

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560204

研究課題名(和文) 疑似卵管内における哺乳類精子の運動特性解明と形態進化ダイナミクスの新展開

研究課題名(英文) Study on motion behaviours of mammalian sperm in actual oviduct and novel development for morphological evolutionary dynamics

研究代表者

百武 徹 (Hyakutake, Toru)

横浜国立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20335582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：実環境下の流体環境が精子運動に与える影響の解明を目的として、様々な粘度特性をもつ試薬内におけるウシ精子の運動のPTV解析、およびPIV解析による精子鞭毛まわりの流れの可視化を行った。実験の結果、ニュートン流体中では粘度増加に伴い精子速度、直進性が低下した。一方で、高粘度非ニュートン流体中では、同程度の粘度域のニュートン流体中に比べ、鞭毛形状、特に局所的な曲率に大きな相違が見られ、結果として、直進性、振動数が大幅に増加した。したがって、これまで観察されている希釈した溶液内での精子運動とは異なり、実際の卵管粘液内における精子は直線的に運動し、より効率的に卵子へ向かうことが示唆される。

研究成果の概要(英文)：We experimentally observed sperm motion in fluids with various fluid rheological properties and investigated the influence of varying the viscosity and whether the fluid was Newtonian or non-Newtonian on the sperm motility. We investigated the following parameters: the sperm velocity, the straight-line velocity and the amplitude from the trajectory, and the beat frequency from the flagellar movement. In a Newtonian fluid environment, as the viscosity increased, the motility of the sperm decreased. However, in a non-Newtonian fluid, the straight-line velocity and beat frequency were significantly higher than in a Newtonian fluid with comparable viscosity. As a result, the linearity of the sperm movement increased. Additionally, increasing the viscosity brought about large changes in the sperm flagellar shape. These results suggest that the bovine sperm has evolved to swim toward the egg as quickly as possible in the actual oviduct fluid, which is a high-viscosity non-Newtonian fluid.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：非ニュートン流体 精子鞭毛 画像解析

### 1. 研究開始当初の背景

動物の生殖において受精は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。精子の運動は鞭毛と呼ばれる尾部の能動的な屈曲によるものであり、鞭毛波形などの運動特性は精子の遊泳する環境に応じて多様性をもっている。このうち、ウシなどの哺乳類精子は体内受精を行うため、卵管内の粘液中を遊泳する。卵管内粘液は様々なゲルや高分子などの存在する高粘度かつ粘弾性流体であり、そのような周囲環境に適応して哺乳類精子の運動形態も進化していると考えられるが、具体的にどういった流体力学的要因が運動形態に影響しているのかはまだ良くわかっていない。

また、現在大きな社会問題となっている少子化の原因のひとつに不妊症があげられ、その原因の半数が男性側、つまり精子の欠如や運動異常であるといわれている。その解決方法として、マイクロ流体原理を利用した運動良好精子選別技術があり、いくつかの方式の装置が提案されている。これらの装置はウシやウマなどの畜産分野における運動良好精子回収への応用も期待されている。しかしながら、それらの装置内の流体環境は希釈した溶液であり、実際の卵管内粘液の流体環境とは大きく異なるため、選別された精子が実環境下でも優れた運動性を発揮するかは不明である。したがって、生物学的だけでなく生殖補助医療分野や畜産分野においても精子運動と周囲流体環境との関係を理解することが重要となってきている。

### 2. 研究の目的

研究では、卵管内粘液の特徴である粘弾性流体の非ニュートン性に注目してウシ精子の運動を観察、解析することで、実際の卵管内に近い周囲流体環境が精子運動に与える影響を詳細に調査することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究ではスライドガラスに精子を含む試料溶液を滴下し、カバーガラスを重ね、顕微鏡を用いて鉛直方向から精子を観察する実験を行った。観察にはオリンパス製倒立型リサーチ顕微鏡 IX71 を用いた。画像を取得するカメラはカトウ光研株式会社製ハイスピードデジタル CCD カメラ K-2 を用いた。手順としては、始めに冷凍ウシ精液 0.5 ml から観察の障害となるタンパク質などの不純物を遠心分離により除去した。その際、まず精液を TCG 溶液で希釈し、パーコールとリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で濃度勾配を形成した遠沈管に注入、遠心分離を行った。遠心分離後の精液を PBS に粘度調整試薬を溶解した溶液と混合し、観察用試料溶液とした。その試料溶液を顕微鏡で観察し、高速度カメラで動画を取得、その動画を PC で画像解析した。さらに本研究ではもう1つの実験として、

試料溶液に粒子径 0.051  $\mu\text{m}$  (精子頭部の約 1/100 の大きさ) の蛍光粒子 (Thermo SCIENTIFIC 社製) を混合し、精子鞭毛まわりの流れを可視化して動画を撮影、そして PIV 解析により精子まわりの流れの速度ベクトルを取得した。画像解析には流体解析ソフト DIPP-Motion Pro (Ditect 製) と PIV 解析用ソフト DIPP-FLOW (Ditect 製) を用いた。本研究で使用した粘度調整試薬は、PVP-K90 (Poly vinyl pyrrolidone) と MC100 および MC4000 (Methyl cellulose) である。図 1 に各試薬に対するせん断速度と粘度の関係を示す。図より PVP-K90 の粘度はせん断速度に関係なく一定でありニュートン性を示した。一方、MC100 はせん断速度の増加とともに粘度は若干減少し、弱い非ニュートン性を示し、MC4000 は、せん断速度の増加とともに粘度は大きく減少し、せん断速度が  $1.0\text{s}^{-1}$  の時の粘度は、せん断速度  $100\text{s}^{-1}$  の時の約 3 倍となり、強い非ニュートン性を示した。

### 4. 研究成果

図 2 に各試薬に対する精子速度と直進速度の関係を示す。図より直進速度は精子速度とともに増加しており、各試薬に対して相関関係があることが分かる。希釈した溶液の場合、精子速度は  $110\text{--}220 \mu\text{m/s}$  の範囲にあるのに対して、PVP-K90 の濃度の上昇、つまり粘度の上昇とともに精子速度は低下していき、PVP-K90 の濃度 15% の場合、すなわち粘度が  $0.45 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  の場合、精子速度は  $7\text{--}12 \mu\text{m/s}$  へと減少した。一方、MC 溶液の場合、PVP 溶液と異なる傾向を示した。MC100 の場合、各速度は濃度の増加とともに減少したが、MC4000 の場合、直進速度は減少せず、MC100 よりも粘度が大きいかにもかかわらず、いくつかの精子の直進速度は増加した。図 1 より、MC4000 の粘度はせん断速度が  $1.0$  から  $100 \text{ s}^{-1}$  の範囲で、PVP-K90 溶液 10% から 15% の間におさまる。しかしながら、MC4000 の速度

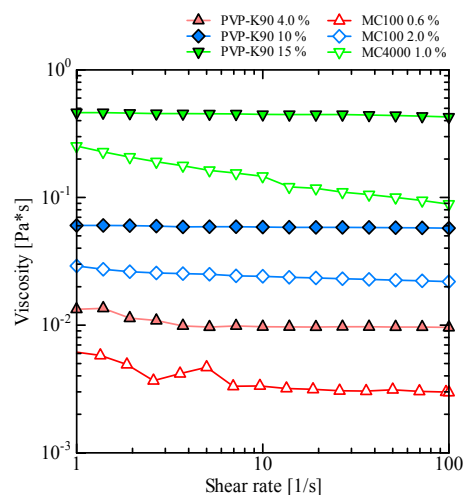


図 1 各試薬の粘度特性

特性は PVP-K90 溶液とは著しく異なっており、MC4000 の直進速度は、PVP 溶液 10-15% の直進速度に比べて大幅に増加していた。

さらに詳しく二つの溶液の傾向の違いをみるため、図 2 の傾きの逆数に対応する直進速度  $L=V_{ST}/V_{SP}$  を定義し、比較を行った。図 3 に直進度と運動軌跡の振幅との関係を示す。図より PVP-K90 および MC100 については、振幅の減少は直進度の増加をもたらしている。しかしながら、非ニュートン性を有する MC4000 の場合、粘度の増加は振幅にはほとんど影響せず、直進度の大きな増加をもたらし、ほとんどの精子の直進度は 0.8 を超え、ほとんど直線的に遊泳していた。また、鞭毛運動の振幅を調査した。図 4 は各試薬に対する振動数の比較を示す。PVP-k90 および MC100 の場合、粘度の増加は振動数の減少をもたらしたが、MC4000 の場合、鞭毛の振動数は試薬の中でもっとも高くなった。

次に、トレーサー粒子を用いて精子鞭毛ま

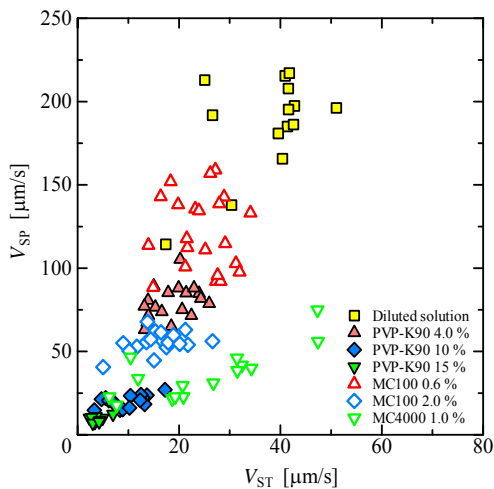


図 2 精子速度( $V_{SP}$ )と直進速度( $V_{ST}$ )の関係

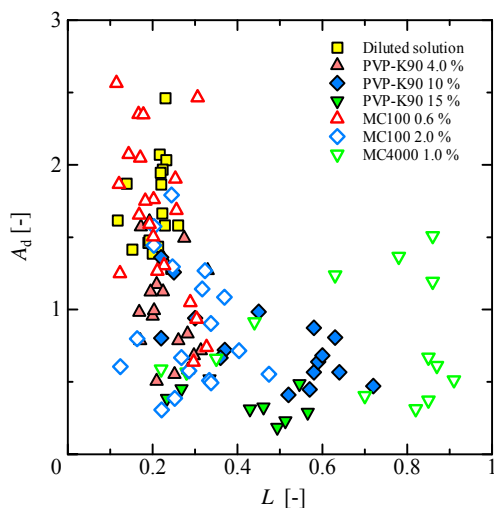


図 3 直進度( $L$ )と精子軌跡( $A_d$ )の振幅の関係

わりの可視化を行った。図 5 に直進性の違う二つの精子まわりの流体の流れを示す。図より、鞭毛まわりには頭部周辺と鞭毛の曲率の大きな部分に大きな渦が発生しており、この渦の大きさは直進性が低いほど大きかった。また、観測された流体の流速から得られた精子鞭毛まわりのせん断速度は、 $0 \sim 10 \text{ s}^{-1}$  程度であった。最後に周りの流体のレオロジー特性が精子の鞭毛形状に与える影響を調査した。図 6 に各試薬に対する鞭毛形状を示す。赤い線が鞭毛を表している。図より、希釈した溶液の場合(a)、つまり粘度が水に近い場合、鞭毛は、根元から先端にかけて全体をくねらせて遊泳しているが、試薬の粘度が増加し、水の約 80 倍である PVP-K90 10%(b)では、鞭毛の中辺部付近の曲率は小さく、先端に向かって曲率が大きくなっていき、非ニュートン流体(d)では、その傾向がさらに強まる事が分かる。したがって、鞭毛まわりの流体のレオロジー特性の違いにより鞭毛形状は大きく変化することが明らかとなった。この違いが、精子の推進性の違いに影響を与えていると考えられる。これらの結果は、精子鞭毛が非ニュートン性を有する卵管内粘液をでき

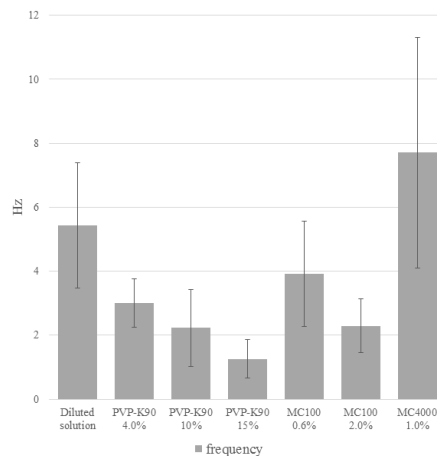


図 4 各試薬に対する鞭毛振動数の比較

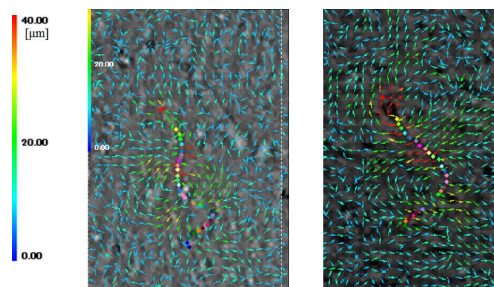


図 5 鞭毛まわりの流れの可視化

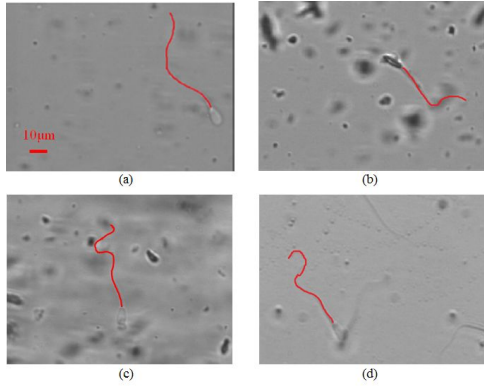


図6 各試薬に対する鞭毛形状の比較  
 (a) Diluted solution, (b) PVP-K90 10%,  
 (c) PVP-K90 15%, (d) MC4000 1%

るだけ早く卵子へ到着するために効率的に遊泳するように進化したことを示唆している。これらの成果より、哺乳類精子の形態が種によって異なる理由をバイオメカニクスの観点より説明するための一助となることが期待できる。

実際の卵管内では卵子に近づくとハイパーアクティベーション(HA; 超活性化)と呼ばれる運動性の変化を行う。実際の卵管粘液内におけるHAが受精に至る運動特性解明において大きな影響をもたらすと考えられ、今後はHAを含めた実環境下における精子運動特性解明へ研究を進めていく予定である。さらには、種に応じた効率的な哺乳類精子の選別方法の提案へと発展させる予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Toru Hyakutake, Hiroki Suzuki and Satoru Yamamoto, "Effect of non-Newtonian fluid properties on bovine sperm motility", *Journal of Biomechanics*, Vol. 48, pp. 2941-2947, 2015, 査読有

(2) Toru Hyakutake, Hiroki Suzuki and Satoru Yamamoto, "Effect of viscosity on motion characteristics of bovine sperm", *Journal of Aero Aqua Bio-mechanisms*, Vol. 4, No.1, pp. 63-70, 2015, 査読有

〔学会発表〕(計10件)

(1) 森浩太郎, 百武徹, 山本賢, 佐藤浩一, "超活性化を伴うウシ精子の運動特性に対する周囲流体の影響", 日本機械学会関東支部第22期総会・講演会, 2016.3.11, 東京工業大学, 目黒区

(2) 佐藤浩一, 山本賢, 森浩太郎, 百武徹, "ウシ精子の運動特性に対する粘弾性の影響", 日本機械学会関東学生会第55回学生員卒業研究発表講演会, 2016.3.10, 東京工業大学,

目黒区

(3) 荻野翔平, 杉江亮祐, 百武徹, "遊泳する精子同士の干渉に関する研究", 日本機械学会北陸信越学生会第45回学生員卒業研究発表講演会, 2016.3.4, 信州大学, 長野市

(4) 山本賢, 森浩太郎, 佐藤浩一, 百武徹, "ウシ精子の運動特性に対する粘弾性の影響", 第28回バイオエンジニアリング講演会, 2016.1.9, 東工大, 目黒区

(5) 杉江亮祐, 百武徹, "非ニュートン流体が精子運動特性に与える影響に関する数値解析", 第28回バイオエンジニアリング講演会, 2016.1.9, 東工大, 目黒区

(6) 森浩太郎, 鈴木大貴, 山本賢, 百武徹, "超活性化を伴うウシ精子の運動特性に関する実験的研究", 日本機械学会関東学生会第54回学生員卒業研究発表講演会, 2015.3.20, 横浜国立大学, 横浜市

(7) 鈴木大貴, 山本賢, 森浩太郎, 百武徹, "ウシ精子の運動特性に対する粘性の影響", 第27回バイオエンジニアリング講演会, 2015.1.10, 朱鷺メッセ, 新潟市

(8) 下田桂聖, 百武徹, "精子の鞭毛形状が運動特性に与える影響に関する数値解析", 第27回バイオエンジニアリング講演会, 2015.1.10, 朱鷺メッセ, 新潟市

(9) Toru Hyakutake, Hiroki Suzuki and Satoru Yamamoto, "Effect of viscosity on motion characteristics of bovine sperm", the 6<sup>th</sup> International Symposium on Aero Aqua Bio-mechanisms, 2014.11.14, Honolulu, Hawaii, USA

(10) 山本賢, 鈴木大貴, 森浩太郎, 百武徹, "粘性がウシ精子の運動特性に与える影響に関する実験的研究", 日本流体力学会年会2014, 2014.9.15, 東北大学川内北キャンパス, 仙台市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
 出願状況(計0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

百武 徹 (HYAKUTAKE TORU)  
横浜国立大学・工学研究院・准教授  
研究者番号：20335582

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：