

## 位相微分 X 線顕微鏡による骨の超微細構造研究: 皮質骨と骨梁における骨細胞と微小血管の解析

### The use of differential phase X-ray imaging microscopy to study fine bone structure in mice: analysis of osteocytes and microvasculature in cortical and trabecular bones

松尾 光一<sup>a</sup>、南郷 脩史<sup>b</sup>、久保田 省吾<sup>b</sup>、堀口 悠介<sup>b</sup>、武田 佳彦<sup>c</sup>、百生 敦<sup>c</sup>  
**Koichi Matsuo<sup>a</sup>, Nobuhito Nango<sup>b</sup>, Shogo Kubota<sup>b</sup>, Yusuke Horiguchi<sup>b</sup>,  
 Yoshihiro Takeda<sup>c</sup> & Atsushi Momose<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>慶應義塾大学、<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  
<sup>a</sup>Keio University, <sup>b</sup>Ratoc systems engineering Co., Ltd., <sup>c</sup>University of Tokyo

#### アブストラクト

マウス骨梁における骨細胞及びその周りのサブミクロンオーダーの微細構造物、特に骨細管ネットワークの抽出を試みた。大腿骨遠位骨幹端の2次海綿骨の骨梁をピンの先端に接着した検体を用いて、X線位相コントラストCTおよびX線屈折コントラストCTで得られた画像を比較検討したところ、「位相」で骨細胞が、「屈折」で骨細管ネットワークと考えられる構造の描出に成功した。

#### Abstract

We attempted to extract a fine structure of osteocytes and their surrounding, especially osteocyte canaliculi, in mouse trabecular bone. A trabecular bone isolated from metaphyseal region of a mouse femur was fixed on the tip of a pin and was imaged using phase contrast and reflection contrast X-ray CT. The phase contrast CT successfully produced images of osteocytes and the reflection contrast CT allowed us to visualize structures possibly be osteocyte canaliculi.

#### 背景と研究目的:

骨では、生涯を通じて破骨細胞 (osteoclast) による骨吸収と骨芽細胞 (osteoblast) による骨形成がおこっており、骨リモデリング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 300nm 以下の骨細管 (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、得られる情報は限られている。放射光を用いた解析もフランス、スイス、米国の研究グループを中心に始まっているが、骨内の空洞を見ているに過ぎないのが現状である。骨の超微細構造を明らかにすることで初めて、骨の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。特に、皮質骨 (長管骨ではパイプ状

のシャフト部分) に比べて骨梁 (trabecular bone、パイプの内側の骨髄にある海綿状の骨) の方が、骨粗鬆症で著名に減少する部分であるにも係らず、超微細構造の解析が遅れている。

そこで本課題では、骨梁における骨細胞と微小血管、さらに骨基質の新旧 (石灰化の程度の差) を位相差 X 線顕微鏡で高感度・高分解能イメージングすることによって、皮質骨や骨梁内の骨細胞や微小血管の構造を明らかにし、骨リモデリング機構の解明に寄与することを目的とした。具体的には、以下の3点の描出を試みた。

1. 骨細胞機能と関連するであろう、骨細胞とその周囲の組織。
2. 骨細胞周囲の毛細血管の走行。
3. (空洞ではない) 骨細管の構造。

#### 実験:

Fig. 1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。屈折コントラスト (輪郭強調) を得るモードでは、回折格子を除き、試料位置を光軸方向に8mm下流にシフトさせてデフォーカスした。X線のエネルギーは12.4keVに設定し、顕微鏡の倍率は17.6とした。骨梁は、ピンの先端に接着剤で固定することと

し、市販のピンにねじ切り加工を施し、ピン自体の固定も容易になるように工夫した。(ピンの先端を平滑化しておくことで検体の接着がやりやすいこと、さらに接着剤を使わずに両面テープで角柱の溝へ固定する方が優れていることが後から判明したが、今回の実験はピンで行った)。

骨梁が増える特殊なトランスジェニックマウス (Ref. 2) と対照の野生型マウス (どちらも5週齢、系統C57BL6/J) とから、大腿骨あるいは脛骨を単離して軟部組織を除去した後、70%エタノール中で固定した。成長板から0.5mm厚の「輪切り」を作り、さらに骨幹骨梁 (直径約50 $\mu$ m、長さ1~2mm) を実体顕微鏡下で単離した。

検体番号16、23 (野生型)

検体番号53、57 (トランスジェニック)

の4検体をそれぞれピンの先端に瞬間接着剤で固定し低解像度 (27 $\mu$ m) のX線CT (explore Locus CT system, GE) で確認した (Fig. 2)。

これらの検体をSPRING-8に持ち込み、X線位相コントラストCTおよびX線屈折コントラストCTで撮影し、解析した (Ref. 3)。

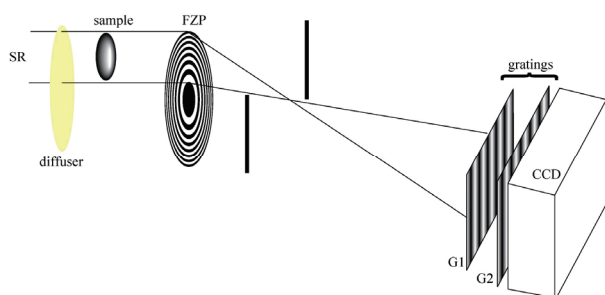


Fig. 1. Experimental setup of differential phase X-ray imaging microscopy. When refraction contrast images were acquired, the gratings were removed and the sample was slightly displaced along the optical axis.

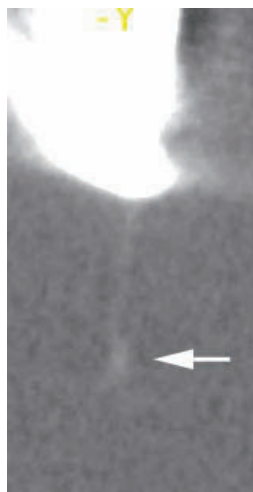


Fig. 2. A piece of trabecular bone was attached at the tip of the pin (arrow).

結果、および、考察：

実際の撮影は、6シフト (48時間) に亘って行われた。平行して準備室で予備の骨梁の単離を進めた。

位相コントラストは、蓄積時間が25秒、投影数250、画像解像度250nm、画像サイズ1344 $\times$ 1017の条件で撮影した。一方、屈折コントラストでは、フォーカスをずらして撮影して、屈折率の微分像 (エッジ) が強調されて見える。例えば、骨細管と思われる放射状の線維が見えた。蓄積時間が2.5秒、2500投影、画像解像度が250nm、画像サイズ1344 $\times$ 1017。

得られた画像をもとにノイズの除去、および3次元再構築を現在進めている。これまで誰もみたことのなかった骨細胞ネットワークや骨内微小血管系を3次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理解できれば、細胞生物学および分子生物学的解析を導くことが期待され、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こと期待される。



Fig. 3. Phase contrast image. Note that osteocytes are visible in the lacunae.

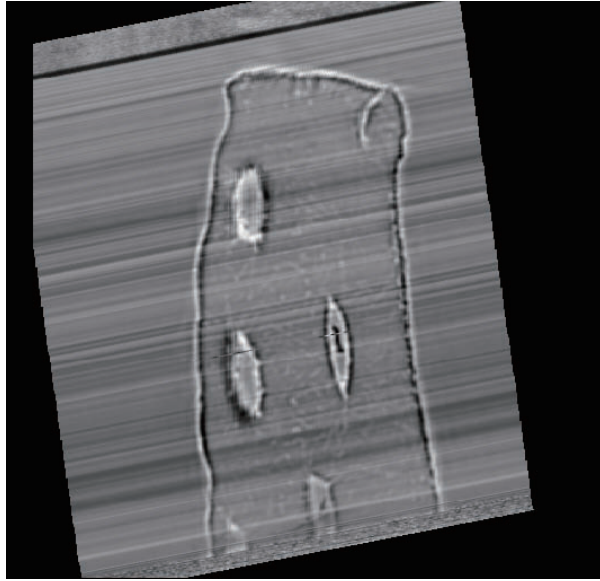


Fig. 4. Reflection contrast image. The image was defocused to emphasize the edges.

#### 今後の課題：

まず、検体をイメージングのために保持するための方法を最適化する必要がある。本課題ではピンの先端に接着剤で固定したが、接着剤そのものが画像に影響を与える可能性があり、また接着剤に X 線が照射されると液化または気泡が発生することがあり、試料がずれたり気泡がイメージングを邪魔するので好ましくない。両面テープで長軸方向に切り込みを入れた支持棒につけるなどの方法に切り替える必要がある。骨梁は棒状のものよりもむ

しろ壁状で連続的に広がっているので、どの部分を取り出すかの生物学的検討が重要である。

今回の撮影では、野生型とトランスジェニックマウスの骨梁における骨細管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。両者で実際に骨細管構造に違いがあるかどうかは、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) Jochum et al, Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat Med*, 6, 980-984 (2000)
- 3) 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：

骨細胞、骨細管、骨代謝  
位相差顕微鏡