

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19898

研究課題名（和文）卵巣内に存在する卵子の品質診断を実現するドップラー光干渉断層撮影システムの開発

研究課題名（英文）Development of doppler optical coherence tomography imaging for analysis
follicular development in ovarian tissue

研究代表者

阿部 宏之（Abe, Hiroyuki）

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：10375199

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、光干渉断層画像化法（OCT）技術を基盤とするドップラーOCT（D-OCT）技術を開発し、卵巣内の卵胞および卵子を非破壊的に解析できる高感度計測システムの開発を目的とした。従来システムに高速ラインカメラとGPU（Graphic Processing Unit）を導入することで画像データ取得の性能を向上させたD-OCTシステムの開発に成功した。生物学的解析によるD-OCTシステムの有効性を評価した結果、このD-OCTシステムはこれまでイメージングできなかった卵胞内卵子を高感度で検出できること、高輝度シグナルを指標に卵子の品質（生物活性）評価を可能とするシステムであることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したドップラーOCTシステムは、非破壊的に卵巣内に存在する卵胞および卵子を検出できることから、新しい組織診断技術として学術的意義が高い。また、卵巣内の卵子の定量や品質（生物活性）を解析できることから、次世代の卵巣機能技術として生殖医療分野での応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have examined Doppler optical coherence tomography (D-OCT) for noninvasive analysis of follicular development and oocyte quality in mouse and bovine ovaries. Ovary has many follicles and oocytes at different developmental stages. Quantification of the follicle at various developmental stages is important to evaluate the capacity of the ovary to provide oocytes that are capable of fertilization resulting in a successful pregnancy. 3D structural D-OCT images were identified each developmental stage from primary follicle to antral follicle in mouse and bovine ovaries. Further we found time-varying OCT signals at the oocytes compared with around tissues. The motions of oocytes were clearly enhanced by inter-frame intensity based Doppler OCT techniques. The D-OCT system is effective to analyze the development of follicles and oocyte quality in ovarian tissues.

研究分野：生殖生物学

キーワード：光干渉断層撮影 卵巣 卵母細胞 発生 生殖医療

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の卵巣には発達段階の異なる卵胞および卵母細胞が多数存在している。卵巣内の卵胞数は胎児期に最も多く個体の成長に伴って減少することから、卵胞の数は卵巣機能評価の重要な指標となる。また、卵胞内に存在する卵子（卵母細胞）の品質（クオリティ）は、体外受精などの生殖医療における治療成績に大きく影響する。現在、生殖巣内の配偶子の解析は超音波画像診断により行われているが、超音波の空間分解能では直径 100 μm 以下の前胞状卵胞や卵子の観察は不可能である。光干渉断層画像化法（オプティカル・コヒーレント・トモグラフィ：OCT）は原理的に直径 10~30 μm 程度の構造体を画像化できることから、卵巣内に存在する様々な発達段階の卵胞のリアルタイム観察が可能であり、卵母細胞の品質評価も期待できる。また OCT は、人体に害のない微弱な近赤外光を用いるため無侵襲計測であることから、卵胞の3次元局在や卵胞周囲に構築される血管のイメージングも期待できる。これまで、卵巣に存在する前胞状卵胞を観察することは、組織学的に連続切片を観察する以外に方法は無かった。本研究で開発するドップラーOCTシステムは、生殖巣の機能を「生きたまま」診断できる画期的な解析技術として期待される。

2. 研究の目的

本研究では、光干渉断層画像化法（タイムドメイン OCT）を応用したドップラーOCT技術を開発し、卵巣内卵子の3次元イメージングと卵子品質評価システムの開発を目的とした。具体的には、OCTを基盤とするドップラーOCT技術を確立し、卵巣組織内に存在する卵胞および卵子を無侵襲的に画像撮影し、卵胞のサイズと卵子の光散乱活性を解析できる高感度計測 OCTシステムを開発する。本研究で開発するドップラーOCTは、画像解析処理能力の向上により生物活動によって生じる卵細胞質の光散乱現象の時間変化を高精度で検出することができ、光を用いた生殖細胞の機能診断というこれまでにない発想に基づいている。本研究の最終目標は、ドップラーOCTシステムを用いた排卵前卵子の品質評価や凍結保存卵巣組織の診断技術を開発し、生殖医療における実用化のための基盤システムを確立することである。

3. 研究の方法

本研究では、卵巣組織に存在する卵胞および卵子の画像化に特化したドップラーOCTシステムを開発し、その有用性を検証した。従来の OCTシステムに高速ラインカメラと GPU（Graphic Processing Unit）を導入し、OCTシステムの画像データの取得の性能向上を試みた。具体的には、SLD光源として、中心波長 $\lambda_0 = 841.1 \text{ nm}$ 、半値全幅 $\Delta\lambda = 40.2 \text{ nm}$ の OCTシステムを用いた（図1）。SLD光源から射出した光は、光源を保護するアイソレータ（OI）を通り、ファイバケーブルにより参照光とプローブ光に 50:50 に分割した。プローブ光は、横方向へ走査するためのガルバノスキャナ（GS）を介し、対物レンズ（ L_2 , $f = 30 \text{ mm}$ ）により集光され、サンプルへ照射した。また参照アームには、分散補償のため、同じ対物レンズ（ L_2 ）を配置した。サンプルからの後方散乱光と参照ミラーで反射された参照光はファイバケーブルで合波され、回折格子（1200 本/mm）により分光され、波長分解された光は複合レンズ（ L_1 , $f = 174 \text{ mm}$ ）を介し、CMOSラインカメラ（Basler Vision Technologies, spL2048-140k, 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, 140kHz）で検出した。

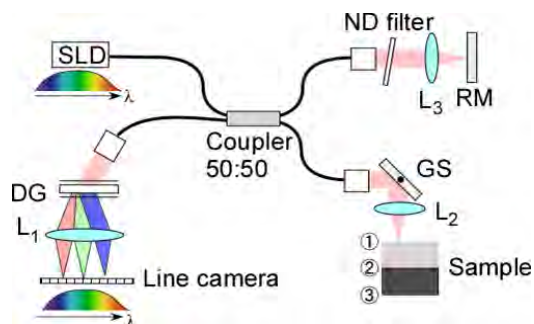


図1. ドップラーOCTシステムの概要図。

リアルタイムに断層画像をモニターするため、安価で高速演算可能な GPU を使い、 N_z (光軸方向) $\times N_x$ (横方向) の干渉画像データを測定した。GPU では、背景成分を除去するためスペクトルの平均を求め、次に干渉データからこの平均値を差し引き、16bit 整数型から 32bit 単精度浮動小数型へ変換し、実部に干渉データ、虚部にゼロを代入した。GPU メモリに保持しておいた値を利用して線形補間を N_x 回行い、深さ信号を得るフーリエ変換 (N_z 点の逆 FFT を N_x 回) を実行した後、 $N_z/2 \times N_x$ のサイズのデータに対して log スケールリングし、8bit グレースケールへ変換した計算結果をホストコンピュータにて OCT 画像を表示した。

新たに開発したドップラー-OCT システムを用いて、マウスおよびウシの卵巣に存在する卵胞のイメージングを行い、ドップラー-OCT の性能評価と卵子品質評価の有用性を検討した。ドップラー-OCT で計測された構造を特定するために、OCT 計測したマウス卵巣の組織学的解析を行った。OCT 計測後のマウス卵巣を室温でブアン固定後、エタノールで脱水し、パラフィン置換後に包埋し連続切片を作製した。ヘマトキシリン-エオシン (HE) で核および細胞質を染色し観察した。

4. 研究成果

(1) ドップラー-OCT システムの開発

本研究では、水平ビニングを行い 1024 画素でスペクトルを検出した結果、深さ測定範囲は、2.4 mm であった。また分解能を評価した結果、深さ方向 $7.8 \mu\text{m}$ で、横方向分解能は $21.4 \mu\text{m}$ であった。

生後 25.5 日齢の B6C3F1 雌マウスより卵巣を採取し、OCT を用いてイメージングを行った。1 枚の OCT 画像 (512×1024 画素) を 130 フレーム/秒で取得し、3 次元データ (1000 フレーム) は 7.7 秒で取得した結果、横 2.2 mm、深さ 0.97 mm における OCT 画像と平均画像を得ることができた。本研究で構築したドップラー-OCT システムでは、発達初期の前胞状卵胞 (一次卵胞) と成熟した胞状卵胞が明確に識別することができた (図 2)。また、前胞状卵胞および胞状卵胞の内部に、高輝度のドップラー信号が検出された (図 3)。

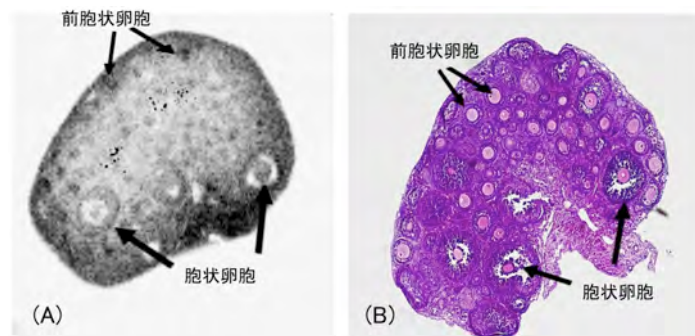


図 2. (A) マウス卵巣の OCT 画像と (B) 同卵巣の組織像 (光学顕微鏡観察)。前胞状卵胞は、OCT 画像では全体的に濃色に描写される。胞状卵胞は卵胞腔と卵母細胞が識別でき、卵胞膜の構造も明確に観察される。

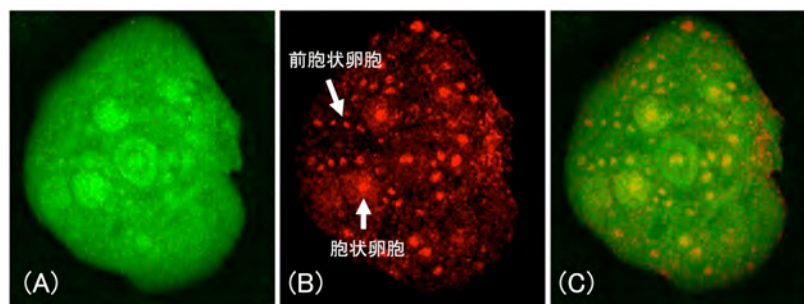


図 3. OCT システムにより観察したマウス卵巣。(A) 平均化 OCT 画像、(B) ドップラー-OCT 画像、(C) オーバーラップ画像。ドップラー-OCT では卵胞内に高輝度の信号が検出され、個々の卵母細胞が明確に描写されている。

(2) ドップラー-OCT システムによる卵子の品質評価

生きた卵胞および卵母細胞のサイズを正しく測るためには、短時間にボリュームデータを計測する必要がある。また、測定対象への光照射サイズは $10\ \mu\text{m}$ 程度とかなり小さいため、二次元の断層画像だけでは詳細な測定位置や卵胞のサイズを正しく判別するのは非常に困難であると考えられる。そこで、卵母細胞の細胞質に観察される散乱光のドップラー効果を位相差計測することで、卵胞の3次元断層画像データの取得を試みた。具体的には、これまで使用してきたラインカメラより5倍速い超高速ラインカメラを導入し、3次元断層画像計測の時間短縮を図った。これによりボリュームサイズ ($1024 \times 500 \times 500$ 画素) が2秒以下で計測できるようになった。さらに、測定箇所をリアルタイムにモニタするためGPUによる超高速画像処理を行い、同一の断面を連続測定した断層画像からドップラー効果による信号強度の変動の大きさを算出した。その結果、従来の平均化画像と比べて大幅に解像度が向上し、前胞状卵胞と胞状卵胞に存在する卵母細胞の高解像イメージングが可能になった。

ドップラーOCTで検出される高輝度信号の実体を調べるために、パラフォルムアルデヒド (PFA) で固定したマウスおよびウシの卵巣におけるドップラー信号を調べた。その結果、マウス (図4) およびウシ (図5) 共に、卵子の高輝度信号はPFA固定により急激に低下した。この結果から、ドップラーOCTで検出される高輝度信号は、卵子細胞質内の生物活動によって生じる「動き」を捉えていると考えられる。

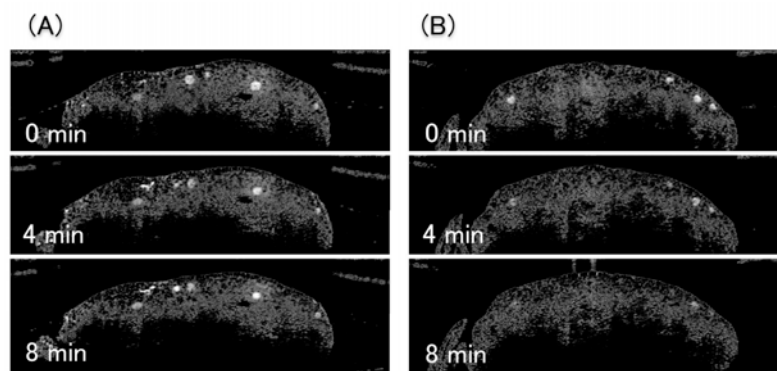


図4.マウス (25.5日齢) 卵巣のドップラーOCT 観察像。(A) 無固定の卵巣では、時間経過 (0~8 min) によるドップラー信号の変化は見られない。(B) 4%PFAで固定した卵巣では、時間の経過に伴いドップラー信号強度が急激に低下した。

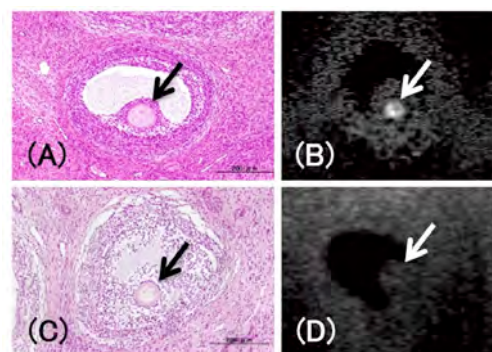


図5.ウシ卵巣のドップラーOCT 観察像 (B,D) と同卵巣の組織像 (A,C)。(C) 無固定の卵巣では、卵子 (矢印) におけるドップラー信号の強度は変化しない。(D) 4%PFAで固定した卵巣では、卵子 (矢印) のドップラー信号はほとんど検出できない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato M., Eto K., Goto T., Kurotani R., Abe H., Nishidate I.	4. 巻 9
2. 論文標題 n-vitro rat brain imaging through full-field optical coherence microscopy using ultrathin short multimode fiber probe	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app9020216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Homma T., Takeda Y., Sakahara S., Ishii N., Kobayashi S., Abe H., Asao H., Fujii J.	4. 巻 53
2. 論文標題 Heterozygous SOD1 deficiency in mice with an NZW background causes male infertility and an aberrant immune phenotype	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 1060-1072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2019.1677901	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato M., Eto K., Goto T., Kurotani R., Abe H., Nishidate I.	4. 巻 1059109
2. 論文標題 Tissue imaging using full field optical coherence microscopy with short multimode fiber probe	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc. of SPIE	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishizono H., Darwish M., Endo T.A., Abe H.	4. 巻 59
2. 論文標題 Glycine receptor 4 subunit facilitates the early embryonic development in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 41-48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/REP-19-0312	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 近藤綾香、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 卵管液アミノ酸組成を基本とするウシ胚培養液の開発
3. 学会等名 第60回日本卵子学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊光、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 高精度ミトコンドリアDNAコピー数定量システムの開発と応用
3. 学会等名 第60回日本卵子学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤貴仁、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 マウス初期胚発生における小胞体ストレスの影響
3. 学会等名 第60回日本卵子学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小泉遥奈、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 ヒト卵管液アミノ酸組成をベースとするマウス胚培養液の開発
3. 学会等名 第60回日本卵子学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤綾香、武田奈々、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 卵管液アミノ酸組成を基本とする高性能ウシ胚培養液の開発
3. 学会等名 日本動物学会令和元年度東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田優真、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 ウシ胚における小胞体ストレスの発生と胚のクオリティーとの関係
3. 学会等名 日本動物学会令和元年度東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田奈々、伊東莉菜、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 ウシ胚における機能的な密着結合の形成は胚のハッチングに不可欠である
3. 学会等名 日本動物学会令和元年度東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤貴仁、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 マウス初期胚における小胞体ストレスの誘導とその影響の解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤綾香、武田奈々、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 卵管液アミノ酸組成をベースとするウシ胚培養液の開発
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田奈々、伊東莉菜、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 ウシ胚において密着結合と接着結合は胚の形態的品質を決めている
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤綾香、武田奈々、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 卵管液アミノ酸組成をベースとするウシ胚培養液開発の試み
3. 学会等名 第57回東北生殖医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田優真、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 ウシ初期発生において小胞体ストレスは胚品質低下の一因である
3. 学会等名 第57回東北生殖医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小泉遥奈、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 マウス胚を用いた新規培養液HiGROW OVITの汎用性の検討
3. 学会等名 第57回東北生殖医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田奈々、伊東莉菜、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 ウシ胚における機能的な密着結合と接着結合の形成
3. 学会等名 第57回東北生殖医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部宏之
2. 発表標題 培養液は胚の品質にどのような影響を及ぼしているのか - 動物実験からの考察 -
3. 学会等名 第59回日本卵子学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤莉菜、小浜怜、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 初期胚における細胞接着は胚の形態的品質とハッチングに影響する
3. 学会等名 第59回日本卵子学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤翼、渡部佑、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 マウス胚における微小管ネットワークの形成とミトコンドリア呼吸機能の発達
3. 学会等名 第59回日本卵子学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江藤魁、増田純平、黒谷玲子、阿部宏之、西舘泉、佐藤学
2. 発表標題 直径125 μ m長さ7.4mm光プローブによるin vivoラット脳の光波断層画像測定
3. 学会等名 第19回山形ニューロサイエンス・医工学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊光、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 高精度ミトコンドリアDNAコピー数定量システムの開発
3. 学会等名 日本動物学会平成30年度東北支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤貴仁、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 マウス胚における小胞体ストレスの誘導と胚発生に及ぼす影響
3. 学会等名 日本動物学会平成30年度東北支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊東莉菜、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 ウシ胚における接着結合および密着結合は胚のパッチングに影響する
3. 学会等名 日本動物学会平成30年度東北支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴谷昭洋、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 ウシ胚においてアポトーシスおよび酸化ストレスは胚の品質を低下させる
3. 学会等名 日本動物学会平成30年度東北支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato M., Eto K., Masuta J., Kurotani R., Abe H., Nishidate I.
2. 発表標題 Short multimode fiber image probe for full field optical coherence microscopy
3. 学会等名 Second World Congress on Microscopy (WCM 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊東莉菜、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 ウシ胚における密着結合および接着結合の形成と胚の品質とハッチングに及ぼす影響
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤翼、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 マウス胚における微小管ネットワークの構築とミトコンドリア呼吸機能の発達
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊光、坂原聖士、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 高精度ミトコンドリアDNAコピー数定量システムの開発と有用性の検討
3. 学会等名 第56回東北生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴谷昭洋、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、阿部宏之
2. 発表標題 アポトーシスと酸化ストレスはウシ胚品質低下の原因となる
3. 学会等名 第56回東北生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山形大学理工学バイオ化学工学科「研究科 阿部研究室」 http://abe-labo.yz.yamagata-u.ac.jp/index.html 山形大学研究者情報 http://yubl.kj.yamagata-u.ac.jp/html/10000176_ja.html

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
研究 分 担 者	渡部 裕輝 (Watanabe Yuki) (00333328)	山形大学・大学院理工学研究科・准教授 (11501)	

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