

令和元年6月7日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04585

研究課題名(和文) 流体操作技術による新たな精子選別技術の開発と実証試験

研究課題名(英文) Development of sperm separation to improve the reproductive performance of cattle

研究代表者

山下 健一 (YAMASHITA, Kenichi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・研究グループ長

研究者番号：90358250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：牛の繁殖性改善のため、手薄とされる精子側の研究に取り組んだ。研究開発の方向性は、ヒトの不妊治療にかかる報告を参考として、健全性の高い精子は、運動性も高いという点に着目し、運動している精子を周囲の溶液に流れを生じさせて集合させるという技術を開発することで、初めて人工授精にそのまま使える数の精子の捕集を成功させ、生体試験で良好な受胎成績を得た。併せて、受胎に有利な精子の性質を、その泳ぎの形に紐づけられることを明らかにした。さらに、捕集精子の分析や体外受精により、良好な受胎性の科学的なエビデンスも収集した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家畜の繁殖性改善は、畜産業の生産性向上による食糧供給の安定化とともに、地方の産業振興やバイオエコノミーとしての位置づけなど、幅広い意義を持つ。この研究では、牛の繁殖性の改善につながる精子の性状を、泳ぎの形で「見える化」するとともに、泳ぎの形ごとに分ける技術も開発した。ここで得られた知見は、繁殖用精液の改善の方向性を示すとともに、その精子の質的健全性から、体外受精などの成績改善につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Our research focused on sperm manipulation to improve the reproductive performance of cattle. Our experiments were conducted based on preceding studies on infertility treatment of humans by relying on the advantages of motile spermatozoa, that is, by being able to swim around and against the flow of solution, and considering such quality as an attribute of healthy and physiologically functional spermatozoa. We succeeded in collecting the number of spermatozoa that can be used for artificial insemination for the first time, and obtained good conception results in the field trial. In addition, the field trial clarifies the property of sperm advantageous to conception to be linked to the trajectory. Moreover, we studied the scientific evidences of good fertility by analyzing collected sperm and in vitro fertilization.

研究分野：化学工学

キーワード：家畜繁殖 不妊治療 人工授精 体外受精 受精卵移植 流体工学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

TPP や就労者の減少・高齢化のような農業全般の問題に加え、家畜を育てる畜産業は、さらに複雑な問題に直面している。例えば「牛」の場合、平成になった頃から年 0.5% ずつ受胎率が下がり続け、さらに口蹄疫等伝染病の流行や東日本大震災が就労者減少の悪循環を加速させた結果、例えば中級程度のいわゆる「普段の牛肉」となる子牛の取引価格が 2 倍近くにもなるなど、特に最近 5 年の変化は急激である。

牛は、効率的な繁殖管理を行ったとしても 1 年一産で 1 頭しか産まないこと、生まれてくる子牛の用途により必要とする性別が異なるといった理由により、肉用牛でも乳用牛でも、特に「計画的に」、「望んだ性別の」子牛を誕生させることへの要望が非常に強い。国内での子牛の生産は、ほぼ 100% が人工的な交配（人工授精と受精卵移植）であり、その成功率を上げるために、種雄牛から採取した精液から、活性の高く受精能が高い精子を簡便に捕集する技術が求められている。牛では、凍結保存された精液を、使用時に融解したものが用いられているが、凍結・融解などにより、使用時に運動している精子は 20-50% 程度となってしまふ。さらに、死んでしまった精子が放出する成分が悪影響を及ぼし精液中の精子全体のパフォーマンスは大幅に低くなってしまふ。

畜産で求められている技術は多様であるが、近年の問題の変化を踏まえると、特に繁殖技術への対応が急務とされている。高い受胎率が期待でき、かつ性選別された精液を生産することができれば、年間を通した緻密な繁殖計画から収益向上へとつなげられることから、農林水産省も、家畜全般において「必要性の高い課題」に指定している。

このような背景から、運動性精子の精製技術、性選別の両方の研究が様々になされている。しかしながら、前者の精製技術については、人工授精に使用するには極端に濃度が低いという従来法共通の問題があり、一方後者の性選別について唯一実用化に至ったものは、フローサイトメトリー法による、機械的な選別方法によるものだけである。この方法では、精子の細胞膜の損傷、活力の低下および精子濃度の低下などが避けられず、その結果、性選別の正確性は 90% 以上である半面、精子濃度の低下、受胎率の低さが問題となっている。加えて、高度な技術を要する選別の費用や特許使用料により、一般の精液の数倍近い価格であること、ライセンス条件のため所望する種雄牛の精液を任意に処理することができないといった問題がある。このような背景から、技術的性能だけでなく、国産技術であることについての要望が非常に強い。

2. 研究の目的

高度に計画的な家畜繁殖の実現を目指し、精子の運動に流体力学的手法を融合した精液の簡便な精製技術を開発している。これまでに、非侵襲的に生死だけでなく運動速度や泳ぎ方ごとに精子を選別する特徴的性能を有するデバイスの開発に成功している。それをを用いた選別後の精液は、人工授精にもそのまま使える濃度で、かつ高品質な精子を含むため、受胎率向上の可能性へ期待が寄せられている。さらに、この技術を精子の生化学的な性質と併用することで、確度 7 割の性選別も達成している。そこで、本研究では、この精子の運動性および性選別技術を高度化するとともに、分野横断的な体制により実証試験を含めた包括的課題を達成し、本技術の実用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

これまでに、流体力学的手法を導入し、精液から活性の高い精子だけを簡便に捕集する技術の検討を行ってきた（図 1）。マイクロ流路中の層流という向きの揃った流れの中では、精子はその流れを遡るように泳ぐ「rheotaxis」として知られる現象を足掛かりに、数値流体力学（CFD）計算による流路設計などを通じ（図 2）、効率的かつ選択的な運動精子の誘導を実現した。その効率性は、体外受精にしか使えなかった従来法の十万～百万倍であり、そのまま人工授精に用いることができる濃度と量と処理時間を初めて実現した。さらに、特定の運動速度の精子だけや、寿命前期である直進精子だけを捕集することもできることを明らかにした。

本研究では、運動性精子の捕集技術については、さらなる高濃度化、高速化、そして速度別・泳ぎ方別の選別精度を高めるために、数値流体力学（CFD）計算といった流体力学的手法を用いた。併せて、捕集精子を用いて体外受精や人工授精を行うことによって、本技術の有用性、

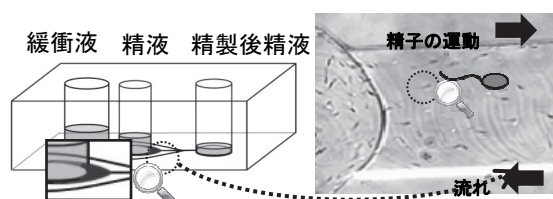


図 1 我々の精液改質技術である「精子の運動能力別捕集技術」の概略図。流路全体が、マイクロ流体技術の知見により高度に設計されている。右端の液溜めから、高活力の精子だけとなった精液を得る。

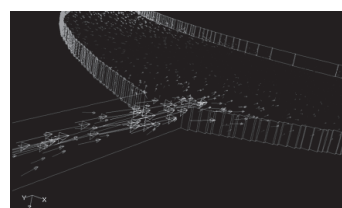


図 2 数値流体力学（CFD）計算の一例。精子がわざわざ狭い流路に意思を持って泳いでいくような状態を作り出すことができる。

精子の用途別の捕集条件の最適化を試みた。

4. 研究成果

流体操作による運動性精子捕集技術の高度化

数値流体力学 (CFD) 計算などを導入することにより、三日月型の流路構造を考案し、ひとつの構造体で、「精子を吸い寄せて、出口流路へ送り込む」という手法 (図 3) に行き着き、人工授精にそのまま使用できる濃度で効率的に選別精子を捕集できる技術を実現した。加えて、運動精子が最後に泳ぐ細長い流路にも、仕切り壁を立てるだけで数倍の捕集効率となる (図 4) ことなど、単純な改良で大きな効果をコンピューター上で設計し、試作を行い運動性精子捕集の実験を行った。本研究では、このような CFD 計算による細部の設計と、それを用いての実験による性能確認を繰り返し行うことで、現場での使いやすさを設計に反映することに成功した。

また、後述の人工授精の成績から得られた「高い受精性が期待される精子」を大量に捕集する技術の検討を行うことで、凍結ストローという規格流通形態で大量生産できるような改良捕集技術の検討を行った。スケールアップの基本的な考え方である相似則を参考に、マイクロ流路型から、回転流れ型への捕集方法の再構築を検討した。この方法は、様々な性質のものを取り分けるには向いていないが、あらかじめ狙いを定めた特定の運動性質の精子だけを大量に捕集することに焦点を絞ったものである。この方法にて大量に捕集し、実際に凍結ストローの形態で試作を行い、下記のような評価を行った。

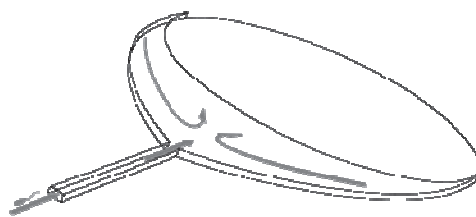


図 3 三日月層状流路内での溶液の流れの概略。

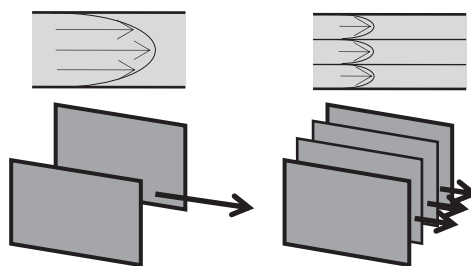


図 4 精子が泳ぐ流路に仕切りを立てるだけで、捕集効率は数倍になる。放射線状の流速分布の平準化によるものである。

選別精子の評価

一般に、運動性の良好な精子は、質的健康性も高いという相関は知られている。本研究で開発した運動性選別器具で選別された精子について質的な面からの評価を行った。捕集した運動精子の DNA 断片化率を調べたところ、処理前がおよそ 7%であったのに対し、処理後はおよそ 0.4%と、大幅な改善が確認された。DNA 断片化率が低いということは、言い換えれば、精子が運んでいる DNA の正常性が高いことを示している。市販されている繁殖用精液の DNA 断片化率が 5%前後であることを踏まえると、十分に良好な値と考えられる。

一方、凍結ストロー化し、融解した精液についても評価を行ったところ、DNA 断片化率は 2.0%であった。凍結前に比べ高くはなっているのは、凍結-融解という物理刺激によるものと思われるが、凍結させることで流通を可能にするメリットを考えると、十分に良好な成績であると考えている。

体外受精による評価

運動性選別された精子を用いて体外受精による試験を行い、下記のような点で特徴的な傾向が見られた。

媒精を行い、受精の状況、胚の育成状況を観察した。全体的な傾向として、低い精子濃度でも分割率や発生率は十分に高く、例えばおよそ 10 分の 1 の精子濃度でも対照区と同程度の成績であった試験区も見られた。また、「胚盤期発生数/分割数」率が特に高い傾向が見られた。つまり、ひとたび受精すれば高率に移植可能なステージまで発生するというを示しており、分割途中で多くの胚が発生停止する一般的な体外受精との違いがみられた。

また、多精子受精の割合が低いことも確認された。対照区が多精子受精の割合はロットに依存するが、運動性選別精子を用いた体外受精の場合、およそ 4 分の 1 の多精子受精の割合であった。これらの結果は、本技術により低濃度かつ高品質な精子での体外受精の実施が可能となったことで実現された成果であり、体外受精技術の改良に寄与する成果と考えられる。特に、体外受精における多精子受精が高率で起こるブタにおいて、本技術を転用することでさらなる成果が期待できる。

さらに、高温での耐性についても特徴的な結果が得られた。一般的な体外受精は 38.5°C で媒精するが、40°C といった高温ストレス下で媒精すると、大幅に分割率や発生率が低下することが知られている。一方、この運動性選別精子を用いた体外受精では、そのような高温ストレス下であっても非選別精子に比べて、有意に高い発生率を示した。したがって、運動性選別精子は高温ストレス耐性に関して優れていることが示唆された。これらの特性は、夏季の人工授精における受精率の向上に寄与するものと期待される。

人工授精による評価

雌牛の発情を発見した後、融解した精液を、運動性精子選別器具を用いて処理し、人工授精を行った。また、人工授精に用いた処理後精液の運動性の検査も同時に行った。通常の人工授精に用いられる家畜繁殖用精液の凍結ストロー1本には2000万-3000万の精子が封入されているが、本試験では捕集する運動性精子をおよそ100万に統一し人工授精を行った。この精子数で、通算の受胎率が対照区（試験実施農場の過去数年間の受胎率）と同等であった。なお、妊娠の経過や産まれた子牛はすべて正常であった。

データ解析の結果、受胎/不受胎の帰結と、人工授精に用いた精子の運動性と、人工授精のタイミングの間に、相関がみられることを発見した。具体的には、直線的な泳ぎの精子より、蛇行した泳ぎの精子の方が、受胎率が高く、また、発情発見から、人工授精のタイミングが遅いほど、この傾向は顕著であった。

射出精子は最初から受精能力を有しているのではなく、雌性生殖路内で様々な生化学的な反応や運動性の増進を経て、受精可能な状態へと変化していくが、この過程で泳ぎの形も変化する。市販の精子運動解析装置では、直線速度や曲線速度など精子の移動速度、頭部振動数などを計測できるが、「泳ぎの形」を表現する指標がないことから、独自に「泳ぎの形」を表現する指標として、SMI指数を定義して評価を行った。SMI指数は、直線速度と頭部振動数の積を、曲線速度で割った値とした。SMI指数が大きいほど直線的な泳ぎ、小さいほど蛇行した泳ぎであることを示す。

この結果から、一般に人工授精のタイミングとして用いられている、発情発見から8時間から24時間の間に行われる人工授精では、蛇行して泳ぐ精子の方が、受胎性は高いことが示された。また、その時間より早い人工授精でも、直線性泳ぎの精子と同等の受胎性であり、少なくとも劣ることはなかった。この結果は、家畜繁殖用精液として供給すべき精子の性質として【泳ぎの形】という新たな指標を加えるとともに、どういった精子が受精しやすいのか？といったシンプルであるが、解明が困難である問いに対する新たな糸口を提供しており、本研究の大きな成果の一つであると考えられる。一方、不受胎の結果が、時間に対してSMIがほぼ一定であったことは、雌側の要因の存在を示唆しているものと考察している。

まとめ

本研究では、非常に多くの数の運動性精子を簡便かつ短時間で捕集することを目指した運動性精子選別技術の開発を行った。その結果、世界で初めて、処理精液を用いた人工授精での受胎例を報告するに至った。その人工授精の成績と、選別精子の運動性の評価を紐づけることで、人工授精のタイミングと精子の泳ぎの形の関係が受胎性に関連していることを明らかにし、そこから得た知見で、「牛の人工授精に適した精子」を割り出し、そのような精子に絞って平易に大量捕集する手法を考案するに至った。また、受胎性の高さを、精子の生化学的な評価や体外受精での評価を通じて明らかにし、科学的な証拠も併せて得ることができた。

研究成果の社会実装の取り組みと、そのエビデンスとなる科学的検証をバランスよく実施することができたものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

M. P. B. Nagata, K. Endo, K. Ogata, K. Yamanaka, J. Egashira, N. Katafuchi, T. Yamanouchi, H. Matsuda, Y. Goto, M. Sakatani, T. Hojo, H. Nishizono, K. Yotsushima, N. Takenouchi, Y. Hashiyada, K. Yamashita, Live births from artificial insemination of microfluidic-sorted bovine spermatozoa characterized by trajectories correlated with fertility, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 115, E3087-E3096, 2018.

〔学会発表〕（計3件）

M. Sakatani, T. Hojo, N. Takenouchi, M. P. B. Nagata, K. Yamashita, Effects of new sperm sorting method on bovine embryonic development in vitro, WCRB(World congress of reproductive biology), 2017

山下健一、受胎性向上を目指した精子分離技術への流体操作の応用、第52回日本実験動物技術者協会総会、2018年

山下健一、受胎率向上を目指した家畜繁殖用精液の改良技術、九州・沖縄 産業技術オープンイノベーションデー、2018年

山下健一、家畜繁殖用精液の改良に向けた精子の性質分析と人工授精成績、産総研北海道センターワークショップ in 帯広、2019年

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：運動性精子を分離する方法および装置
発明者：山下健一、永田 MariaPortia
権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特願 2017-225102
出願年：2017 年
国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

プレス発表「受精に有利な精子を泳ぎ方で選んで捕集する技術」

https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2018/pr20180320/pr20180320.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山中 賢一

ローマ字氏名：YAMANAKA Kenichi

所属研究機関名：国立大学法人佐賀大学

部局名：農学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40572920

研究分担者氏名：阪谷 美樹

ローマ字氏名：SAKATANI Miki

所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：畜産研究部門

職名：上級研究員

研究者番号（8桁）：00355687

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。