

(様式第5号)

広角・小角 X 線回折による骨組織内アパタイト・コラーゲンの 力学挙動観察

Observation of Mechanical Response of Apatite/Collagen Phases in Bone Tissue by Small and Wide Angle Diffractions

東藤正浩，箕輪政伸，但野 茂

Masahiro TODOH, Masanobu MINOWA, Shigeru TADANO

北海道大学大学院工学研究院人間機械システムデザイン部門

Division of Human Mechanical Systems and Design, Faculty of Engineering,
Hokkaido University

- ※1 先端創生利用（長期タイプ、長期トライアルコース、長期産学連携コース）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※2 利用情報の開示が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後二年以内に研究成果公開〔論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表〕が必要です。（トライアルコース、及び産学連携コースを除く）

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

微視的には骨は無機成分のアパタイト結晶と有機成分のコラーゲン線維からなる複合構造である。これらのコラーゲンとアパタイトが骨組織としての力学的特性の要因となっている。しかし、これらの微視構造が巨視的な骨の力学的特性に与える影響は十分に調査されていない。そこで本研究では、広角・小角 X 線回折を用いて、アパタイトおよびコラーゲンの微視的な変形特性と皮質骨の巨視的な変形特性を調査した。その結果、巨視的な組織ひずみの増加に伴い、アパタイト結晶ひずみおよびコラーゲン線維ひずみは増加した。組織ひずみに対し、アパタイト結晶ひずみは小さい値を示し、コラーゲン線維ひずみは大きな値を示した。これらの結果から、コラーゲン線維の方が変形を許容していることが分かった。また、巨視的な骨組織の弾性率は、微視的なアパタイト結晶、コラーゲン線維の変形割合に大きく依存していることが明らかになった。

(English)

Bone is often regarded as a composite material consisting of mineral particles and organic matrix (mostly Type I collagen) on a microscopic scale. The mechanical properties of bone tissues at a macroscopic scale depend on the structural organization and properties of constituents in the microscopic scale. However, both mechanical behaviors of mineral and collagen phases are not clear yet. In this study, both microscopic strain of collagen and mineral phases in bovine cortical bone by using small and wide angle X-ray diffraction, respectively. As the results, the strain of mineral and collagen matrix increased with increasing bone tissue strain. The mineral strain showed lower value than bone tissue strain and collagen matrix strain showed higher value. The collagen matrix strain allowed tensile deformation as compared with mineral phase. This study could suggest that macroscopic mechanical properties of bone tissue depend on the degree of deformation of mineral and collagen matrix.

2. 背景と目的

微視的には骨は無機成分のアパタイト結晶と有機成分のコラーゲン分子からなる複合構造である。特に、剛性・強度の高いアパタイト結晶は骨密度と密接な関係があり、上述の従来の骨強度推定手法の根拠となっている⁽¹⁾。一方、近年、骨コラーゲンの異常がマイクロダメージ発生の原因となることや、原発性骨粗鬆症や糖尿病などにおいて骨コラーゲンの異常による骨強度低下が認められ、このような微視構成成分に関わる「骨質」の重要性が指摘されている。しかし、コラーゲンの力学的役割、

特にアパタイトとの力学的相互作用については複雑かつ微細であり、可視化等による解明も困難であり、その詳細は未だ不明である。

そこで本研究では、X線回折を利用したコラーゲン-アパタイト両者の構造および力学挙動を観察可能とする小角・広角回折測定系を構築し、微視的力学挙動観察から骨コラーゲン-アパタイト複合構造モデルを提案する。X線回折測定による両成分の結晶・分子のひずみ情報と負荷応力の関係から、複合構造モデルの材料パラメータ同定を行う。それによりマクロな力学特性を推定する新たな骨質評価手法の提案を目的とする。

3. 実験内容（試料、実験方法、解析方法の説明）

試料には、23ヶ月齢のウシ大腿骨を使用した。骨試験片は大腿骨骨幹部皮質骨から切り出した。加工には、ダイヤモンド・ソー（South Bay Technology, MODEL650）を使用した。試験片長軸方向を骨軸方向、試験片短軸方向を円周方向に一致させたものを骨軸方向試験片とした。また、試験片長軸方向を円周方向、試験片短軸方向を骨軸方向に一致させたものを円周方向試験片とした。ダイヤモンドソーで切り出した試験片の表面を#1000のエメリー紙で研磨し、試験片厚さを0.2 mmに加工した。試験片表面の洗浄のため、超音波洗浄機（US-1, エヌエスディ社製）を用いて洗浄を行った。自然乾燥させた後、治具間距離3 mmとして引張試験治具に固定した。

本研究では、局所構造ビームライン（BL11）を使用した。エネルギー8keVの偏光電磁石からのシンクロトロン放射光をモノクロメーターSi(111)で分散させ、単色X線として分離した。第一スリットでビームの整形を行い、第二スリットで散乱を除去した。また、真空パスにより空気散乱を抑えた。試験片に引張負荷を与えるため、図1に示すように引張小型負荷装置を用いた。試験片から2,705 mmの位置に検出器IP（300 mm×300 mm）を設置した。皮質骨の骨軸方向、円周方向の引張強度を考慮し、骨軸方向試験片では、0, 25, 50 MPaの引張負荷を与えた。また、円周方向試験片では、0, 10, 20 MPaの引張負荷を与えた。それぞれの試験片の各負荷条件において、X線を30分間照射し、X線回折像を取得した。IPからのデータ読み取りには読取装置（R-AXIS4, Rigaku）を用いた。読取解像度は100 μmに設定した。取得したX線回折像から1次のコラーゲンピークを使用して、コラーゲン線維ひずみの解析を行った。

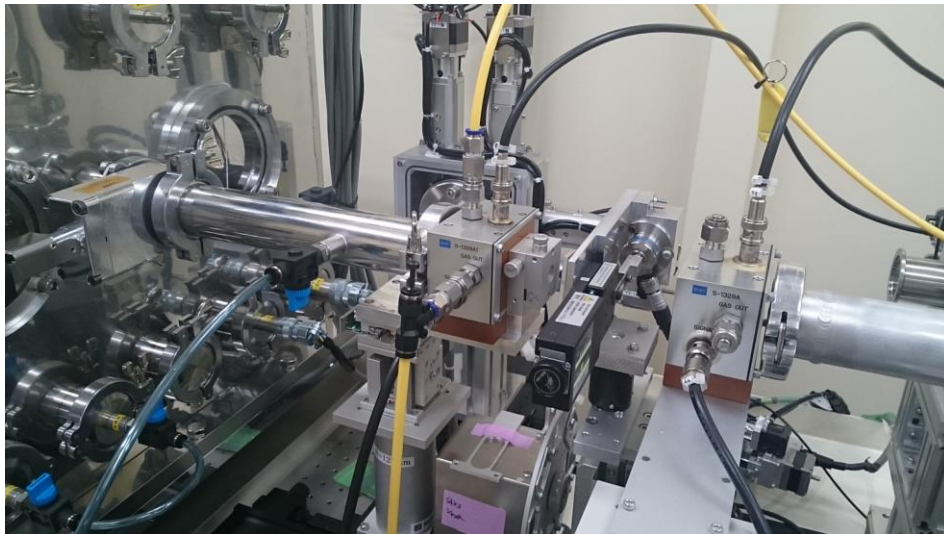


図1 X線回折系

4. 実験結果と考察

図2に放射光を使用した時の骨軸方向、円周方向のX線回折像を示す。図中に対応するコラーゲンの回折次数を記す。回折像の円周上の濃淡はコラーゲン周期の存在頻度を示している。管球式X線を使用した際は、3次のコラーゲンピークのみ確認できたが、シンクロトロン放射光を使用した場合、1次、3次のコラーゲンピークが明確に確認できた。

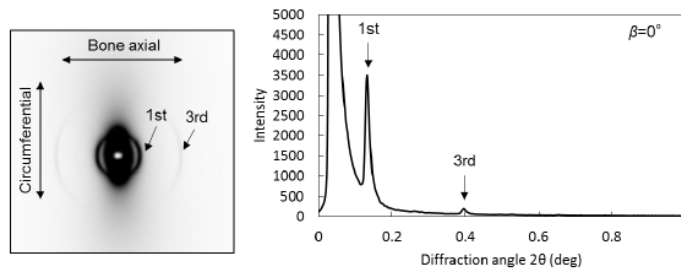


図2 X線回折像とX線強度プロファイル

シンクロトロンを用いた引張負荷時のX線回折測定により得られたコラーゲン線維ひずみと骨組織ひずみの関係を示す。骨組織ひずみは、光学顕微鏡下の引張試験により得られた組織弾性率とX線回折測定の際に負荷した応力から算出した。図3に骨軸方向、図4に円周方向の結果を白丸で示す。骨軸方向のプロット位置は、負荷応力0, 25, 50 MPaと各試験片の組織弾性率から算出した骨組織ひずみにおいて測定された値である。円周方向のプロット位置は、負荷応力0, 10, 20 MPaと各試験片の組織弾性率から算出した骨組織ひずみにおいて測定された値である。骨軸方向、円周方向とも試験片の本数は1本の結果を示している。

コラーゲン線維ひずみ $\epsilon^{Collagen}$ は、骨組織ひずみ ϵ^{Tissue} の増加に伴い増加する傾向を示した。また、負荷方向で比較すると、負荷方向によって変形の割合が異なることがわかる。骨軸方向で、 $\epsilon^{Collagen} = 0.89\epsilon^{Tissue}$ 、円周方向で $\epsilon^{Collagen} = 0.90\epsilon^{Tissue}$ となった。

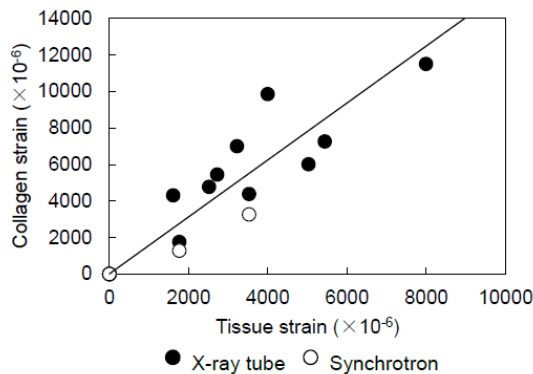


図3 骨軸方向負荷におけるコラーゲンひずみと組織ひずみの関係

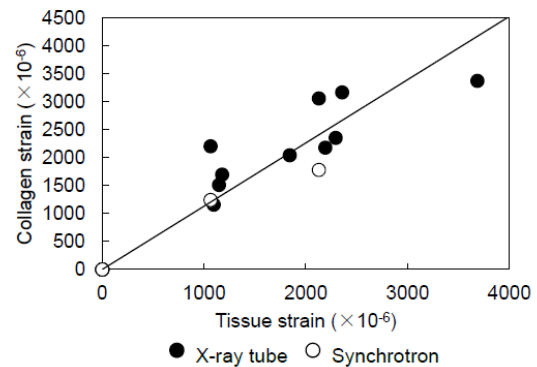


図4 円周方向負荷におけるコラーゲンひずみと組織ひずみの関係

5. 今後の課題

今回の実験では、実験系の制約上、小角散乱によるコラーゲン線維ひずみの測定のみ行った。今後、骨の複合モデルの同定を行うためには、広角同時測定によるアパタイト結晶ひずみの同時測定が必要である。また試験片数も実験時間の都合上、各1本をなつたため、個体差、不均質性を考慮すると測定試験片の増加が望まれる。

6. 参考文献

(1) Todoh M, Tadano S, Giri B, Nishimoto M (2009). "Effect of gradual demineralization on the mineral fraction and mechanical properties of cortical bone". Journal of Biomechanical Science and Engineering 4: 230-238.

7. 論文発表・特許 (注: 本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

Fujisaki K, Todoh M, Niida A, Shibuya R, Kitami S, Tadano S (2012). "Orientation and deformation of mineral crystals in tooth surfaces". Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 10: 176-182.

Yamada S, Tadano S, Todoh M, Fujisaki K (2011). "Residual stress distribution in the bovine femoral diaphysis measured by synchrotron". Journal of Biomechanical Science and Engineering, 6(2): 114-124.

Todoh M, Tadano S, Giri B, Nishimoto M (2009). "Effect of gradual demineralization on the mineral fraction and mechanical properties of cortical bone". Journal of Biomechanical Science and Engineering 4: 230-238.

Giri B, Tadano S, Fujisaki K, Todoh M (2008). "Understanding site-specific residual strain and architecture in

bovine cortical bone”. Journal of Biomechanics 41: 3107-3115.

Tadano S, Giri B, Sato T, Fujisaki K, Todoh M. Estimation nanoscale deformation in bone by X-ray diffraction imaging method. Journal of Biomechanics, Volume 41, Issue 5, 4 March 2008, Pages 945-952.

Giri B, Tadano S, Fujisaki K, Todoh M. Microstructure of bone around natural hole in bovine lumber vertebra. Journal of Biomechanical Science and Engineering 2: 1-11, 2007.

Todoh M, Ihara M, Matsumoto T, Tanaka M (2004). “Relationship between mechanical property of cancellous bone and hardness of trabeculae”. JSME International Journal 47C: 1075-1078.

Todoh M, Tadano S, Shibano J, Ukai T. Polychromatic X-ray measurements of anisotropic residual stress in bovine femoral bone. JSME International Journal, Series C, Volume 43, No. 4, December 2000, Pages 795-801.

Tadano S, Todoh M, Shibano J, Ukai T. Residual stress evaluation of hydroxyapatite coating Ti implant. JSME International Journal 40A: 328-335, 1997.

8. キーワード（注：試料及び実験方法を特定する用語を2～3）

生体骨，引張負荷，小角散乱

9. 研究成果公開について（注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文（査読付）発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください（2014年度実施課題は2016年度末が期限となります。）

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

① 論文（査読付）発表の報告（印刷物の提出） （報告時期：2015年 12月）

② 研究成果公報の原稿提出 （提出時期： 年 月）