

ヒト胚の形態発生に関する三次元データベース

京都大学大学院医学研究科
塩田 浩平

Three-dimensional morphological database of staged human embryos

Kohei Shiota
Kyoto University Graduate School of Medicine

To establish a morphological database of early human embryonic development, we used magnetic resonance imaging (MRI) to acquire digital images of staged human embryos spanning the time of dynamic tissue remodeling and organogenesis (Carnegie stages 13 to 23; 3-8 weeks after fertilization). The imaging data sets obtained by MRI are readily resectioned digitally in arbitrary planes, and they are also suitable for rapid high-resolution three dimensional (3D) reconstructions. Using these imaging datasets, a web accessible digital atlas of human embryos can be created containing serial 2D images of embryos at each stage presented in three standard histological planes - sagittal, frontal, and transverse. In addition, annotations and 3D reconstructions were generated for visualizing different anatomic structures. In the database, we also included photographs, serial histological sections and clinical data of each embryo case. This database of the human embryonic development is an invaluable resource of morphologic data of human developmental anatomy that may aid in the analysis of complicated developmental process as well as molecular networks regulating early morphogenesis and differentiation in human embryos. Such a database could also help to identify the genes responsible for human birth defects whose etiology is yet to be determined.

1. はじめに

本研究開発では、ヒトの正常および異常発生メカニズムの研究、形態形成機序のゲノムワイドな解析などを行うためのリソースとなるヒト胚の形態データベースを構築した。具体的には、京都大学医学研究科附属先天異常標本解析センターに所蔵される世界最大のヒト胎児標本コレクションの標本について、器官形成期（受精後3～8週）を中心としたヒト胚の画像、連続組織切片標本、ならびに各症例の臨床データを含むデータベースを作製した。特に良質な標本約1,200例については、共同研究者の巨瀬が開発した独自のMR顕微鏡を用いて撮像し、各標本の精細な断層画像と三次元画像を得てデータベース化した。

本研究は、成人男女の遺体を用いて人体画像データベースを構築する米国の“Visible Human Project” (http://www.nlm.nih.gov/research/visible/visible_human.html) の胎児版というべきもので、世界に類例がないヒト胚標本コレクションを用いることから、わが国独自の知的財産を形成するという意義も大きい。構築された形態データベースは、Web上で公開して国際的な利用に供する準備を進めている。

2. 研究開発の成果

2.1 ヒト胚子標本のMR撮像

本開発研究経費によって購入した1.5 TeslaのMR顕微鏡ならびに共同研究者巨瀬が開発した2.35 TeslaのMR顕微鏡を用い、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に所蔵され

るヒト胚子標本（体長 10～30 mm）の MR 撮像を行った。平成 18 年度に約 400 例、19 年度に約 800 例、計 1,200 例の標本について MR 撮像を完了し、データベースに蓄積した。その過程で、ヒト胚標本の適切な撮像条件を確立し、80～120 μm の解像度を達成した（図 1、2）^[1-3]。これは、この種の標本の撮像としては世界で最も高解像度のデータである。また、発育や解剖学的構造に関する個体差がかなり大きいことが判明した。

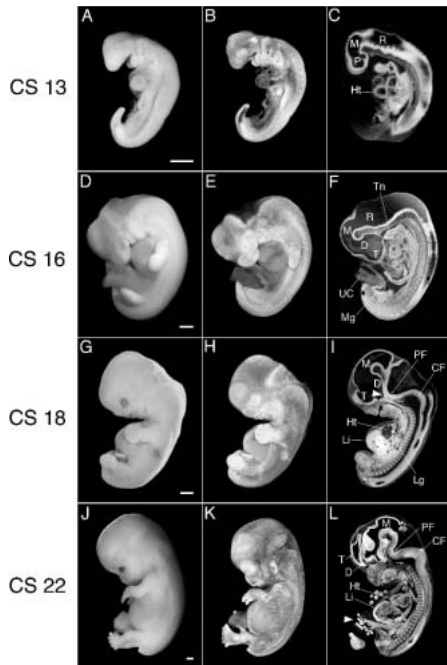


図 1 ヒト胚の MR 画像の例（上段より、5 週、6 週、7 週、8 週）左：外表写真、中：MR より構築した三次元画像、右：MR 断層画像

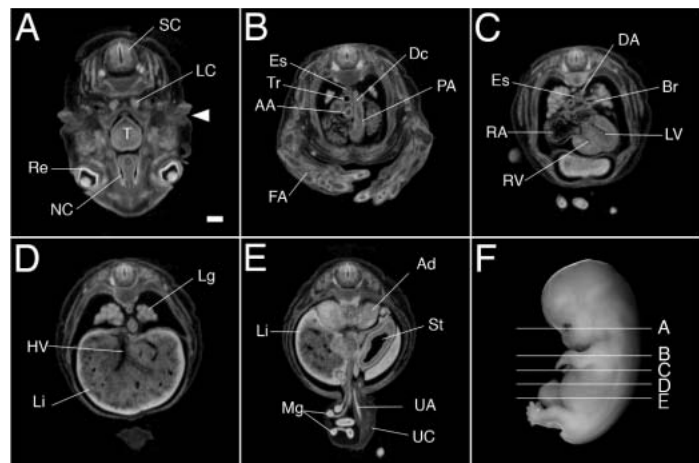


図 2 8 週ヒト胚の横断面 MR 画像

2.2 連続組織切片標本、マクロ写真、書誌データのデータベース

MR 撮像と並行して、約 500 例の正常ヒト胚連続組織切片をデジタル画像データとして取り込み、データベース化した。高解像度でスキャンすることにより、高画質の組織像をデータベースから抽出して、光学顕微鏡で見るとほぼ同等の解像度でモニター上で観察できるようになった。このような多数のヒト胚連続組織切片のデータベースも世界に例がなく、このデータベースが唯一のものである。

また、各症例のマクロ写真、書誌データ（妊娠歴、標本観察データなど）もデータベースに入力した（個人情報は含まれていない）。

2.3 ヒト胚子標本データベース検索表示システムの構築

データベースの画像とその他データを検索・表示するためのシステムの構築を行った。この標本形態 DB の検索表示システムは、書誌情報によるデータベース検索と画像を含む検索結果の表示をネットワークを介して行うものであり、(1) 多言語（日本語・英語）による書誌情報の検索表示（図 3）、(2) 検索された 3 次元画像の断面表示（図 4）、および (3) 3 次元画像から抽出された外表形状表示を特徴的な機能として実装している^[3-7]。本システムにより検索表示を可能とした MR 顕微鏡画像群のデータ規模は標本コレクション全体と比較すると小さいが、3 次元画像 DB としては大きなものである。また、組織標本データ、書誌情報の検索システムも構築し、相互のデータベースをリンクして参照できるシステムを整えた。



図3 検索結果表示画面（日本語版）

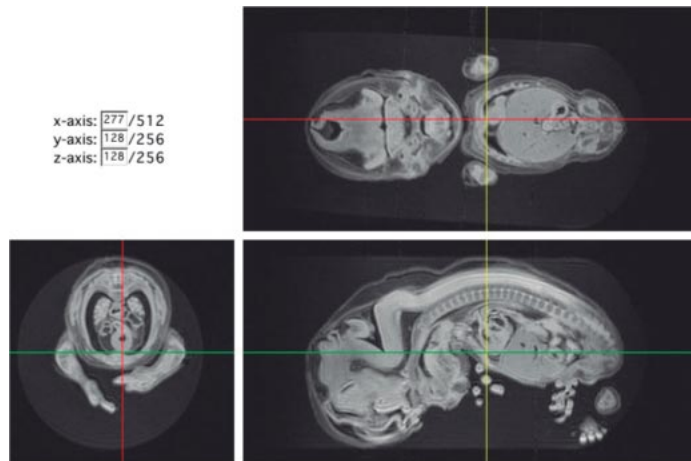


図4 3平面MR断層画像の表示

2.4 MR 撮像と episcopic fluorescence image capturing (EFIC) による新たな胚イメージング法の開発

episcopic fluorescence image capturing (EFIC) は新しいイメージング手法で、胚の断面の自家蛍光を高感度の蛍光顕微鏡で capture するもので、それにもとづいて詳細な2次元・3次元像を得ることができる。この方法は2002年 Weninger らによって開発された方法であるが、ヒト胚の観察に用いた例はなく、またわが国ではEFICの導入は我々が最初である。これまでに少数例のヒト胚標本についてEFICイメージングを行ない、条件設定をほぼ完了した。これにより、EFIC法を用いて解像度10 μ m以下の超高解像度画像の画像データを取得することが可能になった(図5)^[8]。

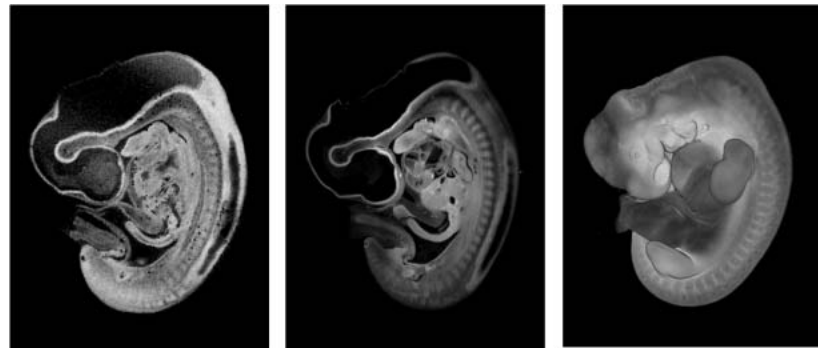


図5 受精後38日ヒト胚子(体長10mm)のMR顕微鏡(左)およびEFIC(中)断面像とEFICデータにもとづく三次元立体構築像(右)

3. まとめ

これまでの開発研究で、1.5 Tesla および 2.35 Tesla の MR 顕微鏡を用い、器官形成期（受精後 4～8 週）の正常ヒト胚子標本（体長 10～30 mm）1,200 例以上の MR 撮像を行った。この種の胚イメージングとしてはこれまでに最高水準である 80～120 μm の解像度を達成した。これらの MR データを各症例の写真および臨床データとともにデータベース化し、MR 画像の x、y、z 3 断面の表示、各標本の検索表示システムを完成した。このデータベースは①世界に類例のない多数の器官形成期正常ヒト胚を対象としたものであること、②これまでの最高水準の解像度を達成したこと、③非破壊的に撮像したため将来の遺伝子産物発現データと対応できること、などの特色を持っており、形態学的研究に止まらず、ポストゲノム時代におけるヒトの正常および異常発生メカニズムの研究に資するところが大きいと考えられる。今後はさらに高解像度での MR 撮像を目指してデータベースの質の向上に努めると共に、EFIC 法によるより精細な画像データベースも併せて構築する。この画像データベースは、近い将来、関連の研究者の利用に供する予定で、そのシステムを構築している。

胚の発生過程には多くの遺伝子が時期特異的・部位特異的に発現しているが、こうした分子生物学的情報は断片的な個別データに止まっているものが多い。今後は、遺伝子群の相互作用や形態形成におけるそれらの役割の全体像を解明するためのゲノムワイドなアプローチが必要であり、そのためには、胚における *in situ* の遺伝子発現マップを作成し、その時間的・空間的パターンを解析することが不可欠である。この種の試みは、マウス胚について英国 Edinburgh 大学などで開始されているが (EMAP and EMAGE; Baldock et al., 2003)、ヒト胚については、これまで例がない。我々が構築した形態発生に関するデータベースをもとに、将来ヒト胚の *in situ* における遺伝子発現の網羅的な 3 次元マップができれば、その時間的・空間的パターンを解析することによって、個別の分子生物学的解析やコンピュータ解析のみでは得られない新たな遺伝子機能や遺伝子群の相互作用の発見につながると期待される。また、ヒトと実験動物の胚における動的な遺伝子発現パターンの比較も可能になる。さらに、異常胚について同様の作業を行うことによって、多くが多因子性と推定される各種先天異常の遺伝学的解析と発症メカニズムの解明にも役立つものと期待される。

4. 研究実施体制

代表研究者 塩田 浩平（京都大学大学院医学研究科）

研究開発題目

- (1) ヒト胚の撮像・計測と三次元データベース構築
グループリーダー 塩田 浩平（京都大学大学院医学研究科）
- (2) データベース表示・検索システムの開発
グループリーダー 美濃 導彦（京都大学大学院情報学研究科）
- (3) 高磁場におけるヒト胚撮像手法の開発と改良、ならびに標本撮像
グループリーダー 巨瀬 勝美（筑波大学物理工学系）

5. 参考文献

- [1] Matsuda Y, Ono S, Otake Y, Handa S, Kose K, Haishi T, Yamada S, Uwabe C, Shiota K. Imaging of a large collection of human embryos using a super-parallel MR microscope. *Magnet Reson Med Sci*, 6 (3) : 139-46, 2007
- [2] Shiota K, Yamada S, Nakatsu-Komatsu T, Uwabe C, Kose K, Matsuda Y, Haishi T, Mizuta S, Matsuda T.

- Visualization of human prenatal development by magnetic resonance imaging (MRI) . *Am J Med Genet A.*, 143 (24) : 3121-6, 2007.
- [3] Yamada S, Uwabe C, Nakatsu-Komatsu T, Minekura Y, Iwakura M, Motoki T, Nishimiya K, Iiyama M, Kakusho K, Minoh M, Mizuta S, Matsuda T, Matsuda Y, Haishi T, Kose K, Fujii S, Shiota K. Graphic and movie illustrations of human prenatal development and their application to embryological education based on the human embryo specimens in the Kyoto Collection. *Dev Dyn*, 235 : 468-477, 2006.
- [4] 水田 忍、番匠武蔵、杜楽宇、松田哲也、山田重人、塩田浩平：「3次元MR顕微鏡画像群を対象とするヒト胚子標本データベース検索表示システムの構築」、*生体医工学*、44 (4) : 665-673、2006年
- [5] 飯田智子、水田忍、松田哲也、山田重人、塩田浩平：「ヒト胚子連続切片標本画像からのretrospectiveな3次元再構成を目的とした画像系列の効率的取得」、*生体医工学*、44 (4) : 650-657、2006年
- [6] 水田忍、杜楽宇、松田哲也、山田重人、塩田浩平：「Region-based Contour Tree を用いた3次元MRM 画像からのヒト胎児標本領域の自動抽出と大規模画像データ群を対象とした体長・体積の推定」、*Med Imaging Technol*、24 (4) : 238-246、2006年
- [7] 水田忍、杜楽宇、松田哲也、塩田浩平：「3次元MRM画像からのヒト胚子標本領域の自動抽出—大規模画像データ群を対象とした体長・体積の推定—」、*画像ラボ*、18 (5) : 34-37、2007年
- [8] Yamada S, Samtani RR, Lee ES, Lockett E, Uwabe C, Shiota K, Anderson SA, Lo CW. High resolution imaging and analysis of human embryonic development. 投稿中