

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 10日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2009～2011

課題番号：21560163

研究課題名（和文） テーラ渦カオス混合を用いた幹細胞など未分化細胞の高効率バイオリアクタの開発

研究課題名（英文） Development of a bioreactor with high growth efficiency for an indifferent cell as a stem cell by using the chaos mixing Taylor vortex flow

## 研究代表者

河合 秀樹 (KAWAI HIDEKI)

室蘭工業大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20292071

研究成果の概要（和文）：同軸二重円筒間に満たされる流体において、内円筒（ローター）の回転によって生ずる軸方向渦列(Taylor vortex flow: TVF)は、流れの局所せん断が少なくマイルドな攪拌が可能であるため、細胞を保護しつつ高効率増殖ができるバイオリアクターや血液濾過など、新しい医療工学装置への応用が期待されている。その実用化には装置の小型化が必須であるが、上下固定端近傍の Ekman 境界層の影響が大きくなることから、流れが不安定になって様々な渦振動が生じ、流れを複雑化させる(カオス流れ)。しかし、この現象は、視点を変えれば新しい混合法にも繋がる可能性を秘めていることから、流体力学的な解析が重要である。そこで固液混相流に力を発揮する超音波計測装置(UVP法：超音波ドップラ流速法や UTDC法：超音波自己相関計測法)を用いた流れの解析を行った。特に UTDC法は安価且つ原理的には濃度計測にも発展性が期待されるが、目下 UVP法に比べて精度が不十分で、時間変化の解析が満足ではない。このため本研究では UTDC法の改良に重点をおいた。この結果、渦空間全域ではまだ不完全であるが、空間を限定すれば流れ速度の時間変化をスペクトル解析することが可能となり、UVP法と比較しても十分な精度を確保するまでに至った。本 UTDC法を細胞破壊と流れの関連性についても適用させ、一部植物細胞の藻体破壊と乱流強度についても相関が得られた。

研究成果の概要（英文）：Ultrasound velocity measuring system for a Taylor Vortex flow(TVF) was developed with a small aspect ratio, where the chaotic complicated flow was generated because of the Ekman boundary layer near the upper and lower boundary conditions. Bioreactors are one of the practical applications for an TVF which enables a milder mixing process protecting the animal cell from the damage of higher shear flows. Successive instantaneous and mean velocity profiles were obtained by using an Ultrasound doppler Velocity Profiler (UVP). An Ultrasound Time Domain Correlation method (UTDC) is another practical method for measurement of the concentration distribution in the solid liquid multiphase flows as well as the velocity measurement, however the present measuring ability is not high compared with the UVP method. In the study, we focused on the development for grading up of the UTDC measuring system and partly the spatiotemporal velocity field was carried out with the spectrum analysis of the Fourier transform, which resulted in good agreement with the one from the UVP.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：Taylor 渦，固気液分離，カオス，混相流，微生物流動，レーザードップラ流速計，超音波ドップラ流速計

### 1. 研究開始当初の背景

血液中に悪玉コレステロールが蓄積する先天性疾患の治療や、肝細胞との接触による血液浄化法においては、血球細胞と血漿を効率よく分離する技術が望まれる。このような血漿分離法は患者自身の血液を使用するため、外部からのウイルス感染や血液適合性の問題もなく、信頼性の高い医療技術として大きく発展している。しかし、現在使用される血液濾過フィルタは、中空ファイバーに代表されるように、フィルタに圧力勾配をかけ、被除去物質をフィルタ膜表面に堆積させて濾過する方法が一般的である。この方法で濾過を長時間行えば、フィルタはいずれ目詰まりを来し、圧力損失を急激に上昇させてしまうため、患者に長時間の苦痛を強いることになる。したがって、堆積層 (cake 層) をできるだけ少なくし、低い圧力損失で効率的に連続濾過できるシステムを開発することが重要である。通常の濾過であれば、cake 層を除去、あるいは堆積させないために、逆洗やインペラーによる強撹拌を用いて強せん断を発生させればよい。しかし、細胞壁を持たない動物細胞 (血球細胞や未分化細胞) を有する反応装置で、このような強せん断を施せば、殆どの細胞は破壊されてしまう。

このような問題を改善する方法の一つとして、研究代表者はTaylor渦 (Taylor Vortex Flow : TVF) の穏やかな撹拌混合に注目した濾過装置 (図 1) を提案した。図 1 はコンパクト化を考慮した試作中のTVF型撹拌装置で、内外円筒の半径差 ( $d$ ) と容器高さ ( $H$ ) の比 ( $H/d$ ) で定義されるアスペクト比 ( $\Gamma$ ) が  $\Gamma=0.5\sim 3$  と低い。TVFは、同軸二重円筒間に流体を満たし、内円筒を回転させることによって遠心力不安定から主流 (Couette流) と垂直方向に渦列が生じる現象である。TVFの流れを評価する上で他の重要な無次元数として、内円筒半径  $R_{in}$  と外円筒半径  $R_{out}$  で表わされる半径比  $\eta=R_{in}/R_{out}$ 、作動流体の動粘度  $\nu$ 、内円筒回転各速度  $\omega$  から定義される回転 Reynolds 数 ( $Re=dR_{in}\omega/\nu$ ) が挙げられる。

### 2. 研究の目的

TVF は二次渦のため渦自身の強度はあまり強くないものの、安定で簡単な装置で発生させることができ、細胞を保護培養しながら、濾過や濃縮分離を可能とするバイオリアクターへの応用が期待される。濾過に際しては、 $\Gamma=3$ 、平均粒径約  $80\mu m$  のマイクロ固体粒子を用いた模擬実験から cake 層の堆積が大幅に低減できる優位な効果も得られた (図 2)。図 2 は、

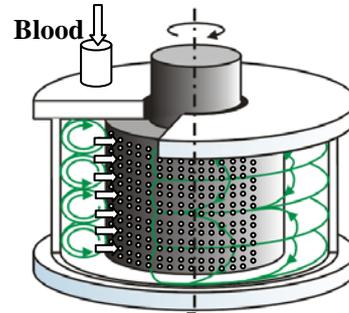


図 1 Taylor 渦型濾過装置



(a) 内円筒非回転 (b) 内円筒回転

図 2 内円筒表面の cake 層堆積状況

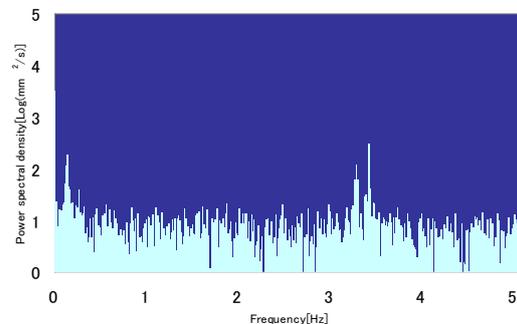


図 3 準周期流れのスペクトル図 ( $Re=2840$ )

内円筒基材 (ポリカーボネート) に多孔を空け、その上に不織布を覆ってフィルタを模擬した濾過装置で、粒子を除去物質として半径方向へ吸引濾過させた結果である。図 2-(a) は内円筒停止のまま吸引濾過した場合、図 2-(b) は  $Re=700$  前後で回転させた場合の結果である。これより、図 2-(a) ではマイクロ粒子が cake 層を形成し内円筒表面一面に堆積しているが、図 2-(b) では、付着粒子も少なく、TVF の効果が現れている。しかし、この現象の再現性は未確認で、また細胞保護効果についても時折損傷率の高い結果が出てしまう。ES 細胞 (胚性幹細胞)、iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) など未分化細胞は、成熟細胞に比べて培養中の流体せん断力によって特にダメージを受け

やすいことが指摘されており、細胞を保護しつつ、増殖、濃縮、分離濾過を行うバイリアクターの開発は急務である。

### 3. 研究の方法

基本的には、固液混相流によるカス乱流解析を主とする流体力学的なアプローチと、微生物モデルとしてせん断に弱い光合成微生物（藻体微生物）を使用したバイリアクターによる攪拌実験の二系統で進め、動物細胞への応用については適宜検討する。 $T=3$ で観察される最も安定な渦モードは正規 2セルモード（N2-mode）と呼ばれ、上下幾何学的対称性を保持する偶数個の渦列である。各種渦モードは内円筒の初期加速度を変化させることによって得られるが、実験の容易さから本方法でも N2 モードを使用する。また、TVF ではある臨界  $Re$  を超えると、渦の界面振動や自励振動が生じ、一気に速やかな混合が達成される。その重要なメカニズムはカス乱流にあると予想され、遷移過程について時空間同時計測が可能な UVP（超音波ドップラ流速法）や UTDC（超音波自己相関計測法）を使用して詳細な流動解析を実施する。ただし、現在の UTDC 法は UVP 法と同程度の時間分解能まで達していない。これが可能になれば原理的には粒子の空間濃度分布もリアルタイムで測定できるポテンシャルを持つため、この問題に焦点を当てる。また TVF バイリアクターについては装置特性が微生物に及ぼす影響も考慮して、主として藻体破壊を評価する計測法を模索する。

### 4. 研究成果

固液混相流による TVF のカス流動の測定（N2モード）については UVP 法による検討を先行させた。これより  $Re$  の増加にしたがって、流れが次第に振動し複雑になる様子（波動 TVF から準周期 TVF）が捉えられた。スペクトルの線形結合を検討した結果、基本周波数は波動 TVF で一つ、準周期 TVF で二つのスペクトルを確認した。また TVF カス流れとして注目されている低周波変調成分は本実験でも確認されたものの、後述の UTDC 法の結果と若干の差異が生じたため、まだ検討の余地が残る。

UTDC 法による速度分布と濃度分布の同時測定法の開発について、自己相関係数 0.8 では遠方でのエコー信号にノイズが乗りやすく、下部渦（下部セル）での精度が下がり、速度分布を全域で計測するには未だ課題が残った。自己相関係数を 0.90 に上昇させると精度の大幅な改善が見られるが、逆に有効カウント数が下がり、あるカウント数以下では速度データの精度がカウント数に影響される現象が現れた。この原因については未解明であり、今後の検討課題であるが、トランスジェナ（TDX）からあまり離れていない上部セルに限れば有効カウント数を維持することができるため、まずは UVP 法と同レベルの測定精度を確保し、時系列解析が可能になった。

図 3 には得られた基本周波数スペクトルの一例を

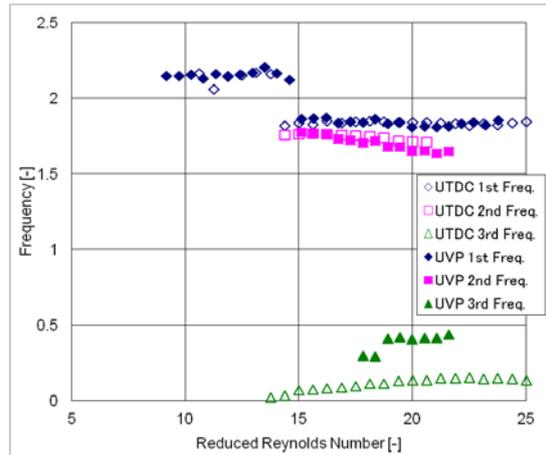


図 4 第 1～3 基本周波数の  $Re$  に対する変化

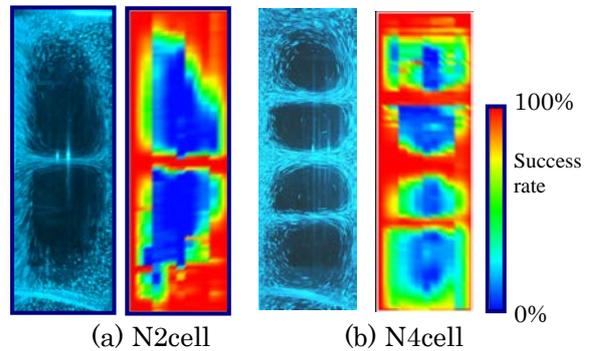


図 5 濃度分布計測(各図右:UTDC 法)

示し、図 4 には内円筒回転数で正規化された  $Re$  に対する基本周波数の変化を第三成分まで UVP 法と比較して表示した。第三成分については UVP 法と UTDC 法のそれぞれの結果に差異が見られるものの、第一、第二基本周波数は両者ともよく一致した。また、準周期解における第二基本周波数の存在は渦界面領域のみに限定されること、逆に第一基本周波数は、 $Re$  の増加とともに渦界面では消えて行くこと、など新しい知見も得られた。以上の結果は空間によって振動パターンが異なる領域が存在することを示しており、より高度な攪拌のカス混合に発展できると考えられる。

濃度分布の測定では TDX から発信する出力信号の違いから、低濃度 (50ppm) 用と高濃度 (10,000ppm) 用に分けて受信時空間分解能を試験した。濃度分布計測では自己相関係数を 0.8 に設定した場合でも、反射音波の粒子捕捉カウント数と濃度との間に良好な直線関係が得られることを確認した。これより得られた定常流における半径方向-軸方向の二次元濃度分布図は、低濃度時にレーザーシート光によって撮影された粒子濃度分布と定性的に一致し、時空間において速度と濃度分布が同時に計測できる可能性が示唆された (図 5)。ただし、前述のように自己相関係数 0.8 では速度分布

の精度に大きな問題が残る。

TVF バイリアクター内における流れの遷移過程と細胞の損傷率については、偏心内円筒を考案し、光合成微生物の細胞破碎時に槽内に分散されるクロフィル a の吸光度スペクトルと UTDC 法による速度計測から、より詳細に調べた。光合成微生物として、本実験ではせん断に弱いスピルリナ植物細胞を用い、内円筒半径  $\phi$  28mm に対して 6mm 偏心加工した内円筒を用いて乱流による細胞の損傷率を調べた。Re=100,000 で 5 日間培養した結果、従来の無偏心では細胞の損傷は殆ど観察されなかったが、偏心実験では  $\Gamma=1.0$  で 1.926mg/L 程度の損傷が観察された。これは 108mg/L の細胞増殖量に比べると約 1/100 の損傷率である。 $\Gamma=3$  では更に低い損傷率の傾向を示したが、再現性等、今後更に検証する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- (1) 野村慶太, 河合秀樹, 岡元隆典, 低アスペクト比 Taylor 渦流内における光合成微生物の増殖特性, 寒地技術シンポジウム 論文集, 査読有, vol.27, 2011, pp.137-140.
- (2) H.Miyoshi, N.Ohshima and C. Sato, Three-dimensional culture of mouse bone marrow cells on stroma formed within a porous scaffold: influence of scaffold shape and cryopreservation of the stromal layer on expansion of haematopoietic progenitor cells, J. Tissue Eng Regen Med, 査読有, in press, 2011, DOI10.1002.
- (3) Hirotohi Miyoshi, Tomo Ehashi, Hideki Kawai, Norio Ohshima, Satoshi Suzuki, Three-dimensional perfusion cultures of mouse and pig fetal liver cells in a packed-bed reactor: Effect of medium flow rate on cell numbers and hepatic functions, Journal of Biotechnology, 査読有, vol.148, 2010, pp.226-232.
- (4) 河合秀樹, 亜臨界水による植物性油脂の加水分解, 寒地技術論文集, 査読有, vol.26, 2010, pp. 176-179.
- (5) 河合秀樹, 木倉宏成, 有富正憲, 超音波計測法によるアスペクト比の小さい Taylor-Couette 渦流れの速度計測, 化学工学論文集, 査読有, vol.37, 2011, pp.85-90.
- (6) 野村慶太, 河合秀樹, 光合成微生物の限界光量並びに CO<sub>2</sub> 通気方法による増殖特性の違いについて, 寒地技術論文集, 査読有, vol.26, 2010, pp. 180-183.
- (7) 岸浪絃機・戸倉郁夫・河合秀樹・ヒムサ

ール・アムバリタ・長船康裕・鈴木淳・阿部壮史・ノル・アズラン, 寒冷地向きプロペラ型風力タービンに関する研究, 寒地技術論文集, 査読有, vol.25, 2009, pp.463-468.

- (8) 岸浪絃機, ヒムサール・アムバリタ, 河合秀樹, 媚山政良, 戸倉郁夫, 長船康裕, 鈴木淳, 佐藤和彦, 掛川徹, 船越雅人, カウンターフロー型熱交換器の性能向上に関する研究, 寒地技術論文集, 査読有, vol.25, 2009, pp.169-173.
- (9) H.AMBARITA, K.KISHINAMI, M.DAIMARUYA, I.TOKURA, H.KAWAI, J.SUZUKI, M.KOBIYAMA and A.GINTING, The Optimum Plate to Plate Spacing for Maximum Heat Transfer Rate from a Flat Plate Type Heat Exchanger, Thermal Science & Engineering, 査読有, vol.17, 2009, pp.1-8.

[学会発表] (計 19 件)

- (1) K.Nomura, H.Kawai, Immobilization of the photosynthesis microorganism in the Taylor Couette vortex flow, MIER2012, 2012, Noboribetsu.
- (2) M.Nakamura, H.Kawai, Immobilization of the photosynthesis microorganism using polyethyleneimine-coated BSP in a Taylor-Couette vortex flow, MIER2012, 2012, Noboribetsu.
- (3) 河津秀治, 河合秀樹, Taylor Couette 渦を利用した固液分離濾過性能の評価実験, 第 21 回化学工学・粉体工学研究会, 2012, 登別市.
- (4) 本間友基, 河合秀樹, 超音波によるアスペクト比の小さい Taylor-Couette 渦の解析, 第 21 回化学工学・粉体工学研究会, 2012, 登別市.
- (5) 野村慶太, 河合秀樹, 低アスペクト比 Taylor 渦流内における光合成微生物の増殖特性, 第 27 回寒地技術シンポジウム, 2011, 札幌市.
- (6) 中村恵龍, 河合秀樹, Taylor-Couette 渦バイリアクターにおける光合成微生物の固定化の効果について, 第 43 回化学工学学会秋季大会, 2011, 名古屋市.
- (7) 岡元隆典, 河合秀樹, 高橋洋志, 低アスペクト比 Taylor 渦流内における光合成微生物の増殖特性, 第 20 回化学工学・粉体工学研究会, 2011, 札幌市.
- (8) 河合秀樹, 斎藤義鷹, アスペクト比の小さい Taylor-Couette 渦の数値解析, 日本機械学会北海道支部第 49 回講演会, 2010, 札幌市.
- (9) 河合秀樹, 岡元隆典, 野村慶太, アスペクト比の小さい Taylor-Couette 渦による光合

- 成微生物の増殖特性, 日本機械学会北海道支部第 49 回講演会, 2010, 札幌市.
- (10) 河合秀樹, 長井明寛, 木倉宏成, アスペクト比の小さいTaylor渦流れの解析, 日本機械学会流体工学部門講演会, 2010, 米沢市.
- (11) 河合秀樹, 木倉宏成, 超音波によるTaylor渦固液二相流の速度と濃度計測の可能性について, 日本流体力学会年会 2010, 2010, 札幌市.
- (12) 河合秀樹, 岡元隆典, Taylor渦における光合成微生物の増殖特性について, 化学工学会第 42 回秋季大会, 2010, 京都市.
- (13) 河合秀樹, 斎藤義鷹, 木倉宏成, 超音波によるTaylor-Couette 渦の固液混合流れの速度計測, 第 38 回可視化情報シンポジウム, 2010, 東京都.
- (14) 河合秀樹, 安井砂雄, 高橋秀治, 木倉宏成, 有富正憲, Taylor-Couette 渦流れにおける光合成微生物の培養実験, 第 37 回可視化情報シンポジウム, 2009, 東京都.
- (15) 河合秀樹, 新部智由, 木倉宏成, 有富正憲, 超音波によるTaylor-Couette 渦の固液混合濃度分布の計測, 第 37 回可視化情報シンポジウム, 2009, 東京都.
- (16) 河合秀樹, 安井砂雄, 岡元隆典, アスペクト比の小さいTaylor 渦による光合成微生物の増殖特性について, 化学工学会第 41 回秋季大会, 2009, 広島市.
- (17) 河合秀樹, 小林広精, 新部智由, 超音波自己相関法によるTaylor 渦の速度分布計測, 化学工学会第 41 回秋季大会, 2009, 広島市.
- (18) 河合秀樹, 小林広精, 木倉宏成, 有富正憲, 超音波計測によるアスペクト比の小さいTaylor渦流れの解析, 日本機械学会流体工学部門講演会, 2009, 名古屋市.
- (19) 河合秀樹, 長井明寛, 井門康司, 木倉宏成, 磁性流体によるアスペクト比の小さいTaylor渦流れの数値解析, 日本機械学会流体工学部門講演会, 2009, 名古屋市.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河合 秀樹 (KAWAI HIDEKI)

室蘭工業大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：20292071

### (2) 研究分担者

三好 浩稔 (MIYOSHI HIROTOSHI)

筑波大学・人間総合科学研究科・講師  
研究者番号：70292547