

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－

田畑 香織

緒言

矯正歯科治療は、歯列に矯正力を与えた時に、歯の周囲の骨がメカニカルストレスを感知して骨リモデリングを行うことでなされる¹⁾。そのメカニカルストレスを感知する主要な細胞が骨細胞といわれている。骨細胞は骨芽細胞に由来し骨系細胞の90～95%を占め、骨組織中で最も多く存在する²⁾。骨細胞は骨細胞突起を介して互いにネットワークを形成しており、そのネットワークは骨髄側にまで伸びて広く骨組織に行き渡っていることが確認されている^{3,4)}。細胞性ネットワークの一部はギャップ結合を介して形成されるため^{5,6)}、骨細胞同士は細胞間コミュニケーションにより同調していると考えられている⁷⁻⁹⁾。このように骨細胞は、骨細胞性ネットワークを形成し豊富に存在することから、いくつかの役割が提唱されてきた。その中でも、メカニカルストレスに対する骨細胞の役割が注目されるようになってきた¹⁰⁻¹⁸⁾。骨細胞は、メカノセンサーとして機能した後、この細胞性ネットワークを介して骨リモデリングを調節している¹⁴⁾。しかし、骨に負荷されたメカニカルストレスを骨細胞がどのように感知しているのかは明らかになっていない。一般に細胞が外的な力を生物的に感知するには、細胞の歪みが10%以上必要である^{19,20)}。しかしながら、骨細胞を取り囲む骨基質の歪みは坂道をジグザグに駆け下りた際に最大になり、その時の大腿骨の変形量はわずか0.3%である²¹⁾。ここには10倍以上の差がある。よって、骨細胞は骨基質の変形を直接的に感知している可能性は低く、わずかな骨基質の変形を感知する機構を有するか、あるいは骨細胞突起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のかもしれない。

そこで我々の教室では、骨細胞の変形に対する反応を、単離した骨細胞の骨細胞体と骨細胞突起それぞれを直接刺激した時の骨細胞内 Ca^{2+} の上昇を指標に評価した。その結果、骨細胞の直接刺激による変形に対する反応は骨細胞突起で高いことが示唆された。上昇した細胞内 Ca^{2+} は、刺激した骨細胞突起を起点として細胞性ネットワークに伝播された²²⁾。しかしながら、実際の骨細胞突起は骨細管に取り囲まれているため、骨細胞突起が変形を感知する機構は明らかになっていない。そのような中で、着目されているのが流体剪断応力による骨細胞の刺激である^{23,24)}。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²⁵⁾。Cowinらは、細胞突起と骨細管のシンプルなモデルを用いて流体剪断応力の考察を行った。その結果、骨細胞がメカニカルストレスを感知する機構として流体剪断応力の可能性を示した²⁶⁾。それらのことを検証する

ために我々の教室では、単離した骨細胞の細胞内 Ca^{2+} の上昇を指標に評価し、骨細胞は流体剪断応力によりメカニカルストレスを感知すると報告した²⁷⁾。このように、単離した骨細胞を用いた実験では、骨細胞は流体剪断応力によりメカニカルストレスを感知し、その局在は骨細胞突起である可能性が高いということが示された。しかし、これまでの骨細胞がメカニカルストレスを感知する機構に関する報告は単離した骨細胞を用いたものや、骨細胞突起と骨細管の簡易モデルを用いたものであり、生体下での骨細胞突起と骨細管の三次元データを用いた報告はなされていない。骨細胞突起と骨細管の形態は、骨細胞がメカニカルストレスを感知する機構に影響を与えると考えられるため、詳細にかつ三次元的に解明することが必要であると考えた。

骨細胞突起および骨細管の形態観察には、これまで透過電子顕微鏡(TEM)や走査電子顕微鏡(SEM)が用いられてきた²⁸⁾。TEMは、分解能が0.1 nm程度であるため、骨細胞突起および骨細管の詳細な形態把握が可能である。一方で100 nm以下の薄切切片を観察に用いるため、観察深度が浅く骨細胞性ネットワークの観察はできない。近年開発された超高圧透過電子顕微鏡(UHVEM)は、従来の透過電子顕微鏡の約15倍の電子線を透過することで約3 μm ほどの厚みの試料も観察が可能となった²⁹⁾。KamiokaらUHVEMを用いて成人男性の大腿骨の骨細胞突起と骨細管の観察を行い、602 nmの長さの三次元再構築と観察および流体シミュレーションを行った³⁰⁾。その結果、骨細胞突起と骨細管の位置関係は確認できたが、三次元的な形態を把握するには少なくとも数 μm の観察範囲が必要であることがわかった。

近年、Haraらによって開発された直交配置型 Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopy(FIB-SEM)断層撮影法は、細胞や組織を電子顕微鏡レベルの高い分解能で三次元構築する新たな手法である^{31,32)}。収束イオンビーム(FIB)による試料表面の切削と、切削面のSEM観察を繰り返す(シリアルセクションング)連続スライスSEM法の一つである。FIBには主にガリウムイオンビームが用いられる。加速され直径数 nm に収束されたイオンビームは樹脂のような柔らかい素材から金属のような硬い組織に至るまで、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。Hashimotoらは、直交配置型FIB-SEMを用いてモデリング期の骨組織を25 nm/voxelの解像度で25 \times 25 \times 25 μm の立方領域を観察した。その結果、ナノサイズのコラーゲン線維から、マイクロサイズの骨系細胞までを25 nm/voxelの解像度で広範囲に観察した³³⁾。つまり、直交配置型FIB-SEMでは、ナノサイズの骨細胞突起や骨細管³⁴⁾から、マイクロサイズの骨細胞性ネットワークまでを広範囲に観察が可能である。

直交配置型FIB-SEMにより得られたSEM像からの組織抽出には、これまで主に目視判定(アノテーション)による手動抽出が行われてきた。約1000枚全てのSEM像から組織を手動抽出するには数か月単位の時間を要する。一方で、機械学習は大量の組織抽出を、数時間で行うことが可能である。そこで、我々は骨細胞突起と骨細管の組織抽出に人工知能(AI)の一部である機械学習を応用した^{35,36)}。

材料ならびに方法

1. 試料作製

本研究は、岡山大学動物実験委員会 (OKU-2016141) のもと実施した。

実験には、8週齢のICRマウスを用いた。4%パラホルムアルデヒド固定液(PFA)と4%グルタルアルデヒド固定液(Glu)を用いて灌流固定を行なったのち、大腿骨を採取した。採取した大腿骨は6日間OSTEOSOFT(Merck Millipore, USA)にて脱灰を行なった³⁷⁾。その後、従来の方法に従ってそれぞれ2%に希釈したPFAとGluを合わせた固定液にて4°Cで24時間後固定を行なった³⁸⁾。HEPES緩衝液を用いて十分に洗浄し、大腿骨の骨端部を切断して骨幹部の約10mmを観察試料とした。HEPES緩衝液は、HEPES 120 mM (片山化学工業株式会社, 大阪, 日本), 塩化ナトリウム 200 mM (ナカライテスク株式会社, 京都, 日本) を1000 mlの純水に溶解させ、1 M水酸化ナトリウム溶液を用いてpH 7.4に調整したのち443.9 mMの塩化カルシウム (ナカライテスク) を加えた。洗浄後はまず、4%四酸化オスミウム (TAAB, Berkshire, GBR) とHEPES緩衝液で希釈した3%フェロシアン化カリウム三水和物(Sigma Aldrich, MO, USA)を同量合わせた溶液に4°Cで1時間浸漬した。HEPES緩衝液を用いて十分洗浄した。次に0.94 mMのチオカルボヒドラジド(Alfa Aesar, Lancashire, GBR)を60°Cの純水10 mlに溶解させたのち、フィルタリングして作製したチオカルボヒドラジド溶液に室温で20分間浸漬した。純水で十分洗浄した後、純水で希釈した2%四酸化オスミウム溶液に4°Cで30分間浸漬し、染色を行なった。染色後は純水で十分洗浄し、試料をエタノール系列 (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%無水エタノール) でそれぞれ20分ずつ脱水し酸化プロピレンで置換した。脱水後は、酸化プロピレンとエポキシ樹脂 EPON 812(Agar Scientific, Essex, GBR)の等量混合物、酸化プロピレン:エポキシ樹脂=1:2の混合物にそれぞれ6時間浸漬後、真空下でエポキシ樹脂に一晩浸漬した。エポキシ樹脂に包埋し、60°Cの常温器で2日間重合させた。

大腿骨骨幹部約10mmの包埋試料は、その長軸方向を二等分して約5mmの大腿骨の包埋試料にした。切断面が観察面となるように規定して4×4×1mm以下の大きさになるように研磨した。このとき研磨した試料の長軸方向が平行になるように、そしてFIB-SEMの観察領域が試料のエッジにくるように研磨した。その後、クロスセクションポリッシャー(CP)を用いて研磨を行うことで、さらに歪みのない観察面を作製した。観察には、骨細胞の配向性が保たれている皮質骨側の骨細胞を選択した¹⁸⁾。

2. 直交配置型 FIB-SEM を用いた骨組織の三次元的観察

試料の観察は直交配置型 FIB-SEM (SMF-1000, 株式会社日立ハイテクノサイエンス, 東京, 日本) を用いた。FIBのイオンビームはガリウムイオンを用いた。FIB加工の加速電圧は30 kV, SEMの加速電圧は1 kVに設定した。SEMの検出器は、光軸上に設置された環状二次電子検出器(InLensSE)とエネルギーフィルタ付環状反射電子検出器(EsB)を混合して使用した。

骨細胞性ネットワークの観察は、試料断面の SEM 像は $20 \times 20 \mu\text{m}$ の領域を 2000×2000 pixel に設定した。観察試料の深さは FIB によるセクショニングピッチを 10 nm に設定し、 1000 枚の SEM 像を取得した。 10 nm/voxel で、 $20 \times 20 \times 10 \mu\text{m}$ の領域のデータを観察した。骨細胞突起と骨細管間隙の詳細な形態観察は、SEM 像は $4 \times 4 \mu\text{m}$ の領域を 2000×2000 pixel に設定した。FIB によるセクショニングピッチは 2 nm に設定し、合計 2000 枚の SEM 像を取得した。 2 nm/voxel で、 $4 \times 4 \times 4 \mu\text{m}$ 領域のデータを得た。取得した連続 SEM 像はソフトウェア Amira(Zuse Institute Berlin, Berlin, GER)を用いて骨細胞と骨細胞突起の自動抽出を行い、三次元再構築を行なった。なお、画像は観察が容易になるように白黒反転し、TEM 様の画像に変換した。

3. 機械学習による骨細胞突起と骨細管の抽出

機械学習による骨細胞突起と骨細管の抽出は、FIB-SEM により観察した 2000×2000 pixel の連続 SEM 画像を、 50% (1000×1000 pixel) に圧縮したのちに行なった。そのうち一続きの骨細胞突起と骨細管が確認できる領域を関心領域(ROI)とした。機械学習には、ソフトウェア ImageJ のプラグインである Trainable Weka Segmentation(TWS)を用いた^{39,40)}。TWS法では、入力画像である連続断層画像の一部を用いて骨細胞突起、骨細管、骨基質の 3 つの構造に目視判定で特徴ピクセル値を設定した。特徴ピクセル値は、ランダムフォレスト法をもとにランダムに複数選択され、複数個の決定木で得られる重ね付き平均確率に基づいて識別させた。識別された特徴ピクセル値(教師データ)を入力画像に適用することで骨細胞突起と骨細管および周囲骨基質の領域抽出を行なった。

4. 機械学習の精度評価

機械学習による骨細胞突起および骨細管の領域抽出の有効性を判断するため、精度評価を行なった。精度評価には Dice 係数を用いた。Dice 係数は以下の式によって求めた。

$$\text{Dice 係数} = 2 \times (A \cap B) / A + B$$

A は機械学習により抽出した骨細胞突起または骨細管の領域、B は手動抽出した骨細胞突起または骨細管の領域を示す。機械学習によって抽出した骨細胞突起または骨細管の領域と、手動抽出した骨細胞突起または骨細管の領域(正解データ)の類似度を算出した。Dice 係数の算出は、領域抽出できた骨細胞突起または骨細管の連続 SEM 像数の約 10 分の 1 にあたる 40 枚の連続 SEM 像を用いて行なった。

5. 骨細胞突起と骨細管の生体ボリュームイメージの作製

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それぞれの二値化データに、ソフトウェア Amira(Zuse Institute Berlin, Berlin, GER)を用いて三次元再構築を行なった。三次元再構築を行うことで、取得した断層面だけでなく任意の断層面も観察することが可能になった。取得した SEM 像の横方向を X 軸、縦方向を Y 軸、

大腿骨の長軸方向を X 軸と規定すると，SEM 像は x-y 平面となる。三次元再構築像では，X-Y 平面だけでなく，X-Z 平面，Y-Z 平面の観察も可能になった。

6. 骨細胞突起と骨細管の生体ボリュームイメージの解析

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それぞれの二値化データに，ソフトウェア Dragonfly(Object Research Systems, Montreal, CAN)を用いて，三次元的な三角形メッシュモデルを再構成した⁴¹⁾。骨細胞突起の直径と骨細管間隙の間の内接球の直径を計測し⁴²⁾，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。ボクセル数が 4 以下となる直径が 16 nm 以下の内接球の計測は困難であった。骨細胞突起と骨細管間隙の形態解析は，中央値と最大値を用いて行なった。

結果

1. 骨細胞性ネットワークの高詳細三次元的観察

直交配置型 FIB-SEM を用いることでマウス的大腿骨骨幹部の皮質側の $20 \times 20 \times 10 \mu\text{m}$ の領域の骨細胞性ネットワークを 10 nm/voxel の解像度で観察することができた (図 1 A)。

図 1 B～図 1 F に取得した SEM 像 (x-y 平面) を示した。マウス的大腿骨骨幹部の皮質骨側を，骨梁の長軸方向に観察した。その結果，骨細胞の形態や骨細胞表面から伸びる無数の骨細胞突起の形態と走行を観察することができた。rOTO 法 (還元オスミウム，チオカルボヒドライド，オスミウム) による染色を行うことで明瞭な膜コントラストを得ることが可能となった。

次に，骨細胞性ネットワークの三次元的な形態観察を行うため骨細胞と骨細胞突起の自動抽出を行い，三次元再構築を行なった (図 2)。図 2 A は左から順に Y 軸を中心にそれぞれ 0 度，60 度，120 度回転させたものである。図 2 B は抽出した骨細胞と骨細胞突起をすべて表示し，図 2 A に合わせて回転させたものである。骨細胞突起は，比較的直線的なものや弯曲したもの，分岐したものなど様々な形態を示した。特に，骨細胞体から伸びた直後の骨細胞突起は比較的直線的であり，骨細胞体から離れるに従って大きく弯曲するものや分岐したものが多く認められた。また，骨細胞突起は互いに結合しネットワークを形成していた。骨細管はボクセルサイズ 10 nm の連続 SEM 像では良好なコントラストが得られず，自動抽出と詳細な形態観察は困難であった。

骨細管の詳細な形態観察を行うため，マウス的大腿骨骨幹部の皮質側の $4 \times 4 \times 4 \mu\text{m}$ の領域を 2 nm/voxel の解像度で観察した。直交配置型 FIB-SEM を用いた観察を連続して二度行い，計 2000 枚の SEM 像を得た (図 2 D F)。骨細管のコントラストは改善されたが，骨細管の組織抽出には骨基質とのごくわずかなコントラストの区別が必要であり，自動抽出が可能なほど良好なコントラストは得られなかった。図 2 C の四角枠で囲んだ約 $4 \times 4 \mu\text{m}$ の領域の取得した 1000 枚の SEM 像 (X-Y 平面)

を三次元再構築したものを図 2 D に示した。得られた SEM 像にソフトウェア Amira を用いて骨細胞突起のみを自動抽出した結果、 $4 \times 4 \times 2 \mu\text{m}$ の領域に 5 つの骨細胞突起を確認できた (図 2 E)。図 2 F に図 2 D と連続する 1000 枚の SEM 像を三次元再構築したものを示した。白枠に示す $2.7 \times 1.2 \mu\text{m}$ の関心領域の約 800 枚の連続 SEM 像に一本の骨細胞突起が観察できた (図 2 G)。

2. 機械学習による骨細胞突起と骨細管の抽出

直交配置型 FIB-SEM を用いて得られた連続 SEM 像は、骨細胞と骨細胞突起のコントラストがつきやすく自動抽出が可能であった。一方で、骨細管はコントラストがつきにくいため自動抽出は困難であった。FIB-SEM を用いた観察は、一度の観察で連続 SEM 像を約 1000 枚取得できるため、手動トレースによる目的組織の抽出には膨大な労力と時間を要する。そこで、我々は機械学習を用いて、図 2 E の矢頭で示す直線的な骨細胞突起と図 2 G の凸型に弯曲した骨細胞突起の 2 種類の骨細胞突起と骨細管を領域抽出した。機械学習を用いることで計 1800 枚の連続 SEM 像より骨細胞突起と骨細管の領域抽出を行うことができた。

3. 機械学習の精度評価

機械学習を用いた骨細胞突起と骨細管の領域抽出の精度を評価した(図 3)。精度の評価には 40 枚の連続 SEM 像の機械学習による領域抽出結果 (図 3 B D F H) と手動抽出による領域抽出結果 (図 3 A C E G) の Dice 係数の中央値を用いた。図 2 E の矢頭で示す走行が直線的な骨細胞突起の Dice 係数は 88.9 % (図 3 I)、骨細管の Dice 係数は 86.5 %であった (図 3 J)。図 2 G の凸型に弯曲した骨細胞突起の Dice 係数は 82.7 % (図 3 K)、骨細管の Dice 係数は 82.8 %であった (図 3 L)。

4. 骨細胞突起と骨細管の生体ボリュームイメージの観察

機械学習により得られた骨細胞突起と骨細管の領域抽出データを用いて、図 2 G の凸型に弯曲した骨細胞突起と骨細管の三次元再構築を行なった (図 4)。領域抽出には、直交配置型 FIB-SEM で得られた 2 nm/pixel , $2000 \times 2000 \text{ pixel}$, 2 nm/voxel の連続断層画像の解像度を 50 % に圧縮した 4 nm/pixel , $1000 \times 1000 \text{ pixel}$, 4 nm/voxel の仮想データを用いた。図 4 A~図 4 C は図 2 F の白枠に示す $2.7 \times 1.2 \times 1.2 \mu\text{m}$ の領域の連続 SEM 像を三次元再構築した図を示し、左から順にそれぞれ Y 軸を中心に 0 度, 60 度, 120 度回転させたものである。図 4 D~図 4 F は図 4 A~図 4 C に合わせて Y 軸を中心にそれぞれ 0 度, 60 度, 120 度回転させたものである。Z 軸方向に約 300 枚の連続画像から約 $3.5 \mu\text{m}$ の全長をもつ骨細胞突起と骨細管が再構築された。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。

5. 骨細胞突起と骨細管の生体ボリュームイメージ解析

骨細胞突起の直径と骨細管間隙の間をそれぞれ計測し、骨細胞突起と骨細管の生体ボリュームイメージ解析を行なった (図 5)。図 4 で示した凸型に弯曲した生体ボ

リユームデータの骨細胞突起の直径の中央値は 73.8 nm, 最大値は 104.0 nm (図 5 A), 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 (図 5 B)。

考察

今回我々は、直交配置型 FIB-SEM を用いることで、骨細胞突起と骨細管の三次元的な形態の観察を 2 nm/voxel の高解像度で観察した。得られた連続 SEM 像の領域抽出に機械学習を応用することで、約 3.5 μm の骨細胞と骨細管の三次元形態解析を行うことができた。

直交配置型 FIB-SEM を用いて骨細胞突起と骨細管を 2 nm/voxel で観察し、得られた連続 SEM 像を三次元再構築することで、細胞突起の直径は非常に細い箇所や太い箇所などがあり、複雑な形態であることが観察された。これは骨細胞突起の直径が約 50~410 nm と幅があることも合致する⁴⁵⁾。

連続 SEM 像から骨細胞突起と骨細管を領域抽出するために、機械学習を応用した。機械学習は連続 SEM 像の一部を用いて、抽出したい組織の特徴づけ (教師データの作成) を人間が行い、そのデータの規則を残りの約 1000 枚の SEM 像に適用して領域抽出を行う人工知能の一部である。機械学習を用いることで、骨細胞突起と骨細管の領域抽出を教師データに基づいて自動的に行うことができた。また手動抽出では、組織抽出を行う観察者間の能力差や観察者内エラーより結果が左右され、領域抽出の再現性が低下する可能性がある。我々は、直交配置型 FIB-SEM で得られた連続 SEM 像の組織抽出に機械学習を応用することで、これらの問題を回避することが出来たと考える^{35, 46)}。さらに、Dice 係数を用いて機械学習の有効性を評価した。その結果、骨細胞突起と骨細管の Dice 係数はいずれも約 83 % 以上であった。先の報告で Polan らは CT 所見に機械学習(TWS)を応用し各臓器を領域抽出した。その結果 Dice 係数の中央値は約 86 % であった⁴⁷⁾。我々が得た Dice 係数は先の結果に近似するものであり、骨細胞突起と骨細管の領域抽出に機械学習は有効であると考えられた。今回 FIB-SEM で得られた約 1000 枚の連続 SEM 像は、一度に機械学習を行うためにその解像度を半分の 4 nm/voxel に下げることで連続 SEM 像のデータ容量を圧縮したのち、機械学習を応用した。今後、一度の処理枚数を少なく分割することで、機械学習に適用する連続 SEM 像の解像度の低下を回避し、機械学習の精度の向上が可能であると考ええる。

骨細胞突起と骨細管の生体ボリュームイメージの観察を行うため、機械学習により領域抽出した骨細胞突起と骨細管を三次元再構築した。以前、我々の教室では UHVEM を用いて成人男性の大腿骨の骨細胞突起と骨細管の観察を行った⁴⁴⁾。仮想切片の解像度 2.2 nm/voxel で観察した骨細管の直径約 170 nm の 3.5 倍にあたる 602 nm の長さの骨細胞突起と骨細管の三次元的形態観察を行った³⁰⁾。その結果、骨細胞突起と骨細管の位置関係は確認できたが、三次元的な形態を把握するにはさらなる観察範囲の拡大が必要であった。今回我々は、骨細胞突起と骨細管の観察に直交配置型 FIB-SEM を用いることで、観察した骨細管の直径の約 160 nm の 22 倍にあ

たる約 $3.5\mu\text{m}$ の長さのより立体的な生体ボリュームイメージの観察を行うことができた。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。

骨細胞突起および骨細管の生体ボリュームイメージ解析を行うため、ソフトウェア Dragonfly を用いて、骨細胞突起の直径と骨細管間隙の間の距離を計測した。骨細胞突起の直径の最大値は 104.0 nm 、中央値は 73.8 nm であった。また骨細管間隙の間の最大値は 108.8 nm 、中央値は 40.0 nm であった。今回の計測値は、先に報告されている骨細胞突起の直径約 $50\text{-}410\text{ nm}$ や、骨細管の直径約 $80\text{-}710\text{ nm}$ という結果と比較するとやや小さい。従来の TEM や SEM を用いた骨細胞突起や骨細管の観察は二次元的であり、その計測値には観察試料の厚さによる影響を受ける。その一方、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ことが一因として考えられる。また、幼若骨細胞は骨小腔の細胞を占める割合が大きく、骨細胞によっては、わずか数十 nm の距離で石灰化骨質と接している。そのため今回観察した骨細胞は幼若骨細胞であった可能性が考えられる。

骨細胞がメカニカルストレスを感知するためには骨細胞突起と骨細管の存在が重要であると考えられている。骨細胞は周囲を硬い骨基質に取り囲まれた特異な環境下に存在するため、生体下で骨細胞がメカニカルストレスを感知する現象を確認することは困難である。また、実際の骨細胞突起や骨細管の形態は、これまで Cowin らが用いたシンプルなモデルとは違い、非常に複雑である⁴³⁾。形態の違いは、骨細胞がメカニカルストレスを感知する機構に影響を与えられられるため、骨細胞突起と骨細管の形態を詳細かつ三次元的に解明することが必要であると考えられる。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ュームイメージは、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。

結論

直交配置型 FIB-SEM を用いることで、骨細胞性ネットワークの一部である骨細胞突起と骨細管を 2 nm/voxel の解像度で詳細かつ広範囲に形態観察を行うことが出来た。取得した連続 SEM 像の組織抽出に機械学習を応用して骨細胞突起と骨細管を自動抽出することが可能となった。精度評価の結果、機械学習は連続 SEM 像を用いた骨細胞突起と骨細管の領域抽出に有効であることがわかった。機械学習により領域抽出した骨細胞突起と骨細管を三次元再構築することで、約 $3.5\mu\text{m}$ の骨細胞突起と骨細管の生体ボリュームを作成することができ、三次元的な形態を観察することができた。

謝辞

本研究の一部は、文部科学省委託事業ナノテクノロジープラットフォーム課題としてNIMS 微細構造解析プラットフォームの支援を受けて実施されました。

稿を終えるにあたり、懇篤なる御指導と御校閲を受け賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野上岡寛教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、御指導御協力を頂きました岡山大学歯学部先端領域研究センター長岡紀幸先生、国立研究開発法人物質・材料研究機構原徹先生、中村晶子様、原由佳様、株式会社マックスネット上村逸郎様に謹んで感謝の意を表します。さらに、本研究を行うにあたり、多くの貴重な御援助と御協力を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Murshid, S.A.:The role of osteocytes during experimental orthodontic tooth movement: A review. *Arch Oral Biol.*, 73, 25-33, 2017.
2. Schaffler, M.B., Cheung, W. Y., Majeska, R., & Kennedy, O. :Osteocytes: Master orchestrators of bone. : *Calcif Tissue Int.*, 94, 5-24, 2014.
3. Kamioka, H., Honjo, T., Takano-Yamamoto, T. :A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone.*, 28, 145-149, 2001.
4. Holmbeck, K., Bianco, P., Pidoux, I., Inoue, S., Billingham, R. C., Wu, W., Chrysovergis, K., Yamada, S., Birkedal, H., Poole, A. R. : The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci.*, 118, 147-156, 2005.
5. Kamioka, Hiroshi, Ishihara, Y., Ris, H., Murshid, S. A., Sugawara, Y., Takano-Yamamoto, T., Lim, S. S. : Primary cultures of chick osteocytes retain functional gap junctions between osteocytes and between osteocytes and osteoblasts. *Microsc Microanal.*, 13, 108-117, 2007.
6. Ishihara, Y., Kamioka, H., Honjo, T., Ueda, H., Takano-Yamamoto, T., Yamashiro, T. :Hormonal, pH, and calcium regulation of connexin 43-mediated dye transfer in osteocytes in chick calvaria. *J Bone Miner Res.*, 23, 350-360, 2008.
7. Doty, S. B. : Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int.*, 33, 509-512, 1981.
8. Jones, S. J., Gray, C., Sakamaki, H., Arora, M., Boyde, A., Gourdie, R., Green, C. : The incidence and size of gap junctions between the bone cells in rat calvaria. *Anat Embryol (Berl).*, 187, 343-352, 1993.
9. Donahue, H. J. : Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. *Bone.*, 26, 417-422, 2000.
10. Pead, M. J., Suswillo, R., Skerry, T. M., Vedi, S., Lanyon, L. E. : Increased³H-uridine levels in osteocytes following a single short period of dynamic bone loading in vivo. *Calcif Tissue Int.*, 43, 92-96, 1988.
11. Skerry, T. M., Lanyon, L. E., Bitensky, L., Chayen, J. : Early strain - related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J Bone Miner Res.*, 8, 251-259, 1989.
12. Haj, A. J. E., Minter, S. L., Rawlinson, S.C.F., Suswillo, R., Lanyon, L.E. : Cellular responses to mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res.*, 5, 923-932, 1990.
13. Van der Plas, A., Nijweide, P.J. : Isolation and purification of osteocytes. *J Bone Miner Res.*, 7, 389-396, 1992.
14. Lanyon, L.E. : Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int.*, 53, 102-107, 1993.

15. Dallas, S.L., Zaman, G., Pead, M.J., Lanyon, L.E. : Early strain - related changes in cultured embryonic chick tibiotarsi parallel those associated with adaptive modeling in vivo. *J Bone Miner Res.*, 8, 251-259, 1993.
16. Feng, J.Q., Ward, L.M., Liu, S., Lu, Y., Xie, Y., Yuan, B., Yu, X., Rauch, F., Davis, S.I., Zhang, S., Rios, H., Drezner, M.K., Quarles, L.D., Bonewald, L.F., White, K.E. : Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet*, 38, 1310-1315, 2006.
17. Bonewald, L.F. : The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.*, 26, 229-238, 2011.
18. Sugawara, Y., Kamioka, H., Ishihara, Y., Fujisawa, N., Kawanabe, N., Yamashiro, T. : The early mouse 3D osteocyte network in the presence and absence of mechanical loading. *Bone.*, 52, 189-196, 2013.
19. You, L., Cowin, S. C., Schaffler, M.B., Weinbaum, S. : A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix. *J Biomech.*, 34, 1375-1386, 2001.
20. Li, B., Li, F., Puskar, K. M., Wang, J.H.C. : Spatial patterning of cell proliferation and differentiation depends on mechanical stress magnitude. *J Biomech.*, 42, 1622-1627, 2009.
21. Burr, D.B., Milgrom, C., Fyhrie, D., Forwood, M., Nyska, M., Finestone, A., Hoshaw, S., Saiag, E., Simkin, A. : In vivo measurement of human tibial strains during vigorous activity. *Bone.*, 18, 405-410, 1996.
22. Adachi, T., Aonuma, Y., Tanaka, M., Hojo, M., Takano-Yamamoto, T., Kamioka, H. : Calcium response in single osteocytes to locally applied mechanical stimulus: Differences in cell process and cell body. *J Biomech.*, 42, 1989-1995, 2009.
23. Knothe Tate, M.L. : "Whither flows the fluid in bone?" An osteocyte's perspective. *J Biomech.*, 36, 1409-1424, 2003.
24. Fritton, S.P., Weinbaum, S. : Fluid and Solute Transport in Bone: Flow-Induced Mechanotransduction. *Annu Rev Fluid Mech.*, 41, 347-374, 2009.
25. Burger, E.H., Klein-Nulend, J. : Mechanotransduction in bone - Role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J.*, 13, 101-112, 1999.
26. Cowin, S.C., Moss-Salentijn, L., Moss, M.L. : Candidates for the mechanosensory system in bone. *J Biomech Eng.*, 113, 191-197, 1991.
27. Kamioka, H., Sugawara, Y., Murshid, S.A., Ishihara, Y., Honjo, T., Takano-Yamamoto, T. : Fluid shear stress induces less calcium response in a single primary osteocyte than in a single osteoblast: Implication of different focal adhesion formation. *J Bone Miner Res.*, 21, 1012-1021, 2006.
28. Boyde, A., Jones, S.J. : Scanning electron microscopy of bone: Instrument, specimen, and issues. *Microsc Res Tech.*, 33, 92-120, 1996.
29. Takaoka, A., Hasegawa, T., Yoshida, K., Mori, H. : Microscopic tomography with ultra-HVEM and applications. *Ultramicroscopy.*, 108, 230-238, 2008.
30. Kamioka, H., Kameo, Y., Imai, Y., Bakker, A.D., Bacabac, R.G., Yamada, N.,

- Takaoka, A., Yamashiro, T., Adachi, T., Klein-Nulend, J. : Microscale fluid flow analysis in a human osteocyte canaliculus using a realistic high-resolution image-based three-dimensional model. *Integr Biology*, 4, 1198-1206, 2012.
31. Lešer, V., Milani, M., Tatti, F., Tkalec, Ž. P., Štrus, J., & Drobne, D. : Focused ion beam (FIB)/scanning electron microscopy (SEM) in tissue structural research. *Protoplasma*, 246, 41-48, 2010.
32. Hara, T. : Recent improvement of a FIB-SEM serial-sectioning method for precise 3D image reconstruction – application of the orthogonally-arranged FIB-SEM. *Microscopy*, 63, suppl 1, 2014.
33. Hashimoto, M., Nagaoka, N., Tabata, K., Tanaka, T., Osumi, R., Odagaki, N., Hara, T., Kamioka, H. : Three-dimensional morphometry of collagen fibrils in membranous bone. *Integr Biol*, 9, 868-875, 2017.
34. You, L.D., Weinbaum, S., Cowin, S.C., Schaffler, M.B. : Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 278, 505-513, 2004.
35. Tang, F., Liang, S., Zhong, T., Huang, X., Deng, X., Zhang, Y., Zhou, L. : *Postoperative glioma segmentation in CT image using deep feature fusion model guided by multi-sequence MRIs*. *Eur Radiol*, Oct 24, 2019.
36. Remedios, S., Roy, S., Blaber, J., Bermudez, C., Nath, V., Patel, M.B., Butman, J.A., Landman, B.A., Pham, D. L. : *Distributed deep learning for robust multi-site segmentation of CT imaging after traumatic brain injury*. Proc SPIE Int Soc Opt Eng., Mar, 2019.
37. Savi, F.M., Brierly, G.I., Baldwin, J., Theodoropoulos, C., Woodruff, M.A. : Comparison of Different Decalcification Methods Using Rat Mandibles as a Model. *J Histochem Cytochem*, 65, 705-722, 2017.
38. Shapiro, F., Cahill, C., Malatantis, G., & Nayak, R. C. : Transmission electron microscopic demonstration of vimentin in rat osteoblast and osteocyte cell bodies and processes using the immunogold technique. *Anat Rec*, 241, 39-48, 1995.
39. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. : Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 28, 676-682, 2012.
40. Arganda-Carreras, I., Kaynig, V., Rueden, C., Eliceiri, K. W., Schindelin, J., Cardona, A., & Seung, H.S. : Trainable Weka Segmentation: A machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics*, 33, 2424-2426, 2017.
41. Welch, W., Witkin, A. : Free-form shape design using triangulated surfaces. *Proceedings of the 21st Annual Conference on Computer Graphics and Interactive Techniques, SIGGRAPH 1994*, July, 1995.

42. Zhao, L., Chen, D., Chen, Z., Wang, X., Paliwal, N., Xiang, J., Meng, H., Corso, J.J., Xu, J. : Rapid virtual stenting for intracranial aneurysms. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng*. Accessed February 27, 2016.
43. You, L.D., Weinbaum, S., Cowin, S.C., Schaffler, M.B. : Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evo Biol*, 278, 505-513, 2004.
44. Giger, M.L. : Machine Learning in Medical Imaging. *J Am Coll Radiol*, 15, 512-520, 2018.
45. Polan, D.F., Brady, S.L., Kaufman, R.A. : Tissue segmentation of computed tomography images using a Random Forest algorithm: A feasibility study. *Phys Med Biol*, 61, 6553-6569, 2016.
46. Tanaka-Kamioka, K., Kamioka, H., Ris, H., & Lim, S. S. : Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J Bone Miner Res*, 13, 1555-1568, 1998.

表題脚注

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第39回日本骨形態計測学会（2019年7月，福岡）

第78回日本矯正歯科学会学術大会（2019年11月，長崎）

図の説明

図 1 直交配置型 FIB-SEM による骨細胞性ネットワークの観察

- (A) 直交配置型 FIB-SEM で取得した連続 SEM 像を三次元再構築した。
- (B)~(F) マウスの大腿骨骨幹部皮質骨側の骨細胞性ネットワークの観察を行なった。矢印は骨細胞，矢頭は骨細胞突起を示している。左上と右下に 2 つの骨細胞を確認できた。無数の骨細胞突起を確認できた。スケールバーは $2 \mu\text{m}$ である。

図 2 骨細胞性ネットワークの三次元的形態観察

- (A) 直交配置型 FIB-SEM で取得した SEM 像を三次元再構築した図を示す。左から順にそれぞれ Y 軸を中心に 0 度， 60 度， 120 度回転させている。スケールバーは $5 \mu\text{m}$ である。
- (B) 抽出した骨細胞と骨細胞突起をすべて示し，(A)に合わせて回転させている。骨細胞からは無数の骨細胞突起が伸びており，それらがネットワークを形成している様子を観察することができた。
- (C) 図 1 の直交配置型 FIB-SEM で， $20 \times 20 \times 10 \mu\text{m}$ の領域を 10 nm/voxel で観察した SEM 像を示す。スケールバーは $5 \mu\text{m}$ である。
- (D) (C)の白枠で示す $4 \times 4 \times 2 \mu\text{m}$ の領域を直交配置型 FIB-SEM を用いて 2 nm/voxel の解像度で取得した SEM 像を三次元再構築した図を示す。
- (E) (D)の直交配置型 FIB-SEM で取得した連続 SEM 像から骨細胞突起のみを自動抽出し三次元再構築した。5 つの骨細胞突起が観察できた。
- (F) 直交配置型 FIB-SEM で，(D)と連続する $4 \times 4 \times 2 \mu\text{m}$ の領域を 2 nm/voxel の解像度で観察した連続 SEM 像を三次元再構築した図を示す。
- (G) (F)の白枠に示す $2.7 \times 1.2 \times 1.2 \mu\text{m}$ の選択領域から骨細胞突起のみを自動抽出し三次元再構築した。凸型の約 $3.5 \mu\text{m}$ の骨細胞突起を観察できた。

図 3 機械学習の精度評価

- (A)~(D) 図 2 の(E)の矢頭が示す直線的な形態の骨細胞突起と骨細管の SEM 像を示す。スケールバーは $5 \mu\text{m}$ である。
- (E)~(H) 図 2 の(G)に示す凸型に弯曲した細胞突起と骨細管の SEM 像を示す。スケールバーは $1 \mu\text{m}$ である。
- (A)(E) SEM 像から骨細胞突起を手動抽出した。
- (B)(F) SEM 像から骨細胞突起を機械学習により抽出した。
- (C)(G) SEM 像から骨細管を手動抽出した。
- (D)(H) SEM 像から骨細管を機械学習により抽出した。
- (I) 図 2 の(E)の矢頭で示す骨細胞突起の Dice 係数のヒストグラムを示す。中央値は 88.9% であった。
- (F) 図 2 の(E)の骨細管の Dice 係数のヒストグラムを示す。中央値は 86.5% であった。

(K) 図 2 の(G)に示す骨細胞突起の Dice 係数のヒストグラムを示す。
中央値は 82.7%であった。

(L) 図 2 の(G)の骨細管の Dice 係数のヒストグラムを示す。
中央値は 82.8%であった。

図 4 骨細胞突起と骨細管の生体ボリュームイメージの観察

(A)~(C) 図 2 の(F)の白枠に示す $2.7 \times 1.2 \times 1.2 \mu\text{m}$ の領域の連続 SEM 像を
三次元再構築した図を示す。

左から順にそれぞれ Y 軸を中心に 0 度, 60 度, 120 度
回転させている。

(D)~(F) 直交配置型 FIB-SEM で取得した SEM 像を, 機械学習を用いて
骨細胞突起と骨細管を領域抽出し三次元再構築した。

(A)~(C)に合わせて Y 軸を中心にそれぞれ 0 度, 60 度, 120 度
回転させている。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。

図 5 骨細胞突起と骨細管間隙の生体ボリュームイメージ解析

(A)(B) 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用いて,
骨細胞突起の直径と骨細管間隙の間を計測した。

(A) 図 4 で示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 であった。

(B) 図 4 で示した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。

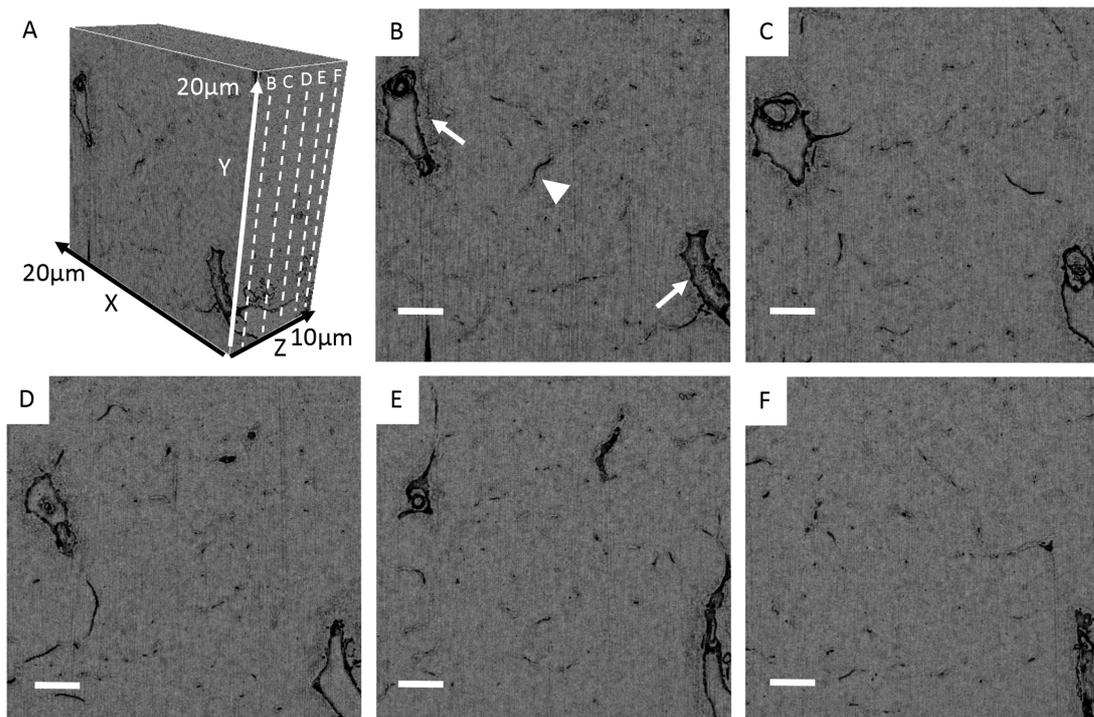


图 1 田畑 香織

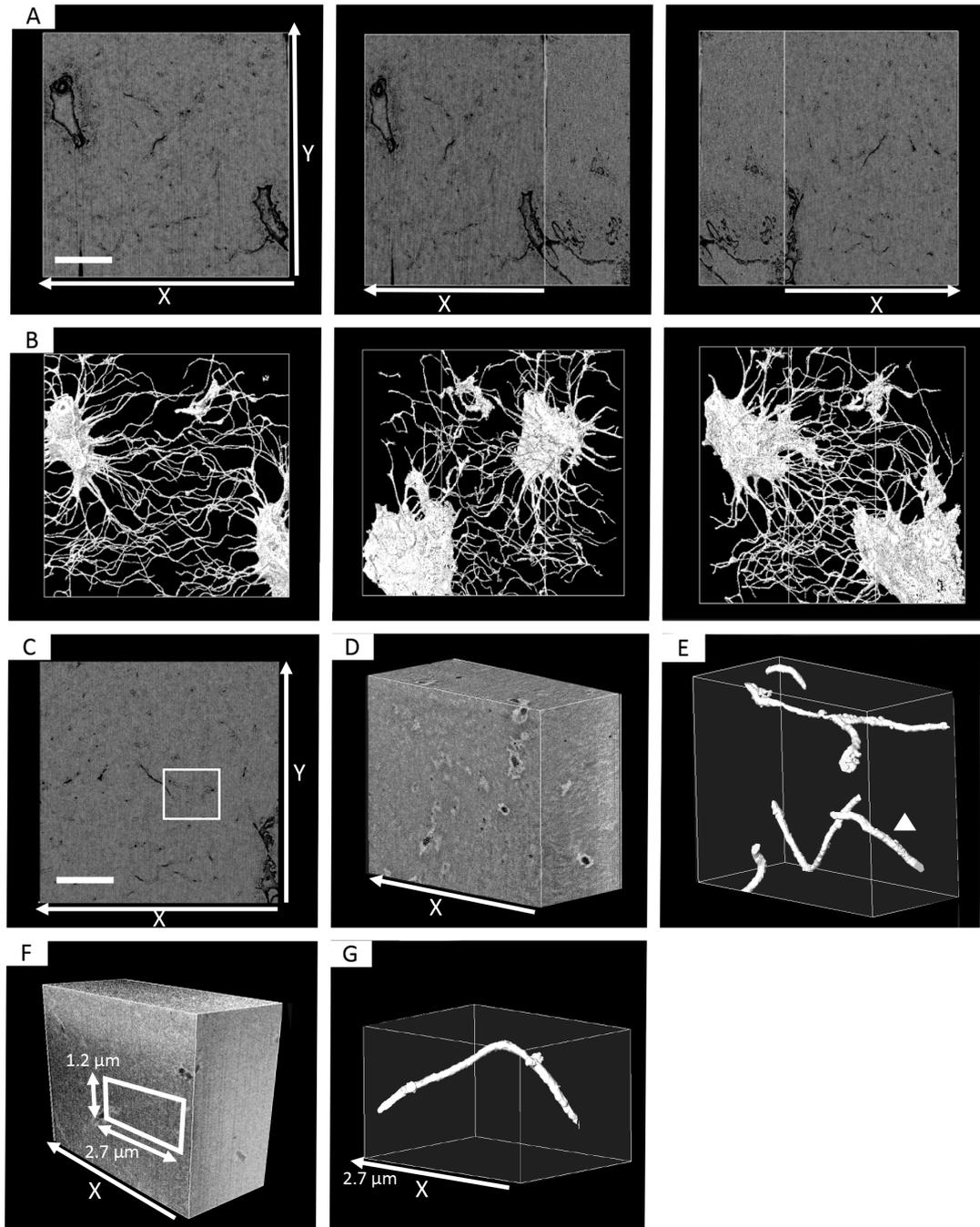


図 2 田畑 香織

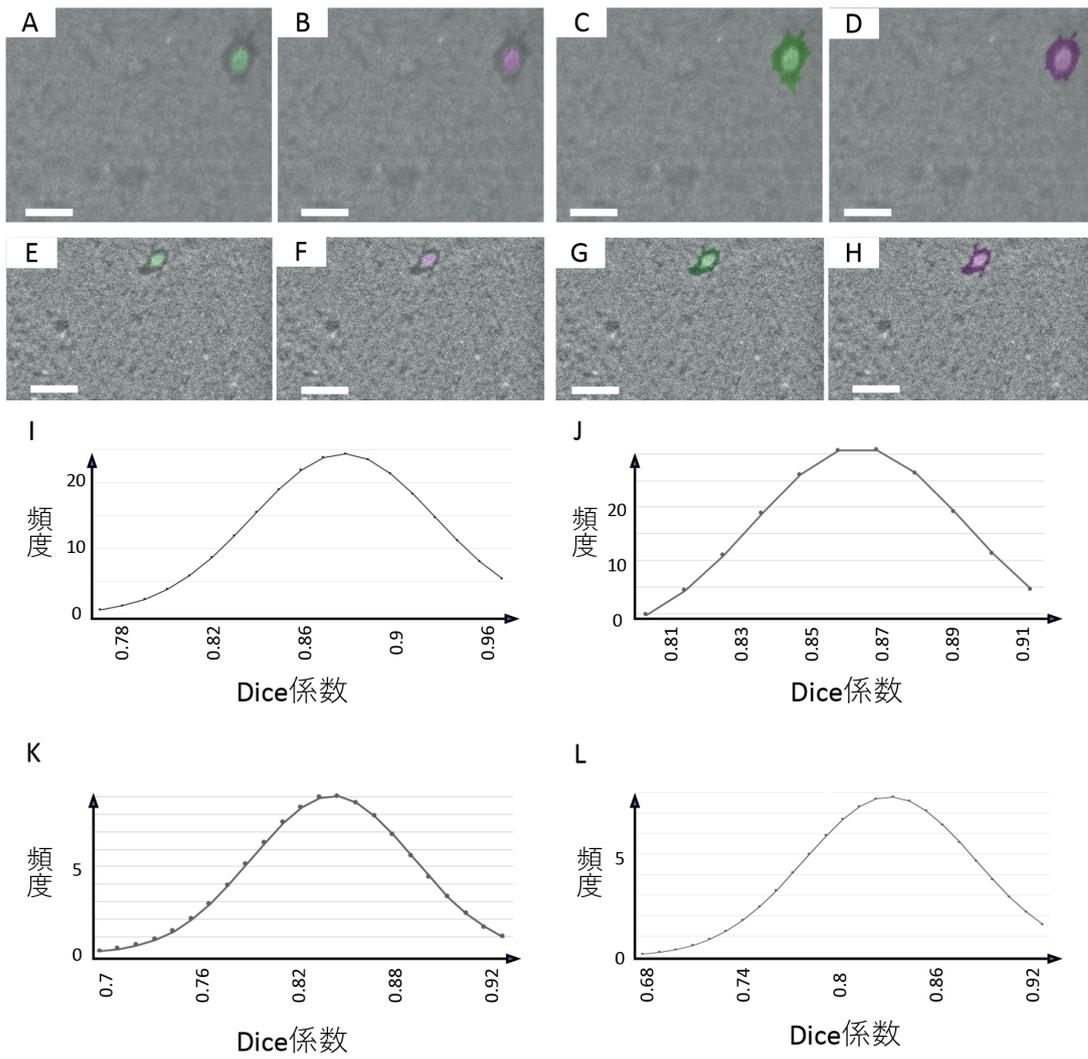


図3 田畑 香織

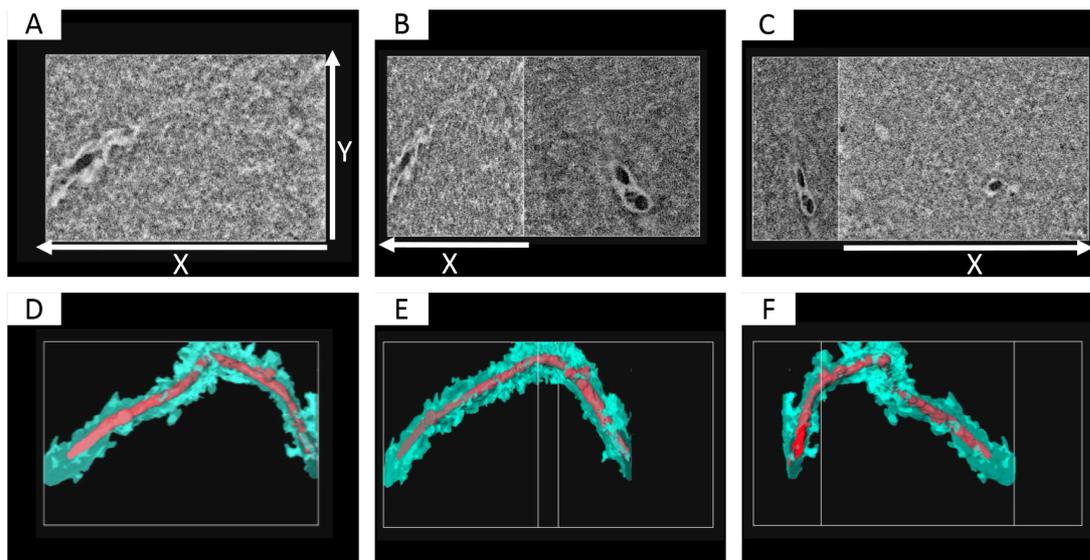


図 4 田畑 香織

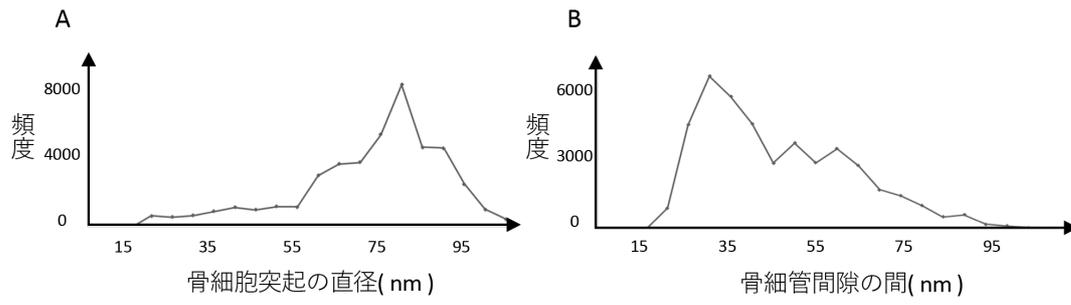


図5 田畑 香織