藤森科学技術振興財団
研究実施概要報告書

（西暦）　2025 年　　3 月　　19 日

公益財団法人藤森科学技術振興財団
理事長　藤森 行彦　殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関　　東京農工大学

職　　名　准教授（テニュアトラック）

氏　　名　　倉科　佑太　　印

【提出書類】

（1）研究実施概要報告書（本紙）
　　添付書類（A4 版 3 枚以内）：研究状況を示す写真等の資料

（2）収支報告書
　　添付書類：助成金を充当した経費の領収書
　　領収書を添付しない場合：支払一覧表と支払部門担当者記名捺印

（1）テーマ　　※スペースが足りない場合は、枠を追加いただいて構いません。

超音波と遠心力によりテイトの法則を超えた極小マイクロゲル粒子の生成

（2）本研究の期間

（西暦）　2024 年 4 月 ～　2025 年 3 月

（3）本研究の目的

ハイドロゲルを微細加工したマイクロゲル粒子は，水を含む高分子ネットワークに起因した多様な機能や性質を示し，微小なサイズかつ比表面積が極めて大きいという特徴を有している．これらの特徴から，薬剤送達や細胞組織形成，バイオセンサへの応用に期待されている．マイクロゲル粒子の生成は，従来では攪拌手法や Oil/Water エマルジョン手法が報告されていた．このような先行研究に対して，申請者はこれまでにマイクロチューブ内に先端が微細なガラス管を設置して，遠心分離により高速で滴下することでハイドロゲルを主成分とするマイクロゲル粒子を生成する遠心分離手法に着手してきた．この手法は従来と比較して，少量のサンプルを高速で生成できること，またエマルジョンを作らずに水層で生成できるため洗浄も必要ないこと，生体サンプルなどの稀少で劣化の早い試料を封入できることから，次世代のマイクロゲル粒子生成方法として期待されてきた．しかし，高速で気層から水層に射出する必要があることから，遠心分離によるマイクロ粒子の形成では，スケール効果が支配的となりガラス管先端の表面張力や粘性の影響により，100 μm よりも小さな粒子や高粘性のゲル粒子を生成することは困難（図 1）であった．以上の背景を鑑み，本研究の目的を給電型遠心駆動システムに超音波振動子を具備することで微小・高粘性のマイクロゲル粒子を生成することとした．

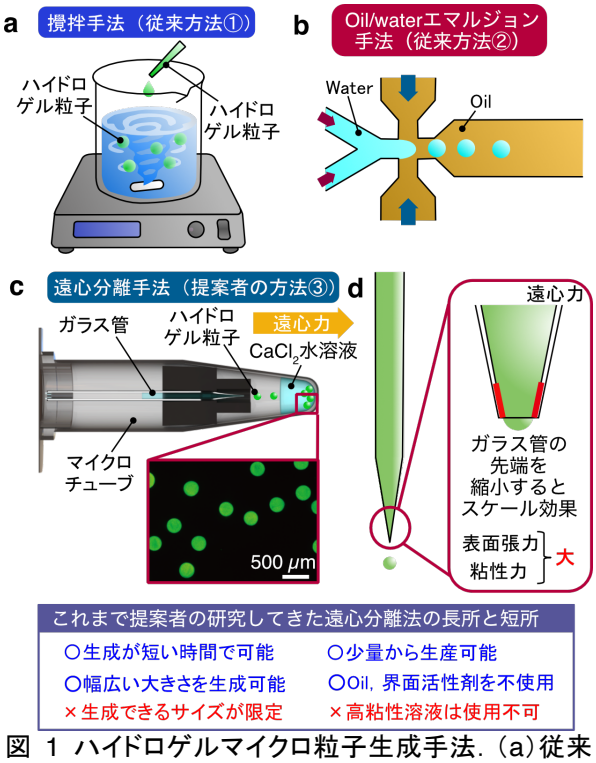

図 1 ハイドロゲルマイクロ粒子生成手法．(a)従来の撹拌手法，(b)従来の Oil/Water エマルジョン手法，(c)提案者が実施していた遠心分離手法，(d)遠心分離法の問題．

（4）本研究の概要

超高粘度のプレゲル溶液から遠心力と超音波振動を組み合わせたシステムを用いてハイドロゲル微粒子を合成した．このシステムにより，粘度が 10^4 mPa·s を超える溶液から球状微粒子を形成することが可能となった．システム内の超音波液滴射出モジュールは，100 kHz の超音波振動を利用して毛細管からアルギン酸ナトリウムのプレゲル溶液を射出し，遠心力のみでは困難な高粘度溶液の加工を実現した．振動子の振動モードを最適化することで，1.5×10^5 mPa·s までの粘

度に対応する射出を達成した．1.5×10^4 mPa·s の条件では，毛細管と架橋溶液の距離を調整することで粒子の円形度が向上し，約 140 μm の球状微粒子を形成した．3.0×10^4 mPa·s の溶液では，ろ過処理により均一なサテライト粒子（約 31 μm）を得ることができた．この手法は超高粘度溶液からの精密な微粒子合成を可能とする結果を得られた．

(5) 本研究の内容及び成果

本研究では，超高粘性のプレゲル溶液からマイクロゲル粒子を生成するために，遠心力と超音波振動を組み合わせた粒子生成手法を提案する．遠心分離機内で駆動可能な超音波液滴射出モジュールを製作し，それを遠心分離機内で制御可能な超音波遠心分離システムを構築した．超音波液滴射出モジュールの内部に搭載された積層型振動子は，プレゲル溶液が注入されたキャピラリの先端を振動させる．この振動が遠心力による射出を促進させることで，超高粘性プレゲル溶液をマイクロ液滴として射出することを試みた．積層型振動子の振動条件の検討したのち，プレゲル溶液の射出率を比較することで，超音波遠心分離システムの射出力を評価した．加えて，射出から架橋までの液滴飛翔距離を調整することで，粒子形状が均一かつ球形となる条件を検証した．

実験方法

超音波遠心分離システムの構築

遠心分離機内で使用可能な小型の超音波装置として，超音波液滴射出モジュールを製作した（図 2a）．このモジュールは 50 mL 遠沈管の内部に構成した．キャピラリと積層型振動子，α ゲル製の振動吸収材を治具の上に組み立て，その中に塩化カルシウム水溶液を満たした粒子回収容器を配置した．キャピラリは積層型振動子の穴に挿し込まれており，駆動時の遠心力によって積層型振動子に固定された．α ゲル製の振動吸収材は，積層型振動子をモジュール内に固定するために使用した．

超音波液滴射出モジュールの構成部品であるキャピラリは，内径 0.9 mm のガラス管を加工することで製作した．加工にはプーラーとマイクロフォージを使用し，キャピラリ先端のプレゲル溶液射出部を形成した．キャピラリ先端の内径は 30 μm である．

積層型振動子には，PZT と真鍮板をそれぞれ 2 枚ずつ用いた．どちらも直径は 20 mm で，真鍮板には配線用の突起を有している．本研究では，軽量かつ小型でも大きな振幅を得るために，金属板を介して PZT を同じ電極面で貼り合わせたバイモルフ構造にした．エポキシ系接着剤で PZT と真鍮板を貼り合わせ，スクリュープレスを用いて 1000 N で 24 時間静置させることで圧着した．

製作した超音波液滴射出モジュールを遠心分離機内で使用するために，超音波遠心分離システムを構築した．積層型振動子への給電のため，既往研究にて使用されている給電型遠心駆動システムを導入した（図 2b）．遠心分離機内に取り付けたスリップリングを経由して給電することで，遠心分離中でも積層型振動子を駆動させることが可能である．モジュールの駆動電源はファンクションジェネレータとバイポーラ電源である．回路中にはオシロスコープを接続し，積層型振動子が遠心分離中にも共振周波数での駆動を維持できていることを確認した．

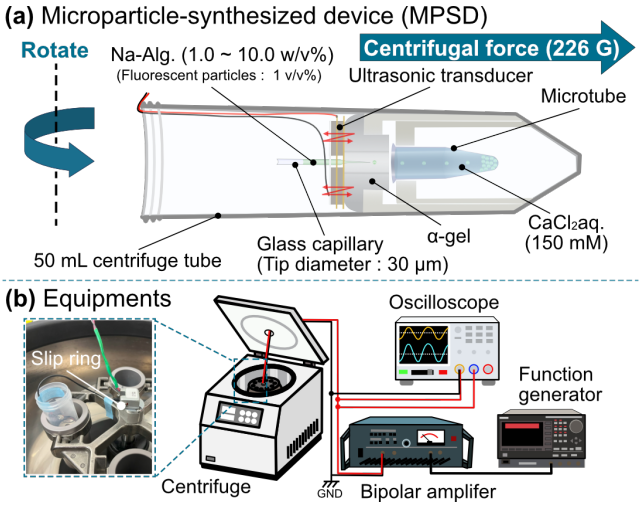

図 2 超音波システムの構成．（a）超音波液滴射出モジュールの構成要素．（b）スリップリングを介した電源供給と微粒子合成システムを駆動するための実験セットアップ．

2.2. 積層型振動子の共振周波数と振動モード計測

積層型振動子（Fig. 3a）の共振周波数は，インピーダンスアナライザによって取得した（Fig. 3b）．本研究では積層型振動子から大きな振幅を得ることが重要であるため，kHz 帯の共振周波数のみを計測対象とした．

本研究の提案する手法において，キャピラリの振動方向が重要な要素である．しかし，超音波液滴射出モジュール内では，積層型振動子とキャピラリは遠心力によって固定されるため，重力下での振動モードを把握することができない．そこで，有限要素解析ソフトウェアの COMSOL を使用し，積層型振動子とキャピラリが一体化したときの振動モードを解析した．振動モードは固有周波数解析によって取得し，インピーダンスアナライザで得られた共振周波数に最も近い固有周波数での結果を使用した．加えて，振動変位の定量化のために，共振周波数における積層型振動子の面外方向への振幅を，レーザードップラ振動計によって計測した（Fig. 3c,d）．計測点数は，積層型振動子の半径方向に 10 点ずつ，計 40 点である．

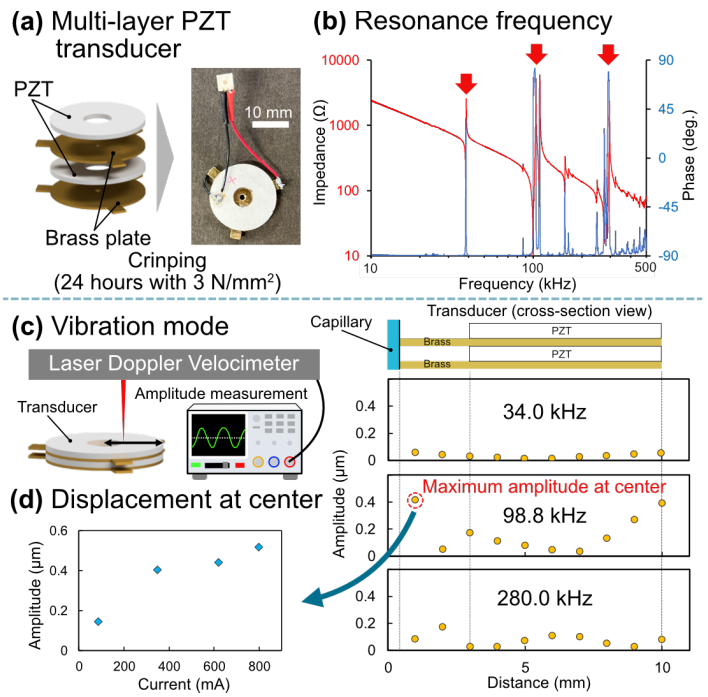

図 3 積層振動子の振動特性．（a）製作した PZT の構成．（b）インピーダンスアナライザーによる特性評価．（c）レーザードップラー振動計を用いた多層膜トランスデューサーの測定．（d）各振動モードにおける振幅分布測定．

2.3. 溶液の調製と粘性計測

射出するプレゲル溶液には，アルギン酸ナトリウム水溶液（1-10 *w/v*%）を用いた．アルギン酸は，自然界に豊富に存在する海洋藻類由来の天然多糖類である．アルギン酸ナトリウムは二価以上の金属イオンとの反応により架橋するため，架橋用の溶液には塩化カルシウム水溶液（150 mM）を使用した．各濃度のアルギン酸ナトリウム水溶液には 0.2 μm の蛍光粒子（1 *v/v*%）を混ぜ，粒子生成後の蛍光観察を可能にした．

アルギン酸ナトリウム水溶液の粘性は，せん断レオメーターを用いて計測した．アルギン酸などのポリマー溶液はせん断速度に対する粘性が一定ではないため，Carreaw モデルを用いた近似曲線によってゼロせん断粘度を取得した．本研究においては，各濃度のアルギン酸ナトリウム水溶液のゼロせん断粘度を，その溶液の粘性とした．

2.4. 粒子生成実験と射出率の算出

構築した超音波遠心分離システムを駆動させ，マイクロゲル粒子を生成した．実験パラメータはアルギン酸ナトリウム水溶液の濃度（1-10 *w/v*%）であり，濃度ごとの射出率を調査した．射出率は，キャピラリへのプレゲル溶液の注入量に対する射出量で，実験前後のキャピラリの質量を計測することで算出した．遠心力は 1300 rpm（= 226 G）で，回転時間は 60 秒である．積層型振動子に流れる電流は 700 mA に設定した．

射出率の評価に加えて，射出から塩化カルシウム水溶液への着水までの液滴飛翔距離を変化させ，それが粒子形状に与える影響を調査した．液滴飛翔距離（5-25 mm）は塩化カルシウム水溶液の液面を変化させることによって調整した．使用したプレゲル溶液は 5 *w/v*%のアルギン酸ナトリウム水溶液である．

2.5. 粒子形状の解析

超音波遠心分離システムによって生成したマイクロゲル粒子は，蛍光顕微鏡を用いて観察した．得られた粒子画像は ImageJ を用いて解析した．解析項目は粒径（フェレー径）と円形度である．円形度は粒子の断面積と周囲長から算出した．円形度の統計分析には Student の t 検定を使用し，$p < 0.01$ の値は優位であるとした．粒径分布とともに記載した変動係数（C.V.）は，標準偏差と平均値の比である．

実験結果

積層型振動子の振動特性

インピーダンスアナライザを用いた共振周波数計測により，38，100，287 kHz の周波数で特に顕著な位相シフトが得られたため，これを共振周波数とした．

この共振周波数に最も近い固有周波数（39，100，289 kHz）でのモード解析の結果，積層型振動子のモデルは面外振動モードで変形した．キャピラリを挿し込んだ状態の積層型振動子についても解析し，固有周波数（36，100，287 kHz）を得た．36 kHz ではキャピラリ先端が遠心力方向に沿った縦振動モードであるのに対し，100 kHz では遠心力方向と横方向の両方で振動した．287 kHz ではより小さい振幅の高次振動モードを示した．これらの振動特性から，超音波遠心分離システムの駆動には，縦振動と横振動の低次モードを有する 100 kHz の共振周波数が適していると考えた．

振幅を計測すると，積層型振動子の中心部分で振幅が最大になった．100 kHz の共振周波数における中心振幅は，印加する電流に応じて増加した．

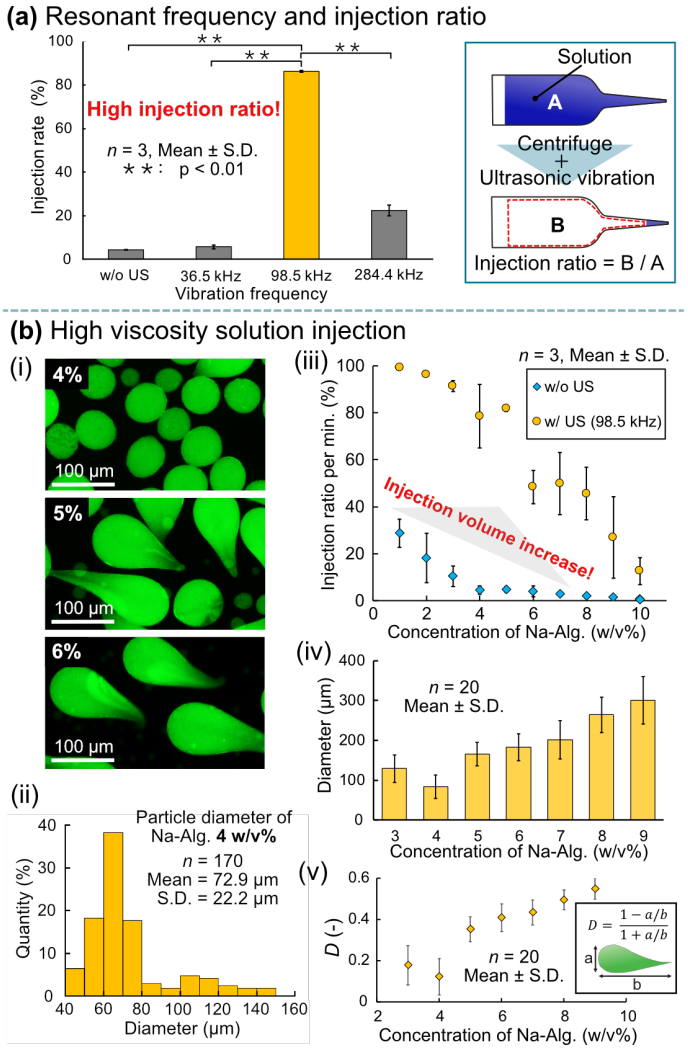

図 4 Na-Alg 濃度に着目した超高粘度プレゲル溶液の排出性評価と粒子観察．（a）超音波振動の有無による周波数と排出率の関係．（b）微粒子の蛍光観察と評価．生成したハイドロゲルの粒径分布．Na-Alg の濃度と射出率の関係． Na-Alg プレゲル溶液の濃度を変えて合成した微粒子のフェレット径と円形度（*D*）の計算．なお，スケールバーはすべて 500μm.

3.2. プレゲル溶液の粘性

実験に用いるアルギン酸ナトリウム水溶液（1-10 *w/v*%）の粘性は，せん断速度に応じて低下した．Carreaw モデルの近似を用いたゼロせん断粘度を整理すると，粘性が濃度に応じて急速に増加する結果を得た．この粘性領域は，細胞外マトリクスとして使用されるマトリゲルの粘性領域[11]と同等である．

3.3. 射出率の評価

プレゲル溶液の粘性に対する超音波遠心分離システムの性能を評価するため，アルギン酸ナトリウム水溶液の濃度を変化させて，それぞれの条件における射出率を算出した．遠心力と超音波振動を組み合わせることで，遠心力のみの場合よりも極めて高い射出率を得た（Fig. 4a）．加えて，遠心力のみでは射出が困難な 4 *w/v*%を超えるアルギン酸ナトリウム濃度（= 2.5×10^3 mPa·s）の超高粘性プレゲル溶液の射出も実現した．

3.4. アルギン酸濃度と粒子形状

射出率比較の実験において，キャピラリ先端から塩化カルシウム水溶液までの液滴飛翔距離が

5 mm の条件下で得られた異なる濃度の粒子の蛍光観察画像を取得（Fig. 4b(i)）し，粒径分布を測定した（Fig. 4b(ii)）．アルギン酸の濃度を変化させると，超音波を照射することで高濃度において顕著に射出量が増えることが示された（Fig. 4b(iii)）．超音波振動を与えない条件下では，粒子数は粘度とともに減少した．また，7 *w/v*%と 9 *w/v*%の濃度条件では，プレゲル溶液がほとんど射出されなかったため，観察できた粒子も微量だった．超音波振動を与えた条件下で生成された粒子は，超音波振動を伴わない条件の粒子と比較して，粒径がより大きく，涙滴形状を形成した．

マイクロゲル粒子の定量評価として，微細なサテライト粒子を除き，粒径が 80 μm 以上の粒子に限定して粒径と円形度を算出した．蛍光観察による結果を裏付けるように，アルギン酸ナトリウムの濃度が高くなるにつれて粒径は大きくなり（Fig. 4b(iv)），円形度は低下した（Fig. 4b(v)）．

3.5 液滴飛翔距離の変化と粒子形状

前節の結果において，超高粘性のプレゲル溶液からなる粒子は低い円形度を有した．しかし，マイクロゲル粒子の応用においては，粒子形状の均一性が求められる．そこで，超高粘性のプレゲル溶液から高い円形度を有するマイクロゲル粒子を生成するために，液滴飛翔距離であるキャピラリの先端から塩化カルシウム水溶液までの距離を調整することで，粒子を生成した（Fig. 5a）．5 *w/v*%のアルギン酸ナトリウム水溶液から生成された粒子の蛍光画像について比較すると，液滴飛翔距離が 20 mm のとき，涙滴形状の粒子の数が減少した（Fig. 5b）．統計的優位な高い円形度を得た距離 20 mm の結果では，粒径は 140 ± 25 μm で，変動係数（CV）は 18%だった（Fig. 5c）．一方で，距離 20 mm までの液滴飛翔距離で円形度が上昇した傾向とは対照的に，さらに液滴飛翔距離を伸ばして距離 25 mm としたとき，円形度は低下した．

遠心分離手法の既往研究では，プレゲル溶液の液滴はキャピラリ先端から直進する方向に射出されないことが報告されている．したがって，本研究における超音波液滴射出モジュール内でも，ある距離で粒子回収容器と接触する．そこで，プレゲル溶液の液滴が粒子回収容器の壁に接触する最短距離を調査するために，塩化カルシウム水溶液を除いた粒子回収容器にトレーシングシートを設置し（Fig. 5d），超音波遠心分離システムを駆動させた．これにより，プレゲル溶液の液滴が粒子回収容器の壁面に接触した位置をトレーシングシートに記録した．トレーシングシートに接触した液滴の最高位置は，キャピラリ先端から 20 mm 離れた距離だった（Fig. 5e）．この結果から，液滴飛翔距離が 25 mm のときは，液滴の一部が粒子回収容器の壁面に接触し，粒子形状が崩れたと考えられる．

3.6 サテライト粒子の生成

本研究における超音波液滴射出モジュールのサイズでは，アルギン酸ナトリウムの濃度を 6 *w/v*% 以上に高めると，液滴飛翔距離が不足して均一な粒子を得ることが困難である．一方で，高濃度のアルギン酸ナトリウム水溶液では，液滴飛翔距離が 5 mm の条件において，形状が均一なサテライト粒子が生成された（Fig. 5f）．メッシュサイズが 40 μm のセルストレーナで粒子を分離すると，サテライト粒子のみの粒子画像が得られた（Fig. 5g）．このサテライト粒子の粒径は 30.5 ± 3.1 μm で，変動係数は 10%だった（Fig. 5h）．この結果は，超音波振動や遠心力，プレゲル溶液の粘性などの特定の条件において，均一なサテライト粒子の生成が促進されることを示唆している．

（6）本研究の考察

本研究では，積層型振動子に固定した微細なキャピラリから，1.0×10^4 mPa・s を超える超高粘性のプレゲル溶液を遠心力下で射出させた．遠心分離法のみを用いた既往研究では，圧力損失の増加により，超高粘性プレゲル溶液からの微粒子合成は達成されていない．また，超音波のみを用いた既往研究では，超高粘性プレゲル溶液をマイクロゲル粒子生成に適用することは困難であった．これは，超音波の主な役割はポンプではなく，プレゲル溶液を小さな液滴に分断することだからである．したがって，マイクロゲル粒子の生成には，遠心力と超音波振動の両方が必要であることが明らかになった．

マイクロゲル粒子の蛍光観察では，プレゲル溶液の濃度が高くなるにつれて，涙滴状の粒子が生成された．これは，超高粘性プレゲル溶液が射出される際に，大きな伸長流動応力[13]によって液糸が形成されたためである．伸長流動下における高分子溶液の液滴の寿命は，溶液の濃度に依存するため，こうした傾向が得られた．また，キャピラリ先端から塩化カルシウム水溶液までの距離変化によって粒子形状の変化が観察されたことから，球状粒子を形成するには，距離に応じて適切な液滴射出位置が存在することがわかる．本研究の条件下では，設定可能な範囲内で最長である 20 mm の飛翔距離によって，液滴の復元力が作用するための時間を確保することができた．

本研究では，超高粘性プレゲル溶液からなるマイクロゲル粒子の生成手法開発を目的とし，遠心力と超音波振動を組み合わせたマイクロゲル粒子生成手法を提案した．遠心力のみでは 4 *w/v*%（7.7×10^3 mPa·s）の濃度を境界として著しく射出率が低下したが，超音波振動を併用した本研究の手法では 9 *w/v*%（1.5×10^5 mPa·s）の濃度のアルギン酸ナトリウム水溶液の射出に成功した．射出後の架橋によって生成された粒子は，粘性の増加とともに涙滴形状になったが，キャピラリ先端から塩化カルシウム水溶液までの液滴飛翔距離を制御することで，粒子の円形度が改善した．

今後の課題と展望としては，生成可能な溶液と構造の拡大，および細胞組織への適用可能性の検証が考えられる．マイクロゲル粒子は，半球ずつ異なる特性を持つヤヌス型や，内側の核と外側の殻を有するコアシェル型が多く用いられている．つまり，異なる溶液から 1 つの粒子を生成することに対して大きな需要があり，ここに超音波遠心分離システムの特徴である粘性の幅の広さが生かせる可能性がある．したがって，本研究で提案した手法により，マイクロゲル粒子化が可能なマテリアルの幅が広がり，生体医工学分野に限らず幅広い応用が期待できる．

(7) 共同研究者（所属機関名、役職、氏名）

なし

(8) 本研究の成果の公表先

1. ○Yuta Bando, Hiroaki Onoe, Yoshiyuki Tagawa, and Yuta Kurashina, “Microparticle-Synthesized System by Ultrasound and Centrifugation for High-Viscosity Fluids,” The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences – Micro-Total Analysis Systems (μTAS 2024), 2024.
2. ○板東雄太，尾上弘晃，田川義之，倉科佑太，”超音波遠心分離手法により生成した高粘性マイクロゲル粒子の形状特性”，第 15 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム，2024.
3. ○板東雄太，尾上弘晃，田川義之，倉科佑太，”超音波遠心駆動システムによるマイクロゲル粒子の高速生成”，Dynamics and Design Conference 2024（D&D2024），横浜，2024/9/3-6.
4. ○板東雄太，尾上弘晃，田川義之，倉科佑太，”超音波遠心駆動システムによる微小ハイドロゲル生成手法の開発”，化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 48 回研究会（CHEMINAS 48），熊本，2023/11/6-8.

［注］この報告書を当財団のホームページ等に掲載します。予めご了承ください。