

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：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700473

研究課題名（和文） 衝撃ひずみ負荷による脳神経細胞損傷の定量的解析

研究課題名（英文） Quantitative analysis of cerebral neuronal injury induced by impact strain loading

研究代表者

中楯 浩康（NAKADATE HIROMICHI）

首都大学東京・システムデザイン学部・助教

研究者番号：10514987

研究成果の概要（和文）：外傷性脳損傷は、頭部に急激な慣性力が働くことによって脳組織が変形し、結果として神経軸索に引張応力が負荷されることが原因である。本研究では、神経細胞損傷を定量的に解析するため、通常培養では無秩序に伸長する神経突起を、微細加工技術により伸長方向を制御した。神経突起の伸長方向へのひずみの大きさと損傷程度に相関関係が認められ、通常培養した神経突起と比較して配向させた神経突起において高い損傷率を示した。

研究成果の概要（英文）：Traumatic brain injury is associated with rapid deformation of brain tissue resulting in the stretching of neural axons. In this study, the elongation of neurite was controlled by microfabrication technique for quantitative analysis of neuronal injury. We demonstrated that the degree of injury was correlated with the magnitude of strain along neurite elongation and the rate of injury was higher in neurites oriented in the direction of strain than in neurites oriented in a random pattern.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生体力学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学，生体材料学

キーワード：インパクトバイオメカニクス，神経損傷，衝撃ひずみ，神経突起伸長制御

1. 研究開始当初の背景

交通事故やスポーツ事故時の頭部外傷を原因とするびまん性軸索損傷は、頭部に急激な慣性力が働くことによって脳組織が変形し、結果として神経軸索に引張応力が負荷され、細胞レベルでの機能的損傷や構造的損傷に繋がる。

従来、培養神経細胞を用いた衝撃ひずみ負荷実験において、神経損傷に対するひずみの大きさや速度の影響は検討されてきたが、ひずみの作用方向の影響に関しては議論されてこなかった。体細胞から細長く伸びている軸索は、大脳皮質や脳幹といった脳の部位に応じて一定方向に直線的に伸びているため、軸索に対するひずみの作用方向の違いによる神経損傷評価が必要不可欠であると考えられる。しかし、培養神経細胞の軸索は培養面内に無秩序に伸びるため、従来までの培養基板では軸索に対するひずみの作用方向の制御が困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、ひずみの大きさや速度に加え、ひずみの作用方向に対する神経損傷を検討するため、Polydimethylsiloxane 製培養基板に微細加工を施すことで神経細胞の配置や神経突起の伸長方向を培養段階で誘導し、神経突起に対するひずみの作用方向を制御する。さらに、培養神経細胞を用いた衝撃ひずみ負荷実験において、神経突起に対するひずみの作用方向と神経損傷の関係を定量的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 培養基板の微細加工による神経突起の伸長方向制御

生体適合性材料である PDMS (Polydimethylsiloxane) を用い、細胞サイズと同等なマイクロトンネル構造 (幅 50 μ m, 高さ 50 μ m) を細胞培養面に加工することで、神経突起の伸長方向を制御した。

(2) 衝撃引張負荷装置および単軸引張チャンバの開発

リニアアクチュエータと PID 制御を組み合わせ、 $\sim 50\%$ のひずみと ~ 50 /s のひずみ速度を負荷可能で顕微鏡下の観察が可能な衝撃引張装置を作製した。また、細胞培養面の単軸引張を実現可能な PDMS チャンバを製作した。

(3) 衝撃引張実験と神経突起損傷評価

本装置と本チャンバを用いて、伸長方向を制御した神経突起に対して、衝撃引張を負荷し、神経突起損傷の形態学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) PDMS を用い、細胞サイズと同等なマイクロトンネル構造を細胞培養面に加工することで、神経突起の伸長方向 (最大 1.8mm) を制御可能であることを示した (図 1)。

(2) PDMS チャンバ内の細胞培養面の引張方向に垂直方向のひずみは、引張方向のひずみに対して 10%未満に抑制された。

(3) PDMS チャンバ内の細胞培養面に通常培養により無秩序に伸長した神経突起と、マイクロトンネルを用いて引張方向に伸長させた神経突起に対して衝撃引張を負荷した結果、神経突起の伸長方向へのひずみの大きさと神経突起の膨張数に相関関係が認められ、通常培養した神経突起と比較して配向させた神経突起において 1.5 倍程度の高い損傷率を示した (図 2, 3)。

微細加工技術を用いて神経突起の伸長方向を制御して培養することに成功し、1 本の神経突起に衝撃ひずみを正確に負荷することができた。ひずみの大きさと速度を独立に制御可能な衝撃引張装置を製作したことにより、衝撃ひずみ負荷と神経突起損傷程度との関係を明らかにすることができた。

培養神経細胞を用いた衝撃ひずみ負荷実験において、神経突起 1 本単位での正確なひずみ負荷を実現している研究は国内外において報告がほとんどない。脳内の神経細胞、特に軸索部分は、大脳皮質や脳幹など、部位に応じて配向性を持つため、軸索に所望の衝撃ひずみを正確に負荷することで、神経細胞の衝撃ひずみ耐性が定量的に得られ、従来よりも局所的な脳神経損傷の評価に繋がる。

今後は、衝撃ひずみ負荷により誘発された軸索損傷と神経細胞間の情報伝達機能の関係を明らかにする。複数の神経細胞を対象に、細胞体の配置と軸索の伸長方向を制御することで、1 細胞単位での神経ネットワークを形成し、衝撃ひずみ負荷により損傷した軸索が、神経細胞間を機能的に連絡しているかどうかを定量的に解析する。脳神経障害の発症や発達を、予防・予測するための数値解析に必要な神経細胞の衝撃ひずみ耐性に新たな知見を提供することが期待される。定量化さ

れた衝撃ひずみ耐性と計算力学による頭部外傷時の脳内力学解析を組み合わせることで、局所的な脳神経損傷の発症予測や発達予防が可能となる。

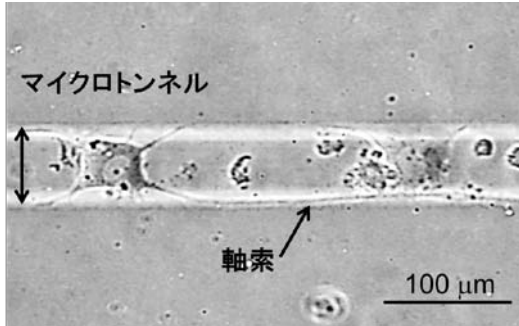


図1 マイクロトンネル内に軸索が伸長している様子

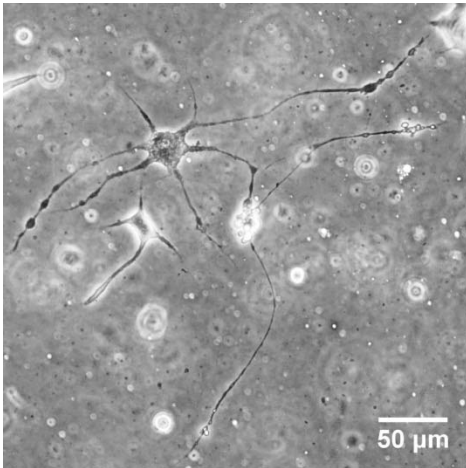


図2 引張負荷による神経突起膨張

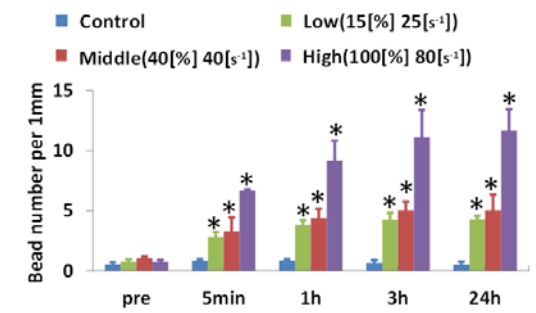


図3 神経突起膨張の経時的変化

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1件)

- ① 中楯浩康, 馬橋洋人, 張月琳, 角田陽, 青村茂, 二軸引張応力を負荷した培養神経細胞の損傷評価, 日本機械学会論文集A編, 査読有, 掲載決定

[学会発表] (計4件)

- ① 舟木勇矢, 角田陽専, 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2012春季大会, 2012年3月16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, 日本機械学会バイオエンジニアリング講演会, 2012年1月6日, 大阪大学
- ③ 福村洋平, 青村茂, 中楯浩康, 角田陽, 方向性を持った神経突起の衝撃ひずみ耐性評価, 日本機械学会バイオフロンティア講演会, 2011年10月7日, アスト津アストプラザ(津市)
- ④ 馬橋洋人, 張月琳, 中楯浩康, 角田陽, 青村茂, ひずみ負荷による培養神経細胞損傷の形態計測, 日本機械学会バイオフロンティア講演会, 2010年11月13日, ITビジネスプラザ武蔵(金沢市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中楯 浩康 (NAKADATE HIROMICHI)

首都大学東京・システムデザイン学部・助教

研究者番号：10514987

(2) 研究協力者

馬橋 洋人 (UMAHASHI HIROTO)

首都大学東京・システムデザイン研究科

福村 洋平 (FUKUMURA YOHEI)

首都大学東京・システムデザイン研究科