

## 屈折コントラスト X 線マイクロCTによる脊椎動物初期胚の 脳における細胞核の観察

### Visualization of cell nuclei in zebrafish embryos by using refraction-enhanced X-ray micro-tomography

山本珠実<sup>a\*</sup>、モリー プリシラ カーン<sup>a\*</sup>、橋本琢人<sup>b</sup>、籠島靖<sup>b</sup>、上杉健太郎<sup>c</sup>、  
竹内晃久<sup>c</sup>、鈴木芳生<sup>c</sup>、藤田恭平<sup>a</sup>、原真弓<sup>a</sup>、中山創平<sup>a</sup>、伊藤真理子<sup>a</sup>、磯田恵里佳<sup>a</sup>、  
田島一剛<sup>a</sup>、松下淑恵<sup>a</sup>、八田公平<sup>a</sup>

Tamami Yamamoto<sup>a\*</sup>, Moly Pricila Khan<sup>a\*</sup>, Takuto Hashimoto<sup>b</sup>, Yasushi Kagoshima<sup>b</sup>,  
Kentaro Uesugi<sup>c</sup>, Akihisa Takeuchi<sup>c</sup>, Yoshio Suzuki<sup>c</sup>, Kyohei Fujita<sup>a</sup>, Mayumi Hara<sup>a</sup>,  
Sohei Nakayama<sup>a</sup>, Mariko Itoh<sup>a</sup>, Erika Isoda<sup>a</sup>, Kazutake Tashima<sup>a</sup>, Yoshie Matsushita<sup>a</sup>, Kohei Hatta<sup>a</sup>

<sup>a</sup>兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 生体情報学 I 分野,

<sup>b</sup>兵庫県立大学 大学院物質理学研究科 X線光学分野, <sup>c</sup>JASRI

\*equally contributed to this work

X線屈折コントラストマイクロCT法を用いて、ゼブラフィッシュとメダカ胚の観察をおこなった。4%PFAで固定した10日目胚と26時間胚をパラフィン包埋し、ガラスチューブやループに封入、これによりピクセルサイズ0.5~1 $\mu$ mの解像度による観察をおこなった。その結果、細胞核や脳における層構造や神経核が可視化され、組織切片を作成することなく、任意な方向の切片で観察できることが示された。また、金ラベルした抗体と金コロイドエンハンサーを用いて染色する事により特定の神経（マウスナー細胞）の3次元観察ができることが示唆された。

We tried to analyze three-dimensional structures of the brain in zebrafish and medaka by visualizing individual cell nuclei by using refraction-enhanced high-resolution X-ray micro-tomography at BL20XU in SPring8. Fixed larvae at 10 days or 26 hours after fertilization were inserted in a glass tube or loop. They were observed at the resolution of pixel size 0.5~1 $\mu$ m. It was possible to create virtual serial sections of any direction at high resolution to analyze layers and brain nuclei in the vertebrate nervous system. We also could use gold-labeled antibody and colloidal gold enhancer to visualize specific neurons, Mauthner cells, at 3 dimension.

背景と研究目的：

脊椎動物の頭部骨格系は、脳の原基の背側にある神経堤細胞が腹側に移動し、間充織となり、移動先の上皮組織との相互作用によって形成される。その一部である歯は、数・形状・位置が動物間でそれぞれ異なっている。この差異を生み出す分子・細胞レベルでの仕組みはまだ明らかにされていない。

そこで、前回のメディカルバイオ・トライアルユースにおいて、最も単純な脊椎動物の

実験モデルである、ゼブラフィッシュとメダカを用いて、X線屈折コントラストマイクロCT解析を行った。その結果、上記のゼブラフィッシュとメダカの初期発生における、歯の立体構造を明らかにすることができた（参考文献1）。

その際、頭部骨格系以外の部位（軟組織）においても細胞核が一つ一つ見え、例えば脳や、網膜の層構造も観察することが可能であることが初めて明らかになった。この方法を

確立し、さらに神経回路を可視化することを目的として、今回、さまざまな方法で固定されたサンプルを用いて CT 撮影を行い、実験条件の検討を行った。

実験方法：

兵庫県立大学・播磨科学公園都市キャンパスの生体材料センターで飼育しているゼブラフィッシュおよびメダカを掛け合わせて、卵を回収し、28.5 度で飼育した。受精後 26 時間の稚魚を用いて、金免疫染色法を施し、同定可能な神経細胞を標識したあと、さらに金コロイドによって増幅した。それらの処理したサンプルをパラフィン、あるいはワックス、OCT（凍結）で包埋し、厚み 0.01mm、外径 0.8mm のガラスチューブ、またはクライオループ内に保持した。受精後 10 日目のゼブラフィッシュとメダカ胚は 4%パラホルムアルデヒドで固定後そのままパラフィンに包埋した。それらを回転させながら、X 線屈折コントラストマイクロ CT 撮影を行った。

撮影条件：

エネルギー：8keV

解像度：0.5~1.0  $\mu$ m

撮影条件：0° から 180° を 0.2° ずつ 900 枚、あるいは 0.1° ずつ 1800 枚

結果、および考察：

受精後 10 日目のゼブラフィッシュとメダカの X 線屈折コントラストマイクロ CT 撮影の後、画像処理した横断面では、神経組織の組織内の細胞核をほぼ単細胞レベルで認識することができた (Fig1)。また、受精後 26 時間のゼブラフィッシュ胚の X 線屈折コントラ

ストマイクロ CT 撮影の後、画像処理をした横断面では、脳や網膜の組織内の細胞核をほぼ単細胞レベルで認識することができた。また、金粒子を免疫染色法によって、同定可能な神経細胞(マウスナー細胞)に付着させたサンプルでは、染色された神経細胞を観察することができた (Fig2)。一方、歯・耳石・脊索・鰓弓のような骨化が起こっている部分は立体構造を構築できることができた (Fig3、Fig4)。

今後の課題：

軟組織の屈折コントラスト法による観察は、ほぼ単細胞レベルでの観察が可能になってきた。次回は固定方法、撮影時のサンプルの保持方法について、より良い条件を検討することでより詳細な画像を得ることが可能であると思われる。また、金染色法によって特定の神経細胞を可視化することができた。しかし、神経回路を可視化した結果、サンプルはバックグラウンドを有していた。したがって次回は、染色方法のより良い条件を検討したい。

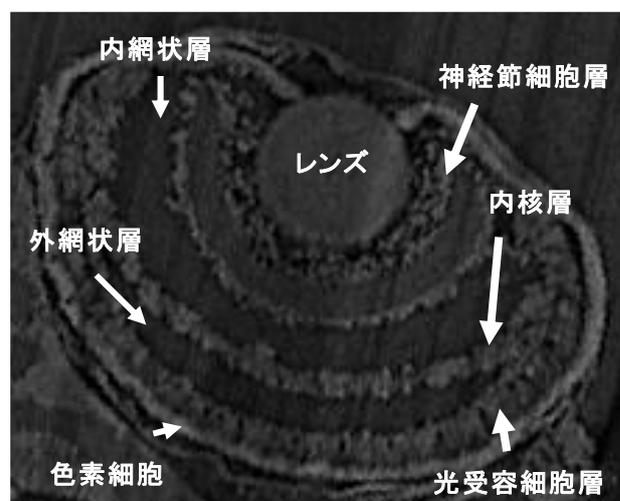


Fig1. ゼブラフィッシュ 10 日目胚の網膜

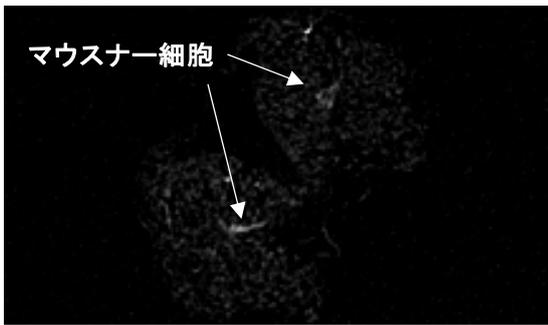


Fig2. ゼブラフィッシュ 26 時間目胚の脳



Fig3. ゼブラフィッシュ 10 日目胚

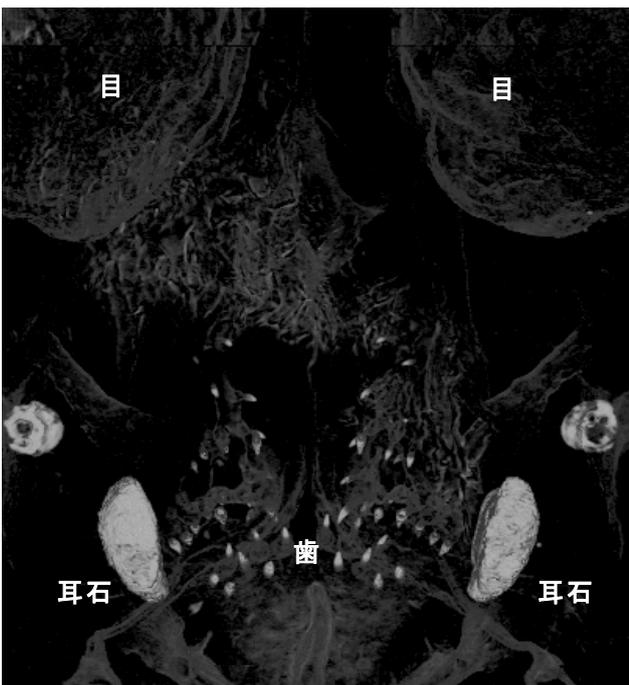


Fig4. メダカ 10 日目胚

参考文献：

- 1) 山本珠実・吉田圭佑・橋本琢人・籠島靖・上杉健太郎・竹内晃久・鈴木芳生・伊藤真理子・磯田恵里佳・八田公平：ゼブラフィッシュとメダカの摂食・呼吸に関わる頭部骨格の立体構造：歯の発生過程における X 線屈折コントラストマイクロ CT 解析。メディカルバイオ・トライアルユース課題実施報告書（2008）

論文発表状況・特許状況：

- 1) 山本珠実・吉田圭佑・橋本琢人・籠島靖・上杉健太郎・竹内晃久・鈴木芳生・伊藤真理子・磯田恵里佳・八田公平：Imaging by high resolution phase contrast X-ray computed micro-tomography reveals 3D structures of developing teeth and brain in zebrafish. and medaka. 第 41 回日本発生生物学会 徳島（2008）
- 2) Tamami Yamamoto, Keisuke Yoshida, Takuto Hashimoto, Hidetoshi Takano, Yasushi Kagoshima, Kentaro Uesugi, Akihisa Takeuchi, Yoshio Suzuki, Mariko Itoh, Erika Isoda, Sohei Nakayama, Moly Pricila Khan, Kohei Hatta : X-ray imaging by refraction-enhanced micro-tomography reveals developing teeth and brain of zebrafish and medaka in three dimension. 8th International Meeting on Zebrafish Development and Genetics, Wisconsin U.S.A. (2008)