

生殖医療・育種デバイス

松浦 宏治*・成瀬 恵治

はじめに

生殖工学・家畜育種技術の経緯について最初に説明する。1950年の家畜改良増殖法以降、能力の高い雄牛の精液を採取し、これを多数の雌に人工的に受精させる人工授精が我が国でも行われ始めた¹⁾。ヒトの場合、1969年に体外受精が成功しており、1978年、イギリスで世界最初の体外受精による女の子が誕生した²⁾。細胞操作マイクロマニピュレータを用いたヒト卵子の授精にはいくつかの方法が試みられてきた。紆余曲折の結果、卵細胞質内精子注入法 (Intracytoplasmic Sperm Injection: ICSI)³⁾が現在中心に行われている。1992年には初めてICSI (顕微授精) によって4例の妊娠が報告された^{3,4)}。1990年代以降、マウスゲノム研究が盛んに行われるようになり、マウス生殖工学技術は必要不可欠な技術として急速に広まった²⁾。上記の歴史を振り返ると、家畜育種技術とヒト生殖補助医療は互いに関連し合って発展してきた。

これまで、精子や卵子を扱うにはマイクロマニピュレータやマイクロデバイスが用いられてきた。その理由は、精子の全長50 μm であり、受精卵の直径は100–200 μm であることが大きい。今世紀になってPolydimethylsiloxane (PDMS) などのシリコン樹脂を利用したソフトリソグラフィーが普及し、マイクロデバイスの作製が容易になったために、生殖工学分野でも盛んに用いられるようになった。先駆的な研究として、BeebeらやTakayamaらによる受精卵培養と精子選別にに関する研究があげられる^{5,6)}。その後、一部の生殖工学や生殖補助医療用のマイクロデバイスが市販されるようになった。本稿では、はじめに生殖補助医療における手技と課題について説明する。次に、最近十数年間における精子選別と受精卵培養で用いられるマイクロデバイスの発展と今後の課題について解説する。

生殖補助医療手技と課題

ヒトの生殖補助医療においては、体外に取り出した卵子に精子を人為的に受精させ、体外で数日間培養する。約5日後に胚盤胞まで発育した受精卵のうち最良好のものが選択され、一個のみ子宮内に移植される。よく成熟

した受精卵は着床し、妊娠が成立する可能性、および挙児に至る可能性が上昇する。現在の生殖補助医療の一般的なプロセスを図1に示す。母体から卵子を採取する際において、超音波ガイドの下で卵胞液ごと卵子を吸引・採取する。通常は一回の採卵で10数個程度の未受精卵を得る。男性から採取した精液を洗浄し (図1A)、濃度調整後に人工授精あるいは体外受精に用いる。人工授精は洗浄精子を子宮内に注入し、受精能を持った精子を卵管膨大部へ十分到達させるために行う手技である (図1B)⁷⁾。通常体外受精 (In Vitro Fertilization: IVF) ではシャーレ内に採卵した卵子に洗浄精子を添加・培養することにより、シャーレ内で自然に受精する (図1C)。顕微授精はガラスキャピラリーで精子を吸引し、そのキャピラリーを卵細胞に穿刺して精子を挿入させ授精する方法である (図1D)。

精液の洗浄は異物を除去するために必要な操作であるが、現状では非生理的環境で行われる。一般的な方法として、精子濃度を容易に調整可能な遠心分離法があげら

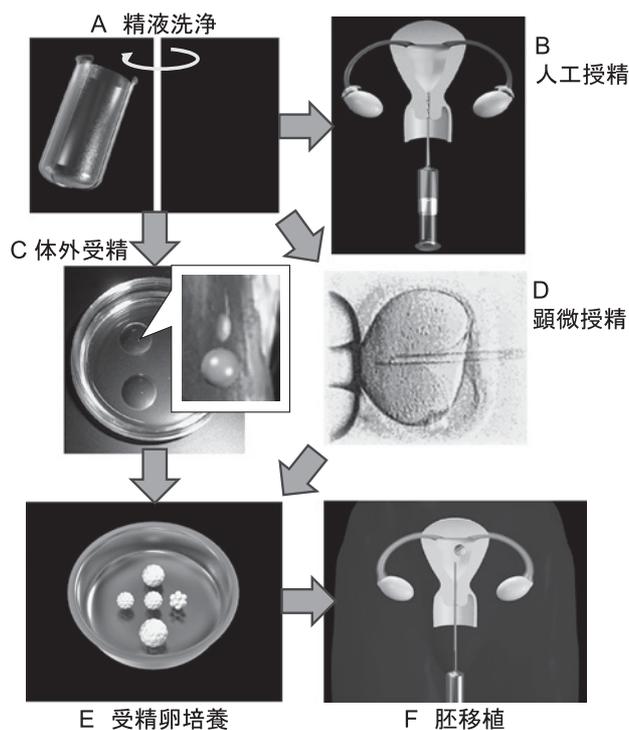


図1. 現在の生殖補助医療の一般的なプロセス

*著者紹介 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学 (講師) E-mail: kojimatu@md.okayama-u.ac.jp

れる。400 gの遠心処理によってペレットを作製する際に、精子に過度のストレスが負荷される。ペレット作製後、培養液上方まで泳ぐ運動良好精子を回収するスイムアップ法 (Swim-up) と呼ばれる手技などが行われている。しかし、ペレットを作製した場合にはペレット中で圧縮された精子自身が産出する活性酸素にさらされ、頭部DNAが断片化し受精卵の発育が悪くなるリスクが上昇する報告がある^{8,9)}。そのため、遠心フリー精子分離法が望まれている。精子数の少ない乏精子症の患者にとっても、貴重な精子へのダメージが大きいため、遠心処理にはデメリットがある。

受精卵は微量量(10–500 μ l)の培養液内に入れられて、CO₂インキュベータ内で5日間培養される(図1E)。マイクロドロップ法と呼ばれる方法が主に用いられる。その方法では、シャーレの上に数十 μ lの培養液滴が作製され、液滴の乾燥防止のためにミネラルオイルでこの液滴は覆われる。施設によっては500 μ l程度の培養液に受精卵を1個あるいは複数個培養するケースもある。体外培養されている受精卵は発育を促進する成長因子を分泌するために、受精卵は単独培養よりも複数卵培養時によく成長する(詳細は後述)。受精卵は胚盤胞まで体外培養される。サイズが大きく、中に隙間のある胚盤胞を一つだけ選択して母体に移植する(図1F)。この手技は「単一胚移植」と呼ばれている。現在は、多胎防止のために、日本産婦人科学会からの指針で移植する胚盤胞は一つだけに限られている⁷⁾。そのために、体外培養で受精卵の発育向上が求められる。我々卵管内の生理的環境、特に卵管窄部の直径が100–200 μ mであることに着目して、マイクロデバイスを用いて上記課題の解決を目指している。

精子選別用デバイス

遠心フリー精子分離法として、前述のTakayamaらが考案したMFSS (MicroFluidic Sperm Sorter) はチップデバイス化されている。MFSSによる運動精子分離方法を簡単に説明する。図2Aに示されるAのチャンバーに希釈精液を、BCDのチャンバーに適切な量の緩衝液を入れると重力差によりマイクロ流路内にAからDとBからCへの2つの層流が発生する。運動精子のみが二層流の界面間を移動し、チャンバーCで回収される。ピペット操作のみで運動精子のみを分離でき、30分程度で操作が完了する^{6,8,9)}。

遠心分離操作を含む従来のプロトコルでは精液処理のために2時間近く必要とする。MFSSを用いることにより、30分以内で遠心分離および前後処理のない1ステップで運動精子の分離を完了できる⁶⁾。処理時間の縮

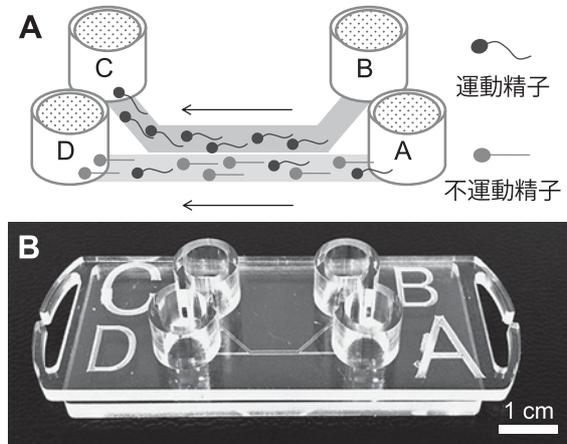


図2. A：MFSSによる運動精子選別の原理，B：市販されているMFSSの写真

小および遠心分離操作の除去によって、遠心処理で破壊された精子からの濃縮活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) への接触を減らし、DNA断片化を防ぐ。DNAにダメージがある精子の場合、受精卵発育に問題が起こりやすい^{8–12)}。ミシガン大学産婦人科の精子頭部DNA断片化割合評価に関する報告によれば、MFSSを用いて分離された精子ではDNA断片化割合が従来の遠心処理と比較して低下した¹¹⁾。名古屋大学産婦人科の顕微授精における受精率のデータにおいては、MFSSを使用した区において従来法と比較して受精率が上昇する傾向が見られた¹²⁾。したがって、受精すべき精子が分離されていると言える。分離後のCでは直進速度の大きい運動精子を選択的に分離できる¹²⁾。顕微授精においては直進速度の大きい精子を選択的に授精するために、MFSSでは顕微授精にふさわしい精子を回収できると考えられる。これらの結果に基づいて、MFSSはICSIおよびIVFの精液処理時に用いられる。しかし、現時点では分離された運動精子数が通常体外受精に必要な数に達していない¹³⁾。我々はデバイスの仕様を工夫することにより、さらに運動精子の回収数を増加させることを目指している。

当初はPDMSによるプロトタイピング⁶⁾、人工石英製チップデバイス¹²⁾が用いられていた。現在、層流を安定させ胚培養士にとって使いやすくするために(株)メニコンが臨床現場仕様のシクロオレフィンポリマー製のMFSS(図2B)を2012年に上市し複数の医療機関で使用されている¹⁴⁾。インピーダンス計測やレンズ不要なイメージングシステムをマイクロ流体デバイスに組み込んだ精子運動性評価システム構築に関しては10年間で数多くの論文が掲載されている^{15,16)}。最近では、精子濃度が低い場合の男性不妊のケースに適用可能な精子濃度を10

倍程度に上昇可能なマイクロ流体デバイスも発案された^{17,18)}。これらのシステムは発展途上国のクリニックでは初期投資コストが低いために普及するかもしれない。

受精卵培養用デバイス

受精卵は単独培養よりも複数卵培養時によく成長すると前述したが、受精卵自身が分泌する autocrine、卵管壁を構成する細胞または受精卵間の paracrine などによる成長因子のクロストークに由来する胚発育効果があるためと考えられている¹⁹⁾。実際、クロストークに由来する胚発育効果は体外培養系でも存在し、マイクロドロップ内に入れる受精卵の数を増加させることによって受精卵発育が促進されることが知られている²⁰⁾。この現象はマイクロドロップ内で分泌される成長因子の総濃度が上昇することにより胚発育が促進されると推測されている。たとえば、受精卵近傍の成長因子濃度を上げるために、受精卵をそのサイズよりも少し大きい孔に入れて培養する The well of the well (WOW) 法も活発に行われており(図3A)、その成績が複数の生物種で上昇していることが報告されている^{21,22)}。ポリスチレン製のデバイスまたはPDMS製のWOWデバイスが報告されている(幅0.3 mm、深さ0.2 mm、各ウェル間の距離が0.1–0.3 mmなど)。HashimotoらはPDMS製WOWデバイスを用いてヒト胚を培養した²³⁾。120時間培養開始後PDMSマイクロウェル内に培養した胚とWOWのグループで培養された胚における胚盤胞到達率との間に有意差はなかったが、個々に培養した場合と比較した場合には有意差があった。この原因はparacrine効果によるものと推察される²³⁾。WOWデバイスは当初は研究者が自作していたが、ライブイメージング用のデバイスとしても使用できることから(株)大日本印刷などより現在市販されている²⁴⁾。

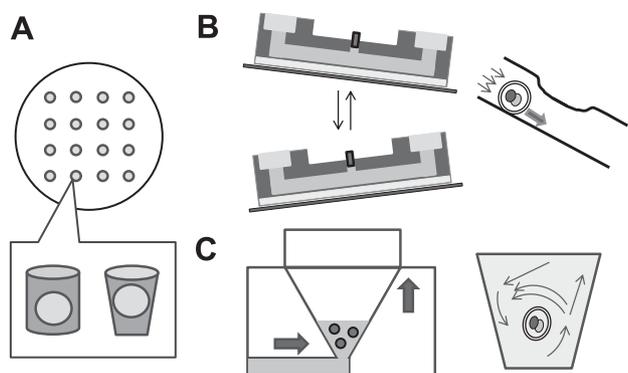


図3. 受精卵培養マイクロデバイスで培養される受精卵の環境模式図。A: WOW^{21,22)}, B: マイクロ流路²⁸⁾, C: Microfunnel²⁹⁾を用いた場合。

Beebeらのグループではガラス底面のPDMSマイクロ流路内での受精卵培養および卵丘細胞除去などの卵子操作に関して報告している^{25–27)}。2細胞期マウス受精卵からマイクロ流路内で培養したところ、72時間および96時間後に胚盤胞到達率がマイクロ流路培養群で上昇した。受精卵近傍の autocrine/paracrine 効果による影響と考えられている²⁶⁾。

Kimらは受精卵1個が通る程度の断面積(0.16 mm)となる狭窄部を有したPDMSマイクロ流路内でウシ受精卵培養を行った(図3B)²⁸⁾。このマイクロ流路を培養皿の上に載せて、傾斜させて受精卵を動かしながら培養した。その結果、狭窄部の幅が0.16 mmのように受精卵の直径(0.15 mm)より少し大きい場合には、狭窄部のない流路を用いた培養系と比較して8細胞期への到達率が上昇した。逆に、狭窄部の幅を0.14 mmにした際には8細胞期に到達した割合が10%と大きく低下した。狭窄部が受精卵の直径と比較して小さい場合、受精卵が移動できなくなり、老廃物の濃度が上昇すると推測される。

Heoらはdynamic microfunnel embryo culture systemについて報告している²⁹⁾。PDMS製の流路を用いて、流路近傍の膜を点字デバイスのピンで上下駆動させることにより培地を継続的に供給し、漏斗型チャンバー内の培地を攪拌させながら受精卵を培養できる(図3C)。受精卵は供給される液体の流れによって、回転しながら移動する。有限要素法シミュレーションから最大のせん断応力(Shear Stress: SS)は約0.007 dyne/cm²程度と計算され、アポトーシスを起こす値よりもはるかに小さい²⁹⁾。この培養系を使用した際には、流体移動のない静置培養系と比較してマウス胚盤胞の細胞数が有意に増加した。このシステムを用いて培地移動させた際には、培地移動がない場合と比較して胚移植後の妊娠率が*in vivo*の値に近づいた。マイクロ流路培養系²⁶⁾とは異なり、この培養系では培地移動による胚移動が起こるため、胚に適度なSSと生化学的刺激を負荷できる³⁰⁾。

上記のmicrofunnelでは培養時の受精卵を顕微鏡観察することは困難であるために、マイクロ流路を用いて蛍光顕微鏡観察しながらメカニカルストレス(MS: Mechanical Stress)を制御できるシステムの開発が必要であると我々は感じていた。この目的を果たし、かつ卵管蠕動運動を体外培養で再現することを目指して、空圧アクチュエータ駆動型人工卵管システムを作製した³¹⁾。PDMSは柔らかく、空気圧によってその変形を制御できることから、この素材を用いたデバイスによって卵管の運動を模倣することができる。空気圧を制御するアクチュエータをインキュベータの外側に、マイクロチャンバーをインキュベータ内に設置した(図4)。厚さ0.1 mm

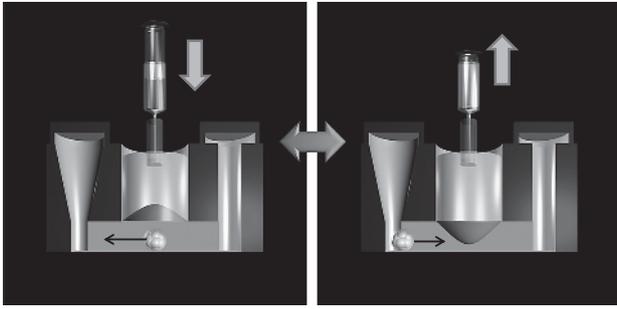


図4. 空圧アクチュエータ駆動型流路培養システムの概略図. 中央のPDMS薄膜がシリンジの移動に伴い上下し、その薄膜移動に伴い流路内の培養液と受精卵が移動する。

のPDMS薄膜が空気圧によって上下する。その際、培地用流路内の流体が移動し、受精卵を流体移動によって並行移動させ、圧縮することができる。二細胞期からのマウス受精卵培養において、アクチュエータを駆動させたdynamic culture培養区で胚盤胞到達率および胚盤胞内細胞数が有意に上昇した³²⁾。卵管内の培養時に近いSSを負荷した際の細胞内カルシウム濃度の変化や分化などをライブイメージングできるマイクロ流体システムによって、MSの受精卵発育に及ぼす影響を精査できる可能性がある。

上記のようにマイクロ流体システムにMS負荷と細胞内分子応答と細胞分泌物分析を行うデバイスをコンパクトにまとめる試みが最近なされている。Heoらは受精卵培養において一日間使用可能なマイクロ流体測定システムを開発した³³⁾。このシステムでは複数マウス受精卵によるグルコースなどの消費をpmol/h量で測定できる。この分析システムを用いて制御された微小環境内で受精卵発育に影響を与える化学物質の挙動を評価できるかもしれない。このように受精卵のライブイメージングや微量分析のマイクロ流体システム化によって、複数の指標を同時かつ連続的に計測でき、細胞内外の反応とシグナルカスケードとの関連から、受精卵発育機構にとって卵管内環境の重要な因子が何であるか見いだすことができるだろう。

まとめ

我々は臨床現場への普及や社会実装を目指す立場であるため、マイクロ流体デバイスの発展とその普及との間にトレードオフが存在するを感じている。研究用なら複雑なシステムやプロトコルで問題ないが、臨床用の場合は手技が単純でなければ普及しにくいという問題点がある。基礎医学研究には上記の受精卵のライブイメージングや微量分析のマイクロ流体システム化は有効であるため、用途に応じたシステムの最適化が一般的な課題

と我々は認識している。今後も臨床データを継続的に取得することによって、卵管内のMSに近い環境で医療手技を行うことが好ましいというコンセプトの有効性が示される可能性がある。したがって、精子選別、受精卵培養手技双方の改善により難治患者の治療成功率の上昇が期待されるために、使いやすかつ効果的なマイクロ流体デバイスの普及に努める。

謝 辞

本研究は科研費 (MEXT/JSPS) (22680036) および若手人材育成補助金 (JST) の助成を受けたものである。兒玉美恵子氏には原稿・図作成を補助して頂いた。

文 献

- 1) http://trg.affrc.go.jp/v-museum/history_text/history03_t/h03t_02.html
- 2) 第27回 動物生殖工学研究会 (十和田シンポジウム) 要旨 (2012)
- 3) Palermo, G. *et al.*: *Lancet*, **1**, 826 (1992).
- 4) <http://www.jsrae.or.jp/annai/yougo/160.html>
- 5) Beebe, D. *et al.*: *Theriogenology*, **57**, 125 (2002).
- 6) Cho, B. S. *et al.*: *Anal. Chem.*, **75**, 1671 (2003).
- 7) 日本臨床エンブリオロジスト研究会: エンブリオロジストのためのART必須ラボマニュアル, 医歯薬出版株式会社 (2005).
- 8) Alvarez1, J. G. *et al.*: *Hum. Reprod.*, **8**, 1087 (1993).
- 9) Devroey, P. *et al.*: *Hum. Reprod. Update.*, **10**, 19 (2004).
- 10) Schuster, T. G. *et al.*: *Reprod. Biomed. Online.*, **7**, 75 (2003).
- 11) Schulte, R. T. *et al.*: *Fertil. Steril.*, **88**, S76 (2007).
- 12) Shibata, D. *et al.*: *Fertil. Steril.*, **88**, S110 (2007).
- 13) Matsuura, K. *et al.*: *Reprod. Biomed. Online.*, **24**, 109 (2012).
- 14) <http://www.menicon-lifescience.com/qualis.html>
- 15) Su, T-W. *et al.*: *Anal. Chem.*, **82**, 8307 (2010).
- 16) Segerink, L. I. *et al.*: *Lab Chip.*, **10**, 1018 (2010).
- 17) Matsuura, K. *et al.*: *Fertil. Steril.*, **99**, 400 (2013).
- 18) Matsuura, K. *et al.*: *Androl. Gynecol. Cur. Res.*, **1**, 1000106 (2013).
- 19) Kawamura, K. *et al.*: *Endocrinology*, **146**, 4105 (2005).
- 20) Ebner, A. P. *et al.*: *Reprod. Biomed. Online.*, **21**, 762 (2010).
- 21) Vajta, G. *et al.*: *Mol. Reprod. Dev.*, **55**, 256 (2000).
- 22) Sugimura, S. *et al.*: *Biol. Reprod.*, **83**, 970 (2010).
- 23) Hashimoto, S. *et al.*: *Fertil. Steril.*, **97**, 332 (2012).
- 24) http://www.dnp.co.jp/news/10091778_2482.html
- 25) Raty, S. *et al.*: *Theriogenology*, **55**, 241 (2001).
- 26) Raty, S. *et al.*: *Lab Chip*, **4**, 186 (2004).
- 27) Zeringue, H. C. *et al.*: *Lab Chip*, **5**, 86 (2005).
- 28) Kim, M. S. *et al.*: *Electrophoresis*, **30**, 3276 (2009).
- 29) Heo, Y. S. *et al.*: *Hum. Reprod.*, **25**, 613 (2010).
- 30) 松浦宏治ら: *J. Mammal. Ova. Res.*, **28**, 174 (2011).
- 31) Matsuura, K. *et al.*: *Advanced Elastomers: Technology, properties and applications*, p.243, InTech (2012).
- 32) Matsuura, K. *et al.*: *Reprod. Fertil. Dev.*, **24**, 156 (2012).
- 33) Heo, Y. S. *et al.*: *Lab Chip*, **12**, 2240 (2012).