

Title	超音波を利用した新規な微小液滴バイオリアクターの開発
Sub Title	Development of a novel microbioreactor of droplet using ultrasound device
Author	松原, 輝彦(Matsubara, Teruhiko)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2019
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究ではバイオマテリアル（生体材料）との接触面をなくした反応場の実現を目指し、超音波の音響放射圧を用いた浮揚技術を開発した。振動子を数cmの距離で金属板とともに固定し、超音波を反射させる装置を準備した。振動子と金属板の間に定在波を生成させ、その節に水滴を捕捉（浮揚）できることを確認した。浮揚可能な溶液量および時間の範囲を見積もった。</p> <p>生化学実験では反応容器材料表面へのタンパク質の吸着による、みかけの生物活性減少が無視できない。そこで血清アルブミンを含む水溶液を浮揚させ、溶液の移動を行った。96穴プレートで行う操作と比較し、タンパク質の損失が少ないことを確認した。次に生化学反応に先立ち、浮揚した水滴内で有機合成化学反応を行った。低分子モノマーを溶液に入れて浮揚させ、開始剤などを入れてラジカル重合反応させたところ、重合反応が進行して自己支持性のゲルが生成し、高分子合成が可能であることがわかった。さらに低分子化合物の基質を酵素とともに浮揚水滴内で反応させたところ、溶液が発色し、酵素反応が起きることを明らかにした。</p> <p>また、水溶液中に細胞を浮遊させて凝集、培養する技術を開発した。このための装置は、水槽中に固定したランジュバン型超音波振動子の上方に細胞培養ディッシュを配置した構成であり、振動子から発せられた超音波が水、ディッシュ、培養液に伝播され、培養液の気液界面で反射することによって、振動子端面と界面の間に定在波を生成するものである。定在波の節に細胞懸濁液を注入することによって、細胞はその位置に捕捉されて細胞塊が生成できる。これにより筋芽細胞を空間中に9時間捕捉した結果、直径8 mm、厚さ2.7 mmの細胞塊が生成でき、細胞塊を構成する細胞の94%以上が生存していることを確かめた。</p> <p>以上、空中で捕捉した水滴内で生化学反応が可能であり、さらに培養液内で超音波で生きた細胞塊を生成できることが明らかになった。</p> <p>In order to develop a novel bioreactor without contact of surface of biomaterials, floating technology using the acoustic radiation pressure of ultrasonic waves was developed in the present study. An ultrasonic transducer was positionally fixed with a distance of several centimeters from a metal plate as reflector. The standing waves was generated by reflection of ultrasonic waves between the transducer and the reflector, and water droplets was captured at the nodes. Available range of volume of water and time for floating was estimated.</p> <p>The reduction of bioactivity caused by protein adsorption onto the surface of reaction vessels is often observed. A solution containing serum albumin was floated and the solution was transferred to another sites. Compared to the procedure using a 96-well plate, the loss of protein was negligible small. Next, prior to biochemical reaction, organic chemical reaction was performed in floating droplet. Radical polymerization was occurred in the droplet containing monomer and initiator, resulted in self-supporting gels. Additionally, enzymatic reaction was confirmed by coloring of substrate in droplet.</p> <p>We developed a technology to suspend cells in solution by using ultrasonic waves which enables to generate a cell aggregate. The device consists of a Langevin-type ultrasonic transducer placed in a water tank and a culture dish. The ultrasonic wave emitted from the transducer propagates through water, dish, and culture medium, resulting in developing a standing wave between the transducer surface and culture medium surface. Cells are then trapped at a node position of the standing wave by injected with pipette, and a cell aggregate can be generated. As a result of trapping myoblast cells for 9 hours, a cell aggregate with diameter and thickness of 8 mm and 2.7 mm, respectively, could be generated. Also, it was confirmed that 94% or more of the cells constituting the cell aggregate were alive.</p> <p>These results indicate that we can perform biochemical reaction in water droplet floated, and living cell aggregates are generated by ultrasonic waves in culture medium.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2018000006-20180394

研究代表者	所属	理工学部	職名	専任講師	補助額	1,550 千円
	氏名	松原 輝彦	氏名（英語）	Teruhiko Matsubara		
研究課題（日本語）						
超音波を利用した新規な微小液滴バイオリアクターの開発						
研究課題（英訳）						
Development of a novel microbioreactor of droplet using ultrasound device						
研究組織						
氏 名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
松原 輝彦 (Teruhiko Matsubara)		理工学部・生命情報学科・専任講師				
竹村 研治郎 (Kenjiro Takemura)		理工学部・機械工学科・准教授				
1. 研究成果実績の概要						
<p>本研究ではバイオマテリアル（生体材料）との接触面をなくした反応場の実現を目指し、超音波の音響放射圧を用いた浮揚技術を開発した。振動子を数 cm の距離で金属板とともに固定し、超音波を反射させる装置を準備した。振動子と金属板の間に定在波を生成させ、その節に水滴を捕捉（浮揚）できることを確認した。浮揚可能な溶液量および時間の範囲を見積もった。</p> <p>生化学実験では反応容器材料表面へのタンパク質の吸着による、みかけの生物活性減少が無視できない。そこで血清アルブミンを含む水溶液を浮揚させ、溶液の移動を行った。96 穴プレートで行う操作と比較し、タンパク質の損失が少ないことを確認した。次に生化学反応に先立ち、浮揚した水滴内で有機合成化学反応を行った。低分子モノマーを溶液に入れて浮揚させ、開始剤などを入れてラジカル重合反応させたところ、重合反応が進行して自己支持性のゲルが生成し、高分子合成が可能であることがわかった。さらに低分子化合物の基質を酵素とともに浮揚水滴内で反応させたところ、溶液が発色し、酵素反応が起きることを明らかにした。</p> <p>また、水溶液中に細胞を浮遊させて凝集、培養する技術を開発した。このための装置は、水槽中に固定したランジュバン型超音波振動子の上方に細胞培養ディッシュを配置した構成であり、振動子から発せられた超音波が水、ディッシュ、培養液に伝播され、培養液の気液界面で反射することによって、振動子端面と界面の間に定在波を生成するものである。定在波の節に細胞懸濁液を注入することによって、細胞はその位置に捕捉されて細胞塊が生成できる。これにより筋芽細胞を空間中に 9 時間捕捉した結果、直径 8 mm、厚さ 2.7 mm の細胞塊が生成でき、細胞塊を構成する細胞の 94% 以上が生存していることを確かめた。</p> <p>以上、空中で捕捉した水滴内で生化学反応が可能であり、さらに培養液内で超音波で生きた細胞塊を生成できることが明らかになった。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>In order to develop a novel bioreactor without contact of surface of biomaterials, floating technology using the acoustic radiation pressure of ultrasonic waves was developed in the present study. An ultrasonic transducer was positionally fixed with a distance of several centimeters from a metal plate as reflector. The standing waves was generated by reflection of ultrasonic waves between the transducer and the reflector, and water droplets was captured at the nodes. Available range of volume of water and time for floating was estimated.</p> <p>The reduction of bioactivity caused by protein adsorption onto the surface of reaction vessels is often observed. A solution containing serum albumin was floated and the solution was transferred to another sites. Compared to the procedure using a 96-well plate, the loss of protein was negligible small. Next, prior to biochemical reaction, organic chemical reaction was performed in floating droplet. Radical polymerization was occurred in the droplet containing monomer and initiator, resulted in self-supporting gels. Additionally, enzymatic reaction was confirmed by coloring of substrate in droplet.</p> <p>We developed a technology to suspend cells in solution by using ultrasonic waves which enables to generate a cell aggregate. The device consists of a Langevin-type ultrasonic transducer placed in a water tank and a culture dish. The ultrasonic wave emitted from the transducer propagates through water, dish, and culture medium, resulting in developing a standing wave between the transducer surface and culture medium surface. Cells are then trapped at a node position of the standing wave by injected with pipette, and a cell aggregate can be generated. As a result of trapping myoblast cells for 9 hours, a cell aggregate with diameter and thickness of 8 mm and 2.7 mm, respectively, could be generated. Also, it was confirmed that 94% or more of the cells constituting the cell aggregate were alive.</p> <p>These results indicate that we can perform biochemical reaction in water droplet floated, and living cell aggregates are generated by ultrasonic waves in culture medium.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 （著者・講演者）		発表課題名 （著書名・演題）	発表学術誌名 （著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月 （著書発行年月・講演年月）		
Misa Nakao, Chikahiro Imashiro, Taiki Kuribara, Yuta Kurashina, Kiichiro Totani, Kenjiro Takemura		Formation of Large Scaffold-Free 3-D Aggregates in a Cell Culture Dish by Ultrasound Standing Wave Trapping	Ultrasound in Medicine and Biology	in press		