Akita University

Akita J Med 43 : 7-16, 2016

電界撹拌技術を用いた卵に対する新たな蛍光免疫染色手法の確立*

白 澤 弘 光

秋田大学院医学系研究科医学専攻機能展開医学系 産婦人科学講座

（平成 28 年 4 月 28 日掲載決定）

Establishment of Novel Method For Immunofluorescence Staining of Eggs Using Alternating-Current Electric-Field Mixing

Hiromitsu Shirasawa

Department of Obstetrics and Gynecology, Akita University Graduate School of Medicine

Key words : Electric field, Immunofluorescence staining, Eggs, Tubulin

はじめに

蛍光免疫染色とは目的とする対象抗原に対し蛍光を発する抗体を結合させることで，その抗原の発現を確認する研究手法である．ヒト，マウスなどの卵研究においても蛍光免疫染色は不可欠の手法であり，卵の全体像および卵内部の微小器官を把握するために様々な抗体が使用されている[1-3]．また，卵子に対する精子の侵入有無を蛍光免疫染色で確認することで受精の評価を行い，その結果を次周期の治療に活かすなど，生殖補助医療の臨床においても広く活用されている技術である．卵に対する蛍光免疫染色は多くの場合 1 次抗体，2 次抗体を用い，それぞれの抗体に対し室温では 30 分から数時間，暗所冷所保存の場合には 12 時間（over night）程度反応させる事が一般的である[4,5]．また卵研究における微小蛋白の発現確認では，商業ベースの抗体では染色が不十分かつ不鮮明な場合や，商業的には頒布されていない抗体も多いのが実情である．この場合には各研究機関で自家精製した抗体を研究者間で提供を行うなど，希少かつ高コストな抗体を用いて研究を行うことは少なくない．これまで卵における蛍光免疫染色は，希釈した抗体を含む数十 μl の液滴内に卵を静置し，1 次抗体，2 次抗体を反応させる手法が一般的であった．液滴内部に静置した卵と，抗体がブラウン運動により抗原抗体反応を起こす手法であり[6]，数十年来にわたり染色手法には大きな変化は見られていない．このように卵のような 3 次元の構造物である対象物に対する染色手法が大きく変化していない一方で，薄くスライスされ，カバーガラス上に固定された病理標本のような対象物に対する免疫染色では，染色手技を効率化する試みが様々行われている．磁力，表面弾性波，超音波，電磁波などを用い，微小液滴内に撹拌を生じさせる手法や，それらを用い染色に要する反応時間を短縮させる試みなどが過去に複数報告されている[7-12]．しかし，卵に対し，これらの手法を応用し，染色を効率化する試みはこれまで認められない．そのような中で，近年新たな免疫染色効率化の手法が報告された．1999 年に Akagami らが報告した電界砥粒制御技術[13] を基盤とした非接触電界撹拌技術を用い，免疫染色のプロトコルを短縮化する手法である．病理標本に対し希釈した抗体 150 μl を液下し，スライドガラスを挟む電極内に一定の電圧を一定周期で印加する事により，電界により液滴内部に撹拌を生じ，免疫染色の効率化を図る手法が報告されている．Toda らは，同手法を病理標本に対する免疫染色に初めて応用し 2011 年に報告している[14]．その後も非接

Corresponding author : Hiromitsu Shirasawa, M.D., Ph.D.
Department of Obstetrics and Gynecology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
TEL : 81-18-884-6163
FAX : 81-18-884-6447
E-mail : shirasawah@doc.med.akita-u.ac.jp
*平成 28 年 2 月 29 日秋田医学会学術賞受賞記念講演

Akita University

触電界撹拌技術を用い，手術中の迅速診断に応用する試みが，Kawaharada（2013），Tanno（2015）らにより報告されている[15,16]．本手法を用いた迅速免疫染色装置 Histo-tek® R-IHC®（Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan）は 2014 年 5 月に市販されている．今回我々は卵の蛍光免疫染色の効率化を目的に，Histo-tek® R-IHC® を応用する試みを行った．

本研究成果は 2015 年 9 月に “Novel method for immunofluorescence staining of mammalian eggs using non-contact alternating-current electric-field mixing of microdroplets” として，Scientific Reports（nature publishing group）に報告している[17]．また同成果は 2016 年 2 月に行われた秋田医学会賞受賞記念講演で要旨を発表した．本論文では Creative Commons Attribution 4.0 International License の元に公表している元論文のデータを基盤とし，秋田医学会での発表内容を再構成した．

目　　的

本研究の目的は，非接触電界撹拌技術を卵に対する蛍光免疫染色に応用し，染色時間の短縮および使用抗体量の削減が可能であるか検討することである．非接触電界撹拌技術を用いることで，抗原抗体反応を亢進し，通常は数時間以上かかる染色プロセスを 10 分程度に短縮した上で，通常の使用濃度より 10 倍以上希釈した抗体濃度においても観察が可能な染色結果が得られるか検討した．また，今回は非接触電界撹拌技術を初めて卵のような 3 次元の構造物に応用しており，染色効率化に関与する原理に関しても検討を行った．

方　　法

今回はマウス卵子，マウス胚盤胞における紡錘体，ギャップジャンクション結合蛋白を染色対象とした．概略すると，マウスから得た卵および受精卵を 15 µl の抗体を含む微小液滴内部に留置し，電界撹拌技術を用いて微小液滴内部に撹拌を生じさせ，抗原抗体反応を生じさせた後に対象の観察を行っている．また退色の影響を確認するために初回の観察から 48 時間後に再観察を行った．紡錘体の染色画像は数値化し評価を行っている．また，電界撹拌を行わず抗体を含む液滴内部に卵を静置するのみの群をコントロール群として比較検討している．電界撹拌による染色効率化の原理に関する検討としては，ハイスピードカメラを用いて電界撹拌施行中の微小液滴を観察するほか，電流プローベを微小液滴内に留置し電流の変動を計測した．上記について詳細を記す．

1.　電界撹拌

Histo-tek® R-IHC® を用いて電界撹拌を行った．機器の外観を図 1-A に示す．機器のカバーを開けた状態を図 1-B に示した．電極上に留置したスライドガラス上に液滴の崩壊を防ぐために Dako Pen®（Dako, Carpinteria, CA, USA）にて 5 mm の円を描き，その内部に抗体を希釈した 15 µl の液滴を滴下した．その液滴内部に卵もしくは受精卵を複数個注入し，カバーを閉じることでスライドガラスが電極によって挟まれる．両電極間に 5.0 kV の電圧を 5 Hz，21 Hz，32 Hz，46 Hz の 4 段階の周波数で印加する事により，電極間に電界を発生させ，液滴表面に対するクーロン力により液滴内部に撹拌を生じさせている．ハイスピードカ



図 1.　文献 17 より引用：（A）The Histo-Tek® R-IHC® の外観　（B）電極の間に静置したスライドガラス上の 15 µl の液滴

Akita University

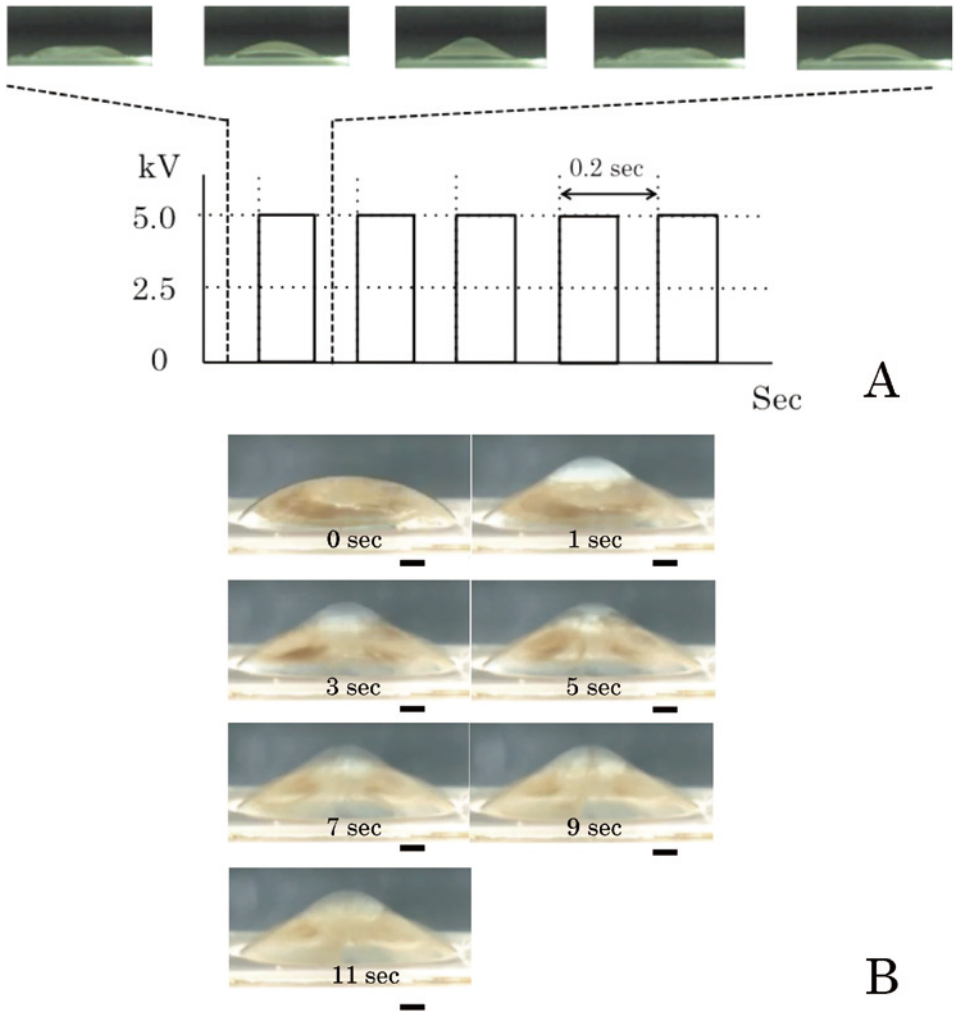


図 2. 文献 17 より引用：（A）5 Hz における電界撹拌施行中の微小液滴表面の変化 （B）14 µl の希釈液中に注入した 1 µl の FG beads® の電界撹拌中における拡散の様子をハイスピードカメラで撮像．Scale bar : 1 mm.

メラによって撮像した 5 Hz の際の液滴の変化を図 2-A に示した．また液滴内部の撹拌の状態を可視化するために，1 µl の FG beads® (Tamagawa Seiki, Tokyo, Japan) を 14 µl の希釈液に注入した後，電界撹拌を施行した際の連続画像を図 2-B に示した．

また，5 Hz，21 Hz，32 Hz，46 Hz のそれぞれにおける微小液滴の変化をハイスピードカメラで撮像し，図 3 に示した．

2. 卵回収，固定および染色

4-7 週齢の imprinting control region (ICR) マウスから，卵核胞期 (germinal vesicle : GV) 卵を回収した[5,18]．その後 MG-132 を添加した培養液にて 7 時間培養し，第 1 減数分裂期の卵子を得ている．その後 2% パラホルムアルデヒド，0.2% Triton X-100 を用いて固定を行った．また，マウス胚盤胞については 8-12 週齢の ICR マウスを用いて，同居交配によって胎生 3-4 日目 (Embryonic day 3.5) の受精卵を得たのちに，同様に

Akita University

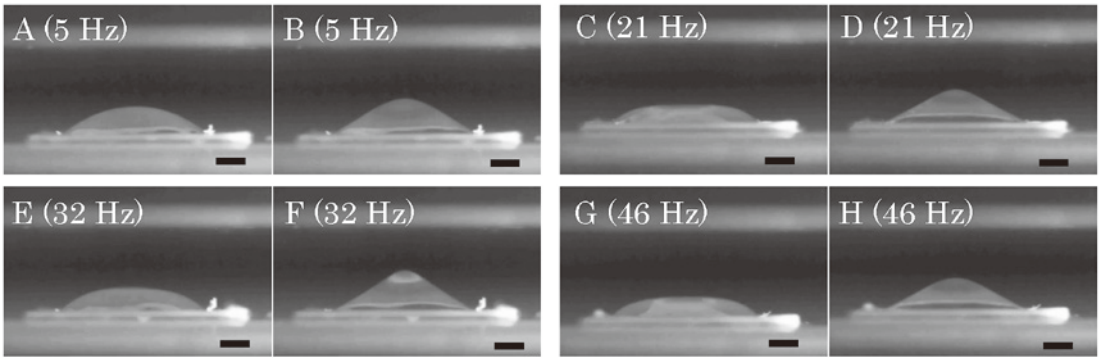


図 3.　文献 17 より引用：5 Hz，21 Hz，32 Hz，46 Hz のそれぞれにおける微小液滴の変化をハイスピードカメラで撮像．5 Hz（A,B），21 Hz（C,D），32 Hz（E,F），and 46 Hz（G,H）　Scale bar：1 mm.

2% パラホルムアルデヒド，0.2% Triton X-100 を用いて固定を行っている．対象の染色について，抗体は以下のものを使用した．紡錘体を構成する微小管については，1 次抗体として mouse monoclonal anti-acetylated tubulin antibody（1.0 mg/ml）（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）および mouse monoclonal anti-β-tubulin antibody（2.0 mg/ml）（Sigma-Aldrich）を混合して用いた．2 次抗体は Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG（2.0 mg/ml）（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）を用いた[19]．また未受精卵における染色体は卵子の封入および退色予防に用いる VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI（Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA）によって染色した．今回は胚盤胞の染色としてギャップジャンクション結合蛋白であるコネキシン 43 を染色している．1 次抗体は Anti-Connexin43（ZYMED, Sun Francisco, CA, USA）を用い，2 次抗体は Alexa Fluor 488-conjugated goat mouse IgG（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を使用した[20]．上記の 1 次抗体，2 次抗体はデータシートでの推奨使用濃度は 200 倍希釈（1 : 200）から 1,000 倍希釈（1 : 1,000）となっている．今回は微小管については 1 次抗体濃度を 1 : 1,000，1 : 2,000，1 : 4,000，1 : 8,000，そして 1 : 16,000 の 5 段階で検討を行った．また微小管の 2 次抗体濃度は 1 : 1,000 に固定して検討している．各抗体に対し 5 分間ずつ電界撹拌を施行した群を電界撹拌群とし，各抗体に対し，液滴内に卵を静置したのみの群をコントロール群として比較検討している．コネキシン 43 については 1 次抗体濃度 1 : 5,000，2 次抗体濃度 1,000 に固定して染色を行っている．1 次抗体，2 次抗体それぞれに対して 5 分間の染色を行い，その後卵を封入した．それぞれの抗体希釈濃度，周波数に対し約 6 個の卵を用いて検討を行った．

3.　観察と比較

染色し固定した卵，受精卵は VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI に封入後速やかに観察を行った．観察には DP73 顕微鏡（Olympus, Tokyo, Japan）を用いた．100 倍の油浸レンズを用い，cellSens® Standard（Olympus）を用いて画像を取得した．蛍光の退色を防ぐため 1 卵あたりの観察時間を 1 分以内にするように心がけた．微小管の観察が鮮明になるように焦点，ゲインを調節する以外は，画像ソフトを用いた修正，加工を行わずに画像を取得している．初回の観察後は 4℃ 下に標本を 48 時間暗所保存し，その後に退色の影響を検討するため 2 回目の観察を行っている．卵の染色から観察までのこれらのプロトコルを表 1 に示した．

微小管の染色強度を比較するため，画像解析には ImageJ software（version 1.48 for Mac OS X）[21,22] を用いた．微小管および染色体の内部の染色強度を平均化し，pixels 比（微小管の緑色の平均染色強度/ 染色体の青色の平均染色強度）を Relative Intensity（RI）とし，電界撹拌を施行した群と，コントロール群で比較検討した[21,23]．統計処理には SPSS software version 21.0（SPSS Inc., Chicago, IL, USA）を用い，two-sample *t*-test, Welch's *t*-test および Bonferroni 検定を行い，*p* 値（*P*）<0.05 もしくは<0.01 を有意とした．

Akita University

表 1. 文献 17 を改変：実験プロトコル

	コントロール群	電界撹拌群
卵の固定	室温	室温
	30 分間	30 分間
1 次抗体	液滴内に静置	電界撹拌
	5 分間	5 分間
卵の洗浄	室温	室温
	1 分間	1 分間
2 次抗体	液滴内に静置	電界撹拌
	5 分間	5 分間
卵の洗浄	室温	室温
	1 分間	1 分間
卵の封入	室温	室温
	VECTASHIELD®	VECTASHIELD®
	30 分間	30 分間
初回観察	室温	室温
	1 卵子あたり 1 分間以内	1 卵子あたり 1 分間以内
卵の保存	暗所（4℃）	暗所（4℃）
	48 時間	48 時間
退色の影響を確認する 2 回目の観察	室温	室温
	1 卵子あたり 1 分間以内	1 卵子あたり 1 分間以内

4. 液滴内部の電流測定

電界撹拌の原理および電界撹拌が卵および卵内部の器官へ与える影響を検討するため，電界撹拌中における微小液滴内の電流変動を測定した．電流プローベを液滴内に留置し，電界撹拌を施行中の液滴内部の電流を継時的に測定した．測定の概略図および実際の測定の様子を図 4 に示した．

結　　果

1. 未受精卵および胚盤胞の形態は，電界撹拌を施行した群とコントロール群で明らか差を認めなかった．また微小管，染色体などの内部器官の形態にも明らかな差を認めなかった．

2. 図 2-B に示すように，FG beads® は電圧印加から数秒で速やかに撹拌された．

3. ハイスピードカメラによって得た図 3 に示すように，微小液滴表面の変化は 5 Hz，21 Hz，32 Hz，46 Hz のそれぞれの周波数で異なることを確認した．

4. 5 Hz の周波数における，各希釈濃度の染色結果を図 5-A に示した．肉眼的には 1 : 4,000 の希釈濃度まではコントロール群でも観察が可能であるが，1 : 8,000 および 1 : 16,000 のような高希釈濃度ではコントロール群で染色が弱く，観察が困難になった．一方，電界撹拌群では高希釈濃度においても染色が比較的鮮やかであった．同様に，高希釈濃度ではコントロール群で退色が強く，観察がさらに難しくなったが，電界撹拌群では退色の程度が小さい結果となった．1 : 16,000 の希釈濃度ではコントロール群と 5 Hz による電界撹拌に加え，21 Hz，32 Hz，46 Hz においても検討を行い，その染色結果を図 5-B に示した．全ての

Akita University

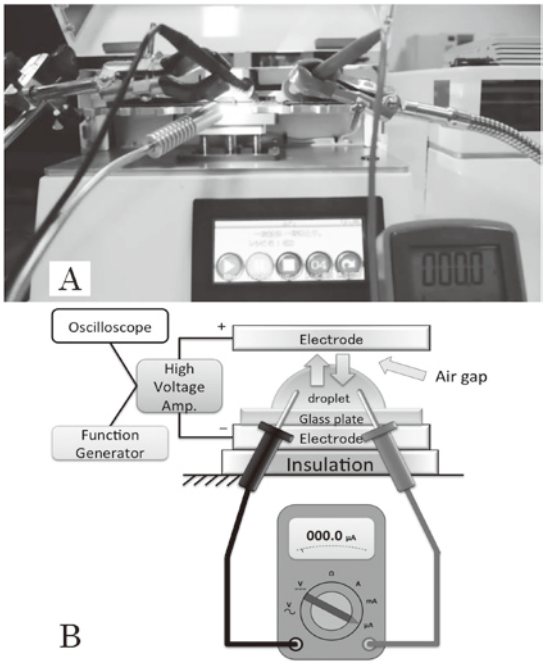


図 4.　文献 17 より引用：電界撹拌施行中における微小液滴内の電流計測
（A）電流計測の様子．測定プローベ（赤，青）を微小液滴内に静置し測定　（B）電流測定の概略図

周波数において，電界撹拌群ではコントロール群より初回，2 回目の観察共に染色が鮮やかであり退色の程度が小さかった．

5.　染色画像において取得した RI 値を，図 6 に示した．初回の観察では 1 : 1,000 から 1 : 16,000 の全てにおいて，5 Hz による電界撹拌群で RI 平均値がコントロール群より高く，1 : 2,000，1 : 8,000，1 : 16,000 の濃度においては有意に電界撹拌群で RI 値が高い結果となった．また，2 回目の観察では全ての希釈濃度において，5 Hz による電界撹拌群で RI 値がコントロール群より有意に高かった．1 : 16,000 の希釈濃度においては 5 Hz，21 Hz，32 Hz，46 Hz における電界撹拌群の RI 値とコントロールの比較を行い，図 6-B に示している．全ての周波数において，コントロール群より電界撹拌群の RI 値が初回，2 回目の観察共に有意に高い結果となった．

6.　胚盤胞におけるコネキシン 43 の染色結果を図 7 に示した．胚盤胞固定の際には通常においても胚の形態に若干の乱れを生じる．今回は，電界撹拌を原因とするような，特別な内部構造の形態異常は認めなかった．また，1 次抗体を 1 : 5,000 と希釈し，1 次抗体および 2 次抗体の染色時間を 5 分ずつと短縮したが，電界撹拌による染色によってコネキシン 43 は緑色に染色され観察が可能であった．

7.　図 4 に示したように，微小液滴内部の電流を計測したが，電界撹拌が施行されている間に微小液滴内部に電流は流れておらず絶縁環境にあることを確認した．

考　　察

今回我々は電界撹拌によって，微小管の蛍光免疫染色強度がコントロール群より高くなることを明らかにした．また，電界撹拌はコネキシン 43 のような胚盤胞内部の蛋白に対する蛍光免疫染色においても応用が可能であることを示している．今回の検討では限られた対象蛋白のみを染色している．未受精卵の微小管の染色において，1 : 1,000 から 1 : 4,000 のように 1 次抗体の濃度が比較的高濃度の条件では，各抗体の染色時間を 5 分と短縮しても，コントロール群でも比較的良好な染色を認めている．このような条件においては電界撹拌の優位性は明らかとならないが，微小管は卵内部において比較的大きい構造物であり，染色が容易である点も影響していると考える．そのような比較的大きい対象物においても，通常の 10 倍以上抗体濃度を希釈した場合，通常の染色法では染色時間を短縮すると，染色強度が低くなり，退色も強くなってしまう．一方，同一条件において電界撹拌を用いると良好な染色が得られ，RI 値による数値化によっても有意に染色強度が高くなることが今回示された．また，電界撹拌による染色によって退色の程度も軽減されることが示された．希少な抗体の使用量の削減や，実験過程の短縮化につながり得る結果と思われる．また，今回は微小管において 1 : 16,000 の 1 次抗体濃度では，5 Hz，21 Hz，32 Hz，46 Hz の間で周波数を変化させて検討している．全ての周波数においてコントロール群に比較して，初回，2 回目の観察共に，有意に RI 値が高まったが，周波数の間には RI 値に有意差を認めなかった．図 3 に示したように．15 μl の液滴に対して周波数を変化させると液滴表面の変動には差異を認めており，内部の撹拌状態にも違いが生じていると推測される．今回の微小管のような比較的蛋白量が大きい対象では各周波数における染色結果に差を認めなかったが，例

Akita University

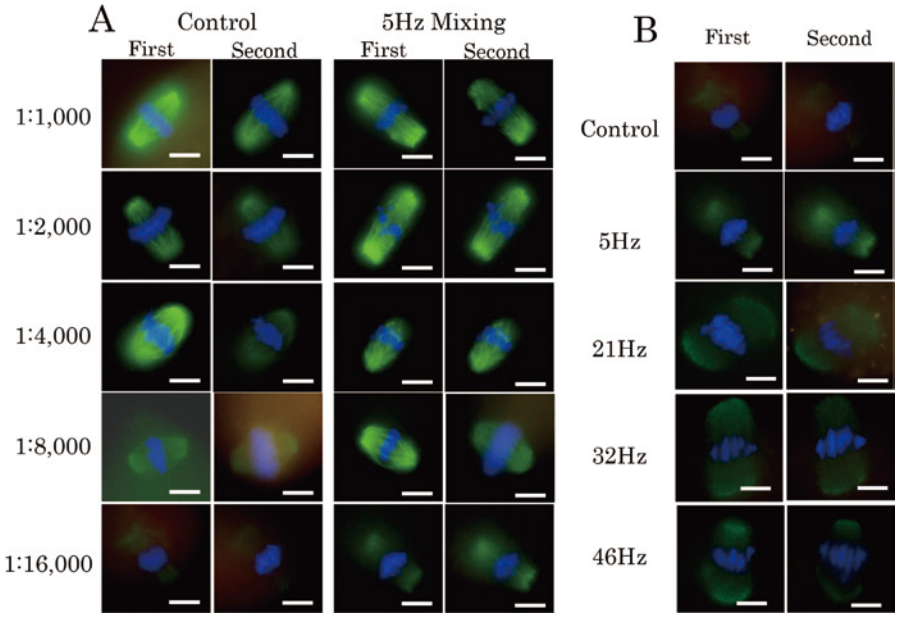


図 5. 文献 17 より引用：(A) 各抗体濃度における 5 Hz で施行した電界撹拌群とコントロール群の比較．初回と 2 回目の観察における蛍光免疫染色結果．(B) 1 : 16,000 における各周波数の電界撹拌群とコントロール群の比較．初回と 2 回目の観察における蛍光免疫染色結果．緑，微小管；青，DAPI． Scale bar : 10 μm.

えばコヒーシン蛋白のように染色体上に微量に存在する蛋白[23] の検出の際には至適な周波数が存在する可能性がある．今後，微小蛋白や核内蛋白などの染色に電界撹拌を応用し，更に検討していく．

今回用いた非接触電界撹拌技術は秋田大学，秋田県産業技術センターなどが共同して技術改良を行い，医工連携によって産まれた新たな手法である[13-15]．微小液滴を用いる研究手法は “labs-on-a-chip” として一つの研究分野として発展している[7,9]．これまでも磁性体や表面弾性波を用い，液滴内部に撹拌を生じさせる試みが報告されてきた．また，免疫染色の効率化の試みとしては電磁波や超音波を用いる手法や，高感受性の抗体の開発など，様々な試行が報告されている[7,8]．今回のような 3 次元の構造物である卵を対象とし，微小液滴を用い染色手法の効率化を試みる報告は今回の我々の報告が初めてである．卵の蛍光免疫染色に電界撹拌技術を用いる一つの利点として，非接触的に液滴内部の撹拌が可能なことが挙げられる．今回我々が示したように，電界撹拌によっても卵および内部構造の形態に変化は認めず，液滴内部に磁性体を入れ物理的に撹拌を生じさせる手法と異なり，卵を非破壊的に染色可能であることは大きな利点である．また電磁波などを生じる場合と異なり，液滴内部の温度上昇なども生じないことから，蛋白変性などを生じないことも卵に使用する際の利点となる．

また，電界撹拌を免疫染色に応用した英語論文は，我々の報告の他に現在まで 4 報存在する[14-16,24] が，撹拌時における液滴内部の挙動および電流変化について詳細な検討を行ったのは今回が初めてである．図 2-B に示したように液滴内の FG beads® は速やかに撹拌されており，液滴内部においてブラウン運動以外に，卵子と抗体の接触機会が増加することで，物理的に卵子と抗体における抗原抗体反応が亢進し染色強度が高まったと考えられる．また，図 4 に示したように電界撹拌中に液滴内部には電流が生じていないことから，液滴内部は絶縁環境にあることを今回我々は示している．微小液滴は空気，スライドガラスのような絶縁体に接しており，液滴内部の卵においては electroporation が生じる可能性は低いと考える．このように，3 次元の対象物に対し，物理的な接触頻度が増すことにより抗原抗体反応が亢進されるという電界撹拌の原理は，生体である卵を取り扱う生殖医療の研究において，非破壊的な撹拌が可能な原理とともに大きな利点であると考える．

Akita University

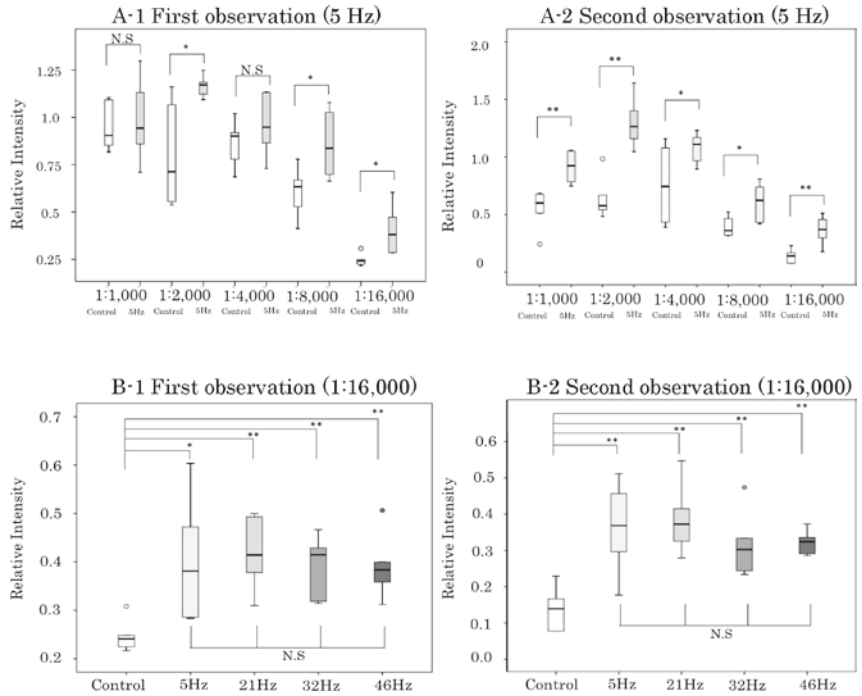


図 6.　文献 17 より引用：各周波数における RI 値．*P<0.05, **P<0.01　N.S.：not significant.
（A1）5 Hz 電界撹拌群とコントロール群の初回観察における比較　（A2）5 Hz 電界撹拌群とコントロール群の 2 回目の観察における比較　（B1）16,000 倍希釈濃度における各周波数の電界撹拌群とコントロール群の初回観察における比較　（B2）16,000 倍希釈濃度における各周波数の電界撹拌群とコントロール群の 2 回目の観察における比較

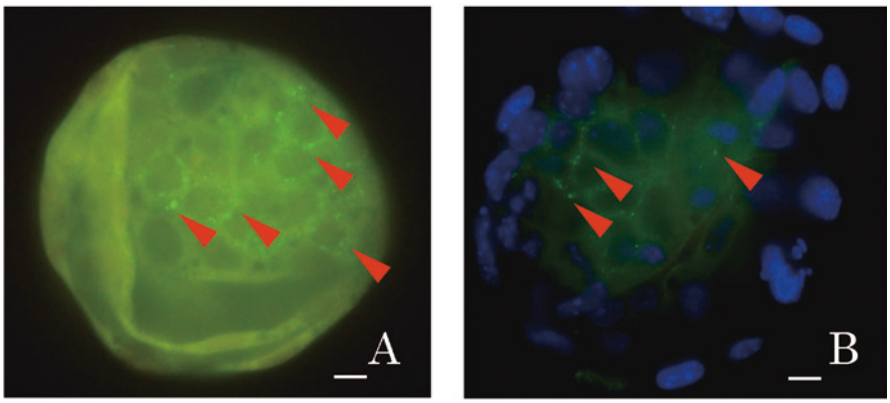


図 7.　文献 17 より引用：電界撹拌を用いた蛍光免疫染色の胚盤胞に対する応用．（A）コネキシン 43 を染色．赤矢印で示した緑色の発現部位がコネキシン 43　（B）コネキシンと染色体を染色赤矢印で示した緑色の発現部位がコネキシン 43．青，染色体．Scale bar：10 μm.

Akita University

今回我々は抗体使用量の削減，染色時間の短縮の可能性を示したが，具体的にどの程度抗体使用量を減少可能かは今後の検討が必要である．今回の検討では微小管において，同一抗体濃度では，電界撹拌を施行した群ではRI平均値がコントロール群の約1.5-2倍上昇するという結果であった．単純には同一条件では約50%程度，抗体使用量を減らせ得るが，今回の検討は各抗体5分間ずつの染色時間における微小管の蛍光免疫染色に限られている．今後染色時間，周波数の変更や様々な対象蛋白を用い，更なる検討を要する．

今回の結論として，我々は卵の蛍光免疫染色に初めて非接触電界撹拌技術を用い，その有用性を明らかにした．今後染色時間の短縮化，抗体使用量の削減など，研究および臨床の両面で応用を期待できる結果であると考える．また電界撹拌技術は卵子，受精卵において，抗原抗体反応に類似する様々な実験系への応用も期待できる．今後生殖医療分野で更に検討を進めていく．

謝　　辞

本研究は当大学産婦人科の寺田幸弘教授とともに，2013年秋に秋田産業技術センターを見学させて頂いた際に，赤上陽一博士，中村竜太博士より電界撹拌技術を教えて頂き研究の着想を得ました．加えて両氏には研究における原理的なデータ取得に多大なるご協力を頂きました．また秋田大学胸部外科の南谷佳弘教授，当医学部付属病院病理部の南條博病院教授には本研究にあたり技術的な助言を頂きました．寺田教授をはじめとする当大学産婦人科の先生方，研究施行時に所属されていた佐藤恵美子さんをはじめとする技術系補佐員の方々にも重ねて御礼申し上げます．

本研究および発表はJSPS科研費25861464，JSPS科研費16K20170の助成を受けたものです．

引 用 文 献

1） Zhang, Y. and Wang, T.H.（2012） Micro magnetic gyromixer for speeding up reactions in droplets. *Microfluidics and nanofluidics*, **12**, 787-794.

2） i Solvas, X.C., Niu, X., Leeper, K., Cho, S., Chang, S.I. and Edel, J.B.（2011） Fluorescence detection methods for microfluidic droplet platforms. *JoVE* (*Journal of Visualized Experiments*), **58**, e3437-e3437.

3） Gadd, J.C., Fujimoto, B.S., Bajjalieh, S.M. and Chiu, D.T.（2012） Single-molecule fluorescence quantification with a photobleached internal standard. *Analytical chemistry*, **84**, 10522-10525.

4） Lee, J., Iwai, T., Yokota, T. and Yamashita, M.（2003） Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *Journal of cell science*, **116**, 2781-2790.

5） Li, M., Yu, Y., Yan, J., Yan, L.Y., Zhao, Y., Li, R., Liu, P., Hsueh, A.J. and Qiao, J.（2012） The role of cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, on oocyte maturation and subsequent pregnancy in mice. *PloS one*, **7**, e30649.

6） Sagawa, T., Azuma, T. and Sasaki, Y.C.（2007） Dynamical regulations of protein-ligand bindings at single molecular level. *Biochemical and biophysical research communications*, **355**, 770-775.

7） De Bruyker, D., Recht, M.I., Bhagat, A.A., Torres, F.E., Bell, A.G. and Bruce, R.H.（2011） Rapid mixing of sub-microlitre drops by magnetic micro-stirring. *Lab on a chip*, **11**, 3313-3319.

8） Li, Y., Fu, Y.Q., Brodie, S.D., Alghane, M. and Walton, A.J.（2012） Integrated microfluidics system using surface acoustic wave and electrowetting on dielectrics technology. *Biomicrofluidics*, **6**, 12812-128129.

9） Grigoriev, R.O., Schatz, M.F. and Sharma, V.（2006） Chaotic mixing in microdroplets. *Lab on a chip*, **6**, 1369-1372.

10） Hatta, H., Tsuneyama, K., Kumada, T., Zheng, H., Cheng, C., Cui, Z., Takahashi, H., Nomoto, K., Murai, Y. and Takano, Y.（2006） Freshly prepared immune complexes with intermittent microwave irradiation result in rapid and high-quality immunostaining. *Pathology, research and practice*, **202**, 439-445.

11） Kumada, T., Tsuneyama, K., Hatta, H., Ishizawa, S. and Takano, Y.（2004） Improved 1-h rapid immunostaining method using intermittent microwave irradiation : practicability based on 5 years application in Toyama Medical and Pharmaceutical University Hospital. *Modern pathology*, **17**, 1141-1149.

12） Hatta, H., Tsuneyama, K., Kondo, T. and Takano, Y.（2010） Development of an ultrasound-emitting device for performing rapid immunostaining procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **58**, 421-445.

13） Akagami, Y., Asari, K., Jeyadevan, B., Fujita, T. and Umehara, N.（1999） ER fluid finishing using rotat-

Akita University

ing electrode. *Journal of intelligent material systems and structures*, **10**, 753–756.

14） Toda, H., Minamiya, Y., Kagaya, M., Nanjo, H., Akagami, Y., Saito, H., Ito, M., Konno, H., Motoyama, S. and Ogawa, J.（2011） A novel immunohistochemical staining method allows ultrarapid detection of lymph node micrometastases while conserving antibody. *Acta histochemica et cytochemica*, **44**, 133–139.

15） Kawaharada, Y., Minamiya, Y., Nanjo, H., Saito, H., Konno, H., Kagaya, M., Akagami, Y., Motoyama, S. and Ogawa, J.（2013） INTRAOPERATIVE DETECTION OF LYMPH NODE MICROMETASTASIS USING A RAPID IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING METHOD IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER. *Akita J. Med*., **39**, 73–79.

16） Tanino, M., *et al.*（2015） Rapid immunohistochemistry based on alternating current electric field for intraoperative diagnosis of brain tumors. *Brain tumor pathology*, **32**, 12–19.

17） Shirasawa, H., *et al.*（2015） Novel method for immunofluorescence staining of mammalian eggs using non-contact alternating-current electric-field mixing of microdroplets. *Sci. Rep*., **5**, 15371. doi:10.1038/srep15371.

18） Lee, J., Ogushi, S., Saitou, M. and Hirano, T.（2011） Condensins I and II are essential for construction of bivalent chromosomes in mouse oocytes. *Molecular biology of the cell*, **22**, 3465–3477.

19） Shirasawa, H., Kumagai, J., Sato, W., Kumazawa, Y., Sato, N. and Terada, Y.（2013） Retrieval and in vitro maturation of human oocytes from ovaries removed during surgery for endometrial carcinoma : a novel strategy for human oocyte research. *J. Assist. Reprod. Genet*., **30**, 1227–1230.

20） Togashi, K., Kumagai, J., Sato, E., Shirasawa, H., Shimoda, Y., Makino, K., Sato, W., Kumazawa, Y., Omori, Y. and Terada, Y.（2015） Dysfunction in gap junction intercellular communication induces aberrant behavior of the inner cell mass and frequent collapses of expanded blastocysts in mouse embryos. *J. Assist. Reprod. Genet*., **32**, 969–976.

21） Matsubara, K., Lee, A.R., Kishigami, S., Ito, A., Matsumoto, K., Chi, H., Nishino, N., Yoshida, M. and Hosoi, Y.（2013） Dynamics and regulation of lysine-acetylation during one-cell stage mouse embryos. *Biochemical and biophysical research communications*, **434**, 1–7.

22） Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W.（2012） NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis. *Nature methods*, **9**, 671–675.

23） Tsutsumi, M., Fujiwara, R., Nishizawa, H., Ito, M., Kogo, H., Inagaki, H., Ohye, T., Kato, T., Fujii, T. and Kurahashi, H.（2014） Age-related decrease of meiotic cohesins in human oocytes. *PloS one*, **9**, e96710.

24） Moriya, J., *et al.*（2016） Rapid immunocytochemistry based on alternating current electric field using squash smear preparation of central nervous system tumors. *Brain Tumor Pathol*., **33**, 13–18.