

—原著—

# 微小流体力学法および移動重力沈降法で選別処理した 精子の運動能とDNA断片化の評価

## Evaluation of motility and DNA fragmentation of sperm purified by microfluidics and Migration-Gravity sedimentation

大久保 毅\*・樋口 謙太・林 輝明・恩田 知幸・  
松尾 涼子・大見 健二・瀬川 智也

Tsuyoshi Okubo\*, Kenta Higuchi, Teruaki Hayashi, Noriyuki Onda,  
Ryoko Matsuo, Kenji Omi and Tomoya Segawa

新橋夢クリニック 〒105-0004 港区

Shinbashi Yume Clinic, EXCEL Shinbashi, 2-5-1 Shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-0004, Japan

**要旨：**体外受精に用いる精子の選別における代表例である密度勾配遠心分離法は、遠心分離や長時間の処理などの影響による精子DNA断片化や細胞膜損傷などが懸念されている。我々は精子への物理的損傷の影響を軽減すべく、微小流体力学法および移動重力沈降法による新しい選別処理法を検討した。精子の運動能とDNA断片化率は、両手法ともに選別前と比べると有意に改善が見られ、従来法に比べてもDNA断片化率が低い精子が回収できた。遠心分離を用いない両手法による比較では、DNA断片化率に関しては有意な差は認めなかったものの、移動重力沈降法の方が微小流体力学法を用いた手法よりも運動性の高い精子が回収可能であった。また、微小流体力学法では装置の特性上、総運動精子数の回収が少なかった欠点が移動重力沈降法では改良されており、顕微授精と体外受精両方の媒精に用いることができると期待される。

**キーワード：**精子選別処理, 微小流体力学法, 移動重力沈降法, 精子DNAフラグメンテーション

**Abstract:** A typical example of preparation of sperm for in vitro fertilization is density gradient centrifugation. However, there are concerns about sperm DNA fragmentation and cell membrane damage due to the effects of centrifugation and the long preparation time. In order to reduce the effects of physical damage to spermatozoa, we investigated new purification methods which use microfluidics and migration-gravity sedimentation. The sperm motility parameters and DNA fragmentation rates of both methods were significantly improved compared to density gradient centrifugation. In a comparison of the two methods, there was no significant difference in the DNA fragmentation rate, but the migration-gravity sedimentation method collected sperm with higher motility than the microfluidic method. The total number of motile sperm collected was less due to the characteristics of the microfluidic method device. The migration-gravity sedimentation method did not have this shortcoming and can be used for both conventional IVF and ICSI insemination.

**Key words:** Sperm preparation, Microfluidics, Migration-Gravity sedimentation, Sperm DNA fragmentation

(受付 2019年12月20日/受理 2020年2月4日)

別刷請求先：〒105-0004 東京都港区新橋2-5-1

EXCEL新橋

\*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: t-okubo@yumeclinic.net

### はじめに

体外受精における精子選別法として、今日では密度勾配遠心分離法がもっとも主流である<sup>1)</sup>。成熟精子では細胞密度がもっとも高く、未成熟精子は残存する細胞小滴により細胞密度が低くなる。また死滅した精子は細胞膜の透過性が変化

し、水分が細胞内に浸透するため密度が低下する。これらの精子密度の違いを利用して精液中の死滅精子、奇形精子だけでなく不純物も取り除くことが可能であり、形態あるいは運動性の良好な精子が遠心分離による選別で遠沈管の底部から回収可能である。しかし、古くから広汎に行われている密度勾配遠心分離による選別であるが、一方で懸念されている点も多い<sup>2)</sup>。具体的には選別に用いる選別液による毒性に問題がないか、遠心分離による荷重が精子に損傷を与えないか、選別に要する時間や手技の問題で回収精子の数や運動性に個人差がでないか、などといった問題点である。

今回我々は従来法に代わる精子選別法として、遠心分離機や選別液を使用しない微小流体力学法 (MF; Microfluidics)<sup>3-5)</sup>と移動重力沈降法 (MGS; Migration-Gravity sedimentation)<sup>6)</sup>を用いた新しい精子選別法を検討した。前者は4つのチャンパーと微細流路から形成された精子選別装置 (QUALIS: メニコンライフサイエンス, 愛知, 日本) を用いて微小流体力学を応用した手法によって運動精子を回収する方法である<sup>7)</sup>。また後者はチューブ状の容器内に内管が挿入された精子選別装置 (MIGLIS: メニコンライフサイエンス) を用いて運動精子自身にかかる重力による自然沈降にて選別する移動重力沈降法を応用した手法で、外管に注入した精液が内管壁を乗り越えて運動良好精子が内管底に集まる方法である<sup>8)</sup>。これらを利用して簡便かつ低負荷に運動能力の高い精子を回収することを試みた。また選別後の精子運動能だけでなく妊娠成績に影響があるとされるDNA断片化率 (DFI; sperm DNA fragmentation index) に関する評価も行った。

## 対象と方法

### 1. 対象

本研究は2015年9月から2019年1月にかけて、書面による同意が得られたIVF症例患者の精液を対象とし、当院の倫理委員会の承認を得て行った。対象患者の精液60症例に対して従来法, MF, MGSによる選別処理を行い、選別前後における精子運動能とDFIをそれぞれ評価した。

### 2. 精子選別法

#### ・密度勾配遠心分離法による選別処理法 (従来法)

検体として用いる精液に10%血清添加HTF (北里メディカルサプライ, 静岡, 日本) をよく希釈混和して精液サンプルとした。Sepa sperm調整液 (北里メディカルサプライ) 80%濃度1 mLを滅菌チューブに入れ、その上に40%濃度溶液1 mLと精液サンプルを重層し、600×gで15分間遠心分離し、精子ペレットを吸引して別のチューブ内の5 mL血清添加HTFに入れた。さらに400×gで4分間洗浄処理を行い精子ペレット上まで5 mL血清添加HTFを吸引して廃棄し、新しい血清添加HTFを加えて媒精に用いるために至適濃度となるよう希釈した。

#### ・MFによる選別処理法 (図1)

検体として用いる精液と等量の10%血清添加HTFをよく希釈混和して精液サンプルとした。MF法はQUALISを用いて選別処理を行った。A, B, C, D全てのチャンパーにHTFを100 μL添加したあと、全てのチャンパー内のHTFを抜き取った。その後C, DチャンパーにHTFを20 μL, BチャンパーにHTFを100 μL, Aチャンパーに精液サンプルを65 μL加

### 製品の特徴

- ・遠心分離および精子調整液が不要である
- ・A,B,C,D4つのチャンパーとそれらを繋ぐ流路を微調整することで精子を精製する
- ・60mmディッシュ底部に嵌め込み使用出来る

### 使用方法

- ①Aに精液サンプル、B,C,Dに培養液を注入する
- ②A→DとB→C2つの層流が形成される
- ③Aから流れる精子のうち層流界面を渡る運動良好精子がCに集まる

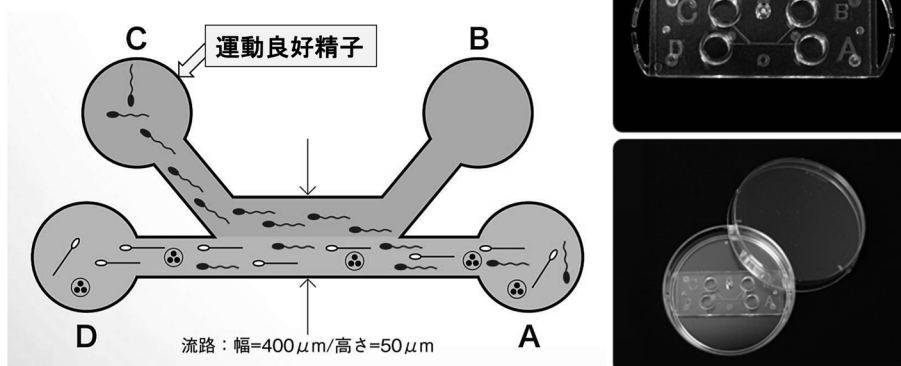


図1 QUALISを用いた微小流体力学法による精子選別の特徴と操作手順

えた。生物顕微鏡下にA, B両チャンバー出口からの合流位置が確認できるように本装置を設置し, Aからの層流幅が合流部で40%くらいになるように, ピペットを用いてA, Bの液量を微調整した。C, D両チャンバー入口への合流部の層流を確認したのち, 37°Cウォームプレート上にて1時間静置した。Cチャンバーに集まった運動良好精子を回収して本実験サンプルとして用いた。

・MGSによる選別処理法(図2)

検体として用いる精液とHTFを上限3.0 mLとなるよう希釈混和して精液サンプルとした。MGS法はMIGLISを用いて選別処理を行った。精液注入部位である内管に希釈した精液サンプルを加え, 内蓋を本体から浮かないように設置した。HTFを内管にゆっくりと精液を完全に覆うまで添加し, 外蓋を設置して37°Cウォームプレート上にて1時間静置した。内管の底部に集まった運動良好精子を回収して本実験サンプルとして用いた。

3. 検討試験と解析法

・精子運動能評価

精液検査の運動能評価はSMAS (DETECT, 東京, 日本)により行った<sup>9)</sup>。評価項目は運動率, 直線速度, 曲線速度, 直進性, 頭部振動, 頭部振幅に関して選別前後で解析を施行した(表1)。

・精子DFI評価

精液検査の精子DFI評価はhalosperm HT-HS10 kit (Halotech DNA; Spain)により行った<sup>10, 11)</sup>。本キットを用いることで運動性や形態評価だけでは分からないDNAフラグメンテーション化精子を定量可能である。正常精子では頭部にあるDNAのループ鎖によって形成されるハローが視認できるが, フラグメンテーション化した精子では損傷した

DNAを持つループ鎖においてハローが形成されない。総精子数に対するフラグメンテーション化精子の割合をDFI率として選別前後で解析を施行した。

結果

MFおよびMGSを用いて選別処理した精子の運動能をそれぞれ比較した結果, 運動率はそれぞれ93.9±4.9%および95.1±3.9%であり, 両群間において有意な差は認めなかった。同様に直線速度, 曲線速度, 直進性, 頭部振幅, 頭部振動数に関しては, 全ての項目においてMGSの方がMFに比べて有意に上昇した(表2)。また, 選別処理前の精液におけるDFIは15.4±1.1%であったが, 従来法, MFおよびMGS後のDFIはそれぞれ4.7±4.1%, 2.4±1.1%および2.0±1.2%であり, 精子の選別処理前後ではいずれの方法でも選別処理前に比べて有意に低いDFI精子が回収されたが, 選別処理法の違いでみると, MFとMGSでは有意に従来法よりDFIの低い精子が回収可能であった。また遠心分離を使わないMFとMGSとの両群でDFIを比較すると, 両群間において有意な差は認めら

表1 選別処理前の精液における患者背景と精子運動所見

症例数(人)	60
平均年齢(歳)	39.8±5.8
精液量(mL)	3.1±1.5
精子濃度(10 <sup>6</sup> /mL)	81.6±51.4
精子運動率(%)	57.9±16.9
直線速度(μm/秒)	17.9±5.5
曲線速度(μm/秒)	45.5±14.8
直進性(直線速度/曲線速度)	0.4±0.1
頭部振幅(μm)	1.1±0.4
頭部振動数(Hz)	8.3±0.9

製品の特徴

- ・遠心分離および精子調整液が不要である
- ・精液注入部の外管と運動精子回収部の内管で構成されている
- ・精液注入後の操作は特に必要がない

使用方法

- ①外管に精液サンプル、内管に培養液を注入する
- ②内管壁を乗り越えて運動精子が内管の底部に集まる

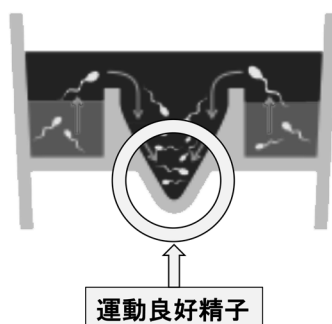


図2 MIGLISを用いた移動重力沈降法による精子選別の特徴と操作手順

表2 従来法, MF およびMGSで選別処理した後の精子運動所見

	従来法	MF	MGS
症例数 (人)	20	20	20
精子運動率 (%)	90.9 ± 6.2 <sup>a</sup>	93.9 ± 4.9 <sup>a,b</sup>	95.1 ± 3.9 <sup>b</sup>
直線速度 (μm/秒)	42.6 ± 8.1 <sup>a</sup>	18.40 ± 7.1 <sup>b</sup>	40.5 ± 9.2 <sup>a</sup>
曲線速度 (μm/秒)	118.9 ± 19.4 <sup>a</sup>	63.1 ± 23.0 <sup>b</sup>	102.7 ± 25.8 <sup>a</sup>
直進性 (直線速度/曲線速度)	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>
頭部振幅 (μm)	2.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.7 <sup>c</sup>
頭部振動数 (Hz)	10.5 ± 1.4 <sup>a</sup>	8.1 ± 1.1 <sup>b</sup>	10.6 ± 1.7 <sup>a</sup>

平均値はMean ± SDで表示され, 各群の比較はTukey-Kramer HSD検定により行った. 異符号間で有意差あり ( $P < 0.05$ ).

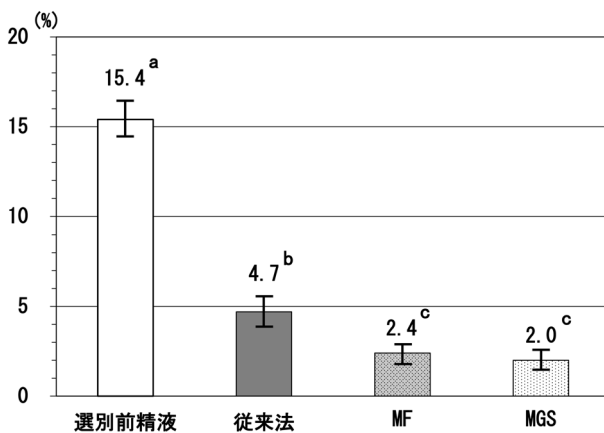


図3 選別前原精液と従来法, MS およびMGSによる選別後の精子DFI率

選別前に比べて従来法, MS, MGSにて選別処理した精子のDFI率はすべての群において低下した ( $P < 0.01$ ). また従来法に比べてMSとMGSで選別処理した精子のDFI率は有意に低下したが ( $P < 0.01$ ), MSとMGSの間における精子のDFI率に有意な差は認められなかった.

れなかった (図3). なおMFとMGSにおける選別処理別での運動精子回収率は従来法に比べ有意に低いものの, MFでは少数の運動精子しか回収できなかった一方, MGSではMFに比べ有意に高い濃度の運動精子を回収可能であった.

## 考 察

従来法に代わる精子選別法としてMFとMGSを検討したが, これらの方法を用いて回収した精子は過去に報告のあった文献と同様に高い運動能を有しており, DFIが非常に低い精子が回収可能であった<sup>12)</sup>. 運動能が高い精子がMFとMGSで回収できた点に関しては以下の要因が考えられる. MFは微小流体力学を利用した精子選別デバイスであり, 安定した層流が形成されれば2つの層流が混じることがなく, 層流の界面を渡った運動良好精子は特定のチャンバー内に回収される. 本デバイスは, 流路幅, 深さ, 長さが良好運動精子回収のために綿密に設計されていることが運動性の非常に高い精子を簡単に回収できる要因であると思われる.

さらに, 最初の層流幅を正しく微調整したあとは特別な操作は必要とせず, 個人の手技による回収率の差も少ないと考えられる. デメリットとしては, 安定した層流を形成するために多少のコツが必要であること, チャンバーには精液サンプルが65μLしか注入できないために良好運動精子の回収量が少ないこと, 蛇行運動をしているがために層流の界面から外れた直進性の低い精子が集まってしまうことなどが挙げられる. また, MGSはスイムアップの原理をもとに設計された精子選別デバイスであり, チューブ状の容器内に管状の内管が設置された構造である. 内管の外側に精液を注入してSWで覆って重層すると, 運動良好精子が内管の隔壁を乗り越えて内管の底部に回収される. MFに比べると手技はさらに簡便であり, 精液サンプルの注入後の特別な操作も必要としないだけでなく, 精液注入部には3.0 mLまで精液サンプルが注入可能である. そのため, MFに比べてはるかに良好運動精子の回収総数も多い (MFにおける運動精子回収率は1%未満, 同様にMGS法は14.5 ± 2.0%). そのため, MGS法では顕微授精だけでなく通常の体外受精としての媒精法にも対応できる.

一方, 密度勾配遠心法に比べてDFIが低い精子がMFとMGSで回収できた点に関しては以下の要因が考えられる. MFあるいはMGSにおける精子選別では希釈しただけの精液をサンプルとしている. 密度勾配遠心分離法における代表的な選別液であるパーコールでは高濃度のエンドトキシンが存在することが分かっており, その他安全とされている選別液についても低濃度エンドトキシンが存在するものもあるとの報告がある<sup>13)</sup>. また遠心分離による物理的負荷における損傷も排除できる. MFやMGSによる精子選別では, これらの影響を排除するために密度勾配遠心法よりも低負荷な精子の選別を可能にしたと考えられる<sup>14)</sup>.

これらの低負荷な選別処理法によって選別された低DFI精子を用いることで, 通常媒精もしくは顕微授精による受精率の向上<sup>15, 16)</sup>や流産率の低減<sup>17-21)</sup>も期待できるために, IVFの成績向上に繋がる可能性がある. また, DFI精子の要因は年齢<sup>22)</sup>だけでなく活性酸素<sup>23)</sup>や培養条件<sup>24)</sup>などが考えられていたが, 今回の我々の検討により, 選別処理法によるストレスの有無も関連性があるのではないかと推察された.

これらの結果を総合的に判断すると, MFとMGSは精子

選別の在り方を大きく変える可能性が示唆された。特に MGS での精子選別は、MF での欠点であった少数の精子しか回収できなかった点を克服しており、DFI が非常に低くかつ運動性が非常に高い精子をより多く回収できることが明らかとなった。

## 文 献

- 1) Henkel, R.R. and Schill, W.B. (2003): Sperm preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 1, 1–22.
- 2) Amiri, I., Ghorbani, M. and Heshmati, S. (2012): Comparison of the DNA Fragmentation and the Sperm Parameters after Processing by the Density Gradient and the Swim up Methods. *J. Clin. Diagn. Res.*, 6, 1451–1453.
- 3) Chung, Y., Zhu, X., Gu, W., Smith, G.D. and Takayama, S. (2006): Microscale integrated sperm sorter. *Methods. Mol. Biol.*, 321, 227–244.
- 4) Matsuura, K. and Naruse, K. (2012): Use of silicone elastomer-based microfluidic devices and systems in reproductive technologies. *Advanced Elastomers – Technology, Properties and Applications*, Chapter 10.
- 5) Huang, H.Y., Fu, H.T., Tsing, H.Y., Huang, H.J., Li, C.J. and Yao, D.J. (2014): Motile human sperm sorting by an integrated microfluidic system. *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 5, 199.
- 6) Tea, N.T., Jondet, M. and Scholler, R. (1984): A ‘migration-gravity sedimentation’ method for collecting motile spermatozoa from human semen. In *In Vitro Fertilization, Embryo Transfer and Early Pregnancy*, pp.117–120, Springer, Dordrecht.
- 7) Shirota, K., Yotsumoto, N., Itoh, H., Obama, H., Hidaka, N., Nakajima, K. and Miyamoto, S. (2016): Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertil. Steril.*, 105, 315–321. e311.
- 8) Muratori, M., Tarozzi, N., Carpentiero, F., Danti, S., Perrone, F.M., Cambi, M., Casini, A., Azzari, C., Boni, L., Maggi, M., Borini, A., and Baldi, E. (2019): Sperm selection with density gradient centrifugation and swim up: effect on DNA fragmentation in viable spermatozoa. *Sci. Rep.*, 9, 7492.
- 9) Isobe, T. (2012): New method to estimate the possibility of natural pregnancy using computer-assisted sperm analysis. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 58, 339–347.
- 10) Fernández, J.L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., LaFromboise, M., and De Jonge, C. (2005): Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil. Steril.*, 84, 860.
- 11) Tandara, M., Bajić, A., Tandara, L., Bilić-Zulle, L., Šunj, M., Kozina V., Goluža, T. and Jukić, M. (2014): Sperm DNA integrity testing: big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. *Andrology*, 2, 678–686.
- 12) Yamanaka, M., Tomita, K., Hashimoto, S., Matsumoto, H., Satoh, M., Kato H., Hosoi, Y., Inoue, M., Nakaoka, Y. and Morimoto, Y. (2016): Combination of density gradient centrifugation and swim-up methods effectively decreases morphologically abnormal sperms. *J. Reprod. Dev.*, 62, 599–606.
- 13) Makkar, G, N., H.Y., Yeung, S.B., and Ho, P.C. (1999): Comparison of two colloidal silica-based sperm separation media with a non-silica-based medium. *Fertil. Steril.*, 72, 796–802.
- 14) Yetkinel, S., Kilicdag, E.B., Aytac, P.C., Haydardedeoglu, B., Simsek, E. and Cok, T. (2019): Effects of the microfluidic chip technique in sperm selection for intracytoplasmic sperm injection for unexplained infertility: a prospective, randomized controlled trial. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 36, 403–409.
- 15) Larson-Cook, K.L., Brannian, J.D., Hansen, K.A., Kasperon, K.M., Aamold, E.T. and Evenson, D.P. (2003): Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil. Steril.*, 80, 895–902.
- 16) Benchaib, M., Lornage, J., Mazoyer, C., Lejeune, H., Salle, B. and François Guerin, J. (2007): Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil. Steril.*, 87, 93–100.
- 17) Ni, W., Xiao, S., Qiu, X., Jin, J., Pan, C., Li, Y., Fei, Q., Yang, X., Zhang, L. and Huang, X. (2014): Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcome of frozen-thawed embryo transfer and on blastocyst formation. *PLoS One*, 9, e94956.
- 18) Osman, A., Alsomait, H., Seshadri, S., El-Toukhy, T. and Khalaf, Y. (2015): The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online*, 30, 120–127.
- 19) Palermo, G.D., Neri, Q.V., Cozzubbo, T., Rosenwaks, Z. (2014): Perspectives on the assessment of human sperm chromatin integrity. *Fertil. Steril.*, 102, 1508–1517.
- 20) Simon, L., Proutski, I., Stevenson, M., Jennings, D., McManus, J., Lutton, D. and Lewis S.E. (2013): Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod. Biomed. Online*, 26, 68–78.
- 21) Speyer, B.E., Pizzey, A.R., Ranieri, M., Joshi, R., Delhanty, J.D. and Serhal, P. (2010): Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Hum. Reprod.*, 25, 1609–1618.
- 22) Brincat, D., Catania, S., Wismayer, P.S. and Calleja-Agius, J. (2015): Male factors in ART outcome prediction. *Gynecol. Endocrinol.*, 31, 169–175.
- 23) Wright, C., Milne, S. and Leeson, H. (2014): Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod. Biomed. Online*, 28, 684–703.
- 24) Matsuura, R., Takeuchi, T. and Yoshida, A. (2010): Preparation and incubation conditions affect the DNA integrity of ejaculated human spermatozoa. *Asian J. Androl.*, 12, 753–759.