

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22656047

研究課題名（和文） ナノ・マイクロバブルを用いた遺伝子・癌治療のためのシミュレーション技術の開発

研究課題名（英文） Development of a Simulation Technique for Gene/Cancer Therapy Using Nano/Micro Bubbles

研究代表者 高比良 裕之

(TAKAHIRA HIROYUKI)

大阪府立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80206870

研究成果の概要（和文）：

気泡崩壊を用いた遺伝子治療技術の開発のために、圧力変動下における音響性リポソームの力学に関する実験とその解析モデルの構築、境界要素法または Ghost Fluid 法による生体壁近傍での気泡崩壊に関する数値解析、気泡崩壊に伴う治療性分子の輸送シミュレーションを行った。その結果、リン脂質分子層の離脱による表面張力の変化が、気泡の半径変化を決定する重要な因子であること、生体壁面の変位速度は、気泡崩壊時の衝撃波による壁面での力積と強い相関があること、分子の輸送を促進するには、気泡崩壊時の液体ジェットにより形成される渦流れの利用が有効であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

This study is aimed to develop a technique for gene therapy using bubble collapse. The motion of acoustic liposomes under pressure change is investigated experimentally and a bubble model for acoustic liposomes is developed. The collapse of a bubble near a tissue surface is simulated using the boundary element method or the ghost fluid method. A simulation technique is also developed for the transport of therapeutic molecules using bubble collapse. It is shown that the bubble motion is much affected by the variation of surface tension due to the reduction of phospholipid layers on the bubble surface. The tissue boundary velocity is correlated to the impulse at the tissue due to bubble collapse. The usage of vortex flows generated by the liquid jet accompanied with bubble collapse is effective in transporting the molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	0	2,500,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	210,000	3,410,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：流体工学，ナノ・マイクロバブル，治療性分子，衝撃波，液体ジェット

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、遺伝子や抗ガン剤などの治療性分子を注入したナノ・マイクロバブルを利用し

た遺伝子治療法(ソノポレーション)が注目されている。本治療法は、癌細胞近傍において、超音波によりナノ・マイクロバブルを崩壊さ

せて、治療性分子を細胞質・核まで輸送するという原理に基づいている。

(2) ナノ・マイクロバブルを用いた遺伝子および癌治療には、EPR(Enhanced Permeability and Retention)効果を定量化することにより、治療のみならず癌の早期発見に役立つという利点がある。EPR効果を定量化するためには、気泡崩壊による生体内への分子の輸送機構の解明が不可欠である。

(3) しかし、多数のナノ・マイクロバブルの崩壊現象は、生体と気泡群および気泡同士の相互干渉、気泡変形などを伴うマイクロ秒オーダーの高速現象であり、治療性分子の輸送のメカニズムには不明な点が多い。

(4) 申請者は、これまでに、気体・液体・固体の三相の場を同時に解析するための Ghost Fluid 法に基づく直接数値計算手法を考案し、気泡崩壊による材料損傷の機構を解析した。また、界面活性剤が気泡界面に付着したマイクロバブルの力学を理論・実験の両面から解析し、表面張力および気体拡散抵抗の動的変化を考慮したマイクロバブル力学理論を構築した。本研究は、これらの研究成果を基礎として、気泡崩壊による治療性分子の生体内への輸送に係るシミュレーション技術を構築するものである。

2. 研究の目的

本研究では、境界要素法と Ghost Fluid 法を用いた気泡崩壊を利用した治療性分子の輸送に係るシミュレーション技術を開発することを目的とし、以下の達成目標のもとで研究を遂行する。

- (1) リン脂質の界面特性を考慮した気泡モデルの構築。
- (2) 生体近傍での気泡崩壊モデルの構築。
- (3) 生体組織の張力や浸透性を考慮した生体組織モデルの構築。
- (4) 効果的な治療性分子導入方法の提案。

3. 研究の方法

(1) 圧力変動下におけるナノ・マイクロバブルの力学に関する実験

音響性リポソーム(8 フッ化プロパン(C3F8))をリン脂質で覆ったナノ・マイクロバブルを用いて、以下の実験を行う。

① 音響性リポソームの膨張・収縮実験

圧力容器内の入れられた音響性リポソーム溶液に、準静的な圧力変動を与えた時の音響性リポソームの挙動を観測し、気泡界面のバックリングとスムージング過程を調べる。

② 音場中での音響性リポソームの振動実験

超音波を印可した際の、音響性リポソームの挙動を高速カメラで観測し、その非線形振動特性を調べる。

(2) 数理モデルの構築

① 音響性リポソームの界面モデルの構築
音響性リポソームは、界面のバックリングとスムージング過程を繰り返しながら収縮する。界面のスムージング過程における拡散抵抗と表面張力の変化を適切に考慮した気泡界面モデルを構築し、音響性リポソームの界面特性をモデル化する。

② ナノ・マイクロバブル崩壊モデルの構築
(a) 血管を模擬した弾性管内での気泡崩壊を、境界要素法を用いて解析する。その際、三次元気泡変形を考慮した直接数値解法を用いて、管の特性と気泡崩壊との関係を明らかにする。

(b) 適合多重格子の利用により効率的な格子解像度の変更が可能な改良 Ghost Fluid 法を用いて、生体壁近傍での気泡の崩壊挙動を解析し、遺伝子等の治療性分子の輸送過程を明らかにする。

(c) 生体壁面の浸透性を、拡散抵抗を用いてモデル化する。

4. 研究成果

(1) 音響性リポソームの力学解析

① 準静的な圧力変動下での音響性リポソームの挙動

圧力変動下におけるリン脂質に覆われたマイクロバブル(音響性リポソーム)の挙動を観測した。実験装置を図1に示す。本実験では、アクリル製の圧力容器の観察用光学ガラス窓から、カバーガラスに付着したマイクロバブルをCCDカメラにより撮影する。アクリル製の圧力容器はチューブで注射器と接続されており、これを用いて準静的に周囲液体に圧力変動を与えて、マイクロバブルの収縮・膨張の様子を調べる。気泡周囲の圧力は、チャンバーに接続した圧力変換器と動ひずみ計によって圧力を電圧に変換し、デジタルオシロスコープを介してPCにより計測される。図2に実験結果の一例として、(a)気泡形状と(b)気泡半径の時間変化を示す。なお、圧力変動波形は図1(b)に点線で示されている。加圧開始時刻(約20 s)までの大気圧下では気泡半径はほとんど変化せず、平衡状態にあると考えられる。

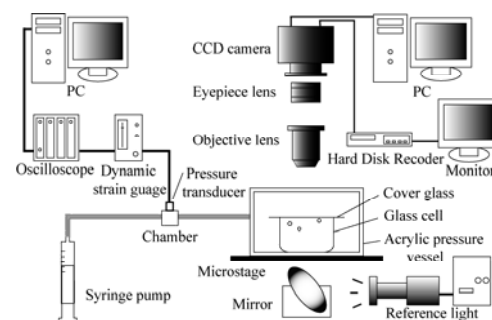


図1 実験装置.

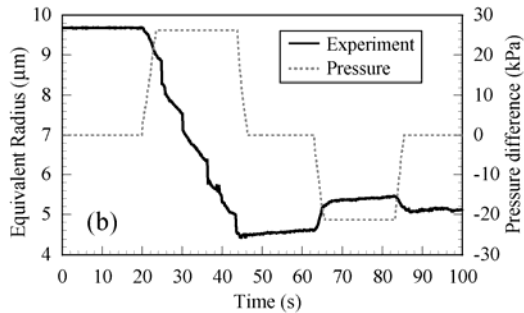
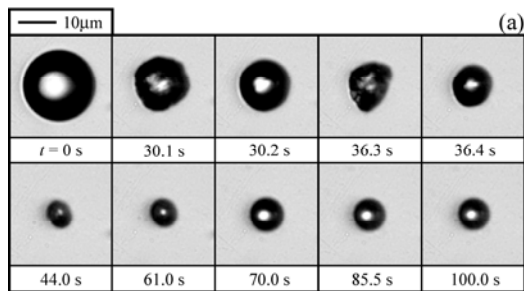


図2 圧力変動に対する気泡の応答: (a) 気泡形状, (b) 気泡半径と圧力変動の時間履歴 (気泡半径: $R_0 = 9.6 \mu\text{m}$).

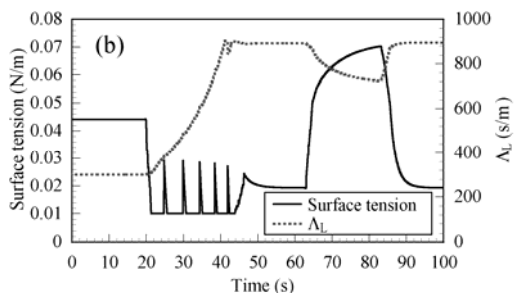
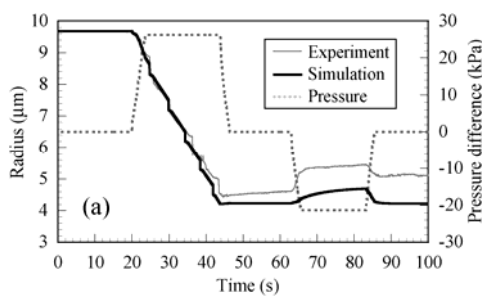


図3 音響性リポソームの界面モデルを用いたシミュレーションと実験との比較: (a) 気泡半径の比較, (b) 表面張力と拡散抵抗の時間変化.

加圧による収縮が始まると、気泡表面に凹凸が形成される。これは、収縮により気泡の表面積が減少することで、気泡表面のリン脂質膜が過圧縮されることにより、余分なリン脂質膜が多重層を形成しているためと考えられる。そのまま収縮が進むと、凹凸は気泡表面から瞬間的に消滅し、気泡表面は滑らかなになる(図2(a), 30.2 s)。凹凸の消滅時にリン脂質の分子層は気泡表面から押し出され、周囲

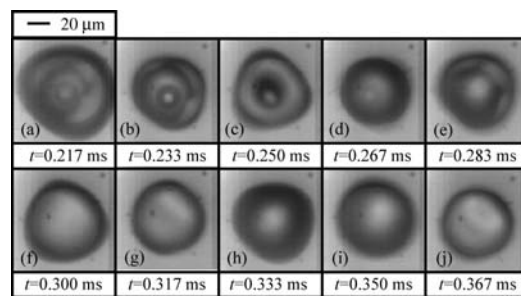


図4 超音波中での音響性リポソームの振動.

液体中に離脱していると考えられる。さらに収縮が進むと再び気泡表面に凹凸が形成されるが、瞬間的に消滅する(図2(a): 36.3 s~36.4 s)。しかし、気泡は、完全に滑らかな球形には回復せず、変形していることがわかる。図2(b)より、加圧時(約20 s~)において気泡の等価半径は階段状の変化を繰り返していることがわかる。この変化の繰り返しは気泡表面の凹凸の形成とその瞬間的な消滅に起因し、凹凸の消滅時に気泡半径は急激に減少する。この現象の要因として、zippering process によるリン脂質分子層の離脱が考えられる。

② 音響性リポソームの界面モデル

Takahira & Itoの気泡モデルをもとに、リン脂質分子層の離脱に伴う表面張力の変化を考慮した新しい気泡モデルを提案した。本モデルでは、脂質分子層の拡散抵抗と動的表面張力を考慮して、気泡の運動方程式と気体の拡散方程式を解く。図2の実験をシミュレートした結果を図3に示す。図3(a)には実験とシミュレーションとの比較、図3(b)には表面張力(実線)と拡散抵抗(点線)の時間変化が示されている。図3(a)より、本モデルによる結果は、実験結果を良く予測できていることがわかる。特に収縮過程において実験で得られた気泡半径の階段状の変化を再現できている。図3(b)より拡散抵抗が単調に増加するのに対して、収縮により気泡の表面積が約20%減少するたびに表面張力が瞬間的に増加し、そのときに気泡半径の急激な減少が繰り返されている。このことより、実験における階段状の半径の変化の要因は、リン脂質分子層の離脱による表面張力の増加に起因する可能性が示された。

③ 音場中での音響性リポソームの挙動

超音波による圧力変動下での気泡振動の様子を、高速度ビデオカメラを用いて観測した。その結果の一例を図4に示す。図4のように気泡には、表面振動が観測された。解析の結果、気泡の表面振動は、リン脂質分子層により気泡の表面張力が低下し、低下した表面張力の下で、パラメータ励振の機構により引き起こされる可能性が高いことが示された。

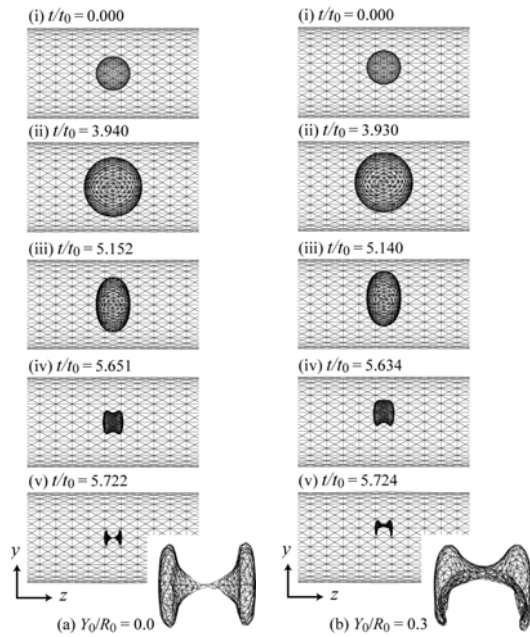


図5 弾性管内での気泡の崩壊: (a) 中心軸上に配置された気泡, (b) y 方向に偏心した位置に配置された気泡.

(2) 気泡と生体壁との干渉

① 血管内での気泡の崩壊

血管を模擬した弾性管内での気泡の崩壊挙動を、三次元境界要素法を用いて解析する手法を開発した。本手法では、管壁面をバネ-質量モデルで表現し、気泡の3次元運動と壁面の運動を連成して解くものである。図5は、振幅0.2 MPa、振動数1 MHzの超音波を印可した時の半径1.5 μm の気泡の崩壊の様子である。(a)の管の中心軸に配置された気泡の場合には、気泡は収縮時に z 方向に伸びた楕円球状になった後、管径方向の先端からくぼみが生じ、中心軸に向かって液体ジェットが発生する。一方、(b)の y 方向に偏心した位置に配置された気泡の場合には、気泡崩壊末期に、気泡は壁面方向に並進移動し、管壁の方向に液体ジェットが発生する。また、管壁が大きく変位する条件では、気泡の並進運動が助長され、管内壁近傍で液体ジェットが形成されることから、壁面損傷が増大する可能性があることが示された。

② 各種生体壁近傍での気泡の崩壊

Ghost Fluid法を用いて、生体を模擬した各種壁面(ゼラチン、肝臓など)近傍での入射衝撃波と気泡との干渉問題を解析し、気泡崩壊が生体組織に及ぼす影響を調べた。図6に、(a)石、(b)脂肪、(c)肝臓壁近傍での気泡の崩壊の様子(圧力分布と気泡形状)を示す。入射衝撃波は気泡を通過後、生体壁面に衝突する。その際、図6(a)の石の場合のように、硬い壁

面の場合には、入射衝撃波が壁面で反射することにより、気泡周囲には高い圧力場が形成される。一方、脂肪、肝臓の場合には、音響インピーダンスが水に近いので、入射衝撃波はほとんど壁面で反射せず透過する。その後、いずれの生体壁面においても、壁面に向かって気泡は並進移動し、上流側の気泡壁から液体ジェットが形成される。液体ジェットが下流側の気泡壁に衝突する際、および気泡が再膨張する際に気泡から衝撃波が発生する。気泡から放射された衝撃波は、生体壁面に衝突し、壁面にくぼみが形成される。入射衝撃波の反射による圧力上昇のもとで気泡が崩壊する石壁面の場合に、生体壁面での衝撃圧力が最も高くなる。図7に、生体壁面中心の変位速度と壁面中心に作用する力積との関係を示す。図7のように、いずれの生体壁においても壁面損傷(壁面の変位速度)は、気泡崩壊時の衝撃波による壁面での力積とほぼ線形関係があることがわかった。

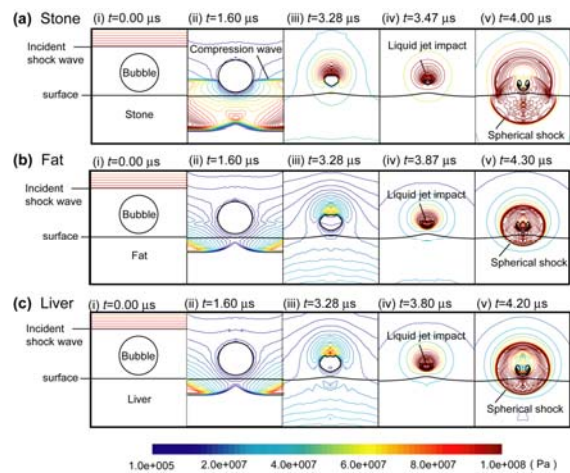


図6 生体壁面近傍での衝撃波と気泡の干渉: (a) 石壁, (b) 脂肪壁, (c) 肝臓壁.

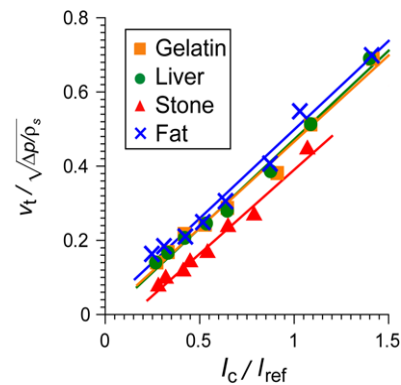


図7 壁面中心の変位速度と力積との関係

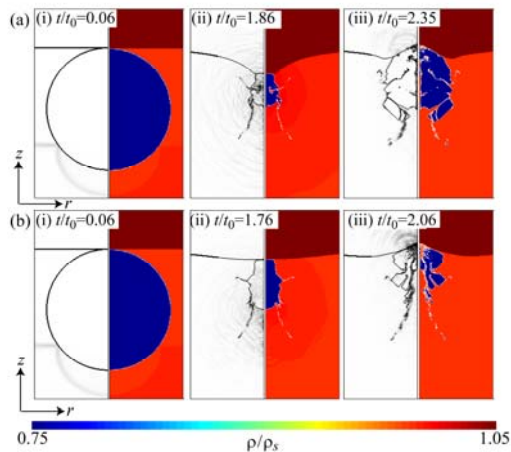


図 8 壁面張力が気泡崩壊に及ぼす影響: (a) 張力がない場合, (b) 張力がある場合.

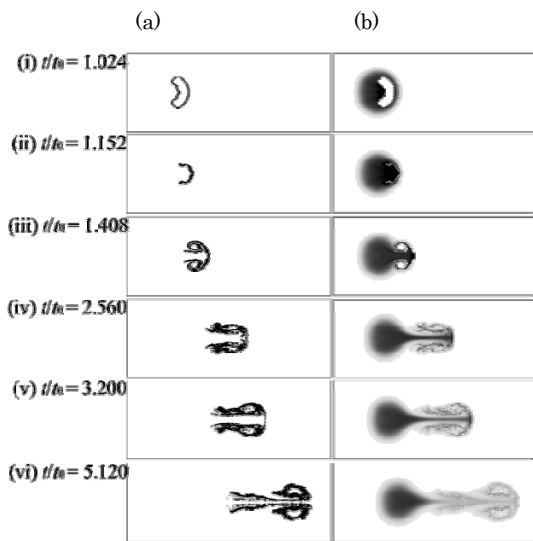


図 9 気泡崩壊による治療性分子の輸送: (a) 気泡形状, (b) 濃度分布.

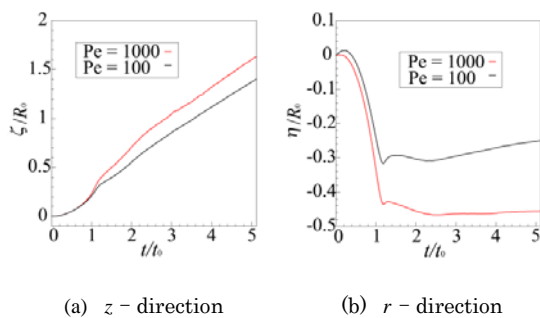


図 10 治療性分子の濃度分布の重心位置の時間変化.

生体壁面の張力を考慮した生体壁面モデルを考案した. 本生体壁面モデルを用いて, Ghost Fluid法により気泡の崩壊挙動を解析した結果を, 図8(各図の右半側は密度分布, 左半分は気泡形状)に示す. 図8(a)は壁面張力

がない場合, (b)は壁面張力がある場合の結果である. 壁面張力がない場合には, 気泡の収縮に伴い, 壁面が気泡の方向に大きく変位するのに対し, 張力がある場合には, 壁面の変位量が減少している. その結果, 張力がない場合には, ほぼ左右から発生していた液体ジェットが, 張力がある場合には, 壁面に向かって発生する. このように, 生体壁面の張力により気泡崩壊時の液体ジェットの方向が変化することが示された.

③ 気泡崩壊に伴う治療性分子の輸送

気泡崩壊に伴う治療性分子の輸送を改良 Ghost Fluid法を用いて解析した. 図9にペクレ数 $Pe=1000$ のときの気泡形状(左図)と治療性分子の濃度分布(右図)を示す. 図9より, 治療性分子が, 気泡崩壊に伴い形成される渦流れによって下流に輸送されていることがわかる. 図10に, 2種類のペクレ数($Pe=1000, 100$)に対する治療性分子の濃度分布における濃度重心((a)は対称軸(z 軸)方向, (b)は径(r 軸)方向)の時間履歴を示す. 図10より, ペクレ数が小さいほど, 物質拡散による濃度分布の広がりが大きくなり, 濃度重心の z 方向の移動量が減少し, r 方向の移動量が増加する. 以上の結果, 分子の輸送を促進するには, 気泡崩壊時の液体ジェットにより形成される渦流れを利用することが有効であることが示された. また, 生体組織内部への浸透性を, 拡散抵抗を用いてモデル化して, 分子輸送をシミュレートする方法を考案した.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. K. Kuzutani, Y. Jinbo and H. Takahira, Numerical Simulations for Drug Delivery with Bubble Collapse Induced by a Shock Wave, Proc. the Eighth KSME-JSME Thermal and Fluids Engineering Conference, USB-flash (No. FR04-001), 2012, Total 2 pages. 査読なし.

2. 神保佳典, 高比良裕之, 生体壁近傍における衝撃波と気泡との干渉に関する数値解析(生体表面の特性が気泡崩壊に及ぼす影響), 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, CD-ROM (No. 7E34), 2012, Total 2 pages. 査読なし.

3. K. Kobayashi, T. Kodama and H. Takahira, Shock Wave-Bubble Interaction near Soft and Rigid Boundaries during Lithotripsy: Numerical Analysis by the Improved Ghost Fluid Method, Physics in Medicine and Biology, Vol. 56, 2011, pp. 6421-6440. 査読あり.

4. 葛谷健士郎, 神保佳典, 高比良裕之, 衝撃波と気泡との干渉による薬剤輸送に関する数値シミュレーション, 日本機械学会 2011 年度年次大会講演論文集, DVD-ROM (No. J052023), 2011, Total 5 pages. 査読なし.

5. Y. Tanaka and H. Takahira, Effects of Phospholipid Layers on the Motion of Microbubbles under Pressure Variations, Proc. ASME-JSME-KSME Joint Fluids Engineering Conference 2011, USB-flash (AJK2011-33011), 2011, Total 8 pages. 査読あり.

6. 田中佑樹, 小林一道, 高比良裕之, 圧力変動下でのリン脂質に覆われたマイクロバブルの挙動, 混相流—混相流研究の進展—, Vol. 24, 2011, pp. 559-566. 査読あり.

7. 葛谷健士郎, 高比良裕之, 神保佳典, 気泡崩壊に伴う物質輸送に関する数値解析, 日本機械学会関西支部第 86 期定時総会講演会講演論文集, No. 114-1, 2011, p. 3/13. 査読なし.

8. 神保佳典, 木村憲太, 高比良裕之, 三次元境界要素法を用いた振動圧力場における弾性管内での気泡挙動に関する数値解析, 日本機械学会関西支部第 86 期定時総会講演会講演論文集, No. 114-1, 2011, p. 13/4. 査読なし.

9. 神保佳典, 高比良裕之, 三次元境界要素法を用いた弾性変形する管内部での気泡崩壊に関する数値解析, 日本機械学会第 88 期流体工学部門講演会講演論文集, No. 10-16, 2010, pp. 135-136. 査読なし.

10. 神保佳典, 小林一道, 高比良裕之, 気泡崩壊によるゼラチン壁面損傷に関する数値解析, 日本混相流学会年会講演会 2010 講演論文集, Vol. 1, 2010, pp. 410-411. 査読なし.

11. 田中佑樹, 小林一道, 高比良裕之, 圧力変動下でのリン脂質に覆われたマイクロバブルの挙動, 日本混相流学会年会講演会 2010 講演論文集, Vol. 1, 2010, pp. 402-403. 査読なし.

[学会発表] (計 9 件)

1. K. Kuzutani, Numerical Simulations for Drug Delivery with Bubble Collapse Induced by a Shock Wave, The Eighth KSME-JSME Thermal and Fluids Engineering Conference, 2012 年 3 月 20 日, Songdo Conversia Center, Incheon, Korea.

2. 神保佳典, 生体壁近傍における衝撃波と気泡との干渉に関する数値解析(生体表面の特性が気泡崩壊に及ぼす影響), 日本機械学会第 24 回バイオエンジニアリング講演会, 2012 年 1 月 7 日, 豊中市, 大阪大学.

3. 葛谷健士郎, 衝撃波と気泡との干渉による薬剤輸送に関する数値シミュレーション, 日本機械学会 2011 年度年次大会, 2011 年 9 月 14 日, 東京都, 東京工業大学.

4. Y. Tanaka, Effects of Phospholipid Layers on the Motion of Microbubbles under Pressure Variations, ASME-JSME-KSME Joint Fluids Engineering Conference 2011, 2011 年 7 月 28 日, 浜松市, アクトシティ浜松.

5. 葛谷健士郎, 気泡崩壊に伴う物質輸送に関する数値解析, 日本機械学会関西支部第 86 期定時総会講演会, 2011 年 3 月 20 日, 京都市, 京都工芸繊維大学.

6. 神保佳典, 三次元境界要素法を用いた振動圧力場における弾性管内での気泡挙動に関する数値解析, 日本機械学会関西支部第 86 期定時総会講演会, 2011 年 3 月 19 日, 京都市, 京都工芸繊維大学.

7. 神保佳典, 三次元境界要素法を用いた弾性変形する管内部での気泡崩壊に関する数値解析, 日本機械学会第 88 期流体工学部門講演会, 2010 年 10 月 31 日, 米沢市, 山形大学.

8. 神保佳典, 気泡崩壊によるゼラチン壁面損傷に関する数値解析, 日本混相流学会年会講演会 2010, 2010 年 7 月 19 日, 浜松市, 静岡大学.

9. 田中佑樹, 圧力変動下でのリン脂質に覆われたマイクロバブルの挙動, 日本混相流学会年会講演会 2010, 2010 年 7 月 19 日, 浜松市, 静岡大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者
高比良 裕之 (TAKAHIRA HIROYUKI) ・大阪府立大学・工学研究科・教授
研究者番号: 80206870

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
小玉 哲也 (Kodama Tetsuya) 東北大学・医学工学研究科・教授
研究者番号: 40271986