Copyright © 2014 JSPE

稚魚を対象としたマイクロインジェクションシステムの開発

○工藤　謙一*　高橋　真吾*　伊藤　寿美夫**

（地独）青森県産業技術センター*，株式会社クラフトワークス**

Development of Injection Systems Applied to Fish Juveniles.

Ken-ichi Kudoh *,　Singo Takahashi*,　Sumio Ito **

Aomori Prefectual Industrial Technology Research Center *,　Craft Works Co., Ltd**.

Experiments of breed improvement injecting DNA or sperm cells are performed on fish juveniles, similarly to be done on farm or laboratory animals.　There are some difficulties inserting pipettes onto fish skin, because some fish species have hard integument.　Some injection systems utilizing impact and hammering technique are developed and experimented.

1.　緒　言

近年，水産業界において，雌雄産み分け技術を利用した雌雄どちらかだけを生産するデザイン養殖や，親魚の飼育が困難な大型魚に対して，近縁種の小型の魚のお腹を借りて増やす技術（借り腹養殖技術）を用いて，発生時から畜養する完全畜養技術が着目されている．この借り腹養殖技術に用いられる装置は，哺乳動物の品種改良や不妊症治療に使われる装置と同様の物が使用されている．一般に細胞操作に使用される装置は，観察用の倒立顕微鏡又は実体顕微鏡，油圧又は機械駆動のマイクロマニピュレータ，インジェクション用の微細針（ガラス管），液圧操作のインジェクタなどが操作に用いられている．哺乳動物卵細胞におけるマイクロインジェクションにおいては，筆者らは，モータ駆動の自動化マニピュレータや圧電素子の急速変形を利用したピエゾマイクロマニピュレータを開発し，実験効率の向上に寄与してきた[(1),(2)]．

今回，稚魚への始原生殖細胞インジェクション実験用に圧電素子の急速変形を利用したピエゾマイクロマニピュレータ，圧電素子を用いた打撃型インジェクタ，空圧打撃型インジェクタを試作して穿刺実験を試みたので報告する．

2.　ピエゾマイクロマニピュレータ

Fig.1 に，圧電インパクト駆動機構を用いた細胞穿孔装置の微動部を示す．微動部分である直径 4mm のピペットホルダ（ステンレス製）に，圧電素子 2 個と 8g の慣性体 2 個を接着したプレート（アルミ製）を固定して，静止摩擦発生機構であるガイド部（真鍮製）に取り付けた．ピペットホルダにはマイクロピペット（ガラス製）を取り付けた．使用した圧電素子は，積層型素子（5mm×5mm×10mm：NEC トーキン製）で，最大印加電圧 150V において約 8μm の変位を生じる．圧電インパクト駆動機構を利用したピエゾマイクロマニピュレータは，哺乳動物卵細胞を用いた実験では細胞の変形が無くスムースにピペットを細胞質内へ挿入可能である．一般に液圧駆動マイクロマニピュレータでは，細胞質へピペットを挿入する際に，細胞が大きく変形してピペットがなかなか細胞質内へ挿入出来ない．

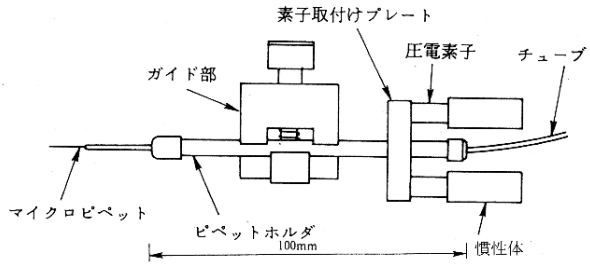

Fig.1　Micromotion part of cell injection device with Piezo-impact driving mechanism.

〈2･1〉実験結果

ピエゾマイクロマニピュレータは，哺乳動物卵細胞への穿刺実験では良好な結果を示したが，今回行った日齢８～９日のトラフグ稚魚では，卵細胞に比べると外皮が非常に硬いのでマイクロピペットによる穿刺は不可能であった．

3.　打撃型インジェクタ

ピエゾマイクロマニピュレータでは，穿刺不可能であった為，さらに大きな力が得られる装置（打撃型インジェクタ）を試作した．

本装置は，マイクロマニピュレータアームにバネヒンジ機構を介してピペットホルダが固定され，ピペットホルダに取り付けられたインジェクションピペットに，芯打ちアクチュエータにより後方から打撃力を与える構造になっている．ピペットにぶれることなく振動を伝える為に，A7075 材（超超ジュラルミン）を用いて精密放電ワイヤー加工により平行バネヒンジ機構を製作し，ピペットホルダを支持する構造としている．Fig.2 に打撃型インジェクタ

Copyright © 2014 JSPE

を示す．実験に日齢９のトラフグの稚魚を使用した．

Fig.2　Hammering injector.

実験は，手動マニピュレータによる実験及び電動マニピュレータ＋打撃型インジェクタを使用しての実験行った．手動マニピュレータ及び電動マニピュレータ＋打撃型インジェクタタイプとも作業時間を１時間として，移植作業数，移植成功率，針刺し不可などの項目を比較検討した．

９日齢の試料を用いた実験では，処理数 30 尾に対して移植成功は０尾，針刺し不可が 30 尾であった．

９日齢の稚魚へは手動マニピュレータでは移植不可能であった．電動マニピュレータ＋打撃型インジェクタタイプを用いた実験では，24 尾の処理数に対して，移植成功 18 尾であり成功率は 75%であった．９日齢以降の成長した稚魚では，手動マニピュレータ，電動マニピュレータ＋打撃型インジェクタタイプの両方ともインジェクションは出来なかった．

表１　実験結果（９日齢）

Table 1.　Result (9 days).

装置	時間 (min)	処理数	成功	不可	成功率
電動＋打撃ｲﾝｼﾞｪｸﾀ	60	24	15	9	63
手動	60	30	0	30	0

4.　空圧打撃型インジェクタ

ピエゾマイクロマニリュレータ，打撃型インジェクタでは穿刺不可能な日齢の稚魚に対応するため，エアシリンダーに打撃用ピストンを追加した，空圧打撃型インジェクタを試作した．本装置は，ピペットホルダをエアシリンダーのロッドとして利用することで，大きなストロークと推力を得ると同時に，小型化,軽量化を可能とした．また空気圧を調整することにより，簡単に推力の調整が可能である．ピペットホルダにカラーを固定してシリンダー内部に配置，カラーをピストンで押すことで推力とストロークを発生させている．ピストンをシリンダー内部で自由に可動する形にすることで，エアがシリンダー内に流入する時にカラーに衝突して打撃力を発生させる構造とした．Fig.3 に試作した空圧打撃型インジェクタの外観を示す．空圧打撃型インジェクタ性能評価のため，ピペットホルダ先端の変位を計測した．ピペットホルダ先端に測定ターゲットを取り付け，レーザー変位計（キーエンス IA-100）により変位カーブを測定した.測定結果を Fig.4 に示す．横軸は時間，縦軸は変位を電圧で表しているが，1V=1mm と設定している．また，流入させる空気圧は 0.8MPa に設定した．

その結果，約 2.5 ミリ秒で 2mm 変位
することが確認した．またその際の推力をデジタルフォースゲージ（イマダ ZP-50N）で測定し，約 30N であった．

Fig.3　Air-Hammering injector.

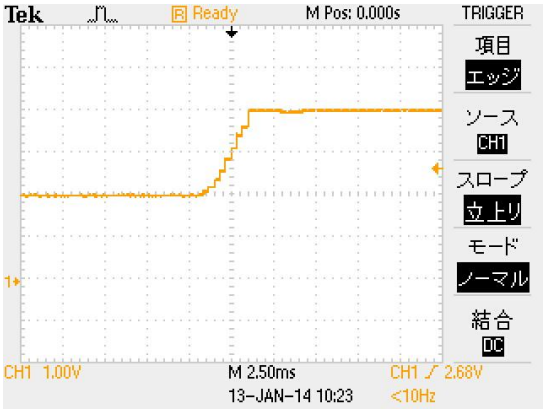

Fig.4　Ouput curve from air-hammering injector.

5.　結　言

水産業界で着目されている借り腹技術を支援する為に，始原生殖細胞移植を目的とした装置の開発を試みた．

哺乳動物卵細胞を用いた細胞操作では実績のある，ピエゾマニピュレータを用いて実験を行ったが，稚魚の外皮が予想以上に硬かった為，穿刺は不可能であった．

次に試作した平行バネヒンジ機構と芯打ちアクチュエータから構成する打撃型インジェクタタイプを用いた実験では，９日齢にトラフグの稚魚を用いた実験では，手動マニピュレータを用いた実験よりも，高い成功率を得ることが出来た．電動マニピュレータを用いた実験の処理数が，手動マニピュレータを用いた実験の処理数よりも少ないのは，オペレータが電動型マニピュレータの作業に習熟していないものであり，電動マニピュレータのオペレーションに慣れれば，その処理数が逆転するものと思われる．

謝辞

本研究の一部は，科学研究費補助金（基盤研究（B）：稚魚を対象とした高精度マイクロインジェクションシステムの開発）を用いて行った．ここに記して謝意を表す．

参考文献

（１）工藤，後藤，佐藤，山形，古谷，樋口：「圧電素子を利用したマイクロマニピュレータの開発」，哺乳動物卵子学会誌，Vol．７，No．１号，p７-12，（1990）

（２）樋口俊郎，渡辺正浩，工藤謙一：「圧電素子の急速変形を利用した超精密位置決め機構」，精密工学会誌，第 54 巻，第 11 号，pp. 2107-2112（1988）