

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670712

研究課題名(和文)非侵襲卵巣機能診断を実現する光干渉断層撮影システムの開発

研究課題名(英文)Development of optical coherence tomography imaging system for analysis of 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光干渉断層画像化法(オプティカル・コヒーレント・トモグラフィ：OCT)技術を応用し、無侵襲的に卵胞サイズと位置情報をイメージングできる高感度計測システムの開発を目的とした。高分解能OCTプローブと超高速画像処理技術を開発し、生物学的解析によるOCTシステムの有効性を評価した。その結果、従来のOCTシステムではイメージングができなかった一次卵胞を検出できるドップラーOCT技術を開発することができた。本研究で開発したドップラーOCTシステムは、高輝度シグナルを指標に卵巣内に存在する卵母細胞の定量化とクオリティー評価を可能とするシステムであることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have examined optical coherence tomography (OCT) for noninvasive analysis of follicular development in mice 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 OCT images were identified each developmental stage from primary follicle (50 μm in diameter) to antral follicle (350 μm in diameter) in the ovary of 25.5-day-old mouse. 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 OCT techniques are effective to analyze the development of follicles and oocytes in ovaries.

研究分野：生殖生物学

キーワード：光干渉断層撮影 卵母細胞 発生 加齢 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。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精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ため、卵巣内に存在する全ての発達段階の卵胞のリアルタイム観察が期待できる。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。したがって、本研究で開発する計測システムは、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を応用した 3次元卵胞イメージングシステムの開発を目的とする。具体的には、OCT を基盤とするドップラー-OCT 技術により卵巣内の卵胞を無侵襲的に画像撮影し、卵胞サイズと位置情報をイメージできる高感度計測システムを開発する。OCT 計測の解像度と解析能力の向上により、従来の画像解析技術では実現できなかった (1) 全発達段階の卵胞の定量化と (2) 3次元局在解析を目指す。卵巣の組織学的解析や 3次元画像構築により計測システムの性能を評価するとともに、加齢マウス卵巣の解析により OCT の卵巣機能診断システムとしての有用性を検証する。

3. 研究の方法

本研究では、(1) 超高速画像処理技術とドップラー-OCT 技術の開発と、(2) 卵胞の 3次元局在イメージングを行った。具体的には、(1) では卵巣組織表面から 2~3 mm の領域において、全ての発達段階にある卵胞および卵母細胞 (最小サイズ 10 μm) の 3次元計測を可能とするドップラー-OCT システムの開発を目指した。(2) では、マウス卵巣の組織学的解析を行い、新たに開発した OCT システムの画像解析データの信頼性を評価した。

4. 研究成果

(1) OCT システム基盤技術の開発

本研究で使用した OCT システムは、SLD 光源として、中心波長 $\lambda_0 = 841.1 \text{ nm}$ 、半値全幅 $\Delta\lambda = 40.2 \text{ nm}$ を用いた。SLD 光源から出射した光は、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 に分割される。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、サンプルへ照射される。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) を配置する。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) により分光される。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) で検出される。本実験では、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 μm で、横方向分解能は 21.4 μm であった。

(2) ドップラー-OCT 技術の開発

本システムでは、リアルタイムに断層画像をモニタするため、安価で高速演算可能な GPU (Graphics Processing Unit) を用いた。GPU を用いた計算のフローチャートを図 3 に示す。 N_z (光軸方向) $\times N_x$ (横方向) の干渉画像データを測定し、これを GPU メモリへ転送する。GPU では、まず背景成分の除去のため、スペクトルの平均を求める。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、虚部にゼロを代入する。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 回実行する。さらに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、 $N_z/2 \times N_x$ のサイズのデータに対して log スケーリングし、8bit グレースケールへ変換した計算結果を PC のメモリへ転送し、そしてホストコンピュータにて OCT 画像を表示した。

(3) 卵胞の非接触・無侵襲・リアルタイム画像化

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 \times 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 (縦断面: 図 1a-c) と平均画像 (図 1d) を得ることができた。卵巣内の卵胞は、原始卵胞 (直径約 20 μm) から 1次卵胞 (直径 50~130 μm)、2次卵胞 (直径 290~310 μm)、卵胞液腔を形成する胞状

卵胞(直径 400~500 μm)へと発育を続け、成熟卵胞となる。今回の観察では、成熟した胞状卵胞において卵胞腔と卵母細胞が明確に識別できた。それより小さい卵胞は、平均画像において、明確に識別することができた。画像よりその大きさを調べた結果、直径約 50 μm であり、1次卵胞であると推測される。

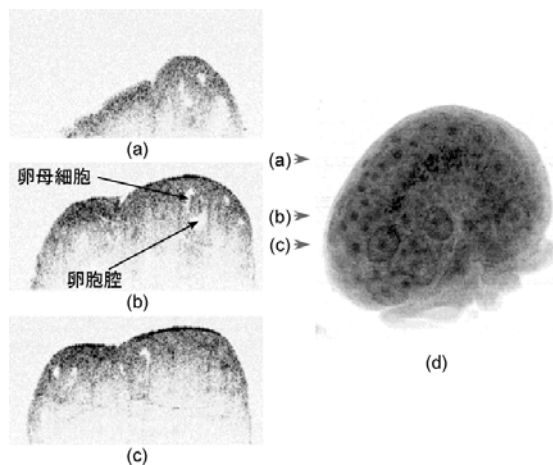


図 1. 25.5 日齢マウスの卵巣の 3 次元 OCT イメージング。(a) - (c) OCT 画像(横 2.2mm、深さ 0.97mm)、(d) 平均画像を示す。

(4) OCT システムの評価

OCT で計測された卵胞様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た。その後、ミクロトームを用いて、各卵巣すべてを 5 μm の厚さで連続切片にし、ヘマトキシリン-エオシン (HE) で核および細胞質を染色した。図 2 に組織画像と OCT 画像(横断面)を示す。組織画像と OCT 画像の比較より、本 OCT システムでは、卵胞液腔を形成する胞状卵胞から、約 50 μm の大きさの 1次卵胞までが画像化されていることがわかった。

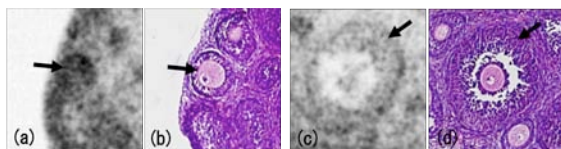


図 2. (a,c) マウス卵巣の OCT 画像と (b,d) 同卵巣の組織像(光学顕微鏡観察)。1次卵胞は、OCT 画像では全体的に濃色に描写される (b: 矢印)。胞状卵胞では、卵胞腔と卵母細胞が識別でき、卵胞膜の構造も明確に観察される (c: 矢印)。

(5) ドップラー-OCT 技術の開発

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 μm 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断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 (1024×500×500 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。ドップラー-OCT 技術を用いてマウス卵巣を観察した結果、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 (図 3)。

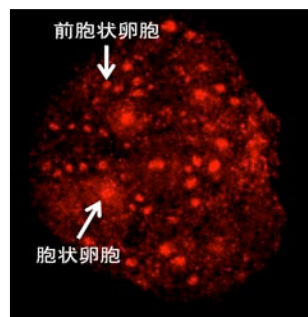


図 3. ドップラー-OCT 技術により観察したマウス卵巣。個々の卵母細胞が明確に描写されている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Sato M., Saito D., Shoji K., Kurotani R., Abe H., Nishidate I. (2016) Ultrathin forward-imaging short multimode fiber probe for full-field optical coherence tomography. *Opt. Commun.*, 381:296-308. DOI: 10.1016/j.optcom.2016.07.012
- ② Watanabe Y., Takakura K., Kurotani R., Abe H. (2015) Optical coherence tomography imaging for analysis of follicular development in ovarian tissue. *Appl. Optics*, 54 (19): 6111-6115. DOI: 10.1364/AO.54.006111

[学会発表] (計 15 件)

- ① 高倉啓、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2015) ドップラー光干渉断層撮影法を応用したウシ卵母細胞イメージング技術の開発、第 53 回東北生殖医学会総会・学術講演会 (山形市、ホテルキャッスル山形、2015 年 10 月 3 日)
- ② Takakura K., Kurotani R., Watanabe Y., Abe H. (2015) Development of 3D imaging system of follicles in mouse ovary using optical coherence tomography. IFFS/JSRM International Meeting 2015 (Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, April 26-29, 2015)
- ③ 渡部裕輝、高倉啓、黒谷玲子、阿部宏之 (2014) OCT を用いたマウス卵巣内卵胞のリアルタイム計測、日本光学会年次学術講演会 (東京都、筑波大学東京キャンパス文京校舎、2014 年 11 月 5-7 日)
- ④ 高倉啓、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2014) ドップラー光干渉断層画像化技術を応用したマウス卵胞の三次元非侵襲イメージング、日本動物学会第 85 回大会 (仙台市、東北大学川内北キャンパス、2014 年 9 月 11-13 日)
- ⑤ 高倉啓、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2014) ドップラー光干渉断層画像化法を応用した高感度卵胞 3 次元イメージング、第 32 回日本受精着床学会学術講演会 (東京都、ハイアットリージェンシー東京、2014 年 7 月 31 日-8 月 1 日)
- ⑥ 高倉啓、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2014) ドップラー光干渉断層撮影法を応用したマウス卵胞の高感度 3 次元イメージング解析、日本動物学会平成 26 年度東北支部大会 (盛岡市、岩手大学復興祈念銀河ホール、2014 年 7 月 12-13 日)
- ⑦ 高倉啓、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2014) ドップラー光干渉断層画像化技術を応用した 3 次元卵胞イメージングシステムの開発、第 55 回日本卵子学会 (神戸市、神戸国際会議場、2014 年 5 月 17-18 日)
- ⑧ 高倉啓、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2013) 光干渉断層画像化法を用いたマウス卵巣内卵胞の非侵襲的定量解析、第 106 回日本繁殖生物学会大会 (東京都、東京農工大学農学部府中キャンパス、2013 年 9 月 12-14 日)
- ⑨ 阿部宏之、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、渡部裕輝 (2013) 光干渉断層画像化法を応用したマウス卵胞の非侵襲イメージングシステムの開発、第 31 回日本受精着床学会学術講演会 (大分県別府市、別府国際コンベンションセンター、2013 年 8 月 8-9 日)
- ⑩ 阿部宏之、高倉啓、坂原聖士、黒谷玲子、渡部裕輝 (2013) 光干渉断層画像化法を応用したマウス卵胞の非侵襲イメージング、日本動物学会平成 25 年度東北支部

大会 (秋田県秋田市、秋田大学手形キャンパス大学会館クレール、2013 年 7 月 20 日)

- ⑪ 高倉啓、栢本亮太、黒谷玲子、渡部裕輝、阿部宏之 (2013) 光干渉断層撮影法を応用したマウス卵巣内卵胞の非侵襲的観察、第 54 回日本卵子学会 (東京都、学術総合センター、2013 年 5 月 25-26 日)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://abe-labo.yz.yamagata-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

渡部 裕輝 (WATANABE, Yuki)
山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：00333328

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

黒谷 玲子 (KUROTANI, Reiko)
高倉 啓 (TAKAKURA, Kei)