

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09703

研究課題名（和文）非閉塞性無精子症に対するMD-TESE成績向上に資する精細管MRIの開発

研究課題名（英文）Preclinical study aiming at the development of diagnostic MRI technique for NOA patients

研究代表者

山口 雅之（Yamaguchi, Masayuki）

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長

研究者番号：90450577

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：国は少子化社会対策基本法を定め、良質かつ適切な不妊治療の提供を推進している。国内では、不妊治療として、体外受精が年間約40万例実施されている。その半数は、男性不妊症が原因で、中でも非閉塞性無精子症（NOA）と呼ばれる患者は1万人以上いる。NOAでは、顕微鏡下精巣内精子回収術（MD-TESE）と顕微授精が有効な治療とされる。MD-TESEでは、精巣を切開し、直径0.2mm以下の精細管、数百本の中から精子産生の残された、太い精細管を探し出し、精子を回収する。専門医でも難しい手術で、成功率は約3割と高くない。手術前に太い精細管の場所を特定するMRI技術を目指して、基礎的な研究をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRIを利用して、太い精細管と細い精細管が区別できるか、実験動物を利用して確認した。0.2 mm以下の構造のMRI取得には、高い技術が必要である。プスルファンと呼ばれる抗がん剤を投与し、精巣を非閉塞性無精子症（NOA）の類似の状態とした動物と、投与しなかった対照動物とで精巣のMRI所見を比較した。前者では精細管が細く見え、隣接する管の間隔が小さい傾向が見られた。また、MRIの信号が、管の中心部で低い傾向が見られた。このような知見を蓄積することで、将来の臨床応用の道が開かれ、最終的にMD-TESEの手術前にMRIを撮影し、男性不妊症の診療成績向上に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To improve success rate of micro-dissect testicular sperm extraction (MD-TESE), andrologists need preoperative diagnostic imaging technique for non-obstructed azoospermia (NOA) patients. We investigated MRI technique to visualize the seminiferous tubules in a NOA animal model. We found that MRI can visualize the seminiferous tubules and can provide some imaging markers that are likely related to the width of the tubular lumen and interval of adjacent lumens. The discovery of such imaging markers that are highly relevant to sperm production activity may facilitate future clinical application of MRI to NOA patients.

研究分野：画像診断学

キーワード：精細管 MRI 非閉塞性無精子症 がんサバイバー 抗がん剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非閉塞性無精子症において造精のある精細管を検出する MRI の実現を目指し、ヒトの非閉塞性無精子症を模した動物実験を実施し proof-of-concept を取る。Micro-dissect testicular sperm extraction (MD-TESE)の術前に、精巣内精子回収の見込みあり・なしの患者層別診断に利用し、効果に乏しい手術を避ける、術中ナビゲーションに利用するなどし、小児・AYA がんザバイバーを含む、男性不妊治療の MD-TESE 成績向上につながる。申請者らによる先行研究では、3 ~ 4.7 テスラの高磁場 MRI を用い、200 μm の動物精細管が検出されている。本研究では、最新鋭の 9.4 テスラ MRI を使いながら、抗がん剤投与による生殖細胞の減少に伴い菲薄化した精細管と、造精が再開し壁厚が増加した精細管の鑑別を可能とする測定技術的な条件を探索する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗がん剤を投与し、ヒトの非閉塞性無精子症に似た動物モデルを作成し、MRI によって部分的な造精再開部位を検出可能か調査すること、また、検出に必要な技術的要件を探索することである。

3. 研究の方法

動物実験は、国立がん研究センター動物実験倫理委員会の承認を受けて実施された(承認番号 K21-023)。

非閉塞性無精子症の動物モデルとして、低用量ブスルファンモデルを用いた()。研究当初、停留精巣モデルラットの作出を試みたが、造精障害の出現率や重症度にばらつきがあり、本研究における使用は適切ではないと判断した。

ブスルファン(1,4-ブタンジオールジメタンスルホナート; CAS RN 55-98-1, 東京化成工業、東京)を使用した。溶媒は、Dimethyl sulfoxide (CultureSure DMSO; 富士フィルム和光純薬、大阪)とした。

雄性 Sprague-Dawley (SD)種ラット(n = 20)を10匹ずつ2群にわけ、第一群には、ブスルファン(濃度 2 % w/v、溶媒 DMSO、投与容量 0.5 mL/kg)を腹腔内投与した。第二群は DMSO のみを投与した。2 回目投与後 20 日、及び 45 日後に、イソフルラン麻酔下の放血により安楽死処分し、精巣および精巣上体を採取した。精巣及び精巣上体の重量を、体重で除し、相対重量を算出した。また、採材した精巣および精巣上体は、室温で 18 から 24 時間ブアン液に浸漬し、70% エタノールに置換した。精巣及び精巣上体の摘出標本を、9.4 テスラ MRI 装置 (BioSpec 94/20 USR; Bruker Biospin, Ettlingen, Germany)を用いて、MRI 測定し、T1 map 及び T2 map を得た。測定条件は、表 1 に示す通りである。

表 1

パラメーター名	パラメーター値
パルスシーケンス	RARE T1 T2 map
Repetition time [msec]	1267, 1500, 3000, 5500
Echo time [msec]	8.8, 26.5, 44.1, 61.7, 79.4
Field-of-views [mm]	20 × 20
Matrix	384 × 384
Slice thickness [mm]	0.7

画像解析には、ImageJ (Version 1.52p; National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)を使用した。精巣の中心部にて、精細管の長軸方向を垂直な方向に線を引き、信号プロファイルを得た。T1 map, T2 map それぞれにおいて、ピーク間隔、ピーク強度の平均値を算出し、ブスルファン投与後 20 日後、45 日後、DMSO 投与後 20 日後、45 日後の 4 グループ間で、Turkey 検定

(有意水準 0.05)を用いて比較した。統計解析には、IBM SPSS Statistics (Version 20.0.0; IBM, Armonk, NY, USA)を用いた。

4. 研究成果

ブスルファン投与後20日、45日後のSD種ラットでは、精巣及び精巣上体の相対重量は0.54%、0.33%であった。ブスルファン投与群では、DMSO群と比較して、相対重量は有意に小さかった($p < 0.001$)。

T1map、T2map 双方において、精細管と思われる細い管状構造が描出された。ブスルファン投与後20日後、45日後、DMSO投与後20日後、45日後では、T1 map におけるピーク強度の平均値は、1095 +/- 106、1108 +/- 58、1303 +/- 91、1346 +/- 62[msec]であった。ブスルファン投与群にてピーク強度は有意に低値を示した。T2 map におけるピーク強度の平均値は、31 +/- 1、29 +/- 3、35 +/- 3、33 +/- 1 [msec]であった。DMSO投与後20日後と、ブスルファン投与後45日との間に有意差を認めた。ピーク間隔は、DMSO投与後45日のT1 map において265 +/- 21 [micrometer]、ブスルファン投与後45日のT2 map において212 +/- 9 [micrometer]と有意に縮小した。

低用量ブスルファン2回投与による一過性造精障害モデルは、MD-TESEの対象となる非閉塞性無精子症患者の精巣に類似した動物モデルである。2回目投与の20日後では、精原幹細胞を除く造精細胞は消失し、45日後では、生存した精原幹細胞が活発に増殖する状態になると報告されている()。

本研究では、低用量ブスルファン2回投与後の精細管において、MRIを用いて微細形態の変化や組織の緩和時間の変化を捉えることに成功した。T1 map、T2 mapともに、管腔と思われる部分や管と管の間隙部で信号が強く、壁と思われる部分で信号が弱く見えた。これは、前者で、T1値、T2値が大きいことを示している。組織学的に、精細管の管腔には精細管液が、管と管の間隙部には間質液が、存在する(本研究では、固定液に置換されている)。従って、水分子が自由に拡散するスペースが広く、高いT1値、T2値を示すことは妥当と思われる。これに対し、壁は、細胞成分に富み、T1値、T2値は相対的に低いと考えられる。このことから、本研究で測定したピーク強度は、精細管腔や管と管の間隙(間質)の広さや、管腔に含まれる液体の状態に関連することが示唆される。また、ピーク間隔は、隣接する精細管のサイズや間質の幅に関連することが示唆される。低用量ブスルファン2回投与後に、ピーク強度が低下し、ピーク間隔が縮小したことは、精細管のサイズや間質の幅の縮小で説明できるものと考えられる。

まとめると、MRIのT1 mapやT2 mapから計測可能な、ピーク間隔やピーク強度といった指標は、精細管や間質の微細形態に関連し、造精機能のイメージングマーカーとなる可能性が示唆された。これを確認するためには、ピーク強度、ピーク間隔と、精細管径、壁の厚み、間質の幅といった組織学的指標との相関を、追加検討する必要がある。

研究代表者の山口と研究分担者の古城は、本研究とは別に、ヒト精巣の高分解能MRIの技術開発に取り組んでいる。臨床用3テスラMRI装置と小口径ラジオ波コイルを使用し、精細管のサイズに匹敵する117マイクロメートルのMRI画素にて、精巣の測定を実現した()。ヒトと実験動物では、精細管のサイズや走行が異なるが、精細管壁と内腔に存在する水分子の緩和時間の差や拡散係数の差によってMRIのコントラストが変化する点は同様である。臨床用3テスラMRI装置を用いて、本研究と同様のイメージングマーカーが取得可能となれば、NOA患者の診療に役立つ可能性がある。

参考文献

- Jiang FX. Behaviour of spermatogonia following recovery from busulfan treatment in the rat. *Anatomy and embryology* 1998;198(1):53-61.
- Enatsu N, Miyake H, Chiba K, Fujisawa M. Identification of Spermatogenically Active Regions in Rat Testes by Using Narrow-band Imaging System. *Urology* 2015;86(5):929-935.
- Yamaguchi M, Kojo K, Akatsuka M, et al. High Resolution MR Imaging of the Testis

Using a Small Radiofrequency Coil. Magnetic resonance in medical sciences 2022.
E-pub ahead to print. DOI: 10.2463/mrms.tn.2021-0130

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古城 公佑 (Kojo Kosuke) (30828158)	筑波大学・医学医療系 腎泌尿器外科学・助教 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関