

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23760093

 研究課題名（和文） 細胞・実空間スケールを統合した脳外傷バイオメカニクスの実験的研究
 研究課題名（英文）

 Experimental study of brain injury biomechanics by integrating the
 spatial scale from cell to tissue level

研究代表者

宮崎 祐介 (miyazaki yusuke)

東京工業大学・大学院情報理工学研究科・准教授

研究者番号：70432135

研究成果の概要（和文）：

交通事故等の各種事故において頻度・重症度から脳外傷の予防が重要であるが、その評価は既存の頭部傷害基準では困難である。脳外傷を評価可能な傷害基準を制定するためには、(a)製品評価用ダミーで計測可能な頭部の剛体運動、(b)脳実質変形、(c)細胞スケール損傷までの空間的にスケールが異なる関係をシームレスに解明することが必要である。そこで本研究では、(a)頭部の剛体運動と(b)脳実質変形の関係について超精密頭部実体モデルの構築とその衝撃実験を実施し、頭蓋骨の剛体運動と脳深部変形挙動の関係を明らかにするとともに、(b)脳実質変形と(c)細胞スケール損傷の関係を解明するために、培養神経細胞としてPC12細胞をシリコンゲル状に培養した神経細胞培養脳実体モデルを構築し、脳実質変形と細胞損傷との関係を解明することを目標とした。本研究の結果、特に側方衝突を模擬した衝撃条件下において、脳深部変形挙動のメカニズムとして、頭蓋骨-脳間の相対回転にともなう、左右大脳の逆向き回転による脳深部せん断変形が重要であることを明らかにした。さらに、脳実質モデルのせん断ひずみ、主ひずみともに0.25近傍にて、神経突起損傷率が急激に上昇することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Prevention of traumatic brain injury due to rotational impact is important from the frequency and severity of the injury in various accidents. However, head injury criterions existing have not been able to correctly estimate or predict the injuries. In order to establish the injury criterion capable of evaluating the severe traumatic brain injury, the multi scale relationships between the rigid-body motion of a head measured in dummy, brain parenchyma deformation and cell scale damage should be elucidated seamlessly. In this study, we constructed a precise head physical model and carried out the side impact experiments to clarify the relationship between the brain parenchyma deformation and rigid body motion of the head. In addition, in order to elucidate the relationship of cell damage and brain parenchyma deformation, brain physical model with cultured PC12 cells was developed and shear deformation was applied to the model. As the results obtained in the side impact experiments, the most important mechanism of deep brain deformation behavior was due to reverse rotation of the left and right brain. In addition, the 0.25 shear or principal strain of brain parenchyma model causes significant increase of neuritis damage rate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械材料・材料力学

キーワード：生体力学・外傷

1. 研究開始当初の背景

脳外傷は歩行者事故、高齢者から乳幼児に至る家庭内転倒事故、乳幼児虐待による外傷など様々な状況において発生し、その頻度、重症度の観点から最も重要な外傷である。

そこで、その予防が必要であるが、製品評価に利用される従来の頭部傷害基準は頭蓋骨骨折の発生評価は可能であるが、重症脳外傷の評価を行うことができない。

重症脳外傷の発生機序は次のようである。

- (a)頭部に作用した外力による頭蓋運動
- (b)頭蓋運動に伴う脳実質変形挙動
- (c)脳実質変形による細胞損傷の発生

したがって、(a)製品評価用人体ダミーで計測可能な外力の程度、(b)脳実質変形、(c)細胞スケール損傷の発生の関係を定量的に解明し、細胞スケール損傷を評価可能な設計基準を提案することが、各種製品の頭部防護性能を飛躍的に向上させることにつながる。

すなわち、脳外傷予防のキーは、(a)剛体、(b)連続体、(c)細胞スケールまでの空間的にスケールが異なる(a)(b)(c)の関係をシームレスに解明することである。しかし、これまでの研究は各々の過程内もしくは二過程間に関する研究が実施されているのみであり、(a)(b)(c)すべての過程をシームレスに繋いだ研究はまだ行われていない。

LaPlacaらは、細胞損傷を考慮した次世代の脳外傷発生基準を提案するためには、(a)(b)(c)間の関係のシームレスな検討が必要となることをのべており、その方法論として、(a)(b)間は「コンピュータ・シミュレーション」を利用し、(b)(c)間は「培養細胞実験」を用いることが提唱されている。しかし、コンピュータ・シミュレーションと実験を併用する手法は、技術的に困難な問題が多々ある。例えば、有限要素法を代表とするコンピュータ・シミュレーションには、脳脊髄液を介した頭蓋骨と脳間の構造-流体連成計算の精度、複雑な脳形状のモデル化、マルチスケール解析における境界条件の定義などの課題があり、まだメカニズム解明の利用の前段階にとどまっている。

そこで、(a)(b)間の関係の解明において、計測力学的手法を用いない新たな手法が必要である。これまでに、申請者は(a)(b)間の関係に着目して特定被験者のCT/MR画像よりシリコーンゲルを用いて実人体の脳形状・材料特性を再現した実験モデルを構築し、計測断面のひずみ分布をデジタル画像相関法で計測し、(a)頭蓋骨の剛体運動と(b)脳実質変形挙動の関係を明らかにした。実人体頭部を再現する申請者の実験的頭部モデリング手法は、(a)(b)から(c)の関係のシームレスな解明に用いることができる唯一の実験的手法である。これより、申請者が有する実人体形状・構造再現技術を活用し、(a)(b)(c)を統一した評価

を行う必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、実人体と形状・材料特性が等価な培養細胞接着脳実体モデルに対して、実事故レベルの外力を与えることにより、頭蓋の剛体スケールから脳深部の細胞スケールに至る脳外傷メカニズムを実験的に解明することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 頭部剛体運動と脳深部変形の関係

①三次元頭頸部実体モデルの構築

構築したモデルは、実人体形状・構造を忠実に再現した頭部実体モデルと、側方衝突時の人体頸部特性を再現可能な頸部モデルより構成される。頭部実体モデルは頭蓋骨、脳、膜構造、脳脊髄液の四組織を模擬したものである。頭蓋骨モデルは、成人男性の頭部CT画像より構築された頭蓋骨の三次元CADモデルを基に、ポリカーボネートを用いて機械加工により製作した(図1)。この頭蓋骨モデルに対し、頭部剛体運動計測用の加速度計設置面として、上顎骨、頬骨、鼻骨にかけて前額面に平行な面をフライス加工により設けた。また、額部に穴加工を施し、脳深部撮影に使用するファイバースコープの固定具を設置した。

脳モデルは、脳深部の中空構造である脳室や、脳表層に存在する脳回、脳溝といった実人体脳の特徴的な形状を忠実に再現したモデルである。このモデルは、頭蓋骨モデルと同一被験者の頭部MR画像を基に構築されたもので、光造形装置により作成した脳の型に、人体の脳と動的粘弾性特性が等価なシリコーンゲル(Dow Corning: Sylgard527)を注入、硬化させ製作した。その際、中空構造の脳室を再現するために、ゼラチン製の脳室の型を埋め込み、シリコーンゲル硬化後に脳モデルを水中で熱し脳室モデルを溶出させた。図2に示すように、脳深部のひずみ計測を可能にするために、計測面より前頭側は透明で、後頭側は黒く着色した二色モデルとした。なお、計測面全域に点間6mmの白色マーカを塗布した。

また、左右大脳を隔てる大脳鎌と、大脳と小脳とを隔てる小脳テントは、実人体の硬膜とヤング率と膜厚が等価なポリウレタンシートを用いて再現を行った。この膜構造の固定は、頭蓋骨付着部に取り付けられたワイヤーにより行った。そのため、頭蓋骨モデルには直径2mmの穴を複数箇所あけ、そこにワイヤーを通した状態で頭蓋骨モデルに脳モデルを挿入し、頭蓋骨モデルを結合した。そして、膜構造を固定するとともに脳脊髄液の漏洩を防ぐために穴をボンドで塞ぎ、頭蓋内腔をグリセリン水溶液で満たすことにより脳脊髄

液を模擬した。これにより頭蓋骨と脳間の相対運動が生じる。

頸部モデルとして、側面衝突ダミーの中でも高い生体忠実性を持つEuroSID-1の頸部

(図3)を用いることで、人体頸部特性を再現した。頭部実体モデルを頸部モデルに取り付けるために、頭蓋骨モデルの後頭骨底部にジュラルミン製頭頸接合部を固定し、ボルト締結により頸部モデルとの結合を行った。

②側方衝突実験装置

図4に示すインパクト発射式衝撃実験装置を用いて側方衝突実験を実施した。頭頸部実体モデルをスライダ上にボルト締結し、インパクトをスライダに衝突させ、頸部下側に左側方からの衝撃を与えることで頭部に非衝突の回転衝撃を与えた。なお、スライダには一軸加速度計が取り付けられており、それによりスライダ加速度応答を計測する。なお、スライダは運動開始地点から210mmの地点でバネに衝突し反発する。

③頭部剛体運動計測法

側方衝突時における人体頭部運動は、前額面内の運動だけでなく、頸部の回旋や屈曲・伸展が発生するために複雑な挙動を示す。そこで本研究では、衝撃負荷時における頭部剛体運動を正確に把握するために6自由度成分計測を行い、頭部重心並進加速度、頭部角加速度および角速度応答を算出した。

6自由度成分計測のために、本研究では9個の一軸加速度計(Endevco inc.: Model 7264D)を使用し計測を行った。加速度計を頭蓋骨モデルの上顎部に固定するためにアルミニウム製加速度計マウントを作成し、そこに加速度計を強力な両面テープで貼付し固定した。加速度計の位置ベクトルを与えて展開することにより、頭部の各応答が算出できる。

④脳深部のひずみ計測法

脳脊髄液としてグリセリン水溶液を用いることで、屈折率マッチングにより脳深部計測面の撮影を可能にした。そして、頭部の脳深部撮影を行うために、フレキシブルなファ

イバースコープ(MORITEX: MSGS-1350IV)を使用し、額部より前額面に垂直になるよう頭蓋内に挿入し固定した。なお、大脳鎌の映り込みを回避するために、二本のファイバースコープを使用し、重篤脳外傷の好発部位である脳梁に着目して脳深部変形挙動の撮影を行った。ファイバースコープはCマウントアダプタを介して高速度カメラと結合することで、変形挙動の高速度撮影を可能にした。脳梁のひずみを解析するために、まず撮影した各実験画像に対して、点間5mmのキャリブレーションシートを用いて各スコープのレンズ収差および屈折の影響を補償するための画像補正を行い、その画像に対し共通な点を指定し、二カメラ画像の合成を行った。この合成した画像を用いてデジタル画像相関法により、脳梁における3点マーカセット要素の変位計測を行った。得られた各マーカの変位の関係より要素内の変形こう配テンソルFを求め、Green-LagrangeひずみテンソルGを算出した。Green-Lagrangeひずみテンソルより、最大せん断ひずみの算出を行った。

(2) 脳実質変形と細胞損傷の関係

①脳実質模擬体の構築

脳実質模擬体の材料として前述の精密頭部実体モデルで使用したシリコンゲルを選定した。耐熱性・耐衝撃性を持つポリカーボネートを用いて底面部と側壁部が相対運動を行うように容器を設計した。側壁部内に注入、硬化させるゲルの接着によってのみ底面と側壁を固定させ側壁部壁面に円筒状の錘(材質:SS400, 質量:415g)を装着した。これにより、急激な角加速度が発生した際、底面部が回転しようとするのに対し、錘の慣性によって側壁部はとどまろうとするために、脳実質模擬体にねじり変形を付与できる。

また軸索を模擬するため、PC12細胞(ラット副腎髄質由来褐色細胞種)を用いた。まず側壁部に厚さ6mmとなるようにシリコンゲルを注入・硬化させ、シリコンゲルの表面に計測用の白色マーカを塗布した。なお、計測点として、中心から5mmごとの4つの同心円上に45[deg]ごとにマーカセットを塗布した。そして、PC12細胞を播種し、播種



図1 頭蓋骨モデル



図2 脳モデル



図3 頸部モデル

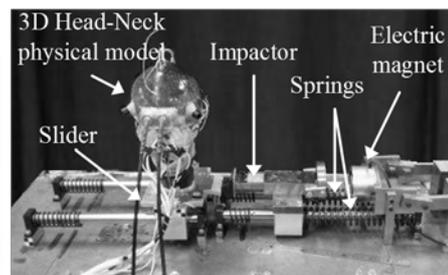


図4 側方衝撃実験装置

後 24 時間経過した後、神経成長因子を添加して、神経突起を伸張させた。

②実験装置

図 4 に示すインパクト発車式衝撃実験装置をもとに、回転盤に取り付けられた脳実質模擬体にねじり変形を付加する装置を製作した (図 5)。回転盤に取り付けたアーム部を押し出し、定常回転後に、アーム部が緩衝材付ボールに衝突することにより、回転盤が逆回転する。ここで、底面部が回転盤上に固定されていることから、脳実質模擬体には、ボールと衝突した際の錘の慣性力によって、ねじり変形が付与される。

③計測方法

脳実質模擬体の変形挙動の計測方法は 3。

1. 4 と同様に、高速度カメラにより、脳実質模擬体表面の 3 点マーカセットを追尾し、変位計測を行った。そして、3 点マーカセットの変位の関係により、Green-Lagrange ひずみテンソルを算出し、最大せん断ひずみおよび主ひずみを算出した。

細胞観察には、位相差顕微鏡 (BX51WI:OLYMPUS) を用いた。顕微鏡にはデジタルカメラ (S/N S006684c:SHIMADZU) を装着し、顕微鏡画像を PC に保存した。脳実質模擬体の計測点近傍を、実験前・実験直後・衝撃から三時間後の 3 パターンの時間において観察し、衝撃による神経突起の損傷、時間経過による損傷の進行について検討した。ひずみ計測を行った三点マーカセットの領域内において、実験前後で同一の細胞を探索し、神経突起の損傷の有無をカウントすることで、神経突起の損傷評価を行った。本実験では、実験後新たに膨張した箇所のある神

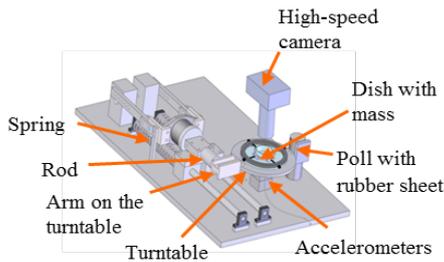


図 5 ねじり変形付与実験装置

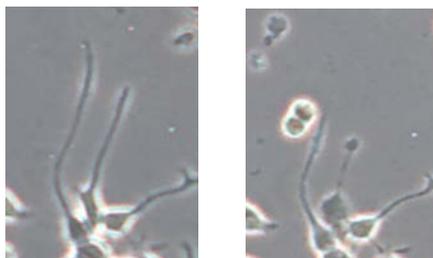


図 6 変形前後の顕微鏡画像

経突起 (図 6)、退縮した神経突起および明らかに断裂した神経突起を損傷有の神経突起として定義し、無損傷の神経突起との割合を算出し神経突起損傷率を定義した。

4. 研究成果

(1) 頭部剛体運動と脳深部変形の関係

三次元頭頸部実体モデルを用いて側方衝突を模擬した実験を行い、そのときの脳深部変形挙動計測を行い、せん断ひずみの計測を行った (図 7)。

インパクト衝突後に頭部実体モデルは、インパクト衝突後に対して 10ms 以上遅れて回転運動を開始した。インパクト衝突後、負の頭部角加速度最大値を示した時間において脳梁にほとんどせん断ひずみが生じなかった。その後、頸部上部の可動域限界に到達して正の頭部角加速度が最大となり、これ以降、頭部の急激な角度増加は抑制されるが同方向に回転を継続し、頸部全体で左側屈挙動を示した。このとき、脳梁のせん断ひずみは増加傾向を示し、脳梁の両要素において一次ピークとなった。その後ひずみは減少し、右脳側、左脳側ともに再び増大した。その後頸部最大側屈において、頸部剛性により頭部回転が停止し、逆回転を開始した。これより頭部は逆回転を続け、正の頭部角速度が最大となった後、頸部の左側屈は徐々に回復した。脳梁におけるひずみは二次ピークを示した。

脳梁においてひずみの一次ピークが生ずるとき、左脳側は先に回転運動を開始する頭蓋骨に対して相対的に脳深部へと潜行し、右脳側は外側へと変位していた (図 8 (a))。それとは対照的に、二次ピーク時は、左脳側の外側変位、右脳側の脳深部潜行が見られた (図 8 (b))。これらの挙動は、頭蓋内に存在

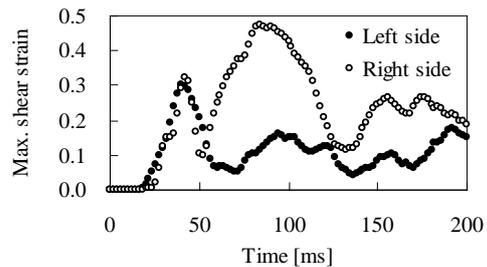
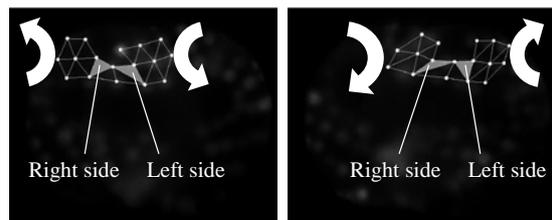


図 7 脳梁におけるせん断ひずみ応答



(a) 1次ピーク時

(b) 2次ピーク時

図 8 脳梁における変形挙動

する脳脊髄液による頭蓋骨 - 脳間の相対運動の発生や、大脳鎌・小脳テントといった頭蓋内膜構造の脳回転運動拘束効果に起因すると考えられた。したがって、脳深部変形挙動の重要なメカニズムは、頭蓋骨 - 脳間の相対回転にともなう、左右大脳の逆向き回転による脳深部のせん断変形であることを明らかにした。

(2) 脳実質変形と細胞損傷の関係

脳実質模擬体を用いて回転運動実験を行い、ねじり変形が脳実質模擬体に作用しているときの脳実質変形挙動計測、また細胞観察を行った。

細胞観察により、細胞から伸張した神経突起に退縮や膨張が確認された。図9より、実験直後においては、最大主ひずみが小さい場合には細胞損傷率は横ばいであるが、ひずみが0.2付近以降において、損傷率が急激に上昇した。その後はひずみが増加するに従い、損傷率は増加傾向となった。また図9より、実験から180分経過後においても、実験直後と同様の関係となることが分かった。また、全体として、180分経過時の神経突起の方が高い割合で損傷しており、衝撃直後には無損傷の神経突起が180分経過後には退縮・膨張していた例、衝撃直後よりも180分経過後にさらに症状が進んでいた例が見られた。

DAIは発生すると axonal retraction ball(軸索退縮球)や axonal swelling(軸索腫脹)が発生することが従来の研究で判明しており、これらの症状と今回実験で得られた神経突起の形態変化の様子は類似していることから、DAIの症状が再現されていることがわかる。

神経突起損傷はひずみによる損傷と、温度やCO2濃度などのひずみ以外の環境要因による損傷に分類される。ここで、ひずみによる神経突起損傷閾値を推定するためには、ひずみによる損傷とひずみ以外の環境要因による損傷に分類する必要がある。これより、ひずみを付与しない試験片(コントロール)を実験環境下で3時間放置し、試験片内の7領域において細胞損傷評価を実施した。そして、この評価結果から、ひずみ以外の環境要因による損傷率の95%範囲を算出した。そして、この範囲以内の領域を非損傷領域、範囲以上の領域を損傷領域と定義した。神経突起損傷閾値を推定するため、本研究ではロジスティック回帰分析を実施した。損傷閾値推定を行う際に対象となるデータは、細胞観察を実施した被衝撃領域・42領域とした。また、統計処理は、統計解析ソフト(SPSS: IBM)を用い、ロジスティック回帰モデルにおける回帰係数を算出した。最大主ひずみにおける非損傷(0)・損傷(1)およびロジスティック回帰曲線を図10に示す。これより、本研究では、損傷確率が50%である最大主ひずみ0.267を、神

経突起損傷閾値として定義した。

4. 3 総括

本研究は超精密頭部実体モデルを用いることにより、(a)頭部の剛体運動と(b)脳実質変形の関係において、頭蓋骨 - 脳間の相対回転にともなう、左右大脳の逆向き回転による脳深部せん断変形が重要であることを解明し、培養神経細胞モデルを用いることにより、(b)脳実質変形と(c)細胞スケール損傷の関係において、脳深部せん断変形と神経突起損傷率の関係を定量的に明らかにした。

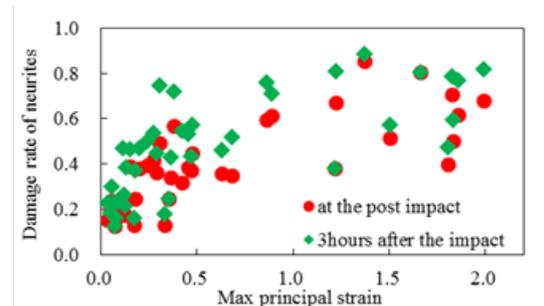


図9 主ひずみと神経突起損傷率の関係

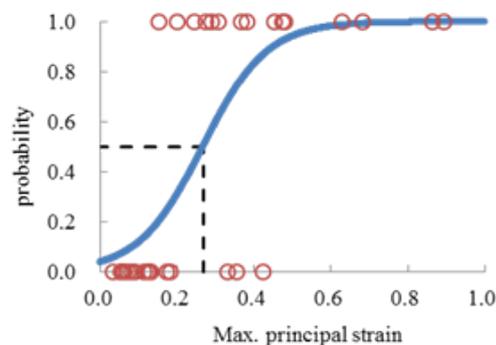


図10 神経突起損傷率の算出

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2件)

(1) 宮崎 祐介, 立矢 宏, 放生 明廣, 阪本 雄一郎, 三次元透過頭部実体モデルによる後頭衝撃時の頭蓋骨・脳間相対運動の可視化, 日本機械学会論文集A編, Vol. 78, No. 785, 2012, 106-115 (査読有)

(2) 穴田賢二, 宮崎 祐介, 丹治 和也, 立矢 宏, 放生明廣, 阪本 雄一郎, 三次元頭部実体モデルによる脳深部ひずみ分布の計測と脳形状因子の影響, 日本機械学会論文集A編, Vol.78, No.789, 2012, 758-769 (査読有)

[学会発表] (計6件)

(1) 宮崎祐介, 精密頭部実体モデルを用いた急性硬膜下血腫発生メカニズムの検討, 第36回日本脳神経外傷学会, 2013年3月8日, ウィンク愛知 (愛知県名古屋市) (招待講演)

(2) 宮崎祐介, 力学的手法による乳児急性硬膜下血腫発生メカニズムの検討, 第71回日本脳神経外科学会, 2012年10月17日, 大阪国際会議場, (大阪府大阪市) (招待講演)

(3) Anata K., Miyazaki Y., Tachiya H., Hojo A., Sakamoto Y., RELATIONSHIP BETWEEN IMPACT CONDITIONS AND BRAIN SHEAR STRAIN IN ROTATIONAL HEAD IMPACTS, Proceedings of 13rd International Congress on International Society of Biomechanics, 2011年7月5日, Brussels, Belgium

(4) 中田雄, 宮崎祐介, 中楯浩康, 青村茂. 脳実質粘弾性特性を模擬した培養面のせん断変形挙動と神経細胞損傷との関係, 日本機械学会第25回バイオエンジニアリング講演会, 2013年1月11日, 産業技術総合研究所筑波センター (茨城県)

(5) 丹治和也, 宮崎祐介, 穴田賢二, 立矢 宏, 放生明廣, 透過頭蓋骨を有する三次元頭頸部実体モデルの脳変形挙動計測, 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング講演会, 2012年1月7日, 大阪大学豊中キャンパス(大阪府豊中市)

(6) 丹治和也, 宮崎祐介, 穴田賢二, 立矢 宏, 放生明廣, 脳深部のひずみ分布に対する形状因子の影響, 日本機械学会年次大会 2011, 2011年9月14日, 東京工業大学大岡山キャンパス (東京都目黒区)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hei.mei.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 祐介 (miyazaki yusuke)

東京工業大学・大学院情報理工学研究科・
准教授

研究者番号 : 70432135