

# 皮質骨の曲げ特性に及ぼすホルマリン保存の影響

菊川久夫<sup>\*1</sup>・淺香 隆<sup>\*2</sup>・康井義明<sup>\*3</sup>

## The Effect of Formalin Preservation on Bending Properties of Bovine Compact Bone

by

Hisao KIKUGAWA, Takashi ASAKA and Yoshiaki YASUI

(Received on Mar. 20, 2002, accepted on Jul. 26, 2002)

### Abstract

The effect of formalin preservation on the mechanical bending properties of bovine cortical bone was examined. Samples were taken from Haversian and Plexiform bone in the vicinity of the portion of one-third of the shaft of the bovine femur center. Specimens of the formalin preservation group were prepared in the same way as the normal group specimen and preserved in 250ml of a 10 vol% formaldehyde aqueous solution. The period of formalin preservation was 7 days. There was an increasing tendency in bending stiffness with formalin preservation and a significant decreasing tendency in bending strength with formalin preservation for the Haversian bone specimen. Based on the results, the effect of formalin preservation on the material property is discussed with regard to bone structure.

**Keywords:** Bone biomechanics, Compact bone, Bending property, Formalin preservation, Fracture pattern

### 1. はじめに

近年, CAE のスポーツ工学への適用が進み, 有限要素法(FEM)が整形外科領域の各種骨折の力学シミュレーションに用いられるようになった。

しかし, 力学的特性をはじめとする骨の物性評価が統一的手法により把握されていないため, シミュレーション結果の信頼性については疑問の残るところである。

特に, 実験室レベルにおいて, 骨折挙動や骨の機械的特性を正確に決定するために, 保存の影響は最小限に保たなければならぬが, 入手される試料は必ずしも統一された保存処理がなされているわけではない。よって, その保存方法や保存期間が骨の物性に与える影響を明らかにする必要がある。しかし, 骨の力学的特性に与える保存の影響を調査した研究は, 冷凍保存に関する報告例がほとんどである<sup>1)</sup>。

一方, 医学分野においてホルマリンはホルムアルデヒドが持つタンパク質を不可逆的に凝固させる性質を利用し, 防腐剤や保存剤として解剖死体等の保存によく用いられているが, 骨の力学的特性に対するホルマリン保存の影響について調べた報告例は田中<sup>2)</sup>らの研究以外に見当たらない。

また, ヒト長管骨の骨折においては, 主に曲げにより骨の破壊が生じると考えられるが, 骨のような不均質な断面には, 曲

げ応力のみならずせん断応力も複合的に生じているはずである。よって純粋な曲げによる物性評価だけでなく, 複合応力下による力学試験も必要である。

そこで本研究では, ホルマリン保存がウシ皮質骨の曲げ特性に与える影響について, せん断応力が生じる比較的試験片幅/スパン比の大きい試験片を用いて検討したので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試験片

試料は-30°Cで冷凍保存された生後約24ヶ月, 体重約400kgの新鮮なウシ大腿骨の皮質骨を用いた。Fig.1に示すように, 大腿骨の中央骨幹部よりその横断面を前方(Anterior), 後方(Posterior), 外側(Lateral)および内側(Medial)に4分割し, この各部位よりFig.2に示すような板厚3mmの試験片をできる限り近接した部分から2個づつ機械加工により製作した。2個の試験片はNormal群およびホルマリン(10%ホルムアルデヒド水溶液)保存7日群に分け, 試験に供した。

長管骨の皮質骨は, 無機質成分のハイドロキシアパタイトと有機質成分である骨軸方向に主に配向されたコラーゲン線維から構成される。ウシ大腿骨中央部の皮質骨はFig.3に示すように, Posterior部分近傍はハバース骨(Haversian bone)であり, Anterior, LateralおよびMedial部分は板状骨(Plexiform bone)である。

\*1 第二工学部機械工学科講師

\*2 工学部応用化学科講師

\*3 工学部動力機械工学科教授

そしてハバース骨に比べて板状骨は構造が均一で安定した組織と考えられており、大型哺乳類などの皮質骨の大部分はこの種の骨である<sup>3)</sup>。強度もハバース骨に比べて一般的に高く、多くの Lamina からできており、これらの間に血管吻合網が存在する。一方、ハバース管は同心円状の Lamella を持った、骨軸方向 (Longitudinal) に配向する骨単位 (Osteon) より構成され、その中心部には血管であるハバース管 (Haversian canal) がある。

垂直断面 (Tangential あるいは Radial 方向) においては、ハバース管の間を連結するフォルクマン管 (Volkmann's canal) が血管を入れている<sup>3)</sup>。

本研究では、これら両皮質骨を実験に用いた。なお、採取した試験片はあらかじめ電子天びん (エー・アンド・ディ、HF-200) により質量の測定を行い、試験片の体積で除して見かけの骨密度を算出した。骨密度は骨の機械的特性に影響を与えるため、その統計学的評価も行った。

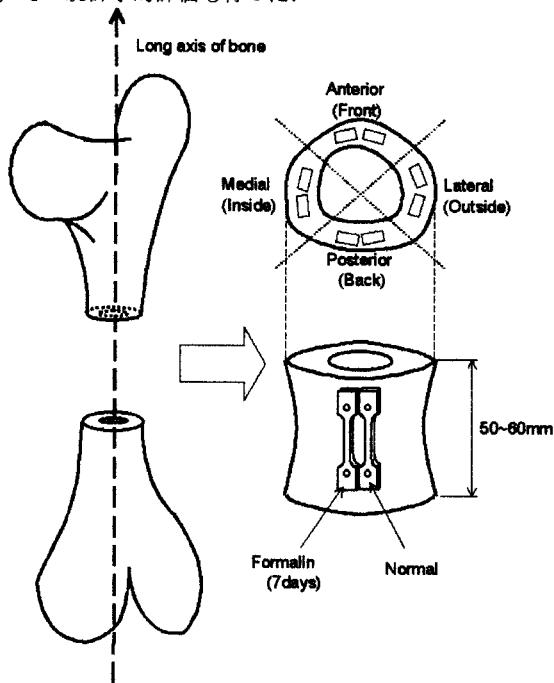


Fig.1 Specimen preparation.

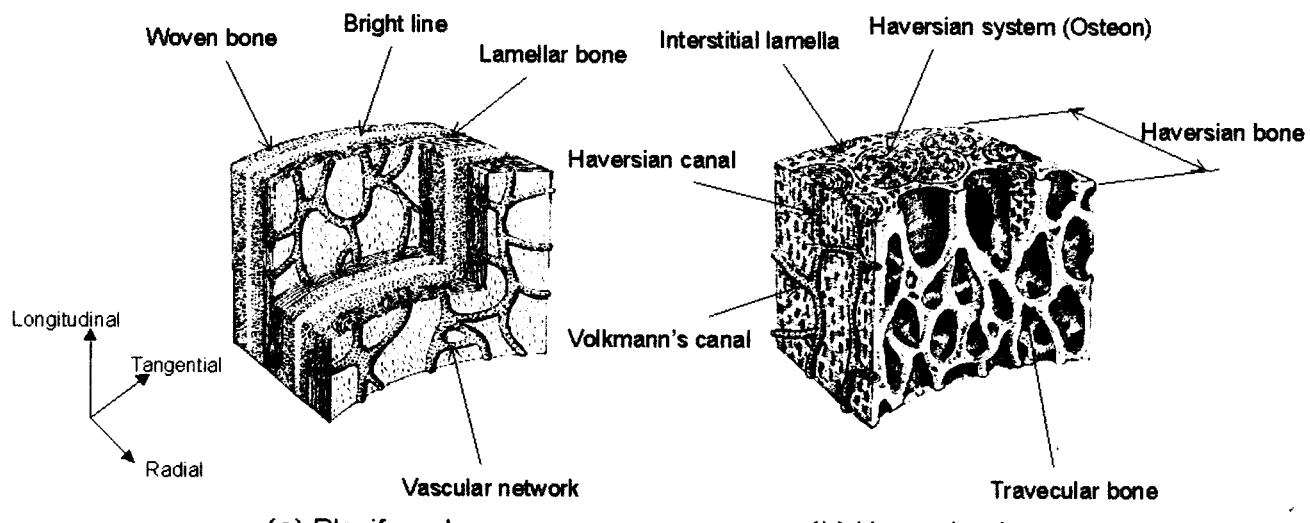


Fig.3 Schematic illustration of the microstructure of Plexiform and Haversian bone<sup>3)</sup>.

## 2.2 実験装置

三点曲げ試験はインストロン材料試験機(Model 1000)を用い、負荷速度を 20mm/min に設定して行った。Fig.4 に示すような特製の試験片取り付け治具を用い、試験片の上部より荷重を加え、破断に至るまで負荷を行った。そして、この時の試験片のたわみ量  $\delta$  と荷重  $P$  を測定し、荷重-変位曲線を描いた。

## 2.3 三点曲げ試験片の変形と応力の関係式

短形断面を有するはりが曲げモーメント  $M$  を受ける場合の曲げ応力  $\sigma$  は式(2.1)で与えられる。

$$\sigma = \frac{M}{Z} = \frac{3Pl}{2bh^2} \quad (2.1)$$

ここで、 $b$  および  $h$  は試験片の横断面の幅および高さ、 $Z$  ははりの断面係数 ( $=bh^2/6$ )、 $P$  は荷重、 $l$  は試験片のスパンの長さである。

骨のように不均質な材料の場合、はりの断面にはせん断応力が存在し、また、試験片の長さがはりの寸法に対し小さい場合にはせん断力を考慮する必要がある。せん断力によるはりのせん断応力  $\tau$  および三点曲げによるたわみ  $\delta$  は、それぞれ式(2.2)、式(2.3)<sup>4)</sup> で与えられている。

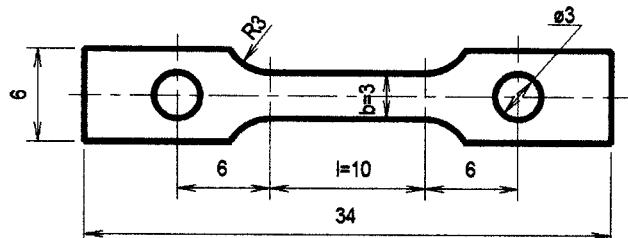


Fig.2 Test specimen (in mm).

$$\tau = \frac{3P}{4bh} \quad (2.2)$$

$$\delta = \frac{Pl^3}{48EI} \{1 + 2.85(h/l)^2 - 0.84(h/l)^3\} \quad (2.3)$$

ここで、 $I$ ははりの断面二次モーメント( $=bh^2/12$ )である。

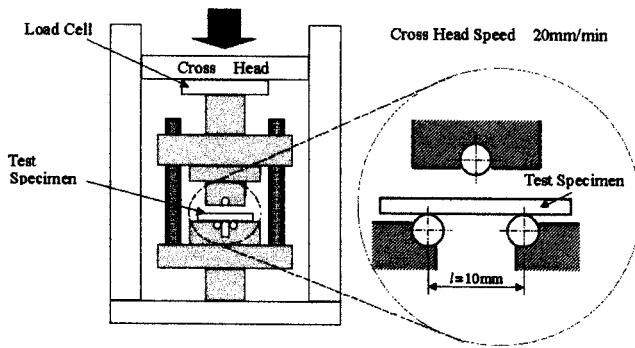


Fig.4 Three-points bending test.

### 3. 骨試験片の形状と異方性の影響

いま、脛骨骨管部の長さを 250mm、中央骨幹部の横断面の形状を外径 32mm および内径 22mm の中空円筒のはりと考え、中央に集中荷重を受ける両端支持はりと単純化して計算すれば、はりの曲げ応力  $\sigma$  とせん断応力  $\tau$  の比は約 10 と見積られる。

また、上記計算例に加え、生理的荷重下において骨内部は多軸応力状態となり、その複雑な骨形状からも骨内にさらに  $\tau$  の大きい状態が生じると考えられる。そこで本研究は  $\sigma/\tau < 10$ 、 $h/l = 0.3$  となるよう試験片を Fig.2 の形状に設定した。

また、骨は軸方向の弾性率が最も大きいという異方性を示すため、はりの形状とともにこれらがはりの曲げ弾性率  $E_b$  および曲げ応力  $\sigma$  に与える影響について FEM 解析により調べた。モデルは Fig.5 に示すような単純支持はりとし、 $h/l$  を 0.1 から 0.5 まで 0.1 每の 5 種類、はりの軸方向の弾性率  $E_x$  と法線方向の弾性率  $E_y$  の比  $Ex/Ey$  を 1, 1.5 および 3 の 3 種類に変化させた。解析には FEM コード COSMOS/M (Ver.2.6) (横河技術情報) を使用した。

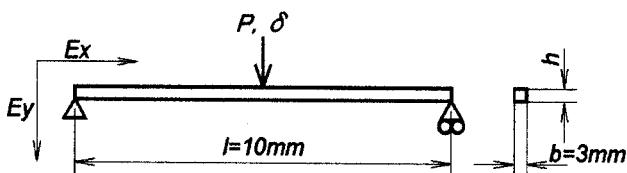


Fig.5 FEM model.

その結果を Fig.6 および Fig.7 に示す。Fig.6 は  $P=250N$  一定とした場合の  $E_b/E_x$  と  $h/l$  の関係である。縦軸の  $E_b$  は FEM 解析によって求められた  $\delta$  を式(2.3)に代入して求めている。 $h/l$  が 0.1 近傍では異方性による影響はほとんど見られず、 $Ex/Ey$  が大

きいほど、そして  $h/l$  の増加とともに  $E_b$  は低下した。

Fig.7 は  $\delta = 6.4mm$  一定にした場合の荷重点における x 方向の圧縮応力  $\sigma_{min}$  と  $h/l$  の関係を示したものである。図中の実線は式(2.1)より求めたものであり、 $h/l = 0.1$  においては FEM 解析結果とよく一致しているが、 $h/l$  の増加とともに解析結果は減少している。この減少は  $Ex/Ey$  が大きいほど顕著である。

いずれにしても  $h/l = 0.3$  以降においては、せん断力によるたわみの影響が顕著に現れていると考えられる。

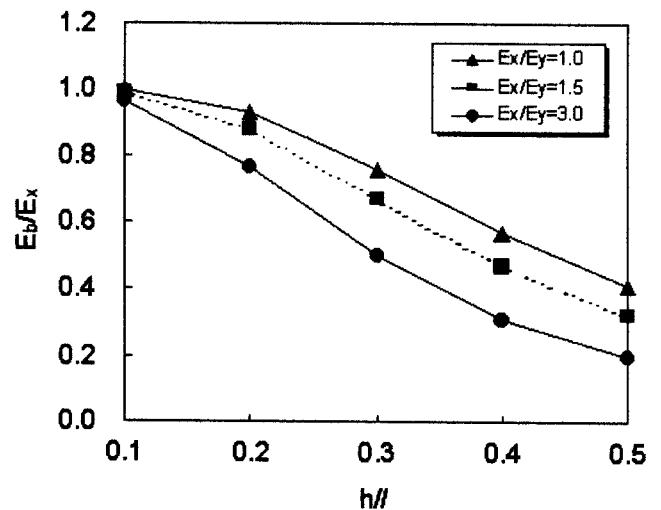


Fig.6 Relationship between  $E_b/E_x$  and  $h/l$  with  $Ex/Ey$ .

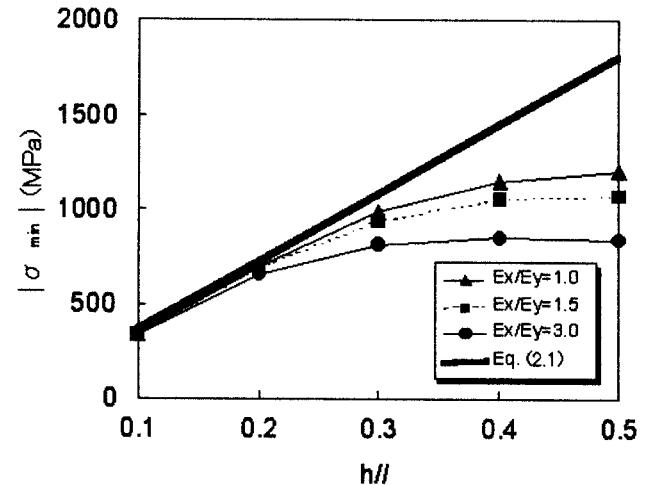


Fig.7 Relationship between  $\sigma_{min}$  and  $h/l$  with  $Ex/Ey$ .

### 4. 三点曲げ試験結果および考察

骨の材質や機械的特性のばらつきに与える影響として、多くの複雑な因子が含んでいるが、試験に用いた試験片の見かけの骨密度ならびに曲げ特性それぞれは、ワイブル分布の確率密度関数で良好に表現できた。このことは、本研究において比較的骨密度が一定した骨材料による試験を行うことができ、曲げ特性についても一定した値が得られたことを意味する。

また、歩行やスポーツ時などの生理的運動範囲において、骨折に至らない程度のマイクロクラックが骨中に常に発生していることがよく知られている。そのため骨の弾性変形と塑性変形の区別は極めて難しい。しかし、皮質骨は骨のうちでもハイドロキシアパタイトとコラーゲン線維を主成分とした比較的硬い脆性材料であり、巨視的には均一性が認められるため、本研究では皮質骨を弹性体と見なすことにする。実験より得られた荷重-変位曲線においても、破壊に至るまでほぼ直線的傾向を示したため、最大荷重とこのときのたわみ量より、式(2.3)を用いて曲げによる弾性率  $E_b$  を求めた。その結果を採取部位ごとに Fig.8 に示す。

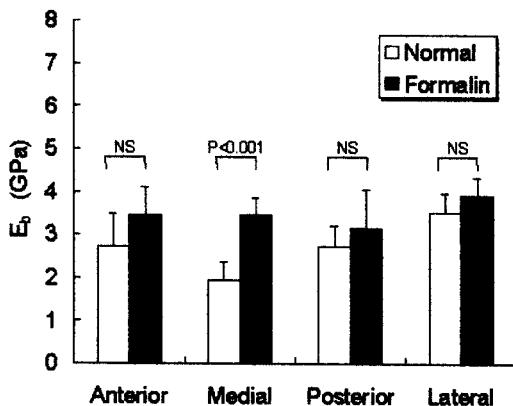


Fig.8 Young's modulus of bending.

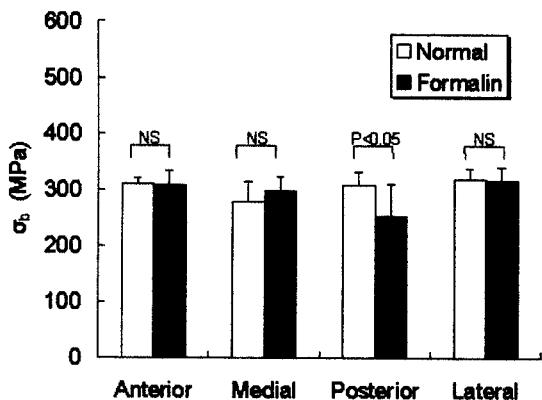


Fig.9 Bending strength.

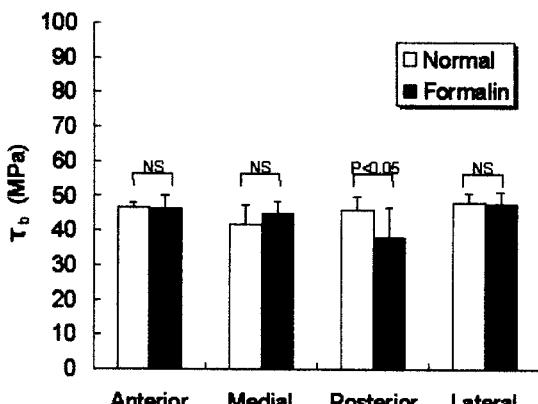


Fig.10 Shearing stress.

各部位においてホルマリン保存群で  $E_b$  は増加傾向を示している。特に Medial において統計学上、有意な増加を示した。

ここでホルマリン群の  $E_b$  が高い値を示した原因として、骨中のタンパク質成分であるコラーゲン線維がホルマリン固定により硬化し、弾性率を増加させたものと考えられる。

吉川<sup>5)</sup>らはホルマリン固定されたヒト大腿骨皮質骨より、骨軸を長手方向とする長さ 30mm、断面が 3mm × 10mm、 $h/l=0.1$  の曲げ試験片を採取し三点曲げ実験を行っている。皮質骨の種類は不明であるが、吉川らの得た曲げ弾性率は 8GPa であり、Fig.6 を考慮すれば、本実験より得られたホルマリン保存群の結果の平均値 3.5GPa は妥当なものと思われる。

また、最大荷重を式 (2.1) よび式 (2.2) に代入して求めた曲げ強度  $\sigma_b$  およびせん断応力  $\tau_b$  の結果についても同様に Fig.9 および Fig.10 に示す。

$\sigma_b$  と  $\tau_b$  の間には本試験片の場合  $\tau_b = 0.15 \sigma_b$  の関係があるため、Fig.9 および 10 は同様な傾向を示している。

Anterior, Medial および Lateral ではホルマリン保存による影響はほとんど認められなかった。しかし、Posterior では有意に低下した。これは Plexiform bone と Haversian bone の構造の相違によるものと考えられ、Posterior に多く分布する骨単位 Osteon がホルマリン保存により脆化し、これらの有効なブリッジング効果が低下し、クラックの進展が容易となり、その結果、 $\sigma_b$  および  $\tau_b$  が低値を示したものと推察する<sup>6)</sup>。

小川<sup>7)</sup>らおよび津田<sup>8)</sup>によれば、皮質骨の曲げ強度は約 120 ~ 260MPa 程度である。そして  $h/l$  の低下により、 $\sigma_b$  は  $h/l=0.1$  から 0.25 への変化において約 1.1 から 1.2 倍程度増加することが明らかにされている<sup>8)</sup>。これらを考慮すると、本実験結果は妥当な値であると考えられる。

田中<sup>2)</sup>らは鶏の脛骨をそのまま用いて三点曲げ試験を行い、ホルマリン保存の影響を検討している。これらによると保存期間（最大 60 日）によらず骨の剛性、最大荷重および吸収エネルギーといった曲げ特性へのホルマリン保存の影響は少ないと述べている。しかしづか 1 週間の保存で曲げ弾性率において増加傾向を、そして曲げ強度においては Haversian bone が有意に低下することが本研究により初めて明らかになった。

試験片の破壊形態を Fig.11 に示す。破壊は①荷重方向にほぼ直線的に破壊が進展するもの、②斜め方向に進展するもの、そして、③骨折線が多数存在し第三骨片を有するものの 3 種類に分類できた。これは臨床上見られる長管骨（図中には脛骨の骨折型を示す）の横骨折、斜骨折あるいはらせん骨折および粉碎骨折それぞれに対応していると考えられ、 $h/l$  の大きい骨試験片では確認できない破壊形態である。また、①、②、③型の順で  $\sigma_b$  および  $\tau_b$  は大きくなる傾向にあった。

Fig.12 は Plexiform bone における各破壊の発生頻度を示したものであり、ホルマリン保存により①型の破壊の発生が顕著に増加していることがわかる。

Haversian bone では、Fig.13 に示すようにホルマリン保存群において②および③の破壊が Normal 群に比較し減少しているのに対し、き裂が真直に進展する①型の発生が顕著に増加している。本実験においては、サンプル数が比較的小少なため、求めた骨の機械的特性の大きさは破壊形態に関係なく、その平均値と標準偏差で表示した。しかし、ホルマリン保存により明らかに破壊形態が変化し、骨の機械的特性に影響を与えることが予想されるため、今後、各破壊形態ごとの平均値の算出が必

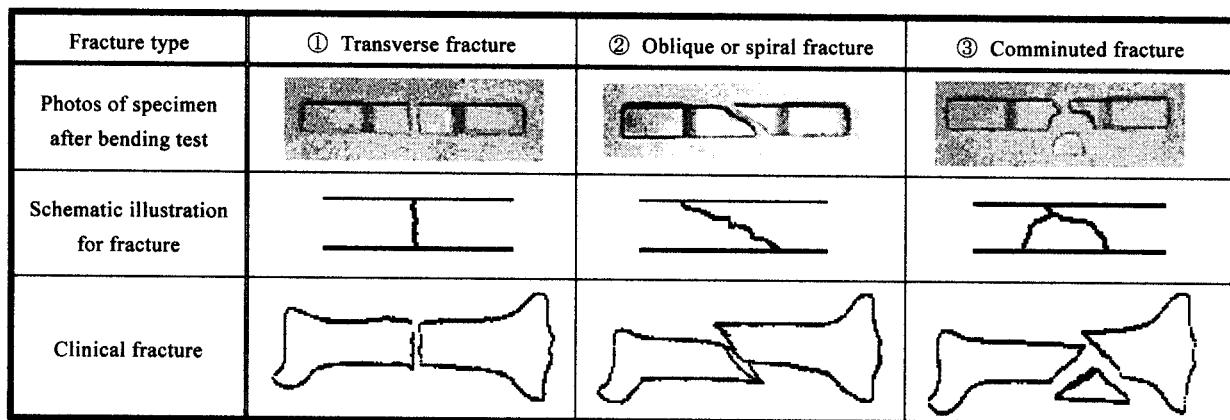


Fig.11 Fracture pattern.

要であると考えている。

いずれにしても、有限要素解析などで骨折のシミュレーションを行う場合、骨の機械的特性は既存の文献値に頼らざるを得ないのが現状である。その際、ホルマリン保存は冷凍保存<sup>1)</sup>に比較し骨の機械的特性ならびに破壊形態に大きな影響を与えるため、採取した骨ならびに加工後の骨試験片のホルマリン保存は避けるべきである。

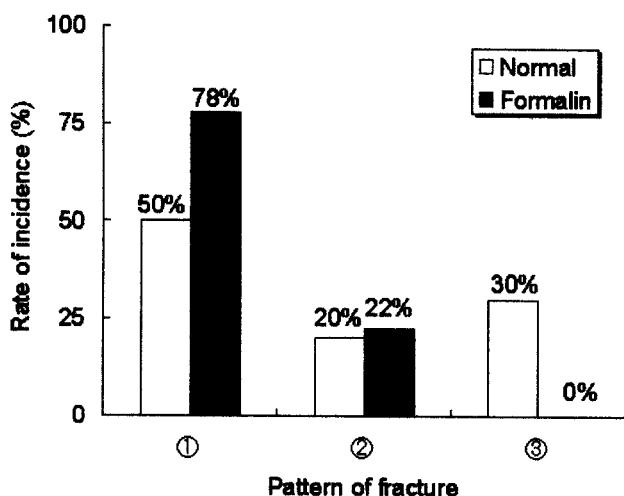


Fig.12 Rate of incidence of fracture for Plexiform bone.

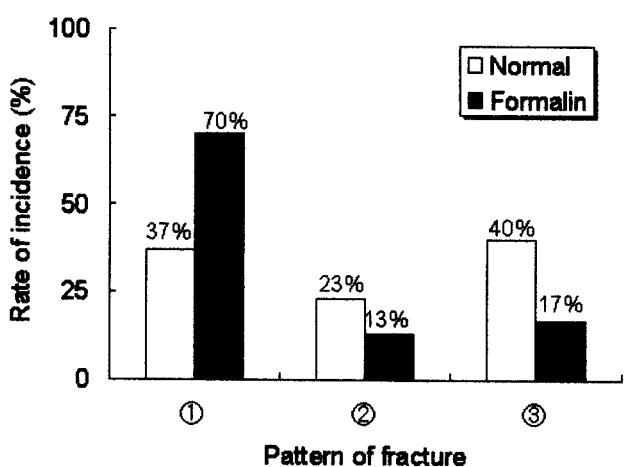


Fig.13 Rate of incidence of fracture for Haversian bone.

## 5.まとめ

ウシ大腿骨皮質骨の三点曲げ試験を行った。その結果より骨の曲げ特性および骨折形態に与えるホルマリン保存の影響について考察・検討し、以下の成果を得た。

- (1)一週間のホルマリン保存により、骨の弾性率は増加し、曲げ強度およびせん断応力は Haversian bone で減少傾向を示した。
- (2)破壊形態は臨床で見られる長管骨の骨折に類似した骨折型に分類できた。
- (3)Plexiform bone, Haversian bone とともにホルマリン保存によって直進に進展するき裂の発生が顕著に認められた。

現在、ホルマリン保存 30 日を含めた、長期保存期間による曲げ特性の変化について検討中である。

## 参考文献

- 1) 例え R. R. Pelker, G. E. Friedlaender, T. C. Markham, M. M. Pamjabi and C. J. Moen: *Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone*, *J. Orthop. Res.* 1 (1984) 405-411.
- 2) 田中茂雄ほか4名、骨の力学的およびAE特性に及ぼすホルマリン保存の影響、日本臨床バイオメカニクス学会誌、15 (1994) 1-6.
- 3) L. B. Halstead (後藤仁敏、小寺春人 訳), 硬組織の起源と進化、共立出版 (1984) 72-76.
- 4) S. Timoshenko and J. N. Goodier, *Theory of Elasticity*, McGraw-Hill, Third edition (1951) 122.
- 5) 吉川 香ほか5名、皮質骨の継弾性係数測定法に関する検討、日本臨床バイオメカニクス学会誌、20 (1999) 237-240.
- 6) 菊川久夫ほか3名、ウシ皮質骨の破壊じん性に及ぼすホルマリン保存の影響、日本臨床バイオメカニクス学会誌、22 (2001) 85-88.
- 7) 小川公平ほか2名、ヒト脛骨の方向依存性、日本複合材料学会誌、3 (1977) 32-37.
- 8) 津田弘太郎、人の緻密骨質の曲げ及び衝撃曲げ強度に関する研究、京都府立医科大学雑誌、16 (1957) 1001-1025.