生物対流の制御とその機械への応用*

(第1報, 電場による対流制御の基礎特性)

伊 東 明 俊^{*1}, 樋 田 英 紀^{*2}, 早乙女 康典^{*3}

Control of Bioconvection and It's Application for Mechanical System

(1st Report, Basic Effects of Electrical Field on Bioconvection)

Akitoshi ITOH^{*4}, Hideki TOIDA and Yasunori SAOTOME

^{*4} Tokyo Denki University, Dept. of Mechanical Engineering,
2-2 Kanda Nishiki cho, Chiyoda ku, Tokyo, 101-8457 Japan

This study investigates how to control the stream of bioconvection. Bioconvection is a phenomenon that is autonomously generated by the high density culture media of microorganisms. In this study, "negative galvano-taxis" of microorganisms are used to control the downward stream of bioconvection. For that purpose, an array of 15 negative electrodes is installed at the top of the observation pool. The basic effects of electrical field on bioconvection was investigated. The result shows that the status of bioconvection classifies three different regions by the strength of electrical field. The lower area is "natural convection region" in which bioconvection is not changed by electrical field. Middle area is "convection control region" in which down flow stream near the negative electrode is brought to just under the negative electrode. The higher area is "forced convection region" in which the down flow stream that is generated under negative electrode dominates whole of convection stream and original bioconvection stream is disappeared. This controlled downward flow has a possibility as a driving source for micro fluid machines.

Key Words: Bioengineering, Micromachine, Bioconvection, Negative Gravi-Taxis, Protozoa, Negative Galvano-Taxis, Micro Motor Source

1. 緒 言

原生動物などの多くの微生物は、刺激に対して、一定の方向へ必ず行動する走性といわれる性質を有する。現在までのところ、走化性、走光性など様々な刺激に対する走性が確認されている⁽¹⁾が、その中の1つに、重力に逆らって上方へ泳ぐ「負の走地性」がある。この、負の走地性を持つ微生物によって数密度が高い懸濁液を作ると、多くの微生物が上方に集まり、かつ微生物が水よりも比重がわずかに重いことから、溶液密度の逆転現象が起き、Rayleigh-Taylor 不安定を経て、Benard 対流に似た模様を持つ対流が自然発生する。この現象を生物対流という。図1は、生物対流を横から観察したときの像の一例を示したものである。写真の程度が悪く判別しづらいが、溶液に白黒の濃淡ムラがあり、所々に、白い上下方向の線が見える。この白い部分は微生物が多く存在する領域であり、実際には下

降流になっている。この下降流をきっかけとして、全体としてはダブルロール状の対流が並んでおきている。図1下部に記載したのが、このときの流れの概略を示した模式図である。

この生物対流のメカニズムについては、古くから多くの生物学者や流体力学者によって調べられている⁽²⁻⁴⁾。筆者らも、過重力場における生物対流の挙動を観察し、そのメカニズムを探ってきた⁽⁵⁾。

一方、繊毛虫など多くの微生物には、溶液中に直流電場を印加すると、陰極に向かって集まる「負の走電性」なる性質を持つ。筆者らは、これまでに、この走電性を利用すれば、微生物の行動を電場により自在に

Fig.1 An example of the bioconvection observed from side direction

* 原稿受付 2000 年 7 月 17 日.

^{*1} 正員, 東京電機大学工学部(〒101-8457 東京都千代田区神田錦町2-2).

^{*2} 学生員, 東京電機大学大学院.

^{*3} 正員, 群馬大学工学部(〒376-8515 桐生市天神町1-5-1).

E-mail: aito@eck.dendai.ac.jp

制御できるのではないかと、それが可能であるなら、微生物を「生きたマイクロマシン」として工学的に利用できるのではないかと考え、研究を行ってきた⁽⁶⁻⁹⁾。その結果、ゾウリムシやテトラヒメナなどの繊毛虫類について、電場により任意経路に沿って行動を自動制御すること、繊毛虫を制御して、微小物体の移動や微小機械システムの駆動を行わせることに成功した⁽⁶⁻⁹⁾。しかしながら、多数の微生物群の行動を電場により制御する方法については、まだ検討を行っていない。

一般に、対流現象は、環境条件(容器の寸法、比重差など)により容器内の流れが自動的に決定される。

生物対流においても、通常は、容器の形状、微生物の数密度、微生物の活性などにより流れは自動的に決定される。しかしながら、生物対流に負の走電性を組み合わせれば、電場により密度分布を変化させることにより、例えば下降流を常に一定の位置から発生させ、それにより機械を駆動するといったことが可能となるであろう。

このような研究が成功すれば、現在、マイクロマシンや群ロボット研究の分野において、コンセプトが繰り返し語られている⁽¹⁰⁾、「単機能なマイクロマシンを群で制御することにより、個々のマイクロマシンでは実現できない複雑な機能を発現させる」ことについて、この実験系を使うことにより検討できるのではないかと期待される。

そこで本研究では、負の走電性を利用して、生物対流における下降流などの流れの位置を直流電場により自在に制御することが可能かどうかを検証した⁽¹¹⁾ので、以下に報告する。

2. 電位勾配に対するテトラヒメナの反応行動

本研究においては、生物対流を発生させる微生物として、テトラヒメナ(*Tetrahymena thermophilla*)を用いる。テトラヒメナは、ゾウリムシと近縁の小型の繊毛虫であり、体長は $50\mu\text{m}$ 前後である。図2にテトラ

Fig.2 Schematic diagram of *Tetrahymena thermophilla*

Fig.3 A photograph of *Tetrahymena thermophilla*

ヒメナの構造を示す模式図を、図3に、テトラヒメナの遊泳中の写真を示す。洋梨のような形をしており、細胞口は、前方(尖った方)のやや側面に位置している。繊毛は、同じ長さのものが、体軸に沿って直線的に並んで生えている。

生物対流を電場により制御することを試みる前に、テトラヒメナの走電性、すなわちテトラヒメナの各個体が直流電位勾配に対してどのような反応を示すかを、深さ 2mm 、幅 3mm のアクリル製の実験プールに炭素電極を対向して取り付けられた実験プールで調べてみた。

最初に、設定電位勾配で対抗電極間に電場を印加したときに、直流電位勾配に対して反応して陰極の方向へ泳ぎ出すテトラヒメナの割合(以下反応率とする)と、個々のテトラヒメナの遊泳速度の変化を、実験時のビデオ画像を画像処理することにより調べた。電場に対する遊泳速度の変化を図4に示す。この実験では、陰極に向かって泳いでいるテトラヒメナを無作為に50例ずつ選び、中心部 1mm の区間を通過する時間を実験画像から計測した結果から遊泳速度を算出したものである。結果として、電場に反応したテトラヒメナの遊泳速度は、電位勾配によりあまり変化せず、 $0.3\sim 0.6\text{mm/s}$ 前後の一定値であることがわかった。この速

Fig.4 Effect of the applied potential gradient on swimming speed of *Tetrahymena* (E.D.:Electrode distance)

Fig.5 Relationship between applied potential gradient and reaction ratio of Tetrahymena

度は、テトラヒメナが一秒間に体長の10倍前後の速度で泳いでいることを示すものである。すなわち、微生物についてそのスケールから一般にイメージされているように、粘性が支配する溶液内をゆらゆらと漂っているわけではなく、実際のテトラヒメナは極めて高速に溶液の中を泳ぎ回っている。

次に、電場に対する反応率の変化を図5に示す。反応率は、電位勾配 1.0V/mm 前後までは、電位勾配の増大に連れて反応率が増加するが、それ以上では反応率 80%前後で飽和することが明らかになった。

以上で得られた実験結果を、同じ原生動物であるゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の結果⁽⁶⁾と比較してみる。基本的な傾向はテトラヒメナとゾウリムシでよく似ているが、反応率がテトラヒメナの方が悪く、最終的に電場に反応しないテトラヒメナが 20%程度存在すること、遊泳中の横方向へのふれ幅がテトラヒメナの方が小さいことなどの違いがあった。振れ幅がテトラヒメナの方が小さいことには、テトラヒメナの繊毛が体軸に沿って生えているのに対して、ゾウリムシの繊毛は体軸に対して螺旋状に生えていることが、関係しているのではないかと考えられる。

また、ゾウリムシの場合、電場の印加自体は生理活性にほとんど影響を及ぼさないが、電場の印加に伴い電極近傍で培養液が電気分解する場合は、pH バランスの変化により生理活性が急速に低下することが観察されている。この現象についてテトラヒメナについても調査した結果、直流電位勾配を大きくした実験においては、電極近傍での電気分解とそれに伴う生理活性の低下が観察され、印加する電位勾配はなるべく小さくする必要があることが明らかになった。

3. 電場による生物対流の制御方法

以上の基礎データをもとに生物対流の流れを制御することを試みた。なお、生物対流の観察容器の形状は、各種のものを比較検討した結果、最終的に、L42×W3×D7mmの直方体のものを用いた。

次に、電場で生物対流の流れを制御する方法であるが、これに関しては幾通りも方法が考えられる。過去の研究⁽⁵⁾において密閉容器内で生物対流を観察していたときに、偶然容器内に上部のフタの部分から気泡が混入する場合があった。この場合、容器上部に気泡があると、テトラヒメナが酸素に対する正の走化性を持つことから、気泡のまわりに集まってくるため、気泡の下部近傍の溶液部分に存在するテトラヒメナの数密度が増加し、それにより溶液の見かけの比重が選択的に高まることになる。その結果として、気泡の下部から必ず下降流が発生しているのを何度も観察した。本研究においては、この実験事実からヒントを得て、観察容器上部のある場所に負電位を印加し、その場所に電場により選択的にテトラヒメナを集めることにより、その場所から下降流を発生させ、下降流位置を制御する方法を検討することにした。図6は、下降流の制御方法を模式的に示したものである。(a)微生物懸濁液のプール上部に陰極アレイを設置し、(b)そのうちの一つの電極に－電場を印加すると、周囲の微生物は印加した電極の近傍に集まる。(c)すると、電極下部の溶液の見かけの比重が増加する。(d)比重差により、必ず印加電極下部から下降流が発生する。

そのために、本研究では、図7にあるように、下部一面全体に炭素電極の＋極が設置してあり、上部に、径 2mm の炭素棒の－極を中心間隔 2.5mm ピッチで複数設置した構造の実験プールを試作した。複数の－極のうちの一本だけに実際に負の電圧を印加することにより、印加電極近傍にテトラヒメナを集め、そこから対流の下降流を発生させようとするものである。なお、プールの形状は上述のように L42×W3×D7mm であり、計 15 本の－極が並んで設置されている。－極の下から下降流を発生させることができれば、－極の位置を切り替えることにより、下降流位置を制御できることになる。

本方法で本当に下降流位置の制御が可能かどうか、

Fig.6 Schematic diagram of control method of downward stream

Fig.7 Basic construction of the control pool of bioconvection

Fig.8 An example of the position control experiment of bioconvection

予備実験を行った結果、実際に印加電極下部から下降流を発生させることに成功した。図8に予備実験結果の一例を示す。これは、側方から対流を観察した様子を示したものであるが、図中の中央に、白いすじが見えているのが確認できる。このすじが、印加電極の下部にテトラヒメナが集まり、その部分の溶液の見かけの比重が選択的に増加したことをきっかけに発生した、下降流である。

4. 電場による生物対流の下降流の位置の制御実験

上述のように基本的に本方法で下降流の位置制御が可能であることが確認されたため、次に、電場の印加により下降流がどのように変化するかについて調べた。

実験には、あらかじめ高密度になるように、振盪培養したテトラヒメナの懸濁液を用いる。最初に、懸濁液におけるテトラヒメナの数密度が、下降流の流速に与える影響について調べた。本観察容器では、生物対流は自然状態で、 1.0×10^6 population/ml 前後から発生するようになる。そこで、実験においては、テトラヒメナの数密度を $1.0 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^6$ population/ml の範囲で変化させることにした。

結果を図9にまとめて示す。下降流の流速は、数密度が高いほど大きくなるわけではなく、 1.3×10^6 population/ml 前後でピークとなることが明らかになった。これは、観察容器の深さが 7mm であるため、数密度が大きすぎると、テトラヒメナが容器全体に拡散してしまい、むしろ上下方向での数密度の差が小さくなってしまったためではないかと推測される。

以上の結果を踏まえ、以下の実験では、 $1.1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ population/ml の密度に調整した状態のテトラヒメナ懸濁液を用いることにした。

実験方法としては、以下の方法を用いた。(1)最初に電場を印加しない状態での生物対流を観察する。(2)その後、一本の陰極に電極に負の電圧を印加し、対流の変化挙動を観察する。(3)その際に、電圧を印加する電極に一番近い位置に発生している下降流の流速を、印加前と印加後定常状態に達した状態の2回、実験画像をもとに計測する。

実験画像からの流速の計測方法であるが、本実験では、実験画像に映っている個々のテトラヒメナの移動速度を測ることにより、流速としている。この場合、流れ自体を可視化しているわけではないので、画像処理により計測できるのは、あくまでも、テトラヒメナの遊泳速度+テトラヒメナ近傍の溶液の移動速度である。生物対流中のテトラヒメナを拡大して観察すると、上昇流の中では、テトラヒメナが上面へ向かって泳いでいる様子が観察される。よって、上昇流中のテトラヒメナの移動速度を測っても、これが上昇流の流速であるということとはできない。それに対して、下降流の中では、テトラヒメナは錐もみ状に不規則に回転しながら落下してくる様子が観察される。よって、下降流中のテトラヒメナの移動速度を測る場合は、テトラヒメナ自身の遊泳速度は平均すれば0であると扱えるの

Fig.9 Relationship between population density of suspension and downward flow speed of bioconvection

で、テトラヒメナの移動速度を下降流の流速として扱ってよいであろう。

以上をもとに、本実験では、深さ 7mm の実験容器の中央部 1mm の区間を通過するテトラヒメナの通過時間を、各条件でそれぞれ 50 例ずつ計測することにより、下降流の流速として求めたものである。

生物対流には、観察容器の形状、培養液中のテトラヒメナの数密度、テトラヒメナの生理活性が影響を及ぼすことが明らかになっている⁽⁵⁾。特に生理活性が影響を及ぼすことは、生物対流について工学的な意味での再現性を得ることを極めて困難にしている。よって、実際の計測結果を見ても、下降流の流速はかなりバラツキが大きく、流速の絶対値を比較しても、電場の影響についての傾向を把握することは困難であることがわかった。

そこで本研究では、印加前後の下降流の流速の比(=印加後/印加前)が、電位勾配に対してどのように変化するのかについて、調べることにした。図 10 に、結果をまとめて示す。

電場の印加による対流の挙動変化は、印加電位勾配により大きく 3 つに分けることができることが明らかになった。

印加電位勾配が 0.15V/mm 以下の範囲では、電場の印加が生物対流の本来の流れにほとんど影響を与えず、印加前後で生物対流はほとんど変化しない(以下、これを自然対流領域と呼ぶ)。

印加電位勾配が 0.15~0.27V/mm の範囲では、電場の印加前後で、もともとの生物対流がそのまま継続するが、印加前に一極から最も近い位置に発生している下降流を電場により一極の下に移動させることができる(以下これを対流制御領域と呼ぶ)。

Fig.10 Ratios of the downward flow speed before/after the application of potential gradient

電位勾配が 0.27V/mm 以上の範囲では、印加電極下部に発生する下降流が、容器全体の流れを支配し、元の生物対流は消滅する(以下これを強制対流領域と呼ぶ)。

以上のように、電場の印加により下降流の位置を制御することが可能な条件が存在すること、容器の中の流れを電場により発生する対流により支配することもできることが明らかになった。なお、0.4V/mm 以上の電位勾配の領域では、電極近傍で溶液の電気分解が発生し、pH 変化によりテトラヒメナが急速に衰弱する。また、電場制御の最適値が走電性の基礎実験の値より大幅に小さい理由としては、この実験では負の走地性+負の走電性を計測していること、電極の形状が非対称であることより、一極近傍の電位勾配が実際には表示値(印加電圧/電極間距離)よりも大きくなっていることなどが理由として考えられる。

なお、前述のように、生物対流の中では、テトラヒメナは、水中を上昇していくときは、自らの遊泳によって上昇するが、対流の下降流の中では、溶液の下降に巻き込まれるように、ランダムに回転しながら下降していく様子が観察されている。よって、今回の実験結果において電場の印加により下降流の流速が増加したことは、直流電場により下降流中のテトラヒメナの溶液に対する遊泳速度が増加したことを示しているのではなく、電場により上部に集まるテトラヒメナの数が増え、上部と下部の溶液の比重差が大きくなったということを示している。

5. 結 言

以上の制御した下降流を、マイクロ流体機械の駆動源として利用する可能性について調べるために、感光性樹脂を用いて直径 0.5~3mm の微小水車を製作し、実際に生物対流の下降流により駆動する実験を行ってみたが、水車は下降流によってわずかに動くのみで、連続的に水車を回転させることはできなかった。これは、水車を駆動するには、下降流の流速が最大 1.2mm/s 前後と小さすぎること、水車に効率よく下降流を当てるほど下降流の位置決め精度がよくないことが原因であると考えられる。今後の研究で、これらの点を解決し、微小機械の駆動源として生物対流を利用する方法についてさらに検討していきたい。

また、本研究により電場により生物対流の流れを制御可能な条件があることを見いだしたわけであるが、このことは、微生物を中心に考えると、「生きた群れロボット」を制御することにより、機械システムを構築しているとも捉えることができる。また、微生物懸

濁液を流体として考えると、電場により自在に流れを制御できる知能性流体であると捉えることができ、これを利用すれば、固体により流路制限する構造を持たない、すなわち「形のないマイクロ流体機械」を実現できる可能性があることを、本研究は示すものである。

最後に、本研究を行うにあたり有益なるご助言をいただいた、早稲田大学三輪敬之教授、共に研究を行った卒研学生、太田淳君に、深甚なる感謝の意を表する。

文 献

- (1) 内藤豊, 単細胞動物の行動, UP バイオロジー選書, (1994), 東京大学出版会
- (2) Wagner H., Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B 201, (1911)
- (3) Plesset M. S. and Winet H., Nature, 248, 29, (1974) 441-443
- (4) Hill N. A., Pedley T. J. and Kessler J. O., J. Fluid Mech., 208, (1989) 509-543
- (5) 伊東明俊, 他 3 名, 機論, B 編, 65, 630, (1999) 698-705
- (6) 伊東明俊, 機論, C 編, 65, 631, (1999) 1078-1084
- (7) 伊東明俊, 他 2 名, 機論, C 編, 67, 655, (2001) 775-781
- (8) 山崎悟史, 他 2 名, 第 17 回日本ロボット学会学術講演会 RSJ'99, 予稿集第 1 分冊, (1999), 207-208
- (9) 天野則和, 他 2 名, 日本機械学会ロボティクスメカトロニクス講演会 RoboMec'00, (2000), 2P1-64-106
- (10) 例えば, 福田敏男, 光岡豊一, 夢のマイクロロボット, テクノライフ選書, (1995), 90-91, オーム社
- (11) 樋田英紀, 伊東明俊, 日本機械学会第 75 期通常総会 講演論文集 (1) (1998) 577-578