

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 21 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26390039

研究課題名(和文) 受胎率向上を目指す体外受精卵培養マイクロシステムの開発

研究課題名(英文) Development of in vitro embryo culture system based-on microfluidics for artificial reproductive technology

研究代表者

木村 啓志 (Kimura, Hiroshi)

東海大学・工学部・准教授

研究者番号：40533625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生殖補助医療における体外受精の受胎率・出生率向上を目指し、受精操作や培養操作などの複数の機能をマイクロデバイスに集積化し、タイムラプス観察システムと統合することで、高品質な受精卵を作製・管理しながら移植可能な胚盤胞までの発生を促すことのできる体外受精操作統合型プラットフォームの開発を行った。具体的には、マウス精子および卵子を利用して、精子選別機能、体外受精機能、受精卵培養機能の各機能を単一のデバイスに集積化し、これらの機能評価を実施した。この結果、従来法と比して各機能の優位性を示した。このような新規技術の実現は、今後の生殖補助医療の発展に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop an in vitro embryo production device which allows three steps of sperm selection, fertilization and culture on a microdevice. We have integrated the sperm sorting function combining with swim-up and swim-down methods onto the device. To evaluate the device functions, sperm sorting experiment, in vitro fertilization experiment, and embryo culture experiment have been carried out. As results, we concluded that the device has ability to produce high quality embryos by integrating the sperm sorting function. This concept will open and enhance the management of an individual embryo for assisted reproductive technology, livestock breeding, and fundamental stage research by further development.

研究分野：バイオエンジニアリング

キーワード：マイクロデバイス 不妊治療 受精卵培養 精子選別 媒精

1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療は、不妊症の最も有効な治療法である。欧米では新生児の1~4%がARTによる出生といわれており、日本でも体外受精児の割合が2%を超えていることから、この治療法がいかに普及しているかが伺える。急激な生活習慣の変化や社会的ストレス、晩婚化などの様々な要因から、不妊症の患者は増加の一途をたどると考えられており、今後ますます生殖補助医療の重要性が高まると予想される。しかしながら、世界初の体外受精児の誕生から35年余り経過した現在でも、生殖補助医療による移植あたりの出生率は20%に満たないのが現状である。出生率が低い原因は卵子の質、母体の高齢化などさまざまであるが、もう一つの大きな要因として、受精卵の体外培養方法における問題が挙げられる。通常、体外受精卵は着床直前の胚盤胞になるまでの4~5日間、培養液のドロップレット内で培養されるが生体外培養系は生体内環境との差異が大きく、受精卵の著しい発生率や質の低下が認められる。これらの要因が体外受精卵の受胎率および出生率低下の原因の一端となっていると考えられている。

一方、申請者はこれまでに、マイクロ流体デバイスを応用した哺乳動物の体外受精卵培養システムの研究に携わってきた。この研究成果の中で、本来受精や発生、着床などのイベントが起こる母胎の卵管や子宮の環境をデバイス技術によって再現することで、受精卵の発生に良好な影響を与えられることを見出した。しかしながら、これまでに提案したデバイスの機能は培養機能のみであり、体外受精卵を作製するための受精操作機能や培養した受精卵の品質を客観的に評価することのできる機能は集積化されていない。受胎率を向上させる鍵が高品質の受精卵の作製にあるのであれば、良質な精子の選別、良好な培養環境、良質な受精卵の選別という各段階における評価と操作が可能な培養システムを構築することによって、生殖補助医療にブレイクスルーをもたらすことができるのではなかろうか、という発想に至った。

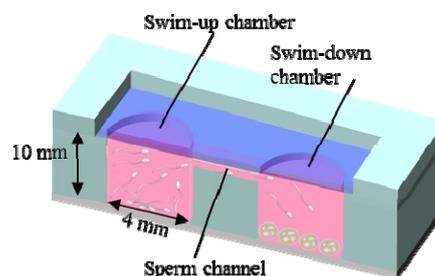
2. 研究の目的

本研究では生殖補助医療における体外受精の受胎率・出生率向上を目指し、受精操作や培養操作などの複数の機能をマイクロ流体デバイスに集積化し、タイムラプス観察システムと統合することで、高品質な受精卵を作製し、管理しながら移植可能な胚盤胞までの発生を促すことのできる体外受精操作統合型プラットフォームの実現を目的としている。そこで、受胎・出生率を向上しうる高品質な受精卵を得るために(1)精子選別、(2)母胎内を模擬した培養環境、(3)経時的な形態観察が可能な機能集積型の体外受精卵培養マイクロシステムの開発を実施した。

3. 研究の方法

受胎・出生率を向上しうる高品質な受精卵を得るためには、正常な精子と受精させることが望ましい。本研究ではマイクロデバイスに不良精子を取り除くことのできる仕組みを導入することで高品質受精卵の作製を目指し、特にスイムアップ法とスイムダウン法を連続して実施可能なデバイスを開発した。スイムアップ法とは、培養液下に濃縮した精液を静置し、時間の経過とともに培養液中に浮遊してくる運動機能が良好な精子を集める手法である。一方、スイムダウン法は、泳ぎ上がった後に重力によって沈降する精子を集める方法である。スイムダウン法はスイムアップ法に比べ形態異常のある精子の選別に優れる方法である。これらのことから、より質の良い精子を得るためにはスイムアップ法とスイムダウン法の2つを行うことが好ましいと考えられる。このようなコンセプトで開発したデバイスを図1に示す。本デバイスでは、スイムアップチャンバとスイムダウンチャンバが微小流路(精子チャンネル)によって接続されている。このような構成によって、本デバイスでは精子選別・体外受精・受精卵培養の3つの操作を実施することができる。

(A) デバイスデザイン



(B) 作製したデバイス

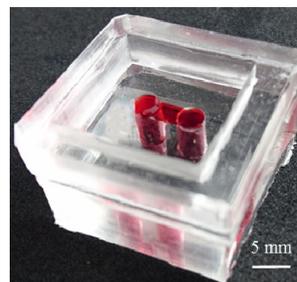


図1 開発したデバイスの外観図

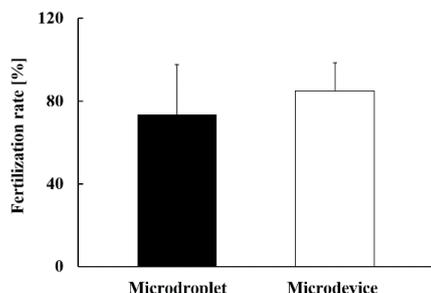
4. 研究成果

(1) 体外受精機能評価

本デバイスの機能評価として、体外受精実験を行った。本実験では、デバイス内でのスイムアップ/ダウンを行なった。その後、6時間インキュベーター内で体外受精操作を行なった。受精率の結果を図2に示す。実験結果から、本デバイスでの受精率は従来法を上

回り、その受精率は約 85%であることが判明した。この要因として、デバイス内で精子選別が十分行われ、運動能力が高く、また形態の優れた精子と受精したことが考えられる。これらのことから、本デバイス内で媒精機能を再現可能であり、その性能は従来法を上回ることが示唆された。

(A)受精率



(B)発生率

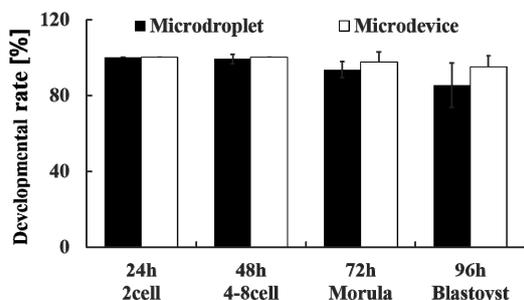


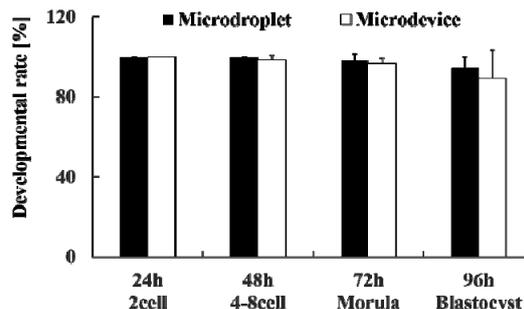
図 2 体外受精機能評価

(2) 受精卵培養機能評価

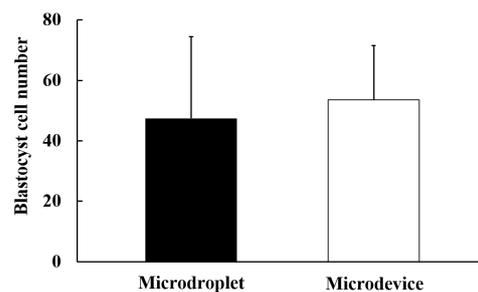
本デバイスの受精卵培養機能評価として体外受精卵の培養実験を行った。本実験では、体外受精の常法として用いられているマイクロドロプレット法にて受精卵を作製した。本実験の結果を図 3 に示す。実験結果から、本デバイスでの発生率は 96 時間において 90%を超えており、十分な培養機能を有していることが確認された。また、従来法であるドロプレットと比して、胚盤胞における細胞数が多い傾向にあり、本デバイスの有用性が示唆された。

以上の検討結果から、本デバイスを用いた媒精機能評価実験では、受精率およびその後の発生率も従来法を上回る結果となり、本デバイスの精子選別機能の有用性が明らかとなった。受精卵培養機能評価実験では、本デバイスが従来法と同等、もしくはそれ以上の培養機能を有することが示唆された。本研究では、これまで非常に煩雑であった不妊治療現場で実施されている精子選別機能、媒精機能および培養機能の 3 つの機能の単一デバイスへの集積化することに成功し、その有用性を示すに至った。このようなデバイスは、今後の生殖補助医療の発展に大きく寄与するものと期待される。

(A)発生率



(B)胚盤胞時の細胞数



(C)培養中の受精卵の様子

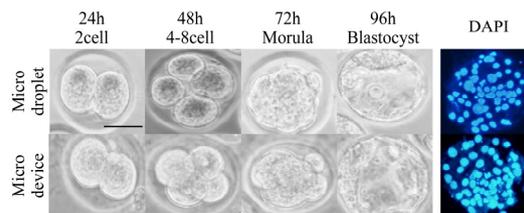


図 3 受精卵培養機能評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. 高橋翼, 中村寛子, 木村啓志, 精子選別機能集積型受精卵作出デバイスの開発, 日本機械学科論文集, 印刷中 査読有
2. M. Komeya, H. Kimura, H. Nakamura, T. Yokonishi, T. Sato, K. Kojima, K. Hayashi, K. Katagiri, H. Yamanaka, H. Sanjo, M. Yao, S. Kamimura, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, T. Fujii, T. Ogawa, Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device, Scientific Reports, 6, 21472, DOI: 10.1038/srep21472, 2016 査読有

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 高橋翼, 中村寛子, 木村啓志, 精子選別機能を有する体外受精卵作製マイクロデバイスの開発, 情報・知能・精密機器部門講演会, 東洋大学白山キャンパス(東京都文京区), 2017年3月14日-15日

2. H. Kimura, Microfluidic Spatiotemporal Control Technology for Organ-on-a-Chip, Organ-on-a-chip World Congress 2016, Boston (USA), July 7-8, 2016
3. 高橋翼, 中村寛子, 木村啓志, 精子選別機能を有する受精卵作製・培養マイクロデバイスの開発, 化学とマイクロ・ナノシステム学会, 東京大学生産技術研究所(東京都目黒区), 2016年4月25日-26日
4. 高橋翼, 中村寛子, 木村啓志, 精子選別機能を有する受精卵作製マイクロデバイスの開発, 第16回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 名古屋国際会議場(名古屋市熱田区熱田西町1-1), 2015年12月16-19日

[図書] (計3件)

1. 木村啓志, 酒井康行, 藤井輝夫, Organ-on-a-Chip: マイクロ流体アプローチが拓く新展開, 日本内科学会雑誌, 印刷中
2. 木村啓志, 酒井康行, 藤井輝夫, 創薬を加速するツールとしての Organ-on-a-chip の進展, 薬剤学, 76(4), 238-242, 2016年7月1日発行

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 組織片の機能を発現・維持する方法および組織片培養デバイス

発明者: 藤井輝夫, 木村啓志, 小川毅彦, 古目谷暢

権利者: (学) 東海大学, (一財) 生産技術研究奨励会, (公大) 横浜市立大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-119858

出願年月日: 2014年6月10日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

東海大学 木村啓志研究室

<http://www.kimura-lab.info/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 啓志 (KIMURA HIROSHI)

東海大学・工学部・准教授

研究者番号: 40533625

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

藤井 輝夫 (FUJII TERUO)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号: 30251474

小川 毅彦 (OGAWA TAKEHIKO)
横浜市立大学・生命医科学研究科・教授
研究者番号: 50254222

(4)研究協力者

中村 寛子 (NAKAMURA HIROKO)

東海大学・工学部・特定研究員

高橋 翼 (TAKAHASHI TSUBASA)

東海大学・工学研究科・大学院生