

赤外イメージングを用いた 硬骨魚類ウロコの成分分布分析

新居田 恭 弘

1 はじめに

1.1 硬骨魚類の鱗（ウロコ）

硬骨魚類の鱗は破骨細胞と骨芽細胞によって骨中のカルシウム代謝が調節される。ヒトの骨の研究において鱗が優秀なモデル試料となりうるため、大きく注目されている¹⁾。硬骨魚類の鱗はコラーゲンを主成分とする繊維層とコラーゲンにハイドロキシアパタイト（HAP）や炭酸アパタイトが沈着した骨質層の二層構造から成る²⁾³⁾。ヒトの骨は骨折しても修復され再生されるように、鱗も再生される⁴⁾。種々の硬骨魚類の鱗の成分分布の可視化により、骨の再生に関する知見を得ることは重要である。本稿では赤外イメージングを用いた硬骨魚類の鱗のタンパク質、HAP、炭酸アパタイトの各成分分布の可視化の手法について述べる。

1.2 赤外分光法と赤外イメージング法

鱗表面の HAP や炭酸アパタイトの成分分布を可視化する方法として、赤外分光法、ラマン分光法による方法が挙げられる。ラマン分光は 1 μm 以下の微小領域の測定が可能であるが、コラーゲンを構成するタンパク質の吸収バンドが弱く、かつ大面積の測定には不向きである。赤外分光法はタンパク質、HAP、炭酸アパタイトの特徴的なバンドが良好に得られ、かつ 10 μm 程度の大きさまで赤外光を絞った顕微測定が可能のため、本分析の目的によく合致している。

赤外顕微測定は、赤外分光計を赤外顕微鏡に接続することで可能となる。赤外顕微鏡はカセグレン鏡と呼ばれる凹面鏡により光源からの赤外光を集光でき、かつ赤外光を高感度で検出可能なテルル化カドミウム水銀（MCT）検出器を備えている⁵⁾。赤外イメージングシステムは赤外顕微鏡の検出器としてアレイ型 MCT 検出器を備えたもので、視野内の複数の箇所のスペクトルを一度に取得できる。このシステムでは赤外顕微鏡の焦点位置に試料を配置し、精密な電動ステージにより試料を奥行き方向と左右方向に移動させることで、2次元イメージングデータを高速で得ることができる。このような測定法を赤外イメージング法と呼ぶ⁵⁾⁶⁾。本講では、赤外

イメージング法を用いた魚類の鱗の成分分布の可視化の方法を紹介する。

2 鱗の成分分布分析

2.1 分析対象とサンプリング

硬骨魚類として条鰭綱-骨鰾上目-コイ目-コイ科に属するキンギョ、モツゴ、フナ、ゼブラフィッシュの4種を対象とした。各個体から鱗を超精密ピンセット（Dumont 製 No.Du-5）で採取し、エス・ティ・ジャパン製 Low-E グラススライド上にサンプリングした。鱗は乾燥すると反りやすいため、乾燥する前に Low-E グラススライドに密着させた。Low-E グラススライドは可視光を透過し、かつ赤外光を良好に反射する光学基板である。赤外反射測定における最も一般的な基板は金蒸着ミラーであるが、Low-E グラススライドは金蒸着ミラーと比べ可視画像の色情報を損なわず、かつ良好な反射スペクトルが得られる。

2.2 装 置

すべての測定は PerkinElmer 社製赤外イメージングシステム Spectrum3/Spotlight400 を使用した。装置の外観を図1に示す。FTIR 本体である Spectrum3 に Spotlight400 を接続した構成である。Spectrum3 が有する改良型マイケルソン干渉計によって安定的に高いシグナルノイズ比のスペクトルが得られるため⁶⁾、イメージング測定における高速スキャンが可能となる。鱗のような数 mm 角



図1 PerkinElmer 社製 Spectrum3/Spotlight 400

の大きさのサンプルのイメージングデータに含まれるスペクトル数は5万本以上になるが、数分～数十分程度の測定時間で解析に足るデータが得られる。

2・3 測定方法

可視画像はSpotlight400の赤外光学系を利用した装置内蔵の可視光学系を利用して取得した。視野サイズは各鱗の大きさに合わせた。測定方法は反射イメージングを選択した。Spotlight400は透過イメージング、反射イメージング、ATR (Attenuated Total Reflection) イメージングの三つのイメージング手法を選択できる。これらのうち透過イメージングは鱗の厚みが厚いため吸収ピークが飽和する問題がある。ATR イメージングは鱗の大きさがGeクリスタルの測定可能サイズより大きく、データ取得領域に問題がある。反射イメージングは、これらの問題が起こらず、鱗全体の赤外吸収スペクトルの収集が期待できる。

反射イメージングの取得領域は可視画像と一致させた。測定条件は分解能 4 cm^{-1} 、積算回数4回、波数範囲 $4000\sim700\text{ cm}^{-1}$ 、干渉計の移動速度 2.2 cm s^{-1} 、ピクセルサイズ $25\text{ }\mu\text{m}$ とした。バックグラウンドに使用するリファレンスはLow-E グラススライドの未使用箇所にて取得した。

2・4 解 析

測定によって得られた反射率スペクトル (R) を以下の式に基づき吸収スペクトル (A) に変換した。

$$A = \log (100/R)$$

更にPerkinElmer製HyperViewソフトウェアを使用し、吸収スペクトルにSavitzky-Golay法による2次微分処理を加えた。2次微分処理は吸収スペクトルのベースラインの変動を抑制することが目的である。

3 結果及び考察

3・1 硬骨魚の通常鱗

3・1・1 可視画像と赤外スペクトル

キンギョの鱗の可視画像を図2に示す。鱗の大きさは、もっとも小さいゼブラフィッシュで約1 mm角、最も大きいフナが約6 mm角の大きさであった。鱗の表面構造である骨質の線状隆起によって形成される隆起線⁴⁾、鱗の中心から縁辺にのびる溝条⁴⁾、露出部と被覆部の色差が明瞭に観察された。

キンギョ通常鱗の反射イメージングから抽出および解析したスペクトルを図3に示す。

図の上段は抽出した吸収スペクトルの元データ、下段は2次微分後のスペクトルである。2次微分スペクトルは吸収ピークの向きが微分前と比べ上下逆転するため、2次微分スペクトルに-1を乗算し、元データの吸収

ピークの向きと合わせている。反射スペクトルの元データには正反射光に由来する屈折率の異常分散の寄与がわずかに認められたものの、全体的には拡散反射光が支配的なスペクトルが得られた。

生データは 1655 cm^{-1} にタンパク質のアミド I バンド (主に $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動)、 1551 cm^{-1} にアミド II バンド (主に $\text{C}-\text{N}-\text{H}$ 変角振動)、 1242 cm^{-1} にアミド III バンド (主に $\text{C}-\text{N}$ 伸縮振動) がそれぞれ観察された⁷⁾。さらに 1065 cm^{-1} に HAP に含まれるリン酸イオン、 868 cm^{-1} に炭酸アパタイトに含まれる炭酸イオンに起因するバンドが観察された⁸⁾。元データのスペクトルは赤外光の散乱によるベースラインの傾きが大きい。ベースラインの傾きはケミカルイメージを描く際に特定の吸収バンドで予期せぬアーティファクトをもたらすため、排除する必要がある。図3の微分後の鱗のスペクトルは、各ピークの波数位置は生データとほぼ一致し、かつ散乱によるベースラインの傾きが良好に補正された。

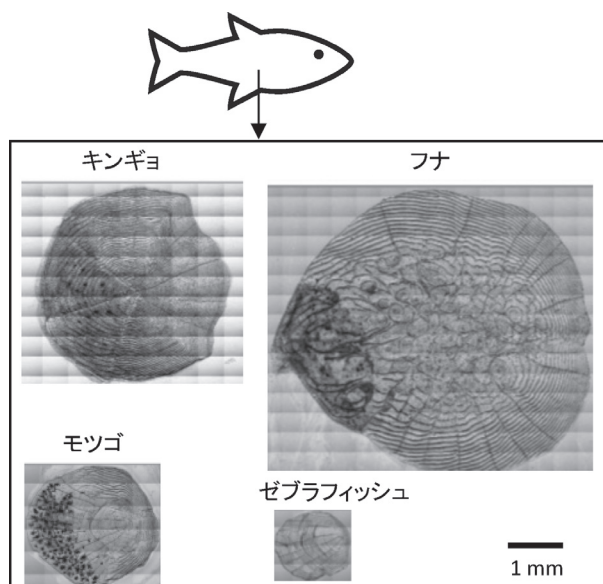


図2 通常鱗の可視画像

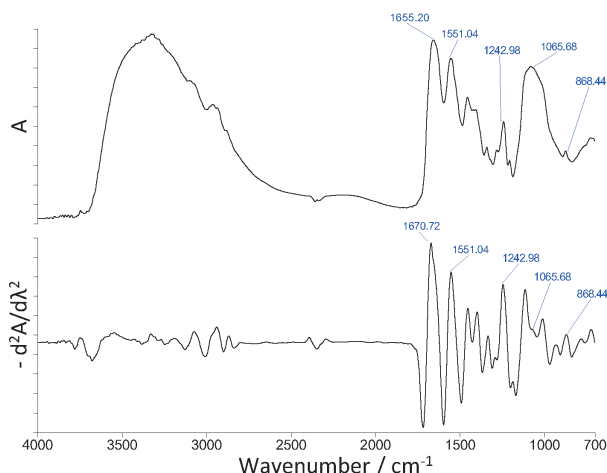


図3 キンギョ通常鱗のIRスペクトル(上段)と2次微分IRスペクトル(下段)

3・1・2 キンギョ通常鱗の赤外イメージング

キンギョ通常鱗の2次微分後赤外イメージングデータからアミドI、アミドII、HAP、炭酸アパタイトの各ピークを抽出してケミカルイメージを作成した。ケミカルイメージとは特定の官能基の強度分布を示した画像情報である。結果を図4に示す。左上はアミドIバンド、右上はアミドIIバンド、左下はHAP、右下は炭酸アパタイト(CO_3Ap)のケミカルイメージである。

アミドIは鱗の露出部側に多く分布しており、被覆部側は少なかった。加えて、アミドIは溝条に沿って分布していることが示唆された。アミドIIはアミドIと同じ傾向を示した。HAPはアミドI、IIと異なり被覆部側に多く存在していた。また隆起線に沿って分布している様子が観察された。被覆部側のHAPの吸収が弱い。これは被覆部側の表面を被覆しているコラーゲン層の存在た

めで、その下部に存在する骨質層まで赤外光が届いていないためと考えられる。炭酸アパタイトもHAPと同様に隆起線に沿って分布していた。

3・1・3 モツゴ・フナ・ゼブラフィッシュ

同じ手法でモツゴ・フナ・ゼブラフィッシュのケミカルイメージを作成した。図5以降はアミドIIは省略する。各図のうち、左上が可視画像、右上がアミドI、左下がHAP、右下が炭酸アパタイトである。図5にモツゴのケミカルイメージを示す。モツゴのアミドIはキンギョと同様には露出部側に多く分布していた。HAPと炭酸アパタイトは特定の隆起線に沿って分布しており、HAPと炭酸アパタイトの分布のパターンは互いに異なっていた。図6にフナのケミカルイメージを示す。フナのアミドIは被覆部に加えて鱗の縁を囲うように分

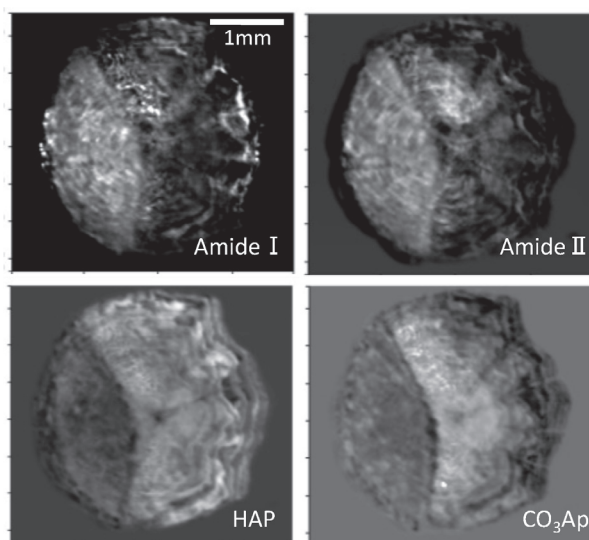


図4 キンギョ通常鱗のケミカルイメージ

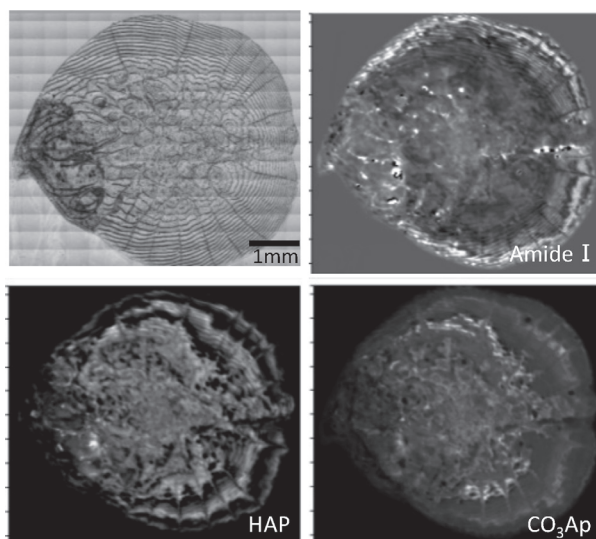


図6 フナ通常鱗のケミカルイメージ

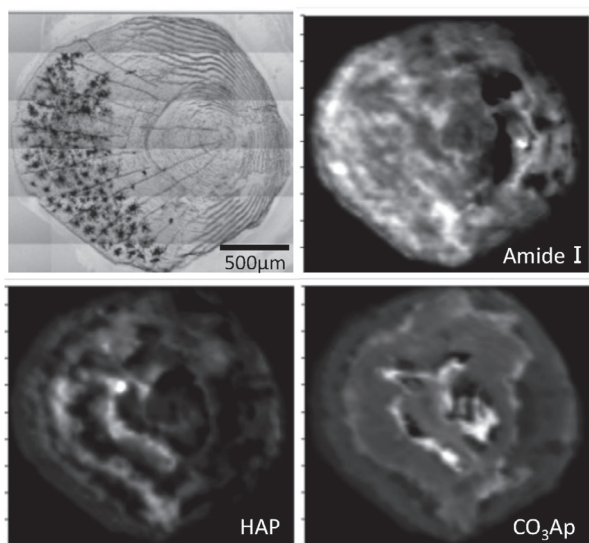


図5 モツゴ通常鱗のケミカルイメージ

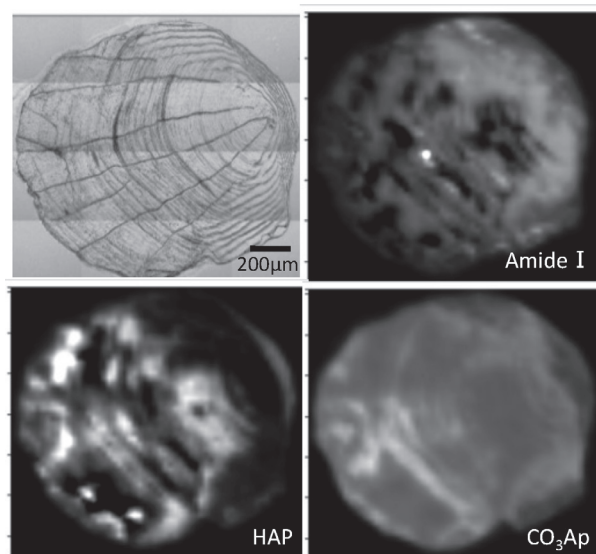


図7 ゼブラフィッシュ通常鱗のケミカルイメージ

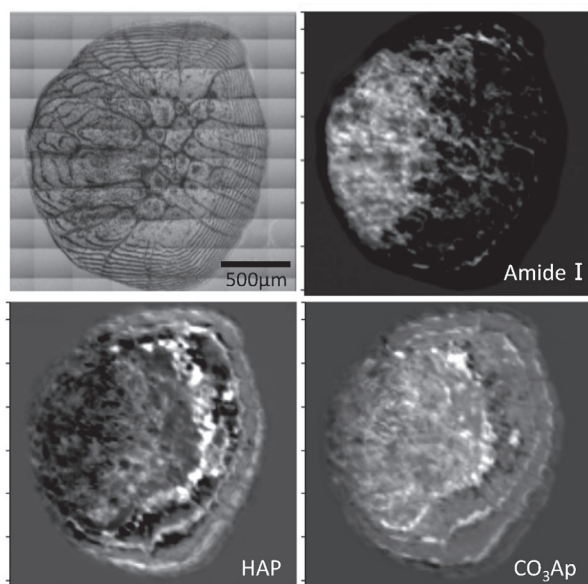


図8 キングギョ再生鱗のケミカルイメージ

布していた。HAPと炭酸アパタイトが隆起線に沿って濃淡が観察されており、HAPと炭酸アパタイトの分布のパターンはやはりそれぞれ異なっていた。図7のゼブラフィッシュのHAPと炭酸アパタイトも隆起線に沿った分布が見られ、かつHAPと炭酸アパタイトが異なる分布を示していた。ゼブラフィッシュは鱗が小さいため、より高い解像度で測定する必要があると考えられる。

3.2 キングギョの再生鱗

最後にキングギョの再生鱗を図8に示す。再生鱗は鱗が急激に発達するため、個体の発生から一生を通じて成長を続けてきた通常鱗とは構造が異なると考えられている⁴⁾。キングギョの再生鱗でもHAPと炭酸アパタイトの分布が異なることが明らかになった。

4 まとめ

本講では、赤外イメージングを用いた魚類の鱗の成分

分布の可視化の方法を紹介した。反射イメージング法で測定したデータを2次微分することで、タンパク質、HAP、炭酸アパタイトの分布を明瞭に示すことが可能となり、特にHAPと炭酸アパタイトは鱗の内部で異なる分布を示すことが示唆された。

謝辞 本稿は東京医科歯科大学との共同研究の成果の一部をまとめたものです。奈良雅之教授、服部淳彦教授、丸山雄介先生には、試料のご提供、研究の進め方や枠組みに関して大変有益な助言を賜りました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 奈良雅之, 丸山雄介, 服部淳彦, 新居田恭弘: 日本化学会第101回春季年会講演要旨 講演番号A04-3am-07 (2021).
- 2) 山田寿郎, 麦谷泰雄: “海洋生物の石灰化と系統進化” p.210 (1988), (東海大学出版会).
- 3) 福若雅章: “魚鱗の構造, 形成と鱗相分析” p.47, (1997).
- 4) 吉富友恭 日本水産学会監修: “魚のウロコのはなし” p.35 (2007), (ベルゾーブックス).
- 5) 田隅三生編著: “赤外分光測定法 基礎と最新手法”, p.114 (2012), (日本分光学会).
- 6) P. R. Griffiths, J. A. De Haseth, J. D. Winefordner: “*Fourier Transform Infrared Spectrometry 2nd Edition*”, p.312 (2007), (Wiley).
- 7) N. B. Colthup, L. H. Daly, S. E. Wiberley: “*Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, Third Edition*”, p.320 (1990), (Academic Press).
- 8) C. Rey, C. Combes, C. Drouet, A. Lebugle, H. Sfihi, A. Barroug: *Mat.-wiss.u. Werkstofftech.*, **38**, No.12., p.2 (2007).



新居田 恭弘 (Yasuhiro NIIDA)

株式会社パーキンエルマー・ジャパン アプリケーションリサーチラボ (〒240-0005 神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町134 横浜ビジネスパーク テクニカルセンター4F)。神戸大学大学院自然科学研究科応用化学専攻。修士。《現在の研究テーマ》国内における紫外可視、近赤外、赤外分光光度計の分析解析技術の向上に貢献する。

会社ホームページ URL :

<https://www.perkinelmer.co.jp/>

関連製品ページ URL :

<https://www.perkinelmer.co.jp/ft/tabid/589/Default.aspx>