

平成 21年 5月 8日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19560078  
 研究課題名 (和文) 動的ナノインデンテーションを利用したヒト骨および軟骨の粘弾性評価に関する研究  
 研究課題名 (英文) Study on Dynamic Viscoelastic Properties of Human Bone and Cartilage Using Dynamic Nanoindentation  
 研究代表者  
 坂本 信 (SAKAMOTO MAKOTO)  
 新潟大学・医歯学系・教授  
 研究者番号：80215657

研究成果の概要：本研究では生体硬組織（骨、軟骨、歯等）の微小領域の動的粘弾性的性質を明らかにするために、硬組織を対象に動的ナノインデンテーション（超微小押し込み）を用いて動的粘弾性パラメータである貯蔵弾性率および損失正接を求めることを主な目的としている。すなわち、生体硬組織の力に対する抵抗力と柔軟性を極めて微小な領域について明らかにすることである。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・機械材料・材料力学

キーワード：生体力学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生体組織の力学的性質を明らかにすることは、生体力学（バイオメカニクス）における研究のなかで基礎的かつ重要なことであるが、生体組織の有する材料不均質性および力学的異方性等から、これを正確に求めることは難しく、これまでに種々の材料試験法が提案されてきた。生体組織の全てが有する粘弾性的性質についてのこれまでの研究は、限られた材料試験法のみでの評価であり、特に生体組織の超微小領域における粘弾性特性については、全く不明であるといっても過言ではない。巨視的観点からは、例えば生体組織のなかでも実験的な取扱いが比較的容易で

ある骨組織を対象に、周期的な荷重を骨試験片に作用させる曲げ試験、すなわち、動的粘弾性測定装置が広く用いられているが、対象とする試験片の大きさ等の確保が必要となるため、試験片形状、寸法および測定領域に制限があるのが現状である。

(2) 一方、近年の材料工学の分野では薄膜材等の微小領域の力学的性質を評価する目的で超微小硬度法が注目され、それに伴い超微小押し込み（ナノインデンテーション）試験機が開発・実用化され、超微小領域における弾性的性質について調べることが可能となってきた。Rhoら(1999)は、ヒト皮質骨を対象

に三角錐ダイヤモンド圧子を装備した超微小押し込み硬さ試験機を利用して、超微小硬さを求めるとともに、試験時の荷重-押し込み深さ曲線から直接に皮質骨の弾性率を算出している。報告者らも同様の準静的ナノインデンテーションを利用して、生体硬組織である皮質骨、歯組織の力学的性質について明らかにしてきた【平成15~16年度、基盤研究C(2)、「ナノインデンテーション法を用いた生体硬組織の力学的特性評価に関する研究】。しかしながら、これらはいくまでも弾性的特性を主に調べたものである。他方、最近、動的粘弾性測定法の一つとして、連続剛性測定法による動的ナノインデンテーション試験法が工業材料研究の分野において開発され、樹脂の粘弾性的特性を明らかにする試が行われ始めた。

## 2. 研究の目的

動的ナノインデンテーション試験法（周期的荷重を圧子に作用させるナノインデンテーション試験法）は、ごく微小な領域を対象に動的な超微小押し込み試験を行うため、試験片寸法および形状の制限が少なく、微小領域での皮質骨、海綿骨や歯のエナメル質、象牙質等の生体硬組織を初めとして、軟骨や皮膚等の軟組織における粘弾性的特性評価において極めて有効な手段となる可能性が高い。本研究では、動的ナノインデンテーション試験法を利用して、生体組織である硬組織である骨、関節軟骨および歯等の動的粘弾性特性を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

本実験で用いる動的ナノインデンテーション装置の概略図を図1に示す。装置内の板バネが圧子軸の水平方向運動を強く制限するとともに、垂直方向（圧入方向）には自由に運動が可能な構造となっている。装置全体の力学系モデルは図2のように主にバネとダッシュポット（減衰器）で表される。図2中のバネ定数  $K_s$  および  $K_f$  はそれぞれ板バネおよびロードフレームの剛性を示し、ダッシュポット  $D_s$  は圧子系の減衰係数、 $m$  は圧子系の質量を示しており、これらの定数はすべて既知である。試験片の剛性  $S$  および減衰係数  $D_s$  は試験片材料の粘弾性的性質に依存する未知の定数である。

本装置によって求める力学的パラメータは貯蔵弾性率  $E'$ 、損失弾性率  $E''$  および損失正接  $\tan \delta = E''/E'$  であり、これらは以下の式を用いてそれぞれ計算できる。

$$E' = \frac{S}{2\beta} \sqrt{\frac{\pi}{A}} \quad E'' = \frac{\omega D_s}{2\beta} \sqrt{\frac{\pi}{A}} \quad (1)$$

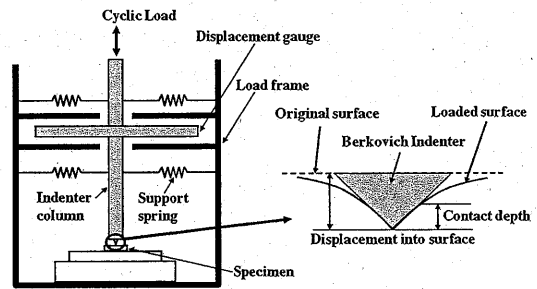


図1 動的ナノインデンテーション装置の概略図

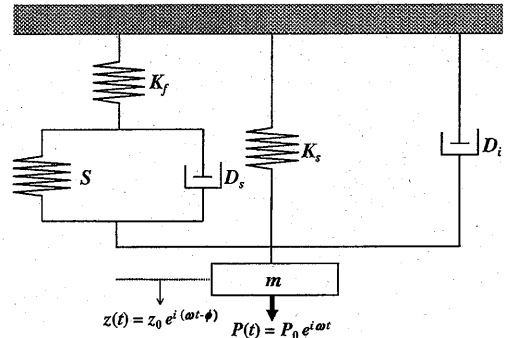


図2 動的ナノインデンテーション装置の力学系モデル

ここで、 $S$  は荷重-変位線図の直線部の傾き、 $\omega$  は調和振動数、 $D_s$  は試験片の減衰係数、 $\beta$  は圧子形状が弾性率に与える影響を考慮した補正値をそれぞれ示しており、三角錐圧子（Berkovich indenter）の場合は  $\beta = 1.034$  となる。また、 $A$  は圧子と試験片の投影接触面積である。実験では圧子を試験片に対して45Hz程度で微小振動を与えながら一定速度で圧入し、最大設定荷重に達した後に除荷する手法を用いる。

## 4. 研究成果

### (1) 皮質骨の動的粘弾性の評価

#### ① 対象と方法

骨のバイオメカニクスの分野では初めて動的ナノインデンテーション（Dynamic Nanoindentation; 以下 DNI）を適用して、週齢の異なるラット大腿皮質骨の微細組織構造での動的粘弾性を測定するとともに、骨試験片に含まれるミネラル質、有機質成分および水分重量含有率が動的粘弾性パラメータに与える影響について検討した。

試料として、雄のS.D.ラット9個体（6, 10, 24週齢、各3個体）の両足から摘出した18本の大腿骨を用いた。試験片は、ラット大腿骨の骨幹中央部から骨軸方向に垂直に厚さが約1.5mmとなるようにマイクロカッターで大腿骨1本から1個を切り出した。その後、試験片の表面粗さや平行度を向上させるために耐水研磨紙で研磨し、最終仕上げとして

粒度  $3\ \mu\text{m}$  のダイヤモンドおよび粒度  $0.04\ \mu\text{m}$  のコロイダルシリカを用いて琢磨した。加工後は超音波洗浄器で試験片表面を洗浄し、試験片は速やかに実験に使用した。本実験の DNI では、圧子を試験片の骨軸方向に  $45\ \text{Hz}$  で微小振動を与えながら一定速度  $1.0\ \text{mN/sec}$  で圧入し、 $10\ \text{mN}$  に達した後に除荷した。DNI においては、1 つの試験片表面の骨単位内部とその外側組織である介在層板 (interstitial lamella) について、それぞれ 5 箇所を測定した。DNI 終了後、各試験片の重量を測定し、その後エタノールによる水分置換を行い十分に脱水、乾燥をさせて重量を測定した。さらに、ギ酸を用いて試験片を脱灰、乾燥させて重量を測定した。これらの各重量からミネラル質重量含有率  $w_{\text{miner}}$ 、有機質重量含有率  $w_{\text{organ}}$  および水分重量含有率  $w_{\text{water}}$  をそれぞれ求めた。

### ②実験結果

図 3 および図 4 にラット週齢ごとの osteon 内部と interstitial lamella での貯蔵弾性率  $E'$  と損失正接  $\tan \delta$  の変化についてそれぞれ示した。いずれの週齢においても  $E'$  は osteon よりも interstitial lamella の方が有意に高い傾向を示すとともに、両組織の  $E'$  は週齢の増加に伴い上昇することがわかる。一方、 $\tan \delta$  は 6 週齢と 10 週齢では osteon および interstitial lamella との間で有意な差は認められないが、24 週齢では interstitial lamella よりも osteon の方が  $\tan \delta$  は高い値を示した。また、両組織ともラットの週齢が増加するにつれて  $\tan \delta$  は減少する。

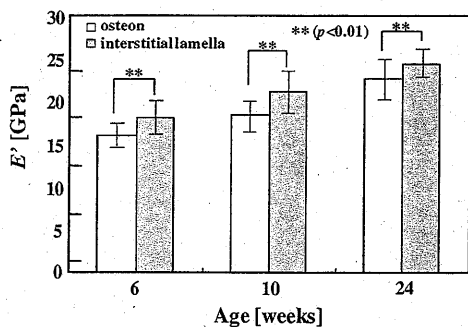


図 3 osteon と interstitial lamella の貯蔵弾性率の変化。

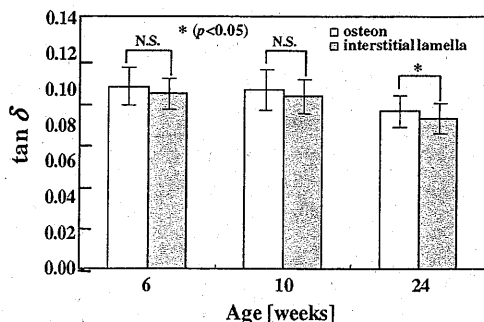


図 4 osteon と interstitial lamella の損失正接の変化。

図 5、6 は、1 試験片について osteon および interstitial lamella での粘弾性パラメータをまとめて平均化した値と各重量含有率との関係について調べた図である。図 5 にミネラル質重量含有率  $w_{\text{miner}}$  と貯蔵弾性率  $E'$  との関係を示す。ラットの週齢が増すにつれて  $w_{\text{miner}}$  は増加するとともに、 $E'$  も上昇し、 $w_{\text{miner}}$  と  $E'$  との間には高い正の相関関係 ( $r = 0.91$ ) が認められた。図 6 に有機質重量含有率  $w_{\text{organ}}$  と水分重量含有率  $w_{\text{water}}$  を加えた重量含有率  $w_{\text{organ}} + w_{\text{water}}$  と損失正接  $\tan \delta$  との関係を示した。 $w_{\text{organ}} + w_{\text{water}}$  はラットの週齢が低いほど高いことがわかる。また、 $w_{\text{organ}} + w_{\text{water}}$  の増加とともに、 $\tan \delta$  も増加し、両者の間には良好な正の線形的な相関 ( $r = 0.85$ ) が認められた。

### ③考察

本結果で示した貯蔵弾性率  $E'$  と損失正接  $\tan \delta$  は、骨の弾性的性質と粘性的性質をそれぞれ示している。図 3 および図 4 より、本実験で用いたラット大腿皮質骨の微細組織構造による粘弾性の差異についてみると、interstitial lamella よりも osteon の方が変形しやすいが、柔軟性の高い組織であることがわかる。図 5 および図 6 から、皮質骨のミネラル質重量含有率が高い骨ほど貯蔵弾性率は高く、変形しにくい、有機質および水分重量含有率が低いため、より脆い骨であること

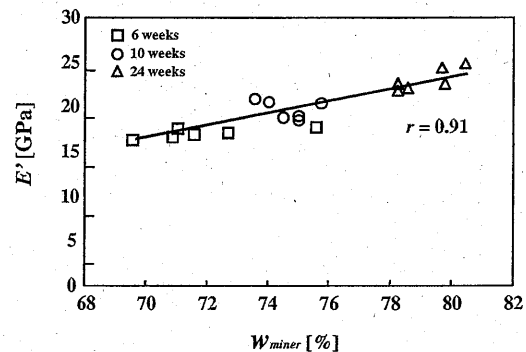


図 5 ミネラル質重量含有率と貯蔵弾性率との関係。

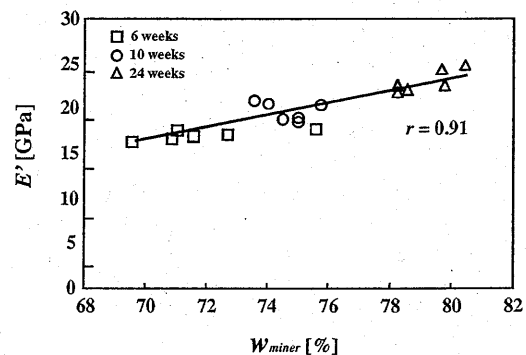


図 6 有機質重量含有率と水分重量含有率を加えた重量含有率と損失正接  $\tan \delta$  との関係。

がわかる。

Lesら<sup>1)</sup>は12個体のヒツジを対象に卵巣摘出術を行うことで骨粗鬆症モデルを作り、橈骨皮質骨の粘弾性パラメータ変化について検討している。その実験では、動的3点曲げ試験を利用して2×2×19 mmの直方体形状の試験片に対する貯蔵弾性率および損失正接を求めている。Lesらの結果では、皮質骨の石灰化率(ash重量/乾燥重量)と貯蔵弾性率は正の相関( $r=0.45$ )が、石灰化率と損失正接との間には弱い負の相関( $r=-0.27$ )があったと報告しており、それらの傾向は本結果と同様である。

#### ④まとめ

ヒト皮質骨と同様の骨成分および構造を有するラット大腿皮質骨に対して、動的ナノインデンテーション試験を行い、骨単位(osteon)および介在層板(interstitial lamella)における動的粘弾性パラメータである貯蔵弾性率および損失正接を求めた。また、骨試験片中のミネラル質、有機質および水分重量含有率がこれらのパラメータに与える影響について検討した結果、以下のようなことがらを明らかにした。

1. 皮質骨組織の骨単位内部の方が介在層板よりも貯蔵弾性率は低く、損失正接はわずかに高いという傾向がみられた。

2. ミネラル質重量含有率と貯蔵弾性率の間には正の相関が、有機質と水分重量を加えた含有率と損失正接の間には正の相関がそれぞれ認められた。

#### ⑤参考文献

1) Les, C. M. et al., *Bone*, **35**(2004), 729-738.

### (2) ヒト象牙質の動的粘弾性の評価

#### ① 対象と方法

試料として東北大学病院にて抜去されたヒト永久歯を用いた。永久歯の正確な性別や年齢は不明であるが、う蝕や修復物がない切歯8個体(#1~#8)を選択し、実験で使用した。なお、すべての試料は抜去直ちに生理食塩水中で冷蔵保存し、抜去後6ヶ月以内に実験を行った。本研究では、力学試験を行う前に骨密度(ミネラル密度)の定量測定法として、ほぼ確立されている手法<sup>10), 11)</sup>であるpQCT装置を用いて象牙質に含まれる単位体積あたりのミネラル密度DMD( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )を非破壊的に求めた。測定に際してはスキャンビームが歯軸へ垂直に照射するように留意し、各切歯を2.05 mm間隔でボクセルサイズを $0.1 \times 0.1 \times 2.05 \text{ mm}$ と設定して、歯冠から歯根部にかけて8~10スライスを撮影し、各断面の平均DMDを測定した。

DNI試験に使用する象牙質として、図7のように歯冠部、歯頸部、歯根中央部および根尖部の各部位から歯軸と垂直な厚さ約1 mmの薄板を切り出し、切歯8個体から32個の試

験片を作製した。

本実験のDNIでは、圧子を試験片表面に垂直(歯軸方向)に微小振幅2 nm, 振動数45 Hzで振動させながら、Fig. 5で示すように一定速度10 mN/secで圧入し、荷重300 mNに達した後に除荷した。なお、実験では試験片の象牙質部分における任意の5箇所を測定し、各試験片の平均貯蔵弾性率および平均損失正接をそれぞれ求めた。

#### ② 実験結果

DNI試験で求めた象牙質の貯蔵弾性率 $E'$ と損失正接 $\tan \delta$ を各断面位置において平均化し、象牙質位置における歯牙8本での平均値と標準偏差表を図8にそれぞれ示した。弾性的性質を表す貯蔵弾性率 $E'$ は歯冠部で平均19 GPaであり、歯根部で平均16 GPaと約3 GPa低下した。一方、粘性的性質を表す損失正接 $\tan \delta$ の平均値は、歯冠部で0.112から尖根部で0.118とわずかに上昇している。歯冠部から歯根部での貯蔵弾性率の変化は有意な低下であったが( $p < 0.005$ )、損失正接の上昇には有意差はみられなかった。

図9は各試験片について得られたDMDと貯蔵弾性率との関係を示したものである。貯蔵弾性率は象牙質ミネラル密度DMDが増加するに従い、増加するという正の相関関係( $r = 0.72$ )を認めた。

象牙質試験片のDMDと損失正接との関係を図10に示した。損失正接は貯蔵弾性率とは反対に、DMDが増加するに従い、減少するという弱い負の相関( $r = -0.23$ )があった。

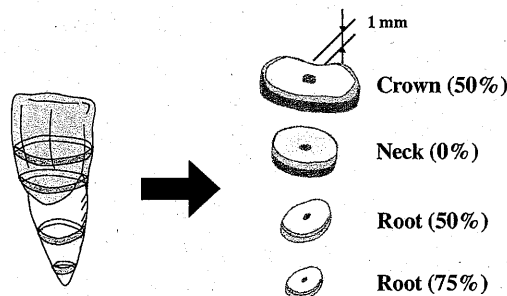


図7 ヒト切歯象牙質試験片。

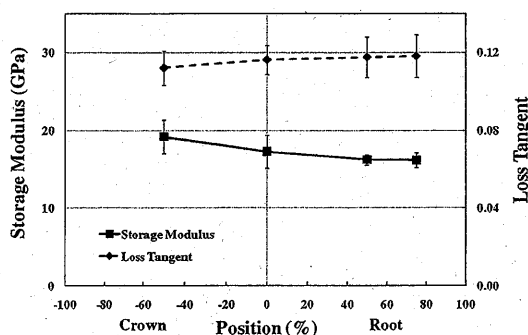


図8 象牙質の貯蔵弾性率と損失正接の分布。

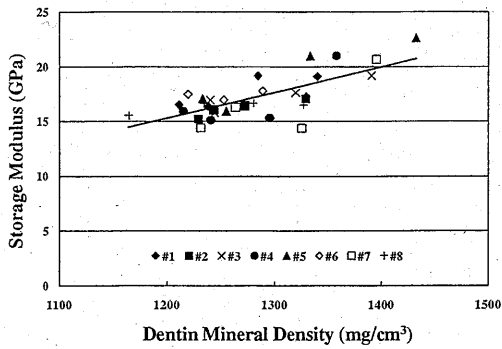


図9 ミネラル密度 DMD と貯蔵弾性率との関係.

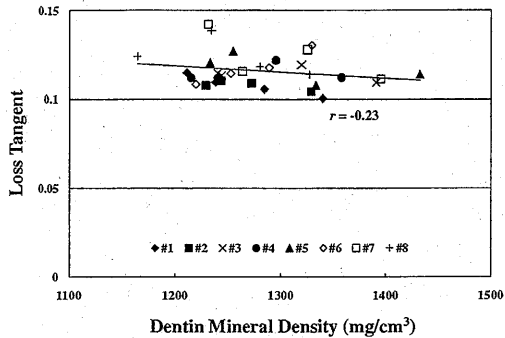


図10 ミネラル密度 DMD と損失正接との関係.

### ③考察

本結果で示した貯蔵弾性率  $E'$  と損失正接  $\tan\delta$  は、象牙質の弾性的性質（剛性）と粘性的性質をそれぞれ示している。図8より、歯根象牙質は歯冠象牙質よりも剛性が低い（変形しやすい）が、粘性の高い（力の速度の増加とともに変形に対する抵抗が増加する）組織であることがわかる。象牙質の剛性、すなわち貯蔵弾性率に最も影響を及ぼすと考えられるものは DMD であり、これは図9の DMD と貯蔵弾性率が強い正の相関を有することからも容易に理解できる。また、粘性、すなわち損失正接に関与する主な象牙質成分は、コラーゲン線維と水分と予想される。本研究ではそれらの成分量を測定していないために、その定量的な関係は明らかではないが、同じ生体硬組織である皮質骨においては DMD が高いほどコラーゲン線維と水分が減少することが示されていることから、図10の DMD と損失正接が負の相関を有することに反映しているものと考えられる。

### ④まとめ

ヒト切歯8本の歯冠から歯根までの象牙質を対象に pQCT により単位体積あたりのミネラル密度 DMD 分布を測定するとともに、動的ナノインデンテーション (DNI) 試験を行い、象牙質の動的粘弾性パラメータである貯蔵弾性率および損失正接について求めた結

果、以下のような知見を得た。

1. 象牙質の DMD は、歯冠部で高く歯頸部、歯根部に向かうにつれて単調に低下する。
2. 象牙質の剛性を表す貯蔵弾性率は、歯冠部で最も高く歯根部に向かうにつれて有意に減少するが、粘性を表す損失正接は、それとは反対に歯冠部で低く歯根部に向かうにつれてわずかに増加したが、有意差は認められなかった。
3. 貯蔵弾性率と DMD との間には正の相関 ( $r = 0.72$ ) が、損失正接 DMD との間には負の相関関係 ( $r = -0.23$ ) がそれぞれ認められた。

### (3) 軟骨の動的粘弾性の評価

関節軟骨のナノインデンテーションを行う際の基礎数学理論を確立するために、軟骨の異方性（横等方性）を考慮した押込み試験の3次元理論応力解析を行った。

#### ① 応力解析

図11に示すように円柱座標  $(r, \theta, z)$  において、剛体基礎（軟骨下骨）上に密着した厚さ  $h$  の横等方性無限弾性厚板（関節軟骨層、 $r-\theta$  面：等方性面、 $z$  軸：異方性主軸）上面を直径  $2a$  の平底円柱状剛体パンチで微小量  $\epsilon_0$  だけ押込む軸対称弾性接触問題を考える。このとき、剛体パンチと厚板とは滑らかに接触するものとして3次元弾性論に基づいて厳密に解析を行った。

本問題は3次元弾性論における混合境界値問題とよばれ、与えられた境界条件式を完全に満足するように解析を行う。初めに、弾性体の変位の釣合い式を満足する2組の調和型応力関数を選ぶ。次に応力関数で表現される変位と応力の式に境界条件を適用させると、この問題は双積分方程式を解く問題になる。従来の多くの研究では、この双積分方程式を Fredholm 型積分方程式に変換する方法が用いられているが、ここでは、厚板上面のパンチ面の垂直応力  $(\sigma_z)_{z=h}$  を未知係数と第2種 Tchebycheff 多項式を含む無限級数で表示して、Hankel 逆変換と Gegenbauer の加法定理を適用させることによって、本問題を無限連立一次方程式の解法問題に帰着させた。

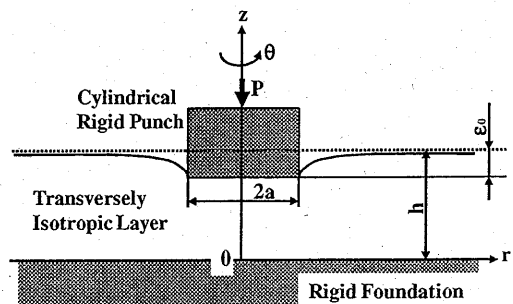


図11 剛体基礎上に密着した横等方性厚板の円柱状剛体パンチによる押込み.

②数値結果例

図 12 に数値結果の一例として、厚板の弾性定数値を  $E'/E=1.5$ ,  $G'/G=1$ ,  $\nu=\nu'=0.3$  と一定とし、パンチ半径と板厚のアスペクト比  $h/a$  を変化させた場合の基準化したパンチ接触面の垂直応力  $(\bar{\sigma}_z)_{z=h} = a^2(\sigma_z)_{z=h}/P$  の半径方向分布図を示す。ここで、 $E, G, \nu$  はそれぞれ等方性面内の縦弾性係数、横弾性係数およびポアソン比であり、 $E', G', \nu'$  は異方性主軸方向に関する弾性定数である。

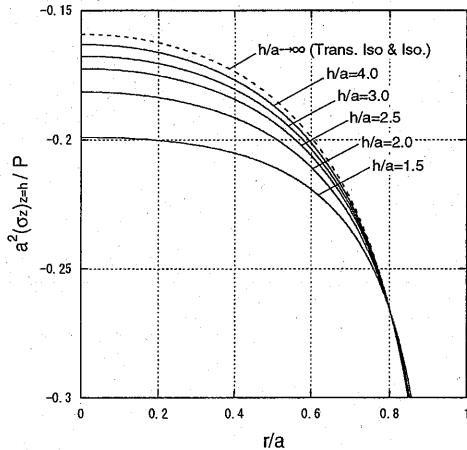


図 12 基準化したパンチ接触面の垂直応力  $(\bar{\sigma}_z)_{z=h} = a^2(\sigma_z)_{z=h}/P$  の半径方向分布図。

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 5 件) \*

1. 坂本信, 小林公一, Dynamic Nanoindentation Study on Viscoelastic Properties of Cortical Bone, Journal of JSME 2009, Special Issue, vol. 9, 2009, 掲載決定, 査読有。
2. 坂本信, 北村拓也, 笹川圭右, 小林公一, 遠藤英昭, 伊藤秀美, ヒト象牙質のミネラル密度と粘弾性的特性の評価, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, vol. 29, p. 153-159, 2008, 査読有。
3. 坂本信, 笹川圭右, 小林公一, 遠藤英昭, 伊藤秀美, ヒト象牙質の動的粘弾性, 実験力学, vol. 8, p. 121-126, 2008, 査読有。
4. 坂本信, 小林公一, The Elastic Contact between a Circular Rigid Punch and a Transversely Isotropic Layer Bonded to a Rigid Foundation, Theoretical and Applied Mechanics, vol. 56, p. 15-28, 2008, 査読有。
5. 坂本信, 小林公一, 田邊裕治, 大森豪, Estimation of Viscoelastic Properties of Rat Cortical Bone Using Dynamic Nanoindentation, Proceedings of ATEM'07,

JSME-MMD, vol.7, p. OS2:1:1-4, 2007, 査読有。

[学会発表] (計 7 件) \*

1. 坂本信, ダイナミックナノインデンテーションによる骨の動的粘弾性評価, 第 35 回日本臨床バイオメカニクス学会, 2008-11-14, 大阪。
2. 坂本信, Biomechanics of Bone, 1st International Workshop on Human-Oriented Product Innovation, (招待講演), 2008-10-10, ソウル(大韓民国)。
3. 坂本信, 笹川圭右, 小林公一, 遠藤英昭, 伊藤秀美, ヒト象牙質の動的粘弾性の評価, 日本機械学会 2008 年度年次大会, 2008-8-4, 横浜。
4. 坂本信, 笹川圭右, 小林公一, 遠藤英昭, 伊藤秀美, ヒト象牙質の動的粘弾性, 日本実験力学学会 2008 年度年次講演会, 2008-6-30, 札幌。
5. 坂本信, 小林公一, Dynamic Nanoindentation Study on Viscoelastic Properties of Rat Femoral Cortical Bone Tissues, 54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2008-3-2, サンフランシスコ(米国)。
6. 坂本信, 小林公一, 横等方性弾性組織層のインデンテーション試験に対する数学的解析, 日本機械学会第 20 回バイオエンジニアリング講演会, 2008-1-25, 東京。
7. \* 坂本信, Dynamic Nanoindentation Study on Viscoelastic Properties of Rat Cortical Bone Tissues, PLASTICITY 2007, 2007-11-8, アラスカ(米国)。

[その他] \*

ホームページ等

<http://www.vbl.niigata-u.ac.jp/>

6. 研究組織 \*

(1) 研究代表者

坂本 信 (SAKAMOTO MAKOTO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 80215657 \*

(2) 研究分担者 \*

小林 公一 (KOBAYASHI KOICHI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 70296317

田邊 裕治 (TANABE YUJI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号: 60143020

大森 豪 (OMORI GO)

新潟大学・超域研究機構・教授

研究者番号: 70283009