

骨芽細胞から形成されるコラーゲンの

高詳細 3 次元解析

高宮 留美子

Three-dimensional analysis of collagens secreted by osteoblasts.

Rumiko Takamiya

(平成 25 年 12 月 13 日受付)

緒言

骨組織は力学的負荷（メカニカルストレス）を強く受ける組織である。そのため、骨組織は様々なメカニカルストレスに適応できるように、硬く、かつしなやかで弾性に富んでいる必要がある。これらの機械的条件を満たすため、骨組織は独自の複雑な層板構造を形成している。骨組織の構造は、300年以上前に Clopton Havers が長管骨の長軸方向に沿って“parallel plate”と名付けた層板骨を観察し¹⁾、Gebhardt が層板骨の twisted plywood-like model について提唱して以来²⁾、様々な研究者により観察されてきた。Ascenti や Bonucci らはオステオンの観察に成功し、層板骨の走行は骨の長軸方向に平行なものと、それと直交するものからなることを示した³⁾。その後、顕微鏡の進歩に伴い、研究者達の関心は骨組織から、それらを形成するナノサイズのコラーゲン線維へとシフトしていき、骨組織の構造を解明する上で、それらを形づくるコラーゲン線維の構造(コラーゲンネットワーク)やコラーゲン線維の形成過程を知ることは非常に重要であると考えられるようになった⁴⁻⁷⁾。Ascenti や Benvenuti らは、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いてコラーゲン線維の走行を観察し、それらは隣り合う層板同士で直交していることを示した⁸⁾。しかし、TEM では約 70 nm 厚の薄切切片を使

用するため、直径数 μm ～数十 μm であるコラーゲン線維の全体像を観察することはできない。また、コラーゲン線維よりさらに微細なコラーゲン細線維であっても、その直径は百数十 nm であるため、全体像を観察することができない上、2次元像であるためその立体的な観察は困難であった。そこで、近年では X 線回折装置⁹⁾や、傾斜配置型 FIB-SEM(Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy)¹⁰⁾を用いて、層板骨の様々な部位や深さにおけるコラーゲン細線維を観察し、その走行角度やばらつきを 3 次元的に解析し数値化するようになった。これまでに、コラーゲン細線維はプロコラーゲンの形で骨芽細胞から開口分泌され放出することが知られているが、その放出過程と細胞外でのコラーゲン細線維及びコラーゲン線維を含んだコラーゲンネットワークの走行方向との関連性については、未だに解明されていない¹¹⁾。その理由として、コラーゲンネットワークはナノサイズで非常に微細な構造物であることや、骨芽細胞と骨基質の間という閉ざされた空間に放出されるため、その空間的な制限から観察が困難であることが考えられる。また、骨芽細胞はコラーゲン細線維の放出を活発に行う活性型骨芽細胞と、ほとんど行わない休止期骨芽細胞という 2 つの面を持つことも、観察を困難にする理由として考えられる。

一方、近年新たに開発された直交配置型 FIB-SEM (SMF-1000, SII ナノテクノロジー)¹²⁾ は、従来の装置では困難であった空間的な制限のある部位の観察や、3 次元的な観察が可能な装置である。集束イオンビーム (FIB) 装置とは、きわめて細く集束したイオンビームを試料表面で走査させることにより、発生した二次電子を検出して顕微鏡像を観察したり、試料表面を加工するための装置である。FIB 装置の原形は 1979 年の Seliger^{13,14)} らの発表にさかのぼり、以後材料系分野において重要な装置として使用されてきた¹⁵⁻¹⁷⁾。1990 年代半ばには、生物系分野でも FIB 装置の使用が行われてきたが、歯などの無機材料に近い試料の断面観察が主要なものであった¹⁸⁾。近年になり FIB 装置はさらに進化し、同一チャンバー内に走査型電子顕微鏡 (SEM) 装置を搭載した FIB-SEM 装置が開発された。FIB-SEM 装置は、FIB 装置による試料スライス断面の作製と SEM 装置による断面観察を繰り返すことで、数百枚もの SEM 像を撮影することができ、さらにコンピュータ上で加工することで立体的に再構築し (シリアルミリング法)、3 次元的な構造解析を行うことが可能である¹⁹⁻²²⁾。これにより、従来の方法では重なって見えなかった部分の観察や、3 次元的な観察が可能となった。当初開発された FIB-SEM 装置は、FIB 装置と SEM 装置が 60° の傾斜をもち配置されて

いる傾斜配置型 FIB-SEM が主流であった。傾斜配置型 FIB-SEM は TEM 用試料作製に優れているが、試料に対し SEM 装置が傾斜し配置されているので、SEM 像のフォーカスやコントラストの面で問題があった。一方、今回新たに開発された直交配置型 FIB-SEM は FIB 装置と SEM 装置が直交し配置されているため、高い分解能を持ち、コントラストの良い SEM 像を得ることができる。また、一度の撮影でマイクロサイズの撮影視野と、解像度の高いナノサイズの撮影視野を同時に得ることができるという利点もある。今回この直交配置型 FIB-SEM を用い、骨組織における様々な骨系細胞層及びコラーゲンネットワークを観察した。

一方、超高压電子顕微鏡 (H-3000, 日立製作所) は世界最高である常用 3 MV の加速電圧を持つ電子顕微鏡である。これまで、電子顕微鏡はいかに薄い試料を高い分解能で観察できるかという点が重視され、それに適した数百 KV の加速電圧を持つ高压電子顕微鏡が頻用されてきた。しかし、2 次元像をコンピュータ上で 3 次元構築するという電子トモグラフィ法の発達に伴い²³⁾、より厚い試料の観察が注目されるようになり、高い加速電圧をもつ電子顕微鏡の需要が高まるようになった²⁴⁾。汎用 TEM では、生物試料の厚さの限界は数 100 nm であ

るのに対し、超高圧電子顕微鏡ではその高い加速電圧から、約 15 倍厚い数 μm 厚さの試料を観察することができ、さらにその解像度は数 nm と非常に高い。

Perkins と Renken らが示したように、神経細胞内のミトコンドリアのような、軟組織の生物試料の観察であれば、透過型電子顕微鏡によって 400 KV の加速電圧を用い、500 nm と厚い切片を観察することが可能である²⁵⁾。しかし、今回のようなカルシウムを多く含む骨組織などの硬組織の観察には、さらに高い電子透過性をもつ高圧電子顕微鏡が必要であると考えられる。またコラーゲン細線維の観察にはその全体像が観察できるように汎用 TEM 用切片よりも厚い試料が必要である。我々の研究グループでは過去に、超高圧電子顕微鏡及び電子トモグラフィ法を用いて、3 μm の厚い試料を観察することに成功している²⁶⁾。この際、ニワトリ胚頭蓋骨中の骨細胞に鍍銀染色を施し、幼弱骨細胞を高い解像度で詳細に観察できた。また、骨細胞突起と周辺基質を研究し、数 nm レベルでの 3 次元的観察を行い、骨細管壁表面の複雑な形態だけでなく、コラーゲン細線維の走行も観察できた²⁷⁾。よって、超高圧電子顕微鏡及び電子トモグラフィ法により、骨芽細胞とコラーゲン細線維の 3 次元的な位置関係の観察が可能ではないかと考えた。さらに、連続断層像からソフトウェア Avizo を用い加工

することで、骨芽細胞から放出されたコラーゲン細線維を 1 本単位で輪郭抽出し、3 次元的に観察することが可能であると考えた。

そこで本研究では、骨芽細胞のコラーゲン細線維放出過程及びその走行方向や、コラーゲンネットワークを調べるため、直交配置型 FIB-SEM 及び超高压電子顕微鏡を用い骨組織における骨芽細胞及びコラーゲン細線維の観察を試みた。

材料と方法

1. 直交配置型 FIB-SEM の試料作製

16 日齢ニワトリ胚頭蓋骨(図 1A)を試料とした。頭蓋骨は採取後、直ちに約 1 × 3 mm の長方形に細切した(図 1B)。その際、長方形の長辺が、骨梁の形成方向(図 1A, B 矢印)と平行になるように規定した(図 1)。その後、試料を 1 % アクロレイン (Sigma, St. Louis, MO) にて室温で 15 分固定した後、2 % アクロレインに交換して 2 時間固定した²⁸⁾。続いて、リン酸緩衝液(Phosphate Buffered Saline: PBS)を用いて十分に洗浄し、タンニン酸水溶液(関東化学)に室温で 60 分間浸漬した。その後、リン酸緩衝液を用いて十分に洗浄し、2 % 四酸化オスミウム液(TAAB)にて室温で 1 時間後固定を行った。その後、Reynolds の鉛液²⁹⁾

に浸漬させ、電子レンジにて出力 170 W で 60 秒間照射した。その後、蒸留水 (Distilled Water: DW) で洗浄し 1 %酢酸ガドリニウム液 (添川理化学) に浸漬させ、電子レンジにて出力 170 W で 60 秒間照射した。その後、蒸留水で十分に洗浄し、試料はエタノール系列 (60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 % 無水エタノール) で脱水され、アセトン (ナカライテスク) で置換後、アセトンとエポキシ樹脂 EPON812 (Agar Scientific) の等量混合物、アセトン : エポキシ樹脂 = 1 : 2 の混合物にそれぞれ 1 時間浸漬後、真空下でエポキシ樹脂に 1 日浸漬後、エポキシ樹脂に包埋し、60 °C の恒温器で 2 日間重合させた。包埋した試料は、4×4×1 mm 以下の大きさになるよう研磨した。

2. 直交配置型 FIB-SEM による観察

試料観察は直交配置型 FIB-SEM (SMF-1000, SII ナノテクノロジー) を用いた。今回、FIB 加工の加速電圧は 30 KV, SEM 加速電圧は 1 KV に設定し、検出器はインレンズ SE 及び EsB を使用した。断面 SEM 像は 25×25 μm の領域を 1000×1000 ピクセルで取得した。FIB によるセクショニングピッチを 25 nm に設定し 980 枚の SEM 像を取得することで、25 nm の立方体ボクセルによる、25×25

×25 μm 領域のデータを得た。

3. 超高压電子顕微鏡の試料作製

16日齢ニワトリ胚頭蓋骨を試料とした。頭蓋骨は採取後、直ちに約1×3 mmの長方形に細切した。その際、直交配置型 FIB-SEM の試料と同じく、長方形の長辺が、骨梁の形成方向と平行になるように規定した(図1)。その後、試料を3%パラホルムアルデヒド水溶液-2.5%グルタルアルデヒド水溶液と30 mM HEPES 緩衝液の混合液にて室温で60分間固定した。その後、30 mM HEPES 緩衝液と0.1 M ショ糖液の混合液にて十分に洗浄し、2%四酸化オスミウム液と30 mM HEPES 緩衝液の混合液にて室温で1時間固定を行った。その後、HEPESにて十分に洗浄し、エタノール系列(60%、70%、80%、90%、95%、100%無水エタノール)で脱水し、QY-1(日新 EM)で置換後、エポキシ樹脂と等量混合液に1時間浸透させた。さらにエポキシ樹脂に1時間浸透後、減圧下でエポキシ樹脂に1晩浸透させた。その後、エポキシ樹脂に包埋し、60℃の恒温器で2日間重合した。包埋された試料は、ウルトラマイクロトーム(Reichert-Jung Ultracut)を使用し、0.7 μm 及び1.0 μm 厚切片を作製し、フォルムバル膜を

張った 50 メッシュの銅グリッド上に伸展させた。その後、切片を 70 %メタノールに溶解した 3 %酢酸ウラニル溶液及びクエン酸鉛液にて電子染色した。洗浄後、トモグラフィーの再構成時の座標マーカーとして 20 nm の金コロイド (BB International, Cardiff, U. K) をグリッドの両面に分散させた。その後、グリッドの両面を真空蒸着装置でカーボン (JEE-420; JEOL) 蒸着し電子顕微鏡観察に供した。

4. 超高压電子顕微鏡による観察

試料観察は超高压電子顕微鏡 (H-3000, 日立製作所) を用い、1 MV の加速電圧で行った。試料は -60° ~ $+60^{\circ}$ の範囲で 2° 毎に 1 軸傾斜させ、3000 倍及び 4000 倍、15000 倍で観察した。投影像は 4096×4096 ピクセルのスロースキャン CCD カメラ (TVIPS, Germany) にて取得した。連続傾斜像解析は IMOD ソフトウェアを用いた³⁰⁾。また、3 次元再構成には、3D 解析ソフトウェア Avizo (VSG, Bordeaux, France) を使用して、骨芽細胞から放出されたコラーゲン細線維の輪郭抽出を行った。

結果

1. FIB-SEM による骨組織の高詳細 3 次元的観察

最初に骨組織中に存在する様々な骨系細胞層とコラーゲン層及び石灰化領域の 3 次元的な位置関係を観察した。FIB 装置を用い、包埋した試料のうち 1 辺 25 μm の立方体領域を観察領域とし、骨の形成方向(y 軸方向)に沿って 25 nm 毎にスライスしながら連続的に撮影し、980 枚の SEM 像を得た。画像の x-z 軸は 1000 \times 1000 ピクセルで、1 ピクセルが 25 nm に相当する。これらの像からソフトウェア Avizo を用いて、y 軸への観察が可能な 1 ボクセルが 25 nm である 3 次元再構成像を作製した。

まず、x-z 面を観察することで、マイクロサイズである骨系細胞層からナノサイズであるコラーゲン細線維及びコラーゲン線維を含んだコラーゲンネットワークまでを同時にかつ高詳細に確認することができた (図 2A-E)。骨表層の前骨芽細胞 (図 2A: po) の外形は扁平で、細胞質 (図 2A 白枠) を拡大すると、細胞小器官に乏しいことが確認できた (図 2F)。一方、その下部に配列する骨芽細胞 (図 2B: ob) の外形は卵円形で核は大きく、細胞質 (図 2B 白枠) を拡大すると、細胞小器官が発達しており、ミトコンドリア (図 2G 白矢印) 及びその周囲一帯

に扁平な層板状に積み重なった粗面小胞体を多数認めた。さらに骨基質側では、類骨骨細胞 (図 2C: oo) が横方向及び骨基質へ向かって細胞突起 (図 2H 白矢頭) を伸長させている像が確認できた。コラーゲン層 (図 2D 白枠) を拡大すると、コラーゲン線維の断面像を詳細に観察することができた (図 2I)。また、本サンプルは未脱灰のため、骨基質深部では針状結晶を有する石灰化球も同時に多数確認できた (図 2E: cm, J)。

次に、各層における骨系細胞及びコラーゲン線維の形態や、それらの連続性を確認するため、先ほどの 3 次元再構成像をソフトウェア Avizo を用いて加工し、x-y 面を z 軸方向に連続して観察した (図 3)。前骨芽細胞 (図 3A: po) は比較的粗に配置しているが、骨芽細胞 (図 3B : ob) 同士は密に接していることが確認できた。また、コラーゲン層 (図 3C 白枠) では、直径百数十 nm のコラーゲン細線維と、それらが結合し直径約 1 μm ~ 数十 μm になったコラーゲン線維が混在しランダムに走行していた (図 3F)。さらにコラーゲン層をコラーゲン細線維の直径とほぼ同等な 200 nm で z 軸方向へ観察すると、コラーゲン細線維 1 本分の薄い層の間でも各層において様相が全く異なり、コラーゲン細線維の走行はランダムで秩序性に乏しかった (図 3G-J)。

2. 超高圧電子顕微鏡及び電子トモグラフィー法による骨芽細胞のコラーゲン細線維形成の観察

次に超高圧電子顕微鏡を用いて、骨梁の長軸を中心とする縦断像の連続傾斜像を得た(図 4)。傾斜像は試料を -60° ~ $+60^{\circ}$ の範囲で 2° 毎に1軸傾斜させ得られた。これらの像から骨芽細胞及びその核が明瞭に観察できた。さらに、ソフトウェア IMOD を用いてこれらの連続傾斜像から再構築し、連続断層像を得た(図 5)。断層像の縦横軸は 1895×2014 ピクセルであり、1 ピクセルが 8.14 nm であったため、領域 $15425 \times 16393 \text{ nm}$ 、厚さ 8.14 nm を有する像を示す。像から、骨芽細胞(図 5A: ob)が骨梁に近接し、骨梁の長軸に沿って配列しているのが確認できた。また、骨芽細胞の細胞膜と細胞外のコラーゲン細線維が連続性をもつ領域(図 5A 黒点線枠)と、連続性をもたない領域(図 5A 黒実線枠)が認められた。次に、図 5A を厚さ 0 nm と設定し、20 枚毎(深さ 162 nm 毎)の断層像を示した(図 5B-D)。これらから、断層像の深さが 162 nm 毎に変化しても、黒点線枠では常に骨芽細胞の細胞膜とコラーゲン細線維に連続性を認め、黒実線枠では常に連続性を認めないことが確認できた。さらに、これらの領域を拡大すると、黒点線枠(図 5E)では骨芽細胞の細胞膜とコラーゲン細線維の特徴

である 67 nm 毎の周期構造を有した線維とが連続しており (図 5E 黒矢印), 骨芽細胞内部では扁平な膜が層板状に積み重なった粗面小胞体が発達していることが確認できた (図 5E 白矢印)。一方, 黒実線枠 (図 5F) では骨芽細胞の細胞膜とコラーゲン細線維に連続性がなく, 骨芽細胞内部では細胞小器官に乏しいことが確認できた。直径百数十 nm のコラーゲン細線維と細胞膜が, 厚さ 8.14 nm の断層像において常に連続性をもつことから, 黒点線枠ではこの骨芽細胞からコラーゲン細線維の放出が行われていると考える。

また, 細胞外のコラーゲン細線維において, 骨芽細胞付近のもの (図 5A 白点線枠) を拡大すると, その直径は数 nm~数十 nm と細くランダムに走行していることが確認できた (図 5G)。一方, 骨基質側のもの (図 5A 白実線枠) を拡大すると, その直径は数十 nm~百数十 nm と太くなり, 67 nm ごとの周期構造も明瞭になり, 骨梁の長軸方向へ秩序性をもち走行していることが確認できた (図 5H)。

3. ソフトウェア Avizo を用いたコラーゲン細線維の 3 次元再構成像

次に別の試料を用いて, 骨梁の長軸を中心とする横断像の連続傾斜像を得,

ソフトウェア IMOD を用いてこれらの連続傾斜像から再構築し、連続断層像を得た(図 6A)。断層像の縦横軸は 2014×1895 ピクセルであり、1 ピクセルならびに 1 枚の厚さが 12.21 nm であるため、領域 24590×23137 nm, 厚さ 12.21 nm を有する像を示す。今回、55 枚の連続断層像を得たため、連続断層像の厚みは 671 nm となる。骨芽細胞層の横断像を観察することで、多数の骨芽細胞とその周囲を走行する多数のコラーゲン細線維を高詳細に確認できた(図 6A)。コラーゲン細線維は骨梁の長軸に対し概ね平行に走行していた。さらに、骨芽細胞の細胞膜の一部と、細胞外のコラーゲン細線維に連続性を認めた(図 6A 白実線枠)。同部を拡大すると、直径数十 nm のコラーゲン分子が骨芽細胞(図 6C: ob)の細胞膜と連続しており、それらは細胞外でランダムに走行していた(図 6C)。なお、今回得られた厚さ 12.21 nm の全ての再構成像において、これらの連続性は認められたため、この部位ではこの骨芽細胞からコラーゲン分子が放出されていると考える。また、骨芽細胞付近では、コラーゲン分子が結合してできた直径百数十 nm のコラーゲン細線維をわずかに認め、その特徴的な 67 nm 毎の周期構造も確認できた(図 6C 白矢印)。一方、骨芽細胞から離れた部位(図 6A 白点線枠)を拡大すると、コラーゲン細線維を多数認めた(図 6B)。これらは骨梁の長

軸に対し概ね平行に走行していた。

次に、ソフトウェア Avizo を用いて、この骨芽細胞から形成されたコラーゲン分子及びコラーゲン細線維を 1 本単位で輪郭抽出し、3 次元再構成した。これにより細胞外へ放出されたコラーゲン分子の形態的特徴や、他のコラーゲン分子との結合後の状態などを確認することができた。骨芽細胞付近のコラーゲン分子は短く、粗に走行しているが(図 6D)、その後他のコラーゲン分子と結合することで長く、密に走行することが確認できた(図 6F)。

さらに、先ほどの 3 次元再構成像(図 6D)を様々な方向から観察することで、今まで困難であった骨芽細胞から放出されたコラーゲン分子及びコラーゲン細線維を含むコラーゲンネットワークの立体的観察を行うことができた。右側から観察すると、骨芽細胞から放出されたコラーゲン細線維は、骨芽細胞の外形に沿って骨基質側に向かって走行していることが分かった。(図 6E)。

4. 骨芽細胞内の線維状構造物の観察

さらに別の試料を用いて、骨梁の長軸を中心とする縦断像の連続傾斜像を得、ソフトウェア IMOD を用いてこれらの連続傾斜像から再構築し、連続断層像を

得た(図 7A)。再構成像の縦横軸は 1907×2014 ピクセルであり、1 ピクセルならびに 1 枚の厚さが 9.04 nm であるため、領域 $17239 \times 18206 \text{ nm}$ 、厚さ 9.04 nm を有する再構成像を示す(図 7A)。断層像から、骨芽細胞同士が密に接しており、細胞外には多数のコラーゲン細線維を認めた。また、骨芽細胞内において、細胞外のコラーゲン細線維と同程度の密度、形状、直径である線維状構造物を認めた(図 7A 白矢頭)。また、これらの構造物を拡大すると(図 7B)、線維状構造物は細胞内で膜状構造物に包まれていた。また、図 7A を深さ 0 nm と設定し、深さ 27.1 nm 毎の断層像(図 7B)を見ると、線維状構造物は膜状構造物に伴って細胞内で湾曲していることが分かった。

考察

骨組織はメカニカルストレスに適応するため、隣り合う層板同士で走行方向を変化させた複雑な構造 (twisted plywood-like model) を形成している。この構造を形成するのはナノサイズのコラーゲンネットワークである。コラーゲン線維は骨芽細胞により形成され、隣り合う層板同士で直交し走行していることが分かっている。また、骨系細胞は骨組織中でマイクロサイズの細胞性ネットワークを形成し³¹⁻³³⁾、コラーゲンネットワークと互いに影響を与え合っていると考えられている。よって、骨組織の複雑な構造を解明する上で、細胞性ネットワーク及びコラーゲンネットワークを同時に観察することは非常に重要である。さらに、コラーゲン線維の走行方向を規定する要因は、それらを形成する骨芽細胞にあると考えられるため、骨芽細胞のコラーゲン細線維形成過程を観察することは非常に重要である。我々は従来、共焦点レーザー顕微鏡やTEM, SEMを用いて細胞性ネットワークやコラーゲンネットワークを観察してきたが、大きさの全く異なる両者を同時に観察することは困難であった。また、骨芽細胞のコラーゲン細線維形成は、骨基質の間で行われるため、観察に際し空間的な制限があった。

本研究では、直交配置型 FIB-SEM を用いることで、 $25 \times 25 \mu\text{m}$ の断面 SEM 像を 25 nm ごとに連続して撮影し、コンピュータ上で加工し 3 次元構築像を得ることで、骨組織中の細胞性ネットワークとコラーゲンネットワークを同時にかつ高詳細に観察し、さらに空間的な制限の問題を解決した。骨組織の血管側では扁平な形態をした前骨芽細胞を認め、その基質側では大きな核を有し卵円形を呈した骨芽細胞同士が密に接していた。骨芽細胞はコラーゲン細線維形成を活発に行い立方形もしくは卵円形を示す活性型骨芽細胞と、骨表面にとどまり単層扁平細胞様に配列した休止期骨芽細胞があるが³⁴⁾、今回観察した骨芽細胞はその形態的特徴から活性型骨芽細胞であると考えられる。また、今回の観察を通して、活性型骨芽細胞の割合は休止期骨芽細胞に比較し少ないという印象を受けた。また、3 次元構築像をコラーゲン細線維の直径とほぼ同等な 200 nm 毎に z 軸方向へ観察すると、各層において様相は全く異なり、ランダムで秩序性に乏しかった。これは、試料が 16 日齢であり線維性骨(woven bone)であることによると考える³⁵⁾。また、コラーゲン層では直径百数十 nm のコラーゲン細線維と、直径約 $1 \mu\text{m}$ ～数十 μm であるコラーゲン線維とが混在していた。これは細胞外に放出されたコラーゲン細線維同士が結合しコラーゲン線維を構築す

るという先の報告に一致する³⁶⁾。今回、前骨芽細胞層から石灰化領域までを含んだ大きな領域を、コラーゲン細線維の走行が確認できるほど高詳細に、かつ3次元的に観察することができ、生体材料の中でも観察が困難とされる骨組織の研究において直交配置型 FIB-SEM は非常に有用なツールであることが分かった。

また、超高圧電子顕微鏡から得られた連続断層像は、ナノサイズの分解能を持ち、立体的解析に優れていることから、骨芽細胞の細胞膜とコラーゲン細線維の連続性や位置関係の観察が可能となった。今回、骨梁の長軸を中心とする縦断像の連続断層像から、1つの骨芽細胞内において細胞小器官の分布に極性があり、細胞小器官が豊富な部位においてコラーゲン細線維を放出していた。その他の部位では、骨芽細胞と骨基質が接触しておらず、細胞間接着によってその間隙は維持されていると考えられた。このように、骨芽細胞内において細胞小器官の分布の極性と、骨芽細胞のコラーゲン細線維形成との関連性は、コラーゲン線維の走行方向さらには骨組織の構造を解明する上で非常に重要であると考えられる。

さらに、骨梁の長軸を中心とする横断像から、コラーゲン細線維は骨芽細胞か

ら直径数十 nm のコラーゲン分子の形で放出されランダムに走行するが、細胞外で互いに結合し直径百数十 nm のコラーゲン細線維となり秩序性を持った走行へと変化することが確認できた。また、ソフトウェア Avizo を用いて骨芽細胞から形成されるコラーゲン分子及びコラーゲン細線維を含んだコラーゲンネットワークを 3 次元再構成した結果から、骨芽細胞から放出されたコラーゲン細線維は、骨芽細胞の外形に沿って骨基質側方向へ走行することが分かった。よって、骨芽細胞層の基質側で広がるコラーゲン層は、骨芽細胞が極性を持ってコラーゲン分子を放出した後、コラーゲン分子及びコラーゲン細線維を含むコラーゲンネットワークが骨芽細胞外形に沿いながら基質側へ向かって走行することにより形成されていると考えられる。

これらを覆う膜状構造物を確認した。既存の報告から、プロコラーゲンの段階で骨芽細胞から細胞外へ開口分泌されると考えられているが、これまでに骨芽細胞内のプロコラーゲンを観察したという報告はほとんどなく、細胞内でプロコラーゲンはどのような状態で存在し、放出されるのか明らかではなかった。今回観察された線維状構造物については、その密度や形状が細胞外のコラーゲン細線維と類似しており、細胞内で産生されたプロコラーゲンである可能性が

示唆される。但し、プロコラーゲンの直径は約 10 nm と考えられているが³⁷⁻⁴²⁾、今回観察された線維状構造物は細胞外のコラーゲン細線維と同程度の直径を有していた。また、線維芽細胞や骨芽細胞はコラーゲン細線維を取り込むという報告⁴³⁻⁴⁶⁾もあるため、今後さらなる検討が必要であると考え。

結論

直交配置型 FIB-SEM を用いることで、骨組織中の細胞性ネットワークとコラーゲンネットワークを同時にかつ高詳細に 3 次元的に観察できた。さらに超高压電子顕微鏡及び電子トモグラフィ法を用いることで、骨芽細胞は極性を持ってコラーゲン細線維を放出し、放出後にコラーゲン細線維は骨芽細胞外形に沿いながら骨基質側へ走行していくことが明らかになった。

謝辞

稿を終えるに当たり、懇篤なる御指導、御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎顔面口腔矯正学教室 山城隆教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野 上岡寛准教授に謹んで感謝の意を表します。また、本

研究の遂行に際し、御指導御協力をいただきました独立行政法人 物質・材料
研究機構 原徹主幹研究員，大阪大学超高压電子顕微鏡センター 森博太郎特
任教授，長谷川紀昭様，西田倫希特任研究員，日本電子 梶村直子招聘研究員
ならびに，山田直子様，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科共同利用施設 長
岡紀幸助教に謹んで感謝の意を表します。さらに，本研究を行うに当たり，多
くの貴重な御援助と御協力をいただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究
科歯科矯正学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Havers, C. : Osteologia nova. *London Samuel Smith*, 1691.
- 2) Gebhardt, FSMW., et al.: Lamellensysteme und seine funktionelle Bedeutung.
Roux. Arch., **20**, 187-334, 1905.
- 3) Ascenzi, A., Bonucci, E.: The compressive properties of single osteons. *Anat. J. Res.*, **161**, 377-392, 1967.
- 4) Gebhardt, W.: Über funktionelle wichtige Anordnungsweisen der feineren und grö ßeren Bauelementeb des Wirbeltierknochens, II . Spezieller Teil. Der Bau der Haver'schen Lamellen-systeme und seine funktionelle Bedeutung. *Arch. Entwickl. Mech. Org.*, **20** , 187-322, 1906.
- 5) Rouiller, C., Huber, L., Kellenberger, E., Rutishauser, E.: The lamellar structure of the osteon. *Acta Anat.*, **14**, 9-22, 1952.
- 6) Ruth, E. B.: Bone studies. II . An experimental study of the Haversian-type vascular channels. *Am. J. Anat.*, **93**, 429-455, 1953.
- 7) Ziegler, O.: Studien uber die feinere Struktue des Rohrenknochens und dessen Polarisation. *Dtsch. Z. Chir.*, **85**, 248-263, 1906.

- 8) Ascenzi, A., Benvenuti, A., Burghammer, M., Panzavolta, S., Bigi, A.: Orientation of collagen fibers at the boundary between two successive osteonic lamella and its mechanical interpretation. *J. Biomech.*, **19**, 455-463, 1986.
- 9) Ascenzi, A., Bigi, A., Ripamonti, A. and Roveri, N.: X-ray diffraction analysis of transversal osteonic lamellae. *Calcif. Tissue Int.*, **35**, 279-283, 1983.
- 10) Reznikov, N., Almany-Magal, R., Shahar, R., Weiner, S.: Three-dimensional imaging of collagen fibril organization in rat circumferential lamellar bone using a dual beam electron microscope reveals ordered and disordered sub-lamellar structures. *Bone*, **52**, 676-683, 2013.
- 11) Clarke, B.: Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **3**, 131-139, 2008.
- 12) Hara, T., Tsuchiya, K., Tsuzaki, K., Man, X., Asahata, T., Uemoto, A.: Application of orthogonally arranged FIB-SEM for precise microstructure analysis of materials. *J. Alloys and Compounds*, 2012.
- 13) Seliger, R. L., Ward, J. W., Wang, V. and Kubena, R. L.: A high-intensity scanning ion probe with submicrometer spot size. *Appl. Phys. Lett.*, **34**, 310-312, 1979.

- 14) Seliger, R. L., Kubena, R. L., Onley, R. D., Ward, J. W. and Wang, V.:
High-resolution, ion-beam processes for microstructure fabrication. *J. Vac. Sci. Technol.*, **16**, 1610-1612, 1979.
- 15) Michael, D. Uchic., Michael, A., Groeber, D. M. D. and Simmons, J. P.: 3D
microstructure characterization of nickel superalloys via serial-sectioning using a
dual beam FIB-SEM. *Scripta Materialia*, **55**, 23-28, 2006.
- 16) Cao, S., Somsen, C., Croitoru, M., Schryvers, D., Eggler, G.: Focused ion beam/
scanning electron microscopy tomography and conventional transmission electron
microscopy assessment of Ni₄Ti₃ morphology in compression-aged Ni-rich Ni-Ti
single crystals. *Scripta Materialia*, **62**, 399-402, 2010.
- 17) Adachi, Y., Morooka, S., Nakajima, K., Sugimoto, Y.: Computer-aided three-
dimensional visualization of twisted cementite lamellae in eutectoid steel.
Acta Mater., **56**, 5995-6002, 2008.
- 18) Ginnuzzi, L. A., Prenitzer, B. L., Drown-MacDonald, J. L., Shofner, T. L., Brown
S. R., Irwin, R. B. and Stevie, F. A.: Electron microscopy sample preparation for the
biological and physical sciences using focused ion beams. *J. Process Anal.*, **4**, 162-

167, 1999.

- 19) Holzer, L., Indutnyi, F., Gasser, P. H., Munch, B., Wegmann, M.: Three-dimensional analysis of porous BaTiO₃ ceramics using FIB nanotomography. *J. Microsc.*, **216**, 84-95, 2004.
- 20) Heymann, J. A., Hayles, M., Gestmann, I., Giannuzzi, L. A., Lich, B., Subramanian, S.: Site-specific 3D imaging of cells and tissues with a dual beam microscope. *J. Struct. Biol.*, **155**, 63-73, 2006.
- 21) Knott, G., Marchman, H. Wall. D., Lich, B.: Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *J. Neurosci.*, **28**, 2959-2964, 2008.
- 22) Hekking, L. H., Lebbink, M. N., De Winter DA., Schneijdenberg, C. T., Brand, C. M., Humbel, B. M., Verkleij, A. J., Post, J. A.: Focused ion beam-scanning electron microscope: exploring large volumes of atherosclerotic tissue. *J. Microsc.*, **235**, 336-347, 2009.
- 23) Nishioka, H., Niihara, K., Kaneko, T., Yamanaka, J., Inoue, T., Nishi, T. and Jinkai, H.: Three-dimensional structure of a polymer/clay nanocomposite

- characterized by transmission electron microtomography. *Composite Interfaces*, **13**, 589-603, 2006.
- 24) Takaoka, A., Hasegawa, T., Yoshida, K., Mori, H.: Microscopic tomography with ultra-HVEM and applications. *Ultramicroscopy*, **108**, 230-238, 2008.
- 25) Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S. J. and Ellisman, M.: Electron tomography of neuronal mitochondria: Three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J. Struct. Biol.*, **119**, 260-272, 1997.
- 26) Kamioka, H., Sakhr, A. M., Ishihara, Y., Kajimura, N., Hasegawa, T., Ando, R., Sugawara, Y., Yamashiro, T., Takaoka, A. and Takano-Yamamoto, T.: A method for observing silver-stained osteocytes in situ in 3- μ m sections using ultra-high voltage electron microscopy tomography. *Microsc. Microanal.*, **15**, 377-383, 2009.
- 27) Kamioka, H., Kameo, Y., Imai, Y., Bakker, A. D., Bacabac, R. G., Yamada, N., Takaoka, A., Yamashiro, T., Adachi, T. and Klein-Nulend, J.: Microscale fluid flow analysis in a human osteocyte canaliculus using a realistic high-resolution

- image-based three-dimensional model. *Integr. Biol.*, **4**, 1198-1206, 2012.
- 28) McNamara, L. M., Majeska, R. J., Weinbaum, S., Friedrich, V. and Schaffler, M. B.
: Attachment of Osteocyte Cell Processes to the Bone Matrix. *Anat. Rec.*, **292**, 355-
-363, 2009.
- 29) Reynolds, E. S.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in
electron microscopy. *Brief Notes*, **19**, 208-212, 1962.
- 30) Kremer, J. R., Mastrorarde, D. N., McIntosh, J. R.: Computer visualization of
three-dimensional image data using IMOD. *J. Struct. Biol.*, **116**, 71-76, 1996.
- 31) Nakashima, T., Hayashi, M., Takayanagi, H.: New insights into osteoclastogenic
signaling mechanism. *Trends Endocrinol. Metab.*, **23**, 582-590, 2012.
- 32) Manolagas, S. C.: Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and
implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.*, **21**,
115-137, 2000.
- 33) Bonewald, L. F.: The amazing osteocyte. *J. Bone Miner. Res.*, **26**, 229-238, 2011.
- 34) Miller, S. C., de Saint-Georges, L., Bowman, B.M., Jee, W.S.: Bone lining cells:
structure and function. *Scanning Microsc.*, **3**, 953-960, 1989.

- 35) Oguma, H., Murakami, G., Takahashi-Iwanaga, H., Aoki, M., Ishii, S.: Early anchoring collagen fibers at the bone-tendon interface are conducted by woven bone formation: light microscope and scanning electron microscope observation using a canine model. *J. Ortho. Res.*, **19**, 873-880, 2001.
- 36) Shea, L. D., Wang, D., Franceschi, R. T., Mooney, D. J.: Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds. *Tissue Eng.*, **6**, 605-617, 2000.
- 37) Ramachandran, G. N., Reddi, A. H.: Biochemistry of collagen. *New York. Plenum Press.*, 1976.
- 38) Bornsterin, P.: The biosynthesis of collagen. *Annu. Rev. Biochem.*, **43**, 567-603, 1974.
- 39) Fessler, J. H., Fessler, L. I.: Biosynthesis of procollagen. *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 129-162, 1978.
- 40) Fietzek, P. P., Kuhn, K.: The primary structure of collagen. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, **7**, 1-60, 1976.
- 41) Miller, E. J.: Biochemical characteristics and biological significance of the

- genetically distinct collagens. *Mol. Cell. Biochem.*, **13**, 165-192, 1976.
- 42) Uitto, J., Lichtenstein, J. R.: Defects in the biochemistry of collagen in diseases of connective tissue. *J. Invest. Dermatol.*, **66**, 59-79, 1976.
- 43) Deporter, D. A. and Ten Cate, A. R.: Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase in collagen-containing vesicles of fibroblasts. *J. Anat.*, **114**, 457-461, 1973.
- 44) Takahashi, T., Kurihara, N., Takahashi, K. and Kumegawa, M.: An ultrastructural study of phagocytosis in bone by osteoblastic cells from fetal mouse calvaria in vitro. *Archs oral Biol.*, **10**, 703-706, 1986.
- 45) Hamamoto, Y., Nakajima, T. and Ozawa, H.: Ultrastructural and Histochemical Study on the Morphogenesis of Epithelial Rests of Malassez. *Arch. Histol. Cytol.*, **52**, 61-70, 1989.
- 46) Takeyama, M., Irie, K., Nakamura, H., Kominami, E., Haneda, K., Ozawa, H. and Ejiri, S.: Immunohistochemical Demonstration of Cathepsins B and L in the Periodontal Ligament(PDL) of the Rat Molar. *Jpn. J. Oral Biol.*, **43**, 194-202, 2001

図表の説明

図 1. ニワトリ胚頭蓋骨の骨梁形成方向

A: ニワトリ胚頭蓋骨の模式図。白矢印方向へ骨梁形成を行う。

B: ニワトリ胚頭蓋骨の実体顕微鏡像。黒矢印は骨梁形成方向を示す。長方形で囲った部分を試料として採取し、長辺を骨梁形成方向と平行に規定した。

図 2. FIB-SEM による骨組織の高詳細 3 次元的観察 (x-z 面)

A: 血管側では、扁平な形態をした前骨芽細胞(po)と核(n)を認めた。

B: 骨基質の血管側では、卵円形をした骨芽細胞(ob)と核(n)を認めた。

C: 骨基質中では、骨基質に埋め込まれた類骨骨細胞(oo)を認めた。

D: 骨芽細胞の下部では、コラーゲン層(白点線に挟まれた領域)を認めた。

E: 骨基質深部では、石灰化した領域(cm)を認めた。

F: 図 A 白枠の拡大像。前骨芽細胞は細胞小器官に乏しい。

G: 図 B 白枠の拡大像。骨芽細胞は細胞小器官が発達しており、ミトコンドリア(白矢頭)や粗面小胞体を認めた。

H: 図 C 白枠の拡大像。類骨骨細胞の細胞突起を認めた。

I: 図 D 白枠の拡大像。コラーゲン線維の断面像を示した。

J: 図 E 黒枠の拡大像。針状結晶を有する石灰化球を多数認めた。

図 3. FIB-SEM による骨組織の高詳細 3 次元的観察 (x-y 面)

A: 前骨芽細胞層では、前骨芽細胞(po)が比較的粗に配列していた。

B: 骨芽細胞層では、骨芽細胞(ob)同士が密に接していた。

C: コラーゲン層では、コラーゲン細線維がランダムに走行していた。

D: 類骨骨細胞層では、類骨骨細胞(oo)が粗に配列していた。

E: 石灰化領域では、針状結晶を有する石灰化球を多数認めた。

F: 図 C 白枠の拡大像。コラーゲン細線維及びコラーゲン線維が混在しており、ランダムに走行していた。

G-J: 図 C から z 軸方向に 200 nm 毎骨基質側を観察した像。各層において様相は全く異なり、コラーゲン細線維の走行はランダムで秩序性に乏しかった。

図 4. 超高压電子顕微鏡による連続傾斜像

骨梁の長軸を中心とする縦断像の連続傾斜像。超高压電子顕微鏡を用いて、1.0

μm の薄切切片を、 $-60^\circ \sim +60^\circ$ の範囲で 2° 毎に 1 軸傾斜させ得た。

図 5. 超高圧電子顕微鏡及び電子トモグラフィ法による骨芽細胞のコラーゲン細線維形成の観察

A: 骨芽細胞 (ob) の細胞膜と細胞外のコラーゲンが連続性をもつ領域 (黒点線枠) と、連続性をもたない領域 (黒実線枠) を認めた。

B-D: 図 A を深さ 0 nm と設定し、20 枚毎 (深さ 162 nm 毎) の断層像を示した。

断層像の深さが変化しても、図 A 黒点線枠では常に細胞膜とコラーゲン細線維に連続性を認めた。

E: 図 A 黒点線枠の拡大像。細胞膜と連続する周期構造を有したコラーゲン細線維 (黒矢印) を認めた。骨芽細胞内では粗面小胞体 (白矢印) が発達していた。

F: 図 A 黒実線枠の拡大像。細胞膜と細胞外のコラーゲン細線維に連続性を認めない。

G: 図 A 白点線枠の拡大像。骨芽細胞付近のコラーゲン細線維は細く、ランダムに走行する。

H: 図 A 白実線枠の拡大像。骨基質側のコラーゲン細線維は太く，走行に秩序性を認める。

図 6. ソフトウェア Avizo を用いたコラーゲン細線維の 3 次元再構成像

A: 骨梁の長軸を中心とする横断像の断層像。多数の骨芽細胞とその周囲を走行するコラーゲン細線維を認めた。骨芽細胞の細胞膜の一部と，細胞外のコラーゲン細線維に連続性を認めた（白実線枠）。

B: 図 A 白点線枠の拡大像。多数のコラーゲン細線維を認め，これらは骨梁の長軸に対し概ね平行に走行していた。

C: 図 A 白実線枠の拡大像。コラーゲン分子が骨芽細胞の細胞膜と連続しており，ランダムに走行していた。

D: ソフトウェア Avizo により骨芽細胞から放出されたコラーゲン細線維の 3 次元再構成像を作製した。骨芽細胞付近のコラーゲン分子は短く，粗に走行していた。

E: 図 D を右方から観察した断面像。コラーゲン細線維は骨芽細胞の外形に沿って骨基質側へ走行していた。

F: コラーゲン分子は細胞外で他のコラーゲン分子と結合し，長く密に走行していた。

図 7. 骨芽細胞内のコラーゲン様構造物の観察

A: 骨芽細胞内に，細胞外と同程度の密度，形状，コントラストをもつコラーゲン様構造物を認めた(白矢頭)。

B: 図 A 白枠の拡大像。コラーゲン様構造物は細胞内で筒状構造物に包まれていた。図 A を深さ 0 nm と設定し，深さ 27.1 nm ごとに観察した像を示した。