

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360067

研究課題名(和文)多機能マイクロバブルの生成・制御・破壊に関する研究開発

研究課題名(英文)Study on the generation, control and destruction of functional microbubbles.

研究代表者

高木 周 (TAKAGI, SHU)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30272371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロバブルドラッグデリバリーシステムに対する基礎的知見を得ることを目的とし、マイクロバブル表面への分子修飾や超音波音場によるマニピュレーション方法について実験的検討を行った。ビオチン修飾したマイクロバブルをアビジン修飾した壁面に選択的吸着させるための条件について調べ、実際に選択的吸着を行うことに成功した。また超音波音場によるマイクロバブルのマニピュレーションについて、集束超音波を用いた手法を検討し、2次元平面内で任意の軌跡でマイクロバブルを移動させるのに成功した。また、流れの存在かにて気泡をトラップすることにも成功し、将来の応用に向けて基礎的知見を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：To get a fundamental knowledge on the microbubble drag delivery system using ultrasound-contrast-agent, two kinds of experiments were conducted. One is the surface modification of microbubbles for selective adhesion to the target. The other is manipulation of microbubbles using ultrasound field. In this study, we succeeded to achieve the selective adhesion of microbubbles with the surface modification using biotin molecules, to the avidin-coated solid wall. We further developed the microbubble manipulation system using focused ultrasound and succeeded to manipulate them on arbitrary trajectories in 2-D plane. We also succeeded to trap the microbubble clusters under the presence of flows. These results give us the fundamental knowledge for the future possible applications.

研究分野：工学

キーワード：混相流 マイクロ流体 気泡力学 医療応用 超音波 DDS

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。このような背景のもと、これまで開発されてきた医療用マイクロバブル (レボビスト, ソナゾイド, オプティゾンなど) は、血管造影に重きを置かれていたため、超音波照射で十分な強度の音を跳ね返し、かつ血液に溶けづらく長寿命であるという点が開発のキーであった。一方、超音波治療への利用考えた場合には、HIFU 照射による気泡の体積振動と熱エネルギーへの変換効率、ドラッグデリバリーシステム (DDS) を目標とした場合には、目的部位への吸着と気泡崩壊時に細胞への薬剤の導入効率などが重要な因子となる。このように医療用の用途だけを考えてみても、マイクロバブルに要求される機能は多岐に亘り、適切な機能を持たせるためには、マイクロバブル内部への物質輸送や表面修飾が極めて重要となる。また、医療応用だけでなく、マイクロ流体における物質輸送と隔離、熱輸送の促進などを考えた場合にも様々な機能を持たせたマイクロバブルの利用が考えられる。

マイクロチャネルを用いてマイクロバブルを生成する研究については、生成された気泡のサイズの小ささの観点からは、Hettiarachchi ら (*Lab on a Chip*, 7(2007), 463-468) の研究が有名である。彼らは、流れを対向させながら絞り込む Flow Focusing 型の流路で直径 $3\mu\text{m}$ の微細気泡の生成に成功している。彼らの手法は、マイクロチャネルを用いてなるべく小さな気泡を生成する手法としては優れているが、繰り返し利用による目詰まりの問題などが指摘されている。一方、申請者らのグループでは、将来的に数種類のマイクロバブルを連続的に生成し混合していくことも念頭に置き、T字型流路によるマイクロバブル生成技術に関して検討を行ってきた。そして、特別な流路形状を用いることにより、直径 $6\mu\text{m}$ の気泡の生成に成功し、血管造影剤サイズの気泡の生成が可能となってきた。この手法では、流路形状を工夫することにより、流路の幅よりもずっと小さな気泡の生成に成功しており、直径 $6\mu\text{m}$ の単分散の気泡というのは、申請者らの知る限り、T字型流路を用いた気泡生成手法としては、世界最小のサイズとなっている。さらに形状の最適化を進めることにより、 $5\mu\text{m}$ 以下の気泡の生成も十分可能であると考

えられ、これにリガンド修飾の機能を付加させたマイクロバブル生成装置は、医療応用を中心として様々な用途での利用が考えられる。マイクロチャネルを用いてマイクロバブルの表面に膜をコーティングする技術の開発に関しては Arakawa ら (*Sensors and Actuators A*, 143(2008) 58-63) の研究があるが、生成された気泡サイズが $100\mu\text{m}$ 以上と本研究の対象に比べサイズが大きく、 $5\mu\text{m}$ 以下の気泡に対してT字型流路を用いて表面修飾の制御性に優れた手法はまだ開発されていない。

2. 研究の目的

上記の研究背景に対して、マイクロチャネルを用いて生成された微細気泡に対する表面修飾技術の確立と、超音波音場によるマイクロバブルの制御と破壊を目指す。具体的には、表面修飾の機能を有するマイクロチャネルによるマイクロバブル生成手法の開発として、脂質分子でコーティングされたマイクロバブルの表面にビオチン分子を就職し、アビジン修飾された壁面への選択的吸着を達成する。また、定在音場及び集束超音波音場を用いてマイクロバブルの捕獲および破壊を行う手法を開発し、将来の薬剤搬送システムへの適用に向けて知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、(a) マイクロバブル表面へのビオチン分子の修飾とアビジン修飾された壁面への選択的吸着と (b) 超音波音場によるマイクロバブルの制御の2つに分けて研究を遂行した。以下、その方法について説明する。

3.1 マイクロバブル表面へのビオチン分子の修飾とアビジン修飾された壁面への選択的吸着

実験系を Fig. 1 に示す。気泡生成には図に示すマイクロ流路を用いた。液相はシリンジポンプにて流量制御し、気相には純窒素を用い圧力コントローラにて制御した。気泡生成の様子は光学顕微鏡に取り付けた高速度カメラを用いて撮影した。また流路出口側にキャピラリーチューブを取り付けて、プレパレート上や水槽中にマイクロバブルを取り出し、観察を行った。液相には Kanaka ら [1] の研究を参考に、純水に体積比で 10% のグリセリンおよびプロピレングリコールを加えた混合水 (GPW)、リン脂質である 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) に加えて、(a) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethyleneglycol)-2000]

(DSPE-PEG2000), (b) DSPE-PEG2000 · NaCl, (c) DSPE-PEG2000-biotin · NaCl を混合した脂質溶液を用いた. (a)-(c)いずれの脂質も DSPC とモル比で 1:9 となる様に調合した. マイクロバブルは流路内で衝突しない周期で, 気泡径は流路後流部で 30-40 μm となるように生成した. 気泡表面への脂質修飾, 安定性を観察するために, (a), (b)を用いて生成したマイクロバブルをプレパラート上に取り出し, 顕微鏡下で経過観察を行った.

シャーレ表面には, Phillip ら[2]の研究を参考にして, Bovine Serum Albumin (BSA) を物理吸着させた BSA 修飾表面と, biotinylated-BSA を介してアビジンを固定化したアビジン固定化表面を作成した. またアビジンが目的箇所のみ固定されていることを確認するために, Spherotec 製のビオチン標識ポリスチレン粒子(平均径 6.7 μm) を純水中で滴下し, 一定時間経過後シャーレを転置して粒子の残存量を確認した.

更にビオチン修飾したマイクロバブルの, アビジン固定化表面への選択的吸着の確認を行った. BSA 修飾表面及びアビジン固定化表面それぞれ半面ずつ作成したシャーレを, 生理食塩水で満たした水槽に傾けて設置した. そこに(b), (c)を用いて生成したマイクロバブルをシャーレの下方から流すことで, シャーレ表面にマイクロバブルを接触させた. また気泡吸着の様子は三脚で固定したカメラを用いて撮影した.

3.2 超音波音場によるマイクロバブルの制御

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獲による位置制御について実験方法を説明する.

3.2.1 定在波音場による気泡捕獲の実験

定在波音場中における気泡には第一ビヤクネス力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のが理論より予測される. さて, 血管造影剤として用いられているマイクロバブルは, 気泡表面を脂質分子などでコーティングし, 安定化させているため, その振動挙動は, 理論で扱われているコーティング無しの気泡とは異なるものとなる. ここでは, 理論予測される第一ビヤクネス力の影響が, 実際の血管造影剤であるソナゾイドに対してどのように現れるか, 実験系の確認も含め調べた. 実験は, 超音波トランスデューサーと反射板を用いて1次元定在波を作成し, ソナゾイドの分布を調べた. 超音波照射前に一様に分布しているソナゾイドが, 超音波照射とともに, 腹の部分に集まり始めるとともに, 合体して大きくなった気泡

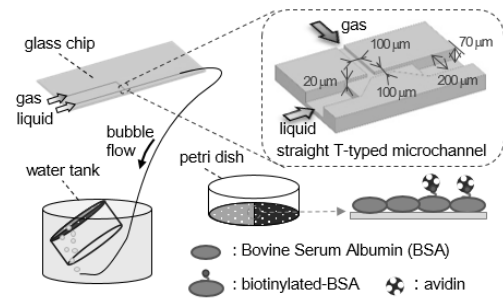


Fig.1 Experimental setup to generate surface modified biotin-microbubble and avidin coated surface

は節の部分へと集中するようになる. そのときの実験結果を Fig.2 に示す. 照射超音波の振動数は 2 MHz, 図より, 小さなソナゾイドと合体して大きくなった気泡が縞模様を作って並ぶのが観察され, 小さなソナゾイドが集まっている縞模様の間隔が, 1/2 波長ごとになっているのがわかる. すなわち, 理論予測の通り, 2MHz の振動数で, 単一ソナゾイドと合体気泡の選別ができてるのが確認でき, 良好な音場が形成されているのがわかる.

3.2.2 集束超音波によるマイクロバブルマニピュレーション

次に二次元平面に音圧勾配を作りマイクロバブルを捉え, 移動させる方法として集束超音波を用いた実験系を構築した. マイクロバブルは, Fig.3 に示すような集束超音波装置を用いて捕獲する. この装置を用いると焦点付近は腹となるため, 固有振動数の高い微細気泡が捕獲され易くなり, 捕獲した気泡に対して, 超音波素子を移動させることにより気泡自身を動かしていく.

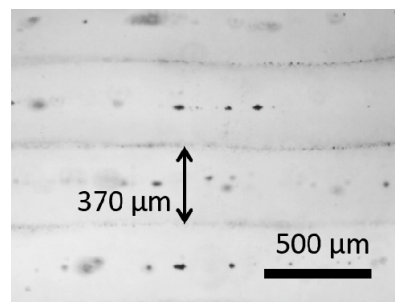


Fig.2 Microbubbles in standing wave. Small bubbles at the Anti-node and Large Bubbles at the Node.

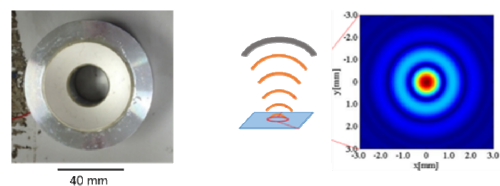


Fig.3 Focused Ultrasound Device to capture a bubble

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 2 MHz, 3.25 MHz, 5.46 MHz の三種類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, 穴の直径は 20 mm である。圧電セラミックスには PZT (C213 ; Fuji Ceramics Corp.) を用いた。球面型素子から超音波を照射した時の焦点面における音圧分布は Fig.3 左図に示す様になる。ここでは, 線形波を仮定し, その重ね合わせで音圧分布を計算している。中心に最も高い音圧の焦点が存在し, 同心円上に音圧分布が並んでいる様子が確認できる。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マイクロバブルをトラッピングすることが可能であると考えられる。

この中心に存在する焦点にマイクロバブルをトラッピングし, 球面型素子自体を超音波伝搬方向と垂直な面内で移動させることでマイクロバブルのマニピュレーションを行った。実験では, 純水にマイクロバブルを投入した溶液を音響流を防ぐためにアクリルアミドゲルで囲った空間に閉じ込め, 外側から集束超音波を照射した。下面から倒立顕微鏡 (TE2000-E, Nikon Corp.) で観察し, 高速度カメラ (MotionPro X3, IDT Inc.) で撮影した。マイクロバブルとして, ソナゾイドを用いた。ソナゾイドは参考文献から, 共振周波数は約 5.6 MHz である。また, 水槽の底に流路を固定した実験を準備し, 球面型素子の位置を制御し, 流路内でトラッピングした気泡のマニピュレーションを行なう。

4. 研究成果

4.1 マイクロバブル表面への修飾

4.1.1 マイクロバブルへの脂質コーティング

マイクロバブルへの脂質コーティング及び安定性を観察した結果を Fig.4 に示す。(a)は GPW, DSPC に DSPE-PEG2000 を混合した脂質溶液を用いて生成したマイクロバブルの様子であり, (b)は更に NaCl 0.1 mol/L 加えた脂質溶液で生成したマイクロバブルの様子である。(a)のマイクロバブルは時間経過と共に合体による破泡や内部ガスの脱離・溶解による消滅によって, 観察できる数が大幅に減少していることが確認された。一方で, (b)のマイクロバブルでは気泡数の大幅な減少は観察されず, 気泡径の変化も限定的で, 十数時間経過してもマイクロバブルが安定して存在していた。

NaCl がマイクロバブルに与える影響としては, 気泡の合体の防止効果が挙げられる。しかし NaCl の及ぼす合体防止効果は界面活性剤の効果ほどあるとは考え難く, また気泡の安定性を大幅に増大させる効果は期待されない。そのため NaCl の与えた影響は, マイクロバブル自身ではなく気泡表面に付

着する脂質に対するものであると考えられる。更に Fig.5 に示す表面張力の計測結果より, 純水に DSPE-PEG2000 のみを溶解した溶液に比べ, NaCl を加えた溶液は表面張力が低下することが確認された。

DSPE-PEG2000 は負に帯電した両親媒性分子であり, NaCl を加えたことで静電気的作用が減少して気液界面への吸着が容易になったために, 気泡表面への十分な修飾が可能になったと考えられる。

4.1.2 シャーレへのアビジン固定化

アビジン固定化表面がシャーレの目的箇所を作成されていることを確認するために, ビオチン標識粒子を塗布した結果を Fig. 6 に示す。(1)はシャーレ全体を, (2)は顕微鏡を介してその一部を撮影している。いずれの画像も右側がアビジンの固定化が期待されている面 (アビジン固定化表面) で, 左側が BSA 修飾面である。ビオチン標識粒子は, アビジン固定化表面に吸着したのに対して, BSA 修飾表面には殆ど吸着しなかった。このことから, ビオチン標識粒子の選択的吸着, アビジンの目的箇所への固定化を確認した。

4.1.3 マイクロバブルの選択的吸着

マイクロバブルの選択的吸着を確認した結果を Fig.7 に示す。マイクロバブルは GPW, DSPC, NaCl に加えて (b) DSPE-PEG2000, (c) DSPE-PEG2000-biotin を混合した脂質溶液により生成した。画像は(1), (3)シャーレ下方からのマイクロバブルを流した様子, (2), (4)静置後のマイクロバブルの吸着の様子である。ビオチンを修飾していないマイクロバブルは, BSA 修飾表面, アビジン固定化表面どちらにも吸着せず, 浮力によって脱離することが確認された。

一方, DSPE-PEG2000-biotin を含む溶液で生成したマイクロバブルは, BSA 修飾表面では脱離したが, アビジン固定化表面では吸着することが確認された。このことから, マイクロバブルへのビオチン修飾に成功し, 更にアビジン-ビオチン相互作用を利用したマイクロバブルの選択的吸着に成功したと考えられる。

以上, 本研究では, 特定のたんぱく質をターゲットにして吸着するマイクロバブルを開発するために, 気泡表面をビオチンで修飾し, アビジンを固定化した固体壁面に選択的に吸着するマイクロバブルの開発を行い, 以下の成果を得た。

- ・ GPW, DSPC, DSPE-PEG2000-biotin に加えて, NaCl を混合した溶液で気泡を生成することによって, マイクロバブルへのビオチン修飾に成功。

- ・ アビジンを固定化したシャーレにマイクロバブルを流し, ビオチンを修飾した気泡のみを, アビジン固定化表面へ選択的に吸着させることに成功。

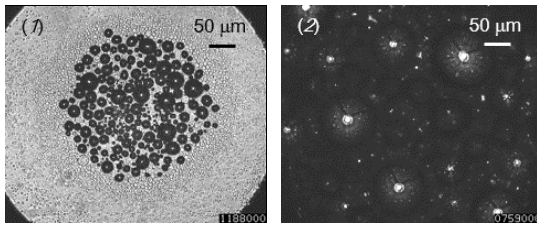


Fig. 4 Photographs of microbubbles' coalescence and life time. Microbubbles were generated using GPW, DSPC and (1) DSPE-PEG2000 or (2) DSPE-PEG2000 with NaCl. Each PEG lipids and DSPC were combined at 1:9 molar ratio. Photographs were taken at around 18 hours after generation.

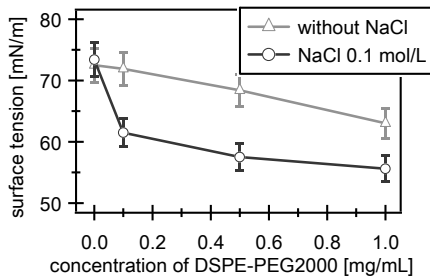


Fig. 5 Measurement of surface tension in terms of concentration of DSPE-PEG2000 mixed with or without NaCl 0.1 mol/L.

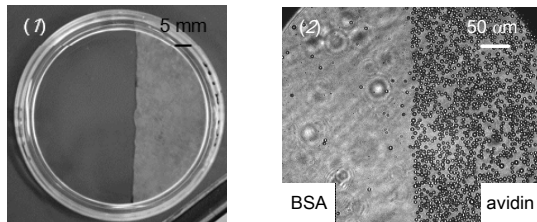


Fig. 6 Photographs of selective adsorption of biotinylated polystyrene particle. On right hand side, avidin was expected to be fixed on surface of petri dish via biotinylated-BSA. (1) is macroscopic observation and (2) is microscopic.

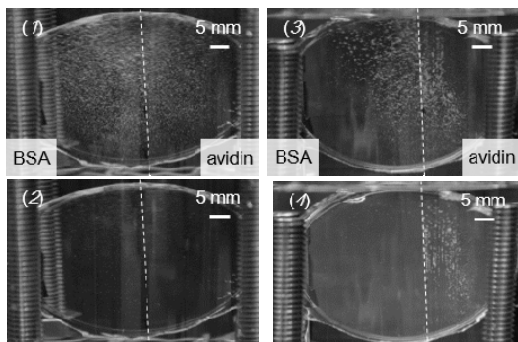


Fig. 7 Photographs of selective adsorption of microbubbles. Microbubbles were generated with (1), (2) DSPE-PEG2000 or (3), (4) DSPE-PEG2000-biotin. Photographs were taken at (1), (3) microbubbles' flowing from bottom to top and (2), (4) after flotation.



Fig. 8 Trapped Bubbles and Manipulation

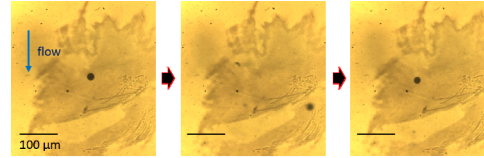


Fig. 9 Manipulation of a bubble cluster under the presence of flow

4.2 超音波音場によるマイクロバブルの制御

球面型素子から照射された集束超音波による音圧分布の焦点にマイクロバブルをトラッピングし、素子をオートステージで制御することでマニピュレーションを行った。ここでは軌跡としてアルファベットの”M”を描くように制御した際の結果を Fig.8 に示す。この時の集束超音波の周波数は 5.46 MHz で焦点部分の音圧振幅は約 7.6 kPa である。Fig.8 右図は焦点にトラッピングされた気泡クラスターであり、数個の単一気泡から構成されていることが確認できる。Fig.8 左図の白線は実際にトラッピングされた気泡クラスターが通った軌跡を表し、黄線は焦点が通った軌跡を表しており、両者の始点を重ねている。図より、”M”を描いてマニピュレートされているのがわかる。さらに、周波数 5.46 MHz の焦点領域は約 500 μm であることを考えると、焦点領域内に軌跡全体が収まり、誤差も数十 μm 程度であることから、この集束超音波照射装置は非常に高い精度でのマニピュレーション能力を有するといえる。

この実験系を用いて、流路内におけるマニピュレーションにも成功した。Fig.9 にマニピュレーションの様子を示す。流体は純水で流速は図の上から下に向かって約 0.06 mm/s で流れている。捕獲のための超音波の振動数は 9.75 MHz、流路の深さは 2 mm である。流路内に超音波を集束させることによって気泡クラスターを周囲の流れに逆らう形で左右に動かすマニピュレーションに成功した。

以上より、本研究で構築された集束超音波実験系により、血管造影剤であるソナゾイドを実際にマニピュレートすることに成功し、集束超音波によるマイクロバブルの遠隔操作について基礎的知見を得た。

参考文献

[1] Kanaka H., et al., *AICHE*, **22**, (2006)

pp.9487-9490

- [2] Phillip K., et al., *Anal. Chem.*, **83**, (2006), pp8877-8885

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 4 件)

- ① Ichiyanagi, M., Miyazaki, R., Ogasawara, T., Kinefuchi, I., Matsumoto, Y., Takagi, S., "Measurements of microbubble generation process in microchannel using ultra high-speed micro-PTV system," *Microfluidics and Nanofluidics*, Vol.14 (2013), pp.1011-1020
- ② Liu, Y., Sugiyama, K., Takagi, S., Matsumoto, Y., "Theoretical study on the shape instability of an encapsulated bubble in an ultrasound field," *NONLINEAR ACOUSTICS State-of-the-Art and Perspectives*, 2012, pp.131-134, DOI: 10.1063/1.4749313.
- ③ 高木周, 松本洋一郎, "バイオ・医療分野における混相流," *混相流*, Vol. 26 (2012), pp. 386-391.
- ④ Inoue, K., Ichiyanagi, M., Takagi, S. et al., "Two-dimensional Manipulation of Microbubbles Using Primary Bjerknes Force", *Proceedings of 2013 IEEE-International Ultrasonics Symposium*, pp.1907-1910.

[学会発表] (計 14 件)

- ① Shu Takagi, "Development of Functional Microbubbles for Ultrasound Therapy," 8th International Cavitation Symposium, CAV2012, 2012/8/15, Singapore, (招待講演)
- ② Kaji, H. Ichiyanagi, M., Takagi, S. et al., "Development of microbubbles generator using microchannel toward biomedical applications," 65th Annual Meeting of the American Physical Society, Division of Fluid Dynamics, 2012/11/19, San Diego, USA.
- ③ 高木周, "マイクロバブルからミリバブルまで—複雑な気泡挙動の解明を目指して," 第 62 回理論応用力学講演会 (NCTAM2013) (招待講演), 2013/3/6, 東京
- ④ Inoue, K., Ichiyanagi, M., Takagi, S. et al. "Microbubble manipulation using standing wave generated in square column transducer", *The 13 International Symposium for Therapeutic Ultrasound*, 2013/5/12-16, Shanghai, China.
- ⑤ Inoue, K., Ichiyanagi, M., Takagi, S. et al. "Microbubble Manipulation using Ultrasound Standing Waves",

IEEE-International Ultrasonics Symposium, 2013/7/21-25, Prague, Czech Republic.

- ⑥ 高木周, "微小気泡から赤血球まで, 分散混相流の基礎と応用," 第一回力学アカデミー記念講演会, 2014/3/18, 東京 (招待講演)
- ⑦ Shu Takagi, "On bubble clustering phenomena," 9th UK-Japan Seminar on Multi-Phase Flow, 2014/9/16-18, London, UK.
- ⑧ 増田礼, 一柳満久, 高木周他, 日本混相流学会混相流シンポジウム, 2014/7/28-30, 札幌
- ⑨ 尾崎太一, 一柳満久, 高木周 他, 日本混相流学会混相流シンポジウム, 2014/7/28-30, 札幌
- ⑩ Osaki, T., Inoue, K., Azum, T., Ichiyanagi, M., Takagi, S., Matsumoto, Y., 2014/9/3-6 IEEE International Ultrasonic Symposium, 2014, Chicago, USA.
- ⑪ 尾崎太一, 井上和仁, 東隆, 一柳満久, 高木周, 松本洋一郎, "超音波によるマイクロバブルのマニピュレーション手法の開発," *キャビテーションに関するシンポジウム*, 2014/11/20-21, 東京.
- ⑫ Takagi, S., Osaki, T., Azuma, T., Ichiyanagi, M., Matsumoto, Y. "Experimental study on the manipulation of microbubbles using ultrasound field," 67th Annual Meeting of American Physical Society, Division of Fluid Dynamics, 2014/11/23-25, San Francisco, USA
- ⑬ Masuda, R., Ariyoshi, T., Ichiyanagi, M., Takagi, S., Matsumoto, Y. 67th Annual Meeting of APS, DFD, 2014/11/23-25, San Francisco, USA
- ⑭ Takagi, S., Maeda, K., Sekiguchi, Y., Sugiyama, K., Matsumoto, Y., "Bubble Clustering and Turbulent Modulation in Upward Bubbly Flows," *IUTAM Symposium, Dynamics of Bubbly Flows*, 2015/3/9-14, Oaxaca, Mexico (招待講演)

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

杉山 和靖 (SUGIYAMA KAZUYASU)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授
研究者番号：50466786

一柳 満久 (ICHIYANAGI MITSUHISA)

上智大学・理工学部・准教授

研究者番号：00584252