

平成 22 年 4 月 15 日現在

研究種目： 若手研究（B）  
 研究期間： 2007 ～ 2008  
 課題番号： 20700387  
 研究課題名（和文）生体内実働負荷波形を用いた骨の疲労特性評価  
 - 疲労骨折発生機序の解明 -  
 研究課題名（英文）Bone fatigue damage under single, static, and cyclic loading:  
 Implications for fatigue fracture etiology.  
 研究代表者  
 山本 衛（YAMAMOTO EI）  
 近畿大学・生物理工学部・准教授  
 研究者番号： 00309270

研究成果の概要（和文）：複数の蛍光色素を使用した蛍光顕微鏡観察を実施することで、継続的に作用させた過負荷のもとで発生する骨の微小き裂の進展の様子を調べた。負荷の作用に対応して段階的に染色された微小損傷が認められ、損傷が進展していく過程を示す画像が得られた。このような微小損傷の蓄積が、骨の自己修復能力を超える場合に、最終的に骨折を生じさせるような大きなき裂へと進展していくことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, the specimens were obtained from the middiaphysis of bovine femur. We applied the overloads to the specimens singly, cyclically, or statically. Microdamage in bone tissues induced by overloading was observed by a fluorescence microscopy. The growth of microdamage was monitored during the course of mechanical loading tests by the application of a series of fluorescent chelating agents. By sectioning the specimens both transversely and longitudinally, we examined the damage size and monitored how this changes during mechanical loading. Fluorescence microscopic images showed the propagating of microdamage which is labeled with different agents. Both in the transverse and longitudinal directions, microdamage was found to be greater in case of static and cyclic overloading in comparison to that of single overloading. Not only linear microcracks but also diffused microdamage were observed in the all specimens applied to overloading. The linear microcracks and diffused microdamage were dominated in the cyclic-overload and static-overload groups, respectively. These results showed that the bone microdamage accumulation strongly depends on the cycles, durations, and modes of non-destructive compressive overloading. If the damage accumulation at each type of overloading occurs at such a rate that the capacity for bone repair is exceeded, stress fractures may result in bone tissues.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学，生体材料学

キーワード：バイオメカニクス

### 1. 研究開始当初の背景

生体内での骨組織は，常に形成と吸収を繰り返して新しい骨に生まれ変わりながら，その機能を維持している．その過程では，骨に発生する微小な損傷が，骨の新陳代謝プロセスを制御しており，微小損傷の修復が骨機能の健全性を維持するために必要であると考えられている．さらに，骨の微小損傷の発生は，組織の力学的適応制御機構と密接に関連しており，骨のリモデリング現象（再構築現象）が引き起こされる際の刺激として働くと推察されている．このように，骨組織は微小損傷を常に修復しながら，その機能を維持しており，このような修復機能は人工的な工業材料には存在しない，生体組織特有の優れた能力である．しかし，損傷の蓄積が骨の修復能力を超える場合には，最終的に骨強度の低下を引き起こすことになり，このタイプの骨損傷は激しい運動を繰り返すスポーツ選手などでは高い頻度で発生することが知られている．このように，力学的負荷によって生じる骨微小損傷は，骨の機能維持にとって不可欠であるが，過度の損傷は骨折を引き起こす．つまり，骨の微小損傷は，骨の機能維持と骨障害の病因という相反する2つの面に関与する極めて重要な事象である．

骨の破壊が発生する直前では，ある程度の微小損傷が徐々に蓄積されるものと考えられている．さらに，生理的なレベルの負荷の大きさであっても，骨の微小損傷が引き起こされることが報告されている．また，このような微小損傷の発生は，骨のリモデリング現象と密接に関連しているだけでなく，著しい損傷の蓄積は，骨の強度や剛性の低下をもたらすことが示唆されている．従って，骨に作用する力学的負荷と，負荷後に生じる骨の微小損傷との定量的な関係を明らかにすることは，骨のリモデリング機構の解明につながるものと推察される．また，骨に生じる微小損傷を定量化することは，骨の脆弱化の予測を可能とし，骨損傷の診断や予防手法の改良に大きく貢献する可能性があるものと考えられる．特に，骨折を直接的には引き起こさないレベルの過負荷を作用させ，その後生じた微小損傷を定量的に評価することは，骨の強度の退行性変化に及ぼす過負荷の影響に関する基礎的知見を提供するものと推測される．

### 2. 研究の目的

本研究では，ウシ大腿骨骨幹部より作製した皮質骨試料の骨軸方向に，非破壊的な圧縮過負荷を作用させ，その後発生した微小損傷を蛍光顕微鏡によって観察した．過負荷を単一（Monotonic），繰り返し（Cyclic），持続的（Continuous）の3条件で作用させることで，負荷様式の相違が微小損傷の発生に及ぼす影響について検討した．また，3種類の蛍光色素を使用した蛍光顕微鏡観察を実施することで，継続的に作用させた過負荷のもとで発生する微小き裂の進展の様子を調べた．微小損傷の観察は，骨軸方向に対して平行もしくは垂直方向の断面内で実施し，圧縮過負荷下での微小損傷発生メカニズムの解明に結びつく基礎的知見を得ることを試みた．骨折を直接的には引き起こさないレベルの過負荷によって，骨組織に生じる微視的な損傷は，疲労性骨折の発症のみならず骨機能の維持とも密接に関連しており，本研究の結果は臨床医学分野や基礎生物学分野における諸問題の解決に対しても，基礎的情報を提供する端緒となるものと推察される．

### 3. 研究の方法

食肉処理施設から入手したウシ大腿骨を実験に使用した．海綿骨が多く含まれる大腿骨の両端部分を切断し，皮質骨からなる骨幹部のみにした．次に，骨幹部を骨軸方向に対して垂直に厚さ約15 mmで切断し，輪切り状試料を作製した．その後，輪切り状試料の断面を研磨し，光学顕微鏡による観察を行うことで，ハバース骨（Heversian bone），煉瓦状骨（Plexiform bone）の位置を確認した．次に，ダイヤモンドコアリングツールを使用して，試料の長軸が骨軸方向と一致するように，皮質骨のみからなる円柱型試験片（直径約3 mm）を作製した．なお，今回の実験では骨の組織構造の相違に起因する実験結果のばらつきを最小限とするために，煉瓦状骨の部分のみからなる試料を使用した．この加工の際には，湿潤状態を維持するとともに，試料の力学的特性に及ぼす摩擦熱の影響を最小限にするために，試料作製を水中で実施した．次に，マイクロカッター（MC-201，マルトー）に取り付けたダイヤモンド回転鋸刃（厚さ0.3 mm）を用いて，各試料の両端を切断し，平行な両端面をもつ試料を作製した．

試料長さは、圧縮試験時に座屈変形を生じさせないように、試料直径の2倍となる約6mmとした。最終的な試料の直径および長さはノギスを使用して計測した。

力学試験には、万能材料試験機(AGS-H, 島津製作所)を使用した。荷重の測定には、最大荷重容量5kNのロードセルを用いた。一方、試験機のコンプライアンス等の影響を取り除き、微小変位を精度よく測定するために、圧縮版の移動量をレーザ変位計(最小分解能0.2 μm)で計測することにより試験片の変形を求めた。検出された荷重及び変位はコンピュータのメモリに記録した。試験機には、アクリル製恒温水槽が設置されており、試験片を37℃生理食塩水中に浸漬させた状態で試験を行った。試料にプリロードとして5Nの圧縮荷重を作用させた状態でゼロ点を設定した後、ピーク圧縮荷重10Nの繰り返し負荷を10回作用させるプリコンディショニングを実施した。このプリコンディショニングの最後の負荷曲線から得られた応力-ひずみ関係より、試料の初期弾性係数( $E_0$ )を算出した。その後、初期弾性係数で正規化した応力( $\sigma/E_0$ )が0.05となる荷重を非破壊的な過負荷として試料に作用させた(Overload群)。過負荷の様式は、一回の過負荷を作用させる単一負荷(Monotonic-overload群)、5回の過負荷を連続で作用させる繰り返し負荷(Cyclic-overload群)、過負荷を5分間作用させる持続的負荷(Continuous-overload群)の3条件とした。

微小損傷観察では、作製した全ての試料に対して、過負荷作用前に存在する損傷の有無を確認するため、試料を0.0005MのAlizarin(赤色)溶液に約12時間浸漬させた。なお、この蛍光染色の過程は、染色液が試料の内部にまで到達するように、0.06MPaまで減圧したデシケータの中で実施した。その後、上述の荷重条件で過負荷を作用させた全ての試料(Monotonic-overload群、Cyclic-overload群、Continuous-overload群)に、Alizarin溶液の場合と同じ条件下において、0.0005MのXylenol(橙色)溶液による染色を行った。Xylenol溶液による染色を施した後、Overload群の全試料に対して再び同一条件の過負荷を作用させた。その後は、前述の2つの溶液の場合と同様に、0.0005MのCalcein溶液(黄緑色)による染色を実施した。一方、負荷を作用させない試料(Control群)に対しても、Alizarin、Xylenol、Calcein溶液による染色を順次行った。次に、蛍光染色を施した試料を厚さ400 μmにスライスした。この際、試料内部の観察をより詳細に実施するために、試料の横断面(骨軸方向に対して垂直方向の断面)及び縦断面(骨軸方向に沿った断面)の2種類の薄片を作製し、蛍光顕微鏡(ECLIPSE E800, Nikon)による

観察を行った。波長365nmの照射光を用いて蛍光観察を実施し、蛍光像を取得した。

#### 4. 研究成果

蛍光染色法では、Alizarin(赤色)の染色領域は、過負荷作用前の損傷部位を示している。これに対して、Xylenol(橙色)とCalcein(黄緑色)で染色された領域は過負荷を作用することで発生した損傷部位を示している。Control群の横断面と縦断面の蛍光画像では、試料側面部の極めて狭い領域に、Alizarin、Xylenol、Calceinによる3種類の染色領域が混在している様子が認められた。一方、Monotonic-overload群、Cyclic-overload群、およびContinuous-overload群の全ての群で、試料側面のわずかな領域にAlizarinによって染色された部分がみられるとともに、XylenolおよびCalceinによって染色された線状の微小き裂が確認された。さらに、観察されたき裂の近傍には、炎様状の染色領域が観察され、拡散性の微小損傷の存在が確認された。圧縮荷重を作用させた群において、各染色液で識別されたき裂長さをFig. 1(横断面)、Fig. 2(縦断面)に示す。負荷の作用前の損傷を示すAlizarin領域は、他の染色領域と比較して最も短く、過負荷の様式による大きな差はなかった。Xylenol領域のき裂長さは、作用させた負荷の様式が持続的、単一、繰り返しの順に長くなる傾向が得られた。一方Calcein領域では、繰り返し過負荷を作用させた場合が最も長く、持続的、単一の順に短くなる傾向が得られた。また、繰り返し及び持続的過負荷の場合では、Xylenol領域と比較して、Calcein領域のき裂長さが増加していた。すなわち、単一過負荷以外の条件では、再度負荷が作用することによって微小き裂の進展は増加し、骨損傷が増大するという傾向が得られた。

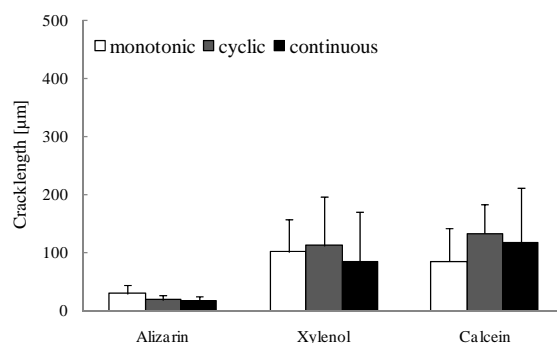


Fig. 1 Length of cracks stained with alizarin, xylenol, and calcein in the transverse section of the overload groups.

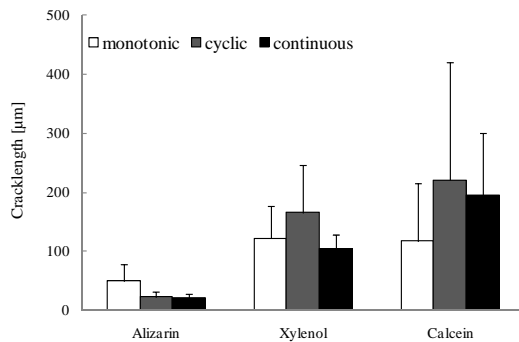


Fig. 2 Length of cracks stained with alizarin, xylenol, and calcein in the longitudinal section of the overload groups.

(2)研究分担者  
無し

(3)連携研究者  
無し

## 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)

[学会発表](計4件)

松本祐樹, 山本衛, 圧縮過負荷下で皮質骨に生じる微小損傷の形態評価, 日本機械学会第22回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp. 245, 2010年1月9日, 岡山.

山本衛, 松本祐樹, 中山裕隆, 骨組織に発生した微小損傷の蛍光顕微鏡観察, 日本非破壊検査協会平成21年春季大会講演概要集, pp. 235-237, 2009年5月20日, 東京.

山本衛, 松本祐樹, 中山裕隆, 繰り返し圧縮負荷を作用させた皮質骨で発生する微小損傷の蓄積, 日本機械学会第21回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp. 153-154, 2009年1月23日, 札幌.

松本祐樹, 山本衛, 非破壊的応力下で皮質骨に発生する微小損傷の経時的変化, 日本機械学会第19回バイオフロンティア講演会講演論文集, pp. 91-91, 2008年9月25日, 八王子.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山本 衛 (YAMAMOTO EI)  
近畿大学・生物理工学部・准教授  
研究者番号: 00309270