

第 3 章 細胞膜の水伝導係数測定

3-1 緒言

葉菜類は水分損失により萎れを起こすことから、その貯蔵時には水分損失の抑制が図られる慣例にある。しかし第 2 章における研究により葉菜類は水分損失を起こさずとも、生体内部の局所的な水移動により萎れ等が起こり品質低下を起こしている可能性が高いことが明らかになった。したがって今後は葉菜類貯蔵技術の研究・開発を進めていく上で細胞内外の水移動や組織間の水移動など葉菜類内部の水移動を把握し理解することが重要になってくると予想される。植物体内の水の挙動に根源的に関連すると考えられる要素の一つに細胞膜の水伝導係数を挙げることができる。細胞膜の水伝導係数は、液晶、ゲル、結晶などの膜の状態や、水に対して選択性のあるチャンネルの存在などにより変化すると考えられる。したがって細胞内外の細胞膜をとおした水移動に関する研究を行う上で、細胞膜の水伝導係数を知ることは大変意義のあることと言える。

これまでの細胞膜の水伝導係数測定は主に動物細胞、特に卵細胞などを対象に、凍結保存の研究の一環として行われてきた。しかし用いられた測定手法の多くは原理的に大きな誤差を含みやすく、また測定には高度な熟練が必要であった。これらの問題を解決する測定手法も開発されてきたが、測定精度が向上する反面、大量の試料が必要になる等の問題があった。

よって第 3 章では少量の試料で、高い測定精度を実現する二層流式水伝導係数測定法を考案し、またこの測定法を実現するための装置を開発することを目的とした。また開発した装置にて測定を行い、その性能を検証した。

3-2 細胞膜の水伝導係数について

3-2-1 水伝導係数について

本章における測定項目である水伝導係数は次のように説明される。面積が A [m^2]である半透膜の両側の溶液に浸透圧差 $\pi - \pi'$ [Pa]が存在するとき、単位時間 Δt [s]あたり ΔV [m^3]の水が半透膜を通過したとすると次に示す式が成立する。

$$\frac{\Delta V}{\Delta t} = L_p A (\pi - \pi') \quad (3-1)$$

式 3-1 における比例定数 L_p が水伝導係数であり、 $[\text{m} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ の次元を持つことがわかる。また L_p の値が大きくなるほど半透膜をとおした単位時間あたりの水の移動量は大きくなることがわかる。この L_p を測定した研究例はいくつか存在するが、 L_p の名称は **water permeability**, **hydraulic conductivity**, または透水係数, 水透過係数などが用いられており統一されていない。本研究では岩波生物学辞典(山田ら編著、1993)に従い、 L_p を水伝導係数(**hydraulic conductivity coefficient**)と呼ぶことにする。

また水伝導係数に類似した物性値に浸透透水係数(**osmotic water permeability coefficient**)と拡散透水係数(**diffusional water permeability coefficient**)がある。浸透透水係数 P_o は膜の両側に溶質濃度差があるとき、膜を通過する水のモル数を表す係数であり、次の式にて表される。

$$P_o = f_{net} / A \Delta C \quad (3-2)$$

式 3-2 において、 f_{net} は正味の水の動き [$\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$]、 A は膜の面積 [m^2]、 ΔC は浸透濃度差 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$]を表す。 P_o の次元は [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]となる。また P_o と水伝導係数 L_p の関

係は次に示す式にて表される。

$$P_o = L_p RT / \bar{V}_w \quad (3-3)$$

式 3-3 において、 R は気体定数[Pa·m³·mol⁻¹·K⁻¹]、 T は温度[K]、 \bar{V}_w は水の部分モル体積[mol·m⁻³]である。また拡散透水係数 P_d は自由運動(自己拡散)により、膜を通過する水のモル数を表す係数であり、次の式にて表される。

$$P_d = f'_d / AC \quad (3-4)$$

式 3-4 において、 f'_d は水の流束[mol·s⁻¹]、 A は膜の面積[m²]、 C は水のモル濃度、 55.6×10^3 [mol·m⁻³]である。 P_d の次元は[m·s⁻¹]となる。また P_d は細胞内水の緩和時間から計算された、細胞内外の水の交換時間 λ [s]より次式にて求めることができる。

$$P_d = V / A\lambda \quad (3-5)$$

式 3-5 において、 V は細胞体積[m³]、 A は細胞表面積[m²]である。膜をとおした水移動が拡散現象のみによるとき、すなわち生体膜上に水に対して選択性のあるチャンネルが存在しないとき、浸透透水係数 P_o と拡散透水係数 P_d は等しいとされる(Zhang, 1996)。

3・2・2 細胞膜水伝導係数の測定原理

細胞膜の水伝導係数 L_p の測定は細胞の外部浸透圧変化に対する体積応答を調べることにより行われる。細胞(植物細胞ではプロトプラスト)は高張液あるいは低張液にさらされると、浸透圧の違いにより半透膜である細胞膜を通して細胞内外を水が移動し、細胞の体積変化が起きる。このときの体積変化の速度は次に示す式にて表される。

$$\frac{dV(t)}{dt} = -L_p A \{ \pi_e - \pi_i(t) \} \quad (3-6)$$

式 3-6 において、 $V(t)$ は細胞体積、 A は細胞表面積、 π_e は細胞外溶液の浸透圧、 $\pi_i(t)$ は細胞内部の浸透圧である。浸透圧 π は Van't Hoff の式より次のように表される。

$$\pi v_w = RT\chi \quad (3-7)$$

v_w : 水のモル体積($1.8 \times 10^{-5} \text{m}^3/\text{mol}$)

χ : 溶質のモル分率

式 3-6 における浸透圧 π を式 3-7 よりモル分率 χ に置き換えると次のようになる。

$$\frac{dV(t)}{dt} = -\frac{L_p ART}{v_w} \{ \chi_e^s - \chi_i^s(t) \} \quad (3-8)$$

χ^s : 細胞膜を透過しない溶質のモル分率

式 3-8 において、 χ_e^s は細胞外溶液の溶質のモル分率であり、その変化は無視できると仮定すると、時刻 t における細胞内液の溶質モル分率 $\chi_i^s(t)$ は次の式にて表される。

$$\chi_i^s(t) = \chi_e^s \frac{V_\infty - V_b}{V(t) - V_b} \quad (3-9)$$

式 3-9 において V_∞ は細胞平衡体積、すなわち細胞内液のモル分率が細胞外液のモル分率 χ_e^s と等しくなった時の細胞の体積である。 V_b は浸透圧非応答体積であり、細胞骨格など細胞内部の浸透圧に影響を与えない部位の占める体積である。式 3-9 を式 3-8 に代入し、整理すると次のようになる。

$$\frac{dV(t)}{dt} = - \frac{L_p ART \chi_e^s}{v_w} \cdot \frac{V(t) - V_\infty}{V(t) - V_b} \quad (3-10)$$

式 3-10 をさらに次のように変形する。

$$\left\{ 1 + \frac{V_\infty - V_b}{V(t) - V_\infty} \right\} \frac{dV(t)}{dt} = - \frac{L_p ART \chi_e^s}{v_w} \quad (3-11)$$

式 3-11 の両辺を時間 t で積分すると次式のとおりになる。

$$V(t) + (V_\infty - V_b) \ln \{V(t) - V_\infty\} = - \frac{L_p ART \chi_e^s}{v_w} t + C' \quad (3-12)$$

C' : 積分定数

また $t=0$ のとき $V(0) = V_i$ (V_i は初期体積) であるからこれを式 3-12 に代入すると

$$C' = V_i + (V_\infty - V_b) \ln(V_i - V_\infty) \quad (3-13)$$

となり、式 3-12 は次のように表される。

$$t = \frac{v_w}{L_p ART \chi_e^s} \left[\{V_i - V(t)\} + (V_\infty - V_b) \ln \left\{ \frac{V_i - V_\infty}{V(t) - V_\infty} \right\} \right] \quad (3-14)$$

式 3-14 は、溶質モル分率が $\chi_i^s(0)$ である外部溶液と浸透圧平衡にあり体積が V_i であった細胞に、時刻 $t=0$ において瞬時に外部溶液のモル分率を χ_e^s に変化させた

後の、時刻 t における細胞体積を表している。細胞膜の水伝導係数 L_p は、細胞の外部溶液の溶質モル分率を瞬時に変化させ、その後の経過時間と細胞体積を測定し、式 3-14 に回帰することにより求める。式 3-14 において $V(t)$ は超越数となるため、既往の研究(Leibo、1980)においては、Newton-Raphson 法を用いて時刻 t における細胞体積 $V(t)$ を求める、回帰している。

3-2-3 既往の研究における細胞膜水伝導係数の測定例

既往の研究において測定された細胞膜の水伝導係数 L_p の値を Table3-1 に示した。Table3-1 の cell の列に着目すると、測定対象は動物細胞であることが多いことがわかる。また水伝導係数 L_p に温度依存性があることや、植物細胞に比べて動物細胞の水伝導係数 L_p はおおよそ一桁大きいことなどがわかる。

Table3-1 における全ての測定において、細胞外部の浸透圧を変化させ、細胞体積応答を計測するという原理は共通している。しかし細胞に外部浸透圧の変化を与える方法、細胞体積の計測方法はそれぞれ異なっている。以下にそれぞれの測定例における手法を述べる。

Table3-1 水伝導係数の測定例

	Cell	Solute	Temp.(°C)	$L_p(\text{pm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1})$
Leibo(1980)	mouse ova	NaCl,PBS	20	0.069
Gao(1994)	mamalian oocyte	NaCl	30	0.17
			22	0.074
			12	0.042
Schwartz(1983)	yeast	NaCl	-	0.0019
			-	0.38
Curry(1997)	rabbit spermatozoa		35	0.32
			25	0.10
			15	0.043
Ishikawa(1997-b)	<i>Oryza sativa</i>	sucrose	25	0.0147
	<i>Vitis</i>	sucrose	25	0.020
	CH27	sucrose	25	0.090
	yeast	sucrose	25	0.033

Leibo(1980)はマイクロスライドと呼ばれる両端の開いたガラスチューブ(深さ 0.3mm、幅 1.2mm、長さ 25mm)に高張液を満たし、マイクロピペットにて 2.5 μ l の一つの細胞を含んだ等張液をマイクロスライドに流し込んでいる。すなわち等張液を拡散などによりマイクロスライド中の高張液と混合させ、細胞の外部浸透圧を変化させている。マイクロスライドは顕微鏡のステージ上におかれ、温度制御がなされている。細胞を含んだ溶液をマイクロスライドに流し込んでから、顕微鏡にて写真撮影を開始し、ステージを動かし細胞を視野内に追いながら、数秒おきに 15 枚から 30 枚の写真を撮影し、細胞の体積変化を計測している。

Gao ら(1994)は哺乳類の卵細胞の透明帯(zona pellucida, 哺乳類の卵にある透明な卵膜で受精の後は卵の最外層になる)を径が 8~10 μ m のマイクロピペットの負圧で、細胞培養皿上の 2 μ l の等張液中に固定し、1ml の 900mosmol の NaCl 溶液を滴下している。細胞が浸透圧平衡に達するまでを顕微鏡に取り付けたビデオカメラで撮影し、デジタルイメージアナライザを用いて、細胞の体積変化を計測している。

Schwartz ら(1983)は、イーストを NaCl 溶液に懸濁し冷却し、細胞外の溶液を凍結させていくことにより溶液の濃度を上昇させている。そのときの外部浸透圧変化による細胞体積の変化を低温顕微鏡に取り付けたカメラを用いて写真撮影を行い計測している。温度操作は 0 $^{\circ}$ C から -60 $^{\circ}$ C で、測定される細胞膜の透水係数は、冷却速度により大きく異なるようである。温度変化を伴うため、式 3-14 の温度を変数として更に変形して用いている。

Curry ら(1995)はまず、細胞を低張液に浸漬し、50%の細胞が破裂するときの浸透圧を臨界浸透圧と定義している。次に細胞を蒸留水に浸漬し、50%の細胞が破裂するまでの時間をその細胞が臨界浸透圧に達するまでの時間(溶解時

間)とし、溶解時間から L_p を計算している。臨界浸透圧の測定では様々な浸透圧の溶液を用意し、それらの溶液中での細胞の破裂率をフローサイトメータにて測定している。また溶解時間の測定では細胞を蒸留水にある時間浸漬した後、蒸留水に溶質を添加し細胞外浸透圧を初期の値に戻しフローサイトメータにて細胞の破裂率を測定している。細胞を蒸留水に浸漬してから溶質を添加するまでの時間を変化させ溶解時間を求めている。

Ishikawa ら(1997-b)は、細胞懸濁液中にて細胞の占める割合と細胞懸濁液の誘電率に関連があることを利用し(Ishikawa, 1997-a)、誘電率を測定することにより細胞の体積を求めている。細胞懸濁液に溶質を添加し攪拌することにより細胞外浸透圧を変化させている。

3-2-4 既往の研究における測定法の本研究への応用可能性

葉菜類の組織内部の水移動のメカニズムを解明するには、貯蔵中の葉菜について細胞膜の水伝導係数の経時変化を知ること、あるいは貯蔵環境と細胞膜の水伝導係数の関連を知ることなどが重要となる。そこで Table3-1 に示した測定例における手法の測定精度と特徴を、葉菜類組織内部の水移動に関する研究への応用における適合性という面から考察した。

まず Leibo(1980)の手法では、細胞外の溶液を拡散などにより高張液と混合させることにより、細胞外浸透圧を変化させている。このような方法では細胞外浸透圧を瞬時に変化させるのが困難であり、細胞外液の混合時間遅れが不確定であることに起因する誤差により、測定精度の向上は困難であると考えられる。また、細胞が小さくなるほどこの時間遅れの影響は大きくなるとされ(花沢, 1998)、Leibo が用いた卵細胞(直径 70~150 μm)より小さな葉組織細胞(直径 30~40 μm)への応用では十分な測定精度が実現されないと予測される。また、細胞をマイクロピペットで操作するには高度な熟練を要するので、やはり細胞が小さくなるほど測定が困難になると考えられる。

Gao(1994)らの手法においても Leibo(1980)と同様な細胞外液の混合時間遅れの問題があり、また測定に透明帯を用いているので、測定対象は哺乳類卵細胞のみとなり、葉組織細胞への応用は不可能である。

Schwartz ら(1983)の手法では、細胞の温度を変化させている。 L_p は温度依存性のある係数であるが、この研究ではそもそも細胞を凍結保存する際の、体積変化などの挙動を知ることによって目的があったとされている。よって葉菜類組織内の水移動に関する研究において細胞膜の水伝導係数 L_p を測定する際に、この手法を応用するのは適切ではない。

Curryら(1997)の手法では細胞外浸透圧を変化させる折に、溶液を攪拌していることからLeibo(1980)やGao(1994)らの手法に比べて混合時間遅れは改善されていると考えられる。しかしこの手法では細胞の臨界浸透圧や溶解時間を測定するために、多数の測定を行わなければならない、試料も高密度のものが $300\mu\text{l}$ 以上は必要と考えられる。この手法には多数の細胞を同時に測定することから、一度の測定で多くの細胞の細胞膜水伝導係数の平均値を得ることができる。しかし貯蔵中の葉菜類からプロトプラストを単離し試料とする場合、ハウレンソウであれば3~4枚の葉から作成できるプロトプラストは、 $10^6/\text{ml}$ の密度のものが $100\mu\text{l}$ 程度である。したがってこの手法に必要な試料を確保することは困難と考えられる。

Ishikawa(1997)らの手法においても細胞懸濁液を攪拌していることから、細胞外溶液の混合時間遅れは改善されていると考えられる。測定には $1.2\times 10^7/\text{ml}$ の密度の試料が 100ml 必要であり、この手法においても一度の測定で、細胞膜水伝導係数の平均値が得られるが、やはり本研究への応用は現実的ではない。

以上のとおり、既往の研究における細胞膜の水伝導係数の測定手法について検討したが、本研究に応用が可能と考えられるのはLeibo(1980)の手法のみとなった。

3-2-5 既往の研究における測定法の精度

既往の研究における水伝導係数測定の手法を検討した結果、本研究への応用の可能性が考えられるのは Leibo(1980)の手法のみとなった。しかしながら Leibo(1980)の手法においては、細胞外部溶液の浸透圧変化に時間遅れが生じ、この時間遅れが不確定であることに起因する誤差のため、十分な測定精度が期待されないという問題がある。そこで Leibo(1980)の手法を用いたときの測定精度を計算機によるシミュレーションにより推算し、本研究で必要と考えられる測定精度が得られるかを検討した。

Leibo(1980)の手法では細胞をある程度の量の等張液とともにマイクロピペットにて高張液に注入する。するとこの細胞の周囲の等張液が高張液と拡散などにより混合し、細胞外部の溶液の浸透圧が変化する。ここで半径 $20[\mu\text{m}]$ の細胞が $2.0[\mu\text{l}]$ の等張液とともに、高張液に注入されたと仮定して、この細胞外部の溶液の浸透圧変化における時間遅れを計算した。

まず Fig.3-1 に示すように細胞の中心と等張液の球の中心が一致しており \mathbf{O} で表されているとした。このとき r_1 は細胞半径であり $20[\mu\text{m}]$ 、 r_2 は等張液の球の半径であり、約 $842[\mu\text{m}]$ となる。Fig.3-1 において細胞の中心 \mathbf{O} を原点とした球面座標を設定し、等張液と高張液の混合が拡散のみによると仮定すると、位置 $\mathbf{P}(r, \theta, \phi)$ ($|r| > r_1$) における溶液の濃度は次に示すフーリエの拡散方程式に従う。

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D \left\{ \frac{\partial^2 u}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{\partial u}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \cdot \frac{\partial^2 u}{\partial \theta^2} + \frac{\cos\theta}{r^2 \sin\theta} \cdot \frac{\partial u}{\partial \theta} + \frac{1}{r^2 \sin^2\theta} \cdot \frac{\partial^2 u}{\partial \phi^2} \right\} \quad (3-15)$$

式 3-15 において u は溶液の溶質濃度、 D は溶質の拡散係数である。このとき濃度分布が原点に対して対称、すなわち θ 、 ϕ 方向には濃度勾配が無いと仮定すると式 3-15 は次のように簡略化できる。

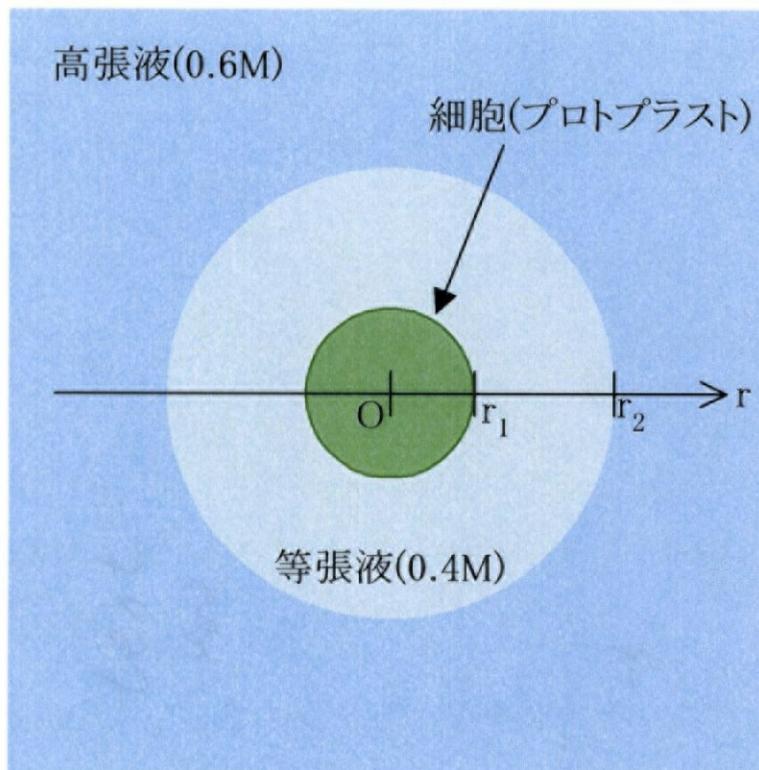


Fig.3-1 高張液に注入された細胞

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D \left\{ \frac{\partial^2 u}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{\partial u}{\partial r} \right\} \quad (3-16)$$

またこのとき細胞表面においては物質移動が起こらないと仮定し、

$$\left(\frac{\partial u}{\partial r} \right)_{r=r_1} = 0 \quad (3-17)$$

とした。陽解法にて溶液の濃度変化を求めるため、式 3-16 より、次に示す差分式を得た。

$$U_n^{m+1} = U_n^m + D \frac{\Delta t}{(\Delta r)^2} \left\{ U_{n+1}^m - 2U_n^m + U_{n-1}^m + \frac{1}{n} (U_{n+1}^m - U_{n-1}^m) \right\} \quad (3-18)$$

$$t = m\Delta t \quad r = n\Delta r$$

式 3-18 において U は溶質のモル濃度である。また、式 3-17 より、次に示す差

分式を得た。

$$U_n^{m+1} = U_n^m + 2D \frac{\Delta t}{(\Delta r)^2} (U_{n+1}^m - U_n^m) \quad (3-19)$$

以上の条件において D にスクロースの拡散係数 $5.8 \times 10^{-10} [\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}]$ を与え、 Δr を $10^{-6} [\text{m}]$ 、 Δt を $10^{-4} [\text{s}]$ として、計算した細胞表面における外部溶液の溶質濃度変化を Fig.3-2 に示した。Fig.3-2 より、細胞外溶液がほぼ高張液と等しい濃度となったとみなせるまで 10 分程度かかることがわかる。しかし実際には外部溶液の混合は細胞挿入時に発生する流れなどにより Fig.3-2 で示された結果よりは速いものと考えられる。

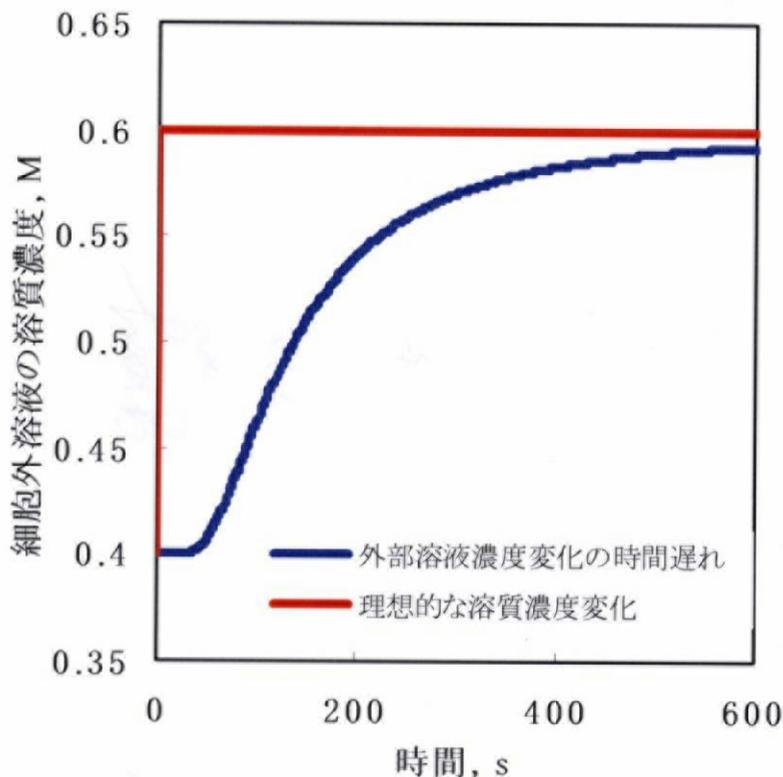


Fig.3-2 細胞外部溶液の混合時間遅れ

次に、計算によって得られた細胞表面における外部溶液の変化を $\chi_e^s(t)$ として式 3-10 に代入し、次に示す式を得た。

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{L_p RT}{v_w} \cdot 4\pi^3 \sqrt{\frac{9}{16\pi^2}} \cdot V(t)^{\frac{2}{3}} \left\{ \chi_e^s(t) - \frac{V_i - V_b}{V(t) - V_b} \cdot \chi_i(0) \right\} \quad (3-20)$$

式 3-20 において細胞表面積は体積の関数とした。式 3-20 から 4 次の Runge-Kutta 法を用いて細胞体積変化を計算した。計算式は次に示したとおりである。

$$f(V)_n = -\frac{L_p RT}{v_w} \cdot 4\pi \left(\frac{9}{16\pi^2} \right)^{\frac{1}{3}} V_n^{\frac{2}{3}} \left\{ \chi_{en}^s - \frac{V_i - V_b}{V_n - V_b} \cdot \chi_i(0) \right\} \quad (3-21)$$

$$t = n\Delta t$$

と $f(V_n)$ を定義し、

$$k_1 = f(V_n)\Delta t \quad (3-22)$$

$$k_2 = f\left(V_n + \frac{k_1}{2}\right)\Delta t \quad (3-23)$$

$$k_3 = f\left(V_n + \frac{k_2}{2}\right)\Delta t \quad (3-24)$$

$$k_4 = f(V_n + k_3)\Delta t \quad (3-25)$$

$$V_{n+1} = V_n + \frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4) \quad (3-26)$$

上式にて V は細胞体積である。水伝導係数 L_p を $0.050[\text{pm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ 、浸透圧非応答体積を初期細胞体積の 10%、温度 T を $293[\text{K}]$ 、また Δt を $0.01[\text{s}]$ として計算し、結果を Fig.3-3 に示した。

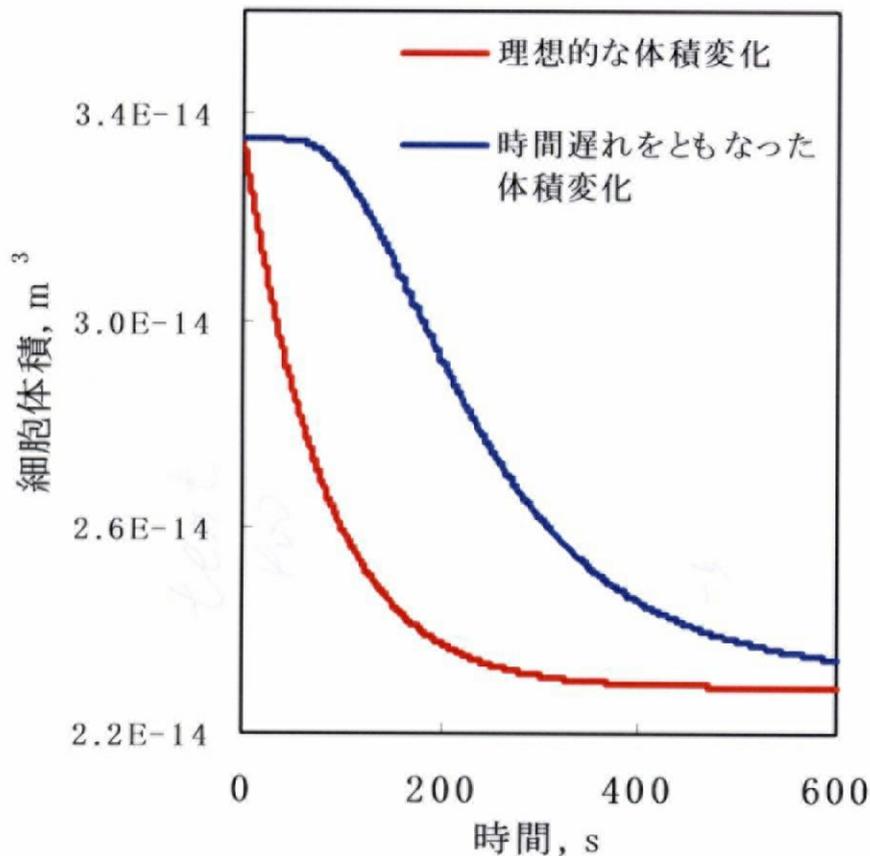


Fig.3-3 時間遅れをともなった細胞体積変化

計算によって得られた細胞体積変化を、式 3-14 にて回帰することにより細胞膜の水伝導係数 L_p を計算すると約 $0.012[\text{pm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ となった。すなわち仮定された真の水伝導係数 $0.050[\text{pm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ に比べて測定結果は約 4 分の 1 ということになる。実際の測定においては細胞外部溶液の混合は拡散以外の要因が働き速くなり、水伝導係数は $0.012[\text{pm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ より大きく測定されることが考えられる。すなわち測定結果は 0.012 から $0.050[\text{pm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ の間に分散すると考えられる。以上のことから Leibo(1980)の測定手法による測定値で、信頼できるのは水伝導係数の指数部までと考えられる。

ここで Table3-1 に示した測定例の中で、攪拌により細胞外溶液の浸透圧を速やかに変化させていると考えられる Curry ら(1997)の測定結果に着目してみた。Curry らは水伝導係数 L_p を 15 から 35°C の間で測定しているが、このときの温度の違いによる水伝導係数の違いは 10 倍以内であった。このことからのみは一概には言えないものの、水伝導係数 L_p の 10 倍以内の違いに有意な情報が存在する可能性が十分に考えられる。したがって水伝導係数 L_p の測定値で、信頼できるのがその指数部までであるとすると、仮に葉菜類組織内部の水移動に影響を与える水伝導係数の変化が起きたとしても、既往の手法による水伝導係数測定では、それを知ることができないということも考えうる。

以上のとおり、既往の研究における水伝導係数の測定手法を検討した結果、本研究においては、測定に必要な試料が少なく、細胞外部の溶液を速やかに置換できる、新たな測定手法が必要であるとの考えに至った。

3-3 二層流式水伝導係数測定法の開発

3-3-1 二層流式水伝導係数測定法の原理

水伝導係数測定において必要な試料が少量(細胞1つで可能)であり、なおかつ細胞外部溶液を速やかに置換することが可能な新しい測定手法を考案した。新しく考案した手法は二層流式水伝導係数測定法と命名した。二層流式水伝導係数測定法の原理について以下に述べる。

まず二層流についてであるが、マイクロチャンネルのような狭い流路に2種の溶液を層流として流すと、2種の溶液は接する面において互いに拡散し、混合していくが、混合した溶液はすでに下流に流されているので、流路の中では両液はきわめてよく分離した状態を維持する。

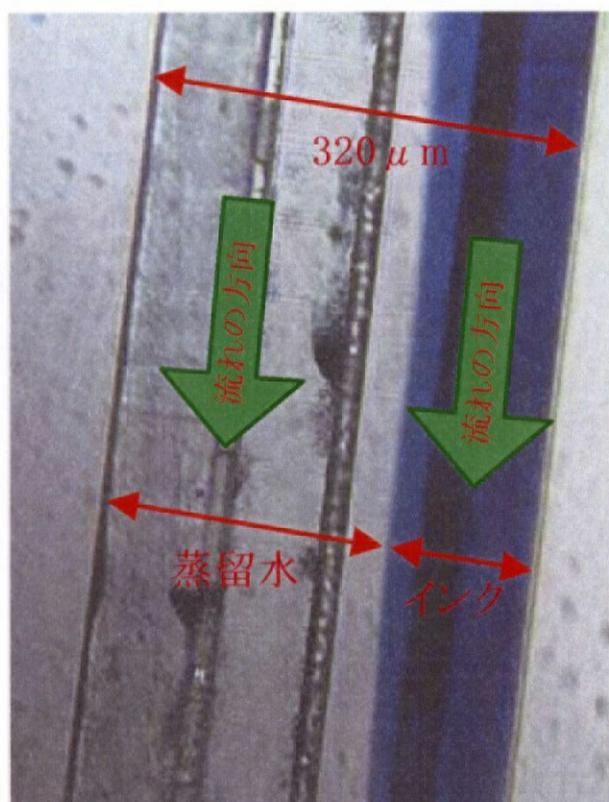


Fig.3-4 蒸留水とインクの二層流

溶液の流速を速くするほど両液の境界面は鮮明なものとなるが、流れのレイノルズ数が臨界レイノルズ数を超えると、両液は乱流となり混合してしまう。**Fig.3-4**に蒸留水とインクを流路に流し二層流を形成させ、撮影した写真を示した。流路はアクリルにエキシマレーザを用いて切削したものであり、撮像倍率は100倍である。

また2種の溶液の境界面はそれぞれの溶液の流量を調節することにより動かせる。**Fig.3-5(A)**に示したように、初めに流路中に溶液Aと溶液Bを二層流として流し、細胞が溶液B内になるように溶液の流量を調節する。この状態を保つことにより、細胞が溶液Bと浸透圧平衡となる。次に**Fig.3-5(B)**に示したように、それぞれの溶液の流量を調節し、細胞が溶液A内になるようにする。これにより細胞外部の溶液は溶液Bから溶液Aへと速やかに置換されることとなる。溶液A、Bの浸透圧に違いを与えておけば、細胞外溶液の浸透圧を瞬時に変化させることができる。このとき試料細胞を適切な方法で固定しておくことにより、細胞の顕微鏡による観察が可能となり、外部浸透圧変化に対する細胞の体積応答を調べることができる。

二層流式水伝導係数測定法の利点としては、細胞外溶液の浸透圧を速やかに変化させつつ顕微鏡にて観察が可能な点以外に、

- ・細胞外溶液が置換される瞬間が容易に判別できる。
- ・細胞が固定されており、測定中に顕微鏡の視野や焦点を調節する必要がない。

等が挙げられる。

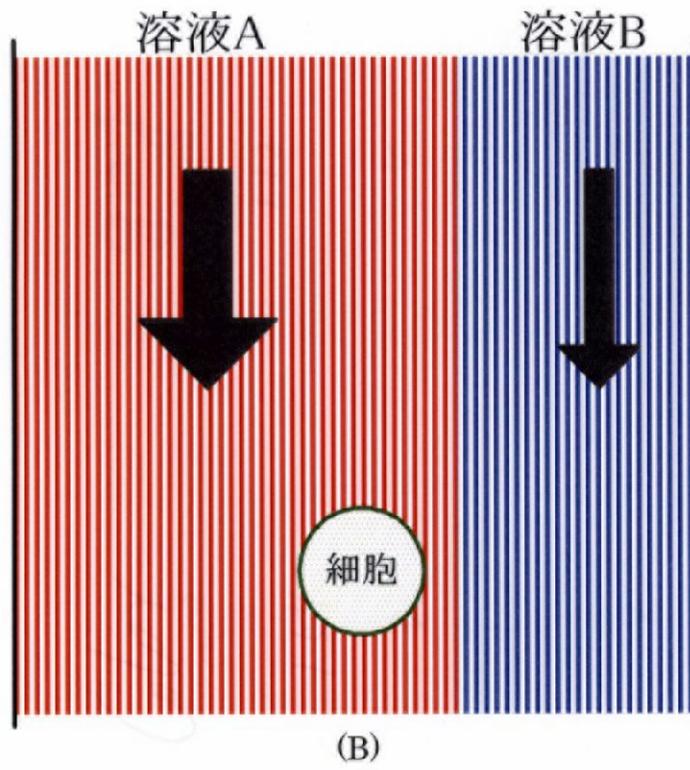
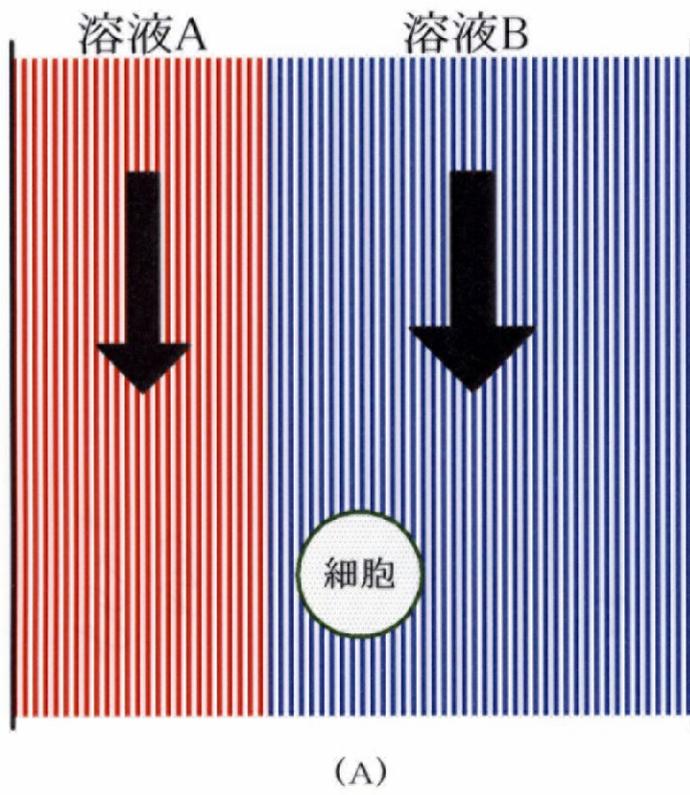


Fig.3-5 二層流内の細胞

3-3-2 水伝導係数測装置の構造

3-3-2-1 二層流セルの構造

二層流式水伝導係数測定法を実現するにあたって、測定装置に要求される機能は、

- ・二種類の溶液を二層流として流すことが可能な流路を備えていること。
- ・試料細胞を二層流流路内に固定することが可能であること。
- ・顕微鏡による流路内の細胞の観察が可能であること。

などが挙げられる。以上の機能を備えた装置(二層流セル)を作成した。作成した二層流セルの流路部の略図を Fig.3-6 に示した。

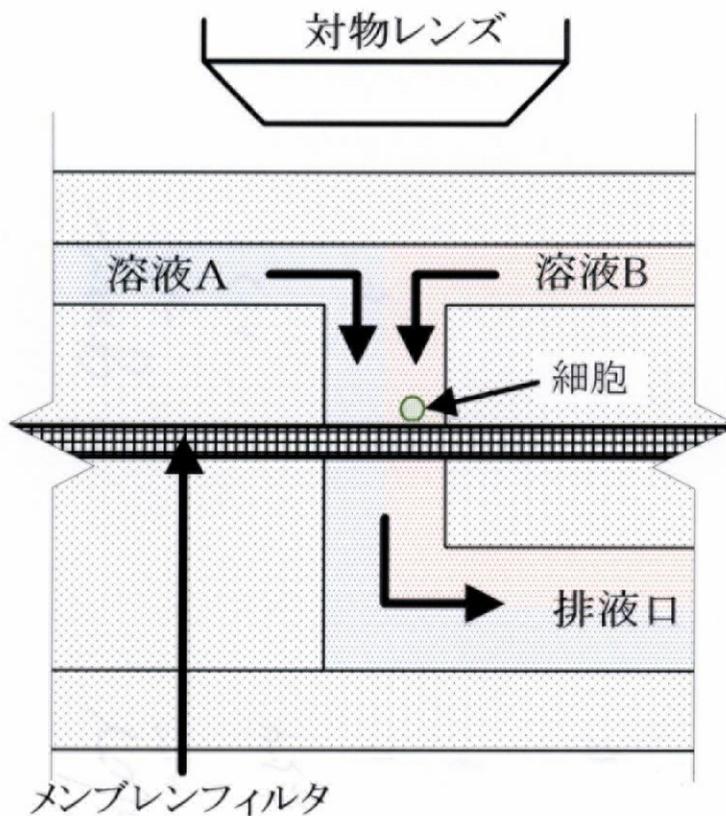


Fig.3-6 二層流セルの略図

二層流セルの素材は透明なアクリルである。二層流セルには上部の水平な 2 つの溶液導入口より溶液が流入する。それぞれの導入口から流入した 2 種の溶液は垂直坑にて合流し、二層流を形成して垂直坑を下方へ向かう。垂直坑の下部に達した溶液は、二層流セル下部の水平な排液口より排出される。垂直坑の途中には溶液の流れの向きに垂直にメンブレンフィルタ(東洋濾紙株式会社製、ポリカーボネイト、ポアサイズ $8.0\mu\text{m}$)が設置されており、ここに試料細胞が固定される。固定された試料は二層流セルの上部から顕微鏡にて観察が可能である。

Fig.3-7 に二層流セルを上方より撮影した写真を示した。二層流セル全体の大きさは縦 50mm、横 40mm である。写真における 2 層流セルの左右に見える銅管が溶液導入部であり、下方に見える銅管が排液口である。

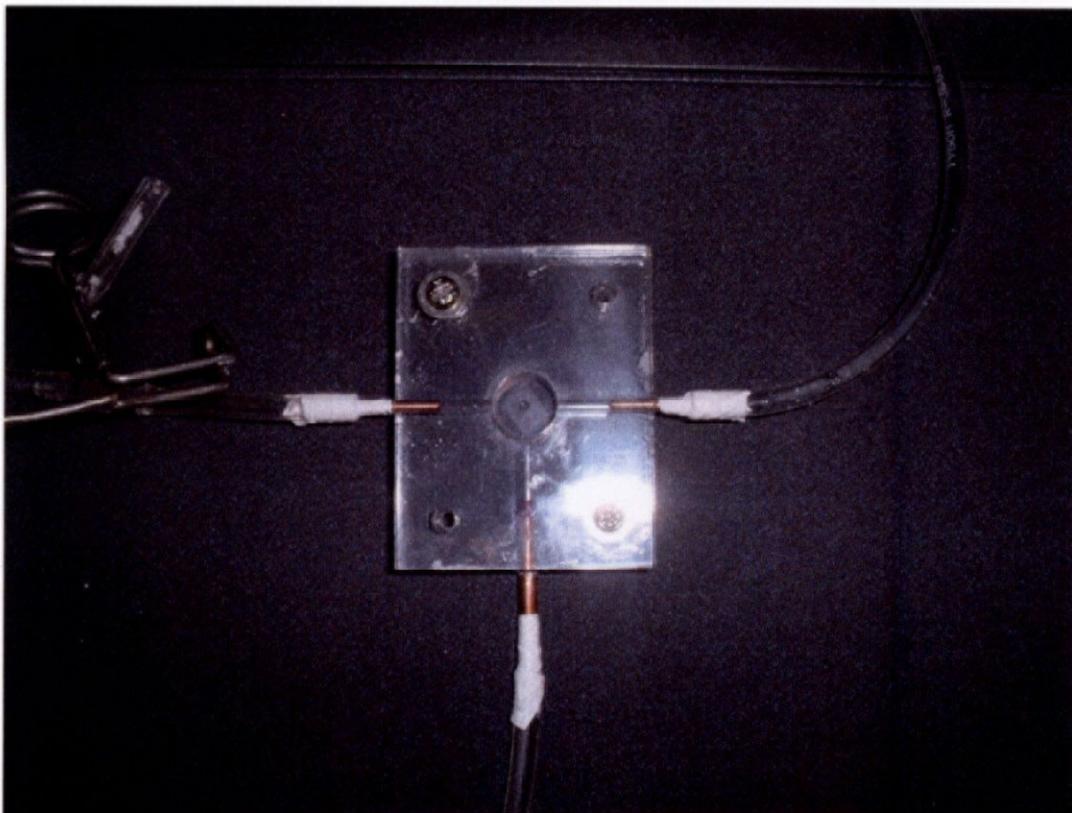


Fig.3-7 二層流セル

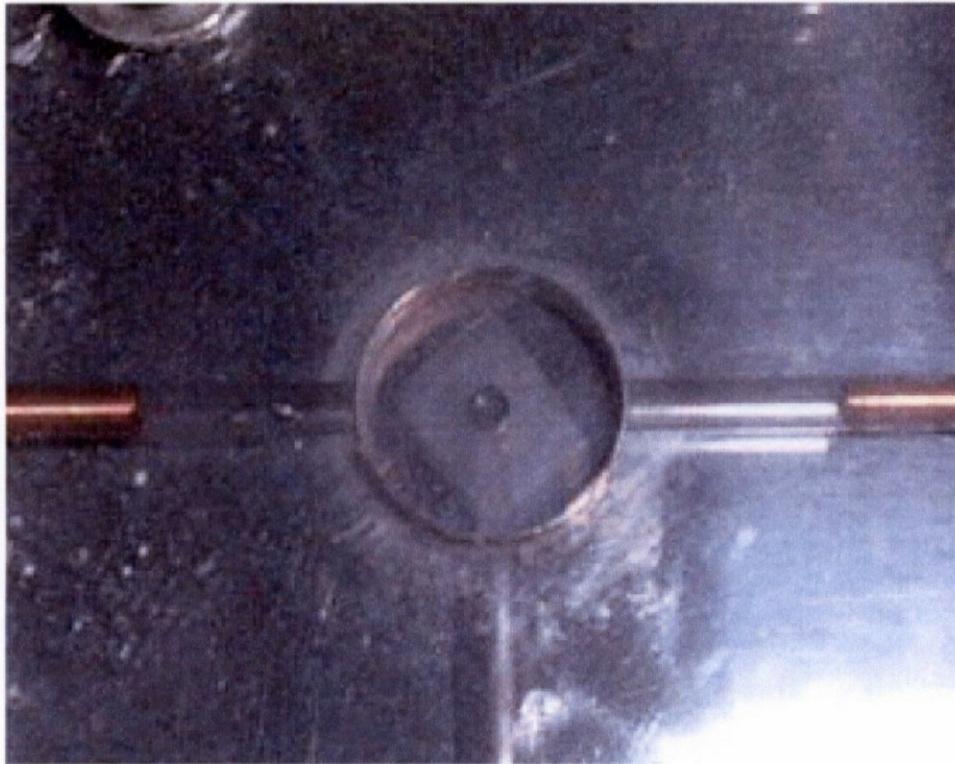


Fig.3-8 二層流セル拡大写真

また Fig.3-8 に二層流セル中心部の拡大写真を示した。Fig.3-8 において中央部の大きな円の直径は 10mm である。その中に見える白色で四角形の部分が設置されたメンブレンフィルタである。またその中に見える小さな円は垂直坑であり、ここで試料細胞を観察する。垂直坑の直径は 1.4mm である。

3-3-2-2 周辺装置の構成

二層流式水伝導係数測定法に必要な、周辺装置の模式図を Fig.3-9 に示した。二層流セルには導入する溶液を蓄える溶液タンク A、B がタイゴンチューブ(外径 4.0mm、内径 2.0mm)にて接続されている。導入する 2 種の溶液それぞれの流量を調節し両液の境界面を動かすため、接続チューブの途中にはニードルバルブが設置されている。また二層流セルから排出された廃液は廃液タンクに蓄えられる。溶液は重力によって溶液タンクからセルに導入され、廃液タンクに排出される。セル内の試料細胞はセル上部より顕微鏡に接続された CCD カメラ (SONY 製、DXC-950P)により撮影され、デジタルビデオレコーダ(SONY 製、DSR-11)に記録される。

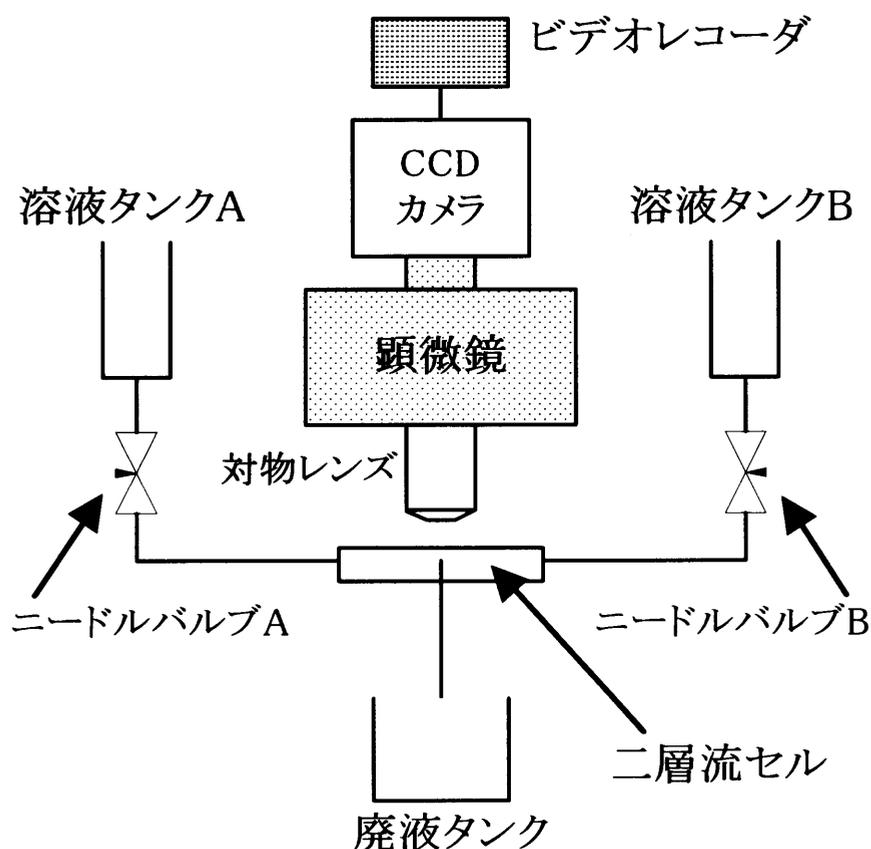


Fig.3-9 周辺装置の模式図

また Fig.3-10 に周辺装置の写真を示した。溶液タンクおよび廃液タンクは高さが調節可能となっている。タンクの高さを調節することにより、二層流セル内を流れる溶液の流量を粗調整することができる。

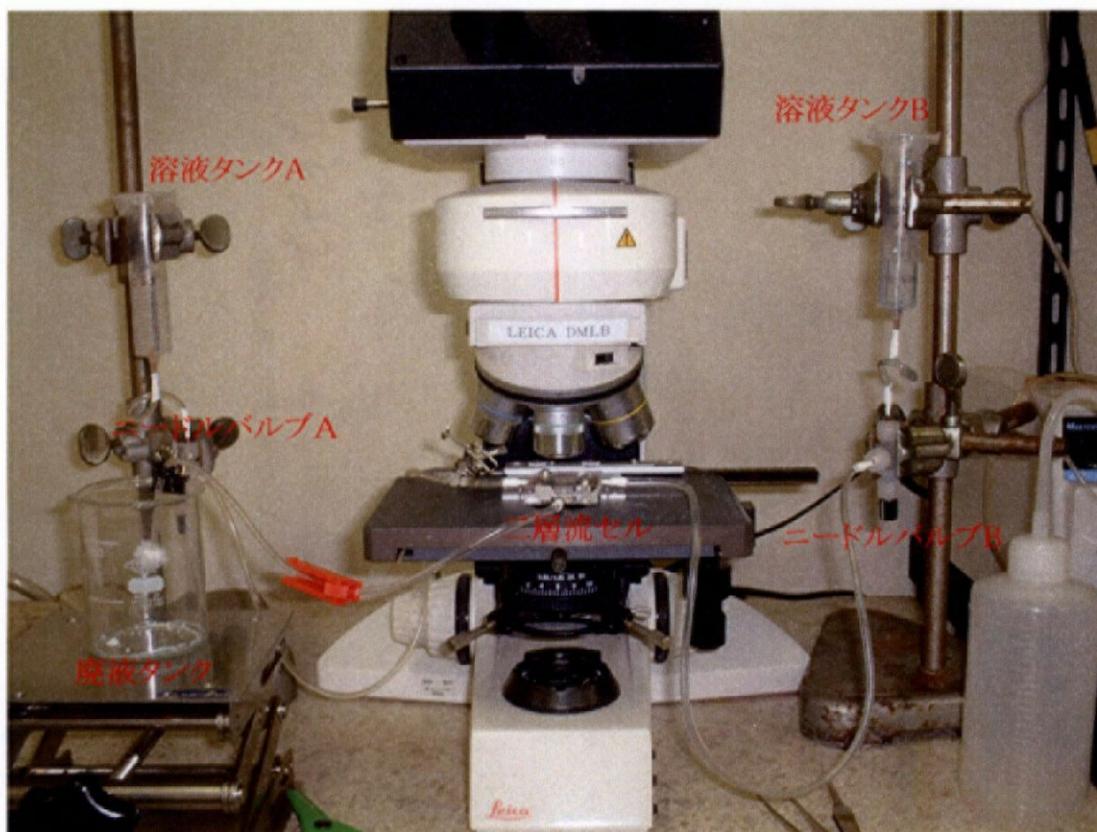


Fig.3-10 周辺装置の写真

3-3-3 二層流形成の確認

作成した二層流セル内部を、2種の溶液が混合せず、二層流を形成するかを確認した。装置に赤色インク(株式会社パイロット製、INK-350-R)と蒸留水を流し、垂直坑内を顕微鏡にて観察、撮影した。撮影された写真を Fig.3-11 に示した。撮像倍率は 200 倍である。Fig.3-11 より、左側を赤色インクが流れ、右側を蒸留水が流れている様子が確認された。流れの方向は写真手前から奥に向けてである。Fig.3-11 における右側の蒸留水が流れている部分に見える構造物は、メンブレンフィルタの穴である。

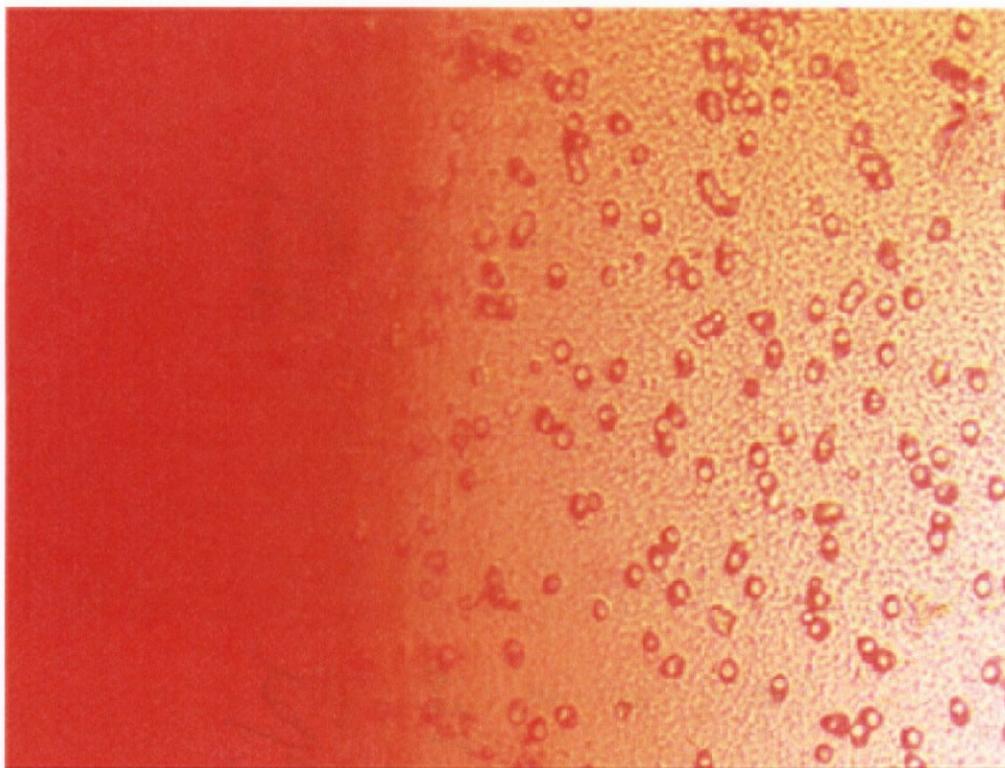


Fig.3-11 赤インクと蒸留水の二層流

また同様にして装置に、赤色インク(同上)と青色インク(株式会社パイロット製、INK-350-BB)を流し、廃液を観察した。Fig.3-12 に廃液タンクに流出する廃液の写真を示した。Fig.3-12 から分かるように、2種の溶液は二層流セルから排出され、廃液タンクに流出する段階においても、二層流を形成した。

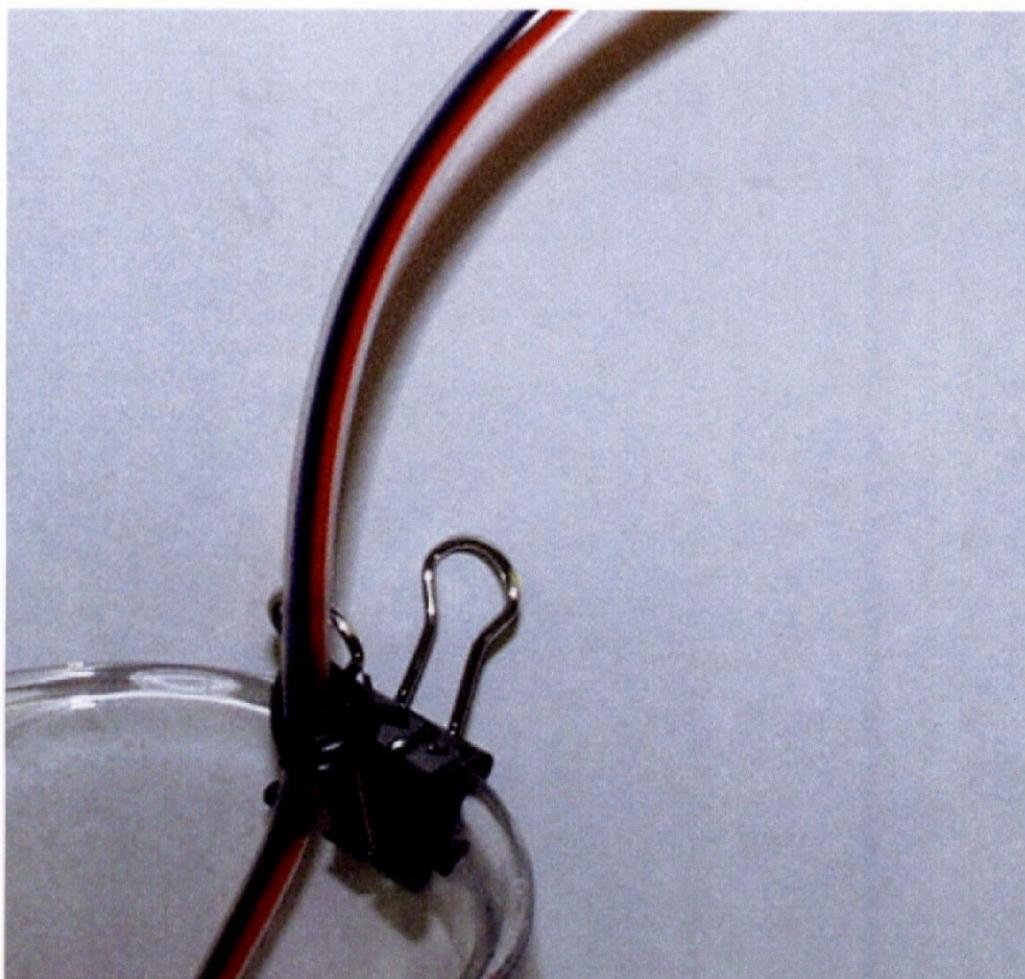


Fig.3-12 廃液タンクに流出する二層流