

Title	新規なバイオリアクターによるプラスチックを使わないバイオ実験システムの開発
Sub Title	Novel chem-bio experimental reactor using a non-contact system without plastics
Author	松原, 輝彦(Matsubara, Teruhiko)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2023
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>化学および生物学の実験における反応容器は近年、使い捨てプラスチック製に置き換わった。反応溶液を空気中に浮揚させ、SDGsに適合する容器を用いない非接触型の(バイオ)リアクターを開発している。これまで、浮揚した液滴中において有機合成反応(クリック反応)、高分子重合、酵素反応が進行することを示してきた。本課題では、合成反応の促進の機構解析、大腸菌や動物細胞の培養を目指している。浮揚させた液滴では効率的な拡散・対流およびガス交換が期待できることから、細胞培養に有利に働くと考えられ、特に形質転換効率が低い浮遊細胞への適用が期待される。</p> <p>標的遺伝子を有するベクターを遺伝子導入試薬(リポフェクトアミン)と複合体形成させ、Huh-7細胞へ導入した。細胞への遺伝子導入には数時間必要であるが、空気中で液滴を浮揚させると徐々に水分が蒸発する。30分以上浮揚状態を維持するためには、定期的に水分の添加を行う必要がある。そこで液滴を高感度カメラで撮影し、浮揚液滴の容量を自動計測した。水を添加して容量を回復させ、4時間監視することに成功した。また空気圧で水を飛滴させることで、非接触で水の添加を行うことにも成功した。フローサイトメトリーや蛍光顕微鏡観察の結果、浮揚液滴内部でルシフェラーゼだけでなく、緑色蛍光タンパク質においても効率よく遺伝子導入できることが示された。阻害剤を用いて導入経路を調べたところ、カベオラ・ラフト介在性エンドサイトーシスが阻害され、マクロピノサイトーシスが亢進していることが明らかになった。この結果は、浮揚させたことによる遺伝子導入効率の亢進が効率的な遺伝子発現に寄与していることを意味する。さらに、浮揚液滴内で4時間インキュベーションを行っても、細胞生存率が低下しないことが明らかになった。これらの結果は、他の接着細胞に加え、浮遊細胞でも同様の効果が期待できる。</p> <p>Reaction vessels used in chemical and biological experiments have recently been replaced by disposable plastics. We are developing a non-contact (bio)reactor that complies with the SDGs, where a levitated droplet of reaction solutions in air is used as the reactor. We previously showed that click reaction (organic synthesis), polymer polymerization, and enzymatic reactions were proceed in the levitated droplets. In this study, we intended for elucidation of the mechanism of accelerated reactions and culture E. coli and animal cells. Since there are efficient diffusion, convection, and gas exchange in levitated droplets, it is expected that these conditions are available for effective cell culture, especially with floating cells with low transformation efficiency. A target gene-containing vector was mixed with a gene delivery reagent (lipofectamine) to form a complex and the complex was introduced into Huh-7 cells. A transfection procedure requires several hours, but water of droplet evaporates gradually during levitation in air. In order to maintain the volume of droplet more than 30 minutes, water must be added periodically to the levitated droplet. The levitated droplets were monitored using a high-sensitivity camera to measure its volume of the droplets. Water was repeatedly added to the droplet, which provides a levitation for 4 hours long. The addition of water to the levitated droplet was also performed with flying droplet, which is generated by air pressure. Flow cytometric and fluorescence microscopic analyses showed that efficient gene transfer in the levitated droplet was performed not only in the case of luciferase but also green fluorescent protein. The treatment of endocytosis inhibitors revealed that caveolae/raft-mediated endocytosis was inhibited, whereas macropinocytosis was enhanced. This result suggest that the enhancement of efficiency of gene transfer in the levitated droplet contributes to the effective gene expression. Furthermore, cell viability was found to maintain after incubation for 4 hours in the levitated droplet. We think that similar effects are expected to be effective to floating cells as well as adherent cells like as Huh-7 cell.</p>
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-20220003-0007

publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	理工学部	職名	准教授	補助額	1,500 千円
	氏名	松原 輝彦	氏名 (英語)	Teruhiko Matsubara		
研究課題 (日本語)						
新規なバイオリアクターによるプラスチックをしないバイオ実験システムの開発						
研究課題 (英訳)						
Novel chem-bio experimental reactor using a non-contact system without plastics						
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・准教授				
1. 研究成果実績の概要						
<p>化学および生物学の実験における反応容器は近年、使い捨てプラスチック製に置き換わった。反応溶液を空気中に浮揚させ、SDGsに適合する容器を用いない非接触型の(バイオ)リアクターを開発している。これまで、浮揚した液滴中において有機合成反応(クリック反応)、高分子重合、酵素反応が進行することを示してきた。本課題では、合成反応の促進の機構解析、大腸菌や動物細胞の培養を目指している。浮揚させた液滴では効率的な拡散・対流およびガス交換が期待できることから、細胞培養に有利に働くと考えられ、特に形質転換効率が低い浮遊細胞への適用が期待される。</p> <p>標的遺伝子を有するベクターを遺伝子導入試薬(リポフェクトアミン)と複合体形成させ、Huh-7細胞へ導入した。細胞への遺伝子導入には数時間必要であるが、空気中で液滴を浮揚させると徐々に水分が蒸発する。30分以上浮揚状態を維持するためには、定期的に水分の添加を行う必要がある。そこで液滴を高感度カメラで撮影し、浮揚液滴の容量を自動計測した。水を添加して容量を回復させ、4時間監視することに成功した。また空気圧で水を飛滴させることで、非接触で水の添加を行うことにも成功した。フローサイトメトリーや蛍光顕微鏡観察の結果、浮揚液滴内部でルシフェラーゼだけでなく、緑色蛍光タンパク質においても効率よく遺伝子導入できることが示された。阻害剤を用いて導入経路を調べたところ、カベオラ・ラフト介在性エンドサイトーシスが阻害され、マクロピノサイトーシスが亢進していることが明らかになった。この結果は、浮揚させたことによる遺伝子導入効率の亢進が効率的な遺伝子発現に寄与していることを意味する。さらに、浮揚液滴内で4時間インキュベートを行っても、細胞生存率が低下しないことが明らかになった。これらの結果は、他の接着細胞に加え、浮遊細胞でも同様の効果が期待できる。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>Reaction vessels used in chemical and biological experiments have recently been replaced by disposable plastics. We are developing a non-contact (bio)reactor that complies with the SDGs, where a levitated droplet of reaction solutions in air is used as the reactor. We previously showed that click reaction (organic synthesis), polymer polymerization, and enzymatic reactions were proceed in the levitated droplets. In this study, we intended for elucidation of the mechanism of accelerated reactions and culture E. coli and animal cells. Since there are efficient diffusion, convection, and gas exchange in levitated droplets, it is expected that these conditions are available for effective cell culture, especially with floating cells with low transformation efficiency.</p> <p>A target gene-containing vector was mixed with a gene delivery reagent (lipofectamine) to form a complex and the complex was introduced into Huh-7 cells. A transfection procedure requires several hours, but water of droplet evaporates gradually during levitation in air. In order to maintain the volume of droplet more than 30 minutes, water must be added periodically to the levitated droplet. The levitated droplets were monitored using a high-sensitivity camera to measure its volume of the droplets. Water was repeatedly added to the droplet, which provides a levitation for 4 hours long. The addition of water to the levitated droplet was also performed with flying droplet, which is generated by air pressure. Flow cytometric and fluorescence microscopic analyses showed that efficient gene transfer in the levitated droplet was performed not only in the case of luciferase but also green fluorescent protein. The treatment of endocytosis inhibitors revealed that caveolae/raft-mediated endocytosis was inhibited, whereas macropinocytosis was enhanced. This result suggest that the enhancement of efficiency of gene transfer in the levitated droplet contributes to the effective gene expression. Furthermore, cell viability was found to maintain after incubation for 4 hours in the levitated droplet. We think that similar effects are expected to be effective to floating cells as well as adherent cells like as Huh-7 cell.</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)			
T. Arai, T. Sato, T. Matsubara	Effective Cell Transfection in An Ultrasonically Levitated Droplet for Sustainable Technology	Adv. Sci.	2022年8月			
松原輝彦	次世代のウイルス検出センサーおよびバイオリアクターの開発	第2回ヘルステック・デバイス・フォーラム	2022年8月			