

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20691

研究課題名(和文)放射光X線回折・散乱を用いた2型糖尿病皮質骨の微細力学解析

研究課題名(英文) Micromechanical analysis of cortical bone in type 2 diabetes by using synchrotron radiation X-ray diffraction and scattering

研究代表者

長谷 栄治 (HASE, Eiji)

徳島大学・ポストLEDフォトンクス研究所・特任助教

研究者番号：50805512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射光小角散乱・広角回折同時計測装置を力学試験と組み合わせ、2型糖尿病皮質骨の微細力学解析に応用した。放射光実験等のデータ解析から、糖尿病モデルの大腿骨では、マクロな力学特性の劣化の傾向を確認した。ミクロな変化としては、骨中ハイドロキシアパタイトが変形しやすくなっている一方で、コラーゲンは変形しにくくなる傾向があることを確認した。また、近赤外光によるコラーゲン・イメージングの結果から、放射光実験で計測する局所的領域が試料中における代表的な配向となっていることを確認した。今後、実験条件を統一した上で放射光実験を実施し、糖尿病が骨の微細力学特性に及ぼす影響について確定できる知見を得る予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型、2型糖尿病は共に患者の骨折リスクの上昇につながることが調べられている。本研究では、糖尿病による骨の微細力学特性への影響の調査を目的としており、これは少子高齢化が進む我が国において生活の質を向上させ、健康寿命を延ばすことに繋がるものと考えられる。学術的意義として、当初は骨バイオメカニクス分野におけるX線CTのみにとどまらない放射光X線利用研究の開拓という位置付けであったが、本研究の今後の進捗により、糖尿病による骨の微細力学特性への影響が真に明らかとなれば骨バイオメカニクス分野自体への貢献も期待できる上、本手法を用いた他の骨疾患への応用展開も見えてくる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we combined a simultaneous synchrotron radiation wide-angle X-ray diffraction and small-angle X-ray scattering measurement with mechanical testing and applied it to the micromechanical analysis of cortical bone in type 2 diabetes. We confirmed that macromechanical properties tend to decrease in the diabetes model. As microscopic changes in the diabetes model compared with the control model, we also confirmed that hydroxyapatite in bone increases the strains, whereas collagen strains decrease. In addition, from the results of collagen imaging with near-infrared light, we confirmed that the local region measured by the synchrotron radiation experiment could be regarded as a representative region in the whole sample. In the future, we plan to carry out synchrotron radiation experiments after unifying the experimental conditions and then obtain new findings that can determine the effect of diabetes on the micromechanical properties of bone.

研究分野：生体医工学

キーワード：放射光 X線 骨 微細力学 SAXS WAXD

### 1. 研究開始当初の背景

骨の重要な役割の一つは、生体にかかる荷重の支持であり、荷重によって破壊が起こらないような力学的強度を持つ事が重要である。生体硬組織である骨は、金属材料などと同様に古くから材料力学的手法を用いてその力学特性が調べられている[1]。一方、放射光を用いての骨バイオメカニクス分野への応用研究という観点からは、骨中のハイドロキシアパタイト (HAp: Hydroxyapatite) 成分の高い密度に起因した高 X 線吸収特性を利用し、X 線 CT により骨の三次元構造を調査することを目的とした研究が行われてきた[2]。このような研究の背景には、骨の強度低下の主な原因は、骨粗鬆症に見られるような骨量の減少による巨視的な骨密度の低下である、という考え方があった。しかしながら、近年では骨の力学特性の決定要因として骨量の他に、骨を造る成分の特性によって決まる骨質が影響していると指摘されている[3]。骨組織は HAp からなる無機基質と、コラーゲンを主成分とする有機基質から構成される複合材料であることから、この骨質を評価するためには、骨中における HAp とコラーゲンの力学特性が重要である。特に、遺伝・生活習慣が要因となり発症すると言われる 2 型糖尿病においては、骨密度はむしろ増加するが、終末糖化産物によるコラーゲン架橋の異常により骨強度が低下すると報告されている[4]。このような先行研究は、骨質の低下により骨力学特性が劣化するというを示唆している。したがって、糖尿病による骨力学特性への影響を調査するためには、骨質を詳細に評価できる手法が求められる。

### 2. 研究の目的

生体組織における数 Å から数十 nm 程度の内部微細構造を時分割で可視化できる小角散乱 (SAXS: small-angle X-ray scattering), 広角回折 (WAXD: wide-angle X-ray diffraction) 同時計測装置を力学試験と組み合わせ、2 型糖尿病皮質骨の微細力学解析に応用する。本手法で可視化する骨中 HAp とコラーゲンの変形の振る舞いが糖尿病によってどのように、どの程度変化するかを糖尿病の重篤度・進行度の違いとともに調査することを本研究の最終的なゴールとする。

### 3. 研究の方法

本研究では、主に以下の 3 点について実施した。

- (1) 放射光実験のデータ解析
- (2) 高速引張試験機の設計・製作、および標準試料の力学試験
- (3) 放射光実験の代替としての近赤外光を用いた骨中コラーゲン・イメージング

### 4. 研究成果

#### (1) 放射光実験のデータ解析

まず、これまでの放射光実験のデータ解析を行い、各試料群について取りまとめた。図 1 に真上からみた場合の放射光実験レイアウトを示す。検出器は SAXS 用、WAXD 用それぞれ 1 台ずつ用いた。1 台は SAXS 用として X 線イメージンシファイア、もう一台は WAXD 用として X 線半導体二次元検出器を用いる。試料は横置きし、各構造からの子午線反射を横方向に出すようにした。実験は大型放射光施設 SPring-8, BL40XU で行い、X 線のエネルギーは 10.5 keV、ビーム径は 150 μm とした。カメラ長はそれぞれ、コラーゲン観察のための SAXS では 3 m、HAp 観察のための WAXD では 30 cm 程度とした。試料については、正常骨として Wistar ラットの、また糖尿病骨として GK ラットの大腿骨を用いた。また、試料は radial-longitudinal plane に沿って全長 10 mm、幅 0.6 mm、厚さ 0.15 mm 程度で切り出し、研磨・洗浄して用いた。このような薄い板状の試料の両端を、試料ステージ台に設置した引張試験機の両クランプに接着剤で接着した上、治具で挟み、試料をステップ状に高速延伸 (引張) した後、ひずみを一定にした際に掛

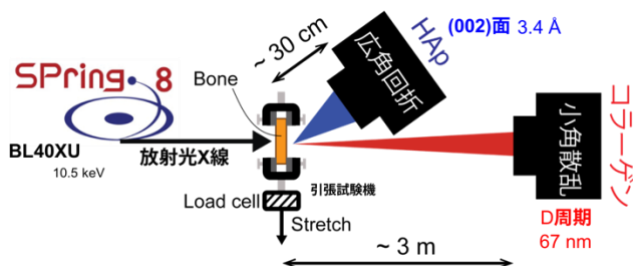


図 1 放射光実験のセットアップ。

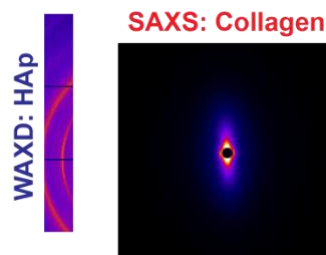


図 2 骨の SAXS/WAXD 像の一例。

かっている荷重を記録していく（応力緩和試験）。この時、延伸は 100 ms 程度の速さで行い、SAXS/WAXD 撮影のフレーム間隔は 10 ms で高速測定する。また、上記の引張試験機と 2 台のカメラおよび X 線シャッターは、同一のトリガー信号によって計測を開始できるように同期した。また、図 1 には記載していないが、SAXS/WAXD と同時に力学的負荷に伴う組織全体のひずみも同期して測定する。その際は、高速 CCD カメラで上方から撮像し、画像相関法を用いて試料自体の伸びを算出することによって、マクロな伸びをミクロな伸びと共に得る。図 1 および 2 に示すように、SAXS および WAXD では、応力緩和試験中のコラーゲンの D 周期および HAp の (002) 面の時間的変形を可視化する。解析の際には、ある時間における回折/散乱像を周方向に 10° 積分し、その積分プロファイルのカーブフィッティングから得られるピーク値を長さとして算出し、それぞれ時系列的に解析していく。図 3 に解析によって得られた HAp、コラーゲン (Col)、および組織のひずみと測定した応力の時間変動の一例を示す。各プロットのデータサンプリングは HAp ひずみ、コラーゲンひずみ、応力は 10 ms ごとであり、可視光カメラから得られた組織ひずみは 15 ms である。この図から、4 つの値がステップ状に与えた変形にตอบสนองして変化していることが確認できる。次に、図 3 において記載のように、時間変動を弾性領域と粘弾性領域に分け、解析を行った。まず、図 4 および図 5 に組織ひずみと応力の値を用いて計算したヤング率と、同様に試験中に試料が破断した場合の値を用いて得られた破断応力の比較を示す。両図ではマクロな力学特性を対象としており、図 3 における弾性領域の値を利用して計算している。図 4 と 5 から、正常骨と比較して糖尿病骨では両力学特性が低下している傾向があることを確認した（有意差なし）。次に、放射光測定から得られる HAp・コラーゲンひずみについて、同一試料の組織ひずみの値と比を取ることで規格化した上で両群を比較したものを図 6、7 に示す。両図から、正常骨と比較して糖尿病骨では HAp が伸びやすくなっている一方で、コラーゲンが伸びにくくなっていることが確認できた ( $p < 0.05$ )。糖尿病骨においては、終末糖化産物の架橋が非生理的に形成・蓄積することから、この結果は妥当であると考えられる。最後に、弾性・粘弾性領域の時間変動において、HAp とコラーゲンひずみの相関を確認した。まず、図 8 に弾性領域の結果を示す。図から、どちらの群においても両者が線形に変化していることが確認できる。また、糖尿病群における傾きは正常群と比較して 80% 程度であることがわかった。一方、図 9 の粘弾性領域の結果では、HAp とコラーゲンとの間における力学的エネルギーのやり取りが可視化されていることを期待したが、測定値のばらつきが大きく、考察することが不可能であったため、再度実験条件を検討してデータ取得する必要がある。以上のことから、糖尿病において骨の微細力学特性が変化する様子が確認できたが、今回の実験では体重・週齢が完全には揃っておらず、試料数も少ない ( $n = 6 \sim 8$ )。また、手持ちの力学試験機の性能によって、ひずみ速度が完全に一定になっていないため、現状では確定できる知見は得られていない。そこで、本研究における次のステップとして、まず引張試験機を設計・作製したので次項に示す。

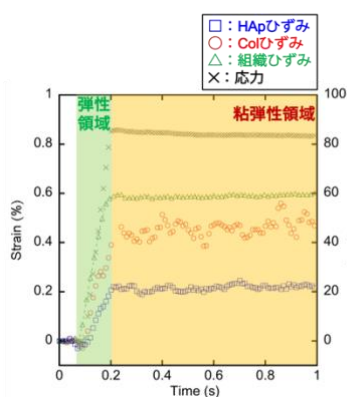


図 3 ひずみと応力の時間変動。

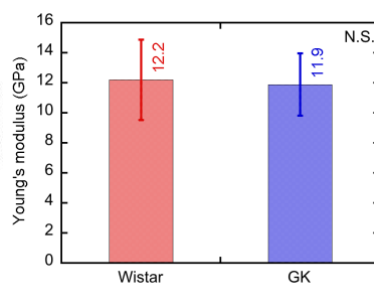


図 4 ヤング率の比較。

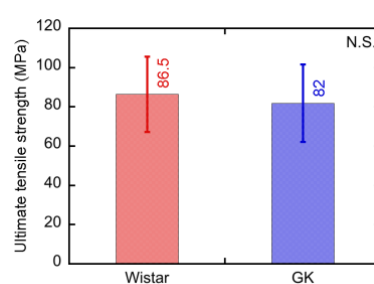


図 5 破断応力の比較。

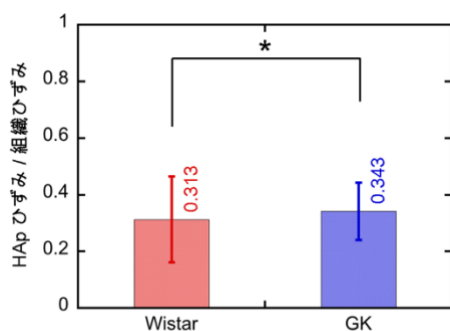


図 6 HAp と組織のひずみ比。

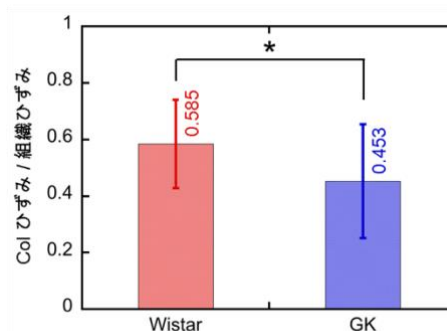


図 7 コラーゲンと組織のひずみ比。

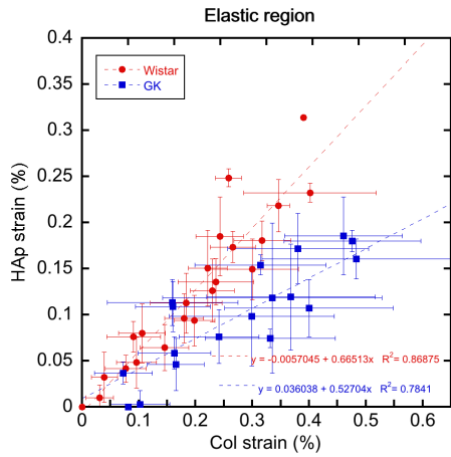


図8 弾性領域におけるHApとコラーゲンひずみの比.

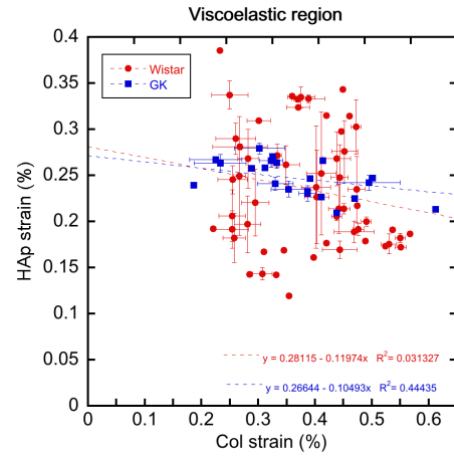


図9 粘弾性領域におけるHApとコラーゲンひずみの比.

(2) 高速引張試験機的设计・製作, および標準試料の力学試験

次に, 高速引張試験機的设计・製作を行った. 図10に製作した高速引張試験機の外観を示す. 概要として, 一軸(片軸)の高速な引張が可能であり, 自作の計測プログラムにより放射光実験時の開始トリガー受付, モーター制御や荷重計データ取得を可能なものとした. 各仕様としては, 実験で用いる骨試料のサイズを鑑みて最大荷重 200 N, 最大引張速度 100 mm/s, ストローク 35 mm などと設定した. 製作後, 標準試料としてポリプロピレン板を用いて引張試験機の動作確認



図10 高速引張試験機の外観.

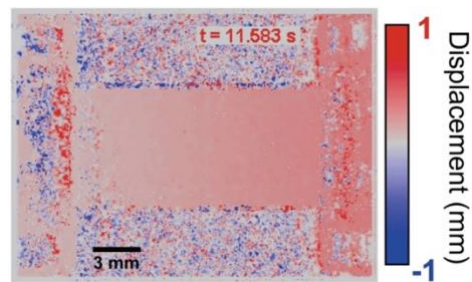


図11 標準試料のひずみ解析結果.

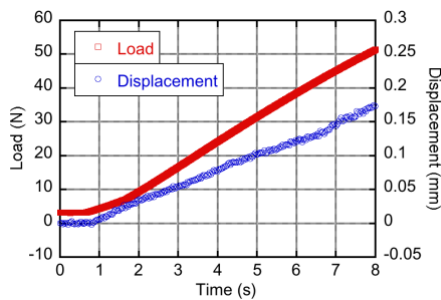


図12 標準試料の荷重と変位.

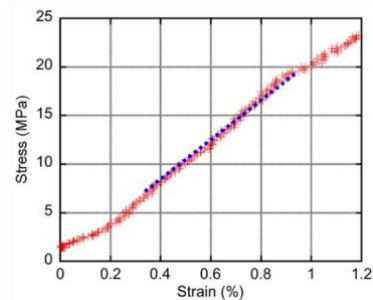


図13 標準試料の応力-ひずみ曲線.

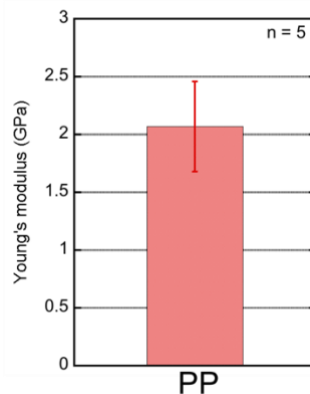


図14 ヤング率の再現性.

を行った。なお、ここでは実験値と手持ちの文献データとの整合性から妥当性を確認するため、静的な引張試験を行った。図 1 1 に可視光カメラで前方から測定した試料のひずみ解析の例を示す。図では、自作の解析ソフトウェアを用いて、ある時刻  $t$  における画像と初期状態  $t_0$  (試料の平行な把持のため数  $N$  負荷) との画像相関からひずみを算出した。両端にクランプ、画像中心付近に長方形 (直方体) 状の試料が位置しており、引張は画像右方向である。このようにして得られるひずみを時間ごとに計算し、荷重とともに示したものが図 1 2 である。また、図 1 2 から得られたデータから計算した応力ひずみ曲線が図 1 3 である。最後に、試料を同一の板から切り出し、繰り返し計測を行った際のヤング率の測定結果を図 1 4 に示す。ヤング率は図 1 3 中の青破線のように応力ひずみ曲線の線形部分の傾きから得ている。実験結果から、平均値が文献値とおおよそ一致しており、値の再現性も確認できたことから、装置動作の妥当性を確認できた。

このようにして製作した引張試験機と、週齢・体重等の条件を整えた試料を放射光施設に持ち込んで実験する予定であったが、放射光実験のための課題申請の不採択、更に新型コロナウイルス感染症の流行の影響により、本研究期間においては放射光実験を実施することができなかった。そこで、放射光実験の代替として近赤外フェムト秒レーザーを用いた骨中コラーゲンのイメージングを行ったので次項に示す。

### (3) 放射光実験の代替としての近赤外光を用いた骨中コラーゲン・イメージング

ここでは、生体組織におけるコラーゲンを生きたありのままの状態で見える第 2 高調波発生 (SHG: Second harmonic generation) 顕微鏡を用いることで、放射光実験と比べてよりマクロなコラーゲン配向を可視化した。本研究で実施する放射光実験ではビーム直径  $150\ \mu\text{m}$  程度として照射しているためこの領域の積分値が得られているが、試料の全長  $10\ \text{mm}$ 、幅  $0.6\ \text{mm}$ 、厚さ  $0.15\ \text{mm}$  程度というサイズにおける空間依存性について事前に確認する必要があると考えられる。このような目的の元、構築した顕微鏡のセットアップを図 1 5 に示す。光源には生体透過性の高い中心波長  $1250\ \text{nm}$  に設定したフェムト秒レーザーを用いた。1/2 波長板 (HWP) と偏光子 (P) によりレーザーパワーを調整した後、SHG 光の偏光依存性をキャンセルするために 1/4 波長板 (QWP) を設置し、円偏光としてから試料に照射する。イメージングのため、ガルバノミラーとリレーレンズによるレーザー走査光学系を経た後、対物レンズによりレーザー光を照射する。試料から発生した SHG 光は、ハーモニックセパレーターとバンドパスフィルター (BPF) を経てからフォトンカウンティング型光電子増倍管 (PC-PMT) によって検出する。この装置を用いて測定した SHG イメージを図 1 6 に示す。測定試料は放射光実験の場合と同様に準備したが、ここではウシの皮質骨を用いている。また、測定深さは試料の最表面であり、画像右側が骨髓側 (海綿骨)、上下方向が長軸方向である。本視野中 (約  $400 * 400\ \mu\text{m}$ ) においては、オステオンの規則正しい構造から、コラーゲンが単一方向に配向していることが確認できた。この結果から、放射光実験で計測する局所的領域は、現実的には試料を代表する領域として取り扱って差し支えないと考えられる。今後、(2) で開発した引張試験機を用いて放射光実験を行う予定であるが、(3) のイメージング法は非破壊・低侵襲で動作可能であるため、試料準備後にはこれを用いて骨におけるコラーゲンのマクロな配向データについても取得する予定である。

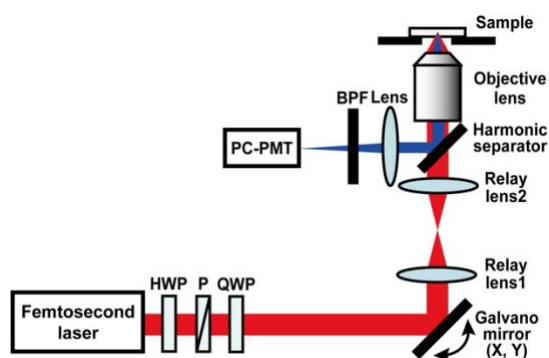


図 1 5 SHG 顕微鏡のセットアップ。

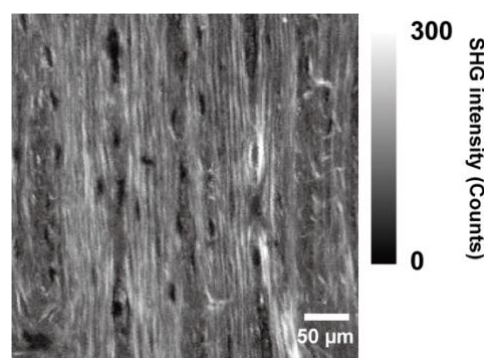


図 1 6 骨試料表面のコラーゲンイメージ。

#### 参考文献

- [1] McElhaney, J. Appl. Physiol., 1966, 21:1231.
- [2] Bonse et al., Bone Miner., 1994, 25:25.
- [3] The NIH consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy, Journal of the American Medical Association, 2001, 285:785.
- [4] Saito et al., Osteoporos Int. 2006, 17:1514.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hase Eiji, Minamikawa Takeo, Sato Katsuya, Yonekura Daisuke, Takahashi Mitsuhiko, Yasui Takeshi	4. 巻 27
2. 論文標題 Quantitative Evaluation of Both Histological and Mechanical Recovery in Injured Tendons Using Fourier-Transform Second-Harmonic-Generation Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/JSTQE.2021.3063535	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷栄治, 松本健志, 八木直人
2. 発表標題 放射光X線小角散乱・広角回折法を用いた糖尿病皮質骨の力学特性解析
3. 学会等名 生体医工学シンポジウム2019
4. 発表年 2019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
---------	---------