超音波による植物培養計測に関する研究

鳥居 徹・姜 昌浩*・岡本嗣男・木谷 収・高山真策**・中園敦之***

東京大学農学部 113 文京区弥生

*韓国農業機械化研究所

**東海大学開発工学部 410-03 沼津市西野

***ナーサリーテクノロジー 川崎市中原区

Measurement of Cell Mass in Bioreactor Using Ultrasonic Technique

Toru TORII, Kang Chang HO*, Tuguo OKAMOTO, Osamu KITANI,
Shinsaku TAKAYAMA**, and Atsuyuki NAKAZONO***

Faculty of Agriculture, University of Tokyo Yayoi, Bunkyo-ku Tokyo 113

**Agricultural Machinery Institute, Suweon, Korea*

***Department of Biological Science and Technology, Tokai University,
Numazu, Shizuoka 410-03*

****Nursery Technology Inc., Nakahara-ku, Kawasaki 221*

Summary

Mass culture of plant cell and tissues in a bioreactor are widely used for production of plant metabolites or seedlings. Packed Cell Volume(PCV) and Optical Density(OD) are used for off-line measurement, and Electric Conductivity(EC) and pH are used for on-line measurement of growth rate in bioreactors. In these measurement, the samples are derived from a part of a reactor, and these sample may not indicate the actual status of bioreactor, because the growth rate may change in height or radius of bioreactor.

An ultrasonic technique was used to measure the growth rate in a bioreactor. The material used were plant cell of Rice plant (*Oryza sativa*), and adventive root of *Atropa belladonna*. The frequency of ultrasonic sensors were 0.5, 1, 2, 3, 5, and 7 MHz. It was found that the attenuation of ultrasonic wave propagated through the bioreactor had linear relation with the growth rate and that the stronger attenuations were measured in higher frequencies. The velocity of waves were almost constant with the growth rate. A simple model using a wave equation was used to simulate the attenuation of ultrasonic wave in the bioreactor, and the results showed good agreement with the experiment. The ultrasonic wave can propagate across the bioreactor, and it seems that the results correspond to the actual status of the bioreactor.

はじめに

ジャーファーマンタを用いた植物の組織または細胞培養は、種苗生産、有用物質生産のために広く行われており、今後益々発展するものと考えられる。現在、ジャー内における培養速度の計

1993年12月6日

測法として、オフライン計測法では乾重量、PCV (Packed Cell Volume), OD (Optical Density) などが挙げられ、オンライン計測法では、pH, EC などが行われているが¹⁾、前者は測定に手間がかかるなどの点が問題であり、後者は原理的には間接測定であるため精度が良くない²⁾。また、ジャー内では、液内の高さ方向や直径方向によって細胞の生育状況が変化し、場所によって培養細胞濃度や培地濃度などが異なるため、ジャーから局所的なサンプリングによる計測結果は、ジャー内全体の状態を表わすとは限らないと考えられる。したがって、ジャー内の培養量をオンライン計測するためには、ジャー全体の特性を表せる計測方法が必要である。

本研究では、超音波をジャー内に伝播させて、培養濃度変化に対する超音波特性的変化を計測し、培養計測法についての可能性を検討した。超音波波動はジャー内を横断的に伝播させることが可能であるため、超音波の波動伝播特性からジャー全体の特性を明らかにすることが可能になると考えられる。

実験装置および実験方法

1. 実験材料

培養植物として、カルス細胞培養したものと、不定根を培養したものを用いた。細胞培養した植物はササニシキ種子胚から誘導したイネカルス (*Oryza sativa*) で、不定根はペラドンナ (*Atropa belladonna*) である。イネカルスは、M6 培地を用いて、300 ml フラスコにより 25°C 暗条件で振とう培養 (120 rpm) し、10 日間で継代を行った。不定根の培地は、MS 改変培地 (MS 培地成分のうち NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を 1/2 に減量し、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 を 2 倍にしたもの) にショ糖 60 g/l を添加したものを用いた。培養は、培地 150 ml を含む 300 ml 容フラスコを用いて 25°C 暗条件下で振とう培養 (120 rpm) を 30 日行った。不定根は、培養中に 1 つの塊状になるため、実験するときは、ピンセットで 5 mm 程度に小さく細分して実験を行った。

2. 実験装置および実験方法

超音波波動の減衰は、培養植物細胞あるいは組織の大きさと波長との関係で変化することが予

図1 測定用ジャーの断面図
Fig. 1 Schematic of jar for measurement

想されるため、超音波の周波数を 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 MHz の 6 種類で実験を行った。実験に用いたジャーの略図を図 1 に、計測回路略図を図 2 に示す。センサ加振方式は交流加振で、ファンクションジェネレータからの正弦波が 3 波出力されるように、パルスジェネレータで変調した。超音波は透過法で計測したため、センサを向かい合わせに相対して取り付けた。実験法としては、ジャーで培養中にオンライン計測することが望ましいが、装置の関係上オフライン計測をした。細胞培養の材料は、継代後 2, 4, 6, 8, 10 日後の材料を用いた。細胞は、静止状態では沈殿するためスターラで回転させて細胞を浮上させて計測を行った。超音波の波動は、細胞の回転によって変動が生じることが考えられるので、計測にあたっては 32 回の平均化を行った。

実験結果

イネカルの培養量(乾物重)と液中を伝播する超音波の音速との関係を図 3 に、減衰率との関係を図 4 に示す。音速は、培養量濃度に関係なく一定であった。センサ周波数によって音速の値

図 2 計測回路略図

Fig. 2 Schematic diagram of measurement instruments

図 3 各周波数における音速

Fig. 3 Trends of velocity for each sensor's frequency

が異なるのは、培養液濃度が異なるためか、測定時の液温が異なっていたために生じたものと思われる。減衰率としては、受信波形における最大振幅値で評価し、培養量が0のとき(培地だけのときの最大振幅)との比較から計算を行った。

すなわち

$$\text{減衰率} = 20 \log(v_i/v_o) \quad (\text{dB}) \quad (1)$$

v_i : 培養細胞がある溶液で計測ときの

v_o : 培地だけのときの最大振幅

その結果、減衰率は細胞の培養量濃度および超音波のセンサ周波数に大きく依存することが明らかになった。培養濃度と減衰率はほぼ直線関係であり、培養量が増加するにつれて減衰量も増加することが明らかになった。回帰直線の回帰係数と r^2 誤差を表1に示す。周波数が0.5、1 MHzでは、減衰率は培養濃度にあまり影響されないため回帰係数の絶対値が小さく、そのために誤差も大きくなっている。2 MHz以上になると培養量濃度に大きく影響を受けるため、回帰係数の絶対値が大きくなり誤差も小さくなった。これは、水中における2 MHzの超音波の波長は0.75 mmであり、一方培養細胞の大きさは0.1~0.3 mm程度である。したがって、周波数が高くなると超音波の波長が培養細胞の大きさに近づくために、波動に散乱などが生じて大きい減衰

図4 イネカルの乾重量と減衰量との関係

Fig. 4 Relationships between attenuation and dry weight (Rice plantlets)

表1 イネカルスおよび不定根の周波数特性の回帰直線の回帰係数および r^2 誤差

Table 1. Regression coefficients and r^2 errors of Rice plant and *Atropa belladonna*

Frequency (MHz)	Rice Plant		<i>Atropa Belladonna</i>	
	r^2	regression coefficients	r^2	regression coefficients
0.5	0.16	-0.012	0.85	-0.012
1.0	0.68	-0.035	0.76	-0.017
2.0	0.98	-0.157	0.97	-0.068
3.0	0.98	-0.285	0.98	-0.118
5.0	0.97	-0.654	0.98	-0.23
7.0	0.99	-0.966	0.94	-0.266

が生じたと考えられる。さらに、周波数を横軸に取った周波数特性を図5に示す。培養濃度が濃くなる時の減衰は、高周波になるにつれて大きくなることが判る。

不定根の減衰率の結果を図6に示す。これも、細胞培養と同じように、培養濃度と超音波の減衰率に直線関係が見られる。回帰係数と r^2 誤差を表1に示す。これも、イネカルの結果と同様に、低周波領域では回帰係数が小さいために誤差が大きいが、2 MHz 以上では回帰係数の絶対値が増加するために誤差が小さくなった。また、周波数特性を図7に示す。イネカルを用いたときと不定根を用いたときの減衰の大きさを比較すると、不定根の方が減衰率が大きくなっている。このことから、超音波の周波数特性から培養物のサイズまで推定できる可能性が考えられるため、今後の研究にしたい。

数 値 実 験

1. 計算モデル

今までの実験結果を解析するために、波動方程式による数値実験を行った。著者らの今まで行

図5 イネカルス培養時の周波数特性

Fig. 5 Frequency characteristic of plant cell(Rice plant)

図6 不定根の生体重と減衰率との関係

Fig. 6 Relationships between attenuation and fresh weight(*Atropa belladonna*)

図7 不定根の周波数特性
Fig. 7 Frequency characteristics of adventive root

ってきた植物体の超音波特性に関する研究から、植物細胞は大部分が水であるが、音波の非常に通りにくい性質であることが明らかになっている^{3,4)}。

したがって、培養液中に培養細胞がある系のモデルとしては、培養液中に音波を通さない物体が分布していると考えたモデルを想定して計算を行った。

一般に、液体中を伝播する波動方程式は、次式で表される⁵⁾。

$$\frac{\partial^2 p}{\partial t^2} = c_s^2 \nabla^2 p \quad (2)$$

(2)式を差分法によって計算した。差分法の計算で用いたモデルを図8に示す。

音を通さない物体を表すために、細胞があるとみなす格子点には次式の値を与えた。すなわち、これは液中に空気など音を通さない物体(以下ボイドと呼ぶ)が存在していることと同じである。

$$p_{t,i,j} = 0 \quad (3)$$

細胞は、図8における○印に示すように配置した。与えたパラメータは以下の通りである。格子サイズは200×200である。

$$\begin{aligned} c_s &= 1500 \text{ [m/s]} \\ dt &= 0.04444 \text{ [\mu sec]} \quad (\text{時間間隔}) \\ dh &= 0.1 \text{ [mm]} \quad (\text{格子間隔}) \end{aligned} \quad (4)$$

2. 計算結果

計算では、ボイドを156, 277, 400点配置して減衰率を計算した。計算結果を図9に示す。減衰率は、ボイドがないときと比べた結果である。定性的にみて、ボイドの数が大きくなるほど波動の減衰率が増加することがわかる。計算では格子サイズが小さく、20 mm角程度の大きさの中の解析しか行っていない。実験に用いたジャーは、大きさが5倍程度なので計算結果の方が減衰率がやや大きいと思われるが、これは計算時における境界条件の影響のためと考えられる。計算モデルとしては、基本的にこれでよいと思われるが、計算精度を上げるため、さらにモデルの大きさを大きくして計算する必要があると考えられる。

A : 加振点

B : 波動の観測点

○ : void

図8 差分モデル

Fig. 8 Model of numerical analysis

図9 数値計算による void と減衰率との関係

Fig. 9 Numerical solution of attenuation versus number of void

結 論

超音波の減衰率と培養濃度との間に直線関係が成り立ち、培養量の増加とともに減衰率が増加することが明らかになった。また、減衰の大きさは、周波数に依存し、周波数が高くなるほど減衰が大きくなることが明らかになった。圧電素子は 100℃ 程度であれば特性変化に影響がないため、センサを組み込んだ状態でオートクレーブに掛けることができる。本計測法は、超音波がジャー内を横断して通過するために、ジャー内に濃度分布が存在しても平均値的な値を出力結果として得ることが出来る。また、ジャーの大きさが増加しても適用できるため、培養濃度を計測す

る方法として有望であると考えられる。また、タンク内における細胞のモデルを提案して計算した結果、定性的により結果が得られた。

参 考 文 献

- 1) 高山真策：植物組織培養と計測，計測と制御，23(9)，p. 759-764, 1984
- 2) 中園敦之他：培地中 pH モニタリングによるイネ細胞増殖量の把握，植物工場学会誌，3(2)：103～110(1992)
- 3) 鳥居 徹，岡本嗣男，木谷 収：超音波を用いた農産物性の研究，第 45 回農業機会学会講演要旨，pp. 160(1986)
- 4) 鳥居 徹，岡本嗣男，木谷 収：植物の超音波特性の研究，日本音響学会平成 4 年度春期研究発表会講演論文集，p. 965～966(1992)
- 5) 鈴木浩平：振動・音響学，p. 152～158，サイエンス社(1989)