

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：	10102
研究種目：	挑戦的萌芽研究
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23656124
研究課題名（和文）	ミクロな混相流動場の可視化と制御によるソノポレーション最適条件の究明
研究課題名（英文）	Exploration of Optimum Conditions for Sonoporation Effect by Controlling Multi-Phase Flow Field with Microscopic Visualization
研究代表者	
	富田 幸雄 (TOMITA YUKIO)
	北海道教育大学・教育学部・教授
	研究者番号：00006199

研究成果の概要（和文）：超音波とソナゾイドの干渉によってゲル表面で気泡の自己分裂が起こり、個々の小気泡の崩壊による微細ジェットの影響痕が確認された。1 MHzの超音波照射時間  $T_{ex}$  が、 $0.01 \text{ s} < T_{ex} < 1 \text{ s}$  ではソナゾイドの崩壊に起因するナノスケールのピットが顕著であり、 $T_{ex} > 1 \text{ s}$  ではキャビテーション気泡の崩壊に起因するマイクロサイズのピットが卓越した。低い音響強さで最大のピット数が得られる超音波照射の最適条件の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：A fine liquid jet was produced during the collapse of individual small gas bubbles in the second collapse of an attached Sonazoid microbubble. Evidential pits are found on the gel surface. Nanoscale pits are dominant in  $0.01 \text{ s} < T_{ex} < 1 \text{ s}$ , and caused by the collapse of Sonazoid microbubbles, whereas microscale pits in  $T_{ex} > 1 \text{ s}$  mainly resulted from cavitation. We found the maximum number of pits when a moderate pressure amplitude of 0.45 MPa was applied, together with a duty ratio of 0.1 and 20 pulses, a result that nearly equals that obtained by continuous ultrasound at a pressure of 0.75 MPa. These results suggests that more suitable conditions for sonoporation can be determined by systematically exploring the characteristics of ultrasound.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体力学

キーワード：マイクロバブル、キャビテーション、ソノポレーション、超音波、分子導入、マイクロジェット、衝撃波、気泡

## 1. 研究開始当初の背景

(1) マイクロバブル存在下での超音波作用によって非侵襲的に外来分子を細胞内部に導入可能であることが明らかにされ、この種のドラッグ・デリバリシステムのがん治療などへの応用が期待されている。

(2) 細胞膜を一過的に破るソノポレーションの発生機構として気泡の非線形崩壊によるミクロな衝撃圧の作用が指摘されているが、細胞膜を効果的に破断する超音波の最適

条件については未だ不明である。

## 2. 研究の目的

(1) 発振周波数 1 MHz の集束型超音波とソナゾイドマイクロバブルとの干渉実験を行い、寒天ゲル近傍および表面に付着して崩壊する気泡のダイナミクスを明らかにする。また寒天ゲル表面におけるくぼみの発生数からソノポレーション効果を評価する。

(2) ナノならびにマイクロスケールの顕微

鏡観察から、相対的に小さい音響強さの超音波作用によって、適度な深さのくぼみの発生数が最大となる超音波の最適照射条件を究明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 集束超音波の圧力および温度測定

- ① 集束点に配置したハイドロフォンによる振動圧力計測、ならびに寒天ゲル表面層近くに埋め込んだ熱電対温度計による温度測定を行う。
- ② 超音波の照射条件、懸濁液濃度、および異なる音響インピーダンスの寒天ゲルに対して基礎データを集積する。

#### (2) マイクロバブルの破壊個数の測定

- ① 肝臓周りの血液循環の可視化に常用されている超音波造影剤ソナゾイド（平均直径  $2 \sim 3 \mu\text{m}$ ）の破壊特性を、各実験条件に対して検証する。
- ② 破壊個数の計測には、各照射時間後に超音波を停止させて平均残存個数を光学顕微鏡で計測する静的な方法ならびに高速度カメラ撮影による直接的な動的観察から明らかにする。

#### (3) ソノレーション模擬実験：寒天ゲル表面でのナノおよびマイクロスケールのピット痕の観察

- ① 細胞膜の主成分である糖類から成る寒天およびその主成分であるアガロース S ゲルを試験壁に使用してソノレーション模擬実験を行う。
- ② ピット痕（くぼみ）を、通常の反射型光学顕微鏡によるマイクロスケール観察ならびに原子間力顕微鏡（AFM）を使用したナノスケール観察で明らかにする。

#### (4) 超音波の最適照射条件の探究

- ① 超音波照射条件（デューティ比、パルス数、圧力振幅、照射時間）を変化させてアガロース S ゲル表面でのピットの深さ、発生数および二乗平均粗さを調べる。
- ② その結果、相対的に小さい音響強さの超音波に対して、適度な深さ（ $>$ 細胞膜の平均的な厚さ  $10 \text{ nm}$ ）を有し、単位面積当たりのくぼみの発生数が最大となる超音波の最適照射条件を究明する。

### 4. 研究成果

#### (1) 集束超音波によるソナゾイドの破壊と寒天ゲルの温度変化

- ① 周波数  $1 \text{ MHz}$ 、平均振幅  $0.75 \text{ MPa}$  の超音波をターゲットであるアガロース S ゲルに集束させ、超音波照射時間の経過に伴う寒天ゲルの温度変化を測定した。図 1 の結果が示すとおり、照射時間が  $10 \text{ s}$  以

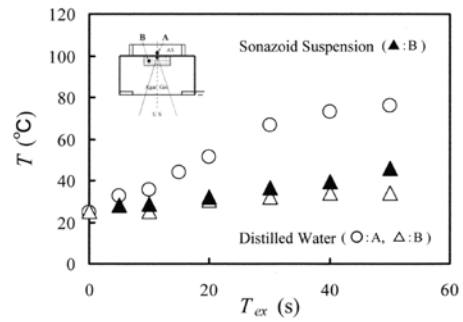


図 1 温度変化に及ぼす照射時間の影響

上になると集束部の温度は  $40^\circ\text{C}$  を超えるため、液体および固体物性の温度依存性を考慮する必要があることが明らかとなった。

- ② 濃度  $5\%$  のソナゾイド懸濁液と集束超音波との相互作用の結果、およそ  $1 \text{ s}$  で殆どのソナゾイドが破壊された。残存数に及ぼす超音波照射エネルギー  $E$  の影響は図 2 のようになる。インテンシティが大きいほど短い照射時間でソナゾイドは破壊され、またデューティ比が大きく連続波に近い超音波ほどソナゾイド破壊が著しくなることが分った。

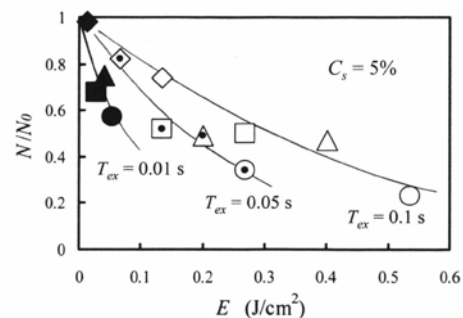


図 2 ソナゾイド残存数に及ぼす超音波照射エネルギーの影響

#### (2) ゲル近傍および表面でのソナゾイドマイクロバブルの運動特性

- ① 周波数  $1 \text{ MHz}$  の超音波に共振応答するソナゾイドの直径は  $9 \mu\text{m}$  程度であるため、懸濁液中のソナゾイドマイクロバブル群に超音波が作用すると個々の気泡は図 3 のように運動しながら互いに引き合い、ついには合体してほぼ直径が  $9 \mu\text{m}$  程度の単一泡に成長して活発に半径方向および並進運動を繰り返す。図 4 は、直径がほぼ  $3 \mu\text{m}$  の二つの気泡が合体直後、最大速度  $1.5 \text{ m/s}$  で寒天壁面に急速に接近し、体積が最小となった後、壁から遠ざかりながら再膨張するという過程を 7 回繰り返して、ついには壁面に付着した例を示している。この場合、最小体積に到達し

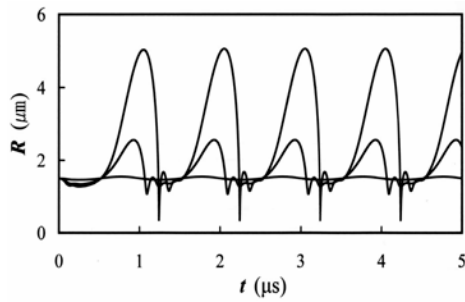


図3 ソナゾイドの半径方向運動 ( $R_0 = 1.5 \mu\text{m}$ ,  $p_A/p_\infty = 5.0$ )

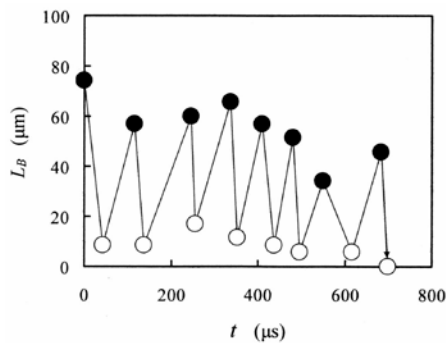


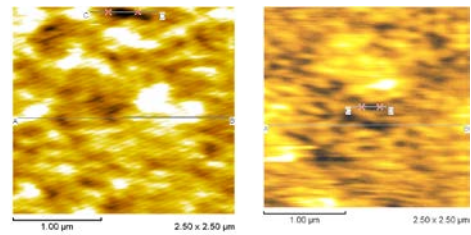
図4 壁面近傍での合体気泡の合成運動 (○最近接位置、●最遠位置)

た気泡の位置はすべて壁面から  $20 \mu\text{m}$  以内であった。付着気泡は数～数十 ms の間ゲル表面に停留し続けた。この期間、付着気泡は膨張と収縮を繰り返し、その結果発生する微細な衝撃力が一定期間、一定の間隔で壁面に作用したものと推測できる。

- ② 細胞に微細な孔を開けるソノポレーション効果の重要な発生要因の一つが液体ジェットの衝突に起因する衝撃圧である。キャビテーションエロージョンの研究から、付着気泡の崩壊が最も効果的に表面エロージョンに寄与することが分かっている。付着気泡の崩壊末期に生じるトラス気泡の自己分裂で、多数の微小気泡が生成され、それらが瞬時に崩壊する様子が高速撮影から明らかとなった。

(3) アガロース S ゲル表面のナノスケール観察とピット痕の特徴

- ① ゲル表面の変化の様子をナノスケールで捉えるために、原子力間顕微鏡 (AFM) を利用してターゲットの表面を観察した。図5に画像の一例を示す。超音波照射時間が数十 ms になるとゲル表面に小さなくぼみ (黒い部分) が発生するようになり、ソナゾイドの破壊がほぼ全て完了する1 s では、数十から数百 nm という小さ



(a) (b)

図5 アガロースSゲルの表面画像: (a)  $T_{ex} = 50 \text{ ms}$ , (b)  $T_{ex} = 1 \text{ s}$

なくぼみが多数観察された。照射時間1 s 以下で発生したくぼみは、ソナゾイドそれ自体の崩壊、あるいはその内部の気体の泡がキャビテーション気泡となって壁面に作用した結果であると推察された。

- ② 超音波の照射時間が1 s を超えるとゲル表面の平均粗さは平滑化する傾向となり、ゲル表面温度が  $40^\circ\text{C}$  を超える照射時間10 s 以上ではゲルの溶解が起こり、小さなくぼみは消失して比較的大きなくぼみが点在するようになる。したがって集束型超音波を利用する場合には、ターゲットの温度上昇を考慮しながら超音波の照射時間を決定する必要がある。図6にゲル表面走査領域 ( $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ ) での単位面積あたりのピット痕の発生個数と最大谷深さの関係を示す。  $1 \mu\text{m}^2$  あたりのピット、あるいはくぼみの発生個数は最大で8個程度、最頻個数は5個と読み取れる。最大谷深さは最低でも細胞膜の厚さ程度の  $10 \text{ nm}$  であり、最大  $170 \text{ nm}$  まで測定された。蒸留水だけの結果によると、ピットの発生個数は4個以下となっており、最大谷深さも  $70 \text{ nm}$  以下であった。

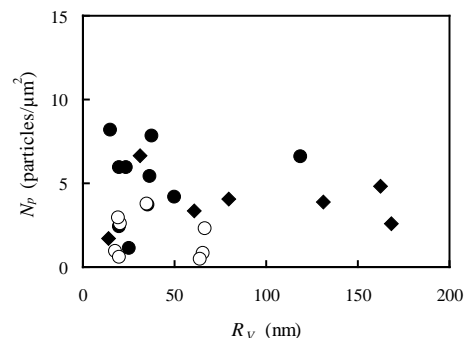


図6 ゲル表面の単位面積あたりピット痕の発生個数とピットの最大谷深さの関係

(4) 最適超音波照射条件

(1) から (3) の成果は、基本的に平均圧力振幅  $0.75 \text{ MPa}$  の連続超音波を使用した場合の結果であった。圧力振幅を約半分、デュー

ティ比を 10% に固定して、アガロース S ゲル表面に形成される単位面積あたりのピット痕が最大になるパルス数の最適値を調べた。その結果、最適パルス数として約 20 パルスを得ることができた。この結果は、比較的音響強さが小さい超音波の場合でもターゲット表面に効果的にくぼみを形成できる最適条件が存在することを示唆している。

#### 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 5 件)

- ① 松浦俊彦、冨田幸雄、他 2 名、集束超音波とソナゾイドの干渉による寒天壁の微視的観察、日本産業技術教育学会北海道支部会研究論文集、査読無、26 号、2013、pp. 17-20
- ② 松浦俊彦、冨田幸雄、他 2 名、集束超音波による寒天壁の表面損傷に及ぼすキャビテーション効果、日本産業技術教育学会北海道支部会研究論文集、査読無、26 号、2013、pp. 13-16
- ③ Yukio Tomita, Shigenori Tanaka and Tetsuya Kodama, Characteristics of Sonazoid destruction and bubble motion caused by focused ultrasound、Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Cavitation、CAV2012、Singapore、査読有、電子媒体 (DVD) DOI: 10.3850/978-981-07-2826-7\_031、2012、Paper No. 31
- ④ Yukio Tomita and Shigenori Tanaka、Focused ultrasound induced free-surface breakup and damage in acrylic plates、AIP Conference Proceedings 1474、NONLINEAR ACOUSTICS State-of-the-Art and Perspectives: 19<sup>th</sup> International Symposium on Nonlinear Acoustics、査読有、Vol. 1474 (DOI: 10.1063/1.4749311)、2012、pp. 123-126
- ⑤ 冨田幸雄、田仲慈訓、集束超音波によるソナゾイド破壊の高倍率光学観察、日本産業技術教育学会北海道支部会研究論文集、査読無、25 号、2012、pp. 15-18

[学会発表] (計 10 件)

- ① 冨田幸雄、集束超音波とソナゾイドの干渉による気泡のダイナミクスと寒天ゲル表面の微視的観察、キャビテーションに関するシンポジウム (第 16 回)、2012 年 11 月 23 日、金沢工業大学 (野々市)
- ② 冨田幸雄、超音波作用による寒天壁近傍でのソナゾイドの破壊と気泡のダイナミクス、日本機械学会 2012 年度年次大会、2012 年 9 月 11 日、金沢大学 (金沢)

- ③ Yukio Tomita、Characteristics of Sonazoid destruction and bubble motion caused by focused ultrasound、Presented at the 8<sup>th</sup> International Symposium on Cavitation、CAV2012、Aug 15、Novotel Singapore Clarke Quay、Singapore
- ④ Yukio Tomita、Focused ultrasound induced free-surface breakup and damage in acrylic plates、Presented at the 19<sup>th</sup> International Symposium on Nonlinear Acoustics、May 22、2012、Waseda University、Japan
- ⑤ Yukio Tomita、Ultrasound induced Sonazoid destruction and the resultant bubble motion、Presented at the informal meeting as a part of Joint Research Project under the Japan-Korea Basic Scientific Cooperation Program for FY 2009、Sept. 27、2011、Jeju National University、Republic of Korea
- ⑥ 冨田幸雄、集束超音波によるソナゾイドの破壊と気泡生成、日本機械学会 2011 年度年次大会、2011 年 9 月 14 日、東京工業大学 (東京)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

冨田 幸雄 (TOMITA YUKIO)  
北海道教育大学・教育学部・教授  
研究者番号：00006199

##### (2) 研究分担者

松浦 俊彦 (MATSUURA TOSHIHIKO)  
北海道教育大学・教育学部・准教授  
研究者番号：50431383

##### (3) 連携研究者

小玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)  
東北大学・医工学研究科・教授  
研究者番号：40271986