

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：10103

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656116

研究課題名(和文) テーラー渦によるせん断に弱い未分化細胞などの高効率バイオリアクターの開発

研究課題名(英文) Development of a Taylor vortex flow bioreactor which is suitable for the cultivation and mixing of animal cells such as the undifferentiated cells easily destroyed in a shearing flow region

研究代表者

河合 秀樹 (KAWAI, Hideki)

室蘭工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20292071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：単純な構造で安定した混合攪拌が期待されるテーラー渦(TVF)に着目したバイオリアクターの開発を目的として、浮遊増殖、固定増殖の両面から増殖特性を検討した。固定増殖における固定担体(BSPs)には、2mm角立方の多孔性樹脂を用い、モデル植物細胞にはカビと固定化用にカビを用いた。

BSPsをカビ懸濁液とともに攪拌し、増殖前後の乾燥重量差からカビの固定量(付着量)を測定した。また比較としてAeration法(気泡流動法)を実施した。これより、担体間の固定化率分布において、標準偏差ではTVFがAeration法よりも6倍以上小さく、担体間固定量の均一性が高いことが示された。

研究成果の概要(英文)：Bioreactors are one of the practical applications for a Taylor Vortex Flow system(TVF) which enables a milder mixing process protecting the animal cell like an indifferent cell from the damage of higher shear flows. The TVF system with a small aspect ratio has characteristics of spectrum chaotic complicated flow with an Ekman boundary layer near the upper and lower boundaries.

In the present, we study the mixing effect of the TVF on uniformizing the immobilization of microorganisms to the carriers. As the results, the distribution of the immobilization rate to the Bio supported polymers(BSPs) is much uniform with using the TVF bioreactor system compared with the previous aeration mixing method which is often used in the bio-mixing process. On the contrary, the immobilized absolute rate is much more in the aeration method, which is the current problem of the TVF system.

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 超音波ドップラ流速計

1. 研究開始当初の背景

血球細胞や幹細胞など、一般に動物細胞(微生物を含む)は細胞壁を持たないため流れのせん断に弱く、培養攪拌が強過ぎると却って細胞を損傷させる恐れがある。特に幹細胞など未分化細胞は、僅かな外力で容易に破壊されてしまうため、今後再生医学や医薬品生産、血液浄化バイオリアクターなど医工学分野において中核的役割を担うものの、流体力学的な機構を無視した闇雲な攪拌は致命的な打撃を与えかねない。その回避策として、従来から小さい多孔性樹脂担体(BSPs, 本研究では 2mm 角の立方体硬質スポンジを使用)の中に細胞を担持(固定化)させ、担体内で細胞を高密度増殖させつつ、外部流の強いせん断から細胞を防護する固定化法が知られている。肝細胞などは固定化法以外の方法では培養困難なものもあり、その応用価値は高い。しかし、固定化法は、担体間の増殖率に大きな斑(バラツキ)が生じるなど、増殖を制御する因子も含め未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

申請者は、これまで浮遊細胞の局所せん断を極力回避する攪拌法として、単純な装置で乱れの中にも一定の秩序を発現させ(カオス混合)、乱流への段階的遷移を有するテーラー渦(Taylor Vortex Flow, TVF; Fig.1)に着目し、超音波流速計測(UVP)などを通じてバイオリアクターへの応用を模索してきた。TVFの主渦にはその中に細胞等を内包保護する効果があると推測され、周方向に高せん断(クウェット流)が生じるにも関わらず比較的穏やかに均一混合ができ、細胞壁を保持しないスピルリナ植物微生物を使って高速攪拌しても細胞は殆ど損傷されず高い活性が維持された。Fig.2では $\phi 3\mu\text{m}$ のナイロン粒子が上部セルの中心部に捕捉(内包)されている様子が可視化されている。装置特性として、内外円筒の半径比 $\eta=0.375$ 、アスペクト比 $\Gamma=H/d=3$ を使用した。またFig.3では光合成微生物(クロレラ)を攪拌させた時の沈殿率(S)と増殖率(Q)の回転 Reynolds 数(Re)に対する結果例を示した。低回転では沈殿率が高いものの、回転数の増加にしたがって沈殿率は急速に0に近づくとともに混合が促進され増殖率が高くなる様子が観察される。

このTVF槽へ試験的に2mm角BSPsを数百個投入したところ、植物微生物の付着率が均一で斑の少ない担体を得られた。これは従来の気泡流動やスターラ攪拌の知見と異なり、固定化培養法の問題を大きく改善する可能性がある。本実験と並行させた気泡流動実験(Aeration)では大きなバラツキが生じたことから、その要因が流体力学に由来する可能性が高く、可視化や超音波計測法など流速計測技術を駆使して培養条件との因果関係を精査すれば、その主要因の解明が期待できる。

3. 研究の方法

これまで申請者は、一連の実験を通して光合成微生物を使用したTVFバイオリアクターの性能評価を実施し、(1)TVFは装置的にも局所せん断が少なく、比較的穏やかで均一な攪拌が得られること、(2)実際の細胞壁を持たない光合成微生物の浮遊培養実験においても、高速攪拌下で致命的な細胞破壊は生じていないこと、などの知見を得てきた。これらの経緯から、TVF攪拌は浮遊性微生物培養だけでなく固定化培養にも有効であると予想し、樹脂担体を数百個投入した試験実験を開始した。その結果、TVF攪拌では気泡流動法(Aeration)などに比べて担体間の増殖率を均一化する傾向を得たが、その一方で、担体への付着量の絶対値はAeration法の方がTVF法よりかなり高かった。

これらの差異は流体力学的要因に基づくことは明らかであり、その要因を調べるため、従来の再現性を含めた追試と固液(担体と流体)流速分布の計測法について検討する。

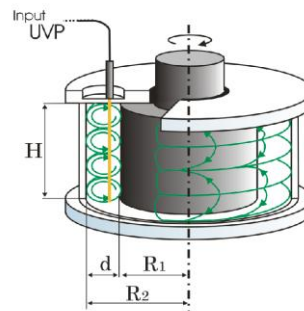


Fig.1 TVF 発生装置

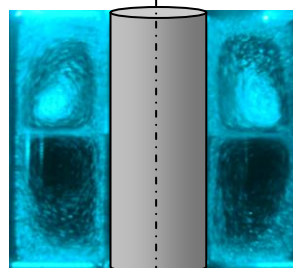


Fig.2 TVF主渦(2cell)内での $\phi 80\mu\text{m}$ と $\phi 3\mu\text{m}$ ナイロン粒子の挙動($\eta=0.375$, $\Gamma=3$, $Re=600$)

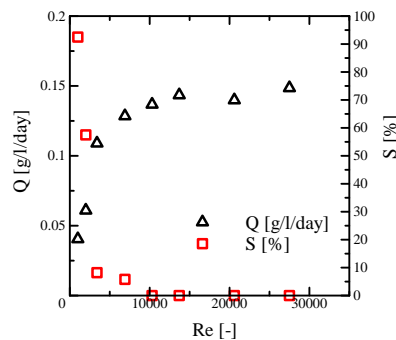


Fig.3 光合成微生物の増殖曲線(Q)と沈殿率(S)($\eta=0.375$, $\Gamma=3$)

また、固液流動と培養条件との相関メカニズムに焦点を当てて、均一且つ細胞付着量の増大を目指した TVF 攪拌による固定化培養法の可能性を探る。

4. 研究成果

担体と細胞との固定化率を高めるために用いられるポリエチレンイミン処理を植物細胞にも試行した結果、一定の効果があることが確認された。本処理後滅菌した BSPs を植物微生物(クロレラ)懸濁液とともに攪拌し、実験前後の乾燥重量差からクロレラの固定量(付着量)を測定した。また比較実験として同型装置で内円筒を静止させ、気泡(空気)を細管で装置底部に誘導してバブリングする Aeration 法も実施した(Fig.4)。空気吹込流量は 8ml/s であり、それに相当する攪拌速度(0.10 s⁻¹)は TVF の Reynolds 数換算で $Re=15,000$ となった。BSPs を 100 個投入し、その内 36 個をサンプリングした。その結果、担体間の固定化率分布において、標準偏差はそれぞれ TVF が 0.02mg, Aeration が 0.12mg であった(Fig.5)。これより TVF 攪拌では個々の固定量の均一性が高いことが示された。ただし、Aeration 攪拌では細胞固定量が不均一であったものの、全体の固定量は TVF で 0.08 mg, Aeration で 0.29mg となり、Aeration が 3 倍以上も多かった。Fig.6 は Fig.5 の結果を可視化したもので、Fig.6-(a), (b)は、それぞれ Aeration 法と TVF 法における担体間固定化率の分布を示した。これより、Aeration 法の不均一性に比べて TVF 法の均一性が明確に示されている。

Fig.7 には、TVF において BSPs 担体の孔径を変化させ、 Re に対する固定量とその粒子間の均一性について調査した。ただし、 $F=1$ 、 Re の測定範囲は $Re=30,000\sim90,000$ とし、BSPs のサンプル個数は 100 個とした。縦軸は BSPs 一個あたりの平均細胞固定量である。それぞれの孔径において Re の増加にしたがって固定量も増加した。 Re が大きいほど、BSPs の中に入る細胞も増えたためと考えられるが、ある Re を境として固定量が逆に減少している。この理由として、攪拌のせん断力が大きくなったことで BSPs から細胞が剥離してしまったことが考えられる。また、孔



Fig.4 Aeration 法

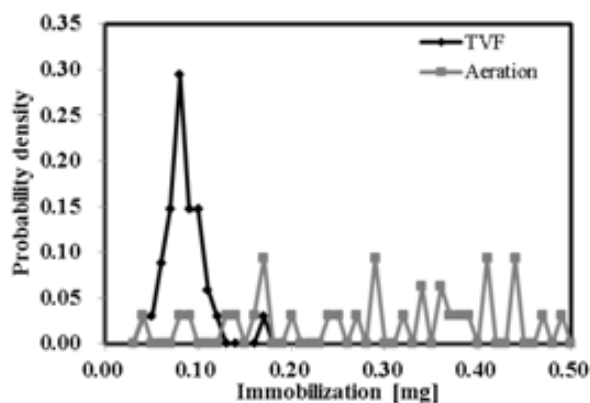


Fig.5 担体間(BSPs)の固定化率分布(正規化)



(a) Aeration 法



(b) TVF 法

Fig.6 担体間(BSPs)の固定化率(可視化)

径を変化させるとそれぞれ固定量のピークに違いが見られた。平均孔径 60 μm の BSPs では孔径が小さく BSPs の中心まで細胞が入らなかったため固定量が少なく、平均孔径 130 μm の BSPs では孔径が大きいことから剥離の影響が強くなり、固定量のピークが低くなったと考えられる。

担体の孔径の違いによって固定化率に大きな変化が生じたが、TVF の均一固定化の効果は基本的に同じであった。これより固定化率は、担体と流体の速度差に起因する流れに大きく影響されることが示唆される。しかし、

定量的な計測法については未だ中途にあり、引き続きその方法について検討する予定である。

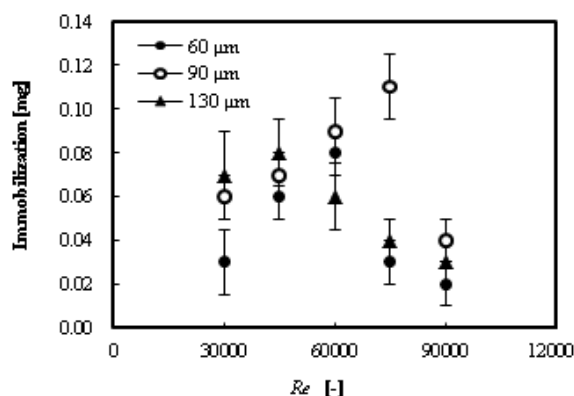


Fig.7 担体への平均固定化率の Re に対する変化

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 2 件)

- (1) 埜上洋, 河合秀樹, 八木順一郎, 小型冷間模型内に形成したレースウェイの X 線 CT による三次元構造測定, 鉄と鋼, 査読有, vol.100, 2014, pp.148-153.
- (2) H. Ambarita, M. Daimaruya, H. Fujiki, H. Kawai, H. Kobayashi and M. Oka, Crack Propagation and Remaining Life Assessment of Coke Drums Due to Thermal Stresses, Journal of Thermal Stresses, 査読有, vol.35, 2012, pp.1095-1107.

[学会発表] (計 21 件)

- (1) 鎌田宗幸, 河合秀樹, 鈴木淳, 熊谷建次, 埜上洋, 充填層内流れの圧力逆転現象, 日本鉄鋼協会第 167 回春季講演大会, 2014 年 3 月 21-23 日, 東京都.
- (2) 小林裕平, 河合秀樹, Taylor 渦バイオリクターにおける光合成微生物の増殖と藻体破壊, 第 23 回化学工学・粉体工学研究発表会, 2014 年 1 月 31 日-2 月 1 日, 札幌市.
- (3) 三好宗幸, 河合秀樹, 村川英樹, 木倉宏成, 低アスペクト比 Taylor 渦の混相流における超音波計測技術, 第 23 回化学工学・粉体工学研究発表会, 2014 年 1 月 31 日-2 月 1 日, 札幌市.
- (4) 三木千純, 河合秀樹, バイオディーゼル燃料の粘度物性と GC による精油過程の評価, 第 23 回化学工学・粉体工学研究発表会, 2014 年 1 月 31 日-2 月 1 日, 札幌市.
- (5) 河合秀樹, 菅佑介, 電磁流体の有限要素法による熱流体解析と実験, 日本機械学

会北海道支部第 52 回講演会, 2013 年 9 月 28 日, 函館市.

- (6) 山田雄大, 河合秀樹, 超音波計測による低アスペクト比 Taylor 渦の流動解析, 日本機械学会北海道支部第 52 回講演会, 2013 年 9 月 28 日, 函館市.
- (7) 赤沢悠太, 河合秀樹, 高レイノルズ数 Taylor 渦の数値シミュレーション, 日本機械学会北海道支部第 52 回講演会, 2013 年 9 月 28 日, 函館市.
- (8) Hideki Kawai, Flow Instability of a Taylor Vortex Flow for Application of Bio-reactor Systems, Joint Symposium on Mechanical-Industrial Engineering and Robotics, Nov.14-17th, 2013, Chiang Mai.
- (9) Yuta Akazawa and Hideki Kawai, Numerical Analysis of a Taylor-Couette Vortex Flow at High Reynolds number, Joint Symposium on Mechanical-Industrial Engineering and Robotics, Nov.14-17th, 2013, Chiang Mai.
- (10) Hiroki Fukui, Tsuyoshi Suzuki, Yuji Nikaido, Kyouhei Yumiba, Jun Suzuki, Hiroshi Nogami and Hideki Kawai, Joint Symposium on Mechanical-Industrial Engineering and Robotics, Nov.14-17th, 2013, Chiang Mai.
- (11) Masahiro Fukuda, Jun Suzuki, Hiroshi Nogami and Hideki Kawai, Joint Symposium on Mechanical-Industrial Engineering and Robotics, Nov.14-17th, 2013, Chiang Mai.
- (12) 河合秀樹, 三好宗幸, 木倉宏成, 村川英樹, 超音波速度計測によるアスペクト比の小さい Taylor 渦流れの流動解析, 第 91 期日本機械学会流体工学部門講演会, 2013 年 11 月 9-10 日, 福岡市.
- (13) 福田雅裕, 埜上洋, 河合秀樹, 粗粒子で構成されたオリフィスの粉体粒子通過挙動の DEM 解析, 日本鉄鋼協会第 166 回秋季講演大会, 2013 年 9 月 17-19 日, 金沢市.
- (14) 河合秀樹, 三好宗幸, 木倉宏成, Taylor-Couette 渦流れの超音波計測法について, 第 45 回化学工学会秋季大会, 2013 年 9 月 16-18 日, 岡山市.
- (15) 岡部紫苑, 河合秀樹, 山地秀樹, 中村恵龍, Taylor-Couette 渦バイオリクターにおける光合成微生物の増殖特性, 第 45 回化学工学会秋季大会, 2013 年 9 月 16-18 日, 岡山市.
- (16) 三好宗幸, 河合秀樹, 村川英樹, 木倉宏成, 超音波計測によるアスペクト比の小さい Taylor 渦流れの流動解析, 第 41 回可視化情報シンポジウム, 2013 年 7 月 16-17 日, 東京都.
- (17) 小林裕平, 河合秀樹, 山地秀樹, 中村恵

- 龍, Taylor-Couette 渦バイオリアクターにおける光合成微生物の増殖と藻体破壊について, 化学工学会 第 44 回秋季大会, 2012 年 9 月 19-21 日, 仙台市.
- (18) 河合秀樹, 三好宗幸, 埜上洋, 木倉宏成, 低アスペクト比 Taylor 渦の超音波速度計測法について, 化学工学会 第 44 回秋季大会, 2012 年 9 月 19-21 日, 仙台市.
- (19) Kun YANG, Yoshitaka SAITOH, Hideki KAWAI, Nobuyoshi TSUZUKI, Hiroshige KIKURA and Gaku HASHIMOTO, Numerical Flow Analysis of Electromagnetic Fluid Using GSMAC Finite-Element Method, Proceeding of the 20th International Conference on Nuclear Engineering(ICONE20), 査読有, July30th-Aug.3rd, 2012, Anaheim.
- (20) 河合秀樹, 三好宗幸, 木倉宏成, 超音波計測によるアスペクト比の小さい Taylor 渦流れの流動解析, 第 40 回可視化情報シンポジウム, 2012 年 7 月 24-25 日, 東京都.
- (21) 木倉宏成, 都築宣嘉, 川口達也, 河合秀樹, 南和宏, 越智英治, 有限要素法による溶融ガラス模擬流体流動シミュレーション, 第 24 回電磁力関連のダイナミクスシンポジウム, 2012 年 5 月 16-18 日, 富山市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 秀樹 (KAWAI Hideki)
室蘭工業大学・工学研究科・教授
研究者番号: 20292071