

# 生化学実験：微小物体の運動

## －ブラウン運動と生物物理・フードサイエンス－

担当教員：江端宏之、内線 4091, 居室：A819

小林史明、内線 4090, 居室：A820

緊急連絡先：物理学科事務室、内線 4101、部屋：A713

### 概要

物質は原子や分子から構成されており、それらは統計力学を通じて我々の日常のスケールと結びついている。しかしこのような微視的な世界を実感する機会はほとんど無い。そこで Einstein に倣い、微粒子のブラウン運動を通じて分子の存在を確認するとともに、統計的な解析手法についても学ぶ。またこの微粒子は、目に見える大きさよりもはるかに小さいが、原子などよりはるかに大きい「中間的 (メソスコピック)」な大きさを持つ。そこでメソスケールの物理が重要な役割を果たす生物・生体物質の物性や統計的性質についても学ぶ。さらにこれらの実験を通じ、現在の研究に不可欠である PC を使った測定、解析手法を身に付ける。

### 進め方

- その日の内容に事前に目を通しておくこと。各実験日に設定された課題まで終わらない場合、時間を延長します。
- 行った内容はノートに記入すること（データ自体は PC 内でも構わない）。  
**注意!** 欠席などに備え、データは USB メモリなどを用い各自で保持する。
- 「課題」毎に教員に見せ、完了後に次に進む。説明、解説はきちんと聞き、不明なところは質問したり参考文献を調べたりすること（特に課題 5、7、8 など）。
- レポートは主に後半の選択課題について書く。「課題」の内容をきちんと書くことが必須である。発展・独自課題をこなすと加点になる。

- 実験は6組程度に分かれて行う。後半は3組ずつ2つの選択課題に分かれる。

## スケジュール

- 1-3日目：微小球のブラウン運動

2日目：課題2まで。3日目：課題4まで。

微小球のブラウン運動を解析し、アボガドロ数を決定する。

- 4-6日目：選択課題 どちらかに取り組む。

### A. 生体物質の挙動

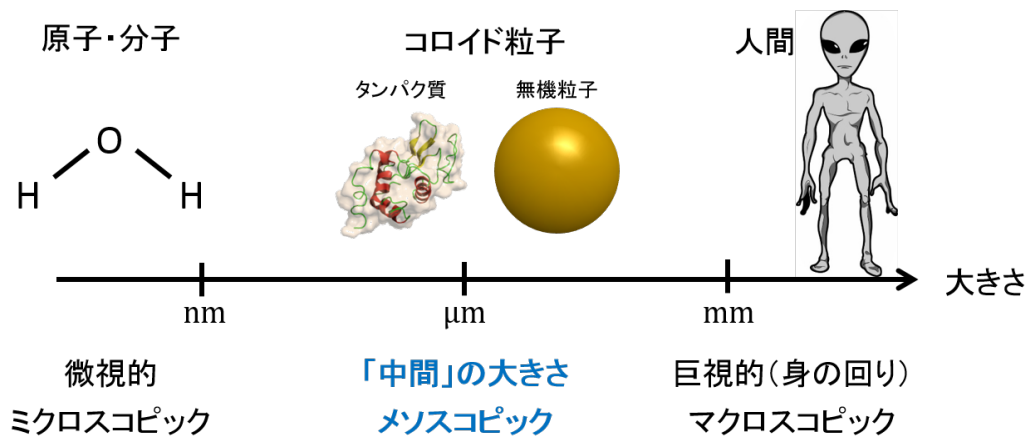
5日目：課題5まで。6日目：課題8まで。

牛乳の脂肪球の大きさを測定する。化学刺激などによる凝集現象について調べる。

### B. 微生物の運動

5日目：課題9まで。6日目：課題11まで。

微生物の運動を観察・解析し、ブラウン運動との違いを評価する。



# 第1章 ブラウン運動と原子・分子 [1]

## 1.1 背景

現在、物質が原子や分子から構成されていることは常識として受け入れられている。しかし電子顕微鏡などで原子や分子を観察できなかった時代に、その実在をどうやって確かめたのだろうか。

原子の存在を確かめる方法として、1905年に Einstein はブラウン運動の理論を提唱した。そして実際に実験を行った Perlin はノーベル賞を受賞した。この実験により求められたアボガドロ数が、他の独立な方法で求められたものと一致したため、原子や分子の存在が広く受け入れられるようになった。

## 1.2 ブラウン運動の理論

### 1.2.1 ブラウン運動の起源

1827年に生物学者の Robert Brown は、水中の花粉から出た微粒子を顕微鏡で観察し、不規則な運動をすることを発見した。後にあらゆるメソスケールの微粒子 - 原子や分子よりはるかに大きい、肉眼では見えないほど小さい - が同じような運動をすることが分かった。これがブラウン運動である。

水中にある球形の粒子を考えよう。粒子周囲の水分子は常に運動しており、その運動エネルギーの平均は、一方向 ( $x$ ) あたり次式のように書ける。

$$\left\langle \frac{1}{2} m v_x^2 \right\rangle = \frac{1}{2} \frac{RT}{N_A} \quad (1.1)$$

(エネルギー等分配則)。ここで、 $\langle \dots \rangle$  は平均を表す。 $R = 8.31$  [J/K] は気体定数、 $T$  は絶対温度、 $N_A$  はアボガドロ数である。

非常に多数の水分子が全方向から粒子に衝突しているため (図 1.1)、粒子に与えられる運動量はほとんど 0 だと思えるかもしれない。しかし有限の時間内に衝突する分子の数は有限個である。そのため衝突する個数や場所は揺らぎによって平均よりずれ、粒子に有限の運動量が与えられる。これがブラウン運動である。

つまりブラウン運動は分子運動の「揺らぎ」に由来しており、ランダムである。よって Einstein は、この運動の変位に注目すれば分子の情報を得られると考えた。それが測定可能な物理量と  $N_A$  を結びつける Einstein の関係式である。

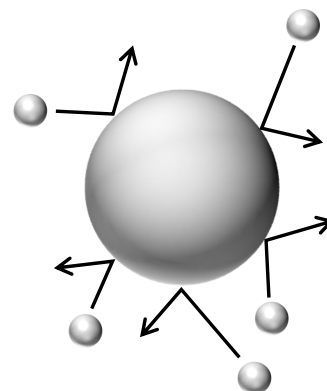


図 1.1: 微粒子に衝突する分子

### 1.2.2 ランダムウォーク

さて、Einstein の関係式を導出する前に、ブラウン運動を単純化したランダムウォークの性質を見てみよう。

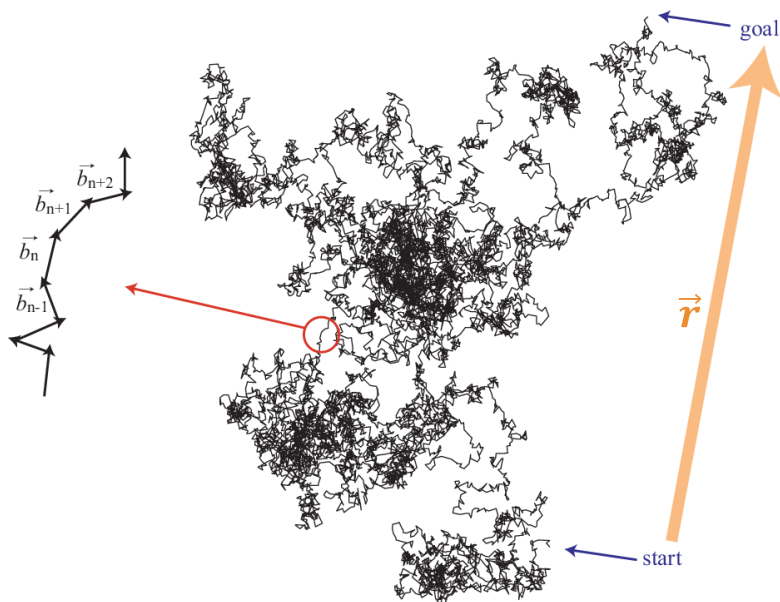


図 1.2: 数値計算によるランダムウォークの軌跡。左はその拡大図。

一步の距離は一定 ( $b$ ) で、一步毎に向きをランダムに変えて 2 次元平面上を移動する場合を考える。図 1.2 はそのランダムな全軌跡から、 $\tau_0$  番目から  $\tau = \tau_0 + N$  番目までの  $N$  歩 (ステップ) を取り出したものである。

各ステップを順に  $\vec{b}_1, \vec{b}_2, \dots, \vec{b}_N$  とした場合、 $\tau_0$  から  $\tau$  での変位は

$$\vec{r} = \vec{b}_1 + \vec{b}_2 + \dots + \vec{b}_N$$

である。この変位  $\vec{r}$  はどのような特徴を持つだろうか。統計平均  $\langle \vec{r} \rangle$  を考えてみる。なお上述の過程はランダムであるため、全軌跡のうち重なっていない  $N$  ステップの部分を取り出したものは全て独立である。よって時間的に重なっていない各ステップを平均したもの、つまり時間平均と考えても良いし、あるいは無数のランダムウォークの試行の平均 (ensemble average) と考えても良い (エルゴード性)。 $\langle \dots \rangle$  の中は別個に計算でき、当然時間/試行毎に独立であるため  $\langle \vec{b}_n \rangle = 0$ 。よって

$$\langle \vec{r} \rangle = \langle \vec{b}_1 + \vec{b}_2 + \dots + \vec{b}_N \rangle = \langle \vec{b}_1 \rangle + \langle \vec{b}_2 \rangle + \dots + \langle \vec{b}_N \rangle = 0$$

となる。 $\vec{r}$  の向きはランダムであるため、この結果は当然である。

では広がり的大小はどうだろうか。このような場合、絶対値より取り扱いが容易な 2 乗値 (即ち分散) を用いると良い。その統計平均は以下ようになる

$$\langle \vec{r}^2 \rangle = \langle (\vec{b}_1 + \vec{b}_2 + \dots + \vec{b}_N)^2 \rangle = \langle \vec{b}_1^2 \rangle + \langle \vec{b}_2^2 \rangle + \dots + \langle \vec{b}_N^2 \rangle = b^2 N.$$

( $\vec{b}_n$  の独立性から、 $n \neq m$  の時  $\langle \vec{b}_n \vec{b}_m \rangle = \langle \vec{b}_n \rangle \langle \vec{b}_m \rangle = 0$ 。) 即ち、 $\Delta\tau = \tau - \tau_0 = N$  とすると

$$\langle r(\Delta\tau)^2 \rangle = b^2 \Delta\tau \quad (1.2)$$

となり、変位の 2 乗の平均値 (**平均 2 乗変位、Mean Square Displacement (MSD)**) がステップ数、あるいは単位時間に一步と考えると時間に比例することが分かる。

### 1.2.3 Einstein の関係式

さて、単純化されたランダムウォークの場合、MSD が時間に比例することが分かった。しかしこれは物性値と関連付けられていない数学的な性質であるし、ブラウン運動そのものでもない。以下実際にブラウン運動を考え、Einstein の関係式を導出する。

まず 1 次元運動の場合を考える。時刻を  $t$ 、粒子の位置を  $x$  とし、 $t = 0$  のとき  $x = 0$  とする。粒子の運動方程式は以下のように書ける (ランジュバン方程式)。

$$m \frac{d^2}{dt^2} x = F_{\text{total}} = -\gamma v + F_{\text{rnd}} \quad (1.3)$$

$m, v$  はそれぞれ粒子の質量、速度である。 $\gamma v = 6\pi\eta a v$  ( $a$  は球状粒子の半径、 $\eta$  は水の粘性率) は球状粒子が水から受ける粘性抵抗力である。 $F_{\text{rnd}}$  は、前述の揺らぎにより粒子が水分子から受けるランダムな力で、ブラウン運動の起源である。両辺に  $x$  をかけると以下の式が得られる。

$$m \left[ \frac{1}{2} \frac{d^2}{dt^2} x^2 - v^2 \right] + \frac{1}{2} \gamma \frac{d}{dt} (x^2) = x F_{\text{rnd}} \quad (1.4)$$

この式の平均を取る (平均の意味は上述と同じ)。 $F_{\text{rnd}}$  はランダムかつ位置  $x$  に依存しないため  $\langle x F_{\text{rnd}} \rangle = 0$  となる。すると (1.1) 式と同様に等分配則  $m \langle v^2 \rangle = RT/N_A$  から

$$\frac{1}{2} m \frac{d^2}{dt^2} \langle x^2 \rangle - \frac{RT}{N_A} + \frac{1}{2} \gamma \frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle = 0 \quad (1.5)$$

直径が  $1\mu\text{m}$  程度の粒子では  $m/\gamma \ll 1$  のため、左辺第一項を無視すると、

$$\frac{1}{2} \gamma \frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle = \frac{RT}{N_A}, \quad (1.6)$$

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt, \quad D = \frac{RT}{6\pi a \eta N_A}. \quad (1.7)$$

これが Einstein の関係式である。(ちなみに  $D$  は拡散係数であり、その表式は Einstein-Stokes の式と呼ばれる。)

ここで重要なのは、 $N_A$  以外の物理量  $x, t, D, R, T, a, \eta$  は全て測定可能ということである。即ち、上式を用いて**原子の性質を直接測ることなく  $N_A$  を求めることができる**。ちなみに上の関係式は 1 次元であるが、次元が増えても各方向への運動が独立であれば単純に足すことができる。よって 2 次元運動の場合は以下ようになる。

$$\langle r(t)^2 \rangle = \langle x^2 + y^2 \rangle = 4Dt \quad (1.8)$$

3 次元の場合は同様に  $6Dt$  となる。

## 第2章 実験1：微小球のブラウン運動

### 概要

- (i) 微粒子が分散した溶液を顕微鏡で観察し、PCに録画する。
- (ii) 動画をソフトウェアで解析し、粒子の軌跡のデータを取得する。
- (iii) 軌跡データを統計処理し、Einsteinの関係式と比較することによってアボガドロ数や他の物性値などを算出する。

### 実験上の注意事項

- 実験室での飲食は固く禁止。薬品の誤飲の防止、装置の保護のため。
- 通常試薬類を下水に流すことは厳禁!!だが、今回の生化学では全て下水に流し、通常のゴミ箱に捨てて構わない。
- 薬品、器具を手汗などで汚染しないこと。
- その他、不都合が発生した時は直ちに実験指導者やTAに知らせること。

以下の実験では、顕微鏡などの精密機器を用いる。説明や指示をよく聞いて、丁寧に扱うこと。また様々な試料を作成し実験を行うが、正しい結果を得るためには実験条件を正確に制御することが必要となる。よって不純物の混入などの影響を避けるため、注意深く作業しよう。またソフトウェアの使い方、解析方法や必要なパラメータなどが載った冊子が別途配布されているので、都度参照すること。

## 2.1 ブラウン運動の解析によるアボガドロ数の決定

### 2.1.1 ソフトウェアのインストール

まずは必要なソフト等がインストールされている学生実験用のPCを用いる。後の解析の際は、各自のPCにも必要なもの(ImageJ)をインストールし分担して作業する。基本的にWindows上での動作を想定している。ExcelのVBAプログラムができればMacでも構わない。

解析に用いるソフトウェアは、画像解析用ソフト「ImageJ」である。観察像を取り込む際は、「uEye Cockpit」を用いる。インストール時は 32bit、64bit など OS に合わせてインストーラを選び、そのファイルを PC にコピー、実行する。インストール時の選択肢は基本的にデフォルト設定で良い (uEye Cockpit は driver install を選択)。言語は英語を選択。

ImageJ のインストールの際は、「MTrack2i」フォルダの中身を ImageJ の plugin フォルダ内にコピーする (通常 C ドライブの program files の中にある)。また Excel 用の「VBA プログラム」フォルダを PC にコピーする。

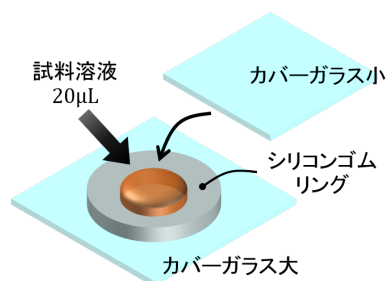
### 2.1.2 試料セルの作成

(i) 試料作成はすべて手袋をして行う。各自カバーガラス (大、小各 1 枚)、ピンセット、シリコンゴムリングを揃える。カバーガラスなどをストックから取り出す際はピンセットを使い、かつ作業は新しいキムワイプなどの綺麗な面で行う。試料溶液は共用である。

**注意!** ピンセット先、キムワイプの面など、試料に触れる部分は汚さないように! 手袋で触ったり机上に直接おいたりしないこと。

(ii) 試料溶液は、単分散 (大きさが揃った) のポリスチレン粒子を水に分散させたもの (直径  $2\mu\text{m}$ 、体積分率 2.5% の原液を 1000 倍希釈する)。保存中に沈殿、凝集 (粒子同士がくっつくこと) していることがあるので、セルへの滴下直前まで 5 分以上超音波洗浄器にかけて良く分散させる。滴下前に容器を手で振り、溶液全体を均一に混ぜる。

(iii) カバーガラス大にシリコンゴムリングを載せる。中央に試料溶液を  $15\mu\text{L}$  滴下する。カバーガラス小を上から被せ、ピンセットで軽く押さえて密着させる。溶液が大量にはみ出た場合はキムワイプなどで吸い取る。



### 2.1.3 顕微鏡観察の準備

(i) 対物レンズを選択する際はレボルバー部、試料ステージを上下させる場合はステージ昇降ハンドルを動かす。決して対物レンズなどを持って動かさないこと。またレンズ面など光学系には決して直接触れないこと。試料などで汚さないようにも気を付ける。



(ii) 焦点を合わせる：試料ステージにスライドガラスをセットし、キムワイブ片などの適当なものを載せる。レボルバー部を回転させ、一番低い倍率の対物レンズを光路に入れる。照明光量を最小にし、切り替えつまみ（出し入れする。回さないこと!）で顕微鏡の光路を接眼レンズ側に切り替える。次にステージ昇降ハンドルを用い、目視で試料セルを対物レンズぎりぎりまで近づける。接眼レンズで観察しながら、対物レンズが試料から遠ざかる方向にステージを動かし、焦点が合う場所を探す。（近づけながら合わせようとすると、試料とレンズがぶつかる危険性がある。）また 40 倍以上などの高倍率では対物レンズから試料までの距離が非常に短い（1 mm 以下）ものが多く、視野も狭くなる。よって低い倍率で焦点を合わせてから、そのまま高い倍率に切り替えると良い。このとき試料セルに凹凸がある場合は、レンズをぶつけないように注意する。また試料下部を見ようとしてステージを上げ過ぎると、試料セルとレンズがぶつかる（焦点面が動かなくなり、観察像の高さ方向の変化がなくなることも分かる）。そのまま上げるとセルが破損するので注意する。

(iii) PC での観察（配布資料参照）：顕微鏡の USB カメラを PC に接続し、観察用のソフトウェアを起動する。切り替えつまみで顕微鏡の光路をカメラ側に替え、ソフトウェア上で観察し、画像の焦点が合うように調整する。ソフトウェアで実際に静止画、動画が取得、保存できることを確認する。

**!!注意!!** 観察中、机や顕微鏡に振動を与えないこと。試料調整などは顕微鏡台では行わない。台上での PC 操作などは静かに行う。

#### 2.1.4 試料の観察と動画撮影

(i) 微粒子がブラウン運動している様子を顕微鏡上で観察する：ステージのスライドガラス上に試料セルを載せる。まず  $\times 10$  など低めの倍率で焦点を合わせ、次に粒子がなるべくはっきり見える倍率（基本的に  $\times 40$ ）で観察する。（まずシリコンゴムスぺーサの内側端の鉛直上端に焦点を合わせると分かりやすい。）（ $\times 10$  では粒子が小さくて見えないこともある。）なお時間が経つと粒子がセル下面まで沈殿し、**焦点の調整可能範囲から外れることがある**。その場合はセルをひっくり返す。

(ii) PC で粒子の運動を録画する：カバーガラスの内側面（セルの鉛直上下面）やシリコンゴムスぺーサ近くは**避ける**。画面内に観察可能な粒子が数個程度の濃度が望ましい。また解析する粒子は他粒子と充分に離れている必要がある。解析用に 10 fps で 1 分程度の動画を取得する。次節以降、各自で 2-3 粒子を解析するが、余裕を持って動画を取っておこう。（途中で粒子が画面外に外れたり大きくぼやけたりすると、軌跡が解析できなくなる。）各動画の取得条件（レンズの倍率、試料など）、その他気付いたことは漏れ無くノートに記録しよう。

#### 2.1.5 解析とアボガドロ数の決定

以下ではソフトやプログラムの使い方などの詳細は配布資料をよく読み、分からない箇所は教員や TA に聞こう。



(i) 画像解析：動画を解析ソフト（ImageJ）で開く。なるべく粒子だけが見えるように2値化する。これらの処理の後、元の動画ファイルに上書きしないよう保存する（元データは必ず残す!!）。

(ii) 軌跡データの取得：粒子追跡の機能（MTrack2i (or MultiTracker)）を使い、粒子の軌跡データを取得する。

(iii) 運動の解析：粒子の軌跡データを Excel で読み込み、以下の課題に沿って解析を行う。

## ブラウン運動を正しく測定できたのか？

### 課題 1 粒子運動の解析

まずどれか一粒子の運動を解析する（配布資料参照）。得られた軌跡及び速さの特徴を検討し、ブラウン運動のものとして問題がないか（ブラウン運動以外の影響の有無や程度について）、考えよう。

### 課題 2 運動の特徴

計6粒子（程度）の軌跡データを集め、それぞれ前課題と同様の解析を行う。（ここでは検討しないが、MSD も同時に計算しておくとも良い。）（前課題の解析ファイル/シートをコピーし、生データの部分のみ入れ替えること。）複数粒子の結果を一つのグラフに重ねてプロットし、様子を比較する。このとき重ねすぎると見づらくなるので、一グラフにつき3粒子程度までとしよう。

得られた結果の特徴や問題点について、前課題と同様に検討しよう。またランダム運動の結果として、複数粒子のデータはどのようにばらついているだろうか：ランダムであれば、一つ一つの軌跡には偏りがあっても、「偏り方」は粒子によってまちまちのはずである。また速さのばらつきは同程度になっているだろうか。

### 発展 沈降速度と沈降平衡

同じ粒子を観察し続けると顕微鏡の焦点面から粒子が外れることが分かる。粒子は沈降と浮上のどちらをしているのだろうか。ステージの上下調節で確認をする。

この時の粒子速度は粒子と水の密度差による重力・浮力と粘性抵抗力の均衡により決まる。ポリスチレン粒子の密度を  $1.1\text{g/cm}^3$  として、垂直方向の粒子速度を計算してみよう。試料溶液を粒子間相互作用のない理想系と考えた時、十分に時間が経った時の垂直方向の数密度分布は統計力学の考え方から求められないだろうか。

### 発展 速度相関関数の緩和時間

1.3 式から速度相関関数  $\langle v(t)v(0) \rangle$  が  $e^{-t/\tau}$  に比例することが導ける。ここで  $\tau = m/\gamma$  は緩和時間と呼ぶ。前の発展問題の密度を使って、緩和時間を計算してみよう。課題1、2で計算した速さは、力学的な意味で本当の速さなのだろうか？

## アボガドロ数の推定

### 課題 3 MSD と Einstein の関係式

VBA プログラムを用いて各粒子の MSD を計算し、一つのグラフにまとめる。次にそのグラフをコピーし、時間差  $\Delta t$  [s] の最大値（横軸の最大値）を 10, 3, 1, 0.5 などに変えたグラフを作る。グラフを比較すると、MSD のプロットのばらつきが  $\Delta t$  が小さくなると減少することが分かるはずである。同時に MSD が Einstein の関係式 (1.8 式) で予想される比例関係に近づくはずである。このような  $\Delta t$  依存性が生じるのはなぜか、下記を参考に考えよう。

● 平均 2 乗変位 (MSD) : MSD は、 $\alpha(\Delta t) = \langle (\vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t))^2 \rangle$  であり、プログラムでは  $t$  に関して平均を取っている。つまりある時間差  $\Delta t$  における変位の 2 乗値を、軌跡全体に渡り平均したものである。Einstein の関係式 (1.8 式) より無限のアンサンブル or 時間平均を取った理想的な場合にはブラウン運動の MSD は  $\Delta t$  に比例し、その係数が  $4D$  となる。なぜ  $\Delta t$  が小さくなると、「理想的」な関係式に近づくのだろうか。統計の観点から考えてみよう。

### 課題 4 アボガドロ数の推定

Einstein の関係式を良く近似する適切な  $\Delta t$  の最大値を用い、各粒子の MSD に切片 0 とした近似直線をフィッティングして傾きを求める。次にそれぞれの傾きから Einstein の関係式を使って  $N_A$  を求める。そして本実験での  $N_A$  の測定値を、これらの  $N_A$  の「平均値  $\pm$  標準誤差」の形で求めよう。粒径が与えられていなければ教員や TA に確認する。水の粘性率など必要な物性値は理科年表を参照し、室温に近いものを使う。

アボガドロ数 ( $N_A = 6.02 \times 10^{23}$ ) を正しく測定できたと言えるだろうか。誤差を考慮して考えよう。正しく測定できたとは言えない場合、その原因は何だろうか。

### 発展 他の手法

分子論の描像に基づいてこのように求められた  $N_A$  が他の方法で求められたものと一致したことが、分子論を支持する強い証拠となった。ではブラウン運動によるものとは独立に  $N_A$  を決定する方法には、どのようなものがあるだろうか。

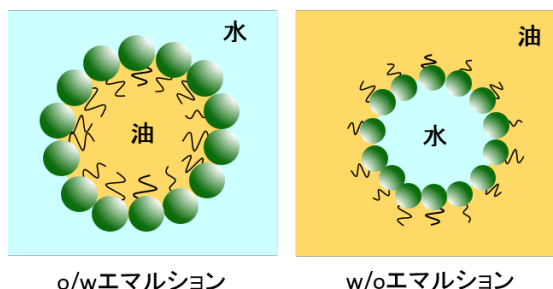
### 発展 マイクロレオロジー

1.8 式には、粒子や流体の様々なパラメータ（物性値）が含まれている。よってこの式を用いることで、それらのパラメータを測定することができる。特に微粒子の運動から微小な領域の粘弾性を調べる手法はマイクロレオロジーと呼ばれている。実際にどのような測定に用いられているだろうか。調べてみよう。

## 第3章 実験2A 生体物質の挙動

生体物質であるタンパク質・DNA や細胞内器官、あるいは赤血球などの細胞など、生体内の構造はメソスケール (数 10 nm-10  $\mu$ m) であるものが多い。また食べ物や化粧品など生物と関連が深い物質においても、メソスケールの構造が物性に大きな影響を与えている。

そこで生体物質の作るメソ構造の一例として、牛乳のエマルジョン状態を調べる実験を行う。エマルジョン (乳濁液) とは、水と油のように本来混ざり合わない液体同士が、界面活性剤 (セッケンなど) によって安定に分散したものである。牛乳の場合、水 (乳清) の中にタンパク質などによって安定化された脂肪液滴が分散している。この小さな脂肪の粒が光を散乱するため、牛乳は白く見える。またこの脂肪球の大きさや量が風味にも影響している。



### 概要

1. 牛乳の脂肪球の様子を顕微鏡観察により解析し、牛乳の種類によってどのような違いがあるのかを調べる。
2. 酸などの刺激により、エマルジョン状態の安定性がどのように変化するか調べる。
3. 発展：上記で得られた知見を活かし、カッテージチーズや牛乳豆腐を作成する。

### 3.1 脂肪球の観察と測定

(i) 牛乳が数種類与えられている。各牛乳を 100 倍希釈 → ~10 倍希釈 (トータルで ~1000 倍) する。第 2 章と同様のやり方で顕微鏡用試料を作成し、脂肪球の様子を観察する。

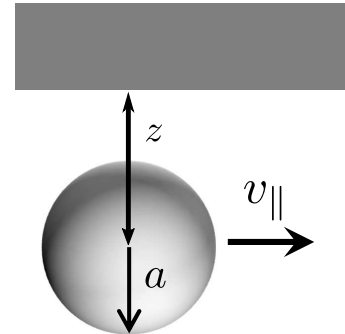
観察：基本的に  $\times 40$  の対物レンズを用いる。乳脂肪球は沈降と浮上のどちらをするかを、ステージの上下調節をしながら確認する。次にブラウン運動解析用の動画を取得する。特に大きな脂肪球に着目し、浮上しきったらセルを上下反転させるなどして、同一脂肪球の軌跡を 3 粒子程度について、それぞれ、セル中央部とセル上面近傍で取得する。(脂肪球が多すぎる場合などは、希釈率を調整する。)

(ii) 動画を解析し、液体の粘性率が水と等しいと仮定して、1.8 式から脂肪球の大きさを算出する。上面近傍ではセル表面に近接しているので、下記の壁面効果を考える。

## 壁面効果

固体表面近傍では、壁面と平行な方向に固体粒子が並進する（回転せずに真っ直ぐ進む）際に受ける粘性抵抗は、壁がないときと比べて増加する。壁面と平行方向の抵抗係数  $\gamma_{\parallel}$  は、理論的には壁と固体粒子重心間の距離  $z$  を使って、次のように近似される [2]。

$$\gamma_{\parallel} = \left[ 1 - \frac{8}{15} \ln \left( 1 - \frac{a}{z} \right) \right] \gamma \quad (3.1)$$



### 課題 5 牛乳の種類と脂肪球

脂肪球の大きい方の牛乳について、6 粒子程度の軌跡を測定し、MSD の解析と式 (1.7) から脂肪球の大きさ  $a$  を計算しよう。また、 $a$  は顕微鏡画像のスケールを使って粒子像のコントラストからも求めることができる。これらの  $a$  の比較しよう。

牛乳の種類と脂肪球の様子（数や大きさなど）にはどのような関連が見られたか、観察・解析結果に基づいて説明しよう。

またその違いは牛乳のどのような特徴から生じるのだろうか。脂肪分の違いやホモジナイズ（均質化処理）などについて調べ、検討すること。

### 課題 6 同一脂肪球の観察による壁面効果の検証

大きな脂肪球の場合、浮上速度が比較的大きく像も見やすいので、セル中央部とセル上面近傍のそれぞれの領域で軌跡を得ることができる。MSD の解析から、壁面効果による抵抗係数の変化、そして  $z/a$  を求めてみよう。セル中央部の MSD の解析もしくは顕微鏡画像から求めた  $a$  を用いて、セル上面に浮上しきったときの壁からの距離  $z$  を見積もってみよう。

### 発展 浮上ダイナミクスの MSD による検出

セルを上下反転させ、同一脂肪球がセル中央部からセル上面近傍に浮上する間の粒子の軌跡を、連続的に取得し（例えば、ピントを合わせ 1 分間の動画取得を 2 分間隔で何回か繰り返す）、摩擦係数の時間変化を検出しよう。顕微鏡の  $z$  ステージは、 $\mu\text{m}$  の目盛りが付いている。これにより、おおよその粒子の相対位置が分かるので、これも記録しておく。

拡散係数の時間依存性を解析して、 $t$ - $D$  グラフを書いてみよう。壁面効果や浮上速度などを考慮すると、このデータからどんなことが言えるだろうか？

### 3.2 エマルション状態の安定性

例えばイタリアンドレッシングで見られるように、水と油を混ぜてもやがて液滴同士が融合して分離する。では牛乳の脂肪球は、どうやって融合せずに分散状態を保っているのだろうか？その仕組みを理解するため、ここでは酸が分散状態に及ぼす影響を調べる。

#### 実験

(i) 酢酸の 20v% (体積%) 水溶液 1mL をエッペンドルフチューブ内に作成する。次に溶液を希釈し、10, 2, 0.2v% の溶液各 0.5mL をチューブ内に作成する。また 20v% 水溶液 0.5mL、0v% (水) 0.5mL のチューブも作っておく。

(ii) 各チューブに同体積 (0.5mL) の牛乳を加え、手で振って手早く均一に混ぜた後、室温で 10 分程度静置する。その結果、どのような変化が起きたかよく観察し記録する (溶液を傾けたりしてもよい)。

(iii) 各試料から少量をカバーガラス上に採取して顕微鏡観察し、脂肪球の分散状態がどのように変化したかを調べる (静止画を取得する)。このとき、シリコンゴムスぺーサは使わず、単にカバーガラスを被せて薄いセルを作成する。さらに潰す、水を足して希釈する、など必要に応じて観察しやすいように工夫する。

#### 課題 7 分散状態の変化

上記観察・測定結果についてまとめ、酢酸濃度 (分かれば pH) に対し分散状態がどのように変化したかまとめよう。

#### 課題 8 液体中の微粒子間の相互作用

液体中の微粒子間には様々な相互作用が働く。ここでは微粒子 (コロイド粒子) 間のファンデルワールス力、クーロン力を合わせた DLVO 理論について文献などを当たり、まとめよう。

#### 課題 9 脂肪球間の相互作用と分散

脂肪球は牛乳の中では安定に分散している。そのためには脂肪球同士の融合を妨げる力、即ち斥力が必要である。脂肪球の表面はタンパク質 (と脂質) からなる乳脂肪球膜に覆われており、このタンパク質は pH に対しカゼイン (同じく牛乳に含まれるタンパク質) と似た振る舞いを示す。まずこのカゼインの振る舞いについて調べる。次に前課題で調べた相互作用を用い、上記実験における分散状態の変化を定性的に説明しよう。

#### 発展 タンパク質への影響

酸あるいはその他の刺激によって、タンパク質はどのような影響を受けるだろうか。それは観察された現象と関係があるのだろうか。

### 3.3 発展 フード・サイエンス：カッテージチーズ、牛乳豆腐の作成

前節の実験結果を活かし、食品の作成を行う。食べ物を扱うので、実験室以外で行う。授業の一環なので、きちんと記録をつけること。また、時間があったら最後に生化学実験の学生皆で試食しよう。

最小限の材料はあるが、使用したい牛乳や酸、調味料などがある場合は各自で用意してもらって構わない。(脂肪分の多い牛乳が適しているようだ。)ただし特に夏場は保管状況に注意すること(事前に教員やTAに連絡があれば、冷蔵庫に保管できます)。なお以下ではビーカーやマイクロピペットなどの実験器具ではなく、調理器具を使う。

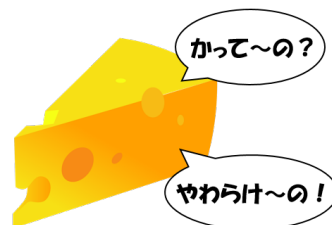
#### 3.3.1 カッテージチーズ

- (i) 牛乳 200 mL を 70°C 程度に温める。電子レンジを使う場合、部分的に過加熱にならないよう少しずつ温めて攪拌することを繰り返す。加熱の後、穀物酢(酸度 4.2%) 10mL を加えて手早く攪拌し、10 分静置する。
- (ii) 10 分後、固まっていなかったら再加温する。ペーパータオル等で漉し、軽く液体成分を絞る。この時火傷などしないように注意!! なおこの液体も乳清と言い、栄養価が高いとのこと。酸を除きたい場合、ペーパータオルなどで包んだ状態で水中で振り洗いする。
- (iii) 見た目、硬さ、量などを観察し、記録する。時間がある場合、牛乳や酢の量や種類を変える、NaCl を少量加えるなどの条件で同様に作成し、結果を比較する。

#### 3.3.2 牛乳豆腐

基本的な手順はカッテージチーズと同様である：牛乳は 90°C 程度に温める。にがり 20 mL を加える。にがりは少し苦いので、振り洗いしても良い。

上手くできた場合、NaCl 20 g / 牛乳 200 mL などでもやってみよう。こちらは濃い塩分を除くため、必ず水中で振り洗いした方が良い(しないと健康に悪い!)



#### 試食 美味しさ/不味さの秘訣

まずは何も付けず、味や食感を調べよう。チーズ、豆腐と呼ばれるように、しょっぱい味付けも良い。また冷やしたものにジャムやシロップを合わせ、スイーツとして味わうこともあるようだ。好みに応じて試してみよう。美味しさなども含めた作成結果は、刺激による変化や作成過程とどのような関係があるだろうか。

#### 発展 産業応用

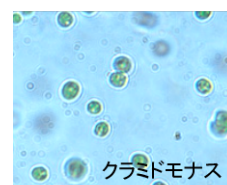
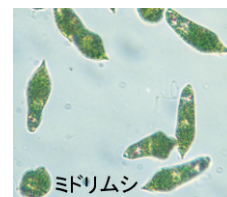
同様の現象を利用した食べ物や工業材料には、どのようなものがあるだろうか。

## 第4章 実験2B 微生物の運動

1827年にRobert Brownが花粉のブラウン運動を発見した際、始めは花粉が生きていると考えた。しかし前半で確かめたように、実際は周囲の分子の熱運動に由来する「受動的」な運動をしているだけである。では微生物のように「能動的」に、つまり自ら動く事のできる微粒子の運動は、ブラウン運動とはどのような違いがあるのだろうか。統計的解析により、その特徴を定量的に評価しよう。

### 概要

1. 微生物を顕微鏡で観察し、運動の特徴を調べる。
2. 発展：光や化学物質などの環境に対する応答を調べる。



© 島津理化

### 4.1 微生物の観察と運動の解析

基本的にミドリムシを用いる。手法の基本は第2章と同様だが、試料セルの作成法など一部が異なるので注意。

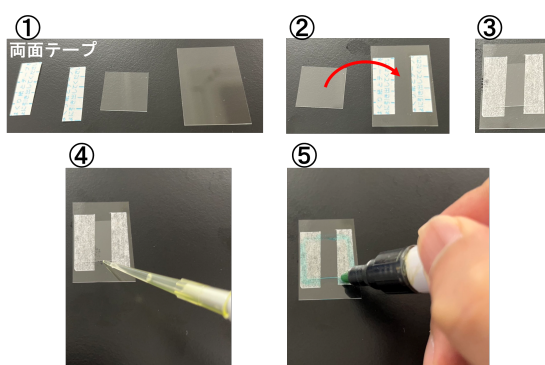
#### 4.1.1 セルの作成

(i) 両面テープを25mm程度の長さ切りとり、縦半分に切る。18×18mm, 24×36mmのスライドガラスを1枚ずつ用意する。

(ii) 24×36mmのスライドガラスに6～7mmほどの間隔をあけて、両面テープを2枚貼る。両面テープの剥離紙をピンセットで取る。

(iii) 24×36mmのスライドガラスの中央付近に18×18mmのスライドガラスを被せる。ピンセットで何か所か軽く押して両面テープに接着させる。2枚のガラスの隙間が観察セルになる。

(iv) 微生物分散液を20～50  $\mu\text{L}$  ほどピペットで吸い取る。ピペットのチップの先端をスライドガラス間の隙間にあて、ゆっくりと溶液を注入する。溶液が隙間全体に行きわたったら、はみ出た溶液をキムワイプなどで吸い取る。



(iv) 18 × 18mm のスライドガラス周囲を接着剤（リキッドブロッカー）でなぞり、隙間を塞ぐ。数分で接着剤は固まる。

#### 4.1.2 顕微鏡観察

(i) 微生物は実験 1 で用いた微粒子よりかなり大きいので、基本的に低倍率で観察する。カメラの前に画像縮小用のリレーレンズを入れる。薄いスペーサ（微生物と同程度）によりセル内の厚みはかなり小さくなっているため、主に 2 次元的な運動が観察されるはずである。

まずは ×10 のレンズなどで微生物の様子を観察し、記録する（次課題参照）。実験条件として室温も忘れずに記録すること。なお動かない微生物の数が多くても、運動しているものがある程度観察できればよい。室温が低い場合は透明ヒータを用いて加温できるので、教員や TA に尋ねる。

(ii) 次に第 2 章と同様のやり方で微生物の軌跡を解析するため、動画を取得する。条件にもよるがよく運動するので、視野を広く取る必要がある。よって基本的に ×4 の対物レンズを用いる。（リレーレンズ有りでは微生物が小さくて見えづらい場合は、リレーレンズを外しても良い。）

解析対象は孤立した個体が望ましい。よって微生物が多すぎる場合は、希釈した溶液で試料を作りなおしても良い。（微生物濃度は実験日ごとに変動するので注意。）動画は**運動に関して十分な統計性が得られるようにフレームレート（fps）や録画時間を調整する**：動きが激しい/大きい場合、視野内に滞在する限り撮影しよう。撮影時間の目安は最大 5 分程度、また総フレーム数が最大 1000 程度になるよう fps を調整しておくとうまい。ただし後で動画の fps を調整できるので、撮影時に過度に気にする必要はない。

微生物の数によるが、ある程度軌跡を解析しやすいような動画を最低 4 つ取得しよう。

#### 4.1.3 運動の解析

以下の手順で微生物の運動の特徴を評価する。やり方に不明な点がある場合、それ以外のやり方で評価したい特徴がある場合など、教員や TA に相談しよう。（コントラストが小さい場合はバックグラウンド補正、フレーム数が大きすぎて処理困難な場合はフレーム間引き、などが有効である。）

##### 課題 10 運動の定性的特徴

取得した動画から微生物の様子をよく観察し、直接観察で見た結果と合わせ、特徴的な運動モード（様態）を Excel の表などの形でまとめる。その際、全体的（平均的）な運動の様子に加え、個体ごとの運動の様子の違い、時間による運動の変化などについても注意しよう。



### 課題 11 特徴的な運動の定量解析

前課題でまとめた内容に基づき、その特徴的な運動を示している微生物各 1 匹以上を選び、下記の一通りの解析を行う。そして前課題でまとめた特徴的な運動について、それらがどの解析結果にどのように反映されているのか、また解析結果からどのような運動の特徴が分かるのか、を検討しまとめよう。このとき、各運動の様子を観察・解析結果を整理し（同一グラフ上にプロットをまとめる、表を作る、など）、可能/必要なら平均や分散などの評価も行う。追加観察を行っても良い。

#### 解析項目

- 軌跡：軌跡をプロットする。
- 速さの時間変化：速さを時間に対しプロットする。
- 速度の分布： $(v_x, v_y)$  を散布図でプロットし、運動方向や速さの分布を可視化する。
- MSD：MSD を求め、プロットする。このとき、第 1 章で説明したように、ブラウン運動やランダムウォークでは  $\Delta t$  に比例する。しかし例えば直線的な運動をする場合、一定の範囲内のみを運動する場合など、異なる運動をする場合は  $\Delta t$  への依存性も変化する。これらの場合などで MSD がどうなるかを具体的に検討し、微生物のものにとくらべてみよう。
- 必要に応じ、速さのヒストグラムを取るなど他の解析をしてもよい。

### 課題 12 ブラウン運動との比較

前節のブラウン運動する粒子を一つ（以上）選んで微生物と同様の解析を行い、微生物と比較してその相違を説明しよう。

## 4.2 発展 環境への応答

生物は生存・繁栄のため、特定の環境を好む。よって微生物も周囲の環境に応答してその運動が変化し、これが生存戦略の重要な役割を担っている。温度、光、物質濃度などの影響について顕微鏡観察により調べ、どのような環境を好むのか解明する。その際、各動画や静止画における実験条件をなるべく正確に記録すること。（特にステージ上、接眼観察像、PC 画像では位置関係がしばしば異なるので注意!）

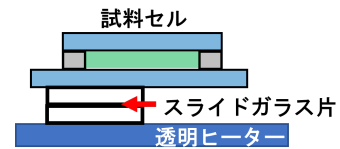
### 4.2.1 実験

下記からテーマを選択する。特に記述がない場合は前節と同様に両面テープをスペーサとして用いたセルを作成し、多くの微生物のおおまかな挙動を見る。

## 温度

透明ヒータ上に薄い試料セルを載せ、室温から少しずつ温度を上げながら運動の様子を調べる（使い方は説明書参照）。制御装置の温度指示値は室温とずれているので、加温前に室温との差を記録する。温度の目標値を変更し、指示値が目標値に達した後、温度が安定するまで数分待つこと。

次にスライドガラス片を挟むことで透明ヒータと試料セルとの非接触部を作り、温度勾配を生じさせる（右図参照）。ヒータ温度を室温から少しずつ上げ、微生物が勾配に対しどのように応答するか調べる。

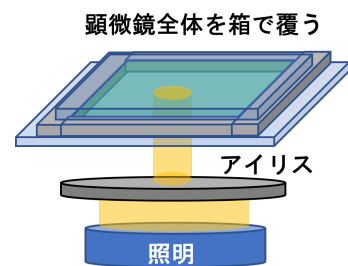


## 光

運動の光量依存性：高倍率にして、微生物の運動の照明光量依存性を調べる。高倍率の場合、遊走しているミドリムシは観察できないので、止まっているミドリムシを観察する。露光時間調整をオートにすると、光量を変化させても、像が見えるように調整してくれる。像が取得できる範囲で最小から光量を大きくしたときに、止まっているミドリムシがどのような反応をするのか調べる。

明暗の選択性：試料部の大部分を黒い紙などで遮光し、明るい部分を好むか否かを調べる（右図参照）。時間があれば光量への依存性も調べる。

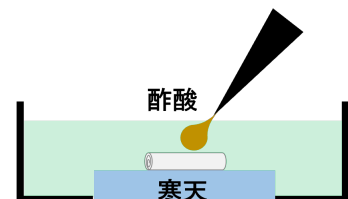
方向依存性：照明器具を使って光を横から当て、光の向きへの依存性を調べる。



## 化学物質の濃度勾配

具体的な手順は別紙参照。酢酸 1 v%（体積%）水溶液を用いる。

ミドリムシ懸濁液の中に、数 mm 四方のキムワイプ小片に酢酸を吸い込ませたものを置く（下図参照）。物質はキムワイプから徐々に広がっていく。セル作成直後から観察し、微生物がどの場所を好むのか調べよう。時間があれば他の水溶液を用いて実験しても良い（NaCl 2 wt%（重量パーセント）水溶液（中性）、炭酸水素ナトリウム 5 wt% 水溶液（弱塩基性）など）。



その他に思いついたものがあれば、教員や TA に相談しよう。

### 課題 13 刺激への応答

刺激に対して微生物はどのように応答したか。画像を含めて観察結果を整理し、まず定性的に検討する。可能であれば軌跡や速度などの統計的な解析も行い、特徴を示そう。

### 課題 14 応答の理由

微生物が上記で調べたような応答をするのはなぜだろうか。それは微生物の生存にとってどのような意味があるのだろうか。調べて検討・考察しよう。

参考：刺激に応じて移動する性質を走性と言い、例えば温度走性、走光性、走化性などが挙げられる。

### 発展 ミドリムシの壁面効果

薄いセルと厚いセルにおいて、ミドリムシの運動モードの種類や分布に違いがあるだろうか？流体力学相互作用や壁面効果 (p.12)、あるいは「いきもの」の観点から考察してみよう。

### 発展 自己推進粒子

このように自ら動く粒子は「自己推進 (self-propelled) 粒子」と呼ばれている。[3] 化学反応により推進力を得る無機粒子のような単純なものもあるが、広い意味では魚や人間も自己推進粒子の一種と見なせる。魚や人間などの「粒子」の運動にはどのような統計的性質があるだろうか。またそれらが混みあった際にはどのような集団運動が現れるだろうか。具体的な例を挙げ、その仕組みを考えてみよう。

### 発展 アクティブマター

自己推進粒子を含む、自らエネルギーを生み出すものにより構成される系はアクティブマターと呼ばれ、近年注目が高まっている新しい分野である。[3] 現在どんな研究がなされているか、調べてみよう。

# レポート

提出締め切り：実験最終日の一週間後ですが、その都度、指定します。

内容：i) 前半の課題 3、4 の要点のまとめ（Einstein の関係式を利用して物性値などを求める際のやり方とその理由、測定結果をまとめたもの）、ii) 後半の選択実験の結果と課題、iii) 発展課題や独自の解析・考察。i、ii は必須、iii は加点となる。試問時に不足を指摘された場合は必ず対応すること。

書き方：**科学のレポートとしてきちんと書く**ことを求めます。（「第三者に分かりやすい正確な記述」、「実験・解析結果を分かりやすくまとめる」、「論理的・科学的な考察」など。文献引用なども忘れずに。両面印刷推奨。）実験・解析手法は、テキスト通りであれば節番号などを参照するだけで構わない。ただし条件などの違いや気づいた事があれば記述する。測定・解析結果については、軌跡の数値データなど大量の生データを載せる必要はない。同様のデータは重ねてプロットする、表にまとめるなど、分かりやすく整理しよう。その際、単にデータを載せるだけでなく、内容や得られた結果について文章でも記述する。考察において文献を参考にした場合、引用と自身の考察は明確に区別する。

## 参考文献

- [1] ブラウン運動に関する文献：  
慶應義塾大学 日吉物理学教室、学生実験資料  
<http://www.sci.keio.ac.jp/gp/87B7D75A/BCC35D66/5845DCE2.pdf>;  
田崎 晴明、「ブラウン運動と非平衡統計力学」  
<http://www.gakushuin.ac.jp/881791/docs/BMNESM.pdf>;  
江沢 洋、「だれが原子をみたか」、岩波現代文庫（2013）
- [2] G. S. Perkins and R. B. Jones, *Physica A* **189**, 447-477 (1992).
- [3] アクティブマターに関する文献：  
太田隆夫、「非平衡系の物理学」、裳華房（2000）；  
Tamas Vicsek, Anna Zafeiris, “Collective motion”, *Physics Reports* **517**, 71 (2012);  
Andreas M. Menzel, “Tuned, driven, and active soft matter”, *Physics Reports* **554**, 1 (2015);  
川久保 達之、「物理学はこんなこともわからない」(2011)