

ヤツメウナギ幼生の頭部の位相イメージング Phase Imaging of the cranial region of the larval lamprey

鈴木大地^{1*}, 吉本賢一郎¹, 小薮大輔¹, 米山明男²

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

Daichi G. SUZUKI^{1*}, Ken-ichiro YOSHIMOTO¹, Daisuke KOYABU¹, and Akio YONEYAMA²

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

²SAGA Light Source, 8-7 Yayoigaoka, Tosu, Saga 841-0005, Japan

1 はじめに

脊椎動物の頭部には、眼をはじめとする高度に発達した種々の感覚器官、摂餌器官である口器などの運動器官、そして両者を統合するインターフェイスである脳が集まる。そして脳と身体は、末梢神経によって接続されている。つまり脳と身体が機能的に協調するメカニズムを理解するためには、脳・身体・末梢神経の構造と機能のつながりを包括的に理解する必要がある。

我々はこれまで、脊椎動物の頭部・脳形態の多様化とその背景となる遺伝的基盤との結びつき＝身体オミクスの定量的・網羅的解析を目指して研究を進めてきた。その一環としてヨウ素溶液や燐タングステン酸溶液に浸漬し、 μ CTにて軟組織を撮像する手法(dice-CT)により、筋骨格系と脳の精密な三次元立体構築と定量解析を進めてきた。しかしこれらの手法では末梢神経を十分に可視化できないという課題があった。一方でPFのBL-14Cでは、位相コントラストCTによって生体組織の高精細な撮像が可能であることが報告されている[1]。

そこで我々は、BL-14Cでの位相コントラストCTを脊椎動物の頭部形態の解析に適用することを考え、まずヤツメウナギに注目した。

ヤツメウナギは脊椎動物の系統で最初期に分岐した円口類に属し、脊椎動物の祖先的な形質を多く保存していると考えられている。そのため脊椎動物の頭部形態の基本型を理解するうえで極めて重要なモデルとして研究されてきた[2]。またヤツメウナギは変態を通じて頭部の形態が著しく変化するが、その過程は詳細には明らかになっていない。その過程における筋骨格系・末梢神経系・脈管系の変化を包括的に明らかにすることは、脊椎動物の身体の起源を理解するうえで重要な知見をもたらすと期待される。

さらにBL-14Cでの位相コントラストCTは、放射光の透過率の低い硬組織には適さないが、ヤツメウナギは一生を通じて硬骨をもたないので、この点でも位相コントラストCTを最初に適用する動物として適している。

2 実験

試料として、富山県庄川水系の鴨川より採集されたスナヤツメ北方種(*Lethenteron* sp. N)を用いた。採集体はMS-222による安楽殺の後に4%パラホルムアルデヒドに4日間浸漬して固定し、100%メタノール中で -20°C で保存した。

撮像にあたっては、前日に頭部のみを切り出し、蒸留水へと置換した。試料をプラスチック製のステージに瞬間接着剤により固定し、蒸留水で満たされたセル内に設置した。脱気の後、標本を固定した棒をセル外からモータにより回転させ、三次元像を取得した。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 \times 約13 mm, 露光時間: 4秒/像、投影数 500枚/360 $^{\circ}$ 。

撮像データは、まず専用ソフトウェア(SAKAS, <https://github.com/SAGALS-IMG/SAKAS-DEF>)を用いてCT断面像を再構成した。次にCTデータをAmira (2021.1, Thermo Fisher Scientific)で読み込み、手動でセグメンテーションを行って外形・筋・末梢神経・脈管を三次元立体再構築した。三次元立体再構築にあたっては、別個体のパラフィン切片を作成し、抗アセチル化チューブリン抗体を用いた免疫染色によって神経軸索を可視化してCT像と比較することで、末梢神経と脈管を区別した。

3 結果および考察

BL-14Cでの位相コントラストCTの結果、ヤツメウナギ幼生の頭部領域において、従来の手法ではほとんど見えなかった末梢神経系および脈管系の少なくとも一部が識別できた。また筋については繊維の走行までも明瞭に確認された。しかし耳胞の存在する断面においては、平衡砂によって放射光が散乱し、著しいノイズが生じた。

三次元立体再構築の結果、末梢神経および脈管系の一部の再構築に成功した。しかし神経については、当初の想定より識別が難しく、神経束が細くなる末端部分まで追いきることはできなかった。撮像時間を十分にとり、より明瞭な像を得ることで、この問題を解決できる可能性がある。

筋の再構築については、放射光の吸収が少ない領域においては、ヨウ素を造影剤に用いた既存手法 (dice-CT) と同程度の再構築像が得られた。つまり繊維を走行レベルで可視化できても、再構築のクオリティ向上にはそれほど寄与しないように思われる。放射光が吸収される領域では、位相アンラップの問題によりクオリティが著しく下がった。放射光の散乱の問題についても、撮影条件の工夫によって軽減できる可能性はあるので、検討を重ねたい。なお画像データは現在も解析中であり、本レポートでの掲載は省略する。

4 まとめ

本研究では、脊椎動物の頭部を構成する諸構造とその構造のつながりの包括的理解を目指し、進化的に重要かつ撮像に適した特徴を有するヤツメウナギを用いて、PFのBL-14Cにて、位相コントラストCTを実施した。その結果、高い密度分解能でのCT像が得られた。いくつかの問題点は残るが、撮像条件の検討を重ねながら引き続き研究を進める予定である。

参考文献

- [1] Yoneyama A, Yamada S, Takeda T, *Nucl Instrum Methods Phys Res A* 523: 217-222 (2004).
- [2] Kuratani S, Kuraku S, Murakami Y. *Genesis* 34:175–183 (2002).

成果

1. 吉本賢一郎, 仮屋山博文, 小薮大輔, 鈴木大地. ヤツメウナギ幼生の頭部筋形態の再検討. 日本動物学会 第75回関東支部大会, 2023年3月18日.

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