修 士 学 位 論 文

題　名

加熱処理酵母における誘電泳動速度と代謝状態の相関検証

指導教授　　内田　諭　　准教授

平成　28年　2月　17日　　提出

首都大学東京大学院

理工学研究科　　電気電子工学　専攻

学修番号　　14882302

氏　名　　石田　高広

学位論文要旨（修士（工学））

論文著者名　石田　高広

論文題名：加熱処理酵母における誘電泳動速度と代謝状態の相関検証

醸造や燃料合成などのバイオ産業において，品質及び生産性向上の観点から，菌代謝工程の最適化が進められている．しかしながら，現行の定時管理では異常発生時の即時対応が困難であり，工程の最適化に大きな制約を与える．ゆえに，菌体に対する常時管理体制の確立が急務である．

現在，微生物試験の公定法は，培養法を基本としている．しかしながら，本法は測定に膨大な時間を必要とする．他に，菌代謝を評価可能な迅速法として，ポリメラーゼ連鎖反応法 (polymerase chain reaction: PCR) やフローサイトメトリー法などがある．これらの手法では，DNA 増幅や蛍光標識等の菌体に対する前処理が前提となる．また，使用する試薬や機材が高価であり，操作に高度な専門知識を必要とする．現状において，これらの評価法は菌代謝の常時管理に適さない．そのため，迅速かつ簡便に菌代謝状態を監視できる自動化システムの開発が望まれている．

誘電泳動 (dielectrophoresis; DEP) を利用した電気的計測法は，迅速性や簡便性の観点から有力な菌評価技術として，近年期待が高まっている．DEPとは，不均一電界下において誘電体微粒子が分極し，電界強度の差に応じて泳動する現象である．DEP力は粒子及び媒質の複素誘電率，粒子半径，印加電圧及び周波数に依存する．また，菌体は代謝状態の変化に伴い誘電特性が変化することが報告されている．そのため，DEP力を計測することで菌体の代謝状態を評価することができる．筆者らはDEP力と菌代謝状態の直接的な相関について検討するため，画像解析によるDEP速度計測に着目した．本手法は単一粒子での測定が可能であるため，極微量検体に対して有効である．また，高導電媒質や流体場への応用も見込める．

本研究は，DEP速度計測により菌体の代謝状態を，迅速かつ簡便に評価する新たな生体粒子計測システムの構築を目的としている．これまでに，当該システムにおける基本性能を検証するため，加熱処理により膜生理状態の異なる酵母を実験的に調整し，処理温度及び時間に対する酵母群のDEP速度における周波数特性を精査してきた．

本論文では，酵母を低温(37 – 47℃)処理した際の，被熱ストレス時間に依存するDEP速度の変化を詳細に計測した．また，核酸染色剤を用いた蛍光スペクトル

強度測定により，菌体の細胞膜状態を生化学的に評価し，膜生理状態とDEP速度の相関を検証した．さらに，コロニーカウント法を用いて，酵母における代謝活性の一つである生育活性とDEP速度の相関を調査した．そして，酵母の微細な誘電特性変化によるDEP変動を数値解析から考察した．

本実験装置はDEPデバイス，電気回路系，媒質送液系及び光学計測系で構成されている．DEPデバイスは，電極基板，マイクロ流路及びデバイスホルダからなる．電極には間隔20 μmのITO薄膜を用いた．実験手順としては，振幅20 $V_{p\text{-}p}$，周波数100 kHz - 1 MHzの正弦波電圧を印加後，菌体の挙動の軌跡を画像解析により計測し，DEP速度を導出した．対象菌種は，72 h培養した出芽酵母（Saccharomyces cerevisiae, JCM 7255）とし，媒質には0.15MのDマンニトール溶液を使用した．対象菌へのストレス負荷工程として，ウォーターバスによる厳密な温度管理下で加熱を行った．菌体における膜生理状態は，核酸染色（SYTO9及びPI）による蛍光スペクトル強度から評価した．

本研究では，加熱処理により膜生理状態を変化させた酵母の DEP 速度を計測し，低温 (37 - 47℃) 処理における被熱時間に対する DEP 速度の周波数特性を精査した．47℃において，加熱処理後の余熱ストレス時間 (放置時間) の増加に伴い DEP 速度は減少した．各処理を施した酵母に蛍光染色実験を行った結果，処理温度の上昇に伴い酵母の細胞膜損傷度は増加し，余熱ストレスの多寡が膜浸透機能に影響を与えることが分かった．また，37℃での長時間 (2 h) 処理では低周波数帯 (50 – 100 kHz) で特に高い DEP 速度を示し，膜浸透機能を活性化させた．以上から，亜致死性の低温ストレス及びその余熱により酵母の代謝機能が繊細に変化することが分かった．すなわち，47℃では余熱ストレスの抑制によって，37℃では長時間 (2 h) 加熱によって膜輸送が活性化されたと推察される．本結果は，DEP 速度と膜損傷度の相関を示すものである．また，DEP 速度が膜輸送及び細胞分裂に関連する代謝機能や酵母の生育活性を反映している可能性がある．

更に，DEP 速度と誘電特性の相関を定量化するため，細胞電気定数の数値解析を行った．その結果，本実験における周波数領域（50 kHz –10 MHz）において，細胞外壁，内壁及び細胞質の誘電率は DEP 速度に殆ど影響しなかった．一方，細胞膜誘電率は全周波数域の DEP 速度を変化させた．すなわち，処理温度変化による全周波数域での DEP 速度遷移が細胞膜誘電率に依存する可能性を示唆している．また，細胞膜及び細胞質の導電率が DEP 速度に強く影響することを確認した．特に，低周波域（50 – 100 kHz）における細胞膜の導電率は唯一菌体の DEP 速度上昇に寄与した．本結果は，37℃処理のような低周波域で顕著な DEP 速度変化が細胞膜導電率に起因するものであることを示唆する．

3－5　加熱処理酵母における誘電泳動速度と代謝状態の相関検証

石田 高広　　指導教員　内田 諭 教授

1. はじめに

醸造や燃料合成などのバイオ産業において，品質及び生産効率向上の観点から，菌代謝管理の最適化が切望されている。しかしながら，工程内における菌代謝状態を直接的かつ定量的に評価する手段は確立されていない。

誘電泳動(Dielectrophoresis;DEP)[1]を利用した電気的計測手法は，迅速かつ簡便な菌評価技術として，近年期待が高まっている[2]。そこで筆者らは，菌体の誘電特性を直接導出できるDEP速度計測法に着目した。本手法は，蛍光標識等の前処理が不要で連続的計測に適している。ゆえに，DEP速度計測技術が十分に整備されれば，迅速かつ簡便な菌代謝評価システムの構築も可能である。

本報では，当該システムにおける基本性能を検証するため，加熱処理温度及び処理時間に対する酵母群 DEP 速度の周波数依存性を精査した。また，核酸染色剤を用いた蛍光スペクトル強度測定により，菌体の細胞膜の状態を生化学的に評価し，膜生理状態と DEP 速度の相関を検証した。さらに，酵母の等価誘電体モデルによる数値解析から，DEP 速度と細胞電気定数の相関を考察した。

2. 実験及び解析手法

本研究で用いた実験装置の概略を図 1 に示す。電極には間隔 20 μm の ITO 薄膜を用いた。対象菌種は，出芽酵母(S. cerevisiae)とし，媒質には 0.15 M の D マンニトール溶液を使用した。菌体への熱ストレスとして，ウォーターバスによる加熱を施した。デバイス及び計測に関する詳細は文献(3)と同様である。

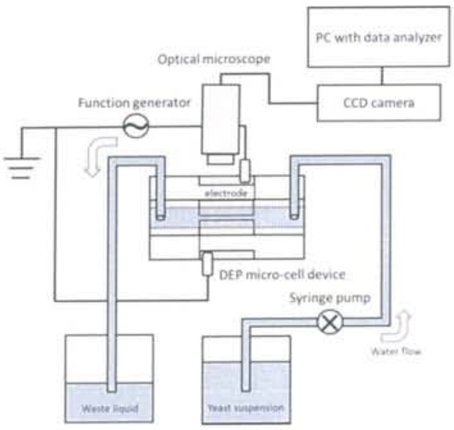


図 1 誘電泳動速度計測装置

また，本研究では酵母を細胞外壁，内壁，膜及び細胞質の四層からなる球体としてモデル化し，各層の電気特性に依存する Clausius-Mossotti（CM）関数実部 Re[$K(\omega)^*$]の変化率を求めた。各層の導電率及び誘電率については文献(4)の値を用いた。

3. 実験結果及び考察

＜3・1＞誘電泳動速度の処理温度特性　図 2 に，酵母を 28℃(control)，37℃，47℃，60℃及び 80℃で 5 min 加熱したときの DEP 速度から導出した Re[$K(\omega)^*$]の周波数特性を示す。処理温度の増加に伴い，Re[$K(\omega)^*$]は低下した。特に，1 MHz 以上の高周波数帯域で変化が大きくなった。

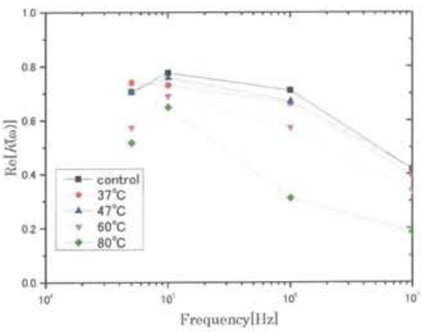


図 2 加熱処理酵母における Re[$K(\omega)^*$]の周波数特性

＜3・2＞誘電泳動速度の低温長時間処理特性　酵母を 37℃で 5 min，30 min，1 h 及び 2 h 加熱処理した時の DEP 速度を図 3 に示す。処理時間の増加に伴い，DEP 速度も増加した。特に，低周波数域(50 –100 kHz) で大きく変化した。低周波数域では 30 min –2 h 処理酵母の DEP 速度が未処理を上回り，1 MHz 帯では 2 h 処理酵母のみ未処理を上回った。

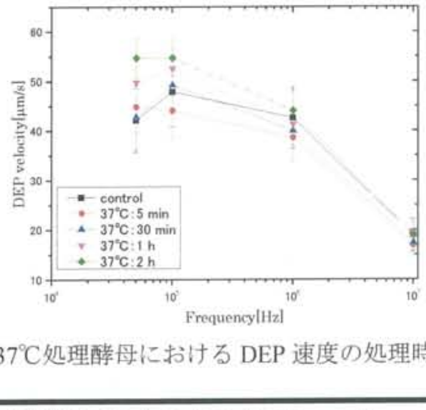


図 3 37℃処理酵母における DEP 速度の処理時間特性

首都大学東京主催　平成 27 年度電気電子工学専攻修士論文発表会 平成 28 年 2 月 5 日，6 日
首都大学東京 11 号館 204 室

＜3･3＞膜損傷度及び膜活性の生化学的検証　本節では、酵母を核酸染色剤 PI 及び Syto9 を用いて染色し、それぞれの蛍光強度（以下，PI 強度及び Syto9 強度と表記）を計測した。PI は膜透過性がないため，PI 強度は膜損傷の有無及び大小を示す。また，Syto9 強度は細胞内への染色剤浸透量と相関している。Syto9 浸透量の増減要因として，膜穿孔及び膜輸送量の大小が挙げられる。

図 4 に 37℃処理酵母の PI 強度及び Syto9 強度の処理時間特性を示す。なお，縦軸は未処理時の蛍光強度に対する変化率を表す。長時間処理により酵母の PI 強度は低下し，Syto9 強度は増加した。2 h 処理酵母の PI 強度は未処理とほぼ同値であった。本結果から，37℃での長時間処理により酵母の膜損傷が徐々に修復し，2 h で未処理と同程度にまで膜状態が回復したことが分かる。また，時間経過とともに膜損傷が修復するにも関わらずSyto9強度は上昇していることから，長時間処理に伴い酵母の膜機能が活性化することが言える。

37℃での長時間処理は酵母の寿命を延長するという報告[5]がある。故に，本結果は，熱による酵母寿命変化に関連した膜機能と DEP 速度の相関を示している。酵母の寿命は，細胞分裂の回数に依存するものである。すなわち，DEP 速度と寿命もしくはそれに伴う細胞機構は相関を示し，酵母における同化代謝（細胞分裂）評価への適用可能性も示す。また，1 MHz 帯での DEP 速度が PI 強度（膜損傷度）との相関をより正確に反映していることから，速度計測における周波数帯域を調整することで，DEP 速度計測による膜損傷及び菌代謝等の診断精度の向上が期待できる。

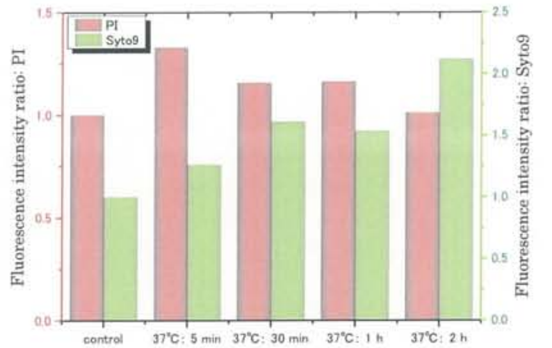
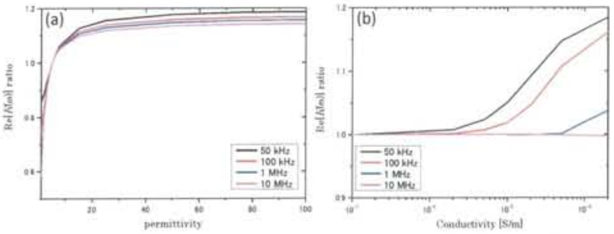


図 4 PI 及び Syto9 強度の処理時間特性

＜3･3＞球状四層モデルによる $\mathrm{Re}[K(\omega)^*]$ の数値解析　本節では，前述した四層の中で，特に酵母の細胞膜における電気特性に注目し，$\mathrm{Re}[K(\omega)^*]$ の数値解析を行った。細胞膜の比誘電率を 1 –100 の範囲で変化させた時の $\mathrm{Re}[K(\omega)^*]$ の変動を図 5 に示す。なお，縦軸は文献(4)の基準値から算出した $\mathrm{Re}[K(\omega)]$ に対する変化率を表す。細胞膜の誘電率に対して，全周波数域で $\mathrm{Re}[K(\omega)]$ が顕著に変化した。なお，比誘電率が 30 で飽和した。本結果は，図 2 で示した加熱処理温度による全周波数域での DEP 速度変化は細胞膜の誘電率に強く依存することを示している。

細胞膜の導電率を 2.0×10^{-7}S/m -2.0×10^{-4}S/m (細胞膜の基準導電率)の範囲で変化させたときの $\mathrm{Re}[K(\omega)^*]$ の変動を図 6 に示す。導電率が媒質の値に近づくに伴い変化が大きくなり，各四層の中で唯一，$\mathrm{Re}[K(\omega)^*]$ の上昇を示した。本結果は，37℃処理で生じる低周波数域での顕著な DEP 速度変移が細胞膜の導電率変化に起因することを示唆する。



(a) 誘電率依存性　　　(b) 導電率依存性

図 5 細胞膜の電気定数に対する $\mathrm{Re}[K(\omega)^*]$ の依存性

4. まとめ

本報では，加熱処理条件により DEP 速度及び $\mathrm{Re}[K(\omega)^*]$ が変化することを示した。処理温度の上昇に伴い，$\mathrm{Re}[K(\omega)^*]$ は全周波数域で低下した。また，37℃処理において，処理時間が増加すると，$\mathrm{Re}[K(\omega)^*]$ は低周波数域で顕著に上昇した。

さらに，生化学的な検証として，加熱処理酵母に対して蛍光染色を行った。低温長時間(2 h)処理により，膜損傷が修復し，膜浸透機能を活性化させた。本結果は，DEP 速度と膜損傷度の相関を示すものである。また，DEP 速度が膜輸送及び細胞分裂に関連する代謝機能や酵母の生育活性を反映している可能性がある。

また，数値解析により酵母の細胞膜の電気特性変化による $\mathrm{Re}[K(\omega)^*]$ の周波数特性を求めた。細胞膜の誘電率変化により，全周波数域での $\mathrm{Re}[K(\omega)]$ が変動した。また，細胞膜の導電率変化が低周波数域での $\mathrm{Re}[K(\omega)]$ 変動に大きく影響した。本結果は，細胞膜の誘電率変化が DEP 速度の処理温度特性の要因となること及び細胞膜の導電率変化が DEP 速度の処理時間特性に寄与する可能性を示している。

参考文献

(1) H.A.Pohl: “Dielectrophoresis”, *Cambridge University Press*. (1978)
(2) 圓城寺隆治，内田諭，杤久保文嘉：「誘電泳動インピーダンス計測法による細菌誘電特性と細胞膜活性状態及び流量依存性の相関検証」，静電気学会誌，35 巻，3 号，pp. 139-144 (2011)
(3) 高澤晋，白井直機，内田諭，杤久保文嘉：「誘電泳動速度計測による加熱処理酵母の膜変性評価」，静電気学会誌，38 巻，1 号，pp. 2-8 (2014)
(4) J. L. Sebastian et al: "Electromechanical effects on multilayered cells in nonuniform rotating fields ", *Phys. Rev. E*, Vol. 84, No.011926 (2011)
(5) S. Shama, C. Y. Lai, J. C. Jiang, and S. M. Jazwinski: “Heat Stress-Induced Life Span Extension in Yeast”, *Exp. Cell. Res*, Vol. 245, No. 2, pp. 379-388 (1998)

目次

第1章　序論

1.1　研究背景

食料品や医薬品，家庭用品，自動車燃料などの多くのバイオ製品は発酵現象を利用して製造されている．特に，ビールやワイン等の酒類，バターやヨーグルト等の乳製品，醤油や味噌等の調味料を生産する際に古来から用いられてきた．発酵とは，広義で「微生物(細菌や菌類など)の働きによる有機物質の変換」を意味する [1]．例えば微生物は，食品中において酵素を用いてデンプンなどの多糖類やタンパク質を分解し，ブドウ糖，アルコールまたはアミノ酸などの有機物を生産する．この活動の中で，人畜にとって有益なものは発酵，そうでないものは腐敗と呼ばれる [2]．これらは微生物の生活に必要なエネルギーを獲得するための生理過程であり [3]，代謝活動という観点で考えた場合，発酵と腐敗または呼吸作用は大別されるものではない．そのため，発酵食品製造において，菌体の「代謝」状態に関する精密な測定及び制御が必要不可欠である．

酒造業においては，伝統的に酒蔵の杜氏によって，定時発酵管理による製造を行ってきた [4]．しかし，本管理方式は職人の経験や先代からの伝承に大きく依存するものであり，定量性に欠ける．また，異常発生時の瞬時対応が困難である．さらに，全国の杜氏の数は年々減少しており，知見継承が危惧されている（図 1.1 参照）．本現状を踏まえ，近年では，品質及び生産性向上の観点から，発酵管理の最適化が進められている．酒造業や乳加工業における発酵管理において，発酵関与酵母や乳酸菌の代謝状態の即時把握は非常に重要な項目である．そのため，菌体の代謝状態を迅速に常時モニタリングし，フィードバック制御する新たな計測システムの開発が望まれている．

現在，微生物検査及び分析の公定法は，培養法 [6] が基本となっている．培養法とは，生育に必要な栄養素を含む培地上において，人工的に微生物を増殖させ，肉眼による微生物検出を行う手法である．また，培地の種類や成分含有量を調整することで，検体中における特定の細菌のみを選択的に増殖させることが可能である．しかしながら，本法は増菌工程を伴うため，培地調整や滅菌処理等の操作が煩雑である．また，菌種に依存するが，結果が得られるまで 2 日から 10 日程度を必要とする．さらに，増殖活性の評価は可能であるが，代謝活性の評価に対しては限定的である．

他に，菌体の代謝状態を評価可能な手法として，細胞の生化学的状態を考慮した評価法や，物理状態からの間接的な評価法が存在する．例えば，細胞の生化学的状態を測定する方法として，ポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction: PCR）法による遺伝子発現の評価や，アデノシン三リン酸（Adenosine Triphosphate: ATP）法によるエネルギー放出・貯蔵量の定性的評価，及び発光分光法であるフローサイトメトリー法を用いた核酸の定量や細胞内の抗体検出などが挙げられる．これらの手法は高精度・高感度分析に用いられる有力な分析手法であるが，DNA 増幅や蛍光標識といった菌体の前処理が前提

となる．また，使用する試薬や機材が高価であり，操作に専門知識を必要とする．

一方，細胞の物理状態から代謝状態を間接的に計測する手法としては，アリシアンブルー染色法 [7] がある．この手法は，細胞表面電荷の多寡に依存する細胞の凝集能力及びそれに伴う発酵効率変化を測定する方法である．本手法は，操作が簡便であるが，前述した手法と同様に染色工程を伴う．現状において，これらの評価法は菌代謝の常時モニタリングに適さない．また，実際の産業現場では，分析に掛かる初期費用及び運営管理費が重要視される．以上のことを踏まえ，バイオ産業における微生物の代謝評価法として，迅速，簡便かつ安価な新手法の開発が必須となる．

微生物や細胞の持つ電気的特性を利用した計測手法は，迅速性及び簡便性の観点から有力な生体粒子評価技術として近年期待が高まっている．特に，誘電泳動（dielectrophoresis: DEP）を利用した電気的計測手法は，溶液中における粒子挙動の精密制御が可能であることから，幅広い応用が見込まれている．誘電泳動とは，不均一電界中で分極した微粒子が電界勾配に沿って泳動する現象である．誘電泳動力の向きや大きさは，粒子及び媒質の誘電率や導電率などの誘電特性及び粒子径に依存する．本特徴を活かし，誘電泳動を利用した生体細胞の分離・捕集，生死菌判定，及び溶液中菌の濃度測定などの応用が考案されてきた [8][9]．また，代謝状態については，微生物懸濁液の誘電率変化 [10][11] や微生物の成長過程における誘電特性の変動 [12] から間接的に評価可能であるという報告がなされている．以上より，菌体及び菌懸濁液の誘電特性を厳密かつ定量的に計測することで，対象粒子の代謝状態を評価できると推察される．

誘電泳動を用いた従来の菌代謝評価法として，誘電泳動インピーダンス計測（Dielectrophoretic Impedace Measurement: DEPIM）法 [13] - [15] や，誘電回転法 [16][17] などがある．これらの手法は発酵菌の誘電特性を迅速に測定できる．実際に，当研究室でも，誘電泳動インピーダンス計測法を用いて酵母や大腸菌の誘電特性から代謝状態を間接的に評価している [18] - [21]．しかしながら，本手法は，測定に一定量以上の菌捕集数を必要とし，高導電媒質への適用も難しい．また，菌濃度や流量などの誘電泳動力以外の影響を含むため，計測値から誘電特性を直接導出することができない．

誘電回転法は，誘電泳動力による生体細胞の回転速度から代謝状態を測定できる．しかしながら，本手法は対象粒子の回転状態を精密に計測する必要があるため，数 μm オーダー以下の生体粒子（細菌や真菌など）への適用は困難である．さらに，測定には，四重極電極のような複雑な電極構造を必要とする．他には，対象粒子に掛かる誘電泳動力と正味の重力を釣り合わせ，その時の印加電圧値から誘電泳動力を直接計測する誘電泳動浮揚法 [22] - [25] がある．本手法では，対象粒子に働く誘電泳動力の大きさから代謝状態を測定できる [26]。ただし，本手法は対象粒子の精密な配置を必要とすることから，流体場への適用は困難である．また，測定には一定の時間を要する．

上記の計測手法に対して，著者らは，細胞の誘電特性と代謝状態の直接的な相関を検証するために，画像解析による誘電泳動速度計測に着目した．本手法は，粒子の泳動速度から細胞の誘電特性を直接導出可能な手法である．また，原理的に単一粒子での測定が可能なため，極微量検体に対して有効であり，高導電媒質への応用が見込まれる．さらに，周辺媒質（溶液）の速度が求められる場合，流体場に対しても適用できると考えられる．

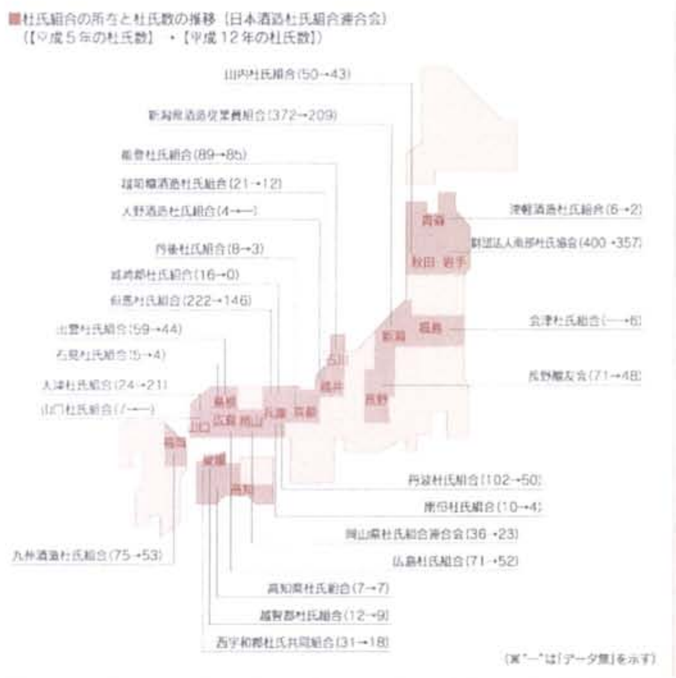


図 1.1: 全国の杜氏数の推移 [5]

1.2　関連研究

微生物や細胞に対する主要な検査・分析法として，遺伝子解析法や生化学的検査法及び発光分光法などが存在する．これらの手法に対して，微生物や細胞の持つ電気的な特性に着目した計測手法は，迅速性及び簡便性の観点から，近年期待されている．従来の電気的計測手法として，キャピラリー電気泳動法，インピーダンス法及び誘電計測プローブ法などがある．

キャピラリー電気泳動法は，毛細管（キャピラリー）内で電気泳動を行う手法である．具体的には，緩衝液で満たしたキャピラリー（内径 100 μm 以下，長さ 80 cm）の片端に試料を導入した後，両端に電圧を印加し，電気泳動を生じさせる．試料中の異種分子間における移動速度の違いから，試料を成分分離することができる [27]．本手法では，極微量試料による分析が可能であり，高性能かつ迅速な検出を行うことができる [28]．しかしながら，電気的に中性な成分が複数存在する試料に対しては適用が困難である．

インピーダンス法は培地中に直接挿入した一対の電極間に微弱な交流電流を流すことにより，細胞増殖及びそれに伴う代謝作用をインピーダンス変化として計測する手法である [29]．電気的変化の検出に掛かる時間は，検体中の初期菌体濃度及びその増殖活性に依存する．実際に，L. Yang らはインピーダンス計測法を用いて，ネズミチフス *S. Typhimurium* の代謝活性を計測している [30]．ただし，本手法は流体場における即時計測が困難である．また，マクロスケールでの計測となるため，一定量以上の試料を必要とする．

誘電計測プローブ法は，酵母をはじめとする各種微生物が，絶縁体である細胞膜の中に導電性の細胞質を含む誘電体構造を持つことに着目した手法である [31]．本手法は，酵母懸濁液における発酵過程の常時モニタリングを可能とする．コイルを巻いたトロイダルコアの表面を樹脂コーティングしたものをプローブとして懸濁液中に配置し，酵母の誘電率を測定した（図 1.2 参照）．計測原理としては，1 次コイルにより液中に生じたループ電流を 2 次コイルで検出し，1 次側の電圧と 2 次側の電流の関係から懸濁液の誘電特性を導出するものである．本装置により測定されたビール酵母の誘電率は，出芽・成長・分離という酵母の増殖サイクルとの密接な相関を示している（図 1.3 参照）．故に，本手法は，酵母の増殖速度，体積変化及び発酵過程をリアルタイムに評価することができる．しかしながら，計測には大量の検体（数十リットルオーダー）を必要とするため，低濃度検体への適用が困難である．また，本手法は，菌体を含んだ懸濁液自体の誘電率を総合的に評価する手法であり，分析結果が媒質成分の変動に大きく影響される可能性がある．

上記計測手法に対して，近年では，新たな電気的計測手法として，誘電泳動を用いた手法が注目されている．誘電泳動法は，微粒子及び周辺媒質（溶液）が持つ誘電特性を利用することで，懸濁液内に存在する微粒子の挙動を制御できるという特徴を持つ．本法は電気的に中性な物質に対して適用可能であり，極微量検体への応用も期待できる．Pohl らによって誘電泳動が発見されてから現在に至るまで，生物細胞の分離・捕集や活性状態の評価に関する様々な研究報告がなされてきた．本節では，誘電泳動原理に基づく，微生物分離及び代謝評価に関する研究例を示す．なお，誘電泳動を含む原理の詳細については次章に記述する．

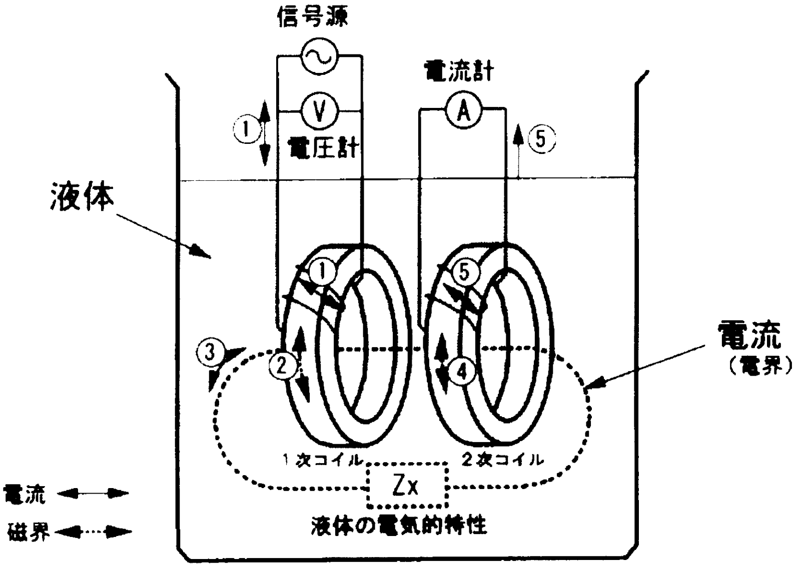


図 1.2: 誘電計測プローブ法実験装置 [31]

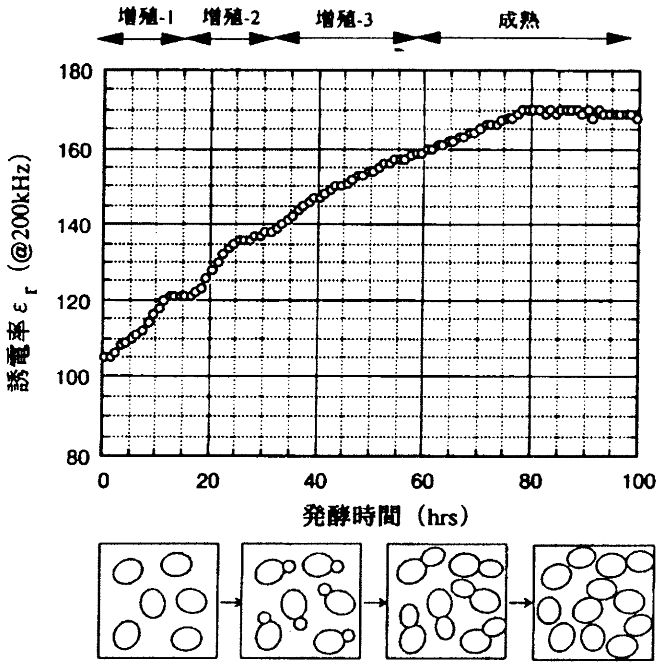
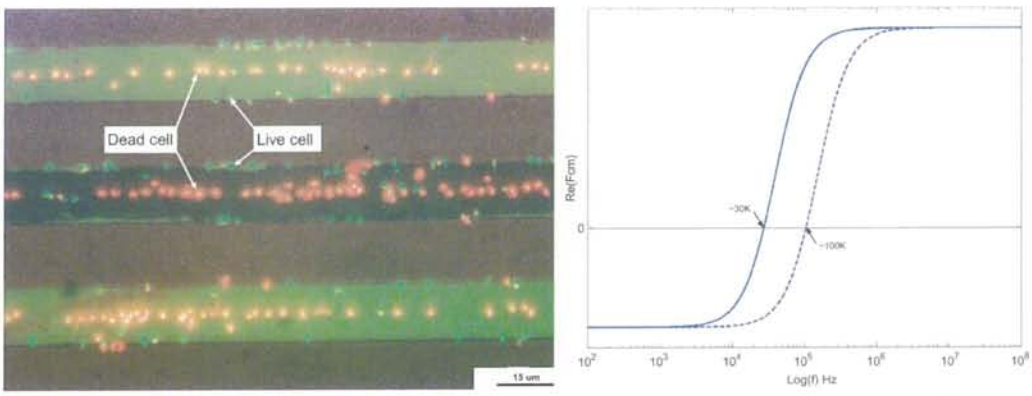


図 1.3: ビール酵母の誘電率測定結果 [31]

1.2.1 誘電泳動を用いた微生物分離

誘電泳動法による生死細胞及び微生物の分離技術は，多くの研究者によって研究されている．

誘電泳動現象の発見者であり，命名者でもある Pohl は，誘電泳動法における基礎検証として，細胞周期の異なる酵母（*S. cerevisiae*）の周波数特性等を調査している [1]．Li らは，ノンフロータイプのマイクロフィルタ電極を用いて，加熱処理したリステリア菌の生死細胞の分離研究を行っている [33]．図 1.4(a) は蛍光染色により，生死菌に対する泳動挙動の違いを観察したものである．周波数が 30 kHz - 1 MHz の時，生菌と死菌が異なる誘電特性を有することを立証した（図 1.4(b)）．Jen らも，誘電泳動力の違いを利用した Hela 細胞の生死菌分離を行っている [34]．箱田らは，ワイヤ型誘電泳動フィルタを用いて，細胞系の異なる MDCK 細胞と馬赤血球の異種細胞分離における誘電泳動法の有用性を検討している [35]．Terpitz らは，*P. pastoris* の巨大プロトプラスト（植物細胞などの細胞壁を有する細胞から，細胞壁溶解酵素（セルラーゼ）などにより細胞壁を取り除いたもの）を生成する効率的な電気融合条件を精査するため，誘電泳動法を用いてプロトプラストの誘電特性を分析している [36]．



(a) 加温処理リステリア菌の生死細胞分離　　(b) 生菌と死菌の誘電特性の違い

図 1.4: H. Li and R. Bashir らのリステリア菌の生死細胞分離 [33]

1.2.2 誘電泳動を用いた微生物の代謝評価

誘電泳動法による免疫測定

細胞や微生物の代謝活性の計測技術として，Lee らは，誘電泳動を用いた微粒子の迅速（数秒レベル）な配列化技術を利用し，数分レベルで免疫測定が可能なシステムを開発した [37]．安川はこのシステムを応用し，図 1.5 に示すようなデバイスを用いて，2 種類の腫瘍マーカーである alpha-fetoprotein(AFP) と carcinoembryonic antigen(CEA) の同時検出を行った [38]．デバイスに交流電圧を印加すると，抗体を修飾した分散状態の蛍光微粒子は，抗体が固定されている流路（チャネル 1 及び 2）の上面にライン状に配列される．その後，電圧印加を停止すると，抗体修飾微粒子は，免疫反応によってそれぞれに対応した流路に捕捉され，非対応の粒子は再分散される．溶液中に再分配された微粒子は流路上方の PDMS 表面から散逸し，蛍光シグナルとしては検出されない．従って，それぞれの流路で補足された微粒子の蛍光強度を計測することにより，溶液中の AFP 及び CEA を同時に検出することが可能となる．図 1.6（A）及び（B）は，電圧印加停止直前及び停止 5 分後における配列化微粒子の蛍光顕微鏡画像を示す．PDMS 表面の固定化された抗体に AFP 及び CEA が認識捕捉されている．

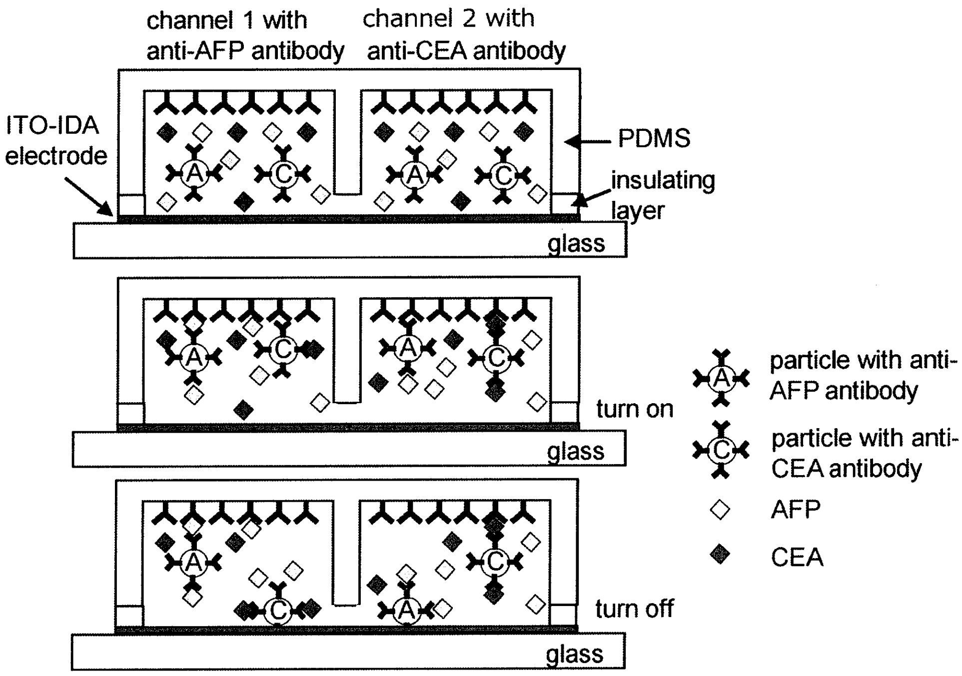


図 1.5: 誘電泳動による粒子操作を用いた免疫センサ装置の概略図 [38]

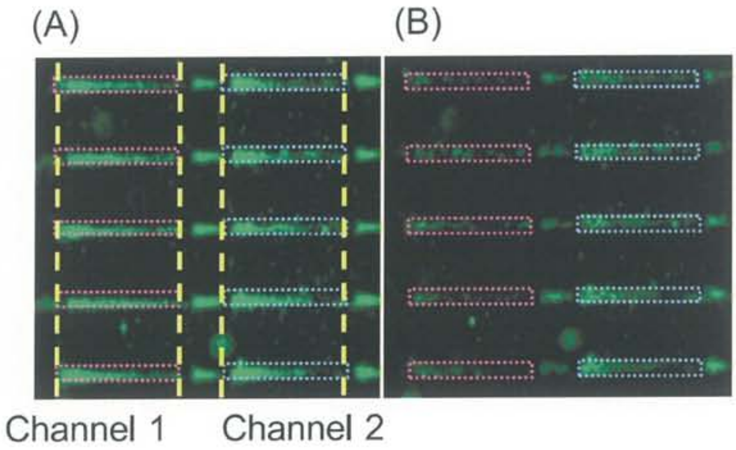


図 1.6: 免疫センサによる AFP 分析結果 [38]

誘電泳動インピーダンス計測法

誘電泳動インピーダンス計測（dielectrophoretic impedance measurement: DEPIM）法は，溶液中の微生物を誘電泳動により電極間に捕集し，インピーダンス（またはコンダクタンス）を計測することで，溶液中菌における初期濃度及び代謝状態を計測する手法である．計測の際には，誘電泳動力を効果的に生じさせるために，微小電極を用いる．誘電泳動による粒子捕集が進むとパールチェーンと呼ばれる粒子鎖が形成され，図 1.7 に示すように電極間を架橋する．電極間に捕集された粒子群は RC 直並列回路と等価の電気的特性を持つ．粒子群の電気パラメータは粒子濃度や粒子状態に依存する．そのため，電極間インピーダンスを計測する事により電極間に捕集された粒子数及び粒子状態の推定が可能となる．末廣らは，本手法を用いて，迅速かつ高感度な微生物の濃度測定に関する諸検証を行っている [13] - [15]．本手法は，一定濃度の微生物懸濁液を微小電極へ連続供給することによって電極間に微生物を集積させる．故に，電極近傍における微生物の捕集状況は流れ場の影響を大きく受けるため，菌個体に対する誘電特性の計測という点において精度は低下する．

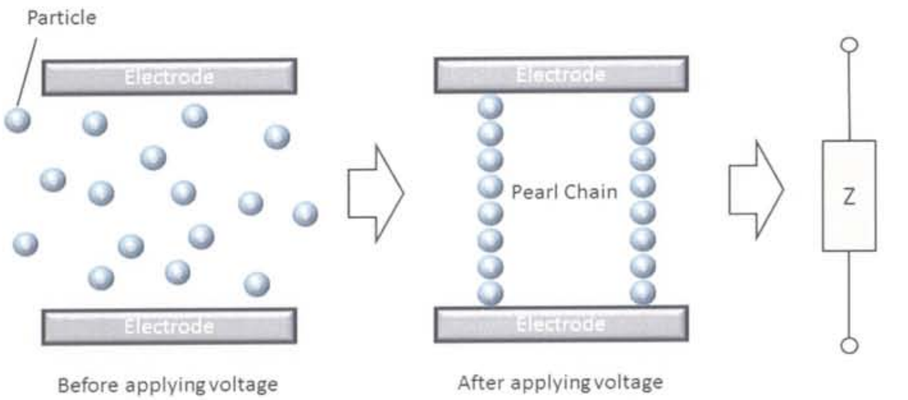


図 1.7: 電極における架橋と等価回路

本研究室では，DEPIM 法を応用し，大腸菌や酵母の代謝状態を評価してきた [18] - [21]．図 1.8 及び図 1.9 に大腸菌及び酵母における加熱処理温度と電極間コンダクタンスの変動値（ΔG）の関係を示す．大腸菌については，計測時間の長短に依らず，加熱処理温度の上昇に伴って ΔG は減少した．ただし，全ての処理時間において，320 K で一度 ΔG が特異的に低下し，その後上昇するような振る舞いを示した．酵母については，低温処理（278 - 320 K）時は，全ての計測時間において ΔG の大幅な変動は見られなかった．中温処理（320 - 353 K）時においては，短時間計測（30 - 100 sec）の場合は ΔG がほとんど変化しなかったのに対し，長時間計測（300 - 900 sec）の場合では，ΔG が一端低下してから上昇するような挙動を示した．353 K 以上の高温処理時は，短時間計測の場合，処理温度

の上昇に伴って ΔG は僅かに上昇した．一方，長時間計測の場合では，処理温度の上昇に伴い ΔG は減少した．コロニーカウント法や蛍光染色実験を用いた実験結果との比較により，菌の状態に依存して ΔG が変化する事が確認されている．また諸条件における ΔG の挙動は，菌体内の導電率と高い相関があることも示している．

以上の結果から，DEPIM 法により，溶液の初期菌濃度推定やサンプル全体の代謝平均値の評価が可能であると考えられる．また，電極間における微生物の捕捉量によって瞬時的に変動するコンダクタンス変化量（ΔG）は， LCR メーターなどの電気装置を用いることによって，リアルタイムに計測することが可能である．DEPIM はフロータイプの実験系であり，捕捉した粒子を実験後に回収することも可能である．従って，従来の定性分析法を併用することにより，菌種の特定が可能となる．当該手法は，食品製造ラインなどにおける検査手法として考えた場合，極めて有効な迅速スクリーニング検査法として期待できる．しかしながら，対象粒子を捕捉する際に正の誘電泳動を生じさせる必要があるため，高導電媒質中への適用は困難である．また，十分な検出感度を得るために，対象粒子を一定量以上捕集する必要がある．

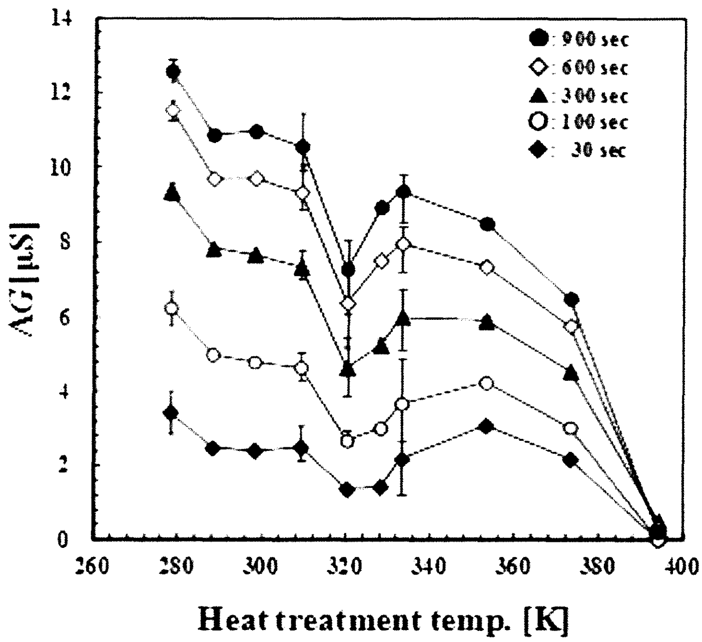


図 1.8: 大腸菌における加熱処理温度とΔ G の関係 [20]

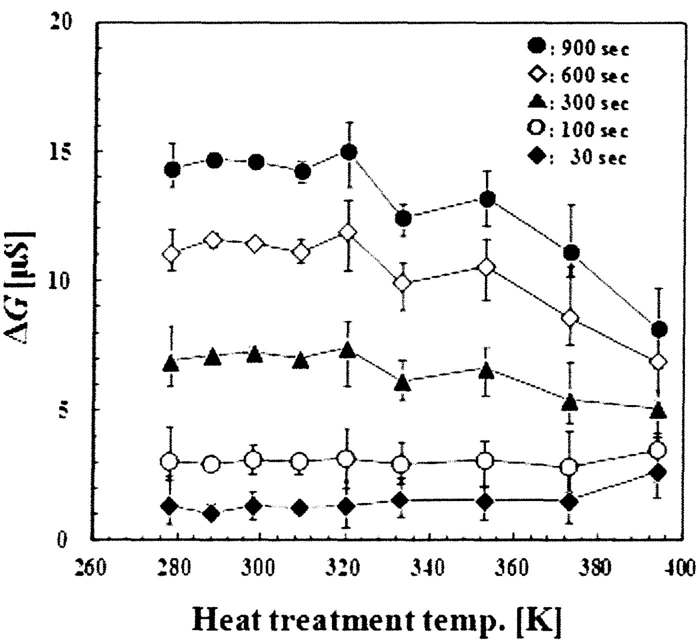


図 1.9: 酵母における加熱処理温度と ΔG の関係 [21]

誘電回転法

誘電回転法とは，多重電極に位相の異なる交流電界を印加することにより，細胞を回転させ，その回転方向と回転速度により，細胞の代謝状態を導出する手法である [16]．図 1.10 に，誘電回転の模式図を示す．分極電荷が瞬間的に変化できる場合には，外部から印加した電界の向きに双極子が誘導されるため，粒子にトルクは働かない．一方，例えば媒質に導電性があり粒子表面に真電荷が現れる場合，細胞の静電容量を溶液の抵抗により充電することになるため，粒子表面の分極電荷は外部電界に対して位相が遅れる．従って，誘導された双極子と外部電界が平行にならないため，粒子に回転トルクが働く．実際に，安川らは，クシ型電極を組み込んだチップデバイス（図 1.11 参照）を作成し，大量の細胞を一括に制御・回転させることで，細胞膜表面の受容体の発現量と表現型（フェノタイプ）を解析している [39][40]．伊野らは，マイクロガラスロッドの回転速度からタンパク質修飾の有無を測定するデバイスを作成している [41]．また，誘電回転法と免疫測定法である ELIZA 法を組み合わせることで，腫瘍マーカーである前立腺特異抗原（prostate specific antigen: PSA）の迅速検出を行った（図 1.12 参照）．

本手法によって，生体細胞の代謝状態を迅速に評価することが可能である．しかしながら，本手法は対象粒子の回転状態を精密に計測する必要があるため，数 μm オーダー以下の生体粒子（細菌や真菌など）への適用は困難である．さらに，測定には，上記のような複雑な電極構造を必要とする．

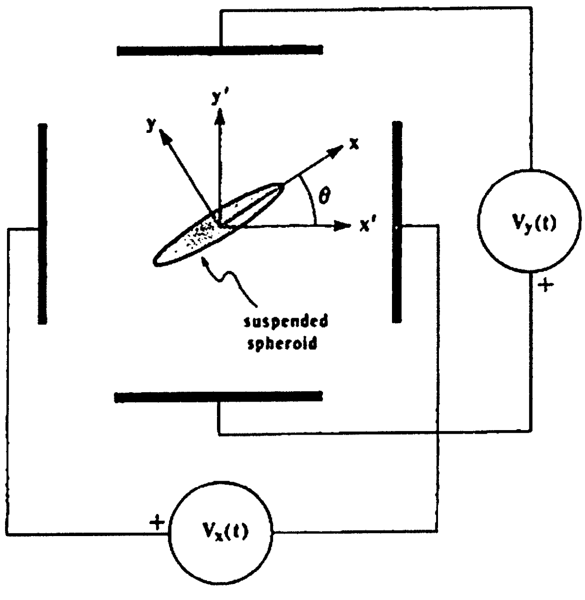


図 1.10: 誘電回転の模式図 [16]

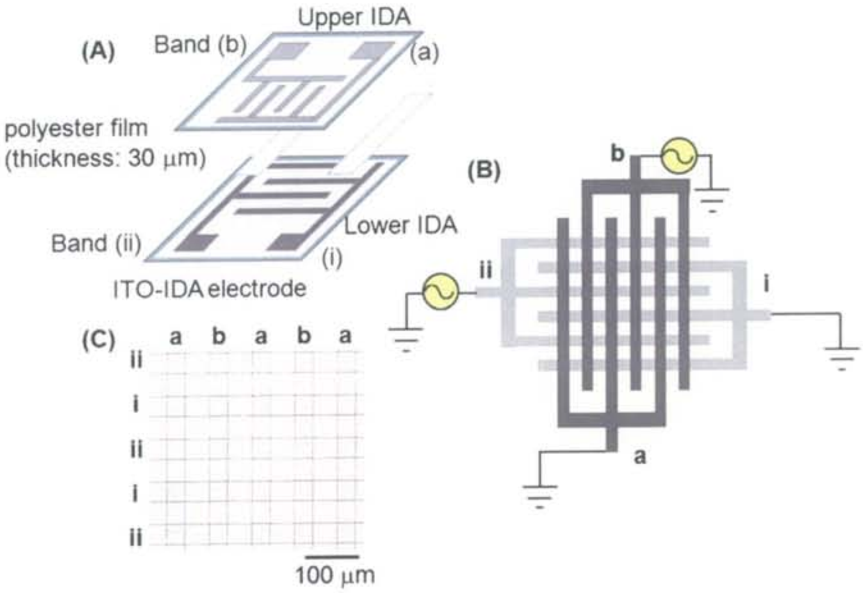


図 1.11: クシ型電極を組み込んだチップデバイス [39]

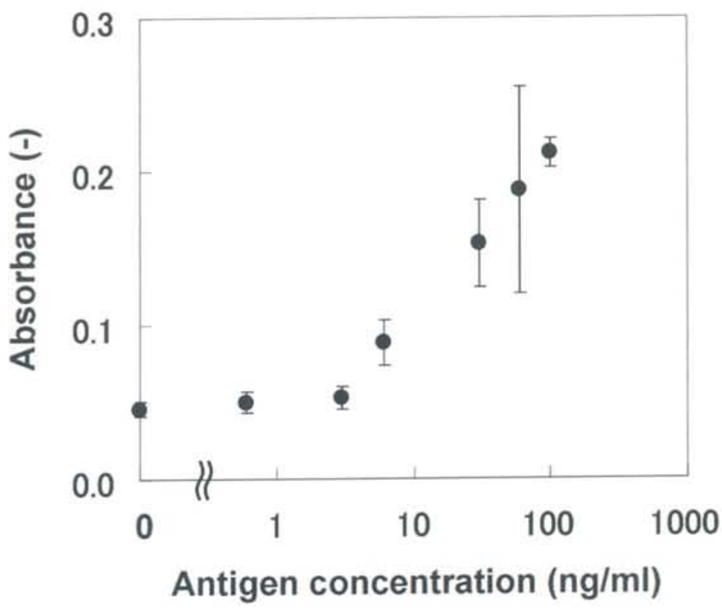


図 1.12: マイクロガラスロッドを用いた ELIZA 法による PSA 検出 [41]

誘電泳動浮揚法

誘電泳動浮揚法とは，溶液中の粒子に掛かる誘電泳動力と正味の重力を均衡させて空間に静止し，その時の印加電圧値や静止位置から誘電泳動力を導出する手法である [22]．本手法では，力のつり合いから得られる誘電泳動力から，対象微粒子の誘電特性を直接的に評価できる．実際に，Kaler らは，図 1.13 に示すような，円錐状電極及び平板電極構造を用いた誘電泳動浮揚法による計測を行った．植物プロトプラスト細胞において，周囲媒質の導電率や pH などを変えることにより誘電特性が変化することを確認した [23]（図 1.14 参照）．箱田らは，浮遊性のマウスハイブリドーマ 3-2H3 細胞や，付着性の Hela 細胞及び MDCK 細胞における増殖速度と誘電特性の相関を検証した [24]．各種細胞の比増殖速度と細胞の誘電特性に依存するクラウジウス・モソッティ関数実部 Re $[K(\omega)^*]$ の関係を図 1.15 に示す．癌細胞である HeLa 細胞を除き，Re $[K(\omega)^*]$ と比増殖速度の相関が認められた．また，誘電特性と増殖活性の関係が，細胞種により異なることを明示した．今里らは，本浮揚法を更に発展させ，可変式傾斜台を用いて斜面重力（基準量）を調節することにより，誘電泳動力をより詳細に計測する手法を考案している（図 1.16 参照）[25]．

本手法によって，微生物や細胞の代謝状態を計測することが可能である．しかしながら，計測に一定の時間を要するため，リアルタイムな計測には適さない．また，対象粒子の精密な配置操作を必要とすることから，流体場への適用は困難である．

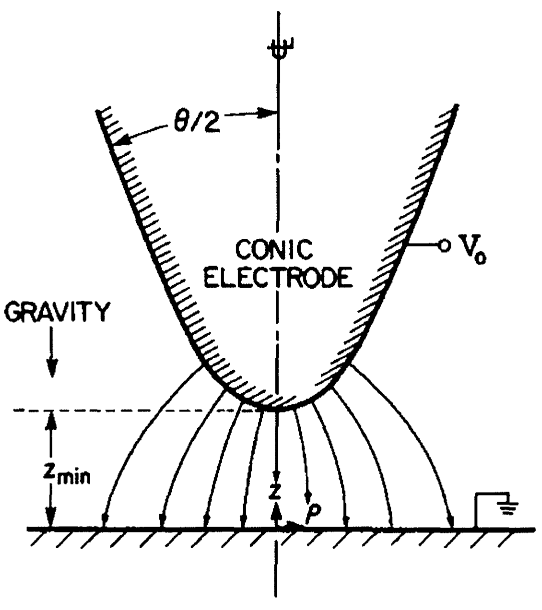


図 1.13: 誘電泳動浮遊法における円錐状電極及び平板電極構造 [22]

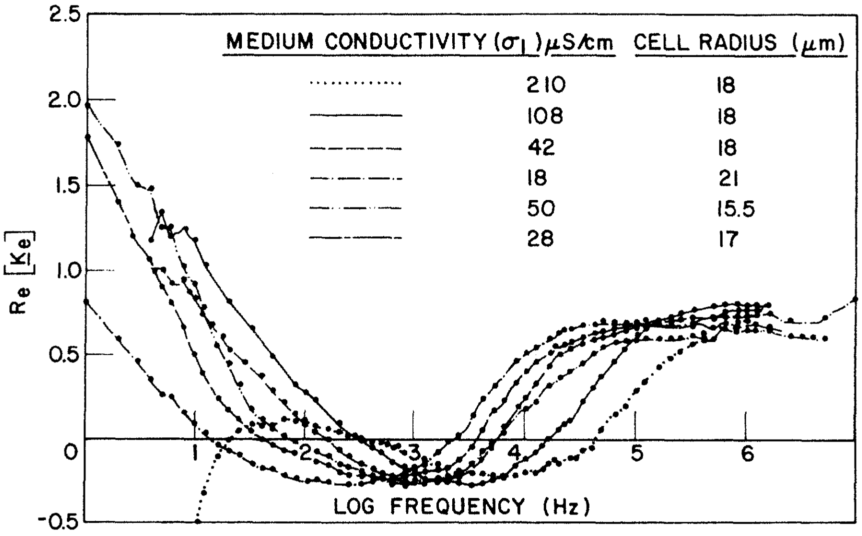


図 1.14: 媒質導電率変化による植物プロトプラスト細胞の誘電特性変化 [23]

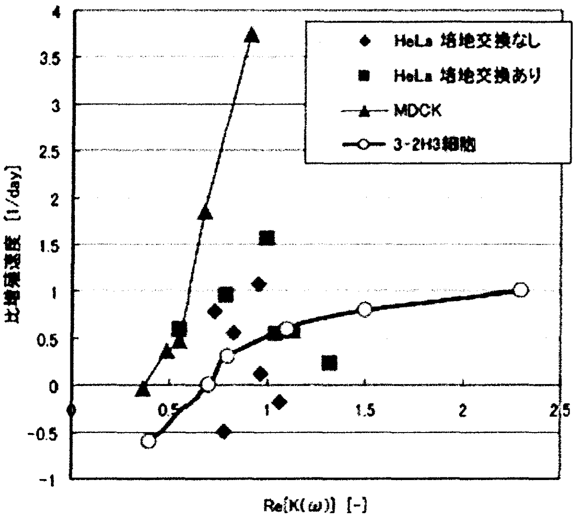


図 1.15: 各種細胞の比増殖速度と Re $[K(\omega)^{*}]$ の関係 [24]

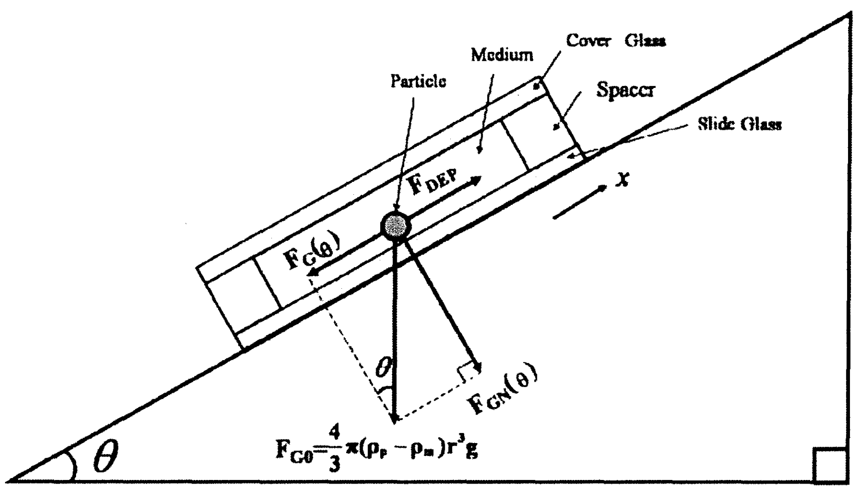


図 1.16: 可変式傾斜台を用いた誘電泳動浮揚法の模式図 [25]

誘電泳動速度計測法

誘電泳動速度計測法は，媒質中の粒子（細胞や微生物を含む）に対する運動方程式に基づき，対象粒子の泳動速度から誘電特性を直接的に導出する手法である．誘電泳動速度は，粒子及び媒質の複素誘電率，粒子半径，印加電圧及び周波数に依存する．従って，異なる誘電特性や粒径を持つ異種細胞群を，誘電泳動速度の差異から分離することが可能である．また，同一種の細胞を対象とした場合，細胞の代謝変動に伴う誘電特性の変化を誘電泳動速度として評価できると考えられる．

脇坂らは，図 1.17 に示すようなピン・ワイヤー型の電極装置を用いて，浮遊性動物細胞であるマウス・ハイブリドーマ 3-2H3 細胞，付着性動物細胞であるヒト子宮頚部腫瘍由来の HeLa 細胞，犬腎 (コッカスパニエル) 由来の MDCK 細胞及び酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）の生死状態と誘電泳動速度の相関を検証した [42]．各種細胞の誘電泳動速度の周波数特性を図 1.18 に示す．各周波数における誘電泳動速度は，細胞種により異なった．また，死細胞では泳動がほぼ見られず，生細胞と比較して，細胞に働く誘電泳動力が弱くなった．

さらに，脇坂らは，電極形状に依存する二乗電界勾配 ∇E^2 の評価法として誘電泳動速度計測を行った [43]．誘電泳動フィルタとしての電極形状を最適化できれば，誘電泳動法による生体粒子の選択操作及び分離・精製における作業効率の向上が見込める．理論的に，誘電泳動速度は ∇E^2 の増加に伴って線形的に増加する．従って，誘電泳動速度計測により ∇E^2 を一意に評価することが可能であると考えられる．脇坂らは，二つの形状の異なる電極モデルを用いて ∇E^2 分布のシミュレーションを行っている．脇坂らが用いた pin-plate 電極モデル及び wire-wire 電極モデルを図 1.19 に示す．各モデルにおける電極間隔及び wire 直径を変化させ，∇E^2 分布を導出した（図 1.20 及び図 1.21 参照）．また，それぞれのモデル電極でポリスチレン粒子を用いて実際に誘電泳動速度を計測し，誘電泳動速度の ∇E^2 特性を求めた（図 1.22 参照）．これらの結果より，理論的及び実験的に，誘電泳動速度と ∇E^2 は線形的に比例することを立証した．また，この線形関係が流体場でも適用可能であることを示した（詳細は図 1.23 及び文献 [43] 参照）．

本研究室においても誘電泳動速度計測の基礎特性の確認として，誘電泳動速度と ∇E^2 の相関について精査した [44][45]．詳細については，次章で記述する．

上記より，本手法は，誘電泳動力によって生じる微生物及び細胞の泳動速度を計測することによって，対象の誘電特性を直接的に評価できる．すなわち，誘電泳動速度計測により，微生物や細胞の代謝状態の評価が可能である．本手法は単一粒子での測定が可能なため，極微量検体に対して有効であり，高導電媒質への応用が見込める．さらに，流体場が粒子速度に与える影響を考慮することにより，流体場における連続的計測も可能であると考えられる．

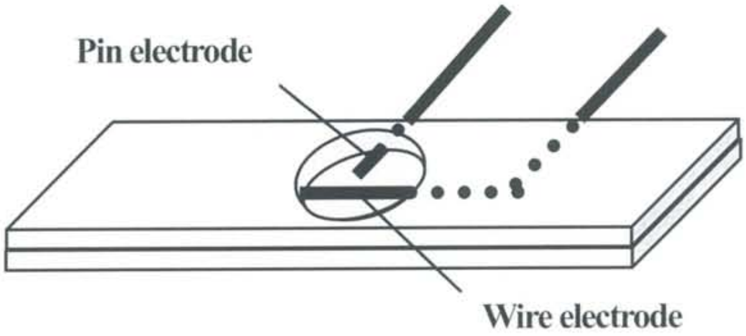


図 1.17: ピン・ワイヤー型電極装置の概略図 [42]

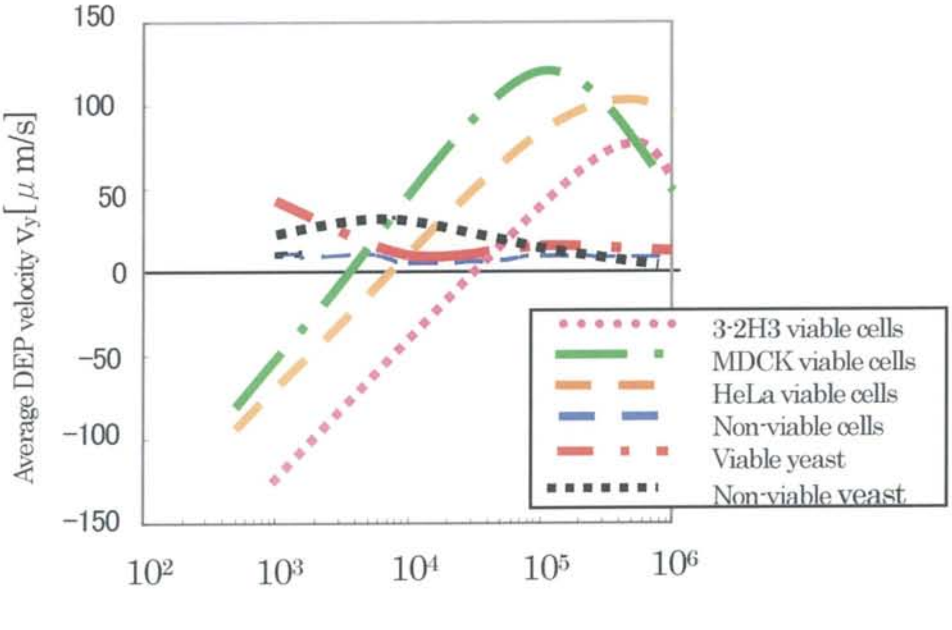
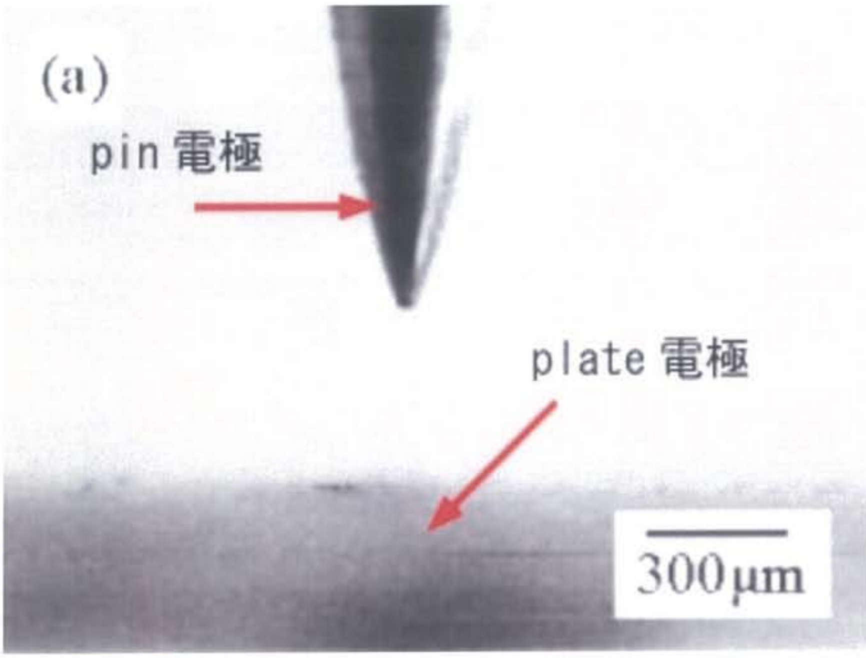
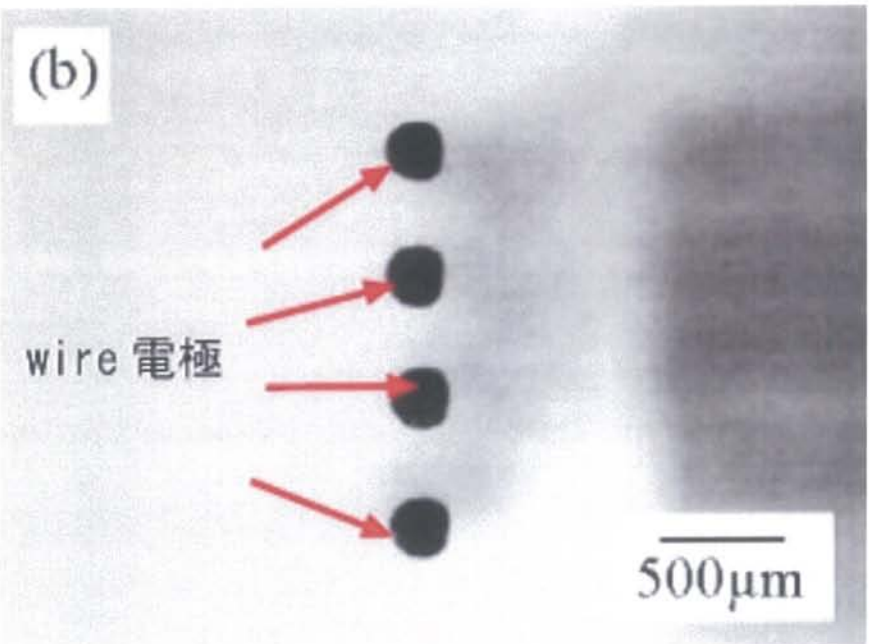


図 1.18: 各種細胞の誘電泳動速度の周波数特性 [42]



(a) pin-plate 電極



(b) wire-wire 電極

図 1.19: 脇坂らの用いた誘電泳動フィルタのモデル電極 [43]

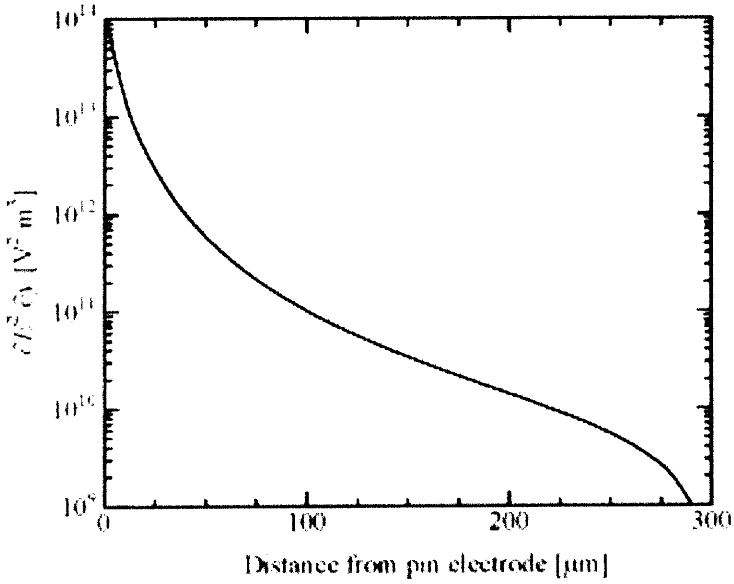


図 1.20: pin-plate 電極モデルにおける ∇E^2 分布の計算結果 [43]

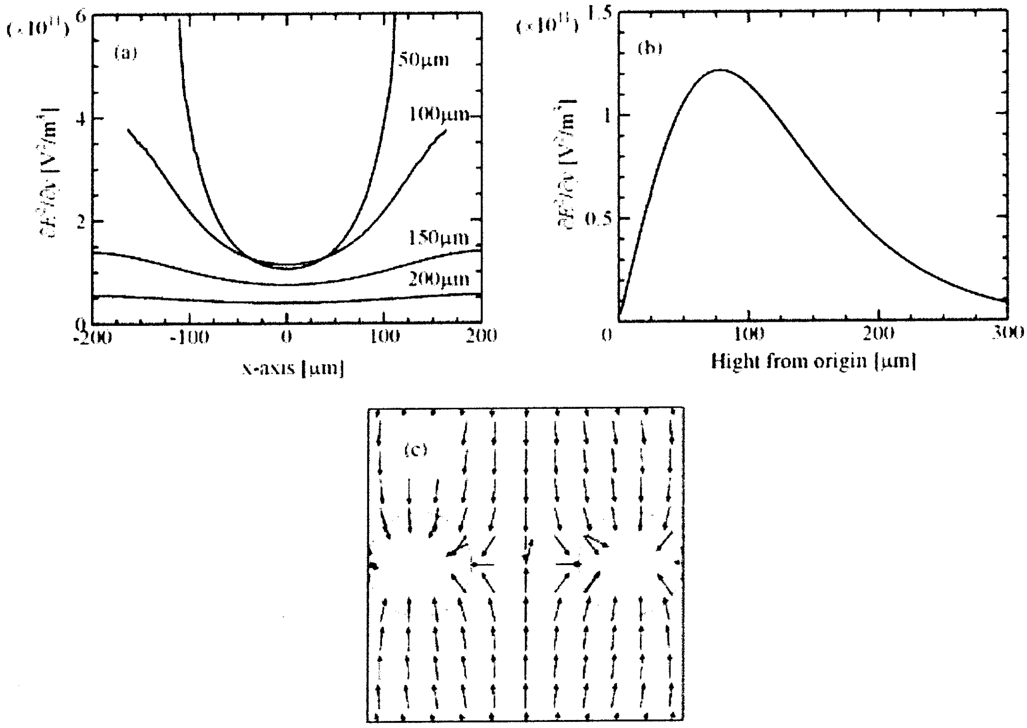


図 1.21: wire-wire 電極モデルにおける ∇E^2 分布の計算結果 [43]

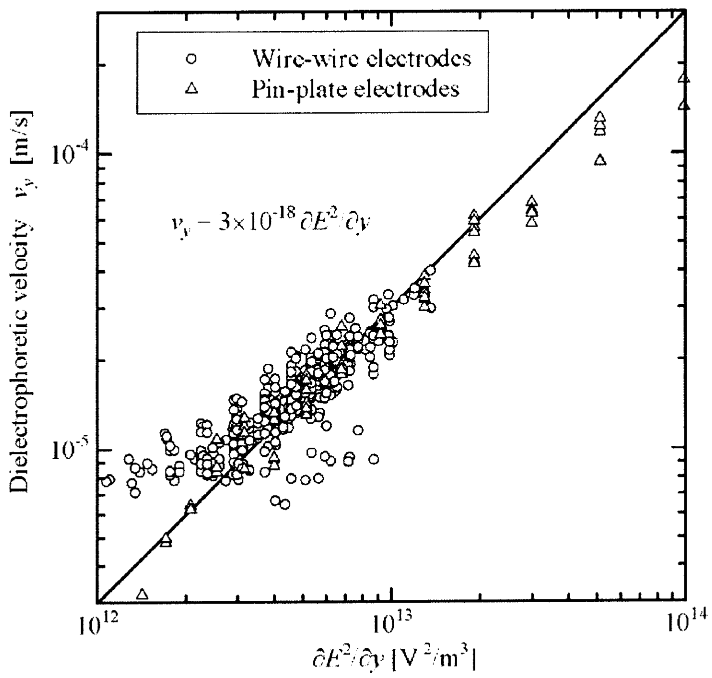


図 1.22: wire-wire 電極及び pin-plate 電極における DEP 速度の $\frac{\delta E^2}{\delta y}$ による影響 [43]

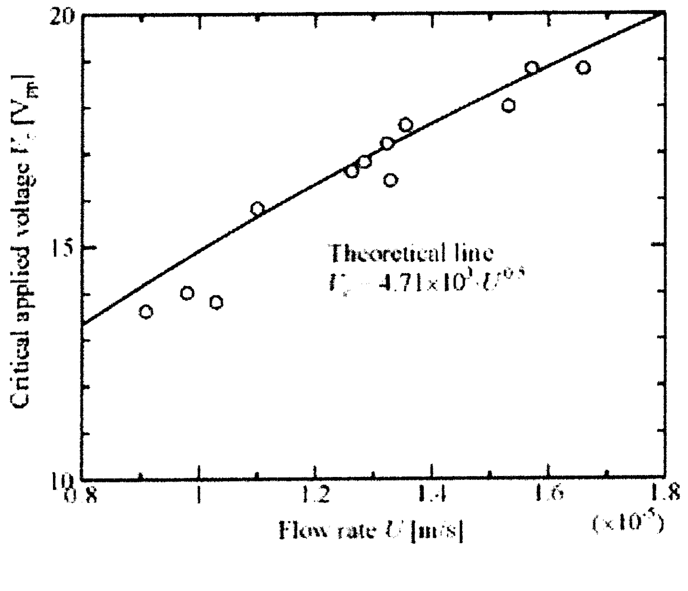


図 1.23: 臨界電圧値の流量依存性 [43]

1.3 研究目的

従来の微生物検査法である，遺伝子解析法や生化学的検査法及び発光分光法に対し，微生物の持つ電気的特性を利用した計測手法は，迅速性及び簡便性の観点から有力な生体粒子評価技術として近年注目されている．特に，誘電泳動を利用した電気的計測手法は，溶液中における粒子挙動の精密制御が可能であることから，生物細胞の分離・捕集及び代謝評価などの広い応用が見込まれている．誘電泳動法を用いた菌代謝計測には対象の誘電特性の評価が不可欠である．現在までに，誘電泳動を用いたDEPIM法及び誘電泳動浮揚法など様々な定量分析法が考案されてきた．これらの手法は，従来法と比較して，操作が簡便であり，また高価な試薬や機材が不要であるため，安価に計測を行うことができる．さらに，一部手法を除き，迅速性にも優れる．ただし，DEPIM法では，十分な検出感度を得るために対象粒子を一定量以上捕集する必要があり，高導電媒質への適用は難しい．また，誘電泳動浮揚法では微粒子を精密に配置する必要があることから，流体場での即時計測は困難であるといった問題点がある．

そこで，筆者らは，細胞の誘電特性と代謝状態の直接的な相関を精査するため，画像解析による誘電泳動速度計測に着目した．本手法は原理的に単一粒子から測定が可能なため，極微量検体に対して有効である．また，高導電媒質や流体場への応用も見込める．

本研究では，誘電泳動速度計測により菌体の誘電特性（電気定数）を評価し，代謝状態を迅速かつ簡便に常時モニタリングする新たな生体粒子計測システムの構築を目的としている．これまでに，当該システムにおける基本性能の検証として，菌体の細胞膜損傷度と誘電泳動速度の相関を調査するために，加熱処理により膜生理状態の異なる酵母を実験的に調整し，処理温度及び時間に対する酵母群の誘電泳動速度の周波数特性を精査してきた[45]．高澤らは，加熱処理酵母において，処理温度や時間の増加に伴い誘電泳動速度が減少することを示した．また，核酸染色剤を用いた蛍光観察により，熱ストレスを負荷された酵母は外側から順次損傷し，外部媒質の流入によって各層の導電率が変化することを示唆した．さらに，Re $[K(\omega)^*]$ の数値解析により，特定の周波数域において，細胞壁及び細胞質の損傷度が誘電泳動速度に顕著に影響を及ぼすことを確認した．

本報では，加熱処理の中でも特に，酵母を低温 (37 - 47 ℃) 処理した際の，被熱ストレス時間に依存する誘電泳動速度の変化を詳細に調査した．47 ℃処理については，加熱処理後の余熱ストレス時間 (放置時間) と誘電泳動速度の相関を精査した．また，37 ℃での長時間 (2 h) 処理は酵母の寿命を延長するという報告 [46] について，長時間の亜致死性熱ストレスが誘電泳動速度に及ぼす影響を調べた．また，核酸染色剤PI及びSyto9を用いた蛍光スペクトル強度測定により，菌体の細胞膜の状態を生化学的に評価し，膜生理状態と誘電泳動速度の相関を検証した．さらに，酵母の代謝活性の一つである生育活性と誘電泳動速度との相関を調べるために，コロニーカウント法を用いて，諸加熱条件における酵母の生育活性への影響を調査した．また，酵母の等価誘電体モデルによる数値解析から，誘電泳動速度と細胞電気定数の相関を考察した．

1.4 論文構成

本論文は全7章から構成されており，概要は以下の通りである．

第1章は序論であり，研究背景，関連研究及び研究目的について述べた．

第2章は誘電泳動理論について記述した後，流体中の粒子に対する運動方程式から誘電泳動速度を導出する．また，誘電泳動速度計測法の基礎特性を紹介する．

第3章は菌種の調整法及びストレス負荷工程や，本研究で用いた誘電泳動デバイスの構造を説明する．また，各種計測手法の具体的な手順について述べる．

第4章は加熱処理により代謝状態を変化させた酵母における誘電泳動速度の周波数特性を精査する．また，蛍光染色により膜活性状態計測を行い，細胞膜損傷及び細胞膜機構に伴う代謝活性の相関を検証する．

第5章はコロニーカウント計測による生育活性評価であり，各処理を施した酵母における誘電泳動速度と生育活性の相関を検討する．

第6章は酵母の等価誘電体モデルによる数値解析から，誘電泳動速度と細胞電気定数の相関について考察する．

第7章は本研究で得られた知見をまとめ，今後の展望について述べる．

参考文献

[1] 協和発酵工業（株）編: 「トコトンやさしい発酵の本」, 日刊工業新聞社 (2008)

[2] 日本食品工学会編： 「食品工学ハンドブック」, 初版 第1刷, 朝倉書店 (2006)

[3] 好井久男, 金子安之, 山口和夫編： 「食品微生物学ハンドブック」, 1版1刷, 技報堂出版 (1995)

[4] 上田誠之助： 「日本酒の起源—カビ・麹・酒の系譜」, 初版 第1刷, 八坂書房 (1999)

[5] 北陸電力 WEB サイト: http://www.rikuden.co.jp (2015/12/21 アクセス)

[6] 別府輝彦・野本明男・太田隆久：「微生物実験法」, 東京化学同人 (1992)

[7] D. Kregiel, J. Berlowska, B.Szubzda: "Novel permittivity test for determination of yeast surface charge and flocculation abilities", J Ind Microbiol Biotechnol, Vol. 39, No. 12, pp. 1881-1886 (2012)

[8] 今里浩子・山川烈： 「誘電泳動法による白血病細胞と正常白血球の分離」, 第23回バイオメディカル・ファジィ・システム学会年次大会 (2010)

[9] 鈴木雅登・安川智之・珠玖仁・末永智一： 「誘電泳動法による微小流体中での微生物の生死分離」, 分析化学, Vol. 54, No. 12, pp. 1189-1195 (2005)

[10] 米澤岳志： 「ビール, ウイスキー発酵の誘電計測によるオンラインモニタリング」, 生物工学, Vol. 78, No. 5, pp. 152-155 (2000)

[11] K. Asami and T. Yonezawa : "Dielectric analysis of yeast cell growth", Biochim. Biophys. Acta., Vol. 1245, No. 1, pp. 99-105 (1995)

[12] K. Asami, T. Hanai, and N. Koizumi: "Dielectric Properties of Yeast Cells", J. Membrane Biol., Vol. 28, No. 1, pp. 169-180 (1976)

[13] J. Suehiro, R. Yatsunami, R. Hamada and M. Hara: "Quantitative estimation of biological cell concentration suspended in aqueous medium by using dielectrophoretic impedance measurement method" J. Phys. D Appl. Phys., Vol. 32, No. 21, pp. 2814-2820 (1999)

[14] J. Suehiro, R. Hamada, D. Noutomi, M. Shutou and M. Hara: "Selective detection of viable bacteria using dielectrophoretic impedance measurement method", J.Electrostat ,Vol. 57, No. 2, pp. 157-168 (2003)

[15] D. W. E. Allsopp, K. R. Milner, A. P. Brown and W. B. Betts: "Impedance technique for measuring dielectrophoretic collection of microbiological particles" , Phys. D: Appl. Phys, Vol. 32, No. 9, pp. 1066-1074 (1999)

[16] 静電気学会: 「静電気ハンドブック」, オーム社（1998）

[17] T. B. Jones: "Electromechanics of Particles", Cambridge University Press（1995）

[18] 円城寺隆治・尼子恵理・内田諭・杤久保文嘉：「インピーダンス計測法による損傷大腸菌の誘電特性解析」, 静電気学会誌, Vol. 31, No. 1, pp. 8-13 (2007)

[19] 尼子恵理・円城寺隆治・内田諭・杤久保文嘉：「誘電泳動インピーダンス計測法を応用した熱損傷菌の代謝評価に関する基礎検討」, 電気学会誌, Vol. 128, No. 12, pp. 499-504 (2008)

[20] 円城寺隆治・内田諭・杤久保文嘉：「誘電泳動インピーダス計測法による細菌特性と 誘電泳動インピーダス計測法による細菌特性と細胞膜活性状態及び流量依存の相関検証細胞膜活性状態及び流量依存の相関検証」, 静電気学会誌, Vol.35, No.3 pp.139-144 (2011)

[21] T. Enjoji, S. Uchida and F. Tochikubo : "Fundamental Studies of Dielectric Characteristics of Heat-Injured *S. cerevisiae* using Dielectrophoretic Impedance Measurement Method", Intelligent Automation and Soft Computing, Vol. 17, No. X, pp. 1-12, (2011)

[22] K. V. 1. S. Kaler and T. B. Jones: "Dielectrophoretic spectra of single cells determined by feedback-controlled levitati", Biophys. Soc., Vol. 57, No. 2, pp. 173-182 (1990)

[23] K. V. I. S. Kaler, Jing-Ping Xie, T. B. Jones and R. Paul: "Dual-frequency dielectrophoretic levitation of Canola protoplasts", Biophys. Soc., Vol. 63, No. 1, pp. 58-69 (1992)

[24] 箱田優: 「誘電泳動を利用した生物活性解析システムを伴う生物分離装置の開発」, 北関東産官学研究会研究紹介 http://www.hikalo.jp/HiKaLo/Kenkyu/18（2016/1/12 アクセス）

[25] H. Imasato and T. Yamakawa: "Measurement of dielectrophoretic force by employing controllable gravitational force", J. Electrophoresis, Vol. 52, No. 1, pp. 1-8 (2008)

[26] 廣田祐輔・箱田優: 「ラット間葉系幹細胞の分化活性と誘電泳動浮揚法による誘電特性の関係」, 静電気学会誌, Vol. 34, No. 1, pp. 8-13 (2010)

[27] 大塚電子株式会社 WEB サイト: https://www.otsukael.jp/weblearn/chapter/learnid/66/page/1/category1id/35 (2016/1/12 アクセス)

[28] 梅澤喜夫，澤田嗣郎，中村洋：「最新の分離・精製・検出法 -原理から応用まで-」，エヌティーエス (1997)

[29] 澤井淳:「収集溶液として酸性溶液を用いたインダイレクト・コンダクタンス法による細菌の検出と増殖速度の測定」, Vol. 36, No. 2, pp. 75-78 (2008)

[30] L. Yang, C. Ruan, and Y. Li: "Detection of viable Salmonella typhimurium by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance", Vol. 19, No. 5, pp. 495-502 (2003)

[31] 小嶋幸次・米沢岳志：「種類発酵における酵母の状態変化の誘電計測」，日本農芸化学会誌，Vol. 70，No. 6, pp. 687-690 (1996)

[32] H. A. Pohl: "Dielectrophoresis", Cambridge Univ. Press, New York (1978)

[33] H. Li and R. Bashir : "Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of Listeria on microfabricated devices with interdigitated electrodes", Sens. Actuators B, Vol. 86, No. 2, pp. 215-221 (2002)

[34] Chun-Ping Jen, Teng-Wen Chen: "Selective trapping of live and dead mammalian cells using insulator-based dielectrophoresis within open-top microstructures"Biomedical Microdevices, Vol. 11, No. 3, pp. 597-607 (2009)

[35] 箱田優:「誘電泳動法による異種細胞分離ワイヤー型誘電泳動フィルターの開発」, 群馬大学産学連携・共同研究イノベーションセンター Center News 2009, pp. 82-83 (2009)

[36] U. Terpitz,S. Letschert,U. Bonda,C. Spahn,C. Guan,M. Sauer ,U. Zimmermann,E. Bamberg,D. Zimmermann,V. L. Sukhorukov: "Dielectric Analysis and Multi-cell Electrofusion of the YeastPichia pastoris for Electrophysiological Studies", J Membrane Biol, Vol. 245, No. 12, pp. 815-826 (2012)

[37] H.J. Lee, T. Yasukawa, H. Shiku and T. Matsue: "Rapid and separation-free sandwich immunosensing based on accumulation of microbeads by negative-dielectrophoresis", Biosens. Bioelectron, Vol. 24, No. 4, pp. 1000-1005 (2008)

[38] 安川智之:「誘電泳動による微粒子操作を応用した迅速な免疫測定」, 富山大学水素同位体科学研究センター研究報告, Vol. 33, pp. 1-7 (2013)

[39] M. Yamamoto, T. Yasukawa, M. Suzuki, S. Kosuge, H. Shiku, T. Matsue and F. Mizutani: "Patterning with particles using three-dimensional interdigitated array electrodes with negative dielectrophoresis and its application to simple immunosensing", Electrochimica Acta, Vol. 82, No. 1, pp. 35-42 (2012)

[40] 安川智之・水谷文雄:「誘電泳動を利用した表面抗原発現細胞の迅速検出技術」, Electrochemistry, Vol. 82, No. 11, pp. 993-999 (2014)

[41] 伊野浩介：「誘電泳動を用いたマクロロッド回転による腫瘍マーカー検出用小型デバイスの開発」，技術開発助成成果報告，Vol. 25，pp. 102-109 (2008)

[42] 脇坂嘉一・箱田優・吉田暁:「誘電泳動現象に及ぼす操作因子の影響」, SCEJ 39th Autumn Meeting, 30F058 (2004)

[43] Y. Wakizaka, M. Hakoda and N. Shiragami: "Effect of electrode geometry on dielectrophoretic separation of cells", Biochemical Engineering Journal, Vol. 20, No. 1, pp. 13-19 (2004)

[44] 西村僚太:「平成 22 年度首都大学東京電気電子工学専攻修士論文」, (2011)

[45] 高澤晋:「平成 25 年度首都大学東京電気電子工学専攻修士論文」, (2014)

[46] S. M. Jazwinski: "Heat Stress-Induced Life Span Extension in Yeast", Exp Cell Res, Vol. 245, No. 2, pp. 379-388 (1998)

第2章　原理
ー誘電泳動及び液中の力学的効果ー

本章では，誘電泳動の原理ついて説明する．流体中の粒子に作用する力及び流体場を考慮し，粒子に対する運動方程式から，誘電泳動速度を導出する．流体中の粒子に生じる力として，誘電泳動力，粘性力，重力及び浮力の合力である正味の重力，電極板から受ける電気的な力（電気鏡像力）及び摩擦力について詳述する．

2.1　誘電泳動

誘電泳動（dielectrophoresis: DEP）とは，不均一電界中において分極した微粒子が，電界勾配に沿って泳動する現象である [1] - [4]．誘電体を静電界中に配置すると，誘電体を構成する原子又は分子中における正負の両電荷が変位する分極現象が生じる [5]（図 2.1 参照）．電界が均一な場合，荷電粒子には，自身の持つ電荷と逆の電極に誘引される電気泳動が生じる．それに対して，中性粒子では，分極により生じた正負の電荷（分極電荷）に掛かる力の大きさが等しいため，粒子は移動しない．一方，電界が不均一な場合，粒子近傍における電界強度は一様ではなく，正負の分極電荷に働く力の大きさが異なるため，その差分だけ粒子に力が掛かる．本現象が DEP である．DEP による粒子の泳動挙動は，粒子及び媒質の電気特性に強く依存する．従って，DEP は，粒子及び媒質が持つ電気特性を利用して，溶液内に存在する粒子の挙動を選択的に制御できるという特徴を持つ．また，DEP は，電気泳動とは異なり，粒子の電荷の有無に関わらず作用する．ゆえに，細胞や微生物のような電荷を持たない粒子に対して有効であり，交流場への適用も可能である．

静電界 E 中に置かれた半径 r の無損失の誘電体粒子を考える．粒子及び媒質の誘電率を ϵ_{p} 及び ϵ_{m} とする．電界 E 中において，粒子は誘電分極により原子核の位置と電子雲の中心位置が移動し，次式で表されるような双極子モーメント p を生じる（図 2.1 参照）．

$$p = \alpha E \tag{2.1}$$

$$\alpha = 4\pi r^3 \epsilon_{\mathrm{m}} \frac{\epsilon_{\mathrm{p}} - \epsilon_{\mathrm{m}}}{\epsilon_{\mathrm{p}} + 2\epsilon_{\mathrm{m}}} \tag{2.2}$$

ここで α は分極率である．上式より，不均一静電界中において誘起双極子モーメントに作用する誘電泳動力 F_{DEP} は以下のように表せる．

$$F_{\mathrm{DEP}} = (p \cdot \nabla E) = \frac{\alpha}{2} \nabla E^2 = 2\pi \epsilon_{\mathrm{m}} r^3 K \nabla E^2 \tag{2.3}$$

ここで K は

$$K = \frac{\epsilon_{\mathrm{p}} - \epsilon_{\mathrm{m}}}{\epsilon_{\mathrm{p}} + 2\epsilon_{\mathrm{m}}} \tag{2.4}$$

で与えられるクラウジウス・モソッティ関数である．誘電率とは物体の分極の程度を示すものであるため，K は粒子及び媒質の界面の分極率を表す．式 (2.3) 及び (2.4) より，F_{DEP} は粒子及び媒質の誘電率，粒子半径，印加電界に強く依存する．F_{DEP} の向きは K の正負によって決定される．$K > 0$ の場合，粒子の分極率が媒質の分極率より大きいため，粒子は媒質を押しのけながら強電界側へ泳動する．この現象を正の誘電泳動 (positive DEP: p-DEP) という (図 2.2(a) 参照)．また，$K < 0$ の場合，媒質の分極率が大きいため，媒質が強電界側から引力を受け，粒子は相対的に強電界側から遠ざかる向き（弱電界側）へ誘導する．この現象を負の誘電泳動 (negative DEP: n-DEP) という（図 2.2(b) 参照）．

一般的に，細胞や微生物のような生体粒子は，印加電界に対して時間的な遅れを伴って分極する．これを誘電緩和 [6] と呼ぶ．ただし，その所要時間（誘電緩和時間）は非常に小さく，直流や低周波域の電界変化に対しては双極子モーメントが十分に追従するため，誘電緩和による損失は無視できる．しかし，高周波域のような瞬時的な電界変化に対しては分極が間に合わず，電界と双極子モーメントの向きにズレが生じる．このズレにより，粒子は誘電損失を引き起こす．このような誘電緩和現象や，生体粒子が持つ導電性に起因する損失により，生対粒子に作用する誘電泳動力 F_{DEP} は，複素領域において議論される必要がある．

交流電界 E_{AC} 中に置かれた電気的に中性の粒子を考える．粒子及び媒質の複素誘電率 ϵ_{p}^* 及び ϵ_{m}^* は次式で表せる．

$$\epsilon_{\mathrm{m}}^* = \epsilon_{\mathrm{m}} - j\frac{\sigma_{\mathrm{m}}}{\omega}, \qquad \epsilon_{\mathrm{p}}^* = \epsilon_{\mathrm{p}} - j\frac{\sigma_{\mathrm{p}}}{\omega} \tag{2.5}$$

式 (2.3) 及び式 (2.5) より，粒子に働く F_{DEP} は以下のようになる．

$$F_{\mathrm{DEP}} = (p \cdot \nabla E_{rms}) = \frac{\alpha}{2}\nabla E_{rms}^2 = 2\pi\epsilon_{\mathrm{m}} r^3 \mathrm{Re}\left[K(\omega)^*\right] \nabla E_{rms}^2 \tag{2.6}$$

ただし，E_{rms} は電界 E_{AC} の実効値である．ここで $K(\omega)^*$ は

$$K(\omega)^* = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \tag{2.7}$$

である．また，Re $[K(\omega)^*]$ はクラウジウス・モソッティ関数実部であり，-0.5 $\leq$ Re $[K(\omega)^*]$ ≤ 1 の範囲で変化する．式 (2.6) より，交流電界場において，誘電泳動力は粒子及び媒質の複素誘電率，粒子半径，印加電界及び周波数に依存する．

ここで，液中における粒子の挙動について考える．液中に分散した微粒子は，多くの場合，それ自体のイオン性及び分極性により正または負に帯電する [7]．従って，周囲媒質が液体であるような計測条件下では，生体粒子のような中性粒子を対象にした場合においても，電気泳動力を考慮する必要がある．液中において粒子が帯びる総電荷を q とする．電界 E 中の粒子に働く電気泳動力は以下のようになる [8]．

$$F_{\mathrm{ep}} = qE \tag{2.8}$$

上式より，低周波交流電界中において，粒子に働く電気泳動力の正負は半周期ごとにゆっくりと入れ替わるため，粒子は周期的に速度を変えながら液中を泳動する．一方，電界 E が高周波交流電界である場合，電気泳動力の正負は高速で切り替わり，粒子の泳動挙動に及ぼす影響は限りなく小さくなる．従って，高周波交流電界においては電気泳動力を無視することができる．故に，本研究では，対象粒子に働く誘電泳動力のみを評価するために，印加電界の周波数を 50 kHz - 10 MHz の高周波領域とした．

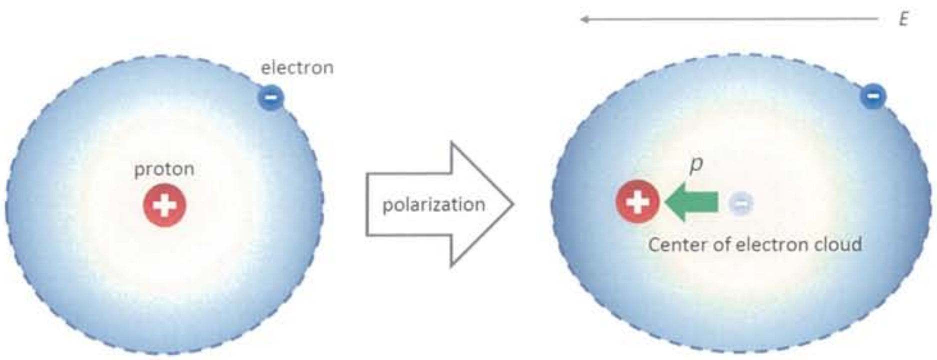
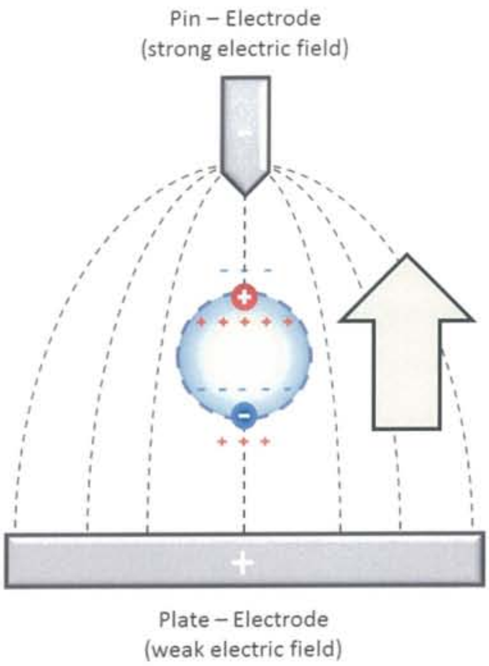
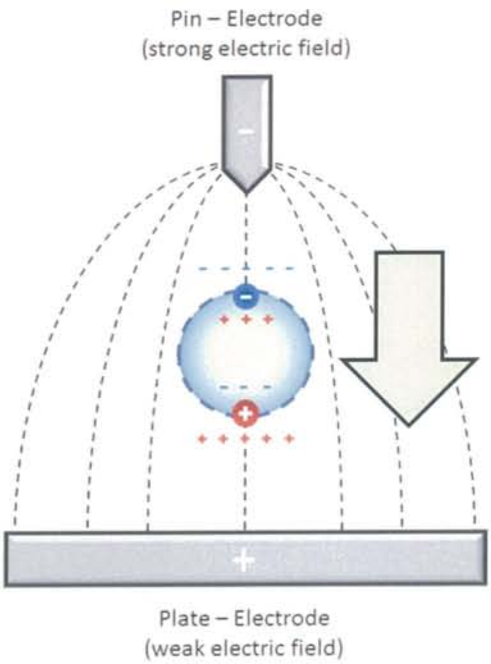


図 2.1: 誘電分極の模式図



(a) 正の誘電泳動（Re $[K(\omega)^*] > 0$）



(b) 負の誘電泳動（Re $[K(\omega)^*] < 0$）

図 2.2: 不均一電界における粒子の挙動

2.2 誘電泳動力以外の力学的効果

2.2.1 粘性力

非圧縮かつ密度が一様な単成分ニュートン流体のナビエ・ストークス（Navier-Stokes: NS）の方程式は式 (2.9) で与えられる [9].

$$\rho_{\mathrm{m}}\{\frac{\partial \nu}{\partial t} + (v \cdot \mathrm{grad})v\} = -\mathrm{grad}P + \eta\Delta v \tag{2.9}$$

ここで，ρ_{m} は流体密度，$v = v(r,\, t)$ は流体速度，P は圧力，η は粘度である．一方，レイノルズ数 Re は式 (2.10) で定義される．

$$Re = \frac{\rho UL}{\eta} = \frac{UL}{\nu} \tag{2.10}$$

ここで，ν は動粘性係数であり，U 及び L はそれぞれ流れを特徴づける代表流速及び代表長さである．

式 (2.10) について，流体中を運動する粒子を考える．このとき，代表長さ L は粒子径であり，代表流速 U は粒子と流体の相対速度である．また，この定義において，レイノルズ数 $Re \leq 0.1$ のとき，流れは純粋な層流となる．本計測条件下では，流れのない流体（媒質）中を粒子（酵母）が運動するため，相対速度は粒子の移動速度となる．また，酵母の平均粒子径は 5.0 μm であり，媒質の動粘性係数 ν は 8.39×10^{-3} cm^2/s である．粒子の移動速度を 0 - 100 μm/s とすると，レイノルズ数 Re は，$10^{-7} - 10^{-8}$ となる．従って，式 (2.9) の左辺第二項である慣性項は右辺である粘性項と比較して十分に小さいため，ストークス近似が成り立つ．特に，流速 v は時刻 t に依存しない定常流の時，定常ストークス近似が成り立ち，式 (2.11) 及び (2.12) を連立して解が求められる．

$$\eta\Delta v = \mathrm{grad}P \tag{2.11}$$

$$\mathrm{div}v = 0 \tag{2.12}$$

静止流体中を粒子が v で運動する場合，式 (2.11) 及び (2.12) より，粒子が媒質から受ける粘性力 F_{drag} が求められる．

$$F_{\mathrm{drag}} = 6\pi\eta r v \tag{2.13}$$

ここで，r は粒子半径である．上式はストークスの抵抗法則と呼ばれる [10][11]．粘性力は粒子半径や粘度，粒子速度に依存する．また，式 (2.13) における速度 v は静止した液体に対する相対速度であるため，流速 v_{flow} の流体中における抗力は式 (2.14) で表される．

$$F_{\mathrm{drag}} = 6\pi\eta r(v - v_{\mathrm{flow}}) \tag{2.14}$$

2.2.2 重力及び浮力

粒子が流体（気体及び液体）中にあるとき，粒子と流体の密度差によって，粒子には鉛直上向きの力が生じる．この力を浮力という．浮力の大きさは，その粒子が排除した流体の重量に相当する (アルキメデスの原理)．また，浮力の作用点は，粒子が排除した流体の重心に一致する．流体中の粒子に働く重力 F_{g} と浮力 F_{b} は次式で示される [12].

$$F_{\mathrm{g}} = \frac{4\pi r^3 \rho_{\mathrm{p}}}{3} g \tag{2.15}$$

$$F_{\mathrm{b}} = \frac{4\pi r^3 \rho_{\mathrm{m}}}{3} g \tag{2.16}$$

ここで，r は粒子半径，ρ は密度であり，添字 p 及び m は粒子及び媒質を意味する．また，g は重力加速度であり，地球の自転の影響を考慮せず，地球の密度が一様であると仮定すると以下のようになる．

$$g = \frac{GM}{R^2} = 9.80619920 \ \ [\mathrm{m/s^2}] \tag{2.17}$$

G は万有引力定数，M は地球の質量及び R は地球の半径である．重力加速度の値は場所によって異なるが，本計測では標準重力加速度として上記の値を使用した．

以上より，重力及び浮力を含めた正味の重力 F_{G} は次式で表される．

$$F_{\mathrm{G}} = F_{\mathrm{g}} - F_{\mathrm{b}} = \frac{4\pi r^3 (\rho_{\mathrm{p}} - \rho_{\mathrm{m}})}{3} g \tag{2.18}$$

物体に働く正味の重力の正負は，粒子と流体の密度に依存する．$\rho_{\mathrm{p}} > \rho_{\mathrm{m}}$ のとき粒子は沈み，$\rho_{\mathrm{p}} < \rho_{\mathrm{m}}$ のとき粒子は浮き上がる（図 2.3 参照）．

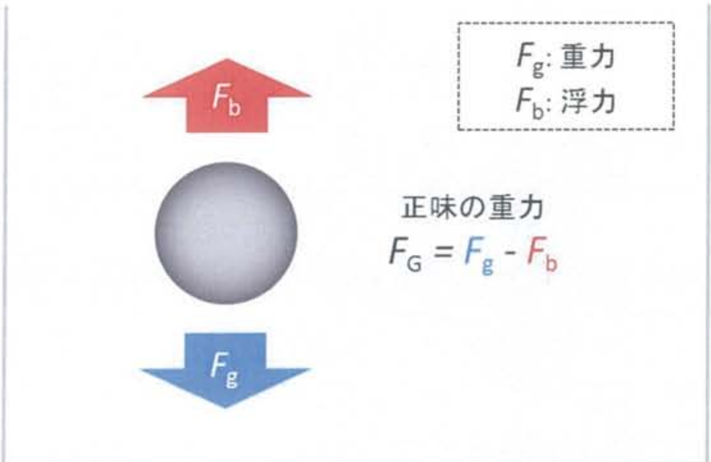


図 2.3: 流体場における浮力及び重力

2.2.3 電気鏡像力

2.1 節で述べたように，液中に分散した粒子は，そのイオン性及び分極性により帯電する．故に，本計測条件下では，溶液中において帯電した粒子（酵母）が電極（導体）表面上を移動する．この系において，粒子が電極板に対して鉛直方向に受ける電気鏡像力 F_{ij} について考慮する必要がある．電気鏡像力とは，電荷を保有した粒子が導電性材料（ここでは電極に相当）と接触したとき，粒子と逆の電荷を有した仮想粒子（鏡像電荷）が存在するような場を作り出し，粒子が導電性材料に引き寄せられる力のことである [13]．図 2.4(a) のように，$\mathrm{y} \leq 0$ を導体が占め，点 $\mathrm{y} = \mathrm{y_0}$（$\geq 0$）に電荷 $+\,\mathrm{q}$ が存在する場合，電荷 q は電極表面に負電荷を誘起する [14]．その結果，電荷 q と電極表面で誘起された負電荷の間にファンデルワールス力が働き，粒子は電極に引き寄せられる．

電荷 q によって電極板付近に生じる電界は単純な Coulomb の法則では求められない．電極表面で誘起した負電荷の分布は未知なためである．そこで，鏡像法 [15] を用いて電界を導出する必要がある．本手法では，$\mathrm{y} \leq 0$ に導体が存在しないものと考え，その代わり $\mathrm{y} = -\,\mathrm{y_0}$ に鏡像電荷 $-\,\mathrm{q}$ が存在すると仮定する（図 2.4(b) 参照）．鏡像電荷と電極表面上に誘起された電荷の総和は等しく $-\,\mathrm{q}$ [C] であり，$\mathrm{y} \geq 0$ の範囲では，図 2.4（a）及び（b）に同一の電界が生じる．電気双極子モーメントは正負一対の電荷で表せるため，鏡像法を用いて電極板付近の電界を求めることができる．従って，F_{ij} は分極した他の粒子（鏡像粒子）から受ける電気的な力として導出できる．

粒子の中心に生じた電気双極子モーメント $\vec{p}$ は次式で表される [15].

$$\vec{p} = \frac{4\pi a^3}{3}\vec{P} = 4\pi\epsilon_{\mathrm{m}}\epsilon_0\frac{\epsilon_{\mathrm{p}} - \epsilon_{\mathrm{m}}}{\epsilon_{\mathrm{p}} - 2\epsilon_{\mathrm{m}}}a^3\vec{E} \tag{2.19}$$

ここで，a は粒子半径，$\vec{P}$ は誘電分極，ϵ_0 は真空の誘電率である．

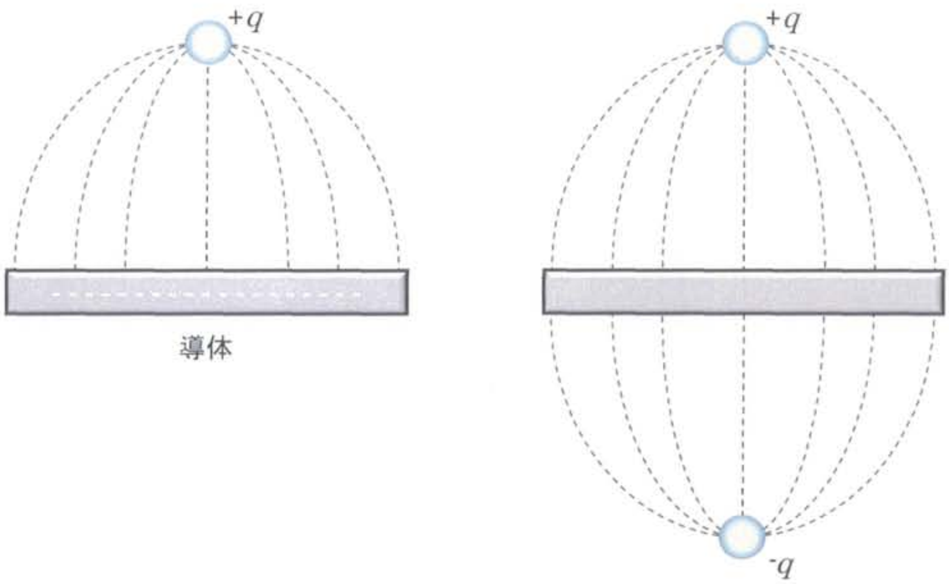
粒子 i,j の電気双極子モーメントを用いて，粒子 i，j 間の電気的相互エネルギー u_{ij} は次式で与えられる．

$$u_{ij} = \frac{1}{4\pi\epsilon_m\epsilon_0}\left\{\frac{\vec{P}^2}{r_{ij}^3} - \frac{3}{r_{ij}^5}(\vec{p}\cdot\vec{r_{ij}})^2\right\} \tag{2.20}$$

よって，粒子 i,j 間の電気的相互作用に基づいた粒子 j が粒子 i に作用する力 F_{ij} は次式のように表される．

$$F_{ij} = -\frac{\delta}{\delta\vec{r_i}}u_{ij} = \frac{3}{4\pi\epsilon_{\mathrm{m}}\epsilon_0}\{\vec{p}^2\frac{\vec{r_{ij}}}{r_{ij}^5} - 5(\vec{P}\cdot\vec{r_{ij}})^2\frac{\vec{r_{ij}}}{r_{ij}^7} + 2(\vec{P}\cdot\vec{r_{ij}})\frac{\vec{P}}{r_{ij}^5}\} \tag{2.21}$$

ここで，本計測で想定される電気鏡像力について考える（図 2.5 参照）．鏡像粒子は，粒子の泳動の有無に依らず，常に電極表面に対して粒子と線対称となるように存在する．故に，式 (2.21) における，粒子と鏡像粒子の距離 r_{ij} は，恒常的に $(2a)$ と置く事が出来る．また，計測条件下では対象粒子近傍には他の粒子が存在しないため，電極に対して垂直方向にのみ力が生じる．従って，$\vec{P}\cdot\vec{r_{ij}} = Pr_{ij}$ となる．



(a) 荷電粒子と導体　　(b) 荷電粒子と鏡像粒子

図 2.4: 鏡像法 [14]

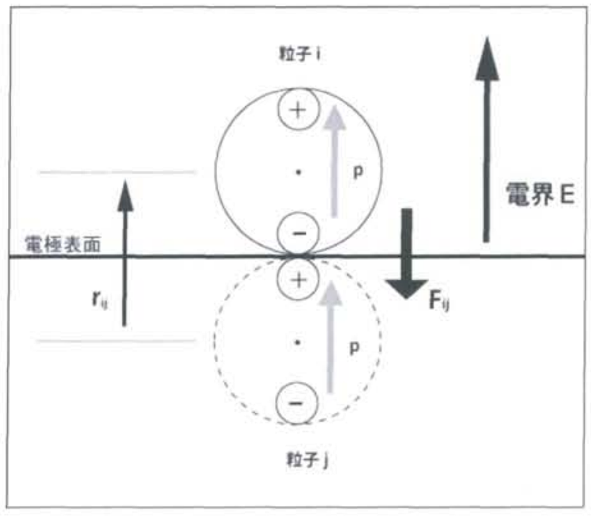


図 2.5: 分極した他の粒子から受ける電気的な力

2.2.4 摩擦力

摩擦力とは，物体が他の物体と接触しながら運動しようとするとき，または運動しているときに，物体間の接触面に対して水平方向に働く力である．静止している物体に働く摩擦力を静止摩擦力，運動している物体に働く摩擦力を動摩擦力という．本計測条件下では，粒子は電極表面上を移動するため，粒子及び電極表面の接触面において動摩擦力が働く（図 2.6 参照）．動摩擦力 F_f は式 (2.22) で表せる．

$$F_f = \mu' N \tag{2.22}$$

ここで，μ' は動摩擦係数，N は垂直抗力である．本計測条件下において，垂直抗力 N は電極表面に対して垂直方向に働く力の合力となり，式 (2.23) となる．

$$N = F_{\mathrm{DEP},z} + F_{\mathrm{G}} + F_{ij} \tag{2.23}$$

ここで，$\mathrm{F_{DEP,\mathit{z}}}$ は電極表面に対して垂直方向に働く誘電泳動力である．

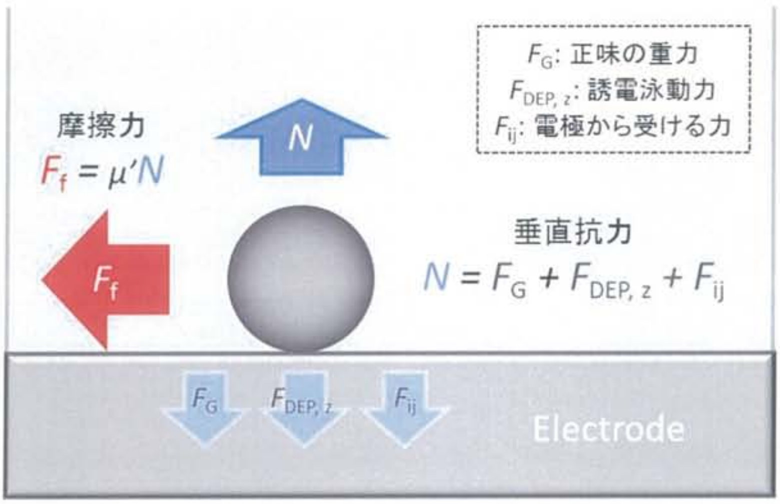


図 2.6: 粒子が受ける摩擦力

2.3 誘電泳動速度の導出

2.2 節に記述した力を考慮すると，流体中における粒子の運動方程式は次式で表せる．

$$m\frac{dv}{dt} = F_{\mathrm{DEP},x} - F_{\mathrm{drag}}(v) - F_{\mathrm{f}} \tag{2.24}$$

ここで m は粒子質量，F_{drag} は粘性力，F_f は動摩擦力である．電圧を印加した直後は，誘電泳動力が粘性力及び動摩擦力の和より大きいため，式 (2.24) より粒子の速度は増加する．このとき，粘性力は粒子速度に依存して線形的に増加する．電圧印加から一定時間後，粘性力の増加に伴い，粒子に働く力が均衡すると加速度は零となり速度は定常状態になる．このときの速度を誘電泳動速度 v_{DEP} と定義する．電界勾配の変化が緩やかであり，速度の緩和時間が十分に短いと見なせるとき，次式が成り立つ．

$$F_{\mathrm{DEP},x} - F_{\mathrm{drag}}(v) - F_{\mathrm{f}} = 0 \tag{2.25}$$

上式に式 (2.6)，(2.13) 及び (2.22) を代入し整理すると，誘電泳動速度は次式のようになる．

$$v_{\mathrm{DEP}} = \frac{r^2\epsilon_{\mathrm{m}}\mathrm{Re}\,[K(\omega)^*]}{3\eta}|\nabla E_{\mathrm{rms}}^2| - \frac{\mu' N}{6\pi r\eta} = v_{\mathrm{DEP},1} + v_{\mathrm{DEP},2} \tag{2.26}$$

式 (2.26) において，右辺第一項は誘電泳動力及び粘性力による誘電泳動速度を示し，右辺第二項は摩擦力による誘電泳動速度の補正値を示す．右辺第一項及び第二項を次式のように定義する．

$$v_{\mathrm{DEP},1} = \frac{r^2\epsilon_{\mathrm{m}}\mathrm{Re}\,[K(\omega)^*]}{3\eta}|\nabla E_{\mathrm{rms}}^2| \tag{2.27}$$

$$v_{\mathrm{DEP},2} = -\frac{\mu' N}{6\pi r\eta} \tag{2.28}$$

電界分布及び粒子径などの値が既知のとき，式 (2.26) より，誘電泳動速度から $\mathrm{Re}\,[K(\omega)^*]$ を一意に導出できる．

$\mathrm{Re}\,[K(\omega)^*]$ は，粒子及び媒質の界面の分極率を表すクラウジウス・モソッティ関数の実部であり，粒子の誘電特性に依存する．これまでに，菌体の代謝状態と誘電特性は相関があることが確認されている [16] - [19]．そのため，誘電泳動速度計測により $\mathrm{Re}\,[K(\omega)^*]$ を精査することで，菌体の代謝状態を間接的に評価できる．

2.4 誘電泳動速度の基礎特性

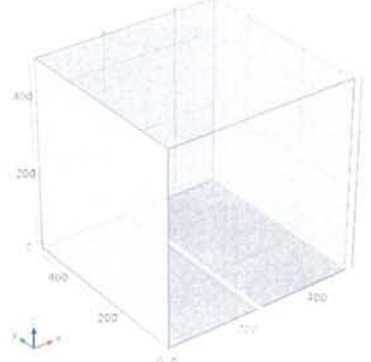
本研究室では，誘電泳動速度計測による新たな生体粒子計測システムの構築を目的として，これまでに，当該システムにおける基本性能の検証を行ってきた [20][21]．本節では，前節で述べた誘電泳動速度の理論式 (2.26) と実際の計測における粒子の泳動挙動の相関検証の結果を紹介する．

2.4.1 数値解析による電界分布シミュレーション

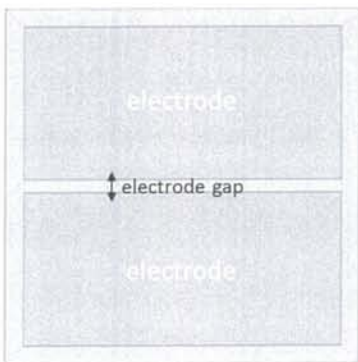
西村らは，本計測で用いるデバイス系において，電極表面に生じる電界強度の分布を，連成物理解析ソフトウェア（COMSOL Multiphysics 4.3, COMSOL）を用いて数値的に解析した．解析条件及び解析モデルを表 2.1 及び図 2.7 に示す．電極表面における電界強度及び二乗電界勾配（∇E^2）は，電極端に近づくにつれて指数関数的に増加し，電極ギャップ間及び電極端で最大となった（図 2.8 参照）．従って，本計測条件下において，酵母に掛かる誘電泳動力は，電界強度の大きい電極ギャップ方向へ作用すると考えられる．

表 2.1: 電界分布シミュレーションにおける解析条件

Property	SI unit	Analytical Condition	Experimental Condition
Electrode widh	μm	500	4400
Electrode thickness	μm	1	0.1
Electrode gap	μm	20	20
Applied voltage	V_{0-p}	7.07	7.07(RMS value)

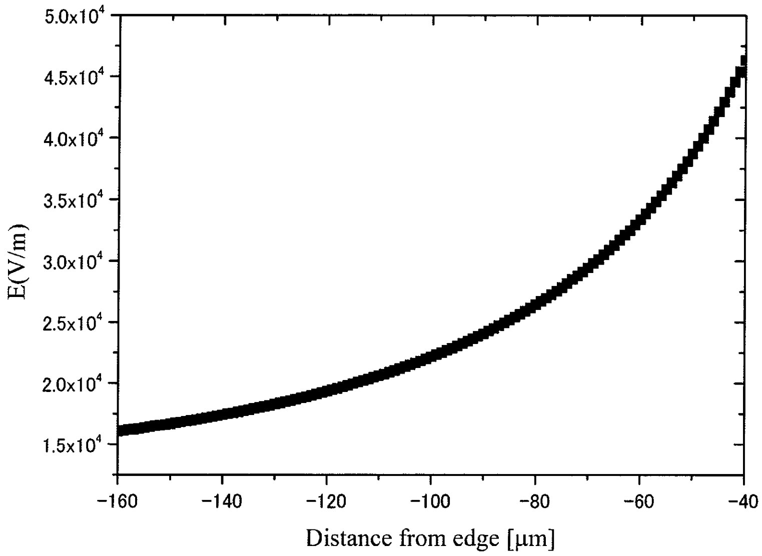


(a) 解析モデル: 3D

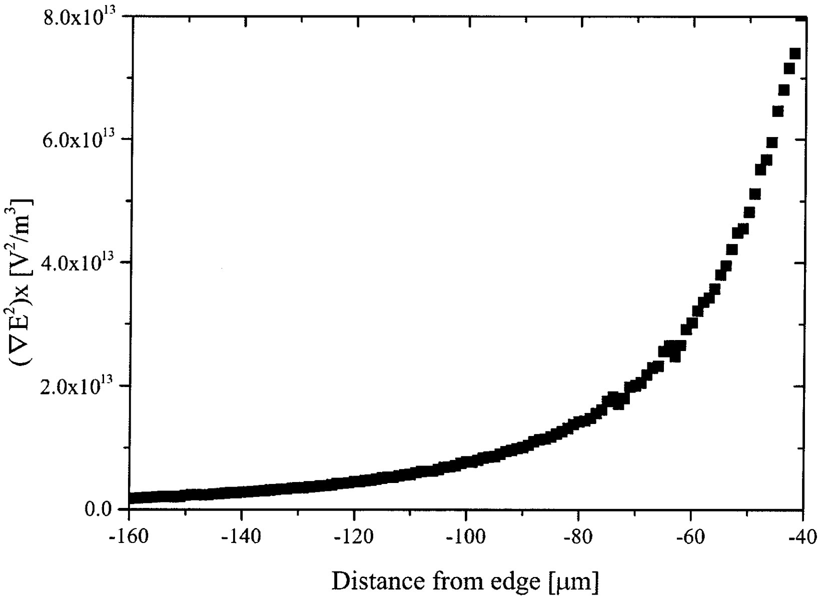


(b) 解析モデル: x-y 平面

図 2.7: 解析モデル



(a) 電極端からの距離と電界強度の関係



(b) 電極端からの距離と ∇E^2 の関係

図 2.8: 数値解析による電界分布シミュレーション結果

2.4.2　二乗電界勾配特性

高澤らは，実際の計測における誘電泳動速度と二乗電界勾配の関係を精査した．電圧印加開始時の初期位置が異なる酵母 4 サンプルにおける誘電泳動速度の測定結果を図 2.9 に示す．誘電泳動速度は，粒子及び媒質の誘電特性及び粒子径に依存するため，測定対象として，同条件（28°C, 72 h）下で培養した粒子半径 2.5 μm の酵母を選択的に用いた．全てのサンプルにおいて速度分布が一致したことより，誘電泳動速度は電圧印加時の酵母の初期位置には依存しないことが明示された．図 2.8(b) 及び図 2.9 より導出した誘電泳動速度と二乗電界勾配の関係を図 2.10 に示す．誘電泳動速度の実測値は二乗電界勾配の増加に伴って線形増加し，理論式 (2.26) を満たすことを確認した．

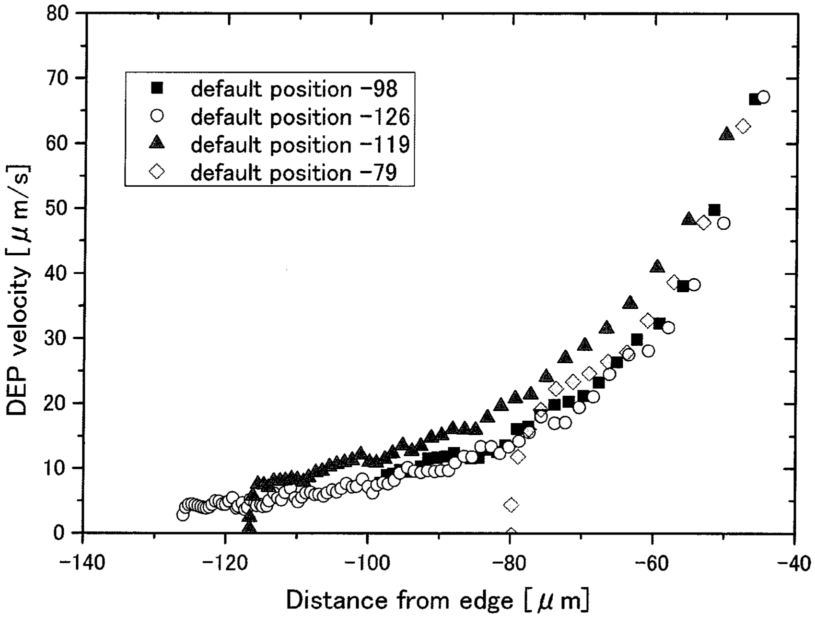


図 2.9: 電極端からの距離と誘電泳動速度の関係

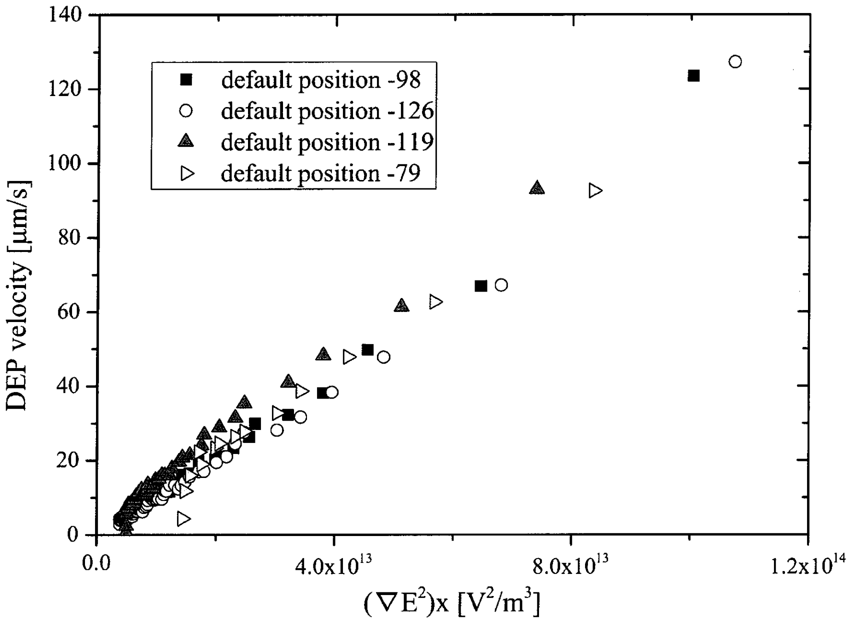


図 2.10: 誘電泳動速度の ∇E^2 特性

2.4.3　二乗粒子半径特性

また，高澤らは，誘電泳動速度と二乗粒子半径の相関を検証した．理論式 (2.26) より，誘電泳動速度は二乗粒子半径に依存して線形的に変化すると考えられる．これを実験的に検証するため，粒子径の異なるいくつかの酵母における誘電泳動速度を計測した．誘電泳動速度の二乗粒子半径特性を図 2.11 に示す．なお，印加電圧は振幅 20 V_{p-p} で固定し，周波数を 100 kHz，1 MHz 及び 10 MHz として計測した．誘電泳動速度は，二乗粒子半径の増加に伴って線形増加し, 理論式 (2.26) が満たされた．

酵母の粒径によって誘電泳動速度が変化することを考慮し，本節以降の計測では速度実測値に粒子径による補正を加えて規格化した．測定粒子径及び基準粒子径を r 及び r_s=2.5 μm とし，誘電泳動速度の補正値は以下のように定義した（式 (2.29) 参照）．なお，測定粒子径は長径と短径を計測して平均化した．

$$\nu_{\mathrm{DEP}} = \nu_{\mathrm{DEP-experiment}} \times \left(\frac{r_s}{r}\right)^2 \tag{2.29}$$

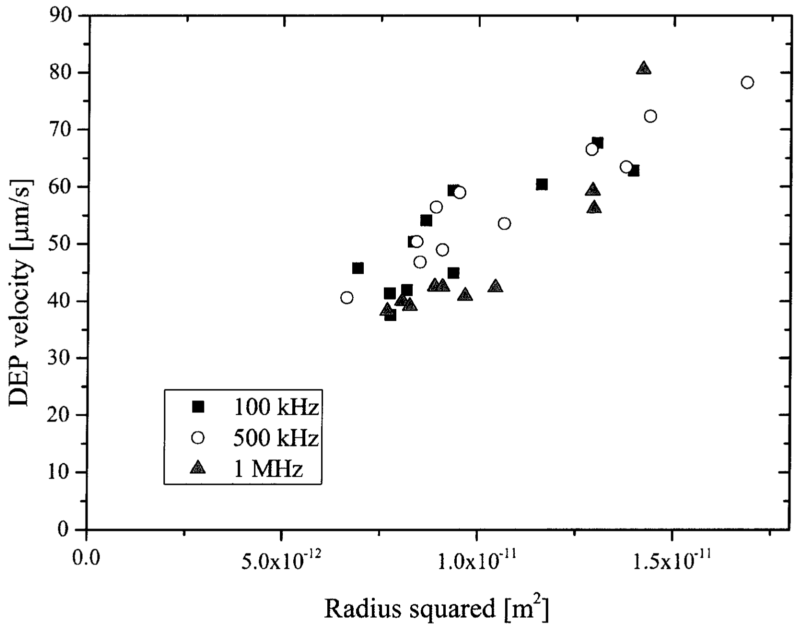


図 2.11: 誘電泳動速度の二乗粒子半径特性

2.4.4 誘電泳動速度の緩和時間

さらに，高澤らは，誘電泳動速度が 0 から定常状態になるまでに必要となる緩和時間について検討した．緩和時間が撮影間隔（10 ms）に比べて十分に短いとき，粒子挙動は式 (2.26) を満たすと考えられる．粒子半径 1.5 - 4.5 μm の粒子における誘電泳動速度と経過時間の関係を図 2.12 に示す．なお，解析条件は表 2.2 とした．緩和時間は，粒子径の増加に伴い長くなり，10 - 40 μs となった．従って，本計測条件下において，撮影間隔に比べて緩和時間が十分に短いため，粒子の泳動挙動が式 (2.26) を満たすことを確認した．

表 2.2: 緩和時間解析に用いた諸パラメータ

property	SI unit	Condition
$F_{\mathrm{DEP,X}}$	kg·m/s^2	2.71×10^{-12}
Particle radius	m	2.5×10^{-6}
Particle density [22]	kg/m^3	1440
Viscosity	kg/ms	0.00089
Δt	sec	1.0×10^{-8}

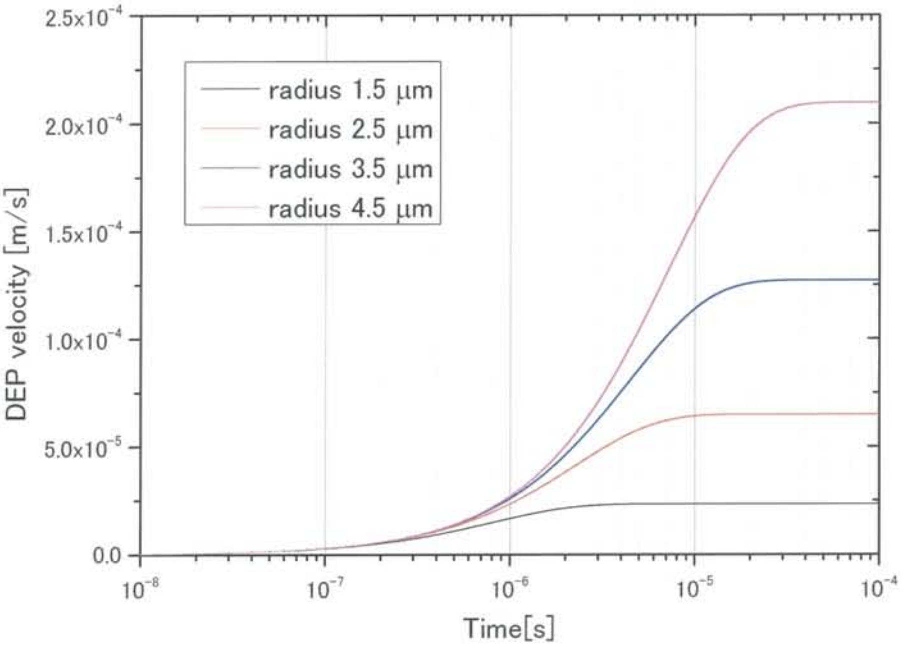


図 2.12: 誘電泳動速度と経過時間

2.4.5 誘電泳動速度計測における動摩擦力の影響

本計測条件下において，酵母は電極上を滑るように泳動するため，粒子に生じる動摩擦力が誘電泳動速度に及ぼす影響を考慮する必要がある．従って，本節では，前述した摩擦力による誘電泳動速度の補正値を精査する．式 (2.28) より，補正値は垂直抗力及び動摩擦係数に依存する．補正値を求めるために，まず，電極表面上の粒子に働く垂直抗力 N を導出した．解析に用いたパラメータを表 2.3 に示す．なお，電界強度及び二乗電界勾配 ∇E^2 について，電極表面上 2 μm かつ電極端より 50 μm の位置における電界強度分布シミュレーションの計算値を用いた（図 2.8(b) 参照）．垂直抗力 N の大きさは，電極表面に対して垂直方向に働く正味の重力 F_{G}，誘電泳動力 $F_{\mathrm{DEP,z}}$ 及び電気鏡像力 F_{ij} の大きさの和と等価である．それぞれの力は次式のように求められる．

$$F_G = F_g - F_b = \frac{4\pi r^3(\rho_p - \rho_m)}{3} g = 2.85 \times 10^{-13}[\mathrm{N}] \tag{2.30}$$

$$F_{\mathrm{DEP,z}} = (p \cdot \nabla E_{eff}) = \frac{\alpha}{2}\nabla E^2 = 2\pi\epsilon_{\mathrm{m}} r^3 \mathrm{Re}\,[K(\omega)^*]\,\nabla E^2 = 2.96 \times 10^{-13}[\mathrm{N}] \tag{2.31}$$

$$F_{ij} = \frac{3}{4\pi\epsilon_m\epsilon_0}\{p^2\frac{\vec{r_{ij}}}{r_{ij}^5} - 5(\vec{P}\cdot\vec{r_{ij}})^2\frac{\vec{r_{ij}}}{r_{ij}^7} + 2(\vec{P}\cdot\vec{r_{ij}})\frac{\vec{P}}{r_{ij}^5}\} = 1.97 \times 10^{-11}[\mathrm{N}] \tag{2.32}$$

上記結果から，垂直抗力は次式のようになる．

$$N = F_{\mathrm{DEP,z}} + F_{\mathrm{G}} + F_{ij} = 2.03 \times 10^{-11}[\mathrm{N}] \tag{2.33}$$

次に本計測条件下における動摩擦係数を求める．式 (2.26) を変形をすると，動摩擦係数は，式 (2.34) のように表せる．ここで，未知数は v_{DEP} 及び Re $[K(\omega)^*]$ である．v_{DEP} として，100 kHz における未処理時の酵母速度の実測値である 48 μm/s を用いた．また Re $[K(\omega)^*]$ については，酵母の等価誘電体モデルによる数値計算から求めた．本結果より，100 kHz における未処理酵母の Re $[K(\omega)^*]$ は 0.8 となった．本モデルの詳細は 6 章で述べる．

$$\mu' = \frac{2\pi r^3\epsilon_m|\nabla E^2|\mathrm{Re}\,[K(\omega)^*]}{N} - \frac{6\pi r\eta}{N}v_{\mathrm{DEP}} \tag{2.34}$$

以上より，本計測条件下における酵母と電極表面の動摩擦係数 μ' は 0.03 となった．従って，式 (2.28) より，摩擦力による誘電泳動速度の補正値は 14.5 μm/s，Re $[K(\omega)^*]$ の補正値は 0.185 となる．本節以降の計測では，補正値としてこの値を用いた．

表 2.3: 摩擦力による補正値の解析におけるパラメータ

property	SI unit	Condition
r	m	2.50×10^{-6}
$\mathrm{d_p}$ [22]	$\mathrm{kg/m^3}$	$1.44{\times}10^{3}$
$\mathrm{d_m}$	$\mathrm{kg/m^3}$	996
ϵ_{m}		78.3
σ_{m}	S/m	$2.00{\times}10^{-4}$
η	F/m	$8.85{\times}10^{-12}$
g	$\mathrm{m/s^2}$	9.81
$\mathrm{E_{norm}}$	V/m	3.87×10^{4}
$(\nabla E^2)_x$	$\mathrm{V^2/m^3}$	4.99×10^{13}
$(\nabla E^2)_z$	$\mathrm{V^2/m^3}$	5.43×10^{12}
$\mathrm{F_{DEP,X}}$	N	2.71×10^{-12}
$\mathrm{F_{DEP,Z}}$	N	2.96×10^{-13}

参考文献

[1] H. A. Pohl: "Dielectrophoresis", Cambridge Univ. Press, New York (1978)

[2] 静電気学会: 「静電気ハンドブック」, オーム社 (1998)

[3] T. B. Jones: "Electromechanics of Particle", Cambridge Univ. press, New York (1995)

[4] H. A. Pohl: "The motion and precipitation of suspensoids in divergent electric fields", J. Appl. Phys, Vol. 22, No. 7, pp. 869-871 (1951)

[5] 東京理科大学 WEB サイト: http://www.rs.noda.tus.ac.jp/furuelab/introduction/b-unkyoku.html (2016/1/13 アクセス)

[6] Personal Notebook of Petit Science WEB サイト: http://hr-inoue.net/zscience/topics/dielectric1/dielectric1.html (2016/1/28 アクセス)

[7] 株式会社マイクロテック・ニチオン WEB サイト: http://nition.com/product (2016/1/22 アクセス)

[8] D. Li: "Electrokineticks in Microfluidics", Academic Press (2004)

[9] 吉澤徴: 「流体力学」, 東京大学出版会 (2001)

[10] 川村哲也: 「基礎からの流体力学」, 山海堂 (2006)

[11] 藤川重雄, 武田靖, 矢野猛, 村井祐一: 「工学の基礎　流体力学」, 培風館 (2005)

[12] 埼玉工業大学 WEB サイト: http://www.sit.ac.jp/user/konishi/JPN/ (2016/1/8 アクセス)

[13] 日本画像学会編: 「電子ペーパー (シリーズ「デジタルプリンタ技術」)」, 東京電機大学出版局 (2008)

[14] 東京理科大学 WEB サイト: http://www.rs.tus.ac.jp/nikuni/elemag/elemagnotes2.pdf (2015/12/29 アクセス)

[15] 小林敏夫: 「数値流体力学ハンドブック」, 丸膳 (2003)

[16] 米澤岳志: 「ビール, ウイスキー発酵の誘電計測によるオンラインモニタリング」, 生物工学, Vol. 78, No. 5, pp. 152-155 (2000)

[17] K. Asami and T. Yonezawa : "Dielectric analysis of yeast cell growth", Biochim. Biophys. Acta., Vol. 1245, No. 1, pp. 99-105 (1995)

[18] K. Asami, T. Hanai, and N. Koizumi: "Dielectric Properties of Yeast Cells", J. Membrane Biol., Vol. 28, No. 1, pp. 169-180 (1976)

[19] 小嶋幸次・米沢岳志：「種類発酵における酵母の状態変化の誘電計測」，日本農芸化学会誌，Vol. 70，No. 6, pp. 687-690 (1996)

[20] 西村僚太: 「平成 22 年度首都大学東京電気電子工学専攻修士論文」, (2011)

[21] 高澤晋: 「平成 25 年度首都大学東京電気電子工学専攻修士論文」, (2014)

[22] 柳田高志，藤本真司，佐賀清崇，美濃輪智朗：「バイオエタノール生産における酵母の培養およびエ タノール発酵のプロセスシミュレーションの検討」, (独) 産業技術総合研究所バイオマス研究センター（2010）

第3章　実験手法

本章では，本研究における実験条件，実験装置及び実験手法について説明する．実験条件として，対象菌種，菌懸濁液の調整方法及び対象菌へのストレス負荷として用いた加熱処理工程について記述する．また，実験装置として，誘電泳動速度計測装置の概略，誘電泳動マイクロデバイスの構成及びデバイス内の電極並びに流路の形状・材質について述べる．さらに，本研究で行った誘電泳動速度計測の具体的な手順について詳述し，蛍光染色による膜損傷及び膜輸送等の膜生理状態の評価法及びコロニーカウントによる生育活性の計測法について解説する．

3.1　実験条件

3.1.1　実験菌種及び特徴

本研究では，対象菌種を出芽酵母（*SaccharomycesCerevisiae*: *S. cerevisiae*）とした．酵母は，広義には生活環の大半における存在形態が単細胞である真菌類の総称である．狭義には産業利用及び研究材料として極めて有用な *Saccharomyces* 属酵母の一種である *SaccharomycesCerevisiae* を指す場合が多い [1]．一般的に，酵母は，粒子径 2 - 6 μm の球状構造を持つ菌であり，子嚢菌門（*Ascomycota*）に属する．古来より，ビールやワイン，清酒の醸造，あるいはパンの製造など多岐に渡るバイオ産業の発酵工程に用いられるなど，工業的に重要な役割を担ってきた [2] - [4]．一方，酵母の細胞内代謝やオルガネラの構造など基本的な生命現象にかかわる多くの事柄において，高等動植物と相同であることから，基礎生命科学研究のための重要なモデル生物としてもよく認識されている [5]．なお，酵母の至適生育温度は 288 - 303 K（15 - 30°C）程度といわれている．

酵母細胞の超薄切片画像を図 3.1 に示す．構造としては，最外殻に細胞壁があり，高分子多糖類であるグルカン及びマンナンを主成分とする．細胞壁の主な役割は，防御，改築・補強，物質補給，細胞間連絡及び影響感知である．また，細胞壁の分子間隔は密ではないため，水・ナトリウムイオン・カリウムイオンなどを容易に通す．細胞壁の直下には細胞膜がある．主な構成要素はリン脂質であり，他にもタンパク質やそれに付随する多くの分子が存在する．図 3.2 は細胞膜の模式図であり，流動モザイクモデルと呼ばれる [6]．細胞膜は単に細胞内外を隔てている静的な構造体ではなく，流動性があり，選択的な透過性を持つ半透膜として振る舞う．具体的には，特異的なチャネルによるイオンなどの低分子の透過，受容体を介した細胞外からのシグナルの受け取り，細胞内への外部物質の輸送など，細胞にとって重要な機能を担っている．細胞膜に覆われた空間内部は細胞質と呼ばれる．細胞質内には核や小胞体，ゴルジ体，ミトコンドリアなど多くの器官が存在する [7]．

本研究では，*S. cerevisiae* の標準菌株として *S. cerevisiae* JCM7255 を採用した．

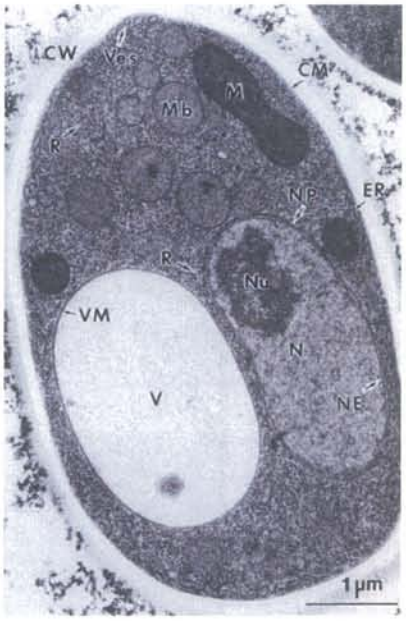


図 3.1: 酵母細胞の超薄切片像 [1]

（CM，細胞質；CW，細胞壁；ER，小胞体；G，ゴルジ体；M，ミトコンドリア；Mb，マイクロボディ；N，核；NE，核膜；NP，核膜孔；Nu，核小体；R，リボソーム；S，隔壁；V，液胞；Ves，分泌顆粒）

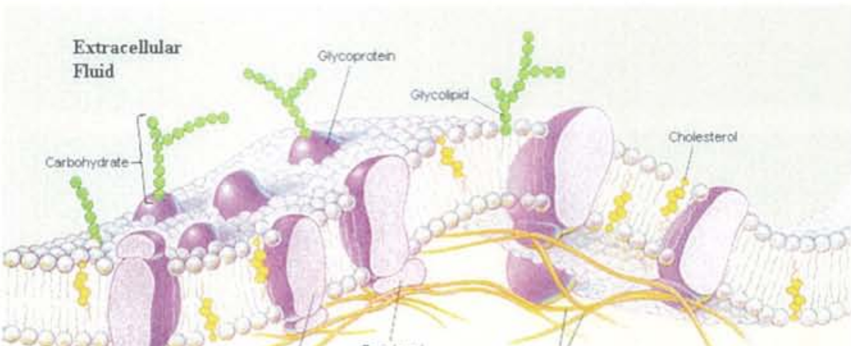


図 3.2: 細胞膜の模式図 [6]

3.1.2 菌懸濁液の調整方法

S. cerevisiae JCM7255 の培養において，培地としてポテトデキストロース寒天（Potato dextrose agar: PDA）培地（MERCK) を使用した．PDA 培地上に酵母を塗布し，28°C (301 K)，72 h の条件で増菌培養した．培養酵母を 0.15 M の滅菌済み D-マンニトール（D-mannitol：DM）溶液 1 mL に適量混和させた後，遠心分離（6000 rpm × 10 min）を施した．分離沈殿した酵母を同 DM 溶液で 2 回洗浄した．洗浄済み酵母を新たな DM 溶液に混和したものを懸濁原液とした．懸濁原液の菌濃度は分光光度計（UV mini 1240， 島津製作所）による吸光度特性から導出し， 2.0×10^6 CFU/mL に調整した．なお，DM 溶液及び懸濁液の導電率は，0.165±0.015 mS/m 及び 0.3±0.1 mS/m であった．

3.1.3 加熱処理工程

生物細胞の代謝状態は，様々な環境ストレスにより変化することが報告されている [7] - [9]．具体的なストレス因子として，熱，酸化，低酸素，浸透圧及び UV 照射などが挙げられる．本研究で用いる酵母において，これらのストレスを負荷することにより，菌体の代謝活性を調整することが可能であると考えられる．そこで，本研究では，酵母に対する簡便なストレス負荷法として加熱処理を行った．処理手順を図 3.3 に示す．28°C で保管した懸濁原液 1.0 mL を滅菌済みスクリューチューブ (I-692S, AS ONE) に分取し，ウォーターバス (HWA-50D, AS ONE) による厳密な温度管理下で，5 min 加熱した．加熱処理温度は，28°C（301 K, 未処理），37°C（310 K），47°C（320 K），60°C（333 K）及び 80°C（353 K）とした．さらに，37°C の低温加熱については 30 min, 1 h 及び 2 h の処理を施した．測定時において，余熱による実質的な酵母の被熱時間変化を考慮し，処理済み懸濁液を 28°C の DM 溶液で 10 倍希釈した．なお，DM 溶液による希釈時の急冷によるストレスを除外するため，加熱処理後の懸濁液を 28°C のインキュベータ (MIR-153, SANYO) 内に 5 min 放置した．ただし，47°C の加熱処理については，余熱ストレスの影響を観測するため，放置時間を 0 min (急冷) , 5 min 及び 10 min と変化させて測定した．

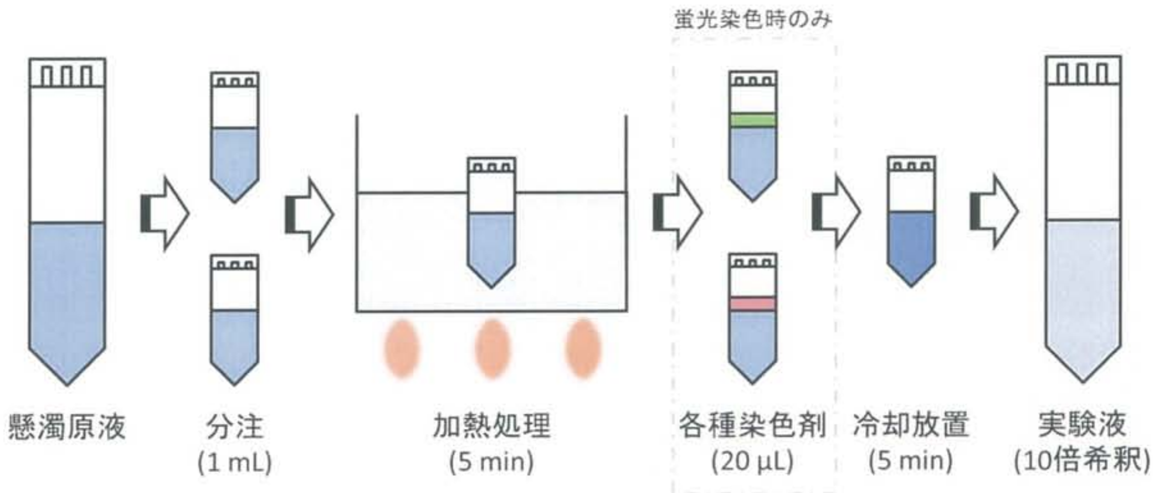


図 3.3: 加熱処理工程

3.2　実験装置

本実験で用いた誘電泳動速度計測装置を図 3.4 に示す．本装置は誘電泳動デバイスを中心に，電気回路系，媒質送液系及び光学計測系により構成されている．誘電泳動デバイス（以下，DEP デバイス）への電圧印加には，ファンクションジェネレータ (AFG3102, Tektronix) を使用し，出力電圧をオシロスコープ (TDS2024B, Tektronix) により連続測定した．また，DEP デバイス内への懸濁液送液には，極微量シリンジポンプ (KSP-111, KYOTO CHROMATO) を使用した．なお泳動濃縮による初期菌濃度変化の影響を除外するため，送液路は循環型ではなく，通過型を採用した．DEP デバイス上における酵母の泳動挙動を撮影するため，光学顕微鏡 (LV100D-U, Nikon)，高速度 CCD カメラ (IGK-0613, DITECT) 及び画像解析用パーソナルコンピュータを設置した．計測時には菌挙動部へ焦点が合うように調整した．

本実験で用いた DEP デバイスを図 3.5 に示す．本デバイスは，電極基板，マイクロ流路及びデバイスホルダからなる．電極基板は 60 mm (L) × 20 mm (W) × 1.0 mm(T) の石英ガラス製である．電極には厚さ 100 nm の酸化インジウムスズ (Indium Tin Oxide: ITO) 薄膜を，電極基板に間隔 20 μm で蒸着形成したものを使用した．また，電極表面には，絶縁層として厚さ 300 nm の二酸化ケイ素 (SiO_2) を成膜した．電極構造の詳細を図 3.6 に示す．なお，各数値の単位は mm である．実際の計測においては，図 3.6 中の点線枠で示す領域のみを用いた．流路としては，内部に 55 mm (L) × 2.4 mm (W) × 0.5 mm (T) の空間を形成した軟性ポリジメチルシロキサン (Polydimethylsiloxane: PDMS) 製の流路カバーを採用した．PDMS には自己吸着性があるため，電極基板と PDMS カバーの間に液体試料が封入される．

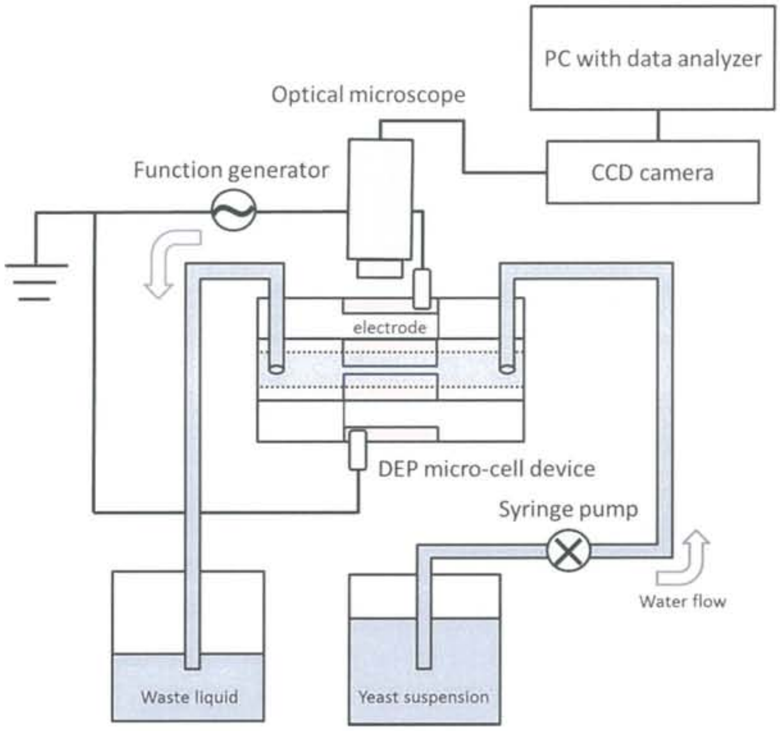


図 3.4: 誘電泳動速度計測装置の概略図

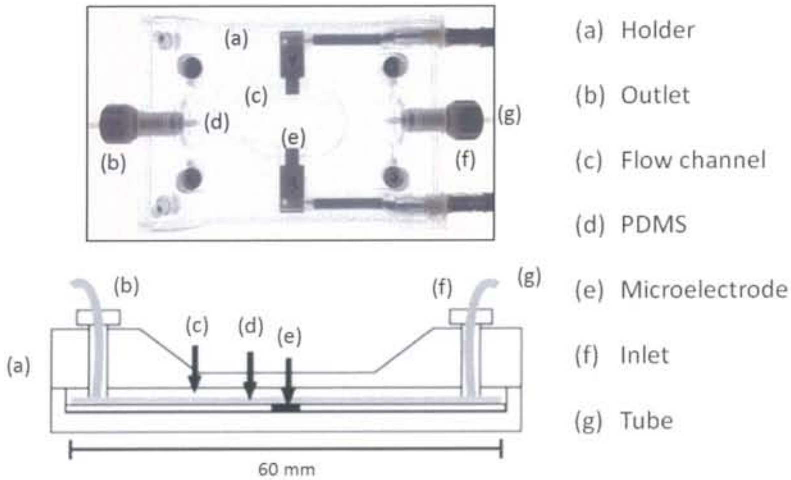


図 3.5: 誘電移動マイクロデバイス

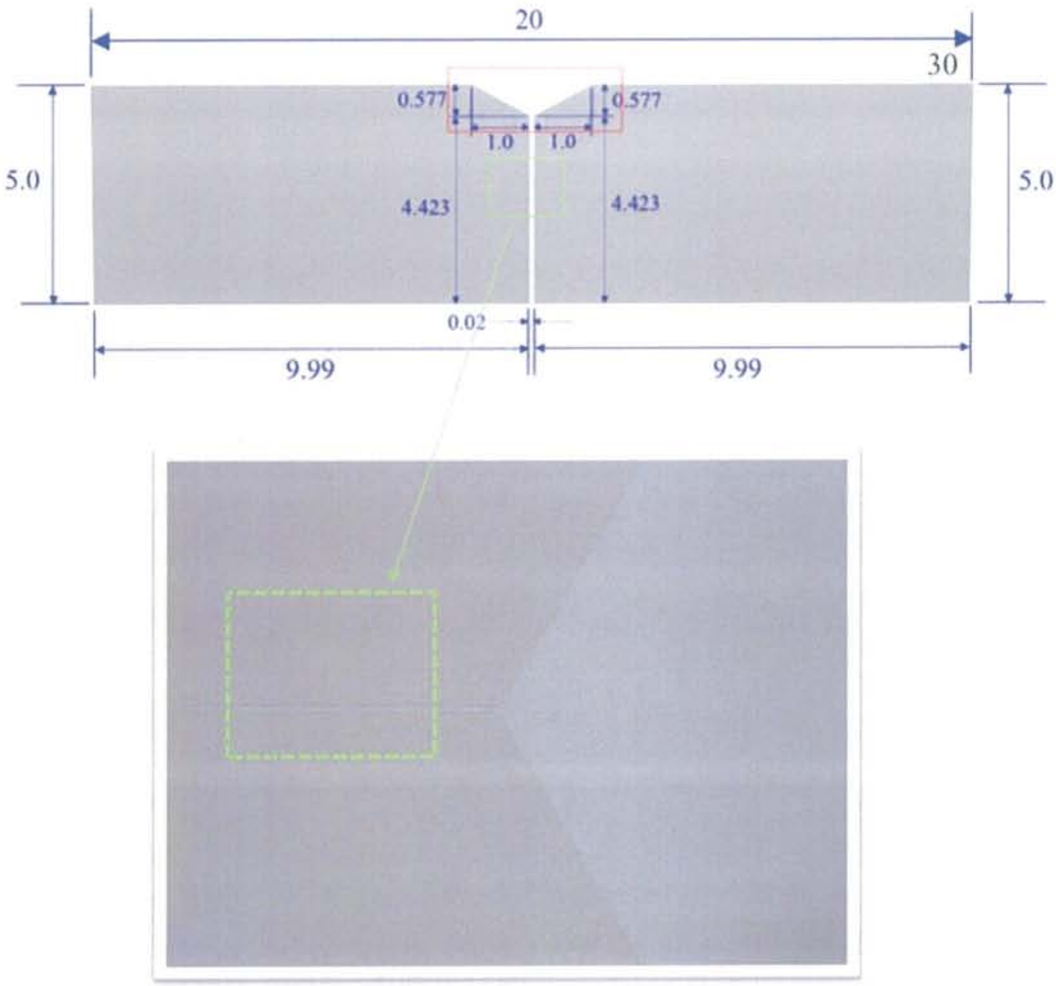


図 3.6: 電極設計図と拡大写真

3.3 実験方法

3.3.1 誘電泳動速度計測

誘電泳動速度計測の実験手順を図 3.7 に示す．まず加熱処理を施した酵母懸濁液を DEP デバイス内に通流し，流路を充満させた（図 3.7①参照）．次に通流を止め，顕微鏡レンズの焦点を流路底面に合わせた後，酵母が電極上に降着するのを確認した（図 3.7②参照）．実際の顕微鏡画像を図 3.8 に示す．図中下端の薄灰色部が電極ギャップであり，酵母は図中灰色部の電極領域上に分布している．ファンクションジェネレータを用いて電圧を印加すると，酵母は電極上を滑る様に電極端へ向けて泳動する（図 3.7③参照）．

実験においては，印加電圧を振幅 20 $V_{\mathrm{p-p}}$ の正弦波電圧とし，周波数を 50 kHz - 10 MHz の範囲で変動させた．酵母の泳動挙動は CCD カメラを用いて連続撮影した．撮影後，酵母の DEP 軌跡を画像解析ソフトウェア（DIPP Motion PRO 2.2, DITECT）により計測した．

図 3.9(a) は本解析ソフトウェアによって得られた酵母の DEP 軌跡である．本実験では，一つの撮影動画から 3-4 サンプル程度の DEP 軌跡を計測することができる．図 3.9(a) により得られた DEP 軌跡を，電極端からの距離及び時間に関してグラフ化したものを図 3.9(b) に示す．電極端より 55 μm の位置から電極ギャップ方向へ 10 μm 移動する際に掛かった時間を計測し，DEP 速度を導出した（図 3.7④参照）．図 3.9(b) において，電極端を解析時の基準点としているため，電極端からの距離はマイナス値として表示されている．前章で示したとおり，本計測法において，DEP 速度は電圧印加開始時の酵母位置には依存しない．しかしながら，酵母の初期位置が電極端から 45 μm より近い場合，DEP 速度が CCD カメラの分解能以上の値になるため，泳動挙動を連続撮影できなかった．故に，本実験では，DEP 速度の計測範囲を電極端上 45 μm - 55 μm の位置とした．なお，各処理条件に対して 10 サンプルの平均値を取り，同様の独立した実験工程を 3 回以上繰り返して再現性を確認した．各実験工程で得られた計測速度の平均値を最終的な誘電泳動速度とした．

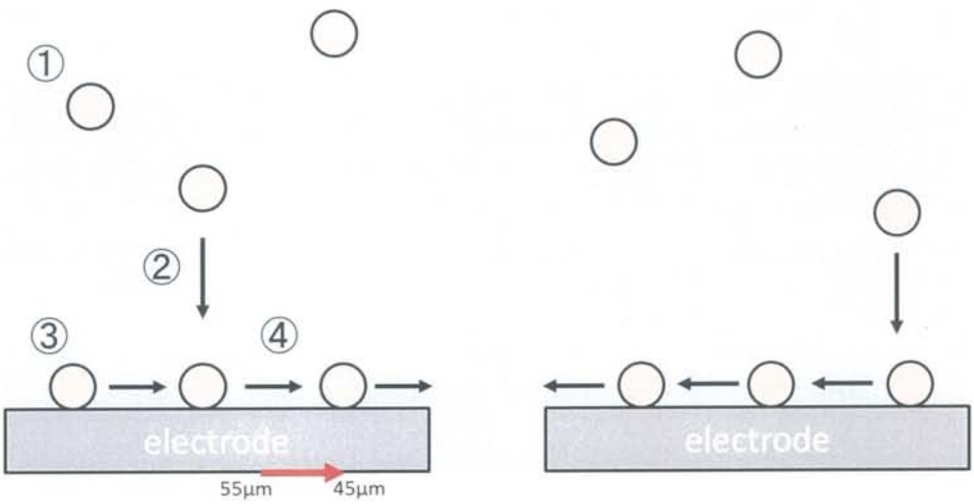


図 3.7: DEP 速度の計測手順

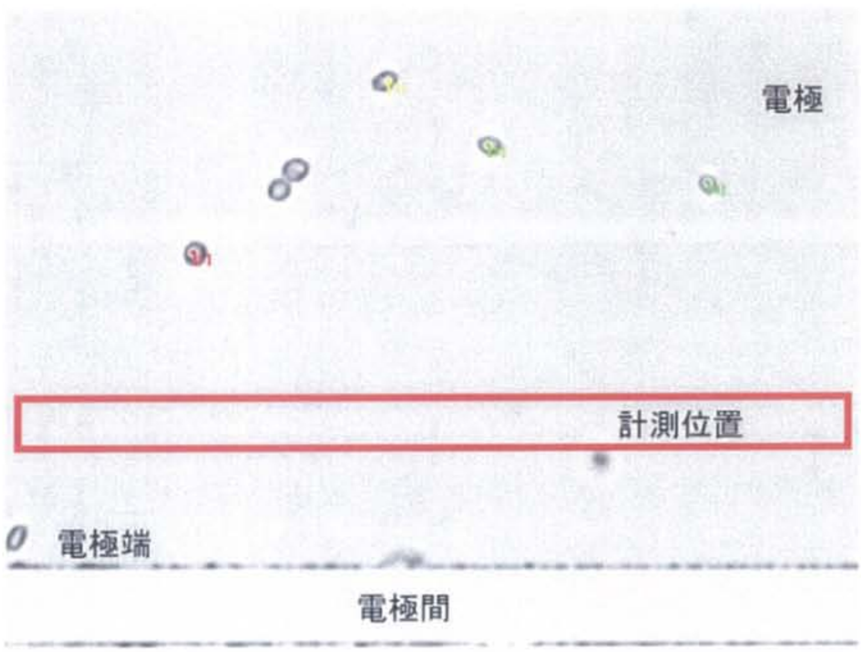
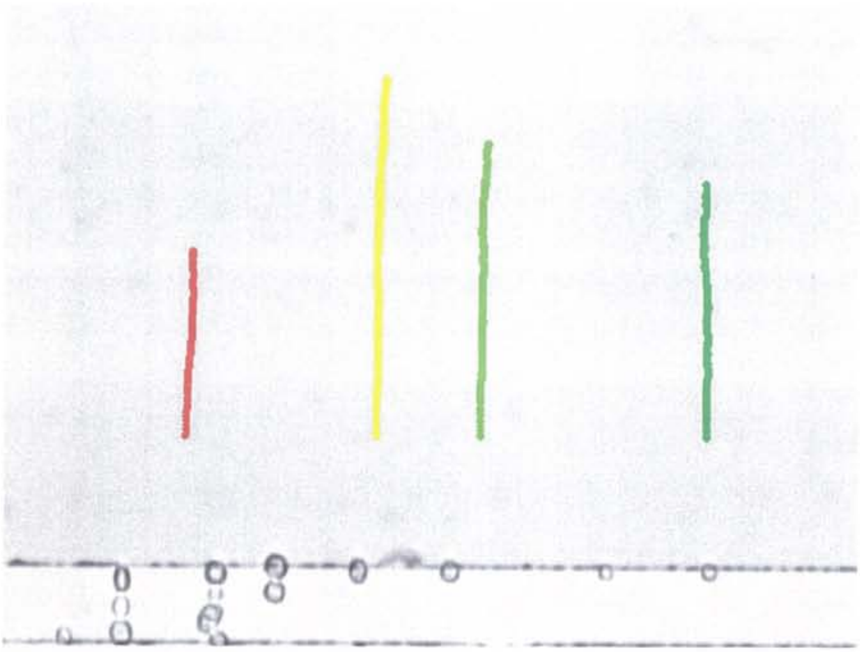
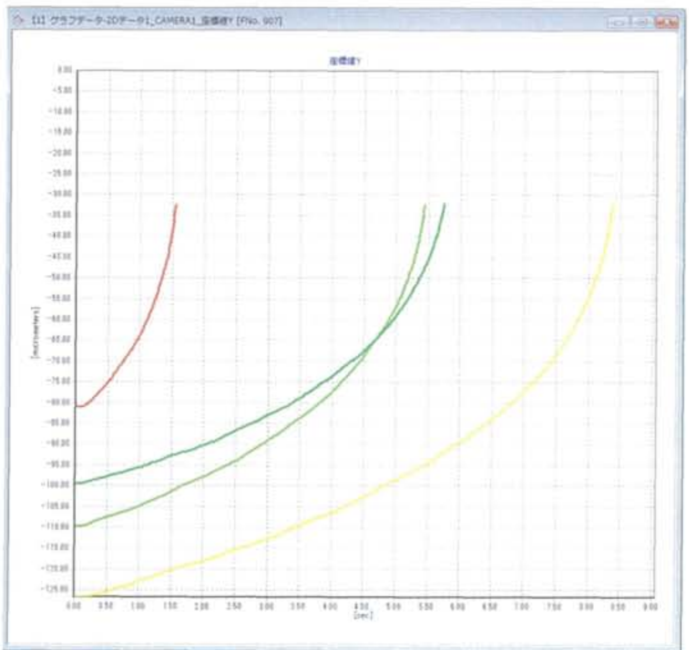


図 3.8: 顕微鏡画像



(a) 酵母の誘電泳動軌跡



(b) 位置特性

図 3.9: 解析時の画像例

3.3.2　蛍光染色による膜生理状態計測

菌体の生化学的評価法として，LIVE/DEAD® 染色キット（L13152, Invitrogen）を用いて菌染色を行った．本キットは，propidium iodide（PI, $C_{27}H_{34}I_2N_4$）及び SYTO®9（以下，Syto9）の核酸染色剤からなる．PI は膜透過性がなく，赤色蛍光を示す．一方，Syto9 は膜透過性があり，緑色蛍光を呈する．一般には，これらの染色剤を同時に使用することで生死菌判別を行う [10]．本キットによる生死菌判別の原理を図 3.10 に示す．菌に膜損傷がない場合，膜透過性のある Syto9 のみが菌体内部に取り込まれ，核酸が緑染色される．膜損傷がある場合，膜透過性のない PI も菌体内部に同時に取り込まれ，核酸が橙色または赤色の蛍光を発する．本実験では，2 つの試薬の蛍光スペクトル強度を個別に測定し，その膜透過特性の違いから菌体の膜生理状態を推定した．

具体的な手順としては，分注した懸濁液 1 mL に加熱処理を 5 min 施した後，染色剤を 20 μL 加え，遮光した 28°C の暗室で 5 min 放置した．その後，マイクロプレートリーダー (Microplate Reader: MPR, SH-9000, 日立ハイテクサイエンス) を用いて，各波長の蛍光スペクトル強度を測定した．測定結果の一例を図 3.11 に示す．PI 及び Syto9 の蛍光色に対応した特定波長（PI: 620 - 650 nm, Syto9: 510 - 540 nm）における蛍光スペクトル強度の積算値（以下，PI 強度及び Syto9 強度と表記）を，それぞれの試薬による最終的な蛍光強度とした．

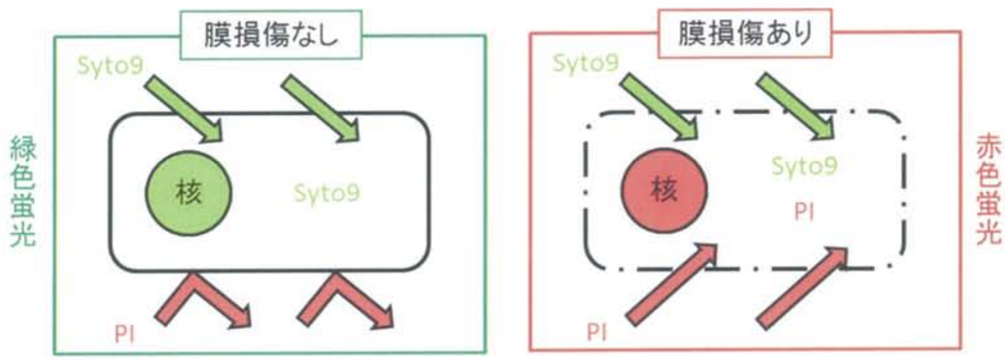
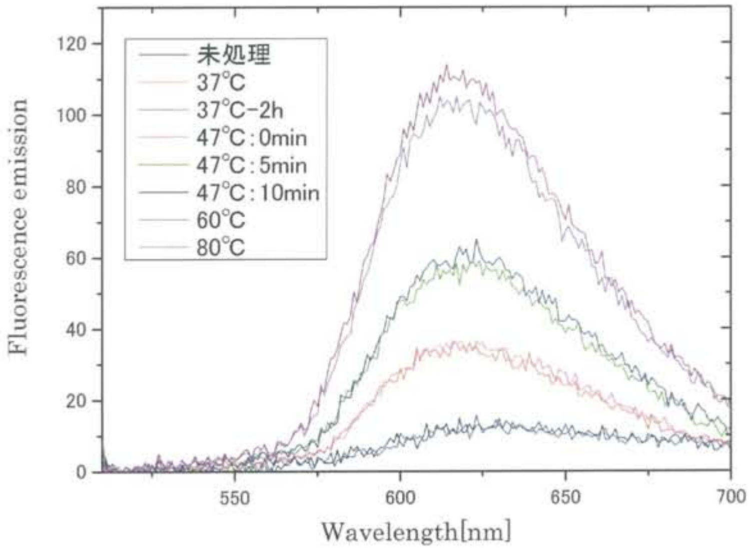
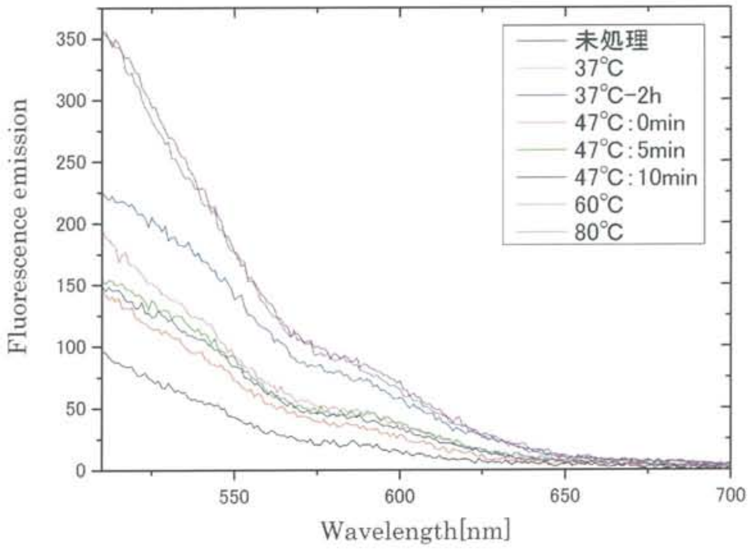


図 3.10: 染色過程模式図



(a) 蛍光スペクトル強度: PI



(b) 蛍光スペクトル強度: Syto9

図 3.11: 蛍光スペクトル強度の画像例

3.3.3 コロニーカウント計測法による生育活性計測

一般的に，培地上の微生物 1 単体は，35°C 程度の生育が可能な温度環境下において一日程度培養すると，10^8 個まで増殖される．本増菌によって，寒天培地では集落（コロニー）が形成され，肉眼での判定が可能となる [11]．寒天培地を用いて形成コロニー数を計測する手法を，コロニーカウント計測法という．単位としては，ある一定の培養条件において 1 つのコロニーを形成する最小菌単位（Colony Forming Unit: CFU）を用いる．すなわち，1 CFU は少なくとも 1 つの生菌から形成されたことを意味する．以上より，コロニーカウント計測法では，分裂増殖しコロニーを形成した細胞は，生細胞であると判断することができる．しかしながら，培地の種類や菌体の状態によっては生細胞であっても増殖及びコロニー形成が困難な場合がある．故に，本結果から生菌の存在を完全に否定することはできず，いわゆる偽陰性となる [12]．このように、細胞が生きてはいるが培養することはできない状態を VNC（viable but non-culturable）と呼ぶ．つまりコロニーカウント計測法は，検体中に存在する菌体の生育活性の有無を評価するための手法に過ぎず，コロニー形成の元となる菌体の厳密な生死判別や代謝状態の詳細な検証を行うことは困難である [13]．ただし，生育活性を有する菌体においては，一定時間培養後に形成されるコロニー数の差異から，菌体の生育活性の大小を簡易的に推定することが可能であると考えられる．

本実験では，加熱処理による酵母の生育活性変化量を調査するため，直接塗布法によって平板培地表面上にコロニーを形成し，その数から菌体の生育活性を計測した．具体的な手順としては，加熱処理済みの懸濁液を計測に適した濃度 (2.0×10^3 CFU/mL) に希釈し，PDA 培地上に 10 μL ずつ塗布した後，28°C で 72 h 増菌培養した．その後，培地表面に生じたコロニー数を計測した．計測したコロニー数に希釈倍率を掛けた値を，元の懸濁液における生育活性を有する菌（生菌）数として導出した．各処理条件に対して 3 サンプルの平均値を取り，独立した測定を 3 回行って再現性を確認した．

PDA 培地による酵母の生育例を図 3.12 に示す．加熱処理条件によって，形成コロニーの大きさや数が変化することがわかる．

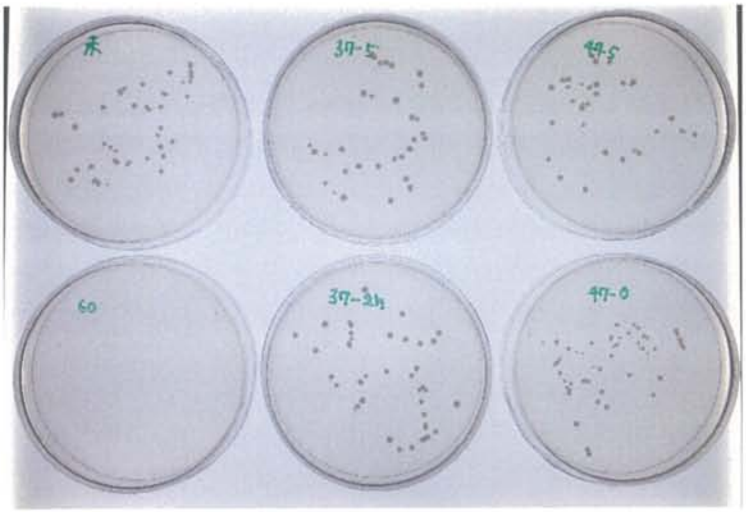


図 3.12: PDA 培地による酵母（JCM 7255）の生育例

参考文献

[1] 五十君靜信・江崎孝行・高鳥浩介・土戸哲明：「微生物の簡易迅速検査法」，テクノシステム（2013）

[2] P. V. Attfield,: "Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast", Nat. Biotechnol,Vol. 15, No. 13, pp. 1351-1357 (1997).

[3] Randez-Gil, F., Sanz, P. and Prieto, J. A.: "Engineering baker's yeast: room for improvement", Trends Biotechnol, Vol. 17, No. 6, pp. 237-244 (1999)

[4] 島純: 「環境ストレス耐性：酵母の発酵生産における重要特性」, 日本食品微生物学会雑誌, Vol. 22, No. 3, pp. 81-88（2004）

[5] 今中忠行: 「微生物利用の大展開」, エヌ・ティー・エス（2002）

[6] 東京医科歯科大学 WEB サイト: http://www.tmd.ac.jp/artsci/biol/textbook/cellm-emb.htm (2016/1/13 アクセス)

[7] 大隈良典・下田親：「酵母のすべて　系統，細胞から分子まで」，シュプリンガー・ジャパン（2007）

[8] N. Kedersha, S. Chen, N. Gilks, I. J. Miller, J. Stahl and P. Anderson: "Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNAiMet)-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules", Mol. Biol. Cell, Vol. 13, pp. 195-210（2002）

[9] N. Kedersha, G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. L. Andersen, M. J. Fritzler, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. E. Golan and P. Anderson: "Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling", J. Cell Biol., Vol. 169, pp. 871-884（2005）

[10] 同仁化学研究所 -DOJINDO-： http://www.dojindo.co.jp (2016/1/25 アクセス)

[11] 土戸哲明・松村吉信：「殺菌・静菌における"ストレスバイオテクノロジー"とその概念」，生物工学会誌, Vol. 77, No. 6, pp. 225-228（1999）

[12] 斉藤正行・丹波正治：「改訂基礎生化学」，講談社（1990）

[13] 円城寺隆治: 「平成 23 年度首都大学東京電気電子工学専攻学位論文」, (2012)

第4章　加熱処理酵母における誘電泳動速度と膜生理状態の相関検証

本章では，加熱処理により代謝状態の異なる酵母を実験的に調整し，処理温度及び時間に対する酵母群のDEP速度の周波数特性を精査した．特に，本論文では，酵母を低温（37 - 47°C）処理した際の，被熱ストレス時間に依存するDEP速度の変化を詳細に調査した．

4.1　誘電泳動速度の処理温度特性

図4.1及び4.2は，酵母を28°C（301 K, 未処理），37°C（310 K），47°C（320 K），60°C（333 K）及び80°C（353 K）で5 min加熱処理したときのDEP速度及びDEP速度から導出したRe $[K(\omega)^*]$ の周波数特性である．

全体的な傾向として，100 kHz帯にピークを持つ山形の周波数特性を示した．周波数に依らず，未処理時の酵母が一番高いDEP速度及びRe $[K(\omega)^*]$ を示し，処理温度が上昇するに従って値が低下した．特に，高温処理 (60 - 80°C) 時は，高周波数域 (1 - 10 MHz) において大幅なRe $[K(\omega)^*]$ の低下が見られた．47°C処理時は未処理時と比較して大きな差はなかったが，周波数100 kHz - 1 MHz帯でDEP速度及びRe $[K(\omega)^*]$ が僅かに低下した．

先行研究の結果 [1] との定量的な比較では，50 kHz以外の周波数帯で47°C処理時のDEP速度及びRe $[K(\omega)^*]$ が最も高い値となり，本結果とは異なる傾向を示した．一方，60°C及び80°Cにおいては同様の結果となった．

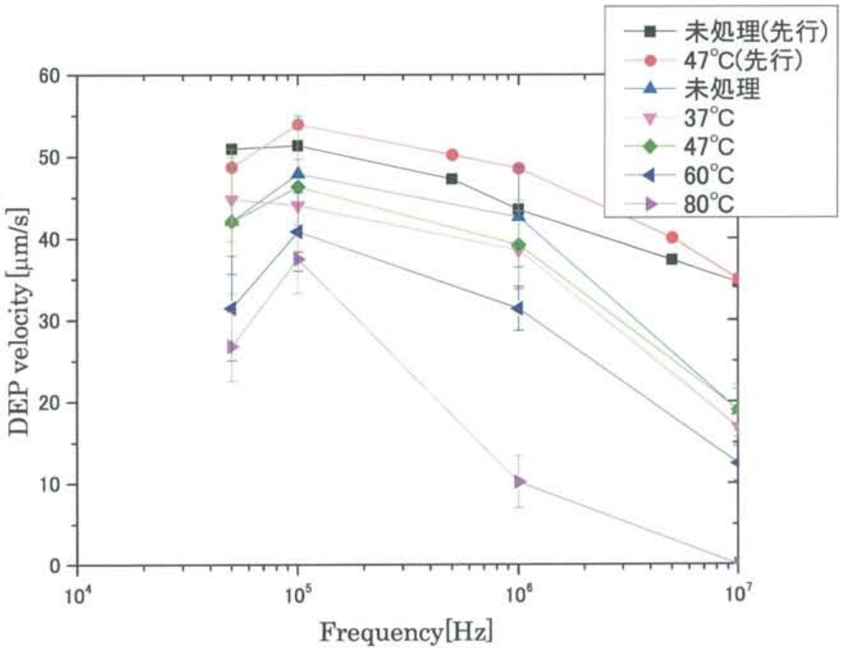


図 4.1: 各処理温度における誘電泳動速度の周波数特性

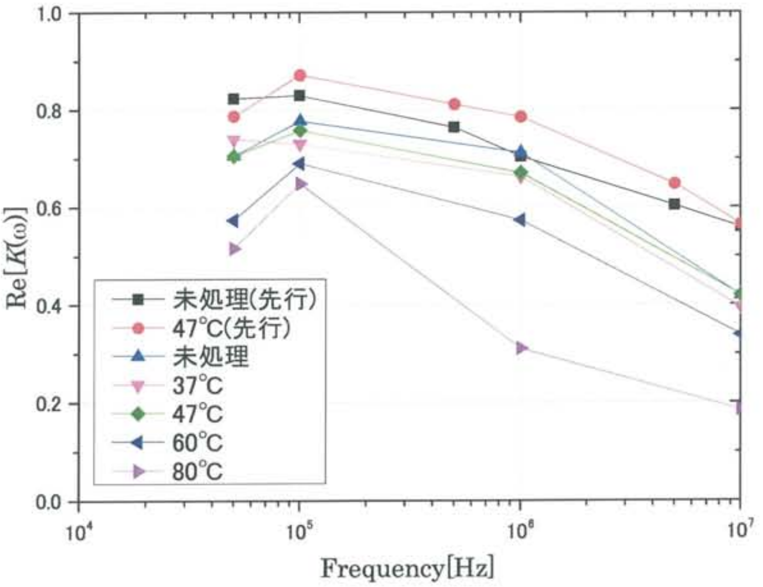


図 4.2: 各処理温度における Re $[K(\omega)^*]$ の周波数特性

4.2 放置時間特性

4.2.1 誘電泳動速度の放置時間特性

先行研究との DEP 速度傾向の相違について，高温処理時と比べて被熱ストレス量の少ない 47°C 処理酵母では，加熱処理工程（図 3.3 参照）における冷却放置時間中に生じる余熱ストレスの多寡が影響したものと推察される．そこで，放置時間を 0 min, 5 min 及び 10 min とした時の 47°C 処理酵母速度の周波数特性及び懸濁液の温度推移を調査した（図 4.3 及び 4.4 参照）．

最も余熱ストレスが小さい放置時間 0 min の DEP 速度が未処理時を上回り，放置時間の増加と共に速度は低下した．このことから，冷却放置時間内でのわずかな熱ストレスが DEP 速度特性に影響を与えることが分かる．放置時間により DEP 速度が変化する理由として，式 (2.26) における細胞の粒径変化もしくは細胞内部のイオン濃度に依存した細胞導電率の変化が挙げられる．今回，前出の光学顕微鏡による観察の範囲内では，処理温度及び放置時間による明確な細胞の粒径変化は観測されなかった．従って，放置時間による DEP 速度変化の主要因は，細胞内イオン濃度の変化によるものであると考えられる．

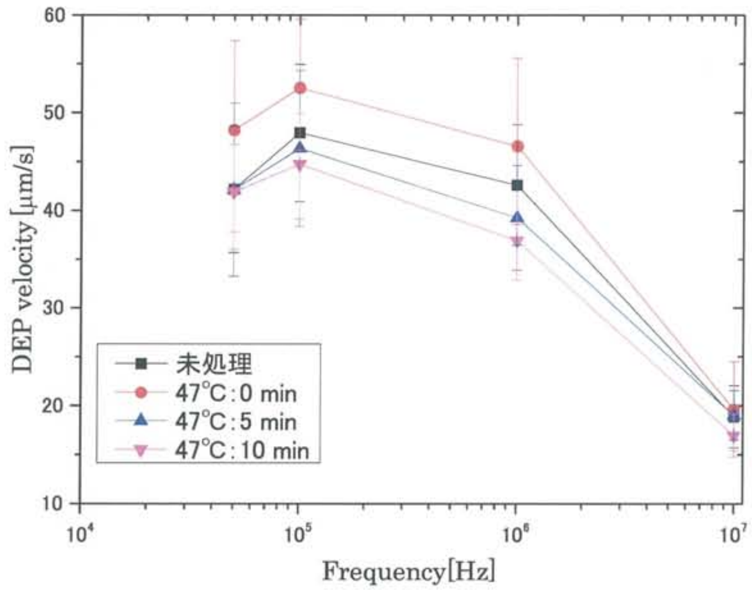


図 4.3: 47°C 処理酵母における誘電泳動速度の放置時間特性

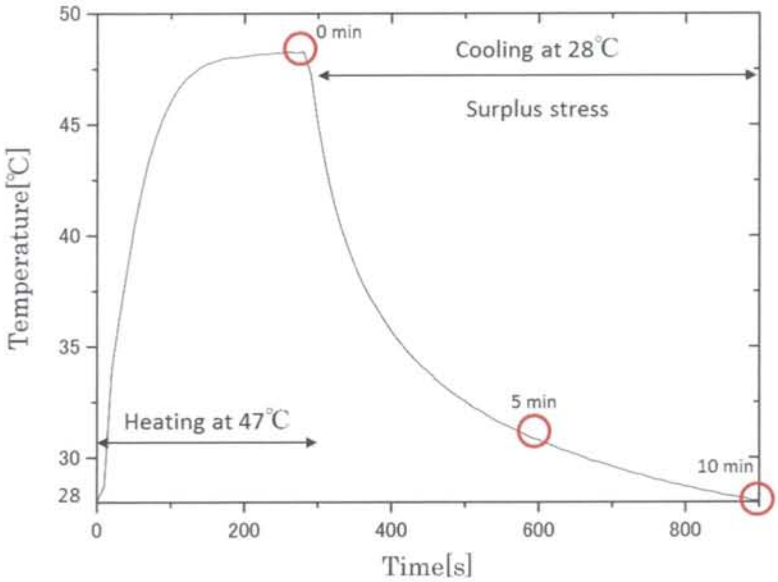


図 4.4: 懸濁液の温度推移

4.2.2 47°C 処理酵母における膜活性及び膜損傷度の放置時間特性

細胞内イオン濃度変化の要因を調査する上で，放置時間が膜損傷度及び膜輸送量の変化に及ぼす影響を確認するために，核酸染色剤 PI 及び Syto9 により蛍光標識した酵母の蛍光スペクトル強度を測定した．PI 及び Syto9 に対応した特定波長 (PI: 620 - 650 nm, Syto9: 510 - 540 nm) における蛍光スペクトル強度の積算値 (以下，PI 強度及び Syto9 強度と表記) の処理温度特性を求めた．

PI は膜透過性がないため，PI 強度は膜損傷の有無及び大小を示す．また，Syto9 強度は細胞内への染色剤浸透量と相関している．Syto9 浸透量の増減要因として，膜穿孔及び膜透過速度の大小が挙げられる．

図 4.5 に，5 min 処理酵母における PI 強度及び Syto9 強度の処理温度特性を示す．また，図 4.6 に PI 強度及び Syto9 強度の放置時間特性を示す．なお，縦軸は未処理時の蛍光強度に対する各処理条件における蛍光強度の比率を表す．処理温度の上昇に伴い，PI 強度は増加した．特に，高温処理（60 - 80°C）時は非常に高い蛍光強度を示した．これは，未処理時と比較して，高温処理（60 - 80°C）時は膜損傷が大きく，47°C 処理時は比較的軽微なためだと考えられる．また，60°C 及び 80°C 処理時は高い Syto9 強度を示した．高温処理時は未処理及び 47 °C 処理時に比べて膜損傷が大きく，穿孔による Syto9 流入量が多いためであると推察される．

47°C 処理では，放置時間の増加と共に PI 強度は上昇した．これは，放置時間 0 min での膜損傷が最も軽微であり，放置時間の増加に伴い膜損傷が大きくなることを意味する．従って，放置時間 0 min の DEP 速度が増加した理由として， 放置時間 0 min では細胞質に達する損傷は余り生じず，放置時間の増加と共に膜損傷が拡大し，細胞質に達する傷が増加したことが挙げられる．

また，放置時間の増加に伴い Syto9 強度が低下した．これは膜透過速度及び浸透量の関係から説明できる．放置時間 0 min では細胞内イオン濃度が高く，外部媒質との濃度勾配が大きい．そのため，膜透過速度も高くなる．放置時間が増加すると，細胞質に外部媒質の流入を許容する程度の損傷が生じる．そして，細胞内イオン濃度とともに膜透過速度が低下する．47 °C では膜損傷が比較的軽微であり，膜穿孔より膜透過速度が Syto9 浸透量変化の要因として支配的となる．以上の結果は，膜損傷度及び膜輸送に関連した代謝機能の変化が DEP 速度に反映された可能性を示している．

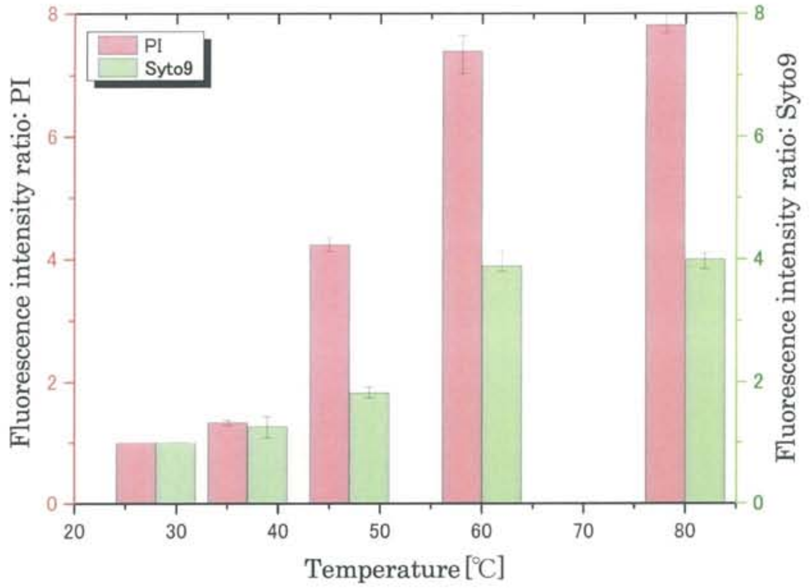


図 4.5: PI 及び Syto9 強度の処理温度特性

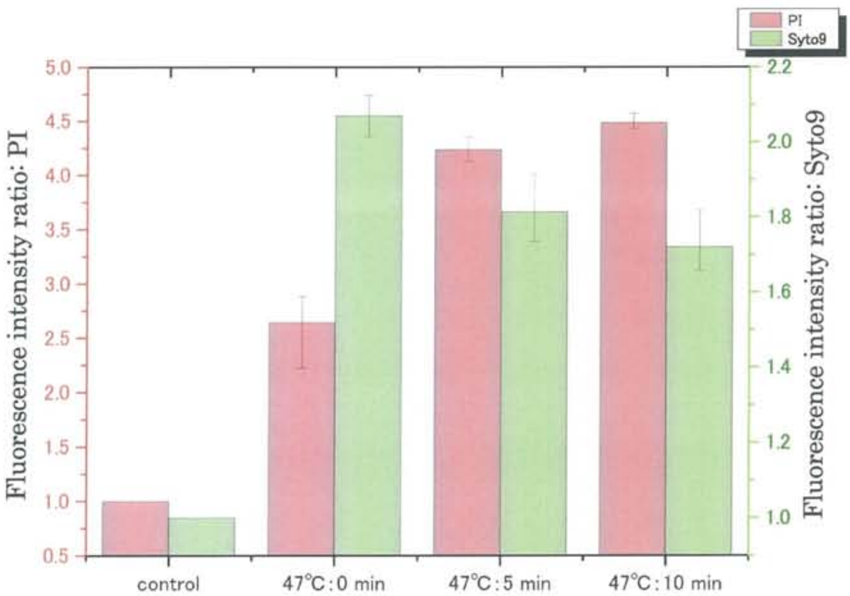


図 4.6: PI 及び Syto9 強度の放置時間特性

4.3 処理時間特性

4.3.1 誘電泳動速度の低温長時間処理特性

Jazwinski らは，酵母に亜致死性の熱ストレス（37°C 加熱）を長時間（2 h）与えると，酵母の寿命が未処理時と比較して約 10%延長することを報告している [2]．そこで，本小節では，亜致死性熱ストレスによる寿命延長と DEP 速度の関連性を確認するため，37°C で 2 h 処理 (以下 37°C2 h と表記) 及び， 他の処理温度同様 5 min 処理 (37°C5 min) した酵母の DEP 速度を測定した．また，5 min - 2 h 処理の間での DEP 速度の変化を調べるために，37°C で 30 min 処理 (37°C30 min) 及び 1 h 処理 (37°C1 h) した酵母の DEP 速度を測定した．図 4.7 に処理時間に対する DEP 速度の周波数特性を示す．寿命延長効果のある 37°C2 h 酵母の DEP 速度が未処理を上回り，寿命延長効果のない 37°C5 min 酵母の DEP 速度は未処理を下回った．また，処理時間の増加に伴い DEP 速度は上昇した．特に，低周波帯域 (50 - 100 kHz) で大きく変化した．1 MHz 帯では 37°C2 h 酵母の DEP 速度のみ未処理を上回り，処理時間の減少に伴い DEP 速度は減少した．

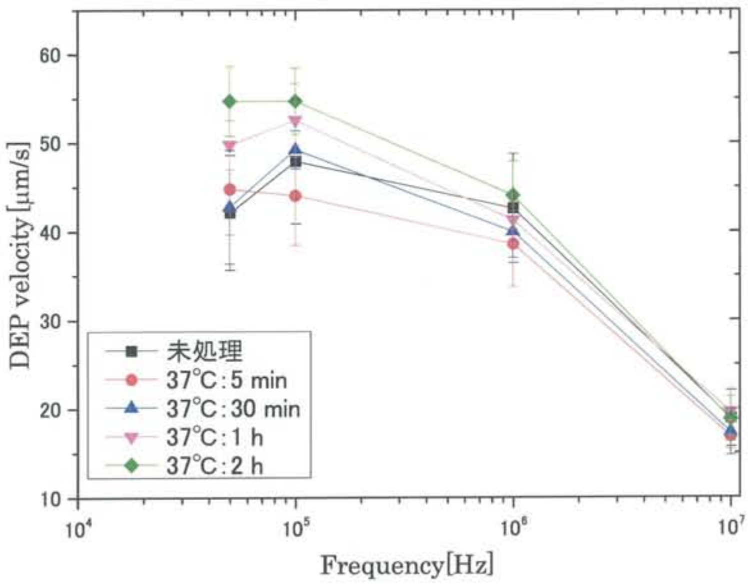


図 4.7: 37°C 処理酵母における誘電泳動速度の処理時間特性

4.3.2 37°C 処理酵母における膜活性及び膜損傷度の処理時間特性

酵母に低温長時間処理を施したときの，膜生理状態の変化を蛍光染色により検証した．図 4.8 に 37°C 処理酵母の PI 強度及び Syto9 強度の処理時間特性を示す．長時間処理により酵母の PI 強度は低下し，Syto9 強度は増加した．37°C2 h 酵母の PI 強度は未処理とほぼ同値であった．本結果から，37°C での長時間処理により酵母の膜損傷が徐々に修復し，2 h で未処理と同程度にまで膜状態が回復したことが分かる．また，時間経過とともに膜損傷が修復するにも関わらず Syto9 強度は上昇していることから，長時間処理に伴い酵母の膜機能が活性化することが言える．

本結果は，熱による酵母寿命変化に関連した膜機能と DEP 速度の相関を示している．酵母の寿命は，細胞分裂の回数に依存するものである．すなわち，DEP 速度と寿命もしくはそれに伴う細胞機構は相関を示し，酵母における同化代謝 (細胞分裂) 評価への適用可能性も示す．また，1 MHz 帯での DEP 速度が PI 強度 (膜損傷度) との相関をより正確に反映していることから，速度計測の際の周波数帯域を調整することで，DEP 速度計測による膜損傷及び菌代謝等の診断精度の向上にも期待が持てる．

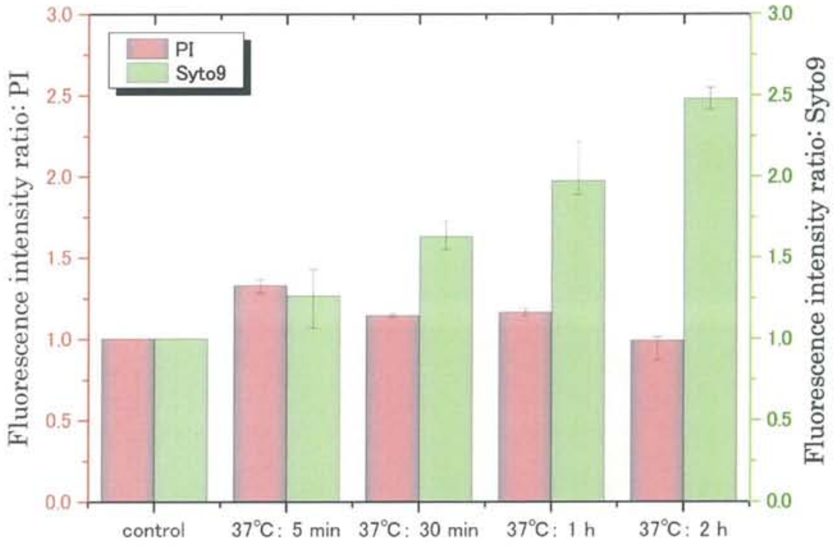


図 4.8: PI 及び Syto9 強度の処理時間特性

4.4 走査型電子顕微鏡による細胞表面の損傷評価

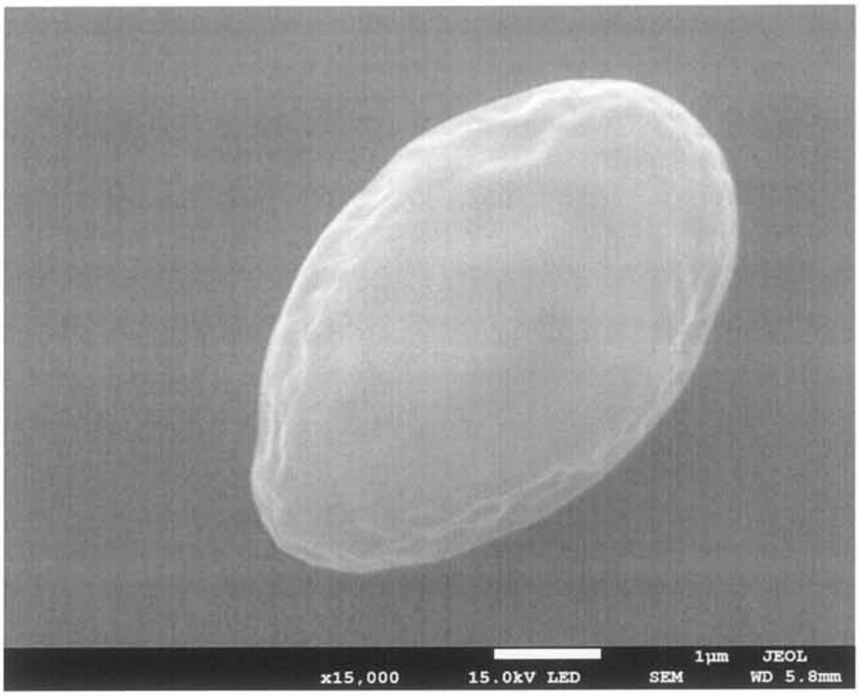
本節では，4.2 及び 4.3 節の蛍光染色法による膜損傷評価の妥当性を確認するために，走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope: SEM）を用いて各処理を施した酵母細胞における表面状態の変化を視覚的に確認した．

4.4.1 細胞表面の処理温度依存性

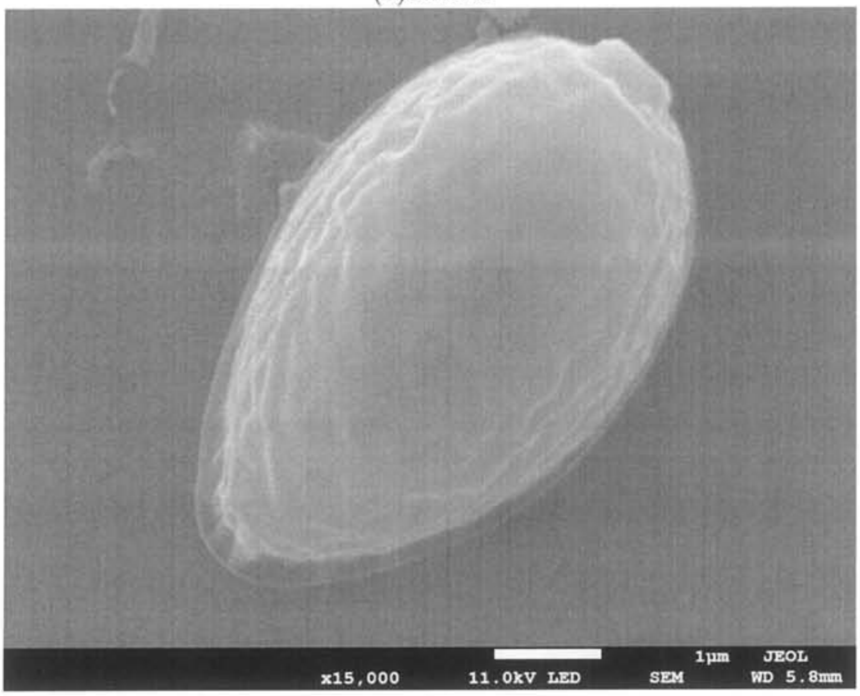
酵母に対する 5 min の加熱処理によって，細胞表面にしわやくぼみが生じた（図 4.9 参照）．このしわやくぼみが膜損傷であると考えられる．特に，高温処理時（60 - 80°C）における損傷が顕著であり，処理温度の上昇に伴って細胞表面の損傷が進行している様子が確認できる．なお，28 - 80°C での 5 min 加熱による酵母細胞の顕著な粒径変化は見られなかった．

4.4.2 細胞表面の処理時間依存性

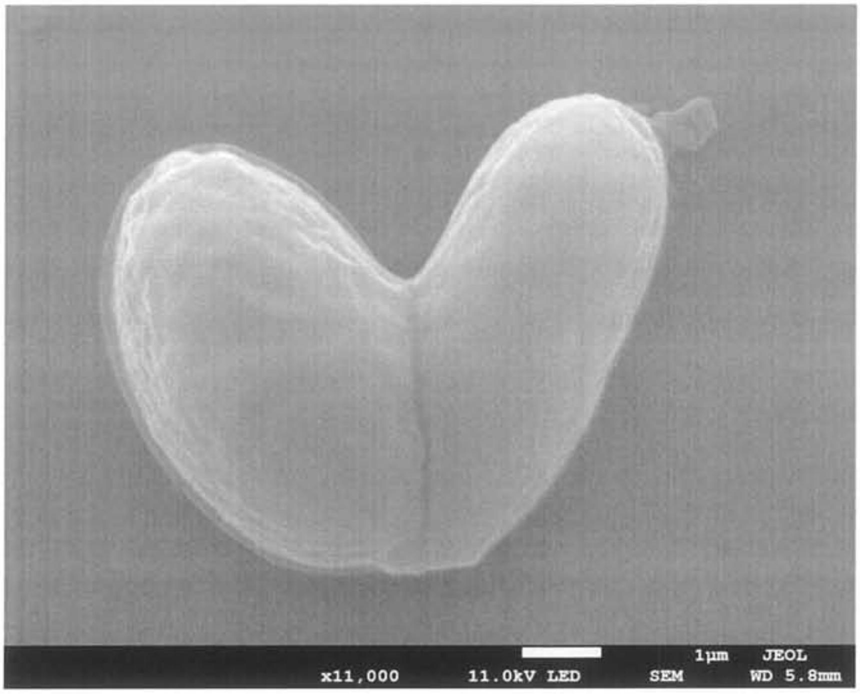
酵母に対する 37°C の短時間（5 min）処理によって，細胞表面にしわが生じた（図 4.9(b) 参照）．一方，長時間処理では損傷はほとんど生じなかった（図 4.9(c) 参照）．本結果は，37°C の長時間処理による膜修復作用の誘起を示唆するものである．しかしながら，本結果はあくまで視覚情報のみによる評価であるため，本推察の確証には 4.2 及び 4.3 節の蛍光染色法やその他の手法による更なる検証が必要となる．



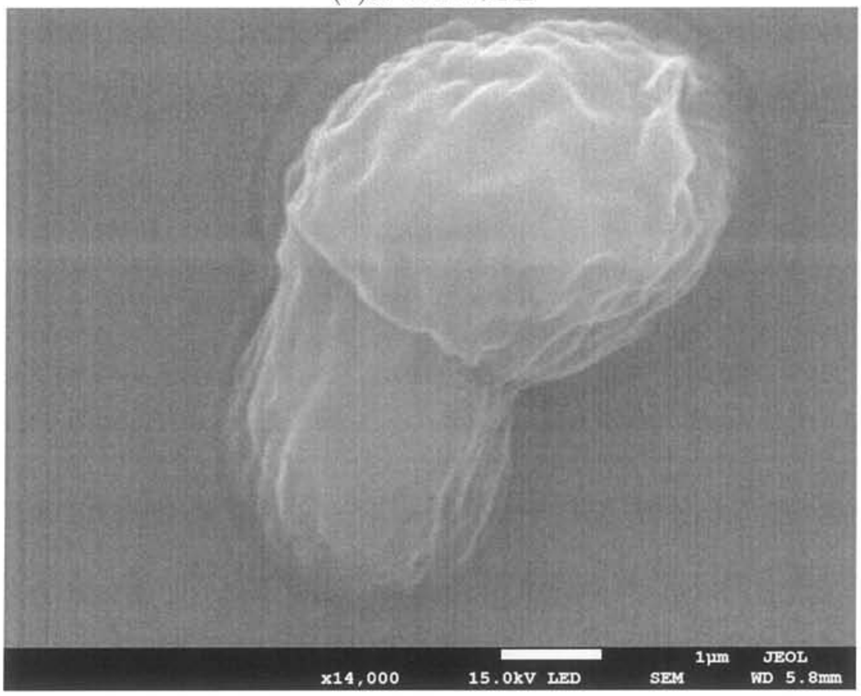
(a)control



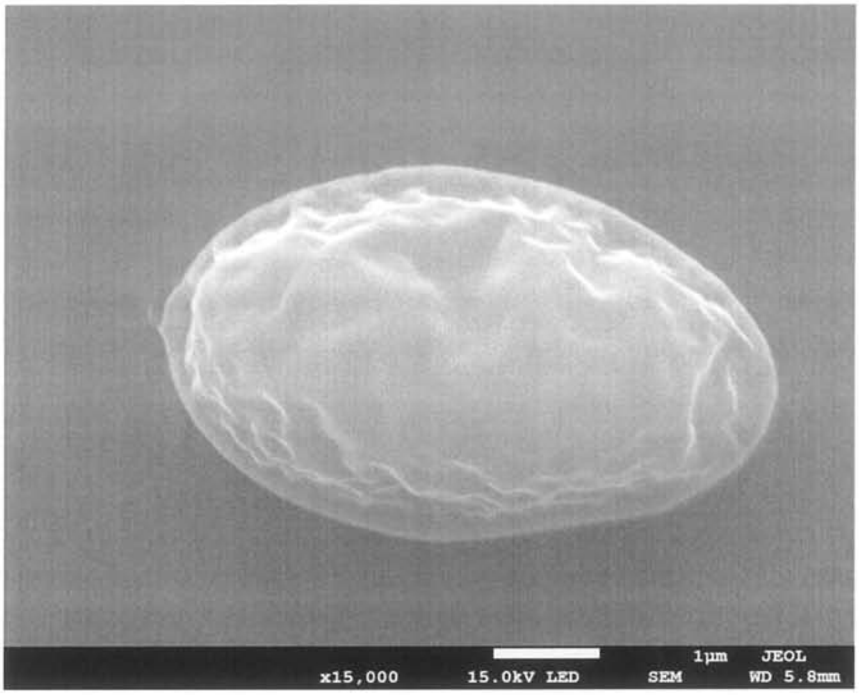
(b)37°C 5 min 処理



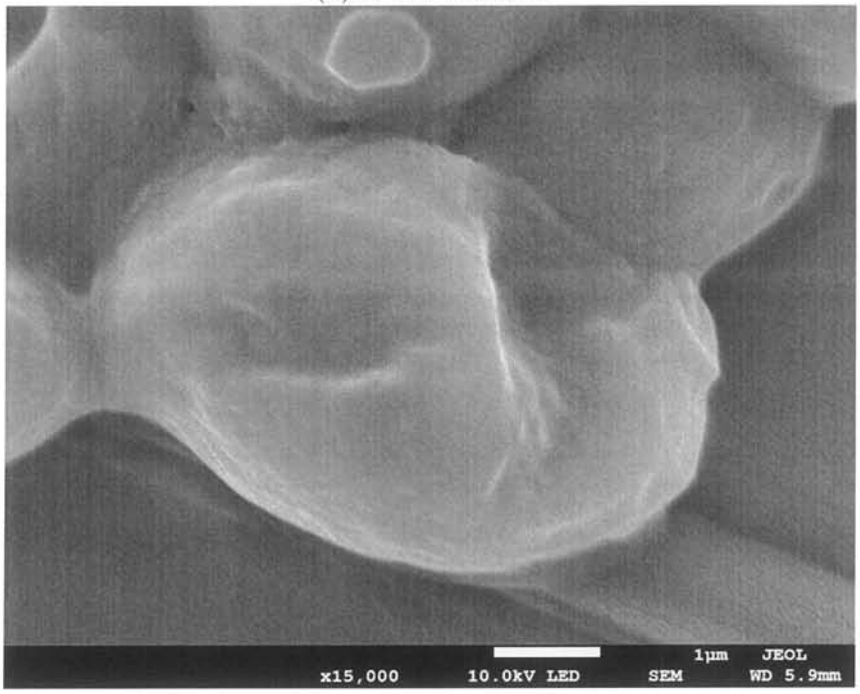
(b)37°C 2 h 処理



(c)47°C 5 min 処理



(d)60°C 5 min 処理



(e)80°C 5 min 処理

図 4.9: 加熱処理酵母における細胞表面の状態変化

4.5 まとめ

本章では，加熱処理により膜生理状態を変化させた酵母の DEP 速度計測を行い，低温 (37 - 47°C) 処理における被熱ストレス時間に対する DEP 速度の周波数特性を精査した．処理時間が 5 min のとき，周波数に依らず，未処理時の酵母が一番高い Re $[K(\omega)^*]$ を示し，処理温度が上昇するに従って値が低下した．特に，高周波数域において，変化が大きくなった．47°C において，加熱処理後の被余熱ストレス時間 (放置時間) の増加に伴い DEP 速度は減少した．各処理を施した酵母に蛍光染色実験を行った結果，処理温度の上昇に伴い酵母の細胞膜損傷度は増加し，余熱ストレスの多寡が膜浸透機能に影響を与えることが分かった．また，37°C での長時間 (2 h) 処理では低周波数帯 (50 - 100 kHz) で特に高い DEP 速度を示し，膜浸透機能を活性化させた．以上から，亜致死性の低温ストレス及びその余熱により酵母の代謝機能が繊細に変化することが分かった．すなわち，37°C では長時間 (2 h) 加熱によって，47°C では余熱ストレスの抑制によって膜輸送が活性化されたと推察される．本結果は，DEP 速度と膜損傷度の相関を示すものである．また，DEP 速度が膜輸送及び細胞分裂に関連する代謝機能を反映している可能性がある．

参考文献

[1] 高澤晋: 「平成 25 年度首都大学東京電気電子工学専攻修士論文」, (2014)

[2] S. M. Jazwinski: "Heat Stress-Induced Life Span Extension in Yeast", Exp Cell Res, Vol.245, No.2, pp.379-388 (1998)

第5章　加熱処理酵母における誘電泳動速度と生育活性の相関検証

本章では，加熱処理により代謝状態を変化させた酵母に対してコロニーカウント計測を行い，熱ストレスが酵母の生育活性に及ぼす影響を検証した．また，酵母の DEP 速度と生育活性の相関を考察した．

5.1　生菌率の処理温度特性

計測したコロニー数から，各処理条件での酵母の生菌 (生育活性を有する菌) 数を導出し，未処理時の生菌数に対する比率 (生菌率) を求めた．生菌数の多寡と酵母の生育活性は直接的な相関がある．故に，生菌率は各処理条件における酵母の生育活性を表していると考えられる．ただし，生菌数が未処理時に比べて増加している場合に限り，VNC（viable but non-culturable; 細胞は生きているが培養することはできない状態）細胞の生育機能の取得や，熱刺激による出芽中の娘細胞の単離も，生菌数変化の要因として挙げられる．図 5.1 は，酵母を 28°C（301 K，未処理），37°C（310 K），47°C（320 K），60°C（333 K）及び 80°C（353 K）で 5 min 加熱処理したときの生菌率の変化を示す．処理温度の上昇に伴い生菌率が減少した．低温処理（37°C - 47°C）の場合は，生菌率の変化が緩やかであり，生菌の存在を確認できた．一方，高温処理（60°C - 80°C）の場合は，生菌率が急激に減少し，全ての菌において生育能力の失活が見られた．なお，本結果はあくまで生育活性を有する菌体に対してのものであり，VNC 細胞の存在を否定できない．ゆえに，本処理条件下において，厳密な意味での生死判別を行うには更なる検証が必要である．

以上より，加熱処理温度の上昇に伴い DEP 速度及び生育活性が共に低下することから，定性的ではあるが，両者に一定の相関が見込まれることを示した．また，高温処理（60°C - 80°C）において，酵母が生育活性を持たない VNC 細胞となっている場合を仮定する．このとき，高温処理時において高周波数（1 - 10 MHz）域で特に顕著な DEP 速度の変化が，VNC 酵母の膜生理状態及びそれに関連した代謝状態を反映している可能性がある．ただし，この推察は本結果により確証されるものではなく，より詳細な検証を必要とする．

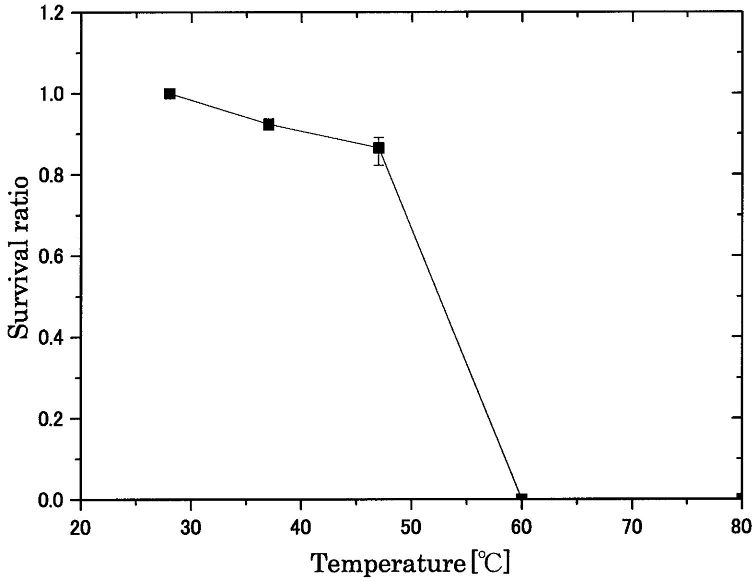


図 5.1: 生菌率の処理温度特性

5.2 生菌率の放置時間特性

47°C 処理酵母における生菌率の放置時間特性を図 5.2 に示す．放置時間 0 min では未処理時と比べて約 10%の生菌率の増加が見られた．また，放置時間の増加に伴い生菌率は低下した．本結果は，余熱ストレスのない放置時間 0 min では，酵母の生育能力が活性化されることを示唆する．また，放置時間の増加により酵母の生育機能が阻害されたことを示す．なお，放置時間 0 min については，47°C 刺激により酵母の娘細胞が単離し，疑似的な細胞分裂が生じたことにより実質的な生菌数が増加した可能性がある．

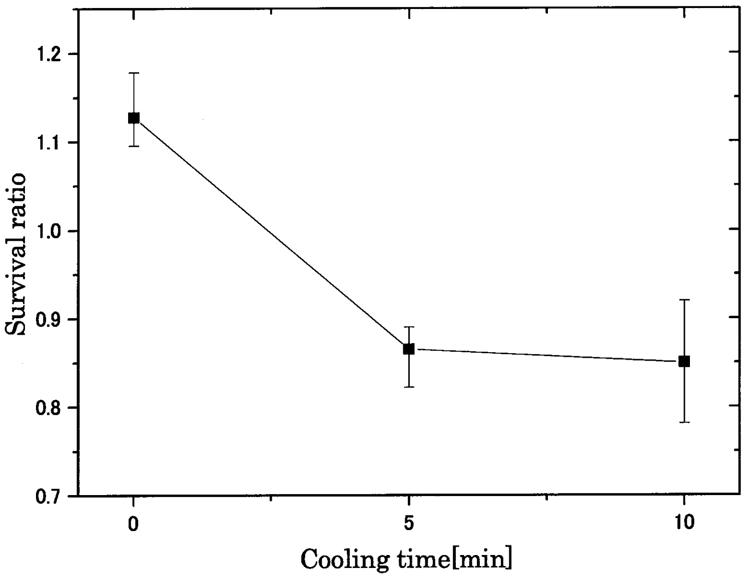


図 5.2: 生菌率の放置時間特性

5.3 生菌率の処理時間特性

37°C 処理酵母における生菌率の処理時間特性を図 5.3 に示す．2 h 処理時の生菌率が未処理時に比べて約 3%増加した．一方，5 min 処理時の生菌率は未処理時に比べて約 8%低下した．これは，37°C 加熱における短時間処理は酵母の生育能力を阻害し，長時間処理によって生育能力が回復もしくは活性化されることを示す．37°C での長時間処理によって酵母の生育能力が回復した要因として，前章で示した膜修復やそれに伴う膜機能の改善及び活性化が考えられる．また，生菌数増加の要因として，寿命延長作用による個々の酵母における細胞分裂可能回数の増加が挙げられる．本結果は，DEP 速度と生育活性の相関を示した一例であるが，計測精度をより高めた検証が必要である．

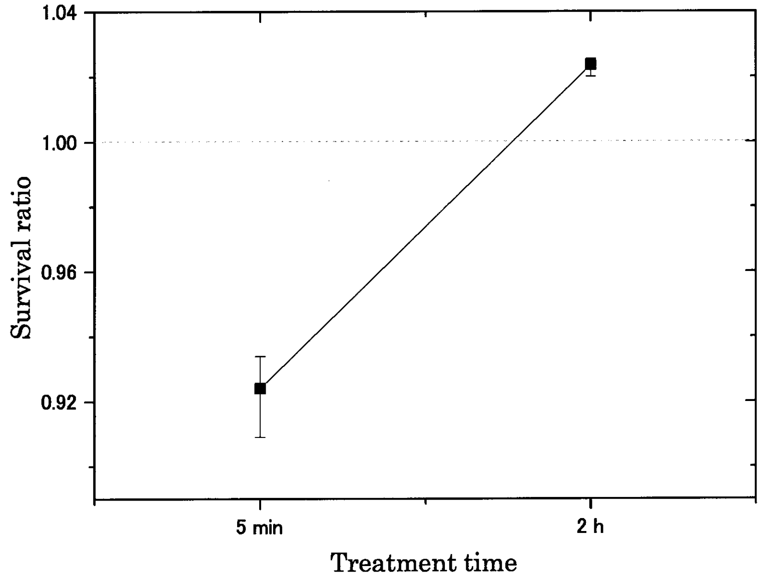


図 5.3: 生菌率の処理時間特性

5.4 まとめ

本章では，加熱処理を施した酵母に対してコロニーカウント計測を行い，熱ストレスが酵母の生菌数及び生育活性に及ぼす影響を検証した．処理温度の増加に伴って，酵母の生育活性は減少した．低温（28 - 47°C）処理時は生菌率の減少が緩やかであった．一方，高温処理時は生育活性を有する菌の存在は確認されなかった．ただし，本計測による厳密な死菌断定は困難であり，高温処理時においても VNC 状態の生菌が存在する可能性がある．47°C 処理において，放置時間の増加に伴い生菌率は減少した．本結果は，余熱ストレスの抑制により，酵母の生育能力が活性化されることを示唆する．また，37°C 処理において，短時間（5 min）処理では生菌数が減少し，長時間（2 h）処理では生菌率が上昇した．この要因として，前章で示した 37°C 長時間処理による膜修復及び膜活性の上昇が考えられる．以上の結果は，DEP 速度と生育活性の相関を示した一例である．しかしながら，コロニーカウント計測法は精度の低い評価法であり，DEP 速度と生育活性の相関の確認には，より精密な検証が必要である．

第6章　加熱処理酵母における誘電泳動速度（Re $[K(\omega)^*]$）の数値解析

本章では，酵母の等価誘電体モデルによる数値解析から誘電泳動速度の決定因子である Re $[K(\omega)^*]$ を導出し，誘電泳動速度と細胞電気定数の相関を精査した．さらに，数値解析により求めた Re $[K(\omega)^*]$ の理論値及び誘電泳動速度から導出した Re $[K(\omega)^*]$ の実測値の周波数特性を比較し，加熱処理が酵母の各層の電気定数に及ぼす影響について考察した．

6.1　解析手法

本解析では，酵母を細胞外壁（Outer wall），細胞内壁（Inner wall），細胞膜（Membrane）及び細胞質（Cytoplasm）の四層からなる球体としてモデル化し（図 6.1 参照），各層の電気特性に依存するクラウジウス・モソッティ関数実部 Re $[K(\omega)^*]$ の変化率を求めた．解析に用いたパラメータを表 6.1 に示す．各層の導電率及び誘電率については，文献 [1] の値を参照した．なお，媒質は蒸留水とし，導電率 0.2 mS/m，比誘電率 78.3 とした．

式 (2.7) より，Re $[K(\omega)^*]$ を導出するためには，粒子の各層の複素誘電率 ϵ^* を均質化し，粒子を単層球体と見なしたときの等価的な複素誘電率 $\epsilon^{*'}$ を求める必要がある．図 6.2 に本解析で用いた二層球体の均質化モデルを示す．複素誘電率 ϵ_1^* 及び ϵ_2^* の二層からなる球体について考えるとき，球体の等価複素誘電率 $\epsilon^{*'}$ は ϵ_1^* 及び ϵ_2^* を用いて次式のように表せる．

$$\epsilon^{*'} = \epsilon_2 \frac{(\frac{R_1}{R_2})^3 + 2(\frac{\epsilon_1 - \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2})}{(\frac{R_1}{R_2})^3 - (\frac{\epsilon_1 - \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2})} \tag{6.1}$$

ここで，R_1 及び R_2 は各層の半径である．球状四層モデルにおいて，各層の複素誘電率を順次均質化することで，球全体の等価複素誘電率を導出した．本解析における周波数範囲は，計測時と同様に 10^4 - 10^7 Hz とした．

表 6.1: 四層球状モデルの電気的及び幾何学的パラメータ

Region	Radius (μ m)	ϵ_f	σ(S/m)
Cytoplasm	2.500	51	1
Membrane	2.508	5	10^{-7}
Inner wall	2.708	60	0.01
Outer wall	2.758	6	0.02
Suspension conductivity			0.2 mS/m
Suspension relative permittivity			78.3

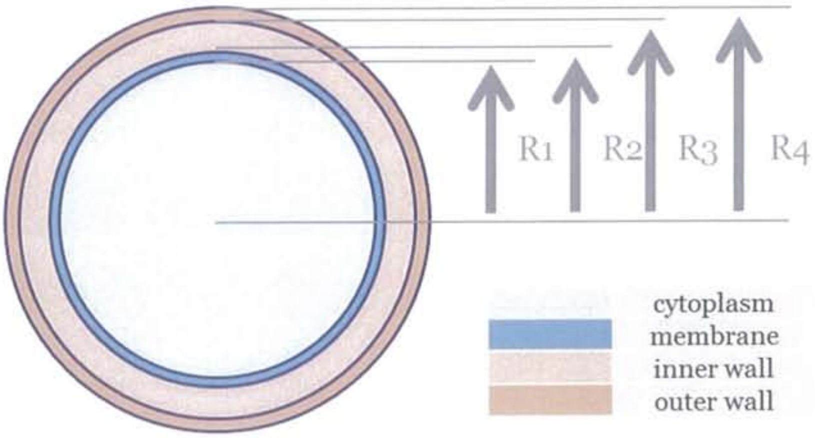


図 6.1: 酵母の球状四層モデル

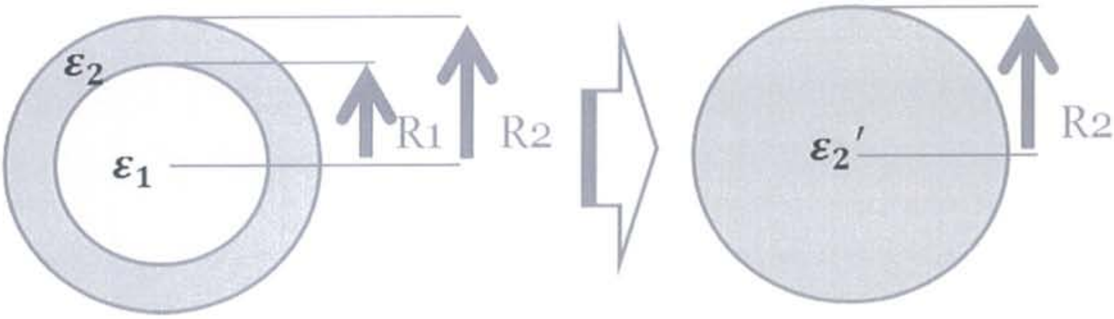


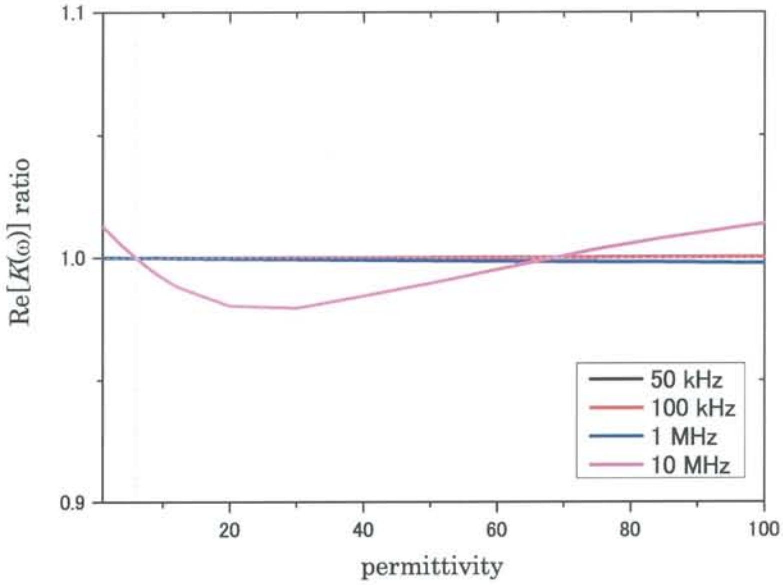
図 6.2: 二層球体の均質化モデル

6.2 Re $[K(\omega)^*]$ の誘電率依存性

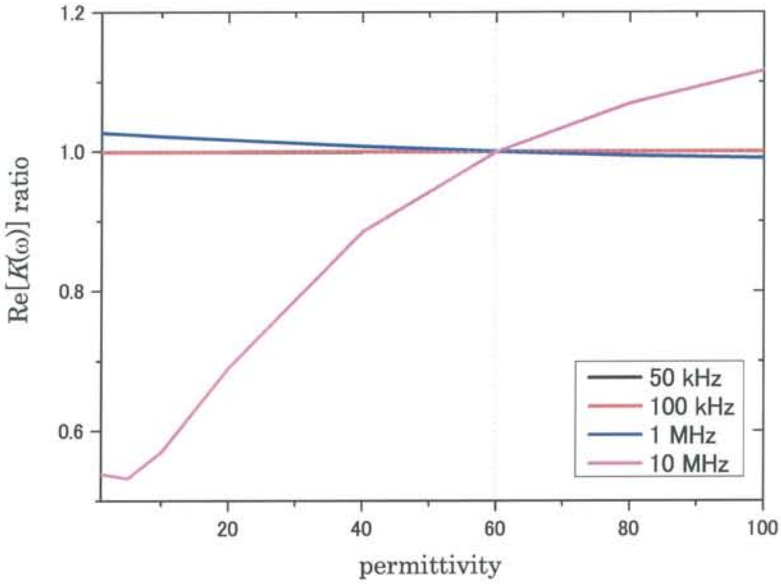
酵母は，大腸菌などとは異なり，最外殻に厚い細胞壁を持つ．酵母の細胞は，細胞壁によってその形状を保持し，また外部刺激から細胞内部を保護している．細胞壁の直下には細胞質を覆うように細胞膜が存在し，細胞の生存に必要とされる重要な機能を担っている．このような構造を持つ酵母に対して熱ストレスを負荷すると，細胞壁や細胞膜を構成するタンパク質が熱変性し，酵母表面から徐々に断片破壊が生じる．細胞壁及び細胞膜の断片破壊により空隙が生じると断片部位より外部媒質が流入し始める．細胞膜の損傷が進行すると，細胞質内の物質が外部に漏洩し，細胞質のイオン濃度は低下する．このとき，細胞質のイオン濃度を保ち生体機能を維持するために，液胞と呼ばれる細胞内物質が肥大する．細胞膜の損傷がさらに進み，細胞内物質の漏洩が深刻になると，細胞は生体機能に障害を起こし，生育能力を失う [2]．以上のような損傷過程により，加熱処理酵母における各層の電気特性は経時的に変化し，それに伴って Re $[K(\omega)^*]$ が変動する．実際に浅見らは，30 - 70°C で 10 min 加熱処理した酵母懸濁液の誘電率及び導電率の変化を計測している [3]．処理温度の上昇に伴い酵母懸濁液の誘電率が低下し，また導電率が上昇することを明示した．

本節では，酵母の細胞外壁，内壁，膜及び細胞質において各層の比誘電率を，真空の比誘電率である 1 から水の比誘電率程度である 100 の範囲で変化させたときの Re $[K(\omega)^*]$ の変動を数値的に計算した（図 6.3 参照）．上述した損傷過程により，加熱処理酵母では，液胞の肥大化による粒径変化及びそれに伴う各層の厚み変化が予想される．しかしながら，3 章で述べた光学顕微鏡による観察の範囲内では酵母の粒径変化は見られなかったため，各層の厚みは変化しないものと仮定して計算を行った．なお，縦軸は文献 [1] の基準値から算出した Re $[K(\omega)^*]$ に対する変化率を表す．

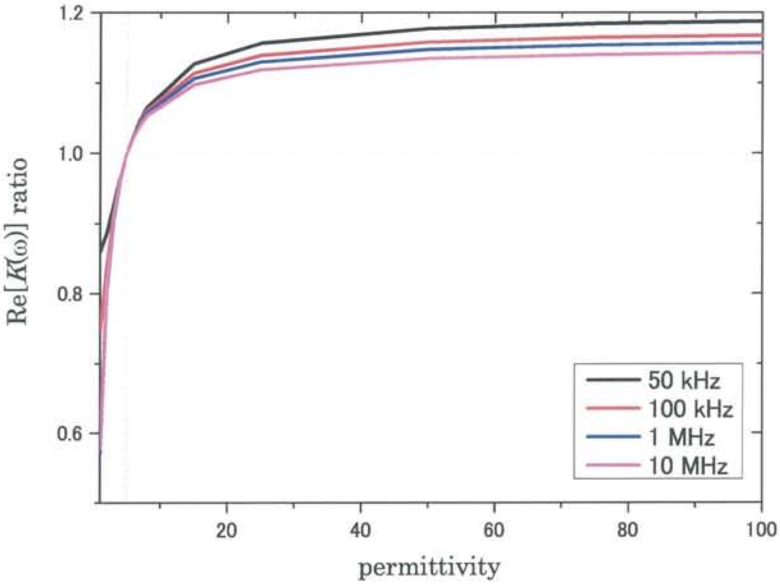
細胞外壁及び内壁については，低中周波数域（50 kHz - 1 MHz）ではほとんど変化せず，10 MHz 帯で変化した．特に，内壁の比誘電率が 5 程度になると Re $[K(\omega)^*]$ は元の半分程度にまで低下した．細胞膜については，全周波数域で Re $[K(\omega)^*]$ が大きく変化した．特に，比誘電率 1 - 20 の範囲における Re $[K(\omega)^*]$ の変動が顕著であり，比誘電率 30 程度になると Re $[K(\omega)^*]$ は飽和した．細胞質においては，誘電率変化による影響は見られなかった．本結果は，4 章で示した加熱処理温度の上昇に伴う全周波数域での DEP 速度低下が，細胞膜誘電率の低下に起因することを示している．なお，細胞膜誘電率低下の要因として，細胞膜の熱変性による組成変化などが考えられる．


1.1
1.0
0.9
Re[K(ω)] ratio
20
40
60
80
100
permittivity
50 kHz
100 kHz
1 MHz
10 MHz

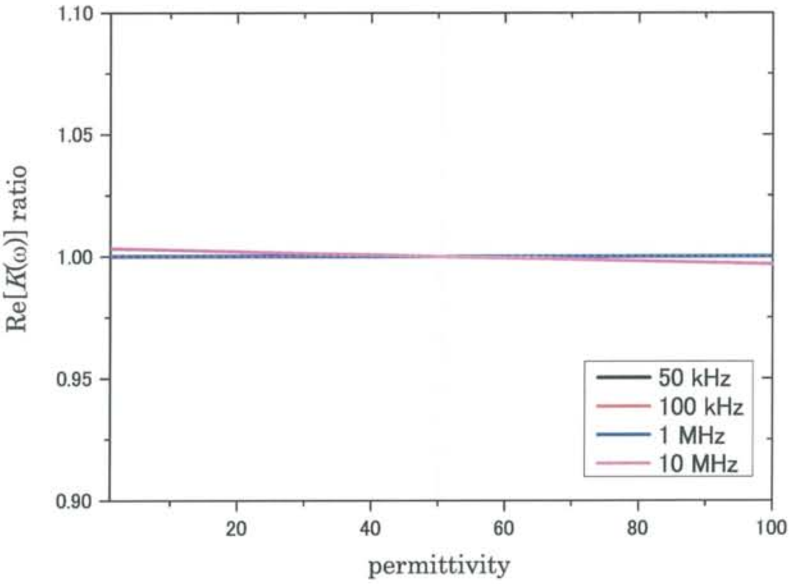
(a) 細胞外壁


1.2
1.0
0.8
0.6
Re[K(ω)] ratio
20
40
60
80
100
permittivity
50 kHz
100 kHz
1 MHz
10 MHz

(b) 細胞内壁



(c) 細胞膜



(d) 細胞質

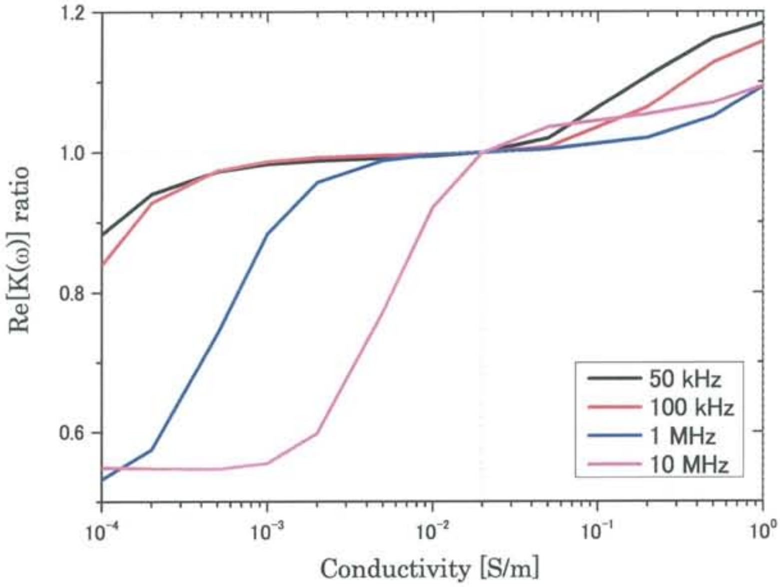
図 6.3: Re $[K(\omega)^{*}]$ の誘電率依存性

6.3 Re $[K(\omega)^*]$ の導電率依存性

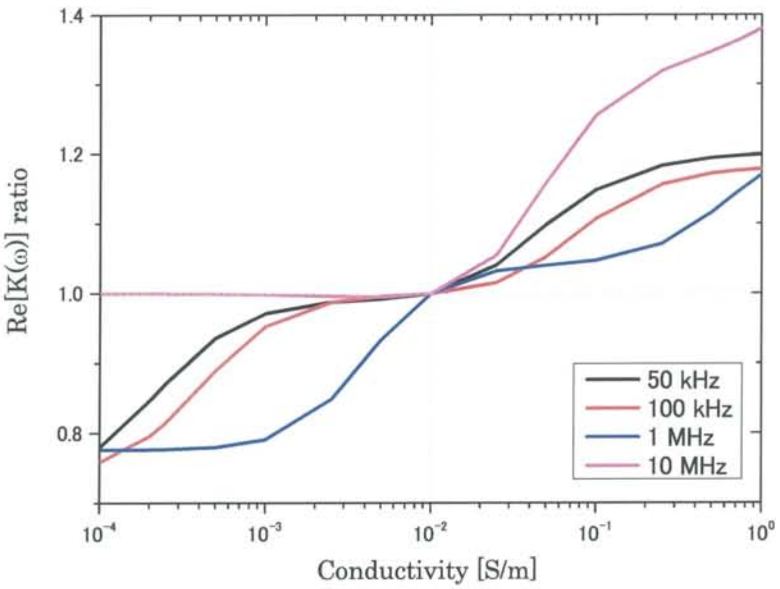
前述したとおり，酵母に加熱処理を施すと，細胞外壁から徐々に損傷し，外部媒質が細胞内部へ流入し始める．従って，熱ストレスにより損傷が進行するに伴って，各層の導電率は外部媒質の導電率に近似していくと考えられる．本節では各層の導電率を外部媒質の 2.0×10^{-4} S/m から細胞質の導電率 1.0 S/m の範囲内で変化させたときの Re $[K(\omega)^*]$ の変動を数値的に解析した（図 6.4 参照）．なお，細胞膜導電率の基準値は外部媒質の導電率に比べて非常に小さい値であるため，細胞膜に限り，導電率を 2.0×10^{-7} S/m - 2.0×10^{-4} S/m の範囲で変化させた．各層の厚みについては，前節と同様に変化しないものと仮定した．細胞膜を除いて，外部媒質の流入による各層の導電率上昇は見込めないため，本節では，特に，各層の基準導電率から外部媒質の導電率の範囲における Re $[K(\omega)^*]$ 変化に注目して考察を行った．

細胞外壁及び細胞質の導電率に対して，Re $[K(\omega)^*]$ は高周波数域（1 - 10 MHz）で大きく変化した．細胞外壁において，1 MHz では 2.0×10^{-3} S/m で Re $[K(\omega)^*]$ が急激に低下した．10 MHz では，導電率 2.0×10^{-2} S/m を起点に減少し，2.0×10^{-3} S/m になると Re $[K(\omega)^*]$ は元の半分程度の値で飽和した．また，細胞質の導電率変化に対して Re $[K(\omega)^*]$ は非常に大きく変動し，各四層の中で最も大きい変化率を示した．1 MHz 帯及び 10 MHz 帯の細胞質導電率が $10^{-2} - 10^{-3}$ S/m 及び $10^{-1} - 10^{-2}$ S/m 程度になると Re $[K(\omega)^*]$ は負領域まで低下した．本結果は，4 章で示した加熱処理温度の上昇に伴う高周波数域で特に顕著な DEP 速度低下が，細胞外壁及び細胞質導電率の低下に起因することを示している．なお，細胞外壁及び細胞質における導電率低下の要因として，熱損傷による外部媒質の流入や細胞質内物質の漏洩が考えられる．以上の数値解析結果より，4 章で示した DEP 速度の処理温度特性は，細胞外壁，細胞膜及び細胞質などの酵母全域の損傷度合によって決定づけられると推察される．

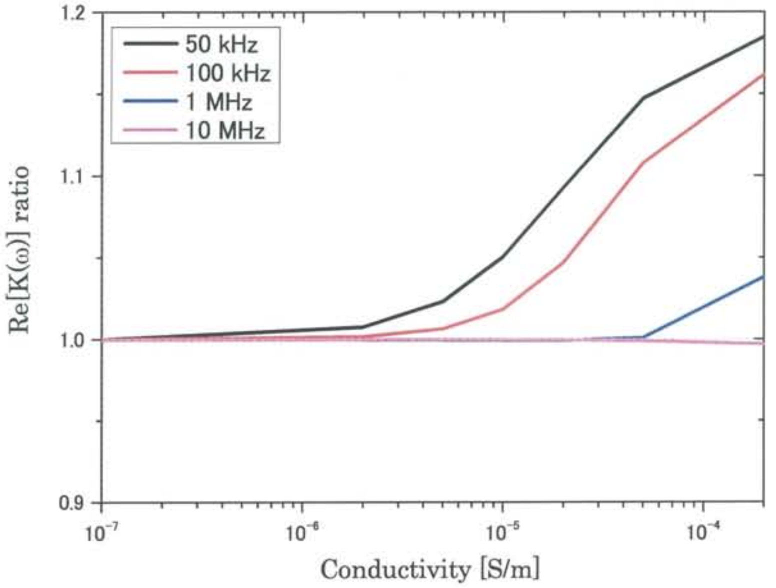
内壁については，低周波数域（50 - 100 kHz）では $10^{-2} - 10^{-3}$ S/m において，1 MHz 帯では $10^{-1} - 10^{-2}$ S/m において，Re $[K(\omega)^*]$ がそれぞれ変動を見せた．10 MHz 帯では，内壁の導電率変化の影響を受けなかった．細胞膜については，導電率が媒質の値に近づくに伴い変化が大きくなり，各四層の中で唯一，Re $[K(\omega)^*]$ の上昇を示した．本結果は，37°C の長時間処理で生じる低周波数域での顕著な DEP 速度上昇が細胞膜導電率上昇に起因することを示唆する．なお，細胞膜導電率上昇の要因として，熱損傷による外部媒質流入，または膜輸送等に関連した代謝の活性化によるイオン濃度上昇が考えられる．ここで，本研究における蛍光染色及び SEM 画像結果より，37°C 処理において，細胞表面（細胞壁）及び細胞膜の損傷は軽微であることが示されている．従って，37°C 処理における細胞膜導電率上昇の主要因は，膜代謝の活性化によるイオン濃度上昇であると考えられる．以上より，4 章で示した DEP 速度の処理時間特性は，細胞膜に関連した代謝の活性度によって決定づけられると推察される．


1.2
1.0
0.8
0.6
Re[K(ω)] ratio
50 kHz
100 kHz
1 MHz
10 MHz
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
Conductivity [S/m]

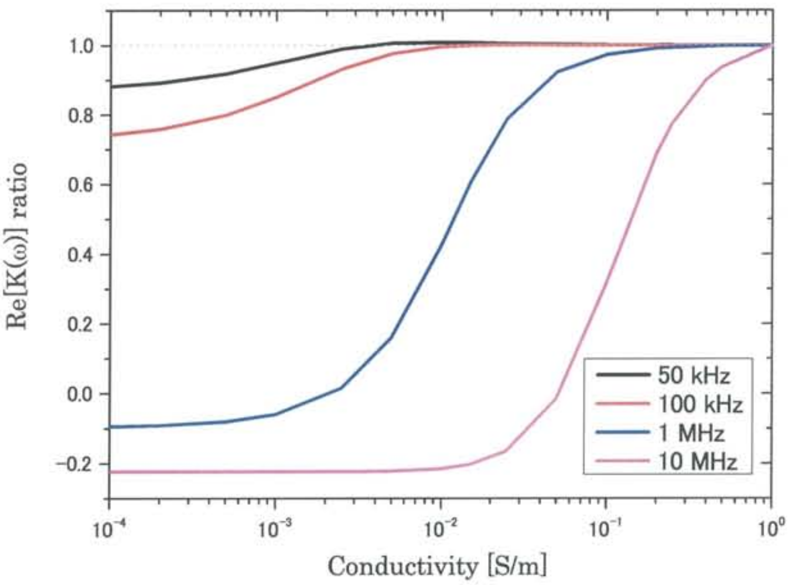
(a) 細胞外壁


1.4
1.2
1.0
0.8
Re[K(ω)] ratio
50 kHz
100 kHz
1 MHz
10 MHz
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
Conductivity [S/m]

(b) 細胞内壁



(c) 細胞膜



(d) 細胞質

図 6.4: Re $[K(\omega)^*]$ の導電率依存性

6.4　まとめ

本章では，酵母の等価誘電体モデルによる数値解析から酵母の各層の電気特性変化による Re $[K(\omega)^*]$ の周波数特性を求めた．特に，細胞膜の誘電率変化により，全周波数域での Re $[K(\omega)^*]$ が変動した．また，加熱処理温度による高周波数域での DEP 速度変化は細胞外壁及び細胞質の導電率に依存することを解析により示した．本結果は，DEP 速度の処理温度特性が，細胞外壁，細胞膜及び細胞質などの熱損傷に起因することを示唆する．

さらに，細胞膜の導電率が媒質の値に近づくに伴い変化が大きくなり，各四層の中で唯一，Re $[K(\omega)^*]$ の上昇を示した．本結果は，37°C 処理で生じる低周波数域で顕著な DEP 速度変移が細胞膜の導電率変化に起因することを示す．37°C 処理において，細胞膜の損傷は軽微であることから，DEP 速度の処理時間特性は，細胞膜に関連した代謝によって決定されると推察される．本結果は，酵母における DEP 速度と代謝の相関を数値解析的に示した一例である．

参考文献

[1] J. L. Sebastian et al: "Electromechanical effects on multilayered cells in nonuniform rotating fields", Phys. Rev. E, Vol. 84, No.011926 (2011)

[2] J. Zhang, X. Wang, Q. Li, J. K. Shang: "Real time, in situ observation of the photocatalytic inactivation of Saccharomyces cerevisiae cells", MAT. SCI. ENG C, Vol. 49, pp. 75-83 (2015)

[3] K. Asami: "Dielectric behavior of Yeast Cell Suspensions: Effects of Some Chemical Agents and Physical Treatments on the Plasma Membranes and the Cytoplasms", Bull. Inst. Chem. Res, Vol. 55, No. 3, pp. 283-309 (1977)

第7章　総論

7.1　結論

本研究では，誘電泳動速度計測を用いた生体粒子の代謝活性評価システムの構築を目的として，加熱処理酵母における誘電泳動速度と代謝状態の相関について検証した．本研究室では，これまでに，誘電泳動速度計測の基礎特性調査や，誘電泳動速度の処理温度及び処理時間特性を調査してきた．

本論文では，酵母における加熱ストレスの中でも，特に，亜致死性の低温 (37 - 47°C) 処理における熱ストレス印加時間に対する誘電泳動速度の周波数特性を精査した．致死性の高温処理と比較し，酵母に対する低温処理は，菌代謝状態により顕著な影響を与えると予想される．また，加熱処理時間の変動範囲を広く設けることで，熱刺激に対する酵母の代謝応答を詳細に検討した．さらに，核酸染色剤を用いた蛍光スペクトル強度測定により，菌体の膜損傷度や膜輸送活性などの膜代謝を生化学的に評価し，膜代謝状態と誘電泳動速度の相関を検証した．

短時間（5 min）処理において，処理温度の増加に伴い，誘電泳動速度は全周波数域で低下した．特に，高周波域（1 - 10 MHz）における速度低下が顕著であった．47°C において，加熱処理後の被余熱ストレス時間 (放置時間) の増加に伴い誘電泳動速度は減少した．各処理を施した酵母に蛍光染色実験を行った結果，処理温度の上昇に伴い酵母の細胞膜損傷度は増加し，余熱ストレスの多寡が膜浸透機能に影響を与えることが分かった．また，37°C での長時間 (2 h) 処理では，低周波数帯 (50 - 100 kHz) において特に高い誘電泳動速度を示し，膜浸透機能を活性化させた．以上から，37°C では長時間 (2 h) 加熱によって，47 ℃では余熱ストレスの抑制によって膜輸送が活性化されたと推察される．本結果は，誘電泳動速度と膜損傷度の相関を示すものである．また，誘電泳動速度が膜輸送及び細胞分裂に関連する代謝状態を反映している可能性がある．

また本論文では，コロニーカウント法を用いて，酵母における生育活性と誘電泳動速度の相関を調査した．短時間（5 min）処理において，加熱処理温度の上昇に伴い酵母の生育活性は低下した．37°C 処理について，長時間（2 h）処理では生菌率が上昇した．また，47°C 処理において，放置時間の増加に伴い生菌率は減少した．以上の結果は，誘電泳動速度と生育活性の相関を示した一例であるが，計測精度を高めた検証が必要である．

以上より，亜致死性の低温ストレス及びその余熱により酵母の代謝機能が繊細に変化することが分かった．また，本結果は，定性的ではあるが，酵母における誘電泳動速度と代謝状態の相関を示す．

さらに，酵母の等価誘電体モデルによる数値解析から，誘電泳動速度の決定因子であるクラウジウス・モソッティ関数実部 Re $[K(\omega)^*]$ と細胞電気定数の相関を考察した．酵母の細胞外壁，細胞内壁，細胞膜及び細胞質において，各層の電気特性変化による Re $[K(\omega)^*]$

の周波数特性を求めた．細胞膜の誘電率変化により，全周波数域での Re $[K(\omega)^*]$ が変動した．また，細胞外壁及び細胞質の導電率変化が高周波数域の，細胞膜の導電率変化が低周波数域の Re $[K(\omega)^*]$ 変動に大きく影響した．本結果は，細胞膜の誘電率低下や，細胞外壁及び細胞質の導電率低下が誘電泳動速度の処理温度特性の要因となることを示す．また，細胞膜の導電率上昇が誘電泳動速度の処理時間特性に寄与することを示している．

本論文では，誘電泳動速度計測による菌代謝状態の評価が可能であることを明示した．本結果は，誘電泳動速度計測を用いた生体粒子における代謝活性評価システムの構築に寄与するものである．

7.2 今後の展望

7.2.1 酵母の代謝状態における熱ストレス依存性の精査

本論文では，熱ストレスに起因する酵母の代謝変動と電気定数変化の相関を示した．しかしながら，本計測法は代謝量の評価については改善の余地があり，他の試薬や計測法との比較による，より精密な検証を要する．また，本研究で行った膜代謝及び生育活性に関する代謝評価の他に，発酵及び呼吸活性の計測，ストレス応答性タンパク質の検出，核酸の定量などを行うことで，誘電泳動速度と代謝のより直接的な相関を精査する必要がある．

7.2.2 各種外因性ストレスに対する代謝評価

本研究では，代謝状態の異なる微生物を作成するために，加熱処理を採用した．一般的に，微生物の代謝状態は，様々な環境ストレスによって変化する．酵母に対して，熱以外の外因性ストレスである酸化，低酸素，浸透圧及びUV照射などを施すことにより，加熱処理時とは異なるメカニズムで代謝応答することが予想される．ゆえに，諸外因ストレスに対する酵母の誘電泳動速度と代謝変動を評価することにより，誘電泳動速度計測の精度を高めることが可能であると考えられる．

7.2.3 誘電泳動速度計測システムの最適化

本研究では，誘電泳動速度計測として，高速度カメラによる泳動挙動の撮影，画像解析ソフトウェアによる泳動軌跡の計測，及び泳動軌跡からの速度算出の工程を要する．現状において，誘電泳動速度計測は迅速性に欠ける．故に，酵母の泳動速度の算出工程を最適化し，計測に掛かる時間を短縮する必要がある．懸濁液中における粒子の挙動に関する有用な計測技術として，粒子像流速計測法（Particle Image Velocimetry: PIV）[1][2] 及び粒子像追跡流速計測法（Particle Tracking Velocimetry: PTV）[3][4] がある．PIV は，流体中において高密度に存在する粒子群にレーザー光を照射し，散乱光の輝度分布から粒子濃度パターンの変異を追跡することで流体の挙動（速度）を算出する手法である．可視化された計測空間から画像処理により数多くの計測点で速度と方向を同時に算出するため，流速計よりも空間構造が把握しやすい点が特徴である．また，流速が極めて遅い場合にも対応できる．ただし，本手法は粒子一つ一つの挙動を追尾するわけではない．一方，PTV は，流体中における個々の粒子挙動を追尾することで，粒子の位置や速度を算出する手法である．実際に，藪崎らは，マイクロ PTV を用いて直径 4.3 μm のヤギの赤血球の空間分布及び速度分布を計測している [5]．

本研究において，測定対象は粒径 5.0 μm の酵母であり，上述の PTV が適用可能であると考えられる．従って，今後，誘電泳動速度計測に PTV を併用することで，計測時間の大幅な削減が期待できる．

参考文献

[1] Advanced In-Flight Measurement Techniques WEB サイト: http://aim2.dlr.de/measurement-techniques/particle-image-velocimetry-piv/index.html (2016/1/27 アクセス)

[2] カトウ光研株式会社 WEB サイト: http://www.kk-co.jp/piv_.php (2016/1/27 アクセス)

[3] Bojan Vukasinovic WEB サイト: http://bvukasinovic.gatech.edu/ptv.html (2016/1/27 アクセス)

[4] FLOWTECH RESEARCH WEB サイト: http://www.ft-r.jp/service_piv.html (2016/1/27 アクセス)

[5] 薮崎仁史，A. Charalambides，大石正道，木下晴之，大島まり:「マイクロ PTV を用いた微小流路内における赤血球の軸集中挙動の定量的解析」, 可視化情報学会誌, Vol. 27, No. 1, pp. 139-140（2007）

謝辞

本研究は，首都大学東京理工学研究科電気電子工学専攻マイクロ電気力学研究室及び電磁気応用グループにおいて行われたものである．本研究を進める上で指導教員として様々な面から御指導いただいた内田諭准教授に深く感謝いたします．また，多くのご助言をいただいた杤久保文嘉教授，白井直機助教，斉藤光史助教に深く感謝いたします．本実験全般に渡って，多くのご助言及び補助をしていただいた円城寺隆治さん，高瀬亜希さん，加藤英子さんに深く感謝いたします．最後に，事務的な仕事全般を手伝ってくださった小谷田美恵子さんに深く感謝いたします．研究だけではなく様々な御協力，御助力をいただいた電磁気応用グループの皆様に深く感謝いたします．

付録1 高速度カメラでの泳動撮影

デジタルカメラに付属している HAS-220 Basic Ver.1.05 の使用方法

1. HAS-220 Basic Ver.1.05 を起動
2. フレームレート・モードを選択
3. 画像サイズは [M0]640x 480 S.CFG
4. フォーマットはモノクロ
5. カメラリンクフォーマット 8bit
6. ライブで顕微鏡画像を取り込む
7. 赤い丸ボタンで撮影開始
8. 撮影後 avi で保存

付録2 DippMotionPro2Dによる速度解析

動画解析ソフト（DippMotionPro2D）の使用方法

1. ファイルから新規プロジェクトを作成し，使用カメラ台数（撮影した動画の数）を設定
2. データ作成を選択（動画入力）
   2D座標入力からカメラを選択
   追尾モードを選択（2値化相関 or 相関追尾）
   部位選択（酵母）
   自動追尾を行う．自動でできないようであれば，修正追尾を行う
   追尾できたら，ファイルから解析終了
   本工程を撮影した動画の数だけ行う
3. キャリブレーションを選択（2Dキャリブレーション）
   ファイルからプロジェクト参照．データをロードするカメラ番号を選択
   2Dキャリブレーションの時間補正を選択
   フレームレートを撮影動画のフレームレートに合わせる
   2Dキャリブレーションの距離補正を選択
   2Dスケールの補正係数の取得を行う
   電極間隔に合わせ，実際の距離を入力．その後原点を入力
   2Dキャリブレーションの単位設定を選択．単位を設定
   ファイルから2Dキャリブレーション終了を選択
4. 解析を選択
   グラフからxtグラフを選択．縦軸プロットの座標をy座標に選択
   グラフを表示し，グラフデータを保存
   CSVファイルで軌跡が保存される

付録3 SEMによる生物試料の撮影

走査型電子顕微鏡（SEM）による酵母の撮影方法

1. 観察対象: 酵母懸濁液
   濃度 1.0×10^5 CFU/ml
   媒質 蒸留水（媒質がDMの場合，白い物質が析出するため）
2. 加熱方法:
   通常通り
3. 試料作製方法:
   プレパラートを切断したものの表面に懸濁液 10 μm 滴下
   28°C のインキュベータ内で乾燥させる
   10 号館のクリーンルーム室前の蒸着装置で Au スパッタ（5 mA，1 min）
4. 観察条件:
   Au スパッタ時は SEM の生物試料を選択