

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04083

研究課題名(和文) 骨梁剛性・異方性マルチスケール構造特性に基づく海綿骨骨折リスク

研究課題名(英文) The role of the microarchitecture and single trabecular tissue in the mechanical function of cancellous bone

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症の予防・診断・治療には、海綿骨の骨折リスクの正確な予測や制御が重要であり、骨密度を含む構造的・力学的因子を明らかにすることが重要となる。そのため、本研究では、海綿骨構造の形態及び幾何学的特性の解析手法を開発し、海綿骨の力学特性に対するこれらの特性の寄与を明らかにした。また、海綿骨を構成する骨梁の弾性率計測システムを開発し、骨梁の力学特性を調査した。X線回折により骨組織を構成する分子・結晶構造特性を調査し、骨梁力学特性との対応を調査した。以上により、海綿骨の力学特性に対して重要な構造的・力学的特性を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、主に海綿骨で構成される部位での骨折が多い。そのため、骨粗鬆症の予防・診断・治療には、海綿骨の骨折リスクの正確な予測や制御が重要であり、骨密度を含む海綿骨の構造的・力学的因子を明らかにすることが重要となる。そこで本研究では、海綿骨の有するネットワーク構造とこれを構成する骨梁及びその組織に着目し、これらの力学的相互作用を明らかにするために必要な技術開発を通して、海綿骨の力学特性を決定する重要な構造的・力学的特性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the role of the microarchitecture and single trabecular tissue in the mechanical function of cancellous bone for further understanding of the decline in the function, which may underlie osteoporotic fractures. An integrated method of morphological and geometrical analyses for the single trabecular network in cancellous bone and a customized testing system for measuring the mechanical properties of single trabeculae were developed to clarify the contribution of the microarchitecture and single trabecular tissue to the mechanical properties of cancellous bone. Furthermore, the nanostructure of the tissue was observed by using X-ray diffraction techniques. This study clarified a part of the structural and mechanical features that are important for the mechanical function of cancellous bone.

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 海綿骨 骨梁 マイクロアーキテクチャ 力学特性 剛性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 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、主に海綿骨で構成される部位での骨折が多い。そのため、骨粗鬆症の予防・診断・治療には、海綿骨の骨折リスクの正確な予測や骨強度の制御が重要であり、骨密度を含む構造的・力学的因子を明らかにすることが重要となる。海綿骨は、骨梁が網目状に配列した構造を有し、骨梁はコラーゲンとヒドロキシアパタイトで構成され、骨梁と分子・結晶構造の配向性によりマルチスケールの構造異方性を有する。臨床では主に骨密度により評価されるが(引用文献①)、骨折リスクの正確な予測と海綿骨強度の制御には、骨密度以外の構造的・力学的因子を明らかにすることが重要である。

(2) 海綿骨力学特性は、骨密度、骨梁ネットワーク構造特性、骨梁力学特性に依存し、骨梁力学特性は分子・結晶構造に依存すると考えられるが、その機序は明らかでない。X線 CT 撮影により得られる海綿骨の形態学的特徴と海綿骨力学特性との比較について多くの報告例があるが、骨梁の圧縮・曲げ剛性とラーメン構造に関わる海綿骨骨梁ネットワーク構造特性の寄与は未だ明らかでない。また、骨梁力学特性は計測の難しさから報告例が少なくばらつきも大きく(引用文献②)、海綿骨力学特性への寄与も明らかでない。骨梁の分子・結晶構造の計測例は、研究代表者ら(引用文献③)を含めて報告例が少なく、骨梁力学特性との関係も未だ明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、海綿骨力学特性が骨梁力学特性と異方性マルチスケール構造に依存すると仮定し、これらの特性とその相互関係を解明することで、海綿骨力学特性に対して重要な構造的・力学的特性を明らかにすることを目的とした。そのため、補助事業期間を通して、以下を実施した。①海綿骨骨梁ネットワーク構造の形態及び幾何学的特性の解析手法を開発し、これらの特性の海綿骨力学特性への寄与を調査した。②骨梁弾性率計測システムを開発し、計測条件の影響を整理し、骨梁力学特性を調査した。③X線回折により骨組織を構成する分子・結晶構造特性を調査し、骨梁力学特性との対応を調査した。

3. 研究の方法

(1) 海綿骨の力学特性に対するネットワーク構造とこれを構成する骨梁の幾何学的特徴の寄与を明らかにするため、骨梁の圧縮・曲げ剛性とラーメン構造に関わる海綿骨骨梁ネットワーク構造特性を解析する手法を開発した。マイクロ X 線 CT 撮影により取得した海綿骨構造を骨格化し、骨格構造に含まれるアーチファクトを除去することで、海綿骨試料に含まれる骨梁数、骨梁分岐部数、平均骨梁長さ、平均骨梁配向角、平均骨梁分岐数、各分岐数における平均骨梁分岐角度を評価した。また、平均骨梁長さとして既存の形態学的指標である骨梁幅を用いて、骨梁剛性に関わる形状係数を指標化した。2歳齢ウシ大腿骨の近位骨幹端部および骨頸部の海綿骨より採取した 5×5×5mm の立方体試験片 23 個について、骨梁ネットワーク構造特性を解析し、圧縮試験により得られた海綿骨剛性との対応を調査した。

(2) 骨梁ネットワーク構造特性に加えて、各骨梁の形態・形状の影響を明らかにするため、骨梁ネットワーク構造の形態及び幾何学的特徴を統合的に解析する手法を開発した。前記手法では、骨格化のため各骨梁の形態や厚さを評価できない。そこで、骨格構造における各骨梁とマイクロ X 線 CT 撮影により得られる海綿骨構造とを対応させることで各骨梁の横断面を決定し、骨梁形態及び骨梁厚さを計測した。また、各骨梁の長さとして既存の形態学的指標である骨梁幅を用いて、骨梁剛性に関わる形状係数を指標化した。前述の試験片について、形態及び幾何学的特性を解析し、平均骨梁形態値、平均骨梁長さ、平均形状係数をそれぞれ算出した。既存の形態学的指標及び海綿骨剛性との対応より、本指標の有効性及び骨梁ネットワーク構造の力学的寄与を調査した。

(3) 次に、骨梁の力学特性を明らかにするため、単一骨梁の片持梁曲げ負荷(引用文献④)による乾湿両環境での計測が可能な骨梁弾性率計測システムを開発した(図1)。生理食塩水で満たした水槽内に単一骨梁試験片を鉛直に固定し、円錐台の穴が加工されたアクリル製負荷治具を用いて水槽内で骨梁先端にたわみを付与できる機構とした。円錐台の穴の先端を骨梁に接触させ、1軸自動ステージによりステップ状に変位を与えた。このとき、負荷治具に接続した微小荷重用ロードセルを用いて、各変位における荷重を計測した。また、実体顕微鏡と LED 光源を用いて、骨梁先端を試験機上部より観察し、各変位における骨梁のたわみを計測した。このとき、生理食塩水中の骨梁先端を明瞭に観察するため、予め先端部に油性インクを少量塗布した。試験後、水性インクを負荷治具の穴の先端に塗布して試験片と再度接触させ、試験片の負荷位置を顕微鏡

により観察した。これにより、単一骨梁試験片の荷重—たわみ関係を得た。

(4) 湿潤状態が骨梁弾性率に及ぼす影響を明らかにするため、2歳齢ウシ2個体の大腿骨近位海綿骨より6本の棒状骨梁の単一骨梁試験片を採取し、自然乾燥状態と再水和による湿潤状態の骨梁弾性率を計測した。ダイヤモンド・ソーを用いて、大腿骨近位より海綿骨をスライス状に切り出した。採取しやすい骨梁を選択し、片端に接続する周囲の海綿骨を切除し、もう一方の端に接続する海綿骨を直方体に成形した。空気中で自然乾燥させた後、エポキシ樹脂を用いて直方体状の海綿骨部分をアクリル製治具に包埋し、骨梁試験片を作製した。試験片は、試験直前まで常温で密閉容器内に保存した。はじめに、常温・空気中で自然乾燥状態の試験片の骨梁弾性率を計測した。その後、密閉容器内で常温の生理食塩水に24時間以上浸漬させ、試験片を再水和させた。力学試験機の水槽を常温の生理食塩水で満たし、水槽内で再度計測した。マイクロフォーカスX線CT装置を用いて試験片形状を取得し円柱に近似することで、荷重—たわみ関係より骨梁長軸方向の弾性率を算出した。

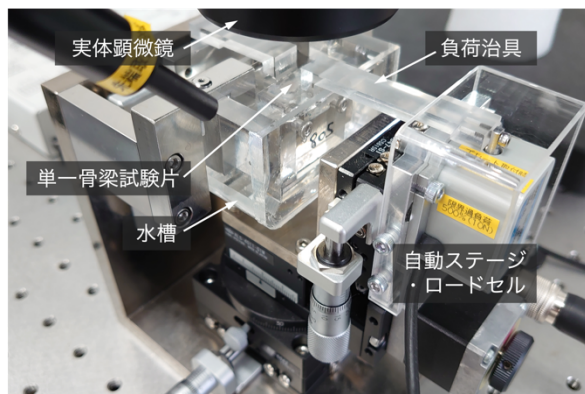


図1 骨梁弾性率計測システム

(5) 加齢による骨梁弾性率の変化を明らかにするため、16歳齢と18歳齢の高齢ウシの大腿骨近位海綿骨よりそれぞれ11本と10本の棒状骨梁の単一骨梁試験片を採取し、湿潤環境にて骨梁弾性率を計測した。

(6) これまでの計測では、骨梁試験片の先端にステップ状の変位を与え、各変位における荷重とたわみを計測することで弾性率を算出した。負荷条件の影響を検証するため、連続的に変位を与え連続的な荷重—たわみ関係より骨梁弾性率が計測可能な計測システムを再構築した。ステージの移動は、RS-232Cを介してコントローラドライバをPCに接続し制御した。実体顕微鏡の映像信号は、USBビデオキャプチャによりPCに入力しステージ制御と同期させて記録した。荷重は、データロガーを介してPCにより記録した。2歳齢ウシ1個体の大腿骨近位海綿骨より9本の棒状骨梁の単一骨梁試験片を採取し、骨梁弾性率に及ぼす負荷方法及び変位速度の影響を検証した。

(7) 次に、骨組織を構成する分子・結晶構造特性と骨梁弾性率への寄与を明らかにするため、2歳齢ウシ3個体の大腿骨近位海綿骨より採取した10本の板状骨梁の単一骨梁試験片を用いて、広角X線回折および小角X線散乱計測により、試験片中央近傍のハイドロキシアパタイト結晶とコラーゲン線維の配向性を観察した。それぞれ、配向方向と配向度(引用文献③)を計測した。また、片持梁曲げ試験により試験片長軸の骨梁弾性率を測定した。

4. 研究成果

(1) 海綿骨を骨格化することで骨梁の長さや配向、骨梁分岐部における分岐数や分岐角度を計測する手法を開発した。2歳齢ウシ大腿骨近位海綿骨における骨梁ネットワーク構造特性と海綿骨剛性の重回帰分析の結果、骨梁剛性に関わる形状係数、骨梁配向、分岐特性の組み合わせにより、骨体積密度と同程度に高い精度で海綿骨剛性が評価できることを示した ($R^2=0.85$)。これより、海綿骨の力学特性に及ぼす骨梁ネットワーク構造特性の寄与を明らかにすることができた。

(2) 各骨梁の形態および形状の解析手法を考案し、これを統合した海綿骨骨梁ネットワーク構造の形態・幾何学的解析手法を開発した。既存の形態学的指標と比較した結果、平均骨梁形態値は、structure model indexと高い正の相関が確認され ($r=0.94$, $P<0.01$)、海綿骨剛性との相関係数も同程度であった。また、平均骨梁厚さは骨梁幅と同程度の値を示し、両者に高い正の相関が確認され ($r=0.92$, $P<0.01$)、海綿骨剛性との相関係数は骨梁幅よりも向上した。海綿骨剛性に対して、平均形状係数、骨梁配向、分岐特性の組み合わせは、骨体積密度及び前述の組み合わせよりも高い決定係数を示した ($R^2=0.88$)。これより、本指標が既存の形態学的指標を一部代替し得ることが確認され、本手法により海綿骨剛性の予測精度が向上することが示唆された。

(3) 生理食塩水中で単一骨梁の片持梁曲げ負荷が可能な骨梁弾性率計測システムを開発し、自然乾燥状態と再水和による湿潤状態の違いによる骨梁の力学特性の変化を検証した。その結果、

自然乾燥状態における骨梁弾性率は 8.7 ± 2.2 GPa, 再水和させた湿潤状態における骨梁弾性率は 5.2 ± 2.2 GPa であり, 再水和によって有意に減少した ($P < 0.05$)。この傾向は, Frank らの報告と一致した (引用文献⑤)。このとき, 荷重-たわみ関係にはどちらの状態においても高い線形性が確認され, 弾性域での線形性には明らかな差は認められなかった。また, 自然乾燥状態と湿潤状態の弾性率には, 有意な正の相関が認められた ($r=0.84$, $P < 0.05$)。これより, 湿潤状態が骨梁弾性率に及ぼす影響を明らかにすることができた。

(4) 湿潤状態における高齢ウシの骨梁弾性率を調査し, 若齢ウシにおける骨梁弾性率と比較した。その結果, 高齢ウシの骨梁弾性率は 4.1 ± 1.9 GPa であり, 2 個体間の有意差は認められなかった。2 歳齢の若齢ウシに比べて有意に低い傾向が確認され ($P < 0.05$), 加齢による骨梁弾性率の変化とそれに伴う海綿骨剛性への影響が示唆された。

(5) 骨梁弾性率に対する負荷方法及び変位速度の影響を検証した。その結果, 変位速度の違いによる弾性率の差は小さく, 各速度間における 1 標本 t 検定の結果, 有意差は認められなかった。本システムで計測可能なひずみ速度範囲では, 速度効果はないと考えられる。これは, Szabò らの指摘とも一致した (引用文献⑥)。また, 各試験片における全変位速度の骨梁弾性率の平均値は, ステップ状の負荷における骨梁弾性率と有意な差を示さなかった。これまでのステップ状負荷による計測値は, 連続的負荷による計測値と明らかな差がないことが確認された。

(6) 広角 X 線回折および小角 X 線散乱計測により, 骨組織を構成するハイドロキシアパタイト結晶とコラーゲン線維の配向性を明らかにした。その結果, 試験片長軸に対するハイドロキシアパタイト結晶 c 軸の配向角は $6.1 \pm 4.8^\circ$ であった。コラーゲン線維は, 散乱 X 線が観察されなかった試験片を除いて, 配向角は $28.4 \pm 31.7^\circ$ であった。ハイドロキシアパタイト結晶とコラーゲン線維の配向軸に相関はなく, コラーゲン線維の配向が一様でないことが確認された。また, 骨梁弾性率と分子・結晶配向性に有意な相関は認められなかった。これより, 若年ウシでは, 海綿骨内の骨梁弾性率はばらつきを有するもののある範囲では一様と考えることができ, 海綿骨剛性の分布に対する影響は小さい可能性が示唆された。骨組織内の分子・結晶構造特性の変性とその影響について, 今後検証する必要がある。

(7) 以上より, 補助事業期間を通して, 海綿骨強度特性に対して重要な構造的・力学的特性を明らかにすることができた。今後, 本研究で開発した手法を応用し, 海綿骨の圧縮破壊特性とこれに及ぼす構造的・力学的因子の解明, 及び加齢・疾患による変性様態とその力学的影響の解明が課題となる。

<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 Wu D, Isaksson P, Ferguson SJ, Persson C. Young's modulus of trabecular bone at the tissue level: A review. *Acta Biomater* 2018;78:1-12.
- ③ Yamada S, Tadano S, Fukuda S. Nanostructure and elastic modulus of single trabecula in bovine cancellous bone. *J Biomech* 2014;47:3482-7.
- ④ Yamada S, Tadano S, Fukasawa K. Micro-cantilever bending for elastic modulus measurements of a single trabecula in cancellous bone. *J Biomech* 2016;49:4124-4127.
- ⑤ Frank M, Marx D, Nedelkovski V, Fischer JT, Pahr DH, Thurner PJ. Dehydration of individual bovine trabeculae causes transition from ductile to quasi-brittle failure mode. *J Mech Behav Biomed Mater* 2018;87:296-305.
- ⑥ Szabò ME, Taylor M, Thurner PJ. Mechanical properties of single bovine trabeculae are unaffected by strain rate. *J Biomech* 2011;44:962-967.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 山田悟史, 東藤正浩, 高橋祐太
2. 発表標題 海綿骨骨梁の弾性率とミネラル結晶・コラーゲン線維配向性
3. 学会等名 日本機械学会第33回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Yamada, Yuki Suzuki, Masahiro Todoh
2. 発表標題 Geometrical features of the microarchitecture for cancellous stiffness in bovine proximal femur
3. 学会等名 The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyu Kobayashi, Satoshi Yamada, Yuta Kawasaki, Masahiro Todoh
2. 発表標題 Elastic moduli of single trabeculae in proximal femurs of aged bovines measured by micro-cantilever bending
3. 学会等名 The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田悟史, 鈴木雄貴, 東藤正浩
2. 発表標題 海綿骨骨梁ネットワーク構造の形態・幾何学的解析法
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田悟史, 高橋祐太, 川崎佑太, 小林実柚, 東藤正浩
2. 発表標題 湿潤環境における海綿骨単一骨梁の力学的特性
3. 学会等名 第33回北海道骨粗鬆症研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川崎佑太, 山田悟史, 高橋祐太, 小林実柚, 東藤正浩
2. 発表標題 乾燥・湿潤状態の海綿骨骨梁の力学的特性計測
3. 学会等名 日本機械学会第31回バイオフィロントニア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田悟史, 鈴木雄貴, 東藤正浩, 但野茂
2. 発表標題 海綿骨骨梁ネットワーク構造特性解析と力学的特性との対応
3. 学会等名 日本機械学会第30回バイオフィロントニア講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋祐太, 山田悟史, 東藤正浩, 但野茂
2. 発表標題 ウシ大腿骨海綿骨の棒状・板状骨梁の弾性率とHAp結晶配向性
3. 学会等名 日本機械学会第30回バイオフィロントニア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Yamada, Yuta Takahashi, Koichi Fukasawa, Masahiro Todoh, Shigeru Tadano
2. 発表標題 Elastic modulus and nanostructure of the plate- and rod-like trabeculae in bovine proximal femurs
3. 学会等名 The XXVII Congress of the International Society of Biomechanics (ISB2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中亜実, 山田悟史, 東藤正浩, 但野茂
2. 発表標題 ウシ大腿骨頸部及び骨幹端部における海綿骨圧縮破壊特性
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木雄貴, 山田悟史, 東藤正浩, 但野茂
2. 発表標題 海綿骨における骨梁形状・配向・分岐特性解析
3. 学会等名 第32回北海道骨粗鬆症研究会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------