

論文

セルソータノズル通過時にプロトプラストに 加わる膜張力の解析

川上友則*, 水野彰*

(1992年8月19日受理)

Analysis of Membrane Tension of Plant Protoplasts at a Nozzle of a Cell Sorter

Tomonori KAWAKAMI* and Akira MIZUMO*

(Received August 19, 1992)

High speed sorting 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. Plant protoplasts are however mechanically very fragile and easily be destroyed when they are sprayed at a nozzle of a cell sorter, and it is difficult to obtain the same sorting speed as that for animal cells. The purpose of this paper is to estimate the maximum membrane tension, T_{\max} , of a protoplast at the nozzle, and to discuss the sorting conditions to improve its speed. The theoretical value of T_{\max} is calculated using the measured value of the deformation ratio, K , and the membrane tension, T_d , at the mechanical breakdown of the cell. T_{\max} is expressed as $\frac{C_0 \beta V_s^2 D_p^3}{D_n^2}$, where C_0 is a constant when $K=1.8$ and the squeezing angle of the nozzle,

$A_s=25^\circ$. β is also a constant determined by A_s . V_s is the spray velocity, D_p is the diameter of the protoplast and D_n is the diameter of the nozzle. The theoretical maximum droplet formation frequency, f_{\max} , is given as $f_{\max} = \frac{1}{0.92\pi\sqrt{C_0}} \sqrt{\frac{T_d}{\beta D_{pm}^3}}$. D_{pm} is the maximum diameter of the protoplasts, which can be sorted without destruction. This equation indicates that the value of f_{\max} is independent from D_n and V_s . In order to raise the sorting speed, the results indicate that the decrease in D_p or the increase in T_d is effective. This conclusion supports the experiments made by other researches to improve the sorting speed by raising the osmotic pressure (decrease in D_p) or reducing the temperature (increase in T_d) of the protoplasts suspension. The results also indicate that the increase in the nozzle diameter or the decrease in the spray velocity is not effective to increase the sorting speed.

1. はじめに

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

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

* 豊橋技術科学大学電気電子工学系 (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

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、あるいはプロトプラスト懸濁液の浸透圧の上昇、またはプロトプラスト懸濁液の温度の低下等の試料調整が行われている¹⁻⁵⁾。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⁶⁾。また、キャベツプロトプラスト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 8.0 m/s で動作させることで最も高い選別速度が得られ、ノズル通過率すなわちノズルで破壊されずに通過するプロトプラストの割合 R_s は 60~70% であり、液滴化周波数は 9.0 kHz であった⁶⁾。

本論文では、近似計算モデルよりノズル通過時にプロトプラストに加わる最大の力（最大膜張力： T_{\max} ）を求める。計算時の定数の決定に際し、プロトプラストの機械的破壊が起きる時の変形率 K および破壊膜張力 T_d の実測値を用いた。そして壊れずにノズルを通過できる運転条件を、液流速 V_s 、ノズル口径 D_n 、ノズル絞り角度 A_s およびプロトプラスト径 D_p に対して求めた。また、これらの結果をもとに選別速度を向上させる条件を検討した。

2. ノズル内でプロトプラストの受ける力の近似計算モデル

2.1 流れ場の近似計算およびプロトプラスト破壊条件の仮定

図1にノズル内外の流体場を示す。A領域はノズルから噴出した液柱、B領域はノズル内部である。ノズル内部において、中心流れに垂直な方向で液流速差が大きくプロトプラストを押しつぶす力が働くと考えられる。この単位面積当たりの力を絞り圧力 P とする。この絞り圧力を近似計算するため、以下の仮定を行う。

(1) 領域A、Bの境界（ノズル先端部： $r \cos \theta = r_0$ ）までの流れ場は円錐の吸い込み流れ場であり、A領域の

流れ場はノズル先端部の最終速度分布を維持していると仮定する。

円錐の頂点を原点Oとする。粘性流体の吸い込み流れ場は、以下のように計算されている⁷⁾。

$$V_r(r, \theta) = \frac{3Q \left\{ \cos^2 \theta - \cos^2 \frac{A_s}{2} \right\}}{2\pi \left\{ 1 - \cos \frac{A_s}{2} \right\}^2 \left\{ 1 + 2 \cos \frac{A_s}{2} \right\} r^2} \quad (1)$$

ただし、 V_r は r 方向への液流速、 r は原点からの距離、 θ は原点からの角度、 Q は流量、 A_s はノズルの絞り角度である。

(2) 流れ場はプロトプラストによって乱されない。

(3) プロトプラストは流体と同じ速度で移動する。

次にノズル通過時にプロトプラストが破壊する条件として以下の仮定を行う。

(4) プロトプラストが破壊する時の変形率 $K=1.8$ とする。

ノズル内のプロトプラストは絞り圧力のみによって流れ方向に綫長変形しているとした。

近似計算モデルで用いるプロトプラストの変形率 K の値（長径 $2A$ /短径 $2B$ ）は、プロトプラストを高周波電界中でマクスウェル応力により変形させ、破壊した時の変形率を測定する末廣らの方法で求めた⁸⁾。実験で用いたニンジンプロトプラスト、キャベツプロトプラスト、レタスプロトプラストおよび山東菜プロトプラストの精製は別報⁹⁾に示す方法で行った。0.5 M マンニトール溶液に懸濁したニンジンおよびキャベツプロトプラストを電極間 400 μm の平行電極間に入れ 1 MHz の交流電圧を徐々に上昇させ、破壊する時の変形率が顕微鏡下で測定した。その結果、ニンジンプロトプラストでは $K=1.8 \pm 0.2$ （平均土標準偏差）、キャベツプロトプラストでは $K=1.8 \pm 0.3$ であった。このことから、近似計算モデルで用いるプロトプラストの変形率は $K=1.8$ とした。

プロトプラストはまた粘性ずり応力も受け^{9,10)}。実験条件範囲内で、ノズル内でプロトプラストに加わる粘性ずり応力が最も大きくなる条件（ノズル口径 150 μm、ノズル出口 8 m/s）では、ノズルから噴出された直後のプロトプラストと周辺流体流速との差 U_0 は、 $U_0 \leq 0.5$ m/s であった。そこで間隔 100 μm のスライドガラス間にキャベツプロトプラストを入れ、上部スライドガラスを高速で動かして $U_0=0.5$ m/s と同等の粘性ずり応力をプロトプラストに加える実験を行った。その結果、破壊しているプロトプラストは認められなかった。このことから実験条件範囲内では粘性ずり応力の影響は小さいと考えられ、本近似計算ではこの影響を無視した。

(5) プロトプラストはノズル内で最大膜張力 T_{\max} が

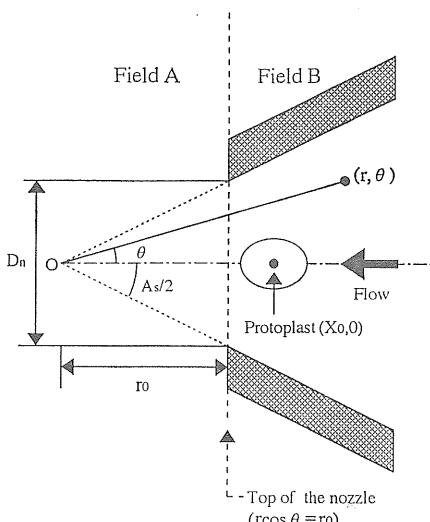


図1 ノズル内外の流体場

O: 極座標 (r, θ) , A_s : ノズル絞り角度, D_n : ノズル口径, r_0 : 原点 O からノズル先端中心部間での距離, $(X_0, 0)$: プロトプラスト中心部座標

Fig. 1 Liquid flow at the nozzle.

O: the origin of the polar coordinates (r, θ) , A_s : the squeezing angle of the nozzle, D_n : the nozzle diameter, r_0 : the distance from O to top of the nozzle, $(X_0, 0)$: the coordinates of the center of the protoplast.

一瞬でも破壊膜張力 T_d 以上の値となれば破壊する。すなわちプロトプラストがノズルで破壊される条件は、 $T_{\max} \geq T_d$ であると仮定する。

2.2 プロトプラスト周りに発生する膜張力 T

絞り圧力によって橢円状に変形した $\theta=0$ 上のプロトプラスト {中心座標 $(X_0, 0)$ } のモデルを図2に示す。ここでプロトプラスト表面の座標を $X=r \cos \theta$, $Y=r \sin \theta$ で表す。絞り圧力 $P(X, Y)$ は次式のようになる¹¹⁾。

$$P(X, Y) = \frac{\rho \{V^2(X, 0) - V^2(X, Y)\}}{2} \quad (2)$$

ただし、 $V(X, Y)$ はプロトプラスト表面の点 (X, Y) の液流速、 $V(X, 0)$ は中心軸上 $(X, 0)$ の液流速、 ρ は溶液の密度である。

(2)式は完全流体の絞り圧力を与えるものであり、(1)式の粘性流体場の V を(2)式に用いることは矛盾している。しかしながら、粘性流体の絞り圧力の式は極めて複雑であるため、(2)式を近似計算に用いた。ノズル内流れ場の計算値は、粘性流体と完全流体とではノズル動作条件範囲内において最大 15% 程度の相違である。粘性流体としてより正確な流れ場を求めた後、完全流体として簡易に絞り圧力を計算する手順は論理的には矛盾しているが、この程度の相違の範囲内では実用上良い近似を与えるものと考えられる。さらに、プロトプラストの破壊はその破壊膜張力と絞り圧力とで決定されるが、実際には前者の分布が大きいため、後者を上述の手順で計算してもプロトプラスト破壊を予測するうえで生ずる誤差は無視できる程度と考えられる。

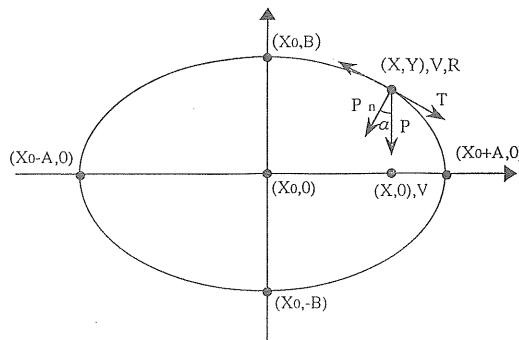


図2 変形したプロトプラストの絞り圧力と膜張力
 P : 絞り圧力, P_n : 絞り圧力の法線方向成分, V : 液流速, R : 曲率半径

Fig. 2 Squeezing pressure, P , and the membrane tension of a deformed protoplast.
2A: the major axis, 2B: the minor axis, P : the squeezing pressure, P_n : normal squeezing pressure, V : the spray velocity, R : the radius of curvature.

このとき、点 (X, Y) 点に発生する膜張力 T は

$$T = \frac{P_n R(X, Y)}{2} = \frac{P(X, Y) \cos(\alpha) R(X, Y)}{2} \quad (3)$$

となる¹²⁾。ただし、 $R(X, Y)$ はプロトプラスト表面の点 (X, Y) における曲率半径、 P_n は P の法線方向成分、 α は X 軸に直角な断面と法線が作る角度である。

(1)(2)(3)式を用いて、ノズル口径 $D_n=200 \mu\text{m}$ 、ノズル絞り角度 $A_s=25^\circ$ 、プロトプラスト径 $D_p=30 \mu\text{m}$ 、ノズル出口液流速 $V_s=5 \text{ m/s}$ 、プロトプラストの中心位置 $X_0=r_0+20 \mu\text{m}$ 、プロトプラスト変形率 $K=1.8$ における流れ中心軸上 ($\theta=0$) のプロトプラストの周りに発生する膜張力を $X_0-A \leq X \leq X_0+A$ の範囲で計算した。 $A=18 \mu\text{m}$ である((5)式)。その結果を図3に示す。膜張力 T は $X=X_0-A$ と $X=X_0+A$ で最も小さくなり、 $X=X_0$ で最大になる。従って X_0 が最も膜破壊の起こりやすい場所と考えられ、そこでの膜張力を $T_m(X_0)$ とする。すなわち

$$T_m(X_0) = \frac{P(X_0, B) R(X_0, B)}{2} \quad (4)$$

ここで A と B は、変形してもプロトプラスト円周が変わらないとすれば直径 D_p と変形率 K から以下のように算出できる¹³⁾。

$$B = \frac{D_p}{1.5(K+1) + \sqrt{K}} \quad (5-1)$$

$$A = KB \quad (5-2)$$

2.3 ノズル内を通過する際の最大膜張力 T_{\max}

$r_0-50 \mu\text{m} \leq X_0 \leq r_0+50 \mu\text{m}$ における $T_m(X_0)$ を計算(計算条件; $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$)を行った。その結果を図4に示す。 $T_m(X_0)$ は

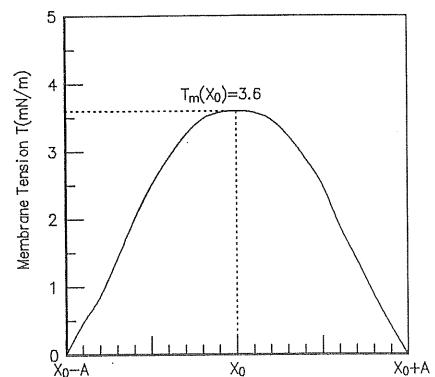


図3 粒子径 $D_p=30 \mu\text{m}$, $A=18 \mu\text{m}$, 变形率 $K=1.8$, プロトプラスト中心位置 $X_0=r_0+20 \mu\text{m}$ における粒子周りに発生する膜張力 T

Fig. 3 Membrane tension, T generated by the squeezing pressure around the protoplast with $D_p=30 \mu\text{m}$, $A=18 \mu\text{m}$, $K=1.8$, $X_0=r_0+20 \mu\text{m}$.

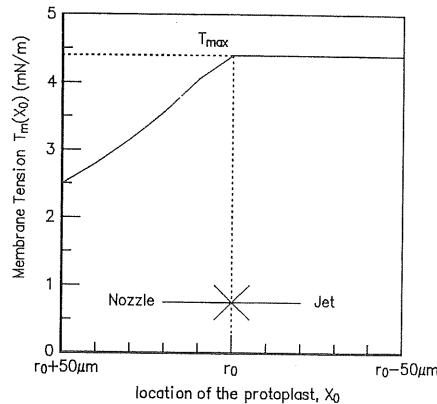


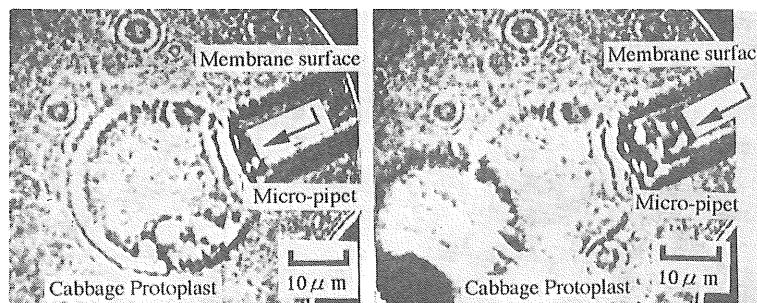
図4 ノズル内のプロトプラスト位置 X_0 に対する膜張力 T_m の変化

Fig. 4 Variation of the membrane tension, T_m , as a function of the location of a protoplast, X_0 , in a nozzle.

ノズル先端部に近づくほど大きくなり、 $X_0 \leq r_0$ で最大になった。このときの破壊膜張力 T_{\max} とする。しかし、実際にはノズルから噴出した後の液柱内部液流速分布は均一になる方向に変化するので、実際には $r_0 = X_0$ でプロトプラストは最大膜張力 T_{\max} を受けていると考えられる。以下、 T_{\max} は(4)式に (r_0, θ) での液流速および $K=1.8$ を代入し数値計算して求めた。

3. 植物プロトプラストの破壊膜張力 T_d の実測

下記4種のプロトプラストの破壊膜張力 T_d をマイクロピペット吸引法を用いて測定した。この方法は、図5(a)のようにマイクロピペット内の圧力を低下させマイクロピペットの先にプロトプラストを吸引させて図5(b)のように破壊させることで、膜が破壊したときの圧力 P_d 、マイクロピペットの半径 D_m およびプロトプラストの半径 D_p より破壊膜張力 T_d を次式のように求める



(a) Cabbage protoplast suction by micro-pipet (b) Before membrane surface breakdown

図5 マイクロピペット吸引法によるキャベツプロトプラストの破壊膜張力 T_d の測定
破壊条件: $P_d=1.3 \text{ kPa}$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $D_m=10 \mu\text{m}$, $T_d=4.8 \text{ mN/m}$.

Fig. 5 Measurement of the membrane tension at the breakdown of a cabbage protoplast, T_d , by the micropipet-suction method.
Breakdown conditions: $P_d=1.3 \text{ kPa}$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $D_m=10 \mu\text{m}$, $T_d=4.8 \text{ mN/m}$.

ことができる¹⁴⁾。

$$T_d = \frac{P_d D_m}{4 \left(1 - \frac{D_m}{D_p} \right)} \quad (6)$$

温度 20°C の 0.5 M マンニトール溶液中において、それぞれ約 20 個を測定した結果、破壊膜張力 T_d (平均値±標準偏差) は小さい順に以下のようであった。山東菜プロトプラスト; $3.8 \pm 0.7 \text{ mN/m}$ (直径 $25 \pm 8 \mu\text{m}$)、レタスプロトプラスト; $4.4 \pm 0.8 \text{ mN/m}$ (直径 $33 \pm 6 \mu\text{m}$)、キャベツプロトプラスト; $5.0 \pm 0.6 \text{ mN/m}$ (直径 $28 \pm 10 \mu\text{m}$)、ニンジンプロトプラスト; $7.8 \pm 1.4 \text{ mN/m}$ (直径 $57 \pm 13 \mu\text{m}$)。

4. 近似計算モデルと実測値との比較

以下に近似計算モデルによる計算結果と実験的に測定した結果の比較を行い、このモデルの誤差および適応範囲を検討した。壊れずにノズルを通過する割合（ノズル通過率： R_s ）の測定は別報¹⁵⁾に示す方法で行った。液滴回収は、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⁶⁾。実験では、細胞を含んだ懸濁液のサンプル液は 0.5 M マンニトール溶液を用い、温度は約 20°C で行った。

4.1 液流速 V_s に対する最大膜張力 T_{\max} の変化

上記4種のプロトプラストを用いて、液流速 V_s に対するノズル通過率 R_s の変化をそれぞれ測定した。ノズルは、口径 $D_n=200 \mu\text{m}$ 、絞り角度 $A_s=25^\circ$ のものを用いた。ノズル通過率は、プロトプラスト径 D_p に大きく影響されるため、 $D_p=30 \sim 35 \mu\text{m}$ のプロトプラストを対象に測定を行った。

各プロトプラストのノズル通過率 R_s を図6に示す。ノズル通過率は液流速が高くなるほど小さくなり、同じ液流速では破壊膜張力 T_d の大きいプロトプラストほど

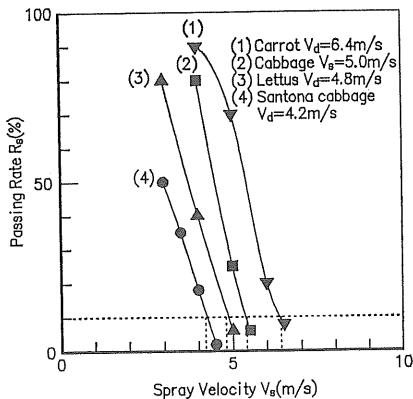


図 6 ニンジン、キャベツ、レタス、山東菜プロトプラストの液流速 V_s に対するノズル通過率 R_s の変化
(実験条件: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30\sim35 \mu\text{m}$)

Fig. 6 Variation of passing rate, R_s , for carrot, cabbage, lettuce and santona cabbage protoplasts as a function of spray velocity, V_s . Experimental conditions: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30\sim35 \mu\text{m}$.

ノズル通過率が高くなかった。

ここで、実測時にプロトプラストが相当程度に破壊されている様子の認められる $R_s=10\%$ のときの液流速を破壊液流速 V_d とし、これを計算値との比較用いた。

理想的には、実測値からの外挿で $R_s=0\%$ となる液流速と、対象とするプロトプラストのうち強度最大のものが破壊されるときの液流速計算値（プロトプラスト径の分布範囲のうち最小値、かつ K および T_d の最大値を用いた計算値）とで比較を行なうべきである。しかしながら、 R_s はノズル通過前後のサンプルを採取して顕微鏡視野内に存在する正常形状のプロトプラスト数を比較して求めているため、 R_s が 10% 以下では測定誤差が大きくなることと、 K および T_d の測定精度上の制約から、上記の破壊液流速と、 D_p 分布範囲内の最小径および K 、 T_d の平均値を用いた計算値、との比較を行なった。ノズル通過後の正常形状プロトプラストは $R_s=10\%$ 程度では $D_p=30 \mu\text{m}$ 付近の小さいプロトプラストが多く、 D_p の大きいプロトプラストの方が破壊されやすいことが認められたことからも、計算値として D_p 分布の最小値を用いた値が適当であると考えた。

破壊膜張力 T_d と破壊液流速 V_d との関係を図 7 に示す。また、近似計算モデルを用いて計算した T_{\max} と液流速 V_s の関係も示す。実測値と計算値はほぼ一致することから、近似計算モデルで算出した最大膜張力は実際に近い値であると考えられ、従ってこのモデルからプロトプラストの破壊液流速を求められるものと思われる。

近似計算モデルから得られる T_{\max} と液流速 V_s の関

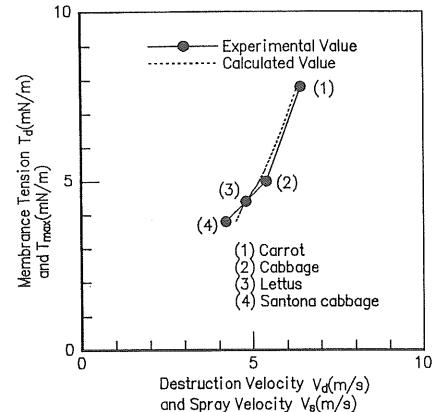


図 7 ニンジン、キャベツ、レタス、山東菜プロトプラストの破壊流速 V_d と破壊膜張力 T_d の関係。
(実験条件: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30\sim35 \mu\text{m}$, 計算条件: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$)

Fig. 7 Relationship between the destruction velocity, V_d , and the membrane tension, T_d , for carrot, cabbage, lettuce and santona protoplasts.
Experimental conditions: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30\sim35 \mu\text{m}$.
Calculated conditions: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$.

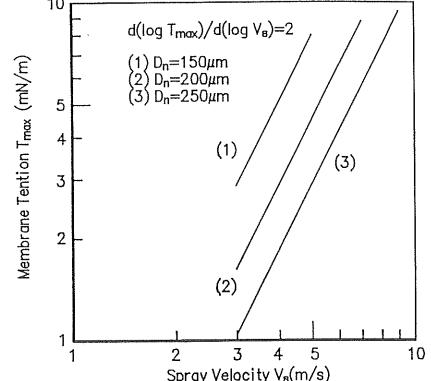


図 8 プロトプラストにおける最大膜張力 T_{\max} と液流速 V_s の関係
(計算条件: $D_n=150\sim250 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$)

Fig. 8 Theoretical relationship between the maximum membrane tension, T_{\max} , and the spray velocity, V_s .
Calculated conditions: $D_n=150\sim250 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$.

係 (計算条件: $D_n=150, 200, 250 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$) を図 8 に示す。どのノズル口径でも $d(\log T_{\max})/d(\log V_s)=2$ 、すなわち T_{\max} が V_s の 2 乗に比例する結果が得られた。

4.2 ノズル口径 D_n に対する最大膜張力 T_{\max} の変化

ノズル口径 $D_n=150, 175, 200, 220 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$ の4種類のノズルを用い、 $D_p=30\sim35 \mu\text{m}$ のキャベツプロトプラストの液流速 V_s に対するノズル通過率 R_s の変化を測定した。その結果を図9に示す。ノズル通過率 R_s は、ノズル口径が大きいほど同じ液流速でも高い。このことは、ノズル口径が大きいほどプロトプラストが破壊し難いことを示している。

次に破壊液流速 V_d とノズル口径 D_n の関係を図10に示す。また、近似計算モデルによる T_{\max} がキャベツプロトプラストの破壊膜張力 $T_d=5.0 \text{ mN/m}$ と等しくなる液流速 V ($T_d=5.0$) も点線で示す。実測値と計算値はほぼ一致することから、プロトプラスト破壊に対するノズル口径の影響も近似計算モデルで算出できると考えられる。

近似計算モデルから得られる T_{\max} と D_n の関係(計算条件; $A_s=25^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$, $V_s=5 \text{ m/s}$)を図11に示す。グラフより、両者の関係は $d(\log T_{\max})/d(\log D_n)=-2$ 、すなわち T_{\max} は D_n の2乗に反比例する結果が得られた。

4.3 ノズル絞り角度 A_s に対する最大膜張力 T_{\max} の変化

ノズル口径 $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=2, 25, 52, 90, 120^\circ$ の5種類のノズルを用いて、プロトプラスト径 $D_p=30$

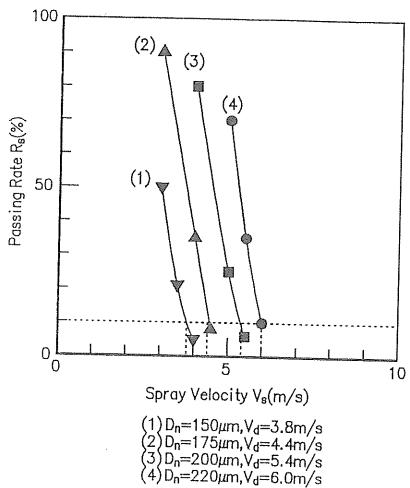


図9 キャベツプロトプラストの液流速 V_s に対するノズル通過率 R_s の変化
(実験条件: $D_n=150, 175, 200, 220 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30\sim35 \mu\text{m}$)

Fig. 9 Variation of the passing rate, R_s , of cabbage protoplasts as a function of the spray velocity, V_s .

Experimental conditions: $D_n=150, 175, 200, 220 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30\sim35 \mu\text{m}$.

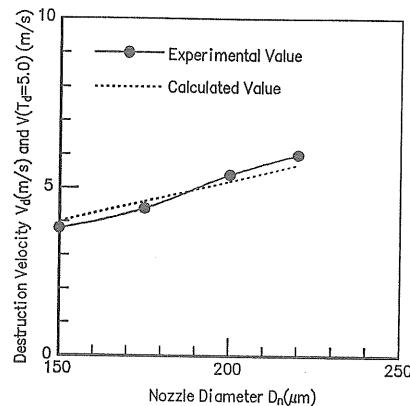


図10 キャベツプロトプラストのノズル口径 D_n と破壊液流速 V_d (実測値)、および V ($T_d=5.0$) とノズル口径 D_n (計算値) の関係
(実験条件: $D_n=150\sim220 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30\sim35 \mu\text{m}$ 、計算条件: $D_n=150\sim220 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$, $T_d=5.0 \text{ mN/m}$)

Fig. 10 Relationship between the destruction velocity, V_d and the nozzle diameter D_n and between V ($T_d=5.0$) and D_n for cabbage protoplasts.

Experimental conditions: $D_n=150\sim220 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30\sim35 \mu\text{m}$.

Calculated conditions: $D_n=150\sim220 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$, $T_d=5.0 \text{ mN/m}$.

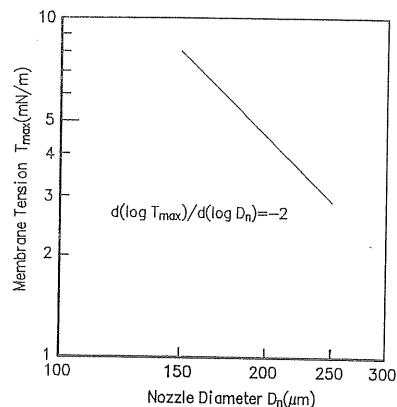


図11 近似計算モデルによる最大膜張力 T_{\max} とノズル口径 D_n の関係
(計算条件: $D_n=150\sim250 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$, $V_s=5 \text{ m/s}$)

Fig. 11 Theoretical relationship between the membrane tension, T_{\max} and the nozzle diameter D_n .

Calculated conditions: $D_n=150\sim250 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$, $V_s=5 \text{ m/s}$.

~35 μm のキャベツプロトプラストの液流速に対するノズル通過率 R_s を測定した。その結果を図12に示す。ノズル通過率 R_s は、同じ液流速で比較すると $A_s=25^\circ$ のノズルで最も高くなつた。 $A_s<25^\circ$ では、ほとんど

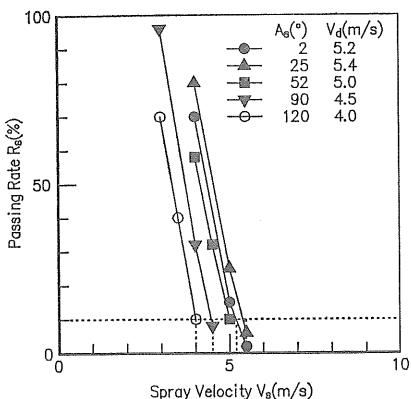


図 12 キャベツプロトプラストの液流速 V_s に対するノズル通過率 R_s の変化
(実験条件: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=2\sim120^\circ$, $D_p=30\sim35 \mu\text{m}$)

Fig. 12 Variation of the passing rate, R_s , of cabbage protoplasts as a function of spray velocity, V_s .
Experimental conditions: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=2\sim120^\circ$, $D_p=30\sim35 \mu\text{m}$.

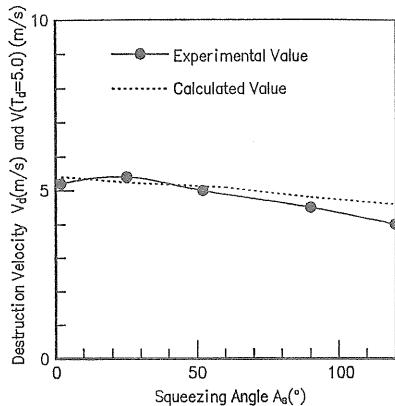


図 13 キャベツプロトプラストを用いた破壊液流速 V_d とノズル絞り角度 A_s (実測値), および $V(T_d=5.0)$ と A_s (計算値) の関係
(実験条件: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=2\sim120^\circ$, $D_p=30\sim35 \mu\text{m}$, 計算条件: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=2\sim120^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$, $T_d=5.0 \text{ mN/m}$)

Fig. 13 Relationship between the destruction velocity, V_d , and the squeezing angle, A_s and between $V(T_d=5.0)$ and A_s for cabbage protoplasts.
Experimental conditions: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=2\sim120^\circ$, $D_p=30\sim35 \mu\text{m}$.
Calculated conditions: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=2\sim120^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$, $T_d=5.0 \text{ mN/m}$.

$A_s=25^\circ$ と変わらなく, $A_s>25^\circ$ では A_s が大きいほどノズル通過率は低下した。

図 13 にノズル絞り角度 A_s と破壊液流速 V_d の関係を

示す。また、近似計算モデルより得られる A_s と $V(T_d=5.0)$ の関係も合わせて示す。実測値と計算値は $A_s \leq 90^\circ$ の条件でほぼ同様の値を得たが、(a) A_s が増加するほど実験値と計算値の差が大きくなる、(b) 実験値では $A_s=25^\circ$ で V_d が最大であるが、計算値では A_s が小さいほど $V(T_d=5.0)$ が高くなる、の 2 点に違いが見られた。(a)の原因は、近似計算モデルでは流れ垂直方向の速度差だけが絞り圧力としてプロトプラストに力を及ぼすと仮定したが、実際にはノズル絞り角度 A_s が大きくなると流れ方向の液流速差も大きくなり、絞り圧力と同時に流れ方向に引っ張る力が働き、実際の方がより破壊されやすくなるためと考えられる。(b)の原因は、 A_s が 25° より小さくなるとプロトプラストを流れの中心に維持する作用が小さくなり、中心からはずれて絞り圧力が増加し、破壊されやすくなるためと考えられる。

次に、近似計算モデルから得られる A_s に対する T_{\max} の関係 (計算条件: $D_n=150, 200, 250 \mu\text{m}$, $A_s=2\sim120^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$, $V_s=5 \text{ m/s}$) を図 14 に示す。どのノズル口径でも A_s が小さいほど T_{\max} が小さかった。また、 T_{\max} に対する A_s の影響はノズル口径 D_n が小さいほど大きく、 $D_n=250 \mu\text{m}$ では T_{\max} はほとんど絞り角度の影響を受けないと考えられる。

また、各絞り角度における T_{\max} と、 $A_s=25^\circ$ での T_{\max} との比率 β (絞り角度定数) を図 15 に示す。この比率は、 T_{\max} を数式化する際に用いる。

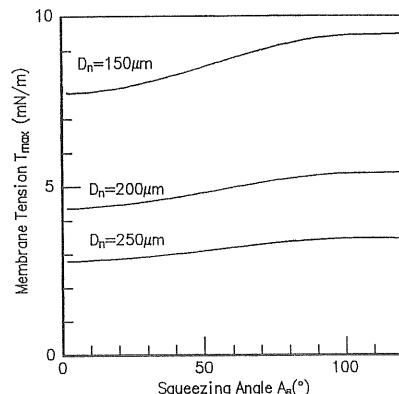


図 14 近似計算モデルによる最大膜張力 T_{\max} とノズル絞り角度 A_s の関係
(計算条件: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=2\sim120^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$, $V_s=5 \text{ m/s}$)

Fig. 14 Theoretical relationship between the membrane tension, T_{\max} and the squeezing angle, A_s .
Calculated conditions: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=2\sim120^\circ$, $D_p=30 \mu\text{m}$, $K=1.8$, $V_s=5 \text{ m/s}$.

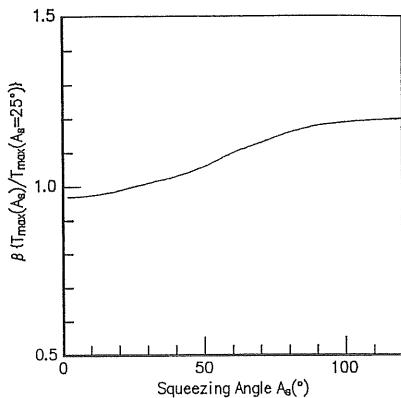


図 15 $T_{\max}(A_s)$ と $T_{\max}(A_s=25^\circ)$ との比率 β の A_s に対する変化

Fig. 15 Variation of the ratio, β , of $T_{\max}(A_s)/T_{\max}(A_s=25^\circ)$ as a function of the squeezing angle, A_s .

4.4 プロトプラスト径 D_p に対する最大膜張力 T_{\max} の変化

ノズル口径 $D_n=200 \mu\text{m}$, ノズル絞り角度 $A_s=25^\circ$ のノズルを用いて、直徑 D_p の異なるキャベツプロトプラストの液流速に対するノズル通過率を測定した。 $D_p=20 \sim 45 \mu\text{m}$ の範囲で $5 \mu\text{m}$ 刻みで分割した。その結果を図 16 に示す。ノズル通過率 R_s はプロトプラスト径 D_p

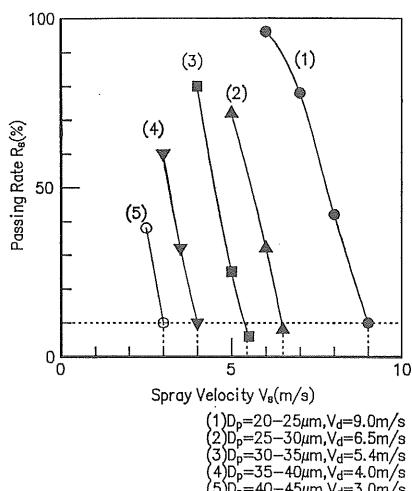


図 16 キャベツプロトプラストの液流速 V_s に対するノズル通過率 R_s の変化
(実験条件: $D_n=200 \mu\text{m}, A_s=25^\circ, D_p=20 \sim 40 \mu\text{m}$)

Fig. 16 Variation of the passing rate, R_s , of cabbage protoplasts as a function of spray velocity, V_s .

Experimental conditions: $D_n=200 \mu\text{m}, A_s=25^\circ, D_p=20 \sim 40 \mu\text{m}$.

によってかなり違いがあり、 $V_s=3.6 \text{ m/s}$ では $D_p=40 \sim 45 \mu\text{m}$ のプロトプラストは 90% が破壊されるのにに対し、 $D_p \leq 35 \mu\text{m}$ のプロトプラストはほとんど破壊されていない。また、 $V_s=6.0 \text{ m/s}$ では $D_p=20 \sim 25 \mu\text{m}$ では $R_s=96\%$ 、 $D_p=25 \sim 30 \mu\text{m}$ では $R_s=32\%$ 、 $D_p \geq 30 \mu\text{m}$ ではほとんどのプロトプラストは破壊されている。

次にプロトプラスト径 D_p と破壊液流速 V_d の関係を図 17 に示す。また、近似計算モデルより得られた $V (T_d=5.0)$ と D_p の関係（計算条件; $D_n=200 \mu\text{m}, A_s=25^\circ, K=1.8, T_d=5.0 \text{ mN/m}$ ）も点線で示す。実測値、計算値ともに D_p が大きくなるほど V_d が急激に小さくなり、両者はほぼ一致している。図 18 に近似計算モデルより得られる D_p と T_{\max} の関係（計算条件; $D_n=200 \mu\text{m}, A_s=25^\circ, K=1.8, V_s=5.0 \text{ m/s}$ ）を示す。両者の関係は $d(\log T_{\max})/d(\log D_p)=3$ 、すなわち T_{\max} は D_p の 3 乗に比例する結果が得られた。

5. 最大膜張力 T_{\max} の式化

4.1, 4.2, 4.4 に述べた比例関係および 4.3 の絞り角度定数 β を用いると、最大膜張力 T_{\max} はより簡易に次式で表すことができる。

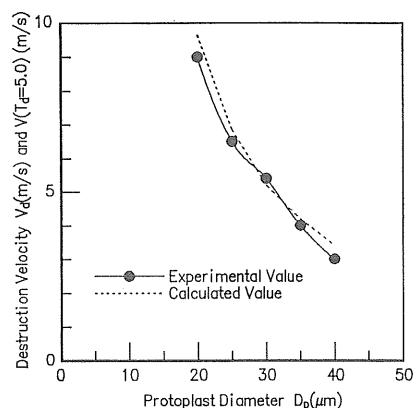


図 17 キャベツプロトプラストを用いた破壊液流速 V_d とプロトプラスト径 D_p (実測値)、および $V (T_d=5.0)$ と D_p (計算値) の関係
(実験条件: $D_n=200 \mu\text{m}, A_s=25^\circ, D_p=20 \sim 40 \mu\text{m}$ 、計算条件: $D_n=200 \mu\text{m}, A_s=25^\circ, D_p=20 \sim 40 \mu\text{m}, K=1.8, T_d=5.0 \text{ mN/m}$)

Fig. 17 Relationship between the destruction velocity, V_d and the protoplast diameter, D_p , and between $V (T_d=5.0)$ and D_p for cabbage protoplasts.

Experimental conditions; $D_n=200 \mu\text{m}, A_s=25^\circ, D_p=20 \sim 40 \mu\text{m}$.

Calculated conditions; $D_n=200 \mu\text{m}, A_s=25^\circ, D_p=20 \sim 40 \mu\text{m}, K=1.8, T_d=5.0 \text{ mN/m}$.

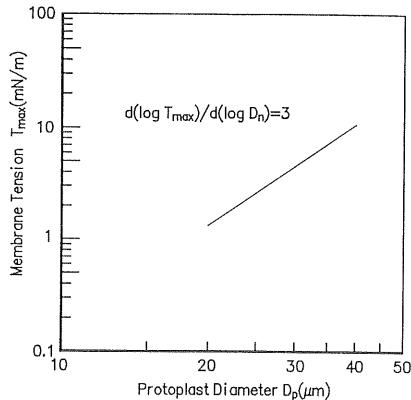


図 18 近似計算モデルによる最大膜張力 T_{\max} と粒径 D_p の関係
(計算条件: $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=20 \sim 40 \mu\text{m}$, $K=1.8$, $V_s=5 \text{ m/s}$)

Fig. 18 Relationship between the membrane tension, T_{\max} and the protoplast diameter, D_p . Calculated conditions; $D_n=200 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$, $D_p=20 \sim 40 \mu\text{m}$, $K=1.8$, $V_s=5 \text{ m/s}$.

$$T_{\max} = \frac{C_0 \beta V_s^2 D_p^3}{D_n^2} \quad (7)$$

ただし、 C_0 は $A_s=25^\circ$, $K=1.8$ の場合の定数である。

(7)式は、実験条件範囲で成立している(1)～(5)式の関係を整理したものであり、(7)式の適用条件範囲は以下のようである。

$$\begin{aligned} 3 \text{ m/s} &\leq V_s \leq 9 \text{ m/s}, \\ 150 \mu\text{m} &\leq D_n \leq 220 \mu\text{m}, \\ 20 \mu\text{m} &\leq D_p \leq 40 \mu\text{m}, \\ 2^\circ &\leq A_s \leq 90^\circ \end{aligned}$$

また、 $D_p=200 \mu\text{m}$, $A_s=25^\circ$ ($\beta=1$), $V_s=5 \text{ m/s}$, $D_p=30 \mu\text{m}$ のときの T_{\max} を計算し、これを(7)式に代入することで C_0 を求めたところ、 $C_0=267.8 \text{ Ns}^2/\text{m}^4$ であった。しかし、 C_0 は変形率 K によって変わるために、温度、プロトプラストの種類、単離させるための酵素、単離に要した時間、プロトプラスト懸濁液の種類およびプロトプラスト懸濁液の浸透圧に影響されるはずである。

6. プロトプラストのノズル通過率向上 および選別速度向上条件の検討

最大膜張力 T_{\max} を小さくしてノズル通過率を向上させるためには、(7)式より V_s , D_p を小さく、 D_n を大きくする必要がある。また、 T_d を大きくして破壊し難くすることも重要である。

ノズル通過率向上のため、プロトプラスト懸濁液の浸透圧を高くする効果が報告されているが³⁾、これはプロトプラスト体積が小さくなる (D_p 小) こと、および細

胞膜密度が高くなる (T_d 大) ことによるものであると考えられる。さらに、プロトプラスト懸濁液の温度を低くする効果も報告されているが³⁾、これは膜の流動性が低下し T_d が高くなることによるものと思われる。

次に選別速度向上条件について考察する。一般にノズルから噴出した液柱を液滴化する条件は¹⁵⁾

$$f < \frac{V_s}{\pi D_j} \quad (8)$$

ただし、 D_j はノズルから噴出した液柱径、 f は液柱表面の乱れ波長、 f は液滴化可能周波数である。ノズル絞り角度 $A_s=25^\circ$ のノズルでは、本実験では $D_j=0.92 D_n$ の関係であったため、最高液滴化周波数 f_{\max} は

$$f_{\max} = \frac{V_s}{0.92 \pi D_n} \quad (9)$$

である。大きい径のプロトプラストほど破壊されやすいことから、(7)式において選別すべきプロトプラストの最大径 D_{pm} に対する T_{\max} の関係を(9)式に代入し、また仮定(5)すなわち $T_{\max}=T_d$ を代入すると、

$$\begin{aligned} f_{\max} &= \frac{1}{0.92 \pi \sqrt{C_0}} \sqrt{\frac{T_d}{\beta D_{pm}^3}} \\ &= C_1 \sqrt{\frac{T_d}{\beta D_{pm}^3}} \end{aligned} \quad (10)$$

となる。ただし、 $C_1=0.02 \text{ m}^2/(\text{N}^{1/2}\text{s})$ である。(10)式は、最高液滴化周波数 f_{\max} はノズル口径 D_n および液流速 V_s に影響されず、選別したいプロトプラストの破壊膜張力 T_d と最大径 D_{pm} によって決定することを示している。

選別速度 S は液滴化周波数 f とノズル通過率 R_s の積であり、 D_{pm} の値によって変化する。 D_{pm} が大きい条件 (V_s 小、 D_n 大) では f は減少、 R_s は増加し、反対に D_{pm} が小さい条件では f は増加、 R_s は減少する。すなわち、選別速度 S は選別すべきプロトプラストの直径分布内で極大点を持つ。別報⁶⁾ のキャベツプロトプラストの選別を行った実験では、最も選別速度の高くなった条件で、ノズル通過率 $R_s=60\%$ 、液滴化周波数 $f_{\max}=9.0 \text{ kHz}$ であった。直径は $D_p=28 \pm 10 \mu\text{m}$ (平均土標準備差) であり、60% のプロトプラストが $D_p \leq 30 \mu\text{m}$ に分布している。したがって、この運転条件で破壊を受けない最大径 D_{pm} は $30 \mu\text{m}$ である。(10)式にこの D_{pm} の値および $T_d=5 \text{ mN/m}$ を代入すると $f_{\max}=8.6 \text{ kHz}$ となり、実験的に得られた最大周波数とほぼ一致する値が得られる。

D.W. Galbraith らは、ノズル口径 $D_n=106, 155, 204 \mu\text{m}$ のノズルを用いてタバコプロトプラストの最高液滴化周波数が 5 kHz になるよう液流速を変えてノズル通過率を測定しており、 $D_n=106 \mu\text{m}$ で $R_s=84\%$ 、

$D_n=155 \mu\text{m}$ で $R_s=85\%$, $D_n=204 \mu\text{m}$ で $R_s=91\%$ とほぼ同じ値になっている^⑨. T_d が等しければ大きい径のプロトプラスチックほど破壊されやすいため, R_s が同一の場合, D_{pm} も同一であると考えられる. (10)式は T_d が等しく D_{pm} が同一であれば f_{max} は一定値であることを示しており, 上記実験結果は(10)式を支持していると考えられる.

ノズル口径や液流速の値は f_{max} には影響を与えないが, ノズル内の流れを層流状態に保たなければならぬこと¹⁶⁾, ノズルから液柱を安定して噴出し, 細胞の解析を行うためには液流速が 3 m/s 以上必要であること^⑩, サンプルをノズルから噴出しても安定した液滴形成ができること¹⁷⁾, 口径 250 μm より大きいノズルで作られた液滴は偏向が難しいこと^⑪, およびプロトプラスチックの存在によって流れが大きく乱れない D_p , D_n の実験条件より, 以下のような範囲で選択を行う必要がある.

$$150 \mu\text{m} \leq D_n \leq 250 \mu\text{m} \quad (11)$$

$$3 \text{ m/s} \leq V_s \leq \frac{2300\nu}{D_n} \quad (12)$$

$$\frac{D_p}{D_n} \leq 0.26 \quad (13)$$

ただし, ν はノズルから噴出する液体の動粘性係数である.

7. ま と め

植物プロトプラスチック用セルソータのノズル内で受けるプロトプラスチックの膜張力およびプロトプラスチックが破壊するときの液流速を近似計算し, 実測値との比較を行い実験条件範囲内で良い一致が見られた. また, プロトプラスチック選別時の最大液滴化周波数は破壊膜張力および直径を用いて計算できることを示した. 最大液滴化周波数を向上するためには直径を小さくすること, 破壊膜張力を

高くすることが有効であり, ノズル口径および液流速にはよらない結果が得られた. 従来型のノズルを用いては, 本論文で示した最大液滴化周波数 f_{max} より高い値を得ることは難しく, さらに高速度の細胞選別を行うためには, 例えは太い液柱を空気流で絞り込んでから液滴化させる等の特殊なノズルが必要であると思われる.

参 考 文 献

- 1) K. Redenbaugh : Z. Pflanzenphysiol., 107 (1982) 65
- 2) D.W. Galbraith : Cytometry, 8 (1987) 60
- 3) K.R. Harkins : Physical Plant, 60 (1984) 43
- 4) C.L. Afonso, K.R. Harkins, M. Thomas Comp-ton, A.E. Krejci and D.W. Galbraith : Biotechnology, 3 (1985) 811
- 5) 山形 光, 高橋 澄 : Bio Industry, 4 (1987) 45
- 6) 川上友則, 水野 彰 : 静電気学会誌, 16 (1992) 411
- 7) 日本流体学会 : 流体力学ハンドブック, p. 90, 丸善 (1987)
- 8) 原 雅則, 末廣純也, 外村浩之 : 静電気学会誌, 15 (1991) 48
- 9) 日本流体学会 : 流体力学ハンドブック, p. 208, 丸善 (1987)
- 10) 日本流体学会 : 流体力学ハンドブック, p. 227, 丸善 (1987)
- 11) 日本流体学会 : 流体力学ハンドブック, p. 34, 丸善 (1987)
- 12) 国清行夫, 木本知男, 長尾 健, 森北 肇 : 演習水力学, p. 10, 森北出版 (1981)
- 13) 宮本敏雄, 松田保行 : 基礎数学ハンドブック, p. 194, 森北出版 (1976)
- 14) J. Wolfe and P.L. Steponkus : Plant Physiol., 71 (1983) 276
- 15) M.R. Melamed, T. Lindomo and M.L. Mendelsohn : *Flow Cytometry and Sorting*, Second Edition, p. 148, John Wiley & Sons, Toronto (1990)
- 16) M.R. Melamed, T. Lindomo and M.L. Mandelsohn : *Flow Cytometry and Sorting*, Second Edition, p. 27, John Wiley & Sons, Toronto (1990)
- 17) 川上友則, 水野 彰 : 静電気学会講演論文集'90, p. 275, 静電気学会 (1990)