

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656144

研究課題名（和文） 電気穿針による魚卵内への耐凍結・乾燥保護物質の導入法の開発

研究課題名（英文） Development of electroinjection method for loading single fish egg with cryo- and lyoprotective agents

研究代表者

白樫 了 (SHIRAKASHI RYO)

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号：80292754

研究成果の概要（和文）：魚卵は孵化能力を維持した凍結や乾燥保存ができないが、その大きな要因として魚卵内に生体保護物質を大量に高効率で導入することができないことにある。本研究では、可動部のいらぬ手法で中空針を魚卵に電氣的に穿刺して物質を注入する装置を開発し、電氣的操作パラメータの最適化に必要な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Cryo- or lyopreservation of fish egg for seedling production has not been succeeded yet mainly because the method of loading eggs with mass cryo/lyoprotective agents still not exist so far. In this study, a high performance motionless device for needling a fish egg that utilizes the electro manipulation has been developed. In addition, the basic electro manipulation parameters for optimizing the needling have been achieved experimentally.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生体熱工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：魚卵，誘電特性，物質輸送

1. 研究開始当初の背景

魚卵の保存は、これまでに主として国内外の水産学や生物学者らが試みているが、魚卵を耐凍結・乾燥保護物質に浸漬して僅かな水分や物質透過性を利用して脱水と物質導入を期待する手法が主流であったため、いずれの報告も保存後の孵化率が極めて低かった。ところが、近年になり、卵膜を除去して魚卵内部の成魚の母体となる胚(割球)だけを取り出し、耐凍結保護物質に浸漬した後に凍結保存をしたところ、通常の動物細胞並の高い孵化率になることや⁽¹⁾、魚卵にガラス製のマイクロキャピラリーを刺し込み糖類等の保護物質を導入したところ、生化学毒性の影響もなく高い孵化率が得た等の報告⁽²⁾がなされはじめた。前者の結果は、胚自身は耐凍結・乾燥保護物質が存在すれば保存が可能であ

ることを、後者の結果は、適切な保護物質であれば卵膜内部においても生毒性なく機能する可能性を示唆している。これらの研究動向より、保護物質を卵膜内に効率よく導入する手法が開発されれば、実用で要求される大量の魚卵の保存処理の実現が期待できる。一方、申請者らは、これまでに電場を用いた非膜透過性の物質を直径 10 μm 程度の動物細胞内に導入する装置や手法の開発を通じて、電場を用いた細胞や細胞膜の操作技術・理論を蓄積してきている。その蓄積を踏まえると、魚卵の場合は直径が 1mm 程度もあり細胞の操作が極めて容易であることや、電場操作により比較的制御性のよい膜の破壊が期待できることから、魚卵を対象とした物質導入手法の開発を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、1mm程度のサイズの魚卵に、直径数10～数100 μm 中空針を穿刺して、一般的に用いられているグリセロール、エチレングリコール等の凍害保護物質を注入する手法とデバイスを開発することを目指す。

この目標は、具体的には1)複数の卵細胞を、微小流路(ミリ単位)を通じて安定に配列させる構造の開発、2)構造や電気特性に空間的偏り(極性)のある卵細胞について、特に電気的極性を利用した配向や穿針技術の開発と現象の理論解析、の二つに分けられる。さらに、時間的余裕が得られた場合は、保護物質を導入した卵細胞の凍結保存後の孵化率を測定し、デバイスの機能評価も視野に入れる。

3. 研究の方法

1)デバイスの作製・評価

提案する電気穿針用のデバイスは、外径70 μm 内径50 μm のニッケル中空針の先端を約40度に尖化した物質注入用の穿刺針とこれに垂直に配置した平板ステンレス板からなる電極が挿入されている(図1)。中空針の穿刺は、両者の間に直径1.2mmの魚卵(メダカ受精卵:ステージ20まで)を両電極、または針電極のみに接触させて配置し、電極間にパルス電位を印加することでおきる。この装置で穿刺に必要なパルス電圧と長さを種々の導電率や浸透圧の支持液について測定した。穿刺の有無は、デバイスに装填した魚卵を光学顕微鏡観察することで判断した。

2)魚卵の誘電特性の誘電回転スペクトルによる測定

穿刺に要するパルスや支持液の条件を予測できるようにするために電場解析をおこなったが、それに先立ち、魚卵の絨毛膜、囲卵腔、卵黄膜、卵黄の各部位の電気特性を、誘電回転スペクトルに基づく解析で算出した。誘電回転スペクトルは、ガラス上のパターンニングした2対の直交する電極の中心に魚卵を配置して測定する(図2)。即ち、同電極群により種々の回転周波数の回転電場を魚卵に印加して、その回転方向と速度を測定して、数10Hzから20MHzの間のスペクトルを測定した。測定は、分化ステージの異なる魚卵についておこなった。

3)電気穿針の非定常電場解析

穿刺の機序と穿刺条件の予測を目的として、2)で測定した電気特性を用いて、電気パルスを魚卵に印加した際の魚卵内の電場に加えて、針近傍局所の膜電位、ジュール損失、クーロン力等を計算し、1)の実験結果と比較した。

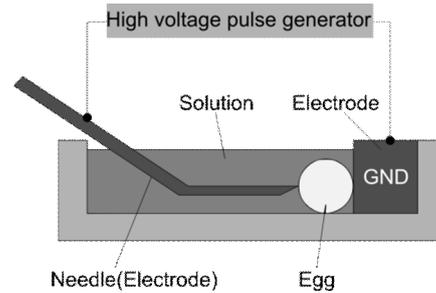


図1 電気穿針装置概略図

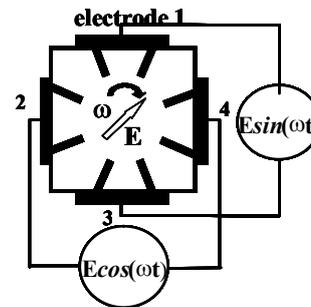


図2 誘電回転スペクトル測定装置概略

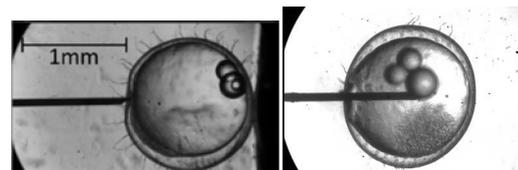


図3 電気穿針前(左)、穿針後(右)

4. 研究成果

1)電気穿針現象の観察

図3にパルス印加前後の魚卵の顕微鏡写真を示す。電気パルスの印加により絨毛膜から卵黄膜まで瞬時に穿刺されていることがわかる。穿刺は印加電圧が高く、パルス長さが短いほど、図3の様に魚卵が中空針の方向に移動して深く刺さった。尚、研究目的1)に掲げた魚卵の安定配置、1つの魚卵について安定配置と回収が可能である流路構造を作製し、魚卵を配置、一定の深さで穿刺、回収するまでの一連の操作を流れ方向の切り替えのみでできることを確認した。また、この構造は、容易に複数魚卵に適用可能と考えられる(特許出願前につき図は割愛)。

2)穿刺条件

電気パルスの印加時間と印加電圧を変化させて得られた卵膜穿孔に必要な最低電圧値の結果を図4に示す。図4より、いずれの支持液でも電圧印加時間が長くなるに従い、穿孔に必要な電圧値は単調減少して200V付近に漸近していることがわかる。また、導電率が高いほど同一パルス長に対して必要電圧値が低くなった。パルス長が長くなると電

極付近から電気分解による泡が発生するようになり、イオン交換水では 50msec 以上、PBS では 10msec 以上の印加時間でその様子が見られた。

各浸透圧条件下での魚卵の変形の有無および穿孔の可否を測定した結果を表 1 に示す。130mOsmol/kg 付近を境に変形の有無と穿孔の可否の両方が逆転し、200mOsmol/kg では魚卵は支持液に浸漬すると直ちに变形した。200mOsmol/kg より小さな浸透圧では、浸漬直後の变形はないものの、電圧印加と同時に針付近を中心に变形が生じた。变形が生じた場合はいずれも針と卵膜の接触がなくなり、穿孔されなかった。

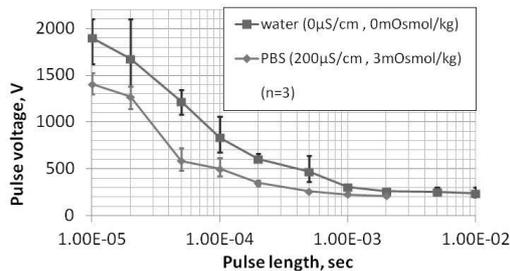


図 4 穿刺パルス電圧-時間

mOsmol/kg	Deformation	Perforation
200		x
150		x
133		x
129	x	
120	x	
100	x	
50	x	

表 1 電気穿刺における魚卵変形条件

3) 魚卵の電気特性

種々の導電率の支持液中において初(中)と後期の分化段階の魚卵の回転スペクトルを図 5a), b)にそれぞれ示した。また、初(中)期のスペクトルより算出した誘電特性を用いて、各電気物性を変化させてピーク周波数に与える影響を計算したスペクトルを図 6a)~d)に示した。

まず、初期と中期のスペクトルは同一であったことから、この間は大きな電気物性や構造変化がないことがわかる。スペクトルのピーク周波数は、導電率と誘電率の比で求められる緩和周波数により決まるので、各部位の導電率や誘電率に敏感なピーク周波数を行うことで、魚卵の電気物性と構造の対応をつけることができる。初中期では、導電率を変化させると最も低周波数(f_{c1})の負のピークの高さが導電率に依存していることと、同ピークの大きさのみが卵黄膜の膜静電容量の変化に依存していること(図 6b))から、このピークは主として卵黄膜と周囲の導電率を反映していることがわかる。ついでピーク周波数 f_{c2} は、図 6d)によれば囲卵腔の誘電率 ϵ_2 に強

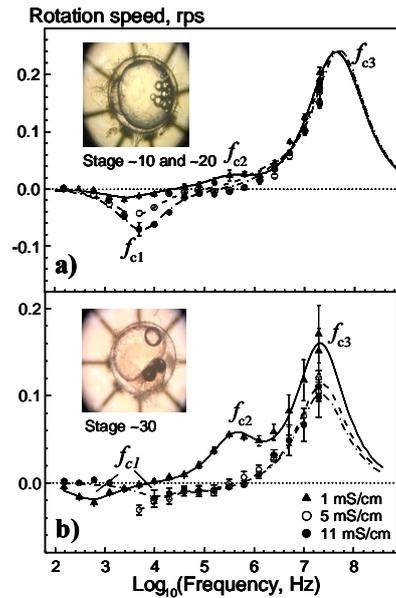


図 5 魚卵の回転スペクトル

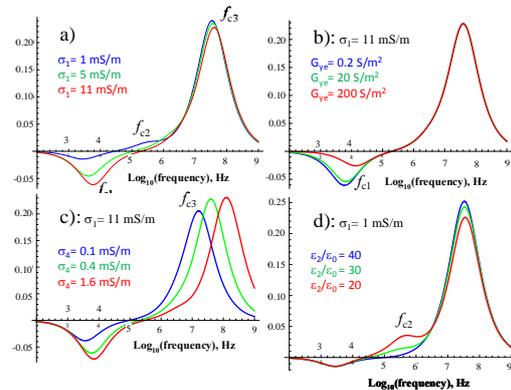


図 6 魚卵電気特性と回転スペクトル

く依存することがわかる。尚、囲卵腔の導電率は計測によれば周囲の導電率に比例して変化していることから、絨毛膜はイオンを透過すると推測できる。 f_{c2} におけるピーク高さは初中期と後期の間で、大きく変化するが、これは後期に胚細胞の分化が進み囲卵腔の有効誘電率が低下した為と思われる。最後に一番高い周波数(f_{c3})のピーク高さは卵黄の導電率に最も依存していることから(図 6c)), このピークは主として卵黄の分極緩和が原因と推測できる。図 5b)では、 f_{c3} のピークの高さは周囲の導電率が高くなると低くなり、 f_{c1} が高周波側に移動しているが、これは図 6a)と同様の変化の傾向である。また、初中期と後期で f_{c3} の値(周波数)が大きく変化していないことから、この間の卵黄の導電率は変化していないことがわかる。

4) 電気穿刺針の非定常電場解析

支持液の導電率が $1\mu\text{S}/\text{cm} \sim 1730\mu\text{S}/\text{cm}$ の場合について計算をおこなった。一定のパルス

印加時間では、 $400\mu\text{S}/\text{cm}$ あたりまでは、導電率を上げるほど穿刺に必要な電圧が低下するが、それ以上の導電率では穿刺条件に殆ど変化が見られていない。また、導電率一定の場合、パルス印加時間が長いほど、穿刺に必要な電圧は低かった。

図7に電場印加直後と一定時間後の電位分布を示した。電場印加直後の卵黄膜内の電位勾配は一定であるが、時間が経過すると、細胞内のイオンが分極することで、印加電場と逆方向の電場が生成するので電位勾配が殆どなくなる。この緩和に要する時間は、 ϵ/σ で見積もることができる。メダカ魚卵の場合、この緩和は卵黄膜内が最も早く、ついで卵膜、卵黄膜の順に遅くなっていく。

図8に種々の導電率の支持液に対する穿刺針近傍の卵膜の膜電位の時間変化を示した。導電率が高い方が、短時間で飽和膜電位に達するが、飽和膜電位は導電率が低い方が高い。但し、その差は電位比で1.1程度でしかない。

図9に種々の導電率の支持液に対する穿刺針近傍の卵膜の体積力の時間変化を示した。体積力は、いずれの場合もパルス印加後 $1\mu\text{sec}$ 以内にピークをもち、その後は殆ど作用していない、また、ピークの高さは支持液の導電率が $1\mu\text{S}/\text{cm}$ の場合を除いてほぼ等しいものの、全般的にピークを過ぎた後の計算値が不安定になった。

図10に種々の導電率の支持液に対する穿刺針近傍の卵膜のジュール損失の時間変化を示した。いずれの導電率においてもジュール損失による発熱密度は 10nsec で飽和するが、飽和発熱密度は導電率に比例した値となった。

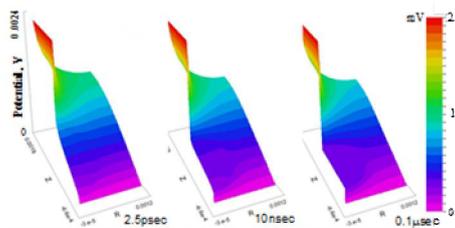


図7 電位分布の変化($1\mu\text{S}/\text{cm}$, 有効電界強度 $1\text{V}/\text{m}$)

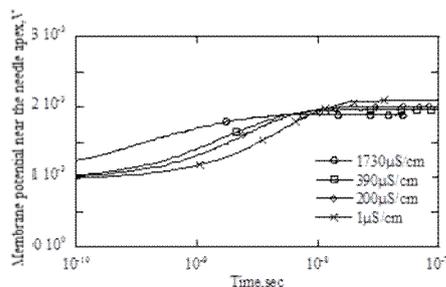


図8 針近傍局所絨毛膜電位

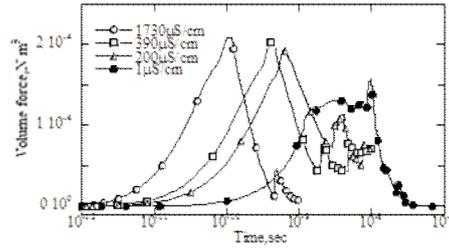


図9 針近傍卵膜内局所クーロン力

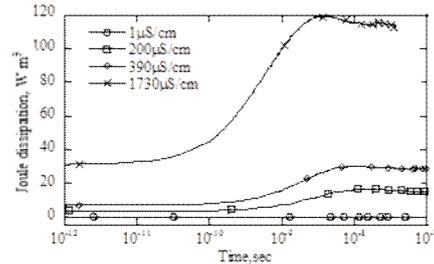


図10 針近傍絨毛膜内ジュール損失

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 白樫 了, Vladimir Sukhorukov, 魚卵の誘電特性の測定, 第25回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, No.12-48 (2013) pp.179-180. 査読無
- ② Ryo Shirakashi, Miriam Mischke, Peter Fischer, Simon Memmel, Georg Krohne, Günter R. Fuhr, Heiko Zimmermann, Vladimir L. Sukhorukov, Changes in the dielectric properties of medaka fish embryos during development, studied by electrorotation, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.428 (2012) pp.127-131. 査読有
- ③ 白樫 了, 安井龍生, 魚卵内への高効率物質輸送法, 熱工学コンファレンス講演論文集, No.12-62 (2012) pp.365-366. 査読無

[学会発表] (計4件)

- ① 白樫 了, Vladimir Sukhorukov, 魚卵の誘電特性の測定, 日本機械学会 第25回バイオエンジニアリング講演会, 2013.1.9, 産業技術総合技術研究所つくばセンター
- ② 白樫 了, 安井龍生, 魚卵内への高効率物質輸送法, 日本機械学会 熱工学コンファレンス, 2012.11.18, 熊本大学

- ③ V.L. Sukhorukov, R. Shirakashi, Changes in the dielectric properties of medaka fish embryos during development studied by electrorotation, Broadband Dielectric Spectroscopy and its Applications (BDS2012), 2012.9.3 ライプチヒ大学
ドイツ
- ④ R. Shirakashi, V.L. Sukhorukov, Dielectric spectroscopy of medaka fish embryos using Electrorotation, Broadband Dielectric Spectroscopy and its Applications (BDS2012), 2012.9.3 ライプチヒ大学
ドイツ

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：穿針装置および穿針方法

発明者：白樫 了，安井龍生

権利者：東京大学

種類：特許

番号：特願 2013-071274

出願年月日：2013.03.29

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白樫 了 (SHIRAKASHI RYO)

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号：80292754