

Accounts of Materials & Surface Research

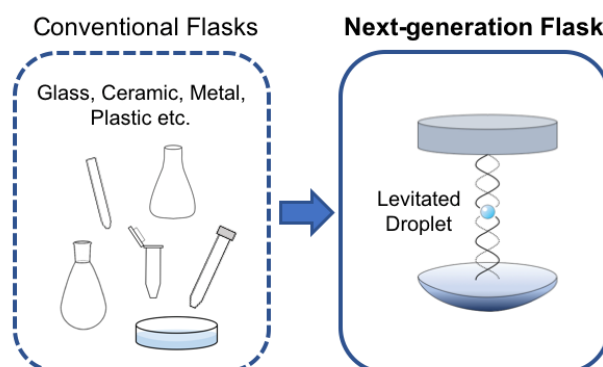
Next-generation reaction flask having a 3-dimensional air-water interface

Teruhiko Matsubara*

Department of Biosciences and Informatics, Faculty of Science and Technology, Keio University
3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama 223-8522, JAPAN
matsubara@bio.keio.ac.jp

Water droplets in air have a non-contact and three-dimensional air-water interface because the interface is maintained owing to its surface tension. In the present study, we investigated chemical and biochemical reactions in water droplets floated using an acoustic levitation device with ultrasonic waves in air. In particular, the click reaction in the levitated droplet proceeded approximately four times faster than that in a test tube, whereas most reactions proceed without a decrease in conventional flasks. Furthermore, the target proteins were highly expressed in the collected cells after the culture cell suspension was levitated for 4 h for transfection. The treatment with endocytosis inhibitor indicated that expression was improved by the enhancement of macropinocytosis. Our results suggest that the levitated droplet is available as a chemical and biological flask with advanced functions.

Keyword: levitation, containerless reactor, air-water interface, plastic free, sustainable



Teruhiko Matsubara received a PhD in Engineering at the Tokyo Institute of Technology in 2000. He worked in the Department of Chemical Science and Technology at The University of Tokushima from 2000–2002. In 2003, he moved to Keio University as an assistant professor. Since 2019, he has been an associate professor in the Department of Biosciences and Informatics, Keio University. His research interests include application of levitation technology in chemical biology and design of peptide-based biofunctional molecules.



三次元の気水界面を有する次世代の反応容器の開発

松原 輝彦

慶應義塾大学理工学部

1. はじめに: 気水界面

化学および生物学研究では多くの場合、対象物を容器にいれて液相反応を行う。しかし対象物が反応容器の材料表面と接触して変質するほか、物理吸着して溶液中の濃度が減少することがあり、実験の再現性を下げる要因の1つとなり得る。例えば、溶液を異なる反応容器に移動するだけで、タンパク質濃度が半分程度に減少することは少なくない。この影響を少なくするため、各研究グループで独自のプロトコールが整備されるほか、市販の研究用キット類では、誰でも再現性良く結果が得られる詳細な使用マニュアルが添付されている。また近年では材料表面を加工し、タンパク質や核酸が吸着しないことを売りとする商品が売り出されている(低吸着チューブやチップなど)。

反応溶液は容器材料表面と接触するだけでなく、空気(気相)とも接する(二次元の気-液界面、**Figure 1A** 左)。もし空気中の酸素と反応する対象物であった場合に、これも期待しない副反応の原因となり得る。これらは言い換えれば、固-液界面と気-液界面のヘテロな界面を有するということである。仮に接する界面を単一にすることができれば、これらの諸問題を解決することができるかもしれない。固-液界面をなくし、気-液界面のみにするということは、具体的には溶液を空気中に浮かせることでその実装が可能になる。

2. 気相中での溶液の浮揚 (音響浮揚)

溶液が接する界面が気相(空気)のみという状態は、身近にある例では、雨つぶや飛散した水滴が考えられる(三次元の気-液界面、**Figure 1A** 右)。しかし重力のため地球上ではこの状態

を1秒以上維持するのが困難である。

物質を浮かせる技術は、1980年代にすでに磁気、低温超伝導、光、電気、空気力学などが提案されている^[1]。もっとも手軽なものは磁性体を利用するものであるが、対象物が磁性体である必要がある。超伝導は低温にする必要がある、水溶液は凍ってしまうために利用できない。光ピンセットは微粒子や細胞をトラッピングできる技術であるが、その保持力は数ピコニュートン(pN)であり、溶液自体を捕捉するには力が足りない。空気力学は高熱の金属やガラスを成形する場合に有用であるが、水溶液など溶媒を用いる条件には適用が困難である。

化学反応および生物を取り扱う場合には、まず常温・常圧が好ましく、さらに出来得るならば浮揚させる物質の制限が少ないほうが望ましい。そこで本研究では音響浮揚現象(acoustic levitation)に着目した^[2]。この現象は、音響波(音波もしくは超音波)の発生源となる振動子と反射板の間に定在波音場を形成させると、その音圧により定在波の節(node)の位置に物体(数mm程度)を捕捉(浮揚)させることができる(**Figure 1B**)。

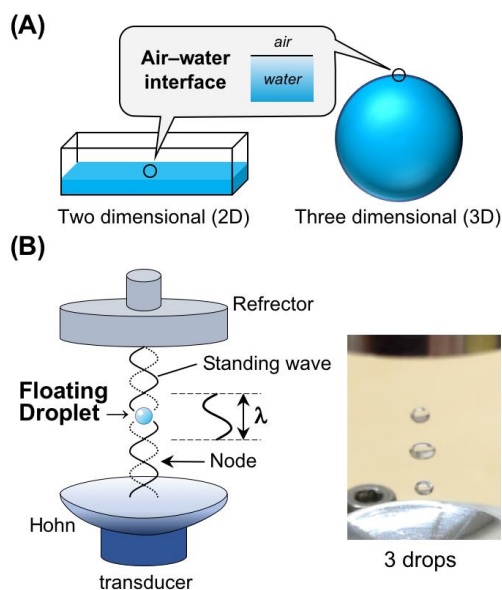


Figure 1. Three-dimensional (3D) air-water interface. (A) Schematic representation of 2D (water in trough, left) and 3D (droplet, right) interface. (B) Single-axis ultrasonic levitator used in this study. Three (two 5 μL and one 10 μL) levitated droplets are shown.

ランジュバン型の超音波振動子(周波数 60 kHz)に凹型ホーンを装着し、反射板をホーンから 15 mm 程度の距離に設置した(Figure 1B)。ここで波長 λ (m)、空気中の音速 c (340 m)、周波数を f (Hz)とすると、この周波数での音波は $\lambda = c / f = 5.67$ mm となる^[3]。この時の音圧は数 Pa (=N/m²)であることから、数 mm 程度の小さくて軽い物質であれば捕捉させることができる。実装した装置では、1~20 μL の範囲の水滴を定在波の節に安定に固定することができ、また複数の節で 2 つ以上の水滴が同時に浮揚可能であった^[4]。この装置は原理的に指向性スピーカーでも構築可能であるが、水溶液を使用する場合は、防水が必要と考え、本研究では金属製の振動子を用いた。

3. 有機合成反応

(a) 高分子重合

音響浮揚させた液滴内部で、有機合成反応を行った研究例は見当たらないようであった。そこでまず最初に、ポリアクリルアミドの高分子重合

(合成)を行った。この高分子は分子ふるい能があるため、電気泳動によってタンパク質や核酸などの生体高分子を分離・精製する用途で用いられている(ポリアクリルアミドゲル電気泳動, PAGE)。

モノマーとしてアクリルアミドと N,N' -メチレンビスアクリルアミドを入れた溶液をマイクロピペッターを用いて節の位置付近で吐出し、液滴として浮揚させた。ここに重合開始剤として過硫酸アンモニウム(APS)および N,N,N',N' -テトラメチレンジアミン(TEMED)を加えて重合反応を開始した(Figure 2A)。電気泳動で用いる場合、この反応は2枚のガラス板を挟んだ間隙で行われるが、浮揚液内でも重合が進行し、ゲル化することが確認できた。また重合後の液滴に綿棒を近づけ、ゲル(数 mm の大きさ)を回収することが可能であった。

(b) クリック反応

試験管内や培養細胞内の水溶液中において多くの化合物が共存する場合に、部位特異的にマーカーとなる官能基(蛍光性物質など)を修飾することができれば、標的分子の細胞内および体内動態を調べることができ、大変有用である。この修飾は標的とする分子のみに特異的に反応(生体直交型の反応)できることが望ましい。「クリック反応」と呼ばれるアジドとアルキン残基の間の Huisgen 1,3-双極子付加環化反応はこの目的に適しており、水溶液中での修飾反応に頻用されている^[5]。

リシン側鎖の ϵ -アミノ基がアジドに置換された Fmoc-アジドリジン(Fmoc-Lys(N₃))とアルキン修飾されたビオチンとクリック反応で連結させる反応を行なった。これらの化合物を含む溶液を浮揚させた後、最後に CuSO_4 水溶液を添加して反応を開始した。試験管内では 20 分程度かかる反応が、浮揚液滴内では 5 分以内で進行し、数倍促進されることが明らかになった(Figure 2B)^[4]。合成した化合物の分解も観察されず、試験管内よりも反応が早く進行した。これらの結果は、浮

揚液滴が合成反応の無容器フラスコとして利用できる可能性を示す。

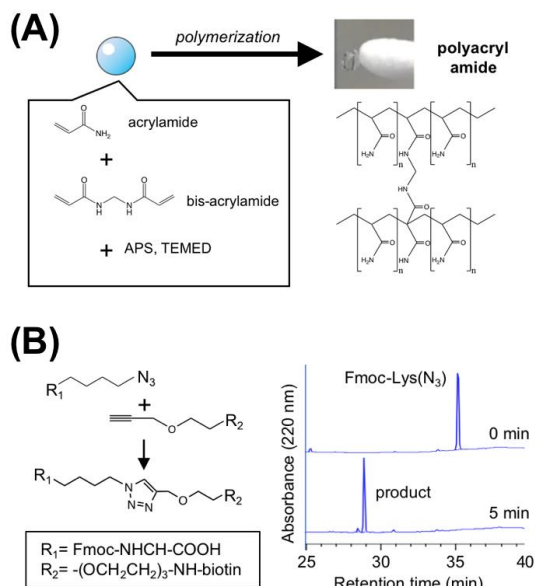


Figure 2. Organic synthesis reactions in the levitated droplet. (A) Polyacrylamide polymerization. The polyacrylamide gel obtained was collected with a cotton swab. (B) Cu(I)-catalyzed click reaction. The reaction was completed within 5 min.

4. 酵素反応

(a) 発色反応

浮揚液滴を生命科学研究で用いるには、酵素反応は必須である。酵素は反応容器に吸着して濃度が減少するだけでなく、失活することも多い。

まず、発色反応を検討した。例えば酵素結合免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、ウエスタンブロットティング、免疫組織化学染色などでは、基質を酵素反応で着色分子や蛍光性の分子に転換する方法が頻用される。浮揚液滴内において酵素反応の進行を可視化するため、酵素は西洋ワサビペルオキシダーゼ、比色基質として *o*-フェニレンジアミン (OPD) を用いた。酵素と OPD を浮揚させ、そこに過酸化水素 (H₂O₂) を加えることで反応を開始した。

液滴を撮影してモニタリングすると、浮揚液滴は時間とともに色に変化した (**Figure 3A**)^[4]。ELISA などで発色するための反応時間は 20 分以内であることが多い。試験管内と同条件で、浮揚液滴内での酵素反応が進行することが示された。

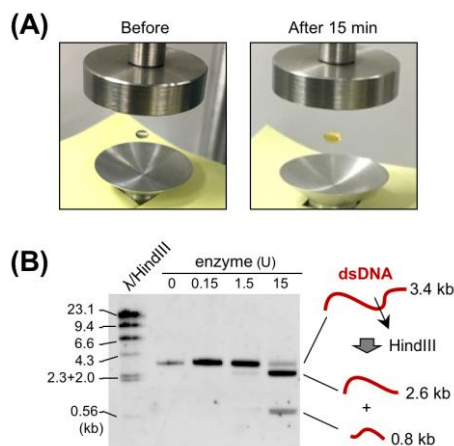


Figure 3. Enzymatic reaction in a levitated droplet. (A) Chromogenic reaction of *o*-phenylenediamine (OPD) catalyzed by horseradish peroxidase. (B) Agarose electrophoresis of plasmid DNA after digestion by restriction enzyme.^[4]

(b) 制限酵素による切断

遺伝子操作を行う際には、酵素による反応が必要である。遺伝子を切断する場合は制限酵素、連結ではリガーゼ、伸長 (増幅) する場合はポリメラーゼを用いる。浮揚液滴内でこれらの酵素反応が進行するか検証するため、二本鎖 DNA (dsDNA) の切断反応 (消化) を行った。

3.4 キロベース (kb) の dsDNA および制限酵素 (HindIII) を浮揚液滴内で 15 分間反応させた。アガロースゲル電気泳動で解析したところ、切断された 2.6 kb と 0.8 kb のフラグメントが確認できた (**Figure 3B**)^[4]。またこれらのフラグメント以外のバンドが観察されないことから、浮揚させることで DNA が損傷 (切断) されないことが確認された。最近、浮揚液滴内でウイルス RNA 遺伝子を酵素で増幅する研究が報告され^[6]、浮揚液

滴内での様々な遺伝子操作への応用が期待できる。

5. 細胞への遺伝子導入

(a) 培養細胞の浮揚

生命科学研究において培養細胞への遺伝子導入(トランスフェクション)は、タンパク質や遺伝子の役割を評価する極めて重要な操作の1つである。遺伝子導入に先立ち、細胞を4時間空中で浮揚させ、その生存率を評価した。細胞懸濁液を浮揚(levitated)させるほか、対照実験として試験管を静置(static)および振盪(shaken)させ、トリパンプルー色素排除試験法を行った。静置条件などと比較してやや生存率は低かったものの、遺伝子導入操作に影響ないことが示された(Figure 4)。

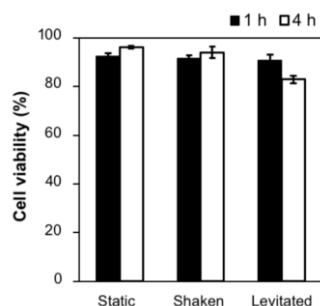


Figure 4. Influence of levitation on the cell viability. Huh-7 cells were levitated for 4 h and then subjected to trypan blue exclusion assay.^[7]

(b) 遺伝子導入 (トランスフェクション)

浮揚液滴を用いてプラスミドの細胞への遺伝子導入を試みた研究はすでに報告がある。しかし、浮揚させたのは数分間の混合操作だけであり、数時間のトランスフェクションは培養皿で行っていた^{[8][9]}。

そこで我々は、プラスミド DNA(pDNA、ルシフェラーゼ遺伝子を含む)と遺伝子導入試薬(リポフェクタミン)の複合体を浮揚させた Huh-7 細胞懸濁液に投与し、4 時間遺伝子導入を行った(Figure 5A)。継時変化を追跡したところ、トランスフェクション時間の増加とともにルシフェラー

ゼ発現活性が増加し、4 時間で有意に高い活性を示した(Figure 5B)。

エンドサイトーシス阻害剤による処理を行ったところ、pDNA 複合体はカベオラ/ラフト介在性エンドサイトーシスを抑制し、マクロピノサイトーシスを亢進していることが示された。つまりルシフェラーゼなどの遺伝子発現の向上は、浮揚させたことによる取り込み効率の増加に起因することが示された。

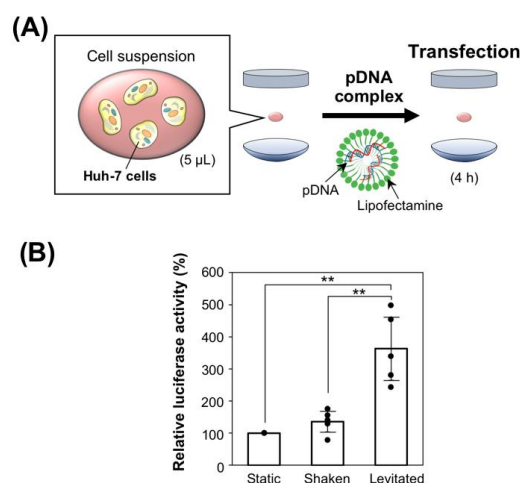


Figure 5. Plasmid DNA (pDNA) transfection by levitation. (A) The cell suspension was mixed with the pDNA complex and the mixture was levitated for 4 h. (B) Luciferase activity of the cells levitated for 4h was greater than that of the static and shaken cells.

6. 超音波の生体試料への影響について

上述したクリック反応や遺伝子導入は、試験管の中と比較して数倍の反応速度や導入効率の向上があった。しかしながら、このような影響は予想外であり、直接的な因子は明らかになっていない。生命科学研究での超音波は、器具洗浄はもちろん、細胞破碎を破壊するほか、リポソームを作製する際にも用いられる。これらの操作で有効な因子はキャビテーションであり、ソノケミストリー(sonochemistry)分野の研究対象である。キャビテーションは物理的な負荷に加え、活性酸素(reactive oxygen species,

ROS)が発生する。例えばホモジナイザー(細胞破砕機)は、100 W以上の強力な出力で超音波(周波数:20 kHz~100 kHz)を発生させる装置である。本研究で用いる超音波の出力は、最大で超音波強度 1.6 W/cm^2 であり、見かけ上の DNA への損傷も観察されず、Miller らによる先行研究^[10]の結果と一致する。ここで超音波強度 (W/cm^2) は、単位面積に垂直に照射された場合の単位時間あたりのエネルギーであり、空間ピーク時間平均強度 (spatial peak temporal average intensity, SPTA) という指標で評価される。ただし超音波強度を 8 W/cm^2 まで増加させて 10 分間連続的照射すると、細胞内の一本鎖 DNA が損傷すると報告している(周波数 1.6 MHz)^[10]。本装置でキャビテーション気泡やそれに起因するソノルミネッセンス^[11]などは観察できていないが、微弱なキャビテーションがクリック反応や遺伝子導入への影響があったと考えられる^[12,13]。さらに、浮揚液滴の内外で特異な流動^[14]があるとの報告もあり、今後の研究が必要である。

非侵襲の診断装置として、超音波はすでに医療現場で実用化されている。超音波診断装置は、熱的作用を評価するサーマルインデックス (thermal index, TI) や非熱的作用を評価するメカニカルインデックス (mechanical index, MI) が生体への影響を調べる指標とされ、厳格な基準が設けられている^[3]。ここで MI は音圧 (MPa) と周波数 (MHz) で定義され、キャビテーションは非熱的作用に分類される。超音波は、周波数と出力の組み合わせで音響エネルギーを選択し、生体に与える影響がない条件を設定することが可能である。

7. 研究動向

浮揚現象を利用した学術研究は、物理現象としての理論研究が多く、生命科学に適用した例はあまり多くない。2000年代では5~10 mm程度の昆虫などの生物(蟻、てんとう虫、クモなど)を浮かせるなどのユニークな研究も報告されて

いた^[15]。Wood らは浮揚させた赤血球をラマンスペクトル測定し、Raman acoustic levitation spectroscopy (RALS) と命名している^[16]。2010年代になり、少しずつケミカルバイオロジーに適用できる研究が報告され始めた。Cheng らは、溶媒が蒸発することを利用し、浮揚させた状態で DNA を含むナノアセンブリを作製している^[17]。また、上述したが、変調超音波アレイによって浮揚させた液滴内で酵素を用い、ウイルス遺伝子を増幅する研究も報告された^[6]。今後、化学および生命科学研究への音響浮揚技術の適用が期待される。

8. 最後に

本稿では、水溶液中における有機合成および酵素反応、液滴内での培養細胞に関わる成果について紹介した。従来の試験管内と比較し、いくつかその利点は見出されてきている。ただし3次元界面を活用した効果や因子はまだ見出されておらず、今後の研究が期待される。

また、バイオ系実験で用いる消耗品の多くは使い捨てプラスチックであり、実験従事者が年間で数十 kg の廃棄物を出しているとの報告がある^[18]。ゼロにすることは難しいかもしれないが、無容器にすることで、その廃棄量を大きく削減することが期待できる。バイオ系実験室のゴミは焼却処分されることが多いが、持続可能な開発目標 (SDGs) への取り組みの一環として、利用制限されることも想定すべきである。無容器のフラスコとしての普及により、次世代の研究環境が変わることを期待したい。

9. 謝辞

本研究の一部は JSPS 科研費 20K21113 および学内研究費補助金による支援を受けた。本研究を遂行するにあたり、協力を得た本多電子株式会社、株式会社アイカムス・ラボ、共同研究者および学生諸氏に心より謝意を表す。

参考文献

[1] E. H. Brandt, Levitation in physics. *Science*, **1989**, 243, 349.

- [2] E. H. Brandt, Suspended by sound. *Nature*, **2001**, *413*, 474.
- [3] P. R. Hoskins, K. Martin & A. Thrush (Eds.), “Diagnostic Ultrasound, Third Edition: Physics and Equipment”. **2019**, p.7, CRC Press.
- [4] T. Matsubara, K. Takemura, Containerless Bioorganic Reactions in a Floating Droplet by Levitation Technique Using an Ultrasonic Wave. *Adv. Sci.*, **2020**, *8*, 2002780.
- [5] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2004.
- [6] Y. Luo, M. Zhou, L. Wang, C. Fan, T. Xu, X. Zhang, Programmable-Modulated Ultrasonic Transducer Array for Contactless Detection of Viral RNAs. *Small Methods*, **2023**, *7*, 2300592.
- [7] T. Arai, T. Sato, T. Matsubara, Effective Cell Transfection in An Ultrasonically Levitated Droplet for Sustainable Technology. *Adv. Sci.*, **2022**, *9*, 2203576.
- [8] D. Foresti, M. Nabavi, M. Klingauf, A. Ferrari, D. Poulikakos, Acoustophoretic contactless transport and handling of matter in air. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2013**, *110*, 12549.
- [9] T. Vasileiou, D. Foresti, A. Bayram, D. Poulikakos, A. Ferrari, Toward Contactless Biology: Acoustophoretic DNA Transfection. *Sci. Rep.*, **2015**, *6*, 20023.
- [10] D. L. Miller, R. M. Thomas, M. E. Frazier, Single strand breaks in CHO cell DNA induced by ultrasonic cavitation in vitro. *Ultrasound Med. Biol.*, **1991**, *17*, 401.
- [11] 安井久一, ソノルミネッセンスの原理について, *日本音響学会誌*, **2011**, *67*, 339.
- [12] 畑中信一, ソノケミストリー, *日本音響学会誌*, **2016**, *72*, 193.
- [13] L. H. Thompson, L. K. Doraiswamy, Sonochemistry: Science and Engineering. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1999**, *38*, 1215.
- [14] K. Hasegawa, Y. Abe, A. Goda, Microlayered flow structure around an acoustically levitated droplet under a phase-change process. *npj Microgravity*, **2016**, *2*, 16004.
- [15] W. J. Xie, C. D. Cao, Y. J. Lü, Z. Y. Hong, B. Weiet, Acoustic method for levitation of small living animals. *J. Appl. Phys. Lett.*, **2006**, *89*, 214102.
- [16] L. Puskar, R. Tuckermann, T. Frosch, J. Popp, V. Ly, D. McNaughtona, B. R. Wood, Raman acoustic levitation spectroscopy of red blood cells and Plasmodium. *Lab Chip*, **2007**, *7*, 1125.
- [17] Q. Shi, W. Di, D. Dong, L. W. Yap, L. Li, D. Zang, W. Cheng, A General Approach to Free-Standing Nanoassemblies via Acoustic Levitation Self-Assembly. *ACS Nano*, **2019**, *13*, 5243.
- [18] L. Howes, Can Laboratories Move Away from Single-Use Plastic? *ACS Central Sci.* **2019**, *5*, 1904.