

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630045

研究課題名(和文) プラズマナノバブルへの抗体修飾による選択的アポトーシス誘導法の開発

研究課題名(英文) Development of plasma nano-bubbles with modified antibody for induction of apoptosis

研究代表者

佐藤 岳彦 (SATO, Takehiko)

東北大学・流体科学研究所・教授

研究者番号：10302225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：水中に絶縁被覆された針状の白金ワイヤ電極とリング状の白金ワイヤ電極を超純水中に設置し、針電極に高電圧を印加することで、水中に微細気泡を大量生成する装置の開発に成功した。これらの気泡は最大頻度が100～200 nmの粒径を有する粒径分布となることを明らかにした。一方、電極材などの固形不純物と微細気泡の判別を行うため最大100気圧に加圧・観測する装置の開発、衝撃波を利用した気泡変形観察装置を開発し、固気判別が不可能であった超微細気泡の検証法を開発した。これらの成果により、ナノバブルの抗体修飾に向けた重要な基盤要素技術を提案した。

研究成果の概要(英文)：The underwater discharge device which produces a large amount of microscopic bubbles was accomplished by installing the insulation-coated needle-like and ring-shaped platinum wire electrodes in the ultrapure water and applying the high voltage to the needle electrodes. It has been shown that these bubbles generated a particle size distribution with a greatest frequency of particle size of 100 - 200 nm. Also, a verification method for ultrafine bubbles that was impossible for solid-gas determination was developed by developing the devices that pressurizes and observes the bubbles with a maximum of 100 atm in order to distinguish solid impurities such as electrode materials and the ultrafine bubbles, and that observes bubble deformation using shock waves. By these results, we proposed an important fundamental technology toward modification of antibodies of nano-bubbles.

研究分野：流体工学

キーワード：バイオ流体力学 プラズマナノバブル

1. 研究開始当初の背景

ナノバブルは、超音波診断における造影剤、ターゲットドラッグデリバリー、気泡洗浄などへの応用が進められ次世代技術として大きく期待されているが、安定分散するための条件が限定されることなどにより、研究が進展していない状況である。ナノバブル発生法は、現在までに、高速旋回流、電気分解、超音波などにより直接もしくはマイクロバブルを生成破壊させ発生させる方法が提案されている。申請者は、2005年より水中でプラズマ流による微細気泡発生法を開発してきたが、この液体をフィルターで濾過すると、フィルター上に直径300nm程度の球形物体が残留することを発見している。このことから、申請者は、水中プラズマ流により高安定性ナノバブルを生成できるのではないかと考えるに至った。一方、医療分野では、抗体療法において、抗体を抗がん剤やラジオアイソトープに修飾するがん治療法が開発されているが、2回目以降では抗体除去作用による効果の低減、アナフィラキシーショックの発生、抗がん剤の副作用、放射線被曝対策などの問題を抱えている。そこで、申請者は、抗体をナノバブルに修飾し、がん細胞に選択的に結合させ、超音波を照射しナノバブルが破裂する時に発生する、衝撃波、活性酸素、発光、熱により、がん細胞にアポトーシスを誘導することが可能ではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究は、水中プラズマ流を利用して、高い安定性を有するプラズマナノバブルを生成する手法とナノバブル気泡径を制御する手法を開発し、その安定化機構の解明を行う。次に、プラズマナノバブルに抗体を修飾し、がん細胞表面のみに抗原抗体結合を利用してナノバブルを固定化する。超音波照射で固定化したナノバブルを破裂させ物理刺激を与えることで、がん細胞のみにアポトーシスを誘導する手法を開発する。これにより、流体力学を基盤にしたプラズマ、化学、電気、バイオ、医療を融合する、日本発の独創的な次世代医療基盤技術となる「ナノバブル医療」を創出し、次世代がん治療の開発の飛躍的發展に貢献する。

3. 研究の方法

研究は、(1)水中プラズマ流による高安定性ナノバブル発生法の開発、(2)ナノバブルの気泡径計測・制御法の開発、(3)超音波照射によるナノバブル破裂法の開発、(4)ナノバブルに抗体を修飾する手法を開発、(5)超音波照射によりナノバブルを破裂させアポトーシスを誘導する手法の開発を行う。

特に、(1)(2)についての手法については以下の通りである。(1)超純水中に針・ワイヤ白金電極を設置し、高電圧を針電極に印加することで、ナノバブルを発生させる。高電圧

は、新たに購入する数十 ns 程度で 10 kV 昇圧できるナノパルス高圧電源を利用する。高速信号発生器と組み合わせ、印加電圧、周波数、波形、パルス幅をパラメータとし、プラズマの発生モード(プライマリストリーマとセカンダリストリーマ)を変化させ、イオンの発生量や気泡ガスチャネル径を適切に制御することで、バブル量増大・水温上昇抑制を行う。ナノバブルの安定化機構の解明は、ナノバブルの元素解析、構造解析、AFM 観察、TEM 観察、SEM 観察などから行う。サンプル量が一定以上のバルクとして必要な場合は、構造解析や元素解析に影響を与えないような溶剤に封入し高密度ナノバブルサンプルを作製する。

(2)生成したナノバブル水をシリンジで回収し、フィルター1(孔径100-1000nm)とフィルター2(孔径50-200nm)で濾過する。フィルター1,2から、それぞれ気泡径の異なるナノバブル濃縮液が回収できる。これは、計測において濃度を高めることで精度を上げることを目的としている。フィルターの孔径は適宜変更し、動的光散乱法、顕微鏡観察により、期待する気泡径のナノバブルが回収されているかどうか検証する。また、高正圧負荷下で形状が収縮するかどうか、高負圧負荷下で膨張するかどうか、加熱時に膨張するかどうかを観察し、生成したナノバブルが気体なのか固体なのかを判別する。

4. 研究成果

本研究では、水中に絶縁被覆された針状の白金ワイヤ電極とリング状の露出した白金ワイヤ電極を超純水中に設置し、針電極に高電圧を印加することで、水中に微細気泡を大量生成する装置の開発に成功した。そこで、レーザー共焦点顕微鏡により詳細に観察した結果、300nm以下と見られる微小球体がブラウン運動している様子が観察された。より微小な粒径の計測と統計的な粒径分布を計測するために、動的光散乱法を利用し分析した。これにより、最大頻度が100~200nmの粒径を有する粒径分布が得られた。さらに、図1に示すようにSEMによる観察を行った結果、数十nm~数百nmの球状の物体が観察された。SEM観察では真空中における計測のため気泡は残存していないと考えられるため、観察された微粒子のX線分析を行い、白金や有機物の微粒子が発生していることを確認した。これより、微粒子群にはプラズマ発生時に生成された電極材やコーティング材などからなる微粒子が含まれていることが明らかになった。この微粒子群が固体のみなのか気泡が含まれているのかを判別するために、最大100気圧まで加圧できる顕微鏡観測チャンバーを利用し観察したところ、いずれの微粒子も変形しないことが明らかになった。

そこで、微細気泡の固気判別法の開発と

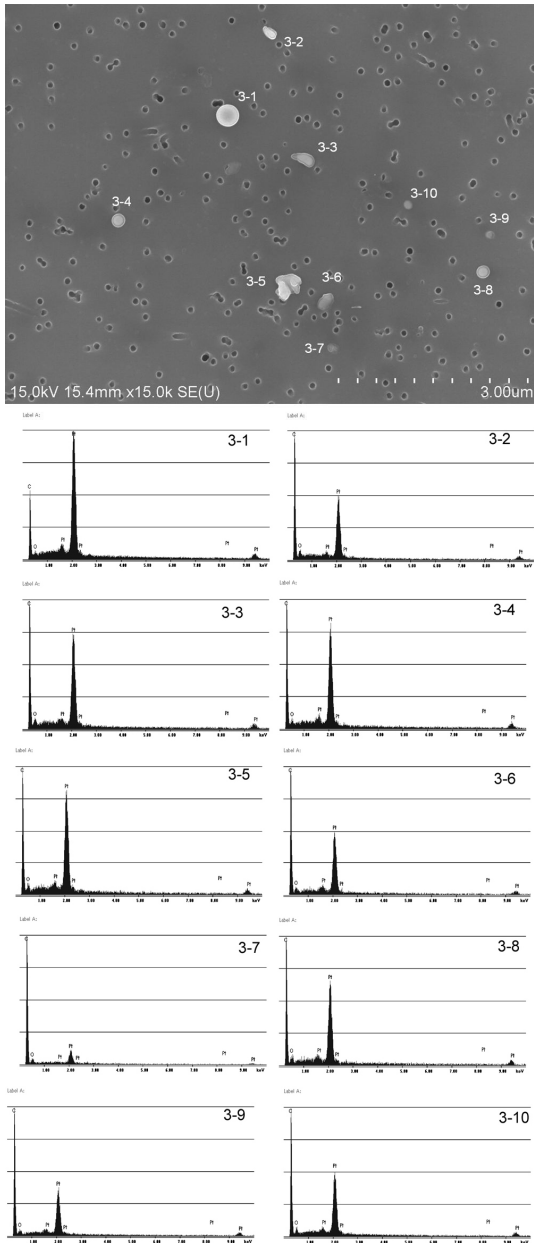


図1 プラズマ生成水中の不純物のSEM画像とEDAXによるX線分析結果。

検証を行った。ナノパルスレーザを利用して衝撃波を水中に発生させ膨張波が通過すると、図2に示すように、水中の微細気泡が膨張し数十 μm 程度まで膨張し観察が可能になる。図3に膨張波が通過した後の気泡の成長を露光時間20 ns, 10 Mfpsで撮影した連続写真を示す。スケールバーは50 μm である。残存している微細気泡が膨張波による数十 μm まで成長する様子が示されている。また、このように成長した気泡が崩壊するときの気泡径の時間変化をまとめた結果を図4に示す。実線は、レイリープリセット方程式から得た解析結果である。微細気泡は概ね解析結果と同じ傾向を示し、微細気泡の生成崩壊が、一般的な気泡挙動である可能性を示している。この手法を利用して、衝撃波照射による微粒子の固気判別法の開発に取り組み、図5に示

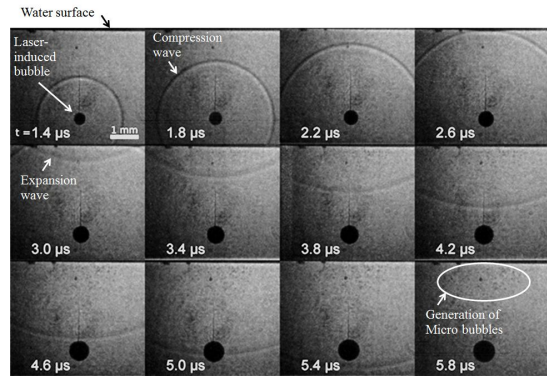


図2 レーザ誘起水中衝撃波により圧縮波と膨張波の進展と気泡生成の様子連続写真。露光時間は80 ns。

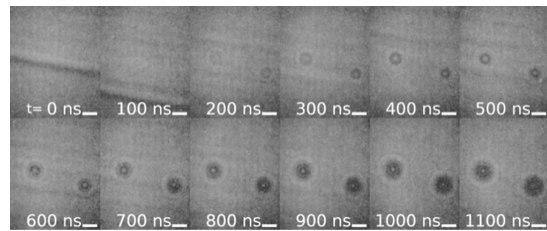


図3 膨張波通過後の気泡成長の様子。

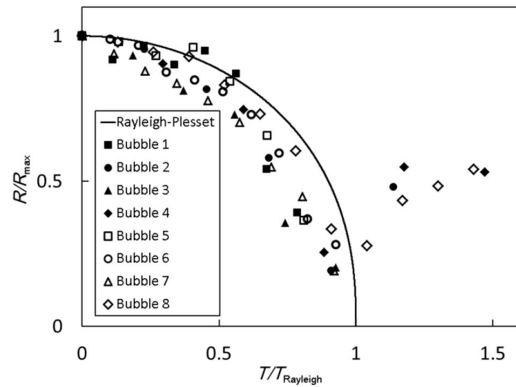


図4 気泡崩壊時の気泡径の時間変化とレイリープリセット方程式との比較。

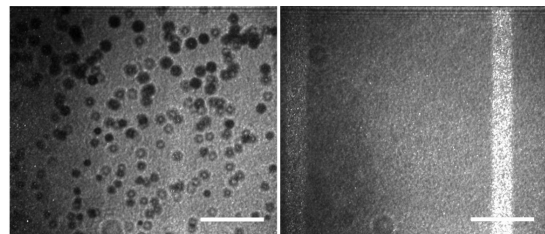


図5 微細気泡群(左)と固体微粒子群(右)の膨張波通過による気泡生成の様子。

すように、マイクロメートルスケールの微細気泡群に対しては、同程度の粒径を有する固体微粒子との間に、膨張波通過後の気泡生成の様子が異なることを明らかにした。このように、膨張波を利用して固気判別が可能であることが示され、さらに微細なナノバブルへの適用が可能である要素技術の

開発に成功したと考えている。これらの結果は、ナノバブルの抗体修飾に向けた重要な基盤となると確信している。

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0件)

〔学会発表〕(計5件)

1. 南共哉, 佐藤岳彦, 中嶋智樹, 吉野大輔, 金子俊郎
水中衝撃波を用いたマイクロジェット生成法
日本機械学会第92期流体工学部門講演会, (2014-10-26), 富山大学.
2. Tomoya Minami, Takehiko Sato, Tomoki Nakajima, Daisuke Yoshino and Toshiro Kaneko
Formation of Microjet by Plasma Generated Underwater Shock Wave
Proceedings of the 11th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2014), pp.552-553, (2014.10.9), 仙台国際センター.
3. Takehiko Sato, Yuki Yamaguchi, Kiyonobu Ohtani, Takashi Miyahara and Tatsuyuki Nakatani
Development of New Visualization Method for Plasma-Generated Nano-Micro Bubbles
Proceedings of the 14th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI2014), pp.186-187, (2014.10.9), 仙台国際センター.
4. Marc Tinguely, Takehiko Sato, Kiyonobu Ohtani and Mohamed Farhat
Visualization of the Formation of Shock Waves at the Collapse of a Laser-induced Bubble
Proceedings of the 14th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI2014), pp.108-109, (2014.10.9), 仙台国際センター.
5. Takehiko Sato, Takashi Miyahara and Tatsuyuki Nakatani
Analysis of Plasma-generated Bubbles by Electron Microscope
Proceedings of the 13th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI2013), pp.148-149, (2014.10.9), 仙台国際センター.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 岳彦 (SATO, Takehiko)
東北大学・流体科学研究所・教授
研究者番号: 10302225

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宮原 高志 (MIYAHARA, Takashi)
静岡大学・工学研究科・教授
研究者番号: 70239432

大谷 清伸 (OHTANI, Kiyonobu)
東北大学・流体科学研究所・助教
研究者番号: 80536748

吉野 大輔 (YOSHINO, Daisuke)
東北大学・流体科学研究所・助教
研究者番号: 80624816