

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03171

研究課題名(和文) ミクロンサイズバブルの多機能化と制御に関する研究

研究課題名(英文) Study on the multi-functionalization and control of micron-scale bubbles

研究代表者

高木 周 (Takagi, Shu)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：30272371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,920,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロバブルの医療応用技術の一つとしてドラッグデリバリーシステム(DDS)に利用可能なマイクロバブル内包ベシクルの生成技術の開発と、超音波によるベシクル位置の制御に関する研究を実施した。マイクロバブル内包ベシクルの生成法として、油水界面通過法による方法を検討し、従来の手法より安定にマイクロバブル内包ベシクルを生成することに成功した。また、生成されたマイクロバブル内包ベシクルを定在音場の中で捕捉することに成功した。さらにサイズの揃ったマイクロバブル内包ベシクルを安定に生成させる方法としてフローフォーカス型のマイクロ流路を用いてベシクルを生成するための基盤技術の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象としている薬物搬送担体は、通常用いられる数十ナノメートルの小さな粒子ではなく、その100倍程度大きいミクロンスケールのマイクロバブル内包ベシクルである。内包されたマイクロバブルを体外から照射させた超音波で制御し、ベシクルの膜を破壊することにより、薬物放出を局所で可能にすれば、従来のものに比べ、一度に大量の薬剤を局所的に送りこむことが可能となる。そのための基礎技術として、マイクロバブル内包ベシクルを安定に作り出す技術の開発は重要な学術的及び社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：In the present study, as one of the medical applications using microbubbles, we have developed a method to generate microbubble-encapsulated vesicles containing microbubbles which can be available for the drug delivery system and a method to control these vesicles using ultrasound field. First, we developed the method using oil-water interface passage method and succeeded in generating microbubble-encapsulated vesicles more stably than conventional methods. We also succeeded in capturing the generated microbubble-containing vesicles in a standing sound field. In addition, we have developed a basic technology for generating microbubble-encapsulated vesicles using a flow-focus type microchannel as a method for stably generating equally-sized vesicles.

研究分野：流体工学

キーワード：マイクロバブル 超音波 医療応用 ドラッグデリバリーシステム ベシクル バブルクラスター マイクロチャンネル マイクロフルイディクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

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反射し、かつ血液に溶けづらく長寿命であるという点が開発の重要点であった。一方、超音波治療への利用を考えた場合には、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、マイクロバブルのベシクルへの内包や表面修飾等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。

マイクロチャン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[1]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、マイクロチャン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[2]。その結果、直径 $5\mu\text{m}$ の気泡の生成に成功し、臨床応用されている血管造影剤サイズの気泡生成に成功した。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、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。さらに複数サイズが生成される系においては、直径 $2.8\mu\text{m}$ の超微細気泡を連続的に生成させることにも成功している。このサイズの気泡をベシクルで包み込み、さらにベシクル表面にリガンド修飾の機能を付加させたマイクロバブル内包型ベシクルは、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。マイクロチャン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[3]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、 $5\mu\text{m}$ 以下の気泡を用いてマイクロバブル内包ベシクルを生成、超音波によりそのベシクルを制御、破壊する技術はまだ確立しておらず、技術の確立が期待されている研究課題である。

2. 研究の目的

液体中に存在する微細な気泡 (マイクロバブル) は、超音波血管造影剤としての医療応用技術から水処理技術まで幅広い応用がある。本研究では、医療応用を中心に様々な用途に適用できる $1\mu\text{m}$ サイズの超微細気泡に対して、脂質分子による表面コーティングを施し、マイクロバブル内包型ベシクルを生成する手法を確立させる。さらに、超音波によるベシクルのマニピュレーションと目的部位への選択的吸着、膜の破壊を可能とするために、超音波音場によりマイクロバブル内包型ベシクルの位置を制御する手法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、マイクロバブルの医療応用技術の一つとしてドラッグデリバリーシステム (DDS) に利用可能なマイクロバブル内包ベシクルの生成技術の開発と、超音波によるマイクロバブル内包ベシクルの位置の制御および破壊に関連して以下の 3 つの項目について研究を実施した。

(1) 油水界面通過法によるマイクロバブル内包ベシクルの生成

本研究では、まず、油水界面通過法によるマイクロバブル内包ベシクルの生成法について検討を行った。この際、リン脂質にはベシクルを形成するための相転移温度が存在するため、本研究では常温でベシクルを生成する相転移温度が $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ の POPC を用いた。油水界面通過法の概略図を Fig. 1 に示す。まずリン脂質を溶解させたミネラルオイル中に、マイクロ

バブルを加えたスクロース水溶液を機械的に攪拌し乳化させ、エマルジョンを作る。次に生成容器に、グルコース水溶液と、リン脂質を溶解させたミネラルオイルで油水界面を形成する。この油水界面にリン脂質が吸着し、界面に単分子膜が形成される。次に、上で作られたエマルジョンを容器内に滴下し、分散された油中水滴が界面を通過することで、マイクロバブル内包ベシクルが生成される。油水界面を通過させるのには、分散させる水滴と水相に用いる溶液の比重差によって界面を通過させる手法を用いた[4,5]。この際、本研究ではマイクロバブルを内包させるため、ベシクル全体が軽くなる傾向があり、マイクロバブルを内包した状態で水相側に沈降させるためには、油相と水相の密度比を十分とっておく必要がある。

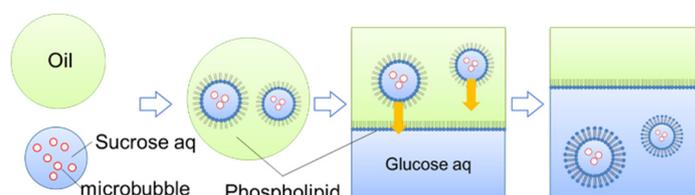


Fig.1 Schematic of oil-water interface passage method for generating microbubble-encapsulated vesicle

(2) フローフォーカス型チャンネルによる微細液滴生成技術

上記の油水界面通過法によるマイクロバブル内包ベシクルの生成では、ベシクル径を揃えるのが困難であるため、径の揃った大量のベシクルを発生させる方法としてフローフォーカス型マイクロチャンネルによるマイクロバブル内包ベシクルの生成法について検討を始めた。実験に用いた装置の模式図、及びマイクロチャンネルの形状・寸法をそれぞれ Fig. 2 および Table 1 に示す。マイクロチャンネルは、素材として PDMS を用い、ソフトリソグラフィにより作成した。型取りした流路と PDMS を薄くコーティングしたカバーガラス、両方をプラズマ処理し接着した。接着後に、流路を 150 °C のオーブンで約 90 分加熱し、流路壁面の疎水性回復を行った。本実験では縮小部 W_{or} の幅を 2 種類用意し、異なる流路幅で生成される水滴の大きさを評価した。油中水滴の生成には分散相、連続相、共にシリンジポンプを用い、流量を制御した。また分散相の流量は 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ に固定し、連続相の流量のみ変化させて実験を行った。分散相には純水、連続相にはミネラルオイルと 2 種類のシリコンオイルを用いた。水滴が生成する様子を光学顕微鏡及び高速度カメラを用いて撮影し、直径の評価を行った。

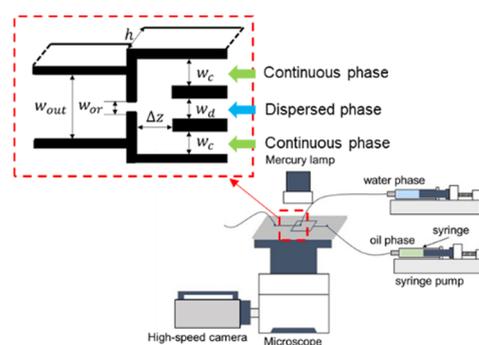


Fig.2 Schematic of experimental setup and geometry of the microchannel

Table 1 The dimensions of microchannel

	w_c [μm]	w_d [μm]	Δz [μm]	w_{or} [μm]	w_{out} [μm]	h [μm]	D_e [μm]
A	285	188	194	53	176	46	49
B	285	188	193	26	74	46	33

(3) 超音波照射によるマイクロバブルの挙動制御について

実際の臨床応用を考えた際には、マイクロバブル内包ベシクルの位置制御を超音波音場で達成する必要がある。その基礎研究として本研究では、集束超音波照射下におけるマイクロバブル内包ベシクルの捕捉に関する研究、及び、超音波照射下における気泡クラスターの振る舞いに解する解析を実施した。実験装置としては、定在音場を用いた実験系と集束超音波を用いた実験系の二つを用意した。また、超音波血管造影剤として表面コーティングされたマクロバブルで構成されたバブルクラスターの振る舞いを解析するために、理論モデルを構築した。従来、多数の気泡の相互作用を解析する際には、多重極展開を利用した方法がよく用いられ、その際、気泡表面は自由界面とし、水-空気系の表面張力が用いられることが一般的である。ここでは、表面をコーティングされたマイクロバブルとなるので、マイクロバブル表面を超弾性膜と仮定して、通常の表面張力との違いを調べるための理論モデルを構築してきた。

4. 研究成果

(1) 油水界面通過法によるマイクロバブル内包ベシクルの生成

油水界面通過法を用いて生成したマイクロバブル内包ベシクルの顕微鏡画像を Fig. 3 に示す. ベシクルは内外の溶液の濃度差がある場合, 浸透圧により消滅してしまう. そのため, 分散させるスクロース溶液とグルコース溶液のモル濃度を等張になるように調整した結果, 安定したマイクロバブル内包ベシクルの生成に成功した. 次にミネラルオイル中にマイクロバブルを含んだスクロース水溶液を滴下し, 攪拌時間を 1 s, 60 s, 600 s と変化させた結果, ベシクルの平均径はそれぞれ 61.9 μm , 41.2 μm , 17.8 μm に変化した. このことから攪拌時間を変更することによって, 得られるベシクル径が小さくなり, またベシクル径のばらつきも抑えられることを確認した. しかし, いずれの場合においても要求機能である 5 μm を超えており, サイズも不均一である. 油水界面通過法では, ミネラルオイルに分散する水滴のサイズが, ベシクルのサイズを決めると考えられ, この水滴のサイズを制御することが今後必要であると考えられる.



Fig.3 Photo of microbubble-encapsulated vesicle generated by oil-water interface passage method

(2) フローフォーカス型流路による微細液滴生成技術

つぎに水滴径を制御するために, フローフォーカス型流路[6,7]を用いた水滴生成技術について実験を実施した. フローフォーカス型流路を用いて水滴が生成されている様子を Fig. 4 に示す. それぞれの流路, 異なる試薬を用いた際に, 生成される水滴の直径 D_d を流路縮小部の等価水力直径 D_e で無次元化した値と, キャピラリー数(Ca)の関係を示したグラフを Fig. 5 に示す. ただし Ca は連続相の流量を流路縮小部の断面積で除した値である流速 U_{oil} , 連続相の粘性係数 μ_{oil} , 界面張力 σ を用いて式(1)のように定義した.

$$Ca = \frac{\mu_{oil} U_{oil}}{\sigma} \quad (1)$$

Fig. 5 から Ca が増加するにつれて, 水滴の直径が小さくなっていくことが分かる. これは界面形状を保持しようとする表面張力に対し, せん断力が大きくなることによって分裂する周期が早くなり, 小さな水滴が生成されたことによる. また Ca で, 生成される水滴の直径 D_d を流路縮小部の等価水力直径 D_e で無次元化した D_d/D_e を整理すると, キャピラリー数が大きい領域においては異なる液体, 流路であっても良好な一致を示すことが確認された. ただし, 粘度の低い 5 cS のシリコンオイルで生成された水滴径は, レイノルズ数が 1 を超える条件になっているものもあり, 他と傾向の異なる結果となっている.

フローフォーカス型マイクロチャンネルで生成された水滴を取り出し, 油水界面通過法を用いて, 生成されたベシクルを Fig. 7 に示す. また攪拌する手法と, マイクロチャンネルを用いる手法で生成されたベシクルの平均径と標準偏差の比較を Table 2 に示す. Table 2 から分かるようにマイクロチャンネルを用いてベシクル生成を行うことによって, ベシクルの平均径の改善とばらつきを抑えることが可能となった. ただし, 現在のところ, 最も多く生成されたベシクルの直径は 6 から 10 μm であり, 目的である 5 μm のマイクロバブル内包ベ

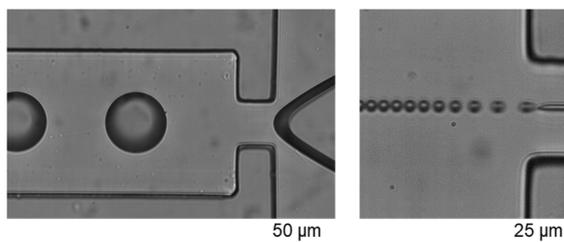


Fig.4 Droplet formation using flow-focusing type channel. (Type A)

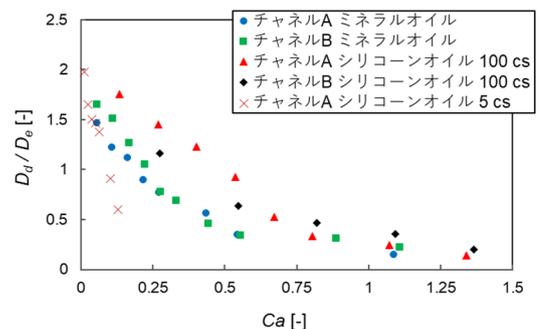


Fig. 5 Droplet formation using flow-focusing type channel. (Type A)

シクルの生成には至らなかった。また生成されたベシクルにバブルが内包されているものは少なく、生成効率が低いことが課題である。今後は、マイクロチャネルへ導入する時点で、マイクロバブルの数密度を高密度に維持したまま、液滴を生成していくプロセスを検討する必要がある。

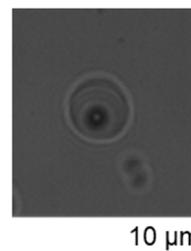


Fig. 6 Photo of microbubble-encapsulated vesicle generated using flow focusing device.

Table 2 Comparison of agitation vs. microchannel method

手法	平均径[μm]	標準偏差[μm]
攪拌	17.8	11.3
マイクロチャネル	10.7	6.23

(3) 超音波照射によるマイクロバブルの挙動制御について

ここでは、油水界面通過法で得られたマイクロバブル内包ベシクルを定在音場で捕獲した実験結果について説明する。定在音場を用いた実験では、血管造影用マイクロバブル（ソナゾイド®）は音場の腹に集積しはっきりとした局在化が確認できたが、マイクロバブル内包ベシクルを捕捉させた場合は個数が少ないこともあり、定在音場で捕捉できているのは確認できるが、定在音場の腹への多数のベシクルの集積は達成できていない。

実際には、マイクロバブル内包ベシクルの位置制御を集束超音波で実施できるのが好ましい。集束超音波音場の焦点付近は定在音場の腹と同じ状況で、照射超音波の周波数より高い固有周波数を持つ気泡にとっては安定点となり、気泡の集積が起きる。しかし、多数の気泡が集積し、気泡クラスターのサイズが大きくなり、気泡クラスターとしての共振周波数が照射超音波の周波数より低くなると、集束超音波の焦点付近は不安定点となり、捕捉されていた気泡クラスターがその位置から逸脱していく。このときの気泡クラスターのサイズを臨界気泡クラスターサイズ(critical bubble cluster size)とし、臨界サイズが照射超音波の周波数に依存して、どのように変化するかを調べた。さらに、この現象に対して、気泡数密度の影響や気泡表面のコーティングの影響を調べるため、多重極展開による手法を利用し、超弾性膜を有するマイクロバブルに対する数理モデルの構築を行なった。この部分の詳細は省略するが、クラスターサイズが大きくなるほどバブルクラスターとしての固有振動数が下がる傾向などが再現されている。

参考文献

- [1] Hettiarachchi, K., Talu, E., Longo, M. L., Dayton, P. A., & Lee, A. P. (2007). On-chip generation of microbubbles as a practical technology for manufacturing contrast agents for ultrasonic imaging. *Lab on a Chip*, 7(4), 463-468.
- [2] Ichiyangi, M., Miyazaki, R., Ogasawara, T., Kinefuchi, I., Matsumoto, Y., & Takagi, S. (2013). Measurements of microbubble generation process in microchannel using ultra high-speed micro-PTV system. *Microfluidics and nanofluidics*, 14(6), 1011-1020.
- [3] Arakawa, T., Yamamoto, T., & Shoji, S. (2008). Micro-bubble formation with organic membrane in a multiphase microfluidic system. *Sensors and Actuators A: Physical*, 143(1), 58-63.
- [4] Pautot, S., Frisken, B. J., & Weitz, D. A. (2003). Engineering asymmetric vesicles. *PNAS*, 100(19), 10718-10721.
- [5] 山田彩子, 濱田 勉, 吉川 研一, 細胞サイズリポソームの新しい作製法とその応用, 生物物理, 49, (2009), pp.256-259.
- [6] Anna, S. L. (2016). Droplets and bubbles in microfluidic devices. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 48, 285-309.
- [7] Rodríguez-Rodríguez, J., Sevilla, A., Martínez-Bazán, C., & Gordillo, J. M. (2015). Generation of microbubbles with applications to industry and medicine. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 47, 405-429.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 松崎玄伸, 尾崎太一, 井上和仁, 東 隆, 一柳 満久, 松本洋一郎, 高木 周	4. 巻 32
2. 論文標題 集束超音波を利用したマイクロバブルの二次元マニピュレーション	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 混相流	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Shu Takagi
2. 発表標題 On the microbubble generation process using thin T-junction Microchannel
3. 学会等名 The 32nd International Congress on High-Speed Imaging and Photonics (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hironobu Matsuzaki
2. 発表標題 Behaviors of microbubble clusters trapped in focused ultrasound field
3. 学会等名 The 32nd International Congress on High-Speed Imaging and Photonics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiro Eguchi
2. 発表標題 The effect of single bubble-cluster in upward bubbly flow on large-scale vortex structure
3. 学会等名 71st Annual Meeting of the American Physical Society Division of Fluid Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Sobue
2. 発表標題 Investigation on interaction between ultrasound and living tissue
3. 学会等名 IEEE International Ultrasonics Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shu Takagi
2. 発表標題 Numerical Simulations of Rising Bubbles in Non-Newtonian Fluid
3. 学会等名 8th European-Japanese Two-phase Flow Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎玄伸(東大)、尾崎太一(東大)、川口京(東大)、一柳満久(上智大)、東隆(東大)、高木周(東大)
2. 発表標題 集束超音波を用いたマイクロバブルクラウドの制御に関する研究
3. 学会等名 混相流シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shu Takagi, Varun Jadon, Kazuyasu Sugiyama
2. 発表標題 Numerical study on the interaction of two bubbles rising in a power-law fluid
3. 学会等名 72nd Annual Meeting of the American Physical Society, Division of Fluid Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jadon Varun, Kazuyasu Sugiyama, Shu Takagi
2. 発表標題 Interaction between two bubbles rising side by side in Newtonian and Non-Newtonian fluid
3. 学会等名 10th International Conference on Multiphase Flow (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹岡憲也, 高橋毅, 榛葉健太, 石島歩, 佐久間一郎, 東隆, 神保泰彦, 高木周
2. 発表標題 脳神経系培養細胞の超音波刺激に関する力学的作用機序の検討
3. 学会等名 第18回日本超音波治療研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杵淵 郁也 (Kinefuchi Ikuya) (30456165)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	杉山 和靖 (Sugiyama Kazuyasu) (50466786)	大阪大学・基礎工学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	田川 義之 (Tagawa Yoshiyuki) (70700011)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (12605)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	東 隆 (Azuma Takashi) (90421932)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授 (12601)	2019年3月末に退職