

3次元内部構造顕微鏡装置（3D-ISM）を用いたウマ卵巢内部構造の観察

木村 順平¹, 平野 悠子², 猪飼 志保¹, 竹本 智子^{3,4}, 中村 佐紀子³, 横田 秀夫³,
姫野 龍太郎^{3,4}, 三島 健稔^{3,4}, 南保 泰雄⁵, 津曲 茂久¹, 松井 基純², 三宅 陽一²

¹ 日本大学生物資源科学部 獣医学科
神奈川県藤沢市亀井野 1 8 6 6
e-mail: kimura@brs.nihon-u.ac.jp

² 帯広畜産大学 獣医学科
北海道帯広市稲田町西 2 - 1 1
e-mail: s01099@st.obihiro.ac.jp

³ 埼玉大学大学院 理工学研究科
埼玉県さいたま市桜区下大久保 2 5 5
e-mail: satoko@me.ics.saitama-u.ac.jp

⁴ 理化学研究所 生体力学シミュレーション特別研究ユニット
埼玉県和光市広沢 2 - 1

⁵ JRA 日高育成牧場
北海道浦河郡浦河町字西舎 5 3 5 - 1 3

要旨

ウマの卵巢は形態の特異性から卵巢全体の内部構造の観察が困難とされてきた。そこで 3D-ISM をウマ卵巢観察に応用したところあらゆる断面観察が可能となり、さらに VoxelViewer やセグメンテーション技術の開発に伴い三次元像再構築や形態計測等が行えるようになった。

1. はじめに

1-1. ウマ卵巢の解剖学的特徴

ウマ卵巢は他の哺乳類と比較して極めて特異的な形態を有している。ウマの卵巢は著しく大きく、大型の繁殖牝馬では最長軸が 8 ~ 10 cm 程度にまで及ぶ。そのため、従来の組織学的技術では卵巢全体の内部観察は不十分とされてきた。また、多くの哺乳類では髄質が内側で皮質が外側に位置しており、卵胞（※1）は皮質内で発育してどの箇所からでも排卵（※2）することができる。しかしウマでは皮質と髄質の位置が逆転しており、内部の大部分を皮質が占め、表面を髄質が被っている。髄質は卵管采付近で途切れて皮質が表面を占め、その表層は表面上皮で被われている。この部分

は排卵窩とよばれ、ウマの排卵はここでしか行われぬ。

※1 卵胞： 卵巣内にみられる球形の細胞塊。中に卵細胞を入れる。発育段階により原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、三次卵胞（胞状卵胞）、成熟卵胞（グラーフ卵胞）とよばれる。主に発情に関与するホルモンであるエストロジェンを産生する。

※2 排卵： 卵胞から卵子が排出すること。

1-2. ウマの繁殖生理

ウマは典型的な長日繁殖動物である。長日繁殖動物は日照時間の長くなる春から夏にかけて繁殖活動を行い、秋から冬には非繁殖期となる。発情周期の長さは平均 23 日で、卵胞の発育・閉鎖、排卵および黄体（※3）形成・退行という卵巣内部の変化が周期的に繰返される。発情周期中の卵巣内部の変化はホルモンという微量の生理活性物質により複雑にコントロールされている。また、ウマは通常 1 回に 1 個排卵する単排卵動物である。

※3 黄体： 卵巣内の卵胞破裂部位に形成される黄色の内分泌組織。多数の小血管と黄体細胞からなる。主に妊娠の維持等に関与するホルモンであるプロジェステロンを産生する。

1-3. 実験の背景と目的

家畜の飼養によって生計を立てている農家にとって、交配は非常に重要なものであり、1 年 1 産の大型家畜動物であればなおさらのことである。特に繁殖活動の時期が限定されているウマでは、発情周期をきちんと把握して交配する機会をできるだけ多くつくることが重要である。超音波画像診断装置は卵巣内モニタリングに有効な手段であり、これを用いた卵胞発育に関する研究は多く報告されている。しかし、卵巣観察のほとんどは 2 次元的なものであり、3 次元的な卵巣内の構造および動態に関しては不明な点が多い。そこで、本研究では画像診断に有用なウマの卵巣内部構造の詳細な基礎データを収集するために、3 次元内部構造顕微鏡装置（以下、3D-ISM）および画像処理プログラムの適用について検討を行った。

2. 材料と方法

2-1. 材料

1999 年 5 月～9 月上旬、2000 年 3 月～4 月および 2001 年 8 月に、日本中央競馬会競走馬総合研究所にて安楽死または斃死したサラブレッド種の雌 12 頭から卵巣計 24 個を採取し、供試材料とした。死亡前に頸静脈より血液採取を行った。

2-3. 卵巣断面画像の取得

採取した卵巣を直ちに 10%ホルマリン溶液にて固定した。卵巣を PBS にてよく洗浄した後周囲の結合組織をできる限り取り除き、卵管は切除した。次に卵巣を長軸方向の断面となるように OCT コンパウンド(サクラファインテック (株))で凍結包埋

した。次に 3D-ISM にて $30\ \mu\text{m}$ 間隔で切削を行い白色光源下で CCD カメラ撮影により断面画像を取得した。各画像の X、Y 方向分解能は $188\ \mu\text{m}$ 、Z 方向は $30\ \mu\text{m}$ であった。

2-3. 断面画像の観察

卵巣の断面画像から黄体、出血体および退行黄体の分類を試みた。また、肉眼的に観察可能な卵胞の数をカウントした。さらに卵胞を球形であると仮定し、卵胞が認められる断面画像の枚数に切削厚さの $30\ \mu\text{m}$ を乗じて卵胞の直径とした (図 1)。

2-4. 画像処理

1) 立体画像の再構築

3次元画像解析ソフトウェア Voxel Viewer (東芝機械) を用いてボリウムレンダリングを行い、卵巣の3次元立体像を再構築し(図 2 a)、さらに体積測定を行った。

2) 画像抽出

卵巣内の卵胞および黄体に対して領域の抽出を行った。卵胞に対しては統計的手法を用いた領域判別を半自動的に行い、黄体に対しては RV エディタ (RIKEN) を用いて直交 3 断面 (x,y,z) を作成し、マニュアルで直接抽出を行った。その後、ボクセルデータに変換して上述の方法により 3次元立体像を構築し、体積を測定した。

また、卵巣内の空間的位置関係を可視化するために卵巣と卵巣内構造物の不透明度の設定を変えてから 3次元再構築を行った (図 2 b)。

3) 血中ホルモン濃度測定

採取した血液を用いて血中ホルモン濃度の測定を行った。血液は遠心分離後、冷蔵保存した。血中エストラジオール濃度 (以下、 E_2) は、血漿をドライアイス-メタノール法によりエーテル抽出した後、アセトニトリルおよびヘキサンを用いた脱脂肪処理を行い、2 抗体法 RIA にて測定した。血中プロゲステロン濃度 (以下、 P_4) はエーテル抽出後、2 抗体法 RIA にて測定した。 E_2 および P_4 測定には、米国 Colorado State University の G.D.Niswender 博士より供与された抗 E_2 血清(GDN244)および抗 P_4 血清(GDN337)を使用した。 E_2 の測定内および測定間変動係数は 4.8% および 5.8%、 P_4 の測定内および測定間変動係数は 3.5% および 13.4% であった。

測定結果より、血中 P_4 値が $1.0\ \text{ng/ml}$ 未満のものを「卵胞期群」、 $1.0\ \text{ng/ml}$ 以上のものを「黄体期群」として分類した。

4) 統計学的処理

全てのデータは平均±標準誤差で示した。2群間の比較には t 検定またはマンホイットニーの U 検定を用い、多群間の比較については二元配置分散分析の後、Scheffe の多重比較検定を行った。 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

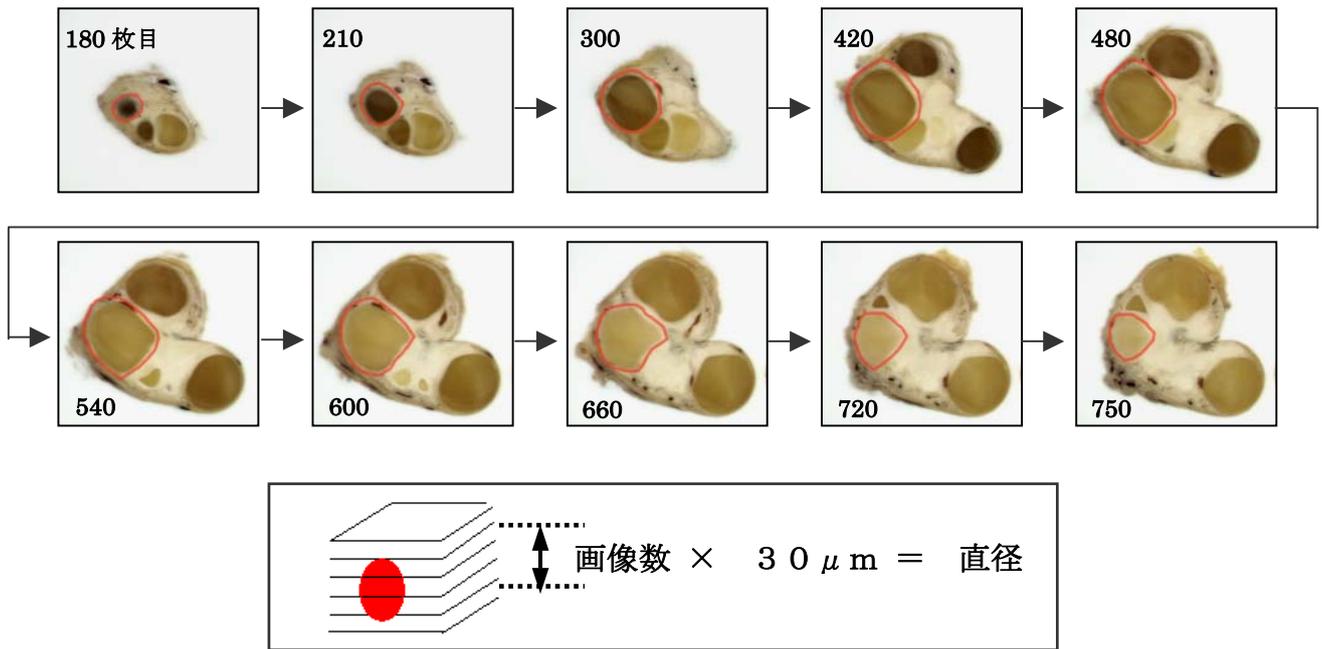


図 1. 卵胞計測法



(図 2 a)



(図 2 b)

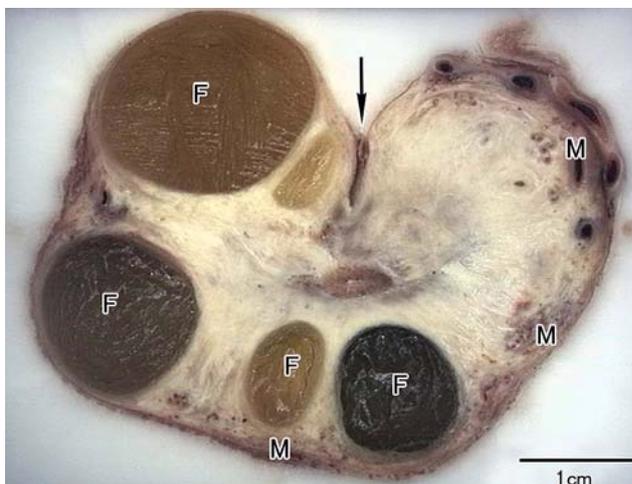
図 2. 再構築された 3 次元立体像

3. 結果

3-1. 卵巣内部構造

断面画像より皮質、髓質および排卵窩の位置関係が明らかとなった(図4 a, カラー Fig.1)。すなわち排卵窩は卵巣中央部に位置し、卵胞、黄体および出血体を含む広範囲の卵巣皮質に囲まれていた。髓質は辺縁の狭い範囲のみに認められた。出血体には大量に血液が充満していることが確認された(図4 b, カラー Fig.2)。黄体は黄体層を有する様々な形態の構造物として認められ、退行黄体は小さな痕跡的な形態として観察された(図4 b, カラー Fig.2)。また、排卵窩に向けて形の歪んでいる排卵前の大型卵胞も観察された(図4 b, カラー Fig.2)。

さらに、卵巣の立体再構築画像の可視化(図5, カラー Fig.3・4・5)により、卵胞、黄体、出血体および排卵窩の空間的位置関係が明らかとなった。排卵間近の大型卵胞、黄体および出血体が排卵窩に向っている様子を立体的に観察することができた。



→ : 排卵窩の位置を示す
M : 髓質部を示す
F : 卵胞

図4 a. 卵巣断面画像-1
(巻頭カラーFig.1 参照)

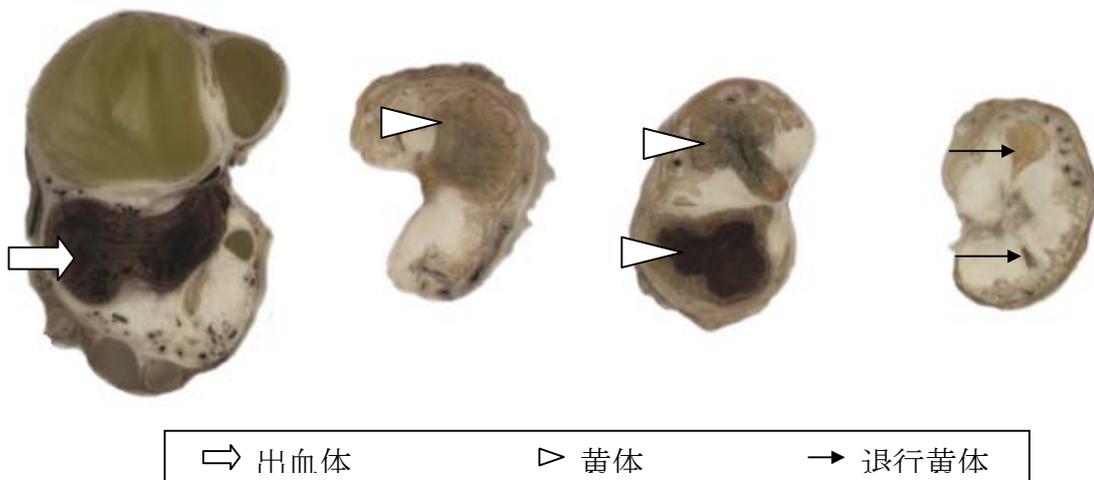
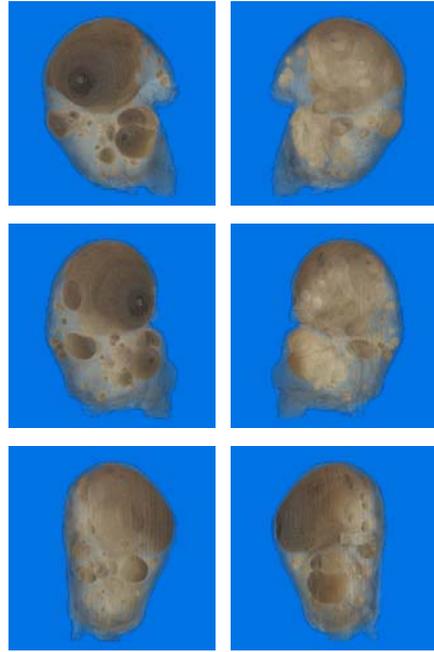


図4 b. 卵巣断面画像-2
(巻頭カラーFig.2 参照)

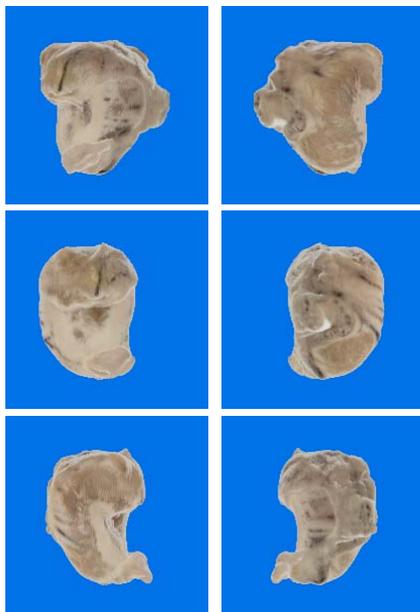
卵巣の3次元再構築像(卵胞期)
(不透明度=255)



卵巣の3次元再構築可視化像(卵胞期)
(不透明度: 卵巣=5、構造物=255)



卵巣の3次元再構築像(黄体期)
(不透明度=255)



卵巣の3次元再構築可視化像(黄体期)
(不透明度: 卵巣=5、構造物=255)

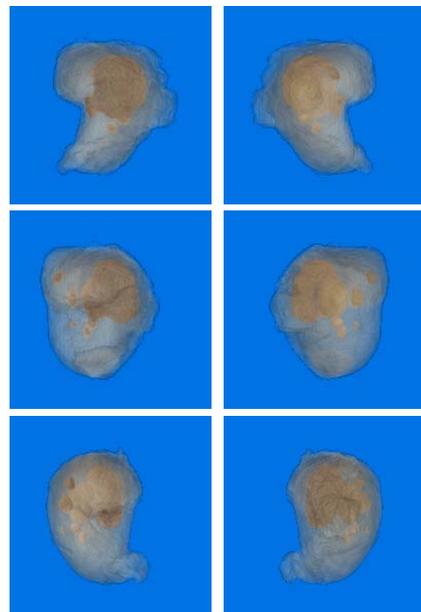


図5. 3次元再構築画像(上段: 卵胞期群 下段: 黄体期群)
(巻頭カラーFig.3、Fig.4、Fig.5 参照)

排卵窩のある側を軸に360度(60度×6回)回転させた画像。
可視化画像は卵巣の不透明度を5にし、構造物の不透明度を255に設定。

3-2. 卵巣体積および構造物の体積

卵胞期群の卵巣体積 ($89.2 \pm 24.7 \text{mm}^3$) は黄体群の卵巣体積 ($39.5 \pm 3.6 \text{mm}^3$) と比べて有意に大きかった (図 6 a)。また、各個体の両卵巣の差は卵胞期群で大きい傾向があったが、有意差はなかった (図 6 b)。

さらに抽出した卵巣内構造物の体積を測定したところ、図 5 上段に示した卵胞期群の卵巣内に存在する卵胞の総体積は 36.3cm^3 であり、卵巣全体 (119.1cm^3) の約 30% を占有していた。このうち、大型卵胞の体積は 27.5cm^3 あり、総卵胞体積の 75% であった (表 1)。また、図 5 下段に示した黄体期群の卵巣内に存在する卵胞の総体積は 0.9cm^3 、黄体の体積 2.5cm^3 であり、それぞれ卵巣体積 (34.6cm^3) の 3% および 7% を占めていた (表 1)。

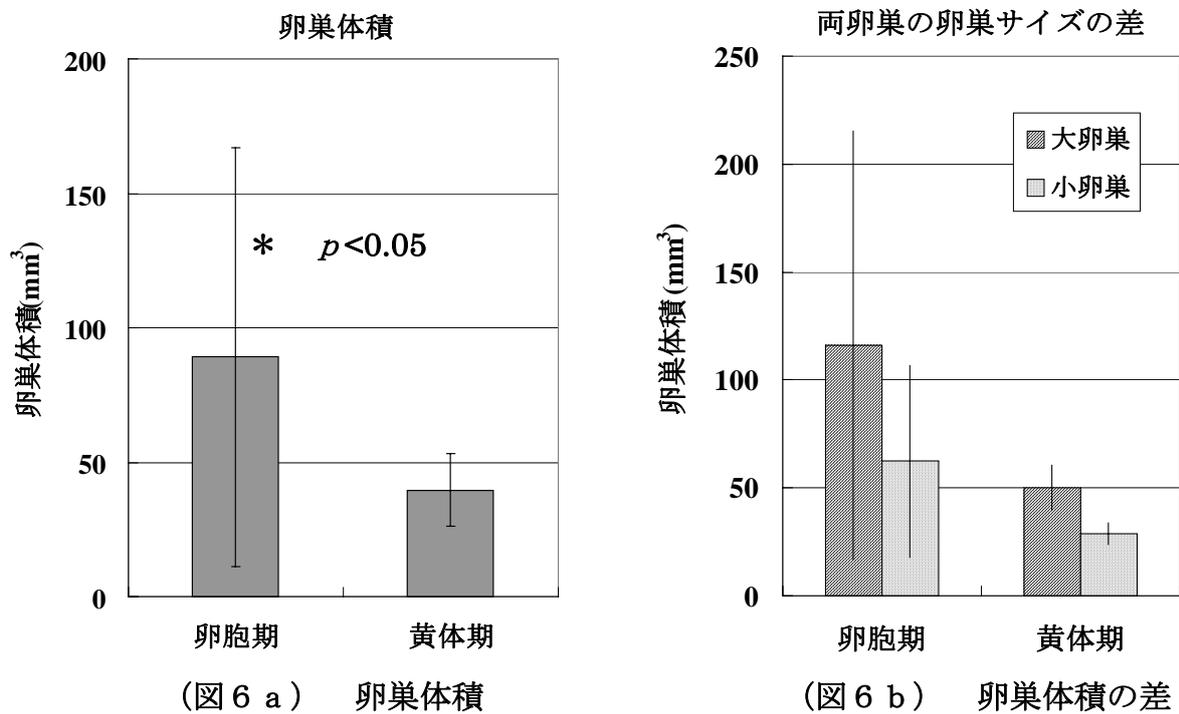


図 6. 卵巣体積

	卵胞期群 (1 例)	黄体期群 (1 例)
卵巣体積 (cm^3)	119.1	34.6
総卵胞体積 (cm^3)	36.3 [30%]	0.9 [3%]
黄体 (cm^3)	—	2.5 [7%]

表 1. 卵巣体積と卵巣内構造物の体積
([] 内は卵巣体積に対する占有率を示す)

3-3. 卵胞サイズと卵胞数

図7より卵胞期群では1-5mmの卵胞数が他のサイズと比べて有意に多かった。黄体期群では卵胞数に有意差はみられなかったが、卵胞期群と同様に小卵胞数が多い傾向にあった。また卵胞期群と黄体期群の卵胞数をサイズ毎に比較したところ、1-5mmの卵胞に関しては卵胞期群の方が有意に多い傾向にあった。

次に、排卵に近い大型卵胞 (>40mm) をもつ個体を調べたところ、卵胞期群は5頭中3頭、対して黄体期群には7頭中0頭に認められた (表2)。卵胞期群で大型卵胞をもつ検体の平均血中 E₂ 値 (18.0±2.7 pg/ml) は、大型卵胞をもたない検体の血中 E₂ 値 (5.9±4.1 pg/ml) に対して有意に高いことがわかった。

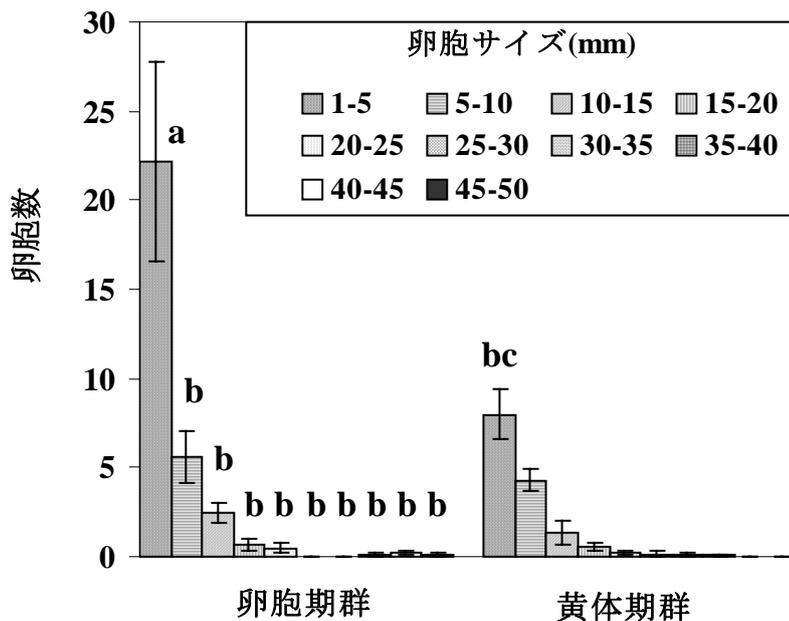


図7. 卵胞サイズと卵胞数 (群別)

	大型卵胞あり	黄体あり	出血体あり
卵胞期群 (5頭)	3/5	2/5	1/5
黄体期群 (7頭)	0/7	6/7	0/7

表2. 大型卵胞、黄体および出血体をもつ検体 (頭) の割合

3-4. 出血体、黄体および退行黄体の数

出血体は黄体期群には見られず、卵胞期群に1頭認められた (表2)。また、黄体期群では7頭中6頭に黄体がみられたのに対し、卵胞期群では5頭中2頭であった (表2)。しかし、卵胞期群は P₄ 値が 1.0 ng/ml 以下であるため、認められた黄体はいずれも機能していないと考えられた。

4. まとめと考察

ウマ卵巢全体の断面画像から皮質、髄質および排卵窩の位置関係が明確となり、さらに卵胞、黄体および出血体が肉眼的に分類された。特に卵胞に関しては、超音波診断装置による観察が困難である5 mm以下の小卵胞を観察することが可能となり、詳細な観察を行えるようになった。また、卵巢画像の立体化および可視化によって卵巢内構造物や排卵窩の3次元的位置関係が明らかとなり、大型卵胞、出血体および黄体の先端部が排卵窩へ向っていることが実証された。卵胞や黄体の立体構造が明確に示されたのはこれが初めてであり、今回示したような扁平な黄体構造などは全く新しい知見である。

さらにボクセルデータから体積算出することで、卵巢だけでなく卵胞、黄体および出血体といった構造物の体積や表面積の測定が可能となった。これにより様々な形態を呈する卵巢内構造物（特に出血体や黄体）を比較する際に有効な手段となることが示唆された。

P_4 濃度の低い卵胞期群ではLH（黄体形成ホルモン）が増加するので小卵胞の発育を促進させる。そのため黄体期群に比べて小卵胞が有意に多く大型卵胞が存在するので、卵巢体積が大きくなるのではないかと考えられた。また、大きな卵胞ほど E_2 産生量が増加するので、大型卵胞をもつ方がもたないものに比べて E_2 濃度が高くなる。一方、 P_4 濃度の高い黄体期群ではLHが抑制されるために大型卵胞が形成されないと考えられた。また、 P_4 濃度が高いということは観察される黄体が機能的であることを示す指標となる。

5. 結論

3D-ISMによって鮮明なウマ卵巢断面画像が得られた。スライサ部分が自動制御で高速回転であるため非常に効率よく連続断面画像を得ることが可能となった。取得した画像より三次元化および領域抽出を行ったところ、卵巢内の立体的配置や体積および表面積といった視覚的情報および数値データを得ることが可能となった。これらの情報に生理学的な情報を付随することによりウマ卵巢の詳細な解析が可能であるということが示唆された。また、画像診断における基礎的なデータの作成に3D-ISMは極めて有用であると考えられた。

参考文献

- [1] Gastal, E.L., Bergfelt, D.R., Nogueira G.P., Gastal, M.O., Ginther, O.J., 1999. Role of luteinizing hormone in follicle deviation based on manipulating progesterone concentrations in mares. *Biol. Reprod.* 61, 1492-1498.
- [2] Ginther, O.J., 1992. *Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects*, Second Edition. Equiservice, Wisconsin, USA.
- [3] Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Beg, M.A., 2005. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biol. Reprod.* 73, 315-323.
- [4] Kimura, J., Tsukise, A., Yokota, H., Nambo, Y., Higuchi, T., 2001. The application of three-dimensional internal structure microscopy in the observation of mare ovary. *Anat. Histol. Embryol.* 30, 309-312.
- [5] Kimura, J., Hirano, Y., Takemoto, S., Nambo, Y., Ishinazaka, T., Himeno, R.,

Mishima, T., Tsumagari, S., Yokota, H., 2005. Three-dimensional reconstruction of the equine ovary. *Anat. Histol. Embryol.* 34, 48–51.

[6] Nagamine, N., Nambo, Y., Nagata, S., Nagaoka, K., Tsunoda, N., Taniyama, H., Tanaka, Y., Tohei, A., Watanabe, G., Taya, K., 1998. Inhibin secretion in the mare: Localization of inhibin α , β A, and β B subunits in the ovary. *Biol. Reprod.* 59, 1392–1398.

[7] 竹本智子, 平野悠子, 横田秀夫, 中村佐紀子, 木村順平, 南保泰雄, 津曲茂久, 姫野龍太郎, 三島健稔: "生体フルカラー連続断面画像からの組織抽出法の検討(ウマ卵巢内構造物の可視化)", 画像電子学会誌, 第 34 卷, 第 6 号, pp.770-777, Nov. 2005.