

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：12701
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2021
課題番号：18K12052
研究課題名(和文) アクティブマターとしての集団精子遊泳のバイオメカニクスと形態進化解析への展開
研究課題名(英文) Biomechanics of collective sperm swimming as active matter and its application to analysis of morphological evolution
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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：卵管内のような特殊な流体環境下で受精をする哺乳類精子の遊泳メカニズムを明らかにするため、ソフトリソグラフィ技術によるマイクロ流体デバイスを用いて、以下に挙げるいくつかの環境下における精子遊泳特性を調査した。溝付きマイクロ流路内における精子運動特性の調査、流路内にテーパをもたせた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、Shear thinning粘弾性流体中における精子集団遊泳の観察。

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過程に関する新しい知見を提供できる。社会的意義としては、精子の体内受精プロセスを理解することで、生殖補助医療や畜産分野において、体外受精への適用を想定した高受胎性を有するマイクロ流体チップ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)：In order to elucidate the swimming mechanism of mammalian sperm that fertilize in a special fluid environment such as the oviduct, we investigated sperm swimming characteristics in several environments using soft lithography-based microfluidic devices. (1) investigation of sperm motility characteristics in microfluidic channels with groove, (2) study on microfluidic chips with tapered sperm accumulation structures in the channels, and (3) observation of collective sperm swimming in a shear thinning viscoelastic fluid.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：精子遊泳 走流性 走触性 マイクロ流体チップ 集団遊泳 粘弾性流体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。一方で、自分の体長の数千倍もの距離を遊泳し、卵子に巡り合う航路について実はまだよく分かっていないことが多い。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、この運動は観察を容易にするために精液を希釈した中での結果である。しかし、実際に精子が遊泳する卵管内の粘液は水の100~1000倍の粘度をもち、かつ高分子やゲル状物質などが存在するため粘弾性特性を有しており、かなり特殊な環境下で遊泳しているといえる。また、卵管壁はマイクロスケールの溝が存在しており、この中を精子は卵管蠕動による流れに逆らって遡上していくと予想される。さらには、実際の精子は互いに干渉しながら集団遊泳している。したがって、卵管内のような特殊な流体環境下で受精をする哺乳類精子群の遊泳メカニズムについて、バイオメカニクスの観点から改めて研究対象として注目すべきである。

2. 研究の目的

ソフトリソグラフィ技術によるマイクロ流体デバイスを用いて、以下に挙げる様々な環境下における精子遊泳特性を調査した。精子が遊泳する卵管内には多くのマイクロスケールの溝があることに注目し、卵管内を模擬した溝付きマイクロ流路を製作し、流路内の流動特性や精子運動の調査を行った。テーパ部をもつマイクロ流路において、走流性と走触性によってテーパ部分に運動性の良い精子が集積する。このようなマイクロ流体デバイスに対して、流路形状や流路内流速が、流路内の精子分布や精子濃度に与える影響について調査を行った。さらに、マイクロ流路内の精子運動特性をより詳細に調査するために、数値シミュレーションによる精子遊泳モデルの構築を行った。ポリアクリルアミドを用いて粘弾性流体である疑似子宮経管粘液を作製し、その中を遊泳する精子の運動特性、特に精子集団遊泳の観察を行った。これらの研究で得られた結果は、体外受精への適用を想定した高受胎性を有するマイクロ流体チップの設計・製作に対して重要な知見となるだろう。

3. 研究の方法

溝付きマイクロ流路内における精子運動特性の調査

幅200 μm 、長さ20 mm、高さ50 μm のマイクロ流路に高さ10 μm の溝がついた溝付き流路を用意し、溝幅 $W_g = 0, 10, 20, 30 \mu\text{m}$ の4パターンで精子運動特性を比較した。ここで、溝の数は5個とし、溝中心間の間隔は40 μm とした。Solidworksを用いて流路モデルを作成した後、マスクライナーを用いて流路部分、溝部分の順に2回に分けて露光を行うことでSU-8鋳型を製作した。マイクロ流体チップは、製作したSU-8鋳型をソフトリソグラフィ技術によって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製作した。ウシ精子は、神奈川県酪農業協同組合連合会より購入したストロー状の凍結ウシ精液0.5 mLを38.5°Cの恒温槽にて融解し、パーコール法によってグリセリンを除去した。チャンネル内に流す流体には、精子に対して毒性をもたないリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いた。チャンネル内にPBSを満たしたのち、inlet側のチャンバ下部に精液を満たし、その上に希釈液をかぶせるように滴下することで、スイムアップ法で上方に移動し、かつ流れに逆らって遊泳する精子を観察した。シリンジポンプを用いて流路内平均流速は調整した。精子の観察には位相差顕微鏡(E200, ニコン株式会社)を使用し、ハイスピードデジタルCCDカメラ(HAS-U1, カトウ光研株式会社)を用いて流路中央付近において動画撮影を行った。また、顕微鏡内にサーモプレートを組み込み、実験中の溶液温度をウシの体温と同等の38.5°Cに保った状態で実験を行った。得られた動画をもとに2次元運動解析ソフトウェアDIPP-motion V/2D(株式会社ディテクト)を用いて精子の運動特性を調べた。また、流路内の精子分布、および精子速度について各溝幅に対する比較を行った。合わせて、OpenFoamによる流体シミュレーションを行い、流路内流速分布を求めた。ここで、数値解析では流路長さを600 μm とし、流路内平均流速が実験と同等になるように上流側と下流側の圧力差を設定した。

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

幅 $W = 0.4 \text{ mm}$ 、長さ $L = 22 \text{ mm}$ 、高さ $H = 50 \mu\text{m}$ のマイクロ流路に狭窄幅 $W_s = 0.08 \text{ mm}$ 、テーパ長さ $L_t = 0, 0.25$ と $L_t = 1, 4 \text{ mm}$ の2パターンの形状をもつ2種類の流路を縦に5本並べ、出入り口で1本の流路とした。本実験では、テーパ長さ $L_t = 0, 1 \text{ mm}$ の2パターンで比較を行った。マイクロ流体チップの作成方法、および用いた精子の準備工程はと同様である。シリンジポンプを用いて、 $q = 100, 125, 150, 175, 200 \text{ nl/s}$ の5つの流量に設定した。チャンネル内に流す流体には、ウシ血清アルブミン0.2wt%入りHTFメディウムを用いた。まずシリンジポンプに接続されているマイクロチューブを培養液槽に差し込み、シリンジポンプを操作することで流路内を溶液で満たした。チャンネル内の空気が全て押し流されて除去されたことを確認したのち、シリンジポンプにて設定流量で溶液を送り出した。次に精液槽に希釈した精液を50 μL 加え、流れに逆ら

って遊泳する精子を観察した。観察方法は と同様である。

次に、精子遊泳モデルを用いた解析方法を説明する。一般的に精子は、鞭毛のビートに合わせてジグザグな軌道を描く。この精子挙動を簡易的なランダムウォークと仮定した。また、壁面に近づくとき遊泳方向角度が狭まる走触性モデルや、流れに対して反対方向に遡上する走流性モデルを構築した。マイクロ流路内における走触性と走流性の反応性について、それぞれ調査した既存の実験結果と比較することで、より実環境に近い精子挙動を再現した。流路形状、および流量条件は前述の精子集積構造を有するマイクロ流体チップと同等である。精子速度は、実際の精子データから近似した正規分布をもとに、その平均値と標準偏差から Box-Muller 法を用いて決定した。計算時間は 250 秒間で、0.05 秒間隔で精子挙動を調査した。全精子数として 5000 匹用意し、各 step で 1 匹ずつ yz 面 (図 2 中の青点線) の任意の点から発生するようにした。

Shear thinning 粘弾性流体中における精子集団遊泳の観察

ポリアクリルアミド (分子量 18,000 kDa) を HTF メディウムに混ぜることで、Shear thinning 粘弾性流体としての疑似子宮頸管粘液を作製した。このポリアクリルアミド溶液と融解させたウシ精液を混合させ、カウンティングチャンバにて疑似子宮頸管粘液中における精子集団遊泳の様子を観察した。その際、複数の濃度のポリアクリルアミド溶液での比較を行い、Shear thinning 粘弾性特性の大きさが精子集団遊泳特性に与える影響を調査した。

4. 研究成果

溝付きマイクロ流路内における精子運動特性の調査

まず、流路内の精子の位置から流路断面における精子分布を求めた。溝がない場合、精子の多くは走触性により壁面付近に多く分布していた。一方で、流路内に溝があることで溝付近にも精子が一部分布していることが分かった。これは精子が壁面を沿うように遊泳していく過程で、一部の精子が溝にトラップされて溝にも分布していたと考えられる。ここで、溝幅による影響を調査するために、壁面の影響を受けない流路中央付近、具体的には流路断面が $20 \mu\text{m} < y < 160 \mu\text{m}$ の範囲にいる精子の割合を各溝幅において比較した。実験結果 ($N = 3$) を図 1(a)に示す。図より、溝なし流路 ($W_g = 0 \mu\text{m}$) と溝幅 $W_g = 10, 20 \mu\text{m}$ に関して有意差があることが分かる。つまり、溝を設けることで精子が溝周辺にも分布しやすくなると考えられる。続いて、各溝幅における精子平均速度 (VAP) の比較を行った (図 1(b))。図より、溝なし流路に比べて溝幅 $10, 20 \mu\text{m}$ におい

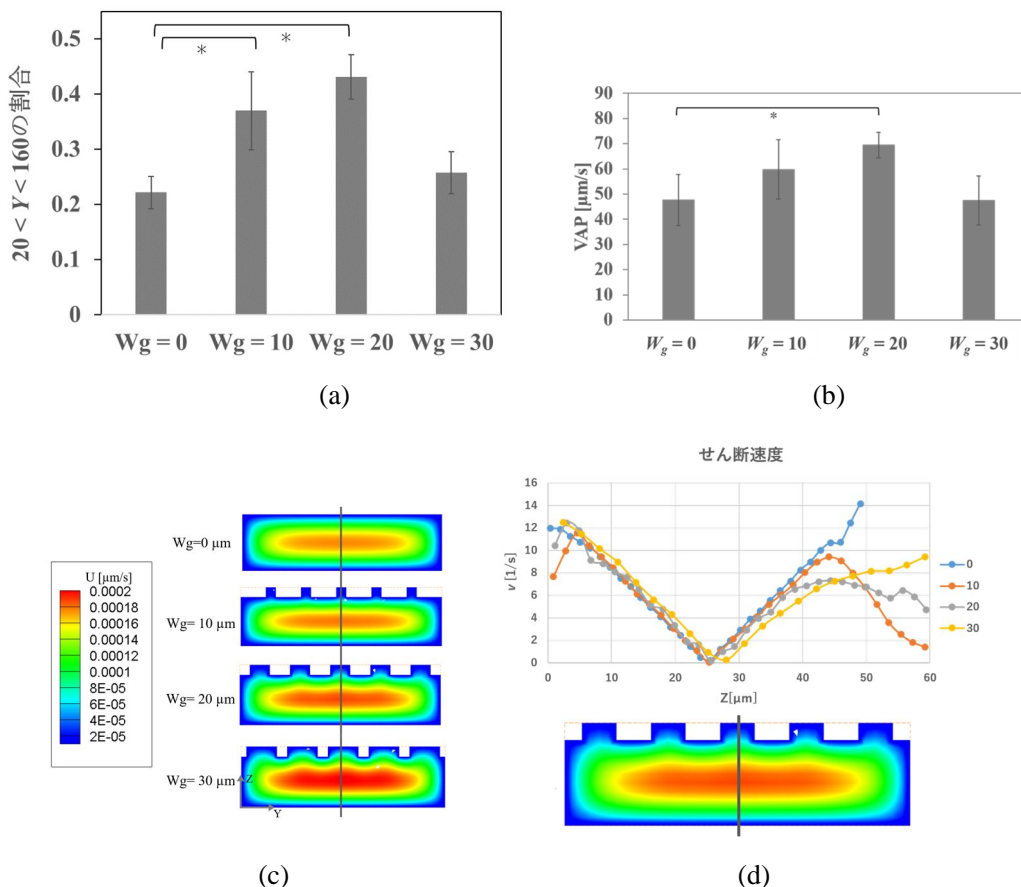


図 1 (a) 各溝幅における流路内精子分布の比較 (b) 平均精子速度の比較
 (c) 流路断面の流速分布 (d) 流路内せん断速度の比較

て精子平均速度が高いことが分かった。この原因をさらに調査するために、流体シミュレーションの結果から考察を行った。図 1(c)は流路断面の流速分布を示す。また、図 1(d)は流路の高さ方向 Z とせん断速度の関係を示す。ここで、せん断速度と精子の走流性には関連性があり、最も走流性を示すせん断速度は $2\text{--}7\text{ s}^{-1}$ であると報告されている。図 1(d)では、溝幅 $W_g = 10, 20\text{ }\mu\text{m}$ において、溝部分 ($Z = 50 \sim 60\text{ }\mu\text{m}$)のせん断速度が最も走流性を示す範囲に相当しており、溝幅 $W_g = 10, 20\text{ }\mu\text{m}$ の溝を設けることで、より多くの精子が溝に沿って遡上する可能性を示唆している。

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

まず、精子集積機構を有するマイクロ流体チップのテーパ部分における精子集積の様子を観察した。その結果、精子の動きは以下の 3 種類に分類されることが分かった。Type 1: 流れに逆らって進む精子。Type 2: 流れに流されている精子。Type 3: その場にとどまっている精子。上記の 3 種類の割合はテーパ角によって異なった。Type 1 の精子はほとんどが壁面付近で見られる。この理由として、壁面付近は流路中央に比べ流速が小さく精子遊泳の特徴的な性質である走触性に起因するところが多い。Type 2 の精子は壁面付近から離れたところに多い。最初は Type 1 の精子のように壁面付近を流れに逆らって進んでいるが、途中で壁面から離れてしまい流される様子が確認された。Type 3 の精子はほとんどがテーパ角 $\theta = 90\text{ deg}$ においてコーナーに集積している精子であった。次に、流路内平均流速がテーパ部周辺の精子濃度や精子速度に与える影響を調べた。図 2 に結果を示す。左上は実験の画像、右上がシミュレーション結果である。また、下図は、様々な流路内平均流速における流路内精子濃度分布の比較である。図より、流路内平均流速の違いによって、流路内でも、特にテーパ部における精子集積の傾向が大きく変化していることが分かる。また、実験結果と計算結果の精子濃度分布は比較的良好な一致を見せた。これにより、効果的に精子を集積させるための適切な流路内平均流速や集積効率を上げるチップ形状を特定させることが可能となった。

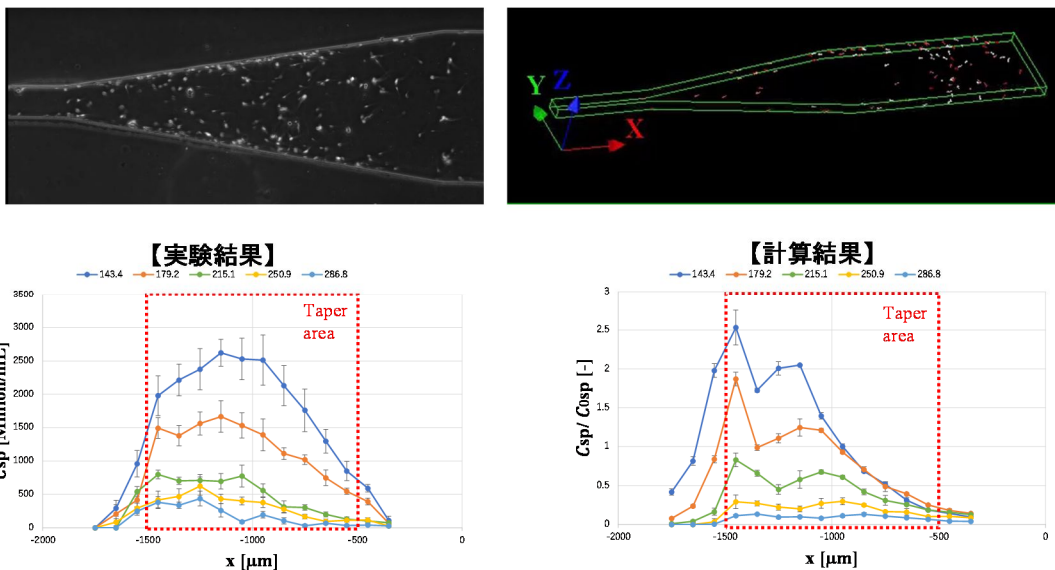
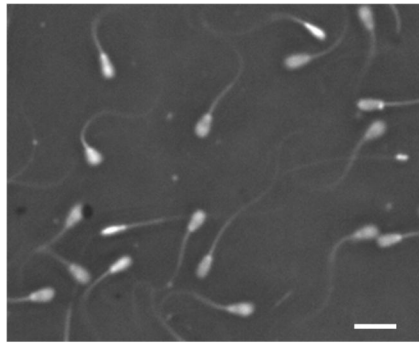


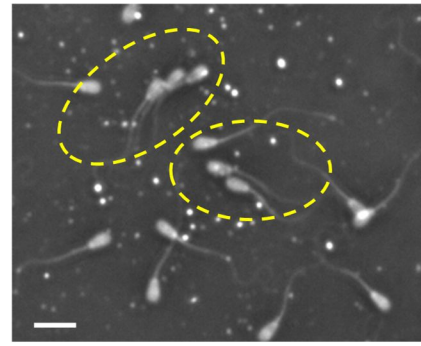
図 2 精子集積機構を有するマイクロ流体チップの結果 (左上: 実験の画像、右上: 計算結果, 下: 様々な流路内平均流速に対する流路内精子濃度の比較)

Shear thinning 粘弾性流体中における精子集団遊泳の観察

図 3 に、希釈した溶液中とポリアクリルアミド溶液中におけるウシ精子を観察した様子を示す。希釈した溶液中では精子はお互い同調することなく各々がランダムな方向に遊泳しているのに対して (図 3(a)), ポリアクリルアミド溶液中では黄色枠で囲った精子同士が鞭毛運動を同調させ、小さな集団を形成していることが分かる (図 3(b)). ポリアクリルアミド濃度や精子濃度によってクラスター形成の割合は変化した。マウスで見られる精子頭部の付着による集団遊泳とは異なり、ウシ精子の場合、流体力学的相互作用の結果、精子同士が同調していると考えられる。つまり、Shear thinning 粘弾性流体が精子の協調的な遊泳を促進しているといえる。さらに高濃度の精子遊泳の場合は、大きな集団を形成するものと考えられる。この現象は、実際の女性生殖器内で精子が受精に至る過程において大きな意味をもつ可能性がある。



(a)



(b)

図 3 (a) 希釈溶液中における精子遊泳の様子．ランダムに遊泳している (b) ポリアクリルアミド溶液中における精子遊泳の様子．黄色枠では精子同士の同調現象が見られる．スケールバーは $10\mu\text{m}$ を表している．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0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 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 百武徹	4. 巻 40
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

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回バイオフィロンティア講演会
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 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 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

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 Toranosuke Sakamoto, Yasutaka Hayamizu, Toru Hyakutake, Takeshi Gonda, Shinichi Morita, Shigeru Ohtuska, 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 坂本虎之助, 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 マイクロチャネル内の運動精子の挙動
3. 学会等名 日本機械学会中国四国学生会第50回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2019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

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 運動性精子選別チップ及びその方法	発明者 三田正弘, 安井学, 百武徹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-98540	出願年 2020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
---------	---------