

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13865

研究課題名（和文）マイクロバブル内包ベシクルの超音波マニピュレーションに関する研究

研究課題名（英文）Study on the manipulation of microbubble-encapsulated vesicles using ultrasound field

研究代表者

高木 周（TAKAGI, SHU）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授

研究者番号：30272371

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マイクロバブルDDSへの応用を目指し、マイクロバブル内包型ベシクルを効率よく作成、さらに超音波により、その位置を制御、膜を破壊する技術について、実験およびシミュレーションによる検討を行った。その結果、油水面通過法の導入により、従来の静置水和法と比べ、格段に収率のよりマイクロバブル内包ベシクルの生成に成功し、さらに、実験より集束超音波によりベシクルの捕捉と膜の破壊を達成できる可能性を示すことに成功し、シミュレーションにより、効率よく膜の破壊を達成するための条件について調べ、ベシクル動かさずに膜破壊を達成していくための気泡サイズの条件などについて知見を得た。

研究成果の概要（英文）：In this study, for the application of micro bubble DDS, we investigated the efficient method to generate microbubble-encapsulated vesicles. We further investigated the method to control the vesicle position and to break-up the vesicle membrane using ultrasound field. Both the experiments and simulations were conducted for the manipulation of vesicles. As results, it was shown that microbubble-encapsulated vesicles are very effectively generated by introducing Oil/Water Interface inverted emulsion method. For the vesicle manipulations, we succeeded to break-up the vesicles by manipulating bubbles using ultrasound field. The simulations were conducted to investigate the bubble size effect to the effective break-up of the vesicles.

研究分野：流体工学

キーワード：混相流 マイクロバブル 超音波 DDS ベシクル 表面修飾 マイクロチャネル バブルクラスター

### 1. 研究開始当初の背景

超音波血管造影剤としてのマイクロバブルは、第一世代のレボビストから始まり、さまざまな改良が加えられ、臨床の現場で利用されてきた。これに対し、マイクロバブルと超音波を併用し治療に活かす超音波治療は、強力集束超音波（HIFU）を利用した腫瘍焼灼技術と関連してその有効性は示されているが、治療方法としては確立していない。また、マイクロバブルを薬剤輸送担体（カプセル）として利用し、目的部位で薬剤を放出されるマイクロバブルドラッグデリバリーシステムの開発も行われているが、現在のところ、特定の細胞（がん細胞等）にだけ吸着するリガンドをカプセル上に修飾し、目的の部位にリガンドを使って接着した後に、超音波で破壊する方法が考えられている。この手法では、リガンドとレセプターの結合力が弱いいため、微弱な超音波の影響でも、マイクロバブルごとベシクルが吹き飛ばす可能性が高く、目的部位で効率よくカプセルを破壊することは困難である。これに対し、超音波によりカプセルを移動かつ固定することができれば、その部位で、カプセルを破壊し薬剤放出を促進することが可能となり、超音波によるマイクロバブル内包ベシクルの位置制御、破壊の手法の開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、医療応用を中心に様々な用途に適用できる1ミクロンサイズの超微細気泡に対して、表面コーティングや表面修飾、薬剤の封入などを施し、目的に合わせた機能性を有するマイクロバブル内包型ベシクルを生成することを旨とする。さらに、超音波によるベシクルのマニピュレーションと目的部位への選択的吸着、膜の破壊を行うことにより、マイクロバブル内包型ベシクルを制御し、機能を発現させる方法を検討する。特に、マイクロバブル薬剤搬送システムへの実用化を意識し、体外から照射する超音波により血流中のマイクロバブル内包型ベシクルを制御する方法について、実験とシミュレーションの両方の観点から検討する。

### 3. 研究の方法

本研究では、上記の研究の目的を達成するために、(1)マイクロバブル内包ベシクルの安定した生成手法の確立、(2)マイクロバブル内包ベシクルの超音波場による位置制御、膜破壊に関する実験、(3)数値シミュレーションを実施した。以下、3つに分けて説明する。

#### (1) マイクロバブル内包ベシクルの生成手法

申請者らは、これまで静置水和法によりマイクロバブル内包ベシクルの生成を行った来た（原ら、マイクロ・ナノ工学シンポジウ

ム, 1(2009), 105- 106). この手法は、簡便ではあるが、マイクロバブルがベシクル内部へ取り込まれづらく、マイクロバブル内包のベシクル生成率が低いのが問題であった。これに対し、本研究では、本研究では、Yamadaら(Langmuir, 22 (2006), 9824-9828)が提案した油水界面通過法によるリポソーム生成を応用して、マイクロバブル内包ベシクルを生成した。油水界面通過法によるマイクロバブル内包ベシクル生成の概要を Fig. 1 に示す。油層はリン脂質である 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (Avanti Polar Lipids, Inc.)、または 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (Avanti Polar Lipids, Inc.) をミネラルオイル (Nacalai Tesque, Inc.) に 1 mM の濃度で溶解したものをを用いた。Sonazoid® (Daiichi-Sankyo Co., Ltd.) 溶液は 200 mM スクロース水溶液で調製した。Sonazoid® 溶液を脂質溶液に 1:30 の体積比で混合し、ボルテックスミキサー (Vortex- Genie 2, Scientific Industries, Inc.) を用いて乳化させた。水層には 200 mM グルコース水溶液を用いた。乳化させた Sonazoid® 液滴入りの油層をグルコース水溶液上に滴下し、Sonazoid 液滴を自重落下により油水界面を通過させてマイクロバブル内包ベシクルを生成した。生成の様子は光学顕微鏡 (TE- 2000E, Nikon Corp.) に取り付けられた高速度カメラ (MotionPro X3, IDT Inc.) およびデジタルカメラ (D5100, Nikon Corp.) を用いて撮影した。

#### (2) マイクロバブル内包ベシクルの超音波場による位置制御、膜破壊に関する実験

ここでは、定在波および集束超音波音場によるマイクロバブルの捕捉および破壊について実験方法を説明する。

定在波音場中における気泡には第一ビヤクネスカと呼ばれる音響放射圧が働くのが知られている。この音響放射圧により、固有

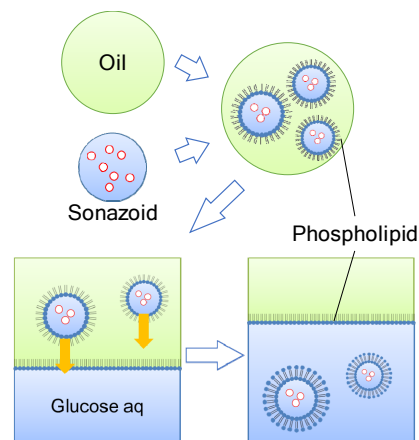


Fig. 1 Schematic view of method for generating liposomes.

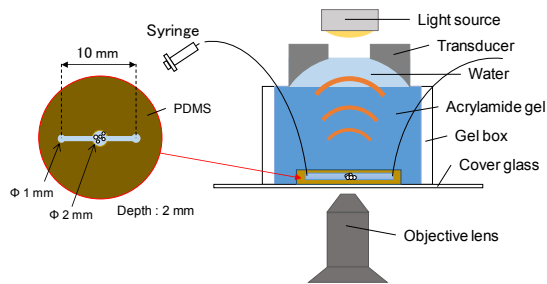


Fig. 2 Experimental setup for capturing and destructing vesicles using focused ultrasound.

振動数が照射超音波の振動数より高い小さな気泡は、定在波の腹に、固有振動数が低い大きな気泡は節に集まることが理論より予測される。本研究では、超音波トランスデューサーと反射板を用いて1次元定在波音場を形成し、音場中にマイクロバブル内包ベシクルを含む水溶液を満たして実施した。照射超音波の周波数は2.2 MHzであり定在波はその約2倍の周波数となるため、Sonazoid®のうち直径2  $\mu\text{m}$  以下の大きさの気泡が腹に、それ以上の大きさの気泡は節へと向かう。定在波照射によりベシクル中のマイクロバブルを駆動させること、さらには超音波によってマイクロバブル同士の合体を誘起し、小気泡から大気泡へ変化させることによって、大きなビヤクネス力を引き起こし、ベシクルの脂質膜を破壊することに成功した。

次に二次元平面に音圧勾配を作り、流路中を流れるマイクロバブル内包ベシクルを捕捉、破壊する方法として集束超音波を用いた実験系を構築した。実験系の概略図を Fig. 2 に示す。3-(1)-①の手法により生成したマイクロバブル内包ベシクルを高さ2 mm、幅1 mmの流路に流し、流路外部から集束超音波を照射してベシクル内部のマイクロバブルを捕捉、ベシクルの破壊を行った。用いた超音波発生装置は口径40 mm、焦点距離40 mmで、共振周波数344 kHzの球面型素子である。球面型素子の中央の穴は、観察用の光源をとるために空けており、直径は20 mmである。圧電セラミックスにはPZT (C213, Fuji Ceramics Corp.)を用いた。集束超音波では焦点付近にのみ音圧分布が存在しているため、その部分に選択的に捕捉することが可能であると考えられる。光学顕微鏡(TE2000-E, Nikon Corp.)で観察し、高速度カメラ(MotionPro X3, IDT Inc.) およびデジタルカメラ(D5100, Nikon Corp.)で撮影した。

### (3)マイクロバブル内包ベシクルの超音波場による位置制御に関する数値シミュレーション

本研究では超音波によって誘起された気泡の並進運動によるバブルリポソームの位置制御手法および膜破壊手法を検討するためシミュレーション手法を開発した。

生体内で用いられるミクロンサイズのマイクロバブルを考えた場合、超音波音場内で、その体積振動と並進運動の時間スケールが大きく異なる。体積振動の周期は0.1-1.0  $\mu\text{s}$ 程度であるのに対して、音響放射力による並進運動の時間スケールは、数msから数s程度である。これらの時間スケール違いを踏まえ、体積振動を追跡する時間刻みで並進運動を扱うことは計算負荷の観点から見て極めて困難である。そこで本手法では流れ場と音場の計算を分離しながら、超音波音場の影響で体積振動する気泡が、ビヤクネス力により並進運動し、さらにはベシクル全体を移動させるのを扱うことができる計算手法を開発した。

本計算手法では、遠方から照射された超音波音場により体積振動する気泡については、Rayleigh-Plesset方程式を用い、気泡の放射する音場を計算し、その結果誘起される音響放射力とマイクロバブルの並進運動に関しては、Maxeyら<sup>③</sup>のForce Coupling Method (FCM)を用いた。また、膜を有するベシクルの変形流動構造については、Peskinら<sup>④</sup>のImmersed Boundary Method (IB)を用いた。手法の詳細については、本研究の発表論文(雑誌論文①)を参照のこと。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロバブル内包ベシクルの生成手法

油水界面通過法を用いて生成したマイクロバブル内包ベシクルを Fig. 3 に示す。内包されているマイクロバブルはベシクル内部で浮力により上昇し、球面膜によってベシクル中央に集まった。申請者らのグループで従来用いていた静置水和法による生成と比較すると、格段に収率が向上し約90倍程度の収率上昇を達成した。さらに、本手法で生成されるリポソームは高確率で単層となるため、超音波によるリポソーム膜の破壊条件の検討をより正確に行うことが可能となった。

生成されたマイクロバブル内包ベシクルのベシクル径および内包された気泡数の分布をそれぞれ Fig. 4(a)と(b)に示す。生成されるベシクルは直径20  $\mu\text{m}$  付近にピークを持ち、その時内包されるマイクロバブルは10個以下であった。一方で、粒子の単分散性を示すCV値はおよそ78%であり、一般的に単分散性が高いとされる10%以下を達成しなかった。CV値は直径の標準偏差 $\sigma$ と平均値 $D$ を用いて求められ、次式で表される。

$$CV = (\sigma/D) \times 100 \quad [\%]$$

CV値より、本研究により生成されたマイクロバブル内包ベシクルの大きさには大きなばらつきが存在すると言える。内包される気泡数とベシクル径の相関係数は0.68であり、相関はあるが、ばらつきが大きい結果となった。また、直径5  $\mu\text{m}$  以下のマイクロバブル

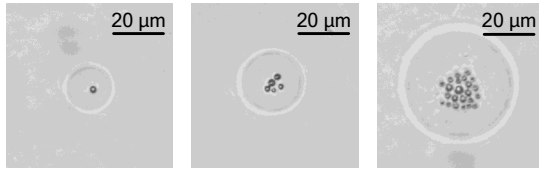


Fig. 3 Microbubble-enclosed liposome.

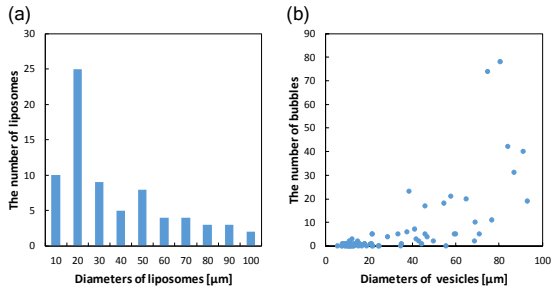


Fig. 4 (a)Histogram of liposome diameters. (b)Relation between the diameters of liposomes and the number of enclosed microbubbles

内包ベシクルは安定的に生成されず、気泡が内包されない直径数  $\mu\text{m}$  程度のリポソームが多数確認されるに留まった。径の小さなマイクロバブル内包ベシクルを実現するためには、生成時の気泡数密度を高くする、もしくはより小さなマイクロバブルを使用することによって達成されることが考えられる。

(2)マイクロバブル内包ベシクルの超音波場による位置制御、膜破壊に関する実験

Fig. 5 に一次元定在波を用いたマイクロバブル内包ベシクルの捕捉および破壊の様子を示す。音場に捕捉された (a) からベシクルの破壊が完了する (d) までの間、ベシクルは移動せず同じ場所に留まった。 (b) においてベシクル内部の気泡の一部が合体して一つの大きな気泡となり、その後 (c) のように小さな気泡を周囲に放出することでベシクルの破壊が行われた。

Fig. 6 に流路内を流れるマイクロバブル内包ベシクルを集束超音波によって捕捉した様子を示す。(a)~(d)は時系列に並んでいる。流れの方向は右から左である。焦点位置に予め捕捉されていた気泡に対してマイクロバブル内包ベシクルが吸い寄せられ、約1秒間焦点位置での捕捉に成功した。これより、焦点付近で作用するピヤクネス力の効果により、マイクロバブル内包ベシクルを捕捉可能であることが示された。また、ベシクルと単体気泡を同時に流すことで、効率的にベシクルを捕捉できる可能性も示唆された。

(3)マイクロバブル内包ベシクルの超音波場による位置制御に関する数値シミュレーション

開発された手法を用いて、流体・気泡・膜

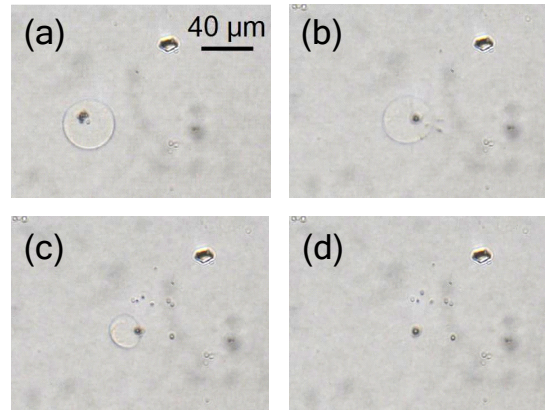


Fig. 5 Destruction of microbubble-enclosed liposome using 1D standing wave.

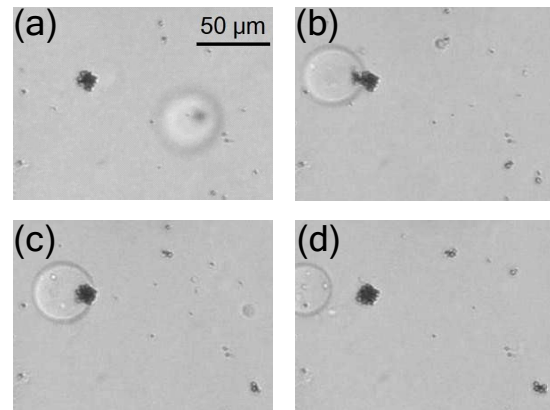


Fig. 6 Capturing microbubble-enclosed liposome at the focus of the focused ultrasound.

構造の三次元シミュレーションを実施し、マイクロバブル内包ベシクル (バブルリポソーム) の超音波音場内での挙動について解析を行なった。Fig.7(a)にシミュレーション系を示す。ここでは、超音波照射の条件下でベシクル内部の気泡が力を受けて、ベシクル内部で移動し、らにはその結果ベシクル全体が動きはじめるシミュレーションを実施した。まず始めに、解析解と FCM による数値計算結果の比較を Fig. 7(b)に示す。ここでは、横軸に気泡中心から並進方向の距離  $x_1$  をとり、縦軸に並進方向の流体の速度  $u_1$  を示している。また気泡半径および球殻の半径はそれぞれ  $0.5 \mu\text{m}$  および  $2.5 \mu\text{m}$  とした。実際の計算では、リポソームを固定することができないため、計算値はベシクルの重心から見た相対速度をプロットした。簡略化したモデルではあるが、気泡外部の流動に注目すれば、解析解と計算による値とが精度良く一致することが確認できる。

次にベシクルの移動に対する内包する気泡のサイズの影響などを調べるために、音圧振幅  $10 \text{ kPa}$ 、周波数  $1 \text{ MHz}$  の一次元定在波の節と腹の中間点にバブルリポソームを置き、その速度の時間変化を調べた。各時刻に

における気泡及びベシクルの重心速度の時間変化を Fig. 8 に示す. ここでは気泡直径が  $1.0 \mu\text{m}$ ,  $1.5 \mu\text{m}$ ,  $2.0 \mu\text{m}$  の三通りの結果を示している. いずれの場合も, 音場形成直後は気泡とベシクルとの間には速度の乖離が存在するが, 気泡がベシクル膜に近づくにつれ両者の速度が一致していく様子が確認できる.

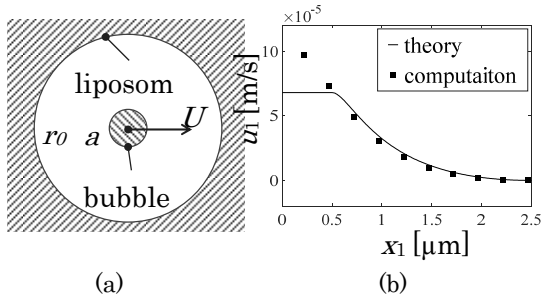


Fig.7 (a) Simplified model of bubble liposome (b) Profile of velocity  $u_1$  along the streamwise axis  $x_1$

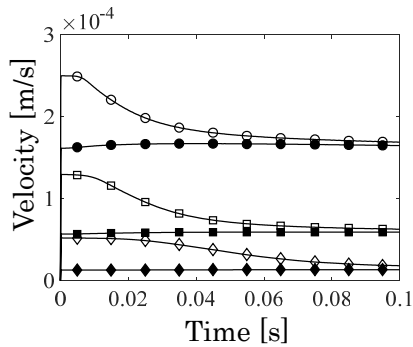


Fig. 8 Time evolution of velocity;  $\circ, \bullet$ :  $2.0 \mu\text{m}$ -bubble and vesicle;  $\square, \blacksquare$ :  $1.5 \mu\text{m}$ ;  $\diamond, \blacklozenge$ :  $1.0 \mu\text{m}$

バブルリポソームを実際に生体に向けて利用することを考えると, 膜破壊のための超音波照射の後, ベシクル自身はなるべく動かさずに, 膜破壊をその場で引き起こせるのが望ましい. またそのときの音圧もできる限り抑えるのが望ましい. すなわち, 低強度の超音波で, カプセル膜はできるだけ動かさずに内部の気泡のみを動かし, 膜破壊を引き起こすのが好ましい. ここでは, 膜破壊の限界張力を  $\sigma_{\text{max}} = 5.0 \times 10^{-4} \text{ N/m}$  と設定し, 複数の気泡半径  $r_0$  に対して, 膜に限界張力を発生させるために必要な最小の音圧振幅  $P_A$ , および限界張力が生じるまでにリポソームが移動した距離  $L$  を評価した.

解析対象とした超音波照射系を Fig. 9 に示す. ここでは, 集束超音波の焦点部分に捕捉された単一のバブルリポソームに対し, 別の超音波を照射し気泡を駆動する状況を考えている. Fig.9 中, 音源 A, A' はともに周波数  $1 \text{ MHz}$  の集束超音波を形成し, その焦点における音圧振幅は  $10 \text{ kPa}$  である. これら

A, A' により三次元的な定在波音場を形成し, その頂点部分に気泡を捕捉する. 音源 B は周波数を各気泡の共振周波数と一致させ, 音圧振幅については限界張力を与える最小の音圧振幅とした.

リポソーム半径で無次元化し, 横軸に無次元気泡半径, 縦軸にベシクルの無次元移動量を取り, 対数プロットした図を Fig.10 に示す. ベシクル内部の気泡径とベシクルの移動量には, べき乗関係があるのがわかる. 本計算結果より, 集束超音波で捕捉しながら, 別の集束超音波で膜破壊を誘起するためには, 気泡径を小さくした方が, ベシクルの移動量を少なくして, 膜破壊が可能となる. また, ここでは示さないが, 計算結果より, リポソーム内部の気泡半径  $r_0$  が大きいほど, 膜構造にある張力を加えるために必要な音圧振幅  $P_A$  は小さくなるのがわかった. このとき  $P_A \propto r_0^{0.5}$  の関係が成り立つことを示した.

さらに, 遠方場近似の下で気泡間相互作用を考慮することで, 超音波音場内でのバブルリポソームクラスターの挙動予測が可能であることを示した. 詳細については, 本研究の発表論文 (雑誌論文①) を参照のこと.

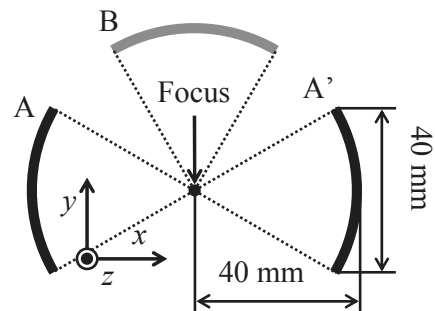


Fig. 9 Simulation setting of transducers

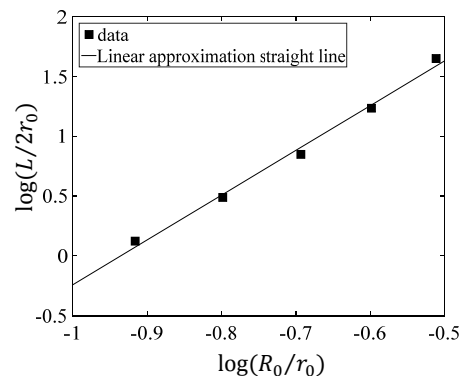


Fig.10 Log plot of (traveling distance)/(liposome diameter) with respect to the ratio of the radius of bubbles to that of liposome

<引用文献>

- ① 原 啓樹, 長谷川 裕征, 葭仲 潔, 高木 周, 松本 洋一郎, "超音波によるマイクロバブル内包型ベシクルの破壊", マイクロ・ナノ工学シンポジウム, vol. 1, no. 1, pp. 105-106, 2009.
- ② A. Yamada, T. Yamanaka, T. Hamada, M. Hase, K. Yoshikawa and D. Baigl, "Spontaneous Transfer of Phospholipid-Coated Oil-in-Oil and Water-in-Oil Micro-Droplets through an Oil/Water Interface", *Langmuir*, vol. 22, no. 24, pp. 9824-9828, 2006.
- ③ Maxey M. R., Patel B. K.: Localized force representations for particles sedimenting in stokes flow, *Int. J. Multiphase Flows*, 27 (2001) 1603-1626.
- ④ Peskin, C. S.: Numerical analysis of blood flow in the heart, *J. Comput. Phys.*, 25 (1977) 220-252

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 速水尚, 伊井仁志, 沖田浩平, 高木周, 超音波によるバブルリポソームの制御に関するシミュレーション手法の開発, [特集] 注目研究 in CFD30, ながれ Vol. 36 (2017) 93-100. (査読有)
- ② Liu, Y., Sugiyama, K. and Takagi, S., "On the interaction of two encapsulated bubbles in an ultrasound field", *J. Fluid Mech.*, Vol. 804 (2016), pp. 58-89. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 速水尚, 伊井仁志, 沖田浩平, 高木周, 超音波によるバブルリポソームの制御に関するシミュレーション手法の開発, 第 30 回数値流体力学シンポジウム, 講演番号 A01-1, 2016 年 12 月, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)
- ② Shu Takagi, High-speed measurement of bubble generation process in microchannel, The 31st International Congress on High-Speed Imaging and Photonics, 1C-P04, 7-10 Nov, 2016, ホテル阪急エキスポパーク (大阪府・吹田市) (招待講演)
- ③ 速水尚, 伊井仁志, 沖田浩平, 高木周, 超音波によるバブルリポソームの制御に関する数値解析、混相流シンポジウム 2016, 講演番号 P57-9, C135, 2016 年 8 月, 同志社大学今出川キャンパス (京都府・京都市).
- ④ 有吉拓也, 高橋 毅, 高木 周 杵淵郁也, 表面修飾マイクロバブル及びマイクロバ

ブル内包ベシクルの選択的吸着に関する研究、混相流シンポジウム 2016, 講演番号 P81-13, F315, 2016 年 8 月, 同志社大学今出川キャンパス (京都府・京都市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 周 (TAKAGI SHU)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号: 30272371

(2) 研究分担者

杵淵 郁也 (IKUYA KINEFUCHI)

東京大学・大学院工学系研究科・講師

研究者番号: 30456165