

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360155

研究課題名(和文) 気泡ミストからのキャビテーションの解明とソノポレーションへの展開

研究課題名(英文) Evaluation of cavitation from bubble mist and development to sonoporation

研究代表者

山越 芳樹 (Yamakoshi, Yoshiki)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：10174640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：直径数ミクロン以下の微小気泡に薬液を包含させて血管に注入し、薬液を患部にピンポイントで送り込むドラッグデリバリーシステムは、効果的で副作用が少ない夢の治療法として大きな期待が寄せられている。本研究は、気泡クラウドや気泡が音響放射圧により運動している気泡ミストからのキャビテーションを活用してDDSにおける効率向上に繋がる手法を開発することを目的とする。超音波により気泡クラウドを制御することでソノポレーションにおいて形成される微小孔の数や大きさを制御できること、DDS支援技術として強力超音波音場のその場可視化法、気泡キャビテーションのその場での高時間分解能観察能観察法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Ultrasonic wave assisted drug delivery system which uses micro bubbles of less than several microns in diameter including medicine is effective because sonoporation which makes small pores on the cell membrane can be applied for the injection of drug into the cell. Purpose of this research is that cavitation from bubble cloud is evaluated and a method in order to improve the efficiency of sonoporation is developed. By evaluation of bubble cloud dynamics under high intensity ultrasonic wave irradiation using optical observation by high speed camera, an optimum ultrasonic wave irradiation sequence for bubble cloud cavitation is proposed. In-situ observation of bubble cloud cavitation and ultrasonic wave field visualization method which are important tools in ultrasonic wave assisted drug delivery system are developed. These methods use ultrasonic power Doppler imaging method to visualize the sound field and the bubble cloud cavitation.

研究分野：波動情報処理

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 音響放射圧 気泡クラウド 気泡ミスト キャビテーション

1. 研究開始当初の背景

(1) 直径数ミクロン以下の微小気泡に薬液や遺伝子を包含させて血管に注入し、血流に載せて患部に運び、薬液や遺伝子を患部にピンポイントで送り込むドラッグデリバリシステム (DDS) や遺伝子デリバリシステム (GDS) は、効果的で副作用が少ない夢の治療法として治療率の向上や予後の改善に大きな期待が寄せられている。DDS や GDS の実現では、①患部へのピンポイント導入を図るためのターゲティング、②可制御な薬液放出、③細胞内部への吸収改善、の3つの基盤技術が必要になるが、微小気泡を薬液や遺伝子の搬送媒体として用い、超音波を薬液放出トリガとして用いる超音波支援の DDS や GDS では、これら3つの技術に対して超音波中の気泡のダイナミクスを有効に用いることができるので、他の手法に比べて実用化が最も近い方法として有望視されている。超音波で気泡に働く音響放射圧を用いると気泡の運動の制御ができるので、これはターゲティングに使える可能性が"ある。強力超音波によるキャビテーション(気泡破壊)は、薬液放出に結びつくし、気泡のキャビテーション時に生まれる高速なマイクロジェットにより細胞壁に修復可能な微小な穴を穿つことができるので(ソノポレーション:音響穿孔)、この微小穴を通じて細胞内に直接、薬液や遺伝子を送り込める。

(2) 超音波支援の DDS や GDS を実現する技術開発は、著名な国際会議である IEEE Ultrasonic Symposium において毎年多くのセッションが設けられるほど活発に研究が行われているが、いまだ基礎研究の段階に留まっているものが多い。研究が進まない大きな理由として超音波中での微小気泡のダイナミクスとその利用技術が十分に解明されていない点が挙げられる。運動し気泡クラウドの形や"位置が常に変化する。さらに気泡クラウドのキャビテーションや音響穿孔のメカニズムについては不明な点も多く、これを制御して DDS や GDS の改善に積極的に用いようとする研究は皆無と言って良い。

2. 研究の目的

(1) 我々が観察に成功した「気泡クラウド-気泡ミスト-微小穿孔形成」のメカニズムは、①気泡をまず気泡の集まり(気泡クラウド)として流路壁面に付着させる、②その一部を超音波で破壊、③気泡が壁面から周囲に飛散、というプロセスであり、壁面から飛び散った気泡(気泡ミスト)はある微小時間内であれば、微小穿孔に最適な条件(流路壁面から 10~20 ミクロン)にある。つまり、このターゲット付近の浮遊気泡の生成を制御し、微小穿孔形成に使えば穿孔効率を格段に高めることができ、細胞内への導入効率の向上に繋がる。これが本研究で解明しようとする気泡ミストを介した微小音響穿孔法である。

気泡クラウド-気泡ミスト-微小穿孔形成という我々が見出したメカニズムを詳細に解明すること、気泡ミストの制御技術を見出して微小穿孔の数を格段に向上させる方法を開発することが本研究の目標である。気泡ミストの制御で、微小穿孔の質(大きさ、深さ、アスペクト比等)の制御も可能になると考えているが、これら方法は DDS や GDS における薬液、遺伝子導入の高効率化、ピンポイント化、生体への安全性向上、副作用低減など DDS や GDS の実用化に大きく貢献する。

(2) 従来、キャビテーションは金属表面の侵食などの障害を低減する目的で研究がなされてきた。本研究は、これに対して「気泡ミストからのキャビテーション」のダイナミクスを明らかにし、それを積極活用する方法を開発することに特色がある。この研究の遂行には、我々の研究室で研究してきた音響放射圧による気泡制御技術が役立つ。本研究で得られる気泡ミストのダイナミクスとその制御技術、活用に関する多くの知見は、微小気泡を搬送媒体として用いる DDS と GDS の導入効率改善、ピンポイント化、副作用の低減、安全性向上など治療システムの根幹を成す基本特性の改善を可能とする。

3. 研究の方法

(1) 直径数ミクロン以下の微小気泡を薬液や遺伝子の搬送媒体として用いる超音波支援の DDS や GDS は、夢の治療技術として脚光を浴び、①気泡へのペイロード付加技術、②超音波中での気泡ダイナミクスの解析、③細胞内へのペイロードの導入など、薬学、工学、医学を横断した学際的研究として、内外で精力的に研究が行われてきている。中でも、強力超音波照射時の微小気泡の破壊により生まれるソノポレーション(音響穿孔)は、細胞内へのペイロードの取り込み効率を格段に向上できる重要な方法として注目を集めている。しかし現状の超音波支援の DDS や GDS には、今後、解決しなければならない幾つかの課題がある。

第一の課題は、細胞膜の微小穿孔に寄与する気泡の割合が極端に低いことである。我々の研究室でも、血管を模擬した流路に微小気泡を流し比較的強力な超音波を照射して流路壁面に微小穿孔を形成させる実験を行ったが、微小気泡は超音波で容易に破壊されるものの、流路壁面には微小穿孔がほとんど形成されなかった。Prentice らの実験が示すように、細胞膜への微小穿孔が可能になるのは、気泡が細胞膜から 10~20 ミクロン離れている場合であり、この間隔が近すぎても、遠すぎても、微小穿孔は生じない。

第二の課題は、気泡破壊-微小穿孔形成というソノポレーションのメカニズムが十分に解明されていないことである。多数の微小気泡に超音波を照射すると、気泡間に働く音響放射圧により気泡が凝集し気泡の集まり

(気泡クラウド) が形成される。我々が先に開発した方法を使えば流路壁面に気泡クラウドを形成できるが、この気泡クラウドに強力な超音波を照射して気泡を破壊しても、効率的な微小穿孔は期待できない。どのようなメカニズムで穿孔がなされるのか、どのような気泡クラウドが微小穿孔の効率向上に繋がるのか、など基本的な課題に対して現状では十分に答えが得られていない。これは、気泡クラウドが多数の気泡からなる「気泡群」としての性質を持つために理論的な検討が難しいこと、気泡の破壊が瞬間的に起こる非線形プロセスであり、気泡破壊から始まる穿孔プロセスを実験で明らかにしていくことが難しいためである。

これら課題を解決するために、血管を模擬した流路を用いて、高速度カメラと超音波による可視化技術を開発し、これを用いて気泡クラウドのダイナミクスを明らかにする。

4. 研究成果

気泡クラウドからのキャビテーション現象を観察するための実験系を図1に示す。この実験では、まず微小気泡に 100kPa 程度の弱い音圧を持つ超音波（以降トラッピング超音波と呼ぶ）を照射する。この時、微小気泡間に働く音響放射圧 (Bjerknes 力) により近隣気泡が集合して気泡クラウドが形成され、この気泡クラウドは音響放射圧により流路壁面に付着する。このようにして形成された気泡クラウドに対して強力超音波を照射する。この実験では、強力超音波照射中の気泡クラウドの様子を流路上部に取り付けられたデジタルスチルカメラまたは高速度カメラで観測する。気泡クラウドの運動軌跡は、移動速度が遅いと明るく逆に速いと暗く写り、一種、霧のような画像になるので、この画像を以降、気泡ミスト画像と呼ぶ。実験終了後に流路を取り出して上下半分に分断後、キャビテーションにより形成された流路内面の微小くぼみを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。実験では、気泡として超音波造影剤として使われているレボビスト (バイエル薬品) を用い、流路として N-イソプロピルアクリルアミド (NIPA) ゲルを用いた。

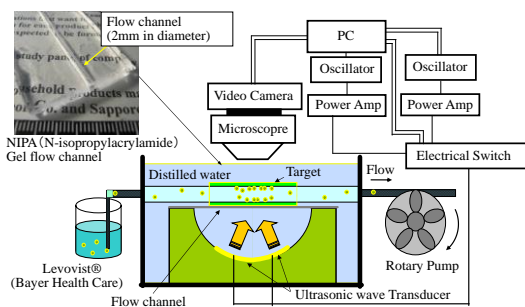


図1 実験系の構成

周波数 2.5MHz、音圧 100kPa のトラッ

ピング用超音波を、100ms ずつ計 3 回照射して流路内面に気泡クラウドを付着させた。この気泡クラウドに対して周波数 2.5 MHz、音圧 2 MPa の強力超音波を照射してキャビテーションを生じさせたときの気泡クラウドの様子を高速度カメラで撮影した。このときの連続画像を図2に示す。強力超音波照射開始時点からの経過時間をカッコ内に示してある。強力超音波照射前には大きさ 10 μ m 程度の気泡クラウドがほぼ数十 μ m 程度の間隔を置いて付着しているが、強力超音波を照射すると図中に点線で示したように照射直後 10 μ s 程度で近隣の気泡クラウドが急速に集合する様子と、その後 70 μ s 付近まで気泡クラウド数が減少するとともに近隣の気泡クラウドが集合していく様子が見て取れる。

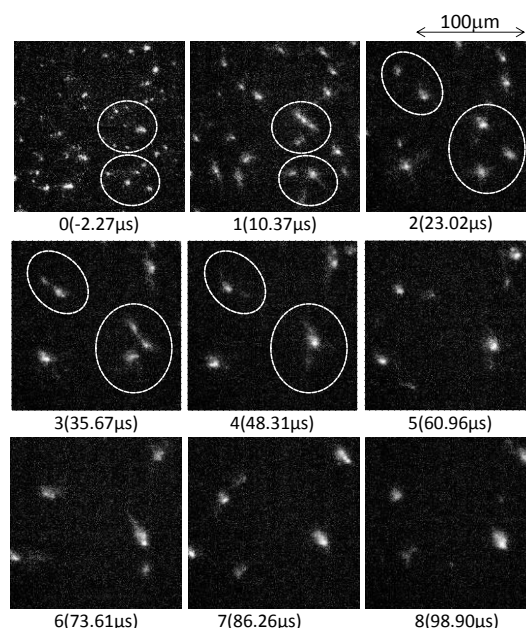


図2 気泡クラウドの様子

図3に、強力超音波照射時に観測された気泡の運動を模式図で示した。まず、強力超音波照射後 10 μ s まで（第一ステージ）では、流路壁面付近における気泡クラウドの急速な運動と集合化が起こり、その後

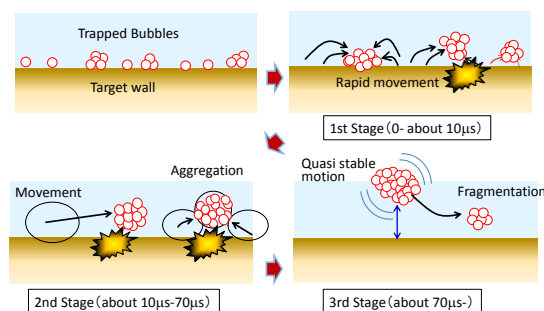


図3 気泡クラウドの運動

70 μs 程度まで継続する第二ステージでは、ゆっくりした気泡クラウドの集合化と壁面からの浮上、その後の第三ステージでは気泡クラウドの運動はほぼ定常状態になる。このとき共焦点レーザー顕微鏡によるキャビテーションによる微小くぼみの観測を行ったところ、ほぼ第二ステージまでに微小くぼみが形成されていることがわかった。

図4に、同一の領域に対して観察した気泡クラウド画像(図a)、強力超音波照射中の気泡クラウドの運動軌跡である気泡ミスト画像(図b)、共焦点レーザー顕微鏡による流路壁面の微小くぼみ画像(図c)を示す。気泡ミスト画像から、第3図で観測されたように、近隣の複数の気泡クラウドが移動して集合化する様子が特徴的な運動軌跡として記録されていることがわかる。一方、形成された微小くぼみの総数は気泡クラウドの総数よりもはるかに多く、微小くぼみの空間分布も気泡クラウドのそれと比べて密であり、気泡クラウド直下以外にも多くの微小くぼみが形成されていることが画像から見て取れる。

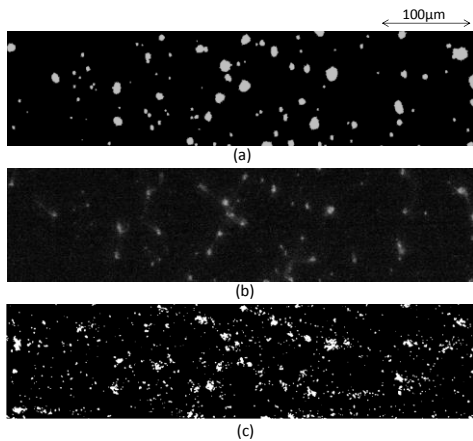


図4 気泡クラウド、ミスト画像、微小くぼみ画像の同一領域観測

図5は、気泡クラウド直下に形成された微小くぼみと気泡クラウド直下以外の場所に形成された微小くぼみを画像解析により分離し、それぞれの場合について微小くぼみの等価半径の分布を求めた結果である。ここで

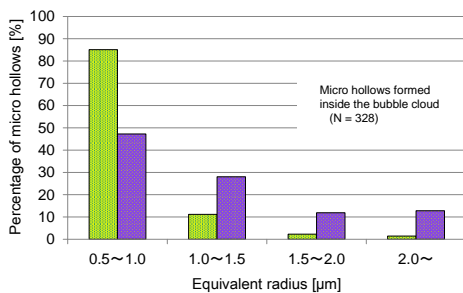


図5 微小くぼみの気泡クラウド依存性

等価半径とは、微小くぼみの開口と面積が等しい円形の開口に換算したときの半径である。この結果を見ると気泡クラウド直下に形成された微小くぼみの方が相対的に大きな孔が開くことがわかり、これは観測結果と矛盾しない。

気泡クラウドの条件を変えることで、微小くぼみの量や質を変える基礎的な実験を図6に示す。超音波照射シーケンス(図a)は、トラッピング超音波を50msだけ照射して気泡クラウドをあまり成長させないような照射シーケンスであり、図cはトラッピング超音波を300msの間照射して気泡クラウドを十分に成長させてからキャビテーションを生じさせるような照射シーケンスであり、図bはその中間のシーケンスである。どのシーケ

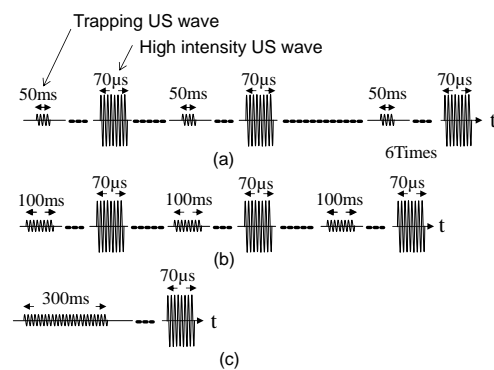


図6 実験で用いた超音波照射シーケンス

ンスにおいてもトラッピング超音波の総照射時間は同じである。

図7に、これら3つの超音波照射シーケンスに対して、流路内面に捕捉された気泡クラウドの様子を示す。超音波照射シーケンス(c)では、照射シーケンス(a)に比べて予想されるように気泡クラウドが大きく成長し、また空間密度も高くなっていることがわかる。

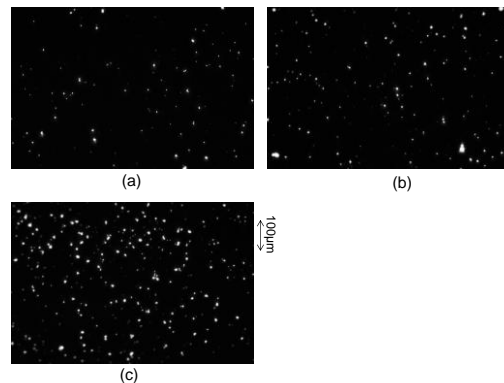


図7 超音波照射シーケンスによる気泡クラウドの形成の様子

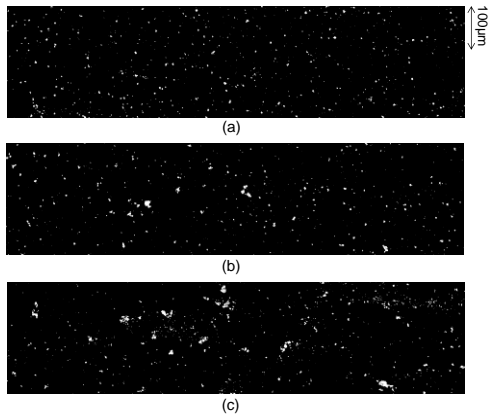


図8 超音波照射シーケンスによる微小くぼみ形成

図8、この時に形成された微小くぼみの様子である。超音波照射シーケンス (a) では微小くぼみの大きさが小さくなる傾向にあるが、気泡クラウドを大きく成長させた照射シーケンス (c) では比較的大きなくぼみが見受けられる。

図9は、3つの照射シーケンスに対して微小くぼみ形成を比較したものである。図 (a) は微小くぼみの総面積であり、図 (b) は等価半径2ミクロン以上の微小くぼみの超音波照射シーケンス依存性である。これらの結果を見ると、トラッピング超音波を50msだけ照射し気泡クラウドをあまり成長させない照射シーケンス (a) では、微小くぼみの総面積は小さいが、比較的径の小さい微小くぼみが形成されること、一方、気泡クラウドを大きく成長させた照射シーケンス (c) では、微小くぼみの総面積は大きい、比較的大きな微小孔が形成されることがわかる。

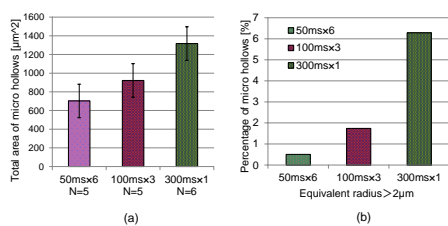


図9 超音波照射シーケンスによる微小くぼみの形成の解析

微小気泡を用いた超音波支援のDDSにおいて、強力超音波の焦点位置と気泡クラウドの破壊のダイナミクスをその場で確認することは重要になる。研究では、汎用超音波装置のパワードブラ像を用いた強力超音波音場と気泡キャビテーションのその場可視化法を開発した。図10にその実験系を示す。ここで、映像用超音波と同期させた特定照射シーケンスで気泡キャビテーション用の強力超音波を照射するが、パワードブラ画像 (CFA)、カラードブラ画像の信号処理ユニッ

トを活用し、音場の音圧分布と高時間分解能での気泡キャビテーション現象を可視化する方法である。キャビテーション用強力超音波の照射シーケンスを変更することにより、非侵襲的に強力超音波の音場、気泡の運動・破壊をマイクロ秒の高時間分解能で可視化できる点に特徴がある。

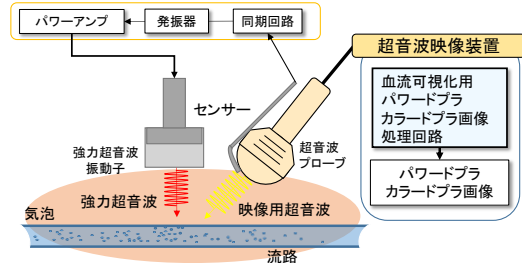


図10 強力超音波音場、気泡クラウドのキャビテーションの高時間分解能可視化法

図11にこの方法を用いた強力超音波音場の可視化実験の結果を示す。映像用超音波の周波数は3.5MHzであり、これに同期させて周波数2.5MHzの強力超音波を焦点距離15mmの収束円盤状振動子を用いて照射させたときの焦点付近の音場分布であり、音圧が評価できる、音場が画像として得られるなど気泡クラウドを介したDDSにおいて、超音波照射位置と照射音圧の確認に有効になる方法である。

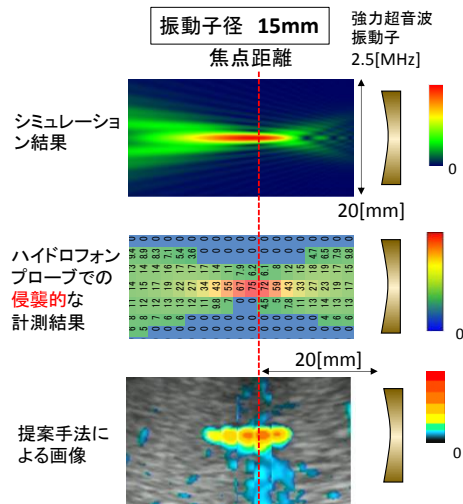


図11 音場の可視化実験結果

図12に強力超音波照射時の気泡ダイナミクスの高時間分解能でのその場可視化実験の結果を示す。この方法は、映像用超音波と気泡クラウド破壊用の強力超音波を同期させ、特定シーケンスで強力超音波を照射することで、気泡破壊、気泡運動によるキャビテーション雑音を、マイクロ秒オーダーの高時間分解能でその場で観測できる新規方法

である。

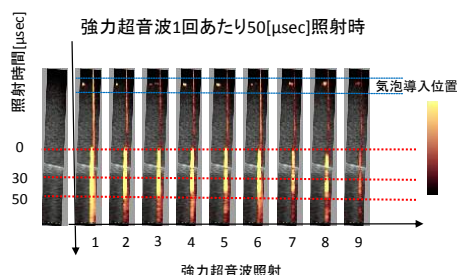


図 1.2 気泡クラウドキャビテーションの高時間分解能その場観察法による観測結果

超音波中の微小気泡は音響放射圧の影響を受けて非常に複雑な現象を示す。その現象を精密に制御することは不可能であるが、気泡群全体としてある性質や秩序を持たせることは実現可能と考えられる。本研究では、気泡クラウドからのキャビテーションについて、強力な超音波を照射してキャビテーションを生じるような条件下で気泡破壊を伴わないような低音圧時と類似の現象が観察されること、さらにキャビテーションにより生じる音響穿孔などの改善に、超音波による気泡マニピュレーションを導入できることを実験的に明らかにした。また、気泡クラウドからのキャビテーションを使う DDS において有効になる強力音場のその場可視化、気泡破壊と気泡クラウドの運動によるキャビテーション雑音をその場で、高時間分解能で観察する新たな方法を開発することができた。

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 5 件)

- ① 山越芳樹、砂口尚輝、気泡クラウドと微小くぼみの同時観察による気泡クラウドキャビテーションの評価、超音波テクノ、25 巻, 5, 1-6, 2014. 解説論文、査読無
- ② 山越芳樹、砂口尚輝、工学から見た DDS 超音波治療、超音波テクノ、26 巻, 4, 65-70, 2014. 解説論文、査読無
- ③ Naoki Sunaguchi, Jun Yamaguchi, Takuya Kanai, Tomoaki Isono, and Yoshiki Yamakoshi, Improvement in microhollow production using bubble cloud cavitation by dual-frequency ultrasonic wave irradiation, Japanese Journal of Applied Physics, 53, 07KF18 (2014). 査読有
- ④ Y. Yamakoshi, K. Kotani, N. Taniguchi, and T. Miwa, Characterization of skin dermis microcirculation in flow-mediated dilation using optical sensor with pressurization mechanism, Med Biol Eng Comput., 51, 5, 497-505, 2013. 査読有

- ⑤ Y. Yamakoshi and T. Miwa, Observation of Microhollows Produced by Bubble Cloud Cavitation, Japanese Journal of Applied Physics, 51, 07GF28 (2012) 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 永井隼人, 磯野智章, 砂口尚輝, 山越芳樹, 音響穿孔のための微小気泡評価法の提案, 日本超音波医学会第 87 回学術集会, 横浜, 2014 年 5 月 9 日
- ② 泉遥介, 金井拓也, 砂口尚輝, 山越芳樹, 複数同時超音波照射による気泡クラウドキャビテーション, 日本超音波医学会第 87 回学術集会, 横浜, 2014 年 5 月 9 日
- ③ 砂口尚輝、山口淳、金井拓也、磯野智章、山越芳樹、複数超音波の同時照射による気泡クラウドキャビテーションの評価、第 34 回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム、京都、2013 年 11 月 20 日
- ④ 山越芳樹、気泡クラウドと微小窪みの同時観察による気泡クラウドキャビテーションの評価、第 5 回超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシンポジウム、東京、2012 年 12 月 15 日
- ⑤ 山越芳樹、山口淳、小澤知亨、磯野智章、金井拓也、気泡クラウドと気泡クラウドキャビテーションにより形成される微小孔の同時観察、第 33 回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム、千葉、2012 年 11 月 13 日
- ⑥ 山越芳樹、音響放射力による気泡クラウドのダイナミクス、日本生体医工学会関東支部研究会、東京、2012 年 11 月 28 日
- ⑦ 小澤知亨、中野宜泰、郡裕路、三輪空司、山越芳樹、2 焦点同時観察による気泡ミストの 3 次元ダイナミクスの観察、第 85 回日本超音波医学会学術集会、東京、2012 年 5 月 25 日
- ⑧ 磯野智章、金井拓也、郡裕路、山口淳、山越芳樹、気泡クラウドキャビテーション中の気泡のダイナミクスと微小窪みとの関係、第 85 回日本超音波医学会学術集会、東京、2012 年 5 月 25 日
- ⑨ 金井拓也、磯野智章、郡裕路、山口淳、山越芳樹、高速度カメラを用いた気泡クラウドキャビテーションの観察、第 85 回日本超音波医学会学術集会、東京、2012 年 5 月 25 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山越 芳樹 (YAMAKOSHI, Yoshiki)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：10174640

(2) 研究分担者

砂口 尚輝 (SUNAGUCHI, Naoki)

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：60536481