

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09557

研究課題名（和文）ナノスーツ法による新しい精子評価方法の確立

研究課題名（英文）Characterization of ultrastructural morphology of human sperms by field-emission scanning electron microscopy using the NanoSuit method

研究代表者

宗 修平（So, Shuhei）

浜松医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：30647607

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：数ナノメートルの精子形態の“正常さ”を定義するためには光学顕微鏡では分解能が低い。NanoSuit法は、化学固定や脱水・乾燥といった試料の前処理を必要としない電子顕微鏡による生試料観察技術であり、生物個体を生きた状態のまま観察することができる。本研究ではナノスーツ法を精子サンプルに対し最適化し、本手法が精子形態異常の詳細な解析に有用であることを確認した。また、本法を用いることで、精子頭部における電子密度および元素の分布、さらには頭部形態的特徴と精子機能に関わるレクチンの結合パターンを定量的に評価する方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立したNanoSuit法を用いた電子顕微鏡観察技術による精子形態評価法は、これまでの光学顕微鏡観察像を正確にするだけでなく、精子の形態そのものについても新たな超微形態的知見を与えることを可能にした。また、本法を基礎とした精子頭部における電子密度および元素分布などの解析結果は、精子の形態と機能の関係を理解するための新たな視点をもたらし、さらにそれらを定量的に評価する手法の確立は、これまでにない男性不妊症評価法の開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Light microscopy has low resolution to define the "normality" of sperm morphology at a few nanometers. The NanoSuit method is a technique for observing a wet and alive biological sample with an electron microscope. In this study, we optimized the Nanosuit method for sperm samples and confirmed that this method is useful for detailed analysis of sperm morphological abnormalities. In addition, by using this method, we established a method to quantitatively evaluate the electron density and element distribution in the sperm head, as well as the morphological characteristics of the head and the binding pattern of lectins involved in sperm function.

研究分野：精子学

キーワード：精子 精子形態 男性不妊症 電子顕微鏡 ナノスーツ法 不妊治療

1. 研究開始当初の背景

不妊症の原因の半数は男性にある(Pierik et al., Int J Androl, 2000)。さらに近年、男性不妊症の増加が問題のひとつとなっている(Rahban et al., Andrology, 2019)。男性不妊症の診断に精子正常形態率は重要な評価方法であるが、数ナノメートルの精子形態の“正常さ”を定義するためには光学顕微鏡では分解能が低すぎる(図1)。一方、これまでの電子顕微鏡観察では、化学固定や脱水処理などの煩雑な前処理のために重要な形態情報が消失していることが危惧されている。そのため、これまでの方法では不妊症男性における精子表面構造の特徴を十分に評価できていない可能性がある。

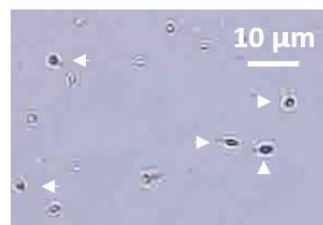


図1. 光学顕微鏡下の分解能は低く、数ナノメートルの精子の形態的特徴は十分に評価できない。矢頭は精子を指し示す。

2. 研究の目的

NanoSuit®(以下、ナノスーツ)法は、我々のグループによって開発された電子顕微鏡による生試料観察技術であり、従来の電子顕微鏡観察では必須であった化学固定や脱水・乾燥といった試料の前処理を必要としないため、生物個体を生きた状態のまま観察することができる(Takaku et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2013)。本研究では、ナノスーツ法を用いて生きた状態の細胞形態を保持しながら、高分解能で精子形態をFE-SEM観察・解析することで、精子形態の詳細な特徴づけを行う。

3. 研究の方法

精子はPBSで洗浄し、ARTフィルターによるムチン繊維などの除去を行った後、PolyL リジンコートスライドガラス上に適量を滴下した。ナノスーツ法では、この試料に低真空下でプラズマを照射し、精子の周りにナノスーツを形成させ観察に用いた。従来法では、2%グルタルアルデヒドで試料の一次固定を行い、1%オスミウムで二次固定後、エタノール脱水、*t*-ブチルアルコール置換、凍結乾燥を経て、オスミウムによる蒸着を行った。観察はJEM-7100F(JEOL)を用いた。精子へのレクチン結合性に関しては、15nmの金粒子が結合したWGA、ConA、PNAを用い、適量を精子と反応、銀増感を行い、電子顕微鏡下で観察を行った。

4. 研究成果

ナノスーツ法を精子サンプルに対し最適化し、従来の試料作成方法(従来法)との比較解析を行った。従来法で調整した精子では頭部の大きさがナノスーツ法で調整した精子に比べて有意に収縮していることが明らかになった($12.9 \mu\text{m}^2$ vs $11.6 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$)。この従来法における精子頭部の収縮は、固定・脱水・凍結乾燥などの煩雑な前処理が原因と考えられる。このようにナノスーツ法では、処理工程が少なく、試料作製に要する時間が短くだけ

でなく、その観察像はより本来に近い特徴が保持されていると考えられる。また本研究では、多くの男性不妊症患者の精子の形態的特徴づけを通して、本手法が精子形態異常の詳細な解析にも有用であることを確認した（図3）。

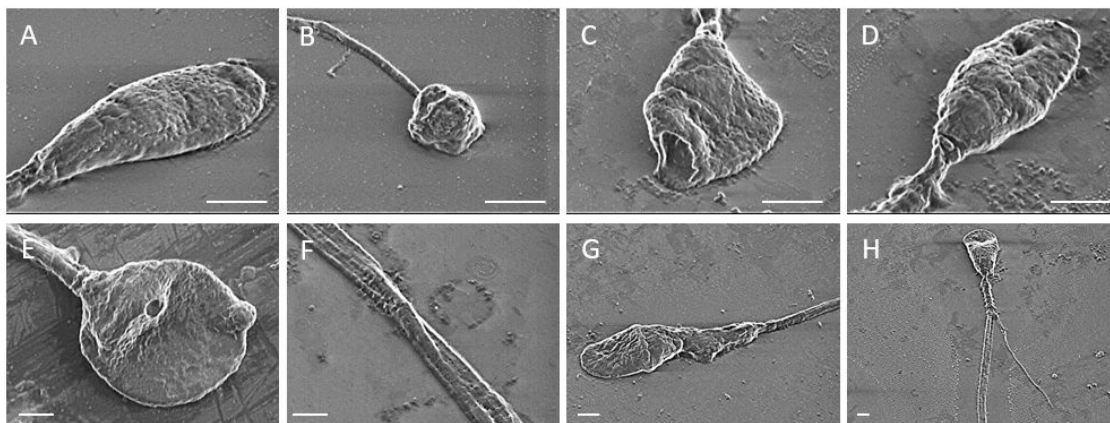
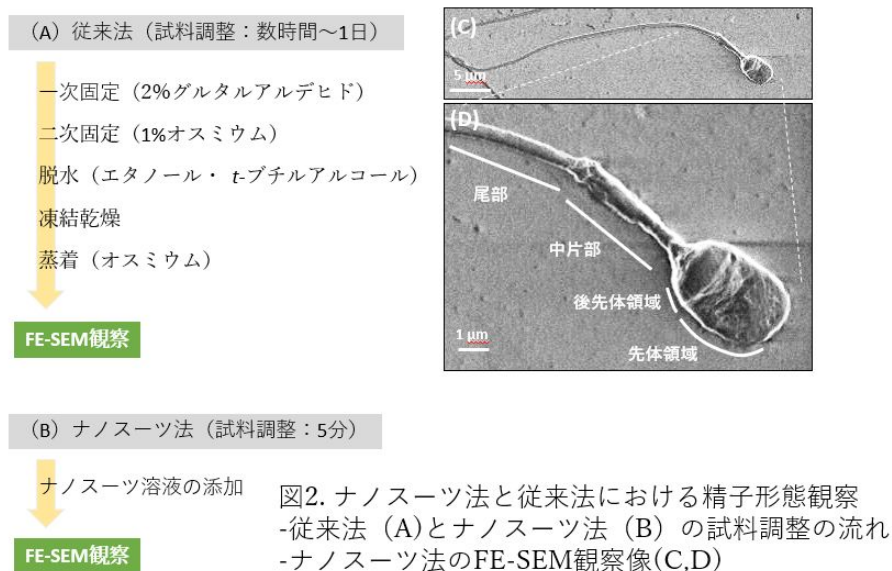


図3. ナノスーツ法により評価できる様々な精子形態異常の例

さらに我々は、観察時に SEM 加速電圧を 1kV から 5kV まで段階的に上昇させると、ナノスーツ法の試料のみ、部域ごとに異なる二次電子像が確認できることを明らかにした（図 4A）。この結果は、精子頭部に電子密度が高い領域と低い領域が存在することを示唆する。精子は、先端部分に比べ中央部が厚い形態的特徴を示し、その部位における素材の電子密度は高くなる。また、頭部が小さい精子程、この電子密度の高い領域の割合が多く（図 4B）、頭部全体に対し 50%程度を占める最頻値を示した（図 4C）。精子間のこのような特性に注視した解析例はなく、今後精子の質や男性不妊症に有用な指標になる可能性がある。また本

解析法は、小型で比較的安価な卓上電子顕微鏡でも評価可能であった。

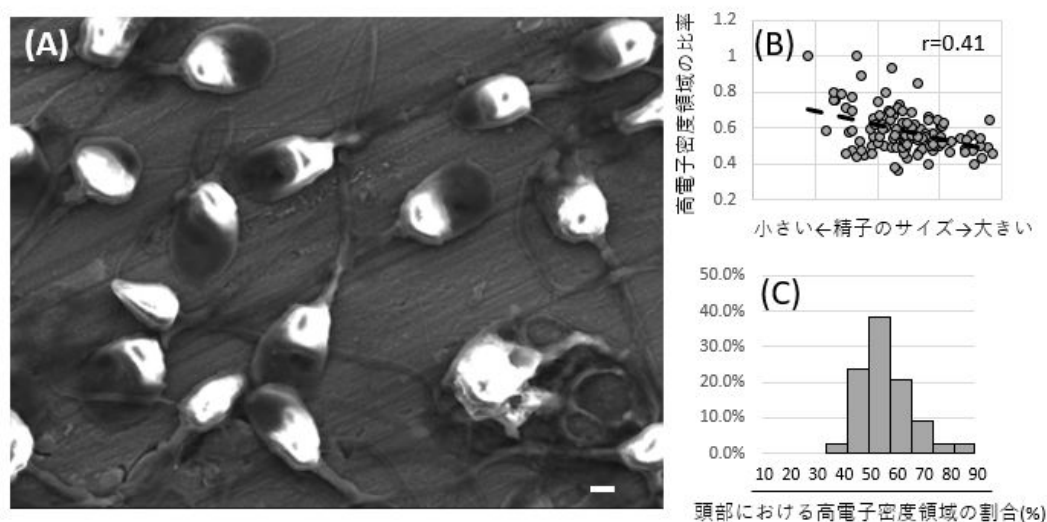


図4. ナノスーツ法を用いた精子頭部における高電子密度領域の特徴づけ

(A)精子頭部で検出できる高電子密度領域像（白色部分）

(B)精子の大きさと高電子密度領域の負の相関性：大きさが小さい精子は高電子密度領域が多い傾向

(C)頭部における高電子密度領域の分布

精子の形態的特徴は男性不妊症の指標として重要であるが、現在のところ、必ずしも精子の受精能と関連してはいない。それゆえ、形態的特徴と他の指標を組み合わせた複合的な評価が必要となる。そこで、本研究では“精子の元素レベルでの分析”および“精子のレクチン結合能”に着目した新しい精子評価指標の開発に取り組んだ。

まず精子頭部の元素組成を解析した結果、炭素、酸素、リンが主要な成分として検出された（図5A）。一方で、精子間におけるNaやClの検出量には差を認めた（図5B-D）。このような精子の塩類の取り込み能の違いは、受精能などの機能に関連している可能性が示唆される。

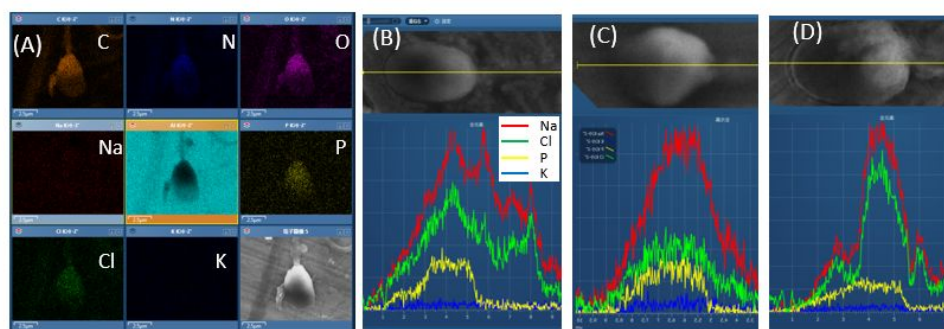


図5. 生きた状態の精子の頭部領域の元素分析

(A)元素分析により精子頭部で検出される元素、(B-D)精子頭部におけるNa、Cl、P、Kの分布と個体差

一方、精子におけるレクチン機能に関しては、PNA や ConA のようなレクチンが inner

acrosomal membrane へ結合することが報告されている。したがって、これらの先体領域への結合の有無は先体反応を起こした精子の特徴づけに有用である。また、post acrosomal membrane や equatorial region などの領域への結合特性を示すレクチンは、精子間で結合分布に差があることが知られている。しかし一方、レクチン結合分布の精子間差と詳細な精子形態的特徴の連関については不明である。その理由として、レクチン結合分布の解析の多くは光学顕微鏡下で行われているが、解像度が低く微細な構造まで評価することができないためである。我々はWGA、ConA、PNA の局在パターンについてナノスーツ法を用いて電子顕微鏡レベルで確認する方法の検討を行い、詳細な精子形態とレクチン結合部位を特徴付けに成功した(図6A-C)。さらに我々はレクチンに標識されている Au もしくは増感剤の Ag を元素分析により検出することで、これらのレクチン結合を定量的に評価する方法を確立した(図6D)。

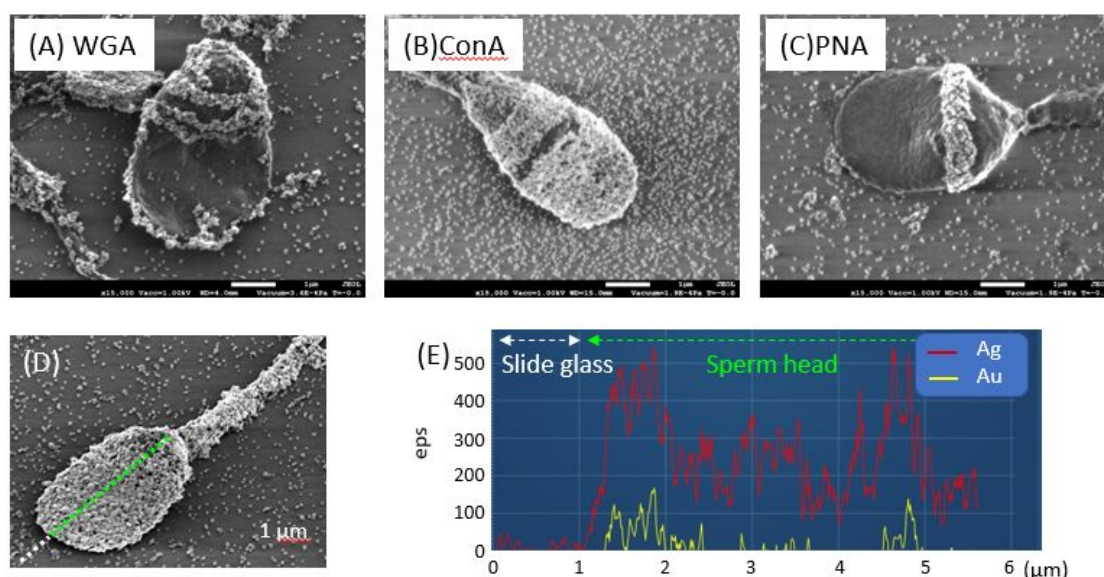


図6. ナノスーツ法による精子形態評価とレクチンの局在
(A-C)各種レクチンの結合パターンの一例：WGA(A)、ConA(B)、PNA(C)
(D,E) 元素分析による精子結合WGAレクチンの定量化

このように元素分布やレクチンの結合パターンは、精子形態と組み合わせることで精子機能や男性不妊症の診断に有用な可能性がある。現在、本研究で得られた成果を臨床応用する目的で、ナノスーツ法を用いた形態的特徴付けを基に体外受精成績を予測するアルゴリズム構築を目指している(AMED 研究課題：ナノスーツ法による精子形態評価の機械学習アルゴリズムの開発)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hariyama T, Takaku Y, Kawasaki H, Shimomura M, Senoh C, Yamahama Y, Hozumi A, Ito S, Matsuda N, Yamada S, Itoh T, Haseyama M, Ogawa T, Mori N, So S, Mitsuno H, Ohara M, Nomura S, Hirasaka M. | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 Microscopy and biomimetics: the NanoSuit method and image retrieval platform. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Microscopy (Oxf) | 6. 最初と最後の頁 1-12 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfab042 | 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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 宗修平 |
| 2. 発表標題 NanoSuit技術を用いたヒト精子の解析とその臨床応用 |
| 3. 学会等名 第40回日本受精着床学会総会・学術講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宗修平、俵史子、山口和香佐、宮野奈緒美、村林奈緒 |
| 2. 発表標題 小型分光光度計を用いた精液濁度測定による精子濃度評価の精度 |
| 3. 学会等名 第40回日本受精着床学会総会・学術講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宗修平、俵史子、村林奈緒 |
| 2. 発表標題 微量粘度計を用いた精しょう液粘度の定量評価と男性不妊症との関連性 |
| 3. 学会等名 第68回日本生殖医学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宗修平、高久康春、太田勲、依史子、針山孝彦 |
| 2. 発表標題 NanoSuit法を用いたFE-SEMによる精子超微形態の特徴づけ |
| 3. 学会等名 第40回日本アンドロロジー学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宗修平、高久康春、太田勲、依史子、針山孝彦 |
| 2. 発表標題 NanoSuit法を用いたFE-SEMによる精子超微形態観察法の確立 |
| 3. 学会等名 第38回日本受精着床学会総会・学術講演会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宗修平、依史子、金山尚裕、高久康春 |
| 2. 発表標題 NanoSuit法を用いた精子超微形態観察による新しい男性不妊症評価法の開発 |
| 3. 学会等名 第65回日本生殖医学会学術講演会・総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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 | 高久 康春 (Takaku Yasuharu) (60378700) | 浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・特任研究員 (13802) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|