

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791673

研究課題名(和文) 血流障害における精巣機能解析～精索捻転症の新たなガイドライン作成を目指して～

研究課題名(英文) Effects of arterial ischemia and venous congestion on the rat testis

研究代表者

平井 宗一 (Hirai, Shuichi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：70516054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円、(間接経費) 480,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、精巣における動脈性虚血と静脈性鬱血の影響の違いを明らかにすることである。虚血群の精巣は肉眼的に白くなるが、鬱血群の精巣は赤黒くなり腫脹した。一方、虚血群では鬱血群よりも精細管内の死細胞の数が増加することが明らかになった。このことにより、精巣の血流障害において、肉眼所見は精子形成機能の予後を予測するための指標として不適切である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify different effects of testicular arterial ischemia and venous congestion. Macroscopic examination indicated that the testes of the AI group had turned white, whereas the testes of the VC group had turned reddish-black and swollen. However, histological evaluation indicated that the number of dead germ cells increased in seminiferous tubules more in the AI group than in the VC group. Our results suggest that when testicular blood flows are disturbed, macroscopic findings are unsuitable for predicting testicular function prognosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：精巣 虚血 鬱血

1. 研究開始当初の背景

一般的に血流障害には、流入動脈の閉塞による“動脈性虚血”と灌流静脈の閉塞による“静脈性鬱血”がある。これまで、動脈性虚血(AI)と静脈性鬱血(VC)における影響の違いを、腸管、皮膚および中枢神経において調査した動物実験がいくつかあり、AIとVCは異なる病態を示めることが明らかになっている。AIを伴う腸管はVCを伴う腸管よりも肉眼的に青黒くなり、酸化ストレスが発生して障害の程度が重いことが分かっている。皮膚においては、VCの方がAIよりも血流障害の程度が重いということが明らかになっている。また最近、VCがAIよりも神経根における血液-神経バリアに悪影響を与えることが報告されている。

精巣は絶え間ない精子形成とテストステロンの分泌のために豊富な血流を必要とする臓器である。それゆえ、血流障害によって容易に精子形成障害が引き起こされる。特に、急性血流障害を伴う精巣疾患として、精巣捻転症がよく知られている。一般的に精索捻転症の病態は、精索の捻転に伴うAIが引き起こす血流障害であると考えられている。しかしながら、動脈の壁は静脈の壁よりも厚く弾力があり、動脈圧は静脈圧よりもはるかに高いため、精巣捻転症においてAIとVCが混在する病態が存在すると考えられる。精巣捻転症では、血流障害の時間が長くなると、精巣が壊死し、不可逆性の精子形成障害となる。さらに抗精子抗体の出現によって、健側の精巣に精子形成障害が誘導される場合がある。そのため、治療は重症度に合わせて、整復手術、もしくは精巣摘出手術を速やかに選択する。精巣摘出手術の適応は、予測される血流障害時間(6時間以内かどうか)、手術中に見られる捻転の程度、そして精巣の肉眼所見を参考にして判断するのが一般的であり、その適応を決めるための判断は泌尿器科医の経験によるところが大きい。実際、精巣捻転

による症状発症から6時間を経過した症例では、精巣機能の回復は望まれないと判断され、手術さえ行われない症例もある。また、手術が行われたとしても、術中に精巣機能回復の可能性を肉眼所見で判断するのが難しい。そのため、精巣捻転症の病態を正確に把握することは臨床的に重要な課題であると考えられる。

2. 研究の目的

過去の精巣捻転症の動物実験モデルには、「精索を720度、480度、360度捻転させるモデル」と「精巣動静脈を同時にクリップし、血流を完全に遮断するモデル」があり、多くの研究者がその病態を調査してきた。その結果、急性血流障害によって、精巣内に酸化ストレスが発生し、精子形成障害が引き起こされることが知られるようになった。また、急性血流障害による生殖細胞死には、Fas-Fas-L systemやBax systemによるアポトーシスが関連していることが明らかとなっている。しかしながら、AIとVCの病態を明確に分けて精巣の血流障害を調査した報告はない。

本研究の目的は、精巣の血流障害においてAIとVCが与える影響の違い、および、それぞれを再灌流させた後の影響の違いを、動物実験モデルを用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

10週齢のラットを用いて精巣動脈(虚血群)と精巣静脈(鬱血群)の血流をそれぞれ2、4、6時間遮断し、精巣に与える影響の違いを組織学的に調査した。また、両群をそれぞれ再灌流させ、3日後の再灌流障害を組織学的に解析した。

4. 研究成果

ラット精巣動脈は大動脈から分岐するところを同定し、クリップで血流を遮断するのは容易だった。一方、ラット精巣静脈は、下

大静脈に直接流入する場合、腎静脈に流入する場合、内腸骨静脈に流入する場合、そしてそれらが混合する場合があります、42 匹中 12 匹で精巣静脈の血流を完全に遮断するのが困難だった。そこで、我々は完全に精巣動脈の血流を遮断できた精巣を虚血群、完全に精巣静脈の血流を遮断できた精巣を鬱血群とした。

虚血群の精巣は、直後から徐々に色が変化して、2 時間後にとても白くなった。一方、鬱血群の精巣は、徐々に色が変化して 2 時間後にはとても青黒くなった。血流遮断後 4 時間においても虚血群の精巣は白く、鬱血群の精巣は青黒かった。血流遮断後 6 時間では、鬱血群の精巣には点状出血が見られたが、虚血群には見られなかった。6 時間の血流遮断後に血流を再灌流した後、虚血群の精巣は直ぐに赤みを増して鬱血群の精巣と同様の肉眼所見となった。また、血流を再灌流させて 1 時間後でも、虚血群と鬱血群を見分けることは難しかった。

虚血群と鬱血群の精巣重量を比較したところ、2 時間後で虚血群と鬱血群に明らかな変化はなかった。しかしながら、血流を遮断して 4 時間および 6 時間後には鬱血群の精巣重量は、虚血群の精巣よりも優位に重く、腫脹していた。再灌流した 5 分後の精巣では、鬱血群の精巣は虚血群の精巣よりも優位に重かったが、再灌流 1 時間後の精巣では、両群の重量に明らかな変化はなかった。

組織学的評価では、血流を 2 時間遮断した虚血群と鬱血群では精細管に明らかな変化はなかった。しかしながら、血流を遮断して 4 時間および 6 時間遮断した虚血群と鬱血群で精細管にクロマチンの凝集した精原細胞がところどころに見られた。また、6 時間後の鬱血群では、間質に出血が見られたが、虚血群では見られなかった。

免疫組織化学法では、Control 群では TUNEL 陽性生殖細胞が精細管の基底膜に沿って検

出されたが、虚血群および鬱血群では多くの TUNEL 陽性細胞が散発的に精細管の内側と外側に観察することができた。精細管内の TUNEL 陽性生殖細胞を定量したところ、4 時間および 6 時間後の虚血群では鬱血群よりも有意に存在した。

血流を再灌流させて 3 日後の組織変化は、血流を 2 時間遮断した虚血群と鬱血群では明らかな精子形成障害は見られなかった。血流を 4 時間遮断した虚血群では、いくつかの生殖細胞の核がヘマトキシレンに染色されず、いくつかの精細管が壊死していた一方で、血流を 2 時間遮断した鬱血群では、明らかな精子形成障害は見られなかった。血流を 6 時間遮断した虚血群では、多くの生殖細胞の核がヘマトキシレンに染色されず、多くの精細管が壊死していた一方で、血流を 2 時間遮断した鬱血群では、精子形成障害の程度は軽度で精細管の壊死は見られなかった。

免疫組織化学法では、Control 群では PCNA 陽性生殖細胞が精細管の基底膜に沿って検出された。血流を 2 時間遮断した虚血群と鬱血群では PCNA 陽性生殖細胞は Control 群と同様に染色された。血流を 4 時間および 6 時間遮断した虚血群では、PCNA 陽性生殖細胞はところどころに観察することができたが、鬱血群ではほとんど全ての精細管に検出できた。精細管内の PCNA 陽性生殖細胞を定量したところ、4 時間および 6 時間後の虚血群では鬱血群よりも有意に存在した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Effects on the Local Immunity in the Testis by Exposure to Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) in Mice. Kitaoka M, Hirai S, Terayama H, Naito M, Qu N, Hatayama N, Miyaso H, Matsuno Y, Komiyama M, Itoh M, Mori C.

J Reprod Dev. 2013 Jul 26. In press.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/advpub/0/advpub_2012-180/_pdf

査読有

Serum Autoantibodies in Mice Immunized with Syngeneic Testicular Germ Cells Alone. Hirai S, Naito M, Terayama H, Hatayama N, Qu N, Musha M, Itoh M. Am J Reprod Immunol. 2013 Jul 15. doi:

10.1111/aji.12145. 査読有

Lymphangiogenesis in chronic inflammation in the testis. Hirai S, Naito M, Terayama H, Qu N, Kuerban M, Musha M, Itoh M. Andrology. 2013 Jan;1(1):147-54. doi:

10.1111/j.2047-2927.2012.00015.x. 査読有

The effects of adjuvants on autoimmune responses against testicular antigens in mice. Musha M, Hirai S, Naito M, Terayama H, Qu N, Hatayama N, Itoh M. J Reprod Dev.

2013;59(2):139-44. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/59/2/59_2012-121/_pdf 査読有

Nine renal arteries in a Japanese female cadaver. Hirai S, Honma S, Naito M, Terayama H, Kawata S, Itoh M. Anat Sci Int. 2013 Mar;88(2):118-21. doi:

10.1007/s12565-012-0161-y. 査読有

Effect of a magnetic field on Drosophila under supercooled conditions. Naito M, Hirai S, Mihara M, Terayama H, Hatayama N, Hayashi S, Matsushita M, Itoh M. PLoS One.

2012;7(12):e51902. doi:

10.1371/journal.pone.0051902. 査読有

The origin of lymphatic capillaries in murine testes. Hirai S, Naito M,

Terayama H, Qu N, Kuerban M, Musha M, Ikeda A, Miura M, Itoh M. J Androl. 2012 Jul-Aug;33(4):745-51. doi:

10.2164/jandrol.111.015156. 査読有

Testicular autoimmunity in men-its suggestion that a Japanese pathologist left. Hirai S, Itoh M. Reproductive Immunology and Biology. 2012 27(1):7-13. 査読有

〔学会発表〕(計 5件)

平井宗一、Role of macrophages in newly formed lymphatic vessels in the testis、The International Society for Immunology of Reproduction、2013年5月28-6月1日、Boston

平井宗一、精巣における虚血障害および鬱血障害の違い、第118回日本解剖学会・全国学術集会、2013年3月28-30日、香川

平井宗一、Rare two cases of multiple renal arteries、1st congress of Asian Association of Clinical Anatomists、2012年11月3-4日、Korea

平井宗一、重複腎動脈の解剖学的考察、第117回日本解剖学会・全国学術集会、2012年3月26-28日、山梨

平井宗一、スunks雄性生殖器の構造、第6回スunks研究会、2012年3月26日、山梨

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

平井 宗一 (HIRAI SHUICHI)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：70516054