

## 中尾聡宏氏の学位論文審査の要旨

### 論文題目

マイクロ流路チップセルソーターを用いたマウス精子選別技術の開発  
(Development of mouse sperm sorting system using microfluidics chip cell sorter)

体外受精は、生殖医療における不妊治療や家畜および実験動物の繁殖において汎用されている技術である。これまで、マウスバンクにおける遺伝子改変マウスの作製、保存、供給に有用な生殖工学技術が開発されてきた。これらの研究によって、体外受精において受精率を向上させるには、精子前培養培地中で受精能獲得を誘起し、受精能獲得を起こした精子を選別して卵子へ媒精することが重要であることが明らかとなっている。精子選別の手法として、細胞分離に汎用されるセルソーターの利用が有効であると考えられるが、従来のセルソーターでは物理的ダメージにより運動能がある精子を回収することが困難であった。近年、低侵襲性のセルソーターであるマイクロ流路チップセルソーターが開発され、神経細胞や幹細胞等の選別が困難な細胞においてもそれが可能になっている。そこで本研究では、マイクロ流路チップセルソーター技術を応用し、受精能獲得精子の選別を可能にする精子選別システムの開発を目的として以下の研究を行った。精子および卵子は、C57BL/6 系統の雄および雌マウスから採取した。精子選別には、マイクロ流路チップセルソーターを用いて、選別した精子について運動能、受精能および発生能を評価した。まず、散乱光により精子を分取し精子運動性解析装置により運動能(検討1)を、体外受精により受精能(検討2)を、体外培養および胚移植により発生能(検討3)を、それぞれ評価した。つぎに、先体反応を受精能獲得マーカーとし、精子選別技術の開発を行った。先体反応精子は PNA Lectin-FITC により標識し、蛍光強度により AR-low、AR-middle および AR-high の3区に選別し、先体反応選別精子の先体反応陽性率を蛍光顕微鏡により観察した(検討4)。また、先体反応選別精子の運動率を、運動性解析装置を用いて評価した(検討5)。さらに、先体反応選別精子の体外受精における受精能(検討6)を、また体外培養または胚移植による発生能(検討7)を評価した。

その結果、検討1では、マイクロ流路チップセルソーターは、最適条件の設定により運動能を有した精子の回収が可能であった。検討2では、マイクロ流路チップセルソーターにより回収した精子は体外受精による受精能が確認された。検討3では、回収した精子より作製された胚は、体外培養により胚盤胞に、胚移植により産子へと発生した。検討4では、AR-high および AR-middle 区では80%以上の精子が先体反応陽性精子であった。一方、AR-low 区では、先体反応精子は約半数であった。検討5では、AR-low、AR-middle および PNA-high 精子において、運動性の違いは認められなかった。検討6では、AR-low 精子と比較し、AR-high 精子で高い受精率を示した。最後の検討7では、先体反応選別精子を用いた体外受精により作製された胚は、体外培養により胚盤胞に、胚移植により産子へと発生した。

審査では、体外受精における精子運動の意義、セルソーターによる選別前後の精子運動能の相違、精子の散乱光による分画パターンの解釈、回収精子の受精能評価における精子数、精子への物理的刺激の影響の種差、先体反応精子の受精能獲得マーカーとしての評価、先体反応精子の PNA Lectin-FITC による標識結果の解釈、先体反応選別精子への Lectin の影響、先体反応選別精子の評価の正確性、受精能獲得精子の運動能の評価、受精能未獲得精子の受精能に及ぼす影響、PNA Lectin-FITC 標識法のヒトへの応用、Hoechst を用いた性選別法のヒトへの応用とその倫理性など、多くの質疑がなされたが、申請者からは概ね適切な回答あるいは考察がなされた。

本研究では、マイクロ流路チップセルソーターを用いることで、運動性および受精能を維持したまま、マウス精子の選別が可能であることが明らかとなった。また、先体反応をマーカーとして精子を選別することで、先体反応を起こしている精子において高い受精率が得られることも示された。これらの知見は、受精能獲得マーカーによる精子の選別技術を用いた体外受精法の有用性を示すとともに、臨床や様々な動物種における体外受精の課題を解決する新規技術の開発に活用できる可能性があり、学位授与に値する研究として評価された。

審査委員長 産科婦人科学担当教授

中尾聡宏