

## On-chip Sortを用いたマウス精子の分離に関する条件検討

### Introduction

近年、先進国における適齢期の不妊カップルの割合は15%を超えつつあり、わが国でも晩婚化による高齢出産の機会が増加していることに伴い、生殖補助技術によって得られた産仔数は全体の1.5%に達し、治療を続けている患者数も50万人に達するとされている。現在、その生殖補助医療では主に人工授精法が行われているが、これには主な手法が2つある。1つは体外受精法(IVF:2010年度ノーベル生理学・医学賞)で、成熟した精子と卵をそれぞれ体内から採取して培養条件下で混合(媒精)して受精胚を得る。もう1つは顕微授精法(ICSI)で、同様にして体内から採取した卵に対して、ガラス針を用いて精子(または未成熟精子細胞)を導入する。受精卵を得られる可能性が高いため、現在、多くの治療現場では後者の顕微授精が多く用いられているが、近年、顕微授精による操作ストレスによって、染色体構造・遺伝子のエピジェネティックな状態に変化があるとの報告もあり、より自然に近いIVF法を見直す動きがある。

しかし、ICSIに対してIVFは成功率が不安定であることが不利な要件として挙げられる。この理由は、卵と混合する際の精子濃度の判断が難しい点にある。受精に至る精子は、卵と混合する前に前培養を経て、その中で受精能獲得と呼ばれる生理的变化を起こし、運動性を変化させ、先体と呼ばれるオルガネラが崩壊しやすい状態になる必要がある。しかしながら、特に泳いでいる精子を用いて、透過光でオルガネラの変化を見ることは不可能に近い。そのため、IVFに供する精子の濃度は主に運動性によって判断するしかなく、本当に受精できる精子の濃度という観点においては、不確定な要素が多く存在していた。我々は、これまでに先体の崩壊を蛍光で検出できる遺伝子改変マウスを作製してきたが、精子は~100 $\mu$ mに及ぶ細い鞭毛をもった特殊な構造と、物理的ストレスや温度変化によってたやすく運動性を失う性質のため、これまでのセルソーターを用いてこの変化を起こした精子を選り分けても、分取後に卵を受精する能力が残らないといわれてきた。そこで、本研究ではOn-Chip Sortによるストレスフリーな分取を用いることで、運動性や受精能の損失を減らせるのではないかと考え、前述の遺伝子改変マウスの精子を用いて、分取の効果と運動性の残存などについて検討した。その結果、分取後もIVFに有用な精子濃度を確保でき、運動性の損失も最小限に抑えられる条件を確定することができた。

本内容は、大阪大学 佐藤先生にサンプルを供与頂き、共同でおこなったものである。

### Material&Methods

#### 実験材料:

- ・成熟♂野生型マウス(8-12週齢)
- ・成熟♂遺伝子改変マウス(Red Body-Green Sperm: 8-12週齢)
- ・成熟♂野生型マウス凍結精子サンプル(理研BRC提供によるプロトコルで作製)
- ・マウス人工授精用培地TYHメEDIUM
- ・3% PVP入りTYHメEDIUM
- ・1.5% PVP入りTYHメEDIUM

#### 新鮮精子の採取と培養:

成熟♂マウスから精巣上体を採取した。精巣上体尾部の管構造を部分的に破損させ、管から押し出されてくる成熟精子を、あらかじめインキュベーター中で37°C、5% CO<sub>2</sub>環境下に平衡化した100 $\mu$ l TYHメEDIUM中に採取した。

精子濃度の測定は、精子の遊泳で溶液が均一になった~15分後に血球計数盤を用いて行った。

## 精子運動性の検定

常法に従い、顕微鏡下に簡易型インキュベーターを設置し、保温下で運動している精子の割合を計測した。判定は採取直後と、採取から30分後の2回行った。



## 凍結精子の解凍と培養:

マウス精子用凍結培養液(TYH)を37°C温水で融解する(融解前・後では色は黄色)

↓

フラスコまたはシャーレに5ml分注し、蓋を開けた状態で37°C CO<sub>2</sub>インキュベーターへ入れ、培地にCO<sub>2</sub>を含ませる。(時々揺らしてをCO<sub>2</sub>を十分含ませる)

↓

24well plateへ500μl分注しする。(解凍する精子の本数分)37°C CO<sub>2</sub>インキュベーターで温めておく。

↓

凍結精子の解凍

-80°Cより凍結ストローを取り出し、空気中で10秒保持したあと37°C温水で15分

↓

ストロー周囲の水滴を拭き取り、白濁した精子液とオイルの間をハサミで切り取り(両端)、培地を入れた24wellプレート上でストローを傾け、チップのついたピペットの空気圧でwell中へ精子を押し出す。

↓

40分~60分37°C CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養する。

↓

培養液の上清部分に運動性のある精子が集まるので、上清400μlほど、エッペンチューブへ移し、トリパンブルーで染色しカウントする。

## On-Chip Sorterによるマウス精子ソーティング 1:凍結精子

マウス精子が形態・性質的に本セルソーターに適しているかを確認するため、凍結精子を材料に、標準サンプルバッファーを用いて、流路における精子の詰まり・吸着について検証した。

上清を除去し、on-chip標準サンプルバッファーで $1 \times 10^6$ /mlになるよう懸濁し、解析を行う。

On-Chip Sortを用いてソーティング最適流速(1.4kPa)にて解析(Figure.1)。

↓

残った精子液を遠心し(1000rpm 5min) on-chip標準シース液に懸濁後、PIとSYTO9で染色(final concentrations were 0.09uM each)

↓

SYTO9 positive cells (生細胞)をSorting

↓

Sorting回収リザーバーの顕微鏡観察(ソーティングされたかの確認)

## On-Chip Sorterによるマウス精子ソーティング 2:新鮮精子

全ての条件において、野生型またはRBGS遺伝子改変精子はTYHメディウムによって $2 \times 10^6$  cell / mlに懸濁し、ソーティングまでに前培養を1.5時間、37°C、5% CO<sub>2</sub>にて行った。

流路のプライミングを1.5% PVP入りTYHメディウムで行い、そのほかのチャンパーにはTYHメディウムを充填し、操作をしないときにはチャンパーを37°C、5% CO<sub>2</sub>にてインキュベートした。

↓

上清を除去し、TYHメディウムで $1 \times 10^6$ /mlになるよう懸濁し、ソーティングの直前に最終濃度10μM PIを含む3.0% PVP入りTYHメディウムと1:1で混合し、サンプルウェルにアプライし、操作を開始した。On-Chip Sortを用いてソーティング最適流速(1.4kPa)にて解析(Figure.3)。

↓

PI negative cells (生細胞)の中から、特定のpopulationをSorting

↓

Sorting回収リザーバーの顕微鏡観察(ソーティングされたかの確認)

## 他社製セルソーターとの比較

RBGSマウスの精子を2時間TYHメディウム中で前培養し、 $1 \times 10^6$  cell/mlに濃度を調整したのち、Dsred2とGFPの蛍光を指標に分離した。

# Results

## On-Chip Sorterによるマウス精子ソーティング 1:凍結精子



マウス精子(未染色)をOn-chip Sortで解析を実施した結果、マウス精子は、詰まる事なくカウントされ、FSC-SSCの分布を確認することが出来た。また、マウス精子をPIとSYTO9で染色した後にOn-chip Sortで解析しても、同様に詰まる事なく解析が可能であった。

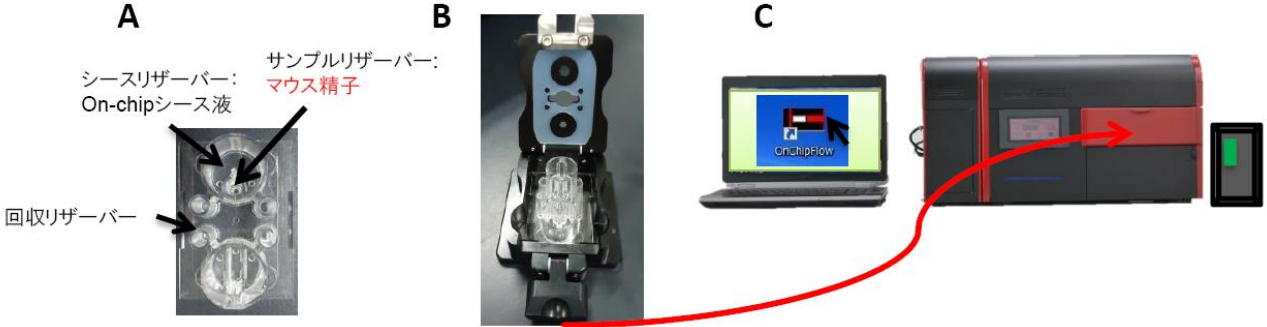


Figure 1. On-Chip Sortを用いたマウス精子の解析の概要。A. ソーティングチップにサンプルとシース液を添加した場所。B. ソーティングチップをチップフォルダにセットした様子。C. On-chip Sort本体と、本体にチップフォルダをセットした場所を赤い矢印で示した。

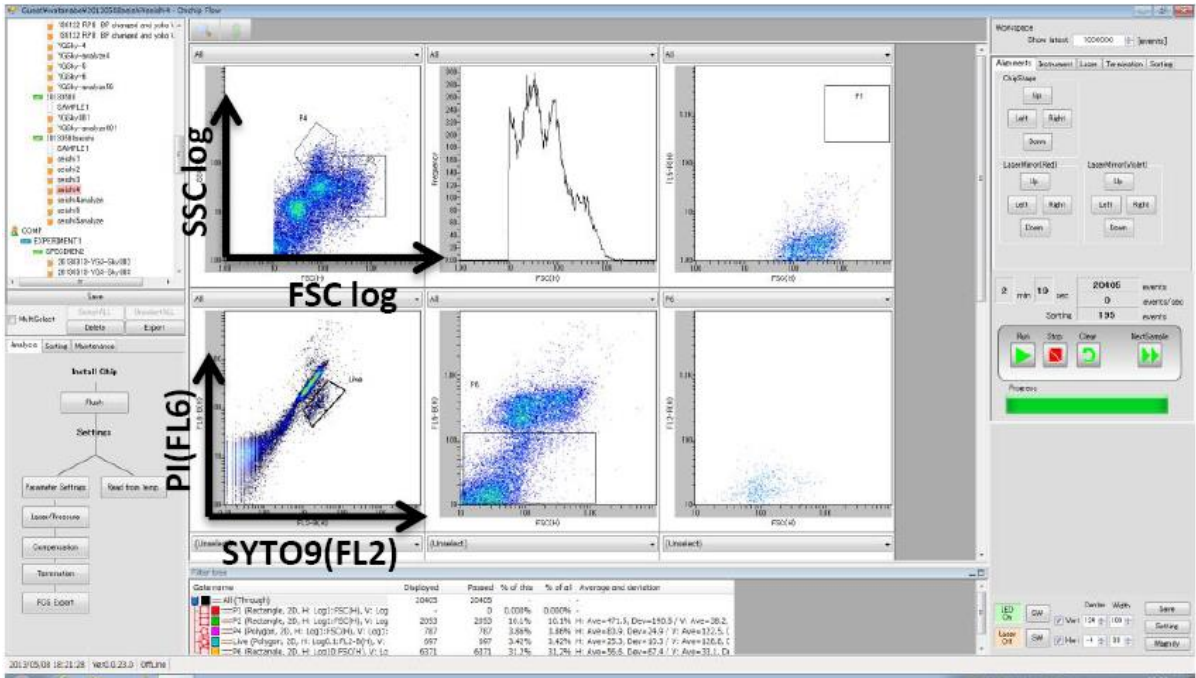


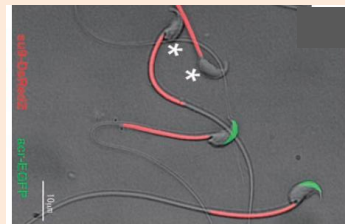
Figure 2. On-Chip Sortのソフトウェアを用いたマウス精子の解析結果。PI(0.09uM)とSYTO9(0.09uM)で染色したマウス精子を解析が可能であった。

### (参考1) 低濃度IVF条件の検討

	受精卵	未受精卵	受精率
1 TYHメディウム (1.0 x 10 <sup>5</sup> /ml)	111	5	95.7
2 TYHメディウム (1.0 x 10 <sup>4</sup> /ml)	110	5	95.7
3 市販Fメディウム (1.0 x 10 <sup>5</sup> /ml)	100	5	95.2
4 市販Fメディウム (1.0 x 10 <sup>4</sup> /ml)	70	33	68.0

TYHメディウムを用いた場合、1.0 x 10<sup>4</sup>cell/ml (2の条件)でも受精率に影響はない。他のメディウムでは影響が見られるため、今回はこれを低濃度IVFの条件として設定した。

### (参考2) RBGS精子



精子頭部の先体にGFPを、頭部のミトコンドリア中にDsRed2を発現する遺伝子組換えマウスの精子。

## On-Chip Sorterによるマウス精子ソーティング 2:新鮮精子

新鮮精子を用いた場合、分取後のチャンバーへの結合は顕著に減少した。

また、TYHメディウムをベースとしても分取は問題なく行われた。一方、野生型精子を用いて検討を行った結果、組織夾雑物と精子との分離が不明瞭で、PI陰性ポピュレーションとの分離が難しかったが、RBGS精子を用いて精子特異的シグナルを分取した場合は、明瞭に蛍光シグナルを認めることができた。また、分取後の精子は分取直後も、30分後も同様に十分な運動性を有していた。

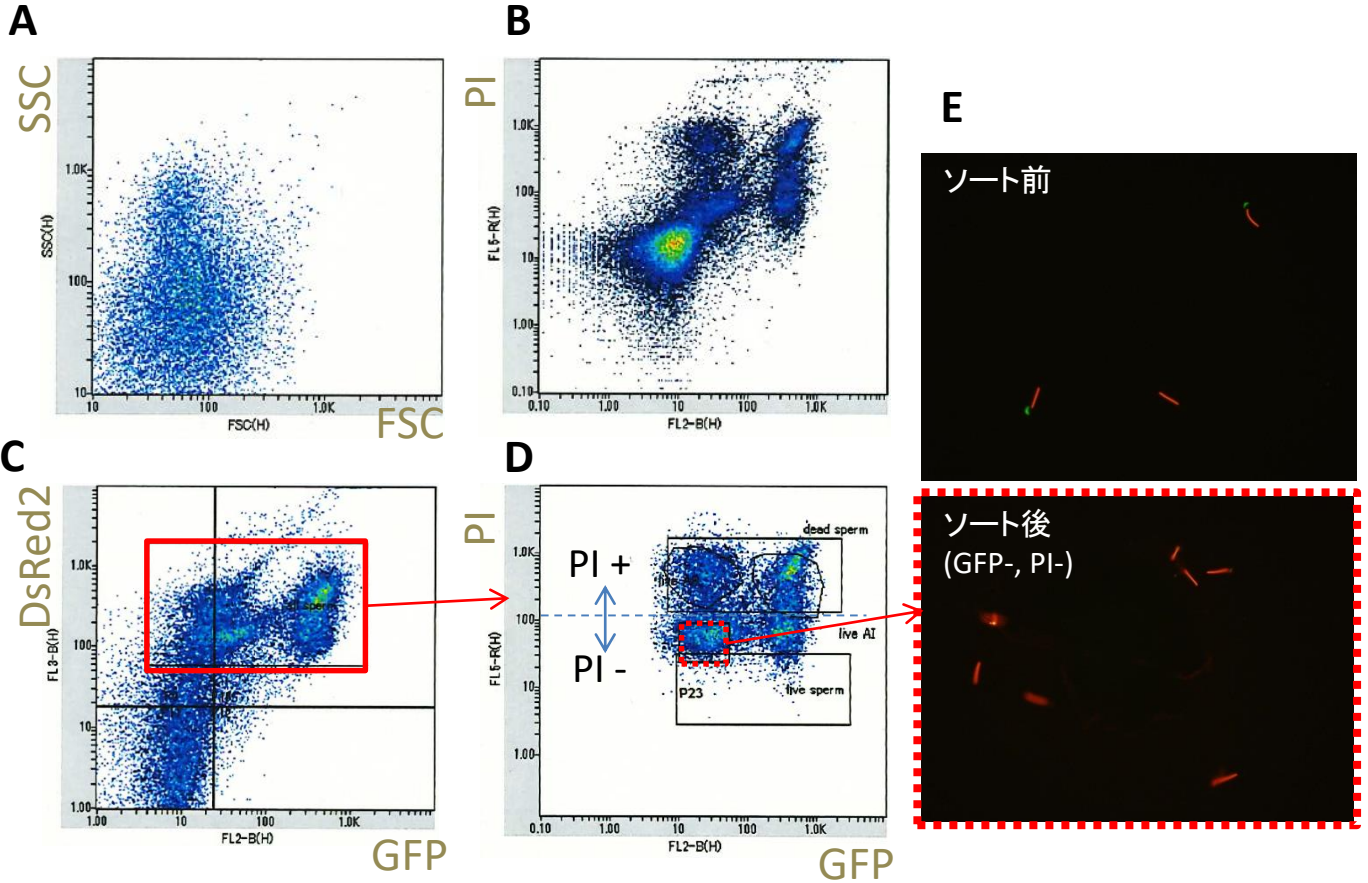


Figure 3. On-Chip Sortを用いた新鮮マウス精子のソーティング。A.B DsRed2を用いない(野生型と同様)分離条件での結果。FSC/SSCによる分離で細胞と夾雑物との境界が不明瞭だった。C. DsRed2のシグナルを指標に精子由来のシグナルを分離した結果、D.E.のように、GFP +/-、PI +/-の4つのポピュレーションを分離することができた。

## 他社製セルソーターとの比較

分離において、FSC/SSCでの精子の夾雑物からの分離が可能であった。一方、分取した精子の運動性は、採取直後に高かったが、30分には大きく減衰していた。

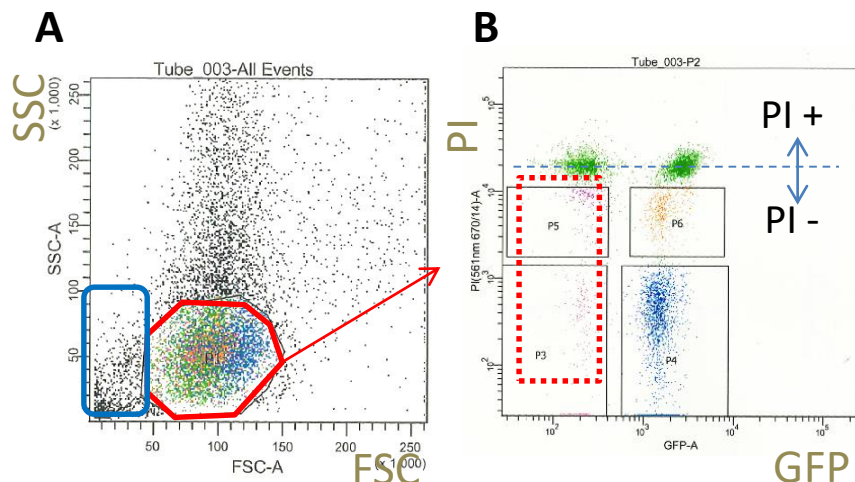


Figure 4. 他社製セルソーターを用いた分取例。A.組織夾雑物(青囲み)は、FSC/SSCによって精子と分離することが可能であった。B.はPI/GFPを用いた分離の結果。赤点線で囲んだのはFigure3で採取したものと同一集団。

## Conclusion

精子は細胞膜を修復する能力が低いいため、哺乳類精子(特にマウス精子)は衝撃や遠心分離などの操作ストレスに弱い。また自己増殖能がないので、分離後に培養して細胞数を確保することができない。このため、採取した精子をいかに希釈せずに人工授精培地に供するかが重要な点である。

凍結精子を用いて検討した結果(Figure 1 & 2)では、マウス精子が運動性を損なわず、また流路のつまりもほぼなく回収できることが分かった。一方、ソートされた精子は運動性を示すが、流路への吸着が認められた。これについては、凍結精子は新鮮精子に比べて細胞膜の損傷が多く物理的な刺激に対して弱くなること、損傷した細胞膜は非常に粘性が強く、容器への非特異的吸着を招きやすいことが知られているため、新鮮精子を用いることで解決することが示唆された。また、回収後の精子濃度は $\sim 3000\text{cell}/200\mu\text{l} = 1.5 \times 10^4 \text{ cell/ml}$ となったが、これはIVFの低濃度限界( $\sim 1 \times 10^4 \text{ cell/ml}$ )に近かった。効率よくIVFを行うためには、培地の組成が非常に重要であるため、標準シース液を用いて分離した場合、(遠心操作をせずに)この濃度の出発材料を希釈してIVFの培地へと持ち込むのは難しいと思われる。

上記を踏まえて、新鮮精子を材料に、ソート液をIVF用のTYH培地をベースとしたものに変更して実験を行った結果(Figure 3)、凍結精子を用いた時と比較して、ソート後の精子の残留が顕著に減少した。このことから、上記の懸念は、細胞膜損傷が少ない新鮮精子を用いることで回避できると思われる。精子を採取した際の組織夾雑物と精子との分離については、RBGS精子で解決することができたことから、精子になんらかの(蛍光)マーカーを用いることで回避できると思われる。また、運動性の高い精子だけを溶液中から回収するスイムアップ法を併用することで改善されると思われる。

従来型(ドロップ分離型)のセルソーターでは、分取後の精子の運動性が低下した(Figure 4.)。これは哺乳類の精子が細胞膜に損傷を受けた後、おそらくCaイオンの流入などによってしばらく( $\sim$ 数十分)高い運動性を保持する現象に類似しているため、分離中・直後に液滴中に閉じ込められた精子が衝撃を受けたためと予想している。また、乾燥と衝撃の緩和のために最初から多量の培養液を用意する必要があり、希釈されてしまう(下表)。このため分離速度は早いですが、体外受精に供する濃度( $1 \times 10^4 \text{ cell/ml}$ 以上)を確保する場合は難しいと考える。

	他社製セルソーター	On-Chip sorter
細胞採取前の培地量(受け側)	約1000 $\mu\text{l}$ (推奨)	微量 ( $\sim 10\mu\text{l}$ )
$1 \times 10^4/\text{ml}$ になるまでの採取時間	最長で25分	最長で6分
最終容量	約1500 $\mu\text{l}$	150-180 $\mu\text{l}$
培地の組成 (シース液/受け側)	シース液/任意	任意/任意
培地の保温	有	無

On-Chip Sortは、上記のような条件の検討により、ソーティング中のダメージが少ないだけでなく、溶液の選定が比較的フレキシブルであることから、マウス精子の運動性を保ったまま選別する最適なデバイスとして利用可能であると考えられる。今後、FSC/SSCによる精子の選別が可能になり、分取中のチャンバーを保温できるようになることで、IVFに供する精子の選別に十分なクオリティを発揮することが予想される。



<http://www.on-chip.co.jp/en/>

**On-Chip Biotechnologies Co., Ltd**

#204 Venture Port  
2-24-16 Nakacho, Koganei city  
Tokyo 184-0012 Japan  
Phone +81-42-385-0461  
Fax +81-42-385-0462  
email [info@on-chip.co.jp](mailto:info@on-chip.co.jp)

**The world's first, flow cytometer using microfluidics chip**

Excellent operability and maintainability, a flow cytometer with brand-new technology