

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500503

研究課題名(和文) オステオン構造の組成観察に基づいた骨折リスク低減法

研究課題名(英文) Improvement of bone fracture characteristics based on microstructural considerations

研究代表者

藤崎 和弘 (FUJISAKI, Kazuhiro)

弘前大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：90435678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織は硬質であるアパタイトを有することで剛性を得るが、アパタイトによる微視的な変形拘束と応力集中により破壊というリスクを背負っている。本研究では骨組織の破壊強度向上方法として、脱アパタイト(脱灰)による組織軟化に注目した。自作の小型シャルピー衝撃試験装置にて骨試料の破壊試験を行い、牛皮質骨から作製した試験片に適切な軟化処理を施すことで、組織の破壊強度が向上することを確認した。また、同様の処理により、表面傷により強度低下した骨試験片の衝撃破壊強度を回復させる事に成功した。

研究成果の概要(英文)：Bone tissue is a composite material consisting of hydroxyapatite-like mineral particles and collagen fibers. The stiffness of the tissue is strongly dependent on the form of apatite phase. Mechanical properties of cortical bone vary drastically with the change of apatite concentration under demineralization processes. Thus we focused on the demineralization to improve the fracture toughness of bone tissue. In this study, we developed a Charpy-type impact loading device for bone fracture tests. And we showed that the demineralization process increased the impact toughness of bovine cortical bone specimens. And the demineralization improved the impact toughness of notched specimens even if the process was locally applied to the defected area.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：生物・生体工学 機械材料・材料力学 生体材料 物性実験 医療・福祉 骨折予防

1. 研究開始当初の背景

骨強度は外形状や骨量のみならず、骨組織中のアパタイト含有量や、アパタイトとコラーゲンからなる複合構造特性(骨質)により決まる。骨粗しょう症など骨量・骨質の低下に伴う骨折リスクの低減策として、生理学、細胞学的知見に基づいた組織再生がある。組織機能の回復は力学特性の改善にも本質的かつ有効な手段である。しかしながら、骨組織の再構築(骨リモデリング)期間は数カ月から半年と長く、組織再生効果の有無に関わらず、骨折リスクを迅速に低減することは難しい。材料の破壊は内部の空隙や介在物界面からの亀裂発生と進展により脆性的に進行することが多い。骨構造外周部の皮質骨内部にはハバース管と呼ばれる血管系が存在し、血管孔や骨細胞間ネットワーク(オステオサイト)による空隙が無数に存在する。また、ナノレベルでみると、組織を構成するアパタイト結晶がコラーゲン繊維に沈着しており、結合境界など亀裂発生起点となる要因が多い。工業材料開発分野における脆性破壊リスク軽減法に、材料表面の平滑化(高精度仕上げ面生成)や部分的な強化、介在物・空隙の低減、分散、位置制御などによる局所応力集中の回避、亀裂伝播の抑制がある。欠陥除去による破壊回避手法を計画的に骨組織に応用できれば、迅速かつ簡易な骨折リスク軽減法となる。また、骨整形による荷重伝達経路修正をインプラント置換術後に適用できれば、インプラント不適合や応力遮蔽の軽減など術後経過の改善に有効な手段となる。

我々は、X線回折を利用し、骨ナノスケール構造に着目した組織弾性率測定や、内部応力計測を実現するための新しい技術を開発してきた。これらの研究から、骨組織の強度がナノレベルのアパタイト結晶構造や、コラーゲンとの相互作用に大きく依存する事がわかった。本計測を医療診断に応用することで、高精度な強度評価や経過予測が可能となる。これは、手術法の改善やインプラントの再設計といったフィードバック技術として、後出の患者の処置向上に大きく貢献する。しかしながら、術後診断により明らかとなった不具合や骨折リスクを取り除く方法ではないため、我々にはリスクを抱えた患者に注意を促すか、術後経過を見守ることしかできない。現在、計測・解析技術の進歩により、リモデリングによる骨構造変化など組織の経時変化予測精度が向上している。この解析技術と破壊リスクを低減する術後修正技術を組み合わせれば、より積極的な治療が実現できると期待される。

2. 研究の目的

本研究では骨構造内に存在する微視的構造欠陥を選択的に除去することで亀裂発生・進展を抑制し、骨折リスクを迅速に低減

させる手法を提案する。図1に骨組織中のアパタイトを選択的に除去した牛皮質骨試料を示す。この状態では組織の剛性は失われるが、変形性に富み、曲げても折れる事はない。本研究ではこの物性変化を制御する事で、骨折リスクの低減を図る。また、骨構造のマルチスケールな荷重伝達を考慮し、効果的な骨折リスク低減方法について調査する。



図1 脱アパタイト処理した牛皮質骨試料

3. 研究の方法

(1) 研究内容の概要

本開発技術の最終目標は整形外科分野での臨床適用である。しかしながら、本手法は生体組織自体を部分的に破壊し構造改築するものであるため、不用意に臨床実施すれば正常機能にダメージを与える可能性が高い。したがって、臨床適用までには、多くの基礎検討や検証実験が求められる。今回設定した研究期間(3年間)は先駆的な研究期間として位置付け、骨組織の微視構造由来の骨折リスクの特定、皮質骨試験片の欠陥有無による破壊耐性変化の計測、マルチスケールの荷重伝達を考慮した破壊挙動解析に重点を置き、装置開発や力学的実験を行う。これらの検討により、骨折リスク除去の具体的な方針・手法を定めた後、臨床に向けた応用課題を模索する。本期間中に医師、医学研究者に実験結果を提示していき、臨床応用に向けた協力体制の確立と実用化研究プロジェクトの樹立を目指す。

(2) 研究計画

骨組織構造のマルチスケール観察から、破壊へ発展しうるマイクロ・ナノレベルの微視構造特性を分類し、これら欠陥の除去処理が骨強度に与える影響を動的力学試験・衝撃試験により明らかにする。主な研究項目として、

骨試料作成法の確立

：骨試料として成牛の皮質骨を利用し、力学試験用の試験片を作製する。試料表面の仕上げ加工精度や、成形中の乾燥などが骨組織の破壊強度に関わる事から、湿潤下で精密な試料成形が可能な低速型のホイールソーを導入し、高精度な骨試験片成形を実現する。

骨組織用3次元内部構造観察システムの開発：申請者らが開発を進めてきた硬組織対応型内部構造顕微鏡システム(RMSS-003、既存・理化学研究所所有)を利用し、骨組織内

部の3次元構造観察を実施する。RMSS-003はシリアルセクション観察法に基づいており、試験片のスライスと表面の顕微鏡観察を自動的に繰り返す3次元観察システムである。このシステムを骨組織に適用するため、加工時の割れ発生や組織の破壊を防ぐための最適な加工条件、ならびに、組織内欠陥を明確に特定するための観察条件を決定する。

破壊試験機開発

：骨組織弾性率や破壊じん性は水分含有量の影響を受けやすいため、試験は湿潤状態で行うことが望ましい。そこで、湿潤骨試料の実験に利用可能な、小型の衝撃破壊試験装置を製作する。

骨折リスク除去処理

：破壊の起点となる構造を特定し、局所的な化学処理を施す。ここでは、脱アパタイト(脱灰)処理による骨組織の軟化に注目し、処理時間と処理範囲を変えることで脱灰の有効性を検討する。

オステオン構造の観察

：内部構造顕微鏡システムにより、ハバース管、オステオサイトを含むオステオスケールの3次元構造を観察する。

ナノスケール構造変化の調査

：骨組織が変形するとナノスケール構造要素であるアパタイト結晶がひずみ、変形が過大となると結晶の破壊や、コラーゲン繊維の断裂が発生する。このナノスケールの破壊挙動を、X線回折法により得られる、アパタイト結晶の配向変化、結晶サイズの変化として取得する。

破壊試験

：各種骨試料の破壊試験を実施し、脱灰処理の有効性を定量的に調査する。評価には破壊時の吸収エネルギーから破壊じん性値を測定し、破断挙動および破断面観察から亀裂発生個所と進展形態を評価する。また、骨試料に繰り返し負荷を与えることにより、亀裂進展度合いを制御した試験片を人工的に作製し、欠陥除去による破壊リスク抑制効果を調査する。

マルチスケール力学解析

：骨格構造を考慮し、各部に作用する応力分布から、欠陥存在位置とその除去効果を数値解析により確認する。解析には汎用の有限要素解析ソフトを利用する。

結果のまとめと開示

：本手法の有効性をまとめ、医師、医学系研究者に情報提供する。また、本結果を論文・学会等で広く公開することで、医工学のみならず、生理学、形態学的側面からの意見を集め、臨床適用のための方法論をまとめる。本

研究期間内に整形外科の医師との連携を計画する。

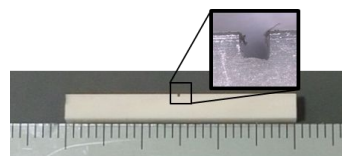
4. 研究成果

骨試料作成法の確立

：実験試料として成牛大腿皮質骨(図2(a))から四角柱状(3×3×30 mm)の試験片を製作した。試験片は生理食塩水供給下で加工しており、湿潤状態、発熱抑制状態での成形を実現している。また、骨組織損傷例として、中央部に0.5×0.5 mmの切欠きを設け、意図的に破壊強度を低下させた損傷モデルを製作した(図2(b))。



(a) 成牛大腿骨



(b) 試験片(損傷モデル)

図2 作製した牛大腿皮質骨試験片

骨組織用3次元内部構造観察システムの開発

：理化学研究所所有の3次元内部構造顕微鏡をベースにして、皮質骨試料の断面生成と顕微鏡観察を多断面にわたり自動で行う観察システムを構成した。また、装置にロードセル(荷重計)とダイヤモンド圧子を取り付けることで、機上でのピッカース硬さ試験を実現した(図3)。これにより、弾性率等、物性情報を有する骨組織微視構造の3次元有限要素モデルの作成が可能になった。

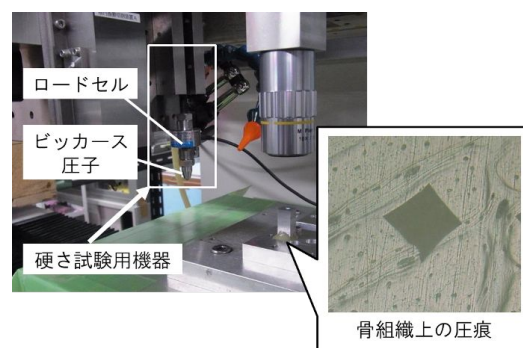


図3 3次元内部構造顕微鏡による観察例

破壊試験機開発

：破壊試験用に小型シャルピー型破壊試験装置を設計・製作した。図4に装置の外観を示

す。骨組織が対象であるため、通常の金属材料用の装置では負荷が過大となることから、0.5J、1.0Jといった低荷重用の衝撃試験用ハンマーを製作し、装置に搭載した。本装置を用いて、骨組織破壊じん性の評価を行った。

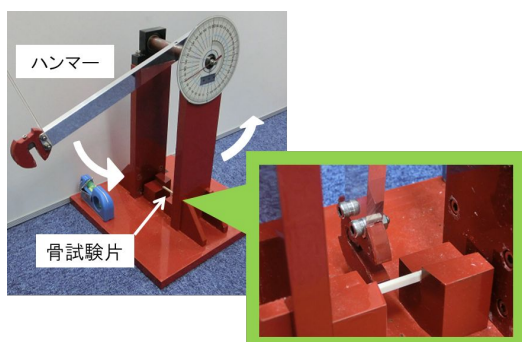


図4 製作した小型シャルピー試験装置

骨折リスク除去処理

：本研究では骨折リスク除去として、化学的処理による脱アパタイト（脱灰処理）を選択した。脱灰にはエチレンジアミン四酢酸（EDTA）を用い、成形した牛皮質骨試料をEDTA溶液に浸け、時間により脱灰量を調整した。図5に脱灰試験片の断面図を示す。脱灰が試験片表面から進行している様子が確認できた。脱灰初期の検討では、反応が緩やかに進行する5の低温環境で行っていたが、生体応用を考慮し、37の環境での脱灰も実施した。この37環境下では脱灰が比較的短時間で進行し、2時間で5、24時間の脱灰と同等の脱灰状態になった。

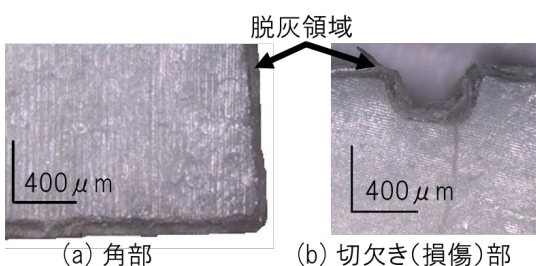


図5 試験片断面に見られる脱灰層

オステオン構造の観察

：の観察システムを利用し、骨組織内微視構造の観察を行った。皮質骨を構成するオステオンの形態観察（図6）に基づき、オステオン構造を基にした力学モデルの解析を実現した（4. 参照）。

ナノスケール構造変化の調査

：生体硬組織のアパタイト構造と力学負荷によるアパタイトの変形を精度良く検出する方法を提案した。負荷時のアパタイト挙動の測定実験により、骨組織の弾性変形特性や剛性に組織内のアパタイト結晶の構造が大きく寄与することを確認した。

破壊試験

：脱灰した牛皮質骨試験片の破壊試験を実施し、脱灰前に比べて衝撃吸収エネルギーが増大する（破壊じん性の向上）条件：5、24時間を見出した。また、同脱灰条件を、切欠きを付与した損傷試験片に適用したところ、24時間以上の脱灰処理により2倍以上の衝撃吸収エネルギーを示すことがわかった（図7）。本結果から、脱灰処理が骨組織の強度改善に有効な手段となることが確認できた。本処理は損傷部のみに適用しても十分な効果を発揮し、37の脱灰環境においては2時間の脱灰処理で5、24時間と同等の吸収エネルギーを示した。本処理は短期的かつ簡易な手法で骨組織の強度を改善できることから、臨床応用に向け期待ができる技術といえる。

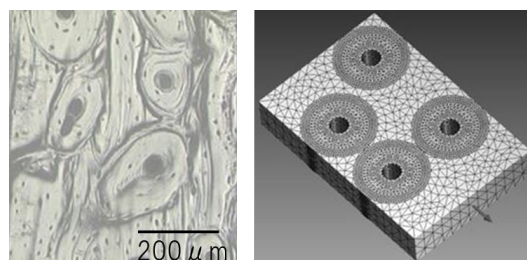


図6 骨組織の微視構造（左）を基にした有限要素モデル（右）

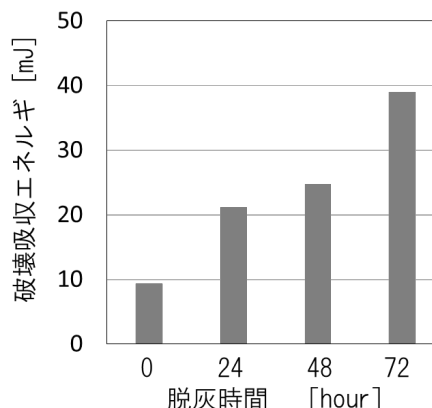


図7 骨組織の衝撃破壊強度に及ぼす脱灰処理効果の1例（成牛大腿皮質骨、損傷試験片、5脱灰、0.5J衝撃入力）

マルチスケール力学解析

：骨格構造の力学解析は多くの報告例があるが、顕微鏡組織であるオステオンスケールの解析例は少ない。そこで、顕微鏡観察画像を基に、オステオン構造を再現した骨組織の有限要素モデルを作成した（図6）。このモデルについて数値解析を行い、微視構造由来の応力集中について調査した。本モデルに見られる応力集中部を脱灰することで、少量かつ局所の脱灰のみで骨強度を改善できる可能性がある。

結果のまとめと開示

：これまでの成果を、主としてバイオメカニ

クス、整形外科に関連する国内外の学会にて報告してきた(主な発表論文等参照)。また、学内の研究会等を通じて成果を開示し、医学部との連携体制を樹立した。今後、本課題をさらに進展させ、臨床応用可能な技術にまで展開したい。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計14件)

藤崎和弘、太田恭介、東藤正浩、但野茂、後方散乱X線による歯牙表層アパタイトの結晶構造観察、日本機械学会 第23回バイオフロンティア講演会、2012年10月05日弘前文化センター、弘前市

藤崎和弘、但野茂、東藤正浩、生体硬組織の応力測定技術とバイオメカニクス、第28回寒地技術シンポジウム、2012年10月31日弘前文化センター、弘前市

Fujisaki K., Yokoyama H., Todoh M., Tadano S., Effect of Apatite Crystal Alignments on Anisotropic Fracture Characteristics of Cortical Bone, Korea-Japan Joint Session/ KSME 2013 Bioengineering Division Spring Conference, 2013年5月23日、The Ocean Resort Yeosu, 韓国

門谷琢郎、東藤正浩、但野茂、皮質骨のラマン分光現象と引張負荷の関係、日本機械学会 2013年度年次大会、2013年9月8~11日、岡山大学津島キャンパス、岡山市

藤崎和弘、横山弘矢、笹川和彦、皮質骨組織の衝撃破壊強度に及ぼす微視的損傷の影響、日本機械学会 2013年度年次大会、2013年9月8~11日、岡山大学津島キャンパス、岡山市

Todoh M., Tadano S., Raman Spectroscopy for Mechanical Analysis of Bone Tissue, International Symposium on Interdisciplinary Research and Education on Medical Device Developments, 2013年9月12~13日、弘前大学、弘前市

Todoh M., Tadano S., Mechanical Analysis of Mineral and Collagen Phases in Bone by Raman Spectroscopy, 15th International Conference on Biomedical Engineering, 2013年12月4~7日、National University of Singapore、シンガポール

横田秀夫、藤崎和弘、山下典理男、中村篤人、鉄鋼材料内の介在物、組織の3次元情報収集と数値解析システムの開発、日本

鉄鋼協会 鉄鋼ゲノムの解明フォーラムシンポジウム、2014年3月22日、東京工業大学、大岡山キャンパス、東京都

長谷川歩、藤崎和弘、笹川和彦、皮質骨組織の破壊特性に及ぼす脱アパタイトの影響、日本非破壊検査協会 平成26年度東北支部講演会、2014年4月18日、仙台市

Fujisaki K., Yokoyama H., Hasegawa A., Sasagawa K., Effect of Demineralization on Impact Fracture Characteristics of Bovine Cortical Bone Tissue, The 7th World Congress of Biomechanics, 2014年7月6~11日、ボストン、米国

長谷川歩、藤崎和弘、笹川和彦、皮質骨構造欠陥部の破壊特性に及ぼす脱アパタイト処理の影響、日本機械学会 第25回バイオフロンティア講演会、2014年10月3~4日、鳥取市

東藤正浩、但野茂、ラマン分光法による骨コラーゲン/アパタイト複合構造に基づく力学機能評価、第29回日本整形外科学会基礎学術集会、2014年10月9~10日、鹿児島市

藤崎和弘、古城直道、中土裕樹、山下典理男、横田秀夫、逐次断面切削 - 観察技術に基づいた工業材料の内部構造観察・組成分析システムの開発、理研シンポジウム「3次元内部構造顕微鏡による3次元計測の生物・材料分野への挑戦と展開」、2015年2月6日、和光市

伊達駿斗、藤崎和弘、笹川和彦、骨-インプラント早期結合のためのチタン表面へのアパタイト誘引法、日本機械学会 東北学生会 第45回卒業研究発表講演会、2015年3月10日、八戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤崎 和弘 (FUJISAKI, Kazuhiro)
弘前大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号： 90435678

(2) 研究分担者

横田 秀夫 (YOKOTA, Hideo)
理化学研究所・画像情報処理研究チーム・
チームリーダー
研究者番号： 00261206

東藤 正浩 (TODOH, Masahiro)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号： 10314402