

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790180

研究課題名（和文）新しいマイクロイメージング技術EFICを用いたヒト胚子発生過程の三次元画像解析

研究課題名（英文）Three-dimensional analyses of embryonic development in humans using episcopic fluorescence image capture (EFIC)

研究代表者

山田 重人 (YAMADA SHIGEHITO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80432384

研究成果の概要（和文）：

京都大学・先天異常標本解析センターに所蔵されるヒト胚子を用いて、これまで行われていなかった三次元形態学的な観察を、新しいイメージング技術（EFIC）を用いて行った。EFIC法のヒト胚子への応用にあたり、撮像プロトコルを完成させ、さらに実験動物への応用も可能となった。得られた画像については三次元可視化および定量的な観察を行った。また、データおよび画像については、Webによる公開を予定している。

研究成果の概要（英文）：

Rapid advances in medical imaging are facilitating the clinical assessment of first trimester human embryos at increasingly earlier stages. To obtain data on early human development, we used episcopic fluorescence capture (EFIC) to acquire digital images of human embryos spanning the time of dynamic tissue remodeling and organogenesis (Carnegie stages 13 to 23). Using these imaging datasets, 3D reconstructions were generated for visualizing different anatomical structures and further morphometrical analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、解剖学一般（含組織学、発生学）

キーワード：先天異常学、奇形学、発生学

1. 研究開始当初の背景

発生学研究において、ヒトのサンプルは概して入手が困難であり、実験・観察は容易ではない。京都大学の先天異常標本解析センタ

ーでは、1961年以来、ヒト初期胚を多数収集しており、これを用いて研究を行ってきた。当コレクションは、世界一のサンプル数を誇り、また世界で唯一利用可能なヒトの初

期胚のリソースとして、諸外国からも注目を集めている。組織切片を用いたヒト胚子の2次元解析は行われてきたが、3次元解析については、その技術的な問題から、ほとんど行われていなかった。

代表者らはこのコレクションを用いて、組織切片からの3次元立体構築によるヒトの初期発生のメカニズムの解析を行ってきた(Yamada et al., *Anat. Rec. (Hoboken)* 290: 259-267, 2007)。しかし、この方法は、多大の労力と時間が必要であり、またかなりの熟練を必要とした。

E F I Cは、Weninger ら(2002)、Lo ら(2004)により開発が進められている新しい3次元イメージング技術である。基本画像は蛍光イメージングであり、マイクロトームで胚を切断する際に表れる断面内の蛍光像を、スライスしつつ連続撮影することで3次元的にデータを蓄積する。その断面像は、従来の組織切片画像とほぼ同様の像となる。このマイクロトームは自動的に標本をスライスする装置であり、標本台が自動滑走し標本を切断後に撮影ポジションに戻るが、その位置が撮像ごとに全く同じであるため、画像データの軸が保持され、撮影後の軸合わせが不要であるところが大きな利点である。画像データは標本の内部情報を含む完全な3次元データであり、高解像度の3次元再構築画像および任意方向の断面像を得ることが可能となる。この新しい方法により、3次元データをデジタル再構成することで、従来の組織切片では不可能な任意方向断面での観察が可能になると考え、研究を提案した。

2. 研究の目的

新しいイメージング技術E F I Cについては、安定して動作する機器・標本作製プロトコルが完成していないため、まずマウスを用いて技術の開発を行い、さらにそれを用いてヒト胚子の撮像に応用し、ヒト初期発生の三次元的形態形成メカニズムの解明に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) E F I C法における安定した撮像プロトコルの開発：マウスサンプルを用いて行う。

(2) ヒト胚子における撮像：マウスサンプルで得られた標準プロトコルを参考に、ヒト胚子のE F I C撮像を開始する。

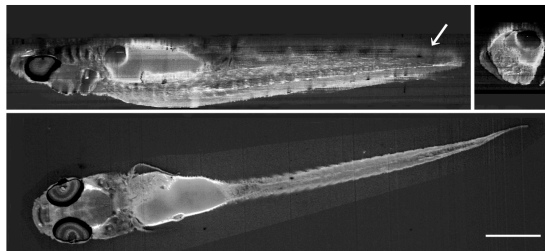
(3) ヒト胚子画像の3次元解析：高解像度であるので、撮像した画像の解析は全身で可能であるが、胚子期に特に形態変化の著しい心血管系、脳神経系を優先して解析する。

(4) ヒト胚子画像データベースの作成に向けて：得られた画像をデータベース化する

準備段階として、テンプレート作成を行う。

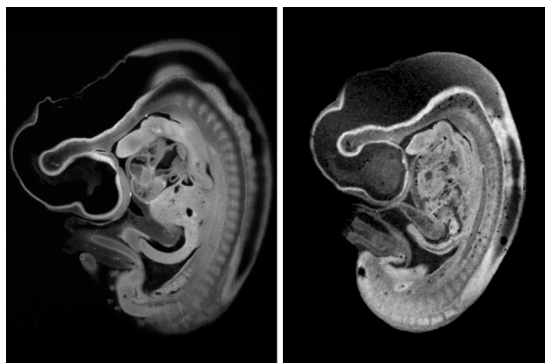
4. 研究成果

(1) E F I C法における安定した撮像プロトコルを完成させ、ヒト胚子だけでなく、マウス、ニワトリなどの実験動物への応用に道を開いた。



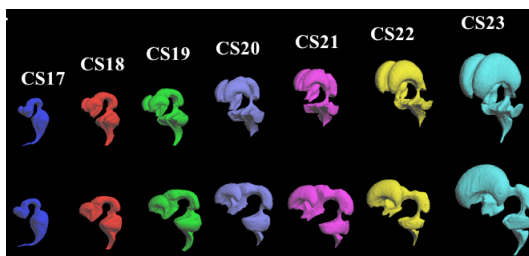
メダカを用いた撮像。上左：矢状断面、上右：横断面、下：冠状断。Bar=500μm

(2) ヒト胚子においてカーネギー発生段階13～23の胚子数例ずつについて撮像を行い、極めて高解像度の三次元データを得た。



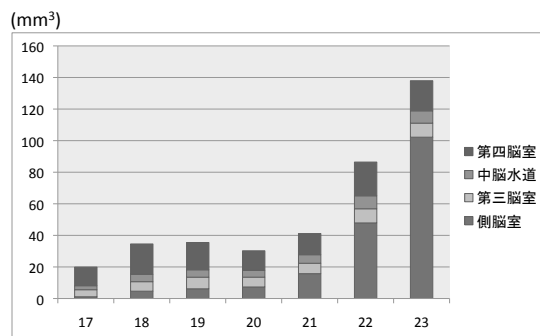
左：E F I C法におけるヒト胚子画像
右：MRIの技術を用いたMR顕微鏡による画像

(3) 得られた画像について、画像解析を行った。肝臓、脳神経管、脳室を選択しての発生段階の定量、可視化を行い、詳細な観察に耐えうる画質であることが分かった。



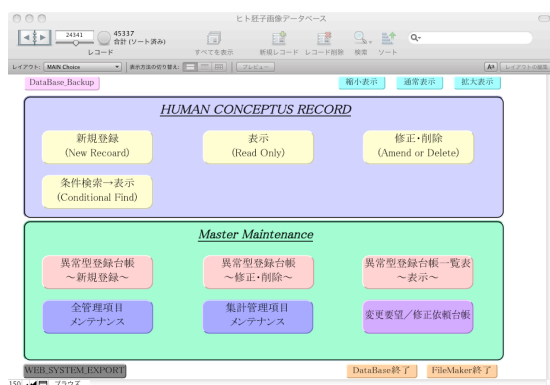
カーネギー発生段階17～23の脳室の三次元再構築像

まず数体についての脳室体積データを数値化し、発生段階による比較を行った。その結果、指数関数的に体積が増えることが明らかとなった。

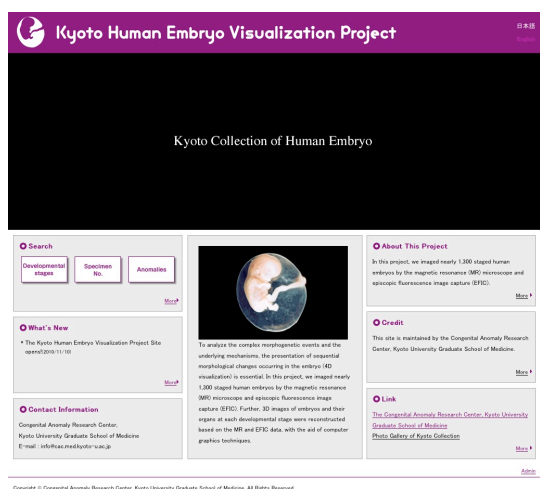


脳室容積の各発生段階における変化。

(4) データベース作成に向けて、テンプレート作成作業を行った。さらに、一部のデータについてはデータベース化を開始した。データは Web で公開される予定である。



内部でのみ利用可能なデータベース画面



インターネット上で公開しているデータベース表紙ページ

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16件)

- ① Kameda T, Yamada S, Uwabe C, Suganuma N. Digitization of clinical and epidemiological data from the Kyoto Collection of Human Embryos: maternal risk factors and embryonic malformations. *Congenital Anomalies*, 2012 Mar;52(1):48-54. (査読有)
DOI: 10.1111/j.1741-4520.2011.00349.x.
- ② Yamada S, Lee ES, Samtani RR, Lockett E, Uwabe C, Shiota K, Anderson SA, Lo CW. Developmental atlas of the early first trimester human embryo. *Dev Dyn*, 2010 Jun;239(6):1585-95. (査読有) DOI: 該当なし
- ③ 塩田浩平, 山田重人, 土屋真衣子, 巨瀬勝美 「MR 顕微鏡と episcopic fluorescence image capture (EFIC) 法を用いたヒト胚子のイメージング - 中枢神経系を中心に -」 *小児の脳神経* 35(1): 7-10, 2010 (査読有) DOI: 該当なし

[学会発表] (計28件)

- ① 亀田知美, 白川康一, 土屋真衣子, 山崎茉莉, 上部千賀子, 塩田浩平, 山田重人 「妊婦の疫学データベースを用いた胚子奇形発生に関する要因の検討～先天異常データベースの網羅的解析～」 第 51 回日本先天異常学会 2011年7月22-24日 於: 東京
- ② Yamada S, Kameda T, Takahashi M, Funatomi T, Mizuta S, Matsuda Y, Haishi T, Kose K, Matsuda T, Minoh M, Uwabe C, Shiota K. Construction and Application of Human Embryo Database. *Teratology Society 51st Annual Meeting*. 2011年6月25日-6月29日 於: San Diego, California, USA (口演)
- ③ Yamada S, Tsuchiya M, Kameda T, Komada M, Shiota K. 「Embryo imaging: Episcopic fluorescence image capture (EFIC) for experimental animals」 *Teratology Society 50th Annual Meeting*. 2010年6月26日-6月30日 於: Louisville, Kentucky, USA

[図書] (計3件)

- ① Edited by Yamada S, Takakuwa T. *The Human Embryo*. InTech, March, 2012 ISBN 978-953-51-0124-6. Hard cover, 180 pages
- ② 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 ISBN 978-953-307-555-6. Hard cover,
280 pages

〔その他〕

ホームページ等

<http://bird.cac.med.kyoto-u.ac.jp>
データベースの一部が公開されている。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 重人 (YAMADA SHIGEHITO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80432384