

FIB-SEM を用いた骨組織の 3 次元微細構造解析

北海道大学大学院歯学研究科 長谷川 智香, 山本 知真也, 網塚 憲生, 新潟大学・松本歯科大学
 小澤 英浩
 北海道大学工学研究院共同利用施設 (ナノ・マイクロマテリアル分析研究室) 遠堂 敬史



(左から) 北海道大学大学院歯学研究科 長谷川 智香, 山本 知真也, 網塚 憲生, 新潟大学・松本歯科大学 小澤 英浩



北海道大学工学研究院共同利用施設 (ナノ・マイクロマテリアル分析研究室) 遠堂 敬史



1. はじめに

われわれ人類を始めとした脊椎動物は、体を支える「骨組織」を有することにより、地球上の生物の中で最も進化を遂げてきた。骨組織は、無機物であるリン酸カルシウム $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ と有機物である I 型コラーゲンを主体とした骨基質、これを維持する細胞群、血管、神経から構成され、全身を支える支持組織として機能するほか、腎臓や小腸と協調してカルシウムやリン等のミネラル代謝を調節する臓器としての役割を担っている。われわれは、光学顕微鏡や透過型電子顕微鏡、走査型電子顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡等の構造解析装置を用いて、骨組織における細胞組織学研究を推進している。一方、近年、ライフサイエンス領域において、FIB-SEM を用いた 3 次元微細構造解析例が報告され始めており、本装置はわれわれの研究遂行を強力にサポートするものと期待される。そこで、骨組織、とくに「骨細胞・骨細管系」の 3 次元

微細構造解析を目的として FIB-SEM の活用を試みている。本稿では、本研究の背景と、現在の取り組みを紹介する。



2. 骨組織の構造

人体の骨格は 206 個の骨から構成されており、これらの骨はそれぞれの機能に適した大きさ、形、特性を有している。大腿骨や上腕骨のような細長い骨（長管骨）を例に挙げると、これらは外側を硬い骨質（皮質骨）で囲まれたチューブ状の構造をしており、その内部には骨髄によって満たされる骨髄腔が存在する。骨の両端は骨端、中央は骨幹と呼ばれ、骨端と骨幹の境をなす部位は骨幹端と呼ばれる。骨端から骨幹端の骨髄腔内部には梁状の海綿骨（骨梁）が伸びており、皮質骨とともに内外からの力学負荷に耐えうる構造を示している（図 1）。

このような骨基質の表面には骨形成を行う骨芽細胞と骨吸収を行う破骨細胞が、骨基質内部には骨細胞が局在

し(図2),これらの細胞群が互いに影響を及ぼし合いながら,生涯にわたって骨吸収と骨形成を繰り返し,古い骨を新しい骨へと置き換えている。

骨基質表面に局在する骨芽細胞はI型コラーゲン等の骨基質タンパク合成と基質小胞を介した石灰化(組織にカルシウム塩が沈着し,硬組織へと変化する現象)を誘導し,骨形成を行う。一方,骨芽細胞は自ら産生した骨基質に埋まり骨細胞へと分化するが,これら骨細胞は互いに細胞突起を介した細胞性ネットワーク(骨細胞・骨細管系)を形成することで骨基質のミネラル維持,力学負荷感知,骨代謝調節などを行う。また,破骨細胞は骨吸収を営む大型の細胞であり,酸とタンパク分解酵素を分泌して骨基質を吸収する。なお,破骨細胞は骨芽細胞系細胞の支

持によって形成されるが,その一方で,骨芽細胞の活性や機能に対して影響を与えるとされており,密接な相互関係を有している。このように,骨組織は単なる「硬い」支持組織ではなく,様々な役割を有する臓器として機能しており,複雑な構造を呈している。



3. 骨細胞・骨細管系について

骨細胞は,周囲に細胞突起を張り巡らしており,これらの細胞突起を介して隣り合う骨細胞同士や骨表面上の骨芽細胞と「骨細胞・骨細管系」と呼ばれる細胞性ネットワークを形成している(図3)。また,骨芽細胞は,前

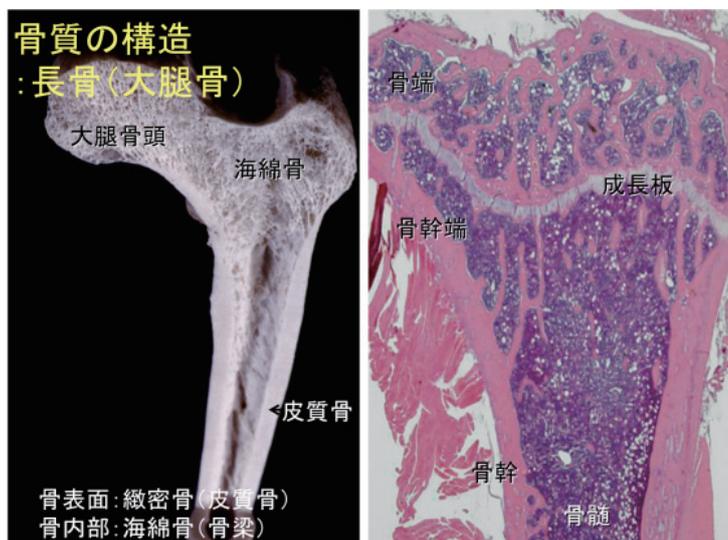


図1 骨質の構造

緻密な骨基質(皮質骨)が表面を取り囲む一方,内部は網目状の海綿骨(骨梁)とその隙間を満たす骨髄からなる。(筆者提供)

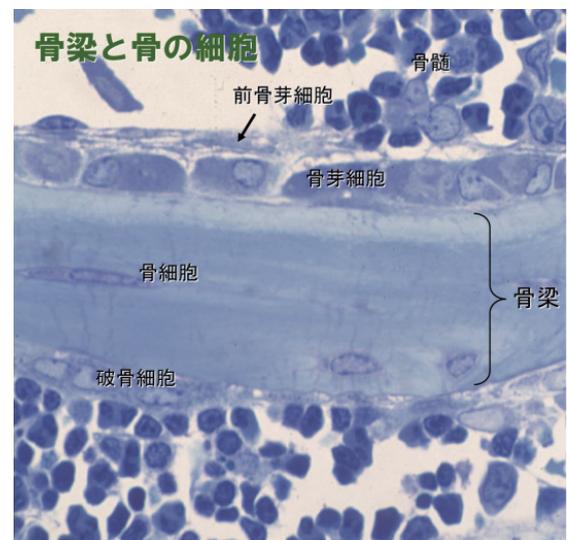


図2 骨に存在する細胞

骨組織には,骨形成を行う骨芽細胞,骨吸収を行う破骨細胞,骨基質に埋め込まれた骨細胞が存在する。(文献[1]より改変)

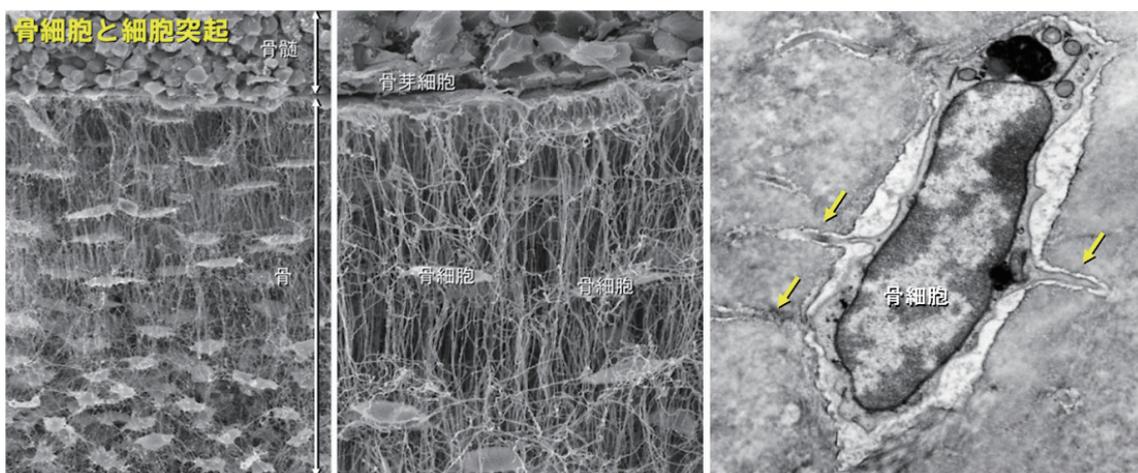


図3 骨細胞とその細胞突起の微細構造

骨細胞は周囲に細胞突起を伸ばして,隣り合う骨細胞や骨芽細胞と連結している。左,中央図:走査型電子顕微鏡像,右図:透過型電子顕微鏡像(文献[2]を改変)

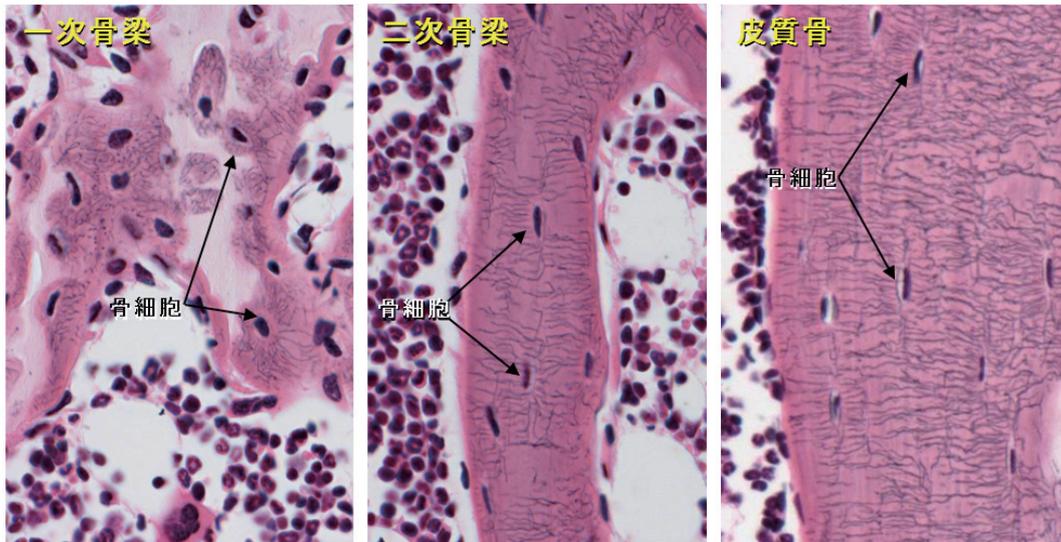


図4 骨細胞・骨細管系の走行（鍍銀染色：骨細胞・骨細管を黒色に表現）
 骨細胞・骨細管系の走行は部位により異なる。
 成長板直下の一次骨梁では、骨細胞・骨細管系の配列は不規則で断続的である。二次骨梁の骨細胞・骨細管系は比較的規則的に配列し、皮質骨になるとさらに規則的に走行する傾向が認められる。（文献 [3] を改変）

駆細胞である前骨芽細胞とも機能的グループを形成している。骨細胞は、これらのネットワークを用いて骨基質の情報を周囲に伝えるとともに、周囲の情報を骨基質に反映させるといった重要な役割を担っていると考えられている。先に述べた通り、近年、骨細胞の役割として、骨基質ミネラルの維持、力学的負荷の感知、また、骨改造に対する調節や血中リン、カルシウム濃度調節などが挙げられており、これら詳細の解明に対する期待が高まっている [5]。また、これまでのわれわれの検索から、骨細胞・骨細管系は部位によってその規則性が異なり（図4）、とくに規則的に配列する骨細胞・骨細管系が力学的負荷の感知やミネラル代謝調節に多大な影響を及ぼす可能性が示唆されたことから [2][3][4]、その微細構造と細胞機能には密接な関連があるものと推測される。すなわち、骨細胞の役割について全容を解明するには、これらの微細構造解析を行う必要性が考えられる。



4. 本研究の目的

われわれは、骨細胞・骨細管系の微細構造を明らかにする目的で、透過型電子顕微鏡や走査型電子顕微鏡を用いた解析を進めてきた（図3）。しかし、これらの機器では骨細胞・骨細管系の2次元微細構造しか解析することができない。一方、共焦点レーザー顕微鏡等を用いることで3次元的な構造解析が可能となるが、これらはTEM程の分解能を有していないため、その3次元微細構造を明らかとするのは難しい。事実、骨細胞・骨細管系における3次元微細構造の詳細は未だ不明である。

一方、FIB-SEMは、FIBによるサンプルの切削とSEM

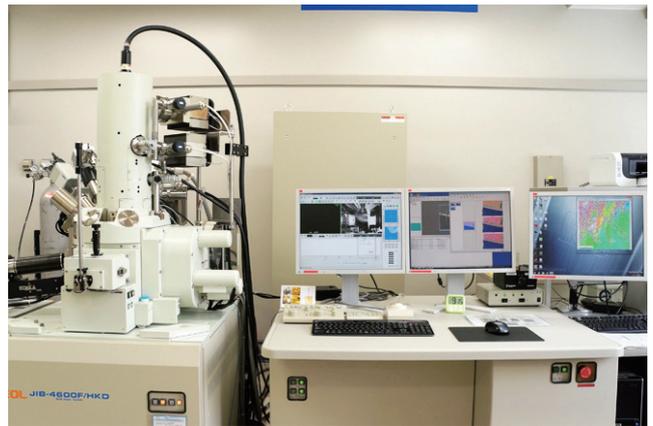


図5 FIB-SEM (JIB-4600F/HKD)

による表面性状のイメージングを連続して行うことが可能な装置であり、これまで工学材料の微細加工・構造解析に用いられてきた（図5）。この装置の特性を鑑みると、撮像条件や試料作製に創意工夫を加えることで、FIB-SEMが工学材料のみならず生物試料である骨細胞・骨細管系の3次元微細構造解析においても大変有力なツールとして、われわれの研究を大きく推進させると期待された。そこで、われわれは、第一に、骨組織の3次元微細構造解析におけるFIB-SEMの有用性を模索すること、さらには骨細胞・骨細管系の3次元微細構造を明らかにすることを目的とし、本実験に着手した。



5. 実験方法

ここ数年で、生物試料を対象としたFIB-SEMによる微

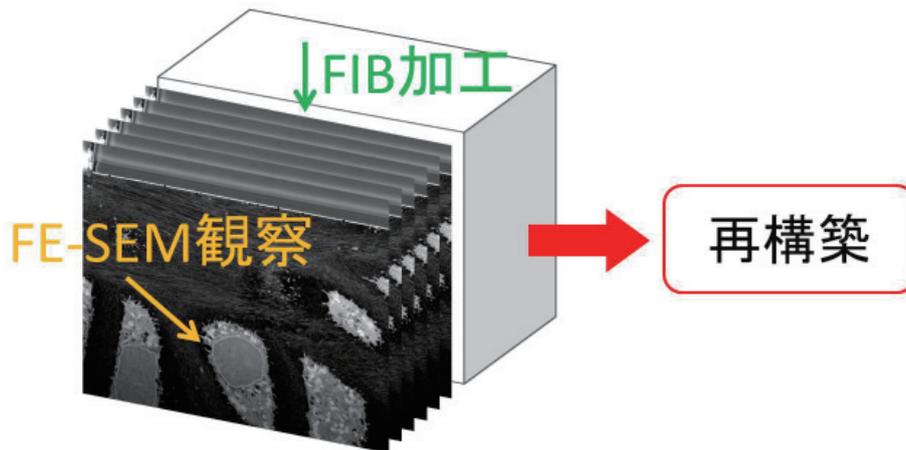


図6 FIB-SEM画像の3次元再構築の概略
FIB-SEMを用いて撮像した画像は、3次元再構築ソフトにより再構築を行う。

細構造解析例が報告されるようになってきたが、その数は僅かであり、かつ、十分な解像度を有する画像が得られているとは言い難い。この理由として、撮像条件はもとより試料作製に改善の余地があるためと推測された。そこで、これまでの知見をもとに、よりFIB-SEMでの解析に適した試料作製方法の検討を行い、次の手順で試料を作製した。

生後7週齢雌性野生型マウスを1/2Karnovsky溶液にて還流固定し、脛骨を摘出した。摘出したサンプルは、EDTA-2Na水溶液を用いて脱灰した後、後固定およびブロック染色を施し、アセトン脱水、エポキシ樹脂包埋を行った。ウルトラマイクロトームを用いて試料表面を滑沢にした後SEM観察を行い、加工・観察領域を決定した。加工領域表面に保護膜を施し、FIB-SEMにより加速電圧5kVの観察像を得た後、30kVのGaイオンによるスライス加工(50nm間隔)と連続SEM-COMP像を獲得した。なお、これらのSEM像と比較するために同一試料にて超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡観察を行った。



6. 結果・今後の展開

TEM観察およびFE-SEM観察を行ったところ、撮像条件等に若干の改善点を有するものの、過去の報告以上の解像度を有する画像が得られた。現在、これらの画像の3次元再構築に着手しており、今後さらに検討を重ねることにより本研究領域で長年不明とされてきた骨細胞・骨細管系の微細構造の詳細が可能になると考えられる。また、細胞の形態にはその機能が反映されていることから、骨細胞・骨細管系の微細構造の解明はミネラル代謝調節など骨細胞の機能を解明する上で非常に有益である。本研究成果が骨代謝研究におけるブレイクスルーとなることを祈念し、さらなる解析を進める予定である。



7. 謝辞

本研究は、文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業、平成26年度研究設備の“試行的利用”事業による支援・協力のもと実施しております。設備利用にあたり、多大なる御協力をいただいた北海道大学工学研究院共同利用施設 ナノ・マイクロマテリアル分析研究室 遠堂 敬史技術職員を始め、関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。



参考文献

- [1] 下村淳子, 網塚憲生: 骨の細胞の形態と機能. 新しい透析骨症 東京 日本メディカルセンター 107-115, 2003.
- [2] Sasaki M., Hongo H., Hasegawa T., Suzuki R., Liu Z., Freitas PHL., Yamada T., Oda K., Yamamoto T., Li M., Totsuka Y., Amizuka N.: Morphological Aspects on Osteocytic Function on Bone Mineralization. *Oral Science International*. 9 (1) :1-8, 2012.
- [3] Hasegawa T., Amizuka N., Yamada T., Liu Z., Miyamoto Y., Yamamoto T., Sasaki M., Hongo H., Suzuki R., Freitas PHL., Yamamoto T., Oda K., Li M.: Sclerostin is differently immunolocalized in metaphyseal trabecules and cortical bones of mouse tibiae. *Biomed Res*. 34(3): 153-159, 2013.
- [4] Ubaidus S., Li M., Sultana S., Freitas PHL., Oda K., Maeda T., Takagi R., Amizuka N.: FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling. *J Electron*

Microsc. 58(6):381-392, 2009.

ディカルレビュー社 東京 27(3):23-29, 2013.

[5] 網塚憲生, 山本知真也, 佐々木宗輝, 長谷川智香:

1. 骨の微細環境における骨細胞. THE BONE メ

(北海道大学大学院歯学研究科 長谷川 智香)



【お問い合わせ】

微細構造解析プラットフォーム
北海道大学 ナノテクノロジー連携研究推進室
☎ 011-706-9340
E-mail nanoplat@cris.hokudai.ac.jp

ホームページ

<http://www.cris.hokudai.ac.jp/cris/nanoplat/>