

がんサバイバーシップ研究助成金

研究報告書
(平成 27 年度)

平成 28 年 4 月 30 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 高山 昭三 殿

研究施設 国立がん研究センター
先端医療開発センター機能診断開発分野
住所 千葉県柏市柏の葉 6-5-1

研究者氏名 山口 雅之



(研究課題)

小児がん克服者の男性不妊治療を支援する画像診断法の開発

平成 27 年 7 月 8 日付助成金交付のあった標記研究課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究の背景と目的】

本研究の最終的な目的は、小児期や AYA (Adolescent and Young Adult) 期に抗がん剤や放射線治療を受けた後、精巣が傷害され、男性不妊となったがん克服者の治療を支援するため、新規 MRI 診断法を開発することである。MRI を用い、精細管の形態や精子産生に必要な代謝物を可視化し、精巣のどの部分に精子産生が残されているか画像診断することを目指している。このような画像診断法が実現すると、精巣内精子回収術 (testicular sperm extraction; TESE) の術前検査として利用でき、精子回収率を向上し、その結果、人工授精の成功率向上に貢献できるものと考えられる。平成 27 年度の研究では、①高精細 MRI を用い直徑約 200 ミクロンの精細管の微細構造をイメージングする、②MR spectroscopic imaging を利用し、精子産生と関連が深い代謝物信号を非侵襲的に計測し、その代謝物の精巣内における濃度分布を画像化する、といった基盤計測技術を開発することを目標とした。

MRI を用いた精細管イメージングは、実験動物において 2009 年に私達が世界で初めて成功した (4.7 tesla MRI 装置を使用)¹。ヒト精細管のイメージングは、私達が知る限りにおいて、報告例がない。本研究においては、ヒト精細管 MR イメージングに向け、測定システムの構築を実施した。また、研究用 9.4 tesla MRI 装置を用いて、実験動物の精細管イメージングを実施し、精細管の形態を観測することにより、正常精巣と傷害精巣を鑑別可能か検討した。また、造精機能と関連性の深い代謝物であるクレアチニン分子の精巣内含有量を計測し、精巣内におけるクレアチニン分子の濃度分布を可視化する分子イメージング技術を開発した。

【実験動物の精細管の MR イメージング】

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得て実施された。雄性ラットを全身麻酔下に置き、左精巣動静脈のみを結紮した。18 から 24 時間後、両側の精巣の MR イメージングを実施した。MR イメージングは、9.4 tesla MR 装置 (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany)、信号検出には小型のマルチアレイコイルを用いた。高速 spin echo 法 (repetition time [TR] /effective echo time [TE] =2500/48 msec) を用いて両側の精巣を撮影した。

結果と考察：代表的な画像を図 1 に示す。正常な精巣では、精細管の壁が低信号、内腔が強い高信号を示し、曲精細管の短軸断面や長軸断面が明瞭に描出された。一方、長時間の虚血の結果、梗塞に陥った精巣では、精細管の壁と内腔のコントラストが低下し、精細管の描出は不良となった。また、精巣内を貫通する血管は、正常では太い低信号を示すのに対し、梗塞精巣では検出されなか

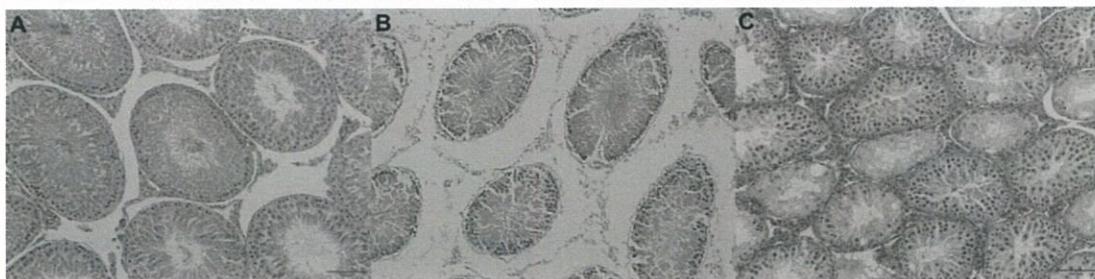
った。この実験結果から、MRI を用いて精細管や、精巢を貫通する血管の形態を観測することにより、正常精巢と傷害精巢を鑑別可能と考えられた。MRI の分解能は、 $58 \times 58 \times 500 \mu\text{m}^3$ と、2009 年の報告と比較して 5 倍以上向上した。その上、高速撮影法を採用することにより、撮影時間は 5 分程度と、従来の 10 分の 1 未満に短縮され、生体の動きに伴うアーチファクト（所謂ぶれ）が減少した。その結果、精細管の微細構造が明瞭に描出されたと考えられる。

虚血や梗塞によって、生理学的、組織形態学的に精細管は強く傷害される。その結果、精子産生能は著しく低下する。抗がん剤や放射線照射によっても精細管は傷害されるが、生理学的、組織形態学的な精細管の変化は、虚血や梗塞精巢のそれとは異なる（図 2）。² 従って、9.4 tesla MRI を用いて抗がん剤投与後や放射線照射後の傷害精細管と正常精細管を鑑別できるか否かは、動物モデルを使用し、引き続き検討を進めている。

【図 1】正常精巢（右）、梗塞に陥った精巢（左）の MRI
9.4 tesla 装置を用い撮影した。上が尾側、下が頭側。白いバーは 1 cm を示す。正常精巢では、精細管が明瞭に描出されている。精巢内や表面の血管は太く黒い構造として描出されている。これに対し、精巢梗塞では、精細管が傷害され、精細管壁と内腔のコントラストが減弱している。また、精巢内を貫通する血管像は消失している。



【図 2】正常精細管（A）、梗塞（B）、抗がん剤による傷害精細管（C）の形態



なお、ヒト精細管 MR イメージング技術の検討に関しては、特許申請を検討しているため、本報告書においては、詳細な記述を割愛させて頂く。

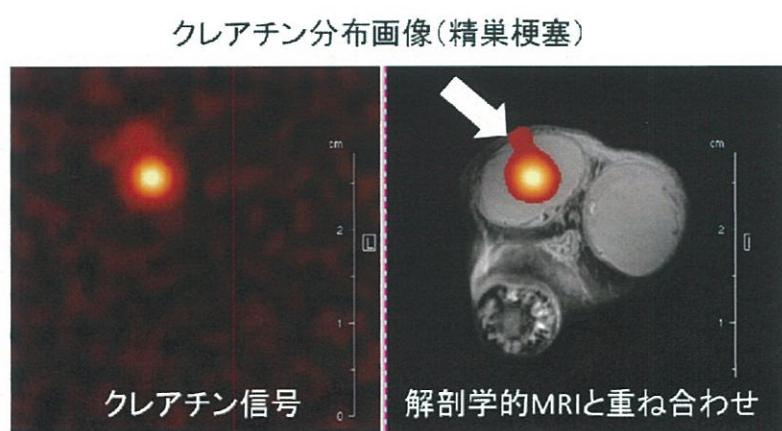
【精巢内のクレアチニン分布を可視化する分子イメージング技術の開発】

方法：雄性ラットを全身麻酔下に置き、正常および虚血精巢の MR spectroscopic imaging (MRSI) を実施した。MRSI は、9.4 tesla MRI 装置 (Bruker BioSpin)、信号検出には円筒型ボリュームコイル（内径 40 mm）を用いた。精巢の中央部において、 $5 \times 5 \text{ mm}^2$ 、厚み 2 mm の関心領域を設定し、関心領域内におけるクレアチニン信号の分布を計測した。計測条件は、TR = 1000 ms, TE = 21 ms, 加算回数 10 回とし、測定時間は 30 分とした。解析では、 $5 \times 5 \text{ mm}^2$ の関心領域を $0.625 \times 0.625 \text{ mm}^2$ の小領域に分割し、小領域毎にクレアチニン信号量を表示させ、解剖学的な MRI と重ねた。比較対照として、コリン代謝物の信号量も同様の手法で表示させた。本計測法にて得られた信号量は、クレアチニンおよびコリン濃度と高い相関を示すことを予備実験にて確認した。

結果と考察：正常精巢および虚血精巢において、クレアチニン信号量の分布が表示可能であった（図 3）。クレアチニン信号とコリン信号の比は、正常精巢において 1.03 ± 0.25 （平均 \pm 標準偏差）、梗塞精巢において 0.60 ± 0.09 であり、両者には統計学的に有為差が認められた ($P < 0.05$, t-test)。関心領域におけるクレアチニン、コリン以外の代謝物では、梗塞精巢において、乳酸の上昇が検出された他、化学シフト 3.4-3.6 ppm 付近において、正常では認められない二つの代謝物信号が検出された。後二者の代謝物は、精巢虚血や梗塞による精細管傷害の診断マーカーの発見につながる可能性もあるため、現在、代謝物の種類の帰属を進めている（図 4）。

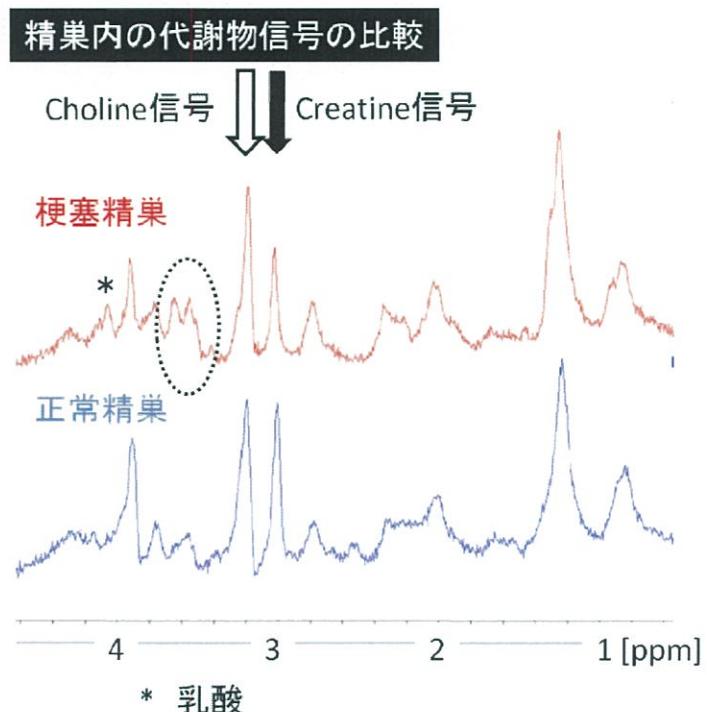
【図 3】梗塞精巢におけるクレアチニン分布画像

精巢中心部のクレアチニン分子の含有が黄色及び赤色で表示されている。矢印は、皮下脂肪信号によるアーチファクト。



【図 4】精巣内の代謝物信号の比較

梗塞精巣では、正常精巣と比較して、creatine 信号が減弱している。Choline 信号の高さは、両者で同等である。梗塞精巣には乳酸*が検出される。また、点線で示す化学シフト 3.4-3.6 ppm 付近に、二つのピークが出現在している。



クレアチニンは、精細管上皮に存在するセルトリ細胞が産生し、精細管の内腔に分泌され、精子のエネルギー代謝に関与する低分子化合物である。^{3, 4} 正常な精巣には、10-15 μmole/g 程度存在する。精子産生能が低下した精巣においては、最大 75%、クレアチニン含有量が低下するとされる。⁵ 私達の検討では、精巣内のクレアチニン濃度と組織学的な精子産生能の指標である Johnsen's score は相関した。⁶ 従って、クレアチニン濃度と精子産生能との間に関連が深いと考えられる。

今回の検討により初めて、精巣内におけるクレアチニン分子の濃度分布が、非侵襲的にイメージング可能となった。この成果を臨床へトランスレーションし、クレアチニン濃度が高く精子産生が期待できる領域を、TESE の術前検査として画像診断することにより、精子回収部位が同定し易くなるものと期待される。

【文献】

1. Yamaguchi M, Mitsumori F, Watanabe H, Takaya N, Minami M. Visualization of seminiferous tubules in rat testes in normal and diseased conditions by high-resolution MRI. Magn Reson Med 2009; 62: 637-644.
2. Yamaguchi M, Kutsuna N, Nakagami R, Nabetani A, Nozaki A, Niitsu M, Hasezawa S, Fujii H: In vivo prediction of spermatogenesis in seminiferous tubules using high-resolution magnetic resonance imaging and machine-learning techniques in

- combination. In: *Proceedings of the 18th Annual Meeting of ISMRM: 2010; Stockholm, Sweden*: 2010: 2690.
3. Lee HJ, Fillers WS, Iyengar MR. Phosphocreatine, an intracellular high-energy compound, is found in the extracellular fluid of the seminal vesicles in mice and rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 7265-7269.
 4. Lee H, Kim JH, Chae YJ, Ogawa H, Lee MH, Gerton GL. Creatine synthesis and transport systems in the male rat reproductive tract. *Biol Reprod* 1998; 58: 1437-1444.
 5. Gray J, Nicholson JK, Creasy DM, Timbrell JA. Studies on the relationship between acute testicular damage and urinary and plasma creatine concentration. *Arch Toxicol* 1990; 64: 443-450.
 6. Yamaguchi M, Mitsumori F, Watanabe H, Takaya N, Minami M: 1H MRS assessment of spermatogenic activity in experimentally injured rat testes. In: *Proceedings of the 15th Annual Meeting of ISMRM: 2007; Stockholm, Sweden*: 2007: 2738.

【謝辞】

本研究を実施するに当たり、公益財団法人 がん研究振興財団 がんサバイバーシップ研究助成金にご支援頂きましたことを感謝申し上げます。