

整理番号	2023-J-021	報告者氏名	倉科 佑太
------	------------	-------	-------

研究課題名

気泡核含有ハイドロゲル複合材料による高感度超音波センシング

<代表研究者> 機関名：東京農工大学 職名：准教授 氏名：倉科 佑太

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：

機関名： 職名： 氏名：

機関名： 職名： 氏名：

機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

レアメタルの枯渇やマイクロプラスチックによる環境汚染といった地球規模の課題に直面する中で、持続可能性を考慮した新しい材料技術が強く求められている。その中で、水を主成分として外部からの刺激に応じて膨張や収縮などの動的変化を示すハイドロゲルが注目されている。この材料は優れた生分解性や環境負荷の低さから、次世代のセンサー技術や医療分野での応用が期待されている。従来、ハイドロゲルを用いたセンシング技術では可視的な色の変化が用いられていたが、この方法では目視できる範囲に用途が限定されるという課題があった。本研究では、超音波技術を利用することで、このような制約を克服し、新しい可能性を開拓することを目指した。本研究の第一段階では、圧電基板であるリチウムナイオベート (LN) を用いて、表面弾性波 (SAW) デバイスを作製し、センサの代わりに細胞を測定した。このデバイスは、表面を伝播する弾性波を利用して、材料や細胞の性質を評価することができる。具体的には、送信波と受信波を比較することで、細胞の成熟度やその動態を詳細に評価した。その結果、細胞や培地の存在が R-SAW (レイリー波) の伝播を減衰させ、質量の付加や物理的变化が波形に反映されることが明らかになった。この手法により、非破壊かつリアルタイムでの観察が可能となり、従来の観察手法に対する大きな進展が見られた。第二段階では、超音波応答性ハイドロゲルの開発に取り組んでいる。このハイドロゲルには気泡核が含まれており、超音波の刺激に対して特異的な応答を示す。本研究では、異なる共振周波数を持つ超音波デバイスを用いて、音圧に対するハイドロゲルのナノ粒子放出量を評価した。その結果、気泡核を含むハイドロゲルは、超音波刺激に応じて効率的にナノ粒子を徐放する能力を持つことが確認された。さらに、超音波の周波数が気泡核の共振周波数に近づくほど、放出効率が向上することも示された。この成果は、ハイドロゲルを用いた制御可能な薬物放出システムの開発や、生体内における安全性を重視した医療技術の発展に貢献するものと考えられる。以上の研究から、ハイドロゲルと超音波技術を組み合わせた新たな応用の可能性が示され、特に環境負荷の低減や持続可能な技術としての展望が広がることが期待される。すなわち、ハイドロゲルの柔軟な特性と超音波の非侵襲的かつ高精度な制御性を活かすことで、医療、環境、産業分野での幅広い活用が可能となることが示唆される。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

査読付き原著論文

1. Ryuto Yamakawa, Hiroaki Onoe, Yuta Kurashina*, “Hydrogel carrier with bubble vibration enhancer for ultrasound-triggered drug release,” *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 112, 107173, 2025.

国際会議発表（口頭）

2. ○Shun Koda, Yuta Kurashina, “Cell Seeding Method with PDMS Coating for Observation of Cell Maturation by Surface Acoustic Wave,” The 17th International Conference on Motion and Vibration & The 20 th Asia-Pacific Vibration Conference, Tokyo, Japan, 2024/08/5-9
3. ○Shun Koda, Takahiro Yamada, Hiroaki Onoe, James Friend, and Yuta Kurashina, “Observation of Cell Behavior by Waveform Measurement using Lithium Niobate-Based Surface Acoustic Wave Device,” the 2024 MRS Spring Meeting & Exhibit, Seattle, WA, USA, 2024/04/22-26

国際会議発表（ポスター）

4. ○Shun Koda, Takahiro Yamada, Hiroaki Onoe, James Friend, and Yuta Kurashina, “Non-Invasive Evaluation System of Cells by Surface Acoustic Wave Device with micro-Walled Chamber,” 2024 IEEE Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control Joint Symposium (UFFC-JS 2024), Taipei, Taiwan, 2024/9/22-26.

国内会議発表（ポスター）

5. ○香田駿, 山田貴大, 尾上弘晃, James Friend, 倉科佑太, ”シリコンチャンバを搭載した表面弾性波デバイスによる細胞活性の評価システム構築”, 第45回 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (USE2024), 東京, 2024/11/25-27.
6. ○山川龍斗, 板東雄太, 尾上弘晃, 倉科佑太, ”薬剤放出のための生体安全性と超音波刺激応答性を具備したハイドロゲル微小球状キャリア”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第50回研究会 (CHEMINAS 50), 仙台, 2024/11/25-28

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

レアメタルの資源枯渇、マイクロプラスチックによる環境汚染など技術の進歩にともない環境問題が生じる社会において持続的に開発可能な技術への期待が高まってきた。水を主成分としたハイドロゲルでは、例えば外部のpHや温度、化学物質の変化に伴い、水分子の移動で膨張・収縮する性質を有している。これを用いたハイドロゲルのセンシングデバイスは、環境負荷が低く、人体にもやさしいことから循環・省資源を目指した現代社会において、理想的な材料として期待されてきた。一方で、このような外部の刺激に応答するハイドロゲルを用いたセンシングは基本的には水分子の受け渡しにより生じる現象を用いていることから、その変化は微量のため捉えることが難しい。従来では、ナノコロイド粒子を用いた構造色による色の違いを用いて、その問題を解決した技術が報告されてきた (M. Tsuchiya *et al.*, *Sci Rep* 2019)。しかし、色を用いたセンシングでは直接ハイドロゲルを目視できる部分でのみ用途が限定されてしまっていた。すなわち、生体内で利用することは困難であった。

そこで本研究では、MHzの超音波（表面弾性波）と気泡核に着目した。これらの技術を刺激応答性ハイドロゲルに組み込むことで、気泡核の超音波応答性を具備したハイドロゲルの膨張・収縮を超音波によりセンシングできる複合材料のセンサを開発することを目的とする。具体的には、不活性ガスを脂質で包み込んだ気泡核を刺激応答性高分子に含有し、外部刺激を付与することで生じるハイドロゲルの変化量を任意の周波数のMHzを照射することができる表面弾性波（SAW）デバイスにより感知する。これにより、ハイドロゲルに生じる微小な変化を超音波により読み取ることが可能となる。このように表面弾性波を照射することで、ハイドロゲルの変化量をセンシングできるかを明らかとすることを本研究における最終的な目的として設定し、研究を実施した。本研究ではとくに、検出用のSAWデバイスとセンサ用の気泡核の超音波応答性を具備したハイドロゲルの製作を実施した。

SAWは、圧電効果を利用した高周波音波であり、主に通信機器のフィルターとして利用されてきた技術である。SAWは、圧電材料に電極を設置し、交流電圧を印加することで生成される。この技術をバイオセンサーに応用することで、ラベルフリーで高感度なセンシングが可能となる。特に、リチウムナイオベート（Lithium Niobate; LN）基板を用いたSAWデバイスは生体適合性が高く、バイオメディカル分野での応用が期待されている。近年では、SAWを用いた細胞操作や観察に関する研究が進展している。本研究では、127.86°YカットLN基板を用いてSAWデバイスを作製した。このデバイスは、レイリー波を発生および受信するための構造を備えており、送信波と受信波の比較に基づいて配置した物性の挙動を確かめることができる。

本研究で最終的に用いるハイドロゲルセンサより前に、まずはレイリー型の表面弾性波（R-SAW）に細胞を配置して、その動態を評価した（Fig.1）。具体的には、デバイス上に播種された細胞がSAWを透過する際の波形変化を解析することで、細胞の状態を評価した。モデル細胞としてC2C12細胞を用い、分化過程における形態変化とSAW信号の関連性を検討した。SAWを用いた検知デバイスの原理としては、圧電基板であるリチウムナイオベート（LN）にくし歯状電極（IDT）を蒸着し製作したR-SAWデバイスにより送受信される。向かい合わせにIDTを配置し、片方のIDTから送信し細胞組織を透過したR-SAWをもう一方のIDTで受信する。その際の送信波形と受信波形の差異から細胞組織の成熟度を評価する。細胞をIDT間に保持するため、ポリジメチルシロキサン樹脂（PDMS）で製作したマイクロチャンバをLN上に接着した。

R-SAWデバイスはリフトオフ法により製作した。具体的には、4インチのLNウェーハから15mm×30mmの大きさに切り出したLNチップを、アセトン、エタノールで1分間ずつ超音波洗浄した。その後、フォトリソグラフィ工程によりLN上にネガティブフォトレジストをスピニングコートし現像した。コート後、レジストの上からクロムとアルミニウムを順に蒸着した。再度アセトンでLNチップを超音波洗浄することにより

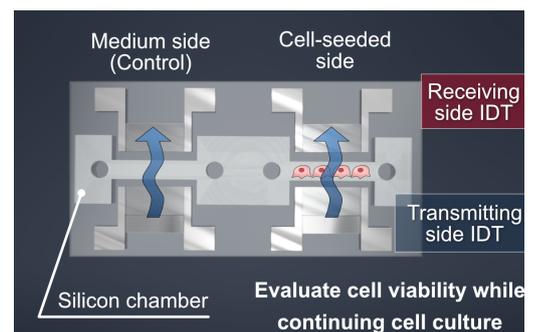


Fig.1 Evaluation of cell maturity by SAW.

レジストを洗浄した。

その後、細胞を IDT 間に保持するためのマイクロチャンバを製作するため、フォトリソグラフィの工程で形成したモールドに PDMS を流し込み成形した (Fig. 2)。まずガラス基板をアセトンで1分間洗浄し、 O_2 プラズマアッシングにより基板表面を洗浄した。洗浄後、フォトリソグラフィの工程により厚さ $100\ \mu\text{m}$ のモールドをガラス基板上に形成した。

高いアスペクト比の PDMS をモールドから剥離させるため、モールドのチャンバ部分にフッ素系離型剤を塗布し 120°C で 20 分加熱した。加熱後、モールドに液状の PDMS を塗布した。200 RPM で 80 秒間のスピンドーティングにより、モールドに $300\ \mu\text{m}$ の厚さで PDMS をコーティングした。チャンバ部に PDMS を正常に浸透させるため PDMS がコーティングされたモールドを真空状態で 40 分間静置し脱気した。脱気後、PDMS を架橋させるため 90°C で 2 時間加熱した。PDMS の架橋を確認したのち、カッターを用いてマイクロチャンバを切り出した。マイクロチャンバに付着した離型剤を除去するため、イソプロパノールを用いて1分間超音波洗浄した。マイクロチャンバの細胞保持部分の両端に直径 $1\ \text{mm}$ の通し穴を加工し、細胞と培地の注入口、抽出口とした。その後、マイクロチャンバを R-SAW デバイスに接着させるため、6000 RPM でスピンドーティングした PDMS にマイクロチャンバの接着部分を接触させた。その後、R-SAW デバイスに接着させて 90°C で 2 時間加熱した。製作したマイクロチャンバは液体の PDMS により R-SAW デバイスに安定して接着した (Fig. 3)。製作した R-SAW デバイスの共振周波数は、Control 用培地側の IDT と細胞播種側の IDT とともに $38.4\ \text{MHz}$ であった。これより、R-SAW 波形の取得にあたり両 IDT に $38.4\ \text{MHz}$ の交流電流を印加した。マイクロチャンバの流路壁は $280\ \mu\text{m}$ で、細胞播種領域の距離は $680\ \mu\text{m}$ であった。

次にデモンストレーションとして、細胞を播種して測定した。まずは、PDMS サポータに直径 $1\ \text{mm}$ の通り穴を加工し、マイクロチャンバの注入口、抽出口それぞれに接着した。接着した PDMS

サポータに $10\ \mu\text{L}$ ピペットチップを挿入し、培地の乾燥防止のための培地保持タンクとして用いた。観察対象の細胞として、マウスの筋芽細胞である C2C12 細胞を採用した。細胞播種後、Control 用培地側のマイクロチャンバでは細胞は見られず、一方で細胞播種側の IDT では $1.4 \times 10^3\ \text{cells}/\text{mm}^2$ の密度で細胞が見られた (Fig. 4)。また、測定領域外では細胞は見られなかった。このことから、培地や細胞のマイクロチャンバ外への漏洩は少なく、R-SAW 波形測定に十分な精度で細胞播種領域が制御されているといえる。

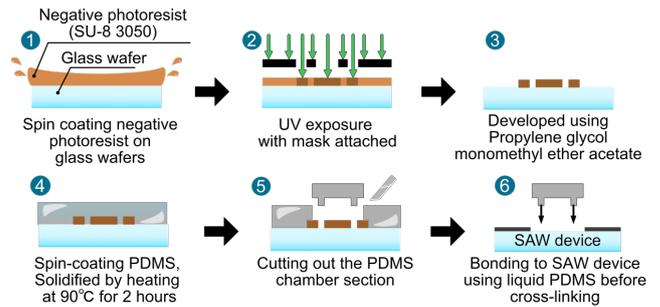


Fig. 2 Fabrication process of PDMS chamber.

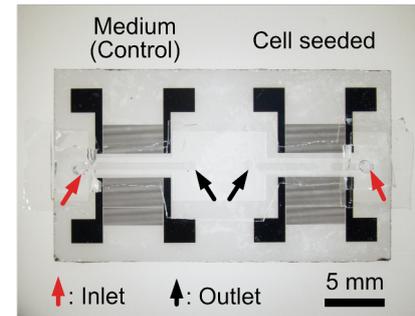


Fig. 3 Fabricated R-SAW device with microchamber made by PDMS.

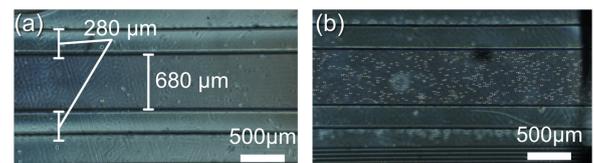


Fig. 4 Flow paths in PDMS chambers after cell seeding. (a) medium side for control. (b) cell-seeded side.

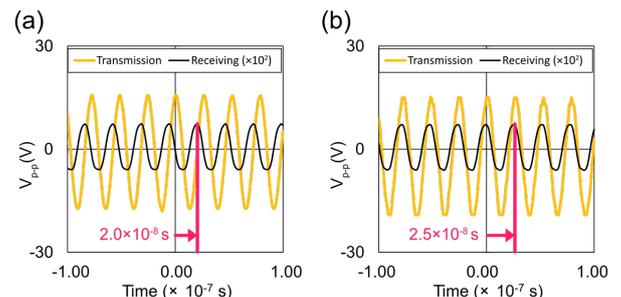


Fig. 5 SAW waveforms obtained from the cell-seeded side. (a) before cell seeding for blank data. (b) after cell seeding.

R-SAW 波形は細胞播種前、細胞播種直後の2回にわたり取得され、今回は細胞播種側でのみ波形を測定した (Fig. 5). 送信波に対する受信波の振幅比は、細胞播種前では 4.0×10^{-3} であり、細胞播種後では 3.9×10^{-3} となった。また、送信波に対する受信波の位相差は細胞播種前では 2.0×10^{-8} s、細胞播種後では 2.5×10^{-8} s となった。これらの結果より、細胞と培地がダンパとして働き、R-SAW を減衰させたほか、位相の遅れを生み出したことが推察される。つまり、質量の付加による影響を R-SAW が受け、波形情報として表れている。本研究では細胞播種側のみでの波形測定だったが、開発したマイクロチャンバを備えた R-SAW デバイスによる質量付加の検知が示唆された。

また、もう一つの検討項目として、気泡核の超音波応答性を具備したハイドロゲルを開発した。

ハイドロゲルに気泡核を含有することが超音波応答性を向上させるかを調べるために、SAW デバイスを用いる前に汎用的な超音波照射システムを用いて評価した。超音波照射デバイス (図 6a) は構成するガラスの厚みの違いで共振周波数を変化させ、インピーダンスアナライザを用いて共振点を測定した。超音波照射時にはデバイスの発熱により生じるハイドロゲルキャリアからのナノ粒子放出を防ぐため、冷水に静置した状態で実験を行った (図 6b)。超音波照射システムはファンクションジェネレータで超音波周波数と印加電圧を決定し、アンプで電圧を増幅して超音波照射デバイスに入力した。超音波照射デバイスに流れる電圧・電流値についてはオシロスコープで観察した (図 6c)。ガラスの厚みを変化させて超音波照射デバイスの製作を行い、気泡核の共振周波数 (数 MHz) 帯の共振点を持つ 1.790 MHz、2.502 MHz のデバイス、比較対象として共振点 294.3 kHz のデバイス、計 3 つの異なる周波数を持つ超音波照射デバイスを採用した。

生体内で超音波を照射する際には、音圧の強さを制御する必要がある。そこで本研究では、超音波の繰り返し周期内平均強度を示す I_{SPTA} を導入した。 I_{SPTA} と音圧の関係から、生体への安全性が保障された超音波出力に制御して実験を行う。そのため、製作した超音波照射デバイスにおける音圧分布、印加電流と音圧の関係を測定し、生体内安全性が保障される条件を決定した。超音波照射時の生体内への安全性を考慮する場合、血管等の生体組織では超音波照射出力の強度が $I_{SPTA} < 720 \text{ mW/cm}^2$ であることが求められる。そこで、 I_{SPTA} 値を導入して本研究で照射する超音波出力を計算した結果、平均音圧 200 kPa で生体内安全性が保障されることが示された。

そこで、製作した超音波照射システムの音圧強度分布と最大音圧を見るために、音圧測定実験を行った。まず初めに、製作した超音波デバイスにおいて 0.5 A の電流を印加した時の音圧分布を測定した。音圧はディッシュ中心部で最大となることが確認された。次に、ディッシュ中心部での印加電流と音圧との関係を調べた結果、印加電流に比例して音圧も増加することが示された。得られた電流と音圧の関係を用いて、オシロスコープで電圧と電流を測定しながら所望の音圧を超音波照射デバイスから照射できる。これにより、生体内安全性を考慮した実験条件の選択を可能とした。

超音波応答性を評価するために、蛍光シリカナノ粒子をハイドロゲル内に含有して、応答したら徐放される仕組みを組み込み、分光蛍光光度計で測定した。蛍光シリカナノ粒子の徐放量は検量線を使用して、分光蛍光光度計で得られた蛍光強度から計算して求めた。さらに、超音波と気泡核含有が超音波応答性に与える影響を評価するため、ハイドロゲルへの超音波照射の有無、気泡核含有の有無を組み合わせ、計 4 つの条件において実験を行った (Fig. 7)。熱的作用によるナノ粒子放出を防ぐため、超音波照射デバイスを冷水に静置して実験を行い、超音波周波数は 1.790 MHz で照射時間は 5 分とした。また、生体内安全性が保障される平均音圧 200 kPa として実験を実施した。

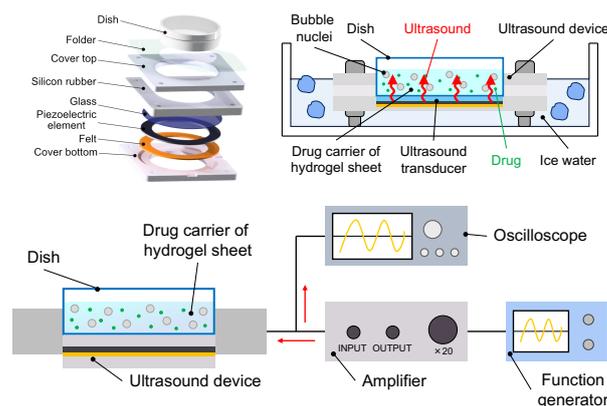


Fig. 6 (a) Assembly view of ultrasound irradiation device. (b) Ultrasound transmission path and cooling of the ultrasound irradiation device. (c) Experimental setup of the ultrasound irradiation system.

蛍光シリカナノ粒子の定量測定を行った結果、ハイドロゲルのみではナノ粒子の徐放量が全体の2.2%であった。一方でハイドロゲルに気泡核を含有し、超音波照射した条件では最も多く徐放され、全体量の6.5%と、3倍程度の徐放量が得られた。多重分析からも有意差が検出され、超音波と気泡核の両作用が超音波応答性を向上させることが示唆された。

さらに、超音波の周波数変化が徐放効率に及ぼす影響を評価するため、294.3 kHz, 1.790 MHz, 2.502 MHzの3つの周波数において超音波応答実験を行った (Fig. 8)。その結果、周波数 2.502 MHzの超音波が最も高い徐放性を示した。また、照射超音波の周波数が本実験で封入した気泡核の共振周波数 2.6 MHz に近づくにつれて、超音波応答性が向上することが示された。

以上の2つの研究から、(1) 細胞の増殖生の違いを感知できる SAW デバイスおよび (2) 超音波応答性を増感した気泡核を含有したハイドロゲルのそれぞれの要素開発に成功した。今後はこの2つの技術を融合しても有効であることを示し、生体モニタリングのためのツール製作に大きく前進した結果を得ることができた。今後はこれらを組み合わせて、*in vivo* での実験を行い、社会実装を目指して開発を進めていく。

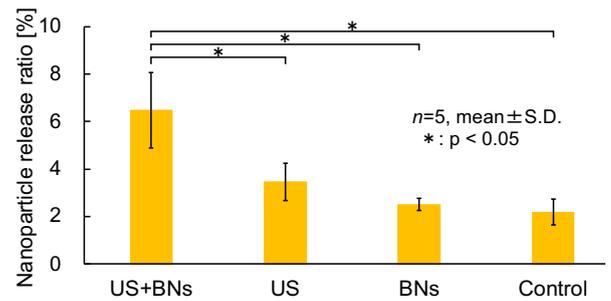


Fig. 7 Ultrasonic responsive experiments using alginate sheet containing bubble nuclei. Effects of bubble nuclei inclusion. (BNs) and ultrasound irradiation (US) were verified.

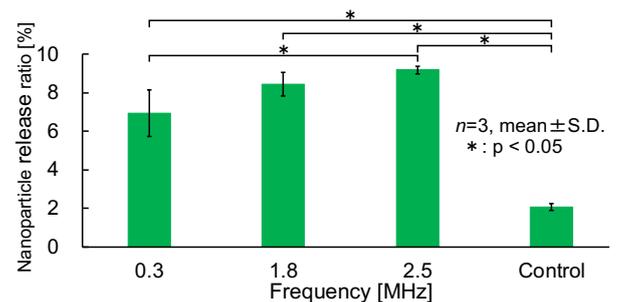


Fig.8 Change in nanoparticle release ratio with different frequencies of ultrasound irradiation.