

学位論文

表 題：直交配置型 FIB-SEM を用いたコラーゲン細線維の三次元形態計測

所 属：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

歯科矯正学分野

投稿者：橋本 真奈

原稿総紙数： 20 枚（本文，文献，表題脚注， 図の説明）

図： 0 枚

写真： 4 枚（図 1, 2, 3, 4）

表： 0 枚

電子媒体： CD-R（1 枚）

別刷数： 50 部

連絡先：橋本 真奈（PHS: 3913）

メールアドレス：ph70319m@s.okayama-u.ac.jp

（勤務先）〒700-8525

岡山市北区鹿田町 2-5-1

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

歯科矯正学分野（内線 6691）

直交配置型 FIB-SEM を用いたコラーゲン細線維の三次元形態計測

橋本 真奈

緒言

コラーゲン線維は骨が構成される初期段階、すなわち骨の石灰化に大きく影響している¹⁾。骨芽細胞や軟骨細胞から放出された基質小胞の内部でハイドロキシアパタイトの結晶核が形成され、それが小胞外に放出され結晶が成長するとともに、石灰化がコラーゲン線維を足場に行われると考えられている²⁾。

そうして作られた骨はハイドロキシアパタイトを主成分とした無機成分と、コラーゲン線維を主成分とした有機成分とで構成されている。コラーゲン線維は骨の重量あたりでは 25%程度であるが、体積あたりでは 50%ほどを占めている。骨の強度は構成成分の質と量に依存することから、コラーゲン線維の質的、量的変化は骨の強度に直接的に影響する³⁾。とくに、極限つよさ(ひっぱり強さ)や靱性といった降伏後の特性は、正常なコラーゲンネットワークが維持されること、そしてコラーゲン線維の含有量に依存している^{4, 5)}。

また、遺伝子異常により α 鎖の異常が生じることで正常なトロポコラーゲンの産生ができなくなった結果、コラーゲン線維の構造が維持されないことでコラーゲン線維の強度が弱くなり、骨が易骨折性を示す骨形成不全症や、コラーゲン線維の架橋結合が阻害されることで骨格異常をきたすラチリズムのように、コラーゲン線維の構造が変化することで重篤な疾患が引き起こされることが知られている⁶⁻⁹⁾。したがって、コラーゲン線維の構造やコラーゲンネットワークを解析することが重要視され、研究が進められてきた。

一方、顕微鏡の進歩に伴い、骨組織内のコラーゲン線維の観察が可能となった。偏光顕微鏡(PLM)を用いたコラーゲン線維の観察では、コラーゲン線維の走行に関する新たな知見が得られてきた。Martin らは PLM を用いてコラーゲン線維が骨の長軸方向に走行することで、骨組織がより大きな弾性係数や強さをもつことを示した¹⁰⁾。Goldman らは PLM を用いて年齢や性別によってコラーゲン線維の方向が変化することを発見し¹¹⁾、骨の機械的特性の変化とコラーゲン線維の走向の違いに関係があることが示唆された。PLM 以外にも TEM や SEM といった電子顕微鏡でもコラーゲン線維の観察が可能となった。Weiner らは TEM を用い

て1本1本のコラーゲン細線維の走行を観察し、コラーゲン細線維が隣り合う層板同士で直交していることを示した¹²⁾。YamamotoらはSEMやTEMを用いてtwisted plywood modelにおけるコラーゲン細線維の走行をより詳細に観察した¹³⁾。

そしてさらに、近年ではコラーゲン線維の三次元的観察が行われるようになり、NatarileらはSSV (Serial Surface View)を用いて層板骨を三次元的に観察し、高速フーリエ変換(Fast Fourier Transform)による解析を行うことで、コラーゲン線維が扇状に広がるように走行する層板骨(plywood-like fanning sub-lamella)、コラーゲン線維が一定の方向性をもって走行する層板骨(unidirectional sub-lamella)、そしてコラーゲン線維の走行が乱れている層板骨(disordered sub-lamella)というコラーゲン線維走向の異なる3種類の層板骨を観察した¹⁴⁾。またHosaki-Takamiyaらは、超高压電子顕微鏡を用いて、骨芽細胞内部からコラーゲン細線維が放出される様子を観察し、放出されて間もないコラーゲン細線維の走向は乱れているものの、放出された骨芽細胞から離れるにつれて、コラーゲン細線維の走向がそろいはじめるということを示した¹⁵⁾。

このように層板骨におけるコラーゲン線維の走向の解析は進んでいるものの、コラーゲンネットワークの詳細な三次元的解析は行われておらず、またコラーゲン線維の走向と骨系細胞の有無の関連に関する知見もほとんど示されていない。これは、骨組織という固く閉ざされた組織内部の明瞭な観察が非常に難しいことが原因であると考えられる。加えてナノサイズのコラーゲン細線維とマイクロサイズの骨系細胞とを同時かつ広範囲に観察しようとする、解像度と観察範囲との間でトレードオフの問題が生じるためである。

PLMは広範囲な骨組織の観察が可能であるものの、ナノサイズのコラーゲン細線維1本1本の観察は困難である。TEMは分解能が0.1 nm程度であり、高解像度の観察が可能であるものの、超薄切片を観察に用いるため、コラーゲンネットワークの三次元的観察はできない。またSEMは表面形状の観察に長けているものの骨組織深部の観察はできない。したがって今まで用いられてきた顕微鏡ではコラーゲンネットワークの三次元的解析は行えない。

一方、近年原らによって開発された直交配置型FIB-SEMはこうした問題を一挙に解決することができる。まず、FIB-SEM断層撮影法とは電子顕微鏡レベルの高い分解能をもつ細胞や組織の三次元再構築手法であり、収束イオンビーム

(FIB)による試料表層の切削と、その切削面の SEM 観察を繰り返すことで (シリアルセクションング)、試料の再構築を行う連続スライス SEM 法の一つである。FIB-SEM の大きな特徴は、この SEM 観察が表面の凸凹を見る形態観察ではなく、FIB によって切削した平面を観察するという点である。ほぼ完全な平面を作って、その平面内の内部組織のコントラストを二次電子あるいは反射電子で観察する¹⁶⁾。FIB-SEM 断層撮影法のもう一つの特徴は、試料の切削に FIB を用いることである。FIB には主にガリウムイオンビームが用いられる。加速され直径数 nm に収束されたガリウムイオンビームは樹脂のような柔らかい素材から未脱灰骨のような固い組織に至るまで、数 nm の精度で任意の形状に切削・加工することが可能である。これまでもその特徴を生かして、硬組織の観察に FIB が用いられてきた^{17, 18)}。したがって FIB 切削ごとに SEM で切削面を観察するため、固い骨組織の内部構造の三次元的観察が可能であり、また、FIB で骨組織の表面を切削することで、数 nm の深さ分解能をもつ三次元再構築が可能となり、したがってナノサイズのコラーゲン細線維の 1 本 1 本から、マイクロサイズの骨系細胞までを広範囲に観察することが可能である。

こうして本研究では、コラーゲンネットワークの詳細な三次元的解析を行い、さらにコラーゲン細線維の走向と骨系細胞の有無の関連に関する知見を獲得するため、直交配置型 FIB-SEM を用いて骨組織の三次元的観察を行い、そしてコラーゲン細線維の三次元的形態計測を行った。

従来の FIB-SEM は FIB と SEM の光軸が約 60 度の角度をもって配置されている傾斜配置型が主流であった。これは、例えば SEM で観察部位を探し、その部位を FIB で加工して取り出す場合などには非常に有用である。しかし FIB と SEM の配置に角度がついていることで SEM 像に視野のずれが生じるため、画像の補正が必要となり解像度が落ちることから、シリアルセクションングに限ると、必ずしも最適の配置とは言い難い¹⁹⁾。そこで本研究では傾斜配置型 FIB-SEM ではなく、直交配置型 FIB-SEM を用いることで、より高解像度の SEM 像を取得することを試みた。直交配置型 FIB-SEM は切削面の高低差によるコントラスト変化がなく、常に歪みのない面が観察でき、視野のずれが生じないことから、三次元観察に適している。

撮影した連続断面の SEM 像はソフトウェア Amira を用いて三次元構築を行った。さらに、主にアクチンフィラメントの抽出に用いられていたソフトウェア XTracing 拡張機能を用いて、コラーゲン細線維の三次元的形態計測を行った²⁰⁾。

材料ならびに方法

1. 試料作製

本研究は、岡山大学動物実験委員会承認(OKU-2016141)のもと実施した。

試料は胎生17日齢のニワトリ胚の頭蓋骨を用いた。頭蓋骨を取り出したあと、 1×3 mm程度の長方形に切り出した。このとき長方形の長辺が骨梁の長軸方向と平行になるように規定した。その後、HEPES 120 mM(片山化学工業株式会社、大阪、日本)、塩化ナトリウム 200 mM(ナカライテスク株式会社、京都、日本)を1000 mlの純水に溶解させ1 M水酸化ナトリウム溶液を用いてpH 7.4に調整後、443.9 mMの塩化カルシウム(ナカライテスク)を加えて作製したHEPES緩衝液を用いて、それぞれ2%に希釈したパラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドを合わせた固定液に4℃で24時間固定を行った。固定後はHEPES緩衝液を用いて十分に洗浄した。洗浄後は電子染色を行った。まず4%四酸化オスミウム(TAAB, Berkshire, GBR)とHEPES緩衝液で希釈した3%フェロシアン化カリウム(Sigma Aldrich, MO, USA)を同量合わせた溶液に4℃で1時間浸漬した。次に0.94 mMのチオカルボヒドラジド(Alfa Aesar, Lancashire, GBR)を純水10 mlに溶解させ作製したチオカルボヒドラジド溶液に室温で20分間浸漬した。続いて純水で希釈した2%四酸化オスミウム溶液に室温で30分間、純水で希釈した1%ヒドロキノン溶液(和光純薬工業株式会社、大阪、日本)に室温で1時間浸漬した。次に酢酸イッテルビウム(III)四水和物(Sigma Aldrich)を純水に溶解させ作製した1%酢酸イッテルビウム溶液に1.5 mlコニカルチューブ内で浸漬させ、電子レンジにて出力170 Wで30秒間照射した後、4℃で一晩浸漬した。そして0.3 mMのアスパラギン酸(Sigma Aldrich)を沸騰させた純水10 mlに溶解させ作製したアスパラギン酸溶液に0.2 mMの硝酸鉛(II)(和光純薬工業株式会社)を溶解させ、1 M水酸化カリウム溶液を用いてpH 5.5に調整したアスパラギン酸鉛溶液に60℃で3分間浸漬した。それぞれの染色後に純水で十分洗浄した。染色後、試料はエタノール系列(50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%無水エタノール)で脱水され、アセトンで置換後、アセトンとエポキシ樹脂EPON 812(Agar Scientific, Essex, GBR)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6時間浸漬後、真空下でエポキシ樹脂に一晩浸漬した。エポキシ樹脂に包埋し、60℃の常温器で2日間重合させた。

包埋した試料は $4 \times 4 \times 1$ mm以下の大きさになるように研磨した。このと

き研磨した試料の長軸と骨梁の長軸方向が平行になるように、そしてFIB-SEMの観察領域が試料のエッジにくるよう研磨した。その後CP（クロスセクションポリリッシャ）研磨を行うことで、さらに歪みのない観察面を作製した。

2. 観察領域

ニワトリ胚の頭蓋骨を用いた理由は、この時期の頭蓋骨が眼窩から頭頂部にかけて成長するため、骨梁の長軸方向の規定が比較的容易であるためである²¹⁾。本研究では、試料の長軸方向と骨梁の長軸方向が平行になるように試料作製を行った。骨の成長にはモデリングとリモデリングが存在する。モデリングは新生骨の形成のみが行なわれているが、リモデリングは既存の骨と新生骨とが混在するため基質の構造が複雑である。したがって本研究ではモデリング期の骨組織を用いることとし、胎生期の頭蓋骨のさらに先端領域の骨組織を観察した。

3. 直交配置型FIB-SEMを用いた骨組織の三次元的観察

試料の観察は国立研究開発法人物質・材料研究機構所有の直交配置型FIB-SEM（SMF-1000，株式会社日立ハイテクサイエンス、東京、日本）を用いた。本研究では、FIBにはガリウムイオンビームを用いた。FIB加工の加速電圧は30 kV、SEM加速電圧は1 kVに設定した。SEMの検出器は、光軸上に設置された環状二次電子検出器（InLensSE）とエネルギーフィルタ付環状反射電子検出器（EsB）の信号を混合して使用した。断面SEM像は $25 \times 25 \mu\text{m}$ 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、1000枚のSEM像を取得することで、25 nmボクセルの $25 \times 25 \times 25 \mu\text{m}$ 領域のデータを得た。

取得した連続SEM像はソフトウェアAmira（Zuse Institute Berlin, Berlin, GER）を用いて三次元構築を行った。三次元再構築を行うことで、取得した断層面とは別の任意の断層面も観察することが可能になった。つまり、取得したSEM像の横方向をx軸、縦方向をy軸、骨梁の長軸方向をz軸と規定すると、取得したSEM像はx-y平面となり、すなわちx-y平面だけでなく、x-z平面やy-z平面の観察も可能になった。そして、特定の構造物のみを抽出し観察できるようになった。

なお、画像は観察が容易になるように白黒反転し、TEM様の画像に変換した。

4. コラーゲン細線維の三次元的形態計測

Amiraで三次元再構築した後にソフトウェアXTracing拡張機能（Zuse Institute Berlin）を用いて骨組織中におけるコラーゲン細線維を自動抽出し、

解析を行った。このソフトは、まず抽出したコラーゲン細線維と同径のシリンダーをテンプレートとして設定し、元の画像からコラーゲン細線維を自動抽出し、実際の画像との一致具合を算出していくものである。コラーゲン細線維はその直径がほとんど変化しないため XTracing 拡張機能の適応が可能となる。設定したテンプレートをもとに、抽出したコラーゲン細線維の始点と終点を結んだ直線の角度を測定し、走行角度や長さが出力される。骨組織中におけるすべてのコラーゲン細線維を抽出すると膨大な量になるため、本研究では 2 μm 以上の長さのコラーゲン細線維を抽出した。テンプレートは直径 80 nm、長さ 500 nm で設定し、すべてのコラーゲン細線維の解析に同じ条件を適用した。

コラーゲン細線維を自動抽出し、表示するにあたって、本研究では骨梁の長軸方向 (z 軸) を 90 度と規定し、コラーゲン細線維の走行角度により線維の色分けを行った。

骨組織中から抽出することのできたすべてのコラーゲン細線維の三次元的形態計測を行ったあと、コラーゲン細線維の走向と骨芽細胞や骨細胞といった骨系細胞の有無との関連を解析するため、層を設定し、各層ごとに解析を行った。まず骨芽細胞とコラーゲン細線維との関係を調べるため、骨芽細胞が豊富な骨芽細胞層を設定した。次に骨芽細胞は少なく、骨細胞が存在する骨芽細胞直下層 [Office1]、そして骨系細胞がほとんど存在せず、集束化したコラーゲン細線維が束状構造をなしている骨中心層を設定した。それぞれの層は 2.5 μm の厚さに設定した [Office2]。

さらに、骨細胞周囲のコラーゲン細線維の走向を観察するため、骨細胞周囲の横約 10.2 μm 、縦約 8.8 μm の領域を選択し、その部位のコラーゲン細線維を抽出、観察した。

結果

直交配置型 FIB-SEM を用いて、1 枚の SEM 画像からニワトリ胚頭蓋骨の 25 \times 25 μm の領域を 25 nm / pixel の高解像度で観察することができた (図 1)。骨梁の長軸方向を規定しているニワトリ胚頭蓋骨の頭頂側から眼窩側方向へ、セクショニングピッチを 25 nm で、1000 回の連続撮影を行い、25 \times 25 \times 25 μm の立方体領域を観察することができた。

図 1 A～図 1 D に取得した SEM 像 (x-y 平面) を示した。図 1 A から図 1 D に

かけてニワトリ胚頭蓋骨の頭頂側から眼窩側方向へセグメンテーションを行った。骨組織の表層に骨芽細胞や骨細胞を観察することができた(図 1 B : OB, OCY)。骨細胞は周囲をコラーゲン細線維によって囲まれていた(図 1 B : Col)。骨組織の中心部にはコラーゲン細線維が集束した束状の構造物を観察することができた(図 1 B : CB)。図 1 E~図 1 H に SEM 像を三次元再構築することで取得した x-z 平面の画像を示した。図 1 E から図 1 H にかけて骨表層から骨深層方向へセグメンテーションを行った。三次元再構築することで、骨梁の長軸方向に走行しているコラーゲン細線維の連続性を観察することができた。また、rOTO 法(還元オスミウム、チオカルボヒドラジド、オスミウム)による染色を行ったことで、強力な膜コントラストを得ることが可能となり、骨芽細胞や骨細胞には細胞内小器官である ER やミトコンドリア、核、核小体等を観察することができた。図 1 I に図 1 A の黒枠で囲んだ約 $9 \times 9 \mu\text{m}$ 領域の拡大図を示した。コラーゲン細線維の横断面を 1 本 1 本明瞭に観察することができた。図 1 J に図 1 G の黒点線で囲んだ約 $9 \times 9 \mu\text{m}$ 領域の拡大図を示した。骨梁の長軸方向に走行しているコラーゲン細線維の連続性やコラーゲン細線維のストライプ様構造を観察することができた。なお、コラーゲン細線維は、図 1 I から骨芽細胞下部に直径が約 80~100 nm 程の構造物として観察できたことやストライプ様構造から判断した。図 1 K に図 1 I の白枠で囲んだ約 $4 \times 4 \mu\text{m}$ の領域の拡大図を示した。コラーゲン細線維間には直径約 20~150 nm の球形の構造物を観察することができた(図 1 K 黒矢印)。図 1 L には図 1 I の黒線で示した深さの再構築 x-z 平面を示した。以前 Hosaki-Takamiya らによって発表されたように、骨芽細胞からコラーゲン細線維が束状に放出されている様子が観察できた(図 1 L 黒点線矢印)。そのほか石灰化物の観察も可能であった(データ省略)。

次に、コラーゲンネットワークの詳細な三次元的解析のため、XTracing 拡張機能を用いて、コラーゲン細線維 1 本 1 本の走向解析を試みた(図 2)。図 2 A~図 2 D は取得した SEM 像を三次元構築し、y 軸を中心にそれぞれ 0 度、約 60 度、約 80 度、約 180 度左回転させたものである。図 2 E~図 2 H は抽出したコラーゲン細線維をすべて表示し、図 2 A~図 2 D に合わせて回転させたものである。同様に、図 2 I~図 2 L は三次元構築像を x 軸を中心に約 45 度、約 90 度、約 135 度、約 270 度上方回転させたもので、図 2 M~図 2 P は図 2 I~図 2 L に合わせて回転させたものである。抽出したコラーゲン細線維は、骨梁の長軸方向(z 軸)を 90 度と規定し、コラーゲン細線維の走向角度によって図 2 右下のカ

ラーコードをもとに色分けを行った。すなわち、骨梁の長軸方向と平行に走行するコラーゲン細線維は青色や緑色で表示され、骨梁の長軸方向に対して直交する方向に走行するコラーゲン細線維は赤色やピンク色で表示されている。

コラーゲン細線維を抽出後、解析をおこなった(図2 Q)。図2 Qは合計4つの個体から作製したサンプルを計測した平均値を示している。

このようにコラーゲン細線維を抽出することで、骨組織内部のコラーゲン細線維の走向を視覚的にとらえることができた。図2 Gや図2 M, 図2 Oより、それぞれ青色や黄色、黄緑色等で表示されたコラーゲン細線維が部分的に集束して走行している様子が観察できた。骨中心部のコラーゲン細線維が集束している部分は、抽出することができなかった。骨細胞が埋め込まれている場所ではコラーゲン細線維は存在しないため、コラーゲン細線維は抽出されなかった。骨梁の長軸方向は90度と規定されていることから、図2 Qより多くのコラーゲン細線維が骨梁の長軸方向に沿って走行していることがわかった。90度方向に走行するコラーゲン細線維の本数と有意差をもつコラーゲン細線維の走行角度を調べるため、スチューデントのt検定を行った。その結果、0度~50度、140度~180度方向に走行しているコラーゲン細線維と90度方向に走行するコラーゲン細線維の本数に有意差があることがわかった。

次にコラーゲン細線維の走向と骨系細胞の有無との関連を調べるため、骨芽細胞が豊富な骨芽細胞層、骨芽細胞が少なく骨細胞が存在する骨芽細胞直下層、骨系細胞がほとんど存在しない骨中心層においてコラーゲン細線維の解析を行った(図3)。今回はその一例を示す。図3 Aに各層の設定を示した。骨芽細胞層ではコラーゲン細線維は60度や90度の角度に多く走行しているものの、全体的にあまり規則性は認めなかった(図3 B)。骨芽細胞直下層では、コラーゲン細線維は70度~90度の角度に多く走行しており、骨芽細胞層と比較すると、規則性を認めた(図3 C)。骨中心層ではほとんどのコラーゲン細線維が90度、すなわち骨梁の長軸方向に沿って走行しており、その規則性は非常に顕著であった(図3 D)。つまり、モデリング期骨組織の成長端においては、骨芽細胞層ではコラーゲン細線維の走向に著明な規則性はなく、骨中心層に向かうにつれて走向に規則性が生じ、骨中心層ではほとんどのコラーゲン細線維が骨梁の長軸方向に走行しているということがわかった。

さらに、骨細胞周囲のコラーゲン細線維の走向を検討するため、骨細胞周囲の縦約8.8 μm 、横約10.2 μm の領域を取り出し、コラーゲン細線維の走向を観

察した(図4)。図4 A, Bに取り出した骨細胞周囲の領域を示した。図4 C~図4 Fに骨細胞周囲のコラーゲン細線維を表示し、y軸を中心にそれぞれ0度、90度、180度、270度右回転させたものを示した。図4 Cの手前側はニワトリ胚頭蓋骨の頭頂側であり、頭頂側から観察したコラーゲン細線維の走向に規則性はあまり認めなかった。図4 Dから、部分的に青色で表示されたコラーゲン細線維が束状に走行している様子が観察できたが、骨細胞下部には集束し束状構造をなしたコラーゲン細線維が存在するため、抽出できたコラーゲン細線維が少なくなっていた。また、コラーゲン細線維の走行が疎である部分へ細胞突起が多く伸びている様子が観察できた。図4 Eの手前側はニワトリ胚頭蓋骨の眼窩側であり、眼窩側から観察したコラーゲン細線維の走向に規則性はあまり認めなかった。図4 Fから、図4 Dと同様、青色や黄緑色で表示されたコラーゲン細線維が束状に走行している様子が観察できた。これらをまとめると、骨細胞周囲のコラーゲン細線維は部分的に集束して走行しており、コラーゲン細線維の走行が疎である部分に細胞突起が多く伸びているということが観察された。

考察

これまでコラーゲン線維の走向の観察には偏光顕微鏡が用いられてきた。また、骨組織や骨組織中のコラーゲン細線維の観察にはTEMやSEMが多く用いられてきた^{13, 14, 22)}。しかしながら、いずれも二次元的な観察であり、骨組織やコラーゲンネットワークを三次元的かつ詳細に把握することは困難であった。そこで今回、新たに直交配置型FIB-SEMを用いることで、TEMのような高解像度で広範囲のSEM画像を連続撮影することが可能となり、骨組織の詳細な三次元的観察が可能となった。さらに、AmiraやXTracing拡張機能を用いることで、コラーゲンネットワークの詳細な三次元的形態計測を行うことが可能となった。

近年開発された直交配置型FIB-SEMは数ナノレベルの高解像度で数十マイクロレベルの広範囲の観察が行える電子顕微鏡である。これにより、初期の石灰化像、骨芽細胞や骨細胞といった骨系細胞、およびその細胞内小器官、コラーゲン細線維が集束化し束状構造をなした構造物、そしてコラーゲン細線維1本1本といった骨組織内部の詳細な観察が可能となった。コラーゲン細線維間に観察できた、直径約20~150 nmの球形の構造物は、今回観察したサンプルが骨形成

における初期段階であることや、その大きさから基質小胞であると考え²³⁾。また、コラーゲン細線維が骨芽細胞から束状に放出された様子が観察できたが、これはコラーゲン細線維が骨芽細胞内部から開口分泌の形式で放出され、また骨芽細胞からある一定の幅で束状に放出されている^{15, 24)}という以前の文献と同様の結果を示唆していると考えられる。

取得した連続 SEM 像を Amira を用いて三次元構築することで、骨系細胞やコラーゲン細線維といった骨組織中の微細な構造物の三次元的観察を行うことが可能となり、そうした構造物の三次元的な位置関係の把握や、細胞から細胞突起が伸びている様子なども三次元的に観察することができた。さらに、取得した SEM 像を三次元的に再構築することにより、取得した断層面とは別の任意の断層面を観察することが可能となった。今回、取得した x-y 平面だけでなく x-z 平面を観察することで、x-y 平面だけでは観察することができなかったコラーゲン細線維の連続性を観察することが可能となり、コラーゲンネットワークを観察することができた。

次に、これまで主にアクチンフィラメントの解析に用いられてきた XTracing 拡張機能を用いたことにより、コラーゲン細線維の自動抽出が可能となり、コラーゲン細線維の三次元的形態計測を行うことができた。このソフトは、コラーゲン細線維と同径のシリンダーをテンプレートとして設定し、このテンプレートをもとに SEM 像からコラーゲン細線維の自動抽出を行うものである。抽出したコラーゲン細線維の始点と終点を結んだ直線の角度を計測することでコラーゲン細線維の走行角度も解析することが可能となった。テンプレートの設定値を一定にして自動抽出を行うことで、異なるサンプル間のコラーゲン細線維走向の観察、解析の比較に非常に有用であると考えられる。また、今回は骨梁の長軸方向を 90 度と規定し、コラーゲン細線維の走行角度により線維の色分けを行うことで、コラーゲン細線維の走向を視覚的にとらえることが可能となり、コラーゲン細線維が部分的に一定方向に走行している様子が観察できた。抽出したすべてのコラーゲン細線維の走行角度を計測することで、骨組織ではコラーゲン細線維が骨梁の長軸方向と平行に多く走行していることがわかった。さらに解析を進めると、とくに骨中心部ではほとんどのコラーゲン細線維が骨梁の長軸方向に走行していることがわかった。今回骨中心部のコラーゲン細線維が束状構造をなしている領域は抽出することができなかった。これはコラーゲン細線維の直径が変化しているためと考えられるが、この領域のコラーゲン細線維は

骨梁の長軸方向に走行していることから、今回の解析結果に影響はないものと考えられる。この領域のコラーゲン細線維を抽出することができれば、骨梁の長軸方向と平行に多くのコラーゲン細線維が走行しているという結果をさらに強調することが可能になると考えられる。

さらに、骨芽細胞層、骨芽細胞直下層、骨中心層にわけてそれぞれのコラーゲン細線維の走向解析を行うことで、コラーゲン細線維走向と骨系細胞の有無との関連の解析を行うことが可能となった。これまで、骨組織の深さによってコラーゲン細線維の走行が変化することが報告されていた^{25, 26)}。今回、骨芽細胞層では他の層と比較してコラーゲン細線維の走向の規則性は弱く、骨芽細胞直下層では骨梁の長軸方向にその走向の規則性が生じ始め、骨中心層では規則性が非常に強く、そして骨梁の長軸方向にほとんどの線維が走行するということがわかった。すなわち、コラーゲン細線維は骨芽細胞から放出された直後や骨系細胞が周囲に多く存在する部位では骨系細胞を避けて走行するため、走向の規則性が弱いものの、骨系細胞の少ない骨中心部に向かうにつれて徐々に骨梁の長軸方向に集束して走行するということが考えられる。骨組織の深さによってコラーゲン細線維の走向が変化するという点で、以前の文献と同様の結果を示唆していると考えられる。

骨組織中のコラーゲン細線維が骨梁の長軸方向に多く走行する要因として、まず、骨中心部のコラーゲン細線維が架橋により集束し、束状構造をなして走行することで、コラーゲン細線維の走行の方向性がととのうことが挙げられる。そして今回試料として用いた胎生期のニワトリ胚は脳が急速に成長することから²⁷⁾、この成長速度に合わせて骨組織の縫合部に成長方向の伸展力が生じることで、束状構造をなしたコラーゲン細線維が骨梁の長軸方向に多く走行するようになることが要因ではないかと考えられる。

一方、骨細胞周囲の領域を限定して解析を行うことで、骨細胞周囲のコラーゲン細線維の走向を観察することができた。骨細胞周囲のコラーゲン細線維は部分的に束状に集束して走行しており、コラーゲン細線維の走行が疎な部位に細胞突起が伸びている様子が観察できた。したがって、コラーゲン細線維の走行は初期骨細胞の細胞体には影響されるものの、細胞突起には影響されないという可能性が示唆された。

今回はニワトリ胚頭蓋骨を用いて、直交配置型 FIB-SEM による骨組織の三次元的観察、およびコラーゲン細線維の三次元的形態計測を行ったが、今後は骨形

成不全症や骨ページェット病、骨粗鬆症、ラチリズムといったコラーゲン系疾患²⁸⁻³²⁾をもつモデルマウス等の観察を行うことで、疾患による影響を骨組織内部の構造やコラーゲン細線維の走行といった骨基質の観点から探ることが可能になると考えられる。

結論

直交配置型 FIB-SEM を用いることで、骨組織内部を 25 nm / voxel の高解像度で明瞭に観察することができ、初期の石灰化像、骨芽細胞や骨細胞といった骨系細胞、およびその小器官、そしてコラーゲン細線維などの骨組織内部の詳細な観察が可能となった。XTracing 拡張機能を用いることで、骨組織中のコラーゲン細線維の走向を解析することが可能となり、その結果、骨組織中のコラーゲン細線維は骨梁の長軸方向に多く走行していることがわかった。さらに、コラーゲン細線維は、骨芽細胞から放出された直後や骨系細胞が多く存在する部位では走向の規則性は弱く、骨系細胞の少ない骨中心部に向かうにつれて走向に規則性が生じ、骨中心部ではほとんどのコラーゲン細線維が骨梁の長軸方向に走行していることがわかった。骨細胞周囲のコラーゲン細線維は部分的に束状に集束して走行しており、コラーゲン細線維の走行が疎な部位に細胞突起が伸びている様子が観察できた。

謝辞

本研究の一部は、文部科学省委託事業ナノテクノロジープラットフォーム課題として NIMS 微細構造解析プラットフォームの支援を受けて実施されました。

稿を終えるにあたり、懇篤なる御指導と御校閲を受け賜り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上岡寛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岡山大学歯学部先端領域研究センター長岡紀幸先生、国立研究開発法人物質・材料研究機構原徹先生、中村晶子様、原由佳様、株式会社マックスネット上村逸郎様に謹んで感謝の意を表します。さらに、本研究を行うにあたり、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. Fleisf, H., Neuman, WF. : Mechanisms of calcification : role of collagen, polyphosphates, and phosphatase. *Am J Physiol.*, 200, 1296-1300, 1961.
2. Hoshi, K., Kemmotsu, S., Takeuchi, Y., Amizuka, N., Ozawa, H. : The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen fibrils. *J Bone Miner Res.*, 14, 273-80, 1999.
3. Saito, M., Marumo, K. : Collagen cross-links as a determinant of bone quality : a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int.*, 21, 195-214, 2010.
4. Nyman, JS., Reyes, M., Wang, X. : Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. *Micron.*, 36, 566-582, 2005.
5. Nyman, JS., Roy, A., Tyler, JH., Acuna, RL., Gayle, HJ., Wang, X. : Age-related factors affecting the postyield energy dissipation of human cortical bone. *J Ortho Res.*, 25, 646-655, 2007.
6. Misof, K., Landis, WJ., Klaushofer, K., Fratzl, P. : Collagen from the osteogenesis imperfecta mouse model (oim) shows reduced resistance against tensile stress. *J Clin Invest.*, 100, 40-45, 1997.
7. Rauch, F., Glorieux, FH. : Osteogenesis imperfecta. *Lancet.*, 363, 1377-1385, 2004.
8. Mikkonen, L., Tuominen, T., Kulonen, E. : Collagen fractions in

lathyritic

rats. *Biochem Pharmacol.*, 3, 181-183, 1960.

9. Lees, S., Barnard, SM., Mook, HA. : Neutron studies of collagen in lathyritic

bone. *Int J Biol Macromol.*, 9, 32-38, 1987.

10. Martin, RB., Lau, ST., Mathews, PV., Gibdon, VA., Stover, SM. : Collagen

fiber organization is related to mechanical properties and remodeling in

equine bone. A comparison of two methods. *J Biomech.*, 29, 1515-1521,

1996.

11. Goldman, HM., Bromage, TG., Thomas, CD., Clement JG. : Preferred collagen fiber orientation in the human mid-shaft femur. *Anat Rec A Discov*

Mol Cell Evol Biol., 272, 434-445, 2003.

12. Weiner, S., Arad, T., Sabanay, I., Traub, W. : Rotated plywood structure of

primary lamellar bone in the rat: orientations of the collagen fibril arrays.

Bone, 20, 509-514, 1997.

13. Yamamoto, T., Hasegawa, T., Sasaki, M., Hongo, H., Tabata, C., Liu, Z., Li,

M., Amizuka, N. : Structure and formation of the twisted plywood pattern

of collagen fibrils in rat lamellar bone. *J Electron Microsc.*, 61, 113-121, 2012.

14. 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.

15. Hosaki-Takamiya, R., Hashimoto, M., Imai, Y., Nishida, T., Tamada, N.,

Tanaka, T., Kawanabe, N., Yamashiro, T., Kamioka, H. : Collagen production of osteoblasts revealed by ultra-high voltage electron microscopy.

J Bone Miner Metab., 34, 491-499, 2016.

16. Laser, V., Milani, M., Tatti, F., Tkalec, ZP., Strus, J., Drobne, D. : Focused

ion beam (FIB)/scanning electron microscopy (SEM) in tissue structural

research. *Protoplasma.*, 246, 41-48, 2010.

17. Giannuzzi, LA., Phifer, D., Giannuzzi, NJ., Capuano, MJ. : Two dimensional

and 3-dimensional analysis of bone/dental implant interfaces with the use

of focused ion beam and electron microscopy. *J Oral Maxillofac Surg.*, 65,

737-747, 2007.

18. Schneider, P., Meier, M., Wepf, R., Muller, R. : Serial FIB-SEM imaging for

quantitative 3D assessment of the osteocyte lacuno-canalicular network.

Bone, 49, 304-311, 2011.

19. 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 Compd.*, 577, 717-721, 2013.

20. Rigort, A., Gunther, D., Hegerl, R., Baum, D., Weber, B., Prohaska, S.,

Medalia, O., Baumeister, W., Hege, HC. : Automated segmentation of electron tomograms for a quantitative description of actin filament networks.

J Struct Biol., 177, 135-144, 2012.

21. Kamioka, H., Murshid, SA., Ishihara, Y., Kajimura, N., Hasegawa, T., Ando,

R., Sugawara, Y., Yamashiro, T., Takaoka, A., Takano-Yamamoto, T. :

A

Method for observing silver-stained osteocytes in situ in 3-micron sections

using ultra-high voltage electron microscopy tomography. Microsc Microanal., 15, 377-383, 2009.

22. Boyde, A., Lones, SJ. : Scanning electron microscopy of bone: instrument,

specimen and issues. Microsc Res Tech., 33, 92-120, 1996.

23. Golub, EE. : Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology.

Semin Immunopathol., 33, 409-417, 2011.

24. Leblond, CP. : Synthesis and secretion of collagen by cells of connective

tissue, bone, and dentin. Anat Rec., 224, 123-138, 1989.

25. Foolen, J., van Donkelaar, C., Nowlan, N., Murphy, P., Huiskes, R., Ito, K. :

Collagen orientation in periosteum and perichondrium is aligned with

preferential directions of tissue growth. J Orthop Res., 26, 1263-1268, 2008.

26. Reznikov, N., Shahar, R., Weiner, S. : Three-dimensional structure of human

lamellar bone: the presence of two different materials and new insights into

the hierarchical organization. Bone, 59, 93-104, 2014,

27. Wang, Z., Odagaki, N., Tanaka, T., Hashimoto, M., Nakamura, M., Hayano, S., Ishihara, Y., Kawanabe, N., Kamioka, H. : Alternation in the gap- junctional intercellular communication capacity during the maturation of osteocytes in the embryonic chick calvaria. *Bone*, 91, 20-29, 2016.
28. Oestreich, AK., Carleton, SM., Yao, X., Gentry, BA., Raw, CE., Brown, M., Pfeiffer, FM., Wang, Y., Phillips, CL. : Myostatin deficiency partially rescues the bone phenotype of osteogenesis imperfecta model mice. *Osteoporos Int.*, 27, 161-170, 2016.
29. Ohara, M., Imanishi, Y., Nagata, Y., Ishii, A., Kobayashi, I., Mori, K., Ito, M., Miki, T., Nishizawa, Y., Inaba, M. : Clinical efficacy of oral risedronate therapy in Japanese patients with Paget' s disease of bone. *J Bone Miner Metab.*, 33, 584-590, 2015.
30. Zimmermann, EA., Kohne, T., Bale, HA., Panganiban, B., Gludovatz, B., Zustin, J., Hahn, M., Amling, M., Ritchie, RO., Busse, B. : Modifications to nano- and microstructural quality and the effects on mechanical integrity in Paget' s disease of bone. *J Bone Miner Res.*, 30, 264-273, 2015.
31. Andersson, A., Bernardi, AI., Stubelius, A., Nurkkala-Karlsson, M., Ohlsson, C., Carlsten, H., Islander, U. : Selective oestrogen receptor modulators

lasofoxifene and bazedoxifene inhibit joint inflammation and osteoporosis

in ovariectomised mice with collagen-induced adthritis. Rheumatology., 55, 553-563, 2016.

32. Knott, L., Bailey, AJ. : Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review]

of their chemistry, function, and clinical relevance. Bone, 22, 181-187, 1998.

表題脚注

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 57 回歯科基礎医学会学術大会 (2015 年 9 月、新潟)

第 72 回日本顕微鏡学会学術講演会 (2016 年 6 月、仙台)

第 36 回日本骨形態計測学会 (2016 年 6 月、新潟)

第 34 回日本骨代謝学会学術集会 (2016 年 7 月、大阪)

第 58 回歯科基礎医学会学術大会 (2016 年 8 月、札幌)

第 38 回米国骨代謝学会学術大会 (2016 年 9 月、アトランタ、アメリカ)

第 75 回日本矯正歯科学会大会 (2016 年 11 月、徳島)

図の説明

図1 直交配置型 FIB-SEM による骨組織の観察

すべての画像は白黒反転させている。

(A)～(D) 直交配置型 FIB-SEM で取得した SEM 像 (x-y 平面)。(A)から(D)にかけてニワトリ胚頭蓋骨の頭頂側から眼窩側方向へセグメンテーションを行った。それぞれ Col=コラーゲン細線維、OB=骨芽細胞、OCY=骨細胞、CB=集束化したコラーゲン細線維を示している。スケールバーは $2 \mu\text{m}$ である。(A)黒枠内の拡大像を(I)に示す。

(E)～(H) SEM 像を三次元再構築することで取得した x-z 平面の像。(E)から(H)にかけて骨表層から深層方向へセグメンテーションを行った。SEM 像を再構築することで、骨梁の長軸方向と平行に走行しているコラーゲン細線維の連続性を観察することができた。骨芽細胞や骨細胞内には細胞内小器官を観察することができた。スケールバーは $2 \mu\text{m}$ である。(G)黒点線枠内の拡大像を(J)に示す。

(I) (A)黒枠の拡大像。骨梁の長軸方向と平行に走行しているコラーゲン細線維の横断面を明瞭に観察することができた。スケールバーは $2 \mu\text{m}$ である。白枠内の拡大像を(K)に示す。

(J) (G)黒点線枠の拡大像。骨梁の長軸方向と平行に走行しているコラーゲン細線維の連続性を明瞭に観察することができた。スケールバーは $2 \mu\text{m}$ である。

(K) (I)の白枠内の拡大像。黒矢印にてコラーゲン細線維の間に観察された直径約 20～150 nm の球形の構造物を示す。スケールバーは $2 \mu\text{m}$ である。

(L) (I)の黒線の深さの x-z 平面像。黒点線矢印にて骨芽細胞から束状に放出されたコラーゲン細線維を示す。スケールバーは $2 \mu\text{m}$ である。

図2 コラーゲン細線維の三次元的形態計測

(A)～(D) 直交配置型 FIB-SEM で取得した SEM 像を三次元構築し、y 軸を中心にそれぞれ 0 度、約 60 度、80 度、180 度左回転させている。赤矢印は骨梁の長軸方向を示している。

(E)～(H) 抽出した骨組織中のコラーゲン細線維をすべて表示し、(A)～(D)に合わせて回転させている。骨梁の長軸方向(z 軸)を 90 度と規定し、コラーゲン細線維の走行角度により、右下のカラーコードをもとにコラーゲン細線維の色分けを行った。

(I)～(L) 直交配置型 FIB-SEM で取得した SEM 像を三次元構築し、x 軸を中心にそれぞれ約 45 度、90 度、135 度、270 度上方回転させている。

(M)～(P) 抽出した骨組織中のコラーゲン細線維をすべて表示し、(I)～(L)に合わせて回転させている。

(Q) 合計 4 つの個体から作製したサンプルのコラーゲン細線維の走向を解析した平均値をグラフに示した。グラフの横軸はコラーゲン細線維の走行角度を、縦軸はコラーゲン細線維の本数を示している。*は 90 度方向に走行しているコラーゲン細線維の本数と有意差のある角度を示している。(Student t-test $P < 0.05$)

図 3 コラーゲン細線維の走向と骨系細胞の有無との関連

(A) 各層の設定を示している。オレンジ色の線に囲まれた領域を骨芽細胞層、緑色の線に囲まれた領域を骨芽細胞直下層、青色の線で囲まれた領域を骨中心層と設定した。設定した各層の範囲内に細胞成分が含まれるよう、骨組織を約 15 度回転させて解析を行った。それぞれの領域の厚さは $2.5 \mu\text{m}$ である。

(B) 骨芽細胞層の解析結果。コラーゲン細線維の走向は 60 度や 90 度の方向に一定の規則性があることがわかった。

(C) 骨芽細胞直下層の解析結果。コラーゲン細線維の走向は 70 度～90 度の方向に規則性があることがわかった。骨芽細胞層と比較すると走向に規則性を認めた。

(D) 骨中心層の解析結果。コラーゲン細線維の走向は 90 度の方向につよい規則性をもっていることがわかった。

図4 骨細胞周囲のコラーゲン細線維の走向

(A) 直交配置型 FIB-SEM で取得した SEM 像から骨細胞を抽出し、立体的に表示したものであり、取り出した骨細胞周囲の領域を示している。黒枠内の拡大像を(B)～(F)に示す。

(B) (A) 黒枠内の拡大像。骨細胞を示す。手前側がニワトリ胚頭蓋骨の頭頂側となる。

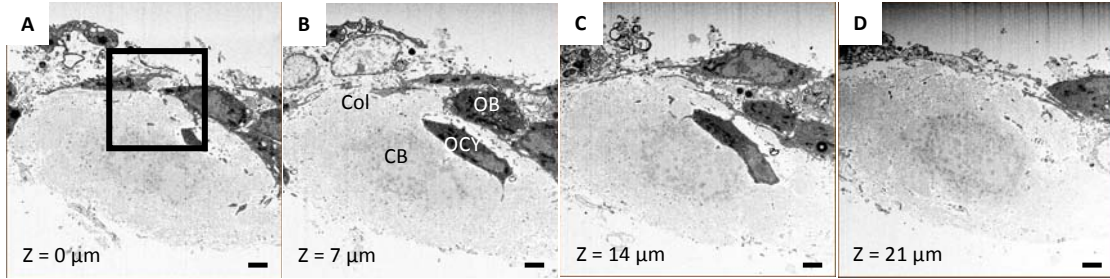
(C) 骨細胞周囲のコラーゲン細線維を抽出し表示した。手前側がニワトリ胚頭蓋骨の頭頂側となる。

(D) (C) から y 軸を中心に約 90 度右回転させた。抽出できたコラーゲン細線維が少ないが、これは骨細胞下部に、集束し束状構造をなしたコラーゲン細線維が存在するためである。白矢印にてコラーゲン細線維が束状に走行している様子を示す。またコラーゲン細線維の走行が疎である部分から細胞突起が伸びている様子が観察できた。

(E) (D) からさらに 90 度右回転させた。手前側がニワトリ胚頭蓋骨の眼窩側となる。

(F) (E) からさらに 90 度右回転させた。白矢印にてコラーゲン細線維が束状に走行している様子を示す。

SEM像(x-y平面)



三次元再構築像(x-z平面)

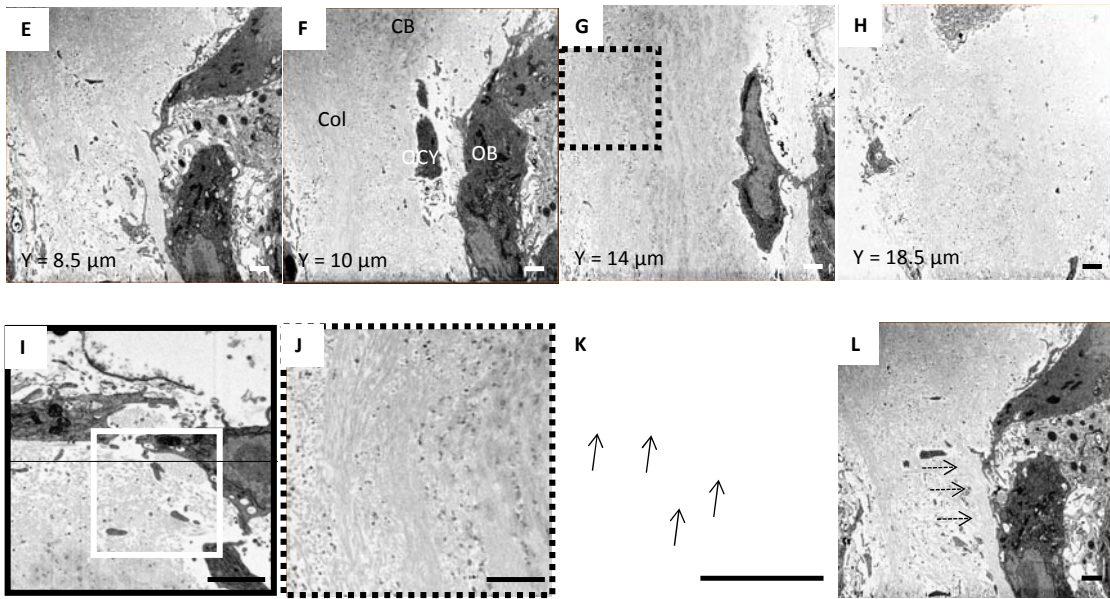


図1 橋本 真奈

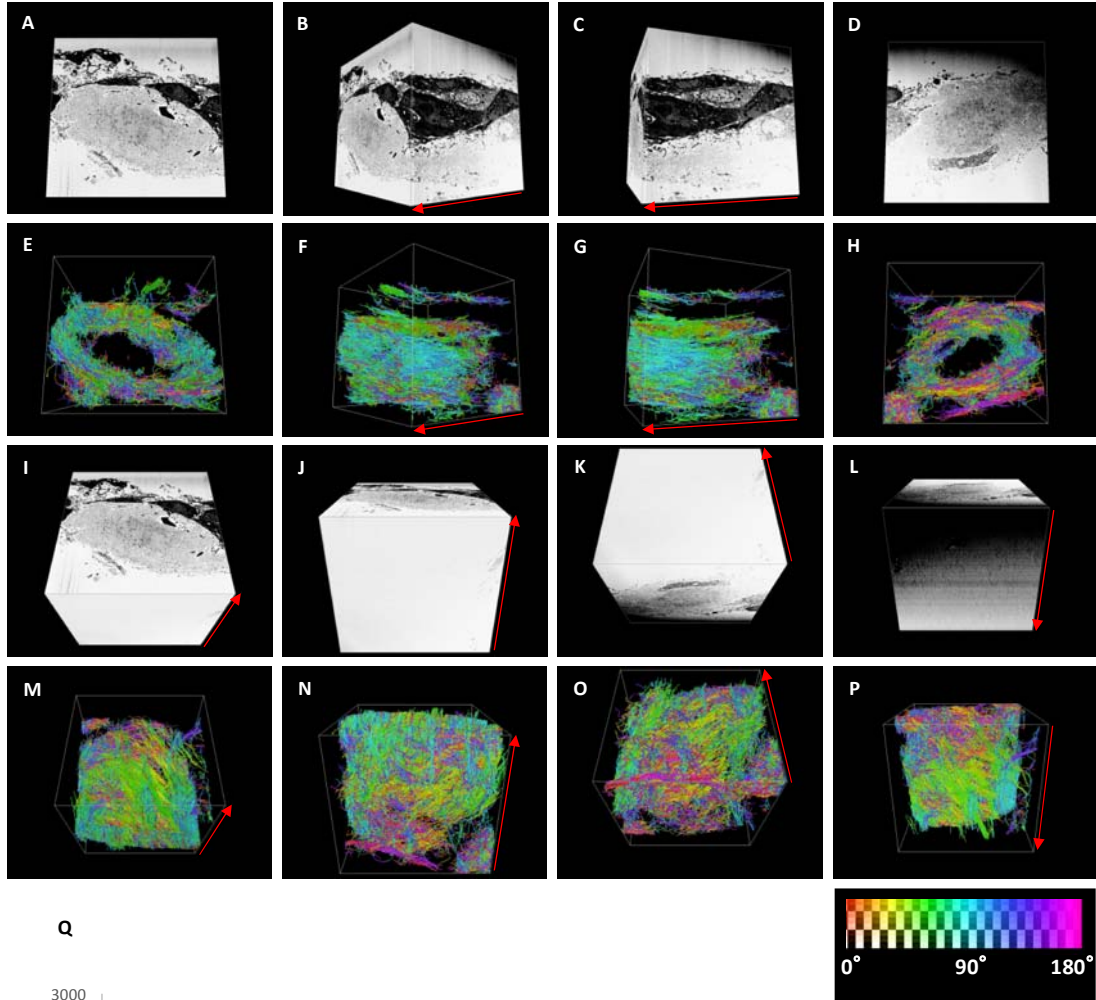


図2 橋本 真奈

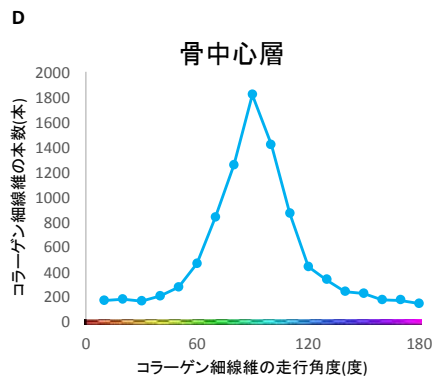
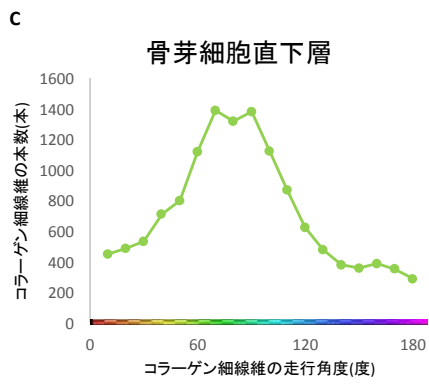
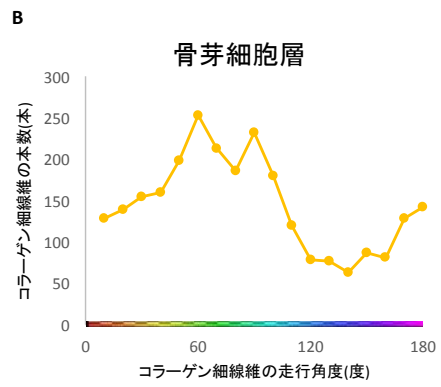
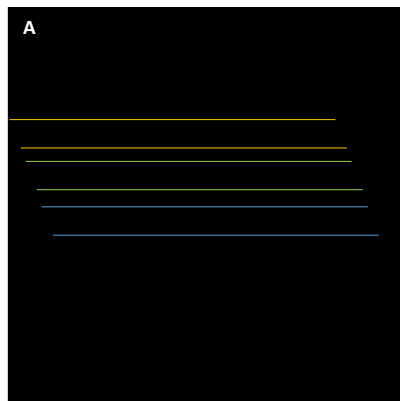


図3 橋本 真奈

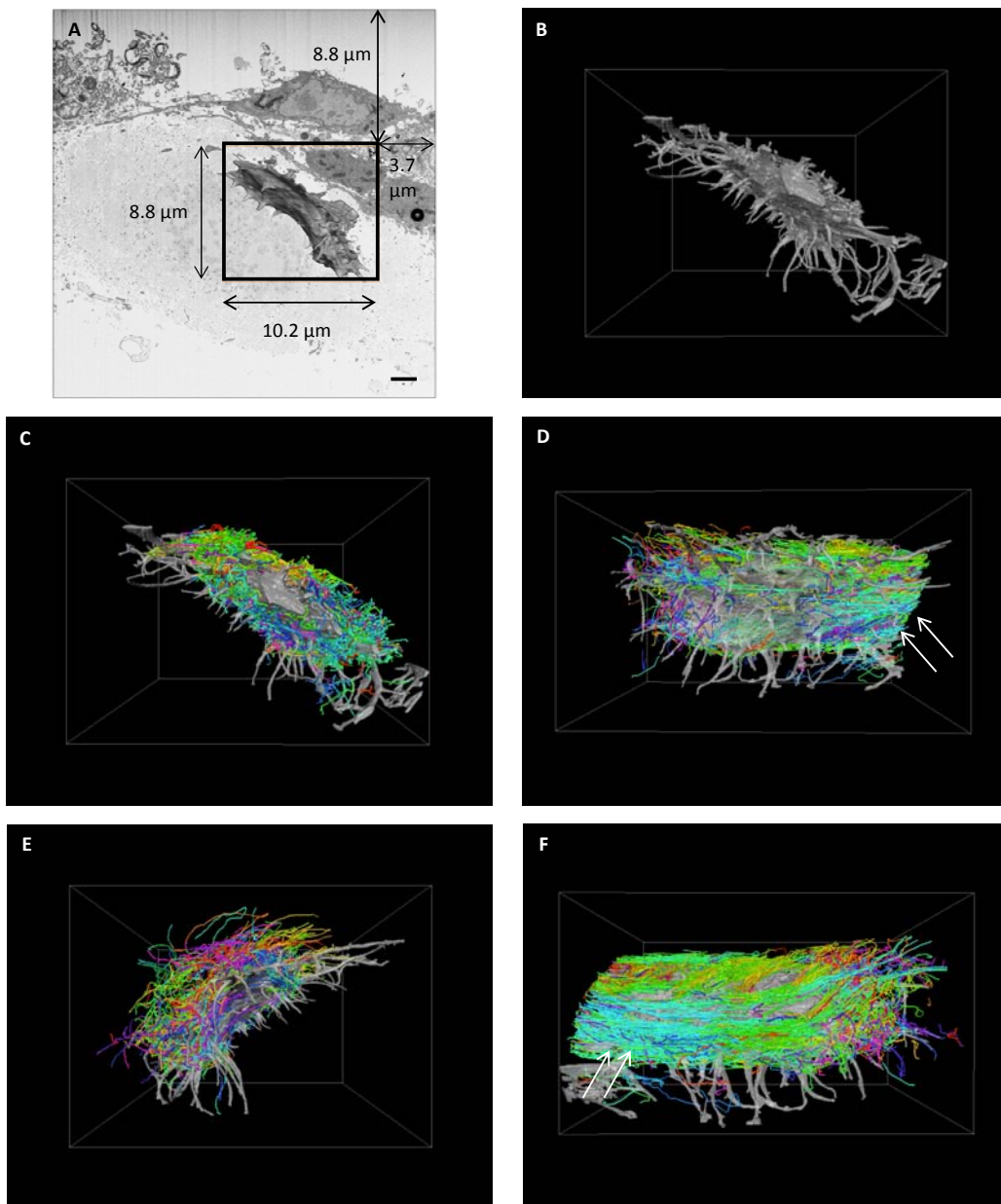


图4 橋本 真奈