

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12042

研究課題名(和文)透明帯(ZP)複屈折の定量イメージングによる未受精卵の品質診断

研究課題名(英文)Quality diagnosis of oocytes by the birefringence imaging of zona pellucida.

研究代表者

村山 嘉延(MURAYAMA, Yoshinobu)

日本大学・工学部・准教授

研究者番号：80339267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、未受精卵の成熟過程において卵子透明帯複屈折が変化する様子を明らかにし、卵子品質の新たな診断手法を提案することを目的とする。まず、透過型レーザー顕微鏡を用いた複屈折測定法を試み、透明帯複屈折像の撮影と定量評価に成功した。加えて未受精卵の体外成熟過程における卵子品質の検討を行い、透明帯の硬さから成熟過程において卵子品質を評価できる可能性が示された。このことから、透過型レーザー顕微鏡を用いて未受精卵透明帯の複屈折率を定量的に測定することにより、未受精卵の品質を評価できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

品質の良い体外受精卵を得るためには、活力ある精子と品質の良い卵子が必要である。本研究結果は、形態学的な見た目による卵子品質の評価に変わり、定量的に卵子の品質を診断できる可能性を秘めており、ヒト生殖補助医療への応用が十分に期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the changes in the birefringence of the oocyte zona pellucida during the maturation process of oocytes, and to propose a novel diagnostic method for oocyte quality. In this study, the birefringence of the zona pellucida of oocytes was quantitatively measured using a transmission laser microscope, suggesting the possibility of evaluating the quality of unfertilized eggs.

研究分野：生体医工学

キーワード：卵子品質 透明帯 複屈折

1. 研究開始当初の背景

ヒト生殖補助医療において母子共に重大な合併症のひとつである多胎妊娠の防止は重要課題であり、複数の体外受精卵から優良胚を一つだけ選択し移植すべきとの会告が出されている(日本産科婦人科学会 2010)。すなわち、未受精卵の成熟(卵胞発育)、受精、初期胚分割の各過程で卵子品質を評価して診断する必要がある。これまで卵子の品質評価はおもに受精後の分割期卵から胚盤胞に至るステージが対象とされ、臨床では Veeck 分類や Gardner 分類による形態観察が唯一の手法であり主観的ばらつきが避けられなかったが、これに対し、近年では細胞分裂の過程を継続的に撮影して動画を作成するタイムラプス動画解析や、受精卵の呼吸量(溶存酸素濃度測定)による定量評価法が研究されている。ところが一方で、未受精卵に対しては、卵細胞を包む透明な糖タンパク質構造体である透明帯が呈する複屈折と卵子品質との間に相関があると複数報告されているものの、複屈折の測定値にばらつきが大きいことに加えて複屈折と品質との相関は無いとのネガティブな報告も複数あり、いまだ統一の見解には至らず特に品質評価が難しいとされている。

研究代表者は、これまでに卵子透明帯の弾性率(機械的な硬さ)を世界で初めて測定し、受精前後に透明帯弾性率がダイナミックに軟硬化している現象を明らかにして、透明帯弾性率から受精卵品質を定量的に評価する手法を提案してきた。同時に測定手法の安全性を確認し、ヒト卵子を対象として 500 例以上の臨床試験を実施(ヒト生殖補助医療クリニックとの共同研究)して本手法の有用性を確認している。しかしながら、測定前に校正が必要であり時間がかかること、熟達した操作者でなければ卵子にダメージを与えることがあり、実際の胚培養臨床の現場での使用に耐える装置の開発には至らずとも心残りであった。課題解決の方法を探し続けてきたところ Montag ら(2006 年)により開発された透明帯複屈折偏光イメージング手法が臨床実用化され、透明帯複屈折が弾性率変化を推定する指標として応用できるのではとの着想に至った。すなわち、研究代表者は透明帯弾性率変化が“透明帯を構成する糖タンパク質の切断と構造変化”に起因することに着目し「透明帯の構造変化を複屈折の変化として測定することで卵子品質が評価できるはずである」との仮説を立てた。従来の透明帯複屈折による評価は発生生物学的现象を無視して未受精卵成熟過程における“一時点”の複屈折量のみを測定していたことが問題であり、複屈折が変化する過程(変化率)に着目することにより、発生生物学的に裏付けのつく品質評価手法が提案できると考えた。

2. 研究の目的

未受精卵の成熟過程において、卵子透明帯複屈折が変化する様子を明らかにし、透明多複屈折の変化率(経時変化による相対量)と受精後の妊娠能との相関を調べて卵子品質に関する学理を追求するとともに、卵子品質の新たな診断手法を提案することが本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

研究の目的を達成するために、本研究では次の研究課題(1)-(5)を行う。

【計測工学的に取り組む研究課題】

研究課題(1) 簡便・高速に透明帯複屈折を定量イメージングできる方法の確立

【発生生物学的に取り組む研究課題】

研究課題(2) 卵子透明帯複屈折の経時変化パターンを明らかにする

研究課題(3) 受精後の卵子透明帯硬化に伴う複屈折変化と卵子品質との関係の解明

研究課題(4) 未受精卵の卵子透明帯軟化に伴う複屈折変化と卵子品質との関係の解明

【生殖医学的に取り組む研究課題】

研究課題(5) 透明帯複屈折を用いた卵子品質評価法の臨床応用可能性を検討

4. 研究成果

まず、マウス卵子を用いて従来の偏光顕微鏡による透明帯複屈折測定に表れるばらつきを調べたところ、未受精卵の成熟過程において透明帯軟化に相当する変化は測定できず、受精前後においても透明帯硬化に相当する変化は測定できなかった。複屈折性は屈折率の差と試料の厚さに依存するため、透明帯のように測定部位の光路長が分からない試料の複屈折を測定するのは難しい。この問題を解決するために、本研究では透過型レーザー顕微鏡を用いた複屈折測定法を試みることで、透明帯複屈折像の撮影に成功した(図 1)。次いで、未受精卵の体外成熟過程における卵子品質の検討を行った。体内成熟した透明帯弾性率が 18.5kPa まで軟化したのに対し、

体外成熟卵では 28.8kPa と有意に高い結果を得た。体外成熟卵は卵丘細胞の付着が弱い細胞ほど透明帯硬化の傾向がみられたことから、成熟による透明帯軟化が不十分であったか、表層顆粒が分泌され透明帯硬化した可能性が考えられる。同様に卵丘細胞を裸化した体外成熟卵は、形態学的に成熟卵と同様であっても透明帯硬化が起こらず、これらの結果から成熟過程において卵子品質を評価できる可能性が示唆された。これらの結果から、透過型レーザー顕微鏡を用いて未受精卵透明帯の複屈折率を定量的に測定することにより、未受精卵の品質を評価できる可能性が示唆されたので、直接的に実証する実験を残すのみであった。しかしながら以降の研究については、令和元年度は長期海外派遣に伴い研究を中断し、令和2年度には新型コロナウイルスの感染拡大を受けて研究活動に制約が生じたため、当初の予定通りに研究を遂行できなかった。

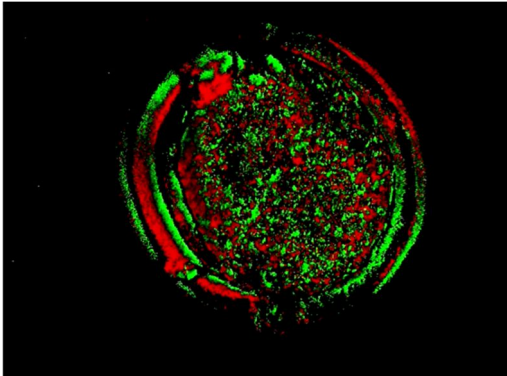


図1 . 透過型レーザー顕微鏡を用いて取得した屈折率分布の素情報

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村山嘉延
2. 発表標題 電気の雑音、社会のノイズ、生体のゆらぎ
3. 学会等名 第27回基礎体温計測推進研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村山嘉延
2. 発表標題 局所的微弱超音波の暴露が胚発生に及ぼす影響
3. 学会等名 第54回日本生体医工学会東北支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山嘉延
2. 発表標題 卵子の品質評価
3. 学会等名 第52回バイオサロン、日本機械学会・バイオエンジニアリング部門（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshinobu Murayama
2. 発表標題 The Potential Adverse and Enhancement Effect of Evanescent Ultrasound on Embryonic Development
3. 学会等名 BMES2018 (Biomedical Engineering Society 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 体温解析装置、体温解析プログラム及び体温解析方法	発明者 村山嘉延	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-018929	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------