

0.2 T 小型磁気共鳴イメージング装置 (MRI) によるリンゴ果実における モモシクイガ食入害の観測

拝師 智之*・小泉 博**1)・新井 朋徳***・小泉 美香****・狩野 広美*****

*(株) エム・アール・テクノロジー

** 早稲田大学大学院先進理工学研究科

*** 農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点

**** 早稲田大学理工学術院総合研究所

***** くぬぎ山蛭雪研究所

Non-invasive observations of an infestation by the peach fruit moth, *Carposina sasakii* Matsumura (Lepidoptera: Carposinidae) in apples using a 0.2-T compact MRI system. Tomoyuki Haishi (MRTechnology, Inc.), Hiroshi Koizumi (Faculty of Science and Engineering, Waseda University), Tomonori Arai (Apple Research Station, National Institute of Fruit Tree Science, National Agriculture and Food Research Organization), Mika Koizumi (Research Institute for Science and Engineering, Waseda University), Hiromi Kano (Oak-Hill Georgic Patch-Work Laboratory)

要旨：0.2 テスラ (T) 小型 MRI 装置を用いて収穫果実におけるモモシクイガ (*Carposina sasakii* Matsumura) 幼虫の食入害を非破壊的に観測した。安定性が高い三次元スピンエコー法 (分解能 $(470 \mu\text{m})^3$) によって食害孔、虫糞とともに成長した幼虫を検出することができた。本測定法では輪郭が明瞭な画像が得られたが、撮像時間は一果実につき 82 分を要し、果実に食入した幼虫の行動観測のためには撮像できる試料数の制限が問題となる。食害孔および蓄積された虫糞は、輪郭の鮮明度が若干劣るが、三次元グラディエントエコー法 (分解能 $(860 \mu\text{m})^3$) によって 27 分で検出された。グラディエントエコー法による食害孔の拡大の追跡は、果実における幼虫の活動を追尾する指標となると同時に、試料の数に関する問題を解決できる。画素サイズに対して幼虫は小さいので、幼虫自体の検出には画素サイズが小さい画像を長時間かけて撮像することとともに、画像回転などの画像処理技術が必要であるが、0.2 T 小型 MRI は果実における蛾の幼虫の生態学において、ユニークで新しい視点を切り拓く研究手法となると考えられる

キーワード：バイオイメージング、非破壊観測法、自然生態系保全、植物防疫、幼虫の果実内行動

Abstract: Using a 0.2-Tesla (T) compact magnetic resonance imaging (MRI) apparatus, we non-invasively observed an infestation of the peach fruit moth, *Carposina sasakii* Matsumura (Lepidoptera: Carposinidae) in harvested apple fruits. Using the 3-dimensional spin-echo method with a $(470 \mu\text{m})^3$ spatial resolution, mature larvae together with accumulated excreta were detected in infested holes. This method provided stable, clear-contour images. Because measurement times ran upwards of 82 min per fruit, observations of larval ecological activity in fruits were restricted to a few samples. Infested holes and excreta were also detected using the 3-dimensional gradient-echo method with an $(860 \mu\text{m})^3$ spatial resolution and a 27-min measurement time. The resultant images were not as clear as those using the spin-echo method. Nevertheless, this procedure permitted larger sample sizes and thus enabled the tracking of larval movement through the examination of the expansion of infested holes. The 0.2-T compact MRI has proven to be a unique means for the ecological study of the growth and movement of the moth in apple fruits, despite the significant time required for the detection of larvae, including the measurement and rotation-processing of 3-dimensional image data, due to the relatively small sizes of larvae compared to the voxel size of the apparatus.

Keywords: bio-imaging, non-destructive observations, conservation of natural ecological system, plant protection, growth and movement of larvae in fruits

2009年6月11日受付、2009年8月31日受理

1) e-mail: hkoizumi@waseda.jp

緒言

昆虫による食入害は果実の商品価値を損うばかりでなく、被害果の流通は生産地の評判を著しく低下させる。そのような事態を防ぐために、我が国では、生態学的研究を基にした定期的な農薬散布が実施され、さらに、収穫時および収穫後に目視による果実の検査を行うので、普通には穿孔性害虫の食入害を受けた果実の流通は起こらない。しかし、輸出品の場合、輸入国にとっては植物防疫と自然生態系保護という面で、食害果実流通に随伴する害虫の侵入は、不測な事態をも含めて完全に防御されるべきものである。

リンゴ果実に食入するモモシクイガ (*Carposina sasakii* Matsumura) の幼虫も典型的な例である。従来の生態学的研究 (梶野・中尾 1978; 成田 1986) に基づく農薬による防除に加え、蛾の遺伝的性質の研究や、切片法による果実内の幼虫の成長解析など、多くの研究によって万全な防除の基礎を固める努力が行われている。さらに、輸出検疫における害虫付着果および食入果の流通阻止技術の一環として、非破壊的検査法の開発が望まれている。

近赤外線を用いて開発中の検査装置を用いれば、90%以上のモモシクイガによる被害果を非破壊的に検出できる。しかし、同時に約40%の確率で健全果を被害果と誤認するという問題点が指摘されている (Toyoshima et al. 2006)。また、この手法は近赤外光の吸収を基にしたものであるため、他の原因による果実の組織劣化と害虫による食害の識別は困難である。このため、食入孔が小さく、虫糞を果実外へ出さないために肉眼では捉えにくい幼虫による食害の実態や、未だ明らかになっていない果実内における幼虫の行動など、防除の基礎である害虫の生態を観測する手法とはなり難い。

磁気共鳴イメージング (MRI) を用いれば、果実の生理変化、傷害、劣化、罹病による内部構造の変化を非破壊的に観測できる (Wang et al. 1988; McCarthy et al. 1995; Chudek and Hunter 1997; Faust et al. 1997; Clark et al. 1998; Barreiro et al. 1999; Koizumi et al. 2000) ので、害虫食入による果実組織の損壊も捉えることができる。すでに昆虫では、MRIによってチョウ目 (*Pieris brassicae*) および *Graphiphora augur* の蛹の生育変化 (Goodman et al. 1995)、エゾゲンゴロウモドキ (*Dytiscus marginalis*) (Wecker et al. 2002) や、キオビクロスズメバチ (*Vespa vulgaris*) とハリアリの一種 (*Dinoponera quadricaps*) (Hart et al. 2003) の形態、および、ナナホシテントウ (*Coccinella 7-punctata*) とテントウハラボソコマユバチ (*Dinocampus*

coccinellae) の間の宿主-寄生虫相互関係 (Chudek et al. 1998) の研究が行われている。ただし、医療用の MRI 装置は巨大かつ高価であり、研究用のマイクロ MRI 装置は所有機関が限られる。このためこれまでの昆虫の研究では、MRI の応用の可能性が示されるに留まっており、MRI を穿孔性害虫の高頻度の観察や検査業務に使用することは考えられなかった。近年、Koizumi et al. (2008) は、1 テスラ (T) の静磁場強度をもつ永久磁石を装備した超小型 MRI 装置を開発した。この装置でリンゴの幼果に食入したモモシクイガの幼虫、食害孔、幼虫が排泄した糞の可視化など、害虫の食入被害を非破壊的に観測することが可能になった (井原ほか 2008)。しかし、1 T 小型 MRI 装置は、撮像視野が (30 mm)³ に限られるので、害虫の繁殖期において大きく成長した果実や、害虫移動を媒介する収穫果実の観察に、そのまま用いることはできない。

本研究では、生育が進んでサイズが大きくなった果実の観測が可能な (110 mm)³ の撮像視野を有する、磁場強度 0.2 T の永久磁石を装備した小型 MRI 装置を開発、製作して、成熟果実に食入したモモシクイガ幼虫の観測を行った。0.2 T 小型 MRI 装置では、100 mm 程度の果実を扱えるように磁極間隙を広げたことと引き替えに、装置重量を実用範囲に留めるために静磁場強度を下げなければならなかったこと、および、撮像視野拡大にともない 1 T 小型 MRI に比べて分解能が低下した (画素サイズが大きくなった) ことが、どのように対象の識別能および画像の鮮明性に影響するか、未確定である。本論文では、撮像した画像を基に 0.2 T 小型 MRI で検出し得る対象物と現象、さらに、その検出限界を明確にし、果実穿孔性害虫の生態研究と害虫の移動阻止技術への、MRI の応用の可能性について考察する。

材料および方法

供試果実

試料果実は、岩手県盛岡市果樹研究所リンゴ研究拠点の殺虫剤無散布区圃場のリンゴ樹 (*Malus pumila*) より収穫した。2008 年 9 月に収穫された早生 'さんさ' と 11 月に収穫された晩生 'ふじ' を用い、孵化間近のモモシクイガの卵の付いたパラフィン紙を果実に貼付し、20℃の部屋で 16 時間明 / 8 時間暗の条件で飼育した。'さんさ' での孵化は 9 月 19 ~ 20 日、'ふじ' では 11 月 19 日であった。幼虫の孵化後、'さんさ' 8 果については 5 日の間隔で約 3 週間にわたって、'ふじ' 4 果については 3 週間目に MRI による撮像を行った。

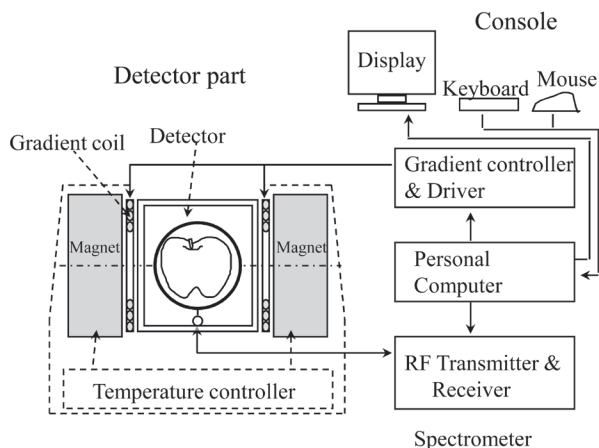


図1. MRI システムのブロックダイアグラム。左部：検出部、磁場強度 0.2 T 永久磁石、磁場勾配コイルおよびラジオ波 (RF) 磁気遮蔽ハウジングを備えた検出器、磁石には温度調節装置が装備されている。右下部：MRI 分光器、ラジオ波送受信器、磁場勾配制御器、ドライバー (三軸磁場勾配電源)、パーソナルコンピュータによる制御器。右上部：コンソールディスプレイ、キーボード、マウス。システムは WindowsXP で制御されている。

Fig. 1 Block diagram of the MRI system. Left: Detector module composed of a 0.2-T permanent magnet, gradient coils and a detector coils in a radio-frequency noise seal housing. The magnet is equipped with temperature controller. Right bottom: An MRI spectrometer unit contained a radio-frequency transmitter-receiver, a core personal computer and a gradient controller and driver. Right top: A console unit with a display, a key-board, and a mouse. These are operated by WindowsXP.

MRI装置

MRI は、試料の局所における NMR (核磁気共鳴) 信号を部位別に検出して、検出位置に合わせて配置することによって画像を得る。信号強度は、その部位に存在するプロトン (水素原子核) の密度とプロトンを含む化合物分子 (生体では主として水と油脂) の運動性によって決まるので、得られた画像は自ずとプロトンの状態に差異がある内部組織の形態的構造を表す。

撮像に使用した 0.2 T 小型 MRI は、直径 110 mm までの試料を測定することを目的に (株) エム・アール・テクノロジーで開発中の装置である。装置のブロックダイアグラムを Fig. 1 に、写真を Fig. 2 に示す。装置は、磁石、磁場勾配コイルおよびラジオ波 (RF) 検出コイルを持つ検出部 (Fig. 1、左)、磁場勾配制御器、ドライバー (三軸磁場勾配電源)、RF 送受信器とそれらをコントロールするパーソナルコンピュータによる分光器 (Fig. 1、右下)、装置と撮像の操作を行うコンソールのディスプレイ、

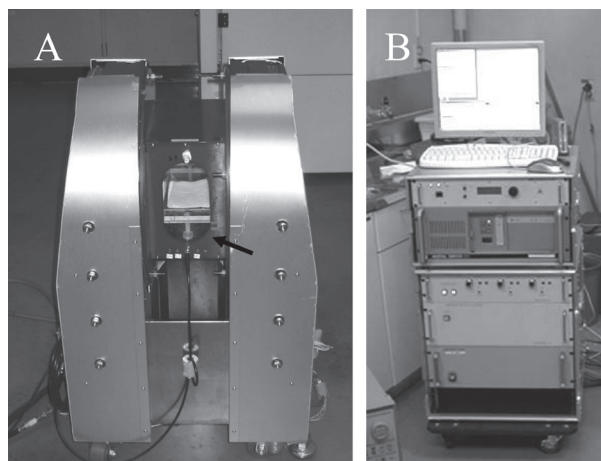


図2. 0.2 T 永久磁石 (A) と MRI 分光器 (B)。検出器 (A、矢印) を装着した磁場強度 0.2 T の永久磁石 (A)。磁極間隙は 160 mm。検出器は Fig. 3A に示す他の検出器に換装できる。

Fig. 2 0.2-T permanent magnet (A) and MRI spectrometer (B). A permanent magnet of 0.2-T field strength (A) equipped with radio-frequency probe (A, indicated by an arrow). The gap between poles is 160 mm. The probe can be changed with another probe shown in Fig. 3A.

キーボードおよびマウス (Fig. 1、右上) で構成されている。Fig. 2A は検出部を構成する磁場強度 0.2 T、磁極間隙 160 mm の永久磁石であり、サイズは幅 50 cm、奥行き 50 cm、高さ 75 cm、重量約 500 kg、温度調節器が装備され磁石の温度は一定 (29°C) に保たれる。Fig. 2A (矢印) は目的に合わせて換装される検出器である。Fig. 2B は MRI 分光器で、サイズは幅 60 cm、奥行き 60 cm、高さ 80 cm、重量 100 kg である。装置は ¹H (プロトン) の専用で、共鳴周波数は 8.96 MHz である。装置は WindowsXP 上で稼働するプログラムにより制御され、撮像操作および撮像画像は分光器天板上のディスプレイで確認できる。

検出器と撮像

検出器は、任意の径と形状のコイルに換装することができる。本研究では 'ふじ' については内径 110 mm、軸長 75 mm の円形ソレノイドコイル検出器 (Fig. 3A) を、'さんざ' では短径 90 mm、長径 165 mm、軸長 220 mm の楕円ソレノイドコイル検出器 (Fig. 3B) を用いた。前者はシグナル対ノイズ (S/N) 比の高い画像を得るため、Hoult and Richards (1976) に従いコイルの軸長を短くした高感度検出器であり、コイル軸と平行になる撮像断層で画像の左右端の信号強度が弱くなる性質を持つ。後者は、全体に均一な信号強度を示す検出器であるが、画像の輪郭は鮮明性に欠ける。

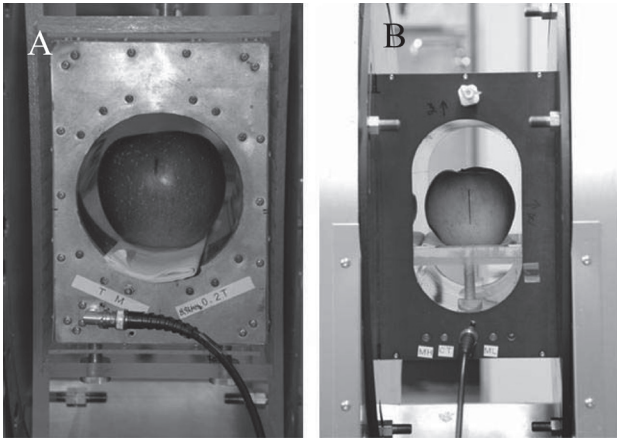


図3. 撮像に使用された検出器。それぞれ専用のラジオ波遮蔽ハウジングを備えた直径110 mmの高感度ソレノイド検出器(A)と短径90 mmの楕円型ソレノイド検出器(B)。

Fig. 3 The radio-frequency probes used for the measurements. A sensitive circular solenoid radio-frequency probe (A) with 110 mm in diameter, and an 90 mm ellipsoidal solenoid radio-frequency probe (B). The both have each specified cover-housing against external radio-frequency noises.

‘ふじ’は三次元スピネコー法によって、TR (repetition time) = 0.3 s、TE (echo time) = 21 ms、 $256 \times 128 \times 64$ マトリックス、積算2回の条件で撮像し、 $256 \times 256 \times 256$ マトリックスで画像を構築した。画像分解能は $(470 \mu\text{m})^3$ 、一果実の撮像に要した時間は82分であった。撮像視野(FOV)は120 mmに設定し、磁場勾配の読み出し(read; Gx)は4.9 mT/m、位相エンコード(phase; Gy)は最大8.4 mT/m、第二位相エンコード(phase; Gz)は最大8.4 mT/mである。

‘さんざ’は三次元グラディエントエコー法によって、TR = 0.1 s、TE = 5 ms、 $128 \times 128 \times 64$ マトリックス、フリップ角を 30° に設定、積算2回の条件で撮像し、 $128 \times 128 \times 128$ マトリックスで画像を構築した。画像分解能は $(860 \mu\text{m})^3$ 、一撮像に要した時間は27分であった。FOVは110 mmに設定し、Gxは5.3 mT/m、GyおよびGzは最大9.6 mT/mである。

結果

スピネコー法による‘ふじ’果実内の食害孔および幼虫の観察

撮像した‘ふじ’4果のうち、異なる状態で幼虫が捉えられた2果のリングの画像をFig. 4に示す。Fig. 4Aは典型的な食害が認められた果実の食害孔を通る断面写真、

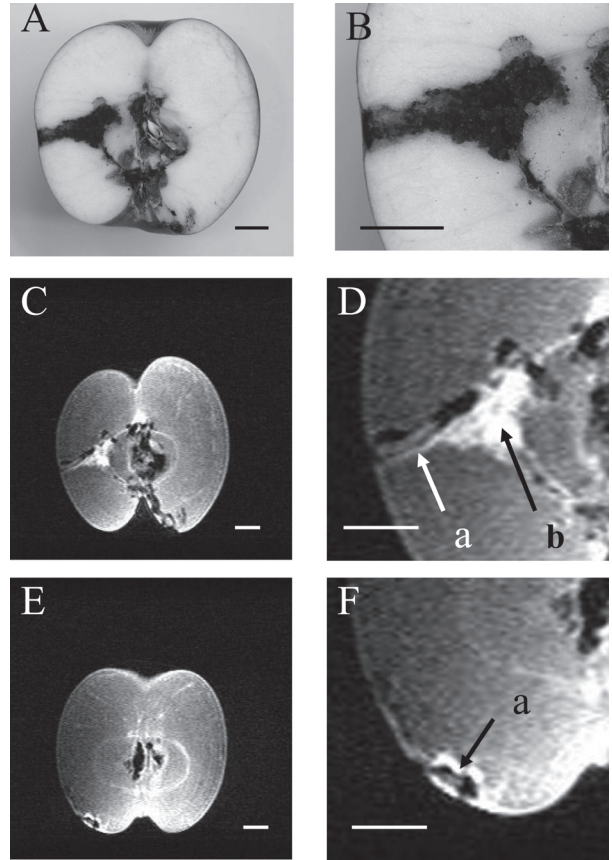


図4. 径110 mmの高感度検出器を用いて三次元スピネコー法により撮像した‘ふじ’リンゴの食害孔と幼虫。食害を受けた‘ふじ’の切断面写真(A)と3倍拡大写真(B)。食害を示すMRI断層画像(C)とC画像を3倍拡大した画像(D)における幼虫(a)と蓄積された虫糞(b)。別の‘ふじ’果実において幼虫が見出された断層画像(E)とE画像を3倍拡大した幼虫(F)。

Fig. 4 Larvae in the infested holes in ‘Fuji’ apples measured by the 3D spin-echo method using the 110 mm circular radio-frequency probe. A and B show the photographs of the cut face of an ‘Fuji’ apple fruit. C shows a sectional image showing the infestation of the apple and D, a full length larva (a) and accumulated excreta (b) in the 3-times magnified image of C. E shows an MR image of another fruit showing infesting larva at the bottom, and F, a larva (a) in the 3-times magnified image of E. Spatial resolution was $(470 \mu\text{m})^3$. Scale bar is 10 mm.

Fig. 4Bは食害孔部位の拡大写真であり、それぞれFig. 4CおよびFig. 4DのMRIによる撮像断層画像に対応する。この果実では、撮像日に食害孔の果実表皮付近に外部へ通じる穴が開き、その開口部の内側に幼虫が数条の糸を渡していることを肉眼にて確認できた。Fig. 4Cは、穴と果実中心を結ぶ線と平行に断層を作るように撮像された256枚のうちの120枚目の果実中央付近における断層画

像で、果実の左側にかかなり大きな食害が認められた。果実は、先ず果心維管束に沿って食害され、それから表皮に向かって果肉組織が食害された。さらに、画像を3倍に拡大すると食害孔の表皮近くに幼虫の全身が明瞭に捉えられた (Fig. 4D, a)。幼虫の体長は9 mm、体幅は1.5 mmである。果心維管束と接して認められる強い白い信号 (Fig. 4D, b) は、虫糞である。虫糞は水分が多く、軟質で空気孔隙が少なく、かつ、水の運動性が低く緩和時間が比較的短いので強い信号を与える。

上記の画像は、幼虫が真っ直ぐな位置に存在した典型的な例である。Fig. 4Eに、別の果実で三次元撮像した256枚のうちの115枚目の断層画像で幼虫が発見された食害孔を示す。Fig. 4Fは、Fig. 4Eを3倍に拡大したものである。食害孔に、強い信号を示す虫糞に挟まれて幼虫が認められた (Fig. 4F, a)。この時点では果実外へ通じる穴は無かったが、肉眼で透けた表皮の内側で動く幼虫が確認された。

一般には、撮像画像において、Fig. 4Dのように撮像断層と食害組織や幼虫は平行にならない (Fig. 4E)。脱出のために表皮付近に出てきたステージの幼虫でも、一断層画像にはFig. 4Fのように幼虫の一部だけが捉えられ、全身が確認できることは希である。幼虫を検出するためには、撮像データに対して適切な画像回転処理を施し、幼虫を断層面と平行にする必要がある。これらの画像 (Fig. 4D および F) で捉えられた幼虫は、画像マトリックスを $128 \times 128 \times 128$ (分解能 $(860 \mu\text{m})^3$) にすると周辺の食害孔の壁面と重なり識別し難くなった。一方、高分解能画像 (分解能 $(470 \mu\text{m})^3$) においても、回転処理が画質を低下させ、幼虫の発見を妨げる場合がある。

グラディエントエコー法による‘さんざ’果実内の食害組織の観察

‘さんざ’における孵化は9月19～20日であったが、撮像した8果のうち2果では9月22日の撮像においてかなりの食害を受けていたことから、自然産卵幼虫が食入した結果であると考えられる。2果は、果実の表面付近に小さな食害孔を残すのみで食害の拡大が認められなかった。1果については果柄脇の大きな組織の欠落と果心の食害は認められたが、果肉の食害は観察できなかった。残る3果に関しては、実体顕微鏡観察による孵化の確認後約一週間で食害が認められ、その後一週間から10日程度で外部に通じる孔が形成された。‘さんざ’の撮像においては、三次元グラディエントエコー法 (Haase et al. 1986) を採用することにより、短時間で食害孔を検出す

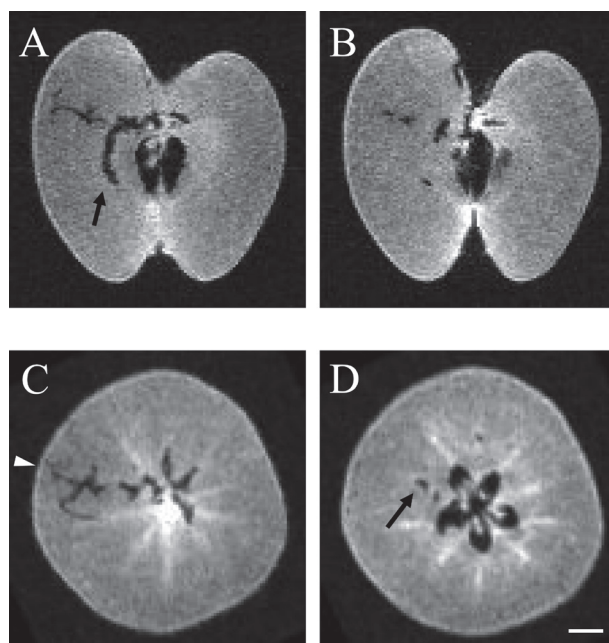


図5. 短径90 mmの楕円検出器を用い三次元グラディエントエコー法によって撮像した‘さんざ’の食害。Aは128縦断層画像の69～72枚目の最小信号強度 (mip) 投影画像 (横断層画像Cにおける白三角の位置に対応)、Bは66～69枚目。Cは128横断層画像の42～47枚目の mip 投影画像、Dは54～59枚目。

Fig. 5 Infestation in a ‘Sansa’ apple observed by the 3D gradient-echo method using the 90 mm ellipsoidal solenoid radio-frequency probe. A is the minimum intensity projection (mip) image of vertical sections from 69th to 72nd in the 128 slices (the position of which are indicated by triangle on a horizontal section, C) and B, from 66th to 69th. C is the mip image of horizontal sections from 42nd to 47th in the 128 slices and D, from 54th to 59th. Spatial resolution was $(860 \mu\text{m})^3$. Scale bar is 10 mm.

ることができた。測定時間を短縮したために、画像は若干鋭さに欠け、分解能を高くしても幼虫は明瞭には確認できなかった。

Fig. 5は、人工的に接卵、孵化した幼虫により食害が進んだ果実について、中央付近の連続した数枚の断層画像を基に mip (最小信号強度投影法) で表した画像で、縦断面 (Fig. 5A: 69-72/128の断層面、B: 66-69/128断層面) は、横断層画像 (Fig. 5C) に白三角で示した食害孔に対して直角方向へ画像を回転したものである。Fig. 5Cは、心皮の直上部 (42-47/128断層面)、Dは果実中央付近で種子を通る位置 (54-59/128断層面) の横断面の mip 画像である。mip 画像は、食害孔のように信号源が欠落した部位を投影して明瞭に示す方法である。画像の食害孔の分布を基にすると、幼虫は果実の側面から表皮下に侵入

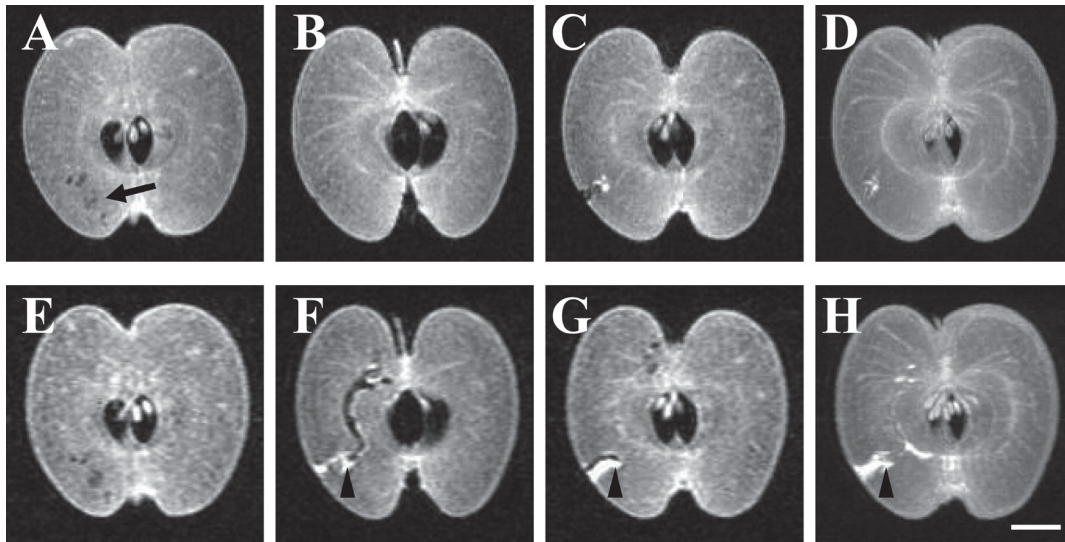


図 6. 短径 90 mm の楕円検出器により三次元グラディエントエコー法で撮像した 'sansa' の 5 日間における食害の拡大。A-D は 9 月 22 日に、E-H はそれから 5 日後に撮像した。A、B、C はそれぞれ 128 枚中の 71、65、61 枚目の断層画像、D は 56-70 枚目の断層画像の最大信号投影 (MIP) 画像である。E、F、G はそれぞれ 72、65、62 枚目の断層画像、H は 58-72 枚目の MIP 画像である。

Fig. 6 Marks of infestation in a 'Sansa' apple expanding during 5 days observed by the 3D gradient-echo method using the 90 mm ellipsoidal solenoid radio-frequency probe. The top images (A-D) were measured on September 22 and the bottom images (E-H) after more 5 days. A, B and C are the 71st, 65th and 61th sections in the 128 slices. D is the maximum intensity projection (MIP) image from 56th to 70th. E, F and G are the 72nd, 65th and 62nd sections in the 128 slices. H is MIP image from 58th to 72nd. Spatial resolution was (860 μm)³. Scale bar is 20 mm.

し、しばらく表皮下の組織を食害した後に果実中心に向かい、果心周辺を維管束に沿って食害した (Fig. 5A)。その後、果実上方に移動し、果柄左脇で外へ通じる穴を開けた (Fig. 5B) と推定できる。縦断面では、幼虫は果心の維管束に沿って食害したことが明瞭に捉えられた (Fig. 5A、矢印) が、横断面では、維管束周辺の食害は比較的狭い孔を形成しただけであった (Fig. 5D、矢印)。

Fig. 6 および Fig. 7 では、幼虫の食入が認められた同一果実について、5 日の間隔をおいて撮像した画像の食害孔変化を示した。Fig. 6 上段 (A-C) は 9 月 22 日における縦断層画像 (71, 65, 61 枚目)、Fig. 6 下段 (E-G) はその 5 日後に撮像した縦断層画像 (72, 65, 62 枚目) である。人工的に接卵した幼虫の孵化は 9 月 19 ~ 20 日であるから、この果実は自然食入を受けたと考えられる。Fig. 6D は、9 月 22 日の撮像結果の 56 枚目から 70 枚目の断層画像を、Fig. 6H は、5 日後の撮像結果の 58 枚目から 72 枚目の断層画像を、それぞれ MIP (最大信号強度投影) 法で表現した画像である。前の撮像においてわずかであった食害は、5 日の間に著しく進んだことがわかる。断層画像 (Fig. 6A-C, E-G) を基に考察すると、幼虫は果萼脇

から果実に侵入し (Fig. 6B)、果実左下方の外側に移動しながら (Fig. 6A、矢印)、果肉組織を食害した (Fig. 6C)。その後の 5 日間で果実左外側組織の食害を拡大し (Fig. 6E)、次に果実の内側に向かって侵入し、果心維管束周辺を食害しながら果柄方向に昇り (Fig. 6F)、果柄脇に外へ通じる穴をあけた (Fig. 6G) と推定される。幼虫が果実外へ脱出したか否かは明らかでない。著しい食害を受けた部位には強い信号を与える糞が集積した (Fig. 6F-H、三角)。糞のように強い信号を示す部位を投影して強調する表示法である MIP 画像では、果実左下方外側の食害部位に虫糞が集積している (Fig. 6D) こと、また、後の撮像日には虫糞が多くなり (Fig. 6H)、果心維管束に沿って虫糞が点在していることがわかる。

Fig. 7 は、人工的に接卵、孵化した幼虫の食害が認められた他の果実の画像である。Fig. 7 上段 A および B は、孵化 11 日後における横断面、C および D は縦断面である。下段の Fig. 7E および F は、さらに 5 日後における横断面、G および H は縦断面である。横断面の位置は、縦断面における果実下部の果萼上 (Fig. 7D、三角 c) と果実中央の種子がある内腔 (Fig. 7D、三角 d) 付近である。

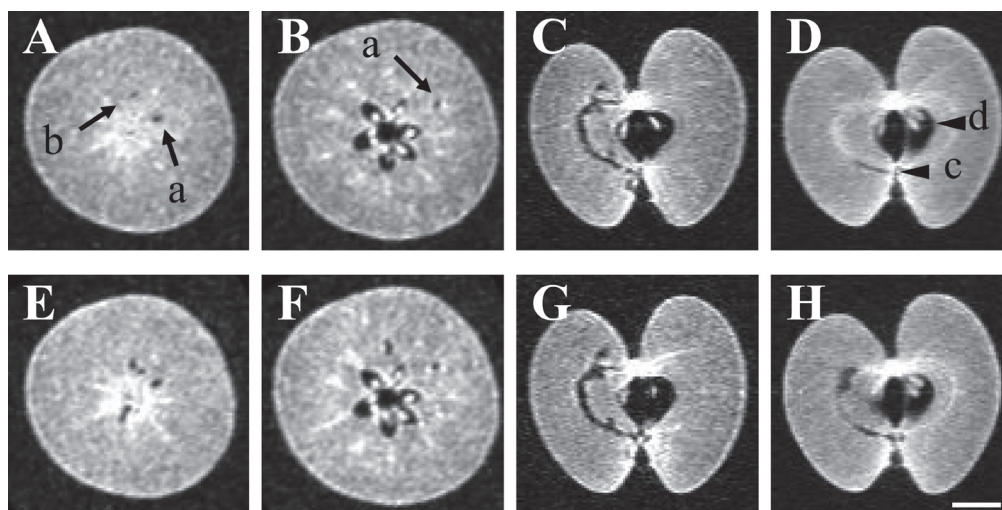


図 7. 短径 90 mm の楕円検出器を用いてグラディエントエコー法によって撮像した 'さんざ' の果心維管束に沿った食害の 5 日間における拡大。A-D は幼虫が孵化して 11 日後に、E-H はそれから 5 日後に撮像した。A は 128 枚中の 79 枚目 (D 画像の c の位置)、B は 62 枚目 (D 画像の d の位置) の横断層画像。C は a の食害孔を、D は b の食害孔を、直角方向から観た縦断層画像。E は 128 枚中の 79 枚目、F は 62 枚目の横断層画像。G は a の食害孔を、H は b の食害孔を、直角方向から観た縦断層画像。縦断層画像は適切に回転の画像処理が施されている。

Fig. 7 Increase of infestation along the vasculature around core of a 'Sansa' apple during 5 days observed by the 3D gradient-echo method using the 90 mm ellipsoidal solenoid radio-frequency probe. A-D were measured 11 days after hatching of larvae and E-H after more 5 days. A and B are horizontal sections of 79th (sliced position indicated as c in image D) and 62nd (sliced position indicated as d in image D) in 128 slices. C is the vertical sections showing the infested hole denoted a, and D is the image showing the infested hole denoted b, observed from rectangular direction. E and F are horizontal sections of 79th (sliced position indicated as c in image D) and 62nd (sliced position indicated as d in image D) in 128 slices. G is the vertical sections showing the infested hole denoted a, and H is the image showing the infested hole denoted b, observed from rectangular direction. The vertical images were suitably processed in rotation. Spatial resolution was (860 μm)³. Scale bar is 20 mm.

縦断面の Fig. 7C および G は食害孔 a (Fig. 7A, 矢印 a)、Fig. 7D および H は食害孔 b (Fig. 7A, 矢印 b) と果実の中心を結ぶ線に対して直角方向から見るように回転させた画像である。まず、横断面において、前の撮像では、食害孔 a は果萼部 (Fig. 7A) でも果実中央 (Fig. 7B) でも認められたが、食害孔 b は果萼部 (Fig. 7A) においてかすかに認められたにすぎない。後の撮像 (Fig. 7E および F) では、食害孔 a および食害孔 b の双方が明瞭に認められた。縦断面を見ると、食害孔 a は前の撮像 (Fig. 7C) でも後の撮像 (Fig. 7G) でもほとんど変化が認められないが、食害孔 b は 5 日の間に果心維管束に沿って拡大した (Fig. 7H)。幼虫が果心の維管束 (花弁維管束) に沿って食害することは、食害孔が確認できた 'さんざ' 6 果のうち 4 果で、また、'ふじ' 3 果のうち 2 果で認められた。幼虫の脱出の方向は、'さんざ' では果柄脇の場合が多かったが、'ふじ' では果実側面から脱出する傾向を示した。

考 察

MRI によって、昆虫の動態 (Callaghan 1991; Hart et al. 2003) や果実組織の内部変化を非破壊的に観察できる (Chudek and Hunter 1997; Faust et al. 1997; Koizumi et al. 2000) ことは良く知られている。井原ほか (2008) は、1 T 小型 MRI により、着果直後の外径 30 mm より小さなリンゴ幼果に食入したモモシクイガ幼虫、食害孔および食害により集積された虫糞など、食害状況を可視化した。しかし、越冬した蛹の羽化、産卵により孵化した幼虫の食入が活発になるのは、果実の生育がより進んだ 5 月下旬からであり (成田 1986)、非越冬蛹の羽化、産卵はさらに果実が成熟した 7 月下旬から 9 月初旬に起こる。このためモモシクイガの生態的調査に供するためには、0.2 T 小型 MRI を用いて、サイズが大きな果実に食入した幼虫の行動観測が必要になる。

幼虫は短い紐状の形態によってのみ、周辺の組織から識別される。その上、身体を曲げたり移動したりするために、通常の楕円検出器 (Fig. 3B) では、径約 100 mm の果実に食入した幼虫を確実に発見するのは困難であった。高感度ソレノイドコイル検出器 (Fig. 3A) では、コイル長を短くしたことでラジオ波が果実全体に均一に照射されなくなり、撮像された画像は、検出コイルの軸方向において中央が明るく両端が暗く信号強度分布が不均一になった (Fig. 4C および E)。しかし、幼虫の検出に目的を限定すれば、画素強度の不均一性は許容できる水準にあると考えられる。高感度ソレノイドコイル検出器を用いた三次元スピンエコー法により、75%の確率で終齢幼虫を発見できた。

確認された孵化後約三週間の幼虫の体長は 9 mm、体幅は 1.5 mm であった (Fig. 4D)。終齢幼虫は体長約 12 mm、体幅 2 mm 程度まで成長する (成田 1986) ことを考慮すると、幼虫を可視化するためには、画像分解能は最も低い場合で $(470 \mu\text{m})^3$ ($256 \times 256 \times 256$ マトリックス) (Fig. 4D および F)、一般には、それ以上 (小さな値) に設定する必要がある。それでも、体幅が 1 mm に達するまでの 1~3 齢幼虫 (成田 1986) の可視化は困難である。また、同一の MRI 装置を使用する場合は、分解能を高くするほど、位相エンコード数が増加することに加えて、画素サイズが小さくなり、信号強度が弱くなるため、信号積算が必要となり撮像時間は著しく長く (分解能 $(470 \mu\text{m})^3$ において最短で 82 分) なる。よって、幼虫が大きく場所を移動した場合は検出されないと推定される。このように、本研究で使用したような撮像視野が広い故に分解能が高くない (一般的に FOV の辺を 256 画素で割った値が、実用上の最良の分解能となる) MRI で、果実全体の食害状況とそこに食入した初期齢の幼虫を同時に観測することは難しい。しかし、収穫果実内の幼虫の所在は不確定であるから、0.2 T 小型 MRI によって食害が進行している部位を特定した上で試料調製をし、光学顕微鏡、1 T 小型 MRI あるいは高分解能 NMR 顕微鏡のような分解能が高い手法を使用することで、初めて幼虫の実態的な行動を効率的に観察できると考えられる。

撮像視野に対して均一な信号が得られる楕円検出器 (Fig. 3B) により、グラディエントエコー法で撮像した三次元画像 (分解能 $(860 \mu\text{m})^3$) から作成した断層画像では、‘さんざ’におけるモモシクイガ幼虫の食入初期の食害孔 (Fig. 6A および E) が検出され、果実内部の食害拡大の経過 (Figs. 5-7) が確認できた。幼虫は果心維管束および周辺の組織を食害し、果柄脇から外部へ脱出し

たと推定される。‘ふじ’については、幼虫脱出の位置は果実側面中央付近 (Fig. 4A および B) であり、‘さんざ’とは異なるが、果心の維管束に沿って組織を食害する傾向は同じであった。幼果における幼虫の観察 (井原ほか 2008) では、果実全体が無作為な食害を受けたが、本研究における収穫果では、幼虫の成長に要する摂食量に対して果実が大きいため、虫が好んで食害する組織が明らかになった。収穫期のリンゴ果実では、果心維管束 (花弁維管束) の篩管および周辺細胞には高い濃度で可溶性糖が集積する。幼虫の生育のために栄養的に都合が良い可溶性糖に富んでいることが、果心の維管束周辺が食害を受けやすい原因の一つであると考えられる。しかし、リンゴ果実の栄養状態、生育ステージおよび品種はモモシクイガの生育に影響を与える (Ishiguri and Toyoshima 2006) ことから、食害の傾向とリンゴ品種相互の関係の MRI による解明は今後の研究課題であると考えられる。

撮像時間が短いグラディエントエコー法は、多数の果実の食害の変化を調査する場合には有効な撮像法であり、孵化から果実脱出までおよそ 3 週間かかる幼虫の成長期間に対して充分に対応できる時間分解能で観測できる。また、MRI は、撮像に必要なラジオ波のエネルギーが生体を損傷しない程度に弱いので、同一の試料に対して適切な時間間隔で繰り返し撮像することができる (Fig. 6 および Fig. 7)。このことから、MRI としては画期的に軽量で操作および保守が簡単、そして、何処にでも設置できる 0.2 T 小型 MRI とグラディエントエコー法による食害孔の拡大の観測は、幼虫が果実に何処から食入し、どのように移動し、どの部位を食害し、どれだけの速さで食害を拡大し、何処から果実を脱出するかという果実内における生態学的行動パターンを *in situ* で連続的に観察するためのユニークな手段となる。また、0.2 T 小型 MRI の検出部 (Fig. 1、左) は開放型 (Fig. 2A) であることから、目的に合った形状の検出器を換装すれば、これまで不可能とされてきた母樹に着生したままの果実におけるモモシクイガの食入行動についての解明にも糸口を与えると考えられる。

原理的に、1 T 小型 MRI 装置に比べて画像分解能が低い 0.2 T 小型 MRI では、モモシクイガによる初期の食害や幼虫の観測は不可能であると考えられていた。しかし、感度の良い検出器を用い、適切な撮像時間をかけることにより、モモシクイガの終齢幼虫を可視化できること、さらに、食害孔の拡大や虫糞の集積はより短い撮像時間で観測できることが明らかとなった。よって、0.2 T 小型 MRI は幼虫の生態学的研究や害虫防除の研究に新

しい手法を提供すると考えられる。

永久磁石を用いた小型 MRI は、卓上電源 (100V 15A) 仕様、メンテナンスフリー、随時シャットダウン可、かつ、移動可能であり、従来の MRI に比べて格段に低い経費で製作できる。三次元撮像による観測においては、初期の食害孔を正確に可視化できる (Fig. 6B および 7D)。しかし、検疫に使用できる食害果選別機を実用化するためには、一果実の検査時間を数秒にまで短縮する必要があり、三次元撮像法は適切な方法とはいえない。可能性がある解決の方法として、高速撮像法により数秒で数枚の二次元画像が得られるマルチ断層撮像法の開発を行っている (拝師ほか 未発表) が、今後、果実全体に立体的に起こる食害を見落とすことなく検出するための論理の構築が必要である。

磁石のサイズを観測対象に合わせて製作すれば、永久磁石の小型 MRI 装置は、多くの果実および果菜への応用 (Koizumi et al. 2008) が可能である。また、母樹についたナシ果実を野外において撮像できる (木村ほか 未発表) が、装置を圃場へ搬送するために磁石重量を減ずることが必至であり、結果として、さらに低い静磁場強度の磁石を用いて必要とされる感度を確保するという課題を解決しなければならないなど、観測対象の性質と目的に応じて固有の問題を解決する必要がある。

謝 辞

本論文をまとめるに当たり、貴重なご意見とアドバイスを頂いた日本生態学会誌の校閲者の方々に感謝致します。

引用文献

- Barreiro P, Ruiz-Cabello J, Fernández-Valle ME, Ortiz C, Ruiz-Altisent M (1999) Mealiness assessment in apples using MRI techniques. *Magn Reson Imaging* 17:275-281
- Callaghan PT (1991) Principles of nuclear magnetic resonance microscopy. Clarendon Press, Oxford
- Chudek JA, Hunter G (1997) Magnetic resonance imaging of plants. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 31:43-62
- Chudek JA, Hunter G, Mackay RL, Moritz S, Birch ANE, Geoghegan IE, McNicol RJ, Majerus MEN (1998) MRM, an alternative approach to the study of host/parasitoid relationships in insects. In: Spatially resolved magnetic resonance; methods, materials, medicine, biology, rheology, geology, ecology, hardware. Blümler P, Blümich B, Botto R, Fukushima E (eds) WILEY-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, pp 467-471
- Clark CJ, MacFall JS, Bielecki RL (1998) Loss of watercore from 'Fuji' apple observed by magnetic resonance imaging. *Sci Hort C* 73:213-227
- Faust M, Wang PC, Maas J (1997) The use of magnetic resonance imaging in plant science. *Hort Rev* 20:225-266
- Goodman BA, Gordon SC, Chudek JA, Hunter G, Woodford JAT (1995) Nuclear magnetic resonance microscopy as a non-invasive tool to study the development of lepidopteran pupae. *J Insect Physiol* 41:419-424
- Haase A, Frahm J, Matthaei D, Hänicke W, Merboldt K-D (1986) FLASH imaging. Rapid NMR imaging using low flip-angle pulses. *J Magn Reson* 67:258-266
- Hart AG, Bowtell RW, Köckenberger W, Wenseleers T, Ratnieks FLW (2003) Magnetic resonance imaging in entomology: a critical review. *J Insect Sci* 3:5:1-9, available online: insectscience.org/3.5
- Hoult DI, Richards RE (1976) The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment. *J Magn Reson* 24:71-85
- 井原史雄・柳沼勝彦・石田信昭・小泉美香 (2008) 小型磁気共鳴イメージング装置 (MRI) によるリンゴ幼果に食入したモモシクイガ幼虫の検出. *日本応用動物昆虫学会誌* 52:123-128
- Ishiguri Y, Toyoshima S (2006) Larval survival and development of the peach fruit moth, *Carposina sasakii* (Lepidoptera: Carposinidae), in picked and unpicked apple fruits. *Appl Entomol Zool* 41:685-690
- 梶野洋一・中尾弘志 (1978) モモシクイガの生態に関する研究II. 産卵の果樹種間およびリンゴ品種間差異. *北海道農業試験場集報* 39:75-80
- Koizumi M, Ishida N, Kano H (2000) Postharvest fruits and MRI. *Current Topics Plant Biol* 2:1-20
- Koizumi M, Naito S, Ishida N, Haishi T, Kano H (2008) A dedicated MRI for food science and agriculture. *Food Sci Technol Res* 14:74-82
- McCarthy MJ, Zion B, Chen P, Ablett S, Darke AH, Lillford PJ (1995) Diamagnetic susceptibility changes in apple tissue after bruising. *J Sci Food Agric* 67:13-20
- 成田 弘 (1986) モモシクイガ (*Carposina niponensis* Walsingham) の生態と防除に関する研究. *秋田県果樹試験場研究報告* 17:31-128
- Toyoshima S, Nakamoto Y, Takanashi M, Masuda T (2006) An experiment to detect apples infested by the peach fruit moth, *Carposina sasakii* Matsumura (Lepidoptera: Carposinidae), using near-infrared spectroscopy. *Bull Natl Inst Fruit Tree Sci* 5:87-94
- Wang SY, Wang PC, Faust M (1988) Non-destructive detection of watercore in apple with nuclear magnetic resonance imaging. *Sci Hort* 35:227-234
- Wecker S, Hörschemeyer T, Hoehn M (2002) Investigation of insect morphology by MRI: Assessment of spatial and temporal resolution. *Magn Reson Imaging* 20:105-111

