

研究テーマ：微小流体チップ技術によって極微量精子液から回収したウシ性判別運動精子の顕微授精	
研究代表者（職氏名）：教授 堀内 俊孝	連絡先 (E-mail等)：toshi@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者（職氏名）：なし	

1. はじめに

2つの液層を2本の微小流路に通し1つの微小な流路に合流させると、この2つの液層は混合することなく流出する。この原理を応用した微小流体チップ、Microfluidic sperm sorter (MFSS)が考案され、極微量な精子液から運動精子を回収できる。このMFSSを用いることで、極微量なウシ性分別精子液から運動精子を回収することが可能になり、この運動精子を顕微授精に応用することで、性分別胚の作出が可能となり、胚移植によって性分別された子牛を生産できる。現在、我が国では、家畜改良事業団がソート90と言う名称で、ウシの性分別した凍結保存精子液を販売している。この精子液の容量と精子濃度は著しく少なく、人工授精での受胎率は必ずしも高くない。そこで、本研究は、MFSSを用いて極微量な精子液から運動精子を回収する技術を確立し、顕微授精による胚発生を検討した。次いで、性分別精子を用いてMFSSによる運動精子の分離を行い、顕微授精による胚作出と子牛生産を試みた。

2. 微小流体チップ、Microfluidic sperm sorter :MFSS とは？

約1cm x 2cm、高さ5mmの石英ガラスに、左側に2カ所の入口、右側に2カ所の出口があり、左右を繋ぐ約50 μ mの幅の微小な流路がある。この微小な流路では、左側の2カ所の入口から流入した液体が混ざることなく、右側の上下の出口に流出する。左側上部の入口から流入した精子液は右側上部の出口から流出する。左側下部の入口から流入した精子回収液は中央部では精子液と混合することはなく、運動精子が自身の運動によってこの境界を越えてくる。そのため、右側下部に運動精子が回収される。

3. MFSS を用いた運動精子の回収

(1) 精子回収液のアルブミン添加が運動精子率と回収精子濃度率に及ぼす影響

ウシ凍結保存精液ストローを約1cmカットし約40 μ Lの極微量な精子液を採取した。精子洗浄液(Sperm washing medium:SPW)で1:3に希釈した。精子回収液にSPW液を使用し、この液に0, 0.1%, 1%ウシ血清アルブミン(BSA)を添加したときの運動精子率と回収精子濃度を調べた。インキュベーション5分から10分間の運動精子率は86%から92%であり、回収精子濃度(sperm/ μ L)は5分間より10分間で高く、BSA添加濃度の増加に伴い増加した。1%BSA添加条件での回収精子濃度が最も高かった。

(2) ペントキシフィリン添加が運動精子率と回収精子濃度に及ぼす影響

精子回収液(SPW液)への10mMペントキシフィリン(PF:精子のcAMP濃度を増加させ、運動性を活発にさせる薬剤)無添加または添加による運動精子率は、インキュベーション5分間と10分間で各73%と84%、各69%と78%で、PF添加によって有意に高くなった。回収精子濃度は、各53と93 sperm/ μ L、各113と193 sperm/ μ Lで、5分間と10分間ともにPF添加区で回収精子濃度は有意に高くなった。

(3) 添加液量による静止水圧差による流速が運動精子の回収率に及ぼす影響

精子液と回収液の流入量を変えることで、流速を低速(約0.17mm/sec)と高速(約0.26mm/sec)として、流速が回収精子濃度に及ぼす影響を調べた。その結果、2頭の種雄牛ともに、高速の流速において低速よりも回収精子濃度は高くなった。

4. 微小流体チップ、MFSSを用いて回収した運動精子の顕微授精

(1) MFSS における回収前後の運動精子率

種雄牛 A と B の MFSS による回収後の運動精子率は各 80%と 89%で、回収前の各 69%と 71%よりも有意に高くなった。

(2) MFSS を用いて回収した運動精子の顕微授精による胚発生

種雄牛 A と B からの凍結保存精液ストローを約 1 cm カットし、極微量の精子液（約 40 μ L）を採取した。MFSS を用いて極微量な精子液から運動精子を回収した。回収したウシ運動精子を顕微授精に用いた。対照区を通常の 1 本の精液ストローを希釈し SPW 液で遠心洗浄する方法とした。ウシ卵子は屠畜卵巣から採取し未成熟卵子を体外成熟させた。種雄牛 A と B の MFSS 法または遠心法で分離したウシ精子の顕微授精による卵割率は、各 80%と 83%、各 90%と 76%で有意な差はなく、胚盤胞率も各 24%と 22%、各 27%と 24%で有意な差はなかった。発生した胚盤胞の総細胞数も同様であった。

5. 性判別精子液から微小流体チップによる運動精子の回収と顕微授精

(1) 性判別精子液からの MFSS による運動精子の回収

ホルスタイン種の性分別（X 染色体保有）精子の凍結保存ストロー（通常の精子濃度の約 1/10）を約 1cm カットし、極微量な精子液（約 40 μ L）から MFSS を用いて運動精子を回収した。運動精子率は回収前 65%から回収後 81%に有意に増加した。

(2) 性判別精子を用いた顕微授精による胚発生

高スピード・ソーティングによって性分別された精子の胚発生への影響を同一種雄牛の未性判別精子の顕微授精と比較することで評価した。性判別または未性判別精子の顕微授精による 2 細胞期胚率は各 77%と 81%、胚盤胞率は各 27%と 29%で有意な差はなく、約 30%が移植可能胚に発生した。

(3) 経膈採卵によって得られたホルスタイン種の卵子への性分別精子の顕微授精

性分別（X 染色体保有）精子液から MFSS によって運動精子を回収し、顕微授精を行った。4 頭のホルスタイン種雌牛から総計 32 個の成熟卵子が得られ、顕微授精後に生存した卵子数は 28 個 88%であった。このうち、卵割卵数 13 個 46%、胚盤胞率 9 個 32%であった。この 9 個の胚からバイオプシーし一部細胞を採取した。LAMP 法によって性判別を行った結果、すべて雌胚であった。この性判別胚 5 個を 5 頭のレシピエントに胚移植を行った。その結果、2 頭（40%）のレシピエントが受胎した。その他の 2 個は凍結保存され、2 個は退行した。

6. まとめ

微小流体チップ、Microfluidic sperm sorter(MFSS)を用いて、極微量（約 40 μ L）の精子液から運動精子を回収する技術を確認した。極微量な精子を遠心分離のため希釈すると精子は運動性を停止してしまう。MFSS を用いることで遠心分離することなく、耐凍剤を含む精子液から運動精子のみを分離することが可能となった。この方法は、精子濃度が非常に薄い性分別精子液にも応用できた。MFSS によって回収した運動精子を顕微授精することで、胚盤胞に発生した。さらに、ホルスタイン種雌牛から経膈採卵された卵子への性分別精子の顕微授精によって、胚盤胞が得られ、胚移植によって受胎が確認された。

以上、本研究では、極微量な性分別ウシ精子液から運動精子を分離する技術を確認し、顕微授精によって移植可能胚を作出できること、胚移植によって胎子に発育することを明らかにした。