精巣の硬さを指標とした精子形成能の新規定量的評価 —精子形成不全ハムスターを用いて—

A New Quantitative Method for Evaluating Spermatogenesis Based on Measurements of the Testis Hardness : A Study Using a Hamster Model with Experimental Cryptorchidism

小川健司 (学生会員)^{a*}, 富塚大輔^a, 吉池美紀^b, 野澤資亜利^b, 中澤龍斗^b, 佐藤陽子^c, 森川康英^d, 岩本晃明^e, 大西公平^a

^a 慶應義塾大学理工学部

^b 聖マリアンナ医科大学腎泌尿器外科

^c 東亜大学医療学部医療工学科

^d 国際医療福祉大学病院小児外科

^e 国際医療福祉大学病院リプロダクションセンター

Kenji Ogawa^a, Daisuke Tomizuka^a, Miki Yoshiike^b, Shiari Nozawa^b, Ryuto Nakazawa^b, Yoko Sato^c, Yasuhide Morikawa^d, Teruaki Iwamoto^e, Kouhei Ohnishi^a

^a Faculty of Science and Technology, Keio University

^b Development of Urology, St. Marianna University School of Medicine

^c Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Science, University of East Asia

^d Department of Pediatric Surgery, International University of Health and Welfare Hospital

^e Center for Infertility and IVF, International University of Health and Welfare Hospital

Abstract

Background and Aims : Non-obstructive azoospermia (NOA) is one of the most serious causes of male infertility. Microdissection testicular sperm extraction (MD-TESE) is a first-line therapy of NOA ; however, sperm retrieval rate from MD-TESE differs substantially between surgeons and is generally insufficient. To develop a new accessible method to identify seminiferous tubules with sperm in real time during MD-TESE, we have made a hypothesis that the hardness of seminiferous tubule wall is available as a quantitative index for the presence of sperm. In this study, as a first step, we determined the stiffness of the testis from an animal model of NOA using a measuring system that we designed.

Methods : Male Syrian hamster with bilateral experimental cryptorchidism was used as a NOA model. Stiffness of the testis was evaluated with two different indices of stiffness value : K_j (the stiffness value in a small interval) and $\bar{K}$ (the mean of K_j values) by using an indentation instrument with a micro force sensor.

Results : Hamster testis was confirmed to be valid as a dynamic model for physical measurements by checking the dependency of stiffness and viscosity on the reaction force generated in indentation procedure. Both stiffness values of the testis with cryptorchidism were significantly decreased compared with those of the control testis.

Conclusion : The results suggest that our system is useful for quantitative evaluation of testis stiffness. Testis hardness has promise for a new index for spermatogenesis. As the next step, we need this approach to permit measurement for seminiferous tubules.

Key words

Male Infertility, Non-Obstructive Azoospermia, Motion Control, Biomechanics

* 慶應義塾大学理工学部

〒 223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1

kenji@sum.sd.keio.ac.jp

受付 2017 年 5 月 13 日 ; 採択 2017 年 8 月 31 日

1. 序論

男性不妊症の認知度は産婦人科医師でさえ十分でなく、特に無精子症の場合には男性不妊の精査もされずに絶対不妊を言い渡されることもある。なかでも、精巣自体の造精機能障害による非閉塞性無精子症 (non-obstructive azoospermia: NOA) は最も治療が困難な重症疾患で、男性不妊症の約 10%、無精子症の 60% を占める¹⁾。NOA は従来、非配偶者間人工授精しか治療手段がないとされていたが、1999 年に Schlegel は顕微鏡下精巣内精子回収術 (microdissection testicular sperm extraction: MD-TESE) によって精細管の一部に精子形成があることを確認し、精子が存在する精細管の特徴として、周囲より太く拡張し、やや白濁した内溶液が見えることを明らかにした²⁾。その後、MD-TESE は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 40~50%^{3),4)}と海外の報告 60%⁵⁾に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、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装置が構築できれば、精子回収率の向上と施設間差の軽減が期待できる。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。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⁶⁾。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。これらを踏まえ、小川らの先行研究により、力センサレス臓器接触デバイスを用いて生体内臓器の硬さを定量的に測定することに成功していた⁷⁾ことをヒントに、この方法を応用し、精細管壁の硬さを測定することを着想した。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発想に至った。

実際、がん組織や肝硬変は正常の組織より硬くなることが知られており、超音波による測定などが試みられているが、精細管のような 100 μm 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。

2. 精巣の力学的モデル化

精巣は様々な構造体からなる複雑な器官である。精巣が押し込み動作により変形するとき、精巣白膜、精細管、間質などの複数の構造体によって反力が生じる。これらの構造体を精巣を構成するサブシステムとして捉えたとき、精巣に与える押し込み量が増え、反力もサブシステムに依存して大きくなる。すなわち、精巣の反力は押し込み量と押し込み速度の関数として式 (1) となる。

$$F(x, \dot{x}) = \sum_i^n f_i(x_i, \dot{x}_i) \quad (1)$$

ここで、 F は精巣で生じる全反力、 f はサブシステムから生じる反力、 n はサブシステムの合計数である。ここで、それぞれの組織が剛性と粘性の性質を含むと仮定すると、反力の合計は式 (2) として書き換えられる。

$$\begin{aligned} F(x, \dot{x}) &= \sum_i k_i x_i + \sum_i d_i \dot{x}_i \\ &= \sum_i k_i c_i (X - x_i^{\text{cog}}) + \sum_i d_i c_i \dot{X} \end{aligned} \quad (2)$$

ここで、 k_i は i 番目のサブシステムの剛性、 d_i は i 番目のサブシステムの粘性、 x_i は i 番目のサブシステムの変形量、 x_i^{cog} は精巣とプローブの接触位置 ($X=0$) から i 番目のサブシステムの重心位置までの垂直距離、 $\dot{x}_i$ は i 番目のサブシステムの押し込み速度、 X は精巣の押し込み量、 $\dot{X}$ は精巣への押し込み速度、 c_i は式 (3) で表す係数である。

$$c_i = \begin{cases} 1 & (X - x_i^{\text{cog}} \geq 0) \\ 0 & (X - x_i^{\text{cog}} < 0) \end{cases} \quad (3)$$

式 (3) より、各サブシステムの剛性と粘性は精巣

Fig.1 Relationship Between K_j and $\tilde{K}$

への押し込み量 X に依存している。すなわち、精巢の剛性と粘性は精巢への押し込み量 X の関数として式 (4) で表現される。

$$F(X, X) = K(X)X + D(X)X \quad (4)$$

ここで、 $K(X)$ は非線形な剛性、 $D(X)$ は非線形な粘性となる。ここで、精巢が低速で変形されるとき、式 (4) は式 (5) に書き換えられる。

$$F(X, X \approx 0) \approx K(X)X \quad (5)$$

ここで、非線形系である $K(X)$ を線形近似する。本研究では、剛性の変化量と精巢との接触時に発生する初期剛性値と微小区間における剛性 K_j の平均値として式 (6) で定義する。

$$\tilde{K}(X) = \frac{F^{init}}{X^{init}} + \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m K_j \quad (6)$$

ここで、 $\tilde{K}(X)$ は $K(X)$ を線形近似した値、 F^{init} は精巢との接触時に発生する反力、 X^{init} は F^{init} 測定時の押し込み量、 j は微小区間の区間数、 m は最大押し込み量 X^{max} の分割数である。また、微小区間の剛性は押し込みによる剛性の変化量を用いて式 (7) で表すことができる。

$$K_j = \frac{F(t_j) - F(t_{j-1})}{X(t_j) - X(t_{j-1})} \quad (7)$$

ここで、 t_j は j 番目の測定時間を表す。本研究では、 $\tilde{K}$ と K_j を精巢の硬さの指標として用いる。Fig.1 に最大押し込み量を均等に 5 分割したとき ($m=5$) の $\tilde{K}$ および K_j の関係図を記載する。

Fig.2a Whole System

Fig.2b Measurement Device

Fig.2 System Configuration

3. 方法

3.1 測定装置の構成と制御法

Fig.2 に実験装置を示した⁸⁾。測定系 (Fig.2a) は 4 つのシステムにより構成され、(A) は制御用パソコン、(B) は制御システム [マイクロコンピュータ (STM32F411RET6 MCU, STMicroelectronics Co., Ltd), リニアアンプモータドライバ回路, カウンタボード, 13 ビットアナログデジタル変換回路], (C) は測定デバイス, (D) は顕微鏡である。同様に、測定デバイス (Fig.2b) は 4 つのシステムにより構成され、(i) は押し動作を実現するためのリニアモータの一つであるボイスコイルモータ (voice coil motor: VCM), (ii) は精巢反力を測定するためのマイクロフォースセンサ (FTS-10000, Femto tools AG), (iii) は VCM の位置を測定するためのリニアエンコーダ (RGH24, RENISHAW plc.), (iv) は精巢の測定位置の調整を行うための XZ メカニカルステージ (XZmechanical stage, Misumi.Inc.) である。測定中に精巢が乾燥することを防ぐために、精巢は生理食塩水で湿らせた湿潤箱中に置いた状態で測定した。精巢は外乱オブザーバ (Disturbance OBserver: DOB) を用いた位置制御により測定した。DOB は摩擦力や測定対象か

Table 1 Control Parameters

Sampling Time	0.1 msec
Nominal Mass of VCM (M_n)	0.03 kg
Nominal Torque Coefficient (K_{tn})	0.56 N/A
Position Gain (K_p)	3600.0 s^{-2}
Velocity Gain (K_D)	120.0 s^{-1}
Cutoff Frequency of DOB (g_{dob})	100 rad/s
Cutoff Frequency of Pseudo Differentiation (g_{bd})	200 rad/s

Table 2 Specifications of Force Sensor

Force Resolution (10 Hz)	$0.5 \mu\text{N}$
Maximum Deformation of Measurement Tip	$1.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$
Sensor Force Range	$\pm 10000.0 \mu\text{N}$
Stiffness of Measurement Tip	$6666.7 \mu\text{N}/\mu\text{m}$
Sensor Gain	$5000.0 \mu\text{N}/\text{V}$
Resolution of AD Convertor	13 bit

Fig.3 Shape of Force Sensor's Probe

ら生じる負荷のような外乱力を補償するためのオブザーバである⁹⁾。DOBを用いた位置制御の各パラメータを **Table 1** に示した。マイクロフォースセンサの仕様を **Table 2** に記載した。マイクロフォースセンサのプロープにはシリコンが用いられている。精巢はプロープの先端 ($50 \mu\text{m}$ の正方形平面) と接触し、プロープの歪み量から力を測定する。プロープの形状に関する詳細について **Fig.3** に記載する。 **Fig.4** に測定の様子を記載する。センサのプロープを精巢表面に接触した状態を初期位置 (**Fig.4a**) とし、精巢に対し押し込みを開始し (**Fig.4b**)、あらかじめ指定した押し込み量に達した時点で押し込み動作を停止した (**Fig.4c**)。なお、本研究でおこなったすべての実験において、マイクロフォースセンサのプロープは精巢を貫通しないことを顕微鏡下により確認した。

3.2 精巢の力学モデルの妥当性に関する検証法

本研究では、式 (4) で定義したとおり、精巢は剛性と粘性を含む物質と仮定している。そこで、剛性と粘性の影響について確認するために式 (8) によって定義される機械インピーダンス $G(X, \dot{X})$ を用いて2通りの検証をおこなった。

$$\frac{F(X, \dot{X})}{\dot{X}} = G(X, \dot{X}) \quad (8)$$

検証のための実験には、オスの成熟シリアンハムスターより摘出した精巢 ($n=3$) を用いた。

1) 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 ($X_1^{cmd} = 10.0$, $X_2^{cmd} = 50.0$, $X_3^{cmd} = 100.0$, $X_4^{cmd} = 500.0$ 単位: $\mu\text{m}/\text{sec}$) 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 $500 \mu\text{m}$ で一定とし、押し込み量が $500 \mu\text{m}$ 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、機械インピーダンスを算出した。

2) 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 $10.0 \mu\text{m}/\text{sec}$ で一定とし、5通りの位置指令値 ($X_1^{cmd} = 400.0$, $X_2^{cmd} = 800.0$, $X_3^{cmd} = 1200.0$, $X_4^{cmd} = 1600.0$, $X_5^{cmd} = 2000.0$ 単位: μm) で VCM を駆動し、各位置指令値に対す

Fig.4a Initial Position **Fig.4b** Pushing **Fig.4c** Finish**Fig.4** Measurement Motion

Fig.5 Measurement Point

る反力を測定した。押し込み量と反力の結果から、機械インピーダンスを算出した。

3.3 精子形成不全ハムスターの作製

11～14 週令の成熟したオスのシリアンハムスターに実験的停留精巣手術を施し、精子形成不全を誘起した。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¹⁰⁾、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おこなった。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。

3.4 精巣の硬さ測定と精子形成能の病理学的評価

測定に用いる精巣は、炭酸ガスによる安楽死後のハムスターより摘出し、脂肪組織などを取り除いたあと、測定まで蓋付きプラスチックシャーレに入れて4℃で保存した。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.5）。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おこない、中央、右、左、下、上の順番で測定した。押し込み量は500 μm 、押し込み速度は10.0 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 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染色をおこなった。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）¹¹⁾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

Fig.6a Dependency of Pushing Velocity

Fig.6b Dependency of Deformation Amount

▲ Testis-A × Testis-C
 ■ Testis-B ◆ Average
 --- Linear Approximation of Average

Fig.6 Experimental Results for Physical Model Validation.

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。

3.5 統計学的解析

統計学的解析にはJMP ver. 12（SAS Japan）を用いた。多群間の比較には分散分析、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. 結果

4.1 精巣の力学モデルの妥当性に関する検証

1) 粘性に対する依存性

Fig.6aに押し込み速度を変えて精巣の反力を測定したときの機械インピーダンスの変化を示した。測定結果より、押し込み速度が速いほど機械インピーダンスが大きくなることがわかった。押し込み量が一定のため、機械インピーダンス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もつことが示された。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

に大きな変化がみられないことから、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。

2) 剛性に対する依存性

Fig.6b に押し込み量を変えて精巢の反力を測定したときの機械インピーダンスの変化を示した。測定結果より、押し込み量が増えるほど、機械インピーダンス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込み量に依存せずに一定となるため、本実験で扱う精巢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式 (8) により得られる微小区間ごとの剛性値 K_j 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。

4.2 精巢の硬さ測定値の測定回による変動の検討

測定回による測定値の変動の有無を検証するため

Table 3 Results of Average Stiffness for each experiment

Day	n	$\bar{K}$ ($\mu\text{N}/\mu\text{m}$)	mean $\pm$ SD
1st	2		1.674 ± 0.458
2nd	3		1.432 ± 0.335
3rd	3		1.594 ± 0.271
4th	7		1.354 ± 0.288
Total	15		1.460 ± 0.313

Table 4 Results of Average Stiffness for each measurement point

Point	n	$\bar{K}$ ($\mu\text{N}/\mu\text{m}$)	
		mean $\pm$ SD	range
Center	43	1.041 ± 0.572	0.218–2.266
Right	43	1.051 ± 0.575	0.187–2.185
Left	43	1.039 ± 0.583	0.163–2.109
Bottom	43	1.096 ± 0.642	0.200–2.398
Upper	43	1.008 ± 0.601	0.195–2.280
Total	215	1.047 ± 0.589	0.163–2.398

Table 5 Comparison the Results Between Control Group and Crypt Group

Parameters	Control (n = 15)		Crypt (n = 16)		p-value
	mean $\pm$ SD	range	mean $\pm$ SD	range	
Testis weight (mg)	1.86 ± 0.15	1.52–2.08	0.614 ± 0.118	0.42–0.89	<0.0001
Testis size : major axis (mm)	20.9 ± 0.80	19–22	15.2 ± 1.22	13–18	<0.0001
minor axis (mm)	14.7 ± 0.70	14–16	10.4 ± 1.15	8–13	<0.0001
$\bar{K}$ ($\mu\text{N}/\mu\text{m}$)	1.46 ± 0.31	1.01–2.00	0.40 ± 0.13	0.24–0.68	<0.0001
Johnsen score (1–7)	6.96 ± 0.04	6.9–7.0	4.08 ± 0.71	2.93–5.43	<0.0001

に、Control 群について 4 回の異なる測定日の平均 $\bar{K}$ 値を比較した (Table 3)。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。

4.3 精巢の測定部位による硬さ測定値の検討

押し込み試験をおこなった精巢 5 か所の部位における $\bar{K}$ 値を Table 4 に示した。対応のある t 検定の結果、5 か所の $\bar{K}$ 値どの組み合わせにも平均値に有意な差はみられなかった。この結果から、以降は 5 か所の平均 $\bar{K}$ 値を剛性値として使用することとした。

Fig.7a Control

Fig.7b Crypt

Fig.7 Histopathological Images of the Hamster Testis

4.4 精子形成不全ハムスターにおける精巣の硬さ測定と各種パラメータの比較

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 (Fig.7). Control 群と Crypt 群における各種パラメータと $\bar{K}$ 値, JS を Table 5 に示した. 精巣重量, 精巣長径, 精巣短径, $\bar{K}$ 値, JS の全てにおいて, Crypt 群で有意に低下していた. 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.

4.5 精子形成不全ハムスターにおける精巣の各微小区間の剛性値 K_j

全押し込み量を 10 等分 ($m=10$) して, 各微小区間の剛性値 (K_j 値) について, Control 群と Crypt 群の比較をおこなった (Fig.8). 点線は各微小区間の剛性値の平均値を直線で結んだ回帰直線である. 測定結果より, 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 ($y=0.053j+1.16$) 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 ($y=0.0072j+0.4983$) ことがわかる. この結果は, 回帰直線の傾きからも理解できた.

5. 考察

本研究では, 精子の存在する精細管部位を同定するためのコンピュータ支援による測定装置の開発を目指し, その第一段階として精巣の硬さ測定装置を開発し, 測定装置の有用性を検証することを目的として, 精子形成不全ハムスターの精巣の硬さを測定した. 実際, 生体組織の硬さの変化は多くの医療分野で注目されている. 例えば, がん組織や肝硬変は正

常の組織より硬くなる. その測定には多くの方法があるが, なかでも超音波による測定は医療分野で最も実績のある手法である^{12),13)}. しかし超音波法には, 超音波の放射範囲により硬さの値が変化するという問題点があり, ごく小さな特定の箇所の測定には適していない. 本法においては VCM に位置制御を実装することで精巣への押し込み動作をおこない, マイクロフォースセンサを用いて, 押し込み時に精巣から生じる反力を測定する装置を新たに開発した. 位置制御に DOB を組み合わせることで, 未知の外乱を補償することができ, 精巣に対して正確に押し込みをおこなうことができる. さらに, 硬さの定量的な判定のために, 「剛性値」を用いて評価をおこなった. 2通りの剛性値を用いることで, 精巣の静的な性質 (剛性の平均値: $\bar{K}$) と動的な性質 (剛性の微小変化: K_j) をそれぞれ確認することが可能であった. その方法として精巣の力学的なモデル化をおこない, モデルの妥当性について実験により検証したのち, 正常および精子形成不全をきたした精巣を比較して, 硬さによる精子形成能の定量的評価が可能であるかを統計学的に検討した. その結果, 精子形成能の低下した精巣では2つの剛性値である $\bar{K}$ および K_j 値がどちらも有意に低下していることが示された. 精巣における精子形成能を評価する方法としては, 病理組織標本作製して判定する以外の方法は殆ど知られておらず, 本研究のように精巣そのままを測定対象として質を定量的に評価する試みは, 我々の知る限り初めての報告である.

本研究では押し込み速度および押し込み量を $10.0 \mu\text{m}/\text{sec}$ と $500.0 \mu\text{m}$ に設定した. Fig.4a の結果から精巣の粘性が押し込み速度の増加に伴い大きくなることが理解できるため, 押し込み速度による粘性値の増加を抑える必要がある. 本研究では, 低速域での粘性の増加の差が少ないことから, 測定に時間のかからない範囲で速度が大きくなりすぎない値として $10 \mu\text{m}/\text{sec}$ に設定した. 同じく, Fig.4b の結果より, 押し込み量の増加に伴い, 剛性の値が大きくなることが実験結果から理解できたため, 精巣を確実に押し込むことのできる範囲で押し込み量が大きくなりすぎない $500 \mu\text{m}$ に最大押し込み量 X^{max} を設定した. また, 白膜の厚さは $25\sim30 \mu\text{m}$ であり, 押し込み量に比べ精巣白膜の厚さが十分に小さく, 精細管などのサブシステムから生じる反力も測定した反力に反映していると考えられる.

Fig.8 Measurement Results of K_j Value

本研究で用いたマイクロフォースセンサはプローブの接触面が50 μm 四方の正方形平面となっている。この形状のプローブを採用することで、精巣白膜をプローブが貫通することを防ぐことができる。さらに、プローブの接触面積は精巣全体の断面積よりも十分小さいので精巣とプローブで接触時に発生する摩擦力を限りなく小さくできると考えられ、マイクロフォースセンサの形状が本研究を遂行する上で適切であるとして採用した。

微小剛性値 K_f について考察すると、Fig. 6 より Control 群では押し込み量の増加に伴い K_f 値が増加しているが、Crypt 群では押し込み量が増加しても K_f 値が増加せず、ほぼ一定の値をとることが判明した。この違いを考察すると、Crypt 群では Control 群に比べて精巣を構成するサブシステムの密度が低下したことが原因と推察される。その要因として Fig. 7b にみられるような精子形成能不全に基づくサブシステムの病的変化、例えば精細管の縮小による間質占有率の増加、精細管基底膜の厚さおよび性質変化、精細胞層の菲薄化による精細管内腔の増大などが考えられる。本研究ではそれら原因の特定にまでは至らなかったが、さらなる病理組織学的な検討により明らかにできる可能性がある。

今後の課題として、MD-TESE における実用化のためには精細管単位で硬さを測定する必要があるが、より分解能の高いマイクロフォースセンサを実装することで本装置が精細管レベルでの硬さ測定にも応用できることをすでに予備的検討により確認している。現在 MD-TESE においては精巣から採取した数本の精細管の束を胚培養士がすりつぶし、顕微鏡下に内容物の精子の有無を確認する方法がとられているが、本研究が発展して精細管の硬さを定量的に評価することが可能となれば、精巣から精細管を採取することなく精子が存在する精細管の同定ができるため、不要な組織を採取することを回避できる。このように、MD-TESE 術中にリアルタイムに精子の存在箇所を特定することができれば、術者間差や施設間差の減少のみならず、精子回収率を含めた MD-TESE 技術の向上に大いに貢献できると考えられる。さらに、本法における定量的な測定に加えて、飯田、大西らの発明による haptics 技術¹⁴⁾を適用し、マスタ、スレーブロボット間で位置と力の情報を同期することで、医師はロボットを経由して精細管の硬さを感じながら TESE をおこなうことが可能になり、極めて画期的

な治療法が実現する。

謝辞

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金（課題番号 15K15588 挑戦的萌芽研究「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」）によっておこなわれたことを記すと共に、関係者各位に謝意を表す。さらに、本研究掲載の経費は、文部科学省補助事業『慶應義塾大学リーディング大学院（オールラウンド型）超成熟社会発展のサイエンス』によってサポートされている。

文献

- 1) Su LM, Palermo GD, Goldstein M, et al. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia : testicular histology can predict success of sperm retrieval. J Urol 1999 ; 161 : 112-116.
- 2) Schlegel PN. Testicular sperm extraction : microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. Hum Reprod 1999 ; 14 : 131-135.
- 3) Okada H, Dobashi M, Yamazaki T, et al. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia. J Urol 2002 ; 168 : 1063-1067.
- 4) Tsujimura A, Matsumiya K, Miyagawa Y, et al. Prediction of successful outcome of microdissection testicular sperm extraction in men with idiopathic nonobstructive azoospermia. J Urol 2004 ; 172 : 1944-1947.
- 5) Schlegel PN. Nonobstructive azoospermia : a revolutionary surgical approach and results. Semin Reprod Med 2009 ; 27 : 165-170.
- 6) Sato Y, Nozawa S, Iwamoto T. Study of spermatogenesis and thickening of lamina propria in the human seminiferous tubules. Fertil Steril 2008 ; 90 : 1310-1312.
- 7) 小川健司, 魚住誠二, 兪 浩洋 ほか. 力センサレス臓器触診デバイスによる生体の硬さ測定法. JJSCAS 2015 ; 17 : 91-100.
- 8) 富塚大輔, 小川健司, 吉池美紀 ほか. 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～. JJSCAS 2016 ; 18 : 271-272.
- 9) Ohnishi K. Robust Motion Control by Disturbance Observer. Journal of Robotics and Mechatronics 1996 ; 8 : 218-225.
- 10) Shirai M, Matsushita S, Kagayama M, et al. Histological changes of the scrotal testis in unilateral cryptorchidism. Tohoku J Exp Med 1966 ; 90 : 363-373.
- 11) Johnsen SG. Testicular biopsy score count—a method for regis-

- tration of spermatogenesis in human testes : normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970 ; 1 : 2-25.
- 12) Nakamura M, Ikezoe T, Kobayashi T, et al. Acute effects of static stretching on muscle hardness of the medial gastrocnemius muscle belly in humans : an ultrasonic shear-wave elastography study. *Ultrasound Med Biol* 2014 ; 40 : 1991-1997.
- 13) Matsuzuka T, Suzuki M, Saijo S, et al. Stiffness of salivary gland and tumor measured by new ultrasonic techniques : Virtual touch quantification and IQ. *Auris Nasus Larynx* 2015 ; 42 : 128-133.
- 14) Iida W, Ohnishi K. Reproducibility and operationality in bilateral teleoperation. The 8th IEEE International Workshop on Advanced Motion Control. 2004. AMC '04. 2004 ; 217-222.