

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05626

研究課題名(和文) 超音波トラップを用いたゲルのマイクロ構造制御

研究課題名(英文) Control of microscopic structure in hydrogel materials by acoustic wave

研究代表者

向井 貞篤 (Mukai, Sada-atsu)

京都大学・工学研究科・特定准教授

研究者番号：30371735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、機能的なゲル材料の構築を目指し、音響波を用いてゲルの内部構造を三次元的に制御することを試みた。対向する音波が干渉し定在波が生じると、周囲の媒体より固い物質は体積変化の少ない節に保持される。この原理を利用し、溶媒中のナノゲルが定在波の節の部分に周期的に配列した、三次元的な粗密構造を持つゲルを作製した。得られたゲルの物性評価として、原子間力顕微鏡による局所的な固さ測定と、乾燥状態からの膨潤挙動の観察を行った。さらに、細胞とナノゲルとのハイブリッドゲルを作製し、ゲル中における細胞の生存率や形態について評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハイドロゲルは、高い含水率と生体適合性から再生医療の足場材料として注目を集めており、その構造を三次元的に制御することへの要求が高まっている。本研究では、音響波トラップによりハイドロゲル中に周期的なパターン構造を形成することに成功した。また細胞を音波により集積させることで、構造化された細胞-ゲルハイブリッドの形成にも成功した。この技術を発展させることにより、生体組織を模倣した細胞集積構造を形成させることができるようになると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to construct a functional gel material, we tried to control a three-dimensional structure of hydrogels using acoustic waves. When opposing acoustic waves interfere, a standing wave is generated, and a material harder than the surrounding medium is held at a node due to a small volume change. Using this principle, we prepared hydrogels with a periodical density pattern. We evaluated physical properties of obtained gels, local hardness measurement with an atomic force microscope and observed swelling behavior from a dry state. Furthermore, we prepared hybrid gels of cells and nanogels and evaluated cell viability and morphology in the gel.

研究分野：ソフトマター科学

キーワード：非平衡開放系 ゲル マイクロ構造 超音波

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ハイドロゲルは、その高い含水率と生体適合性から、バイオメテック材料や医療材料として注目を集めている。ソフトコンタクトレンズは既に製品化されたものの代表例であり、現在、再生医療における足場材料としても、多くの研究・開発が行われている。このような背景から、ハイドロゲルの物性や構造を制御することへの要求が高まってきている。

ハイドロゲルのパターン形成については、ゲル膨潤時に現れる表面の“しわ”構造¹、ゲル中のマイクロ相分離²、リーゼガング現象による縞模様³といった自発的なパターン形成の報告の他、様々な鋳型の利用(報告例多数)やフォトマスクの利用⁴によるパターンゲルの形成といった、積極的に構造を制御し、機能の発現を目指した研究も行われている。また近年では、光照射型3次元プリンタによるゲルの立体的重合や、細胞塊そのものを剣山状の足場に串刺しにしていくことで3次元組織を形成する技術まで開発されている。

以上これまでの研究では、自発的なパターン形成の他は、鋳型やフォトマスクといった元となる構造をゲルに転写するという発想であった。そこで申請者は、局所的な外場と自発的なパターン形成を組み合わせるといった発想の下、新たに音響波トラップを用いて内部に構造を有するハイドロゲルを調製する手法を提案する。

<参考文献>

- Tanaka et. al., *Nature*, **325**, 796 (1987)
Mukai et. al., *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **136**, 95 (2009)
Narita et. al., *Colloid Surf. A*, **321** (1-3), 117 (2008)
Takahashi et. al., *Nat. Commun.*, **5**, 4490 (2014)

2. 研究の目的

ハイドロゲルは、その高い含水率と生体適合性から、バイオメテック材料や医療材料として注目を集めており、ハイドロゲルの物性や構造を制御することへの要求が高まってきている。本研究では、化学架橋ハイドロゲルを音響波トラップ中で架橋反応させることにより、高分子鎖密度や架橋密度といったゲルの内部構造をマイクロメートルスケールで制御することを目的とする。

具体的には、「1次元音響波トラップ装置の製作」、「音響波中で安定にゲル化する系の探索」、「1次元音響波トラップ中で架橋反応させたゲル構造の解明」、「2次元音響波トラップ装置の製作とその中で架橋反応させたゲル構造の解明」の4項目を目標とする。本研究は、音響波トラップとソノケミストリーを組み合わせることで、ハイドロゲルのマイクロメートルスケール構造を制御することを特色とし、細胞スケールの立体構造制御など、新たな足場材料の創製に繋がることを期待される。

3. 研究の方法

(1) 1次元音響波トラップ装置の製作

2個の振動素子を用いて、“その場観察”が可能な1次元音響波トラップ装置を製作する。対向して配置した2個の振動素子を、同じ振幅、振動数、位相で振動させることで、1次元的な音響波トラップ場を形成する。ファンクションジェネレーターで発生させた信号をアンプで増幅し、振動素子に与え、求める振動を得る。理解が容易な直接観察のため、光学窓をもつ試料チャンバーとして、その場観察する。トラップ状態を観察するため、プローブ粒子としてポリスチレンラテックス粒子を用い、振幅、振動数によるトラップ場の変化を観察する。また粒子サイズへの依存性についても検討する。

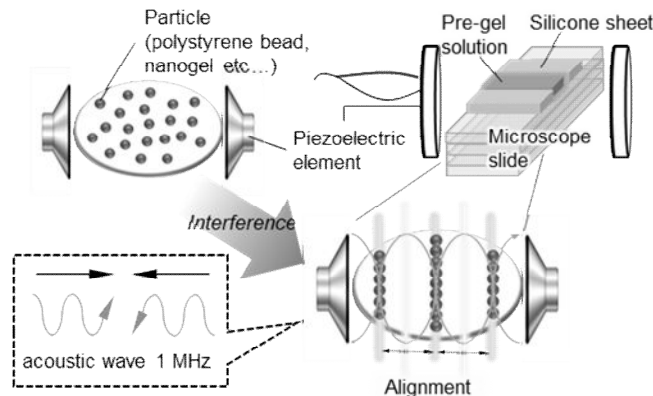


図1 音響波トラップ装置の概略図

(2) 1次元音響波トラップ中で架橋反応させたゲル構造の観察

製作した1次元音響波トラップ装置を用い、音響波トラップ中で架橋反応させたゲルの観察を行う。プレゲル溶液にプローブ粒子としてポリスチレンラテックス粒子を分散させ、粒子のトラップ状態とゲル密度の条件を検討する。観察手法としては、その場観察のほか、ゲル化した試料を回収し、詳細な観察を行う。蛍光標識が可能であれば、ウェットな状態で3次元構造の観察が可能である共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察により、ゲル内部の立体的な構造を評価する。原子間力顕微鏡による表面観察や局所固さ測定を行う。ゲルの膨潤率や力学特性の異方性について検討する。

(3) 細胞-ゲルハイブリッドの調製

再生医療に向けた応用展開の可能性を検討するため、細胞を集積した三次元構造を制御することを試みる。ハイドロゲル中に埋め込まれた細胞の配列を音響波により制御し、構造化された細胞-ゲルハイブリッドの調製を行う。ゲル中の細胞の状態について検討する。

4. 研究成果

(1) 1次元音響波トラップ装置の製作と基礎的性質の検討

振動素子の配置、組み立て・観察の容易さなどを検討し、図1に示すように1枚の振動素子と反射板、スライドガラスとシリコンシートにより試料チャンバーを作成し、音響波トラップ装置を構成した。

音響波トラップに関する基礎的な知見を得るため、サイズの異なるポリスチレンラテックスビーズおよびPEGを用いて、粒径や粘度の異なる溶液を調製した。スライドガラスおよびシリコンシートで作成したチャンバーに各溶液を流し込み、振動素子(1 MHz)を用いて音響波を照射し、その様子を観察した。

様々な粒径のポリスチレンラテックスビーズ溶液に音響波を照射したところ、粒径10 μmのビーズ溶液が音響波によってトラップされ縞模様が観察されたが、0.20 μmおよび0.10 μmのビーズ溶液はトラップされなかった。縞の間隔は約800 μmであり、振動数から期待される値(750 μm)と近く、定在波により、ビーズがトラップされているものと考えられた。粒径の小さな場合でも、PEGを加えて溶液を増粘することでトラップされた。よって音響波で微粒子をトラップするためには、粒径と粘度の適度なバランスが必要であると考えられた。

(2) ナノゲル集積マイクロスフィアのゲル中パターン形成

コレステリル基置換プルラン(CHP)に、蛍光色素であるローダミンとアクリロイル基を導入したCHP-OA-Rhが形成するナノゲルと、末端にチオール基を有する4本鎖PEG(PEG-SH)を用いて調製したナノゲル集積マイクロスフィアを音響波トラップにより整列させ、他のゲル中に固定する試みを行った。w/o エマルション法により調製したナノゲル集積マイクロスフィアを、フィルターにより分取し、直径10~40 μmの粒子を得た。これらをアクリルアミドゲル(30 wt%)のプレゲル溶液中に分散させ、1次元音響波トラップによりナノゲル集積マイクロスフィアを整列させた後、光反応開始剤によりゲル化を行った。得られたゲルをその場観察したところ、振動素子と反射板の間に、ナノゲルに由来する蛍光色素が等間隔に並んでいる様子が観察された。レーザー共焦点顕微鏡により詳細な観察を行ったところ、縞には多数のナノゲル集積マイクロスフィアが集まっていることが確認された。

(3) 1次元音響波トラップ中で架橋反応させたナノゲル集積ゲルの構造

CHP-OA-Rh ナノゲル分散液(30 mg/mL)と、末端にアクリロイル基を有する4本鎖PEG(PEG-OA)、開始剤であるLithium phenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinate(LAP)を混合し、プレゲルを調製した。チャンバーにプレゲルを流し込み、紫外線照射(365 nm)による光架橋を行いながら音響波を照射した。以上の光重合により得られたゲルの構造を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

アクリロイル基が100単糖あたり18個導入されたCHP-OA-Rhからナノゲルを形成させ、このナノゲルとPEG-OA、LAPの混合溶液に紫外線と音響波を照射すると、ナノゲル中のローダミンの蛍光色に由来する赤い縞模様が目視により観察され、溶液全体がゲル化した。縞の間隔は水中における音響波の半波長(750 μm)とほぼ等しく(図2)、また共焦点レーザー顕微鏡による観察から、ナノゲルが集積して縞を形成していることが確認された(図3)。光照射下でナノゲルの架橋反応が進行しマイクロ微粒子となることで、効果的に音響波でトラップされ、縞模様が形成したと考えられる。

2 MHzの振動素子を用いて、縞構造の変化について検討したところ、縞間隔は約半分になり、縞一本あたりが細くなった。縞間隔は約370 μmであり、理論値の375 μmにほぼ等し

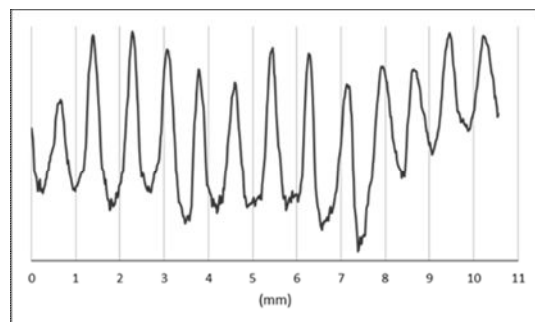


図2 音響波トラップにより形成されたナノゲル架橋ゲル中の縞模様の輝度グラフ

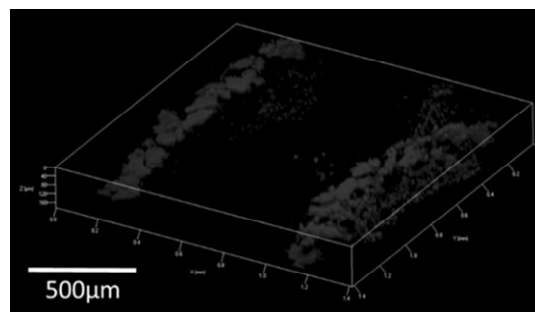


図3 音響波トラップにより形成されたナノゲル架橋ゲルの共焦点顕微鏡像(10 x)

い値となった。よって、縞の間隔はチャンバーの形状や配置に固有のものではなく、振動素子の振動数によって制御できることが分かった。

(4) 1次元音響波トラップ中で架橋反応させたナノゲル集積ゲルの特性評価

原子間力顕微鏡を用いて、作製したゲルの局所固さ測定を行った。ゲルを凍結後スライスしたもの(厚み 50 μm)をスライドガラス上に固定し、水を添加して膨潤させ、ヤング率を測定した。膨潤挙動については、Polydimethylsiloxane製の型を用いて円筒形のゲルを作製し、一晚乾燥させた後水を加え、膨潤する際の長さを経時的に測定した。

原子間力顕微鏡を用いてゲルの局所固さ測定を行ったところ、縞の部分と縞でない部分のヤング率はそれぞれ約 43 kPa、約 18 kPaであり、ナノゲルが集積している縞の部分が、PEGを主とする縞でない部分よりも固いことが分かった。また、乾燥させたゲルの縞構造を保持したまま再膨潤させることが可能であった。縞を有するゲルについて、縞に対して垂直および水平方向の辺の長さをそれぞれ経時的に測定し、異方性を確認した。しかし辺の方向による膨潤挙動の差はほとんど見られなかった。一方、縞を有するゲルと、音響波を照射せず作製したようなゲルの膨潤体積について、同様に経時的に評価したところ、縞のないゲルの方が大きく膨潤することが分かった。

(5) パターン構造化した細胞-ナノゲル架橋ゲルハイブリッドの形成

上記のプレゲルにC2C12筋芽細胞懸濁液を混合して光重合を行い、細胞とナノゲルとのハイブリッドゲルを作製した。得られたゲルを分化誘導培地に浸漬させ、37 $^{\circ}\text{C}$ インキュベータ内で培養した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、細胞の生存率や形態の評価を行った。

CHP-0A-Rh ナノゲル、PEG-0A、LAPにC2C12筋芽細胞懸濁液を混合し、紫外線と音波を5分照射すると、等間隔の縞構造を持つゲルが得られた。共焦点レーザー顕微鏡による観察から、縞の部分に細胞とナノゲルが集積していることが分かった(図4)。ゲル中における細胞生存率は、3日間培養後で約8割であり、細胞のパターニングが可能であることが明らかとなった。

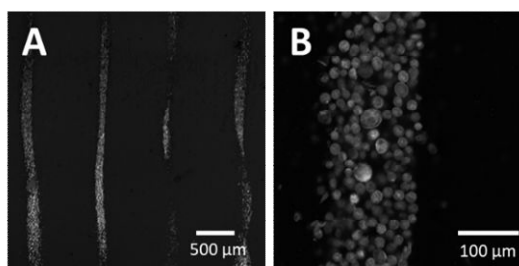


図4 音響波トラップにより形成された細胞-ゲルハイブリッドの共焦点顕微鏡像(A: 2.5 x, B: 20 x)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

なし

〔学会発表〕(計 6件)

角田千里, 向井貞篤, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成, “音響波によるマイクロゲル構造の制御”, 第66回高分子学会年次大会, 2017年5月.

角田千里, 向井貞篤, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成, “音響波によるナノゲル架橋ゲルのマイクロ構造制御とその物性評価”, 第66回高分子討論会, 2017年9月.

向井貞篤, 藤本達也, 角田千里, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成, “非平衡過程を利用したナノゲル架橋マイクロ構造の形成と物性評価”, 第66回高分子討論会, 2017年9月.

角田千里, 向井貞篤, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成, “音響波によるナノゲル架橋ゲルのマイクロ構造制御とその物性評価”, 第67回高分子学会年次大会, 2018年5月.

角田千里, 向井貞篤, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成, “音響波によるナノゲル架橋ゲルのマイクロ構造制御”, 第67回高分子討論会, 2018年9月.

向井貞篤, 角田千里, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成, “非平衡過程を利用したナノゲル架橋マイクロ構造の形成”, 第69回コロイドおよび界面化学討論会, 2018年9月.

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

なし

取得状況（計 0件）

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

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、研究者個人に帰属されます。