

論文要旨等報告書

氏	今井 裕一
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 4 3 5 3 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	超高压電子顕微鏡ならびに電子トモグラフィ法を用いた骨基質と骨細胞突起の3次元構築に関する研究
論文審査委員	教授 山本 敏男 教授 山城 隆 教授 杉本 朋貞

学位論文内容の要旨

【緒言】

静的に見える骨は、破骨細胞による骨吸収ならびに骨芽細胞による骨形成により絶えずその姿を変えている。また、骨は外界の機械的刺激に応答して骨量の見直しおよび空間的再構築を絶えず行っている。これら機械的刺激による骨リモデリングは、骨芽細胞が形態変化し骨中に存在するようになった骨細胞の働きによって調節されていると考えられている。数々の *in vivo* の実験において、骨細胞が機械的刺激に応答していることが報告されるようになり、機械的刺激に対する骨細胞の役割が注目されるようになってきた。しかし現在までのところ、骨に負荷された機械的な刺激がどのような形で骨細胞に働き、細胞のどの部分が応答を行う引き金となっているのかについて明確な答えは得られていない。近年、骨細管内を間歇的に流れる体液が骨細胞突起を刺激し、その結果、骨細胞が機械的刺激を感知しているという報告がなされた。また、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた観察から骨細胞突起が骨細管から伸びる三角錐の突起状の構造物に直接接触するという報告や、この接触部位を基点として骨細胞が機械的刺激を感知しているという報告など、TEM を用いた骨細胞突起と骨細管の形態的な観察から、骨に負荷される機械的な刺激が骨細胞の生物学的な応答を引き起こしているとする様々な仮説が提唱されるようになった。そこで今回我々は、常用 300 万ボルト超高压電子顕微鏡と電子トモグラフィ法を用いて、1 μm 厚の切片から骨基質に囲まれた骨細胞突起ならびに骨細管を数 nm の解像度で観察し、3次元再構築を行うことにより両者の形状、位置関係を解析することを目的とした。

【方法】

オランダ ACTA-Vrije 大学の Dr. Klein-Nulend から供与された、インフォームドコンセントを十分に受け、股関節置換術が施行された 83 歳女性患者ならびに 62 歳男性患者から摘出されたヒト大腿骨皮質骨を試料とした。試料観察は 300 万ボルト超高压電子顕微鏡を用い、200 万ボルトの加速電圧で行った。試料は -60° ~ $+60^{\circ}$ の範囲で 2° 毎に 1 軸傾斜させ、15,000 倍および 40,000 倍で撮影した。結果として、8 箇所異なる骨細胞を観察することができた。断層像解析はすべてコロラド大学で開発された IMOD ソフトウェアを用いて行った。得られた再構築像は TRI/3D-VOL ソフトウェア (Ratoc system Engineering Co. Tokyo, Japan) を用いて骨細胞突起ならびに周囲骨基質領域を抽出し、3D 解析ソフトウェア Avizo (VSG, Bordeaux, France) を使用して骨細胞突起と骨細管の位置関係の検討を行った。

【結果】

骨細胞突起の長軸を中心とする縦断像、横断像が得られ、骨細胞突起と骨細管の両者、ならびに周囲骨基質を観察することができた。また、横断の電子トモグラフィ像から骨細胞突起の輪郭、骨細管の内壁、ならびに一部追跡が可能なコラーゲン細線維の輪郭をトレースし、3次元立体構築を行った。立体構築は 3次元再構築ソフトウェア Avizo を用いた。骨細胞の突起には隆起状の構造物が観察された。さらに、骨細管の内壁の形態は、個々のコラーゲン細線維の走行によって形作られていることが確認された。

【考察】

電子トモグラフィ法は、対象となる組織について広い角度範囲から数 10 枚または数 100 枚の投影像を TEM で撮影し、この連続像から組織の断層像をコンピュータ上で構築する手法であり、得られた連続断層像から個体組織を立体構築できる利点がある。今回、超高圧電子顕微鏡を使用することによって、生体試料の厚さの限界は汎用 TEM が数 100 nm であるのに対し、その約 10 倍である数 μm の試料の観察を行うことができ、数 nm の解像度で組織を観察できた。また、観察倍率は 2,000 倍から 20,000 倍と電子顕微鏡としては比較的低い倍率で利用可能であり、細胞や細胞内器官の形態を 3 次元かつ定量的に解析するのに有利であった。さらに、従来の薄切切片と比較してさらに薄い数 nm 厚の連続断層像を作成できる電子トモグラフィ法を用いて、骨細胞突起と周囲骨基質の関係、特に両者が接触しているかどうかという点について解析することができた。今回連続断層像を作成した骨細胞突起の長軸を中心とする縦断像ならびに横断像からは、骨細胞突起と骨細管内壁の接触は観察できなかった。しかし、接触が観察されなかった 36 枚の連続断層像を重ね、仮想的に汎用 TEM で使用される超薄切片とほぼ同様の厚さをもつ 79.2 nm の仮想超薄切片を作成し観察したところ、骨細胞突起と骨細管内壁は接触しているように見えた。成熟骨細胞の骨細胞突起と骨細管内壁が全く接していないことを証明するにはこの方法を用いても困難であるが、本研究の結果から汎用 TEM による観察では、骨細胞突起と骨細管内壁の接触を解析するには不十分であることが示唆された。

【結論】

超高圧電子顕微鏡と電子トモグラフィ法を使用することによって、骨細胞突起ならびに周囲基質の立体構築が数 nm レベルで可能であった。また、汎用 TEM では骨細胞突起と骨細管の位置関係を解析するには不十分であることが示唆された。さらに、連続断層像から立体構築された骨細胞突起と骨細管内壁ならびにコラーゲン細線維から、骨細管壁表面の複雑な形態はコラーゲン細線維の走行によって形成されていることが明らかになった。