

円盤回転型バイオリアクターでの微細領域におけるせん断力の解析

Experimental analysis of shear stress at a local area in a disk rotating bioreactor

田子 大輔 (埼玉大院) 平原 裕行 (埼玉大院) 川橋 正昭 (埼玉大院)
K. Hourigan (Monash 大)

Daisuke Tago, Graduate School of Science and Engineering, Saitama University
Hiroyuki Hirahara, Graduate School of Science and Engineering, Saitama University
Masaaki Kawahashi, Graduate School of Science and Engineering, Saitama University
Kerry Hourigan, Monash University, Australia

Abstract

Stem cell culture becomes a key technology for the medical treatment of patient and implant technology. In this process, the cell size and the rate of necrosis is influenced on the fluid dynamical condition, such as maximum flow velocity, shearing stress, Reynolds stress, etc. According to the previous report, the cell size was determined by the turbulence of the flow, in which the Kolmogorov's scale becomes important parameter in cell culture. In the present study, velocity measurement was carried out in whole flow field and local area. From the experimental results, it was shown that the fluctuation of velocity and vorticity had Kolmogorov's scale. The estimated shear stress obtained from the velocity distribution showed a good agreement with the previous investigation.

Keywords: Bioreactors, Kolmogorov's scale, Stem Cell Culture, Low Reynolds number, Shear Stress, PIV Measurement

1. 緒論

近年、細胞培養に関する研究はその大きな可能性から、積極的に多くの研究が行われている。中でも ES 細胞や神経幹細胞 (NSC) 等の細胞の培養の研究は注目を集めている。細胞培養には様々な形式の培養器が用いられている。最も多く用いられているのはフラスコ型の攪拌器である。Sen らはこの培養器を用いて細胞培養を行い、実験における流体力学的な諸条件と細胞成長との関連について詳しく報告している。彼らは、媒体中の乱れと細胞成長との関連に着目して、乱れの程度をコルモゴロフの渦スケ

ールで表し、これと細胞成長および壊死の割合との関連を調べてまとめた。彼らの報告によれば、細胞培養の過程において、その集積径が大きくなりすぎると中心部分に栄養が行き渡らず壊死が発生し最終的に細胞全体が死に至り、それを防ぐためには集積径をおよそ 200 μm 程度以下に抑える必要があるという結果が得られている。この集積径を制御するための方法としてコルモゴロフの渦スケールを基準にして制御を行うことが重要であるとの結論を得ている。Fig1 に Sen らによる結果を示す。図は細胞集積径 D_{MAVG} とコルモゴロフの渦スケール η との関係が線形の関係にあることを示している。

Fig1 から分かるように D_{MAVG} は η の値よりもわずかに小さな値を示している。これにより、乱れのスケールが細胞の集積径を直接に決定していることが推定できる。このプロセスにおける、細胞成長に影響を及ぼす物理的なパラメータは、実験的に求められているが、細胞の成長にとって、如何様なる流体力学的なストレスが影響を及ぼすかを明らかにすることで、さらに高度な細胞培養が可能となるであろう。実際、細胞の成長においては、様々なストレスが作用する。例えば、温度、光、栄養の過多、不足、酸素の過多、不足、流体力学的応力とその周期的変動力などが挙げられる。これらの要素を一つ一つ解明することで、健全な細胞の培養技術が確立されなければならない。流体力学的な応力につ

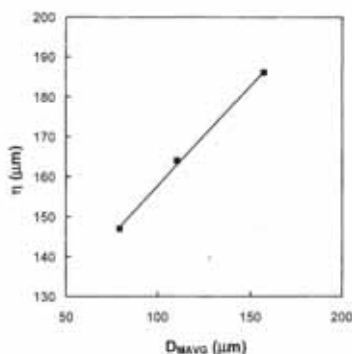


Fig.1. Relation of Kolmogorov's eddy scale, η and the maximum mean aggregate diameter of NSC aggregates

いて、Hourigan らは、回転容器を用いて、様々な Re 数における容器全体のせん断力を実験的に求めてい。本研究においても、Hourigan らの実験と同様な装置を用いて実験を行い 培養容器内の細部の流れ構造を実験的に詳細に求め 瞬時瞬時のせん断応力を求めて 流体力学的ストレスの大きさとストレスの空間的な分布及び周波数を求めることを目的として PIV 解析を行ったので、ここに報告する。実験の条件としては、回転容器内の渦がブレイクダウンす臨界 Re 数近傍における流れを対象として実験を行い、微小な領域の平均速度と瞬時速度から、せん断力分布を詳細に求めた。

2. 実験装置及び方法

図2に、本研究で用いた実験装置の概要を示す。バイオリアクターを模擬した円筒回転攪拌容器は、底面が回転するタイプのリアクターであり、円筒容器の半径は $R = 50\text{mm}$ である。円筒回転容器は透明アクリル製で、リアクターの容器の高さは $H = 100\text{mm}$ である。従って、高さと円筒容器半径とのアスペクト比は2である。底面円盤は、容器外部のモーターに連結されており、モータはインバータによって回転数を制御している。リアクター容器は、水を満たした直方体の容器内に沈めてあり、撮影時の屈折率の影響が最小となるように設定している。

速度計測は粒子画像計測法(PIV)を用いて行った。光源はツイン Nd:YAG レーザであり、出力は 50mJ/pulse 、波長は 532nm である。画像撮影には CMOS カメラ(IDT 社, SharpVision 1400, 1360×1036 pixels, 10bit)を用いている。PIV の解析は、IDT 社、

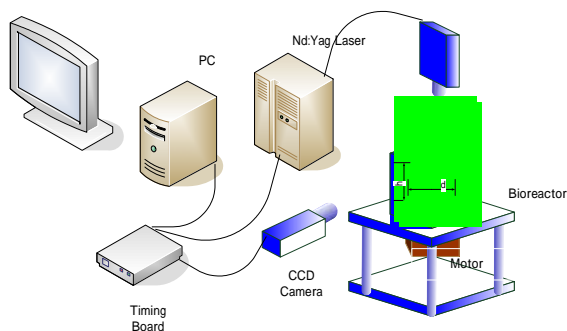


Fig.2 Experimental apparatus

ProVision を用いて行った。バイオリアクターの試験流体は水であり、トレーサー粒子には直径 $20\ \mu\text{m}$ のナイロンビーズを使用した。

実験は、底面回転円盤の回転数を $20\ \text{rpm}$ として行った。これは、事前に行った可視化実験によって、容器内の流れに変動が見られる条件である。この時の、円盤の周速度は $V_{ref} = 0.1\text{m/s}$ であり、この速度と容器半径をもとにしたレイノルズ数は、

$Re = 5236$ である。すなわち、このレイノルズ数は、臨界レイノルズ数よりも若干大きな値となる。コルモゴロフの渦スケールは、先に述べたように重要な実験パラメータであり、この大きさを基準にして、今回の実験の検査領域の大きさを定めている。コルモゴロフの渦スケールは、よく知られている次式を用いて概算

した。

$$\frac{\eta}{R} = 3.16 \times Re^{-\frac{3}{4}} \quad (1)$$

今回の実験条件における η の値を上式により求めると、およそ $260\ \mu\text{m}$ となる。

3. 実験結果及び考察

3.1 全領域の流れ

初めに全体の流れを把握するために行った、全領域の速度計測

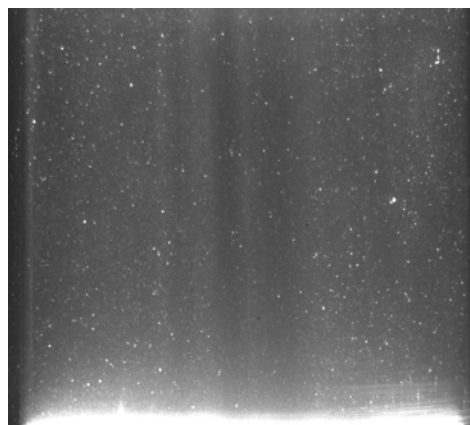


Fig.3 Raw image of PIV measurement showing whole

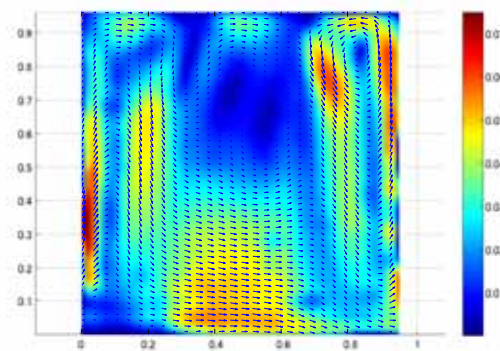


Fig.4 Velocity vectors of mean flow in a disk rotating bioreactor. $n = 20\ \text{rpm}$, $H/R = 2$, $Re = 5236$.

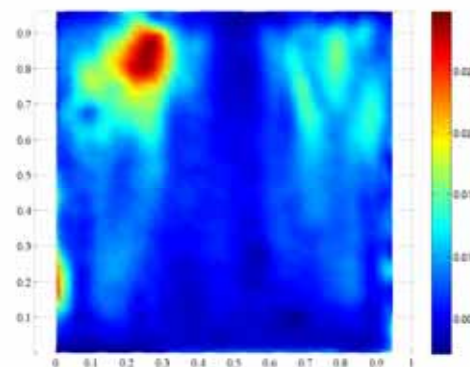


Fig.5 RMS distribution of velocity W in a disk rotating bioreactor. $n = 20\ \text{rpm}$, $H/R = 2$, $Re = 5236$.

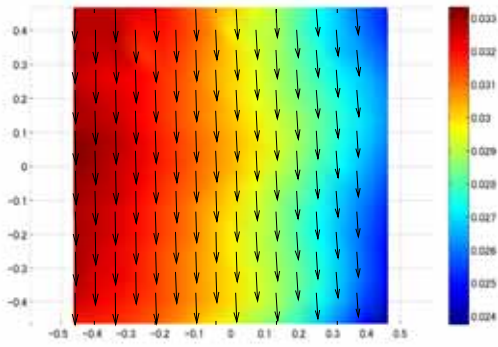


Fig.6 Mean velocity vectors and contour at $x/D = 0.35, y/D = 0.45$

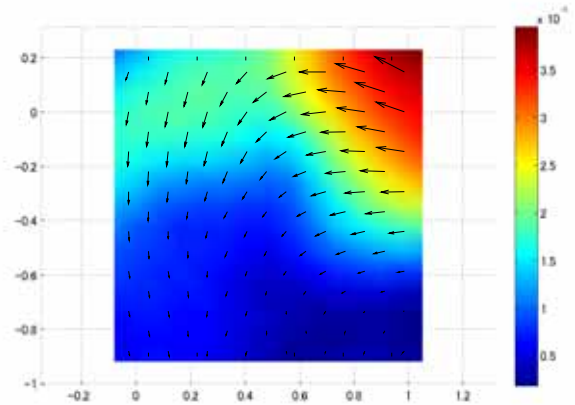


Fig.9 Mean velocity vectors and contour at $x/D = 0.35, y/D = 0.70$ Velocity Vectors and

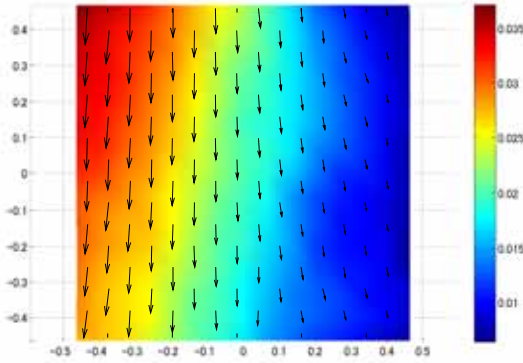


Fig.7 Instantaneous velocity vectors and contour at $x/D = 0.35, y/D = 0.45$ Instantaneous Velocity .

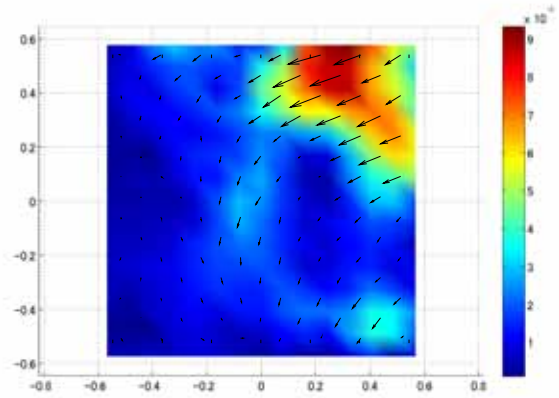


Fig.10 Instantaneous velocity vectors and contour at $x/D = 0.35, y/D = 0.70$.

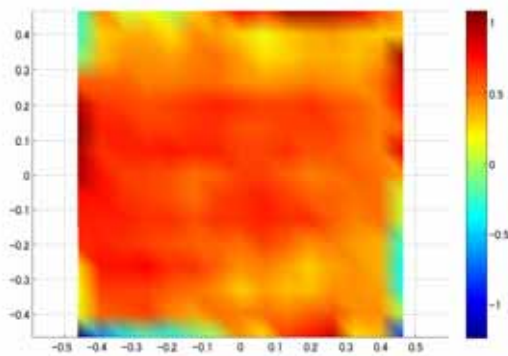


Fig.8 Instantaneous vorticity at $x/D = 0.35, y/D = 0.45$

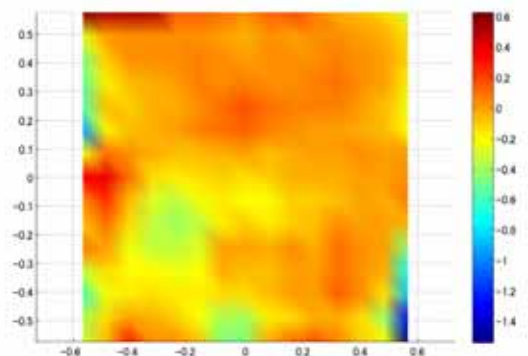


Fig.11 Instantaneous vorticity at $x/D = 0.35, y/D = 0.70$

結果を以下に示す . PIV 計測におけるペア画像の撮影間隔は 20ms であり , 250 ペアの画像を取得して速度回復を行い , それらの平均から全領域にわたる平均速度場を求めた .

図 3 は , PIV 計測により得られた粒子画像の一例である . 測定断面は回転中心軸を通る中央断面である . 粒子画像から速度回復

し , 250 ペアの速度ベクトルの平均を取って得られた結果を図 4 に示す . また , それらから根 2 乗平均を取って得られた分布を図 5 に示す . 基本的な流れは , 底面の円盤の回転によって , 回転円盤状に速度境界層が形成され , 円盤の底面上に境界層が形成される . 特に , 円盤の境界層において形成される回転中心から周囲に

向かう流れと、回転中心上を下降する流れが発生し、らせん状の旋回流れを形成する。従って、この断面での観測で半径方向 r と回転軸方向 z の速度成分を計測した場合、流れが軸対称であれば、速度ベクトルは回転軸に対して対称でなければならないが、計測された流れは、非対称性を示している。これは十分な時間平均が得られていないためであるが、基本的に対称渦構造が崩壊していることを確認するには十分である。今回は、この速度分布を元にして、速度変動成分の大きい領域を対象として計測を行うこととする。

3.2 局所流れの観察

計測対象は、図 5 の結果から、 $(x/D, y/D) = (0.35, 0.45)$ および $(0.35, 0.70)$ の点を左下の原点とする 1 辺 5mm の正方形領域である。今回の実験では、IDT 社製 XS-4(512x512 pixels, 10bit) を用いて撮影を行った。ペア画像の撮影時間間隔は 12ms であり、1 回の撮影において 500 ペアの画像を取得して処理した。

$(x/D, y/D) = (0.35, 0.45)$ における平均速度のベクトルおよびその大きさのカラーコンターを図 6 に示す。流れは全領域にわたって下向きである。図 7 と 8 は、この領域での瞬時データの一例である。誤差範囲は、移動距離の計測精度を 0.1Pixel 以内としたとき、代表的な速度の移動量を 5Pixel としているので、およそ 2% 程度の大きさとなる。瞬間的な速度場は、ここに示されたように、相当に変動していることが明らかである。これらの変動の振幅と周波数を詳細に把握することが今回の実験の目的である。図 8 には、図 7 の速度場における瞬時の渦度を示した。渦度の分布に見られる変動の空間スケールは、およそ $0.1D$ 程度であると判断できる。

同様に、数点の局所領域を計測した。図 9 から 11 は、 $(x/D, y/D) = (0.35, 0.70)$ における同様な解析結果である。この領域では、平均速度場からわかるように、流れが回りこんでいる場所であるので、前の場合よりも速度変動は大きい。図 11 に見られるように渦度の分布にも明確な変動が見られる。この場合にも渦のスケールは $0.1D$ 程度、すなわち $500\mu\text{m}$ 程度であると判断することができる。

次に、せん断応力に関して算定を行った結果について述べる。図 12 及び 13 は、地式によって速度ベクトルの測定結果から算出したせん断応力の分布を示す。

$$\tau_{xz} = \mu \left(\frac{\partial W}{\partial x} + \frac{\partial U}{\partial z} \right)$$

図 12 では、下向きの流れながら局所的に強いせん断力 ($8.0 \times 10^{-4} \text{ Pa}$) が発生している他、せん断力の力の向きも一定ではないのでこれらの力の成分の変化が細胞に大きなストレスを与え悪影響を及ぼす事が考えられる。次に図 13 を見ると、図 12 と比べてせん断力の変化の幅が小さく中心部では平均的に $1.0 - 2.0 \times 10^{-4} \text{ Pa}$ のせん断力が発生している。これらの値は、Hourigan らが行った実験結果と比較しても、オーダー的により一致を示しており、結果は妥当であると考えられる。しかしながら、今回の計測では、空間分解能が不十分であり、応力分布が十分な解像度で得られたとはいえない。今後、更に詳細に

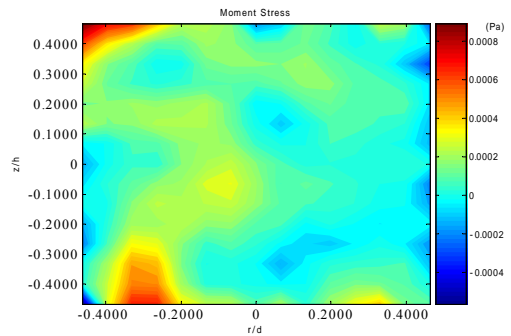


Fig.12 Shear stress at $(x/D, y/D) = (0.35, 0.40)$

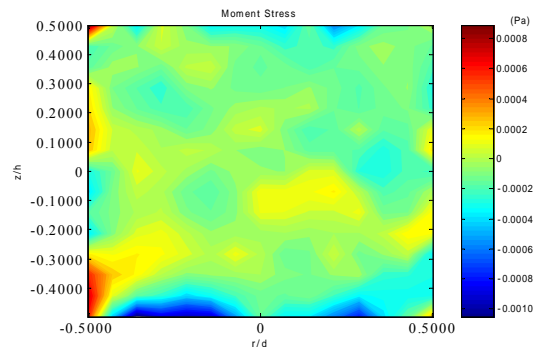


Fig.13 Shear stress at $(x/D, y/D) = (0.35, 0.45)$

分析を行っていく必要がある。

6. 結言

回転円盤型バイオリクター内の全領域流れの構造および局所領域の詳細な速度計測を行って、時間平均速度ベクトル、瞬時速度ベクトル、速度の RMS 分布、渦度分布、ならびにせん断応力分布を求めた。得られた結果を以下に示す。

1. 細胞培養において壊死が発生し始めるとされる Re 数近傍でのバイオリクター内の流れを解析した結果、流れは不安定で変動を伴っていることが実験的に明らかとなった。
2. 細胞に及ぼされる流体力学的なストレスとしてせん断応力成分を速度計測から求め、その局所空間的な分布を求めた。空間的な分布は $500\mu\text{m}$ の変動で求められ、応力の大きさは過去の報告とほぼ一致した。

参考文献

- 1) A. Sen, M. S. Kallos, L. A. Behie: Expansion of mammalian neural stem cells in bioreactors: effect of power input and medium viscosity, Development brain Research 134 (2002) 103-113
- 2) J.Dusting, J.Sheridan and K. Hourigan: Flows Within a Cylindrical Cell Culture Bioreactor with a Free-Surface and a Rotating Base, 15th Australasian Fluid Mechanics Conference
- 3) A. Sen, M. S. Kallos, L. A. Behie: Effects of Hydrodynamics on Cultures of Mammalian Neural Stem Cell Aggregates in suspension Bioreactors, Ind. Eng. Chem. Res. 2001,40,5350-5357
- 4) A. Sen, M. S. Kallos, L. A. Behie: Passaging Protocols for Mammalian Neural Stem Cells in Suspension Bioreactors, Biotechnol.Prog.2002,18,337-345