

た同じ音圧、周波数の超音波をカプセルに照射したところ、破壊しないことを確認した。以上のことより、定在波の印加によってカプセル濃度の局所的変化が生じていることが明らかとなった。

3.3 流速及び定在波の音圧に対するカプセル濃度の局所的変化

前節の実験は流速 100 mm/s の状態で行った結果であるが、流速が速くなれば同じ強度の定在波でも捕捉限界に達し、また定在波の音圧が大きくなれば、捕捉できる流速の範囲も広がると考えられる。よって上記の実験において流速と定在波の音圧を変化させ、Bモード像上での輝度変化を確認できる条件を検証した。カプセル粒径及びカプセル懸濁液の濃度は、前節で輝度変化が見られた 63~75 μm 、0.1 g/l とした。流速は 80, 100, 120 mm/s の3通り、定在波の音圧は 110~150 kPa の間の5通りとした。またBモード像の記録は前節と同様にした。ここで定在波に起因する輝度変化の指標として、図6における領域 R2 と領域 L1 の輝度平均値の差 (R2-L1) を計算した。結果を図8に

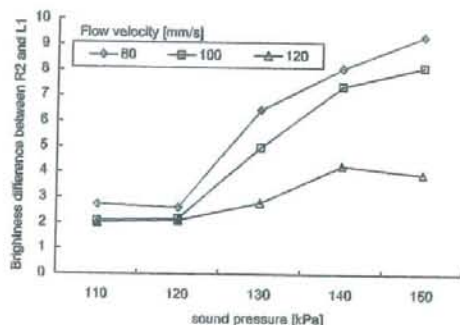


図8 定在波の音圧と懸濁液の流速に対する設定領域 R2 と L1 の輝度差の変化

Fig. 8 Variation of brightness difference between the regions R2 and L1 versus sound pressure of the standing wave and flow velocity.

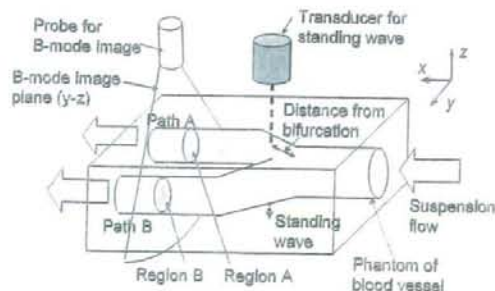


図9 分岐を有する模擬血管の構成と定在波・Bモード像の位置関係

Fig. 9 Phantom of bifurcated blood vessel and the positions of standing wave and B-mode image.

示す。

図8より、流速が 80, 100 mm/s では音圧が 130 kPa 以上になると輝度平均値の差が顕著に見られるため、カプセルの局所的濃度変化が起きていると考えられるが、120 mm/s の時はその傾向は小さい。これは流速が早くなれば、カプセルが流れによって受ける抗力の方が、流体中の定在波による捕捉力を上回るためと思われる。また音圧 130 kPa 以上の場合、同じ音圧であれば流速が遅い方が輝度平均値の変化が高い。これも同様に、定在波による捕捉力が抗力を上回るためであると考えられる。

3.4 定在波による流路選択実験

上記の結果を受けて、分岐を有する模擬血管において同様の検証を行い、定在波の存在が分岐後の経路を流れるカプセル濃度に及ぼす影響を確認した[24]。まず2.2節と同様の方法で、図9のように分岐を有する模擬血管を作成した。外形寸法は 85×40×150 mm で、流路は内径 12 mm のY字型、分岐部の角度は 120° とした。分岐点から流路 A 側の下流側の 10 mm の位置に、前節同様の周波数 1 MHz の定在波を印加した。この流路で矢印の方向に 100 mm/s でカプセル懸濁液を流し、下流の2流路の両方を断面方向に横切る y-z 平面の Bモード像を記録できるように超音波プローブを配置した。懸濁液を流した状態の Bモード像を図10に示す。懸濁液の流入後、5秒間記録された Bモード像において、8×8 mm の2つの計測領域 (ROI A, ROI B) を設定し、それらの輝度変化を計測した。ここで両領域の条件を同じにするため、Bモード像上の両領域は同じ深さになるようにプローブの位置に配慮した。

カプセル粒径及び懸濁液の濃度は、前節で使用した 63~75 μm 、0.1 g/l とした。定在波の音圧の増加に伴い、ROI A の輝度が低下し、ROI B の輝度が上昇する傾向が見られた。また逆に流路 B 側に定在波を印加すると、逆の現象が見られた。A・B それぞれの流路に定在波を印加した場合、定在波の音圧に対する ROI A と ROI B の輝度平均値の差

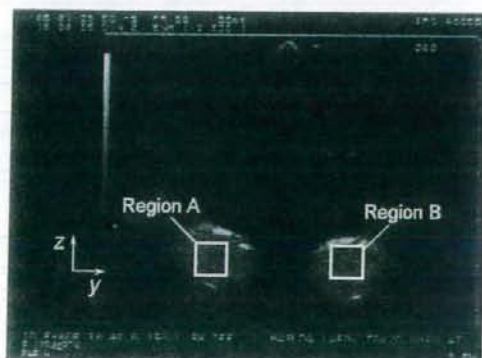


図10 分岐後の下流の Bモード像と2つの輝度計測領域
Fig. 10 B-mode image of two lower courses and measurement regions of brightness.

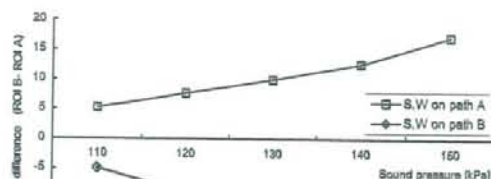


図 11 定在波の音圧に対する下流領域の輝度平均値の比較
Fig. 11 Comparison of brightness average in two lower regions versus sound pressure of the standing wave.

(ROI B - ROI A) を図 11 に示す。これより、定在波の音圧の上昇と共に、下流の両領域のカプセル濃度差が増加することが明らかとなった。これは前節の結果で見られたように、定在波の影響でカプセルが捕捉されて流入しにくい状況が生じ、定在波の上流側で濃度が高くなったカプセルの一部が反対側の経路に流れ込んだものと考えられる。このことから模擬血管中に定在波を形成することによって、分岐部におけるカプセルを誘導できる可能性が示された。

4. 考 察

本論文では流れの中に存在するマイクロカプセルに音響的な力を与え、流速 100 mm/s 程度の条件において、カプセルの濃度に生じる現象を確認した。マイクロカプセルの濃度を効率よく制御するためには、最適なカプセル粒径、超音波の周波数、音圧の条件を見つけ出す必要がある。また、人体に用いることを考えるとできるだけ低音圧であることが望ましい。今後様々な条件を整備し、実用化を視野に入れた更なる検討が必要である。以下、本論文で述べた実験結果について考察する。

4.1 カプセルの濃度変化について

図 4 からカプセル濃度に対する輝度の関係は、カプセル濃度が 0.1 g/l 付近で線形性が得られた。またカプセル粒径に対する傾向は伺えなかった。これから、0.02~0.2 g/l の間の濃度 d (g/l) と輝度値 B の関係を近似すると、以下の式が得られる。

$$B = 14.3 \log d + 77.9 \quad (2)$$

更にこの式から、濃度が d_0 から d_1 に変化した際、輝度変化が ΔB 見られたとすると、次式が導かれる。

$$d_1/d_0 = \exp(\Delta B/14.3) \quad (3)$$

この関係を踏まえると、図 8 で得られた結果より、最も輝度変化が見られた音圧 150 kPa、流速 80 mm/s の場合で、上流と下流のカプセル濃度差が約 2 倍あったことが伺える。また図 11 の結果でも同様に、音圧 140~150 kPa の場合は模擬血管の分岐後の 2 つの下流領域で輝度差が 10~15 程度見られ、カプセル濃度差は 2~3 倍あったことになる。カプセルが途中で失われていることは考えられない

め、今回の分岐実験では分岐前の 0.1 g/l のカプセルのうち、最大で 0.05 g/l 程度が本来流れるはずの経路を外れて別の経路に誘導されたと考えられる。

本論文では 3.2 節で得られた実験結果から、定在波の印加位置から 10 mm 上流の位置でカプセル濃度が上昇していると考え、3.4 節の実験では分岐部から 10 mm 下流の位置に定在波を形成したが、今後更に高効率にカプセルを誘導するための検討として、定在波の印加位置と流速に対する角度、複数のトランスデューサによる定在波の形成、音圧と周波数の比較等を行っていく必要がある。

4.2 カプセルの性質と粒径について

音波による捕捉力は放射圧による力と、定在波音場中での膨張・収縮に依存し、音圧の腹と節の間に存在する空間的な音響エネルギーの密度勾配による Bjerknes 力 [14] がある。本論文で使用したマイクロカプセルは、マイクロバブルとは違って殻 (シェル) があり、また定在波の周波数が共振周波数から外れるため、Bjerknes 力が生じにくい環境にある。よって音波による捕捉力を向上させるためには、殻が柔らかいカプセルで、共振周波数に近い周波数の定在波を用いれば良いことになる。しかし同時にカプセルが破壊され易くなるため、使用する環境に応じた最適な周波数、音圧等の条件を導出する必要がある。

また本論文ではカプセルの都合上、粒径が血球レベルより大きいものを使用した。一般に粒径が小さくなるとカプセルの捕捉力も小さくなるが、流体から受ける抗力も小さくなる。直径 D の球体が一次元の流れによって受ける抗力 F_d は、流体の粘性係数を ν 、流速を u とすると次式で表される。

$$F_d = 3\pi D\nu u \quad (4)$$

これに対して、音波による捕捉力はカプセルの体積に比例するため、粒径が小さくなれば式 (4) の流体の抗力に比べて音波による捕捉力が圧倒的に小さくなり、カプセル粒径が 1/5 程度の血球レベルになれば、同じ定在波でも捕捉力は 1/100 程度になる。本論文で述べた抗力と捕捉力はその向きが直交するため、単純な比較はできないが、捕捉できる流速の限界は数 mm/s になるのではと予想できる。これは末梢血管の血流速度に相当するため、血球レベルのカプセルにて実験を行う場合は模擬血管の形状を含めた流路システムを再考する必要がある。

4.3 B モード像の輝度値について

更に本論文では、濃度変化の検証として超音波 B モード像を用いたが、一般に B モード像の解像度は送信パルスの波長程度。7.5 MHz の送信周波数に対して波長が 200 μm であり、微小血管への適用には限界があると考えられる。しかしこのような場合、超音波造影剤として使用されるマイクロバブルと、ハーモニックイメージングを併用することを提案する。ハーモニックイメージングとは送信パルスの 2.3 倍の高調波 (ハーモニック) 反射信号を検出して画

像化する方で、理論的には100 μm以下の高空間分解能が得られる。また3次元超音波診断装置を用いれば、血管の3次元的な走行状態を認識することは可能である。また前述したように、Bモード像の輝度値は装置のゲイン等の調節で大きく変化する。診断装置内部では生体内からのエコー信号(RF信号)の振幅を対数圧縮して輝度値としているため、本論文で示したマイクロカプセルのようにエコー信号の強度が高い場合は、輝度値が飽和しないようにゲインを調節する必要があった。そこで今後はエコー信号そのものから解析を行うことを検討する予定である。

5. ま と め

本研究では、マイクロカプセルを使用した超音波 DDS の実現のため、生体外からのモニタリング方法及びカプセル濃度制御の可能性を示した。まず流路中に作成した定在波によって、一次元的な流れを有するカプセル懸濁液の濃度に変化が生じることを、Bモード像の輝度値変化からモニタリングする手法を示した。また分岐を有する流路に定在波を照射することによって、カプセルの濃度を調整できる可能性を示唆した。今後、より生体に近い条件の実験環境を用いて、さらに高い効率で局所的なカプセルの濃度変化を生じる方法の検討とそのモニタリング方法の改善を行う予定である。

謝辞 本研究の一部は、小野音響学研究助成基金によるものを明記し、ここに感謝いたします。また本研究にご協力頂いた東京農工大学の山田晃先生、野上啓介氏、また実験を手伝って頂いた上田沢氏に深く感謝いたします。

文 献

- 橋田 亮: ドラッグデリバリーシステム—創薬と治療への新たな挑戦—, 化学同人, 京都, 1995.
- 石原 謙: 共振超音波を用いた気マイクロカプセル DDS の計測と制御. *BME*, **6**(1): 45-52, 1992.
- Ishihara K, Yoshii K, Chihara K, Masuda K, Yamashita K, Shirai K, Furukawa T: Path Lines in Blood Flow using High-speed Digital Subtraction Echography. *Proc of the IEEE Ultrasonic Symposium*, Tucson, 1992, pp. 1277-1280.
- 山田正敏, 田畑泰彦: 超音波と DDS を組み合わせたがん治療法. *生体医工学*, **43**(2): 238-246, 2005.
- Whateley TL: *Microcapsulation of Drugs*, Harwood Academic Publishers, 1992.
- 工藤信樹, 栗林香織, 名取道也, 森安史典, 山本克之: 超音波照射下における微小気泡の振動の高速度カメラによる観察. *電子情報通信学会誌*, **J84A** 12: 1492-1499, 2001.
- Wei K, Skyba DM, Firsche C, Jayaweera AR, Lindner KR, Kaul S: Interactions between micro-bubbles and ultrasound: in vitro and in vivo observations. *J Am College of Cardiology*, **29**(5): 1081-1088, 1997.
- 大城 理, 岡崎哲三, 眞漢 歩, 大江洋介, 大塚博紀, 千原國宏, 石原 謙: DDS における薬物濃度の超音波画像計測, システム制御情報学会論文誌, **12**(6): 344-348, 1999.
- Yamakoshi Y, Ozawa Y, Ida M, Masuda N: Effects of

- Bjerknes Forces on Gas-Filled Microbubble Trapping by Ultrasonic Waves. *Jpn J Appl Phys*, **40**(5B): 3852-3855, 2001.
- Koyama D, Kiyama W, Watanabe Y: Optical Observation of Microcapsule Destruction in an Acoustic Standing Wave. *Jpn J Appl Phys*, **43**(5B): 3215-3219, 2004.
- 石松憲和, 玉川雅章, 山野井一郎: 衝撃波 DDS カプセルの開発とその設計法について. *生体医工学*, **43**(4): 730-737, 2005.
- 立花克郎: マイクロバブルの治療応用. *生体医工学*, **43**(2): 211-215, 2005.
- 工藤信樹, 山本克之: 微小気泡存在下におけるパルス超音波を用いたソノポレーション. *生体医工学*, **43**(2): 231-237, 2005.
- Yamakoshi Y, Koganezawa M: Bubble Manipulation by Self Organization of Bubbles inside Ultrasonic Wave. *Jap J Appl Phys*, **44**(6B): 4583-4587, 2005.
- 山越芳樹: 超音波による微小気泡のハンドリング. *日本音響学会誌*, **58**(10): 659-662, 2002.
- 竹内正男: 微小物体の超音波マニピュレーション. *日本音響学会誌*, **52**(3): 203-209, 1996.
- Chelly N, Yamakoshi Y, Sawada Y, Sakamaki T, Ida M, Masuda N, Ozawa Y: Effects of Red Blood Cells on Ultrasonic Wave Microbubble Trapping. *Jpn J Appl Phys*, **41**(5A): 3145-3146, 2002.
- Yamakoshi Y, Ozawa Y, Chelly N, Kurita Y, Masuda N: Characterization of Secondary Ultrasonic Waves Radiated from Bubbles Based on Small-Bubble Trapping Pattern Analysis. *Jpn J Appl Phys*, **41**(5B): 3559-3562, 2002.
- 山田 聡, 小室 薫, 谷口麻里子, 浦西歩美, 小松博史, 浅沼俊彦, 石蔵文信, 小野塚久夫, 三神大世, 筒井裕之, 別府慎太郎: 低音圧コントラストエコー法による超音波造影剤濃度の定量に関する基礎的検討. *超音波医学*, **33**(6): 665-671, 2006.
- 溝部一行, 八頭司磨介, 樹田晃司: 流路中の定在波によるマイクロカプセルの濃度勾配変化の観測と破壊効率への影響. 第 26 回超音波シンポジウム講演論文集, 横浜, 2005, pp. 139-140.
- 溝部一行, 樹田晃司, 石原 謙: 超音波ビーム照射によるマイクロカプセル破壊効率の B モード像の動画処理による推定. 第 25 回超音波シンポジウム講演論文集, 札幌, 2004, pp. 413-414.
- Minnaert M: On Musical Air-Bubbles and the Sound of Running Water. *Phil Mag*, **16**: 235-248, 1933.
- 溝部一行, 秋山剛生, 樹田晃司, 石原 謙: 水中に捕捉されたマイクロカプセルの破壊方法と破壊率の検討. 第 44 回日本生体医工学学会大会論文集, 筑波, 2005, p. 296.
- 八頭司磨介, 溝部一行, 樹田晃司: 生体内の定在波による局所マイクロカプセル濃度の操作のための実験的検討. 第 45 回日本生体医工学学会大会論文集, 福岡, 2006, p. 619.

梶田 晃司 (マサダ コウジ)

1989年国立明石工業高専卒業, 1991年大阪大学工学部卒業, 1996年大阪大学大学院工学研究科博士課程修了, 博士(工学)。1996年日本学術振興会特別研究員(国立大阪病院), 同年名古屋大学工学部助手, 1999年愛媛大学医学部助手。2002年より1年間, グルノーブル第一大学(フランス)医学部研究員。2003年東京農工大学大学院生物システム応用科学府助教授, 2007年より准教授, 現在に至る。この間, 超音波医用画像処理, 医療ロボティクス, 生体内薬物伝送に関する研究に従事。

1999年本学会論文賞・阪本賞受賞, 2000年本学会秋季大会にて若手研究者最優秀賞受賞。2002年日本超音波医学会より超音波工学フェロー授与。所属学会は本学会の他にIEEE EMBS, 日本超音波医学会, 電子情報通信学会, 日本ロボット学会等。

村松 悠佑 (ムラマツ ユウスケ)

2007年東京農工大学工学部電気電子工学科卒業。同年同大学大学院生物システム応用科学府博士前期課程入学。現在に至る。生体内マイクロカプセルの制御に関する研究に従事。

日本超音波医学会の会員。



溝部 一行 (ミゾベ イッコウ)

2004年東京農工大学工学部電気電子工学科卒業。2006年同大学大学院生物システム応用科学府博士前期課程修了, 日本光電(株)に入社。修士(工学)。在学中は, 超音波断層像によるマイクロカプセルの濃度解析に関する研究に従事。



石原 謙 (イシハラ ケン)

1978年大阪大学医学部卒業。同年大阪大学医学部第1内科入局, 1980年大阪労災病院医員, 1984年大阪大学医学部附属病院医員, 1991年同内科学第一講座助手, 同年国立大阪病院臨床研究部, 1995年同部長, 1998年愛媛大学医学部附属病院医療情報部教授, 現在に至る。2000年より日本医師会総合政策研究機構(日医総研)主席研究員, 2001年より2006年まで同機構研究部長兼務。日本生体医工学学会理事, 日本医療情報学会評議員, 循環器専門医, 超音波指導医, 医学博士。

1999年本学会論文賞・阪本賞受賞, 所属学会は本学会の他に, 電子情報通信学会, 医療情報学会, 日本超音波医学会, 日本循環器学会等。



解説

マイクロカプセルと
ドラッグデリバリー

Microcapsules and Drug Delivery

執筆者プロフィール



梶田 晃司
Kohji MASUDA

- 1991年大阪大学卒業, 1996年同大学院修士課程修了, 博士(工学), 国立大阪病院, 名古屋大学, 愛媛大学, Univ. Grenoble I を経て現職
- 研究・専門テーマは, 医用超音波工学, 医用画像処理およびロボティクス
- 東京農工大学准教授 大学院生物システム応用科学府
(〒184-8588 小金井市中町2-24 /
E-mail: masuda_k@cc.tuat.ac.jp)

1. はじめに

通常の経口・塗布・注射といった薬物投与方法では薬物は体内で拡散し, また肝臓・腎臓で捕そく・排せつされるため, 目的部位での十分な薬物効果を得るためには投与時に高い薬物濃度が必要である。いっぽう, 投薬量を増やすと他の部位での副作用が発生するという問題がある。このため, 患部にのみ必要量の薬物を送り, 最大限有効な薬物効果を得る選択的薬物伝送システム (Drug Delivery System, 以下 DDS) が数多く研究されている。現在, 主流は遺伝子操作等のバイオテクノロジーを用いた化学的手法であるが, 薬物ごとに異なる修飾基を用いる必要があり, 開発に時間がかかりコストが高くなるなどの問題点が存在する⁽¹⁾。

いっぽう, 超音波を用いた物理的 DDS として, 直径数〜数十ミクロンの含気マイクロカプセルを生体内で破壊する手法^{(2)~(4)}が提案されてきた。これは薬物を保持したマイクロカプセルを生体内に注入し, 生体外からある条件の超音波を照射すると, 内部の気体が膨張・収縮することによりカプセルの殻が破壊され, 薬物が放出されるというシナリオである。カプセル内に薬物を保持させる手法としては, 薬物が気化した状態でカプセルを製造するか, カプセルの殻自身に薬物を含ませる手法⁽⁵⁾等が考案されている。

これまでに行われた超音波 DDS に関する研究として,

高速度カメラを用いた超音波音場での微小気泡の観察⁽⁶⁾, 定在波による微小気泡の捕そく⁽⁷⁾と破壊⁽⁸⁾, また衝撃波を用いる手法⁽⁹⁾や, 破壊による細胞膜への損傷効果^{(10)~(11)}等の研究が行われてきた。また粒径の異なる複数の微小気泡を凝集させる研究⁽¹²⁾も行われているが, 生体内へ注入後のカプセルが受ける血流抵抗はほとんど考慮されておらず, さらにその挙動や動態を生体外から能動的に操作し, モニタリングする手法は確立されていない。そこで本研究では, 体外からの超音波照射により, 生体内のマイクロカプセルに音響的に作用力を生じさせ, その濃度や動態を局所的に制御すると同時に, 超音波断層像によってリアルタイムの観察・計測を行うシステムの構築を目指している。超音波によって局所的なカプセル濃度を自在に制御できる DDS が実現すれば, 投薬量の調節が可能となり, また血管の分岐部において局所的濃度変化を与えることができれば, カプセルの流路を選択して目的部位への誘導が可能となる。つまりカプセル放出から標的部位までに多数の分岐が存在していたとしても, その中から最適な流路を設定し, カプセルを誘導できるようになると考えられる。以下, 本研究の概要を述べる。

2. 水中の定在波によるマイクロカプセルの捕そく

本研究ではマイクロカプセルとして, 熱可塑性高分子 (AN系コポリマ) の殻を有し, 炭化水素 (イソブタン) を内包した松本油脂製薬社製マイクロスフェアを用いる。図1はF-80E (真比重0.0225, 平均粒径99.2 (μm)) をふるいにかけて, 直径63~75 (μm) に選別したカプセルの顕微鏡画像である。このカプセルを水中に浮遊させ, 超音波の定在波を形成してカプセルの挙動を観察した。

音波の持つ放射力を利用する技術として, 物体を非接触で空間中に保持できる音波浮揚あるいは超音波マニピュレーション⁽¹³⁾が知られているが, 定在波による捕そく力は音の放射圧による力, あるいは音響力とも呼ばれ, 周囲流体と音響インピーダンスの異なる物質の表面に働く時間平均的な力である。式(1)に微小粒子が受ける音響力 F_a

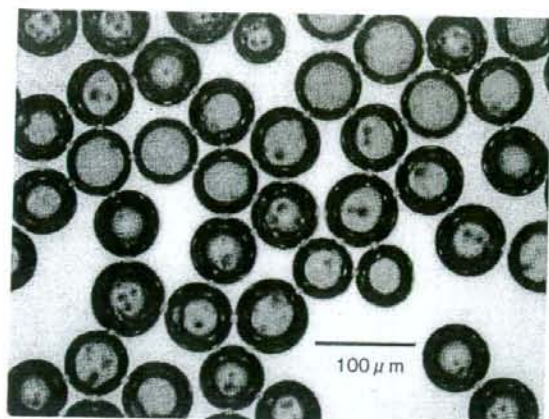


図1 マイクロカプセル F-80E の顕微鏡写真

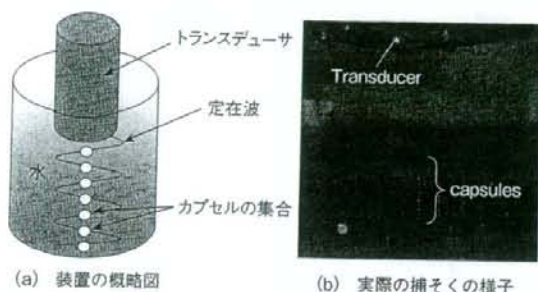


図2 静水中でのマイクロカプセルの捕そく

の理論式を示す⁽¹⁴⁾。ここで D は粒子直径、 k は超音波の波数、 E_{ac} は平均音響エネルギー密度、 x は定在波の節からの距離、 A は定数である。

$$F_{ac} = \left(\frac{1}{6}\right) \pi D^3 E_{ac} A \sin(2kx) \quad (1)$$

実験装置は図2(a)に示すように、円筒状のアクリル製容器に脱気水を満たし、中心周波数1(MHz)の収束型狭帯域超音波トランスデューサ(NTR Co. Ltd., PA072)の放射面を容器底面に対して平行になるように挿入し、正弦波を高周波増幅器(サムウェイ A50-1601)で増幅して定在波を形成した。この周波数では、定在波の周期は0.75(mm)となるため1周期中に複数のカプセルが存在でき、またカプセルの共振周波数⁽¹⁵⁾である数十~百数十(kHz)から外れており、カプセルが破壊しにくい⁽¹⁶⁾。トランスデューサは照射面から中心軸上45(mm)のところまで放射音圧が最大(半値幅約3(mm))になることから、水槽底面との距離を45(mm)に保つことによって水槽底面からの反射強度を確保した。定在波音場の音圧の計測は困難であるが、水槽底面における反射音圧の最大値を定在波の音圧とした。図2(b)は音圧を150(kPa)とした場合、トランスデューサの中心軸上に一直線にカプセルが集合し、等間隔で捕そくされた⁽¹⁶⁾。カプセルの個体は肉眼では確認できないため、カプセルが集合体を形成していることが

伺える。カプセルの捕そく間隔は、定在波の周期である0.75(mm)にはほぼ一致した。

3. 流路中の定在波に対するカプセル濃度の局所的变化

上記と同様の定在波を用いて、一定方向に流れを有する流路にカプセル懸濁液を注入し、その動態を観察する実験を行った。超音波透過性に優れかつ成形が容易なポリエチレングリコールを用いて $50 \times 80 \times 10$ (mm³) の直方体を成形し、内径2(mm)の直線状の流路を通して模擬血管とした。さらに図3のように流路に直交する方向に定在波を形成し、倒立顕微鏡(DMRIB, ライカ)を用いて底面からその内部を観察する実験系を構築した。実際に人体に適用する場合には生体内に反射板等を設置するのは困難であるが、複数の音源からの音波の干渉によって定在波を形成する手法⁽¹²⁾はすでに報告されているため、本論文では現象の確認として1個のトランスデューサによって定在波を形成した。

倒立顕微鏡のステージ上の模擬血管をロータリーポンプ、流量計を含む流路システムに組み込んで150(mm/s)の流速を維持し、直径を65~75(μm)に統一して重量濃度⁽¹⁷⁾を0.2(g/L)としたカプセルの懸濁液を注入した。またトランスデューサの中心周波数は1(MHz)、定在波の音圧を160(kPa)とした。

図4はカプセル懸濁液を注入した直後の定在波照射部付近の流路の連続写真で、時間間隔は200(ms)である。図4(a)の○印付近に定在波を形成しており、その付近にマイクロカプセルが集合していく様子がわかる。図ではわかりにくいですが、カプセルの集合体はそれ自体が回転しており、流速の抵抗を受けつつ局所的に高濃度を保っている。定在波の照射を止めると、カプセルの集合体は瞬時に流されて視野から消えた。このことから、流速に対する定在波の周波数や強度を調整することにより、カプセルの動態を制御できる可能性が示された⁽¹⁸⁾。

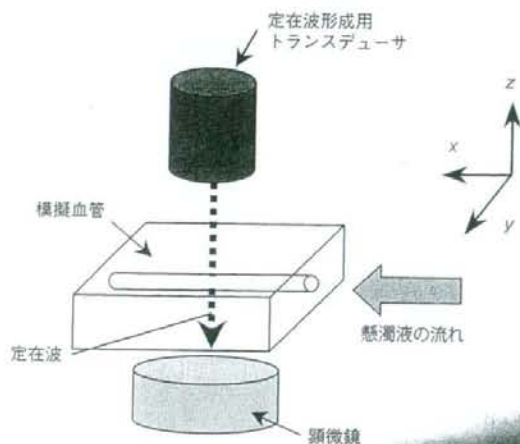


図3 擬血管への超音波照射と観察装置

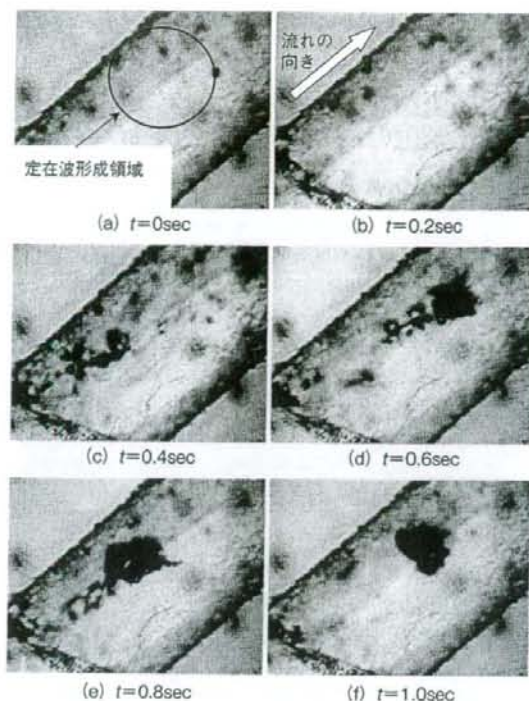


図4 流路中の定在波によるマイクロカプセル集合の様子

4. 定在波による流路選択実験

上記の結果を受けて、分岐を有する模擬血管において同様の検証を行い、定在波の存在が分岐後の経路を流れるカプセル濃度に及ぼす影響を確認した⁽¹⁷⁾。まず前章と同様の方法で、分岐を有する模擬血管を作成した。模擬血管の外形状は $85 \times 40 \times 150$ (mm³) で、流路は内径 12 (mm) の Y 字型、分岐部の角度は 120° とした。ここで模擬血管内部のカプセルの濃度変化の観測は、生体内での観測を想定し、超音波断層像 (以下、B モード像) を使用した。一般に B モード像上の輝度は、超音波反射体と周辺組織の音響特性の相対関係によって変化するが、カプセル内の気体の音響インピーダンスは生体組織と大きく異なり、反射率はほぼ 100% であると考えられ、生体内のカプセルにて反射したエコー信号は、カプセルの濃度と相関があると予想されるためである。通常、輝度値は診断装置のゲイン調整等で簡単に変動する性質があるが、診断装置の設定を固定し、濃度変化に対する輝度変化が線形になる条件において、濃度変化の測定は可能⁽¹⁸⁾と考えられる。

図 5 に示すように分岐点から流路 A 側の下流寄りの位置に、前章と同様の周波数 1MHz の定在波を印加した状態で、矢印の方向に 100 (mm/s) でカプセル懸濁液を流した。さらに下流の 2 流路の両方を断面方向に横切る y-z 平面的 B モード像を記録できるように超音波プローブを配置した。超音波診断装置は (株) 日立メディコ社製 EUB-565S、中心周波数 3.5 (MHz) のセクタ走査型プローブを

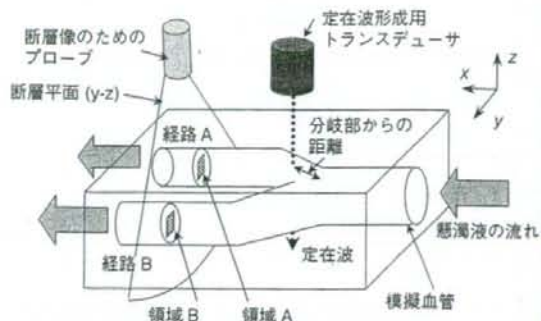


図5 分岐を有する模擬血管の構成と定在波・Bモード像の位置関係

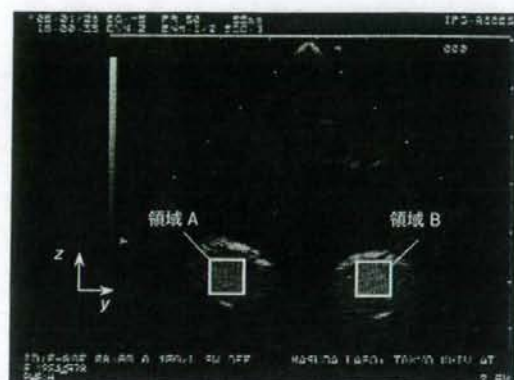


図6 分岐後の下流の B モード像と二つの輝度計測領域

使用した。Bモード像の PC への取り込みは、画像入力ボード (FLX-PCI, フォトロン) を介してフレームレートを 30fps でハードディスクに記録した。懸濁液を流した状態の B モード像を図 6 に示す。また B モード像上の任意に設定した領域の輝度平均値を算出するために、VisualC++ と DirectX9.0 を用いて開発したプログラム⁽²⁰⁾を利用した。懸濁液の流入後、5 秒間記録された B モード像において、 8×8 (mm²) の二つの計測領域 (ROI A, ROI B) を設定し、それらの輝度変化を計測した。ここで両領域の条件を同じにするため、B モード像上の両領域は同じ深さになるように配慮した。カプセル粒径および懸濁液の濃度はそれぞれ $63 \sim 75$ (μm)、 0.1 (g/L) とし、定在波の音圧を $110 \sim 150$ (kPa) の間で変化させた。

実験の結果、定在波の音圧の増加に伴い、ROI A の輝度が低下し、ROI B の輝度が上昇する傾向が見られた。また逆に流路 B 側に定在波を印加すると、逆の現象が見られた。A・B それぞれの流路に定在波を印加した場合、定在波の音圧に対する ROI A と ROI B の輝度平均値の差 (ROI B - ROI A) を図 7 に示す。これより、定在波の音圧の上昇とともに、下流の両領域のカプセル濃度差が増加することが明らかとなった。これは前章の結果で見られたように、定在波の影響でカプセルが捕そくされて流入しにくい状況が生じ、定在波の上流側で濃度が高くなったカプセルの一部

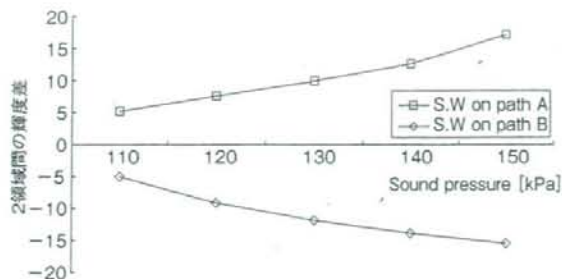


図7 定在波の音圧に対する下流領域の輝度平均値の比較

が反対側の経路に流れ込んだものと考えられる。このことから模擬血管中に定在波を形成することによって、分岐部におけるカプセルを誘導できることが示された。

図7の結果、音圧140~150 (kPa) の場合は模擬血管の分岐後の二つの下流領域で輝度差が10~15程度見られ、これを輝度-カプセル濃度の関係⁽¹⁷⁾から推測すると、濃度差は2~3倍であると考えられる。カプセルが途中で失われていることは考えられないため、本実験では分岐前の0.1 (g/L) のカプセルのうち、最大で0.05 (g/L) 程度が本来流れるはずの経路を外れて別の経路に誘導されたと考えられる。

5. 考察

本論文ではカプセルの都合上、粒径が血球レベルより大きいものを使用した。一般に粒径が小さくなるとカプセルの捕そく力も小さくなるが、流体から受ける抗力も小さくなる。直径 D の球体が一次元の流れによって受ける抗力 F_d は、流体の粘性係数を ν 、流速を u とすると次式で表される。

$$F_d = 3\pi D\nu u \quad (2)$$

これに対して、音波による捕そく力はカプセルの体積に比例するため、粒径が小さくなれば式(2)の流体の抗力に比べて、式(1)で示した音波による捕そく力が圧倒的に小さくなり、本論文で示したカプセル粒径の5分の一程度の血球レベルになれば、同じ定在波でも捕そく力は100分の一程度になる。本論文で述べた抗力と捕そく力はその向きが直交するため、単純な比較はできないが、捕そくできる流速の限界は数 (mm/s) になると予想できる。これは末梢血管の血流速度に相当するため、血球レベルのカプセルにて実験を行う場合は模擬血管の形状を含めた流路システムを再考する必要がある。

6. まとめ

本研究では、マイクロカプセルを使用した超音波 DDS の実現のため、生体外からのモニタリング方法およびカプセル濃度制御の可能性を示した。まず流路中に作成した定在波によって、一次元的な流れを有するカプセル懸濁液の

局所的な濃度変化を確認した。また分岐を有する流路に定在波を照射することによって、カプセルの濃度を調整できる可能性を示した。マイクロカプセルの濃度を効率よく制御するためには、最適なカプセル粒径、超音波の周波数、音圧の条件を見つけ出す必要がある。また、人体に用いることを考えるとできるだけ低音圧であることが望ましい。今後さまざまな条件を整備し、より生体に近い条件の実験環境を用いて、さらに高い効率で局所的なカプセルの濃度変化を生じる方法の検討とそのモニタリング方法の改善を行う予定である。

(原稿受付 2007年12月25日)

●文献

- (1) 横田 充, ドラッグデリバリスシステム-創薬と治療への新たな挑戦-, (1995), 化学同人.
- (2) Watanabe, M., Chihara, K., Shirae, K., Ishihara, K. and Kitabatake, A., Pressure Measurement Using Ultra sonic Resonance of Microcapsules, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **30**-Suppl1 (1991), 241-243.
- (3) 石原 謙, 共振超音波を用いた含気マイクロカプセル DDS の計測と制御, *BME*, **6**-1 (1992), 45-52.
- (4) 山田正敏・田畑泰彦, 超音波と DDS を組み合わせたがん治療法, *生体医工学*, **43**-2 (2005), 238-246.
- (5) Whateley, T.L., *Microcapsulation of Drugs*, (1992), Harwood Academic Publishers.
- (6) 工藤信樹・栗林香織・名取道也・森安史典・山本克之, 超音波照射下における微小気泡の振舞いの高速カメラによる観察, *電子情報通信学会誌*, **J84A**-12 (2001), 1492-1499.
- (7) Yamakoshi, Y., Ozawa, Y., Ida, M. and Masuda, N., Effects of Bjerknes Forces on Gas-Filled Microbubble Trapping by Ultrasonic Waves, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **40**-5B (2001), 3852-3855.
- (8) Koyama, D., Klyan, W. and Watanabe, Y., Optical Observation of Microcapsule Destruction in an Acoustic Standing Wave, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43**-5B (2004), 3215-3219.
- (9) 石松憲和・玉川雅章・山野井一郎, 衝撃波 DDS カプセルの開発とその設計法について, *生体医工学*, **43**-4 (2005), 730-737.
- (10) 立花克郎, マイクロバブルの治療応用, *生体医工学*, **43**-2 (2005), 211-215.
- (11) 工藤信樹・山本克之, 微小気泡存在下におけるパルス超音波を用いたソノポレーション, *生体医工学*, **43**-2 (2005), 231-237.
- (12) Yamakoshi, Y. and Koganezawa, M., Bubble Manipulation by Self Organization of Bubbles inside Ultrasonic Wave, *Jap. J. Appl. Phys.*, **44**-6B (2005), 4583-4587.
- (13) 竹内正男, 微小物体の超音波マニピュレーション, *日本音響学会誌*, **52**-3 (1996), 203-209.
- (14) Masudo, T., Okada T., Ultrasonic Radiation - Novel Principle for Microparticle Separation, *Analytical Science*, **17**-Suppl. (2004), 11341-11344.
- (15) Minnaert, M., On Musical Air-Bubbles and the Sound of Running Water, *Phil Mag*, **16** (1933), 235-248.
- (16) 清部一行・秋山剛生・樹田晃司・石原 謙, 水中に捕そくされたマイクロカプセルの破壊方法と破壊率の検討, 第44回日本生体医工学学会大会論文集, (2005-4), 296.
- (17) 樹田晃司・村松悠佑・清部一行・石原 謙, 超音波定在波の印加による流路中のマイクロカプセルの局所的濃度制御とその観測, *生体医工学*, **46**-2 (2008), 印刷中.
- (18) Muramatsu, Y., Masuda, K., Ueda, S. and Ishihara, K., Observation of Microcapsules Behavior by Producing Acoustic Standing Wave at the Bifurcated Flow, 第28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講演論文集, (2007-11), 407-408.
- (19) 山田 聡・小室 薫・谷口麻里子・浦西歩美・小松博史・浅沼俊彦・石蔵文信・小野塚久夫・三神大世・筒井裕之・別府慎太郎, 低音圧コントラストエコー法による超音波造影剤濃度の定量に関する基礎的検討, *超音波医学*, **33**-6 (2006), 665-671.
- (20) 清部一行・樹田晃司・石原 謙, 超音波ビーム照射によるマイクロカプセル破壊効率の B モード像の動画像処理による推定, 第25回超音波シンポジウム講演論文集, (2004-11), 413-414.

Active path selection of fluid microcapsules by acoustic radiation force in the artificial blood vessel

Y. Muramatsu¹, S. Ueda¹, R. Nakamoto¹, Y. Nakayashiki¹, K. Masuda¹, K. Ishihara²

¹ Graduate School of BASE, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan

² School of Medicine, Ehime University, Ehime, Japan

Abstract— Microcapsules of μm order collapse themselves after ultrasound emission. Recently, this technique attracts attention to apply to the gene delivery because virus vector is not necessary. However, it has been limitation to enhance the efficiency of medication because capsules suspension diffuses after the injection, where motion of capsules in blood flow cannot be controlled. To affect behavior of microcapsules, acoustic radiation force was introduced. Then we have detected the local change of microcapsules density by producing acoustic radiation force in the artificial blood vessel. Furthermore, we estimated theoretically condition for active path selection of capsules at the bifurcation in the artificial blood vessel. We observed the difference of density in capsules according to the acoustic radiation force and the produced point. Comparing the experimental results with theoretical equations, the condition for active path selection is calculated from acoustic radiation force and fluid resistance of capsules. It showed a possibility to control capsules direction and to lead to an objective point in blood vessel.

Keywords— drug delivery system, microcapsules, acoustic radiation force, active path selection, artificial blood vessel

I. INTRODUCTION

Making use of the phenomena that microcapsules or microbubble of μm order collapse themselves after ultrasound emission near their resonant frequency, physical DDS (Drug Delivery System) has been proposed[1-3]. To minimize the side effect of medication, drug should affect to the target area, not to other parts inside human body. Though recent mainstream of research in DDS is focused on the gene transduction by using gene vector, it takes time and cost for development. The microcapsules, which can contain the specified drug inside the shell, have the possibility to correspond to various kinds of medications. Also the feature to use the microcapsules is that both the detection and the actuation of capsules are possible by ultrasound. The distribution of capsules inside the body is easily recognized by echogram (B-mode image) because the

brightness of echogram varies according to the density of capsules. We have developed the software to detect local change of density in capsules as the brightness variation on echogram[4]. Fig.1 shows a microscopic image of microcapsules F-80E (Matsumoto Oil Co. Ltd, Japan), which we have used.



Fig.1 Microscopic image of microcapsules F-80E

However, because of the diffusion of capsules after injection, it was difficult to enhance the efficiency of medication. If the behavior of capsules can be controlled, the amount of drug would be minimum. Then we have noticed that microbubble aggregates in water by the effect of Bjerknes force[5], which is produced by pressure gradient of ultrasound and the oscillation of diameter in microbubble. Since the oscillation in microcapsule is smaller than in microbubble, because of the shell, a microcapsule is thought to receive the acoustic radiation force to be pushed out with acoustic propagation. In this paper we describe our attempt for active path selection of microcapsules in an artificial blood vessel by acoustic radiation force.

II. THEORY

In general, an object under the ultrasound emission receives the acoustic radiation force[6] according to its volume as the equation (1).

$$F = \langle -\nabla p \cdot V \rangle \quad (1)$$

Assuming the shape of a microcapsule as sphere, the acoustic radiation force[7] acts to push the capsules to the direction of acoustic propagation as the following equation

$$F_{ac} = \frac{4}{3} \pi R_0^3 A \frac{P^2}{\rho c^2} \quad (2)$$

where R_0 is the average of radius in capsules, P is sound pressure, ρ is density of medium and A is constant number, respectively.

On the other hand, when the microcapsules are put in flow, a capsule should receive the flow resistant F_d as the following equation

$$F_d = 6 \pi R_0 \mu u_r \quad (3)$$

where u_r is the velocity caused by acoustic radiation force and μ is viscosity coefficient of surroundings, respectively.

Thus, if ultrasound is emitted to a microcapsule in flow, and the acoustic radiation force is greater than the flow resistant, the trajectory of a capsule would be curved as shown in Fig.2.

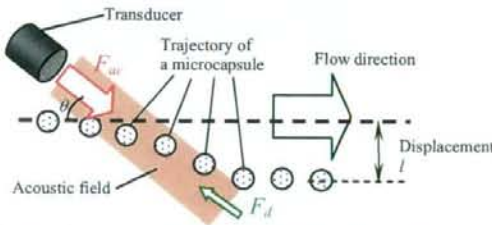


Fig.2 Trajectory of a microcapsule in flow under ultrasound emission.

While the microcapsules pass through the acoustic field, where sound pressure is higher than other area, capsules are pushed away from the original course. Then the displacement in Fig.2 should be calculated as equation (4), where m is weight of a capsule.

$$l = \int \int \frac{(F_{ac} - F_d) \sin \theta}{m} dt dt \quad (4)$$

III. EXPERIMENTS

Observation of capsules behavior

We used above-mentioned microcapsule F-80E which shell is made of PVC (polyvinyl chloride) with specific gravity as 0.0225 and average of diameter as 99.2 [μm]. We sieved it as the range of diameter is from 65 to 73 [μm]

because of the limitation of magnification in the microscope. Of course though the size of capsules is not used to be applied *in vivo*, it is important to confirm the fundamental behavior of capsules before minimizing the size of capsules.

Also we have prepared the artificial blood vessel, which is made of PEG (polyethylene glycol), including the Y-form bifurcation as the schematic view shown in Fig.3. The external size is 50x80x10 [mm] and the inner diameter of the path is 2 [mm]. By using an inverted microscope (DMRIB, Leica, Germany), optical image of observed area in Fig.3 is recorded.

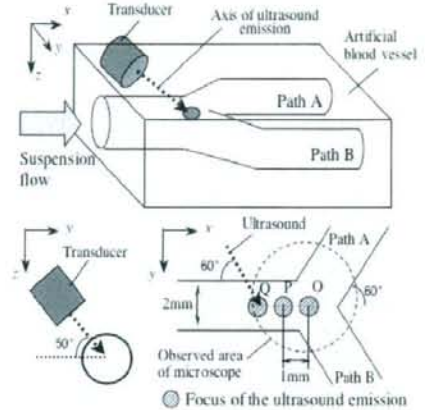


Fig.3 Schematic view of the artificial blood vessel.

The axis of the transducer is set 50 [deg] to x - y plane and 60 [deg] to y - z plane as shown in Fig.3. Focused ultrasound is emitted by amplifying sinusoidal signal of 1 [MHz] to the amplitude 160 [kPa] at a point indicated in Fig.3. Defining the point O as the intersection of three paths, the points P and Q indicate 1 and 2 [mm] upper point from O, respectively. We observed the behavior of capsules at the bifurcation shown in Fig.3 after the injection of capsules suspension with flow velocity of 100 [mm/s]. When ultrasound was emitted, more capsules flew through path B rather than path A where no significant difference was observed without ultrasound emission. Fig.4 shows the comparison of microscopic images of the observed area before and after capsules suspension was injected with focused ultrasound at point Q. Since amount of capsules were observed as shadow, the possibility for active path selection of capsules was indicated. Here we have to mention that we have confirmed the capsules are not destroyed by ultrasound specified above since the frequency of the ultrasound is far from the resonant frequency of capsules.

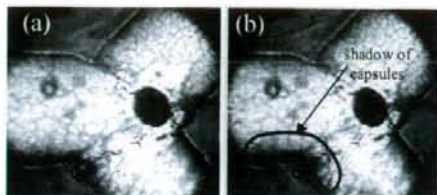


Fig.4 Comparison of microscopic images of the observed area, (a) before and (b) after injection of capsules suspension with focused ultrasound at the point Q.

Quantitative evaluation of path selection

To evaluate the amount of capsules which passes through each path, we have extended two lower courses by using semi-transparent tube and established the observed area which includes them in the same view as shown in Fig.5.

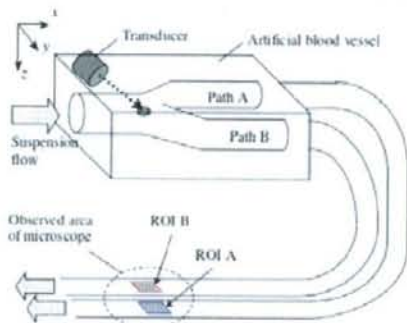


Fig.5 Observed area to evaluate amount of capsules in each path.

Fig.6 shows microscopic images of the area, which are captured by using high-speed camera Phantom-V4.2 (Nobitec Co. Ltd, Japan) with interval time as 2 [ms], after injection of capsules suspension with the same condition to Fig.4. Individual microcapsules can be distinguished.

To measure the capsules amount, we established two square regions of interest in each course (ROI A, ROI B) and calculated the brightness average. The brightness in a region decreases according to the number of capsules inside. Thus we defined the shadow index as the following equation to evaluate the amount of capsules in the ROI.

$$\text{shadow index} = \text{REF} - \frac{\sum_{x=0}^m \sum_{y=0}^n f(x,y)}{S} \quad (5)$$

where f is brightness of the ROI, REF is brightness average without capsules and S is area of the ROI. Then we have confirmed the relation between shadow index and capsules density. Capsules suspension passed through the ROI

without ultrasound and calculated the average of shadow index for 15 [frames] (duration 30 [ms]) for various flow velocities. As the result shown in Fig.7, using the density in capsules as 0.15-0.25 [g/L], significant change of density can be detected.

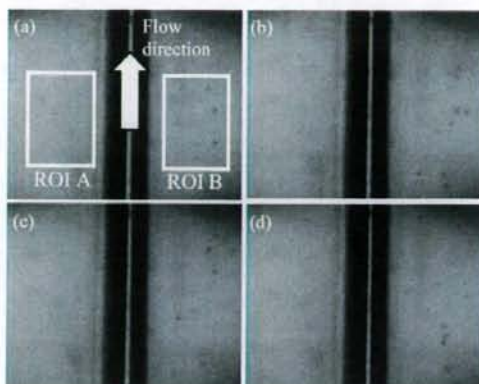


Fig.6 Time series images of the observed area by 500 [fps] after injection of capsules suspension with ultrasound emission.

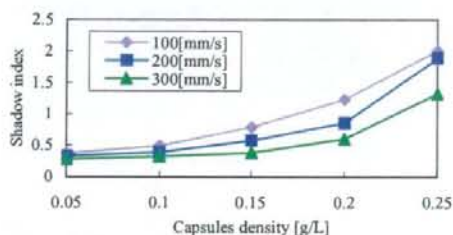


Fig.7 Shadow index versus capsules density.

IV. RESULTS AND DISCUSSION

We measured the shadow indices in two ROIs under emission of sinusoidal ultrasound with frequency as 1 [MHz], flow velocity as 150 [mm/s] and capsules density as 0.2 [g/L], where ultrasound was focused at points O, P, Q shown in Fig.3. Fig.8 shows the value of shadow indices versus sound pressure at the focused point Q. When sound pressure is less than 120 [kPa], there was no difference between two ROIs. However, the value of shadow index in ROI B increased in proportion to the sound pressure more than 140 [kPa]. More than 90 [%] of capsules were introduced to path B when the sound pressure is more than 160 [kPa]. On the other hand, there was no significant difference between two ROIs with the focused point at O

and sound pressure of 160 [kPa]. Thus ultrasound should be focused at upper point than the bifurcation to realize active path selection of capsules.

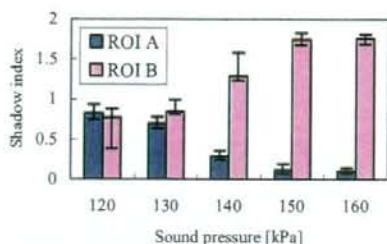


Fig.8 Shadow indices in two ROIs versus sound pressure with focused ultrasound of 1 [MHz] at the point Q and flow velocity as 150[mm/s].

Next we also measured the shadow indices in two ROIs in various flow velocities. Focused ultrasound was emitted at the point Q shown in Fig.3 with frequency of sinusoidal ultrasound as 1 [MHz], sound pressure as 160 [kPa] and capsules density as 0.2 [g/L]. Fig.9 shows the value of shadow indices versus flow velocity. The difference of them decreased in proportion to the flow velocity. When flow velocity is more than 200 [mm/s], active path selection was not functioned because the capsules passed through the acoustic field without receiving enough acoustic radiation force in the acoustic field.

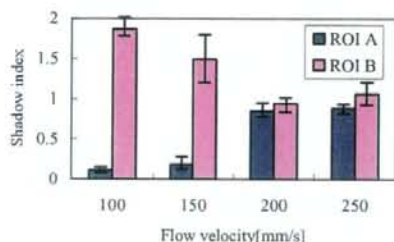


Fig.9 Shadow indices in two ROIs versus flow velocity with focused ultrasound of 1 [MHz] at the point Q and sound pressure as 160[kPa].

From those results, conditions of sound pressure, focused point and flow velocity should be considered to realize active path selection of microcapsules at a bifurcation point. In the experiments in this paper, diameter of the path is 2 [mm] so that at least 1 [mm] of displacement in a microcapsule is necessary from the beginning of the acoustic field to the bifurcation as shown in Fig.2. Then we calculated displacement of a microcapsule using equation (4) by assuming width of the acoustic field as 3 [mm] from the half width of the maximum sound pressure. Fig.10

shows the calculated displacement using equation (4) under the condition of Fig.8. In proportion to the sound pressure, the displacement increases, which value is equivalent to the size of the path. For further analysis, precise condition to realize active path selection should be elucidated.

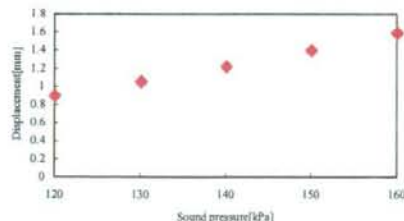


Fig.10 Calculated displacement of a microcapsule under the condition of Fig.8.

V. CONCLUSIONS

In this study, we have experimented and considered to realize active path selection of microcapsules at a bifurcation of the artificial blood vessel. We are going to apply the experiment by varying other parameters and to investigate the mechanism of this phenomena.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by Ono Acoustic Research Fund, Japan.

REFERENCES

1. M. Watanabe, K. Chihara, K. Shirai, K. Ishihara and A. Kitabatake : Jpn. J. Appl. Phys. 30-Suppl1, (1991) 241-243.
2. D. Koyama, W. Kiyan and Y. Watanabe : Jpn. J. Appl. Phys. 43 (2004) 3215-3219.
3. K. Okada, N. Kudo, K. Niwa and K. Yamamoto : J. Med. Ultrason. 32 (2005) 3-11.
4. K. Masuda and K. Ishihara : Proc. of Int. Symp. on Ultras. Contrast Imaging (1999) 120
5. H. Mitome : Jpn. J. Appl. Phys. 40 (2001) 3484-3487.
6. T.G. Leighton, The Acoustic Bubble, academic press, (1994) 287-345.
7. T. Tuziuti, T. Kozuka and H. Mitome, Jpn. J. Appl. Phys. 38 (1999) 3297-3301.

- Author: Yusuke Muramatsu
- Institute: Tokyo University of Agriculture and Technology
- Street: Koganeishi Nakamathi
- City: Tokyo
- Country: Japan
- Email: masuda_k@cc.tuat.ac.jp

村松 悠佑¹, 上田 沢美¹, 榎田 晃司¹, 石原 謙²¹東京農工大学 生物システム応用科学府, ²愛媛大学 医学部

【はじめに】

超音波とマイクロカプセルを用いた DDS, ならびに遺伝子導入法に関する研究が盛んに行われている [1] [2]. 我々はこれまで, 血管分岐部において薬物を含むマイクロカプセルを体外から能動的に誘導することを目的とした流路選択法に関する研究を進めてきた. その結果, 分岐部に超音波を照射することにより, 下流領域に流れるカプセル量をコントロールできる可能性を示した [3]. 今回は分岐部においてカプセルに対して作用する音響放射力の理論的シミュレーションを, 光学的観測下の実験結果と併せて検討を行った.

【方法】

超音波透過性に優れる凝固剤ダイアエースーパー (菱見社製) を使用して 80×50×10mm 程度の大きさの外形に内径 2mm で 1:2 の分岐を有する模擬血管を作成した. この模擬血管の分岐部の軸断面を Fig.1 に示す. そして模擬血管の分岐地点に対して 1 個または 2 個の超音波トランスデューサを用いて様々な音場を形成した. 超音波の音圧・流路内の流速・カプセルサイズをパラメータとし, 分岐部におけるカプセルの挙動を倒立顕微鏡を用いて光学的に観測した. またカプセルに与える作用力と水流より受ける抗力の関係をシミュレーションにより算出し, 実験結果と比較した.

【結果】

流速を 100mm/s, 超音波の音圧を 160kPa にして流路中に音場を形成すると, Fig.2 のようにカプセルは群を成して回転しつつ捕捉される様子が観察された. また流速を一定とし音圧を 160kPa より下げていくと, 捕捉されるカプセルは減少し, 音圧 110kPa 程度では分岐部に捕捉されるカプセルは観察されなかった. この結果は音響放射力と流体の抗力とのつり合いを考

慮したシミュレーションにより, カプセルを捕捉できなくなる限界とがほぼ一致した. また分岐を有する流路に対して同様のシミュレーションを適用し, 検討した.

【まとめ】

超音波の音響放射力によって局所的にカプセル濃度を変化させ, 分岐を有する模擬血管においてカプセルを目的の流路へ誘導するための理論的検討を行った. 今後は血管径及びカプセルサイズに対応した適切なパラメータの検討を行う.

【参考文献】

- [1] 小川 他, 電子情報通信学会, Vol.J89-A, No.9 p.734-745(2006)
- [2] Yamakoshi et al, JJAP, Vol.43, No. 5B, p3210-3214(2004)
- [3] Muramatsu et al, Proc. of USE Sympo Vol.28, p.407-408 (2007)

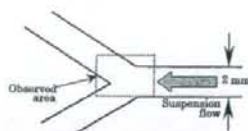


Fig.1 Horizontal cross section of the phantom

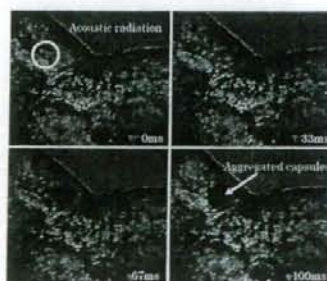


Fig.2 Observation of capsules aggregation

Study of influence in acoustic radiation force to fluid microcapsules in blood vessel

Yusuke MURAMATSU¹, Sawami UEDA¹, Kohji MASUDA¹, Ken ISHIIHARA²¹Graduate School of BASE, Tokyo University of A and T, Tokyo, Japan,²School of Medicine Ehime, Ehime, Japan

マイクロカプセルの血管内局所的濃度変化のための音場形成法の検討

榎田 晃司¹, 村松 悠佑¹, 上田 沢美¹, 石原 謙²

東京農工大学¹ 愛媛大学²

Study of acoustic field production for local density variation of microcapsules in blood vessel

Masuda Kohji¹, Muramatsu Yusuke¹, Ueda Sawami¹, Ishihara Ken²

Tokyo Univ A&T¹ Ehime University²

1. はじめに

投薬効率の向上や副作用を低減する手段としてのドラッグデリバリーシステム(DDS)の研究では、現状では薬物に修飾基を合成させる等の化学的手法が主流であるが、開発に膨大な時間とコストがかかるという欠点がある。そこで薬剤を保持したマイクロカプセルによる物理的なDDSの研究が進められている。これまで、超音波の定在波を用いて流路を流れるマイクロカプセルの捕捉^[1]、超音波の照射によるカプセルの崩壊^[2]、さらには超音波音場内での気泡運動の観察や理論的考察^[3]、超音波断層像の輝度情報によるカプセル濃度の評価^[4]などが行われてきた。しかし体内に投与後の血流中のカプセルについて、目的部位への誘導法は十分に検討されていなかった。そこで我々は、分岐を有する模擬血管中に局所的な超音波音場を形成してカプセルに作用力を発生させ、任意の下流領域にカプセルを集積させる手法を検討してきた^[5]。本稿では超音波音場の強度や焦点領域、カプセル径や流速などの様々なパラメータに対して、カプセルの誘導効率を計測し、理論と比較した結果を述べる。

2. 模擬血管内でのカプセル捕捉実験

超音波透過性に優れたポリエチレングリコールを用いて、図1のように直方体の内部に内径2mmの直線の流路を形成して模擬血管(ファントム)とした。超音波照射下のカプセル挙動を観察するため、図1に示すように倒立顕微鏡(DMIRB, LEICA社製)のステージ上の水槽に模擬血管を沈め、ポンプとチューブを含む流路に接続した実験系を構築した^[6]。この実験系に粒径を65-73 μm に統一したカプセル懸濁液を通過させ、分岐部付近に中心周波数1MHzの収束型狭帯域超音波トランスデューサ(PA072, NTR社製)によって、局所的に超音波の定在波を形成した時の分岐部をビデオカメラによって撮影した。カプセルの共振周波数は約100kHzであり、超音波音場によってカプセルが崩壊する可能性は小さい。定在波は160kPaの正弦波、流速を100mm/sとした時のカプセルの挙動を図2の連続写真に示す。フレーム間隔は200msであり、カプセルが群を形成して回転しながら捕捉され、局所的な濃度変化が起きていることが確認できた。

また、図3に示すように内部に1:2のY字分岐を有する模擬血管を作成し、定在波を照射するトランスデューサの焦点位置を、分岐後の片方の下流側の Q_1 、 Q_2 、 Q_3 の3箇所とした。音圧と流速が図2と同条件の場合のカプセルの挙動を図4に示す。定在波の照射位置によって、凝集するカプセル

の量に変化が見られ(枠内)、さらに Q_1 の位置では捕捉されたカプセルが集合から離れる際に、もう一方の下流側に流れる現象を確認した。

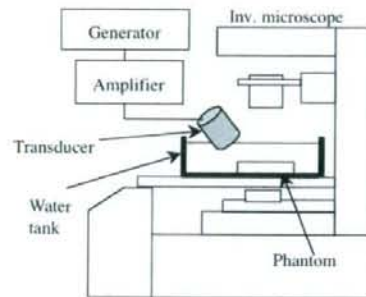


図1 Observation system

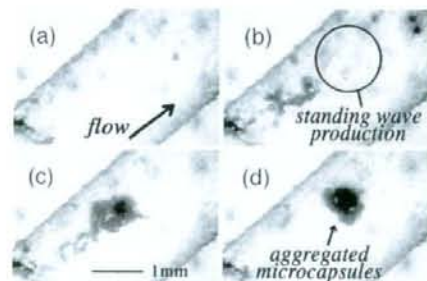


図2 Trapped capsules in the linear path

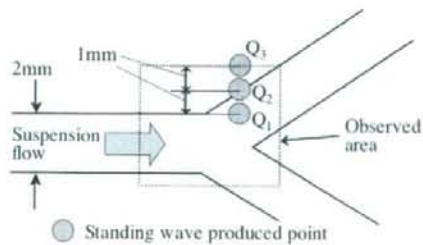


図3 Shape of bifurcation path

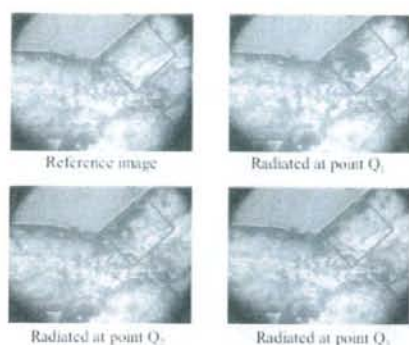


図4 Trapped capsules near the bifurcation

3. マイクロカプセルの分岐実験

上記の模擬血管を用いて、図5に示すように分岐後の流路A, Bに内径1mmの半透明なチューブを接続し、分岐後の下流300mmの地点で両方の下流領域A', B'が平行になるように配置し、ハイスピードカメラ(Phantom4.1, Nobby tech)で同一視野内を観測した。領域A', B'を通過するカプセルの計測には、撮影範囲内に同じ大きさの2つの関心領域を設定し、カプセルを流していない状態の関心領域内における輝度と比較した。カプセルの通過量に従って領域内に影ができて輝度値が低下するため、カプセルを流す前の各領域の輝度平均値と、カプセルが通過中の輝度平均値との差を計算し、1フレーム当たりのshadow index^[6]として定義した。この値が大きいほど、多くのカプセルが流れたことになる。

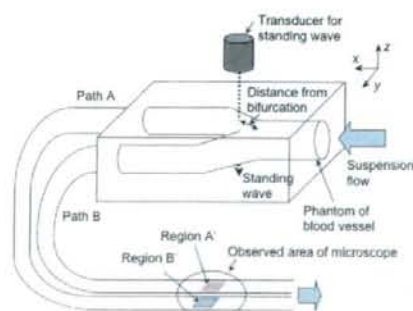


図5 Observation of the lower paths

定在波の照射位置を分岐部のA側に設定した場合は、領域B'側により多くのカプセルが流れた。これから、音圧と水流の流速を変化させて、領域A', B'のshadow indexを計算した。図6は流速を150mm/sとし音圧を変化させた場合、また図7では音圧を160kPaとし流速を変化させた場合の3回の試行の平均値で、カプセルが通過した15フレームで計測した。図6より、カプセルの誘導は超音波の音圧を上げれば効率が良いが、

120kPa以下ではカプセルが両方の流路を流れて誘導できていない。また図7より流速が遅ければカプセルを誘導できるが、300mm/s以上になると水流の抗力が上回っていることが伺える。

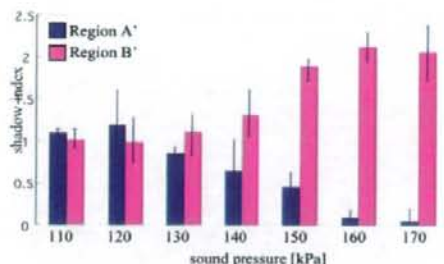


図6 Shadow index vs sound pressure

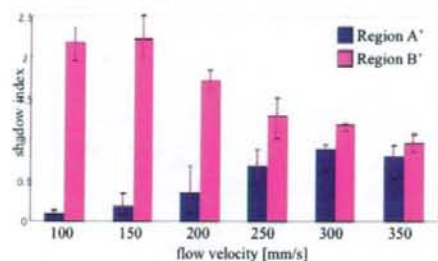


図7 Shadow index vs flow velocity

4. まとめ

本稿では超音波定在波の照射によって分岐部を流れるマイクロカプセルの誘導実験について述べた。今後は効率の良い誘導条件を数学的モデルを用いて確立することを目指す。

参考文献

- [1] Y.Yamakoshi et al. Effects of Bjerknes Forces on Gas-Filled Microbubble Trapping by Ultrasonic Waves. *Jpn. J. Appl. Phys.* 2001, 40, 5B, 3852-3855.
- [2] D.Koyama et al. Optical Observation of Microcapsule Destruction in an Acoustic Standing Wave. *Jpn. J. of Appl. Phys.* 2004, 43, 5B, 3215-3219.
- [3] 工藤ほか. 超音波照射下における微小気泡の振舞いの高速度カメラによる観察. *電子情報通信学会誌*, 2001, J-84A, 12, 1492-1499.
- [4] 梶田ほか. 超音波定在波の印加による流路中のマイクロカプセルの局所的濃度制御とその観測. *生体医工学*, 2008, 46, 2(印刷中).
- [5] Y.Muramatsu, et al. Observation of microcapsules behavior by producing acoustic standing wave at the bifurcated flow. *Proc. of USE Symp.*, 2007, 407-408.

O-24-4 生分解性ポリマーを用いた細胞クラスターの構築

宮本義孝¹, 湯川 博¹, 大石幸一¹, 野口洋文²,
林 衆治¹

¹名古屋大学 医学部 先端医療バイオロボティクス学講座,
²Baylor Institute for Immunology Research / Baylor All Saints Medical Center

【背景】近年、バイオポリマーを用いた細胞クラスター（三次元組織体）の構築技術が注目を集めている。その中でも、人工的に組織を作製するために、一番問題になるのが血管を含む複雑な三次元組織の構築である。実際、得られた組織体が大きくなるにつれて、中心部付近の酸素や栄養分の供給が低下し、壊死してしまう。したがって、三次元組織体の大きさと細胞内部の配向を精密に制御することは、長期間生理的機能を維持するのに必要不可欠である。我々は、現在までに、初代肝細胞を用いた肝スフェロイド（三次元組織体）の細胞数と密度を精密に制御することに成功している。さらに、本報告では、生分解ポリマーを利用し、長期培養することで、ポリマーが分解され、三次元組織体の血管形成化が促進されるかどうか検証した成果も併せて紹介する。

【方法】ウシ由来頸動脈正常血管内皮細胞株HHやヒト肝癌由来培養細胞株HepG2を、三次元培養基材上に播種し、数日間培養した。得られた細胞クラスターの形態観察、組織学評価、及び機能評価を行った。また、実験動物から分離した初代肝細胞を用いて、同様の実験を行った。

【結論と展望】本研究では、三次元培養基材上で、生分解性ポリマー含有細胞クラスターの形成に成功した。また、初代肝細胞を用いても、同様の結果が得られた。本技術を構築することで、三次元組織体内部の血管形成化を促進させ、再生・移植医療分野への応用が期待される。

W6-5. Improvement of Cryopreservation of Human and Rat Hepatocytes using Oligosaccharides and 3D Culture Matrix.

Yoshitaka Miyamoto¹, Satoshi Suzuki², Toshiaki Takezawa³, Takeshi Ikeya⁴, Shuji Hayashi⁵, and Shin Enosawa¹. ¹Department of Innovative Surgery, National Research Institute for Child Health and Development, ² Research Laboratories, HAB Research Organization, Ichikawa, Japan. ³ National Institute of Agrobiological Sciences, Ibaraki, Japan. ⁴ Photosensitive Materials Research Center, Toyo Gosei Co., LTD. Chiba, Japan. ⁵ Department of Advanced Medicine in Biotechnology and Robotics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

Liver diseases such as fulminant hepatitis, congenital metabolic abnormality, cirrhosis, etc are possible targets of regenerative medicine and hepatocyte transplantation will be a potent approach. For this medical treatment, quality of cells is a key factor. Although fresh cells are ideal, preservation, especially cryopreservation is indispensable for on-time supply and efficient use of spare cells. However, cryopreservation of hepatocytes is extremely difficult so far. Cryopreservation loses not only cell viability but also attaching capability that is crucial for cells to survive. To solve this problem, we improved the freezing medium, freezing environment and culture system of thawed cells.

Use of oligosaccharides with higher molecular weights resulted in greatest improvement in viability. Moreover, attachment and survival rates in plastic dishes were approximately 1.2 - 1.8 fold greater after freezing in the presence of di-, tri-, and tetrasaccharides. Human hepatocytes isolated from untransplantable liver showed the same tendency regarding viability. An insect-derived protein, sericin was also effective on the viability and survival of cryopreserved hepatocytes.

Next, we tried direct *in situ* cryopreservation of cells cultured on collagen vitrigel membranes. Collagen vitrigel membrane is a new type of collagen scaffold and suitable for 3D culture of various cells. The membrane on which hepatocytes were cultured was soaked in cryopreservation medium and stored frozen for from 1 week to 3 months. After thawing, the viability estimated by morphology and functional staining with calcein showed significant improvement in comparison to cells cryopreserved without the collagen vitrigel membrane. In addition, the method is also effective in the cryopreservation of mouse ES cells.

Finally, we introduce the effectiveness of cell array coculture system on the survival of hepatocytes damaged by cryopreservation. Cell array is featured by two technologies; micropatterning by polyethyleneglycol and coculture with endothelial HH cells (Otsuka et al ChemBioChem 2004). The former induces spheroid formation and the latter contributes to the maintenance of hepatocytes. We found that the cell array was highly effective on the culture of damaged hepatocytes by cryopreservation. In future, hepatocyte spheroids thus obtained will be a good option of cell transplantation.

In summary, the technologies demonstrated here will support regenerative medicine as a fundamental technology.

量子ドットを用いた幹細胞イメージング

1. 名古屋大学医学部先端医療バイオロボティクス学
2. 名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻
3. Baylor Institute for Immunology Research / Baylor All Saints Medical Center, Baylor Research Institute

湯川 博¹、鏡味幸真²、渡辺将生²、大石幸一¹、宮本義孝¹、加地範匡²、野口洋文³、馬場嘉信²、林 衆治¹

[目的]我々は移植した幹細胞をイメージングする技術の構築に向け、量子ドット (Quantum Dots : QDs)を用いて、これまで検討を進めてきている。量子ドットは蛍光寿命が長く、発光色が鮮明であることから、ナノ蛍光材料として注目され、現在では、ナノバイオテクノロジーの分野で非常に脚光を浴びている。今回、体性幹細胞のなかでも獲得が簡便で、その多機能性から注目を集めている脂肪組織由来幹細胞 (Adipose tissue-derived Stem Cells : ASCs) に対し、QDs を導入し、移植後の体内挙動を観察したので報告する。

[方法]マウス皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理により ASCs を得た。膜透過タンパク質として知られている R8 peptide を用いて、QDs を ASCs に導入し、導入後の ASCs の細胞毒性、増殖速度、及び幹細胞特性への影響等を検討した。その後、QDs 導入後の ASCs をマウスの皮下、及び尾静脈から移植し、Maestro (*in vivo* 蛍光撮影機器) を用いて、移植後の幹細胞の挙動を観察した。

[結果] *In vitro* の系において、QDs 単独では ASCs にほとんど導入されず、R8 peptide を混合させて用いることで QDs の導入が認められた。QDs が 16nM 以上の濃度では細胞毒性が認められた。細胞毒性が認められない 0.4nM の QDs の導入では、増殖速度に影響はなく、2 週間以上の蛍光発現を確認した。また、導入後の ASCs は脂肪・骨細胞に分化し、分化後の脂肪・骨細胞内でも QDs の蛍光を確認した。幹細胞特異性への影響は確認できなかった。マウスに対して QDs 導入後の ASCs (1×10^5 cells ~ 1×10^6 cells) を皮下及び尾静脈から移植し、移植後の ASCs について検証した。

[結語] 以上の結果から、量子ドットによる移植幹細胞イメージングは有用な方法であることが示唆された。

肝細胞凍結保存における保護剤の有用性

宮本義孝^{1,2}、鈴木聡³、寺本直純⁴、佐々木真宏⁵、林衆治²、絵野沢伸¹

1. 国立成育医療センター研究所 移植外科研究部
2. 名古屋大学 医学部 先端医療バイオロボティクス学寄附講座
3. (NPO) HAB 研究機構附属研究所
4. 千葉工業大学 工学部 生命環境科学科
5. セーレン株式会社 研究開発センター

【目的】細胞を長期間安定に保存するためには、凍結保護剤が重要な役割を担っている。その一例として、細胞膜保護作用を有し、水代替物質であるトレハロースは、凍結時におこる細胞障害（細胞内氷晶形成や脱水）を防ぐことが知られている。我々は、以前の報告で（第32回日本臓器保存生物医学会）、凍結保護剤として、オリゴ糖に着目し、凍結保存が難しい初代肝細胞への凍結保護効果と解凍後の生存率・接着率の改善について発表した。さらに、再生医療や細胞移植をより実現化するには、凍結保存過程での異種動物や生物由来物質の影響を排除する必要がある。そこで、本報告では、カイコ繭由来タンパク質であるセリシンに注目し、その凍結保存法について紹介する。

【方法】米国から HAB 研究機構に空輸された移植不適合肝（冷阻血時間約 40 時間前後）から、肝細胞を得た。基本凍結保存液として、DMEM と 10%DMSO を用い、保護剤として、セリシン（セーレン（株）製）やオリゴ糖を添加した。凍結は、プログラムフリーザーを用い、保存は液体窒素内に保管した。融解後、肝細胞の生存率を測定し、24 時間培養後、培養皿への肝細胞の生着率を評価した。また、示差走査熱量計（DSC）により、保存液組成の結晶化挙動を解析した。

【結果】新鮮ヒト肝細胞に 1%セリシンや 0.1M マルトースを添加して保存した場合、対照群と比べて、解凍後の生存率が約 1.4 倍高く、その生着率も約 2.3 倍高まった。また、凍結時の保存液組成の結晶化挙動は、高分子量のセリシン添加時と、低分子量のオリゴ糖添加時で、大きな差は見られなかった。

【結論】新鮮ヒト肝細胞の凍結保存に、オリゴ糖と同様に、セリシンは有効であることがわかった。

【謝辞】本研究は、ヒューマンサイエンス振興財団の政策創薬総合研究推進事業（KHD1027）、及び、財団法人日本科学協会の笹川科学研究助成によって実施したものである。

P-137 膵島移植のための磁性ナノ粒子を用いたMRI画像診断法に関する検討

名古屋大学大学院医学研究科 先端医療バイオロボティクス学¹、バイラー研究所²、名糖産業株式会社³
○大石 幸一¹、野口 洋文²、齋藤 弘明³、湯川 博¹、宮本 義孝¹、村瀬 勝俊³、林 衆治¹

【目的】膵島移植は1型糖尿病の新たな治療法として認知されつつあるが、移植後に定着する膵島には大幅な量的減少がみられる。定着した膵島の非侵襲的診断法として、磁気標識による核磁気共鳴イメージング(MRI)が有効な手法として期待される。今回、われわれは新規に開発した磁性ナノ粒子を細胞に標識する際の最適条件、及び標識方法を検討した。

【方法】膵島モデルとして、マウス膵β細胞株であるMIN6を使用し、磁性ナノ粒子の細胞への付着・取り込み量を核磁気共鳴(NMR)装置で測定した。各種磁性粒子の細胞標識の際の最適条件(温度、時間、粒子の標識量)、及び標識方法(細胞の培養用Flaskへの付着状態と浮遊状態)を検討した。

【成績】負に帯電した粒子では、細胞への付着・取り込みがほとんど確認されなかった。一方、正に帯電した磁性粒子(300 μg-Fe/1 × 10⁶ cells)を用いた場合、細胞活性の高くなる37℃では、粒子取り込み量は1.47 μg-Fe/1 × 10⁶ cellsであった。さらに、付着状態と浮遊状態での粒子標識方法を比較した結果、浮遊状態で粒子取り込み量の向上が確認された。粒子による細胞の死滅や細胞形態の異常などは確認されなかった。

【結語】以上の結果から、膵島モデルでは正に帯電した磁性粒子による標識が可能であり、膵島での有効性が示唆された。今後、膵島移植後のMRI画像診断法を用いた経過観察について検討していく予定である。