



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Observation for Protoplasmic streaming that changes its morphology and transport in Physarum polycephalum
Author(s)	佐藤, 耀
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(ソフトマター科学)
Dissertation Number	甲第16532号
Issue Date	2025-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16532
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95687
Type	doctoral thesis
File Information	Yo_Sato.pdf



Doctoral Dissertation

Observation for Protoplasmic streaming that changes its
morphology and transport in *Physarum polycephalum*
(変形菌モジホコリにおける形態と輸送を変える原形質流動の観察)

SATO Yo 佐藤 耀

Graduate School of Life Science, Hokkaido University

2025 June

目次

第 1 章	序論	5
第 2 章	先行研究	7
2.1	変形菌の生物学	7
2.1.1	変形菌の生態	7
2.1.2	変形菌の生活環	8
2.1.3	変形体の内部構造	9
2.1.4	原形質流動の仕組み	9
2.2	生物ネットワークのモデル生物としての変形菌	10
2.3	流路ネットワークの輸送能力評価	10
2.4	流路ネットワーク内で観察された物質のミキシング	11
第 3 章	培養方法と実験方法	13
3.1	培養方法	13
3.2	原形質ドロップ内部流動の観察実験方法	13
3.3	画像処理方法	14
3.4	細胞内粒子の可視化	14
3.5	PTV のアルゴリズム	16
3.6	PTV データの扱い方	19
3.7	質量輸送率とそのエネルギー効率の推定	19
3.8	最大流速による最大流速分布	20
第 4 章	結果	23
4.1	PTV による細胞全域の流速測定	23
4.1.1	原形質ドロップの形態変化	23
4.1.2	PTV による細胞中のゾル層流路の可視化	24
4.1.3	流路ネットワークの発達に伴う流速の発達	25
4.1.4	流動パターン	27
4.1.5	質量輸送の増加と単位コストあたりの質量輸送の評価	28
4.2	流速分布測定と原形質のレオロジー特性	29
4.2.1	流速分布におけるシアシニング特性と流速分布の時間変化	29
4.2.2	臨界せん断速度の包括的な推定	30
4.2.3	流路ネットワークのスケーリング関係	31
4.2.4	F-アクチン溶液の様なシアシニング流体における管状の流れの理論と実験結果との比較	31
4.3	流速の実測値に基づく細胞内物質輸送・混合シミュレーション	34
4.3.1	細胞内物質輸送シミュレーション	34
4.3.2	シミュレーションの手法	35

4.3.3	平均流速場の妥当性	36
4.3.4	粒子シミュレーション例	36
4.3.5	輸送能力の定量的評価	39
4.3.6	仮想粒子の平面分散評価	39
4.3.7	異なる 4 区画から出発した仮想粒子の混合に関するシミュレーション	40
第 5 章	考察と結論	43
5.1	単純なモデルによる拡散定数に関する論理的検証	43
5.2	流路ネットワークにおいて環状路を介して管の細い周辺部同士で物質輸送する際に考えるメカニズム	43
5.3	変形菌モジホコリ <i>Physarum polycephalum</i> における原形質流動のシアシニング性	44
5.4	流路ネットワークの形成機構	44
5.5	本研究のまとめと今後の展望	45
参考文献		47
付録 A	圧力差によって駆動される硬い円筒形パイプ内の定常流の流速分布の導出	50

Abstract

生物における輸送ネットワークは、動物の血管系や植物の維管束系、真菌類の菌糸系をはじめ幅広い生物種にみられる特徴的な構造物であり、生物体の維持において重要な役割を担っている。にもかかわらず生物体全域にわたる輸送性能の計測や評価は容易ではないため、この課題はこれまで持ち越されてきた。本研究では、変形菌モジホコリに注目し、その特性を活かすことで、この課題をいくつかの点で克服できた。

変形菌 (または真性粘菌) モジホコリの変形体は、アメーボゾアに属する多核の単細胞生物であり、シート状の体内に流路ネットワークを作って、体全体を調節し維持している。変形体内の原形質流動 (1~2 分周期で往復するので往復流動とも) は、1940 年ごろから、主に細胞の収縮リズム (周期は 1 分程度) や細胞内組織の観点から研究されはじめ [1, 2, 3]、2000 年以降になり輸送ネットワークのモデル生物として注目されるようになった [4, 5, 6, 7]。近年では、原形質流動の局所的な計測を踏まえて、流路の分岐前後での局所的な攪拌 [8] や、ネットワークの幾何学的な形状から体全域にわたる輸送性能の推測 [9] などが行われている。

本研究では、原形質流動の体全域計測をめざして、比較的微小 (直径 1mm 程度) な変形体を調整し、流路ネットワークの形成過程を顕微鏡で観察した。変形体に内在する顆粒 (多糖類、核、オルガネラなど) を Particle Tracking Velocimetry (PTV) によって追跡した。粒子追跡データを統計的に処理して、原形質流動の速度を体全域で求め、かつその時間変化も求めた。それによって、流路内の流速分布を吟味することができたので、原形質のレオロジー特性がわかった。さらに、計測した速度データに基づいて仮想粒子を運搬させるシミュレーション等を実施することによって、体全域にわたる物質の輸送や攪拌の特性がはっきりした。

(1) 微小な変形体は、はじめ流路ネットワークを持たない状態から 3 時間ほどかけて、変形と原形質流動のパターンを変えながら、体全体にわたる流路ネットワークを構築した (流速の分布範囲は数から $100\mu\text{m/s}$)。この時、変形体の中央部分に特徴的な環状路 (Central Annular Channel; CAC) が発達し、そこに局所的な樹枝状分岐ネットワークがつながった。このような CAC 構造を介して高速かつ遠距離に物質が輸送されるようになり、ネットワークの輸送能力は飛躍的に向上した。

(2) 管路ネットワーク全体の輸送性能を調べるために、今回計測した流れ速度場の結果を活用して、仮想粒子の移動シミュレーションを行った。このシミュレーションでは、はじめに仮想的な粒子を管路の横断面に並べ、流速データに沿って動かした。その結果、往復する移流であるにも関わらず、初期位置からの平均二乗距離 (MSD) は、時間に対してほぼ比例した (拡散定数は $100\mu\text{m}^2/\text{s}$)。これは流路ネットワークを往復することで、拡散のようなランダムな運動が実現したことを意味する。

(3) 流路ネットワーク上の往復流動による拡散の機構を読み解くために、流路ネットワークのグラフ構造を抽出し、グラフのノードを分流ノードと合流ノードに分類した。隣接した分流ノード間の平均距離と平均流速を定量し、このように粗視化したグラフ上のランダムウォーク模型に照らし合わせて、拡散機構を分析できた。

(4) 変形体内全域にわたる、物質の混合性を調べるためのシミュレーションを実施した。はじめに変形体全域を仮想的に 4 つの領域に分割して、それぞれの領域に同じ数の仮想粒子をランダムに配置した。その後、実験データにそって粒子を動かして、4 種類の粒子の混ざり具合を定量化した。その結果、CAC が発達した領域では粒子の混合が活発でほぼ均等になった (均等に混合するまで約 5 分)。

(5) 流路内の流速分布は管壁付近でせん断速度が大きく、そのせん断速度はサンプルや流路径によらずほぼ一定の値を示した。この結果は、原形質レオロジーのシアシニング性を示しており、特に管路の内壁においてせん断速度が一定 ($2.5\mu\text{m/s}^2$) であるという発見をもたらした。このせん断速度一定という経験則は、流路ネットワー

クの自己組織化機構を解明する一つの鍵となる。

以上の結果から、流路ネットワークの構造に対応して、流れ速度の向きと緩急が体全域で構造化がされることがわかった。その構造により、体全域にわたる物質の輸送や混合が著しく向上することがはっきりした。特に、粗視化すると流路ネットワーク中の往復流動であるにもかかわらず、拡散的な挙動が実現する点は、物理的な観点からも興味深い。さらに、流路内壁のせん断応力が一定であるとの結果は、このような輸送性能をもったネットワークの自己組織化の機構解明に、伴となるヒントを与えている。モジホコリの研究は、今後もますます生物輸送ネットワークに関する重要な知見をもたらしてくれるだろう。

第 1 章

序論

生物にとって物質を輸送するネットワークとは細胞内もしくは細胞を超えて、物質を送ったり受け取ったりするのに必要不可欠なシステムである。動物の静脈や動脈といった血管系や植物の維管束系、菌類の菌糸体などに見られる様に酸素や二酸化炭素、栄養といった物質を運び生理機能を維持させるほか、神経系の様に情報伝達を行う事で個体が環境に適応できるように働く。近年生物の輸送ネットワークへの関心が高まる中で、ネットワーク全域における輸送の経過観察は困難である。それはネットワークのスケールの問題だけでなく三次元に展開するネットワーク構造の複雑さ、輸送の非線形性や動的な変化の他それらを観察・記録する上での技術的な制約などに起因する。

変形菌モジホコリ *Physarum polycephalum* はアメーボゾアに属する多核の単細胞生物である。変形菌の栄養相にあたる変形体はミクロスケールからメートルスケールまで成長するアメーバ細胞であり、前方にはシート状に広がりながらも後方では管を発達させた細胞質のネットワークを形成することが知られている。この生物に関する研究はおよそ 80 年以上に遡り、その時々によって様々な領域や観点から注目を集めていた。

モジホコリの変形体はその培養しやすさや原形質流動の観察しやすさ等から変形を伴う原形質流動の研究対象であった。特に重要な研究として神谷宣朗先生による複室法による原形質流動の原動力測定が挙げられる [1]。これは隣接する二つのチャンバーを一本の変形菌の管を通し、片側の部屋の気圧を測定しながら調節する実験であり、原形質流動を止めたり強制的に起こしたりすることで原形質流動にかかる原動力 (圧力) を測定した。またこれにより変形菌の原形質流動が細胞内に生じる圧力差によって駆動される事が示唆された。その後 Bottermann 先生らによって位相差顕微鏡や光学顕微鏡によって細胞質の収縮を引き起こすアクチンフィラメントの繊維構造が観察された [10, 11]。この様にモジホコリは細胞生物学において原形質流動や細胞の構造の分野で長く研究されてきた。

2000 年代にはいるとモジホコリの変形体は生物ネットワークのモデル生物として注目されるようになった。モジホコリ変形体の作るネットワークが環境に対応してより有利な形状へと変形する事が出来る事が注目された。例えば与えた餌 (オートミール) 同士を管で効率よく繋いだり、光や忌避剤を避けたり環境に応じてネットワークを変形できる。これを利用して変形体を迷路の中に閉じ込め、入口と出口に餌を与えて数時間後、迷路の最短経路の形に変形した研究が特に有名である [4]。またモジホコリが幾何学的形状の閉じた空間から脱出する際には空間の形状に適応して効率よく脱出する為のネットワークを形成した [12]。

近年ではこのような変形菌のネットワークに対してグローバルな輸送特性を考える研究も増えてきている [7, 8, 13, 14, 15, 16, 17]。特に Marbach らはネットワーク全体に対する粒子の長時間の分散を分散効率 (Effective Dispersion) と定義し、ネットワーク全体の概形から移流拡散系を構築し、粒子の確率的な分散をシミュレートした。これによりネットワークのトポロジカルな変化に対する輸送能力の変化を報告した [9]。

このようなモジホコリのネットワークに関する研究が進む一方でネットワークの輸送に対するブラクティカルな測定がより重要となっていた。測定のスケールも一本の管から分岐の周辺にまで拡大していき、特に Haupt らは mPIV (micro-Particle Image velocimetry) によって流路の分岐付近の二次元流速測定に成功している [8]。この研究は本研究にとっても非常に重要な試みであり、この研究によって分岐付近における往復流動の特性が原形質内の物質の混合を促進させるのに重要である事が示された。

本研究では Haupt らの例よりも変形体のスケールは小さいが、その代わりネットワーク全体における流動の観察を主題に置いている。変形菌のネットワーク全体の流れを可視化する為に本研究では PTV(Particle tracking velocimetry) を利用した。これは個別の粒子を追跡する手法であり、本研究で撮影された変形菌はスケールが小さくなり且つ流路が未発達の状態から撮影を開始した都合上流路中の粒子の数が限られている事によってこの手法が採用された。本研究はそれまでの流路ネットワーク全体の輸送能力測定や物質の混合のシミュレーションを踏まえつつ、より包括的な流動ダイナミクスを提供する。

本研究では細胞内のミクロな粒子（核、オルガネラ、デンプン顆粒等）を追跡することで流れを定量化した。この手法により、流路ネットワークの形成過程における流速場の時空間変化を定量化することができた。これらの流速場の実測値に基づき、観測された流速ベクトルに従って仮想粒子を逐次駆動することで体内の物質輸送を決定論的にシミュレーションした。このシミュレーションの結果により、流路ネットワーク内の循環経路が視覚化され、異なる局所領域間での物質交換の仕組みが明らかになった。

さらに流路ネットワークの輸送特性は、モジホコリ変形体における管状ネットワーク形成前後で物理的および生理的に特徴付けられた。これらの結果に基づき、静脈ネットワークを通じた原形質の混合と輸送メカニズムを探究した。

第2章

先行研究

2.1 変形菌の生物学

変形菌は真核生物であり、そのスーパーグループの内、Amoebozoa さらにその下位分類として Evosea、Conosa、Eumycetozoa(真菌様アメーバ類) に属する [18]。特にこの Eumycetozoa は孢子を形成するアメーボゾアのグループであり、この Eumycetozoa から変形菌 (Myxogastria) と多細胞性の細胞性粘菌 (Dictyostelia) と変形菌に近縁な原生粘菌 (Protostelia) と分類される [19]。本研究で取り扱うモジホコリ *Physarum polycephalum* はこの変形菌にあたる。変形菌は栄養相として変形体を形成してアメーバ様の移動と細菌、菌類、バクテリア等を捕食をし、飢餓時に子実体を形成し孢子によって繁殖を行う。



図 2.1: 変形菌モジホコリの変形体。実験室では 20×30 cm プラスチックケースの中の 1%(w/v) 寒天培地上で培養されている。

2.1.1 変形菌の生態

変形体は世界全体で 900 種、日本の全域には 500 種ほどが確認されている [19]。変形菌の生息域は山や森、ひいてはひとの住む町にも及ぶ。日陰と湿地を好み、落ち葉の裏や倒木の下で変形体や子実体の姿で見つかる。この子実体の形態が種によって多種多様であり、その美しさから愛好家も多い。自然界では主に菌類やバクテリアをアメーバの食作用によって捕食するが、実験室ではオートミールを餌として与えられることが多い。

2.1.2 変形菌の生活環

変形菌の生活環は栄養相である変形体より説明する。変形体は単細胞ながら無数の核 (複相) を持つアメーバ細胞である [20]。変形体は核のみを分裂させることで単細胞のままサイズを増大することが可能であり、実験条件によっては全長数 m にも達した記録もある [21]。変形体は主に地表を這いながら餌を探している。

変形体が飢餓状態または急速な乾燥に見舞われると水気のない固形物へと変形しやがて菌核 (スクレロチウム) と呼ばれる休眠体へと移行する [20]。休眠体では細胞表皮は多糖類に覆われ、代謝が極端に抑えられる。菌核は光と高温・多湿を避けて密閉容器にて保存すれば数年の保存が可能である。菌核は再び寒天培地などの多湿な空間に置くことで再び元の変形体に戻る事ができる。

一方で飢餓状態の変形体が光 (紫外線) にさらされると子実体形成へと誘導される [20, 22]。モジホコリの子実体形成では球状にまとまった細胞質塊の下から数ミリメートルの茎が伸びて細胞質塊が持ち上げられる。先端の細胞質塊では減数分裂が起こり、孢子が形成される。子実体が成熟すると先端の細胞質塊は黒い殻に覆われ中には大量の孢子が内蔵される。そして殻が破れる事で孢子は流出し、風などに運ばれて分布するようになる。孢子は実験室では寒天上に撒かれた数時間後にアメーバ細胞として発芽する。このアメーバ細胞は核相が単相であり、這って移動する。しかし水の多い環境下だと鞭毛生やし、泳いで移動するようになる。このアメーバ細胞と鞭毛細胞の移行は可逆である。一方で乾燥や飢餓状態に陥るとアメーバ細胞は円形のシストと呼ばれる休眠体へと移行する。シストの状態ではスクレロチウム同様に代謝が抑えられるが再び水の豊富な環境に戻ると再びアメーバ細胞としての機能を取り戻す。

このようなアメーバ細胞同士が2体集まると接合し、核相2の接合体を形成する。そして接合体が1個の細胞を保ちながら核分裂する事で巨大な単細胞である変形体へと成長する。

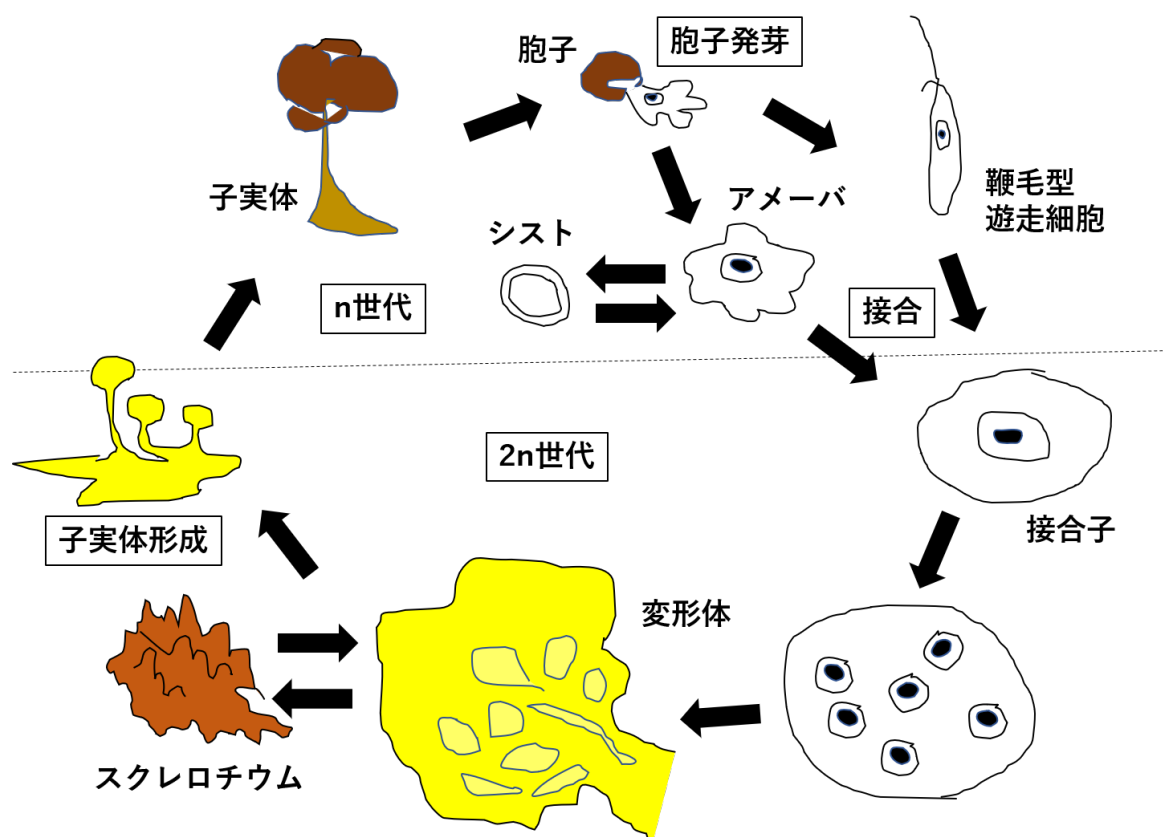


図 2.2: 変形菌モジホコリの生活環。[23] を参考にして描いた。

2.1.3 変形体の内部構造

変形体の内部構造は大きく分けてゲル状の外部原形質 (ゲル層) とゾル状の内部原形質 (ゾル層) によって構成される。それぞれの原形質中の組成は共通しており、核やミトコンドリア、顆粒、液胞、アクチンフィラメント、ミオシン (筋肉細胞と同じ II 型 [24]) などが存在する [20]。ゾル層とゲル層の大きな違いとして、ゲル層 (細胞の皮質側) ではアクチンフィラメントの繊維構造が多く観察され反対にゾル層ではほとんど観察されない [21, 25]。ゲル層ではアクチンフィラメントのネットワークが結合する事で細胞質の粘度と硬さが変化する。また変形体の先端部ではゾル層とゲル層が盛んに交換される事で管構造が作られている [21]。

Bottermann らによって変形体の管を傷つけてゾル層のドロップ (原形質ドロップ) を抽出して観察した処、およそ 10 分後にゲル層を形成してドロップの収縮と流動が見られ、更に 3 時間程で小変形体になった [10, 11, 26, 27]。更に高木らは原形質ドロップを抽出した 3 時間の間に細胞の厚み振動の時空間パターンが観察された事を報告し、そこでは定常波、カオティックな多くのスパイラル、1 つまたは二つの螺旋波パターン、内側と外側で周期がシンクロしたパターンへの遷移が観察された [28]。

実際の変形体におけるアクチンフィラメントの分布は先端部から後方にかけて規則的なネットワーク構造を形成する [3]。Naib-Majani らはアクチンの一次抗体をアクチンフィラメントに結合させて、蛍光色素と結合させた二次抗体で処理する事でアクチンフィラメントを蛍光染色する間接蛍光抗体法によってアクチンフィラメントを蛍光顕微鏡で観察した。その結果変形体の先端部においてアクチンフィラメントは前方に放射状に並び先端の膜と結合している事が観察された。変形体の先端部はアクチンの繊維構造の形成場所と考えられている。先端から少し後方に下がった中間部ではアクチンフィラメントの束が多角形の網目状ネットワークを形成する。ここから後方にかけてゾル層の流路が出来てきて、アクチンフィラメントの束も管に平行なものとそれにらせん状に巻き付くものの構造が出来ていく [29]。後方になるにつれて螺旋のピッチは小さくなりより垂直に密に巻いた構造になり、管構造も発達したものになる。

2.1.4 原形質流動の仕組み

変形体が作る管内部では細胞質が高速に運ばれる原形質流動が観察される。これは細胞質の変形を伴って駆動し、管を構築するゲル層が収縮する事で原形質流動としては非常に速い流速 1.3 mm/s もの速さで流れるという [2]。神谷によって測定された原形質流動の流速分布は頭のつぶれた放物線のような形状をしていた。この流動は流速分布の形状や圧力差によって粘性流体が駆動されるといった点からハーゲンポワズイユ流 (円管を通過する粘性流体の定常の層流) とよくみなされた。

この原形質流動はゲル層内の収縮性繊維構造であるアクトミオシン (アクチンフィラメントとミオシンの複合体) が ATPase 活性で発生させる力によってゲル層にリズミカルな収縮を起こし、細胞内に生じた圧力差によってゾル層が駆動される事によって起こる [24]。このアクトミオシンを構成するミオシンはリン酸化されるとモータータンパクとして活性型になり ATPase 活性が高まる一方で Ca^{2+} と結合する事で抑制される [30, 31]。ミオシンの活性は Ca_2^{+} が分離する事で再度取り戻す。この ATP と Ca^{2+} によってアクトミオシンによるゲル層の収縮が制御されていると考えられている。ゲル層の収縮がピークになった後は弛緩し始めて圧力も減っていく、すると周囲と比べて圧力が小さくなるので今度は流れが逆流する。この様にして変形体の原形質流動は周期的な往復流動となる。

変形体の往復流動を制御するアクチンフィラメントの繊維構造もまた流動に応じて周期的に変形する [32]。永井らは変形体系 (変形体のネットワークから管部分を一本切り取ったもの) が室中で吊り下げられた状態 (等張条件下) で収縮を記録し、固定処理した後に電子顕微鏡で観察している。ゲル層におけるアクチンフィラメントの繊維構造は、変形体系が収縮を始めた状態では直径 6~7 nm のアクチンフィラメントが束状に規則正しく配向し、収縮が進むにつれてこの規則正しい構造は崩れて、収縮が最大になった時には玉状に密集した。このような繊維構造の変化は流動と連動しながらも周期的に繰り返される。

また吉本らによると変形体の収縮リズムは先端部が主体となって発生し、後方の管状部分は高い張力を維持している [29, 33]。先端部分は短冊状に切り出しても直ぐに収縮リズムを発現するが、後方の管を切り出した変形体系が収縮リズムを発現させるのは 10~20 分かかり、それまでは高い張力を示す。これは観察結果とも同意し、管部分におけるアクチンフィラメントの規則的で堅牢な構造が高い張力を維持させる一方でアクチンフィラメントが疎らな構造をしている先端付近では収縮リズムに対応してその繊維構造が変わる。

2.2 生物ネットワークのモデル生物としての変形菌

変形菌が形成する流路ネットワークが注目されるようになったのは 2000 年代に入ってからである [4, 5, 6, 7, 34]。この流路ネットワークは餌や乾燥、光や忌避剤などの周囲の環境に応じて変形できる。特に有名な研究として中垣先生によって迷路全域に変形菌の変形体を満たした後でスタートとゴールの所に餌を置いたところ、ものの数時間で変形体はスタートとゴールを直線的につないだ形状へと変形した [4]。この実験の設計では二組の別れ道を用意しており、最終的に 4 つの経路の組み合わせの内より経路長が短くなる組み合わせを残して長い管が縮退した。つまり変形菌のネットワークがこの迷路におけるほぼ最短の経路へと変形したことになる。

流路ネットワークの形状最適化は必ずしも細胞量に対する経済性に限らず、各餌場同士が短い経路で結びつく連絡効率やいずれかの経路が壊れても他の経路で輸送が可能になる耐故障性等、複合的な観点で合理的であると考えられた [6, 7]。つまり変形体のネットワークはこの三つの指標において無駄のないトレードオフを実現しており、これは多目的最適問題に対する解を流路ネットワークが導いていることになる。このような点から変形菌の形成するネットワークは生物ネットワークのモデル生物として注目されており、生物学の枠を超えて情報科学分野からの注目も集めている。

2.3 流路ネットワークの輸送能力評価

このような流路ネットワークへの理論的な理解のため、幅広い分野から研究されて来た。変形菌のネットワーク構造が輸送性能にどのように影響を与えるのかは強い関心を誘った。変形菌が円形などの閉じた空間に設置されて唯一用意された出口から脱出する時、流路ネットワークは空間の形状に対応して、細胞質が万遍なく輩出されるように太い静脈が樹状に展開しそこから分岐した細い管が空間を埋める様に配置された [12]。この実験では管の厚みの減少する速度 (細胞流出していく速度) が場所によらずおよそ一定であった。

変形菌の流動を収縮などによる粘弾性などは無視しつつシンプルな流体学的に考察すると円管を流れる粘性流体 (ハーゲンポワズイユ流) とみなすことができる。原形質のような粘性流体が一定の圧力差 ΔP によって駆動される場合、その管を流れる流量は管の長さ L や管の半径 r 、粘性係数 η に応じて以下の様に与えられる。

$$Q = \frac{\pi r^4}{8\eta L} \Delta P \quad (2.1)$$

この時、流量 Q と圧力差 ΔP は比例関係にあり、圧力差 ΔP の係数をコンダクティビティと呼ばれる。これは電磁気学の電流 I と電圧 V の関係によく似ている。キルヒホッフの第一法則 (電気量保存の法則) から、任意の二点間に定常電流が流れると電圧が決まりひいてはコンダクティビティ (導電率) が導ける。流路ネットワークも同様にして計算したところ太い管がおおざっぱに広がった後の隙間を細い管が埋める様に分布する空間ではコンダクティビティが空間全体で一様であった。

また管ネットワークにおいて二つの細い管が一つの太い管に合流するような分岐では、太い管の半径の三乗は細い管の半径の三乗和にほぼ一致した。これはマレーの法則が成り立っているといえる。マレーの法則とはマレーが犬の腸間膜血管から発見した法則であり、血管を流れる流量が半径の 3 乗に比例する事を意味する。これはマレーがエネルギー最小原理の法則から導いたものである。血管において単位時間に物質輸送にかかるエネルギーを流量 Q と圧力差 ΔP の積として、体積に比例する流動のエネルギーコスト ($\pi r^2 L$) との和が最小になるように (r の偏微分が 0 になるように) した結果 $Q \propto R^3$ になった。さらにキルヒホッフの第一法則を踏まえると $Q(\text{親管}) = Q(\text{娘管 1}) + Q(\text{娘管 2})$ が成り立つので血管の分岐に関してマレー則が成り立つことを示した。

ポワズイユ流が成り立つとした上で変形菌の流量 $Q = R^3$ が成り立つ場合、興味深い事に圧力差 ΔP は R^{-1} に比例することになる。つまり管が細くなればなるほどその管にかかる圧力が大きくなる。さらに管壁にかかるずり応力は、半径の 3 乗に半比例して流量に比例する為に半径の 0 乗に比例、つまり一定になる。これは管の太さによらず管壁にかかるせん断速度が一定であることを意味する。

以上の事は理想化された条件の上での話でもある為確定したわけではない。しかし数理モデルでの評価も推し進められている。変形菌のネットワークを再現するためのネットワーク形成アルゴリズムとして経験則的に得られている流量強化則というものがある。これは管内の流量が大きくなればその管の径は増大に反対に流量が小さくなれば径は小さくなっていくというルールである。パラメータを調整すれば、現実の流路ネットワークが発達する過程が再現されており、発達とともに必要なエネルギーが急速に減少する事がわかっている。このような数理アルゴリズムの提案やそれらを応用した研究は幅広く存在し、カーナビゲーションの経路探索や上下水道管のネットワーク設計などへの拡大もされている。

また一方で流路ネットワークに対して理論的に輸送能力をシミュレートする研究もおこなわれてきた。Marbach らはネットワークで起こるトポロジカルな変形 (管の剪定など) によって変化する輸送能力をシミュレートした [9]。Marbach らの解析はネットワークの概形から流路の径を測定し、各流路から全体に分散する粒子に対してテイラー分散を仮定している。

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -u \frac{\partial c}{\partial z} + \kappa \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} + \frac{u^2 a^2}{48\kappa} \frac{\partial^2 c}{\partial z^2},$$

ここで u は流速、 $\kappa = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ は分子拡散率、 a は管の半径、 l は管の長さである。管が粒子の拡散速度より十分長いとき ($l \gg ua^2/\kappa$) に粒子濃度の断面方向の拡散は平滑化され、テイラー分散の仮定は有効になる。また粒子は遷移確率と遷移時間に基づくランダムウォークとして拡散するとした。ただしテイラー分散をそのまま解くのは計算が膨大になる為に拡散する粒子群の半径の二乗が時間に比例すると仮定し、その比例定数を effective dispersion D_i と定義した。

$$D_i = \lim_{t \gg T} \frac{r_i^2(t)}{4t} \quad (2.2)$$

$r_i(t)$ はここで初期ノード i から拡散する粒子群の半径で T は変形菌の振動の周期であり、時間 t が十分大きいとき effective dispersion D_i は飽和し、粒子群の成長は安定した速度になる。

ネットワークの全体的な輸送能力を評価するうえで粒子群の成長速度から決定する手法は計算が楽である上に、指標として明解である。本研究でもこの effective dispersion を参考にしてネットワークの輸送能力を推定した。

2.4 流路ネットワーク内で観察された物質のミキシング

流路ネットワークにおいてこの特徴的な原形質流動は物質輸送に対してどのように機能するのかは研究者らにとっても関心のあるトピックである。残念ながら流路ネットワーク全体の流動を実測した研究は無かった。それは主に流路ネットワークというのが非常に巨大で、巨視的に観察するには原形質が分厚い事が大きな制約を生んでいた。そこで Haupt らは局所的な分岐付近の流路に対して mPIV(micro-Particle Imaging Velocimetry) による内部粒子追跡を行い、測定結果を基にした流速場に仮想粒子を配置して仮想粒子のミキシングをシミュレートした [8]。結果物質の混合において重要な 2 つのファクターが示唆された (1) 管の分岐付近で流動が分断されたり、逆転したりする事と (2) 分岐の流路間で流動のサイクルにずれが生じる事。これらの要因によって粒子がより複雑に混合すると考えられた。

Haupt らによれば変形菌の管内の流れは層流であるとして、単純な直線の管では分子拡散によって広がるだけだが分岐付近になると物質の混合はより複雑になった。二本の流路から一本の流路に流れ込む時、起源の異なる物質が交じり合う一方で、分岐が障害物の様に機能して流れを分割させた後、流動の逆転し物質が再度混合するなどが起こる。再度混じる時には分流以前と同じ混合にはならない。これに加えて状況をより複雑にしているのは分岐周りで流路の逆流のタイミングが必ずしも一致しない事である。変形菌の往復流動のサイクルはおおよそ 90~100 秒程だが、分流後に片側の流路の流動が他より遅れて逆流するなどがしばしば起こる。Haupt らの興味

深い仕事として管の分岐手前の管に仮想粒子を配置し mPIV の実測値を基に仮想粒子の運搬と混合のシミュレーションがある [8]。

実測値に基づくネットワーク中の物質輸送のシミュレーションは変形菌の変形や情報処理を説明しうる可能性がある。しかし通常の変形体では細胞が巨大であるが故にネットワーク全体における物質の輸送と混合は依然として着手されない問題であった。流量強化則の観点から物質輸送による地理的流体力学的にヒエラルキー構造はネットワーク全体の流路の形成・発達にとって重要な要素である。故にその形成過程から流動を観察することは変形菌の単なる輸送特性だけでなく変形菌の環境に適応して変形するプロセスひいては情報処理の解明につながる。

第3章

培養方法と実験方法

3.1 培養方法

モジホコリの変形体は室温 23 度の暗室中の 1%(w/v) 寒天 (伊那寒天) 上にて培養された。モジホコリの餌としてオートミール (Quarker Oats Co.) を 1 日に 2 回ずつ変形体の上から与えた。1~2 日に 1 度の頻度で寒天培地上に変形菌が満たされた寒天培地を切り出し、新しい寒天培地上に移した。本実験では変形体の管が多い方法が望ましく、変形体は寒天培地を移し替えてからおよそ 12 時間後の、寒天培地の新しい部分に変形体が広がり管も多数形成していたサンプルを使用した。さらに細胞内に観察しやすい巨大な粒子 (例として多糖類やたんぱく質を貯蓄した液胞) が増える様に実験開始のおよそ 6 時間前に変形体全体にオートミールを与えた。

3.2 原形質ドロップ内部流動の観察実験方法

図 3.1 は顕微鏡下にて原形質ゾルから流路ネットワーク発達までの過程を観察する実験のセットアップである。図 3.1A,B は撮影用に加工した直径 15 cm のプラスチックディッシュとその蓋であり、図 3.1C は顕微鏡のステージ上でディッシュと蓋を重ねたセットアップを横から見た時の概略図である。

事前準備として直径 15cm のプラスチックディッシュ (図 3.1A) とその蓋 (図 3.1B) を中心部分に矩形または円形の穴を空け、カバーガラスをレジン接着して蓋をした。光源と透過光の通過部分がプラスチックからガラスに置き換わり光の透過率の上昇と散乱が抑えられた事により、より明瞭な撮影が可能になった。また顕微鏡で焦点を合わせやすいよう試料と対物レンズを近づける為に、蓋の縁は削って代わりに小さいディッシュ (直径 35 mm) 4つ並べて蓋を支えた (図 3.1C)。

また長時間の撮影になる為、事前にチャンバー内の湿度の調整が必要だった。図 3.1C の直径 35mm ディッシュの周りには薄い濡れティッシュを敷き詰めた。蓋の脇 (図 3.1B 左下) を削って外部からサイフォン (超純水 100 ml) を差し込めるようにした。一方で実験中撮影箇所に結露しない様に蓋の周辺部に円形の穴を空気口として開けた。

試料である変形菌の原形質ドロップは寒天培地中の変形体 (約 20 cm×30 cm) の管をメスで切開しそのままメスの刃先で流出した原形質ゾルを 1 mm 程掬い取った。原形質ドロップは蓋の裏側の中心部分 (図 3.1B 中心の緑の楕円) にスパチュラなどで優しく丁寧に移した。保湿の為に匙で掬った超純水一滴と厚さ推定 0.1mm の 1%(w/v) 寒天シートで覆った。この寒天シートは大きいカバーガラス (例 24×50 mm) 上に 4 枚の小さいカバーガラス (例 18 mm×24 mm) で囲いを作り、囲いの中に 1%(w/v) 寒天を流し込んだ後上からカバーガラス (例 18 mm×24 mm) で蓋することで作製した。蓋に設置した原形質ドロップはひっくり返して、図 3.1C の様に直径 35 mm ディッシュの上に設置し、正立顕微鏡 (BX-53, Olympus) のステージ上に移動させた。

入射光による試料の負荷を抑えるため、顕微鏡の光源の真上に赤セロファン紙を貼り付けて赤色光で照射した。倍率 10 倍の対物レンズで観察し、原形質ドロップの接地面付近の皮質にピントを合わせた。撮影機器は正立顕微鏡の対物レンズ側に CMOS カメラ (ORCA spark) を繋ぎ、カメラからパソコン (GALLERIA, GCF1050TNF)、

外付けハードディスク (IODATA HDJA-UT8.0W)) へと接続した。撮影画像 (生データ) は 1177 mm×1177 mm の範囲を 1024 px×1024 px で保存したが、後の解析には容量を抑える都合上 512 px×512 px の解像度に変換した (解析時 1 px = 約 2.3 μ m)。撮影は 10fps で 25 分間 (15000 枚) 行った。長時間の撮影はパソコンのフリーズ等の不具合があった為に 25 分間の撮影後 5 分のインターバルを置き、撮影は 2 時間半まで行った (実験回数 n=3)。なお本稿では簡単の為 30 分毎の撮影時間帯を 0 min(0~25 分)、30 min(30~55 分)、60 min(60~85 分)、90 min(90~115 分)、120 min(120~155 分) と呼ぶことにし、それぞれのサンプルに対応する実験も Exp1、Exp2、Exp3 と呼称する。

3.3 画像処理方法

ここでは撮影画像の処理方法について説明する。生データから細胞内の粒子と細胞の厚みの二種類のデータをそれぞれ抽出する為に以下の様な処理を行った。

3.4 細胞内粒子の可視化

ここでは細胞内粒子を可視化する為の画像処理を図 3.2 を例に説明する。生データである撮影画像 (例：図 3.2A) の各ピクセルの光強度 $I(x, y, t)$ (x, y は空間座標、 t は時間) に対して短いスケール (± 6 秒間) の時間平均を差し引いた偏差 $\Delta I(x, y, t)$ を計算した。

$$\Delta I(x, y, t) = I(x, y, t) - \int_{t-6s}^{t+6s} I(x, y, t) dt \quad (3.1)$$

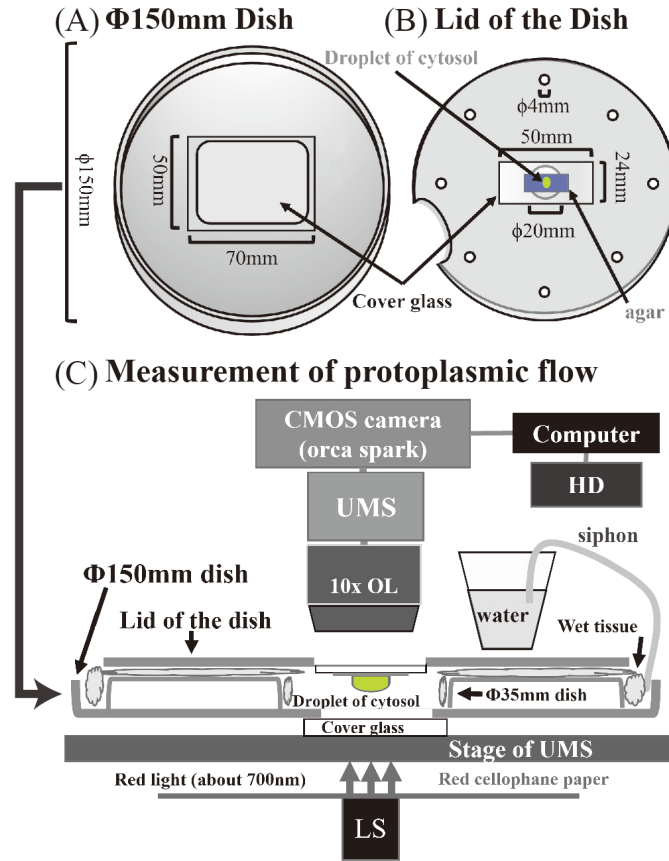


図 3.1: 原形質ドロップ内の原形質流動の観察実験のセットアップ。(A) 直径 150mm のプラスチック皿および (B) 皿の蓋の裏面。(A) の丸い長方形と (B) の円はドリルで貫通した穴で、カバーガラス (長方形) が樹脂で穴を覆うように接着されている。原形質ドロップ (緑の楕円) は寒天シート (青い長方形) で覆われている。(C) 皿と蓋を重ね、顕微鏡 (UMS) のステージに置いた。ピント調節のため、蓋の端を削り、4 つの直径 35mm の皿が蓋を支えている。また、直径 35mm の皿の周囲に湿れティッシュが配置されている。さらに削られた蓋の端を通してサイフォンも挿入された。標本はステージの下から赤色光 (波長約 700nm) で照射され、10 倍対物レンズで基板側の皮層にピントを合わせて CMOS カメラ (Orca Spark) で撮影した。[35] より引用。

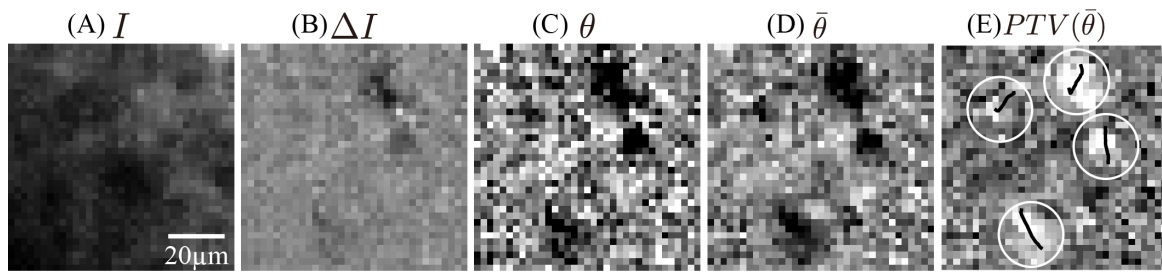


図 3.2: 画像処理例 (A) 生の撮影画像 I 、 $t = 32$ 分 37.4 秒。(B) ΔI 、(C) ΔI の位相 θ 、および (D) 時間平均された位相 $\bar{\theta}$ 。(E) 実際に検出された粒子と、その軌跡を PTV によって画像の光強度を反転後に示した。検出された白色の粒子は、白い円 (半径 = $5\mu\text{m}$) で表示され、その中心には短い黒い軌跡が示されている。[35] より引用。

ΔI により生データでは暗くて不明瞭だった所に円形の黒い巨大粒子がわずかに可視化された (図 3.2B)。生データの光強度 $I(x, y, t)$ は基本的に細胞質の 1~2 分周期の周期的な収縮によっておおよそ正弦波形に変化しており、粒子の移動による光強度 $I(x, y, t)$ の変化はより小さい時間スケールにおける変化である。この手法は比較的薄い細胞の撮影画像に対して十分な効果が得られた。Exp1 では主に撮影時間 1 時間以降のある程度薄く広がった細胞に対してこの手法は利用され、細胞が十分薄い Exp2,3 に対してはこれだけで十分可視化された。しかし Exp1 の初期 (実験時間 1 時間以内) では細胞が厚すぎるなどにより陰影に対して粒子の移動による光強度の変化が小さすぎる場合、 ΔI でも粒子が十分に視認されない事があった。粒子のコントラストを高めるためには別の処理を加える必要があった。

時系列信号 ΔI の位相 $\theta(x, y, t)$ を得るために ΔI を正規化した。この信号は、 $|\Delta I(x, y, t)|$ の最小値を検出することにより周期的なセグメントに分割され、シャトルストリーミング (細胞の厚さの周期的変化に関連する現象) の各周期における $|\Delta I(x, y, t)|$ の最大値で正規化された。位相 $\theta(x, y, t)$ は、周期や振幅が不規則な正弦波の位相として定義され、振幅は $\max(|\Delta I(x, y, t)|)$ として、

$$\theta(x, y, t) = \sin^{-1} \left(\frac{\Delta I(x, y, t)}{\max(|\Delta I(x, y, t)|)} \right) \quad (3.2)$$

$\sin^{-1}$ 関数は、 $-1 \leq \Delta I(x, y, t) / \max(|\Delta I(x, y, t)|) \leq 1$ の範囲で、-1 または 1 に近い値の差異を強調する。一方、 $\theta(x, y, t)$ の画像は移動する粒子に対して非常に感度が高いものの、ノイズの影響を受けやすい (図 3.2C)。ノイズを低減するため、 $\theta(x, y, t)$ の短期間の時間平均を計算した (図 3.2D)。

$$\overline{\theta(x, y, t)} = \int_{t-0.6s}^{t+0.6s} \theta(x, y, t) dt. \quad (3.3)$$

処理された $\overline{\theta(x, y, t)}$ の画像は、Exp1 において観察開始から 30 分から 55 分の間の時間のみで使用した。これらの粒子の正確な組成を決定することはできなかったが、観察された直径 (6~30 μm の範囲) から、液胞内のデンプン粒のように積み重なった物質に似ていると考えられた。この直径範囲は、一般的に核やオルガネラのサイズよりも大きかった。

3.5 PTV のアルゴリズム

粒子追跡速度測定法 (PTV) に Fiji のプラグイン TrackMate を使用した (図 3.2E)。TrackMate が想定する粒子は白い円形の光強度分布なので解析直前に光強度を反転させた。TrackMate は、粒子サイズ (半径) やしきい値などのユーザー定義の基準に基づいて粒子を自動的に識別し、個別に追跡することができる。TrackMate による粒子追跡は図 3.3 にあるステップで行われた。ステップ 0 は各画像に対して行われる処理であり、①粒子検出と②粒子情報取得がこれにあたる。各画像で粒子を検出するために、以下のように定義されるガウシアン (LoG) トラッカーを使用した：

$$\text{LoG}_\sigma = -\sigma^2 \times \left(\frac{\partial^2}{\partial X^2} + \frac{\partial^2}{\partial Y^2} \right) \times G_\sigma \times I \quad (3.4)$$

ここで、 $\sigma = \frac{R}{\sqrt{2}}$ で、 R は粒子半径 ($R = 5 \text{ px} \simeq 11 \mu\text{m}$) である。最初に、TrackMate は入力テスト画像 I にガウシアンフィルタ G_σ を適用してノイズを低減する。その後、ラプラシアンフィルタ $\left(\frac{\partial^2}{\partial X^2} + \frac{\partial^2}{\partial Y^2} \right)$ を適用して粒子の境界を検出する。最終的に、フィルタリングされた画像は反転され、 $-\sigma^2$ で正規化される。これらの処理された画像では、5~20 px の直径を持つ粒子の中心で値がピークを持ち、粒子の正確な局在化が可能となった。ユーザーが設定するしきい値とは粒子検出のクオリティであり、今回は処理後の画像における局所的なピークがそれにあたる。今回は半径 5 px、しきい値は Exp1 は 2.5, Exp2,3 は 1.5 に設定した。検出された粒子からは②粒子情報取得が行われ、空間・時間における位置や検出のクオリティ、粒子の推定半径や平均光強度などのパラメータが取得される。

粒子を連続する画像間で結びつけるプロセスは、2つのステップで行われる：(Step1) 連続するフレームの粒子を結びつけるトラックセグメントを作成し、(Step2) 2つのトラックセグメントの間のギャップを埋める。両方の

ステップで、TrackMate は線形割り当て問題 (LAP) を解決する。これは、粒子間の可能なリンクコストを表すコストマトリックス (図 3.4) を計算し、総コストを最小化することで最適な割り当てを決定する。

Step 1 では③連続する 2 つのフレームの間で粒子のリンクを検討する。このステップでは最初のフレーム内の各粒子が次のフレーム内の任意の粒子にリンクするか、あるいはリンクしないかが選択される。これにより、 $(n + n_{t+1}) \times (n + n_{t+1})$ の行列が形成される (図 3.4A、 n はフレーム t の粒子数、 n_{t+1} はフレーム $t + 1$ の粒子数)。この行列は 4 つの象限に分割される。

- 左上の象限 (サイズ $n \times n_{t+1}$) には、フレーム t 内のスポット i をフレーム $t + 1$ 内の任意のスポット j にリンクするためのコストを含む。
- 右上の象限 ((サイズ $n \times n_{t+1}$) には、フレーム t 内のスポット i が次のフレームにリンクを作成しない場合のコスト (セグメント終了) を含む。
- 左下の象限 (サイズ $n_{t+1} \times n_{t+1}$) には、フレーム $t + 1$ 内のスポット j が前のフレームにリンクを持たない場合のコスト (セグメント開始) を含む。
- 右下の象限 (サイズ $n_{t+1} \times n$) は LAP 形式に数学的に必要とされる補助ブロックである。詳細な説明は Jaqaman 論文の補足資料 3 に記載されている。この象限は左上象限を転置し、ブロックしないコストを最小コストに置き換えることで構築される。

ここでリンクするためのコスト C_{ij} は粒子間の距離 D とユーザーが設定したパラメータの差から計算されるペナルティ p によって決定されるが、今回ペナルティは指定していないのでリンクコスト C_{ij} は直線距離 D の二乗になる。ただし直線距離 D の上限はユーザーによって指定可能であり、今回は 5 px を上限としている。これにより上限以上の D のリンクコストは無限大として扱われ除外される (図 3.4 中の x)。一方右上と左下の象限は各粒子が連結しないためのコスト b , d を計算しているが両者ともに $b, d = 1.05 \times \max(C_{ij})$ で定義される。このコストマトリックスからコストの総和が最小になるよう計算され (ペナルティなしで粒子距離上限を設定した場合、返される解は平方距離の合計を最小化するもの)、粒子の組み合わせは決定された。これによって④フレーム間のトラックセグメントが生成された。

Step2 では⑤生成されたトラックセグメント同士をリンクさせる為再びリンクコストマトリックス (図 3.4B) を使用した LAP を解く事で組み合わせを決定し、トラックセグメント同士をリンク付けする (ギャップクロージングと呼んでいる) かもしれないセグメントはそこで新たなトラックの始点となるか終点となるかが決められる。本来の LAP トラッカーはここで粒子が分裂したり融合することも考慮するが、今回はそのようなことは無いと想定し、simple LAP トラッカーを使用している。行はフレーム T を始点とするトラックセグメントに、列はフレーム T を終点とするトラックセグメントに対応する。

- 左上の象限 (サイズ $n_T \times m_T$) フレーム T を終点とするトラックセグメント I がフレーム T を始点とするトラックセグメント J とリンクすることが提案される。これは、ギャップクローズイベントに対応し、検出が一度途切れた 2 つのセグメント間にリンクを作成する。
- 左下の象限 (サイズ $n_T \times n_T$) と右上の象限 (サイズ $m_T \times m_T$) フレーム T を始点または終点とするトラックセグメントがリンクを作成しないことが提案される。

第 2 のコスト行列は、フレーム間のリンクに対して計算された最初のコスト行列に似た形状を持っており本稿では各コストの定義も共通している (つまり $C_{ij} = g_{IJ}$ 。 b , d も図 3.4A と共通)。そしてこの行列に対して総和コストが最小になるようにしてトラックセグメントのセグメントの組み合わせが決定され、⑥長期的なトラックが形成される。

10 秒間に 4x4 ピクセルの領域を通過する内在する移動粒子の数が約 10 粒子に制限されることを考慮し、分析の各ステップに対して空間的および時間的解像度を調整した。

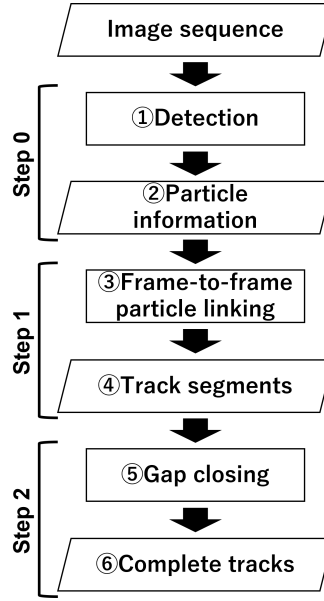


図 3.3: PTV のチャート。Step0 は画像ごとに行われる処理であり① 画面内の粒子を検出して② 粒子の平均強度や推定半径等の特徴量を計算している。Step1 は連続するフレーム間でおこなわれる処理であり③フレーム間の粒子を繋げ、④トラックのセグメントを作成している。Step2 はセグメント同士を連結させる処理であり⑤連続または非連続なフレーム間のトラックセグメントを連結させて、⑥トラックが完成する。

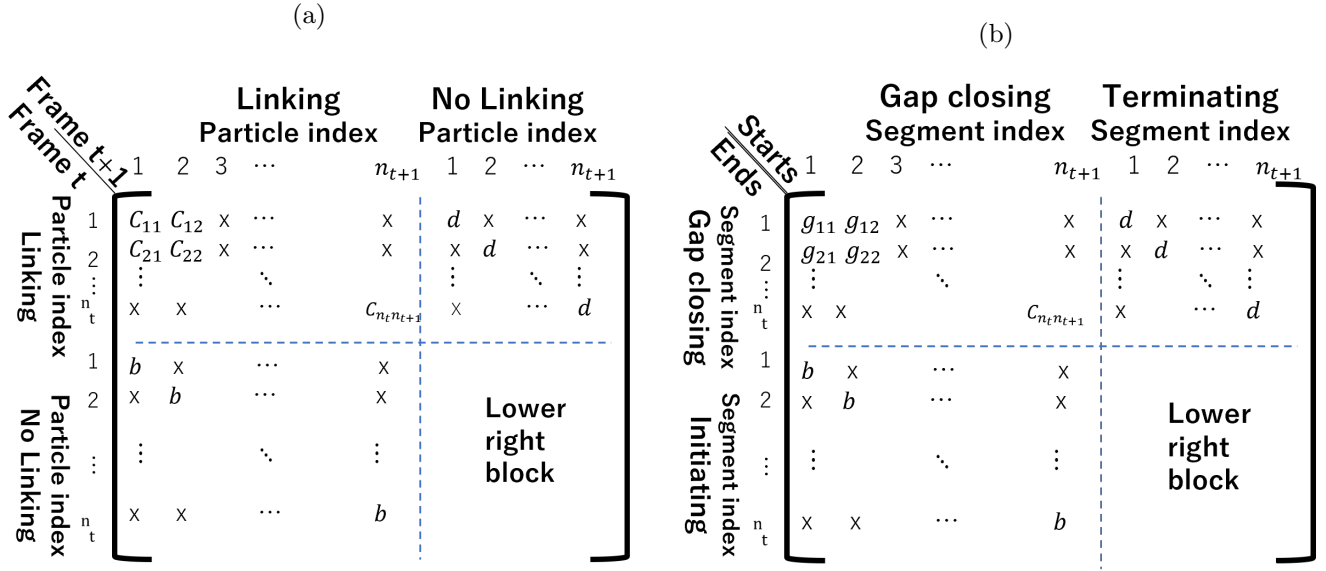


図 3.4: PTV における粒子同士のリンクコスト行列。この行列は点線が示す様に 4 つの象限に分けられる。それぞれの象限で粒子が連続するフレーム間で粒子が結びつく、又は結びつかない場合のコストを計算している。左上の象限は $n_t \times n_{t+1}$ 行列であり、行と列の番号はそれぞれフレーム t および $t+1$ の粒子と対応している。ここでは異なる粒子がリンクを持つためのコストを計算している。そしてコストの総和が最小となるような組み合わせでリンク付けされる。

3.6 PTV データの扱い方

変形体の原形質ドロップがネットワークを形成する際、そのネットワークチャネルの形態は容易に識別できなかった。形態を推定するために、Fiji 内で Particle Tracking Velocimetry (PTV) データから各データポイントを 1 分ごとに 2×2 ピクセルの範囲で集約したバイナリマップを作成した。各 30 分間のバイナリマップに対し各ピクセルで合計し、自動二値化を適用してバイナリマスクを作成した (図 3.5A)。図 3.5A の白い所が反復的に PTV データが取得されている事を意味しており、言い換えれば粒子が通過する流路が可視化されたと考えられる。次に、Python の Scikit-image および SciPy の関数を用いてバイナリマスクをスケルトン化し、ネットワークチャネルの中央位置を決定した。この時スケルトン上の各ピクセルの流路半径は、スケルトンから背景までの距離として計算した。この段階ではネットワークにはどこにもつながらない小さな枝分かれがあった。ネットワーク構造を単純化するために、スケルトンから末端の枝を除去した。

Fiji の Analyze Skeleton プラグインを使用して、ネットワークのノード (交差点) とエッジを識別した [19]。図 3.5B には、得られたグラフネットワークが示されている。短い枝を除去したにもかかわらず、2つのエッジしか持たない不要なノードが残った。さらにこれらのノードを除去し、残りのノードを再接続して、図 3.5C に示す単純化されたネットワークを作成した。このネットワークは末端のノード以外は3つのエッジと繋がるノードのみで構成されている。

スケルトン内の各位置での速度分布を計算するために、平均流速 (MeanFV) マップを生成した。これらのマップは、各ピクセル (x, y) の毎秒 t s において、 $(x \pm 4 \text{ px}, y \pm 4 \text{ px}, t \pm 5 \text{ s})$ のウィンドウ内の PTV データの速度を平均化して計算した。流速分布の方向は、局所的なスケルトンの方向に対して垂直な軸に沿って推定され、流速分布の幅はスケルトンの両側に、既知のチャンネル半径まで延長された。

流速分布における流量 Q は、以下の式により計算された：

$$Q = \int_0^{2\pi} \int_0^{r_0} v(r, \theta) dr d\theta \quad (3.5)$$

ここで、 $v(r)$ は流路の半径 r_0 に沿った測定された流速分布である。平均速度 v は、流量 Q を円管の断面積で割ることで求めた。最後に、これらの値をネットワーク内の各エッジについて平均した。

3.7 質量輸送率とそのエネルギー効率の推定

ネットワークの輸送効率を評価するために、原形質の輸送率およびそれに関連するエネルギーコストを推定した。これらはネットワーク性能の主要な指標である。原形質流動を Hagen-Poiseuille の式を用いてモデル化した ($Q = d \cdot \Delta p$)。ここで、 Q は体積流量、 Δp は距離 L で分離された 2 点間の圧力差、 d は以下の式で与えられるコンダクティビティである：

$$d = \frac{\pi r^4}{8\eta L} \quad (3.6)$$

ここで、 r は流路の半径、 η は内質の粘度で、 $2.0 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ と仮定した [12]。質量輸送率 (Mass Transport Rate, MTR) を、ネットワークに沿った質量流量の線積分として定義した：

$$MTR = \int \rho |Q| ds \quad (3.7)$$

ここで、 ρ は原形質の密度で 1120 kg/m^3 とした [12]。エネルギー消費量を定量化するために、作業消費量 (Work Expenditure, WE) を計算した：

$$WE = \int |Q| \cdot |\nabla p| ds = \int \frac{8\eta Q^2}{\pi r^4} ds \quad (3.8)$$

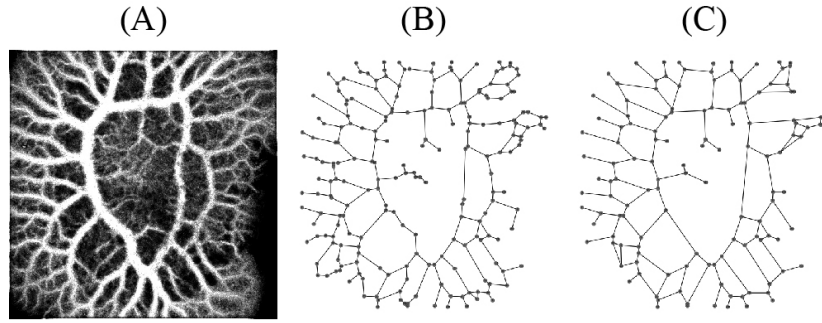


図 3.5: 実験データからネットワークを構築するプロセス (A) 白色ピクセルが多数回検出された PTV データを示すバイナリマップの合計。この図は (2 px, 2 px) の範囲で検出されたデータを 120 分後 (121 ~ 144 min) に集計した。(B)Fiji の Analyze Skeletonize の結果に基づく (A) のグラフネットワーク。(C)2 つのエッジを持つノードを剪定することで単純化した (B) のグラフ。[35] より引用。

ここで、 $|\nabla p|$ は圧力勾配であり、 $|\nabla p| = \Delta p/L = |Q| \cdot 8\eta/\pi r^4$ である。最終的に、輸送効率を MTR と WE の比として定義した：

$$\text{Transport Efficiency} = \frac{MTR}{WE} \quad (3.9)$$

この比率は、単位エネルギーあたりの輸送される質量を示し、原形質輸送ネットワークの全体的な性能を評価するための指標となる。

3.8 最大流速による最大流速分布

流路ネットワークのスペックとして 1 分間の最大流速をネットワーク全体で可視化する時、変形菌の流路における流速は 60~80 秒ほどの周期で変動する上に各地で位相差があるので 1 分間における流速の最大流速 (MaxFS) を以下の手順により決定した。①位置 (x, y, t) の 1 分間最大流速を決める為に (x~x+1 px, y~y+1 px, t~t+1 min) の範囲になる PTV データを集積した。②10 秒ごとにグループ分けを行い、それぞれのグループで最大速度を算出した。③グループ間で 2 グループ移動平均を計算。④平均後データの内、最大のものを (x,y,t) の最大流速とした。一回移動平均を挟んだのは外れ値があった場合それをなます為であり、2 グループ移動平均というのは往復流動のマックスの状態はおよそ 20 秒間ほど続くという経験から決定した。

図 3.6A は (x,y,t)=(166,129,136~138 min) における MaxFS の計算例である。図中の青い点は実際この (x, y, t) に (x, y)=(2 px, 2 px) の範囲内で検出された PTV による速度データである。図中オレンジのプロットはこの青点を 10 秒ごとにグループ分けした後の各々の最大速度を示し、赤いプロットはその 2 グループ移動平均である。1 分間の MaxFS はこの赤いプロットから 1 分間毎に最大値を取得することで決定した。

本稿では流路ネットワークにおける原形質流動が見せる流速分布にも着目していく。神谷伸郎先生によって測定された流速分布は放物線状でなく、中心付近で平たく頭打ちになり管壁際で急速に降伏するシアニング (shear-thinning) の特徴を示した。一方後発の研究では Bykov らによってこの流速分布は放物線状を描くという主張がなされてもいた。当時の研究と比較して測定精度の上昇した今こそ再度検証する価値があると考えた。本節では流速分布は 2 つの方法で測定された。どちらの測定も一長一短の特徴を持つために、解析の目的に応じて使い分けた。

1 つ目は流路ネットワークの 1 分間単位の最大流速 (MaxFS) 測定を基にした最大流速分布である。前節に説明した MaxFS の二次元マップを基に前節までで使用した平均流速 (MeanFV) は 10 秒という短い時間で集積した速度データでは断面上に流速分布をとる時にどうしても欠落データ生じる為に変更された。また 1 分間の間に流速は周期的に増減してしまう為に、流路ネットワークの往復流動における典型的な流速分布を考える際に最大流速を採用した。

流速分布を決定する為に流路概形を決定する必要があるが節 3.6 の時とは異なり、1 分単位で流路ネットワー

ク概形を取得し続けた。それは毎分の MaxFS の二次元マップの 0 より大きい部分 (=速度データが検出された部分) をマスキングして作られた。流路中に欠陥があることも想定されたので、マスク化されたマップを (3×3) ウィンドウの膨張処理 (ウィンドウ内最大値を返す。マスク=1 背景=0 ならマスク部分が拡大する。) によって欠陥を埋める工夫をした。その一方流速マップの方で発生した欠損値には、一度 0 と変換して (5px×5px) ガウシアンフィルタをかけた値を埋め込んで、それでも速度 0 の場所は欠損値に戻した。起きたその後のネットワークの中心線と流路半径は節 3.6 同様にスケルトンと背景とのディスタンスマップの重ね合わせより、決定した。流速分布の向きはローカルなスケルトンの向きに垂直な方向を計算して決定し、その両側に流路の半径分延長した分を一断面上の最大流速分布の範囲とした。

二つ目の方法は粒子が可視化された ΔI の動画に対してキモグラフをとって直接流速を測定する方法である。キモグラフとは時間の経過に伴う動きや変化を記録するための図であり、本稿では動画の画面内を直線または長方形で範囲指定し、図 3.6C の様に横軸時間縦軸空間 (直線または長方形の長軸方向) に再出力した図を指す。図 3.6C は発達した管の長軸上をとったキモグラフの例 (1 分間) である。黒い曲線はそれぞれ測定位置を通過した粒子の軌道を示し、この曲線の傾きは粒子の速度になる。この例では 30 秒経過するあたりで原形質流動が停滞して向きが逆転し、その後およそ 20~30 秒間非常に速い流れが続いた。キモグラフから流速測定する際は ImageJ の直線ツールによって手動で粒子軌道の角度を測定した。完全なフリーハンドで角度を測ると人為的な誤差につながる為、以下のレギュレーションで測った。①1 分間の中で一番流れが速く明瞭な曲線を選ぶ。②直線ツールを曲線の中心に沿って合わせて、直線ツールに沿って特定の色で描画した。③Wand ツールによって描画部分を選択してから描画部分の角度 θ を算出した。④この角度を基に $\tan(\theta \times \frac{\pi}{180}) \times 1177 [\text{mm}]/512 [\text{px}]$ より速さ及びその絶対値から速度を決定した。これを 3 回繰り返し、平均値を流速分布中の位置 x の値とした。

図 3.6B は 120 分以降のネットワークに対して同じ程度の太さの流路を 10 か所 (半径約 36 μm 、長軸方向 15px) 選び、MaxFS (長軸方向に平均) とキモグラフでそれぞれの流速分布を測定して、同じ中心からの位置 x のデータ同士で平均した平均流速分布である。両者は中心付近では近い値をとった。一方 MaxFS (図 3.6B 青プロット) は管の外側に行くにつれてキモグラフの流速分布 (図 3.6B 赤プロット) より大きく評価された。

一方で流速分布の時系列 (10 秒おき) を図る際はキモグラフを使って、10 秒おきに明瞭な曲線 1 本から速度を決定した。

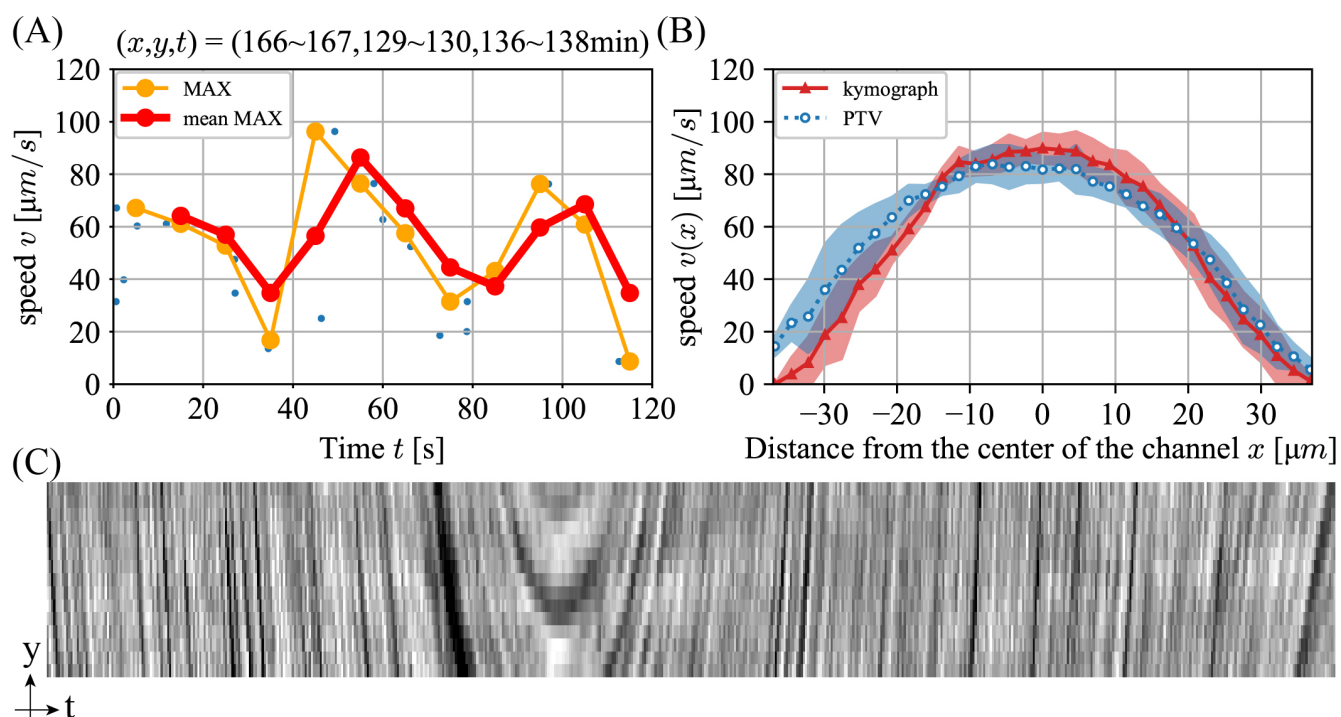


図 3.6: 1 分間最大流速 MaxFS とキモグラフによって決定された流速分布の比較。(A) $(x, y, t) = (166\sim 167 \text{ px}, 129\sim 130 \text{ px}, 136\sim 138 \text{ min})$ の範囲内にて検出された PTV の速度データ (図中青点) の時間変化。MaxFS の計算の為に速度データは 10 秒毎にグループ分けされて各々のグループでの最大速度をオレンジのプロットで示し、さらに 2 グループ移動平均を赤のプロットで示した。1 分間の MaxFS をこの赤プロットの 1 分毎の最大値として定義した。(B) PTV (青) またはキモグラフ (赤) によって決定した流路方向の最大流速分布。この流速分布は 120 min 以降の流路ネットワークから同程度の流路を 10 か所測定し、図には平均の流速分布を示した。(C) 流路の長軸に沿ったキモグラフ (1 分間) の例。

第 4 章

結果

4.1 PTV による細胞全域の流速測定

4.1.1 原形質ドロップの形態変化

実験 Ex1 の原形質ドロップの形態変化は図 4.1 のようになった。原形質ドロップは滴下してから初めは等方的に広がっていた (図 4.1A)。10 分経過する頃から、細胞縁側で形態の収縮が観察されるようになり、わずかに細胞内の粒子の移動もこの時間から観察された。

収縮はやがて大きくなり、細胞の縁全体で周期的に凸凹する変形が目立つようになった。この時、細胞は初めよりわずかに小さくなった (図 4.1B)。50 分以降からは細胞の縁が凸凹する変形は目立たなくなる代わりに細胞が外側に等方的に広がる動きが見えるようになった。それと同時に細胞も薄くなっていき、細胞内の粒子の移動も目視しやすくなった (図 4.1C)。

そうすると次第に細胞内の粒子の通過する経路も目視できるようになった (図 4.1D)。これ以降も細胞は広がり続けたが、細胞の右下には比較的広がらなかった。赤色の入射光は完全に全体に等しく照射されているわけではなく、画面をわずか右下に強く照射していたが原因は不明である。90 分時点では原形質ドロップに見える流路には既に径の大小の差が出ていた。撮影開始から 2 時間経過する頃には原形質ドロップは場所ごとに細胞質の粗密が明確になり、特に径の大きな流路が細胞中心部で環状に繋がり細胞の外側には網目状に広がる管ネットワークを完成させていた (図 4.1E)。

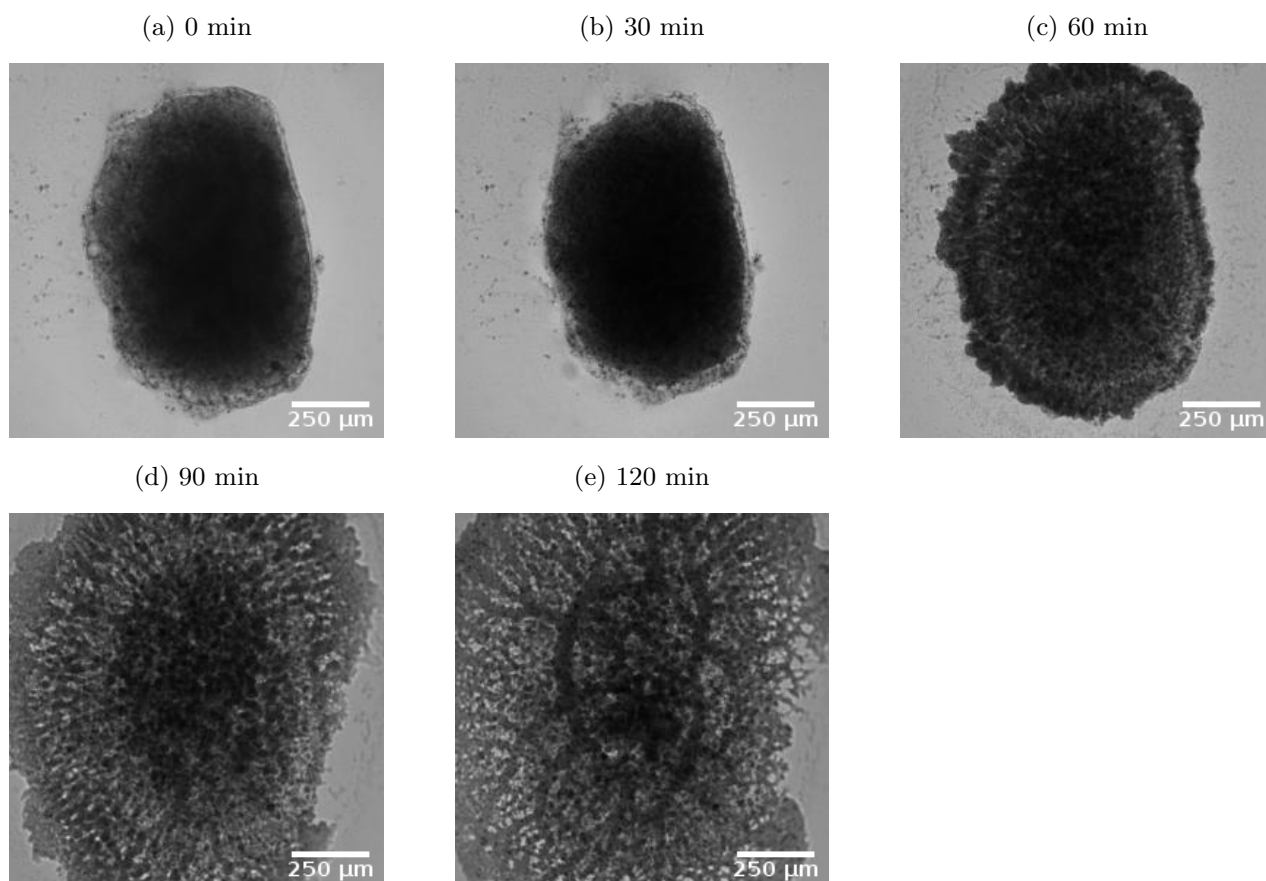


図 4.1: 原形質ドロップの形態変化。(A) 撮影開始時点 (0 min) で細胞は縦長の楕円形で中心が山なりに厚い形態をしていた。(B)30min 経過時点では細胞は若干小さく、より分厚くなった。(B)60 min 経過時点では細胞は外側へ等方的に薄く広がった。(C)90 min 経過時点では細胞は薄くなり、細胞内粒子の観察が容易になった。細胞から放射状に薄い筋状に流路が伸びているのがわかる。また細胞の端側では変形体の先端部によく見られる様な扇状に細胞質が広がっていた。(D)120 min 時点では原形質ドロップ内の流路ネットワークが発達した。細胞の中心部には太い環状の流路が発達し、そこから外側へ樹状に枝分かれした。

4.1.2 PTV による細胞中のゾル層流路の可視化

各撮影時間帯ごとに PTV のデータを分割し粒子検出位置を全て 2 次元マップ上に白黒で図示した (図 4.2)。粒子が連続で検出される場所は特に濃い白で塗りつぶされた。これは細胞内の粒子の経路つまりゾル層の概形に相当する。時間発展によって細胞は広く変形し、流路の変形が生じた。

図 4.2A は 30~55 min における流路である。形状は不明瞭ではあるものの細胞の縁に沿った太い流路が内側へ粗い網目状に伸びていた。粒子の運動が観察され始めた 10 分ごろから 1 時間近く経過するまで、見かけ上流路は太くなく、単体の粒子がゆっくり動く様子がよく観察された。この流路の構造は図 4.2B の同じ場所でも同様の形状の流路が確認できた。

撮影時間 60~85 min(図 4.2B) では流路がより明確になり、更に外側では図 4.2B の構造が放射状に伸びていた。これはゾル層中の粒子が細胞の内側と外側を直線的に往復していたことを示す。

撮影時間 90~115 min(図 4.2cC) では流路はより太く発達した。隣り合う流路同士が繋がり外側の流路は樹状に発達し、内側では特に太い環状路を形成していた。この環状路は図 4.2 と図 4.2 に見られた流路の構造と位置が重なっていた。つまりこの環状線部分はそれまでも存在はしていたが円周上の流れは小さかったが図 4.2 の時間帯になって強い流れが生じた事が示唆される。撮影時間 120~145 min までで流路は一通り完成したが流路構造は小さく変化し続けていた。例えば外側の樹状構造が網目に入り組んだ構造になり、内側の環状線流路は左右で太さの差が目立った。

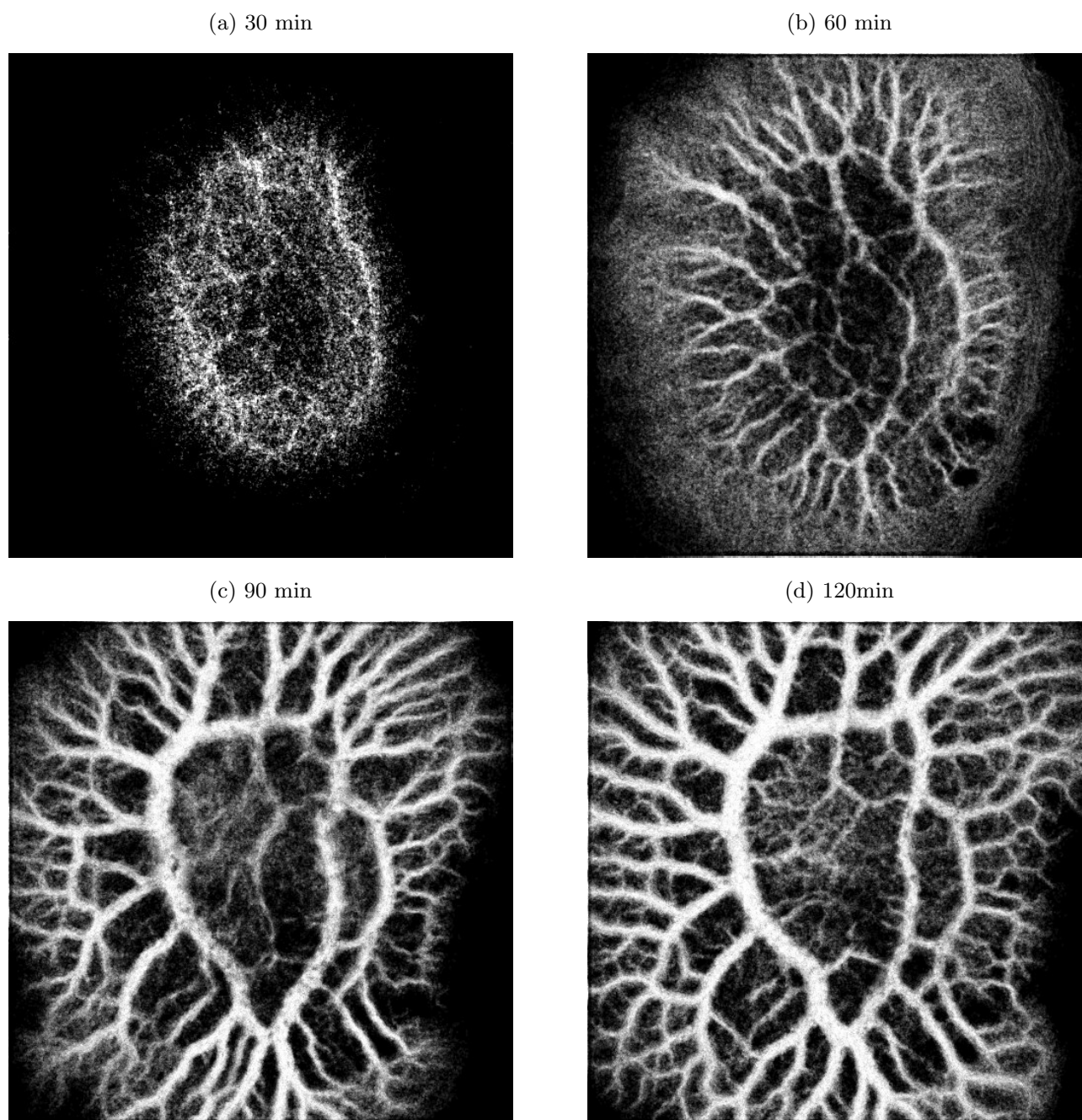


図 4.2: 撮影時間帯 (a)30~55 min(b)60~85 min(c)90 min~115(d)120~145 min 中で PTV によって粒子が検出された事が 1 度でもある場所を白、1 度もない場所を黒で示した。白い場所は粒子の経路である。

4.1.3 流路ネットワークの発達に伴う流速の発達

この節では原形質ドロップにおけるネットワークの発達と共に流路で観察された流速の変化を示す。図 4.3A-D は、変形菌の原形質液滴の経時的なスナップショットを示している。実験時間 30 分以降の (A) において、縁側全体でリズムカルな収縮と細胞質流動が良く観察された。さらに実験時間 50 分経過する頃に、この過程が進行するにつれ、液滴は拡がり薄くなった (B)。同時に、原形質の流動のための流路が形成され始めた。この流路は成長を続け、最終的には異なる直径を持つ流路が液滴全体にわたって複雑なネットワークを形成した (C,D)。

図 4.3A'-D' は、最大流体速度 (MaxFS) の空間分布図を示しており、ここではその速度を MaxFS と記す。MaxFS は液滴内の各位置において、1 分間の間隔での最大速度 (原形質のシャトル流動の 1 サイクル中の最大速度) を示し、カラーチャートを用いて表現されている。初期段階 (A') では、MaxFS は低く (濃青)、液滴が拡がり薄くなるにつれ、高速の流路が形成される (B')。時間の経過とともに、一部の流路は厚くなり、他の流路は

消失する。一般的に、流路の直径が大きいほど、 $|\text{MaxFV}|$ も高くなる傾向にある (C', D')。流路ネットワークが完全に発達すると、液滴の中心部に厚い環状の流路が現れ、これを中心環状流路 (Central Annular Channel; CAC) と呼ぶ。

図 4E は、水平線 (図 4A' のピンクの線) に沿った流速の時間変化を示している。図 4E に示されるように、CAC は約 90 分で急速に開口する。このようにして、液滴全体にわたる流路ネットワークが体系的に構築される。同様の CAC 形成は、実験 2 (F, F') および実験 3 (G, G') でも観察された。本研究の次の段階として、この流路ネットワークの形状および輸送機能の定量的解析が必要である。

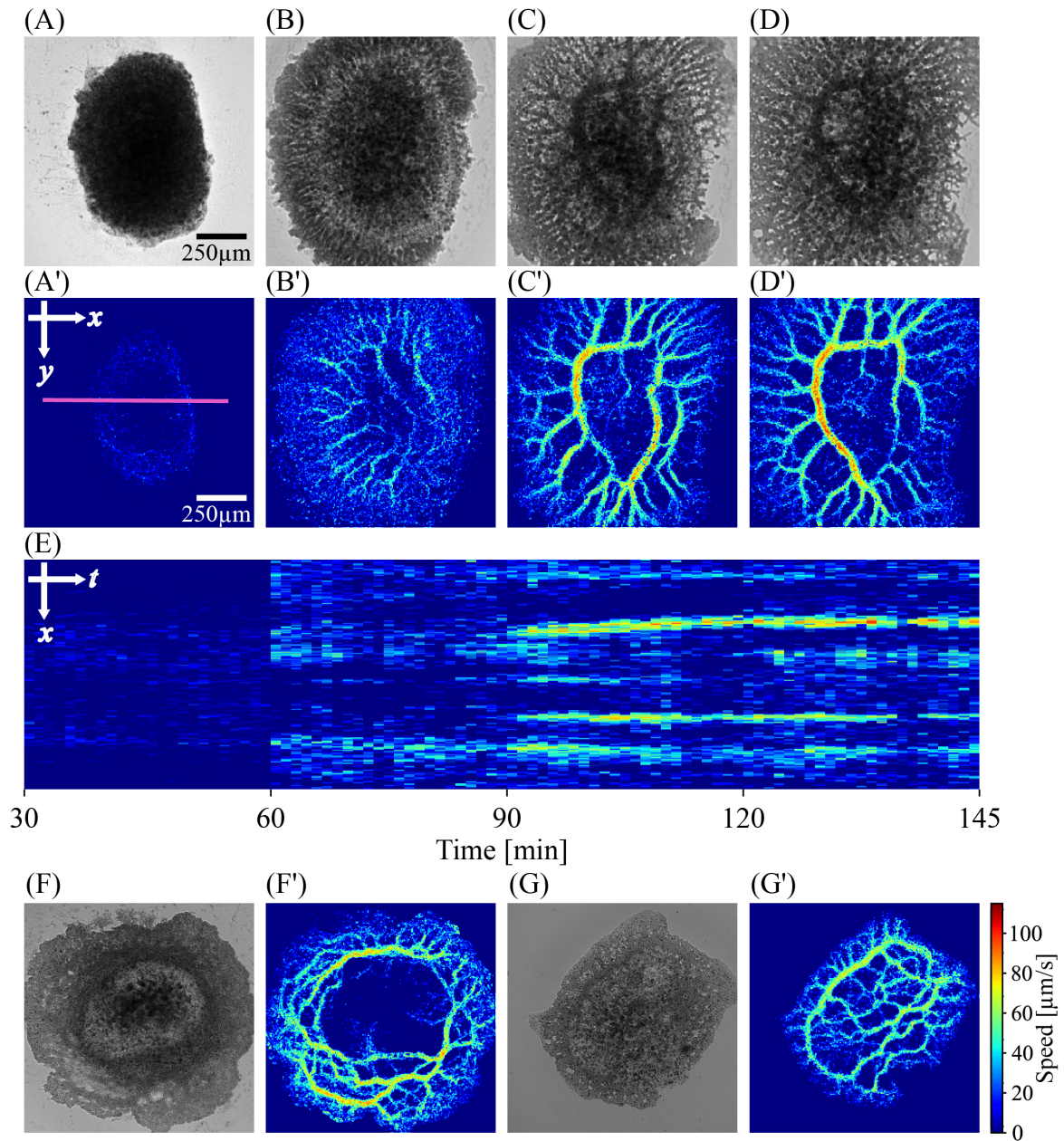


図 4.3: 撮影開始から 44 分 20 秒 (A)、74 分 20 秒 (B)、104 分 20 秒 (C)、および 134 分 20 秒 (D) の時点での原形質ドロップの経時的なスナップショット。さらに、準備から 33 分 (A')、66 分 (B')、105 分 (C')、および 133 分 (D') の時の 1 分間における最大流速 (MFS) の二次元マップを示す。(E) 図 A' のマップ上のピンクの線に沿った MFS の時間経過を示す。スケールバーは 250 μm である。各要素の最大流速は、1 分間の間に (2×2 ピクセル $\simeq 4 \times 4 \mu\text{m}^2$) のウィンドウ内で計算された。[35] より引用。

4.1.4 流動パターン

図 4.4 は、各 30 分間隔における典型的な原形質流動の時空間パターンを示している。この図は液滴全体の MeanFV（平均流速）マップを表し、各行は 20 秒間隔で配置され、30 分ごとの時系列に沿って縦方向に整列している。流動の方向は約 40 秒ごとに反転し、液滴全体でシャトル流動が生じる。90～120 分までに中央環状流路（CAC）が完全に形成された。

この図の意味することとして、例えば 120 分以降の発達したネットワークである図 4.4M において、流動は図の下部の狭い流路から CAC に合流し、CAC に沿って加速し、左上の狭い流路に向かって流出した。このことから、細胞内の物質（小胞や粒子など）が下部から左上の領域に向かって輸送される可能性が示唆された。図 4.4M から 40 秒後の様子を示している図 4.4O では、流動ベクトルが前の構成に比べてほぼ逆転している。この結果、細胞内物質は左上から再び下部に向かって輸送される可能性がある。これにより、CAC を介して、遠く離れた領域間で細胞内物質が交互に移動することが示唆された。

残念なことに最初の 30 分間は PTV がほとんどうまく取れなかった。目視で観察された範囲では比較的薄かった細胞の縁付近で、縁側の収縮に応じて単体の粒子がゆっくりと往復するような動きをしていた。30 分近く経過する頃にはこの収縮は細胞の縁全体で浪打のような形で観察され、個別の粒子もまたその場が収縮すると縁にそって押し出され、いった先でいった細胞は弛緩していた。このようなサイクルが繰り返し観察された。

図 4.4A-D は 30～55 分で撮影された流動パターンの典型例を示す。この時原形質ドロップの収縮は先述した通り、細胞の縁全体がリズミカルに収縮していた。それにより流動も比較的ローカルな範囲で行き来していた。図 4.4A-D を見てもあまり全体を循環するというよりは狭い範囲で粒子が行ったり来たりしている様子が観察されたし、場所によっても流れるタイミングがばらついていて、しかし 50 分経過あたりで各地の流動はそろそろようになっていった。図 4.4A-D でもその傾向があるが、細胞の全域の流動が右下に向かうタイミングがそろった時に流動は同時に外側に向かって流れ出し、細胞膜の陥入が起きた。このあたりのタイミングで細胞が等方的に広がりだした。

1 時間経過する頃の典型的な流動はまさに細胞全体の流動が等方的に広がるパターンだった（図 4.4E-H）。この流動に応じて細胞はどんどん広がっていった。しかしいつまでも細胞は広がり続けたわけではなく、流動のタイミングも全体でそろい続けたわけではなかった。図 4.4F、H でもその傾向があるが、細胞の上部と下部で流動がわずかにずれ始めていた。このずれはやがて大きくなり、80 分経過する辺りで、中心付近のわずかに横繋がりだった流路（後に CAC となる部分）で粒子が通過する瞬間が観察された。残念ながらこの撮影には 5 分のインターバルを設けていた為に、これ以降の 85～90 分の間の流動がどのようなものだったのかはわからないままであった。

90 分以降のネットワークでは CAC が発達し、CAC を中心とした高速の流動が起きていた。この時の流動は両側の CAC から同様の速度の流れがきて端から端へと物質が輸送されていた。120 分以降では右側の CAC が少し細り、左側の CAC での流動が主流になった。CAC が発達することで高速な流れが実現されただけでなくおよそ 80 秒間の流動のサイクルで流動が細胞内の広い範囲を循環するようなパターンとなった。

次に、図 4.5 に示すように、流路パターンを抽象化し、グラフ構造を抽出して輸送の簡略化した表現に還元した。エッジは流動方向と流速をそれぞれ矢印と色で示している。多数の三重接合ノードが 2 種類に分類され、合流ノード（2 つの流入と 1 つの流出、赤色点で表現）と分岐ノード（1 つの流入と 2 つの流出、青色点で表現）に分けられている。分岐ノードは、物質の拡散において重要な役割を果たす [12]。

図 4.5A では、右上領域の流動が合流ノードの集団を介して CAC に向かう傾向を示し、一方、左半分の流動は CAC から分岐ノードを通じて周辺部に向かって流出している。この流動方向は 40 秒後にほぼ逆転し（B）、その時点でほとんどの分岐ノードが合流ノードに、逆もまた然りである。このようにして、粒子はこれらのノードを介して往復移動する。粒子が流路ネットワーク全体でどのように分散および混合されるかを測定することは興味深い、長期間にわたる個々の粒子の追跡には課題がある。そのため、本実験で計測された実際の速度場に基づく仮想粒子のシミュレーションによる理論的推定を提案する。

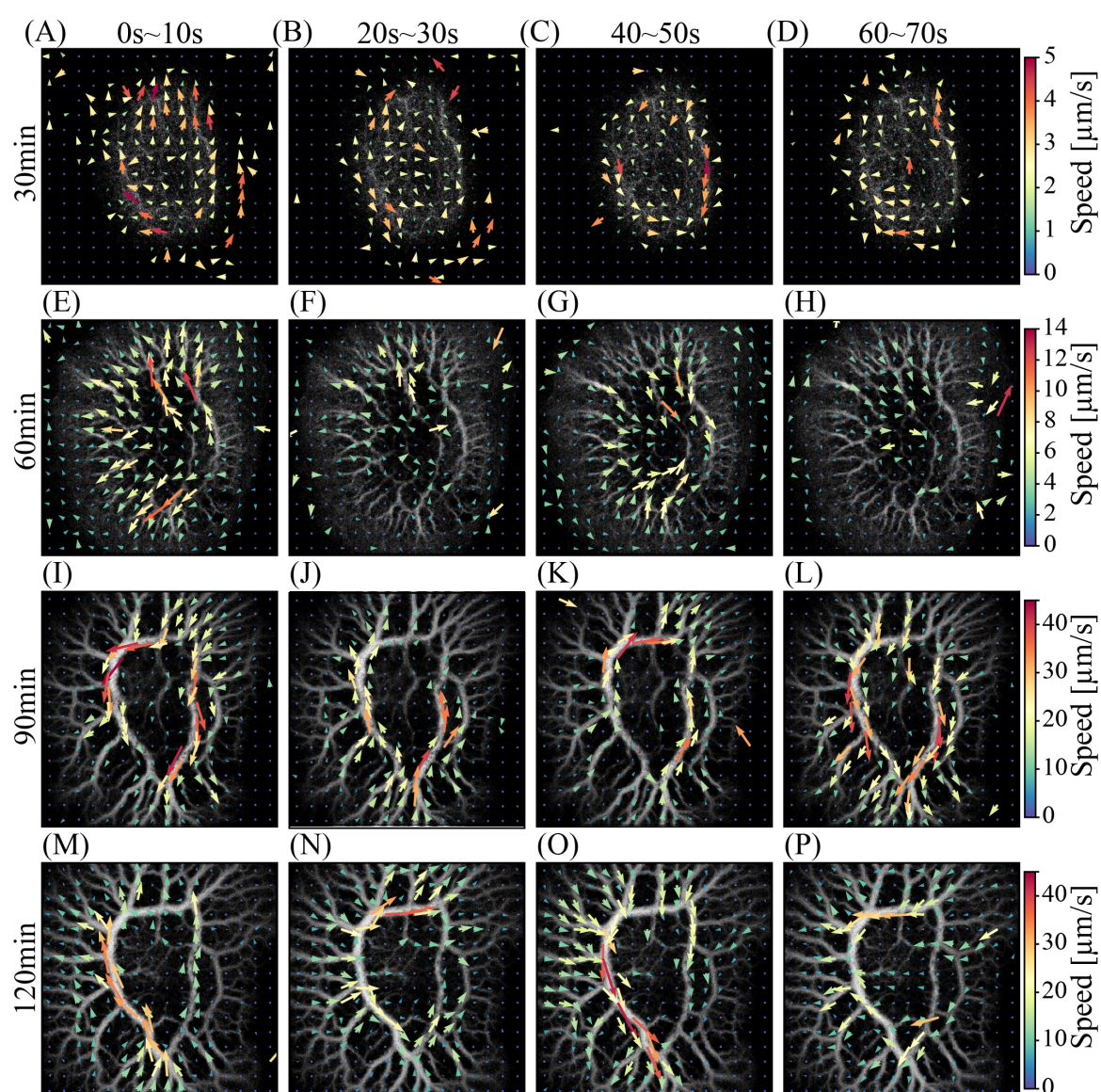


図 4.4: 原形質ドロップの準備後の各時点における原形質流動ベクトルの二次元パターン。本図の MFV（平均流速）は、視覚的な認識を考慮して、単位空間（ $32 \times 32 \text{ px} = 74 \times 74 \mu\text{m}^2$ ）および単位時間（10 秒間）での平均速度として示しているが、取得されたデータは図に示すように、空間および時間解像度が高い。各図の列には、流動方向の周期的切り替え（約 40 秒）を示すため、20 秒ごとに連続して得られた 4 つのパターンが含まれている。各列の縦順は、原形質ドロップの準備から 30 分ごとの時間順序を示している。[35] より引用。

4.1.5 質量輸送の増加と単位コストあたりの質量輸送の評価

ネットワークの性能を経時的に評価するために、Hagen-Poiseuille 流動条件を仮定して、ネットワーク全体の質量輸送率 (MTR) と作業消費量 (WE) を解析した。図 4.6A は、ネットワーク全体における MTR および WE の時間経過を示している。MTR は 30~50 分の間の $0.1 \times 10^{-12} \text{ kg}\cdot\text{m/s}$ 未満から 120~140 分の間に $1.0 \times 10^{-12} \text{ kg}\cdot\text{m/s}$ を超えるまで、10 倍以上増加した。同時に、流路ネットワークの発達に伴い WE も増加した。実験 1 および実験 2 では、90 分以降に MTR と WE が顕著に増加し、流路ネットワークへの変化と一致した。一方、実験 3 ではこの増加が 120 分後に見られた。最終的に、ネットワーク構造が安定すると、すべてのサンプルで MTR と WE が類似した値に収束する傾向が見られた。

図 4.6B は、輸送効率を示す MTR/WE 比の時間変化を示している。初期（30~50 分）には、この比率はすべての実験で 1 から 2 の範囲にあり、90~120 分の一時的な増加の後、120~140 分の間に約 1.3 に収束した。注目すべきは、ネットワークの発達に伴い質量輸送率が大幅に増加したにもかかわらず、MTR/WE 比は比較的安定

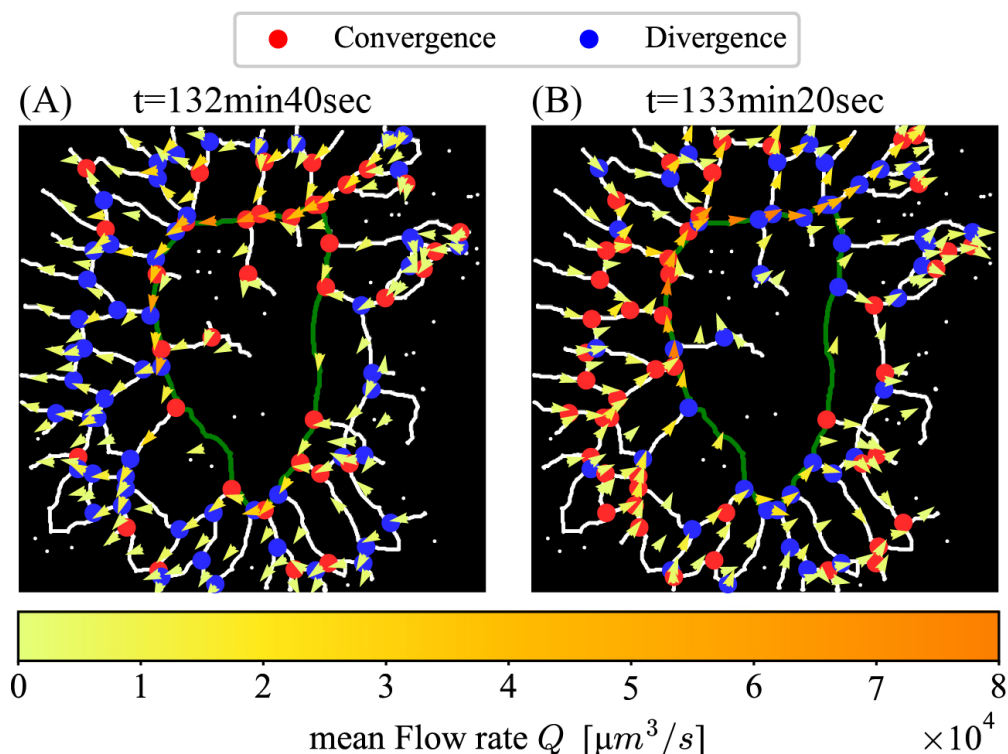


図 4.5: ノードとエッジからなるグラフに簡略化された流路ネットワーク。エッジ上の矢印は流動の方向を表し、色は平均の流量 Q を示している。流速が大きいエッジはオレンジ色、小さいエッジは淡い黄緑色で描かれている。ノードは分流ノード（青色の円、一つの流入と二つの流出）と合流ノード（赤色の円、二つの流入と一つの流出）に分類されている。流路ネットワークの中心環状流路 (CAC) は緑色の線で示され、他の流路は白色の線で表されている。(A) $t = 132$ 分 40 秒、(B) $t = 133$ 分 20 秒の様子を示す。[35] より引用。

していた点である。

4.2 流速分布測定と原形質のレオロジー特性

4.2.1 流速分布におけるシアニング特性と流速分布の時間変化

図 4.7 は 120 min 以降の発達したネットワークにおいてキモグラフによって十秒おきに測定された流速分布の典型例である。図 4.7A ではオレンジ (10s) と緑 (20s) のプロットの時、流動は最速になり、その形状はニュートン流体が示すような放物線ではなく、頭をつぶれた放物線 (中央付近の流速がほぼ同じ) であった。

流速は管壁付近で急速に落ち込み、管壁に到達する頃に 0 になった。流速分布において頭の平たい中心付近と速度が落ち込んでいく管壁付近の境界が観察された (典型的には図 4.7A の緑 (20s) の右肩、図 4.7 C の茶 (50 s) の左肩、図 4.7 D の緑 (20 s) の左肩である)。しかしこのような境は必ずしも明確ではなく、いつも観察されるわけではなかった。そのような場合、流速分布は管端ではなだらかに直線的に変化していった。

実際流速分布は場所によっても変われば、同じ場所でも時間によって形状が大きく変わることがあった。図 4.7B は往復流動が反転した後の流速分布がシンメトリーでなかった例である。このような変動は測定した流路が曲がっていることや流路近くの分岐からの流入や流出する流れなどによって起こるが、詳細は明らかでない。

流速分布を放物線で近似した時、放物線と実測値のずれはランダムでない偏りがあり、流速分布が放物線であると結論付けられなかった。しかしその一方で放物線での近似が可能なケースも見られた。これらの発見は原形質が非ニュートン流体としての性質を持ちながらもそのレオロジー特性は一定でなく可変性のものであることを示唆した。

平均的なレオロジー特性を知るために一周期において最大の速度の流速分布を測定した (向きは無視する)(図 4.8)。図 4.8 は図 3.6B を出力する際に使用したの最大流速分布の内の典型例である。図 4.8A にネットワークで

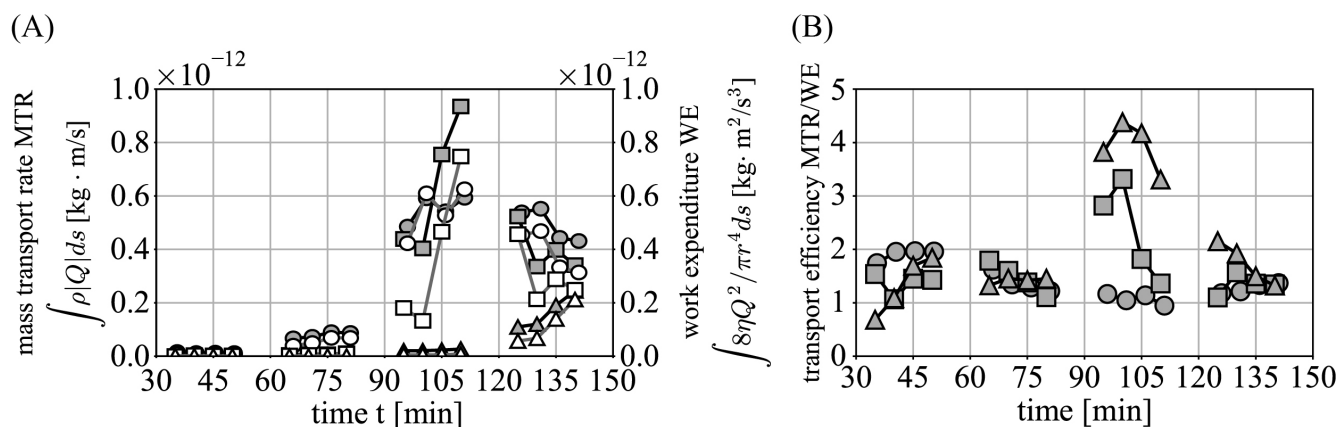


図 4.6: (A) 図は、ネットワーク全体における質量輸送率 (MTR; グレーのシンボル) と、Hagen-Poiseuille 流動を仮定した作業消費量 (WE; 白色のシンボル) の時間経過を示している。また、(B) 図は単位作業消費量あたりの質量輸送率 (MTR/WE) の時間変化を示している。シンボルの形状は実験ごとに変更しており、各シンボルは ± 60 秒の移動ウィンドウで平均化した値を示し、5 分間隔でプロットされている。流路ネットワークが発達し整理されるにつれ、質量輸送率と作業消費量は大幅に増加したが、単位作業消費量あたりの質量輸送率はわずかに減少するにとどまった。[35] より引用。

の測定位置を示す。図 4.8 の各流速分布を測定した時間にばらつきがあるが、位置が被る時は図 4.8A で枠の色を変えた。管壁と中心部の境界は図 4.8B'-D' の黒い点で示した。この黒い点は中心から少し離れた所で初めてが大きくなった所をプロットした。図 4.8B'-D' 中の γ_{1l} と γ_{2l} は流速分布左側において黒点から内側または外側の隣の点との間のせん断速度であり、 X_L は管壁と境界との距離である。そして $\overline{\dot{\gamma}_l}$ は境界より外側に対してせん断速度の平均値である。右側に対しても同様に計算しそれぞれ γ_{1r} , γ_{2r} , X_R , $\overline{\dot{\gamma}_r}$ で表した。この最大流速は場所や時間によって異なる形状と値を示したが、おおよその傾向として境界内側のせん断速度は $1-3 \text{ s}^{-1}$ 、外側のせん断速度は $4-9 \text{ s}^{-1}$ という値を取った。境界の位置は管壁から $6-10 \mu\text{m}$ 離れている事が多かった。管壁付近の平均せん断速度は $4-7 \text{ s}^{-1}$ であった。境界の位置はサンプルによっては曖昧であるが 1 分間の中で管が収縮している事を考慮すると管内の原形質の粘性もダイナミックに変化している事が伺える。特に図 4.8C', D', J' はほぼ同じ場所で放物線の様な時とそうでない様に見える時があった。

4.2.2 臨界せん断速度の包括的な推定

異なるサンプル、異なる流路間で臨界せん断速度を推定する為に、PTV の手法によって推定された最大流速分布を導出した (図 4.10)。図 4.10A ではネットワーク発達した 120 min 以降のネットワークに対して同じ半径の流速分布同士で平均した平均流速分布を示し、さらにサンプル毎に色を変えて出力している。PTV は空間・時間解像度が低く粒子の数が限られている時に有効な手法であり、さらに管壁が収縮によって位置が変わる為に管壁付近の流速を推定する事は困難であった。故に図 4.10A では管壁より内側の速度だけを示し、それより外の管壁では点線で速度 0 に結び付けた。流速分布は中心付近は放物線状で、管壁近くでは直線的に速度が落ちていた。流速は管壁付近でも速度が 0 にならない特徴は原形質が非ニュートン流体であることを示す。

図 4.10A の黒い点はこの流速分布内で流速が最も落ち込んだ所 (つまり境界) を示し、この時の外側のせん断速度を図 4.10B にまとめた。図 4.10B は横軸が平均断面流速で、図 4.10A の各流速分布から両側の臨海せん断速度を平均して 1 点ずつプロットした (サンプル毎にシンボルの形を変えてある)。その結果図 4.10B で臨界せん断速度は平均断面流速・サンプルに依らずおおよそ横ばいにプロットされた。その結果臨界せん断速度は $1-3.5$ の間の数値をとり、平均は $\bar{\gamma}_1 = 2.5$ だった。これは図 4.8 で見てきた臨界せん断速度の値と同意できる。

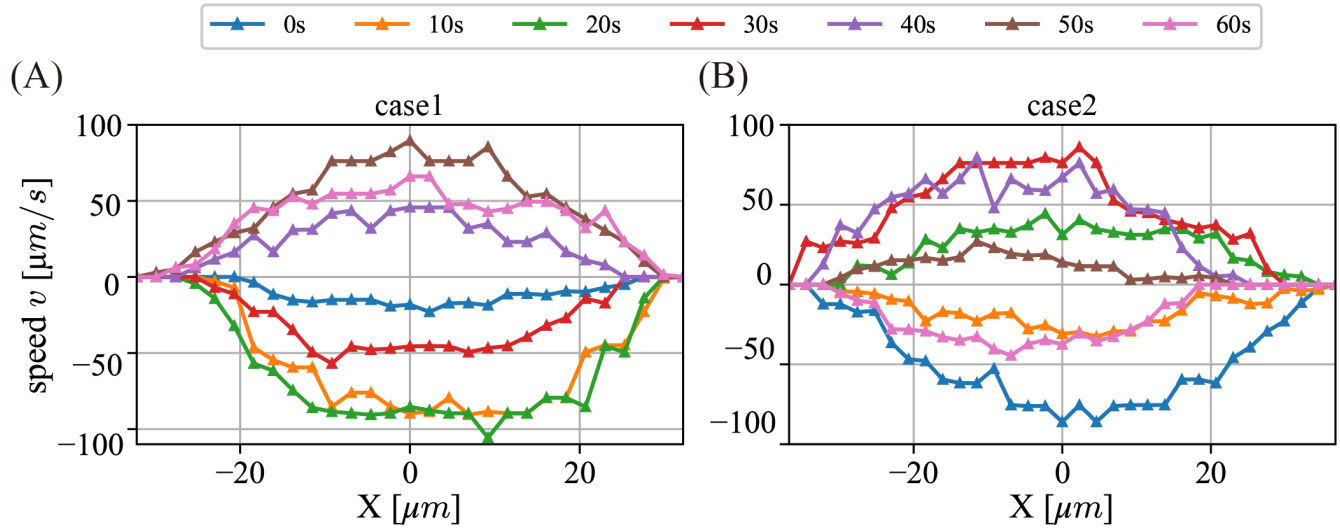


図 4.7: Ex1 のネットワークが発達した時間 (120 min) 以降のキモグラフによって測定された流速分布の 10 秒毎の時間変化。(A), (B) はそれぞれ図 4.8 の (A),(B) に対応する。(A) 10 s と 20 s では管の中心付近 (およそ $-10 < X < 10$) は殆ど同じ速度だった。管の中心付近より外側からは流速は直線的に落ち始めて管壁でゼロになった。流動が逆転した 50 s、60 s では中心付近は平たいものややとがっていたり、速度が小さめだったり、父買いが見られた。このように中心付近が平たいのはよく見られたが、同じ流路でも流速分布の形状にはばらつきがあった。(B) 流動反転後の流速分布の対称性が低いケース。上半分では速度は左側に偏って高かった (ピークは 30 s, 40 s) が反対に下半分ではやや右側に高かった (ピークは 0 s)。流速分布は時間空間によって大きく変動したが、これには少なくとも流路の曲がりと近隣の分岐からの流入と流出が関わっていると考えられる。

4.2.3 流路ネットワークのスケーリング関係

図 4.10 C は横軸流路半径、縦軸平均断面流速の両対数グラフである。この結果は各サンプルは細い流路に関しては殆ど同じ平均断面流速を記録し、比較的細い流路 ($r = 10^{0.8-1.3} = 6.3 - 20.0 \mu\text{m}$) に対しては直線的に増加していき太い流路 ($r = 10^{1.4-1.6} = 25.1 - 39.8 \mu\text{m}$) で頭打ちになった。それぞれのサンプルのプロットを平均二乗法でフィッティングした結果、おおよそ $r^{0.7}$ に比例している事が分かった。より太い流路に関しては、サンプルの mass によっては太い流路が未発達になり、サンプル毎にずれていった。流量は平均断面流速と管断面積の積として与えられるため、観察された生体内の流量は半径のおよそ 3 乗に比例した。流路の厚さについては、特に太いチャンネル間の分岐点付近では解析アルゴリズムの性質上大きめに出る傾向があるため、太いチャンネルの結果解釈には注意が必要である。いずれにしても、細いチャンネルに対しては明確なスケーリング則が確認された。

4.2.4 F-アクチン溶液の様なシアニング流体における管状の流れの理論と実験結果との比較

本節では、円管に流れる非ニュートン流体を理論的に考察し (詳細は付録にまとめた)、その理論的な結果と実験結果を比較した。シアニング特性を示す非ニュートン流体を仮定して図 4.11 に示すせん断ひずみ速度-せん断応力 (S-S) 関係を考慮する。これは特定の範囲内のせん断ひずみ速度に対してせん断応力が一定であるシアバンディングという非ニュートンの挙動を示す流体に特徴的であり、F-アクチン溶液でも報告されている。また、モジホコリ変形体の原形質にはアクチン分子が豊富に含まれている為、この S-S 関係を考慮するのは妥当であると考えられる。

ここで、 γ_1 は本研究の実験から 2.5 s^{-1} とした。神谷先生によって測定された変形体の管内の流速分布 [36] の結果は本研究の結果と似ており (放物線の頂点が本研究の結果よりも平坦)、その論文では $\gamma_1 = 1.1 \text{ s}^{-1}$ ($= 7.3 \mu\text{ms}^{-1}/6.7 \mu\text{m}$) であった。さらに、S-S 関係は [37] によって $\gamma < 1 \text{ s}^{-1}$ の範囲で測定されており、見か

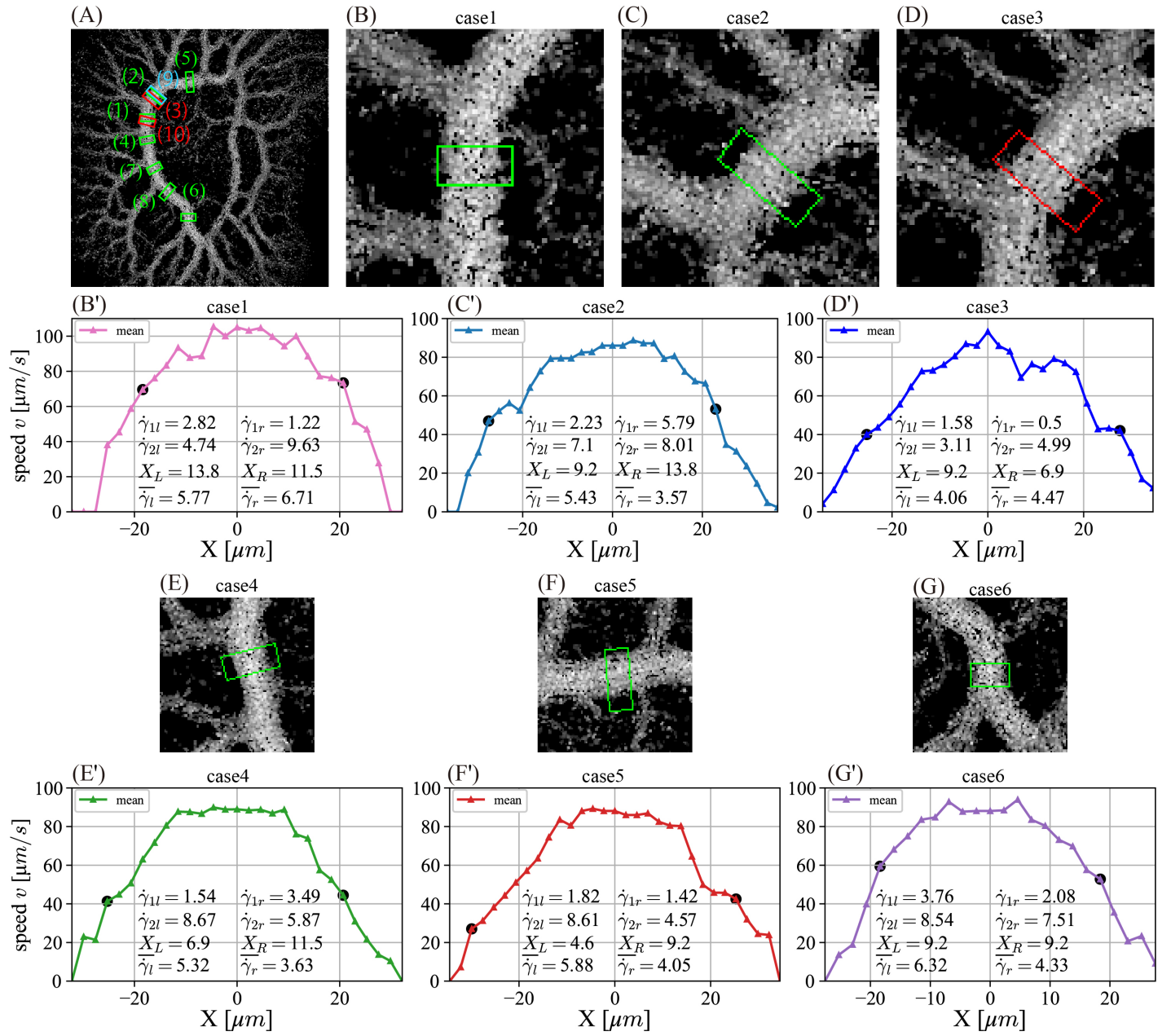


図 4.8: キモグラフの手法によって測定された 1 分間における最大流速分布。Ex1 で 120 min 以降の流路ネットワークから 10 か所選定してキモグラフを測定した。その平均の結果は MaxFs での手法との比較の為に 3.6B の赤プロットに示した。測定した 10 か所流速分布の内 3 つの典型例の身を示す。(A)120 min の流路ネットワークにおける測定箇所を示す。(B)-(D) 測定箇所における MaxFs の二次元マップ。緑で囲われた部分をキモグラフで測定した。(B')-(D') 各地点で測定された最大流速分布。B' と C' は頭のつぶれた流速分布だが、D' は放物線の様に頭がとがっていた。

けの粘度 η は $0.2 \sim 2.0 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ だった (著者らはせん断増加が起こった可能性や未知の要因があると議論していたが、この点を明確にするためには 1 s^{-1} よりずっと大きなせん断速度での詳細な測定が必要であり、これは今後の課題である)。

長さ L , 半径 R の剛体パイプを流れる非ニュートン流体が圧力差 Δp を仮定する。定常流では、流速分布は図 4.12 の様に円管断面の中心付近で放物線になり、端の方で急速に速度が落ちる。この流速分布の二つの領域の境界の位置 R_1 として以下の関係式が与えられる。

$$\frac{\Delta p R_1}{2L \sigma_0} = 1 \quad (4.1)$$

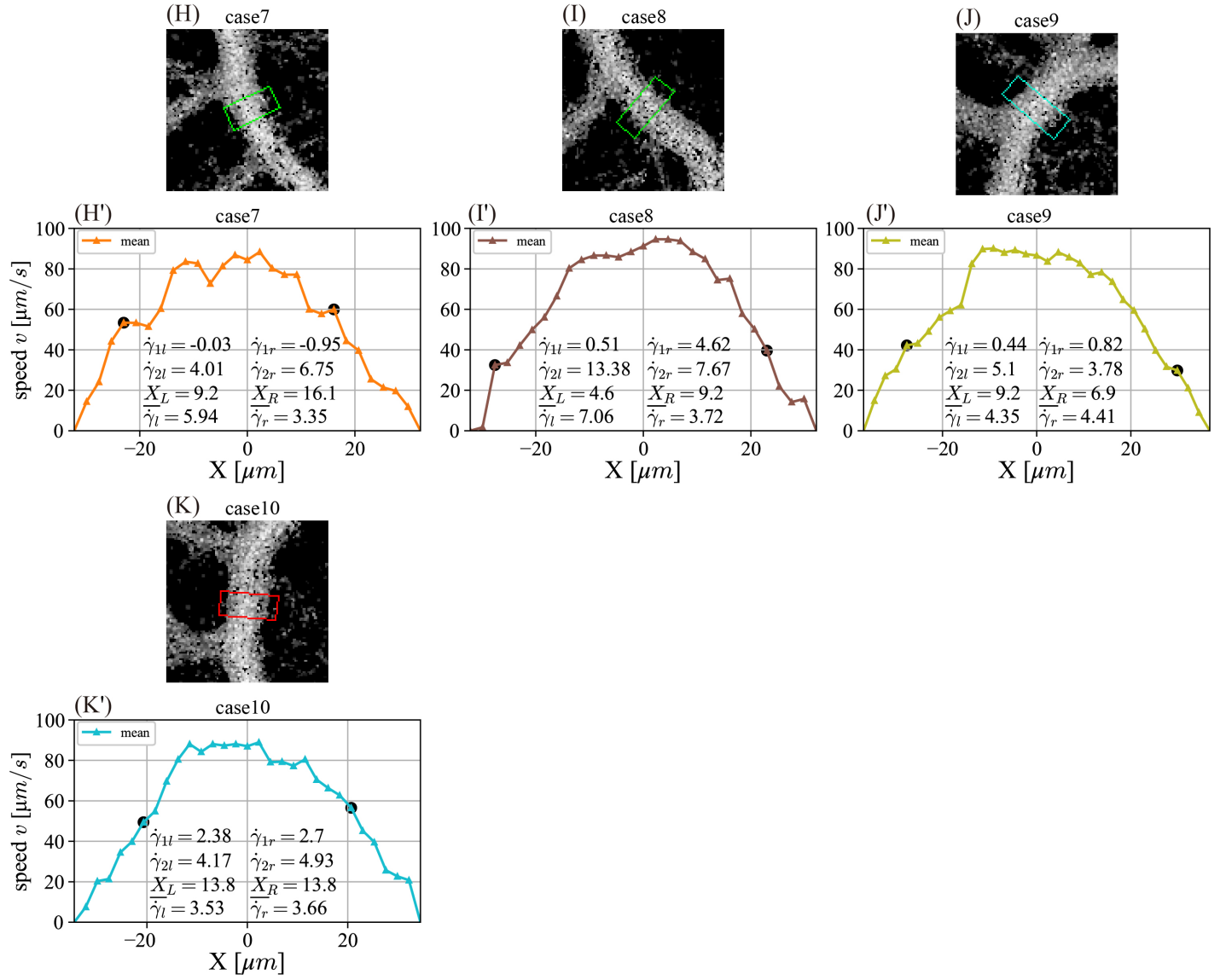


図 4.9: 図 4.8 の続き

流速分布の二つの領域は以下のようにして表せられる。

$$v(r) = \begin{cases} \frac{1}{\eta_1} \left(-\frac{\Delta p}{4L} r^2 \right) + \frac{1}{4\eta_1 \eta_2 L \Delta p} \{ 4\eta_2 L^2 \sigma_0^2 + \eta_1 (\Delta p R - 2L\sigma_0) (4\eta_2 \dot{\gamma}_2 L + \Delta p R - 2L\sigma_0) \} & r < R_1 \\ \frac{1}{\eta_2} \left\{ -\frac{\Delta p}{4L} r^2 + (\sigma_0 - \eta_2 \dot{\gamma}_2) r \right\} + \frac{1}{4\eta_2 L} R (4\eta_2 \dot{\gamma}_2 L + \Delta p R - 4L\sigma_0) & r > R_1 \end{cases} \quad (4.2)$$

この理論から得られる流速分布は、実験結果を定性的に再現しており、観察された流れの挙動と一致している。この理論曲線の生物学的妥当性を式 4.2.4 を使用して検討する。文献 [36] によれば、

$$\Delta p = 160 \text{ Pa}, \quad L = 5 \times 10^{-3} \text{ m}, \quad R_1 = 45 \times 10^{-6} \text{ m}, \quad \gamma_1 = 1.1 \text{ s}^{-1}$$

および文献 [38] の粘性 $\eta = 1 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ と $\sigma_1 = 1.1 \text{ Pa}$ を採用すると、式 (1) の左辺は 0.65 となり、理論値の 1 と同程度の値となる。この類似性は、変形菌などの生物学的系への理論の適用可能性を支持している。

流速分布の実測データ（図 4.10 参照）に式 4.2.4 を適用すると、次のようになる。

$$R_1 = [5 \sim 20] \times 10^{-6} \text{ m}, \quad \sigma_0 = 1.2 \text{ Pa}, \quad \eta = 1.0 \text{ Pa} \cdot \text{s}, \quad \gamma_1 = 1.2 \text{ s}^{-1}$$

これにより、圧力勾配は次のようになる。

$$\frac{\Delta p}{L} = \frac{2\sigma_0}{R_1} = [4.8 \sim 1.2] \times 10^5 \text{ Pa} \cdot \text{m}^{-1}$$

したがって、圧力勾配は細い管ほど大きくなることが示される。

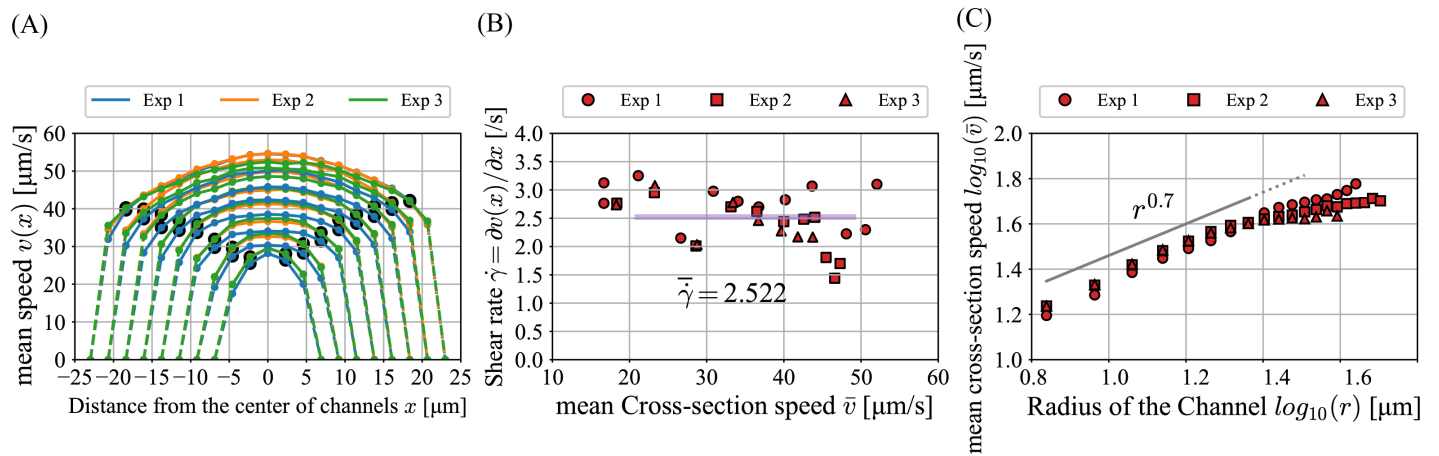


図 4.10: 流路半径別の MaxFS の平均流速分布と最大せん断速度と平均断面流速の半径依存性。(A) 各実験で得られた流路半径別の MaxFS の平均流速分布の重ね合わせ (Ex1(青)、Ex2(オレンジ)、Ex3(緑))。流路が発達した 120 min の比較的細い流路の平均流速分布である。特に管壁側へのせん断速度が一番大きい地点を黒い点で示した。比較的細い流路の流速分布はサンプルデータが多く、安定して放物線に似た形になった。細い流路同士はサンプルが異なっても結果が似通っている事が示唆された。(B) 平均断面流速に対する最大せん断速度。(A) の黒い点のせん断速度とその時の平均流速分布の平均断面流速から導出した。なお両側の最大せん断速度を平均して各流速分布に一つずつプロットした。せん断速度は殆ど横並びだった。(C) 横軸流路半径、縦軸：平均断面流速の両対数グラフ。流路における流速の半径依存性を示す。おおよそではあるが平均断面流速は半径 $r^{0.7}$ に比例していた。

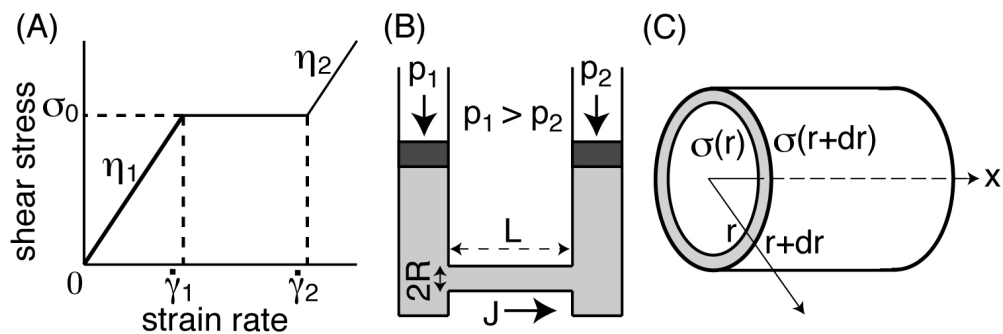


図 4.11: 硬い壁の円管内を流れる非ニュートン流体の定常流の理論的セットアップ。(A) 非ニュートン流体にて想定されるせん断応力-ひずみ速度の曲線。応力 σ はひずみ速度 $\dot{\gamma}$ [$\dot{\gamma}_1 < \dot{\gamma} < \dot{\gamma}_2$]

の範囲内では一定 (σ_0) である。この特徴はレオロジーやソフトマターの領域では応力プラトーと呼ばれる。さらに粘度 η は $[\dot{\gamma} < \dot{\gamma}_1]$ の範囲内で η_1 、 $[\dot{\gamma}_2 < \dot{\gamma}]$ の範囲内で η_2 を取る。(B) パイプ内の流れの概略図。円管 (半径 R 、長さ L) は圧力 p_1 と p_2 の 2 つのリザーバーが取り付けられ、 $p_1 > p_2$ の時、流れ J は右側へと流れる。(C) 流体の円管状の層にかかるせん断応力の外力図。

4.3 流速の実測値に基づく細胞内物質輸送・混合シミュレーション

4.3.1 細胞内物質輸送シミュレーション

ここまでで、我々は原形質ドロップの形成する流体ネットワークが時間と共に発達した事、特に細胞の中心より少し離れた中間部分にて発達した環状流路が流速の向上と流れのパターンを変化させ、結果より多くの物質の輸送が細胞全域で行われている事を見てきた。だがここまでで見てきた流量は単なる粒子追跡データの統計量に過ぎない。ネットワーク全域の粒子追跡をしていながらも、その追跡が途中で途切れたりして長期的な実際の物

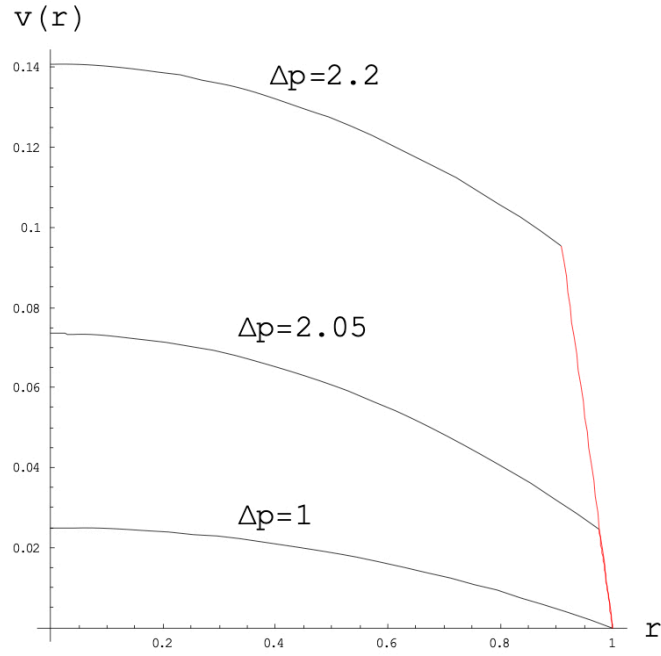


図 4.12: 理論的に予測される応力プラトーを持つシアニング流体の流速分布 (図 4.11A 参照)。 $L = 1$, $R = 1$, $\gamma_2 = 1$, $\sigma_0 = 1$, $\eta_2 = 1$, $\eta_1 = 10$. (これらのパラメータは実験結果から導出した。)

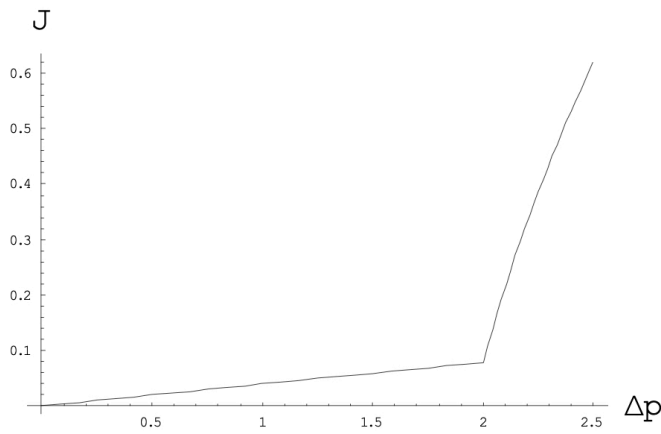


図 4.13: 理論的に予測される応力プラトーを持つシアニング流体の流量 (図 4.11A 参照)

質輸送は明らかではなかった。よってここでは瞬間的な平均流速場のデータを利用する事で仮想的に任意の流路の断面上から出発させた粒子群がどのように広がっていくのかを予測する物質輸送シミュレーションを構築した。

シミュレーションは二種類用意している。一つは一つの管断面上に並べられた 15 個の粒子群が平均流速場に従って輸送される物質輸送シミュレーションである。これは一断面上を通過する流体もといそこに含まれる物質がどれだけ早く遠くに運ばれるかの輸送能力について考察していく。もう一つは細胞を 4 つの区画に分断し、各区画内で同じ数の粒子を流路上にランダムに設置した物質混合シミュレーションである。各区画の粒子群が平均流速場に従って各区画間でどのようにして交換されていくのかの結果を通して *Physarum* ネットワークの物質混合能力について考察していく。

4.3.2 シミュレーションの手法

本シミュレーションは実験時間 30 分以降に行われた PTV による粒子追跡データを基にしており、各時間帯の撮影から 7 分経過した実験時間 37 分、67 分、97 分、127 分を時間の基準としている。特に粒子輸送シミュレーションについては時間の基準の最も直近で出発地点付近の平均流速場の平均速度が極小を取るタイミングを

シミュレーションの開始点としている。

本シミュレーションに使われる平均流速場はこれまで出てきたものよりも狭い時間 ($t \pm 5$ s)・空間 ($x \pm 8$ μm , $y \pm 8$ μm) の範囲内で検出された粒子の X 変位、Y 変位のデータをそれぞれ平均したものである。基本的に仮想粒子がある場所 (x, y) にいる時、その場所に対応する平均流速 (V_x, V_y) を変位として粒子は次のフレーム時に移動する事で輸送されていく仕組みである。この処理はフレーム毎 (0.1 s) に行われ、シミュレーション 500 秒経つまで繰り返した。その間、平均流速場は 1 秒に一回更新された。粒子が画面外に出る計算になった場合、粒子の位置は範囲内 (0~511, 0~511) の上限・下限に留まるよう修正した。

物質輸送シミュレーションにおける仮想粒子の配置方法は管の壇上に配列させる為に以下のようにして決めた。輝度値を管の半径に対応させたネットワーク skeleton 画面 (図 C) を (32 μm , 32 μm) で等区画に分断し、その範囲内で最も半径の大きい skeleton を中心として付近の平均流速場をローカルに平均した流れに直交する方向に 1px 間隔で 15 個仮想粒子を配置した。

シミュレーション中粒子がネットワークのノードを通過した時 (図 4.2C のノードの位置の流路の半径を半径とした円の領域内に入った時) に、ノードの通過数をカウントした。なお通過した時のノード周りの流れパターンが分流 (一つの流路から流れが入って二つの流れに分かれてるパターン) または合流 (二つの流路から流れが入って一つの流れに合わるパターン) のノードの時、それぞれを区別して通過分流ノード数または合流ノード数としてカウントした。

物質混合シミュレーションでは観察領域をその対角線で 4 つの区画に分割しそれぞれを個別の区画としてラベリングした (下の領域: A、左: B、上: C、右: D)。そして流路ネットワークの skeleton (図 3.5C) 上に各地域に仮想粒子を 750 個ずつランダムに配置した。シミュレーション開始後は物質輸送シミュレーション同様に各粒子とその位置に対応する平均流速ベクトルを加算させ続けて仮想粒子を分散させた。シミュレーションの間は各粒子の初期位置の他に現在位置から所属している区画を記録し続けた。

4.3.3 平均流速場の妥当性

本シミュレーションでは平均流速場という移流のみを動力としており、流速が低いときに顕著になる熱揺らぎによる粒子の拡散を無視している。シャトルストリーミングが発生している間に粒子に対する拡散が無視できる条件を以下のようにして導出した。長さ ℓ の管を考える。拡散によって粒子が管の端から端に移動する時間は $\ell^2/(2D_T)$ によって表される (ここで D_T 粒子の拡散定数であり、簡単の為にテイラー拡散は無視した)。一方で流速 v の移流による粒子の移動時間は ℓ/v である。よって必要な条件は $\ell^2/(2D_T) \gg \ell/v$ となる。これをアインシュタインストークスの式 $D_T = kT/6\pi\eta\ell a$ により

$$a \gg \frac{kT}{3\pi\eta\ell v} \quad (4.3)$$

を得る。ここで a は粒子の半径、 $k = 1.38 \times 10^{23}$ JK⁻¹ はボルツマン定数、 $T = 293$ K は温度である。この不等式が成り立つ場合、移流に対する粒子の拡散は十分に無視できる。 $\ell = d/2$ と仮定して図 4.15B より管の長さそれぞれに対応する速度を $\ell = 15$ μm と $v = 2$ $\mu\text{m/s}$, $\ell = 70$ μm と $v = 20$ $\mu\text{m/s}$ の時に 4.3 から半径 a の最大値と最小値はそれぞれ 7 nm と 0.15 nm をとる。特に後者は単一の高分子にも適応しうる値であり、本実験で観察された内部粒子は 1 μm を超えているので不等式 4.3 は満たされているものと考えられる。

4.3.4 粒子シミュレーション例

本シミュレーションの実行例を図 4.14A,B に示す。図は実験 1 の 120 分以降のデータを利用したシミュレーションの中でも代表的な例である。本例にて 15 個の仮想粒子 (図中赤■) は環状路の上側の断面上を初期位置としている。

これらの粒子はシミュレーション開始 100 秒後 (往復流動 1 周期以上) に環状路を通じて分岐の細い流路に入ったりまたは逆流によって再び環状路に引き戻されてまた別の流路に入ったりするのを反復していた。300 秒時点

では各粒子はそれぞれ個別の経路を辿っており、環状路を通じてさらに別の分岐を辿ることで単一の仮想粒子が細胞の広い範囲に分布するようになっていった。中には細胞の縁まで到達した経路も見られ、このシミュレーションによる粒子の輸送範囲は細胞の大部分に及ぶことが分かった。500 秒時点では粒子のこうしたグローバルな運搬が繰り返されさらに複雑な経路を描いていった。

図 4.14B は図 4.14A では粒子すべてを載せて見づらい為、その内の一つのみを描画したものである。この粒子は往復流動によって環状路内を前後し、時折分岐の細いネットワークに入り込んだりするのを繰り返している。実際この粒子は画面中央上から出発して始めに左上分岐に入りすぐ引き戻され、その後中央下、中央左、また中央下の別の分岐など流れの 1 ループと少しばかりの時間に対してかなり小刻みに環状路を周回しているのがわかる。その後も 500 秒経過するまで時には細い流路に入り込んでかなりゆっくり動いたりほぼとどまったりすることもあったが、こうした巡回は続いた。往復流動の 1 周期に対して粒子が何度も巡回しているように見えるが実際の所ネットワーク全体では往復流動の周期に位相のずれがあり遠隔でずれてくるのは勿論、場合によっては分岐した流路同士でも片側が止まった間ももう片側は流れ続けるなどの位相のずれが見られた。こうしたことがシミュレーションでも単一の仮想粒子が複雑な経路を進む原因となったと考えられる。Haupt らによるとこうした分岐上の位相差のずれが流体のより効果的な分配を促しカオティックな移流による混合が促進されるが、このような粒子の振る舞いは彼らの知見と同意するよう思える。

図 4.14C,D は本シミュレーションで使用した平均流速ベクトルを 8 px 間隔で描画した図であり、それぞれ環状路 (図中右側) からの分岐付近の流れが分流 (図 4.14C) か合流 (図 4.14D) になっている時の図である。環状路から分流している場合 (図 4.14C)、分岐付近の管内の流れベクトルは完全に平行ではなく分岐路への垂直成分を含むために粒子が 2 つの流路に分割された。これが結果として三又分岐での粒子は確率的に分配される原因となった。反対にこうした分流がやがて逆転したとき、流れは合流 (図 4.14D) となり流体中の粒子は一つの管に流れ込む過程で混合される。Haupt によればこうした分岐における分流とその逆流 (合流) もまた移流で構成される流体ネットワークにおいて効果的な混合を促す原因となる。

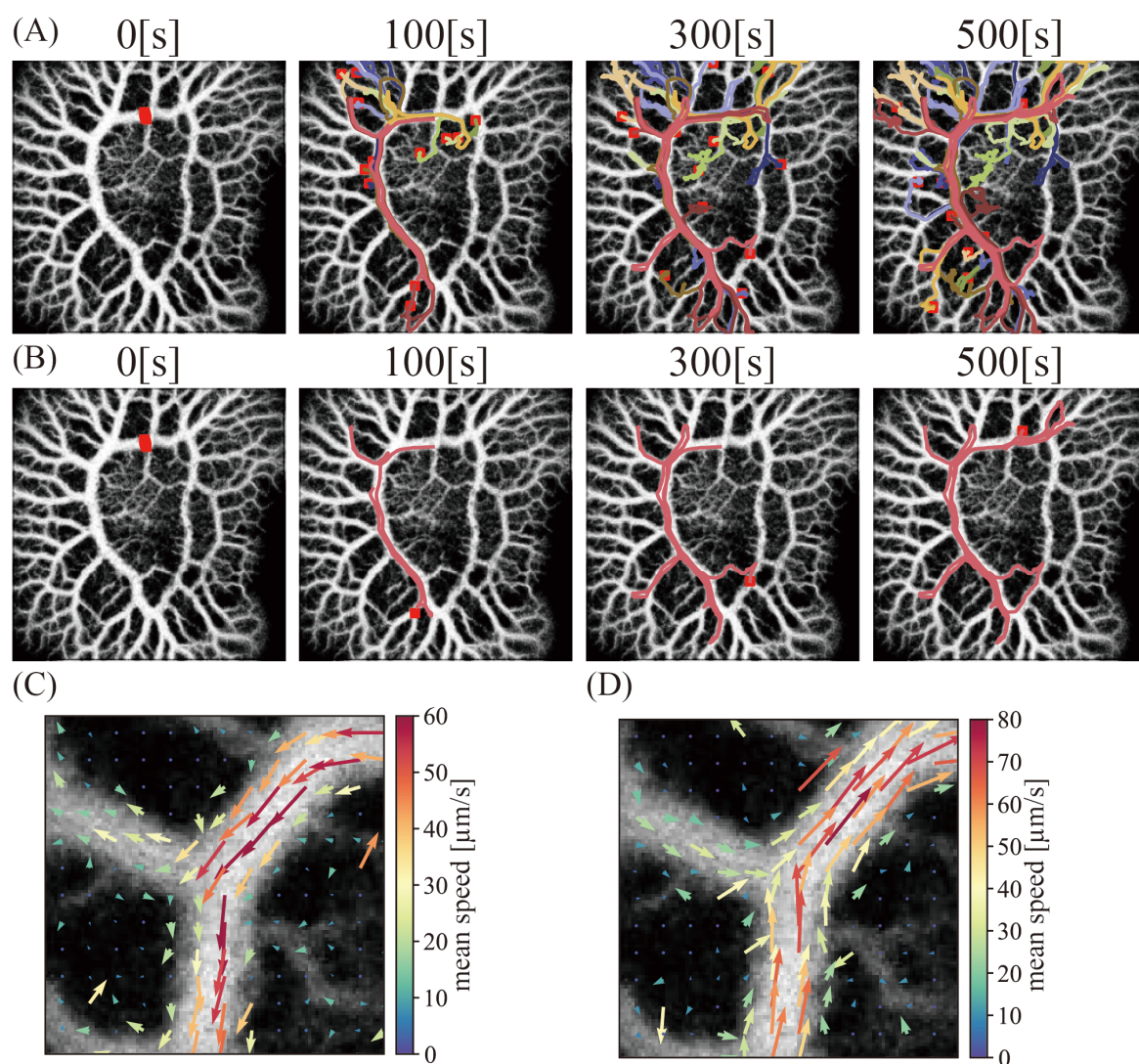


図 4.14: 仮想粒子輸送のシミュレーション実行例 (A、B) と分岐付近におけるシャトルストリーミングの分流 (C) および合流 (D) を示す平均流速 (MeanFV) ベクトル場。(A)15 個の仮想粒子 (赤い四角形) は、CAC の太い静脈の断面に沿って初期位置がわずかに異なり (1px のずれ)、設定された。各粒子の軌道は、平均流速の実験データに基づいて、0.1 秒ごとに計算され、各粒子の動きは時間 0 から異なる色の線で表される。時間が経過するにつれて、仮想粒子は体全体に散布し、時間 0 から 500 秒の間に前後に移動した。100 秒までに散布は生物の一部をカバーし、300 秒および 500 秒には全範囲に達した。単一粒子の経路 (B) が追跡され、CAC を通じた輸送と体の局所領域内での移動が示されている。[35] より引用。

4.3.5 輸送能力の定量的評価

流路ネットワークが十分に発達した時間帯 (120 分以降) において粒子はそれまでよりもずっと早く運搬されるようになった。図 4.15A は同じ時間帯の全シミュレーション中の全粒子で平均した初期位置からの平均二乗距離 MSD (図中黒実線) と通過した分流または合流型のノード数の時間変化を示す。結果、粒子はおよそ 100 秒で $180000 \mu\text{m}^2 (=424 \mu\text{m 長})$ の範囲まで分散した。これはほんの 100 秒間 (往復流動が 1 周した後) で粒子は細胞の約半分程の距離にまで広がったことを示す。また MSD は周期的に振動していたが、これは往復流動によって環状路を介して粒子は分散したり引き寄せられたりする事によるものである。振動を伴いながら MSD は大きくなっていったが、一部の粒子が細胞の大きさの制約や観測領域の端に到達してしまった事によりおよそ 200 秒程度で MSD は飽和してしまった。粒子の輸送能力としての指標となる拡散定数 D は 200 秒までの MSD が時間に対しほぼ線形に比例している部分を最小二乗法による近似線 (図 4.15A, グレー直線) の傾き α と拡散定数 D の $D = \alpha/4$ の関係式より決定した。そのようにして決定した拡散定数 D の 30 分毎の変化は図 4.15C のグレーのシンボルにまとめられている。このシンボルの形は 3 つの実験にそれぞれ対応し (○: 実験 1、□: 実験 2、△; 実験 3)、実験 1 における結果である図 4.15A の D は図 4.15C のグレーの○でプロットされている。結果として 60 分までは $D = 100 [\mu\text{m}^2/\text{s}]$ にも満たないのが環状路が発達してくる 90 分以降に著しく拡散定数を増大させていることがわかる。この $D = 100 [\mu\text{m}^2/\text{s}]$ のオーダーは Marbach らによって計算された拡散定数 D とは同程度のオーダーである為 (ネットワークのスケールに差はあるが)、この数値はある程度信頼可能な指標であると考えられる。

また図 4.15A によれば粒子は 500 秒間で平均して 25 個の分流ノードと 23 個の合流ノードを通過していた。これは二つの近隣のノードを通過するのにおよそ 10.4 秒かかった事を意味し、言い換えると往復流動の 1 周期 (本実験では約 80 秒間) の間におよそ 8 個のノードを通過していた事になる。粒子は往復流動の 1 周期に 4 つの分流ノードを通過しうる。同じ場所から発した粒子の輸送経路が多岐に渡ることは、細胞内物質が細胞の端々にまで運ばれて細胞全体で混合していく現象と密接に関わっている。

図 4.15B は各 30 分毎の全シミュレーション中の仮想粒子で平均した、仮想粒子が実際に通過した分流ノード間距離の平均値 d と分流ノード間距離をその通過時間で割って算出した流速の平均値 v の時間変化を示す。どちらも実験 1, 2 では 90 分以降、実験 3 では 120 分以降というネットワークが発達していった時間帯に著しく上昇した。いずれも環状路の発達によって大規模な輸送が可能になった事と関連する。流路の概形として図 4.2 を参照すると、60 分までの流路は判然としない部分も多いが細かい枝分かれや網目状のように見える部分も多かった。それに対し環状路が発達した流路ネットワークは節目の間隔が大きくなっていることからこの結果と符合が合う。無論、90 分以降の流路にも細い分岐はあるのだが、大部分がより太い物質が流れてしまうのは管のコンダクティビティが管径の乗数に比例することからも当然の帰結となる。

図 4.15C では前述の拡散定数 D に加えて分流ノード間距離の平均値 d とその時の流速の平均値 v から決定される $dv/4$ (白いシンボル) の時間変化も示す。どちらも時間変化もとい流路ネットワークの発達に応じて同様のスケールで成長していった。 D と $dv/4$ は理論上同質のものであるのだが、これに関する議論は Discussion にて行う。

4.3.6 仮想粒子の平面分散評価

先ほどの粒子の輸送能力は粒子がどれだけ初期位置から離れていくかの直線的な輸送に基づいた指標であった。本節では仮想粒子の分散が細胞をどれだけ平面的にカバーしていくのかを観察するために、シミュレーション中に分散した 15 個の粒子の一番外側のもの同士を結んで作る凸包多角形 (図 4.16B の青い多角形) の面積とその背景である細胞全域 (図 4.16AB の黒い領域) の面積の比率をとることで細胞に対する粒子分散領域の面積被覆率 ACR を計算した。図 4.16A,B はそれぞれ図 4.14A の 0 秒と 500 秒の時の粒子の分散に細胞全域の背景と凸包多角形を追記したものである。このように凸包多角形の算出もとい ACR はシミュレーション中常に算出し続

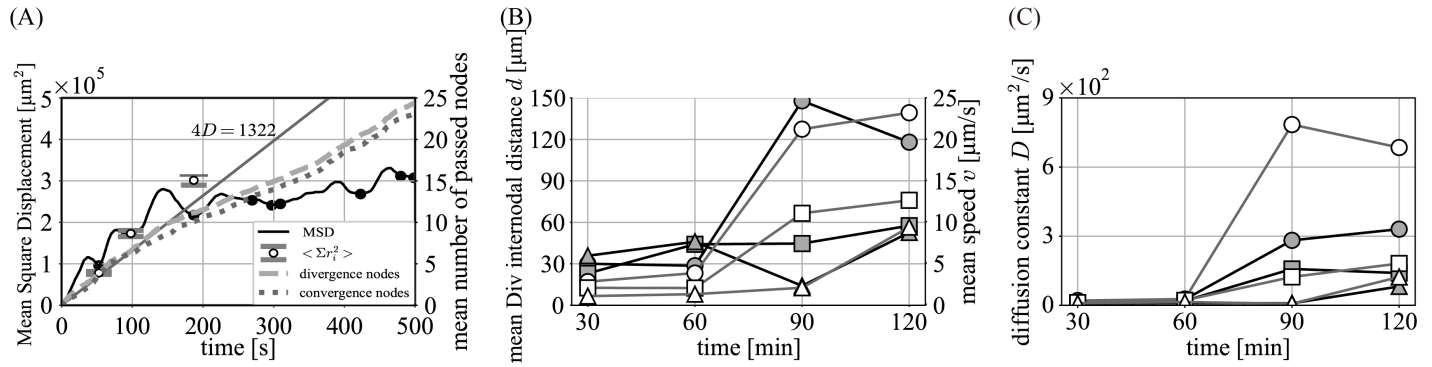


図 4.15: 異なる初期領域と拡散定数 D からシミュレーションされた仮想粒子の輸送距離。(A) 黒い実線は平均二乗変位 (MSD) の平均を表し、黒い点は MSD の局所最小値を示している。灰色の実線は、最小二乗法によって得られた最初の 3 つの黒い点と原点のフィッティング線で、方程式 $MSD = 4Dt$ で表され、ここで D は拡散定数、 t は時間である。誤差範囲付きの白い円は、平均 $\langle \sum r_i^2 \rangle$ を示し、誤差範囲は $\sqrt{\sum r_i^2}$ の標準誤差を表している。さらに、点線 (分流ノード) と破線 (合流ノード) で示されたように、粒子が通過したノードの平均数を計算して拡散を測定した。(B) 分流ノード間の平均距離 d (灰色のシンボル) と、全シミュレーションを通じた粒子の平均速度 v (白色のシンボル) の時間経過。両方の値は 90 分後にネットワークの発展と一致して有意に増加した。(C) 拡散定数 D (灰色) と $dv/4$ (白色) の時間経過。ネットワークが成熟するにつれて拡散定数 D は増加した。シンボルの形は各実験ごとに異なる: 円 (Exp1)、四角 (Exp2)、三角 (Exp3)。

けた。

図 4.16C はそうして得た ACR の時間変化である。これは同じ時間帯のシミュレーション結果で平均した ACR を時間帯別にそれぞれ実線、破線、点線などの黒の曲線でプロットしている。また各時間の ACR の標準偏差を各時間帯のプロットを挟むように上下に同じスタイルの薄いグレーの曲線としてプロットした。また図中のグレーの直線は 120 min のプロットの 200 秒までの部分に対する近似直線である (最小二乗法にて算出)。この ACR の傾きこそが粒子が平面に分散していく速度の指標になる。 ACR の時間変化は時間に対しておおよそ線形に増大していく傾向にあり、 MSD の時と同様 90 min 以降にかなりのハイペースで増大していった。これは 60 min までは 1 か所から出発した粒子はかなりローカルな範囲にとどまってしまう傾向とその後環状路の発達で粒子をどれだけ細胞内の離れた場所に届くようになったかを示唆している。図 4.16C の数値によると、およそ 200 秒程で粒子は細胞の約半分の領域にまで分布した。その後は MSD の時と同様に粒子の分散領域が飽和していき、増加ペースを落としていった。それでも時間とともに増大はし続け、500 秒立つ頃には細胞全域のおよそ 7 割までをカバーしていた。

図 4.16D は近似線の傾きから決定した ACR の傾きの 30 分刻みの時間変化をすべての実験に対して同様に行った結果である。ここの数値の意味としては例えば 1.0×10^{-3} [1/s] は 100 秒立つと粒子の分散領域が全体の 1 割をカバーする計算になる。いずれの実験でもネットワークの発達が平面分散を促進した。

4.3.7 異なる 4 区画から出発した仮想粒子の混合に関するシミュレーション

図 4.17A は仮想粒子が混合していくシミュレーションのタイムラプスである。時間経過とともに各区画の仮想粒子は互いの区画に混ざり合っていた。500 秒経つ頃にはどの区画の仮想粒子も細胞のほぼ全域に分散し、違った出身の粒子たちが混合していた。図 4.17B-E は各区画 (A-D) に存在する粒子の初期に属していた区画の内訳の時間変化を示す。下の区画 (4.17B) は赤い粒子はシャトルストリーミングにより振動しながらその数を減らし、その振動に同調して他の区画の粒子 (色と区画が対応している) が流入してきた。500 秒には下の区画には各区画から約 200 ずつの粒子が参入しており、ほとんど均一な割合の混合になっていた。各区画には周期的に初期粒子数 (750 個) を超え粒子が集積したその半数近くが流出していくのが観察された。局所的に蓄積された物質は環状路が発達した下、左、上の区画で周期的に交換されつづけ、そのたびにこの三区画は均一な比率に近づい

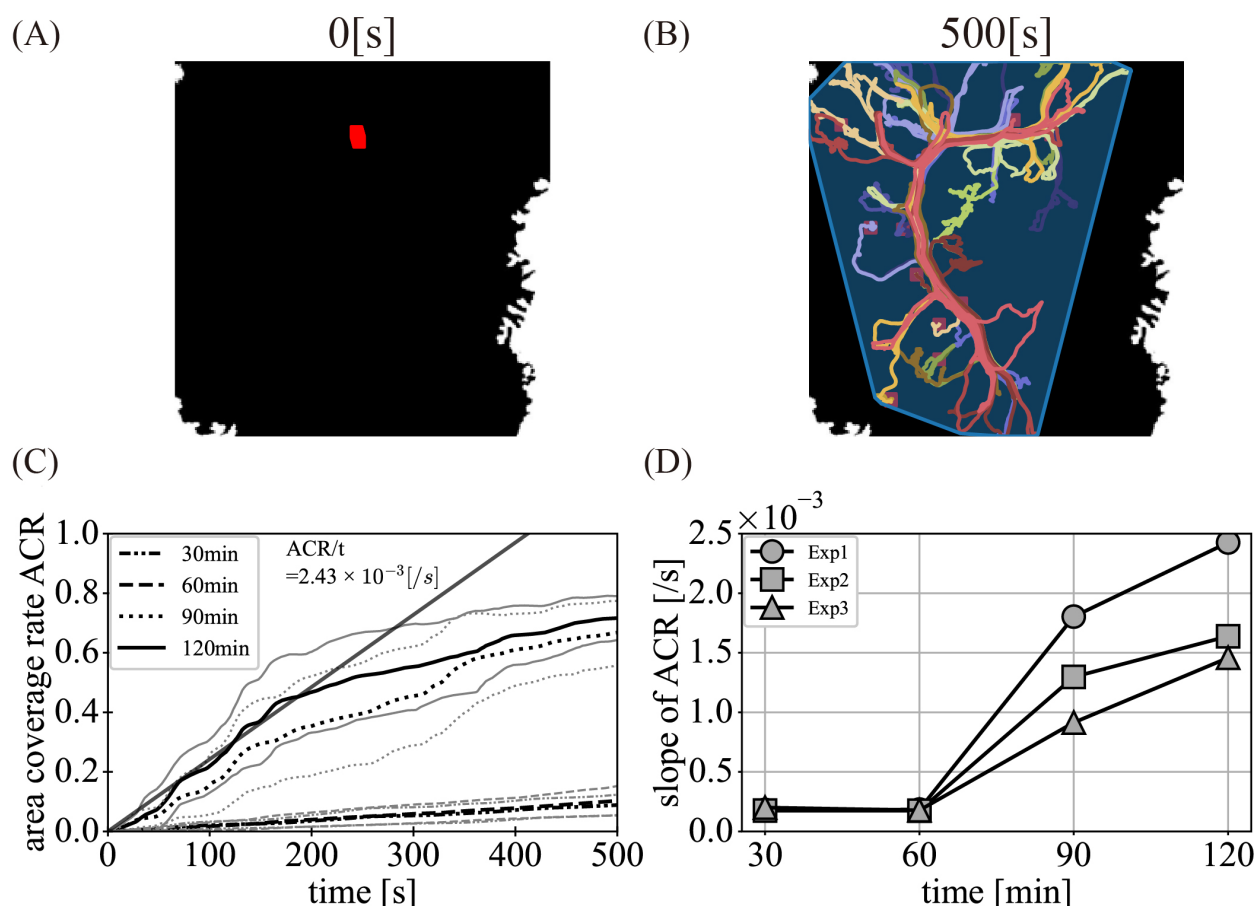


図 4.16: 仮想粒子の平面分散。(A) と (B) は、平面分散のシミュレーションの一例を示しており、(A) は $t=0$ [s]、(B) は $t=500$ [s] における様子を表している。仮想粒子（赤い四角形）とその軌跡は、図 4.14C と同じものを使用している。暗い背景は細胞全体の領域を示しており、分散領域は最外縁の粒子を結んだ凸包（青い多角形）として定義される。(C) では、分散した粒子の細胞全体に対する面積被覆率（ACR）の時間変化（平均値 $\pm$ 標準偏差）を、4 つの異なる 30 分間の期間（Ex1 の場合）にわたって示している。4 種類の異なる黒い破線は ACR の平均値を示しており、それぞれのプロットは同じパターンの 2 本の灰色の線の間配置されており、ACR の標準偏差の範囲を意味している。プロット上の灰色の線は、120 分間の ACR を 200 秒ごとにフィッティングした線である。(D) では、3 つの実験における各 30 分間の期間ごとの ACR の傾きの時間変化を示している。これは、粒子が細胞全体にどれだけ速く混ざったかを示している。全ての実験において、平均速度や拡散定数が増加した（図 4.15B および C）にも関わらず、ACR の傾きは同じ期間で増加していることが確認された。[35] より引用。

て行った。

この結果に対して右の区画のみ他の区画から大量に入り込むことなく、粒子の比率も大きくは変わらないという結果だった。この区画はたいして全体の粒子数の振動も大きくなく、他の区画からの流入も少なかったという事になる。さらに全体の粒子数の傾向としては初期の粒子数 (750 個) からゆっくり減り続けていた。このような結果はこの区画が他と違って環状路が太く発達していない事と関連していると考えられるが、その他にもこの区画の流路は衰退の傾向にあるのを表しているのかもしれない。興味深いのはスローペースであれど他区画との物質は続いているという事である。

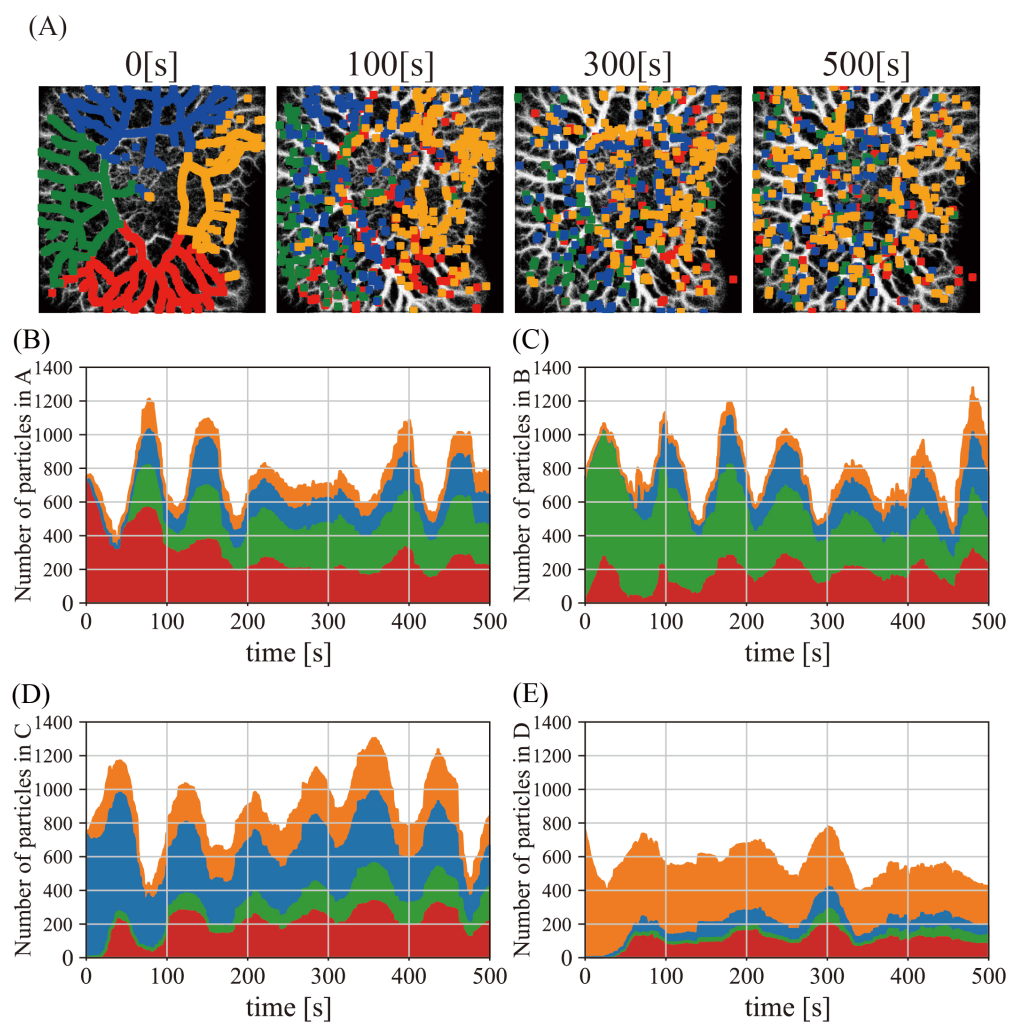


図 4.17: 変形体内における粒子のミキシング。(A) は、分布した粒子のスナップショットを示しており、粒子の色はそれぞれの初期区画を表している。この 4 つの区画は、画像の四角い枠に対して 2 本の対角線で分割されている。750 個の粒子の初期位置はランダムに静脈ネットワーク上に配置されている。数字は初期状態から経過した時間 (秒) を示している。シミュレーションは、図 4.14 と同様の方法で実施された。(B)~(E) は、それぞれの区画 A、B、C、D に流入する粒子数の時間経過を示している。グラフの色は、粒子がどの区画から来たかを表しており、左、上、右、下の区画に対応して、それぞれ緑、青、オレンジ、赤で示されている。[35] より引用。

第 5 章

考察と結論

5.1 単純なモデルによる拡散定数に関する論理的考証

本論文における物質輸送シミュレーションは分流ノードの存在によって移流が支配的な系でも拡散的な振る舞いは認められた。ここでシミュレーションの任意の粒子の経路を途中通過した N 個の分流ノードを節目に分割し、始点 ($i=1$) から終点 ($i=N+1$) までの移動経路のセグメントを考える。ここで i 番目の分流ノードから $i+1$ 番目の分流ノードまでを直線で結ぶベクトル $\vec{r}_i$ と定義し、始点から終点までを結ぶベクトル $\vec{R}$ は以下の様になる。

$$\vec{R} = \sum_{i=1}^N \vec{r}_i. \quad (5.1)$$

これより、平均二乗距離 MSD は以下の様に決定される。

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = \sum_{i=1}^N \langle \vec{r}_i^2 \rangle + \sum_{i \neq j}^N \langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \rangle, \quad (5.2)$$

ここで $\langle \dots \rangle$ はすべての粒子の間に平均をとったことを意味する。ここで重要な二つの仮定を立てる。①式 5.2 の第二項が第一項に対して十分無視できる。これは後述にて解説する。②式 5.2 の第一項が Nd^2 で近似できる事 (ここで d は平均の分流ノード間距離)。これらの仮定の下、平均流速 v を用いれば、第一項は dvt の様に書き直せる。これは次元解析からすぐに導き出すことができ、2 次元の系の場合、この結果から次のような拡散定数 D が得られる

$$D = \frac{dv}{4} \quad (5.3)$$

今回上記の二つの仮定が有効であることは Result から確認された。①式 5.2 の第二項が無視できる：図 4.15A では第一項が MSD とおおよそ等しく、翻って第二項は十分無視できるのがわかる。これは往復流動と $\vec{r}_i$ のランダム性が結びついた事によるものと考えられる。実のところ、同じ断面上から出発した粒子に限定した場合には第二項の絶対値が無視できないくらい大きくなることもあった。しかしすべての出発地点の全粒子の軌道で平均をとった場合、第二項は十分小さくなった。② $D = dv/4$ が成り立つ：図 4.15B から平均分流ノード間距離 d と平均流速 v は決められた。その結果図 4.15C にあるように MSD から測定した拡散定数 D と $D = dv/4$ の方程式から得た拡散定数 D は同意できるものであった。

5.2 流路ネットワークにおいて環状路を介して管の細い周辺部同士で物質輸送する際に考えるメカニズム

本稿の結果は分厚い流路がグローバルな物質輸送を可能にしている一方で、細胞の先端部にある細い管が中央環状路へと原形質を押し出す役割があることを示唆している。これは、偏光顕微鏡観察により、伸長する前方の

薄い管の周りにフィラメント状アクチンの束が存在することによって裏付けられる。これらのフィラメントは原形質ゾルが前方から後方の太い管に流れ出す時に出現し、逆流した時に消滅する。広がり続ける先端部でフィラメントが出現と消滅を繰り返す周期的なサイクルが繰り返される間、後方の太い管に沿った複屈折信号は一定に保たれ、太い管が時間をかけて安定した張力を維持していることが示されている。

細い管はより分厚い中央環状路へ物質を流し込み、離れた所の弛緩状態にある細い管へと輸送するのに重要な役割を果たしているように思える。すなわち、中央環状路内の流体圧力によって遠隔の細い管同士が相互作用している可能性がある。物質が細い管から中央環状路へと流れ込むとき、環状路は拡大し(厚くなる)、物質の通路としてだけでなく、一時的な貯蔵場所として機能している。さらに中央環状路は物質だけでなく運動エネルギーも蓄える。流れ込む原形質の運動エネルギーは管の拡張時に弾性エネルギーに変換され、その後、再び運動エネルギーに変換されて分厚い管を通じて原形質が押し流される。

このメカニズムにより、細胞全体の物質輸送と循環両方が可能になる。このメカニズムは、哺乳類の循環システムにおける血流動態、いわゆるウィンドケッセル理論(Windkessel Theory)に類似している【24, 25】。この理論では、心臓のリズミカルなポンプ動作が大動脈や大きな動脈の弾性変形によって緩和され、ポンプの機械エネルギーが滑らかな血流に効率的に変換される。近年、Ottmeier や Döbreiner による研究が、*Physarum* の原形質体においてもこのウィンドケッセルモデルが適用可能であることを指摘している【26】。今後、原形質体内でのグローバルな輸送および混合のメカニズムを解明するために、ウィンドケッセル理論のさらなる探究が必要とされている。

5.3 変形菌モジホコリ *Physarum polycephalum* における原形質流動のシアシニング性

本稿では変形体の原形質がシアシニング性を示したことから非ニュートン流体として取り扱ってきた。神谷先生によると変形体の原形質は管中の流速分布から構造粘性を示す [2, 36]。それはハーゲンポワズイユ流の様な単純な放物線状のものではなく、頭のつぶれた放物線であった。この時管の径は $40\text{ }\mu\text{m}$ 、流速は $40\text{ }\mu\text{m/s}$ であった。しかし一方でドップラー光コヒーレントトモグラフィ技術による観察結果では管が著しく太く(内径 $400\text{ }\mu\text{m}$) 且つ流速も $3000\text{ }\mu\text{m/s}$ にまで及ぶ場合は流速分布は放物線だったという報告もあった [39]。

シアシニング性もといシアバンディングに関連する現象はワーム状ミセルや F-アクチン溶液といった様々な高分子溶液で見られる [37, 40, 41, 42, 43]。シアシニング特性のように、これらの溶液で起こる流れは変形の弱いせん断速度下ではある程度の粘性を示し、ある一定のせん断速度からは流体は降伏して粘度が下がる。また、それらは応力プラトーという性質を示し、ある程度の範囲のせん断速度に対してせん断応力がせん断速度に依らず一定になる [40, 41, 42]。応力プラトー特性によって、流体はシアバンディングを示し、溶液が粘度が高い又は低い二層またはバンド状の領域に分かれ、二層のバンドの厚みの比率はどれだけ変化するせん断速度に対してせん断応力が一定なのかによって変わる(これをレバールールという)[37, 43]。

モジホコリの変形体には脂質小胞やアクチンタンパク分子も豊富に存在する為、このシアシニング性が起こる可能性がある。このシアシニング及びシアバンディング特性は均一な原形質ドロップからの流動チャネルの発達に関わっているかもしれない。

5.4 流路ネットワークの形成機構

流れに起因するチャネル形成は管ネットワークの自己組織化のメカニズムたりえる。上記に議論してきたようにシアシニングとシアバンディング特性はこの形成機構に対して重要な役割を果たしているかもしれない。[44] によるネットワーク形成機構の単純なモデルは以下になる。原形質はゾルゲル変換を行う事が知られているが、チャネルの形成もまたゲル様の多孔質メディア内を陥入する事でできるものと見なせる。この時、多孔質ゲルの局所的に壊れる速度がゾルの流速と共に増えるのは合理的である [45]。流れによるチャネル形成は流体力

学的な観点からも説明できる [44]。

本稿では観察された流路の管壁付近のせん断速度がサンプルやその太さ、速度に依らず一定であった事を見出した。この事実は流動している原形質も管壁の界面ではせん断応力が一定であることを意味する。この様なせん断速度やせん断応力はチャンネルの厚みの自己調節や異なる流路のの階層的な組織化に重要な役割を果たす可能性がある。

5.5 本研究のまとめと今後の展望

本研究は流路ネットワークの形成機構における明確な解を与えられたわけではなかったが、いくつか重要な可能性を示した。原形質室ドロップ内の流れパターンは細胞の変形とともに進められ、始めは局所的な範囲を移動するだけであったが次第に細胞全体を高速に輸送されるに至った。管発達後は CAC が輸送の主要路であったが、その CAC における輸送は周辺の分岐から一斉に流入してくることによって物質とエネルギーが CAC に集中することが示唆された。変形菌自身のシアシニング性も認められたのもあり、特定の流路の発達にはこうした力学的な要件が満たされる必要が在ると考えられる。

また特定の流路の発達のみならず、流れパターンの遷移に関しても不意に流動のタイミングが重なるもしくはズレる事で局所的に力のバランスが崩れて原形質への陥入や流路の拡大が起きる可能性がある。またタイミングによっては隣り合った流路の流体同士が同じ向きに流れたり、もしくは壁の様に機能して流れを阻む事もあり得る。その時先端のゲル層も特定の方向へ押し進められ、流路の拡大や延長を促し、それがまた流れのタイミングのずれに繋がり、結果パターン変化へとフィードバックされているシナリオが想像できる。今後は観察条件の改良は勿論、観察された流動とその力学との結び付けが大きな課題になる。またそのような力の動力源として原形質の収縮リズムとの対応も必須であると考えられる。現状の手法では細胞の透過光強度の振動と細胞形状の変化などが考えられるが、変形と流動の駆動力との対応は未だ解決できていない。今後への重要な課題である。

また本研究では流速分布の測定をキモグラフによるマニュアルな測定と PTV によるオートマチックな測定の二つの手法で行ったが、結果として流速分布は放物線もしくは頭をつぶれた放物線であり、曖昧な結果になった。その理由として考えられるのはまず流路が過去の研究では多くの場合変形体の一本鎖に対して測定したものが多かったのに対し、本実験のネットワークは曲がった流路が多く更に流路のすぐ脇に分岐が出ている事が多かった(図 4.1e または図 3.5d 参照)。これによって近隣に分岐からの流入または分岐への流出による影響は十分あり得るだろう。実際図 4.7A,B を参照するに流速分布が非定常であることが良くわかる。特に図 4.7B では流れ始めもしくは終わりの時の流速分布同士はほとんど鏡合わせのようだったが、速度が最大の時に左右どちらかに偏っている。更にこの時、逆転の前後で最大速度に差が出る事もあった。このような流体の非定常性が管の変形や輸送にどうかかわっていくのかは今後の課題の一つである。

流速分布に関連して管壁付近において一定の高いせん断速度を記録した事により変形菌の原形質にシアシニング性が認められたが一定のせん断速度がどのように管に影響を与えるのかはわからない。また PTV の速度マップによる流速測定は必ずしも管壁で速度 0 を記録したわけではなかった。そのようなキモグラフと速度マップによる測定結果のずれには十分注意しなければならない。今後の展開としては二つあり、一つはこのような結果の再現性もとい原形質のサンプルのコントロールが挙げられる。先行研究では通常のサイズの変形体の管を使っている事が殆どなので、本研究のサンプルはよりスケールが小さい分最大流速も小さかった。その場合、このような結果に必要なのはスケールの変化に応じた流速分布の変化と管壁付近のせん断速度が変わるのかどうか検証していく必要が在る。そして二つ目は流速分布測定の改良である。特に検討していきたいのはキモグラフによる自動測定である。PTV のデータによる測定は、まず検出される粒子は形状が不明であり、測定速度はどこまで及ぶのか決定できない。そのため、速度は検出位置の座標にしか残せず、管断面上には測定データの欠落が起り得る。その点キモグラフの方が流速の決定方法として信頼性が高く、キモグラフ内の速度測定の自動化が実現できれば PTV に十分取って代わる測定方法たり得る。

最後に粒子運搬シミュレーションの今後の可能性である。本稿では主にネットワークの輸送能力測定をした事とネットワークの構造によって移流が主体の系でも物質は拡散の効果と同様に分配されていく事が示された。し

かしこのシミュレーションが持つポテンシャルはそれだけにとどまらず、流路ネットワークに何かしらの刺激や情報を与えてどのように情報処理するのかへのアプローチが期待できる。例えば、特定の形状の閉鎖空間に閉じ込めたり、餌や忌避剤へと接触させたり、一部を強い光を当てる等が挙げられる。特に閉鎖空間に閉じ込めて一か所から脱出させる場合、出口へ向かって流路ネットワークは樹状になり、閉鎖空間の壁側の原形質を均等に効率よく吸い上げられるような形状になることが知られている [12]。このネットワーク形成もとい変形は細胞内部でネットワーク最適化の為の流動の振る舞いつまりある種の情報処理が行われていると解釈できる。そのように意図的に意味や情報を与える事で変形菌の輸送の解釈性を高める事は本研究にとって大きな展望となる。

参考文献

- [1] Kamiya, N. The control of protoplasmic streaming. *Science*, **92**(2394), 462–463 (1940). American Association for the Advancement of Science.
- [2] Kamiya, N. The rate of the protoplasmic flow in the Myxomycete plasmodium. I. *Cytologia* **15**, 183–193 (1950). <https://doi.org/10.1508/cytologia.15.183>
- [3] Naib-Majani, W., Stockem, W., Wohlfarth-Bottermann, K. E., Osborn, M., Weber, K. Immunocytochemistry of the acellular slime mold *Physarum polycephalum*. II. Spatial organization of cytoplasmic actin. *European Journal of Cell Biology* **28**, 103–114 (1982).
- [4] Nakagaki, Toshiyuki, Yamada, Hiroyasu, and Tóth, Ágota. ”**Maze-solving by an amoeboid organism**.” *Nature*, vol. 407, no. 6803, 2000, pp. 470–470. Nature Publishing Group UK London.
- [5] Nakagaki, T., Yamada, H., Agota, T. Path finding by tube morphogenesis in an amoeboid organism. *Biophysical Chemistry* **92**, 47–52 (2001). [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(01\)00179-X](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(01)00179-X)
- [6] Nakagaki, T., Kobayashi, R., Nishiura, Y., Ueda, T. Obtaining multiple separate food sources: behavioural intelligence in the *Physarum* plasmodium. *Proceedings of the Royal Society B* **271** (2004). <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2856>
- [7] Nakagaki, T., Yamada, H., Hara, M. Smart network solutions in an amoeboid organism. *Biophysical Chemistry* **107**, 1–5 (2004). [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(03\)00189-3](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(03)00189-3)
- [8] Haupt, M., Hauser, M. Effective mixing due to oscillatory laminar flow in tubular networks of plasmodial moulds. *New Journal of Physics* **22**, 053007 (2020). <https://doi.org/10.1088/1367-2630/ab7edf>
- [9] Marbach, S., Alim, K., Andrew, N., Pringle, A., Brenner, M. P. Pruning to increase Taylor dispersion in *Physarum polycephalum* networks. *Physical Review Letters* **117**, 178103 (2016). <https://doi.org/10.1103/physrevlett.117.178103>
- [10] Wohlfarth-Bottermann, K. E. Weitreichende fibrillare protoplasmadifferenzierungen und ihre bedeutung für die protoplasmaströmung. II. Lichtmikroskopische darstellung. *Protoplasma*, **57**, 747–761 (1963).
- [11] Wohlfarth-Bottermann, K. E. Cell structures and their significance for ameboid movement. In Bourne, G. H., & Danielli, J. F. (Eds.), *International Review of Cytology*, **16**, 61–131 (1964). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60294-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60294-6)
- [12] Akita, D., Kunita, I., Fricker, M. D., Kuroda, S., Sato, K., Nakagaki, T. Experimental models for Murray’ s law. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **50**, 024001 (2017). <https://doi.org/10.1088/1361-6463/50/2/024001>
- [13] Alim, K., Amselema, G., Peaudecerfa, F., Brenner, M. P., Pringle, A. Random network peristalsis in *Physarum polycephalum* organizes fluid flows across an individual. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 13306–13311 (2013). <https://doi.org/10.1073/pnas.1305049110>
- [14] Alim, K. Fluid flows shaping organism morphology. *Philosophical Transactions B* **373**, 20170112 (2017). <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0112>
- [15] Fleig, P., Kramar, M., Wilczek, M., Alim, K. Emergence of behaviour in a self-organized living matter

- network. *eLife* **11**, e62863 (2022). <https://doi.org/10.7554/eLife.62863>
- [16] Baumgarten, W., Hauser, M. J. Functional organization of the vascular network of *Physarum polycephalum*. *Physical Biology* **10**, 026003 (2013). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/10/2/026003>
 - [17] Fessel, A., Oettmeier, C., Bernitt, E., Gauthier, N. C., Dobereiner, H.-G. *Physarum polycephalum* percolation as a paradigm for topological phase transitions in transportation networks. *Physical Review Letters* **109**, 78103 (2012). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.109.078103>
 - [18] Tekle, Y. I., Wang, F., Wood, F. C., Anderson, O. R., Smirnov, A. New insights on the evolutionary relationships between the major lineages of Amoebozoa. *Scientific Reports* **12**, 11173 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15372-7>
 - [19] 川上 新一. *Graphic voyage 変形菌*. 株式会社技術評論社, 2017.
 - [20] Dietrich, K. Plasmodial Structure and Motility in *Physarum polycephalum*. In Buetow, D. E., et al. (Eds.), *Cell Biology of Physarum and Didymium*, pp. 145–208, Academic Press (1982).
 - [21] Stockem, W., & Brix, K. Analysis of microfilament organization and contractile activities in *Physarum*. In Jeon, K. W., & Jarvik, J. (Eds.), *International Review of Cytology*, **149**, 145–215 (1994). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62088-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62088-4)
 - [22] Mohberg, J. Ploidy throughout the life cycle in *Physarum polycephalum*. In Buetow, D. E., et al. (Eds.), *Cell Biology of Physarum and Didymium*, pp. 253–272, Academic Press (1982).
 - [23] Aldrich, H. C., Daniel, J. W. Cell biology of *Physarum* and *Didymium*. Academic Press, New York (1982).
 - [24] Nakajima, H. Some properties of a contractile protein in a myxomycete plasmodium. *Protoplasma*, **52**, 413–436 (1960). <https://doi.org/10.1007/BF02665258>
 - [25] Wohlfarth-Bottermann, K. E. Differentiations of the ground cytoplasm and their significance for the generation of the motive force of ameboid movement. In Allen, R. D., & Kamiya, N. (Eds.), *Primitive Motile Systems in Cell Biology (Second Edition)*, pp. 79–109, Academic Press (1964). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395681-1.50013-8>
 - [26] Isenberg, G., & Wohlfarth-Bottermann, K. E. Transformation of cytoplasmic actin. *Cell Tissue Research*, **173**, 495–528 (1976).
 - [27] Wohlfarth-Bottermann, K. E., & Gotz von Olenhusen, K. Oscillating contractions in protoplasmic strands of *Physarum*: Effects of external Ca^{++} -depletion and Ca^{++} -antagonistic drugs on intrinsic contraction automaticity. *Cell Biology International Reports*, **1**, 239–247 (1977).
 - [28] Takagi, S., & Ueda, T. Emergence and transitions of dynamic patterns of thickness oscillation of the plasmodium of the true slime mold *Physarum polycephalum*. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, **237**(3), 420–427 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.physd.2007.09.012>
 - [29] Kamiya, N., Allen, R. D., Yoshimoto, Y. Dynamic organization of *Physarum* plasmodium. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **10**, 107–116 (1988). <https://doi.org/10.1002/cm.970100115>
 - [30] Nakamura, A., & Kohama, K. Calcium regulation of the actin-myosin interaction of *Physarum polycephalum*. *International Review of Cytology*, **191**, 53–98 (1999). [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)60157-6](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60157-6)
 - [31] Nachmias, V. T. Properties of *Physarum* myosin purified by a potassium iodide procedure. *Journal of Cell Biology*, **62**(1), 54–65 (1974). <https://doi.org/10.1083/jcb.62.1.54>
 - [32] Nagai, R., Yoshimoto, Y., and Kamiya, N. (1978). Cyclic production of tension force in the plasmodial strand of *Physarum polycephalum* and its relation to microfilament morphology. *Journal of Cell Science*, **33**(1), 205–225. The Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jcs.33.1.205>
 - [33] Yoshimoto, Y., Kamiya, N. Studies on contraction rhythm of the plasmodium strand IV. Site of active

- oscillation in an advancing plasmodium. *Protoplasma* **95**, 123–133 (1978). <https://doi.org/10.1007/BF01279700>
- [34] Halvorsrud, R., Wagner, G. Growth patterns of the slime mold *Physarum* on a nonuniform substrate. *Physical Review E* **57**, 941 (1998). <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.57.941>
 - [35] Yo Sato, Charles Fosseprez, Yukinori Nishigami, Katsuhiko Sato, Hiroshi Orihara, and Toshiyuki Nakagaki. Measurement of protoplasmic streaming over the entire body of *Physarum* plasmodium, and estimation of the transport and mixing of protoplasma through the intricate vein network. *Biophysics and Physicobiology*, 22(1):e220002, 2025. Available from: <https://doi.org/10.2142/biophysico.bppb-v22.0002>.
 - [36] Kamiya, N., Kuroda, K. Studies on the velocity distribution of the protoplasmic streaming in the Myxomycete plasmodium. *Protoplasma* **49**, 1–4 (1958). <https://doi.org/10.1007/BF01248113>
 - [37] Sato, K., Kunita, I., Takikawa, Y., Takeuchi, D., Tanaka, Y., Nakagaki, T., Orihara, H. Direct observation of orientation distributions of actin filaments in a solution undergoing shear banding. *Soft Matter* **13**, 2708–2716 (2017). <https://doi.org/10.1039/C6SM02832B>
 - [38] Sato, M., Terence, Z. W., Robert, D. A. Rheological properties of living cytoplasm: endoplasm of *Physarum* plasmodium. *The Journal of Cell Biology* **97**, 1089–1097 (1983). <https://doi.org/10.1083/jcb.97.4.1089>
 - [39] Bykov, A. V., Priezzhev, A. V., Lauri, J., Myllylä, R. Doppler OCT imaging of cytoplasm shuttle flow in *Physarum polycephalum*. *Journal of Biophotonics* **2**, 540–547 (2009). <https://doi.org/10.1002/jbio.200910057>
 - [40] Maruyama, K., Kaibara, M., Fukada, E. R. Rheology of F-actin. I. Network of F-actin in solution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **371**, 20–29 (1974). [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(74\)90150-0](https://doi.org/10.1016/0005-2795(74)90150-0)
 - [41] Buxbaum, R. E., Dennerll, T., Weiss, S., Heidemann, S. R. F-actin and microtubule suspensions as indeterminate fluids. *Science* **235**, 1511–1514 (1987). <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2881354>
 - [42] Janmey, P. A., Hvidt, S., Peetermans, J., Lamb, J., Ferry, J. D., Stossel, T. P. Viscoelasticity of F-actin and F-actin/gelsolin complexes. *Biochemistry* **27**, 8218–8227 (1988). <https://doi.org/10.1021/bi00421a035>
 - [43] Kunita, I., Sato, K., Tanaka, Y., Takikawa, Y., Orihara, H., Nakagaki, T. Shear banding in an F-actin solution. *Physical Review Letters* **109**, 248303 (2012). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.109.248303>
 - [44] Guy, R. D., Nakagaki, T., Grady, B. W. Flow-induced channel formation in the cytoplasm of motile cells. *Physical Review E* **84**, 016310 (2011). <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.84.016310>
 - [45] Matsumoto, K., Takagi, S., Nakagaki, T. Locomotive mechanism of *Physarum* plasmodia based on spatiotemporal analysis of protoplasmic streaming. *Biophysical Journal* **94**, 2492–2504 (2008). <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.113050>

付録 A

圧力差によって駆動される硬い円筒形パイプ内の定常流の流速分布の導出

図 4.13 に示すように、せん断薄化流体の流れの流速分布を導出する。

流れがパイプの縦軸（x 軸）に沿って均質であると仮定します。最初に、パイプ内の円筒形状の薄い流体セグメントについて力の均衡を考える。このセグメントは r と $r + dr$ の間に挟まれている：

$$2\pi r(p_1 - p_2)dr + \{2\pi(r + dr)\sigma(r + dr) - 2\pi r\sigma(r)\}L = 0,$$

ここで、 r はパイプの円形断面の中心からの距離（x 軸に垂直）、 $\sigma(r)$ はせん断応力、 L はパイプの長さ、 p_1 と p_2 はパイプの両端の圧力である。

式 (3) で $dr \rightarrow 0$ を適用すると、次の式が得られる：

$$\frac{d}{dr}(r\sigma) = -\frac{r\Delta p}{L},$$

ここで $\Delta p = (p_1 - p_2)$ である。式 (4) を解くと、次のようになる：

$$\sigma = -\frac{\Delta p}{2L}r + a\frac{1}{r},$$

ここで、 a は後で決定される積分定数である。

次に、せん断応力に対する以下の構成則を仮定する：

$$\sigma = \eta \frac{\partial v(r)}{\partial r} + b,$$

ここで： η は粘度、 b は定数、 $v(r)$ は流体の流れの速度である。

式 (6) を式 (5) に代入し、 r に関して積分すると、次のようになる：

$$v(r) = \frac{1}{\eta} \left(-\frac{\Delta p}{4L}r^2 + a \log r - br \right) + c, \quad (7)$$

ここで、 c は定数である。

次に、流れの速度 v とせん断応力 σ に対して次の境界条件を適用する：1. 壁でのスリップなし条件：

$$v(R) = 0, \quad (8)$$

ここで R はパイプの半径である。2. 図に示すせん断速度とせん断応力の仮定された構成則：

$$\sigma = \eta_1 \frac{\partial v}{\partial r} - \sigma_0 \quad \text{for } \sigma < \sigma_0,$$

そして

$$\sigma = \eta_2 \frac{\partial v}{\partial r} + (\eta_2 \gamma_2 - \sigma_0) \quad \text{for } \sigma > -\sigma_0,$$

ここで γ_1 と γ_2 はせん断速度である。3. $r = R_1$ での流れ速度とせん断速度の連続条件：

$$\sigma(R_1) = -\sigma_0, \quad v(R_1, -0) = v(R_1, +0),$$

そして

$$\left. \frac{\partial v}{\partial r} \right|_{r=R_1, -0} = -\gamma_1, \quad \left. \frac{\partial v}{\partial r} \right|_{r=R_1, +0} = -\gamma_2.$$

また、速度 v は $r = 0$ で有限である必要がある。

これにより、 R_1 を決定することができる。領域 $0 < r < R_1$ では、式 (9) および式 (7) から、流れの流速分布は次のように表される：

$$v(r) = \frac{1}{\eta_1} \left(-\frac{\Delta p}{4L} r^2 + c_1 \right), \quad (10)$$

ここで、 c_1 は後で決定される定数である。これを式 (11) に代入すると、次の式が得られる：

$$R_1 = \frac{2L\sigma_0}{\Delta p}. \quad (11)$$

領域 $r > R_1$ では、式 (9) および式 (7) から、流速分布は次のように表される：

$$v(r) = \frac{1}{\eta_2} \left(-\frac{\Delta p}{4L} r^2 + a_2 \log r - b_2 r + c_2 \right), \quad (12)$$

ここで、 a_2 、 b_2 、および c_2 は後で決定される定数である。

条件 (8)、(10)、および (12) から、定数 c_1 、 c_2 、および a_2 は次のように与えられ：

$$c_1 = \frac{1}{4\eta_1\eta_2L\Delta p} [4\eta_2L^2\sigma_0^2 + \eta_1(\Delta pR - 2L\sigma_0)], \quad (13)$$

$$a_2 = 0, \quad b_2 = 1,$$

$$c_2 = \frac{1}{4\eta_2LR(4\eta_2\gamma_2L + \Delta pR - 4L\sigma_0)} \quad (14)$$

ここまでで、条件 $R > R_1$ の下で方程式を導出した ($R_1 = \frac{2L\sigma}{\Delta p}$)。しかし、 $R < R_1$ の場合、流速分布 $v(r)$ はポアズイユ流として与えられる：

$$v(r) = \frac{1}{\eta_1} \left(\frac{\Delta p}{4L} (R^2 - r^2) \right). \quad (15)$$

謝辞

本論文を執筆するにあたり、多くの方々のご指導とご支援を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。まずは本研究において偉大な先達であると同時に指導教員である中垣俊之先生へ研究の方向性のご指導を始め、6年間多くの貴重なご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。また副査の居城邦治先生、黒川孝幸先生、西上幸範先生、大村拓也先生には論文の内容について貴重なご意見を頂き、大変勉強になりました。

中垣先生からは工学部の時に興味本位で尋ねたにも関わらず快く対応していただいた事や紹介していただいた変形菌の研究が本研究室のある生命科学学院への進学を決定づけました。そこから変形菌の培養が一時難航して結局他研究室からの株を頂いたり、何かと締め切りはギリギリになったり、結構忘れぼかったりと筆者はあまり出来が良くなく期待に応えられた事があったかすら怪しいのですが、それでも6年間根気強くご指導頂けた事大変ありがたく思います。始めは漠然と変形菌のネットワークと収縮リズムの関連性についてやりたいと考えたのが修士の頃で、博士の頃にはより具体的な細胞内部の流動へのアプローチする様になりました。中垣先生はそんな筆者の研究が持っているポテンシャルを評価していただけたのは自分にとっても希望でした。

佐藤勝彦先生は数学と理論に非常に強い先生で、本研究では応力プラトーを持つシアシニング性を仮定した粘性流体の理論構築もとい流速分布と流量の試算において大変お世話になりました。セミナーでも常に素朴な観点からのご指摘を頂きました。

西上先生は生物学のスペシャリストかつジェネラリストとも呼ぶべきお方で、本研究においては原形質ドロップを観察する事を提案していただけたのは本研究の重要なターニングポイントともいえます。多くの生徒を直接指導する事が多かった先生は本研究室のムードメーカーでした。

折原宏先生からは本稿における仮想粒子運搬シミュレーションの理論と考察において多大な示唆を頂きました。学部生時代の研究室の教授かつ指導教員という縁もあり、まさか生命科学学院でもお世話になるとは思っておりませんでした。シミュレーションへの解釈に困っていた自分としては当時の先生とのディスカッションは大変勉強になり、投稿論文完成のきっかけになったと認識しております。

Charles Fosseprezさんは解析やプログラミングにおいて多くの議論を交わしました。本研究の解析手法そのものは自分で考えたオリジナルな部分が多い反面垢抜けないものでした。Charlesさんとの議論により本研究の解析のクオリティは向上したと認識しております。何よりも博士課程まで進学し、同級生がいなくなっていた自分にとっては大変貴重な友達といえる存在でした。休みの時間等に気軽に議論できた事や一緒に飲みに行ったことは大変さが目に付きがちな博士課程においては大切な時間でした。

本研究をここまで進められた事、本稿をここまで書き上げられた事は筆者一人では消して成し得ませんでした。今この文章を書くに至るまでこのような未熟者には勿体無い位の多くの助けがありました。

最後に自分がここまで研究を続けられたのは家族と友達そして天国の祖母が支えてくれたからです。本研究に関わった全ての人達に感謝申し上げます。