

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00222

研究課題名（和文）マイクロバブル内包ベシクルの医療・産業応用に向けた基盤技術の研究開発

研究課題名（英文）Fundamental study for medical and industrial applications of vesicles containing microbubbles

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） 34,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、フローフォーカス型マイクロチャネルを用いて、油中に直径5ミクロン以下のマイクロバブル内包水滴を大量に生成することに成功し、さらに生成された水滴に対し、油水界面通過法を用いることにより、5ミクロン以下の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、マイクロバブル内包ベシクルのみを選択的に移動させる手法として、超音波照射により音響放射力を用いた手法を検討し、実際に超音波トランスデューサを用いて、超音波照射下でマイクロバブル内包ベシクルを移動させることに成功した。これらの技術は体外など遠方場からの超音波照射によりベシクルを移動させる基本技術となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

直径5ミクロン以下のマイクロバブルを内包ベシクルを生成し、遠方から照射した超音波により目的部位に移動させ、さらに膜の破壊を行えるようになると、ドラッグデリバリーシステム（DDS）への利用が可能となる。従来型のDDSに比べカプセル（ベシクル）、サイズが各段に大きいため大量の薬剤の封入が可能となる。超音波によるベシクルの輸送・破壊技術は、医療応用だけでなく、カプセルの融合による化学反応の促進など様々な技術への応用が考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we successfully achieved the mass production of microbubble-encapsulated water droplets with a diameter of less than 5 microns using a flow-focusing type microchannel. Furthermore, we succeeded in generating microbubble-encapsulated vesicles with diameters below 5 microns by employing the oil-water interfacial passage method on the generated droplets. Additionally, as a selective manipulation technique for the microbubble-encapsulated vesicles, we explored the use of acoustic radiation force through ultrasound irradiation, and successfully demonstrated the movement of the vesicles under ultrasound exposure using an ultrasound transducer. These techniques form the fundamental basis for manipulating vesicles using ultrasound irradiation, particularly in scenarios such as extracorporeal applications and remote fields.

研究分野：流体力学

キーワード：マイクロバブル ベシクル マイクロチャネル 油水界面通過法 超音波 ドラッグデリバリーシステム 気泡クラスター 液滴

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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、第一世代のレボピストから始まり、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 (レボピスト、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 (*Lab on a Chip*, 7(2007), 463-468) [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、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、直径 $5\mu\text{m}$ 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。さらに著者らのグループでは、フローフォーカス型流路を用いて水滴を生成し、マイクロバブルを内包させる技術開発を進めてきて、直径 10 ミクロンのマイクロバブル内包型ベシクルの生成に成功した[3]が、医療応用可能となる直径 5 ミクロン以下のマイクロバブル内包ベシクルの生成技術、および超音波によるマイクロバブルのマニピュレーション技術に関しては、安定した技術の確立に至っていないかった。

2. 研究の目的

本研究では、上記の背景を考慮して、様々な用途に適用可能なマイクロバブル内包ベシクルの生成技術と超音波によるマニピュレーション技術の開発を行う。特に、ドラッグデリバリーシステムへの医療応用を目指し、 $5\mu\text{m}$ 以下の脂質二分子膜ベシクルの内部にマイクロバブルを内包させ、超音波によりマイクロバブル内包ベシクルを移動・破壊させる技術を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、著者らがこれまで行ってきたフローフォーカス型マイクロチャンネルを用いて、マイクロバブルを内包する水滴の生成を行ない、より微細なマイクロバブル内包水滴を生成するための条件について検討した。また、生成された水滴に対して油水界面通過法によりマイクロバブル内包ベシクルを生成し、生成されたマイクロバブル内包ベシクルに対して、超音波を照射させることにより、音響放射力を用いてマイクロバブルを移動させる手法について検討した。以下、これらについて説明する。

(1) 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とマイクロバブル内包ベシクルの生成

Fig.1 に本研究で使用したフローフォーカス型デバイスの概略図を示す、フローフォーカス型マイクロチャンネルについては文献[3]を参考にし、3種類のものを検討した。Table 1 に、フローフォーカス型マイクロチャンネルの寸法について記す。流量を制御して外側 2 つの流路にミネラルオイルを流し、中央の流路にスクロース水溶液を流して液滴に分裂させる。スクロース水溶液にマイクロバブルを分散させることでマイクロバブル内包液滴を生成した。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

イルを用い、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。

(2) 超音波照射によるマイクロバブル内包ベシクルの位置制御

ここでは、Fig.2 に示す V 型超音波発生装置と Fig.3 に示すリング型アレイトランスデューサを用いて、マイクロバブル内包ベシクルの位置を制御する方法について検討を行った。

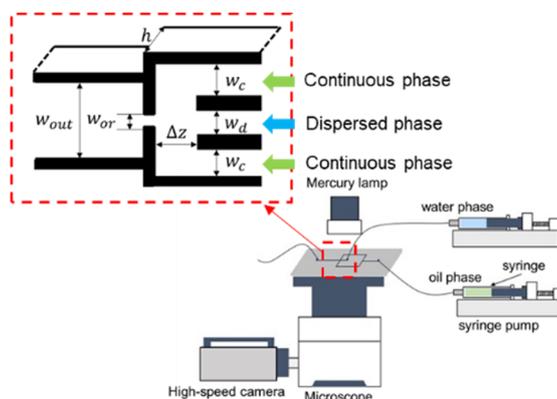


Fig.1 Schematic of experimental setup and geometry of the microchannel

Table 1 The dimensions of microchannel

	w_c [μm]	w_d [μm]	Δz [μm]	l_{or} [μm]	w_{or} [μm]	w_{out} [μm]	h [μm]
50 μm Type	285	188	194	47	53	176	46
25 μm Type	285	188	193	47	25	80	46
10 μm Type	285	188	195	30	10	32	46

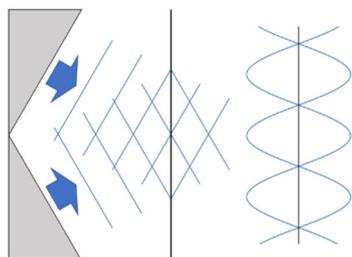


Fig. 2 V-shape ultrasound transducer

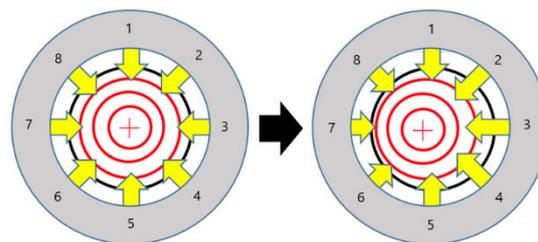


Fig. 3 Ring-type array transducer

4. 研究成果

水相にスクロース水溶液、マイクロバブル含有溶液を用いて液滴を生成した。Fig.4 にマイクロバブル内包液滴が生成されている様子を図示する。油相の流速の増加とともに小さな液滴径が生成されているのがわかる。また画像からはみづらいが液滴の中にマイクロバブルが内包されているのも確認できる。流速は流量を縮小部の断面積で除した値を示している。Fig. 4 右側の写真に見られるように、マイクロバブルが縮小部の手前で集積し、一番小さな液滴径のときには、液滴へマイクロバブルが封入されない様子が観察された。このとき、右側の水相の内部では渦構造が発生しており、渦構造にマイクロバブルが停留しているのが観測できた。これについては、流路水相の幅を小さくし渦構造を抑制することでマイクロバブルの内包率を改善できる可能性があると考えられる。

マイクロバブル内包ベシクルの生成

マイクロバブル含有溶液を用いてマイクロバブルを内包した液滴を生成し、油水界面通過法 [4]を用いてベシクル化を行った。Fig. 5 にマイクロバブル内包ベシクルの画像を示す。最小で 5 μm のマイクロバブル内包ベシクルが確認された。バブルの有無による生成個数の違いを Table2 に示す。グラフに示される通り、5 μm 以下のベシクルは安定的に生成されるものの、マイクロバブルを内包したものの収率は全体で約 0.9 %、5 μm 以下の場合には約 0.5 % と非常に低い。この原因として流路内での液滴へのマイクロバブルの封入率が低いことやマイクロバブルを含むものは密度が小さくなるため界面を通過しにくいことが考えられる。

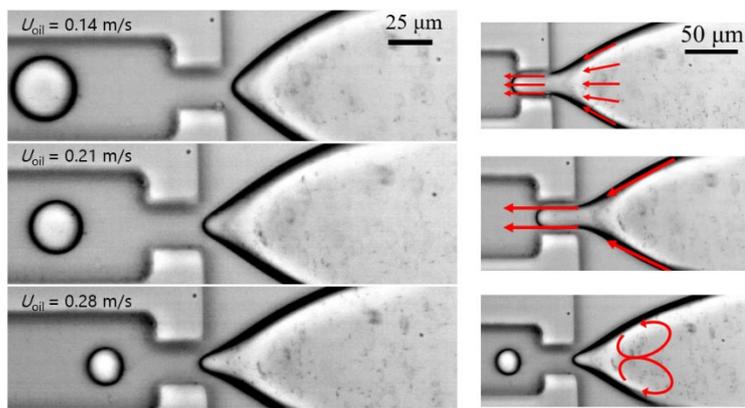


Fig. 4 Photos of microbubble containing water droplet generations

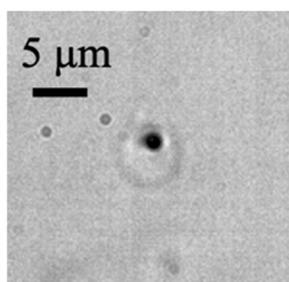


Figure 5: Generated Microbubble Encapsulated Vesicle

Table 2: The Number of Generated Vesicles

Vesicle Size [μm]	Microbubble Encapsulated [-]	Microbubble Not Encapsulated [-]
0-5	33	6654
5-10	31	2566
10-	31	496

超音波を用いたベシクルの制御

水中気泡に超音波を照射すると、気泡にはビヤクネス力と呼ばれる音響放射力が働く。本研究では、ベシクルに内包されたマイクロバブルに働く音響放射力を利用し、ベシクル全体の移動を行うことを目指す。ここでは特に進行波中によりベシクルを移動させること検討する。気泡には進行波の向きに力が働き、また気泡の共振周波数と進行波の周波数の差が小さいほど気泡に働く力は大きくなる。そのため、本研究では Sonazoid®の共振周波数を計算し、ほぼ同じ周波数である 2.16 MHz の超音波を照射した。

前節で説明した V 字型超音波トランスデューサを用いて進行波を照射し、進行波の向きへマイクロバブル内包ベシクルの移動する実験を行った。その結果、ベシクルの内側のマイクロバブルが進行波の向きに移動し、マイクロバブルがベシクルの内側の壁を押し出すようにしてベシクルが動く様子が確認された。Fig. 6 に、いくつかのマイクロバブル内包ベシクルについて、連続画像から計測した移動距離を示す。図中の実線は、マイクロバブルを内包していないベシクルの移動量を表したものであり、この移動量は弱い音響流の存在により全体が移動していることに対応していると考えてよい。点線で示したものが個々のマイクロバブル内包ベシクルの挙動になっており、図に示す通り、全体の移動に対して優位に相対速度を持って移動しているのが確認できる。これにより、進行波によりマイクロバブル内包ベシクルを移動させることが可能であることを示すことに成功した。

アレイトランスデューサを用いた位相制御による方法

さらに、任意の位置へ任意の軌跡で移動させる制御技術の開発のため Fig. 5 に示すようなリングアレイ型トランスデューサを用いて、周上に並べた 8 枚の超音波素子の位相を制御することによりバブルの位置を動かす手法の開発を行った。Fig. 7 に、水中にばらまかれたマイクロバブル(Sonazoid)が音場により同心円状に捕捉されている様子をします。位相正業によりこの同心円状の縞模様を維持させながらマイクロバブルの移動が可能であることを確認できている。

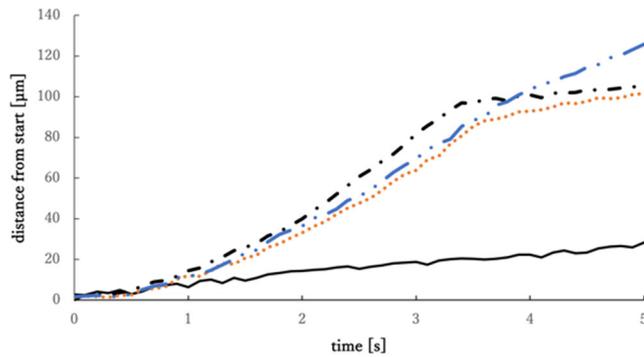


Fig.6 Moving distance of vesicles

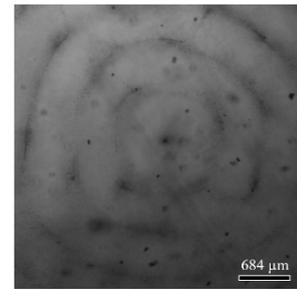


Fig. 7 Bubble Capturing by Ring Transducer

まとめ

本研究では、マイクロバブル内包ベシクルの医療応用を目指し、マイクロバブルを内包させた直径5ミクロン以下のベシクルを安定して生成させる方法、および生成したマイクロバブル内包ベシクルを超音波により操作させる方法について研究開発を行ってきた。現在までのところ、フローフォーカス型マイクロチャネルを用いて、超音波血管造影用マイクロバブルを混入させた水相を中央から、側方からは油相を流すことにより、油中に直径5ミクロン以下の水滴を大量に生成することに成功している。さらにこのようにして生成された水滴に対し、油水界面通過法を用いることにより、5ミクロン以下のマイクロバブル内包ベシクルを生成することに成功している。これまでのデータより、ベシクル内に取り込まれるマイクロバブルの個数は、生成されたベシクル径の影響を受け、現時点では、生成された5ミクロン以下のベシクルにおいてマイクロバブルの内包率が低いのが改善すべき点となっている。これに関しては、ベシクル内におけるマイクロバブル封入率を高くすべく、水滴生成条件や水相内における気泡数密度の増加なども検討している一方で、生成されたマイクロバブル内包ベシクルのみを選択的に選別するための方法についても検討を行った。具体的には、超音波トランスデューサを用いて、進行波を作り出すことにより、音響放射力によりマイクロバブルを操作し、さらにベシクル内でマイクロバブルが移動することにより、マイクロバブルを内包したベシクルのみを動かす技術を開発した。これに関しては、実際にマイクロバブル内包ベシクルを動かすことを目的に設計した超音波トランスデューサを用いて、超音波照射下でマイクロバブル内包ベシクルを移動させることに成功している。今後は、より精緻に位置制御を行い、マイクロバブル内包ベシクルのクラスター生成とベシクル破壊技術の構築が重要となる。

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] Ichiyanagi, 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] Anna, S. L. (2016). Droplets and bubbles in microfluidic devices. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 48, 285-309.
- [4] 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.
- [5] 塩崎寛子, 東京大学修士論文, 2020 年度

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 Dongig Oh, Satoshi Ii, Shu Takagi	4. 巻 7
2. 論文標題 Numerical Study of Particle Margination in a Square Channel Flow with Red Blood Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 fluids	6. 最初と最後の頁 96 - 115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/fluids1010000	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 2件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Hironobu Matsuzaki, Yunqiao Liu, Kazuyasu Sugiyama, Shu Takagi,
2. 発表標題 ON THE BEHAVIOR OF MICROBUBBLE CLUSTERS IN ULTRASOUND FIELD
3. 学会等名 The 25th International Congress of Theoretical and Applied Mechanics（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroko Shiozaki, Ikuya Kinefuchi, Mitsuhsa Ichianagi, Yoshiaki Tagawa, Shu Takagi
2. 発表標題 Development of microbubble-encapsulated-vesicles generation method using flow-focusing device
3. 学会等名 Annual Meeting of DFD, American Physical Society（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shu Takagi, R. Kakukawa, R. Kiyozumi, B. Chen and M. Ichianagi
2. 発表標題 Generation of Microbubble Encapsulated Vesicles and the Manipulations using Ultrasound Field
3. 学会等名 European-American-Japanese Two-Phase Flow Group Meeting（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shu Takagi, Dongig Oh, Satoshi Ii
2. 発表標題 Numerical study of particle margination in a square channel flow with red blood cells
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Maehara, K., Obana, R., Watanabe, I., Shimizu, K., Yoshimoto, Y., & Takagi, S
2. 発表標題 Ultrasound Measurement for Prediction of Gas-Liquid Two-Phase Flow Patterns
3. 学会等名 75th Annual Meeting, APS-DFD (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 BERMUDEZ Juan Sebastian, 高木周
2. 発表標題 脳内におけるリンパの流れのモデリング
3. 学会等名 日本流体力学会年会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角川龍輝, 塩崎寛子, 一柳満久, 高木周
2. 発表標題 フローフォーカス型流路と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
3. 学会等名 第66回理論応用力学講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shu Takagi
2. 発表標題 Dynamics of a Rising Bubble and Bubble Cluster
3. 学会等名 The 11th International Conference on Multiphase Flow (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yijie Liu, Shu Takagi, Kazuyasu Sugiyama
2. 発表標題 Characterization of dynamic features of bubbly flow rising in a slightly inclined vertical pipe: A three-dimensional numerical study
3. 学会等名 The 11th International Conference on Multiphase Flow (国際学会)
4. 発表年 2023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	一柳 満久 (Ichianagi Mitsuhsa) (00584252)	上智大学・理工学部・准教授 (32621)	
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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	田川 義之 (Tagawa Yoshiyuki) (70700011)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関