

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24240068

研究課題名(和文) 骨組織ミネラルとコラーゲン複合体の変形相互作用に基づく骨強度・応力特性

研究課題名(英文) Strength and Stress Characterization based on Mechanical Interaction between Mineral and Collagen Components in Bone tissue

研究代表者

但野 茂 (Tadano, Shigeru)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：50175444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織の基本構成物質であるミネラルとコラーゲンにおける分子/結晶レベルの荷重伝達・負荷応答を明らかにするため、それらの物質が組織化される過程の細胞、構造体、組織といった各階層レベルの強度変形特性を調べた。各階層間の力学的機能相互を確認し、骨組織における強度特性(剛性、弾性率、残留応力、負荷応力、等)の発現機構を確認した。分子/結晶レベルの変形計測からマクロな骨組織の強度特性を高精度に検出する手法を提案した。

研究成果の概要(英文)：Bone shows a hierarchical structure from a nano scale of hydroxyapatite crystal and collagen molecular to a macro scale of cortical and cancellous bone. This work proposed a new method of detecting stress of tissue level using the information of HAp crystal deformation and collagen molecular deformation. X-ray diffraction experimental procedure and Raman spectroscopy method were developed to measure the characteristics of hierarchical structure. Some structural parameters were introduced to represent these characteristics. Also, the XRD method was applied to detect residual stress in bone, and the stress was observed at various regions in animal extremities.

研究分野：バイオメカニクス、人間医工学

キーワード：バイオメカニクス 生体骨組織 応力検出 X線回折 ハイドロキシアパタイト 結晶配向性 コラーゲ

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化が急速に進み、骨粗鬆症に代表される高齢者の骨疾患は深刻である。骨強度脆弱化が骨折を引き起こし、寝たきりの致命的原因となる。また腫瘍の骨転移等による骨脆弱化も見逃せない。高齢者の骨強度については、多くの議論がなされてきた。しかしながら未だに有効な診断・検査方法が無い。X線吸収量から骨塩量(骨密度)を検査する装置(DXA(Dual-X-ray Absorption))は実用化されているが、骨組織の力学的強度は単にミネラル量(骨塩量)だけで決まるわけではない。骨組織はミネラル(主にハイドロキシアパタイト:HAp)と有機質(主にコラーゲン:Col)によって作られるマトリックス構造体が複雑に積層した構造のためである。その体積比(ミネラル:有機質)は、6:4とも言われている。骨塩量の低下が顕著でなくても、骨脆弱化による骨折が生じた高齢患者はめずらしいことではない。より高精度に骨強度を計測する手法の開発が望まれている。そこで本研究では、骨組織皮質骨の力学的強度(剛性、弾性率、応力、等)を、組織、構造、細胞、分子・結晶レベルの荷重伝達・負荷応答とそれらの階層的機能相互を明らかにし、革新的な骨強度・骨応力計測手法を提案する。

(2) 研究代表者(但野)は、これまで皮質骨組織の応力計測法に関する研究を行ってきた。骨組織ミネラルのHApが結晶構造を示すことから、応力測定にはX線回折法の利用を思い当たった。骨組織特有のX線応力測定法を提案した。また、骨組織には無負荷でも残留応力が内在することを報告した。さらに、HAp結晶構造と配向性による骨組織の構造的異方性を明らかにした。これらの研究は、HAp結晶変形から直接骨応力を推定する手法であったが、HAp結晶変形と骨組織変形との関係は非常に複雑で、多くの異方性的構造要因の作用が明らかとなった。臨床診断にも十分有効な骨強度・応力測定には、HAp結晶状態や結晶粒配向性、Col分子の結合状態、マイクロ骨構造体の形態を調べることが非常に重要なことが分かった。

(3) これまでの研究を臨床診断に有効な骨強度・応力計測へと発展させるための課題が整理された。骨組織からマイクロ骨構造体、分子/結晶、それぞれのレベルの荷重伝達や負荷応答、それに伴う変形状態を高精度に測定する手法の開発が必要である。分子/結晶レベルでは、X線回折によるHAp結晶変形計測の高精度化、Col分子の変形挙動や性状についての新たな計測技術が要求される。マイクロ骨構造体レベルでは、HApとColが複合階層化したLamella/Fibril構造体における変形状態とマクロ剛性との関連性を明らかにしなければならない。骨組織レベルでは、Osteon

構造と異方性・階層性を考慮した変形状態と負荷応答の関係が重要である。さらに、マクロな力学的特性を数理モデルで表示することも学術的な価値がある。これらにより、各レベル間の機能相互をより正確に解明される。

2. 研究の目的

骨組織の基本構成物質であるミネラルとコラーゲンにおける分子/結晶レベルの荷重伝達・負荷応答を明らかにし、それらの物質が高度に組織化される過程の細胞、構造体、組織といった各階層レベルの強度変形特性を調べるとともに、各階層間の力学的機能相互(Functional Interaction)をも効果的に評価することで、骨組織における強度特性(剛性、弾性率、応力、等)の発現機構を解明する。このことにより、分子/結晶レベルの変形計測からマクロな骨組織の強度特性を高精度に検出する手法を提案する。

3. 研究の方法

(1) 骨HAp結晶X線回折計測: 牛大腿皮質骨を測定対象として、これまでの広角X線回折に加え、小角散乱X線回折計測を行う。広角測定ではHAp結晶内の 10^{-9} mレベルの変位や構造に対し、小角散乱ではHAp結晶粒子間の 10^{-7} m程度の変位や構造が測定される。これによりマイクロ骨構造体低レベルの変形特性が確認される。負荷中の広角/小角同時計測を行い、HAp結晶内と結晶粒子間の変形相互作用を確認する。

(2) 骨Col分子ラマン分光計測: Col分子構造の状態と負荷時の変形挙動をラマン分光で計測する手法を開発する。熱変性・疲労変性(加齢相当モデル)による分子構造変化の確認も行う。

(3) 骨細胞変形特性解析: 骨細胞を一定の負荷環境下培養した場合の形態変化、変形特性、負荷応答性との関連を観察する。また骨芽細胞の負荷環境下におけるHAp結晶構造やCol分子の形成・成長過程を調査する。

(4) 骨構造体モデリング: マイクロ骨構造体(10^{-5} ~ 10^{-6} m)の数理モデルを作成し計算シミュレーションを行い、階層複合化した骨組織構造体(Osteon-Lamella)(10^{-3} ~ 10^{-4} m)の変形状態を推定する。顕微鏡下の負荷試験により骨組織構造体の荷重伝達・変形応答特性の測定を行い、Col性状が骨弾性率や剛性、骨強度に及ぼす影響が確認できる。骨構造モデルについては、HAp/Col結晶粒子を材料複合則Mori-Tanaka Model (ACTA Metallurgica, 21, 1973)で表示可能なことが最近の世界的ト

ピックスである。この検証と骨構造体機能を考慮した新モデルの提案が可能となる。

(5) マイクロ骨構造体解析：同心円層状構造のOsteonの詳細な形態や構造やBone Lamella, Fibril Arrayの階層的構造を詳細に観察する。マイクロレベルの皮質骨切削面を共焦レーザー顕微鏡（現有）で観察し、弾性率分布を原子間力顕微鏡（AFM：現有）で測定する。

(6) 同時計測：骨 HAp X線回折計測、骨 Col ラマン分光計測、骨細胞特性解析、それぞれの研究をより深化させると共に、力学的機能の相互作用を明らかにするための同時計測手法を検討する。さらに、海綿骨についても同様な手法で基礎研究を実施する。

(7) 階層間機能相互：骨構造体モデリング、マイクロ骨構造体解析の研究を継続して進め、それらをより深化させるとともに、分子・結晶変形特性との機能相互について調査する。

(8) マイクロX線CT構造解析：皮質骨、海綿骨の骨構造体の観察を行う。また、（伊東：分担者）を通じて北大医の協力により加齢骨モデルやCadaver加齢骨の性状観察も実施する。

(9) 回折X線応力検出：X線回折装置を改良し、透過・回折X線測定システムを製作する。測定試料を圧縮負荷しX線を照射する。CT用X線源からは透過画像がCT検出器で撮像される。回折用X線源から発したX線は骨試料で回折し、高速一次元検出器で計測される。これらの透過・回折情報から弾性率および応力分布が測定される。

(10) 骨組織動的特性解析：骨折のほとんどは動的あるいは衝撃荷重によることが多いため、動的な剛性や粘弾性特性を測定する。

(11) 加齢モデル：本項目のすべてについて、骨組織の加齢に伴う強度特性変化を調査する。このために、加齢モデル試料の開発を行う。

(12) Cadaver計測検証：ヒト屍体加齢骨に対する実験検証を海外研究協力者の協力で実施する。

(13) 生検試料負荷特性：本研究によって得られた骨強度・応力計測方法を総括的に整理し、診断装置を開発する。患者のバイオプシー（生体組織診断）により採取した微小骨試料（径1mm×3mm程度）を専用ケースに封入し、圧縮負荷をかけることにより、骨強度と骨応力が検出される。

4. 研究成果

(1) 骨 HAp 結晶 X線回折計測：牛大腿皮質骨を測定対象として、これまでの広角 X線回折に加え、小角散乱 X線回折計測手法開発した。小角散乱では HAp 結晶粒子間の 10 マイクロ程度の変位や構造が測定された。これによりマイクロ骨構造体レベルの変形特性が確認

された。負荷中における広角 / 小角計測を行い、HAp 結晶内と結晶粒子間の変形相互作用を確認した。

(2) 皮質骨残留応力計測：長管骨皮質骨表層の残留応力計測手法を整備した。X線の反射側回折線をイメージングプレートで二次平面で計測し、その回折リングの変形状態から高精度に残留応力を計測する手法を検討した。年齢差によるウシ大腿骨皮質骨内残留応力の違いを明らかにした。幼齢期にはほとんど残留応力が見られなかった。

(3) 骨 HAp-Col 分子ラマン分光計測：骨内 HAp/Col 分子構造の状態と負荷時の変形挙動に対するラマン分光による計測手法を開発した。熱変性・疲労変性（加齢相当モデル）による分子構造変化の確認を行った。また試験片内一点ではなく、表面のイメージング像からひずみを計測する手法を考案した。これにより従来より計測制度の向上が見られた。

(4) 骨構造体モデル：マイクロ骨構造体（皮質骨、海綿骨）のマイクロCT解析を行い、階層複合化した骨組織構造体（Osteon-Lamella）(10-3 ~ 10-4μm)の変形状態を確認した。マイクロインデンテーション骨組織構造体骨組織構造体レベルの弾性率 / 剛性分布の計測手法を開発した。また、径3mm×3mmのCube状海綿骨試験片を作成し、負荷試験することで構造パラメータと剛性・弾性率や降伏応力との関係を調べた。

(5) マイクロ骨構造体解析：同心円層状構造のOsteonの詳細な形態や構造を詳細に観察した。海綿骨骨梁1本の弾性率測定方法を開発し、骨梁の弾性率やHAp結晶特性などを調査した。

(6) 生検試料負荷特性：患者から採取した微小骨試料（径3mm×3mm程度）をCube状に加工し、圧縮負荷による変形特性とX線回折特性の関係を確認した。

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23件)

1. Satoshi Yamada, Shigeru Tadano, Sakurako Fukuda: Nanostructure and elastic modulus of single trabecula in bovine cancellous bone, Journal of Biomechanics, 査読有, 47(14), 2014, pp.3482-3487
2. Satoshi Yamada, Shigeru Tadano, Mai Onuma: X-ray Diffraction Technique with Imaging Plate for Detecting Surface Distribution of Residual Stress in Diaphysis of Bovine Femurs, Experimental Mechanics, 査読有, 54(4), 2014,

- pp.633-640
3. Rajesh Kmar Sharma, Kazuya Furusawa, Akimasa Fukui, Naoki Sasaki: Effects of a flow field on amyloid fibrillogenesis in a b-lactoglobulin solution, *International Journal of Biological Macromolecules*, 査読有, 70, 2014, pp.490-497
 4. Masahiko Morita, Takehiro Tawara, Masaomi Nishimura, Shin Yoshizawa Yoshizawa, Bukai Chou, Ipei Kuroki, Takashi Ijiri, Yuki Tsujimura, Ryutaro Himeno, Hideo Yokota: Communication Platform for Image Analysis and Sharing in Biology, *International Journal of Networking and Computing*, 査読有, 4(2), 2014, pp.369-391
 5. Tadashi Hemmi, Fumie Costen, Salvador Garcia, Ryutaro Himeno, Hideo Yokota, Mehshan Mustafa: Efficient Parallel LOD-FDTD Method for Debye-Dispersive Media, *IEEE Transactions on Antennas and Propagation*, 査読有, 62(3), 2014, pp.1330-1338
 6. Masahiro Todoh, Shigeru Tadano: Mechanical Analysis of Mineral and Collagen Phases in Bone by Raman Spectroscopy, *IFMBE Proceedings - The 15th International Conference on Biomedical Engineering*, 査読有, 43, 2014, 347-348
 7. Mai Onuma, Satoshi Yamada, Shigeru Tadano: Age-Related Residual Stresses at Diaphyseal Surface of Bovine Femur Measured by XRD-IP System, *IFMBE Proceedings - The 15th International Conference on Biomedical Engineering*, 査読有, 43, 2014, pp.743-744
 8. Satoshi Yamada, Sakurako Fukuda, Shigeru Tadano: Orientation and Deformation of HAP Crystals and Elastic Modulus of Single Trabecula in Bovine Femur, *IFMBE Proceedings - The 15th International Conference on Biomedical Engineering*, 査読有, 43, 2014, pp.741-742
 9. Shigeru Tadano, Satoshi Yamada: Residual Stress and Structural Anisotropy of Cortical Bone, *Mechanics of Biological Systems and Materials, Volume 4 - Proceedings of the 2013 Annual Conference on Experimental and Applied Mechanics*, 査読有, 4, 2014, pp.117-122
 10. Satoshi Yamada, Shigeru Tadano, Mai Onuma: X-ray Diffraction Technique with Imaging Plate for Detecting Surface Distribution of Residual Stress in Diaphysis of Bovine Femurs, *Experimental Mechanics*, 査読有, 54(4), 2014, pp.633-640
 11. Katsuhisa Yamada, Hideki Sudo, Koji Iwasaki, Naoki Sasaki, Hideaki Higashi, Yusuke Kameda, Manabu Ito, Masahiko Takahata, Kuniyoshi Abumi, Akio Minami, Norimasa Iwasaki: Caspase 3 Silencing Inhibits Biomechanical Overload-induced Intervertebral Disc Degeneration, *American Journal of Pathology*, 査読有, 184, 2014, pp.753-764
 12. Tomohiro Shimizu, Masahiko Takahata, Yusuke Kameda, Hiroki Hamano, Teppei Ito, Hiromi Kimura-Suda, Masahiro Todoh, Shigeru Tadano, Norimasa Iwasaki: Vitamin K-dependent carboxylation of osteocalcin affects the efficacy of teriparatide (PTH1-34) for skeletal repair, *Bone*, 査読有, 64, 2014, pp.95-101
 13. Yohei Hanazaki, Jyunichi Masumoto, Shoichi Sato, Kazuya Furusawa, Akimasa Fukui, Naoki Sasaki: Multiscale analysis of changes in an anisotropic collagen gel structure by culturing osteoblasts, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 査読有, 5, 2013, pp.5937-5946
 14. Naoki Sasaki, Hideki Shirakawa, Tsutomu Nozoe, Kazuya Furusawa: Elastic properties of collagen in bone determined by measuring the Debye Waller factor, *Journal of Biomechanics*, 査読有, 46, 2013, pp.2824-2830
 15. Takashi Ijiri, Shin Yoshizawa, Yu Sato, Mssaki Ito, Hideo Yokota: Bilateral Hermite Radial Basis Functions for Contour-based Volume Segmentation, *The International Journal of Eurographics Association*, 査読有, 32(2), 2013, pp.123-132
 16. Satoshi Yamada, Shigeru Tadano: Effects of growth on residual stress distribution along the radial depth of cortical cylinders from bovine femurs, *Journal of Biomechanics*, 査読有, 46(13), 2013, pp.2130-2136
 17. Surbhi Kirti Mishra, Tomoko Nagata, Kazuya Furusawa, Naoki Sasaki, and Akimasa Fukui: Expression of xSDF-1 α , xCXCR4 and xCXCR7 during gastrulation in *Xenopus laevis*, *International Journal of Developmental Biology*, 査読有, 57, 2013, 95-100
 18. Hideki Shirakawa, Kazuya Furusawa, Akimasa Fukui, Shigeru Tadano, Naoki Sasaki: Changes in the viscoelastic properties of cortical bone by selective degradation of matrix protein, *Journal of Biomechanics*, 査読有, 46, 2013,

pp.696-701

19. Satoshi Yamada, Shigeru Tadano, Kazuhiro Fujisaki, Yuka Kodaki: Influence of Osteon Area Fraction and Degree of Orientation of HAp Crystals on Mechanical Properties in Bovine Femur, Journal of Biomechanics, 査読有, 46 (1), 2013, pp.31-35
20. Kazuya Furusawa, Shoichi Sato, Jyun-ichi Masumoto, Yohei Hanazaki, Yasuyuki Maki, Toshiaki Dobashi, Takao Yamamoto, Akimasa Fukuid, Naoki Sasaki: Studies on the Formation Mechanism and the Structure of the Anisotropic Collagen Gel Prepared by Dialysis-Induced Anisotropic Gelation, Biomacromolecules, 査読有, 13, 2012, pp.29-39
21. Mitsuo Nakata, Yoshiaki Nakamura, Naoki Sasaki: Slow knot formation by suppressed self-reptation in a collapsed polymer chain, Physical Review E, 査読有, 85, 2012, pp. 021802-1-11
22. Shin Yoshizawa, Alexander Belyaev, Hideo Yokota: Shape and Image Interrogation with Curvature Extremalities, Journal for Geometry and Graphics, 査読有, 16(1), 2012, pp.81-95
23. Fujisaki Kazuhiro, Yamashita Norio, Yokota Hideo: An automated three-dimensional internal structure observation system based on high-speed serial sectioning of steel materials, Precision Engineering, 査読有, 36(2), 2012, pp.315-321

〔学会発表〕(計 50 件)

(国際会議 16 件、国内学会等 34 件、内招請講演 11 件)

1. Kaori Endo, Satoshi Yamada, Masahiro Todoh, Shigeru Tadano, Masahiko Takahata, Norimasa Iwasaki: Structural Strength of Bovine Cancellous Cubic Specimens Under Cyclic Compression, ORS2015 (Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting), 2015 年 3 月 30 日, Las Vegas (US)
2. Satoshi Yamada, Sakurako Fukuda, Shigeru Tadano: HAp Crystal Strain and Elastic Modulus of Single Trabecula of Bovine Cancellous Bone, WCB2014 (7th World Congress of Biomech.), 2014 年 7 月 9 日, Boston (USA)
3. Shigeru Tadano, Satoshi Yamada, Masahiro Todoh, Kazuhiro Fujisaki: Relationship between micro-nano structure and macroscopic strength of bovine cortical bone, JSB2014 (4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics), 2014 年 9 月 3 日, Shima

Kanko Hotel The Classic (Shima, Mie)

4. Shigeru Tadano, Satoshi Yamada: Residual Stress and Structural Anisotropy of Cortical Bone, SEM2013 (2013 SEM Ann. Conf. & Expo. on Exp. & Appl. Mech.), 2013 年 6 月 4 日, The Westin Lombard Yorktown Center, Lombard, IL, US
5. Satoshi Yamada, Sakurako Fukuda, Shigeru Tadano: Orientation and Deformation of HAp Crystals and Elastic Modulus of Single Trabecula in Bovine Femur, ICBME2013 (15th Int. Conf. on Biomed. Engineering), 2013 年 12 月 6 日, National University of Singapore, Singapore

〔図書〕(計 3 件)

1. Naoki Sasaki: InTec, Viscoelastic Properties of biological materials in Viscoelasticity, 2012, pp.99-122
2. 佐々木直樹: 金芳堂, 力学刺激に対する細胞応答 In「生体電気・物理刺激による骨・軟部組織修復法」, 2013, pp.104-111
3. 但野 茂: エヌティーエス, 骨研究最前線—アンチエイジングシリーズ 3—第 5 章第 2 節「非侵襲骨応力計測の測定原理」, 2013, 430, pp.257-262

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

但野 茂 (TADANO, Shigeru)
北海道大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 5 0 1 7 5 4 4 4

(2)研究分担者

佐々木 直樹 (SASAKI, Naoki)
北海道大学・大学院先端生命科学研
究院・教授
研究者番号: 4 0 1 4 2 2 0 2
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: 9 0 4 3 5 6 7 8
横田 秀夫 (YOKOTA, Hideo)
理化学研究所・その他・研究員
研究者番号: 0 0 2 6 1 2 0 6
伊東 学 (ITO, Manabu)
北海道大学・大学院医学研究科・特任教
授
研究者番号: 0 0 2 7 1 6 7 7