

## 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 25 年 6 月 10 日現在

機関番号: 14301

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2010~2012

課題番号: 22591199

研究課題名(和文) 磁気共鳴画像を用いた器官形成期ヒト胚子の解析

研究課題名(英文) Morphology and Morphometry of the human embryos by magnetic resonance microscopic imaging

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

研究成果の概要(和文): ヒト器官形成期(胚子期)に発生する先天異常の解明のために、京都大学大学院医学研究科附属先天異常標本解析センターが保持しているヒト胚子の MR 画像約 1200 例を出発材料として、コンピュータを用いた立体再構成、外表、内部諸器官の形態観察を行い、主要器官発生の定量可視化、胚子の個体差の検討を行った。得られた知見は、胎児成長の基準作成、先天異常例の抽出に寄与し、胎児診断の確立に有用である。

研究成果の概要(英文): Insights into the dynamic and complex processes during organogenesis will require accurate morphologic data with dynamic modeling of embryonic structures. Especially, 3D reconstructions are necessary to elucidate the complex anatomic remodeling that occurs during these early embryonic stages. In this aspects, morphogenesis during early human embryonic periods, has been precisely analysed using the MR image data. Those embryo and materials derived from the "Kyoto Collection" which is the the largest collection of human embryo specimens in the world, stored at the Congenital Anomaly Research Center. The obtained data will contribute to a better understanding of morphogenesis of human embryo, and serve as a useful reference for fetal medicine and prenatal diagnosis.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 胎児・新生児医学

キーワード: 3次元画像、MR 顕微鏡、ヒト胚子、形態形成、発生

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト胚子の発生研究は、先天異常学の基礎となる重要な分野で、ヒト胚子の収集、組織形態

学的観察を基礎に 1 世紀以上におよぶ歴史を持つ。しかしながら、新生児の約 3% とされる生まれつきの障害(先天異常)のうち病理解明されたものはいまだに一部にすぎない。京都大学大

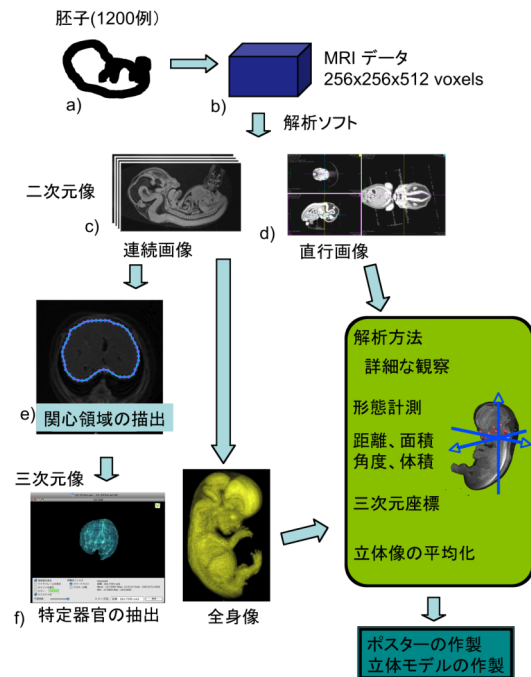
学院医学研究科附属先天異常標本解析センター(代表;共同研究者 山田)には約 4.4 万例のヒト胚子標本が所蔵され、京都コレクションと呼ばれている。同センターでは、筑波大学大学院数理工学科学部(巨瀬研究室)などとの共同で外表正常 1200 体を MR 顕微鏡で撮像し、各発生段階の胚の MR 画像を蓄積している(ヒト胚の形態発生に関する三次元データベース;JST「バイオインフォマティクス推進事業」(2005-11)(代表:塩田)。

## 2. 研究の目的

ヒト器官形成期の正常発生を解析し先天異常の原因に新たな知見を加えるために、京都大学が保持している器官形成期のヒト胚子由来 MR 画像を用いて胚子の外表、内部諸器官の形態観察を行い、胚子の主要器官発生の定量可視化、個体差の検討を行う。

## 3. 研究の方法

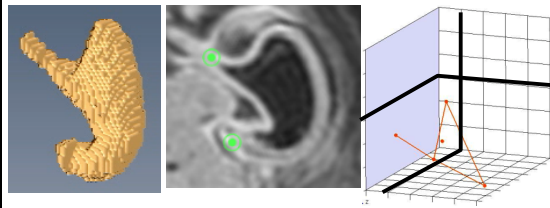
“京都コレクション”に属するヒト胚子の MR 画像を出発材料として、主要器官についてコンピュータ上で再構成を行い、発生段階の定量化、可視化を行う。各発生段階の正常形態、計測標準値を確立するとともに、異常個体を抽出できるパラメーターの設定を行い異常個体の抽出を試みる。対象とする器官は脳神経、感覚器、消化器などである。(下図参照)



## 4. 研究成果

### (1)ヒト胚子期の胃の形態形成と3次元動的な動き

教科書には、胃の動きは”下降”、”頭尾軸に対する回転”、”背腹軸に対する回転”と3つの動きにわけて説明されていることが多い。しかしながら実際の動きは立体空間的でありそう単純ではない。本研究では、377 例の胚子 MR 画像を用いて、Carnegie stage (CS)16-23 の胃の形態形成と動きを検討した。胃の形態は stage ごとに特徴的な形態を示した。胃角、胃底部の隆起は CS18 にみられた。胃角は CS18-20 では 90 度程度であったが、それ以降鋭角となった。噴門、幽門は CS20 ころに分化がみられた。胃は stage が進むにつれてゆがみを生じた。このゆがみと differential growth により胃は左側、尾側に移動するように見えるようである。胃の各解剖学的位置を追跡することにより胃の3次元動的な動きを可視化できた。大弯(M)の動き、は噴門(C)、幽門(P)の動きと大きく異なった。C、P は CS16-23 の間正中矢状面上にほぼ存在していた。M は尾側、左側に CS22 まで大きく移動をした。CP はこれまで言われているように背腹軸を中心に回転することはなく左右軸を中心に回転した。胃の最大平面 CPM はおもに頭尾軸を中心に回転をした。本研究で得られて知見は、近い将来、出生前診断での応用が期待される。(論文1)

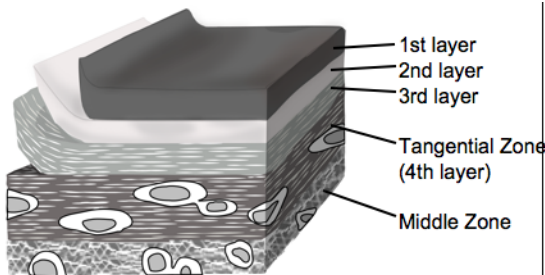


### (2) 軟骨最表層の構造(ラット実験モデル)

はじめに: 関節軟骨は一般的に細胞の形態、基質の含有により表層、中層、深層の三層に分類される。しかし、関節の潤滑な動きに重要な役割を担うであろう最表層と呼ばれる層が、表層より更に関節面側に存在することは、あまり注目されていない。最表層に関するこれまでの報告では、光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡、走査型顕微鏡のいずれかが用いられてきたが、得られた最表層の像は手法により様々で一定化していない。そこで本研究では、光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡及び走査型電子顕微鏡を用い、組織学的、免疫組織学的手法を組み合わせ最表層各層の構造・構成成分の比較を行なった。手法: ブタの膝関節軟骨を用いて、組織化学染色及び I 型、II 型、III 型コラーゲンに対する免疫染色を行い、光学顕微鏡、及び透過型、走査型電子顕微鏡による観察を行った。結果: 光学顕微鏡観察により、関節軟骨の最表層はプロテオグリカンに乏しく、方向性を持ったコラーゲン性の層を含んでいることが明らかとなった。また、透過型、走査型、及び免疫電子顕微鏡による観察から、最表層は三層構造に分けられた。最表面から第一層、次いで第二層が存

在した。第一層は透過型電子顕微鏡では電子密度の高い層として観察でき、無定形物質からなる層であった。第二層は透過型電子顕微鏡でのみ、低電子密度層として確認された。これらの層には I 型、II 型、III 型いずれのコラーゲンも含まれていなかった。一方、第三層は透過型電子顕微鏡では識別できないが、線維の密度や走行から走査型顕微鏡で下層と区別して観察された。この第三層は I 型、II 型、III 型コラーゲンにより構成されていた。第三層の下層は、II 型コラーゲンから構成されるコラーゲン線維と紡錘形の軟骨細胞からなる、いわゆる表層であった。表層には I 型、III 型コラーゲンはほとんど分布していなかった。

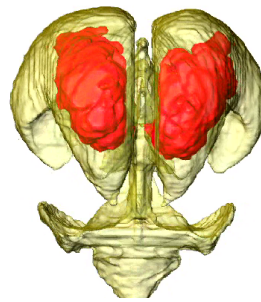
考察: 最表層を構成する三層の中でも、より表面に存在する第一層と第二層では、コラーゲンやプロテオグリカンなどの軟骨構成成分が認められず、第三層は I 型、II 型、III 型コラーゲンにより構成される事が示された。これらのことから、第一層、二層は第三層以下の軟骨構造とは異なる構成帯であり、第三層は軟骨構成成分である II 型コラーゲンを含むとともに、この層に特異な I 型、III 型のコラーゲンサブタイプを含み、独立した構造体を構成していることが示された。(論文2)



(3) ヒト胚子期における側脳室脈絡叢の形態

脈絡叢は脊髄液を産生する組織であり、脳神経の発達や血液脳関門において重要な役割を果たしている。本研究では、ヒト胚子期の側脳室脈絡叢の形態学的特徴の変化を発生段階の指標であるカーネギー発生段階(CS)ごとに MR 画像および組織切片を用いて解析し、発生過程を定量化した。MR 顕微鏡で撮像された 1204 体の胚子 MR 画像の中で、外表形態及び脳、脊髄に明らかな異常が見られない胚子のうち CS19-23 の合計 49 個体を用いて、脈絡叢の三次元立体像を作成し、解析を行った。CS18-23 に該当する合計 41 体の胚子組織切片を用いて、脈絡叢の発生過程を組織学的に観察した。さらに CS21 の胚子組織切片を立体化することで、組織情報を三次元立体像に当てはめ、MR 画像から作成した脈絡叢立体像と比較、検討した。脈絡叢を CS ごとに三次元立体化することで、その形態形成や表面の形状に特徴的な変化がみられた。CS20 ではなだらかな表面であったが、CS21、22 では多くの不規則な凹凸が観察された。しかし

CS23 ではそれらは観察されず、代わりに 3 カ所の大きな隆起が観察された。これは CS21、22 から Lobulation が盛んになり、CS23 では水腫様に膨張し、Lobulation が少なくなるという組織観察での所見と合致している。CS23 で観察された 3 カ所の大きな隆起は、胎児期にみられる毛細血管構造に合致していると考えられた。脈絡叢体積は CS19 で  $0.282 \pm 0.141 \text{ mm}^3$  から CS23 で  $16.8 \pm 8.77 \text{ mm}^3$  と約 60 倍に急速に増加した。同時期の側脳室に対する側脳室脈絡叢の割合は  $4.84 \pm 2.52\%$  から  $21.5 \pm 4.13\%$  と側脳室脈絡叢は側脳室に対して、より急速に増大していた。組織学的な観察では CS21 では低分化な領域(前方、正中側)と高分化な領域(後方、外側)が観察された。低分化な領域では造血や血管生成が盛んに行なわれており、上皮は偽重層したままであった。高分化な領域では Lobulation が進み、間質には血管が既に完成しており、上皮は単層で細胞質にはグリコーゲンだと考えられる空胞を有していた。これらの観察結果から、側脳室脈絡叢は paraphysis に対して近位の部分で主に増殖し、分化したのち、遠位部分に押し出されていくのではないかと考えられた。組織学的に低分化な領域は前方、正中側に存在するなだらかな表面の領域に合致し、高分化な領域は不規則な凹凸や、大きな隆起のある領域に合致した。上記の形態計測学的な解析と組織学的な観察結果をまとめることによって、従来提唱されていた側脳室脈絡叢の発生段階を、より細かな CS に応じて細分化した。本研究で得られた結果は、胚子期の脈絡叢の発生を精確に定量化し、胚子期の脈絡叢の発生を評価する基準値になる可能性を示した。今後、個体数を増やしさらに精確性を増すことで、胎児早期診断の発展に貢献することが期待される。(論文3)

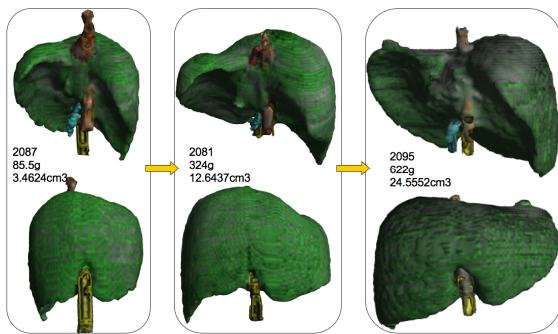


(4) ヒト胎児の肝臓形態形成

肝臓は腹腔内最大の器官で、胎児期においてすでに代謝、造血機能を有し正常発生に重要な役割を果たすこと、特有の血行動態を有することから胎児の発育の評価への使用が試みられている。現在の胎児肝臓についての知見は、エコーと病理解剖によるものが主で、MRI を用いた正確な立体像や、それを用いた定量的な解析は行われていない。われわれは、妊娠中期(16

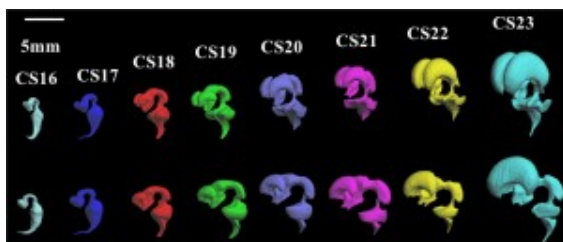


〜28 週)の胎児21例 (体重 80800g)を対象に肝臓の形態形成の過程を、MR 画像を用いて三次元的に解析し、その特徴を明らかにした。また、カーネギーステージ 23 の胚子肝臓(妊娠 9-10 週相当)と比較検討した。胎児期の肝臓は体重の増加に伴って横径・縦径・厚みすべてが大きくなる。胎児期の肝臓は縦径に比べ、横径、厚みの増加が顕著である。体幹部の成長に伴って肝臓も同じ比率で成長する。分葉の割合はほぼ一定である。今回の研究で得られた肝臓の三次元における形態学および形態計測学的データは、将来的には妊娠中期〜後期の胎児診断における重要な基礎的データとなると考えられる。(論文4)



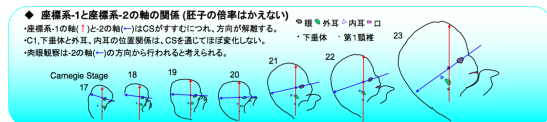
(5)ヒト胚子脳胞の形態計測

本研究では、ヒト胚子期の脳神経管及び脳室の形態学的特徴の変化を発生段階の指標であるカーネギー発生段階(CS)ごとに形態計測学的に解析し、発生過程を定量化した。MR 顕微鏡で撮像された 1204 体の胚子 MR 画像の中で、外表形態及び脳、脊髄に明らかな異常が見られない胚子合計 177 個体を用いて、脳神経管の平面画像と脳室の平面・立体像を作成し、解析を行った。脳神経管は、マクロ形態を用いて前脳、中脳、菱脳に区分し脳胞長を計測した。脳胞背側長、腹側長は CS18 から CS23 の間は増加し、背側の方が増加量が 4.2 倍大きかった。前脳、中脳、菱脳に区分し比較すると、背側、腹側とも前脳の増加量が最も大きく背側は腹側の 3 倍以上であった。これらの結果は、胚子期の脳胞発生の特徴である終脳の急速な増大を反映していると考えられた。本研究で得られた結果は、胚子期の脳神経管の発生を精確に定量化し、胚子期の脳神経管の発生を評価する基準値になる可能性を示した。今後、個体数を増やしさらに精確性を増すことで、胎児早期診断の発展に貢献することが期待される。(論文5)



(6)外耳の動きを differential growth で説明する

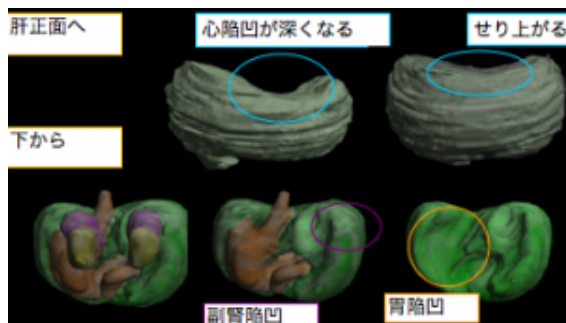
『ヒト胚子期に外耳は顔の側方を頭側に大きく移動する』と、多くの発生学の教科書に記載されている。この動きは”移動 (migration)”ではなく ”分化・成長 (differential growth)”で説明できることを、われわれは、MRI データを用いて、個体の中心に基準点を置き、位置変化の絶対値を検査することで明らかにした。実際の観察では、目や口といった顔の表面にある解剖学的基準をもとに相対的な動きとしてとらえため、外耳は移動してみえるのである。(論文6)



(7)ヒト胚子期の肝臓の形態形成

胚子期において肝臓は腹腔内最大の実質器官であり、造血・代謝を担い、胚子や胎児の成長に大きく影響を与えている。しかし胚子の肝臓の発生、特に形態の変化に関しては現在ほとんど知られていない。そこでMR 顕微鏡によって撮像された約 1200 例の胚子 MR 画像のうち Carnegie Stage(CS)14-23 の 67 例を用いて、胚子期の肝臓の形態学的解析、形態計測学的解析、及び肝内血管系の解析を行った。形態学的解析では胚子における肝臓及び周辺器官である心臓・肺・胃・後腹膜器官の立体画像を作成し、肝臓の形態学的変化を観察した。その結果、肝臓は CS と連動して周辺器官による陥凹や平面の形成、およびその消失という特徴的な形態変化を起こしていることが明らかになった。肝臓は頭側では心臓と接しており、CS17・18 において心陥凹を形成する。心陥凹は CS20 で消失し、CS22・23 では横隔膜により隆起が形成される。背側では胃と接しており、CS15 から胃陥凹を形成している。胃陥凹は胃の発達に伴って胃全体を覆うように変化する一方、十二指腸球部により CS19 から平面を形成する。背側右方では CS20 以降副腎陥凹が形成される。また腹側では CS17・18 に臍陥凹が形成されるが、CS20 には消失する。一方で肺、左側副腎、後腎、生殖腺は肝臓に隣接しているが、形態学的な影響は明らかでない。これらの結果から、各 CS における肝臓の形態とその変化を詳細に知ることができ、また肝臓は心臓・横隔膜・胃・右副腎の形態を反映していることがわかった。これは肝臓を観察することで肝臓だけでなく周辺器官の形成不全や形態異常を発見できることを意味する。形態計測学的解析では計測した肝臓の容積・断面積・3 次元分布、及び胚子の体積・腹部断面積・Trunk Height (TH)の全てにおいて、CS が進むとともに値が増加した。また、各 CS における肝臓の縦径に対する横径及び厚みの比を計算すると CS14 から 17 では値が増加、CS17 から 19 では減少す

る傾向がみられた。肝臓の縦径に対する TH の比は CS14 から 17 においてはほぼ一定であるが、CS17 から 19 において急激に増加し、しかし CS20 から 23 では再び変化が小さくなる。これは肝臓は CS17 までは主に横断面における平面状の発生が進むに対して、CS18 からは頭尾方向への発生が顕著である事を意味する。これらの結果から、肝臓の発生における計測基準を設け、より明確に肝臓の発生の様子を表すことができたと考えられる。肝内血管系の解析では、各 CS における主要な肝内血管の形成状態とその位置関係を観察した。CS17 以降では約 70% の胚子において左・中・右肝静脈が見られ、血管形成においても CS との相関が見られた。本論文では胚子期における肝臓の発生及び周辺器官との関係を詳細に表すことができたといえる。将来的には妊娠初期の胎児診断における重要な基礎的データとなると考えられる。(論文7)



## 5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 26 件)

① Kaigai N, Nako A, Yamada S, Uwabe C, Kose K, Takakuwa T, Morphogenesis and three-dimensional movement of the stomach during the human embryonic period, Anat Rec (Hoboken). in press (査読あり)

② Fujioka R, Aoyama T, Takakuwa T, The layered structure of the articular surface, Osteoarthritis Cartilage, in press doi: 10.1016/j.joca.2013.04.021(査読あり)

③ Shiraishi N, Nakashima T, Yamada S, Uwabe C, Kose K, Takakuwa T, Morphogenesis of lateral choroid plexus during human embryonic period, Anat Rec (Hoboken). 2013; 296(4): 692-700. doi:10.1002/ar.22662(査読あり)

④ Hamabe Y, Hirose A, Yamada S, Uwabe C, Okada T, Togashi K, Kose K, Takakuwa T, Morphology and Morphometry of Fetal Liver at 16-26 Weeks of Gestation by Magnetic Resonance Imaging- Comparison with Embryonic Liver at Carnegie Stage 23, Hepatol Res, 2013;

43: 639-647, doi:10.1111/hepr.12000(査読あり)

⑤ Nakashima T, Hirose A, Yamada S, Uwabe C, Kose K, Takakuwa T, Morphometric analysis of the brain vesicles during the human embryonic period by magnetic resonance microscopic imaging, Congenit Anom (Kyoto). 2012 ;52(1): 55-8, doi; 10.1111/j.1741-4520.2011.00345.x (査読あり)

⑥ Kagurasho M, Yamada S, Uwabe C, Kose K, Takakuwa T, Movement of the external ear in human embryo, Head Face Med. 2012;8(1):2, doi: 10.1186/1746-160X-8-2(査読あり)

⑦ Hirose A, Nakashima T, Yamada S, Uwabe C, Kose K, Takakuwa T, Embryonic liver morphology and morphometry by magnetic resonance microscopic imaging, Anat Rec (Hoboken). 2012; 295(1):51-9. doi; 10.1002/ar.21496(査読あり)

[学会発表] (計 41 件)

[図書] (計 3 件)

① Yamada S, Takakuwa T; the Human Embryo, InTech - Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, 2012, 180 頁

[その他]

ホームページ

京都大学医学研究科人間健康科学系専攻病理学研究室 <http://www.hs-kyoto.net/>

Kyoto Human Embryo Visualizing Project <http://bird.cac.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>

## 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