

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14589

研究課題名(和文) 高精細X線CT装置を活用した生物多様性研究の高精度化

研究課題名(英文) Technical development for high-resolution morphological biodiversity analysis using X-ray CT system

研究代表者

佐々木 猛智 (Sasaki, Takenori)

東京大学・総合研究博物館・准教授

研究者番号：70313195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：X線マイクロCTを用いて、小型種、微小種の内部構造を高解像度で明らかにすることを目的に、様々な生物で撮影実験を行った。石灰化した生物の骨格は比較的容易にデータを取得できたが、軟体部、化石を撮影する際には工夫が必要である。特に微小標本を撮影する際には温度変化や僅かな振動が結果に影響する。通常のCT装置では撮影困難なサンプルのデータを取得するために、放射光X線CTを用いて撮影実験を行い、良好な結果を得た。

研究成果の概要(英文)：High resolution imaging experiments were conducted using X-ray microCT for various organisms to reveal the internal structure. The skeleton of calcified organisms was visualized relatively easily, but modified and improved methods were necessary for soft body parts and fossils. Especially, temperature change and slight vibration affect the scanning results in minute specimens. A synchrotron X-ray CT was useful for samples difficult to scan with a conventional laboratory-scale CT facilities.

研究分野：動物分類学

キーワード：マイクロCT 形態学 分類学 生物多様性

1. 研究開始当初の背景

本研究の前段階として、研究代表者の研究室は軟体動物の貝殻の微細構造の研究を行ってきた。高倍率の電子顕微鏡(SEM,TEM)で断面構造を撮影するとともに、鉱物学の研究者と連携してX線を用いた解析(結晶方位解析、アラゴナイトの双晶密度測定等)を行ってきた。その結果、貝殻の内部にミクロな新規形質を実際に見出し、分類学に応用することが可能になった。電子線・X線を用いた研究は形態学の精度を高める上で非常に重要であるが、上記の手法の問題点は標本を完全に破壊しなければならない点にある。そのため、稀少試料は研究に用いることができず、証拠標本も画像でしか残すことができない。しかし、もし非破壊でデータを取得する選択肢があれば研究の対象を広げることができる。その経験に基づき、非破壊形態観察技術の高精細化を目指したいと思ったことが本研究計画の出発点である。

本研究で取り組む課題のうち、特に重要な項目は、(1)高精細CT装置を用いた研究技術の精度の向上、(2)得られたデータを多数のユーザーが有効に活用できる枠組みの構築、(3)他分野への応用と貢献である。本研究では1mmに満たない生物まで対象とし、非破壊で内部構造を高解像度で研究することが目標である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高精細CT装置を用いた新しい生物多様性研究のモデルを構築することである。そのためになすべきことは、(1)これまでに実現可能であったものよりさらに高精細な表面形状・内部構造のデータの取得を目指す、(2)硬組織だけでなく軟組織も研究対象とし、あらゆる生物群に対応できる研究手法を確立する、(3)多種多様なサンプルを撮影し、比較形態学的研究を行い、新規のミクロな形態形質を発見する、の3点である。(1)の研究対象のサイズと解像度は、生物多様性研究の質を高める上で最も重要であり、国際的なレベルでの最高精度を目指す。精度を向上させることができれば、(2)(3)の過程において新しい形態形質を発見できる可能性が高まる。CT撮影は特にタイプ標本や稀少種の標本のように破壊が許されないサンプルの研究に威力を発揮すると考えられるため、博物館における有効な活用法を検討する。

3. 研究の方法

(1)使用機器:CT装置は、東京大学総合研究博物館、東北大学学術総合博物館にある現有設備を用いて行った。それぞれ細部の仕様は異なるが、同じメーカー(コムスキャンテ

クノ社)の機器であり、基本設計は同一である。

(2)CT撮影:CT装置による撮影ではX線の透過に関係するパラメータが結果に影響する。具体的には、管電圧(kV)、管電流(A)、管電力(W)、ターゲット電流、焦点径、検出器ビニングモード、試料ステージ位置設定、明暗校正、積算レート(撮影速度)、プロジェクション数(撮影枚数)等の設定が結果に影響する。異なる設定の組み合わせを様々なサンプルに対してテストした。

(3)立体構築:上記で得られた2Dの断面画像から3D画像を作成する。立体構築ソフトウェアはMolcerPlus, AmiraおよびOsirixを用いた。

(4)撮影結果の評価:CT撮影では撮影試料の材質や形状によって種々のアーティファクトが生じることが知られている。撮影結果が適正であるか、表面形状は走査型電子顕微鏡、内部構造は切片による画像と比較し確認した。

(5)造影剤:硬組織の乾燥標本を撮影する場合は特別な前処理は不要であるが、軟体動物の液浸標本の内部を撮影する場合には造影剤が必要である。複数の造影剤を用いて、試験撮影を行った。

(6)ノイズ軽減:微小サンプルを撮影する場合の問題はノイズである。CT撮影中はX線の照射に伴い熱が発生するが、その熱によって試料ステージが数 μm 伸張するだけで画像のずれが発生する。さらに試料の回転に伴う振動に起因するノイズも発生する。ハード、ソフトの両面からノイズをさらに軽減する仕組みを検討した。

4. 研究成果

本研究はCT撮影の基礎的な技術の確立を主目的として、撮影実験から開始した。本研究の第一段階では、撮影の容易な乾燥標本を中心にテストを行い、次に液浸標本のテストを追加した。

(1)撮影の速度等の値を設定する過程で機器の特性に合わせた調整が重要であり、初めて撮影する分類群では試験撮影が必要である。X線の吸収の程度を考慮に入れつつ、CT装置の電流、電圧、撮影速度、撮影枚数等のパラメータを変えながら、撮影を行い結果を比較した方がよい。

(2)撮影中に振動が生じないように工夫が必要である。X線を十分に透過しつつ、変形しない部材を用いてサンプルを固定する必要がある。

(3)温度変化を極力抑えるように工夫した方がよい。特に、長時間撮影した場合は熱の発生により高温になり、様々な問題を引き起こす。

(4)液浸標本の場合は、液体部分の対流や蒸発による移動が生じないように追加の対策

が必要である。通常は、X線透過フィルムで包み発泡スチロール中で撮影したが、サンプルが動きやすい場合はアガロースで固定し撮影した。

(5) 軟体部は低電圧で長時間の撮影が必要で、ノイズを生じやすい。画質を向上させるためには、金属球を用いた位置補正と多数回撮影による平均化処理が有効であった。データを重ね合わせてノイズを除去する平均化処理は撮影回数が少ない場合は効果が乏しいため、長時間を要する。従って、データの質と作業時間とのトレードオフを考慮に入れた選択になる。

(6) 軟体動物の貝殻等、石灰化した部分は、比較的容易に可視化された。ただし、厚さに極端な差がある部分は撮影が難しい。

(7) 微細構造レベルの撮影をテストしたが、結晶の3D画像を得ることは困難である。現状ではX線CTは生体鉱物の微細構造の研究に適していない。

(8) 軟組織の視覚化は、画像のコントラストを高めるために染色が必要である。ヨウ素による染色が最も簡易な染色法である。オスミウム染色は微小標本には有効であるが、大型標本では浸透が悪い。

(9) 通常型のCTでは、小型標本は撮影に時間がかかるため作業効率が悪い上に、発熱によるノイズが生じやすい。そこで、放射光X線CT装置による撮影実験を試みて比較したところ、短時間で鮮明な像が得られることが確認された。シンクロトロンX線マイクロトモグラフィーは、明確な3D画像を達成するための最も進んだ方法であり、特に軟組織の撮影に有効である。また、化石標本の研究にも有効であることが確かめられた(論文9)。

(10) 3Dデータの作成により、形態学的定量化を容易に行うことが可能になる。例えば、CTデータから貝殻の形態を比較することができる(論文10)。さらに、複雑な形状の内部器官など、通常では計測困難な形質の定量化を行うことができる(論文1)。ただし、セグメンテーションの作業は現時点では自動化できていないため、全て手作業で領域指定をしなければならないため、時間と労力を要する。

結論として、X線マイクロCTは形態学的に鉱化および軟組織の研究に非常に有用である。ただし、微細構造および組織学的詳細については万能ではなく、他の顕微鏡技術によって補完されるべきである。

本研究の研究材料は、軟体動物を中心とし、さらに棘皮動物、節足動物、脊椎動物、植物等多様な材料を用いた。撮影結果には分類群による違いがあり、サイズが大きいかかわらず十分な像が得られなかったサンプルもある。特に微小なサンプルや液浸標本は条件設定のための撮影を繰り返す必要が生じることが多かった。軟体動物以外の分類群では、カンブリア紀の化石(論

文4, 5, 7, 8)、アリ(論文6)、クモヒトデ類の内部骨格(論文3)、コウモリ類の蝸牛(論文2)の研究にマイクロCTの技術を適用した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件) 全て査読有

- (1) Sasaki, T., Maekawa, Y., Takeda, Y., Atsushiba, M., Chen, C., Noshita, K., Uesugi, K. and Hoshino, M. in press. 3D visualization of calcified and non-calcified molluscan tissues using computed tomography. In: Endo, K., Kogure, T. and Nagasawa, H. (eds.) *Biom mineralization - From Molecular and Nano-structural Analyses to Environmental Science*. Springer.
- (2) Nojiri Taro, Werneburg Ingmar, Son Nguyen Truong, Tu Vuong Tan, Sasaki Takenori, Maekawa Yu, Koyabu Daisuke. 2018. Prenatal cranial bone development of Thomas's horseshoe bat (*Rhinolophus thomasi*): with special reference to petrosal morphology. *Journal of Morphology*. in press.
- (3) Masanori Okanishi, Toshihiko Fujita, Yu Maekawa and Takenori Sasaki. 2017. Non-destructive morphological observations of the fleshy brittle star, *Asteronyx loveni* using micro-computed tomography (Echinodermata, Ophiuroidea, Euryalida). *ZooKeys* 663: 1-19.
- (4) Han, J., Li, G., Wang, X., Yang, X., Guo, J., Sasaki, O., Komiya, T., 2017. Olivoides-like tube aperture in early Cambrian carinacitids (Medusozoa, Cnidaria). *J. Paleontology*. 10.1017/jpa.2017.10.
- (5) Wang, X., J. Han, J. Vannier, Q. Ou, X. Yang, K. Uesugi, O. Sasaki and T. Komiya, 2017 Anatomy and affinities of a new 535-million-year-old medusozoan from the Kuanchuanpu Formation, South China. *Palaeontology*. doi:10.1111/pala.12320
- (6) R. Satria, O. Sasaki, B. T. Viet, E. Oguri, K. Syoji, B. L. Fisher, SK. Yamane and K. Eguchi, 2016. Description of the first Oriental species of the ant genus *Xymmer* (hymenoptera: Formicidae: Amblyoponinae). *Zootaxa* 4168(1): 141-150.
- (7) J. Han, G. Li, S. Kubota, Q. Ou, S. Toshihiko, X. Wang, X. Yang, K. Uesugi, M. Hoshino, O. Sasaki, H. Kano, T. Sato and T. Komiya, 2016. Internal Microanatomy and Zoological Affinity of the Early

Cambrian Olivoides. Acta Geologica Sinica 90(1): 38-65.

- (8) J. Han, S. Kubota, G. Li, Q. Ou, X. Wang, X. Yao, D. Shu, Y. Li, K. Uesugi, M. Hoshino, Q. Sasaki, H. Kano, T. Sato, T. Komiya, 2016. Divergent evolution of medusozoan symmetric patterns: Evidence from the microanatomy of Cambrian tetramerous cubozoans from South China. Gondwana Research, doi:10.1016/j.gr.2015.01.003
- (9) Takeda, Y., Tanabe, K., Sasaki, T., Uesugi, K. and Hoshino, M. 2016. Non-destructive analysis of in situ ammonoid jaws by synchrotron radiation X-ray micro-computed tomography. Palaeontologia Electronica. 19.3.46A: 1-13.
- (10) Noshita K., Shimizu, K. and Sasaki, T. 2016. Geometric analysis and estimation of the growth rate gradient on gastropod shells. Journal of Theoretical Biology 389: 11-19.

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) Takenori Sasaki, Yu Maekawa, Yusuke Takeda, Maki Atsushiba, Chong Chen, Koji Noshita, Kentaro Uesugi and Masato Hoshino. 2017. 3D visualization of calcified and non-calcified molluscan tissues. Biomin XIV 14th International Symposium on biomineralization.
- (2) 佐々木猛智・前川 優・竹田裕介・厚芝真希・Chong Chen・野下浩司・上杉健太郎・星野真人. 2017. 形態データの 3D 化と軟体動物学への応用. 日本貝類学会平成 29 年度大会.
- (3) 佐々木猛智・前川 優・竹田裕介・厚芝真希・Chong Chen・野下浩司・上杉健太郎・星野真人. 2017. 動物標本の 3D 化と 3D データの活用法の検討. 日本動物分類学会第 53 回大会.
- (4) 佐々木猛智・竹田裕介・棚部一成・上杉健太郎・星野真人. 2016 年 06 月 25 日. 軟体動物頭足類の摂餌器官の機能形態. 日本古生物学会 2016 年年会. 福井県立大学, 福井県吉田郡永平寺町.
- (5) 佐々木猛智・前川 優・前野哲輝・幸塚久典・近藤真理子. 2016 年 06 月 11 日. X 線 CT を用いた生物の内部構造の撮影法の検討. 日本動物分類学会第 52 回大会. 北海道大学理学部, 北海道札幌市.
- (6) 佐々木猛智・前川 優・佐々木理・前野哲輝・幸塚久典・近藤真理子. 2015 年 06 月 27 日. 高精細 X 線 CT 装置を用いた生物多様性研究の効率化. 日本動物分類学会. 広島大学(広島県東広島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 猛智 (SASAKI TAKENORI)
東京大学・総合研究博物館・准教授
研究者番号: 70313195

(2) 研究分担者

佐々木 理 (SASAKI OSAMU)
東北大学・学術資源研究公開センター・准教授
研究者番号: 60222006
近藤 真理子 (KONDO MARIKO)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号: 70372414

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()