

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01252

研究課題名（和文）フェムト秒レーザー誘起水中衝撃波生成・伝播挙動解明と再生医療用含気カプセルの開発

研究課題名（英文）Elucidation of generation mechanism and propagation behavior of femtosecond laser-induced underwater shock wave, and development of microcapsules including gas bubbles for regenerative medicine

研究代表者

玉川 雅章（Tamagawa, Masaaki）

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・教授

研究者番号：80227264

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究においては、衝撃波の再生医療への応用の1つとして、気泡と細胞を内包するマイクロカプセルで組み上げられた組織形状に対して、外部からマイクロ衝撃波を作用させるシステムを提案し、そのための衝撃波制御法の開発を最終目的とする。本課題においては、(1)フェムト秒パルスレーザー誘起水中衝撃波の生成とその伝播機構を解明すること、(2)カプセル破膜が効率的となる最適な圧力作用条件を探ること、(3)3次元構造をもつ気泡内包カプセル体のマイクロ衝撃波の伝播や減衰機構を調べることに、の3つを目的とし、結果として、マイクロ衝撃波の可視化が行え、光学計測から衝撃波の波面特性を調べることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の学術的独自性として、フェムト秒レーザー誘起水中マイクロ衝撃波生成や伝播などの高速現象を顕微鏡下で可視化し、理論的足がかりをつけて、医療に応用することを目的としており、時間の長いナノ秒レーザー誘起衝撃波のものとは予測の異なる結果が期待できることである。一方、学術的創造性としては、カプセル内部細胞への“力学的刺激”と“カプセル破壊”の切り替えができる医用工学技術の創造によって、再生医療工学として国内外でも報告されていない新しい方法、すなわち細胞の増殖刺激とカプセル破壊を同時に行うことが可能となることである。

研究成果の概要（英文）：In this study, as one application of shock waves to regenerative medicine, we propose a system that applies micro-shock waves from the outside to tissue structures assembled from microcapsules containing gas bubbles and cells. For this application, to elucidate the generation and propagation mechanism of femtosecond pulsed laser-induced shock waves, there are three objectives: (1) to generate micro-shock waves by focusing a laser in water, (2) to find out the optimal conditions for rupturing capsule, and (3) to investigate the propagation and attenuation mechanisms of shock waves in a bubble-encapsulated capsule. As results, (1) two-dimensionally the shock wave front and its propagation after the micro-shock wave was captured by using high-speed images, (2) the pseudo-thickness of the micro-shock wave in water and silicone oil can be suggested, and (3) it is necessary to take into account the law of conservation of energy and the effects of air bubbles for CFD analysis.

研究分野：流体工学，生体医工学

キーワード：マイクロ衝撃波 再生医工学 フェムト秒レーザー 衝撃波生成機序 気泡内包カプセル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、iPS細胞などの再生医療やティッシュ・エンジニアリングにおいて、物理的な刺激を使って効率よく細胞や組織を再生させることが重要な問題の一つとなっており、主に生体材料や高分子系の化学工学の立場からの研究が積極的に進められている。国際的にみても、細胞工学レベルや分子生物学的、生体材料的な部分では欧米、日本、ともに盛んに基礎研究が行われており、人体外での効率的な細胞増殖や臓器再生に向けての装置・機器開発も行われているものの完成しておらず、現在の主流は人体内で細胞や臓器再生を行うことである。しかしながら、将来的には人体外においても高速かつ効率的な臓器再生が行われるバイオファブリケーション装置やその機構開発において、人体内外にとらわれず、3次元構造の細胞凝集塊から組織形成へと効率よく進行させるための装置や機構原理が求められている。

一方、衝撃波の医療や産業への応用、特に、殺菌、結石破碎、ドラッグデリバリー、骨治療、遺伝子導入などに加えて、再生医療領域への応用も盛んになってきており、衝撃波の物理的特徴、特に急激な圧力の立ち上がりを生かした応用技術開発がますます求められてきている。超時短フェムト秒パルスレーザーは、その作用時間の短かさのためアブレーションを防げ、組織や細胞の周辺部位を損傷する可能性も低いいため、バイオファブリケーションでの微細加工・刺激には適していると考えられる。しかしながら、これらの加工の際に発生するフェムト秒パルスレーザー誘起マイクロ衝撃波については十分解明されていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究においては、衝撃波の再生医療への応用の1つとして提案しているシステムすなわち、気泡と細胞を内包するマイクロカプセルで組み上げられた組織形状に対して、外部から衝撃波を作用させ、カプセル内の“細胞への物理的刺激”と増殖後の“カプセル破壊”の2つのモードをもつ衝撃波作用と制御の開発を最終目的とする。

本課題においては、このシステムでのフェムト秒パルスレーザー誘起衝撃波の生成とその基礎的な機構開発のため、

- (1) フェムト秒レーザーの水中集束により、コア半径が数マイクロメートル程度の局所的な微小な衝撃波(以降、“マイクロ衝撃波”)を生成し、その圧力の伝播特性と圧力場を調べ、ナノ秒レーザーとの比較を行うこと、
  - (2) カプセル膜近傍の気泡とマイクロ衝撃波の干渉によるマイクロジェット等のカプセル破壊(破膜)を、気泡変形挙動の可視化や圧力計測等によって調べ、破膜が効率的となる最適な圧力作用条件や気泡配置条件を得ること、
  - (3) 構造体への応用のため、3次元構造をもつ気泡内包カプセル体のマイクロ衝撃波の伝播や減衰機構を調べること、
- の3つを目的とする。

### 3. 研究の方法

3つの目的に合わせて(1)圧力生成、(2)気泡変形挙動観察・圧力制御、(3)カプセル内衝撃波伝播と分けて行う。具体的には以下に示す手順で実施した。

#### (1) 圧力生成：水中での時短レーザーを用いたマイクロ衝撃波の生成と可視化

まず、最初にフェムト秒レーザー(ファイバー型フェムト秒パルスレーザー:250fs, 2μJ)、顕微鏡の対物レンズを用いて、水で満たされた微小セルにレーザーを集束させて、マイクロ衝撃波を生成させる。実験系の概略として、フェムト秒パルスレーザーを単発または複数発振させ、これをビーム調整し、偏光調整をおこなった後、対物レンズに入射し、セル水中内でレーザーを集束させ、マイクロ衝撃波を発生させる。これらの実験系(集束されたフェムト秒レーザー)に対して、セル内でニードル型(衝撃波用)圧力センサーによって圧力を測定した。

次に、衝撃波生成の様子を、シャドウグラフ光学系を組み、PIV用レーザーを用いて、マイクロ衝撃波の波面(密度変化層)の観察を試みる。本可視化の場合、気泡の変形を捉えることは容易であるが、衝撃波の伝播、特に減衰の早い衝撃波に関しては分解能の不足や十分な感度が出ない可能性がある。この時に高速度ビデオカメラ(Photoron, FastCAM)で、フェムト秒誘起衝撃波の動的観察を行い、その生成の機序について比較を行う。

一方、圧力センサーでの圧力計測の検証を行うため、セルの上面に既設のAFM(原子間力顕微鏡)カンチレバーの取り付けられたワイヤーの先端に微小球(10-30μm)を取り付け、作用する力の計測を試みる。この微小球を移動させて、50-100μm間隔の圧力の空間分布を計測する。これにより、通常のマクロなセンサーで計測不可能な圧力の微小な空間分布を求めることを行う。ワイヤーの剛性やビーズの材質、振動系、さらには圧力の計測範囲なども影響することが予測されるが、これらも考慮して計測を行う。

#### (2) 気泡変形挙動観察・圧力制御：気泡の大きさと細胞やカプセルの膜の弾性率(物性値)による破膜への影響の観察

マイクロ衝撃波と膜近傍での気泡干渉の可視化のために、高速度ビデオカメラを用いて高速度撮影を行い、弾性膜(カプセル膜および細胞膜モデル)近傍でのマイクロ衝撃波の伝播と気泡との干渉の観察を試みる。弾性膜の実験モデルについては、(a)カプセル材の平面膜(高分子)、(b)細胞膜モデル(高分子修飾のリポソーム膜)の2種類を対象を行う。

具体的には、弾性膜、固体壁面などを組み合わせた相構造に対しマイクロピペットによって生成したガス気泡数 $\mu \sim$ 数十 $\mu\text{m}$ の(マイクロバブル)を静置し、膜近傍に置かれた気泡に下面よりマイクロ衝撃波を作用する。このとき、気泡変形ならびに衝撃波伝播、実験膜の変形を高速度カメラを用いて撮影する。また、衝撃波の波形(時間履歴)や空間分布、気泡サイズと気泡変形挙動のパターン、ならびに膜貫通や破壊のパラメータを総合的に抽出し、既出の平面衝撃波との比較を行う。

### (3)カプセル内衝撃波伝播：衝撃波生成と気泡内包カプセル体の衝撃波伝播や減衰機構

レーザー集光領域近傍での圧力計測が困難であるため、数値解析により生成初期におけるマイクロ衝撃波の伝播挙動を調べる。最初は、自遊空間での気泡生成を伴わないモデルでの検討を行う。ここで、これまでの水中マイクロ衝撃波の数値解析では、状態方程式にTaitの式を用いていたためにエネルギー保存則が考慮されていないため、本解析では、新たな状態多項式を適用することで、エネルギー保存則を含む数値解析を行い、集束位置の変化によって生成する水中衝撃波の伝播予測を行う。

また、カプセル内部で液体の粘性の伝播衝撃波の減衰への影響を調べるため、1個のカプセルの膜・液体の2相モデルをCFD(ALE法)によって圧力の伝播を調べ、その減衰を調べる。また、これらの数値計算モデルを拡張して、2個直列に並べた気泡内包カプセルに対して、水中衝撃波を作用させるモデルを作成し、最終目標であるマイクロカプセルの3次元構築したときの衝撃波伝播の予測と、その中での衝撃波の減衰を調べる。

## 4. 研究成果

本研究課題では、(1)水中でフェムト秒レーザーを用いたマイクロ衝撃波の生成と可視化、および(2)気泡の大きさと細胞やカプセルの膜の弾性率(物性値)による破膜への影響の観察、(3)衝撃波生成と気泡内包カプセル体の衝撃波伝播や減衰機構について、特に、マイクロ衝撃波の波面(密度変化層)の観察を高速度ビデオカメラで行い、フォトダイオード、圧力計測などの併用により、以下の結果を得ている。

- (a) これまでに可視化されていなかったマイクロ衝撃波の高速度撮影が可能となった。具体的には、最終年度において高速度カメラを用いた観察実験において、光源を高輝度化した連続レーザーを用いて、観察部での光量を増加させたところ、集光部周辺からマイクロ衝撃波が生成した後の波面とその伝播を高速度画像で2次元的に捉えることができた。しかしながら、高速度カメラのフレーミングレートとその制御信号の制約から、前年度に得られた200ns内の衝撃波の初期生成部分についての高速度画像が正確には取れていない。これについては、フェムト秒レーザー誘起衝撃波現象の中でのプラズマ効果と熱的効果の交差領域にあたるためパルス光源などの疑似的な高速シャッターを用いた引き続き観察を行うこととする。
- (b) マイクロ衝撃波生成を粘性や体積弾性率を変化させるため、水のほかにシリコンオイルでも同様の観察を行ったが、シリコンオイルでは密度変化が大きく出るためより鮮明な波面画像を得ることができた。それぞれの媒体での波面伝播速度の違いについても、それぞれの媒体の音速から得られていることが確認でき、発達したマイクロ衝撃波の速度がバルク液体程度であることも確認できた。また、生成されるマイクロ衝撃波は媒質の違いによって伝播挙動が異なり、衝撃波厚さや立ち上がり時間も変化する可能性が示された。
- (c) フォトダイオードによる光学計測の光量変化の2階の空間積分から密度分布を得る手法を、マイクロ衝撃波の高速度画像に対して適用したところ、フェムト秒レーザー集光点近傍で、水とシリコンオイル中での衝撃波形成を示す指標の衝撃波厚さについて解像度の制約があるものの、定性的にはその厚さの大小を示すことができた。
- (d) 一方、粘性の変化による波面挙動の変化や細胞膜モデルである弾性壁近傍での衝撃波挙動観察等については、課題期間内では達成できなかった。これについては継続の観察実験を行っている。
- (e) 1次元の数値解析から、球面状に伝播するマイクロ衝撃波の伝播挙動が得られ、従来のTaitの状態方程式のみを用いた数値解析結果との比較から、状態多項式およびエネルギー保存則を用いたものの衝撃波のピーク圧力がわずかしか上昇しないことがわかった。これじゃら、エネルギー保存則の影響は非常に小さいものとなった。今後は、レーザー集光領域における供給されるエネルギー源の与え方や生成気泡の影響を加味する必要が生じている。なお、気泡の影響については、レイリー・プリサットの改良モデルなどの気泡の運動方程式も水中の衝撃波挙動の運動方程式と連成解析することを検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ayumu Yamamoto, Kazuteru Toh and Masaaki Tamagawa	4. 巻 13-1
2. 論文標題 Numerical Simulation to Investigate Interactions of Generated Underwater Micro Shock Waves and Micro Bubbles by Focusing Femtosecond Pulse Laser,	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Advanced Research in Numerical Heat Transfer	6. 最初と最後の頁 18-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.37934/arnht.13.1.1830	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山本歩夢, 玉川雅章	4. 巻 44-170
2. 論文標題 フェムト秒レーザー誘起水中マイクロ衝撃波の可視化 微小なスケールでの高速現象の可視化	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 可視化情報化学会	6. 最初と最後の頁 36-44
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山本歩夢, 玉川雅章
2. 発表標題 血管治療用衝撃波生成装置の開発のためのフェムト秒レーザー誘起水中マイクロ衝撃波の伝播挙動の解明（マイクロ衝撃波の生成と初期挙動の高速撮影）
3. 学会等名 2023年度衝撃波シンポジウム, 2B1-3, 北九州国際会議場
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山本歩夢, 玉川雅章
2. 発表標題 日本機械学会 2023年度年次大会
3. 学会等名 日本機械学会 2023年度年次大会, J022-06, 東京都立大学
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本歩夢, 玉川雅章
2. 発表標題 再生医療用システム開発に向けたフェムト秒レーザー誘起水中マイクロ衝撃波の初期挙動の光学的計測と高速度撮影について
3. 学会等名 日本機械学会 2022年度年次大会, J023-08, 富山大学
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本歩夢, 玉川雅章
2. 発表標題 フェムト秒レーザー誘起水中マイクロ衝撃波と微小気泡の制御に向けた初期挙動の光学的計測と高速度撮影
3. 学会等名 日本機械学会 第100期流体工学部門講演会, GS-02, 熊本大学
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayumu YAMAMOTO, Kazuteru TOH and Masaaki TAMAGAWA
2. 発表標題 Numerical Simulation to Investigate Interactions of Generated Underwater Micro Shock Waves and Micro Bubbles by Focusing Femtosecond Pulse Laser
3. 学会等名 ICCMEH2022 (International Conference on Computational Methods in Engineering & Health Sciences), S6-11, Online (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本歩夢, 玉川雅章
2. 発表標題 再生医療用システム開発のためのフェムト秒レーザー誘起水中マイクロ衝撃波生成と微小気泡挙動に関する基礎的研究 (光学的アプローチによる観察および計測)
3. 学会等名 2022年度衝撃波シンポジウム, 3C3-3, 産業技術総合研究所
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayumu YAMAMOTO, Kazuteru TOH and Masaaki TAMAGAWA
2. 発表標題 Numerical Simulation to Investigate Interactions of Generated Underwater Micro Shock Waves and Micro Bubbles by Focusing Femtosecond Pulse Laser
3. 学会等名 ICCMEH2022 (International Conference on Computational Methods in Engineering & Health Sciences), S6-11, Online
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本歩夢, 唐和輝, 玉川雅章
2. 発表標題 再生医療用システム開発のためのフェムト秒レーザー誘起水中マイクロ衝撃波の生成と集光点近傍での気泡発生による衝撃波伝播への影響
3. 学会等名 日本機械学会2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本歩夢, 唐和輝, 玉川雅章
2. 発表標題 再生医療システム用フェムト秒レーザー誘起水中マイクロ衝撃波と微小気泡の計測
3. 学会等名 日本衝撃波研究会2021年度衝撃波シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 A. Yamamoto and M. Tamagawa
2. 発表標題 Generation and Control of Femtosecond Laser-Induced Underwater Micro Shock Wave and Micro Bubble at Laser-Focal Area for Developing Regenerative Medical System
3. 学会等名 9th International Symposium on Applied Engineering and Sciences (SAES2021) (国際学会)
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------