

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360119

研究課題名（和文） びまん性軸索損傷（DAI）メカニズム解明のための神経細胞の耐衝撃特性の解析

研究課題名（英文） Analysis of neuronal impact properties for elucidation of pathogenesis of diffuse axonal injury (DAI)

研究代表者

青村 茂（AOMURA SHIGERU）

首都大学東京・システムデザイン研究科・教授

研究者番号：20281248

研究成果の概要（和文）：びまん性軸索損傷は頭部に強制的な回転運動が加わり、その慣性力によるひずみやひずみ速度が原因であるといわれているが、神経損傷を引き起こすひずみやひずみ速度の閾値が解明されていない等、力学的入力と神経損傷の定量的な関連性は未だ不明瞭な部分が多い。本研究では、培養神経細胞に一軸引張ひずみを負荷可能な装置を製作し、一軸引張ひずみに対する PC12 細胞の形態変化を経時的に観察した。ひずみの負荷直後における神経細胞損傷は、負荷されるひずみの大きさに依存することが示された。また、ひずみ負荷後に時間が経過すると共に神経細胞に二次的な損傷が生じ、その損傷度合いは、経過時間と、負荷されたひずみの大きさに依存することが示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, impact tolerance of PC12 cells for stretch was evaluated. PC12 cells were exposed to three different stretches. Then, the length of neurites, the number of neurites, the number of swellings which are the morphological hallmarks of pathology in traumatic brain injury and lead to the disconnection of neurons resulting in neuronal death, and the number of cell bodies in PC12 cells from 5 min to 24 hours after exposure to stretch were measured using microscope. As a result, the neurites and the cell bodies were decreased, and the swellings were increased time-dependently after the exposure. These results suggest that production of neurite swelling and neuronal death correlate with time course after the exposure of stretch.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	12,200,000	3,660,000	15,860,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・知能機械学・機械システム

キーワード：バイオメカニクス

1. 研究開始当初の背景

外傷性脳損傷の発生メカニズム解明のための研究はこれまでも広く行われており、なかでも近年死因として注目されているび

まん性軸索損傷（Diffuse Axonal Injury:DAI）は診断が困難で見過される場合も多いことから、発生を予測することが救命医療や法医学的診断上の課題となってい

る。

DAI は頭部に強制的な回転運動が加わり、その慣性力によるひずみやひずみ速度が原因であるといわれているが、神経損傷を引き起こすひずみやひずみ速度の閾値が解明されていない等、力学的入力と神経損傷の定量的な関連性は未だ不明瞭な部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では、まず所望のひずみを培養神経細胞に負荷可能な装置を製作し、ひずみとひずみ速度の出力関係について検討する。次に本装置を用いて培養神経細胞 PC12 にひずみを負荷し、神経損傷を経時的に観察することで、力学的入力直後の損傷とその発達について評価する。

3. 研究の方法

(1) 衝撃ひずみ負荷装置の開発

本実験で用いられる装置は、エアコンプレッサ、ファンクションジェネレータ、電磁弁、ひずみチャンバにより構成される(図 1)。大気圧とエアコンプレッサにより圧縮された空気を電磁弁で切り替えることにより、ひずみチャンバに圧力を負荷する。電磁弁の切り替えはファンクションジェネレータにより制御される。ひずみチャンバには PDMS(ポリジメチルシロキサン)製の細胞培養ディッシュが内蔵されており、このディッシュに圧力を負荷することで、細胞培養面にひずみを発生させる。また、ディッシュの培養面の形状を変更することで、与えるひずみの種類を変更できる。本研究では横幅 2[mm]、長さ 26[mm]の長方形の培養面形状を採用し、横幅方向のみの一軸引張りひずみを負荷する。

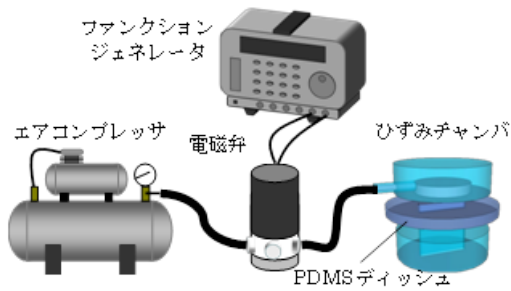


図 1 衝撃ひずみ負荷装置の構成

(2) 細胞培養面の変位計測

本装置の圧力制御部における入力圧力の大きさおよび持続時間と、細胞培養面に生じるひずみおよびひずみ速度の関係を検討した。変位計測にはレーザ変位計を使用し、細胞培養面中央部の鉛直変位を計測した。横幅方向の 1 軸公称ひずみは、式(1)、(2)より求まる。は長方形の横幅の長さ、は培養面中央部の鉛直変位である。が の 2 分の 1 以下の場合

には式(1)を、2 分の 1 以上の場合には式(2)を用いる。入力圧力の大きさは 100, 150[kPa]、入力圧力の持続時間は 10-50[ms]とした。また、細胞培養面中央部の鉛直変位をレーザ変位計を用いてサンプリング周波数 5000Hz で計測した。ひずみは式(1)、(2)より計算し、ひずみ速度は単位時間あたりのひずみ増分として計算した。

$$\varepsilon = \frac{w^2 + 4\delta^2}{4\delta w} \sin^{-1}\left(\frac{4\delta w}{w^2 + 4\delta^2}\right) - 1.0 \quad (1)$$

$$\varepsilon = \frac{w^2 + 4\delta^2}{4\delta w} \left(\pi - \sin^{-1}\left(\frac{4\delta w}{w^2 + 4\delta^2}\right) \right) - 1.0 \quad (2)$$

(3) 衝撃ひずみ負荷実験

前述した装置を用いて PC12 に一軸引張りひずみを負荷し、細胞形態の経時的変化を検討した。負荷条件を Table 1 に示す。それぞれの負荷条件に対して実験前、実験 5 分後、1, 3, 24 時間後に位相差顕微鏡で細胞画像を取得した。損傷の経時的な変化を詳細に観察するため、実験 5 分後以降は同一細胞群を追跡して観察を行った。取得した画像から、画像解析ソフト Image J を用いて、神経突起の長さ、本数、神経突起に生じた瘤の数、細胞体の数を計測した。

Table 1 衝撃ひずみ負荷条件

	ひずみ [%]	ひずみ速度 [s ⁻¹]
Control	0	0
Low	15	30
Middle	30	40
High	100	80

4. 研究成果

(1) 装置の入出力関係

入力圧力の各大きさにおける持続時間とひずみおよびひずみ速度の関係を Fig. 2 に示す。ここで、ひずみ及びひずみ速度は細胞培養面のひずみ及びひずみ速度の経時的変化の最大値と定義した。入力圧力の大きさ、持続時間の増加に伴い、ひずみ及びひずみ速度は増加し、ひずみ：15-100[%]、ひずみ速度：30-80[s⁻¹]の出力範囲を得た。先行研究において、軸索は 65[%]以下のひずみでは断裂を

生じないこと、脳損傷を生じるとされるひずみ速度は $10[s^{-1}]$ 以上であるという報告から、本実験で使用する装置の出力範囲は、神経が損傷を生じるとされるひずみ及びひずみ速度を広範囲に再現可能であるため、本装置は神経細胞の耐性評価に適した実験装置であると言える。

(2) 顕微鏡観察

ひずみ負荷前の PC12 細胞では、細胞体から伸びている神経突起にほとんど瘤は認められなかったが、ひずみ負荷後の神経突起には瘤が観察され、1本の神経突起に複数の瘤が観察された PC12 細胞も認められた。また、Middle, High の 2 条件において、ひずみ負荷 3 時間後と 24 時間後の間で神経突起、細胞体の消失が観察された。

(3) 細胞形態計測

一軸引張ひずみを負荷した PC12 細胞の神経突起の長さの負荷前に対する割合を比較した。すべての負荷条件において、ひずみ負荷前と比べて 24 時間後まで神経突起の長さに有意な増減は見られなかった。しかし、神経突起の本数に着目すると、Low, Middle, High の 3 条件で、ひずみ負荷前と比べて、24 時間後に有意な減少が認められた。特に Middle において、ひずみ負荷後の神経突起の本数に顕著な減少傾向が認められたが、他条件と比較して大きな誤差も認められた。

神経突起 1[mm]における神経突起に生じた瘤の数を図 2 に示す。*は各観察時間で Steel test を用いた多重比較において、Control と比べて有意な差があること ($p < 0.05$) を示す。Control においては、すべての観察時間において僅かに瘤が観察されたものの、ひずみ負荷前と比べて 24 時間後まで有意な増減は認められなかった。しかし、Low, Middle, High の 3 条件では、ひずみ負荷後に瘤の数は有意に増加した。また、Low, Middle, High では、負荷 5 分後から瘤の数は増加し始め、3 時間後まで緩やかに増加した。その後、24 時間後においては、3 時間後の値を維持した。さらに、負荷したひずみが大きいほど多数の瘤が認められた。

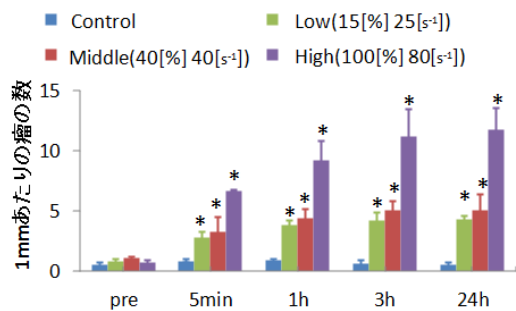


図 2 神経突起に生じた瘤の数

細胞体の数の負荷前に対する割合を図 3 に示す。*は各観察時間で Steel test を用いた多重比較において、Control と比べて有意な差があること ($p < 0.05$) を示す。Control においては、ひずみ負荷前と比べて、24 時間後までに細胞体の数に有意な増減は認められなかった。しかし、Middle, High の 2 条件では、ひずみ負荷により細胞体の数は有意に減少した。また、その減少は時間経過と共に亢進し、負荷したひずみが大きいほど、細胞体の数の減少の割合は大きかった。

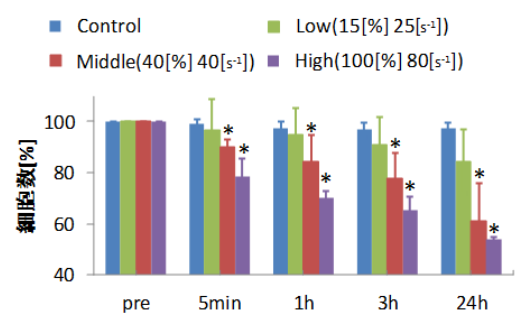


図 3 神経細胞の数の負荷前に対する割合

以上の結果から、ひずみの負荷直後における神経細胞損傷は、負荷されるひずみの大きさに依存することが示された。また、ひずみ負荷後に時間が経過すると共に神経細胞に二次的な損傷が生じ、その損傷度合いは、経過時間と、負荷されたひずみの大きさに依存することが示された。

今後、さらに実際に近い環境 (グリア細胞と混合環境で 3 次元培養) で培養を行った神経細胞を用いて実験を行う。また、PC12 以外の初代培養細胞も用いて実験を行う。より正確に衝撃ひずみを神経細胞に負荷することで、外部衝撃と神経損傷のより詳細な関係を明らかにする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Yuelin ZHANG, Shigeru AOMURA, Hiromichi NAKADATE and Satoshi FUJIWARA, Study of the Mechanism of Cerebral Contusion Based on the Real-World Brain Injury Accidents, Journal of Biomechanical Science and Engineering, 査読有, Vol. 6, No. 3, pp. 191-202

② Hiromichi NAKADATE, Eiichi SEKIZUKA, Shigeru AOMURA and Haruyuki MINAMITANI, Combinations of Hydrostatic Pressure and Shear Stress

Time-dependently Decrease E-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 Expression Induced by Tumor Necrosis Factor-Alpha in Cultured Endothelial Cells, Journal of Biomechanical Science and Engineering, 査読有, Vol.7, No.2, pp.118-129

- ③ 張 月琳, 青村 茂, 中楯浩康, 藤原敏, 局在性脳損傷とびまん性軸索損傷の併発の可能性について、日本保健科学学会誌、査読有、Vol.13、No.3、 pp.112-121
- ④ Yuelin ZHANG, Shigeru AOMURA, Kiyoto FURUSE, Akira KAKUTA, Satoshi FUJIWARA and Ayako NASU, Study on Impact Resistance of PC12 Cells, Journal of Biomechanical Science and Engineering, 査読有, Vol.5, No.2, pp.119-128

[学会発表] (計18)

- ① 舟木勇矢, 角田 陽, 青村 茂, 中楯浩康, 微細形状によるPC12 の樹状突起伸長方向制御, 精密工学会春季大会, 2012年3月15日, 首都大学東京
- ② 馬橋洋人, 中楯浩康, 青村 茂, 角田 陽, ひずみ及びひずみ速度に対する培養神経細胞 PC12 の衝撃耐性評価, バイオエンジニアリング講演会, 2012年1月7日, 大阪大学
- ③ 福村洋平, 中楯浩康, 角田 陽, 青村 茂, 方向性を持った神経突起の衝撃ひずみ耐性評価, バイオフィロンティア講演会, 2011年10月7日, アスト津アストプラザ
- ④ 齋藤 誠, 青村 茂, 中楯浩康, 張 月琳, 藤原 敏, 様々な衝撃加速度によるびまん性軸索損傷の生成に関する研究, 日本機械学会年次大会, 2010年9月8日, 名古屋工業大学
- ⑤ 張 月琳, 青村 茂, 中楯浩康, 藤原 敏, 症例解析による脳損傷生成メカニズムに関する研究, 第23回バイオエンジニアリング講演会, 2010年11月12日, アストプラザ武蔵
- ⑥ 張 月琳, 青村 茂, 藤原 敏, 症例シミュレーションによる脳損傷生成メカニズムの検討, 第14回計算工学講演会, 2009年5月14日, 東大生産技術研究所
- ⑦ 張 月琳, 青村 茂, 藤原 敏, 脳挫傷生成に対する外部衝撃の持続時間の影響, 第22回バイオエンジニアリング講演会, 2010年1月10日, 岡山理科大学

[図書] (計1件)

- ① Yuelin ZHANG, Shigeru AOMURA, Hiromichi NAKADATE and Satoshi FUJIWARA, InTech, in press, Study on the

Mechanism of Traumatic Brain Injury, 2012, 22

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青村 茂 (AOMURA SHIGERU)
首都大学東京・システムデザイン研究科・教授
研究者番号: 20281248

(2) 研究分担者

藤原 敏 (FUJIWARA SATOSHI)
横浜市立大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号: 20173487

角田 陽 (KAKUTA AKIRA)
東京工業高等専門学校・その他部局等・准教授
研究者番号: 60224359

吉田 真 (YOSHIDA MAKOTO)
首都大学東京・理工学研究科・助教
研究者番号: 60336518

中楯 浩康 (NAKADATE HIROMICHI)
首都大学東京・システムデザイン研究科・助教
研究者番号: 22604991

(3) 連携研究者

()

研究者番号：