

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350834

研究課題名(和文) 微細気泡崩壊現象の解明とその健康増進効果への活用

研究課題名(英文) Elucidation of Microbubble Collapse Behavior and Its Application to Vitality

研究代表者

長谷川 裕晃 (Hasegawa, Hiroaki)

宇都宮大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90344770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロバブルは、気泡径が数十マイクロメートル程度で通常の気泡に比べサイズが小さいだけで、通常の気泡とは異なる物理化学特性を示す。そうした特性の中で、特に興味深い電気的特性と気泡収縮挙動の関係を調べた。その結果、気泡収縮挙動は3つのパターンに分類することができ、この気泡収縮パターンは、気泡表面電位(ゼータ電位)に顕著に影響を受けることがわかった。また、マイクロバブル浴の生理的効果としての気力量の変化を調べた。その結果、マイクロバブル浴により、気力のバイオマーカーで気力と正相関することがわかっているGPCの増加が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Microbubbles are very small air bubbles with diameter on the order of less than several tens of microns and have properties different from those of property from the small bubbles from the chemical and physical viewpoints. A crucial characteristic of the microbubble is that they are electrically negative charged (ζ -potential) on their surface. In the present study, it was confirmed that the pattern of shrinkage behavior can be classified as three types. We concluded that the shrinkage behavior of microbubbles was strongly affected by the ζ -potential of microbubbles. Furthermore, the antidepressant effect using the microbubbles was evaluated by experiments on animals. The restoration of vitality as antidepressant effects was investigated in the mouse forced swimming test and estimated using globopentaosylceramide (GPC), which is the biochemical marker of vitality. Result of in this study, the GPC increased after microbubble bathing in contrast to the bathing with no microbubbles.

研究分野：流体工学

キーワード：マイクロバブル ゼータ電位 気泡収縮 圧壊 動物実験 気力

1. 研究開始当初の背景

これからますます高齢化社会が加速していくことが見込まれ、肉体面、精神面双方での健康に対する関心が高まっている。そのため、マイクロバブルのような身近にあり自然界に存在する物質からのみで構成され、副作用のない物質を活用し、人体の生理活性効果を促進できれば国民のQOL (quality of life) の向上に大きく貢献できることになる。微細気泡の医学応用に関しては、血管内に赤血球よりも小さい微細気泡を投入した超音波造影剤や患部にのみ必要量の薬物を送る選択的薬物伝送システム (Drug Delivery System : DDS) に利用する機能性バブルの研究が、近年急速に進められている。また、微細気泡圧壊時のホットスポット (気液界面の消失にともない形成される高温高压の極限反応場) で、結石を粉碎したり、がん細胞を焼いたりする研究も進められている。本研究では、こうした血液中に微細気泡を導入するのではなく、温浴によりマイクロバブルを人体外部からの使用により、生理的に有効となる手法を確立し、健康維持、健康増進に役立てる。温浴では、気泡内部のガスが経皮的に吸収される効果にくわえ、気泡収縮時の体積振動、気泡の変形や圧壊にともなう物理的的刺激効果が人体に良好な影響を及ぼすことが期待できる。特に、これまでの成果で気泡表面電位の違いで膜透過効率、洗浄効果等に違いが出てることがわかっている。そこで、マイクロバブルの重要な特性である気泡表面電位の違いが気泡収縮挙動に及ぼす影響についても調べる。

2. 研究の目的

微細気泡 (マイクロバブル) の特異性を活用することで、人体の生理活性効果を促進させる手法を確立する。特に、これまでの成果で微細気泡の電気的特性 (気泡表面電位) が気泡の収縮速度に影響することがわかっているため、この収縮および圧壊時の現象の違いを調べ、人体の生理的有効性に及ぼす影響を解明し、健康増進効果への活用を目指す。

3. 研究の方法

気泡表面電位 (ゼータ電位) の異なる気泡で気泡収縮挙動および消滅時の違いを調べる。その際、真空脱気したゲル内に気泡を注入し、気泡の上昇を極力抑えた状態で、高倍率のレンズで高速度撮影を行う。気泡表面電位の違いは、発生させる水溶液の pH を変化させた場合と水溶液の状態は変えずに微細気泡発生方法 (加圧溶解式、せん断式) を変化させた場合で実施した。

マイクロバブル浴による生理的効果

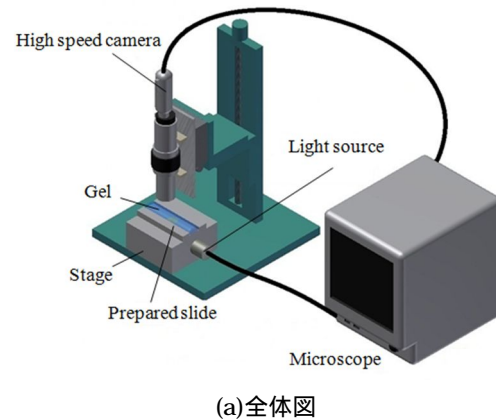
に関しては、マウスを使った動物実験で実施する。マウスを使った動物実験では、生理活性効果として抗うつ効果を評価した。抗うつ効果の指標となる生理活性物質の増加を気力量として評価し、マイクロバブル浴での生理活性効果について、マイクロバブルを含まない通常浴との比較で実施した。気力量の測定は、気力と正相関するバイオマーカーである糖脂質 globopentaosylceramide (GPC) で評価した。また、マイクロバブル浴が人体に及ぼす影響を調べるために、足浴での評価も実施した。その際、気泡内部ガスの違いについても比較する。実施内容をまとめると以下のとおりである。

- (1) 気泡表面電位の違いでの気泡収縮時、消滅時の挙動に違いが出るかを調べる
- (2) マウスを使った動物実験で、マイクロバブル浴での生理的効果の有無を調べる
- (3) 足浴によりマイクロバブルが人体に及ぼす影響を調べる。その際、マイクロバブル内包ガスの違いについても調べる

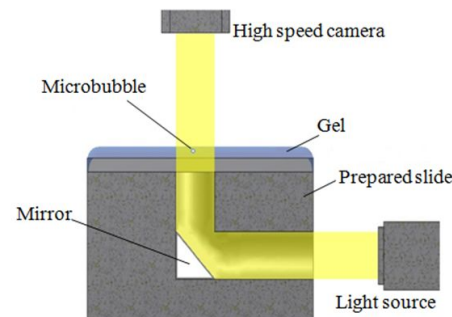
4. 研究成果

4.1 気泡表面電位 (ゼータ電位) の違いでの気泡収縮、消滅挙動

図 1 に気泡収縮時の挙動を測定する装置の概要を示す。図 1(b) は測定部の拡大図である。10 L の水槽に水道水を入れ、マイクロバブル



(a) 全体図



(b) 測定部拡大図

図 1 気泡挙動測定装置概要図

発生装置によってマイクロバブルを 15 分間発生させ、マイクロバブルを飽和させる。装置を停止後、マイクロシリンジ(MS-NG50, 株式会社伊藤製作所)を用いてマイクロバブル水を 30 μL 採取した。観察しやすくするために、あらかじめ観察用プレパレートに真空脱気した 0.2 wt% のゼラチン水溶液(ゲル)を敷き、採取したマイクロバブル水を注射することで、気泡の動きを制限している。その後、観察用プレパレートにメタルハイドランプを観察台に内蔵した鏡に反射させ、下から光を当てた。マイクロスコープによって上方からマイクロバブルの収縮過程を撮影した。室温、水温は 25 ± 1 に設定した。撮影倍率は 5000 倍である。フレームレートは 200 fps である。撮影した動画から画像処理によって気泡輪郭、気泡径を計測した。

ゼータ電位は、マイクロバブル発生方法を変えることで変化させた。本研究では、スリット式発生装置と加圧溶解式発生装置を使用した。各発生装置でのゼータ電位を図 2 に示す。平均電位は、スリット式、加圧溶解式、それぞれ -42mV 、 -10mV である。各発生方法での収縮速度を図 3 に示す。水中を収縮しながら浮上するマイクロバブルをマイクロスコープで撮影し、画像処理によって気泡輪郭を求め、等価円直径として気泡径を算出した。マイクロバブルは、自己加圧効果で気泡径が小さくなるほど内部の圧力が上昇する。このため、気泡径が小さくなると、一気に収縮が加速され、急激に消滅に至る様子が確認できる。スリット式発生装置によって発生したマイクロバブルは、加圧溶解式発生装置によ

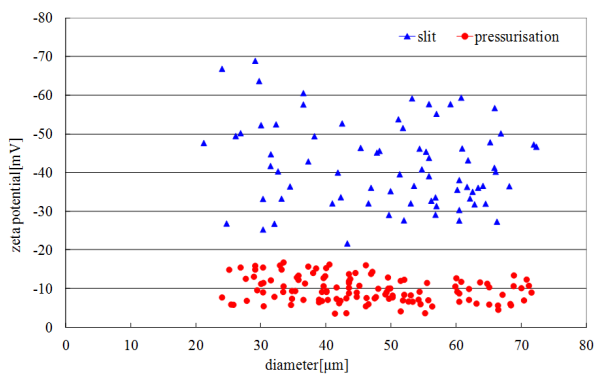


図 2 各発生方法でのデータ電位

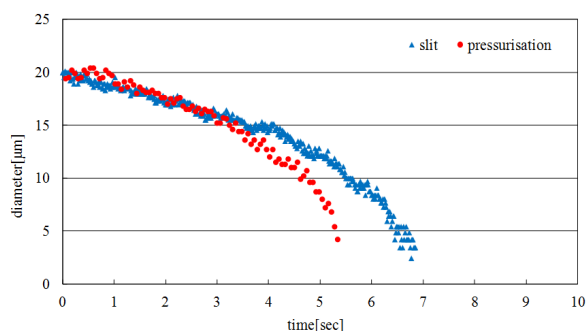


図 3 気泡収縮速度

て発生したマイクロバブルよりも収縮速度が遅くなることがわかった。つまり、気泡表面電位が高いほど、収縮速度は遅く気泡寿命が長くなる。気泡収縮速度は気泡の表面電位に大きく影響される。

収縮速度に気泡表面電位が影響していたので、気泡収縮時の様子の撮影を試みた。図 4 に加圧溶解式、図 5 にスリット式発生装置での収縮過程の様子を示す。気泡収縮時間を t とおき、気泡消滅時を $t=0\text{s}$ としている。加圧溶解式では、気泡は初期段階から消滅まで球形を保ちながら収縮していく。こうした収縮過程は、撮影した全ての気泡で同様の結果となった。一方、スリット式発生装置で発生させたマイクロバブルの収縮過程はいくつかのパターンが存在した。気泡は初期段階では球形のまま収縮していく。気泡径が小さくなるにつれて顕著な変形が確認された(図 5, $t=-6\text{s}$)。他にも収縮過程においてほぼ球形を保ちながら、わずかに変形を生じるものや、球形を保ちながら収縮し、変形が生じないものが確認された。今回の結果では、収縮パタ

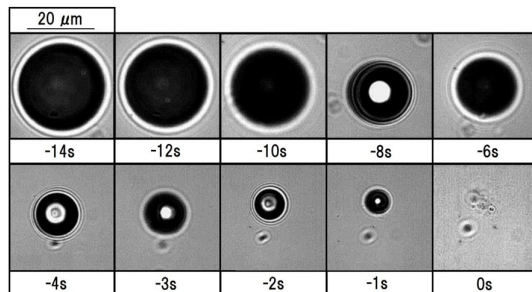


図 4 加圧溶解式発生装置での収縮挙動

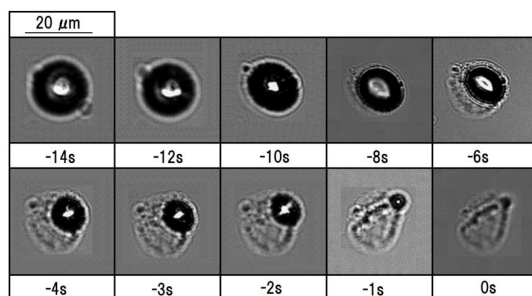


図 5 スリット式発生装置での収縮挙動

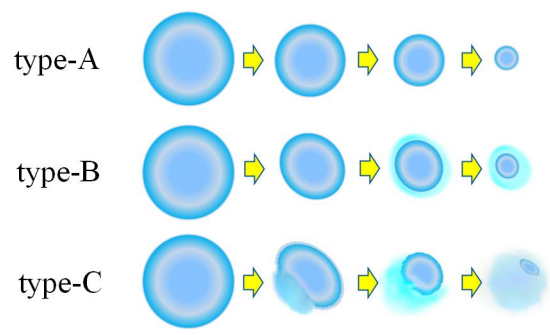


図 6 マイクロバブル収縮パターン

- ーンを以下の3つに分けることができる。
- type-A：初期段階から消滅まで球形を保ちながら収縮していき、気液界面に変化は認められない
 - type-B：初期段階では球形のまま収縮していき、気泡径が小さくなるにつれて球形から楕円のように変形する
 - type-C：初期段階では球形のまま収縮していき、気泡径が小さくなるにつれてより顕著な気液界面が変形する

加圧溶解式発生装置の場合、撮影した全ての動画(7回)においてtype-A。スリット式発生装置の場合、撮影した6回の動画のうち3つがtype-C、2つがtype-B、残りの1回がtype-Aであった。加圧溶解式発生装置によって発生されるマイクロバブルは、低い表面電位でバラつきが小さい。スリット式発生装置によって発生されるマイクロバブルは、高い表面電位でバラつきが大きい。このことから、加圧溶解式で発生されるマイクロバブルは、表面電位が低くばらつきが小さいために、type-Aのような収縮のみ起きる。それに対して、スリット式発生装置によって発生されるマイクロバブルは、電位が高くばらつきが大きいために、同じ気泡径の場合でもtype-A, B, Cのよう複数の種類の収縮パターンが起き、表面電位が高い気泡ほど収縮時に顕著な変形が起きるといえる。こうした3つの収縮パターンのイメージを図6に示す。また、水溶液のpHを変えて(調整剤は H_2SO_4 , $NaOH$)ゼータ電位を変化させた場合、類似の結果が得られた。電位の低い場合(pH=3)から高い場合(pH=11)に変化するにつれて、収縮パターンはtype-AからCへ移っていく結果となった。

4.2 マウスでの動物実験

マウスによる動物実験では、円筒容器内をマウスを遊泳させる強制遊泳試験で実施した。図7に使用した遊泳槽である円筒容器を示す。円筒容器はアクリル製で(内径158mm, 高さ550mm)、マイクロバブル発生装置、発生装置駆動用ポンプ、空気流量計から構成されている。容器内には水温20℃の水が500mmの高さまで入れてある。ポンプの吸引側および吐き出し側ホースは、水流によるマウスへの影響を小さくするため、円筒容器側面底部付近に接続している。マイクロバブル発生装置への空気供給量は、40 mL/minとした。

動物実験を行う上で、使用する動物に関して最も重要なことは、遺伝的因子、環境因子、疾病因子が十分に規制されているか否かである。つまり、この3条件を備えてこそ適正な実験動物となる。このうち、環境因子は実験施設に依存するものであり、温度や湿度など各種環境下を一定に維持された環境において実験を行う必要がある。本研究では、秋田大学バイオサイエンス教育・研究センターの動物実験部門にて行い、実験環境の統一および維持している。また本研究の手法および

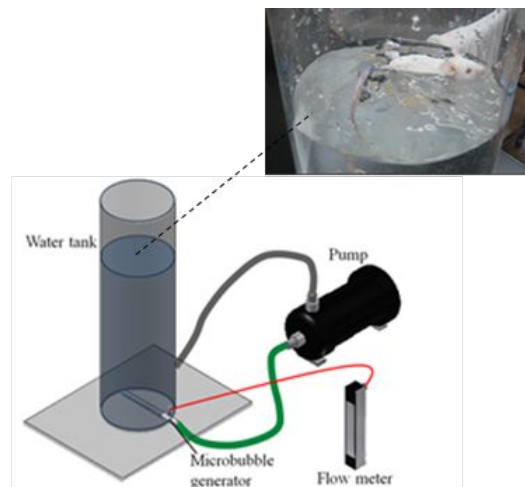


図7 動物実験遊泳槽

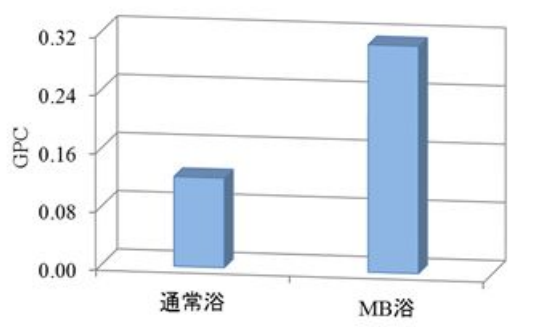


図8 強制遊泳試験後のGPCの比較

実験目的は、秋田大学動物実験倫理委員会の許可を受けている。遺伝的因子および疾病因子の統一のため、ddYマウスを実験動物として使用した。このマウスは、動物実験に最も広く用いられている非近交系のクローズドコロニーとして維持されているマウスのひとつである。ddYマウスは、1910~20年代にドイツから伝染病研究所(現東京大学医科学研究所)に導入されたマウスが由来であり、その後国立予防衛生研究所(現国立感染症研究所)が系統化したものである。これら3つの頭文字からddYマウスと名前が付けられている。本研究で用いたddYマウスは日本SLC株式会社より購入し、移動に伴う疲れやストレスを考慮し、施設にて3週間の予備飼育を行った後、実験に供した。マウスの居住環境は、室温21~25℃、湿度50~60%、7:00~19:00点灯の環境で維持されている。また、水および餌は自由摂取としている。統計検定および動物実験倫理を考慮し、使用マウスは各条件5匹とした。生理活性物質としての気力量の評価に使用したGPCは、遊泳試験後のマウスから採血した。本研究では採血には心臓採血を選択し、マウス全血を採取する。このとき、屠殺後時間経過に伴い血液が固化することを防ぐため、マウスを開胸せずに採血を行っている。

図8に、マイクロバブルを含む場合(MB浴)とマイクロバブルを含まない通常浴での



図 10 足浴実験概要図

表 1 被験者年齢

	Man	Woman
Normal	21.8 ± 1.2	21.3 ± 1.2
Tablet	22.0 ± 1.0	22.8 ± 0.8
Microbubble(air)	21.5 ± 1.5	21.0 ± 1.0
Microbubble(CO ₂)	22.0 ± 1.5	20.8 ± 1.0

表 2 被験者身長

	Man(cm)	Woman(cm)
Normal	170.8 ± 2.5	161.3 ± 5.5
Tablet	169.3 ± 4.0	159.5 ± 7.5
Microbubble(air)	166.8 ± 9.1	158.0 ± 7.6
Microbubble(CO ₂)	169.0 ± 3.8	156.8 ± 4.5

表 3 被験者体重

	Man(kg)	Woman(kg)
Normal	66.8 ± 11.0	55.0 ± 5.5
Tablet	58.0 ± 7.5	52.8 ± 7.0
Microbubble(air)	64.0 ± 12.5	50.3 ± 4.5
Microbubble(CO ₂)	69.0 ± 6.3	49.3 ± 5.4

GPC の比較を示す。マイクロバブル浴で GPC が優位に増加している。GPC と気力は正相関していることから、マイクロバブル浴で気力量が増加していることになる。

4.3 足浴試験

足浴では浴槽に 40 ℓ のお湯をはり、そこにスリットせん断式マイクロバブル発生装置でマイクロバブルを発生させた。図 10 に実施した足浴の概要図を示す。今回の実験の目的と内容を説明し、同意を得た下肢の血行障害のない健常学生を被験者とし各条件 8 人（男女 4 人ずつ）で足浴を行った。被験者は 10 分間入浴を行う。このとき足浴前後と足浴後 1 時間後にデータを測定した。被験者の概要を表 1、2、3 に平均 ± 標準偏差で示す。

足浴では、マイクロバブルなし、炭酸タブレット（ホットアルバムコム株式会社製スパークリングホットタブ）、空気マイクロバブル（内包ガス空気）、炭酸マイクロバブル（内包ガス炭酸ガス）の 4 ケースの比較を行った。測定項目は、心拍数と血流量である。心拍数の測定はパルスオキシメータを使用し、測定部位は右手の人差し指とした。血流量はオキ

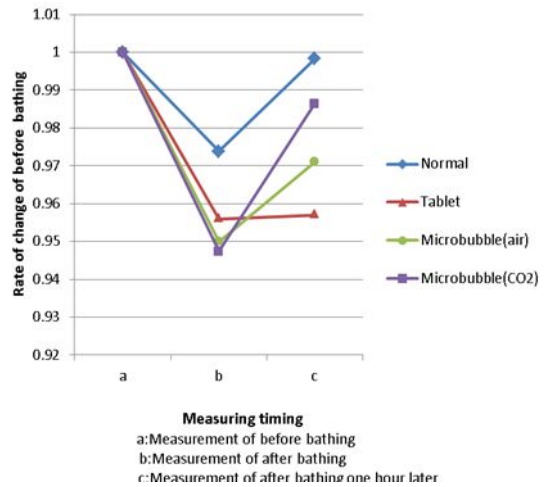


図 11 心拍数の変化

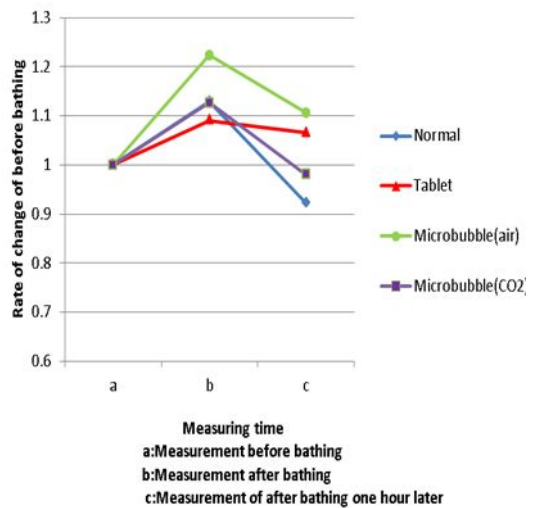


図 12 血流量の変化

シメータを用いて測定した。血流量は変化しやすいため測定は、被験者にベッドの上で横になってもらい 1 分間継続して測定を行いその平均をその人の測定データとした。

図 11 に心拍数の結果を示す。グラフでの数値は、各測定値を足浴前の測定値で割ったもので、足浴前との変化率を示している。足浴中は、どの条件においても心拍数の減少が確認できる。心拍数は副交感神経が優位になると減少する。副交感神経が優位であるということはリラックスしている状態を示すため、足浴によって副交感神経が優位になりリラックスした状態となったといえる。足浴直後において、空気マイクロバブル浴、炭酸マイクロバブル浴およびタブレット浴でそれぞれ 5% 程度減少しており、通常浴よりもリラックス効果があることが示唆された。足浴後 1 時間後では、タブレット浴のみ足浴直後の状態が維持されている。これは、マイクロバブルに比べ、錠剤の効果が長く続いているものと推測される。

図 12 に血流量の測定結果を示す。入浴後は全ての場合において、血流量は上昇している。血流量は副交感神経が優位になると増加するため、心拍数の測定結果と同様に入浴に

よりリラックスしている状態にあるといえる。また、血流量が増加すると体内の二酸化炭素や体の老廃物が体外に放出されやすくなり、疲労の改善につながる。このことから、血流量の増加の特に大きい空気マイクロバブル浴は、他の足浴と比較して疲労回復効果が大きいという結果になった。

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 2 件)

- (1) 酒井駿, 長谷川裕晃, 上村佐知子, 増田豊, マイクロバブル炭酸泉浴のストレスコーピング効果, 秋田医学, 42 巻, 2015, pp.125-128.
- (2) Sakai, S., Hasegawa, H., Masuda, Y. and Sugiyama, T., Behavior of Microbubbles with High Electrical Potential and Its Application to Vitality, Proc. of The First Pacific Rim Thermal Engineering Conference, 2015.

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 酒井駿, 長谷川裕晃, 増田豊, 杉山俊博, ゼータ電位の異なるマイクロバブル浴による気力回復, 日本混相流学会混相流シンポジウム 2015.
- (2) 酒井駿, 長谷川裕晃, 増田豊, 杉山俊博, ゼータ電位の異なる微細気泡の挙動とその生理的效果, 日本機械学会流体工学部門講演会, 2015.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 裕晃 (Hasegawa Hiroaki)
宇都宮大学大学院工学研究科・教授
研究者番号：90344770

(2) 研究分担者

上村 佐知子 (Uemura Sachiko)
秋田大学大学院医学研究科・講師
研究者番号：40271829

夏井 美幸 (Natsui Miyuki)

秋田大学医学部・助教
研究者番号：60227527

(3) 連携研究者

()

研究者番号：