

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25年 4月1日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21360192

研究課題名（和文） 光-微生物フィードバックシステムの構築と2次元培養での新機能発現

研究課題名（英文） Functionalization of microbes cultured in 2D on the newly developed optical feedback system

研究代表者

尾笹 一成 (OZASA KAZUNARI)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員

研究者番号：10231234

研究成果の概要（和文）：

遊泳性微生物をマイクロ流路中で2次元培養し、光フィードバックを施せる装置を開発した。対象微生物としてミドリムシを用い、光忌避反応を利用することによってマイクロ流路内でのセル分布を動的にパターン制御することに成功した。また、フィードバックアルゴリズムにニューラルネットワークを導入することで、最適解を複数にわたって変遷するニューロコンピューティングが実現できた。さらに、独立した複数の培養系間への相互作用の導入や化学刺激を利用したセンシングデバイスの開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：

We developed a new optical feedback system for the photoreactive microbes confined in a microfluidic device. By using the photophobic reaction of Euglena, we succeeded in the control of cell density in the micro-aquarium dynamically with arbitrary pattern. We also achieved neuro-computing by introducing neural network algorithm in the feedback algorithm, by which optimized solution can be obtained with dynamic transition. Further, we succeeded in artificial connection between two individual culture system with optical feedback as well as chemical sensing using chemotaxis of the microbes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2012年度	2,000,000	600,000	2,600,000
総計	11,600,000	3,480,000	15,080,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・システム工学

キーワード：光フィードバック、ミドリムシ、マイクロ流路、光走性、化学走性、ニューロコンピューティング

1. 研究開始当初の背景

半導体デバイスや量子構造などと異なり、バイオ材料である細胞や微生物の反応や行動は基本的に大きな揺らぎが伴う。この際の

ために、単純な物理法則として記述できる電子や粒子はデバイスとしての利用がしやすく、バイオ材料のデバイス応用は困難を伴う。培養細胞を対象とした場合、細胞の成長増殖

には揺らぎが伴い、それがセンシング安定性の問題となっていた。このような揺らぎは学術的には「複雑系」あるいは「カオス問題」として捉えられており、近年は揺らぎやカオスを積極的に利用しようとする試みがなされつつある。しかし時間発展する物理システム（系）における確率的な挙動から生み出されるのは構造を持ったカオスまでであり、生物系に見られる生存・増殖という絶対的な方向性は実現されない。方向性をもった揺らぎの現象を追求するには、哺乳動物といった高等生物ではなく、短い生命サイクルでより根源的に現象を示す微生物や細胞を材料とするのが適当であろう。これらの生物系材料の持つ性質を外部から制御したり変更したりする手段としては遺伝子改変などの生物物理学的な手法が代表的であるが、改変は一度きりのものであり、動的な制御はまったくできていない。そのため、生物材料の応用・利用はもっぱらバイオリアクターに見られる均一化生産か、あるいは医療応用に限られている。

2. 研究の目的

本研究では、生物系の時間発展システムに物理的なフィードバックを与える複合システムを構築することにより、今までバイオ工学にもシステム工学にも含まれていなかった「潜在的に方向性をもった時間発展揺らぎ」を取り上げる。代表者は半導体を主とする電気電子工学で長く研究を行ってきており、その中で制御工学の理論を新しい対象である生物系材料に適用する方策を探ってきた。外部から刺激を与えた場合の反応を微生物や細胞を対象として探る研究では、防菌や酵母反応の最適化がその代表例といえる。しかし「バイオー物理フィードバックシステム」をひとつの独立した系として捉え、その動的で可逆な時間変化を制御したり機能化したりする研究はこれまでに例がない。ここでのフィードバックはバイオ系に内在する揺らぎを積極的に増幅し、時空間的に構造をもった大きな位相遷移（phase transition）に発展させることを意図しており、単にバイオリアクターの温度を制御するようなたぐいのものではない。通常の制御システムの概念を越えた「潜在的根本的な方向性をもった時間発展揺らぎの顕在化」が目標である。

3. 研究の方法

第一段階として、「光-微生物フィードバックシステム」を構築する。「バイオー物理フィードバックシステム」のモデル実験系として、フィードバック対象となるバイオを微生物の2次元培養系とし、フィードバック信号を光パターンの照射で行うシステムを構築する。培養を顕微鏡観察下で行い、得られ

た像を情報処理して微生物群の分布と発展状態を判断し、制御信号として微生物の活動を促進（あるいは抑制）する光を照射することで、光-微生物フィードバックシステムを完成させる。

第2段階として、構築した「光-微生物フィードバックシステム」を用い、ミドリムシを対象微生物として光フィードバック機能を発揮させるための条件を決定していく。ミドリムシをシステム機能に適した形で2次元培養するため、マイクロ流路に閉じ込め構造を導入し、培養条件を探る。マイクロ流路内のセルの密度をどこまで任意に制御できるかを明らかにしていく。

第3段階として、ミドリムシの生存戦略を取り込んだニューロコンピューティングを新機能発現の例として実現することを目指す。簡単な組み合わせ最適化問題を取り上げ、微生物とのフィードバックによってどのようなコンピューティングの特徴が現れるかを明らかにしていく。

第4段階として、光フィードバック機能の展開を目指す。独立した2つの培養系を用意し、その間を光フィードバックによって結合し、人工的な相関関係を持たせた培養系を実現していく。また、ミドリムシの化学走性を利用したセンシング機能をチップ化し、微生物の新機能発現をどのように利用できるかの方向性を示す。

4. 研究成果

実験系として正立型光学顕微鏡をベースとし、それに縮小パターン光投影系を組み合わせた「光-微生物フィードバックシステム」を構築した。微生物の光反応を引き出すに足る光強度を縮小投影系で確保できた。対物レンズ10倍を基本として投影パターンの全エリアが2-3mm角になるようにできた。ビデオ観察装置を導入し、微生物の光反応を連続記録できるようにした。フィードバック制御のためのソフトウェアを既存のPCベースで開発した。構築した「光-微生物フィードバックシステム」の基本性能を、対象微生物として選定したユーグレナ（和名ミドリムシ）を使って調べた。光を照射した場合のユーグレナの基本反応（光照射を行うと遊泳速度が約10分の1に減少するなど）を実験から抽出した。実験から求めたユーグレナの光反応をモデル化し、フィードバックのモンテカルロシミュレーションを行った。16枝の閉じ込め構造を仮定し、各枝内のユーグレナの速度和を状態変数とした。ニューロコンピューティングのアルゴリズムによってフィードバックを行うと、簡単な問題（4-8-都市巡回セールスマン問題）が解けることがわかった。フィードバック系は複数ある最適解のうちのいくつかを遷移する振

る舞いを示した。その遷移の要因としては状態変数の統計的な揺らぎとフィードバック不安定性であることがわかった。粘菌を用いた同様の実験との比較を行い、生物としての方向性がどのようにフィードバック系に反映されているのか検討した結果、光に対する順応あるいは忌避エリアの構築が重要であることが判明した。

開発したフィードバックシミュレーションプログラムに修正を加え、微生物が示す光反応の感受性や耐性などに個体差がある場合について、どのような効果が現れるかを調べた。また、4都市巡回セールスマン問題において、都市間の距離が変わった場合の影響について調べた。さらに都市数を8に増やした場合、計算効率や得られる解の分布がどのように変化するのかを分析した。これとは別に、微生物の行動をノイズオシレータとみなし、光反応をノイズオシレータの振動強度に対応させた場合のシミュレーションを行った。ノイズオシレータに基づいたフィードバック計算がうまく進行するための条件を解析し、状態変数を規格化する経験式を確立した。

正立型光学顕微鏡をベースとして構築した「光-微生物フィードバックシステム」において、微生物を閉じ込めるパターン構造を作成し、閉じ込めの効率と長時間培養中の変化を調べた。閉じ込めた微生物にさまざまな条件の光を照射し、微生物の示す光反応を時間分解で解析した。その結果に基づき、フィードバック実験における最適な光強度を明らかにした。2次元培養している微生物の活動度と行動様式をビデオ観察データから数値化する方法を検討した。差分データから微生物の動きの軌跡を抽出し、その軌跡のエリア積分あるいは、軌跡の重なりエリア積分によって数値化を行った場合、光照射によってその数値がどのように変化するかを実験によって明らかにし、フィードバック実験への適用した。

ユーグレナの密度や分布を光フィードバックで制御する実験を3種類のフィードバックアルゴリズムを用いて行った。密度制御においては仮想的なエリアへのリレーフィードバック制御と区分化エリアへの照射光強度の比例制御を試み、リレー制御ではオーバーシュートが大きくなりすぎるものの、光強度の比例制御はうまく働くことを明らかにした。また、区分化エリアへ逐次パターン照射によって特定のエリアへのセルを集合させることができ、光感受性の差によってセル分離が実現できることを示せた。

微生物ユーグレナを媒介としたニューロコンピューティングを4都市巡回問題をターゲットにして検証し、最適解に到達できること、および複数の最適解の間の遷移が起

ることを実証した。ユーグレナの光反応が単純なノイズオシレータとは違い、光照射エリアのセル密度が時間とともに徐々に減少すること、それが長期安定性につながることを示した。解の分布の偏りはプロジェクターから照射している2次元パターン光の偏光依存である可能性が高いと推測できた。

PDMS製の閉鎖マイクロ流路において問題となる水分蒸発を防ぐため、カバーガラスによるサンドイッチ構造とスペースを水で満たす方を考案し、2週間以上の長期培養を可能とした。長期培養においてユーグレナの活動度はサーカディアンリズムを示した。2つの独立した培養系の間人工的なフィードバックによって相互作用をもたらすためには、光照射を制御する2台のコンピュータ間でデータ交換を行えばよいことがわかった。

ユーグレナの化学走性を利用してセンシング機能を発揮するマイクロチップ構造を開発した。化学走性を発揮させるためには、化学濃度勾配をマイクロ流路内に構築する必要があるが、これまでの流束方式やゲル方式とは異なり、定量性と長期培養性にすぐれた閉空間閉じ込め方式と多孔質ポリマー拡散とを組み合わせた新しい構造を開発した。ユーグレナをマイクロチップ内の閉空間に閉じ込め、2つのバイパス流路にテスト試料と参照試料とを流すことで、ユーグレナの化学走性を誘起し、セル分布の変化として定量化することに成功した。開発した方式ではガス試料に対する化学走性を調べられる。これをCO₂ガスを対象として実証した。

同じ閉じ込めエリアとバイパス流路を持つマイクロチップ内においてユーグレナの長期培養を試み、ミネラル成分の供給のみで2ヶ月以上の増殖培養を達成した。

以上の成果をまとめると、次のようになる。

1. 「光-微生物フィードバックシステム」を開発した。それによってマイクロ流路内に閉じ込めたユーグレナのセル分布の動的パターン制御を達成した。
2. ユーグレナの生物としての行動を新機能として発揮させたニューロコンピューティングを開発し、その機能を実証した。
3. 独立した2つの培養系の間を光フィードバックで結合することで、人工的な相互作用を導入した結合培養系を実証した。
4. 化学走性を定量性に優れたセンシング機能として発揮させるマイクロチップ構造を開発し、ガス試料にも適用できることを示した。
5. マイクロチップ内でユーグレナの長期培養を達成し、「光-フィードバックシステム」によって従来になかった新機能を発現させ、利用していくための基盤技術を完成させた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

(6) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, *Key Eng. Mater.*, 543 (2013) 431-434. "Microfluidic Gas Sensing with Living Microbial Cells Confined in A Microaquarium" (査読あり)

(5) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, *Appl. Soft Comput.*, 13 (2013) 527-538. "Euglena-based neurocomputing with two-dimensional optical feedback on swimming cells in micro-aquariums" (査読あり)

(4) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, *Int. J. Unconventional Computing*, 7 (2011) 481-499. "Implementation of microbe-based neurocomputing with Euglena cells confined in microaquariums" (査読あり)

(3) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, *LabChip*, 11 (2011) 1933-1940. "Two-dimensional optical feedback control of Euglena confined in closed-type microfluidic channels" (査読あり)

(2) K. Ozasa, M. Aono, M. Maeda, M. Hara, *Biosystems*, 100 (2010) 101-107. "Simulation of neurocomputing based on the photophobic reactions of Euglena with optical feedback stimulation" (査読あり)

(1) K. Ozasa, M. Aono, M. Maeda, M. Hara, *Lecture Notes in Computer Science*, 5715 (2009) 209-218. "Simulation of Neurocomputing Based on Photophobic Reactions of Euglena - Toward Microbe-Based Neural Network Computing -" (査読あり)

[学会発表] (計 16 件)

(1) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, "Effects of chemical diffusion through PDMS microchannels to living microbial cells", *International Conference on Biomaterials Science 2013 (ICBS2013)*, Tsukuba, Japan, 19-22 March, 2013.

(2) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, "Effects of Analog Feedback in Euglena-based Neural Network Computing - Experimental Research toward Network Optimization -", *Korea-Japan joint workshop on complex communication sciences*, Seoul, Korea, 22-23 November, 2012.

(3) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, "Microfluidic Gas/Liquid Toxicity Sensing Through The Chemotaxis of Euglena Cells Confined in A Micro-Aquarium", *16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS2012)*, Okinawa, Japan, 28 October - 1 November, 2012.

(4) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Maeda, M. Hara, "Optical Analog Feedback in Euglena-Based Neural Network Computing", *Unconventional Computation and Natural Computation 2012 (UCNC2012)*, Orleans, France, 3-7 September, 2012.

(5) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, "Chemotactic Toxicity Detection Using Euglena Cells Confined in An Isolated Micro-Aquarium", *The Sixth International Conference on Quantum, Nano and Micro Technologies (ICQNM2012)*, Rome, Italy, 19-24 August, 2012.

(6) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, "Transient Characteristics in Photophobic Reactions of Euglena gracilis", *American Society for Microbiology 112th General Meeting (ASM2012)*, San Francisco, USA, 16-19 June, 2012.

(7) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, "Microfluidic Gas Sensing with Living Microbial Cells Confined in A Micro-Aquarium", *International Conference on Materials and Applications for Sensors and Transducers (IC-MAST2012)*, Budapest, Hungary, 24-28 May, 2012.

(8) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, "Optical feedback control/analysis of photoreactive Euglena cells swimming in micro-aquariums", *15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS2011)*, Seattle, USA, 2-6 October,

2011.

(9) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, "Optical feedback control of Euglena cells in closed-type microfluidic channels", The Fifth International Conference on Quantum, Nano and Micro Technologies (ICQNM2011), Nice, France, 21-27 August, 2011.

(10) K. Ozasa, M. Hara, M. Maeda, "Possibility of incorporation of biomaterials in a hybrid device for two-dimensional optical feedback control", 13th International Conference on Formation of Semiconductor Interfaces (ICFSI13), Prague, Czech Republic, 3-8 July, 2011.

(11) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, "Analog feedback in Euglena-based neurocomputing", 10th International Conference on Unconventional Computation (UC2011), Turku, Finland, 6-10 June, 2011.

(12) J. Lee, S. Song, K. Ozasa, M. Hara, M. Maeda, "Optical feedback control of Euglena swimming in micro-aquarium", The International Symposium on Microchemistry and Microsystems 2011 (ISMM2011), Seoul, Korea, 2-4 June, 2011.

(13) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Hara, M. Maeda, "Optical feedback control of swimming Euglena in microaquariums", International Conference on Biomaterials Science 2011 (ICBS2011), Tsukuba, Japan, 15-18 March, 2011.

(14) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Maeda, M. Hara, "Toward PostNANO technology - Optical control of photoresponsive microbes confined in microfluidic structures -", Asian Conference on Nanoscience and Nanotechnology 2010 (AsiaNANO2010), Tokyo, Japan, 1-3 November, 2010.

(15) K. Ozasa, J. Lee, S. Song, M. Maeda, M. Hara, "Implementation of microbe-based neurocomputing with living Euglena" 9th International Conference on Unconventional Computation (UC10), WS-C, Tokyo, Japan, 21-25 June 2010.

(16) K. Ozasa, M. Aono, M. Maeda, M. Hara,

"Simulation of Neurocomputing Based on Photophobic Reactions of Euglena - Toward Microbe-Based Neural Network Computing -" 8th International Conference on Unconventional Computation (UC2009), Ponta Delgada, Portugal, 07-11 September 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.k-ozasa.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾笹 一成 (OZASA KAZUNARI)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員

研究者番号：10231234

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

Simon Song

Hanyang University, Korea

Professor

Jeesoo Lee

Hanyang University, Korea

Doctor course student