

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：55101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K03939

研究課題名(和文) 卵管内の力学的環境を考慮した運動良好精子分離装置の開発

研究課題名(英文) Development of motile sperm separation device considering dynamic environment of oviduct

研究代表者

早水 庸隆 (Hayamizu, Yasutaka)

米子工業高等専門学校・その他部局等・教授

研究者番号：90413822

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)：卵管内の力学的環境が運動精子に及ぼす影響の解明を目的として、直チャンネル部と曲チャンネル部を有するマイクロチャンネルと溝ありマイクロチャンネル内の運動精子の挙動をPTVで調査した。実験の結果、直チャンネル部と曲チャンネル部においては、いずれも遡上精子は低流速域である壁面付近に集中した。一方で、溝ありチャンネルにおいては、微小溝部にも遡上精子が集中した。そのため、溝ありチャンネルの微小溝は精子の遡上運動を補助する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実際の卵管内は壁面に溝がある微小な曲がり流路であり、卵巣から子宮への流れが生じている。したがって、精子は卵管内の特殊な力学的環境の中で遡上しており、その環境の中で勝ち残った精子こそが受精に最適な精子である。そのため、我々は直チャンネル部と曲チャンネル部を有するマイクロチャンネルと溝ありマイクロチャンネル内の遡上精子の挙動を調査した。直チャンネル部と曲チャンネル部においては、いずれも遡上精子に違いは見られなかった。溝ありチャンネルにおいては、微小溝が精子の遡上運動を補助する可能性があり、今後の運動精子分離装置の設計に有用な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：This study aims to investigate the behavior of the motile sperm in the straight channel (Poiseuille flow) and the curved channel (Dean flow) using the particle tracking velocimetry (PTV) method experimentally. Also, we investigate the effect of groove in a channel wall surface. From the experimental results, if the flow is fast, sperms tend to flow in the same direction as the flow in both the Poiseuille flow and the Dean flow. If the flow is slow, sperms attempt to move in the opposite direction of the flow. This tendency can be observed more strongly when the channel wall surface has a groove.

研究分野：流体力学

キーワード：遡上精子 マイクロチャンネル PTV

1. 研究開始当初の背景

深刻な社会問題である少子化の原因の一つとして不妊症が挙げられる。カップルの約 1 割が不妊症であると言われており、不妊原因の半分は男性精子の欠如や異常であることが判明している。不妊原因と治療には、①環境やストレス等の除去、②運動良好な精子を安全かつ簡便に選別することが重要となる。

上記②のための方法として、スイムアップ法や密度勾配遠心法が用いられているが、どちらの方法も精子を遠心処理するために問題点としては、遠心処理によって精子を圧縮する際に精子へ過度のストレスが負荷される。圧縮された精子自身が産出する活性酸素にさらされ、頭部 DNA が断片化し受精卵の発育が悪くなるリスクが上昇する (Devroey, P. et al.: *Hum. Reprod. Update.*, 2004)。そのため、遠心処理を用いない精子分離法が望まれている。

問題点の解決方法として、マイクロチャネルを用いた運動良好精子分離装置 (Micro Fluidic Sperm Sorter: MFSS, 図 1, 2 参照) が開発されている。MFSS は精子への悪影響を抑え、かつ簡便に短時間で運動良好精子を抽出することを目的とし開発されたものであり、深さ 50 μm 、幅 400 μm の二つの流路によって構成されている。精子を分離抽出する原理としては図 2 の模式図に示すように、チャンバー A から流入した精子のうち、運動不良精子は A-D 間流れに流されチャンバー D へと集まる。しかし、チャンバー A から流入した精子のうち活発な運動を行う運動良好精子のなかには、二つの流れの境界面で流れを振り切って、B-C 間流れへと移動していく個体もある。MFSS は既存の選別方法に比べて、安全かつ簡便に選別することが可能なため、不妊治療に大きく貢献することができると考えられている。マイクロチャネルを用いて運動良好精子を選別するという技術や方法が確立されている一方、どのような形状、または流体力学的な条件がもっとも効率的に運動良好な精子を抽出できるのかはまだ明らかにされていない。

MFSS は、抽出した精子を卵管内粘液のようなゲル状物質を含む高粘度流体中の特殊な環境下ではなく、ニュートン流体である緩衝液によって希釈した低粘度流体中で精子を運動させて回収している。つまり、実際の卵管内とは異なった環境で精子を運動させている。実際の卵管内は壁面に溝がある微小な曲がり流路であり、卵巣から子宮への流れが生じている。したがって、精子は卵管内の特殊な力学的環境の中で流れに逆らって運動 (遡上) しており、その環境の中で勝ち残った精子こそが受精に最適な精子である。そのため、我々は卵管内の力学的環境を考慮した MFSS であれば、運動良好精子の回収数や受精率の増加が期待できると考え、卵管内の力学的環境を考慮した MFSS の開発を目指している。



図 1 MFSS

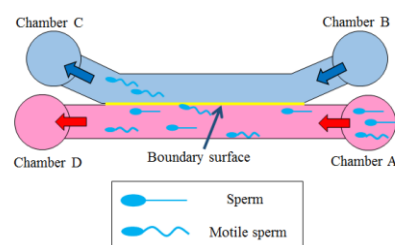


図 2 MFSS の原理

2. 研究の目的

上記 1. の背景に基づいて、以下の項目について実験的に検討した。実験方法は 3. に記載する。

- (1) 運動精子に及ぼすポアズイユ流れとディーン流れの影響
- (2) 運動精子に及ぼす壁面溝の影響

3. 研究の方法

- (1) 運動精子に及ぼすポアズイユ流れとディーン流れの影響

この実験では、直線および曲がり形状で構成されたマイクロチャネルを使用し、運動精子に及ぼす直チャネル部のポアズイユ流れと曲チャネル部のディーン流れの影響を調査した。チャネル断面は、高さ 50 μm 、幅 150 μm の矩形断面、曲がり形状は、曲率半径 1 mm、5 mm、10 mm の 3 種類である。

精液に活性剤である TCG 溶液を攪拌した液体を使用し、これを作動流体とした。精液には、ヒト精液と形状が類似するウシ精液を用いた。ウシ精液は、鳥取県畜産試験場の肉用牛・黒毛和種「勝茂久」の精液を使用した。

図 3 に実験装置概略図を示す。マイクロチャネル内に培養液を満す。培養液には、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いた。溶液タンクを Outlet と接続し、タンク内に作動流体を満す。

シリンジポンプを Inlet に接続し、陰圧を与えチャンネル内に作動流体が流入した状態で観察する。チャンネル内平均流速は、 $200\ \mu\text{m/s}$ 、 $800\ \mu\text{m/s}$ に調整し観察した。撮影位置は、直チャンネル部、曲チャンネル部の下壁面で撮影する。撮影は 1 秒間行い、顕微鏡、ハイスピードカメラを用いることで微小な領域のハイスピード撮影を可能にし、撮影制御を DaVis8.2.3 により行った。撮影した動画の精子挙動を粒子追跡流速測定法 (Particle Tracking Velocimetry : PTV) で調査した。

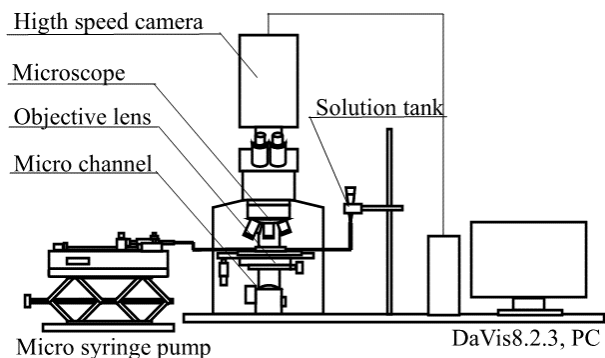


図 3 (1)の実験装置概略図

(2) 運動精子に及ぼす壁面溝の影響

この実験では、上壁面形状を変化させたマイクロチャンネルを使用し、運動精子に及ぼす壁面溝の影響を調査した。チャンネル断面は、高さ $50\ \mu\text{m}$ 、幅 $200\ \mu\text{m}$ の矩形断面である。壁面形状は、チャンネル幅 $200\ \mu\text{m}$ に対し幅 $20\ \mu\text{m}$ の微小溝を等間隔に 5 本配置した溝ありチャンネル、平面形状である溝なしチャンネルの 2 種類を使用した。

マイクロチャンネル内に満たす培養液としてアルブミン溶液を使用した。アルブミン溶液は、マイクロチャンネル構成素材である PDMS への精子の付着を抑える効果を持つ。アルブミン溶液の調整は、富士フイルム和光純薬の牛血清由来アルブミンとモディファイド HTF メディウムを使用した。精液は、(1)と同じく鳥取県畜産試験場の肉用牛・黒毛和種「勝茂久」の精液を使用した。

図 4 に実験装置概略図を示す。マイクロチャンネル内に 0.2% アルブミン溶液を満たす。今回は、シリンジポンプと比べより流速が安定する水頭差を用いて実験を行った。Inlet, Outlet チャンバー間で 0.2% アルブミン溶液を用いて水頭差を形成する。Outlet チャンバーに、作動流体を静置しチャンネル内平均流速を $51\ \mu\text{m/s}$ に調整する。撮影位置は、評価対象を遡上精子のみとするために Outlet チャンバーより $2\ \text{mm}$ の座標で撮影する。マイクロチャンネル内に遡上精子を確認したのち、顕微鏡、ハイスピードカメラを用いて 15 分間撮影、保存作業を行い、撮影した動画の精子挙動を PTV で調査した。

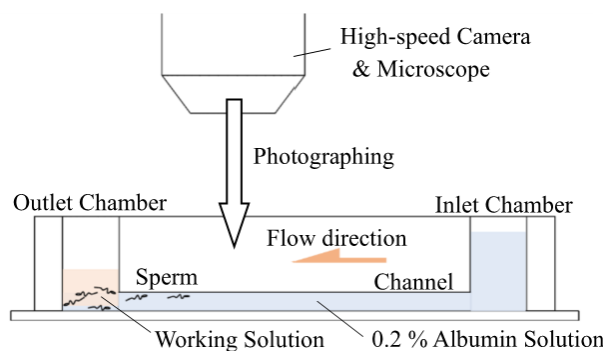


図 4 (2)の実験装置概略図

4. 研究成果

(1) 運動精子に及ぼすポアズイコ流れとディーン流れの影響

図 5 に平均流速 $200\ \mu\text{m/s}$ 、図 6 に平均流速 $800\ \mu\text{m/s}$ の直チャンネル部、曲チャンネル部における精子挙動の軌跡を可視化した結果を示す。縦軸および横軸はチャンネル内での座標 (mm) である。図中薄青色は、チャンネル壁面を示しており、それぞれを内壁面、外壁面とする。流れ方向は、直チャンネル部は右方向、曲チャンネル部は下方向となる。図中では観察結果を以下のように示す。データの色の違いは、別々の精子の軌跡であることを示している。

- : 精子初期座標。精子は流れと逆方向を向いている。
- : 精子初期座標。精子は流れと同方向を向いている。
- : 精子最終座標。精子は流れと逆方向を向いている。
- : 精子最終座標。精子は流れと同方向を向いている。

プロット白抜きは、精子が流れと逆方向を向いていることから、遡上傾向があると表現する。流れと逆方向に泳ぎ移動する精子は、遡上すると表現する。

図5, 6より、平均流速 $200 \mu\text{m/s}$, $800 \mu\text{m/s}$ ともに流れに対し遡上傾向を示す精子はチャンネル全域で確認ができた。精子の軌跡に注目すると、図5では図6と比べ直チャンネル部、曲チャンネル部ともに精子の軌跡がより細かく左右に触れていることが確認できる。精子は頭部を振りながら、もしくは回転しながら遡上運動を行う。このことより、平均流速 $200 \mu\text{m/s}$ では遡上運動が活発である。また、遡上傾向を示している図5 (a), (b), 図6 (a)の傾向として、精子の内壁面、外壁面への移動が確認できる。矩形断面チャンネル流れの壁面付近は低流速域である。実際に遡上している精子は、平均流速 $200 \mu\text{m/s}$ においては直チャンネル、曲チャンネル部の壁面付近、平均流速 $800 \mu\text{m/s}$ においては、直チャンネル部の下壁の両側壁面付近で確認され、いずれも低流速域である。これらのことより、精子の遡上運動は、低流速域で行われる知見を得た。

ポアズイユ流れとディーン流れによる精子挙動の違いは、確認できなかった。

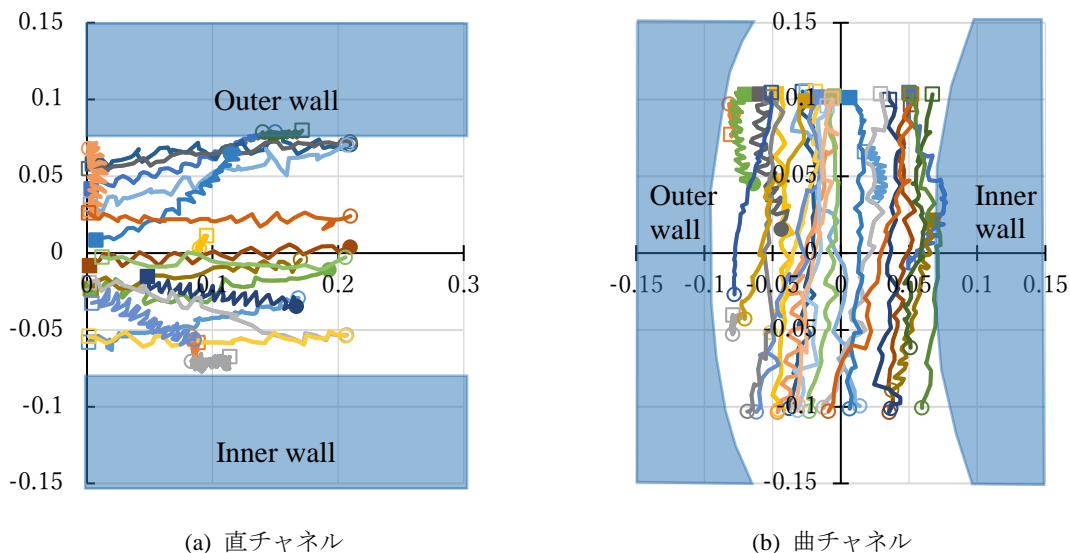


図5 平均流速 $200 \mu\text{m/s}$ の精子挙動の軌跡

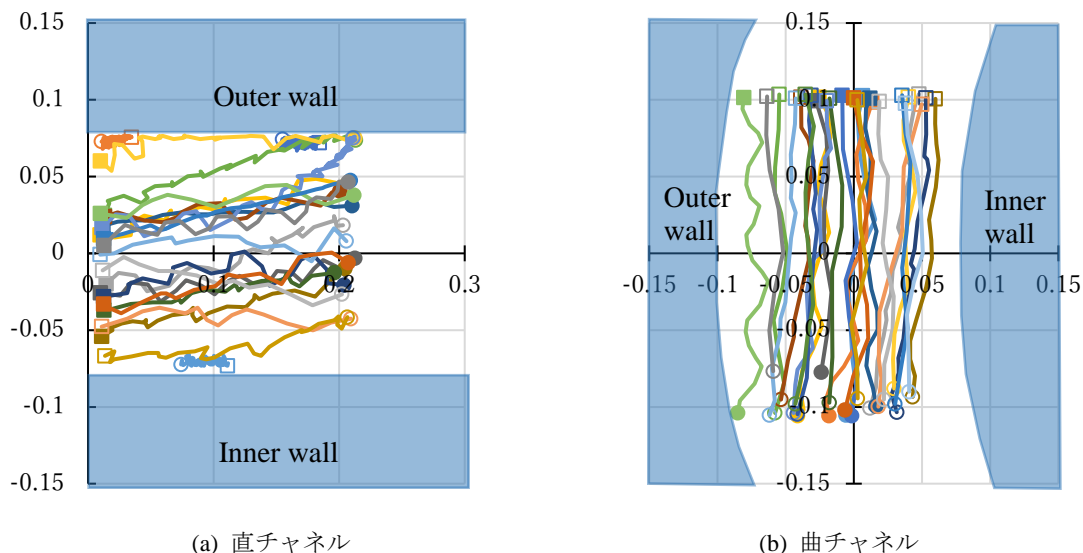


図6 平均流速 $800 \mu\text{m/s}$ の精子挙動の軌跡

(2) 運動精子に及ぼす壁面溝の影響

図7に平均流速 $51 \mu\text{m/s}$ の遡上精子分布割合を示す。図中薄青色の領域は、微小溝部を示しており、その他白色の領域は凸部を示している。遡上精子個体数は、それぞれの凸部、微小溝部座標ごとに整理した。縦軸に遡上精子割合、横軸にチャンネル中心から壁面までの座標を示す。縦軸の遡上精子割合 R (%) は式[1]を用いて定義した。ここで、 n をそれぞれの凸部座標または微小溝部座標で確認した遡上精子個体数、 N を全座標で確認した遡上精子個体の総和である。

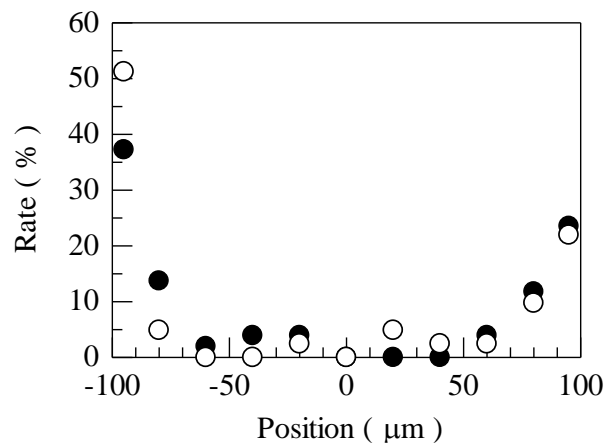
$$R = \frac{n}{N} \times 100$$

[1]

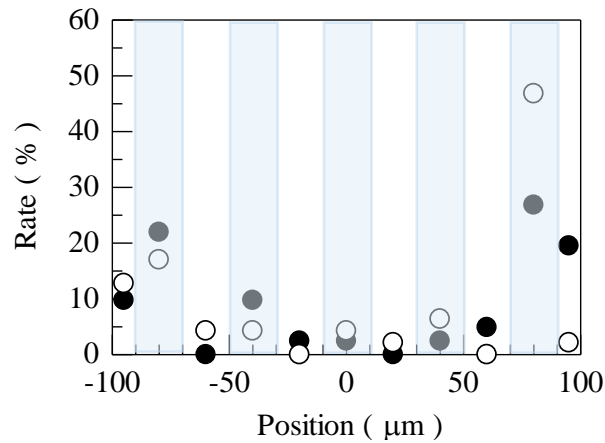
図中では，観察結果を以下のように示す．

- : 観察データ 1
- : 観察データ 2

図 7 (a)より，溝なしチャンネルは壁面付近の凸部において遡上精子割合が高い．一方，図 7 (b)より溝ありチャンネルは，壁面付近の凸部より壁面付近の微小溝部において，遡上精子割合が高いことが確認できる．そのため，溝ありチャンネルの微小溝は精子の遡上運動を補助する可能性を示唆している．



(a) 溝なしチャンネル



(b) 溝ありチャンネル

図7 平均流速51 μm/sの遡上精子分布

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Toru Hyakutake, Kenta Sugita, Shota Ujifuku, Rintaro Sakurai, Renta Murakami and Yasutaka Hayamizu	4. 巻 118
2. 論文標題 Experimental study on the effect of flow in microfluidic channel on bovine sperm navigation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanics	6. 最初と最後の頁 110290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiomech.2021.110290	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 Toru Hyakutake, Koichi Sato and Kenta Sugita	4. 巻 88
2. 論文標題 Study of bovine sperm motility in shear-thinning viscoelastic fluids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanics	6. 最初と最後の頁 130-137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiomech.2019.03.035	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 百武徹	4. 巻 39
2. 論文標題 受精環境下における牛精子の運動特性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ながれ	6. 最初と最後の頁 8-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hyakutake Toru, Mori Kotaro, Sato Koichi	4. 巻 71
2. 論文標題 Effects of surrounding fluid on motility of hyperactivated bovine sperm	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanics	6. 最初と最後の頁 183-189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiomech.2018.02.009	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20件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 坂本 虎之介, 早水 庸隆, 百武 徹, 白石 僚也, 権田 岳, 大塚 茂, 森田 慎一, 柳瀬 眞一郎
2. 発表標題 マイクロチャンネル内の精子の挙動
3. 学会等名 日本機械学会中国四国支部第59期総会・講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 足羽 竜輝, 早水 庸隆, 百武 徹, 白石 僚也, 権田 岳, 大塚 茂, 森田 慎一, 柳瀬 眞一郎
2. 発表標題 ヘリカル管内の2液の混合（混合に及ぼす振りの効果）
3. 学会等名 日本機械学会中国四国支部第59期総会・講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 氏福祥太, 瀬戸佑菜, 百武徹
2. 発表標題 溝付きマイクロ流路内における精子運動特性の調査
3. 学会等名 第31回バイオフィロントニア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y HAYAMIZU, A NAKAMURA, T HYAKUTAKE, T GONDA, S MORITA, S OHTSUKA, and S YANASE
2. 発表標題 Particle Behavior in Curved Microchannels: Aspect Ratio Effects
3. 学会等名 ISROMAC2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本 虎之介, 早水 庸隆, 百武 徹, 白石 僚也, 権田 岳, 大塚 茂, 森田 慎一, 柳瀬 眞一郎
2. 発表標題 曲がりマイクロチャンネル内の運動精子の挙動
3. 学会等名 日本機械学会第98期流体工学部門講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 足羽 竜輝, 早水 庸隆, 百武 徹, 白石 僚也, 権田 岳, 大塚 茂, 森田 慎一, 柳瀬 眞一郎
2. 発表標題 ヘリカル管内の2液混合(混合に及ぼす振りの効果)
3. 学会等名 日本機械学会第98期流体工学部門講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仲村陽宏, 早水庸隆, 百武徹, 権田岳, 森田慎一, 大塚茂, 柳瀬眞一郎, 山本恭二
2. 発表標題 ヘリカル管内流れの混合に及ぼす振りの影響
3. 学会等名 日本機械学会中国四国支部第58期総会・講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉田健太, 氏福祥太, 櫻井凜太郎, 村上蓮太, 安井学, 三田正弘, 百武徹
2. 発表標題 マイクロ流体チップを用いたウシ精子の運動性評価
3. 学会等名 第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲村陽宏, 早水庸隆, 百武徹, 権田岳, 森田慎一, 大塚茂, 柳瀬眞一郎, 山本恭二
2. 発表標題 曲がりマイクロ流体チャネル内の粒子挙動(アスペクト比の効果)
3. 学会等名 日本機械学会第97期流体工学部門講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro NAKAMURA, Yasutaka HAYAMIZU, Toru HYAKUTAKE, Takeshi GONDA, Shinichi MORITA, Shigeru OHTSUKA, and Shinichiro YANASE
2. 発表標題 Effect of Torsion on the Mixing of Helical Pipe Flow
3. 学会等名 The 14th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toranosuke SAKAMOTO, Yasutaka HAYAMIZU, Toru HYAKUTAKE, Takeshi GONDA, Shinichi MORITA, Shigeru OHTSUKA, and Shinichiro YANASE
2. 発表標題 Behavior of Motile Sperm in Microfluidic Channels
3. 学会等名 The 14th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro NAKAMURA, Yasutaka HAYAMIZU, Toru HYAKUTAKE, Takeshi GONDA, Shinichi MORITA, Shigeru OHTSUKA, and Shinichiro YANASE
2. 発表標題 Behavior of Particles in Curved Microchannels: Effect of Aspect Ratio
3. 学会等名 The 2nd IAHR-Asia Symposium on Hydraulic Machinery and Systems (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀨田竜生, 早水庸隆, 百武徹, 川邊俊彦, 権田岳, 森田慎一, 大塚茂, 柳瀬眞一郎
2. 発表標題 テイラー・ディーン流れを利用したマイクロミキサの研究 (混合に及ぼす流路曲率の影響)
3. 学会等名 日本機械学会中国四国支部第57期総会・講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲村陽宏, 早水庸隆, 百武徹, 権田岳, 森田慎一, 大塚茂, 柳瀬眞一郎, 山本恭二
2. 発表標題 曲がりマイクロチャンネル内の粒子挙動 (アスペクト比の影響)
3. 学会等名 日本機械学会中国四国支部第57期総会・講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲村陽宏, 早水庸隆, 百武徹, 権田岳, 森田慎一, 大塚茂, 柳瀬眞一郎, 山本恭二
2. 発表標題 曲がりマイクロチャンネル内の粒子挙動 (粒子密度の影響)
3. 学会等名 日本機械学会第96期流体工学部門講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀨田竜生, 早水庸隆, 百武徹, 川邊俊彦, 権田岳, 森田慎一, 大塚茂, 柳瀬眞一郎
2. 発表標題 テイラー・ディーン流れを利用したマイクロミキサの研究 (混合に及ぼすアスペクト比と移動壁面の影響)
3. 学会等名 日本機械学会第96期流体工学部門講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro NAKAMURA, Yasutaka HAYAMIZU, Takeshi GONDA, Shinichi MORITA, Shigeru OHTSUKA, Shinichiro YANASE and Kyoji YAMAMOTO
2. 発表標題 Behavior of Particles in Curved Microchannels
3. 学会等名 The 13th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuki HAMADA, Yasutaka HAYAMIZU, Shinichiro YANASE, Toshihiko KAWABE, Takeshi GONDA, Shinichi MORITA, Shigeru OHTSUKA and Kyoji YAMAMOTO
2. 発表標題 A Micromixer Using the Taylor-Dean Flow: Effects of Aspect Ratio and Moving Wall on the Mixing Process
3. 学会等名 The 13th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toru Hyakutake
2. 発表標題 Study on effect of surrounding fluid property on sperm motility
3. 学会等名 8th World Congress of Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toru Hyakutake
2. 発表標題 Study on effect of surrounding fluid property on sperm motility
3. 学会等名 World Congress on Medical Physics & Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 固液分離装置、固液分離方法、水質測定装置、および水質測定方法	発明者 早水庸隆，瀧口佳介，大江太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/048604	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 固液分離装置、固液分離方法、水質測定装置、および水質測定方法	発明者 早水庸隆，大江太郎，瀧口佳介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-234211	出願年 2018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	百武 徹 (Hyakutake Toru) (20335582)	横浜国立大学・大学院工学研究院・教授 (12701)	

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