

す。



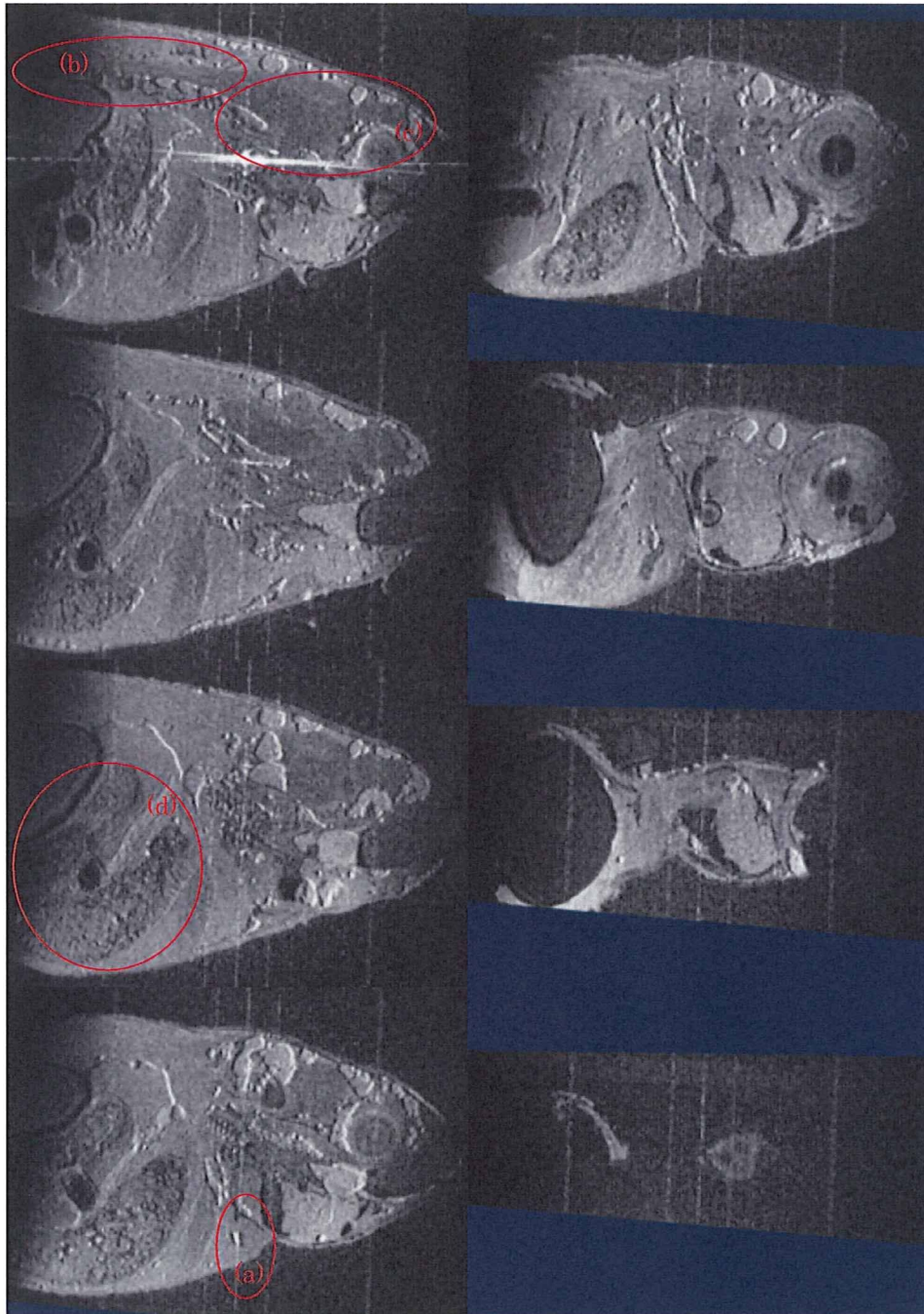
上図の赤線 3 本で囲まれた領域が、FOV の大きさに相当する。

撮像条件としては、TR=1.2sec、TE=1msec のスピンエコー法を用いた。画像サイズは 4096×256×256 で、1voxel=20μm×20μm×20μm である。Y をリード方向として、X、Z 方向を Phase 方向として、3 次元撮像を行なった。撮像時間は 22 時間であった。

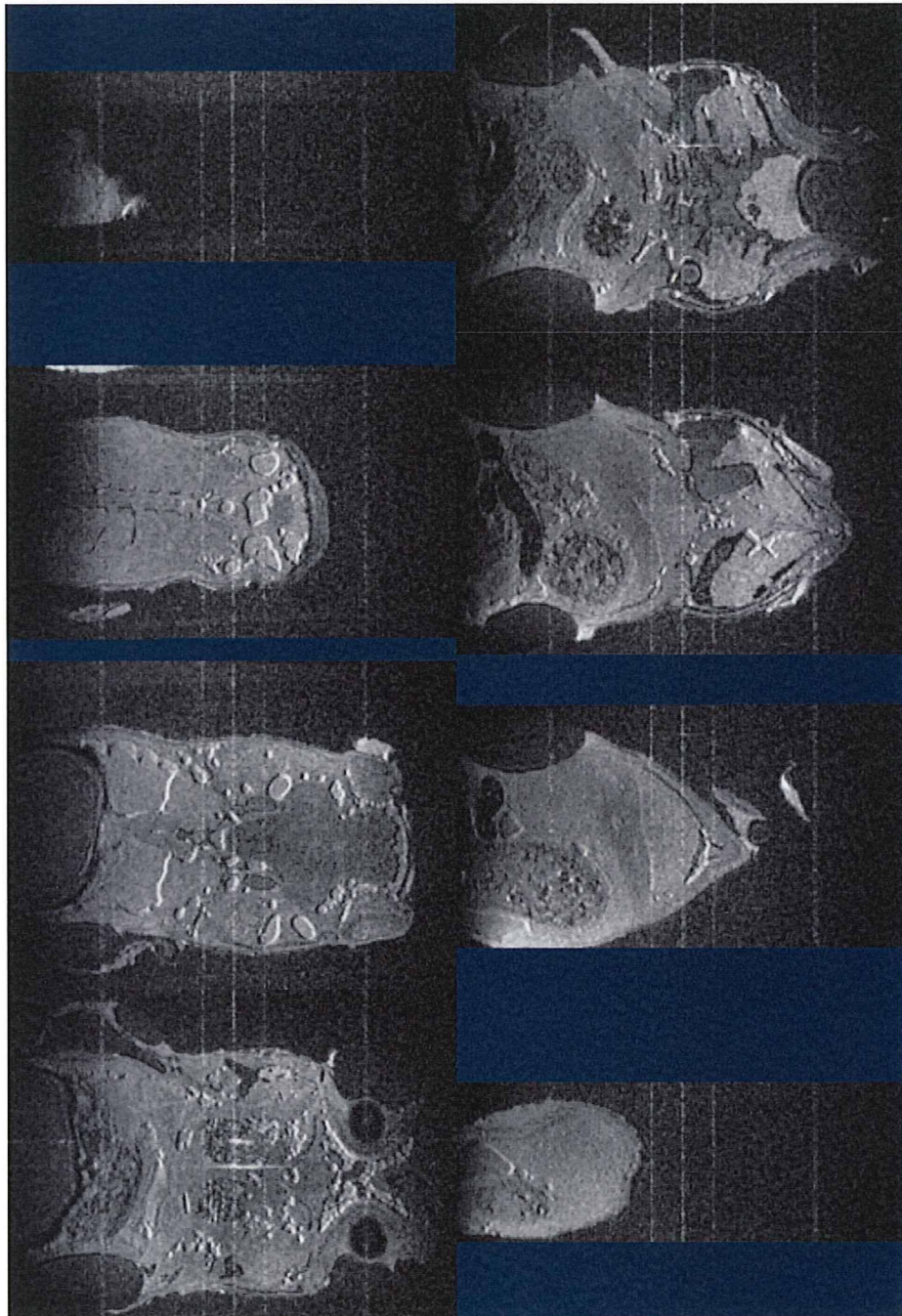
以下に、生後約 4 カ月の野生型のメダカの写真を示す。これは、エタノールでの安楽死後直後のメダカを撮影したものである。



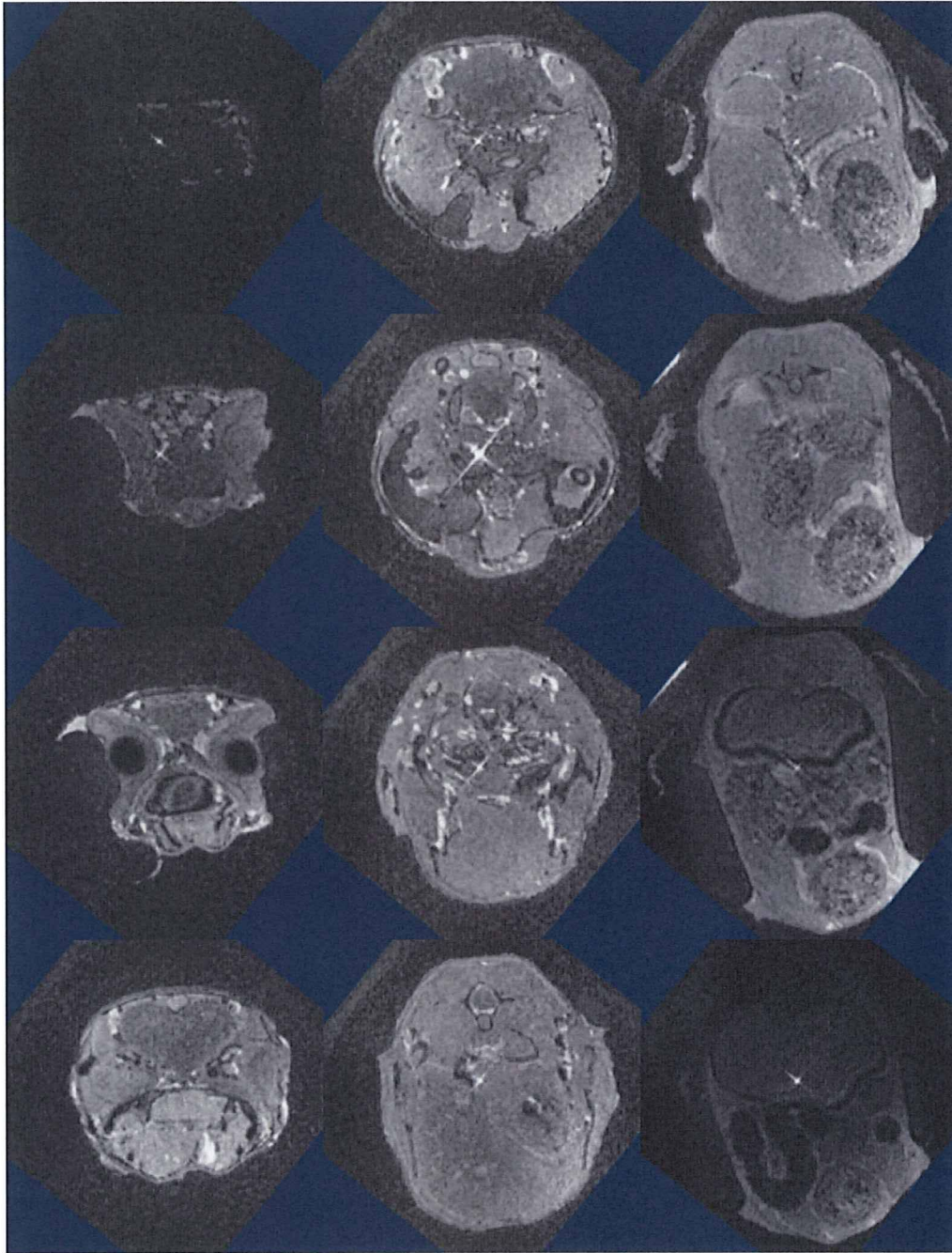
次頁から 3 頁に渡って得られた頭部の MRI 画像を示す。画像の軸合わせや 2D 画像の切り出しは ImageJ の VolumeViewer を用いて行なった。VolumeViewer において、メダカの解剖学的特徴を用いて 3 次元画像を回転させ、目で身体の軸と画像の軸を合わせた。画像の軸合わせを行なった後、sagittal section、coronal section、axial section の 3 つの 2 次元画像に切り出して示したのが、次頁以降の画像である。頁順に sagittal section、coronal section、axial section と並んでいる。次頁の sagittal section の画像上で心臓(a)や脊髄(b)、脳(c)、腸管(d)といった臓器が見てとれた。また、脂肪と思われる部位が浮き出たような形で見られた。また、腹部の画像を、頭部の画像の後に、頭部と同様に sagittal section、coronal section、axial section の順で示す。画像の切り出しは頭部と同様である。以上からも分かるように、FOV の大きさの制限から、腹部と頭部を別々に撮像している。次頁以降の頭部と腹部は別々の個体を用いて撮像されたものである。



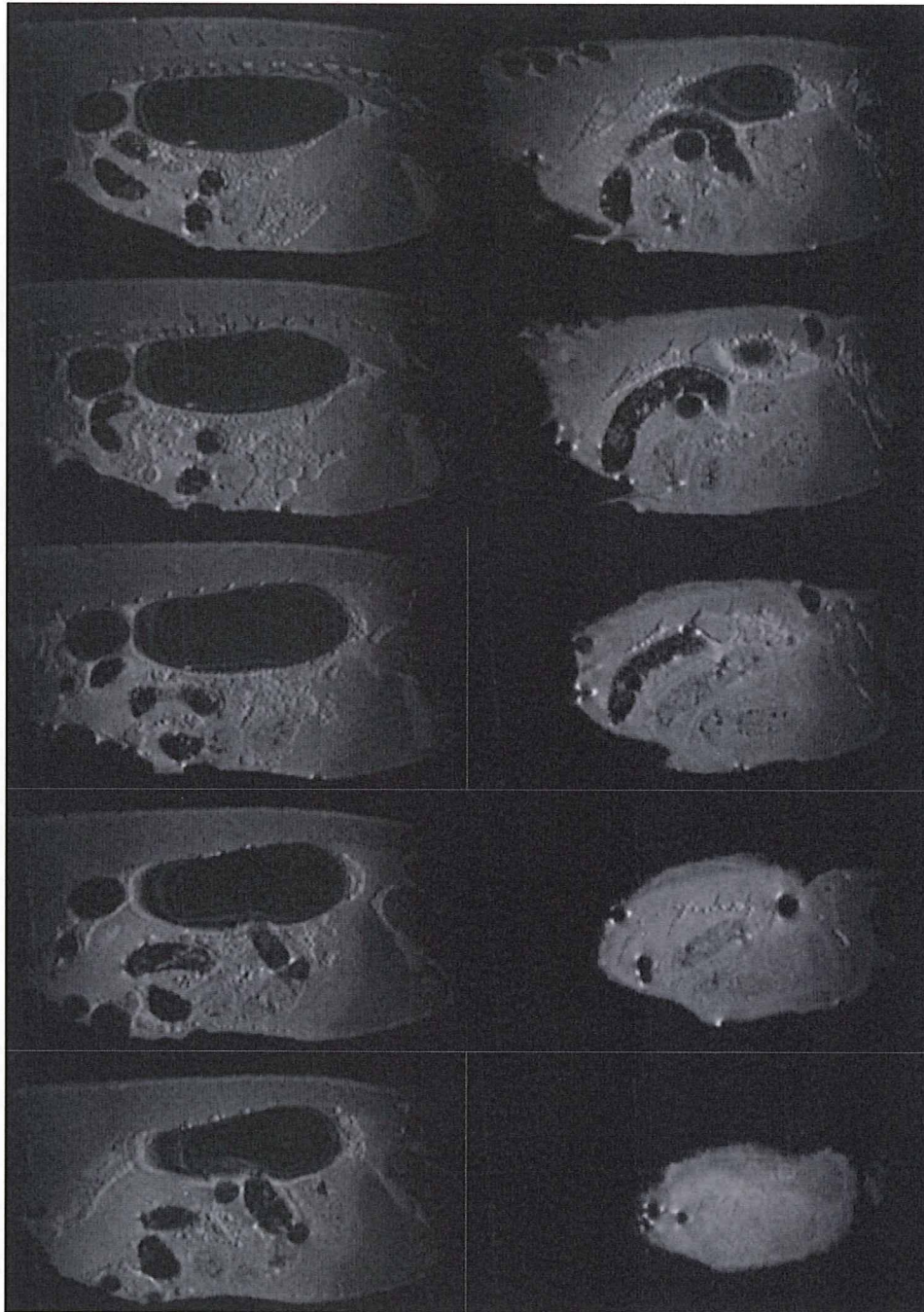
上図が、野生型メダカの頭部の sagittal section の画像となる。(a) 心臓、(b) 脊髄、(c) 脳や(d) 腸管が見て取れる。約 20 スライスごとに表示している。



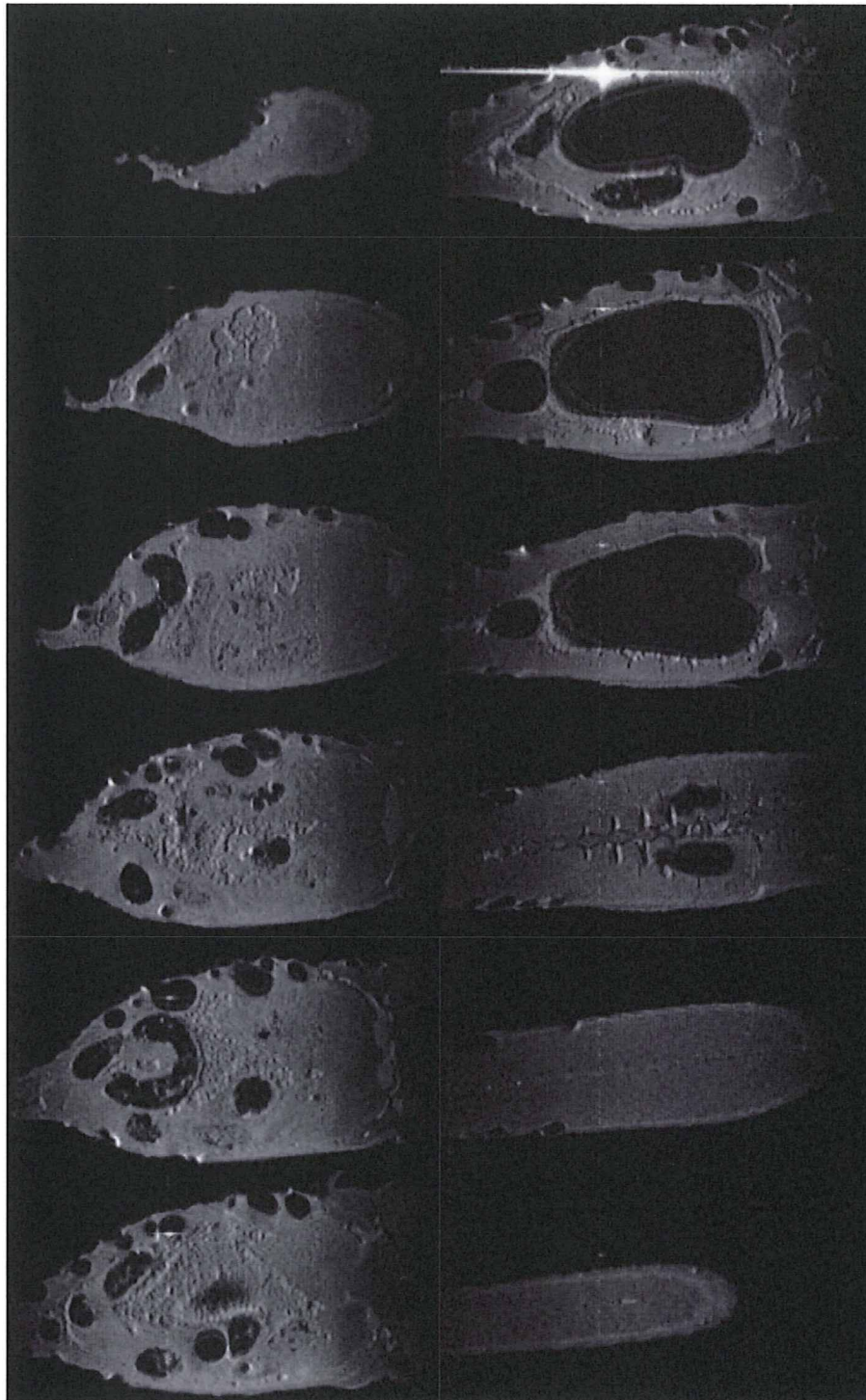
上図は野生型メダカの頭部の coronal section である。約 30 スライスごとに表示している。



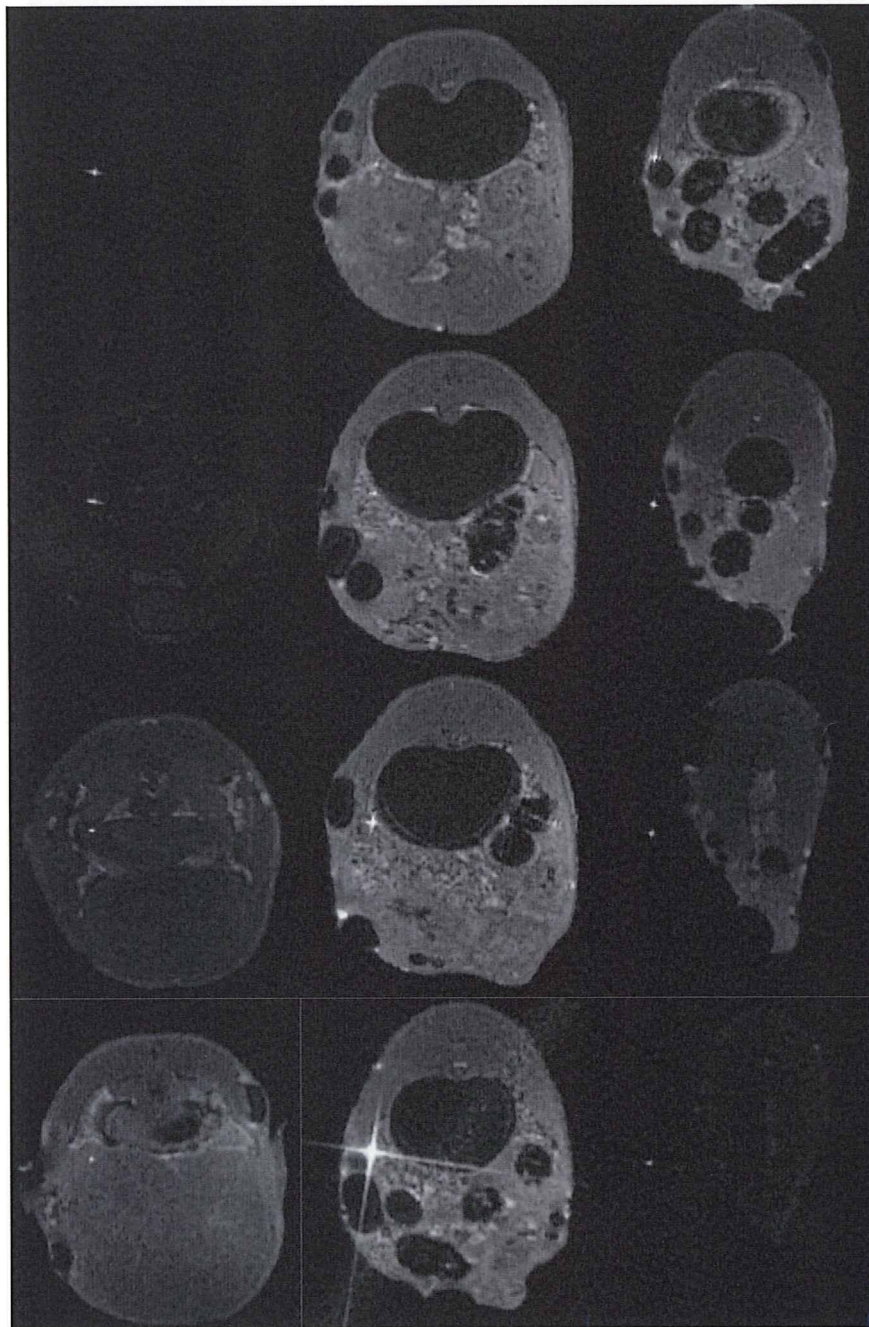
上図は野生型メダカの頭部の axial section を示している。約 35 スライスごとに表示している。



上図は野生型メダカの腹部の sagittal section を示している。約 20 スライスごとに表示している。



上図は野生型メダカの腹部の coronal section を示している。約 30 スライスごとに表示している。




上図は野生型メダカの腹部の axial section を示している。約 35 スライス後に表示している。


野生型メダカにおいて、空間解像度 20 ミクロンによる 3 次元画像の撮像に成功した後、p53 変異型のメダカの撮像を行ない、その画像の比較によって、ガンの発生／転移メカニズムの解析に取り組んだ。京都大学大学院医学研究科放射線遺伝学教室において作成された p53 変異型メダカには変異の入り方から 2 種類存在し、Y186X と E241X と呼んでいる。今回用いたものは、ホモ型の Y186X と E241X のメダカである。以下にその特徴を示す。

「P53遺伝子knockoutメダカ」

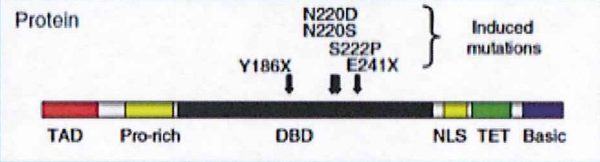
- ・京都大学放射線遺伝学教室で作成
- ・WT: 寿命3~5年 / p53_KO: 寿命1年以下
(痩せて白くなって死ぬ)
- ・Y186X変異型とE241X変異型の存在



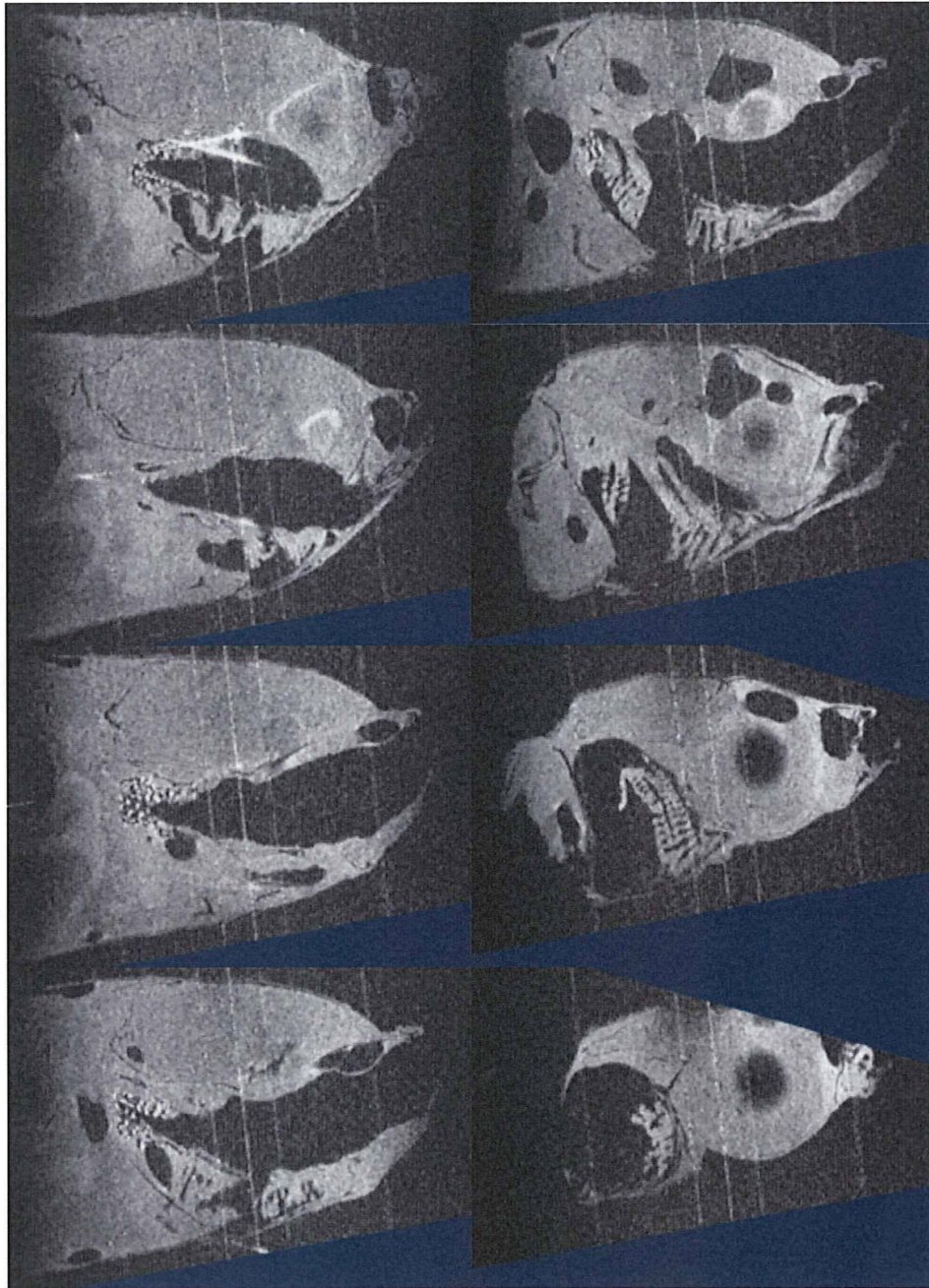
Y186X



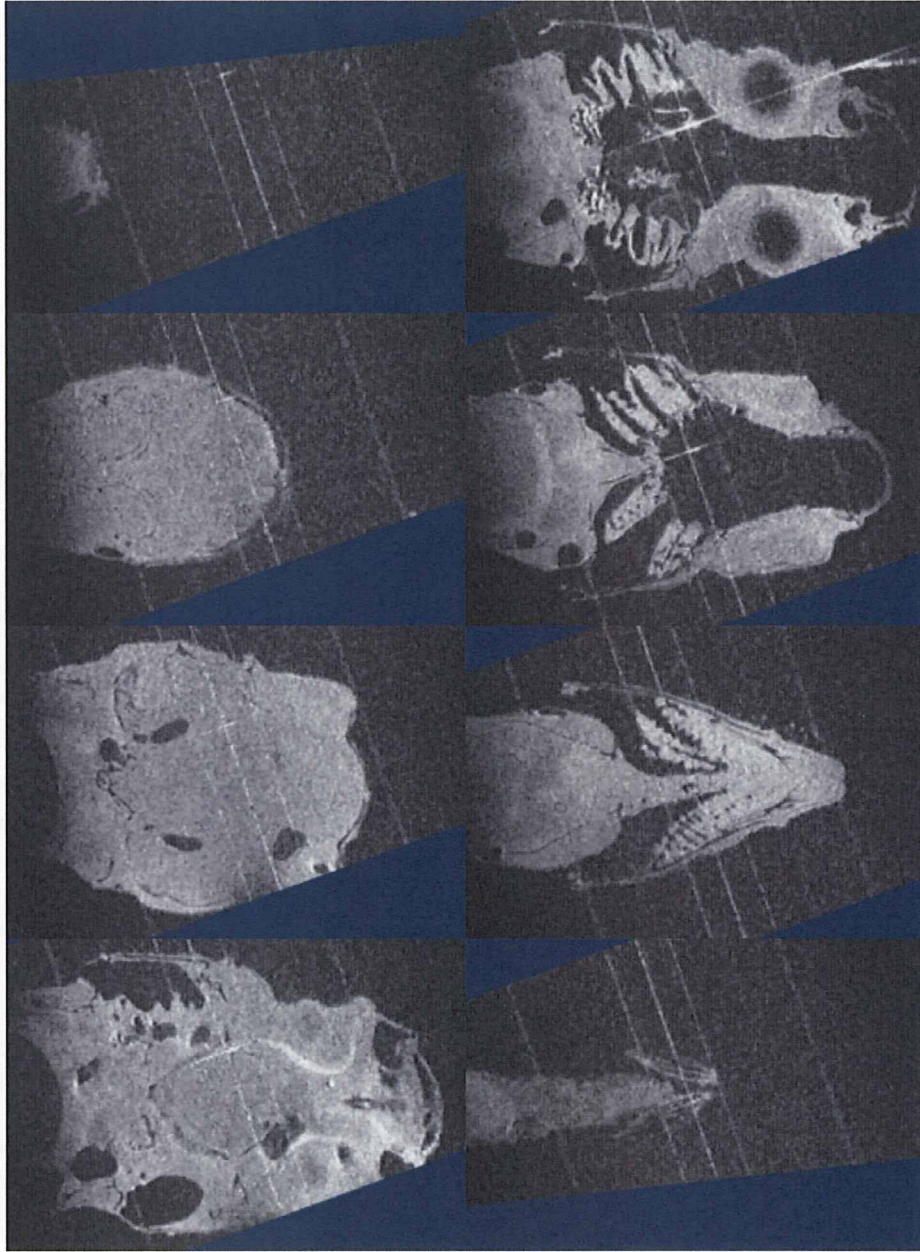
E241X



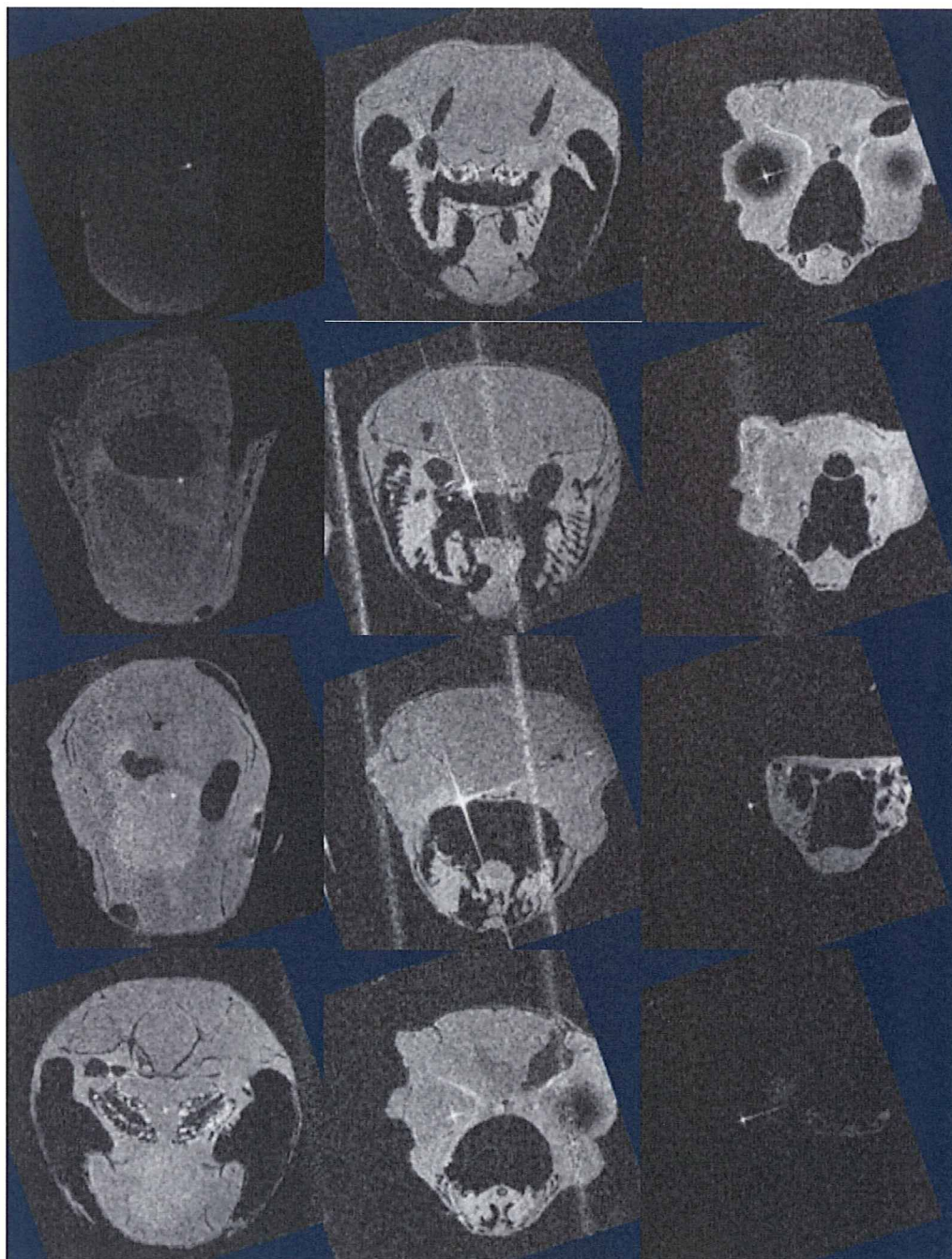
今回は野生型メダカと比較し、動きが鈍くなっており、腹部がやせ細り、体全体が白くなっていた p53 変異型メダカを用いた。急激に動きがおかしくなっていた個体を選んで、MRI 顕微鏡による撮像を行った。Y186X ホモ型 p53 変異型メダカ（生後約 10 ヶ月）の詳しい MRI 顕微鏡画像を次頁以降に頭部の sagittal section、coronal section、axial section、腹部の sagittal section、coronal section、axial section と示す。画像の軸合わせや 2D 画像の切り出しは野生型メダカで説明したものと同様である。



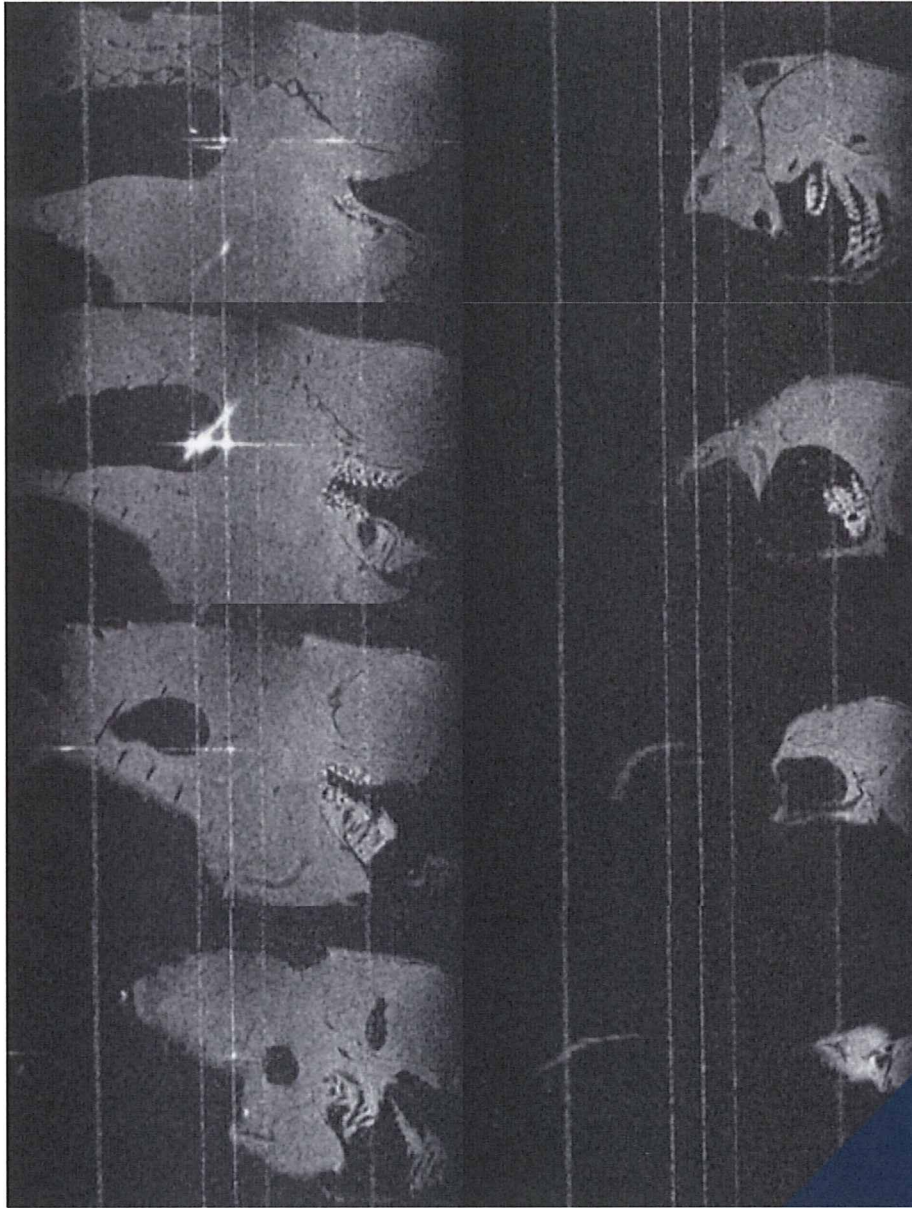
上図は Y186X ホモ型 p53 変異型メダカの頭部の sagittal section を示している。約 20 スライスごとに表示している。



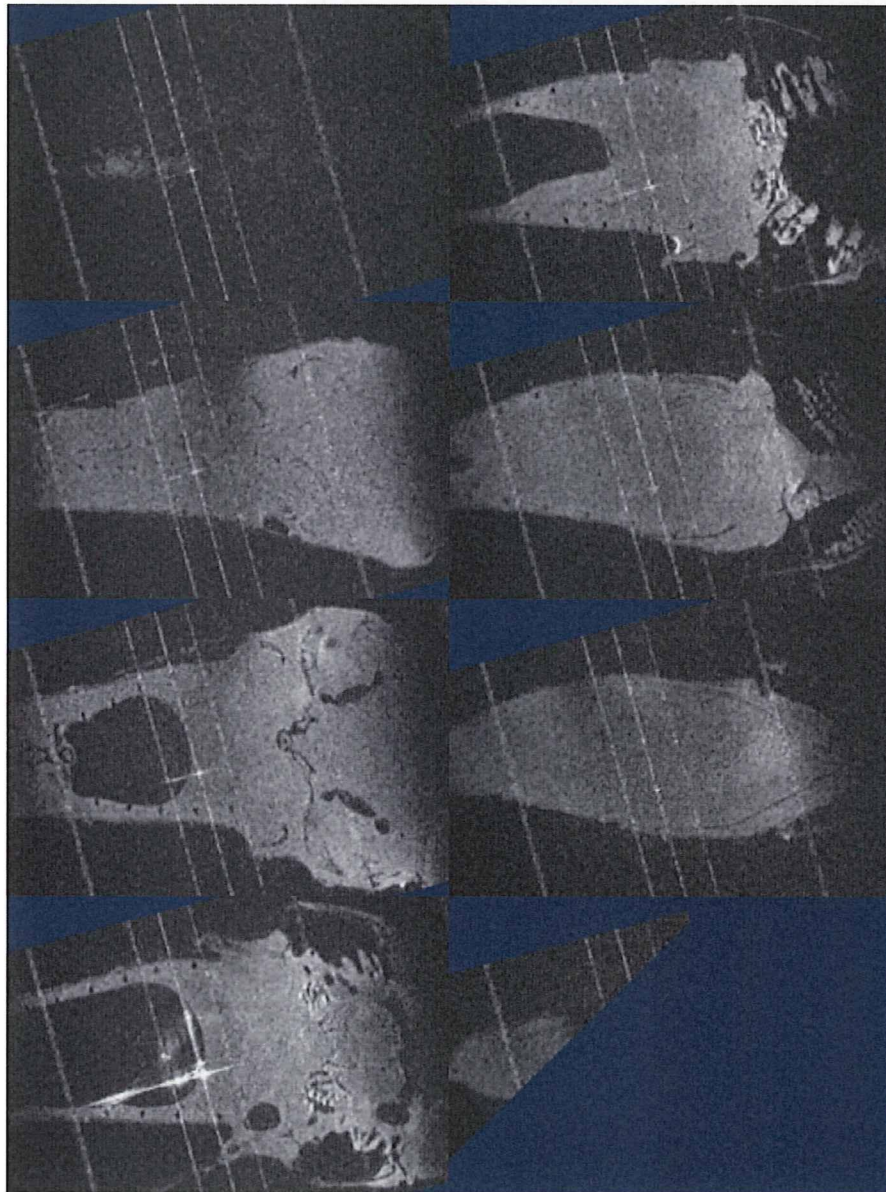
上図は Y186X ホモ型 p53 変異型メダカの頭部の coronal section を示している。約 30 スライスごとに表示している。



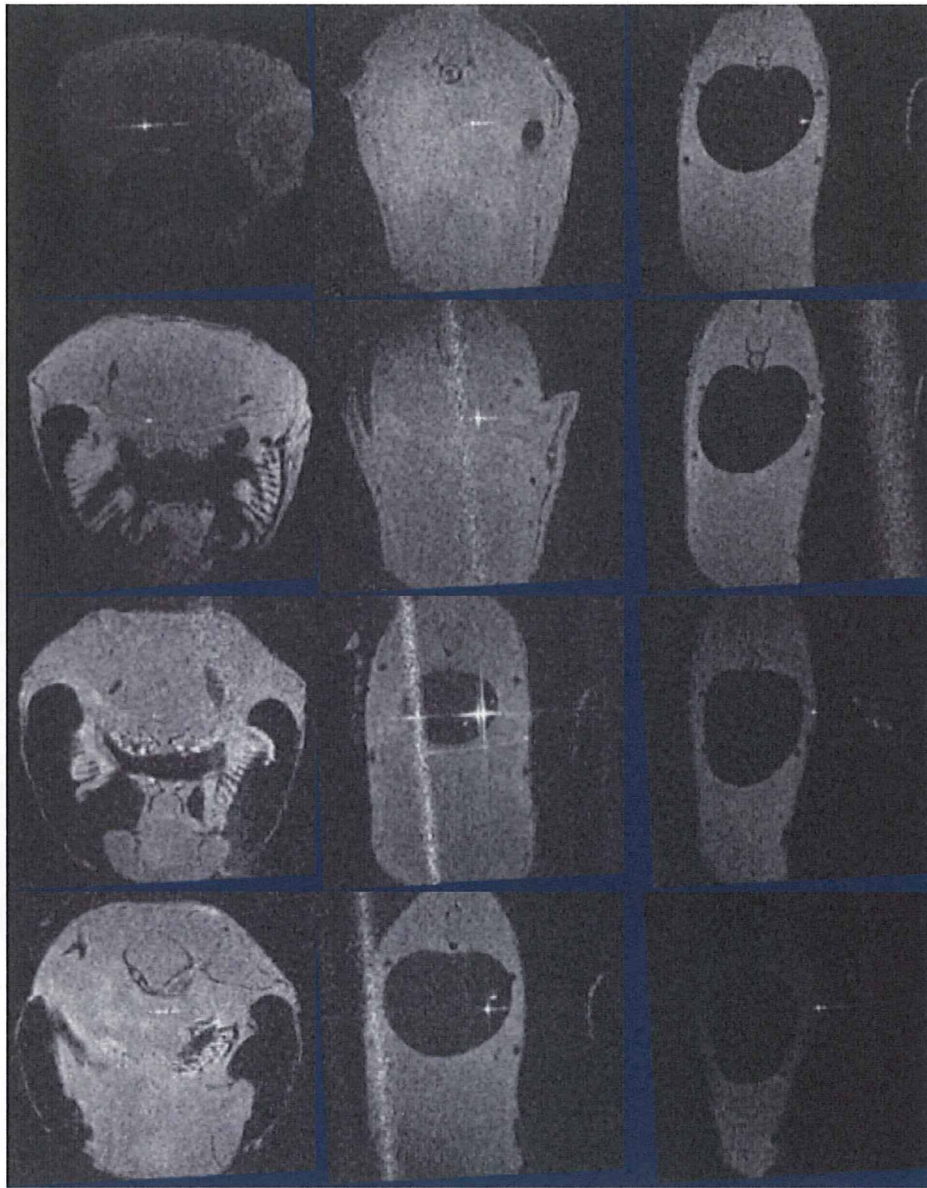
上図は Y186X ホモ型 p53 変異型メダカの頭部の axial section を示している。約 35 スライスごとに表示している。



上図は Y186X ホモ型 p53 変異型メダカの腹部の sagittal section を示している。約 20 スライスごとに表示している。



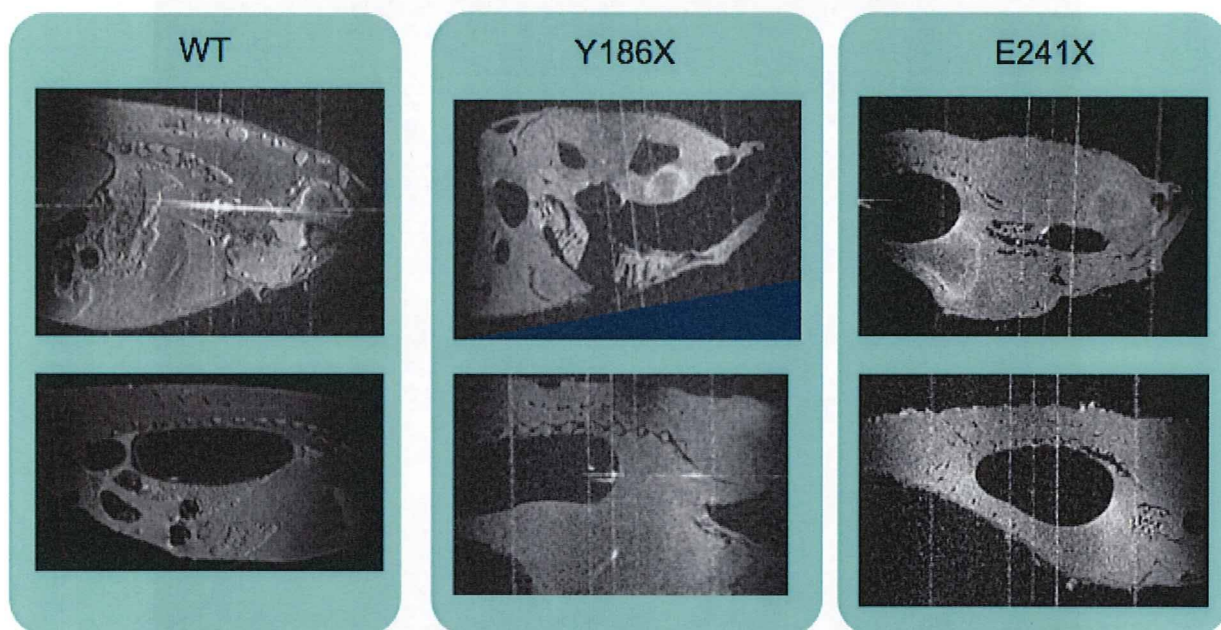
上図は Y186X ホモ型 p53 変異型メダカの腹部の coronal section を示している。約 30 スライスごとに表示している。



上図は Y186X ホモ型 p53 変異型メダカの腹部の axial section を示している。約 35 スライスごとに表示している。

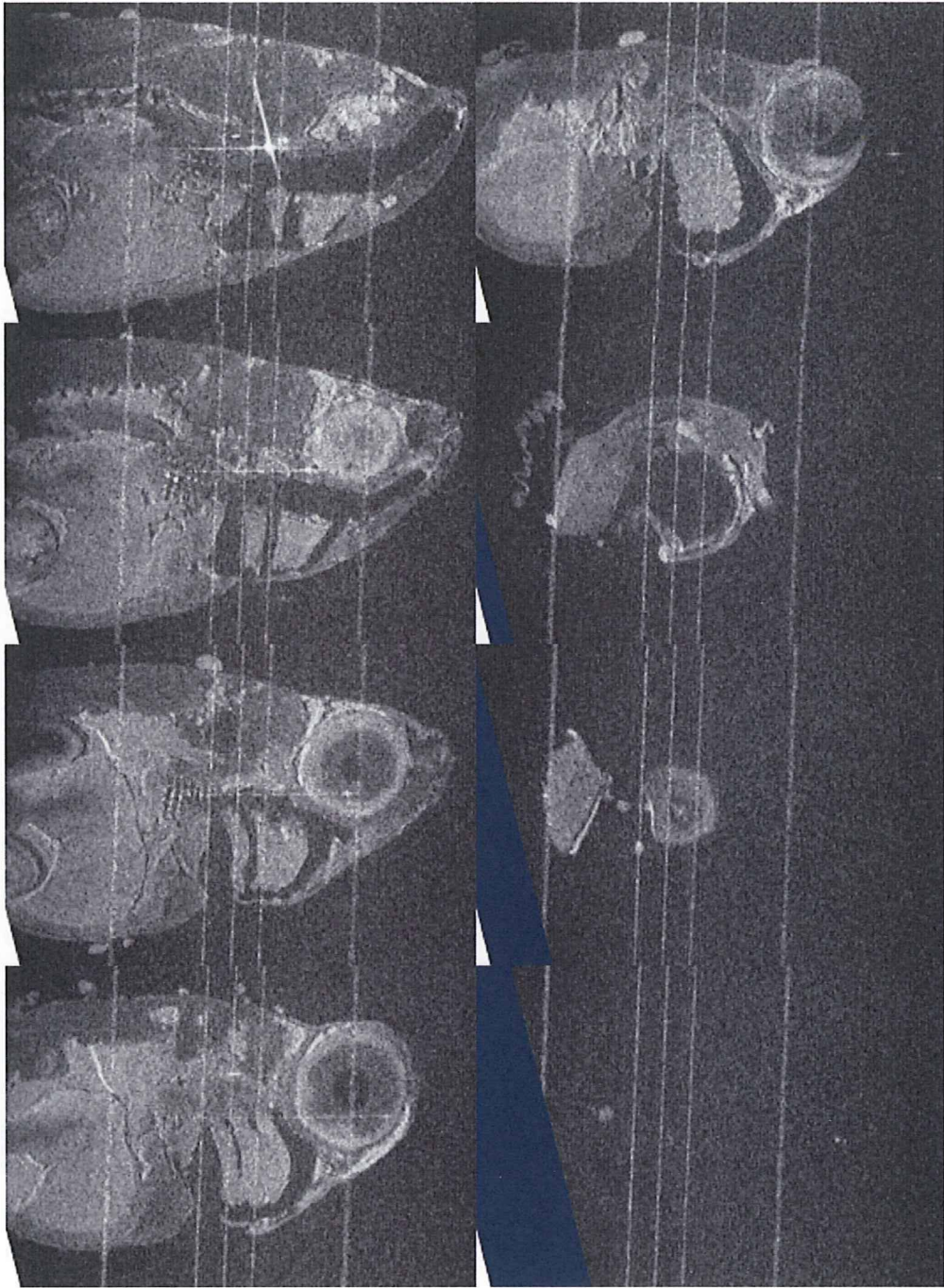
E241X ホモ型 p53 変異型メダカについても、同様に 3 次元撮像を行なった。しかし、以下に示すように E241X ホモ型と Y186X ホモ型における画像上の明瞭な違いは見出すことができなかった。下図の縦の列が右から野生型 (WT)、Y186X と E241X のメダカの saggital section の画像を示している。WT の画像と同様に、解剖学的特徴をもとに、得られた 3 次元画像を 3 次元回転させることで saggital section を得ている。図の上段が頭部、下段が腹部を示している。KO のメダカは、頭部と腹部では同一の個体を用いて撮像している。自己融解の影響を少なくするため、腹部から撮像している。

WTとKOとの比較

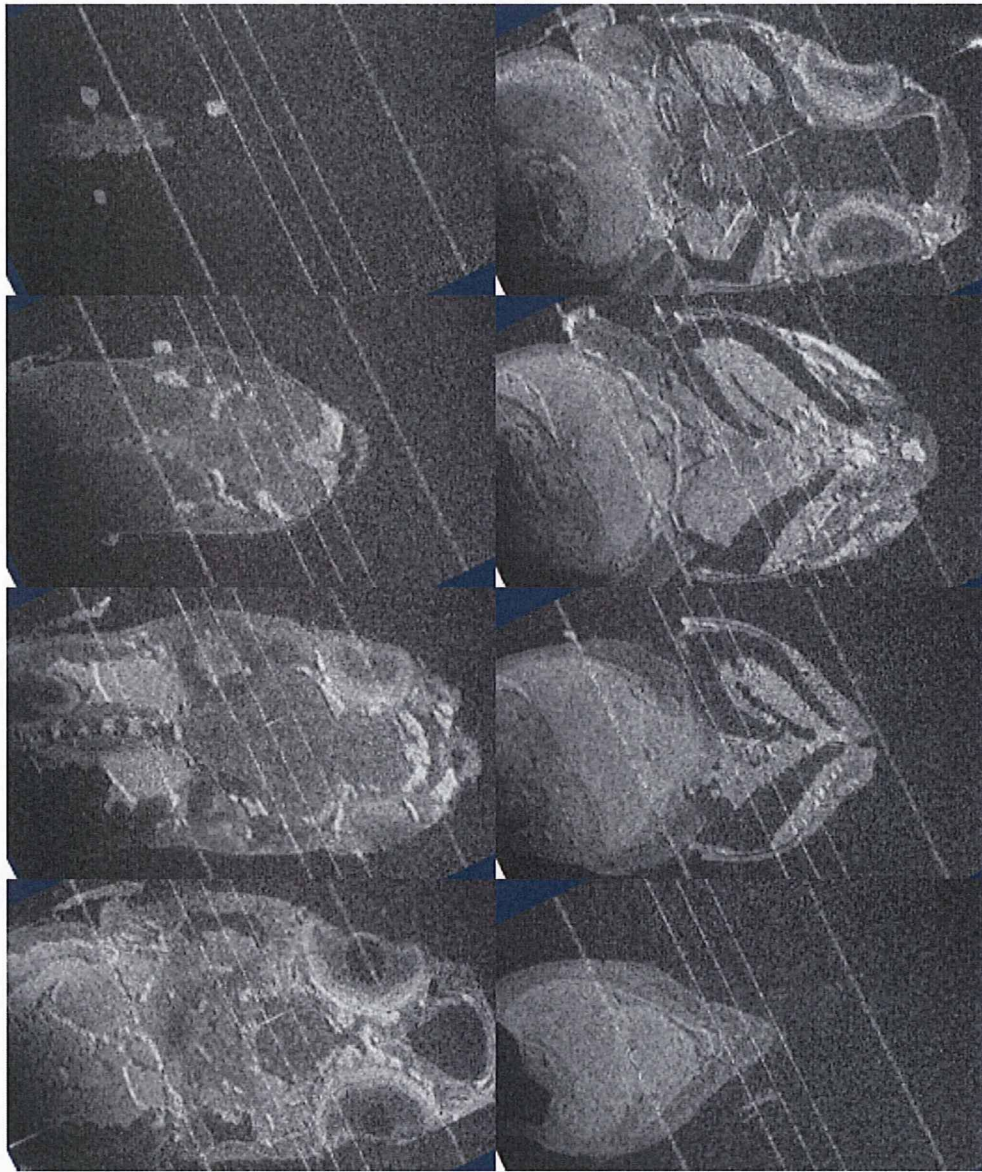


画像から分かるように、WT と KO の画像に大きな違いが生じている。WT と KO の比較においては、組織としての脂肪が WT より KO の方が少ないように見える。また、KO の方が、組織コントラストが低く、さらには腸管を確認することができない。KO の比較においては、Y186X の頭部の画像のみに穴があいたような画像の黒い部分が存在するが、それが、Y186X と E241X の表現型の違いによるものかは結論できていない。

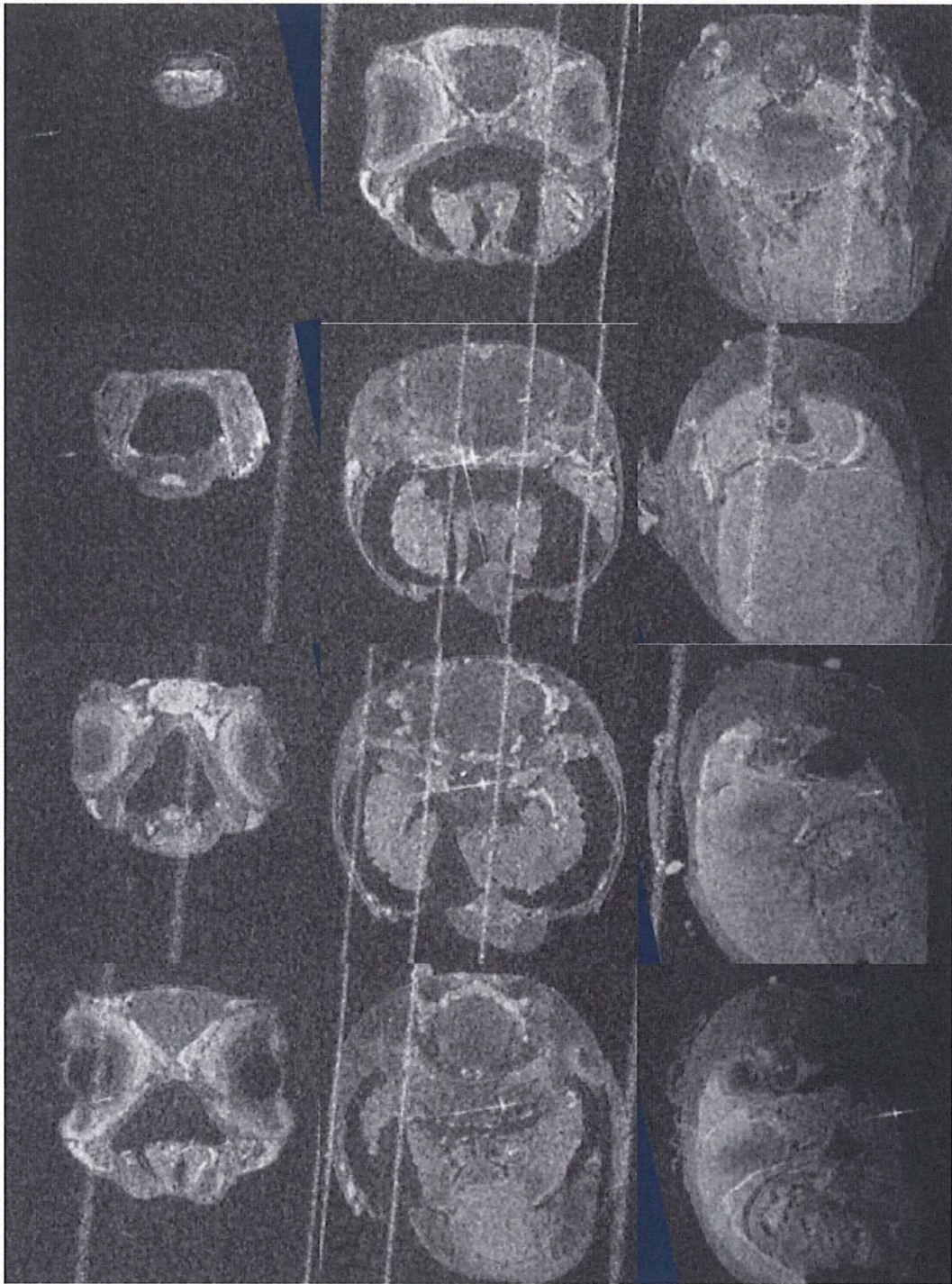
病理切片の作成時に一般的によく用いられる PFA による固定をメダカ (wild) に対して施し、化学固定による画像への影響を検証した。これは、事故融解による画像の影響を排除する目的がある。次頁以降に撮像した 4%PFA により固定された野生型メダカの頭部の画像を示す。得られた画像から、PFA 固定されたメダカはされていない個体と比べて臓器の境界が明瞭であるように思われた。しかし、信号強度はやや低下しているように思える。PFA による化学固定を行っての撮像は、生きた状態での撮像にはもちろん用いることはできないが、形態をより臓器間のコントラストを高いものとして観察したい場合には有用であると考えられる。



上図は 4%PFA により固定された野生型メダカの頭部の sagittal section を示している。約 20 スライスごとに表示している。



上図は 4%PFA により固定された野生型メダカの頭部の coronal section を示している。約 30 スライスごとに表示している。



上図は4%PFAにより固定された野生型メダカの頭部の axial section を示している。約30スライスごとに表示している。

D. 考察

メダカにおける野生型と2種類のp53変異型の3次元撮像により、p53の発現の違いによるメダカの内部状態の違いが明らかになった。さらに、ガンの発生/転移メカニズムの理解につなげるためには、撮像法の改良が重要になると考えられる。現在は安楽死させたメダカをそのまま撮像することが主である。この場合、撮像時における自己融解による影響を免れることができない。そこで、組織固定法とMRI顕微鏡を組み合わせることが必要と考えられる。その際に、固定法により、タンパク質の架橋/凝固/脱水などによる組織の状態、固定の速度や強度が異なるため、様々な固定法を比較検討する必要がある。さらには、p53変異型の特異的な状態が発現されているとすれば、それを残すような固定法を考える必要がある。また、固定したメダカのMRI画像と同一の個体から切片を作り、比較検討を加えることによって、撮像パラメータの最適化も行う必要がある。固定だけでなく、メダカを麻酔状態におき、生きたまま撮像することによって、同一個体の経時変化についても画像化する必要がある。また、氷等で気絶させている間に2次元スライス画像によって撮像することにも全体の撮像時間を短くして、時間分解能を高くした画像が得られるという利点があると考えられる。また、現在は静磁場の不均一度が高いため、様々なパラメータをふって、T1強調画像、T2強調画像、拡散強調画像などのコントラストの高い画像が得られていない。そこで、MRI顕微鏡プローブ/MRI顕微鏡システムとも連動して、静磁場の均一度を高め、異なる種類の組織コントラストが得られるようにする必要がありと考えられる。

F. 結論

MRI顕微鏡により、22時間での解像度20ミクロンによるメダカの3次元画像の撮像に成功した。また、がん抑制遺伝子p53を変異させたメダカと野生型メダカの画像を比較することにより、p53の発現の違いによるメダカの内部の違いが明らかとなった。これにより、開発を行ってきたMRI顕微鏡の基礎医学/基礎生物学の分野における有用性が示唆されたと考えられる。臨床応用や基礎医学/基礎生物学における有効性を高めるためにも、更なる空間解像度の向上と時間分解能の向上が必要と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

著者名：金山翔一郎、桑原航、上野智弘、浦山慎一、波多野直也、杉本直三、福山秀直

論文標題：

雑誌名：信学技報

査読の有無：無

巻：109

発行年：2010

最初と最後の頁：361-366

著者名：金山翔一郎、桑原航、上野智弘、浦山慎一、波多野直也、杉本直三、福山秀直

論文標題：14.1 T MRI 顕微鏡を用いたメダカの 3D 可視化

雑誌名：低温物質科学研究センター誌

査読の有無：無

巻：16

発行年：2010（6月号）

最初と最後の頁：未定

著者名：金山翔一郎、桑原航、上野智弘、浦山慎一、波多野直也、杉本直三、福山秀直

論文標題：生体組織構造の 3D 可視化のための高分解能 MRI 顕微鏡の開発

雑誌名：再生医療

査読の有無：有

巻：vol.9 suppl.

発行年：2010

最初と最後の頁：245

2. 学会発表

発表者名：金山翔一郎、桑原航、上野智弘、浦山慎一、波多野直也、杉本直三、福山秀直

発表表題：14.1 T MRI 顕微鏡を用いたメダカの 3D 可視化

学会名等：電子情報通信学会医用画像研究会

発表年月日：平成 22 年 1 月 29 日

発表場所：那覇市

発表者名：金山翔一郎、桑原航、上野智弘、浦山慎一、波多野直也、杉本直三、福山秀直

発表表題：14.1 T MRI 顕微鏡を用いたメダカの 3D 可視化

学会名等：京都大学低温物質科学研究センター第 8 回研究交流会

発表年月日：平成 22 年 3 月 15 日

発表場所：京都市

発表者名：金山翔一郎、桑原航、上野智弘、浦山慎一、波多野直也、谷口善仁、杉本直三、福山秀直

発表表題：生体組織構造の 3D 可視化のための高分解能 MRI 顕微鏡の開発

学会名等：第 9 回日本再生医療学会総会