

論 文

植物プロトプラスト用エアーシースノズルの開発

川上友則*, 水野彰*

(1992年5月11日受理)

Development of the Air-Sheath Nozzle for Sorting of Plant Protoplasts

Tomonori KAWAKAMI* and Akira MIZUNO*

(Received May 11, 1992)

High speed selection of plant protoplasts and fused protoplasts has been required in the field of plant bio-engineering. For this purpose, cell sorters can possibly be used. However plant protoplasts are mechanically very fragile and easily destroyed when they are sprayed from a nozzle of a cell sorter, and it is difficult to get the same sorting speed for plant protoplasts as that of animal cells. To solve this problem, the authors have developed a novel nozzle which forms droplets after transformed the liquid spray of low velocity and large diameter to that of high velocity and small diameter by squeezing the liquid spray with the surrounding air sheath from the outer nozzle. The results indicate that the frequency of the droplet formation can be increased significantly and that the highest sorting rate could be achieved with an inner nozzle of 250 μm in diameter, an outer nozzle of 300 μm in diameter, the outer squeezing angle of 24°. At this condition, the droplet formation frequency could be raised up to 15 kHz with the squeezed liquid diameter of 135 μm and the spray velocity of 10.0 m/s. The destruction of protoplasts can be avoided effectively, and the passing rate through the nozzle can be increased to 75-90% for cabbage protoplasts.

1. はじめに

一般に市販されているセルソータは直径 5~10 μm 程度の動物細胞用に開発されており、ノズル口径は 50~100 μm 、液滴形成周波数は 30 kHz 程度、選別速度は毎秒数千個程度であり、バイオテクノロジーの広い分野に有用な装置である。セルソータは植物プロトプラスト融合細胞や遺伝子を導入した植物プロトプラストの高速選別にも寄与するものと期待されている。しかし、細胞壁を酵素で取り除いた植物プロトプラストは機械的強度が極めて低く、また直径も動物細胞に比べ大きいため流体場で機械的な力を受けやすく、ノズルから噴出された時の応力および液滴捕集時の衝撃力により破壊されやすい。セルソータで植物プロトプラストの選別を高速で行うため、ノズルの大口径化およびプロトプラスト懸濁液

の浸透圧、およびプロトプラスト懸濁液の温度の調整等による破壊の低減の研究が行われている¹⁻⁴⁾。

我々もセルソータのノズル部および捕集部におけるプロトプラストの破壊状況を調べ、選別速度を向上させるためには特にノズル部の破壊を低減させる必要があることに気付いた⁵⁾。また、従来型ノズルを用い、ノズル口径およびノズル絞り角度の最適値を実験的に求めた結果、口径 250 μm 、絞り角度 25°、ノズル出口液流速 8 m/s で動作させることで最も高い選別速度が得られ、この条件でキャベツとニンジンのプロトプラストは生存率は 60~70% であり、液滴化周波数は 9 kHz であった⁵⁾。しかし、口径 250 μm のノズルを用いた場合、ノズル内の流れを層流状態に保つためノズル出口液流速を 9.5 m/s 以下にしなければならず、液滴化可能周波数をこれ以上高くすることは困難であった。また、液柱が太いため液滴の直径が大きく、分離のための静電偏向距離を大きくすることが困難であった。

これらの問題を解決しプロトプラストの高速度選別を実現するため、エアーシースノズルと名付けた特殊なノズルを開発した^{6,7)}。これは、低速度かつ大口径ノズルにより形成した液柱を外側から空気流で絞り、高速度・小口径の液柱とし、その後に液滴化を行い液滴化周波数を

キーワード：植物プロトプラスト、セルソータ、フローサイドメトリ、細胞融合、遺伝子導入

* 豊橋技術科学大学工学部電気電子工学専攻 (441 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1)

Department of Electrical Engineering, Faculty of Engineering, Toyohashi University of Technology, 1-1, Hibarigaoka, Tenpaku-cho, Toyohashi-shi, Aichi, 441 Japan

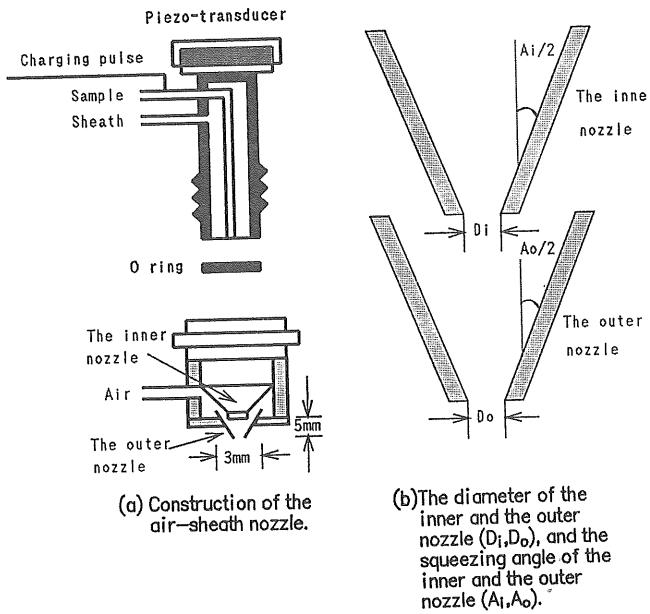


図 1 エアーシースノズルの構造

Fig. 1 Construction of the air-sheath nozzle.

高くするものである。エアーシースノズルの液柱径、プロトプラストの生存率、液滴化可能周波数、および液滴形成距離の測定を行い、植物プロトプラスト用セルソータに使用できる条件を求めたので以下に報告する。

2. エアーシースノズルの構造

図 1(a)にエアーシースノズルの構造を示す。エアーシースノズルは、太い液柱を作るための内側ノズルと、液柱を空気流と一緒に包み込むための外側ノズルから構成されている。内側ノズル内は、従来型ノズルと同様に中心部の細胞を含んだサンプル液をバッファ液で包み込み、細胞が液柱の中心を常に通る構造になっている。大口径の内側ノズルから遅い液流速で噴出した液柱は、外側ノズルの空気流によって絞り込まれ、速く細い液柱に変換される。内側ノズル口径は、口径 $250 \mu\text{m}$ 、絞り角度 25° 、ノズル出口液流速 $V_1=5.0 \text{ m/s}$ の条件で、大きなプロトプラストでも破壊せずに噴出できることが判明しているため⁵⁾、内側ノズルはこの条件とした。外側ノズル形状は、図 1(b)に示す口径 $D_o=250 \sim 300 \mu\text{m}$ 、絞り角度すなわち外側ノズルの上底と下底間の角度 $A_s=20 \sim 27^\circ$ の範囲で液滴化周波数が最大となるものを求めた。

3. エアーシースノズルの特性

図 2にエアーシースノズルの加圧系を示す。エアーシースノズルは、サンプル流、シース流および空気流によ

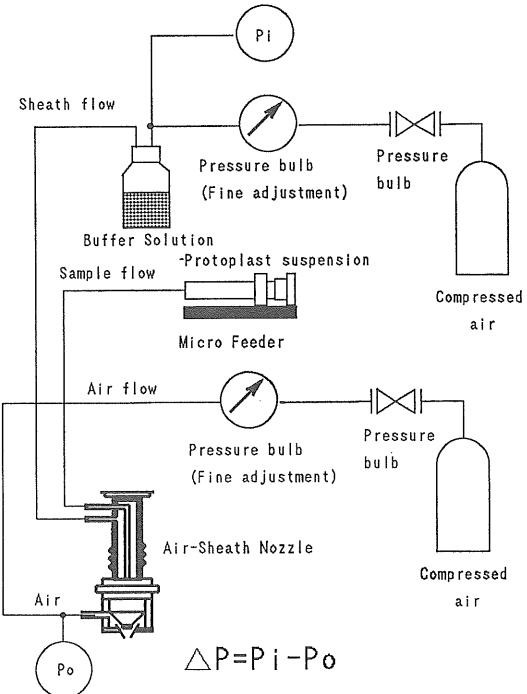


図 2 エアーシースノズルのフローダイアグラム

Fig. 2 Flow diagram of the air-sheath nozzle.

って動作する。シース流（バッファ液）は、バッファ液の入っている容器を加圧して供給した。この圧力を内側ノズル圧力 P_i とする。空気流も圧送しており、その圧

力を外側ノズル圧力 P_o とする。また、サンブル流(プロトプラスト浮遊液)はマイクロフィーダによって供給した。

以下で行った実験は、プロトプラスト浮遊流、バッファ液とともに0.5Mマニシートール溶液を用いており、温度は約20°Cで行っている。

3.1 内側ノズルの液流速条件

エーシースノズルは、外側ノズルと内側ノズルに加える圧力を可変することで、ノズルから噴出する液柱の液柱径および液流速を変化できる。内側ノズルから噴出する液柱の液流速は、内側ノズル圧力 P_i と外側ノズル圧力 P_o の差 ΔP で決定する。内側ノズル口径 $D_i=250\mu m$ のとき、内側ノズル出口の液流速 V_i と ΔP の関係を図3に示す。液流速は、ノズルの単位時間当たりの放出量とノズル口径より算出した。外側ノズル口径 $D_o=300\mu m$ 、絞り角度 $A_o=20^\circ$ のエーシースノズルにおいて $P_i=19\text{ kPa}$ に固定したとき、プロトプラストを壊さないよう液流速 $V_i=5\text{ m/s}$ 以下で液柱を内側ノズルから噴出するための条件は

$$\Delta P < 10.2 \text{ kPa} \quad (1)$$

であった。

3.2 外側ノズルで絞った液柱の液柱径および液流速

上記のエーシースノズルにおいて、内側ノズル圧力 $P_i=19\text{ kPa}$ 、外側ノズル圧力 $P_o=8.3\sim14.3\text{ kPa}$ の範囲で調整すると、内側ノズルから液流速 $V_i=3.0\sim4.9\text{ m/s}$ で噴出した液柱を液柱径 $D_s=150\sim200\mu m$ に絞り込むことが可能であった。このエーシースノズルから噴出する液柱の様子を図4に示す。液柱の絞り込みは外側ノズルの出口直前で行われており、外側ノズル圧力が高いほど絞り込みが強くなっている。液柱径は、外側ノ

ズル出口から少し離れた位置で最小になるが、本論文ではこの最小径をエーシースノズルから噴出した液柱の液柱径 D_s と定義した。図4(a)は $D_s=200\mu m$ 、(b)は $D_s=180\mu m$ 、(c)は $D_s=150\mu m$ に絞り込む様子であり、(d)は(a)～(c)の様子を示したものである。液柱径が $220\sim240\mu m$ では、長時間使用すると外側ノズルに液滴が付着し安定した液柱を作ることができなかった。また、液柱径を $120\mu m$ 程度以下まで絞ると液柱表面が乱れ、液滴形成距離が乱れるとともに細胞計測用レーザ光の散乱光の乱れが大きいレベルで発生するため、セルソータで使用はできないと考えられる。

次に外側ノズル口径 D_o および外側ノズル絞り角度 A_o の液柱径に対する影響を測定した。内側ノズル圧力

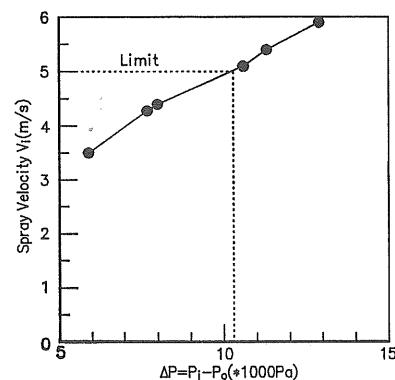


図3 内側ノズルと外側ノズルの圧力差 ΔP に対する内側ノズル出口液流速 V_i

Fig. 3 The spray velocity, V_i , at the outlet of inner nozzle as a function of the difference pressure, ΔP , between the outer nozzle and the inner nozzle.

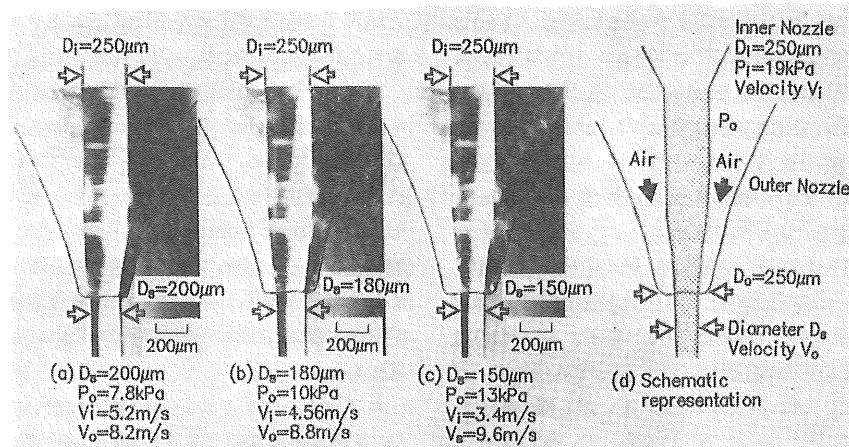


図4 エーシースノズル出口の液流

Fig. 4 The squeezed liquid spray in the air-sheath nozzle.

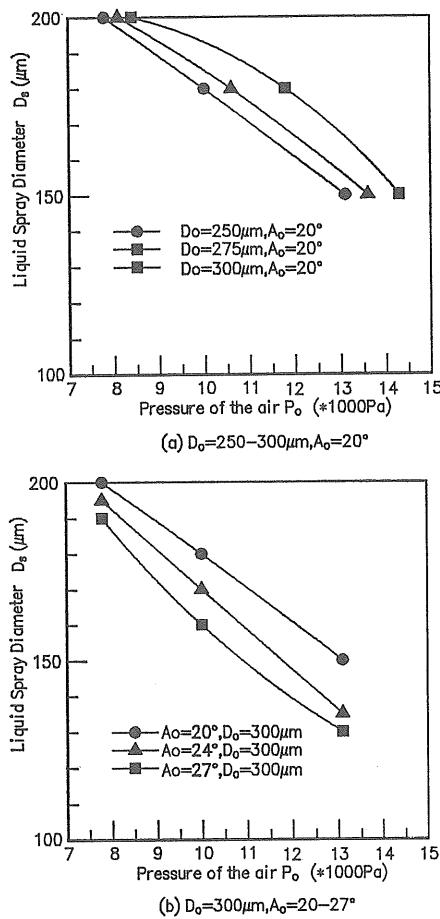
図 5 外側ノズル圧力に対する出口液柱径 D_s

Fig. 5 The liquid spray diameter, D_s , as a function of the outer pressure.

$P_1=19\text{ kPa}$ に固定し外側ノズル圧力 P_o を変化させることで測定を行った。その結果を図 5 に示す。(a)は $A_o=20^\circ$ 一定で $D_o=250, 275, 300\text{ }\mu\text{m}$ の外側ノズル、(b)は $D_o=300\text{ }\mu\text{m}$ 一定で $A_o=20, 24, 27^\circ$ の外側ノズルを用いた場合である。液柱径は D_o が小さいほど、また A_o が大きいほど、小さい外側ノズル圧力で絞り込むことができた。 $D_o=300\text{ }\mu\text{m}$ での液柱径 D_s は A_o の影響も強く受けたことが判明した。

また、絞り込んだ液柱の液流速 V_o も同時に測定した。液流速は、単位時間当たりの流量と液柱径より算出した。その結果を図 6 に示す。(a)は D_o を、(b)は A_o を変えた場合の液流速 V_o である。 V_o は、 D_o が小さいほど、また A_o が大きいほど速くなる様子が見られる。

3.3 エアーシースノズルの液滴形成

$D_1=250\text{ }\mu\text{m}$, $D_o=300\text{ }\mu\text{m}$, $A_o=20^\circ$ のエアーシース

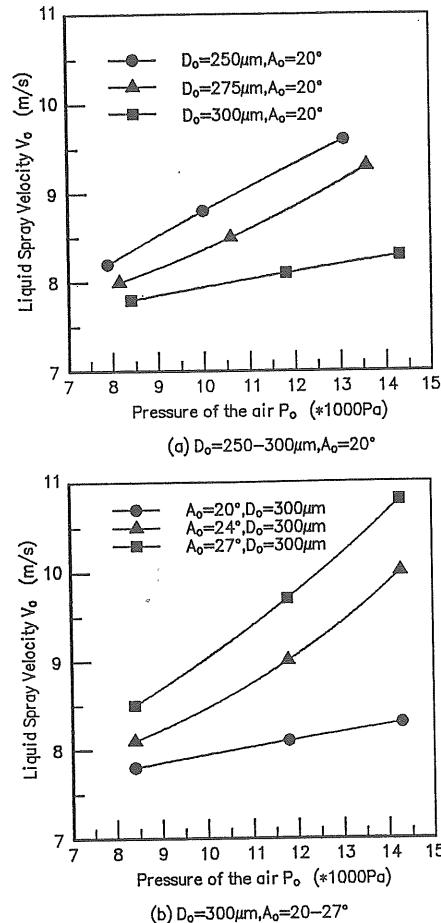
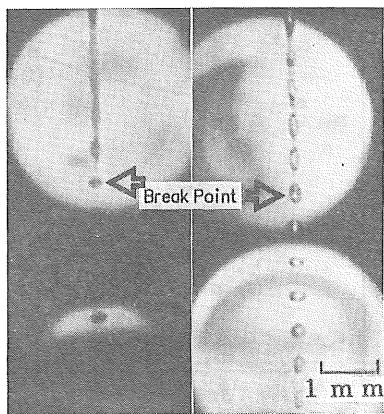


図 6 外側ノズル圧力に対する液流速

Fig. 6 The liquid spray velocity as a function of the outer pressure.

ノズルの液滴化条件を調べた。液滴化の様子は、振動子と同期する発光ダイオードによるストロボによって液滴を可視化して調べた⁸⁾。図 7 に従来型ノズルおよびエアーシースノズルで液滴化する液柱の様子を示す。どちらも液柱径 $150\text{ }\mu\text{m}$, $V_o=8.3\text{ m/s}$, 液滴化周波数 $f_p=12.2\text{ kHz}$ である。エアーシースノズルは従来型ノズルに比べ、液滴形成距離 L_p すなわちノズル出口から液滴形成点 (Break Point) までの距離が長くなるとともに、液柱径がくびれ始めてから液滴になるまでの距離も大きくなる様子が見られる。これは、液柱表面付近を流れる空気流によって液柱表面波が弱められたためであろうと考えられる。

エアーシースノズルと従来型ノズルの液滴形成距離 L_p を図 8 に示す。 L_p は液滴化周波数に影響されるため⁹⁾、液滴化可能周波数の範囲で最も距離の小さくなつた値を測定した。エアーシースノズルによる液滴形成距



(a) Conventional Nozzle (b) Air-Sheath Nozzle
 $D_o = 150 \mu\text{m}$ $D_o = 150 \mu\text{m}$
 $V_o = 8.3 \text{ m/s}$ $V_o = 8.3 \text{ m/s}$
 $f_p = 12.2 \text{ kHz}$ $f_p = 12.2 \text{ kHz}$
 $D_i = 250 \mu\text{m}$
 $D_o = 300 \mu\text{m}$
 $A_o = 20^\circ$

図 7 液滴形成

Fig. 7 The droplet formation.

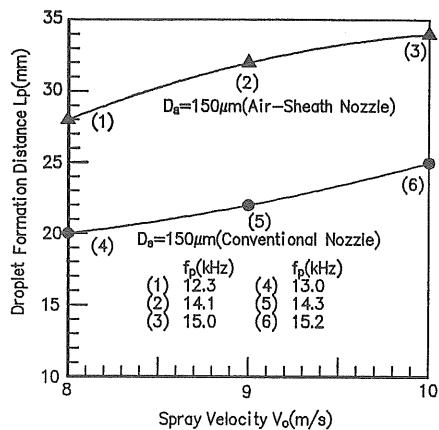


図 8 液流速に対するエアーシースノズルと従来型ノズルの液滴形成距離

Fig. 8 The droplet formation distance, L_p , for the air-sheath nozzle and the conventional nozzle, as a function of the spray velocity, V_o .

離は、従来型ノズルの 1.5~2.0 倍長くなることが判明した。このため、測定時点と荷電時点との遅延時間を短くして荷電した液滴中に細胞が入っている確率を落とさないように注意して使用する必要があると考えられる。

3.4 液滴化可能周波数

エアーシースノズルの液滴化可能周波数を測定した。図 9 に外側ノズル圧力の変化による液滴化可能周波数の変化を示す。エアーシースノズルは、 $D_i = 250 \mu\text{m}$, D_o

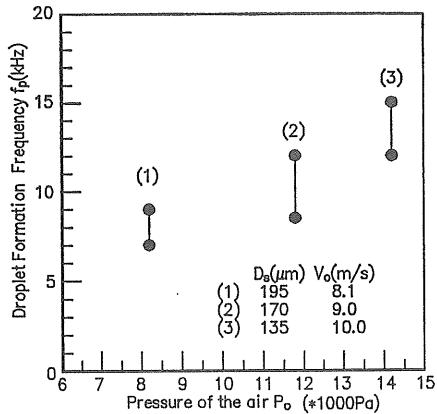


図 9 $P_i = 19 \text{ kPa}$, $D_i = 250 \mu\text{m}$, $D_o = 300 \mu\text{m}$, $A_o = 24^\circ$ におけるエアーシースノズルの外側ノズル圧力に対する液滴形成可能周波数範囲

Fig. 9 Range of the droplet formation frequency, f_p , as a function of the outer pressure, P_o , using the air-sheath nozzle with $D_i = 250 \mu\text{m}$, $A_o = 24^\circ$, $D_o = 300 \mu\text{m}$, $P_i = 19 \text{ kPa}$.

$= 300 \mu\text{m}$, $A_o = 24^\circ$ のものを用いた。その結果、エアーシースノズルの液滴化可能周波数は外側ノズル圧力を上げるに従って高くなった。しかし、 $P_o = 15 \text{ kPa}$ 以上では液滴形成点が不規則となり、セルソータに使用できなくなる。 $P_i = 19 \text{ kPa}$, $P_o = 14.2 \text{ kPa}$ の条件において $f_p = 15 \text{ kHz}$ まで高めることが可能であることが判明した。

次に外側ノズル形状の違いによる液滴化可能周波数の範囲の比較を行った。 $D_i = 250 \mu\text{m}$ である。外側ノズルの形状は $A_o = 20^\circ$ において $D_o = 250 \sim 300 \mu\text{m}$ と変え、また $D_o = 300 \mu\text{m}$ において、 $A_o = 20 \sim 27^\circ$ と変化させた。これらのエアーシースノズルで $D_s = 150 \mu\text{m}$, $V_o = 8 \text{ m/s}$ の液柱を作った場合の液滴化可能周波数を図 10 に示す。また、同じ径および液流速の液柱を従来型ノズルで作った場合の液滴化可能周波数も合わせて示す。その結果、液滴化可能周波数の範囲は従来型ノズルが最も広く、エアーシースノズルでは範囲が狭く、特に外側ノズル口径を小さくするほど、また外側ノズル絞り角度を大きくするほどその範囲は小さくなかった。この理由は、液柱周りの空気流によって液柱が加速されるほど液柱表面を伝播する振動子からの表面波が弱められるためであると思われる。また、その周波数範囲は従来型ノズルにおける液滴化可能周波数範囲の中心周波数に収束する様子が見られた。

上記各種ノズルにおいて P_o により V_o および D_s を変化させ、液滴化可能周波数が最大となる点の液柱径および液流速を調べた 結果を図 11 に示す。最も高い液

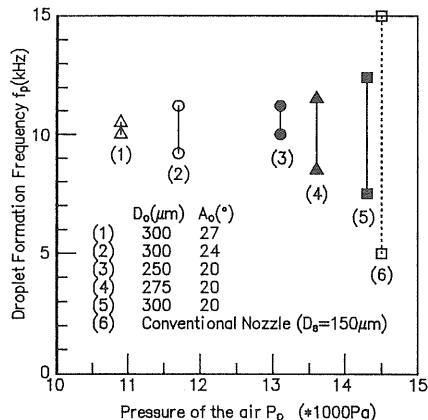


図 10 $D_o=250\sim300\mu\text{m}$, $A_o=20^\circ$ および $D_o=300\mu\text{m}$, $A_o=20\sim27^\circ$ の外側ノズルを持つエアーシースノズルの液柱径 $150\mu\text{m}$, 液流速 8 m/s における液滴化可能周波数範囲

Fig. 10 Range of the droplet formation frequency using the air-sheath nozzle with $D_o=250\sim300\mu\text{m}$, $A_o=20^\circ$, and $D_o=300\mu\text{m}$, $A_o=20\sim27^\circ$, at the liquid spray velocity of 8 m/s and the liquid spray diameter of $150\mu\text{m}$.

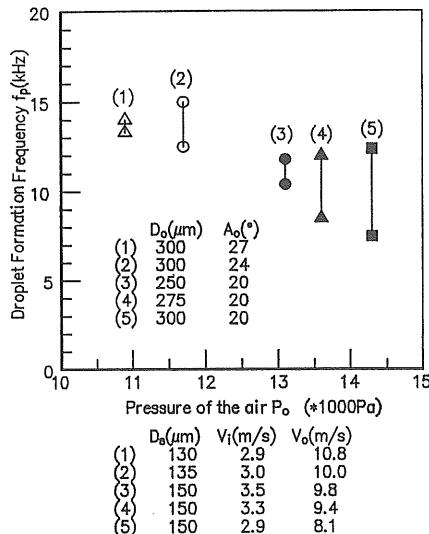


図 11 $D_o=250\sim300\mu\text{m}$, $A_o=20^\circ$ および $D_o=300\mu\text{m}$, $A_o=20\sim27^\circ$ の外側ノズルを持つエアーシースノズルによる最高液滴化可能周波数

Fig. 11 The most highest droplet formation frequency using the air-sheath nozzle with $D_o=250\sim300\mu\text{m}$, $A_o=20^\circ$, and $D_o=300\mu\text{m}$, $A_o=20\sim27^\circ$.

液滴化可能周波数の得られた動作条件は、(1) では液柱径 $130\mu\text{m}$ で液流速 10.8 m/s , (2) では液柱径 $135\mu\text{m}$ で液流速 10.0 m/s , (3) では液柱径 $150\mu\text{m}$ で液流速 9.8 m/s , (4) では液柱径 $150\mu\text{m}$ で液流速 9.4 m/s , (5) で

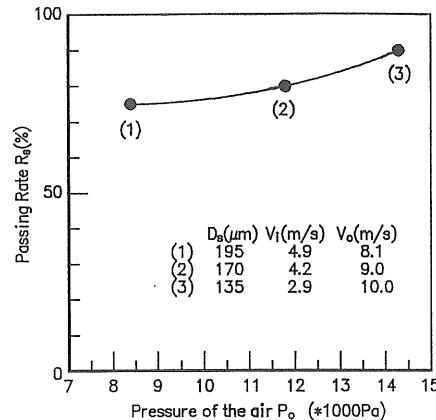


図 12 $D_i=250\mu\text{m}$, $D_o=300\mu\text{m}$, $A_o=20^\circ$ のエアーシースノズルの外側ノズル圧力に対するキャベツプロトプラストのノズル通過率

Fig. 12 The passing rate, R_s , of cabbage protoplasts using the air-sheath nozzle with $D_i=250\mu\text{m}$, $D_o=300\mu\text{m}$, $A_o=20^\circ$ as a function of the outer pressure, P_o .

は液柱径 $150\mu\text{m}$ で液流速 8.1 m/s であった。エアーシースノズルにおいても従来型ノズルと同様に液柱径が小さくかつ液流速の速い(1)の条件が最も高い液滴化可能周波数が得られるように考えられるが、外側ノズル絞り角度が大きいほど液滴化可能周波数の範囲が小さくなるため(2)の条件で最も高い最高液滴化可能周波数が得られるものと思われる。

4. エアーシースノズルによる植物プロトプラスト破壊の低減

実験では、サンプルとしてキャベツプロトプラストを用いた。プロトプラストは別報⁵⁾の方法で単離した。プロトプラストを用いて、従来型ノズルとエアーシースノズルのノズル通過率、すなわち壊れずにノズルを通過する割合を測定した。ノズル通過率 R_s は別報⁵⁾に示す方法で測定した。液滴の回収には、液滴回収時の損傷を大幅に低減できるパラフィルム捕集法を使用した⁵⁾。

図 12 に外側ノズル圧力を上昇させた時のノズル通過率を示す。エアーシースノズルは、最も高い液滴化可能周波数の得られる $D_i=250\mu\text{m}$, $D_o=300\mu\text{m}$, $A_o=24^\circ$ のものとした。その結果、ノズル通過率は外側圧力を上昇させる、つまり液柱を細く速くするとノズル通過率は上昇することが判明した。これは、内側ノズル出口の液流速が低下するためであり、その液柱を絞り込む際の損傷が発生していないことを示している。このことを確認するために、従来型ノズルで通過率を求め、同一口径の内側ノズルを有するエアーシースノズルとの比較を行っ

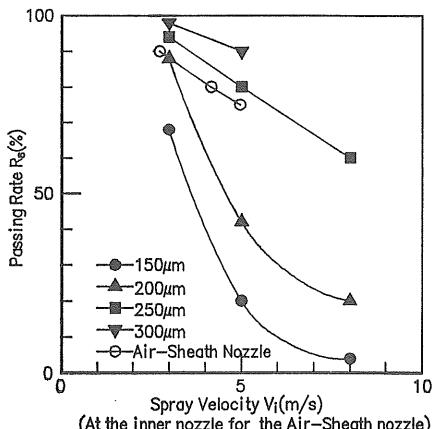


図 13 口径 150~300 μm の従来型ノズルによる液流速に対するキャベツプロトプラストのノズル通過率変化と $D_t=250 \mu\text{m}$, $D_o=300 \mu\text{m}$, $A_o=20^\circ$ のエアーシースノズルの内側ノズル出口液流速 V_t に対するキャベツプロトプラストのノズル通過率

Fig. 13 The passing rate, R_s , of cabbage protoplasts as a function of spray velocity (at the inner nozzle for the air-sheath nozzle) for conventional nozzle with diameter of 150~300 μm , and the air-sheath nozzle with $D_t=250 \mu\text{m}$, $D_o=300 \mu\text{m}$, $A_o=20^\circ$.

た。従来型ノズルは、ノズル絞り角度 25° でノズル口径 150, 200, 250, 300 μm とした。また、エアーシースノズルは $D_t=250 \mu\text{m}$ である。エアーシースノズルではエアーシースにより液流を絞り、 $V_o=10.0 \text{ m/s}$ としている。横軸をノズル出口液流速とし、エアーシースノズルの場合を内側ノズル出口液流速とした。その結果を図 13 に示す。口径 250 μm の従来型ノズルのノズル通過率と $D_t=250 \mu\text{m}$ のエアーシースノズルのノズル通過率はほぼ同じであった。5% 程度エアーシースノズルの通過率が低くなったが、有意な差はないと思われる。この結果は、エアーシースノズルにおいてプロトプラストが内側ノズルを通過する際に従来型ノズルと同じように損傷を受けるが、空気流によって絞られる際にはほとんど損傷を受けていないことを示している。

口径 150 μm の従来型ノズルを用い、液流速 8 m/s 、液滴化可能周波数 $f_p=15 \text{ kHz}$ とするとキャベツプロトプラストはほぼ全部破壊される。しかし、エアーシースノズルでは内側ノズル出口液流速 $V_t=2.9 \text{ m/s}$ 、外側ノズル出口液流速 $V_o=10.0 \text{ m/s}$ 、 $f_p=15 \text{ kHz}$ において約 90% のプロトプラストが破壊されずに液滴化でき、エアーシースノズルにより選別速度の向上が可能となることを示している。

5. まとめ

植物プロトプラスト用セルソータのノズルでの破壊を低減するため、低速度かつ大口径ノズルにより形成した液柱を外側から空気流で絞り高速度・小口径の液柱とし、その後に液滴化を行うエアーシースノズルの開発を行った。

内側ノズル口径 250 μm 、内側ノズル絞り角度 25°、外側ノズル口径 300 μm 、外側ノズル絞り角度 24° において液柱径 $D_s=135 \mu\text{m}$ 、液流速 $V_o=10.0 \text{ m/s}$ の条件下液滴化可能周波数を 15 kHz まで高めるとともに、液滴化に伴うプロトプラストの損傷を大幅に低減できた。プロトプラストの損傷は内側ノズル通過時に多少発生するが、それ以降はほとんど発生せずキャベツプロトプラストを $D_s=135 \mu\text{m}$ 、 $V_o=10.0 \text{ m/s}$ において約 90% の通過率で、破壊することなく $f_p=15 \text{ kHz}$ で液滴化が可能となった。液滴径も小さくなるので静電偏向距離を大きく取ることが可能となった。エアーシースノズルでは、絞り込み空気流により液滴化のための表面波が減衰されやすく液滴形成距離が従来型ノズルの 1.5~2.0 倍に長くなる。計測時点から荷電時点までの遅延時間が長くなると荷電液滴中にプロトプラストが入る確率が低くなり、選別効率が低下する可能性があるが、レーザ照射位置を液滴形成点に近づけることにより選別効率の低下を実用上防ぐことが可能であると思われる。また、液柱表面の乱れによる散乱光はプロトプラスト通過時の散乱光強度よりかなり小さいため実用上問題となるレベルではないと思われる。このエアーシースノズルを用いれば、直径が大きくかつ強度の小さい融合プロトプラストの高速度選別が可能になると考えられる。

参考文献

- 1) D.W. Galbraith : Cytometry, 8 (1987) 60
- 2) K.R. Harkins : Phys. Plant, 60 (1984) 43
- 3) C.L. Afonso, K.R. Harkins, M. Thomas Compton, A.E. Krejci and D.W. Galbraith : Biotechnology, 3 (1985) 811
- 4) 山形 光, 高橋 滌 : Bio Industry, 4 (1987) 45
- 5) 川上友則, 水野 彰 : 静電気学会会誌, 16 (1992) 411
- 6) 川上友則, 水野 彰 : 静電気学会講演論文集 '91, p. 57, 静電気学会 (1991)
- 7) 川上友則, 水野 彰 : 静電気学会講演論文集 '90, p. 271, 静電気学会 (1990)
- 8) M.R. Melamed, T. Lindomo and M.L. Mendelsohn : *Flow Cytometry and Sorting*, Second Ed., p. 164, John Wiley & Sons, Toronto (1990)
- 9) A. Mizuno, T. Nakashima, H. Masago and K. Hasegawa : Conference Record of IEEE/IAS '87, p. 1558, Oct., Atlanta, Georgia (1987)