

屈折コントラスト X線マイクロ CT 解析による
ゼブラフィッシュ脳の高解像度 3次元構造解析
– 新たな脊椎動物脳地図の作製法の確立

**Analysis of three-dimensional structures of the zebrafish brain with
refraction-enhanced X-ray micro-tomography**

永田絢香^{a*}、池永隆徳^{a*}、山本珠実^a、Moly Pricila Khan^a、上杉健太郎^b、竹内晃久^b、鈴木芳生^b、
中島洋平^a、勝本真平^a、中川将司^a、八田公平^a

Ayaka Nagata^{a*}, Takanori Ikenaga^{a*}, Tamami Yamamoto^a, Moly Pricila Khan^a, Kentaro Uesugi^b,
Akihisa Takeuchi^b, Yoshio Suzuki^b, Yohei Nakajima^a, Shinpei Katsumoto^a, Masashi Nakagawa^a, Kohei Hatta^a

^a兵庫県立大学 大学院生命科学研究科 生体情報学 I 分野,
^b高輝度光科学研究センター

^aGraduate school of Life Science, University of Hyogo

^bJapan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI)

*equally contributed to this work

アブストラクト

脊椎動物の三次元的な脳地図の作製を目標として、屈折コントラスト X線マイクロ CT 法を用いて 48 日齢のゼブラフィッシュの脳の観察を行った。固定した無染色の脳をガラスチューブ内にパラフィンを用いて包埋し、ビームライン BL20XU を用いて測定した。得られたデータは横断面の画像へと再構成し、さらに画像解析用ソフトウェアを用いてそれらの平面画像を三次元画像に再構築した。平面画像の観察において、単一細胞核が可視化でき、その結果として明瞭な層構造や神経核を確認することができた。さらに、画像解析ソフトウェアを利用して脳の縦断面、水平断面を同一のサンプルから容易に観察することができるようになった。

Abstract

To establish the novel methodology to make three-dimensional brain atlas of vertebrates, brains of 48 days old zebrafish were analyzed by refraction-enhanced high-resolution X-ray micro-tomography. Fixed and unstained brains were embedded in glass tubes with paraffin, and scanned with beamline BL20XU in SPring8. Collected data were re-constructed to images of two-dimensional coronal planes, and then these images were re-organized to three-dimensional images with image analyzing software. Distinct layer structures and brain nuclei were recognized in the coronal plane images, due to visualization of cell nucleus of individual neurons. Sagittal and horizontal planes could be observed easily from the same sample by operating with image analyzing software.

背景と研究目的：

脊椎動物の脳は機能的、および組織的に異なる構造によって構成されている。これらの構造の違いを記載したものに、脳地図というものがある。多くの脊椎動物の脳地図が、これまでは脳の連続切片を作製し、それを染色したものを利用して作製されてきた。しかしながら、実際

の中枢神経系は複雑な立体構造をしており、その理解のためには切片による二次元の情報のみでは不十分である。切片の写真を取り込み、画像解析ソフトウェアで処理することで、三次元立体構造を再構築することは可能であるが、非常に煩雑な手順を要する。

近年、PET や MRI といった方法を用いること

で、生体の三次元の情報を得ることが可能になっているが、解像度が低いため、詳細な脳地図の作製には不向きである。蛍光標識した標本を用いた共焦点顕微鏡観察も、Z 軸方向の解像度には限界がある。

我々は、前回のメディカルバイオ・トライアルルースにおいて、最も単純な脊椎動物の実験モデルとして近年確立された、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。その際、頭部骨格系以外の部位（軟組織）においても、細胞核一つ一つを確認することができ、例えば脳や、網膜の層構造を観察することができた¹⁾。従って、我々が開発した方法を応用することで、煩雑な染色を行うことなく、より解像度の高い立体三次元の脳地図を作製できると考えられる。今回のトライアルでは、以上のことを踏まえて、ゼブラフィッシュの高解像立体三次元脳地図を作製することを目的とした。

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生後 48 日目の野性型ゼブラフィッシュ (AB line) を麻酔した後、脳を摘出して 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した。アルコール、キシレンで脱水、透徹した後、サンプルを厚み 0.01mm、内径 0.5mm のガラスチューブ内にパラフィンを用いて包埋した。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。撮影条件はエネルギーが 8keV、解像度が 1.0 μ m で、0°から 180°を 0.2°ずつ 900 枚撮影した。得られたデータは再構成して平面の画像にした後、画像解析ソフトウェア (Avizo ver6, Maxnet)を用いて平面画像の調整、および三次元立体画像の

作成を行った。

結果、および考察：

X 線屈折コントラストマイクロ CT 撮影の後、再構成によって得られたゼブラフィッシュ脳の横断面のイメージを観察した結果、例えば中脳領域では、視蓋 (TeO)、縦走堤 (TL)、小脳弁外側葉 (VCl)、caudal zone of periventricular hypothalamus (Hc)、torus lateralis (TLa)、といった、代表的な脳の領域を、低倍率の視野において識別することが可能であった (Fig.1A)。また、視蓋中の顆粒細胞が密集する層構造も同定可能であった (Fig.1A, 矢印)。

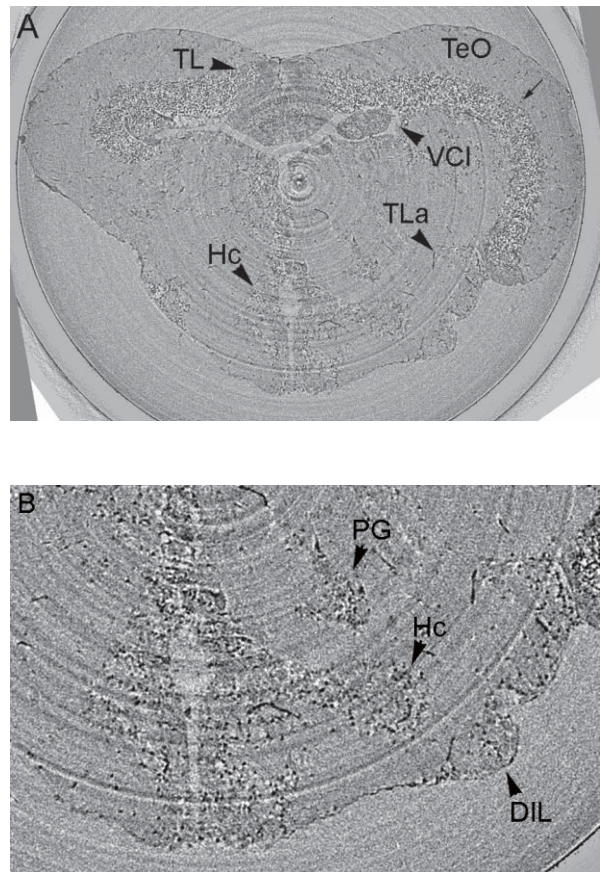


Fig.1 A. ゼブラフィッシュ中脳および、間脳領域の横断面画像。B. 腹側領域の拡大画像。

DIL : 下葉の diffuse nucleus、Hc : caudal zone of periventricular hypothalamus、PG : 糸球体前核、TeO : 視蓋、TL : 縦走堤、TLa : torus lateralis、VCl : 小脳弁外側葉

一部を拡大することによって細胞一つ一つが観察でき、その結果、糸球体前核 (PG) や下葉の diffuse nucleus (DIL) といった、より細かい領域の同定も可能であった。しかしながら、これらのイメージは撮影時の脳の傾きをそのまま反映するため、左右非対称な切片像しか観察でき

ない。このような問題点を克服し、連続した画像を同時に扱うために、Avizo による画像処理を行った。連続した画像を同時に処理するためには解像度を下げる必要があった。そのように画像処理を施した横断面のイメージにおいても、同様の脳領域の識別は低倍率の視野において引

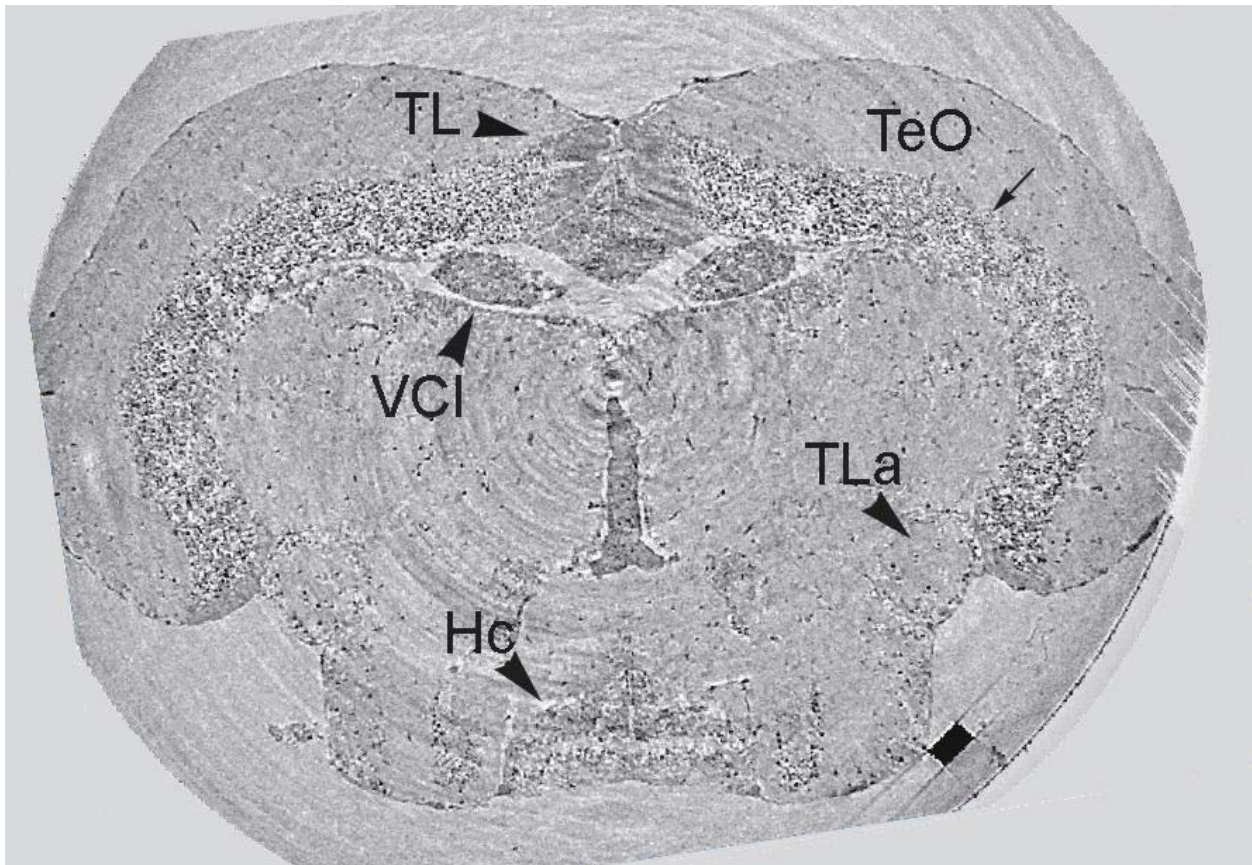


Fig.2 Avizo で画像処理を施したゼブラフィッシュ中脳の横断面画像。略号は Fig.1 を参照

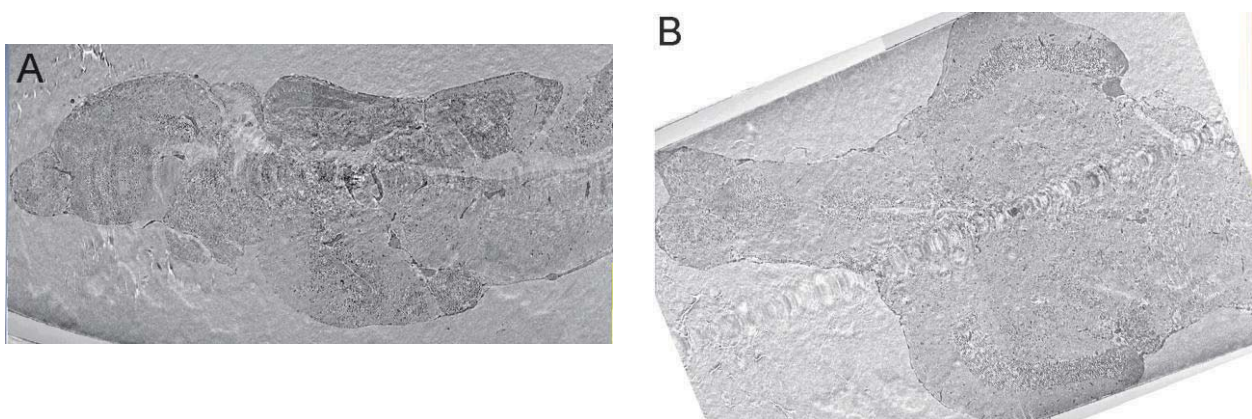


Fig.3 画像処理の結果得られた Fig.2 と同一サンプルの矢状断面 (A) および水平断面 (B) のイメージ。

き続き可能であった (Fig.2)。この際、背腹軸の傾きを Avizo 上で自由に変化させることができるので、同じような部位で異なった角度の切断面を容易に観察することができた。Avizo 上で横断面を作製したものと同一のサンプルを用いて、矢状断面や水平断面を作製することが可能

であった (Fig.3)。このような観察を行うためには、これまでの組織学においてはそれぞれの切片を作製する必要があったが、本研究の方法を用いることによりその行程を省略することができる。また、横断面と矢状断面を同時に一つのイメージの中に示すことも可能であった (Fig.4)。

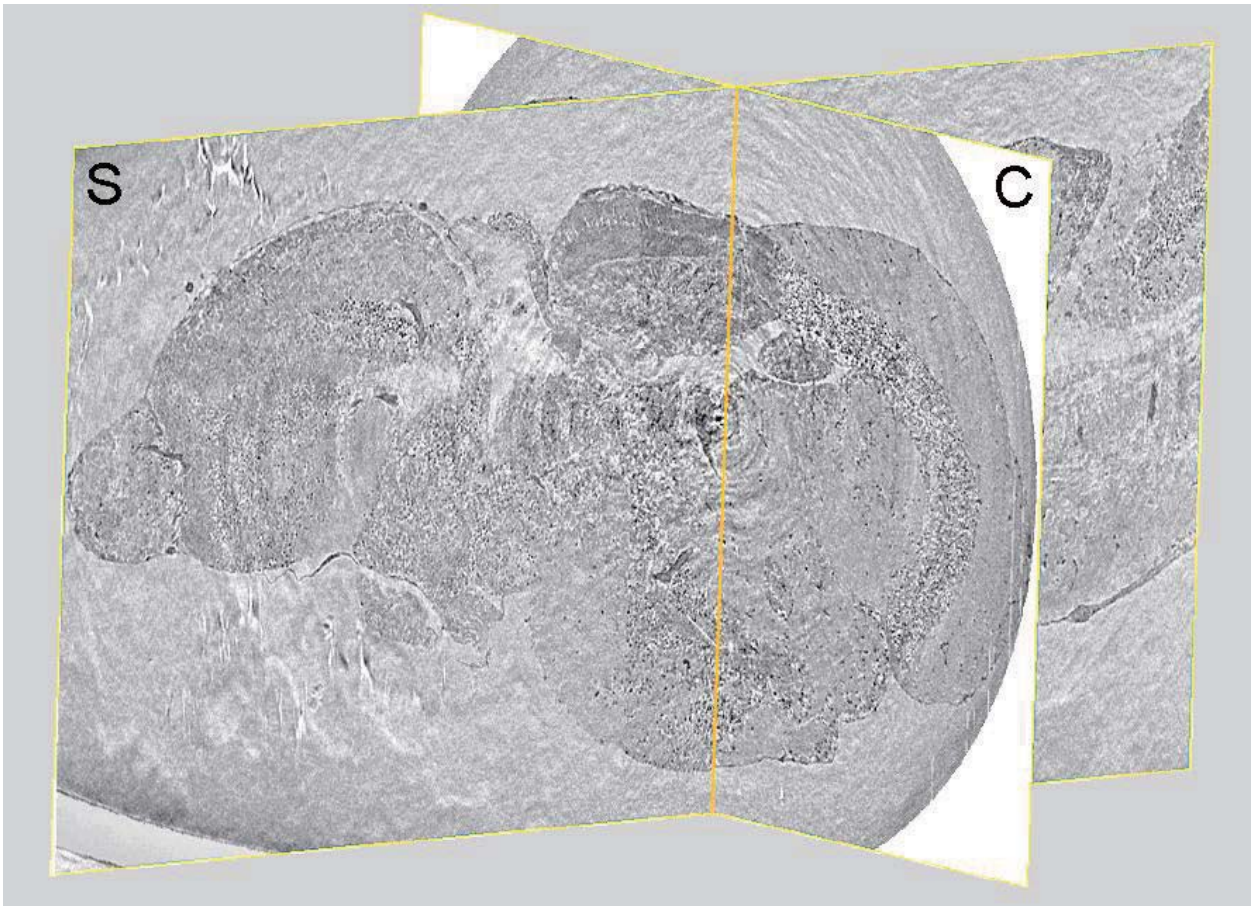


Fig4. 横断面 (C) と矢状断面 (S) を同時に表示したイメージ。



Fig5. 再構築した三次元立体画像。

これにより、矢状断面のイメージ中の興味深い部分の横断面のイメージを即座に観察することができ、このような機能は脳の構造の理解の助けとなる。最後に、Avizo を用いて、これまで扱ってきた平面画像を三次元立体画像へと変換した (Fig.5)。三次元立体画像において、視蓋、小脳といった領域での顆粒状の細胞の密集が表現されていた。

今後の課題：

従来、マイクロ CT を用いた神経細胞の観察のためには、金属染色をあらかじめ行う必要があった。しかしながら、本研究では SPring8 における X 線屈折コントラストマイクロ CT 撮影、および Avizo による画像処理により、無染色のゼブラフィッシュの脳における一つ一つの神経細胞を観察することができた。これを利用することで、これまでは組織切片を用いて二次元的に作製されていた脳地図を、それに極めて近い解像度で三次元的に作製する方法がほぼ確立された。今回は比較的小型のゼブラフィッシュを用いることで、脳全体のスキャンを行うことができた。より大型の哺乳類では全体のイメージングは難しいが、今回確立した技術を応用することで、細かい領域、例えば視床下部や松果体といった部位の詳細な立体構造を解析することが可能となる。また、染色することが問題となってしまうような貴重なサンプルの解析にも、今回の技術は有用である。さらに、無染色の技術は将来的には生体でのイメージングへと応用することが可能である。問題点としては、撮影時に生じた同心円状のアーチファクトが特にその中心部分において、画像の詳細な解析を困難にすることが挙げられる。従って、

より精密な立体脳地図の完成のためには、今回用いた技術と従来の金属染色とを組み合わせることも視野に入れる必要がある。

参考文献：

1) 山本珠実・モリープリシラカーン・橋本琢人・籠島靖・上杉健太郎・竹内晃久・鈴木芳生・藤田恭平・原真弓・中山創平・伊藤真理子・磯田恵里佳・田島一剛・松下淑恵・八田公平：屈折コントラスト X 線マイクロ CT 解析による脊椎動物初期胚の脳における細胞核の観察。メディカルバイオ・トライアルユース課題実施報告書 (2009)

論文発表状況・特許状況：

特になし

* 本研究は、ブレインサイエンス振興財団より研究助成をうけている。