

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289064

研究課題名(和文)有限要素法によるびまん性軸索損傷診断のための立体共培養神経細胞の耐衝撃性評価

研究課題名(英文)Evaluation of functional disorder of nerve cells with direction controlled axons for the prediction 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：びまん性軸索損傷(DAI)予測のために軸索の方向制御による神経細胞の培養を行い、歪みおよび歪み速度に対する耐性評価を行った。まず歪みと歪み速度を独立に制御できる一軸引張り衝撃ひずみ生成装置の開発を行った。その後マウス神経幹細胞(NSCs:neural stem cells)を用いて軸索の方向を制御して培養を行い、種々の引っ張り試験を行った。損傷した神経細胞の観察を行い、今回の条件では歪み0.09、ひずみ速度0.12/sで神経細胞が損傷することを観察した。これは通常報告されている損傷閾値よりも低い値である。今後、幹細胞そのものの耐性も含めさらに検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We exposed axons in cultured neuronal cells to the impulsive strain and the effect of the impulsive strain on axonal injury was evaluated at the cell level. Neural stem cells (NSCs) were used as cultured neuronal cells. NSCs can proliferate and differentiate into neurons and glia. When cultured in medium, NSCs extend the axons towards any direction. The direction of axons growth is controlled by using micro grooves which matched with the size of the cell. Culture surface is used by micro grooves on polydimethylsiloxane (PDMS). It is transcribed from micro groove were generated by using photolithography on resist material (SU8) and the Si substrate. The axons were damaged by the rather small strain with 0.09, strain rate with 0.12/s.

研究分野：バイオメカニクス，機械工学

キーワード：びまん性軸索損傷 立体共培養 神経細胞 耐衝撃性評価 有限要素法

## 1.研究開始当初の背景

交通事故や転倒などにより、頭部に外部衝撃が加わり外傷性脳損傷（Traumatic Brain Injury : TBI）により死に至る場合が多く、さらに死亡者数の数倍が後遺症に悩まされている。TBI の中でも外傷直後の診断が難しく、後遺症を残すびまん性軸索損傷（Diffuse Axonal Injury : DAI）が注目されている。DAI は頭部に衝撃を受けた際に発生するひずみ、ひずみ速度により神経細胞の情報伝達の役割を担う軸索が脳内の広範囲で損傷する病態である。そこで本研究では、培養神経細胞に対し衝撃引張ひずみ試験を行い、軸索一本単位でのひずみ、ひずみ速度に対する損傷評価をもとに、定量的関係性を明らかにする。

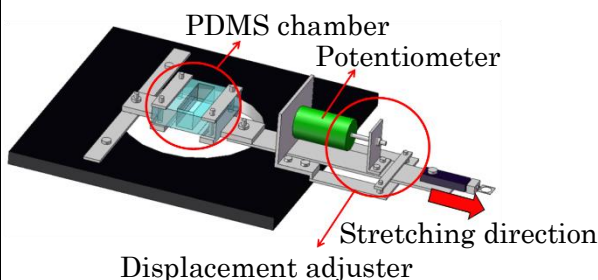
## 2.研究の目的

頭部外傷時の脳組織変形による軸索の引張挙動を模擬した衝撃引張ひずみ負荷装置と、一方向への引張負荷を実現する PDMS 製単軸引張チャンバーを用いて軸索を損傷させ損傷評価を行う。正確な損傷評価を行うには軸索を引張り方向に伸長させる必要があるが、培養神経細胞の軸索は、一般にランダムな方向に伸長するため何らかの方法で軸索の方向制御が必要である。そこで我々は、フォトリソグラフィを用いて Si 基板上のレジスト材で作製された微細溝型を作製し、微細溝型を用いて PDMS に転写した PDMS 製微細溝上で培養を行い、培養神経細胞の軸索の伸長方向制御を行い衝撃引張ひずみ試験を行う。

## 3.研究の方法

本実験で用いる装置の概略図を図 1 に示す。本装置は単軸引張が可能な PDMS 製微細溝付きチャンバー(図 2)、サーボアクチュエータ、制御 PC、ポテンショメータにより構成される。本装置は、PDMS チャンバーに引張荷重を加えることで PDMS 上の神経細胞の軸索にひずみを負荷することができる。アクチュエータの引張速度と引張変位を独立に制御することで、様々なひずみとひずみ速度を組み合わせることが可能であ

る。微細溝付きチャンバーの培養面の溝は溝幅 25  $\mu\text{m}$ 、ピッチ幅 50  $\mu\text{m}$  である。



Displacement adjuster

Fig.1 Components of the uniaxial stretching device

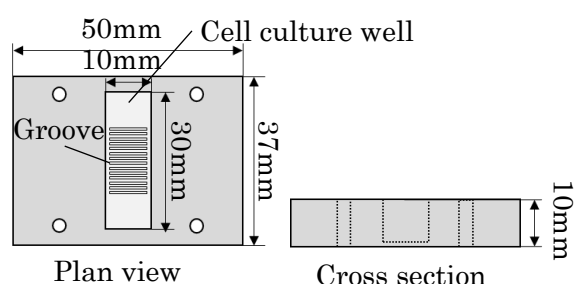


Fig.2 Grooved PDMS chamber

細胞は、マウス神経幹細胞（NSCs : neural stem cells）を用いた。NSCs は神経細胞やグリア細胞に分化可能である。分化には神経細胞用分化培地（MB-X9501, 住友ベークライト）を用いた。播種密度は約 50000 cells/cm<sup>2</sup>、培養期間は 3 日間とした。全細胞が神経細胞に分化するのではなく、グリア細胞の一種であるアストロサイトにも分化しており、より脳内の環境に近づくことが可能となった。

## 4.研究成果

### (1) 軸索の伸長方向制御

PDMS 製微細溝で神経細胞の軸索の方向制御結果を示す。図 3,4 に未加工 PDMS と PDMS 製微細溝上で神経細胞を培養した結果を示している。図 3 の未加工 PDMS 上では軸索がランダムな方向に伸長しているが、図 4 に示す微細溝上での培養では、溝の長手方向に軸索の伸長方向制御が行えることがわかった。

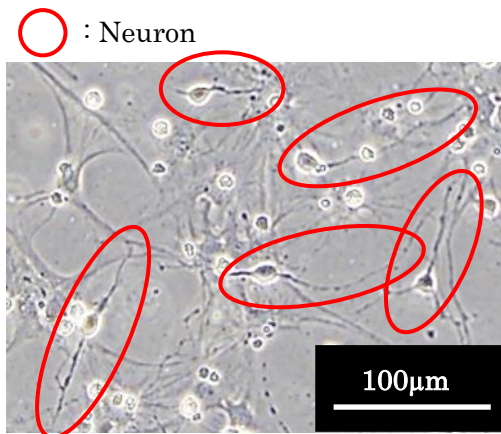


Fig.3 Flat surface

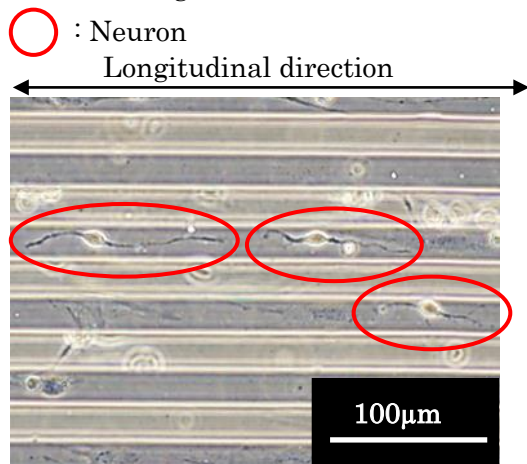


Fig.4 Micro grooves (Width : 25μm)

(2) 衝撃引張負荷実験条件

溝付き単軸引張チャンバーに培養した神経細胞に対し 3 種類の衝撃引張ひずみを負荷した. 表 1 に各衝撃のひずみ及びひずみ速度の関係を示す. ひずみは図 5 に示すように, 軸索の引張り前と引張り後を顕微鏡で撮影し, 撮影した画像から軸索の変位差を求め, 式 (1) により求めた. ひずみ速度は溝付き単軸引張チャンバーの変位波形により, 最大ひずみまでの時間を求め, 式 (2) により求めた.

Table1 Strain and strain rate

Impact	Strain	Strain rate[1/s]
①	0.09	0.02
②	0.09	0.06
③	0.09	0.12

$$\text{Strain} = \frac{L2 - L1}{L1} \quad (1)$$

$$\text{Strain rate} = \frac{\text{Maximum strain}}{\text{Time to maximum strain}} \quad (2)$$

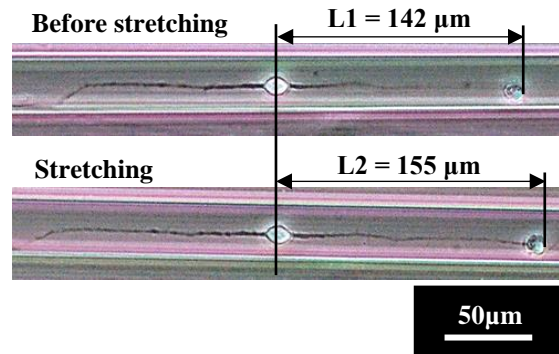


Fig.5 Microscope images before and after stretching

(3) 軸索損傷評価

同一の神経細胞の軸索を観察するために蛍光染色は行わずに位相差顕微鏡で, 衝撃負荷前, 衝撃負荷後 (5 分後, 1 時間後, 3 時間後, 6 時間後) を撮影し, 軸索損傷の調査を行った. その結果, Impact①, Impact②の条件では, 軸索の損傷が確認できなかった. しかし, 図 6 に示すように Impact③の条件では, 衝撃負荷 1 時間後に軸索が断裂し, 6 時間後に断裂箇所が修復されている様子が確認できた.

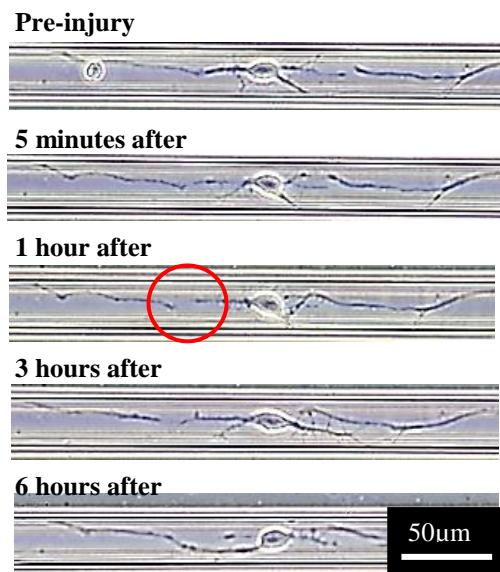


Fig.6 Result of time dependent after stretching

一般的にひずみが約 0.2 で軸索が損傷すると言われているが、今回の結果はひずみが 0.09 で損傷していた。これまでの軸索の損傷評価は、ランダムな方向に伸長した軸索や脳スライスなどを用いて、統計的に損傷評価が行われてきた。そのため、今回の方法を用いた方が正確に損傷評価が行えると考えられるため、これまでの結果よりもひずみが小さくなる可能性がある。しかし、実験回数が少ないため正確な結果が示せていないため、実験回数を増やし、ひずみ、ひずみ速度に対する損傷評価をもとに、定量的関係性明らかにする予定である。

#### 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)

[学会発表] (計 13 件)

- ① KURTOGLU Evrim, 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 衝撃引張ひずみを受ける培養神経細胞の耐性評価, 第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016 年 1 月, 東京工業大学
- ② Hidenori FURUKAWA, Shigeru AOMURA, Hiromichi NAKADATE and Akira KAKUTA, Evaluation of effect of impulsive strain and growth direction control of cultured brain neuronal cells, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, September 2015, Hokkaido, Japan
- ③ Hiromichi NAKADATE, Kazuhiro KIKUTA, Evrim KURTOGLU, Shigeru AOMURA and Akira KAKUTA, Caroline DECK, Remy WILLINGER, Injury Threshold for Axonal Transport by Observation of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in Cultured Rat Brain Neurons Exposed to Impulsive Strain, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, September 2015, Hokkaido, Japan
- ④ Yuelin ZHANG, Daiki HOSONO, Tadamitsu MATSUDA, Nicolas BOURDET, Hiromichi NAKADATE, Remy WILLINGER and Shigeru AOMURA, Traumatic Brain Injury Criteria in Judo Based on Reconstruction Analysis, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, September 2015, Hokkaido, Japan
- ⑤ 菊田和紘, 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 衝撃ひずみが脳神経細胞の情報伝達に与える影響, 第 27 回バイオエンジニアリング講演会, 2015 年 1 月, 新潟
- ⑥ 喜多陵勝, 中楯浩康, 松井靖浩, 及川晶子, 青村茂, contrecoup 型脳挫傷を発症した自転車事故症例の再現シミュレーションと神経損傷予測, 自動車技術会 2014 年秋季大会, 2014 年 11 月, 仙台
- ⑦ 中楯浩康, 菊田和紘, 鶴見明冴美, 青村茂, 角田陽,  $\beta$ -APP 観察による脳神経軸索の衝撃耐性評価, 日本機械学会 2014 年度年次大会, 2014 年 9 月, 東京電機大学
- ⑧ Hiromichi NAKADATE, Tatsuya OHSUGI, Ryoma KITA, Yuelin ZHANG, Yasuhiro MATSUI, Shoko OIKAWA and Shigeru AOMURA, Finite element head model simulation of the case suspected of diffuse axonal injury in the traffic accident, ICRASH2014, August 2014, Malaysia
- ⑨ 中楯浩康, 喜多陵勝, 松井靖浩, 青村茂, 自転車走行時の頭部外傷事故の再現評価シミュレーションと損傷評価, 自動車技術会 2014 年春季大会, 2014 年 5 月, 横浜
- ⑩ 宮本英明, 中楯浩康, 喜多陵勝, 青村茂, マルチスケール解析を用いた頭部外傷

研究者番号：60283561

症例の再現シミュレーションと神経損傷評価に関する研究，第26回バイオエンジニアリング講演会，2014年1月，東北大学

- ⑪ 金子由磨，菊田和紘，中楯浩康，青村茂，角田陽，衝撃ひずみを負荷した脳神経細胞の軸索損傷評価，第26回バイオエンジニアリング講演会，2014年1月，東北大学
- ⑫ 韓露，中楯浩康，青村茂，ヒト頭部有限要素モデルの構築時間短縮と自動化の検討，第26回バイオエンジニアリング講演会，2014年1月，東北大学
- ⑬ 中楯浩康，金子由磨，菊田和紘，青村茂，角田陽，軸索ひずみ損傷評価のための細胞引張装置の開発，日本機械学会2013年度年次大会，2013年8月，岡山大学

## 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

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：10514987

但野 茂 (TADANO, Shigeru)  
北海道大学・名誉教授  
研究者番号：50175444

角田 陽 (KAKUTA, Akira)  
東京工業高等専門学校・機械工学科・准教授  
研究者番号：60224359

西村 明儒 (NISHIMURA, Akiyoshi)  
徳島大学 大学院医歯薬学研究部・教授