

# 博士学位論文審査要旨

2023年7月12日

論文題目： 超音波照射下における Pluronic F-68 バブルの振動特性と安定性

学位申請者： 田畑 拓

審査委員：

主査： 理工学研究科 教授 松川 真美

副査： 理工学研究科 教授 小山 大介

副査： 生命医科学研究科 准教授 貞包 浩一朗

要 旨：

本論文では次世代の超音波画像診断用の造影剤の膜材質として有望な Pluronic F-68 に着目し、マイクロバブル表面の膜を構成する分子の状態と膜の粘弾性、また超音波照射時のバブルの振動特性に着目している。

まず、バブル表面の気液界面における Pluronic F-68 分子の吸着動態を検討した。濃度により界面の Pluronic F-68 分子は吸着形状が異なり、2段階の変化を経て高濃度では界面の分子が飽和状態に達することを確認した。またレーザードップラー振動計を組み込んだバブル挙動の光学観測システムを構築し、径が大きい場合、超音波照射時のシングルバブルの振動特性がほぼ濃度に依存しないことを確認した。

また 10  $\mu\text{m}$  以下の微小バブルの懸濁液にパルス超音波を照射し、その伝搬減衰からバブルの振動特性と膜の粘弾性を検討した。実験結果と理論モデルから膜の粘弾性を推定し、吸着分子が飽和した状態では、膜の粘性と弾性はそれぞれ飽和前の約 3 倍と約 40 倍に増加することを見出した。この急激な増加は膜が液相からゲル相に状態変化した可能性を示唆している。

バブルの実用化を念頭に、超音波照射や膜界面の分子の吸着状態がバブルの安定性に与える影響も実験的に検討した。Pluronic F-68 濃度の増加に伴いバブルの安定性は向上し、共振時のバブルの収縮も低減された。高濃度な膜で表面張力が低下すること、内部気体の拡散が抑制することが安定性の向上に寄与したものと考えられる。

本論文では Pluronic F-68 を用いたバブル表面の膜構成分子の密度や配向、膜の粘弾性や超音波照射によるバブルの振動特性など基礎物性を明らかにした。また、分子密度が高い場合には Pluronic F-68 バブルの長寿命化が実現できることを示し、臨床応用への可能性も見出している。

よって、本論文は、博士（工学）（同志社大学）の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

## 総合試験結果の要旨

2023年7月12日

論文題目： 超音波照射下における Pluronic F-68 バブルの振動特性と安定性

学位申請者： 田畑 拓

審査委員：

主査： 理工学研究科 教授 松川 真美

副査： 理工学研究科 教授 小山 大介

副査： 生命医科学研究科 准教授 貞包 浩一郎

要 旨：

本論文の提出者は同志社大学大学院生命医科学研究科生命医科学専攻博士課程前期課程を2014年3月に修了し、2017年4月に本学大学院理工学研究科電気電子工学専攻博士課程後期課程に入学し、現在在籍中である。

本論文の主たる内容は *Langmuir*, Vol. 35, pp.11322-11329 (2019)と *Langmuir*, Vol. 39, pp.433-441 (2022)に掲載済みであり、すでに十分な評価を得ている。2023年7月12日午後3時より2時間にわたり、提出論文に関する博士論文公聴会が開かれた。講演後には種々の質疑が行われたが、提出者の説明により十分な理解が得られた。また、公聴会終了後、審査委員による学力確認のための口頭試験を実施したところ、論文提出者の十分な学力を確認することができた。上記の論文に加えて、提出者は第一著者として国際会議で2件の英語の発表を行ったうえ、語学試験にも合格しており、高い英語能力を有するものと認められる。以上より、本論文の提出者の専門分野における学力ならびに語学力は十分であることが確認された。よって総合試験の結果は合格と認める。

# 博士學位論文要旨

論文題目： 超音波照射下における Pluronic F-68 バブルの振動特性と安定性

氏名： 田畑 拓

要旨：

マイクロバブルは超音波画像の診断能力を高める造影剤として使用される。その利用は肝がん患者の治療では切除部位決定のプロセスのゴールドスタンダードとみなされている。このバブルによる造影効果の大きな特長として二点が挙げられる。一つ目は内部気体の音響インピーダンスが周囲液体と比べて低いために生じる超音波の強い反射である。二つ目は、液中のバブルに超音波を照射するとバブルが球形振動を行うことによる超音波の再放射である。この再放射された超音波を受信することで、組織ではないバブル固有の情報を解析することが可能となり、画像のコントラストを高めることができる。

この超音波照射によるバブルの振動は造影目的のみならず、ドラッグデリバリーシステム (DDS) にも応用されている。近年は、超音波とバブルを組み合わせた DDS の応用事例として、脳を標的とした治療法が注目されている。きわめて重要な臓器である脳は他の臓器にはない保護機能が備わっている。その一つが血液脳関門 (Blood-Brain Barrier: BBB) と呼ばれる脳血管の機能で、血中の有害物質から脳を保護する役割をもつ。しかし、これにより有害物質と同様に薬物も血管内から脳細胞へと侵入することはできない。そこで脳内細胞に効率的に薬物を注入するために、超音波とバブルを組み合わせた DDS が期待されている。血管内皮付近のバブルが収縮すると、周囲血液によって細胞表面にせん断応力が加わり細胞膜が局所的にバブルに引き寄せられる。拡張時には、バブルによって細胞膜が押し出される。この機械的なストレスにより瞬時的に修復可能な微小孔が形成される。血管内の薬剤がこの微小孔を通過して脳細胞へ浸透し、薬物の血管透過性が一時的に亢進する。しかし、BBB を含め、バブルを応用した超音波技術を改善あるいは実現するには、液中バブルの振動挙動の解明が必須である。また、用いるバブルは長時間にわたり安定して体内に存在しなければならない。

Rayleigh-Plesset 方程式を拡張したバブルの振動モデルでは、バブルの表面膜の粘弾性が振動挙動に影響を与えることが指摘されている。実際、リン脂質バブルなどを対象に、理論的なモデルを実験結果に適用することにより、膜の粘弾性を推定でき、脂質膜の脂肪酸の長さの影響や補助界面活性剤の影響なども検討されている。しかしこれらは、マクロな視点の研究であり、バブル表面に吸着した分子の密度や配向などのミクロな膜の状態と、膜の粘弾性や超音波照射時のバブルの振動特性の関係を検討した報告は見当たらない。また、超音波照射がバブルの安定性に与える影響は、理論モデルも存在せず詳細な検討が必要である。そこで本論文では、膜材質として有望な Pluronic F-68 を用いたバブルを作成し、マイクロバブル表面の膜を構成する分子の状態と膜の粘弾性や超音波照射によるバブルの振動特性との関係を実験的に明らかにする。加えて、超音波照射によるバブルの振動挙動がバブルの安定性に与える影響についても実験的に検討する。

本論文の第1章では、超音波画像の造影剤としてバブルが適応される臨床症例や、今後実現が期待されている超音波とバブル技術を融合した DDS が応用できる疾患について述べた。

第2章では、バブルの利用によって得られる超音波診断画像の造影効果や、DDS において、超音波照射によりバブルの振動が血管透過性を亢進させるメカニズムについて述べた。

第3章ではバブル表面のミクロな膜状態を検討するために、気液界面における Pluronic F-68 分子の吸着動態を観測した。Pluronic F-68 は両親媒性を持つため、水溶液中に放出した気体の気液界面に Pluronic F-68 分子が吸着し、膜を自己組織化する。この吸着動態は膜を構成する分子の種類や濃度、温度などに影響される。本実験では、 $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  の濃度範囲で Pluronic F-68 濃度の水溶液を用意し、界面における分子吸着の濃度特性を評価した。上述の濃度範囲に分子の配向が二回変化することを確認した。Pluronic F-68 は polypropylene oxide 鎖(PPO)を中心に、polyethylene oxide 鎖(PEO)を両端に持つ。 $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  以下の濃度では、Pluronic F-68 分子を構成する PPO と PEO が気体に対して平行に吸着する。 $2 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  の濃度では、中央の PPO は気体に平行であるが、PPO の両端で分子は緩やかに屈曲し両端の PEO は親水性であるため液相に位置する。 $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  以降の濃度では、PPO の両端で分子はより強く屈曲する。このように分子の吸着状態が変わると、高い分子密度で界面に吸着できる。さらに濃度を高めると界面の分子は飽和状態に達することが確認された。

第4章では、二つの実験系を使い粒径分布の異なる Pluronic F-68 バブルの超音波照射時の振動特性を測定しバブル表面の膜の粘弾性を推定した。まずレーザードップラー振動計を組み込んだ光学観測システムを構築し、単一の Pluronic F-68 バブルの超音波照射による振動挙動を観測した。 $0 \sim 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  の濃度範囲で Pluronic F-68 バブルを作成し、粒径分布が  $20 \sim 150 \mu\text{m}$  であることを確認した。臨床で使用されるバブルでは周囲膜の粘性や弾性によって、超音波照射時の振動振幅や共振周波数が影響を受ける。しかし、本実験では Pluronic F-68 濃度に依らず、超音波照射時の振動特性はほぼ一定であった。Sakar らの理論モデルにおいて共振周波数は、バブル表面膜の弾性、表面張力、周囲の圧力によって決まり、振動振幅はバブル表面膜の粘性、バブルの振動による音波の再放射、周囲液体の粘性、熱伝導によるエネルギー損失で決まることが報告されている。これらのうち共振周波数と振動振幅を決める支配的なパラメータはバブルの粒径による。Sonazoid®など臨床で利用されるバブルの径は  $10 \mu\text{m}$  以下であるが、本実験ではバブル径は比較的大きかった。従って、バブル径が大きい場合には粘弾性が振動挙動に及ぼす影響が小さいことが見出された。

次に、 $10 \mu\text{m}$  以下のバブルが多数含まれる懸濁液にパルス超音波を照射し、超音波の伝搬減衰からバブルの振動特性と膜の粘弾性を推定した。バブルは  $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  の Pluronic F-68 濃度で作成した。Pluronic F-68 濃度の増加に伴い、バブルの共振周波数は高周波にシフトし振動振幅は抑制された。特に、界面に吸着している分子が飽和した状態でその変化は顕著であった。理論モデルを用いて振動特性を解析し膜の粘弾性を推定した結果、吸着分子が飽和した状態では、その濃度以下と比較し膜の粘性と弾性はそれぞれ約3倍と約40倍に増加した。この粘弾性の急激な増加はバブルの周囲膜が液相からゲル相に状態変化した可能性を示唆している。

第5章では、超音波照射がバブルの安定性に与える影響を検討した。液中のバブルの安定性については、すでに気体の拡散方程式を利用した自由気泡のモデルに、周囲膜による拡散抑制を考慮した理論が構築されている。ただしこの理論ではバブルへの超音波照射は想定されていない。一方で、超音波照射により周囲膜をもつ液中バブルが不安定になり、寿命が短くなることも実験的に知られている。しかしながらこれまでの研究の多くはバブルが多数含まれる懸濁液に超音波を照射した実験の結果であり、単一バブルの挙動を詳細に検討した研究はない。本実験では上述の光学観測システムを利用し、単一バブルの経時的な体積変化を測定することで超音波照射や膜界面の分子の吸着状態がバブルの安定性に与える影響を実験的に検討した。バブル作成時の Pluronic F-68 の濃度は  $0 \sim 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  であった。結果では、超音波照射時のバブルの体積は、バブルの共振径付近で顕著に減少した。これは振動によりバブル内部の圧力が変動し、内部気体の放出が促進されたものと考えられる。また Pluronic F-68 濃度の増加に伴いバブルの安定性は向上し、共振径付近のバブルの収縮も低減された。これは膜内で分子が高密度に吸着したために、表面張力が低下したことや内部気体の拡散を抑制したことが安定性の向上に寄与したものと考

えられる。

第6章では、本論文全体を総括した。本研究では、Pluronic F-68 を用いたバブル表面の膜構成分子の密度や配向と、膜の粘弾性や超音波照射によるバブルの振動特性の関係を検討した。バブル表面に吸着する膜分子が飽和状態に達すると膜が液相からゲル相に状態変化を起こすことが示唆され、振動特性に強く影響した。加えて、超音波照射がバブルの安定性に与える影響を単一バブルの体積変化を観測することで検討した。振動振幅が最大となる共振径付近でバブルの体積は顕著に収縮する一方、バブル表面に吸着する分子の密度が高めることでバブルは長寿命化し安定性が向上することがわかった。Pluronic F-68 バブルの長寿命化を実現できると、臨床応用の可能性が大きく高まる。