

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15014

研究課題名(和文)新しいX線イメージング技術を用いたヒト胚子中枢神経発生の三次元解剖学的解析

研究課題名(英文) Three-dimensional analyses of human embryos using phase-contrast X-ray computed tomography

研究代表者

趙 蘭英 (Zhao, Langying)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：90582122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：位相X線顕微鏡という新しいイメージング法を用いて、世界で唯一の研究利用可能なヒト胚標本(京都コレクション)の撮像と解析を行った。従来のイメージング法に比べ、高解像度での撮像システムを確立することができた。得られた画像を用いて、世界で初めて、気管の分岐や視覚器の立体的位置関係について三次元立体化し、数理解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Using the new imaging method called phase-contrast X-ray computed tomography, the human embryo specimens called Kyoto Collection were imaged and analyzed with high-resolution, compared with the conventional imaging method such as magnetic resonance microscopy. Using the obtained 3D data, 3D reconstruction and visualization were performed, and the morphogenesis such as branching of respiratory pathway and the positional relationship among the eye, the optic nerve and the chiasma has been analyzed morphometrically.

研究分野：解剖学

キーワード：発生学 画像解剖学

1. 研究開始当初の背景

ヒト胎児を用いた研究は、様々な倫理的制約のため困難であるが、応募者らの施設では1961年以來、ヒト初期胚を多数収集し、倫理委員会の承認のもと研究を行ってきた(Yamada et al. 2004)。主として外表の詳細な観察を行っており、内部構造について非破壊的・高解像度な観察法を切望していた。

医学臨床で用いられるX線CTやMRIは三次元イメージングであり、これを実験動物や微小サンプルに応用したものは従来から存在する(図1)。すなわち、マイクロX線CTやMR顕微鏡などがそれにあたるが、領域代表者が多量に保有する妊娠初期胎児のような柔らかいサンプルでは通常のX線CTでは透過してしまい撮像ができず、MR顕微鏡では詳細な解析に至る解像度が得られないという問題点があった。

位相X線顕微鏡は、X線の波としての性質を利用した新しい三次元イメージング機器である。従来の撮像法に比べて感度が約1000倍高い。位相シフトを検出する方法として様々な方法が開発されているが、結晶によるX線回折を利用し、X線干渉計を用いた方法が最も高感度である。本研究のメンバーは2000年頃からこの方法の開発・応用に取り組み、一定の成果を挙げてきた(図1:未発表データ)。現在、 $9\mu\text{m}/\text{pixel}$ という非破壊的イメージングの分野では世界最高の解像度を得て、これまで組織切片を利用しなければ観察できなかった発生初期の形態変化(下垂体や脊髄など)が非破壊的に観察可能となっている。

また近年、新生児期・乳児期の行動異常の原因を、胎児脳の形態形成に求めるようになってきている(Marsh, et al. 2008)。胎児脳の神経線維連絡の詳細な解析がその解明に不可欠であるが、胚子期についてはMR顕微鏡では十分な画像が得られず、新たな撮像方法を必要としていた。

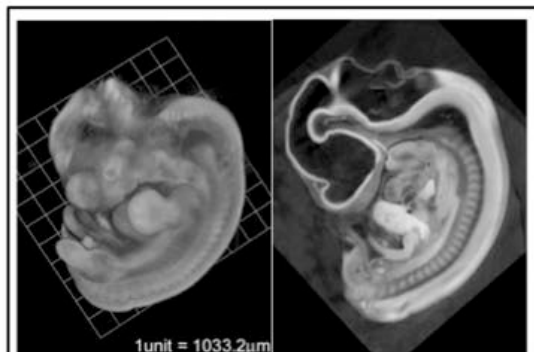


図1: ステージ17ヒト胚子(受精後40日胚)位相X線顕微鏡による三次元表面再構成(左)および断面再構成像(右)。

2. 研究の目的

- ・研究者らが所有する大量のヒト胚標本について、位相X線顕微鏡を用いた標準的な撮像手技を確立すること
- ・中枢神経系のイメージングの可能性を探ること

3. 研究の方法

現在の撮像システム(Yoneyama et al, 2011、図2・図3)は、サンプルを撮像セル内にて金属棒を軸に回転させるものである。貴重なサンプルを用いるので、動物標本で行っていた直接台座に接着する方式を改め、ゲルに包埋する方法を検討した(図3)。

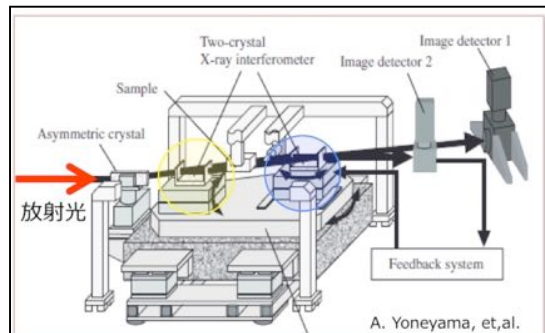


図2 位相X線顕微鏡システム

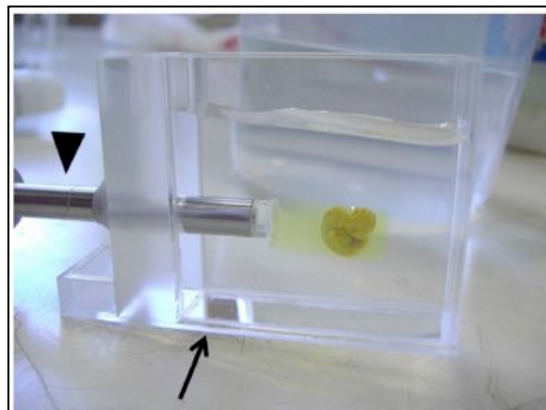


図3: 撮像セル(矢印)にゲル包埋されたサンプルを設置。金属棒(矢頭)が回転し撮像が行われる。

ゲル包埋により、標本を損傷する可能性を減らすことができたが、ゲルが金属棒の回転により揺れることが撮像の不安定性を増加させた。そこで、カプトン膜を用いた固定台を作成し、ゲル全体を膜で包むことにより、安定した画像の撮像に成功した(図4)。

以上の撮像システムにより、外表正常のサンプル58例の撮像を行い、得られた画像について解析に供した。ヒト発生段階を表すカーネギー発生段階(Carnegie stage, CS)について、器官形成期にあたるCS13から23を対象とした。

画像はDICOM形式で得られたものをTIFF等に変換し、画像解析ソフトAmira™(ver.5.5.0 and ver.6.1.1, Visage

Imaging, Berlin, Germany)(以下 Amira)を用いて立体情報を再構成し、立体像を作成した。作成した立体像から、Amira の機能を用いて例えば気管の中心線を取るなどして、細線による気管支樹の図を作成した。

#### 4. 研究成果

目的の1番目の撮像手技については、十分の方法が確立し、解析可能な画像を撮像することができた。

##### (1) 気管支形態形成の解析

得られた画像のうち、解析に適した 33 例について、ヒト気管支の三次元立体像を CS13～22 について各ステージごとに観察し、定性的に気管支を分岐 pattern ごとに分類して気管支樹に表示させた (図 4)。

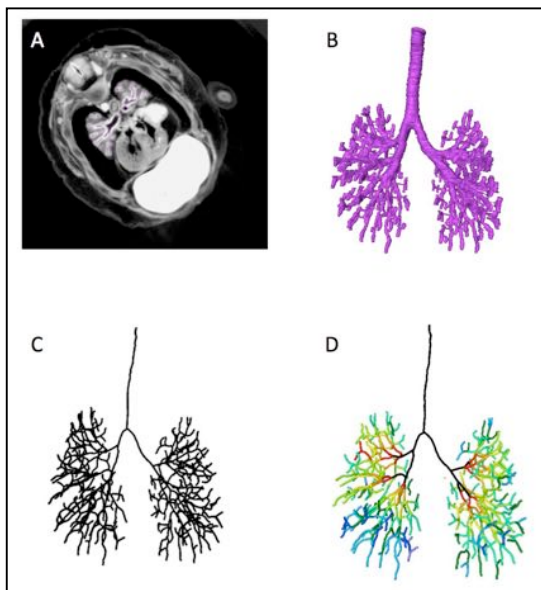


図 4：気管支の三次元構築から細線化の流れ  
A：位相 CT 画像；紫色の部分が抽出した気管支である (横断面)  
B：気管支の三次元立体像を Amira の 3Dviewer 上で表示させたもの。(正面像)  
C：気管支を細線化した気管支樹 (正面像)  
D：気管支を分岐次数ごとに色分けしたものの (正面像)

形態形成過程の結果を詳細に観察したところ、

- CS13～CS14(計 4 個体)では左右の一次気管支芽が形成されていた。
- CS16(3 個体)ではすべての個体において二次気管支芽が形成され、将来、主気管支となる分岐が観察された。
- CS19 では 4 個体中 3 個体で区域気管支が形成されていた。
- CS20 以降(計 11 個体)ではすべての個体において区域気管支が観察された。
- CS13～CS16 頃までは一次気管支芽が気管に対して背側に反るように位置していた。
- CS17 以降では一次気管支芽が腹側に位置していた(図 5-2)。

呼吸器の発生過程において、組織切片等を用いた二次元的な研究が多く、三次元的に解析を行っている研究はない。またヒト胚子期の気管支の形成についても正確に知られていなかった。本研究で位相 CT 画像および EFIC を元にして気管支を三次元立体構築することでヒト胚子気管支の発生過程を正確に観察できた。

##### (2) 視覚器の発達についての三次元解析

得られた画像のうち、解析に適した 26 例について、従来から保有する MRI データ 39 例と共に解析した。水晶体、網膜色素層、視神経について立体像を作成した。作製した立体像を用いて各視覚器の立体的位置関係を観察し、水晶体の中心、視神経乳頭部、視神経と脳実質との交点(以下 X)、第一頸椎、下垂体後葉の下端、左右鼻孔の中間点、嗅球、耳珠に reference point を設定し(図 5)、得られた座標から立体的位置関係の変化についての定量的解析を行った。

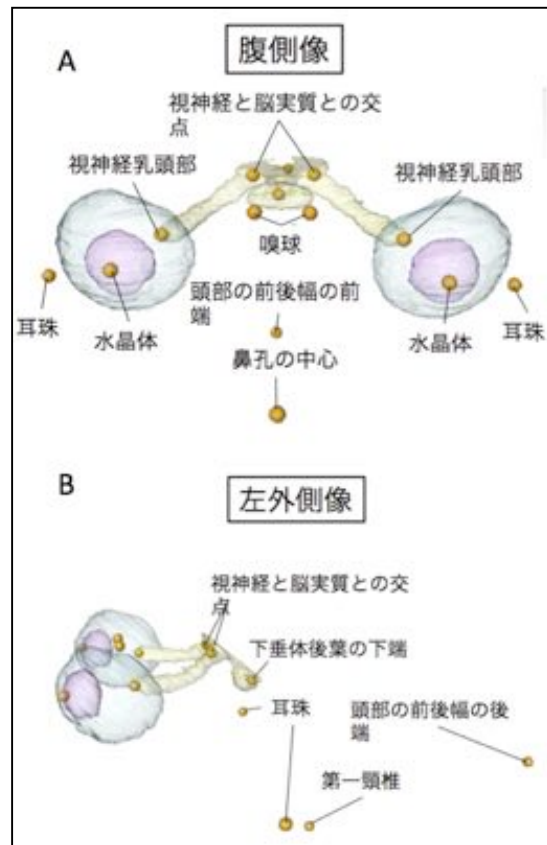


図 5：視覚器の立体像に設定した reference point

A：腹側像  
B：左外側像

これらの reference point を用いて、視覚器の立体的な位置関係の変化を経時的に示した (次ページ図 6、7)

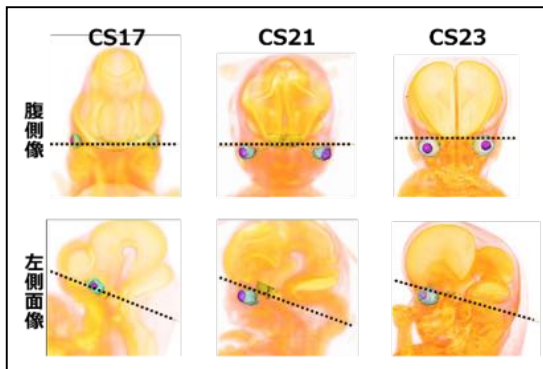


図6：胚子の外表と視覚器の立体像 CS17, 21, 23 を示す。点線は頭蓋面（左右の嗅球と下垂体後葉の下端を含む平面）を示す。

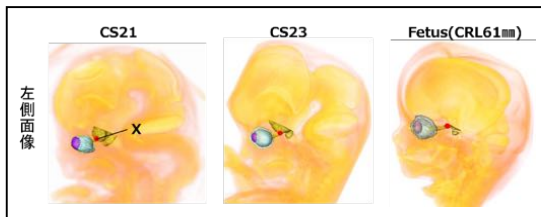


図7：胚子・胎児の外表と視覚器の立体像 CS21, 23 及び胎児期初期について示す。赤丸は視神経と脳実質との交点(X)を表す。

視覚器の発生過程について、これまでは組織切片を用いた平面的な研究が多く、立体的な位置関係の変化については解析されてこなかった。水晶体に関しては、頭部の真横から正面を向くように移動するという表現に留まっていた<sup>8)</sup>。本研究では、胚子期、胎児期の視覚器を立体化することで、視覚器が頭部においてどのように移動していくのかを観察することができ、立体的位置関係の変化を定量的に表すことができた。詳細な計測及び解析については、Osaka et al. 2017にて報告することができた。

目的の2番目である中枢神経系のイメージングについては、研究施設におけるビームタイムが設備の不調により十分に得られなかったため、今後の課題となった。

<引用文献>

Marsh R, Gerber AJ, Peterson BS. 2008. Neuroimaging studies of normal brain development and their relevance for understanding childhood neuropsychiatric disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 47:1233-1251.

Yamada S, Uwabe C, Fujii S, Shiota K. Phenotypic variability in human embryonic holoprosencephaly in the Kyoto Collection. *Birth Defects Res, Part A: Clin Mol Teratol*. 2004; 70 (8): 495-508.

Yoneyama A, Yamada S, Takeda T. Fine Biomedical Imaging Using X-Ray

Phase-Sensitive Technique In: *Advanced Biomedical Engineering / Book 2* (Edited by: Gaetano D. Gargiulo, Co-editor: Alistair McEwan); 107-128. InTech, August, 2011.

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18件) (全て査読有)

- ① 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*, 2017 Mar 13. doi: 10.1002/ar.23588.
- ② 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 (Kyoto)*. 2016 Aug 7. doi: 10.1111/cga.12179. [Epub ahead of print]
- ③ Ozeki-Satoh M, Ishikawa A, Yamada S, Uwabe C, Takakuwa T. Morphogenesis of the Middle Ear Ossicles and Spatial Relationships with the External and Inner Ears during the Embryonic Period. *Anat Rec (Hoboken)*. 2016 Oct;299(10):1325-37. doi: 10.1002/ar.23457.
- ④ Kishimoto H, Matsuura Y, Kawai K, Yamada S, Suzuki S. The lesser palatine nerve innervates the levator veli palatini muscle. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2016 Sep 29;4(9):e1044. DOI: 10.1097/GOX.0000000000001044
- ⑤ Takakuwa T, Koike T, Muranaka T, Uwabe C, Yamada S. Formation of the circle of Willis during human embryonic development. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2016 Sep;56(5):233-6. doi: 10.1111/cga.12165.
- ⑥ Mehemed TM, Fushimi Y, Okada T, Kanagaki M, Yamamoto A, Okada T, Takakuwa T, Yamada S, Togashi K. Magnetic resonance imaging of pituitary gland and postsphenoid ossification in fetal specimens. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016 Aug;37(8):1523-7. doi: 10.3174/ajnr.A4808. Epub 2016 Apr 28.
- ⑦ Yamada Y, Kanazawa H, Iwasaki S, Tsukahara Y, Iwata O, Yamada S, Kuniyoshi Y. An Embodied Brain Model of the Human Foetus. *Scientific Reports*, 2016 Jun 15;6:27893. doi: 10.1038/srep27893.
- ⑧

- ⑨ Kobayashi A, Ishizu K, Yamada S, Uwabe C, Kose K, Takakuwa T. Morphometric human embryonic brain features according to developmental stage. *Prenat Diagn*. 2016 Apr;36(4):338-45. doi: 10.1002/pd.4786. Epub 2016 Mar 4.
- ⑩ Ueno S, Yamada S, Uwabe C, Männer J, Shiraki N, Takakuwa T. The digestive tract and derived primordia differentiate by following a precise timeline in human embryos between Carnegie stages 11 and 13. *Anat Rec*. 2016 Apr;299(4):439-49. doi: 10.1002/ar.23314. Epub 2016 Jan 30
- ⑪ Kishimoto H, Yamada S, Kanahashi T, Yoneyama A, Imai H, Matasuda T, Takeda T, Kawai K, Suzuki S. Three-dimensional observation of palatal muscles in the human embryo and fetus: development of levator veli palatini and clinical importance of the lesser palatine nerve. *Dev Dyn*, Article first published online: 1 DEC 2015 | DOI: 10.1002/dvdy.24364
- ⑫ Ueda Y, Yamada S, Uwabe C, Kose K, Takakuwa T. Intestinal rotation and physiological umbilical herniation during the embryonic period. *Anat Rec (Hoboken)*. 2015 Nov 24. doi: 10.1002/ar.23296.
- ⑬ Ozeki M, Yamada S, Uwabe C, Ishizu K, Takakuwa T. Correlation of external ear auricle formation with staging of human embryos. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2015 Oct 27. doi: 10.1111/cga.12140. [Epub ahead of print]
- ⑭ Kanahashi T, Yamada S, Tanaka M, Hirose A, Uwabe C, Kose K, Yoneyama A, Takeda T, Takakuwa T. A novel strategy to reveal the latent abnormalities in human embryonic stages from a large embryo collection. *Anat Rec (Hoboken)*. 2015 Jan;299(1): 8-24, doi: 10.1002/ar.23281.
- ⑮ Toyoda S, Yamada S, Uwabe C, Imai H, Matsuda T, Yoneyama A, Takeda T, Takakuwa T. Morphogenesis of the inner ear at different stages of normal human development. *Anat Rec (Hoboken)*. 2015 Sep 15. doi: 10.1002/ar.23268.
- ⑯ Shiraishi N, Katayama A, Nakashima T, Yamada S, Uwabe C, Kose K, Takakuwa T. Morphology and morphometry of the human embryonic brain: A three-dimensional analysis. *Neuroimage*. 2015 Apr 28;115:96-103. doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.04.044. [Epub ahead of print]
- ⑰ Endo A, Ueno S, Yamada S, Uwabe C, Takakuwa T. Morphogenesis of the spleen during the human embryonic period. *Anat Rec (Hoboken)*. 2015 May;298(5):820-6. doi: 10.1002/ar.23099. Epub 2014 Dec 5.
- ⑱ Taketani K, Yamada S, Uwabe C, Okada T, Togashi K, Takakuwa T. Morphological features and length measurements of fetal lateral ventricles at 16–25 weeks of gestation by magnetic resonance imaging. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2015 May;55(2):99-102. doi: 10.1111/cga.12076.
- [学会発表] (計 5 件)
- ① 巻島 美幸、勝部 元紀、釜谷 美翔子、宮崎 伶菜、大坂 美穂、小林 諭史、上部 千賀子、山本 憲、今井 宏彦、米山 明男、森本 直記、武田 徹、中務 真人、巨瀬 勝美、高桑 徹也、山田 重人「京都コレクションのヒト胚子・胎児標本を使った様々なモダリティの三次元データ」(ポスター) 第 70 回日本人類学会大会 於: NSC 学生総合プラザ STEP、2016 年 10 月 8-10 日
- ② 白石 直樹、山中 美希、山田 重人、上部 千賀子、巨瀬 勝美、高桑 徹也「ヒトにおける胚子～胎児期の脳形態形成の解析」(ポスター) 第 56 回日本先天異常学会学術集会 於: 姫路商工会議所、2016 年 7 月 29-31 日
- ③ 村中 太河、山田 重人、上部千賀子、米山 明男、武田 徹、巻島 美幸、高桑 徹也「ヒト胚子期における気管支分岐形成の三次元的、数理的解析」(ポスター) 第 56 回日本先天異常学会学術集会 於: 姫路商工会議所、2016 年 7 月 29-31 日
- ④ 村中 太河 1)、山田 重人 1, 2)、上部千賀子 2)、米山 明男 3)、武田 徹 4)、高桑 徹也 1 「ヒト胚子期における気管支の分岐形成の三次元的解析」第 55 回日本先天異常学会学術集会、2015 年 7 月 25-27 日、於: 横浜
- ⑤ 大坂 美穂 1)、山田 重人 1, 2)、上部千賀子 2)、米山 明男 3)、武田 徹 4)、今井 宏彦 5)、松田 哲也 5)、高桑 徹也 1) 「ヒト器官形成期における視覚器の発達について」第 55 回日本先天異常学会学術集会、2015 年 7 月 25-27 日、於: 横浜
- [図書] (計 2 件)
- ① 安田峯生、山田重人 (訳) ラングマン人体発生学 第 11 版 メディカル・サイエンス・インターナショナル 2016 年 2 月 ISBN: 489592839X
- ② Yamada S, Hill, M, Takakuwa T. *Human Embryology*. In: "New Discoveries in Embryology", book edited by Bin Wu, ISBN 978-953-51-2182-4, Published: October 21, 2015. DOI:

10.5772/61453

〔産業財産権〕

○出願状況（該当なし）

○取得状況（該当なし）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

趙 蘭英 (ZHAO, Langying)

京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号： 9 0 5 8 2 1 2 2

### (2) 研究分担者

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： 4 0 2 4 4 9 3 3

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： 8 0 4 3 2 3 8 4

### (3) 連携研究者

巻島 美幸 (MAKISHIMA, Haruyuki)

京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号： 1 0 7 5 0 8 2 0

### (4) 研究協力者

(該当なし)