

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
上岡 寛 印	研究内容の指導、統括
印	
印	

## 学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 歯科矯正学	身分 大学院生	氏名 田畑 香織
論 文 題 名 骨細胞突起と骨細管の生体ボリュームイメージ解析 -機械学習による画像抽出-		
<p>論文内容の要旨（2000字程度）</p> <p>骨にメカニカルストレスがかかると、骨細胞はメカノセンサーの役割を担うことが知られている。骨細胞は、周囲を骨基質に取り囲まれているため、骨基質の変形を直接的に感知している可能性は低く、骨細胞の特徴的な形態である樹状突起に何らかの感知機能があると考えられている。骨細胞は骨細胞突起を介して細胞性ネットワークを形成しており、骨細胞のメカニカルストレスは、骨細胞突起が機械的刺激を感知するとネットワーク全体にその刺激が伝播する。しかし、その骨細胞突起が機械的刺激を感知する機構は明らかではない。そのような中で着目されているのが流体剪断応力である。流体剪断応力とは、骨にメカニカルストレスが加わると骨基質がわずかに歪む。その歪みは、骨細管を流れる体液の移動を引き起こし、骨細胞突起表面にずり応力を引き起こす。そのずり応力に伴う骨細胞突起の変形により、骨細胞突起がメカニカルストレスを感知するというものである。これまで流体剪断応力の検討には、単離した骨細胞や骨細胞突起と骨細管のシンプルなモデルが用いられてきた。実際の骨細胞突起は骨細管に取り囲まれており、またその形態は複雑である。つまり、解剖学的な形態の違いは、流体剪断応力にも影響を及ぼすため、骨細胞突起と骨細管の詳細な三次元的形態観察が必要であると考えた。</p> <p>そこで今回我々は、近年開発された直交配置型 Focused Ion Beam- Scanning Electron Microscopy(FIB-SEM)を用いて、骨細胞突起と骨細管を三次元的に観察することとした。FIB-SEM 断層撮影法とは収束イオンビーム(FIB)による試料表層の切削と、その切削面の SEM 観察を繰り返すことで、電子顕微鏡レベルの高い分解能をもつ細胞や組織の三次元再構築を行うものである。この場合の SEM 観察とは表面の凹凸を見る形態観察ではなく、FIB によって切削した平面内の内部組織のコントラストを二次電子あるいは反射電子で観察するものである。本研究では FIB にガリウムイオンビームを用いた。加速され直径数 nm に収束されたガリウムイオンビームは未脱灰骨のような固い組織を数 nm の精度で任意の形状に切削・加工することが可能である。これにより、直径数十 nm の微細な骨細胞突起と骨細管を数 <math>\mu\text{m}</math> の広領域に観察することが可能である。</p> <p>直交配置型 FIB-SEM を用いることで、マウス大腿骨の <math>20 \times 20 \times 10 \mu\text{m}</math> の領域を <math>10 \text{ nm/voxel}</math> の解像度で観察し、細胞性ネットワークの詳細な観察が可能となった。骨細胞と骨細胞突起は、rOTO 法で染色することで良好なコントラストが得られたため、連続 SEM 像はソフトウェア Amira を用いて自動組織抽出し三次元再構築を行うことで、三次元的な観察が可能となった。次に、<math>4 \times 4 \times 2 \mu\text{m}</math> の領域を <math>2 \text{ nm/voxel}</math> の高解像度で観察し、骨細胞突起と骨細管の詳細な形態観察を行なった。骨細管は骨細胞突起と比較して良好な膜コントラストが得られなかったため、自動組織抽出の適応は困難であった。このような場合、従来の方法では目視判定による手動抽出を行う。しかしながら、直交配置型 FIB-SEM を用いた観察では約 1000 枚の連続 SEM 像を取得</p>		

論文内容の要旨（2000字程度）

機械学習を用いて骨細胞突起と骨細管の領域抽出を行った。機械学習の精度を、Dice 係数を用いて評価した結果、機械学習は連続 SEM 像の骨細胞突起と骨細管の領域抽出に有効であることが分かった。

機械学習を用いて領域抽出した骨細胞突起と骨細管はソフトウェア Amira を用いて三次元再構築した。その結果、骨細胞突起表面の形態は比較的滑らかであるのに対し、骨細管壁内面の形態は非常に複雑であることが分かった。

さらに、機械学習を用いて領域抽出した骨細胞突起および骨細管を、ソフトウェア Dragonfly を用いて三次元的な三角形メッシュモデルで再構成した。骨細胞突起と骨細管間隙の間それぞれの内接球の直径を計測し、骨細胞突起の直径および骨細管間隙の間の三次元的距離として評価した。その結果、今回計測した骨細胞突起の直径の中央値は 73.8 nm、最大値は 104.0 nm、骨細管間隙の間の中央値は 40.0 nm、最大値は 108.8 nm であった。この結果は、先に報告されている骨細胞突起の直径の約 50-410 nm や、骨細管の直径の約 80-710 nm という結果と比較してやや小さい。これは、直交配置型 FIB-SEM を用いた観察では三次元再構築後に形態計測を行うため、形態計測結果への観察切片の厚みによる影響を可及的に排除できた可能性が考えられた。今回我々は、直交配置型 FIB-SEM を用いて骨細胞突起と骨細管の詳細かつ三次元的な形態観察を行うことができた。よって、今回得られた骨細胞突起と骨細管の生体ボリウムイメージは、生体下に近い良好な流体シミュレーションを行うことができると考えられた。