

位相微分 X 線顕微鏡による骨の超微細構造研究：  
ツチ骨における骨細胞と微小血管の解析  
**Differential phase X-ray microscopy to study bone structure:  
osteocytes and microvasculature in murine malleus**

佐野 元市郎<sup>a</sup>、南郷 脩史<sup>b</sup>、久保田 省吾<sup>b</sup>、武田 佳彦<sup>c</sup>、百生 敦<sup>c</sup>、松尾 光一<sup>a</sup>  
Gen-ichiro Sano<sup>a</sup>, Nobuhito Nango<sup>b</sup>, Shogo Kubota<sup>b</sup>,  
Yoshihiro Takeda<sup>c</sup>, Atsushi Momose<sup>c</sup>, Koichi Matsuo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>慶應義塾大学医学部、<sup>b</sup>ラトックシステムエンジニアリング、  
<sup>c</sup>東京大学大学院新領域創成科学研究科

<sup>a</sup>Keio University School of Medicine, <sup>b</sup>Ratoc systems engineering Co., Ltd.,  
<sup>c</sup>University of Tokyo School of Frontier Science

#### アブストラクト

マウス耳小骨を構成する“ツチ骨”における骨細胞、血管及びその周りのサブミクロンオーダーの微細構造、特に骨細管ネットワークの抽出を試みた。耳小骨を構成するツチ骨を金属棒の先端に接着し、検体の短突起部分をデフォーカス状態での吸収 CT、およびタルボ顕微鏡を用いた CT により測定し、骨細胞・血管、およびその周りのサブミクロンオーダーの微細構造の描出を行った。

#### Abstract

We attempted to extract a fine structure of osteocytes and their surrounding, especially osteocyte canaliculi, in mouse malleus (processes brevis). Mallei isolated from the middle ear region of mice were fixed and imaged. The reflection contrast CT successfully produced images of osteocytes and vessels.

#### 背景と研究目的：

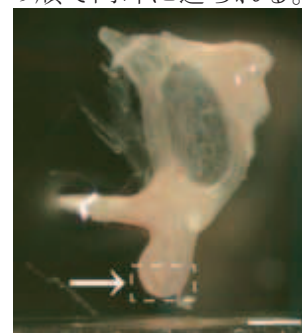
骨リモデリング、すなわち破骨細胞 (osteoclast) による骨吸収と、それに続く骨芽細胞 (osteoblast) による骨形成における吸収と形成のバランスにより、骨密度や骨の微細構造が維持されている。骨細胞は、骨形成の過程で骨基質に埋め込まれる骨芽細胞由来の細胞で、直径 250nm 程度の骨細管 (canaliculi) と呼ばれるネットワークを細胞間に構築しており、微小骨折の検出・修復過程の促進、メカニカルストレスの受容などの機能を持つと考えられている (Ref.1)。また骨や骨髄には微小血管が走行しており、骨量や骨構造・骨質を維持する機構の一端を担っていると考えられる。

ところが、骨細胞や微小血管などの超微細構造の解析には、透過型電子顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡などによる観察が用いられているものの、得られる 3 次元的な情報は限られている。骨の超微細構造を 3 次元的に明らかにすることで初めて、骨リモデリングにおける構造と機能を結びつけることが可能になる。前回我々は BL20XU における解析 (2007A1848) によってマウス頸骨内の骨梁 (trabecular bone、皮質骨の内側の骨髄にある海綿状の骨) を解析し、骨基質内の骨細胞や骨細管など微小構造の構造を解析した (Fig. 1.)。



Fig. 1. Reflection contrast image of trabecular bone. The image was defocused to emphasize the edges.

今回我々は骨微小構造のより広範囲にわたる解析を行うため、マウス耳小骨を解析した。外部より音として鼓膜に伝わった振動は中耳にある耳小骨によって内耳に伝える。哺乳類ではこの振動は鼓膜よりツチ骨、キヌタ骨、アブミ骨の順で内耳に送られる。本実験ではマウス個体



間ではほぼ同じ形状を持ち、かつ直径が約 300µm と SPring-8 の放射光による解析に適切なサイズを持つツチ骨の短突起 (processes brevis, Fig. 2. arrow) を解析した。

Fig. 2. A malleus from wild-type mouse right middle ear region and its processes brevis (arrow). Dotted area was analyzed (see below). Scale bar, 300 µm

本課題では、ツチ骨の短突起部分における骨細胞、微小血管および骨細管をデフォーカス状態での吸収 CT で撮影、高感度・高分解能でイメージングする。またタルボ顕微鏡を用いた CT により、吸収 CT と同じサンプルを解析し、骨細胞・微小血管および骨細管の3次元構造と骨基質の新旧（石灰化の程度の差）とを広範囲において比較し、骨微小構造を明らかにすることを目的とした。

**実験：**

耳小骨の調製は骨吸収が過剰に誘導される OCIF 遺伝子欠損マウス (Ref. 2) と、骨が増える遺伝子改変マウスを3種：Fral 遺伝子トランスジェニックマウスと、c-Fos または TRAF6 遺伝子の欠損マウス (Ref. 3, 4, 5) より行われた。またこれらの対照群として同週齢の野生型マウス (3, 6, 21, 31週齢、系統 C57BL/6J) よりツチ骨が調製された。ツチ骨を右中耳より実体顕微鏡下で単離し、70%エタノール中で固定、80、90、100% と徐々にアルコール濃度を上昇させ脱水した。その後アルコールを完全に蒸発させ乾燥させた。このようにして調製されたツチ骨は、直径1mmの金属棒の先端部分に溝を掘ったものを慶應義塾大学医学部の医療機器開発センターで作成し、これに両面テープで固定した。これらの検体を SPring-8 に持ち込み、デフォーカス状態での吸収CT、およびタルボ顕微鏡を用いたCTで撮影・解析した (Ref. 6)。Fig. 3.に本実験で微分位相コントラストを得るために使用した顕微鏡構成を示す。

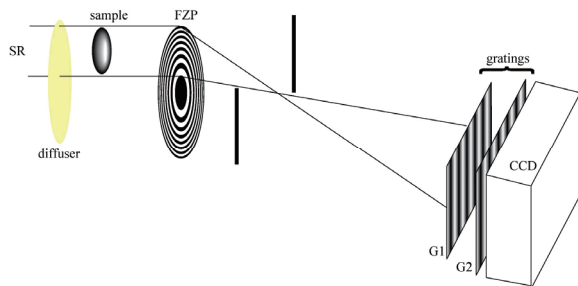


Fig. 3. Experimental set up of differential phase X-ray imaging microscopy. When refraction contrast images were acquired, the gratings were removed and the sample was slightly displaced along the optical axis.

デフォーカス状態での吸収CTでは、試料位置を光軸方向に6mm下流にシフトさせてフォーカスをずらして撮影し、屈折率の微分像(エッジ)を強調した。X線のエネルギーは9keVに設定し、顕微鏡の倍率は20.2であった。蓄積時間が2秒、2000投影、画素サイズが250nm、画像サイズ1344×1017の条件で16サンプルについて撮影を行った。また一部のFralトランスジェニックマウス、及び野生型マウスより得られたサンプルに関してはタルボ干渉計を

入れ、蓄積時間が5秒、500~1000投影、画素サイズが250nm、画像サイズ1344×1017で3サンプルについて解析を行った。

**結果、および考察：**

得られた画像をもとにノイズの除去、および3次元再構築を撮影されたすべてのサンプルについて現在進めている。これまでデフォーカス状態での吸収CTで解析したサンプルについては骨細胞、血管、また骨細管と思われる構造が検出された(Fig. 4.)。

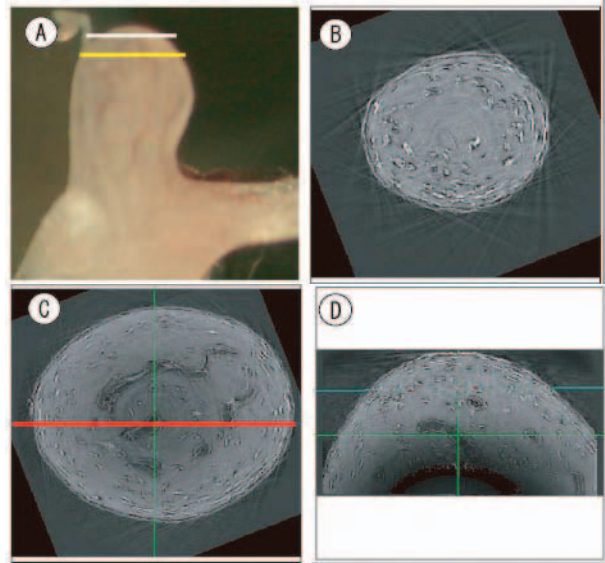


Fig. 4. (A): Microscopic image of a malleus from a 21 weeks old wild-type mouse. (B, C, D): Refraction contrast images of the malleus. (B, C): Top cross sectional views - cut along a white (B) or a yellow (C) line in (A) (D): Sectional side view - cut along a red line in (C). Note that osteocytes, vessels, and structures possibly be osteocyte canaliculi are visible in the malleal processes brevis.

またタルボ干渉計を用いて撮影した画像を解析したところ、特定の部位の骨基質が他の部位の骨基質と質的に異なることを示唆する画像が得られた。

デフォーカス状態での吸収CTより得られた画像をより詳細に解析することによって骨細胞ネットワークや骨内微小血管系を3次元的に描出できる可能性がある。骨リモデリングの基盤をなす構造を解析できれば骨細胞の細胞生物学的理解が深まり、ひいては骨粗鬆症などの骨量異常によってもたらされる疾患に対する新たな治療法の開発に結びつくと期待される。

**今後の課題：**

今回の撮影では異なる週齢間の野生型マウスにおいて、また同週齢の野生型とトランスジェニックマウスのツチ骨における骨微小構造

を比較するという当初の目的が、実行可能であることがわかった。現在3次元画像の再構築を、撮影したすべてのサンプルについて行っている。これらの比較群において、骨微小構造に統計的に有意な違いがあるかどうかを検討するには、特徴的構造を定量化する必要があり、具体的な方法は今後の課題である。

参考文献：

- 1) Tatsumi *et al*, Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab.* 5, 464-475 (2007)
- 2) Kanzaki *et al*, Resorption of auditory ossicles and hearing loss in mice lacking osteoprotegerin. *Bone* 39, 414-419 (2006)
- 3) Jochum *et al*, Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat. Med.* 6, 980-984 (2000)
- 4) Wang *et al*, Bone and haematopoietic defects in mice lacking *c-fos*. *Nature* 360, 741-745 (1992)
- 5) Naito *et al*, Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signaling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* 4, 353-362 (1999)
- 6) Momose *et al*, Phase tomography by X-ray Talbot interferometry for biological imaging. *Jpn J Appl Phys.* 45, 5254-5262 (2006)

論文発表状況・特許状況：  
(論文作成中)

キーワード：

骨リモデリング：局所でおこる破骨細胞による骨吸収と、それに引き続く骨芽細胞による骨形成。このバランスが骨吸収に偏ると骨量が減少し、骨粗鬆症などをおこす。

骨細胞：骨芽細胞は骨形成後、骨基質の中に埋もれて骨細胞となる。近年、骨細胞が骨リモデリングの制御に関与することが明らかになったが、その詳しいメカニズムは明らかになっていない。

骨細管：骨基質に埋もれる骨細胞間、もしくは骨細胞と骨表面などをつなぐ直径 300nm 程の管。この骨細管中に骨細胞は樹状突起を伸ばし、自身を維持する栄養を得たり、骨基質に生じた微小骨折や骨へのメカニカルストレスを感知したりして、骨リモデリングを誘導するとされている。

位相差 X 線顕微鏡