

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12622

研究課題名（和文）受精環境下における精子ナビゲーション戦略の解明と体外受精への応用

研究課題名（英文）Elucidation of sperm navigation strategies in the fertilization environment and its application to in vitro fertilization

研究代表者

百武 徹（Hyakutake, Toru）

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：20335582

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：雌性生殖器内における哺乳類精子のナビゲーション戦略を明らかにするため、疑似卵管内モデルを用いた精子集団遊泳の調査を行った。また、エージェントベースモデルを導入し走触性や走流性を取り入れた新しい精子遊泳モデルの構築を行った。さらに、これまで得られた知見を活かして、高運動性精子を高濃度で選別できるマイクロ流体デバイスを開発し、選別された精子を用いて体外受精を実施した結果、高品質胚の作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの研究で得られた結果は、学術的意義としては、哺乳類精子が体内受精において卵子に到達するまでのナビゲーション戦略に関する新しい知見を提供できる。社会的意義としては、精子の体内受精のナビゲーション戦略を理解することで、生殖補助医療や畜産分野において、これまで低受精確率であった既存の体外受精に替わる新しい効果的な体外受精用デバイスを開発する上での重要な知見を提供できる。

研究成果の概要（英文）：To clarify the navigation strategy of mammalian sperm in the female reproductive organs, we investigated sperm collective swimming using channels that reproduce the flow in the oviduct. We also introduced an agent-based model and constructed a new sperm swimming model that incorporates thigmotaxis and rheotaxis. Furthermore, we developed a microfluidic device that can select highly motile sperm at high concentration, and succeeded in producing high-quality embryos by in vitro fertilization using the sorted sperm.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：集団遊泳 走流性 走触性 エージェントベースモデル 精子選別 マイクロ流体デバイス

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生殖において体内受精は非常に重要なプロセスであり、精子が卵子に向かう運動は受精の実現に最も重要な因子の1つである。様々な運動性や寿命の母集団をもつ精子群から、自分の体長の数千倍もの距離を遊泳し、ただ一匹のみの精子が受精に至るまでのナビゲーション戦略は、生物物理学的、そして流体力学的に複雑なプロセスを経て成立する。この受精に至る精子遊泳メカニズムの理解を妨げる原因のひとつとして、*in vivo* 環境と *in vitro* 環境の解離があげられる。一般的には、精子は鞭毛を規則的に動かすことでジグザグに遊泳するとされるが、これは単に実験を容易にするため、*in vitro* 環境下で精液を希釈して観察した結果でしかない。しかし、実際に精子が遊泳する *in vivo* 環境の卵管内粘液特性は水の 100 ~ 1000 倍という高粘度、かつ粘弾性を有しており、精子は非常に特殊な環境下を遊泳しているといえる。加えて、卵管壁面はマイクロスケールの溝が存在しており、かつ卵管蠕動による流れの存在があることで、精子には力学的に多くの外乱が存在する。よって、実際の受精環境下における哺乳類精子群ナビゲーションとその生殖戦略のメカニズムについて、生体力学的観点からさらに研究を推進する必要がある。

2. 研究の目的

- (1) 3D プリンタを用いて卵管内の流れを模した流路を製作し、疑似卵管粘液特性を有する Shear thinning 粘弾性流体を用いることで、その中を遊泳する精子の運動特性や精子間の同調現象を調査する。
- (2) 遊泳する個々の精子をエージェントとみなすことで、走触性や走流性といった精子の特徴的な運動特性を再現した新しい精子遊泳モデルの構築を行う。さらに、このモデルを用いて、精子集積機能を有するマイクロ流体デバイス内の精子運動を予測する。
- (3) 卵管内環境を模擬することで運動性精子を高濃度で選別できるマイクロ流体デバイスの開発を行う。また、このデバイスを用いて、実際に牛に対して体外受精を実施し、卵割率、胚盤胞率などの体外受精卵の品質評価を実施する。

3. 研究の方法

(1) 疑似卵管内モデルを用いた精子集団遊泳の調査

流路の鋳型を 3 次元 CAD ソフト SolidWorks で設計し、光造形方式の 3D プリンタである Form3B で作製した。素材には生体適合性の高い医療系レジンである BioMed Clear Resin を用いた。この鋳型をポリジメチルシロキサン (PDMS) 樹脂に転写し、穴あけ加工・プラズマによる表面親水処理を施しガラス基板へ接着することで流路を製作した。まず、家畜改良事業団前橋種雄牛センターより購入した凍結ウシ精液を 38.5 °C の恒温槽にて融解する。その後、卵管内粘液のレオロジー特性に近い Shear thinning 粘弾性流体のポリアクリルアミド (PAA) 溶液をシリンジポンプにて流路内に設定流量で送り出す。最後に、精液槽に融解した精液を加え、ハイスピードカメラを用いて、流路底面に焦点を合わせ、壁面付近を遊泳する精子を撮影した。精子の遊泳軌跡は、DIPP-Motion V/2D (株式会社ディテクト) を用いて、撮影した動画から精子頭頂部の座標データを取得した。

(2) 精子遊泳モデルを用いたマイクロ流体デバイス内の精子挙動予測

精子遊泳に関する既存の数値解析の多くは、精子頭部や鞭毛と流体との相互干渉などを考慮することで決定論的力学に基づき、詳細な遊泳特性を明らかにしてきた。一方で、計算コストの面から、対象となる精子数や時空間スケールに制限があり、実際のマイクロ流体デバイスへの適用は難しい。この課題を解決する手段として、我々は、エージェントベースモデルを導入し、実験データをもとに多数の精子遊泳を確率的運動として捉えることで、マイクロ流体デバイスと同じ時空間スケールでの解析が可能となる新しい精子遊泳モデルの構築を行った。このモデルでは、精子はランダムウォークしながら遊泳するものとしており、壁面に近づくとより壁面に沿って遊泳しやすくなる性質として走触性モデルと、流れのせん断速度に応じて精子にモーメントが発生し流れに逆らって遊泳する性質として走流性モデルを導入した。

走触性と走流性を含む精子遊泳モデルを用いて、テーパ部をもつマイクロ流路内における精子挙動について調査した。運動性のある精子の一部は、走触性と走流性を利用して、壁面に沿いながら流れに逆らってテーパ部へ向かって遊泳する。本解析では、流路内平均流速と、投入する精子母集団の平均精子速度を様々に変化させた場合のテーパ部への精子集積効果を調査した。

(3) マイクロ流体デバイスの性能評価および体外受精の調査

本実験では、標準的なソフトリソグラフィ技術を用いてマイクロ流体デバイスを製作した。まず流路パターンを設計後、フォトマスクを作成する。次に、シリコンウエハ上にフォトレジスト (SU-8 3010; KAYAKU Advanced Materials, Inc.) をパターンニングすることによってマスターモールドを製作した。その後、PDMS 樹脂 (Sylgard 184 Silicone Elastomer; Dow Corning Toray Co.) を用いて、主剤と硬化剤を 10 : 1 の割合で混合し、モールド上に流し込み硬化させた後、PDMS

をモールドから剥がし、穴あけ加工、プラズマ照射による親水処理後にスライドガラスに貼り付けてマイクロ流体デバイスの完成となる。ウシ精子は、家畜改良事業団前橋種雄牛センターより購入したストロー状の凍結ウシ精液を 38.5°C の恒温槽にて融解して利用した。流路内に流す流体には、牛血清アルブミンを添加した媒精用基本液を用いた。流路内に媒精用基本液を満たしたのち、精液槽に融解した精液を注入することで、流路内を運動精子が走流性や走触性により遡上する環境を形成した。その後、インキュベータ内で静置した後、回収槽の溶液をマイクロチューブに回収し、精子解析ソフトウェア SMAS を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 疑似卵管モデルを用いた in vitro 実験

雌性生殖器官内粘液のレオロジー特性を模擬した Shear thinning 粘弾性流体中を遊泳する精子を観察し、走流性や走触性といった運動特性が、精子の集団遊泳に与える影響を調査した。実験の結果、流れのある条件下で、壁面近傍において多くの集団遊泳する精子が観察された。例として、図 1(a) に PAA 濃度 $C_p = 0.75\%$ 、流量 $q = 100 \text{ nL/s}$ における精子遊泳の様子を示す。図より、赤枠内にて多くの精子が集団を形成しながら流れに逆らって遊泳していることが分かる。ここで、単独遊泳する精子 (Individual sperm) と集団遊泳する精子 (Clustered sperm) の運動特性の比較を行った。図 1(b) に、単独遊泳する精子と集団遊泳する精子速度 (VAP) の比較を示す。図より、集団遊泳する精子に比べ、単独で遊泳する精子の方が精子速度は高いことが分かる。次に、精子頭部の向きと流れ方向のなす角度を配向角と定義し、流れがない場合とある場合における配向角分布を調査した。図 2(a)(b) は、それぞれ流れがない場合とある場合における単独遊泳精子と集団遊泳精子の配向角分布の比較を示す。図より、集団遊泳精子の方が単独遊泳精子に比べて配向角が 0 度付近にて最大値が見られる。また、流れがあることで、その傾向は顕著に表れた。したがって、Shear thinning 粘弾性流体中では、精子が集団遊泳することによって、精子速度は低下するものの、壁面近傍の速度勾配が存在する領域にて走流性が強化されることが明らかとなった。これらの結果は、集団遊泳に生物学的メリットがあることを示唆している。

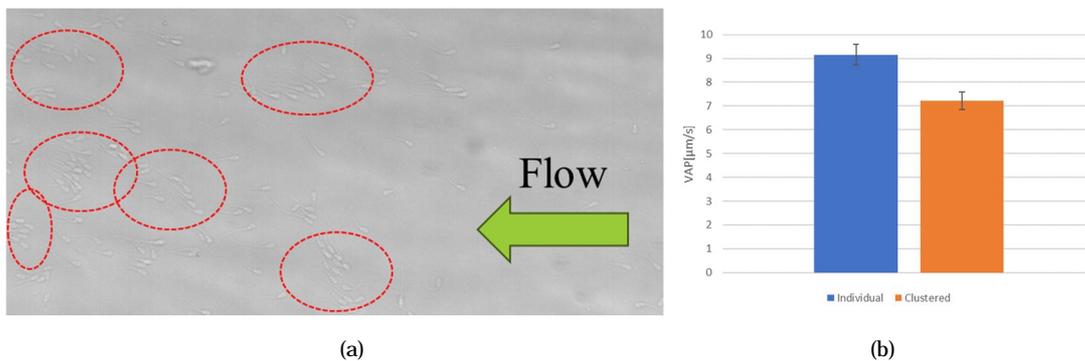


図 1 (a) 精子集団遊泳の様子 (b) 精子速度の比較

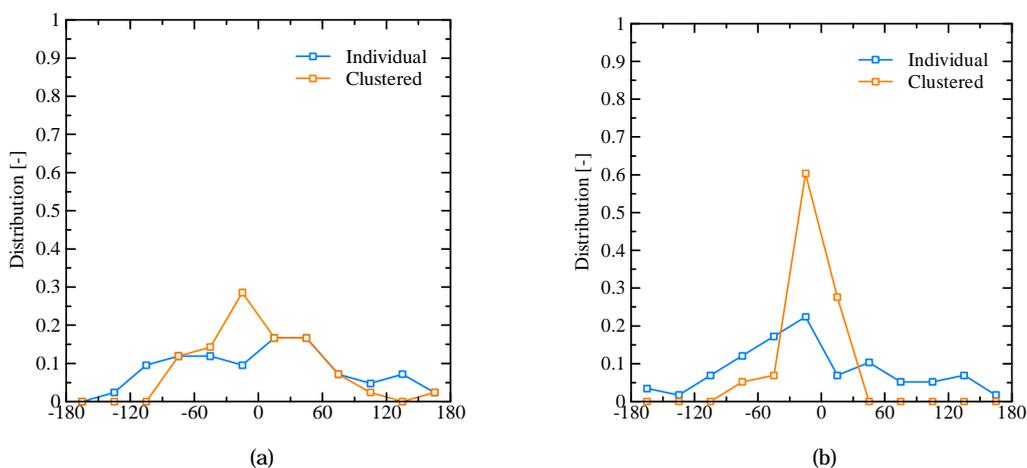


図 2 配向角の比較 (a) 流れがない場合 (b) 流れがある場合

(2) 精子遊泳モデルを用いたマイクロ流体デバイス内の精子挙動予測

図 3 にマイクロ流体デバイスの形状と寸法を示す。精子をチャネルの最下流面からランダムに発生させ、運動性のある精子の一部は、壁面に沿いながら流れに逆らって遊泳し、ある特定のチャネル内平均流速の範囲において精子はテーバ部に集積すると考えられる。そこで、流路内平

均流速 V_m や平均精子速度 V_s^{avg} の変化がテーパ内の精子濃度 C_s に与える影響を調査した。図 4(a)は、様々な流路内平均流速 V_m における、テーパ内の精子濃度 C_s の分布を示している。ここで、母集団の精子速度分布は平均精子速度 $V_s^{avg}=100 \mu\text{m/s}$ 、標準偏差は $V_s^{sd}=25 \mu\text{m/s}$ である。横軸は x 方向を示しており、 $1000 \mu\text{m} < x < 2000 \mu\text{m}$ の範囲が Taper area である。縦軸は精子濃度 C_s [Million/mL]を示している。図より、 $V_m = 0 \mu\text{m/s}$ の場合、チャンネル内の精子は濃度 $C_s = 2 \sim 5$ Million/mLの範囲でほぼ均一に分布している。一方で、 $V_m = 30 \mu\text{m/s}$ になると、テーパ内の精子濃度 C_s は急激に上昇した。特にテーパ上流部分に精子が集積し、最大 55 Million/mLであった。その後、さらに V_m を増加させると、徐々にテーパ内の精子濃度 C_s は減少し、集積する箇所もテーパ下流部へと移動した。次に、テーパ内の精子濃度の平均値を C_s^{avg} と定義し、様々な平均精子速度 V_s^{avg} や V_m に対する C_s^{avg} の変化を調査した。ここで、精子速度分布の標準偏差 $V_s^{sd}=V_s^{avg}/4$ とした。図 4(b)の横軸は流路内平均流速 V_m 、縦軸が Taper area 内の平均精子濃度 C_s^{avg} である。図より V_{avg} が大きくなるにつれて、テーパ内に集積する平均精子濃度 C_s^{avg} が増加した。 V_s^{avg} の値に応じて、テーパ内平均精子濃度 C_s^{avg} には異なるピークが存在することが分かる。また、最も平均精子濃度 C_s^{avg} が高い時の V_m は、 V_s^{avg} が増加するにつれて大きくなった。本解析によって得られた結果から、運動良好精子を効率よく集積させる流速条件を予測することができると思われる。

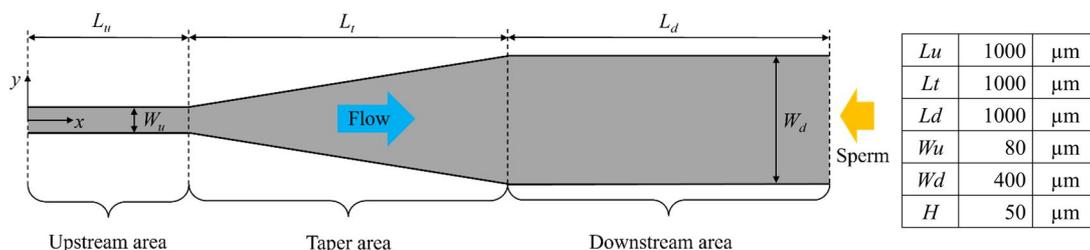


図 3 マイクロ流体デバイスの形状と寸法

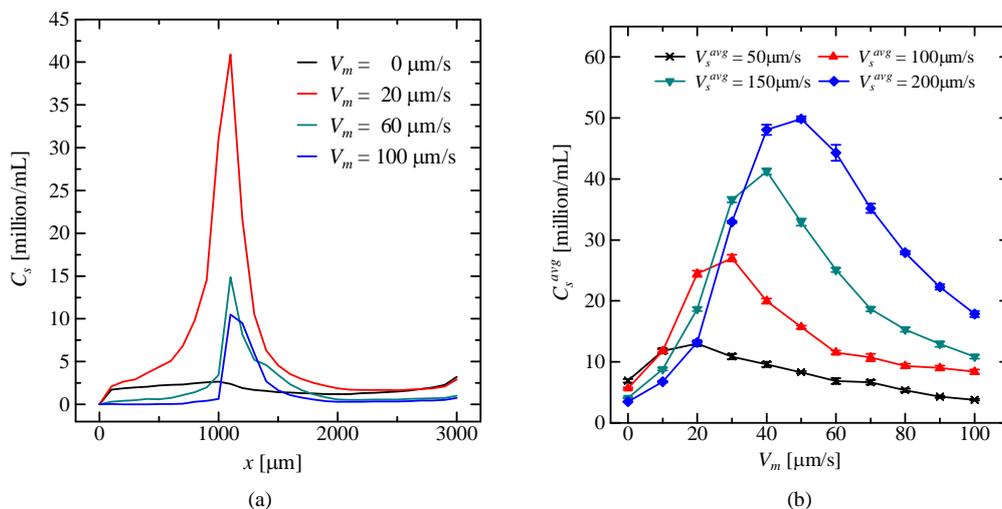
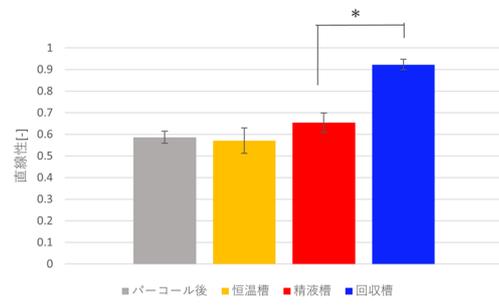
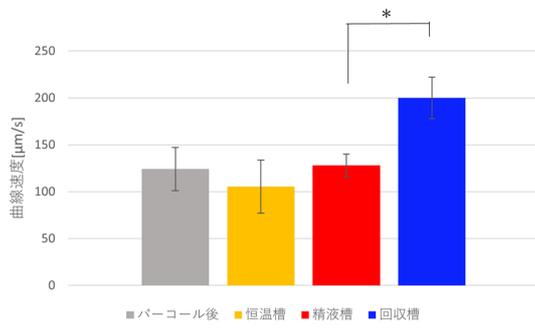


図 4 (a)テーパ内の精子濃度の分布 (b) 様々な V_s^{avg} や V_m に対する C_s^{avg} の変化

(3) マイクロ流体デバイスの性能評価および体外受精の調査

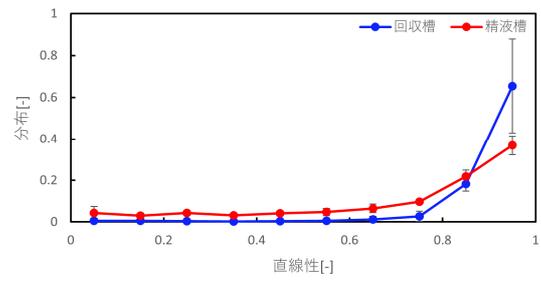
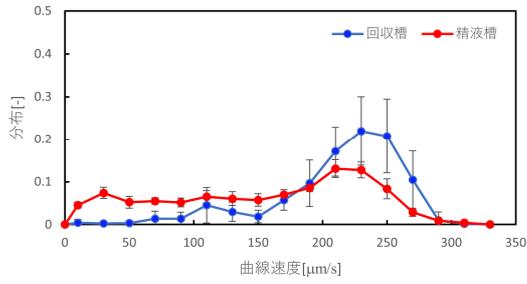
運動良好な精子を選別するマイクロ流体デバイスの開発を行った。その際、チャンネルの形状を最適化することで選別された精子濃度の向上を達成した。性能評価の一例として、既存のパーコール液を用いた遠心分離法で選別された精子、恒温槽で 30 分間保温された精子、インキュベータにデバイスを 30 分間静置した後の精液槽と回収槽の精子の運動性の比較を行った。図 5(a)(b)はそれぞれ、精子の曲線速度と直線性の比較を示す。実験は 5 回実施した。図より、曲線速度、直線性ととも、精液槽に比べて回収槽の値が大きく上昇していることが分かる。 t 検定を行い、 p 値を算出した結果、ともに $p < 0.01$ で有意差が見られた。ほかにも頭部振幅、頭部振動数についても、精液槽に比べて回収槽の方が有意に増加した。さらに詳しく比較するために、精液槽と回収槽の精子の曲線速度と直線速度の分布を求めた。図 6 にそれぞれの結果を示す。図より、回収槽では、速度の遅い精子の割合はほとんどなく、速度の速い精子が優先的に選別されていることが分かる。また、直線性については、回収槽では直線性がほぼ 1 に近い精子が 6 割ほどであり、本デバイスが直線的に遊泳する精子を回収していることが分かる。最後に、今回のマイクロ流体デバイスにより回収された精子を用いて実際の体外受精を実施した結果、現行の体外受精よりも高い胚盤胞率、凍結可能胚率となり、従来の密度遠心分離法の代替法としての有用性を示す結果を得ることができた。



(a)

(b)

図 5 (a) 曲線速度の比較 (b) 直線性の比較



(a)

(b)

図 6 (a) 曲線速度分布 (b) 直線性分布

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 百武徹	4. 巻 62
2. 論文標題 受精環境を模した流体中の精子運動特性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 175-177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.62.175	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 Yasutaka Hayamizu, Akihiro Nakamura, Toru Hyakutake, Takeshi Gonda, Shinichi Morita, Shigeru Ohtuska, Shinichiro Yanase	4. 巻 1909
2. 論文標題 Particle behavior in curved microchannels: aspect ratio effects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Physics: Conference Series	6. 最初と最後の頁 12062
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1742-6596/1909/1/012062	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11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 佐藤駿介, 百武徹
2. 発表標題 非ニュートン流体中における精子の集団遊泳に関する実験的研究”
3. 学会等名 第35回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Toru Hyakutake and Daisuke Higashiyama
2. 発表標題 Predicting sperm motion in microfluidic channels with sperm swimming model
3. 学会等名 2023 BMES Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 百武徹
2. 発表標題 受精環境を模したレオロジー流体中における精子の運動特性
3. 学会等名 2023年度生物流体研究集会「生物流体力学における境界の役割」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東山大介, 櫻井凜太郎, 百武徹
2. 発表標題 精子遊泳モデルを用いたマイクロ流路内の精子運動予測
3. 学会等名 第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ren Kanai, Yunosuke Tosen, Toru Hyakutake
2. 発表標題 Development of an effective in vitro fertilization device featuring a three-dimensional structure
3. 学会等名 The 9th World Congress of Biomechanics 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuna Seto, Joji Shiroto, Toru Hyakutake
2. 発表標題 Rheotaxis-based sorting of highly motile sperm using multiple microfluidics channels
3. 学会等名 The 9th World Congress of Biomechanics 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toru Hyakutake, Daisuke Higashiyama
2. 発表標題 Predicting sperm motion in microfluidic channels with sperm swimming model
3. 学会等名 The 9th World Congress of Biomechanics 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲村 渉太, 早水 庸隆, 益田 卓哉, 濱田 竜生, 森田 慎一, 百武 徹
2. 発表標題 マイクロチャネル内の精子の挙動 (運動精子に及ぼす溝の効果)
3. 学会等名 日本機械学会第100期流体工学部門講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲村 渉太, 早水 庸隆, 益田 卓哉, 濱田 竜生, 森田 慎一, 百武 徹
2. 発表標題 溝付きマイクロチャネル内における精子の挙動 (運動精子に及ぼす溝幅の影響)
3. 学会等名 日本機械学会中国四国支部第61期総会・講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 櫻井凜太郎, 金井蓮, 百武徹
2. 発表標題 精子集積構造を有するマイクロ流体チップに関する研究
3. 学会等名 第33回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toru Hyakutake
2. 発表標題 Hydrodynamic Study of Bovine Sperm Motility and Application to In-vitro Fertilization
3. 学会等名 RIMS Workshop Biofluid Mechanics of Reproduction (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 運動性精子選別デバイス、及び運動性精子の選別方法	発明者 三田正弘, 安井学, 百武徹, 大日方壘, 塚原隼人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-205929	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	安井 学 (Yasui Manabu) (80426361)	地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・電子技術 部・主任研究員 (82718)	

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
---------	---------