

令和元年6月10日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17634

研究課題名（和文）フィードバック型超音波ドラッグデリバリー実現のための微小気泡の高感度その場検出法

研究課題名（英文）High sensitive in-situ detection method of microbubbles for realization of feedback controlled ultrasound drug delivery

研究代表者

江田 廉（Koda, Ren）

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：40734273

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：微小気泡を用いた超音波治療は副作用の少ない夢の治療技術として、勢力的に研究が行われている。しかし、実用化のためには気泡キャビテーションメカニズムの機序解明と、効率向上のためのフィードバックシステムの構築が必須である。本研究では従来法では得ることができない気泡キャビテーション信号の空間的・時間的分布の可視化を行うシステムの映像化原理の確立と細胞実験への応用を図った。結果、本手法は観測プローブのラテラル方向の空間分解能0.34mmとサブマイクロ秒の時間分解能を同時に実現し、超音波ドラッグデリバリーのフィードバックシステム構築に有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気泡破壊時の雑音を測定する音響的方法や活性酸素を定量する化学的方法に対して、本手法は超音波ドラッグデリバリーにおいてのフィードバックシステム構築を主眼としており、気泡クラウドの破壊過程の観測手法として他に類似概念のない画期的な試みである。また気泡から能動的に放射される超音波信号を可視化するという点において本手法の画像生成原理が従来の音響画像的手法とは異なり、原理的に大幅な感度向上を実現した。今後の発展により、気泡表面を修飾した機能性気泡を組み合わせることで癌の超早期発見が可能になるなど、気泡観測だけでなく、革新的な治療診断技術創出を拓く基盤技術になる。

研究成果の概要（英文）：Ultrasound-mediated drug delivery systems (US-DDSs) using microbubbles have been actively researched as therapeutic techniques to minimize side effects. However, for high-efficiency DDSs, it is essential to elucidate the mechanism of the bubble cavitation mechanism and to construct a feedback system to improve the efficiency. In this study, we aimed to establish the imaging principle of the system to visualize the spatiotemporal distribution of bubble cavitation signal which can not be obtained by the conventional method, and to apply it to the cell experiment. As a result, the spatial resolution of 0.34 mm in the lateral direction of the observation probe and the time resolution of sub-microsecond can be realized simultaneously, suggesting that it is effective for the construction of a feedback system for US-DDSs.

研究分野：超音波工学

キーワード：気泡キャビテーション 超音波ドラッグデリバリーシステム マイクロバブル 波動逆伝播 高時間分解能観測

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 血中に投与する微小気泡を薬剤担体として機能させ、体外からの超音波照射により目的組織への薬物導入を行う超音波援用のドラッグデリバリスシステム（DDS）治療の開発が進められている。微小気泡と超音波の組み合わせは造影効果と治療効果を両立し相乗効果が期待できる点から他のモダリティ比べ臨床的価値が高く、また、分子標的能を有するように表面修飾した機能性気泡製剤の開発により副作用の少ない治療実現に向け新たな展開を見せようとしている。さらに、この技術は細胞内への遺伝子デリバリスシステム（GDS）として使える可能性があることから、GDS への展開も勢力的に研究がなされてきている。気泡を使った DDS や GDS では、微小気泡に対し高い音圧の超音波を照射することで気泡を圧壊し、あらかじめ気泡に付加させた薬剤や遺伝子（ペイロード）を放出し患部や細胞内へ効率よく取り込ませることが基本になる。圧壊に伴い発生するマイクロジェットにより、細胞膜に対し時間的かつ空間的に制御された微小な孔が開くので、この効果（ソノポレーション）を使うと薬剤や遺伝子の導入をアシストすることが可能になる。このような DDS や GDS では、システムの根幹である気泡キャビテーションの制御が重要な役割を担っており、薬剤や遺伝子の導入効率の向上のためには「いかに効率的に気泡が破壊されたか」、「気泡破壊が DDS や GDS の薬剤導入効率の向上に寄与する形でなされたか」などをその場で観測し、これを超音波の照射シーケンス（超音波音圧、音場、照射時間、周波数）に実時間でフィードバックし、効率向上を図ることが必要になる。しかし、超音波照射下で気泡間に働く Bjerknes 力による気泡クラウド形成や運動、非線形振動の発生と圧壊、フラグメンテーション、気泡膜を介した内部気体の周囲液体への溶解など複雑な挙動を示し、また、気泡キャビテーション時に気泡から放射される 2 次超音波を観測したとしても、そこで得られる観察信号はこれらの現象の複合的な信号であることから、観測信号から特定の物理現象を評価することは難しい。

(2) 気泡キャビテーションの観察技術として、すでにいくつかの方法が提案されている。音響化学的方法は、気泡の圧壊に伴う活性酸素による効果を可視化する方法であるが、基本的にオフラインでの処理で、その場計測には向かない。音響電気的方法は、気泡キャビテーションに伴う 2 次超音波音響雑音を観測する方法であるが、空間分解能が得にくいという課題がある。一方、エコー装置を使った画像化方法は、時間分解能や信号の定量性に劣るといふ課題がある。我々はパワードプラ画像を使い時間分解能を有する T 画像と呼ぶ画像を用いて気泡キャビテーションを観察する方法を提案してきた。この方法は汎用の超音波映像装置のパワードプラ画像を検出手段として用い、映像用超音波に対して強力超音波を遅延同期させて照射させることで気泡キャビテーション信号を高時間分解能で観測する手法であるが、T 画像は基本的に気泡キャビテーションによる 2 次超音波の信号強度しか観察できず、また十分な空間分解能が得られないという問題があった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では超音波ドラッグデリバリスシステムの高効率化に繋がる気泡キャビテーションの空間分解能と高時間分解能観測を両立した観察を実現することを目的とする。この手法の基本アイデアでは気泡キャビテーション信号をアレイ振動子で観察し、受信 RF データから波動の逆伝搬を行うことで、気泡キャビテーションの時間—位置平面での気泡ダイナミクスの可視化を実現しようとするものである。この方法は、気泡キャビテーション信号のサブマイクロ秒での時間分解能観察とサブミリメートルでの空間分解能を併せ持つ観測法である。

(2) 開発した可視化システムを展開し、生体応用を見据えた実験に取り組む。超音波の生体作用を定量するための基礎的な実験においては、音響的に定在波の影響を受けにくく、安定した培養を両立する実験系構築が難しいこともあり、これまでに気泡からの観測信号と生体作用効果の関係については明らかになっていない。そこで一般的な接着細胞とシャーレ等の組み合わせではなく、浮遊細胞を用いた実験系を構築することで超音波照射による生体作用効果の計測を図る。

3. 研究の方法

図1に手法の概要を示す。強力超音波を気泡に照射すると、気泡は非線形振動や圧壊などのキャビテーションを起こし、周囲に照射超音波の周波数とは異なる周波数の2次超音波を放射する。この放射超音波をアレイで受信し、波動の逆伝播を用いて波源の気泡ダイナミクスを時間一位置平面上に可視化するのが本方法の原理である。アレイで受信した放射超音波はAD変換器を通してデジタル信号として取得されるが、この時、気泡破壊で見られるインパルス的な信号や非線形振動で見られるn次の高次高調波信号が受信の中心周波数付近の周波数帯域に含まれる。よって周波数特性が畳み込まれた信号がRF信号として記録される。像再生で得られる画像は位置(x軸)と時間(t軸)の異なる次元を持つ2次元画像として取得される。構築した実験系を図2に示す。RF信号を採取するためにRSYS0003(マイクロソニック:7.5MHzリニアプローブ)を用いた。実験では気泡としてSonazoidを用い、これをカンテンファントム中の気泡導入孔(直径2mm)に入れ、ここに焦点を結ぶように強力超音波を照射し、気泡から放射された二次超音波を強力超音波と直交する方向に配置したリニアプローブで受信した。強力超音波の周波数を2.5MHz、バースト長は40マイクロ秒(100cycle)とした。そして強力超音波の照射時間中のキャビテーション信号を記録したRFデータから波動逆伝播の計算を行い、PC上で像再生を行った。

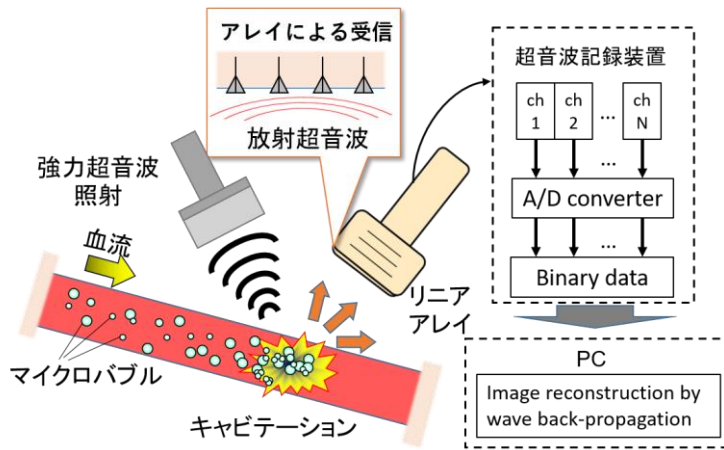


図1 気泡キャビテーション観測法の概要

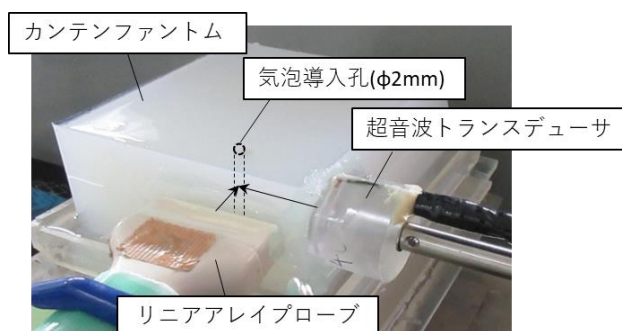


図2 構築した実験系

4. 研究成果

音圧 0.3MPa の音波を Sonazoid に照射したときの結果を図3に示す。図3(a)-(d)はそれぞれ振幅像、瞬時周波数像、x=0でのRF信号波形(時間間隔 2 μ s)、x=0でのRF信号のパワースペクトラムである。このような低音圧照射下では、信号強度が小さいだけでなく、振幅像には、ではほぼ等間隔の信号が周期的に現れているが、パワースペクトラム波形を見ると、RF信号には2.5倍調波と3倍調波が含まれていることから、振幅像に

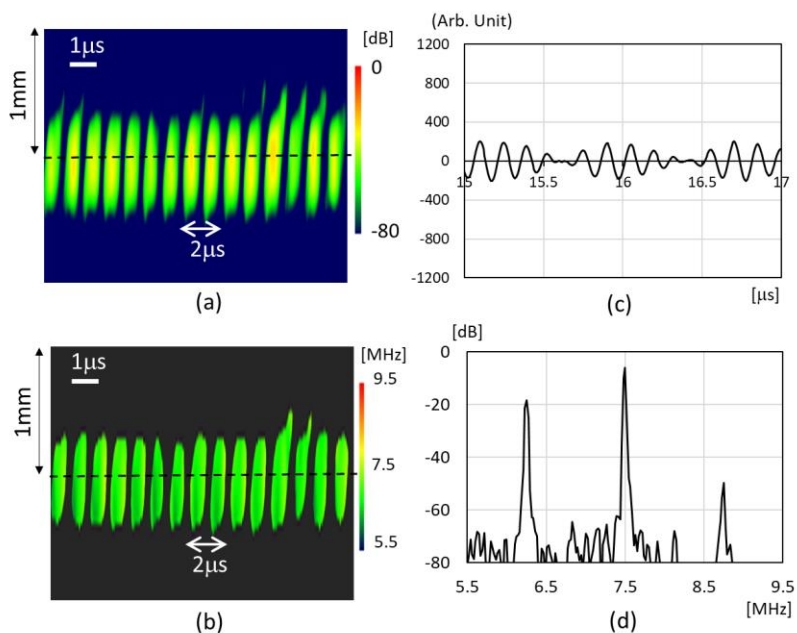


図3 強力超音波低音圧(300kPa)、Sonazoid に対する照射の結果 (a) 振幅像、(b) 瞬時周波数像、(c) RF信号波形(時間間隔 2 μ s)、(d) パワースペクトラム

現れる周期的なパターンはこの2つの周波数を持つ信号のビート信号であることが分かる。つまり、低音圧時には気泡の振動は照射超音波の高調波と分調波からなる非線形振動が主になることが観測されるが、これは気泡の非線形振動としてよく知られている現象である。強力超音波の音圧を1.0MPaに上げて、Sonazoidに照射したときのホログラフィック像の振幅像、瞬時周波数像、RF信号波形(時間間隔2 μ s)、パワースペクトラムを図4(a)-(d)にそれぞれ示す。強力超音波の音圧が上昇すると、振幅像には複雑なパターンが記録されるだけでなく、x軸方向に伸びる線状のパターンが観測された。特に、パワースペクトラムには、高調波、分調波以外に広帯域なスペクトラム成分が顕著に現れるが、これは気泡破壊による信号が記録されているためと考えられる。

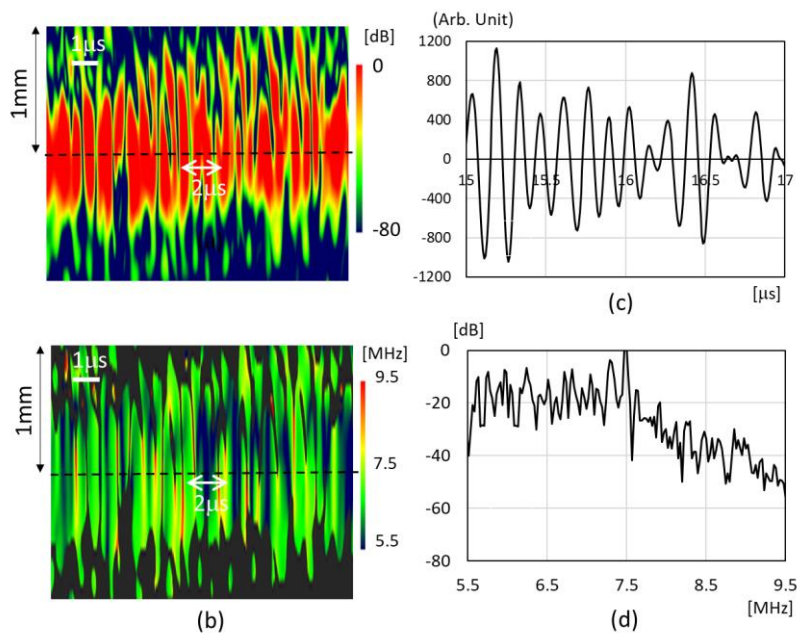


図4 強力超音波高音圧(1.0MPa)、Sonazoidに対する照射の結果 (a) 振幅像、(b) 瞬時周波数像、(c) RF信号波形(時間間隔2 μ s)、(d) パワースペクトラム

続いて気泡の非線形振動による信号と気泡破壊による信号を分離して観測するためのデジタルフィルタを設計した。気泡の非線形振動観測用では、2.5MHz照射時の気泡の2次・3次・4次の整数倍の高調波(それぞれ5MHz、7.5MHz、10MHz)に加え、2.5倍、3.5倍の分数次調波(6.25MHz、8.75MHz)を観測するように、バンドストップフィルタの遮断周波数を3.85-4.9MHz、5.1-6.15MHz、6.35-7.4MHz、7.6-8.65MHz、8.85-9.9MHzとして組み合わせた。気泡破壊信号観測用では上記の帯域を阻止するように、バンドストップフィルタを組み合わせた。気泡破壊信号観測用ではそれぞれ気泡非線形振動観測用では、それぞれバンドストップフィルタの遮断周波数を4.8-5.2MHz、6.05-6.45MHz、7.3-7.7MHz、8.55-8.95MHz、9.8-10.2MHzとした。

強力超音波の音圧を1.0MPaに設定し1000倍に希釈したSonazoidに対する照射を行ったときの照射1照射目の像再生結果、および照射16照射目の像再生結果を(a-1, b-1)フィルタ適用なし、(a-2, b-2)気泡破壊信号のフィルタ適用、(a-3, b-3)非線形振動信号のフィルタ適用、として図5にそれぞれ示す。縦軸はリニアプロ

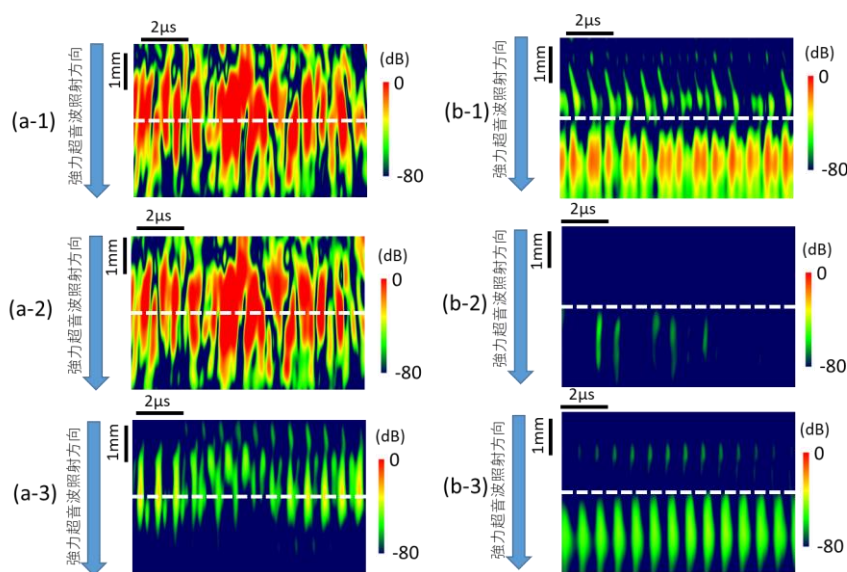


図5 強力超音波1照射目での像再生結果((a-1) フィルタ適用なし、(a-2) 気泡破壊信号、(a-3)非線形振動信号)、および強力超音波16照射目での像再生結果((b-1) フィルタ適用なし、(b-2) 気泡破壊信号、(b-3)非線形振動信号)

ープの方位方向 x [mm], 横軸は時間 t [μ s]とした2次元画像となる。破線は気泡導入孔の中心位置を示している。(a-1)で再生される結果は複雑なパターンが記録されるだけでなく、 x 軸方向に延びる線状パターンが観測された。これは inertial cavitation 時に見られる特徴的な像再生パターンと考えられる。また、(a-1)と(a-2)の像再生パターンがほぼ同様であり、照射1照射目においては気泡破壊が支配的なメカニズムと考えられる。照射16照射目において全体として強力超音波照射方向にパターンが移動しているが、これは照射方向手前側の気泡が破壊されるに伴い、照射方向奥側でも音波が散乱されずに到達できるようになったためと考えられる。(b-3)では時間的に規則的なパターンが見られ、これは整数倍の高次高調波と分数次調波のビート信号により得られる non-inertial cavitation の特徴的な像再生パターンであり、16照射目においては非線形振動が支配的なメカニズムと考えられる。

1 照射目および16照射目で得られる再生像の振幅の値を時間方向に積算し x 軸方向の分布としてプロットしたグラフを図6(a)(b)にそれぞれ示す。16照射目では気泡の破壊信号と非線形振動信号の概形が異なっており、気泡破壊に至る気泡と非線形振動を起こす気泡が異なる分布で存在していることが示唆される。

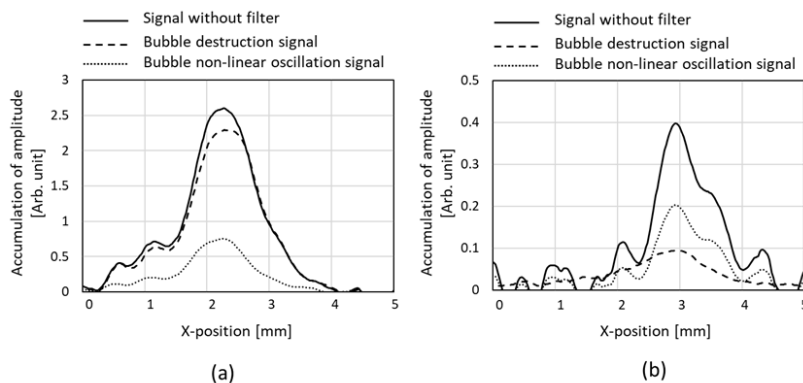


図6 信号振幅積算値の x 方向分布
(a) 強力超音波照射1照射目、(b) 強力超音波照射16照射目

浮遊細胞懸濁液に蛍光色素および微小気泡を加えた溶液に強力超音波の音圧を1MPaに設定し1秒間の照射を行ったときの蛍光色素導入の例を図7(a)に示す。図7(b)は比較のためのコントロールである。観測画像内の総細胞数に対する染色細胞の数をカウントし、導入率をもとめた。

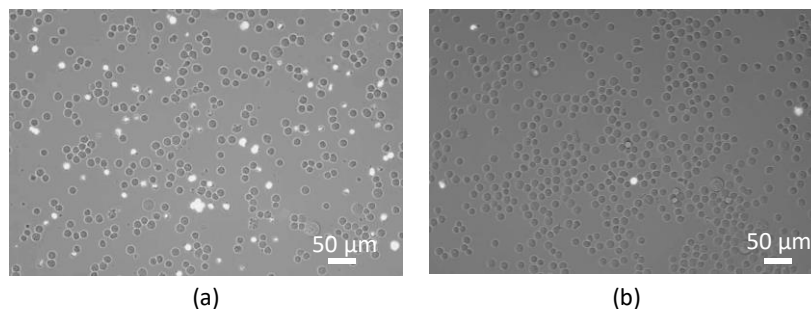


図7 浮遊細胞に対する蛍光色素導入の例
(a) 強力超音波照射結果、(b)コントロール

得られる信号観測結果と細胞への色素導入率の関係を調べるため、信号強度中心位置の解析を行った。色素導入は気泡破壊によって発生するマイクロジェットが主な要因と考えられているので、色素導入と相関が高いと思われる気泡破壊信号を解析した。結果を図8に示す。照射に伴って進行するピーク位置の移動量が大きいほど色素導入量が大きいなど興味深い結果が得られた。今後更なる検討が必要であるが、気泡破壊に至る気泡と割れ残る気泡からの信号の空間分布が細胞への生体作用と関連する可能性を示しており、フィードバックシステム構築に有効であることが示唆された。

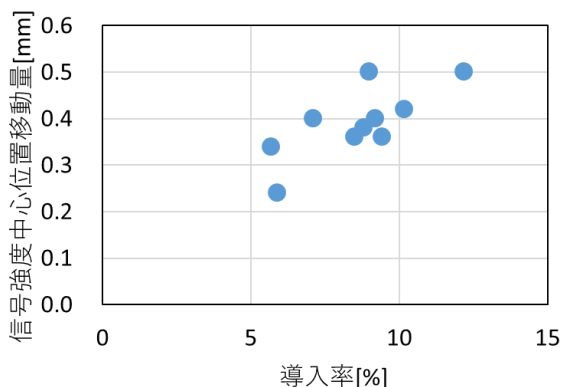


図8 浮遊細胞に対する蛍光色素導入率と信号強度中心位置の移動量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- 1) 江田 廉, 山越芳樹, 波動逆伝播を用いた気泡キャビテーションの新たな観測法, 超音波テクノ, 31,3, pp.24-28 (2019), 解説論文, 査読無.
- 2) Ren Koda, Takumu Origasa, Toshitaka Nakajima and Yoshiki Yamakoshi, Observing Bubble Cavitation by Back-propagation of Acoustic Emission Signals, IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 66, pp.823-833 (2019), 査読有.
- 3) 山越芳樹, 江田 廉, 気泡キャビテーション信号の高時間分解能その場計測, 超音波テクノ, 30, 2, pp.1-6 (2018), 解説論文, 査読無.

〔学会発表〕(計14件)

- 1) 江田 廉, 菊澤朋弥, パルスインバージョン法を応用した極微量気泡の高感度検出, 日本超音波医学会第92回学術集会抄録, S570, 東京, (2019)
- 2) 江田 廉, 堀内 弘喜, 山越 芳樹, 超音波カラー Doppler を用いた気泡キャビテーション信号観測, 平成30年度第4回アコースティックイメージング研究会, 基礎技術研究会資料, pp.34-38, 千葉, (2018).
- 3) R. Koda, H. Hanaoka, T. Nakajima, T. Hashimoto, H. Horiuchi, Spatiotemporal Observation of Bubble Cavitation Signal for Development of Intelligent US-DDS, The 5th International Symposium of Gunma University Medical Innovation, Kiryu, (2018).
- 4) R. Koda, T. Nakajima and Y. Yamakoshi, Measurement of Bubble Cavitation Signal by Using Color Doppler Ultrasound, The 12th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering, Honolulu, (2018).
- 5) 江田 廉, 折笠拓夢, 中嶋俊貴, 山越芳樹, キャビテーション信号のホログラフィック観測における超音波照射条件と気泡特性の影響, 日本超音波医学会第91回学術集会抄録集, S568, 神戸, (2018).
- 6) 堀内弘喜, 中嶋俊貴, 江田 廉, 山越芳樹, カラー Doppler を用いた気泡キャビテーション信号の瞬時周波数の観測, 日本超音波医学会第91回学術集会抄録集, S571, 神戸, (2018).
- 7) 橋本哲也, 折笠拓夢, 江田 廉, 山越芳樹, イースト菌からの気泡キャビテーション信号観測による生体作用効果の計測, 日本超音波医学会第91回学術集会抄録集, S572, 神戸, (2018).
- 8) R. Koda, T. Origasa, T. Nakajima, Y. Yamakoshi, Observation of spatial-temporal dynamics of bubble cavitation during high-intensity ultrasound exposure, The 38th Symposium on Ultrasonic Electronics, Tagajo, (2017).
- 9) R. Koda, T. Origasa, T. Nakajima, Y. Yamakoshi, Temporal and Spatial Resolved Observation of Bubble Cavitation Signal by Holographic Image Reconstruction, The 16th World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology Congress, Taipei, (2017).
- 10) 江田 廉, 折笠 拓夢, 中嶋 俊貴, 山越 芳樹, RF 信号の波動逆伝播を用いた気泡キャビテーション観測法, 日本超音波医学会平成29年度第2回光超音波画像研究会, 札幌, プログラム・抄録集, p.25, (2017).
- 11) 江田 廉, 折笠 拓夢, 中嶋 俊貴, 山越 芳樹, RF 信号の波動逆伝播を用いた気泡キャビテーション信号の瞬時周波数観測, 日本超音波医学会第29回関東甲信越地方会学術集会, 東京, (2017).
- 12) R. Koda, H. Hanaoka, Y. Yamakoshi, T. Nakajima, R. Suzuki, T. Origasa, T. Nakajima, High Sensitive Bubble Cavitation Detection Method for Development of Intelligent US-DDS, The 4th International Symposium of Gunma University Medical Innovation, Kiryu, (2017).
- 13) 折笠拓夢, 江田 廉, 山越芳樹, 気泡キャビテーション信号の高時間分解能ホログラフィック観察, 日本超音波医学会第90回学術集会抄録, S461, 宇都宮, (2017).
- 14) 中嶋俊貴, 江田 廉, 山越芳樹, 超音波パワードプラを用いた気泡キャビテーション過程の詳細観測, 日本超音波医学会第90回学術集会抄録, S638, 宇都宮, (2017).

※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。