

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500401

研究課題名（和文） 無負荷・非接触による骨組織の力学定数の成分選択的その場測定

研究課題名（英文） In situ component selective determination of elastic modulus of bone tissue without loading.

研究代表者

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：40142202

研究成果の概要（和文）：骨コラーゲン(CoI)の弾性率を、X線回折法によって決定した。これは、CoIの回折X線強度の温度変化から、骨のCoI分子の弾性率を無負荷・非接触で測定する方法である。通常、骨中CoIの回折線はミネラルの回折線の中に埋もれてしまうため、ミネラル分率を半減した骨試料について測定を行った。この試料でもCoI弾性率は腱CoIの数倍となり、天然骨中のCoI弾性率は、腱CoIよりも極めて大きいことが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：Elastic modulus of collagen in bone was determined without loading to the specimen by measuring temperature dependence of X-ray diffraction intensity from collagen. In general, diffraction from collagen in bone is superimposed by that from mineral. We prepared bone specimens with mineral fraction one third of native bone. For these specimens, modulus values of collagen several times larger than that of tendon collagen were obtained. Then, reinforcement of collagen in bone by mineral was confirmed and much larger apparent modulus values for bone collagen than those of tendon collagen were deduced.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：骨バイオメカニクス、X線回折、温度因子、弾性率

1. 研究開始当初の背景

骨は柔らかいコラーゲン(CoI)と硬いハイドロキシアパタイト(HAp)からなる2成分複合材料と考えることができる。CoIはHApの脆性を補償し骨の韌性に寄与する。一方で、HAp近傍のCoIは前者に強化を受け、腱中のCoIなどとは異なった力学物性を示す可能性が示唆されている。これを直接的に確認するために、例えば通常用いられるマクロな力学

負荷に対する応答の測定では、各成分への力の分配などの大きな仮定なしには望んだ結果には至らない。結晶面からのX線回折強度は、構成原子の熱振動のため温度に依存して減衰することが知られている[C. Kittel "Introduction to Solid State Physics" 6th Ed. Wiley, 1986]。X線回折線強度の温度依存因子はDebye-Waller因子(DWF)として古くから知られているものである。DWFを利用すると、

古典的なエネルギー等分配則に基づいて、各原子の平衡位置の周りでの熱振動の力の定数が求まる。すなわち外力を加えることなしに、成分選択的に構成成分(複合材料の場合はマトリックス)の力学特性を決定することができる。

2. 研究の目的

本申請の目的は、X線回折に基づき多成分複合材料中で、(1)成分選択的に、(2)非接触、(3)無負荷で各構成物質の力学定数のその場計測を可能にする技術を確認し、骨組織の力学的複合構造を明らかにすることである。先ず装置については、回折X線の温度因子計測のため精密温度制御試料ホルダーの作成を行う。この改装を施した装置を使って、生体多成分複合材料である骨組織について成分選択的にColの力学特性を調べる。特にHAp分率によってそれがどの様に変化するかを測定し、外挿値として骨組織中HAp存在下でColの力学特性を調べる。以上の測定結果に立脚し、複合材料中での充填材とマトリックス界面付近での強化機構に関するモデルの構築を行う。

3. 研究の方法

本申請の研究の中心は、生体材料のような多成分複合材料の(1)成分選択的、(2)非接触、(3)無負荷という条件下で、各構成物質の力学定数のその場計測を行うことである。(1)~(3)、さらにその場測定という条件を満たすために、X線回折実験を行った。特に力学定数を得るために、回折強度の温度因子の測定を行うことが主たる実験となる。このため次の様な実験を行った。

1. X線回折の改装(精密温度制御装置の組み込み)
2. 骨(生体複合材料)試料の作成
3. 温度因子の測定、力学定数の算出

X線回折実験には、RigakuのRad-2R水平ゴニオ回折計を用いた。温度の精密制御のためペルチェ素子を用いた恒温試料ホルダーを作成し回折装置に組み込んだ。骨試料はウシ大腿骨骨幹部緻密骨を用いた。骨ミネラル中のCa²⁺イオンは原子散乱因子がタンパク質に比べて大きく骨HApで最も強いピークの2θ値がコラーゲンのヘリックスに関するピークに近いので、Colの温度因子測定が難しい。そこで骨試料としては、まずミネラル分率を変化させた試料を調整する。ミネラル分率の調整のためEDTA水溶液による脱灰を施した。

4. 研究成果

(1) 腱コラーゲン、完全脱灰骨の弾性率

温度因子を観測するColの回折線は、Col

ヘリックス軸に沿った0.28nmのピークである。これはCol 3重らせんコイルドコイルピッチの30層線にあたる。測定温度範囲は、Colの熱変性を考え、0°Cから40°Cの範囲とした。また、0.28nmのピークは吸水水量により変化することから、試料は測定前に12時間真空乾燥し、測定中も乾燥窒素などを用いて乾燥状態を保った。これからColヘリックス軸方向の弾性率が決定された。表1に温度因子の測定で求められた腱コラーゲンおよび完全脱灰骨コラーゲンの弾性率を示す。表には文献値も示してある。0.28nm反射の温度因子から得られた弾性率は、文献値と比較するとやや小さめである。郷らによれば、これは温度因子法が基本的にColアミノ酸残基1個分の熱振動を観測しロングレンジの熱揺動を観測していないことに依る。

表1 腱および完全脱灰骨の弾性率

測定手法	試料	弾性率 (Gpa)
温度因子(本実験)	ラット尾腱	1.28±0.10
温度因子(本実験)	完全脱灰骨	1.41±0.34
AFM たわみ	ウシ アキレス腱	5.4±1.2
AFM 引っ張り	ウシ アキレス腱	2.0~7.0
X線引っ張り歪測定	ウシ アキレス腱	2.9±0.1

(2) 部分脱灰骨の弾性率

EDTA処理した骨試料について(1)と同様の実験を行った。処理時間を2時間程度にし、平均のHAp体積分率が0.25となる様に調整した。回折プロフィールには、原理的にはHApとColそれぞれの温度因子が入ることになるが、HApの弾性率がColの100以上であることを考えると、HApに関する温度因子は無視できる。ここでは、求めた温度因子は全てColの熱振動によるものと仮定し弾性率を決定した。得られた結果を表2に示す。

表2 ミネラルの有無による弾性率の違い

試料(ミネラル体積分率)	弾性率 (GPa)
完全脱灰骨 (0)	1.41±0.34
部分脱灰骨 (0.25±0.008)	4.0±0.5

(3) 骨中のコラーゲンの弾性率

ミネラル分率が通常骨の約半分の試料の弾性率は、完全脱灰骨の約3倍である。これから、天然骨の中ではコラーゲンは、ミネラルの強化を受け更に大きな弾

性率を持っている可能性が強く示唆される。

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 8 件)

- ① Slow knot formation by suppressed self-reptation in a collapsed polymer chain. M. Nakata, Y. Nakamura, and N. Sasaki *Physical Review E* **85**, 021802 (2012). (査読有)
- ② Studies on the formation mechanism and the structure of the anisotropic collagen gel prepared by dialysis-induced anisotropic gelation. K. Furusawa, S. Sato, J. Masumoto, Y. Hanazaki, Y. Maki, T. Dobashi, T. Yamamoto, A. Fukui, and N. Sasaki *Biomacromolecules* **13**, 29-39 (2012) (査読有)
- ③ Change in the viscoelastic properties of agarose gel by HAp precipitation by osteoblasts cultured in an agarose gel matrix. Y. Hanazaki, D. Ito, K. Furusawa, A. Fukui, N. Sasaki *Journal of Biorheology* in press. DOI 10.1007/s 12573-011-0043-2 (査読有)
- ④ Wide angle X-ray diffraction and small angle X-ray scattering studies on the effect of demineralization on hierarchical structure of bone. K. Furusawa, H. Shirakawa, S. Sato, Y. Tomimori, B. Giri, A. Fukui, N. Sasaki *Transactions of the Materials Research Society of Japan* **36**(2), 387-391 (2011) (査読有)
- ⑤ Effect of pH on Anisotropic Gelation of DNA Induced by Aluminum Cations K. Furusawa*,† Y. Narazaki,‡ N. Tomita,‡ T. Dobashi,‡ N. Sasaki,† and T. Yamamoto *Journal of Physical Chemistry. B*, **114**, 13923-13932(2010) (査読有)
- ⑥ 生体組織力学適応の素過程: 力学刺激に対する細胞の応答
佐々木直樹、古澤和也、福井彰雅、花崎洋平、伊東大輔
日本生体電気・物理刺激研究会誌 **24**, 11-16 (2010).
- ⑦ Effect of pericellular matrix formation by chondrocytes cultured in agarose gel on the viscoelastic properties of agarose gel matrix. Naoki Sasaki, Takahiro Imai, Akiko Hashimoto, Hiroki Yasuda *Journal of Biorheology* **23**, 95-101 (2009). (査読有)

- ⑧ Deformation of mineral crystals in cortical bone depending on structural anisotropy. Bijay Giri, Shigeru Tadano, Kazuhiro Fujisaki, and Naoki Sasaki *Bone* **44**, 1111-1120 (2009) (査読有)

[学会発表] (計 23 件)

- ① アミロイド線維形成のインキュベーション時間および温度依存性-伸長流動複屈折の測定
須磨俊輔, 河合優一, 古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹, 第 32 回日本バイオレオロジー学会年会, 2009 年 6 月 4 日, 桐生市市民文化会館(桐生市)
- ② β -ラクタoglobulin のアルコール変性によるアミロイド小線維形成について
河合優一, 須磨俊輔, 佐々木直樹, 福井彰雅, 古澤和也, 第 32 回日本バイオレオロジー学会年会, 2009 年 6 月 4 日, 桐生市市民文化会館(桐生市)
- ③ 骨芽細胞によるマトリックス石灰化に対する力学刺激の影響
花崎洋平, 伊藤大輔, 古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹, 第 32 回日本バイオレオロジー学会年会, 2009 年 6 月 5 日, 桐生市市民文化会館(桐生市)
- ④ ヒト大腿骨粘弾性の加齢による変化
斎藤 徹、佐々木直樹、福井彰雅、古澤和也、Peter Zioupos, 第 32 回日本バイオレオロジー学会年会, 2009 年 6 月 5 日, 桐生市市民文化会館(桐生市)
- ⑤ 透析によって調製される DNA 異方性ゲルについての研究
古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹, 第 32 回日本バイオレオロジー学会年会, 2009 年 6 月 5 日, 桐生市市民文化会館(桐生市)
- ⑥ Elastic properties of bone collagen with and without mineral particles
N. Sasaki, T. Nozoe, K. Furusawa, and A. Fukui, Third International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues, 17th December, 2009, Hilton Clearwater Beach Resort (Clearwater Beach, USA)
- ⑦ アミロイド小線維形成のダイナミクス
河合優一, 古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹 第 58 回レオロジー討論会, 2010 年 10 月 4 日, 仙台国際センター(仙台市)
- ⑨ KOH処理骨の粘弾性 白川英輝, 古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹, 第58回レオロジー討論会, 2010年10月4日, 仙台国際センター(仙台市)
- ⑩ 多価金属カチオンによるDNAのゲル化と

- その力学特性の研究 古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹, 第58回レオロジー討論会, 2010年10月4日, 仙台国際センター(仙台市)
- ⑪ 骨芽細胞の機能に及ぼす力学刺激の影響
花崎洋平, 伊東大輔, 古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹, 第34回日本バイオレオロジー学会年会, 2011年6月3日, 関西大学100周年記念会館(吹田市)
- ⑫ DNA異方性ゲルの構造とレオロジーに関する研究
古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹, 第34回日本バイオレオロジー学会年会, 2011年6月3日, 関西大学100周年記念会館(吹田市)
- ⑬ イオンの拡散によって形成される異方性コラーゲンゲルの形成過程および構造
増元淳一, 古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹, 第34回日本バイオレオロジー学会年会, 2011年6月3日, 関西大学100周年記念会館(吹田市)
- ⑭ アミロイド線維溶液の流動複屈折と線維の弾性率
須磨俊輔, 斉藤有奈, 古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹, 第34回日本バイオレオロジー学会年会, 2011年6月3日, 関西大学100周年記念会館(吹田市)
- ⑮ Effect of Collagen Degradation on the Viscoelastic Properties of Cortical Bone
N. Sasaki, H. Shirakawa, K. Furusawa, A. Fukui, 12th IUMRS International Conference in Asia, 22nd September, 2011, Taipei World Trade Center Nangang Exhibition Hall (Taipei, Taiwan)
- ⑯ 流動複屈折によるアミロイド線維形成の初期過程
佐々木直樹, 須磨俊輔, 河合優一, 斉藤有奈, 古澤和也, 福井彰雅, 第60回高分子討論会, 2011年9月29日, 岡山大学津島キャンパス(岡山市)
- ⑰ グロビュール状態からキャストした高分子フィルムの構造と物性
富森由佳, 菊野拓人, 古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹, 第60回高分子討論会, 2011年9月29日, 岡山大学津島キャンパス(岡山市)
- ⑱ ベータラクトグロブリンアミロイド線維の形成機構と物性
須磨俊輔, 古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹, 第59回レオロジー討論会, 2011年10月6日, 桐生市市民文化会館(桐生市)
- ⑲ コラーゲン水溶液の相分離過程で観察される輸送現象と構造形成
古澤和也, 増元淳一, 長谷部 舞, 佐藤翔

- 一, 福井彰雅, 佐々木直樹, 第59回レオロジー討論会, 2011年10月7日, 桐生市市民文化会館(桐生市)
- ⑳ 骨芽細胞の分化に与える異方性コラーゲンゲルの階層構造の影響
佐藤翔一, 増元淳一, 長谷部 舞, 古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹, 第59回レオロジー討論会, 2011年10月7日, 桐生市市民文化会館(桐生市)
- ㉑ Effect of mechanical stimuli on the function of osteoblasts
Y. Hanazaki, D. Ito, K. Furusawa, A. Fukui, N. Sasaki, 4th International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues, 13th December, 2011, (Hawai'i, USA)
- ㉒ Selective degradation of bone collagen changes the viscoelastic properties of bone
N. Sasaki, H. Shirakawa, K. Furusawa, A. Fukui, 4th International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues, 11th December, 2011, Marriott Waikoloa Beach Resort and Spa (Hawai'i, USA)
- ㉓ 骨塩密度?コラーゲンの状態?----骨バイオメカニクスの要は? 佐々木直樹, 白川英輝, 古澤和也, 福井彰雅, 第24回バイオエンジニアリング講演会, 2012年1月7日, 大阪大学豊中キャンパス(豊中市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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: 40142202

(2) 研究分担者

古澤 和也 (FURUSAWA KAZUYA)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教
研究者番号: 00510017

(3) 連携研究者 なし