

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21113

研究課題名（和文）全方位非接触界面による革新的バイオリアクターの開発

研究課題名（英文）Development of innovative bioreactor having omnidirectional contactless interface

研究代表者

松原 輝彦（Matsubara, Teruhiko）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・准教授

研究者番号：10325251

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：超音波による音響浮揚技術を基盤とし、化学物質および生理活性物質を取り扱うリアクターとしての実装を試みた。超音波の定在波の節で捕捉された液滴内で酵素活性やプラスミド核酸の構造が維持され、酵素反応が進行することを確認し、生命活動ができる可能性を示すことができた。さらに捕捉させた大腸菌は増殖能が維持され、細胞外マトリクスが残存した動物細胞は細胞塊の生成が高速化されることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果は、この浮揚システムが化学・生物系で初めての無容器反応システムとして活用できることを示している。この技術はSDGsに適合するとともに、宇宙空間などの微小重力環境での液体の振る舞いを地上で疑似的に再現できている。本研究で取り組む無容器反応技術は、化学・生物学研究環境における革新的な次世代リアクターとしての活用が期待出来ることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Based on levitation technique using an ultrasonic waves, we tried to implement a floating droplet as a chemical and biological reactor that handles chemical compounds and biological substances. The enzymatic reaction proceeded in the droplet trapped at a standing wave node of the ultrasonic wave, and plasmids was not disrupted by levitation; these results indicate that cells can live in the droplet. Furthermore, it was indicated that the levitated E. coli has proliferating ability, and the animal cells in which the extracellular matrix remained has accelerated the formation of cell mass.

研究分野：音響浮揚ケミカルバイロジ

キーワード：定在波 音響波 浮揚 非接触界面 バイオリアクター 超音波 無容器反応 音響放射圧

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学および生物学研究を行う場合、百年以上前からガラス、金属、陶器などの素材による反応容器が用いられてきた。しかし近年、特に分子生物学の台頭により、反応容器はプラスチックに置き換わっており、研究者1人あたりが排出するプラスチックごみは、年間数十キロと試算されている。もし無容器反応が実現すれば、持続可能な開発目標 (SDGs) に適合する。

また、化学物質や生体物質などの反応対象物を溶液中で相互作用させる場合、対象物が容器材料表面と接触し、変質や濃度の減少などが起きる可能性がある。この対象物と容器間の相互作用を最小限に抑えるための表面処理などの工夫が必要となる。反応容器に依存しないリアクター、また細胞内および生体内を模した実験条件の確立が様々な分野で望まれる。

さらに2021年から、民間人の宇宙旅行者数が加速し、今後は宇宙ステーションなどの微小重力環境での研究が容易になると考えられる。微小重力環境での液体は球状となるが、その振る舞いやその活用法を研究する例はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

本研究では液滴を空中に浮揚することにより、容器材料と接触する界面がどこにもない全方位非接触界面での革新的リアクターの実現を目指す。化合物や生体物質、大腸菌や動物細胞などを水滴に入れて浮揚させることにより、反応容器材料との接触がない新規な反応場として利用できる可能性がある。超音波の音響放射圧を反射板にあてることにより液滴を浮揚させ、安定に水溶液を空中に浮揚させる技術を確立する。

浮揚した液滴中において有機合成反応、高分子反応、酵素反応、タンパク質発現などが可能であると考えられ、また細胞培養やウイルス感染などを行うことも期待できる。さらに宇宙空間などの微小重力環境での液体の振る舞いを地上で疑似的に再現できる。

本研究で取り組む無容器反応技術は、化学・生物学の研究環境を変える革新的技術になることが期待できる。

3. 研究の方法

液滴の浮揚技術の基盤とし、化学物質および生理活性物質のリアクターへの適用を実装することを目指し、既存の試験管内や培養フラスコ内と比較してその利点や優位性などを検証するほか、材料に接着して変性しやすいタンパク質などの取り扱いや生理活性の測定を想定した。

(1) 装置の構成および物性研究

本課題では、超音波を反射板にあてることにより定在波を発生させ、その節の位置に音響放射圧で液滴を浮揚させる技術を用いた。ランジュバン型の振動子 (60 kHz) を有する試作機を利用した (図1)。凹型ホーンと反射板を垂直方向に設置することで定在波を形成することが可能である。

基礎的な物性研究のため、浮揚液滴の容量、溶媒の粘度 (表面張力) などを検討した。また、溶媒は時間経過とともに蒸発するため、溶媒の補給および湿度などの浮揚環境を検討した。

(2) 生理活性物質の活性測定

タンパク質を浮揚液滴内に入れて、生化学反応が進行するか検証した。具体的には、酵素ペルオキシダーゼと基質を混合させ、発色する反応の進行 (発色過程) を動画で観察した。また制限酵素とプラスミドベクターの反応を行い、アガロースゲル電気泳動などでDNAの切断反応を確認した。これらの実験は液滴内でタンパク質や核酸が正常に生理活性を維持できるかの検証であり、細胞が生命活動を維持する可能性を示すことが期待できる。

(3) 動物細胞の培養 (培地中での捕捉)

本研究は空気中での液体の浮揚を目標の1つとしているが、この浮揚 (捕捉) 現象は液体中でも可能である。そこで浮揚液滴内での培養を目的とする基礎研究として、動物細胞を培地中で捕捉した場合の影響を調べた。動物細胞を培地中で捕捉し、その細胞塊を形成させ、培養への影響および3次元培養の可能性を検討した。

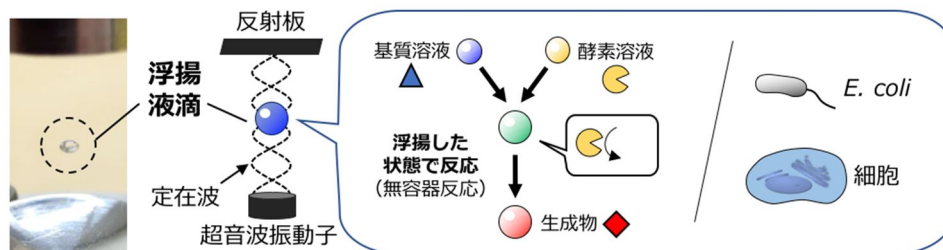


図1 本課題で用いた音響浮揚装置。超音波を反射板にあてることにより定在波を発生させ、その節の位置に音響放射圧で液滴を浮揚させた。

4. 研究成果

(1) 液滴可能な液滴量とその間隔について

波長 λ (m) 空気中の音速 c (340 m/s) 周波数 f (Hz) とすると、 $\lambda = c/f$ の式より 60 kHz における波長は 5.67 mm と計算できる。つまり、この音響浮揚装置は 2.8 mm ($= \lambda/2$) 間隔で定在波の節を形成し、この距離間で物体を浮揚させることができる (図 2A)。また、純水では最大 20 μL 程度まで浮揚可能であったが、容量の限界は表面張力に依存すると考えられる。安定して浮揚可能な純水の液滴量は 1~10 μL であった (図 2B)。

また、液滴を長時間浮揚させるために、リアルタイムで監視する装置の開発に着手した。カメラを用いて液滴を監視し、1 時間以上浮揚させることに成功した。

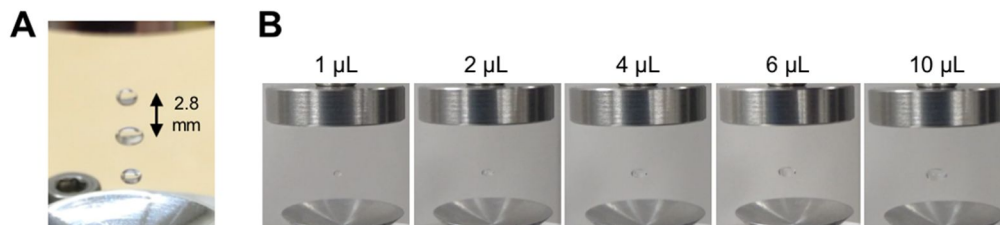


図 2 (A) 浮揚間隔は波長 λ の 1/2 の 2.8 mm。(B) 浮揚量 1~10 μL の様子 (文献^[1])。

(2) 生理活性物質の活性測定

薬物開発やセンサーを開発する実験において、ウイルスやタンパク質が反応容器やセンサー表面などに非特異的に結合して失活し、正確な生理活性評価を妨げることが課題の 1 つとなっている。容器材料との望まない相互作用を避けるため、本研究は材料との「接触そのものを行わない」という発想で行なった。タンパク質を用いた酵素反応および DNA を浮揚液滴内に入れて、生化学反応が進行するか検証した。

酵素ペルオキシダーゼと基質を混合させ、発色反応の進行を動画で撮影し、色の変化の過程をリアルタイムで追跡することに成功した (図 3A)。またプラスミドベクターの制限酵素による切断反応を浮揚液滴内で行い、アガロースゲル電気泳動でその切断を確認できた (図 3B)。さらに、DNA が破断するなどのダメージがないことが明らかになった。これらの結果は、浮揚させてもプラスミドや核酸の構造が維持され、酵素反応も大きく活性を失うことなく進行することを意味する。

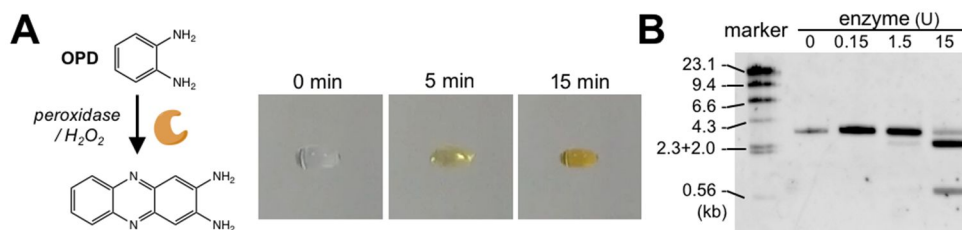


図 3 (A) ペルオキシダーゼによる α -フェニレンジアミン (OPD) の発色反応。(B) 制限酵素によるプラスミドの切断後のアガロース電気泳動 (文献^[1]の図を一部改変)。

(3) 大腸菌 (空気中での捕捉) および動物細胞の培養 (培地中での捕捉)

浮揚液滴中における細胞培養を目指し、培養液や大腸菌を浮揚させ、回収した溶液の菌体生存率を検証した。大腸菌とそのウイルス (ファージ) の生育を評価した。大腸菌およびファージを倍加時間以上浮揚させた後、コロニー形成および増殖能力を評価したところ、浮揚させない従来法と比較し、生育に有意に悪影響がないことが示された。

また、動物細胞での培養に向けた検討を進めた。細胞懸濁液を導入したフラスコに外部から超音波を照射した浮遊培養を行なったところ、照射なしの場合と比較して増殖率が向上した。適切な出力調整によって超音波照射の生物応答に対する有効性が示された。また、培養液中に超音波の定在波を発生させることによって振動の節に細胞を凝集させ浮遊状態で細胞塊を生成できることが明らかとなった。

超音波による増殖培養では、タンパク質分解酵素を用いて細胞を剥離回収する一般的な静置培養と異なり、酵素フリーで活性の高い細胞を増殖、回収できることが期待される。そこで、超音波を利用した増殖培養で獲得した細胞を用いた細胞塊に生成に拡張した。タンパク質分解酵素を用いない培養であるため細胞外マトリクスが残存した細胞を獲得でき、細胞塊の生成が高速化されることが確認された。今後は、超音波の定在波による浮遊状態での細胞塊生成と組み合わせることによって、短時間で細胞塊を生成できるプロトコルの確立が期待できる。

< 引用文献 > [1] T. Matsubara, K. Takemura, *Adv. Sci.*, 8(3), 2002780 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsubara Teruhiko, Takemura Kenjiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Containerless Bioorganic Reactions in a Floating Droplet by Levitation Technique Using an Ultrasonic Wave	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Science	6. 最初と最後の頁 2002780 ~ 2002780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/advs.202002780	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 松原輝彦	4. 巻 38
2. 論文標題 繊細な生体物質を触れずに操る無容器バイオフィラスコ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 バイオインダストリー	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oyama Taigo, Imashiro Chikahiro, Kuriyama Takuma, Usui Hidehisa, Ando Keita, Azuma Tetsushi, Morikawa Akira, Kodeki Kazuhide, Takahara Osamu, Takemura Kenjiro	4. 巻 149
2. 論文標題 Acoustic streaming induced by MHz-frequency ultrasound extends the volume limit of cell suspension culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of the Acoustical Society of America	6. 最初と最後の頁 4180 ~ 4189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1121/10.0005197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松原 輝彦、竹村 研治郎
2. 発表標題 音響浮揚で生成した全方位非接触界面を持つ液滴内における生物有機化学反応
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松原 輝彦・吉田 顕子・竹村 研治郎・佐藤 智典
2. 発表標題 全方位非接触液滴による新規なバイオリアクターの開発
3. 学会等名 第31回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松原輝彦・竹村研治郎
2. 発表標題 定在波トラッピングで作製した非接触液滴内における合成反応の追跡
3. 学会等名 第30回ソノケミストリー討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akiko Yoshida, Teruhiko Matsubara, Toshinori Sato
2. 発表標題 Potential usage of acoustic levitation in phage-display technology
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Chemical Reactions in Levitating Solvent (News) https://www.advancedsciencenews.com/researchers-perform-chemical-reactions-in-levitating-solvent/</p> <p>容器材料の脱プラスチック化を可能にする化学・生物リアクターの開発 (慶應義塾大学プレスリリース) https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/files/2020/12/23/201223-2.pdf</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	竹村 研治郎 (Takemura Kenjiro) (90348821)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関