

全身性器官としての働きを可能にする骨の3次元内部構造の解明 Analysis of Osteocyte canaliculus 3D fine structure which corelate to whole body systemic organ

南郷脩史^a, 久保田省吾^a, 矢代航^b, 百生敦^b, 武田佳彦^c, 松尾光一^c,

Nobuhito Nango^a, Shogo Kubota^a, Wataru Yashiro^b, Atsushi Momose^b, Yoshihiro Takeda^c, Koichi Matsuo^c,

^aラトックシステムエンジニアリング株式会社, ^b東京大学大学院新領域創成科学研究科,

^c慶應義塾大学医学部,

^aRatoc System Engineering Co., Ltd.

^bGraduate School of Frontier Siences, University of Tokyo, ^cKeio University School of Medicine,

放射光 X 線顕微鏡 CT を用い、マウス脛骨皮質骨中の骨細胞、骨細管系の 3 次元内部構造の解明を試みた。骨内細胞の微細構造の描出にはエッジを強調するディフォーカス屈折コントラスト法、骨ミネラル密度の絶対値の測定には微分位相コントラスト法を用い、同部位を CT スキャンした。両画像を精密に比較し、微細構造とミネラル密度の対応を描出できた。これらの画像より骨細管の中には長く伸びる太いらせん状骨細管が存在すること、骨細胞の中には軸方向が荷重方向及び皮質骨表面方向に整列したグループと方向がランダムに乱れた配列をするグループが存在し、前者の骨細管は骨細胞表面に平行な規則的な細胞間ネットワーク状、後者の骨細管は方向性のないランダムに伸びる細胞間ネットワークとらせん状骨細管つながるネットワークが存在することを発見した。

Using X-ray microscope CT with synchrotron radiation, we attempted to analyze the 3D internal structure of osteocyte canaliculi inside the cortical bone at mouse tibia. To extract the fine structure of internal bone, we performed CT scans with the defocus refraction contrast method to emphasize edges and with the differential phase-contrast method to measure thee absolute value of bone mineral. We compared the both images precisely and were able to extract the correspondence of the fine structure and mineral density. From these images, we found some groups, one aligned vertically to the distribution of bone cell, one aligned on the bone surface, and another existing randomly. The former group is shaped as a network between cells and its canaliculi are parallel on the bone cells, in the later group, beside the network extending between cells randomly, the long coiled canaliculus existed and we found the canaliculus network connecting this.

背景及び目的

骨の主な働きは力学的支持組織と考えられている。この場合の骨細胞ファミリーは骨を形成する骨芽細胞、骨を吸収する破骨細胞、力学刺激を感受する骨細胞、及びそれらの前駆細胞が考えられている。しかし、骨細胞は血中 Ca や P のコントロールに直接関与していることが近年明らかにされ⁽¹⁾、骨は全身性の器官とし注目を浴びている。骨細胞はこれまで力学シグナルを感知伝達する機能を中心に考えられてきた。骨粗鬆症、骨形成不全症などは人の力学能力の疾患である。一方、骨を全身性器官として考えた場

合、他の臓器と関連する病態は内科領域まで広がる。全身とつながる血管系と骨の関係の解明が必要とされる。ここでは主に骨細胞、骨細管、血管系の骨内における 3 次元内部構造を明らかにし、骨の全身性の器官としての機能を発揮する構造、機構の解明を目的とする。

実験

検体はマウス脛骨 4、12、14、18W を用いた。

図 1(a)検体切り取り位置

(b)真鍮ロッドに取り付けた 300 μ m 角柱状の検体

マウス脛骨の皮質骨骨幹中央を長さ 3mm で切

り出した。皮質骨の厚さはおよそ 300 μm である。更に断面中央を垂直に幅 500 μm でスライスし、樹脂埋包し、切り口を厚さ 300 μm となるまで研磨した。切り出した検体は骨髄側内表面と逆側皮質骨表面外表面の自然面を含む四角柱である。本四角柱を真鍮製の 1mm 円柱ロッドトップに両面テープではりつけスキャン用の検体を作成した。(図 1)

X 線顕微鏡を用い、微分位相コントラストとデフォーカス屈折コントラスト光学系を用い撮影した。X 線波長は 9keV、顕微鏡倍率 20.2 倍で撮影した。微分位相コントラスト CT 撮影は View 数 500 投影、180° ハーフスキャンにより行なった。得られた画像は撮影解像度 0.25 μm 、画像マトリックスサイズ 1200 x 1200、スライス数 500 である。X 線微分位相コントラスト CT 撮影⁽²⁾⁽³⁾の主な目的は骨細胞の描出とその回りの微細領域の石灰化度のコントラストを得ることである。次に骨細管描出を目的にデフォーカス屈折コントラスト法に光学系を変更した。具体的には微分位相コントラスト顕微鏡光学系から回折格子を除去し、検体をレンズ側へ 6mm 移動させ、検体の構造物のエッジを強調する光学系へと変更した。CT 撮影は View 数 1800、180° ハーフスキャンにより行なった。得られた画像解像度、マトリックスは微分位相コントラスト CT 像と同等のものである。

得られた 2 種の CT 像を 3 次元空間上で位置合わせした。骨小腔、骨細管はコントラストの差はあるものの両画像に描出されており、目視で対応付けを行い、微分位相像を回転、平行移動し、両画像の抽出物の位置を一致させた。

図 2 (a) はデフォーカス屈折コントラスト法、(b) は微分位相コントラスト法により得られた断層像である。(b) では楕円形の黒く抜けた骨小腔が多数存在する。高い石灰化度を表わす明るいエリア、低い石灰化度を表わすダークのエリアが混在している。微分位相コントラスト撮影においては明瞭に石灰化度が表現されていることが分かる。

(b)上の骨小腔と同じ位置に写真(a)ではエッジが強調された骨小腔が存在する。更に(a)では骨細管構造も強調されて見える。

(c)は(a)と(b)を位置合わせして得られた画像である。(a)と(b)両方の特徴が表現されており、骨細胞、骨小腔、骨細管の 3D 位置が正確に確認できる。また、その回り、や画像上の特定部位で石灰化度の亢進や減少が同時に観察可能である。観察可能な視野は約 300 μm の範囲である。この範囲内にはおよそ 4 x 4 層以上の骨細胞の分布が確認でき、骨細胞群の配置の特徴を 3D でとらえることができる。

図 3 は 12 週齢マウスのデフォーカス屈折コントラスト画像である。写真上下方向は皮質骨成長方向、皮質骨表面は写真上下方向と平行に存在する。骨細胞は扁平なラグビーボール状の形状をなし、3 つの軸を持つ。ここでは骨細胞の慣性軸方向を長軸 a、中間軸 b、短軸を c と呼ぶ(図 4)。骨リモデリングにより、a 軸は皮質骨成長方向、c 軸は骨芽細胞の方向を向くことが知られている。マウスの場合は皮質骨内膜又は外膜方向である。この方向への骨細胞の整列をここではユニホームアレイと呼ぶ。一方、ユニホームアレイでない配列をランダムアレイと呼ぶ。図 3 において横矢印 A で示されるエリアの骨細胞はユニホームアレイをしている。一方、C のエリアの骨細胞はランダムアレイをしていた。ユニホームアレイの領域の骨細胞間を張る骨細管ネットワークは骨成長方向に垂直であった。一方、ランダムアレイエリアの骨細胞から出る骨細管は骨細胞の向きを反映し、ランダムな方向を向いて他の骨細胞とネットワークを作っている。図 3B のエリアに骨成長方向に伸びる太い骨細管を認めることができる。この太くて、かつ長く伸びる骨細管は螺旋状にねじれながら、骨成長方向に伸びている。このような骨細管の存在はこれまで報告されていない。ランダムアレイの骨細胞からの骨細管はこのらせん状骨細管ともつながっている。

結論、考察

骨細胞、骨細管系は従来 TEM、SEM、共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)、組織切片などで観察されてきた、これらの方法は、2 次元であったり解像度や視野長が不足していて、骨中の骨細胞、骨細管系を 3 次元で正確に描出することができなかった。

2 次元画像による観察では骨形成初期の骨細胞の各々の方向はランダムに向き、骨細管は細胞側面より放射状に伸びている。一方、成熟期の骨細胞は荷重方向に長軸をそろえ、骨細管は骨細胞に垂直方向に整えられた走行を示す。これは破骨細胞による骨吸収と引き続く骨芽細胞による骨形成である骨のリモデリングにより、整えられたものとされている⁽⁴⁾⁽⁵⁾。

成熟期の骨においてランダムな方向を向く骨細胞群の存在はリモデリングで整列した後、骨の中で向きを変え、突起の方向を変えていることになる。硬い骨で囲まれた骨小腔、骨細管の向きも必然的に変えているものと想像できる。

一方では、最近骨細胞系は Ca 代謝や P 代謝⁽³⁾ など全身性の器官としての働きが明らかにされ

ている。

全身性の器官としての役割を發揮するには全身をめぐる血管との関係が重要と考えられる。想像を大にすると血管は骨内で方向を変えていると考えられる。全身性の器官としての機能を發揮するために骨細胞はリモデリング以外の方法で骨内で向きを変え突起を変更し、血管とつながっている可能性が大である。今回の実験により得られたランダムアレイの細胞群及びらせん状の太い骨細管は骨内のユニホームアレイの状態の構造を変更する過程にある中間状態を示すものと考えられた。今回発見された骨内構造の改変と全体機能の解明が待たれている。

今回骨細胞の 3D 配列の違いや骨細管の中にこれまで報告のない構造など新たな骨内組織構造の知見が得られた。新種のらせん状骨細管はこれまで知られていないメカニカルストレス感知とは別の骨細胞系の機能の存在を示すものと思える。

今後の課題：

骨の石灰化度と骨細胞系および血管との関係を通して、骨細胞のまだ十分明らかでない全身性器官としての働きを可能にする機能の解明を行っていききたい。

参考文献

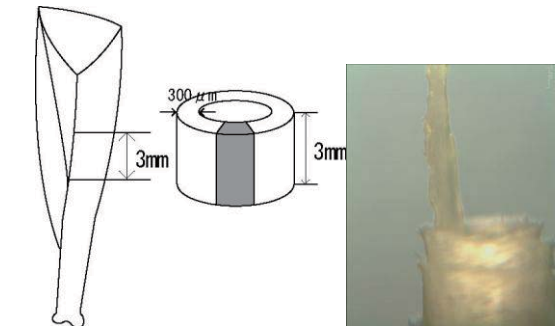


図 1 (a) (b)

(a) マウス脛骨検体切り出し部位

(b) CT 撮影用検体

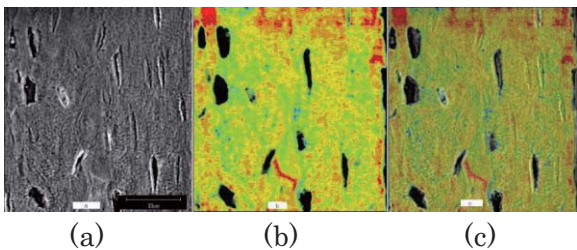


図 2

(a) ディフォーカス屈折コントラスト像

(b) 微分位相コントラスト像

(c) 位置合わせ結果

1.Feng, J.Q. et al., Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. NATURE GENETICS 38(11) Nov. (2006)

2.Takeda, Y. et al., Differential Phase X-ray Imaging Microscopy with X-ray Talbot Interferometer. Appl. Phys. Express 1(11), 117002 (2008).

3.Momose, et al. Demonstration of Xray Talbot Interferometry, Jpn.J. Appl. Phys. Vol.42(2003) pp.L866-L868

4.Hirose, S et al., A histological assessment on the distribution of the osteocytic lacunar canalicular system using silver staining. J Bone 25 (2007).

5.網塚憲生、他 口腔組織・発生学、382-386、医歯薬出版、2006

論文発表状況・特許状況：

(論文作成中)

キーワード：

骨細胞、骨小腔、骨細管、石灰化、X 線顕微鏡 CT、微分位相コントラスト、デフォーカスコントラスト



図 3 骨小腔と螺旋状骨細管

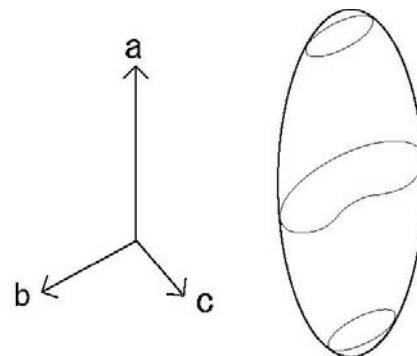


図 4 骨細胞の軸方向