

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6524082号  
(P6524082)

(45) 発行日 令和1年6月5日(2019.6.5)

(24) 登録日 令和1年5月10日(2019.5.10)

|                |              |                  |                 |
|----------------|--------------|------------------|-----------------|
| (51) Int. Cl.  |              | F I              |                 |
| <b>C 1 2 M</b> | <b>1/34</b>  | <b>(2006.01)</b> | C 1 2 M 1/34 A  |
| <b>C 1 2 M</b> | <b>1/00</b>  | <b>(2006.01)</b> | C 1 2 M 1/00 A  |
| <b>C 1 2 M</b> | <b>1/26</b>  | <b>(2006.01)</b> | C 1 2 M 1/26    |
| <b>C 1 2 Q</b> | <b>1/04</b>  | <b>(2006.01)</b> | C 1 2 Q 1/04    |
| <b>A 6 1 D</b> | <b>19/02</b> | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 D 19/02 C |

請求項の数 20 (全 21 頁) 最終頁に続く

|               |                               |           |  |
|---------------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願2016-533083 (P2016-533083)  | (73) 特許権者 | 505270980                                    |
| (86) (22) 出願日 | 平成26年11月19日(2014.11.19)       |           | ブリガム・アンド・ウイミンズ・ホスピタル・インコーポレイテッド              |
| (65) 公表番号     | 特表2016-538858 (P2016-538858A) |           | アメリカ合衆国 02115 マサチューセッツ州、ボストン、フランシス・ストリート 75番 |
| (43) 公表日      | 平成28年12月15日(2016.12.15)       | (74) 代理人  | 100134832                                    |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2014/066405             |           | 弁理士 瀧野 文雄                                    |
| (87) 国際公開番号   | W02015/077333                 | (74) 代理人  | 100070002                                    |
| (87) 国際公開日    | 平成27年5月28日(2015.5.28)         |           | 弁理士 川崎 隆夫                                    |
| 審査請求日         | 平成29年11月13日(2017.11.13)       | (74) 代理人  | 100165308                                    |
| (31) 優先権主張番号  | 61/906,740                    |           | 弁理士 津田 俊明                                    |
| (32) 優先日      | 平成25年11月20日(2013.11.20)       | (74) 代理人  | 100115048                                    |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           | 弁理士 福田 康弘                                    |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 精子を選別するシステム及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

精子を選別するシステムであって、  
 ハウジングと、  
 前記ハウジングによって支持される微小流体システムと、  
 前記微小流体システムへと精子を送達するため前記微小流体システムに対してアクセスを提供する注入口と、  
 前記微小流体システムから選別された精子を採取するため前記微小流体システムに対してアクセスを提供する排出口とを備え、  
 前記微小流体システムが、  
 前記注入口から前記排出口へと精子に対して流路を提供し、  
 前記注入口を通して前記微小流体システムへと送達された精子が前記排出口へと前記流路に沿って前進することを可能とするための前記注入口から前記排出口へと伸びる少なくとも1つのチャンネルと、  
 複数の微細孔を含むフィルタであって、精子を前記フィルタ及び重力に逆らって前記流路に沿って移動させて前記排出口へと到達させるため前記流路に配置されたフィルタと、  
運動性精子を排出口へと通過させ非運動性精子を拘束するように構成された、前記排出口に配置された収集チャンパーと、  
前記収集チャンパーと連通し運動性精子を濃縮して採取を容易にするように構成された濃縮チャンパーと、を備える、

精子を選別するシステム。

【請求項 2】

前記複数の微細孔が、前記精子の頭部がそこを通過できるサイズである、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

前記複数の微細孔が少なくとも  $1 \mu\text{m}$  のサイズを有する微細孔を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 4】

前記複数の微細孔が  $10 \mu\text{m}$  未満のサイズを有する微細孔を含む、請求項 1 に記載のシステム。

10

【請求項 5】

前記複数の微細孔が球形である微細孔を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 6】

前記フィルタがポリカーボネートフィルタを含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 7】

前記収集チャンバーが 2 つのサブチャンバーを備える、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 8】

前記フィルタが 2 つのサブチャンバーのうち 1 つのチャンバー内に配置される、請求項 7 に記載のシステム。

【請求項 9】

20

前記 2 つのサブチャンバーの 1 つ目が前記精子と関連する未処理の精液を収集するように構成され、前記 2 つのサブチャンバーの 2 つ目が運動性精子を前記排出口へと通過させ、非運動性精子を拘束するように構成される、請求項 7 に記載のシステム。

【請求項 10】

前記流路内の前記精子を映すように構成された画像化システムを更に備える、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 11】

前記流路内の前記精子を照らすように構成された少なくとも 1 つの照明、及び前記精子を映すため前記流路に隣接して配置された画像化システムセンサを含む画像化システムを更に備える、請求項 1 に記載のシステム。

30

【請求項 12】

前記画像化システムセンサが少なくとも 1 つの電荷結合素子 (CCD) 又は相補形金属酸化膜半導体 (CMOS) の画像化システムセンサを含む、請求項 11 に記載のシステム。

【請求項 13】

前記微小流体システムが少なくとも 1 つのポリジメチルシロキサン (PDMS) 系又はポリメチルメタクリレート (PMMA) 系を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つのチャンネルが複数のチャンネルを含み、前記複数のチャンネルの各々が異なるチャンネル長を有する、請求項 1 に記載のシステム。

40

【請求項 15】

精子を選別する方法であって、

精子の試料を微小流体システムに接続された注入口へと送達すること、

前記精子の試料中の精子に微小流体システムに対してアクセスを提供する排出口への前記微小流体システムを通る流路を縦走させ、前記微小流体システムから選別された精子を採取すること、

微細孔を有するフィルタ及び重力を使用して前記排出口の収集チャンバーに到達する前に前記精子を濾過し、前記フィルタにより前記精子の運動を制限すること、並びに

前記フィルタを通過し、重力を克服した後に前記排出口の前記収集チャンバーを通過させて、前記収集チャンバーに接続された濃縮チャンバーに濃縮すること、及び

50

前記濃縮チャンバーから精子を採取すること、を含む精子を選別する方法。

【請求項 16】

前記フィルタ及び重力を使用して非運動性精子の前記排出口への到達を制限することを更に含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記フィルタ、別のフィルタ、及び重力を使用して非運動性精子の前記排出口への到達を制限することを更に含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記微小流体システム内で前記精子を画像化システムすることを更に含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記微小流体システム内の前記精子を少なくとも 1 つの光学画像化システムを使用して画像化することを更に含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 20】

前記画像が前記流路に沿って精子の影像を記録するように構成されている、請求項 10 に記載のシステム。

【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、「精子を選別するシステム及び方法」と題する 2013 年 11 月 20 日付 出願の米国仮特許出願番号第 61/906,740 号に基づき、それに対して優先権を主張し、また全ての目的に対してその全体を参照により本明細書に援用する。

【0002】

連邦政府資金による研究開発の記載

該当せず

【0003】

本発明は、概して精子を選別するシステム及び方法に関する。

【背景技術】

【0004】

試算によれば、世界には 7000 万を超える不妊症のカップルがいる。おおよそ 4 組の不妊症カップルに 1 組が臨床治療を希望し、情報によれば、男性因子が不妊症例の約 50 パーセントを占める場合がある。体外受精 (IVF)、卵細胞内精子注入法 (ICSI)、及び子宮腔内受精 (IUI) 等の補助生殖医療 (ART) が不妊症カップルを治療するため不妊治療専門クリニックにおいて一般的に利用される。環境条件及び生理学的条件による男性不妊の割合の増加に伴い、不妊治療専門クリニックにおいて ART の使用に対する要求がますます増加している。最も運動性が高く、形態学的に正常な精子の単離は、一般的に使用される IVF / ICSI 手法に不可欠のプロセスである。運動性が高いだけでなく、正常な形態学、成熟核を有し、活性酸素種 (ROS) 生成がより少ない精子を選択することが必要であるため、未加工の精液 (ストック精子) からの健康な精子の選択は重要である。現在の IVF / ICSI 手法は現在 (of the time) およそ 50 パーセントの妊娠の成功をもたらすが、選択された精子が異常な場合にはアウトプットが非常に損なわれる。

【0005】

現在、より一般的に知られている ART 技術は、遠心分離に基づく精子のスィムアップ、密度勾配分離法、及び精子を選別するため走化性の使用を含む / 含まない微小流体に基づく方法を使用する。これらの技術は、IVF / ICSI のように繊細な手法に対する使用においては、欠点及び制限を有する可能性がある。スィムアップ等の遠心分離に基づく精子選別技術は、遠心分離工程の繰り返しの間に精子の質が損なわれることが注目される

10

20

30

40

50

。精子試料の質はROS生成のためスィムアップ技術の間に低下する。ROS暴露は、外見上運動性で健康な精子のDNAを大いに傷害し得る。さらに、遠心分離に基づく精子選別技術は、手間がかかり、技術者によって結果にばらつきがある。

【0006】

微小流体に基づく精子選別技術は、小容量の精子試料を正確に扱うことができるため利点がある。一方、微小流体に基づく精子選別デバイスは、非常にロースループット (low throughput) であり、 $2\mu\text{l} \sim 50\mu\text{l}$  といった少容量の精液を加工するにすぎず、通常の精子試料が  $1.5\text{ml}$  以上の容量の場合がある不妊治療専門クリニックにおける適用を制限する。

【0007】

臨床でのICSI手法では、胎生学専門医は、4つのペトリ皿で操作可能な平均20の卵母細胞を有し、20の精子を必要とする。発生学専門医は、数百の精子のうち精子減少症の試料においてこれら20の試料を選択しようとする。かかるシナリオは、個別の精子のリアルタイムモニタリング及び20の精子が排出口に到達した際に排出口からの収集を必要とし、これは現在の臨床技術又は微小流体技術を使用しては達成できない。胎生学専門医が健康な試料を扱う第2の手法では、 $5\mu\text{l} \sim 20\mu\text{l}$  の懸濁液に懸濁された、卵母細胞に導入される50万の健康な精子を使用して *in vitro* 受精が行われる。しかしながら、上記のような現在の選別システムは、これらの基準を満たすために必要なスループットを提供しない。

【0008】

慣例上、自動精子解析 (computer assisted sperm analysis; CASA) 及びARTに対する精子運動性の手作業での同定のため光学顕微鏡を使用して精子を映している。この従来のアプローチは、視野 (FOV) が小さいため多数の精子の同時の追跡には制限がある。さらに、精子追跡及び運動性解析を選別の後に行う。現在、精子の選別と解析を同時に行うことができるシステムは存在しない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、選別として、精子を傷つけず、又は精子を傷つける可能性のある条件に供することなく、精子を加工するシステム及び方法を提供することが望ましい。さらに、精子を分析することができるが、効率的で拡大可能なシステム及び方法を提供することが望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、受精に有利で適した精子の効率的な選択を可能とする方法で精子を選別するためのマイクロ及びマクロの流体を統合するシステム及び方法を提供することによって上述の欠点を克服する。特に、本発明は、受精に適した精子が最も望ましく、受精のプロセスに存在するシステム (system presents)、及び受精のプロセスに存在する環境に類似する環境を使用して選択又は選別され得ることを認める。これに関して、マクロ貯蔵器が女性外性器の通路に近い微細孔によって接続されるシステムが提供される。死亡した又は機能性の劣る精子を残して、最も運動性で形態学的に正常で成熟した機能性の精子が、重力に反して選択的に微細孔を通過することによるシステム及び方法が提供される。本発明は、機能性精子が高い回収率で加工されていない精液試料から単離される、化学物質不使用で遠心分離不使用のフローフリー (flow-free) 技術である。

【0011】

本発明の或る一つの態様によれば、ハウジング及び該ハウジングによって支持される微小流体システムを含む、精子を選別するシステムが提供される。また、上記システムは、微小流体システムへと精子を送達するため該微小流体システムに対するアクセスを提供する注入口、及び該微小流体システムから選別された精子を採取するため該微小流体システムに対してアクセスを提供する排出口を含む。上記微小流体システムは、注入口から排出

10

20

30

40

50

口へと精子に対する流路を提供し、注入口を通過して排出口へと流路に沿って前進するように微小流体システムへと精子を送達させる、注入口から排出口へと伸びる少なくとも1つのチャンネルを含む。また、微小流体システムは、複数の微細孔を含むフィルタを含み、精子がフィルタ及び重力に対抗して流路に沿って移動し排出口に到達するように、注入口と排出口の間の流路に配置されるフィルタを含む。

【0012】

本発明の別の態様によれば、微小流体システムから選別された精子を採取することを可能とするため、微小流体システムに接続された注入口に精子の試料を送達すること、及び微小流体システムに対してアクセスを提供する排出口へと微小流体システムを通る流路に精子試料中の精子を縦走させることを含む、精子を選別する方法が開示される。また、上記方法は、複数の微細孔を有するフィルタ及び該フィルタを通る精子の運動を制限する重力を使用して排出口に到達する前に精子を濾過することを含む。上記方法は、フィルタを通過し、重力を克服した後に排出口を通過する精子を採取することを更に含む。

10

【0013】

本発明の上述及び他の態様、並びに利点は以下の明細書から明らかとなる。本明細書では、本発明の一部を成し、本発明の好ましい実施形態が解説として示される添付の図面が参照される。かかる実施形態は、本発明の全ての範囲を必ずしも表すものではないが、したがって本発明の範囲を説明するため特許請求の範囲及び本明細書が参照される。

【図面の簡単な説明】

【0014】

20

【図1A】本発明による精子選別システムの平面図である。

【図1B】図1Aのシステムの横断面図である。

【図1C】選別した精子を濃縮するための収集チャンバーを備えるマルチチャンネルシステムの概略図である。

【図1D】注入口を接続する複数のチャンネル及び収集又は濃縮のチャンバーチャンバーを備えるマルチウェルシステムの概略図である。

【図2A】本発明による精子選別及び画像化システムシステムの分解立体横断面図である。

【図2B】図1A又は図2Aの微小流体システムの詳細な透視図である。

【図2C】本発明によるマルチチャンネル微小流体システムの概略図である。

30

【図2D】本発明による精子選別及び画像化システムシステムのシステム全体の横断面図である。

【図3】本発明による精子を選別するプロトタイプのシステムの斜視図である。

【図4】本発明を使用して取得された一連の精子の画像である。

【図5A】種々の孔径のフィルタを使用して単離され、種々の時間点で回収されたヒト精子の運動性を説明するグラフである。

【図5B】種々のチップを使用して選別された精子の回収率を説明するグラフである。

【図6A】ストック及び3  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$ 、及び8  $\mu\text{m}$ のMMSチップをそれぞれ使用して選別された精子の曲線速度(VCL)、直線速度(VSL)、及び平均経路速度(VAP)を説明するグラフである。

40

【図6B】ストック及び3  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$ 、及び8  $\mu\text{m}$ のMMSチップをそれぞれ使用して選別された精子の曲線速度(VCL)、直線速度(VSL)、及び平均経路速度(VAP)を説明するグラフである。

【図6C】ストック及び3  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$ 、及び8  $\mu\text{m}$ のMMSチップをそれぞれ使用して選別された精子の曲線速度(VCL)、直線速度(VSL)、及び平均経路速度(VAP)を説明するグラフである。

【図7】ストック及び選別された精子の正常な形態学(%)を示すグラフである。

【図8】ストック及び選別された精子について計算された成熟な精子の割合を示すグラフである。

【図9】Aは、3  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$ 及び8  $\mu\text{m}$ のフィルタデバイスを使用して選別された精子

50

が、スイムアップ法及び洗浄法と比較して著しく少ないROS生成を示したことを表すグラフである。Bは、精液試料に対する活性酸素種（ROS）生成のグラフである。Cは、洗浄した精子に対する活性酸素種（ROS）生成のグラフである。Dは、スイムアップ法を使用して選別した精子に対する活性酸素種（ROS）生成のグラフである（ROS領域を円で強調する）。Eは、3 μmのMMSチップを使用して選別した精子に対する活性酸素種（ROS）生成のグラフである。Fは、5 μmのMMSチップを使用して選別した精子に対する活性酸素種（ROS）生成のグラフである。Gは、8 μmのMMSチップを使用して選別した精子に対する活性酸素種（ROS）生成のグラフである。

【図10】Aは、5 μm及び8 μmのMMSチップを使用して選別した精子は、スイムアップ又は選別していない精液試料と比較して著しく少ないDNAフラグメントを示したことを表すグラフである。Bは、精液試料に関するDNAフラグメント散布図である。Cは、スイムアップ法を使用して選別した精子に関するDNAフラグメント散布図である。Dは、3 μmのMMSチップを使用して選別した精子に関するDNAフラグメント散布図である。Eは、5 μmのMMSチップを使用して選別した精子に関するDNAフラグメント散布図である。Fは、8 μmのMMSチップを使用して選別した精子に関するDNAフラグメント散布図である。

【図11】本開示による幾つかの工程の例を説明するフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、腔粘液が薄くなり、精子の卵への先導を補助する小さなマイクロチャネルを形成することを認識する。本発明は、精子を選別する機構として消耗を認識し、粗雑なマルチスケールの模擬実験を使用して健康な精子を選別するために消耗を活用することを実験的また論理的に実証した。具体的には、本発明は、効率的で信頼できる、成功した精子の選別のためのマクロ-ミクロ流体精子選別（MMS）システムを提供する。記載されるように、健康な運動性精子は、選別後の排出口で完全に収集される。このシステムは最小の摂動（*p e r t u r b a t i o n*）によって精子選択プロセスの効率を改善することにより、DNA断片化、細片の堆積、及びROSの生成を制御する。

【0016】

さらに、本発明は、精子の選別、モニター、及び評価を同時に行うことができる。具体的には、本システムは、例えば、広視野（FOV）のレンズ無の画像化システム技術を使用する速度応答に基づいて各精子を個別に評価することを可能とする。該システムは、マイクロチップに基づく、影の画像化システムを利用する広FOVのレンズ無技術を提供する。さらに、本発明は、男性不妊症の信頼できる指標である形態計測学的情報を採取するため使用することができる。

【0017】

図1Aを参照すると、精子選別システム10が解説される。システム10は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）系、ポリメチルメタクリル（PMMA）系、又は他の微小流体システムであってもよい。システム10は、注入口14を有するハウジング12と、そこに配置されたフィルタ18を有する収集チャンバー16とを含む。フィルタ18は、ポリカーボネートフィルタ、又は以下に記載されるように、孔又は通路サイズ等の好適な材料特性を有する他のフィルタであってもよい。図1Bを参照すると、注入口14及び収集チャンバー16は、微小流体チップ22に沿って伸びる通路又は流路20により接続される。以下に記載されるように、微小流体チップ22は、使い捨てであってもよく、例えば、10 μl ~ 3 mlの（新鮮又は凍結、加工又は未処理のいずれかの）加工されていない精液試料を取り扱うマイクロチップを含んでもよく、複雑な機器又は熟練した技術者を必要とせずに、迅速に、例えば30分未満で精子を選別する。

【0018】

流路20は、注入口14から収集チャンバー16に伸びる。収集チャンバー16では、第1及び底部のチャンバー24は微小流体チップ22に隣接して配置され、第2及び頂部のチャンバー26は、上記第1又は底部のチャンバー24の上に微小流体チップ22に関

10

20

30

40

50

して遠位に配置される。以下に記載されるように、第1のチャンバー24は、新鮮又は凍結、加工又は未処理に関わらず、注入口14に提供された精液の試料を収集するように設計され、第2のチャンバー26は運動性精子を濾過するように設計される。

【0019】

図1Cを参照すると、図1Bに関して上に記載されるシステムは、流体接続27によって頂部チャンバーに接続される追加の収集、すなわち「濃縮」チャンバー25を含むように変更されてもよい。すなわち、これに関して、精子はより容易な採取を促すため収集チャンバー25に濃縮されてもよい。

【0020】

別の配置では、図1Dに図示されるように、収集チャンバー25は濃縮チャンバー25の反対側の注入口29を各々有する複数のチャンネル28によって接続されてもよい。これに関して、図1Cの複数の流路20から、又は複数の収集チャンバー16からの精子は、共通する濃縮チャンバー25へと送達されてもよい。更に大容量を取り扱うため、又はより高スループットの適用のため複数のフィルタ及び複数のチャンネルの使用を容易にするように、上述の設計に対するかかる変化を使用することができる。

【0021】

図2Aを参照すると、統合された画像化システムを含むシステム10の一つの任意の配置の分解立体図が示される。画像化システムは、レンズ無しの大FOV画像化プラットフォームを形成してもよい。この観点からすれば、照明30、画像化センサ31及びガラス保護層32等の統合された画像化システムの構成要素は、上述のシステム10と組み合わせられる。機能上、照明30は、注入口14によって微小流体チップ22へと導入された精子34を照らす。照らされた精子34は、電荷結合素子(CCD)、相補形金属酸化膜半導体(CMOS)、又は他の画像化システムデバイスであってもよい画像化センサ31によって画像化システムされ得る。より具体的には、図2Bを参照すると、機能上、精子及び精液34が例えばピペット36を使用して排出口14へと導入され得る。精子は、上述のガラス32、また同様にPMMA又は他の材料層40を含んでもよく、ガラス32とPMMA層40を共に張り付けるためその間に配置された両面粘着(DSA)層42を有する微小流体チップ22に沿って培地38を横切る。最終的には、精子34は、鉍物油44が見られる場合がある排出口16へと微小流体チップ22を縦走する。具体的には、培地の蒸発を回避するため、無菌の胎児で試験した鉍物油の薄層を注入口14及び排出口16の培地38の上部に入れてもよい。

【0022】

図示されるように、有効な精子選別のため異なるチャンネル長を使用してもよく、又は選択してもよい。さらに、図2Cを参照すると、注入口14及び収集チャンバー16が複数のチャンネル46によって接続されるマルチチャンネル設計を利用してもよい。また、図示されるように、例えば、洗浄に使用するためPBS回収バッファ48が含まれてもよい。さらに、上記チャンネルを収容するチップ基体は使い捨てであってもよい。

【0023】

図2A及び図2Bを参照すると、含まれる場合には、光電子センサアレイ面31に各個別の精子34の影画像を記録するため、レンズ無し画像化システムを使用することができる。このシステム10は、非常に大きなFOV、例えば、数センチメートル×数センチメートルのFOVに亘るオンチップ(on-chip)の数十万の個々の細胞の動的配置のリアルタイムでの細胞の検出/計数、又はモニタリングを標的とする。この技術は、低複雑で小型化が容易なこれらの特徴を提供する。

【0024】

画像化システム能を含むシステム10の或る一つの特定の例を図2Dに示す。標準的な顕微鏡は、微小流体選別チップ全体をモニターし、リアルタイムで精子を解析することができない。この挑戦は、平行したオンチップモニタリング及び精子の計数を提供するマイクロチャンネルを有するレンズ無し画像化システムを統合することによって対処され得る。上記デザインは、胎生学/臨床の研究室及び看護拠点での状況に適したものとするため、

10

20

30

40

50

この技術の最小化を可能とする。

【0025】

システム10は、図2Dの例において、上に記載されるように精子34がそれを縦走する微小流体チップ22へと単色光52の焦点を合わせるため、ハウジング12の開口50、例えば50 $\mu$ mの開口によって方向づけられた光源30を含む。システム10は、有線又は無線のいずれでもよい、データコネクション56により接続されたコンピュータシステム54、及び画像能に対して操作可能な動力を供給するため動力コネクション60により連結された再充電電池又は他の動力供給源58に連結されてもよい。

【0026】

或る一つの配置では、1.5mmの厚さのポリメチル-メタクリレート(PMMA)及び50 $\mu$ mの厚さの両面接着(DSA)フィルムの組み合わせを使用して、マイクロチャンネルを作ってもよい。レーザーカッターを使用して5mm~40mmの範囲の異なる長さのマイクロチャンネルを作るためDSAフィルムをカットしてもよい。注入ポート及び排出ポートは、それぞれ0.65mm~2mmの直径を有するPMMAを通して伸びた。その後、PMMAにDSAフィルムを直接置いて2つを有効に接合する。チャンネルの高さが接着層の高さによって決定されるように、ガラススライドをDSAフィルムの他方の側面に置く。より大きな排出口のサイズは、特にピペットによって容易にアクセス可能なチャンネルから選別した精子を抽出するように設計される。注入口と排出口の間の距離はチャンネル長を決定した。チャンネルの長さは注入口と排出口の間の距離として定義される。

【0027】

排出口における運動性細胞及び高容量の加工に対する細胞の割合を増加するため、ポリカーボネートフィルタをこれらのマイクロチップに統合することができる。このフィルタに基づくデバイスは、50mm $\times$ 30mmの面積にカットされ、また別に30mm $\times$ 30mmの面積にカットされた3mmの厚さのPMMAを使用して設計されてもよい。20mmの直径のシリンジを両方のPMMA構成要素へとカットし、150 $\mu$ mのDSAを使用して互いに垂直に配列してもよい。また、0.6mmの精液注入口(injection inlet)を10mmの距離でより大きなデバイス構成要素にカットする。上記システムを2つのPMMA成分間に位置されたワットマンニュークリアポアフィルタを使用して組み立てることができる。

【0028】

図1A~図2Dを参照すると、大規模な精液加工にシステム10を使用することができる。そうするため、注入口14により精子34を導入して微小流体チップ22に入れる。この動作の間、照明30及び画像化センサ31を使用して精子34を映すことができる。精子34は排出口16に向かって動く。この排出口/収集チャンパーは2つのチャンパー24及び26を提供する。第1のチャンパー24は、微細孔を提供するフィルタを含み、第2のチャンパー26は微細孔を含む別のフィルタを含む。これに関して、システム10は、女性外性器の通路に近づくため微細孔によって接続されるマクロ貯蔵器14、16を提供する。そこでは、精子34は、自然に発生するように、排出口16に向かって培地38に沿って集団で動き、互いに影響を受ける。最も運動性の形態学的に正常で成熟な機能性の精子は、第1のチャンパー24に死亡した又は機能性が劣る精子を残して、重力に逆らって微細孔を選択的に通過する。すなわち、精子の頭部は球形であり、約3 $\mu$ m $\times$ 4.5 $\mu$ mの大きさを有する。精子の尾部は、約45 $\mu$ m~50 $\mu$ mの長さである。精子の頭部より大きな直径の微細孔を有するフィルタが第1及び第2のチャンパー24、26に置かれる場合、運動性である精子のみが微細孔を通る道を作ることができるのに対し、死亡した、死につつある、又は傷害された精子は、それらの長い尾部のため微細孔を通過することができない。そのかわり、これらの死亡した、死につつある、及び/又は傷害された精子は重力に負け、第1のチャンパー24に残留する。

【0029】

そのため、最小のROS生成を伴う健康で運動性の形態学的に正常な精子を回収するため任意の遠心分離工程を必要としないように設計される、マイクロチップに基づくシステム

10

20

30

40

50

が提供される。そのデバイスの設計は、精子選別手法をより手間がかからず、安価なものとする。上記システムは、精子の選別に対する機構として、空間の制限されたチャンネルにおける消耗の利用 ( u t i l i z e s ) を組み込む。上記システムは、いかなる遠心分離工程も伴わずに運動性で形態学的に正常な精子を単離することができる。そのため、三次元のフィルタに基づく微小流体デバイスのモデルを作製するため、精子とチャンネル壁、及びフィルタ表面及び穴との間の流体力学的相互作用から協同的に生じる効果を組み込み、現在の精子運動性の粗雑なモデルを使用する。このモデルは、微細孔サイズ及びインキュベーション時間等のデバイスのパラメータの設計を可能とする。

#### 【 0 0 3 0 】

上述のシステムの設計及び操作は、以下のシステムの一例、かかるシステムに関する配置、及びかかるシステムの試験結果の考察より更に理解され得る。しかしながら、これは一例であって、採用され得る配置、設計、及び操作の変化に関して本質的に非限定的であり、本発明の範囲に含まれる。

#### 【 0 0 3 1 】

##### [ 実施例 ]

##### ( M M S S チップの組み立て )

ポリ (メチルメタクリレート) ( P M M A 、厚さ 3 m m ; ジョージア州アトランタの M c M a s t e r C a r r ) 及び両面接着剤 ( D S A 、厚さ 1 2 0 μ m ; ミネソタ州セントポール) をレーザーカッター (アリゾナ州スコッツデールの V e r s a L a s e r <sup>TM</sup>) を使用してカットした。チップの設計を C o r a l D r a w 4 で作製し、カットのため U S L E E n g r a v e ソフトウェアで実行した。M M S S チップの主な構成要素は、5 0 m m × 3 0 m m ( 底部チャンバー ) の面積にカットされた 1 つの 3 m m P M M A 、及び 3 0 m m × 3 0 m m ( 頂部チャンバー ) の面積にカットされた別の 3 m m P M M A を含んだ。また 0 . 6 m m の注入点を、チャンバーから 5 m m の距離で底部 P M M A シートに切り込んだ。2 0 m m の直径のシリンダを両方の P M M A 成分に切り込んだ。D S A を使用して底部 P M M A チャンバー - を最初にガラススライドに付着した。上部 P M M A チャンバーを配列し、D S A を使用して底部チャンバーと付着した。N u c l e p o r e <sup>TM</sup> のトラックエッチド ( t r a c k - e t c h e d ) ポリカーボネートメンブレンフィルタ ( W h a t m a n L t d 、直径 2 5 m m 、3 μ m 、5 μ m 、8 μ m ) をチップ組立ての間に 2 つの P M M A チャンバーの間に挟んだ。したがって、少なくとも 1 μ m 及び 1 0 μ m 未満が有利な孔サイズの範囲であろうと考えられた。組み立てたチップの斜視図を図 3 に示す。

#### 【 0 0 3 2 】

##### ( M M S S チップを使用した精子選別 )

解凍した未加工の精液試料 ( ストック精子 ) を第 1 / 底部チャンバーを満たすまで M M S S チップの注入口に注入した。第 1 / 底部チャンバーを最大 5 6 0 μ l の精液試料を保持するように設計した。別の一連の実験では、M M S S チップに注入する前にヒト卵管液 ( H T F ) 中 1 パーセントのウシ血清アルブミン ( B S A ) でストック精液試料を 4 倍に希釈した。注入の後、第 1 / 上部チャンバーを H T F 中 1 パーセントの B S A 5 6 0 μ l でいっぱいにした。その後、頂部チャンバーからの流体を解析用にエペンドルフチューブに収集する前に、チップを 3 7 のインキュベーターで 1 5 分、3 0 分、4 5 分、及び 6 0 分の間隔で保存した。

#### 【 0 0 3 3 】

##### ( 濃縮及び運動性解析 )

濃縮に対しては標準的な M a k l e r 血球計算器を使用し、運動性に対しては光学顕微鏡を使用して精子試料を解析した。簡潔には、1 μ l の精子試料を M a k l e r 血球計算器にピペットで滴下し、血球計算器によって提供される覆蓋で覆った。少なくとも 3 回、クリックカウンターを使用する方法に慣れた職員によって精子を計数した。前方に動く精子を運動性とした。

#### 【 0 0 3 4 】

10

20

30

40

50

## (生存能力の解析)

L I V E / D E A D (登録商標) S p e r m V i a b i l i t y K i t ( L - 7 0 1 1 , M o l e c u l a r P r o b e s (登録商標)) を使用して生存力について精子試料を解析した。S Y B R 1 4 染料を使用して生存している精子を染色し、ヨウ化ウロピジウム ( P I ) を使用して死んだ精子を染色した。製造業のプロトコルに従って試料を染色した。簡潔には、最初に S Y B R 1 4 染料を最終濃度 1 0 0 n M まで精子試料に添加した。その試料を 3 7 ° C で 5 分間インキュベートした。死んだ精子を染色するため P I 染料を最終濃度 1 0 μ M までその試料に添加し、更に 5 分間インキュベートした。精子試料をガラスカバースリップに塗りつけ、蛍光顕微鏡 Z e i s s A x i o O b s e r v e r . Z 1 を使用して映した。S Y B R 1 4 及び P I に対してそれぞれ緑色及び赤色の発光フィルタを使用した。

10

## 【 0 0 3 5 】

## (速度の測定)

精子の解析に関して W H O ラボマニュアルに記載される方法を使用し、精子試料を解析した。簡潔には、精子を 3 0 分後に M M S S チップ ( 3 μ m , 5 μ m , 8 μ m ) から回収した。6 μ l の精子試料をガラススライドに置くことによりスライドを作製し、1 8 m m × 1 8 m m のカバースリップを使用して覆って試料に深さ 2 0 . 7 μ m を与えた。試料の乾燥を回避するため、スライドを同時ではなく定期的に作製した。コンピュータのモニターに映し出される試料のライブ画像により、光学顕微鏡を使用して 2 0 倍 ( C a r l Z e i s s ) で各スライドを分析した。ビデオ撮像ソフトウェア ( T e c h S m i t h の S n a g i t ) を使用して、精子試料の動きを 5 秒間に亘り無作為の位置で撮像した。ビデオを 1 0 0 f p s で V i d e o t o J p e g ソフトウェアを使用して画像配列に変換した。精子速度パラメータ、すなわち、直線速度 ( V S L ) 、曲線速度 ( V C L ) 及び平均経路速度 ( V A P ) をモニターするための C A S A プラグインを使用する分析に対して、画像配列を I m a g e J ( 国立衛生研究所、<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) にインプットした。

20

## 【 0 0 3 6 】

## (精子の形態学的判断)

5 μ m 及び 8 μ m の M M S S チップから取り出した精子懸濁物を 3 0 分後に収集した。3 μ m の M M S S チップから回収した精子は、形態学的解析には精子濃度が低すぎるため、精子形態学について解析しなかった。その後、1 0 μ L の精子懸濁物を取り、清浄で無菌の顕微鏡スライドに置いて、羽で塗った塗抹 ( f e a t h e r e d s m e a r ) を作製した。塗抹を風乾して固定用に調製した。F e r t i P r o によって提供されるものに類似する S p e r m a c 染色プロトコルに従って形態学的判断のため精子を染色した。簡潔には、乾燥した塗抹を S p e r m a c の固定化溶液に少なくとも 5 分間沈めた後、D I 水で濯いだ。染料 A をスライドの一端にピペットで滴下し、塗抹上に流した。その後、スライドを平面に置いて、1 分間染料に浸した。その後、スライドを D I 水で 2 回洗浄した。次に染料 B を染料 A と同様に塗布し、1 分間に亘って精子に入り込ませた。この後、D I 水で一回濯いだ。最後に、染料 C を塗抹上にピペットで滴下し、1 分間置いて D I 水で濯いだ。この時、油浸の 1 0 0 倍対物レンズを使用して、少なくとも 1 0 0 の精子を映した ( N ( 反復回数 ) = 3 ) 。精子が W H O 形態学的判定基準 ( 頭部 : 球形頭部 ; 頭部面積の 4 0 % ~ 7 0 % を覆う先体 ; 頭部長さ 3 . 7 μ m ~ 4 . 7 μ m ; 頭部幅 2 . 5 μ m ~ 3 . 2 μ m ; 幅に対する長さの比率 1 . 3 ~ 1 . 8 ; 2 以下の小空胞 ; 先体後領域はいかなる空胞も含まない。中間部 : 中間部には細胞質の残留がない ; 中間部の長さは頭部の長さと同様 ; 頸部の破損がない。主部 : 尾部の破損を示す鋭角又は屈曲がない ; 中間部より薄い ; 主部の長さは頭部の長さのおよそ 1 0 倍である ) に含まれる場合に形態学的に正常と見なした。

30

40

## 【 0 0 3 7 】

## (精子成熟の判断)

5 μ m 及び 8 μ m の M M S S チップから取り出した精子懸濁物を 3 0 分後に回収した。

50

3  $\mu\text{m}$ のMMSチップから回収した精子は、この解析には精子濃度が低すぎるため、核の成熟について解析しなかった。乾燥した塗抹をSpermac固定溶液で5分間固定した後、DI水で濯いだ。4%酢酸溶液中の5%アニリンブルーを調製し、塗抹上に注いだ。塗抹を染色溶液に5分間浸した後、DI水で濯いだ。油浸100倍対物レンズを使用して、少なくとも100の精子を判断した(N(反復回数)=3)。濃い青で染色された精子の頭部を未熟とし、染色されていないままのものを成熟と見なした。

#### 【0038】

(ROS検出)

精子洗浄：1mlの精液を凍結保存タンクから取り出し、37の温浴で15分間解凍した。1mlの精液に9mlのHTF+1%BSA培地を添加し、500xgで5分間遠心分離して、チューブの底に精子ペレットを残して上清を除去することによって洗浄した精液試料を作製した。この手順を3回繰り返した。HTF培地を精子ペレットに添加し、ROS研究により試料を染色した。

10

#### 【0039】

スイムアップ法：1mlの精液を凍結保存タンクから取り出し、37(37desiresC)の温浴で15分間解凍した。精液を9mlのHTF+1%BSAで希釈した。その後、希釈した精子懸濁物を500xgで5分間遠心分離した。続いて、上清を除去して廃棄した。残りのペレットを500xgで5分間に亘って試料を遠心分離することによって再度洗浄した。再度上清を除去し廃棄した。最後に、ペレットを破壊しないように500 $\mu\text{L}$ の培地を遠心チューブの壁に沿って添加した。その後、試料をインキュベーターに入れ、30分間に亘って運動性精子をペレットからスイムアップさせた。ペレットを残して運動性精子を収集した。MMSチップを30分間インキュベートし、ROS研究のため精子懸濁物を取り出した。

20

#### 【0040】

ROS検出のための染色：2つの蛍光染料、ジヒドロエチジウム(DHE)とSYTOXグリーンとを組み合わせたフローサイトメトリーを使用してROS生成を検査した。DHEは、精子DNAに結合して赤色蛍光を生じる2つの蛍光色素を産生するスーパーオキシドアニオンと反応する。一方、SYTOXグリーンは細胞生存能力の指標であり、細胞が死んでいる場合に緑色蛍光を生じる。この実験のため、いずれも20 $\mu\text{L}$ の過酸化水素と混合した、取り出した精子懸濁物200 $\mu\text{L}$ からなる4つの対照試料を作製した。これに続いて、37で30分間のインキュベーションを行った。試料に染料を添加した。すなわち、陰性対照には色素を添加せず、5 $\mu\text{M}$ のDHEを第2の試料に添加し、50nMのSYTOXグリーンを第3の試料に添加し、それぞれ5 $\mu\text{M}$ と50nMのDHEとSYTOXの両方を第4の試料に添加した。染料を15分間インキュベートした後、試料を試験する15分前に測定のためフローサイトメトリーへと移した。実験の間FACSCaliburフローサイトメーター(カリフォルニア州サンジョーズのBecton Dickinson)を使用した。488nmでのアルゴンレーザー励起と、FL1とFL2に対してそれぞれ530/30バンドパス(緑)及び585/42バンドパス(赤)のフィルタを使用する発光測定とを組み合わせた。どの精子の事象もゲートアウトせず、少なくとも10,000の細胞を検査した。試験試料に対して、解凍した精液由来の500 $\mu\text{L}$ の試料、スイムアップ懸濁物、3 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 及び8 $\mu\text{m}$ のフィルタ孔サイズのマイクロチップを収集した。それぞれ5 $\mu\text{M}$ と50nMのDHE及びSYTOXを各試料に添加し、15分間インキュベートした。測定のため試料をフローサイトメーターに取った。

30

40

#### 【0041】

(DNA断片化)

TUNELアッセイキット(In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Applied Scienceによるフルオレセイン)を使用し、未処理の精液、スイムアップ、並びに3 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 及び8 $\mu\text{m}$ の孔サイズのフィルタを備えたマイクロチップデバイスから回収した精子の集団についてDNA断片化を

50

定量化した。これらの試料は全て先に言及されたROS検出の欄で獲得された。最初に、全ての精子懸濁物をPBS及び1%BSAを用いて5分間に亘り500×gの遠心分離によって2回洗浄した。洗浄してすぐに、精子細胞の濃度を $2 \times 10^6$ 細胞/mlに調整した。その後、精子懸濁物をPBS中4%パラホルムアルデヒド(100µLの細胞懸濁物毎に200µL)で30分間に亘って室温で固定した。精子細胞をPBS及び1%BSAを用いて6分間に亘り500×gで2回洗浄し、2分間氷中/氷上で0.1%クエン酸ナトリウム中0.1%TritonXを用いて透過処理した。精子を2回洗浄した後、5µLの酵素(TdT)溶液及び45µLの標識(dUTP-フルオレセイン)溶液と共に37で1時間インキュベートした。同様に、陰性及び陽性の対照試料を調製した。ただし、染色に先立って、陽性対照をDNaseと共に37で40分間インキュベートした。染色の間、陰性対照のみを標識溶液(酵素溶液を含まない)と共にインキュベートした。染色の後、試料をPBS及び1%BSAで2回洗浄し、PBS中に再懸濁した(Muratori et al, 2000)。DNA断片化細胞の蛍光発光をフローサイトメーターで判断し、FL-1検出器(521nm)により検出した。合計5000の事象を取得した。精子集団をデータからゲートアウトして細片からのいかなるシグナルも除外した。実験を6回繰り返した(N=6)。

#### 【0042】

(結果及び考察)

化学物質不使用で遠心分離不使用のハイスループットな縦断的な(vertical)精子選別デバイスを開発するため、上に記載されるようにMMSチップを作り、組み立てた。簡潔には、それは、例えば3µm、5µm、8µm等の様々な直径のポリカーボネートフィルタによって分離される2つのチャンバチップである。精子試料を底部チャンバーに注入し、選別された運動性の/健康な精子を頂回収チャンバーから収集する。例えば、2つのチャンバーの間で均一なサイズの孔を有するフィルタの存在は、最も運動性の健康な精子がフィルタ孔を通して移動し得るように設計された。精子選別に使用したポリカーボネートフィルタの走査型電子顕微鏡(SEM)画像は、図4に図示されるように均一な孔径を示した。種々の微細孔径、i) 3µm、ii) 5µm、及びiii) 8µmのポリカーボネートニュークリアポアトラックエッチドメンブレンフィルタのSEM画像である。スケールバーは10µmである。これらの画像は、様々なフィルタ孔と精子の相対的なサイズを示す。

#### 【0043】

精子の頭部は球形であり、約3µm×4.5µmのサイズを有する。精子の尾部は約45µm~50µmの長さである。精子の頭部よりも大きな直径のフィルタがこの2つのチャンバチップの間に設置される場合、運動性の精子のみが微細孔を通る道を作ることができるのに対し、死亡した/死につつある精子は尾部が長いので微細孔を通過することができない。

#### 【0044】

(精子の運動性及び回収率)

選別した精子の運動性を調べるため、本発明者らは、3つ全てのMMSチップ(3µm、5µm、及び8µmの直径のフィルタチップ)の頂回収チャンバーから収集した精子を解析した。図5Aに図示されるように、結果は、MMSチップにより選別された精子がストック精子試料と比較して著しく高い運動性を示すことを示した。具体的には、3µm、5µm、及び8µmのフィルタチップは、それぞれ95パーセント±10以上、90.4パーセント±1.8以上、85.9パーセント±1.5以上の精子運動性を示し、これはストック精子の運動性(39.8パーセント±1.9)よりも著しく高かった。本発明者らは、精子運動性に対するインキュベーション時間の効果を更に調べた。精子を15分後、30分後、45分後、及び60分後に収集した。図5Aに図示されるように、60分の時間点の場合の運動性が最も高かったのに対し、15分の時間点では最も低く、本発明者らは、精子試料がより長い時間の後に収集された場合に回収された精子の運動性が増すことを見出した。この運動性の増加は、3つ全てのチップにおいて認められた。各実

10

20

30

40

50

験の開始時に H T F + 1 パーセント B S A を M M S S チップの頂部チャンバーにピペットで滴下した場合、2つの液体、すなわちストック精子試料と H T F + 1 パーセント B S A 培地の混合に起因して精子試料においてわずかな乱流が生じ得る。この精子試料における乱流は、後の時間点（30分後、45分後、及び60分後）と比較して実験開始時（15分後）におけるより低い精子運動性に対する可能性のある理由である。さらに本発明者らは、様々な時間点における精子回収率、すなわち、ストック試料から回収された健康な精子の割合（%）を計算した。回収率は、精子試料の精子数少ない（精子減少症標本及び無精子標本）状況では特にどの精子選別デバイスにとっても重要なパラメータである。M M S S チップでは、図5Bに図示されるように、或る期間、すなわち15分、30分、45分、及び60分の時間点に亘って精子回収率を分析した。精子回収率は30分の時間点で 10  
 収集された試料で最大であった（3 $\mu$ m、5 $\mu$ m、及び8 $\mu$ mのM M S S チップに対してそれぞれ3.08パーセント $\pm$ 0.42、23.75パーセント $\pm$ 3.96、及び28.58パーセント $\pm$ 2.81）。本発明者らは、図5Bに図示されるように、30分超に亘って試料をインキュベーションした場合に精子の回収率が減少することから、この30分の時間点を飽和時間点と呼ぶ。本発明者らは、30分後に一部の精子がフィルタを逆行して底部チャンバーに戻っている可能性があると考える。

#### 【0045】

（精子の生存能力）

運動性の精子を生存可能とした。選別された精子が生存可能であるという本発明者らの知見を実証するため、本発明者らは30分の時間点で選別した精子に対して生/死染色を行なった。選別された精子の生存能力は、ストック精子試料よりも著しく高く、すなわち41.0パーセント $\pm$ 0.45（ストック精子）、91.32パーセント $\pm$ 3.43（3 $\mu$ mのM M S S チップ）、89.83パーセント $\pm$ 5.82（5 $\mu$ mのM M S S チップ）、91.59パーセント $\pm$ 4.44（3 $\mu$ mのM M S S チップ）であった。 20

#### 【0046】

（精子運動性及び回収に対する試料希釈の効果）

運動性及び回収率に対する精子試料の希釈の効果調べるため、M M S S チップを使用して加工する前に、本発明者らは1:4の比率でH T F + 1パーセントB S Aを用いてストック精子試料を希釈した。図5Aに図示されるように、選別した精子の運動性は4つの時間点（15分、30分、45分、及び60分）の全てにおいてストック精子試料よりも 30  
 著しく高く、すなわち45.8パーセント $\pm$ 1.5（ストック精子）、95.0パーセント $\pm$ 0.5以上（3 $\mu$ mのM M S S チップ）、93.7パーセント $\pm$ 4.7以上（5 $\mu$ mのM M S S チップ）、90.7パーセント $\pm$ 2.5以上（8 $\mu$ mのM M S S チップ）であったのに対し、希釈されていない精子試料を使用した場合には異ならなかった。しかしながら、図5Bに図示されるように、希釈されていないストック精子試料に代えて希釈した精子試料を使用する場合、精子回収率は増加した。最大回収率は、30分後の時間点で8 $\mu$ mのチップに対して52.68パーセント $\pm$ 4.97であることがわかった。希釈した試料では、精子は、別の精子にぶつかる前に平均自由行程の増加を有した。この現象が、精子がフィルタの微細孔により速く到達して横切ることを補助した可能性がある。さらに、フィルタは固定された数の孔（14パーセント未満の空隙率）を有する。希釈した試料 40  
 では、より少ない数の精子がフィルタ孔を横切ろうとすると、各精子が空の孔を見つけ、それを通して移動する可能性がより高かった。

#### 【0047】

（精子速度の解析）

様々な精子の速度パラメータ、すなわち、曲線速度（V C L）、直線速度（V S L）、及び平均経路速度（V A P）を解析した。これらの速度の定義を示す精子の通り道の代表的な画像を補足図面3に示す。図3の通り道が作製されたオリジナルの精子のビデオが補足動画1として与えられる。M M S S チップを使用して選別された精子は、図6に図示されるようにストック精子試料よりも著しく速い精子速度を示した。具体的には、図6Aに図示されるように、平均精子V C Lは、3 $\mu$ m、5 $\mu$ m、及び8 $\mu$ mのM M S S チップに 50

対してそれぞれ  $52.7 \pm 6.0 \mu\text{m}/\text{秒}$  (ストック精子) から  $59.9 \pm 3.5 \mu\text{m}/\text{秒}$ 、 $75.3 \pm 3.1 \mu\text{m}/\text{秒}$ 、及び  $75.6 \pm 4.5 \mu\text{m}/\text{秒}$  に増加した。平均精子 V S L は、図 6 B に図示されるように、 $3 \mu\text{m}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 、及び  $8 \mu\text{m}$  のチップに対してそれぞれ  $44.4 \pm 5.6 \mu\text{m}/\text{秒}$  (ストック精子) から  $52.1 \pm 3.5 \mu\text{m}/\text{秒}$ 、 $63.4 \pm 3.5 \mu\text{m}/\text{秒}$ 、及び  $64.1 \pm 3.9 \mu\text{m}/\text{秒}$  に増加した。平均精子 V A P は、図 6 C に図示されるように、 $3 \mu\text{m}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 、及び  $8 \mu\text{m}$  のチップに対してそれぞれ  $48.4 \pm 5.8 \mu\text{m}/\text{秒}$  (ストック精子) から  $54.1 \pm 3.4 \mu\text{m}/\text{秒}$ 、 $68.0 \pm 2.9 \mu\text{m}/\text{秒}$  及び  $67.5 \pm 4.1 \mu\text{m}/\text{秒}$  に増加した。より速い精子速度は、選別された精子がストック試料よりも健康であることを示す。本発明者らが 3 つの異なる M M S S チップを使用して選別された精子間で速度を比較したところ、 $5 \mu\text{m}$  及び  $8 \mu\text{m}$  の M M S S チップを使用して選別された精子は、 $3 \mu\text{m}$  のフィルタチップよりも速い V C L、V S L 及び V A P の速度を与えたことを認めた。これは、おそらくは、 $3 \mu\text{m}$  より小さい頭部サイズを有するほとんどの未熟な運動性精子が  $3 \mu\text{m}$  の微細孔を通過できたという事実による。この唯一の例外は、2 以上の  $3 \mu\text{m}$  の孔が共に結合してより大きな孔を作るフィルタ領域であった。

#### 【0048】

##### (精子の形態学的解析)

形態学的解析のため、精子を S p e r m a c S t a i n により染色した。W H O によって定義された厳しい基準に基づいて精子を形態学的に正常と見なした。4 パーセント超の形態学的に正常な精子を有する精子試料をいずれも正常と見なした。本発明者らは、 $5 \mu\text{m}$  の M M S S チップを使用して選別した精子は全体的な形態学に関して精子の質を改善しなかったが、選別された精子は運動性であったことを見出した。 $8 \mu\text{m}$  の M M S S チップを使用して選別された精子は、ストック及び  $5 \mu\text{m}$  の M M S S チップを使用して選別された精子に対して著しく改善された形態学、すなわち、 $30.0$  パーセント  $\pm 7.6$  ( $8 \mu\text{m}$  の M M S S チップ)、 $17.0$  パーセント  $\pm 3.2$  ( $5 \mu\text{m}$  の M M S S チップ)、及び  $17.6$  パーセント  $\pm 0.5$  (ストック精子) を示した。

#### 【0049】

##### (精子核の成熟解析)

アニリンブルーで精子を染色し、核成熟について解析した。アニリンブルー染色は、未熟な精子のリジンに富む核と成熟な精子のアルギニン/システインに富む核を区別する。未熟な精子の核をアニリンブルーで染色し、核と先体の色の対比を示した。アニリンブルーで染色した精子の代表的な画像及びそれらの判断基準を図 7 に示す。 $5 \mu\text{m}$  のフィルタチップを使用して選別した精子は、核の成熟に関してストック精子に対して何らの改善も示さなかった。一方、 $8 \mu\text{m}$  のフィルタチップを使用して選別した精子は、図 8 に図示されるようにストック精子試料よりもより高い核の成熟、すなわち、 $40.8$  パーセント  $\pm 5.1$  ( $8 \mu\text{m}$  の M M S S チップ)、 $25$  パーセント  $\pm 4.6$  ( $5 \mu\text{m}$  の M M S S チップ)、及び  $26.9$  パーセント  $\pm 5.8$  (ストック精子) を示した。

#### 【0050】

##### (ROS 生成解析)

選別した精子を R O S 生成について解析した。本発明者らは、洗浄法、従来のスイムアップ法、及び M M S S チップの後、精子における R O S 精製を比較した。本発明者らは、M M S S チップによって選別された精子は、スイムアップ及び洗浄法よりも R O S の生産が著しく少ないことを見出した (図 9)。精子洗浄及びスイムアップ法は、それぞれ精子の  $10.1\% \pm 0.3\%$  及び  $10.6\% \pm 1.1\%$  において R O S を産生したのに対し、M M S S チップを使用して選別された精子は、精子のわずか  $0.8\% \pm 0.4\%$  ( $3 \mu\text{m}$  の M M S S チップ)、 $0.7\% \pm 0.1\%$  ( $5 \mu\text{m}$  の M M S S チップ) 及び  $1.0\% \pm 0.1\%$  ( $8 \mu\text{m}$  の M M S S チップ) で R O S 産生を示した。選別していない精子試料は、精子の  $1.8\% \pm 0.6\%$  において R O S 産生を示し、これは、スイムアップ法及び洗浄法における R O S の生成の増加が遠心分離工程に起因することを明確に示した。

#### 【0051】

## (DNA断片化解析)

精子DNAの断片化の解析は、生殖可能な男性と不妊症の男性を区別することができ、より高レベルのDNA断片化を示す精子試料はIVF/ICSIにおいて結果的により低い受精率、胚の発達不全、及びより低い妊娠率をもたらす。MMSチップを使用して選別された精子をDNA断片化について解析した。DNA断片化(%)は $1.1\% \pm 0.3\%$  (8 $\mu\text{m}$ のMMS)、 $2.1\% \pm 0.7\%$  (5 $\mu\text{m}$ のMMSチップ)、 $3.4\% \pm 0.8\%$  (3 $\mu\text{m}$ のMMSチップ)、 $3.7\% \pm 1.2\%$  (スイムアップ法)、及び $31.2\% \pm 1.2\%$  (選別していない精液)であった。5 $\mu\text{m}$ 及び8 $\mu\text{m}$ のチップを使用して選別された精子は、選別されていない精子試料及びスイムアップ法を使用して選別された精子よりも著しく低いDNA断片化(%)を示した(図10)。

10

## 【0052】

理想的な精子選別技術は、(i)迅速で費用対効果が高く、(ii)手間がかからず、(iii)大容量の精子を加工することができ、(iv)死亡した/非運動性の精子から運動性の精子の単離するため高い回収効率を有する、(v)より速度の速い精子を単離する、(vi)形態学的に正常で成熟な精子を単離する、(vii)遠心分離工程を除外することによってROSの生成及び形態学的な損傷を軽減する、(viii)精子のDNA断片化の割合を減少するものでなくてはならない。これらのパラメータは、一般的には、どの精子選別デバイスに対しても望ましい特徴であり、本発明のシステムはこれらの特徴を提供するプラットフォームを提案する。

## 【0053】

本明細書で提供される特定の実施例では、1つのチップを作り上げるための全材料費は、1ドル未満(フィルタに50セント、PMMA及びDSAに50セント未満)である。MMSチップは、スイムアップ技術(20パーセント未満)よりも高い回収率(ストック精子からの28.58パーセント $\pm$ 2.81パーセントの回収)で非運動性精子から運動性精子を迅速に(およそ30分)単離する。回収は、希釈試料を使用することにより52.68パーセント $\pm$ 4.97(8 $\mu\text{m}$ フィルタ)まで更に高められる。精子希釈は健康な精子のより高い回収をもたらすが、一時に加工可能な実際のストック精子の容量を減少する。(i)小容量の射精、及び(ii)非常に少ない精子数を伴う射精については、加工する前にストック精子を希釈することが望ましい場合がある。MMSチップのデザインは非常に拡張性があり、より大きなフィルタ(例えば、1.5ml以上)を使用することにより大容量の精液を加工することができる。大量の精液試料を加工することは、IVF手法に十分な精子を回収するため必要である。さらに、大容量の加工は、精子数減少又は低い精子運動性を有する試料に非常に重要である。

20

## 【0054】

より速い速度パラメータを有する精子は、ICSIの受精率を高めることができる。MMSチップによって選別された精子は、選別された精子がより高品質であることを明確に示したストック精子と比較して、著しい速度パラメータ(VCL、VSL、及びVAP)の向上を示した。精子形態学は、受精の成功の別の重要な指標である。形態学的に正常な精子は、IVF手法の間の受精率を高める。8 $\mu\text{m}$ のMMSチップを使用して精子を選別することは、精子形態学的を1.7倍改善し、これは図7に図示されるように顕著な改善である。また、精子の運動性と形態学の関連を記すことも興味深い。本発明者らは、形態学的に正常な精子は良好な速度も示すことを見出し、これら2つの機能的パラメータ(精子の速度及び形態学)が関連することを実証した。

30

40

## 【0055】

精子の核成熟は、男性不妊症との関連が示されている。核の成熟によって説明されるクロマチン濃縮は、IVFの結果に対する別の予測因子である。8 $\mu\text{m}$ のMMSチップを使用して選別された精子は、図8に図示されるように、ストック試料と比較して著しく改善された精子の成熟を示した。また、本発明者らは、ヒト精子によるROS生成を調べた。ROS生成は、精子の質及びそのアポトーシス状態を判断するための重要な調査手段である。精子形成の間の分化不良、クロマチン凝縮の不良、重金属への暴露、熱又は電磁波

50

の照射、長期の *in vitro* 培養、及び ROS 生成細胞の近辺の精子の存在等の精子の ROS 生成をもたらす多くの経路及び理由が存在する。健康な精子を選別するため遠心分離工程を利用する従来の技術は、これらの技術が白血球等の ROS 生成細胞と共に精子を遠心分離することから、別の ROS 生成の理由である。本発明者らは、3 つ全ての MMS チップを使用して選別された精子は、ストック精子と比較して著しく低い ROS 生成を示すことを見出した。

#### 【0056】

DNA の断片化は、男性不妊症の別の非常に重要な指標である。幾つかの報告によれば、精子の DNA 完全性は、受精に対する独立したマーカーとして見なされる場合がある。MMS チップを使用して選別された精子は、図 10 に図示されるように選別されていない精液試料と比較して、DNA 断片化において著しい改善を示す。現在、精子のスィムアップ法がより低い DNA 断片化を伴う精子を選別するための基準とされている。5  $\mu$ m 及び 8  $\mu$ m の MMS チップによって選別された精子がスィムアップ法よりもかつてないほど低い DNA 断片化を示したことは興味深い。本発明者らは、これらの機能性アッセイに基づき、8  $\mu$ m の MMS チップを使用して選別された精子が従来の方法と比較してより良好な質であると考えられる。形態学的に正常で成熟した運動性且つ機能性の精子の選別は、IVF / ICSI の結果を改善する可能性がある。

#### 【0057】

ここで図 11 を参照すると、精子を選択するプロセスの工程 100 の幾つかの例が提供される。プロセスブロック 102 で開始する工程 100 は、上に記載されるような微小流体システムの注入口へと精子の試料を受け取ることを含む。その後、プロセスブロック 104 では、微小流体システムから選別された精子を採取するため、微小流体システムに対してアクセスを提供する排出口へと微小流体システムを通る流路に試料の精子を縦走させる。プロセスブロック 106 では、精子を排出口に到達する前にフィルタに供する。記載されるように、フィルタは複数の微細孔を有し、重力を使用してフィルタによって精子の動きを制限するように (*restrict*) 向けられる。したがって、プロセスブロック 108 において、選別された精子は排出口に供給される。選別された精子は、フィルタを通過し、重力を克服した後排出口を通過する精子を含む。

#### 【0058】

そのため、本発明は、(i) 健康な精子を選別し、運動性、速度及び形態学を解析するための化学物質不使用でフローフリーのシステムの開発、(ii) 選別された健康な精子の単離、及び (iii) 精子の枯渇及び集団運動のよりよい理解を促進させるためのシステム及び方法を提供する。このプラットフォームは、スィムアップ技術及びマイクロドロップ (*microdrop*) 技術等の既存の臨床手法を超えた革新である。また、精子の選別及び解析のため空間が制限されたチャンネルにおける枯渇の新たな草分け的な知識を使用することから、報告されている微小流体に基づく精子選別デバイスに対して新規である。臨床生殖医学は手間のかかる困難な分野であったことを考えると、かかる使用が容易なマイクロチップが健康な精子の選択の改善をもたらすことができ、操作者の熟練度への依存を低下し、反復可能で信頼できる操作工程を容易にする。

#### 【0059】

本発明は、1 又は複数の好ましい実施形態に関して記載され、明らかに述べられたもの以外の多くの等価物、代替物、変化及び修飾が可能であり、本発明の範囲に含まれることが理解される。

10

20

30

40

【図1A】

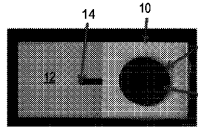


FIG. 1A

【図1B】

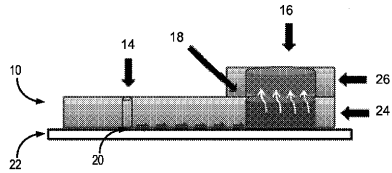


FIG. 1B

【図1C】

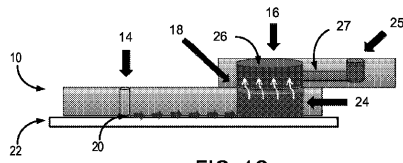


FIG. 1C

【図1D】

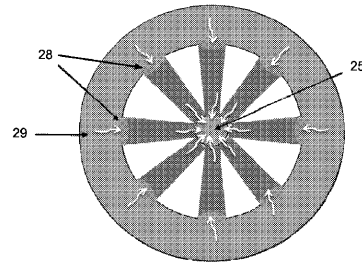
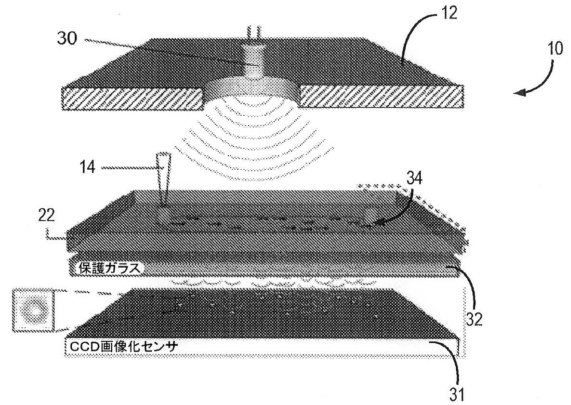
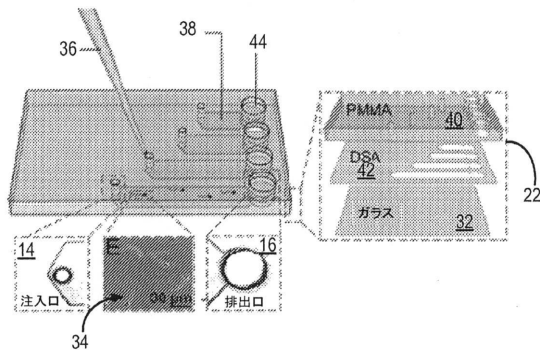


FIG. 1D

【図2A】



【図2B】



【図2C】

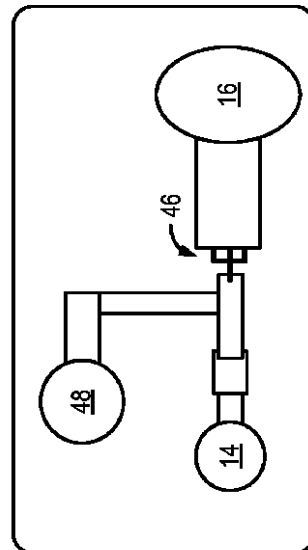
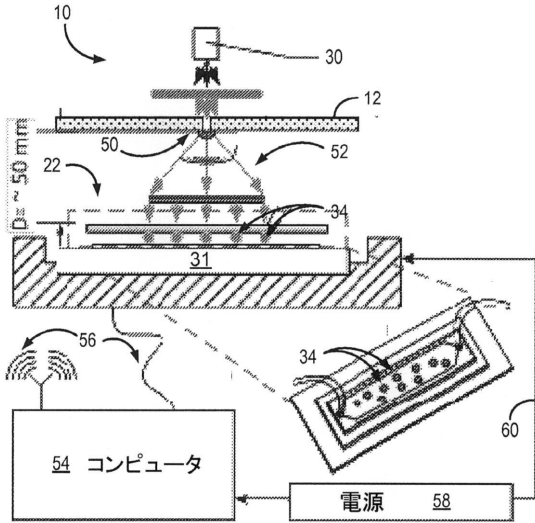
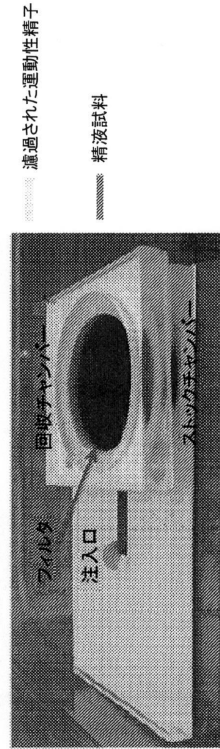


FIG. 2C

【図 2 D】



【図 3】



【図 4】

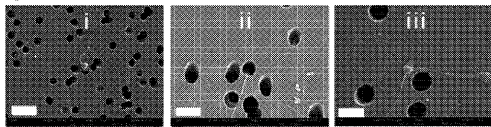
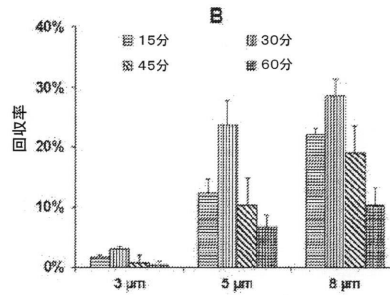
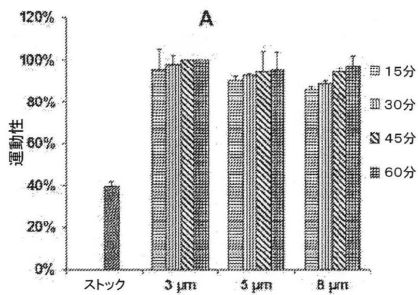


FIG. 4

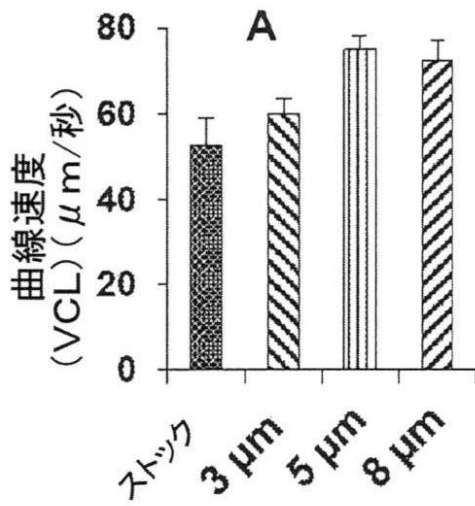
【図 5 B】



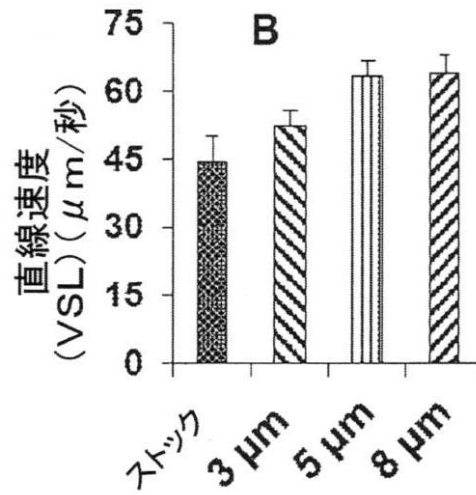
【図 5 A】



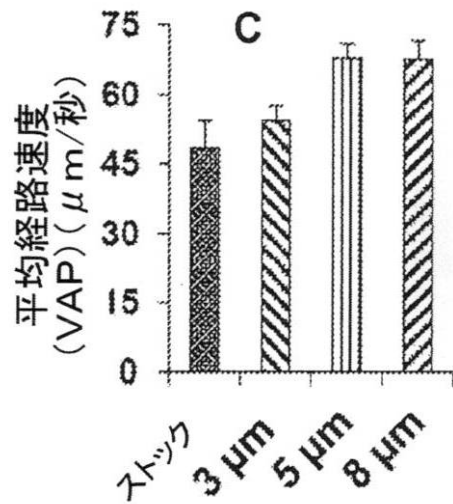
【図6A】



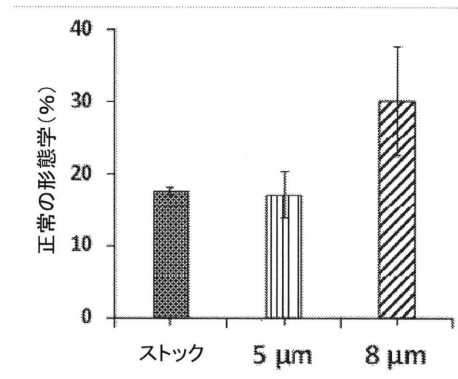
【図6B】



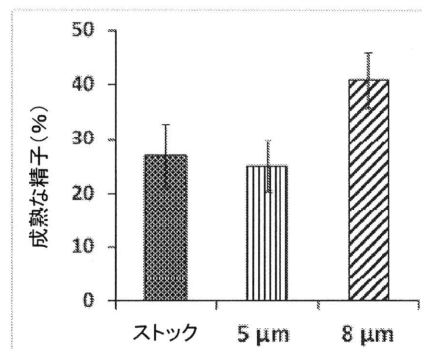
【図6C】



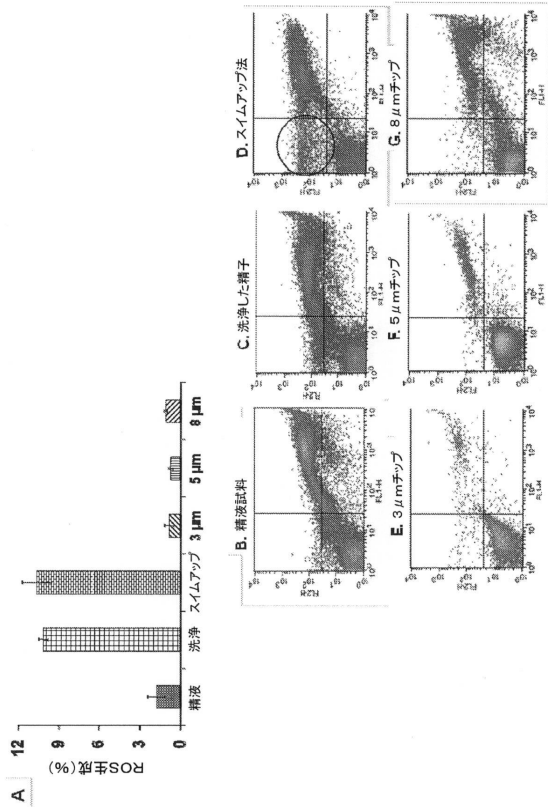
【図7】



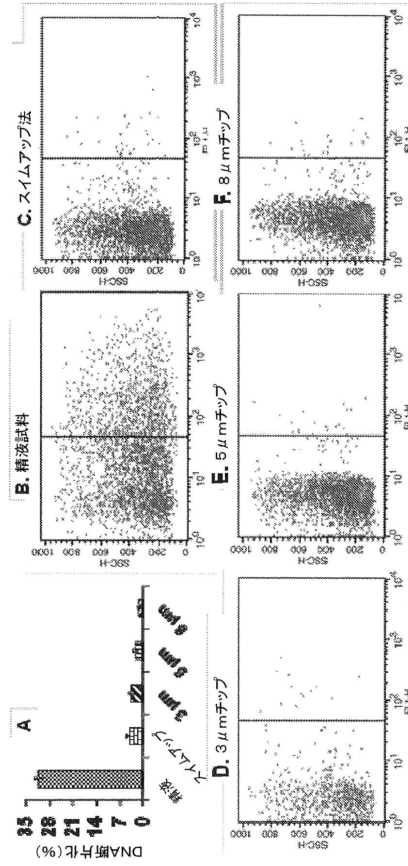
【図8】



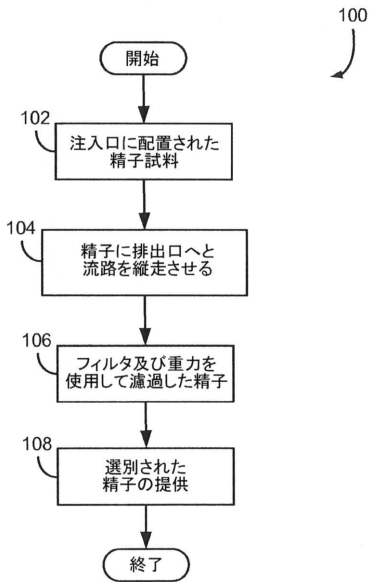
【図9】



【図10】



【図11】



## フロントページの続き

|             |       |           |         |             |
|-------------|-------|-----------|---------|-------------|
| (51)Int.Cl. |       | F I       |         |             |
| G 0 1 N     | 21/85 | (2006.01) | A 6 1 D | 19/02 A     |
| G 0 1 N     | 37/00 | (2006.01) | G 0 1 N | 21/85 B     |
| C 1 2 N     | 5/076 | (2010.01) | G 0 1 N | 37/00 1 0 1 |
|             |       |           | C 1 2 N | 5/076       |

(72)発明者 デミルシ、ウトカン  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9、ケンブリッジ、2 0 4、プレザント ストリート 1 5 7

(72)発明者 アスガー、ワジーム  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9、ボストン、ランズドーン ストリート 6 5

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 特表平07-506256(JP,A)  
 特表2003-523194(JP,A)  
 米国特許第05028526(US,A)  
 国際公開第2012/162181(WO,A1)  
 米国特許出願公開第2004/0059186(US,A1)  
 国際公開第2014/177157(WO,A1)  
 特表2006-511825(JP,A)  
 特表平09-509498(JP,A)  
 米国特許第5908380(US,A)  
 米国特許出願公開第2010/291535(US,A1)  
 米国特許出願公開第2005/26274(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 0 0  
 C 1 2 N 5 / 0 7 6  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 D W P I ( D e r w e n t I n n o v a t i o n )