

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32206

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15588

研究課題名(和文) haptics技術を用いた非閉塞性無精子症に対する精巣内精子回収術の新展開

研究課題名(英文) Novel development of microdissection testicular sperm extraction for non-obstructive azoospermia using haptics technology

研究代表者

岩本 晃明 (Iwamoto, Teruaki)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：60046117

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)：顕微鏡下精巣内精子回収術において、回収率を上げるための客観的な指標として、精密な機械計測によって精細管の硬さを評価することを発案した。その第一歩として精巣を微小力センサを用いた装置により押し込み、反力を測定することで硬さ測定を試みた。実験的停留精巣ハムスターモデルを作製し、精子形成不全をきたした精巣の硬さを測定し、さらにその精子形成能をJohnsenスコア(JS)によって病理学的に評価した。その結果、停留精巣群は無処置群より硬さ及びJSの有意な低下を認め、硬さとJSの間には強い正の相関が見られた。以上より、精巣の硬さが精子形成能評価の新たな指標として有用であることが内外文献上初めて示された。

研究成果の概要(英文)：Microdissection testicular sperm extraction (MD-TESE) is the first choice treatment for patients with non-obstructive azoospermia. The identification of seminiferous tubules in which spermatozoa present is dependent on subjective observation under a microscope. As an objective index to raise the sperm retrieval rate in MD-TESE, it was devised to evaluate the hardness of seminiferous tubule by precise mechanical measurement. As a first step, we tried hardness measurement on the testes by pushing testes with a device using a micro force sensor and measuring the reaction force. Experimental cryptorchidism hamster model was prepared to measure the hardness and spermatogenic potential was evaluated by Johnsen score (JS). Result: the cryptorchidism group showed a significantly lower hardness and JS than the untreated group, and a strong positive correlation was found between hardness and JS.

It was shown that the hardness is useful as a new index of the spermatogenic evaluation.

研究分野：泌尿器科

キーワード：非閉塞性無精子症 顕微鏡下精巣内精子回収術 精巣硬度 造精機能障害モデル停留精巣 Johnsen score haptics 精子回収率 scarling

1. 研究開始当初の背景

男性不妊症の認知度は NPO 法人男性ドクターズ (<http://mids.jp>) の啓発活動を初めとして男性不妊専門医の努力によって上がって来ているもの、2016 年の出生数は 100 万に届かない状況で少子化問題の改善の兆しがまだまだ見えていないのが現状である。特に 非閉塞性無精子症 (non-obstructive azoospermia: NOA) の場合には悲惨で男性不妊の精査もされずに絶対不妊と言われ渡されることもある。中で最も治療に難渋する重症疾患は精巣自体の機能障害である NOA で、全男性の 1%¹⁾、男性不妊症の約 15%、無精子症の約 60% を占める²⁾。男性不妊症の約 10%、無精子症の 80% を占める。従来、非配偶者間子宮内精子注入法しか治療手段がなかった NOA に対し、Schlegel (1999 年) は顕微鏡下精巣内精子回収術 (microdissection-testicular sperm extract: MD-TESE) によって精細管の一部に精子が存在することを明らかにし、精子が存在する精細管の特徴は周囲より太く拡張し、やや白濁した内溶液が見える部位であることをあげて顕微授精により不妊カップルの挙児希望に応えられる幕開けとなった。その後、MD-TESE は内外の多くの施設で実施されるようになったが、精子回収率は本邦では平均的には 40~50%³⁻⁴⁾ と海外の報告 60% 比較すると成績は良くない。また、回収率の施設間差が大きく術者や設備により大きな幅がある。その理由として、精子が存在する精細管を識別することの難しさがある。MD-TESE では術者 (医師) が顕微鏡下で精細管を視認しながら精子の存在する部位の同定を試みるため、その成績は術者の経験や技能に大きく依存する。言い換えれば主観的な手段によって行われている。

2. 研究の目的

我々は、客観的で定量的な指標に基づいて精子が存在する精細管を同定できるシステムが構築できれば、精子回収率の向上と施設間差の軽減が期待できると考えた。そこで本研究では、精子が存在する精細管と存在しない精細管を識別する視覚情報以外の指標として、精細管の硬さの違いに着目した。我々の先行研究としてヒト精巣の病理組織学的検討から Sato らは、造精機能が低下した精巣ではその程度に相関して精細管基底膜が肥厚し、基底膜を構成する細胞外基質の組成が一部変化し

ていたことを報告している。細胞外基質の組成が変われば精細管壁の物性にも変化が生じると考えられ、また精子形成が不良な精細管の内部では当然、精子形成を担う細胞が減少することから、精細管や精巣の硬さが変化する可能性が高い。以上の背景より、NOA 患者の精細管の精子が存在する部域と存在しない部域では硬さに違いがあるとの仮説を立て、硬さの違いが、MD-TESE における精子回収部位同定の予測因子になるのではないかとこの発想に至った。

現在のところ国内外で関連する知見は全く検索されなかった。一方 NOA に対する MD-TESE による精子回収が、どの施設でもある程度の成績が挙げられないものかと思案していた。ロボットによる手術支援技術としては前立腺癌手術にダ・ヴィンチが採用されている。しかしダ・ヴィンチは大型で高価である上に、鉗子で操作するマスタロボットから術者への力覚・触覚のフィードバックがなく、術者が精細管への刺入する際の微妙な力の変化をリアルタイムに知覚しながら手術するには無理がある。その突破口が、慶応義塾大学理工学部システムデザイン科の大西公平教授グループが世界に先駆けて行ったブタの肝臓を用いた硬度についての研究だった。その手段として開放手術 (鈴木ら: 日コンピュータ外会誌 2013, 15: 186-7) と内視鏡 (小川ら: 平成 24 年度電気学会産業計測制御研究会資料 2013) によるブタ肝生検をロボットシステムで行っている。しかしながら精細管のような 100 μ m 以下の局所的なレベルでの測定法は開発されていない。本研究では、定量的な硬さの指標として押し込み量と反力の割合で表現される「剛性値」を採用し、ハムスターを用いた動物実験により、正常な精巣と実験的に精子形成不全を誘導した精巣の硬さを比較した。これにより MD-TESE による精子回収の精度を高め、精子の回収が術者の主観によらず、誰でもある一定の成果が出せる画期的なシステムを構築することが可能になると着想した。

3. 研究の方法

1) 精巣の力学的モデル化

精巣の剛性を測定するために、本装置では微小力センサ (FTS-10000: Femtotools. Inc) により物体の反力を測定し、ボイスコイル

モータ (AVM12-6.4:Technohands.Co.Ltd.) による前後駆動により精巣への押し込みを行った。力センサで測定した情報は 13bit の AD コンバーターでアナログ情報からデジタル情報に変換した。マイクロコンピュータ (STM32F411RET6MCU:ST Microelectronics.Co.Ltd) により変換された力情報を読み取り、かつボイスコイルモータの駆動制御も行った。精巣は水平および垂直方向に駆動するメカニカルステージ上に配置し、顕微鏡下で力センサによる精巣の押し込みを確認した。

2) 剛性値を用いた精巣の硬さ測定法

・測定システムの構成と制御法

この測定法については共同発表者の冨塚がコンピュータ外科学会誌に発表した。(2016)

・精巣の力学モデルの妥当性に関する検証法

精巣の力学モデルでは、剛性が押し込み量に依存する非線形性を有し、粘性の影響は低速域では無視できると仮定したため、その妥当性について検証するため以下の実験を行った。

粘性に対する依存性の確認

一定の押し込み量で等速度試験をおこない、粘性の影響について検証した。4通りの速度指令値

$$(X_1^{cmd} = 10.0, \dot{X}_2^{cmd} = 50.0, \dot{X}_3^{cmd} = 100.0, \dot{X}_4^{cmd} = 500.0)$$

で VCM を制御した。反力は押し込み動作中にマイクロフォースセンサによって測定した。また、押し込み量は 500 μ m で一定とし、押し込み量が 500 μ m に達したときに発生する瞬時反力について各押し込み速度ごとに測定した。

剛性に対する依存性の確認

一定の押し込み速度で等速度試験をおこない、剛性の影響について検証した。押し込み速度を 10.0 μ m/sec で一定とし、5通りの位置指令値 $X_1^{cmd} = 400.0, X_2^{cmd} = 800.0, X_3^{cmd} = 1200.0, X_4^{cmd} = 1600.0, X_5^{cmd} = 1600.0, X_5^{cmd} = 2000.0$ で VCM を駆動し、各位置指令値に対する反力を測定した。

3) 精子形成不全動物モデルの作製

実験的停留精巣による精子形成不全の動物モデルは、11-14 週令の成熟したオスのシリアンハムスターを用いて作製した。イソフルラン (和光純薬) 吸入麻酔下にて左側精巣を腹腔内に引き上げて固定し⁹⁾、2 週間後に摘出した精巣について各種測定および病理学的評価を行った。左側を停留精巣 (cryptorchidism, Crypt) 群とし、右側の未処置精巣を対照 (Control) 群とした。

4) 精巣の硬さ測定と精子形成能の病理学的評価

精巣の硬さは押し込み試験の際のプロープの接触角度の差や精巣内部域差の影響を考慮して、精巣の 5 か所について測定した (Fig. 3)。水平方向および垂直方向位置の調整は XZ メカニカルステージを用いて行い、中央、右、左、下、上の順番で測定した。押し込み量は 500 μ m、押し込み速度は 10.0 μ m/sec で一定とした。

測定後の精巣をブアン液にて固定後、パラフィン包埋標本を作製し、HE 染色を行った。精子形成の成熟度を形態から定量的 (1 から 7) に評価する Johnsen スコア (JS) を用いて、ランダムに 30 の精細管断面を評価し、平均スコアを JS 値とした。JS はヒトの精巣の精子形成能評価のために作成された基準であるが、ハムスターはヒトと精子形成の様相が異なるため、JS をハムスターに適用するためにスコアリングの基準を一部改変した。すなわち Score 5 以下についてはヒトの基準をそのまま適用し、精子細胞の成熟度が円形精子細胞までを score 6、初期伸長精子細胞までを score 6.5、後期伸長精子細胞までを score 7.0 とし最高スコアとした。

5) 統計学的解析

統計学的解析には JMP ver.12 (SAS Japan) を用いた。平均値の差の検定には Student t-test、対応のある 2 群間の比較には paired t-test を用い、有意水準を 5% とした。

4. 研究成果

1) 精巣の力学モデルの妥当性に関する検証について

・粘性に対する依存性

押し込み速度を変えて精巣の硬さを測定した時、押し込み速度が速いほど反力が大きくなることがわかった。押し込み量が一定のため、反力の増分は粘性により生じたものと考えられる。すなわち、本実験で扱う精巣は粘性を持つことが示された。しかし、押し込み速度が低速域 ($\dot{X}^{cmd} = 10.0 \sim 100.0$) での反力の変化量に大きな変化が見られないことから、低速域については粘性の影響を無視できることが明らかになった。

・剛性に対する依存性

押し込み量を変えて精巣の硬さを測定した時、押し込み量が増えるほど、反力が大きくなる

ことがわかった。押し込み速度が一定のため、反力の増分は剛性により生じたものと考えられる。剛性が線形の場合、剛性の大きさは押しこみ量に依存せず一定となるため、本実験で扱う精巣は非線形な剛性を有すると考えられる。そのため、剛性の非線形性については得られる微小区間ごとの剛性値 k を用いて線形近似することで定量的な測定値であるとみなした。

2) 精巣の硬さ測定値の測定回による変動の検討について

測定回による測定値の変動の有無を検証するために、Control 群について 4 回の異なる測定日の平均 \tilde{K} 値を比較した。4 回の平均値に有意差はなく ($P=0.5341$)、複数回における剛性測定値を比較する際に測定回による差を考慮する必要がないことが示された。

3) 精巣の測定部位による硬さ測定値の検討について

押し込み試験を行った精巣 5 か所の部位における \tilde{K} 値を対応のある t 検定で行い、5 か所の \tilde{K} 値はどの組み合わせにも平均値に有意な差は見られなかった。この結果から、以降は 5 か所の平均 \tilde{K} 値を剛性値として使用することとした。

4) 精子形成不全モデルにおける精巣の硬さ測定と各種パラメーターの比較

実験的停留精巣手術 2 週間後のハムスター精巣には明らかな精子形成不全が認められた。精巣重量、精巣長径、精巣短径、 \tilde{K} 値、JS の全てにおいて、Crypt 群で有意に低下していた (Table 1)。すなわち停留精巣手術によってハムスター精巣は精子形成能が低下し、その精巣においては剛性値も低下していることが明らかになった。

Table 1. 2 群における各種精巣パラメーターの比較

Parameters	Control (n=15)	Crypt (n=16)	P-value
Testis weight (mg)	1.86±0.15	0.61±0.12	<0.0001
Testis size: major axis (mm)	20.9±0.80	15.2±1.22	<0.0001
minor axis (mm)	14.7±0.70	10.4±1.15	<0.0001
\tilde{K} (mN/mm)	1.46±0.31	0.40±0.13	<0.0001
Johnsen score (1-7)	6.96±0.04	4.08±0.71	<0.0001

5) 精子形成不全モデルにおける精巣の各微小区間の剛性値 k

全押し込み量を 10 等分 ($m=10$) して、各微小区間の剛性値 (k 値) について、Control 群と Crypt 群の比較を行ったところ Control 群の精巣では微小区間数が増加、つまり押し込み量の増加とともに剛性の値が高くなるが、Crypt 群では、押し込み量が増加しても剛性値はほとんど増加しないことがわかった (Fig. 1)。この結果は、回帰直線の傾きからも理解できた。

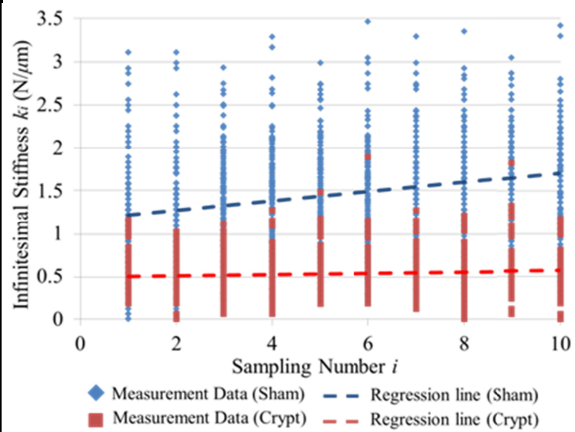


Fig. 1. Measurement Result of k value

以上をまとめると、造精機能障害を有するハムスターモデルの精巣の硬さ (剛性) を測定した結果、剛性値が正常精子形成精巣と比べ有意に低く、剛性値と JS の間には強い正の相関 ($r=0.8883$, $p<0.0001$) が認められた (岩本ら、日本泌尿器科学会総会 2017 発表)。我々の調べた範囲で造精機能障害をきたした精巣ではその硬さが低下するとの新たな知見が得られた。以上の成果を小川健司らにより日本コンピューター外科学会誌 2017 に投稿中である。

6) 精巣の硬さと病理学的アプローチによる精巣内の形態変化

そこで今回、精巣全体の固さに影響を及ぼすと考えられる精巣内の構造の形態学的変化について詳細な解析を行った。前述した造精機能障害モデルとして crypt 群 (16 精巣) と control 群 (15 精巣) の精巣を摘出、硬さの測定後、病理組織標本を作製した。JS による精子形成能の評価と、画像解析装置を用いて精巣白膜厚 (μm)、精細管直径 (μm)、精細管占有率 (%)、精細管内の細胞層厚 (μm)、精細管基底膜厚 (μm) を測定し解析を行った。

その結果、crypt 群は sham 群と比較し精巣サイズが減少するだけでなく白膜と精細管基底膜が有意に肥厚し、精細管サイズの縮小とともに精巣内での精細管占有率が有意に低下した ($P < 0.0001$)。剛性値と JS は同じ傾向 ($r = 0.8883$, $p < 0.0001$) を示し、白膜厚 ($P < 0.001$) 精細管基底膜厚の間 ($p < 0.0001$) には負の相関が、精細管直径 ($P < 0.001$)、精細管占有率 ($p < 0.0001$)、細胞層厚 ($p < 0.0001$) との間には正の相関が認められた。小括：測定した全ての形態学的指標と JS 並びに剛性値には相関が見られた。精子形成能の評価法として最も一般的な JS と測定した剛性値が、形態学的指標に対しても同様の傾向を示すことから、剛性値が精子形成能評価の新たな指標として有用であることが示された。以上の解析結果は日本アンドロロジー学会学術大会 2017 年 7 月に発表予定である。

7) 精細管の硬さの測定の経過

前述の成果を踏まえて、精巣の硬さが測定できたことから我々が目指す第 2 のステップの研究として極細の力センサを用いて精細管の硬さ測定を行い、造精機能と精細管の硬さの関連性の研究に着手した。

実験動物は同じハムスターで行うこととした。まずは精細管を遊離して硬さ測定を試みたが、精細管内の内容液を維持したまま行うことは極めて困難であることが判明した。そこで臨床で行っている顕微鏡下精巣内精子回収術に準じて精巣を創外に露出後白膜を切開し精細管を露出する計画とした。精巣の硬さ測定で得た知識から極細の力センサを用いて試みるも顕微鏡の位置が悪く確実に精細管を接線（精細管に対して直角に）方向で押している確証が得られなかった。平行して岩本は 150 μm 程度の太さのガラス管を用いて数倍の拡大鏡下で精細管を確実に穿刺し内容液を吸引し、コントロール群の精細管内容液から運動性を有する精子を確認し精子回収できる技術を会得した。力センサを用いた精細管の押し込みテストは今の顕微鏡システムでは研究年度内では無理であると判断した。引き続き新たな顕微鏡システムを考えて精細管の硬さの測定を試みる予定である。

研究成果のまとめと今後の方向性

2 年間の特出した成果として精巣の硬さを測

定することが出来て、さらに造精機能障害の精巣の硬さが正常の造精機能を有する精巣より低下すると言う国内外で初めての知見を得た。何ゆえに硬さが低下するのかは精巣の病理学的検討により近いうちに明らかに出来ると信ずる。

これらの成果は我々の挑戦的萌芽研究の第一歩である。我々が臨床の現場での非閉塞性無精子症に対する MD-TESE による精子回収率の向上を目指すには次のステップで精細管壁の硬さとその精細管部位での精子回収の有無を検証する実験が必要である。精巣と同じように精細管の硬い部分に精子が存在するのか、精細管の硬さが低下した部位では精子の回収が出来ないとの関係を明らかにしていきたい。ハムスター精細管の硬度と精子の存在の関係がヒト精細管と同じ状況になるのかヒトで実験を行うことは出来ない。しかし我々は精巣・精細管の組織学的な変化と精巣の硬さがある程度相関することの知見が得られたら、ヒト精巣・精細管組織所見から硬さを推定することが可能になると考えている。従って将来的には本挑戦的萌芽研究により得られた研究成果によって MD-TESE による精子回収率の向上に必ずや寄与するものと確信している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) 富塚大輔, 小川健司, 吉池美紀, 野澤資亜利, 中澤龍斗, 佐藤陽子, 大西公平, 森川康英, 岩本晃明: 精子形成能判定のための精巣の硬さ測定装置の開発 ~ ハムスター精巣を用いての検討 ~ Japan Society of Computer Aided Surgery JSCAS, 2016;18;271-272.
- 2) 小川健司, 富塚大輔, 吉池美紀, 野澤資亜利, 中澤龍斗, 佐藤陽子, 大西公平, 森川康英, 岩本晃明: 精巣の硬さを指標とした精子形成能の新規定量的評価法 - ハムスター停留精巣モデルを用いて - Japan Society of Computer Aided Surgery JSCAS 2017 5 月 投稿中

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 冨塚大輔, 小川健司, 吉池美紀, 野澤資亜利, 中澤龍斗, 佐藤陽子, 大西公平, 森川康英, 岩本晃明: 精子形成能判定のための精巣の硬さ測定装置の開発～ハムスター精巣を用いての検討～第25回日本コンピューター外科学会 平成28年11月 東京
- 2) 岩本晃明, 小川健司, 冨塚大輔, 中澤龍斗, 吉池美紀, 野澤資亜利, 佐藤陽子, 森川康英, 大西公平: ロボット支援を用いた非閉塞性無精子症に対するMD-TESEの精子回収率改善を目指した挑戦的萌芽研究: 第1報 ハムスター精巣の硬さと造精機能との関連 第105回日本泌尿器科学会総会 平成29年4月 鹿児島
- 3) 萩野詩季, 栗脇良太, 小川健司, 冨塚大輔, 吉池美紀, 野澤資亜利, 中澤龍斗, 谷口雅康, 高木光博, 森川康英, 大西公平, 佐藤陽子, 岩本晃明: ロボット支援を用いた非閉塞性無精子症に対するMD-TESEの精子回収率改善を目指した挑戦的萌芽研究: 第2報 ハムスター精巣の硬さに影響する精巣内構造の変化に関する形態学的解析.日本アンドロロジー学会第36回学術大会 平成29年6月 倉敷 発表予定

〔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〕

特になし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩本晃明 (IWAMOTO Teruaki)
国際医療福祉大学・大学病院・教授
研究者番号: 6046117

(2)研究分担者

吉池美紀 (YOSHIKE Miki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員
研究者番号: 60398964

佐藤陽子 (SATO Yoko)
東亜大学・医療学部・教授
研究者番号: 50398963

大西公平 (OHNISHI Kouhei)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号: 80137984

(3)連携研究者

森川康秀 (MORIKAWA Yasuhide)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 90124958

(4)研究協力者

中澤龍斗 (NAKAZAWA Ryuto)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

野澤資亜利 (NOZAWA Shiari)
聖マリアンナ医科大学・医学部・研究員

小川健司 (OGAWA Kenji)
慶應義塾大学大学院・理工学研究科・
大学院生

冨塚大輔 (TOMIZUKA Daisuke)
慶應義塾大学大学院・理工学研究科・
大学院生