Development of multi-scale and multi-physics finite element method of articular cartilage and chondrocyte

新田 那小哉・同志社大学大学院

Naoya NITTA, Graduate School, Doshisha University, Japan

倉前 宏行・大阪工業大学

森田 有亮・同志社大学

仲町 英治・同志社大学

Hiroyuki KURAMAE, Osaka Institute of Technology

Yusuke MORITA, Doshisha University

Eiji NAKAMACHI, Doshisha University

Key Words: Multi-scale, Multi-physics, Finite element method, Articular cartilage, Chondrocyte.

1. 緒言

本研究では巨視関節軟骨および微視軟骨組織に生じる応力・ひずみを求めるためのマルチスケール・マルチフィジックス有限要素解析手法の開発を行った。関節軟骨は軟骨細胞、コラーゲン線維、プロテオグリカンおよび水で構成されている。生体関節軟骨は、歩行などの運動による力学刺激を受けている。この力学刺激は軟骨細胞の正常な代謝活動を誘起し、関節軟骨組織の形成・維持に重要な役割を担っている^{(1), (2)}。そのため、歩行などに起因する関節運動によって軟骨細胞に生じる応力の定量的評価は軟骨組織の代謝プロセスの解明のために重要な課題である。しかし、関節軟骨は細胞外基質の構成要素であるコラーゲン線維の配向に起因する異方性やプロテオグリカンおよび水が示す粘弾性の特性を有することからその精緻な材料構成式を求めることは困難とされてきた。そこで本研究では、関節軟骨の巨視・微視構造体に対して非線形粘弾性材料構成式を採用し、関節軟骨試験片を用いた圧縮実験を行うことで材料特性値の同定を行い、巨視関節軟骨モデルおよび微視軟骨組織モデルによるマルチスケール有限要素解析により、軟骨細胞に生じる応力・ひずみを求めた。

2. 非線形粘弾性材料構成式⁽³⁾

関節軟骨などの生体軟組織は材料特性として、粘弾性と非線形性を有することから、本研究では図1に示す関節軟骨に対して、一般化 Kelvin モデルで表される非線形粘弾性構成式を採用した。

Fig. 1. Nonlinear viscoelastic material properties of articular cartilage.

$$\begin{aligned} \dot{\sigma} = & (\lambda_1 + \lambda_2) \delta_{ij} \dot{\epsilon}_{kk} + 2(\mu_1 + \mu_2) \dot{\epsilon}_{ij} \\ & - \frac{3}{2\eta_1} (\lambda_1 \delta_{ij} \sigma_{kk} + 2\mu_1 \sigma_{ij}) \\ & + \frac{3}{2\eta_1} \{ (3\lambda_1 \lambda_2 + 2\lambda_1 \mu_2 + 2\lambda_2 \mu_1) \delta_{ij} \epsilon_{mm} + 4\mu_1 \mu_2 \epsilon_{ij} \} \end{aligned} \quad (1)$$

ここで λ_1 , λ_2 , μ_1 , μ_2 はラーメの定数であり、次式で表される。

$$\begin{aligned} \lambda_1 &= \frac{E_1 \nu}{(1+\nu)(1-2\nu)} & \lambda_2 &= \frac{E_2 \nu}{(1+\nu)(1-2\nu)} \left(1 + \frac{\bar{\epsilon}}{A} \right) \\ \mu_1 &= \frac{E_1}{2(1+\nu)} & \mu_2 &= \frac{E_2}{2(1+\nu)} \left(1 + \frac{\bar{\epsilon}}{A} \right) \end{aligned} \quad (2)$$

E_1 は線形弾性係数、 $E_2(1 + \bar{\epsilon}/A)$ は非線形弾性係数、 $\bar{\epsilon}$ は相当ひずみ、 A は非線形係数、 η_1 は粘性係数、 ν はポアソン比を表す。

3. 関節軟骨の材料特性同定

3-1 関節軟骨圧縮試験 関節軟骨の材料特性値を同定するため、円柱状に切出した関節軟骨の単軸圧縮試験を行った。関節軟骨は厚さ方向によって微視構造が異なるため、多光子顕微鏡 (MPM) 観察結果を参考にして、関節軟骨表面から下方 10% を表層、60% を中間層、30% を深層とし、複合則により各層の材料特性の同定を行った。圧縮試験には生後約 6 ヶ月、体重約 100 kgf の食用豚の大腿骨遠位端より生検トレビンを用いて採取した関節軟骨を用いた。採取した関節軟骨を表層と中間層を含む試験片 ($t=1.4$ mm)、中間層のみの試験片 ($t=1.2$ mm)、中間層と深層を含む試験片 ($t=1.7$ mm) の 3 種類に加工した後、直径 3 mm の円柱状に加工した。関節軟骨内の水分状態を平衡とするため試験片を 30 分間生理食塩水に浸した後、乾燥を防ぐため生理食塩水中に試験片を設置し、万能試験機 (EZ-graph, SHIMADZU) を用いて圧縮試験を行った。関節軟骨の粘性特性を求めるため、公称ひずみ速度 5 s^{-1} および 0.05 s^{-1} を採用した。各実験条件で 3 回の圧縮試験を行い、その平均としての応力-ひずみ曲線を求めた。表層および深層のひずみは、各層の体積含有率を用いた複合則により算出した。得られた各層の応力-ひずみ曲線を図2の破線に示す。生体軟組織の特徴である粘性特性のため、応力-ひずみ曲線はひずみ速度に依存し、さらにひずみ量に依存して弾性係数が大きくなる非線形性が確認された。

3-2 関節軟骨の表層、中間層、深層の各材料特性同定 関節軟骨は非線形粘弾性特性を有することから、本研究では一般化 Kelvin モデルを用いて関節軟骨の表層、中間層、深層の材料特性の同定を行った。実験から得られた応力-ひずみ曲線を用い、最小二乗近似により一般化 Kelvin モデルのパラメータ同定を行った。一般化 Kelvin モデルの応力-ひずみ曲線を図2の実線に示す。同定より得られた関節軟骨の表層、中間層、

深層の各材料特性値を表 1 に示す。同定したパラメータは線形弾性係数 E_1 、非線形弾性係数 $E_2(1+\bar{\epsilon}/A)$ 、粘性係数 η_1 、非線形係数 A である。弾性特性および粘性特性ともに表面から深くなるほどその大きさを増加させることが分かった。

Fig. 2. Stress-strain curves obtained by experiments and curve fitting of the generalized Kelvin model.

Table 1. Material properties of articular cartilage surface, middle and deep layer.

Part	Linear elastic modulus E_1	Nonlinear elastic modulus $E_2(1+\bar{\epsilon}/A)$	Viscosity coefficient η_1	Nonlinearity coefficient A
Surface layer	5.0 MPa	0.4 MPa	0.35 MPa·s	1.0×10^{-1}
Middle layer	25 MPa	4.5 MPa	3.5 MPa·s	3.7×10^{-2}
Deep layer	90 MPa	10 MPa	10 MPa·s	2.0×10^{-2}

4. 巨視関節軟骨モデルを用いた圧縮解析

4-1 関節軟骨モデルおよび解析条件 本研究では、関節軟骨表面から円柱状に切り出した関節軟骨を有限要素モデル化し解析に用いた。作成した関節軟骨の有限要素モデルを図 3 に示す。本研究では、実験観察結果および関節軟骨の力学特性が深さ方向によって異なるという特徴も考慮し、有限要素モデルの全高さを 2 mm とし、上面から 10% を表層、60% を中間層、30% を深層とした。各層の材料特性値は前節の関節軟骨の圧縮試験より求めた表 1 の非線形粘弾性材料特性値を用いた。歩行運動によって関節軟骨に生じる応力および変形を求めるため、図 3 (c) に示すように関節軟骨モデル上面に鋼板（シェル有限要素）を設置し下方に平行移動させることで圧縮試験解析を行った。圧縮速度 0.4 mm/s で関節軟骨全体のひずみが 10%（0.2mm 圧下、0.5 s 経過後）になるまで圧縮した。圧縮負荷面と軟骨表面の摩擦係数は 0 と仮定した。軸対称変形を仮定することで 1/4 円板を深さ方向 30 分割、総有限要素数 38400 により要素分割した。

4-2 関節軟骨有限要素解析結果 図 4 に全圧縮ひずみ 10% における圧縮応力分布図を示す。深層の外周部に最も高い圧縮応力（9.9 MPa）が生じた。また、解析結果をもとに関節軟骨モデルの中心軸上における表層、中間層、深層の各要素 A-C

の圧縮ひずみの時系列変化を求めた。各要素 A-C の圧縮ひずみの時系列変化を図 5 に示す。表層、中間層、深層と弾性が増加すること起因してひずみは減少する結果を得た。Wong, M ら⁽⁴⁾ は実験において、軟骨組織に段階的に圧縮ひずみを与えた場合、いずれの段階においても深層より表層が大きくひずむと報告しており、本解析結果においても同様の挙動を確認することができた。

Fig. 3. Macro finite element model of articular cartilage and boundary condition.

Fig. 4. Compressive stress distribution in the FE model of articular cartilage.

Fig. 5. Time histories of compressive strain in three layers.

5. 微視軟骨組織モデルを用いた有限要素解析

5-1 軟骨細胞モデルおよび解析条件 関節軟骨の多光子顕微鏡 (MPM) による SHG 観察写真を図 6 に示す。各層におけるコラーゲン線維の配向の相違が観察できる。実際には、各層間では傾斜機能材料のように徐々に配向が変化していることが分かる。軟骨細胞はコラーゲン線維束ネットワーク（鳥獣等の巣状構造）に覆われるように存在しており、本研究では軟骨細胞の観察画像をもとに軟骨組織の微視有限要素モデルを作成した。作成した軟骨組織モデルを図 7 に示す。軟骨組織を構成するコラーゲン線維は、軟骨表層では軟骨表面に平行に配向し、深層では軟骨下骨と直交する方向に配向している。本研究では、関節軟骨の深さ方向による関節軟骨内の

コラーゲン線維の配向の違いを考慮するため、表層、中間層、深層の3種類の軟骨細胞モデルを作成した。関節軟骨モデルの圧縮解析から得た表層、中間層、深層の各8節点アイソパラメトリック固体要素(図4, A, BおよびC)の節点変位解にスケール比を乗じ、さらに内挿により、図7に示す表層、中間層、深層の微視有限要素の境界面の変位を求め、それらの値を強制変位として与えることで微視軟骨組織の有限要素解析を行った。

5-2 軟骨細胞有限要素解析結果 図8にコラーゲン線維および軟骨細胞に生じる相当応力の分布を示す。圧縮方向に線維配向がみられる中間層および深層のコラーゲン線維に高い応力が生じた。つまり、負荷される圧縮力を支持する構成要素としてコラーゲン線維の寄与が高いことが示唆される。各層の最大相当応力はそれぞれ6.34 kPa, 7.35 kPa, 7.72 kPaであり、軟骨表面に平行配向する表面層では小さく、垂直配向の深層は大きいことがわかった。ひずみ値は逆の結果を得た。さらに、軟骨細胞に生じる相当応力分布を拡大して図8に示す。表層、中間層、深層において粘性特性の顕著なプロテオグリカンおよび水に囲まれた軟骨細胞にはコラーゲン線維に生じるような高い応力は生じず、最大相当応力は表層、中間層、深層でそれぞれ80 Pa, 380 Pa, 165 Paとなった。また、中間層で最も高い相当応力が生じていることがわかった。

Fig. 6. Hierarchic structure of articular cartilage.

Fig. 7. Micro finite element models of chondrocyte, collagen fiber and interstitial fluid in cases of surface, middle and deep layers.

Fig. 8. Equivalent stress distributions of chondrocyte in cases of surface, middle and deep layers FE models.

以上に示した関節軟骨の圧縮による軟骨細胞に生じる応力およびひずみの有限要素解析結果により、中間層の軟骨細胞に最も高い応力が生じるということがわかった。これは、コラーゲン線維、プロテオグリカンおよび水の形態および粘弾性特性が相互関連し、結果として軟骨細胞に生じる応力に差異を生じさせたと考える。各層に異なる配置状態で存在する軟骨細胞に生じる応力およびひずみを求めることで、各層の代謝活動の活性度の相違に対する知見を得ることが可能となり、結果として軟骨組織の代謝プロセスの解明に対して重要な情報提供が可能となると考える。

6. 結言

本研究では、生体関節軟骨が有する軟骨組織の微視構造を考慮し、マルチスケール解析有限要素解析により関節運動下で関節軟骨、軟骨組織、軟骨細胞に生じる応力・ひずみを求め、以下のような知見を得た。

- (1) 圧縮負荷において関節軟骨にはコラーゲン線維の配向に依存した圧縮応力の相違が見られた。
- (2) 関節軟骨の圧縮によって軟骨細胞に生じる応力は中間層に存在する細胞において最も高い値を示した。
- (3) 生体関節軟骨が有する軟骨組織の微視構造を考慮し、関節運動下で軟骨細胞に生じる応力の定量化が可能であると示唆された。

参考文献

- (1) Stephen D. Waldman, David C. Couto, Marc D. Gryn timer, Robert M. Pilliar and Rita A. Kandel, *European Cells and Materials*, Vol. 13, 2007, pp. 66-75.
- (2) Yasuji Harada, Naohide Tomita, Shigeyuki Wakitani, Yoshio Mii, Masanori Oka and Sadami Tsutsumi, *Journal of Tissue Engineering*, Vol. 8, No. 6, 2002, pp. 969-978.
- (3) 倉前宏行, 伊藤優一, 上辻靖司, 仲町英治, *Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers, Series A*, vol. 74, 2008, pp. 749-756.
- (4) M. Wong, P. Wuethrich, M. D. Buschmann, P. Egli, E. Hunziker, *J. Orthop Res.*, Vol. 15, No. 2, 1997, pp. 189-196.