

光学式センサーの利用による培養工学の新展開の可能性

岡本 和久*・鈴木 武士・富田 悟志

近年、生物工学の分野での光学式センサーの応用範囲が急速に広まりつつある。光による計測は時間的な分解能や空間的な自由度が高く、非接触・非侵襲的であることから、試料の状態を変えずに測定が可能である。本稿では、光学測定技術（濁度、溶存酸素濃度、pH、二酸化炭素濃度）の原理とその応用の可能性についていくつかのデータをもとに紹介する。

非接触濁度計 OD モニター

基本原理 微生物の培養分野において、一般的に培養液の濁度（OD）が細胞数の増加の指標として用いられる。タイテックは三角フラスコを旋回振とう培養、あるいは試験管を往復振とう培養しながらODを非接触で測定する装置を開発した。本装置はODをリアルタイムで測定することにより、従来行われてきた試料採取・測定のプロセスに伴う作業の負担、培養の一時停止による悪影響（溶存酸素の枯渇など）、コンタミネーションのリスクを低減することを可能にする。

この装置は振とう条件下における揺らぎを持った液体に光を照射し、透過光や反射・散乱光の変化量と分光光度計で測定したODとの関係式を構築し、それぞれの状態で測定した光量の変化から分光光度計での一般的な測定条件でのODを算出する。照射光に赤外光を用いることで、室内光下での測定が可能となる。装置としては培養容器サイズごとに異なるものが必要となる（図1）。

試験管での測定 試験管培養におけるOD測定においては、往復振とうにおいて、試験管の径や液量、振とう角、振幅、振とう速度といった要素を組み合わせた振とう条件ごとにODの変化に伴う赤外線透過光変化の関係式を構築した（図2, 3）。

それぞれの式に基づき、ODのリアルタイム測定を行った。その結果、大腸菌や酵母菌、枯草菌など幅広い生物種においてODのリアルタイム測定が可能であり、分光光度計による測定値と一致することを確認できた（図4, 5）。装置では希釈済みOD値との関係式から計算しており、測定可能濃度の全範囲で一致したODを計算できている。

小型フラスコにおける測定 培養に頻繁に用いられる小型振とうフラスコの直径はφ65～φ108 mmと、分光光度計の測定セル（10 mm）に比べて大きいために静置状態では培養液の濁度が少し上昇した段階で光が透過しなくなる。しかし、旋回振とう培養中には培養液はフラスコの内面に薄く引き延ばされた状態となり、この状態であればある程度の濁度まで光を透過することが可能となる。この状態において試験管と同様にさまざまな振とうパラメータを組み合わせた振とう培養条件ごとにODと透過光の変化量の関係式を作成した（図6）。

実際にODのリアルタイム測定を行ったところ、大腸菌をはじめとして幅広い生物種において分光光度計によ

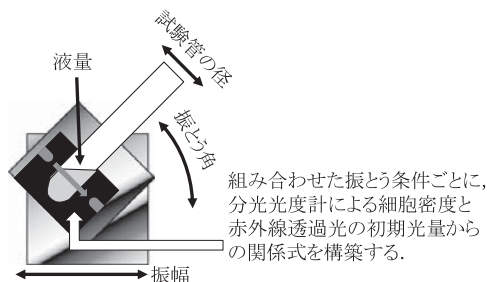


図2. 試験管用ODモニターの測定原理

	OD-C&T	OD-A&S	OD-B&L
容器	φ16.5mm、18mm 試験管	100/200/300/500ml ガラスフラスコ	1/1/2/3/ ガラスフラスコ
振とう方法	往復	旋回	旋回
振とう速度	100～250r/min	80～400r/min	120～250r/min
測定方法	透過型	透過型	透過・反射型
測定範囲	OD.0.01～2.55	OD.0.01～2.55	OD.0.04～9.99

図1. 培養スケールに対応した機種と測定方法

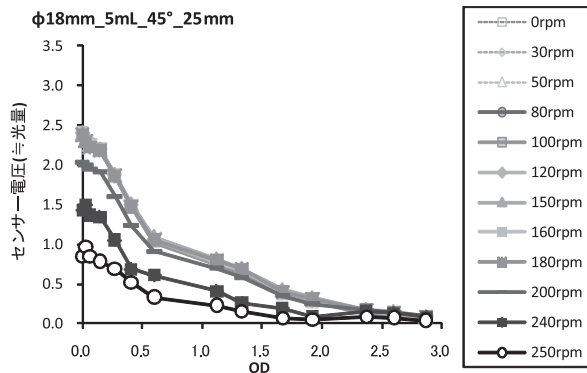


図3. 試験管用におけるODと透過光量の関係性

* 著者紹介 タイテック株式会社科学機器開発部（開発グループ・リーダー） E-mail: okamoto1@taitec.org

る測定値と一致することを確認できた(図7)。

大型フラスコにおける測定 1~3lの大型三角フラスコでは、培養初期を除いて透過光を通すのが不可能である。このような状態ではおもに反射光からODを計算する方式が有効となる。それぞれの振とう条件におけるODと反射光、透過光の関係式を構築して反射光量の変化からODを計算できるようにし、反射光量の低い低OD域での測定と、反射光量の補正に透過光による測定を用いる方式でODの計算を行った(図8)。

実際にODのリアルタイム測定を行ったところ、ODが4を超えるような高濃度域に至るまで、分光光度計を用いた測定値(高濃度域では希釈し)と一致することを確認できた(図9)。

その他の培養容器における測定と応用 振とう培養など揺らぎや気泡を含んだ流体における透過光や散乱光からODを測定するという手法は、上記の実用化されたもの以外にも応用しうるものであり、予備試験においてはバッフル・フラスコや坂口フラスコ、ジャー・フェーマンターにおいても測定可能であることや、振とう中の液体の測定光に対する位置を調整することでOD20に至るきわめて高いODも測定が可能である知見も得られている。

リアルタイム測定方法の開発は、多検体からの高増殖株の選抜や、抗生物質の耐性菌の選抜への貢献が期待さ

れる他、ポンプや振とう培養機の温調プログラムと連動させることで、連続培養、IPTG誘導によるタンパク質発現や培養後の細胞回収の自動化が期待される(図10)。

蛍光消失時間式センサー

動物細胞および微生物培養を利用した物質生産では、溶存酸素濃度やpHが細胞の状態を評価する重要な指標である。プレセンス(株)の酸素濃度計は、蛍光が酸素の存在により減衰するクエンチング現象を利用し、蛍光の強度・寿命より酸素濃度を測定できる。

この濃度計では試料に触れている蛍光物質に対して、励起光の強さを正弦波で振動させることにより、励起光も振動することになる。この励起光の位相の遅れから酸素濃度を計算している(図11)。また、pHや二酸化炭素の測定も同じ原理で測定することが可能である^{1,2)}。

これらの光学式センサーは、従来の電極式センサーと比べて多くの利点を有する。酸素を消費せず、低濃度や長時間の酸素濃度測定が可能(最高感度1ppb)であり、低酸素環境が要求される幹細胞の分化や腫瘍細胞の研究に最適である。センサー部の形状も多様性があり、測定対象によって使い分けることで安定した測定環境が作り出せる。測定領域はセンサー測定部の径のみに依存し、最小0.1mmサイズの測定ユニットを用いれば極微小領域での測定が、シリンジ型の測定部などを用いれば実験動物

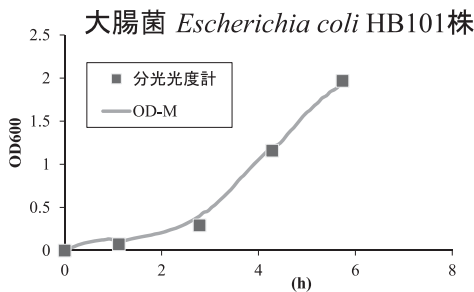


図4. 大腸菌試験管培養における測定

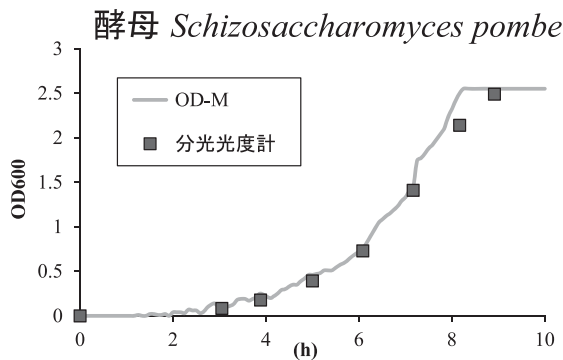


図5. 酵母菌試験管培養における測定

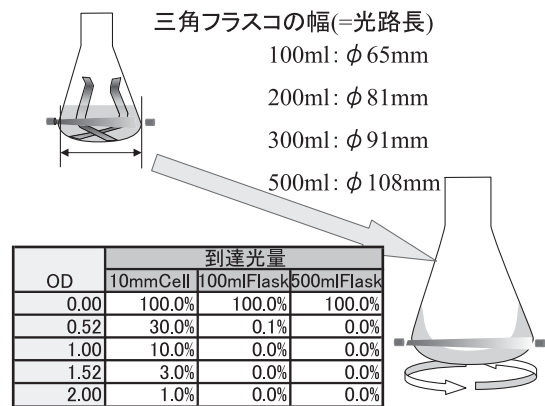


図6. 小型三角フラスコにおける測定原理

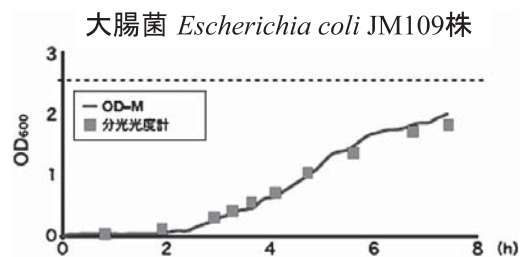


図7. 小型三角フラスコにおける測定の例

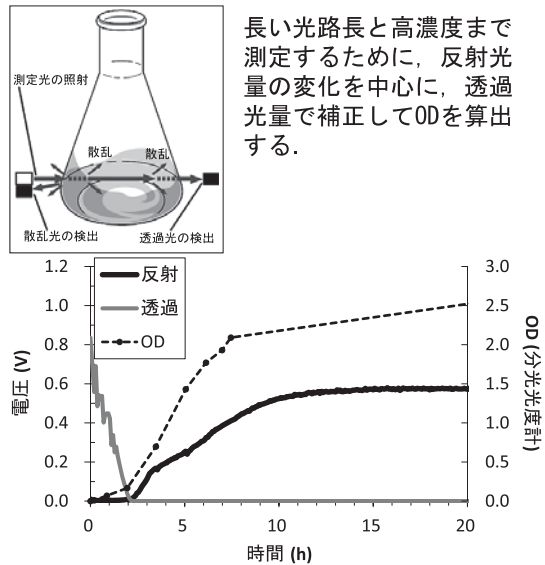


図8. 大型三角フラスコにおける測定原理

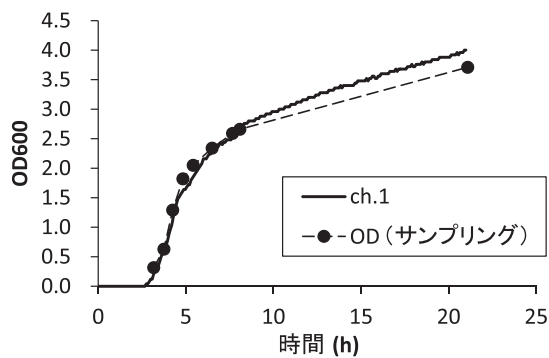


図9. 大型フラスコにおける測定例

の臓器や細胞から生存したままでの測定が可能となる。

さらにセンサー部位と検出部位が分離できることから、滅菌可能なセンサーチップを容器内部に貼り付け、容器外から読み取る非接触センシングも可能である。本用途では、既存の測定システムとは異なり、培養容量や培養容器に依存しない測定ができることからバイオプロセス開発の自由度を上げ、特にコンタミネーションの危険性を伴う動物細胞では有用である(図12)。

まとめ

光半導体や、レーザー技術の進展や生物学に有用な蛍光物質の実用化などによる光学式センサーの測定対象と方法の進展により、実験動物の酸素濃度測定をはじめ、測定困難であったことが、煩雑なシステムを要せず測定可能となっている。今後さらに重要性を増す培養工学が光学式センサーの新技术の導入と用途提案により新たな展開を迎えることに貢献したい。

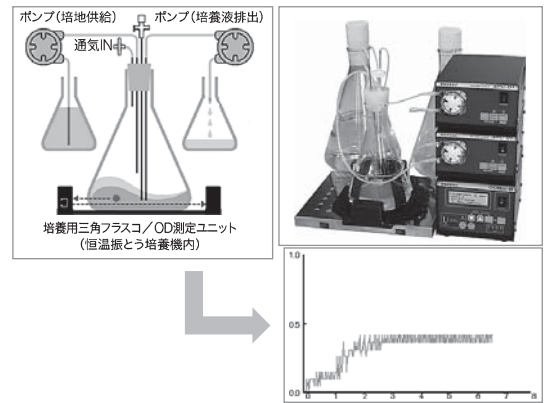


図10. 非接触濁度計を用いた連続培養系の例

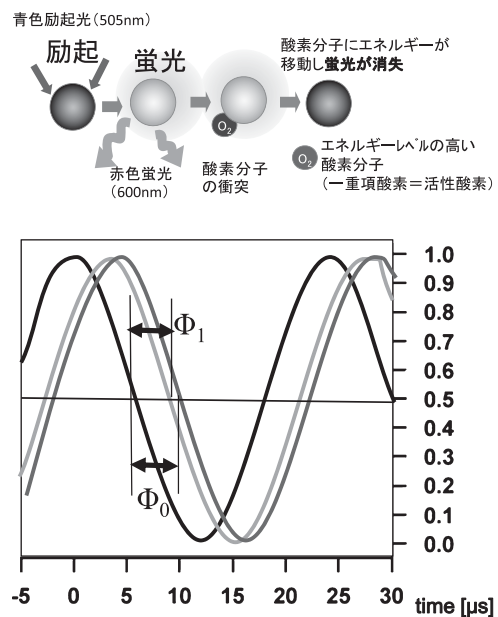


図11. 蛍光消失時間式センサーの原理

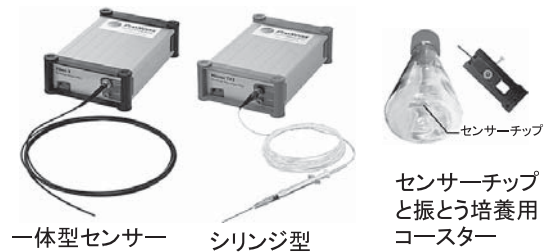


図12. 蛍光消失時間式センサーのバリエーション

- 1) Wolfbeis, O. S. et al.: *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, Vol. 1&2, CRC, Boca Raton (1991).
- 2) Klimant, I. et al.: *Limnol. Oceanogr.*, **40**, 1159 (1995).