

機関番号：81101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20360110

研究課題名（和文）極低温細胞操作システムの開発

研究課題名（英文）Development of a cryogenic temperature cell operating system

研究代表者

工藤 謙一（KUDOH KEN-ICHI）

地方独立行政法人青森県産業技術センター・弘前地域研究所・所長

研究者番号：90250232

研究成果の概要（和文）：本研究は、極低温の環境を利用して、卵細胞などの単一細胞を凍結状態で穿孔し、インジェクションを可能にする極低温細胞操作システムの開発を開発した。

実験には魚卵とマウス卵細胞を用いた。各々の細胞を凍結してドリルによる機械加工で穿孔を試みた。凍結することで、柔らかい卵細胞がかたくなり、ドリルやエンドミルでの加工が可能になる。各々50ミクロン、30ミクロンの穴を開けることに成功した。マウス卵では精子のインジェクションを試みた。しかしながら、受精は確認できなかった。

研究成果の概要（英文）：The equipment which makes a hole in the egg cell frozen using very low temperature environment was developed. And the equipment made injection of the sperm possible.

The equipment which makes a hole in the egg cell frozen using very low temperature environment was developed. And the equipment made injection of the sperm possible.

Roe and a mouse ovum were used in the experiment. Each cell, it froze and a hole is made by Machining by a drill. By freezing, a soft cell become hard and processing by the drill or an Endmill is attained. It succeed in making a hole (50 μ and 30 μ) each cell. Sperm injection was tried with the mouse egg. However, fertilization was not able to be checked.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・知能機械学・機械システム

キーワード：生命・生体工学，生体生命情報工学，知能機械，バイオ関連機器

1. 研究開始当初の背景

生命工学や生殖工学における単一細胞の操作は、機械式手動、油圧駆動、電動モータ

駆動のマикроマニピュレータを用いて行われているが、卵細胞には弾性があり、微細器具を細胞内へ挿入する際には、細胞は変形してスムーズ挿入できない。細胞を壊すことなく微細器具を挿入するには熟練を要していた。マウス卵への穿刺操作には、筆者が開発した圧電素子の急速変形を利用したピエゾマニピュレータが使用されるようになって、穿刺効率の向上が図られ、実験効率が向上してきている。しかし、特に核移植などに用いる比較的大きなピペットなどの挿入の際には、細胞の大きな変形を伴っており、細胞にダメージを与えているのが現状であった。

実験に供される細胞は凍結状態で保管されることが多い。凍結保管された細胞を実際に操作する場合は、凍結されている状態から→解凍→操作→凍結保管という工程で作業が行われる。一度常温に戻すので、温度変化による細胞へのダメージが懸念される。凍結状態で細胞操作できれば、温度変化、コンタミネーションなどの問題が解決されると考えられた。そこで、凍結状態での細胞操作技術を開発することで、壊れやすく運びにくい柔軟体である卵細胞を、凍らせて固形化した安定した状態において、機械加工出来るようになり、細胞の取り扱いが容易になると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、極低温の極限環境を利用して、卵細胞などの単一細胞を凍結状態で操作（顕微授精、核移植操作などにおいて、マイクロドリル等を用いて機械加工で細胞への穴開けを行う）や液体窒素中でのハンドリングなどを可能にする極低温細胞操作システムの開発を目的とした。具体的には、凍結した細胞へ $30\mu\sim 50\mu$ の微細な穴開け加工を行い、精子等のインジェクションが可能な装置を試作することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、極低温の極限環境を利用して、卵細胞などの単一細胞を凍結状態で操作（顕微授精、核移植操作などにおいて、マイクロドリル等を用いて機械加工で細胞への穴開けを行う）可能にする極低温細胞操作システムの開発を目的として、下記の項目に分けて装置などを試作して研究開発を行った。

(1) 凍結細胞への微細な穴開けに関する基礎研究

(2) 凍結細胞操作装置の開発（実際に細胞に穴を開ける装置）

(3) 凍結状態における細胞操作法（顕微授精、核移植操作）の開発

(4) 卵細胞より大きな生体へのマイクロピペット穿刺の試み

(1). 凍結細胞への微細な穴開けに関する基礎研究

①. 前段階として凍結卵細胞（魚卵）を用いて、 $\phi 100\sim 200\mu\text{m}$ のドリルを使用して低温環境下で穴開け実験を行う。使用する魚卵は鱧の卵で直径約 $600\mu\text{m}$ の未成熟卵を使用する。

②. 凍結卵の扱いに慣れたら、次の段階として、 $\phi 50\sim 100\mu\text{m}$ のドリルを用いる。使用する魚卵は直径約 $450\mu\text{m}$ のシロギスの卵を用いる。

このように段階的に小さいモノを扱うようにする訳は、凍結細胞の扱いや微細な加工器具（ドリル、エンドミル）の取り扱い習熟することが、良い結果をもたらす重要な要因であると考えからである。また、鱧やシロギスの卵は鮮魚店等で容易に入手可能である。

(2). 凍結細胞操作装置の開発（凍結試料の操作が可能なマイクロマニピュレータの開発）

倒立顕微鏡に電動マニピュレータを装備し、マニピュレータ先端には高速スピンドルを取り付け、マイクロドリルやマイクロエンドミルを用いて凍結細胞への穴開けを可能にする装置の試作をする。また、この試作機には、マイクロトームの刃を利用したマイクロスライサやマイクロエンドミルを用いて凍結した卵細胞の周りに存在する包埋剤、凍結培養液、試料表面の霜などをそぎ落とす装置を付加する。卵の凍結には -40 度の冷媒を試料設置部へ循環させ、凍結させた。また、低温時の駆動と省スペースの観点からマイクロスライサの駆動はエアシリンダーを用いたエア駆動方式を採用する。マイクロドリル、エンドミルの位置決めは分解能は 1μ を目標とした。試料観察部、試料穿孔部、試料面だしスライス部は、同一箇所ではなく、各作業領域があり、各個所へ試料固定部が移動して各作業を行う様にした。試料凍結には試料冷却ポジションを設定し、試料温度が上昇すると冷却ポジションまで移動して、試料を冷却し温度が下がったら、再び作業領域まで移動するシステムとした。

(3). 凍結状態における細胞操作法（顕微授精、核移植操作）の開発

①. マウスの凍結受精卵の作製

マウスの卵細胞、精子を使用して細胞操作実験を行う。

②. 卵細胞の核、極体等の位置検出、修正方

法

核移植操作に関しては核の位置が重要なファクターとなる。凍結前に顕微鏡で核の位置を確認修正後、微細器具（マイクロピペット等）で固定したままの状態凍結する手法を試みる。

(4). 卵細胞より大きな生体へのマイクロピペット穿刺の試み

卵細胞より大きな生体へのマイクロピペットの穿刺の試みとして、魚の稚魚（1.5mm～2mm）への穿刺を試みた。哺乳動物卵細胞用のピエゾマニピュレータでは稚魚への穿刺は不可能であるとの知見を得た。

4. 研究成果

(1). 凍結細胞への微細な穴開けに関する基礎研究

①. 前段階として凍結卵細胞（魚卵）を供試試料とし、 $\phi 200\mu\text{m}$ のドリルを使用して低温環境下で穴開け実験を行った。使用した魚卵は、鱧の卵で直径約 $600\mu\text{m}$ の未成熟卵を用いて穴開け加工を行った。穴開けに成功した。大きなドリルなので比較的容易に作業が進んだ。

②. 数度の①の凍結細胞加工実験後、次の段階として、直径約 $450\mu\text{m}$ のシロギスの卵を試料として、 $\phi 50\mu\text{m}$ のドリルを用いて穴開け加工を行った。穴開けに成功した。ドリル径が細いのでドリルが折れることがあり、ドリリングにはスピードの制御が必要であった。

③. 本研究の学術アドバイザーである日本大学生物資源科学部応用生物科学科動物細胞学研究室において、マウス卵細胞、マウス精子を用いて、凍結、解凍の条件探索を行った。凍結卵（実験時は解凍）と常温精子、常温卵と凍結精子（実験時は解凍）を用いて顕微授精操作を行った。実験は日本大学生物資源科学部応用生物科学科動物細胞学研究室の博士課程の学生が作業を行った。使用した機材は、オリンパス倒立顕微鏡、ナリングマニピュレータ、プリマピエゾマニピュレータを用いて行った。各々の組み合わせで受精を確認出来たが発生は確認できなかった。

(2). 凍結細胞操作装置の製作

極低温状態における細胞や生体組織に対して、操作、加工、観察などを行い、冷却機能、試料スライス機構、精密位置決め機構、及び今後予定される作業に対応可能な拡張スペースを有する「凍結細胞操作装置」を製作した。

本装置は、倒立顕微鏡に電動マニピュレータを装備し、マニピュレータ先端には高速ス

ピンドルを取り付け、マイクロドリルやマイクロエンドミルを用いて微細な生体への穴開けを可能にした。この試作機には、ミクロトームの刃を利用したマイクロスライサやマイクロエンドミルを用いて凍結した卵細胞の周りに存在する包埋剤、凍結培養液、試料表面の霜などをそぎ落とす装置を付加した。凍結部には -40 度の冷媒を試料設置部へ循環させて凍結させた。スライス部は、低温時の駆動と省スペースの観点からマイクロスライサの駆動はエアシリンダーを用いたエア駆動方式を製作した。マイクロドリル、エンドミルの位置決めは駿河精機株式会社製の分解能 1μ の精密ステージを用いた。試料観察部、試料穿孔部、試料面だしスライス部は、同一箇所ではなく、各作業領域を設け、各個所へ試料固定部が移動して各作業を行うようにした。試料凍結には試料冷却ポジションを設定し、試料温度が上昇すると冷却ポジションまで移動して、試料を冷却し温度が下がったら、再び作業領域まで移動するシステムとした。ホームポジションは冷却作業位置とした。

(3). 凍結状態における細胞操作法（顕微授精、核移植操作）の開発

凍結細胞操作装置（凍結試料の操作が可能なマイクロマニピュレータでスライス画像の取得も可能な装置）を用いて、下記の実験を行った。

①. 生体試料を凍結細胞操作装置上で凍結した後、試料をスライスしてその断面画像を取得して、PC上で3D画像を構築した。

②. マウス卵細胞を凍結細胞操作装置上で凍結した後、マイクロドリル等を用いて、微細な穴開け加工を試みた。また、魚卵等にもマイクロドリルによる穴開けに成功した。直径約 80μ のマウス卵細胞を凍結状態でドリル加工して精子をインジェクションして卵子内に精子の存在を確認できたが発生は確認できなかった。なお、大震災で実験装置が破損して修復に時間がかかり当初予定した受精→発生への確認追実験が行えなかった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計3件）

1. 工藤 謙一、井上 智暁、樋口 俊郎：凍結状態の卵細胞を対象とする細胞操作法の開発、日本冷凍空調学会、Vol. 26, No. 4, 451-458, 2009.

2. Gaku SHIMOI, Yuichi KAMEYAMA,

Ken-ichi KUDOH, Ryoichi HASHIZUME, Masao ITOH : Sister chromatid exchange frequency in early embryos and offspring derived From IVF or ICSI in mice, Journal of Mammalian Ove Research, Vol.27, No.3, 114-121, 2010.

3. 下井 岳, 工藤 謙一, 亀山 祐一, 橋詰 良一, 伊藤 雅夫: 過重力負荷培養を伴ったマウス体外受精における透明帯穿孔法の導入ー低濃度精子における受精率向上の試みー, 日本哺乳動物卵子学会誌 28(2), 372-377, 2011

〔学会発表〕(計8件)

1. 下井 岳, 亀山 祐一, 橋詰 良一, 工藤 謙一, 伊藤 雅夫: 遠心重力負荷を応用した低精子濃度でのマウス体外受精の試み, 第49回日本哺乳動物卵子学会, Journal of Mammalian Ova Research 25, 2, s46, 2008 (東京都)

2. 工藤 謙一, 鈴木 宏俊, 樋口 俊郎: 凍結生体試料への微細穴開け装置の開発, 日本食品科学工学会第55回大会講演集, p129, 2008 (京都市).

3. 工藤 謙一, 鈴木 宏俊, 樋口 俊郎: 低温環境における生体・食品への微細加工技術の開発, 第29回日本熱物性シンポジウム講演論文集, 19-21, 2008 (東京都).

4. 工藤 謙一, 鈴木 宏俊, 樋口 俊郎: 低温環境を利用した生体・食品への新加工技術の開発, 2008年度日本冷凍空調学会年次大会講演論文集, 665-668, 2008 (大阪市).

5. 工藤 謙一, 伊藤 寿美夫, 濱崎 将臣, 門村 和志, 宮木 廉夫: 稚魚を対象とした穿刺システムの開発, 第21回「電磁力関連のダイナミクス」シンポジウム論文集, 441-444, 2009 (長野).

6. イ ウォンセ, 鈴木 宏俊, 工藤 謙一, 樋口 俊郎: 微小円管を利用した凍結人工受精チップの開発, 第19回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 15, 2009(東広島市).

7. 星野 瑠威, 工藤 謙一, 荒木 徹也, 相良 泰行: 極低温マイクロスライサイメーキングシステムの改善, 日本食品工学会第10回(2009年)年次大会講演要旨集, 42, 2009 (野々市町, 石川県)

8. Gaku Shimoi, Masato Hayashi, Yuichi

Kameyama, Ryoichi Hashizume, Ken-ichi Kudoh and Masao Ito : Early development of in vitro aged eggs after intracytoplasmic sperm injection, 16th World Congress on In Vitro Fertilization, 2011, Tokyo

6. 研究組織

(1)研究代表者

工藤 謙一 (クドウ ケンイチ)

研究者番号: 90250232