

機関番号：34315
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20560092
 研究課題名(和文) 生体組織の力学的適応におけるコラーゲン原線維と線維間物質の力学的相互作用の解明
 研究課題名(英文) Effects of the mechanical relationships between collagen fibrils and ground substances on the mechanical adaptation of biological tissues
 研究代表者
 山本 憲隆 (YAMAMOTO NORITAKA)
 立命館大学・理工学部・教授
 研究者番号：40210546

研究成果の概要(和文):

腱や靭帯は、コラーゲンからできており、線維束、線維、原線維からなる階層構造をとっている。また、線維束は、線維や原線維とそれらの間を満たしているプロテオグリカンなどの線維間物質で構成されている。本研究では、これら構成要素の引張試験と電子顕微鏡や原子間力顕微鏡による微細構造観察を行い、線維束、原線維、およびプロテオグリカンの間に生じる力学的関係を明らかにした。

研究成果の概要(英文):

Tendons and ligaments have such hierarchical structures as collagen fascicles, fibers, and fibrils. The fascicles consist of fibers and fibrils embedded in ground substances such as proteoglycans. In this study, these specimens were stretched to failure and their microstructure was observed with electron microscope and atomic force microscope. I elucidated the mechanical relationships among the fascicles, fibrils, and proteoglycans.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生体力学

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：バイオメカニクス，力学的性質，微細構造，力学的適応，腱，コラーゲン，原線維，線維間物質

1. 研究開始当初の背景

生体組織は力学的環境の変化に対して、形態や力学的性質を変化させて適応する。宇宙飛行士が無重力空間で生活すると骨や筋肉の量が短期間に著しく減少するが、適度な運動によりこれを防止できることはよく知られている。また最近では、骨粗鬆症に関連して骨の力学的適応の問題が注目を集めている。腱や靭帯についても靭帯再建や損傷治療に関連して大きな関心が寄せられるように

なっている。この力学的適応制御のメカニズムの解明は、生体組織の生理的機能とその維持、制御の機構を明らかにするうえで非常に重要である。

従来、力学的適応の研究は、おもに実験動物の関節をギプスで固定したり、トレッドミルで運動させることによって行われてきた。しかし、固定や運動によって腱や靭帯に作用する負荷の大きさは計測されておらず、本当に腱や靭帯に作用した荷重が増減したのか、

また荷重がどれだけ増減したのかについてはまったく不明であった。そこで、我々は、ウサギの膝蓋腱に作用している負荷を外科的手術により定量的に増減させる実験を行い、膝蓋腱の力学的性質の変化を調べた。このように、すでにマクロなレベルでの適応現象については、かなり詳細なデータを蓄積していた。

ミクロなレベルでの研究については、ウサギの膝蓋腱から直径 300 μm 程度のコラーゲン線維束を摘出して、引張試験を行ない、力学的性質を調べている。さらに、微分干渉顕微鏡を用いてコラーゲン線維束の微細構造を観察しながら引張試験を行うことができる力学試験装置を開発して、マウス尾腱より摘出した直径 100 μm 程度の線維束の微細構造と力学的性質の関係について検討した。これらの研究を通して、腱や靭帯を構成する微細構成要素であるコラーゲン原線維とそれらの間を満たしているプロテオグリカンなどの線維間物質が、腱や靭帯の力学的性質を決定する重要な要因であることがわかってきた。

2. 研究の目的

腱や靭帯は直径 100 ~ 500 μm のコラーゲン線維束、直径 1 μm 程度の線維、直径 50 ~ 500nm の原線維の順に小さくなり、最終的に直径 1.5nm、長さ 300nm のトロポコラーゲンと呼ばれるコラーゲン分子に至る。また、線維束は多数の線維や原線維とそれらの間を満たしているプロテオグリカンなどの線維間物質で構成されている。このため、腱や靭帯の力学的反応を把握するには、これらマイクロ・ナノレベルでの構造と力学的性質の関係を明らかにすることが重要である。

そこで、本研究では、ラットやマウスの腱・靭帯を微細構成要素に分解して、それら構成要素の力学的性質と構成要素同士の力学的相互作用について検討した。とくに、直径 50 ~ 500nm 程度のコラーゲン原線維と線維間物質に注目して、力学的環境の変化に対する生体組織の適応制御のメカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 線維束の力学的性質に及ぼすコンドロイチナーゼ ABC の影響：本実験では、コンドロイチナーゼ ABC によりプロテオグリカンを取り除いた線維束の引張試験を行い、線維束の力学的性質と微細構造の関係について検討した。

試料の作成：実験には DD-y マウス（雄，4 週齢，体重 20.9 ~ 22.0g）を用いた。尾腱より長さ約 35mm のコラーゲン線維束を摘出し、1unit/ml のコンドロイチナーゼ ABC 溶液で満たした試験管に線維束を入れ、恒温槽で 37

に保持した。浸漬時間は 6, 12, 24, 168 時間とした。浸漬終了後、付着しているコンドロイチナーゼ ABC の影響を停止させるために、直ちに生理食塩水を満たした容器に線維束を入れて洗浄した。その後、引張試験を行い、線維束の力学的性質を求めた。

引張試験：試験には光学顕微鏡のステージ上で利用できる小型の引張試験装置を用いた。ステージの一端にロードセル（LTS-100GA，共和電業）を、他端にリニアアクチュエーター（CM420-3C，オリエンタルモーター）を固定し、両機器に、チャックとなるアクリル板を取り付けた。このチャック間に試料をシアノアクリレート系接着剤で固定し、スライドガラスとカバーガラスの間に生理食塩水と共に挟み込んだ。次に、プリロード 0.003 N をかけた。その後、試料の直径をビデオディメンジョンアナライザー（PERCEPT SCOPE C3160，浜松ホトニクス）を用いて計測し、得られた値を円近似して断面積を求めた。引張試験は、光学顕微鏡の観察像を CCD カメラ（PV10，オリンパス）を用いてビデオテープに記録しながら、引張速度 0.1mm/sec で試料が破断するまで行った。

(2) 成長過程にあるマウス尾腱より摘出したコラーゲン原線維の力学的性質：本実験では、週齢の異なるマウスを用いて、尾腱より摘出した原線維の引張試験を行い、成長が原線維の力学的性質に及ぼす影響について検討した。

試料の作成：実験には 4, 9, 15 週齢の雄の DD-y マウス（体重 25, 40, 45g）を用いた。尾腱より長さ約 35mm のコラーゲン線維束を摘出した。次に、線維束を蒸留水と共に試験管に入れ、試験管ミキサーで攪拌した。原線維が分離し、綿状になった試料をスライドガラス上に取り出し展開した。

引張試験：引張試験は倒立顕微鏡（IX71，オリンパス）のステージ上で行った。原線維は光学顕微鏡の明視野観察では観察することができないため、暗視野観察下で実験を行った。スライドガラス上に展開した試料から、マイクロマニピュレータ（MM-89，MMO-202N，ナリシゲ）に取り付けたマイクロ針を用いて、原線維単体を取り上げた（Fig. 1）。この原線維の他端をもう一本のマイクロ針の先端に吸着させ、マニピュレータを操作して、原線維の両端をマイクロ針に巻きつけた。

原線維を生理食塩水中に 3 分間浸漬した後、一方の針は静止させたままで、もう一方の針は原線維が破断するまでマニピュレータを用いて移動させた（Fig. 1）。顕微鏡画像を CCD カメラ（CS230，オリンパス）を用いてビデオテープに録画し、原線維の長さマイクロ針のたわみ量を画像解析装置（XL-20，オリンパス）を用いて計測した。

原線維に作用する荷重はマイクロ針のたわみから求めた。実験に使用したマイクロ針の原線維取り付け部を電子天秤（UMX2，メトラートレド）上に設置したアクリルパイプに押し当てた。この時の針のたわみをビデオマイクروسコープ（PV10-CB，オリンパス）で計測し、荷重を電子天秤の表示値より読み取った。得られた荷重とたわみの関係から、原線維に作用した荷重を求めた。

引張試験後、マイクロ針を原線維が付いた状態で、アルミニウム製の円柱形載物台に導電性接着剤（ドータイト）で固定した。これらを真空蒸着装置（JFC-1600，日本電子）に入れ、白金コーティングを施した。作成した試料を走査型電子顕微鏡（1710S，テクネクス工房）で観察し、針に付着した破断後の原線維の直径を測定した。この直径から、円近似により断面積を求めた。得られた荷重と断面積より、原線維に作用した応力を算出した。一方、破断ひずみは、録画した画像より原線維の長さの変化を計測し、算出した。

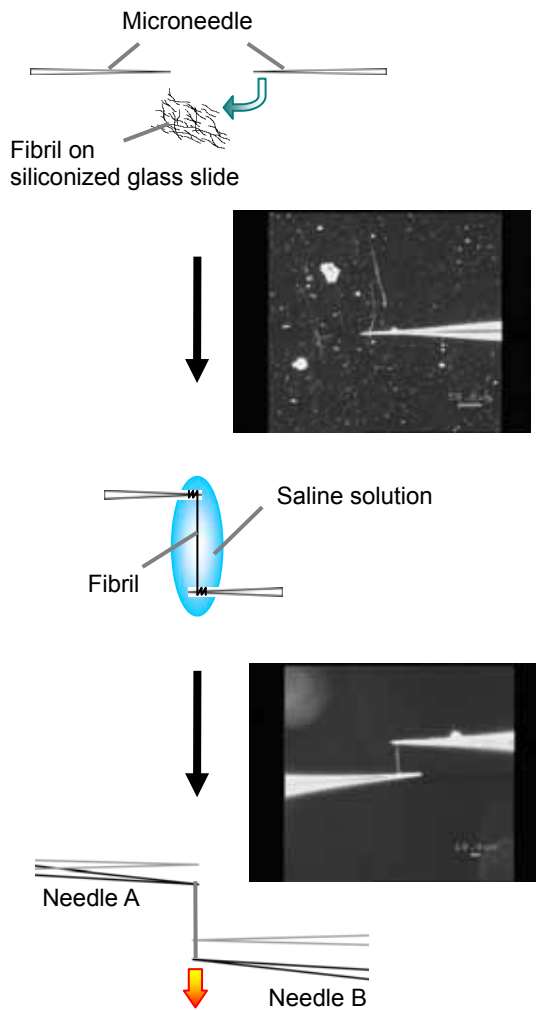


Fig. 1 Schematic diagram of tensile test for fibrils.

4. 研究成果

(1) 線維束の力学的性質に及ぼすコンドロイチナーゼ ABC の影響：線維束をコンドロイチナーゼ ABC 溶液に浸漬すると、プロテオグリカンが除去されて、線維同士の結びつきが弱くなり、線維の走向に大きな乱れが観察された（Fig. 2）。ただし、プリロードを作用させると、バラバラになっていた線維が平行に並んで、線維束全体の外観は浸漬前と同様になり、浸漬前後で線維束の直径はほぼ同様であった。

線維束の引張強度と接線弾性係数は、コンドロイチナーゼ ABC 溶液浸漬により有意に減少し、浸漬時間が長くなるほど減少する割合は大きくなった（Fig. 3）。一方、破断ひずみは浸漬時間が長くなると減少する傾向が見られたが、有意差はなかった。これらの結果から、プロテオグリカンが線維束の長軸方向の力学的性質に大きな影響を及ぼしていることが明らかになった。

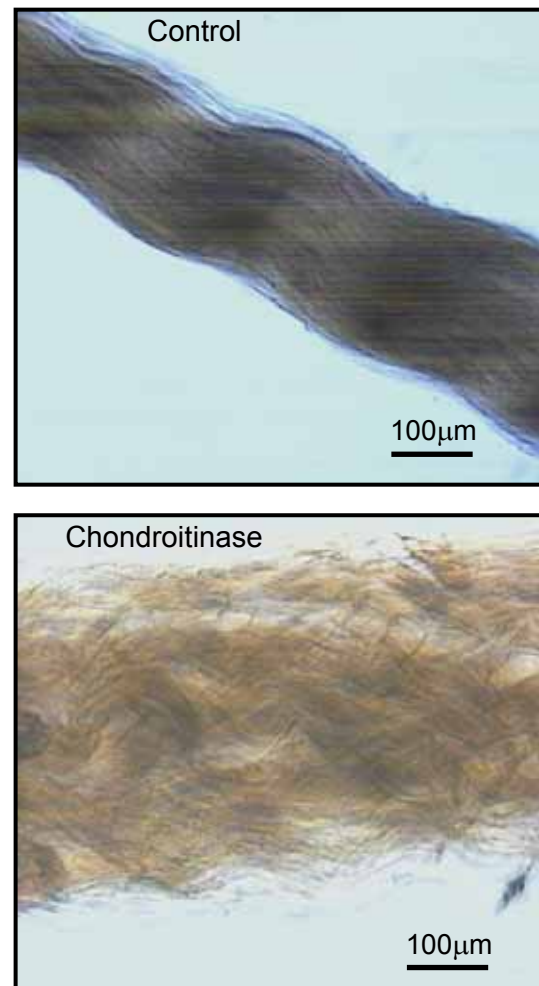


Fig. 2 Light microscopic images of the fascicles immersed in a chondroitinase ABC solution.

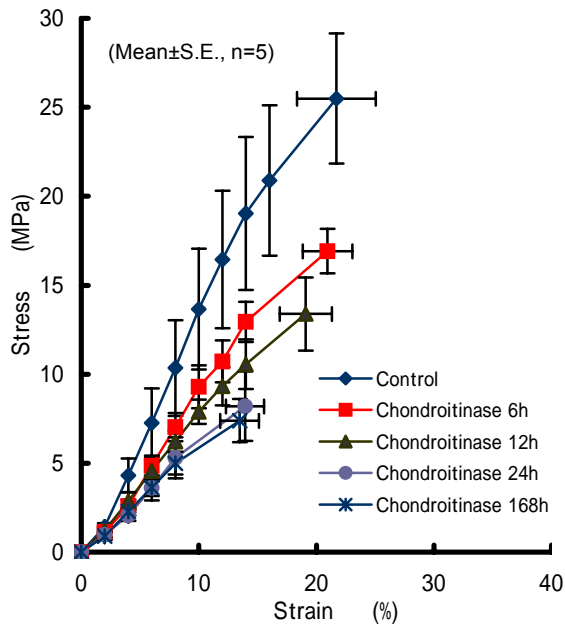


Fig. 3 Stress-strain curves of the fascicles immersed in a chondroitinase ABC solution.

(2) 成長過程にあるマウス尾腱より抽出したコラーゲン原線維の力学的性質: 各週齢における原線維の引張強度と直径の関係を Fig. 4 に示す. 引張強度を目的変数とし, 直径と週齢を説明変数として重回帰分析を行なうと, 直径の p 値は 0.00004, 週齢の p 値は 0.03 となった. このことから, 直径が大きくなると引張強度が有意に小さくなり, 週齢が大きくなると引張強度が有意に大きくなるのが明らかになった. ただし, 直径の影響に比べて週齢の影響はかなり小さいことがわかった. 一方, 破断ひずみにおいては, 有意な変化は現われなかった (Fig. 5).

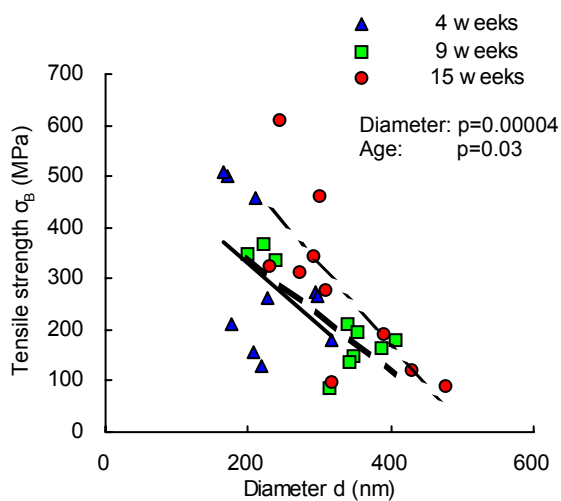


Fig. 4 Relationships between the tensile strength and diameter of fibrils.

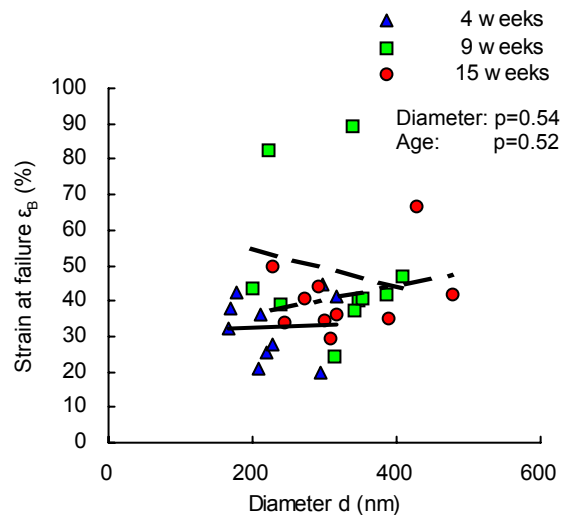


Fig. 5 Relationships between the strain at failure and diameter of fibrils.

(3) 得られた成果の位置づけと今後の展望: 本研究により, 腱や靭帯を構成するコラーゲン線維束, 原線維, およびプロテオグリカンの間に生じる力学的相互作用の基本原則の一部を明らかにすることができた.

生体の力学的適応反応は成長, 老化, 疾病などに大きく関与しているため, 得られた成果は, 骨折や骨粗鬆症, 腱・靭帯の損傷, 高血圧や動脈硬化などの様々な疾患の治療に結びつくと考えられる. さらに, 近年注目を集めている再生医工学 (ティッシュエンジニアリング) において, 幹細胞などの自家細胞から人工の組織や器官を生体外で再構築する際に, 細胞を育成するための足場となる材料開発において重要な指針を与えるものと期待される.

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)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

山本憲隆, 福原和浩: 水晶振動子マイクロバランス (QCM) を用いたコラーゲン原線維とコラーゲン分子の相互作用の解析, 日本機械学会 2010 年度年次大会講演論文集(8), 査読無し, 159-160, 2010.

山本憲隆, 西面知弥: 成長過程にあるマウス尾腱より抽出したコラーゲン原線維の力学的性質, 日本機械学会第 22 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 査読無し, 264, 2010.

Noritaka Yamamoto, Kazunari Sugiura: Mechanical Properties of Collagen Fibrils Obtained from the Fascicles of Mouse Tail Tendons, Proc. 3rd Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics 2009, 査読有

り, 34, 2009 .

山本憲隆, 本田章, 深谷正史: 水晶振動子マイクロバランス (QCM) と原子間力顕微鏡 (AFM) によるコラーゲン原線維の再生過程の解析, 日本機械学会 2009 年度年次大会講演論文集(5), 査読無し, 11-12, 2009 .

植本真妃, 山本憲隆: マウス尾腱より摘出したコラーゲン原線維の微細構造と力学的性質に及ぼすコラゲナーゼの影響, 日本機械学会第 20 回バイオフィロンティア講演会講演論文集, 査読無し, 17-18, 2009 .

山本憲隆, 松尾大地: ラット尾腱より摘出した線維束の引裂強さに及ぼすコンドロイチナーゼ ABC の影響, 日本機械学会第 21 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 査読無し, 177-178, 2009 .

山本憲隆, 松尾大地: ラット尾腱より摘出した線維束の引裂強さ, 日本機械学会 2008 年度年次大会講演論文集(5), 査読無し, 17-18, 2008 .

植本真妃, 山本憲隆: マウス尾腱より摘出したコラーゲン原線維の力学的性質に及ぼすコラゲナーゼの影響, 日本機械学会第 19 回バイオフィロンティア講演会講演論文集, 査読無し, 7-8, 2008 .

〔学会発表〕(計 1 件)

山本憲隆: 腱・靭帯の構造と力学的性質, 日本設計工学会関西支部第 152 回研究会, 2008 年 9 月 13 日, 大阪電気通信大学 (大阪府).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ritsumei.ac.jp/~noritaka/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山本 憲隆 (YAMAMOTO NORITAKA)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号: 40210546