

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23484

研究課題名(和文)非線形共振を利用した薬剤修飾マイクロバブルへのエネルギー局在化手法の開発

研究課題名(英文)Localized oscillation and resonance of microbubbles as drug carrier agents

研究代表者

杉田 直広 (SUGITA, Naohiro)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：80852318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロバブルの共振現象を利用した薬剤放出の高効率化を目的として、超音波照射によるシェル付きマイクロバブル(マイクロカプセル)の崩壊現象の微視的計測を行い、カプセル群の大域的な崩壊率を実験的に算出した。平面型のマイクロチャンバーを用いて光学顕微鏡の焦点面にマイクロカプセル群を2次元的に分散させることにより、音波照射によって崩壊したカプセル群の高解像度かつ広範囲な可視化を行った。画像処理に基づく粒子解析により、音波照射領域に含まれるカプセル群の粒子径分布および数濃度を算出し、これらをパラメータとした崩壊率の定量評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で提案した気泡群の実験的解析手法により、音波照射を受けたマイクロカプセル群を高解像度かつ広範囲に可視化し、音波照射領域に含まれる全てのカプセルの粒子径分布と局所的な数濃度分布を定量化することが可能となった。粒子径と空間分布はカプセル群の崩壊挙動を支配する重要なパラメータであることが実験的に示された。気泡群の連成振動は、薬剤の局所送達応用にとどまらず、超音波気泡を援用した治療・診断技術の基礎現象であり、群の共振現象の利用にとって重要な知見を得たと言える。

研究成果の概要(英文)：The disruption rate of the polymer-shelled microbubbles (microcapsules) subject to ultrasound irradiation was measured experimentally from optical microscopic observation, which enables one to study bubble cloud oscillation in controlled drug release application. Ultrasonically disrupted microcapsules were optically visualized at high spatial resolution by using a planar micro-chamber. The disruption rate was calculated based on particle analysis of the recorded image as a function of size distribution and the number concentration of the microcapsule cloud.

研究分野：振動工学

キーワード：マイクロバブル 共振現象 気泡力学 超音波 放出制御

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体組織への局所的な薬剤導入に利用されるドラッグデリバリーシステム (DDS) は、抗癌剤の局所送達や特定の細胞への遺伝子導入において重要な技術である。DDS では、体内の目標位置まで薬剤を保持したまま輸送する安定性と、目標位置において薬剤を放出する制御性を兼ね備えた薬剤のキャリアが必要となる。超音波で薬剤の放出を制御する場合、マイクロバブルがこのキャリアの役割を果たす。超音波による機械的刺激を用いて、シェルの薬剤を付加したマイクロバブルを崩壊させることによって、目標位置と目標時間において、必要な量の薬剤を血液中に放出させることが可能となる。これにより、健全な細胞に対する薬剤の副作用を低減する効果が期待できる。しかしながら、血液に対する耐溶解性に優れ、液中で長時間安定に存在できるマイクロカプセルは、その機械強度が増強する傾向がある。したがって、薬剤による副作用を抑制しながら、目標位置の組織において、治療に必要な薬剤の取り込み量を得るためには、気泡群の共振現象を積極的に利用する必要がある。

本研究課題では、薬剤修飾した特定のマイクロバブルの崩壊率を向上させる手法の実現を最終目標として、超音波照射下におけるシェル付きマイクロバブル (マイクロカプセル) 群の崩壊率を実験的に定量評価し、気泡群の崩壊現象に寄与するパラメータを特定する。これにより、生体内の外的要因の影響を受けにくい振動特性の獲得を目指す。音波照射に対する気泡群の振動特性の解明は、薬剤の局所送達への応用にとどまらず、超音波気泡を援用した治療・診断技術を拡張するための重要課題と位置付けた。

### 2. 研究の目的

マイクロカプセルによる放出制御の高度化のため、カプセル群の崩壊率の定量評価を可能にする実験手法を構築し、カプセル群の崩壊現象に影響を与えるパラメータとその傾向の特定を行う。本課題研究では、考慮するカプセル群のパラメータを、カプセル群の粒子径分布および数濃度の2つに絞り、これらのパラメータとカプセル崩壊率を関連づける。大規模なマイクロカプセル群の崩壊率を光学的観察から計測するためには、広範囲に分布した多数のマイクロカプセルを顕微鏡の同一の焦点面内に捕捉し、高い空間分解能を保持しながら撮影する必要がある。そこで、カプセル群を観察チャンパー内に2次元的に分布させ、音波照射前後のカプセル群を光学的に可視化する実験手法を提案する。提案手法に基づき、以下に示す実験的解析を行う。

#### (1) 数濃度が崩壊率に与える影響評価

マイクロカプセル群の崩壊率の数濃度特性を明らかにするため、超音波照射前後のマイクロカプセル群を光学顕微鏡により撮影し、画像解析を用いて崩壊したカプセルの割合 (崩壊率) を定量的に算出する。数濃度をパラメータとした実験から、算出した崩壊率と平均数濃度との間にべき乗則を導出する。

#### (2) 粒子径分布を単分散に調整したカプセル群の崩壊特性の評価

マイクロカプセルの粒子径が崩壊率に与える影響を明らかにするため、照射音波の周波数を固定し、粒子径を単分散化したカプセル群の崩壊率を求める。

### 3. 研究の方法

#### (1) マイクロカプセル群の顕微鏡画像の取得

ポリマーの球殻で覆われたマイクロバブルを用いて、超音波照射によるカプセル群の崩壊を可視化する実験を行った。音波照射を受けた全てのカプセルの可視化を可能にするため、マイクロカプセルを平面状のマイクロチャンパー内に2次元的に分散させた。カプセルの分散液を注入したマイクロチャンパーを、XY自動ステージ上に固定し、自動ステージを水平方向に一定間隔で断続的に移動させながら、格子状にチャンパーの全体像を撮影した。ハロゲンランプ光源による透過照明を用いることにより、マイクロカプセルは影絵として撮影された。撮影した合計162枚の画像を、画像処理ソフトウェアを用いて貼り合わせ、図1(a)に示すようなチャンパーの全体画像を得た。粒子解析により、分散したマイクロカプセル群の粒子径分布を算出した。カプセル分散媒の粘性の影響を示すため、分散媒が純水の場合と、血液と同程度の粘性をもつグリセリン水溶液の場合の崩壊率を比較した。

#### (2) 崩壊率の定量評価

画像処理に基づく粒子解析により、マイクロカプセル群の粒子径および粒子数  $N$  を算出した。さらに、カプセルの中心位置を母点とするボロノイ図を生成し、2次元平面内に定義したボロノイ面積 [ $\text{mm}^2$ ] の逆数を、2次元的に分散したマイクロカプセル群の局所数濃度 [ $\text{mm}^{-2}$ ] と定義した。この局所数濃度分布の平均値をカプセル群の平均数濃度と定義した。図1(b)に示す音波照射後の撮影画像から、崩壊したカプセル (ガス気泡) の数  $n$  を算出し、これを粒子数  $N$  で除した割合をマイクロカプセル群の崩壊率と定義した。

#### (3) フィルター粒子径の選別

開き目が異なる複数のナイロン製フィルターを用いてカプセル分散液を濾過することにより、粒子径を選別し、平均粒子径が異なるカプセル群を調製した。選別前の平均粒子径は  $30 \mu\text{m}$ 、標準偏差は  $14 \mu\text{m}$  であり、多分散性指数は  $47\%$  となった。一方、平均粒子径を  $18 \mu\text{m}$ 、 $25 \mu\text{m}$ 、 $37 \mu\text{m}$ 、 $46 \mu\text{m}$ 、 $63 \mu\text{m}$ 、 $75 \mu\text{m}$  に選別したカプセル群の多分散性指数はそれぞれ  $26\%$ 、 $17\%$ 、 $13\%$ 、 $13\%$ 、 $18\%$ 、 $31\%$  となった。多分散群の同様の条件のもとで、単分散群の崩壊率を求めた。

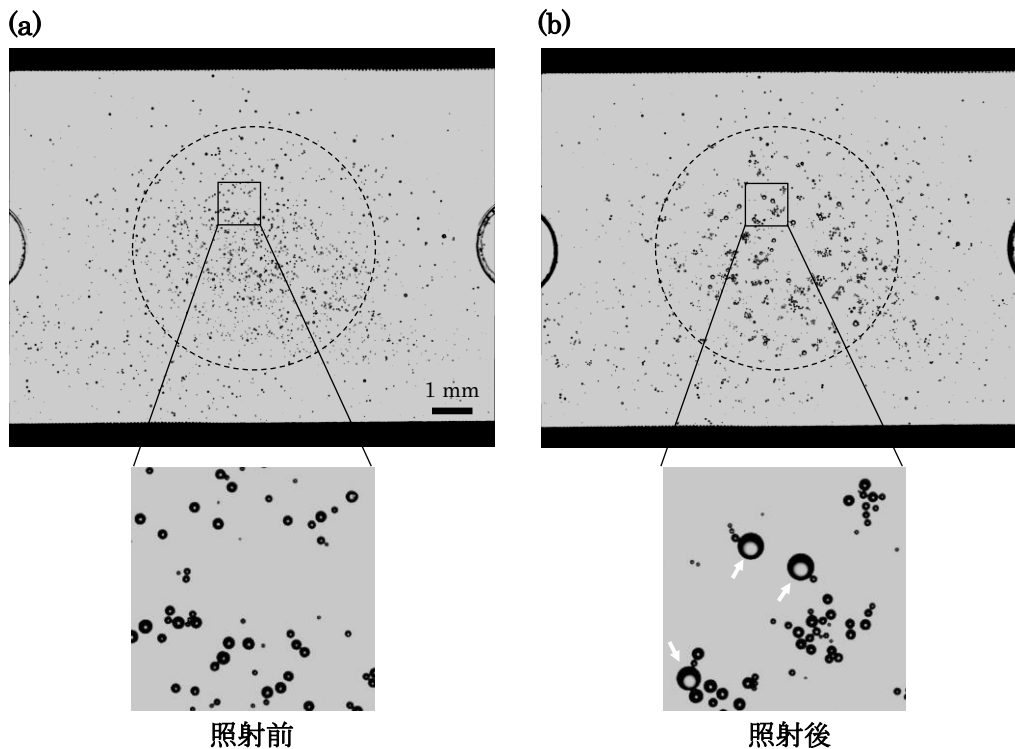


図1 超音波照射前後のカプセル群の顕微鏡画像. 矢印は崩壊したカプセルから漏出したガス気泡を指す.

#### 4. 研究成果

##### (1) 崩壊率の数濃度依存性

平均数濃度に対して多分散カプセル群の崩壊率は図2のように変化した. 崩壊率は低濃度のときに最大となり, 数濃度の上昇とともに単調に減少した. この傾向は, 分散媒が純水・グリセリン水溶液のどちらの場合にも共通して認められた. 導出したべき乗則より, 2次元的に分布したマイクロカプセル群の崩壊率は, その数濃度の $-1$ 乗に比例して加速的に低下することが明らかとなった.

##### (2) 粒子径の単分散化による崩壊率向上

粒子径を選別した単分散群の場合, 崩壊率が極大となるカプセル群の数濃度が存在し, カプセル群の平均粒子径が小さいほど, 崩壊率が極大となる数濃度は大きくなることが明らかとなった. これはカプセル群の共振周波数が数濃度に依存して変化するためである. 粒子径分布が単分散のカプセル群を用いて高い崩壊率を得るためには, 数濃度に合う適切な周波数を選択する必要があることが示唆された.

##### (3) 異種カプセルの混合による崩壊率向上

共振径のカプセル群Aの音響放射によって, 共振径ではないカプセル群Bを間接的に崩壊させることを試みた. しかし, 2種類のカプセル群を混合した結果, 標的とする非共振のカプセル群の崩壊率の向上効果は得られなかった. この理由は, 共振径のカプセル群には数濃度依存性が強く現れるため, 異種カプセルの混合によって共振周波数が敏感に変化したためと考えられる. 実際に, 共振径であるカプセル群Aの崩壊率は, 混合しない場合と比較して大きく低下した.

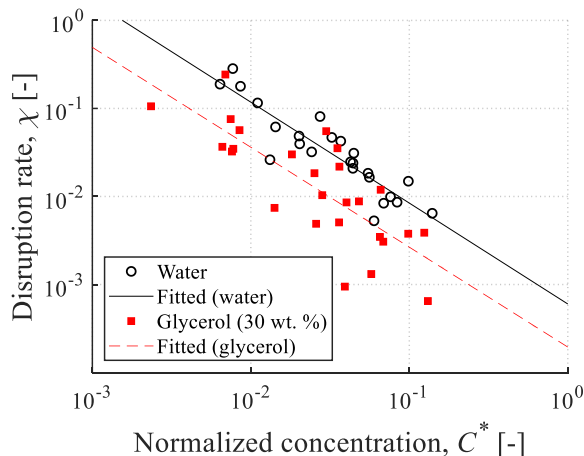


図2 数濃度を変化させた場合の崩壊率の実験結果.

#### (4) まとめ・今後の展望

本研究課題では、超音波照射によるマイクロカプセルの崩壊現象の微視的観察を行い、カプセル群の崩壊率を実験的に定量化した。粒子径を単分散化したカプセルの場合、照射音波の周波数に依存して決まる数濃度において、崩壊率が極大となる傾向が確認された。研究開始当初は、カプセル群の共振現象を利用して、特定のカプセルへの振動エネルギーの局在化を検討する予定であったが、数濃度による共振状態の変動が大きいことが明らかとなったため、研究方法を変更した。音波照射下における気泡群の動力学において、粒子径と数濃度による振動特性の変化は不可避であり、実験中にその場予測が困難なこれらの効果は、カプセルの崩壊現象に大きな影響を与えることが本研究課題により示された。今後、生体中において気泡振動の積極的利用を実現するためには、実環境における気泡群の分布状態を考慮した理論と実験の比較が重要となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 杉田直広, 進士忠彦	4. 巻 87
2. 論文標題 平面分布したマイクロカプセル群の数濃度と崩壊率に関する実験的解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本機械学会論文集	6. 最初と最後の頁 20-00193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1299/transjsme.20-00193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naohiro Sugita, Tadahiko Shinshi
2. 発表標題 Disruption of polymer microcapsules in a narrow gap under 1 MHz ultrasound irradiation
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Biomedical Engineering (ISBE2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉田直広, 進士忠彦
2. 発表標題 超音波による中空マイクロカプセルの破壊における粒子数濃度の影響
3. 学会等名 応用物理学会春季学術講演会（第67回）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金島潤昇, 杉田直広, 進士忠彦
2. 発表標題 粒径制御したマイクロカプセルの超音波崩壊に関する実験
3. 学会等名 混相流シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------