

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700517

研究課題名（和文）：超音波とマイクロバブルの相互作用を利用するバイオセンサの開発

研究課題名（英文）：Investigation on biosensor using interaction between ultrasound and microbubble

研究代表者

吉田 憲司（YOSHIDA KENJI）

同志社大学・高等研究教育機構・助手

研究者番号：10572985

研究成果の概要（和文）：

超音波とマイクロバブルの相互作用を利用するバイオセンサの作成と、その性能を評価する計測システムの構築を目指した。バイオセンサとしての動作が期待される抗体固定化マイクロバブルの前駆体の作成に成功した。一方、バイオセンサの感度や精度に関わるマイクロバブルの共振特性を計測する手法として、レーザドプラ振動計を用いた計測システムを構築し、直径 50 μm 以上のバブルにおいて計測に成功した。

研究成果の概要（英文）：

The goal of this research is to fabricate biosensing microbubbles by using interaction with ultrasound and to construct the measurement system for evaluating the performance as the biosensor. It was succeeded in fabricating the precursor of biosensing microbubbles on which antibodies can be stably bound via avidin-biotin binding. The system by using Laser Doppler vibrometer was proposed to measure the resonance characteristic of microbubbles which significantly relates to the sensitivity and accuracy in the biosensor application. The constructed system enabled to measure the characteristics for microbubble with radius more than 50 μm .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：超音波、マイクロバブル、共振、抗原抗体反応

1. 研究開始当初の背景

抗体等の生体関連物質が有する分子識別機能を利用して、特異的な分子の計測を行うものがバイオセンサである。近年、がんや生活習慣病等に対する予防医学の観点から、尿や血液中に存在するバイオマーカ（疾患に関連するたんぱく質等）を容易に検出できるバイオセンサが求められている。現行技術では、人体から採取した尿や血液を計測し、特殊な質量分析装置を用いてバイオマーカが同定されている。既存の技術とは全く異なる着想である人体内の特定のバイオマーカを“非接触”かつ“リアルタイム”に計測する手法を確立することができれば、より早期での疾患の発見等、予防医学に多大な進展をもたらすことが期待できる

2. 研究の目的

現在の超音波医療分野で用いられている「超音波とマイクロバブルの相互作用（超音波照射により生じるマイクロバブルの振動）」をバイオセンシングに利用する手法を提案し、その応用可能性を検証する。

マイクロバブルのバイオセンサとしての動作原理を示す。超音波診断で用いられるマイクロバブルは薄膜のシェル（膜物質）に内部気体が覆われた構造をとる。特定の生体関連物質がマイクロバブルの薄膜に特異的に付着することでマイクロバブル振動の共振周波数が増加する。この共振周波数の増加を検出することができれば、バイオセンサとしての応用が期待できる。そこで、下記二項目を実施することを目的とした。

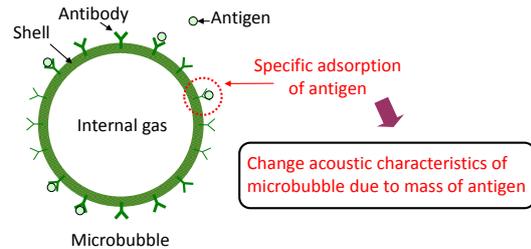
- ①抗原が特異的に吸着する抗体固定化マイクロバブルの作成
- ②マイクロバブルの共振周波数測定システムの構築

3. 研究の方法

①抗体固定化バブルの作成

人体への安全性を考慮し、マイクロバブルのシェル材質にはリン脂質を使用する。また、毛細血管のサイズより小さい直径 $10\ \mu\text{m}$ 以下のマイクロバブルを作成することを目標とした。抗体のシェル材質への固定はアビジン-ビオチン結合を利用を行う。シェルを構成するリン脂質にビオチン化ポリエチレングリコール (PEG) を組み込み、これにアビジンを介してビオチン化抗体を固定化する

Fig.1 Principle of microbubble working as biosensor



ること想定した。

当核研究では、ビオチン化 PEG を組み込んだリン脂質シェルを持つ抗体固定化バブルの前駆体を作成した。

②共振周特性測定システムの構築

マイクロバブルの共振周波数の測定手法としては、マイクロバブル懸濁液に超音波を照射し、超音波減衰の周波数特性を調べる手法が一般的である（減衰が最も大きい周波数がマイクロバブルの共振周波数となる）。しかし、懸濁液に含まれるマイクロバブル群は粒径分布を持つため、精度よく共振周波数が測定できない問題がある。

そこで、レーザドプラ振動計 (LDV) を用いた単一マイクロバブル振動観測システムの提案を行う。マイクロバブル振動の観測には高速度ビデオカメラが頻繁に用いられる。しかし、観測システムの空間および時間分解能の問題から超音波照射下におけるマイクロバブルの微小な振動を定量的に評価することが難しい。LDV を使用することで、変位振幅が数十 nm のバブル振動の定量計測が可能となり、詳細な共振特性（振動変位の周波数特性）の評価が期待できる。提案システムを使用することで、抗原の質量付加で生じる“わずかな”共振周波数の変化を検出できる可能性がある。

当核研究では、LDV 計測システムを構築し、単一マイクロバブルの振動計測および共振特性の評価が可能であることを実証した。

4. 研究成果

①抗体固定化バブルの前駆体の作成

直径 $10\ \mu\text{m}$ 以下のマイクロバブルの作成手法について検討した。作成手法を示す。コネクタで連結した二つのシリンジの一方にリン脂質水溶液、もう一方に気体を注入し、混合することで、直径が数～数百 μm のバブルが作成される。超音波ホモジナイザにより比較的大きいバブルを破碎することで、直径が $10\ \mu\text{m}$ 以下に調整される。Fig.1 に作成したマイクロバブルの顕微鏡観測画像を、Fig.2 にマイクロバブルの粒径分布を示す。

予めリン脂質水溶液にビオチン化 PEG を溶

解させておくことで、ビオチン化 PEG が組み込まれたシェルを持つマイクロバブル（抗体固定化マイクロバブルの前駆体）が作成されると予想される。Fig.4 は、蛍光標識したビオチン化 PEG を使用し、ビオチン化 PEG のシェルへの組み込みを検証した結果である。ビオチン化 PEG が組み込まれる確率は1~2%であり、この確率を向上させることが今後の課題と考える。

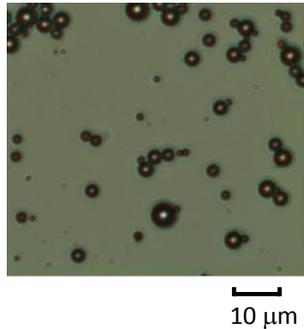


Fig.2 Microscope image of fabricates micorbubbles coated with lipid shell.

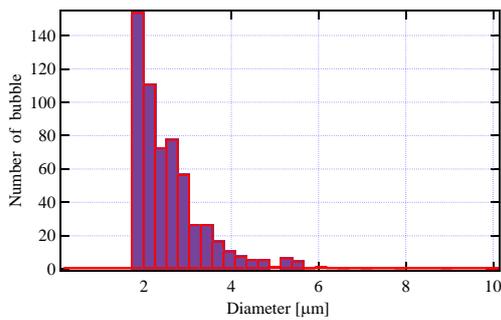


Fig.3 Distribution of microbubble diameter.

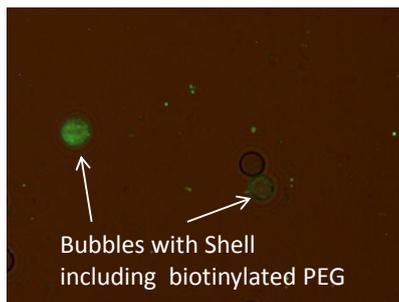


Fig.4 Microbubble Image synthesized from bright-field and fluorescent images.

②共振特性測定システムの構築

Fig.5 に構築した単一バブル振動観測システムの模式図を示す。マイクロバブルの振動を計測するため、LDV には20倍の対物レンズを接続している。バブル表面にレーザを集束させ、ドプラ効果を利用することで、バブル

表面の振動速度をオシロスコープにより計測した。得られる速度波形を積分処理することにより振動変位を算出した。超音波の周波数は27 kHzである。

構築した観測システムの信頼性を検証するため、高速度ビデオカメラを用いた観測結果との比較検証を行った。当核研究で使用した高速度ビデオカメラ観測システムでは、振動変位振幅が数μm以上のバブル振動であれば画像解析により定量評価が可能である。両者の観測結果が良く一致することを示し、LDV 観測システムによりバブル振動の定量的計測が可能であることを実証した。Fig.6 に比較結果を示す。

また、半径が50~200μmのバブルに関して、バブル半径に対する振動変位の変化（共振特性）を計測した。Fig.7にその結果（振動変位および振動位相）を示す。理論計算から算出したバブルの共振半径は100μmであり、測定結果との良い一致が確認された。

現状では対物レンズの倍率が小さいため、直径10μm以下のマイクロバブルの振動計測が行えない。今後、この点を改善することが課題として挙げられる。

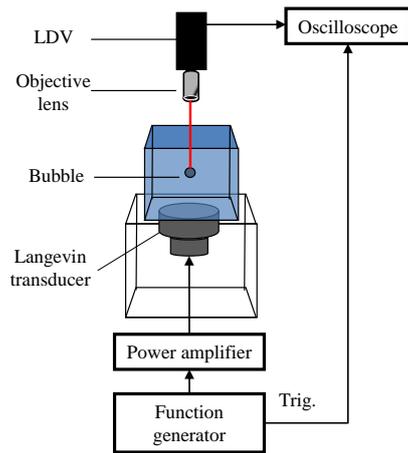


Fig.5 LDV measurement system for bubble oscillation.

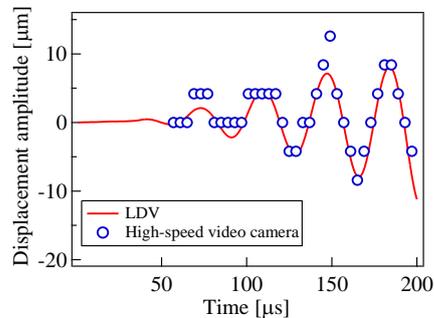


Fig.6 Comparison of bubble oscillations measured by LDV system and high-speed camera system.

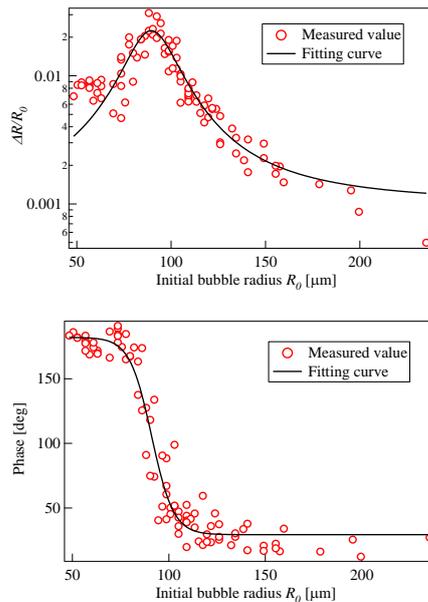


Fig.7 LDV measurement system for bubble oscillation.

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1件)

1. T. Yoshikawa, H. Kotera, K. Yoshida, D. Koyama, K. Nakamura and Y. Watanabe, "Measurement of the resonant characteristics of a single bubble vibration by using a laser Doppler vibrometer" Jpn. J. Appl. Phys., Vol. 50, 07HE04 1-3, 2011. (査読有)
DOI:10.1143/JJAP.50.07HE04

[学会発表] (計3件)

1. 吉田憲司, 森岡俊一, 上田優都, 小山大介, 中村健太郎, 渡辺好章, "超音波照射下において固体表面の濡れ性が付着マイクロバブルの振動に与える影響", 超音波研究会, 静岡, 2011年11月24日.
2. Kenji Yoshida, Taisuke Yoshikawa, Daisuke Koyama, Kentaro Nakamura and Yoshiaki Watanabe, "Experimental measurement of microbubble oscillation by using laser Doppler vibrometer" International congress on ultrasonics, Gdansk, Poland, Sept. 8, 2011.
3. 吉田憲司, 小寺宏典, 田畑拓, 小山大介, 中村健太郎, 渡辺好章, "レーザドップラ振動計を用いた生分解性カプセルの振動計測", 日本音響学会 2010年秋季研究発表会, 吹田, 2010年9月24日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 憲司 (YOSHIDA KENJI)

同志社大学・高等研究教育機構・助手

研究者番号: 10572985