

千葉工業大学

博士学位論文

植物細胞壁物性の磁場制御
とそのメカニズムの研究

Magnetic Control of Elasticity of Plant's Cell Wall
and its Mechanism

平成 22 年 3 月

藤村 祐

目 次

序章	1
1 背景	
2 研究目的	
3 各章の構成	
4 用語説明	
第1章 成熟植物細胞への磁場効果	
1-1 背景・目的	7
1-2 方法	9
1-3 結果	17
1-4 考察	20
1-5 結論	21
1-6 文 献	22
第2章 再生プロトプラストへの磁場効果	
2-1 磁場下再生プロトプラストの弾性測定	
2-1-1 背景・目的	23
2-1-2 方法	25
2-1-3 結果	30
2-1-4 考察	38
2-1-4 結論	42
2-2 磁場下再生プロトプラスト表面のセルロース分子数密度測定	
2-2-1 背景・目的	43
2-2-2 方法	44
2-2-3 結果	46
2-2-4 考察	49
2-2-5 結論	50
2-3 磁場下再生プロトプラストの弾性へあたえる膨潤の影響	
2-3-1 背景・目的	51
2-3-2 方法	52
2-3-3 結果	53
2-3-4 考察	55
2-3-5 結論	56
2-4 おわりに	57
2-5 文 献	58

第3章 再生プロトプラスト弾性にあたる磁場効果のメカニズム	
3-1 セルロースマイクロフィブリルの疎水エネルギーへの磁場効果	
3-1-1 背景・目的	59
3-1-2 方法	61
3-1-3 結果	67
3-1-4 考察	73
3-1-5 結論	74
3-2 構成分子ゲルの弾性への磁場効果	
3-2-1 背景・目的	75
3-2-2 方法	76
3-2-3 結果	81
3-2-4 考察	89
3-2-5 結論	90
3-3 マイクロフィブリルの異方性反磁性による磁場配向と細胞壁弾性の理論的解析	
3-3-1 背景・目的	91
3-3-2 方法	92
3-3-3 結果	93
3-3-4 考察	95
3-3-5 結論	96
3-4 磁場によるセルロースマイクロフィブリルの配向の直接観察	
3-4-1 背景・目的	99
3-4-2 方法	100
3-4-3 結果	102
3-4-4 考察	119
3-4-5 結論	120
3-5 おわりに	121
3-6 文献	122
総括	124
研究業績	
謝辞	

序章

1 背景

動物のように移動できない植物は、その生育場所における環境変化に適応しながら生育する必要がある。外部環境の変化は、植物に対して刺激として作用し、植物はその刺激に適応できる形態を形成していく。この適応方法には、一般に、遺伝子発現が変化適応する方法と、遺伝子発現に依存せず機能性生体分子自身の自己組織化や機能に変化適応する方法とがあり、生命体は、これらの両方の方法により適応性を発揮できる。

植物細胞には動物細胞とはさまざまな違う点があり、その一つに細胞壁がある。動物細胞は、液体状の分子（一種の液晶）により構成されており、ちょうどゲルのような材質と考えることができるが、植物細胞では、そのゲル状の細胞を硬い（弾性率では100万倍）薄い固体により囲われている球殻構造（図1および図2参照）と解釈できる。細胞壁の主成分であるセルロースは地球上でもっとも大量に存在する天然高分子で、おもに植物によって毎年約一兆t合成され、生産・廃棄に関する環境負荷がきわめて小さい¹⁾。通常、セルロースは、微生物や植物による生合成に頼っており、細胞の原形質膜にあるセルロース合成酵素から直接合成されて結晶化する。合成されたセルロースがリボン状のセルロースマイクロフィブリルを形成し、幅10~30 nm、厚さ5~10 nm長さは数 μm に達する¹⁾。セルロースマイクロフィブリルは、植物細胞壁（植物繊維）の50%以上を占める骨格物質で、その弾性率は140 GPa、強度は3 GPaに達する。このような細胞壁セルロースを、綿花や麻から衣類へ、木材パルプから紙へ加工し、複合材料をはじめ医用など工業材料として用いられている。たとえば、医用では医薬品の添加物や、透析膜などに利用されている。仮に、細胞壁の弾性や強度を自由に高める事ができれば、有用性はさらに高まる。

これら物性は、遺伝子発現³⁾により決定されるであろう細胞壁の成分構成以外にも、主として物理的自己組織化により影響を受けと思われるセルロース分子の結晶性や配向性とも深く関わっている。とくに配向性は、生化学反応によらずに自己組織的に起こると考えられ、磁場などの外場に影響を受けると考えられる。

セルロースは反磁性をもつ高分子の一つである。非磁性物質と磁場との相互作用について古くから研究されており、研究の進展により、高分子や有機化合物、生体物質に対する磁場効果についてもいくつか報告されている^{4),5)}。近年、パルス磁場による脳神経刺激、フィブリン重合過程の磁場配向、走磁性細菌がつくる生物磁石など、磁場に対する明瞭な生物現象が呈示され始めている。これらの研究領域はバイオマグネティクスと呼ばれ、この新しい境界領域の進展には各方面からの関心が寄せられている。一方、高分子のような反磁性物質は、その反磁性磁化率が $10^{-5}\sim 10^{-6}$ と非常に小さい⁵⁾ため、強磁場を用いないと反磁性相互作用をみることはむずかしい。しかし、1 Tを超えるネオジウムなどの希土類磁石や10 T以上の磁場を発生させることができる超伝導マグネットの開発により、この分野の発展が期待できる。また、セルロースには微結晶、微粉末、繊維、また誘導体化により結晶、液晶、非晶などさまざまな形態を付与させること

ができ、磁場に対する感受性の高い構造であるといえる。しかし、セルロースに関する磁場の研究についてはあまりなされていない。

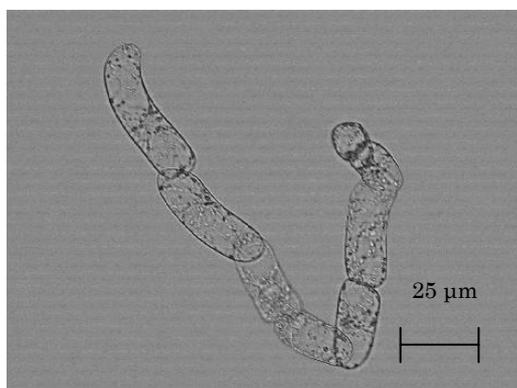


図 1 植物培養細胞

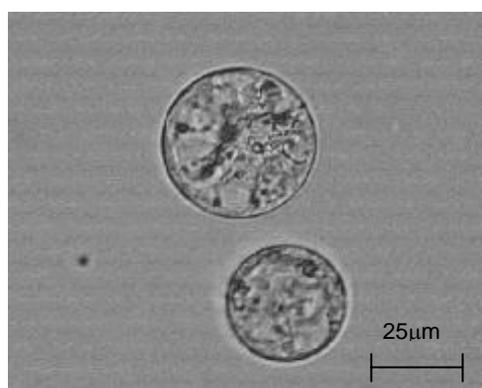


図 2 プロトプラスト

2 研究の目的

植物細胞と再生プロトプラストの機械的な、または弾力的な特徴は、ほとんどすべてが細胞壁に依存している。遺伝子発現に影響を与えない、物理的手段による生体材料としての植物細胞壁の改質を目的として、磁場中での植物再生細胞壁弾性への効果をくわしく調べた。また、細胞壁弾性への磁場効果の原因をさまざまな実験において、検証しメカニズムを明らかにすることを目的とした。

本研究では、生体材料としての植物細胞の細胞壁の改質を行うために必要な技術・知見の蓄積を目指した。

植物細胞の改質を行う方法として遺伝子を改変し物性を制御する方法と遺伝子発現によらず外場の影響を受け構成分子が自己組織的に形成する方法とがある。今まで、遺伝子組み換えによる材料の改質は様々方向されているが応力や磁場といった外場による報告は植物体への影響は～など、いくつか報告されている。流動場でのずり応力により赤血球の形態が変化するという報告がある。またずり応力によって遺伝子発現が誘導されるという報告もある。一方、近年超伝導磁石の開発により飛躍的に磁場強度があがっている。従来、磁場の影響のなかった生体分子へも影響が様々方向されている。磁場は生体分子を配向させるという報告がある。このように動物細胞では磁場で細胞の凝集性が増加するという報告がある。一方、植物細胞へ磁場効果については植物体の引っ張り強度が増加するといった報告はあるが単一の細胞に関しての報告はない。生体材料プロセスの磁場制御に関する基礎的な知見を集積する目的で、磁場による制御を試みた。本研究では最大 10 T の強磁場を用い、制御方法として磁場を用い細胞の力学的物性を評価するため顕微鏡下で利用できる弾性測定装置を試作・開発した。

植物細胞の細胞壁は主成分であるセルロースが数十本束になった状態のセルロースマイクロフィブリル（太さ：4 nm、長さ：数 μ m）により構成させている。棒状のセルロースマイクロフィブリルは異方性反磁性物質で磁化率は 10^5 程度であり、合成酵素から合成され自己組織的に細胞壁を形成している。溶液中ではセルロースマイクロフィブリルは磁束報告と垂直に配向することが報告されている。溶液中では一軸配向せず自由度が残る。一方細胞表面においては合成したセルロースマイクロフィブリルは細胞表面目束縛されるため、磁束方向と垂直に配向するところが期待できる。

植物細胞の細胞壁は得られた装置・知見を基に、生体由来のセルロース材料を対象として磁場により、高機能材料の創製技術の確立を目指した。

本研究では、強磁場下で利用可能な種々の装置開発、弱磁性物質の材料プロセスの磁場制御に関する知見の集積、磁場を用いた高機能材料作製技術の確立を実現した。磁場によってしか実現しない材料プロセスが見出された。

3 各章の構成

第一章では、成熟細胞を最大 10 T の磁場に暴露した後、慎重に磁場外に取り出した。これを、高感度で細胞の弾性を測定可能な細胞圧縮弾性測定装置を使い、成熟細胞の細胞壁への磁場効果のないことを確認した。

第二章では、細胞壁の再合成過程において、磁場に暴露した後、一章と同様に磁場外に細胞を取り出し測定した。再合成過程で磁場に暴露したところ無磁場で再生させたものにくらべ、いちじるしく細胞弾性が増加した。しかしながら、この細胞圧縮型測定装置は、高感度で細胞弾性が測定できるが細胞の膨潤の影響を受けやすいこと、また、仮に細胞の弾性に異方性があった場合でも細胞全体を圧縮するために弾性が平均化されてしまい異方性を測定できないといった欠点もある。そこで、細胞の一部を吸引し、弾性を測定する細胞吸引型測定装置を使い細胞局部のヤング率を高い確度で測定した。この方法は、圧縮測定には感度が劣るものの、細胞の膨潤を受けにくく、細胞の一部の弾性を測定できるため異方性を検出できる利点がある。その結果、磁場下で再生された細胞壁のヤング率は著しく増加し、磁場の方向とマイクロフィブリルとの成す角度に依存した、すなわち、異方性を示すことが発見した。

第三章では、磁場下で再生させた細胞壁が磁場のない場合とくらべ、ヤング率の増加した原因を検証し、細胞壁のヤング率への磁場効果の原因について考察した。その結果力学モデルの理論曲線および、電子顕微鏡から磁場配向により細胞壁表面のセルロースフィブリル同士の接触面積が増加したことが原因であったことを証明した。

4 用語説明

細胞膜

細胞を取り囲む、厚さ 7~10 nm ほどの脂質二重層からなる膜。細胞膜の主成分はリ

ン脂質などの極性脂質であり、気体や疎水性物質以外はほとんど透過させない。そのため細胞内は外界からは独立した区画として存在し得るが、細胞が生きていくためには外界との物質・情報のやりとりが必要である。細胞膜をはさんだ物質や情報のやりとりは、細胞膜に内在または表在する膜タンパク質（ポンプやチャネル、キャリアー）が担っている。

細胞壁

主成分はセルロース（ β -1,4-D-グルカン）であり、細胞膜の外側を覆っている。セルロースは直鎖状の高分子であり数十本が水素結合して束になってマイクロフィブリル（微小繊維）を形成している。マイクロフィブリルは互いに平行に並び、細胞壁の骨組みとなっている。

セルロースマイクロフィブリル

セルロース分子は、グルコース残基が（1→4）- β グリコシド結合によって結合した鎖状の高分子である。天然セルロースでは、多数のセルロース分子は同一の伸長極性をもって平行に配列し、分子内および分子間水素結合を形成して結晶性のセルロースマイクロフィブリルを構成する。セルロースマイクロフィブリルの形態と大きさ、および結晶構造は生物種に固有のものであり、セルロースマイクロフィブリルを構成するセルロース分子の数と配列様式、結晶形が生物の系統によって決まっている。マイクロフィブリルは約 4 nm の直径をもつ。これは、セルロース分子がマイクロフィブリルの横および縦方向にそれぞれ6-7列配列し、約 40 本のセルロース分子から構成されている。

セルロース合成酵素複合体

一般に、セルロースマイクロフィブリルは原形質膜で直接合成されて結晶化する。セルロースマイクロフィブリルの先端部には、タンパク顆粒の集合体が存在するので、この顆粒集合体がセルロース合成と結晶化に関与するセルロース合成酵素複合体（terminal complex =TC）である。TC はセルロースマイクロフィブリルを合成して細胞壁へ沈着させるのと同時に、TC 自身が原形質膜に沿って移動する（TC が動きながら連続的にセルロースマイクロフィブリルを合成している）。

プロトプラスト

細胞壁を有する生物において、細胞壁溶解酵素（セルラーゼ、ペクチナーゼ）などで細胞壁を分解した細胞である。再び培養液にもどすと時間経過とともにセルロース合成酵素複合体からセルロースマイクロフィブリルが作られ細胞壁が再生する。その後、増殖してカルスとなり、これを組織培養することでの植物ができあがる。

膨圧（細胞壁圧）

細胞内部の浸透圧と外部の浸透圧の差である。動物細胞の場合は細胞壁がなく、細胞の最外層は薄い細胞膜であるため、細胞を水中に入れると膨れて破裂する。したがって、動物細胞では膨圧はほとんど無視できる。植物細胞では細胞の外側は堅い細胞壁で覆われているため、細胞を水に入れると、水が細胞内に入って体積を増すが、堅い細胞壁が膨張を押さえることとなり、膨圧が生ずる。膨圧は数気圧から数十気圧に達することもある。

膨圧は植物細胞の力学的強度の保持や成長のためには不可欠なものである。植物がその形を保ったり、伸長成長が行えるのは、細胞が膨圧をもって緊張状態にあるためである。

文 献

- 1) T. Hoson, K. Soga, *Int. Rev. Cytol.*, **229**, 209-244 (2003).
- 2) T. Hoson, K. Nishitani, K. Miyamoto, J. Ueda, S. Kamisaka, R. Yamamoto and Y. Masuda, *J. Exp. Bot.*, **47**, 513-517 (1996).
- 3) S. Andersson-Gunneras, EJ. Mellerowicz, J. Love, B. Segerman, Y. Ohmiya, PM. Coutinho, P. Nilsson, B. Henrissat, T. Moritz and B. Sundberg, *Plant J.* **45**, 144-165 (2006).
- 4) F. Kimura, T. Kimura, M. Tamura, A. Hirai, M. Ikuno and F. Horii, *Langmuir*, **21**, 2034-2037 (2005).
- 5) F. Kimura, M. Yamato, S. Endo, F. Kimura, H. Sata, H. Kawasaki and Y. Shingawa, *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* **39**, 1942-1947 (2001).

第 1 章

成熟細胞への磁場効果

1-1 緒言

植物の性質を改質する方法としては、遺伝子導入などによる、遺伝子を改変する方法と、遺伝子発現に依存せず、機能性生体分子自身の自己組織化や機能を改変する方法とがある。植物細胞壁の物性については細胞壁の成分構成はもとより、セルロース分子の結晶性や配向性と深く関わっており、磁場などの外場に影響を受けると考えられる。しかし、植物細胞については、形態学的なもの¹⁾を除き弾性率のような機械的性質への効果に関する報告は少ない。たとえば、細胞の配向^{2), 3)}や集合^{4), 5)}、生体外における生体分子のゲル化⁴⁾など、これらは生体分子の持つ異方性反磁性によって、磁場に影響されると考えた。そこで、セルロース分子の結晶性や配向性を制御する方法として、磁場を用いる方法を選択した。

とくに配向性については生化学反応によらずに自己組織的に起こると考えられ、磁場などの外場に影響を受けると考えられた。

細胞への磁場効果については動物性細胞については報告^{7), 8)}があるが、植物性の細胞の弾性率のような力学的な性状については報告ない。そこで本研究は植物培養細胞一つの弾性率を測定可能な装置を作製し、植物培養細胞の細胞壁について磁場曝露した細胞壁の力学的な性質を評価した。

1-2 実験

1-2-1 試料

幼葉から採取したニチニチソウの培養細胞を試料に用いた (図 1-2-1)。ニチニチソウの培養の場合、光を必要とせず暗視下で培養されるので、実験の環境条件を整えやすいとされる。細胞を、Ukita ら⁴⁾による培養法と同様な方法で培養した。培養細胞には、2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) を $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ 、スクロースを 30 g l^{-1} 添加した Murashige-Skoog (MS) 培養液を用い、pH を 5.8 に調整し、 $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 、暗視下で 5 年間繰り返し培養を続けた株を用いた。この培養細胞から株分けした培養細胞浮遊液を 6 日間培養後に実験に用いた。



図 1-2-1 ニチニチソウ培養細胞

1-2-2 装置

細胞壁の弾性率を直接測定することができないため、細胞を圧縮し、一定量圧縮変形させたときにかかる力を測定することのできる圧縮型細胞弾性測定装置を作製した。装置は倒立型の位相差・蛍光顕微鏡 (IX70 型、オリンパス製)、冷却 CCD (Pixera Penguin 600CL 型、Pixera 社製)、静電容量変位計 (ST-3512 型、岩崎通信機製)、マイクロマニピュレータ (MM0-202ND 型、Narashige 製)、カンチレバー型センサーとマイクロロッドで構成した (図 1-2-2、図 1-2-3)。マイクロロッドは、マイクロピペットプーラーとマイクロフォージによりガラス棒を引き伸ばし作製しカンチレバーに取り付けた。マイクロロッド表面の静電気防止のため、シグマコートした。

先端直径を $30 \mu\text{m}$ 程度のサイズに加工したガラス棒をマイクロロッドに適用し、カンチレバーに $26 \times 5 \times 0.02 \text{ mm}$ のステンレス箔を用いたことで、 $617 \pm 6 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ という感度を得た。

また磁場曝露による効果をみるためにマグネットに 0.43 T の NdFeB 磁石を用いた。

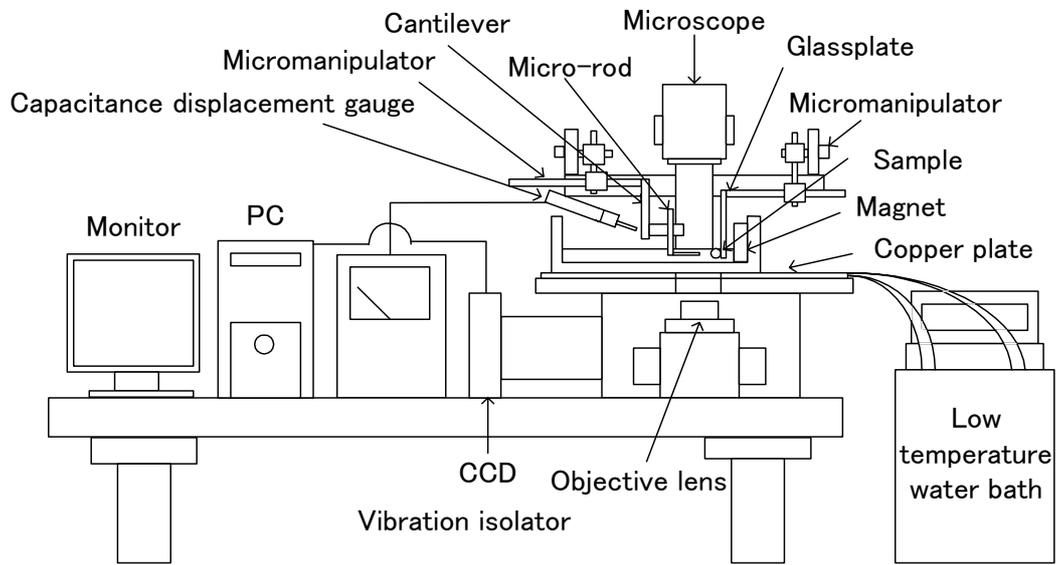


図 1-2-2 測定システム概略図

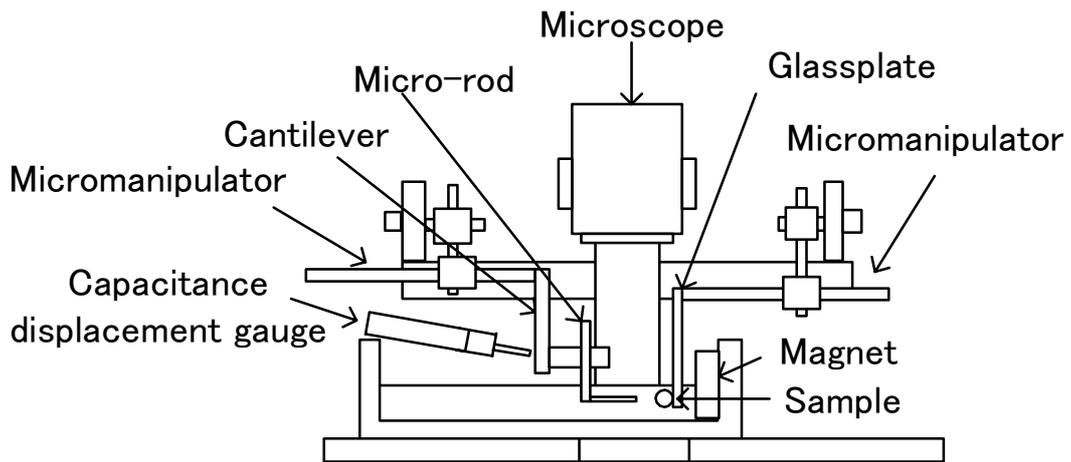


図 1-2-3 測定部外略図

1-2-2 測定原理

細胞の圧縮変形にかかる力は細胞壁弾性率と細胞壁の厚さとに比例する力であり、この値を無次元数で表される Wang らによる細胞圧縮のモデル値¹⁰⁾と比較することで二次元弾性率を求めることができる。なお、細胞壁の弾性率については細胞壁の二次元弾性率と細胞壁圧を乗算した値であるため、細胞壁圧から細胞壁の弾性率を求めることができる。

図 1-4 はガラスプレートを押した時の変位 X (左)と細胞を押した時の変位 a (右)を示す。縦軸 F は変形にかかる力である。

細胞を一定量変形させるのに必要な力を算出するためには、カンチレバーのバネ乗数、カンチレバーのたわみ量、細胞を変形させたときの変位、ガラスプレートを押した時のカンチレバーの変位、細胞直径が必要である。(1)式は相対変形 0.1 の時の変形にかかる力の算出式を示す。

$$F = F_0 \frac{a}{X} \times \frac{A}{(X - a)} \times \frac{X}{x} \times 0.1 \quad (1)$$

ここで、 F : 変形にかかる力 (N)、 F_0 : カンチレバーのバネ乗数(N・ μm) × カンチレバーのたわみ量(μm)、 a : 細胞を変形させたときの変位 (mV)、 X : カンチレバーが x たわんだときの変位量 (mV)、 A : 細胞直径(μm)、 X : カンチレバーのたわみ量である。この(1)式を用いて、細胞を一定量変形させるために必要な力 F を算出した。

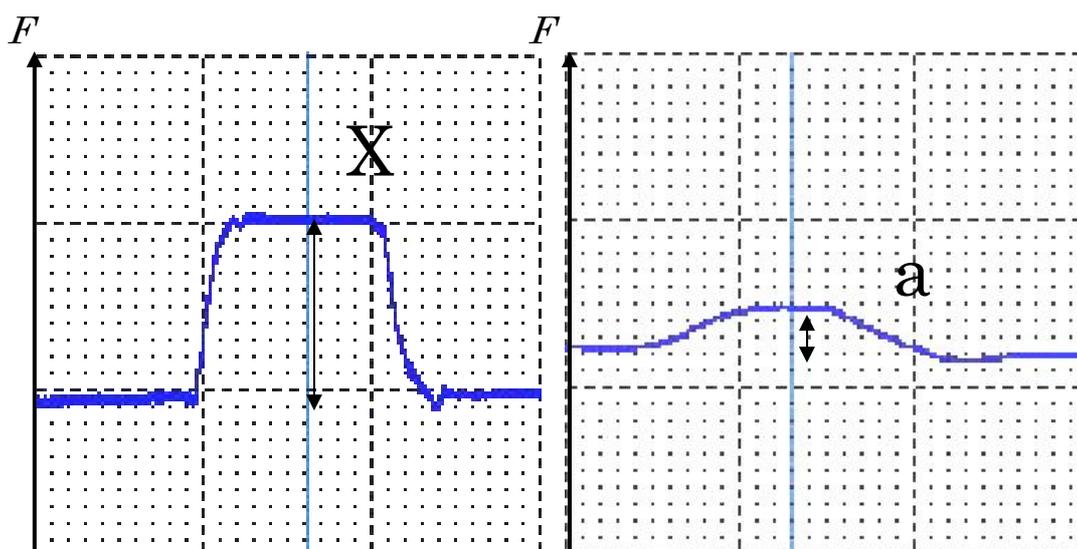


図 1-2-4 ガラスプレートを押した時の変位(左)と細胞を押した時の変位(右)

1-2-3 磁場暴露

NdFeB 磁石については、図 1-2-3 に示したように磁石をガラスシャーレ内にマイクロロッドと磁束方向の向きが平行になるように設置した。このとき細胞にかかる磁場強度は、0.3 T であった。

NdFeB 磁石では最大 0.3 T しか出すことができなかつたため、0.3 T 以上の磁場は超伝導磁石 (JMFD-10T100 型 JASTEC 製) を用いた。

細胞を、光などの培養条件に注意し 0 ~ 10 T の静磁場に 3 時間暴露した。磁場装置はボア径が 100 mm の超伝導電磁石である。まず、ポリリジンコートしたガラスプレートに細胞を接着し、培養液に浸した状態で内径 30 mm のガラスシャーレの中に入れた。次に磁場中心にガラスシャーレを 1 個設置しインシュレータにより断熱と遮光し、最大 10 T の磁場に曝露した (図 1-2-5)。暴露後、超伝導電磁石の中からガラスシャーレを 30 秒かけて慎重に取り出した。

細胞にかかる磁場の不均一性は、10 T の磁場強度において、0.3 % (10 T で 30 mT) であった。実験空間内の磁場勾配は 10 T で 610 ppm/mm 以下であった。

磁場暴露中の温度については内径 90 mm、厚さ 2 mm の銅製ジャケットに、1/4 インチの銅チューブを巻きつけて全体をハンダ付けしたものに発砲スチロールで断熱を施し銅チューブには循環恒温層 (LTB-125 型、アズワン社製) を使用して水を循環させ、27 °C に保った。

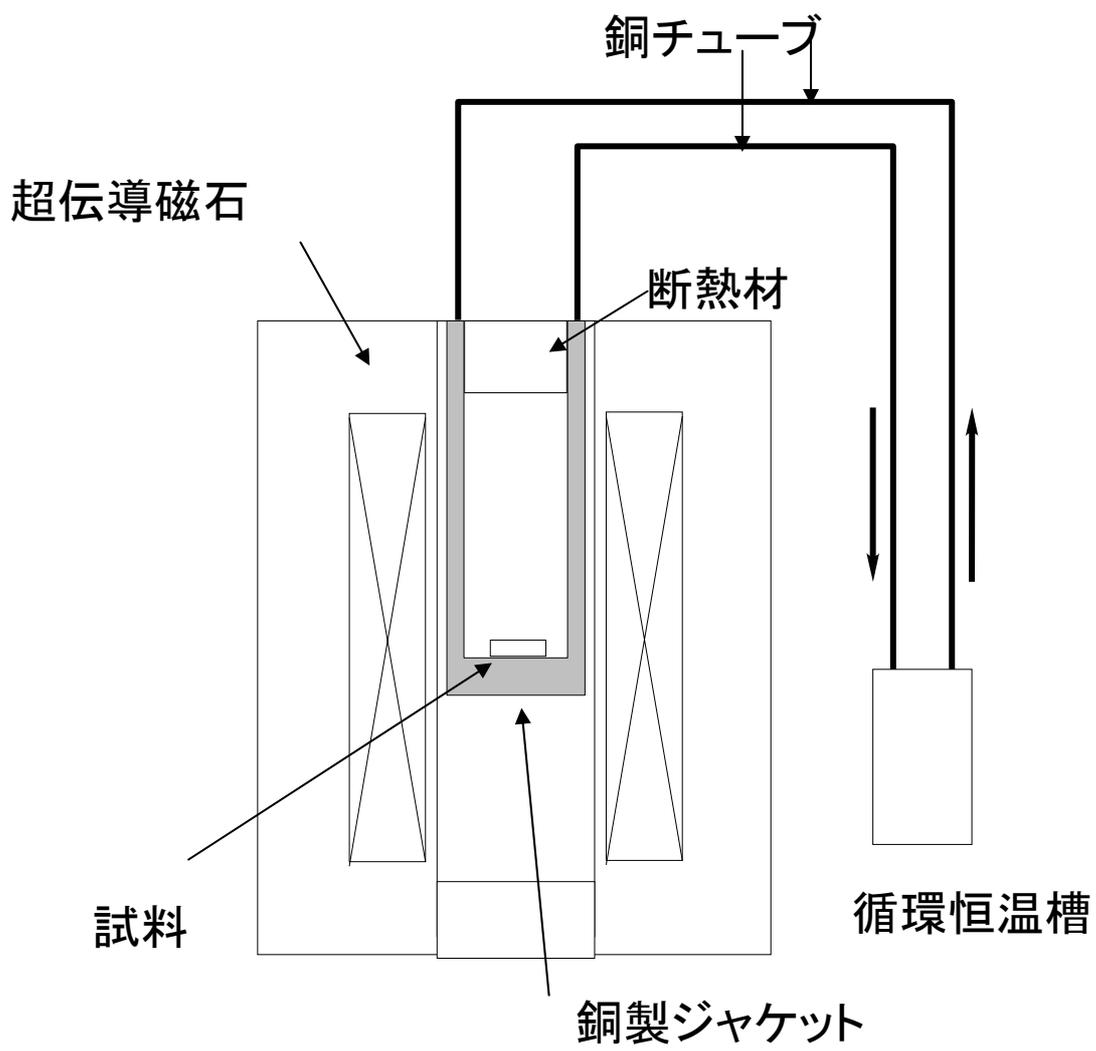


図 1-2-5 磁場装置概略図

1-2-3 測定

測定は静電容量変位計をカンチレバーの底に近いところに設置し、先につけたマイクロロッドにガラス板に付けた細胞を押し付け、図 1-2-6 に示したように磁場に曝露した方向と平行な方向に一定量変形するまで圧縮した。この時カンチレバーがたわみ、静電容量変位計との距離が変わることでマイクロロッドの位置変位が電圧に変換された(図 1-2-7)。カンチレバーのたわみ量を静電容量の変化として容量変位計で測定することができるので、このたわみから変形にかかる力を計算した。力と変位の関係は、変形をしないガラスプレートを押した時の変位を用いて校正された。変位計の値を PC 上でモニタリングし、データを保存した。またガラス板、マイクロロッドともに $1\ \mu\text{m}$ 単位で操作が必要であったため、マイクロマニピュレータを使用した。

NdFeB 磁石を用いた実験については、 $0.3\ \text{T}$ の磁場をかけたまま $0\sim 120$ 分の間 20 分おきに測定した。

超伝導磁石を用いた実験については、磁場に暴露した後磁場外に取り出し測定した。

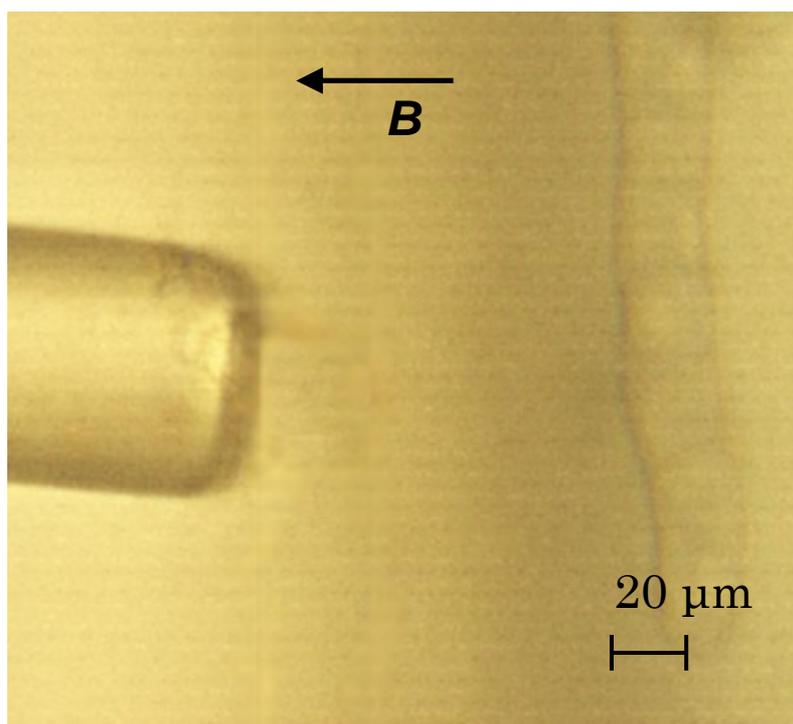


図 1-2-6 成熟細胞の圧縮弾性測定

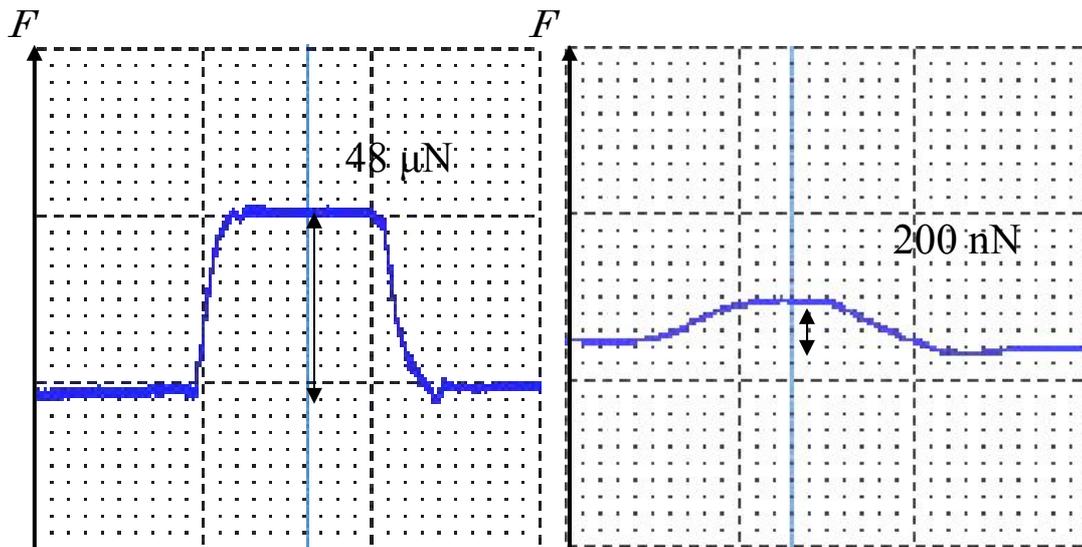


図 1-2-5 カンチレバーに力が加わった時の静電容量の変化

1-2-4 実験装置評価

作製した細胞圧縮型弾性測定装置の評価については、細胞を $0.1 \sim 0.5$ と段階的に圧縮変形させ変形時の静電容量変化を記録した。

1-3 結果

1-3-1 実験装置評価

作製した細胞圧縮型弾性測定装置については、変形率 0.1~0.5 まで段階的に圧縮した。変形時の静電容量の変位と(1)式を使って細胞を変形させたときにかかった力 F を算出した。図 1-3-1 は縦軸に細胞を変形させたときにかかった力 F 、横軸に変形率を示す。●は実験値、曲線は Wang らが算出した理論曲線である。変形率 0.4 のときもっとも実験値と理論曲線が一致していた。これによりすべての実験は変形率 0.4 で行った。

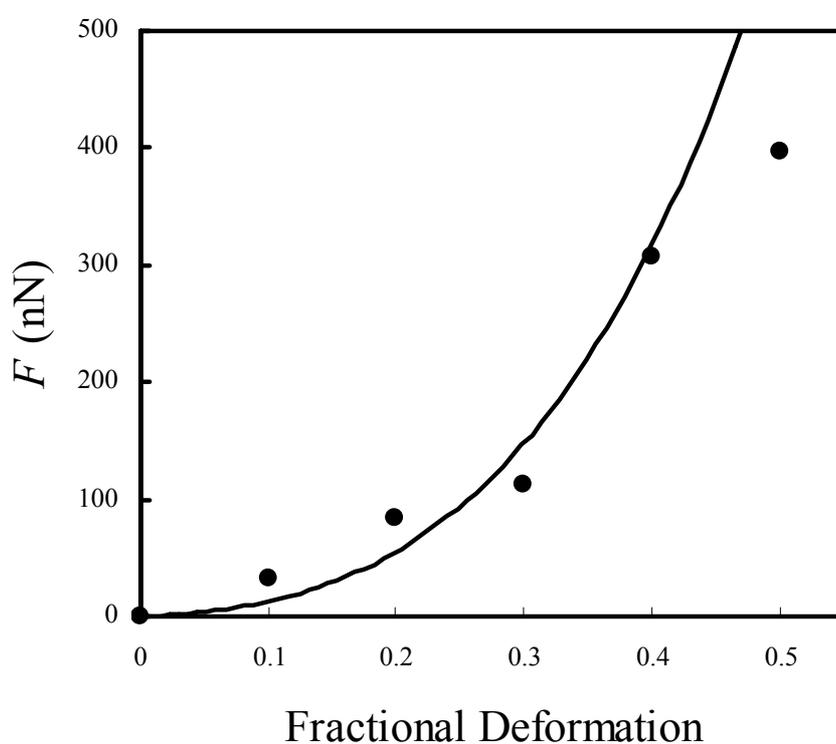


図 1-3-1 細胞を変形させたときにかかった力と変形の関係

1-3-2 NdFeB 磁石を用いた実験結果

図 1-3-2 は、磁場曝露した細胞と無曝露細胞について曝露時間経過後の変形にかかった力の比較である。縦軸に細胞を変形させたときにかかった力、横軸に時間を示す。詳しい測定値は表 1-3-1 に示す。●は 0.3 T の磁場に曝露した細胞の F を、○は 0 T で測定した F を示す。なお●については NdFeB 磁石を用い、細胞を 0.3 T の磁場に曝露したまま測定を行った。各測定点は 3 回の平均値を、誤差は標準誤差である。磁場の有無、曝露時間にかかわらず細胞を変形させたときにかかった力に有意な差はみられなかった。

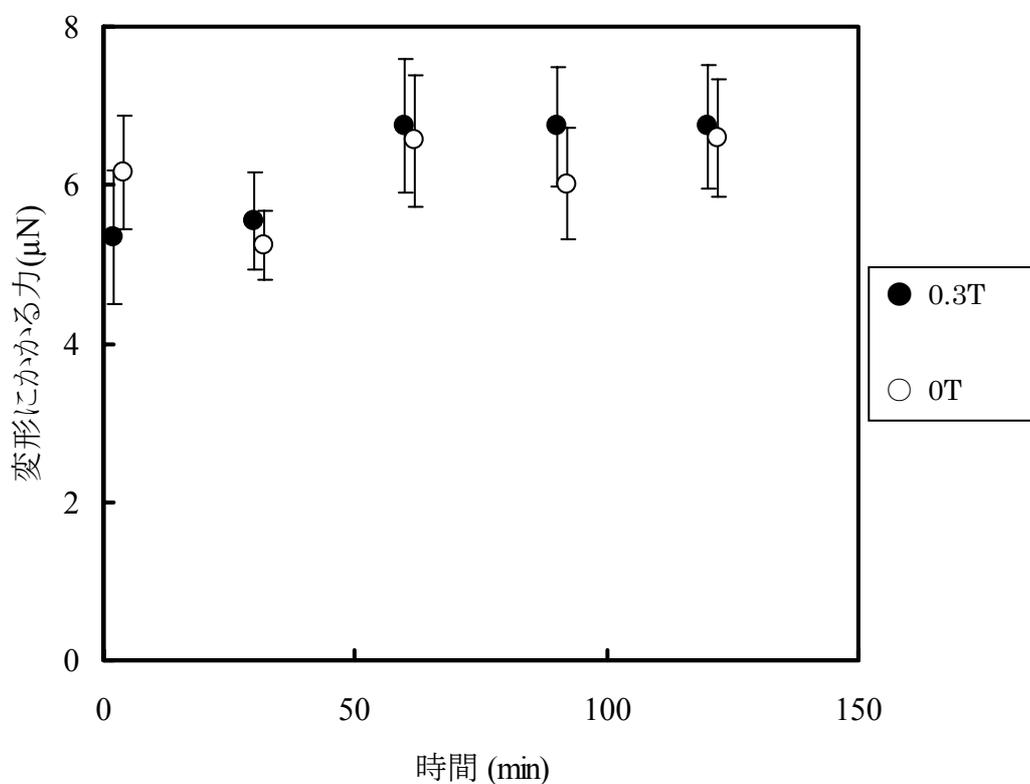


図 1-3-2 細胞壁弾性の時間変化

1-3-3 超伝導磁石を用いた実験結果

超伝導磁石を用いた実験については 3 時間磁場に曝露した後磁場外に取り出し測定を行った。NdFeB 磁石を用いた実験とは違い磁場外に取り出して測定を行った点に注意が必要である。0 T の測定についても超伝導磁石内で 3 時間経過した後装置から取り出し測定を行った。図 1-3-3 は 0~10 T の磁場に 3 時間曝露した細胞の変形にかかった力を示す。縦軸は細胞の変形にかかった力、横軸は磁場強度を示す。磁場強度にかかわらず有意な差はなかった。

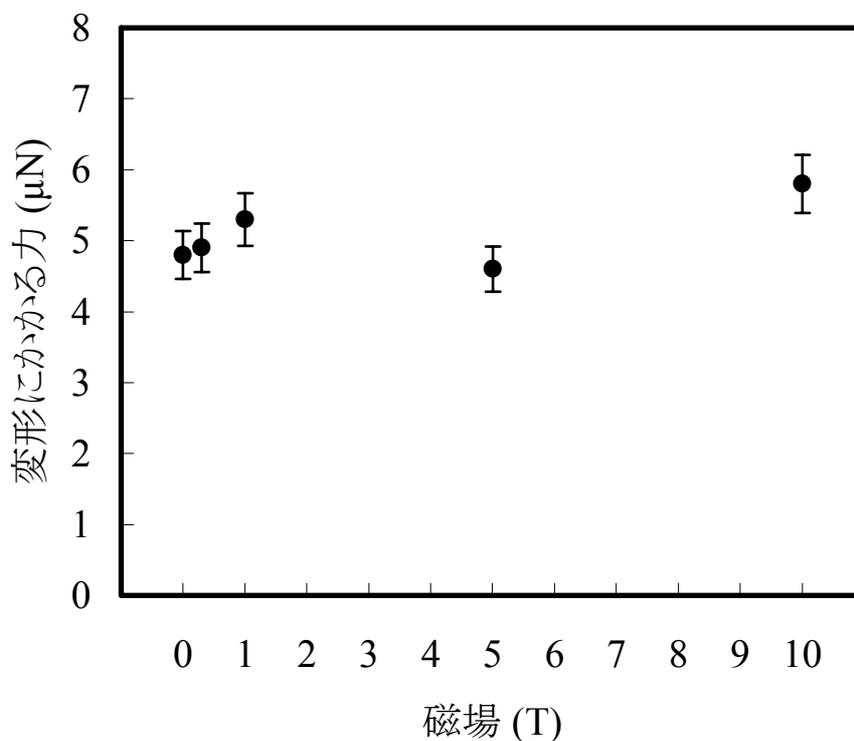


図 1-3-3 細胞弾性の磁場依存性

1-4 考察

成熟したニチニチソウの植物細胞に磁場曝露したときの変形にかかった力を時間を追って測定した。磁場の有無、曝露時間にかかわらず変形にかかる力に有意な差はなかった。

成熟した植物培養細胞を最大 10 T の磁場に 3 時間曝露したが、細胞の弾性に変化はなかった。セルロース材料の物性は分子の結晶性に依存するが、すでに結晶化した後の細胞壁の構造については、制御できないと考えた。一般に、セルロース分子の結晶構造を制御するためには、結晶化するときの温度や圧力などの環境条件に依存することが知られている。このため、細胞壁の合成過程で磁場に曝露する必要があると考えた。

1-5 結論

細胞一つ一つ細胞壁の弾性率を測るための装置で、成熟細胞の細胞壁弾性を測定することに成功した。本実験により、10 T の磁場ではすでに完成されている細胞壁の弾性には効果が現われなかった。

参考文献

- 1) G. Maret and K. Dransfeld, *Topics Appl. Phys.*, **57**, 143-148, (1985).
- 2) EK. Es'kov, AV. Darkov, *Izv Akad Nauk Ser Biol. Sep-Oct* (5), 617-622 (2003).
- 3) A. Yamagishi, T. Takeuchi, T. Higashi, M. Date, *Physica B* **177**, 523-526 (1992).
- 4) T. Higashi, A. Yamagishi, T. Takeuchi, M. Date, *Bioelectrochem. Bioenergetics* **36**: 101-108 (1995).
- 5) M. Iino, *Bioelectromagnetics*, **18**, 215-222 (1997).
- 6) M. Iino, Y. Okuda, *Bioelectromagnetics*, **22**, 46-52 (2001).
- 7) E. Oldfield, N. Janes, R. Kinsey, A. Kintanar, R W K. Lee, T. M. Rothgeb, S. Scaramm, R. Scarjune, R. Smith, M. D. Tsai, *Biochem. Soc. Symp.* **46**, 155-181 (1981).
- 8) M. Kato, K. Honma, T. Shigemitsu and Y. Shiga, *Bioelectromagnetics*, **97**, 97-106 (1993).
- 9) RJ. Reiter and B.A. Richar, *FASEB*, **6**, 2283-2290 (1992).
- 10) T. Haneda Y. Fujimura, and M. Iino, *Bioelectromagnetics*, **27**(2), 98-102 (2006).
- 11) M. Ukita, A. Furuya, H. Tanaka and M. Misawa, *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2849-2854 (1973).
- 12) Y. Fujimura, M. Iino, and U. Watanabe, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44**, 3325-3329 (2005).
- 13) N. Mera, H. Aoyagi, F. DiCosmo, and H. Tanaka, *Biotech. Lett.*, **25**, 1687-1693 (2003).
- 14) T. Murashige and F. Skoog, *Physiol. Plant.*, **15**, 473-467 (1962).
- 15) J. Blewett, K. Burrows, and C. Thomas: *Biotech.*, **221**, 1877-1883 (2000).
- 16) K. K. Liu, D. R. Williams and B. J. Briscoe, *Phys. Rev. E.*, **54**(6), 6673-6675 (1996).

第 2 章

再生プロトプラストへの磁場効果

2-1 圧縮弾性、面積弾性

2-1-1 背景・目的

セルロース材料の物性は、分子の結晶性や配向性と深く関わっているが、生合成後にこれら材料の物性を制御することは難しいとされる。実際、第一章で成熟細胞へ最大 10 T の磁場に曝露してさえも、単一の植物培養細胞の弾性に変化は観測されなかった^{1, 2)}。セルロース材料の物性は、分子の結晶性に依存するが、すでに結晶化した後の細胞壁の構造は、簡単には制御できなかつたと考えられた。一般に、結晶の構造を制御するためには、結晶化するときの温度や圧力などの環境条件に依存することが知られている。そこで、細胞壁を生合成する過程において、磁場に曝露する実験を行った。すなわち、一度植物細胞の細胞壁を取り去った植物細胞（以下プロトプラスト）を磁場中にて培養し、生合成する過程で磁場に曝露した後、磁場外に取り出し細胞圧縮型弾性測定装置を使い測定を行った。

一方、既に赤血球³⁾で確立された方法で感度は圧縮による方法に比べ落ちるものの、吸引法⁴⁾によると、細胞サイズの影響を受けずに、細胞表面の面積弾性率の絶対値が求められるうえ、細胞表面の局部のみの変形による弾性が得られる。

本研究では、一度植物細胞の細胞壁を取り去ったプロトプラストについて、磁場中で再生された細胞壁の再生分子数当たりの弾性率を測定することを目的とした。

2-1-2 方法

幼葉から採取したニチニチソウの培養細胞を試料として用いた。[Haneda, 2006]ニチニチソウの培養では、光を必要とせず、暗視下で培養されるので、実験の環境条件を整えやすいとされる。細胞は、文献4-6の方法に従って、一般的な培養法と同様な方法で暗視下において培養された。培養細胞は、2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) を $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ 、スクロースを 30 g l^{-1} 添加した Murashige-Skoog (MS) 培養液を用い、pH を 5.8 に調整し、 27°C 、暗視下で、5年以上定常的に培養をくり返されている。この培養細胞から株分けした培養細胞浮遊液を 6 日間培養後に実験に用いた。細胞を Cellulase Onozuka R10 (ヤクルト社製) を 20 mg ml^{-1} 、Macerozyme R10 (ヤクルト社製) を 10 mg ml^{-1} 、D-mannitol を 0.6 M、 CaCl_2 を $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ 添加した後、pH を 5.8 に調整した酵素液を用い、 30°C にて 3 時間処理を行い、細胞をプロトプラストとした。0.6 M の D-mannitol で酵素液を洗浄した後、2, 4-D を $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ 、スクロースを 30 g l^{-1} 、0.3 M の D-mannitol を添加した MS 培養液⁵⁾ にプロトプラストを再浮遊させて試料が得られた。

酵素により細胞壁を除去されたプロトプラストを、磁場に 3 時間暴露し、細胞壁を再生させ、その後、細胞弾性を測定するために圧縮弾性測定を行った。磁場の異方性を調べるため、圧縮方向に対して磁場方向を平行、垂直に暴露した。

圧縮弾性測定では細胞全体を押ししてしまうため、面での細胞壁の弾性を求めることができない。また、膨潤の影響も受けてしまう。それに対して、面積弾性率測定では、細胞壁の一部を吸引することによって、試料の細胞サイズの影響を受けずに、吸引する細胞表面局部のみの変形による弾性が得られる。したがって磁場に対する異方性を調べることができる。

再生プロトプラストをガラスマイクロピペットを用いて一定圧力で吸引し、再生プロトプラストを変形させたときの画像を保存し、細胞壁面積弾性率の磁場依存性を調べた。測定は磁場暴露方向に平行な面の吸引と、磁場暴露方向に垂直な面の吸引を行った。幼葉から採取したニチニチソウの培養細胞を、酵素を使用しプロトプラストに調整し試料とした。

内径 30 mm のガラスシャーレ内のガラスプレートに試料をポリリジンにより接着し、培養液に浸した状態でインシュレータにより断熱と遮光し、超伝導電磁石 (JASTEC 社製 JMTD-10T100 型) の磁場中心に設置して、最大 10 T の磁場に試料を磁場に曝露し細胞壁を 3 時間再生させた。暴露後、超伝導電磁石の実験空間内から試料を 30 秒かけて慎重に取り出し、細胞全体の圧縮弾性を図 1 のような方法により測定した。図 1 A のように細胞をカンチレバーに固定されたマイクロロッドにより圧縮して、カンチレバーの変形量を求め、図 1 B のようにマイクロロッドを押しした距離との関係から、球殻モデルの理論値[3]から細胞弾性を算出した。細胞全体の圧縮弾性は、細胞のサイズや浸透圧変化などによる細胞の膨潤にも依存するため、同時に試料細胞のサイズを詳しく調

べた。細胞壁の局所の面積弾性については、図 2 A のように、マイクロピペットにより細胞表面を吸引し、そのときの細胞表面の変形量とピペットの圧力差の関係から、文献 4 により解析を行った。この方法の特徴は、細胞サイズの影響を受けずに、細胞表面の面積弾性率の絶対値が求められるうえ、細胞表面の局部のみの変形による弾性が得られる。また、細胞壁に由来する成分は、細胞壁の弾性とセルロース分子の細胞表面における面密度に比例するため、この面密度を、文献[2]とほぼ同様にセルロース特異的結合蛍光色素(Fluorecent Brightner 28)で染色を行い、落射蛍光顕微鏡にて蛍光計測した⁷⁾。

磁場に暴露したあと、磁場外に注意深くゆっくり取り出して、磁場外において、細胞吸引方法^{7), 13)}により以下のように面積弾性率が求められた。マイクロピペットは、プロトプラストの大きさに合わせるため、ガラスを引き伸ばし先端の穴系 r_p (m) が $5 \mu\text{m}$ になるように加工された。始めの細胞表面の面積を A_0 (m^2)、細胞表面を吸引したときに拡張し変化した表面積を ΔA (m^2)、面積弾性率を K (N/m) とすれば、2 次元的引っ張り張力 T (N/m) は、

$$T = K \Delta A / A_0 \quad (1)$$

と表せる。プロトプラストの半径を r (m) とし、ピペットの吸引圧を ΔP (Pa) とすれば、 T はまた、

$$T = \frac{r r_p}{2(r - r_p)} \Delta P \quad (2)$$

と表される。画像から読み取った変形量 L (m) とし、このときの細胞表面積 A (m^2)、

$$A = 4\pi r^2 + \pi r_p^2 + 2\pi r_p L \quad (3)$$

の変化 ΔA が、細胞体積変化を無視できる短い時間の変形では、

$$\Delta A \cong \pi r_p^2 \left(1 - \frac{8 r_p}{3 r_0} \right) + 2\pi r_p L \left(1 + \frac{r_p}{r_0} \right) \quad (4)$$

で表されるので、これら(1)~(4)式の方程式を解き、面積弾性率 K を導いた。

面積弾性率は、細胞膜の寄与が無視できず、細胞壁だけの値ではない点に注意を要する。

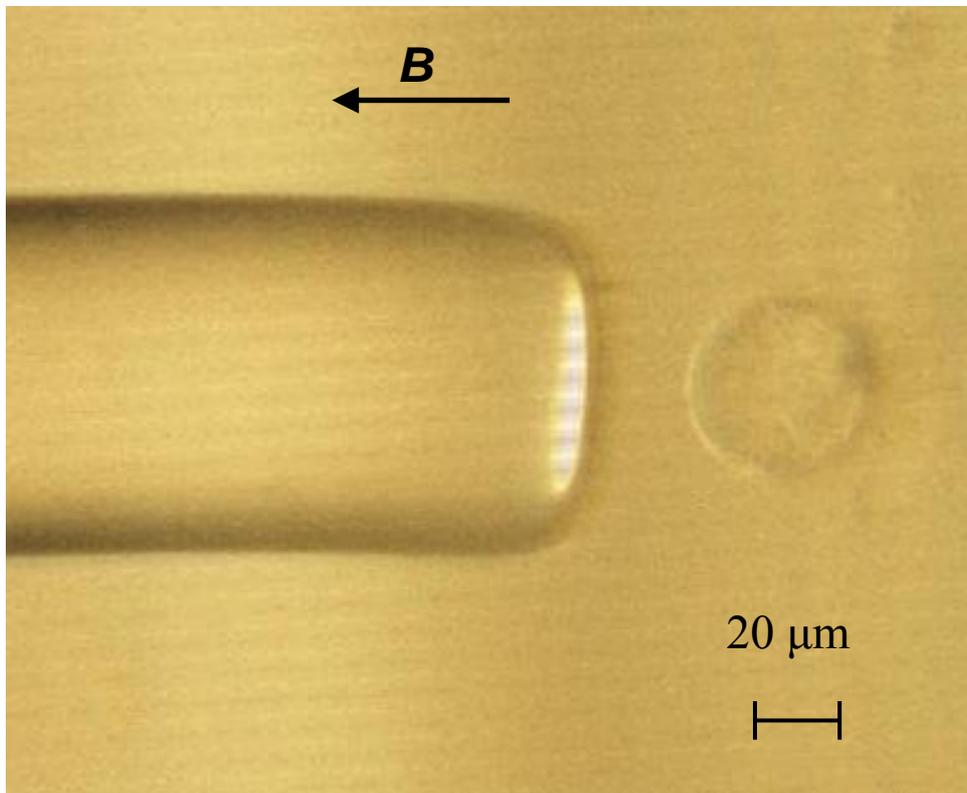


図 2-1-1 プロトプラスト圧縮弾性測定

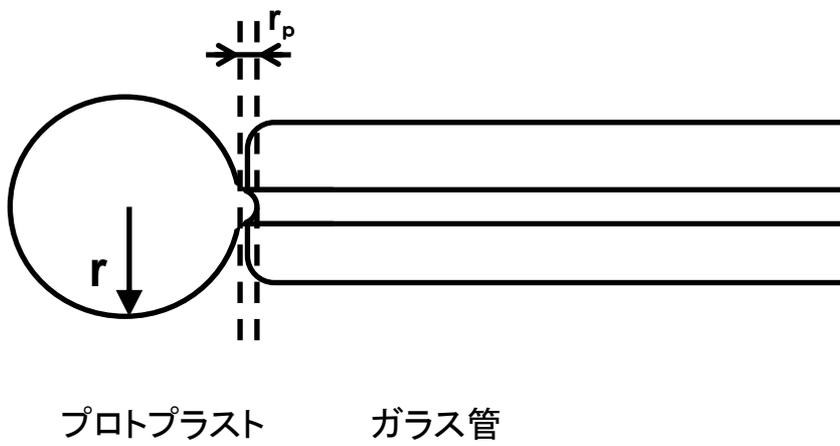


図 2-1-2 吸引方法外略図

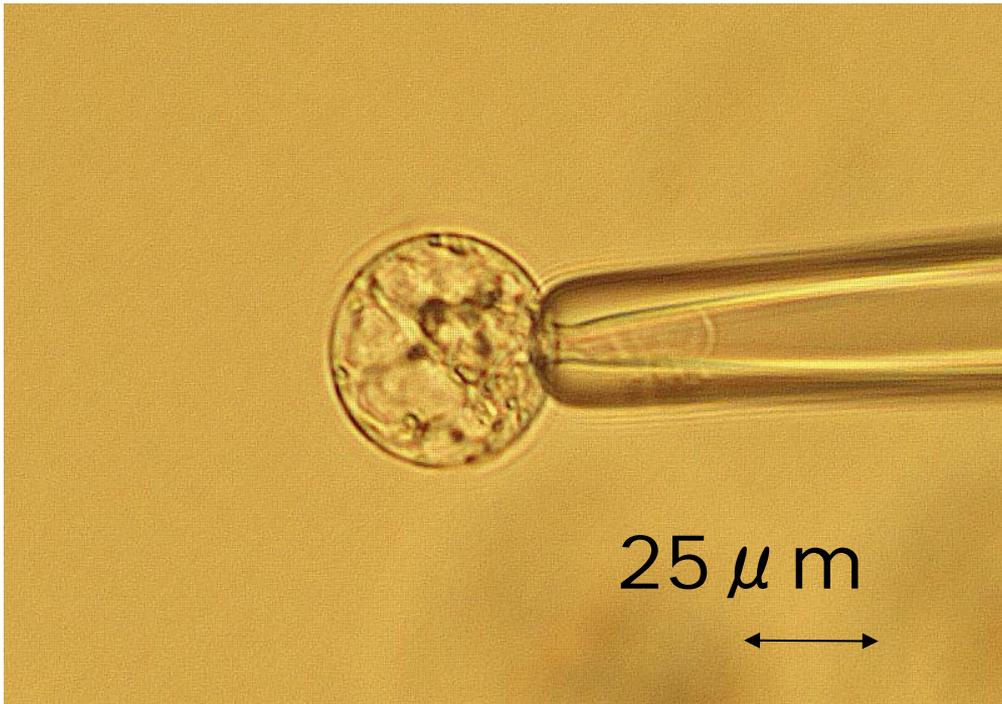


图 2-1-3 細胞壁面積彈性率顯微鏡像

2-3 結果

図 2.1.5 は縦軸に一定量圧縮したときの、再生プロトプラストの変形にかかる力 F をとり、横軸に磁場強度をとった。0 T から 1 T にかけて、磁場暴露方向に平行に圧縮にしたもの、磁場暴露方向に垂直に圧縮したもの、ともに大きく変形にかかる力が上昇した。磁場暴露方向に平行に圧縮したものと、磁場暴露方向に垂直に圧縮したものとの間には有意な差はみられなかった。また、細胞壁を再生させていないプロトプラスト (◇) では、 F は測定にかからない程小さかった。図の 1 点は、1 回の実験の試料数が 10、独立の測定が 3 回の平均値であり、($n = 30$) 誤差バーは標準誤差(SE)を表す。

縦軸に再生プロトプラストの直径を、横軸に磁場強度をとった。0~10 T の磁場強度で 3 時間磁場に暴露した後、磁場外で再生プロトプラストの直径を測定した。磁場に依存した変化はみられなかった。図の 1 点は、1 回の実験の試料数が 200、独立の測定が 2 回の平均値であり、($n = 400$) 誤差バーは標準誤差(SE)を表す。

3 時間磁場中で再生させた試料細胞のセルロース分子の面密度と、成熟細胞のセルロース分子の面密度との相対値を示す。細胞壁セルロース分子の細胞表面面密度の測定結果において、0~10 T では磁場による有意な効果は観測されなかった。各測定は、20 試料について独立の実験を 3 回行い ($n = 60$) , 誤差バーは SE を表す。

図 2.1.6 は磁場中で 3 時間再生させた試料細胞の面積弾性率の平均値を示し、誤差バーは SE を表す。平均値 \pm SE は、0 T の場合は、 0.55 ± 0.02 N/m であった。また、磁場方向に平行な表面を吸引測定した値は 0.79 ± 0.03 N/m であった。細胞壁を再生していないプロトプラストの面積弾性率は 0.37 N/m² 程度であることから、3 時間再生させた試料細胞の面積弾性率と比べて無視できない値を示した。各測定は 15 試料について独立の実験を 2 回行った ($n = 30$)。

図 2.1.7 は、例として、2 T の磁場中で 3 時間再生させた試料細胞の面積弾性率の平均値を示し、誤差バーは SE を表す。平均値 \pm SE は、0 T の場合 0.55 ± 0.02 N/m であったのに比べ、2 T の場合 (B および C) は面積弾性率が有意に増加した。磁場方向に垂直な細胞表面を吸引測定した値 0.71 ± 0.02 N/m と磁場方向に平行な表面を吸引測定した値 0.79 ± 0.03 N/m において、危険率 5% で有意な異方性が観測された。

図 2.1.8 は、縦軸に細胞壁の面積弾性率を、横軸に磁場を示し、●は、磁場方向に平行な表面を吸引測定した値を、▲は、磁場に垂直に吸引測定した値を示した。

表 2.1 磁場暴露方向に平行に圧縮したときの、各磁場強度ごとの測定値

磁場強度(T)	F (nN)	誤差(SE)
0	68.65	3.06
0.1	64.07	3.89
0.2	81.23	8.23
0.3	98.51	6.97
0.6	114.91	6.16
1	158.31	10.34
2	127.8	6.63
5	138.27	8.03
8	168.27	8.03
10	141.7	14.35

表 2.2 磁場暴露方向に垂直に圧縮したときの、各磁場強度ごとの測定値

磁場強度(T)	F (nN)	誤差(SE)
0	68.65	3.06
0.1	68.75	5.2
0.2	95.8	5.85
0.3	113.32	4.26
0.6	119.32	7.05
1	162.35	15.01
2	137.79	10.34
5	133.21	8.48
8	146.85	5.46
10	124.98	4.59

表 2.3 各磁場強度ごとの測定値

磁場強度(T)	再生プロトプラスト直径(μm)	誤差(SE)
0	26.16	0.33
0.3	24.58	0.31
2	25.5	0.38
5	26.44	0.24
10	25.74	0.26

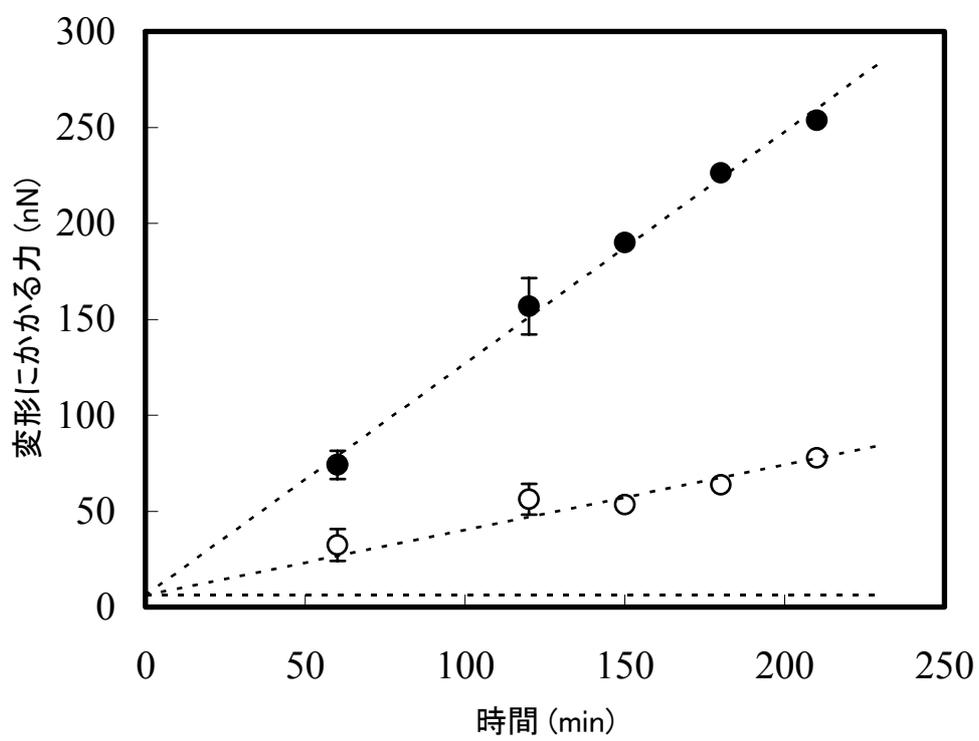


図 2-1-4 プロトプラストに対する磁場効果

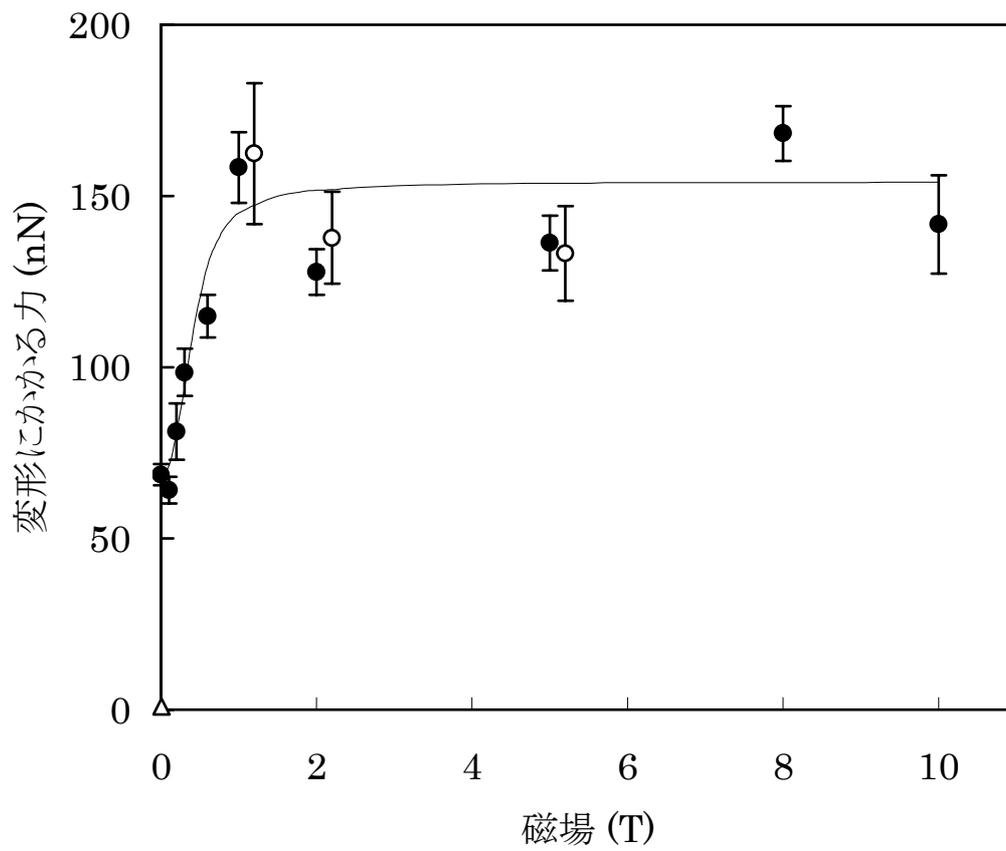
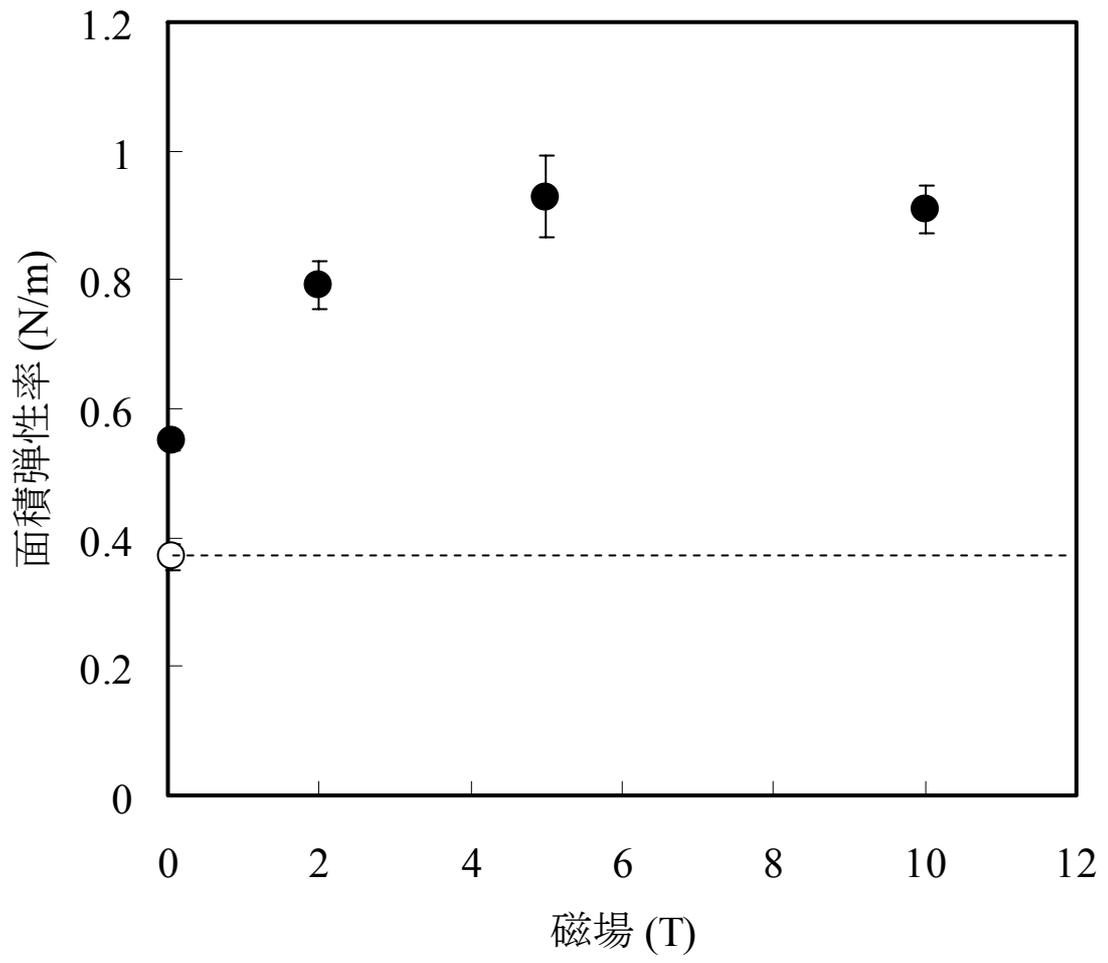


図 2-1-5 細胞壁弾性の磁場依存



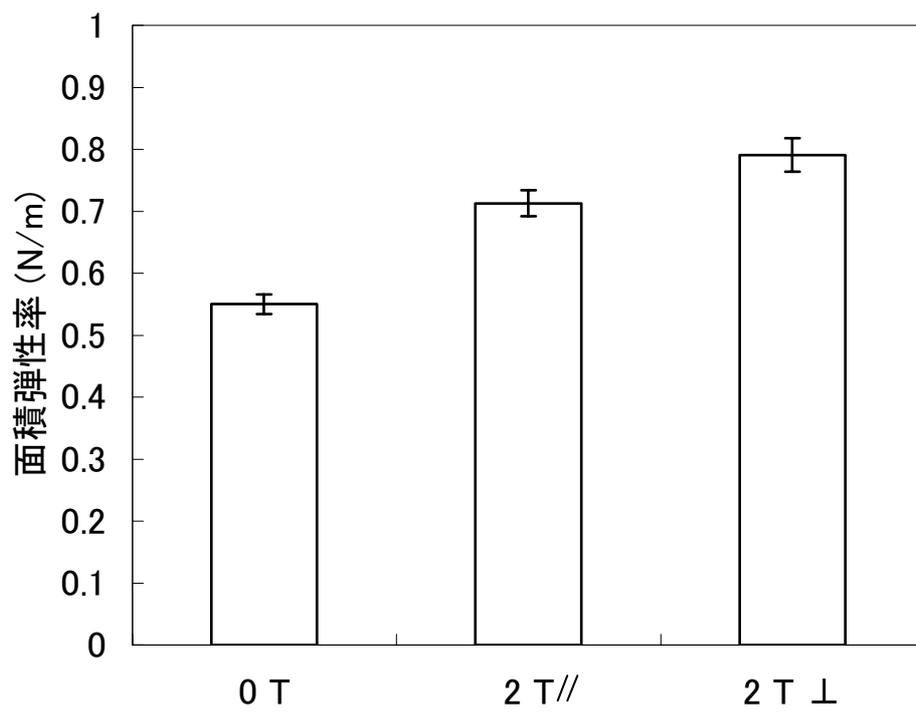


図 2-1-7 細胞壁面積弾性率に対する磁場効果

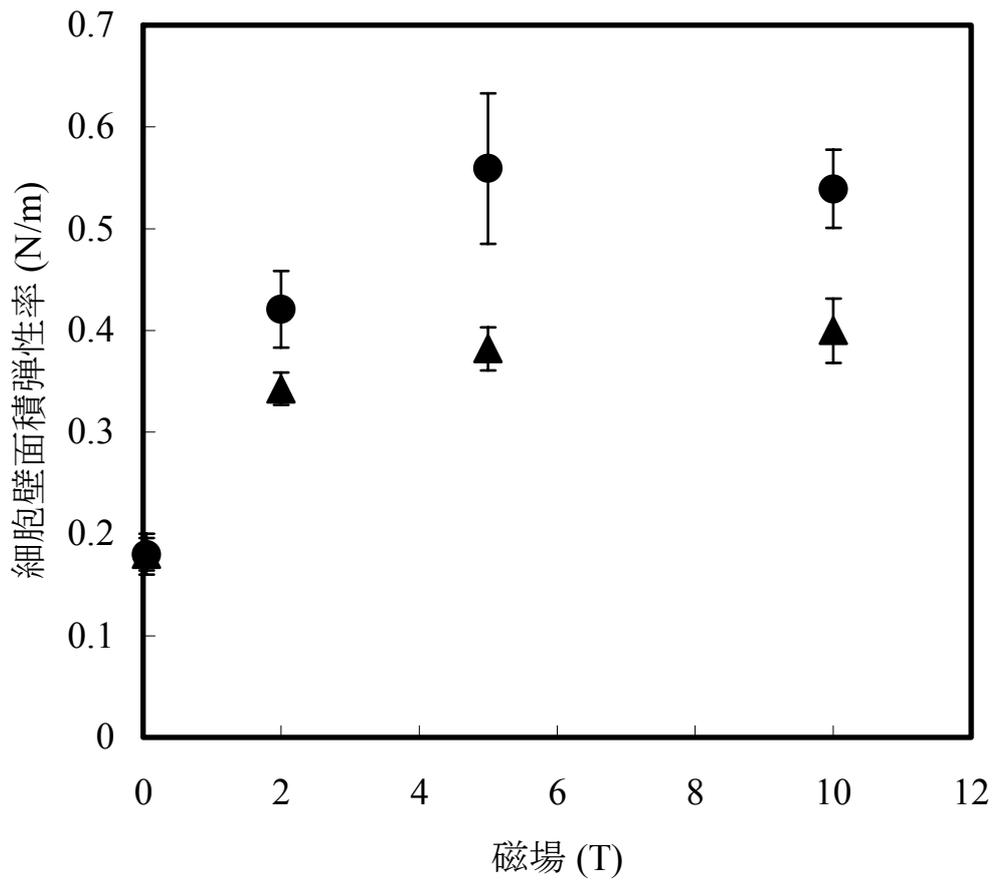


図 2-1-8 面積弾性率の磁気異方性

2-4 考察

実験結果より、細胞壁再生時に磁場曝露したものとそうでないものでは、変形にかかる力に有意な差が見られた[図 3.2.2-3.2.6]。このことから細胞壁再生時に磁場を曝露することで、細胞壁弾性が上昇すると考えられる。また、磁場曝露開始から時間を追うごとに磁場の有無による差が大きくなっていることから、磁場曝露の効果は曝露時間に依存していると考えられる。

図 3.2.7 より、変形にかかる力は、磁場曝露したのもそうでないものも、時間に対してほぼ直線的に上昇しているように見える。これは、磁場曝露の有無に関わらず、細胞壁が再生されることで強度が増すため、変形にかかる力が大きくなったと考えられる。直線的な変化であることについては、細胞壁が完全に再生されるまで通常二週間程度かかるため、今回のような短時間では直線的な変化とみなすことができると考えた。その近似直線から、0 min すなわち細胞壁のないプロトプラストの強度は細胞壁に比べて十分小さいといえる。そこで細胞内部の強度はほとんど無視できると考え、球殻モデル¹⁰⁾が適用できると考えた。この球殻モデルを用いた式からモデル値を求め、測定値との比較から、二次元弾性率を求める。

弾性率、細胞壁厚さ、ポアソン比、伸張率を組み合わせる式(2.4.1)を利用し¹⁰⁾、変形率と力についてのモデル値を計算する。ここで得られるモデル値は無次元数である。

$$W = \frac{Eh_0}{2(1-\nu^2)} \left\{ (\lambda_1 - 1)^2 + (\lambda_2 - 1)^2 + 2\nu(\lambda_1 - 1)(\lambda_2 - 1) \right\} \quad (2.4.1)$$

W : 歪みエネルギー

E : 弾性率

h_0 : 細胞壁厚さ

ν : ポアソン比

λ : 伸張率

モデル値の計算には文献よりポアソン比 $\nu=0.4$ 、 $\lambda_s=1.015$ を用いた。

例として、図 2.1.4 に 0.3 T 磁場に 210 min 曝露した実験結果とモデル値の比較のグラフを示す。実験で得られた変形にかかる力 F と無次元数で表された $F/(Eh_0 \lambda_0^2)$ を比較し、二次元弾性率 $E \cdot h$ を求める。

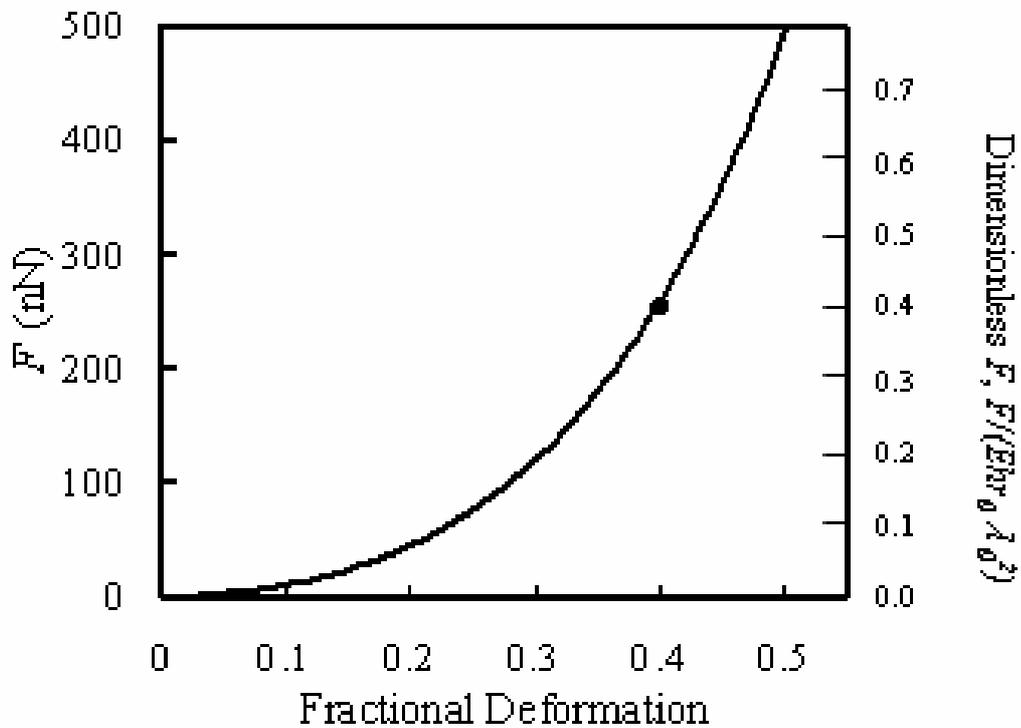


図 2-1-7 実験値とモデル値の比較¹⁰⁾

E は細胞壁弾性率、 h は細胞壁厚み、 r_0 は細胞半径、 λ_0 は細胞壁の伸張率である。今回の実験は $20 \mu\text{m}$ 直径のプロトプラストを選んで行っているので $r_0=10 \mu\text{m}$ を適用し、文献値から $\lambda_0=1.015$ で計算し、二次元弾性率 $E \cdot h=49.7 \text{ mN/m}$ を得た。

しかし、この値は細胞壁の弾性率に細胞壁厚さを乗算したものであるため、磁場効果による二次元弾性率の上昇がそのまま細胞壁弾性率の上昇とはいえない。そこで細胞壁厚みへの磁場効果を調べることで、弾性率を求められると考えた。

再生させた細胞壁の実験で得られた二次元弾性率と、細胞壁の再生速度の実験で得られた細胞壁厚みから、細胞壁弾性率 E を求めた。細胞壁弾性率を求める式を以下に示す。

$$E = \frac{dE_s}{dt} \bigg/ \frac{dh}{dt} \quad (3.4.1)$$

E : 細胞壁弾性率

E_s : 細胞壁二次元弾性率

h : 細胞壁厚み

t : 時間

また培養細胞の細胞壁と再生させた細胞壁の分子容積密度が等しいとする^{11,12)}ならば、上式を次のように書き換えられる。

$$E = \frac{dE_s}{dt} \bigg/ \left(d \left(\frac{h_0 S}{100} \right) / dt \right) \quad (2.4.2)$$

h₀ : 100%再生した状態の細胞壁厚み

S : 細胞壁再生率

式(2.4.2)を用いて計算した結果、0.3 T の磁場に暴露したものの弾性率は 390 ± 65 MPa であった。また、磁場曝露していないものの弾性率は 110 ± 33 MPa であり、磁場曝露したものは無磁場のものに比べ、弾性率がおよそ 4 倍の値になった。

細胞壁の弾性率が上昇した原因についていくつかの可能性が挙げられる。磁場曝露による溶液の浸透圧の変化から細胞内部の圧力変化や、磁場効果による細胞内での物質生成の影響、等が考えられる。しかし、結果より、磁場曝露から影響が出るまでの時間遅れが無いことから、主たる原因が細胞内の遺伝子的要因とは考えにくい。

仮に、細胞壁構成成分が配向することが原因である場合³⁾、0.3 T で変化があったことから、10⁻¹⁹ emu 程度の異方性磁化率がある物質が配向していると考えられる。セルロース分子の分子量がおよそ 100 万であるのに対し、マイクロフィブリルでは分子量がおよそ 1 億であることから、この程度の異方性磁化率が期待できる。高分子繊維のように異方性磁化率と十分な体積を有するものが 1 T 以下の磁場でも簡単に配向することは報告されている¹³⁾。

今回の結果より、生体材料の弾性率が磁場によって制御でき、バイオマテリアルの分野で改質技術などに応用できると期待される。

細胞全体の圧縮弾性の磁場効果に対する原理上の要因として、細胞内部、細胞膜、再生細胞壁および膨圧¹⁴⁾などが考えられる。細胞弾性は、文献 1 と同様、細胞壁が全く再

生していない場合、理論的なモデル³⁾と同様に、観測にかからないほど小さい。このことから、細胞弾性の変化の原因が、細胞内部や細胞膜にはないと考えられる。残った因子は、細胞壁と膨圧であるが、今回の実験から膨圧の磁場依存性に有意差は見られなかったことから、膨圧の変化が原因ではなく、再生細胞壁の弾性が増加したものと推定された。さらに、細胞壁の弾性は、細胞壁の Young 率とセルロース面密度に比例するが、セルロース面密度に有意差が観測されていない。このことから磁場中で再生された細胞壁の再生セルロース分子の細胞表面面密度当たりの弾性率が、磁場の無い場合と比べ増加したと考えられた。

一方、細胞局所の面積弾性率に関しては、細胞壁と細胞膜の面積弾性率の合計を与える。プロトプラストの測定値は、赤血球の場合の値⁵⁾とほぼ同じ値であった。また、プロトプラストに磁場を暴露しても、面積弾性率に変化が見られなかったことから、観測された面積弾性率は、磁場に依存しない一定の細胞膜の面積弾性率に、磁場に依存する細胞壁の面積弾性率を加えたものであると考えられた。この場合も、磁場中で再生された細胞壁の再生セルロース分子の細胞表面面密度当たりの面積弾性率が、磁場の無い場合と比べ増加したと考えられた。なお、得られた面積弾性率は、1 から細胞壁のポアソン比を引いたものを 2 倍したもので細胞壁の Young 率を割ったもの[4]である。

磁場依存性について、反磁性の異方性に基づくオーダーパラメーターと文献 8 と同様に比較を行った。その結果、オーダーパラメーターどちらの実験データとも良い一致を示した。

これらのことから、弾性率の異方性は再生された細胞壁に起因していると考えられ、セルロースマイクロフィブリル、あるいは、そのネットワークの反磁性異方性磁化率が磁場から受けるトルクによって、再生中に磁場に配向し、その結果、フィブリル同士の結合面積が増加するなどしたことが原因であると推定された。

図 2.1.6 の 10 T の磁場で 3 時間再生させたプロトプラストと、0 T で 3 時間細胞壁を再生させたプロトプラスト面積弾性率から細胞膜の面積弾性率を引くと、0 T と 10 T の磁場で 3 時間細胞壁を再生させたプロトプラストの面積弾性率は、0 T のものに比べ、磁場方向に平行な表面で約 2.3 倍であった。図 2-1-6 の結果から、磁場に依存して細胞壁の面積弾性率が増加し、その増加の仕方がシグモイド形であった。また、弾性の増加は 5 T 付近で飽和していた。また、細胞壁を再生していないプロトプラストの面積弾性率は 0.37 N/m⁷⁾程度であったが、これは構造物が細胞膜のみからなる赤血球の面積弾性率(0.45 N/m)¹³⁾とほぼ一致するので、リン脂質 2 重層からなる流動的液晶細胞膜のみの面積弾性率であると考えられるので、弾性の増加は再生された細胞壁に起因していると考えられ、反磁性異方性にもとづく配向が推定された。

2-5 結論

磁場中において再生させた再生プロトプラスト一つ一つの細胞壁弾測定により、細胞と磁場による異方性は見られなかったが、圧縮弾性は磁場に依存して増加した。その磁場による圧縮弾性の変化と、反磁性異方性物質の配向のオーダーパラメータと、良い一致をし、細胞壁そのものの弾性率が磁場に依存して増加することが観測された。面積弾性測定からは、面積弾性率の磁場の異方性が確認され、その弾性率の増加の原因が異方性反磁性物質であるセルロースマイクロフィブリルのネットワークの磁場配向であると推定された。

2-2 分子数密度

2-2-1 背景・目的

細胞壁の弾性には、ヤング率と細胞壁の表面面密度が影響を与える。磁場により細胞壁のヤング率が増加した可能性、また細胞壁の厚みが増加した可能性が考えられる。そこで、細胞弾性が細胞壁の主成分であるセルロースを特異的に染色する蛍光色素によって染色し、細胞壁の表面面密度を詳しく調べた。

2-2-2 方法

セルロース分子の細胞表面における面密度を定量するため、磁場暴露後の試料について、セルロース特異的結合蛍光色素(FLUORECENT BRIGHTNER 28)12)で染色を行い、落射蛍光顕微鏡にて蛍光計測 (Penguin 600CL型, Pixera 社製) した後、アプリケーションソフト (Win Roof ver. 5.1 三谷商事社製) により、各磁場強度において解析され (図 2-2-1), 成熟細胞の面密度で規格化した相対的セルロース分子面密度が算出された。

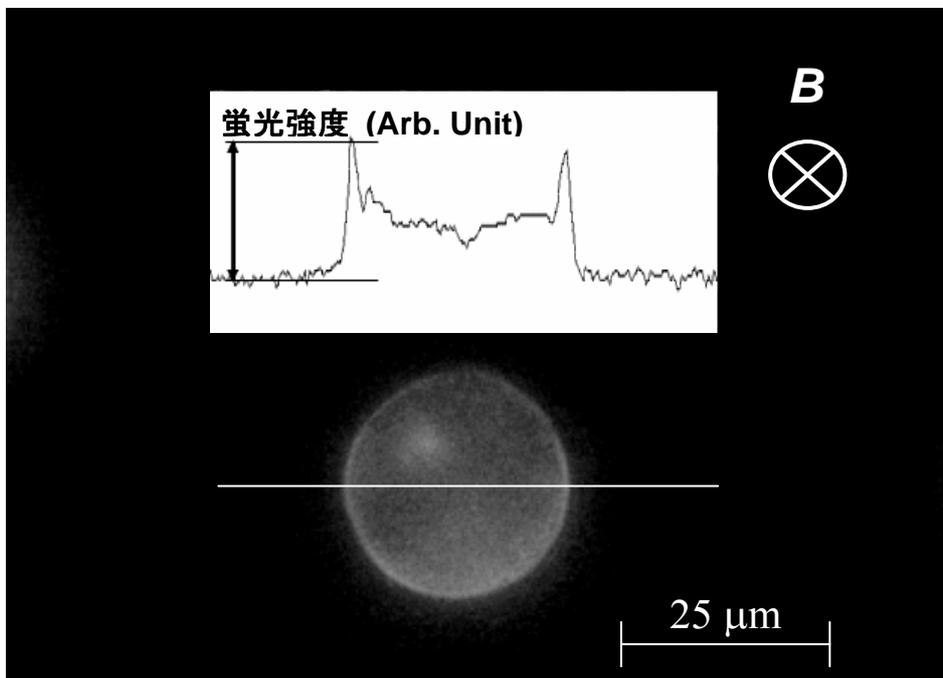


図 2-2-1 細胞合成量測定

2-2-3 結果

図 2-2-2 は 3 時間磁場中で再生させた試料細胞のセルロース分子の面密度と、成熟細胞のセルロース分子の面密度との相対値を示す。細胞壁セルロース分子の細胞表面面密度の測定結果において、0~10 T では磁場による有意な効果は観測されなかった。各測定は、20 試料について独立の実験を 3 回行い ($n = 60$)，誤差バーは SE を表す。

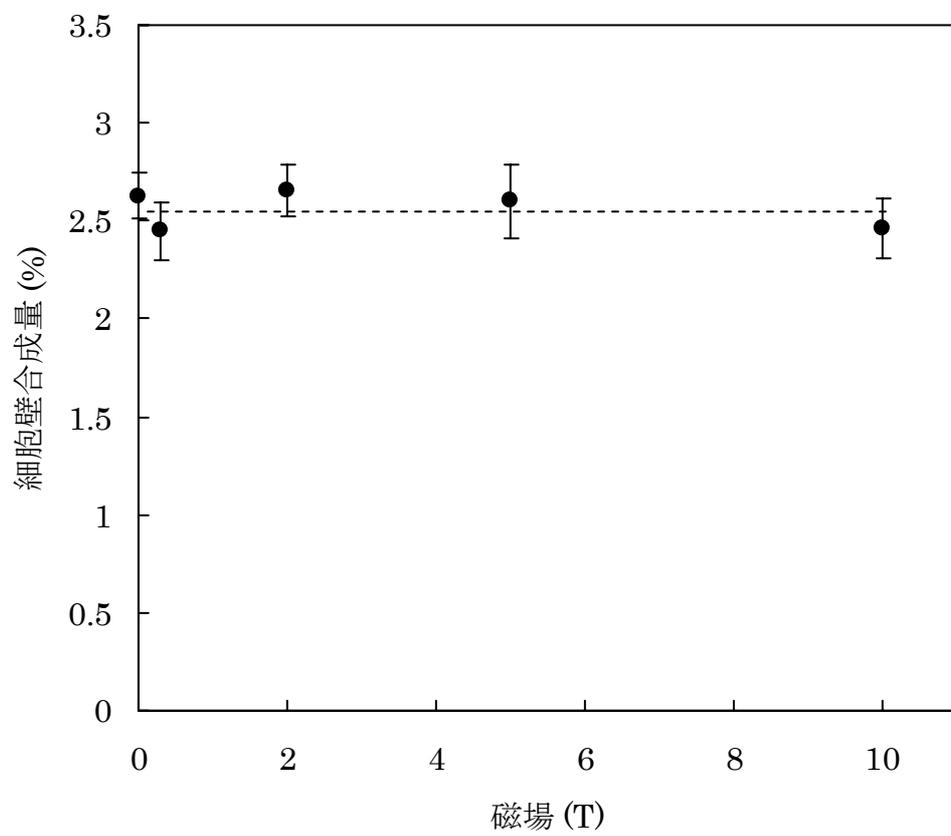


図 2-2-2 細胞合成量測定

表 2.4 各磁場強度ごとの測定値

磁場強度(T)	相対値(%)	誤差(SE)
0	2.63	0.12
0.3	2.45	0.14
2	2.66	0.15
5	2.6	0.16
10	2.47	0.09

2-2-4 考察

細胞壁の弾性は、セルロース分子の細胞表面面密度に大きく影響を受ける。従って、磁場により面密度が増加すれば面密度に比例して細胞壁の弾性も増加することになるため、磁場中で再生された細胞壁表面における面密度を詳しく測定した。

図 2-2-2 より、磁場中と磁場外で再生された細胞壁表面における分子密度に有意な差は観測されなかった。10 T の磁場中で再生させても、細胞壁合成酵素に影響は及ぼさなかったと考えられた。

2-2-5 結論

磁場中で再生された細胞壁の分子面密度を詳しく調べたが、磁場中と磁場外で再生されたものに有意な差は観測されなかった。

2-3 膨潤

2-3-1 背景・目的

圧縮弾性の変化の原因が、細胞内部や、細胞膜にはないと考えられる。原因としては細胞壁と細胞の膨潤による膨圧の変化がある。仮に磁場に暴露されることによって、膨圧が変化し、磁場外における圧縮弾性測定中にもその効果が持続的に残り、圧縮弾性に影響を与えた場合、Wang ら¹⁴⁾によると、細胞の大きさが1%膨潤した場合で、 F が25%以下だけ増加すると推定されている。このことから、圧縮弾性測定では試料の膨潤による圧縮弾性への影響が大きいため、試料の直径を詳しく測定する必要がある。そのため、試料の直径を詳しく調べることを目的とした。

2-3-2 方法

細胞の膨潤による膨圧が磁場により変化し、かつその効果が磁場外に取り出しても残っているかを調べるために、2-1で行った圧縮弾性実験と同じ手法で作成した試料の画像から、無磁場下で再生させたものと、有磁場下で再生させた試料ともに細胞の直径を詳しく計測した。

2-3-3 結果

図 2-3-1 は 0~10 T の磁場強度で 3 時間磁場に曝露した後、磁場外で試料細胞の直径を測定した結果を示す。縦軸は、細胞の平均直径磁場強度 0~10 T における試料細胞の平均直径は、磁場強度 0 T の場合と比較して有意な差は観測されなかった。各測定は 200 試料について、独立の実験を 2 回行い ($n = 400$)、誤差バーは SE を表す。

表 2.3.1 各磁場における細胞サイズ

磁場強度(T)	再生プロトプラスト直径(μm)	誤差(SE)
0	26.16	0.33
0.3	24.58	0.31
2	25.5	0.38
5	26.44	0.24
10	25.74	0.26

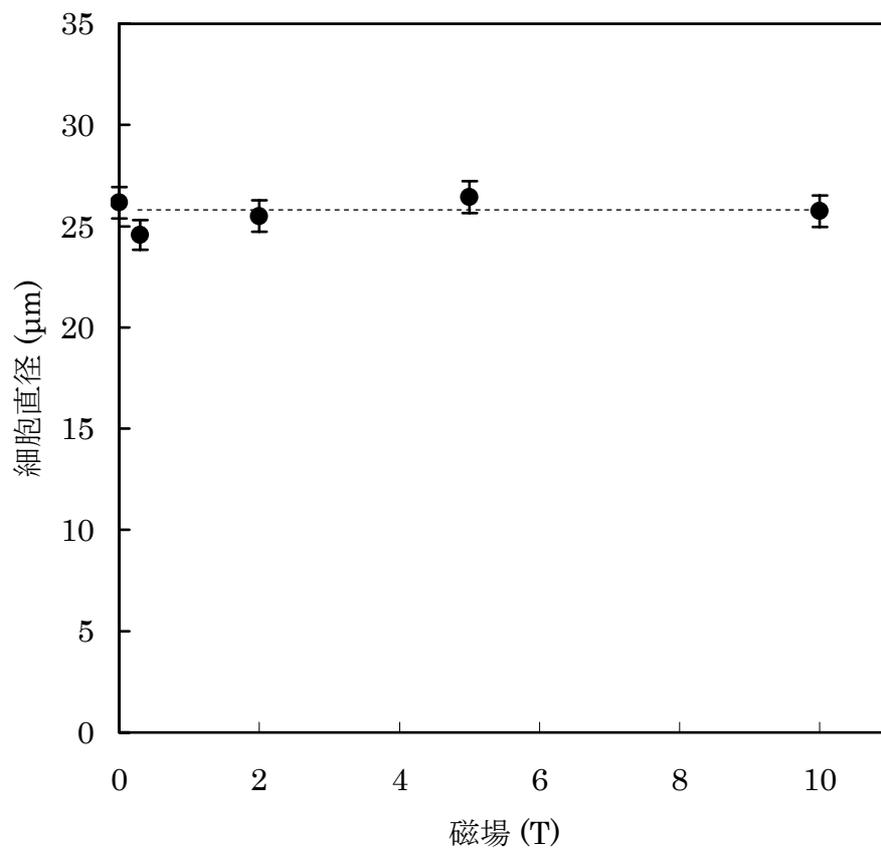


図 2-3-1 細胞サイズ測定

2-3-4 考察

膨圧が変化して、その効果が、磁場外における F の計測中にも持続的に残り、圧縮力に影響を与えた場合、Wang ら¹³⁾や Haneda ら²⁾によると、細胞の大きさが 1 % 膨潤した場合で F が 25 % 以下だけ増加すると推定されている。しかし、図 2-3-1 の結果から、最大 10 T でも、細胞のサイズに有意な差は観測されなかった。従って、仮に磁場により膨圧が変化したとしても、磁場外に取り出して測定しているために膨圧の効果は無視できると考えられた。

2-3-5 結論

細胞壁弾性への膨潤の効果を測定するために、磁場中で再生された細胞の直径を倒立顕微鏡下で直径を詳しく調べたが、磁場中と磁場外で再生された細胞のサイズに有意な差は観測されなかった。

2-4 2章の結論

ニチニチソウの培養細胞から作成したプロトプラストを磁場に 3 時間暴露することにより、細胞全体を圧縮した場合の弾性（圧縮弾性 F ）が磁場依存的に有意に増加した（図 2.1.2）。

図 2.1.1 より、磁場曝露したのもそうでないものも、時間経過によって細胞壁が再生していることから、細胞壁の再生自体は起こっていたと言える。

試料細胞は細胞の内部、細胞膜（リン脂質二重層を基調とする）、および細胞壁（セルロースマイクロフィブリルを基調とする）から構成されている。従って、 F の磁場効果に対する要因として、細胞内部、細胞膜、再生細胞壁および膨圧^{2, 13)}などが原理上考えられる。細胞弾性の指標として用いた F は、文献 2)と同様、細胞壁が全く再生していない場合、観測にかからないほど小さい（図 2-1-5）。このことから、細胞弾性の変化の原因が細胞内部や細胞膜にはないと考えられる。残った因子は、細胞壁と膨圧であるが、膨圧が変化して、その効果が、磁場外における F の計測中にも持続的に残り、圧縮力に影響を与えた場合、Wang ら¹³⁾や Haneda ら²⁾によると、細胞の大きさが 1 %膨潤した場合で F が 25 %以下だけ増加すると推定されている。図 2-3-1 から膨圧の磁場依存性に有意差は見られなかったが、以上の条件を満たしているかを次に議論する。すなわち、 F が大きく変化した 0 T と 0.6 T において、検定を行った結果、危険率 5 %で直径の差が 1 %以下であった。一方、 F が 0 T と 0.6 T において 25 %以上の増加を示しているので、膨圧の変化が原因ではないことがわかった。

また、細胞壁の弾性は細胞壁の Young 率とセルロース面密度に比例するが、図 2-2-2 の結果が示すように細胞壁合成量に磁場の効果が見られなかったことから、細胞壁弾性が上昇したのは細胞壁の厚さ（細胞表面に存在するセルロースマイクロフィブリルの密度）が増した事によるものではないと言える。

以上のことから磁場中で再生された細胞壁の再生セルロース分子の細胞表面面密度当たりの弾性率が、磁場の無い場合と比べ、最大でおおよそ 2 倍増加したと考えられた。

一方、面積弾性率の測定では、膨潤の影響は受けないが細胞壁表面のセルロース面密度に比例する。こちらも同様に図 2-2-2 の結果が示しているように、セルロース面密度に有意な差が観測されていない。このことから、磁場により細胞壁のヤング率そのものが増加したことがわかった。また、図 2-1-8 が示すように磁場の方向を軸としたとき、再生プロトプラストの赤道付近の面積弾性率は、極の付近に比べて弾性増加が著しく大きかった。この弾性の異方性から、細胞表面のセルロースマイクロフィブリルとそれらが構成するネットワークの磁場配向が推定された。

参考文献

- 1) T. Haneda Y. Fujimura, and M. Iino, *Bioelectromagnetics*, **27**(2), 98-102 (2006).
- 2) Y. Fujimura, D. Kurimoto, and I. Masaaki: *Proceedings of International Symposium on Magneto-Science 2005*, Yokohama, ed by M. Yamaguchi, Y. Tanimoto, S. Ozeki, and T. Kimura, (2006).
- 3) J. Torbet, J. M.Freyssinet, and G. Hudry-Clergeon, *Nature*, **289**, 91-93 (1981).
- 4) T. Yamagishi, T. Takeuchi, T. Higashi, and M. Date, *Physica B*, **177**, 523-526 (1992).
- 5) J. Sugiyama, H. Chanzy, G. Maret, *Macromolecules*, **25**, 4232-4234 (1992)
- 6) T. Murashige and F. Skoog, *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497 (1962).
- 7) M. Ukita, A. Furuya, H. Tanaka, and M. Misawa: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2849 -2854 (1973).
- 8) 奥田一雄, 電子顕微鏡, **34**, 81-86 (1999).
- 9) Y. Fujimura, M. Iino, and U. Watanabe, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44**, 3325-3329 (2005).
- 10) N. Mera, H. Aoyagi, F. DiCosmo, and H. Tanaka: *Biotech. Lett.*, **25**, 1687-1693 (2003).
- 11) J. Blewett, K. Burrows, and C. Thomas: *Biotech.*, **221**, 1877-1883 (2000).
- 12) K. K. Liu, D. R. Williams, and B. J. Briscoe: *Phys. Rev. E*, **54**(No. 6), 6673 (1996).
- 13) M. Yamamoto, M. Fujishita, A. Hirata, and S. Kawano: *J. Plant Res.*, **117**, 257-264 (2004).
- 14) CX. Wang, L. Wang, and CR. Thomas: *Annals of Botany*, **93**, 443-453 (2004).
- 15) X. M. Dong and D. G. Gray: *Langmuir*, **13**, 3029-3034 (1997).
- 16) J. F. Revol, L. Godbout, X. M. Dong, and D. G. Gray: *Liquid Crystals*, **16**, 127-134 (1994).

第 3 章

細胞壁弾性の磁場制御のメカニズム

3-1 疎水エネルギーの磁場効果

3-1-1 背景

水は、生活に大変重要な物質であり、様々な特異な性質を持っている。その理由として、水分子同士の水素結合が指摘されてきた。磁場は、水の水素結合の赤外スペクトルを変化させ¹⁾、屈折率を増加させる²⁾ので、磁場が水素結合を安定化させると推定されている^{1, 2)}。一方、磁気エネルギーは、帯磁率から計算でき、10 Tで6.5 mJ/molである。磁場によるバルク水のGibbsの自由エネルギーは、磁場により増加し、この結果、水面下降（モーゼ効果）が起るが、磁場内外でGibbsの自由エネルギーが等しい相平衡が達成される。すなわち、この降下の重力エネルギーは磁場エネルギーと等しくなくてはならず、実際10 Tで4 cm程度の水位差が観測されるにすぎず、バルク水のGibbsの自由エネルギーに比較して大変小さいはずである。一方、バルクでない系ではどうであろうか。水が他の液体より大きい表面張力を示すのも、強い水素結合がその理由であるとされている。水の表面張力、あるいは、界面張力は、生体膜などの分子を含む様々な分子内、あるいは分子同士の相互作用と密接であるので、水の表面張力に磁場効果があれば、明らかにされる必要がある。

表面張力の測定方法には、毛細管上昇法や、円環引き上げ法、液滴法などがある、これらの方法は、メニスカスなどの局面があることや、接触角の影響を強く受けるなどの問題点がある。一方、表面張力波による方法があり、共鳴波を用いる方法では、磁場による計測を想定するとき、表面が曲面になっても測定が容易かつ高精度が得られるため、本実験では、表面波共鳴法4-6を用いた。細胞壁弾性への磁場効果として、セルロース分子間の疎水性相互作用が磁場により強くなった可能性が考えられた。セルロース分子—水分子界面のヘルムホルツ自由エネルギーが磁場で増加したことになるが、この自由エネルギーは水—空気界面の自由エネルギーにほぼ対応する。細胞壁弾性への磁場効果の原因を調べるために表面張力（水—空気界面の自由エネルギー）に対する磁場効果を明らかにすることを目的とした。

3-1-2 実験

測定原理

表面波の波長に比べて液体の深さが十分に深く、表面波の振幅が波長に対して充分小さいという線形近似の範囲において、表面波の分散方程式は以下の形で与えられる。

$$\omega_n^2 = \frac{(\rho_l - \rho_g) g \frac{n\pi}{l-\delta} + \sigma \frac{n\pi^3}{l-\delta}}{\rho_l \text{Coth}\left(\frac{n_l \pi d}{l-\delta}\right) + \rho_g \text{Coth}\left(\frac{n_l \pi d}{l-\delta}\right)} \quad \dots (3.1.1)$$

パラメータが多いため、 σ 、 l 、および δ を不明なパラメータとし、後は、実測値や年表などの値を用いた。代入した具体的な数値は、表 2.1.1 に示す。

表 3.1.1 数式のパラメータ及び実測値・文献値

パラメータ	語句の説明	実測値・文献値
$\omega = 2\pi f$	角周波数	—
f	周波数	—
σ	表面張力	—
n	mode 数	—
δ	伸び補正	—
ρ_l	水の密度	0.99704 g/ml
ρ_g	空気の密度	0.001293 g/ml
d	水の深さ	1.5 cm
l	セルの横幅	0.96 cm
g	重力加速度	980.665 cm · s ²

各モードにおけるパラメータの δ_n は磁場がゼロの場合の σ の値 71.97 N/m と l の実測値 0.96 mm を代入して求めた。

本実験の試料として、超純水を用いた。図 3.1.1 の装置内で図 3.1.2 のようなセル内で表面波を共鳴させ、その分散式 (3.1.2, 3.1.3) から表面張力 σ を算出した。ここで、 n は共鳴モード、 ω_n は角周波数、 k_n はモード n の波数、 ρ_l と ρ_g は、それぞれ液体と気体の密度、 d_g と d_l はそれぞれ気体と液体の深さ、 g は重力加速度、 L は共鳴器の寸法、 $\Delta L(B)$ は磁場の不均一により液面が曲面になったときの L の実効的延長量である。

$$\omega_n^2 = \frac{(\rho_l - \rho_g) g k_n + \sigma k^3}{\rho_l \coth(k_n d_l) + \rho_g \coth(k_n d_g)},$$

(3.1.2)

$$k_n = \frac{n\pi}{L + \Delta L(B)},$$

(3.1.3)

文献 3-6 と同様な方法による電界励起の表面波共鳴法を静電的に検出する技術を用いた。毛細管上昇法では、表面張力による圧力差のため、蒸発の平衡状態が得られない点や、接触角の影響を大きく受けるなどの問題がある。また、表面波を光で検出する方法では、磁場不均一による水面がモーゼ効果で曲面を形成する場合には測定が難しいなどが、本測定法を用いた理由である。しかしながら、強磁場内で、安定して高周波で発振する電子回路や冷凍機の振動の影響を低減するために、様々な工夫が必要であった。温度の安定化は、冷却恒温槽により行い、 $25 \pm 0.1^\circ \text{C}$ の精度で安定化した。

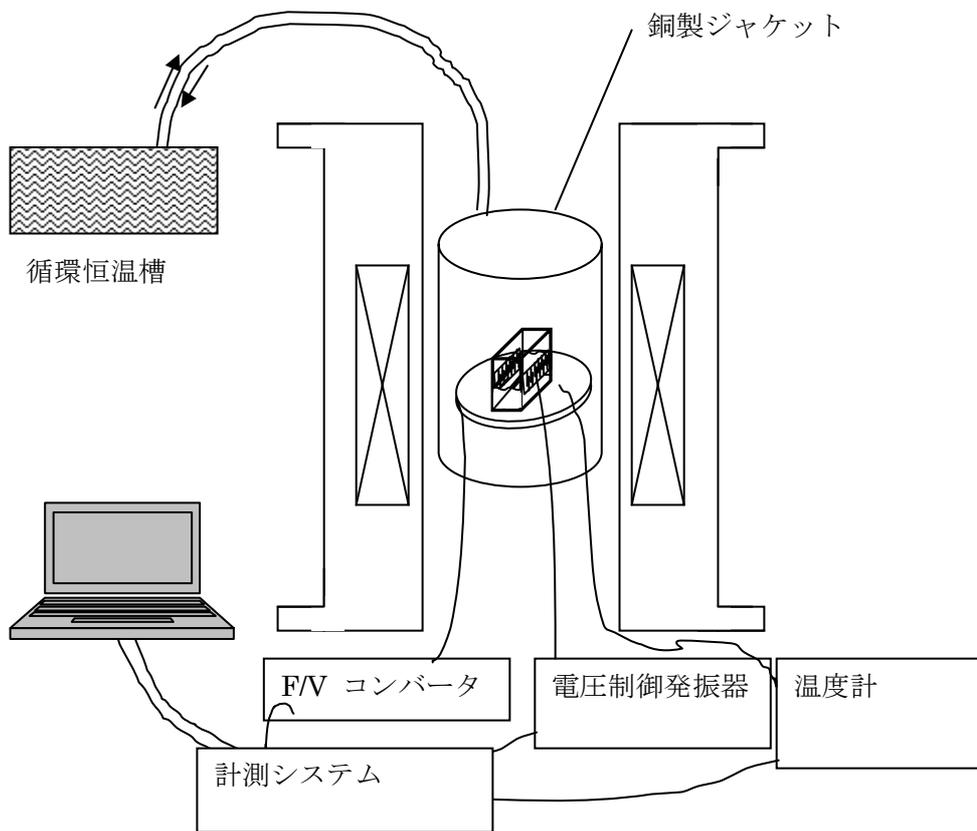


図 3.1.1 測定システム図

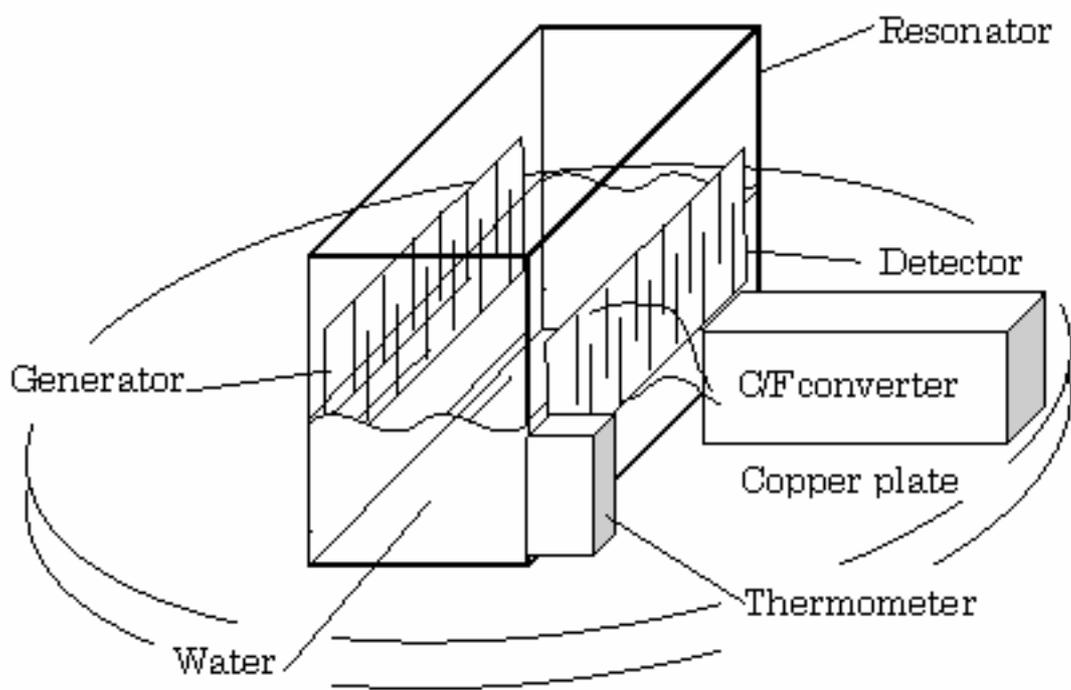


図 3.1.2 測定セル外略図

実験装置

図 3.1.3 に実験システムのブロック図を示した。Voltage Controlled Oscillator (KENWOOD、FG-273A) の交流発振出力を Voltage AMP (KEPCO、BOP 1000M) により表面波が励起するまで電圧を増幅させて Sample Cell に入力し、このときに生ずる電界によって Sample Cell に表面波が発生した。C/F Converter により、表面波の上下変化による静電容量の変化を周波数に変換し、F/V Converter (AOR、AR5000) によって周波数を電圧に変換して、Lock-In AMP (NF ELECTRONIC INSTRUMENTS、LI-575) で電圧信号を検出した。この Lock-In AMP に表示される出力電圧を表面波の測定値として検出した。更に、Lock-In AMP からの出力を P.I.回路、V.C.O.に帰還させ、V.C.O.の出力する周波数と共鳴周波数を同期させた。つまり、Lock-In AMP と P.I.回路によって Phase-Lock-Loop (以下 PLL) をかけた。このとき、Lock-In AMP は V.C.O.の発振する周波数を参照信号とした $2f$ モードで起動した。なお本測定は、精密な周波数測定のために、Digital Multi-Meter (KEITHLEY、2000MULTIMETER) を用いて Lock-In AMP が検出した計測値を正確に測定した。また、Frequency Counter (ADVABTEST、TR5822) で検出した周波数と Lock-In AMP で検出した各種測定値は GPIB ボード (INTERFACE、PCI-4301) を備えたパソコンでデータを取得した。Oscilloscope (KENWOOD、CS-4135) は P.I.回路の出力信号と F/V Converter のアンテナが拾う信号をモニタリングした。また、Water Bath (AS ONE、LTB-125) の設定温度は $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で行った。

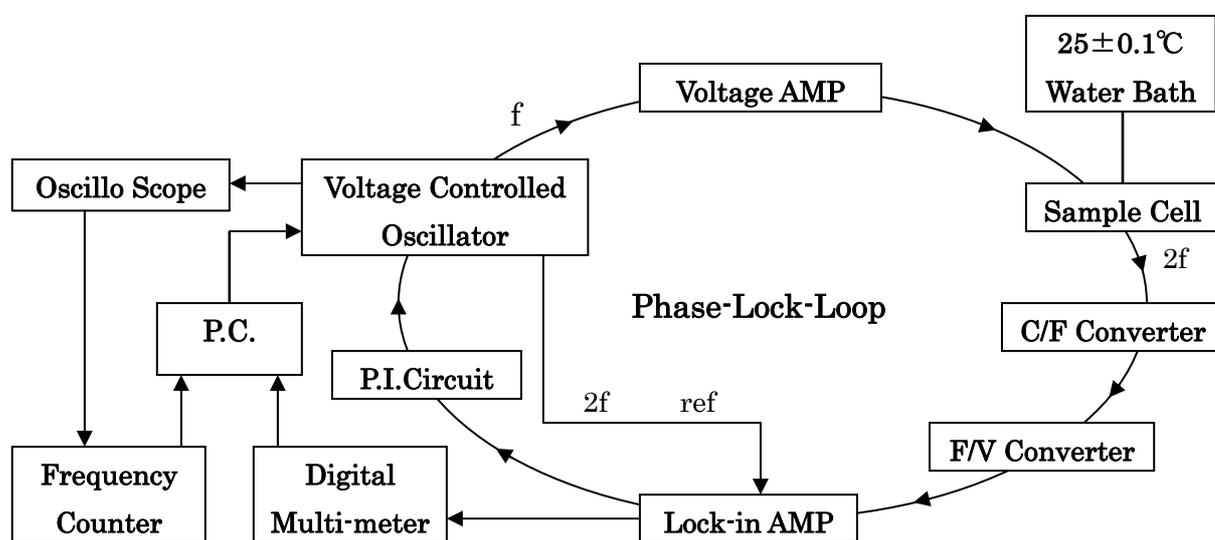


図 3.1.3 実験システムのブロック図

P.I.D.制御

P.I.D.制御理論

P.I.D.制御は比例(Proportional)、積分(Integral)、微分(Derivative)の機能をもっており、これら3つのパラメータを適当に調節できるものである(図3.1.4)。

古くからプロセス制御(化学プラント、石油プラント、製油)の産業分野で温度、圧力、流量などを一定に保つ調整動作で使用されてきた。近年では、サーボ系、ロボットの飛翔体の制御としても広く用いられている。P.I.D.制御の基本的なブロック線図を下に示す。

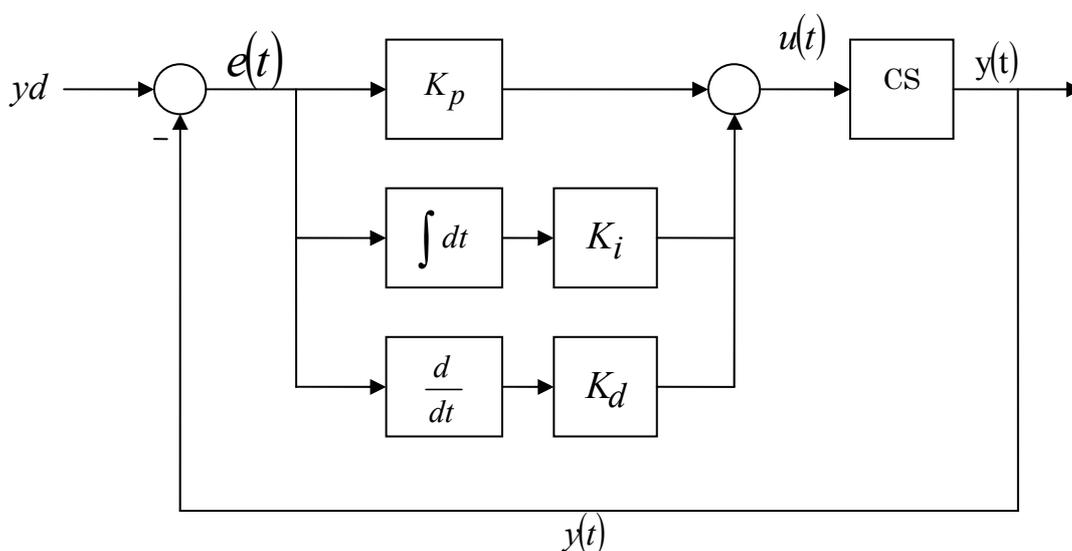


図 3.1.4 P.I.D.制御のブロック線図

ここで、 K_p, K_i, K_d はそれぞれ比例、積分、微分のフィードバックゲイン、CS は制御対象システム、 $\int dt, d/dt$ は積分項、微分項である。このとき積分項、微分項は、

$$K_i \cdot \int_0^t e(t) dt, \quad K_d \cdot \frac{d}{dt} e(t) \quad \dots (3.1.4)$$

となるので、制御対象システムへの入力値 $u(t)$ は、

$$u(t) = K_p \cdot e(t) + K_i \cdot \int_0^t e(t) dt + K_d \cdot \frac{d}{dt} e(t) \quad \dots (3.1.5)$$

で表される。

更に(3.1.5)式をラプラス変換すると、

$$G(s) = K_p + K_i \cdot \frac{1}{T_i S} + K_d \cdot T_d S \quad \dots (3.1.6)$$

となり、もし $K_p = K_i = K_d$ とするならば、

$$G(s) = K_p \left(1 + \frac{1}{T_i S} + T_d S \right) \quad \dots (3.1.7)$$

で表すことができる。ここで、 T_i は積分時間、 T_d は微分時間を表す。

図 3.1.5 には (3.1.7) 式をブロック図で表した ^{7), 8)}。

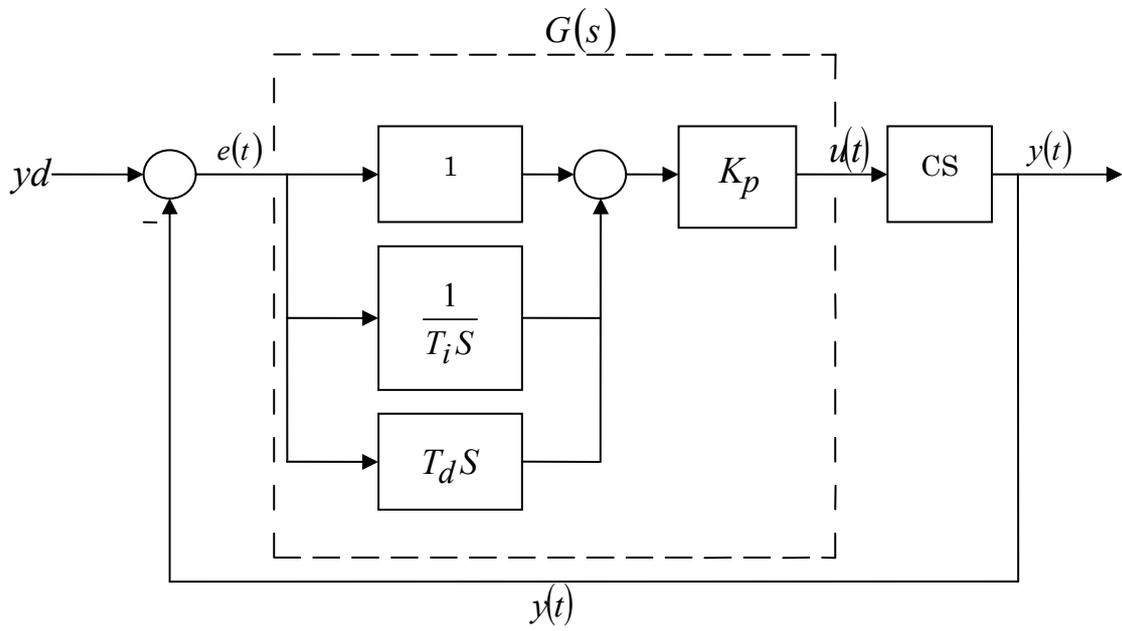


図 3.1.5 P.I.D.制御のブロック線図

P.I.回路の電源

今回、安定した電圧を P.I.回路に供給するため、図 3.1.7 のような三端子レギュレータを用いた電源回路を使用した。入力側のコンデンサは、バイパスコンデンサとしての役割で高周波のノイズをカットした。出力側は、周波数安定用のために用いた。これによって入力電圧や出力電流が変化しても、安定した電圧を供給することができた。

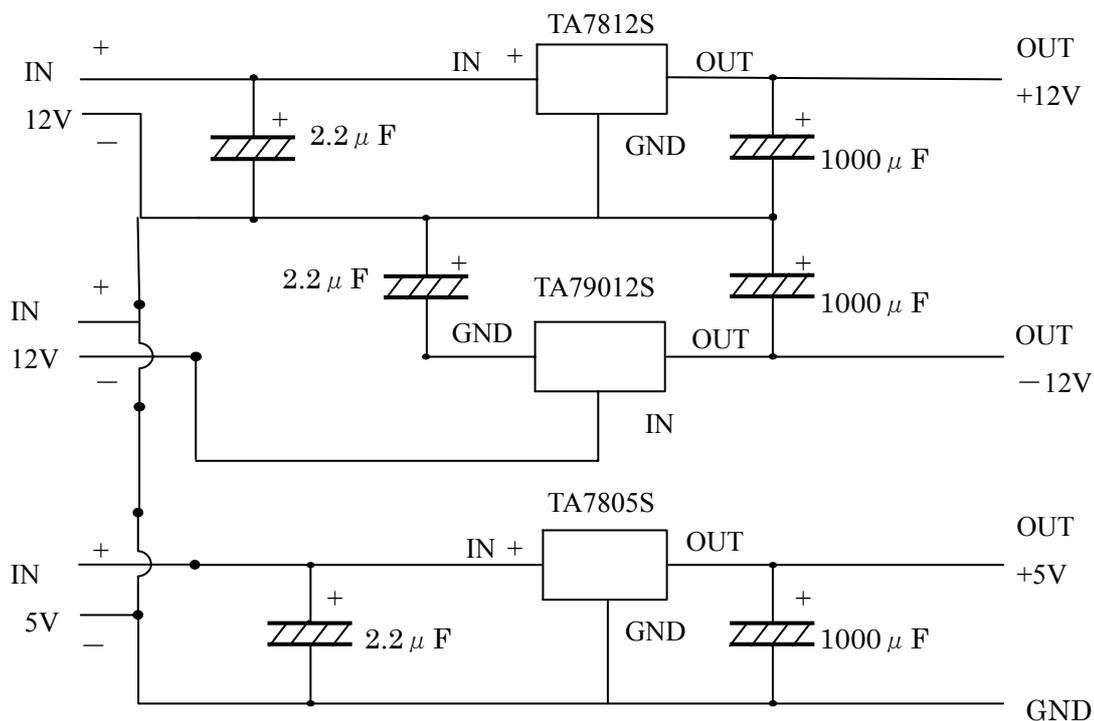


図 3.1.7 安定化電源供給回路の概略図

鳴周波数測定

測定システムは、V.C.O(Digital), FREQUENCY COUNTER、OSCILLOSCOPE、LOCK-IN AMP、DIGITAL MULTI-METER、C/F CONVERTER、F/V.C.ONVERTERによって構成した。循環恒温槽を用いて、セル内を $25\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ に維持した。試料については、セル内に超純水をガラスピペットを用いて5.6 ml入れた。水-空気界面と磁束密度が垂直になるように水準器を使いセルを調整した。また、試料の蒸発を防ぐためゴム製の蓋でセルを密封した。測定は、プログラムを用いてステップ0.01 Hz、間隔を2 sとし自動で掃引した。検出したスペクトルの出力電圧の値がピークになるときの周波数を共鳴周波数とした。

Q 値の算出

最高出力での V.C.O 発振周波数 $\omega_0(\text{Hz})$ とした場合、 $\omega_0 \div 2$ の値と測定波形との交点を $\omega_1(\text{Hz})$ 、 $\omega_2(\text{Hz})$ とする。この時の ω_1 と ω_2 の幅を半値幅とする。この時Q値は以下の式 (3.9) で算出した。

$$\frac{\omega_0}{\omega_2 - \omega_1} = \text{Q値} \quad (3.9)$$

共鳴周波数波形図における ω_0 、 ω_1 、 ω_2 の位置は、下の図 3.1.8 の通りである。

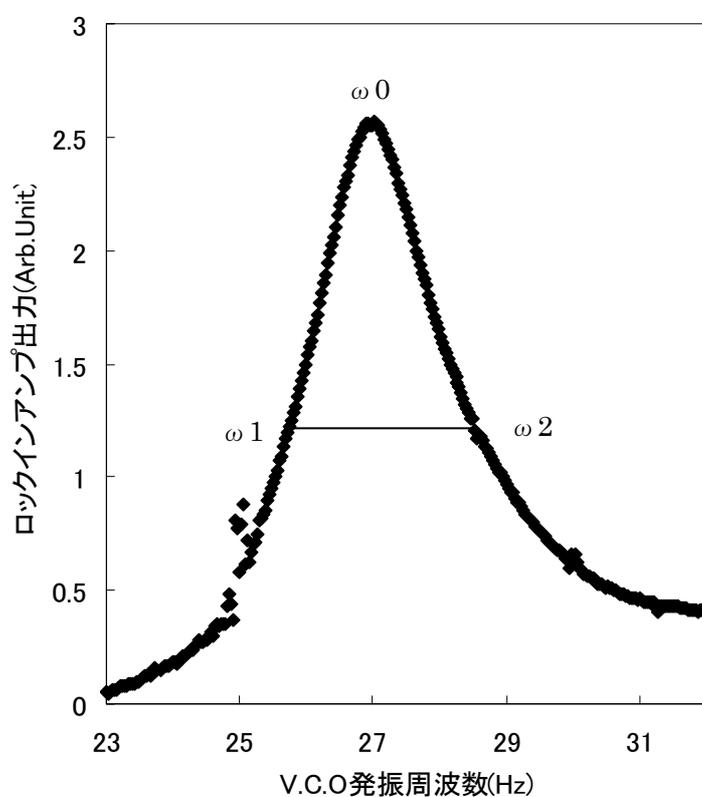


図 3.1.8 共鳴周波数波形図における ω_0 、 ω_1 、 ω_2 の位置

共鳴周波数推移測定

取得した共鳴周波数の中で測定を行うモードを決定した。そのモードにおける共鳴周波数の値を V.C.O(Digital)での数値に合わせ、Lock-In-Amp の OUT1 を $\text{Acos}\varphi$ に設定をし、PHASE OFFSET を回して VOLTAGE MULTI METER の値の触れ幅の中心が 0 V になるように合わせた。

パソコン上のプログラムを起動し、V.C.O(Digital)に入力した周波数 ± 3 Hz の測定を行った。この時 Step は 0.03 Hz 、間隔を 2 s とした。

取得したデータをグラフ化し、図 3.1.9 のような左右対称の波形がでるように確認した。またこのグラフ上で、V.C.O(Digital)に入力した周波数の出力が 0(Arb.Unit) になっている事も確認した。

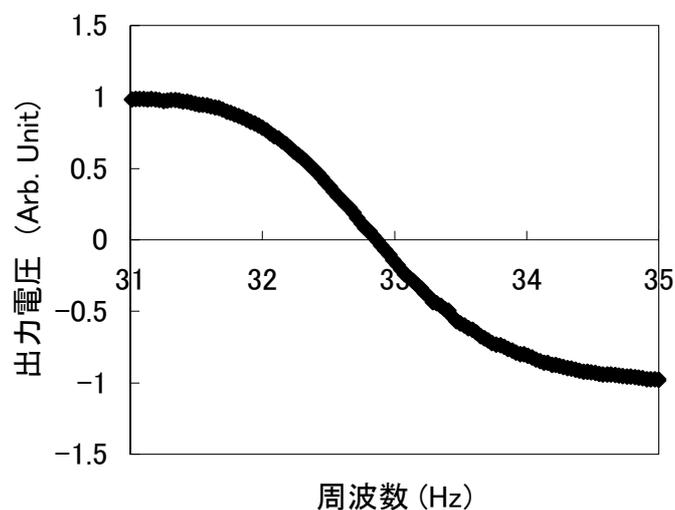


図 3.1.9 $\text{Acos}\varphi$ の測定波形図

磁場中での測定

超電導磁石(100 mm in bore, JMTD-10T100MK, JASTEC, 神戸,兵庫,日本)によって磁場を発生させた。Sample Cell を磁場の中心に配置するために超電導磁石内の磁場の中心測定を行った。磁場中心の測定装置として磁束密度測定装置 (HGM-3000p-3V, 東洋磁気工業,静岡,日本) とプローブ(FS-8,東洋電気工業,静岡,日本)を使用した。磁束密度測定装置にプローブを接続し、超電導磁石から十分に離れた場所で磁束密度測定装置の電源スイッチを入れた。

磁場装置で 2 T の磁場を発生させ、磁束密度測定装置の感度を 3 T に設定をして測定を開始した。磁束密度測定装置が最も高い値の数値を示す場所を磁場の中心とし、その部分に測定セル内の水-空気界面がくるように、測定セルを設置した。

使用 mode の決定

磁場下での測定では、測定を行うモードが重要である。ロックインアンプの出力とは、重力波と表面張力を足したものが表記されている。その為、各モードにおける重力波を 1 とする時の表面張力の割合を算出して使用するモードを決定した。この計算は Mathematica4.1(Wolfram Research, Inc.100 Trade Center Drive Champaign,USA)を使用した。こ Mathematica4.1 で使用した計算式は以下の図 3.1.10 に示した。

$$\begin{aligned}n &= 6 \\g &= 980.665 \\ \rho_l &= 0.99704 \\ \\ \rho_g &= 0.001293 \\ \\ \sigma &= 71.96 \\ l &= 0.96 \\ k &= n * \pi / l \\ \\ \text{Solve} \left[\left\{ \frac{\sigma * k^3}{(\rho_l - \rho_g) * g * k} == L1 \right\}, \{L1\} \right]\end{aligned}$$

図 3.1.10 Mathematica4.1 で使用した mode 決定式

この図内における各記号は以下のようにになっている。

n : モード数 g : 重力加速度 ρ_l : 水の密度 ρ_g : 空気の密度 σ : 水の表面張力
l : セルの横幅

測定

モード4における共鳴周波数推移測定法を行った。この状態で超電導磁石によって磁場を上げていき、2 T、4 T、6 T、8 T、9 T ごとに、それぞれ30分の時間を置いて測定を行った。10 Tまで磁場を上昇させた後、同様に9 T、8 T、6 T、4 T、2 T、ごとに磁場を下げて測定を行った。モード5でも同様の実験を行い、モード4と5の2つのデータから解析を行った。磁場が0 Tにおける表面張力を71.97 mN/mとし、モード3と5における伸び率 σ を以下のMathematica4.1の図3.1.11を使用して算出した。

$$\begin{aligned}
 n &= 5 \\
 g &= 980.665 \\
 \rho_l &= 0.99704 \\
 \rho_g &= 0.001293 \\
 d &= 1.5 \\
 \sigma &= 71.93 \\
 l &= 0.96 \\
 k &= \frac{n * \pi}{l - \delta} \\
 \omega &= 2 * \pi * f \\
 f &= 37.6279485 * 2 \\
 \text{Solve} \left[\left\{ \frac{(\rho_l - \rho_g) * g * k + \sigma * k^3}{\rho_l * \text{Coth} \left[\frac{n * \pi * d}{l} \right] + \rho_g * \text{Coth} \left[\frac{n * \pi * d}{l} \right]} \right\} == \omega^2, \{\delta_n\} \right]
 \end{aligned}$$

図 3.1.11 伸び補正 δ を算出する為に使用した式

この式内の各記号は以下の通りである。

n : 使用した mode、 g : 重力加速度、 ρ_l : 水の密度、 ρ_g : 空気の密度、
 d : 水の深さ、 σ : 表面張力、 l : セルの横幅、
 f : 使用した mode における共鳴周波数、 δ_n : 伸び補正

伸び補正 δ_n は Mathematica4.1 の式である以下の図 3.1.12 内に代入し、各項目における表面張力を算出した。

$$\begin{aligned}
n_1 &= 3 \\
n_2 &= 5 \\
g &= 980.665 \\
\rho_l &= 0.99704 \\
\rho_g &= 0.001293 \\
d &= 1.5 \\
\sigma &= 71.93 \\
l &= 0.96 \\
k_1 &= \frac{n_1 * \pi}{l - \delta_1} \\
k_2 &= \frac{n_2 * \pi}{l - \delta_2} \\
\omega_1 &= 2 * \pi * f_1 \\
\omega_2 &= 2 * \pi * f_2 \\
f_1 &= 20.71739 * 2 \\
f_2 &= 37.6279485 * 2
\end{aligned}$$

$$\text{Solve} \left[\left[\frac{(\rho_l - \rho_g) * g * k_1 + \sigma * k_1^3}{\rho_l * \text{Coth} \left[\frac{n_1 * \pi * d}{0.96 - \delta_1} \right] + \rho_g * \text{Coth} \left[\frac{n_1 * \pi * d}{0.96 - \delta_1} \right]} = \omega_1^2, \frac{(\rho_l - \rho_g) * g * k_2 + \sigma * k_2^3}{\rho_l * \text{Coth} \left[\frac{n_2 * \pi * d}{0.96 - \delta_2} \right] + \rho_g * \text{Coth} \left[\frac{n_2 * \pi * d}{0.96 - \delta_2} \right]} = \omega_2^2 \right] \{ \sigma, l \} \right]$$

図 3.1.12 表面張力を算出するために使用した、分散式

この式内の各記号は以下の通りである。

- n_1 : 低い方のモード数、 n_2 : 高い方のモード数、 g : 重力加速度、
- ρ_l : 水の密度、 ρ_g : 空気の密度、 d : 水の深さ、 σ : 表面張力、 l : セルの横幅
- f_1 : n_1 のモードにおける共鳴周波数 f_2 : n_2 のモードにおける共鳴周波数
- δ_1 : n_1 のモードにおける伸び率 δ_2 : n_2 のモードにおける伸び率

3-1-2 結果

共鳴周波数の測定

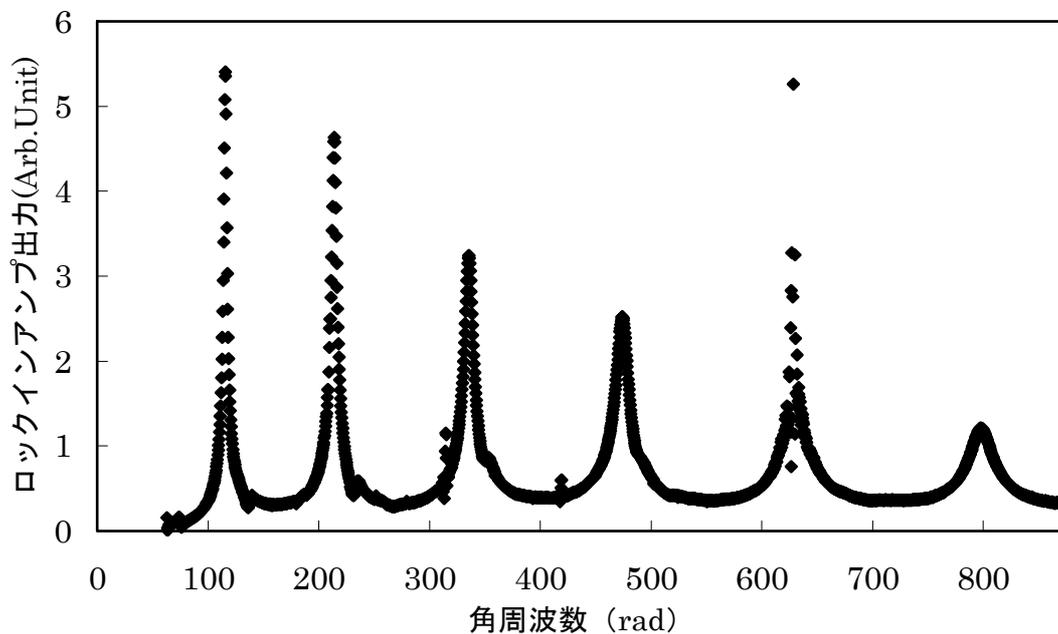


図 3.1.13 共鳴周波数の測定スペクトルのグラフ

表面張力測定装置にて共鳴周波数の測定を行い、図 3.1.13 を得た。このスペクトルより、

mode 1 では S/N 比が 54.0、Q 値は 25.5853、
mode 2 では S/N 比が 46.3、Q 値は 27.0126、
mode 3 では S/N 比が 32.4、Q 値は 26.1454、
mode 4 では S/N 比が 25.2、Q 値は 25.1547、
mode 5 では S/N 比が 14.7、Q 値は 15.7294、
mode 6 では S/N 比が 12.1、Q 値は 18.7363 を得た。

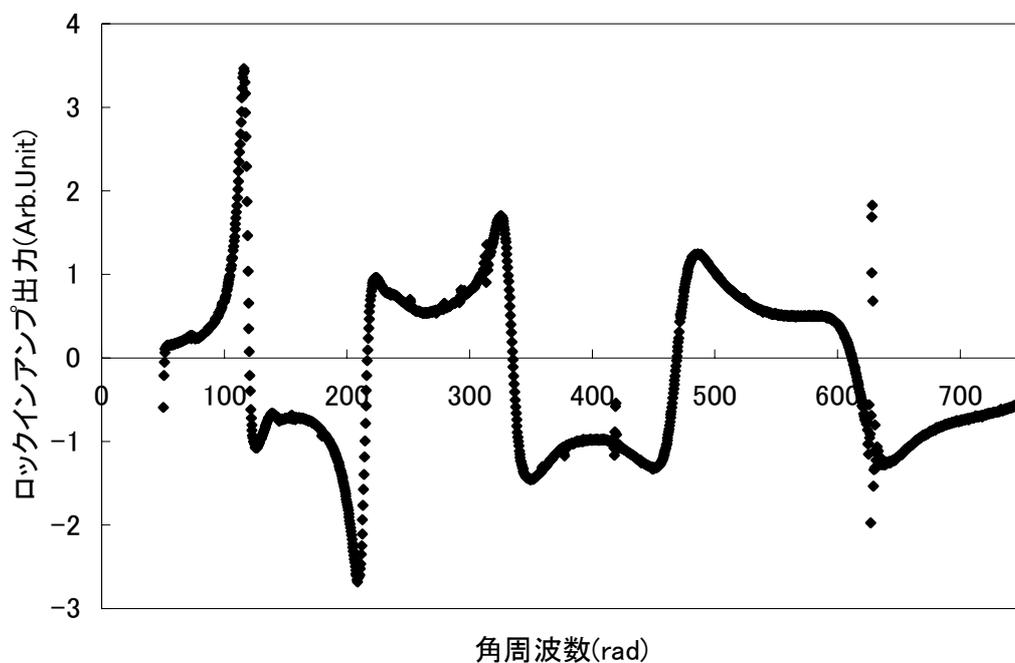


図 3.1.14 同相出力のグラフ

表面張力測定装置にて同相出力 $A\cos\varphi$ の測定を行い、図 3.1.2 を得た。図 3.1.2 からロックインアンプ出力の 0 を横切る各スペクトルが左右対称対象であり、真ん中を 0 度で横切るグラフを得た。

表面張力測定における測定 mode の決定

図 3.1.13 を使用し、ロックインアンプ出力における表面張力と重力波の割合について以下の表 3.1.2 に記した。また分散式における重力波と表面張力について以下の式 (3.1.8) に記す。

$$\omega_n^2 = \left(\underbrace{(\rho_l - \rho_g)g \frac{n\pi}{1-\delta}}_{\text{重力波の項}} + \underbrace{\sigma \frac{n\pi^3}{1-\delta}}_{\text{表面張力の項}} \right) / \left(\rho_l \text{Coth}\left(\frac{n_1\pi l}{l-\delta}\right) + \rho_g \text{Coth}\left(\frac{n_1\pi l}{l-\delta}\right) \right) \quad (3.1.8)$$

$\omega_n = 2\pi f$: 角周波数、

g : 重量加速度、 n : mode 数、 σ : 界面張力、 δ : 伸び補正

ρ_l : 液体の密度、 ρ_g : 液体の密度、 d : 水の深さ、 l : セルの横幅である。

表 3.1.2 各モードにおけるロックインアンプ出力の重力と表面張力の割合

モード数	重力波の割合	表面張力の割合
1	1	0.789
2	1	3.156
3	1	7.102
4	1	12.627
5	1	19.729
6	1	28.410

表 3.2.1 より、mode 数が高いほどロックインアンプ出力は重力波の影響を受けにくくなっていた。

安定度の測定

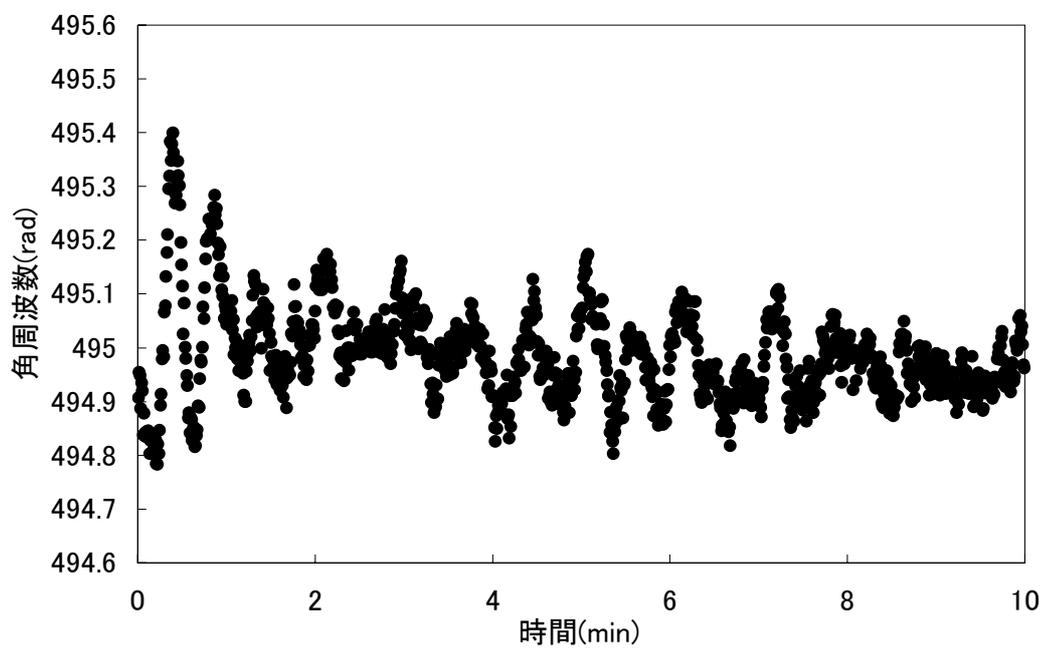


図 3.1.15 安定度測定 PLL 開始 10 分間のグラフ

表面張力測定装置にて共鳴周波数の測定を行い、共鳴周波数のあるところで PLL をかけ、安定度測定を開始し、結果を図 3.1.15 に示した。PLL がかかるまで 1.5 分要した。

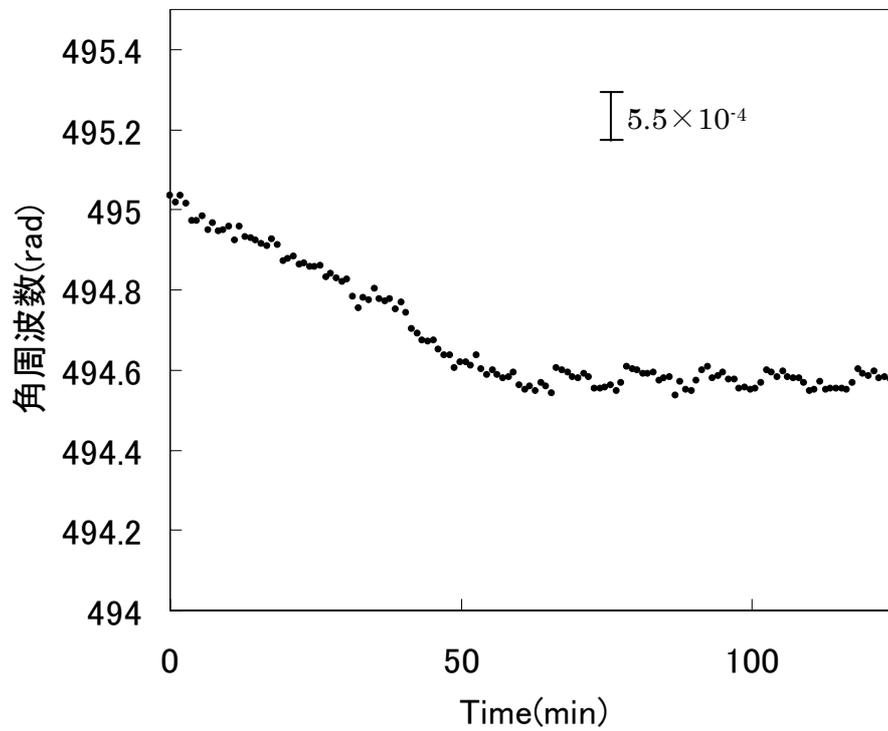


図 3.1.16 安定度測定グラフ

図 3.2.1 の安定度測定を行い、周波数が安定したグラフを図 3.2.3 に示した。60 分経過した辺りから温度が安定した。安定度は 5.5×10^{-4} 得られた。

温度変化の安定度測定

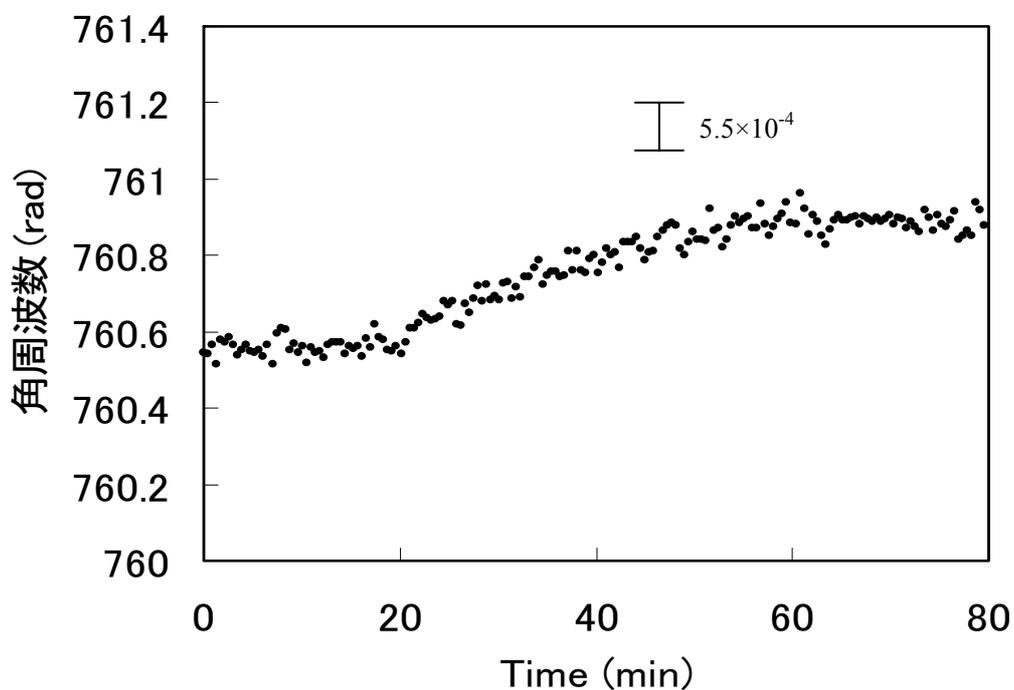


図 3.1.17 温度変化の安定度グラフ

図 3.1.17 のから安定度は 5.5×10^{-4} が得られた。また安定度測定中に循環恒温層の温度を変化させた結果、 1°C 低下あたりに 0.2 % 共鳴角周波数が上昇した。

強磁場下での発振確認

無磁場下での発振を確認した後に、その状態のまま 10 T の磁場下での測定を行った。無磁場下同様に発信が確認できた。

表面波の共鳴が観測された共鳴周波数にロックをかけ、共鳴周波数の推移は 1×10^{-3} 以下の安定度が得られた (図 3.1.18)。測定温度を、プラチナ抵抗温度計や熱電対により測定したところ、最大、0.2 °C 程度、磁場の上げ下げから 10 分程度の間変化していた (図 3.1.19)。

空気-水界面の表面張力は、10 T で $1.83 \pm 0.18\%$ 増加した (図 3.1.20)。2つの共鳴モードから、磁場不均一による水表面の湾曲による延長 (波数低下) から見かけ上、表面張力を低下させる効果をキャンセルした。温度など様々な要因を考慮しても、なお有意な磁場効果が観測された。磁場不均一による水表面の湾曲による延長も、渦電流による温度上昇も、表面張力を見かけ上低下させるが、観測された表面張力は増加した。図 3.1.21 については、横軸に磁場自乗を示した。

表 3.1.3 磁場効果による表面張力の変化

磁場 (T)	表面張力 \pm 標準誤差 (mN/m)
0	71.96 ± 0.14
2	72.12 ± 0.14
4	72.19 ± 0.14
6	72.45 ± 0.14
8	72.86 ± 0.14
9	72.99 ± 0.15
10	73.31 ± 0.16

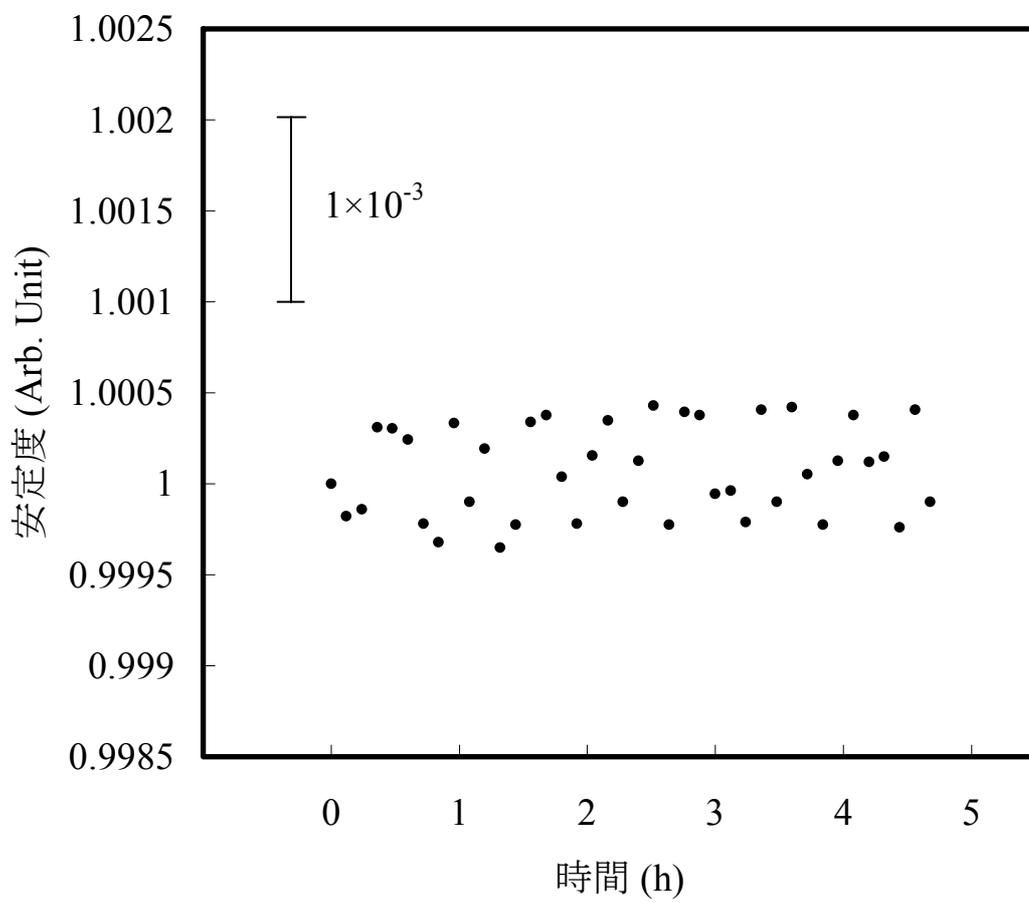


図 3.1.18 表面張力測定 of 安定度

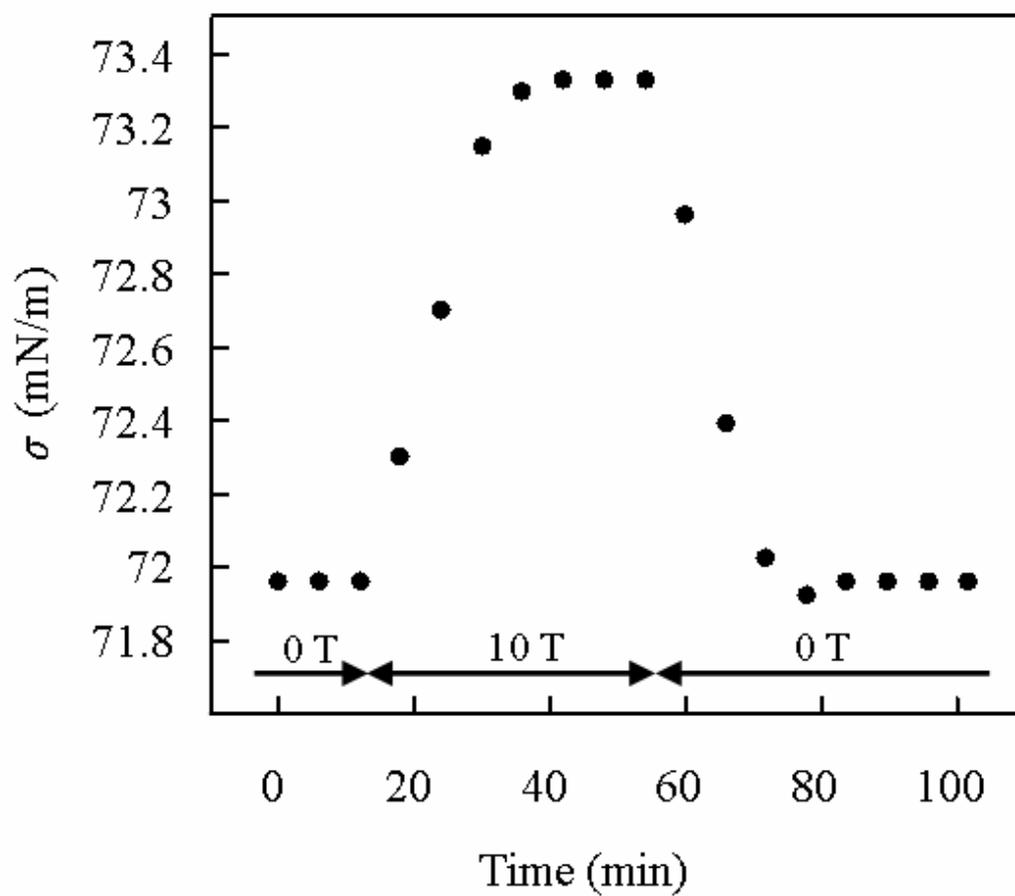


図 3.1.19 10 T における表面張力の変化

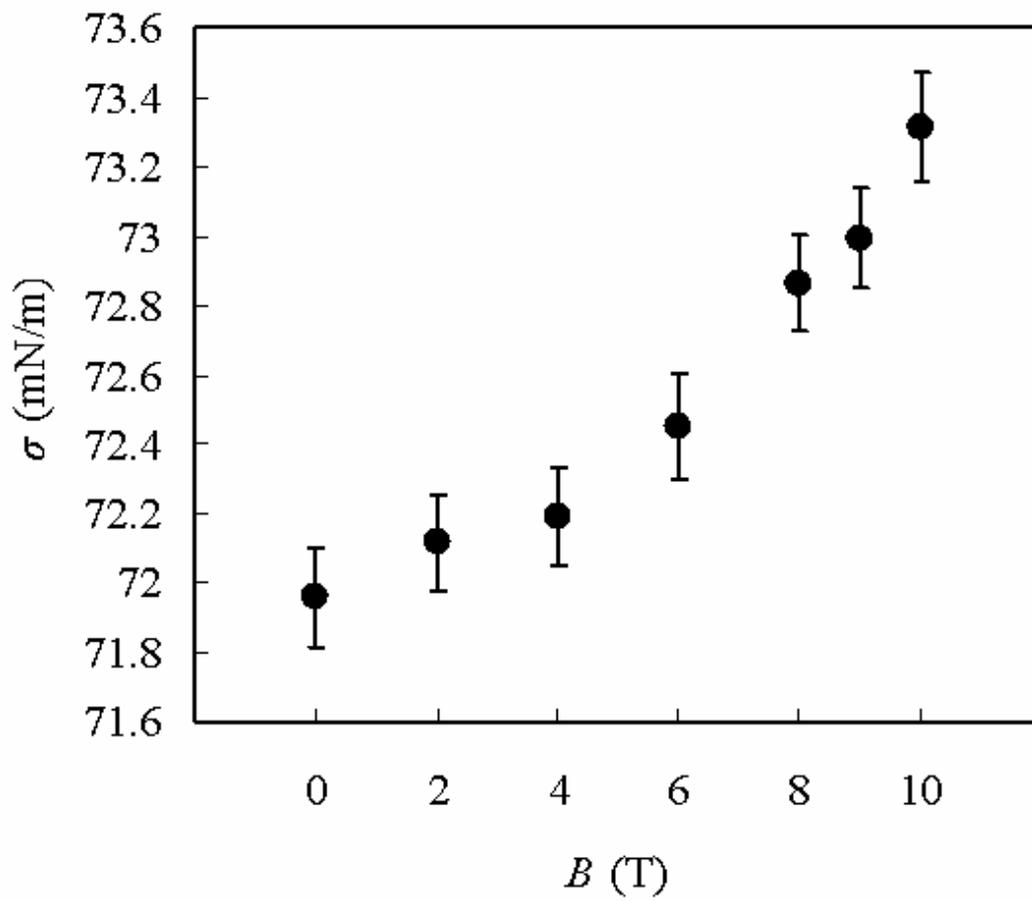


図 3.1.20 表面張力に対する磁場効果

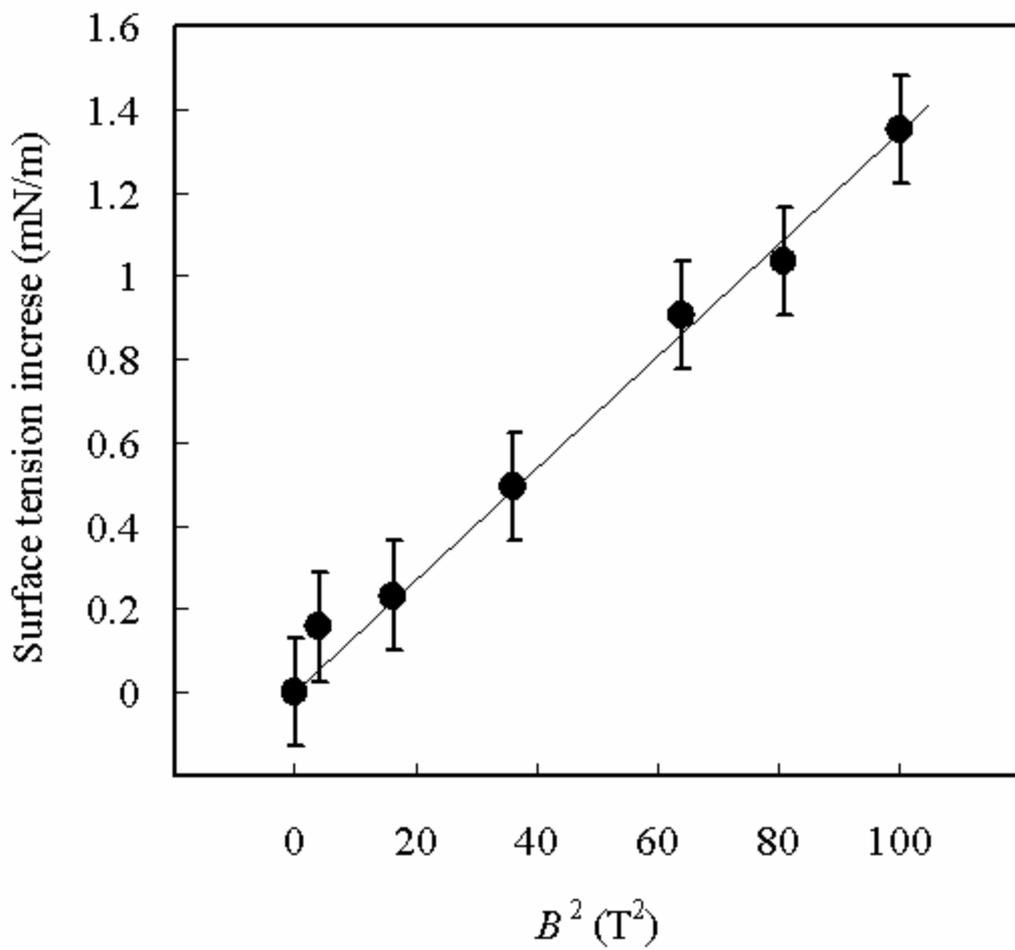


図 3.1.21 表面張力増加の磁場依存性

3-1-4 考察

表面張力測定における測定 mode の決定

表 3.1.2 から重力波の影響で mode 1、mode 2 では表面張力の変化が小さく観測される。しかし、mode 3 以降では重力波の項が表面張力の項に比べ十分に小さくなるため表面張力の変化を正しく観測できると考えられた。

上記のことから本実験では mode4 と 5 を使用した。図 3.1.22 に測定に使用したモード 4 と 5 の共鳴スペクトルと位相を示した。

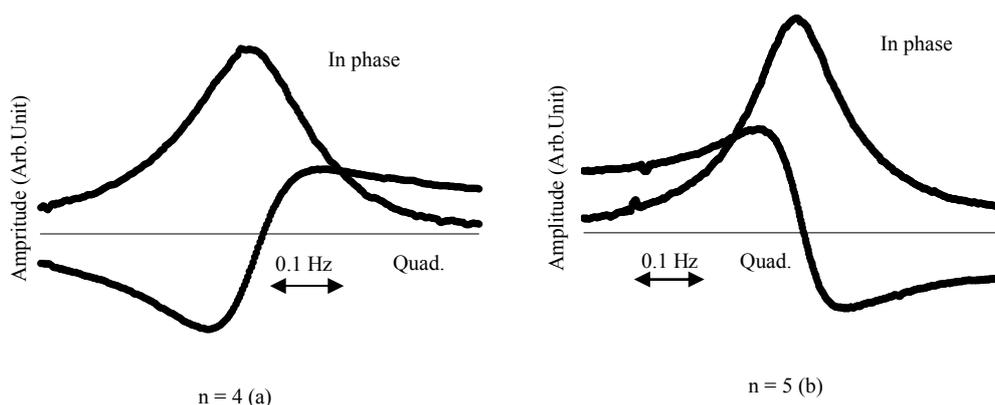


図 3.1.22 共鳴スペクトルと位相.

共鳴周波数推移測定における磁場がない状態での安定度は 8.58×10^{-4} であり、10 T の磁場下における安定度は 7.28×10^{-4} であった。強磁場下でも磁場がかかっている時とほぼ同様の安定度であった。

水の屈折率を強磁場下での測定を行っている文献 1, 2 では約 1×10^{-2} の変化が報告されている。強磁場下の水の表面張力も同程度の変化をするという事を予測していた為、測定精度は充分である事を考えていた。また、この実験システムを使用する事によって磁場下において 7.28×10^{-4} の精度で計測が可能である。

今回の測定における表面張力の上昇が、温度変化によって引き起こされた可能性について考察する。水の温度が 0.1 度変化すると、水の表面張力は 2×10^{-4} するだけである。温度変化による影響は、観測した表面張力の変化より二桁も低い。超電導磁石から発生する渦電流によって温度が上昇する事が考えられるが、温度が上昇する事によって表面

張力は減少する。この2点から表面張力の上昇は、温度変化による影響ではないと考えられた。

通常表面張力測定では、最も影響が大きいのは、磁場の不均一による効果である。表面波共鳴法では、平面が曲面になることで、 L (波の伝わる距離) が増加する点の特徴である。本実験では、故意に磁場中心からずらし、不均一を与えた場合でも、2つの共鳴条件の式を連立させて計算したところ、実験誤差は、0.25 %程度であったことから、磁場中心における誤差は、0.1%以下程度であると見積もられた。図 3.1.21 からわかるように、磁場の自乗に概ね比例した。磁場の自乗依存性は、屈折率への効果³⁾や融解点への効果⁴⁾の場合と似た結果を得ている。原因の1つには、表面の水の磁化率の絶対値が2桁ほど大きく、表面の水分子大きい磁氣的内部エネルギーを有する場合である。磁場がローレンツ力により、電子を非局在化することが原因であるとする、表面にいる分子の気相を向いている電子は、障害となる周りの分子がないため、バルク中の分子の電子が受ける非局在化より著しい可能性がある。もしも、表面の分子の反磁性が、バルクの反磁性より2桁大きいならば(1)式の2対の分布関数が変化を受けなくとも、表面張力の増加を説明しうる。

水の表面張力に水素結合が大きく関係している事は知られている。バルクの水の物性はギブス自由エネルギーに支配され、10 Tの磁場は数 ppm 程度しか影響しないはずである。しかしヘルムホルツ自由エネルギーのPとVの項目がなく、水素結合による体積増加の影響を受けずに、増加すると考えられる。すなわち、水の10 Tでの表面張力上昇の要因について水素結合が関係していると考えられる。磁場の効果により、水の水素結合を安定させるメカニズムも報告された¹⁻³⁾。この事から磁場の効果によって水素結合が安定しやすい状態に向かい、水素結合数が増加し、結果的に表面張力が増加したと示唆された。

以上により、水-空気界面の表面張力は、磁場により増加することがわかったが、磁場の二乗に比例して増加したことから、細胞壁弾性の増加の仕方と明らかに異なった結果となった。これにより、セルロース分子間の疎水性相互作用が磁場により変化したのではないことがわかった。

3-1-5 結論

本実験において水の表面張力における磁場効果を確認する事ができた。10 Tの磁場は約 1.8%の表面張力を増加させ、その増加は磁場の自乗に比例することが明らかとなった。細胞壁弾性の磁場依存性とこの増加が異なっていたため、磁場による細胞壁弾性増加の原因ではないことが判明した。

3-2 構成分子ゲルの弾性への磁場効果

3-2-1 背景

ゲルや液晶の中にも生体由来の材料がある。その力学的物性は構成分子の結晶性や配向性と深く関わっている。特に配向性は生化学反応によらずに自己組織的に起こると考えられ、1T 程度の磁場でも、ゲルによっては構成分子が完全に配向することが知られている^{1,2,3)}が、圧縮弾性などの力学的物性を直接測定している例はあまりない。1章で使われていた細胞圧縮弾性装置を改良しゲルの圧縮弾性を測定した。試料には一般的に色々な研究分野に使われており扱いやすいためアガロースを用いた。ゲルの強度を制御できれば材料としての応用範囲が広まるのではないかと考えられる。

遺伝子発現などにかかわる生物特有の現象、細胞壁を構成するマイクロフィブリルが磁場配向したことが疑われた。生きていない系として、細胞壁構成成分であるアガロースゲルに対するヤング率の磁場効果を測定した。等方弾性体の弾性は、例えば、ラメの定数 λ と μ や、ヤング率 E とポアソン比 σ などの2つの独立な弾性定数で記述される。アガロースゲルでは、弾性データ^{1,2)}より、 $\sigma=0.4999996 \approx 0.5$ の程度であるので、 $E (=3\mu)$ により弾性を特徴付けられ（液体では零）る。一方、磁場下形成ゲルの貯蔵弾性率 $[2\mu+\lambda=2\mu+\sigma E/\{2(0.5-\sigma)(1+\sigma)\}]$ 、液体の場合は体積弾性率が異方性を示すことが、Yamamoto らの卓越した実験により明かにされた¹⁾が、前記のように、ゲルの弾性を完全には特徴付けられない。そこで、本研究では、 E の異方性^{2, 3)}と磁場依存性を測定³⁾し、さらにエントロピー弾性に関する理論的モデル³⁾と測定値との比較を行った。

3-2-2 方法

細胞圧縮型弾性測定装置と同じ系を使って、図 3.2.1 に示したような測定器でアガロースゲルのヤング率を測定した。図 3.2.2 は、顕微鏡下でゲルを圧縮している顕微鏡増である。文献 5-7 と同様な方法（降温速度 0.1 K/min）により濃度が 1% と 2% のアガロースゲルを磁場内（JASTEC 社 JMTD-10T）で形成した。E の測定 5, 6 は、磁場外で、図のように、直方体のゲルを一方方向にガラス棒で押しつけ、そのときの変形量とカンチレバー（感度 15 $\mu\text{N}/\mu\text{m}$ ）の撓みによる反発力から算出した。図 3.2.3 に、ゲルを一定変形させたときの変位計の波形を示した。

測定は、1%、2%アガロースゲルをそれぞれ 4、8、12、・・・、40 μm といった様に 4 μm 刻みで 40 μm までロッドを押し込んで圧縮し力と変位の直線領域を調べた。

図 3.2.4 では 20 μm ロッドを押し込んだ時のまではだいたい直線的に変形している。この結果から以後の圧縮試験を 20 μm 押し込んだ。

測定試料は恒温循環槽で 25°C に保たれた。

試料には 1% と 2% アガロースゲルを用いた。倒立型顕微鏡で補足しながら弾性を測定し、磁場へ暴露したものと無磁場下のものとを比較した。有磁場下のは磁場マグネット を用いてアガロースへ 2~10T まで磁場を曝露しながら 0.17°C/min で 1 時間かけて固まらせた。また、磁場を曝露した方向に平行に圧縮したものと垂直に圧縮したものを測定し比較を行った。

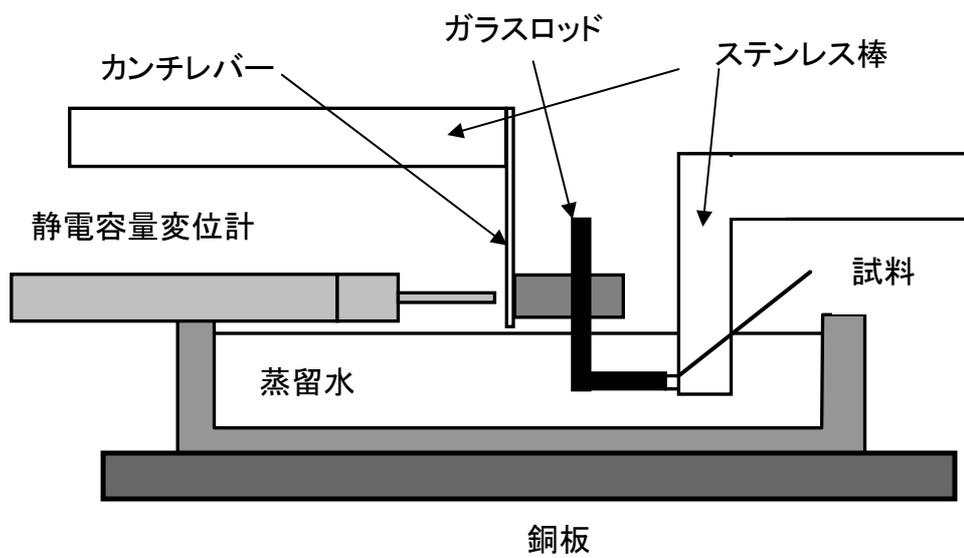


図 3.2.1 アガロースゲル圧縮測定

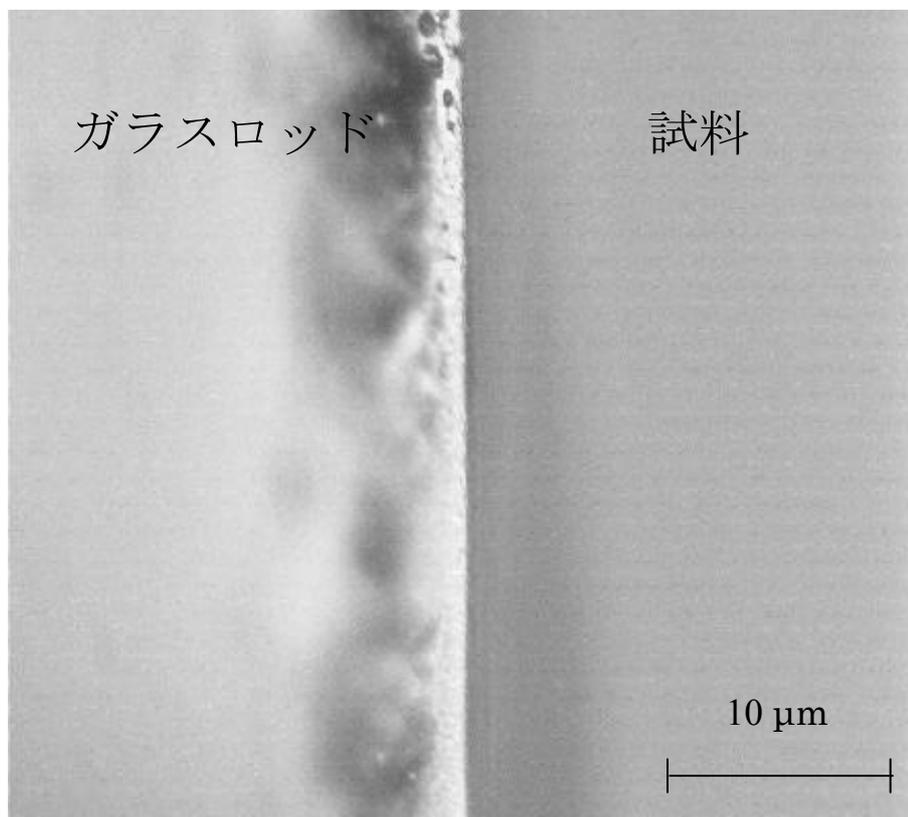
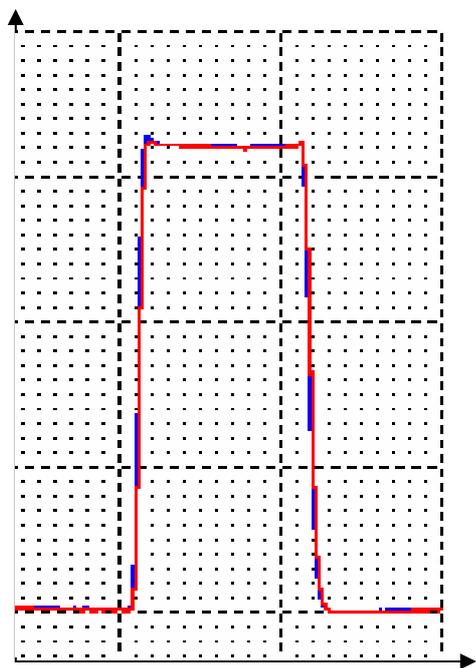


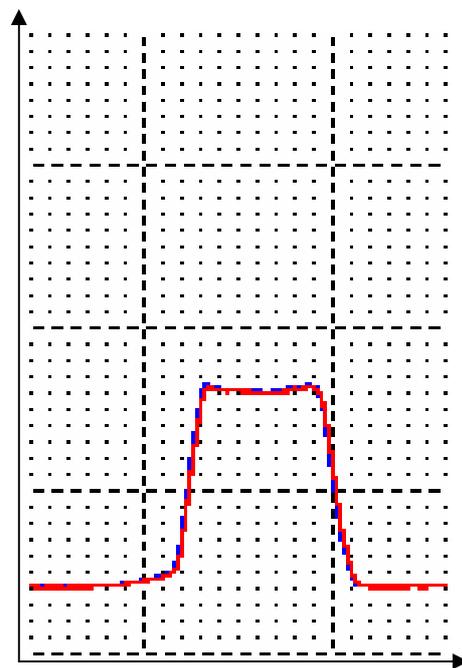
図 3.2.2 ゲル圧縮顕微鏡像

信号 (Arb. Units)



A 時間 (10 min/div)

信号 (Arb. Units)



B 時間 (10 min/div)

図 3.2.3 圧縮したときの変位計

3-2-3 結果

2 T では圧縮変形にかかる力は有意な差は見られなかったが 4~10 T では確認することができた。また各磁場強度に対し弾性は直線にはのらず、4 T あたりから弾性上昇率は若干下がったが磁場強度に依存している。1 %のゲル 10 T 平行において最大 2 倍上昇し、2 %のゲルでは 10 T 平行において最大 1.8 倍に上昇した。異方性は 2T では有意な差は見られなかったが、4~10 T では確認することができた。1%のゲルで平行のものが垂直のものより最大 1.28 倍になり、2%のゲルでは平行のものが垂直のものより最大 1.26 倍になった。

E は無磁場の値 E_0 から磁場とともにシグモイド型に増加(平均値が約 50 %増)し、変形方向と磁場が平行 $E_{||}$ と垂直 E_{\perp} の間で $E_{||} > E_{\perp}$ (異方性が約 30 %) であった。ゲルのエントロピーに、配向のオーダーパラメータの 1 次近似を適用して、アフィン変形に対するエントロピー弾性と比較したところ、実測の $E_{||} > E_{\perp} > E_0$ を説明し、また、 $E_{||}$ と E_{\perp} の磁場依存性と一致した³⁾。濃度が 1%と 2 %のゲルの本モデルにおける異方性反磁性感受率はそれぞれ 4.4×10^{-23} emu と 13.5×10^{-23} emu であったので、強く配向したドメインサイズが濃度とともに大きくなっていると推定された。

表 3.2.1 と表 3.2.2 から 1%、2%アガロースゲルは磁場強度に依存することがわかった。また、磁場を暴露した方向に平行に圧縮したものと垂直に圧縮したものとでは、平行に圧縮したもののほうがゲルを押しした時にかかる力 F が大きいことがわかった。

縦軸にゲルを押しした時にかかる力 F 、横軸には磁場強度 H をとった。磁場を暴露した方向に平行に圧縮したものと垂直に圧縮したものの弾性と 0T の弾性との比較をした。

[図 3.2.7]

2T では圧縮変形にかかる力は有意な差は見られなかったが 4~10 T では確認することができた。また各磁場強度に対し弾性は直線にはのらず、4 T あたりから弾性上昇率は若干下がったが磁場強度に依存している。1%のゲル 10 T 平行において最大 2 倍上昇し、2 %のゲルでは 10 T 平行において最大 1.8 倍に上昇した。異方性は 2 T では有意な差は見られなかったが、4~10 T では確認することができた。1%のゲルで平行のものが垂直のものより最大 1.28 倍になり、2 %のゲルでは平行のものが垂直のものより最大 1.26 倍になった。

表 3.2.1 1%ゲルを 4 μm ずつ圧縮した時の力と変位

	押し込んだ量(μm)					
	0	4	8	12	16	20
変位 Δ (μm)	0	2.75	5.125	7.969	10.38	12.47
力 f (μN)	0	18.38	42.26	59.26	82.69	110.7

	押し込んだ量(μm)				
	24	28	32	36	40
変位 Δ (μm)	15.31	16.75	18.63	21.19	22.44
力 f (μN)	127.7	165.4	196.6	217.7	258.2

表 3.2.2 2%ゲルを 4 μm ずつ圧縮した時の力と変位

	押し込んだ量(μm)				
	24	28	32	36	40
変位 Δ (μm)	6.266	7.305	7.74	8.477	8.882
力 f (μN)	260.7	304.2	356.6	404.6	457.4

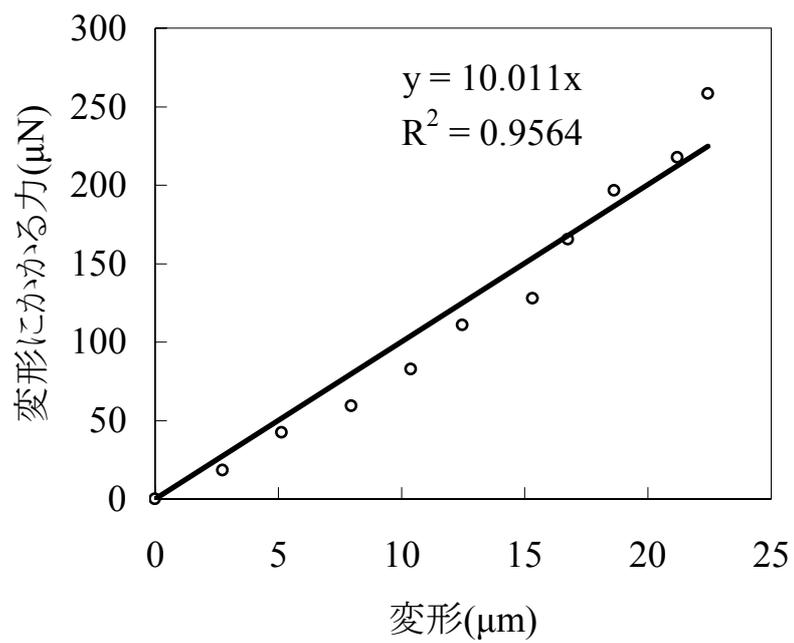


図 3.2.5 1%ゲルを 4 μm ずつ圧縮した時の力と変位の関係

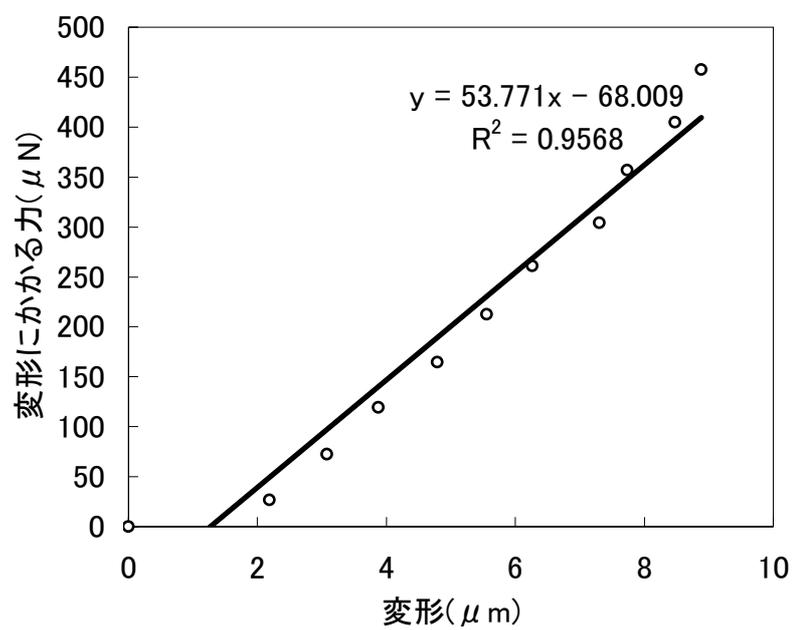


図 3.2.6 2%ゲルを 4 μm ずつ圧縮した時の力と変位の関係

表 3.2.3 1%アガロースゲルの磁場依存性

	平行(N/m)	標準偏差	垂直(N/m)	標準偏差
0 T	9.06	0.64	9.06	0.64
2 T	10.67	1.08	9.88	1.08
4 T	11.85	0	10.64	0.54
6 T	12.73	0.98	11.64	1.06
8 T	15.2	1.11	12.07	1.25
10 T	18.16	1.44	14.16	1.22

表 3.2.4 2%アガロースゲルの磁場依存性

	平行(N/m)	標準偏差	垂直(N/m)	標準偏差
0 T	22.8	0.99	22.8	0.99
2 T	26.69	2.18	26.05	1.63
4 T	33.56	1.59	28.46	0.42
6 T	35.42	2.67	30.08	1.39
8 T	37.73	1.97	31.27	1.82
10 T	41.24	3.42	32.75	2.85

表 3.2.5 式で使われたパラメータ.

Concentration (w/w%), Angle	C	E_0 (Pa)	E at $\langle m \rangle = -0.45$ (Pa)	$\Delta\chi$ $\times 10^{-23}$ emu
1% \perp B	1.4 ± 0.1	$18,120 \pm 510$	$29,540 \pm 830$	4.4 ± 0.7
1% // B	2.5 ± 0.2		$38,500 \pm 1100$	
2% \perp B	0.95 ± 0.08	$45,610 \pm 980$	$65,100 \pm 1400$	13.5 ± 2.0
2% // B	1.65 ± 0.13		$79,500 \pm 1700$	

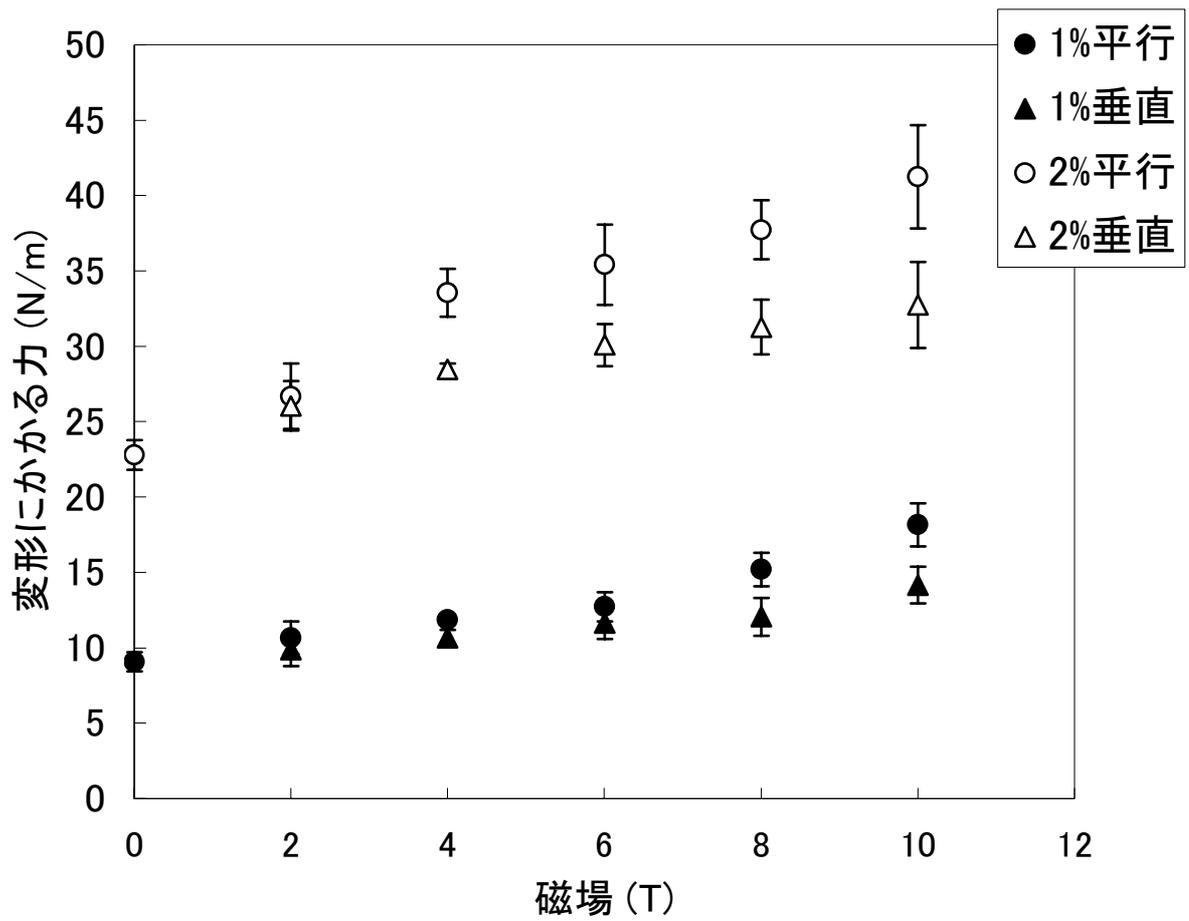


図 3.2.7 磁場へ曝露した時の弾性変化と異方性

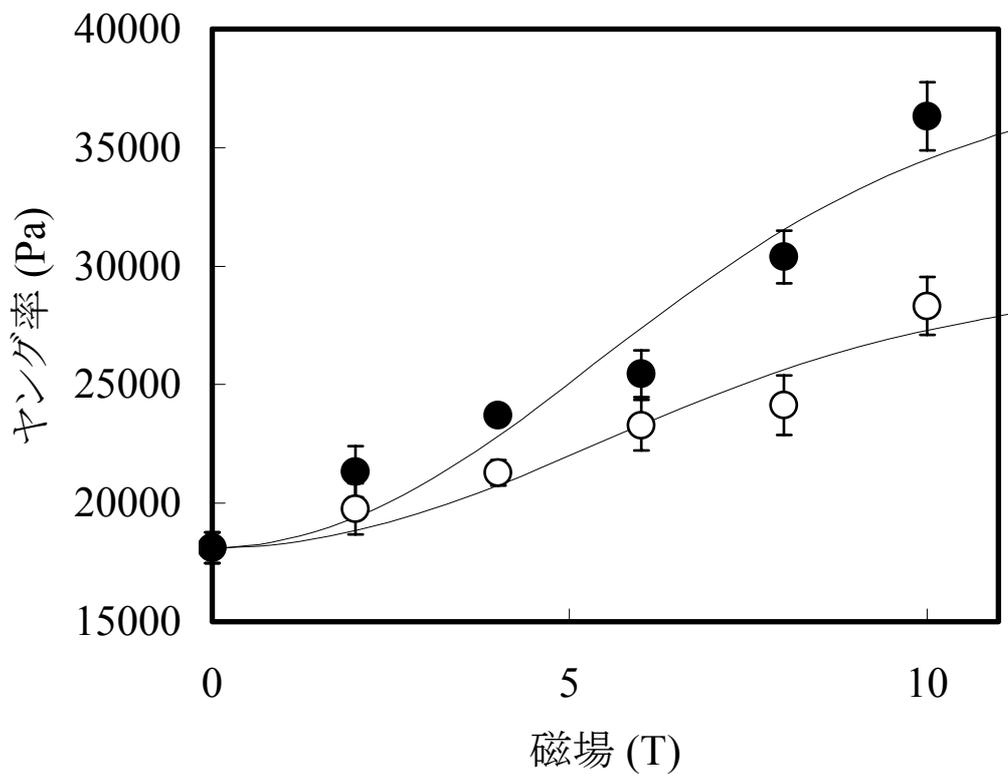
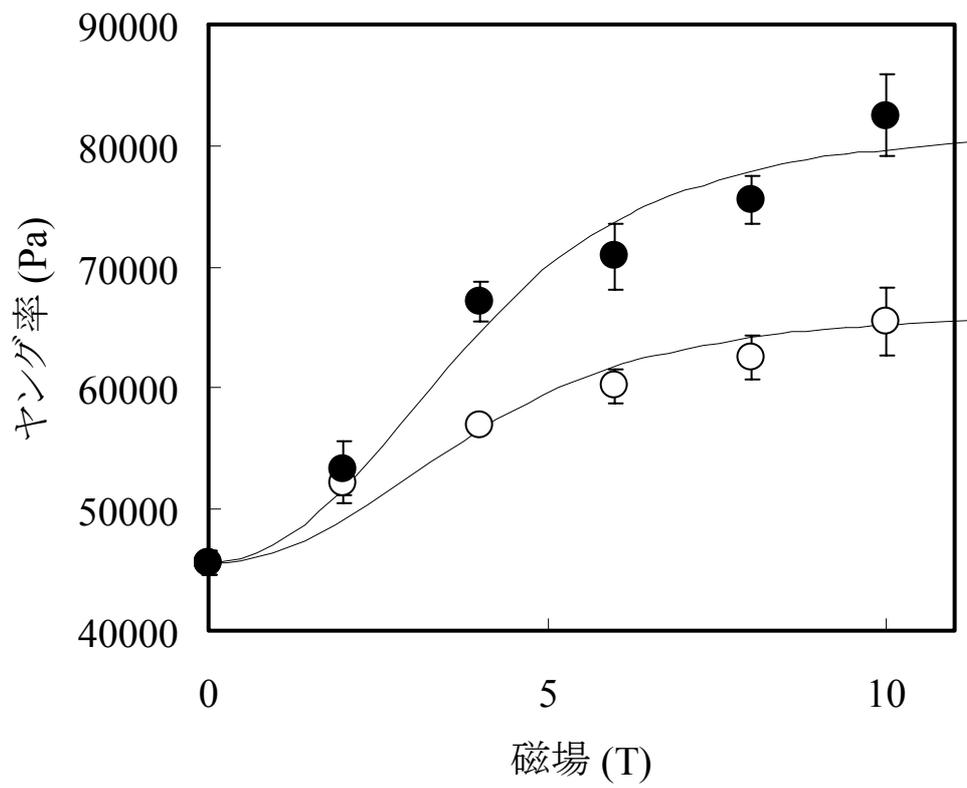


図 3.2.8 1%アガロースゲル測定結果



3-2-4 考察

これらの結果でアガロースゲルの弾性に磁場の効果があった。ゲルの弾性はエントロピー弾性によっている。弾性が上昇したということはゲルのエントロピーが減少したと考えられた。磁場へ曝露する方向の平行、垂直に対しての弾性に違いがあったのでアガロース分子が磁場によって配向したと考えられた。

1%と2%のゲルでは2%の方が分子数が2倍なので弾性上昇率が2倍になると考えられたが、実際は0 Tから10 Tにおける弾性上昇率を計算すると、2%平行で81%、1%平行で100%、2%垂直で44%、1%垂直で56%となった。したがって平行、垂直ともに2%のゲルが1%のゲルよりも弾性上昇率が2倍にはならず、逆に1%の方が2%のものよりも弾性上昇率が平行で1.23倍、垂直で1.27倍大きくなった。

異方性については平行の方が垂直のものよりゲルを押しかけた時にかかる力 F が大きい。平行/垂直を各磁場強度ごとにまとめると1%のゲルで1.08、1.11、1.09、1.26、1.28となり、2%のゲルで1.02、1.18、1.18、1.21、1.26となった。このことから異方性は磁場強度に依存すると考えられる。また1%と2%では各自場強度において平行/垂直の値は大きな差は見られなかったことがわかった。

また、4 Tあたりから弾性上昇率は若干下がったものの6、8、10 Tにおいてゲルを押しかけた時にかかる力 F は磁場強度に依存し上昇を続けているので、10 T以降もゲルを押しかけた時にかかる力 F は上昇を続けるのではないかと考えられる。

生きていない系として、細胞壁構成成分であるアガロースゲルに対するヤング率の磁場効果を測定したところ、生きた細胞壁への磁場依存性と同様な磁場依存性がこのゲルでも観測されたため、生物特有の現象ではないことが判明した。

3-2-5. 結論

アガロースゲル圧縮弾性の測定を行い、磁場へ曝露することにより弾性が上昇し、磁場曝露方向の異方性を確認することができた。磁場による弾性増加の形が、シグモイド形であり、細胞弾性の増加とよく似ていたため、細胞壁弾性への磁場効果が生物特有の現象ではなく細胞壁構成成分に関係していることが判明した。

3-3 マイクロフィブリルの異方性反磁性による磁場配向と細胞壁弾性の理論的解析

3-3-1 背景

磁場でマイクロフィブリルが配向すると、マイクロフィブリル同士の結合面積が増加すると推定される。細胞壁のヤング率を増加させる力学モデルを作成し、その理論曲線と比較した。磁場配向が原因であれば、細胞壁のヤング率に磁気異方性が期待される。そこで、本実験の目的は、第二章で述べた細胞壁面積弾性率を磁場に平行に曝露したものと垂直に曝露したものとで、それぞれ測定をし、磁場依存性及び、磁気異方性を詳しく調べた。また、作成した力学モデルの理論曲線と第二章で得た細胞壁弾性増加とを比較し磁場配向との関連性を調べることを目的とした。

3-3-2 方法

第二章と同様に、磁場に暴露したあと、磁場外に注意深くゆっくり取り出して、磁場外において、細胞吸引方法^{7, 13)}により面積弾性率が求められた。マイクロピペットは、プロトプラストの大きさに合わせるため、ガラスを引き伸ばし先端の穴系 r_p (m) が $5 \mu\text{m}$ になるように加工された。一定時間磁場下で再生された細胞壁の弾性率が、再生分子数当りに増加したことを磁場強度依存的に求めるために実験を行った。

細胞壁表面のセルロースマイクロフィブリルの力学モデルをもとに作成した理論曲線と実験値を比較した。

3-3-3 結果

図 3-3-1 は、磁場中で 3 時間再生させた試料細胞の面積弾性率の平均値を示し、誤差バーは SE を表す。平均値 \pm SE は、0 T の場合 0.55 ± 0.02 N/m であったのに比べ、2 T の場合は面積弾性率が有意に増加した。磁場方向に垂直な細胞表面を吸引測定した値 0.71 ± 0.02 N/m と磁場方向に平行な表面を吸引測定した値 0.79 ± 0.03 N/m において、危険率 5 % で有意な異方性が観測された。また、細胞壁を再生していないプロトプラストの面積弾性率は 0.37 N/m⁷ 程度であることから、3 時間再生させた試料細胞の面積弾性率と比べて無視できない値を示した。図 3-3-2 の、10 T の磁場で 3 時間再生させたプロトプラストと、0 T で 3 時間細胞壁を再生させたプロトプラスト面積弾性率から細胞膜の面積弾性率を引くと、0 T と 10 T の磁場で 3 時間細胞壁を再生させたプロトプラストの面積弾性率は、0 T のものに比べ、磁場方向に平行な表面で約 2.3 倍、磁場方向に垂直な表面で約 1.8 倍の面積弾性率であった。各測定は 15 試料について独立の実験を 2 回行った ($n = 30$)。

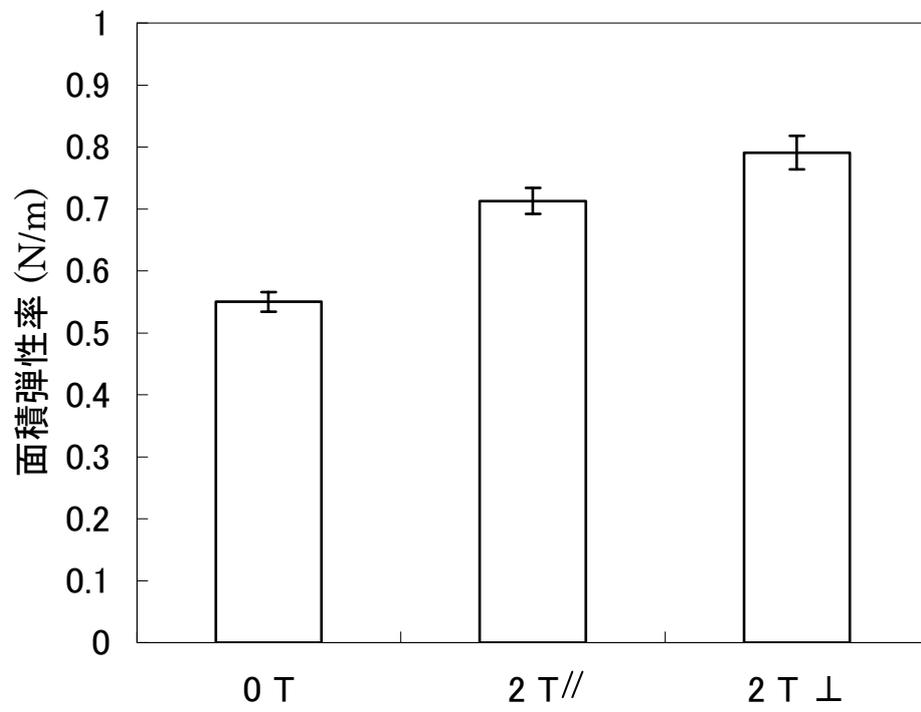


図 3-3-1 細胞壁面積弾性率に対する磁場効果

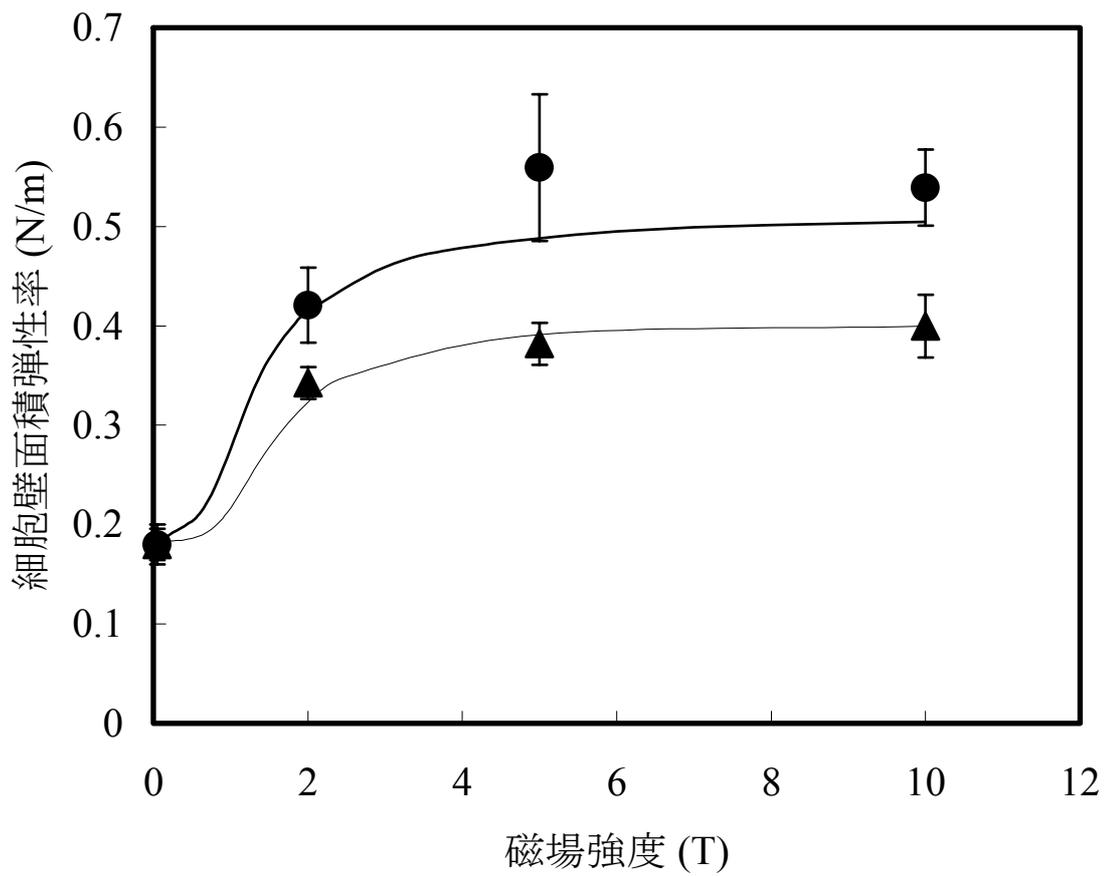


図 3-3-2 面積弾性率の磁気異方性

考察

再生細胞壁が磁場の暴露により増加したメカニズムについて考察する。仮に、セルロースマイクロフィブリル（ $\sim 4\mu\text{m}$ ）を基調とする再生細胞壁ゲルの磁場配向が、 F の増加の原因である場合を考える。セルロースマイクロフィブリルは反磁性であり、その異方性反磁性によるトルクにより配向するとすれば、配向のオーダーパラメータ⁵⁾ となんらか関係があると予想される。細胞壁構成要素の磁化率が、磁場と垂直と平行でそれぞれ χ_{\perp} と χ_{\parallel} で表されるものとする。その磁場の強さ H による自由エネルギー U は、

$$U = -(H^2/2)(\chi_{\perp} + \Delta\chi \cos^2 \theta) \quad (5)$$

で表される。ここで、 θ は磁場の向きと軸と $\Delta\chi = \chi_{\parallel} - \chi_{\perp}$ の間の角度を示している。オーダーパラメータ $\langle m \rangle$ は、

$$\langle m \rangle = \frac{\int_0^{\pi} \left(\frac{3}{2} \cos^2 \theta - \frac{1}{2} \right) \exp(-U/k_B T) \sin \theta d\theta}{\int_0^{\pi} \exp(-U/k_B T) \sin \theta d\theta} \quad (6)$$

で表される⁵⁾。ここで、 k_B はボルツマン定数、 T は温度である。全ての構成要素がランダムの方角に向いているとき、 $\langle m \rangle = 0$ である。細胞壁の主成分であるセルロース分子やその結晶やセルロースマイクロフィブリルの $\Delta\chi$ はマイナスの値を持っており^{16, 17)}、その配向状態は $\theta = 90^\circ$ であるので、 $\langle m \rangle = -1/2$ である。第ゼロ近似として、 F が $\langle m \rangle$ とともに

$$F = F_0 + 2\Delta F \langle m \rangle \quad (7)$$

で表されるものと仮定して(5)～(7)式を解き、 $\Delta\chi$ と F_0 、および ΔF を任意パラメーターとして、図 3-3-2 のデータに(7)式をフィッティングした。 $\Delta\chi = 1.2 \times 10^{-20} \text{ emu}$ のとき、データと(7)式は良い一致を示した(図 3-3-2 の曲線)。この結果から、細胞壁の磁場暴露による増加は、セルロースマイクロフィブリル、あるいは、そのネットワークの反磁性異方性磁化率が磁場から受けるトルクによって、磁場に配向したことが原因であると推定された。磁場配向以外にも、その他の微量な構成要素の成分比が変化したことも考えられるが、一般に化学反応の磁場依存性は磁場の 2 乗に比例するか、または、共鳴的であることが知られている¹⁵⁾。これらのことから、磁場は細胞壁の構成成分を配向させ、詳しい分子論的弾性増加のメカニズムは今後の研究を必要とするものの、結果として、再生細胞壁のヤング率を増加させたと推論された。

磁場配向が原因である場合、物性に異方性が期待される^{5),15)}。しがしながら、再生プロトプラストの圧縮試験において、磁場に対する異方性が見られなかった。これは、圧縮試験では、ロッドで押された部分だけではなく、プロトプラスト全体が変形するため、細胞内で弾性が平均化され、弾性に異方性が見られなかったと考えられた。

一方、図 3-3-2 の結果から、2 T の磁場に曝露した方向に対して、平行な面を吸引したものと、垂直な面を吸引したものとで、面積弾性率に有意な差が見られた。また、細胞壁を再生していないプロトプラストの面積弾性率は 0.37 N/m^2 程度であったが、これは構造物が細胞膜のみからなる赤血球の面積弾性率 (0.45 N/m^2)¹³⁾ とほぼ一致するので、リン脂質 2 重層からなる流動的液晶細胞膜のみの面積弾性率であると考えられるので、異方性は再生された細胞壁に起因していると考えられ、上記の反磁性異方性にもとづく配向を裏付ける証拠である。

以上のように、圧縮弾性と面積弾性率の増加は、細胞壁構成要素の磁場配向が原因であると考えられた。すなわち、磁場下で再生したプロトプラストの細胞壁生合成の過程で起こるゲル化過程で、反磁性異方性物質である合成されたセルロースマイクロフィブリルやそのネットワークが配向し、恐らくはマイクロフィブリル間の水素結合面積増加を生じさせ、細胞壁弾性を硬くしたと考えられた。

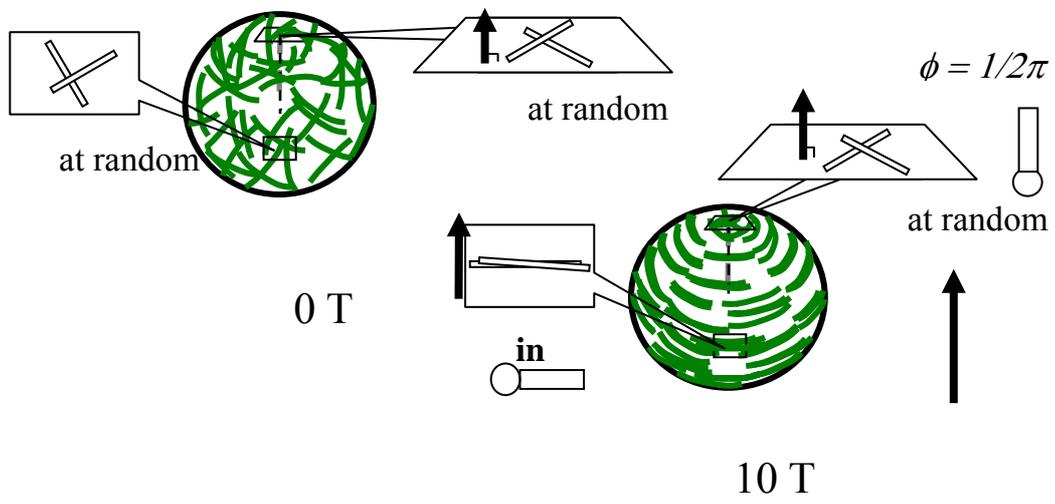


図 3-3-3 理論モデル

3-4 磁場によるマイクロフィブリルの配向の直接観察

3-4-1 背景

細胞壁は細胞膜に存在するセルロース合成酵素により合成されたセルロース分子が細胞外において自己組織的に形成され、細胞壁形成時に物理的プロセスを施すことによってセルロース分子の結晶性やセルロースマイクロフィブリルのネットワーク形成に依存して細胞壁の弾性率が変化すると考えられている^{1, 2)}。走査型電子顕微鏡（以下 SEM と記載する）は、焦点深度が深く、起伏の大きな試料の観察が容易で光学顕微鏡に比べて、高い倍率での観察が可能であるなどの特徴を持っている。SEM でのこれまでの生体試料の観察対象としては、細菌、酵母などがある。赤血球細胞ではこの従来の方法で SEM 観察する方法が確立されている。しかし、植物細胞を観察対象とした事例は少ない。

一般に、植物の細胞壁の形態観察は、動物細胞表面に比べて難しい事が知られる³⁾。特に、プロトプラストの表面に自己組織的に形成されたばかりの細胞壁を詳しく調べることは、未固定では柔らか過ぎ、ブラウン運動が大きく、AFM などでも難しい。前回、固定法などを様々に工夫して、細胞壁の形態を詳しく観察する手法を探り、報告した³⁾。今回は、さらに乾燥方法を改善し、物理的にプロセスされた細胞表面の観察を試みた。植物の細胞壁は、合成されるとき物理的ストレスにより、物性が変化することが報告されてきた^{1, 2)}。特に、培養細胞において、細胞壁が再生するとき、磁場に暴露すると、再生細胞壁は異方的に固くなる^{2, 3)}が、再生速度などは磁場の影響を受けない^{2, 3)}。異方性があることから、マイクロフィブリルの配向きが起きていると推定されてきたが、培養細胞なので、合成量が少ない上、細胞表面における異方性が細胞の緯度や経度に依存するため、ミクロな観察が必要とされる。

3-4-2 方法

文献 9、10 と同様な方法に加え、プロトプラストおよび物理プロセスを与えた再生プロトプラストをグルタルアルデヒド、タンニン酸、オスミウム酸で固定し、t-ブチルアルコールで置換後、凍結乾燥機（JEOL社製 JFD-320）で乾燥を行う際、昇華速度を1～2桁コントロールした。その後、金蒸着を行い走査電子顕微鏡（JEOL社製 SEM-6300）により観察した。

細胞壁の再生

インキュベータの温度設定を 27°C に設定し、切断したカバーガラスを蒸留水で洗浄後した。0.3M マンニトール培地に洗浄された直後の 0.3M マンニトール培地懸濁プロトプラストを試料とした。

細胞接着剤であるポリリジンでカバーガラスをコートし、ガラスシャーレ内で再生させた。

グルタルアルデヒド・パラフォルムアルデヒド固定¹⁰⁾

固定溶液を最終濃度が 2%グルタルアルデヒド、2%パラフォルムアルデヒド、0.2 Mリン酸 buffer になるよう、作製した。グルタルアルデヒドとパラフォルムアルデヒドはプラスチックに反応するため、ガラスピペットを使用した。試料が入ったガラスシャーレをリン酸 buffer で洗浄した後、固定溶液で一晩静置し固定した。

オスミウム酸水溶液固定

2%オスミウム酸水溶液を 1.5ml 滴下して、最終濃度 1%オスミウム酸・0.1M リン酸 buffer の溶液を作製した。混合した 1%オスミウム酸・0.1M リン酸 buffer 溶液でグルタルアルデヒドで固定した細胞に入れ、オスミウムによる導電染色を行った。オスミウム酸水溶液での固定は日本医科大学で行った。

脱水 3)

0.2Mリン酸 buffer で洗浄を行った試料を 4°C以下に冷却した 30%エタノールに置換した。

同様に、50, 70, 80, 90, 95, 100 % エタノールで段階的に置換を行う。濃度 90%からは常温で置換を行った。

乾燥

100%エタノールに置換した試料を t-ブチルアルコールに置換した。置換に一晩かけ細胞内部を t-ブチルアルコールに完全に置換した。試料が完全置換した後、t-ブチルアルコール凍結乾燥装置（JFD-320 JEOL）にセットし、15 分間乾燥させた。乾燥が終わ

ったら引き続き再び、2回目の乾燥を15分間行った。

蒸着

試料台（大）の薬包紙を取り去り、アルミ導電テープを使用して試料を試料台に貼り付ける。金蒸着装置（JFC-1100E JEOL）に試料台をセットする。試料台（大）は大き過ぎるので、粘着テープで固定する。蒸着時間を100sに設定し、GASレバーを左いっぱいにしてスイッチを入れる。蒸着が終了したらGASレバーを戻して試料を取り出す。

SEM 観察

冷却槽のSTARTスイッチを押す。電源操作パネルのPOWERキースwitchをSTART位置まで回す。この操作で装置は始動し、高圧発生可能な状態まで自動運転される。その間、操作・表示部は初期設定され、左右のCRTには基本画面が表示される。所定の真空度に達するとCURRENTメーターのランプが点等し、走査像の観察が可能になる。

（始動後約20分）ACCEL VOLTAGEをONにする。LSPモードボタンを押す、左モニターを見ながらフィラメントつまみをゆっくり回し、エミッション電流の飽和点（二次ピーク）に設定する。XコントロールレバーとYコントロールレバーで観察地点まで移動する。FOCUSつまみとSTIGMATORのX,Yつまみで非点収差の補正を行う。ジャストフォーカスの状態で画像がより鮮明になるようにSTIGMATORを調節した。CL COARSEを $12(1 \times 10^{-10} \text{A})$ 程度に調節する。CONTRASTとBRIGHTNESSをそれぞれつまみで調節する。SPEEDボタンを切り替えてSLOWスキャンモードで行うと良い。アプリケーションソフトで写真撮影した。

3-4-3 結果

最初は細胞が凍結乾燥中に破裂してしまい、表面形状が観察できなかった。しかし、同様の処理を施した赤血球は、光学顕微鏡で観察した形状と同様に中央が両面からくぼんだ円盤状に観察することができた (図 3.4.1, 図 3.4.2)。

固定液のグルタルアルデヒドとパラフォルムアルデヒドの濃度を 1, 1.5, 2, 2.5, 3 % と変化させ、浸透圧を変化させた。

図 3.4.3 に赤血球と同様の処理をした再生プロトプラストの SEM 写真を示す。細胞が破裂している様子が観察できた。

グルタルアルデヒド 2.5 %、パラフォルムアルデヒド 2.5 % において細胞の破壊・収縮を抑えることができた。また、脱水過程を見直し、エタノール置換による試料の収縮を抑える目的で 30 % エタノールでの置換を追加した。さらに、凍結乾燥時に試料内の 100%エタノールを、より t-ブチルアルコールに置換するため、置換回数を 3 回から 5 回に増やした。

固定・脱水の段階での破壊・収縮を抑えることができたが、凍結乾燥後 SEM で観察すると破壊・収縮が起きていた。

以下図 3.4.10, 3.4.11 に固定、脱水手順を改善した再生プロトプラストの SEM 写真を示す。

そこで、乾燥時間を見直し、今までは 15 分間で 1 回乾燥していたものを 15 分間で 2 回乾燥した。これにより細胞の破壊が著しく減少し、細胞の表面形状を観察することができた。

図 3.4.12 は再生プロトプラストの 2500 倍の SEM 写真である。細胞表面に毛のようなものが無数に生えていることが確認できた。

図 3.4.13, 3.4.14 は再生プロトプラストの 10000 倍に表面を拡大した SEM 写真である。

いくつかの処理工程を工夫することで、細胞の変形、破碎を抑えることができた。しかし、図 1 のように再生した細胞壁が剥がれてしまい、細胞壁のネットワーク構造を観察することはできなかった。今回は、乾燥の際の昇華速度をコントロールすることで、再生途上 (成熟の 1 ~ 3 %) の細胞壁を形成するマイクロフィブリルの網目の様子を観察することができた。

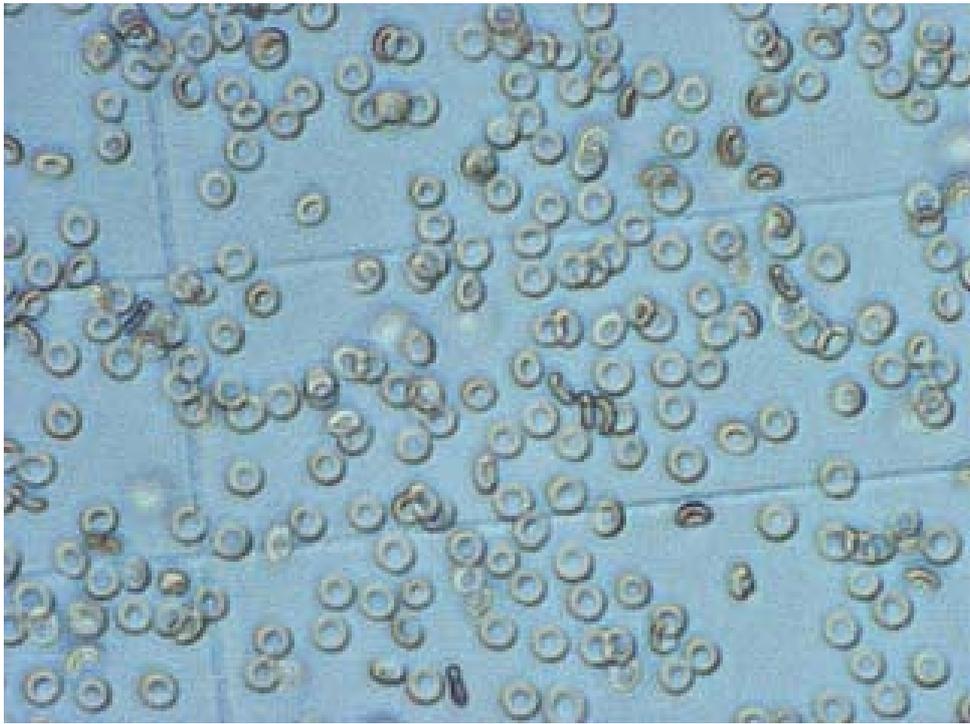


图 3-4-1 赤血球光学顕微鏡写真

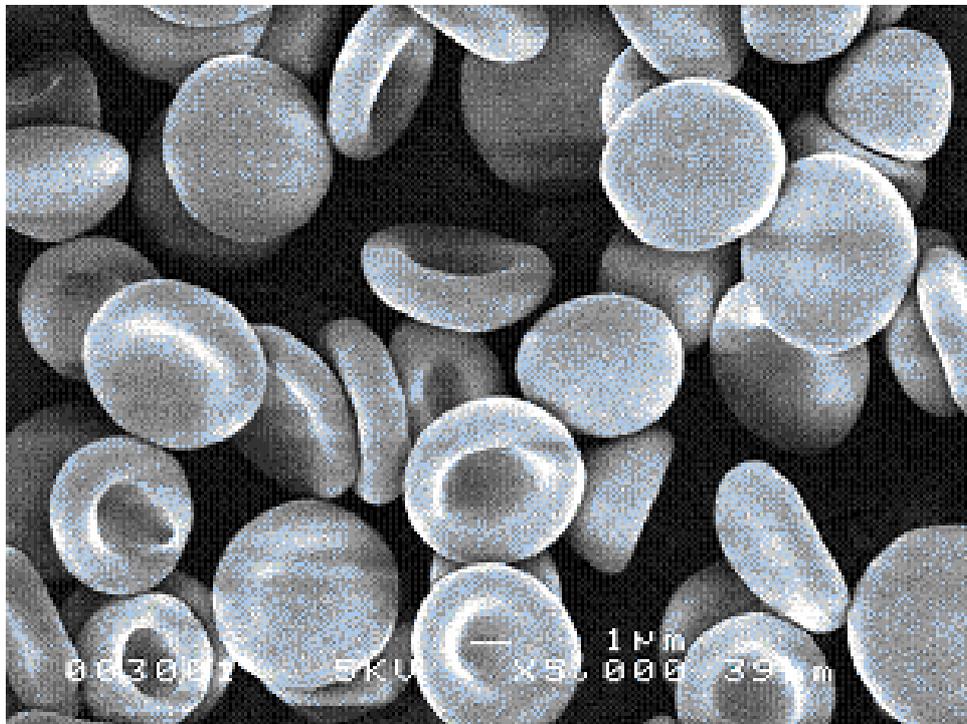


图 3-4-2 赤血球 SEM 写真

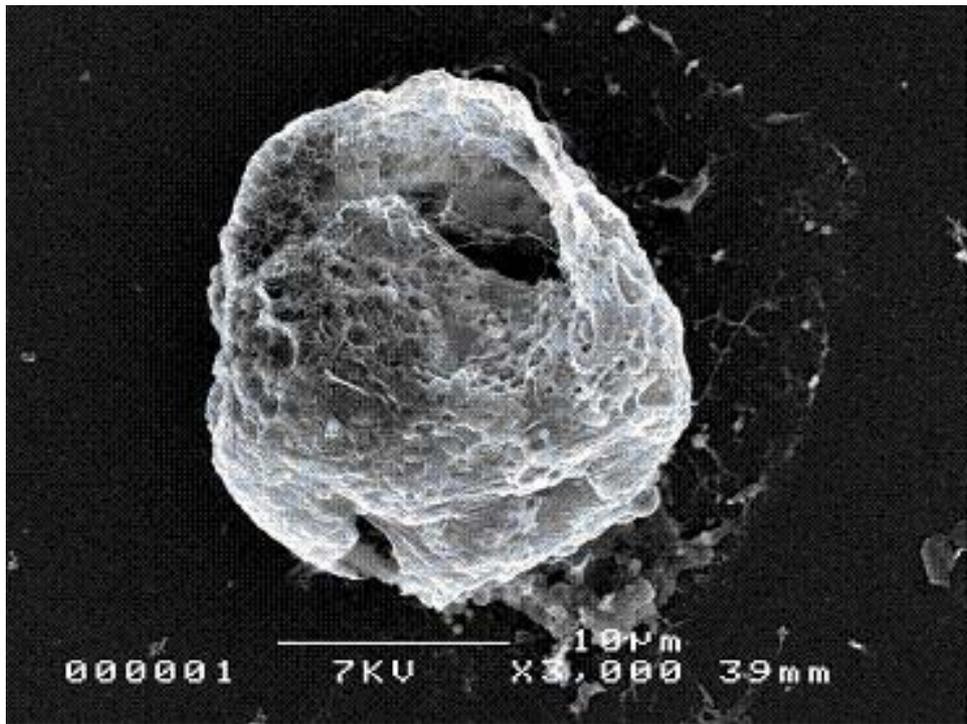


図 3-4-3 赤血球と同様な処理の再生プロトプラスト SEM 写真



图 3-4-5 固定液改善前光学写真



图 3-4-6 固定液改善後光学写真



図 3-4-7 以前の方法で脱水処理した再生プロトプラスト

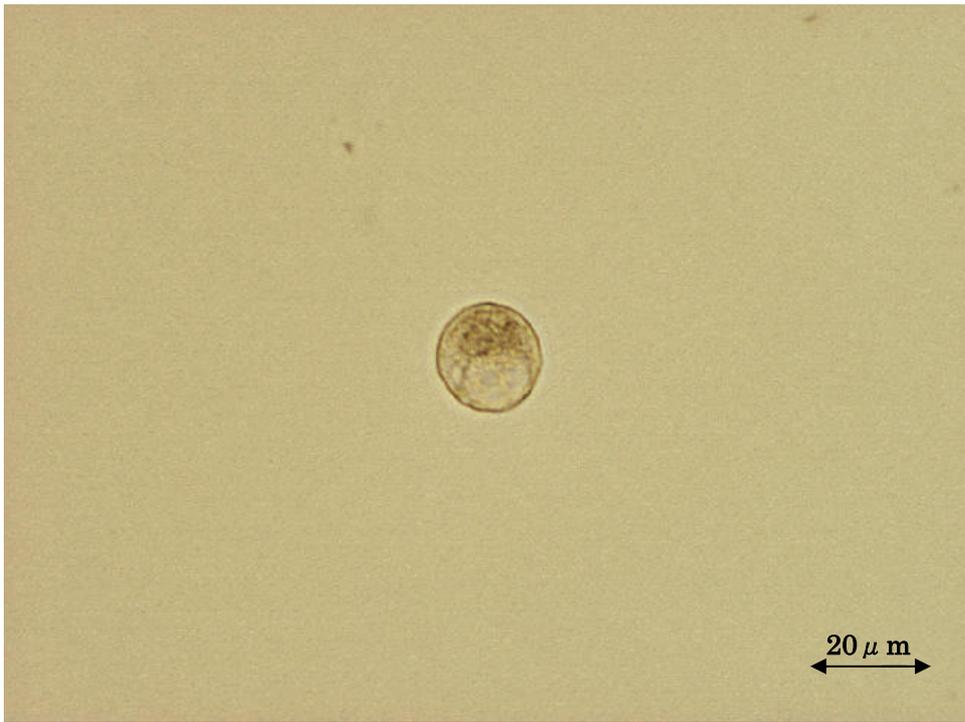


図 3-4-8 脱水処理改善後の再生プロトプラスト

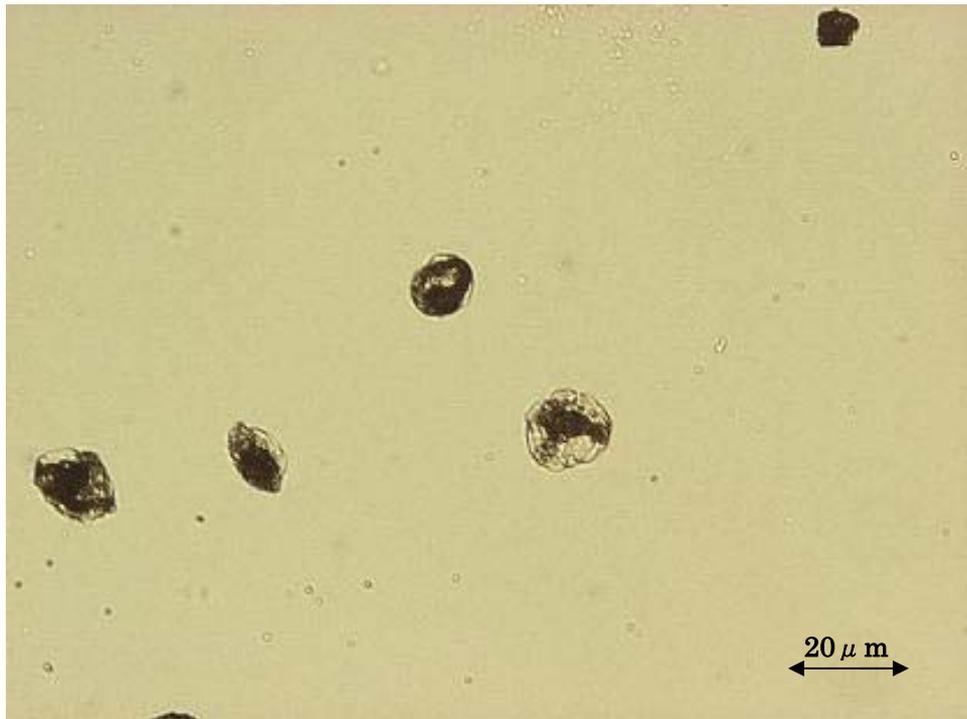


図 3-4-9 t-ブチルアルコール置換回数 3 回で凍結乾燥を行った光学写真

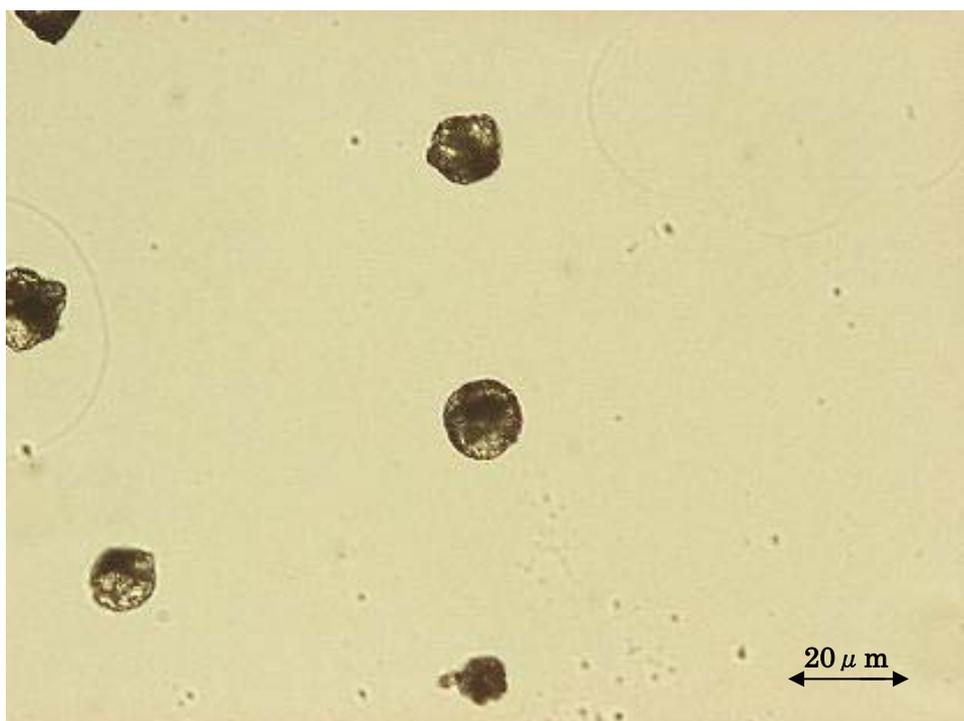


図 3-4-10 t-ブチルアルコール置換回数 5 回で凍結乾燥を行った光学写真

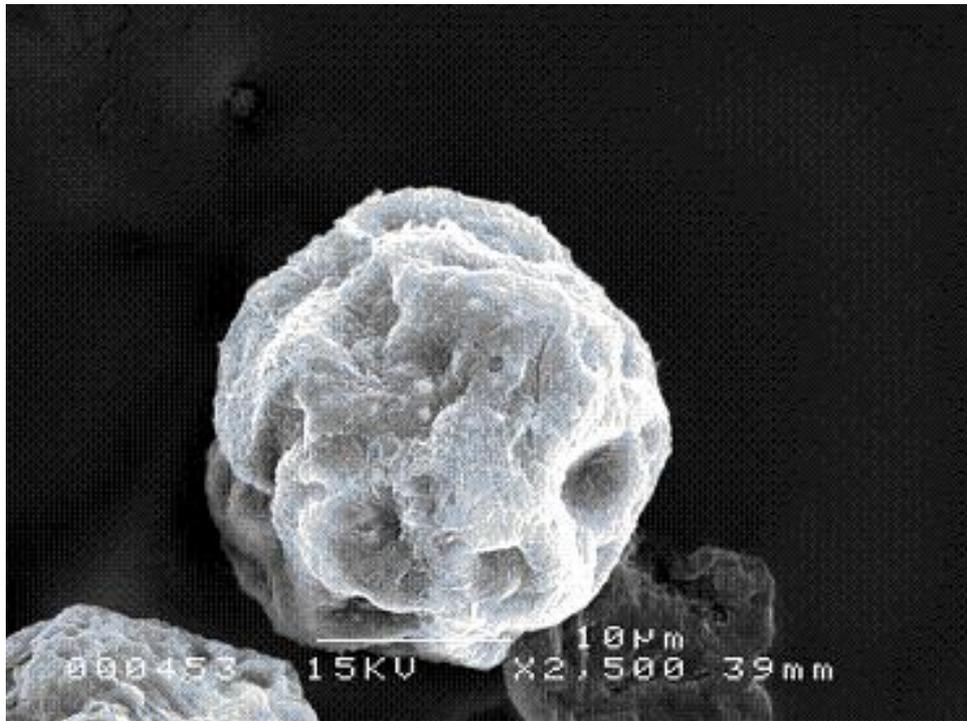


图 3-4-10 固定・脱水改善後 1

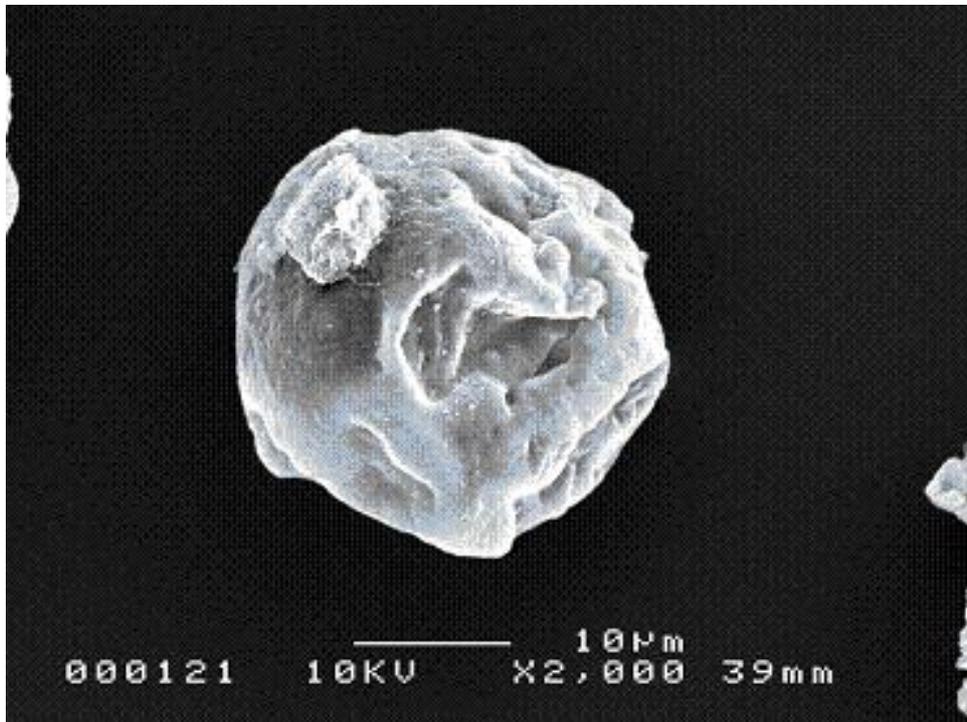


图 3-4-11 固定·脱水改善後 2

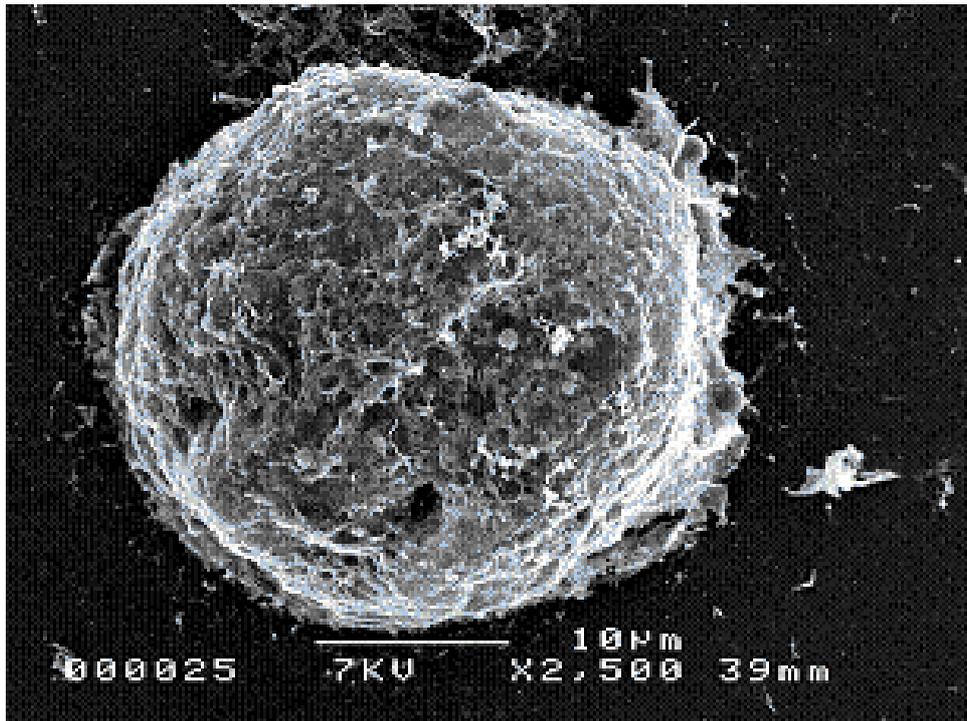


図 3-4-12 処理工程変更後の再生プロトプラスト SEM 写真

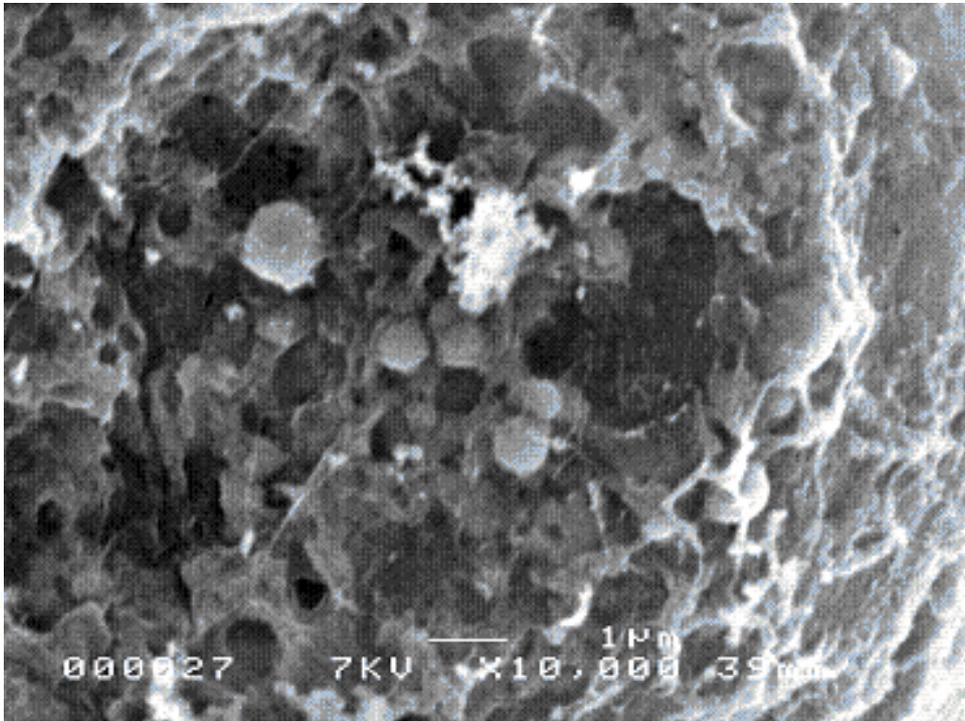


图 3-4-13 10000 倍表面放大 SEM 写真 1

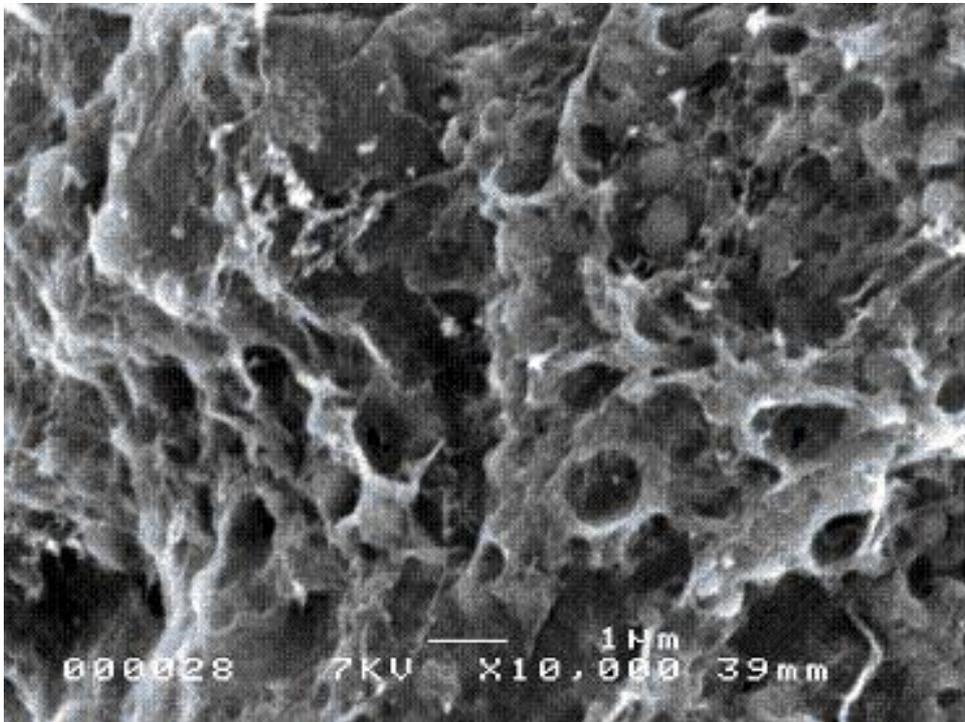


图 3-4-14 10000 倍表面放大 SEM 写真 2

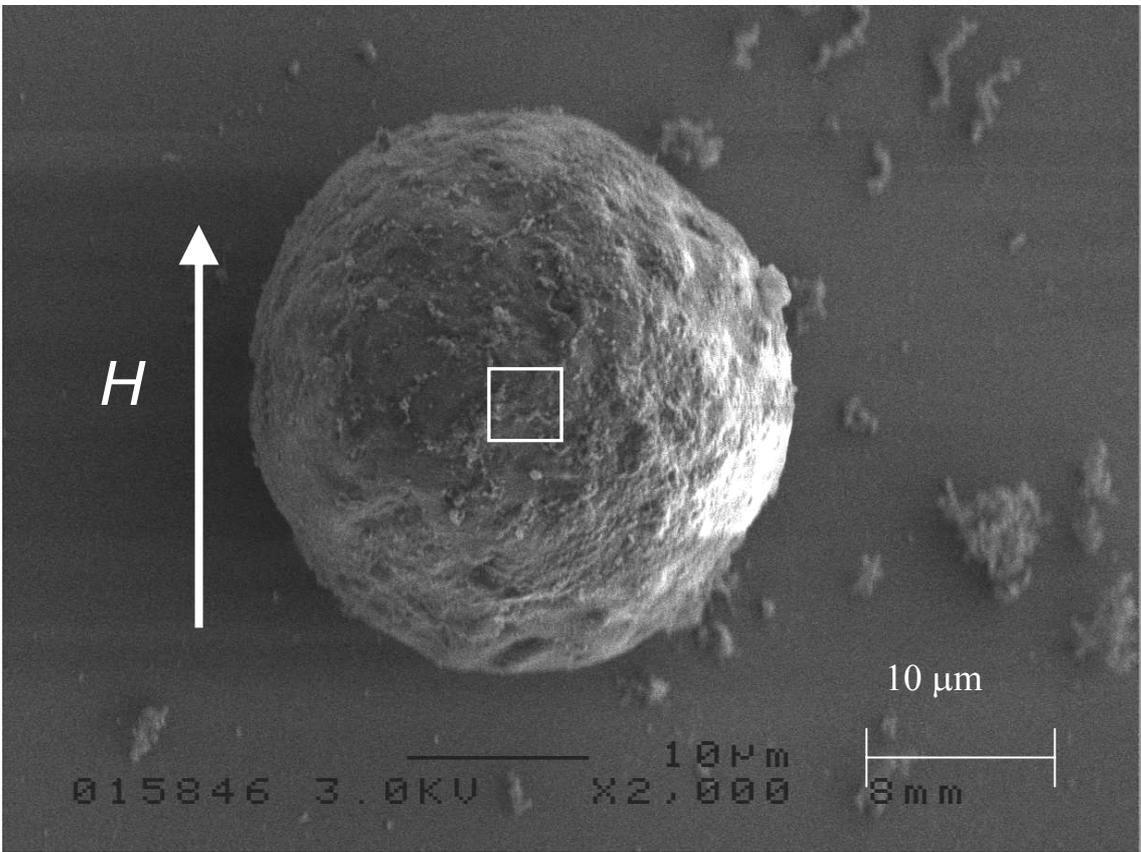


图 3-4-15 SEM 写真

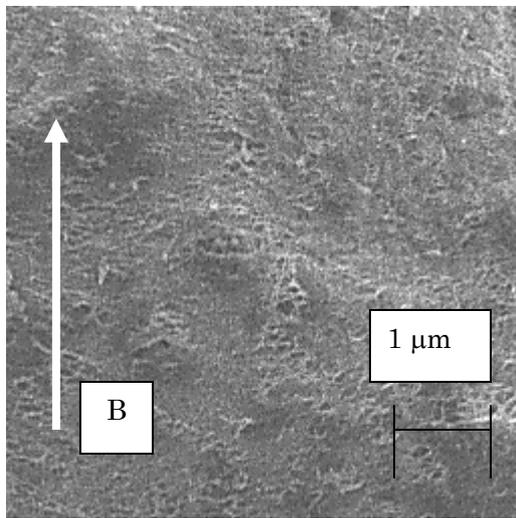


図 3-4-15 10Tにおける細胞表面の拡大図

3-4-3 考察

研究初期は、固定液を等張液で調整していたが、高張液にすることで細胞試料の収縮が抑えられた。これにより固定液の浸透圧が細胞形状に大きく影響していると考えられる。

また、はじめはグルタルアルデヒドとオスミウム酸で二重固定を行っていたが、固定が不十分であった。そこで、グルタルアルデヒドよりも浸透する速度が速いパラフォルムアルデヒドを混合することで、十分に細胞を固定することができた。赤血球ではこのようなことはなく、グルタルアルデヒドとオスミウム酸の二重固定で十分に固定することができた。これにより、細胞壁は細胞膜と比べて浸透速度が遅いことが分かった。次に、脱水の行程・時間を増やすことによって、細胞試料の収縮が抑えられた。上記で分かったように、今までは完全に置換しきれていなく、工程・時間を増やしたことによって完全に置換されたために収縮が抑えられたと考えられる。

t-ブチルアルコールによる置換も同様で、以前は 100 % エタノールがまだ細胞内に残っていたために凍結乾燥時に昇華がうまくいかず、細胞の収縮・破裂が起こっていたと考えられる。

これらを改善し、15 分間で 1 回乾燥させた再生プロトプラストを SEM で観察すると以前よりは破裂の割合が減っていたが、依然破裂しているものが多かった。これは、1 回の乾燥では t-ブチルアルコールが細胞内に残っており、再度真空中に曝露した際に破裂していたものと考えられる。そこで、凍結乾燥装置での乾燥を 15 分間で 2 回行うことにより、細胞内まで十分に乾燥させて破裂を防ぎ、再生プロトプラストの細胞壁の表面を観察することができた。

伸長中の細胞壁は 1 次細胞壁とよばれ、細胞の長軸方向に対しほぼ直角な幅 10~30nm、厚さ 5~10nm、長さ数 μm におよぶセルロースのマイクロフィブリル (microfibril) の骨格を持っている 4)。

観察した細胞壁表面の毛のようなものは、セルロース分子がまとまってマイクロフィブリルを形成している様子ではないかと考えられる。これにより、この方法で再生プロトプラスト細胞の表面を見ることが有効であると考えられた。

図 3-4-15 を見ると、磁場の方向と垂直な方向に細胞表面のマイクロフィブリルが配向していることが確認できる。これにより、細胞壁弾性への磁場効果の原因がセルロースフィブリルやそのネットワークが磁場により配向し、フィブリル同士の結合面積が増加したことにより、弾性が増加したことが明らかとなった。

3-4-4 結論

植物細胞の再生プロトプラストを SEM で観察する方法を確立できた。再生プロトプラストの細胞壁の表面を観察することができた。細胞表面に磁場配向が確認され、細胞壁弾性増加の原因が磁場配向によるものであると判明した。

3-5 三章の結論

第二章で得られた、細胞壁ヤング率への磁場効果のメカニズムにおいて、様々な実験を行い検証した。

まず、第一に磁場により細胞表面のセルロースマイクロフィブリルの疎水性相互作用が強まった可能性を考えた。水-空気界面の表面張力は、磁場とともに増加したが、最大 10 T で約 1.8 % しか増加しなかったことと、磁場に自乗に比例した増加を示しており、細胞壁ヤング率の増加（シグモイド形）とは明らかにことなっていたため、これが原因でないことが判明した。

第二に、この現象が、遺伝子などが介在する生物特有である可能性が考えられた。細胞壁は、セルロース分子でできたゲルと見なせるため、植物（天草）から抽出した分子であるアガロース分子を使い磁場中でアガロースをゲル化させ、第一章で使った細胞圧縮試験機を改良し、弾性を測定した。この結果、アガロースゲルの弾性は、磁場により著しく増加し、また磁場に曝露した方向により弾性増加の仕方に変化が観測された。この異方性と弾性増加の仕方が細胞壁ヤング率の増加によく似ていた。このことから、遺伝子などの影響によらず、この磁場効果が生物特有の現象でないことが判明した。

第三章に異方性反磁性物質による磁場配向しセルロースマイクロフィブリル間の水素結合面積増加を生じさせた可能性が考えられた。これについては、力学モデルを作成し、オーダーパラメータの式から理論曲線を計算し第二章で得た実験値にフィッティングした。得られた実験値と理論曲線がよく一致したことから、異方性反磁性物質であるセルロースマイクロフィブリルの配向により細胞壁ヤング率が増加したことが判明した。

細胞表面のセルロースマイクロフィブリルが磁場により配向していることを検証するために、走査型顕微鏡（SEM）を使い、細胞表面を詳しく観察した。

細胞表面の SEM 像から、磁場と垂直な方向にセルロースマイクロフィブリルが配向していることが確認できた。

以上のことより、細胞壁ヤング率が磁場により増加したメカニズムとして、磁場により細胞表面のセルロースマイクロフィブリルが配向し、セルロースマイクロフィブリル間の水素結合面積増加を生じさせたことが証明された。

- 1) M. Iwasaka and S. Ueno, *J. Appl. Phys.*, **83**, 6459-6461 (1998).
- 2) H. Hosoda, H. Mori, N. Sogoshi, A. Nagasawa, and S. Nakabayashi, *J. Phys. Chem.* **108**, 1461-1464 (2004).
- 3) S. A. Ghauri and M. S. Ansari, *J. Appl. Phys.* **100**, 066101-1-066101-2 (2006)
- 4) H. Inaba, T. Saitou, K. Tozaki Ken-ichi, and H. Hayashi, *J. Appl. Phys.* **96**, 6127-1-6127-6 (2004).
- 5) M. Iino, M. Suzuki, A. J. Ikushima, and Y. Okuda, *J. Low Temp. Phys.* **59**, 291-304 (1985).
- 6) M. Iino, M. Suzuki, and A. J. Ikushima, *J. Low Temp. Phys.* **63**, 495-506 (1986).
- 7) M. Iino, M. Suzuki, A. J. Ikushima, and Y. Okuda, *Jpn. J. Appl. Phys.* **23**(1), 54-58 (1983).
- 8) T. Yamagishi, T. Takeuchi, T. Higashi, and M. Date, *Physica B*, **177**, 523-526 (1992).
- 9) I. Yamamoto, S. Saito, T. Makino, M. Yamaguchi, and T. Takamasu, *Sci. Tech. Adv. Mater.* **7**, 322-325 (2006).
- 10) I. Yamamoto, S. Ozawa, T. Makino, M. Yamaguchi and T. Takamasu, *Sci. Tech. Adv. Mater.* **9**, 024214-1-024214-3 (2008).
- 11) Y. Fujimura and M. Iino, *J. Appl. Phys.*, **103**, 124903-1-124903-4 (2008).
- 12) T. Haneda Y. Fujimura, and M. Iino, *Bioelectromagnetics*, **27**(2), 98-102 (2006).
- 13) A. Hayashi, K. Kinoshita and A. Yasueda, *Polymer J.* **12**, 447-453 (1980).
- 14) K. Nishinari, *Makromol. Chem.* **185**, 2663-2668 (1984).
- 15) G. M. Ravanagh, and S. B. Ross-Murphy, *Prog. Polym. Sci.*, **23**, 533-538 (1998).
- 16) M. Iino, *Bioelectromagnetics*, **18**, 215-220 (1997).

- 17) M. Iino and Y. Okuda, *Bioelectromagnetics*, **22**, 46-52 (2001).
- 18) 神谷瞭, 井街宏, 上野照剛, 医用生体工学, 110-121 (2000).
- 19) M. Ukita, A. Furuya, H. Tanaka, and M. Misawa: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2849 (1973).
- 20) N. Mera, H. Aoyagi, F. DiCosmo, and H. Tanaka: *Biotech. Lett.*, **25**, 1687-1693 (2003).
- 21) J. Blewett, K. Burrows, and C. Thomas: *Biotech.*, **221**, 1877-1883 (2000).
- 22) K. K. Liu, D. R. Williams and B. J. Briscoe, *Phys. Rev. E.*, **54**(6), 6673-6675 (1996).
- 23) P. A. Robless, D. Okonko, D. P. Mikhailidis and G. P. Stansby: *Platelets*, **15**, 215 (2004).
- 24) W. W. Su, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **50**, 189-194 (1995).
- 25) J. Ando and A. Kamiya, *Jpn. Heart J.* **37**, 19-32 (1996).
- 26) S. J. Singer, *Ann. Rev. Physiol.* **66**, 1-27 (2004).

総括

第一章では、ニチニチソウの葉から単離させた培養細胞を磁場に曝露し、高感度で測定できる圧縮弾性装置で細胞壁のヤング率を測定したが、細胞の弾性に変化は無かった。これは、セルロース材料の物性は、分子の結晶性に依存するが、すでに結晶化した後の細胞壁の構造は、簡単には制御できなかつたと考えられた。一般に、結晶の構造を制御するためには、結晶化するときの温度や圧力などの環境条件に依存することが知られている。

そこで、第二章では一度植物細胞の細胞壁を取り去った植物細胞を磁場中にて培養し、生合成する過程で磁場に曝露した後、磁場外に取り出し、第一章と同様な測定装置で、細胞壁のヤング率を測定した。細胞壁を取り除いたプロトプラストから再び細胞壁を合成する過程で磁場に暴露することにより、細胞全体を圧縮した場合のヤング率が磁場依存的に有意に増加した。これにより、細胞壁ヤング率へ磁場効果を発見した。

細胞圧縮型弾性測定装置は高感度ではあるものの、細胞壁のヤング率のみを反映しておらず、細胞全体を圧縮するため細胞の膨潤（サイズ）に大きく依存してしまう欠点があった。正確に力学物性であるヤング率を制御するために、細胞の局部を吸引する測定装置を用いて細胞の局部の面積弾性率を測定した。この結果、細胞壁の面積弾性率は、磁場依存的に増加し、さらに磁場に暴露した向きによってヤング率の増加の仕方に違いが生じ、細胞壁の弾性に異方性が観測された。

第三章では、この細胞壁のヤング率の磁場による増加のメカニズムには、次の3つの可能性が考えられた。第1に、セルロース分子間の疎水性相互作用が磁場により強くなった可能性がある。第2に、遺伝子発現などにかかわる生物特有の現象、第3に細胞壁を構成するマイクロフィブリルが磁場配向したことが疑われた。1が原因であれば、セルロース分子—水分子界面のヘルムホルツ自由エネルギーが磁場で増加したことになるが、この自由エネルギーは水—空気界面の自由エネルギーにほぼ対応する。そこで、水—空気界面の自由エネルギーを調べたところ、自由エネルギーの増加は10 Tにて約2 %程度と僅かに増加し、増加は磁場の自乗に比例した。界面のエネルギーの増加は、2 %と小さく、増加の仕方もシグモイド形ではなく細胞壁のヤング率の磁場依存性と明らかに異なるため、疎水性の増加が原因ではないと考えられた。第2について、遺伝子の影響が介在しない生きていない系として、細胞壁構成成分である植物（天草）から抽出したアガロースのゲルに対するヤング率の磁場効果を測定した。この結果、磁場の増加とともにヤング率が増加し、増加の仕方もシグモイド形であり、生きた細胞壁への磁場依存性と同様な磁場依存性がこのゲルでも観測された。これにより、細胞壁弾性への磁場効果が生物特有の現象ではないことが判明した。第3に磁場でマイクロフィブリルが配向すると、マイクロフィブリル同士の結合面積が増加して、細胞壁のヤング率を増加させる。力学モデルの理論曲線と第二章で得た実験結果が良く一致したことから、反磁性異方性にもとづく磁場配向が示唆された。仮に第3が原因であれば、細胞壁のヤング率に磁気異方性が期待される。第二章で、細胞壁の面積弾性率を磁場に曝露する方向

を変えて測定したところ、細胞のヤング率に磁気異方性が観測された。

これら以上より細胞壁のヤング率の磁場による増加は、細胞壁を構成するマイクロフィブリルの磁場配向が原因であると考えられた。そこで、これを実証するために、走査型電子顕微鏡を用い 0 T で再生させたものと、10 T の磁場に暴露した再生細胞壁表面を観察したところ、マイクロフィブリルの磁場配向が観測された。

結論として、磁場により細胞壁の力学物性であるヤング率を異方的に 2～3 倍の範囲で制御することに成功し、マイクロフィブリルが結晶化時にその異方性反磁性により磁場配向することがこの効果の原因であると判明し、従来にない生体由来の異方性セルロース材料が得られた。

研究業績

学位論文を構成する論文

- 1) T. Haneda Y. Fujimura, and M. Iino, Magnetic field exposure stiffens regenerating plant protoplast cell walls, *Bioelectromagnetics*, **27**(2), 98-102 (2006).
- 2) Y. Fujimura, T. Kushiya and I. Masaaki, Anisotropy in the area expansivity modulus of the cell wall regenerated under a magnetic field, Proceedings of International Conference on Magneto-Science, 2007, Hiroshima, *JSMS*, 97 (2007).
- 3) Y. Fujimura and M. Iino, The surface tension of water under high magnetic fields *J. Appl. Phys.*, **103**(12), 124903-1 - 124903-4 (2008).
- 4) Y. Fujimura, T. Tada and M. Iino, Anisotropic Young's modulus on magnetically ordered agarose gel. *J. Appl. Phys.*, **104**, 123526-1 - 123526-4 (2008).

参考論文

- 1) Y. Fujimura, M. Iino, and U. Watanabe: Area expansivity moduli of regenerating plant protoplast cell walls exposed to shear flows. *Jpn. J. Appl. Phys.* **44** (5A), 3325 -3329 (2005).
- 2) 飯野正昭, 羽田俊彦, 藤村祐, 植物培養細胞に対する静磁場の検討。日本生体磁気学会論文集 **18** (1), 86-87 (2005).
- 3) 藤村祐、栗本大輔、飯野正昭, 磁場下再生植物プロトプラストの力学的特性。日本生体磁気学会論文集 **19** (1), 104-105 (2006).
- 4) Y. Fujimura, D. Kurimoto, and I. Masaaki Magnetic Field Effect on Single Cultured Plant Cells and Regenerating Protoplasts: Proceedings of International Symposium on Magneto-Science 2005, Yokohama, ed. by M. Yamaguchi, Y. Tanimoto, S. Ozeki, and T. Kimura (2006).
- 5) 藤村祐、栗本大輔、飯野正昭 : 強磁場の下で再生させた細胞壁の弾性率とその異方性。日本生体磁気学会論文集 **20** (1), 118 (2007).
- 6) Y. Fujimura and M. Iino, Surface tension of heavy water under high magnetic fields. *Appl. Phys. Lett.* **94**, 261902-1 - 261902-3 (2009).
- 7) Y. Fujimura and M. Iino, Magnetic field increases the surface tension of water. *J. Phys.: Conf. Ser.* **156**, 012028-1 - 012028-5 (2009).

学会発表

国際学会

- 1) Y. Fujimura, D. Kurimoto and M. Iino: Magnetic field effect on single cultured plant cells and regenerating protoplasts. Proceedings of the International Symposium on Magneto-Science 2005, Yokohama, ed. by M. Yamaguchi, Y. Tanimoto, S. Ozeki, and T. Kimura, (2006).
- 2) Y. Fujimura, T. Kushiya and I. Masaaki, Anisotropy in the area expansivity modulus of the cell wall regenerated under a magnetic field: Proceedings of International Conference on Magneto-Science, 2007, Hiroshima, *JSMS*, 97 (2007.11).
- 3) Magnetic Field Increases the Surface Tension of Water. 3rd International Workshop on Materials Analysis and Processing in Magnetic Fields 2009, Tokyo, (2008.5).

国内学会

- 1) 植物細胞物性への流動場の影響。藤村祐、飯野正昭、渡邊宇外：2004年春季第51回応用物理学関係連合講演会予稿集 1442頁、2004年3月、八王子。
- 2) 羽田俊彦,藤村祐, 飯野正昭：磁場下で細胞壁を形成させた植物細胞の強度測定、第28回日本応用磁気学会学術講演会概要集、355頁、2004年9月、沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)。
- 3) T. Haneda, Y. Fujimura, and M. Iino : Mechanical Properties of Plant Cell Walls Under a Magnetic Field、磁気科学合同シンポジウム2004、予稿集115頁、2004年12月、横浜国立大学(横浜市)。
- 4) 流動場の植物細胞壁のヤング率への影響。藤村祐, 松本浩二, 飯野正昭：2005年春季第52回応用物理学関係連合講演会予稿集、1442頁、2005年3月、さいたま。
- 5) 強磁場下で形成された細胞壁のヤング率変化。藤村祐, 羽田俊彦, 栗本大輔, 飯野正昭：2005年春季第52回応用物理学関係連合講演会予稿集、479頁、2005年3月、さいたま。
- 6) 植物培養細胞に対する静磁場の検討。飯野正昭, 羽田俊彦, 藤村祐：日本生体磁気学会プログラム、24頁、2005年7月、千里。
- 7) 超音波処理赤血球内封入分子の生体内循環寿命の測定。中西統子, 河原井英樹, 緑川貴之, 藤村祐, 飯野正昭：2005年秋季第66回応用物理学学会学術講演会予稿集、1126頁、2005年9月、徳島。

- 8) 赤血球内分子封入性の超音波処理条件の影響。河原井英樹, 福永典隆, 藤村祐, 飯野正昭: 2005 年秋季第 66 回応用物理学会学術講演会予稿集 1126 頁, 2005 年 9 月, 徳島。
- 9) 磁場下で形成されたアガロースゲルのヤング率。○藤村祐, 多田智成, 飯野正昭: 2006 年春季第 53 回応用物理学関係連合講演会予稿集 467 頁, 2006 年 3 月, 世田谷。
- 10) 磁場下再生植物細胞強度の磁場依存性。○栗本大輔、藤村祐、飯野正昭: 第 30 回日本応用磁気学会学術講演会、2006 年 9 月、松江市。
- 11) 物理的にプロセスされた植物細胞の形態観察。○櫛谷知宏、藤村祐、飯野正昭: 2006 年秋季第 67 回応用物理学会学術講演会、滋賀。
- 12) 磁場下再生植物プロトプラストの力学特性。○藤村祐, 栗本大輔, 飯野正昭: 第 21 回第日本生体磁気学会、2006 年 7 月、江戸川区。
- 13) 物理的にプロセスされた再生細胞壁の形態観察。○櫛谷知宏, 藤村祐, 飯野正昭: 2007 年春季第 54 回応用物理学関係連合講演会、2007 年 3 月、相模原。
- 14) 細胞弾性と細胞壁弾性における磁場効果。○藤村祐, 栗本大輔, 飯野正昭: 第 2 回日本磁気科学学会年次大会、2007 年 6 月、吹田。
- 15) 強磁場の下で再生させた細胞壁の弾性率とその異方性。藤村祐, 栗本大輔, 飯野正昭: 第 22 回第日本生体磁気学会、2007 年 6 月、岡崎。
- 16) 細胞壁弾性におよぼす磁場効果の解析。藤村祐, 櫛谷知宏, 飯野正昭: 2007 年秋季第 68 回応用物理学会学術講演会、2007 年 9 月、札幌。
- 17) 物理ストレスの影響を受けた再生プロトプラストの分子分析。小幡哲広, 藤村祐, 飯野正昭: 2007 年秋季第 68 回応用物理学会学術講演会、2007 年 9 月、札幌。
- 18) 磁場下における水の表面張力測定。○藤村祐、飯野正昭: 2008 年春季第 55 回応用物理学関係連合講演会、2008 年 3 月、船橋
- 19) 水表面張力の磁場効果。飯野正昭, 藤村祐: 日本物理学会、講演概要集 316 頁, 2008 年 9 月、盛岡。
- 20) 磁場配向アガロースゲルの異方性ヤング率とその磁場依存性の理論的解析。○藤村祐、多田智成、飯野正昭: 2009 年春季第 55 回応用物理学関係連合講演会、2009 年 3 月、つくば。
- 21) 磁場配向したアガロースゲルの異方性レオロジー特性。飯野正昭, 藤村祐, 多田智成: 第 32 回日本バイオレオロジー学会年会抄録集 113 頁, 2009 年 6 月, 桐生。
- 22) 磁場下における水および重水の表面張力。藤村祐、飯野正昭、第 4 回日本磁気科学学会年会、2009 年 11 月、松本。

謝辞

本論文を終えるにあたり、本論文の作成において、終始一貫して丁寧なご指導ご鞭撻を賜りました千葉工業大学 飯野正昭教授に心より感謝と敬意の意を申し上げます。

学位論文審査の労をお執りくださいました戸田善朝教授、柴田充弘教授、滝口泰之教授、菊池耕生教授、には、多くの貴重なご助言と温かいご支援を賜りました。記して感謝申し上げます。

また、学会活動を通して、ご意見・ご助言をいただいた多くの先生方に感謝申し上げます。最後に、論文をまとめるにあたり、見守り、時間を与えてくれた、家族に心からの謝意を記します。

平成 22 年 3 月

付録

共鳴周波数測定を行う為に以下のプログラムを使用した。

共鳴周波数測定法プログラム

```
Private Sub CmdStart_Click()
```

```
Dim i As Long
```

```
Dim CellPos, Timeold, timenow As String
```

```
Dim Data, delta As Variant
```

```
List1.Clear ' リストボックスのクリア
```

```
' □Excel ファイルのプロパティ設定
```

```
Gpib.SaveSelect = 2
```

```
Gpib.ExcelFileNamePath = "共鳴 1.xls"
```

```
Gpib.ExcelSheetName = "Sheet3"
```

```
On Error GoTo ERR_TRAP
```

```
' 直接コマンドメソッドを用いたプログラムです
```

```
' Model7555 から、データを取得して、Excel に貼り付けます
```

```
Gpib.CmdStart
```

```
'待ち時間の変更はここ (秒)
```

```
delta = 6
```

```
Timeold = Time
```

```
'回数の変更はここ (回) device1=Digital multi-meter; device2=FREQUENCY  
COUNTER
```

```
For i = 0 To 35000
```

```
wait:
```

```
timenow = (Time - Timeold) * 24 * 3600
```

```
If Val(timenow) Mod delta < 1 Then GoTo start Else GoTo wait
```

```
start:
```

```
Gpib.CmdOutput Gpib.Device2Address, Gpib.Device2SecondaryAddress,  
"MEASure:VOLTage:F2G0"
```

```
Data = Gpib.CmdEnter(Gpib.Device2Address, Gpib.Device2SecondaryAddress)
```

```
Gpib.CmdPaste Gpib.Device2Address, Gpib.Device2SecondaryAddress, Data
```

```
CellPos = "A" + CStr(i + 1)
```

```
Gpib.CmdCell Gpib.Device2Address, Gpib.Device2SecondaryAddress, CellPos
```

```
Gpib.CmdOutput Gpib.Device1Address, Gpib.Device1SecondaryAddress, ";OTYP
```

```

1;DOUT?"
Data = Gpib.CmdEnter(Gpib.Device1Address, Gpib.Device1SecondaryAddress)
Gpib.CmdPaste Gpib.Device1Address, Gpib.Device1SecondaryAddress, Data
CellPos = "B" + CStr(i + 1)

Gpib.CmdCell Gpib.Device1Address, Gpib.Device1SecondaryAddress, CellPos

Timer1_Timer

Next
Gpib.CmdEnd

```

'ここからの処理は、バッファに格納しているデータを取り出して、リストボックスに貼り付けます

```

On Error GoTo ERR_RECVDATA
i = 0
Do
i = Gpib.GetRecvData(i, Data)
If i <= 0 Then
Exit Do
End If
Data_ = StrConv(Data, vbUnicode)
List1.AddItem timenow - Timeold

Loop Until i = 0      ' ループから抜けます。
Exit Sub
ERR_TRAP:
MsgBox "データ送受信時にエラーを検出しました：" & Err.Description
Gpib.CmdEnd
Exit Sub
ERR_RECVDATA:
MsgBox "データ取り出し時にエラーを検出しました：" & Err.Description
End Sub

```

```

' アプリケーションの終了
Private Sub Exit_Click()
    Unload Me
End Sub

' イベント : Stop
Private Sub Gpib_Stop(ByVal Scode As Long, ByVal Description As String,
CancelDisplay As Boolean)
    ' Trueに設定するとActiveXコントロールのメッセージを表示しないように指示で
    きます
    CancelDisplay = True

    MsgBox "エラーを検出しました：" & Description
End Sub

' イベント : End
Private Sub Gpib_End(CancelDisplay As Boolean)
    ' Trueに設定するとActiveXコントロールのメッセージを表示しないように指示できま
    す
    CancelDisplay = True

    MsgBox "GP-IB の処理が終了しました！"
End Sub

Private Sub stop_Click()
    On Error GoTo ERR_TRAP
    Gpib.stop
    Exit Sub
ERR_TRAP:
    MsgBox "スクリプト中断時に、エラーを検出しました" & Err.Description
End Sub

Private Sub Timer1_Timer()
t0 = Timer
Do While Timer < t0 + 1.2
    DoEvents
    Loop

End Sub

```

共鳴周波数推移測定プログラム

```
Private Sub CmdStart_Click()  
Dim i As Long  
Dim CellPos, Timeold, timenow As String  
Dim Data, data1, delta As Variant
```

```
List1.Clear ' リストボックスのクリア
```

```
' ②Excel ファイルのプロパティ設定
```

```
Gpib.SaveSelect = 2  
Gpib.ExcelFileNamePath = "安定度.xls"  
Gpib.ExcelSheetName = "Worksheets"
```

```
On Error GoTo ERR_TRAP
```

```
' 直接コマンドメソッドを用いたプログラムです
```

```
' Model7555 から、10 s ごとにデータを取得して、Excel に貼り付けます
```

```
Gpib.CmdStart
```

```
Gpib.CmdOutput Gpib.Device2Address, Gpib.Device2SecondaryAddress, "F2G2"
```

```
'待ち時間の変更はここ (秒)
```

```
delta = 10
```

```
Timeold = Time
```

```
'回数の変更はここ (回) device1=Digital multi-meter; device2=FREQUENCY  
COUNTER
```

```
For i = 0 To 8000
```

```
wait:
```

```
timenow = (Time - Timeold) * 2.7 * 3600
```

```
If Val(timenow) Mod delta < 1 Then GoTo start Else GoTo wait
```

```
start:
```

```
data1 = Gpib.CmdEnter(Gpib.Device2Address, Gpib.Device2SecondaryAddress)
```

```
Gpib.CmdPaste Gpib.Device2Address, Gpib.Device2SecondaryAddress, data1
```

```
CellPos = "C" + CStr(i + 1)
```

```
Gpib.CmdCell Gpib.Device2Address, Gpib.Device2SecondaryAddress, CellPos
Gpib.CmdOutput Gpib.Device1Address, Gpib.Device1SecondaryAddress, ";OTYP
1;DOUT?"
```

```
Data = Gpib.CmdEnter(Gpib.Device1Address, Gpib.Device1SecondaryAddress)
Gpib.CmdPaste Gpib.Device1Address, Gpib.Device1SecondaryAddress, Data
CellPos = "D" + CStr(i + 1)
```

```
Gpib.CmdCell Gpib.Device1Address, Gpib.Device1SecondaryAddress, CellPos
```

```
Data = timenow
Gpib.CmdPaste Gpib.Device3Address, Gpib.Device3SecondaryAddress, Data
CellPos = "A" + CStr(i + 1)
Gpib.CmdCell Gpib.Device3Address, Gpib.Device3SecondaryAddress, CellPos
```

```
Timer1_Timer
```

```
Next
```

```
Gpib.CmdEnd
```

'ここからの処理は、バッファに格納しているデータを取り出して、リストボックスに貼り付けます

```
On Error GoTo ERR_RECVDATA
```

```
i = 0
```

```
Do
```

```
i = Gpib.GetRecvData(i, Data)
```

```
If i <= 0 Then
```

```
Exit Do
```

```
End If
```

```
Data_ = StrConv(Data, vbUnicode)
```

```
List1.AddItem Time
```

```
Loop Until i = 0 ' ループから抜けます。
```

```
Exit Sub
```

```
ERR_TRAP:
```

```

    MsgBox "データ送受信時にエラーを検出しました：" & Err.Description
    Gpib.CmdEnd
Exit Sub
ERR_RECVDATA:
    MsgBox "データ取り出し時にエラーを検出しました：" & Err.Description

End Sub

' アプリケーションの終了
Private Sub Exit_Click()
    Unload Me
End Sub

' イベント : Stop
Private Sub Gpib_Stop(ByVal Scode As Long, ByVal Description As String,
CancelDisplay As Boolean)
' True に設定すると ActiveX コントロールのメッセージを表示しないように指示できま
す
    CancelDisplay = True

    MsgBox "エラーを検出しました：" & Description
End Sub

' イベント : End
Private Sub Gpib_End(CancelDisplay As Boolean)
' True に設定すると ActiveX コントロールのメッセージを表示しないように指示できま
す
    CancelDisplay = True

    MsgBox "GP-IB の処理が終了しました！"
End Sub

' スクリプトを中断します
Private Sub Stop_Click()
    On Error GoTo ERR_TRAP
    Gpib.stop

```

```
Exit Sub
```

```
ERR_TRAP:
```

```
MsgBox "スクリプト中断時に、エラーを検出しました" & Err.Description
```

```
End Sub
```

```
Private Sub Timer1_Timer()
```

```
t0 = Timer
```

```
Do While Timer < t0 + 1.2
```

```
DoEvents
```

```
Loop
```

```
End Sub
```

Sample Cell の作成

基板作成

Visio というアプリケーションソフトを使い、くし状電極の配列パターンを作成した。その作成した配列パターンを OHP 用紙で印刷した。次にポジ感光基板で素材がガラスエポキシ (Sunhayato) の基板を 25×40 mm のサイズに切り、2 枚用意した。Voltage AMP 側に励起側、C/F Converter 側に受信側。図 1、図 2 に基板図を示す。図 1 のように銅電極に残したい部分を先ほど OHP 用紙で印刷した配列パターンを感光基板部分に貼り付け、その上から UV 光を 8 分間照射した。照射にはクリーンベンチの殺菌用 UV を用いて照射した。40°C に温めた現像液に浸し感光した部分の感光剤を剥がした。25 % の塩化第三鉄水溶液に上記で用意した基板を入れ、30 分間エッチングを行った。エッチングした後、重曹を用いて基板表面を中和した。次に、テスターを用いて基板の表面にある上下の電極が通電していないことを確認した。

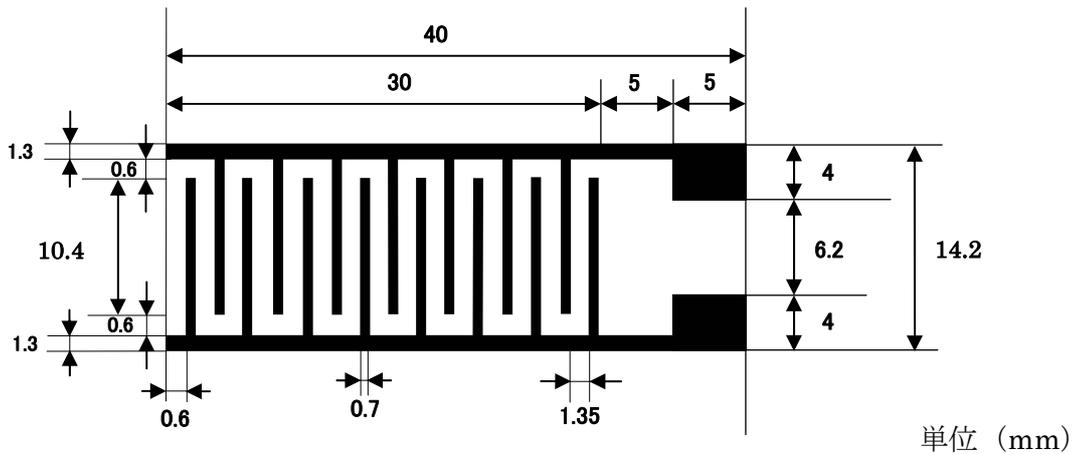


図1 くし電極パターン概略図

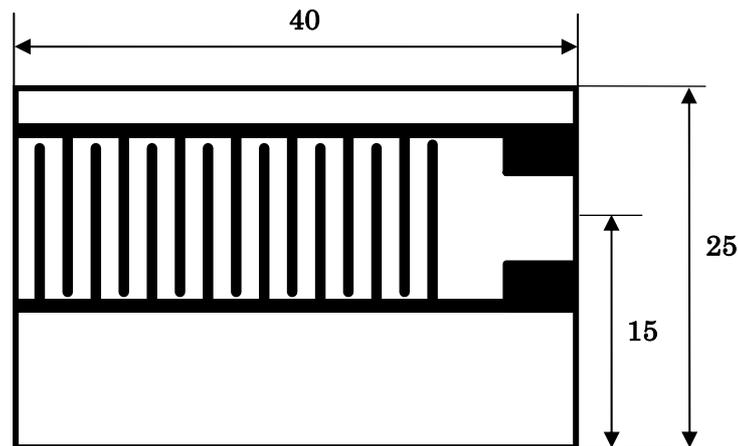


図2 くし状電極基板図2 Sample Cellの組み立て

透明高衝撃性常温硬化エポキシ樹脂 (STYCAST 1266, 図3) を用いて、前記で作成したくし状銅電極と市販のガラスセル (Fine ガラスセル 30×10×45 mm 東京ガラス) との接着を行った。重量比で 100 : 28 の配合比に従い樹脂と硬化剤を、電子天秤 (YMC、MJ-500) を用いて計り取り、十分に攪拌混合した。そして十分に攪拌したエポキシ樹脂を脱気し、攪拌時に発生した気泡を完全に除去した。ポット・ライフは 30 分、硬化条件は 25 °C、8 時間で硬化するため、ガラスセルと前記で作成したくし状銅電極基板の間に塗り、水準器で水平を合わせた場所に置き、両側から同じ力がかかるように万力で挟み、十分時間をおいて硬化させた。

市販の耐震ゴム (Pro7 G-N 4 0, 40×40×5 mm) を半分に切り 20×40×5 mm の大きさにして、スライドガラス (S 1226, 26×76×1 mm) を 25×40×1 mm に切った。耐震ゴムの粘着を利用してゴムとスライドガラスを貼り付け、蓋を作成した。Sample Cell

に、耐震ゴムとスライドガラスを貼り付けゴムの部分をガラスセルと密着させた。これを蒸発、ほこりなどの進入を防ぐ蓋とし、図 4 に示す。

くし状電極の励起側と Voltage AMP をシールド線で繋いだ。アース線は Sample Cell を載せている真鍮製の台につなぎアースを取った。(図 5)

C/F Converter の作成

C/F Converter は図 6 の発信機銅基板図をくし状電極と同じ方法でエッチングした。図 7 の C/F Converter の回路に沿って作成した。強磁場中でも正常に作動するようにマグネットフリーの抵抗を使用した。また、発信機が振動するとコイルも振動しノイズが発生するのでロウで固定し、振動対策を施した。(図.8) そしてバッテリーと C/F Converter をつなぐ配線をシールド線 (図 9 下、図 10) とし、Sample Cell を載せている真鍮製の台につなぎアースをとりノイズをカットした。(図 8)

C/F Converter のバッテリーが劣化しており、十分な容量を充電できず、発振シグナルが十分に出力していなかったため、新たなバッテリー (エネループ) に一新し、電源部分を変更した。(図 11)

図 8 の C/F Converter 用いて、Sample Cell の櫛状電極で感知した表面波の上下変化による静電容量の変化を周波数に変換し、その信号を F/V Converter で受信させた。

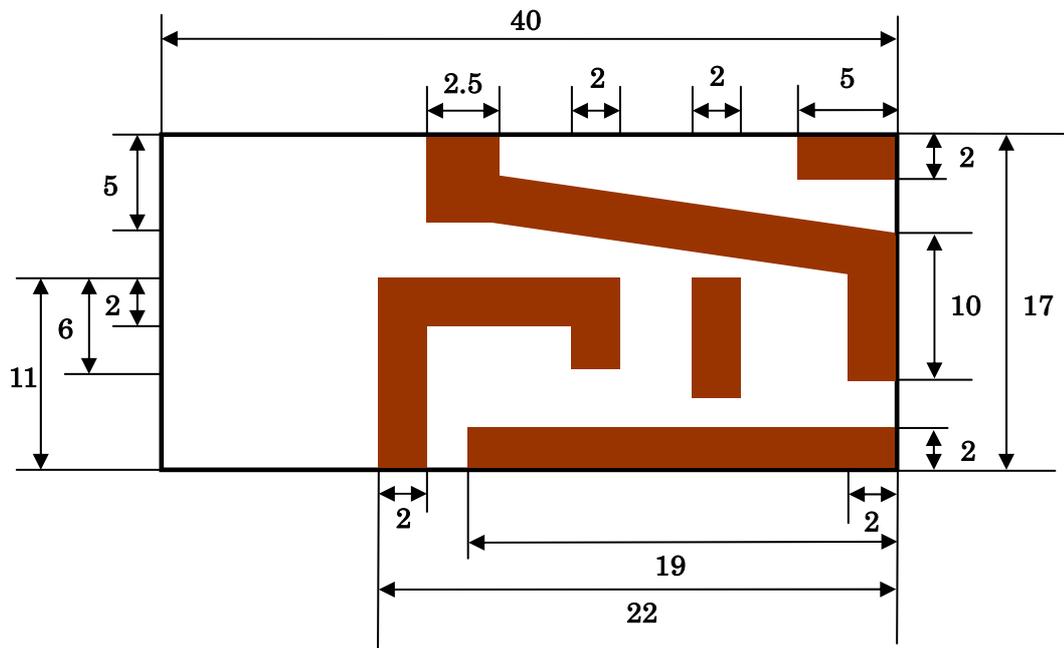


图 6 C/F Converter 基板图

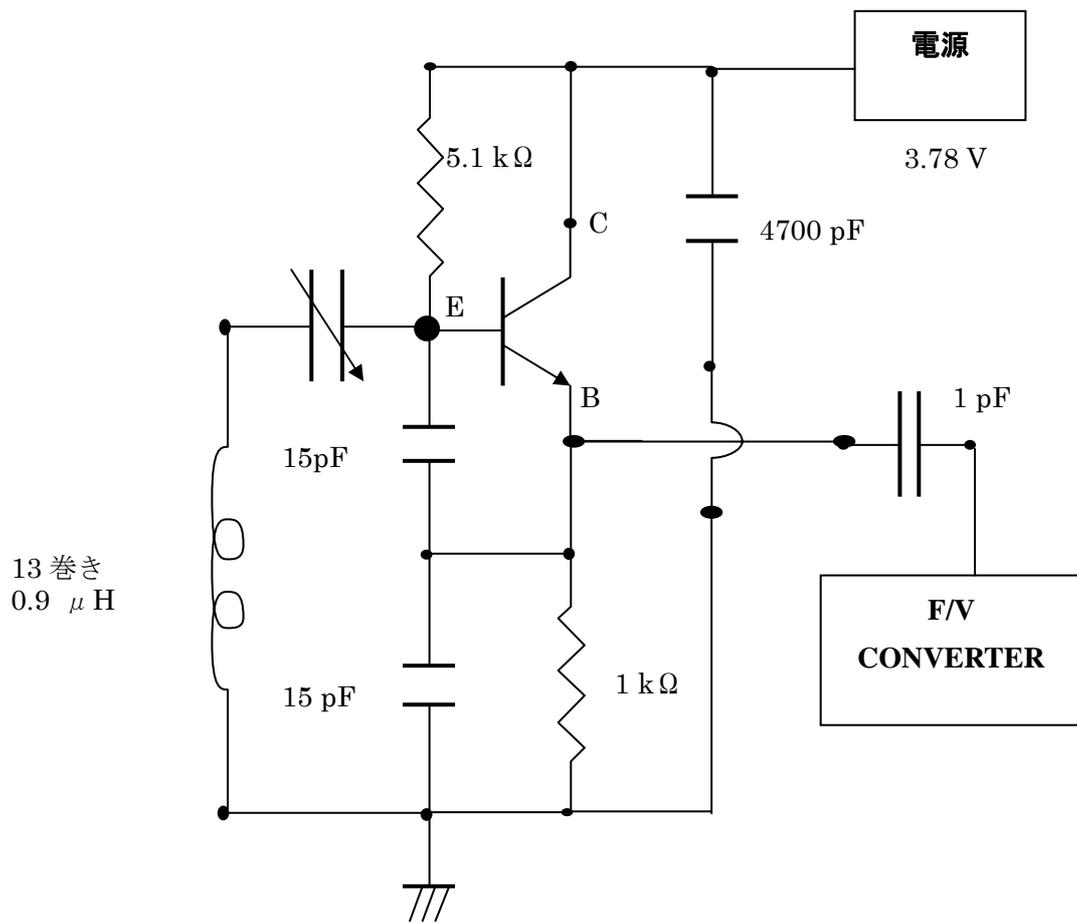


図 7 C/F Converter 回路図

洗浄

使用器具

バイオピペットとプラスチック製のチップを使用して測定セル内の水入れ替えていたが、プラスチック製のチップから不純物が溶け出す為、ガラス製のピペットを使用するようにした。5 ml のガラス製ピペットを図 2.5.1 の超音波洗浄器で洗浄し、蒸留水 (Lot.ALE9142,和光,大阪,日本)で共洗いを行った。(以下蒸留水を D.W.と表記)

また先端部分は特に重要であるために、洗浄した三角フラスコに D.W.を入れた状態でピペットを図 2.5.2 のように立てかけてサランラップを被せ、先端部分を図 2.5.3 小型超音波洗浄機(VSD-2R,アズワン,大阪,日本)の設定(High モード、40 K、25 °Cで 20 分以上)で洗浄を行った。

測定セル内の水の入れ替えの際に使用したピペットは、上記に記述した方法で洗浄したガラスピペットを使用した。

測定セルの洗浄

測定セル内に入れた水は全て UltraPure Water (Lot.ALG6817,和光,大阪,日本)を使用した。(以下 超純水と表記)

測定セル内に超純水をガラスピペットで 8 ml 注いだ。注いだ後はピペットで水の出し入れを行って、測定セル内の水を廃棄した。この作業を 6 回繰り返して測定セルの洗浄を完了とした。