

北海道アルバータ酪農科学技術交流協会

海外農業技術セミナー

Overseas Agricultural Technique Seminar

家畜の繁殖領域における超音波診断技術の基礎と応用

牛から卵子まで —繁殖機能を超音波画像に映し出す—

"From cows to oocytes: in vivo imaging of reproductive events"

日時／2010年2月16日（火）13：00～17：00

会場／酪農学園大学 中央館1階 学生ホール



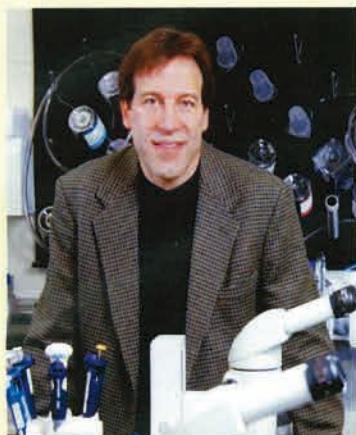
グレッグ・アダムス教授

(カナダ・サスカチワン大学獣医学部生物獣医医科学科)

Dr. Gregg P. Adams, Professor, Veterinary Biomedical Sciences,
Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan



講師紹介



グレッグ・アダムス教授

(カナダ・サスカチワン大学獣医学部生物獣医医科学科)

Dr.Gregg P. Adams, Professor, Veterinary Biomedical Sciences,
Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan

グレッグ・アダムス氏は、1982年にサスカチワン大学獣医学部を卒業後、大動物臨床に4年間従事する。その後、アメリカの専門獣医師(臨床繁殖)の資格を取得するとともに、1991年にウイスコンシン大学より博士号を授与される。1991年よりサスカチワン大学獣医学部の准教授として奉職し、1996年に教授に昇進し現在に至る。

グレッグ・アダムス氏の研究グループは、牛、バッファロー、ラマ、アルパカ、シカ、人など、多くの動物の卵胞ウェーブとそのホルモンコントロールに関する研究に数多くの研究業績を上げている。彼らの研究は、世界的に広く認められ、研究論文の引用も極めて多く、この分野の第一人者である。グレッグ・アダムス氏は、サスカチワン大学より卓越した研究者として表彰されている。また、アダムス氏らの研究グループが行った人の卵巣機能に関する研究論文は、アメリカの科学専門誌「ディスカバリーマガジン」の「2004年の科学的な発見ベスト100」に選ばれる。アダムス氏は、これまで研究論文100編以上を発表するとともに、国内外の学会において80回以上の招待講演を行っている。

プログラム

司会進行：北海道アルバータ酪農科学技術交流協会 事務局長 堂地 修

13:00 開 会

開会あいさつ：北海道アルバータ酪農科学技術交流協会

会長 麻田 信二

13:05 セミナー

**牛から卵子まで
—繁殖機能を超音波画像に映し出す—**
グレッグ・アダムス 教授

通訳：加藤 和代 氏

途中休憩有

16:30 質疑応答

17:00 閉 会

閉会あいさつ：北海道アルバータ酪農科学技術交流協会

副会長 金川 幹司

牛から卵子まで：繁殖事象の超音波画像診断

Gregg P. Adams, Jaswant Singh

Veterinary Biomedical Sciences, Western College of Veterinary Medicine

University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada

サスカチュワーン大学、ウェスタン獣医学部、獣医学生物医学学科

カナダ、サスカチュワーン州サスカトゥーン

はじめに

17世紀のオランダの医師 de Graaf の時代より (Setchell, 1974) 、繁殖機能の研究は、切除した組織の肉眼的検査、および組織学的検査から得られたデータによって行われてきた。いかに詳細な研究であっても、静的な標本を用いたものではダイナミックな生命の過程やそれを制御するメカニズムは除外されざるを得なかった。これまでに生体外 (*ex vivo*) で行われてきた組織検体の研究から得られた知見も多大ではあるが、生殖器系の構造と機能の関係がより深く理解されることになったのは、リアルタイムで検査を行うことができる B モード超音波検査法が導入された 1980 年代になってからのことである。組織機能を制限することも、また歪めることもなく、構造の変化を連続的に視覚化できるようになったことが繁殖生物学の研究に新たな命を吹き込み、私たちの仮説検証アプローチにパラダイムシフトをもたらした。卵巣や子宮のパターン、また実験的処置または治療的処置に対する反応をモニターするために超音波画像診断を取り入れることは、今や研究および臨床診療における常識となっている。

本稿の目的は、牛の繁殖の研究に過去数十年間用いられてきた超音波画像診断の方法および将来有望と思われる新たな手法の概要を示すことにある。まず超音波画像検査が最初に好評を博すことになった子宮と妊娠の画像診断から始め、次に卵胞と黄体の動態に関する知見を飛躍させた卵巣の超音波画像診断について考察し、最後にコンピューターによる画像分析、3D イメージング、血管イメージング、超音波生体顕微鏡検査法といった超音波画像診断の技術的進歩について検討する。

子宮の画像

超音波検査で描出できる生殖管の特徴的な変化は、子宮体の厚さ、血管分布増大と浮腫の徵候、ならびに子宮内、頸管内および腔内の液体貯留に関するものである (図 1; Pierson and Ginther, 1987; 1988b)。発情前期および発情期の -4 日目から -1 日目 (0 日目 = 排

卵)には、1) 子宮体の厚さの増大、2) 初めに子宮内、次いで頸管内および腔内の液体貯留、ならびに3) 子宮角のラセン回転が最小限となるというような特徴が見られる。逆に発情休止期(3~16日目)には、最小限の子宮体の厚さ、わずかな腔内液、および子宮角のラセン回転が最大限であるという特徴を持つ(図1および2)。子宮内膜の不均質なエコーテクスチャ(灰色の濃淡領域が入り交じった様相)は子宮の浮腫を反映しており、間もなく起こる発情および排卵と時間的な関連性を示す。

受胎産物の画像

早期妊娠診断

牛の妊娠診断への超音波検査の利用については多くの報告が存在する(Griffin, 1992, Mee et al., 1994)。雌馬の場合と同様、妊娠の早期診断は子宮腔内に孤立性でエコーフリーの液体のポケットまたはラインが描出されるかどうかによって行われるが、これは後に液体ポケットの進行性の伸長および胚自体の検出によって確定されなければならない。初期の報告では、腔内液の検出によって10日目という早期に妊娠の暫定診断を試みることが可能であることが示唆されている(Kastelic et al., 1991を参照)。しかし、その後の極めて詳細な研究の結果、1) 伸長途上にある受胎産物のサイズは小さく、現在使用可能な主な超音波スキヤナの解像限界(1~3 mm)に近いこと、また、2) 10日目という早期には、妊娠牛の胚胞と区別できない見かけ上正常な少量の自由水が非妊娠牛の子宮内に存在することから、子宮腔内の液体の描出のみに基づく早期診断は信頼できないものであることが示された(Kastelic et al., 1991)。5 MHzのトランスデューサーを用いた18日目以前の早期妊娠診断および7.5 MHzのトランスデューサーを用いた16日目以前の早期妊娠診断の正診率は推測の域(50%)を超えるものではなかった。液体のみに基づく早期妊娠診断の正診率は20日目までに100%に近いものとなる(Kastelic et al., 1991)。妊娠していない牛を次の発情が過ぎてしまう前に検出することが経済的に有利であると考える進歩的な繁殖農家にとって、21日目以前に妊娠を診断できるかどうかが重要となる。20日目に妊娠していないと診断し得る特徴は、間もなく起こる発情と排卵の徵候であり、これには妊娠の場合よりも平均して2~3日早く蓄積する子宮内液、腔内液、子宮緊張の増大、発情に似た子宮のエコーテクスチャおよび退行しつつある黄体が含まれる。

超音波検査は胚損失率の上昇につながるか?

妊娠診断への超音波検査の利用は比較的簡単であるが、それでも誤診を避けるためにはある程度の専門技能が必要である。子宮が骨盤入口よりも頭側に位置しているときは、子宮が骨盤内にあるときよりも偽陰性診断が起こりやすくなる(Szenci et al., 1995)。超音波検査を用いれば触診の場合よりも早期に妊娠を診断できるため、より多くの妊娠損失(早

期胚死滅)を検出することが可能となる。しかし、この技術それ自体が胚死滅を引き起こすことはなさそうである (Ball and Logue, 1994; Baxter and Ward, 1997)。さらに、診断後の妊娠損失(牛が予定日までに流産したり発情に回帰したりすること)の発生率は、妊娠30日目、40日目または50日目以後の妊娠診断実施時期の違いによる差はない(Baxter and Ward, 1997)。牛の直腸検査による妊娠診断に関する研究でも同様の妊娠損失率が報告されており、30~40日目の超音波診断後の損失率は5.5% (Baxter and Ward, 1997)、26~58日目の診断後は8.6% (Szenci et al., 1998)、そして25~45日目の診断後は10% (Mee et al., 1994)と見積もられている。これと比較して、乳牛10群における4,208例の妊娠に関する研究では (Forar et al., 1996)、妊娠45日目(中央値;範囲は38~80日目)の直腸検査後の妊娠損失(発情への回帰、流産の所見、追跡検査)の発生率は10.8% (牛群間の範囲は7.6~13.0%)であった。胚損失の性質も牛で調べられており、その超音波検査上の特徴が記述されている (Kastelic, 1989; Baxter and Ward, 1997)。これらの研究の結果は、子宮の「吸収」が初期受胎産物の一般的な消失機序であるといった誤解をすっかり払拭した。その結果は、胚/胎子の液体と組織が次の発情まで保持されており、次の発情が来て初めて通常は気づかれないままに子宮頸から排出されることを示している。

牛の日常的妊娠診断を超音波検査と直腸検査(触診)のどちらで行うか?

妊娠診断法の有用性については、経験豊富な術者が妊娠を診断し、胎齢(45~108日)を推定できるまでの平均時間は、超音波検査が16.1秒、直腸検査が11.3秒であることをある研究 (Galland et al., 1994) が示している。その著者らは、妊娠45日目以降に超音波を利用した場合、経験豊富な触診者では正診率が高まることはないが、経験の比較的乏しい術者では正診率が高まると結論づけている。胎齢の推定に要する時間は、妊娠45~60日目または90~108日目に比べて65~85日目に長くなった (Galland et al., 1994)。このように中期で要する時間が長かったのは、他の時期に比べて胎子の特徴変化が比較的微妙であるためであると考えられる。

胚/胎子の発達

胚自体、胚の心拍、および牛の受胎産物の発達特徴が、胚および胎子の各発達段階を通じて検出されると報告されている (表1, Curran et al., 1986; Kahn 1989)。妊娠初期には子宮角が輪状平滑筋の分節性収縮から生じた陥凹によって区分され、そうしていくつかの部屋が形成されるため、牛の胚嚢全体を描出することが不可能になると結論づけられた (Kahn et al., 1989)。牛の胎子は妊娠期間を通じて描出することが可能であるが、約90日目を超えると大きくなり過ぎて、標準的な5MHzのプローブでは全体を描出することができなくなる。およそ妊娠7か月以後には子宮が大きく深くなるため、より深部の組織まで透過し、周波数が低め(たとえば3.5MHz)のプローブを使わないと胎子を描出できな

い場合がある。超音波検査は牛の多胎の発生を正確に評価するためにも利用されているが、これが可能なのは胚自体が検出可能になってから（すなわち 20 日目以後）である。ある研究では授精後 49～55 日目 (Davis et al., 1993)、別の研究では授精後 26～107 日目 (Izaike et al., 1991) に多胎が正確に診断された。胚を絶対に見過ごさないよう両子宮角の全長を慎重にスキャンしなければならず、また 1 つの胚を 2 回観察しないように注意を払わなければならない。

胎子の性別診断

直腸を介した超音波検査を利用すれば、雄の胎子の生殖結節 (Curran et al., 1989) または陰嚢および雌の胎子の乳腺をそれぞれ特定することにより胎子の性別を正確に診断することができる (Muller et al., 1986)。超音波検査による生殖結節の位置特定 (50～100 日目) では、陰嚢や乳腺の検出 (73～120 日目) よりも早期の性別判定が可能である。生殖結節は雄では陰茎、雌では陰核に発達する部位で、肉眼的にも超音波検査的にも非常に目立つ構造物である。生殖結節は胎子の後肢の間の未分化な位置に始まり、約 45 日目から徐々に分化した位置へと移動し始め、約 55 日目までに雄では臍の後ろ、雌では尾の下に収まる。正診率および診断時の確度との関係における生殖結節の位置が、最適化された研究条件下で評価された (Curran et al., 1989)。その結果によると、経験豊富な術者は 55 日目以後に胎子の性別を 100% の正診率で診断することができた。続いて、農場条件下での超音波検査による胎子性別診断の信頼性を判定するための研究が実施された (Curran et al., 1991)。約 50～100 日目に検査した 102 頭の乳用未経産牛および経産牛のうち 5 頭 (5%) では診断が不能であり、残る 97 頭のうち 93 頭 (96%) では正確な診断を下すことができた。ただし、診断時の適中率が高かった場合は (95～99%)、65 頭中 65 頭 (100%) で正しい診断が下された。診断不能となったのは、やや胎齢が進んだ (65～101 日目) 胎子の一部で生殖器部の像が十分に得られなかつたことによるが、胎齢が進んだ胎子でも十分な像が得られた場合の診断は正確であった。診断に最適な時期は 55～64 日目であり、診断に要した時間の平均は 1 分 53 秒 (範囲は 16 秒から 8 分) であった。

卵巣の画像—牛モデル

超音波画像診断の影響のうち、卵巣生理の理解にもたらされた変化ほど明白なものは他にない。この技術は動物種で言えばヒトと牛で最も広く利用されているが、超音波研究の重点はヒトと動物では著しく異なっている。ヒトにおける研究の分布は臨床診断のためのツールとしての超音波検査の第一の任務（すなわち卵巣病理の検出および特性決定）を反映しているが、動物の研究は卵巣生理に重点が置かれている。すべての動物種の中で、牛

モデルを用いた排卵ならびに卵胞および黄体の動態に関する研究が最も多く発表されている (Singh et al., 2003)。

超音波検査が生殖機能の理解に与えた影響の最も良い例の 1 つは、卵胞発育波（ウェーブ）の現象が明らかになったことである。牛の卵巢の超音波研究が 1984 年に初めて報告されるまでは (Pierson and Ginther 1984)、卵胞発育波理論について 30 年近くにわたり論争が渦巻いていた。初期の研究では、大きさによって分類した卵胞集団の変化をモニタリングするために超音波検査が毎日実施された (Pierson and Ginther 1986, 1987a, 1987b, 1988a)。これらの研究の結果は卵胞波理論を裏付けるものであったが、その集団に基づく方法は個別に特定した卵胞をモニタリングするように設定されていなかった。そのため、ある大きさ区分から別の区分への個々の卵胞の移行を検出することはできず、卵胞波出現と卵胞選別の詳細な特徴も不明であった。しかしその後間もなく、個別に特定した卵胞をモニタリングできることを実証する代表的な研究が次々と発表された (Ginther et al., 1989a, 1989b, Knopf et al., 1989, Pierson and Ginther 1988, Savio et al., 1988, Sirois and Fortune 1988)。この新たな可能性は関心の波を突発させ、卵胞形成の理解の一連の進歩ならびに牛およびその他の動物種の卵巢機能を制御する方法の開発をもたらした (Adams 1994, 1998, 1999; Fortune 1993, Ginther et al., 1996, 2001; Adams et al, 2008)。個別識別法または「非識別」法 (Ginther and Bergfelt 1992) の利用から生じた最も重要な進歩の 1 つは、特定の基準点（たとえば排卵、卵胞波出現、卵胞選別）に関する卵胞およびホルモンのデータを正規化または集中化できるようになったことである。この可能性は、内分泌と構造の変化の時間的関係を説明づける一般的な卵胞波の概念モデルの考案につながった (Adams and Pierson 1995; 図 3)。

卵胞波概念を組み込むことは、今や分子レベルから動物個体および群レベルに至る卵巢機能の研究の実験計画に固有の部分となっている。最近の研究 (Jaiswal et al., 2009) で、同一個体内の卵胞波パターンの再現性および季節や年齢の影響を調べるために、排卵間隔（発情周期）における卵胞発育の 2 波および 3 波パターンの予測的特徴を検証した。同一個体の卵胞波パターンには再現性があり、排卵間隔の長さは卵胞波パターンを反映していた。すなわち、21 日以下の周期は 90% が 2 波周期であり、22 日以上では 80% が 3 波周期であった。2 波または 3 波の排卵間隔における卵胞優位の期間に影響する要因が卵胞波パターンの調節を担っているようであり、未経産牛の成熟や性成熟後の相対的栄養要求量に関連している可能性がある。

非妊娠成牛の研究から導かれた牛モデル（図 3）はその後、他の繁殖状態および他の動物種にも拡大された。妊娠中および分娩後の期間における卵胞の動態に関する研究は牛で最初に行われた (Pierson and Ginther 1986, Ginther et al., 1989c, Savio et al., 1990)。新生子期および性成熟前の期間における卵胞の動態に関する研究も 1993 年に牛で最初に行われた (Adams et al., 1993, Evans et al., 1994a)。その後間もなく他の動物種における研究

も実施され、1990 年にラクダ科の動物 (Adams et al., 1990)、1993 年に馬 (Bergfelt et al., 1993)、1994 年に羊と山羊 (Ginther and Kot, 1994, Ravindra et al., 1994)、1997 年に初めての野生動物種としてのジャコウウシ (Hoare et al., 1997)、2001 年にエルク (McCorkell et al., 2001, 2002)、そしてごく最近になってヒト (Baerwald et al., 2003, 2005) で卵胞発育の波パターンがそれぞれ実証された。これらの異なる動物種の繁殖パターンは広範にわたるが（すなわち多発情性、季節的多発情性、単および多排卵性、自然および誘起排卵性、明白な黄体期および卵胞期）、卵胞発育の基本的な波パターンは広く維持されている生物学的現象のようである。

超音波画像診断技術は黄体の研究にも革命をもたらし、黄体形成と卵胞形成の相互作用に関する理解を大きく進歩させた。たとえば、今では黄体によるプロゲステロン産生が卵胞発育ウェーブにおける主席卵胞の成長に抑制的作用を示すこと (Adams et al., 1992a, Stock & Fortune, 1993)、また黄体期の程度（プロゲステロンの濃度および持続期間）が卵胞波間隔、卵胞の健康、卵子の受精能およびその後の黄体腺の発達に重要な影響を与えることが明らかになっている。さらに、牛の黄体の約 70% は液体で満たされた腔を持ち、その大きさはその寿命を通じて変化する (Kastelic et al., 1990b)。超音波検査を用いた研究では黄体組織の面積 (Kastelic et al., 1990a) とエコテクスチャ (Singh et al., 1997) が評価されて循環血中と腺内のプロゲステロン濃度と直接関連づけられ、液が充満した腔の存在は黄体機能に影響しなかった (Kastelic et al., 1990b)。超音波検査を用いた研究は、性成熟前後の期間 (Evans et al., 1994b)、分娩後の期間 (Rajamahendran and Taylor 1990)、ならびに羊 (Bartlewski et al., 1998) およびエルク (Adams, 1999) における季節的再活動間の短い黄体期の特性を示した。超音波検査は黄体の存続が胚死滅と関係することも実証し (Kastelic and Ginther, 1989)、さらに牛の卵胞および黄体囊胞 (Adams, 2000)、馬とラマの出血性無排卵卵胞 (HAF ; hemorrhagic anovulatory follicle) (Adams et al., 1991b)、ならびに女性の黄体化未破裂卵胞 (LUF ; luteinized unruptured follicle) および多囊胞性卵巢症候群 (PCOS ; polycystic ovarian syndrome) (Pierson and Chizen, 1994 [総説] ; Atiomo et al., 2000) などの卵巢異常の病理発生も明らかにした。

コンピューターによる画像分析

超音波検査の画像は何千もの画素すなわちピクセルで構成される。各ピクセルは個々の組織反射体を表し、8 ビットのグレースケール画像における 256 段階のグレーの濃淡（黒から白の範囲）のいずれかに相当すると見なすことができる。ヒトの眼はグレーの濃淡段階が多いほど画像の「滑らかさ」を感じることができるが、見分けることができるグレーの濃淡段階数は 18~20 に過ぎない (Baxes, 1994)。高解像度のデジタル画像収集と今までにないコンピューターアルゴリズムを利用した画像データの定量的評価は、研究者や臨床

医が卵胞の成長と発達の基礎にある生理学を評価するのを可能にしてくれる、というのが私たちの主張である（図4）。

超音波検査による組織の様相すなわち画像パターンはエコーテクスチャ（エコーの質感）と呼ばれ、その組織の組織学的構造によって決まる（Powis and Powis 1984, Ginther, 1995a; Singh et al., 1997, 1998, Singh and Adams 2000）。コンピューターアルゴリズムは、主観的な視覚評価の非一貫性を克服すること、およびグレースケールのピクセル値分析への定量的アプローチを提供することを目指して、超音波画像の分析専用に設計されている（Synergyne 2[®], Saskatoon, SK, Canada）。これらのアルゴリズムは、卵胞波の異なる段階における卵巣構造のエコーテクスチャの動態を特徴付ける研究で広く利用されている（Pierson and Adams, 1995; Singh et al., 1997, 1998; Tom et al., 1998a, 1998b, Vassena et al., 2003）。

スポット分析

超音波画像を構成しているピクセルを分析するための最も単純な定量的方法は、1つまたは複数の小さな円形関心領域を選択することである（図5）。コンピューターは選択した点（スポット）の中にあるすべてのピクセルの正確な数値（黒=0、白=255）を容易に求めることができ、その平均値（平均ピクセル値）と標準偏差値（ピクセル不均一度）を示してくれる。この単純な方法は概念的に写真撮影におけるスポット測光法に似ており、画像の様々な部分または異なる時点の画像でピクセル値を比較するのに利用できる。たとえば、連続画像からの卵胞の腔と壁の各部を評価すれば、卵胞の優位性、成長、閉鎖、差し迫った排卵、または黄体の発達や退行に特徴的な変化を検出することができる（Pierson and Adams 1995, Singh et al., 1997, 1998, Tom et al., 1998a, 1998b, Vassena et al., 2003）。

ライン分析

同様に、コンピューターで作った（CG の）ライン（太さ 1 ピクセル、またはアプリケーションによってはそれ以上）を卵胞画像の特定区画を横切るように引くと、そのラインに沿った各ピクセルのグレースケール値を示すグラフを作成することができる。このグラフはラインに沿ったエコーの大きさを描写する（図5）。この種のグラフ表示の 2 つの次元は距離（X 軸）とピクセル値（Y 軸）である。このツールに特異的な用法は、单一の卵胞壁の経時的相違または卵胞間の相違を検出することである。卵胞の腔と壁の接合部は、ラインに沿ったグレースケール値の連続的な上昇を確認することにより容易に検出することができる（図5）。その腔・壁接合部を基準点としてラインに沿ったピクセル値を 3 つの区分に分ければ、周縁の腔、卵胞壁、および支質を個別に分析することができる（図5）。そしてその 3 区分について、平均およびピークピクセル値、ピクセル不均一度、および曲線下面

積を別々に記録することができる。また、ラインに沿ったピクセル値を利用して、3区分のそれぞれについて回帰直線の切片と傾きの数値を別々に求めることもできる（図5）。分析の精度と正確度を高めるには、同一の卵胞壁を横切ってラインツールを繰り返し適用することにより複数の読み取り値を得て、その数値データを平均すればよい。アーチファクト（たとえば伝送による増強、シャドーイング、鏡面反射エコー、屈折、およびビーム幅アーチファクト）のない画像領域にラインを引くよう注意することが重要である（Kremkau, 1989; Ginther, 1995a; Heller and Jehle, 1995）。

領域分析

卵胞の領域分析では、交差点のピクセル値を記録して三次元の骨組み（図6）すなわちワイヤフレームモデルを作成するため、選択した領域上に1ピクセル四方の目の「メッシュ」を重ねていく（図6）。CGの「スキン」をメッシュの骨組みの上に載せれば、地形学的な面が出来上がる（図6）。次にシェーディング（陰影付け）アルゴリズムを用いて、特定領域の面の様相（図6、面シェーディングすなわち等高線と方向に基づいたグレースケールまたは色の割り当て）またはエコー強度（高さシェーディングすなわち「高さ」すなわちピクセルの明るさに基づいたグレースケールまたは色の割り当て）の視覚的認知度を高める。面に色を付けることにより、表面の輪郭の微妙な相違が認識されやすくなる（図6）。この種の表示では、XおよびY座標が二次元の距離（すなわち長さと幅）を表し、Z軸がピクセル値を表す。このアプローチは、臨床現場において、卵胞の健康（生存または閉鎖）に関連する超音波画像上の特性を簡単かつ視覚的に評価できる有効な診断手法に発展していくと思われる。

時系列分析

画像の経時的变化に関する情報を得るには、先にライン分析法について記述したとおりに卵胞画像を横切る直線を引き、その卵胞が成長期または退行期をたどる毎日の二次元グラフ（距離とピクセル値）を作成する。次に毎日のグラフを連結、すなわちつなぎ合わせて、第三（すなわち時間）次元を持つ合成画像を形成する。この種の分析の一例として、卵胞の直径をX軸、ピクセル値をY軸、時間をZ軸とした三次元グラフを図7に示している。領域分析のところで記述したように、輪郭を増強するためにシェーディングアルゴリズムを適用しても良い。この種の分析を行うと、卵胞が生理学的に重要な時期（たとえば主席卵胞の選択、優位性喪失、および閉鎖の日や排卵前の日）をたどる際の壁と腔のエコーテクスチャを経時的に評価できる。

画像特性の生理学的相関

初期の特性決定研究では、特定の卵胞発育時期（すなわち成長期、静止初期、静止後期および退行期；Singh et al., 1998）に切除した牛の卵巢から卵胞の高解像度超音波画像を得ていた。その研究の目的は、異なる発達段階にある主席および下位卵胞のエコーテクスチャの定量的变化がその機能的特徴を反映しているかどうかを判定することにあった。卵胞の超音波画像は、介在組織（すなわち直腸壁や脂肪組織）の干渉のない一定の深さの水槽（脱気した水を入れた）に卵巢を入れることにより、理想的な条件下で得られた。また、直接的な相関を調べるため、卵胞の画像診断後に卵胞液を採取した。卵胞液のエストラジオール濃度は成長期から静止後期にかけて減少していったが、プロゲステロン含量は卵胞が最後の退行期に入るまで増加しなかった。主席卵胞の成長期、静止初期および排卵前期の腔と壁のピクセル値と不均一度は低かった（図8）。逆に、静止後期と退行期のピクセル不均一度は特徴的に高かった。卵胞壁の全域にわたるピクセル値の直線の傾きは成長期から退行期にかけて進行性に増大し（卵胞壁の進行性菲薄化）、排卵前の主席卵胞で壁の厚さが最大となり、傾きが最低となった（図8）。腔と壁のピクセル不均一度および卵胞壁の回帰直線の傾きは、卵胞液のエストラジオールおよびエストラジオール対プロゲステロン比と負の相関を示した ($P < 0.001$)。牛の卵胞の超音波画像のエコーテクスチャの定量的变化は、その機能的および内分泌的特徴の変化と同時に起こると考えられた。

卵胞の画像特性の変化（Singh et al., 1998, Tom et al., 1998, Vassena et al., 2003）は卵胞の構造変化を直接反映していることを前提として、発達段階が判明している牛の卵胞について組織形態計測学的研究を実施した（Singh and Adams 2000）。第一卵胞波の主席および下位卵胞の壁と顆粒層の厚さおよび内膜の血管分布は、成長期および静止初期から退行期にかけて進行性に低減した。一般に顆粒膜細胞、卵胞膜細胞および黄体細胞などの腺細胞は、卵巢の結合組織支質に比べてエコー源性が低い。たとえば、中間期の牛の黄体の超音波画像（56%で最大黄体細胞容積）は、初期（血管形成期）または退行期の黄体腺（41%以下の黄体細胞容積；Singh et al., 1997）に比べて黒っぽく見えた。すなわち、退行中の卵胞壁の菲薄化（Singh and Adams 2000）は腔（低ピクセル値）から結合組織支質（高ピクセル値）へのより迅速な移行を引き起こし、卵胞壁の傾き値をより険しいものとした（図8）。排卵前の卵胞は卵胞壁が最も厚く、顆粒層と内膜層の細胞密度が最も低く、内膜の血管分布と浮腫が最も多大であったが（Singh and Adams 2000）、これらのすべてが最低のピクセル不均一度値および最低の回帰直線傾き値と関連している（Singh et al., 1998, Tom et al., 1998b）。卵胞退行の特徴は、卵胞壁から腔内への顆粒層細胞の剥離と放出であった（Singh and Adams 2000）。健康な牛の卵胞腔は平均ピクセル値が非常に低かったが、閉鎖に向かっている主席卵胞（Singh et al., 1998, Tom et al., 1998, Vassena et al., 2003）やGnRHに反応して排卵することができなかつた卵胞（Martinuk et al., 1992）ではピクセ

ル不均一度が高かった。下位卵胞では併存する主席卵胞に比べて腔が明るく、不均一度が大きい (Singh et al., 1998, Vassena et al., 2003)。

画像の特徴と卵子発育能

画像特性と卵胞機能の関係および卵胞の状態と卵子発育能の関係はすでに実証済みである (Salamone et al., 1999, Vassena 2003)。したがって、次は卵胞の画像特性とそれに含まれる卵子の発育能の関係を調べるのが理にかなっていると思われた。牛胚の体外生産用の卵子の主な供給源は、食肉処理場由来の牛卵巣の小型から中型の卵胞から採取される卵子である。ただし、このような卵胞はそれぞれ異なる生理段階（すなわち成長期、静止期または退行期）にあり、おそらく発育能がばらついた卵子を含んでいると思われる。最近の研究 (Vassena et al., 2003) では、8~16 細胞期胚に発生した卵子を採取した卵胞と胚発生しなかった卵子を採取した卵胞のエコーテクスチャ特性が異なっていた。卵胞の発達段階とその超音波エコーテクスチャの間には緊密な関係が認められた。卵子の発育能は卵胞の状態と関連するという所見と合わせて、発育能のある卵子を生産する卵胞の特定に超音波画像分析を利用するための重要な理論的根拠となる結果が得られた。この方法の感度はまだ診断状況で使用できるほど十分なものではないが、統計学的に有意な評価項目が特定されたことは画像診断法を向上させる基礎を形成した。

超音波で検出される特徴を用いた発情周期の段階分類

卵巢の 1 日（注：1 日のみ）の超音波検査に基づいて発情周期の段階を自動的に判定できる画像に基づく分類システムを開発するため、発情周期の初期（発情後期）、中期（発情休止期）または後期（発情前期）にあることが判明している牛の卵巣の画像を用いてコンピューターアルゴリズムを検証した (Maldonado et al., 2007)。卵胞発育波が、2 波および 3 波パターンの牛から収集したデータの一部を用いて決定樹および単純ベイズ分類子を「養成」し、残りのデータ部分で検証した。決定樹分類子は完璧な性能を示し、黄体と主席卵胞の特徴のみを用いてすべての事例を正しく分類できた。単純ベイズ分類子は事例の 86% を正しく分類できた ($n=19$)。データは発情周期の 3 つの特定時期のみから得られたものであったが、その結果は、1 日の超音波検査で検出された特徴から発情周期の段階を自動的かつ確実に判定できるという仮説を裏付けるものとなっている。卵胞成長が 2 波および 3 波パターンのいずれであっても分類が影響されることを完全に実証するためには、より大きなデータセットを用いた分類子の評価が必要である。そのような研究は、1 回の超音波検査に基づいてその時点の哺乳動物の繁殖段階を判定する完全自動化システムとなり得る方法の第三段階となる。そのシステムの第一段階は、関連する卵巣構造の区分である。主席卵胞の大きさと黄体の大きさが十分に豊かな特徴セットであるなら、卵胞区分の問題

はかなり容易に解決することができる。Potočnik は、自分のアルゴリズムが 10 mm 以上の卵胞をほぼ 100% 正しく区分できると報告した (Maldonado et al., 2007 に所載)。現在の研究課題は黄体の区分である。第二段階では、最大の卵胞を認識し、その直径を測定するだけよい。したがって、将来の研究によって黄体を確実に区分できるアルゴリズムを確立できたなら、すべての過程を完全に自動化できることになる。

バーチャル組織学－スティックフィルタリング

コンピューター「染色」アルゴリズムがバーチャル組織学を想起させる画像を作り出すという仮説が、最近の研究で牛の卵巣の超音波画像を用いて検証された (Eramian et al., 2007)。そこでは、牛の卵巣の「バーチャル組織学」を作り出すための方法として 6 つの候補が検証された (図 9)。スティックフィルタリングは卵胞の境界をより鮮明に描き出すことが明らかになり、いくつかのアルゴリズムによって作り出された黄体テクスチャは組織学的特徴を示していた。均一差異法は卵胞・液接合部を最もうまく描写して際立たせた。アルゴリズム 3 および 4 は支質と黄体を最もうまく定量的に識別した (図 9)。この研究は性質上、非侵襲性 *in vivo* 組織学の方法を開発するための第一段階となっている。発情周期中のエコーテクスチャの統計学的特性の変動についてさらに理解が進めば、自動化画像分類のための識別特徴の定義が促されるはずである。

三次元超音波検査

従来の B モード超音波検査では組織（たとえば卵巣、子宮、胎子）の二次元「スライス」が連続的に視覚化されるだけであるため、それを頭の中で三次元の組織構造に再構成する必要がある。これは技術を要する処理であり、このことはこの種の医学画像の潜在能力を全面活用する妨げとなってきた。しかし今では、演算能力とトランスデューサー設計の進歩により、三次元（3D）イメージングが可能となっている。

最も単純な形式では、標準的なリニアアレイまたはコンベックスアレイトランスデューサーヘッドを関心組織の上で機械的に動かし、コンピューターデジタル処理によって連続画像（たとえば毎秒 30 フレーム）を記録する。そのトランスデューサーヘッドは (i) フリーハンドで回転させることによって、または (ii) 外部のステッピングモーター部品もしくは (iii) トランスデューサーヘッドに内蔵されたステッピングモーターによって機械的に動かすことができる。この二次元画像をつなぎ合わせて組織の立体を再構成する。その後、特異的なアルゴリズムを適用すれば、ほぼリアルタイムで（すなわち画像収集から数秒以内に）辺縁の検出を促したり特定の画像特徴を分離したりすることも可能である（たとえば胎子表面の輪郭を視認できるように胎子周囲の液を透明にするなど）。

3D イメージングがもたらした多大な進歩は、画像を一旦収集して再構成てしまえば、新たにスキャンしなくとも画像を回転させることによってあらゆる平面での評価を行えるようになったことである。さらに、3D データセットを利用すれば容積測定値を求めることができ、画像情報を層ごとに音響的に薄切または細片化することも可能で、内部および外部の特徴をともに明らかにできる（図 10）。3D 超音波検査をルーチン使用できるようになるためには、コンピューターに関連する問題以外にも、解剖学（たとえば経直腸的または経腔的に使用できるサイズや構造のトランスデューサー）や被検体（たとえば画像収集中の動物の動き）に関する多くの技術的課題を解決する必要がある。

血管イメージング

ドップラー効果は、近づきつつあるまたは遠ざかりつつある音源からの音波がそれぞれ相対的に圧縮または希薄化するために生じるもので、動いている音源からの音響ピッチ（周波数）が変化する基本的理由である。超音波スキャナはこれと同じ原理を用いて、トランスデューサ一面に向かう、またはそこから離れていく血球集団からの反響音波の周波数変化を検出する。大きな卵胞や黄体が成長および退行しているときには、卵巣の微小血管に大きな変化が生じる（Singh et al., 1997, Singh and Adams 2000, Acosta et al., 2004）。したがって、カラーフロードップラーイメージングで、卵胞と黄体の血管解剖学だけでなく、血管の動態（たとえば速度、抵抗、容積）の変化を経時的に特徴付ければ、それらの重要な生理学的過程も調べることができる。血管の流れを調べるために用いられるドップラー法には 3 つの種類があり、(i) スペクトルドップラーは血流を経時に波形として表示するために用いられ、(ii) カラーフロードップラーは血流方向の情報を B モードグレースケールイメージングに重ね合わせることができ、(iii) パワーフロードップラーは低速の血流情報を（血流方向の情報なしに）B モードグレースケールイメージングに重ね合わせるために用いられる。

カラーフロードップラーを用いて、馬の排卵前の卵胞壁（Gastal et al., 2006）およびヒトの発達中の黄体（Bäckström et al., 1994）の周囲に血管のはつきりした「リング」が検出されている。牛ではドップラー検査によって排卵前の卵胞内の血流が時間に関係して変化することを示す視覚的証拠が得られている（Acosta et al., 2004）。また、血流の面積と速度（時間平均最大速度；time averaged-maximum velocity [TAMXV]）が血漿エストラジオール濃度の上昇および LH サージと時間的に関連して増大することが、排卵前の卵胞の画像から明らかになった。循環プログステロン濃度ならびに血管分布と黄体機能に対する PGF、PGE、PGI および NOS の影響に関する予備的推測に関連して、黄体の形成中および退行中には血流パターンが明らかに変化することが牛で報告された（Acosta et al., 2004）。女性における卵胞刺激治療中の卵巣の血流の評価結果は（Balakier et al., 1994, Nargund et al., 1996, Oyesanya et al., 1996, Van Blerkom et al., 1997）おそらく、卵胞

の直径が増大するにつれてピーク速度と抵抗指数が低下することを意味すると解釈することができる。卵子の回収率と卵胞の血管分布レベルの間には強い相関があることが認められており、卵胞周囲の血流を利用して hCG 投与の最適時期を選択できることが提唱されている (Oyesanya et al., 1996)。カラーフローイメージングの問題の 1 つは、超音波検査中のランダムノイズによるアーチファクトが方向の定まらない異常な流れのように見えて、真の血流特性を分かりにくくするおそれがあることである。

超音波生体顕微鏡検査

現在市販されている世代の超音波機器は 3~10 MHz のプローブを備えており、その方位分解能は最大 0.7~1.0 mm である。多くの臨床使用にはこの程度の分解能で十分であるが、顕微鏡的分解能（すなわち 0.2 mm 未満）を持つ機器を使用すれば、画像分析の潜在能力を完全に引き出すことができる。「超音波生体顕微鏡」は単一の結晶を使って周波数 25~70 MHz の音波を発し、分解能 30~50 μm の画像を生み出す (Jaiswal et al., 2009)。また、この機器には直径 50 μm ほどの細い血管の血流も測定できるスペクトルドップラーの性能も備わっている。この生体顕微鏡の主要な限界は、浸透深度 (30 MHz で約 10 mm, 50 MHz で約 5 mm)、視野 (画像の幅、1 cm)、およびフレームレート (毎秒 8 フレーム以下) である。

卵巢は直腸と腔に近接しているため、大型の家畜とヒトではこの機器と関心構造物を標的化するための従来型超音波機器を併用することにより卵巢を描出することができる。この点について、牛における初期の研究結果 (Pfeifer et al., 2010) は経腔アプローチを用いた超音波生体顕微鏡検査の *in vivo* での有用性を実証している (図 11 および 12)。直径 1 mm 未満の卵胞の顆粒層も識別することができ、卵丘・卵母細胞複合体がはっきりと描き出された。超音波生体顕微鏡で得られた画像のエコーテクスチャ分析では、組織学的解像度で卵巢の動態像が初めて実現した。顕微鏡的構造物の経時的な連続イメージングは、de Graaf の時代以来ずっと繁殖生物学者の手が届かなかった、生物学的事象の基礎的メカニズム（たとえば卵子発育能、早期胚の発育と死、ヒトの受胎産物の卵管固着、早期黄体機能障害、子宮内膜異常）の研究も可能にしてくれると思われる。

結論

最近の 20 年間の画像診断法の進歩は、生殖器系の構造および機能への研究アプローチに静かな革命をもたらした。超音波検査の利用による最も大きな進歩は卵巢の理解が深まったことであり、その知見は今では多くの動物種にまで広がっているが、それらはすべて牛における初期の研究から派生したものである。イメージングに関する研究結果は、繁殖生物学の分野をはるかに超越した意義を持っている。私たちは、卵巢画像のエコーテクスチ

ヤ特性が卵胞、黄体および卵子の内分泌的および生理的状態を反映しているという基本的仮説を裏付ける説得的なエビデンスを構築してきた。多様な様式を用いて収集されたデータは、卵胞がそれぞれ独自の特徴を持つ、すなわち個々の卵胞の構造的および機能的状態は同じコホートに属するもの同士でもまったく異なっている、という考えに理論的根拠を提供している。また、卵胞壁のエコーテクスチャ分析とそれに含まれる卵子発育能を関連づけるよう計画された初期の研究結果は、その相違が卵子の評価や *in vitro* 処置のための選別に有用であると解釈されている。超音波生体顕微鏡検査によって得られた画像のエコーテクスチャ分析は、早期洞卵胞と卵母細胞の *in vivo* 検査のための新しい方法として最も有望視されている。そしておそらく 3D イメージング、特性区分および分類とともに卵胞細胞と配偶子に *in vivo* で経時的にノーザンプロット法や *in situ* ハイブリッド形成法と同様のものを行うこともやがて可能になるはずである。

表 1. 超音波検査で確認できる牛の受胎産物の特徴の検出初日（出典：Curran et al., 1986）

特徴	検出初日	
	平均	範囲
胚自体	20.3	19~24
心拍	20.9	19~24
尿膜	23.2	22~25
脊髄	29.1	26~33
前肢芽	29.1	28~31
羊膜	29.5	28~33
眼窩	30.2	29~33
後肢芽	31.2	30~33
胎盤組織	35.2	33~38
分割した蹄	44.6	42~49
胎動	44.8	42~50
肋骨	<u>52.8</u>	<u>51~55</u>

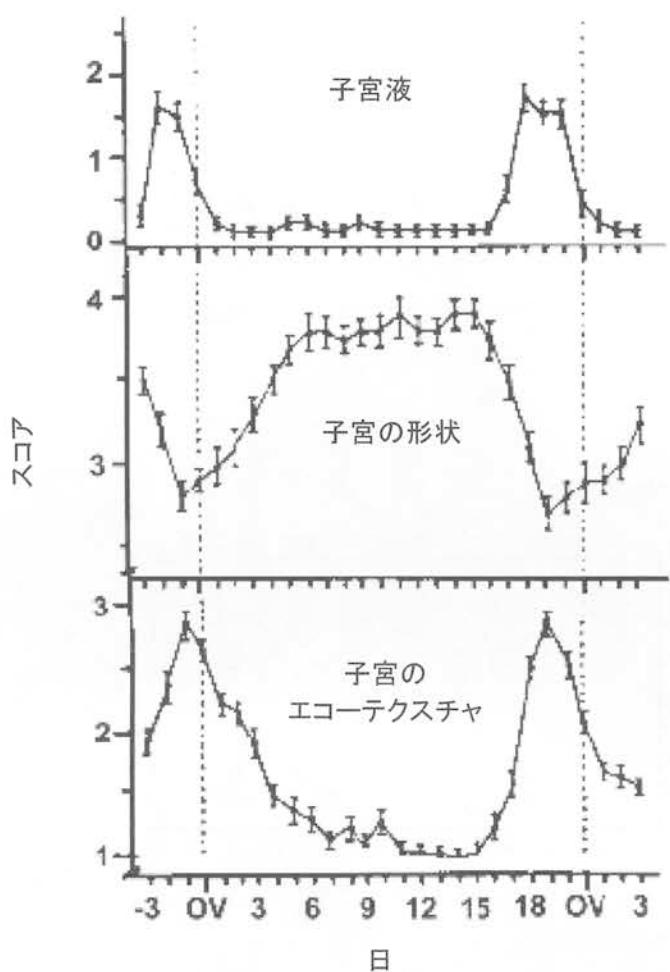


図1. 未経産牛の排卵周期における子宮腔内液（0、最少；3、最多）、子宮角のラセン回転程度（1、最小；4、最大）、および子宮のエコーテクスチャ（1、均質；3、不均質）の変化（n=58；出典：Pierson & Ginther, 1987）。

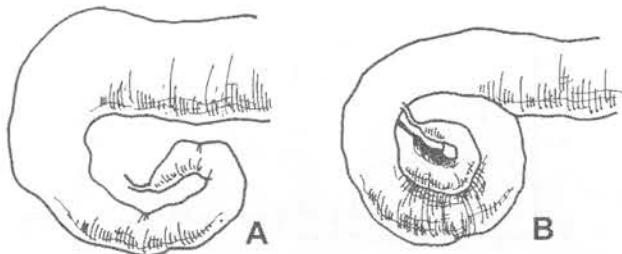


図 2. 経産牛の子宫角（左側面像）のラセン回転は、発情期（A）に最小、発情休止期（B）に最大となる（出典：Pierson & Ginther）。

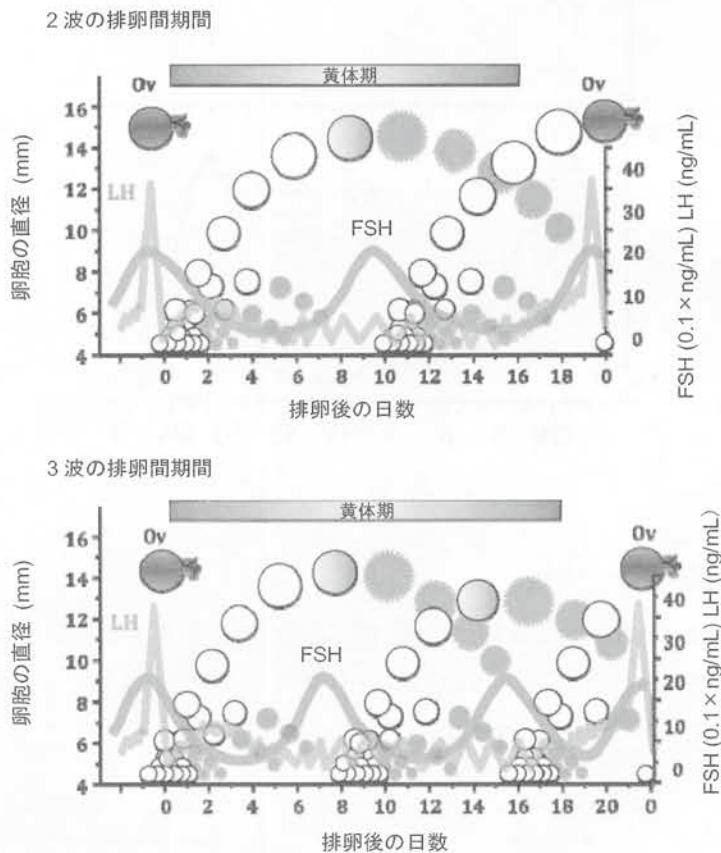


図 3. 牛の 2 波および 3 波発情周期における卵胞発育と性腺刺激ホルモン分泌の動態。主席および下位卵胞を白色（生活）または灰色（閉鎖）の丸で示している。各卵胞波の出現に先だって循環 FSH 濃度（赤線）のサーボ（急上昇）が起こる。排卵に先だって循環 LH 濃度（黄線）のサーボが起こる。低い循環プロゲステロン濃度の結果として LH サーボの前

後に高い LH パルス周波数の期間が生じる（すなわち、それぞれ黄体退行および黄体形成の期間に相当；出典：Adams et al., 2008）。

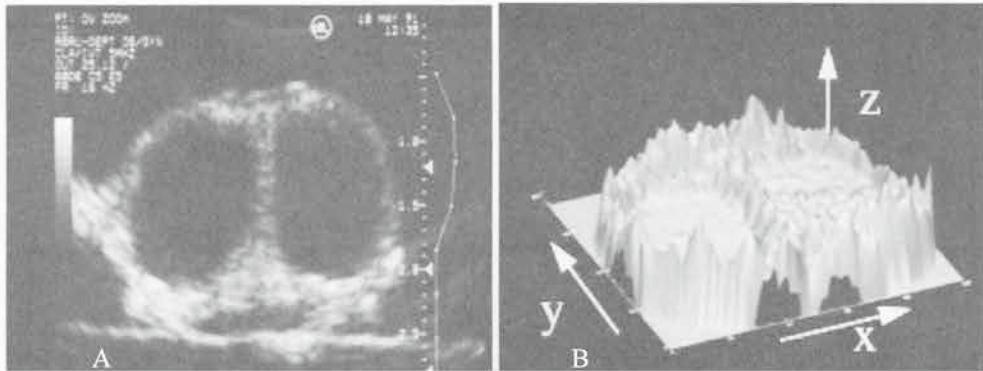


図4. (A) コンピューターによるデータ分析の感度を例証するため、排卵前（左）および退行中（右）の卵胞を含む牛の切除卵巣を、高解像度の超音波機器を用いて脱気水槽内でスキャンした。描出された2個の大きな卵胞は視覚的に識別不能に見える。(B) コンピューターによる分析によると、卵胞の壁と腔に明白な差異を認めることができる。この超音波画像を構成しているピクセル輝度の三次元表示では、右の卵胞の方が腔のエコーテクスチャが不均質に見え、壁のピクセルがより明るく、その下落がより急激なものとなっている。画像特性は、左の卵胞が新しい波の主席卵胞で、右の卵胞が前の波の主席卵胞であるという意見に一致していた（出典：Adams & Pierson, 1995）。

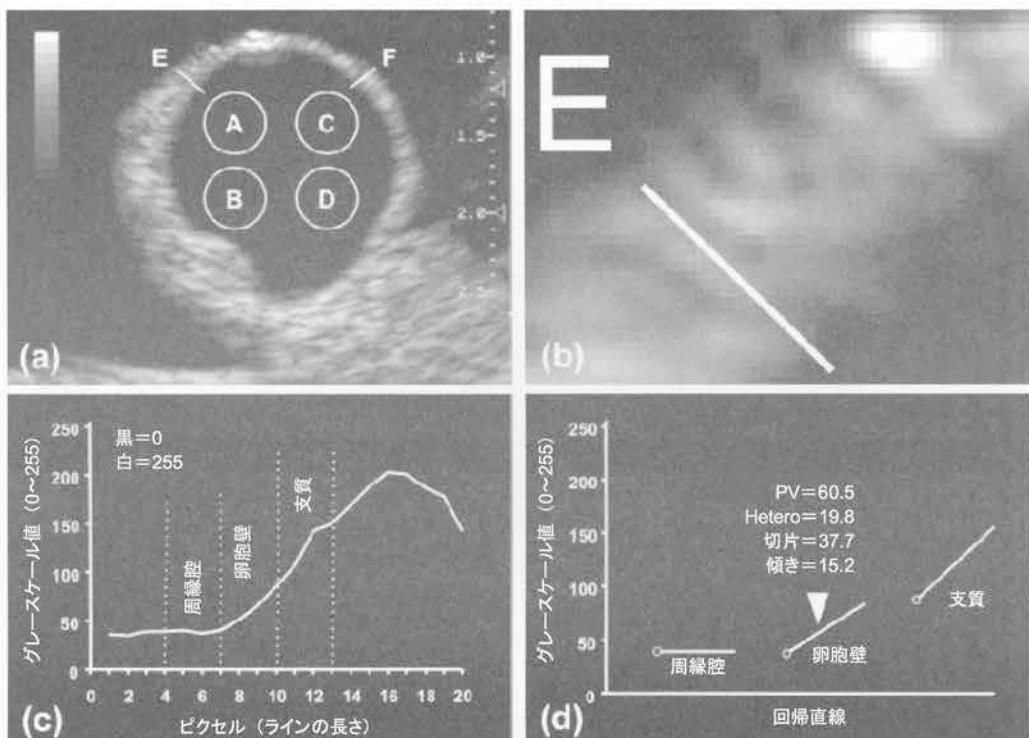


図 5. (A、B) 卵胞の高解像度超音波画像のコンピューターによる画像分析。B は、超音波画像を形成している画素（ピクセル）を表示するために A の卵胞壁部分を拡大したものである。ピクセル値（黒=0、白=255）とピクセル不均一度を測定するため、各四分円の面積の約 20%をカバーするよう卵胞腔上の 4 か所（A、B、C、D）に測定円を置くことにより腔のスポット分析を実施した。（C）超音波画像の 10 時と 2 時の位置（A の E と F、B の E）に CG のラインを置き、そのラインに沿ったグレースケールピクセル値をプロットすることにより、周縁腔、卵胞壁および支質のライン分析を実施した。そのピクセル値のグラフを 3 つの区分（周縁腔、卵胞壁、支質）に分けた。腔-壁接合部を基準点とした。（D）各区分のピクセル値（PV）、ピクセル不均一度（Hetero）、および回帰曲線の切片と傾きを別々に記録した（出典：Singh et al., 1998）。

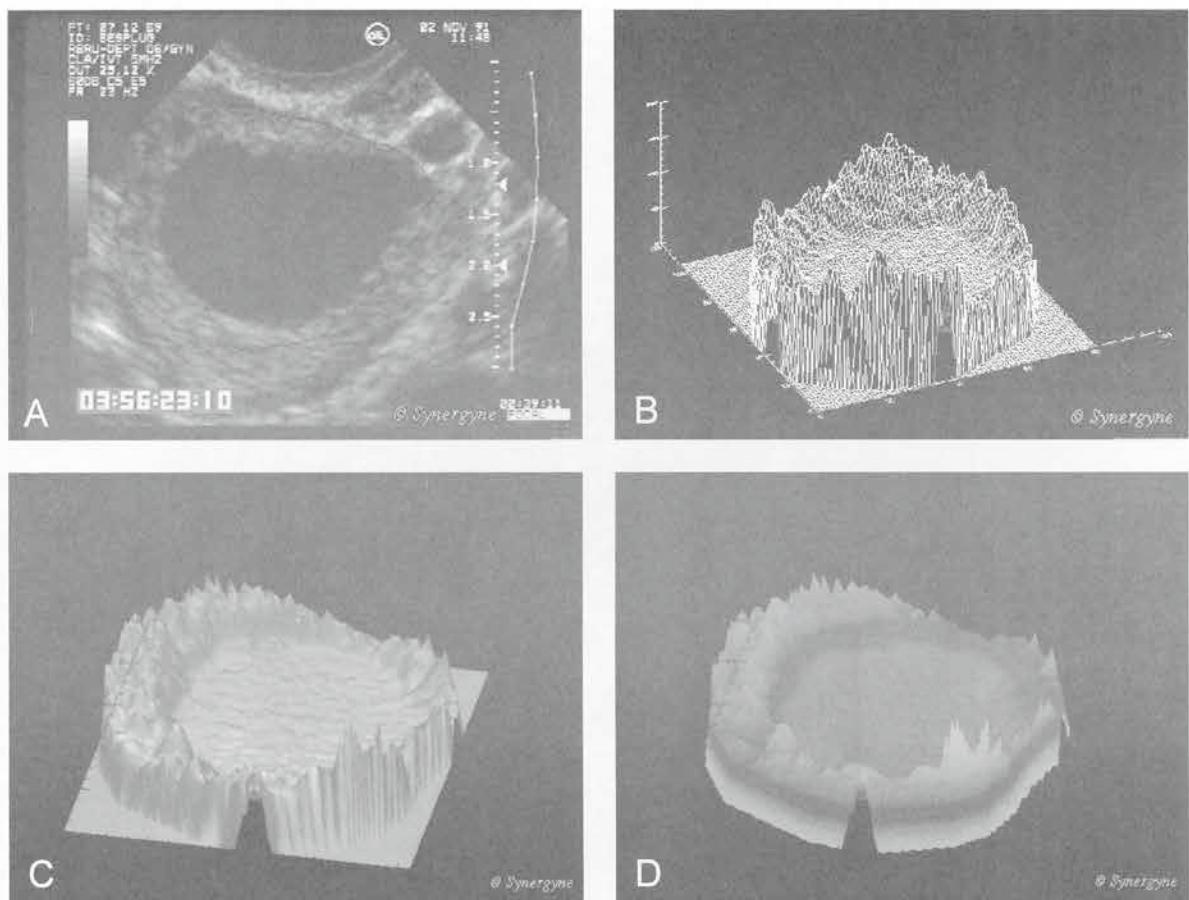


図 6. ヒトの排卵前の単一卵胞の領域分析。A). 卵胞壁を（黒線で）特定した卵胞の画像。B). 卵胞の画像から作成した 1 ピクセル四方の目のメッシュによるワイヤフレームモデル。C). ワイヤフレームモデル上に広げた CG の「スキン」。D). 描出性を高め、種々の帯域を異なる卵胞の画像または異なる日の同一卵胞の画像と比較できるように画像に加えた高さシェーディングカラーアルゴリズム。

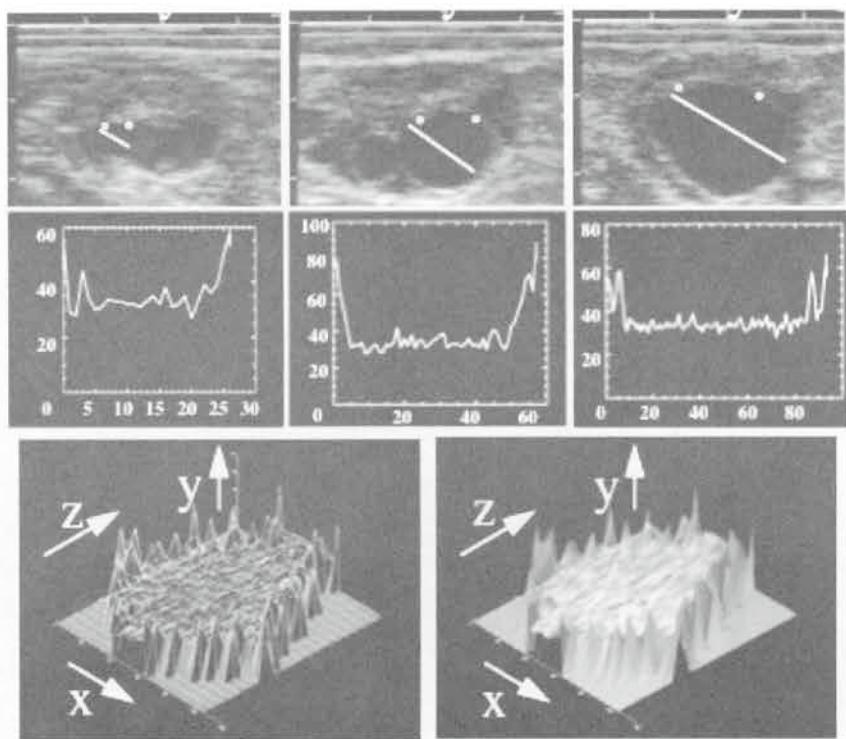


図 7. 主席無排卵卵胞の時系列分析。個々の卵胞を毎日識別し（上の 3 パネル）、その数値を示す折れ線グラフを作成する（2 段目の 3 パネル）。数値を連結し、ワイヤメッシュフレームを作成する（左下のパネル）。X 座標は卵胞壁を含む卵胞の直径、Y 座標はピクセル数値、Z 座標は卵胞を個別に識別したときの周期日数を示す。フレーム上に表面レンダリング（スキン）を置き、その卵胞が初めて確認されたときから成長期を終えて静止期に入り、それを経過して退行し、ついには確認できなくなるまでの生理学的状態を概念化する（右下のパネル）。カラーシェーディングアルゴリズムを加えると、描出性が大きく向上する。

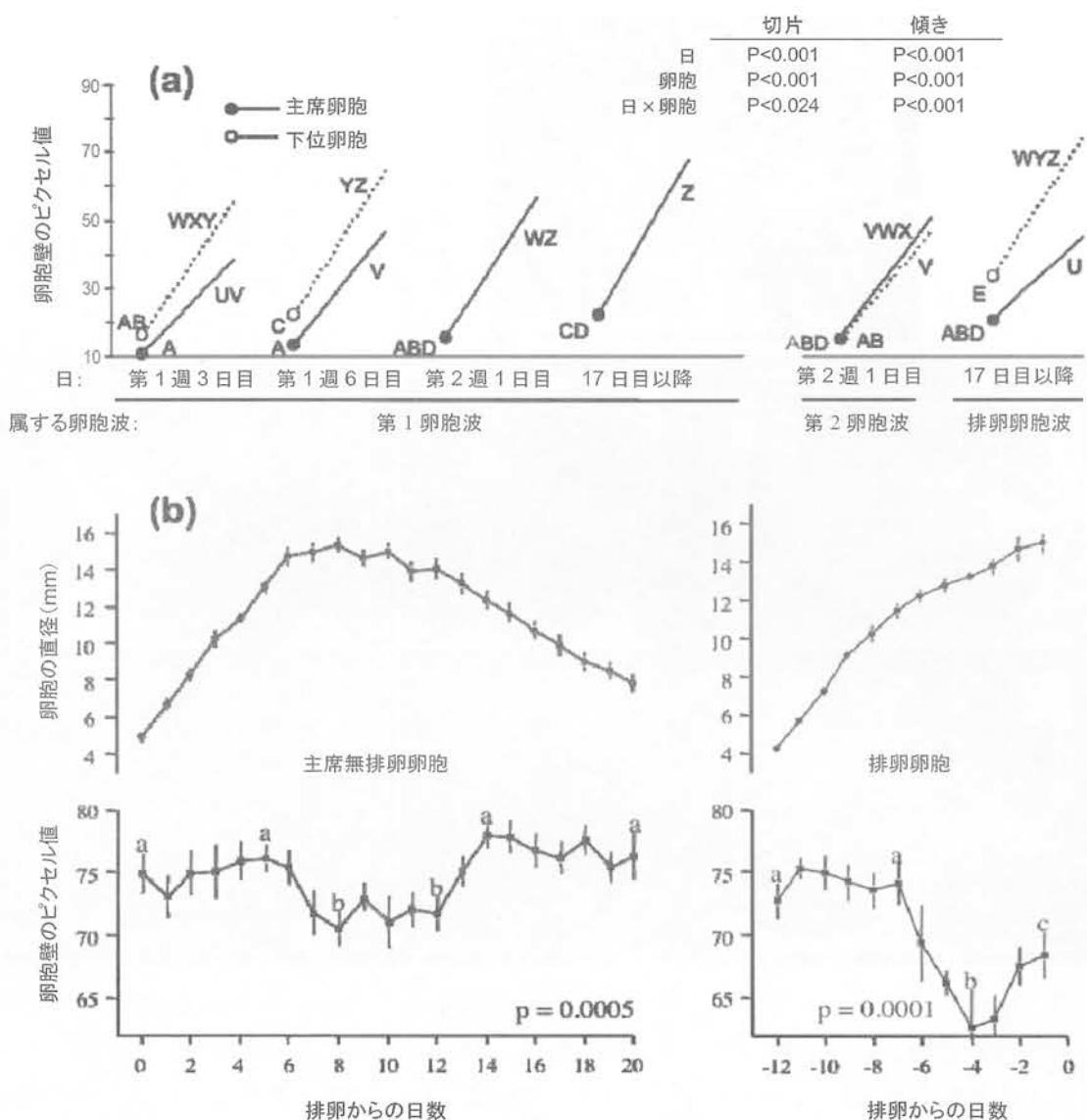


図 8. A. 牛の主席および下位卵胞の壁のライン分析によって得られた回帰直線の切片（丸）と傾き。共通の文字が付いていない数値は、切片（A, B, C, D, E）および傾き（U, V, W, X, Y, Z）の有意に異なる数値を示す ($P < 0.05$) (出典 : Singh et al., 1998)。B. 牛の主席無排卵および排卵卵胞の直径プロファイルとそれに付随するエコーテクスチャ特性（平均 \pm SEM ; 1 日あたりの観察数 $n=15$ ）。主席無排卵卵胞の成長期（0～6 日目）と退行期（12 日目より後）は静止期（6～12 日目）によって分けられている。共通の上付文字を持たない数値は有意に異なることを示す ($P \leq 0.05$) (出典: Tom et al., 1998 and Singh et al. 1998)。

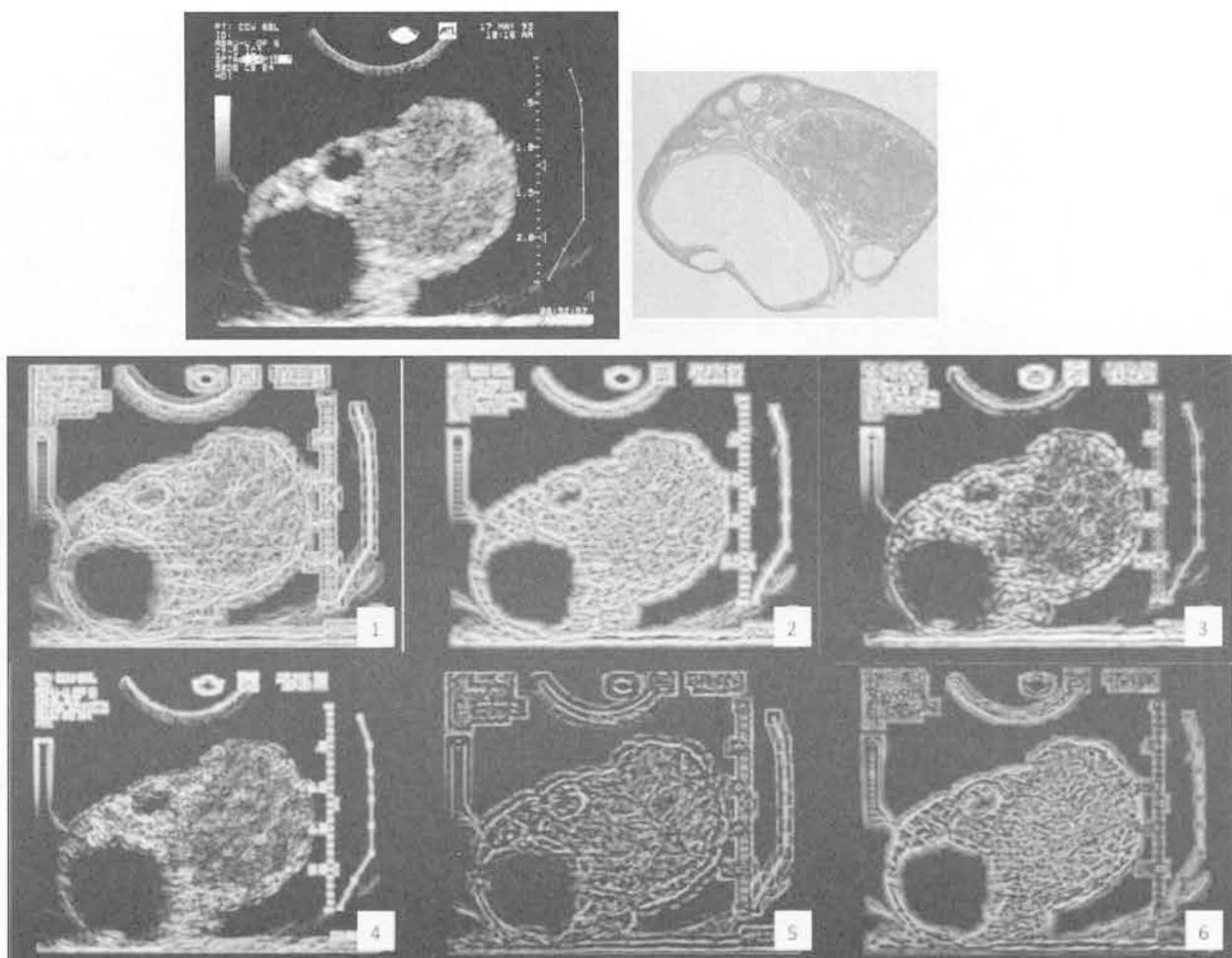


図9. 上：コンピューターで作成したバーチャル組織学アルゴリズムの検証に用いた牛の卵巣の超音波画像と組織切片。下：主席および下位卵胞ならびに黄体を描写した画像上でスティックの長さを 25 とした均一差異（奇数）およびガウス差異（偶数）バーチャル組織学アルゴリズムの結果（1～6）（出典：Eramian et al., 2007）。

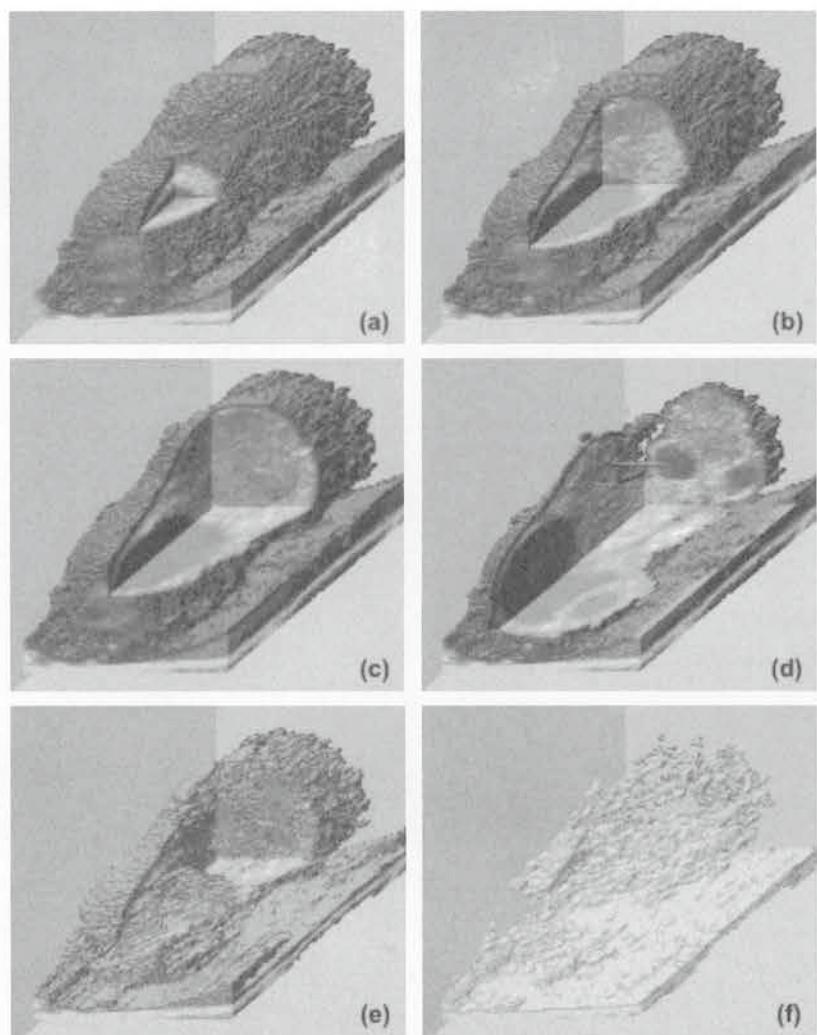


図 10. 卵胞と黄体の地形学的位置を示すために切り出し部分を作った卵巣の再構成 3D 超音波画像 (a~d)。透過レベルを変えることで様々な構造物を「解体」することができる (d、e および f)。

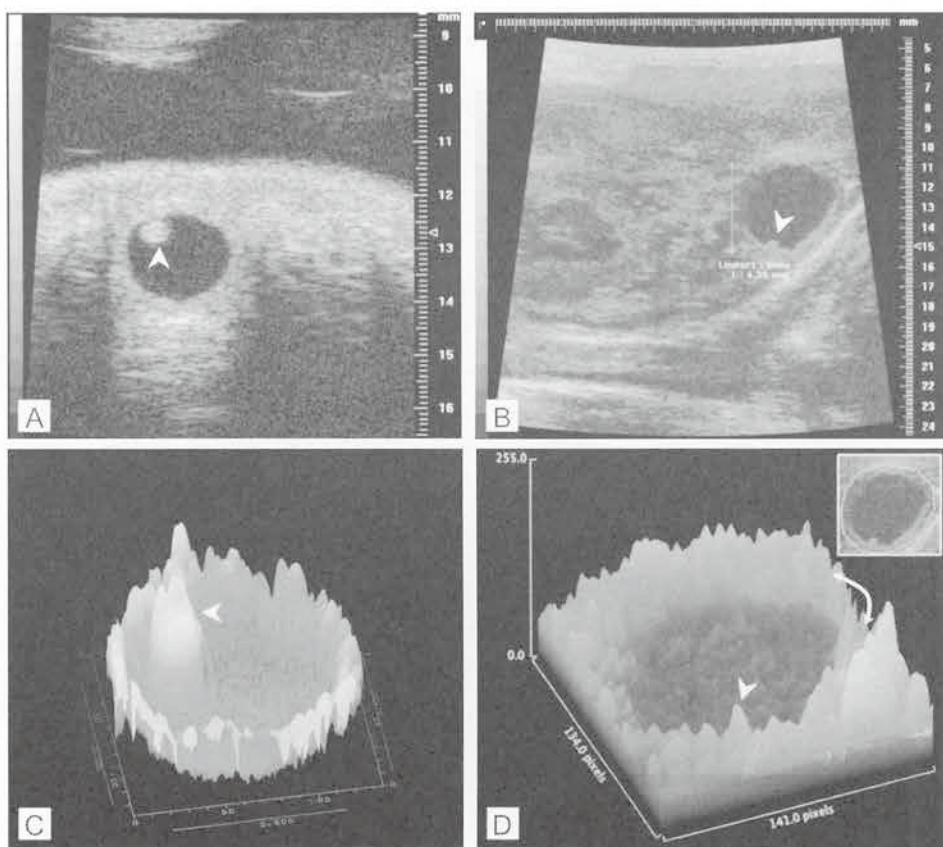


図 11. 牛の切除卵巣から得た卵胞 (A、C) および *in vivo* で経腔的に描出した卵胞 (B、D) の 55 MHz (A) または 25 MHz (B) のトランスデューサーを用いた超音波生体顕微鏡による高解像度画像。1.7 mm の卵胞の壁の 11 時の位置 (A) および 4.38 mm の卵胞の壁の 6 時半の位置 (B) に付着している卵丘・卵母細胞複合体 (矢頭) をはっきりと描出できる。C と D はそれぞれ A と B の卵胞の領域分析によってコンピューターで作成した面プロットを示している。領域分析を行うと、それまでは決して見えなかつた卵胞の壁、腔および卵丘・卵母細胞複合体の詳細を検査できるようになる。D の挿入図は主画像に示されている卵巣の一部分（白線で囲んだ部分）を示している。画像の高さは C ではカラー、D ではグレースケールで符号化されているが、どちらも元の画像のピクセル値（黒=0、白=255）を示している。D をよく見てみると、卵胞壁と支質の接合部分を確認できる（双頭の矢印で示している）。

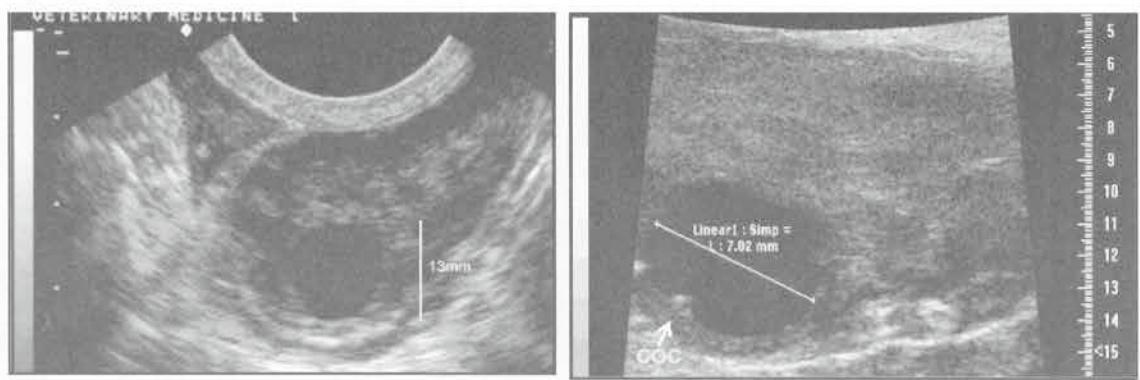


図 12. 従来の機器 (7.5 MHz プローブ; 左) および超音波生体顕微鏡 (40 MHz プローブ; 右) を用いた経腔的超音波検査による牛の卵胞の画像。従来の超音波機器による 13 mm の卵胞の画像 (左) と比較すると、超音波生体顕微鏡検査による 7.02 mm の卵胞の画像 (右) は卵胞壁と卵丘・卵母細胞複合体 (8 時の位置に見える COC) をはるかに詳細に描写している。

