的な異常を認めない犬

（c, d） IVDE Grade 3（歩行不能の不全麻痺）の犬

（e, f） IVDE Grade 4（DPP が残存する完全麻痺）の犬

（g, h） IVDE Grade 5（DPP 消失を伴う完全麻痺）の犬

（i, j） IVDE Grade 5 に分類、かつ、PM と診断された犬

（b～j） アスタリスク（*）は病変中心、（a, c, e, g, i）赤矢印で挟まれた区間は CSF 信号が減衰していた部位、（b, d, f, h, j）黄矢印で挟まれた区間は脊髄実質が高信号を呈した部位を示す。

神経学的重症度が上がると、FASE 画像上の CSF 信号減衰長及び T2W 画像上の脊髄 T2W 高信号長は有意に長くなった。さらに、PM と診断された犬では、より広範囲に CSF 信号が減衰、かつ、脊髄実質が T2W 高信号を呈した。

背側断 FASE 画像は、矢状断 T2W 画像との比較を容易にするために、一般的な画像の表示（画像上側が頭側）と異なり、画像の左側を頭側として表示した。

[L：左、R：右、D：背側、Cr：頭側、Cd：尾側]

1.4. 考察

本研究において、DPP が残存する犬と比較して、DPP の消失した犬では FASE 画像上にて CSF 信号が長く減衰していた。加えて、この CSF 信号の減衰は脊髓実質内の広範な T2W 高信号と有意に相関しており、脊髓の腫れを示唆している可能性が考えられた。DPP が残存する犬では CSF 信号の減衰はより限局的であり、また、CSF:L2 と ECML:L2 の間に有意な相関が認められたことから、この信号の減衰は ECM による脊髓くも膜下腔の圧迫によって生じたと考えられた。OccR は、神経学的重症度、CSF 信号の減衰、脊髓実質内 T2W 高信号及び予後のいずれの因子との間にも有意な相関が認められなかった (OccR と予後の関係については補足情報の表を参照)。これらの結果から、以前の研究 (Besalti O. et al. 2006) と同様に、脊髓圧迫の程度は、神経学的重症度や予後、加えて、脊髓の腫れと関連がない可能性が示唆された。

SCI は以下の 2 つの段階に分類できると報告されている。まず、第一に、神経組織への機械的外傷による軸索損傷、脱髄、出血などの一次損傷 (Griffiths I. R. 1978; Janssens L. L. A. 1991; Smith P. M. & Jeffery N. D. 2006)、そして、第二に、神経組織の破壊、フリーラジカル形成、炎症による細胞障害性水腫や腫瘍性腫脹などの二次損傷 (Janssens L. L. A. 1991; Olby N. 2010) である。この二次損傷における病態生理学的変化により T2W 画像上で脊髓実質が高信号を呈する (Jeffery N. D. et al. 2013; Narayana P. A. et al. 1999; Narayana P. A. et al. 2004; Purdy P. D. et al. 2003; Purdy P. D. et al. 2004)。

胸腰部 IVDE の犬では、脱出した髄核により脊髓が圧迫されて、脊髓の一次および二次損傷が起り、その結果、神経学的機能障害が生じる (Griffiths I. R. 1978;

Janssens L. L. A. 1991; Jeffery N.D. et al. 2013)。現在、DPP が消失した完全麻痺の犬では、脊髄が重度に損傷を受けるため、その予後は不良であると広く考えられている (Henke D. et al. 2013; Ito D. et al 2005; Jeffery N. D. et al. 2013; Jeffery N. D. et al. 2016 ; Smith P. M. & Jeffery N. D. 2006)。そして、重度に損傷した脊髄は広範囲に腫脹すると報告されている (Jeffery N. D. et al.2020; Takahashi F. et al. 2020)。このような症例では脊髄損傷 (腫脹) が神経学的機能障害の主な原因となると考えられており、この事は、画像上広範囲に T2W 高信号を呈した脊髄に関する過去の研究 (Alisaukaite N. et al. 2017; Boekhoff T. M. et al. 2012; Ito D. et al. 2005; Levine J. M. et al. 2009) や、脊髄圧迫の程度が重症度及び予後との間に関連がないことを実証した研究 (Besalti T. et al.2006 ; Penning V. et al.2006) からも立証されている。さらに、胸腰部 IVDE に続発する圧迫性脊髄症により DPP が消失した犬では、脊髄造影検査にて脊髄の腫れを脊髄くも膜下腔における造影剤の減衰として描出することできるとの報告がある (Duval J. et al.1996)。それゆえ、本研究で CSF:L2 と T2W:L2 の間に有意な相関が認められたことに基づき、特に Grade 5 の症例では FASE 画像上での広範囲の CSF 信号減衰は脊髄の腫脹が原因である可能性が高いと考えた。

統計解析を行うことはできなかったが、過去の研究 (Duval J. et al.1996; Ito D. et al. 2005) と同様に、予後不良であった Grade 5 の犬は CSF:L2 と T2W:L2 が大きい傾向にあった (それぞれの中央値 5.91, 4.70)。先に報告された脊髄造影検査の研究において、胸腰部 IVDE に起因した DPP 消失を伴う完全麻痺の犬では、造影剤の減衰が認められた長さが L2 の 5 倍以上である場合予後不良であった (Duval J. et al. 1996)。一方、MRI に関する研究においては、正中矢状断像にて T2W 高信号を呈した脊髄実質の長さが L2 の 3 倍以上であれば予後不良であると

報告された (Ito D. et al. 2005)。これらの研究結果に基づき、今回の結果は広範囲にわたる脊髄の腫れが予後不良に関係していることを示唆していると考えられた。さらに、今回の結果から、近年報告された DPP の消失を伴う胸腰部 IVDE の犬に対して実施される広範囲硬膜切開術は合理的な治療法であると考えられた (Jeffery N. D. et al. 2020)。一方、T2W:L2 と予後の関係に関しては、Grade 4 の犬と Grade 5 の犬では相反する結果であった。過去に、椎間板疾患に起因する DPP 残存の完全麻痺の犬では脊髄実質が T2W 高信号を呈する領域が長いほど予後が悪いと報告されたが (Ito D. et al. 2005)、逆に、T2W 高信号領域の長さや運動機能の回復には有意な関連は認められないとする報告もある (Wang-Lwandro et al. 2017)。したがって、Grade 4 の犬で認められた脊髄実質内の T2W 高信号は脊髄が受けた障害の可逆的な病理学的変化を反映している可能性があると考えられた。

脱出椎間板による脊髄の圧迫によっても、Heavily T2W 像にて CSF 信号が減衰することが報告されている (Guillem Gallach R. et al. 2011; Mankin J. M. et al. 2012; Pease S. et al. 2006)。今回の研究において、FASE 画像で限局的な CSF 信号の減衰が認められた症例では、CSF:L2 と ECML:L2 の間に有意な相関が認められたことから、これらの症例における CSF 信号の減衰は ECM によるくも膜下腔の圧迫に起因するものと考えられた。

22/36 例 (61%) では、FASE 画像上で CSF 信号が減衰した位置と T2W 画像上で脊髄実質が高信号を呈した位置が「一致」に分類された。「不一致」分類された 14 頭中 5 頭は、限局的に脊髄実質が T2W 高信号を示していた。これら 5 頭の CSF:L2 の中央値 (2.36) は、T2W:L2 (0.58)、ECML:L2 (0.66)、CSF:L2 お

よび OccR (0.66) よりも大きかった。また、これらの症例では、CSF:L2 は ECML:L2 および OccR とは相関しなかった (いずれも $P=0.35$)。「不一致」に分類された残りの 9 頭は、脊髄実質が広範囲に T2W 高信号を呈していた。これらのうち、6 頭は CSF:L2 (中央値:5.28) が T2W:L2 (2.59) よりも大きく、残りの 3 頭は T2W:L2 (3.50) が CSF:L2 (2.38) よりも大きかった。この「不一致」の正確な理由は明らかではないが、脊髄の腫脹の程度、髄液中の細胞数やタンパク質濃度などが原因である可能性がある。CSF:L2 が大きかった犬 (広範囲高信号群 6 頭、限局高信号群 5 頭) の「不一致」の原因は不明である。過去に、髄膜炎の犬では、CSF 中のタンパク質濃度の上昇 (143mg/dL) と細胞数の増加 (白血球: 553 / μ L、赤血球: 440 / μ L) が、Heavily T2W 画像に影響を与え、画像上の CSF 信号を減衰させることが報告されている (Pease A. et al. 2006)。したがって、今回の症例では、CSF 組成の変化が FASE 画像上の CSF 信号に影響を与えている可能性が考えられる。しかし、タンパク質濃度が高く、細胞数が増加している犬では、T2W:L2 が大きくなるという矛盾もあった (表 2、症例 2 と 6)。一方、「不一致」に分類された犬の中で T2W:L2 が大きかった 3 頭の犬では、T2W 画像にて T2W 高信号を呈した脊髄実質の頭側と尾側の端にあるくも膜下腔が明確に描出されていた (データは示していない)。したがって、これらの症例では、T2W 高信号を呈していた病変部位においてくも膜下腔を圧迫するほどには脊髄が腫れていなかった可能性がある。このような症例では、FASE 画像では CSF 信号が描出されるが、T2W 画像では同じ部位の脊髄実質が T2W 高信号を呈している可能性がある (結果として、脊髄実質が T2W 高信号を呈している長さが CSF 信号が減衰している長さより長くなる)。

FASE 画像にて、PM と診断された犬の CSF 信号減衰の長さは、過去の報告

(Castel A. et al. 2017 ; Gilmour L. J. et al. 2017) と同様に、PM でなかった犬のそれに比べて有意に長かった (CSF:L2 の中央値、それぞれ 15.72 対 4.81、 $P=0.034$)。一方、過去に報告された研究における DPP 消失を伴う PM の犬の CSF 信号減衰の長さ [CSF:L2 の中央値 : 8.9 (Gilmour L. J. et al. 2017)] と比較すると、本研究における PM の犬の CSF 信号減衰の長さはそれより長かった。PM と仮診断された犬では、神経学的徴候の発現後、時間の経過とともに T2W 画像上、高信号を呈する脊髄実質の長さが増加することが報告されている (Takahashi F. et al. 2020)。この画像所見の進行は、重度の脊髄挫傷後に起こる脊髄の上行性および／または下行性の進行性出血性壊死からなる PM の病態生理学的段階を反映していると考えられる (Griffiths I. R. 1972)。以前の研究 (Gilmour L. J. et al. 2017) では、神経学的徴候の発症後、比較的短い期間 (中央値 2 日、範囲 1~14 日) で MRI 検査が実施されたが、今回の症例ではそれよりも発症後遅い時期 (中央値 4 日、範囲 4~8 日) に MRI 検査が実施された。このため、本研究では PM と診断された犬の CSF 信号の減衰の長さが以前の研究に比べて長くなった可能性があると考えられた。

本研究では脊髄の病理組織学的検査が行われていないため、脊髄実質内 T2W 高信号という MRI 所見が、脊髄の病理学的変化 (すなわち脊髄の腫脹) をどの程度正確に反映しているかを判断することはできなかった。また、術中の脊髄の肉眼的所見や、脱出した椎間板物質や出血を含む硬膜外圧迫病変に関するデータが医療記録から入手できなかったため、病変部位の脊髄が肉眼的に腫れていたのか、画像上 ECM と判断した箇所が血腫などを含まず、脱出した椎間板物質だけで構成されていたかを判断することができなかった。さらに、ほとんどの犬で CSF 検査が実施されておらず、CSF の組成の変化が FASE 画像上の CSF 信号の

減衰にどのような影響を与えたかを評価することができなかった。

Heavily T2W 画像での CSF 信号の減衰と IVDE の犬の予後との関連については、より多くの症例を用いた更なる研究が必要である。しかし、DPP 消失を伴う完全麻痺の犬で広範囲の CSF 信号減衰が認められた場合は予後不良であることが予想される。したがって、このような症例は SCI 後 3 ヶ月の観察期間を経ずに、予後不良となることが予測され、OECs 移植療法の適応患者となる可能性がある。また、これらの症例で OECs の自家移植を行う場合は、外科的治療（圧迫物質摘出術および減圧術）の時の全身麻酔の際に、嗅粘膜を採取し、移植用 OECs の培養を開始することで、SCI 慢性期を迎える前に OECs 移植療法を開始することができる可能性があると考えられた。

1.5. 補足情報

i) FASE 画像と同様の画像の MRI 機器ブランドごと名称

Half-Founder Acquisition Single-shot Turbo spin Echo (HASTE) imaging (Siemens)、
Single-shot fast spin echo (SS-FSE) (GE)、Single-shot turbo spin echo (SSH-TSE)、
ultra-fast spin echo (UFSE) (Philips)、Single-shot fast SE (Hitachi)。

ii) 表：予後と硬膜外脊髄圧迫物質のパラメータ

項目	予後			
	良好 (n = 42)		不良 (n = 12)	
	中央値 (平均値)	範囲 (最小値; 最大値)	中央値 (平均値)	範囲 (最小値; 最大値)
OccR	0.46 (0.45)	0.13 ; 0.77	0.44 (0.46)	0.07 ; 0.81
ECML:L2	0.42 (0.52)	0.27 ; 1.24	0.40 (0.51)	0.24 ; 0.97

OccR : MR 横断面画像における硬膜外圧迫物質の脊柱管内占有率、ECML:L2 : 硬膜外圧迫物質の頭尾側方向の長さの L2 比。

1.6. 小括

本章の研究の結果から、MR Heavily T2 強調画像で広範囲の CSF 信号減衰を認める DPP の消失を伴う胸腰部 IVDE の犬は、早期 OECs 移植療法の適応患者となることが示唆された。

第 2 章

犬嗅粘膜由来嗅神経鞘細胞の純化培養法の検討

2.1. 序論

序章にも記述したように、犬の重度 SCI の症例に対して OECs 移植による脊髄再生医療を考慮した場合、齧歯類における OECs 移植による脊髄再生の研究から換算すると理想的な OECs の割合は約 70%、細胞の総数は約 5×10^6 /head と考えられている (Jeffery N. D. et al. 2005; Ito D. et al. 2008)。犬の嗅球由来 OECs の場合、嗅球から抽出した細胞を初代培養することにより、容易にこの理想値に達することがわかっている (Jeffery N. D. et al. 2005; Ito D. et al. 2006)。しかし、自家移植による嗅球由来 OECs を臨床応用する場合、嗅球採取に伴う合併症のリスクや侵襲性があるため理想的ではない (Jeffery N. D. et al. 2005)。一方、OECs は嗅粘膜からも採取することが可能で、嗅粘膜の採取に伴う合併症のリスクや侵襲性も低いため移植材料として理想的である (Ito D. et al. 2006; Ito D. et al. 2019)。しかし、犬の嗅粘膜から OECs を初代培養した報告では、培養期間の経過とともに混入細胞 (主に線維芽細胞) が増加し、OECs の割合が低下することが示されている (培養 7 日目 : 約 40%、培養 21 日目 : 約 25%) (Ito D. et al. 2006)。

齧歯類において嗅粘膜由来 OECs を純化するために Immunopanning 法 (Plant G. W. et al. 2002; Lakatos A. et al. 2003) や磁気抗体ビーズ (Gudino-Cabrera G. et al. 1996; Lopez-Vales R. et al. 2006)、フローサイトメトリー (Barnett S. C. et al. 1993; Rizek, P. N. et al. 2006) を用いた方法が報告されている。しかし、これらの方法は特定の抗体を用いることからレシピエントに有害な免疫反応を誘発する可能性が示唆されており、犬における臨床応用には適さないと考えられている (Ito D. et al. 2008)。犬において線維芽細胞の増殖を抑制するために、犬嗅粘膜から抽出した細胞を一定期間、血清非含有培地で培養することで犬嗅粘膜由来 OECs の割合を向上させる純化培養法 (平均: 約 80%) が報告されている (Ito D. et al. 2008)。

しかし、近年、この血清非含有培地による純化培養法を用いても、個体間で得られる犬嗅粘膜由来 OECs の割合にはばらつき（平均：70%、範囲：10%未満～95%以上）があることが報告されている（Ito D. et al. 2019）。また、犬において OECs と線維芽細胞の細胞接着性の違いを利用した純化培養法も報告されているが、嗅粘膜由来 OECs の割合にはばらつき（平均：約 50%、範囲：10%未満～90%以上）が認められている（Granger N. et al. 2012）。

したがって私は、犬の嗅粘膜 OECs の純化培養法として報告されている i) 血清非含有培地による純化培養と、ii) 細胞接着性の違いを利用した純化培養法を組み合わせることで、より安定した高純度の犬嗅粘膜由来 OECs を抽出できるのではないかと仮定した。そこで本章では、犬の嗅粘膜由来 OECs で報告されている血清非含有培地を用いた培養方法に、物理的衝撃による細胞剥離処理（Bang 処理）を組み合わせることで、OECs の割合を高めることが可能であるかを検討した（図 3）。本章の実験 1 では従来の血清非含有培地を用いた培養方法での培養中に、Bang 処理による細胞継代を 1 度だけ行い、実験 2 では、実験 1 の結果を元に、Bang 処理による継代の回数と Bang 処理前後の培養期間を変更して検討を行った。

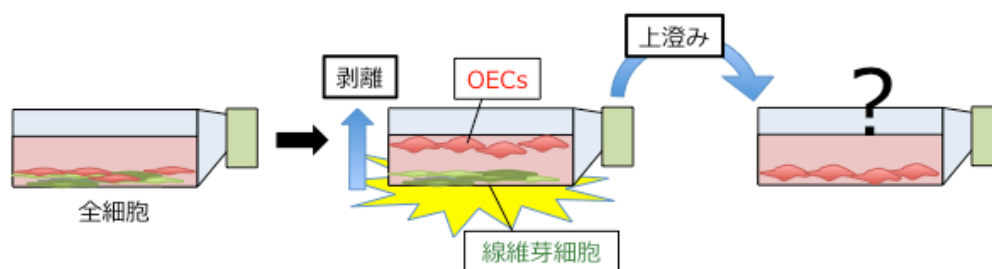


図 3：物理的衝撃による細胞剥離処理（Bang 処理）のイメージ

一度フラスコに全ての細胞を接着させた後に、物理的な衝撃をフラスコに加える。細胞接着性の弱い OECs のみを選択的に培養面から剥離させて、それを回収することで OECs の割合を高めることが可能であるかを検討する。

2.2. 実験 1

2.2.1. 材料・方法

2.2.1.1. 動物

日本大学生物資源科学部獣医学科で実施された小動物外科学実習後に、安楽死を施されたビーグル犬 7 頭から嗅粘膜を採取した（承認番号：AP20BRS016）。

2.2.1.2. 嗅粘膜採取

伊藤ら (Ito D et al. 2019) が報告したキーホールアプローチを改変した方法で、嗅粘膜を採取した。両側の前頭骨側頭突起を結んだ直線と頭蓋の正中が交わる点から 1~1.5cm 吻側の皮膚を、メスを用いて正中切開し、手術用骨ドリル (Aesclup microsPEED uni, B. BRAUN, Germany) を用いて前頭骨にキーホールを作製した。作製したキーホールからゲンタマイシン生理食塩水 (10mg/ml) を注入し、鼻腔内を洗浄した後に、滅菌された鑷子を用いて嗅粘膜を採取した。採取した嗅粘膜をゲンタマイシン生理食塩水 (10mg/ml) で湿らせた滅菌ガーゼに包み、滅菌シャーレに入れて、速やかに細胞培養施設に運搬した。この際、初代培養に移行するまで時間がかかる場合は、遠心管内に分注した Leiboviz's L-15 medium [L-15] (Sigma-Aldrich, USA) に浸漬して、初代培養の手技に移行するまで 4°C で冷蔵保存した (1 時間以内)。

2.2.1.3. 細胞培養

細胞培養は過去に報告されている血清非含有培地を用いた培養方法に (Ito D. et al. 2019)、Bang 処理を組み合わせで行った。採取した嗅粘膜を滅菌シャーレの上に移し、実体顕微鏡下で骨片、結合組織、血管、血餅を除去した後に約 1 cm²

の大きさにトリミングした。トリミングの作業中、適宜、L-15 培養液を付与し、嗅粘膜の乾燥を防止した。その後、得られた嗅粘膜をメスを用いて一片が少なくとも 1mm 以下になるように細断した。細断した組織を、0.5mL のコラゲナーゼタイプ I 溶液（6.66mg/mL、155U/mg、L-15 に溶解、Wako, Japan）の入ったエッペンドルフ管に移し、マイクロピペットを用いて攪拌後、20 分間、37°C、5%CO₂ の条件で作用させた。その後、0.5mL のトリプシン EDTA 溶液（2.5mg/mL, Sigma-Aldrich, USA）を加えて、再び攪拌後、同条件で 15 分間作用させた。トリプシン処理を行った組織を遠心管に移し、10% ウシ胎子血清（Sigma-Aldrich, USA）と 1% ペニシリン・ストレプトマイシン（Sigma-Aldrich, USA）を含有したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM; Dulbecco modified Eagle medium, Sigma-Aldrich, USA）〔Olfactory mucosal cell basic medium : OMBM〕10mL を加え組織を洗浄し、遠心機にかけ（1,000rpm、7 分間）、組織を沈殿させた。遠心管内に形成された組織ペレットを、大豆由来トリプシンインヒビター（0.25mg/mL, Sigma-Aldrich, USA）とウシ膵臓由来デオキシリボヌクレアーゼ（0.04mg/mL, Sigma-Aldrich, USA）、ウシ血清アルブミン（3mg/mL, Sigma-Aldrich, USA）の溶液 1mL に再浮遊させた。再浮遊させた組織を 5 mL プラスチックピペットを用いて 10 回通し、次に 1 mL プラスチックシリンジを用いて 21G と 23G の注射針を用いて 1 回ずつ吸引することで、さらに嗅粘膜組織を破碎した。処理後の嗅粘膜組織に OMBM, 10mL を加えて洗浄し、再度、同条件にて遠心した。形成された組織ペレットを、2μM フォルスコリン（Sigma-Aldrich, USA）と 20ng/mL ニューレグリン 1（R&D systems, USA）を含有した血清非含有 OMBM [Serum free growth medium (Sf-GM)] に再浮遊させ、5×10⁴ cells/mL の濃度に調節した。得られた細胞をポリ-L-リジン（Sigma-Aldrich, USA）でコーティングした 25cm² フラスコに移し、37°C、5%CO₂ の環境下で培養した。3 日ごとに培養液の半量を新

しい Sf-GM に交換した。培養 7 日後に、培養液を同濃度のフォルスコリン とニューレグリン 1 を含む OMBM (GM : 血清添加培養液) に置換した。以降、3 日ごとに培養液の半量を新しい GM に交換した。培養 14 日目にトリプシン EDTA 溶液による細胞継代を行う Control (Ct) 群と Bang 処理により継代を行う Bang 群に分類した。継代後、それぞれの群において GM を用いて 7 日間培養し、データを収集した。

2.2.1.4. 細胞継代

i) Bang 群

細胞を培養しているフラスコ内の培養液を除去し、 Ca^{2+} と Mg^{2+} 非含有のリン酸緩衝生理食塩水 [PBS (-)] を用いてフラスコ内を 2 回洗浄した。PBS (-) を除去し、2mL のハンクス平衡塩溶液 (Ca^{2+} と Mg^{2+} 非含有) [HBSS (-)] を加えて、室温で 1 分間静置した。静置後、高さ 3~5cm から平らな机の上に、フラスコを自由落下させ (Bang 処理)、これを 20 回実施した。フラスコ内の細胞浮遊液を回収し、遠心管へ移した後に 10mL の OMBM 加えて、1,000rpm で 7 分間の条件で遠心した。遠心管内に形成されたペレットを GM に再浮遊させて、 5×10^4 cell/ml の濃度に調節し、ポリ-L-リジンコーティングを施した新たな 25cm^2 フラスコに継代した。

ii) Ct 群

細胞を培養しているフラスコ内の培養液を除去し、PBS (-) を用いてフラスコ内を 2 回洗浄した。その後、0.25%トリプシン EDTA 溶液 (Sigma-Aldrich, USA) を加え、5 分間 37°C 、5% CO_2 の条件下で作用させた。作用後、遠心管に細胞浮遊液を移し、10mL の OMBM を加えて、1,000rpm で 7 分間の条件で遠心した。

遠心管内に形成されたペレットを GM に再浮遊させて、 5×10^4 cell/ml の濃度に調節し、ポリ-L-リジンコーティングを施した新たな 25cm^2 フラスコに継代した。

2.2.1.5. 細胞数の算出と細胞固定

細胞培養 21 日目の時点で 0.25% トリプシンを用いてフラスコから剥離した細胞を洗浄し、培養液に再浮遊させた。細胞浮遊液の一部はトリパンブルー染色液 (Sigma-Aldrich, USA) を用いて染色し、改良ノイバウエル血球計算盤 (HIRSCHMANN, Germany) を用いて総細胞数を算出した。残りの細胞浮遊液は、 $250\mu\text{L}$ の GM で満たした 8 チェンバースライドシステム (Thermo Fisher, USA) に継代し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件で 24 時間培養した。培養後、定着した細胞を 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝生理食塩水 (Wako, Japan) で固定し、PBS (-) で洗浄後、免疫染色まで PBS (-) を重層し 4°C で保存した。

2.2.1.6. 蛍光免疫染色

細胞を固定した 8 チェンバースライドシステム内の PBS (-) を除去し、10% ヤギ血清 (Sigma-Aldrich, USA) と 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) を含有した PBS (-) を加えて、室温で 1 時間作用させた (ブロッキング処理)。ブロッキング後、一次抗体として low affinity mouse nerve growth factor receptor antibody (p75, MAB5264, Millipore, USA) を 1:200 の割合で希釈したものと、poly clonal rabbit anti-human fibronectin antibody (Fn, A024502, Dako, USA) を 1:400 の割合で希釈しものを用いて、p75/Fn の二重染色を行った。一次抗体は室温で 45 分間作用させた。その後、PBS (-) を用いて 3 回洗浄した (1 回 5 分間の静置)。p75 に対する二次抗体として、goat anti-mouse Cy3-conjugated (Jackson Immuno Research, USA)、Fn に対する二次抗体として goat anti-rabbit fluorescein

isothiocyanate-conjugated (FITC, Southern Biotech, USA) を用い、それぞれ 1:200 の割合で希釈して、室温で 45 分間作用させた。二次抗体の作用後、PBS (-) を用いて 3 回洗浄 (1 回 5 分の静置) した後に、4', 6-diamidino-2-phenylindole-containing mounting medium (DAPI, Vector Laboratories, USA) で封入した。

2.2.1.7. データ収集

蛍光免疫染色を行なった細胞の観察は蛍光顕微鏡 (BZ-X800, KEYENCE, Japan) を用いて行い、20 倍の対物レンズで最低 5 視野での細胞を計測した。p75 陽性の細胞を OECs、Fn 陽性の細胞を線維芽細胞として、それぞれの細胞の割合を算出した。加えて、血球計算盤で算出した総細胞数をもとに、培養によって得られた OECs 数も算出した。

2.2.1.8. 統計学的解析

結果では、それぞれの細胞の割合を平均 [%] (\pm SD : 標準偏差) で表記した。統計解析は、市販の統計ソフト (GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて行った。Bang 群と Ct 群の群間における OECs と線維芽細胞の割合を Mann-Whitney U 検定を用いて比較した。P 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意と判断した。

2.2.2. 結果

Bang 群では OECs が 4.6% (± 6.26)、線維芽細胞が 94.4% (± 7.34)、Ct 群では OECs が 0.34% (± 0.41)、線維芽細胞が 98.8% (± 2.91) であった (表 5、図 4)。Ct 群における細胞継代では、全ての細胞を剥離するためのトリプシンの作用時間は 5 分間であった。統計学的に Bang 群における OECs の割合は Ct 群における OECs の割合と比較して有意に高かったが ($P=0.015$)、線維芽細胞の割合に関して両群間に有意な差は認められなかった ($P=0.073$) (図 4)。

細胞培養 21 日目の時点で得られた平均総細胞数は、Bang 群では 7.69×10^6 、Ct 群では 18.7×10^6 であったことから、推定される OECs 数は Bang 群で 0.354×10^6 、Ct 群で 0.0635×10^6 あった。

表 5 : 実験 1 で得られた Bang 群と Ct 群の OECs と線維芽細胞の割合

Bang群		Control群	
OECs	線維芽細胞	OECs	線維芽細胞
4.60(±6.26)*	94.37(±7.34)	0.34(±0.41)	98.81(±2.91)
平均%(±SD)			

* : Bang 群と Control 群の間で OECs の割合に統計学的な有意差を認めた (P=0.015)。

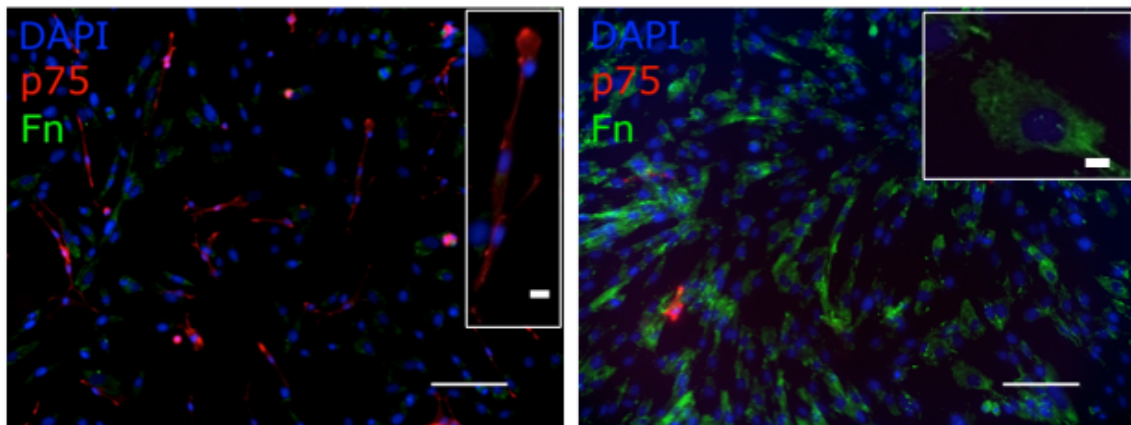


図 4 : 実験 1 の蛍光免疫染色の結果 (Bang 群 : 左、Ct 群 : 右)

Bang 群では p75 陽性の OECs (赤) が散見されるのに対し、Ct 群では OECs がほとんど認められず、主に Fn 陽性の線維芽細胞 (緑) が占めている。[スケールバー : 100 μ m (小窓 : 10 μ m)]

2.2.3. 考察

本研究の Bang 処理の条件は、フラスコに定着した OECs の形態（小型の紡錘形）を示す細胞群の様子を確認しながら自由落下の衝撃を加えた事前実験において決定した。フラスコを落下させる高さは、フラスコの破損を防ぎ、かつ事前実験でフラスコの机からの跳ね返りが小さくなる高さを考慮し決定した。落下回数は事前実験で 20 回の落下を加えた後に、OECs の形態を示す細胞の顕著な剥離が認められたため、本研究では落下回数を 20 回に設定した。事前実験で剥離された細胞で、OECs の形態を示す細胞は免疫抗体染色において p75 陽性であった。

本研究結果から、従来の血清非含有培地を用いた嗅粘膜由来 OECs 純化培養法と Bang 処理による細胞継代法を組み合わせることにより、有意に嗅粘膜由来 OECs の割合を高めることができることが判明した。しかし、本研究の Bang 群で得られた嗅粘膜由来 OECs の割合は過去の報告と比較すると顕著に低かった（血清非含有培地を用いた純化培養法：70～80%の OECs, Ito D. et al. 2008, 2019、細胞の接着性を利用した純化培養法：約 50%, Granger N. et al. 2012）。さらに、本研究で得られた嗅粘膜由来 OECs の割合は Bang 群、Ct 群ともに過去の純化培養を行っていない嗅粘膜 OECs 培養の割合と比較しても低いものであった（細胞培養 21 日目の時点での嗅粘膜由来 OECs の割合：約 25%, Ito D. et al. 2006）。過去の報告と比較して、本研究において Bang 群ならびに Ct 群ともに嗅粘膜由来 OECs の割合が低く、逆に線維芽細胞の割合が高かった理由として、i) 血清による影響、ii) トリプシン処理による影響、そして iii) 細胞密度の影響が考えられた。

犬の嗅粘膜から抽出された線維芽細胞は、血清を含む培地で急速に増殖するこ

とが報告されている (Ito D. et al. 2006)。本研究では過去に使用された血清と同じもの (同じ Lot の製品) を使用したが、製造過程や年代によって同じ型番であったとしても含まれている成長因子には違いがある。したがって、含まれている成長因子や濃度の違いによって、血清非含有培地での培養で除外できなかった線維芽細胞が血清含有培地に交換した際に急速に増殖したのではないかと考えられた。

さらに Ct 群においては、トリプシンによる細胞継代の影響により線維芽細胞が増多したと考えられる。過去に、人の気道トリプシン様プロテアーゼは気管支気道の線維芽細胞の増殖を促進すると報告されている (Matsushima R. et al. 2005)。また、先の犬の嗅粘膜から OECs を培養した論文においても細胞の継代にトリプシン処理が実施されており、結果、継代後の線維芽細胞の急速な増加につながっている (Ito D. et al. 2006)。本研究では、過去の報告と同じ濃度のトリプシンを使用し継代したものの、すべての細胞をフラスコから剥離するためにトリプシンの作用時間を延長した。したがって、トリプシンの作用時間を延長したことが線維芽細胞の急速な増殖に関与し、結果として OECs の割合を低下させたと考えられた。

犬の OECs は細胞密度が低い場合には OECs が密集し、細胞密度が高い場合には線維芽細胞に重なるようにして OECs が増殖する。いずれの場合でも OECs 同士がネットワークを形成し、成長因子を分泌しながら増殖する。本研究では、細胞がコンフルエント (フラスコ内に細胞が 80% 以上定着した状態) になる前に、継代処理を実施したため、OECs 同士がネットワークを形成することができず成長因子を分泌しながら増殖することができなかつたと考えられた。以上のことか

ら、本研究で実施した Bang 処理のプロトコールでは、嗅粘膜由来 OECs の純化には不十分であった。

実験 1 の結果を踏まえ、続く実験 2 では Bang 群において嗅粘膜由来 OECs の純度を上げるために、細胞がコンフルエントになった時点で Bang 処理による細胞継代を行い、はじめの Bang 処理による細胞継代日から 2 週間の培養期間を設け、培養細胞がコンフルエントになる度に Bang 処理による継代を実施し、嗅粘膜由来 OECs の純化が可能か検討した。また、Ct 群においても、最初の細胞継代日から 2 週間の培養期間を設け、培養細胞がコンフルエントになる度にトリプシン処理による継代を行った。ただし、実験 2 では細胞継代の際に行うトリプシンの作用時間を、実験 1 の 5 分間から 2 分間に短縮して検討した。

2.3. 実験 2

2.3.1. 材料・方法

2.3.1.1. 動物および嗅粘膜採取方法

日本大学動物病院神経科にて、経前頭洞アプローチによる開頭術によって脳腫瘍摘出術を実施した犬 2 頭（犬 A、犬 B：表 6）において、開頭術の際に除去および処分する嗅粘膜を用いた（臨床研究承認番号：3-021）。無菌的に回収した嗅粘膜はゲンタマイシン生理食塩水（10mg/ml）で湿らせた滅菌ガーゼに包み、滅菌シャーレに入れて、速やかに細胞培養施設に運搬した。運搬後、嗅粘膜をゲンタマイシン生理食塩水（10mg/ml）で洗浄し、遠心管内に分注した L-15 に浸漬して、細胞培養まで 4°C で冷蔵保存した（最長 1 時間以内）。

2.3.1.2. 細胞培養

細胞培養における嗅粘膜処理や使用した培養液、および培養条件は実験 1 に準拠し、培養液を Sf-GM から GM に置換した後の培養プロトコールのみを変更した（図 5）。それぞれの犬の嗅粘膜から 2 つずつ培養フラスコを作製した。実験 1 と同様に Sf-GM で 7 日間培養した後、培養液を GM に置換し、一定の期間を設定せずに培養細胞がコンフルエントになるまで培養を継続した。2 頭の犬から得られた初代培養の細胞は、それぞれ Bang 群と Ct 群に分けて設定した（各群 2 フラスコ）。培養細胞がコンフルエントに達した時点で、Bang 群では Bang 処理により細胞継代を行い、Ct 群ではトリプシンによって細胞継代を行なった。なお、前述のように実験 2 の Ct 群におけるトリプシン作用時間は 2 分間に短縮して細胞継代を行なった。最初の細胞継代からさらに 2 週間の培養期間を設け、この期間中、細胞がコンフルエントに達する度にそれぞれの継代方法で細胞を継代

した。最初の細胞継代から 2 週間後にデータを収集した。

2.3.1.3. 蛍光免疫染色とデータ収集

蛍光免疫染色とデータ収集は実験 1 と同様の方法で行なわれた。

表 6 : 犬 A、犬 B の基礎情報

	犬A	犬B
犬種	ジャーマン・シェパード	柴
年齢	11才	10才
性別	去勢雄	未去勢雄
粘膜採取部位	前頭洞 吻側	前頭洞 吻側

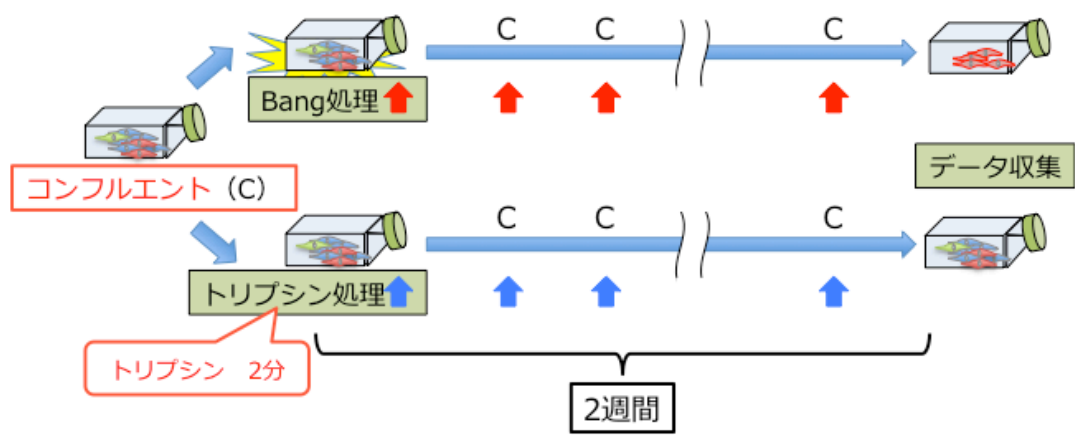


図 5：実験 2 における血清含有培地置換後の培養の概略

この図は、実験 2 において、培養液を血清含有培地 (GM) へ置換した後のプロトコールを表している。細胞がコンフルエントになった時点で、Bang 処理またはトリプシン処理 (作用時間：2 分間) で細胞継代を行い、その初継代から 2 週間の培養期間を設けた。培養期間中は、細胞がコンフルエントになる度にそれぞれの継代方法で継代を行った。

2.3.2. 結果

犬 A の Bang 群において、培地を GM に置換して 7 日後（培養 14 日目）にコンフルエントに達したため、Bang 処理によって細胞継代を行った。その後、残りの 2 週間の培養期間に Bang 処理による継代を 2 回行った（計 28 日間培養）。

犬 B の Bang 群において、培地を GM に置換して 16 日後（培養 23 日目）にコンフルエントに達したため、Bang 処理によって細胞継代を行った。その後残りの 2 週間の培養期間に Bang 処理による継代を 3 回行った（計 37 日間培養）。

犬 A から得られた Ct 群では、培養 21 日時点で培養液中に真菌の混入が認められ、データの収集が不可能であった。犬 B の Ct 群では、培地を GM に置換して 16 日後（培養 23 日目）にコンフルエントに達したため、2 分間のトリプシン処理によって細胞継代を行った。その後残りの 2 週間の培養期間にトリプシン処理による継代を 3 回行った（計 37 日間培養）。

Bang 群では OECs が平均 99.3% (0.39)、線維芽細胞が 0.40% (0.20)、Ct 群では OECs が 8.51%、線維芽細胞が 82.8%であった（表 7、図 6）。

21 日目の培養で得られた平均総細胞数は、Bang 群では 2.70×10^6 、Ct 群では 1.06×10^6 であった。OECs 数は Bang 群で 2.68×10^6 、Ct 群で 0.0902×10^6 あった。

表 7：実験 2 で得られた OECs と線維芽細胞の割合

Bang群		Control群	
OECs	線維芽細胞	OECs	線維芽細胞
99.29 (0.39)	0.40 (0.199)	8.51	82.78
平均%(±SD)		(%)	

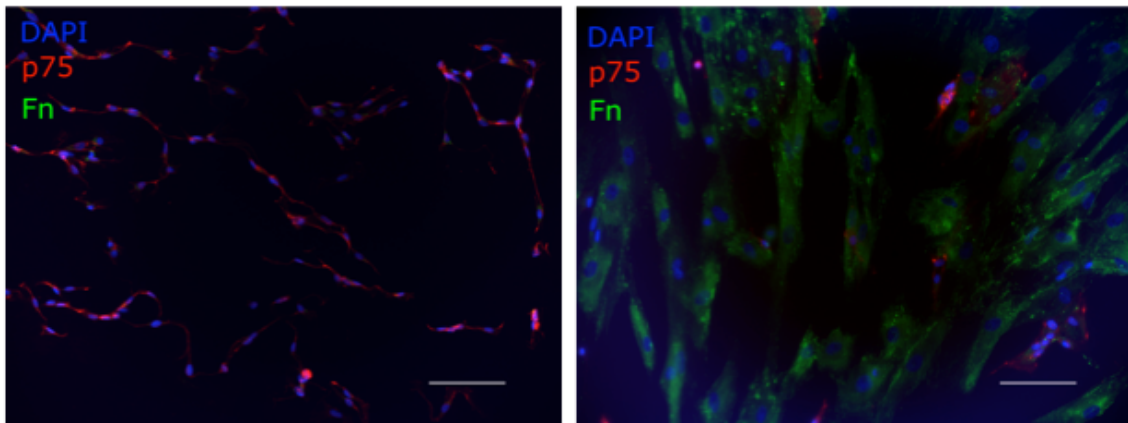


図 6：実験 2 の蛍光免疫染色の結果（Bang 群：左、Ct 群：右）

Bang 群ではほぼ全ての細胞が p75 陽性の OECs（赤）であり、Ct 群では実験 1 と同様に、OECs がほとんど認められず、主に Fn 陽性の線維芽細胞（緑）が占めている。[スケールバー：100 μ m]

2.3.3. 考察

改変した Bang 処理法により細胞接着性の弱い OECs を選択的に分離することで OECs を純化できる可能性が示唆された。また、改変した Bang 処理による細胞継代はフローサイトメトリーや Immunopanning で用いられる特別な機器や抗体を使用しないため、自家移植のための細胞材料として用いることが可能である。さらに細胞培養にかかるコストが抑えられ、かつ、その作業工程も容易に行うことができる。

実験 2 では、Bang 処理によって純度 99% の OECs を得ることができた。しかし、本実験では過去の血清非含有培地を用いた培養の報告の培養期間 (21 日間; Ito D. et al. 2019) よりも長い期間 (28~37 日間) の培養を行ったが、Bang 群で得られた OECs 数 (2.7×10^6) は過去の報告 ($\sim 4.5 \times 10^6$; Ito D. et al. 2019) よりも少なく、得られた総細胞数も犬の SCI 症例に移植に適した細胞数 (5.0×10^6 ; Jeffery N. D. et al. 2005; Granger N. et al. 2012) には達していなかった。Bang 処理によって得られた OECs 数が過去の報告と比較して少なかった正確な原因は本実験からは断定できないが、Bang 処理による細胞への衝撃が OECs の増殖能を低下させた、あるいはアポトーシスを誘発した可能性が考えられた。したがって今後は上記要因を解明するために、各継代時における OECs 数の推移を評価し、かつ、カスパーゼ 3 や tunnel 染色による OECs のアポトーシス数について調査する必要がある。

1 頭のみデータではあるが、犬 B の Ct 群における OECs の割合は実験 1 の結果と比べて向上したが (実験 1 : 0.34%、実験 2 : 8.51%)、OECs 数には大きな変化が認められなかった (実験 1 : 0.0635×10^6 、実験 2 : 0.0902×10^6)。また、

実験 2 では実験 1 と比較して細胞培養期間が長期間であったにもかかわらず(実験 1 : 21 日、実験 2 : 37 日)、Ct の総細胞数は実験 1 の 10 分の 1 以下であった(実験 1 : 18.7×10^6 、実験 2 : 1.06×10^6)。これは混入している線維芽細胞の総数が関与していると考えられるが、実験 2 では線維芽細胞の増殖速度が緩徐であったことや継代時に線維芽細胞の一部が廃棄されたことに起因していると考えられた。実験 2 では細胞継代時のトリプシン処理を 2 分に短縮したことで、すべての線維芽細胞を剥離できず、またトリプシン刺激による線維芽細胞の増殖が抑制された結果だと考えられる。

本実験では改変した Bang 処理により 99% の OECs の精製に成功したが、実験に用いたサンプル数が少なく統計学的解析を行うことができなかった。今後、Bang 処理による OECs の純化方法を統計学的に証明するために、サンプル数を増やして更に検討を行う必要がある。

2.4. 小括

本章の研究で、犬嗅粘膜由来 OECs の培養において、物理的な衝撃による細胞剥離処理 (Bang 処理) は OECs を選択的に分離することが可能であり、犬の SCI 臨床症例への自家移植に用いる OECs の純化培養法の手技のひとつとなる可能性が示唆された。

第3章

慢性期脊髄損傷モデルラットへの コンドロイチナーゼ ABC 産生-犬嗅神経鞘細胞移植による 運動機能回復の検討

3.1. 序論

損傷した脊髄白質の軸索は、SCI 後の生体防御反応として形成されるグリア癒痕を超えて再生することができず、この軸索再生の抑制はグリア癒痕を形成する阻害分子（特に CSPG）が原因の一つとなっている（序章参照）。

ChABC は CSPG を分解する酵素であり、既に挫傷または切断 SCI モデルラットへの投与（脊髄実質内あるいは脊髄くも膜下腔内）によるグリア癒痕の縮小化やグリア癒痕を跨いだ軸索再生、そしてこれら病理組織学的変化に伴う神経機能回復について報告されている（Bradbury E. J. et al. 2002; Caggiano A. O. et al. 2005; Massey J. M. et al. 2015）。しかしながら、ChABC は哺乳類の生体体温で 24～72 時間以内に酵素活性が急速に減衰することが報告されている（Tester N. J. et al. 2007）。したがって、ChABC の十分な効果を得るためには、脊髄内に断続的に ChABC を注入するか、くも膜下腔にカテーテルを留置して継続して新鮮な ChABC を注入する必要がある。しかし、継続的な ChABC の投与は、患者の負担や感染のリスクを増大させる可能性があり、臨床応用における安全性の問題を意味している（Lee H. et al. 2010; Carwardine D. et al. 2016）。

近年、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入技術を利用して、ChABC 産生遺伝子を導入した犬の OECs（ChABC-OECs）が開発された（Carwardine D. et al. 2016）。この ChABC-OECs は、経時的に ChABC を産生・分泌することが可能であるため、ChABC-OECs を SCI 領域へ移植することで、ChABC を持続的に供給することができる。加えて、従来 OECs がもつ軸索再生誘導能や再髄鞘化を發揮することが期待される。すでに急性期頸髄挫滅 SCI モデルラットに対して犬の ChABC-OECs を SCI 領域に移植することにより、グリア癒痕の主成分であ

る CSPG が分解され、かつグリア瘢痕を跨いで再生した軸索数が増加することが報告されている (Carwardine D. et al. 2017)。しかし、犬の ChABC-OECs の慢性期 SCI モデルラットへの移植はまだ行われていない。

そこで私は、犬の ChABC-OECs の SCI 領域への ChABC 供給能と OECs の軸索再生誘導能から、慢性期 SCI においてもこれらの機能が発揮され、運動機能の回復が認められる可能性があると考えた。本章では、慢性期挫傷 SCI モデルラットの SCI 領域へ犬の ChABC-OECs の移植を行うことで、運動機能の回復が認められるかを検討した。

3.2. 材料・方法

本章の研究は日本大学とイギリスのブリストル大学の共同研究の一部として行われ、OECs 移植後の運動機能評価の部分について報告する。本研究の動物実験は両大学の審査機関の承認を経て実施された（日本大学：AP18BRS010、ブリストル大学：BRM017532）。また、本研究における遺伝子導入実験はイギリスの科学委員会の承認を経て実施された（AWERB16/004）。実験の簡単なタイムスケジュールを図7に示した。

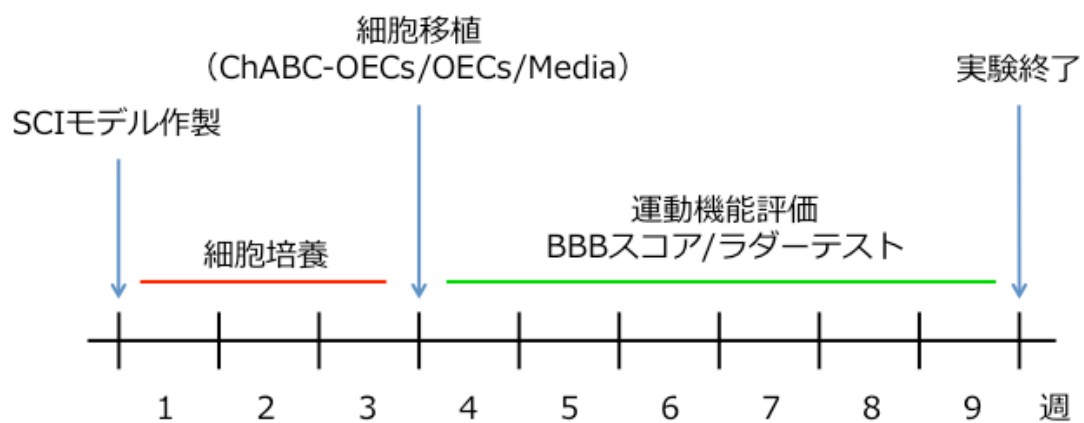


図 7：実験のタイムスケジュール

SCI モデルラットを作製し、その 3 週間後に細胞移植を行った。細胞移植から 6 週間の観察期間を設けて、1 週間ごとに運動機能評価（Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) スコア・ラダーテスト) のための動画を撮影した。

3.2.1. 移植細胞

i) OECs の準備

過去に本研究室で犬の嗅粘膜から純化培養し、凍結保存していた OECs ストックから利用した（日本大学）。

ii) ChABC-OECs の準備

過去にブリストル大学で犬の嗅粘膜から純化培養し、凍結保存していた OECs ストックから利用した。ChABC 産生遺伝子の導入は、過去の報告 (Carwardine D. et al. 2016) と同様にレンチウイルスベクターを用いて行われた（ブリストル大学）。 5×10^4 個の ChABC-OECs が *in vitro* で約 0.075U の ChABC を生成することを示したため、移植する 1.8×10^5 個の ChABC-OECs の場合、約 0.27U に相当すると推測された（補足情報参照）。

3.2.2. 動物

雄の成体 CD ラット [日本チャールズリバー（日本）、チャールズリバー（イギリス）] を合計 24 頭使用した。ラットの実験飼育施設への搬入後、7 日間の順化期間を設けて、健康状態（体重や便の様子など）を確認した。

3.2.3. 群分け

ラットをそれぞれ i) ChABC-OECs の移植を行う群（ChABC-OECs 群）、ii) OECs の移植を行う群（OECs 群）、iii) コントロールとして HBSS (-) の投与を行う群（Media 群）の 3 群に分類した（各群 8 頭ずつ）。ChABC-OECs 群の全てのラットと Media 群の 4 頭のラットの実験はブリストル大学で、OECs 群の全てのラットと残りの Media 群のラットの実験は日本大学で実施された。

3.2.4. 麻酔

本実験で用いたラットは、SCI モデル作製手術および細胞移植手術の際、3% イソフルランにより全身麻酔を施され、術中の鎮痛薬として、塩酸メデトミジン (0.3 mg/kg) と酒石酸ブトルファノール (5 mg/kg) の混合薬を腹腔内投与、およびカルプロフェン (5 mg/kg) を皮下投与された。動物は導入ボックス内で麻酔誘導され、術中の麻酔は3%イソフルランで維持された。

3.2.5. SCI モデルラット作製

全身麻酔下で頸部から腰部までの領域で剃毛を行い、クロルヘキシジンと70%エタノールを用いて皮膚を消毒した。背側正中の第10胸椎の前後2椎骨[第8胸椎～第12胸椎]の範囲をメスで切開した。皮下の脂肪組織を除去し、胸椎棘突起に付着する筋肉をメスで剥離し、関節突起に付着する筋肉をメスで切断した。第10胸椎の棘突起を小型のロンジュールで切除した後、続けて小型のロンジュールを用いて背側椎弓切除を実施し、脊髄を露出させた。SCI モデル作製装置 (Infinite Horizontal Impactor, Precision Systems and Instrumentation, USA) を用いて、第9胸椎と第11胸椎の椎体を鉗子で固定し、露出した脊髄に対して、脊髄正中の挫傷損傷処理 [250 kdyn (速度 1mm/s、滞留時間 0 秒)] を実施した (補足情報参照)。この後、損傷部脊髄と筋肉の癒着を防ぐために合成人工硬膜 (Gore Preclude, W. L. Gore & Associates, Inc., USA) を損傷部位の上に設置し、筋膜、皮下織、皮膚を定法に従って縫合した。手術中はヒートマットで体温を維持し、覚醒後は個別のケージに移した。術後2日間は鎮痛目的でカルプロフェン (5 mg/kg) を皮下投与した。術後は個体の健康状態 (体重や飲水量、外見異常の有無) や膀胱の大きさをチェックし、必要に応じて用手による膀胱圧迫を

施した。SCI 後に、摂食や摂水の困難、苦悶の症状（自傷や呼吸障害、発声など）、回復しない外見異常（下痢や出血、外陰部の汚れ）、回復しない急激な体重減少（数日で 20%以上）が認められた場合は、人道的エンドポイントを適応し、3% イソフルランによる麻酔下で心臓から全採血を行い、安楽死を施した。

3.2.6. 移植細胞液の調整

移植用の細胞液は細胞移植を行う直前に作製した。トリプシン処理とピペッティングによって細胞を単離させた後に、HBSS (-) で 9×10^4 細胞/ μL の濃度に調節した OECs 細胞液と ChABC-OECs 細胞液を作製した。

3.2.7. 免疫抑制処置

免疫抑制処置は過去のシクロスポリンを投与した報告をもとに行った (Jensen M.B. et al. 2012)。全てのラットは 15 mg/kg のシクロスポリンを用いて免疫抑制を施された。細胞移植の 24 時間前から移植後 7 日間は、シクロスポリン（サンディミュン、Novartis、Japan または UK）を毎日腹腔内投与し、その後観察期間が終了するまではシクロスポリン（ネオーラル、Novartis、Japan または UK）を飲料水に混ぜて経口投与した。

3.2.8. 細胞移植

損傷 3 週間後、全身麻酔下にて SCI モデル作製時と同様の範囲の剃毛と消毒を行った。第 8 胸椎から第 12 胸椎までの範囲の皮膚をメスで背側正中切開した。その後、SCI モデル作製時に設置した合成人工硬膜を目標にして筋肉を剥離し、剥離後に合成人工硬膜を取り除き、第 10 胸椎の脊髄を露出させた。ハミルトンシリンジを用いて、SCI 領域の頭側と尾側の背側正中から深さ 1 mm の脊髄実質

内に、それぞれ細胞液（ChABC-OECs または OECs）を 1 μ L ずつ（頭側と尾側で計 2 回）投与した。合計 1.8×10^5 個の ChABC-OECs（ChABC-OECs 群）または OECs（OECs 群）を移植した。Media 群では、HBSS（-）を他の群と同様の位置に、同量投与した。移植後は、SCI モデル作製時と同様の手順で閉創した。

3.2.9. 細胞移植後の管理

細胞移植後は、SCI モデル作製時と同様に、術後 2 日間は鎮痛目的でカルプロフェン（5 mg/kg）を皮下投与した。免疫抑制状態による感染予防のために、周術期から移植 6 週間後まで、セファレキシン 15 mg/kg を筋肉内投与した。移植後も引き続き、個体の健康状態（体重や飲水量、外見異常の有無）や膀胱の大きさをチェックし、必要に応じて用手による膀胱圧迫を施した。また、前述したように、耐え難い苦痛を伴うような所見を認めた場合、人道的エンドポイントを適応し、安楽死を施した。

3.2.10. 運動機能評価

Basso, Beattie, Bresnahan（BBB）スコア（Basso D. M. et al. 1995）とラダーテスト（Metz G. A. & Whishaw I. Q. 2009）を用いて後肢の運動機能の評価した。細胞移植手術直前（BBB スコアのみ）と移植後 6 週間の 1 週ごとに、BBB スコアとラダーテスト評価用の動画を撮影した。撮影した動画を用いて、移植細胞を盲検化した 2 人の評価者が後肢の運動機能評価を行った。2 人の評価者の評価結果を平均化したものをラットのスコアとした。

i) BBB スコア

BBB スコアは、後肢の運動機能（関節の動き、負重、協調性）を 0～21 のス

コアで評価する方法である(表 8)。BBB スコアでは、術前にラットを直径約 60cm の円形の金盥の中を歩行させて順化させた。評価用の動画はラットに金盥の中を自由に歩行させ、その様子を 3 分間撮影した。

ii) ラダーテスト

ラダーテストは、ラットに 1 m 水平方向の梯子をわたらせて、その際の両後肢の踏み外した回数をカウントした。ラットは損傷前に、梯子を渡るように訓練された(図 8)。細胞移植後、1 週間ごとに、ラット 1 匹につき 2 回梯子をわたらせた。両後肢の評価ができるように、評価用の動画は梯子の下から見上げるように撮影した。

3.2.11. 統計学的解析

BBB スコアとラダーテストは、反復測定 ANOVA で分析した。統計解析は、市販の統計ソフト (GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて行った。P 値が 0.05 未満を統計学的に有意と判断した。

表 8 : BBB スコア

スコア	評価基準
0	後肢の動きが認められない。
1	後肢の 1~2 関節がわずかに動く (股関節 and/or 膝関節)。
2	後肢の 1 関節が大きく動く。 または、1 関節が大きく動いて他の 1 関節がわずかに動く。
3	後肢の 2 関節が大きく動く。
4	後肢の 3 関節全てがわずかに動く。
5	後肢の 2 関節がわずかに動き、1 関節が大きく動く。
6	後肢の 2 関節が大きく動き、1 関節がわずかに動く。
7	後肢の 3 関節が全て大きく動く。
8	後肢の関節は十分に動くが負重できず、横に流れる。 または、足底で負重できない。
9	静止時のみ測定で負重できる。 または、時折 (≦50%) or しばしば (51-94%) or 一貫して (95-100%) 足背での負重できたステップが見られる。
10	時折 (≦50%) 足底で負重したステップが見られるが、前肢との協調性はない。
11	半分以上 (51-100%) 足底でステップするが、前肢との協調性はない。
12	半分以上 (51-100%) 足底でステップして、時折(≦50%)前肢との協調性が認められる。

次ページへ続く

表 8 : BBB スコアの続き 1

13	半分以上 (51-100%) 足底でステップして、しばしば(51-94%)前肢との協調性が認められる。
14	ほとんど (95-100%) 負重した足底のステップで、前肢との協調性が認められる。そして歩行中の後肢の着地時と挙上の瞬間に、後肢が外転 or 内転している。 または、しばしば足底でステップして、前肢との協調性があり、時折足背でステップする。
15	ほとんど足底でステップして、前肢との協調性が認められる。 そして前肢で進んだ際に Toe clearance (TC:歩行遊脚期時の床と足尖の距離) がない、または時折 TC がある。(後肢の着地時に後肢が体軸に並行)
16	歩行中、ほとんど足底でステップし、前肢との協調性がある。そして、前進時に TC がしばしば (51-94%) 認められる。(後肢が着地時に体軸に平行、挙上時に回転)
17	歩行中、ほとんど足底でステップし、前肢との協調性がある。そして、前進時に TC がしばしば (51-94%) 認められる。(後肢が着地時と挙上時に体軸に平行)
18	歩行中、ほとんど足底でステップし、前肢との協調性がある。そして、前進時に TC がほとんど (95-100%) 認められる。(後肢が着地時に体軸に平行、挙上時に回転)

次ページへ続く

表 8 : BBB スコアの続き 2

19	歩行中、ほとんど足底でステップし、前肢との協調性がある。そして、前進時に TC がほとんど (95-100%) 認められる。(後肢が着地時と挙上時に体軸に平行)
20	歩行中、ほとんど足底でステップし、前肢との協調性がある。TC がほとんど (95-100%) 認められる。後肢の着地時と挙上時に体軸に平行。尻尾がほぼ常に (95-100%) 挙上している。体軸が不安定。
21	歩行中、ほとんど足底でステップし、前肢との協調性がある。TC がほとんど (95-100%) 認められる。後肢の着地時と挙上時に体軸に平行。体軸がほとんど (95-100%) 安定しており、尻尾がほぼ常に (95-100%) 挙上している。



図 8 : 脊髄損傷処置前のラダーテスト訓練の様子

3.3. 結果

SCI手術後3週間で、3匹のラットが人道的エンドポイントとして安楽死が施された。さらに、3匹のラットが細胞移植手術中に麻酔下で死亡した。最終的に、Media群 (n=5)、OECs群 (n=6)、ChABC-OECs群 (n=7) となった。

BBBスコアでは、6週間の観察期間中、各群間に有意な差は認められなかった ($P = 0.53$) が、OECs群とChABC-OECs群のラットのBBBスコアは期間中に増加する傾向が認められた [OECs群: 移植前= 11.4 ± 3.1 、6週目= 15.0 ± 2.5 (n=6) ; ChABC-OECs群: 移植前= 11.8 ± 2.2 、6週目= 15.9 ± 2.9 (n=7)] (表9、図9、10A)。一方、Media群のラットにおけるBBBスコアの増加は比較的少なく、5週目以降にのみ増加する傾向が認められた [移植前= 11.65 ± 3.3 、5週目= 12.2 ± 4.0 、6週目= 13.1 ± 4.6 (n=5)] (表9、図9、10B)。

ラダーテストにおいても、同様に、足を踏み外した回数は各群間で有意な差は見られなかった ($P = 0.40$) が、OECs群では足を踏み外した回数が減少し、ChABC-OECs群ではさらに減少する傾向が見られた (OECs群: 1週目= 3.3 ± 1.8 、6週目= 2.8 ± 1.1 ; ChABC-OECs群: 1週目= 3.5 ± 1.6 、6週目= 2.1 ± 1.2 (表10、図11)。一方で、Media群のラットでは、OECs群やChABC-OECs群ほどの踏み外し回数の減少は認められなかった (1週目= 3.5 ± 1.6 、6週目= 3.4 ± 1.4) (表10、図11)。Media群の1匹のラットは、梯子を渡ることを拒否したため、ラダーテストにおけるMedia群ではn=4であった。

表 9 : BBB スコアの推移

	移植直前	移植後1週間	移植後2週間	移植後3週間	移植後4週間	移植後5週間	移植後6週間
ChABC-OECs群	11.8(±2.2)	12.2(±3.4)	13.9(±2.9)	14.8(±3.2)	15.0(±3.6)	15.9(±2.7)	15.9(±2.9)
OECs群	11.4(±3.1)	11.0(±2.8)	13.5(±3.4)	14.3(±3.1)	14.8(±2.6)	15.0(±2.4)	15.0(±2.5)
Media群	11.6(±3.3)	11.7(±4.3)	12.0(±4.5)	12.1(±4.2)	12.1(±4.2)	12.2(±4.0)	13.1(±4.6)
							平均 (±SD)

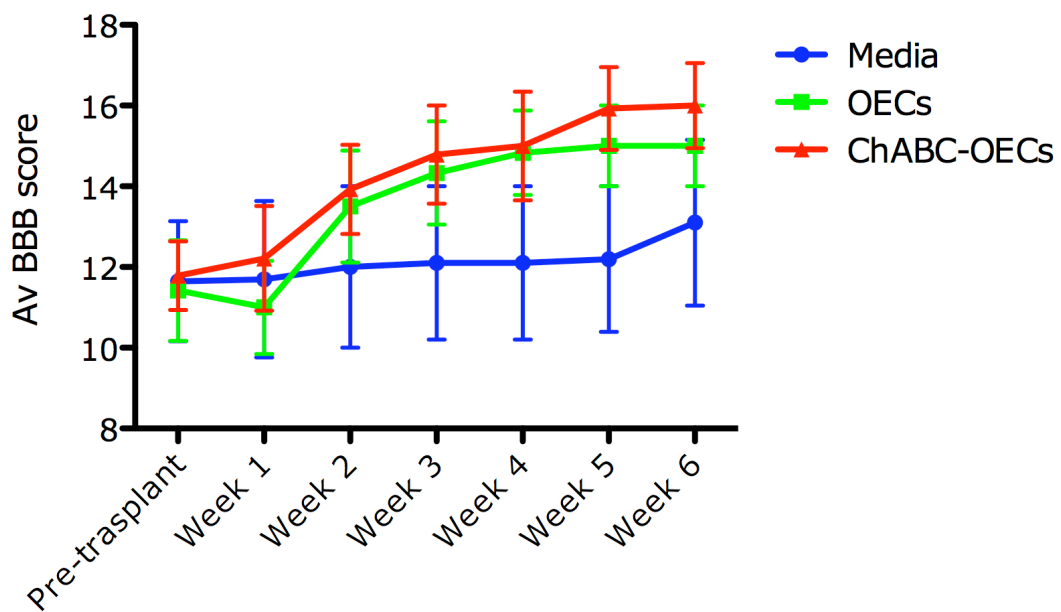


図 9：各群の平均 BBB スコアの推移

縦軸が平均 BBB スコア、横軸が時間を表している。OECs 群および ChABC-OECs 群では、時間経過に伴って BBB スコアが回復する傾向が認められる。[Media 群：n = 5、OECs 群：n = 6、ChABC-OECs 群：n = 7、エラーバー：標準誤差]

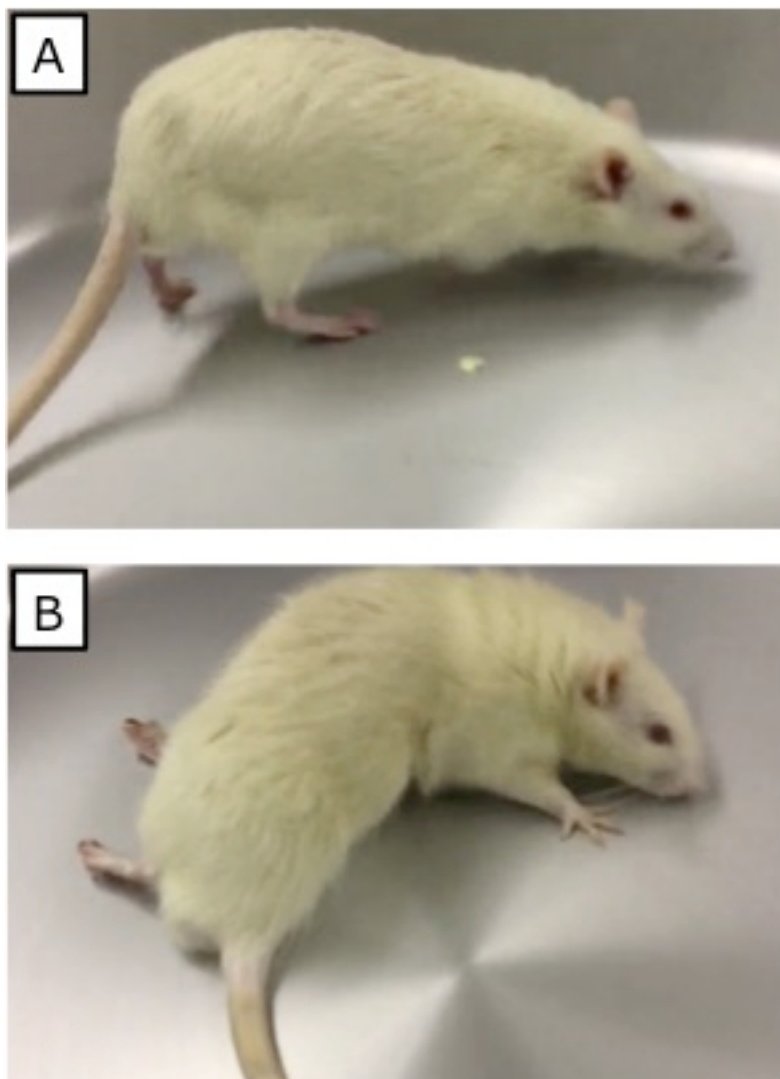


図 10：移植 6 週間後のラットの様子（A：ChABC-OECs 群、B：Media 群）

ChABC-OECs 群では、後肢による起立が可能で、足底で歩行している様子が認められた。Media 群では、後肢で起立することができず、両後肢とも引きずりながら移動している様子が認められた。

表 10 : ラダーテストの結果の推移

	移植後1週間	移植後2週間	移植後3週間	移植後4週間	移植後5週間	移植後6週間
ChABC-OECs群	3.50(±1.6)	3.21(±0.9)	3.18(±0.7)	2.93(±0.6)	2.69(±1.8)	2.14(±1.2)
OECs群	3.29(±1.8)	3.54(±1.1)	2.79(±0.7)	2.67(±1.2)	3.04(±0.9)	2.83(±1.1)
Media群	3.50(±1.6)	3.38(±1.0)	4.13(±1.9)	3.75(±2.1)	4.13(±1.4)	3.38(±1.4)
						平均(±SD)

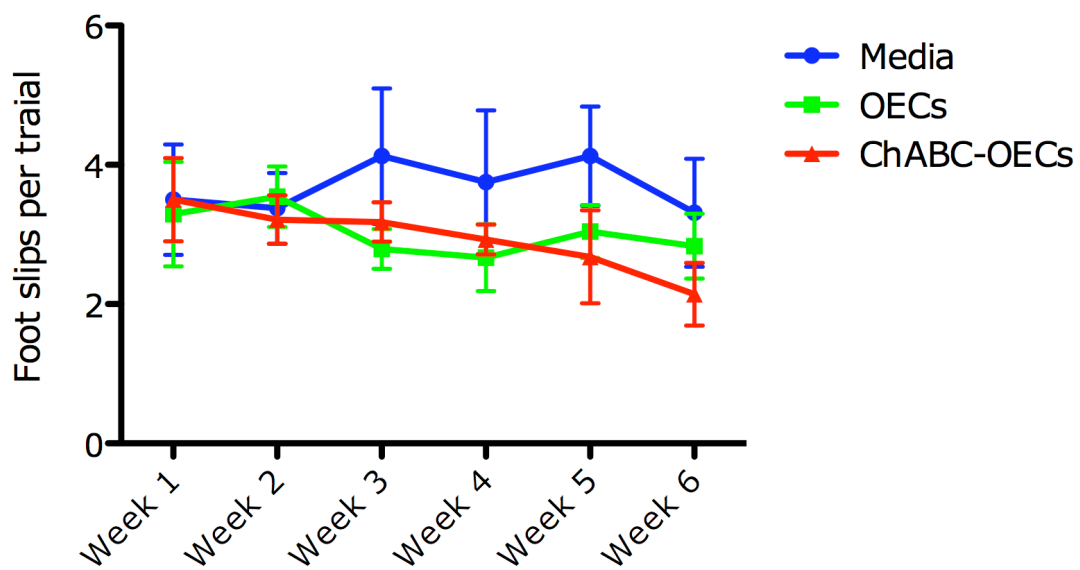


図 11：各群のラダーテストの結果の推移

縦軸が踏み外した回数、横軸が時間を表している。ChABC-OECs 群では、時間経過に伴って、踏み外す回数が減少する傾向が認められる。OECs 群では、損傷 1 週間後と 2 週間後、および 4 週間後と 5 週間後の間で、踏み外し回数の増加が認められたが、観察期間全体（損傷 1 週間後から 6 週間後）では、わずかに踏み外す回数が減少する傾向が認められる。[Media 群：n = 4、OECs 群：n = 6、ChABC-OECs 群：n = 7、エラーバー：標準誤差]

3.4. 考察

犬の OECs または ChABC-OECs を損傷 3 週間後の慢性期胸部 SCI ラットに移植したところ、Media 群との間に統計学的に有意な差は認められなかったものの、後肢の運動機能は回復する傾向が認められた。また、ChACB-OECs 移植群では、移植後の後肢運動機能が OECs 移植群よりもわずかに回復する傾向が認められた。

Media 群と比較し、OECs 群ならびに ChABC-OECs 群で有意に後肢の運動機能が改善しなかった理由として、移植後の細胞生着期間が要因であると考えられた。本学位論文では後肢の運動機能評価のみを担当しているため、OECs 移植後の脊髄の病理組織学的評価に関する結果は報告していないが、共同研究で病理組織学的評価を担当した研究者 (Jon Prager ら) から、移植 6 週間後における脊髄組織内に移植した OECs または ChABC-OECs が確認できなかったことが報告されている。これは異種間移植によって、移植細胞が生存できなかったことが原因であると考えられる。齧歯類の胸腰部挫傷 SCI モデルにおける同種間移植の OECs の生存率を調査した研究では、移植後 3~5 週間の時点でも OECs が存在していることが報告されており、生存率を数値化した研究では、移植 3 週間後の時点で移植細胞の生存率は 0.01~3.1%であった (Pearse D. D. et al. 2007; Zhang J. et al. 2015)。また、移植 9 週間後の生存率は、3 週後の生存率と同程度であったことも報告されている (Pearse D. D. et al. 2007)。つまり、これらの過去の研究では、移植 6 週後 (本研究の終了時点) の OECs が存在していたことを示していた。しかし、異種間移植を行った報告における、緑色蛍光タンパク質による免疫蛍光イメージングによると、移植 6 週間後に生存している明確な OECs は認められず、緑色蛍光タンパク質の破片だけが認められた (Gorrie C. A.

et al. 2010)。一方で、共同研究者によると、OECs 群と ChABC-OECs 群では、Media 群に比べて、病変部（損傷部）での軸索がより多く認められる傾向にあったことが報告されている。したがって、本研究においては、OECs と ChABC-OECs の移植による軸索再生の誘導は生じたものの、過去の報告と同様に、移植後の犬 OECs が異種の脊髄組織内で十分に生存できず、OECs 移植による十分な軸索再生誘導の効果が得られなかったことが、有意な運動機能の改善が認められなかった理由の一端である可能性が考えられた。

加えて、本研究では、細胞移植から観察終了の時点までの間に組織学的分析と細胞生存率の定量化を行わなかったため、移植した ChABC-OECs がどのくらいの期間生存できていたか（すなわち、ChABC-OECs がどのくらいの期間、病変部に ChABC を供給していたか）を正確に示すことはできなかった。しかし、病理組織学的評価を行った共同研究者（Jon Prager ら）によると、ChABC-OECs 群では移植 6 週後の時点で細胞移植した SCI 領域にグリア瘢痕の主成分である CSPG の分解産物が検出されたが、Media 群ならびに OECs 群では CSPG の分解産物が認められなかったとしている。過去の報告では、慢性期胸腰部挫傷 SCI モデルラットに、2 週間の活性を保持させた ChABC を単剤投与した場合、BBB スコアが対照群に比べてわずかに増加していた（Raspa A. et al. 2019）。したがって本研究においても OECs 群と比較して ChABC-OECs 群においてわずかに BBB スコアが増加していた理由として、移植された ChABC-OECs が一定期間 ChABC を分泌し、グリア瘢痕を分解したことに起因していると考えられた。

本研究の BBB スコアとラダーテストの結果に見られる傾向を考慮すると、この研究をより多くの検体数で繰り返しの検討を行うことは価値があると考えら

れた。また、異種間の移植による免疫拒絶反応を回避する点で、ラットの OECs に ChABC 産生遺伝子を導入し、同種間移植により、再評価を検討する事も価値があると考えられた。

補足情報

i) ChABC-OECs の ChABC 産生の確認

Morgan Elson 反応により、ChABC-OECs による *in vitro* での活性型 ChABC の産生が確認された (OECs との有差、 $p < 0.0001$ unpaired t-test; 平均 ChABC-OECs = 0.0034 ± 0.0005 U/ml, OEC = 0.00011 ± 0.000077 U/ml)。ChABC-OECs に由来する ChABC の活性の Morgan Elson 値を、濃度を変えた市販の ChABC の活性と比較した結果、約 5×10^4 個あたりの ChABC-OECs による ChABC 活性は、 $0.075U$ と算出された。(共同研究者 Jon Prager らの提供)

ii) SCI モデル作製時の損傷の実行値

SCI モデル作製時の脊髄損傷モデル作製装置の実行値を測定したところ、群間に差がなく、SCI の重症度とばらつきが同じであることが確認された (一元配置分散分析 ; Media 群 = 303.6 ± 70.8 kdyn、OECs 群 = 296.7 ± 52.94 kdyn、ChABC-OECs 群 = 281.9 ± 60.0 kdyn)。

3.5. 小括

本章の研究から、慢性期 SCI 患者への OECs の移植は運動機能の改善をもたらし、さらに、ChABC-OECs の移植はより良い運動機能の改善をもたらす可能性が示唆された。

第 4 章

総括

本研究によって、MR Heavily T2 強調画像で広範囲の CSF 信号減衰を認める深部痛覚を消失した胸腰部 IVDE の犬は、従来の外科的な治療のみでは機能改善が期待できないことから、SCI 後早期の OECs 移植療法の適応患者となることが示唆された。また、この適応患者に嗅粘膜由来 OECs の自家移植を行う際の OECs の培養には、本研究で検討した物理的な衝撃による細胞剥離法を利用することで、OECs を任意の純度で患者に提供することが可能であると考えられる。さらに、SCI 後慢性期を迎えた患者に対しては、ChABC 産生遺伝子を導入した OECs を移植することでより良い運動機能の改善をもたらす可能性が示唆された。今後は、本研究での結果を利用した OECs の安定的な純化培養法の確立とともに、SCI 患者における OECs 移植の臨床応用への展開が期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり多大なるご指導とご鞭撻を賜りました、日本大学生物資源科学部獣医学科獣医神経病学研究室の北川勝人教授ならびに伊藤大介教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究へのご協力とご意見を賜りました、同研究室所属の石川智恵子先生および塩澤直子先生、英国ブリストル大学の共同研究者である Dr. Liang-Fong Wong、Dr. Jon Prager、Dr. Nicolas Granger、本研究への材料提供にご協力いただきました日本大学生物資源科学部獣医学科獣医外科学研究室内の浅野和之教授には深く感謝申し上げます。最後に、大学院進学を支持および支援してくださった父と母、兄に心から感謝申し上げます。

引用文献

1. Adriaansen, J. J., Ruijs, L. E., van Koppenhagen, C. F., van Asbeck, F. W., Snoek, G. J., van Kuppevelt, D., Visser-Meily, J. M., & Post, M. W. (2016). Secondary health conditions and quality of life in persons living with spinal cord injury for at least ten years. *Journal of rehabilitation medicine*, 48(10), 853–860.
2. Aggarwal, A., Azad, R., Ahmad, A., Arora, P., & Gupta, P. (2012). Additional Merits of Two-dimensional Single Thick-slice Magnetic Resonance Myelography in Spinal Imaging. *Journal of clinical imaging science*, 2, 84.
3. Ahuja, C. S., Wilson, J. R., Nori, S., Kotter, M., Druschel, C., Curt, A., & Fehlings, M. G. (2017a). Traumatic spinal cord injury. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17018.
4. Ahuja, C. S., Nori, S., Tetreault, L., Wilson, J., Kwon, B., Harrop, J., Choi, D., & Fehlings, M. G. (2017b). Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration. *Neurosurgery*, 80(3S), S9–S22.
5. Aikawa, T., Fujita, H., Kanazono, S., Shibata, M., & Yoshigae, Y. (2012). Long-term neurologic outcome of hemilaminectomy and disk fenestration for treatment of dogs with thoracolumbar intervertebral disk herniation: 831 cases (2000-2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241(12), 1617–1626.

6. Alisauskaite, N., Spitzbarth, I., Baumgärtner, W., Dziallas, P., Kramer, S., Dening, R., Stein, V. M., & Tipold, A. (2017). Chronic post-traumatic intramedullary lesions in dogs, a translational model. *PloS one*, 12(11), e0187746.
7. Assinck, P., Duncan, G. J., Hilton, B. J., Plemel, J. R., & Tetzlaff, W. (2017). Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nature neuroscience*, 20(5), 637–647.
8. Barnett, S. C., Hutchins, A. M., & Noble, M. (1993). Purification of olfactory nerve ensheathing cells from the olfactory bulb. *Developmental biology*, 155(2), 337–350.
9. Barone, G., Ziemer, L. S., Shofer, F. S., & Steinberg, S. A. (2002). Risk factors associated with development of seizures after use of iohexol for myelography in dogs: 182 cases (1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(10), 1499–1502.
10. Bartus, K., James, N. D., Didangelos, A., Bosch, K. D., Verhaagen, J., Yáñez-Muñoz, R. J., Rogers, J. H., Schneider, B. L., Muir, E. M., & Bradbury, E. J. (2014). Large-scale chondroitin sulfate proteoglycan digestion with chondroitinase gene therapy leads to reduced pathology and modulates macrophage phenotype following spinal cord contusion injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(14), 4822–4836.

11. Basso, D. M., Beattie, M. S., & Bresnahan, J. C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of neurotrauma*, 12(1), 1–21.
12. Besalti, O., Pekcan, Z., Sirin, Y. S., & Erbas, G. (2006). Magnetic resonance imaging findings in dogs with thoracolumbar intervertebral disk disease: 69 cases (1997-2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(6), 902–908.
13. Boekhoff, T. M., Flieshardt, C., Ensinger, E. M., Fork, M., Kramer, S., & Tipold, A. (2012). Quantitative magnetic resonance imaging characteristics: evaluation of prognostic value in the dog as a translational model for spinal cord injury. *Journal of spinal disorders & techniques*, 25(3), E81–E87.
14. Bradbury, E. J., Moon, L. D., Popat, R. J., King, V. R., Bennett, G. S., Patel, P. N., Fawcett, J. W., & McMahon, S. B. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416(6881), 636–640.
15. Bradbury, E. J., & Carter, L. M. (2011). Manipulating the glial scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain research bulletin*, 84(4-5), 306–316.
16. Caggiano, A. O., Zimmer, M. P., Ganguly, A., Blight, A. R., & Gruskin, E. A. (2005). Chondroitinase ABCI improves locomotion and bladder function following contusion injury of the rat spinal cord. *Journal of neurotrauma*, 22(2), 226–239.

17. Carwardine, D., Wong, L. F., Fawcett, J. W., Muir, E. M., & Granger, N. (2016). Canine olfactory ensheathing cells from the olfactory mucosa can be engineered to produce active chondroitinase ABC. *Journal of the neurological sciences*, 367, 311–318.
18. Carwardine, D., Prager, J., Neeves, J., Muir, E. M., Uney, J., Granger, N., & Wong, L. F. (2017). Transplantation of canine olfactory ensheathing cells producing chondroitinase ABC promotes chondroitin sulphate proteoglycan digestion and axonal sprouting following spinal cord injury. *PloS one*, 12(12), e0188967.
19. Castel, A., Olby, N. J., Mariani, C. L., Muñana, K. R., & Early, P. J. (2017). Clinical Characteristics of Dogs with Progressive Myelomalacia Following Acute Intervertebral Disc Extrusion. *Journal of veterinary internal medicine*, 31(6), 1782–1789.
20. Cheng, C. H., Lin, C. T., Lee, M. J., Tsai, M. J., Huang, W. H., Huang, M. C., Lin, Y. L., Chen, C. J., Huang, W. C., & Cheng, H. (2015). Local Delivery of High-Dose Chondroitinase ABC in the Sub-Acute Stage Promotes Axonal Outgrowth and Functional Recovery after Complete Spinal Cord Transection. *PloS one*, 10(9), e0138705.
21. Chuah, M. I., & West, A. K. (2002). Cellular and molecular biology of ensheathing cells. *Microscopy research and technique*, 58(3), 216–227.
22. Coutts, D. J., Humphries, C. E., Zhao, C., Plant, G. W., & Franklin, R. J. (2013). Embryonic-derived olfactory ensheathing cells remyelinate focal areas of spinal

cord demyelination more efficiently than neonatal or adult-derived cells. *Cell transplantation*, 22(7), 1249–1261.

23. Crawford, A. H., & De Decker, S. (2017). Clinical presentation and outcome of dogs treated medically or surgically for thoracolumbar intervertebral disc protrusion. *The Veterinary record*, 180(23), 569.
24. De Risio, L., Adams, V., Dennis, R., & McConnell, F. J. (2009). Association of clinical and magnetic resonance imaging findings with outcome in dogs with presumptive acute noncompressive nucleus pulposus extrusion: 42 cases (2000-2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(4), 495–504.
25. Dong, H., Fazzaro, A., Xiang, C., Korsmeyer, S. J., Jacquin, M. F., & McDonald, J. W. (2003). Enhanced oligodendrocyte survival after spinal cord injury in Bax-deficient mice and mice with delayed Wallerian degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(25), 8682–8691.
26. Duncan, S.M. & Amrhein T.J., 2012, 'T2 Contrast', in W.I. Mangrun & K.L. Christianson (eds.), *Duke review of MRI principles*, pp. 19-41, ELSEVIER MOSBY, Philadelphia.
27. Duval, J., Dewey, C., Roberts, R., & Aron, D. (1996). Spinal cord swelling as a myelographic indicator of prognosis: a retrospective study in dogs with intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. *Veterinary surgery*:

VS, 25(1), 6–12.

28. Fehlings, M. G., & Vawda, R. (2011). Cellular treatments for spinal cord injury: the time is right for clinical trials. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 8(4), 704–720.
29. Field, P., Li, Y., & Raisman, G. (2003). Ensheathment of the olfactory nerves in the adult rat. *Journal of neurocytology*, 32(3), 317–324.
30. Franceschini, I. A., & Barnett, S. C. (1996). Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Developmental biology*, 173(1), 327–343.
31. Fry, E. J., Chagnon, M. J., López-Vales, R., Tremblay, M. L., & David, S. (2010). Corticospinal tract regeneration after spinal cord injury in receptor protein tyrosine phosphatase sigma deficient mice. *Glia*, 58(4), 423–433.
32. Gamblin, A., Garry, J. G., Wilde, H. W., Reese, J. C., Sherrod, B., Karsy, M., Guan, J., Mortenson, J., Flis, A., Rosenbluth, J. P., Bisson, E., & Dailey, A. (2019). Cost Analysis of Inpatient Rehabilitation after Spinal Injury: A Retrospective Cohort Analysis. *Cureus*, 11(9), e5747.
33. García-Álías, G., López-Vales, R., Forés, J., Navarro, X., & Verdú, E. (2004). Acute transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells promotes recovery after spinal cord injury in the rat. *Journal of neuroscience research*, 75(5), 632–641.

34. GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators (2019). Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Neurology*, 18(1), 56–87.
35. Georgiou, M., Reis, J., Wood, R., Esteban, P. P., Robertson, V., Mason, C., Li, D., Li, Y., Choi, D., & Wall, I. (2018). Bioprocessing strategies to enhance the challenging isolation of neuro-regenerative cells from olfactory mucosa. *Scientific reports*, 8(1), 14440.
36. Gilmour, L. J., Jeffery, N. D., Miles, K., & Riedesel, E. (2017). SINGLE-SHOT TURBO SPIN ECHO PULSE SEQUENCE FINDINGS IN DOGS WITH AND WITHOUT PROGRESSIVE MYELOMALACIA. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 58(2), 197–205.
37. Gómez, R. M., Sánchez, M. Y., Portela-Lomba, M., Ghotme, K., Barreto, G. E., Sierra, J., & Moreno-Flores, M. T. (2018). Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia*, 66(7), 1267–1301.
38. Gorrie, C. A., Hayward, I., Cameron, N., Kailainathan, G., Nandapalan, N., Sutharsan, R., Wang, J., Mackay-Sim, A., & Waite, P. M. (2010). Effects of human OEC-derived cell transplants in rodent spinal cord contusion injury. *Brain research*, 1337, 8–20.

39. Granger, N., Blamires, H., Franklin, R. J., & Jeffery, N. D. (2012). Autologous olfactory mucosal cell transplants in clinical spinal cord injury: a randomized double-blinded trial in a canine translational model. *Brain : a journal of neurology*, 135(Pt 11), 3227–3237.
40. Griffiths I. R. (1972). The extensive myelopathy of intervertebral disc protrusions in dogs ('the ascending syndrome'). *The Journal of small animal practice*, 13(8), 425–438.
41. Griffiths I. R. (1978). Spinal cord injuries: a pathological study of naturally occurring lesions in the dog and cat. *Journal of comparative pathology*, 88(2), 303–315.
42. Gudiño-Cabrera, G., & Nieto-Sampedro, M. (1996). Ensheathing cells: Large scale purification from adult olfactory bulb, freeze-preservation and migration of transplanted cells in adult brain. *Restorative neurology and neuroscience*, 10(1), 25–34.
43. Guillem Gallach, R., Suran, J., Cáceres, A. V., Reetz, J. A., Brown, D. C., & Mai, W. (2011). Reliability of T2-weighted sagittal magnetic resonance images for determining the location of compressive disk herniation in dogs. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 52(5), 479–486.
44. Hansen H. J. (1951). A pathologic-anatomical interpretation of disc degeneration

- in dogs. *Acta orthopaedica Scandinavica*, 20(4), 280–293.
45. Henke, D., Vandavelde, M., Doherr, M. G., Stöckli, M., & Forterre, F. (2013). Correlations between severity of clinical signs and histopathological changes in 60 dogs with spinal cord injury associated with acute thoracolumbar intervertebral disc disease. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 198(1), 70–75.
 46. Hu, H. Z., Granger, N., Pai, S. B., Bellamkonda, R. V., & Jeffery, N. D. (2018). Therapeutic efficacy of microtube-embedded chondroitinase ABC in a canine clinical model of spinal cord injury. *Brain : a journal of neurology*, 141(4), 1017–1027.
 47. Hu, R., Zhou, J., Luo, C., Lin, J., Wang, X., Li, X., Bian, X., Li, Y., Wan, Q., Yu, Y., & Feng, H. (2010). Glial scar and neuroregeneration: histological, functional, and magnetic resonance imaging analysis in chronic spinal cord injury. *Journal of neurosurgery. Spine*, 13(2), 169–180.
 48. Imaizumi, T., Lankford, K. L., Burton, W. V., Fodor, W. L., & Kocsis, J. D. (2000). Xenotransplantation of transgenic pig olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in rat spinal cord. *Nature biotechnology*, 18(9), 949–953.
 49. Iseda, T., Okuda, T., Kane-Goldsmith, N., Mathew, M., Ahmed, S., Chang, Y. W., Young, W., & Grumet, M. (2008). Single, high-dose intraspinal injection of chondroitinase reduces glycosaminoglycans in injured spinal cord and promotes corticospinal axonal regrowth after hemisection but not contusion. *Journal of neurotrauma*, 25(4), 334–349.

50. Ito, D., Ibanez, C., Ogawa, H., Franklin, R. J., & Jeffery, N. D. (2006). Comparison of cell populations derived from canine olfactory bulb and olfactory mucosal cultures. *American journal of veterinary research*, 67(6), 1050–1056.
51. Ito, D., Fujita, N., Ibanez, C., Sasaki, N., Franklin, R. J., & Jeffery, N. D. (2008). Serum-free medium provides a clinically relevant method to increase olfactory ensheathing cell numbers in olfactory mucosa cell culture. *Cell transplantation*, 16(10), 1021–1027.
52. Ito, D., Carwardine, D., Prager, J., Wong, L. F., Kitagawa, M., Jeffery, N., & Granger, N. (2019). Methods of olfactory ensheathing cell harvesting from the olfactory mucosa in dogs. *PloS one*, 14(3), e0213252.
53. Ito, D., Ishikawa, C., Sekiguchi, N., Jeffery, N. D., & Kitagawa, M. (2020). Utility of "MR myelography" in diagnosis of a presumed spinal subarachnoid diverticulum. *The Journal of small animal practice*, 61(12), 782.
54. James, N. D., Shea, J., Muir, E. M., Verhaagen, J., Schneider, B. L., & Bradbury, E. J. (2015). Chondroitinase gene therapy improves upper limb function following cervical contusion injury. *Experimental neurology*, 271, 131–135.
55. Jani, H. R., & Raisman, G. (2004). Ensheathing cell cultures from the olfactory bulb and mucosa. *Glia*, 47(2), 130–137.
56. Janssens, L.A.A. (1991) Mechanical and pathophysiological aspects of acute spinal cord trauma, *Journal of Small Animal Practice* 32(11), 572–578.

57. Jeffery, N. D., Lakatos, A., & Franklin, R. J. (2005). Autologous olfactory glial cell transplantation is reliable and safe in naturally occurring canine spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*, 22(11), 1282–1293.
58. Jeffery, N. D., Levine, J. M., Olby, N. J., & Stein, V. M. (2013). Intervertebral disk degeneration in dogs: consequences, diagnosis, treatment, and future directions. *Journal of veterinary internal medicine*, 27(6), 1318–1333.
59. Jeffery, N. D., Barker, A. K., Hu, H. Z., Alcott, C. J., Kraus, K. H., Scanlin, E. M., Granger, N., & Levine, J. M. (2016). Factors associated with recovery from paraplegia in dogs with loss of pain perception in the pelvic limbs following intervertebral disk herniation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 248(4), 386–394.
60. Jeffery, N. D., Mankin, J. M., Ito, D., Boudreau, C. E., Kerwin, S. C., Levine, J. M., Krasnow, M. S., Andruzzi, M. N., Alcott, C. J., & Granger, N. (2020). Extended durotomy to treat severe spinal cord injury after acute thoracolumbar disc herniation in dogs. *Veterinary surgery : VS*, 49(5), 884–893.
61. Jensen, M. B., Krishnaney-Davison, R., Cohen, L. K., & Zhang, S. C. (2012). Injected Versus Oral Cyclosporine for Human Neural Progenitor Grafting in Rats. *Journal of stem cell research & therapy*, Suppl 10, 003.
62. Kafitz, K. W., & Greer, C. A. (1999). Olfactory ensheathing cells promote neurite extension from embryonic olfactory receptor cells in vitro. *Glia*, 25(2), 99–110.

63. Karousou, E. G., Militsopoulou, M., Porta, G., De Luca, G., Hascall, V. C., & Passi, A. (2004). Polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled hyaluronan and chondroitin sulfate disaccharides: application to the analysis in cells and tissues. *Electrophoresis*, 25(17), 2919–2925.
64. Kawano, H., Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Yoshioka, N., Li, H. P., Kawamura, K., Li, Y., & Raisman, G. (2012). Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell and tissue research*, 349(1), 169–180.
65. Kjell, J., & Olson, L. (2016). Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. *Disease models & mechanisms*, 9(10), 1125–1137.
66. Lakatos, A., Smith, P. M., Barnett, S. C., & Franklin, R. J. (2003). Meningeal cells enhance limited CNS remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells. *Brain : a journal of neurology*, 126(Pt 3), 598–609.
67. Langerhuus, L., & Miles, J. (2017). Proportion recovery and times to ambulation for non-ambulatory dogs with thoracolumbar disc extrusions treated with hemilaminectomy or conservative treatment: A systematic review and meta-analysis of case-series studies. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 220, 7–16.
68. Lee, H., McKeon, R. J., & Bellamkonda, R. V. (2010). Sustained delivery of thermostabilized chABC enhances axonal sprouting and functional recovery after spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3340–3345.

69. Lemons, M. L., Howland, D. R., & Anderson, D. K. (1999). Chondroitin sulfate proteoglycan immunoreactivity increases following spinal cord injury and transplantation. *Experimental neurology*, 160(1), 51–65.
70. Lenehan, B., Fisher, C. G., Vaccaro, A., Fehlings, M., Aarabi, B., & Dvorak, M. F. (2010). The urgency of surgical decompression in acute central cord injuries with spondylosis and without instability. *Spine*, 35(21 Suppl), S180–S186.
71. Levine, J. M., Fosgate, G. T., Chen, A. V., Rushing, R., Nghiem, P. P., Platt, S. R., Bagley, R. S., Kent, M., Hicks, D. G., Young, B. D., & Schatzberg, S. J. (2009). Magnetic resonance imaging in dogs with neurologic impairment due to acute thoracic and lumbar intervertebral disk herniation. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(6), 1220–1226.
72. Lewis, D. D., & Hosgood, G. (1992). Complications associated with the use of iohexol for myelography of the cervical vertebral column in dogs: 66 cases (1988-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200(9), 1381–1384.
73. Lewis, M. J., Granger, N., Jeffery, N. D., & Canine Spinal Cord Injury Consortium (CANSORT-SCI) (2020). Emerging and Adjunctive Therapies for Spinal Cord Injury Following Acute Canine Intervertebral Disc Herniation. *Frontiers in veterinary science*, 7, 579933.
74. Li, S., & Stys, P. K. (2000). Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *The Journal*

of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 20(3), 1190–1198.

75. Li, Y., Li, D., & Raisman, G. (2005). Interaction of olfactory ensheathing cells with astrocytes may be the key to repair of tract injuries in the spinal cord: the 'pathway hypothesis'. *Journal of neurocytology*, 34(3-5), 343–351.
76. Liu, C. B., Yang, D. G., Zhang, X., Zhang, W. H., Li, D. P., Zhang, C., Qin, C., Du, L. J., Li, J., Gao, F., Zhang, J., Zuo, Z. T., Yang, M. L., & Li, J. J. (2019). Degeneration of white matter and gray matter revealed by diffusion tensor imaging and pathological mechanism after spinal cord injury in canine. *CNS neuroscience & therapeutics*, 25(2), 261–272.
77. López-Vales, R., Forés, J., Verdú, E., & Navarro, X. (2006). Acute and delayed transplantation of olfactory ensheathing cells promote partial recovery after complete transection of the spinal cord. *Neurobiology of disease*, 21(1), 57–68.
78. López-Vales, R., Forés, J., Navarro, X., & Verdú, E. (2007). Chronic transplantation of olfactory ensheathing cells promotes partial recovery after complete spinal cord transection in the rat. *Glia*, 55(3), 303–311.
79. Loughin, C. A., Dewey, C. W., Ringwood, P. B., Pettigrew, R. W., Kent, M., & Budsberg, S. C. (2005). Effect of durotomy on functional outcome of dogs with type I thoracolumbar disc extrusion and absent deep pain perception. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology: V.C.O.T.*, 18(3), 141–146.

80. Lu, D., Lamb, C. R., & Targett, M. P. (2002). Results of myelography in seven dogs with myelomalacia. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 43(4), 326–330.
81. Lu, J., Féron, F., Ho, S. M., Mackay-Sim, A., & Waite, P. M. (2001). Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. *Brain research*, 889(1-2), 344–357.
82. Mackay-Sim, A., & Kittel, P. (1991). Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 11(4), 979–984.
83. Mankin, J. M., Hecht, S., & Thomas, W. B. (2012). Agreement between T2 and haste sequences in the evaluation of thoracolumbar intervertebral disc disease in dogs. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 53(2), 162–166.
84. Matsushima, R., Takahashi, A., Nakaya, Y., Maezawa, H., Miki, M., Nakamura, Y., Ohgushi, F., & Yasuoka, S. (2006). Human airway trypsin-like protease stimulates human bronchial fibroblast proliferation in a protease-activated receptor-2-dependent pathway. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 290(2), L385–L395.
85. Mayeur, A., Duclos, C., Honoré, A., Gauberti, M., Drouot, L., do Rego, J. C.,

- Bon-Mardion, N., Jean, L., Vérin, E., Emery, E., Lemarchant, S., Vivien, D., Boyer, O., Marie, J. P., & Guérout, N. (2013). Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair. *PloS one*, 8(4), e62860.
86. McDonald, J. W., & Sadowsky, C. (2002). Spinal-cord injury. *Lancet (London, England)*, 359(9304), 417–425.
87. McKeon, R. J., Schreiber, R. C., Rudge, J. S., & Silver, J. (1991). Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 11(11), 3398–3411.
88. Metz, G. A., & Wishaw, I. Q. (2009). The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (28), 1204.
89. Moore, S. A., Early, P. J., & Hettlich, B. F. (2016). Practice patterns in the management of acute intervertebral disc herniation in dogs. *The Journal of small animal practice*, 57(8), 409–415.
90. Moore, S. A., Zidan, N., Spitzbarth, I., Nout-Lomas, Y. S., Granger, N., da Costa, R. C., Levine, J. M., Jeffery, N. D., Stein, V. M., Tipold, A., & Olby, N. J. (2018). Development of an International Canine Spinal Cord Injury observational registry: a collaborative data-sharing network to optimize translational studies of SCI. *Spinal cord*, 56(7), 656–665.

91. Moreno-Flores, M. T., Díaz-Nido, J., Wandosell, F., & Avila, J. (2002). Olfactory Ensheathing Glia: Drivers of Axonal Regeneration in the Central Nervous System?. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2(1), 37–43.
92. Moreno-Flores, M. T., Lim, F., Martín-Bermejo, M. J., Díaz-Nido, J., Avila, J., & Wandosell, F. (2003). High level of amyloid precursor protein expression in neurite-promoting olfactory ensheathing glia (OEG) and OEG-derived cell lines. *Journal of neuroscience research*, 71(6), 871–881.
93. Nagayama, M., Watanabe, Y., Okumura, A., Amoh, Y., Nakashita, S., & Dodo, Y. (2002). High-resolution single-slice MR myelography. *AJR. American journal of roentgenology*, 179(2), 515–521.
94. Nakamoto, Y., Tsujimoto, G., Ikemoto, A., Omori, K., & Nakamura, T. (2021). Pathological changes within two weeks following spinal cord injury in a canine model. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, 30(10), 3107–3114.
95. Nakamura, M., Houghtling, R. A., MacArthur, L., Bayer, B. M., & Bregman, B. S. (2003). Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. *Experimental neurology*, 184(1), 313–325.

96. Nash, H. H., Borke, R. C., & Anders, J. J. (2001). New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb. *Glia*, 34(2), 81–87.
97. Narayana, P., Abbe, R., Liu, S. J., & Johnston, D. (1999). Does loss of gray- and white-matter contrast in injured spinal cord signify secondary injury? In vivo longitudinal MRI studies. *Magnetic resonance in medicine*, 41(2), 315–320.
98. Narayana, P. A., Grill, R. J., Chacko, T., & Vang, R. (2004). Endogenous recovery of injured spinal cord: longitudinal in vivo magnetic resonance imaging. *Journal of neuroscience research*, 78(5), 749–759.
99. Okada, M., Kitagawa, M., Ito, D., Itou, T., Kanayama, K., & Sakai, T. (2010). Magnetic resonance imaging features and clinical signs associated with presumptive and confirmed progressive myelomalacia in dogs: 12 cases (1997-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 237(10), 1160–1165.
100. Olby, N., Levine, J., Harris, T., Muñana, K., Skeen, T., & Sharp, N. (2003). Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(6), 762–769.
101. Olby N. (2010). The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 40(5), 791–807.

102. Olby, N. J., Muguet-Chanoit, A. C., Lim, J. H., Davidian, M., Mariani, C. L., Freeman, A. C., Platt, S. R., Humphrey, J., Kent, M., Giovanella, C., Longshore, R., Early, P. J., & Muñana, K. R. (2016). A Placebo-Controlled, Prospective, Randomized Clinical Trial of Polyethylene Glycol and Methylprednisolone Sodium Succinate in Dogs with Intervertebral Disk Herniation. *Journal of veterinary internal medicine*, 30(1), 206–214.
103. Packer, R. A., Bergman, R. L., Coates, J. R., Essman, S. C., Weis, K., O'Brien, D. P., & Johnson, G. C. (2007). Intracranial subarachnoid hemorrhage following lumbar myelography in two dogs. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 48(4), 323–327.
104. Pearse, D. D., Sanchez, A. R., Pereira, F. C., Andrade, C. M., Puzis, R., Pressman, Y., Golden, K., Kitay, B. M., Blits, B., Wood, P. M., & Bunge, M. B. (2007). Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery. *Glia*, 55(9), 976–1000.
105. Pease, A., Sullivan, S., Olby, N., Galano, H., Cerda-Gonzalez, S., Robertson, I. D., Gavin, P., & Thrall, D. (2006). Value of a single-shot turbo spin-echo pulse sequence for assessing the architecture of the subarachnoid space and the constitutive nature of cerebrospinal fluid. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 47(3), 254–259.

106. Penning, V., Platt, S. R., Dennis, R., Cappello, R., & Adams, V. (2006). Association of spinal cord compression seen on magnetic resonance imaging with clinical outcome in 67 dogs with thoracolumbar intervertebral disc extrusion. *The Journal of small animal practice*, 47(11), 644–650.
107. Plant, G. W., Currier, P. F., Cuervo, E. P., Bates, M. L., Pressman, Y., Bunge, M. B., & Wood, P. M. (2002). Purified adult ensheathing glia fail to myelinate axons under culture conditions that enable Schwann cells to form myelin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(14), 6083–6091.
108. Paviot, A., Guérout, N., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Jean, L., Boyer, O., & Marie, J. P. (2011). Efficiency of laryngeal motor nerve repair is greater with bulbar than with mucosal olfactory ensheathing cells. *Neurobiology of disease*, 41(3), 688–694.
109. Purdy, P. D., Duong, R. T., White, C. L., 3rd, Baer, D. L., Reichard, R. R., Pride, G. L., Jr, Adams, C., Miller, S., Hladik, C. L., & Yetkin, Z. (2003). Percutaneous translumbar spinal cord compression injury in a dog model that uses angioplasty balloons: MR imaging and histopathologic findings. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 24(2), 177–184.
110. Purdy, P. D., White, C. L., 3rd, Baer, D. L., Frawley, W. H., Reichard, R. R., Pride, G. L., Jr, Adams, C., Miller, S., Hladik, C. L., & Yetkin, Z. (2004). Percutaneous translumbar spinal cord compression injury in dogs from an angioplasty balloon:

- MR and histopathologic changes with balloon sizes and compression times. *AJNR*. American journal of neuroradiology, 25(8), 1435–1442.
111. Raisman, G., & Li, Y. (2007). Repair of neural pathways by olfactory ensheathing cells. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(4), 312–319.
112. Ramón-Cueto, A., Cordero, M. I., Santos-Benito, F. F., & Avila, J. (2000). Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*, 25(2), 425–435.
113. Raspa, A., Bolla, E., Cuscona, C., & Gelain, F. (2019). Feasible stabilization of chondroitinase abc enables reduced astrogliosis in a chronic model of spinal cord injury. *CNS neuroscience & therapeutics*, 25(1), 86–100.
114. Reshamwala, R., Shah, M., St John, J., & Ekberg, J. (2019). Survival and Integration of Transplanted Olfactory Ensheathing Cells are Crucial for Spinal Cord Injury Repair: Insights from the Last 10 Years of Animal Model Studies. *Cell transplantation*, 28(1_suppl), 132S–159S.
115. Richter, M. W., Fletcher, P. A., Liu, J., Tetzlaff, W., & Roskams, A. J. (2005). Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(46), 10700–10711.

116. Rizek, P. N., & Kawaja, M. D. (2006). Cultures of rat olfactory ensheathing cells are contaminated with Schwann cells. *Neuroreport*, 17(5), 459–462.
117. Sasaki, M., Lankford, K. L., Zemedkun, M., & Kocsis, J. D. (2004). Identified olfactory ensheathing cells transplanted into the transected dorsal funiculus bridge the lesion and form myelin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(39), 8485–8493.
118. Sasaki, M., Li, B., Lankford, K. L., Radtke, C., & Kocsis, J. D. (2007). Remyelination of the injured spinal cord. *Progress in brain research*, 161, 419–433.
119. Schanne, F. A., Kane, A. B., Young, E. E., & Farber, J. L. (1979). Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 206(4419), 700–702.
120. Scott, H. W., & McKee, W. M. (1999). Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. *The Journal of small animal practice*, 40(9), 417–422.
121. Seiler, G. S., Robertson, I. D., Mai, W., Widmer, W. R., Suran, J., Nemanic, S., Lamb, C. R., Lang, J., Johnson, J. L., & Thrall, D. E. (2012). Usefulness of a half-fourier acquisition single-shot turbo spin-echo pulse sequence in identifying arachnoid diverticula in dogs. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 53(2), 157–161.

122. Shen, Y., Tenney, A. P., Busch, S. A., Horn, K. P., Cuascut, F. X., Liu, K., He, Z., Silver, J., & Flanagan, J. G. (2009). PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5952), 592–596.
123. Silver, J., & Miller, J. H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(2), 146–156.
124. Skinner, A. P., Pachnicke, S., Lakatos, A., Franklin, R. J., & Jeffery, N. D. (2005). Nasal and frontal sinus mucosa of the adult dog contain numerous olfactory sensory neurons and ensheathing glia. *Research in veterinary science*, 78(1), 9–15.
125. Smith, P. M., Lakatos, A., Barnett, S. C., Jeffery, N. D., & Franklin, R. J. (2002). Cryopreserved cells isolated from the adult canine olfactory bulb are capable of extensive remyelination following transplantation into the adult rat CNS. *Experimental neurology*, 176(2), 402–406.
126. Smith, P. M., & Jeffery, N. D. (2006). Histological and ultrastructural analysis of white matter damage after naturally-occurring spinal cord injury. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 16(2), 99–109.
127. Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7–35.
128. Spitzbarth, I., Moore, S. A., Stein, V. M., Levine, J. M., Kühl, B., Gerhauser, I., Baumgärtner, W., & Canine Spinal Cord Injury Consortium (CANSORT-SCI)

- (2020). Current Insights Into the Pathology of Canine Intervertebral Disc Extrusion-Induced Spinal Cord Injury. *Frontiers in veterinary science*, 7, 595796.
129. Takahashi, F., Honnami, A., Toki, M., Dosaka, A., Fujita, Y., Hara, Y., & Yamaguchi, S. (2020). Effect of durotomy in dogs with thoracolumbar disc herniation and without deep pain perception in the hind limbs. *Veterinary surgery : VS*, 49(5), 860–869.
130. Tator C. H. (1995). Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 5(4), 407–413.
131. Tester, N. J., Plaas, A. H., & Howland, D. R. (2007). Effect of body temperature on chondroitinase ABC's ability to cleave chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Journal of neuroscience research*, 85(5), 1110–1118.
132. Toft, A., Tome, M., Barnett, S. C., & Riddell, J. S. (2013). A comparative study of glial and non-neural cell properties for transplant-mediated repair of the injured spinal cord. *Glia*, 61(4), 513–528.
133. Ulndreaj, A., Chio, J. C., Ahuja, C. S., & Fehlings, M. G. (2016). Modulating the immune response in spinal cord injury. *Expert review of neurotherapeutics*, 16(10), 1127–1129.
134. Wang-Leandro, A., Siedenburg, J. S., Hobert, M. K., Dziallas, P., Rohn, K., Stein, V. M., & Tipold, A. (2017). Comparison of Preoperative Quantitative Magnetic Resonance Imaging and Clinical Assessment of Deep Pain Perception as

Prognostic Tools for Early Recovery of Motor Function in Paraplegic Dogs with Intervertebral Disk Herniations. *Journal of veterinary internal medicine*, 31(3), 842–848.

135. Williams, S. K., Franklin, R. J., & Barnett, S. C. (2004). Response of olfactory ensheathing cells to the degeneration and regeneration of the peripheral olfactory system and the involvement of the neuregulins. *The Journal of comparative neurology*, 470(1), 50–62.
136. Wilson, J. R., Forgione, N., & Fehlings, M. G. (2013). Emerging therapies for acute traumatic spinal cord injury. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 185(6), 485–492.
137. Zhang, J., Liu, Z., Chen, H., Duan, Z., Zhang, L., Chen, L., & Li, B. (2015). Synergic effects of EPI-NCSCs and OECs on the donor cells migration, the expression of neurotrophic factors, and locomotor recovery of contused spinal cord of rats. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 55(3), 760–769.
138. Zhang, Y., Al Mamun, A., Yuan, Y., Lu, Q., Xiong, J., Yang, S., Wu, C., Wu, Y., & Wang, J. (2021). Acute spinal cord injury: Pathophysiology and pharmacological intervention (Review). *Molecular medicine reports*, 23(6), 417.