

加齢骨の微視構造特性と力学特性

Micro-Structural and Mechanical Properties of Ageing Bone

○ 東藤正浩 (北大工) 但野 茂 (北大工)

Masahiro TODOH and Shigeru TADANO  
Hokkaido University

**Abstract:** Over the years, loss of bone mineral or bone mass has been considered the major cause of bone fractures. However, recent studies suggest that collagen also contributes to bone strength by using physiological and artificial aging bone. It was found that fracture risk is related to not just a simple loss of bone mass, but related to significant changes in the biochemical and physical properties of the collagen matrix. Therefore the microscopic interaction between the mineral and organic material may determine the mechanical properties of bone. In this study, cortical bone specimens with different ages were analyzed by Raman spectroscopy and X-ray diffraction techniques. As the results, the effectiveness of Raman spectroscopy was confirmed as a technique for the structural analysis of bone ageing, and the difference of mechanical behaviors by the ageing was observed by X-ray diffraction technique.

**Key Words:** Biomechanics, Bone, Apatite, Collagen, X-ray diffraction, Raman spectroscopy

1. 緒言

骨組織はハイドロキシアパタイト (Hydroxyapatite: HAp) からなる無機基質と I 型コラーゲン (Type I collagen) 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<sup>(1)</sup>。これまで骨の強度低下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を主な原因と仮定し、アパタイト成分の高密度に起因する高 X 線吸収特性を利用して、レントゲンや X 線 CT, DXA といった診断手法が用いてきた。しかし近年、骨強度に関連する因子として骨量の他に、その骨質が影響していると指摘されている<sup>(2)</sup>。そのためより精度の高い骨強度評価のためには骨量と骨質の両者を考慮した診断手法が望まれるが、そのような骨診断方法は未だ実現されていない。本研究ではアパタイト・コラーゲン特性の同時測定による骨強度評価を目的とし、ラマン分光法による骨微視構造解析ならびに X 線回折による力学挙動解析を行い、加齢による構造・力学的影響について調査した。

2. ラマン分光法による骨構造解析

2-1 測定試料

試験片として出生直後、24 ヶ月齢、14 歳のウシ大腿骨を用いた。骨試験片は皮質部から骨軸方向を長軸として、ダイヤモンド・ソー (Model650, South Bay Technology) を用いて成形した。

2-2 ラマン分光実験

本研究では、ラマン分光法を用いて骨微視構造解析を行った。物質に単一波長の励起レーザーを照射すると、入射光と同じ振動数の散乱光 (レイリー散乱) と異なる振動数の散乱光 (ラマン散乱) が生じる。ラマン散乱の場合、入射光の振動数すなわちエネルギーが変化しているため、ラマン散乱光を調べることによって物質に固有な特性を知ることができる。本研究のラマン分光測定には、北海道大学創成科学研究棟オープンファシリティの顕微ラマンマイクロスコープシステム (inVia Reflex, Renishaw) を使用した。励起レーザーとして、波長 532 nm 小型グリーンレーザー (J150GS-11, SOC) を用い、照射時間を 1 秒とした。

2-3 結果

レーザーパワー100%, レンズ倍率 50 倍のときの骨ラマンスペクトルを Fig. 1 に示す。骨のラマンスペクトルでは 960 cm<sup>-1</sup> 付近にアパタイト由来の鋭い ν<sub>1</sub> (PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>: C-O 対称伸縮運動) ピークが見られた。さらに 1070 cm<sup>-1</sup> 付近に CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, 1245 cm<sup>-1</sup> 付近に Amid III (C-N-N 伸縮運動), 1667 cm<sup>-1</sup> 付近に Amid I ピークが見られた。これらはコラーゲン由来の強いピークである。また, Fig. 2 に各年齢における各ピークのラマン強度およびラマンシフトを示す。どのピークについても、年齢が高くなるにつれラマンスペクトル強度が高くなる傾向があった。

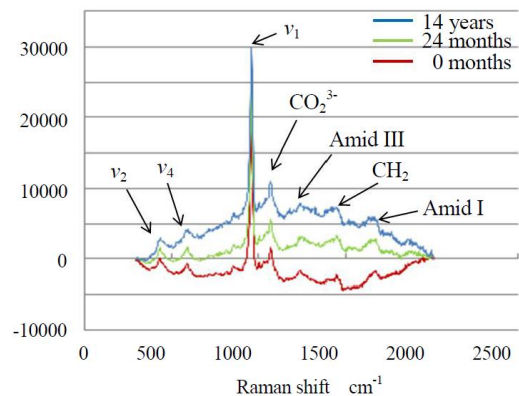


Fig. 1 Raman spectrum from bovine cortical bone.

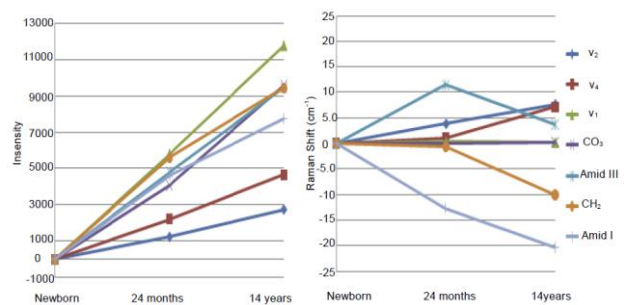


Fig. 2 Changes of Raman intensity (left) and Raman shift (Right) by ageing.

### 3. X線回折による骨力学挙動観察

#### 3-1 測定試料

試験片として、ヒト股関節骨頭頸部 (71.4±9.5 歳, n=7) より短冊状皮質骨試験片 (16.0×2.5×1.5 mm) を骨軸方向が長軸方向となるよう採取した。

#### 3-2 放射光回折実験

回折実験は、シンクロトロン放射光施設 (cSAXS Beamline, Swiss Light Source, PSI, Switzerland) で行った。X線エネルギーは 18.58 keV (波長: 0.0667 nm) とした。コラーゲンからの小角散乱像およびアパタイト結晶からの広角回折像を同時に検出するため、Fig. 3 に示す実験系にて測定を行った。試験片は小型圧縮負荷装置<sup>(3)</sup>に設置した。小角散乱像は、試験片から 7 m 後方に設置した検出器 (PILATUS 2M) により撮像した。広角回折像は前方に 20.5~44.9 deg の散乱角となるよう検出器 (PILATUS 100k) を設置し、撮像した。X線ビームサイズは 400×300 μm, 撮像時間は 0.230 sec/image とした。撮像系と負荷制御系を同期させ、圧縮負荷下における連続観察を可能とした。得られた回折画像を解析し、負荷前に対する負荷中の結晶格子ならびに分子配列の構造的変化から力学的ひずみを算出した。

#### 3-3 結果

巨視的に骨組織に動的圧縮負荷を与えたときのアパタイト-コラーゲン相の各々の時間的なひずみ変化を Fig. 4 に示す。負荷された圧縮ひずみに対し、コラーゲン、アパタイトともに圧縮変形していることがわかる。巨視的な骨組織のひずみに対し、コラーゲンで 25%、アパタイトで 12% 程度のひずみが測定され、コラーゲンの方が変形を許容していることがわかる。

また、組織ひずみとアパタイト/コラーゲンひずみとの関係を Fig. 5 に示す。ひずみ速度 0.0014 の場合、コラーゲンにのみヒステリシスが見られるのに対し、ひずみ速度 0.014 では両者とも見られず、アパタイト-コラーゲン複合構造においてもコラーゲンの粘弾性効果が確認できた。

### 4. 考察

3点曲げ試験により測定した各年齢のウシ大腿骨皮質骨の弾性率、最大たわみ、曲げ強度を Fig. 6 に示す。弾性率および曲げ強度については、24ヶ月齢のものが最大であったのに対し、最大たわみは年齢につれ単調に減少した。このように加齢による骨強度の低下および骨の脆化が確認された。ラマン分光測定で得られたスペクトルデータから算出した  $\nu_1$  ピークと Amid I ピーク間の強度差は高齢な試験片ほど大きかった。これにより高齢な骨ほどアパタイトに対するコラーゲン相対量の減少傾向が見られた。また、Fig. 2 のラマンシフト変化より、コラーゲンの Amid I のピーク位置が高齢な試験片ほど低波数側にシフトしていることからコラーゲンの微視的変性が示唆され、加齢に伴う骨の微視的構造変化による力学特性への影響が予想される。また、X線照射によるコラーゲンからの小角散乱およびアパタイト結晶からの広角回折測定により、外的負荷における骨組織中の無機・有機両成分の力学的挙動を観察することができた。その結果から、骨組織内のコラーゲン/アパタイト両成分において、ひずみ分担、ひずみ速度の影響を評価することができた。今後、これらの結果をもとに、骨の微視的構造・力学モデルを構築し、加齢や疾病の新たな定量化学手法への応用へと展開を図る予定である。

### 参考文献

- (1) Rho, J. Y. et al., Mechanical properties and the hierarchical structure of bone, *Medical Engineering & Physics*, Vol. 20, pp. 92-102, 1988.
- (2) The NIH consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy, *Journal of the American Medical Association*, Vol. 285, pp. 785-795, 2001.
- (3) Meier, M. et al., Investigation of microdamage in murine bone under dynamic load, *Journal of Biomechanics*, Vol. 41, pp. S76, 2008.

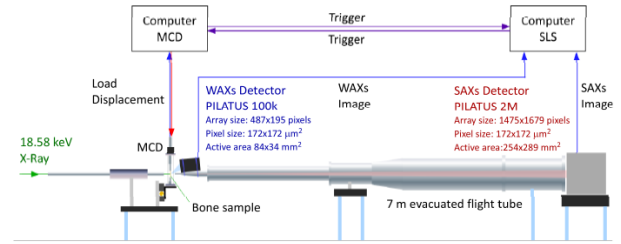


Fig. 3 Experimental setup for X-ray diffraction.

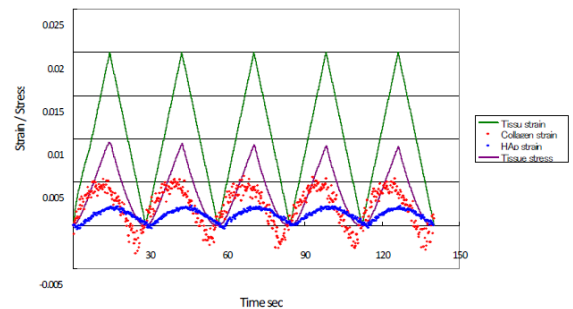


Fig. 4 Changes in mineral, organic and tissue strains.

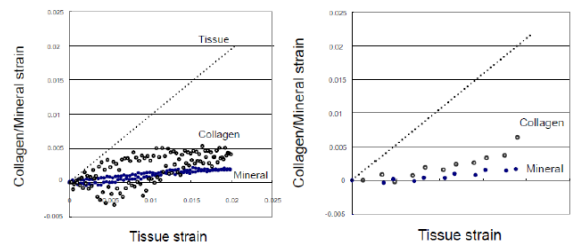


Fig. 5 Relationships between mineral, organic and tissue strains.

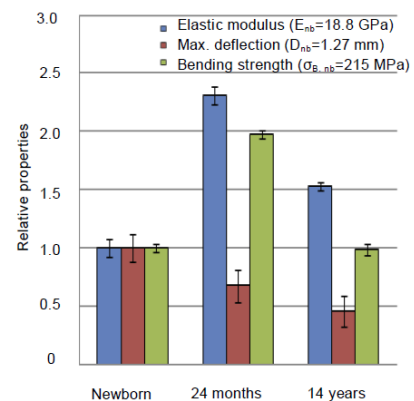


Fig. 6 Changes of mechanical properties by ageing.