

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17929

研究課題名(和文) 海綿骨骨梁の力学的特性とマイクロ・ナノ構造特性計測

研究課題名(英文) Elastic modulus and micro- and nano-structure of a single trabecula

研究代表者

山田 悟史 (Yamada, Satoshi)

北海道大学・工学研究院・助教

研究者番号：90730169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、海綿骨を構成する骨梁の力学的特性とマイクロ・ナノ構造特性を明らかにするため、骨梁単体の力学的特性計測法として片持梁曲げによるMicro-cantilever Bendingを提案した。本手法によりウシ大腿骨骨梁の弾性率を計測し、皮質骨の骨軸方向弾性率に比べて低いことを示した。また、骨梁断面の光学顕微鏡観察の結果、弾性率とマイクロ構造の明確な対応は得られなかった。X線回折法を用いて骨梁内のハイドロキシアパタイト結晶の配向性を計測した結果、結晶c軸が骨梁長軸方向に配向する傾向を示した。骨梁と皮質骨を含めた骨組織全体では、弾性率と結晶配向性に有意な相関関係が認められた。

研究成果の概要(英文)：The study aims to propose a novel experimental method for the mechanical properties of a single trabecula by micro-cantilever bending and to investigate the elastic modulus and the micro- and nano-structure of a single trabecula in the bovine cancellous bone. As a result, elastic modulus of the single trabeculae was significantly smaller than that of the cortical bone specimens. The c-axis of the hydroxyapatite crystals in a single trabecula aligned along the longitudinal direction of the trabecula, not the bone axis. The elastic modulus did not correlate with the degree of crystal orientation, although there was a statistically significant correlation in the bone tissue including the single trabeculae and the cortical bone specimens.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス 骨組織 強度 海綿骨 骨梁 ハイドロキシアパタイト

1. 研究開始当初の背景

(1) 今日の超高齢社会において、骨粗鬆症の予防、診断、治療は、社会的に重要な課題である。骨粗鬆症は骨強度が低下し骨折リスクが増大する疾患であり、大腿骨近位部や椎体の骨折が特に多い。これらの部位は主に海綿骨で構成されるため海綿骨強度を正確に評価することが重要となる。現在、骨強度は、骨密度(骨量、骨塩量)を用いて評価されているが[1]、骨密度だけでは骨強度を予測できない例が多く報告されている。そのため、骨密度の他に、海綿骨の強度を決定する因子として骨梁単体の力学的特性や骨代謝と関わる構造特性を明らかにすることが重要となる。

(2) 海綿骨は、骨梁が3次元網目状に配列した構造を有する(図1)。これまでに、立方体や円柱状の海綿骨試験片の力学試験が行われ、骨量や骨梁配向と概ね相関することが報告されてきた。しかし、直径100-200 $\mu\text{m}$ 、長さ1mm程度と骨梁は非常に小さいため、力学試験の例は非常に少なく[2,3]、骨梁単体の力学的特性やその影響は未だ明らかでない。また、骨梁のマイクロ・ナノ構造は、骨芽細胞・破骨細胞による骨代謝によって形成され力学的特性に対しても重要な役割を担うと予想されるが、その特性や機序は全く明らかでない。

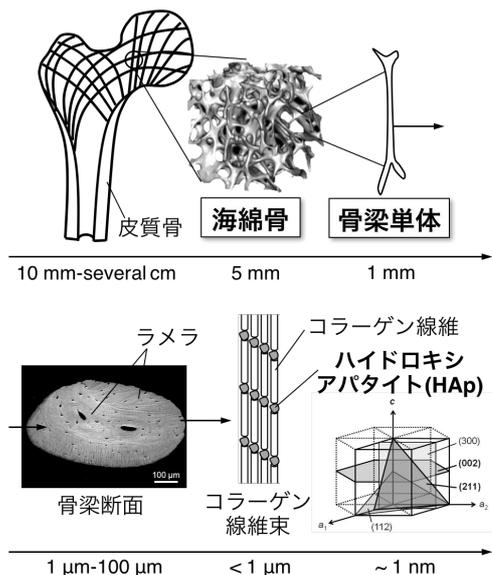


図1 海綿骨構造

(3) これまでに、皮質骨においては、マイクロメートルレベルで観察されるオステオン構造と組織弾性率や強度に相関関係が認められた[4]。また、骨組織内ハイドロキシアパタイト(HAp)結晶の配向性はX線回折法により計測可能であり、HAp結晶配向度と皮質骨の組織弾性率や強度に相関関係が認められた[4]。また、骨梁について、長さ3mm以上の比較的大きい骨梁を対象とし、小型引

張試験機を作製して弾性率を計測した。また、X線回折法により骨梁内のHAp結晶配向性が計測可能であることを確認した[5]。

2. 研究の目的

そこで本研究では、標準的な大きさである直径100-200 $\mu\text{m}$ 、長さ1mm程度の骨梁を対象に、骨梁単体の力学的特性を計測する手法を開発し、骨梁の弾性率を明らかにすることを目的とした。また、断面観察およびX線回折法により、骨梁のマイクロ・ナノ構造特性を計測し、弾性率に及ぼすこれらの影響を調査することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 引張試験では、微小な骨梁の採取および試験機治具への固定が難しく、長さ3mm以上の比較的大きい骨梁の試験に限られた。また、3点曲げ試験では、試験片の採取及び負荷中の固定や変位の計測が難しいという問題点があった。そこで、試験片の採取、負荷中の固定や変位計測を容易にするため、片持梁曲げに基づく骨梁のMicro-cantilever Bendingを提案した。片持梁曲げのため、骨梁を海綿骨から完全に切り離す必要がなく、これにより試験片の固定が容易となる。試験機は、1軸自動ステージにより負荷治具を介して骨梁試験片先端に負荷し、微小荷重ロードセルにより荷重を計測する機構とした(図2)。光学顕微鏡観察により作用点の確認およびたわみ量を計測した。

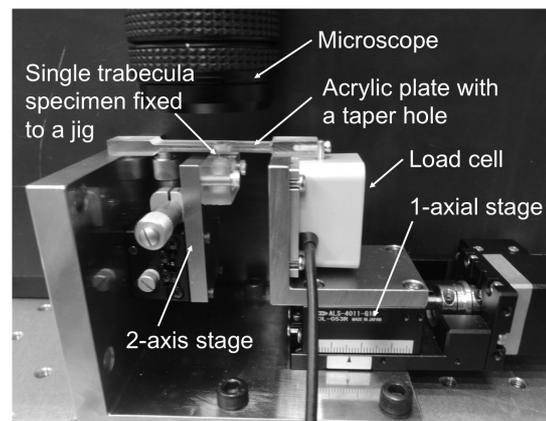


図2 Micro-cantilever Bending 試験機

(2) 実験には、2歳齢ウシの大腿骨近位部海綿骨より採取した骨梁試験片10本を用いた。大腿骨近位部骨端を大腿骨骨幹長軸(骨軸)に対して垂直に切り出し、内部の骨髄を水流により除去した。ダイヤモンド・ソーを用いて海綿骨を板状に切り出し、面内に配向した長さ1mmの棒状の骨梁を任意に選択した。対象とした骨梁周囲の海綿骨を切除し、骨梁下部の海綿骨を整形してアクリル製治具にエポキシ樹脂により固定した。光学顕微鏡を用いて骨梁試験片を観察し、骨梁試験片の長さを計測した。試験片は自然乾燥させた。骨梁長軸と骨軸とのなす角及び骨梁形状を測

定するため、マイクロフォーカス X 線 CT を用いて CT 撮影を行った。骨梁先端に曲げ負荷をステップ状に与え、光学顕微鏡観察により各負荷におけるたわみを計測した。試験は室温・自然乾燥状態で行い、各試験片 3 回ずつ行った。骨梁を垂直な円柱に近似し、荷重-たわみ線図より骨梁長軸の弾性率を計算した。

(3) 弾性率計測後、X 線回折装置を用いて、コリメータにより絞った特性 X 線 Mo-K ( $\lambda = 0.071 \text{ nm}$ ) を骨梁試験片に照射し、回折 X 線像を X 線 2 次元検出器イメージングプレートにより検出した (図 3)。このとき、骨梁試験片を固定したアクリル製治具の一部が回折 X 線の検出に影響を及ぼすため、治具の一部を切除した。得られた回折 X 線像から HAp 結晶 (002) 面の回折パターンを抽出し、HAp 結晶 c 軸の配向性を観察した。

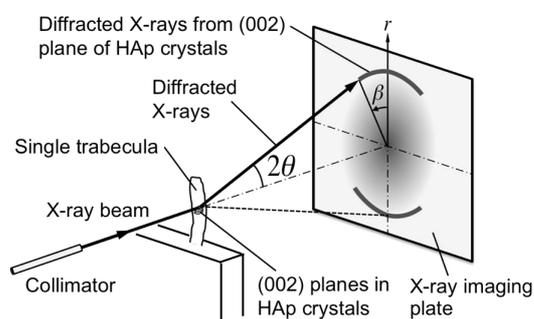


図 3 骨梁内 HAp 結晶配向性計測

(4) X 線回折測定後、骨梁試験片をアクリル製治具ごとエポキシ樹脂に包埋し、ダイヤモンド・ソーを用いて試験片を切断した。骨梁断面をエメリー紙及びバフ研磨機により鏡面仕上げし、レーザ共焦点顕微鏡によりマイクロ構造を観察した。

#### 4. 研究成果

(1) 骨梁の力学的特性の計測方法として、Micro-cantilever Bending を提案した (雑誌論文)。長さ 3 mm の骨梁の引張試験により得られた知見をもとに、標準的な大きさである直径 100-200  $\mu\text{m}$ 、長さ 1 mm 程度の骨梁が計測可能である試験機を作製した。

(2) ウシ大腿骨海綿骨から採取した骨梁試験片を対象に、骨梁単体の弾性率を計測した。測定の分解能や再現性を検証し、CT 撮影により得られる骨梁形状を用いた有限要素解析と比較し、弾性率計算の精度を検証した。

(3) 実験に用いた骨梁試験片の平均長さは  $1.12 \pm 0.17 \text{ mm}$  であった。CT 撮影の結果、骨梁長軸と骨軸とのなす角は最小  $14^\circ$ 、最大  $87^\circ$  であり、骨梁試験片は海綿骨内部で様々な方向に配向していたことを確認した。また、どの試験片も棒状であった。

(4) 骨梁の弾性率は、 $9.1 \pm 5.4 \text{ GPa}$  であった。ウシ大腿骨海綿骨から採取した骨梁の弾性率は皮質骨骨軸方向弾性率 [4] に比べて有意に低く、皮質骨の 36% であった。海綿骨と皮質骨の弾性率の差は、骨密度 (BV/TV) や骨梁配向だけでなく、骨梁の弾性率の低さも要因となることがわかった。また、骨梁の弾性率は、海綿骨内部での骨梁の配向方向とは相関が認められなかった。

(5) また、Micro-cantilever Bending を用いることで、直径 100-200  $\mu\text{m}$ 、長さ 0.5 mm 程度の骨梁まで計測可能であることを確認した。

(6) 骨梁断面の光学顕微鏡観察の結果、断面内にラメラ構造が認められたが、弾性率との明確な対応は得られなかった。

(7) X 線回折測定の結果、骨梁内の HAp 結晶は、骨軸方向とは関係なく骨梁長軸に結晶 c 軸が配向する傾向を示した。これは、長さ 3 mm の骨梁の結果 [5] と一致した。骨梁における HAp 結晶配向は、骨軸方向に c 軸が配向している皮質骨 [4] とは異なることがわかった。

(8) 骨梁長軸方向に対する HAp 結晶 c 軸の  $\langle \cos^2 \rangle$  [4] は、 $0.343 \pm 0.002$  であった (ただし、X 線回折測定中に試験片 1 本が破断したため 9 本の平均値)。  $\langle \cos^2 \rangle$  は皮質骨に比べて有意に低いことがわかった。骨梁の弾性率と  $\langle \cos^2 \rangle$  には有意な相関は認められなかった。

(9) 一方、骨梁 [5] や皮質骨 [4] を含む骨組織全体では、弾性率と  $\langle \cos^2 \rangle$  に有意な正の相関が認められた ( $r=0.75$ ,  $p<0.01$ )。骨組織全体では、弾性率が HAp 結晶配向度に依存することが考えられる。これまでに、長さ 3 mm の骨梁と皮質骨のミネラル含有率を比較した結果、骨梁は皮質骨に比べてやや低かったがその差が小さいことを示した [5]。これより、骨梁組織と皮質骨組織の弾性率の違いは、ミネラル含有率の他に HAp 結晶の配向性にも起因すると考えられる。

(10) 以上より、骨梁の弾性率は皮質骨組織より低く、ミネラル含有率の他に HAp 結晶の配向性に起因することが示唆された。

#### < 引用文献 >

- [1] 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会, 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015 年版, 2015
- [2] R. Carretta, S. Lorenzetti, R. Müller, Towards patient-specific material modeling of trabecular bone post-yield behavior, International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering, 29, 2013,

250-272

- [3] E. Lucchinetti, D. Thomann, G. Danuser, Review micromechanical testing of bone trabeculae - potentials and limitations, Journal of Materials Science, 35, 2000, 6057-6064
- [4] S. Yamada, S. Tadano, K. Fujisaki, Y. Kodaki, Influence of osteon area fraction and degree of orientation of HAp crystals on mechanical properties in bovine femur, Journal of Biomechanics, 46, 2013, 31-35
- [5] S. Yamada, S. Tadano, S. Fukuda, Nanostructure and elastic modulus of single trabecula in bovine cancellous bone, Journal of Biomechanics, 47, 2014, 3482-3487

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Satoshi Yamada, Shigeru Tadano, Koichi Fukasawa, Micro-cantilever bending for elastic modulus measurements of a single trabecula in cancellous bone, Journal of Biomechanics 49(16), 4124-4127, 2016年12月. (査読有り)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2016.10.016>

### 〔学会発表〕(計4件)

山田悟史, 深沢光一, 東藤正浩, 但野茂, ウシ大腿骨単一骨梁における弾性率とHAp結晶配向性の関係と皮質骨との比較, 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会, 2017年1月19日, ウィンクあいち(愛知県名古屋市)

Satoshi Yamada, Koichi Fukasawa, Shigeru Tadano, Elastic modulus of single trabecula in bovine cancellous bone by micro cantilever bending, 22nd Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2016), 2016年7月11日, リヨン(フランス)

Satoshi Yamada, Koichi Fukasawa, Masahiro Todoh, Shigeru Tadano, Micro cantilever bending for elastic modulus of single trabecula, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (AP Biomech 2015), 2015年9月18日, 北海道大学(北海道札幌市)

深沢光一, 山田悟史, 東藤正浩, 但野茂, Micro Cantilever Bendingによる海綿骨骨梁単体の弾性率計測, 日本機械学会2015年度年次大会, 2015年9月15日, 北海道大学(北海道札幌市)

### 〔その他〕

ホームページ等

北海道大学工学系連携推進部研究者紹介  
<http://labs.eng.hokudai.ac.jp/office/el>  
[o/jp/archives/lab/4916/](http://jp/archives/lab/4916/)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

山田 悟史 (YAMADA, Satoshi)

北海道大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：90730169