

変態期ヤツメウナギの頭部の位相イメージング Phase Imaging of the cranial region of the metamorphic lamprey

吉本賢一郎¹, 鈴木大地^{1,*}, 小薮大輔¹, 兵藤一行², 平野馨一², 米山明男³

¹ 筑波大学, 〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

² 九州シンクロトロン光研究センター, 〒841-0005 佐賀県鳥栖市弥生が丘 8-7

Ken-ichiro YOSHIMOTO^{1,*}, Daichi G. SUZUKI¹, Daisuke KOYABU¹, Kazuyuki HYODO², Keiichi HIRANO², Akio YONEYAMA³

¹ University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

² Photon Factory, Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization, Tsukuba 305-0801, Japan

³ SAGA Light Source, 8-7 Yayoigaoka, Tosu, Saga 841-0005, Japan

1 はじめに

近年、脊椎動物の初期進化に対する理解が急速に進みつつある。わたしたちヒトのような多くの脊椎動物が有している顎や手足のような重要形質は、脊椎動物の進化史の初期に獲得されたものである。その獲得の歴史については未解明な点が多かったが、保存状態の良い化石の産出や CT スキャンなどの先端技術の導入により、その過程が明らかにされつつある。

しかし、化石に残りにくい軟組織の進化は未解明な点が多い。顎や手足が進化した際には、骨格だけでなくそれを動かす筋や神経にも大規模な変化が起こったはずである。しかしそのプロセスを化石記録のみで見極めることは不可能である。

したがって、軟組織の進化を明らかにするうえで、祖先的な形質を多く残す現生脊椎動物の形態を研究することが不可欠となる。たとえば現生ハイギョの形態を、放射光を使った X 線 CT で分析し、その内部構造を詳細に明らかにすることで四肢の進化的起源に迫る研究が進められている[1]。

一方で脊椎動物の初期進化で獲得された、現生脊椎動物のほとんどが有している摂餌器官「顎」を構成する軟組織の進化研究はあまり進んでいない。軟組織も含めた顎の獲得過程を理解するには、顎獲得以前の祖先的な頭部特徴を保存している現生ヤツメウナギの軟組織形態の詳細な記載が必要である。しかし先行研究におけるヤツメウナギの形態に関する知見は全て肉眼解剖や組織切片のような古典的手法に基づく、二次元的なものにとどまっている[2]。顎に関わる筋、神経の進化のシナリオを詳細に記述するためには、ヤツメウナギの形態形成過程を、先端技術を駆使して三次元的に解析し、他の脊椎動物と比較することが不可欠である。

そこで我々はヤツメウナギ幼生に対し、先端技術を用いた形態解析を試みてきた。幼生の三次元的かつ精密な形態理解と、ヤツメウナギの形態形成分析の方法論の確立が主な目的である。我々は PF BL-14C でのシンクロトロン放射光位相コントラスト CT[3]の他に、ヨウ素ベースの造影剤を用いた diffusible iodine-based contrast-enhanced computed tomography (dice-CT) や、SPring-8 のシンクロトロン放射光 X 線 μ CT、ライトシート撮影といった手法で形態情報を取得し、解析を進めてきた。その結果、いくつかの問題がありつつも、位相コントラスト CT が精密な筋形態とその神経支配を同時に観察できる唯一の手法である可能性が示唆された。本レポートでは、大規模な形態変化が起こる変態期のヤツメウナギに対して本手法を適用した結果を報告する。

2 実験

富山県庄川水系の鴨川で採集した変態期ヤツメウナギ (*Lethenteron* sp. N、変態ステージ 5) を試料として用いた。試料は採集後に MS-222 での安楽殺ののち、4%パラホルムアルデヒドで 4 日間固定を行い、100%メタノール中で -20°C で保存した。

撮像の際には 1 日前に頭部領域のみを取り出し、蒸留水へ置換した。切り出した頭部は瞬間接着剤を用いてプラスチック製ステージに固定後、セル内に移動させ、そこに蒸留水を加えて設置を完了させた。その後、試料内に残された気泡の影響を軽減するために、セル内に対して脱気を行なった。脱気後、セル外から試料を固定した棒を回転させながら撮像を行い、三次元像を取得した。撮影条件は次の通りである。エネルギー: 17.8 keV, カメラ観察視野: 約 16 mm × 約 13 mm, 露光時間: 4 秒/像、投影数 500 枚 / 360°

また、撮影に用いた X 線カメラ (Andor Zyla) の仕様は次の通りである。方式: ファイバーカップリ

ング, 蛍光体: CsI, 画素数: 2560×2160, 画素サイズ: 6.5 ミクロン

位相の計測には位相シフタを用いた。(縞走査法) 撮像後、専用ソフトウェア(SAKAS, <https://github.com/SAGALS-IMG/SAKAS-DEF>)を用いてCT画像を再構成したのち、形態解析ツールAmira (2021.1, Thermo Fisher Scientific)を用いて外形、筋、末梢神経、脈管の三次元再構築を行なった

3 結果および考察

再構成したCT画像では、幼生での撮影結果と同様に、詳細な筋の走行と末梢神経、脈管を確認することができた。一方で幼生の形態解析の際にも問題とされた耳胞周辺領域での急激な密度変化とそれに伴う干渉縞の消失による画像クオリティの低下も確認された。

三次元再構築は現在進行中であるが、筋に関しては変態期でも幼生と同様に精密な形態分析が可能である。一方で、末梢神経に関しては三叉神経の第1枝、第2枝それぞれの一部を再構築することができたが、細部まで追いきることはできなかった。また現在のところ、変態期ヤツメウナギに関しては組織切片の作成と神経の免疫染色を実施しておらず、脈管との識別は幼生の形態解析結果からの類推によるものとなっている。今後、同ステージの個体の組織切片の作成を行い、それぞれの管状構造の正確な識別を進めていく予定である。

また変態期の撮像でも、耳胞周辺での放射光の散乱が問題となった。耳胞は他の軟骨とは異なり光の透過率が低いことが根本的な原因と考えられる。撮像前に試料に対して脱灰処理することで、耳胞領域を中心に全体的な撮像クオリティを向上させることが可能かもしれない。撮像時間の増加も次回の撮像の際に検討したい。なお三次元再構築とその形態解析は現在も進行中であるので、本レポートでの三次元再構築の結果の掲載は省略する。

4 まとめ

顎の進化的起源の解明に向け、幼生に引き続き変態期のヤツメウナギに対してもPFのBL-14Cにて位相コントラストCTを実施した。変態期においても幼生期の撮像の際に見られた利点と問題点を同様に確認できた。試料状態と撮像条件に変更を加えることでこれらの問題点を解消し、より精密な形態解析を行うことを目指し、研究を進めていく予定である。

参考文献

- [1] Hirasawa T. *et al.*, *Front. Ecol. Evol.* **9**:679633. (2021).
- [2] Mallatt J., *Zool J Linn Soc.* **117**, 329-404 (1995).
- [3] Yoneyama A. *et al.*, *Appl. Sci.* **13**(9), 5424 (2023).

成果

1. 吉本賢一郎, 仮屋山博文, 小薮大輔, 鈴木大地. dice-CTを用いた形態解析によるヤツメウナギ幼

生頭部筋形態の再考. Tokyo Vertebrate Morphology Meeting, 2023年7月15日.

2. 吉本賢一郎, 鈴木大地. 脊椎動物の起源と円口類の進化. 生物の科学 遺産 **78**(1) 21-31 2024年1月.
3. 吉本賢一郎, 仮屋山博文, 小薮大輔, 東山大毅, 鈴木大地. 先端CT技術を用いたヤツメウナギ幼生頭部筋形態の再考. 日本動物学会 第76回関東支部大会. 2024年3月16日.
4. Yoshimoto, K. Kariyayama, H. Tamura, M. Koyabu, D. Higashiyama, H. Nonaka, S. Suzuki, D. G. Three-dimensional morphology of the lamprey larva based on multiple visualization methods. 17th International Symposium on Early and Lower Vertebrates. June 18, 2024.

* suzuki.daichi_gp@u.tsukuba.ac.jp