

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360026

研究課題名(和文)発生生物学への応用を目的とした光コヒーレンストモグラフィ装置の開発

研究課題名(英文)Optical Coherence Tomography for Embryology Application

研究代表者

谷田貝 豊彦(Yatagai, Toyohoko)

宇都宮大学・オプティクス教育研究センター・教授

研究者番号：90087445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,000,000円、(間接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光たんぱく質技術などの発展により、生きたままの状態で生体の可視化が出来るようになり、細胞生物学は飛躍的発展をとげた。本研究では、発生学的研究が進んでいるメダカを取り上げ、初期発生から器官・臓器の発生までを、蛍光たんぱく質遺伝子導入無しに三次元可視化する技術の開発を行う。可視化の手段として、眼底イメージング技術である光コヒーレンストモグラフィ(OCT)を改良して、水中観測可能な高解像度・高速OCTを開発し、メダカの器官・臓器の発生を非侵襲時系列的に三次元イメージングすることが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Some advanced techniques, such as GFP, enable us to make in vivo imaging of biological samples. In this research, an OCT imaging system for 3D imaging of Medaka fish has been developed, by which the early state of embryo and some organs can be imaged without GFP technology. The OCT used in retina imaging is improved to make 3D imaging of moving fish in water.

研究分野：応用物理学・工学基礎

科研費の分科・細目：応用光学・量子光工学

キーワード：OCT 光干渉断層影画像法 メダカ 三次元可視化

1. 研究開始当初の背景

DNA 構造の発見に始まる分子生物学・遺伝子工学の発展により、生物学・生命科学分野の研究は、大きく展開している。DNA が生命の共通の遺伝分子であり、様々な生物の生命活動も遺伝子レベルで見ると「共通の仕組み」が存在することが分かってきた。酵母からは乳類まで保存されている共通の仕組みのある場合もある。特に脊椎動物の間では体のつくりや器官・臓器の構成が類似しており同じ遺伝子が同様のしくみで働いていることが分かってきた。その結果、モデル動物を使った研究により、ヒトの器官・臓器の発生や疾患が解析可能となってきた。このような研究の一例として、ショウジョウバエの心臓組織の三次元観測がある。ショウジョウバエの心臓とヒトの心臓は同様の遺伝子異常により同様の心臓形成異常を引き起こすことが発見され、ヒトの遺伝的な心臓疾患の研究に、光コヒーレンストモグラフィ (Optical Coherence Tomography, OCT) によりショウジョウバエの心臓形成・機能発現の解析が行われている。また、メダカの突然変異体の研究からヒト繊維毛病の原因遺伝子が発見され、腎臓肥大、男性不妊など鞭毛に関する遺伝病の研究・治療に貢献することが期待されている。

2. 研究の目的

蛍光たんぱく質技術や蛍光顕微鏡技術の発展により、細胞内におけるたんぱく質分子動態や分子相互作用、遺伝子活性化などが簡便に生きたままの状態でのイメージング出来るようになり、細胞生物学は飛躍的発展をとげた。この流れは、診断医学や発生生物学などの”組織”や“個体”をあつかう様々な研究分野に波及することは間違いない。ここでは、脊椎動物の中でも発生学的研究が最も進んでいるメダカを取り上げ、初期発生から器官・臓器の発生までを、蛍光たんぱく質遺伝子導入無しに三次元可視化する技術の開発を行う。

可視化の手段として、眼底イメージング技術である光コヒーレンストモグラフィ (OCT) を改良して、水中観測可能な高解像度・高速 OCT を開発し、メダカの器官・臓器の発生を非侵襲時系列的に三次元イメージングする。モデル動物を使った研究により、新機能を持つ遺伝子の同定やヒトの器官・臓器の発生や疾患の解析などが可能となり、この分野に飛躍的発展をもたらす。

3. 研究の方法

メダカの器官・臓器の発生・発育の状態を生きたままでの場観測可能な三次元断層映像装置の開発を行う。この目的を達成するためには、3次元分解能が $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$

の波長走査型スペクトル領域 OCT 装置を開発する必要がある。そのため、中心波長 800nm、スペクトル幅 120nm の光源を使用し、映像化に最適なスペクトル分布を発生させる。走査速度 140kHz の 1 次元イメージセンサーを用い、超高速 OCT 装置を完成させる。更に、水中観測が必要なため、液浸顕微光学系と収差補正用の適応光学 (AO) システムも導入する。遺伝子組み換えメダカや突然変異体メダカの発生初期化過程を、本装置で観測し、脳、生殖器、心臓・循環器などの器官・臓器の発生・発育の時間経過を追跡し、単純な構造をもつ初期胚がどのようにして組織や器官の原基を、正しい領域性に生み出すのかという発生生物学の基本課題を研究する。

4. 研究成果

生きたままのメダカを水中で観測するための高速高分解能 OCT 装置を開発した。図 1 に示すようなスペクトルドメイン OCT 装置であり、中心波長が 840nm、波長幅 135nm の光源を使用し、奥行き分解能 $4\mu\text{m}$ 、横分解能 $6\mu\text{m}$ を達成した。

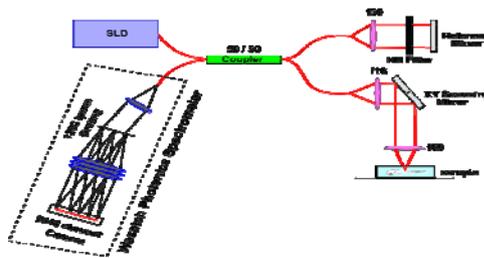


図 1 波長走査型スペクトル領域 OCT 装置

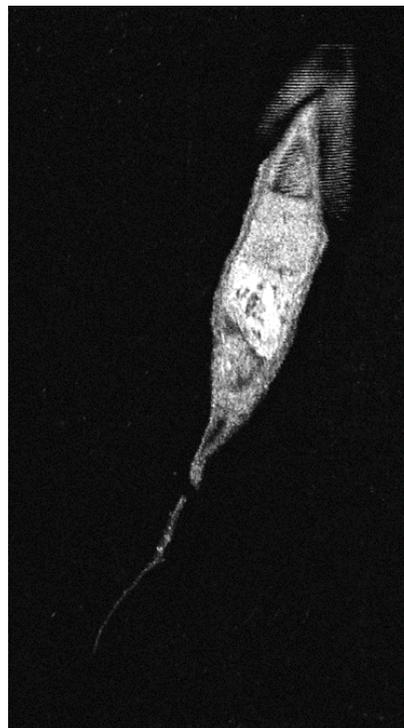


図 2 メダカの OCT 像



図3 メダカの卵巣

メダカは、生後20から40日までは性が未確定し、また、温度変化等によって性転換が起こる。性決定の過程を研究するためには、生殖腺の経時的変化を観測することが重要である。

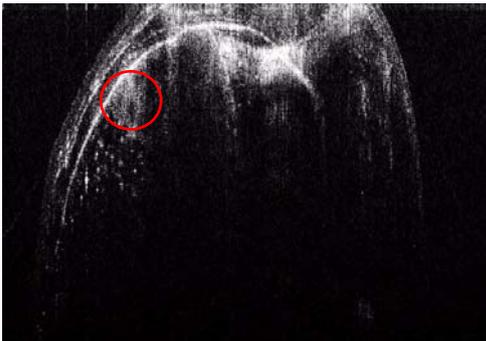


図4 孵化後60日の卵巣
(未成熟卵)

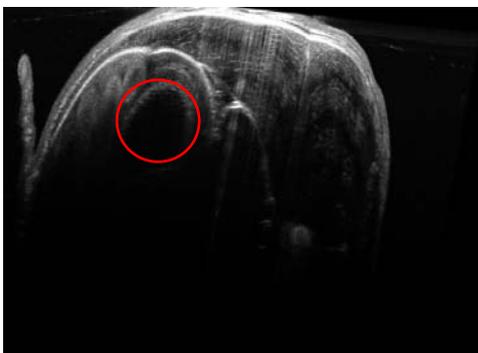


図5 孵化後90日の卵巣
(成熟卵)

開発したOCT装置の高速性により、心臓や鰓の動画撮影にも成功した。



図6 メダカ的心臓 (動画)

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 11 件)

- ① D. Barada, T. Kiire, J. Sugisaka, S. Kawata, and T. Yatagai: “Simultaneous two-wavelength Doppler phase-shifting digital holography,” *Appl. Opt.*, 50, H237-H244(2011).
- ② Fernandino JI, Popesku JT, Paul-Prasanth B, Xiong H, Hattori RS, Oura M, Strüssmann CA, Somoza GM, Matsuda M, Nagahama Y, Trudeau VL: “Analysis of sexually dimorphic expression of genes at early gonadogenesis of pejerrey *Odontesthes bonariensis* using a heterologous microarray,” *Sex Dev* 5: 89-101(2011).
- ③ Masuyama H, Yamada M, Kamei Y, Fujiwara-Ishikawa T, Todo T, Nagahama Y, Matsuda M: “Dmrt1 mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by Dmy in the medaka,” *Chromosome Res* 20:163-76 (2012).
- ④ Pauli Falt, Jakub Czajkowski and Barry Cense: “The effect of collimator lenses on the performance of an optical coherence tomography system,” *Proc. SPIE.*, 7885, 78850X(2012).
- ⑤ Kazuhiro Sasaki, Barry Cense and Yoshiaki Yasuno: “Wide field of view retinal imaging using one-micrometer adaptive optics scanning laser ophthalmoscope,” *Proc. SPIE.*, 7931, 793106(2012).
- ⑥ B. Cense, Q. Wang, S. Lee, L. Zhao, A.E. Elsner, C. Hitzenberger, and D.T. Miller, “Henle fiber layer phase retardation measured with polarization-sensitive optical coherence tomography,” *Biomedical Optics Express*, 4 (11), 2296-2306 (2013).
- ⑦ B. Cense and I. Ibrahim, “Adaptive optics for optical coherence tomography in retinal imaging: a reflection on past and

future developments,” *Review of Laser Engineering*, 41 (12), (2013).

- ⑧ Nakamoto M, Fukasawa M, Tanaka S, Shimamori K, Suzuki A, Matsuda M, Kobayashi T, Nagahama Y, Shibata N: “Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (hsd3b), star and ad4bp/sf-1 during gonadal development in medaka (*Oryzias latipes*),” *Gen Comp Endocrinol* 176:222-230(2012).

[学会発表] (計 21 件)

- ① 谷田貝豊彦、“光で生体の断層をみる—光コヒーレンストモグラフィ—,” (招待講演) 日光シンポジウム、2011年12月18日、日光、栃木県。
- ② B. Cense and T. Yatagai” High-speed high-resolution polarization-sensitive OCT,” SPIE, 2011.1.22-1.27, San Francisco, USA.
- ③ Toyohiko Yatagai, “Full view-angle computer-generated hologram by a fast calculation method based on rigorous diffraction theory,” Workshop on Information Optics (招待講演), 2012.8.20, Quebec, Canada.
- ④ Y. Lim, R. de Kinkelder, and B. Cense, “Low cost active retinal tracker for optical coherence tomography,” Ophthalmic Technologies XXIII, Photonics West BIOS, San Francisco, California, USA, 2013.
- ⑤ F.M. Gladys, Y. Lim, M. Matsuda, and B. Cense, “Non-invasive in vivo 3D imaging of medaka using ultra high resolution spectral domain optical coherence tomography,” 19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, Sendai, Japan, September 21-22, 2013.
- ⑥ B. Cense, “Detection before damage”, Biomedical Engineering, Twente University (October 7), Rotterdam Oogziekenhuis (October 8), TU Delft (October 9), AMC Amsterdam (October 9), Radboud Ziekenhuis Nijmegen (October 11), the Netherlands, 2013 (all invited presentations at the universities).
- ⑦ F.M. Gladys, Y. Lim, M. Matsuda, and B. Cense, “In vivo 3D imaging of medaka fish using SD-OCT for gender differentiation,” Optical Methods in Developmental Biology II, Photonics West BIOS, San Francisco, California, USA, February 1st, 2014.

[図書] (計 1 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : Device for generating three-dimensional retina image
発明者 : B. Cense and R. de Kinkelder
権利者 : 宇都宮大学
種類 : WO 2013141229 A1.
国内外の別 : 外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷田貝豊彦 (YATAGAI TOYOHICO)

研究者番号 : 90087445

(2) 研究分担者

アブラハム・ヨゼフ・センス (Barry Cense)

研究者番号 : 90566366

(3) 連携研究者

松田 勝 (Masaru Matsud13)

研究者番号 : 20414013