

## 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)

### 【目的】

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。これまで当研究室では、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を開発してきた。これまでの研究により、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分かっている。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だった。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選別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行った。

### 【方法】

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、体外受精により受精能、体外培養および胚移植により発生能を評価した。さらに、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 PNA-low、PNA-middle および PNA-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。さらに、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。また、先体反応選別精子の体外受精における受精能および、体外培養または胚移植による発生能を評価した。

### 【結果】

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。また、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、体外受精により受精能が確認された。体外受精により得られた胚は、体外培養により胚盤胞、胚移植により産子へと正常に発生した。PNA Lectin-FITC により標識し、選別した精子は、PNA-high および PNA-middle では 80 %以上の精子が先体反応陽性精子であった。一方 PNA-low では、先体反応精子は約半数であった。選別した精子の運動性は、PNA-high、PNA-middle および PNA-low 精子において変化は認められなかった。一方、体外受精における受精率は、PNA-low 精子と比較し、PNA-high 精子は高い受精率を示した。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正常に発生した。

### 【考察・結論】

以上、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を明らかにした。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を示した。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共に、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応用できる可能性がある。