

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12069

研究課題名（和文）精子運動性の制御に基づく運動精子選別システムの開発

研究課題名（英文）Development of motile sperm sorting system by control of sperm motility

研究代表者

松浦 宏治（MATSUURA, Koji）

岡山理科大学・工学部・准教授

研究者番号：70443223

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）：サイズソートチップおよびオブラートフィルムを含むマイクロデバイスの試作と評価、温度勾配の作成の検討を行ったが、今回は芳しい成果は得られなかった。精子運動制御機構の検討について精子内蛋白質発現評価とグルコース添加時の運動速度変化を検討したところ、解糖系酵素の存在とその酵素活性が精子運動性の制御に関係していた。酸化還元指示薬を用いた精子運動活性の試験紙デバイスを用いた評価から、指示薬の種類と精子内の酵素評価との関係を精査すべきという方針が得られた。今後は、精子内のエネルギーを産生する酵素の活性と運動性との関連を検証し、哺乳類精子が短期間または長期間運動できるような環境を見出す方針とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動精子回収数を増加するデバイスの開発を進めているが、今回用いたマイクロデバイスではその回収数を著しく増加できるような効果が得られず、別の原理を検討すべきと判断した。精子運動活性の試験紙デバイスを用いた評価については、試薬と精子の反応とメカニズムについて検証する方向性が定まった。精子のエネルギー輸送に着目して、精子運動に関する酵素活性の評価方法が発見されれば、自然な受精や人工授精の成否が以前よりも高い確率で予測できる。

研究成果の概要（英文）：We used a particle size sorting microfluidic chip, and could not motile sperm sorting using the microfluidic chip due to low hydrodynamic diameter of motile sperm. We also tried to develop a microfluidic device containing a dissolving film to recover motile sperm by taxis and temperature control system for utilizing the motaxis of sperm. However, these prototype devices did not work well. To evaluate motility control mechanism in mammalian sperm, we found expression of enzymes related to glycolysis in human sperm. Some results using paper-based microfluidic device with redox indicator suggests the relationship between the redox reactivities of the indicators and of related redox enzymes in the sperms. In future, we will evaluate relationship between motility and enzyme reactivity for energy production in sperm cells, and develop a condition that mammalian sperms can maintain their motility for several hours.

研究分野：生体医工学

キーワード：精子運動性 マイクロデバイス 酸化還元指示薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療においては受精率および受胎率の上昇が必須である。その手段としては母体、卵子側からのアプローチが数多くなされている。精子側のアプローチに関しては、受精率上昇のために、運動性が高く、形状が楕円形であり、DNA の損傷が起こっていない精子を受精・授精させるべきである。精液所見の基準は運動精子数が 1500 万個/mL 以上、運動精子割合は 50%以上という指針が WHO より提唱されている。この基準を満たさない場合は男性不妊となるリスクがある。運動精子を選別するためのマイクロデバイスはいずれも現時点で人工授精に適用できる運動精子の回収量には至っていない。そのため、遠心処理が不要で短時間で運動精子を数多く回収でき、ヒト人工授精に適用可能なマイクロ流体デバイスが精子選別時間の短縮には好ましい。

当デバイスの設計指針を得るために、精子の運動特性に関する細胞内反応機構と運動挙動の両面からの理解を深める必要があると考えている。哺乳類の精子において、ミトコンドリアは頸部に存在し、鞭毛に存在するモーター蛋白質ダイニンによるアデノシン三リン酸(ATP)の脱リン酸化と共役したすべり運動に基づいて精子運動が起こる。受精のためには鞭毛運動が著しく活性化されるハイパーアクティベーションが必要であり、精子運動性の変化とその運動性に関わる分子内反応機構の解明が重要である。最近、精子運動に用いられる ATP の精子内活用機構について研究が進んでおり、鞭毛内の細胞質に存在する複数の酵素がミトコンドリアまたは解糖系で産生された ATP 由来の自由エネルギーを効率的にダイニンに伝える機構が提唱されており、精子運動に関わる酵素の活性化が運動性上昇につながる。そこで、マイクロ流路構造および温度勾配に伴う精子運動性に関する分子メカニズムを検証し、これらの知見を上記マイクロ流体デバイス設計開発に反映する。

新規マイクロデバイスを用いて運動精子分離後に運動精子割合が従来法よりも増加していれば、人工授精における受胎率が上昇する可能性が高い。さらに、生殖補助医療の不妊判断については、これまでは精液内の精子運動に着目して議論する方法が殆どであった。精子の走化性およびエネルギー輸送に着目して、様々なストレスを認識する機構および精子運動に関する酵素活性の定量的評価方法の開発を行った。

### 2. 研究の目的

上記の背景にもとづいて、運動精子分離効率の上昇を果たすために、以下の1)~3)の項目について探索的に検討した。それらの実験手法は3.に記載する。

- 1) 多くの精子を回収する人工授精用デバイスの設計・開発
- 2) 温度走化性とマイクロ環境を組み合わせた際の運動精子の挙動
- 3) 解糖系酵素とミトコンドリア内酵素活性上昇に伴う運動精子回収数増加に関する検討

### 3. 研究の方法

- 1) 多くの精子を回収する人工授精用デバイスの設計・開発

#### 1 - 1 > サイズソートチップの適用

本研究グループではチップデバイス内に直径数十 $\mu\text{m}$ 以下のピラーを周期的に多数配置したサイズソートチップを開発・活用している。このチップデバイスではピラー間隔や角度の違いで粒子のサイズ分離を行う(図1)。この微細構造はポリプロピレン(PP)の射出成形で作製でき、低コストの量産化が可能であるとともに、生体適合性の問題もクリアしている。今回、直径50 $\mu\text{m}$ 程度のヒト運動精子と不運動精子の分離が本チップを用いて可能か否か検討した。

#### 図1: サイズソートチップの分離原理

A: 分離原理の概念図とイムノビーズ分離結果 B: 血液からCTCを分離する際の流路全体図と標的細胞移動の模式図 C: 直径2.5 $\mu\text{m}$ の蛍光ビーズを流した場合の1秒間における粒子の軌跡 D: 加圧駆動型の流体操作システム E: チップの外観

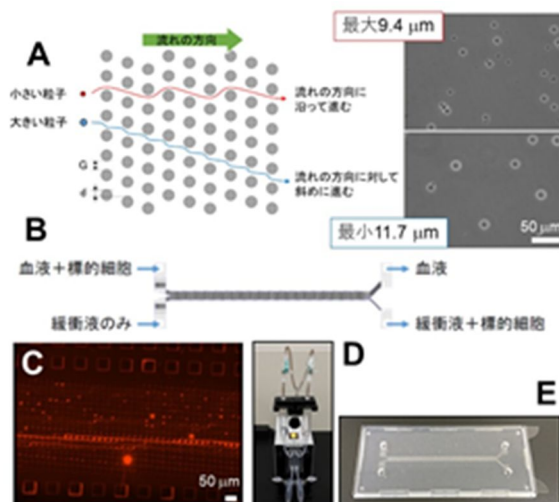


図1: サイズソートチップの分離原理

#### 1 - 2 > オブラートフィルムを含むマイクロデバイスの試作と検討

精液を導入口から入れて、フィルムの下側に配置し、培養液の液滴を置いた上側に運動精子が移動できるようにする。その際、試作が容易かつ精子を効率的に集めるために、厚さ100 $\mu\text{m}$ 程度のポリ塩化ビニリデン膜に50-300 $\mu\text{m}$ 程度の複数の孔を開けて、上方に運動し易くした(図2)。この流路の上下側に培養液または精液希釈液を入れると、オブラートが溶解して上側と下側のチャンバーの溶液が導通する。

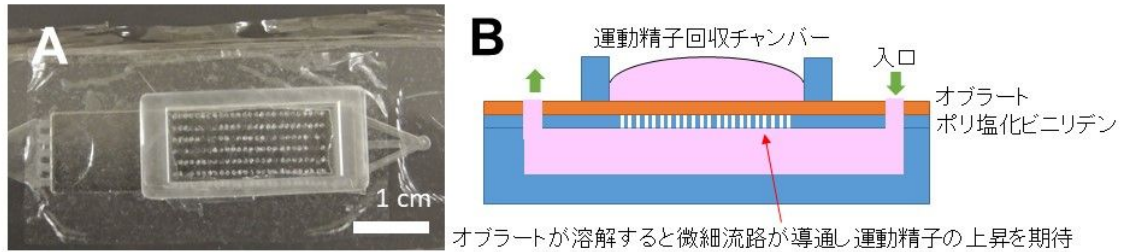


図2：オブラートフィルムを含むマイクロデバイスの試作品 A: 試作品の写真 B: 断面図と想定した機構

## 2) 温度走化性とマイクロ環境を組み合わせた際の運動精子の挙動

2 - 1 > 0.5 mm 程度の金属線を流路内に配置し、通電加熱して温度勾配の作成を試みた。サーモグラフィーを用いて液体表面の温度評価を行った。

## 3) 解糖系酵素とミトコンドリア内酵素活性上昇に伴う運動精子回収数増加に関する検討

### 3 - 1 > ヒト精子の酵素発現評価

ヒト精液の培養液希釈・遠心処理後のヒト精子を回収し、ウエスタンブロッティングを行い、解糖系酵素の存在をチェックした。

### 3 - 2 > グルコースの添加による運動速度上昇

グルコースを添加した際とそうでない場合のヒト精子の運動性を顕微鏡観察時の精子追尾軌跡から評価した。

### 3 - 3 > 試験紙デバイス

酸化還元指示薬の反応に MTT 以外にもレサズリンを検討した。ブタ精子を用いた実験結果について説明する。レサズリン希釈液をブタ精液に混合し 60 分間室温で静置し、一部を試験紙デバイスに滴下し画像撮影を行い、その画像色調(赤色と青色の成分比)と運動精子割合を比較した。

## 4. 研究成果

1 - 1 > サイズソートチップを用いて、球状のイムノビーズを分離した場合には、直径 10 mm 以上の粒子が左側のチャンバーに移動した。一次元様のヒト精子の場合は運動精子、不運動精子双方とも分離できなかった。精子は一次元物質であるために慣性半径が小さく、本サイズソートチップの原理に基づいての分離が困難であった。ビーズ等を用いて精子を吸着させればビーズに吸着した精子を回収できる可能性がある。

1 - 2 > 底面に精液チャンバー、多い孔を介した上側に培養液チャンバーがある図 1 のようなマイクロ流路を作製した。このデバイスでは、上側に培養液を添加した際にはオブラートが溶解し、中間フィルム層の微細孔が培養液で上下チャンバー間を導通し、運動精子が泳ぎあがることを期待した。上記のマイクロ流路を作製し・運動精子の選別を試みたが、運動精子の選択的回収が困難であった。

2 - 1 > マイクロデバイス内の培養液の温度上昇方法を検討したが、0.5 mm 程度の熱源を用いても熱が拡散するために、チップデバイス内で数度の単純な構成による温度勾配作成は困難と判断した。また、温度走化性を示す精子の割合が低いので、温度走化性を哺乳類の運動精子に適用するのは困難と判断した。しかし、温度上昇に伴いエネルギー産生に関する酵素の活性が上昇することから、精子内のこれらの酵素を活性化させることが好適であると現時点では考えている。

3 - 1 > ヒト精子内にタンパク質の発現を確認するために遠心処理による洗浄前後の精子をウエスタンブロットで評価した。その結果、解糖系に存在する酵素である GAPDH および 3PGDH の発現が確認された。2) と 3) の結果から、解糖系の酵素によって産生された ATP や NADH などの還元性の高エネルギー物質が精子の鞭毛運動に活用されることを示唆しており、その定量性評価を今後行う予定である。上記の結果は、これまでの我々の研究で得られた MTT やレサズリンを用いた酸化還元指示薬との呈色反応で得られたものと同傾向である。

3 - 2 > ヒト精液を PBS で希釈した際にグルコース 0.1 M PBS 溶液を添加した場合とそうでない場合の精子運動を比較したところ、グルコース溶液を精液に添加 10 分後の曲線速度および頭部振幅が増大した。グルコースを利用した鞭毛運動の加速が見られた。そのため、ヒト精子においてグルコースの解糖系によるエネルギー代謝を経て鞭毛運動が活性化すると考えている。

鞭毛運動の活性化を促進し、かつ継続するために、精子内解糖系によるグルコース代謝に基づく効果的な ATP 産生と精子内の ATP 輸送が重要である。

### 3 - 3 > 試験紙デバイスによる精子運動性評価とその利用

レサズリンの還元に伴う青から桃色への色調変化を評価したところ、運動精子の割合が高い場合にこの色の変化が進行した。しかし、ミトコンドリアの酵素を阻害する薬剤を添加しても運動性が変わらないにも関わらず、色調変化度が減少し、酸化還元反応が阻害されたことが示唆された。この結果について、どの酵素反応が阻害され、どの酵素で産生される ATP が精子運動に大きく寄与しているか現在調査中である。

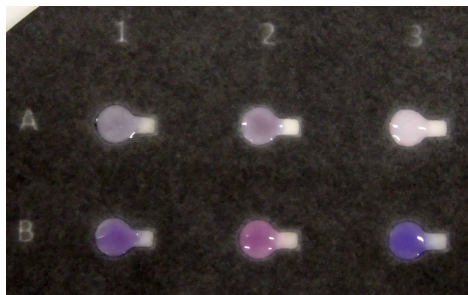


図3：酸化還元指示薬に MTT およびレサズリンを用いた試験紙デバイス ヒト精液および洗浄精液滴下後の色変化を示す。

上記の結果を統合すると、温度走化性を用いた濃度上昇は臨床現場で適用できそうな簡便なシステムの作製については別の原理を検討すべきと判断した。これまでの我々の研究で得られた MTT やレサズリンを用いた酸化還元指示薬との呈色反応で得られたものと同傾向である。今後は、精子内のエネルギーを産生する酵素の活性と運動性との相関を検証し、哺乳類精子が短期間または長期間運動できるような環境を見出す方針とする。その結果、不妊治療における運動精子選別効率、体外受精や人工授精の成功率の上昇を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saori Nishina, Koji Matsuura, and Keiji Naruse	4. 巻 73
2. 論文標題 Spiral trajectory modulation in rheotactic motile human sperm in cylindrical microfluidic channels of different inner diameters	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Medica Okayama	6. 最初と最後の頁 213-221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18926/AMO/56863	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koji Matsuura, Wei-Hsin Wang, Alex Ching, Yu Chen, and Chao-Min Cheng	4. 巻 10
2. 論文標題 Paper-Based Resazurin Assay of Inhibitor-Treated Porcine Sperm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi10080495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Chao Guan, Shinichiro Yanase, Koji Matsuura, Toshinori Kouchi, and Yasunori Nagata	4. 巻 10
2. 論文標題 Numerical Study of the Lift Force, Velocities and Pressure Distribution of a Single Air Bubble and Two Interacting Air Bubbles Rising in Quiescent Liquid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Open Journal of Fluid Dynamics	6. 最初と最後の頁 31-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/ojfd.2020.101003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yu-Ting Tsao, Chung-Yao Yang, Yun-Chiao Wen, Ting-Chang Chang, Koji Matsuura, Yu Chen, Chao-Min Cheng	4. 巻 6
2. 論文標題 Point-of-care semen analysis of patients with infertility via smartphone and colorimetric paper-based diagnostic device	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioengineering & Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 e10176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/btm2.10176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Noriki Tanaka, Saori Nishina, Ayano Fujita, Masatoshi Morimatsu, Yuka Asano, Koji Matsuura, Keiji Naruse
2. 発表標題 Hydrostatic pressure threshold for the reduction of human sperm motility
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of The Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2018年

〔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	高田 耕児  (Takata Koji)  (40530621)	富山県産業技術研究開発センター・その他部局等・主任研究員   (83205)	

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			
その他の国・地域・台湾	国立台湾清華大学			
フランス	CNRS			