

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6196614号
(P6196614)

(45) 発行日 平成29年9月13日 (2017. 9. 13)

(24) 登録日 平成29年8月25日 (2017. 8. 25)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/24 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/24
G O 1 N 37/00 (2006. 01)	G O 1 N 37/00 1 O 1
C 1 2 M 1/26 (2006. 01)	C 1 2 M 1/26
C 1 2 M 1/34 (2006. 01)	C 1 2 M 1/34 D

請求項の数 18 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2014-511597 (P2014-511597)	(73) 特許権者	503146324
(86) (22) 出願日	平成24年5月18日 (2012. 5. 18)		ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホス ピタル インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2014-518627 (P2014-518627A)		The Brigham and Wom en's Hospital, Inc.
(43) 公表日	平成26年8月7日 (2014. 8. 7)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 1 1 5 ポストン フランシス ストリ ート 7 5
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/038680		
(87) 国際公開番号	W02012/162181	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開日	平成24年11月29日 (2012. 11. 29)		弁理士 小林 浩
審査請求日	平成27年5月15日 (2015. 5. 15)	(74) 代理人	100120134
(31) 優先権主張番号	61/488, 300		弁理士 大森 規雄
(32) 優先日	平成23年5月20日 (2011. 5. 20)	(74) 代理人	100149010
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 星川 亮
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 運動性細胞の分析及び選別

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

精子の集団を、マイクロ流体チャネルの第 1 の端部の入口ポートに導入するステップ；
精子の該集団を外部的に駆動される流体の流れがなくインキュベーションし、精子の集
団の少なくとも第 1 の一部をマイクロ流体チャネルに沿ってマイクロ流体チャネルの第 2
の端部の出口ポートに移動させ、それにより、出口ポートの精子の集団の第 1 の一部を、
入口ポートの又はマイクロ流体チャネル内の精子の集団の第 2 の一部から分離するステッ
プ；及び、

精子の集団の第 1 の一部を該出口ポートにおいて収集するステップであって、精子の集
団の第 1 の一部が、精子の集団の第 2 の一部の平均運動性より高い平均運動性を有する、
ステップ

を含む、精子を選別する方法。

【請求項 2】

前記マイクロ流体チャネルを水平又は垂直に向けるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

精子の集団をインキュベーションするステップが、精子の集団の第 1 の一部の一部分がマ
イクロ流体チャネルに沿って出口ポートに移動することができる十分な時間、該精子の集
団をインキュベーションするステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

10

20

マイクロ流体チャネルの高さが、約 50 μm 以下である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

精子の集団の少なくとも第 1 の一部の複数の画像を得るステップ；及び

該複数の画像を分析するステップ

を含む精子の集団の第 1 の一部の平均運動性を特定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

精子の集団を導入するステップが、媒体に精子の集団を懸濁させるステップを含み、

精子の集団の第 1 の一部の濃度が、精子 1.6×10^3 個/ μL 以下である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 7】

精子の集団をマイクロ流体チャネルの第 1 の端部の入口ポートに導入するステップ；

該マイクロ流体チャネルにおいて該精子の集団を外部的に駆動される流体の流れがなくインキュベーションし、精子の集団の少なくとも第 1 の一部をマイクロ流体チャネルに沿ってマイクロ流体チャネルの第 2 の端部の出口ポートに移動させ、それにより、出口ポートの精子の集団の第 1 の一部を、入口ポートの又はマイクロ流体チャネル内の精子の集団の第 2 の一部から分離するステップ；

精子の集団の第 1 の一部がマイクロ流体チャネルに沿って移動する間に、該マイクロ流体チャネル内の該精子の集団の少なくとも第 1 の一部の複数の画像を取得するステップ；及び

20

該複数の画像に基づいて精子の集団の少なくとも第 1 の一部の特性を特定するステップを含む、精子を分析する方法。

【請求項 8】

特定された特性が、運動性、平均経路速度（VAP）、直線速度（VSL）、又は直線性のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

特定される特性が、

（1）精子の集団の第 1 の一部の特性、及び

（2）該マイクロ流体チャネルの長さに沿った精子の集団の第 2 の一部の分布

を含む、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 10】

特性を特定するステップが、特定された特性を、

（1）精子の集団の特性、又は

（2）インキュベーション後に入口ポートに位置している精子の集団の第 2 の一部の特性
の少なくとも 1 つと比較するステップを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

特定された特性に基づいて、精子の集団の健康を特定するステップをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 12】

40

マイクロ流体チャネルの高さが、約 50 μm 以下である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 13】

マイクロ流体チャネルの高さが50 μm 未満となるように選択されたマイクロ流体チャネルと、

該マイクロ流体チャネルの第 1 の端部に接続された入口ポートであって、精子の集団を受け入れるように構成された入口ポートと、

該マイクロ流体チャネルの第 2 の端部に接続された出口ポートとを備え、

該マイクロ流体チャネルが、該マイクロ流体チャネル中において外部的に駆動された流体の流れなしで、出口ポートにおいて、精子の集団の第 1 の一部を提供し、かつ、マイク

50

ロ流体チャネル内の又は入口ポートの精子の集団の第2の一部を提供するように構成され、精子の集団の第1の一部が、精子の集団の第2の一部の平均運動性より高い平均運動性を有する、精子を選別するための装置。

【請求項14】

マイクロ流体チャネルの長さが、少なくとも部分的に、マイクロ流体チャネルでの精子のインキュベーション時間及び精子の速度のうちの少なくとも一方に基づいて選択される、請求項13に記載の装置。

【請求項15】

マイクロ流体チャネルが、四角形断面、台形断面、三角形断面、円形若しくは楕円形断面、マイクロ流体チャネルの長さに沿って変わる断面、又はリッジを有する断面を有する、請求項13に記載の装置。

10

【請求項16】

マイクロ流体チャネルが、直線状であるか又は湾曲している、請求項13に記載の装置。

【請求項17】

マイクロ流体チャネルの少なくとも一部の複数の画像をキャプチャするように構成された撮像システムをさらに含み、該撮像システムが、

該マイクロ流体チャネルの少なくとも一部を照らすように構成された光源と、

該マイクロ流体チャネルにおける光が照らされた部分の精子の画像をキャプチャするように構成された検出器とを含む、請求項13に記載の装置。

20

【請求項18】

キャプチャされた画像に基づいて、マイクロ流体チャネルにおける光が照らされた部分での精子の特性を特定するように構成された分析モジュールをさらに含み、請求項17に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2011年5月20日に提出された米国特許出願第61/488,300号の恩典を主張するものである。上記の内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究の記載

本発明は、米国国立衛生研究所によって付与された認可番号R01 AI081534、R21 AI087107、及びR21 EB007707；米軍医学研究調達機関協力協定(U.S. Army Medical Research Acquisition Activity Cooperative Agreement)に基づく医学及び革新的技術統合センター(Integration of Medicine and Innovative Technology)(CIMIT)の認可(DAMD17-02-2-0006)；米国陸軍医学研究司令部(U.S. Army Medical Research & Materiel Command)(USAMRMC)及び遠隔医療応用研究センター(Telemedicine & Advanced Technology Research Center)(TATRC)により付与された認可(W81XWH-10-1-1050)に基づき、政府の支援により達成された。政府は、本発明においてある特定の権利を有し得る。

40

【0003】

発明の分野

本発明は、運動性細胞、例えば、哺乳動物の精子細胞などの分析及び選別のためのシステム及び方法に関する。

【0004】

発明の背景

生殖年齢の530万人のアメリカ人夫婦(9%)が不妊症を患っており、そのうち、男性側の要因は症例の50%を占めている。細胞質内精子注入(ICSI)の有無にかかわ

50

らず、体外受精（I V F）は、男性不妊症の問題を克服するために、現代の臨床診療において最も広く使用される生殖補助医療技術となっている。I V F 及び I C S I の障害の 1 つは、低精子数（乏精子症（oligozoospermia））及び／又は低精子運動性（精子無力症（oligospermaesthesia））を有し得る精液サンプルから、最も運動性が高く、おそらく最も健康である精子を特定し、単離することである。

【0005】

発明の概要

本明細書において説明される運動性細胞の選別及び分析システムは、運動性細胞、例えば精子などの集団を、空間制約のあるマイクロ流体チャネル内において、インサイチューでリアルタイムに撮像し、追跡し、選別することができる。当該運動性細胞の選別及び分析システムは、迅速でハイスループットの細胞分析及び選別が可能な、化学薬品不含の無流システムである。運動性細胞の特性、例えば、細胞の数、平均運動性、及び特定の細胞の運動性などを特定することができる。そのような特性の分析は、受胎能に影響を及ぼし得る様々な状態、例えば低精子数（乏精子症）及び低精子運動性（精子無力症）などの診断において重要である。さらに、最も運動性の高い細胞は、ポンプ又は他の周辺機器を必要とせずに、当該選別及び分析システムによって受動的に選別される。主に非常に運動性の高い精子で構成されるサンプルは、例えば、生殖補助医療技術での使用にとって望ましい。

10

【0006】

一般的態様において、運動性細胞を選別する方法は、運動性細胞の初期集団を、マイクロ流体チャネルの入口ポートに導入するステップであって、当該運動性細胞の初期集団が第 1 の平均運動性を有する、ステップ；当該運動性細胞の集団をマイクロ流体チャネル内においてインキュベーションするステップ；及び、選別された運動性細胞の集団をマイクロ流体チャネルの出口ポートにおいて収集するステップを含む。選別された運動性細胞の集団は、第 1 の平均運動性より高い第 2 の平均運動性を有する。

20

【0007】

実施形態は、以下のうちの 1 つ又は複数を含み得る。

【0008】

運動性細胞は、精子細胞、例えば、動物の、例えば、哺乳動物の精子細胞を含む。

【0009】

当該方法は、マイクロ流体チャネルを水平又は垂直に向けるステップをさらに含む。

30

【0010】

運動性細胞の集団をインキュベーションするステップは、流動媒体の非存在下においてインキュベーションするステップを含む。

【0011】

運動性細胞の集団をインキュベーションするステップは、マイクロ流体チャネルを約 37℃ に加熱するステップを含む。

【0012】

運動性細胞の集団をインキュベーションするステップは、運動性細胞の初期集団の一部がマイクロ流体チャネルに沿って移動することができる十分な時間、例えば、約 20～60 分間又は約 30 分間、当該運動性細胞の集団をインキュベーションするステップを含む。

40

【0013】

マイクロ流体チャネルの高さは、運動性細胞の寸法の約 20 倍未満、例えば、運動性細胞の寸法の約 3～10 倍である。

【0014】

当該方法は、出口ポート付近において、選別された運動性細胞の集団を含む収集可能な運動性細胞の集団の複数の画像、例えば影像を得るステップ；並びに当該複数の画像を分析するステップを含む第 2 の平均運動性を特定するステップをさらに含む。

【0015】

50

当該方法は、運動性細胞の初期集団の平均経路速度 (average path velocity) (VAP)、直線速度 (straight line velocity) (VSL)、又は直線性 (linearity) のうちの少なくとも1つに基づいて、第1の平均運動性を特定するステップをさらに含む。

【0016】

当該方法は、選別された運動性細胞の集団の平均経路速度 (VAP)、直線速度 (VSL)、又は直線性のうちの少なくとも1つに基づいて、第2の平均運動性を特定するステップをさらに含む。

【0017】

運動性細胞の初期集団を導入するステップは、少なくとも精子約103個/μL、例えば、少なくとも精子約104個/μLの濃度で媒体に精子の初期集団を懸濁させるステップを含む。媒体中の選別された運動性細胞の集団の濃度は、精子約 1.6×10^3 個/μL以下である。

10

【0018】

別の一般的な態様において、運動性細胞の集団を分析する方法は、運動性細胞の初期集団をマイクロ流体チャネルの入口ポートに導入するステップ；マイクロ流体チャネルにおいて運動性細胞の集団をインキュベーションするステップ；マイクロ流体チャネル内の運動性細胞の集団の少なくとも一部の複数の画像を取得するステップ；並びに当該複数の画像に基づいて運動性細胞の集団の少なくとも一部の特性を特定するステップを含む。

【0019】

実施形態は、以下のうちの1つ又は複数を含み得る。

20

【0020】

運動性細胞は、精子細胞、例えば動物の、例えば哺乳動物の精子細胞を含む。

【0021】

複数の画像を取得するステップは、マイクロ流体チャネル内の運動性細胞の集団の少なくとも一部の複数の画像を取得するステップを含む。

【0022】

特定された特性は、運動性、平均経路速度 (VAP)、直線速度 (VSL)、又は直線性のうちの少なくとも1つを含む。

【0023】

特定される特性は、(1) マイクロ流体チャネルの出口ポート付近に位置している選別された運動性細胞の集団の特性、及び(2) マイクロ流体チャネルの長さに沿った運動性細胞の集団の分布のうちの少なくとも一方を含む。

30

【0024】

特性を特定するステップは、マイクロ流体チャネルの出口ポート付近に位置している選別された運動性細胞の集団の特性を、(1) 運動性細胞の初期集団の特性、及び(2) インキュベーション後に入口ポート付近に位置している残留運動性細胞の集団の特性のどちらか又は両方と比較するステップを含む。

【0025】

当該方法は、当該比較の結果に基づいて、マイクロ流体チャネルの選別能力を特定するステップをさらに含む。

40

【0026】

特性を特定するステップは、インキュベーション後に入口ポート付近に位置している残留運動性細胞の集団の特性を、インキュベーション後にマイクロ流体チャネルの出口ポート付近に位置している選別された運動性細胞の集団の特性と比較するステップを含む。

【0027】

当該方法は、特定された特性に基づいて、運動性細胞の初期集団の健康を特定するステップをさらに含む。

【0028】

当該方法は、マイクロ流体チャネルの出口ポートにおいて、選別された運動性細胞の集団を収集するステップをさらに含む。

50

【0029】

運動性細胞の集団をインキュベーションするステップは、精子の初期集団の一部がマイクロ流体チャンネルに沿って移動することができる十分な時間、例えば、約20～60分間又は約30分間、流動媒体の非存在下でインキュベーションするステップを含む。

【0030】

運動性細胞の集団をインキュベーションするステップは、精子の初期集団の一部がマイクロ流体チャンネルに沿って泳ぐことができる十分な時間、精子の集団をインキュベーションするステップを含む。

【0031】

マイクロ流体チャンネルの高さは、運動性細胞の寸法の約20倍未満、例えば、運動性細胞の寸法の約3～10倍である。

10

【0032】

別の一般的状态において、運動性細胞を選別する装置は、マイクロチャンネルを備える。マイクロ流体チャンネルの高さは、運動性細胞の寸法の約20倍未満となるように選択される。当該装置は、マイクロ流体チャンネルの第1の端部に接続された入口ポートであって、第1の平均運動性を有する運動性細胞の初期集団を受け入れるように構成された入口ポートと、マイクロ流体チャンネルの第2の端部に接続された出口ポートとをさらに備える。当該マイクロ流体チャンネルは、マイクロチャンネル中において流体の流れを必要とせずに、第2の端部において、選別された運動性細胞の集団を提供するように構成される。選別された運動性細胞の集団は、第1の平均運動性より高い第2の平均運動性を有する。

20

【0033】

実施形態は、以下のうちの1つ又は複数を含み得る。

【0034】

運動性細胞は、精子細胞、例えば、動物の、例えば、哺乳動物の精子細胞を含む。運動性細胞の寸法は、精子細胞の頭部の直径である。

【0035】

運動性細胞の寸法は、運動性細胞の直径である。

【0036】

マイクロ流体チャンネルの高さは、運動性細胞の寸法の約3から10倍、例えば、約200 μm 未満、例えば、約60 μm 未満、例えば、約3～20 μm などとなるように選択される。

30

【0037】

マイクロ流体チャンネルの長さは、少なくとも部分的に、チャンネルでの運動性細胞のインキュベーション時間及び運動性細胞の速度のうちの少なくとも一方に基づいて選択され、例えば、当該長さは、約20 mm未満、例えば、約12～15 mmである。

【0038】

マイクロチャンネルの長さは、少なくとも部分的に、チャンネルでの運動性細胞のインキュベーション時間及び運動性細胞の泳ぐ速度のうちの少なくとも一方に基づいて選択される。

【0039】

マイクロチャンネルは、インキュベーション時間後に、選別された運動性細胞の集団を提供するように構成される。

40

【0040】

マイクロ流体チャンネルは、四角形断面、台形断面、三角形断面、円形若しくは楕円形断面、マイクロチャンネルの長さに沿って変わる断面、又はリッジを有する断面を有する。

【0041】

マイクロ流体チャンネルは、直線状であるか又は湾曲している。

【0042】

当該装置は、マイクロ流体チャンネルの少なくとも一部の複数の画像をキャプチャするように構成された撮像システムをさらに含む。当該撮像システムは、マイクロ流体チャンネル

50

の少なくとも一部を照らすように構成された光源と、マイクロ流体チャネルにおける光が照らされた部分の運動性細胞の画像、例えば影像などを検出するように構成された検出器とを含む。

【0043】

当該装置は、キャプチャされた画像に基づいて、マイクロ流体チャネルにおける撮像された部分での運動性細胞の特性を特定するように構成された分析モジュールをさらに含む。

【0044】

「運動性細胞」は、例えば、鞭毛及び／又は繊毛の動きなどにより、自発的かつ活動的に移動することができる細胞である。本出願の目的にとっての例示的運動性細胞としては、精子細胞、例えば、哺乳動物の精子細胞など、好中球、マクロファージ、白血球、及びある特定の細菌が挙げられる。

10

【0045】

本明細書において説明されるシステム及び方法は、いくつかの利点を有する。例えば、当該運動性細胞の選別及び分析システムは、高い運動性を有する細胞、例えば精子細胞など、の識別及び選択を容易にする。低細胞数又は低細胞運動性を有する出発サンプルに対しても、細胞に有害な作用を及ぼすことなく、運動性細胞の高収率が実現される。当該システムは、簡素で、小型で、安価であり、複雑な機器設備又は周辺機器、例えば、チューブ又はポンプなどの使用を必要としない。結果はオペレータに依存しない。当該運動性細胞の選別及び分析システムは、生殖補助医療技術における使用のために高い運動性の精子を選択することを望んでいる不妊治療院にとって、並びに自宅でそれらの受胎能を確認することを望んでいる個人にとって、有用であり得る。

20

【0046】

特に明記されない限り、本明細書に用いられる全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者に一般的に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと同様又は同等の方法及び材料を、本発明の実施又は試験において使用することができるが、好適な方法及び材料について下記において説明する。本明細書において言及された全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によりその全体が組み入れられる。それらの内容が本明細書の内容と矛盾する場合には、定義を含めて本明細書が優先する。加えて、材料、方法、及び実施例は、例示に過ぎず、限定を意図するものではない。

30

【0047】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】例示的な運動性細胞の選別及び分析システムの模式図である。

【図2A】本明細書において説明される、運動性細胞の選別及び分析システムの例示的マイクロ流体チップの模式図である。

【図2B】図2Aの例示的マイクロ流体チップの分解立体図である。

40

【図3】例示的マイクロチャネルの幾何学的構造の模式図である。

【図4】選別されたマウス精子及び選別されていないマウス精子の平均経路速度（VAP）及び直線速度（VSL）のプロットである。

【図5A】水平に向けられたマイクロチャネルでのマウス精子運動性ベクトルのブルズアイプロットである。

【図5B】垂直に向けられたマイクロチャネルでのマウス精子運動性ベクトルのブルズアイプロットである。

【図6A】水平及び垂直に向けられたマイクロチャネルにおける、マウス精子の速度のプロットである。

【図6B】水平及び垂直に向けられたマイクロチャネルにおける、マウス精子の直線性の

50

プロットである。

【図 6 C】水平及び垂直に向けられたマイクロチャネルにおける、マウス精子の加速度のプロットである。

【図 7】1 時間のインキュベーション後の、例示的マイクロ流体チップのマイクロチャネル内での、マウス精子の実験による分布及びシミュレーションによる分布のプロットである。

【図 8】インキュベーション時間の関数としての、例示的マイクロ流体チップのマイクロチャネル内での、マウス精子の実験による分布及びシミュレーションによる分布のプロットである。

【図 9 A】チャンネル長及びインキュベーション時間の関数としての、マウス精子の V A P のプロットである。

10

【図 9 B】チャンネル長及びインキュベーション時間の関数としての、マウス精子の V S L のプロットである。

【図 9 C】チャンネル長及びインキュベーション時間の関数としての、マウス精子の直線性のプロットである。

【図 9 D】チャンネル長及びインキュベーション時間の関数としての、運動性マウス精子の割合のプロットである。

【図 1 0】チャンネル長の関数としての、選別された精子におけるマウス精子の V A P 及び V S L 及び収集可能な精子の割合のプロットである。

【図 1 1 A】マイクロ流体チップで選別された精子、スイムアップ手法によって選別された精子、及び非選別精子における、マウス精子の V A P のプロットである。

20

【図 1 1 B】マイクロ流体チップで選別された精子、スイムアップ手法によって選別された精子、及び非選別精子における、マウス精子の V S L のプロットである。

【図 1 1 C】マイクロ流体チップで選別された精子、スイムアップ手法によって選別された精子、及び非選別精子における、マウス精子の直線性のプロットである。

【図 1 1 D】マイクロ流体チップで選別された精子、スイムアップ手法によって選別された精子、及び非選別精子に対する、マウス精子の運動性精子の割合のプロットである。

【図 1 2】精子の軌跡を示す画像である。

【図 1 3】持続的ランダムウォーク (persistent random walk) (P R W) モデルで近似された図 1 2 の精子の軌跡に対する平均二乗変位のプロットである。

30

【図 1 4】持続的ランダムウォーク (P R W) を実行する精子の軌道の模式図である。

【図 1 5】チャンネル長の関数としての、精子の分布のプロットである。

【0 0 4 9】

詳細な説明

図 1 を参照すると、運動性細胞の選別及び分析システム 1 0 0 は、運動性細胞、例えば精子などの集団を、空間制約のあるマイクロ流体チャネル内において、インサイチューでかつリアルタイムに撮像し、追跡し、及び／又は選別する。当該運動性細胞の選別及び分析システム 1 0 0 は、迅速でハイスループットの細胞分析及び選別が可能な、化学薬品不含の無流システムである。運動性細胞の特性、例えば、細胞の数、平均運動性、及び特定の細胞の運動性などを特定することができる。そのような特性の分析は、受胎能に影響を及ぼし得る様々な状態、例えば低精子数（乏精子症）及び低精子運動性（精子無力症）などの診断において重要である。さらに、最も運動性の高い細胞は、ポンプ又は他の周辺機器の必要性なしに、当該選別及び分析システムによって受動的に選別される。主に運動性の高い精子で構成されたサンプルは、例えば、生殖補助医療技術での使用にとって望ましい。

40

【0 0 5 0】

例示的な選別及び分析システム 1 0 0 は、マイクロ流体チップ 1 0 2 を含み、これは、1 つ又は複数のマイクロ流体チャネル 2 0 0 を含む。いくつかの実施形態において、マイクロ流体チップ 1 0 2 は、撮像システム 1 0 6 と統合されており、当該撮像システムは、マイクロ流体チップの 1 つ又は複数のマイクロ流体チャネル内において精子の画像をキャ

50

プチャする。当該画像を分析することにより、マイクロ流体チャンネルでの精子の特性、例えば、数、運動性、速度、加速度、及び／又は指向性を特定することができる。さらに、マイクロ流体チャンネル内の精子は、それらが、チャンネルに沿って（例えば、泳いだり、又は他のタイプの自走的な動きによって）移動する際に選別され、高品質の運動性精子の選別サンプルは、チャンネルの出口において抜き取ることができる。

【0051】

以下の説明において、当該運動性細胞の選別及び分析システムを、精子を参考にしながら説明する。しかしながら、当該システムにおいて他の運動性細胞、例えば、好中球、マクロファージ、白血球、及びある特定の細菌、例えば、大腸菌 (bacterium E. coli) も使用することができることを理解されたい。

10

【0052】

マイクロ流体チップの構造及び製作

図2A及び2Bを参照すると、マイクロ流体チップ102は、1つ又は複数のマイクロ流体チャンネル200a、200b、200c、200dを有する。選別及び／又は分析のために、例えば、ピペット204による注入などによって、入口ポート206a、206b、206c、206dに、精子202が導入される。十分なインキュベーション期間の後、下記において説明されるように、選別された精子のサンプルが、出口ポート208a、208b、208c、208dから抜き取られる。

【0053】

マイクロ流体チップ102は、ベース層210、中間層212、及びカバー層214で形成された多層構造である。チャンネル200は中間層212に形成され、入口ポート206及び出口ポート208は、ベース層210に形成される。各チャンネル200の第1の端部は、対応する入口ポート206に揃えられ、各チャンネル200の第2の端部は、対応する出口ポート208に揃えられ、その結果、入口ポート206からチャンネル200を介して対応する出口ポート208への流路が形成される。いくつかの実施形態において、チャンネル200は、それらのそれぞれの入口ポート206及び出口ポート208をわずかに超えて延びている。チャンネルは、例えば、分析及び／又は選別される精子を含有するマイクロリットル又はミリリットル体積の溶液を受け入れるサイズである。当該チャンネルはさらに、下記において説明されるように、効率的な選別を果たすサイズ及び形状でもあり得る。

20

30

【0054】

マイクロ流体チップは、水平構成（すなわち、チャンネルが水平を向いている）又は垂直構成（すなわち、チャンネルが垂直を向いている）のどちらかにおいて、選別及び分析のために操作可能である。

【0055】

ベース層210は、マイクロ流体チップ102に構造的サポートを提供し、並びに好適な厚さ、例えば、約1.5mm（例えば、約1mmから4mm）などで、十分な剛性の材料、例えば、ポリ（メチルメタクリレート）（PMMA；McMaster Carr、アトランタ、GA）などで形成される。大きな1枚のPMMAをマイクロ流体チップのための所望のサイズ（例えば、24mm×40mm）に切断して入口ポート206及び出口ポート208のための穴を開ける必要がある場合には、レーザー切断機（VersaLaser（商標）、スコッツデール、AZ）が使用される。いくつかの例において、チャンネル200の出口端部に到達した精子の収集を容易にするために、出口ポート208は、入口ポート206より大きい。例えば、いくつかの例では、入口ポート206は、約0.375mm又は約0.65mm（例えば、約0.3mmから1.2mm）の直径を有し、出口ポートは、約0.375mm又は約2mm（例えば、約0.3mmから3.4mm）の直径を有する。

40

【0056】

中間層212は、ベース層210に接着する材料、例えば、両面接着剤（DSA）フィルム（iTapestore、スコッチプレインズ、NJ）などで形成される。チャンネル

50

200は、それ自体が所望のサイズ（例えば、ベース層210のサイズ）にレーザー切断されている中間層212中に、ポリゴン、例えば四角形断面などをレーザー切断することによって形成される。チャンネル200の高さは、中間層212の厚さによって決定され、これについては、下記においてより詳細に説明する。チャンネル200の長さ及び幅は、それぞれ、中間層212中へと切断されたポリゴンの長さ及び幅によって決定される。例えば、下記においてより詳細に説明されるように、チャンネルは、約1～10mm幅（例えば、約4mm幅）及び約1～20mm長（例えば、約3mm、7mm、10mm、15mm、又は20mm長）であり得る。場合によって、様々な長さ及び／又は幅の複数のチャンネルが中間層に形成される。

【0057】

10

チャンネル200を中間層212に切断した後、当該中間層は、各チャンネル200の第1の及び第2の端部が、対応する入口ポート206及び出口ポート210に揃うか又はそれらをわずかに超えて延びるように、ベース層210に接着される。例えばベース層210及び中間層212と同じ横寸法のスライドガラスなどのカバー層214が、中間層の露出している側に接着され、これにより、チャンネル200が封入される。図2に表された実施形態では、マイクロ流体チップ102は、カバー層214が下になるように向けられている。他の実施形態では、マイクロ流体チップ102は、カバー層214が上になるように、又はチャンネル200の上部が開放されるように向けられ得る。

【0058】

概して、本明細書において説明するマイクロ流体チップ102は受動的であり、すなわち、能動的な流れシステムに連結されていない。すなわち、運動性細胞は、マイクロ流体チップ102内のマイクロチャンネル200に沿って、外部的に駆動される流体流れ（例えば、運動性細胞が懸濁されている媒体の流れ）によって押し流されたり又は別の方法で移動させられたりすることなく、自ら移動する（例えば、泳ぐ）。

20

【0059】

撮像システムの操作

再び図1を参照すると、いくつかの実施形態において、精子の選別及び分析システム100は、マイクロ流体チップ102を含み、その構造は、上記において説明されており、任意により撮像システム106と統合されている。マイクロ流体チップ102と撮像システム106とを統合することにより、1つ又は複数のマイクロ流体チャンネル200における精子の集団又は個々の精子を追跡及び分析することが可能となる。いくつかの実施形態において、当該撮像システム106は、マイクロ流体チップ102の1つ又は複数のチャンネル200に対して自動での広視野撮像を実施するレンズレス撮像システムである。他の実施形態において、撮像システム104は、例えば10×対物レンズを備える光学顕微鏡である。

30

【0060】

撮像システム106は、光源108、例えば、発光ダイオード（LED）又は他の光源などを含む。当該光源108は、マイクロ流体チップ102の1つ又は複数のチャンネル200を照らす。画像センサー110が、光源108に対してマイクロ流体チップ102の反対側に位置されている。光がチャンネル200に入射すると、照らされたチャンネルの精子が、光を回折し透過させる。精子による光の回折によって生じた影が、画像センサー110によって撮像され、チャンネル200内の精子の集団の影像（すなわち、チャンネル200内の各精子が影として撮像された画像）が生成される。画像センサーは、任意の適切なセンサー、例えば、電荷結合素子（CCD）センサー（Imperx、ボカトン、FL）又は相補型金属酸化物半導体（CMOS）チップベースのセンサーなどであり得る。

40

【0061】

当該レンズレス撮像システム106は、チャンネル内の精子の影像を、即座に（例えば、約1秒で）、広い視野（FOV）において生成する。例えば、撮像システム106のFOVは、数ミリメートル×数ミリメートル（例えば、4mm×5.3mm）から数センチメートル×数センチメートル（例えば、3.725cm×2.570cm）まで大きくあり

50

得、或いは1つ又は複数のチャンネル200の一部又は全体（例えば、10まで並列に並んだチャンネル）を撮像するのに適切な別のサイズであり得る。

【0062】

場合によって、何十万もの個々の精子が、撮像システム106のFOVに捉えられ得る。さらに、撮像システム106の広いFOVのために、各個々の精子を、比較的長い時間、撮像システムのFOV内に捉えることができる。したがって、多くの精子に対して、精子の動き及び活動性を、全体的に又は個別に、長い時間にわたって追跡及び分析することができ、それにより、正確な統計量を取得することが可能となる。いくつかの実施形態において、当該撮像システム106は、個別に検出し及びカウントするのに十分なコントラスト及び信号対雑音比においてFOV内の精子を撮像するように設計され、これは、場合によって、結果として空間分解能が犠牲になり得る。

10

【0063】

当該画像は、撮像されたチャンネル（複数可）内における個々の精子（例えば、運動性精子）又は精子の集団をカウントし、識別し、追跡し、及びその活動を分析するために、画像解析ソフトウェア（例えば、ImageProソフトウェア、Media Cybernetics, Inc.、MD）を使用して手動及び／又は自動により加工される。例えば、特定のチャンネル内での精子分布のために取得された画像を分析するため、各画像における精子の自動カウント及び識別が実施される。カウントの結果は、回折理論と比較され、これは、臨界パラメータとして、画像センサー110の有効領域（例えば、CCDセンサーの有効面）と撮像された顕微鏡対象（例えば、精子細胞）の位置との間の距離を含む。検出された信号強度に対する、細胞の影の直径の影響を量的に調べるために、キャプチャされた精子細胞の回折シグネチャをモデルで近似する。レンズレス撮像システムの例において、当該システムの操作は、Rayleigh-Sommerfeld回折方程式を数値的に解くことによってモデル化することができる。

20

【0064】

大きな領域のCCDを使用し、適切なソフトウェア処理、例えば、ビデオベースの粒子追跡コードなどを組み込むことにより、かなりの程度の拡張性が可能となり、それにより、例えば、数百万もの精子を同時にモニターしかつ分析することができる。

【0065】

精子の選別及び分析システムの使用

30

生体適合性媒体、例えば、ヒト卵管液（Human Tubal Fluid）（HTF）又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）などに懸濁された精子が、例えばピペットなどを使用して、チャンネルの入口ポート206からマイクロ流体チップ102のマイクロ流体チャンネル200内に導入される。当該チャンネルは、既に生体適合性媒体を含み得る。マイクロ流体チップ102は、37℃で、運動性精子がチャンネルに沿ってチャンネルの出口ポート208へと移動するのに十分な時間、インキュベーションされる。例えば、インキュベーション期間は、約20～40分間、例えば、約30分間、又は約1若しくは2時間未満、或いは、結果として出口ポートにおいて精子の疲弊をもたらす時間量未満などであり得る。インキュベーション期間後、精子は、例えば、微細な先端を有する抜き取り器具又はピペットを使用することによって、又はチップ入口に媒体をポンプ送流することによって、出口208から抜き取られる。運動性精子のみがチャンネルの長さに沿って移動することができるので、出口から抜き取られた精子は運動性精子であり、すなわち、インキュベーション期間は、（例えば、所定の時間内に出口に到達する精子を選択することによって）高い運動性を有する精子のみを得るために最適化することができる。入口付近に残っている精子は、チャンネルの全長を移動することができなかつた低運動性精子であるか、又はランダムな動きによってのみ移動する非運動性精子である。このようにして、マイクロ流体チップ102は、簡単で、受動的で、無流の精子選別を達成し、並びに高運動性の精子のサンプルを抜き出すことができる。

40

【0066】

選別に加えて、当該精子の選別及び分析システム100は、様々なタイプの分析、例え

50

ば、平均精子運動性の分析、並びに個々の精子の経路及び運動性の追跡及び分析などの実施を可能にする。例えば、高品質の精子サンプルを識別するため、又は精子サンプルに関する問題を診断する（例えば、サンプルを乏精子症又は精子無力症サンプルとして診断する）などのために、全精子サンプル若しくは抽出された選別精子サンプルの速度、加速度、指向性、又は運動性を定量化することができる。

【0067】

当該精子の選別システム100は、水平構成（すなわち、チャンネル206を通る流れが水平である）又は垂直構成（すなわち、チャンネル206を通る流れが垂直であり、精子の選別において追加の識別要因として重力が使用される）のいずれかにおいて、操作可能である。インビボにおいて卵子を受精させるために、精子は、女性生殖器系の解剖学的構造及び／又は位置により、重力に逆らって卵子に向かって移動することが必要とされ得る。したがって、垂直方向において精子の分析及び／又は選別を実施することは、水平方向において分析及び／又は選別を実施するよりも、より現実的に精子を特徴付け又は選択するための能力を提供し得る。

【0068】

いくつかの実施形態において、精子のカウントのためにレンズレスCCD撮像システムを使用する場合の誤差を減らすために、当該撮像システムによって分解可能な最大精子濃度は、モデル（例えば、Ozcan及びDemirci、Lab Chip、2008、8、98-106に記載されているようなモデル、なお、当該文献の内容は参照により本明細書に組み入れられる）に基づいて評価され得る。例えば、 $4\text{ mm} \times 5.3\text{ mm}$ のCCD領域では、モデルにより、精子 1.6×10^3 個/ μL の分解可能な最大精子濃度が予測される。精子サンプルが、選別のためにマイクロ流体チャンネル、とりわけ長いチャンネルに位置されると、運動性精子が見つけれられるチャンネルの出口端部に向けて精子のモニタリングが実施され得る。この領域では、精子の濃度は、入口付近の精子の濃度よりも低い。したがって、分解可能な最大精子濃度より高い精子濃度、例えば、臨床的に観察される濃度と同じくらい高い精子濃度などをチャンネルの出口付近での撮像システムの分解能を落とすことなく、チャンネルの入口に導入することができる。下記の実施例において示されるように、分解可能な最大精子濃度より高い精子濃度を導入する能力が実験的に実証され、すなわち、入口において精子 2×10^4 個/ μL の濃度の精子を導入したにもかかわらず、チャンネルの出口付近での選別精子の影の重なりは認められなかった。

【0069】

選別能力に影響を及ぼすパラメータ

再び図2を参照すると、精子が入口ポート206からマイクロ流体チャンネル200に導入されると、運動性精子は当該マイクロ流体チャンネル内を移動する。マイクロ流体チャンネル200は、運動性精子をマイクロ流体チャンネルの長さに沿って出口ポート208に向かって移動するように仕向ける、空間制約のある環境を精子に提示する。結果として、十分なインキュベーション期間の後、高運動性精子の集団は出口ポート付近に到達するが、低運動性精子又は非運動性精子の集団は入口ポート206付近のそれらが元居た場所か又はその付近に残っている。したがって、マイクロ流体チャンネル内での精子の空間制約により、結果として、チャンネル内での精子の運動性による受動的選別が生じる。

【0070】

マイクロ流体チャンネルの幾何学的構造は、チャンネル内での精子選別の効率に影響を及ぼし得る。例えば、マイクロ流体チャンネルの寸法及び形状は、チャンネル内の流体抵抗に影響を及ぼす。さらに、精子の動きは、精子間の相互作用によって影響され、この相互作用は、チャンネル内の利用可能な空間によって部分的に影響される。

【0071】

マイクロ流体チャンネル内での精子の空間制約を達成するために、チャンネルの高さ及び／又は幅（すなわち、中間層212の厚さ、及び中間層中に切断されるポリゴンの幅）は、チャンネル内において選別される精子の寸法に基づいて選択され得る。例えば、図3を参照すると、チャンネル200の高さ h は、選別される精子300のタイプの頭部302の寸法

dの数倍となるように（又は、より一般的には、選別される運動性細胞の寸法、例えば直径など、に基づいて）選択され得る。いくつかの例において、当該高さは、精子の頭部の寸法の3～10倍、又は精子の頭部の寸法dの20倍未満である。他の例では、チャンネル200の幅wは、精子の頭部の寸法d又は運動性細胞の寸法に基づいて選択され得る。図3に示されるように、寸法dは、卵形の精子の頭部302の短い直径である。他の実施形態において、寸法dは、卵形の精子の頭部302の長い直径d'か、又は精子の頭部の長い直径と短い直径の平均であり得る。

【0072】

より詳細には、約2～3 μm の頭部寸法dを有するヒト精子の場合、チャンネル200の高さhは、およそ、例えば、6～30 μm 、又は60 μm 未満であり得る。約10 μm の頭部寸法dを有する齧歯動物（例えば、マウス）の精子の場合、チャンネル200の高さhは、およそ、例えば、30～100 μm 、又は50 μm 、又は200 μm 未満であり得る。約4～5 μm の頭部寸法dを有するウシの精子の場合、チャンネル200の高さhは、およそ、例えば、10～50 μm 、又は100 μm 未満であり得る。約3～4 μm の頭部寸法dを有するウマの精子の場合、チャンネル200の高さhは、およそ、例えば、10～40 μm 、又は80 μm 未満であり得る。約4 μm の頭部寸法dを有するヒツジの精子の場合、チャンネル200の高さhは、およそ、例えば、10～40 μm 、又は80 μm 未満であり得る。約4～5 μm の頭部寸法dを有するウサギの精子の場合、チャンネル200の高さhは、およそ、例えば、10～50 μm 、又は100 μm 未満であり得る。約3 μm の頭部寸法dを有するネコの精子の場合、チャンネル200の高さhは、およそ、例えば、10～30 μm 、又は60 μm 未満であり得る。約3～4 μm の頭部寸法dを有するイヌの精子の場合、チャンネル200の高さhは、およそ、例えば、10～40 μm 、又は80 μm 未満であり得る。約5 μm の頭部寸法dを有するブタの精子の場合、チャンネル200の高さhは、およそ、例えば、15～50 μm 、又は100 μm 未満であり得る。他の種の精子の場合、チャンネルはそれに応じたサイズであり得る。いくつかの実施形態において、チャンネルの寸法は、下記においてより詳細に説明されるような、空間制約のある環境内の精子の動きのシミュレーションにより特定された無次元量に基づいて決定される。

【0073】

いくつかの実施形態において、マイクロ流体チャンネルの形状も、チャンネル内での精子のより効率的な選別を達成するために適合され得る。例えば、非直線的チャンネル（例えば、湾曲したチャンネル、S字形状のチャンネル、正弦曲線状のチャンネル、正方形のチャンネル、又は角度のあるチャンネルなど）を使用してもよい。マイクロ流体チャンネルの幅は、チャンネルの入口ポート側からチャンネルの出口ポート側へと変化していてもよい（例えば、狭くなっていくチャンネル又は広がっていくチャンネルなど）。マイクロ流体チャンネルの側壁は、例えば、広い底部及び狭い上部を有するチャンネル（例えば、台形断面を有するチャンネル）、或いは別の断面、例えば、三角形断面、円形若しくは楕円形断面、又は別の形状の断面などを有するチャンネルなどを形成するように、傾いていてもよい。断面も、リッジ、例えば、ヘリングボーン構造で形成されたリッジ又は四角形のフィンで形成されたリッジなどを有していてもよい。チャンネルの深さは、チャンネルの長さに沿って変わってもよい。他の形状のチャンネル又は他の幾何学的特徴を有するチャンネルも使用することができる。

【0074】

マイクロ流体チャンネル200の長さも、チャンネル内での精子の効率的な選別を達成するために選択される。所定のインキュベーション時間に対して、チャンネルの長さは、運動性精子がインキュベーション時間内にチャンネルの出口端部に到達できるように十分に短い、チャンネルの出口端部の運動性精子とチャンネルの入口端部の低運動性精子及び非運動性精子との間が十分離れるように十分に長くあるように選択される。例えば、30分間のインキュベーション期間及び80～120 $\mu\text{m}/\text{s}$ の速度を有するマウス精子の場合、12～15 mmのチャンネル長が選択され得る。同じ30分間のインキュベーション期間でも、約50 $\mu\text{m}/\text{s}$ の速度を有するヒト精子の場合には、8～12 mmのチャンネル長が選択され得る。

【0075】

他の設計パラメータも、マイクロ流体チャネルの選別能力を最適化するために変えることができる。例えば、チャネルにおける運動性細胞のインキュベーション時間を変えることができる。化学的、生物学的、又は温度における勾配を、チャネルに沿って適用することができる。固定された媒体若しくは動的媒体及び表面パラメータ、例えば、栄養物及び酸素の拡散輸送などを、例えば、卵丘細胞などの他の細胞の存在などによって変えることができる。精子が懸濁されている選別媒体の特性、例えば、密度、表面張力、間隙率、及び／又は媒体の粘度を変えることができる。他の設計パラメータも、マイクロ流体チャネルの選別能力に影響を及ぼすように変えることができる。

【0076】

場合によって、マイクロ流体チップ102のための設計パラメータの一部又は全てが、マイクロチャネルでの精子の運動性のモデルの仕様に従って選択される。当該モデルは、例えば、精子間の相互作用及び精子とマイクロチャネルの表面との間の相互作用などを含めて、空間制約のある環境下での個々の精子及び／又は精子の集団の挙動をシミュレートし得る。当該モデルは、例えば、集合的流体力学効果、精子の疲弊、精子の凝集若しくは他の相互作用、精子の間の流体力学的相互作用の結果としての協同作用、精子とチャネル壁との間の流体力学的相互作用の結果としての協同作用、及び／又は精子の鞭毛の波形などの因子を組み入れることができる。さらに、当該モデルは、長さ、幅、高さ、及び形状など、チャネルの幾何学的構造のパラメータを組み入れることができる。

【0077】

実施例

本発明について、以下の実施例においてさらに説明するが、これは、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

【0078】

概して、以下の実施例は、精子などの運動性細胞を選別するためのマイクロ流体チップの能力を実証するものである。低運動性細胞又は非運動性細胞は当該チャネルに残しつつ、高運動性細胞を当該チップのマイクロ流体チャネル（複数可）の出口端部から回収することができる。当該マイクロ流体チップの選別能力は、チャネル寸法及びインキュベーション時間などのいくつかのパラメータに依存する。運動性細胞の特性、例えば、運動性の様々な運動パラメータなどを、当該マイクロ流体チャネルにおける運動性細胞の画像の分析から特定することができる。

【実施例1】

【0079】

精子サンプルの調製

精液サンプルは、Jackson Laboratories（バーハーバー、ME）からの7～12週齢のB6D2F1マウスから採取した。動きが止まるまでマウスをCO₂に曝露し、次いで頸椎脱臼によって安楽死させた。胴体の中央部を小さく切開し、皮膚をめくり、鋭的に切開して腹膜を開いて内臓を露出させた。両方の脂肪体を引き下げて、精巣及び精巣上体を露出させた。精巣上体尾及び輸精管部分を摘出して、10mg/mLのウシ血清アルブミン（BSA）（Sigma、セントルイス、MO）を補ったヒト卵管液（HTF）（Irvine Scientific、サンタアナ、CA）300μLの入った中央ウェル皿に入れた。解剖顕微鏡下において、一對の鉗子で精巣上体を適所に保持し、精巣上体の遠位末端を切開して、精子を流出させた。インスリン針で臓器を固定して、一對の鉗子を一方の端から他方の端へとゆっくりと移動させて、精子を輸精管から押し出した。当該皿をインキュベータ（37℃、5%のCO₂）に10分間入れて、全ての精子を精巣上体から泳ぎ出させた。精巣上体、輸精管、及びより大きな壊死組織片を手作業で取り出して破棄した。

【0080】

当該精子懸濁液を、0.5mLのエッペンドルフ管に入れ、気体の移動を可能にしつつ蒸発を防ぐために、無菌胚試験済み鉱油の薄層（Sigma、セントルイス、MO）を上

に位置した。次いで、受精能獲得のため、当該開放管を37℃のインキュベータに30分間入れた。受精能獲得の後、当該管をそっと叩いて、当該精子懸濁液を混ぜた。

【0081】

受精能を獲得した精子のサンプル10μLをピペットで取り出し、新しいエッペンドルフ管に入れ、それを60℃の湯浴に入れ、Makler（登録商標）Counting Chamber（Sefi-Medical Instruments、ハイファ、イスラエル）を使用してカウントするための死んだ精子のサンプルを得た。残った精子懸濁液を、HTF-BSA媒体中において精子5000個/μL未満の濃度に調整して、下記の実施例において説明される実験に使用した。特に、マイクロ流体チップに導入される精子の濃度は、ImageProソフトウェア（Media Cybernetics, Inc.、MD）を使用した画像解析により確認したところ、精子1500～4000個/μLの範囲であった。

10

【0082】

下記のいくつかの実施例において、精子をマイクロ流体チップに導入する前に、スィムアップ法を用いて予備選別した。精子を取り出した後、新鮮なHTF/BSA媒体40μLを、0.5mLのエッペンドルフ管中の精子懸濁液の上に加えて、無菌胚試験済み鉱油の薄層を媒体の上に位置した。当該管を37℃のインキュベータに1.5時間入れて、精子を分離させた。エッペンドルフ管の上部から回収した精子をマイクロ流体チップに導入した。

【実施例2】

20

【0083】

高運動性精子の選別

運動性に基づいて精子を選別するマイクロ流体チップの能力を実証するために、入口ポート及び出口ポートでの精子の運動性を、光学顕微鏡を使用して得られた連続する画像に基づいて、非選別精子の運動性と比較した。この選別試験では、7mmのチャンネル長、4mmのチャンネル幅、50μmのチャンネル高さ、0.65mmの入口ポート直径、及び2mmの出口ポート直径を有するマイクロ流体チップを使用した。大きな出口ポート直径は、チャンネルからの精子の容易な取り出しのために設計した。

【0084】

当該チャンネルを、10mg/mLのBSAを含有する新鮮なHTF媒体で満たした。出口ポートを、2μLのHTF/BSA媒体で満たし、蒸発を防ぐために、上に鉱油の薄層を位置した。受精能獲得後、受精能を獲得した精子1μLを取り出し、入口ポートに入れた。マイクロ流体チップを、37℃のインキュベータに30分間入れた。インキュベーション期間の終了時に、10×の対物レンズを備えた顕微鏡（TE 2000；ニコン（Nikon）、日本）を使用し、Spotソフトウェア（Diagnostic Instruments, Inc.、バージョン4.6、スターリングハイツ、MI）を使用して0.4～1秒あたり1フレームの割合において、入口ポート及び出口ポートの両方において1.2mm×0.9mmの領域に対して20枚の連続画像を取得した。検証のために、多数のチャンネル位置における顕微鏡分析を、チャンネルのCCD分析と比較した。

30

【0085】

40

連続する顕微鏡画像に基づいて、入口ポート及び出口ポートでの精子カウント及び無作為に選択された精子の運動性を、お互いに、及び予備選別された対照サンプルと、並びに非選別精子と比較した。平均経路速度（VAP）、直線速度（VSL）、及び直線性（VSL/VAP）などの、精子の運動性を定義する運動パラメータを定量した。VAPは、観察時間の間に精子がその動きの平均的な方向において移動する距離に沿った速度として定義され、VSLは、精子の軌跡の最初の位置と最後の位置の間の直線距離に沿った速度として定義される。非運動性精子も観察したが、運動性を示す精子のみを追跡した。

【0086】

図4を参照すると、出口ポートでの精子の運動性（すなわち、VAP及びVSL）は、非選別精子及び選別後に入口ポートにいる精子の運動性よりも著しく高かった（ $p < 0.$

50

0.1; $n = 33 \sim 66$; カッコは、群間での $p < 0.01$ の統計的有意を示している)。

【0087】

選別試験の結果は、マイクロ流体チップが最も運動性の高い精子を首尾よく選別することができ、それらの精子は、選別プロセスが完了した後に、例えば、抜き取り器具チップにより、又は入口ポートから媒体をポンプ送流することにより、出口ポートにおいて収集することができるということを示している。さらに、選別後でさえも精子速度の幅広い範囲を前提として、単一チップベースの処理及びモニタリングは、水平構成又は垂直構成のどちらかを用いることにより、最も高品質の運動性精子の分離が可能であり得る。

【実施例3】

【0088】

精子選別に対するチャンネルの向きの効果

精子運動性に対するチャンネルの向きの効果を特定するために、水平チャンネル方向及び垂直チャンネル方向における精子の動きを記録した。チャンネルは、7 mmの長さ、4 mmの幅、及び50 μm の高さを有していた。当該チャンネルを、10 mg/mLのBSAを補った新鮮なHTF媒体で満たした。1 μL の精子サンプルを、上記において説明したように、スイムアップカラムの最上部から採取し、ピペットでチャンネルの入口ポートに入れた。レンズレスCCDセンサーを使用して、1秒間あたり1フレームの割合で15枚の連続する影像を記録した。CCDセンサーは、チャンネル全体を網羅しており、そのため、チャンネル内の全ての精子を記録した。Photoshop (Adobe、サンノゼ、CA)を使用して、運動性精子を識別し追跡した。

【0089】

垂直構成において精子を撮像するために、マイクロ流体チップをCCDセンサーに固定して、システム全体を90度回転させた。一度、マイクロ流体チップを垂直に位置すると、撮像の間、システムを垂直方向に維持したまま、同じ雄のドナーマウスからの精子を使用して、上記の調製及び撮像プロセスを繰り返した。

【0090】

各構成から無作為に選択された10個の精子に対して運動性分析を実施した。特に、水平方向及び垂直方向の両方での精子の動きを記録し、結果を、それぞれ図5A及び5Bに示されているように、運動性ベクトルとしてブルズアイプロットに示した。隣接する同心円の間の距離は100 μm である。両方の構成において、精子は、動き及び方向のそれらのパターンにおいて著しい多様性を示した。

【0091】

水平方向及び垂直方向の両方における精子の動きをさらに特徴付けるために、精子の動きの経路を追跡し、移動した距離をImageProソフトウェア(Media Cybernetics, Inc., MD)を使用して測定した。平均経路速度(VAP)、直線速度(VSL)、及び直線性(VSL/VAP)などの、精子の運動性を定義する運動パラメータを定量した。非運動性精子も観察したが、運動性を示す精子のみを追跡した。

【0092】

表1を参照すると、選択された水平構成からの10個の精子及び垂直構成からの10個の精子のそれぞれに対して、VAP、VSL、及び直線性が定量化されている。表から分かるように、水平構成では、精子細胞H2及びH9が最も高い運動性を示し、垂直構成では、精子細胞V1及びV2が最も高い運動性を示した。

【0093】

表1. 選択された精子の精子運動性パラメータ

10

20

30

40

【表 1】

精子	平均経路速度 (VAP)	直線速度 (VSL)	直線性 (VSL/VAP)
H1	69.10	57.14	0.83
H2	85.19	66.07	0.78
H3	19.95	13.57	0.68
H4	21.56	17.86	0.83
H5	36.82	17.86	0.48
H6	67.36	61.43	0.91
H7	21.61	14.29	0.66
H8	26.33	18.57	0.71
H9	80.05	65.36	0.82
H10	29.57	8.57	0.29
V1	90.03	75.00	0.83
V2	86.75	67.86	0.78
V3	47.76	39.29	0.82
V4	92	66.07	0.71
V5	28.72	22.14	0.77
V6	55.31	45.71	0.83
V7	37.09	23.57	0.64
V8	69.9	57.50	0.82
V9	41.50	19.29	0.46
V10	53.18	10.71	0.20

10

20

【0094】

図6A～6Cを参照すると、水平構成及び垂直構成の両方において撮像された精子を、VAP、VSL（図6A）、直線性（図6B）、及び加速度（図6C）について、統計的に分析している。短期間においてモニターされた、受精能を獲得した運動性精子の小さなセットに対して、水平構成及び垂直構成における撮像では、統計的に有意な差（ $p > 0.05$ ）は得られず、したがって、どちらの構成においても、実質的に互換的にマイクロ流体チップを使用することができるということが実証された。対照的に、精子の加速度は、水平構成（ $-50 \sim 30 \mu s^{-2}$ ）よりも垂直構成（ $-75 \sim 90 \mu s^{-2}$ ）の方が幅広い範囲の値に広がる。

30

【0095】

この実施例及び下記において説明されるさらなる実施例に対し、VAP、VSL、及び直線性を、0.05に設定された統計的有意性（ $p < 0.05$ ）による2サンプルのパラメトリックスチューデントのt検定を用いて、以下の群の間の差の有意性について統計的に分析した：（i）選別後の入口の精子と出口の精子；（2）30分間のインキュベーション時間によりマイクロ流体チップによって選別された精子とスィムアップ技術によって選別された精子；及び（3）30分間のインキュベーション時間によりマイクロ流体チップによって選別された精子と非選別精子。統計的有意性の閾値は、全ての試験に対して0.05（ $p < 0.05$ ）に設定し、データは平均±標準誤差（SEM）として提示した。マイクロ流体チップの選別能力をさらに評価するために、非選別条件（ $n = 33$ ）、入口（ $n = 59$ ）、及び出口（ $n = 66$ ）計測に対して、統計的有意性の閾値を0.01（ $p < 0.01$ ）に設定したTukeyのポストホック多重比較検定による一元配置分散分析（ANOVA）により、VAP及びVSLも分析した。収集されたデータの正規性について、アンダーソンダーリング検定により分析した。

40

【実施例4】

【0096】

精子選別に対するインキュベーション時間の効果

マイクロ流体チップを使用した精子選別のためのインキュベーション時間を最適化するために、様々なインキュベーション時間に対して、20mm長、4mm幅、及び50μm

50

高のチャネル全体の精子分布を撮像し分析した。

【0097】

チャネルを、 10 mg/mL のBSAを含有する新鮮なHTF媒体で満たした。出口ポートを、 $2\text{ }\mu\text{L}$ のHTF/BSA媒体で満たし、蒸発を防ぐために、上に鉱油の薄層を位置した。精子 $1500\sim4000$ 個/ μL の密度に希釈された精子サンプル $1\text{ }\mu\text{L}$ を、入口ポートからチャネルに導入し、蒸発を防ぐために、無菌胚試験済み鉱油の薄層で当該入口ポートを覆った。当該マイクロ流体チップを、5分間、15分間、30分間、及び1時間などの様々なインキュベーション時間において、 37°C のインキュベータに入れた。

【0098】

インキュベーション後、チャネル内の精子分布を、AxioVisionソフトウェア (Carl Zeiss Micro Imaging) によって制御された自動ステージによる顕微鏡 (Carl Zeiss Micro Imaging, LLC、ソーンウッド、NY) を使用して撮像した。自動分析及び手動分析を使用して、精子分布を分析した。精子濃度が比較的高い入口付近の領域に対しては、ImageProソフトウェアを使用して精子を自動カウントした。より低い精子濃度の領域 (例えば、出口付近など) に対しては、手動によるカウントを使用した。

【0099】

熱で殺した (60°C で20分) 精子を用い、5分間及び1時間のインキュベーションの後にチャネル内の精子分布を測定する、対照分布実験も実施した。

【0100】

チャネル内の観察される精子分布に対する、精子の疲弊時間の影響及び死亡した精子の初期割合の役割を調査するために、各インキュベーション時間に対する実験での精子分布を、対照精子分布及びチャネルにおける精子運動性のおおざっぱなモデルによる予測と比較した。精子の活動的な運動性は、持続性ランダムウォーク (PRW) としてモデル化し、死亡した精子は、(上記において説明したように) 等方性ランダムウォーク (isotropic random walk) によって模倣したブラウン力によってのみ動くとしてモデル化した。

【0101】

図7は、1時間のインキュベーション後の、チャネルに沿った様々な位置での実験での精子分布を示している。実験結果を、以下の様々なパラメータのPRWモデル：(1) PRWモデル；(2) 25%の精子が初期に死亡したPRW；(3) 30分の平均インキュベーション時間 (± 15 分) を含むPRW；及び(4) インキュベーション時間が30分でありかつ25%の精子が初期に死亡したPRWと比較する。誤差バーは、平均±標準誤差を意味する。実験結果は、精子が30分の平均疲弊時間 (インキュベーション時間) を有しかつ精子の25%が初期に死亡したPRWモデルに最も良く一致している。これらの結果は、実験計測と一致しており、所定の精子サンプルにおいて、当該サンプルは入口ポートに注入する直前に既に精子の20%が死亡したことを示している。

【0102】

図8は、5分間、15分間、30分間、及び1時間のインキュベーション期間後のチャネル内における実験での精子分布を示している。各インキュベーション時間に対する、実験での分布を、同じインキュベーション時間でありかつ精子の25%が初期に死亡したPRWモデルと比較した。誤差バーは、平均±標準誤差を意味する。入口ポートから出口ポートへ向かっての精子分布のシフトが、30分のインキュベーション内において観察され、これは、インキュベーションの間に精子の一部が入口ポートから出口ポートへ向かって泳いで移動したことを示している。この分布のシフトは、30分のインキュベーション期間の終了時にピークとなった。より詳細には、チャネル位置7~20mmにおける精子の割合は、30分のインキュベーション期間までは増加し、より長いインキュベーション時間では減少した。チャネル位置1~3mmにおける精子の分布では、同様であるが逆の傾向が観察された。これらの結果は、精子の疲弊に起因し得る。

【0103】

30分のインキュベーション期間 (標準偏差 ± 15 分) に対するシミュレーション結果

10

20

30

40

50

は、実験結果に対し、最高の一致を示す。

【実施例 5】

【0104】

精子選別に対するチャンネル長の効果

様々な長さのチャンネルでの入口ポート及び出口ポートにおける精子の特性を比較することによって、精子選別能力に対するチャンネル長の効果を特定した。

【0105】

上記の実施例 4 において説明したように、精子サンプルを調製して、チャンネルを満たした。7 mm、10 mm、10 mm、及び 20 mm のチャンネル長を使用した。各チャンネル長に対して、30 分及び 1 時間のインキュベーション時間を適用した。

【0106】

図 9 A～D 及び表 2 を参照すると、VAP、VSL、直線性、並びに 30 分又は 1 時間のインキュベーション時間の後の入口及び出口での運動性精子の割合が、各チャンネル長に対して示されている。下記においてより詳細に説明されるように、調査した全てのチャンネル長は、選別能力を示したが、精子の運動性（VAP、VSL、及び直線性）及び運動性精子の割合は、チャンネル長の間で変わった。チャンネル長の間での統計的有意には、* のマークが付けられており、入口と出口との間での統計的有意には # のマークが付けられている。データは、平均±標準誤差（N=22～109）として提示されている。

【0107】

表 2. 異なるチャンネル長及びインキュベーション時間に対する、平均経路速度(VAP)、直線速度(VSL)、直線性、及び精子の運動性の割合における、SCMS システムの入口と出口の間の変化の倍率

【表 2】

チャンネル長	SCMS システムにおける入口と出口との間の変化の倍率							
	7 mm		10 mm		15 mm		20 mm	
インキュベーション時間	30分	1時間	30分	1時間	30分	1時間	30分	1時間
VAP	1.9	1.4	2.1	1.7	3.0	2.0	2.6	2.1
VSL	1.9	1.3	2.3	1.8	3.8	2.1	2.8	2.1
直線性	1.1	1.0	1.1	1.0	1.2	1.1	1.1	1.0
運動性の割合	1.3	1.6	1.6	3.1	1.7	2.2	2.0	2.3

【0108】

図 9 A～9 B 及び表 2 を詳細に参照すると、30 分のインキュベーション期間において、出口における精子の VAP 及び VSL は、7 mm、10 mm、15 mm、及び 20 mm 長のチャンネルの入口における精子の VAP 及び VSL より、それぞれ、1.9、2.1、3.0、及び 2.6 倍；並びに 1.9、2.3、3.8、及び 2.8 倍高かった。インキュベーション期間が 1 時間まで増加すると、出口での精子の VAP 及び VSL は、7 mm、10 mm、15 mm、及び 20 mm 長のチャンネルの入口における精子の VAP 及び VSL より、それぞれ、1.4、1.7、2.0、及び 2.1 倍；並びに 1.3、1.8、2.1、及び 2.1 倍まで減少した。

【0109】

図 9 C 及び表 2 を参照すると、30 分のインキュベーション期間の場合の全てのチャンネル長に対して、入口及び出口における精子の直線性において有意差が観察された。しかしながら、1 時間のインキュベーション期間では、入口及び出口での精子の直線性における有意差は、15 mm のチャンネル長の場合にのみ観察され；7 mm、10 mm、及び 20 mm のチャンネルでは有意差は認められなかった。これらの結果は、インキュベーション時間が最適のインキュベーション時間（この場合は 30 分）を超えて増加した場合、運動性及び直線性の低い精子が短いチャンネルの出口に到達する機会がより高くなることを示してい

る。20mmチャネルの出口での精子の直線性の低下は、疲弊に起因し得る。

【0110】

図9D及び表2を参照すると、30分のインキュベーション期間及び1時間のインキュベーション期間の両方に対し、全てのチャネル長において、入口及び出口における運動性精子の割合において有意差が認められ、この場合、運動性精子の割合は、総精子数に対する運動性精子の割合として定義した。30分のインキュベーション期間の場合、出口における運動性精子の割合は、入口における運動性精子の割合より、7mm、10mm、15mm、及び20mm長のチャネルに対して、それぞれ、1.3、1.6、1.7、及び2.0倍高かった。インキュベーション期間が1時間まで増加すると、出口での運動性精子の割合は、入口での運動性精子の割合より、7mm、10mm、15mm、及び20mm長のチャネルに対して、それぞれ、1.6、3.1、2.2、及び2.3倍高かった。30分のインキュベーション期間と比較したときの1時間のインキュベーション期間の場合の出口での運動性精子の割合における増加は、より長いインキュベーション期間の間に、いっそう多くの運動性精子が入口から移動することに起因し得る。

10

【0111】

この実施例及びチャネル長の効果に関連する他の実施例において、疲弊及び精子選別結果に対するチャネル長、幾何学的構造、及び表面パターンの有意性を、Tukeyのポストホック比較によるノンパラメトリック一元配置分散分析（ANOVA）により検定した。

【実施例6】

20

【0112】

精子選別効率に対するチャネル長の効果

様々なチャネル長を使用して選別した後に精子の運動性及び運動性精子の割合を比較することによって、精子選別効率に対するチャネル長の効果を調査した。

【0113】

再び図9A及び9Bを参照すると、30分のインキュベーション期間の場合、15mm長のチャネルで選別された精子は、7mm長のチャネルによって選別された精子（VAP： $107.9 \pm 28.1 \mu\text{m/s}$ ；VSL： $98.3 \pm 30.3 \mu\text{m/s}$ ）及び10mm長のチャネルで選別された精子（VAP： $109.8 \pm 26.9 \mu\text{m/s}$ ；VSL： $100.0 \pm 30.3 \mu\text{m/s}$ ）より著しく高いVAP（ $130.0 \pm 31.1 \mu\text{m/s}$ ）及びVSL（ $120.6 \pm 31.6 \mu\text{m/s}$ ）を示した。しかしながら、チャネル長を20mmまで伸ばしても、精子選別（VAP： $127.2 \pm 41.3 \mu\text{m/s}$ ；VSL： $113.7 \pm 38.0 \mu\text{m/s}$ ）において、15mm長チャネルによる選別を超えるさらなる向上は見られなかった。これらのデータは、15mmまでチャネル長を延ばすことによって、運動性精子がチャネル内を、精子速度の差により低運動性精子又は非運動性精子よりも遠くまで移動することができ、その結果として、精子選別が向上することを示した。

30

【0114】

1時間のインキュベーション期間の場合、15mm長のチャネル（VSL： $108.5 \pm 27.8 \mu\text{m/s}$ ）はやはり、7mm長のチャネル（VSL： $67.7 \pm 25.2 \mu\text{m/s}$ ）又は10mm長のチャネル（VSL： $88.6 \pm 27.8 \mu\text{m/s}$ ）よりも良好な選別能力を示した。しかしながら、20mm長チャネルによって選別された精子は、7mm長のチャネルによって選別された精子（VAP： $79.6 \pm 23.6 \mu\text{m/s}$ ）及び10mm長のチャネルによって選別された精子（VAP： $98.4 \pm 27.1 \mu\text{m/s}$ ）よりも著しく高いVAP（VAP： $127.3 \pm 24.1 \mu\text{m/s}$ ）を示した。

40

【0115】

30分のインキュベーション期間と1時間のインキュベーション期間との間に、精子速度において有意な向上は認められなかった。

【0116】

図9Cを参照すると、精子の直線性に対し、30分のインキュベーション期間では異なるチャネル長の間に有意差は認められなかった。しかしながら、インキュベーション時間

50

が1時間まで長くなると、30分のインキュベーション時間と比較した場合、短いチャンネルで選別された精子（7mm； $p < 0.05$ ）に対して、直線性において有意な減少が認められたが、より長いチャンネル（10mm、15mm、及び20mm）で選別された精子に対しては認められなかった。この結果は、十分なインキュベーション時間では運動性の低い精子が短いチャンネルの出口に到達することに起因し得る。

【0117】

図9Dを参照すると、各チャンネルの入口及び出口における運動性精子の割合を特定するために、統計的分析を実施している。30分のインキュベーション期間の場合、異なるチャンネル長を用いて選別された精子は、チャンネルの入口及び出口における運動性精子の割合において、統計的な差を示さなかった。インキュベーション時間が1時間まで長くなると、7mm長のチャンネルでは、より長いチャンネルと比較して、入口及び出口における運動性精子の割合において有意な減少が認められた。1時間のインキュベーション期間の7mm長のチャンネルでは、30mmのインキュベーション期間での同じチャンネルと比較した場合に、運動性精子の割合における減少が認められた。しかしながら、インキュベーション時間を1時間まで延ばしても、より長いチャンネルでは、運動性精子の割合に有意な影響は生じなかった。これらの結果は、十分なインキュベーション時間では、非常に低い運動性の精子が、7mm長のチャンネルの出口に到達することに起因し得る。しかしながら、1時間のインキュベーション時間でも、低い運動性の精子がより長いチャンネル（例えば、15mm又は20mmチャンネル）の出口に到達する可能性は低かった。

【0118】

さらに、チャンネルに導入された総精子に対する、マイクロ流体チップから収集することができる選別された精子の割合（「収集可能な精子の割合」と呼ぶ）を、30分のインキュベーション期間において、各チャンネル長に対して評価した。特に、チャンネルにおける収集可能な精子の割合を、30分のインキュベーション期間でのチャンネル内の精子分布に基づいて算出した。7mm、10mm、15mm、及び20mm長のチャンネルから収集される選別された精子の体積は、出口での媒体（3 μ L）に加え、それぞれ、0.2 μ L、0.6 μ L、1 μ L、及び1 μ Lであった（これは、チャンネルの最後の1mm、3mm、5mm、及び5mmにおける精子サンプルの体積に等しい）。所定の体積において、チャンネルに導入された総精子数を、チャンネルから収集されるであろう選別された精子で割ることにより、収集可能な精子の割合を算出した。

【0119】

図10に示されているように、出口付近の収集可能な範囲内の精子の割合は、7mm、10mm、15mm、及び20mm長のチャンネルに対し、それぞれ、25.6%、19.7%、9.4%、及び3.3%であった。これらの結果は、高い運動性を有する精子に加えて、短いチャンネルから収集される低い運動性の精子に起因し得る効果として、出口付近の収集可能な範囲内の精子の数は、チャンネル長が長くなるに従って減少するというを示していた。データは、 $N = 3$ により平均±標準誤差として提示した。

【0120】

上記の結果に基づき、効率的な精子選別を達成するために最適なチャンネル長及びインキュベーション時間は、それぞれ、15mm及び30分であると結論付けることができる。

【実施例7】

【0121】

マイクロ流体チップ選別と従来のスイムアップ選別との比較

15mm長、4mm幅、及び50 μ m高さのチャンネルを有するマイクロ流体チップにより30分のインキュベーション期間において選別された精子の特性を、30分のインキュベーション期間において従来のスイムアップ技術によって選別された精子及び非選別精子のサンプルの特性と比較した。

【0122】

15mm長のチャンネルを使用した精子選別を、上記において説明したのと同様に実施した。

【0123】

精子に受精能を獲得させるために精子サンプルを30分間インキュベーションすることによって、スイムアップ選別用に精子サンプルを調製し、続いて、90 μ Lの精子サンプルをピペットでエッペンドルフ管に移し、当該サンプルを精子5000個/ μ L未満の濃度まで希釈した。懷死組織片不含の上乗せ媒体を作成するために、60 μ Lの新鮮なHTF-BSA媒体を精子懸濁液の上に加えた。蒸発を防ぐために、無菌鉱油の薄層を当該HTF-BSA媒体の上に加えた。エッペンドルフ管を37℃のインキュベータに入れて、30分又は1時間インキュベーションした。インキュベーション後、運動性分析のために、当該媒体の最上部から5 μ Lの精子サンプルを採取した。

【0124】

10

スイムアップ技術を使用して選別された精子を分析するために、精子サンプルを、撮像のためにPMMAスライド(24mm×60mm)の上に置き、それによって、スイムアップ技術とマイクロ流体チップ技術との間での精子の運動計測に対する基質の影響を排除した。具体的には、5 μ Lの精子サンプルを、PMMA基材上に位置された10 μ LのHTF-BSA媒体の小滴に加えた。2枚のDSAフィルム片(3mm×25mm)を、当該PMMA上に置いた。当該精子媒体の小滴にスライドガラス(25mm×25mm)を被せ、それにより、スライドガラスとPMMA基材との間に位置されたDSAフィルムが、精子が自由に動くための空間を作り出した。

【0125】

PMMA上の精子サンプルを、顕微鏡下において撮像し、精子の運動性及び運動性精子の割合を特定するために分析した。25枚の連続する顕微鏡画像(TE 2000; ニコン(Nikon)、日本)を、10×の対物レンズを使用し、Spotソフトウェア(Diagnostic Instruments Inc.、バージョン4.6)を使用して平均して0.6秒に1フレームの割合で、取得した。

20

【0126】

非選別精子の対照サンプルを調製するためにも、これらのサンプルの調製及び撮像技術を使用した。

【0127】

図11A~11Dを参照すると、15mm長のチャンネルでは、結果として、スイムアップ技術によって選別された精子及び非選別精子よりも有意に高い運動性(VSL、VSL及び直線性)及び運動性精子の割合を有する選別された精子が得られ、当該マイクロ流体チップが高運動性精子を選別するための効果的な方法であることが実証された。データは、N=4~7での平均±標準誤差として提示した。

30

【実施例8】

【0128】

精子の行路の理論的分析

個々の精子を追跡した後、各精子の平均二乗変位(MSD)を計算した。図12は、MTrackJ Pluginを組み込んだImageJソフトウェアを使用して得たサンプル精子の軌跡を示している(Meijering, Dzyubachyk, Smal. Methods for Cell and Particle Tracking. Methods in Enzymology, 504巻、第9章、2012年2月、183-200ページ)。

40

【0129】

x-y面における精子の動きのみを考慮し、
 $\langle d^2(t) \rangle = \langle (x(t) - x_0)^2 + (y(t) - y_0)^2 \rangle$
 によりMSDを得、この場合、x(t)及びy(t)は座標に対応しており、x₀及びy₀は、各精子の行路の最初の位置である。カッコは、異なる精子の行路の平均を意味する。20のデータセットに対して平均した時間の関数として、結果として得られるMSDを図13に示す。短時間では、個々の精子の動きは、弾道的(およそt²)であり、長時間では拡散的(およそt)である。そのような運動性は、持続的ランダムウォーク(PRW)モデルによって説明される。PRWにおいて、MSDは、

50

$$\langle d^2(t) \rangle = 2 S^2 P [t - P (1 - e^{-t/P})]$$

によって得られ、この場合、 S は、ランダムウォーク対象の速度を意味し、 P は持続時間に対応する。短時間の極限、 $t \ll P$ では、PRWモデルにおけるMSDは、

$$\langle d^2(t) \rangle = S^2 t^2$$

となる。長時間の極限、すなわち、 $t \gg P$ では、MSDは、

$$\langle d^2(t) \rangle = 2 S^2 P t$$

によって得られる。

【0130】

拡散係数と同様に、ランダム運動性係数は、

【0131】

【数1】

$$\mu = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{\langle d^2(t) \rangle}{4t} = S^2 P / 2. \quad (5)$$

によって得られる。

【0132】

図13に示されたMSDデータは、PRWモデルにおけるMSDのための上記の式で首尾よく近似することができ、速度に対しては $S = 4.2 \mu\text{m/s}$ 、持続時間に対しては $P = 1.3 \text{ s}$ が得られる。次いで、ランダム運動性係数は、 $\mu = 0.011 \text{ mm}^2/\text{s}$ が得られる。

【実施例9】

【0133】

精子の運動性のシミュレーション

マイクロチャンネル中における活動的なマウス精子の動きを、上記において説明したように、持続的ランダムウォーク（PRW）としてモデル化した。当該シミュレーションは、二次元に制限し、これはチャンネルの厚さ $50 \mu\text{m}$ に相応する。チャンネルの寸法は、実験の設定を模倣して、 $20 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ にした。精子の初期分布を図12に示す。

【0134】

当該モデルにおいて、活動的な精子は、方向を変えるまで、平均所要時間 P において、速度：

【0135】

【数2】

$$\vec{S}(t) = S \cos \theta(t) \hat{i} + S \sin \theta(t) \hat{j},$$

において所定のランダム方向 $\theta(t)$ （図14）に動く。 $\theta(t)$ は、間隔 $(0, 2\pi]$ における一様な分布から選択する。シミュレーション時間ステップが、 Δt （ 1 s を選択）で指示される場合、各時間ステップにおいて精子が新しい $\theta(t)$ 方向を選択する確率は、 $\Delta t/P$ である。これは、方向を変えるまで精子は、平均して $P/\Delta t$ の時間ステップの間、一定の $\theta(t)$ を維持することを意味する。

【0136】

当該シミュレーションにおいて、実験での追跡データに対する近似から得られる S 及び P 値を使用した（実施例8を参照のこと）。結果として得られる、精子の位置 (x, y) に対する運動の式は、

$$x(t + \Delta t) = x(t) + S \cos \theta(t) \Delta t$$

$$y(t + \Delta t) = y(t) + S \sin \theta(t) \Delta t$$

である。

【0137】

チャンネルへの初期注入後に精子が死亡又は疲弊してしまったことによって精子が活動的でない場合、それらの精子は、持続的ランダムウォークを行わない。代わりに、当該精子は、等方性ランダムウォーク（RW）を行う。これは、持続時間 P が時間ステップ Δt に

10

20

30

40

50

等しいPRWと同等である。換言すれば、当該精子は、時間ステップごとに、新たなランダム方向に固定された距離 r_0 を移動し、これは、周囲の媒体からのブラウン力を模倣している。この場合の拡散係数は、 $D = r_0^2 / (4 \Delta t)$ によって与えられる。この拡散係数は、アインシュタインースモルコフスキー式[39]、すなわち、 $D = k_B T / \zeta$ を用いて評価することができ、この場合、 k_B はボルツマン定数であり、 T は温度であり、並びに ζ は摩擦係数である。 ζ を特定するため、長さ $100 \mu\text{m}$ 及び半径 $0.5 \mu\text{m}$ の硬質円筒体としてマウスの精子をモデル化し、これは、先のモデル及び実験による観察に矛盾しなかった。表面から距離 h における長さ L の円筒体の場合、長軸に沿った摩擦係数は、[41]：

【0138】

【数3】

$$\zeta \cong \frac{2\pi\eta L}{\ln(2h/r)},$$

によって与えられ、この場合、 η は、媒体の粘度であり、 r は円筒体の半径である。チャネル内のPBS緩衝液を模倣するため、 $\eta = 10^{-3} \text{Pa} \cdot \text{s}$ を使用し、上記の式において $h = 25 \mu\text{m}$ を用いて、室温において $\zeta = 1.4 \times 10^{-7} \text{kg/s}$ という結果を得た。アインシュタインースモルコフスキー式を使用することにより、精子に対する拡散係数 $D = 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ を得る。このことは、所定の時間ステップにおいて、非活動的な精子は、その方向を変えるまでに約 $0.3 \mu\text{m}$ 移動するであろうことを意味している。

【0139】

チャネル厚($50 \mu\text{m}$)は、チャネルの幅及び長さに対して十分に小さいため、当該モデルを二次元に制限した。チャネルの壁に対しては、反射的境界条件を使用しており、すなわち、精子が壁に衝突した場合、精子はそこで止まって新たなランダム方向へと反射する。

【0140】

実験では、注入の直後に精子がチャネルの最初の 5mm を占領するのが観察された。この効果をシミュレーションにおいて模倣するため、図15に示され、以下の式：

【0141】

【数4】

$$N(x) = \frac{N_T}{\mu(e^{\beta(x-\mu)} + 1)},$$

によって与えられるフェミ様分布により、最初に精子をランダムに分布させ、この場合、 μ は界面の平均位置を意味し、 β は初期の精子分布の前部の鋭さを調整するパラメータであり、 N_T はチャネル内の精子の総数である。これは、

【0142】

【数5】

$$\int N(x) dx = N_T$$

と表すことができる。シミュレーションでは、以下の値： $\mu = 5 \text{mm}$ 、 $\beta = 10 \text{mm}^{-1}$ 、 $N_T = 10^5$ を使用した。

【0143】

他の実施形態

本発明をそれらの詳細な説明に関連して説明してきたが、上記の説明は例示を意図するものであり、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって定義されることは理解されるべきである。他の態様、利点、及び変更も、以下の特許請求の範囲内である。

本発明は以下の態様を包含し得る。

[1] 運動性細胞の初期集団を、マイクロ流体チャネルの入口ポートに導入するステップであって、該運動性細胞の初期集団が第1の平均運動性を有する、ステップ；

運動性細胞の該集団を該マイクロ流体チャネルにおいてインキュベーションするステップ；及び、

選別された運動性細胞の集団を該マイクロ流体チャネルの出口ポートにおいて収集するステップであって、選別された運動性細胞の該集団が、該第1の平均運動性より高い第2の平均運動性を有する、ステップ

を含む、運動性細胞を選別する方法。

[2] 前記マイクロ流体チャネルを水平又は垂直に向けるステップをさらに含む、上記[1]に記載の方法。

[3] 運動性細胞の集団をインキュベーションするステップが、流動媒体の非存在下においてインキュベーションするステップを含む、上記[1]に記載の方法。

[4] 運動性細胞の集団をインキュベーションするステップが、運動性細胞の初期集団の一部がマイクロ流体チャネルに沿って移動することができる十分な時間、例えば、約20～60分間又は約30分間、該運動性細胞の集団をインキュベーションするステップを含む、上記[1]に記載の方法。

[5] マイクロ流体チャネルの高さが、運動性細胞の寸法の約20倍未満、例えば、運動性細胞の寸法の約3～10倍である、上記[1]に記載の方法。

[6] 出口ポート付近において、選別された運動性細胞の集団を含む収集可能な運動性細胞の集団の複数の画像、例えば影像を得るステップ；及び

該複数の画像を分析するステップ

を含む第2の平均運動性を特定するステップをさらに含む、上記[1]に記載の方法。

[7] 運動性細胞の初期集団を導入するステップが、少なくとも精子約 10^3 個/ μL 、例えば、少なくとも精子約 10^4 個/ μL の濃度で媒体に精子の初期集団を懸濁させるステップを含み、

媒体中の選別された運動性細胞の集団の濃度が、精子約 1.6×10^3 個/ μL 以下である、上記[1]に記載の方法。

[8] 運動性細胞の初期集団をマイクロ流体チャネルの入口ポートに導入するステップ；

該マイクロ流体チャネルにおいて該運動性細胞の集団をインキュベーションするステップ；

該マイクロ流体チャネル内の該運動性細胞の集団の少なくとも一部の複数の画像を取得するステップ；及び

該複数の画像に基づいて該運動性細胞の集団の少なくとも一部の特性を特定するステップを含む、運動性細胞の集団を分析する方法。

[9] 特定された特性が、運動性、平均経路速度（VAP）、直線速度（VSL）、又は直線性のうちの少なくとも1つを含む、上記[8]に記載の方法。

[10] 特定される特性が、

(1) マイクロ流体チャネルの出口ポート付近に位置している選別された運動性細胞の集団の特性、及び

(2) 該マイクロ流体チャネルの長さに沿った該運動性細胞の集団の分布のうちの少なくとも一方を含む、上記[8]に記載の方法。

[11] 特性を特定するステップが、マイクロ流体チャネルの出口ポート付近に位置している選別された運動性細胞の集団の特性を、

(1) 運動性細胞の初期集団の特性、及び

(2) インキュベーション後に入口ポート付近に位置している残留運動性細胞の集団の特性

のどちらか又は両方と比較するステップを含む、上記[8]に記載の方法。

[12] 特定された特性に基づいて、運動性細胞の初期集団の健康を特定するステップ

10

20

30

40

50

をさらに含む、上記〔８〕に記載の方法。

〔１３〕 運動性細胞の集団をインキュベーションするステップが、精子の初期集団の一部がマイクロ流体チャンネルに沿って移動することができる十分な時間、例えば、約２０～６０分間又は約３０分間、流動媒体の非存在下でインキュベーションするステップを含む、上記〔８〕に記載の方法。

〔１４〕 マイクロ流体チャンネルの高さが、運動性細胞の寸法の約２０倍未満、例えば、運動性細胞の寸法の約３～１０倍である、上記〔８〕に記載の方法。

〔１５〕 マイクロ流体チャンネルの高さが運動性細胞の寸法の約２０倍未満となるように選択されたマイクロチャンネルと、

該マイクロ流体チャンネルの第１の端部に接続された入口ポートであって、第１の平均運動性を有する運動性細胞の初期集団を受け入れるように構成された入口ポートと、

該マイクロ流体チャンネルの第２の端部に接続された出口ポートとを備え、

該マイクロ流体チャンネルが、該マイクロチャンネル中において流体の流れを必要とせずに、該第２の端部において、選別された運動性細胞の集団を提供するように構成され、該選別された運動性細胞の集団が、該第１の平均運動性より高い第２の平均運動性を有する、運動性細胞を選別するための装置。

〔１６〕 マイクロ流体チャンネルの高さが、運動性細胞の寸法の約３から１０倍、例えば、約２００μｍ未満、例えば、約６０μｍ未満、例えば、約３～２０μｍとなるように選択される、上記〔１５〕に記載の装置。

〔１７〕 マイクロ流体チャンネルの長さが、少なくとも部分的に、チャンネルでの運動性細胞のインキュベーション時間及び運動性細胞の速度のうちの少なくとも一方に基づいて選択され、例えば、該長さが、約２０mm未満、例えば、約１２～１５mmである、上記〔１５〕に記載の装置。

〔１８〕 マイクロ流体チャンネルが、四角形断面、台形断面、三角形断面、円形若しくは楕円形断面、マイクロチャンネルの長さに沿って変わる断面、又はリッジを有する断面を有する、上記〔１５〕に記載の装置。

〔１９〕 マイクロ流体チャンネルが、直線状であるか又は湾曲している、上記〔１５〕に記載の装置。

〔２０〕 マイクロ流体チャンネルの少なくとも一部の複数の画像をキャプチャするように構成された撮像システムをさらに含む、該撮像システムが、

該マイクロ流体チャンネルの少なくとも一部を照らすように構成された光源と、

該マイクロ流体チャンネルにおける光が照らされた部分の運動性細胞の画像、例えば影像を検出するように構成された検出器とを含む、上記〔１５〕に記載の装置。

〔２１〕 キャプチャされた画像に基づいて、マイクロ流体チャンネルにおける撮像された部分での運動性細胞の特性を特定するように構成された分析モジュールをさらに含む、上記〔２０〕に記載の装置。

【符号の説明】

【０１４４】

- １００ 運動性細胞の選別及び分析システム
- １０２ マイクロ流体チップ
- １０６ 撮像システム
- １０８ 光源
- １１０ 画像センサー
- ２００ マイクロ流体チャンネル
- ２０２ 精子
- ２０４ ピペット
- ２０６ 入口ポート
- ２０８ 出口ポート

10

20

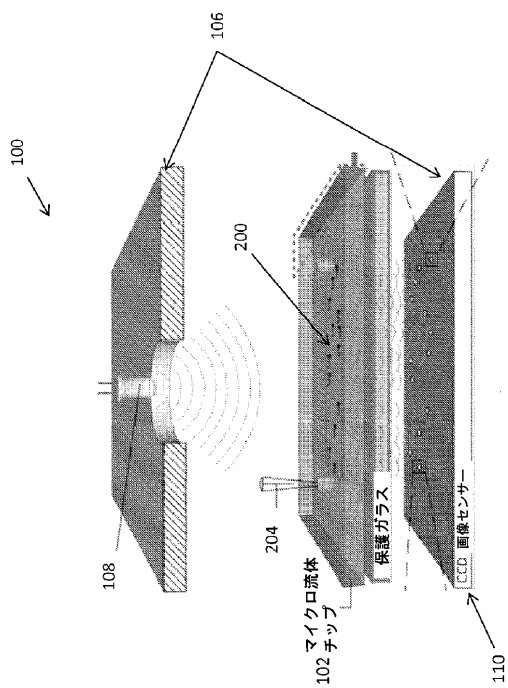
30

40

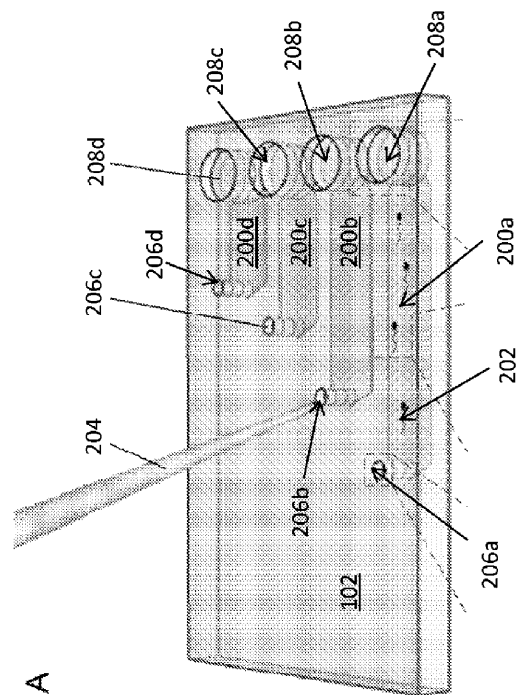
50

- 210 ベース層
- 212 中間層
- 214 カバー層
- 300 精子
- 302 頭部

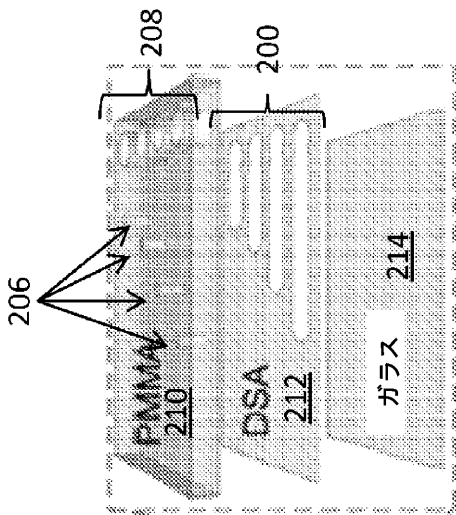
【図1】



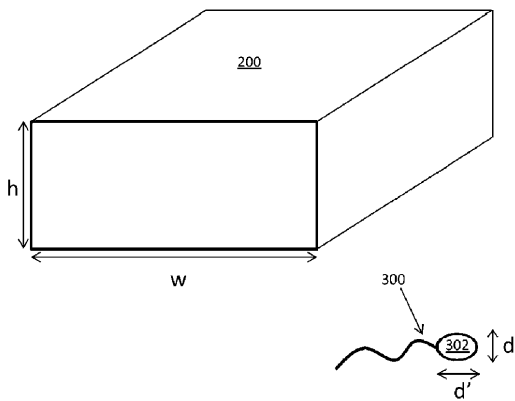
【図2A】



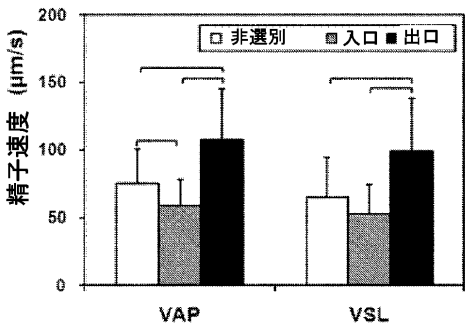
【図 2 B】



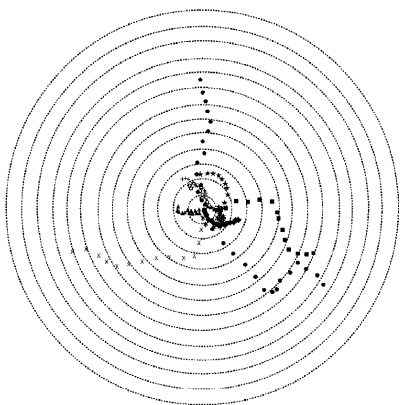
【図 3】



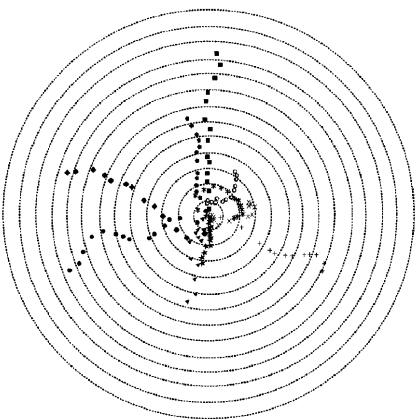
【図 4】



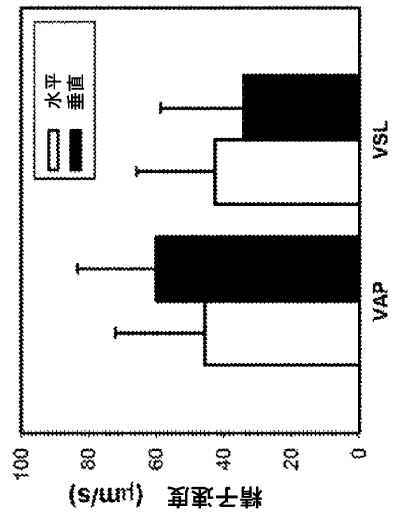
【図 5 A】



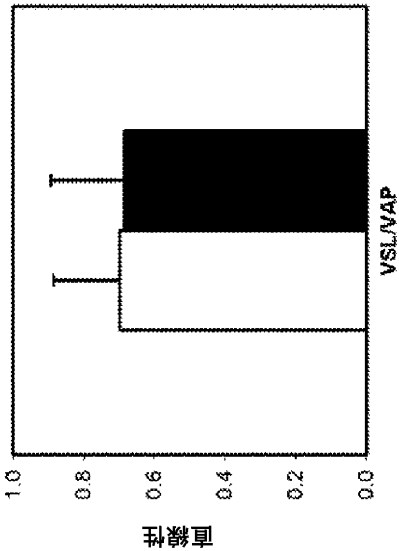
【図 5 B】



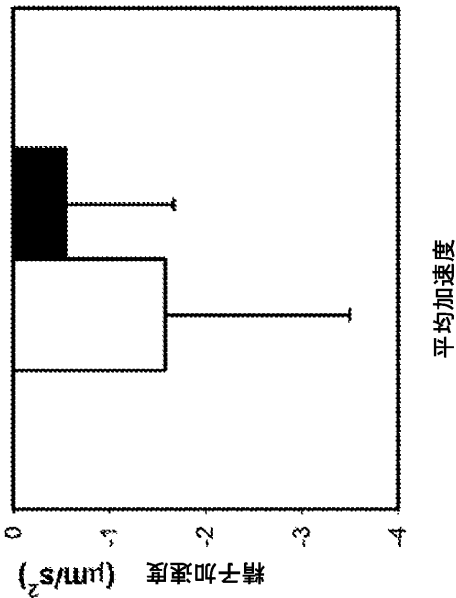
【図 6 A】



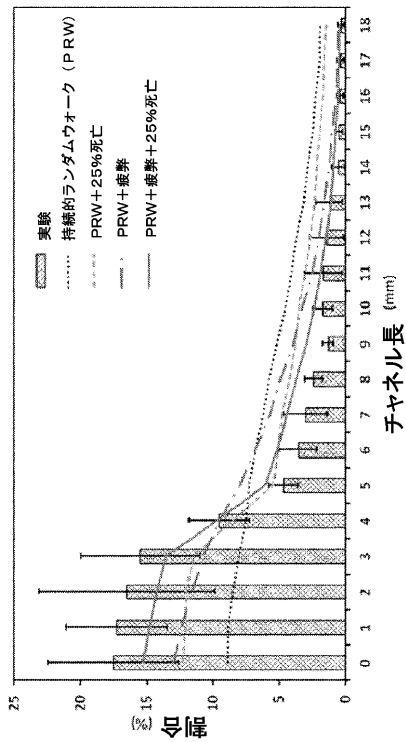
【図 6 B】



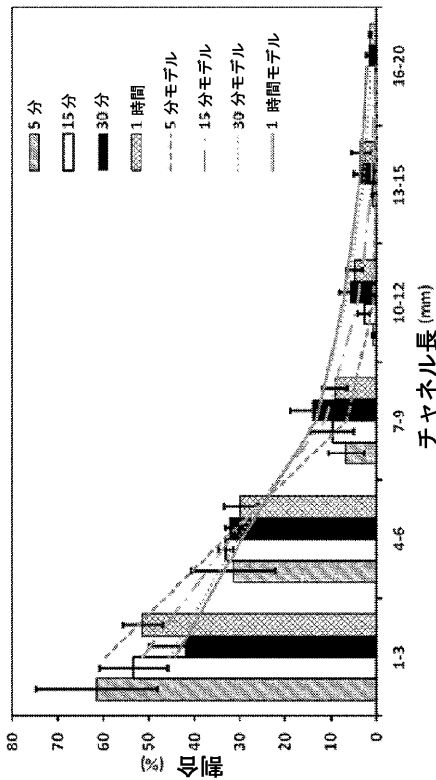
【図 6 C】



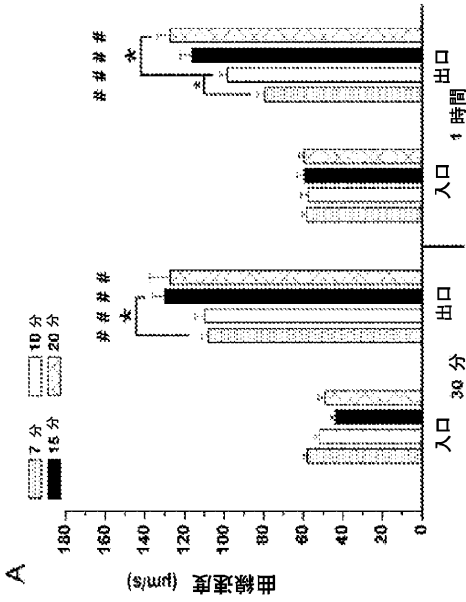
【図 7】



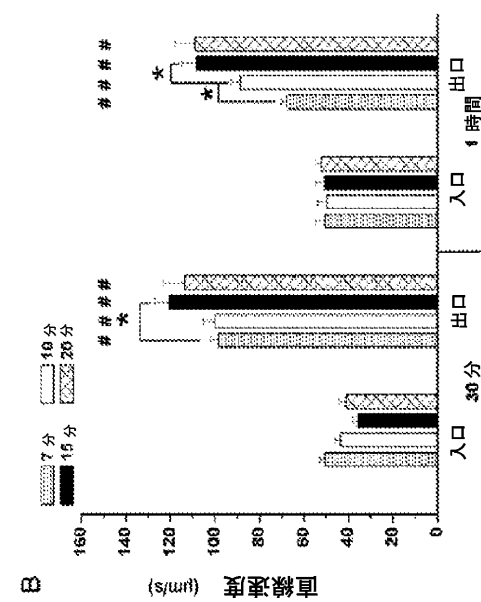
【図 8】



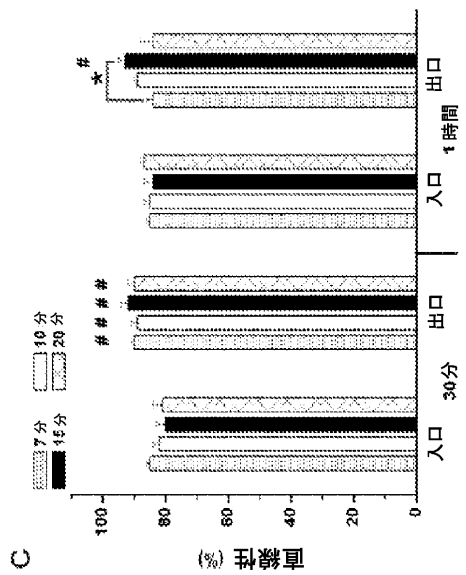
【図 9 A】



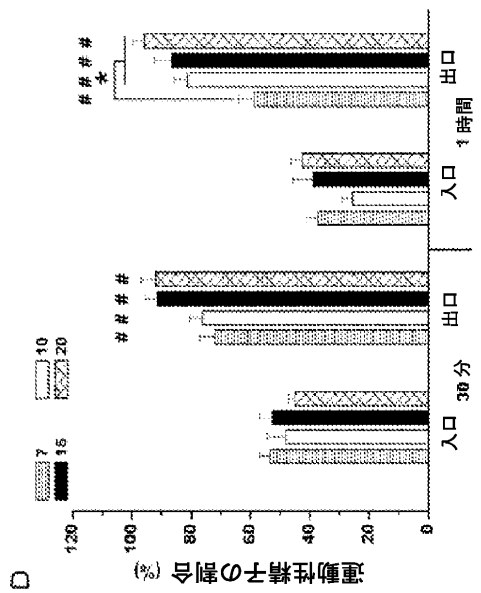
【図 9 B】



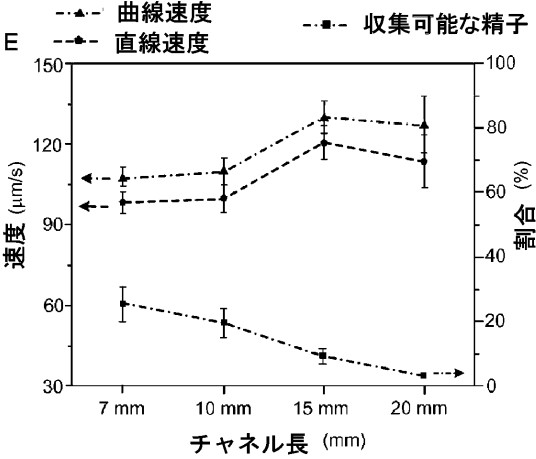
【図 9 C】



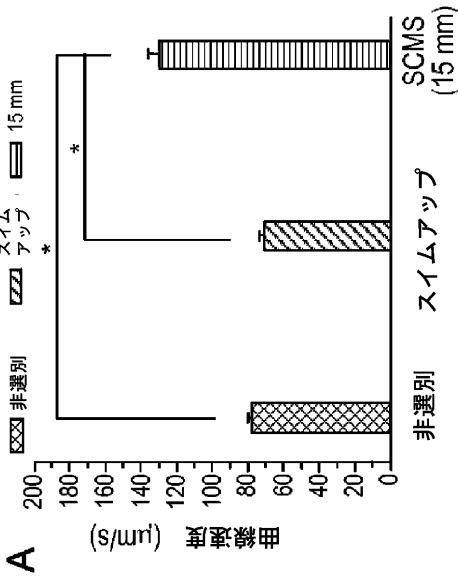
【図 9 D】



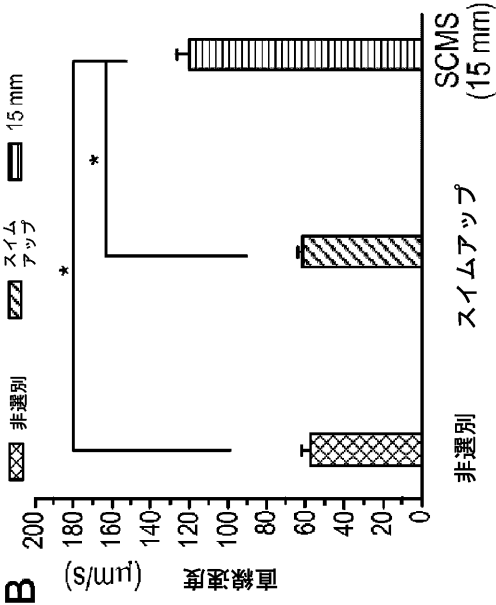
【図 1 0】



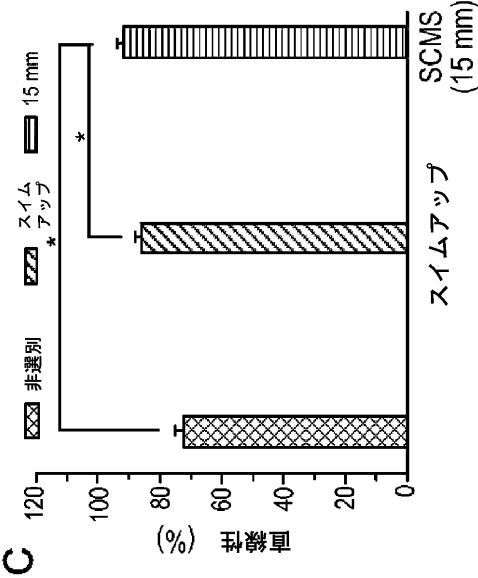
【図 1 1 A】



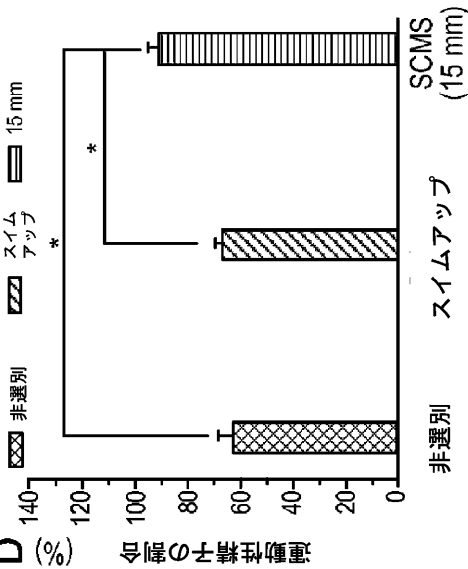
【図 1 1 B】



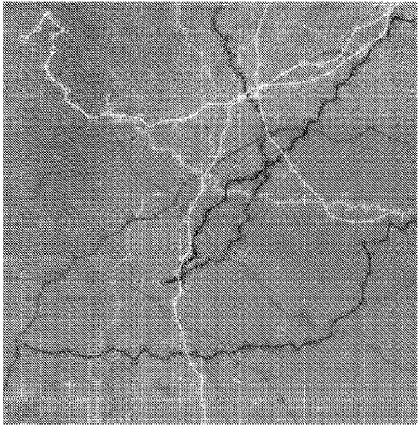
【図 1 1 C】



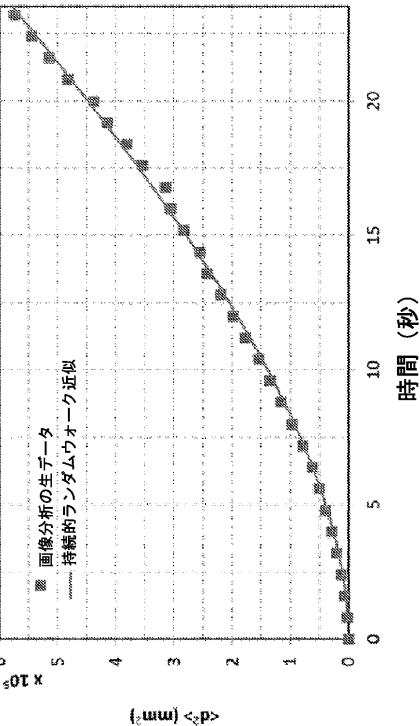
【図 1 1 D】



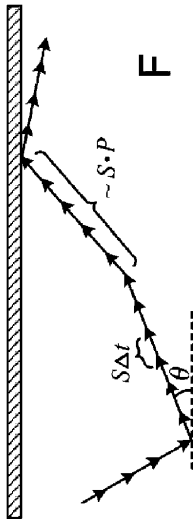
【図 1 2】



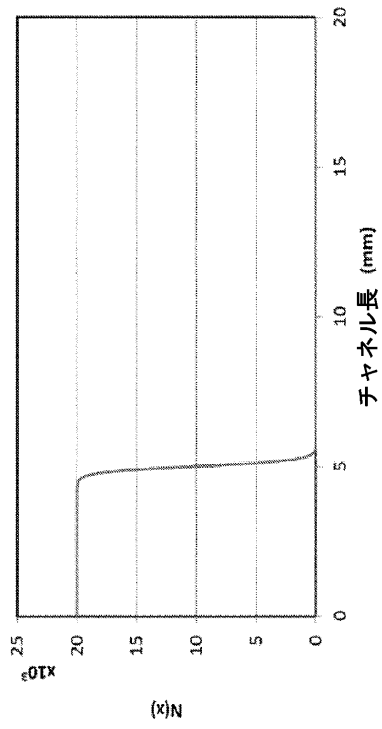
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 15】



フロントページの続き

- (74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
- (72)発明者 デメルチ, ウトカン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139, ケンブリッジ, プリザント ストリート 204 157
- (72)発明者 チャン, シャオホイ
アメリカ合衆国 イリノイ州 60539, ウェルストマド, 507ダブリュー 61エスティー ストリート アパートメント ディー
- (72)発明者 カヤールプ, エムレ
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07670, テナフライ, イーグル ストリート 284
- (72)発明者 サファエ, ホーマン
カナダ国 オンタリオ州 エル5ヴィー2ゼット1, ミシサガ, ホワイトホーン アベニュー 5925
- (72)発明者 タソグル, サバス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139, ケンブリッジ フランクリン ストリート 129 アパートメント 421

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 特表2005-518794 (JP, A)
特表2006-527028 (JP, A)
国際公開第2010/115167 (WO, A1)
米国特許出願公開第2010/0291535 (US, A1)
特表2003-505412 (JP, A)
Lab on a Chip, 2011年 6月16日, Vol. 11, pp. 2535-2540
, Methods in Molecular Biology, 2006年, Vol. 321, pp. 227-244

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/00-1/24
C12M 1/00-1/42
G01N 37/00
G01N 15/00-15/04
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)
JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII)
DWPI (Thomson Innovation)