

沿面放電処理による魚卵への分子導入の放電電流依存性

Dependence of molecular introduction into fish eggs on the current by surface discharge

愛媛大理工¹, パール工業², アイジーン³, 南予水産研究センター⁴

○(M2) 和田 啓太郎¹, 池田 善久¹, 木戸 祐吾^{1,2}, 佐藤 晋^{1,3}, 斎藤 大樹⁴, 神野 雅文^{1,3}, Ehime Univ.¹, Pearl Kogyo Co. Ltd.², i-Gene Corp.³, South Ehime Fisheries Research Center.⁴

°Keitaro Wada¹, Yoshihisa Ikeda¹, Yugo Kido^{1,2}, Susumu Satoh^{1,3}, Taiju Saito⁴, Masafumi Jinno^{1,3}

E-mail: mjin@mayu.ee.ehime-u.ac.jp

1. 序論 筆者らは、沿面放電処理を行うことで、海水魚であるスマの魚卵に対し分子導入出来ることを見出した。沿面放電処理は大量一括導入処理が可能であり、従来法のマイクロインジェクション法に換わる新たな導入技術として期待される。一方でまだ他の魚種への適用可否が検討出来ていなかった。本研究ではモデル生物として多く利用されるメダカの魚卵への分子導入を試みた。

2. 実験方法 導入実験に用いたメダカはOK-Cab(NBRP Medaka; MT830)とした。また比較として導入実績のあるスマを用いた。沿面放電には半波整流した周波数20 kHzの正弦波電圧を用いた。図1に実験装置の概略図を示す。10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の蛍光分子(Sigma Aldrich; FITC-Dextran 10 kDa)含む溶液2000 μl を3.5 cmディッシュに満し、魚卵を設置した。電極-液面間距離を1 mmとし、60秒間隔で2回放電処理を行った。1回の放電時間は100 msとした。沿面放電処理時の電流値を変化させ、導入効率の電流依存性を評価した。導入効率は、孵化した稚魚を蛍光観察し、緑色蛍光を発する稚魚を孵化した稚魚全数で割ることで算出した。

3. 結果と考察 図2に沿面放電処理時の電流とメダカとスマへの蛍光分子の導入効率の関係

を示す。スマの場合、70 mAppを中心に分子導入されていることを確認した。一方でメダカの場合、孵化した稚魚の蛍光は確認出来なかった。図3に沿面放電による分子導入処理後のメダカ魚卵の共焦点顕微鏡による観察結果を示す。放電電流30.4 mAppの場合、緑色蛍光は観察出来ない。一方で54.4 mAppの場合、魚卵卵膜と胚との隙間である困卵腔で緑色蛍光を確認した。本結果より、メダカ魚卵の場合、蛍光分子の胚への導入は確認出来なかったが、30.4 mAppから54.4 mAppの間に分子が卵膜を通過するしきい値の存在を示唆する結果が得られた。スマは70 mAppで蛍光分子が胚へ導入されており、メダカも放電電流を大きくすることで導入される可能性がある。メダカ魚卵処理の放電電流が低くなった理由は、溶液の導電率の違いによるものだと考えている。メダカは導電率0.73 S/mの50%PBS、スマは導電率1.95 S/mの50%海水で処理しているため、今後導電率の最適化を検討する。

4. 結論 沿面放電処理によるメダカとスマ魚卵へ蛍光分子導入を試みた結果、導入対し電流依存性があることを確認した。メダカ魚卵に対してはスマと異なり分子の卵膜通過のみで、胚へは導入されなかった。

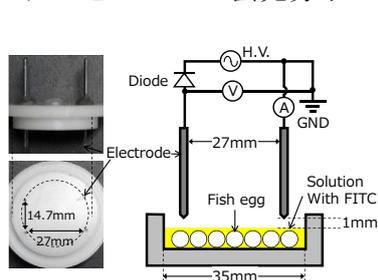


Fig 1. Schematic of surface discharge treatment.

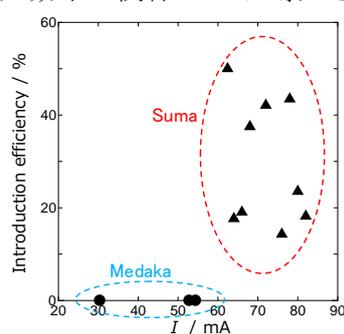
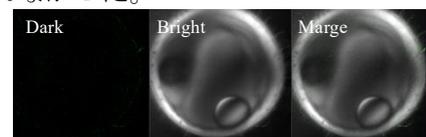


Fig 2. Dependence of the molecule introduction efficiency to the hatchlings on the discharge current.



(a) 30.4 mApp



(b) 54.4 mApp

Fig 3. Confocal microscope observation of Medaka eggs treated by surface discharge.

謝辞 本研究はJSPS科研費 19KT0035の助成を受けたものです。本研究は公益財団法人JKA小型自動車等機械振興事業の助成を受けたものです。本研究は愛媛大学リサーチユニットの支援を受けたものです。