# ゾウリムシの生物対流実験

奈良女子大学・大学院人間文化研究科　狐崎　創 (So Kitsunezaki)
Graduate School of Human Culture,
Nara Women's Univiversity
徳島文理大学・香川薬学部　小森　理絵 (Rie Komori)
奈良女子大学・理学部　春本　晃江 (Terue Harumoto)

概要

水中を遊泳する微生物が高密度状態になると、微生物の運動と流体の流れの相互作用によって自発的に対流が発生することが知られている。ここでは Hele-Shaw cell 中で *Paramecium tetraurelia* (ヨツヒメゾウリムシ) の生物対流の時間発展と個体運動を調べる実験を行った。*P. tetraurelia* では対流パターンは、容器の底付近から現れて徐々に自由界面に向かって発達し、十分に時間が経っても非定常なロール構造が観察される。このような生物対流はゾウリムシ自身の消費によって生じた酸素の欠乏が原因になっている可能性が高い。

# 1 Introduction

生物対流 (bioconvection) は、微生物が水面近くに作った個体密度の高い層が流体力学的不安定性を通して対流を起こし、結果的に集団運動を発生させる現象である。Rayleigh-Bénard (RB) 対流に類似したパターンが運動性のある微生物で広く観察されており、繊毛虫の *Tetrahymena*、鞭毛虫の *Chlamydomonas*、バクテリアの *Bacillus subtilis* などで詳しい実験が行われている [1, 2, 3, 4]。これまで提案された対流発生のメカニズムは、(1) 微生物自身の上昇運動によって水面付近に個体密度の高い層が自発的に形成され、(2) その層が Rayleigh-Taylor (RT) 不安定性により水平な状態を保てなくなり適当な間隔で下降流が生じる、という点で基本的に一致している [5, 6, 7]。

微生物の上昇運動の原因は、oxygentaxis(酸素勾配に対する走行性)、phototaxis(光に対する走行性)、gyrotaxis に起因する geotaxis ( 重力に対する負の走行性) など生物の種類によって異なる。このような微生物の運動をドリフトを伴う個体密度の拡散方程式で表し、Navie Stokes 方程式と組み合わせた形の数理モデルがいくつか提案され、線形及び弱非線形解析が行われている [8, 9, 10, 11, 12, 13]。また数値計算により、RB 対流と同様に水深とほぼ同じスケールの対流ロール構造が発達することが示されている [14]。

本研究では、*P. tetraurelia* を用いて生物対流の実験を行い、Hele-Shaw cell 内での準 2 次元的な対流の形成過程と時間発展を調べた。これまで定量的な生物対流の実験が行わ

れた数種類の微生物の中では、*P. tetraurelia* は体長 約 $90 \sim 170 \mu m$ と大型の繊毛虫である。ゾウリムシは壁や他の個体と衝突すると、後退運動をして回避行動をとる性質がありその運動は基本的に拡散的であるが、様々な刺激に対して複雑な応答する。thermotaxis, glavanotaxis, chemotaxis, oygentaxis, rheotaxis などの様々な走向性を示すことが知られており、gyrotaxis が見られるという報告もある [15, 16, 17]。ここでは、個体運動の顕微鏡観察の結果と合わせて *P. tetraurelia* の生物対流のメカニズムについて調査した。

## 2 実験方法

実験には *P. tetraurelia* の wild-type, stock 51 を用いた。低温 ($15°C$) で保存しているゾウリムシを、餌となるバクテリアを豊富に含む溶液[1] (約 400ml) に移して、実験前に $25°C$ で $3 \sim 4$ 日間培養し個体数がほぼ一定の状態 (stationary phase) になるまで増殖させる。この状態でゾウリムシの個体数は $10^3$cells/ml 程度であり、餌が十分でもこれ以上密度が高くなることはない。個体密度をさらに上げるために、濾過してごみを除いた後、遠心分離機を使って濃縮する。遠心分離は培養液中で一回行ったあと、沈殿部分のみを生理的塩類溶液 SMBIII[20] に移してもう一度遠心分離する。沈殿した部分を取出し再び濾過して得られた個体密度 $10^5$cells/ml 程度の溶液約 1ml を実験で用いる原液とした。実験前に原液を $1/40$ 倍に希釈した $5 \mu l$ の液滴を 15 サンプル作り、実体顕微鏡で個体数を計測し個体数密度 $n_0$ を決めた。実験は原液作成から半日以内に行っている。原液中ではゾウリムシは増殖しておらず、各実験ではほぼ個体数が保たれていると考えられる。

以下では、実験容器として平行な 2 枚スライドガラスからなる Hele-Shaw cell を用いた。容器のサイズは幅 $W = 66.7 \pm 0.1mm$、厚み $D = 1.23 \pm 0.05mm$ で、水深 $H$ は容器に入れるゾウリムシの溶液の体積 $V$ で決まる。個体密度 $n_0$ を低くする場合は、原液を SMBIII で希釈した。実験では、ゾウリムシの溶液を細いステンレスワイヤーで撹拌して個体密度を一様にした後、温度 $26 \sim 28°C$ の室内で放置して容器内を観察した。Hele-Shaw cell の壁の間隔が狭いため、溶液を入れただけでは表面張力で水面は水平にならないが、撹拌の際にほぼ水平な水面ができるようにしている。容器全体は暗室中で後ろから低消費電力の白色蛍光灯で均一に照明し、対流パターンはデジタルカメラ (Canon EOS10D) を用いたインターバル撮影で、また個体の運動状態は実体顕微鏡 (wraymer SW-700TD) で動画撮影した。

## 3 *P. tetraurelia* の生物対流パターン

垂直に置いた容器で対流パターンの形成過程を観察した。溶液の底と側面は固定境界で、上は空気と接する水面である。図 1 は体積 $V = 1000 \mu l$ のゾウリムシの溶液を入れ、

[1] 0.5% phosphate-buffered wheat grass powder ( Pines Int., Inc., Lawrence, KS) infusion supplemented with 0.5 mg/l stigmasterol and inoculated with *Enterobacter aerogenes* 2-3 days before use [18, 19].

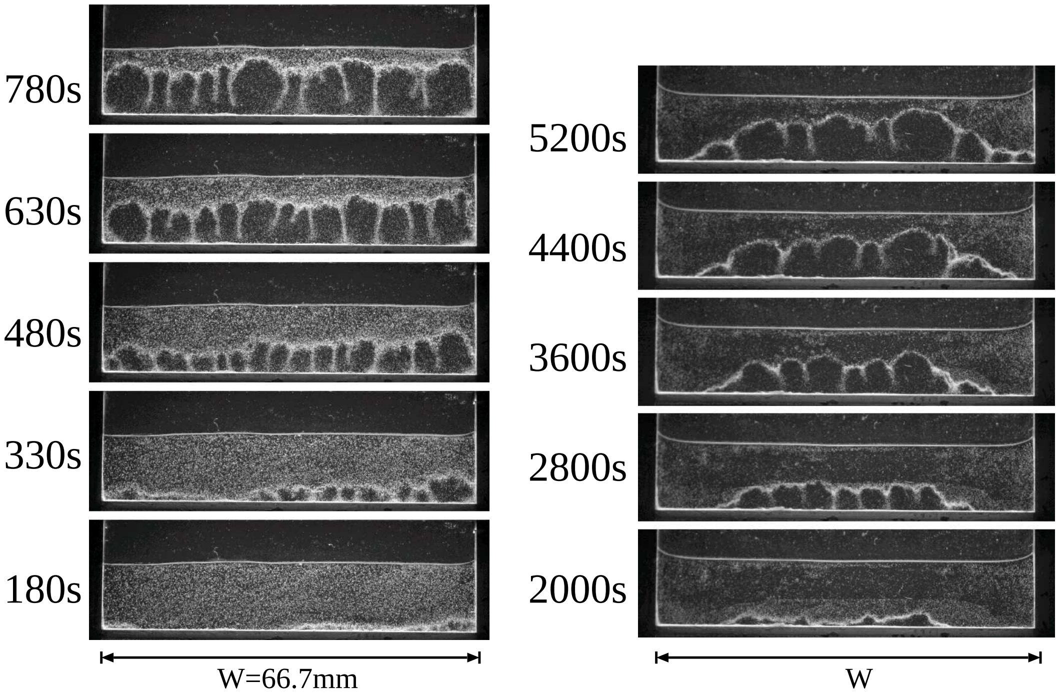


図 1: 対流パターンの形成過程、画像横の数字は撹拌後の経過時間 (秒)
$V = 1000\mu l$, (左)$n_0 = 0.61 \pm 0.22 \times 10^5$cells/ml, (右)$n_0 = 0.21 \pm 0.03 \times 10^5$cells/ml

一定の時間間隔で撮影したグレースケール画像である。ゾウリムシの個体が照明で白く写るので、個体密度が大きい場所ほど明るく見えている。

従来報告されている生物対流では最初に個体の上昇運動により水面付近の個体密度が大きくなるのに対して、*P. tetraurelia* の生物対流は、撹拌後にむしろゆっくりとした沈殿が起り、その後、個体密度の高い帯状の領域（以下フロントと呼ぶ）が容器の底付近にでき水面に向かって徐々に進行する。フロントの後ろには対流パターンが形成され、フロントが進むにつれてロール構造が大きくなる。フロントの形成および上昇にかかる時間は、個体密度 $n_0$ 及び水深 $H$ が増加すると減少する。

フロントの移動は水面付近に達すると止り、フロントの後ろに形成された対流領域は長時間そのまま維持される。表面付近から個体密度の大きい下降流が所々に生じ、その他の領域では表面へのゆっくりした上昇流が観察される。１つの実験で一定間隔に撮影された一連の静止画像から、容器の底から一定の高さ $y$ の水平線に沿って画素を切出し、時間順に並べて１つの画像 (space-time image と呼ぶ) を合成すると、対流パターンの時間発展を視覚的に捉えることができる。図 2 は同じ密度で、水深が 2 倍異なる 2 つの試料についての space-time image である。画像の縦軸が時間で、下が撹拌直後である。撹拌直後からフロントが上昇してくるまで一様な密度が保たれているが、フロントが通過して複数の下降流が発生すると画像上に模様が現れる。体積 $1000\mu l$ の場合（図左）では、下降流が頻繁に発生しては互いに徐々に近づいて合体を繰り返して、対流ロール構造が

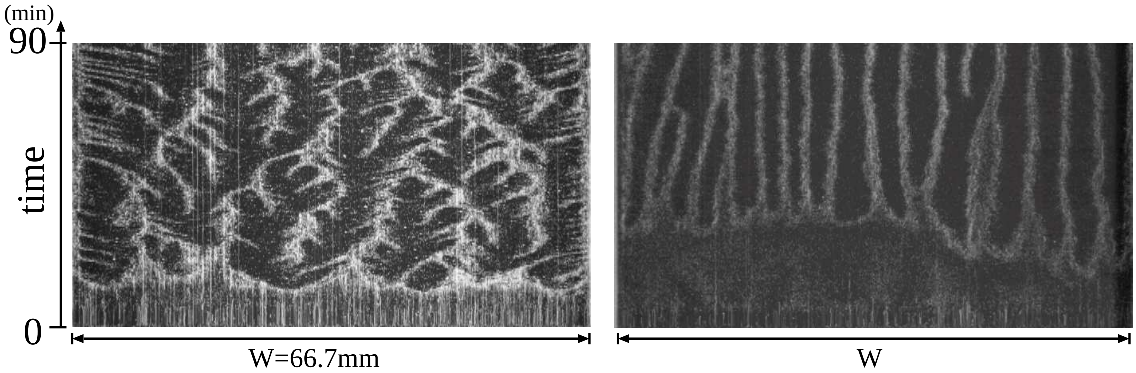


図 2: space-time images
$n_0 = 0.61 \pm 0.22 \times 10^5$cells/ml, 左は $V = 1000\mu l$, $y = 0.75H$、右は $500\mu l$, $y = 0.5H$。

生成消滅を繰り返す。一方、水深が浅い体積 $500\mu l$ の結果（図右）では、下降流の生成と合体は少なく、同じロール構造が長時間保たれている。

発生した下降流同士が徐々に接近し合体することは、Harashima らが *H.akasiwo* の生物対流 に対して提案した数理モデルの数値計算と一致するが、対流構造が定常にならない点で異なる [14]。以上のような非定常な時間発展の原因はまだ明らかではないが、表面付近で発生する下降流の間隔が RT 不安定性により粘性と密度差でほぼ決まるのに対して [5, 6]、時間発展後に選択される大域的な対流ロールの間隔は水深に比例するため、両者の不一致に由来するのではないかと予想される。水深が小さい場合はこの 2 つの間隔が近くなり、対流のロール構造が次々に発生する下降流によって大きな摂動を受けることなく長時間維持されると考えられる。

# 4 フロントの形成要因

対流パターンの発生には重力による流体力学的不安定性が関与している。実際、Hele-Shaw cell 容器に細いワイヤーを水面に沿って渡すと、空気（およびワイヤー）と接するほぼ直線的な水面を維持したまま、容器を水平にしたり、逆さにしたりすることができるが、いずれの場合も前節で見たような持続的な対流は現れなくなる。

一方、図 3 の写真にあるように、フロントの形成とその後のゆっくりした進行自体は、容器を水平にした場合にも観察される。対流を伴わずフロントの形状もやや異なるが、フ

図 3: 容器が水平な場合のフロント。上に写っているのはワイヤー (0.3mm$\phi$)。

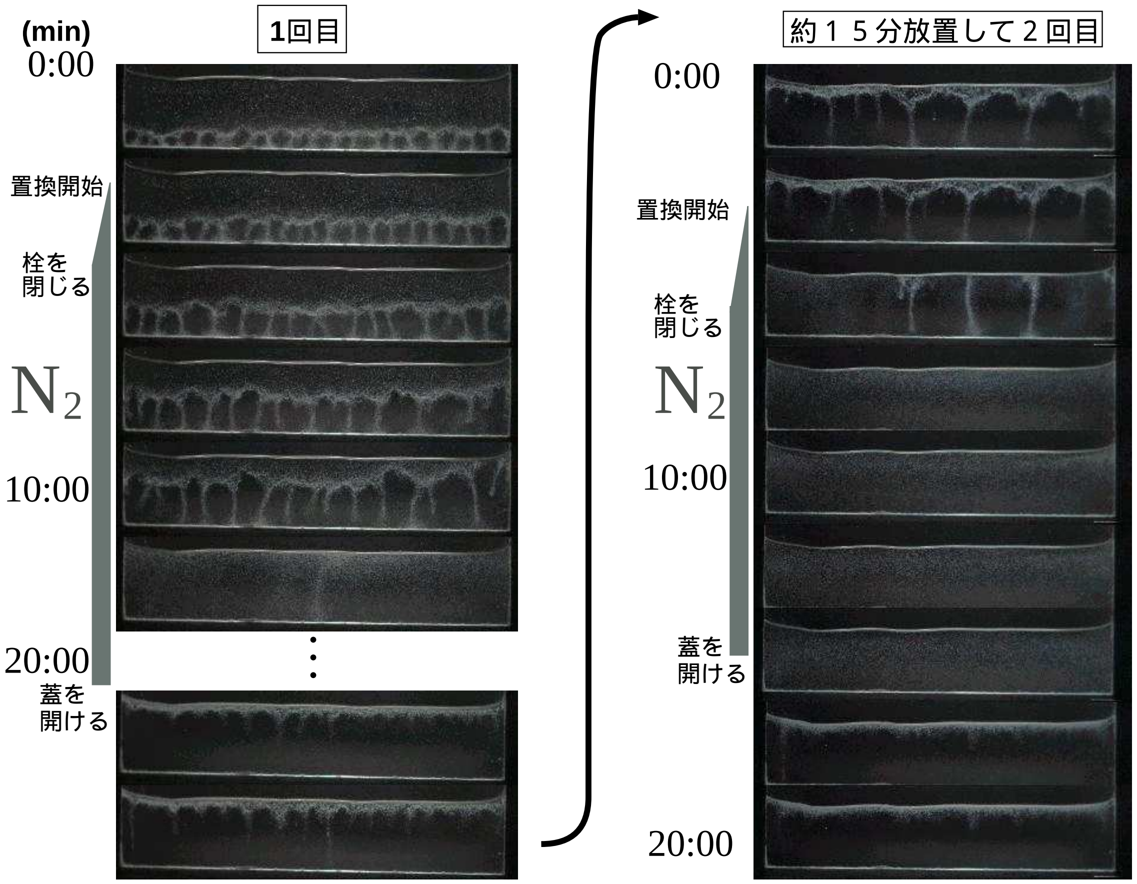


図 4: 窒素中での実験

ロント領域では密度が高く、フロントが空気 – 水界面に向かって移動するという特徴は同じである。従って、フロントの形成の原因は geotaxis (重力に対する負の走行性) ではないと考えられる。

容器が垂直な場合でも、水面を蓋して固定境界に替えると持続的な対流パターンは現れなくなる。そこで空気の影響を調べるために、空気を窒素に置換する実験を行った。図 4 の写真は 1 回の実験で撮影されたスナップショットを時間順に並べたもので横に経過時間を分で表示してある。この実験では Hele-Shaw cell 容器自体を透明な密閉容器にいれ、空気 → 窒素 → 空気 → 窒素 → 空気、と 2 回窒素置換をおこなった。写真の横のグレーの線は、環境が窒素である時刻を示す。

実験の結果から、窒素中では持続的な対流は現れず、対流が起きていても消えてしまうことがわかる。ただし、１回目の窒素置換の結果からわかるように、対流のフロントが容器の底付近にある時に空気を窒素で置換しても、フロントはそのまま上昇を続け、対流が消えるのはフロントが水面に達した直後である。また、窒素中では対流がなくなりゾウリムシがほぼ一様に拡散した状態になるが、そこで再び空気を入れた場合は底からのフロントの形成は起らず、従来報告されている生物対流の形成過程と同様に、水面付近の個体密度がすぐに大きくなって対流パターンが再生される。

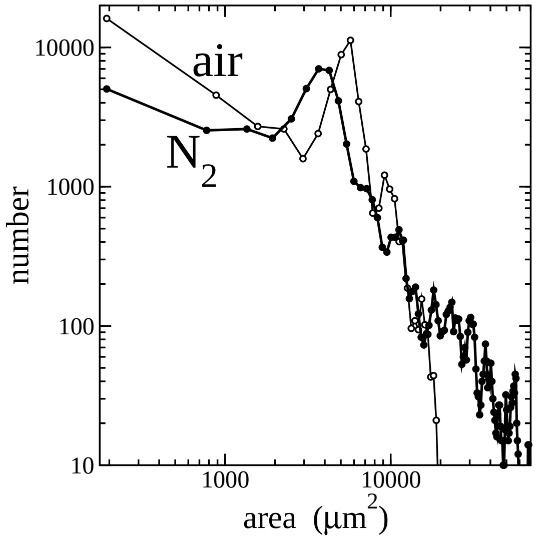


図 5: サイズ分布

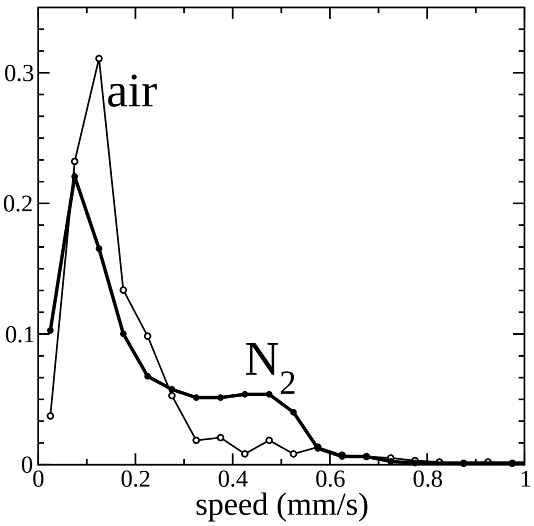


図 6: 速度分布

これらの結果は、フロントが水中の空気（おそらく酸素）濃度が欠乏した結果として、酸素濃度が豊富な領域との境界付近に形成されること、及び、空気中では高密度のゾウリムシの集団自身の酸素の消費がフロント形成の原因になっていることを示唆していると思われる。

## 5　ゾウリムシの個体運動

空気の有無でゾウリムシの個体運動はどのように変化するであろうか。

最初に、前節の実験と同様に密閉容器を用いて、空気中と窒素中でのゾウリムシの運動を実体顕微鏡で観察した。ここでは、底面にカバーガラスを貼った内径 $22\mathrm{mm}$ の円筒形のアルミ容器を用い、ゾウリムシの原液 (密度 $n_0 = 1.9 \pm 0.26 \times 10^5 \mathrm{cell/ml}$) を $1/40$ に希釈した溶液 $800\mu l$ を使った。容器内での水深は平均 $2.1\mathrm{mm}$ である。撹拌後 $4$ 分静置してから、真上から実体顕微鏡で動画を撮影した。

撹拌直後は、どの個体も単独で活発に泳いでおり、空気中と窒素中で動きに差異は見られない。時間が経つと、窒素中ではゾウリムシ同士が衝突してクラスターが多く形成される。ただし、クラスターになった個体は運動をやめるわけではなく、クラスターの大部分は単独の個体に比べてかなり遅いがランダムに動いている。一方、空気中ではクラスターはほとんど作られないが、単独で運動をやめてほとんど動かなくなる個体が多く見られる。

図 5, 図 6 に、５秒間の動画から画像解析ソフト ImageJ [2] を用いて、個体やクラスターを判定し、そのサイズと移動速度の分布を解析したグラフを示す。サイズ分布には、空気中、窒素中とも１個体に相当する面積でグラフにピークが見られるが、大きなクラス

[2]http://rsb.info.nih.gov/ij/.


図 7: フロント付近の実体顕微鏡写真

ターは窒素中でしか形成されない。速度分布は、空気中、窒素中とも $0.1 \sim 0.2\mathrm{mm/s}$ 付近が最大であるが、$0.3 \sim 0.6\mathrm{mm/s}$ 付近で動く個体が空気中より窒素中で多いことがわかる。

このように、空気が欠乏するとゾウリムシが活発に運動する状態になり、同時にクラスターが形成されやすくなる。ただし、クラスター形成に関しては、酸素の欠乏によって衝突時の回避運動が生理的に損なわれているのか、単に活発な運動が衝突回数を増やし運動論的にクラスターの形成が促進されているのか、この実験結果から判断はできない。

次に実際に空気中でフロントが形成されている時のゾウリムシの個体運動を観察した。図 7 はフロント付近の下降流ができている場所を実体顕微鏡で撮影したスナップショットである。フロントの付近ではゾウリムシは密集して渋滞状態になっており、個別的な拡散運動とは異なる。また、小さなクラスターがフロント内で形成され沈降していく様子も観察される。

容器中央の 1 箇所を選び実体顕微鏡で定点観察を行い、フロント通過の前後でゾウリムシの個体運動を調べた。一般にフロント通過前は、止っている個体やクラスターになっている個体が多いが、フロントが通過後に残っている個体はほとんどが活発に運動している。図 8 に動画から 50 個体選んで調べた 1 秒間の運動の軌跡を、始点を一致させて書いたデータを示す。50 個体の 1 秒間の平均変位を黒丸で、共分散楕円を点線で示した。ただし、クラスターに含まれる個体は識別しにくいためこの解析の対象からは除かれている。

左側のグラフは、容器が垂直の場合のフロント通過前（上）と通過後（下）の解析結果である。フロントの通過前には個体運動に上昇運動の傾向は見られず、むしろ、わずかに下降しているように見える。これに対して、フロントが通過し対流が生じた部分では、ゾウリムシは上方に直線運動をする傾向が見られる。この観察位置は対流パターン

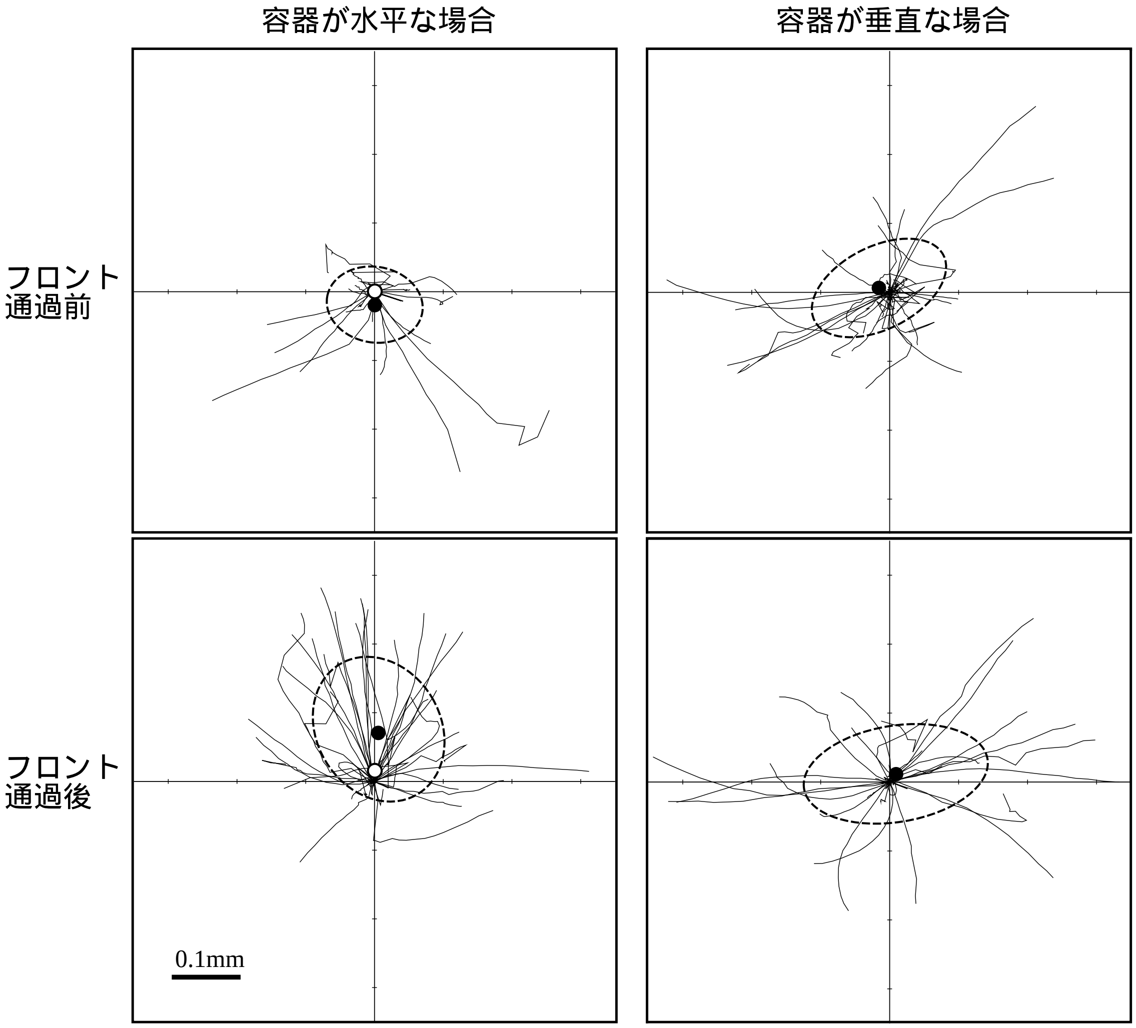


図 8: 1 秒間のゾウリムシの軌跡 (目盛 0.1mm)。

の中で下降流と下降流の中間地点にあり、水の流れ自体も上に向かっている。左側の図中の白丸はゾウリムシより小さな浮遊物の 1 秒間の平均的な変位を解析した結果で、これはこの地点での水の流速の指標と見なせる。このようにフロント通過後は、対流が生じ、その方向とゾウリムシの運動方向はほぼ一致しているが、平均速度は水よりゾウリムシの方が数倍大きいことがわかる。一方、右側のグラフは、図 3 のように容器を水平にした場合のフロント通過前（上）と通過後（下）の同様のデータである。速度の分散がやや大きくなる点は同じであるが、容器が垂直な場合と異なり、フロント通過後にも個体運動に方向性は見られない。

フロントの通過とともにゾウリムシの運動が活発になることは、先に述べた窒素中での振る舞いと一致しており、フロントが通過した領域で酸素の欠乏が起きてるという前

節の仮説を支持する結果と考えられる。対流が生じている場所で観察された上昇運動は、水平に容器を置いた場合は見られないので、酸素勾配に対する走行性というより、対流によって生じた水の流れに対する走行性 (rehotaxis) によって生じている可能性が高い。

## 6 結論

本研究では、高密度に濃縮した *P. tetraurelia* の溶液で観察される生物対流を Hele-Shaw cell を用いて調べた。

*P. tetraurelia* の生物対流は、対流パターンの形成が容器の底付近から表面に進む密度の高いフロントの進行とともに生じるという特徴がある。窒素を用いた実験、および、個体運動の解析結果から、ゾウリムシ自身の消費によって生じた酸素の欠乏により、個体運動が活発になることがこのフロントの形成の要因であると推定される。酸素欠乏がゾウリムシの運動の性質にどう影響するのかに関しては、生理機能も含めた個体レベルの研究が待たれるが、*P. tetraurelia* の生物対流に対しては、酸素勾配や重力に対する走行性 (oxygentaxis, geotaxis) は大きな寄与をしているようには見えず、何らかの oxygenkinesis が主因になっていると考えられる。

フロントの通過前後の個体運動の解析は、ゾウリムシの水流走性が上昇運動を促進していることを示唆している。また、密度の高いフロントではゾウリムシが凝集したクラスターが形成されては沈降する様子が見られるが、このような水流走性やクラスター沈降が対流に与える効果は今後検討する必要がある。

発達した対流パターンは、一般に下降流の生成と合体が繰り返される非定常なロール構造を作る。非定常な時間発展の原因は、RT 不安定性の波長と選択されるロール構造のスケールの不一致にあると推測されるが、この点は数理モデルによる研究の課題であろう。

## 7 謝辞

本研究は著者の狐崎が、高密度のゾウリムシの溶液に見られるパターンについて高木由臣氏 ( 現奈良女子大学名誉教授 ) と共著者の小森氏に聞いたことに始まっています。高木氏には、研究を進める上で不可欠な、ゾウリムシについての多くの知識と実験試料や設備も提供して頂きました。また、窒素置換の実験は、奈良女子大学物理科学科の狩俣氏、石井氏の協力で行われました。

## 参考文献

[1] M. A. Bees and N. A. Hill, J. Exp. Biol. **200**, 1515-1526 (1997).

[2] I. M. Jánosi, J. O. Kessler and V. K. Horváth, Phys. Rev. E **58**, 4793-4800 (1998).

[3] A. Czirók, I, M. Jánosi and J. O. Kessler, J. Exp. Biol. **203**, 3345-3354 (2000).

[4] Y. Mogami, A. Yamane, A. Gino and S. A. Baba, J. Exp. Biol. **207**, 3349-3359 (2004).

[5] M. S. Plesset, C. G. Whipple, Phys. Fluids **17**, 1-7 (1974).

[6] M. S. Plesset, C. G. Whipple and H. Winet, J. Theor. Biol. **59**, 331-351 (1976).

[7] T. J. Pedley and J. O. Kessler, Annu. Rev. Fluid. Mech. **24**, 313-358 (1992).

[8] J. O. Kessler, Nature **313**, 218-220 (1985).

[9] J. O. Kessler, J. Fluid Mech. **173**, 191-205 (1986).

[10] T. J. Pedley, N. A. Hill and J. O. Kessler, J. Fluid. Mech. **195**, 223-237 (1988).

[11] N. A. Hill, T. J. Pedley and J. O. Kessler, J. Fluid Mech. **208**, 509-543 (1989).

[12] T. J. Pedley and J. O. Kessler, J. Fluid. Mech. **212**, 155-182 (1990).

[13] A. M. Metcalfe and T. J. Pedley, J. Fluid Mech. **370**, 249-270 (1998).

[14] A. Harashima, M. Watanabe and I. Fujishiro, Phys. Fluids **31**, 764-775 (1988).

[15] R. Wichterman, *The Biology of Paramecium, 2nd ed.* (Plenum Press, New York, 1986).

[16] K. Hausmann and N. Hülsmann, *Protozoology, 2nd ed.* (Georg Thieme Verlag, New York, 1996).

[17] J. O. Kessler, Comments Theor. Biol. **1**, 85-108 (1989).

[18] Y. Tokusumi and Y. Takagi, Zool. Sci. **17**, 341-348 (2000).

[19] N. Mizobuchi, K. Yokoigawa, T. Harumoto, H. Fujisawa and Y. Takagi, J. Eukaryot. Microbiol. **50**, 299-303 (2003).

[20] A. Miyake, *Sexual Interaction in Eukaryotic Microbes* edited by D. H. O'Day and P. A. Horgen (Academic Press, New York, 1981) pp. 95-129.