2224 卵細胞の力学的特性に関する基礎的研究

Fundamental Studies of Measuring Elastic Properties of Ovum Cell

○正 村山 嘉延 (日大工) 准 吉田 光敏 (鹿児島大)
正 尾股 定夫 (日大工)

Yoshinobu MURAYAMA, Nihon University, Koriyama, Fukushima
Mitsutoshi YOSHIDA, Kagoshima University
Sadao OMATA, Nihon University

Key Words: Ovum Cell, Micro-biosensor, Elasticity

1. 序論

卵細胞は精子の進入に誘発されて透明帯の硬化(透明帯反応:zona reaction)が起こり、多精子受精防御機構に寄与すると考えられている¹⁾。このため、以前より卵細胞の硬さに関して関心が高まっていた。しかし、ここで言われている「硬化」とはプロテアーゼや還元剤による透明帯の溶解速度が遅くなる等、酵素活性を指標とした生科学的知見であり¹⁾²⁾、哺乳類の卵細胞に関して力学的に粘弾性特性が調べられたのはDrobnis等による毛細管への吸引力の測定に過ぎない³⁾。しかも、毛細管法に代表される応力-歪み特性を利用した方法はendoplasmの内圧を測定するものであり、純粋に透明帯の硬さが測定されたとは言い難い。また、応力-歪み法で得られる結果は卵細胞特有の形状に大きく依存するため他物質との比較が出来ない等、未だ多くの問題が残されている。

一方、このような応力-歪み特性を利用する方法の他に、位相シフト法による新しい粘弾性計測法がOmata等によって開発された⁴⁾。位相シフト法は、従来のように荷重による細胞の変形を利用する手法と異なり、共振状態のセンサ素子に接触した物質の音響インピーダンスの変化を共振回路における発振周波数として位相シフトさせたときの周波数変化量として計測する為、高分解能でリアルタイムに計測できる特徴を持つ。また、ほとんど対象物体に変形を加える必要が無い為、卵細胞特有の形状による制約から開放され他物質との比較が容易となる。

本報告では、位相シフト法を利用した卵細胞粘弾性計測用マイクロバイオセンサの試作開発に成功し、生体組織に近い牛皮ゼラチンを標準物質として牛の卵細胞の粘弾性について比較検討したのでその成果を報告する。

2. 方法

(1) 動作原理

センサ部は駆動部と検出部からなる圧電セラミック振動子(PZT)で構成した(図1)。検出部の出力信号を反転増幅器および位相補正回路を介して駆動部に入力することでセンサを強制的に共振させる。センサが対象物体に接触すると、

対象物体の粘弾性特性に応じて位相シフト回路の共振周波数 f_0 が変化する。したがって、 Δf の値から対象物体の粘弾性特性が検出できる。

Fig.1 Micro-biosensor and its resonance curves.

(2) システム構成及び測定方法

センサ部には長さ15mm、外形2mm、内径1mmの円筒状のPZTを使用した(図1)。PZTに金属のコネクタを取り付け、クランク状に加工したガラス管(直径1mm)を固定して探触子とした。ガラス管の先端は直径約10 μ mの球状に加工した。

被測定物にはウシの未受精卵及び牛皮ゼラチンを用いた。マイクロバイオセンサ及び非測定物をマイクロマニピュレーターを用いて固定し、非測定物を移動させることによりセンサを4 μ m間隔で16 μ mまで段階的に進入させ、同時に共振周波数を周波数カウンタで計測しGP-IBを介してコンピュータに記録した。測定は微分干渉顕微鏡下、生理食塩水中で行った。

Fig.2 Schematic diagram

3. 結果

(1)ゼラチン測定

マイクロバイオセンサの基本的特性を調べるために、濃度の異なる牛皮ゼラチン (5%、10%、15%) を用いて実験を行った。図3に示すように各進入量に対する周波数変化量をプロットしたところ、ゼラチン濃度の増加に従い共振周波数が大きくシフトした。

Fig.3 Change in resonance frequency vs. displacement

図4に、別に実験をして求めたゼラチン各濃度における stiffness に対する図3より求めた周波数変化率をプロットした。両者には精度良い相関 (R^2 乗値 0.968) が得られ、マイクロバイオセンサにより硬さの判別が可能である事が示された。すなわち、ゼラチンは濃度が増すに従い硬いゲルを形成するため、硬い物質ほど大きく共振周波数がシフトするマイクロバイオセンサの特性が確認された。

Fig.4 Characteristic of Micro-biosensor for the stiffness of gelatin

(2)卵細胞測定

図5にマイクロバイオセンサを段階的に進入させた時の共振周波数の経時変化を示す。

図6に、図5の結果より求めた周波数変化率をゼラチン測定から得たセンサの特性曲線に対応させた。測定した卵細胞の硬さは stiffness 8.44(g/cm)に対応した。

Fig.5 Micro-biosensor applied to Ovum Cell

Fig.6 Stiffness of Ovum Cell

4. 考察

卵細胞は直径 150 μm 程度と非常に小さく、顕微鏡下ではじめて観察出来る。しかし形態の観察は出来ても、直接触れて硬さを確かめる事はほとんど不可能である。では、どの程度の硬さを有しているのか、人間の触覚で擬似的に感じることは一種のバーチャルであり大変興味深い。

マイクロバイオセンサは高感度であるために、対象物体に接した瞬間より共振周波数に変化が見られ、図3の結果を見るとわずか 4 μm の進入量でも硬さの判別が出来ていることが分かる。顕微鏡下でセンサ接触の様子を観察すると、進入量 10 μm 程度までなら卵細胞にほとんど変形を加えることが無かった。すなわち、卵細胞の形状・内圧に影響されことなく硬さを直接測定する事が出来る。この点で、従来の応力-歪み法ではできなかった他物質との硬さの比較が可能となる。

本実験の結果は、ウシの卵細胞が stiffness 8.44%の牛皮ゼラチンの硬さと同じであるという事を示唆するものであり、端的には濃度 10.3%の牛皮ゼラチンに触れる事で牛の卵細胞の硬さを体験したと言える。

受精による透明帯の硬化は、プロナーゼに溶解速度を指標としてブタ透明帯で約 40%¹⁾、ウシ透明帯で約 12%²⁾ 変化すると報告されている。硬化率を stiffness に対応させると、センサ 10 μm 進入時に 1~5 Hz の変化量に相当し、透明帯反応の検出には未だ十分な感度があるとはいえないものの、センサの改良及び測手条件を変えることにより今後透明帯反応をリアルタイムで検出する事が可能であると考ええる。

謝辞

本研究で使用したウシ卵細胞を提供して頂いた家畜改良センター斎藤氏、金山氏に対しここに謝意を表す。

参考文献

- 1) Hatanaka et al.,(1992) *J.Reprod.Fertil.* 95, 431-440.
- 2) Iwamoto et al.,(1999) *J.Reprod.Fertil.* 117, 395-402.
- 3) Drobnis et al.,(1988) *J.Exp.Zool.* 245, 206-219.
- 4) Omata and Terunuma, (1992) *Sensors and Actuators A.* 35, 9-15