

高密度分解能撮影によるヤツメウナギ幼生頭部形態の解析 Morphological analysis of the lamprey larval head based on high-density resolution phase imaging

吉本賢一郎¹, 鈴木大地^{1,*}, 小薮大輔^{1,2}, 兵藤一行³, 平野馨一³, 米山明男^{3,4}

¹筑波大学, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

²中山大学生態学院, 中国深圳市光明区公常路 66, 518000

³高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

⁴九州シンクロトロン光研究センター, 〒841-0050 佐賀県鳥栖市弥生が丘 8-7

Ken-ichiro YOSHIMOTO^{1,*}, Daichi G. SUZUKI^{1,*}, Daisuke KOYABU^{1,2}, Kazuyuki HYODO³,
Keiichi HIRANO³, Akio YONEYAMA^{3,4}

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

²School of Ecology, Sun Yat-sen University, 66 Gongchang Road, Guangming District, Shenzhen, 518000 China

³ Photon Factory, Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization, Tsukuba 305-0801, Japan

⁴SAGA Light Source, 8-7 Yayoigaoka, Tosu, Saga 841-0005, Japan

1 はじめに

脊椎動物は、最初期に分岐した祖先的な特徴を多く残す円口類と顎を有する顎口類とに二分される。円口類と顎口類は頭部形態が大きく異なるため、頭部構造の相同性を決定することは容易ではなく、それゆえに脊椎動物の頭部の初期進化には多くの謎が残されている。

脊椎動物頭部の重要な形態要素である筋の相同性を決定する際、神経支配はきわめて重要な指標となる。特に円口類の口部領域の筋を制御している三叉神経は、近年形態学的・分子生物学的解析によって、顎口類の三叉神経との相同関係の詳細な検討が進みつつある [1][2]。そのため円口類の頭部筋の三叉神経支配の詳細な解析は、円口類と顎口類の頭部構造の相同性を議論する基盤の構築につながることが期待される。

こうした目的のもとで、我々は PF BL-14C において円口類 ヤツメウナギの頭部形態の位相イメージングに取り組み、筋や脈管などの軟組織も含めた可視化に成功した。しかし密度分解能の限界や硬組織を持つ耳胞による放射光の散乱によって神経枝の可視化を細部まで行うことがこれまでできていなかった。

そこで今回我々は従来とは異なる撮像条件を設定し、密度分解能を引き上げた高密度分解能撮影と硬組織の除去を目的とした脱灰処理を併用し、ヤツメウナギの頭部形態のさらなる精密な形態解析を試みた。

2 実験

富山県庄川水系において採集したヤツメウナギ (*Lethenteron* sp. N) の大型幼生を位相イメージングの対象とした。採集した個体は MS-222 で安楽殺を行い、4 %PFA によって4日間固定後、100 %メタノール中で-20 °Cで保存した。

撮像の際には試料から頭部領域のみを切り出し、蒸留水への置換を行った。次に瞬間接着剤を用いてプラスチック製ステージに固定し、蒸留水の入ったセル内に設置した。試料に残存した気泡による放射光の散乱を軽減するために、セル内の試料に対して脱気処理を行った。その後、セル外から回転棒を用いて試料を回転させつつ、撮像を行い、三次元形態情報を取得した。撮像条件は次のとおりである。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：1000 枚/360°。

また撮影に用いた X 線カメラの仕様は次のとおりである。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。

得られた撮像データは専用ソフトウェア (SAKAS, <https://github.com/SAGALS-IMG/SAKAS-DEF>) を用いて CT 断面画像へと変換した。その後 CT 断面画像を形態解析ソフト Amira (2021. 1, Thermo Fisher Scientific) に読み込ませ、手動でセグメンテーションを実行し、頭部形態をコンピュータ上で三次元再構築した。CT 撮像のみでは脈管構造と神経枝構造の識別が困難であるため、抗アセチル化チューブリン抗体による免疫組織染色を行なった組織切片と

照合しながら管状構造のセグメンテーションを実行した。

また、耳胞の硬組織を減らし、画像クオリティの向上に寄与することが期待される脱灰処理の有効性を検証するために、未処理の状態での撮影が完了したサンプルに対し 5 %ギ酸を加え 1 晩室温にてインキュベートし、再度高密度分化能撮影を実施した。その後、脱灰処理を行った際の撮像データと未処理の撮像データを比較し、脱灰処理の有効性を評価した。

3 結果および考察

高密度分解能撮影による CT 断面画像を元にセグメンテーションを実行したところ、従来の位相イメージングよりも精密に頭部筋、神経枝、脈管を三次元再構築することに成功した。特に従来の位相 CT では識別が難しかった隣接した筋の境界部を、今回の CT 断面画像では明確に認識することができた。一方で神経枝の最末端部は空間分解能の問題により識別ができなくなり、それゆえに筋内部へ神経枝の入力の可視化には至っていない。

また脱灰処理したサンプルと未処理のサンプルのあいだで耳胞付近の CT 断面画像を比較したところ、脱灰処理をしたサンプルでは画像クオリティの低下が軽減されていることが確認された。一方で脱灰処理の影響で筋を中心に構造のわずかな溶解が見られ、構造の若干の歪みや組織間の密度コントラストの低下も同時に確認された。そのため、耳胞以外の領域での再構築のクオリティは脱灰処理をしない試料の方が高いという結果が得られた。また、耳胞の硬組織を完全に除去できているわけではないため、耳胞に直接付着する舌骨筋の再構築については脱灰処理をしてもノイズの影響を強く受け、高精度な再構築ができなかった。脱灰処理の時間等に改良を加えることで今後対処していく予定である。画像データは現在も解析が進行中であるため、本レポートでの掲載は省略する。

4 まとめ

初期脊椎動物のモデルとして知られるヤツメウナギの幼生の頭部構造をさらに詳細に分析するため、PF BL-14C において高密度分解能撮影を実施した。その結果、従来の位相イメージングでは解析が難しかった筋の境界部や細部の神経枝構造を可視化できた。今後はサンプルに対する脱灰処理などに改良を重ねることでさらなる撮影精度の向上を目指す予定である。

参考文献

- [1] Tamura, M *et al.*, *Zool. Lett.* **9**, 23 (2023).
- [2] Higashiyama & Kuratani.. *J. Morphol.* **275**, 17-38 (2014).

成果

1. 吉本賢一郎, 仮屋山博文, 田村元樹, 小薮大輔, 米山明男, 兵藤一行, 平野馨一, 野中茂紀, 東山大毅, 平沢達矢, 鈴木大地. Three-dimensional morphology of the lamprey larval head and its implications for early vertebrates oral evolution. 日本進化学会 第 26 回神奈川大会, 2024 年 8 月 21 日.
2. 吉本賢一郎, 仮屋山博文, 田村元樹, 小薮大輔, 米山明男, 兵藤一行, 平野馨一, 野中茂紀, 東山大毅, 平沢達矢, 鈴木大地. ヤツメウナギ幼生頭部筋の神経支配から捉え直す脊椎動物口器の相同性. Tokyo Vertebrate Morphology Meeting (TVMM), 2024 年 9 月 28 日.
3. 吉本賢一郎, 仮屋山博文, 田村元樹, 小薮大輔, 米山明男, 兵藤一行, 平野馨一, 野中茂紀, 東山大毅, 平沢達矢, 鈴木大地. ヤツメウナギ幼生頭部の精密形態解析から探る脊椎動物口器の初期進化. 日本古生物学会 2025 年年会, 2025 年 6 月 29 日.

* suzuki.daichi.gp@u.tsukuba.ac.jp