

機関番号： 10102
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20560144
 研究課題名（和文） 集束超音波によるキャビテーション気泡群の崩壊制御とソノポレーション効果の促進
 研究課題名（英文） Focused Ultrasound Controlled Cavitation Bubble Collapse and Promotion of Sonoporation Effect
 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）：平面型および凹面型プローブから発振される周波数 1MHz の超音波の作用によるソナゾイドの破壊とキャビテーション現象との関係を明らかにした。ソナゾイドは超音波照射後 100 ms でほぼ半分が破壊され、そのデブリスを核として多数のキャビテーション気泡が発生した。気泡崩壊末期に形成されるマイクロジェットや衝撃波の衝突圧が細胞膜に一過性の微細孔を開けるソノポレーションの原因と考えられた。

研究成果の概要（英文）：The relation between Sonazoid destruction and the resultant cavitation phenomena has been investigated by employing ultrasound waves with the frequency of 1 MHz which were irradiated from two types of US probes with a flat boundary as well as a curved boundary. It was found that Sonazoid microbubbles were rapidly destroyed and the survival number was reduced to half the original number within 100 ms after ultrasound irradiation. The debris of microbubbles played a role of cavitation nuclei from which a large number of cavitation bubbles grew. A liquid micro-jet and a shock wave occurred during the short period of the bubble collapse. An impact pressure resulting from one of these short term phenomena seems to be an important cause of sonoporation which could make a fine hole in the cell membrane transiently.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究代表者の専門分野： 工学

科研費の分科・細目： 機械工学・流体工学

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 超音波とシェル構造のマイクロバブルを用いる分子導入法は遺伝子などの外来分子を非侵襲的に細胞内部に導入することが可能であり、がん治療などへの応用が期待

されている。

(2) 分子導入の機序として、マイクロバブルの破壊で誘起されるキャビテーション気泡の崩壊に起因するミクロな衝撃作用（ソノポ

レーション)が指摘されているが、分子導入効率はまだ低い。

2. 研究の目的

(1) 超音波による細胞内部への分子導入効率を高める目的で、時間的・空間的に制御可能な集束超音波とマイクロバブルの相互干渉実験を行い、キャビテーション気泡群の個々の気泡崩壊による発生衝撃圧の高圧化を図る。

(2) 細胞膜に一過性の浸透圧変化をもたらすソノポレーション(音響穿孔)のメカニズムを解明するとともに、その発生確率を高める条件を探究して細胞内部への分子導入効率の改善に寄与する。

3. 研究の方法

(1) キャビテーション気泡群の挙動解明と集束超音波による圧力波の特性解析

- ① マイクロバブル(超音波造影剤ソナゾイド使用)存在下でのキャビテーションの発生条件を明らかにする。
- ② 発振周波数 1MHz の集束超音波による圧力波の波動特性を確認する。
- ③ キャビテーション気泡群の高速カメラ撮影を行い、同時にキャビテーション気泡群の非線形振動に起因する音響信号を水中マイクロフォンで測定してスペクトル解析する。

(2) キャビテーション気泡群の生成・崩壊挙動の光学可視化と衝撃圧の評価、ならびにソノポレーションのメカニズム解明

- ① キャビテーション気泡の崩壊挙動を2台のナノパルスライト(閃光時間 75ns、180 ns)を光源とし、拡大率 100 倍で光学可視化するとともに、水中音響を測定して得られるデータをFFTアナライザーでスペクトル解析する。
- ② ハイドロフォンによる衝撃圧の直接測定や模擬細胞(ゼラチン)近傍での気泡挙動や衝撃圧の評価を行ってソノポレーションのメカニズム解明に迫る。

(3) キャビテーション衝撃圧の高圧化の条件探究と *in vitro* 実験への適用

- ① 高倍率撮影からキャビテーション衝撃圧の発生原因であるマイクロ規模の水噴流や衝撃波の発生の瞬間を捉える。またゼラチン壁へのピット痕の観察から、衝撃圧の高圧化の条件を探る。
- ② 細胞を用いる *in vitro* 実験を行い、ルシフェラーゼ遺伝子導入に伴う細胞内の遺伝子発現活性と MTT アッセイによる細胞生

存率から最適条件の妥当性を確認する。

4. 研究成果

(1) まず細胞実験でよく用いられる 24 well プレートの円筒容器の一つを試験容器として利用し、その中に体積濃度 10 %[v/v]のソナゾイド懸濁液(本研究で使用した超音波造影剤ソナゾイドの平均直径は約 2 μm と計測された)を入れて基礎実験を行った。すなわち発振周波数 1MHz の超音波の照射によるソナゾイドマイクロバブルの破壊過程を顕微鏡で観察するとともに、キャビテーション現象を光学的に観察した。この場合、円筒容器による光学的ゆがみを矯正するため外側に直方体のアクリル容器を設置した。

① キャビテーション気泡は容器内水深 2.6mm (定在波が形成される水深 $7\lambda/4$ に近い水深、ここで λ :波長)の時に最も多く発生した。この特定の液深でキャビテーション気泡の数が多いという事実は細胞の発現効率に関する培養液深さに関する既存の知見とほぼ一致しており、分子導入の発生がキャビテーション現象と強く関わっていることは明らかである。

② 図1に示すように、マイクロバブルは液深によらず超音波照射後 100ms でおおよそ半分に減少し、また1秒間照射した後では大部分が破壊された。

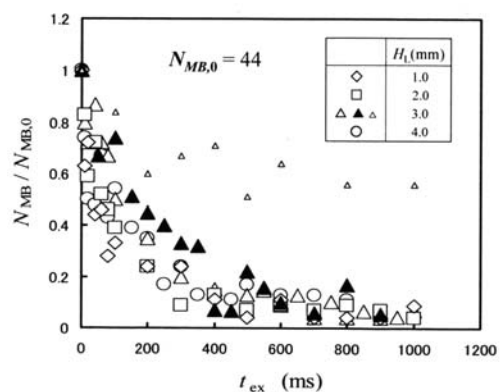


図1 ソナゾイド残存数と超音波照射時間

③ マイクロバブル懸濁液中では超音波照射から数秒後でもより多くのキャビテーション気泡が発生する場合があった。この事実は超音波照射直後にマイクロバブルの大半が破壊されるものの、その際流出するガスや破壊したシェルの破片がその後のキャビテーション発生の核として働いたものと考えられる。

(2) 24wellプレートの円筒容器内の懸濁液の液深の影響に関する実験から以下の事実が

明らかになった。

- ①平面振動子を使用した実験では、液深 2~3mm のときにキャビテーション気泡の発生数が最も多い結果が得られた。
- ②マイクロバブルは超音波照射から比較的早い時間でシェル構造の破壊が進み、多数のデブリス(残骸や破片)が残留する。液深 2~3mm では縦振動で誘起される円形液面の変動によって様々な振動モードが発生し、容器内部液体の循環流が生じる。図 2 に対称軸上で変動する水面変位のパワースペクトルを示す。液面が交互に左右に傾くモード(1,1)の固有振動数 4.7 Hz に近い 5.2Hz の振動が卓越しているのが分かる。キャビテーション核となるマイクロバブルのデブリスがこの循環流に乗って液中に運ばれるため、比較的長い経過時間においても細胞の近くでキャビテーション気泡が発生するものと思われる。

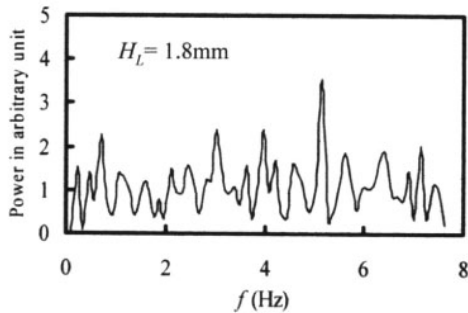


図 2 水面変動のパワースペクトル

- ③アクリル試片を用いた実験から超音波による発熱効果が明らかとなり、凹面型振動子で発生させる集束超音波は微小領域に一定の圧力場と温度場をつくる事が可能であることが分かった。
- ④集束超音波による破壊作用は試片が水面に接触している場合に最も激しく、水中に試片がある場合はキャビテーション効果により、また水面上に試片がある場合は液体ジェットの影響と超音波による発熱作用の重畳効果が破壊の原因と考えられた。

(3)集束超音波を用いてキュベット容器内のマイクロ規模の混相流動場に着目した拡大撮影とソナゾイド破壊数の顕微鏡観察を行い以下の結果を明らかにした。

- ①流体場の拡大撮影から得られる有効体積中に存在する超音波照射前のソナゾイドの個数の割合は最初に設定したソナゾイド懸濁液の体積濃度とほぼ一致した。平面型振動子と凹面型振動子を用いたソナゾイドの破壊数に及ぼす超音波照射時間の影響は、図 3 に示すようにほぼ同じ傾向となった。

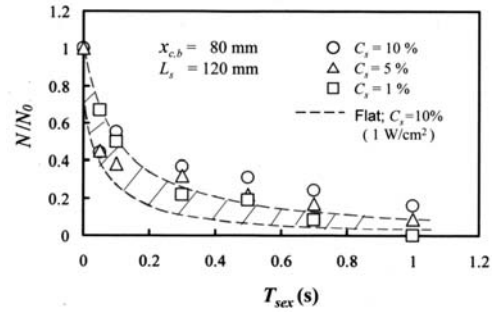


図 3 ソナゾイドの破壊に及ぼす振動子形状の影響

- ②照射時間がおおよそ 200 ms で、ソナゾイドのデブリスを核として多数のキャビテーション気泡が発生した。図 4 (a)、(b)に気泡の発生数とソナゾイドの残存数との関係を示す。ただし(a)は平面振動子の場合、(b)は凹面振動子の場合である。両者は、ほぼ同様な対応関係となっている。崩壊末

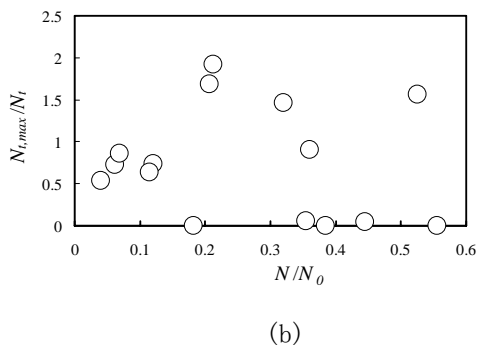
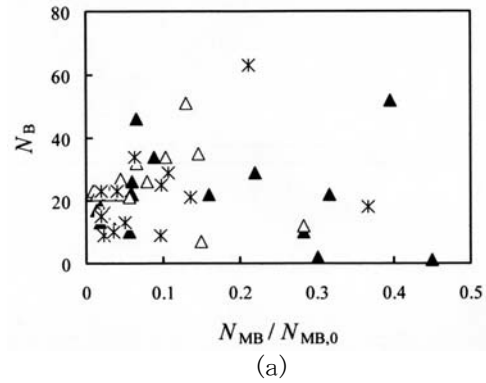


図 4 キャビテーション気泡とソナゾイド残存数の関係

期、非球状に変形する気泡内部に微細な液体噴流が発生していることを瞬間画像で捉えた(図 5)。また閃光時間 180 ns の瞬間光源を用いたシャドウグラフ法により、気泡の再膨張の際に放射された複数の衝撃波も観測できた。このようなジェットや衝撃波による短いパルス状の衝撃力がソノポレーションの原因となり細胞膜に一過性の微細孔を開けるものと考えられる。

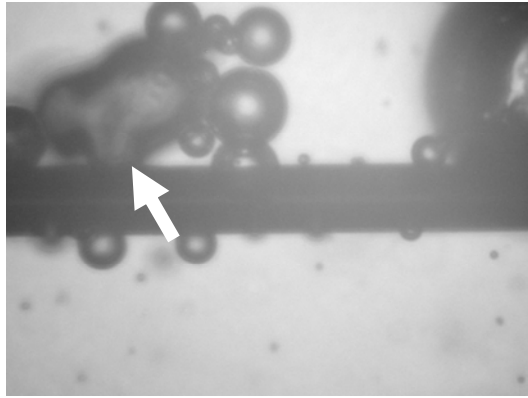


図 5 液体マイクロジェットの形成（中央の白い矢印の変形した気泡内部に観察できる。その横にある黒い白金線の直径は 20 μm ）

③以上、本研究で得られた結果（実験データ）を、細胞実験を進めている研究連携者（東北大学・小玉哲也）に提供した。

現在、日本学術振興会の補助を受け、研究連携者が代表となって日・韓共同研究「ナノバブルと超音波を用いたがん治療法の開発」（研究期間：2010～2012）を進行中である。

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 10 件）

- ① 富田幸雄、小玉哲也、他 2 名、集束超音波によるキャビテーションの生成と噴霧形成、キャビテーションに関するシンポジウム（第 15 回）講演論文集、査読有、電子媒体 (DVD)、2010、Paper No.A1-5
- ② 富田幸雄、小玉哲也、他 2 名、超音波の作用によるマイクロバブルの破壊とキャビテーション気泡の生成、混相流、査読有、24 巻、2010、pp.162-168
- ③ Yukio Tomita、Tetsuya Kodama、他 2 名、Microbubble disruption by ultrasound and induced cavitation phenomena、Proceedings of the 7th International Symposium on Cavitation、Ann Arbor、U.S.A.、August 16-20、査読有、電子媒体 (DVD)、2009、Paper No.109
- ④ Tetsuya Kodama、Yukio Tomita、他 4 名、Cavitation bubbles mediated molecular delivery during sonoporation、*Journal of Biomechanical Science and Engineering*、JSME、査読有、Vol.4、No.1、2009、pp.124-140
- ⑤ Yukio Tomita、Tetsuya Kodama、他 2 名、Peeling off effect and damage pit formation by ultrasonic cavitation、Scientific Bulletin of the Politechnica University of Timisoara、Romania、Transactions on Mechanics、ISSN 査読有、Tom 53 (67)、Special Issue、ISSN

1224 – 6077、2008、pp.19-24

〔学会発表〕（計 13 件）

- ① Yukio Tomita、Sonazoid destruction and cavitation phenomena induced by focused ultrasound waves、Presented at the meeting as a part of Joint Research Project under the Japan-Korea Basic Scientific Cooperation Program for FY 2009、Nov.29、2010、Jeju National University、Republic of Korea
- ② 富田幸雄、集束超音波によるソナゾイドの破壊実験、日本機械学会 2010 年度年次大会、2010 年 9 月 6 日、名古屋工業大学（名古屋）
- ③ Yukio Tomita、Microbubble disruption by ultrasound and induced cavitation phenomena、Presented at the 7th International Symposium on Cavitation、CAV2009、Aug.20、2009、Ann Arbor、U.S.A.
- ④ 富田幸雄、超音波の作用によるマイクロバブルの破壊とキャビテーション気泡の挙動、日本混相流学会年會講演会 2009、2009 年 8 月 9 日、熊本大学（熊本）。
- ⑤ Yukio Tomita、Peeling off effect and damage pit formation by ultrasonic cavitation、Presented at the International Conference on Hydraulic and Machinery and Equipments (Invited Lecture)、Oct.16、2008、Politechnic University of Timisoara、Timisoara、Romania
- ⑥ Yukio Tomita、Physical effect of bubbles in cavitation and underwater acoustics、Presented at Open Seminar of Environmental Studies、Oct.3、2008、Saint Mary's University、Halifax、Canada

6. 研究組織

(1) 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

(2) 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