

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 23 日現在

機関番号：57102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22560290

研究課題名（和文）パルスパワーの新応用技術-極短高電圧パルスによる受精卵への物質導入-

研究課題名（英文）New practical technology using pulsed power - material incorporation for fertilized eggs with a high intensity voltage with very short pulse duration

研究代表者

河野 晋（KONO SUSUMU）

有明工業高等専門学校 電気工学科・准教授

研究者番号：30270375

研究成果の概要（和文）：

本研究では、簡便で高効率な物質導入技術の確立を目指し、極短高電圧パルスとそのほかのパルスを組み合わせた物質導入システムの構築を行い、導入効率に関する実験を行った。システムは極短高電圧パルスを発生するパルスパワー発生器、低電圧長パルスを発生する RC 放電回路、これらをコントロールするトリガ信号発生器、反応容器等から構成される。本システムを用いることで、メダカ受精卵内部組織に対し電氣的ダメージを与えることなく、卵内へシクロヘキシミド、アクチノマイシン D などの化学物質や蛍光色素の導入が確認できた。

研究成果の概要（英文）：

To establish a simple and efficient method to introduce materials into living organisms, pulse system was designed and tested. This system consists of a pulsed power generator to generate a high intensity voltage with very short pulse duration, several RC discharge circuits to generate low voltage pulses with long pulse duration, a trigger signal generator, and reactor. By using this system, chemical substances, such as cycloheximide and actinomycin D, or a fluorescent dye had been incorporated into fertilized Medaka eggs without damage inside them.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電力工学・電力変換・電気機器

キーワード：パルスパワー、物質導入、受精卵、極短パルス、メダカ、シクロヘキシミド、アクチノマイシン D、成長遅れ

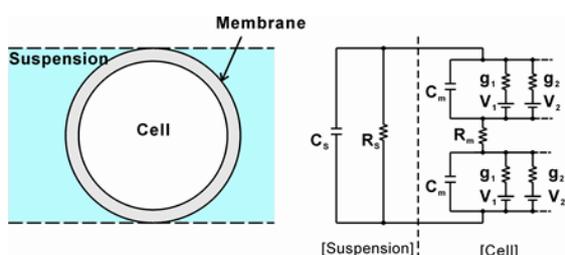
1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、各国の研究機関ではさまざまな電磁波や短時間のパルス高電界を生体や細胞に印加しその影響等を調べる研究が行われており、国際会議等で非常に興味深い研究結

果が報告されている。その中でも電源にパルスパワー発生装置を用いて極短時間に非常に高い波高値の強電界を印加した場合、生体や細胞の周囲媒質の熱上昇はほとんど無く、生体や細胞へ電界の影響を直接与え、さらに

は電気的影響を与える部位をそのパルス幅（周波数）で変化することが出来ると考えられており、それらに関してたくさんの研究報告が行われている。

電気と生物との関係を説明するため、図1に示す動物細胞の電気的等価モデルがよく利用される。これによると懸濁液中の細胞は抵抗、コンデンサ、イオンチャネル用起電力（直流電源）として置換される。生物細胞に数10 kV/cmに相当する電界を数マイクロ秒の期間（パルス幅と呼ぶ）印加すると、コンデンサとして考えられる細胞膜がパルス印加されている時間だけ充電される。このとき、細胞膜両端の電圧値がある閾値（1 V程度と考えられている）を超えると電気的に開放すること(electro-poration)ができ、それ以上の電界になると自然治癒が不可能なダメージを細胞膜に対して与えるとされている。また、印加するパルス幅を短縮していくことで、電界の影響する範囲が、細胞膜から細胞内部へ、さらに、細胞内の核やミトコンドリアへと移行していくと考えられている。



R_s : 懸濁液の抵抗,
 C_s : 懸濁液のキャパシタンス,
 C_m : 細胞膜のキャパシタンス,
 R_c : 細胞質の抵抗,
 V_1, V_2 : イオンチャネル駆動電源,
 g_1, g_2 : イオンチャネルのコンダクタンス

図1 懸濁液に置かれた生物細胞(左)とその等価回路(右)

(2) 本研究室では、パルスパワーが生体に及ぼす影響について、対象として一つの細胞ではなく、ヒトとの類似性も示唆されるメダカの卵を用いて、*in vivo* レベルで調査してきた。その結果、パルス電圧波形、周囲媒質、試験体の状態などによってその影響が変化することが分かってきた。その中で、実験条件として1.5 mmの電極間に配置された産卵直後の受精卵に、6 kVの矩形波状の高電圧パルスを、15 ナノ秒という極短時間だけ1回印加したときの結果によると、卵内の細胞を電気的に傷つけることなく、外殻のみに孔が開き、卵内部へ高効率に物質導入ができる可能性を示すものであった。

(3) ところで、ここ数年来、環境ホルモンなどが生物の発生初期に及ぼす影響が懸念されており、その影響評価の必要性が高まっている。この影響を調査するにあたり、哺乳類では細胞系を用いる以外には適当な手段がないが、その代替として魚類のような卵生生物の受精卵は極めて有望とされている。しかし、魚類の卵は一般的に堅い殻(卵膜)に包まれており、化学物質を取り込ませることが難しい。化学物質を卵内に注入するためにマイクロインジェクション法などが利用されてきているが、特別な装置や高度な技術が必要であり、その代替法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、産卵直後の受精卵という刺激に対して極めて感受性の高い卵細胞を電気的に傷つけることなく外部から化学物質を取り込ませることのできる条件を見出し、高効率化を図ることである。そのためには印加する電圧パルスの形状やその他の条件をパラメータとして、メダカ受精卵に対する影響を幅広く調査する必要がある。また、物質導入実験を高電圧実験室から生物実験室へと移せるように、小型のパルスパワー実験システムを設計製作する。これにより、実験室間の移動時間が不要となるため、卵の採取直後のパルスパワー印加やパルスパワー印加直後からの顕微鏡観測が可能になり、また、他の研究機関でも実験が可能となる。

(2) 本方法による受精卵への物質導入技術が確立できれば、医学、薬学、生物学など幅広い分野において応用できる可能性があると考えられる。例えば、この導入法の実現により、メダカ卵を発生モデル生物として、発生の各段階における種々の化学物質による影響を調べることが可能となり、その貢献度は高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) ブルームライン発生器によるナノ秒オーダーの極短高電圧パルスと、2種類の異なる極性の波形を出力できるRC放電回路による継続時間の長い低電圧パルスを、同一の負荷(リアクタ)に連続して印加できるパルスシステムを構築し、生物実験室に設置した。また、PIC(Peripheral Interface Controller)を用いたトリガ信号発生装置を用いて、各パルスの出力タイミング、低電圧パルスのパルス継続時間、および印加パルス数を任意にコントロールし、実験中のパルスパラメータとした。また、実験効率や電界集中の効果を調査するために数種類の反応容器を設計製作した。

(2) 図2にパルス印加実験の大まかな流れを示す。産卵直後のヒメダカの受精卵を物質導入実験の対象生物とした。ヒメダカの腹についている産卵直後の受精卵をとり、ヘラ等を用いて切り分け、1個ずつ観察用プレートの1穴にいれる。このとき、すべてが正常な受精卵であることを確認する。

(3) 周囲溶液として塩水 (30 mS/cm, 6 mS/cm) に導入物質 (シクロヘキシミド, アクチノマイシン D, 蛍光色素 PI やカルセイン AM など) を混合させたものを準備する。

(4) パルスシステムに接続されたリアクタの電極間を、マイクロピペットで適量 (90 μ L) の溶液 (塩水, 導入物質が混合された塩水) で満たした後、そこに、受精卵を1つ入れる。図3にリアクタの外観, 電極部, 電極間に設置されたメダカ受精卵を示す。

(5) 構築されたパルスシステムを用いて種々のパルスを印加した後、観察用プレートの元の場所に戻す。このとき、プレート内溶液は、パルス印可時と同じ溶液とし、約2時間浸す。その後、十分な量の RO (Reverse Osmosis) 水で洗浄する。以降、適当な間隔で各卵の成長の様子を観察し、電気パルスや導入物質の影響を調査する。

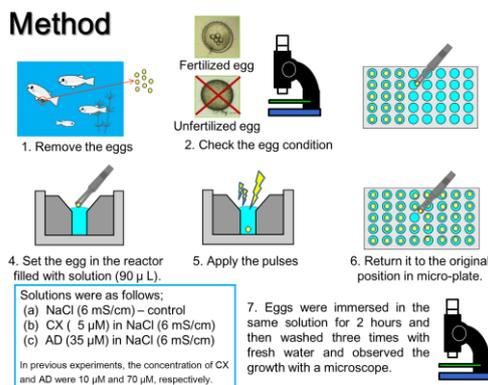


図2 導入実験の手順

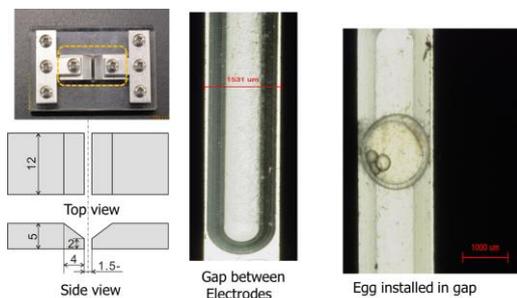


図3 リアクタ外観 (左上), 電極部の拡大 (左下, 中), 電極間に設置された受精卵 (右)

4. 研究成果

(1) 初めにシクロヘキシミドの導入実験を行った。シクロヘキシミドはタンパク質合成阻害剤と呼ばれ、これが受精卵内に導入された場合、その量に応じた成長遅れがメダカ卵に発生する。試験体の成長度をコントロール群と比較することで、物質の導入の有無を調査した。図4の(a)にシクロヘキシミド無し (-CX), (b)にシクロヘキシミド有り (+CX, 10 μ M) の周囲溶液を用いてパルス印加した卵の3日目の様子を示す。塩水の導電率は 30 mS/cm である。(a)のメダカ卵は胴部や眼球が形成されているが、(b)では胴部や眼球の成長に明らかな遅れがみられ、これよりシクロヘキシミドの導入がされていることが分かる。

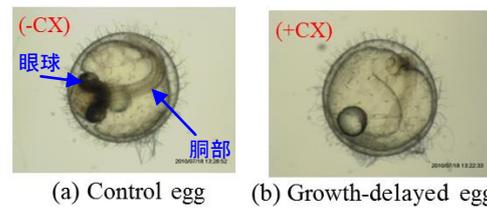


図4 パルス印加後3日目のメダカ卵

この実験では印加パルスとして1発の極短高電圧パルス (パルス幅 15ns, 100ns, 200ns) を用いた。図5に典型的な印加パルス (100 ns, 1 kV) を示す。

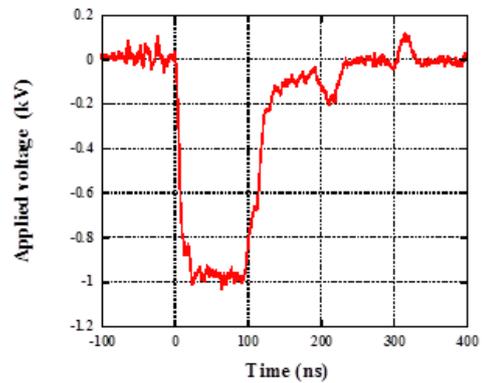


図5 極短高電圧パルス波形 (100 ns, 1 kV)

図6に極短高電圧パルスのパルス幅と充電電圧を変化させたときの、3日目で成長遅れが確認できた個体の試験体総数に対する割合を示す。このとき、縦軸はパルパワー発生装置に充電されたエネルギーとし、パルスごとに成長遅れ 80%以上 (●), 成長遅れ 80-50% (▲), 成長遅れ 50%未満 (■) をプロットしている。このとき、死亡したものは、成長遅れとしてはカウントされていない。

実験結果からすべてのパルスで印加電圧

が高くなると電気ダメージを受け死亡する卵が増加した。一方、電圧が低くなると電気の影響による死亡は確認されなかった。また、中間程度の電圧を印加すると、卵内部に対する電気的影響はほとんど確認されない一方で、シクロヘキシミドが導入されたことに起因する成長遅れが見られる試験体の割合が増加した。これより、印加する矩形波パルスのパルス幅と電圧の組み合わせにより、シクロヘキシミドの導入が確認される試験体の割合は変化し、導入割合が試験体総数の80%以上となる印加パルス条件が判明した。このときエネルギー効率の観点からみたとき、最適なパルス条件(100 ns, 1.2 kV)があることも分かった。

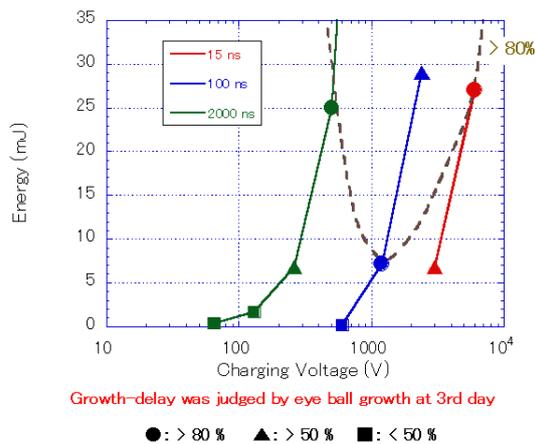


図6 パルス条件と成長遅れの関係

これらの結果から、ブルームライン線路型パルスパワー発生装置による単発の矩形波高電圧パルス(100 ns, 1.2 kV)をメダカ受精卵に印加することで、電氣的ダメージを抑えつつ化学物質(シクロヘキシミド)を導入し、8割以上の受精卵に成長遅れを発生させることができたことが分かった。

(2)しかし、実験を進めていくと“単発”の矩形波高電圧パルスだけでは、電気ダメージを受ける試験体を増やさずに、シクロヘキシミドの導入量を増加することや、分子量の大きい化学物質(アクチノマイシンD)の導入は困難であることが分かってきた。そこで、次に印加パルス数を増やす“2連続”パルスによる実験を行った。2連続パルスとは、高電圧パルスを2回連続して印加する、または、低い電圧で長い時定数の減衰波と高電圧短パルスを反応容器に続けて1発ずつ印加することである。トリガ信号発生器により、2つのパルス間隔(ΔT)や減衰波と高電圧パルスの出力順をコントロールすることが可能である。図7に2連続パルスの出力波形例を示す。この波形例では、0秒で高電圧パルス

(1.2 kV 充電 850 V 出力, 100 ns)が出力され、約7.5 μ s後に低電圧の減衰波(60 V, τ = 66 μ s)が続けて出力されている。

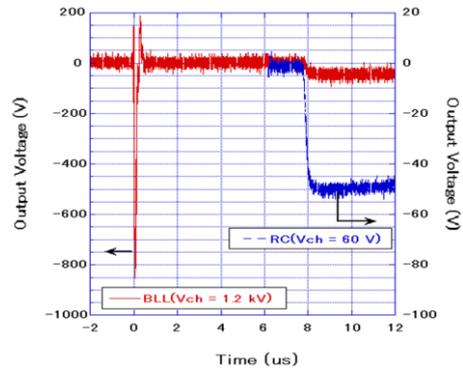


図7 2連続パルス

図8に印加パルスを変化したときのシクロヘキシミドの導入実験によるパルス印加直後、1, 4日目のメダカの成長の様子を示す。なお、2連続パルスの極性は同極性とした。

Pulse	CX	3 hours after pulsing	1st day	4th day	
-	+				正常に成長
Double Pulse 長→短	-				正常に成長
Single Pulse 短×1	+				成長遅れ
Double Pulse 短×2	+				成長遅れ
Double Pulse 長→短	+				著しい成長遅れ

CX: cycloheximide presence (+), absence (-)
 Pulse: 短: 100 ns(1.2kV), 長 τ =66 μ s(60V), パルス間隔 ΔT =100ms

図8 各パルスによる成長の様子

図中の“Pulse”はパルス条件、CXはシクロヘキシミドの有、無(+, -)を示している。図より、2連続パルス(Double Pulse 長→短)、CX無し(-)の成長は、パルス印加無し(Pulseが-)のコントロールと同様であり、電気エネルギーによる影響は特に増加していない。また、極短高電圧パルスを1回(短×1, 図5)、2回(短×2, 図9(a)), 2連続パルス(Double Pulse 長→短, 図9(c))を用い、CX有りの1日目の様子を見ると、いずれもメダカの体幹の形成が見られず、シクロヘキシミドによる遅れが確認できる。4日目を見ると、(短×1)、(短×2)の体や眼球の大きさはコントロールに比べ小さく成長遅れが確認できる。一方、(Double Pulse 長→短)を見ると、体の形成すら確認できず、(短×1)や(短×2)に

比べ、著しい成長遅れとなっていることが分かる。このように極短高電圧パルスに低電圧長パルスの組み合わせることで、物質導入の増量が可能であることが判明した。

(3) 2連続パルスの条件として、図9に示すように長短パルスの順番、図10に示すように長短パルスの極性、また、長短パルスの時間間隔などが考えられる。

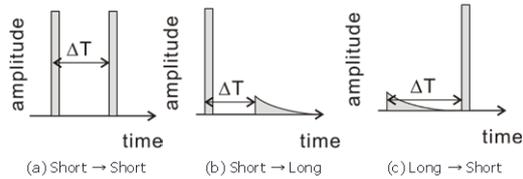


図9 2連続パルスの印加順

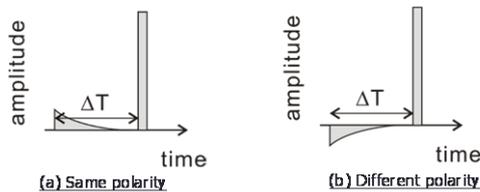


図10 2連続パルスの極性(短→長)

長短のパルスを同極性として、パルス順を短→長、長→短の2通り、また時間間隔 ΔT を1ms、100msの2通りとしたときの実験結果を図11に示す。これより、CXが“-”のときの生存率(Survival rate)が高い、すなわち電気の影響が小さく、一方で孵化率(Hatching rate)が低い、すなわちCX導入量が多いという結果が得られた“パルス順が長短(Long→Short)で、 ΔT が100ms”がパルス条件として良いことがわかる。

Pulse Condition	ΔT [ms]	CX	Survival rate [%]	Ratio of growth-delay egg [%]	Hatching rate [%]
Short x1		-	92	0	100
		+	100	92	0
Short x2	100	-	92	0	100
		+	100	100	25
Short ↓ Long	1	-	63	7	73
		+	75	100	6
	100	-	79	0	74
		+	64	100	10
Long ↓ Short	1	-	75	0	61
		+	83	100	20
	100	-	92	0	91
		+	83	100	8

図11 同極性2連続パルスによる結果

図12に、2パルスの極性を同極性と逆極性の2通りとし、電界強度を変化したときの実験結果を示す。このときのパルス順は長→短、間隔 ΔT を100msとした。結果より、シクロ

ヘキシミド有り(+)の孵化率は、電界が大きくなると減少し、18kV/cmでは、どちらの極性でも0%であった。一方、CX無し(-)の生存率は、逆極性では電界の大きさによらず70%以上であるのに対し、同極性では電界が大きくなるにつれて減少し18kV/cmのときには45%と電気ダメージが大きくなる傾向が見られた。これらの結果より、電気パルスの影響を抑え、物質導入量の増加をするためには、2連続パルスを“逆極性”とし、その印加順を“長→短”、間隔を“100ms”と設定することが最適であることが分かった。

極性	電界強度 [kV/cm]	シクロヘキシミド	個体数	生存率 [%]	成長遅延率 [%]	孵化率 [%]
同極性	9	-	20	75.0	0.0	93.3
		+	20	65.0	100.0	15.4
	12	-	29	58.6	0.0	76.5
		+	30	60.0	100.0	5.6
	18	-	29	44.8	7.7	76.9
		+	30	40.0	100.0	0.0
逆極性	9	-	20	75.0	0.0	93.3
		+	20	70.0	100.0	42.9
	12	-	28	71.4	0.0	90.0
		+	30	70.0	100.0	4.8
	18	-	29	72.4	0.0	95.2
		+	30	60.0	100.0	0.0

図12 異なる極性を持つ2連続パルス(長→短)による結果

(4) シングルパルスでは導入することができなかった分子量の大きいアクチノマイシンDも2連続パルスを用いることで70%以上の受精卵で発生遅れを確認ができた。

(5) 製作したパルスシステムは2連続パルスよりも複雑な組み合わせのパルス出力が可能である。本技術が新しい物質導入技術となり得るかについては、今後さらに多くの物質の導入について調査していく必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Nobuaki Tominaga, Susumu Kono, Akemi Yamaguchi, Hidenori Akiyama, Koji Arizono, A novel material incorporation technique for Medaka (*Oryzias latipes*) eggs using nanosecond pulsed electric fields, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 74 (6), 2010, 1279-1282
<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.90958>
- ② Susumu Kono, Akemi Yamaguchi, Takashi Tanabe, Nobuaki Tominaga, Hidenori Akiyama, A study of material incorporation for Medaka (*Oryzias latipes*) eggs by various voltage

pulses, Proceedings of the 18th IEEE International Pulsed Power Conference, 査読有, 2011, 1165-1170
DOI:10.1109/PPC.2011.6191575

- ③ Takahiro Kubo, Akemi Yamaguchi, Nobuaki Tominaga, Susumu Kono, Development of Pulsed Power Supply for Material Incorporation into Medaka (*Oryzias latipes*) Eggs, Proceedings of 2nd International Symposium on Technology for Sustainability (ISTS2012), 査読有, 2012, 297-300

[学会発表] (計 10 件)

- ① 田邊貴志, 山口明美, 富永伸明, 河野晋, パルスパワーを用いたメダカ卵への物質導入に関する基礎研究, 平成 22 年度 (第 63 回) 電気関係学会九州支部連合大会, p.206, 2010 年 9 月 25 日, 九州産業大学 (福岡)
- ② 富永伸明, 化学物質評価への応用を目指したパルスパワーによるメダカ受精卵への化学物質の新規導入法, バイオエレクトロクスシンポジウム 2011, 2011 年 3 月 10 日, 熊本大学 (熊本)
- ③ 河野 晋, 山口明美, 田邊貴志, 富永伸明, 異なる 2 種類のパルス電圧の連続印可によるメダカ受精卵への物質導入, 平成 23 年 電気学会全国大会, 2011 年 3 月 18 日, p.240, 大阪大学 (大阪) ※中止となったが, 発表は成立
- ④ 山口明美, 河野 晋, 田邊貴志, 富永伸明, 異なる高電界矩形波パルスによるメダカ受精卵への物質導入について, 平成 23 年 電気学会全国大会, p.239, 2011 年 3 月 18 日, 大阪大学 (大阪) ※中止となったが, 発表は成立
- ⑤ 河野 晋, 山口明美, 富永伸明, メダカ卵内への化学物質導入量の増加を目的とした 2 種類の電圧パルスの連続印加実験, 平成 23 年電気学会基礎・材料・共通部門大会, p.26, 2011 年 9 月 21 日, 東京工業大学 (東京都)
- ⑥ 山口明美, 今村泰隆, 河野晋, 富永伸明, 高電界パルスによるメダカ卵への物質導入; 分子量と導入効率についての検討, 第 64 回 電気関係学会九州支部連合大会, p.171, 2011 年 9 月 26 日, 佐賀大学 (佐賀)

- ⑦ 今村泰隆, 山口明美, 河野晋, 富永伸明, 極性の異なる 2 連続パルスによるメダカ卵への影響, 第 64 回 電気関係学会九州支部連合大会, p.170, 2011 年 9 月 26 日, 佐賀大学 (佐賀)

- ⑧ 久保貴博, 今村泰隆, 山口明美, 富永伸明, 河野晋, パルスパワーを用いたメダカ受精卵への物質導入システムの改善, 平成 23 年度 (第 2 回) 高専卒業研究発表会, pp.7-8, 2012 年 3 月 3 日, 久留米高専 (福岡)

- ⑨ 久保貴博, 山口明美, 今村泰隆, 富永伸明, 河野晋, パルスパワーを用いたメダカ受精卵への物質導入実験におけるパラメータの検討, 平成 23 年度 (第 2 回) 高専卒業研究発表会, pp.5-8, 2012 年 3 月 8 日, 熊本大学 (熊本)

- ⑩ Susumu Kono, Akemi Yamaguchi, Takahiro Kubo, Yasutaka Imamura, Nobuaki Tominaga, Improvement of Pulsed Power System for Incorporating Materials into Medaka (*Oryzias latipes*) Eggs, 9th International Bioelectrics Symposium (BIOELECTRICS 2012), P-1A-8, 2012 年 9 月 6 日, KKR Hotel Kumamoto (Kumamoto, Japan)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 物質導入方法およびその装置
発明者: 河野晋, 富永伸明, 山口明美
権利者: 独立行政法人国立高等専門学校機構
種類: 特許
番号: 2013-120148
出願年月日: 25 年 6 月 6 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 晋 (KONO SUSUMU)

研究者番号: 30270375

(2) 研究分担者

富永 伸明 (TOMINAGA NOBUAKI)

研究者番号: 30227631

(3) 連携研究者

山口 明美 (YAMAGUCHI AKEMI)

研究者番号: 90399262