

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 5月 8日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15535

研究課題名(和文) 拡散テンソルイメージング法を応用したヒト心筋の形成と走行の解析

研究課題名(英文) Myocardial fiber formation in the human fetus detected by diffusion tensor imaging

研究代表者

高桑 徹也 (Takakuwa, Tetsuya)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：40244933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胎児期における左室の心筋線維についてin vivo, in vitroの標本を用いMRI撮像を行って検討した。前壁・下壁では内膜側から外膜側、中隔では内膜側から右室側にかけて、心筋線維が横断面となす角度はなだらかに変化した。これは成人における変化と同様である。内膜側と外膜側のHelix angleの差は、CRLが大きくなるに従い前壁では88から107°と大きくなり、成人の値(120°)に近づいた。一方、下壁では106-112とほぼ一定で、成人の値より若干小さかった。CRL100mm未満の個体についての心筋走行を検知しえた報告はこれまでなく、本研究の成果は極めて重要である。

研究成果の概要(英文)：Histologic examination shows that myocardial fibers gradually change direction from endocardium to epicardium in adults. Little is known about the developmental process of such structures in the human fetus. The present study aimed to determine the development of myocardial structure with DTI using a 7T magnetic resonance imaging (MRI) system. Six fetal in vitro heart samples (CRL 71-160 mm) as well as 4 in vivo samples (CRL 50-90 mm) were obtained from the Congenital Anomaly Research Center, Kyoto University. The orientation of myocardial fibers in 12 regions in the anterior and inferior walls of the left ventricle and septum was analyzed. The helix angle, which indicates the orientation of the myofibers to the horizontal plane at each point, gradually increased from the endocardium to the epicardium in all 12 regions examined. The present data indicate that myocardial fiber formation in the left ventricle in the late first-trimester fetus is similar to that observed in adults.

研究分野：胎児医学

キーワード：ヒト胎児 心臓 心筋走行 MRI DTI

1. 研究開始当初の背景

ヒトの心臓発生は、受精後3週ころに胸部に原始心筒が生成され、心拍が開始する。心臓は心筒のルーピング、回転、心室、心内膜症の形成、流出路、中隔形成、大血管の整列、静脈系、心房の発生、刺激伝導系の形成、冠動脈の形成等、重要な発生過程毎に解剖学的解析が積極的に行われている。発生過程の異常は先天性、後天性心疾患の原因となり解析する価値が高い。

心臓は、発生初期を除き在胎内をふくめ一生動き続ける、生理的・機能的器官である。心臓の発生を理解するためには、形態解剖に加え、発生各ステージでの心筋の発生・発達や、心筋の走行を知ることが重要であると考える。これらは、心臓収縮時の力学的特性(方向、強さ)の他、流路の流体力学的形状、冠動脈の血流支配、刺激伝導系の特性、心臓そのものの強度等、心臓の本質的機能と関わるからであるが、ヒト発生時の心筋走行についての立体的な解析は、これまで十分になされていない。

近年、MRI等の撮像技術は飛躍的に進歩し、標本を非破壊的に高解像度の立体情報を得ることが可能になっている。われわれは、ヒト胚子標本のT1強調像の高解像度のMRI画像取得を行い、ヒト器官形成期(約5-10週)における諸器官の立体的形態の記述と計測を中心にデータを蓄積し成果をあげてきた。MRIは、立体情報を得るだけでなく物質の配向性を知ることでも可能である。拡散テンソルイメージング法(DTI)を用いた脳神経の走行の解析はすでに臨床応用されているが、同手法は一部実験動物で示されているように筋肉等の配向性の有る物質に応用可能である。上述の胚子撮像時に、心筋についての配向性の情報を得ることは原理的に応用可能と考えられる。

以上の背景から、応募者らは本研究に必要な十分なヒト胚子標本とMRI技術を保有していると考え、今回の研究を開始した。

2. 研究の目的

ヒト成人の心筋は、筋線維が整然と織り込まれて形成されている¹⁾。ヒト成人におけるHelix angleは、心内膜から心外膜にかけて徐々に変化し、内膜側と外膜側の差は120°である²⁾。このような心筋の構造はどのように形成されるのかを知るために、ヒト胎児の心臓を用いて高解像度のMRI撮像を行い、以下の2点について検討することとした。

心筋線維の方向は領域ごとにどのような特徴があるか

心筋線維の方向は内膜側と外膜側でどのように変化するか

Helix angle; 心筋線維が心臓の横断面となす角度(Helix angle)は、心筋構造を解析する

にあたり用いられる指標である。「固有ベクトルをtangent planeに投影したベクトルと、横断面がなす角度」と定義されている(図1)。

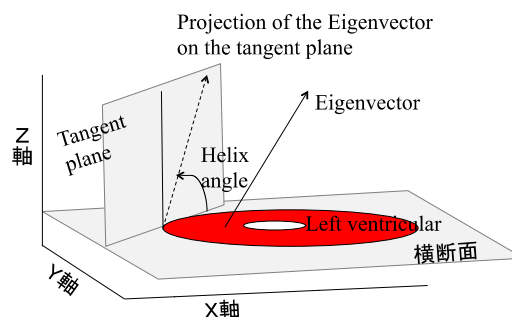


図1 Helix angleの定義

Helix angle(degree)		心筋線維走行
内膜側	外膜側	
45	45	
0	0	
-45	45	

図2 Helix angleと心筋線維走行の関係の例

3. 研究の方法

標本撮像の対象。

京都大学大学院附属先天異常標本解析センターが保有するヒト正常胎児標本6例(CRL: 71~160mm)の摘出心臓を高解像度MRIで撮像したもの

方法

・解析領域の選定

17セグメントモデル³⁾を参考に、4断面(心基部・中層上部・中層下部・心尖部)と3区画(前壁・下壁・中隔)の計12領域を選定した(図3)。

・各領域での解析

内膜側から外膜側にかけて、100μmごとにHelix angleを解析した。

各領域につき10~20箇所を解析した(図4)。

・解析に用いたソフトウェア

立体像構築: 3次元画像解析ソフトウェア Amira(5.5.0; Visage Imaging; ドイツ)
領域選定と解析: MATLAB(R2016a; MathWorks; アメリカ)

4. 研究成果

結果 心臓の形態学的観察

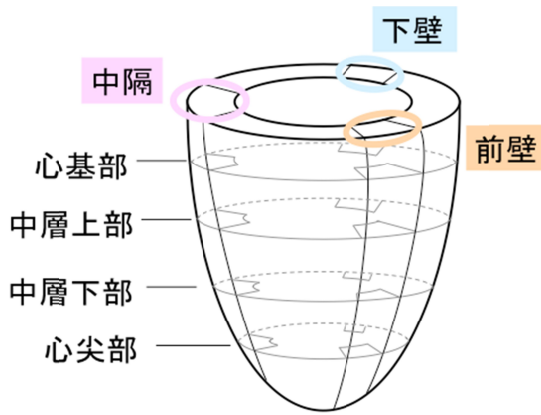


図3 解析領域の選定

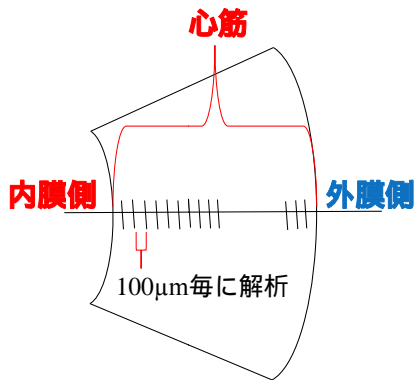


図4 各領域での解析

標本番号	CRL (mm)	長軸 (mm)	心臓壁の厚さ		
			前壁 (mm)	下壁 (mm)	中隔 (mm)
F2482	71	9.7	1.0	1.0	0.9
F2949	85	13.0	1.3	1.4	1.2
F1599	94	12.3	ND		
F48	98	10.9	ND		
F377	158	14.1	1.5	1.7	1.5
F215	160	18.6	1.6	1.7	1.3

- *1 心臓の長軸(mm)は、3次元画像解析ソフトウェア Amira を用いて計測。
- *2 心臓壁の厚み(mm)は、中層上部と中層下部の心臓壁の厚さを計測し、平均したもの。
- *3 ND: 計測不能

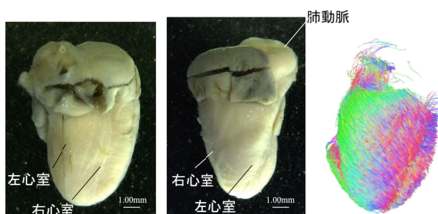


図5 形態学的観察とDSI-Studioを用いた心筋線維の描出(CRL94mm)

結果 12領域における Helix angle

左室内腔の中心から外膜側にかけて Helix angle の変化を解析しグラフ化した。赤のバーの部分が解析領域である心筋を示す。

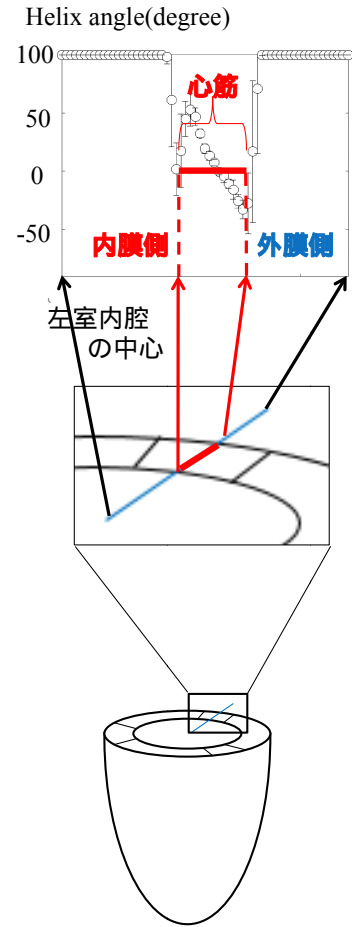
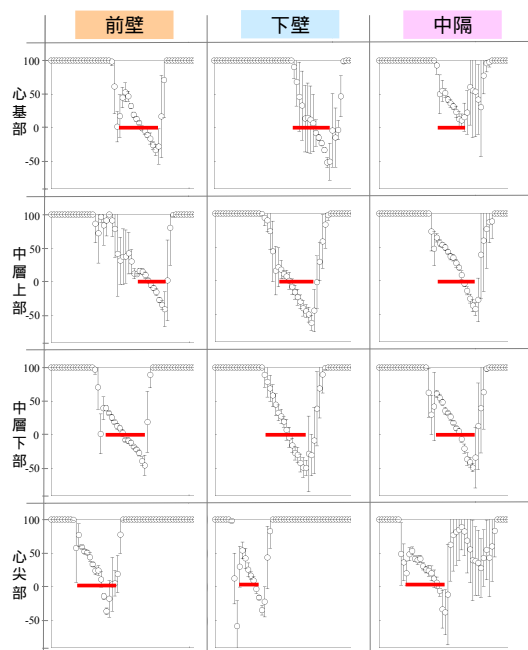


図6 グラフの読取り方



*縦軸: Helix angle (degree) *横軸: 心臓壁の深さ
*CRL158mmの個体の12領域の結果を示した。

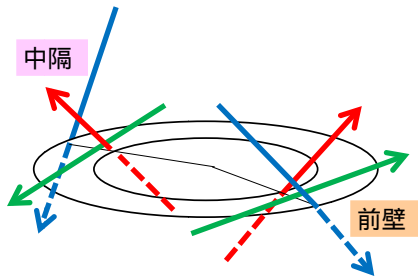


図8 前壁と中隔における心筋線維の模式図

・心基部から心尖部のどの断面においても、前壁・下壁では内膜側から外膜側、中隔では内膜側から右室側にかけて、Helix angle は (+) から (-) へ直線状に変化した(図7)。

・Helix angle が (+) から (-) へ直線状に変化することは、内膜側から外膜側、または内膜側から右室側にかけて、心筋線維がなだらかに変化することを意味する(図8)。

結果 内膜側と外膜側における心筋線維走行の評価

中層上部と中層下部の前壁と下壁において、内膜側と外膜側の Helix angle の最大値と最小値を測定し、その差を算出した。これら2断面の数値を平均してグラフ化し、発生に伴う変化を追った(図9.a、図9.b)。

前壁；CRL が大きくなるにつれて、内膜側と外膜側の Helix angle の差は開いた。内膜側の Helix angle はほとんど変化しないのに対して、外膜側の Helix angle は、より (-) の値になったためである。

後壁；CRL が大きくなっても、Helix angle はほぼ一定であった。

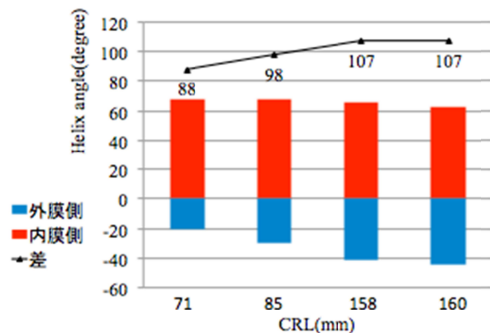


図9.a 前壁における内膜側と外膜側のHelix angleとその差

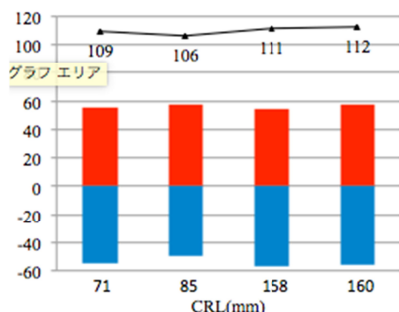


図9.b 下壁における内膜側と外膜側のHelix angleとその差

撮像原理 (拡散強調画像 (DWI)、拡散テンソルイメージング法 (DTI)) とその改良

生体組織中における水分子の拡散を扱う MRI 撮像法として、拡散強調画像 (DWI) があり、拡散効果を画像コントラストに反映した画像を得ることができる。さらに、拡散方向の情報を得るために複数枚の DWI 画像から、拡散異方性を評価する拡散テンソルイメージング法 (DTI) があり、水分子の拡散が異方性を持つ神経細胞や心筋等の線維方向の推定に利用されている。本研究では、7T の MRI (BioSpec 70/20 USR, Bruker Biospin MRI ドイツ) を使用し、voxel size 35 μm (解像度)、長径 70mm 程度の標本 (サイズ) まで T1, T2 撮像が可能であった。発生早期の胚子、新生児・胎児解剖標本用にプロトコルの最適化し、心臓の立体形状や心筋の走行の画像化を行った。より小さい胚子期の個体では、高分解能な画像取得が必要であるため、これに伴う SNR の低下がみられた。SNR の向上のため、MRI 撮像に用いるコイルを新たに設計・製作し、これを用いて DTI 撮像条件を最適化した。新生児、小児の心臓では、大きな対象を高分解能で撮像する必要があるので、撮像時間の延長が予想されたが、撮像時間の短縮に向けて DTI への高速撮像法の導入を検討し、撮像条件を最適化した。

考察

心基部から心尖部のどの断面においても、前壁・下壁では内膜側から外膜側、中隔では内膜側から右室側にかけて、心筋線維が横断面となす角度はなだらかに変化した。これは成人における変化と同様である。

内膜側と外膜側の Helix angle の差は、CRL が大きくなるに従い前壁では 88 から 107 と、大きくなり、成人の値(120)に近づいた。下壁では 106-112 とほぼ一定で、成人の値より若干小さかった。

今後、より小さい個体での解析が望まれる。

5. 主な発表論 (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 11 件)

- 1) Furuichi K, Ishikawa A, Uwabe C, Makishima H, Yamada S, Takakuwa T. Variations of the circle of Willis at the end of the human embryonic period. 301 2018
- 2) Tojima S, Makishima H, Takakuwa T, Yamada S. Tail reduction process during human embryonic development. J Anat 232, 2018, 806-811
- 3) Miyazaki R, Makishima H, Manner J, Sydow HG, Uwabe C, Takakuwa T, Viebahn C, Yamada S. The Blechschmidt Collection: revisiting specimens from a historical collection of

serially sectioned human embryos and fetuses using modern imaging techniques. *Congenit Anom* 58,2018

4) Ishikawa A, Ohtsuki S, Yamada S, Uwabe C, Imai H, Matsuda T, Takakuwa T. Formation of the periotic space during the early fetal period in humans. *Anat Rec* 301 2018 563-570

5) Ohtsuki S, Ishikawa A, Yamada S, Imai H, Matsuda T, Takakuwa T. Morphogenesis of the middle ear during fetal development as observed via magnetic resonance imaging. *Anat Rec* 301 2018 757-764

6) Takakuwa T. 3D analysis of human embryos and fetuses using digitized datasets from the Kyoto Collection. *Anat Rec* 301 2018.

7) Katsube M, Yamada S, Miyazaki R, Yamaguchi Y, Makishima H, Takakuwa T, Yamamoto A, Fujii Y, Morimoto N, Ito T, Imai H, Suzuki S. Quantitation of nasal development in the early prenatal period using geometric morphometrics and MRI: A new insight into the critical period of Binder phenotype. *Prenatal Diag* 37 2017 907-915

8) Osaka M, Ishikawa A, Yamada S, Uwabe C, Imai H, Matsuda T, Yoneyama A, Takeda T, Takakuwa T. Positional changes of the ocular organs during craniofacial development. *Anat Rec* 300,2017 2107-2114

9) Kishimoto M, Saito A, Takakuwa T, Yamada S, Matsuzoe H, Hontani H, Shimizu A. A spatiotemporal statistical model for eyeballs of human embryos. *IEICE Transactions on INF & SYST* E100-D 2017 1505-1515

10) Okumura M, Ishikawa A, Toyama T, Yamada S, Uwabe C, Imai H, Matsuda T, Yoneyama A, Takeda T, Takakuwa T. Cartilage formation in the pelvic skeleton during the embryonic and early-fetal period. *PLoS ONE* 12 2017

11) Yoshida R, Ishizu K, Yamada S, Uwabe C, Okada T, Togashi K, Takakuwa T. The dynamics of gyrification in the human cerebral cortex during development. *Congenit Anom* 57,2017,8-14

〔学会発表〕(計 13 件)

1) Tetsuya Takakuwa A02-KB107 Analysis of Central Nervous System and Skeletal System During Human Early-fetal Period Based on Multidisciplinary Computational Anatomy -Progress Overview FY 2017 The 4th

International Symposium on Multidisciplinary Computational Anatomy) 2018

2) 白石 直樹、山中 美希、岡本 育恵、山田 重人、上部千賀子、今井 宏彦、松田 哲也、高桑 徹也 ヒトにおける胎児期の脳形態形成の解析 57 回日本先天異常学会学術集会・

第 12 回日本 DOHaD 学会合同学術集会 2017

3) 西谷 早織、山田 重人、上部千賀子、原口 亮、今井 宏彦、松田 哲也、高桑 徹也 高解像度 MRI・DTI を用いたヒト胎児心筋の走行 57 回日本先天異常学会学術集会・第 11 回日本 DOHaD 学会 合同学術集会 2017

4) 石山 華、山田 重人、巻島 美幸、上部千賀子、高桑 徹也 ヒト胚子期後腎における腎盂の三次元的解析とネフロン成熟段階別の分布 57 回日本先天異常学会学術集会・第 10 回日本 DOHaD 学会 合同学術集会 2017

5) 藤井 瀬菜、村中 太河、松林 潤、米山 明男、武田 徹、兵頭 一行、上部千賀子、巻島 美幸、山田 重人、高桑 徹也 ヒト気管支分岐形成の三次元的解析 57 回日本先天異常学会学術集会・第 9 回日本 DOHaD 学会合同学術集会 2017

6) 東島沙弥佳、巻島 美幸、高桑 徹也、山田 重人 ヒト胚発生過程における尾部退縮過程の解明 57 回日本先天異常学会学術集会・第 8 回日本 DOHaD 学会 合同学術集会 2017

7) 金橋 徹、奥村 美咲、米山 明男、武田 徹、今井 宏彦、松田 哲也、上部千賀子、山田 重人、高桑 徹也 ヒト胎児期初期の骨盤形成 57 回日本先天異常学会学術集会・第 7 回日本 DOHaD 学会 合同学術集会 2017

8) 鈴木 裕子、山田 重人、上部千賀子、米山 明男、武田 徹、今井 宏彦、松田 哲也、高桑 徹也 ヒト胚子期~胎児期初期における大腿骨の形態形成の解析 57 回日本先天異常学会学術集会・第 6 回日本 DOHaD 学会合同学術集会 2017

9) 高桑 徹也、村中太河、山田重人、他 "Three-dimensional analysis of the bronchial branching in human embryonic stages 第 106 回日本病理学会総会 2017

10) 高石亮太、Xiangkai Zhang、青山 朋樹、山田 重人、高桑 徹也 Three-dimensional reconstruction of rat knee joint using episcopic fluorescence image capture, 第 106 回日本病理学会総会 2017 2017

11) 白石直樹、片山愛里、中島崇、山田重人、上部千賀子、巨瀬勝美、高桑徹也 Morphology and morphometry of the human embryonic brain: A three-dimensional analysis 第 106 回日本病理学会総会 2017

12) 高桑 徹也 A02-KB107: ヒト胎児脳神経系・骨角器系の多元計算解剖学的解析 多元計算解剖学キックオフシンポジウム 2017

13) 高桑 徹也 A01-KB004 Three-dimensional Analysis of the Bronchial Branching in Human Embryonic Stages ? Progress Overview 多元計算解剖学・第 3 回国際シンポジウム 2017

〔図書〕(計 1 件)

高桑 徹也 誠文堂新光社「多元計算解剖学基礎と臨床への応用」2018 500 頁

〔その他〕

ホームページ等；<http://www.hs-kyoto.net>
京都大学大学院 医学研究科 人間健康科学
系専攻 臨床検査展開学分野

6. 研究組織

(1)研究代表者

高桑 徹也 (TAKAKUWA Tetsuya)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号:40244933

(2)研究分担者

山田 重人 (YAMADA Shigehito)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号:80432384

原口 亮 (HARAGUCHI Ryo)
兵庫県立大学・応用情報科学研究科准教授
研究者番号:00393215

今井 宏彦 (IMAI Hirohiko)
研究者番号:40506466
京都大学・情報学研究科・助教