

セルソータによる植物プロトプラストの 損傷の実験的評価

川上友則*, 水野 彰*

(1992年3月16日受理)

Evaluation of Damage of Plant Protoplasts in a Cell Sorter

Tomonori KAWAKAMI* and Akira MIZUNO*

(Received March 16, 1992)

High speed selection of plant protoplasts and fused protoplasts has been required in the field of plant bio-engineering. For this purpose, cell sorters can possibly be used. Plant protoplasts are mechanically very fragile and easily destroyed when they are sprayed from a nozzle in a cell sorter. This problem should be improved. The authors studied the effect of diameter and shape of nozzle on the passing rate of protoplasts. The diameter was varied between 150 and 300 μm and the squeezing angle of the nozzle was varied between 2 and 180 degree. The authors have also developed a recovering method of droplets using parafilms which can reduce damages of fragile protoplasts. Within the experimental conditions, the highest sorting rate could be achieved with a nozzle of 250 μm in diameter, the squeezing angle of 30 degree, spray velocity of 8 m/s. At this condition, the droplet formation frequency could be raised up to 9 kHz, and the passing rate of 60% for cabbage protoplasts could be obtained.

1. はじめに

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

くすること、プロトプラスト懸濁液の浸透圧を高めること、およびプロトプラスト懸濁液の温度を低くする等が行われている^{1,2)}。また、改良されたセルソータでタバコプロトプラストやムラサキプロトプラストの融合細胞の選別が試みられている²⁻⁴⁾。この場合、セルソータでの機械的破壊率を小さくするためにノズル口径を 200 μm に大きくし、ノズル出口の液流速を 3.0 m/s と小さくして行っており、液滴化周波数は 3~4 kHz と選別速度が極めて低くなっている。本研究はセルソータによる植物プロトプラストの選別速度の向上を目的としており、まずプロトプラストの破壊の定量的評価法の検討を行った。そしてキャベツプロトプラストを用いノズル部および捕集部での破壊を調べた。捕集部での破壊を低減できる液滴回収方法を考案し、次にノズル部での破壊に対するノズル口径、絞り角度および液流速の影響を調べ、選別速度を向上するためのノズル口径やノズル形状および運転条件の検討を行った。

キーワード: 植物プロトプラスト, セルソータ, フローサイトメトリ, 細胞融合, 細胞操作

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

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

2. セルソータの構成

図 1 にセルソータに用いられているノズルの構造を示す。細胞を識別するためのレーザ散乱光強度は、ノズルから噴出した液柱の断面積内の細胞通過位置に大きく影響されるため、細胞を含むサンプルフローをバッファ液

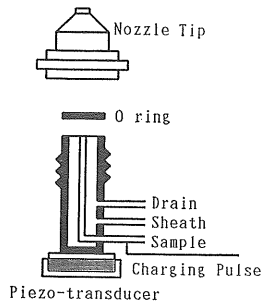


図1 セルソータ用ノズルの構造
Fig. 1 Construction of a nozzle for a cell sorter.

のシースフローで包み込み、ノズル部において層流状態で絞り込むことにより細胞が液柱の中心部を流れるよう、流体力学的な焦点合わせを行っている。また、セラミックス振動子によりノズルから噴出した液柱を均一液滴化している。ノズルは、絞り角度 25° 以下では $3\text{ mm}\phi$ のガラス管を引き伸ばして作り、それ以上はプラスチックを加工して製作した。

セルソータは、ノズルから噴出した液柱にアルゴンレーザー (波長 488 nm : 最大出力 0.7 mW) を照射し、細胞からの前方散乱光、側方散乱光および蛍光の光学的数据を取り出し、選別を行うべき細胞かどうかを判断する⁵⁾。選別すべき細胞の信号が入力されたときのみ、荷電命令を荷電回路に出力する。荷電電圧 (200 V) は、細胞がレーザー光を通過してから液柱の先端部に至るまでの遅延時間を経て印加される。この時、液滴の荷電を安定に行うため液滴を作っている振動子電圧に対し一定の位相差を持たす必要がある^{6,7)}。ノズルと接地電極との間に荷電電圧を印加し、液滴を誘導帯電させる。本実験に用いた装置は目的細胞の回収効率を上げるため3滴を荷電している。偏向電極 (電極長 14 cm , 入口幅 1 cm , 出口幅 4 cm , 最大偏向電圧 $\pm 5000\text{ V}$) によって電荷を持った液滴は、静電的に分離され捕集・回収される。

なお、以下に報告するセルソータを用いた実験では、サンプル液とバッファ液は 0.5 M マンニトール溶液を用い、温度は 20°C で行っている。

3. サンプル調整

実験では、サンプルとしてキャベツおよびニンジンプロトプラストを用いた。プロトプラストは以下の方法で単離した⁸⁾。

3.1 キャベツプロトプラストの単離方法

(a) プロトプラスト単離液

0.3 M ショ糖溶液 100 ml 中に Cellulase Onozuka 1 g , Macerozyme 200 mg , Pectolyase 10 mg を加える。

(b) 滅菌法

(1) キャベツの葉を水洗後 70% エタノールに 30 秒間浸漬する。(2) 1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 7 分間浸漬する。(3) 滅菌水に移して二度洗う。

(c) 組織切片と酵素液とのインキュベーション

(1) 葉の先端部を可能な限り細かく切る。(2) 切片 0.5 g を酵素液 10 ml に浸け、 30°C で 2 時間インキュベートし、その後 15 分間軽く振盪する。

(d) プロトプラストの精製

(1) (c-2) の液を 60 メッシュと 150 メッシュのふるいに通した後、 $400\times g$ で 5 分間遠心する。(2) 遠心後、プロトプラストが浮上して緑色の層になる。この層をパスツールピペットで取り、取ったものを新しい 0.3 M ショ糖溶液に懸濁し、もう一度遠心する。これを 3 回繰り返す。

3.2 ニンジンプロトプラストの単離方法

(a) プロトプラスト単離液

100 ml の 0.5 M マンニトール溶液中に Cellulase Onozuka 1 g , Macerozyme 300 mg , Pectolyase 10 mg を加える。

(b) 滅菌法

キャベツプロトプラストの場合と同じである。

(c) 組織切片と酵素液とのインキュベーション

(1) 先端部を可能な限り細かく切る。(2) 切片 0.5 g を酵素液 10 ml に浸け、 30°C で 3 時間インキュベートし、その後 15 分間軽く振盪する。

(d) プロトプラストの精製

60 メッシュと 150 メッシュのふるいに通した後 $400\times g$ で 5 分間遠心する。(2) 遠心後、底に沈んでいるプロトプラスト以外をパスツールピペットで取り除き、新しい 0.5 M マンニトール溶液に懸濁し、もう一度遠心する。これを 3 回繰り返す。

4. ノズル部と捕集部のプロトプラストの破壊

4.1 セルソータ通過後のプロトプラスト分裂率

セルソータを通過した植物プロトプラストはノズル部および捕集部を経て力を受けているはずであり、外傷はないが分裂しなくなり生存率が低下する可能性がある。セルソータで外傷なく回収されたプロトプラストのうち、培養により分裂する割合 (分裂率 D) を測定し、セルソータを通さないサンプルの分裂率 D_0 との比較を行った。セルソータ通過時の力による変形等が生存率を低下させるとすれば、 $D_0 > D$ となるはずである。

分裂率 D は以下のように測定を行った。サンプルはキャベツプロトプラスト (直径 $28 \pm 10\ \mu\text{m}$) を用いた。培養条件は無機塩類が MS 培地の 4 分の 1 希釈、ビタミン

は MS 培地の 2 分の 1 希釈, 成長ホルモン類は BA を 1 mg/l と 2,4D を 2.5 mg/l である⁸⁾. 培養時の個数密度は 1×10^5 個/ml である. 分裂率は 5 つの培地を用い, それぞれの培地において任意の 200 個のプロトプラストのなかで, 分裂したものの個数を測定してそれぞれ分裂率を算出し平均化した.

その結果, セルソータを通さないサンプルの分裂率 D_0 は 17% であり, そのときの標準偏差は 3% であった.

次に口径 200 μm , 絞り角度 90° のノズルを用い, プロトプラストをノズル出口の液流速を変えて通過させ, 分裂率を測定した. セルソータを通過しても破壊されないプロトプラストの割合 (回収率 R_r) も同時に顕微鏡観測により測定した.

回収率の測定法は以下のものである. (1) ノズルを通過前の溶液のプロトプラスト密度をフックス・ローゼンタール血球計算盤を用いて測定する. (2) ノズルに送り込まれたサンプルの体積を掛けることで全体数を算出する. (3) 回収した溶液のプロトプラスト数を同様の方法で求め, 壊れずに回収できた率を算出する.

回収率 R_r と分裂率 D の測定結果を図 2 に示す. ノズル出口液流速 V_j を増加させるとプロトプラストの破壊される割合が増加するが, 分裂率はどの液流速においても 15~17% であった. なお上記方法により測定された回収率 R_r の CV 値 (標準偏差/平均値) は 8% であった.

外傷のないプロトプラストは一定の割合で分裂することが確認されたことから, セルソータが及ぼす力はプロトプラストの生存率に有意な影響は与えていないことが判明した. 回収されたプロトプラストの分裂率は液流速によらず一定であるため, セルソータ通過後のプロトプラスト生存率 (=回収率 \times 分裂率) は回収率の測定を行うことで可能である.

ここで回収率は, ノズルでの破壊と捕集部での破壊とにより決定される. 捕集部での破壊の無視できる方法で液滴を捕集した場合の回収率は, ノズルでの破壊のみにより決定されるので, この場合の回収率を特にノズル通過率と呼ぶ. 本論文ではセルソータの評価は回収率あるいはノズル通過率の値により行った.

4.2 捕集部におけるプロトプラストの破壊の低減

ノズル部での破壊状況を調べるためには, 捕集部での破壊をできるだけ低減する必要がある. 上向きノズルを用いたソフトランディング式捕集法は 0.3~1.0 m/s のゆっくりとした突入速度で液滴を回収できるので捕集部の破壊はほぼないものと考えられる^{8,9)}. この捕集法による回収率を, 通常用いられている試験管による捕集法

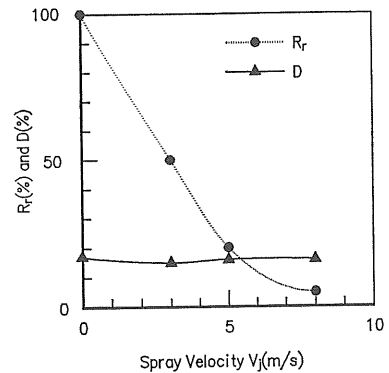


図 2 液流速 V_j に対する回収率 R_r と分裂率 D の変化
Fig. 2 Variation of recovery rate, R_r , and the division rate, D , as a function of the spray velocity, V_j .

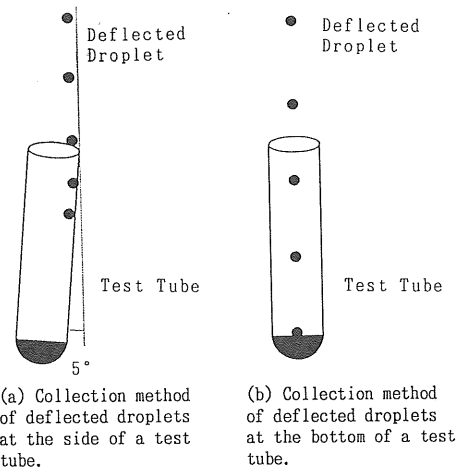


図 3 偏向された液滴の捕集方法

Fig. 3 Collection method of deflected droplets for cell sorter.

と比較した. サンプルはキャベツプロトプラストを用いた.

試験管による捕集法は, 図 3 に示す試験管壁捕集と試験管底捕集の 2 通りを行った. (a) の試験管壁捕集は, 液滴を試験管内壁に 5° の角度で突入させて捕集するものである. また, (b) の試験管底捕集は, 液滴を試験管の底に直角に突入させて捕集するものである. 捕集時の破壊特性は, 液滴速度と液滴径に影響されると考えられるため, 液滴化周波数を調整して液滴径を一定にした. 予備実験において, プロトプラストをノズルから壊さずに噴出するのに 150 μm 以上のノズル口径が必要であること, ならびに口径 300 μm 以上では液滴化が困難であることが判明した. そこで液滴径はノズル口径 150 μm で

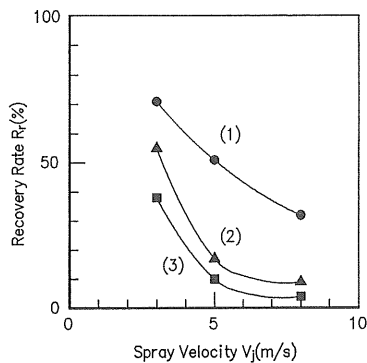
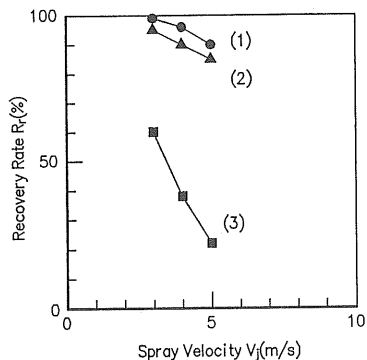
(a) Case of the droplet diameter $D_{dro}=260 \mu\text{m}$.(b) Case of the droplet diameter $D_{dro}=520 \mu\text{m}$.

図4 セルソーティングシステムを通過したキャベツプロトプラストの液流速に対する回収率の変化

- (1) ソフトランディング式捕集法, (2) 試験管壁捕集法, (3) 試験管底捕集法

Fig. 4 Variation of recovery rate, R_r , of cabbage protoplasts through the cell sorter system as a function of spray velocity, V_j .

- (1) By the Soft-landing collection method. (2) By the collection method at the side of a test tube. (3) By the collection method at the bottom of a test tube.

生成される最も小さい液滴径の $260 \mu\text{m}$ とノズル口径 $300 \mu\text{m}$ で生成される最も大きい液滴径の $520 \mu\text{m}$ の2種類を選択し、それぞれの回収率を測定した。液滴径 $520 \mu\text{m}$ の場合、ノズル口径が $300 \mu\text{m}$ のため液流速 6.0 m/s 以上ではノズル内の流れが層流状態ではなく安定した液滴形成ができなかったため、液流速 5.0 m/s までしか測定を行っていない。

測定結果を図4に示す。図4(a)は液滴径 $260 \mu\text{m}$ 、図4(b)は液滴径 $520 \mu\text{m}$ の場合である。(1)に示すソフトランディング式捕集では、破壊率すなわち(1-回収率)はノズル部での破壊を示していると考えられる。(2)は試験管捕集によるものであり、(1)との差は試験管捕集部での破壊率を示していると考えられる。液滴径

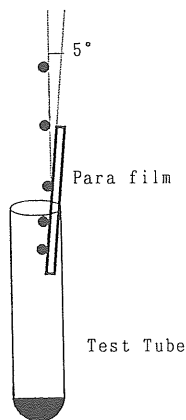


図5 パラフィルム捕集装置

Fig. 5 The collection system using parafilm.

$260 \mu\text{m}$ の場合、プロトプラストの破壊は液流速 3.0 m/s で、ノズル部において 30% 、捕集部において試験管壁捕集法で 16% 、試験管底捕集法では 32% である。液流速を上げるにしたがって、ノズル部の破壊が大きくなり、液流速 8.0 m/s ではノズル部において 70% 、捕集部では試験管壁捕集法で 21% 、試験管底捕集法で 27% であった。液滴径 $520 \mu\text{m}$ の場合、液流速 3.0 m/s でノズル部の破壊率が 2% 、捕集部では試験管壁捕集法で 4% 、試験管底捕集法で 38% であり、液流速 5.0 m/s ではノズル部で 9% 、捕集部では試験管壁捕集法で 5% 、試験管底捕集法で 60% であった。液滴径 $520 \mu\text{m}$ の場合、試験管壁捕集法はソフトランディング式捕集法と同様に捕集時の破壊がほとんどなかったが、試験管底捕集法では液流速が大きいほどよく破壊されることが判明した。

次に図5に示すように疎水性フィルム (American National Can 製パラフィルム) を液滴進行方向に対し 5° の角度で設置し、液滴を滑らせて捕集する方法を試みた。これによる回収率の測定は、液滴径 $260 \mu\text{m}$ の条件で行った。その結果を図6に示す。パラフィルムによる捕集法は、ほぼソフトランディング式捕集法と同様の効果があることが実験的に判明した。以下に述べる回収率 R_r は捕集時の破壊の小さいパラフィルム式捕集法により測定したものであり、このときの回収率 R_r をノズル通過率 P とした。

4.3 ノズル部での破壊

ノズル部でのプロトプラストの破壊は、ノズルの上底と下底の間の角度 A_s およびノズル口径 D_n に影響されると考えられ、それらについて以下に実験的検討を行った。

4.3.1 ノズルの絞り角度の影響

サンプルはキャベツプロトプラストを用いた。ノズル

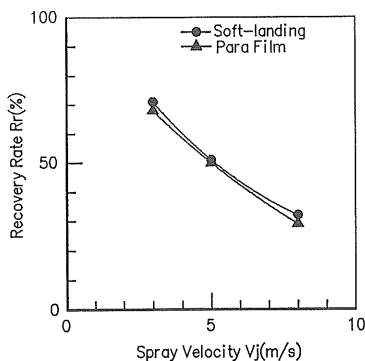


図6 ソフトランディング式捕集法とパラフィルム捕集法との液流速に対する回収率の変化

Fig. 6 Variation of recovery rate, R_r , for cabbage protoplasts as a function of spray velocity, V_j , by Soft-landing collection method and Parafilm collection method.

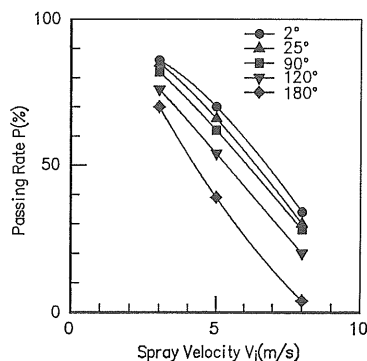


図7 絞り角度の違いノズルを用いたキャベツプロトプラストの液流速に対するノズル通過率の変化 (ノズル径 200 μm , 絞り角度 2, 25, 90, 120, 180°)

Fig. 7 Variation of passing rate, P , of cabbage protoplasts using a 200 μm diameter nozzle having squeezing angle, A_s , of 2, 25, 90, 120 and 180 degree, as a function of spray velocity, V_j .

は、絞り角度 2, 25, 52, 90, 120° でノズル径 200 μm のものを用いた。絞り角度 $A_s=2^\circ$ 未満では圧力損失が大きく液流速が 8.0 m/s 以上得られなかったため、それ以下の角度では実験を行わなかった。それぞれのノズルのノズル通過率を図7に示す。その結果、絞り角度が大きいくほどノズル部の破壊が大きくなり、特に $A_s=120^\circ$ 以上は絞り角度の影響が大きくなった。絞り角度が大きいくほどノズル先端部で急激に絞られるためノズル先端部でプロトプラスト周辺の流速差が大きくなり、プロトプラストに対する破壊力が大きくなったためと考えられる。

ノズル内の液流速分布を計算すると、20~30° 付近が

最も流れ方向の流速差とその垂直方向の流速差が同程度となり、30° 以上は流れ方向の流速差が大きくなり、20° 以下では流れの垂直方向の流速差が大きくなった^{7,10}。

実験では $A_s=2^\circ$ のノズルが最もよい通過率特性を示したが、絞り角度が小さいほどノズル出口から噴出される液柱の中心にサンプルを流しにくくなることから、セルソータに使用できるノズルは、ノズル通過率特性にあまり差のなかった $A_s=25^\circ$ のものが良いと考えられる。

4.3.2 ノズル口径の影響

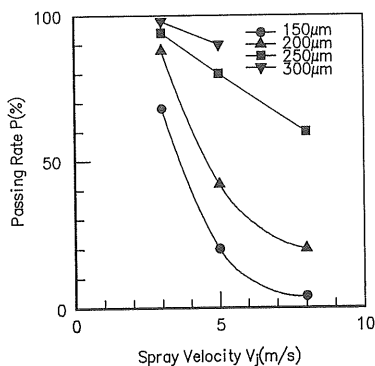
サンプルはキャベツプロトプラスト (直径 $28 \pm 10 \mu\text{m}$) とニンジンプロトプラスト (直径 $57 \pm 13 \mu\text{m}$) の2種類を用いた。ノズルは、絞り角度 25°, ノズル口径 150~300 μm まで 50 μm 刻みの4種類を用いた。また、口径 300 μm のノズルでは液流速 6.0 m/s 以上、250 μm では 9.0 m/s 以上ではノズル内の流れが層流状態でなくなり、流体力学的焦点合わせが機能しなくなることもおよび安定した液滴形成点を得られなくなるため、セルソータに使用できないので測定を行わなかった。

ノズル口径別の通過率の結果を図8に示す。図8(a)がキャベツプロトプラスト、図8(b)がニンジンプロトプラストである。両サンプルとも、ノズル口径を大きくすることおよび液流速を小さくすることで、ノズル部の破壊が低減した。ノズル口径 250 μm の場合、液流速 8.0 m/s でもキャベツプロトプラストで 60%、ニンジンプロトプラストで 70% の高い通過率でプロトプラストを壊さずに液滴形成できることが判明した。

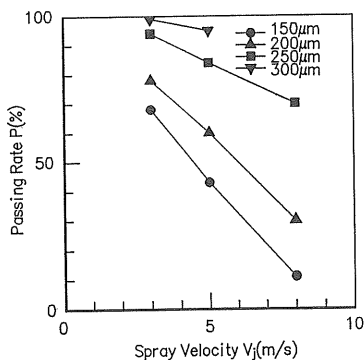
4.3.3 プロトプラスト直径の影響

ノズル口径 200 μm , 絞り角度 25° のノズルを用いて、プロトプラスト径 40 μm 以下のものとそれ以上のものを分けノズル通過率を測定した。サンプルはキャベツプロトプラストである。その結果を図9に示す。液流速 8.0 m/s では 40 μm 以上の大きさのキャベツプロトプラストはほぼ全部が破壊したが、それ以下の径のプロトプラストは 50% 壊れずに残っていた。ノズル部では大きいプロトプラストほど破壊されやすいことが判明した。

また、プロトプラストがレーザ光軸を通過するときの前方散乱光強度分布の測定を行えば大きいものから壊れていく様子が観察できると考えられる。前方散乱光強度はサンプルの大きさに依存しており、プロトプラストがノズル内で壊れると小さな破片になり前方散乱光強度も小さくなる。しかし、壊れたプロトプラストは多数の破片になるため、多数の直径の小さいプロトプラストとして計測されてしまう可能性がある。この誤差を防ぐため FDA によりプロトプラストを染色し^{5,8)}、その蛍光強度を前方散乱光と同時に計測した。FDA 染色法はプロト



(a) Using cabbage protoplasts.



(b) Using carrot protoplasts.

図 8 口径の違うノズルを用いたプロトプラストの液流速に対するノズル通過率の変化 (ノズル口径 150, 200, 250, 300 μm , 絞り角度 25°)

Fig. 8 Variation of passing rate, P , of protoplasts using a nozzle diameter of 150, 200, 250 and 300 μm diameter and squeezing angle of 25 degree, as a function of spray velocity, V_j .

プラストの生死を判別にする際に用いられ、生存しているキャベツプロトプラストは図 10 のように 530 nm の緑蛍光を発する。FDA 染色法では、FDA が生プロトプラスト内部のエステラーゼと反応して蛍光物質となるためプロトプラスト内部の蛍光を観測できるが、細胞膜は蛍光を発しない。壊れていない生プロトプラストは蛍光と同時に大きい前方散乱光強度を有しているのに対し、ノズル内で壊れた場合には蛍光と同時に小さい前方散乱光強度しか観測できなくなるので、破壊されたかどうかを断定できると考えられる。

口径 200 μm , 絞り角度 25° のノズルを用い、ノズル出口液流速 5.0 m/s の条件で FDA 染色したプロトプラストの緑色蛍光強度と前方散乱光強度の分布を測定した。図 11 にその分布を示す。A 領域は、緑色蛍光と強い前方散乱光強度を持っている壊れていないプロトプラストの分布であると考えられる。また B 領域は、やや緑

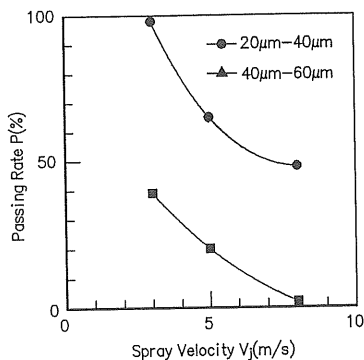


図 9 直径 20~40 μm と 40~60 μm のキャベツプロトプラストの液流速に対するノズル通過率の変化

Fig. 9 Variation of passing rate, P , of cabbage protoplasts of diameters in the range 20-40 μm and 40-60 μm diameter, as a function of spray velocity, V_j .

色蛍光が小さくなり前方散乱光強度も小さくなった壊れたプロトプラストの分布であると考えられる。

次に、口径 200 μm , 絞り角度 25° のノズルを用い、ノズル出口液流速を 3.0, 5.0, 8.0 m/s と変えて、蛍光を発するプロトプラストの前方散乱光強度分布の変化を測定した。その結果を図 12 に示す。選別条件を横軸の前方散乱光強度 7 未満にすると回収した液滴中に破壊されていないプロトプラストが含まれていなかったため、非破壊プロトプラストと破壊されて破片となったプロトプラストとのしきい値は 7 と思われる。ノズル出口液流速を上げるにしたがって前方散乱光強度分布が小さいほうに移動していく様子が観測された。このことは、液流速を上げていくと大きいプロトプラストから壊れていくことを示していると考えられる。

また、しきい値 7 以上の散乱光強度を発したプロトプラストを壊れていないと仮定し、ノズル通過率 P を算出した。図 13 に顕微鏡による測定結果と合わせて示す。両測定結果ともほぼ同じ値を示していることがわかる。前方散乱強度分布を測定することでもノズル通過率 P を測定できると考えられる。

5. 選別速度について

5.1 ノズル口径と液滴化可能周波数

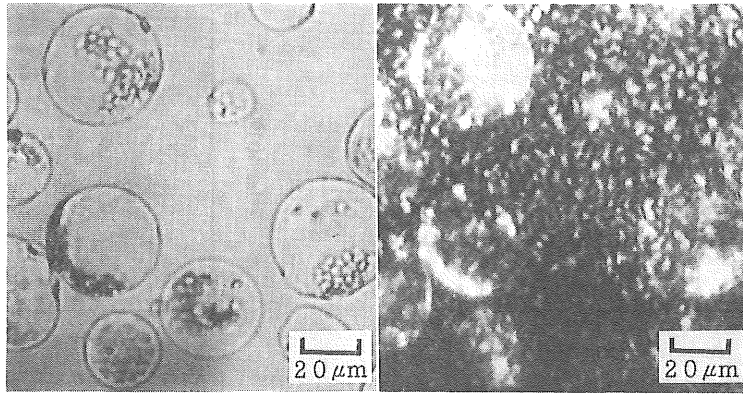
ノズル口径と液柱径との関係を望遠顕微鏡で調べたところ次式の関係にあった。

$$D_j = 0.92 D_n \quad (1)$$

液柱の液滴化条件より¹¹⁾

$$f_p < V_j / (0.92 \pi D_n) \quad (2)$$

ここで D_j : 液柱径, D_n : ノズル口径, f_p : 液滴可能周波数, V_j : ノズル出口液流速である。



(a) Cabbage protoplasts. (b) Living cabbage protoplasts with green fluorescence.

図 10 FDA 染色されたキャベツプロトプラスト

Fig. 10 Dyed cabbage protoplasts with FDA.

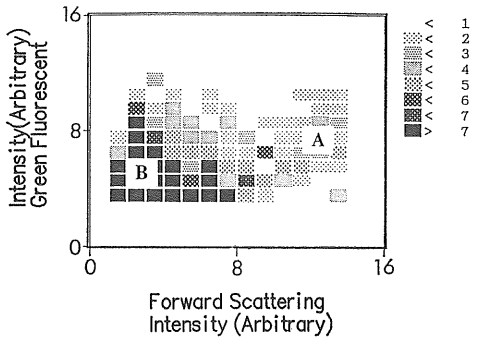


図 11 FDA 染色されたキャベツプロトプラストの緑色蛍光強度と前方散乱光強度の分布

Fig. 11 The distribution of forward scattering intensity and green fluorescent intensity of dyed cabbage protoplasts with FDA.

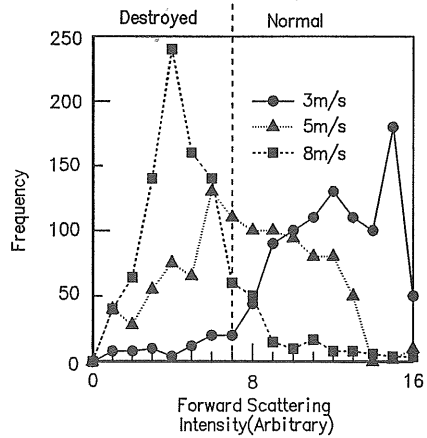


図 12 緑蛍光を持つ生キャベツプロトプラストの液流速に対する前方散乱光強度分布の変化

Fig. 12 Variation of the distribution of forward scattering intensity of living cabbage protoplasts with green fluorescence, as a function of spray velocity, V_j .

液滴化周波数を振動子と同期するストロボを用いて液滴を可視化し、液滴形成の有無より液滴可能周波数の範囲を求めた。その結果を図 14 に示す。また、(2)式を用いて算出した最高液滴化周波数 f_{theo} も合わせて示す。その結果、ほぼ理論値と同様の傾向を得たが、液流速が速いほど理論値と測定値の差が大きくなった。これは、液柱とその周りの空気との速度差によって液柱表面が乱され、液滴を作るための表面波を弱めたためと考えられる。

5.2 選別速度と偏向距離

高い選別速度を得るためには、ノズル部の損傷を抑えて高い液滴化周波数の得られる条件で選別を行う必要がある。ノズル通過率 P と実験で得た最高液滴化周波数 f_{em} の積 S の値を選別速度の評価に用いた。キャベツプロトプラストおよびニンジンプロトプラストの選別を行

った場合の S を図 8 と図 14 より算出した。その結果を図 15 に示す。両サンプルとも口径 $250 \mu\text{m}$ のノズルを用いノズル出口の液流速を 8.0 m/s で運転することで最も速い選別速度を得ることができた。

次に、液滴径と偏向距離の関係を調べた。液滴径 $D_{dro} = 300 \mu\text{m}$ ($D_n = 150 \mu\text{m}$), $390 \mu\text{m}$ ($D_n = 200 \mu\text{m}$), $480 \mu\text{m}$ ($D_n = 250 \mu\text{m}$) を選択し、 $V_j = 3 \text{ m/s}$ における偏向距離を測定した。偏向距離は偏向電極出口までに偏向された距離と定義した。偏向条件は、荷電電圧 90 V 偏向電圧 $\pm 1200 \text{ V}$, 偏向電極長 13 cm である。結果を図 16(a) に示す。また、図 16(b) に液滴径 $300 \mu\text{m}$ の液

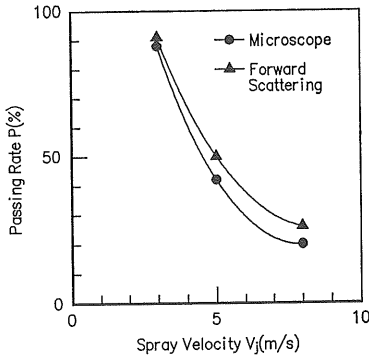


図 13 顕微鏡と前方散乱強度分布の変化により測定した液流速に対するノズル通過率の変化

Fig. 13 Variation of passing rate, P , of cabbage protoplasts by measurement with microscope and by change of the distribution of forward scattering intensity.

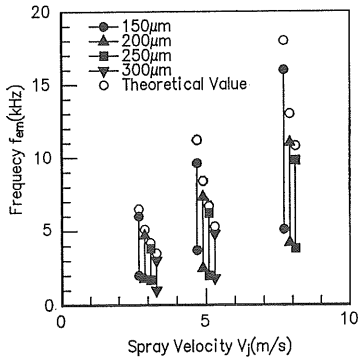
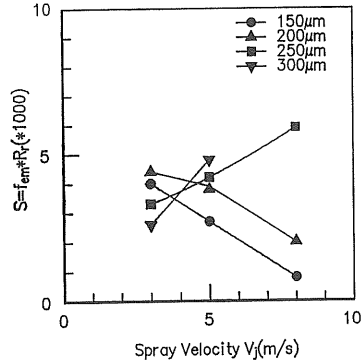


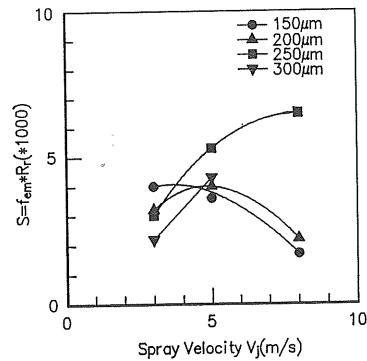
図 14 口径の違うノズルの液流速に対する理論的および実験的な液滴形成可能周波数

Fig. 14 Experimental and theoretical droplet formation frequency for different nozzle diameter.

滴の $V_j=3.0, 5.0, 8.0$ m/s における偏向距離を示す。偏向距離は液滴径を大きくすること、および液滴速度を上げることで急激に小さくなる。ノズル口径を大きくすることでプロトプラストのノズル部の破壊を低減することができるが、偏向距離が小さくなるためセルソータで用いることが難しくなる。液滴の分離を行うためには経験的に最低 5 mm の偏向距離が必要がある。最も選別速度の高かったノズル口径 250 μm , $f_p=9$ kHz, ノズル出口液流速 8.0 m/s の条件では、荷電電圧 220 V, 偏向電圧 ± 5000 V, 偏向電極長 28 cm (入口幅 1 cm, 出口幅 3 cm) で偏向距離は 7 mm であった。口径 250 μm より口径の大きいノズルは偏向距離が取れずセルソータでは使用が難しいと考えられる。



(a) Using cabbage protoplasts.



(b) Using carrot protoplasts.

図 15 口径の違うノズルを用いたプロトプラストの液流速に対する選別速度の変化

(絞り角度 25°, ノズル口径 150, 200, 250, 300 μm)

Fig. 15 Variation of sorting speed, S , of protoplasts as a function of spray velocity, V_j , for nozzle diameters 150-300 μm and 25° squeezing angle.

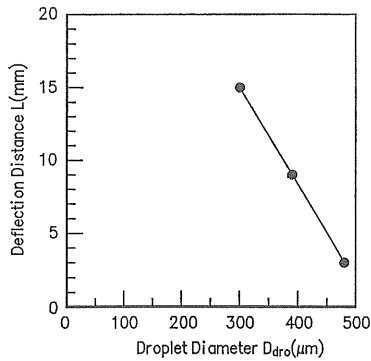
6. ま と め

従来型セルソータにより植物プロトプラストを選別する際のセルソータにおける損傷の評価ならびにその低減法についてキャベツおよびニンジンプロトプラストを用いて実験的検討を行い、以下の結論を得た。

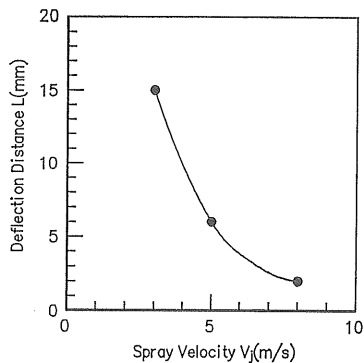
(1) セルソータによって回収されたキャベツプロトプラストで物理的に損傷を受けてないものは一定の割合で分裂した。その結果、セルソータを通過したプロトプラストの生存率 (=回収率 \times 分裂率) の推定は回収率の測定を行うことで可能であることが判明した。

(2) パラフィルム捕集法は、液滴径 260 μm , ノズル出口液流速 8.0 m/s でもソフトランディング式捕集法とはほぼ同様に、選別された液滴に含まれるプロトプラストをほとんど破壊せずに回収できることが判明した。

(3) ノズルの絞り角度を 25° 以下にすることで最も破



(a) As a function of droplet diameter, D_{dro} , for a spray velocity of 3 m/s.



(b) As a function of spray velocity for a 300 μm diameter droplet.

図 16 荷電液滴の偏向距離特性 (偏向電圧 $\pm 1200\text{V}$, 荷電電圧 90V)

Fig. 16 Variation of deflection distance, L , of deflected droplets.

(Deflection voltage = $\pm 1200\text{V}$, charging voltage = 90 V)

壊を小さくできることが実験的に判明した。

(4) ノズル部のプロトプラストの破壊は、ノズル口径を大きくすることおよび液流速を小さくすることで低減できる。口径 250 μm のノズルでは液流速 8.0 m/s でも 60~70% と高い通過率であった。

(5) 直径の大きいプロトプラストほど破壊しやすいことを確認した。

(6) FDA 染色したプロトプラストの前方散乱光強度分布の変化を測定することによりノズルでの破壊特性を迅速に測定できた。

(7) セルソータに必要な偏向距離を確保するためには、口径 250 μm 以下のノズルを使用する必要がある。

(8) 絞り角度 25°, 口径 250 μm のノズルを用い液流速を 8.0 m/s で動作させることで、最も大きい選別速度が得られることが判明した。この時ノズル通過率は 60~70%、液滴形成周波数 9 kHz であった。

謝 辞

本研究を進めるにあたり貴重な御助言をいただいた日本分光工業株式会社の眞砂 央氏、長谷川 勝二氏に深く感謝いたします。また、本研究の一部は昭和 62 年度科学研究費補助金(試験研究(1)研究課題番号 61880022)を受けて行われたものであり、深く謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) D.W. Galbraith: *Cytometry*, 8 (1987) 60
- 2) K.R. Harkins: *Phys. Plant*, 60 (1984) 43
- 3) C.L. Afonso, K.R. Harkins, M. Thomas Compton, A.E. Krejci and D.W. Galbraith: *Biotechnology*, 3 (1985) 811
- 4) 山形 光, 高橋 滋: *Bio Industry*, 4 (1987) 45
- 5) M.R. Melamed, T. Lindomo and M.L. Mendelsohn: *Flow Cytometry and Sorting*, Second Ed., p. 11, John Wiley & Sons, Toronto (1990)
- 6) A. Mizuno, T. Nakashima, H. Masago and K. Hasegawa: *Conference Record of IEEE/IAS '87*, p. 1558, Oct., Atlanta, Georgia (1987)
- 7) 水野 彰, 川上友則: 静電気学会講演論文集 '89, p. 185, 静電気学会 (1989)
- 8) 平井篤志, 内宮博文, 杉浦昌弘: 植物細胞育種入門, p. 38, 学会出版センター (1983)
- 9) 水野 彰, 川上友則: 静電気学会講演論文集 '89, p. 209, 静電気学会 (1989)
- 10) 水野 彰, 川上友則: 静電気学会講演論文集 '90, p. 271, 静電気学会 (1990)
- 11) 杉山 精: 静電気学会誌, 2 (1978) 305