

関節軟骨の微細構造に着目した股関節モデルの構築

特定チーム（課題番号：177202）

研究期間：平成 29 年 7 月 26 日～平成 30 年 3 月 31 日

研究代表者：大澤恭子

研究背景と目的

骨・軟骨の不可逆な病変を惹起する関節疾患には、できる限り早期の対処が重要である。股関節など荷重支持関節の関節疾患病変には力学的因子の影響が大きい。特に変形性関節症では骨よりも先に関節軟骨の病変が発現するとされるが、軟骨力学特性が変化する段階はこれまで無症候とされてきたため、軟骨病変と骨病変との因果関係に関する研究はきわめて不十分である。

関節軟骨は接触荷重や衝撃荷重から関節の骨を保護する結合軟組織であり、荷重の伝達や分配といった役割を果たす。関節軟骨の全体積の約80%は間質液、残り20%は主にコラーゲン線維（乾燥体積50～75%）とプロテオグリカン（PG, 乾燥体積30～35%）から成る細胞外マトリックスで構成される。軟骨の荷重支持は主に細胞外マトリックスによる。これらは軟骨深さに依存して変化する層状の微細構造を形成し、軟骨の力学特性と応力緩和などの粘弾性挙動に多大な影響を及ぼす^{1), 2)}。軟骨変性は軟骨の組織組成や構造の異常を誘発する。

正常な軟骨力学特性は、その構造変化に応じてその弾性係数が深さ（骨）方向に進むに従い高値を示す³⁾。軟骨の透水性は低く、軟骨の変形に伴う間質液移動の大きな抵抗となって、関節に生じる荷重を緩和する粘弾性機能を付与している。軟骨の粘弾性特性は、従来、静的あるいは動的粘弾性試験で観察されるバルク組織としての挙動に基づき検討されてきた。しかしながら、軟骨を巨視的に等方で均質なバルク組織と仮定する従来の評価手法では、圧縮試験などの力学試験結果から変性の影響を軟骨深さ方向に解析することは不可能である。軟組織の正常および病理的機能に対する理解を深め、組織の弾性特性分布を推定するためには、関節軟骨の微細な構造特性に着目した3次元数理モデルが必要となる。代表者は、これまで“微細構造に基づく軟骨力学モデル”を考

案し、数値解析による軟骨力学環境の定量的評価を可能とした⁴⁾。この軟骨力学モデルを用いて推定した正常軟骨の弾性係数分布は、関節表面に比べて骨側が高値を示す実験報告³⁾と同じ傾向が得られた。

軟骨微細構造は組織の力学特性に影響を及ぼすことから、粘弾性試験時におけるバルク組織中の局所的な変形挙動に関する知見は、非常に重要である。軟骨微細構造の詳細な情報を得るために、軟骨組織に静的および周期的な圧縮負荷を与え、その粘弾性応答に関するコラーゲンの配向性と密度分布の変化、特に骨-軟骨移行部における変化に着目して位相差X線CT計測を行う。X線位相イメージングは、吸収コントラストによるイメージングでは認識できないような軟組織中の僅かな密度差も可視化できる極めて高感度な測定手法である^{5), 6)}。本研究では、微細構造に基づく軟骨力学モデルの再現性を向上させるため、時系列X線位相イメージングを用いて関節軟骨の局所的な組織変形に関するデータの取得を試みる。

方法

微細構造に基づいた軟骨力学モデル

大澤らが提案した軟骨微細構造を考慮した粘弾性モデルでは、コラーゲン線維と軟骨細胞が介在したPGマトリックスとしてモデル化した粘弾性の軟骨固相を組み込んだ二相複合材料とした⁴⁾。軟骨の典型的な二相モデルの支配方程式⁷⁾を次式に示す。

$$\text{連続の式：} \quad \nabla \cdot (\phi^s \mathbf{v}^s + \phi^f \mathbf{v}^f) = 0 \quad (1)$$

$$\text{運動量方程式：} \quad \nabla \cdot \boldsymbol{\sigma}^\alpha + \Pi^\alpha = 0 \quad \alpha = s, f \quad (2)$$

$$\text{構成式：} \quad \boldsymbol{\sigma}^s = -\phi^s p \mathbf{I} + \boldsymbol{\sigma}_e^s \quad (3a)$$

$$\boldsymbol{\sigma}^f = -\phi^f p \mathbf{I} \quad (3b)$$

$$\Pi^f = -\Pi^s = \frac{(\phi^f)^2}{k} (\mathbf{v}^s - \mathbf{v}^f) \quad (4)$$

ここで、 σ^s は固相の応力、 σ^f は液相の応力、 σ_ξ^s は固相の有効応力テンソル、 ϕ^s 、 ϕ^f はそれぞれ固相と液相の体積分率であり、 $\phi^s + \phi^f = 1$ を満たす。また、 p は見かけの圧力、 I は単位テンソルである。 Π^s 、 Π^f はDarcyの法則に基づいた拡散運動量の変化量である。 v^s 、 v^f は固相と液相の速度、 k は軟骨内の液体の透水性を表す。

固体マトリックスに対する間質液の流動に起因する粘性だけでなく、軟骨固相自身も粘弾性を示すことが知られている。固体マトリックスはコラーゲン線維ネットワークと軟骨細胞、PGマトリックスからなる。PGは静的力学挙動に関与し、コラーゲンネットワークは主に組織内の即時的な力学応答に関与していると報告^{8), 9)}されている。本モデルではPGマトリックスと軟骨細胞は線形弾性体、コラーゲン線維はバネ要素とダッシュポット要素からなる一般的なMaxwellモデルとしてモデル化した。軟骨微細構造の異方性の扱いとして、固体マトリックスは深さに依存した横等方性を仮定した¹⁰⁾⁻¹²⁾。これにより、固相は等方なPG基質マトリックスと軟骨細胞やコラーゲン線維といったEshelby理論に基づく回転楕円介在物で表される。それらの異方性と不均質性（組成

の濃度分布）とを考慮すると軟骨固相の弾性応力とひずみの関係式は以下で表される。

$$\sigma_e^s(\xi, t) = \int_0^t G(\xi, t-s) \frac{\partial \varepsilon(s)}{\partial s} ds \quad (5a)$$

$$G(\xi, t) = C_{PG}(\xi) + C_{cel}(\xi) + C_{fib}(\xi) + GC_{fib}(\xi) \sum_i^{ts, tm, tl} \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (5b)$$

ここで、 ξ は無次元軟骨厚さ、 t は時間、 Cr は成分 r の横等方弾性テンソルであり、 $r = PG$ はPGマトリックス、 cel は軟骨細胞、 fib はコラーゲン線維を示す。3つの離散型時定数 (τ_i , $i = ts, tm, tl$) は、短時時定数 (τ_{ts}) と長時時定数 (τ_{tl})、および τ_{ts} と τ_{tl} の中間時定数 ($\tau_{tm} = \sqrt{\tau_{ts} \tau_{tl}}$) である。モデルの簡単化のため、コラーゲン線維粘弾性要素とコラーゲン線維の定常緩和弾性テンソル C_{fib} とが緩和定数 G で比例するとした。ここで、PGマトリックス、軟骨細胞、コラーゲン線維、各成分の C_r は以下のように定義する。

$$C_{PG}(\xi) = [d_{PG}(\xi) L_{PG}] \cdot [d_{PG}(\xi) I + d_{cel}(\xi) A_{cel}(\xi) + d_{fib}(\xi) \int_{s^2} \varphi(\xi) A_{fib} da]^{-1}, \quad (6a)$$

$$C_{cel}(\xi) = [d_{cel}(\xi) L_{cel} A_{cel}(\xi)] \cdot [d_{PG}(\xi) I + d_{cel}(\xi) A_{cel}(\xi) + d_{fib}(\xi) \int_{s^2} \varphi(\xi) A_{fib} da]^{-1}, \quad (6b)$$

$$C_{fib}(\xi) = [d_{fib}(\xi) \int_{s^2} \varphi(\xi) L_{fib} A_{fib} da] \cdot [d_{PG}(\xi) I + d_{cel}(\xi) A_{cel}(\xi) + d_{fib}(\xi) \int_{s^2} \varphi(\xi) A_{fib} da]^{-1}. \quad (6c)$$

ここで、 d_r は r 成分の固体マトリックス内における体積分率 ($d_{PG} + d_{cel} + d_{fib} = 1$)、 L_r は r 成分の弾性係数 E_r とそのポアソン比から求められる等方弾性テンソルである。 A_r は r 成分のひずみ集中テンソルであり、基質マトリックスおよび r 成分それぞれの等方弾性テンソルと r 成分のEshelbyテンソルから得られる。Eshelbyテンソルは、基質マトリックスのポアソン比と軟骨細胞やコラーゲン線維といった回転楕円介在物形状の長短軸のアスペクト比とから算出される¹⁰⁾。軟骨細胞は軟骨深さに依存して変化するアスペクト比をもつ回転楕円介在物として表現する¹²⁾。また、コラーゲン線維は直線的な線維介在物（アスペクト比無限大とした回転楕円介在物）とし、正規確率密度分布関数 φ で表される深さ方向に依存して異なる線維配向を示す^{11), 12)}。 S^{2+} はコラーゲン線維配向を考慮するために用いる単位半球体の表面積である。これにより、本モデルは二相、粘弾性、微細構造に依存した組織の異方性と不均質性をもつ力学挙動を表現できる。本研究では、式 (6) 中の軟骨深さの関数であるコラーゲン濃度（体積分率）分布 $d_{fib}(\xi)$ に対し、位相差X線CT撮像により得られたコラーゲン密度の情報の応用を考える。

位相差 X 線イメージングによる軟骨観察

関節軟骨の微細構造は、位相差X線CTを用いて軟骨内部のコラーゲン構造や濃度分布を計測する。位相差X線CTは極めて高い密度分解能を有し、軟骨のように比較的X線吸収が低く、密度変化の小さい試料の計測に有効である。試験片として、食用ブタの膝関節軟骨を表層から軟骨下骨まで円柱状（直径4 mm、厚み2 - 3 mm）に成型した。軟骨試験片は比較的軟骨が厚い膝関節軟骨を用いた。生理食塩水中で試験片下面を固定し、アクリル製圧子にて上面より周期的圧縮を加える。周期的圧縮時の軟骨変形のダイナミクスを位相差X線CTにより計測し、圧子に実装したロードセルで作用荷重を同時モニタリングする。モニタリングされた変位と作用荷重を用いて軟骨内部の不均質な弾性特性分布を推定する。

実験・撮像は、大型放射光施設SPring-8のBL20B2の第1実験ハッチで行った。位相差X線CTを行うために、図1の回折格子を用いたタルボ干渉計を用いた。タルボ干渉計は、位相差格子G1と吸収格子G2によって構成され、X線画像検出器として可視光変換型画像検出器を用いた。撮像システムは、光学系上流部から試料、G1、G2、X線画像検出器の順番で並んでおり、G1とG2

間の距離（タルボ距離）は245mm, G2の走査による微分位相像取得のためのフリンジスキャンステップ数は5ステップとした。X線エネルギーは20keV, 画素サイズは8 μ mである。動的圧縮試験では, 初期荷重は5Nとし, ひずみ振幅5%, 周波数0.5Hz, の荷重—除荷後に2sec休止する断続的な三角波の繰り返し圧縮を与え, 平衡時に計測するため与圧縮を50回繰り返した後撮像した。撮像では, 投影数は900投影(×5ステップのフリンジスキャン), 露光時間40msec/imageとした。

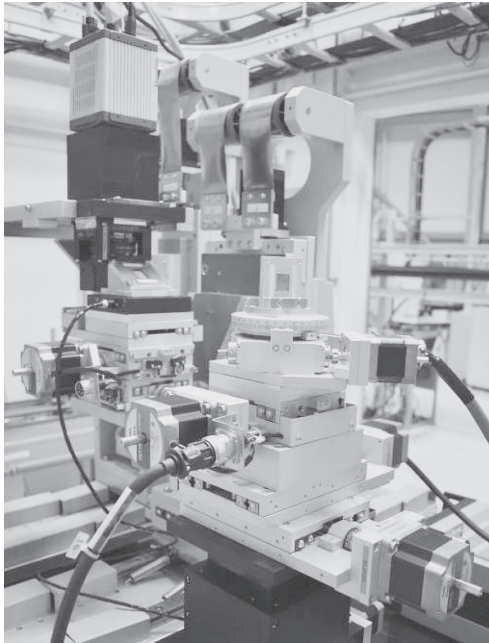
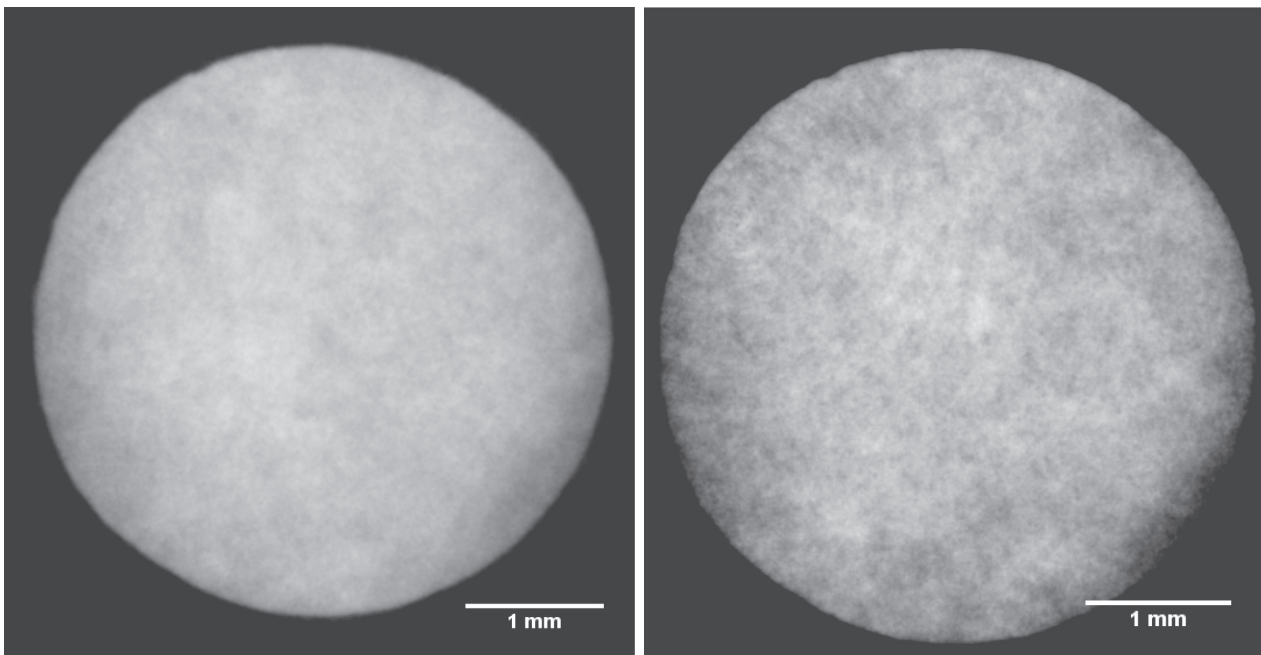


Fig.1 Talbot grating interferometer

結果と考察

初期荷重を静的に負荷したときの膝関節軟骨の位相差X線CTで撮像した表層部の横断層像を図2aに示す。図2bは周期的荷重における最大荷重を負荷した時の表層部の横断面画像である。図2aと図2bはともに表層ではあるが, 同じ位置の断層ではない。図3aは静的な初期荷重を与えたときの軟骨表面から軟骨下骨までの断面像, 図3bは最大荷重負荷時の結果である。図2および図3は軟骨の輝度値にコントラストを調整している。図中上方が観察表面に当たる。軟骨試験片と固定治具との境界部が白く写っているのは, 軟骨組織とアクリル製固定具または骨部でハレーションが起きたと考えられる。横断面像においては, 表層部はもちろん深層部においても軟骨組織内の不均質な密度分布が見られた。特に深層部ではスポンジの断面のような多孔状の密度分布が確認できた。関節表面から骨までが観察できる断面像では関節表面付近の表層の方が深層よりも密度が低い結果となった。軟骨の細胞外マトリックスにおいてコラーゲンは, 表層は関節面と平行, 中間層はランダム, 深層では関節面と垂直に配向する¹³⁾。計測された密度分布は, 細胞外マトリックスの不均質な微細構造に相当していると考えられる。コラーゲン線維は軟骨細胞の周りを取り囲むように生成され, 細胞は表層では円盤形状, 中間層では球形, 深層では紡錘状でさらに細胞が数個凝集する。断面画像における密度が低い部分には軟骨細胞があると推測される。圧縮を加えたときの試験片は, 特に表層が大きく側方に変形した。動的圧縮試験においても静的圧



a) Static Pre-loading (surface layer)

b) Max loading (surface layer)

Fig.2 Transverse section of articular cartilage

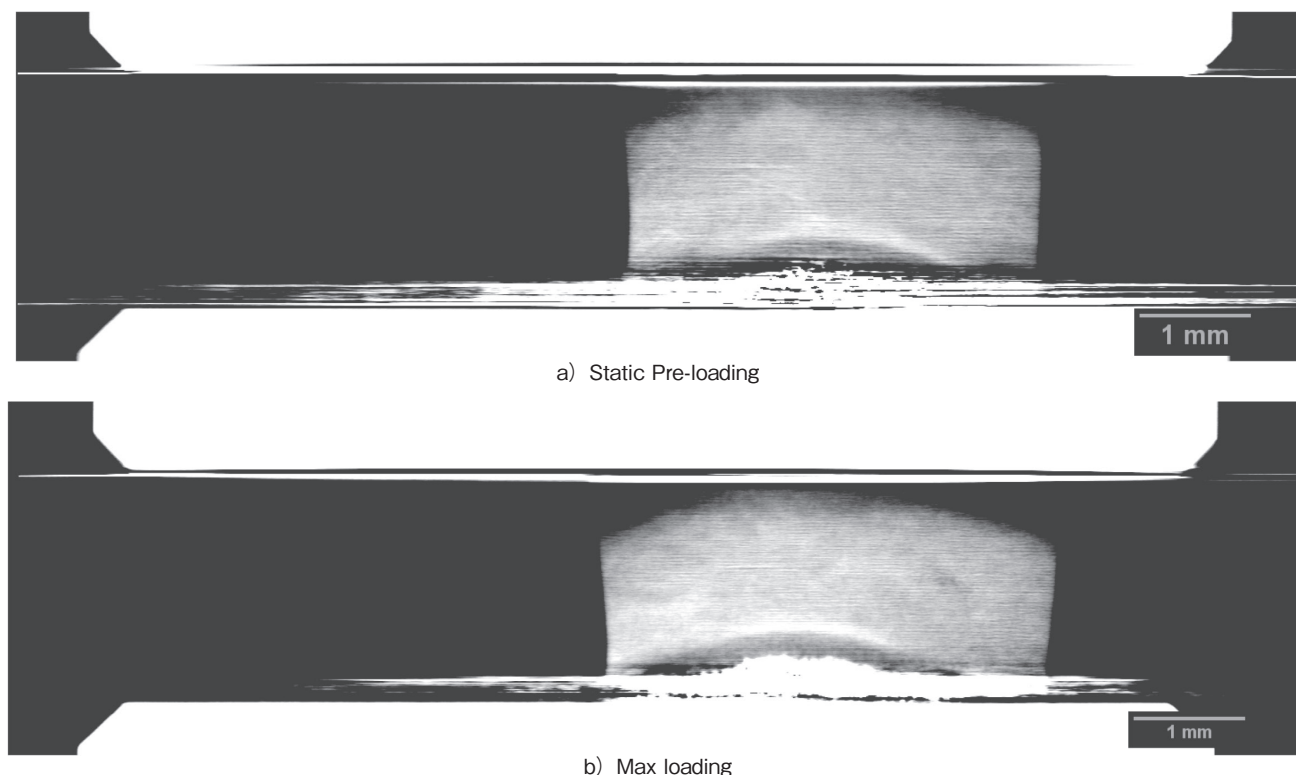


Fig.3 Cross- section of articular cartilage

縮時と同様、表層と深層における密度の分布を詳細に観察することができた。しかしながら、動的試験時の撮像画像は、試験中に内部構造が変形しているため、静的状態で撮像した画像よりも画質が荒いものとなった。また、動的圧縮では繰り返し圧縮による変形が除荷時に十分に回復できず、試験片の上下面が圧子から外れた試験片もあったことから、荷重負荷条件や試験片の固定法など、力学試験手法に対するさらなる検討が必要である。

まとめと展望

X線位相差イメージングにより、関節軟骨内部の不均質な密度分布の撮像に成功し、動的試験と同時に内部の局所変形の情報入手に関する手応えを得た。軟骨表層と深層における密度分布の違いは、軟骨細胞外マトリックスのコラーゲン繊維の層構造に起因していると考えられる。本撮像により得られたコラーゲンの微細な構造に起因する密度分布は、これまでにない実測データであり、これを利用することにより力学モデルの精度を飛躍的に向上できる可能性が示唆された。本結果を入力データとした微細構造に基づく軟骨力学モデルを用いて推定した軟骨内弾性係数分布を軟骨の材料特性とすることで、軟骨力学特性の再現性を高めた股関節モデルを構築する。しかしながら、X線位相差イメージングにおいて粘弾性特性を評価可能な周期的荷重の負荷と同時に軟骨内部の局所変形を詳細にとらえるためには、荷重負荷条件や試

験片の固定法など、力学試験手法に対するさらなる検討が必要である。

本研究を予備実験として発展させ、力学試験手法を見直した結果、既に2018年前期のSPring-8利用課題として採択（課題番号：2018A1394）され、その共同実験者として計測に携わり、その結果は12月に日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会にて成果発表する予定である。

謝辞

本研究の一部は、福岡大学研究推進部の研究経費によるものである。（課題番号：177202）

参考文献

- 1) Xia Y, Moody JB, Alhadlaq H, Wurster NB, Lust G: Characteristics of topographical heterogeneity of articular cartilage over the joint surface of a humeral head. *Osteoarthritis and Cartilage* 10(5): 370-380. 2002.
- 2) Korhonen RK and Herzog W: Depth-dependent analysis of the role of collagen fibrils, fixed charges and fluid in the pericellular matrix of articular cartilage on chondrocyte mechanics. *Journal of Biomechanics* 41 (2): 480-485. 2008.

- 3) 村上輝夫: 関節軟骨・軟骨細胞のマイクロ・ナノバ
イオメカニクス. 生体医工学 46(1): 5-10. 2008.
- 4) 大澤 恭子, 松本 健志, 内藤 尚, 田中 正夫: 微細
構造を考慮した力学モデルに基づく軟骨の変性評
価. 生体医工学 49(1): 116-121. 2011.
- 5) 星野真人, 上杉健太郎, 八木直人: BL20B2における
X線位相差CTの現状報告. SPring-8 利用者情報 17
(1): 33-37. 2012.
- 6) Hoshino M, Uesugi K., Tsukube T., and Yagia
N.: Quantitative and dynamic measurements of
biological fresh samples with X-ray phase contrast
tomography. *Journal of Synchrotron Radiation* 21
(6) 1347-1357. 2014.
- 7) Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong CG:
Biphasic creep and stress relaxation of articular
cartilage in compression: theory and experiments.
Journal of Biomechanical Engineering 102(1): 73-
84. 1980.
- 8) Korhonen RK, Laasanen MS, Töyräs J,
Lappalainen R, Helminen HJ, Jurvelin JS: Fibril
reinforced poroelastic model predicts specifically
mechanical behavior of normal, proteoglycan
depleted and collagen degraded articular cartilage.
Journal of Biomechanics 36(9): 1373-1379. 2003.
- 9) Julkunen P, Harjula T, Marjanen J, Helminen HJ,
Jurvelin JS: Comparison of single-phase isotropic
elastic and fibril-reinforced poroelastic models for
indentation of rabbit articular cartilage. *Journal of
Biomechanics* 42(5): 652-656. 2009.
- 10) Eshelby JD: The determination of the elastic field
of an ellipsoidal inclusion, and related problems.
*Proceedings of the Royal Society of London Series
A241(1226): 376-396. 1957.*
- 11) Federico S, Grillo A, Herzog W: A transversely
isotropic composite with a statistical distribution
of spheroidal inclusions: a geometrical approach
to overall properties. *Journal of Mechanics and
Physics of Solids* 52(10): 2309-2327. 2004.
- 12) Federico S, Grillo A, Rosa GL, Giaquinta G,
Herzog W: A transversely isotropic, transversely
homogeneous microstructural-statistical model of
articular cartilage. *Journal of Biomechanics* 38(10):
2008-2018. 2005.
- 13) Xia, Y. and Elder, K.: Quantification of the
graphical details of collagen fibrils in transmission
electron micrographs. *Journal of Microscopy*. 204
(1): 3-16. 2001.