

フリーフロー電気泳動法によるバクテリア細胞の分離

代表研究者：山口 登喜夫（東京医科歯科大）

共同研究者：秋葉 暁彦（理化学研究所）

高沖 宗夫（三菱重工（株）神戸造船所）

西 敦子（ " " ）

松宮 弘幸（（株）バイオシステムインターナショナル）

富田 房男（北海道大学農学部）

長岡 俊治（NASDA宇宙実験グループ）

要旨

この実験は宇宙環境の特徴を利用して、フリーフロー（無担体）電気泳動法によりバクテリア細胞混合物から単一菌株を効率的に分離することを目的とする。

軌道上での実験は予定の日程に従い進行した。飛行期間の延長により実験を一回追加することができた。搭乗科学者と地上支援科学者との連携作業が順調に機能し、搭載実験装置の吸光度検出系の異常を除いて、大きな支障もなく終了した。

細胞資料のモデルとしてバクテリア *Salmonella typhimurium* の変異株3種を使用した。軌道上での吸光度データが地上に届かなかったため、予備実験は無意味となり、省略して本実験のみ200Vで2回、300Vで1回実施した。各実験の分画試料は、帰還時まで冷蔵保存した。

回収試料を地上で解析したところ、200V泳動実験では、明確な吸光度ピークを検出できなかった。これは試料の泳動が不十分のため分離されておらず、また泳動中の試料の希釈によるためと考えられる。300Vでの泳動実験では吸光度の変化が認められた。各分画について生菌数を測定すると、明確な二つのピークが検出できた。これは3種のバクテリアに相当するもので、残る1種は他の一つのピークに重なっていた。

宇宙実験の結果は、地上実験とは異なり、3種のバクテリアのうち少なくとも2種は理論通りに泳動し、分離されていたことを示す。これは地上で避けることのできない熱対流が、微小重力の場では消滅したことによると考えられ、実験の目的はある程度達成できたといえる。しかし、実験の成果は十分とはいえず、微小重力場の分離能が地上に勝ると断定するまでには、さらに宇宙実験を重ねることが必要である。

序論

細胞および細胞顆粒などの分離法の一つに、それらの有する電荷の差に基づきフリーフロー（無担体）電気泳動を用いる方法がある。無担体電気泳動法には、通電によるジュール熱発生のため、液の流動に攪乱が生じ、試料の分離が妨害されるという欠点に伴う。無重力の場では熱発生による液の対流攪乱は起こらない。そこで、宇宙環境において、電気泳動法を用いて細胞の効率的な分離を試験することを目的として本実験を実施した。

生体内では多種の細胞が混在しているが、その中から目的とする特定の細胞を分離することができれば、例えば生理活性物質生産能のある細胞を分離したり、それを生体に移植する治療技術の開発が可能になる。保存細胞を宇宙実験に供する場合、活性を失った細胞をあらかじめ分離除去できれば、軌道との実験の高度化を図れる。電気泳動の宇宙実験には、基盤技術として大きい意義がある。

アメリカNASAは、アポロおよびアポロ・ソユーズ、さらにはスペースシャトルに円筒型電気泳動装置を搭載し、様々な細胞・タンパク質の分離を試みてきた。アポロ14号ではBNA、ヘモグロビンの電気泳動を試験し（1）、アポロ・ソユーズではリンパ球、赤血球、腎臓細胞の分離を試験した（2）。1982年のSTS-4では初めて無担体連続電気泳動装置を用いて連続分離実験に入り（3）、1983年のSTS-8でも引き続き実験した（4）。実験材料は、腎臓細胞や脳下垂体細胞の動物細胞である。前者試料の実験はウロキナーゼ生産能のある細胞の分離を、後者試料の実験は成長ホルモン生産能のある細胞の分離が目的であった。しかしこれらの実験からは、微小重力環境の有用性を立証するまでの確たる結果は得られなかった。1984年以降もタンパク、ホルモンなどの商業的分離生産を目的とする実験が行われたが、実用化には至らなかった。

電気泳動の宇宙実験に用いる試料は、その電氣的性質が明確であり、泳動槽内の液の挙動や電気浸透などを解析できる実験系にすることが重要である。生細胞を用いる場合は、実験前および実験後に変性、失活、死滅などの起こらないよう、保守保管の方法についても検討が必要である。

本実験はわが国初のフリーフロー電気泳動の宇宙実験である。実験材料は、上記の要請に応えるべく慎重な予備実験から選択し、最終的にバクテリア細胞を選んだ。軌道上では装置の一部に作動不良が生じ、実験結果は期待に十分応えるものではなかったが、将来の研究に資する多くの貴重な情報を残した。

I. 地上における予備実験および対照実験

実験方法

(1) 緩衝液

緩衝液に一定電圧の電流を流すとジュール熱が発生し、緩衝液の温度が上昇する。使用した緩衝液は、ガス発生が少ないトリエタノールアミン/酢酸緩衝液 (pH 7.5) であるが 25 mμ 濃度では、液動槽 (4 mm 厚) の中心温度が 40℃ を越えると予測された。そこで緩衝液濃度を下げることにより、熱発生を抑制することとし、10 mμ または 7 mμ のトリエタノール/酢酸 (TEA) を用いることとした。このときの槽内中心温度の予測値は 25℃ である。

(2) フリーフロー電気泳動装置

NASDA が開発したフリーフロー電気泳動装置 (FFE) を使用した。泳動槽はタテ 10 cm、ヨコ 6 cm、厚さ 4 mm のタテ型平板容器である。試料および緩衝液は槽上部より注入し、槽下部より分離試料を分取した。分取管は 60 本まで装着できる。槽下部では、キセノンランプを光源としガラスファイバーに導かれた光により試料の吸光度 (200 nm) を検出した。吸光度データから分取範囲を決定した。

地上予備実験では、タテ・ヨコ同サイズで厚さ 1 mm の薄型泳動槽も使用した。

いずれの泳動槽も最大印可電圧は 600 V (= 100 V / cm) である。槽内温度の上昇をふせぐため、槽の前・後壁面を 5℃ に冷却した。液動槽の内面にカルボシキメチルセルロースをコーティングし、電気浸透流の発生を制御した (5)。

(3) 顕微鏡電気泳動

試料細胞の易動度 (EM) は Briggs の方法 (6) に従い、位相差顕微鏡のもとで、25℃ において 300 V の電圧をかけたときの細胞の泳動距離と時間を測定して求めた。各試料とも細胞 100 個について測定し、その平均値を EM 値とした。

(4) 生物試料

地上実験では、下に示す動物細胞、カビの胞子細胞、およびバクテリア細胞について検討した。

(a) 動物細胞

マウス脾臓リンパ球細胞、
培養シエローマ細胞
融合ハイブリドーマ細胞
の混合物

(b) カビの胞子

Aspergillus terreus
Gliocladium virens

Penicillium citrinum

Rhizopus oryzae

の孢子細胞。

(c) バクテリア

Salmonella typhimurium LT2の変異株

S型: SL1027

SL3730

R型: SL3749

SL3769

SL1102

の5株。

動物細胞はミエローマ細胞とリンパ球株細胞、およびそれらを融合したハイブリドーマ細胞の3種である。この中から抗体生産能のある融合細胞を分離するのが目的である。3種混合細胞は37℃CO₂保存した。

カビは、麦芽エキス寒天培地(pH4.7)を用いて22℃にて培養し、孢子を形成させた。TEA緩衝液で集めた孢子は、フィルターでろ過してカビ菌糸を除去し、遠心洗浄した。各孢子は約10⁸~10⁹個/mlの濃度になるよう懸濁し、4℃に保管した。

バクテリアの5変異株は、0.5%ポリペプトン液体培地(pH7.0)を用いて37℃にて一夜浸透培養した。集菌、洗浄後に10⁶個/mlになるよう7mμTEA緩衝液に懸濁し、4℃に保存した。

5変異株は、化学型形質として細胞表面のリポ糖質(LPS)の構造に変異をもつ(第1図)。SL1027とSL3770の両株は、第1図にみられるように完全なLPS構造をもつSmoothタイプ(S型)の菌である。他の3株はLPS構造に欠陥を有するRoughタイプ(R型)の菌である。SL3749株はLPS最先端部のD-後編多糖構造がない。SL3769はLPS中間部のグリコシルI基から外側を欠いており、SL1102はLPS構造の最深部まで欠けており、最も薄いLPS構造をとる。

5変異株の遺伝型形質は以下の通りである。

| | |
|--------|------------------------------------|
| SL1027 | ストレプトマイシン耐性、メチオニン・トリプトファン要求性、胆汁酸耐性 |
| SL3770 | ストレプトマイシン感受性、アミノ酸非要求、胆汁酸感受性 |
| SL3769 | ストレプトマイシン感受性、アミノ酸非要求、胆汁酸感受性 |
| SL1102 | ストレプトマイシン耐性、アミノ酸要求性、胆汁酸感受性 |

(5) 菌体濃度および菌数の測定

バクテリアの菌体濃度は、波長600nmにおける光学密度(OD600)で表示した。生菌数は、0.5%ポリペプトン寒天培地にて37℃、24時間培養したときに出現するコロニー数から求めた。

カビの孢子数は、血球計算板を用いて顕微鏡下にて計数した。孢子の発芽数はツァベック・ドックス寒天培地上に20℃~22℃で培養し、発芽したコロニー数から求めた。

(6) バクテリアの分離培養法

バクテリアの人工変異株5株は、上記の遺伝形質に基づく分離用培地を用いて、分別検出した。分離用培地はDavisの最小培地(7)(表1)を基本組成とし、これに抗生物質、アミノ酸、胆汁酸を加えて分離用培地とした。

Davisの最小培地(DM培地)では、SL3770、SL3749、およびSL3769株のみ生育できるが、他の株は生育しない。DM培地にストレプトマイシン(1.0mg/ml)、X4オニンとトリプトファン(各25mg/ml)、およびデオキシコール酸ナトリウム(1.0mg/ml)を加えた培地(SAC培地)には、SL1027株のみ生育し、他の4株は生育しない。SAC培地から胆汁酸を除いた培地(SA培地)には、SL1027とSL1102の2株のみ生育する。三種の培地(DM、SAC、SA培地)を使うことにより、各菌株を分別培養し、コロニーを計数した。

(7) バクテリアの薬剤耐性

スピラマイシン(SP)およびクリスタル・バイオレット(CV)に対するバクテリアの耐性は、濃度の異なるSPまたはCVを含む0.5%ポリペプトン寒天培地に培養し、生育が認められる最小濃度を求めた。これを最小生育阻止濃度(MIC)として示した。

実験結果

(1) 動物細胞のFFE

泳動用緩衝液は10mM TEA、1mM EDTAおよび0.25M サッカロースを含む。サッカロースは動物細胞との比重差もなくし、沈降も防止する目的で加えた。泳動槽は厚さ1mmものを使用した。泳動の結果は、脾臓リンパ球、ミエローマ細胞、およびハイブリドーマ細胞がほとんど分離されておらず、三細胞が互いに重なり合った幅広いピークになった。三細胞の表面電荷に差のないことを示している。

次の問題は、各細胞の保存性がわるいことである。宇宙実験では、地上での試料の調整・保管から軌道上実験、地上への帰還、試料の回収まで所定の時間を要し、その間、試料は安定に保持されなければならない。使用した動物細胞三種とも時間経過とともに生存細胞数が減少し、同時に泳動パターンも変化した。細胞の安定性保持が難しく、細胞表面電荷が変化することを示している。

さらに、試料の生存を保持するために試料容器内にCO₂を補給しなければならない。栄養培地の交換操作も複雑になり、簡便迅速が要求される軌道上実験には向かないとの結論に達した。そこで、代わりの試料としてのカビ胞子とバクテリア細胞について検討することにした。

(2) カビ胞子およびバクテリア細胞の易度度 (EM)

FFE実験の試料の選定基準として、(i) 試料の調整が容易であり、安定性・保存性にすぐれていること、(ii) 試料形状が球形または球に近く、その表面が滑らかであり、吸光度による検出ができること、さらに(iii) EMに明確な差があり、かつEMの値に経時変化のないこと、などがあげられる。

試料候補として検討する対象は、一つはカビ胞子であり、他の一つはバクテリア細胞である。両者とも上記(i)項と(ii)項の基準を満たしており、従って、どちらを選択するかは(iii)項のEMを比較検討することが必要にある。カビ胞子のEMの測定結果は表2に示した。4種の胞子のEM値は極めて狭い範囲に分布していることがわかった。これは、カビ胞子が生化学的に不活性の状態にあり、その表面がキチンやβ-グルカンなどの電荷量の小さい多類でおおわれているためである。FFEによる分離の難しさを予測させる結果であった。

一方、バクテリア細胞では各菌株のEM値に明かな差が認められた。5株中で最大のEM値を示したのはSL1102であり、LPS構造が最も不完全な菌株である。逆に完全なLPS構造を持つSL1027株は最小のEM値を示した。EM=0は表面電荷のないことを示す。これら二つの菌株の中に存在する3株も、LPS鎖が短くなるにつれてEMが高くなるという傾向を示した。この点は第1図に示したLPS構造から推察できることであるが、実測によりそのような相関を確認できたことは新しい知見といえる。

(3) FFE予備実験

カビのFFE分離：

混合試料をFFEにより分離するには、一般的に各々の試料のEMに大きな差のあることが望ましい。使用する泳動槽は泳動距離が10cmであるから、試料EMに0.8以上の差が最低条件である。この点から実験試料として、EM差が最大の*Aspergillus ferreus*と*Rhizopus oryzae*の胞子を選んだ。胞子濃度は、吸光度による検出が可能になるよう10⁸—10⁹個/mlに調整し、等量ずつ混合した懸濁液を試料とした。泳動条件は

泳動槽：厚さ1mm槽

緩衝液流速：5cm/min

サンプル流速：18.5cm/min

印加電圧：100V、200V、300V

第2図に示したように、吸光度による検出法では、二つの試料に相当するピークは認められず、一つのピークが現れたのみであった。泳動後の分画試料の

胞子数を計数したが、明確な分離ピークは存在せず、二試料の分離が認められなかった。

カビ胞子は泳動後に F F E 装置内に付着残留し、無菌水により数回洗浄しても完全な除去は困難であった。カビ胞子はサンプル注入管中で沈降し、均一な注入が難しいこともわかった。試料懸濁は調整してから実験に入るまで冷蔵保存したが、5日目から発芽する胞子が現れ、その後の実験が不可能になった。このようにカビ胞子を用いる実験には様々の障害が伴うことがわかった。

次に、シャトル搭載装置と同型の 4 m m 厚泳動槽を用いて分離実験をおこなった。試料は、*Aspergillus ferreus* と *Penicillium citrinum* の二胞子の混合液である。実験結果を第 3 図に示した。各分画の胞子数を計数すると三つのピークが認められた。しかし、各分画を培養してコロニーを計数したところ、二種の胞子が全分画に拡散しており、両胞子は分離できていないことがわかった。厚い泳動槽では、重力下で液の流動が不規則不安定になるため、各試料の泳動分離の妨害となる。特に近接した E M をもつ試料では、分離が極めて困難である。

以上の 2 種の泳動槽における実験結果を総合的に検討して、カビ胞子宇宙実験に不適と判断した。そこで、次の候補であるバクテリア細胞の検討に入った。

バクテリア細胞の F F E

バクテリア変異株 5 株の中から、表 2 の E M 測定結果に基づき最小及び最大の E M をもつ S L 1 0 2 7 株と S L 1 1 0 2 株、さらに両株の中間 E M 値を示した S L 3 7 4 9 株を実験材料にすることに決めた。S L 1 0 2 7 株は Smooth 型、他の 2 株は Rough 型である。各苗株とも菌濃度を 10^9 個 / m l (O D₆₀₀ は約 3.3) に調整し、等量ずつ混合したものを試料とした。泳動槽は 1 m m 厚と 2 m m のものを用い、緩衝液は 7 m μ T E A (p H 7.5) を使用した。泳動条件は次の通りである。

緩衝液流速 = 6 c m / m i n

試料液流速 = 5 c m / m i n

試料注入位置 = 泳動槽上部中央

印加電圧 = 2 0 0 V または 4 0 0 V

第 4 回に 1 m m 槽にて 2 0 0 V および 4 0 0 V で泳動した結果を示した。3 株に対応する 3 ピークが検出されており、また印加電圧の重い方が当然ながら長い距離まで泳動し、かつ各ピークの間隔も広がっており、分離機能がよいことを示している。S L 1 0 2 7 株は、E M = 0 であるにもかかわらず若干の移動を示していたことは、熱対流による槽内流動の不安定性と電気浸透流の発生が考えられる。

次に、スペースシャトル搭載の F F E と同型の 4 m m 厚の泳動槽を用いて実験した。泳動条件は上記の実験と同様である。第 5 図に 2 0 0 V 泳動の一例を

示した。3株に相当する3ピークが認められたが、第1のピークには他の2株が混在し、第2と第3のピークは互いに重なり合い、分離が不十分であった。槽が厚くなると速の二つの要因（流動の不安性と電気浸透流）の影響により分離能が低下することを示している。宇宙の無重力のもとでは、二つの影響が軽減することにより分離能が向上することを期待している。

(4) バクテリア細胞の安定性

宇宙実験では、地上の準備作業から飛行後の回収まで所要の時間がかかる。この時間に実験材料が変性したり死滅しては、実験の目的は達成できない。そこで、バクテリア細胞がTEA緩衝液中で何日間生存しているかを調べた。

バクテリア5株とそれぞれ単独に7mμTEA緩衝液に懸濁して4℃に保管し、生細胞の経時変化を追跡した(第6図)。5株とも15日目まで初濃度(10¹⁰個/ml)に近い値を維持していた。生存率は90%を保持していた。

泳動後の細胞(高圧にさらされた細胞)について同様に生存率の経時変化を調べたが、上の結果とほぼ同様の結果を得た。二つの実験から、打上げ前から地上回収までの試料の安定性が保証された。

バクテリア細胞は保管中にその電氣的性質に変化が生じないかを検討する目的で、保存直前の細胞と保存4日目の細胞について、分解能のよい1mm槽を用いて泳動パターンを比較した。第7図にみられるように4日間保存した細胞は、保存直前の細胞と同一の泳動パターンを示し、電氣的性質に変化のないことが判明した。さらに、泳動後の3株は0.5%ポリペプトン寒天培地とで順調に生育してコロニーを形成し、それらのサイズ、形状、色調に特に変化や異常は認められなかった。

バクテリア細胞は2週間に及び高い生存率を保つこと、電氣的性質も安定していて泳動パターンに再現性のあることなどから、宇宙実験の材料として適切であるといえる。

考察

宇宙実験の地と予備実験として、(i)実験試料の選択、(ii)選択試料の泳動実験、(iii)試料の安定性について検討を加えた。

電気泳動実験の材料候補として、動物細胞(ハイブリドーマ融合細胞)、カビの孢子細胞、およびバクテリアのLPS変異株をとりあげ、それらの搭載性と操作性などの観点から検討した。

動物細胞は、細胞の安定性や培養操作の複雑性、及び十分な泳動分離が難しいなどの難点があり、搭載試料として不適であろうと判断された。カビの孢子細胞はEM値に差がないこと、保管中に沈降したり発芽生育するという現象があるため、長期を要する宇宙実験には不適と考えられた。さらに、カビ孢子はFFE装置内に一部残留すると、その洗浄は容易でなく、また実験装置や試料カセットから漏れた場合、シャトル船内に飛散し汚染する。安全性の点で問題

になる。一方、バクテリアのLPS変異株はEM値に差があり、生存率は長期にわたり安定であること、さらに泳動分離の結果が上記の二試料に比べて優れていることなどの点から適切な材料と考えられた。特にSL1027、SL1102、SL3749の3株は、上述の利点のほかに、選択培養による細胞の識別が簡単である。これらの点を考慮して、今回の宇宙実験の試料のこの3株が選ばれた。

文献

- (1) E.C. Mckarran et al. (1977). NASA Technical Memorandum TM-64611
- (2) R.E. Allen et al. (1977). Separation and Purification Methods, 2, 259.
- (3) P.Todd (1985). Proceeding of Parm Tech Conperence '85 PP-5-12
- (4) D.R. Morrison et al. (1984). Adv. Space Res., 4, 77.
- (5) B. Feuerbacher et al. ed. (1986). "Material Sci. in Space"
Spring Verlag,
- (6) D.R. Briggs (1940). Ind. Eng. Chem. Anal. ed., 12, 703.
- (7) J. Lederberg (1950). Methods in Medical Res., 3, 5.

II 宇宙実験

地上予備実験の結果から、泳動試料としてSalmonella TyphimuriumのL P S変異株であるS L 1 0 2 7、S L 1 1 0 2、S L 3 9 4 7の3株を選択した。泳動パラメーターも決定できた。泳動試験により熱対流による緩衝液流動の不安定性は試料の分離に少なからぬ影響を及ぼすことも判明した。宇宙ではこの攪乱がどの程度減少するか興味をもたれた。

実験方法

(1) 試料

S. typhimuriumのL P S変異株S L 1 0 2 7、S L 1 1 0 2、およびS L 3 7 4 9の3株を使用した。

培養方法等は地上実験の3部に述べた通りである。

(2) 緩衝液

地上実験では7 m μ T E Aを使用してきたが、宇宙実験では1 0 m μ T E A (p H 7. 5)に変異した。電流値が緩衝液流速に影響されず安定しており、緩衝能および伝導度が高い(1 0 m μでμ m h o ; 7 m μで9 0 μ m h o)ことが理由である。

陽極および陰極の電解液に変異ない。

その他、ここで特に述べない限り、地上実験で記した方法に従った。

(3) 泳動装置および泳動パラメーター

搭載装置は4 m m厚の泳動槽1基である。

泳動パラメーターは地上実験の結果より、次のように設定した。

緩衝液流速 = 6 c m / m i n

試料注入流速 = 5 c m / m i n

印可電圧 = 2 0 0 V (2 回 実 験)

3 0 0 V (1 回 実 験)

(4) 軌道上実験の方法

打上げ日時に合わせて地上で試料の培養を始め、集菌洗浄してから3菌体を混合し、試料カセットに充填密封した。打上げ24時間前にシャトルに搭載し、船内冷蔵庫に収納した。

軌道上実験は予備泳動から始めた。泳動槽にT E A緩衝液を流し、2 0 0 Vの電圧をかけて槽内流動と吸光度ベースラインの安定化を待ち試料を注入した。(ここで吸光度の検出の作動状況、感度等を確認し、試料の分離ピークを観察した。異常のないことを確認してから本実験に入った。吸光度データが直ちに地上に送信され、地上研究者はそのデータから分離状態を検討し分取範囲を決定する。その結果音声にて軌道上に返信した。搭乗科学者は指示通り分離試料を分取管に取り、冷蔵庫に収納して1回の実験が終わる)。 ()内は吸光度データが得られた場合の手順であり、今回はこのデータが得られなかったので、

実験結果の項に述べるように手順変更した。

泳動パラメーターのほかに槽壁温度、および重力変化等は磁気テープに記録され、地上での飛行後解析に供される。

実験結果および考察

電気泳動によるバクテリアの分離実験（L-8）はタンパク分離実験（L-3）の後に設定されており、両実験に使用する緩衝液容量に制限があるため、予備実験1回と本実験1回を実施することになった。しかし、軌道と実験開始直後に吸光度測定不能という情報が入り、予備実験を実施する意味がなくなった。それに代わり200Vでの本実験を2回することにした。飛行日程の1日延長に伴い、本実験を1日追加する時間が生じた。そこで緩衝液の残量を確認したうえで電圧を300Vに上げて本実験をした。泳動槽内の流れが定常状態に達したのを待ち、試料を注入して分離実験に入った。

シャトル着陸後、分離試料を回収して直ちに吸光度（280nmと280nm）と生菌数には、地上実験のところで述べたDM培地、SAC培地、SA培地を用いた。

200V泳動の結果を第1図に、300V泳動の結果を第2図に示した。200V泳動（第1図）では2つのピークが検出されたが、その1つのピークには3菌が混在しており、他のピークにはSL3749株が分離されていた。SL3749株の分離精製度は、吸光度測定により3ピークが現れ（第2図上）、3株が分離されたように見えた。そこで次に生菌数を測定してみると（第2図下）、上図の第1ピークに相当する画分にSL1027株のほかにSL1102株が混在し、第2および第3ピークにはSL3749株が2つに分割されて分離されていた。SL1102株が全く泳動しなかったこと、およびSL3749株が二つのピークに割れたことについては今のところ原因が不明である。

以上の通り200Vまたは300V泳動において3株の明確な分離は達成できなかった。フリーフロー電気泳動法には多くの利点がある一方で操作因子などを最適条件に設定することが難しい。熱対流および電気浸透流は、槽内流体の速度分布の攪乱の原因となり、試料の分離に影響する。泳動層は冷却しているが、槽厚が大きいと槽壁と槽中央部に速度勾配ができる。温度が1℃上昇するとEMは3%上昇するという。

電気浸透流の原因となるゼータ電位は槽壁面と流体及び試料の間に発生する。最適条件はこれらの間のゼータ電位差がないときに得られる。そのため槽内面を適当な物質でコーティングすることが行われる。今回はCMC-セルロースでコーティングしたが、これが最適材料であったかは、今後検討しなければならない。

上述の2つの要因はFFEでは避けられない問題である。このため槽の厚さは、2～2.5mmが限度であるという考え方もある。地上実験でよく使われる

Bender-Hobein社の装置は、0.3～1.0mm厚の泳動槽を採用している。

本実験の緩衝液流速、試料流速、槽壁面温度、槽内電圧および電流は、磁気記録テープから設定範囲内に保持されていたことが認められた。冷蔵庫の扉が7時間にわたり開放になっていて、庫内温度が10℃に上昇していたが試料には影響なかった。

結論

宇宙実験は全体のスケジュールに従い順調に進められた。搭乗科学者と地上支援グループとの連携作業がスムーズに機能し、正確な手順で実験が進められた。他方、不測の装置機能のトラブルにより実験内容を余儀なく変更せざるを得なかった。即ち予備泳動を中止することにより、本実験の遂行に支障が出た。

先に述べたように液体流動の攪乱因子、泳動槽サイズと操作条件の適合性等に関して十分に検討することが必要である。今回の実験からは、分離機能が地上より微小重力の場が優れているという明白な結論を下せない。しかし、今回の経験から多くの貴重な教訓が得られたので、それを生かして十分なる地上実験を積み重ねて行くことが必要と考える。

表 1. Davisの最小培地 (DM培地) 組成 (1 ℓ 当たり)

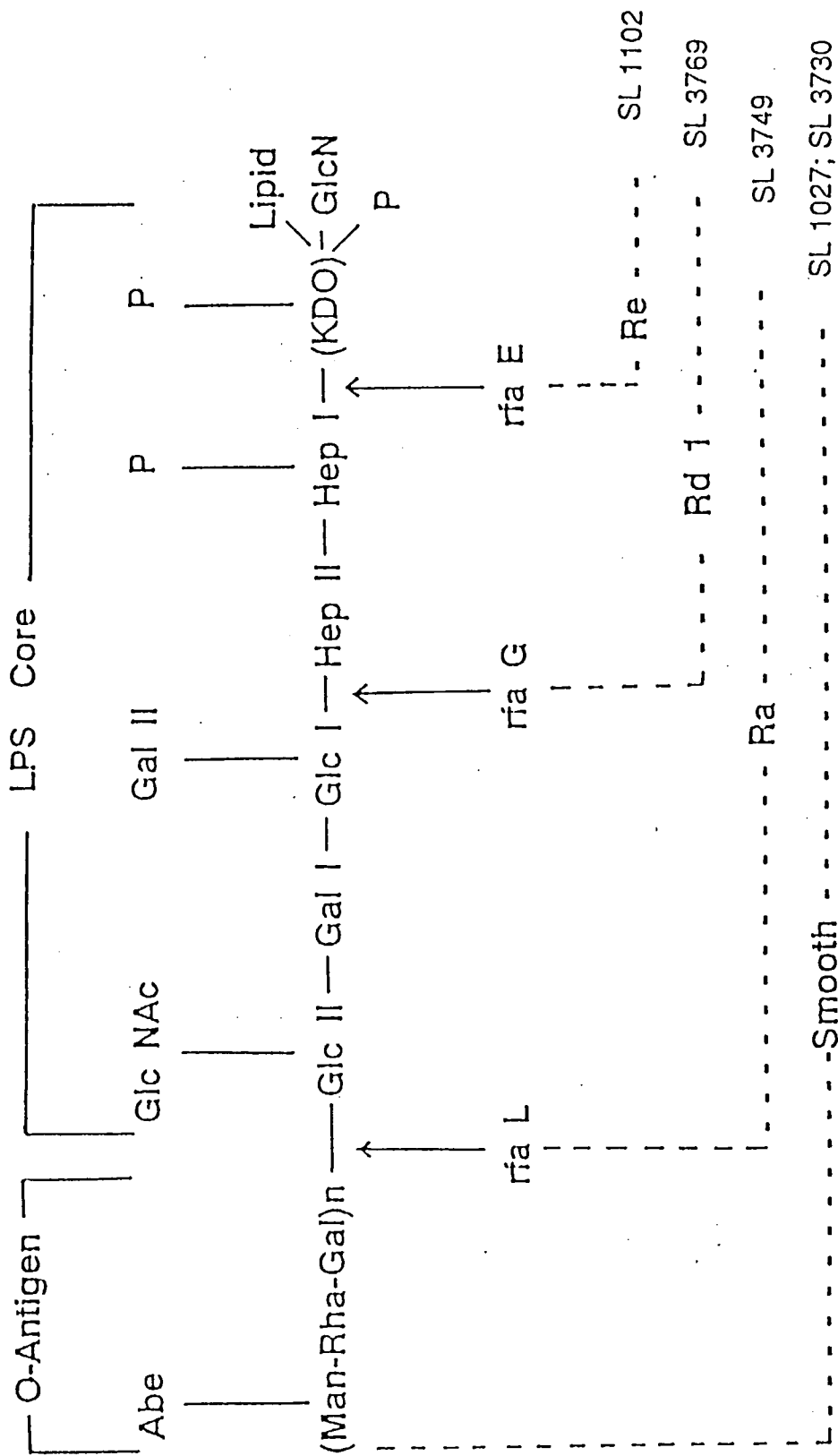
| | |
|------------|--------|
| グリセロール | 2.0 ml |
| K_2HPO_4 | 7.0 g |
| KH_2PO_4 | 3.0 g |
| クエン酸ナトリウム | 0.5 g |
| 硫酸マグネシウム | 0.1 g |
| 硫酸アンモニウム | 1.0 g |
| 寒天 | 15.0 g |
| pH | 7.0 |

表 2. カビ孢子およびバクテリア変異株のE μ

| Sample | Mobility ($\mu\text{m sec}^{-1}/\text{V cm}^{-1}$) | Standard deviation |
|--|---|-----------------------|
| <u>Spore of ;</u> | | |
| <i>Aspergillus terreus</i> | 2.2 | 0.6 |
| <i>Gliocladium virens</i> | 2.2 | 0.3 |
| <i>Penicillium citrinum</i> | 2.8 | 0.3 |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | 3.1 | 0.5 |
| <u><i>Salmonella typhimurium</i> strain;</u> | | |
| SL 1027 | 0 | |
| SL 3770 | 1.8 | 0.3 |
| SL 3749 | 3.1 | 0.6 |
| SL 3769 | 3.6 | 0.5 |
| SL 1102 | 4.2 | 0.3 |

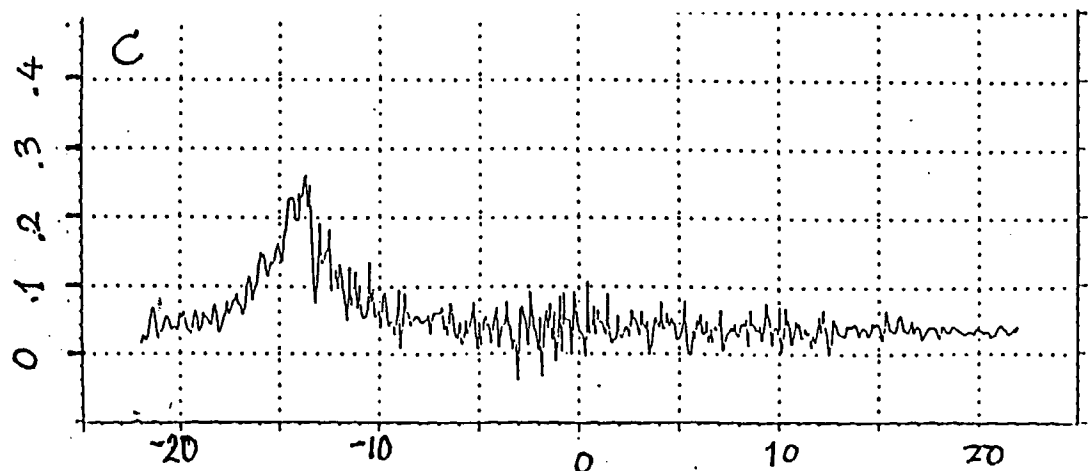
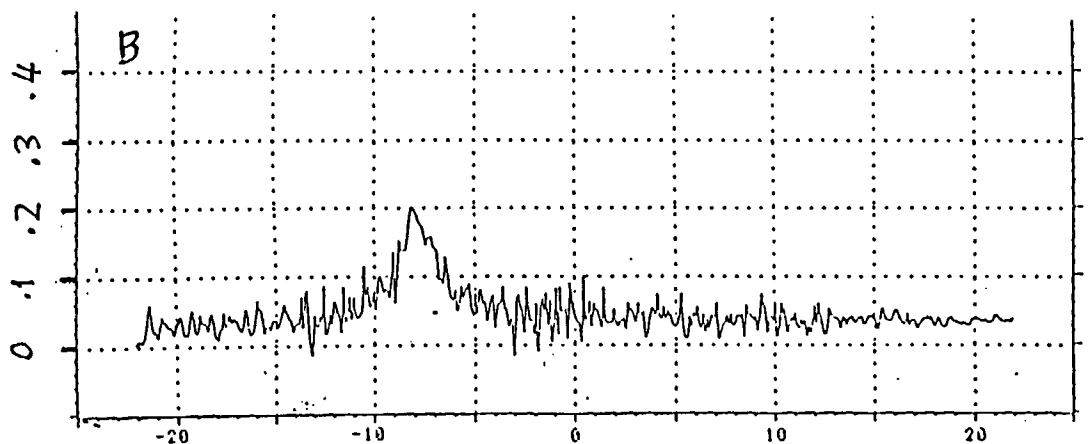
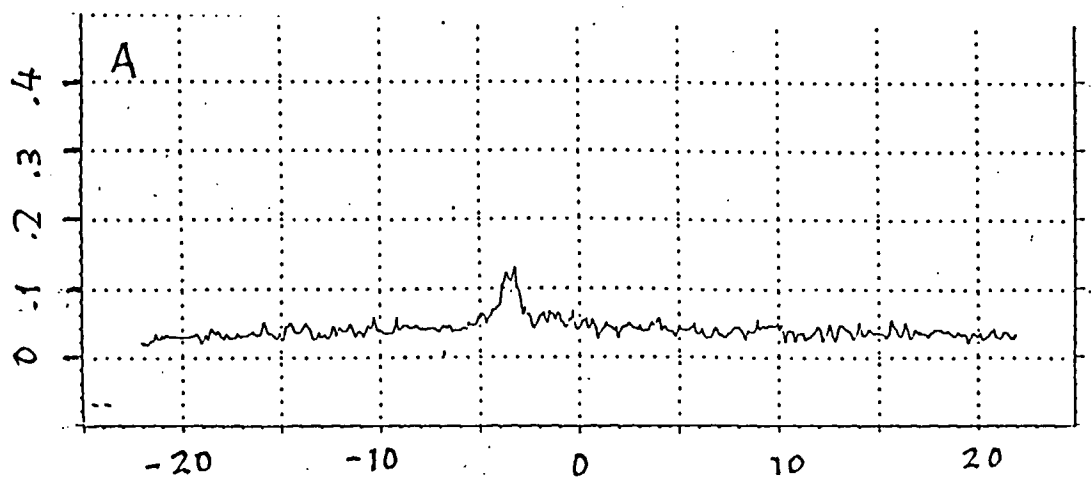
第3表 バクテリアに対する薬剤の最小生育阻止濃度 (MIC)

| Strain | MIC[$\mu\text{g/ml}$] | | Colony type |
|---------|-------------------------|----------------|-------------|
| | Acetyl spiramycin | Crystal violet | |
| SL 1027 | > 50 | 150 | Smooth |
| SL 3770 | > 50 | 150 | Smooth |
| SL 3749 | 50 | 75 | Rough |
| SL 3769 | 50 | 42 | Rough |
| SL 1102 | 12.5 | 12 | Rough |



第1図 サルモネラ変異株のリポ多糖 (LPS) 構造

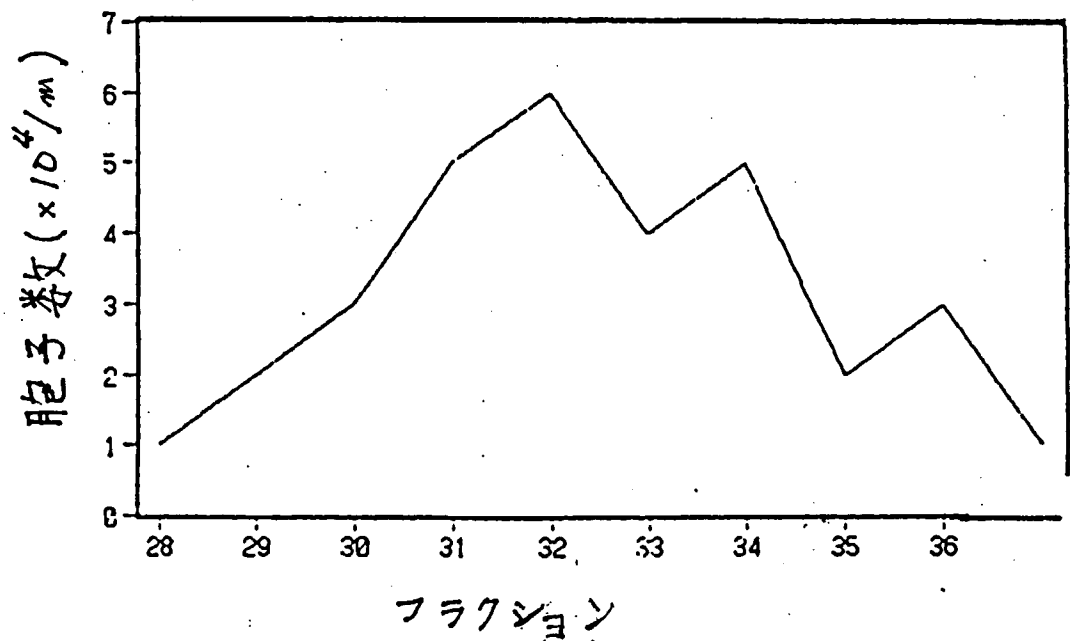
吸光度 (280 μm)



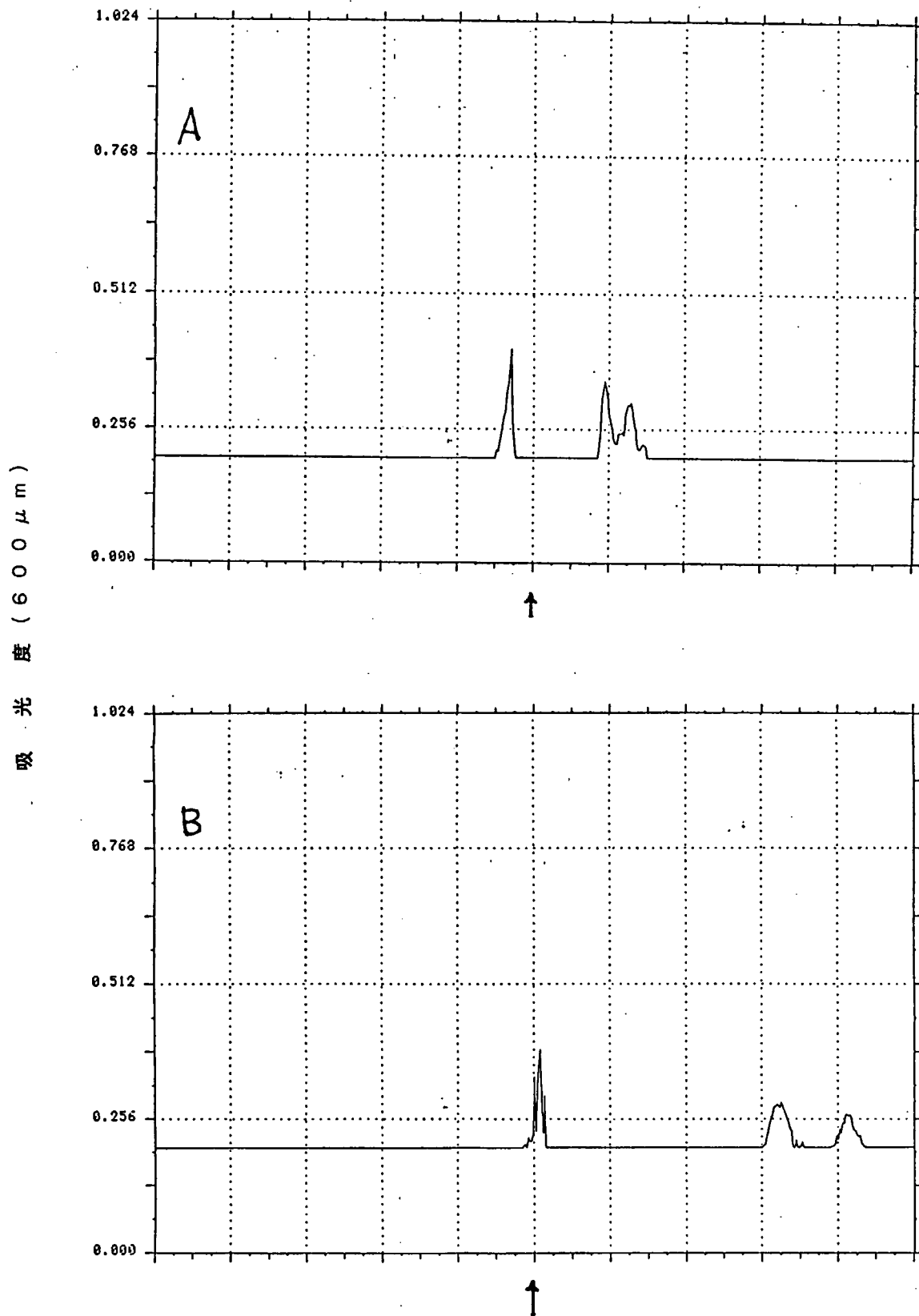
フラクション

第2図 カビ胞子 (*A. terreus* + *R. oryzae*) の
F F E (1mm槽) における吸光度チャート
A=100V, B=200V, C=300V

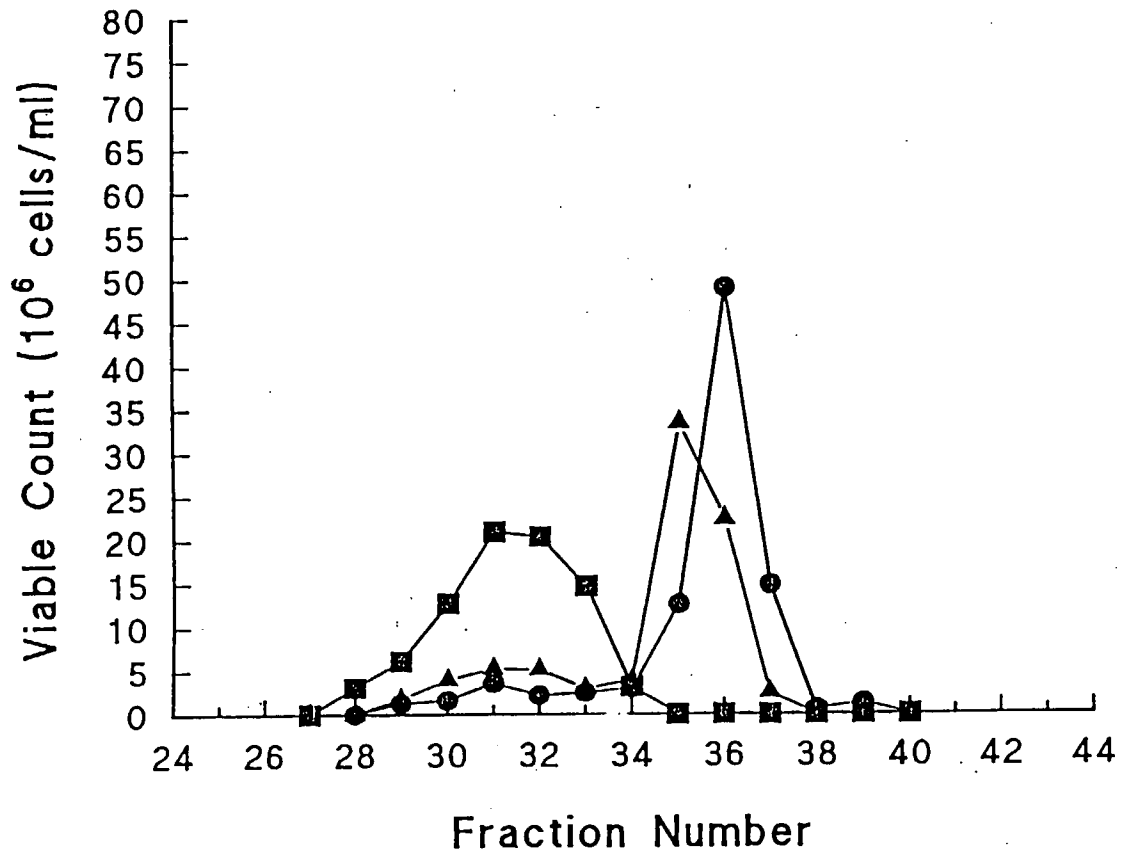
Penicillium $1 \times 10^8 / \text{ml}$
Aspergillus $2 \times 10^7 / \text{ml}$) の混合液



第3図 カビ胞子の F F E (4mm槽)

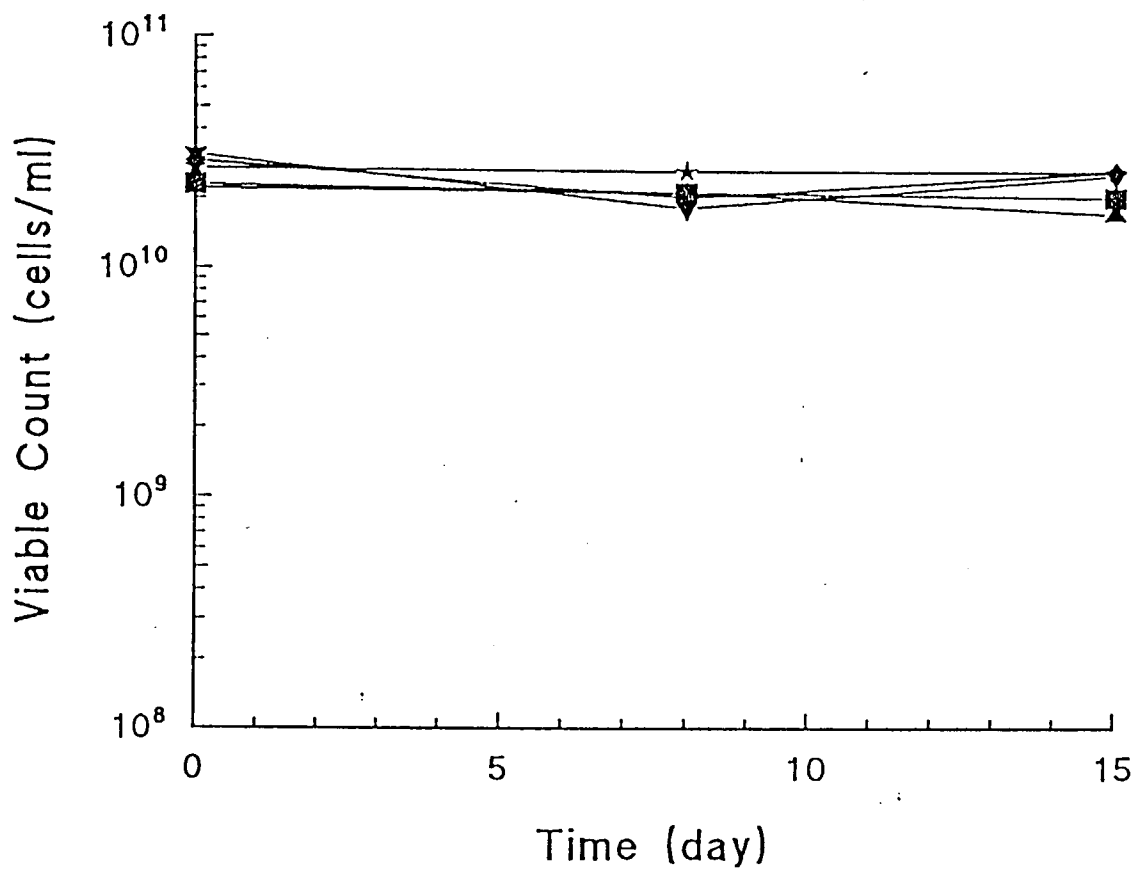


第4図 FFE (1mm槽)によるバクテリアの分離
 A=200V, B=400V
 ↑=泳動槽中央 (試料注入位置)



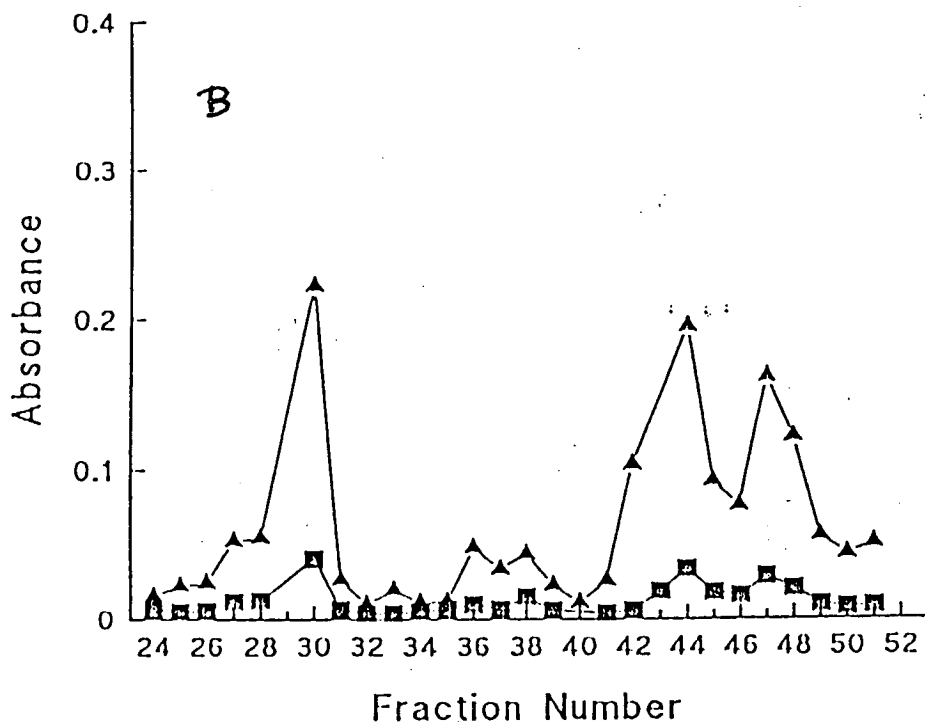
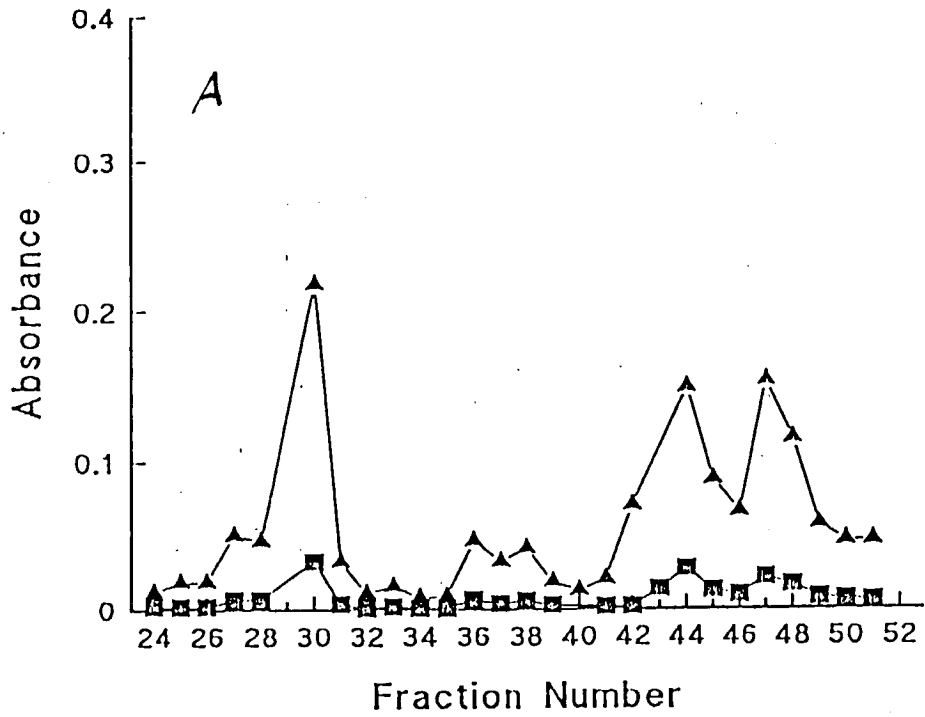
第 5 図 F F E (4mm槽) によるバクテリアの分離

■ ; SL1027, ▲ ; SL1102, ● ; SL3749



第6図 バクテリア細胞の安定性

▲: SL3770, ▼: SL3769, ◆: SL3749,
 ■: SL1102, ☆: SL1027



第 7 図 バクテリア混合液 (SL1027+SL1102+SL3749) の F F E パターンの比較 (200V)

A=調製直後の混合液
 B=4 °Cにて4日保存の混合液
 ■=600 μm吸光度
 ▲=280 μm吸光度