

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 29日現在

機関番号：10101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23760080
 研究課題名（和文） 高次骨機能診断を目指したX線回折による有機・無機複合ナノ構造の力学解析法
 研究課題名（英文） Mechanical Analysis of Nano-Composite Structure of Collagen/Mineral Components by X-ray Diffraction for Bone Diagnosis
 研究代表者
 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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、新しい骨機能診断手法の開発を目的として、有機・無機複合ナノ構造の力学解析を行った。まず、X線回折によりアパタイト/コラーゲンからなる骨複合構造の力学解析を行った。骨組織に放射光を照射することでアパタイト結晶ならびにコラーゲン分子の両方の構造情報を含む回折光が同時に得られ、この情報から外的負荷に対する両者のふるまいを可視化し、骨アパタイト結晶およびコラーゲン分子の力学的役割を明らかにした。またその複合構造モデルとしての知見に基づき、新たな骨質評価手法としてのラマン分光法の有用性を検証するため、骨ラマンスペクトルから力学解析を行った。その結果、力学的負荷に対するラマン散乱の特性は、骨の構造異方性や加齢といった特性によって変化することが確認され、ラマン分光法が骨質評価手法として有用性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, to propose a novel bone quality evaluation as diagnosis of osteoporosis, the mechanical analysis of nano-composite bone structure of apatite/collagen phases was carried out. At first, the microscopic mechanical behaviors of both mineral particles of apatite and collagen matrix in bone are observed by wide-angle X-ray scattering caused by the lattice structure of apatite crystals and small-angle X-ray scattering caused by the periodic structure of collagen molecules, respectively. In combination with micro-compressive device, both strains of mineral and collagen phases were measured simultaneously. Based on these knowledges on bone micro-structure, to evaluate the possibility of Raman spectroscopy as novel bone quality assessment, the mechanical behaviors of mineral and collagen phases in bone tissue were measured by using Raman microscope. And, the effects of mechanical properties and ageing of bone were evaluated.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：機械材料・材料力学，生物・生体工学，放射線，X線，粒子線，老化，骨組織

1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会の到来により、骨折や骨疾患等による運動機能障害が重大な問題となっている。骨は自身の成長・吸収によって合理的な構造・性質を持つことで最適な構造機能特性を実現していると考えられ、このことはリモデリング現象として知られている。微視的には骨は無機成分のアパタイト結晶と有機成分のコラーゲ

ン分子からなる複合構造である。特に、剛性・強度の高いアパタイト結晶は骨密度と密接な関係があり、従来の骨強度推定手法の根拠となっている。一方、近年、骨コラーゲンの異常がマイクロダメージ発生の原因となることや、原発性骨粗鬆症や糖尿病などにおいて骨コラーゲンの異常による骨強度低下が認められ、この

ような微視構成成分に関わる「骨質」の重要性が指摘されている。しかし、コラーゲンの力学的役割、特にアパタイトとの力学的相互作用については複雑かつ微細であり、可視化等による解明も困難であり、その詳細はいまだ不明である。臨床的な骨質評価への応用には課題が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、X線回折を利用したコラーゲン/アパタイト両者の構造および力学挙動を観察可能とする小角・広角回折同時測定系を構築し、微視的力学挙動観察から骨コラーゲン/アパタイト複合構造モデルを提案するとともに、そのモデルを用いX線回折測定により同定された特性パラメータに基づき、ラマン分光法を用いてマクロな力学特性を推定する新たな骨質評価手法の提案を目的とする。

3. 研究の方法

I. X線回折による骨アパタイト/コラーゲンの力学挙動観察

測定試料

試験片として、ヒト股関節骨頭頸部より短冊状皮質骨試験片を骨軸方向が長軸方向となるように採取した。

放射光回折実験

回折実験は、シンクロトロン放射光施設 (PSI, Switzerland) で行った。X線エネルギーは18.58keV (波長: 0.0667 nm) とした。図1に示すように、コラーゲンからの小角散乱像およびアパタイト結晶からの広角回折像を同時に検出するため、図2に示す実験系で測定を行った。

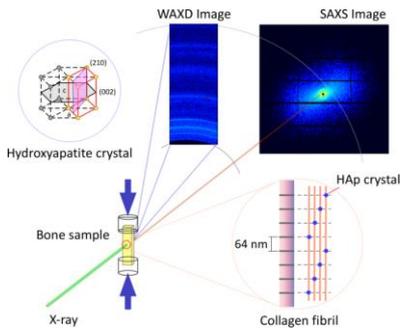


図1 骨アパタイト/コラーゲンにおけるX線回折

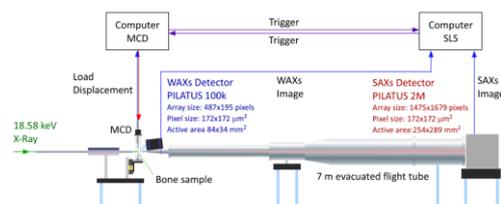


図2 シンクロトロン広角・小角回折実験系

小角散乱像は、試験片から7m後方に設置した検出器により撮像した。広角回折像は前方に20.5~44.9 degの散乱角となるよう検出器を設置し、撮像した。X線ビームサイズは400×300um、撮像時間は0.230sec/imageとした。撮像系と負荷制御系を同期させ、圧縮負荷下における連続観察を可能とした。

試験片は小型圧縮負荷装置に設置し、繰返弾性圧縮試験 (ひずみ速度: 0.014, 0.0014; 最大圧縮ひずみ: 0.02) を行った。得られた回折画像を解析し、負荷前に対する負荷中の結晶格子ならびに分子配列の構造的変化から力学的ひずみを算出した。

II. ラマン分光法による骨アパタイト/コラーゲンの力学挙動観察

測定試料

試験片として23ヶ月齢および9歳齢のウシ大腿骨骨幹皮質骨を用いた。骨試験片は骨軸方向および骨軸垂直方向を長軸として、ダイヤモンド・ソーを用いて作製した。骨試験片表面はエメリー紙で研磨した後、研磨機を使用してバフ研磨した。研磨後、超音波洗浄機を用いて洗浄した。作製した試験片の両端を2枚の金属板に接着剤で固定し、ゲージ長さは3mmとした (図3)。

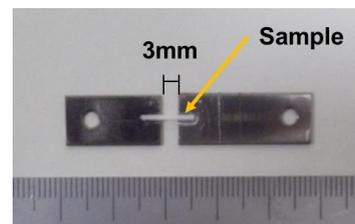


図3 ラマン分光解析用骨試験片

ラマン分光測定

物質に単一波長の励起レーザーを照射すると、入射光と同じ振動数の散乱光 (レイリー散乱) と、異なる振動数の散乱光 (ラマン散乱) が生じる。物質の特性に応じてラマン散乱の振動数すなわちエネルギーが変化することから、ラマン分光法により骨組織内の有機および無機両成分を同時に測定できる。

ラマン分光測定には、北海道大学創成科学研究棟オープンファシリティの顕微ラマンマイクロスコープシステムを使用した。励起レーザーとして、波長785nmダイオードレーザーを用いた。また図4に示すように、装置内ステージ上に、引張負荷治具を設置し、異なる負荷条件でのラマンスペクトル測定を行った。



図4 ラマン分光用引張負荷治具

4. 研究成果

骨のX線回折像

骨組織中のアパタイトおよびコラーゲンからのX線回折像の一例を図5に示す。アパタイトからの回折像（図5左）では、格子面(203)および(502)からの回折強度が高かった。一方、コラーゲンからの回折像（図5右）では、 $d=22.6\text{nm}$ の回折が見られた。またコラーゲンからの回折以外に、骨軸方向に対して直交方向（図中水平方向）に広がる強い散乱が見られる。これは骨組織内のアパタイト結晶形状および配向に由来するものであることが報告されている。これらの回折角の変化を利用してアパタイトおよびコラーゲンの変形挙動を求めた。

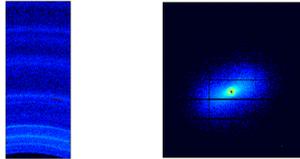
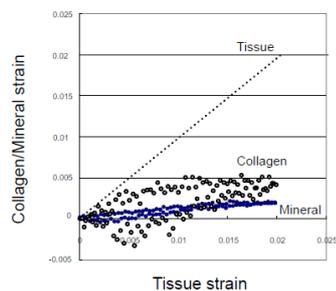


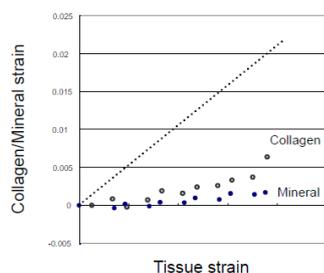
図5 回折X線像(左:広角, 右:小角)

X線回折による微視的力学挙動測定結果

巨視的に骨組織に動的圧縮負荷を与えたときのアパタイト-コラーゲン相の各々のひずみと巨視的な組織ひずみとの関係を図6に示す。負荷された圧縮ひずみに対し、コラーゲン、アパタイトともに圧縮変形していることがわかる。巨視的な骨組織のひずみに対し、コラーゲンで25%、アパタイトで12%程度のひずみが測定され、コラーゲンの方が変形を許容していることがわかる。またひずみ速度0.0014の場合（図6上）、コラーゲンにヒステリシスの影響が見られるのに対し、ひずみ速度0.014（図6下）では見られず、アパタイト/コラーゲン複合構造においても粘弾性効果が確認できた。



ひずみ速度: 0.0014



ひずみ速度: 0.014

図6 圧縮負荷時における組織ひずみとアパタイト/コラーゲンひずみの関係

骨のラマンスペクトル

骨ラマンスペクトルを図7に示す。骨のラマンスペクトルでは 960cm^{-1} 付近にアパタイト由来の強い ν_1 ピークが見られた。さらに 1070cm^{-1} 付近に CO_3^{2-} 、 1245cm^{-1} 付近にAmideIII、 1667cm^{-1} 付近にAmideIピークが見られた。これらはコラーゲン由来の強いピークである。

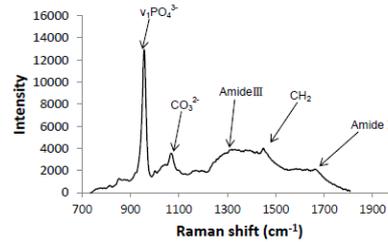


図7 骨ラマンスペクトル

図8に、アパタイト由来のラマンピーク強度分布イメージを示す。白色に近い領域ほど強度が高く、黒色は低い。オステオン構造内においても微視領域においてアパタイト含有量に分布があることが確認できた。

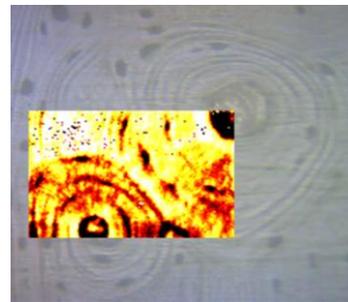


図8 オステオンにおけるミネラルのラマン強度分布

力学負荷に対する骨ラマン応答

各ラマンピークプロファイルからラマンシフトを重心法にて算出した。図9にウシ大腿骨皮質骨の引張負荷・除荷時のラマンシフト変化を示す。引張ひずみが増加するにつれ、骨のアパタイト由来のピークのラマンシフトが低周波側へ移動した。また除荷にともないラマンシフトは元の位置へと移動し、ラマンシフトがひずみ状態に起因することが確認できた。

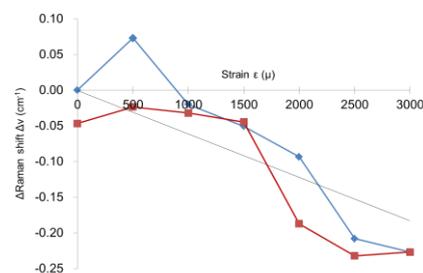


図9 引張負荷・除荷時のミネラルのラマンシフト変化

図10に、骨組織の異方性を考慮した異なる負荷方向および異なる年齢でのアパタイトおよびコラーゲンのラマンシフトの力学負荷応答を示す。骨軸方向への引張負荷の場合に比べ、円周方向への引張負荷の場合には、引張負荷ひずみに対するラマンシフト変化が低下した。皮質骨ではその力学的異方性がよく知られており、この力学的特性の差異がラマンシフト応答に影響したものと考えられる。また同様に高齢の皮質骨でのラマンシフト応答の低下が確認された。

以上の結果より、ラマン分光法によりアパタイトおよびコラーゲンのラマンピークシフトを観察することにより、力学負荷状態を測定することが可能であるとともに、負荷に対するラマンシフト応答を得ることで、骨組織の力学的特性評価の可能性を示すことができた。

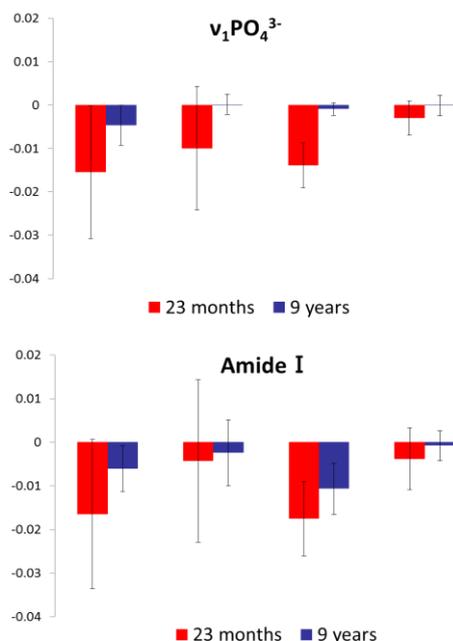


図10 ラマンシフト変化への骨異方性および年齢の影響

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

(1) Fujisaki K, Todo M, Niida A, Shibuya R, Orientation and deformation of mineral crystals in tooth surfaces, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 査読有, Vol. 10, 2012, 176-182.

DOI: 10.1016/j.jmbbm.2012.02.025

[学会発表] (計14件)

(1) Todo M, Tadano S, Mechanical analysis of mineral phase in bone by Raman spectroscopy and effects of aging and its anisotropy, 2013 Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, January 26-29, 2013, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, USA.

(2) 東藤正造, 但野茂, 生体骨のラマン散乱特性と負荷応答, 日本材料学会第62期学術講演会, 2013年5月17-19日, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京都目黒区.

(3) 東藤正造, 但野茂, 門谷琢郎, ラマン分光法による骨組織の微視構造・力学特性評価, 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9-11日, 産業技術総合研究所つくばセンター, つくば市.

(4) 東藤正造, 但野茂, ラマン分光法による骨微視力学挙動観察, 第39回日本臨床バイオメカニクス学会, 2012年11月9-10日, 幕張メッセ国際会議場, 千葉市.

(5) 東藤正造, 但野茂, 丹治雅人, ラマン分光法によるハイドロキシアパタイトの応力解析, 日本機械学会北海道支部第51回講演会, 2012年10月20日, 北見工業大学, 北見市.

(6) 門谷琢郎, 東藤正造, 但野茂, 骨組織の引張変形とラマンシフトの関係, 第51回日本生体医工学会北海道支部大会, 2012年10月6日, 北海道大学工学部, 札幌市.

(7) 東藤正造, 但野茂, ラマン分光法による骨組織力学解析, 日本機械学会M&M2012材料力学カンファレンス, 2012年9月21-24日, 愛媛大学城北地区キャンパス, 松山市.

(8) 東藤正造, 但野茂, ラマン分光法による骨コラーゲン/アパタイトの力学挙動解析, 第32回日本骨形態計測学会, 2012年6月7-9日, 大阪国際会議場, 大阪市.

(9) 東藤正造, 但野茂, 骨アパタイト/コラーゲンの力学的相互作用と骨強度への影響, 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7-8日, 大阪大学豊中キャンパス, 豊中市.

(10) 東藤正造, 但野茂, 加齢骨の微視構造特性と力学特性, 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会, 2011年11月3-5日, 芝浦工業大学芝浦キャンパス, 東京都港区.

(11) 東藤正造, 東海林寛, 但野茂, ラマン分光法によるウシ皮質骨の力学特性評価, 日本機械学会2011年度年次大会, 2011年9月11-15日, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京都目黒区.

(12) 東藤正造, Goldhahn J, Schneider P, Muller R, Bunk O, 但野茂, 骨アパタイト/コラーゲン構造の微視変形挙動観察, 日本機械学会M&M2011材料力学カンファレンス, 2011年7月16-18日, 九州工業大学戸畑キャンパス, 北九州市.

(13) 東藤正浩, Goldhahn J, Schneider P, Muller R, Bunk O, 但野茂, 放射光 X 線回折による骨アパタイト-コラーゲン複合構造の力学挙動観察, 第34回日本バイオレオロジー学会年会, 2011年6月3-4日, 関西大学100周年記念会館, 吹田市.

(14) 東藤正浩, Goldhahn J, Schneider P, Muller R, Bunk O, 但野茂, 放射光 X 線回折によるアパタイト-コラーゲン複合構造の力学挙動観察, 第31回日本骨形態計測学会, 2011年5月20-22日, 長良川国際会議場, 岐阜市.

6. 研究組織

(1)研究代表者

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: 1 0 3 1 4 4 0 2