

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870901

研究課題名(和文) 圧電共振子を用いた標的指向型マイクロバブルの特異的吸着量評価法の確立

研究課題名(英文) Evaluation on specific adsorption of targeted microbubbles using a piezoelectric resonator

研究代表者

吉田 憲司 (Yoshida, Kenji)

千葉大学・フロンティア医工学センター・助教

研究者番号：10572985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：超音波ドラッグデリバリーシステムにおいて使用される分子標的マイクロバブルの標的分子に対する感度を評価する人工的な計測システムを構築した。センシングデバイスとして水晶共振子を用いることで、標的分子の量と吸着したバブル量を評価することを試みた。評価システムから得られる共振子のインピーダンスからバブルの数密度を定量的に推定できる解析モデルを提案した。実験結果を基に、標的分子として使用したアビジン分子の濃度、アビジン分子と特異的に吸着するビオチン修飾バブルの数密度を評価できることを示し、提案システムが分子標的バブルの感度評価システムとして有望であることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study for ultrasonic drug delivery system, an ex vivo system for measuring sensitivity of targeted microbubbles to target molecular was established. In the system, a quartz crystal microbalance was employed as a sensing device for detecting both target molecular and bubbles. The physical theoretical model for analyzing the number density of specifically absorbing bubbles was proposed. The model-based analysis enabled to evaluate the concentration of streptavidin as target molecular and the number density of biotinylated microbubbles specifically absorbing the streptavidin. The proposed system shows promise for the application as evaluation system of the sensitivity of targeted microbubbles.

研究分野：計測工学

キーワード：マイクロバブル 標的指向化 抗原・抗体反応 ビオチン-アビジン結合 横波モード圧電共振子 水晶共振子 共振特性

1. 研究開始当初の背景

薬物投与を時間的、空間的、量的に制御可能な次世代治療技術として期待される超音波ドラッグデリバリーシステム (Ultrasonic drug delivery system; USDDS) とは、薬物の搬送担体 (キャリア) としてマイクロバブルを利用することで薬物を標的部位まで確実に搬送し、超音波照射によるマイクロバブルの破壊により薬物の放出を制御するという技術である。マイクロバブルの超音波診断用造影剤としての機能を併用することで、薬物担体であるマイクロバブルの標的部位に対する集積を超音波診断装置でリアルタイムに評価することもでき、同時に高出力超音波の照射により薬物投与を制御するというセラノティクスとしての応用も期待されている。USDDS における工学的技術課題の一つは標的部位へのバブルの集積方法である。標的を特異的に認識する分子をバブル表面に固定化し、血管内に循環させることで、バブルを目的部位に集積させることができる。本研究ではバブルの集積能を評価する人工的システムの構築を目指した。

2. 研究の目的

特定の分子を特異的に認識するバブルは分子標的バブルと呼ばれ、先行研究でも血管新生に関与する糖タンパクである血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR2) や血管内皮細胞に発現する P-セレクチンなどの生体分子を標的にしたバブルが開発されている。また、それらの部位特異的な吸着も動物モデルを用いた *in vivo* 実験において実証されている。基礎的検討事項として、バブルの標的分子に対する感度 (一つのバブルを標的部位に吸着させるために必要な分子の個数) を評価することが極めて重要であるが、複雑な生態環境下で行われる *in vivo* 実験においてこの特性を評価することは難しい。

そこで、横波モード圧電共振子をセンシングデバイスとして用いた分子標的バブルの感度評価システムを構築することを目指した。提案システムでは、横波モード圧電共振子上に検出したい標的分子を固定化することで擬似的な生態環境を創出し、共振子表面の標的分子の量とそれに吸着するバブルの量を共振子の電気的インピーダンスの変化量から推測する。圧電共振子のバイオセンサとして応用は盛んに行われており、生体分子間の生化学反応を定量的にモニタリングできることは既実証されているため、バブル吸着量の定量的評価法を構築することができれば、分子標的バブルの性能評価システムとして使用することができる。本研究では吸着したバブルの数密度評価の可能性について検証することを第一の目標とし、下記の項目に取り組んだ。

(1) 実験用の分子標的バブルの作成

(2) 圧電素子を用いた評価システムの構築と検証実験

(3) バブル吸着量の定量評価のため理論式の構築と検証

3. 研究の方法

(1) 分子標的バブルの作成

医療用のマイクロバブルは表面覆う薄膜物質と内部気体から構成される。膜物質はリン脂質を、内部ガスはフッ化炭素系の難溶性気体を使用した。分子標的バブルとして、ビオチン化ポリエチレングリコール (PEG) を膜物質に組み込むことで、アビジン分子を特異的に認識するビオチン修飾バブルを作成した。ビオチン-アビジン結合を介して他の分子もバブル表面に固定化することが可能な構造になっている。

(2) 圧電素子を用いた評価システムの構築と検証実験

横波モード圧電共振子として、良好な温度安定性を有し、バイオセンサとして汎用的に用いられる水晶共振子 (Quartz crystal microbalance; QCM) を採用した。QCM 表面にアビジン分子を固定化し、ビオチン修飾バブルを滴下することでバブルとアビジンの反応をリアルタイムで評価できる滴下式システムを構築した。また、血流がバブル吸着に与える影響を検証するための流路式評価システムの構築も試みた。構築したシステムを用いてバブルの特異的な吸着の検出を試みた。

(3) バブル吸着量の定量評価のため理論式の構築と検証

QCM の電気的インピーダンス特性の変化とバブル吸着量を関連付ける理論モデルの提案を行った。バブル吸着の影響を共振子に対する機械インピーダンスとしてモデル化し、電気的等価回路として記述することでバブル吸着と共振子の電気的インピーダンスを関連付けた。構築した理論モデルの妥当性を検証するため、光学顕微鏡で計測したバブル吸着量との比較を行った。

4. 研究成果

(1) 分子標的バブルの作成

直径が 10 μm 以下のビオチン修飾バブルを作成した。蛍光標識したビオチン化 PEG を用いてバブルを作成し、蛍光顕微鏡によりビオチン化 PEG が膜に組み込まれていることを確認した。

(2) 圧電素子を用いた評価システムの構築と検証実験

Fig. 1 に構築した評価システムを示す。QCM は円筒型実験セル内部に組み込まれ、上部電極と下部電極が液体により短絡しない構造となっている。QCM の電気的インピーダンス (もしくはアドミタンス) をネットワークアナライザにより計測する。使用した QCM の基本共振周波数は 5 MHz であり、電極面積は 20 mm^2 である。センサ表面に形成される粘性せん断層がインピーダンス値に与える影響の低減、電気的インピーダンス整合による信号対雑音比向上を考慮し、第 3 次共振周波数 (15 MHz) においてインピーダンス計測を行った。

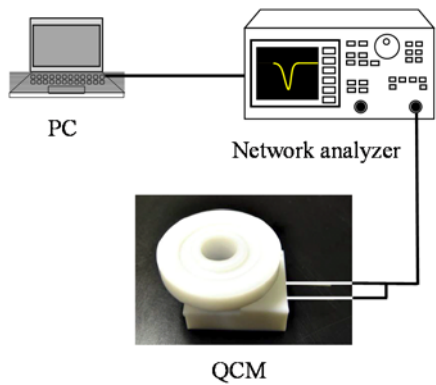


Fig.1 System for detecting specific adsorption of bubbles using QCM.

自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers; SAM) の末端をビオチンで修飾したビオチン化 SAM を介して、アビジン分子を共振子表面に固定化する。Fig. 2 にアビジン濃度に対するセンサの共振周波数の変化を示す。同図より、固定化したアビジン濃度の評価を QCM の電気的特性の変化から評価できることがわかる。Fig. 3 に SAM 固定化時、アビジン固定化時、ビオチン非修飾バブル (コントロール) 滴下時とビオチン修飾バブル滴下時のセンサの反射係数 S_{11} の変化量を比較した結果を示す。ビオチン修飾バブル滴下時における共振周波数 (S_{11} が最も低くなる周波数) がビオチン非修飾バブル滴下時よりも低下しており、QCM を用いてバブルとアビジン分子との特異的な結合を検出できたことがわかる。Fig. 4 に滴下したビオチン修飾バブルの濃度と共振周波数の低下量の関係を示す。ただし、濃度はバブル作成時の濃度 C_0 で規格化している。規格濃度が以下の範囲では、濃度上昇に対して共振周波数が対数的に上昇しており、バブル吸着量と共振子のインピーダンスの間に何らかの関連性があることが示唆された。濃度が以上では、共振周波数の低下量が飽和していることが確認できる。センサ表面のアビジン分子に対して結合できるバブルの吸着量が限界に達したためと考えられる。

マイクロバブルは静脈から生体内に投与され、血流によって体内を循環する。分子標的バブルが流れる血管のサイズや血流速度は分子標的バブルの吸着に多大な影響をあたえると考えられる。この影響を検討するために、上記の滴下式評価システムに加えて流路式の評価システムの構築も試みた。QCM 表面上に PDMS により作成した流路を作成し、シリンジポンプを用いて送液可能なシステムを構築した。今後、同システムを用いた計測を行う予定である。

(3) バブル吸着量の定量評価のため理論式の構築と検証

共振子の電気的インピーダンスとバブル吸着量を定量的に関連付ける理論モデルの構築を試みた。Fig. 5 にその模式図を示す。吸着し

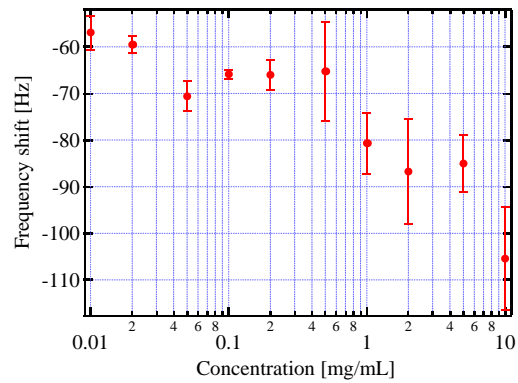


Fig.2 Resonant frequency shift of QCM as function of concentration of streptavidin.

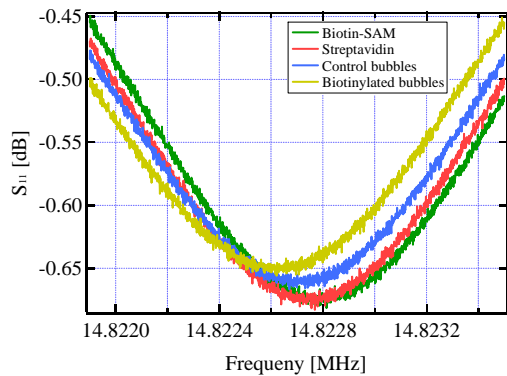


Fig.3 Frequency characteristic of reflection coefficient S_{11} of QCM under load of biotin-SAM, streptavidin, control bubbles and biotinylated bubbles.

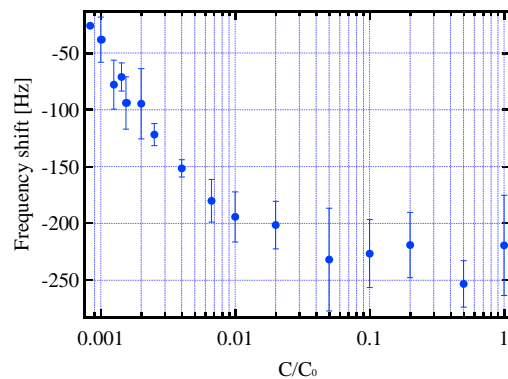


Fig.4 Resonant frequency shift of QCM as function of concentration of biotinylated bubbles.

たバブルは共振子の振動に伴い移動するため、共振子にはその反力が作用し、共振表面における応力条件が変化すると考えられる。バブルの併進運動を記述する運動方程式から共振子に加えられる反力を導出し、その影響を共振子に対する機械インピーダンスとして定式化した。共振周波数付近の QCM の電気的特性は Butterworth-Van Dyke (BVD) 等価回路で表現可能であり、この電気的等価回路の回路定数と定式化した機械インピーダンスを理論的に関連付けることができる。(1) 式は共振

子の動アドミタンスから実験的に計測可能なレジスタンスと機械インピーダンスを関連付ける式である。

$$R_b \approx \frac{N\pi}{4K^2\omega_s C_0 Z_q A} \int 12\pi\eta_w R y(R) dR, \quad (1)$$

このバブル吸着による動インピーダンス成分はバブルの粒度分布 $y(R)$ 、バブル半径 R 、共振子表面上のバブルの数密度 n/A (n はバブル数、 A は電極面積) の関数として記述できる。 K^2 は電気機械結合係数、 ω は共振角周波数、 C_0 は共振子の静電容量、 Z_q は水晶の特性インピーダンス、 N はオーバートーン次数である。

Fig. 7 にレジスタンス R_b とセンサ表面のバブルの数密度との関係を実験的に調べた結果を示す。バブルの数密度は光学顕微鏡によりセンサ表面を観察することで計測した。同図における理論値 (実線) と実験値 (プロット) の比較から、構築した理論モデルは定性的な変化を記述できるが、実験値と比較して約 50% の程度違いがあることを確認した。今後、バブルのサイズ、数密度、粒度分布の条件を変化させることで理論モデルの妥当性に関して更なる検証を行っていく必要がある。

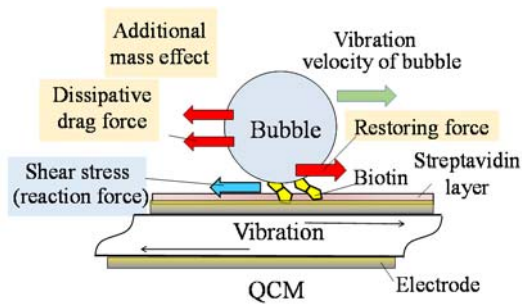


Fig.6 Physical model of the stress induced by an adsorbed bubble on QCM surface.

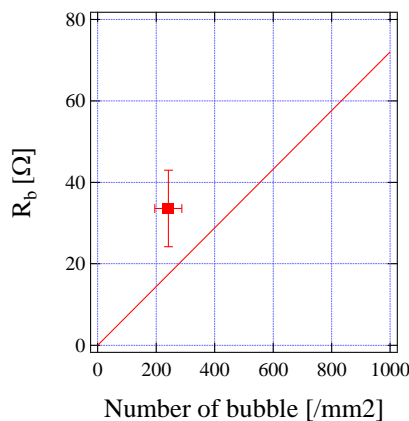


Fig.7 Simulated and measured value of R_b in eq. (1).

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 2 件)

1. R. Shimoya, K. Yoshida, Y. Yokoi, and Y. Watanabe, Modeling the response of a quartz crystal microbalance under the specific adsorption of microbubbles, Japanese Journal of Applied Physics, 2015, in press, 査読有

2. T. Muramoto, R. Shimoya, K. Yoshida, and Y. Watanabe, Evaluation of the specific adsorption of biotinylated microbubbles using a quartz crystal microbalance, Ultrasound in Medicine and Biology, Vol. 40, pp. 1027-1033, 2014, 査読有, doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2013.11.011

[学会発表] (計 6 件)

1. 吉田憲司、圧電センサを用いた分子標的超音波造影剤の性能評価システムの検討、日本マイクロ・ナノバブル学会 第 3 会学術総会、2014 年 12 月 7 日、明治大学 (東京都千代田区)

2. Kenji Yoshida、Study on optimal parameter for evaluating performance of targeted microbubbles using quartz crystal microbalance, The 35th Symposium on Ultrasonic Electronics, 3-5 December 2014, Meiji University (Chiyoda-ku, Tokyo)

3. 吉田憲司、バブルの付着に伴う水晶振動子の挙動変化のモデル化、応用物理学会 第 75 回秋季学術講演会、2014 年 9 月 17-20 日、北海道大学 (北海道札幌市)

4. 吉田憲司、水晶振動子の共振特性変化を利用したマイクロバブルの特異的付着の評価手法の検討、日本音響学会 2013 年秋季研究発表会、2013 年 9 月 25-27 日、豊橋技術科学大学 (愛知県豊橋市)

5. Kenji Yoshida、Resonant frequency shift of quartz crystal microbalance caused by the specific adsorption of targeted microbubbles, 2013 IEEE Ultrasonics Symposium, 21-25 July 2013, Prague (Czech Republic)

6. 吉田憲司、水晶振動子のマイクロバブル標的指向性評価システムへの応用-最適な評価指標の検討-、超音波研究会、2013 年 6 月 24 日、東京大学生産技術研究所 (東京都目黒区)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 憲司 (Yoshida Kenji)

千葉大学・フロンティア医工学センター・助教

研究者番号：10572985