

論文

ラット大腿皮質骨の力学的性質と骨密度との関係

坂本 信*, 佐藤 憲二**, 田邊 裕治**, 小林 公一*, 村田 冬樹*, 坂井 淳***

Relationships between Mechanical Properties and Volumetric Bone Mineral Density of Rat Femoral Cortical Bone

Makoto SAKAMOTO, Kenji SATO, Yuji TANABE, Koichi KOBAYASHI, Fuyuki MURATA, Jun SAKAI

The mechanical properties of cortical bone are a consequence of the interaction between the mineral and collagen components. Small variations in the amount of mineral present in a section of bone can have a large influence on its mechanical properties. Studies have shown the correlations between Vickers microhardness and mineral content, and Vickers microhardness and elastic modulus using three-point and four-point bending tests. However, the precise nature of statistical relationship has yet to be established. Nanoindentation, which evolved from Vickers microhardness test, allows for measurement of mechanical properties of cortical bone at the nanometer scale. The nanoindentation technique has been applied to estimate mechanical properties of bone at a microscopic length scale, overcoming the limitations of traditional mechanical tests for small specimens. In this study, the relationships between mechanical properties measured by nanoindentation and volumetric Bone Mineral Density (vBMD) measured by peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT) in femoral cortical bone from a variety of ages of rats were investigated. The specimen of rat cortical bone used here was Haversian bone. Experimentally measured elastic modulus was correlated with vBMD ($r=0.80$). It was found that a good correlation also existed between hardness and vBMD ($r=0.81$).

Key words: Biomechanics, Rat Cortical Bone, Nanoindentation, Elastic Modulus, Hardness, pQCT, Volumetric Bone Mineral Density

1. 緒言

骨組織には皮質骨（緻密骨）と海綿骨とがあり、皮質骨組織成分はおおよそ水分が15%、無機質が50%、有機質が35%の割合でそれぞれ構成されている¹⁾。骨中の無機質成分はリン酸カルシウムであり、ハイドロキシアパタイトとよばれる結晶構造体である。一方、骨内部の有機質成分は蛋白質のコラーゲンや多糖体の一種であるグリコサミノグリカンとよばれる物質である。骨組織の力学的特性は整形外科領域にとって最も重要で興味ある研究分野であるが、未だ不明な点が多い。臨床においては骨の強度診断として、DXA (Dual energy X-ray Absorptiometry; 二重エネルギー X線吸収法) を利用して、骨に含まれるミネラル量を測定するのが一般的である。また、皮質骨を対象としたバイオメカニクスの研究には、ヒトの骨が入手困難なため、ウシ、ブタ、ラットおよびマウス等の動物が使われることが多い。しかしながら、ウシやブタの長管骨を構成する皮質骨のほとんどは、plexiform bone とよばれる煉瓦状組織の骨である。ヒトやラットの長管骨における皮質骨はオステオン(骨

単位) がみられる Haversian bone であり、plexiform bone とは異なる組織形態である。plexiform bone は急成長する隅蹄類の動物等に特徴的な頑丈な骨で、Haversian bone とは異なる力学的特性を有することが知られており^{2,3)}、ウシ等の動物実験の結果からヒトの皮質骨の力学的挙動を推定するには問題が残る。

Bagi ら⁴⁾は正常ラットと卵巣を切除したラット(卵巣を切除することで骨のミネラル量が減少する)を対象に、DXAを用いて大腿骨頸部のミネラル量であるBMD (Bone Mineral Density, g/cm^2 ; 骨密度あるいは骨塩量と一般に呼ばれている)を測定するとともに、大腿骨頸部に圧縮荷重を作用させて、骨折力およびみかけの剛性に及ぼすBMDの影響について調べた。Akhter ら⁵⁾はマウスの大腿骨および脛骨の皮質骨断面積を求め、DXAによってBMDを測定した。さらに、骨全体に対する3点曲げ試験から力学的評価を行っている。これらDXAによる骨のBMD測定は装置上の原理から、密度測定ではなく単位面積あたりのミネラル量を測定しているために、大きい骨ほどBMDを過大評価するという大きな欠点がある。

これに対して、CTを用いた骨密度測定法(Quantitative Computed Tomography; QCT法)では、単位体積当たりの骨密度(volumetric Bone Mineral Density; vBMD)測定や皮質骨と海綿骨の密度分離測定が可能である。特にpQCT(peripheral QCT)法は末梢骨を対象としたもので、装置が小型であり、被曝線量が低く再現性に優れているという

原稿受付 2004年10月25日

* 正会員 新潟大学医学部 (〒951-8518 新潟県新潟市旭町通2-746)

** 正会員 新潟大学工学部 (〒950-2181 新潟県新潟市五十嵐2-8050)

*** 正会員 新潟工業短期大学 (〒950-2076 新潟県新潟市上新栄町5-13-7)

特徴を有することから最近注目されている。坂本ら⁶⁾はウシ大腿皮質骨およびウシ歯のエナメル質および象牙質を対象にピッカース微小硬さ試験を行うと同時に、走査型超音波顕微鏡を利用して局所弾性率を求め、微小硬さから弾性率を推定する手法を提案し、pQCTによるvBMDと硬さとの関係について示した。Iida-Fukuda⁷⁾は2~30月齢の雄ラットの長管骨を対象にpQCTを用いて月齢の増加に伴うvBMDおよび骨断面積等の変化を求めているが、力学的性質についての実験結果は示していない。Wachterら⁸⁾は23人のヒト大腿骨(56~88歳)の骨幹中央部付近に対してpQCTでvBMDを測定した後、骨軸に対して垂直方向から円柱状皮質骨試験片を採取して圧縮試験を行い、vBMDと弾性率の間には相関があること述べているが、骨の有する材料異方性が実験結果に影響を及ぼしている可能性があり、骨軸方向の弾性率に比べて若干低い弾性率の結果を示しているものと予想される。Kanekoら⁹⁾は9人の新鮮ヒト大腿骨(53~78歳)の骨幹中央部から骨軸方向に摘出した皮質骨を対象にQCTによりvBMDを求めるとともに、圧縮試験等を行い、弾性率とvBMDとの関係について示した。

以上のように、皮質骨におけるvBMDの増減に伴う力学的性質の変化について詳細に検討した例は極めて少ない。週齢の異なるラットを用いれば、比較的広範囲のvBMDに対する力学的性質を明らかにできる可能性があるが、ラット長管骨断面は小さく、通常の材料試験である引張、圧縮、曲げ試験等を行うことは困難である。しかし、ナノインデンテーション試験法^{10)~15)}を適用すれば、極めて微小な対象物について特別形状の試験片を作製することなく、弾性率を求めることが可能である。そこで本研究では、週齢の異なるラット大腿皮質骨に対してpQCTによりvBMDを測定するとともに、ナノインデンテーション試験法を用いて弾性率(ヤング率)および硬さを求め、vBMDとこれら力学的パラメータとの相互関係について明らかにした。

2. 試料および方法

試料には雄の正常Sprague-Dawleyラット(6, 10, 13, 16, 24週齢, それぞれ3個体の両足)より摘出した総計30本の新鮮大腿骨を用いた。屠殺後直ちに左右の大腿骨を取り出し、軟部組織を除去した後、新鮮状態を保つために冷凍保存した。解凍後、大腿骨全長を測定し、その中間部を求めて印を付け、pQCT(XCT-3000, Stratec, Pforzheim, Germany)を用いて骨の断面測定を行った。測定に際してはスキャンビームが骨幹部へ垂直に照射するように留意し、スライス厚さを2mm, ボクセルサイズを0.1×0.1×2.0mmとして、大腿皮質骨の平均vBMDを測定した。

本実験ではFig. 1に示すような手順でラット皮質骨試験片を作製した。初めに、マイクロカッターによって大腿骨骨幹中央部より厚さ2mm程度の骨を骨軸に対して垂直に切出した。試験片は1本の大腿骨につき1個を採取した。試験片表面は平行度および表面粗さを向上させるために1500番の耐水研磨紙で研磨し、最終仕上げに粒度3μm

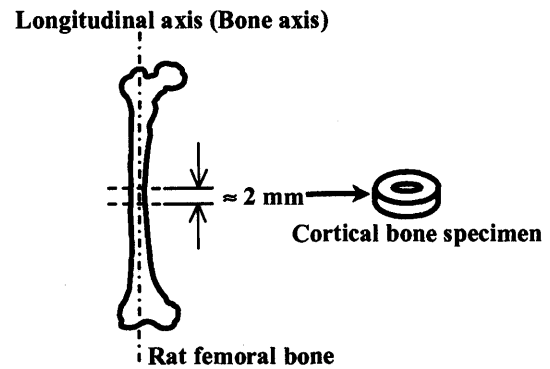


Fig. 1 Schematic diagram of rat femoral cortical bone specimen preparation process.

のダイヤモンドおよび粒度0.04μmのコロイダルシリカを用いて琢磨した。試験片加工中は生理食塩水で骨の湿潤状態を保ち、加工後は試験片表面を超音波洗浄器で洗浄し、試験片は速やかに実験に使用した。

ナノインデンテーション試験法は、微小押込み荷重 P (0.1mN~1961mN)に対応する押込み深さ h を試験の全過程にわたり連続的に測定し、Fig. 2に示すような $P-h$ 曲線として測定することにより、圧子の負荷および除荷過程における材料挙動を一度の試験で知ることが可能である。特に $P-h$ 除荷曲線は、ほぼ対象物の弾性的挙動を反映していると考えられ、これにより弾性率(ヤング率)が求められる。本実験ではFig. 2で示すように、一定の速度で負荷し、設定荷重 P_{max} に達したら一定時間保持した後、負荷と同じ速度で除荷する測定方法を用いた。図中の S は除荷開始初期の $P-h$ 曲線の傾き、 h_{max} は全くぼみ深さ、 h_f は永久くぼみ深さ、 $h_{max}-h_f$ は弾性回復量をそれぞれ示す。

稜間角度115°の三角錐圧子(Berkovich indenter)を用いた場合の硬さ $HT115$ (GPa)は、以下の式を用いて求めることができる。

$$HT115 = \frac{P_{max}}{A_f} = 1.570 \frac{P_{max}}{d^2} \quad (1)$$

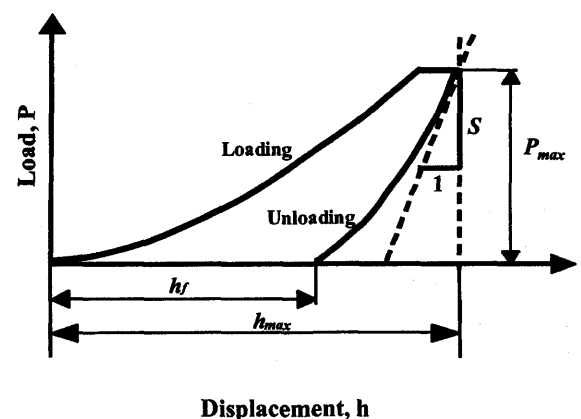


Fig. 2 Typical load-displacement curve obtained by nanoindentation test.

ここで、 A_i は圧痕の表面積、 d (μm)は圧痕底面の垂線の平均長さ、 P_{max} (mN)は最大押し込み荷重である。

一方、皮質骨試験片の弾性率 E_s は、圧子と試験片の接触が弾性接触と仮定することによって、次式を用いて算出することができる^{12),15)}。

$$E_s = \frac{1 - \nu_s^2}{\frac{2\beta}{S} \sqrt{\frac{A}{\pi}} \frac{1 - \nu_i^2}{E_i}} \quad (2)$$

ここで、 ν_s は試験片のポアソン比、 E_i 、 ν_i はそれぞれ圧子の弾性率およびポアソン比であり、 A は圧子と試験片の最大接触面積である。また、 β は圧子形状が弾性率に与える影響を考慮した補正值で、圧子が三角錐の場合は $\beta=1.034$ となる。本実験では、試験片のポアソン比 ν_s を0.3、ダイヤモンド圧子の弾性率 E_i を1140 GPa、圧子のポアソン比 ν_i を0.07として計算を行った¹⁵⁾。

ナノインデンテーション試験は超微小硬度計 (DUH-201S, 島津製作所) を用いて、骨試験片に対してダイヤモンド圧子を骨軸方向から圧入した。このとき、負荷速度を4.4 mN/secとし、押し込み荷重 P_{max} を50 mN、荷重保持時間を30 secと定めた。三角形圧痕の垂線の平均長さ d は試験機に装着された拡大鏡($\times 500$)で読み取った。1つの試験片について10箇所ずつ測定を行い、弾性率および硬さの平均値を求めた。なお、実験中は骨の湿潤状態を保つように留意した。

3. 結果および考察

Fig. 3にラットの週齢とpQCTで得られたvBMDとの関係を示す。本実験で使用した24週齢までのラットは成長過程であり、ラットが6, 10, 13, 16, 24週齢と成長するにしたがい、vBMDは 1040 ± 22 , 1206 ± 18 , 1274 ± 18 , 1333 ± 31 , 1428 ± 9 (mean \pm S.D., mg/cm^3)と単調に増加している。

Fig. 4に6および24週齢のラット皮質骨試験片におけるナノインデンテーション試験で得られた圧痕の典型例を示す。ラット大腿皮質骨組織はおおよそHaversian boneであり、圧痕形状はいずれの測定においてもほぼ正三角形の安定した形状が得られ、圧痕周辺に盛り上がり (pilling-up) や沈み込み (sinking-in) という現象はみられなかった。

ナノインデンテーション試験から得られた押し込み荷重-押し込み深さ曲線 (P - h 曲線) の一例を Fig. 5 に示した。Fig. 5は24週齢ラット皮質骨試験片の結果であり、この P - h 除荷曲線の傾き S から式(2)を用いて算出された弾性率 E_s は19.6 GPaである。他の試験片についても Fig. 5 とほぼ同様の形状の P - h 曲線が得られた。

ラット大腿皮質骨の骨密度 vBMD (mg/cm^3) と弾性率 E_s (GPa) との関係を示す。Fig. 6に示す。 E_s は vBMD が増すにつれて増加する傾向を呈し、本実験で用いた皮質骨の vBMD の範囲内では、両者の関係はほぼ直線で回帰することができる。 E_s と vBMD との間には良好な正の相関 (相関係数: $r=0.80$) が確認できた。 Kaneko ら⁹⁾は9人のヒト大腿骨 (53

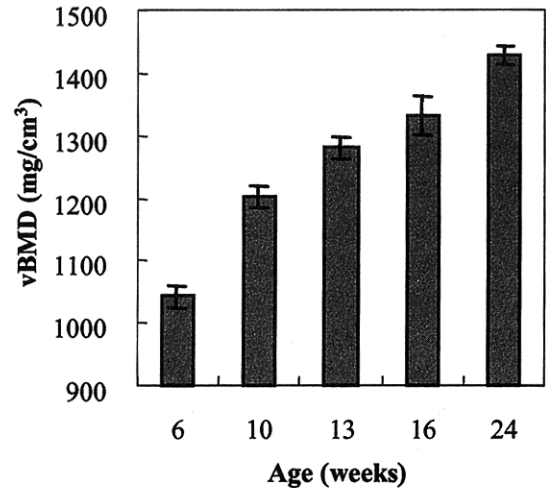
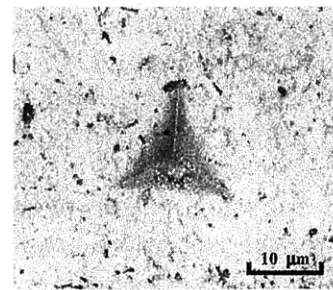
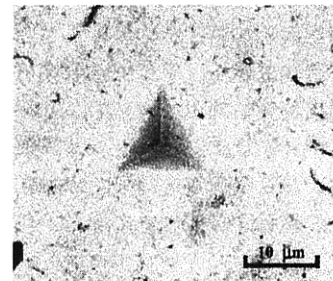


Fig. 3 Changes in volumetric bone mineral density of rats.



6 weeks



24 weeks

Fig. 4 Typical nanoindentations of rat femoral cortical specimens.

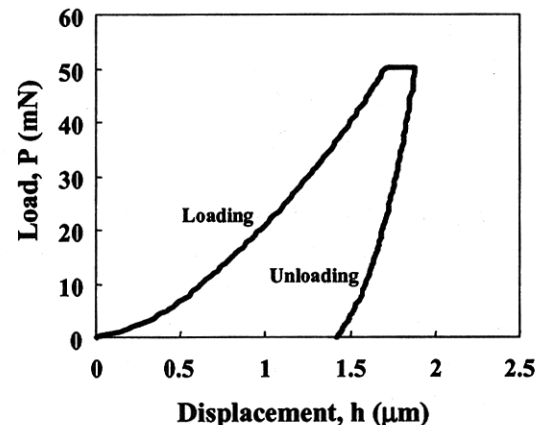


Fig. 5 Typical load-displacement data for a cortical specimen.

～78歳，平均年齢68歳）の骨幹中央部から抽出した50個の皮質骨試験片（全長：15mm，平行部長さ：6mm，5×5mm正方形断面）に対して，QCTによりvBMDを求めるとともに，圧縮試験等を行い，弾性率，極限強さ等とvBMDとの関係について求めている。彼らの結果によれば，実験で使用した皮質骨のほとんどが高齢者のものであったため，vBMDが1200mg/cm³近傍に集中しているものの，本結果と同様に圧縮弾性率とvBMDの間には正の線形的な相関関係（ $r=0.88$ ）が存在することを示している。その報告では，vBMDが1100，1200，1300mg/cm³において弾性率はそれぞれ約18，20，22GPaである。一方，本結果ではvBMDが1100，1200，1300mg/cm³において E_s はそれぞれ17.8，19.3，20.9GPaであり，両者は良い一致を示していることがわかる。

Fig. 7にvBMDと硬さHTI15(GPa)との関係を示した。弾性率の際と同様に，HTI15とvBMDの間にも正の相関（ $r=0.81$ ）がみられた。硬さの力学的意味は容易には解釈されず，いくつかの材料特性が関わりあっていると一般に認められている。しかしながら，硬さ試験では圧痕は試料の塑性変形の結果として形成されるので，骨の強度と硬さには密接な関係があると考えられる。したがって，vBMDと骨の微小破壊との間にも相関性が存在するものと予想される。

本実験のナノインデンテーション試験では，最大押し込み荷重が50mNと比較的大きい荷重による試験である。これは，ラット大腿骨皮質骨試験片の平均的な弾性率や硬さを知るためである。最大押し込み荷重を小さくすることで，皮質骨の微細構造とその力学的性質についてより詳細に調べることができる。さらに，ナノインデンテーション試験法によれば，特別形状の試験片を必要とせず，極めて微小な領域の力学的パラメータ評価が可能であることから，皮質骨のみならず医歯学分野で関心の高い海綿骨の骨梁，仮骨，

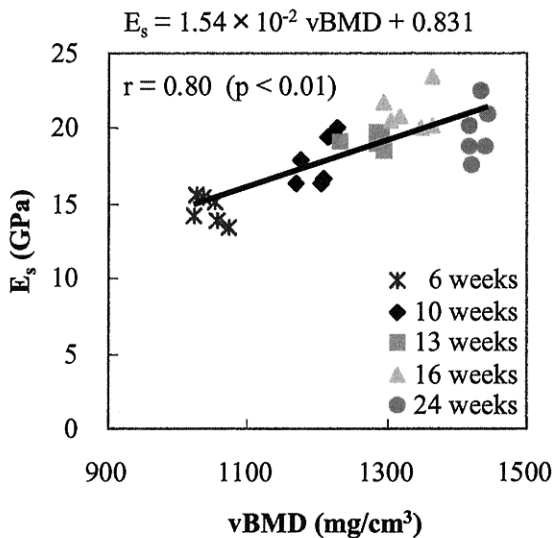


Fig. 6 Relationship between elastic modulus and volumetric bone mineral density.

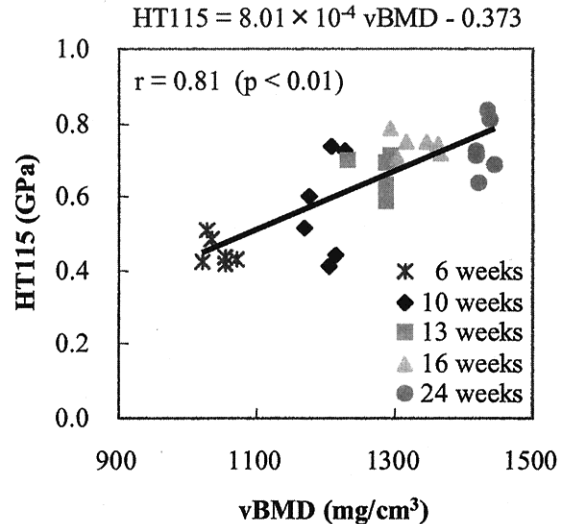


Fig. 7 Relationship between hardness and volumetric bone mineral density.

軟骨，軟骨下骨，セメント質，エナメル質および象牙質等の生体組織に広く適用できる有効な測定法と考えられる。しかしながら，生体組織は一般に弾性異方性を有する。長管骨の皮質骨は異方性主軸がほぼ骨の長軸となる横等方性弾性体とみなすことができる^{16),17)}。本実験では，ほぼ等方性面内の測定であり，異方性の影響を考慮する必要はないが，顕著な異方性を有する組織表面の実験では，ナノインデンテーションで用いる圧子形状や基礎式の検討が必要である。また，一般に皮質骨も含めて生体組織は粘弾性的特性を有することが知られている。皮質骨のナノインデンテーション試験において圧子の負荷速度が上昇するとともに，測定される弾性率も上昇傾向にあることを最近 Fan-Rho¹⁸⁾が指摘していることから，圧子の負荷速度が皮質骨の弾性率や硬さに及ぼす影響についても詳細な検討が必要である。これらに加えて，ナノインデンテーションで得られた骨組織の硬さと微小破壊との関係について明らかにすることが今後の課題と考えている。

4. 結言

週齢の異なるラット大腿骨の骨幹中央断面の皮質骨を対象にナノインデンテーション試験を行い，弾性率および硬さ測定し，pQCTによって求めたvBMDとの関係について検討した。その結果，以下のような知見を得た。

- (1) ラット皮質骨のvBMDは6～24週齢の範囲で約1040～1428mg/cm³と増加した。
- (2) 骨の弾性率および硬さとvBMDの間には，いずれも良好な正の相関がみられた。
- (3) ラット大腿皮質骨の弾性率とvBMDとの相関は，ヒト大腿皮質骨の相関関係と定量的にほぼ一致した。

本研究の一部は，日本学術振興会基盤研究(c) #15560064の補助によるものであり，ここに記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋英明: 骨の科学, 医歯薬出版(1988), 110-128.
- 2) 坂本信, 村田光昭, 池田茂, 坂井淳, 原利昭: 皮質骨の微小硬さ評価, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 19(1998), 291-296.
- 3) Sakamoto, M., Sato, K., Kobayashi, K., Sakai, J., Tanabe, Y. and Hara, T.: Nanoindentation Analysis of Mechanical Properties of Cortical Bone, *Proc. The First Asian Pacific Conference on Biomechanics*, 04-203(2004), 43-44.
- 4) Bagi, C. M., Ammann, P., Rizzoli, R. and Miller, S. C.: Effect of Estrogen Deficiency on Cancellous and Cortical Bone Structure and Strength of the Femoral Neck in Rats, *Calcif. Tissue Int.*, 61(1997), 336-344.
- 5) Akhter, M. P., Iwaniec, U. T., Covey, M. A., Cullen, D. M., Kimmel, D. B. and Recker, R. R.: Genetic Variations in Bone Density, Histomorphometry, and Strength in Mice, *Calcif. Tissue Int.*, 67(2000), 337-344.
- 6) 坂本信, 五十嵐英幸, 丸橋洋一, 坂井淳: 硬組織の微小硬さによる局所弾性率の評価, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 22(2001), 51-57.
- 7) Iida, H. and Fukada, S.: Age-Related Changes in Bone Mineral Density, Cross-Sectional Area and Strength at Different Skeletal Sites in Male Rats, *J. Vet. Med. Sci.*, 64(2002), 29-34.
- 8) Wachter, N. J., Krischak, G. D., Mentzel, M., Sarkar, M. R., Ebinger, T., Kinzl, L., Claes, L. and Augat, P.: Correlation of Bone Mineral Density with Strength and Microstructural Parameters of Cortical Bone in Vitro, *Bone*, 31(2002), 90-95.
- 9) Kaneko, T. S., Pejicic, M. R., Tehranzadeh, J. and Kayak, J. H.: Relationships between Material Properties and CT Scan Data of Cortical Bone with and without Metastatic Lesions, *Med. Eng. Phys.*, 25(2003), 445-454.
- 10) Doerner, M. F. and Nix, W. D.: A Method for Interpreting the Data from Depth-Sensing Indentation Instruments, *J. Mater. Res.*, 1(1986), 601-609.
- 11) Nix, W. D.: Elastic and Plastic Properties of Thin Films on Substrates: Nanoindentation Technique, *Mater. Sci. Eng.*, A234(1997), 37-44.
- 12) Oliver, W. C. and Pharr, G. M.: An Improved Technique for Determining Hardness and Elastic Modulus, *J. Mater. Res.*, 7(1992), 1564-1580.
- 13) Rho, J. Y., Roy II M. E., Tsui, T. Y. and Pharr, G. M.: Elastic Properties of Human Cortical and Trabecular Lamellar Bone Measured by Nanoindentation, *Biomaterials*, 18(1997), 1325-1330.
- 14) Silva, M. J., Brodt, M. D., Fan, Z. and Rho, J. Y.: Nanoindentation and Whole-Bone Bending Estimates of Material Properties in Bones from the Senescence Accelerated Mouse SAMP6, *J. Biomech.*, 37(2004), 1639-1646.
- 15) Roh, J. Y., Roy II, M. E., Tsui, T. and Pharr, G. M.: Elastic Properties of Microstructural Components of Human Bone Tissue as Measured by Nanoindentation, *J. Biomed. Mater. Res.*, 45(1999), 48-54.
- 16) Reilly, D. T. and Burstein, A. H.: The Elastic and Ultimate Properties of Compact Bone Tissue, *J. Biomech.*, 8(1975), 393-405.
- 17) Dong, X. N. and Guo, X. E.: The Dependence of Transversely Isotropic Elasticity of Human Femoral Cortical Bone on Porosity, *J. Biomech.*, 37(2004), 1281-1287.
- 18) Fan, Z. and Rho, J. Y.: Effects of Viscoelasticity and Time-Dependent Plasticity on Nanoindentation, *J. Biomed. Mater. Res.*, 67A(2003), 208-214.