

学 位 論 文 要 旨

氏名 増田 康充

題 目 : THREE-DIMENSIONAL LIVE IMAGING OF BOVINE EMBRYOS BY OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY AND ITS APPLICATION FOR EMBRYO TRANSFER

(光干渉断層撮像法を用いたウシ胚の 3D ライブイメージングと胚移植における応用に関する研究)

論文要旨 :

ウシの受精卵移植技術は、優良な肉用牛や乳用牛の増産・改良のために世界の畜産現場において広く普及している。しかし、人工授精で生産される体内生産胚あるいは体外受精 (IVF) で生産される体外生産胚のいずれにおいても移植受胎率は低く、技術の改善が望まれている。ヒトにおける生殖補助医療 (ART) では、移植胚は Veeck 分類と Gardner 分類を基準に評価されることが多いが、近年では、タイムラプスシネマトグラフィーを用いた経時的解析が有効な評価方法として用いられつつあり、中でも受精卵の前核もしくは核の数、第一卵割のタイミングや卵割後の割球の数などの指標は ART における着床率の向上に貢献している。一方で、ウシの移植胚は光学顕微鏡を用いた形態観察により国際胚移植学会 (IETS) の指標に基づいた品質判定を経て主観的に選別されるのが一般的であり、的確な選別は受胎率を向上させる。この選別には術者の高い選別技術が必要である。こういった現状から、ウシにおける胚移植のさらなる普及にはより効果的かつ客観的な胚の選別手法が求められている。

光干渉断層撮像 (OCT) 技術は、生体透過性に優れ、非侵襲的に生体内情報を横断断層画像として描出する技術であり、ヒト医療の臨床において眼科の緑内障診断に活用されている。OCT は高い空間分解能で 3 次元 (3D) 画像の観察およびその画像を用いた形態計測が可能な高深度断層撮像システムであり、*in vitro* での血管新生における微細な血管構造を撮像・画像化できることが報告されているが、OCT による胚の画像化に関わる報告は乏しく、ウシ胚の構造を定量化することで胚の品質を評価する手法は報告されていない。本研究では、移植に用いるウシ胚の品質を評価する客観的な手法を確立する目的で、OCT 技術を用いてウシ胚の外部形態と内部構造の非侵襲的な断面画像を撮影し、3D 画像を構築することで複数の形態的パラメーターを定量化することを試みるとともに、撮像胚を移植し、妊娠および分娩について調査した。

第 2 章では、ウシ移植胚を評価するために、OCT によって撮像した 3D 画像を用いて、生存胚の形態的パラメーターを定量化した。ウシ胚は、黒毛和種から経膈採卵 (OPU) にて回収した卵丘卵子複合体 (COCs) を用いて IVF によって生産されたものを用いた。実験には、IVF 後 7 日間の培養で拡張胚盤胞に達し、光学顕微鏡下において IETS の指標 Code 1 と

分類された 7 胚を用い、OCT による 3D 画像撮像後に移植した。3D 画像から拡張胚盤胞の内部細胞塊 (ICM)、栄養外胚葉 (TE)、透明帯 (ZP) の厚さと体積、および胞胚腔と胚全体の体積を含む 22 のパラメーターを定量化することができた。ICM, TE, ZP および TE + ZP の平均厚はそれぞれ、50.9, 3.8, 14.3 および 18.7 μm であった。ICM, TE, ZP, TE + ZP, ICM + TE + ZP, 胞胚腔および胚全体の体積はそれぞれ、3.2, 3.0, 15.0, 17.4, 20.6, 12.8 および $33.4 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ であった。また、胞胚腔の平均径は 51.7 μm であった。移植した 7 胚のうち 4 胚が受胎したことから、OCT 撮像とその画像をもとに抽出した 22 のパラメーターは、移植に供するウシ胚の品質評価に応用できる可能性が考えられた。

第 3 章では、ウシ着床前胚の発生能を評価するために、第 2 章と同様の OCT を用いて 2 細胞期および胚盤胞期の生存しているウシ胚の画像を取得し、ICM の体積や TE の厚さなど、胚盤胞における 22 のパラメーターを定量化するとともに、OCT 撮像後に移植した 30 胚について妊娠診断を実施し、妊娠した例については分娩まで追跡した。ウシ胚は、第 2 章と同様に作成し、胚盤胞期胚の撮像には IETS 指標の Code 1 に分類されたものを用いた。OCT 画像では 2 細胞期胚の核が明確に観察され、多核割球における核も明瞭に観察された。OCT 撮像後に移植した胚の移植受胎率は 50% (15/30) であり、新生子牛において異常体重や死産は認められず、OCT が移植胚に著しい影響を与えなかったと推察された。主成分分析では、胚の形態的パラメーターの中で受胎に関連するパラメーターの特定には至らなかったが、階層的クラスタリング解析では、一クラスターにおいて、受胎した胚と受胎しなかった胚の TE 体積に有意な差が認められたことから、TE 体積によってウシ胚の品質を評価できる可能性が示唆された。

本研究で確立した OCT を用いたウシ胚形態の定量的評価は、ウシ胚の発育ステージ毎の形態的变化の調査に客観性を付与するとともに、移植に供するウシ胚の客観的な品質評価に役立つことが期待される。

学位論文審査の結果の要旨

氏名	増田 康充
審査委員	主査： 鳥取大学 教授 山野 好章
	副査： 鳥取大学 教授 菱沼 貢
	副査： 鹿児島大学 教授 浅野 淳
	副査： 鳥取大学 教授 日笠 喜朗
	副査： 鳥取大学 准教授 樋口 雅司
題目	THREE-DIMENSIONAL LIVE IMAGING OF BOVINE EMBRYOS BY OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY AND ITS APPLICATION FOR EMBRYO TRANSFER (光干渉断層撮像法を用いたウシ胚の 3D ライブイメージングと胚移植における応用に関する研究)
審査結果の要旨： ウシの受精卵移植技術は、優良な肉用牛や乳用牛の増産・改良のために世界の畜産現場において広く普及している。しかし、人工授精で生産される体内生産胚あるいは体外受精 (IVF) で生産される体外生産胚のいずれにおいても移植受胎率は低く、技術の改善が望まれている。ヒトにおける生殖補助医療 (ART) では、移植胚は Veeck 分類と Gardner 分類を基準に評価されることが多いが、近年では、タイムラプスシネマトグラフィーを用いた経時的解析が有効な評価方法として用いられつつあり、中でも受精卵の前核もしくは核の数、第一卵割のタイミングや卵割後の割球の数などの指標は ART における着床率の向上に貢献している。一方で、ウシの移植胚は光学顕微鏡を用いた形態観察により国際胚移植学会 (IETS) の指標に基づいた品質判定を経て主観的に選別されるのが一般的であり、的確な選別は受胎率を向上させる。この選別には術者の高い選別技術が必要である。このような現状から、ウシにおける胚移植のさらなる普及にはより効果的かつ客観的な胚の選別手法が求められている。 光干渉断層撮像 (OCT) 技術は、生体透過性に優れ、非侵襲的に生体内情報を横断断層画像として描出する技術であり、ヒト医療の臨床において眼科の緑内障診断に活用されている。OCT は高い空間分解能で 3 次元 (3D) 画像の観察およびその画像を用いた形態計測が可能な高深度断層撮像システムであり、 <i>in vitro</i> での血管新生における微細な血管構造を撮像・画像化できることが報告されているが、OCT による胚の画像化に関わる報告は乏しく、ウシ胚の構造を定量化することで胚の品質を評価する手法は報告されていない。本研究では、移植に用いるウシ胚の品質を評価する客観的な手法を確立する目的で、OCT 技術を用いてウシ胚の	

外部形態と内部構造の非侵襲的な断面画像を撮影し、3D 画像を構築することで複数の形態的パラメーターを定量化することを試みるとともに、撮像胚を移植し、妊娠および分娩について調査した。

第 2 章では、ウシ移植胚を評価するために、OCT によって撮像した 3D 画像を用いて、生存胚の形態的パラメーターを定量化した。ウシ胚は、黒毛和種から経膈採卵 (OPU) にて回収した卵丘卵子複合体 (COCs) を用いて IVF によって生産されたものを用いた。実験には、IVF 後 7 日間の培養で拡張胚盤胞に達し、光学顕微鏡下において IETS の指標 Code 1 と分類された 7 胚を用い、OCT による 3D 画像撮像後に移植した。3D 画像から拡張胚盤胞の内部細胞塊 (ICM)、栄養外胚葉 (TE)、透明帯 (ZP) の厚さと体積、および胞胚腔と胚全体の体積を含む 22 のパラメーターを定量化することができた。ICM, TE, ZP および TE + ZP の平均厚はそれぞれ、50.9, 3.8, 14.3 および 18.7 μm であった。ICM, TE, ZP, TE + ZP, ICM + TE + ZP, 胞胚腔および胚全体の体積はそれぞれ、3.2, 3.0, 15.0, 17.4, 20.6, 12.8 および $33.4 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ であった。また、胞胚腔の平均径は 51.7 μm であった。移植した 7 胚のうち 4 胚が受胎したことから、OCT 撮像とその画像をもとに抽出した 22 のパラメーターは、移植に供するウシ胚の品質評価に応用できる可能性が考えられた。

第 3 章では、ウシ着床前胚の発生能を評価するために、第 2 章と同様の OCT を用いて 2 細胞期および胚盤胞期の生存しているウシ胚の画像を取得し、ICM の体積や TE の厚さなど、胚盤胞における 22 のパラメーターを定量化するとともに、OCT 撮像後に移植した 30 胚について妊娠診断を実施し、妊娠した例については分娩まで追跡した。ウシ胚は、第 2 章と同様に作成し、胚盤胞期胚の撮像には IETS 指標の Code 1 に分類されたものを用いた。OCT 画像では 2 細胞期胚の核が明確に観察され、多核割球における核も明瞭に観察された。OCT 撮像後に移植した胚の移植受胎率は 50% (15/30) であり、新生子牛において異常体重や死産は認められず、OCT が移植胚に著しい影響を与えなかったと推察された。主成分分析では、胚の形態的パラメーターの中で受胎に関連するパラメーターの特定には至らなかったが、階層的クラスタリング解析では、一クラスターにおいて、受胎した胚と受胎しなかった胚の TE 体積に有意な差が認められたことから、TE 体積によってウシ胚の品質を評価できる可能性が示唆された。

本研究で確立した OCT を用いたウシ胚形態の定量的評価は、ウシ胚の発育ステージ毎の形態的変化の調査に客観性を付与するとともに、移植に供するウシ胚の客観的な品質評価に役立つことが期待される。

以上により本論文は、博士 (獣医学) の学位論文として十分な基準に達していると判断された。