7 T 超電導マグネットにより発生した 高磁場における微生物の培養^{*)}

奥田 正彦, 斉藤 一功, 神 門 剛, 伊 藤 聡, 松 本 清*
奥野 和政**, 土屋 耕治**, 阿野 貴司**, 正 田 誠**

神戸製鋼所超電導・低温技術センター 神戸市西区高塚台 1 丁目 5-5

* ジャパンマグネットテクノロジー㈱ 神戸市西区高塚台 1 丁目 5-5

** 東京工業大学資源化学研究所 横浜市緑区長津田 4259

(1994 年 6 月 23 日受理)

Bacterial Cultivation in High Magnetic Fields by 7-tesla Superconducting Magnet

Masahiko OKUDA, Kazuyoshi SAITO, Takeshi KAMIKAYO, Satoshi ITO, Kiyoshi MATSUMOTO*
Kazumasa OKUNO,** Koji TSUCHIYA,** Takashi ANO** and Makoto SHODA**

Superconducting & Cryogenic Technology Center, Kobe Steel, Ltd., 5-5 Takatsukadai 1-chome, Nishi-ku, Kobe 651-22

* Japan Magnet Technology Inc., 5-5 Takatsukadai 1-chome, Nishi-ku, Kobe 651-22

** Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 227

(Received June 23, 1994)

Synopsis :

A new superconducting magnet system for bacterial cultivation was developed. The superconducting magnet has a horizontal room-temperature bore with a diameter of 160 mm, and provides a homogeneous magnetic field of $7\text{ T} \pm 0.5\%$ for a 200-mm-long by 100-mm-diameter region. This homogeneous field region contains an incubator, where bacteria are cultivated aerobically at 10 to $70^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ while being shaken. The culture exposed to the high magnetic field is compared with a control culture incubated at below geomagnetic field strength. Cultivation of *Escherichia coli* was carried out both in homogeneous and in inhomogeneous fields, and 1.4–3.6 times the number of viable cells of the control culture was observed in a stationary phase.

Keywords : superconducting magnets, magnetic fields, bacterial growth, cultivation, *Escherichia coli*

1. はじめに

生物への磁場の影響は古くから数多く研究されているが^{1,2)}, 単純な生物である微生物に対してでさえ, 成長を促進する^{3~5)}, 阻害する^{6~8)}, 影響はない⁹⁾ など, さまざまな報告がある。これらの, 再現性がなく矛盾する結果は, 磁場, 温度, 培地などの培養条件が十分にコントロールされていないことが原因の一つである。これらの実験では磁場の発生に鉄芯コイルやヘルムホルツコイルなどの電磁石が用いられており, 均一磁場空間が試料の大きさよりも小さいために印加磁場

^{*)} 原著論文は Cryogenics Vol. 34 No. 12 に掲載予定

の大きさが不確定であったり, 温度コントロールが不十分であることがしばしば見られる。また, 鉄芯の磁化の飽和やコイルの発熱のために, 発生可能な磁場の強さはたかだか 2 T であり, テスラ領域の高磁場での実験データはほとんど得られていない。奥野らは 11.7 T と 6.4 T で大腸菌を培養した結果, 培地の栄養分の濃度に依存して磁場印加が増殖を促進したり, 抑制したりすることを見つけた^{10,11)}。さらに, λ フェージの溶菌化に対する磁場の作用に温度依存性があることを見いだした¹²⁾。しかし, 彼らの実験はフーリエ変換 NMR 分光装置を流用しており, NMR チューブ内で培養を行っていたために培養容積が小さく

Fig.1 Schematic drawing of the 7-T superconducting magnet system for bacterial cultivation. Arrows with dotted line : water circulation; arrows with solid line : reciprocating shake.

(1~2ml), 振とうできないために好気性微生物の培養に必要な酸素の供給が不足するという問題があった。

この問題を解決するために、高磁場における微生物培養のための超電導マグネットシステムを開発した。前述の実験結果を再現するために、最大の発生磁場を7Tとし、培養器の振とうを容易にするために水平方向の常温ボア（口径 160 mm）を設けた。培養システムに対するおもな要求は、1）常温空間に 0.5~7 T で直径 100 mm、長さ 200 mm の大きさの均一磁場空間（均一度 $\pm 0.5\%$ 以上）を有すること、2）50 ml のフラスコを用いて $10\sim 70^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ で好気培養を行えること、3）地磁気よりも小さい磁場で対照の培養を同時に行えることである。本報では7T超電導マグネットを応用した微生物培養システムと、このシステムによる大腸菌の培養実験について述べる。

2. 実験装置

2.1 培養システムの構成

Fig.1 に示すように、培養システムは超電導マグネット、2つの培養器（磁場印加系と対照系）、恒温水供給ポンプ、振とう機ユニットで構成されている。超電導マグネットは水平の常温ボアをもっており、中心で最大7Tの磁場を発生する。箱型の炭素鋼（C含有量0.16%）製磁気シールドがマグネットを囲っている。ボア内に置かれた磁場印加系培養器には4本の50 ml フラスコが固定されており、その中で微生物が培養される。磁力線の方向は培養液の液面に対して水平である。対照系培養器は磁場印加系と同じ4本のフラスコが固定されており、二重円筒型のパーマロイ製磁気シールドの内側に置かれている。この円筒はマグ

Fig.2 Photograph of the cultivation system.

ネットから漏れる磁場を地磁気以下の大きさに遮蔽する。ボアと円筒の内部の磁場の大きさは、それぞれの内面に取り付けられたホール素子（F. W. Bell Inc., BHT-921）により測定される。2つのループで循環する水の温度は、恒温水供給ポンプにより 10°C と 70°C の間で設定された温度にコントロールされる。循環水の温度は、ボア外の漏れ磁場が小さい場所（5~10 mT）に取り付けられた白金抵抗測温体によりモニタされる。2つの培養器は振とう機に連結されており、水平方向に往復振とうが加えられる。システムは漏れ磁場が 0.5 mT である位置（いわゆる5ガウスライン）の外に置かれた遠隔操作盤から操作され、磁場強度、循環水温度、振とう速度の測定値がパソコンに記録される。Fig.2 に開発した培養システムの写真を示す。このシステムにより、磁場を印加した場合としない場合の培養を、同じ温度条件と振とう条件で同時に行えるので、微生物の増殖に対する高磁場の影響を精密に調べることができる。

Fig.3 Calculated homogeneity distributions of the magnetic field of 7 T around the magnet center for the solenoid (a) without notches and (b) with notches. Figures indicate field homogeneity in a percentage. Four 50-ml flasks placed in the test region are illustrated on the vertical plane of the magnet bore.

2.2 超電導マグネットと均一磁場空間

高磁場空間に 50 ml のフラスコと恒温槽を配置する必要があることから、超電導マグネットの常温ボアの口径を 160 mm とした (Fig.4 参照)。マグネットの形状はノッチ付ソレノイドとし、内側の巻棒には 4 つのグレーディングのあるコイルを、外側の巻棒には 2 つの補正コイルを巻いた。超電導線には 4 種類の線径 (0.94 mm, 1.06 mm, 1.26 mm, 1.45 mm) の銅被覆 NbTi 多芯線 (銅比 3.6) を用いた。詳細なコイルパラメータは文献¹³⁾ に述べた。短尺特性試験で得られた超電導線の臨界電流値は、運転電流値 (最大 111.3 A) に対して 2 倍以上であり、クエンチに対して十分なマージンをとった。発生磁場の大きさは、運転電流値を変えることにより、数 mT から 7 T の間で可変である (最小値はマグネットの残留磁化による)。最大の蓄積エネルギーは 0.8 MJ である。コイルの回路と並列に永久電流スイッチを接続することにより永久電流

モードでの運転を可能とし、定常磁場発生時の微小な磁場変動と液体ヘリウム蒸発量の増加を抑えた。さらに、クライオスタットには 2 段小型冷凍機を搭載することにより、液体ヘリウムの蒸発量を 20 ml/h 以下にした¹⁴⁾。

均一磁場空間を大きくするために、汎用数値計算プログラム (特) エルフ, ELF/MAGIC) を用いて超電導マグネットの形状を最適化した。Fig.3 はノッチを付けた場合と付けない場合のボア中央付近での磁場分布の計算結果である。マグネットの中心での発生磁場は 7 T であり、フラスコの位置をボアの垂直断面上に示している。ノッチを付けることにより均一磁場空間が大きくなり、直径 100 mm, 長さ 200 mm の空間内で $\pm 0.5\%$ 以上の磁場均一度が得られていることがわかる。4 本のフラスコのうち中ほどの 2 本がこの空間に入っており、振幅 ± 20 mm の振とうを加えても外れることはない。 $\pm 2\%$ 以上の空間には 4 本のフラス

Fig. 4 Schematic view of the incubator. The right-hand side shows a front view of the incubator, the left-hand side shows a side view of the incubator inside the magnet bore or the permalloy cylinder.

コが入っている。

炭素鋼製磁気シールドの大きさと厚みをパラメータとして数値計算を行い、設置スペースと床荷重の許容範囲内で漏れ磁場を最小にする値（幅：1,640 mm，長さ：1,400 mm，高さ：1,640 mm，厚み：22 mm）を採用した。その結果，超電導マグネットの中心から5 Gaussラインまでの軸方向の距離は3.3 m，径方向の距離は2.8 mになった。磁気シールドを含めた超電導マグネットの総重量は，3,000 kg（マグネット：800 kg，磁気シールド：2,200 kg）である。パーマロイ製二重円筒は，透磁率の異なる2種類のパーマロイで作り，マグネットの中心から2.5 m離れた位置で，漏れ磁場が約1 mTの場所に置いた。円筒の内径と長さは中で培養器を振とうできる大きさ（外筒：208 mm ϕ ×700 mm L ，内筒：160 mm ϕ ×660 mm L ）とした。

2.3 培養器と温度コントロール

Fig. 4 に培養器の概略図を示す。箱型のポリカーボネート製恒温槽（大きさ：82 mm W ×430 mm L ×45 mm H ）に，テーパ状の内面をもつネジ付キャップにより4本のガラス製50 ml三角フラスコが固定されている。磁場印加系と対照系の2つの恒温槽には，恒温水供給ポンプから10℃と70℃の間の温度にコントロールされた蒸留水が供給される。水は恒温槽の中を一方方向に流れ，フラスコ内の培養液の温度を一定に保つ。恒温槽をでた水はリザーバタンクにいったんためられたのちにポンプにもどる。シリコンゴム製チューブでつくられた2系統のループを水が循環する。片側のループで測定した循環水の流量は，約1.5 l/minであった。熱の流出入を防ぐために，恒温槽と循環水チューブをポリエタンとポリエチレンの発泡材で覆った。2つの恒温槽は塩化ビニル製のパイプで振とう機

Fig. 5 Measured axial magnetic flux density (B) in the magnet bore when the magnetic field of 7.06 T was produced at the magnet center. Axial positions (abscissas) are expressed by a distance (z) from the middle point (E) of the magnet bore. Solid line: the maximum field gradient of 23.2 T/m; F: position with the maximum $B \cdot dB/dz$ of 130 T 2 /m.

に連結されており，循環水チューブの一部がパイプの中を通っているので，このパイプは連結のほかには断熱の役割も果している。振とう機ではモータの回転が往復運動に変換され，恒温槽に伝達される。恒温槽には硬質プラスチック（デルリン）製の車輪がついてお

Fig. 6 Measured field distributions in the homogeneous field region when 7.06 T was produced at the magnet center. ○ : magnetic flux density on the magnet-bore axis; □ : magnetic flux density at 25 mm away from the axis; △ : magnetic flux density at 50 mm. B_{av} : average magnetic flux density; r : radial position; area surrounded by dotted lines : $\pm 0.5\%$ -homogeneous field region.

り、超電導マグネットのボアとパーマロイ製円筒の内面に取り付けられたステンレス製のレール上を水平方向に動くことができる。往復振とうの振幅は ± 20 mm であり、周波数は 0~3 Hz の範囲で可変である。磁場の乱れを避けるために、培養器と連結パイプの部品は非磁性・非導電性の材料でつくった。

3. 実験結果と考察

3.1 培養空間の磁場分布

Fig. 5 は超電導マグネットのボア中心軸上の磁場分布の測定結果である (図はボアの中央から右半分の磁場分布)。マグネットの中心で 7.06 T を発生させ、軸方向の磁束密度をホール素子を用いて測定した。磁場分布はボアの中央 (点 E) 付近の均一磁場領域とそれ以外の不均一磁場領域に分けて考えることができる。Fig. 6 は均一磁場領域での磁場分布の詳細の測定結果を示す。ボア中心軸上の位置と中心軸から 25 mm および 50 mm 離れた軸上での軸方向の磁束密度 (B) を測定した。最大値 (B_{peak+}), 最小値 (B_{peak-}), それらの平均値 (B_{av}) を用いて磁場均一度を $(B_{peak+} - B_{peak-})/B_{av}$ と定義すると、直径 100 mm, 長さ 200 mm の空間で磁場均一度は $\pm 0.5\%$ 以上であることがわかる。中心磁場が 0.3 T, 1 T, 2 T, 3 T, 4 T, 5 T, 6 T の場合についても、同じ大きさの空間で均一度が $\pm 0.5\%$ 以上であることを確かめた。不均一磁場領域

Fig. 7 Measured axial magnetic flux density in the permalloy cylinder, which is compared with axial magnetic flux density without the cylinder. Axial positions (abscissas) are expressed by a distance from the end-plate of the cylinder on the opposite side of the magnet.

では勾配磁場が得られており、磁場勾配の最大値はボアの中央からの距離が 250~400 mm の位置で 23.2 T/m であった。

Fig. 7 はマグネット中心で 7.06 T を発生している時のパーマロイ製二重円筒内の磁場分布の測定結果である。パーマロイ製円筒がある場合とない場合について、ガウスメータ (F. W. Bell Inc., 9900) を用いて中心軸上で軸方向の磁束密度を測定した。円筒がある場合の磁場の大きさは 0.006~0.008 mT であるのに対して、ない場合はおよそ 1 mT である。培養器が振とうされたとしても 4 本の培養フラスコは、地磁気 (0.03~0.05 mT) 以下の磁場強度に遮蔽された空間に収まる。

3.2 培養の温度コントロール特性

はじめに設定温度 70℃ の時の室温変動による循環水の温度変化を測定した。恒温槽に断熱材を取り付けた結果、3 日間に室温が 10~15℃ で周期変動した時の循環水温度の変化幅は 0.1℃ 以下になった。その後、フ

Fig. 8 Temperature changes of distilled water in flasks after the start of shaking at 2 Hz, when the temperature (T_s) was set up at (a) 70°C and (b) 50°C. The middle two flasks in the exposed and control incubators were selected, as shadowed in the illustration.

ラスコに温度センサを挿入してフラスコに入れた蒸留水 (40 ml) の温度を測定した。センサには白金抵抗測温体 (30°Cでの感度は約 $0.4 \Omega/^\circ\text{C}$) に比べて大きい感度をもつサーミスタ (株式会社芝浦電子製作所, PT-312, 30°Cで約 $10 \text{ k}\Omega/^\circ\text{C}$) を用いた。測定前に水銀温度計を用いて較正し, 測定中は磁場の影響を避けるために磁場を発生しなかった。Fig. 8 は設定温度が 50°C と 70°C の時の磁場印加系培養器および対照系培養器の中ほど 2 本のフラスコ内の蒸留水の温度変化を示している。振とう開始から 1 時間後に温度はほぼ一定になっており, この時の温度差は設定温度が 50°C の時は 0.03°C, 70°C では 0.1°C である。各培養器の 4 本のフラスコ間のばらつきは, 設定温度 50°C の時に 0.05°C 以内であった。一般的な培養温度である 30~40°C 付近での温度差は, さらに小さいと考えられる。

3.3 大腸菌の培養

均一磁場領域内にあるボアの中央 (Fig. 5 の点 E) と中央から 250 mm 離れた不均一磁場領域内の位置 (点 F) で, 大腸菌 (*Escherichia coli* B) を培養した。振とう周波数を 2 Hz, 振幅を ± 20 mm, 培養温度を

Table 1 Results for the culture of *Escherichia coli* B in both the homogeneous and inhomogeneous field regions.*

Test region	Experiment No.		
	# 1	# 2	# 3
Homogeneous field (7 T)	1.82	1.42	1.64
Inhomogeneous field (5.2–6.1 T)	2.70	3.61	3.18

*The figures indicate the ratio of the number of viable cells exposed to the magnetic fields to that of the control at a stationary phase, which measured after 24 hours from the beginning of culture. The data show three independent experiments in each magnetic condition.

37°Cとした。用いた培地の組成はポリペプトン 10 g, イースト抽出物 5 g, 塩化ナトリウム 5 g, 蒸留水 1 l である (pH 7.0)。培養開始から 24 時間後に, 増殖定常期にある大腸菌の培養液を寒天培地上にひろげ, 現れたコロニーの数をかぞえる方法で生きた菌の数を測定した。Table 1 は均一磁場および不均一磁場を印加した場合の生菌数と印加しない場合 (対照) の生菌数の比を示している。この比が 1 より大きい場合は磁場が増殖を促進していること, 小さい場合は増殖を抑制していることを表わしている。均一磁場での生菌数は対照よりも 40~80% 大きく, 不均一磁場での生菌数は 2.7~3.6 倍大きい。一方, 増殖初期の対数期では高磁場印加による生菌数は対照の生菌数とほとんど同じであった。このことは, 高磁場印加が増殖定常期での大腸菌の死滅を抑えた結果, 生きた菌の数は磁場を印加しない場合よりも大きくなったことを示唆している¹⁵⁾。

均一磁場よりも不均一磁場の方が大腸菌の増殖への影響が大きい原因について考察する。一般に微生物の細胞は常磁性であるので, 不均一磁場では磁束密度と磁束密度の勾配の積に比例する電磁力が細胞に作用する⁶⁾。したがって, この積が大きいほど大腸菌に作用する電磁力が大きく, 増殖への影響も大きいと考えられる。点 F での磁束密度 (B) は 5.6 T, 磁場勾配 (dB/dz) は 23.2 T/m であるので, 積 ($B \cdot dB/dz$) は 130 T²/m である。これに対して, 点 E での積は十分に小さい (たかだか 0.5 T²/m)。また, 勾配磁場で

の振とう培養器に対して磁場変動を与え、これが大腸菌に作用していることも考えられる。振とうされる培養器の位置を三角関数 $z = A \sin(2\pi ft)$ で近似すると、培養器が受ける磁場変動は $dB/dt = dB/dz \cdot dz/dt = dB/dz \cdot (2\pi fA) \cdot \cos(2\pi ft)$ で表わされる。ここで、 z は位置、 t は時間、 f は振とう周波数、 A は振幅である。点Fでの周波数 2 Hz、振幅 ± 20 mm の振とうは、5.2~6.1 T の磁場変動を与え、最大の変動速度は 5.8 T/s である。

これまで、生物への高磁場の影響の研究は、おもに均一磁場 (6~11 T) でのフィブリンなどの生化学物質の磁場配向^{16~18)} や不均一磁場 (~ 30 T²/m) での赤血球の流れの変化¹⁹⁾ に焦点があてられてきた。また、変動磁場の影響は細胞内に発生する誘導電流のためであることが報告されてきた^{9,20,21)}。例えば、1 T/s の磁場変動により発生する電流は $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ と見積られている²²⁾。しかしながら、“*in vivo*”でのデータはほとんど報告されていないのが現状である。この理由の一つとして、研究に適した装置がなかったことをあげることができる。この観点から本培養システムは、単細胞生物から多細胞生物までの、いろいろな生物に対する高磁場の影響の研究に利用でき、新しい研究分野をきりひらく可能性があるといえる。

4. ま と め

7 T 超電導マグネットを応用した微生物培養システムを開発した。このシステムは、1) 常温ボア内 (口径 160 mm) の直径 100 mm、長さ 200 mm の空間に $0.5 \sim 7 \text{ T} \pm 0.5\%$ の均一磁場を発生する、2) 4本の 50 ml フラスコ内で、高磁場を印加しながら $10 \sim 70^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ で微生物を好気培養できる、3) 地磁気以下の磁場 ($0.006 \sim 0.008 \text{ mT}$) での対照培養と比較できるなどの特徴がある。さらに、均一磁場以外に勾配磁場や変動磁場も印加できる。この培養システムを用いて大腸菌を培養した結果、7 T の均一磁場では対照に比べて40~80%大きい増殖効果が見られた。5.2~6.1 T の変動磁場では2.7~3.6倍の増殖効果が見られた。これらの結果が再現性よく得られたことは、本培養システムが微生物の増殖に対する高磁場の影響の研究に有用であることを証明している。この新しい超電導マグネットの応用により、生物への磁場の影響のメカニズムが明らかになり、医薬、醸造、化学、食品など

の産業分野の発展につながることが期待できる。

参 考 文 献

- 1) 高橋不二雄：磁気と生物、学会出版センター、東京 (1984) 123
- 2) 志賀 健、宮本博司、上野照剛：磁場の生体への影響、てらべいあ、東京 (1991) 45
- 3) R. L. Moor : Can. J. Microbiol. **25** (1979) 1145
- 4) C. Ramon, J. T. Martin and M. R. Powell : Bioelectromagnetics **8** (1987) 275
- 5) W. Thiemann and E. Wagner : Z. Naturforsch. **25b** (1970) 1020
- 6) V. F. Gerencser, M. F. Barnothy and J. M. Barnothy : Nature **196** (1962) 539
- 7) E. M. Goodman, B. Greenebaum and M. T. Marron : Radiat. Res. **66** (1976) 531
- 8) C. Ramon, M. Ayaz and D. D. Streeter, Jr. : Bioelectromagnetics **2** (1981) 285
- 9) A. Thomas and P. G. Morris : Brit. J. Radiol. **54** (1981) 615
- 10) K. Okuno, T. Ano and M. Shoda : Biotechnol. Lett. **13** (1991) 745
- 11) K. Okuno, K. Tsuchiya, T. Ano and M. Shoda : J. Ferment. Bioeng. **75** (1993) 103
- 12) K. Okuno, T. Ano and M. Shoda : Biotechnol. Lett. **14** (1992) 765
- 13) T. Kamikado, M. Okuda, S. Ito, K. Saito and Y. Kawate : IEEE Trans. Magn. **30** (1994) 2218
- 14) M. Okuda, S. Ito, T. Kamikado, K. Saito, K. Matsumoto, K. Okuno, K. Tsuchiya, T. Ano and M. Shoda : Cryogenics, in press
- 15) K. Okuno, K. Tsuchiya, T. Ano, M. Shoda and M. Okuda : J. Ferment. Bioeng. **77** (1994) 453
- 16) J. Torbet, J. M. Freyssinet and G. Hudry-Clergeon : Nature **289** (1981) 91
- 17) A. Yamagishi, T. Takeuchi, T. Higashi and M. Date : J. Phys. Soc. Jpn. **58** (1989) 2280
- 18) 上野照剛、須田隆夫、岩坂正和、津田博子：電気学会論文誌, **111A** (1991) 800
- 19) M. Okazaki, A. Seiyama, N. Maeda and T. Shiga : Int. J. Appl. Electromag. Mat. **1** (1990) 173
- 20) W. Z. Fam : IEEE Trans. Magn. **17** (1981) 1510
- 21) H. Aceto, Jr., C. A. Tobias and I. L. Silver : IEEE Trans. Magn. **6** (1970) 368
- 22) T. F. Budinger : IEEE Trans. Nucl. Sci. **26** (1979) 2821