

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

令和5年6月

同志社大学 大学院 理工学研究科

田畑 拓

目次

記号表

1	序論	1
1.1	背景	1
1.2	本文の概略	3
2	バブルの医療応用	6
2.1	緒言	6
2.2	医療超音波画像とマイクロバブル	6
2.2.1	医療超音波診断装置の画像化技術	6
2.2.2	マイクロバブルの造影効果	9
2.3	ドラッグデリバリーシステムへの応用	11
2.3.1	超音波とバブルを組み合わせたドラッグデリバリーシステムとその効果	12
2.3.2	動物や人を対象とした USDDS の臨床研究結果	13
2.4	バブルの構造と振動・溶解特性	16
2.4.1	臨床応用されているバブルの膜材質と内部気体	16
2.4.2	周囲膜の粘弾性と振動特性	18
2.4.3	バブルの内部気体の拡散	19
2.5	総括	19
3	気液界面における両親媒性物質の吸着メカニズムと表面張力	26
3.1	緒言	26
3.2	両親媒性物質の吸着メカニズム	26
3.3	両親媒性物質の吸着と表面張力	28
3.3.1	Axisymmetric Drop Shape Analysis (ADSA)	28
3.4	リン脂質の吸着特性	30
3.5	Pluronic F-68 分子の吸着特性	31
3.5.1	Pluronic 界面活性剤の特徴	32

3.5.2	フッ化炭素ガスが吸着特性や膜の構造に与える影響.....	33
3.5.3	Pluronic F-68 分子の吸着動態	33
3.5.4	Pluronic F-68 分子配向の濃度依存性	36
3.6	総括	38
4	超音波照射下におけるバブルの振動特性と膜の粘弾性.....	42
4.1	緒言	42
4.2	自由気泡の振動モデル	42
4.3	バブルの線形振動と膜の粘弾性	45
4.4	光学システムで測定した Pluronic F-68 バブルと DMPC バブルの振動特性	50
4.4.1	実験方法.....	50
4.4.2	実験結果と考察.....	53
4.5	音響パルスの減衰特性から求めたバブルの振動特性と膜の粘弾性.....	59
4.5.1	実験方法.....	59
4.5.2	実験結果と考察.....	67
4.6	総括	78
5	超音波照射によるバブルの内部気体放出	84
5.1	緒言	84
5.2	自由気泡の溶解.....	84
5.2.1	表面張力による影響.....	86
5.3	フッ化炭素ガスの溶解度	88
5.4	内部気体溶解に対する周囲膜の効果	89
5.5	超音波照射下における Pluronic F-68 バブルの溶解	92
5.5.1	実験方法.....	92
5.5.2	実験結果と考察.....	93
5.6	総括	97
6	結語	100
	謝辞.....	102

記号表

Γ	界面に吸着した分子濃度
σ	表面張力
σ_0	初期表面張力
σ_{eq}	平衡時の表面張力
B	気体定数
T	絶対温度
c_m	溶質の濃度
ΔP	ラプラス力
z	水面からの深さ
R_1, R_2, R_c	曲率半径
ΔP_0	大気圧
g	重力加速度
$\Delta\rho$	バブル内外の物質の密度差
π, π_1, π_2	初期値と平衡時の表面張力の差
R	バブルの半径
\dot{R}	バブル表面の速度
ϕ	速度ポテンシャル
$r(t)$	バブル中央からの距離
P	周囲液体の圧力
ρ	周囲液体の密度
P_∞	無限遠における周囲液体の圧力
P_0	周囲液体の圧力
$P_a(t)$	超音波によって与えられた圧力
P_g	$r=R_0$ の時の内部気体の圧力
P_i	$r=R$ の時の内部気体の圧力
R_0	平衡時のバブルの半径
γ	内部ガスの比熱比
μ	周囲液体の粘性
$[\tau \cdot n]_{surface}$	周囲の粘性応力による力
τ_s	界面応力の一般形
κ^s	せん断方向の粘性
μ^s	径方向の粘性

I_s	表面の応力テンソル
Δ_s	勾配演算子
d_s	歪率テンソル
E^s	バブルの拡張に対する弾性
A	バブルの表面積
A_0	表面積の初期値
R_E	歪のないバブル半径
D	表面の拡張率
ω	角周波数
f	駆動周波数
P_A	音波の振幅
ΔR	バブルの振動振幅
F	一般化極値分布の数密度関数
θ	location parameter
ξ	scale parameter
M	shape parameter
α	減衰係数
S_{ref}	バブル懸濁液注入前のパワースペクトルの平均値
S	バブル懸濁液注入後のパワースペクトルの平均値
d	反射板と振動子の距離
$\delta_{radiation}$	バブルの再放射によるエネルギーロス
δ_{liquid}	周囲液体の粘性
$\delta_{interface}$	膜の粘性
δ_{therm}	熱的なダンピング
δ_{tot}	損失全体
v	周囲液体の音速
ω_0	共振角周波数
H	バブルの数密度
p_n	バブルの半径の確率分布
X^2	決定係数
β	ボイド率
α_{theo}	理論モデルからえた減衰特性
α_{bubble}	実験値からえた減衰特性
D_w	液中の気体の拡散係数
c_g	気体濃度
J	気体の流れ

m	気体の質量
L_d	飽和溶存気体濃度の気体密度に対する比
L_f	初期溶存濃度の飽和濃度に対する比
n	分子数
V	バブルの体積
ρ_b	バブルの気体密度
ρ_g	曲率 0 の時の気体密度
R_{total}	全体の抵抗値
R_{shell}	周囲膜による気体拡散の抵抗値
R_{water}	水による気体拡散の抵抗値
N_{shell}	バブルの膜を超えて流れるモル流束
K_{shell}	膜の透過性
K_{water}	水の透過性
C_{si}	境界における気体のモル濃度
C_{so}	境界における気体のモル濃度
C_{wi}	液相境界での気体のモル濃度
C_{wo}	液相境界での気体のモル濃度
O	オストワルト係数

Abstract

Microbubbles are used as contrast agents to enhance the diagnosis of ultrasound images. One of the contrast effects of bubbles is the ultrasound re-radiation due to the spherical oscillation of the bubbles under ultrasound irradiation. On the other hand, microbubbles are also potentially useful for the therapeutic applications, such as brain-targeted drug delivery system. In brain-targeted drug delivery system, the oscillation characteristics of the bubble are important determinants of drug permeability. Therefore, a detailed understanding is required on the oscillation characteristics of bubbles under ultrasound irradiation in diagnostic imaging and therapeutic applications. In addition, the bubbles need to circulate in the body for an extended period of time in order to be delivered to the affected area. Thus, high stability is required. However, the effect of ultrasound irradiation on bubble stability is unclear, and a detailed understanding is needed.

In terms of microbubbles, the soft materials coat the internal gas and constitute a shell. The shell on the bubble surface affects the oscillation characteristics and stability of the bubbles during ultrasound irradiation. However, the relationship between the structure of the shell and the oscillation characteristics of the bubbles has not yet been clarified. In addition, the stability of bubbles under ultrasound irradiation has not been evaluated in detail.

In this thesis, the adsorption kinetics of the shell material at the gas-water interface were initially showed to assess the shell structure. Here the concentration characteristics of adsorption measured in the past for Pluronic F-68, a promising shell material, are presented. Based on the results of the adsorption kinetics of Pluronic F-68, Pluronic F-68 bubbles were then prepared, and their oscillation characteristics and the dilatational viscoelasticity of the shells were evaluated. Consequently, at bubble sizes with potential clinical applicability, the oscillation characteristics and the dilatational viscoelasticity of the shells were strongly related to the Pluronic F-68 concentration. Our study showed that the dilatational elasticity and viscosity increased substantially when the adsorbed molecules reached saturation at the bubble surface. This implies that a phase transition from liquid phase to gel phase occurred in the shells. The effect of ultrasound irradiation on bubble stability was evaluated by observing the bubble volume contraction over time. Since the diffusion of the inner gas was accelerated under ultrasound irradiation, the stability of the bubbles decrease. On the other hand, the stability increased with increasing concentration of Pluronic F-68, and diffusion of internal gas by ultrasonic irradiation was also suppressed.

1. 序論

1.1 背景

医療超音波は血流計測や生体内の弾性測定、強力超音波による治療など様々な応用されてきた。その中で超音波診断装置はとりわけ汎用性が高く検査室や手術室、集中治療室などでも幅広い用途で使われている。超音波診断装置は体内をリアルタイムに画像化し、検査・診断をサポートする装置である。本体には音波を送受信するプローブが接続し、主にコンベックス、リニア、セクタの3種類がある。プローブのヘッド形状が異なり、臨床での用途に応じて使い分けられている。携帯可能な小型タイプの装置も開発され簡単に持ち運びできることで、院内やベッドサイドだけでなく院外の救急現場でトリアージなどに使用されている。これにより Point of care ultrasound (POCUS) と呼ばれる新しい概念が生まれた。超音波のもつ簡便でリアルタイムに画像が確認できる利点が生かされ、その有効性は一層高まっている。

超音波診断において、診断精度を高めるためマイクロバブルが造影剤として使われる。特に肝癌の切除手術において、超音波診断による切除領域の決定はゴールドスタンダードとみなされる[1,2]。第一世代超音波造影剤として 1-8 μm の粒径をもつ Levovist®が 1999 年 9 月に上市された。しかしながら内部気体が空気であったため、血液に対する溶解性が非常に高く不安定であった。加えて、生体内では動脈圧などによってより一層溶解が促進される。そのためバブルは血管注入直後、瞬時に消えてしまい繰り返しの病変観察が困難だった[3]。それ故、広く普及するには至らなかった。この課題を解決するために、第二世代の造影剤ではフッ化炭素やフッ化硫黄を使った造影剤が開発されバブルの安定性が劇的に改善した。周囲膜は界面活性剤やリン脂質が使われさらに安定性が向上した。バブルによ

る造影効果の一つに、超音波照射時に発生するバブルの球形振動が応用されている。バブルの振動挙動による造影効果は、現在も様々な検討がなされておりナノオーダーのバブルでもその効果が確認されている[4]。これまでマイクロオーダーでは血管の造影が主な使用目的であったがナノオーダーのバブルに応用することでリンパの造影などの可能性があり、免疫系疾患等の検査に発展する可能性がある。

超音波照射によるバブルの球形振動は、診断画像の造影効果だけではなくドラッグデリバリーシステム（DDS）にも応用されている。その一つの研究領域がソノポレーションである。これはバブルの振動挙動により血管内皮細胞に機械的ストレスを与え局所的に血管透過性を亢進させる技術である。血中に注入した薬物や DNA などが局所的に血管外に浸透するため副作用が軽減される。脳を標的にしたドラッグデリバリーシステムはこの技術の応用例として特に期待を集めている。脳は生体のなかでとりわけ重要な臓器であり、いくつかの保護機能が存在する。その保護機能の一つである血液脳関門（Blood-Brain Barrier : BBB）は、血中の有害成分から脳を守る機構であり、脳血管特有のものである。しかし、この機構によって有害物質だけでなく薬物もそのほとんどが血管内皮を通過できない。ソノポレーションによる薬物の血管透過性亢進は、薬の種類に依らず適応できるため汎用性が極めて高い。したがって、これまで BBB を超えられず有効性が示されなかった多くの薬物も再度有効性を示す可能性がある。脳疾患には、脳腫瘍などの生命維持を脅かす疾患から、アルツハイマーやパーキンソン病などの認知機能や精神活動、運動機能などを低下させ患者の QOL を損なう様々な疾患がある。とりわけ QOL を低下させる後者の疾患は長期化し介護を必要とするケースが多く存在するため、患者だけでなく家族など周囲の介護者にも多くの負担を与える。したがって超音波とバブルを組み合わせたドラッグデリバリーシステム（USDDS）研究の進展により、患者のみならず介護者の負担を軽減させることにつながる。

これらの応用例に対して、バブルの安定性や超音波による振動特性は重要な役割を果た

している。バブルの振動挙動や安定性は内部気体を覆う膜、照射する音波に強く影響を受けることが知られているが詳細な現象はいまだ明らかにされていない。本論文ではマイクロバブルを作製しその音響特性を評価することによってバブル表面膜の微細な構造と、超音波照射下における振動特性やバブルの安定性についてそれぞれの関係性を検討する。

1.2 本文の概略

2章では、初めに医療超音波診断装置のイメージング技術とマイクロバブルの造影効果について説明する。続いて、USDDS の概要と USDDS 技術によって薬物が局所的に透過性亢進する詳細な現象について説明する。USDDS の効果はファントムや培養した細胞を使用してすでに検討されている。さらに、動物や人間で行われた先行研究で実際の効果と安全性が検討されている。ここでは、それらの先行研究の結果をまとめる。医療超音波画像の造影剤として臨床使用されるマイクロバブルは「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」に適合し承認されたものが使われる。USDDS を適応した動物実験や人を対象とした臨床研究でも同様に、その薬機法の承認を受けたバブルが使われている。ここでは承認されているバブルを一覧にまとめる。また、振動特性や安定性は周囲膜や内部気体に強く影響されるため、それらのバブルで使用されている膜材質や内部気体についても示す。

バブルの周囲を覆う分子は両親媒性をもつためバブル表面に吸着し膜を自己組織化する。3章では、この両親媒性物質の気液界面への吸着メカニズムを説明する。本研究では臨床応用が期待される Pluronic F-68 を膜材質としてバブルを作製し音響特性を評価するため、過去に測定した Pluronic F-68 の気液界面の吸着動態と吸着の濃度特性について示す。

4章では自由気泡の球形振動の理論モデルを示す。加えて、周囲の分子膜の影響が考慮されたバブルの線形振動モデルを示す。3章で示した Pluronic F-68 分子の吸着特性を基に

バブルを作製し、実際に測定した Pluronic F-68 バブルの振動挙動を示すとともに、線形振動モデルを適応することでバブル表面を覆う分子膜の粘弾性を推定した結果を示す。ここでは Pluronic F-68 の吸着特性から得られた膜の微細構造と振動特性や膜の粘弾性の関係について検討する。

5章では、液中のバブルの安定性について理論モデルを示す。ここに示す理論モデルは超音波照射を考慮しない静的な状態を仮定している。つづいて、超音波照射下におけるバブルの安定性を検討した結果を示す。Pluronic F-68 分子の吸着状態や超音波照射によるバブルの振動特性が安定性に与える影響を検討する。

最後に、6章では各章で検討した内容を総合して本章にまとめる。

【参考文献】

- [1] Torzilli, G. Montorsi, M. Donadon, M. Palmisano, A. Fabbro, D. D. Gambetti, A. Olivari, N. Makuuchi, M. "Radical but conservative" is the main goal for ultrasonography-guided liver resection: prospective validation of this approach. *J. Am. Coll. Surg.*, 2005, 201, 517-528.
- [2] Zhang, K. Kokudo, N. Hasegawa, K. Arita, J. Tang, W. Aoki, T. Imamura, H. Sano, K. Sugawara, Y. Makuuchi, M. Detection of New Tumors by Intraoperative Ultrasonography During Repeated Hepatic Resections for Hepatocellular Carcinoma. *Arch. surg.*, 2007, 142, 1170–1175.
- [3] Kabalnov A, Klein D, Pelura T, Schutt E, Weers J. Dissolution of multicomponent microbubbles in the bloodstream: 1. Theory. *Ultrasound Med Biol*, 1998, 24, 739–749.
- [4] Sojahrood, A. J. Haghi, H. Karshafian, R. Kolios, M. C. Nonlinear dynamics and bifurcation structure of ultrasonically excited lipid coated microbubbles. *Ultrason Sonochem*, 2021, 72.

2. バブルの医療応用

2.1 緒言

マイクロバブルは超音波診断画像の造影剤として広く使用されてきた。加えて、USDDS に応用することが期待されている。本章では、超音波診断装置の画像化技術とマイクロバブルの造影効果について説明する。続いて、超音波とバブルを組み合わせたUSDDSについて、概要とその効果について説明する。

2.2 医療超音波画像とマイクロバブル

バブルによる造影効果を理解するため、超音波診断装置で行われている画像化技術を説明する。つづいてバブルの造影効果を、模式図や実際の診断画像を使い示す。

2.2.1 医療超音波診断装置の画像化技術

生体内は皮膚や脂肪、筋肉など様々な組織や臓器から構成される。生体に超音波を照射すると超音波はそれらの異なる媒質の界面で反射と透過を繰り返し、生体内を伝搬する。この時、超音波の反射強度は2媒質間界面における音響インピーダンスの差によって決まる。音響インピーダンスとは密度と音速の積で定義される媒質の音響特性の一つである。音波の伝搬距離は、音波照射から反射信号を受信するまでの時間によって知ることができる。この時、生体内の軟組織のほとんどは水で構成されるため、音速はおおよそ 1540 m/sec と仮定される。超音波診断装置は、これらの反射強度と伝搬時間の情報を基に診断画像を

生成する。図 2.1 は診断装置のプロローブヘッドの構造と超音波の送受信方法、信号処理手順を示したものである。超音波プロローブのヘッドには、患者接続面に対して一列に多数の振動子が埋め込まれている。プロローブヘッドに埋め込まれた振動子は超音波の送受波兼用で使われる。一本の音響ビームを照射する時、複数の振動子に位相を変えた電気信号が入力される。位相の異なる電気信号を入力することで複数の振動子から出力した音波は収束し画質の向上に寄与する。生体内で反射した音波は、プロローブ内の複数の振動子で受信し電気信号に変換される。複数素子で受信した信号を合成することで SN 比や画質が向上する。合成した信号から包絡線を求め、包絡線の振幅に応じたグレースケールに変換することで画像内の一つの音響線を作る。同様の手順をプロローブ全体に行うことで一枚の超音波診断画像が得られる。図 2.2 は超音波診断装置で実際に総頸動脈を撮影した画像である。カラードップラーモードで確認したため、関心領域内 (ROI) の頸動脈の血流成分はカラースケールで可視化されている。血管内は音波の反射が極めて小さい血液であるため、ROI 以外では輝度値は低い (黒)。一方で筋肉や脂肪など周辺組織からは相対的に強い反射波が発生するため輝度値は高く (白) なる。

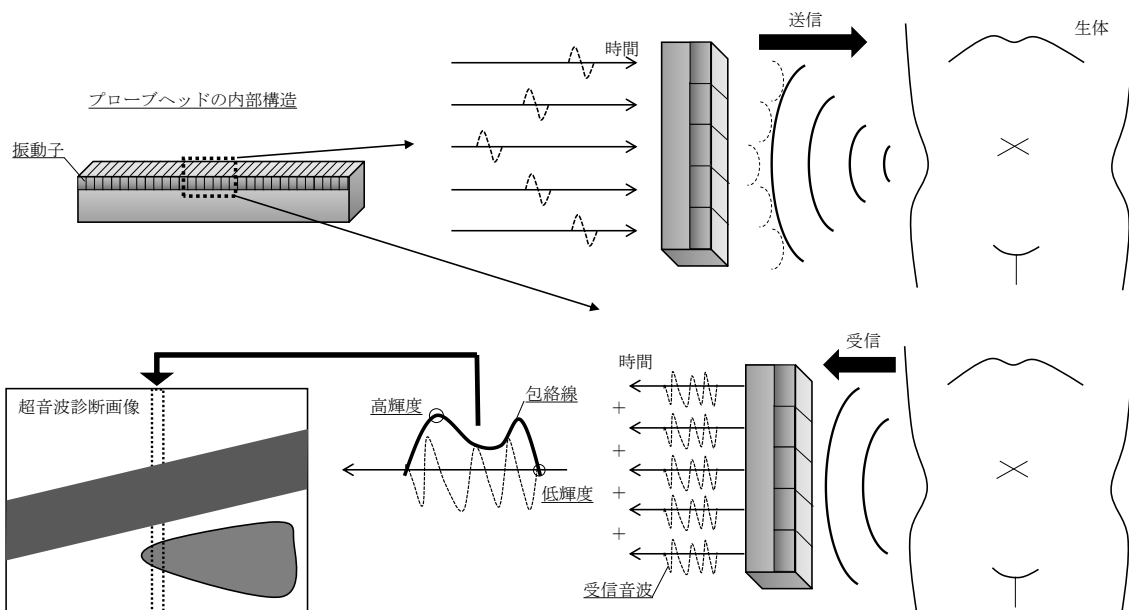


図 2.1 超音波プローブの構造と超音波診断装置の画像化技術。



図 2.2 超音波診断装置で撮影した人の総頸動脈の B モード画像。

2.2.2 マイクロバブルの造影効果

マイクロバブルの造影効果は大きく2つの効果によって引き起こされる。1つ目は、生体内の軟組織と比較して低い音響インピーダンスを有することで得られる効果である。マイクロバブルを造影剤として使用する場合、静脈注射し体内を循環させる。バブルは内部が気体であるため周囲の血液に比べ、音速や密度が低く音響インピーダンスも極めて低い。したがって、血管内腔でより強く音波が反射され診断画像内の輝度値が高くなる。図 2.3 は生体を模擬したファントムでバブルによる造影効果を実際に確認したものである。図 2.3(a)は寒天を主材として作成したファントムをカメラで撮影した画像である。ファントムは生体と音波の散乱や減衰などの音響特性を近づけるためにグリセリンや黒鉛を混ぜて作成した。ファントム中央には模擬血液を流す流路があり、実験中は流路をポンプとチューブでつなぎ模擬血液を循環させた。図 2.3(b)、図 2.3(c)は超音波診断装置で撮影した画像であり、それぞれ流路内にバブルが存在する時の画像と模擬血液のみが流れている時の画像を示している。バブルが流路内を流れる際、その造影効果により画像中央にある流路の輝度値が高くなっている様子が確認できる。

2つ目の造影効果は、超音波照射によってバブルが球形に振動することで得られる。周囲の液体との体積弾性率の違いから、音波の圧力変動によってバブルは球形に振動する。バブルの振動によって発生する音波にはキャリア周波数の2倍や3倍の成分が多く含まれる。この周波数成分を画像化する機能をハーモニックコントラストイメージングと呼ぶ。生体からも同様に高調波成分は発生するが、十分な信号強度を得るためには高い音圧が必要である。一方、バブルから発生する高調波（2倍や3倍の周波数成分）は比較的低音圧で十分な信号強度が得られる。受信した超音波の信号から高調波成分を抽出することによりバブルが存在する空間の輝度値を高めることができる。図 2.4 はこれらの現象を示した模式図である。

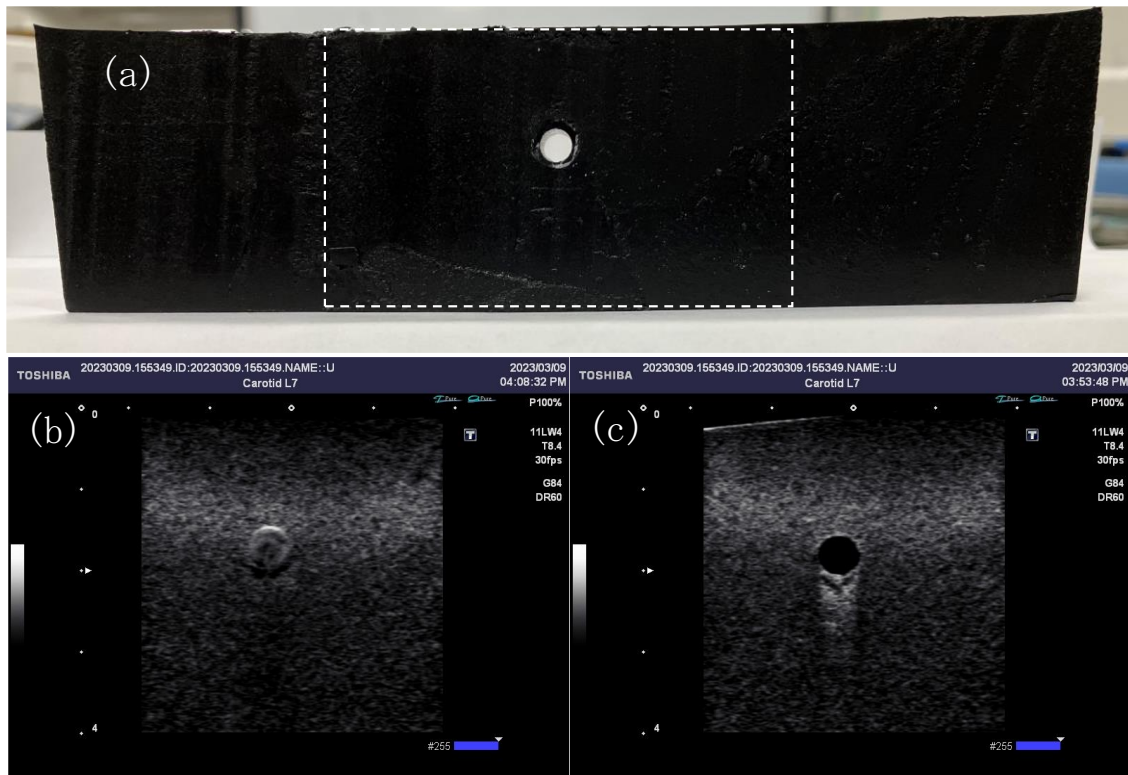


図 2.3 寒天ベースの生体模擬ファントムと超音波診断装置で撮影したファントムの流路内の画像 a) 寒天ベースファントム b) バブルありの診断装置画像 c) バブルなしの診断装置画像

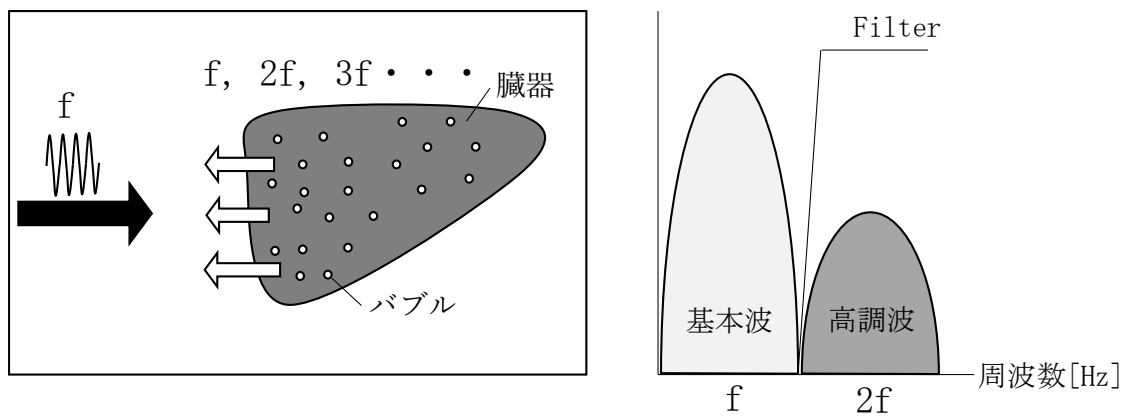


図 2.4 バブルの振動挙動による高調波発生の様式図

先行研究ではファントムを使用し、バブルの非線形振動によってコントラスト比が改善されたことが報告されている[1]。非線形振動が現れる音圧の閾値は膜の硬さによって異なることが示され、この関係は数値計算によっても明らかにされている[2]。超音波照射によるバブルの球形振動を応用して効率よく造影効果を得るために、周囲膜の構造と超音波照射によるバブルの振動挙動の関連性を詳細に検討する必要がある。

2.3 ドラッグデリバリーシステムへの応用

ドラッグデリバリーシステムとは、生体内の特定部位で薬物濃度を特異的に上昇させる技術である[3]。臨床で投薬する場合には有効成分のみを単体で使用することはほとんどない。光、温湿度、pH などの外部環境に依って有効性が損なわれるため、添加物などを使い化学的に安定化させる必要がある[4]。さらに副作用を抑えて薬物の効果を最大化するためには、最適な薬物濃度を保ち続ける必要がある[4]。そのため、投薬する際には DDS をデザインすることが好ましい[5]。超音波とバブルを組み合わせた DDS は一つの有望なシステムであり、局所的に薬物の血管透過性を亢進させることができる。薬物透過性亢進のメカニズムはファントムや培養した細胞を使い詳細に検討されている。本項では現状、明らかになっているメカニズムを示し、超音波照射によるバブルの振動と透過性亢進の関係を明らかにする。また、このシステムはすでに動物や人を対象とした臨床研究が行われている[6-17]。本論文では特に効果が期待されている脳をターゲットとした臨床研究について、先行研究の結果をまとめる。

2.3.1 超音波とバブルを組み合わせたドラッグデリバリーシステムとその効果

超音波を使った DDS によって、局所的に薬物濃度を高める方法や血管の薬物透過性を向上させる方法が検討されている[18,19]。薬物をもったりポソームやミセルを体内に注入し、超音波を照射すると熱や音波による振動によって薬物が放出される[18,20]。薬物は患部で高濃度となり、透過性も亢進するため治療効果が高まる[18]。また、同時にマイクロバブルを血液に注入し超音波を照射することによって、薬物透過性はさらに亢進し治療効果は高まる[21]。このバブルによる透過性亢進のメカニズムを解明するために細動脈を模擬したファントムは開発され、バブルの振動と血管内腔の変形の関係が報告されている[22]。ファントム内の流路径は約 10 μm であり、血管のヤング率と近い値 (2.2 ± 0.2 kPa) を持つ。流路内を流れるバブルは直径 3 μm ほどで、流路内に単一もしくは複数バブルを存在させて実験を行っている。単一バブルの場合、拡張時に血管内腔はバブルに押されて 2 ~ 3 倍程度に拡張し、収縮時には内腔直径は 1/2 程に収縮する。複数のバブルが存在する場合には、Bjerkness 力によってバブル同士の距離が近づき合体する。バブル径は大きくなり、単一時と比較すると振動による血管内腔の変形は増大するため薬物透過性も亢進する[22]。培養細胞では、超音波により細胞膜近傍のバブルを振動させると蛍光物質が細胞内に取り込まれることが確認された[23]。透過性亢進をもたらす細胞膜の損傷は、細胞膜の表面張力や Ca^{2+} 濃度に依って修復することが報告されている[24,25]。図 2.5 はバブルの振動挙動や破壊現象が、細胞膜や細胞間に機械的なストレスを与え透過性を亢進させる現象を示した図である。先行研究の報告から、血管の内皮細胞に付着するバブルが収縮する時、周囲流体によって細胞膜にせん断応力が加わり局所的にバブルに引き寄せられる。一方で膨張時には細胞膜を押し出す[26]。結果として細胞膜に修復可能な微小孔 (< 100 nm²) が発生し、血管透過性が亢進していると考えられている[6,27]。

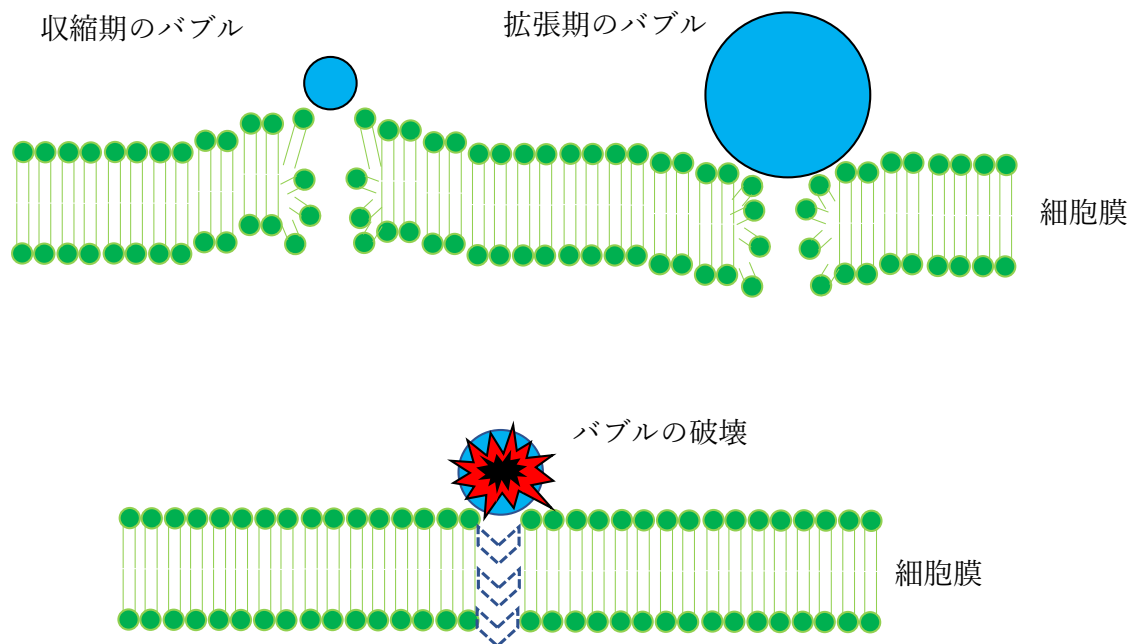


図 2.5 バブルの振動や破壊による細胞膜や細胞間に隙間を与える現象の模式図。

2.3.2 動物や人を対象とした USDDS の臨床研究結果

脳は様々な身体機能を制御する非常に重要な臓器である。そのためいくつかの保護機能が存在し、その一つが血液に溶け込む有害物質から脳を保護する機能である。これは血液脳関門 (Blood-Brain Barrier : BBB) と呼ばれ血管内外の物質のやりとりを制限し、脳の一部器官をのぞき微小血管に局在するとされている。図 2.6 は脳の血管断面を示した図である。BBB は 2 種類の基底膜と 3 種類の細胞によって構築される。3 種類の細胞のうち唯一血液と直接接触する細胞が血管内皮細胞である。血管内皮細胞表面にはトランスポーターやレセプターが発現しており特有の物質輸送系を持っている [28,29]。したがって、細胞を經由して物質のやりとりをすることは厳密に制限される。加えて、タイトジャンクションと呼ばれるたんぱく質が隣り合う内皮細胞を横断しそれぞれを強く密着させる。そのため細胞間を通して物質をやり取りすることも難しい [29]。この防御機能によって分子量の大

きい薬物は血管外に浸潤できない。分子量の比較的小さい薬物についてもそのほとんどが効果を得られていない。この課題を解決するために、超音波とマイクロバブルを組み合わせた DDS が提案されており、期待を集めている [6-17,30]。

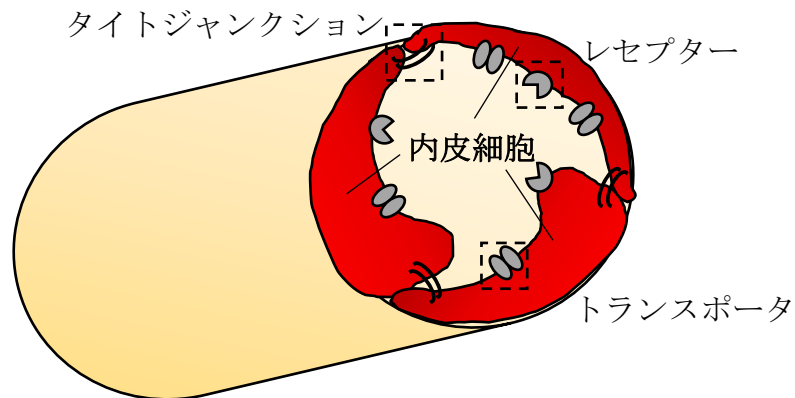


図2.6 脳血管の内皮構造。

動物実験ではラットやマウスなどの小動物、豚や猿などの比較的大きな動物を対象とした研究結果が報告されている [6,7,16,17]。ウサギを使った安全性の評価と効果が表れる音圧閾値を検討した報告では、0.4MPa で効果が確認され、0.8 MPa で 90%、1.4 MPa では超音波を照射した領域の 100% の BBB が破綻していることが確認された [31]。2.3 MPa 以上の音圧を照射した場合には、4 時間生存の個体で照射領域の約 70-80 % 程の脳細胞が修復できずに細胞死の一種であるネクローシスを起こしている [31]。ラットを使った臨床研究では、バブルの粒径による効果を検証している [7]。彼らの報告によると、~0.4 MPa の照射音圧では粒径 1-2 μm のバブルより粒径 4-5 μm のバブルがより透過性を亢進する結果を示した。毛細血管 (4-8 μm) を流れる時、1-2 μm に比べ 4-5 μm のバブルは、バブル表面が血管壁と近くなる。BBB を超えるメカニズムが血管に機械的なストレスを与えることによるものだと考えると、血管径と同等サイズのパブルを使ったことにより血管内腔の変形がより顕著になったためと考えられる。したがって、治療する脳領域の血管径とバブ

ルのサイズを考慮することで治療効果は高まる。

人に対する臨床研究では、パーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、脳腫瘍などの患者に対して安全性や有効性を検証する研究が行われている[8-15]。使用されたバブルは臨床使用可能な Definity®や Luminity®、SonoVue®が使用された。超音波を照射するプローブは頭蓋内に埋め込み直接脳に音波を照射するタイプや、頭蓋を經由して脳に音波を照射するタイプが開発されている[30]。Ahmed らの研究結果によると、中心周波数 1.05 MHz で繰り返し周波数 0.5 から 1.0 Hz のバースト波を 25000 回照射すると照射領域のうち 0.41 MPa で 0%、0.53 MPa で 0%、0.66 MPa で 18%、0.78MPa で 57%、0.90MPa で 80%、1.03MPa で 77%、1.15MPa で 66%の領域で MRI 画像から BBB の破綻が確認された。毎月、繰り返し治療は行われたが透過性亢進状態は保たれていた。安全性について、19 人の患者のうち 0.90MPa で 1 名、1.03 MPa で他の 1 名が神経学的な欠損を確認したが 15 日後にそれらの事象は改善された[15]。

脳細胞に対してネクロシスなどの有害事象を発生させず一過性の薬物透過性を亢進させるため、効率よくバブルを振動させる必要がある。バブルの振動は周囲を覆う分子膜の粘弾性に影響されるため、分子膜とバブルの振動の関連性を明らかにすることは極めて重要である。加えて上記の通り血管の薬物透過性亢進にはバブル径が影響する。長時間体内を循環させて患部に到達させることを考慮すると、バブルには高い安定性が求められる。バブルの安定性については理論モデルが構築されており、溶解度の低い気体を内部気体として使用し、周囲を膜物質で覆うことで安定性は改善される。一方、バブルに超音波を照射すると不安定化し寿命が短くなる。しかしながら、超音波照射による影響は詳細な評価が行われておらず、更なる検討が必要である。

2.4 バブルの構造と振動・溶解特性

バブルは周囲を覆う膜としてポリマーのようなハード材や、脂質や界面活性剤などのソフト材が検討されているが、臨床では脂質膜や界面活性剤のようなソフト材を膜に持つバブルが応用されている[19]。

2.4.1 項では現在臨床で使用可能なバブルと、それらで使われている膜材質と内部気体を一覧にまとめる。膜材質と超音波によるバブルの振動特性の関係を検討するために 2.4.2 項では、市販されているバブルの振動特性や、先行研究で評価された脂質膜バブルや脂質膜と界面活性剤を混合した膜を持つバブルの振動特性について記載する。2.4.3 項ではバブルの安定性について記載する。特にバブルを人体に投与した際に、バブルの溶解に影響を与える生体特有の現象についてまとめる。またバブルの安定性を向上させるために先行研究で取り組まれた内容を示す。

2.4.1 臨床応用されているバブルの膜材質と内部気体

図 2.5 はマイクロバブルの構造と液中で超音波を照射した際の振動挙動を示した図である。超音波診断における造影剤として使われているマイクロバブルは内部気体を周囲膜が覆う構造をしている。液中でバブルに超音波を照射すると、周囲の液体との体積弾性率の違いからバブルは球形に振動する。表 2.1 はすでに臨床使用されているバブルと、それらのバブルで使用されている膜材質、内部気体、粒径分布を一覧にまとめたものである。Levovist®や Albunex®は内部気体が空気であったため、血液に対する溶解性が非常に高く不安定であった。第二世代の造影剤ではフッ化炭素やフッ化硫黄を含む疎水性で分子量の大きい気体を使った造影剤が開発され、安定性は向上した。バブル表面を覆う膜には界面活性

剤やアルブミン、リン脂質が使われ、内部気体の拡散を防ぐことでさらに安定性が向上した。膜分子として使用される界面活性剤やアルブミン、リン脂質は両親媒性をもつためバブル作成時に内部気体と外部液体の界面に自ら吸着し、周囲膜を組織する。周囲の分子膜は超音波照射による振動挙動やバブルの液中への溶解に対して重要な役割を果たす。次項以降に、それらバブルの振動特性および溶解特性と内部気体、周囲の膜との関係について説明する。

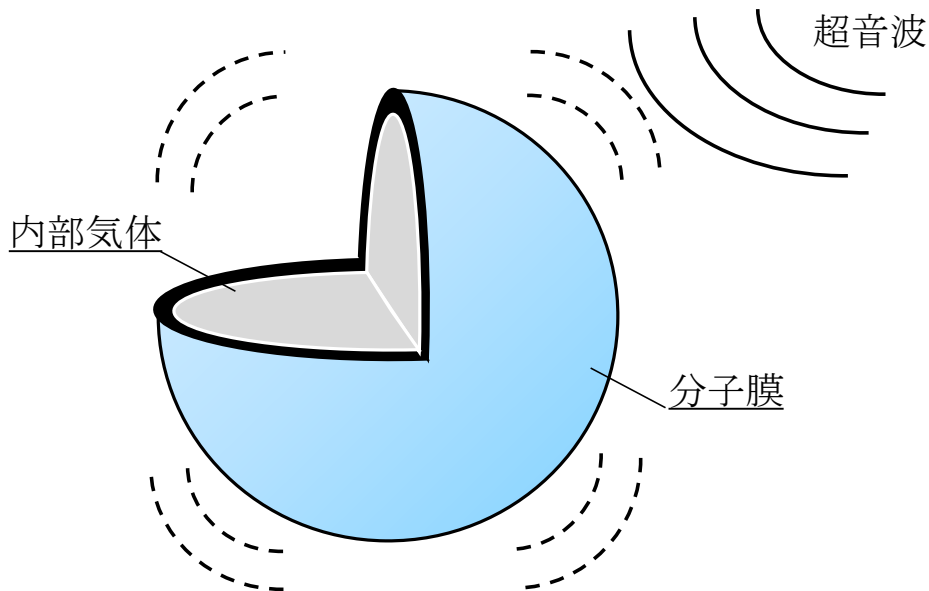


図 2.5 バブルの構造と超音波照射による振動の模式図。

表 2.1 臨床応用されているバブルの内部気体、膜材質、粒形分布。

名称	膜材質	内部気体	粒径 (μm)
Albnex®	Albumin	Air	4.3
Levovist®	Galactose	Air	2-4
Optison®	Lipids	Perfluoropropane	3-32
Definity®	Lipids	Perfluoropropane	1.1-20
Sonovue®	Lipids	Sulfur hexafluoride	2.5
Sonazoid®	Lipids	Perfluorobutane	2-3

2.4.2 周囲膜の粘弾性と振動特性

超音波照射によるバブルの振動挙動は周囲膜の物性に影響を受けることが知られている。詳細は4章以降で示すが膜のない自由気泡と比較すると、多くの場合共振周波数は高周波にシフトし、振動振幅は減衰する[32]。バブル表面を覆う膜の粘性や弾性に影響されるためであり、それらの値は膜材質や製造方法によって変化する。膜の粘弾性が振動挙動に与える影響はバブル径の減少とともに顕著になり、臨床使用可能な数 μm のバブルでも影響を受ける。2.4.1項で示した市販されているバブルの振動特性を測定し自由気泡と比較すると共振周波数は高周波にシフトする[36-38]。Albunex[®]や Optison[®]の粘性と弾性はそれぞれ $0.05\sim 0.08\text{ Ns m}^{-1}$ 、 $0.7\sim 0.9\text{ N m}^{-1}$ と推定されている[32]。脂質で表面膜を構成する Definity[®]、SonoVue[®]、Sonazoid[®]ではそれぞれ $0.02\sim 0.6\text{ Ns m}^{-1}$ 、 $1.1\sim 1.7\text{ N m}^{-1}$ と推定されている[39]。より詳細な検討では、周囲膜を構成するリン脂質分子について疎水基である脂肪酸の炭素鎖の長さが膜の粘弾性に与える影響が検討されている。結果として、炭素鎖が長いリン脂質で構成された周囲膜が高い弾性を示すことが確認された[40]。Polyethylene glycol (PEG)は補助剤として度々リン脂質と混合して膜材質として使われている。混合物の膜物性を評価するため、リン脂質とPEGの混合比を変えて粘弾性は評価されている[40-43]。Poloxamer界面活性剤は、polypropylene oxide鎖(PPO)を中心に、PEGと同様の構造式をもつpolyethylene oxide鎖(PEO)を両端にもつトリブロックコポリマーである。生体に無毒であるため補助界面活性剤として期待されている。しかしながら、Poloxamer界面活性剤は単体で膜の粘弾性を評価した報告はほとんどない。加えて、両親媒性の特徴をもつ膜材質はバブル表面に自ら吸着し膜を構成するが、分子の吸着状態と振動特性との関係を検討した先行研究はこれまでない。膜の粘弾性の詳細な評価には吸着している分子の配向や密度などマイクロな構造を検討することが極めて重要である。

2.4.3 バブルの内部気体の拡散

実際の臨床でバブルを使用する場合、バブルを静脈注射して患部に送るため長時間体内を循環させる必要がある。バブルが動脈中を循環する際には動脈圧によって溶解が促進される[44]。血中の酸素は生命維持のエネルギーであるアデノシン三リン酸（ATP）生成に使われ二酸化炭素が発生するため、血中の気体濃度のバランスは変化する。バブルの内部気体と血ガスとの濃度勾配が変わるため、内部気体の拡散は影響を受ける[41]。体内を循環するバブルを確認するために超音波を照射するが、超音波照射が内部気体の放出を助長する[46]。これらの点を考慮すると診断や治療で使用するバブルは高い安定性がもとめられる。Kabalnov らによって液中における自由気泡（膜無し）の安定性は理論的かつ実験的に研究されてきた[33-35]。内部気体の溶解度はバブルの安定性に大きく寄与するため、第2世代以降のバブルでは生体に不活性で溶解度が低いフッ化炭素やフッ化硫黄が内部気体として採用された[44]。また、バブルを覆う周囲膜は表面張力を下げることで安定性を向上させるとともに、内部気体の拡散を抑制することが理論的に明らかになった[46]。バブルの安定性に対する超音波の影響は、これまでバブルが多数存在する懸濁液を評価した結果がほとんどで詳細な検討はされていない。単一バブルの体積変化を時系列に観測することで、安定性を詳細に検討する必要がある。

2.5 総括

マイクロバブルは超音波診断画像における造影剤や USDDS において血管透過性を亢進させる働きをし、それぞれの技術で重要な役割を果たす。本章では、これらの応用技術の概要を説明するとともに、バブルによる造影効果や薬物の透過性亢進のメカニズムについ

て示した。さらなる診断技術や治療効果の向上のため、超音波照射時におけるマイクロバブルの振動挙動や安定性をもつ重要性を示し、本研究の動機を明確にした。

【参考文献】

- [1] Sojahrood, A. J. Haghi, H. Karshafian, R. Kolios, M. C. Nonlinear dynamics and bifurcation structure of ultrasonically excited lipid coated microbubbles. *Ultrason Sonochem*, 2021, 72.
- [2] Sojahrood, A. J. de Leon, A. C. Lee, R. Cooley, M. Abenojar, E. C. Kolios, M. C. Exner, A. A. Toward precisely controllable acoustic response of shell-stabilized nanobubbles: High yield and narrow dispersity. *ACS nano* 2021, 15, 4901-4915.
- [3] Langer, R. Drug delivery and targeting. *Nature*, 1998, 392, 5–10.
- [4] Adepu, S. Ramakrishna, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules*, 2021, 26, 5905.
- [5] Langer, R. New Methods of Drug Delivery. *Science*, 1990, 249, 1527-1533.
- [6] Meairs, S. Alonso, A. Ultrasound, microbubbles and the blood-brain barrier. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2007, 93, 354–362.
- [7] Choi, J. J. Feshitan, J. A. Baseri, B. Wang, S. Tung, Y. S. Borden, M. A. Konofagou, E. E. Microbubble-size dependence of focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening in mice in vivo. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2010, 57, 145–154.
- [8] Mainprize, T. Lipsman, N. Huang, Y. Meng, Y. Bethune, A. Ironside, S. Heyn, C. Alkins, R. Trudeau, M. Sahgal, A. Perry, J. Hynynen, K. Blood-Brain Barrier Opening in Primary Brain Tumors with Non-invasive MR-Guided Focused Ultrasound: A Clinical Safety and Feasibility Study. *Sci Rep*, 2019, 9, 321.
- [9] Lipsman, N. Meng, Y. Bethune, A. J. Huang, Y. Lam, B. Masellis, M. Herrmann, N. Heyn, C. Aubert, I. Boutet, A. Smith, G. S. Hynynen, K. Black, S. E. Blood–brain barrier opening in Alzheimer’s disease using MR-guided focused ultrasound. *Nat Commun*, 2018, 9, 2336.
- [10] Gasca-Salas, C. Fernández-Rodríguez, B. Pineda-Pardo, J. A. Rodríguez-Rojas, R. Obeso, I. Hernández-Fernández, F. del Álamo, M. Mata, D. Guida, P. Ordás-Bandera, C. Montero-Roblas, J. I. Martínez-Fernández, R. Foffani, G. Rachmilevitch, I. Obeso, J. A. Blood-brain barrier opening with focused ultrasound in Parkinson’s disease dementia. *Nat Commun* 2021, 12, 779.

- [11] Abrahao, A. Meng, Y. Llinas, M. Huang, Y. Hamani, C. Mainprize, T. Aubert, I. Heyn, C. Black, S. E. Hynynen, K. Lipsman, N. Zinman, L. First-in-human trial of blood–brain barrier opening in amyotrophic lateral sclerosis using MR-guided focused ultrasound. *Nat Commun* 2019, 10, 4373.
- [12] Pavlos, A. Dheeraj, G. Yutong, G. Abdul-Kareem, A. Soren, M. B. Costas, A. Graeme, F. W. Localized blood–brain barrier opening in infiltrating gliomas with MRI-guided acoustic emissions–controlled focused ultrasound. *Proc Natl Acad Sci*, 2021, 118, 37.
- [13] Ko-Ting, C. Wen-Yen, C. Ya-Jui, L. Chia-Jung, L. Pin-Yuan, C. Hong-Chieh, T. Chiung-Yin, H. John, S. K. Hao-Li, L. Kuo-Chen, W. Neuronavigation-guided focused ultrasound for transcranial blood-brain barrier opening and immunostimulation in brain tumors. *Sci. Adv.*, 2021, 7.
- [14] Park, S. H. Kim, M. J. Jung, H. H. Chang, W. S. Choi, H. S. Rachmilevitch, I. Zadicario, E. Chang, J. W. Safety and feasibility of multiple blood-brain barrier disruptions for the treatment of glioblastoma in patients undergoing standard adjuvant chemotherapy. *J Neurosurg*, 2020, 475-483.
- [15] Idbaih, A. Canney, M. Belin, L. Desseaux, C. Vignot, A. Bouchoux, G. Asquier, N. Law-Ye, B. Leclercq, D. Bissery, A. De, R. Y. Trosch, C. Capelle, L. Sanson, M. Hoang-Xuan, K. Dehais, C. Houillier, C. Laigle-Donadey, F. Mathon, B. André, A. Lafon, C. Chapelon, J. Y. Delattre, J. Y. Carpentier, A. Safety and Feasibility of Repeated and Transient Blood-Brain Barrier Disruption by Pulsed Ultrasound in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clin Cancer Res.*, 2019 , 13, 3793–3801.
- [16] Liu, H. L. Chen, P. Y. Yang, H. W. Wu, J.S. Tseng, I. C. Ma, Y. J. Huang, C. Y. Tsai, H. C. Chen, S. M. Lu, Y. J. Huang, C. Y. Hua, M. Y. Ma, Y. H. Yen, T. C. Wei, K.C. In vivo MR quantification of superparamagnetic iron oxide nanoparticle leakage during low-frequency-ultrasound-induced blood-brain barrier opening in swine. *J. Magn. Reson. Imaging*, 2011, 34, 1313–1324.
- [17] McDannold, N. Arvanitis, C. D. Vykhodtseva, N. Livingstone, M. S. Temporary disruption of the blood-brain barrier by use of ultrasound and microbubbles: safety and efficacy evaluation in rhesus macaques. *Cancer Res.*, 2012, 72, 3652–3663.
- [18] Rapoport, N. Kennedy, A. M, Shea, J. E. Scaife, C. L. Nam, K. H. Ultrasonic

- nanotherapy of pancreatic cancer: lessons from ultrasound imaging. *Mol Pharm.*, 2010, 7, 22-31
- [19] Zhao, Y. Z. Du, L. N. Lu, C. T. Jin, Y. G. Ge, S. P. Potential and problems in ultrasound-responsive drug delivery systems. *Int J Nanomedicine*. 2013, 8, 1621-1633.
- [20] Rapoport, N. Gao Z, Kennedy A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99, 1095–1106.
- [21] McDannold, N. Arvanitis, C. D. Vykhodtseva, N. Livingstone, M. S. Temporary Disruption of the Blood-Brain Barrier by Use of Ultrasound and Microbubbles: Safety and Efficacy Evaluation in Rhesus Macaques. *Cancer Res.*, 2012, 72, 3652–3663.
- [22] Imai, S. Kudo, N. Development of a Microvascular Phantom for Studies on Microbubble Dynamics and Bubble-Cell Interaction Inside a Capillary, 2018 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), 2018, 1-4.
- [23] Pesset, A. Bonneau, C. Kazuyoshi, S. Nadal-Desbarats, L. Mitsuyoshi, T. Bouakaz, A. Kudo, N. Escoffre, J. M. Sasaki, N. Endothelial Cells, First Target of Drug Delivery Using Microbubble-Assisted Ultrasound. *Ultrasound Med Biol.*, 2020, 46, 7, 1565-1583.
- [24] Kudo, N. High-Speed In Situ Observation System for Sonoporation of Cells With Size- and Position-Controlled Microbubbles. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 2017, 64, 273-280.
- [25] Kudo, N. Okada, K. Yamamoto, K. Sonoporation by Single-Shot Pulsed Ultrasound with Microbubbles Adjacent to Cells. *Biophys J.*, 2009, 17, 4866-4876.
- [26] Lindner, J. R. Kaul, S. Delivery of drugs with ultrasound. *Echocardiography*. 2001, 18, 329-337.
- [27] Kooiman, K. Vos, H. J. Versluis, M. de Jong, N. Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014, 72, 28–48.
- [28] Kibria, G. Hatakeyama, H. Harashima, H. Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system. *Arch. Pharm. Res.*, 2014, 37, 4–15.
- [29] Omid, Y. Barar, J. Impacts of blood-brain barrier in drug delivery and targeting of brain tumors. *Bioimpacts*. 2012, 2, 5-22.
- [30] Gandhi, K. Barzegar-Fallah, A. Banstola, A. Rizwan, S.B. Reynolds, J. N. J. Ultrasound-Mediated Blood–Brain Barrier Disruption for Drug Delivery: A Systematic

Review of Protocols, Efficacy, and Safety Outcomes from Preclinical and Clinical Studies. *Pharmaceutics* 2022, 14, 833.

[31] Hynynen, K. McDannold, N. Sheikov, N.A. Jolesz, F.A. Vykhodtseva, N. Local and reversible blood–brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications. *Neuroimage*, 2005, 24, 12–20.

[32] Chatterjee, D. Sarkar, K. A Newtonian rheological model for the interface of microbubble contrast agents. *Ultrasound Med Biol.* 2003, 29, 1749-1757.

[33] Kabalnov, A. Klein, D. Pelura, T. Schutt, E. Weers, J. Dissolution of multicomponent microbubbles in the bloodstream: 1. Theory. *Ultrasound Med Biol.*, 1998, 24, 739–749.

[34] Kabalnov, A. Klein, D. Pelura, T. Schutt, E. Weers, Dissolution of multicomponent microbubbles in the bloodstream: 1. theory, *Ultrasound in Med Biol.*, 1998, 24, 739-749.

[35] Kabalnov, A. Bradley, J. Flaim, S. Klein, D. Pelura, T. Peters, B. Otto, S. Reynolds, J. Schutt, E. Weers, J. Dissolution of multicomponent microbubbles in the bloodstream: 2. Experiment. *Ultrasound Med Biol.* 1998, 24, 751-760.

[36] Raymond, J. L, Haworth, K. J. Bader, K. B. Radhakrishnan, K. Griffin, J. K. Huang, S. L. McPherson, D. D. Holland, C. K. Broadband attenuation measurements of phospholipid-shelled ultrasound contrast agents. *Ultrasound Med Biol.* 2014, 40, 410-421.

[37] Tu, J. Guan, J. Qiu, Y. Matula, T. J. Estimating the shell parameters of SonoVue® microbubbles using light scattering. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2009, 126, 2954–2962.

[38] Faez, T. Goertz, D. de Jong, N. Characterization of Definity ultrasound contrast agent at frequency range of 5-15 MHz. *Ultrasound Med. Biol.* 2011, 37, 338–342.

[39] Chatterjee, D. Sarkar, K. A Newtonian rheological model for the interface of microbubble contrast agents, *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29, 12, 1749-1757.

[40] van Rooij, T. Luan, Y. Renaud, G. van der Steen, A. F. W. de Jong, N. Kooiman, K. Acoustical response of DSPC versus DPPC lipid-coated microbubbles. 2013 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS) 2013, 310-313,

[41] van Rooij, T. Luan, Y. Renaud, G. van der Steen, A. F. W. Versluis, M. de Jong, N. Kooiman, K. Non-linear response and viscoelastic properties of lipid-coated microbubbles: DSPC versus DPPC. *Ultrasound Med Biol.*, 2015, 41, 1432–1445.

[42] Doinikov, A. A. Haac, J. F. Dayton, P. A. Modeling of nonlinear viscous stress in

encapsulating shells of lipid-coated contrast agent microbubbles. *Ultrasonics* 2009, 49, 269–275.

[43] Azami, R. H. Aliabouzar, M. Osborn, J. Kumar, K. N. Forsberg, F. Eisenbrey, J. R. Mallik, S. Sarkar, K. Material Properties, Dissolution and Time Evolution of PEGylated Lipid-Shelled Microbubbles: Effects of the Polyethylene Glycol Hydrophilic Chain Configurations. *Ultrasound Med Biol.*, 2022, 48, 1720-1732.

[44] Schutt, E. G. Klein, D. H. Mattrey, R. M. Riess, J. G. Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: the key role of perfluorochemicals. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2003, 42, 3218–3235.

[45] Borden, M. A. Longo, M. L. Dissolution Behavior of Lipid Monolayer-Coated, Air-Filled Microbubbles: Effect of Lipid Hydrophobic Chain Length. *Langmuir* 2002, 18, 24, 9225–9233

[46] Tabata, H. Koyama, D. Matsukawa, M. Yoshida, K. Krafft, M. P. Vibration characteristics and persistence of poloxamer-or phospholipid-coated single microbubbles under ultrasound irradiation. *Langmuir*, 2019, 35, 11322–11329.

3. 気液界面における両親媒性物質の吸着メカニズムと表面張力

3.1 緒言

膜材質として使われる両親媒性分子は一つの分子内に、水と親和性が高い親水基と親和性が低い疎水基を持つ。両親媒性分子が溶けた水溶液に気泡が存在すると電気化学・熱力学的な力によって気液界面に分子が吸着し膜を組織する。同時に、吸着した分子によって界面の表面張力は低下する。表面張力の低下や周囲を覆う分子膜の粘弾性は超音波照射による振動挙動やバブルの安定性に影響を与える。本章では、気液界面における両親媒性物質の吸着メカニズムとそれに伴う表面張力の変化について説明する。リン脂質をバブルの膜材質として使用する場合、度々補助界面活性剤が使われる。ここでは補助界面活性剤として有望な Pluronic F-68 の吸着動態を報告し、表面張力や分子の配向の濃度特性について検討する。

3.2 両親媒性物質の吸着メカニズム

両親媒性物質を溶質とする水溶液中に新たに気体が発生した時、気液界面の初期表面張力は溶媒の表面張力と等しい。その後両親媒性物質が界面に吸着することによって表面張力は低下し、数秒から数日かけて平衡状態に推移する。平衡状態に至るまでの時間は溶媒分子の種類や濃度、温度などの雰囲気環境によって変化する[1]。気液界面に対する分子の吸着動態を描いた模式図を図 3.1 に示す。溶液中の分子はまず仮想的に表現される準表面に向かって溶液から拡散する。準表面にたどり着いた後、一部の分子は溶液中に再度拡散

し、また別の一部の分子は気液界面に吸着する。一度気液界面に吸着した分子も一部はまた溶液中に向かって拡散する。分子はこの3つの層で吸着と拡散を繰り返しながら平衡状態へと推移し、それぞれの層に向かう分子の流れは気液界面における分子の吸着状態に依存する。新たにできた気液界面には分子が吸着できる空のスペースが豊富にあるため、溶液（準表面）から多くの分子が吸着する。一方で、界面での分子密度が過剰な場合には、分子の多くが溶液に向かって拡散する。

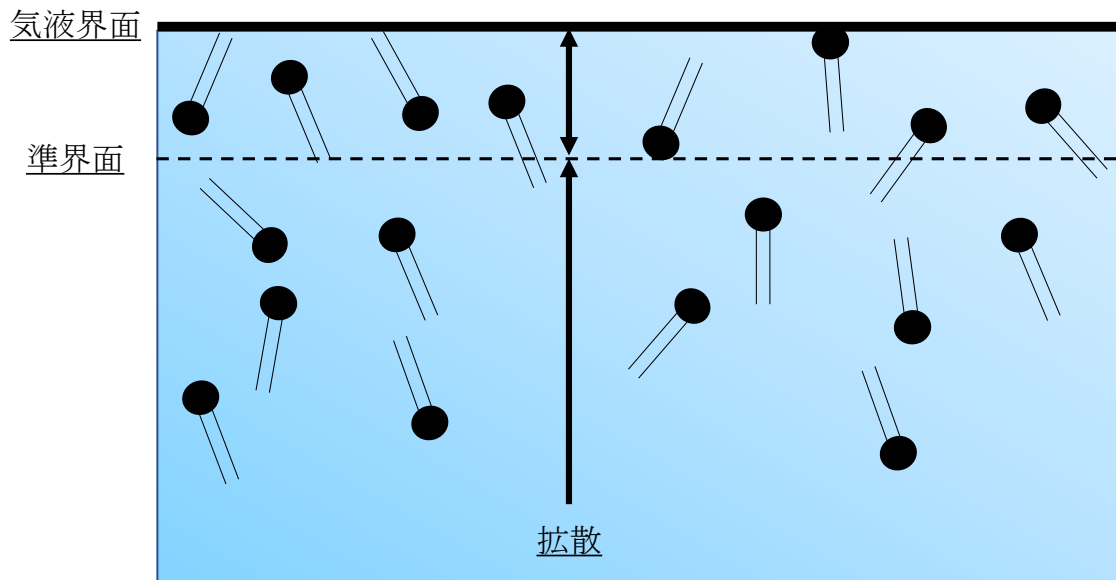


図3. 1 両親媒性物質の気液界面における吸着動態を表した概略図。

気液界面の表面張力 σ と吸着した分子濃度 Γ の関係は以下の Gibbs の方程式で表すことができる。

$$\Gamma = -\frac{1}{nBT} \cdot \frac{d\sigma}{d\ln(c_m)} \quad (3.1)$$

B は気体定数、 T は絶対温度で c_m は溶質の濃度である。非イオン性界面活性剤、中性分

子、過剰電解質存在下のイオン性界面活性剤では $n=1$ 、 $1:1$ イオン性界面活性剤では界面の電気的中性を仮定して $n=2$ となる [1]。吸着した分子は表面張力を下げるだけでなくバブルの内部気体を覆う膜として機能する。この膜は内部気体の放出を防ぎ、超音波照射によるバブルの振動挙動にも影響を与える。

3.3 両親媒性物質の吸着と表面張力

表面張力を時系列に測定する方法はいくつか存在するが、本項では Axisymmetric Drop Shape Analysis (ADSA) の計測原理を説明し、過去に本測定原理を用いて測定した Pluronic F-68 の吸着動態を示す。測定結果や先行研究から、吸着した Pluronic F-68 分子の密度や配向について考察する。加えて、他のグループによって測定されたにリン脂質の測定結果についてもまとめる。リン脂質は表 2.1 にまとめた通り、臨床で使われるバブルの主な膜材質として使用している。

3.3.1 Axisymmetric Drop Shape Analysis (ADSA)

表面張力の測定方法には、中性子反射法、オーバーフローシリンダー (OFC) 法、Wilhelmy plate 法などがある [2-5]。ADSA 法はドロップやバブルの形状から、経時的に変化する気液界面や液液界面の表面特性を簡易に測定できる方法である。プレートを溶液内に部分的に浸す Wilhelmy plate 法と比較すると少量の液体で測定可能であり、操作も単純である。図 3.2 は ADSA 法によって表面張力を測定するシステムである。透明な実験セル内を水溶液で満たし、セル上方にシリンジを固定する。シリンジとつながった針の先端は溶液内に留置し、シリンジを押し出すことで針先端にドロップやバブルを作る。このと

き、先端からバブルが浮力によって浮き上がることが無いように針先端に静止させる。実験セルを固定するケースは側面が空いておりカメラでバブルを撮影することができる。カメラに接続した PC に撮影した画像を送りバブル形状を解析する。バブルの形状は表面張力 σ や内外の圧力差であるラプラス圧 ΔP によって決定され、以下の方程式で示される。

$$\sigma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \Delta P \quad (3.2)$$

ここで R_1 と R_2 はドロップやバブル表面の法線を含み互いに直交する二つの平面について、ドロップやバブルと交わる界面の曲率半径である。この界面が水面からの深さ z の位置にある時、ラプラス圧は以下のように示すことができる。

$$\Delta P = \Delta P_0 + (\Delta \rho)gz \quad (3.3)$$

ΔP_0 は大気圧、 g は重力加速度であり、 $\Delta \rho$ はドロップやバブル内外の物質の密度差を表している。

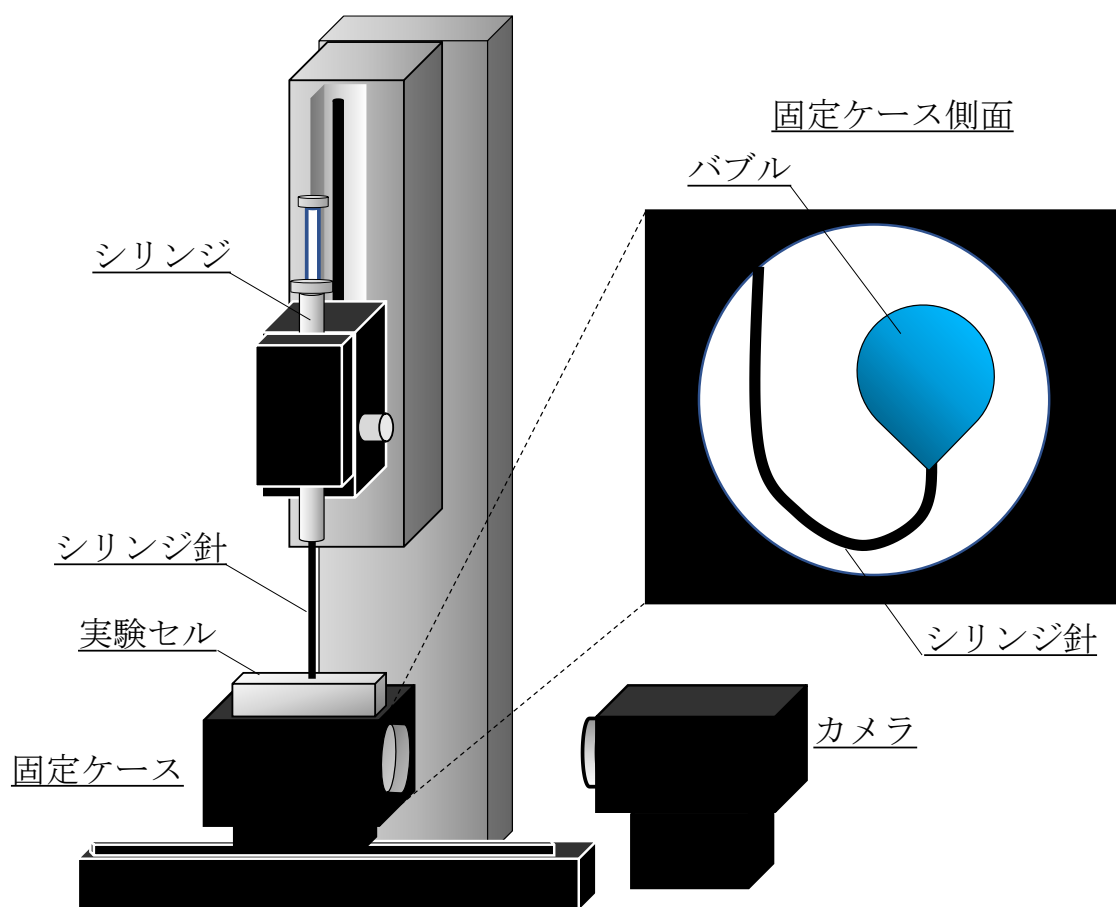


図3. 2 ADSA 法による表面張力計。

3.4 リン脂質の吸着特性

2章で述べた通りリン脂質は臨床で造影剤として使用されるバブルの膜材質として度々使われている。特に第二世代以降、研究用として作られているものを含めバブルの膜材質のほとんどにリン脂質の一種であるホスファジルコリンが使われている[6]。図3.3にホスファジルコリンの構造式を示す。極性を持ち親水基となるリン酸塩のグループと無極性で疎水基となる脂肪酸のグループをもち両親媒性を示す。DPPCやDSPCは投薬時に細胞毒性を下げるため、薬物の添加物や mRNA のカプセル化に使用されており[7]、バブルの膜材質としても使用されている。先行研究ではそれらリン脂質の気液界面の吸着特性が報告

されている[8,9]。DPPC の気液界面への吸着は 10 mM L^{-1} の濃度で平衡状態に至るまでに数時間程度かかる[9]。DPPC より短い炭素鎖の脂肪酸をもつ 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC) では 10 mM L^{-1} の濃度において数十分程度で平衡状態にいたる[10]。DMPC は比較的短時間で分子の吸着が平衡状態になるが、DPPC や DSPC より脂肪酸が短く、バブルは不安定である。脂肪酸の長い DSPC を膜材質としたバブルは DPPC や DMPC を膜材質とするバブルはより安定である[11]。

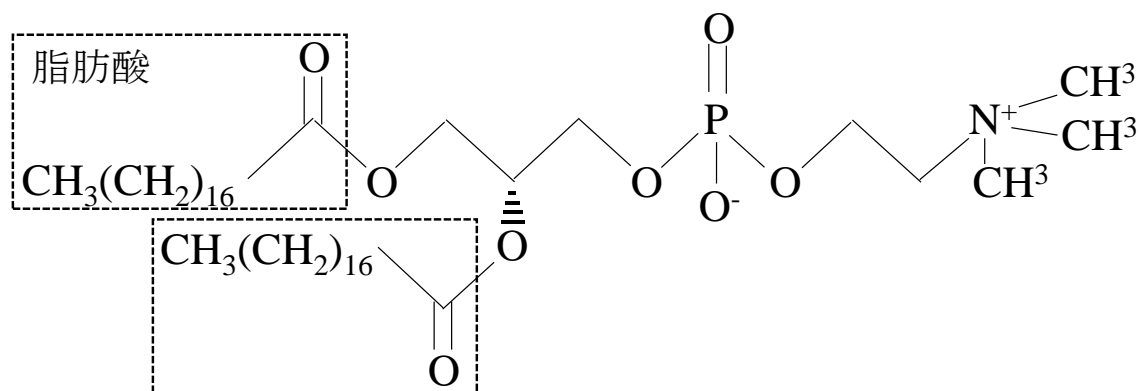


図 3. 3 リン脂質の構造式。

3.5 Pluronic F-68 分子の吸着特性

図 3.2 の観測システムで過去に測定した Pluronic F-68 の気液界面での吸着特性について示す。Pluronic F-68 濃度によって吸着した分子の配向が変わるため、それらについても検討結果を示す。

3.5.1 Pluronic 界面活性剤の特徴

図3.4はPluronicの構造式である。Pluronicはpolypropylene oxide 鎖(PPO)を中心に、polyethylene oxide 鎖(PEO)を両端に持つトリブロックコポリマーである。PEOと同様の構造式をもつPEGは血液に注入されると血液中のたんぱくが吸着することを抑制し、マクロファージからの貪食を防ぐ効果がある[12]。加えて、タンパク質や脂質をPEG化することで水溶性を改善し、腎臓での濾過を抑える効果が報告されている [13]。そのため、マイクロバブルでもリン脂質の吸着を助ける補助界面活性剤としてたびたび使われる。

Pluronicはバブルの膜材質として補助界面活性剤の効果が期待され、臨床では薬物としても使われている物質である。Pluronic の一種であるPluronic F-68は、静脈注射によって脳卒中や心筋梗塞の管理において、血栓溶解を促進し再梗塞を減少させる効果が示されている[14]。したがって、生体適合性を有しバブルの膜材質としても有望な材質である。

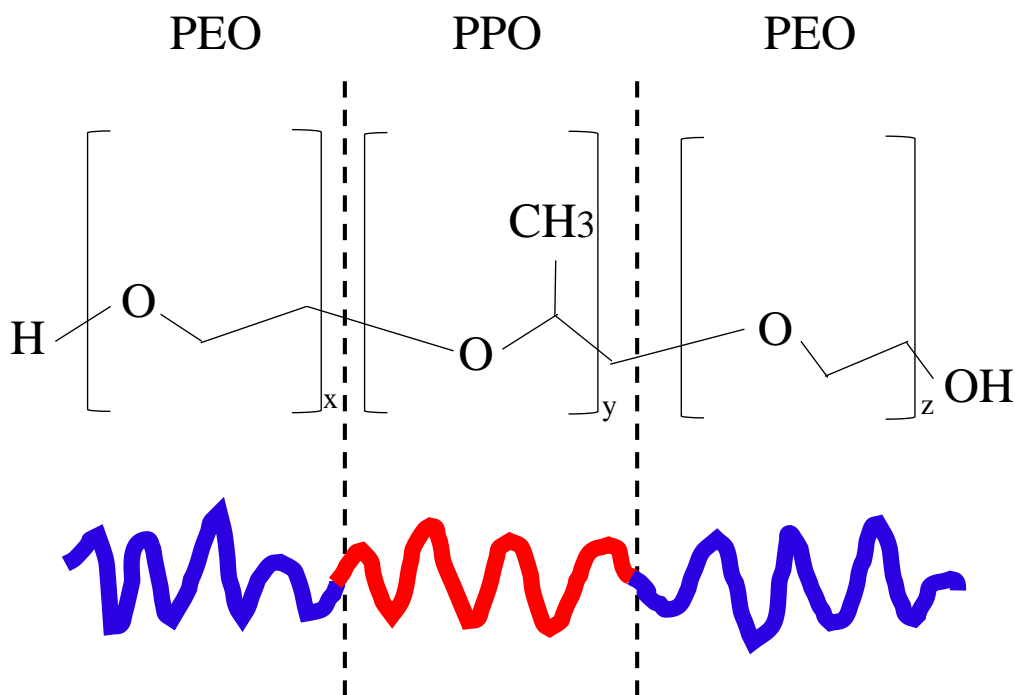


図 3.4 Pluronic 分子とその構造式。

3.5.2 フッ化炭素ガスが吸着特性や膜の構造に与える影響

フッ化炭素は工業的に高い純度で生成可能であり生産性が高い。生体内では非常に安定で、代謝されることなく呼吸によって体外に排出されるため長時間体内を循環できる。そのため、バブルの内部気体として高い有効性を持つ[15]。バブルの内部気体として使用した場合、フッ化炭素の気体分子は気液界面に吸着し、 $2\sim 5 \text{ mN m}^{-1}$ の表面張力を下げることが報告されている[16]。界面に吸着したフッ化炭素の気体分子は、水溶液の溶媒であるリン脂質が気液界面に吸着することを加速させ単分子膜を形成するための補助界面活性剤としての役割を果たすことが報告されている[17]。また、フッ化炭素分子は小さいため周膜を構成する分子間で入り込み粘性や弾性を増加させることが示唆されている[18]。

3.5.3 Pluronic F-68 分子の吸着動態

図3.2の実験系を使って過去にPluronic F-68分子の気液界面への吸着動態を観測した結果を示す[19]。シリンジ内は空気とパーフルオロヘキサン (PFH) の混合気体及び、空気を満たし、実験セル内のPluronic F-68水溶液にそれぞれ気泡を作成する。気液界面の表面張力を式3.3から求め、表面張力の時系列の変化からPluronic F-68分子の吸着動態を推定した。実験セルにはいくつかの濃度のPluronic F-68水溶液を満たし、吸着動態の濃度特性を検討した。雰囲気温度は室温 ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) であった。図3.4と図3.5はPluronic F-68水溶液の各濃度について表面張力の時系列変化を示した図である。図3.4は内部気体が空気、図3.5は内部気体がPFHと空気の混合気体である。空気とPluronic F-68水溶液界面の表面張力はバブル投入直後の初期値で約 72 mN/m であった。一方、空気とPFHの混合ガスでは約 68 mN/m であった。混合ガスに含まれるPFHが急速に界面に向かって表面張力を下げたこと

によるものであると考えられる[17]。各濃度で平衡状態に至るまでの緩和時間の特性を図3.6に示す。緩和時間は図3.4、図3.5に示すPluronic F-68の吸着特性に指数関数的減衰関数をフィッティングすることで求めた。いずれの気体を使った場合にも濃度上昇に伴い平衡状態に推移するまでの緩和時間は短縮する。空気と混合気体を使った場合の緩和時間を比較すると、中程度の濃度領域以降 ($2\sim 3\times 10^{-7}$ mol L⁻¹以降の濃度) で差は見られなかった。一方で $2\sim 3\times 10^{-7}$ mol/L 以下の低濃度では混合ガスを使用した場合に緩和時間が短くなった。PFH分子は、ベジクル状態で液体に存在するリン脂質に対して補助界面活性剤の効果を発揮することが示されており、分子の吸着を加速させることが観測されている[10,17,20]。これは脂肪酸の炭化水素鎖が短いリン脂質である Dioctanoylphosphatidylcholine (DOPC) とPFHの物性値で実施したシミュレーションでも観測されており、互いの強いファンデスワールス力によって起こることが明らかになっている[21]。Pluronic F-68水溶液中においても、混合気体に含まれるPFHが気液界面に急速に向かって、表面張力の初期値を下げる。続いて、界面に現れたPFH分子がPluronic F-68分子の吸着を加速させたことが考えられる[17]。しかし、PFH分子による吸着の補助効果はPluronic F-68濃度の上昇にともない減少し、 3×10^{-7} mol L⁻¹程度の濃度でほとんど補助界面活性剤としての効果は果たされていない。これはPFHが気液界面から気体内部に戻ることで発生する可能性がある[17]。

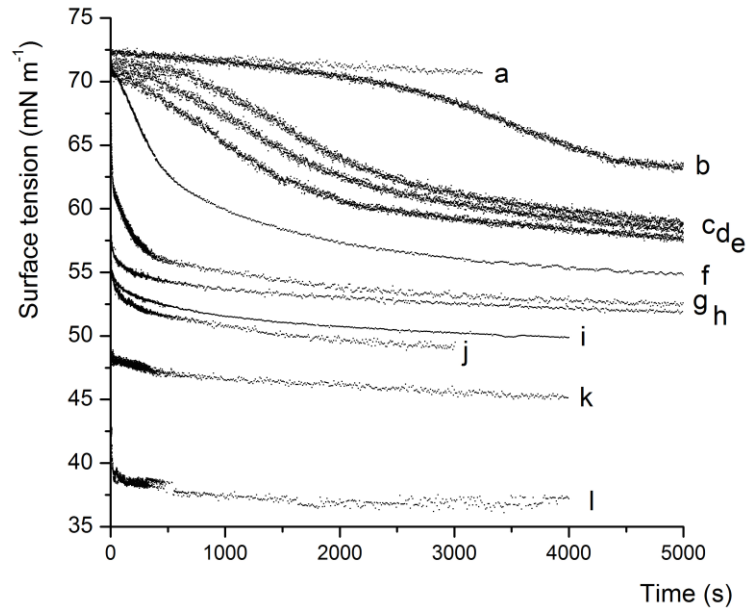


図 3.4 Pluronic F-68 の吸着動態 (空気)。Pluronic F-68 濃度 (mol L^{-1}): a) 5.0×10^{-8} , b) 1.0×10^{-7} , c) 2.0×10^{-7} , d) 2.6×10^{-7} , e) 3.5×10^{-7} , f) 4.0×10^{-7} , g) 1.0×10^{-6} , h) 4.0×10^{-6} , i) 4.0×10^{-5} , j) 1.0×10^{-4} , k) 1.0×10^{-3} , l) 1.0×10^{-2} 。

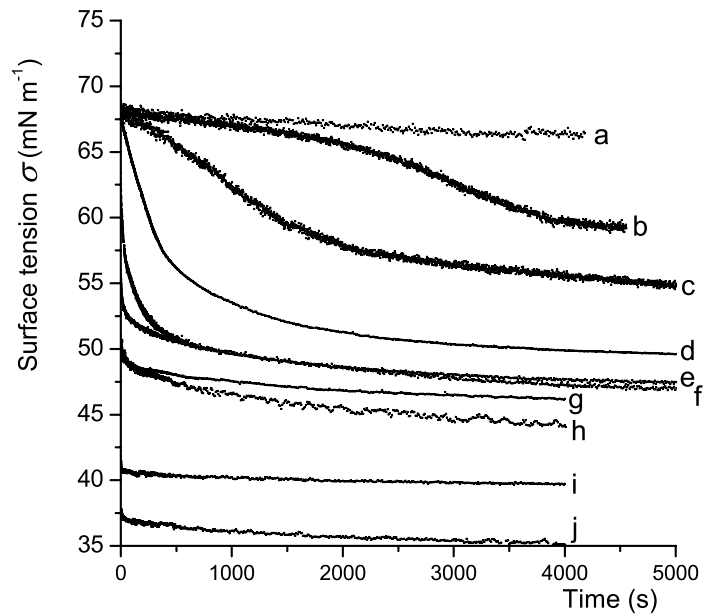


図 3.5 Pluronic F-68 の吸着動態 (PFH)。Pluronic F-68 濃度 (mol L^{-1}): a) 1.0×10^{-8} , b) 1.5×10^{-7} , c) 2.0×10^{-7} , d) 4.0×10^{-7} , e) 1.0×10^{-6} , f) 1.0×10^{-5} , g) 4.0×10^{-5} , h) 1.0×10^{-4} , i) 1.0×10^{-3} , j) 1.0×10^{-2} 。

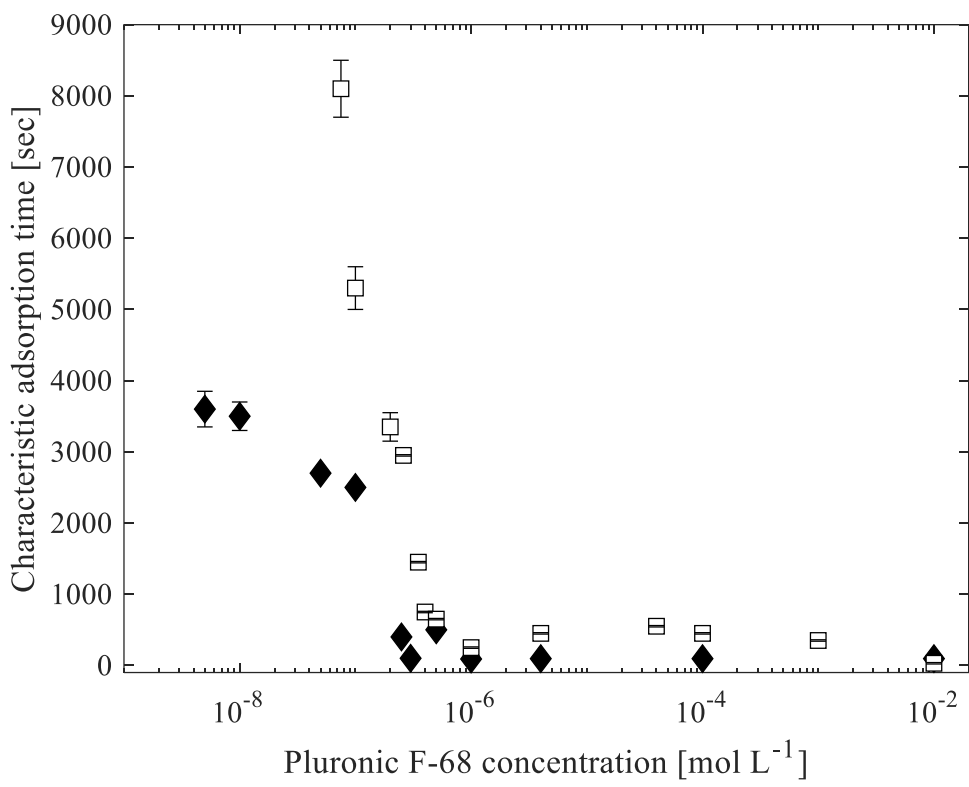


図 3.6 様々な Pluronic F-68 濃度における緩和時間。中空の四角のプロットは内部気体が空気、ひし形のプロットは内部気体が PFH。

3.5.4 Pluronic F-68 分子配向の濃度依存性

図 3.4 と図 3.5 に示す吸着動態の濃度特性に、指数関数的減衰関数をフィッティングすることによって平衡状態の表面張力 σ_{eq} を決定した。図 3.7 は初期表面張力値 (σ_0) と平衡状態時の表面張力値との差分 $\pi = \sigma_0 - \sigma_{eq}$ について、濃度特性を示した図である。本結果は偏光解析結果や表面張力測定を行っている他の先行研究結果ともよく一致している [22]。図 3.7 を見ると、少なくとも 2 度の相転移が発生していることがわかる [19]。低濃度域では Pluronic F-68 分子の吸着は弱く、溶液中に溶けているわずかな分子が界面に吸着している。続いて中程度の濃度域 (π_1) では、Pluronic F-68 分子中央の疎水基は気相

に対して平衡であるが疎水基両端にある親水基は周囲の水溶液に緩やかに向く。この分子の再配向によって密度が高まり、気液界面に空のスペースができた。そのため次の相転移 (π_2) が発生する濃度まで、追加で Pluronic F-68 分子が吸着する。 π_2 濃度以降に達すると両端の親水基はより適した状態に配向を変え（親水基がより一層水を向かって配向する）、分子は高密度で界面に吸着する。他の先行研究と比較すると、図 3.5 に示す π カーブは高濃度側にシフトしている [22]。この差はおそらく測定手法の違いによるものだと考えられる（Wilhelmy plate 法 vs ADSA 法）。しかしながら、それらの相転移は同程度の表面張力で発生しており、それぞれ最初の相転移は $\sim 10 \text{ mN m}^{-1}$ [23] と $\sim 12 \text{ mN m}^{-1}$ （実験結果）、そして 2 回目の相転移では $\sim 18 \text{ mN m}^{-1}$ [23] と $\sim 20 \text{ mN m}^{-1}$ （実験結果）であった。PFH は図 3.5 に示す濃度領域全てで約 $5 \sim 10 \text{ mN m}^{-1}$ 表面張力を減少させた。最も低い Pluronic F-68 濃度 ($1 \times 10^{-8} \text{ M L}^{-1}$) でもこの現象は観測され、 $\sim 3 \text{ mN m}^{-1}$ 表面張力は減少した。この値は純粋な水（Pluronic F-68 分子がない）と PFH 気体の界面において、PFH によって減少した表面張力に相当する値である。これは PFH 気体分子が、吸着した Pluronic F-68 分子の間に位置し表面張力を下げているか、もしくは PFH がより多くの Pluronic F-68 分子を吸着させることを示唆している。図 3.7 の π カーブの特性では、相転移の発生を反映する 3 つの平坦部 ($> \pi_1$ 、 $> \pi_2$ 、 $> \pi_3$) を示した。PFH の有無にかかわらず発生しており、同程度の濃度条件で見られることから PFH 気体分子は Pluronic F-68 分子配向の変化や吸着を妨げる働きはないと考えられる。ここから Pluronic F-68 分子の構造が変化する時、PFH 気体分子が気液界面から放出されると考えられる。

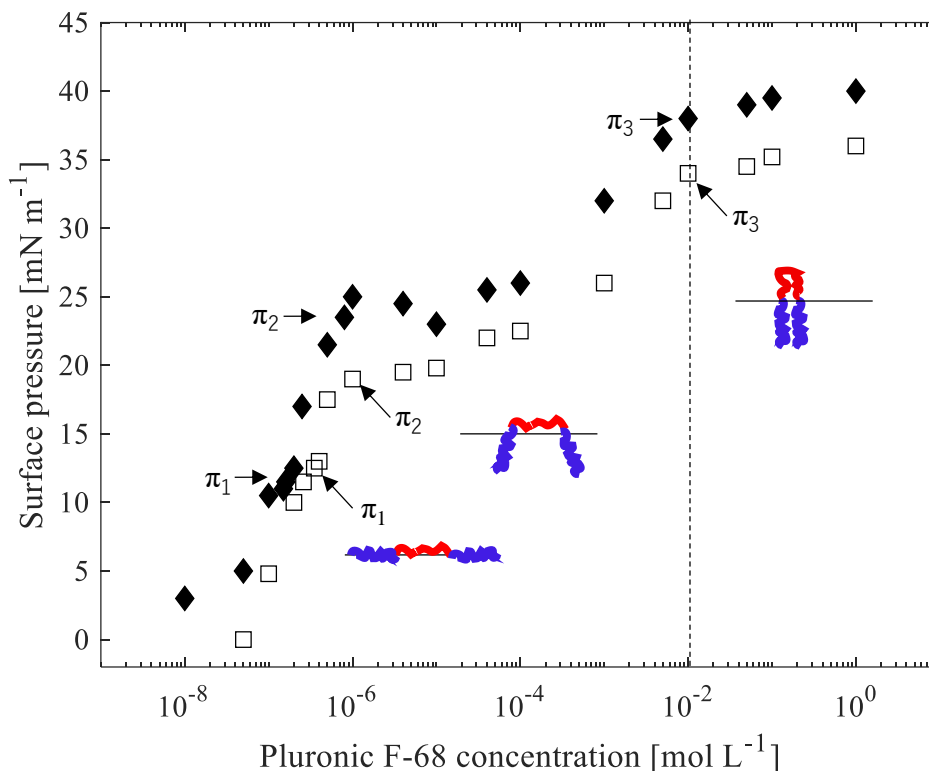


図 3.7 様々な Pluronic F-68 濃度における平衡時の表面張力の変化。中空の四角のプロットは内部ガスが空気、ひし形のプロットは内部ガスが PFH。 π_1 および π_2 は、Pluronic F-68 ギブス膜で起こる相転移である。 π_3 は、臨界ミセル濃度に相当する。

3.6 総括

臨床で 사용되는マイクロバブルは脂質や界面活性剤などの両親媒性物質が内部気体を覆う。本章では、両親媒性物質が気液界面に吸着する現象を電気化学、熱力学的な視点から説明した。そして補助界面活性剤として有望な Pluronic F-68 分子の気液界面における吸着動態の観測結果を示した。結果として Pluronic F-68 分子の吸着動態は水溶液中の濃度や内部気体との相互作用によって変化することを示した。加えて、Pluronic F-68 濃度の上昇にともない分子の配向が変化することを確認した。バブル表面の分子の密度や分子の配向と膜の物性を関連づけることはバブルを設計する上で非常に重要な情報となる。

参考文献

- [1] Eastoe, J. Dalton, J. S. Dynamic surface tension and adsorption mechanisms of surfactants at the air–water interface. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2000, 85, 103-144.
- [2] Dukhin, S. S. Kretzschmar, G. Miller, R. Dynamics of Adsorption at Liquid Interfaces, Elsevier, Amsterdam, 1995.
- [3] Rusanov, A.I. Prokhorov, V.A. Interfacial Tensiometry, Elsevier, Amsterdam, 1996.
- [4] Chien-Hsiang, C. Elias, I. F. Adsorption dynamics of surfactants at the air/water interface: a critical review of mathematical models, data, and mechanisms. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 1995, 100, 1-45.
- [5] Miller, R. Joos, P. Fainerman, V. B. Dynamic surface and interfacial tensions of surfactant and polymer solutions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1994, 49, 249-302.
- [6] Zhao, Y. Z. Du, L. N. Lu, C. T. Jin, Y. G. Ge, S. P. Potential and problems in ultrasound-responsive drug delivery systems. *Int J Nanomedicine*. 2013, 8, 1621-1633.
- [7] Ohgoda, O. Robinson, I. N. Toxicological evaluation of DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). *Fundam Toxicol Sci.*, 2020, 7, 55–76.
- [8] Hollinshead, C. M. Harvey, R. D. Barlow, D. J. Webster, J. R. Hughes, A. V. Weston, A. Lawrence, M. J. Effects of surface pressure on the structure of distearoylphosphatidylcholine monolayers formed at the air/water interface. *Langmuir*. 2009, 25, 4070-4077.
- [9] Nguyen, P. N. Waton, G. Vandammeb. T. Krafft, M. P. Reversing the course of the competitive adsorption between a phospholipid and albumin at an air–water interface. *Soft Matter*, 2013, 9, 42, 9972-9976.
- [10] Rossi, S. Waton, G. Krafft, M. P. Small Phospholipid-Coated Gas Bubbles Can Last Longer than Larger Ones. *ChemPhysChem*, 2008, 9, 1982-1985
- [11] van Rooij, T. Luan, Y. Renaud, G. van der Steen, A. F. W. de Jong N. Kooiman, K. Acoustical response of DSPC versus DPPC lipid-coated microbubbles. 2013 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS) 2013, 310-313.

- [12] Rapoport, N. Kennedy, A. M. Shea, J. E. Scaife, C. L. Nam, K. H. Ultrasonic nanotherapy of pancreatic cancer: lessons from ultrasound imaging. *Mol Pharm.*, 2010, 7, 22-31.
- [13] Suzuki, R. Takizawa, T. Kuwata, Y. Mutoh, M. Ishiguro, N. Utoguchi, N. Shinohara, A. Eriguchi, M. Yanagie, H. Maruyama, K. Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome. *Int J Pharm.* 2008, 346, 143-150.
- [14] Moghimi, S. M. Hunter, A. C. Dadswell, C. M. Savay, S. Alving, C. R. Szebeni, J. Causative factors behind poloxamer 188 (Pluronic F68, Flocor)-induced complement activation in human sera. A protective role against poloxamer-mediated complement activation by elevated serum lipoprotein levels. *Biochim Biophys Acta.* 2004, 1689, 103-113.
- [15] Schutt, E. G. Klein, D. H. Mattrey, R. M. Riess, J. G. Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: the key role of perfluorochemicals. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2003, 42, 3218-3235.
- [16] Song, G. Liang, C. Yi, X. Zhao, Q. Cheng, L. Yang, K. Liu, Z. Perfluorocarbon-Loaded Hollow Bi₂Se₃ Nanoparticles for Timely Supply of Oxygen under Near-Infrared Light to Enhance the Radiotherapy of Cancer. *Adv. Mater.*, 2016, 28, 2716-2723.
- [17] Nguyen, P. N. Trinh Dang, T. T. Waton, G. Vandamme, T. Krafft, M. P. A nonpolar, nonamphiphilic molecule can accelerate adsorption of phospholipids and lower their surface tension at the air/water interface.. 2011, *ChemPhysChem*, 12, 2646-2652.
- [18] Mielke, S. Abuillan, W. Veschgini, M. Liu, X. Konovalov, O. Krafft, M. P. Tanaka, M. Influence of Perfluorohexane-Enriched Atmosphere on Viscoelasticity and Structural Order of Self-Assembled Semifluorinated Alkanes at the Air-Water Interface. *Chemphyschem*, 2019, 20, 1698-1705.
- [19] Ando, Y. Tabata, H. Sanchez, M. Cagna, A. Koyama, D. Krafft, M. P. Microbubbles with a self-assembled poloxamer shell and a fluorocarbon inner gas. *Langmuir* 2016, 32, 12461–12467.
- [20] Szijjarto, C. Rossi, S. Waton, G. Krafft, M. P. Effects of perfluorocarbon gases

on the size and stability characteristics of phospholipid-coated microbubbles-osmotic effect versus interfacial film stabilization. *Langmuir* 2012, 28, 1182–1189.

[21] Krafft, M. P. Fainerman, V. B. Miller, R. Modeling of the effect of fluorocarbon gases on the properties of phospholipid monolayers and the adsorption dynamics of their aqueous solutions or dispersions. *Colloid Polym. Sci.*, 2015, 293, 3091–3097.

[22] Tharmalingam, T. Ghebeh, H. Wuerz, T. Butler, M. Pluronic enhances the robustness and reduces the cell attachment of mammalian cells. *Mol. Biotechnol.* 2008, 39, 167–177.

[23] Muñoz, M. G. Monroy, F. Ortega, F. Rubio, R. G. Langevin, D. Monolayers of symmetric triblock copolymers at the air-waterinterface. 1. Equilibrium properties. *Langmuir* 2000, 16, 1083–1093.

4. 超音波照射下におけるバブルの振動特性と膜の粘弾性

4.1 緒言

バブルと超音波を組み合わせたドラッグデリバリーシステムでは、バブルの振動挙動が血管透過性亢進を決定する重要な現象となる。まず、本章では、自由気泡（膜無し）の振動挙動をモデル化した Rayleigh-Plesset 方程式を示す。次に、界面活性剤などで覆われたバブルの振動挙動の理論モデルを示す。この理論モデルは Rayleigh-Plesset 方程式を基に開発されたものである。

つづいて、本章では粒径分布の異なるバブルの振動挙動を2つの実験系を使って測定した結果を示す。1つはレーザードップラー振動計を用いて超音波照射下での単一バブルの振動挙動を観測した。本システムでは数十 μm の比較的大きな粒径のバブルについて検討する。もう一方は臨床応用が期待できる数 μm の小さな粒径のバブルについて、パルス音波の減衰特性から振動挙動を推定した。さらに、測定した減衰特性に振動挙動の理論モデルを適応することで、バブル表面を覆う分子膜の粘弾性を推定した。3章に示した Pluronic F-68 分子の吸着状態と本章で推定した膜の粘弾性の値や振動特性から、これらの関連性について検討した。

4.2 自由気泡の振動モデル

Rayleigh-Plesset 方程式はバブルの半径 R の変化を検討することで求めることができる。超音波照射によるバブルの球形振動は、周囲流体が非圧縮性で照射する超音波の波長がバブルの径に対して十分に長いと仮定すると、バブル中央からの距離 $r(t)$ における周囲液体

の速度は逆二乗の法則から以下の通りに表現することができる。

$$\dot{r}(t) = \frac{R^2(t)}{r^2(t)} \dot{R}(t), \quad (4.1)$$

ここで $R(t)$ と $\dot{R}(t)$ はそれぞれバブルの半径と表面の速度である。この時のバブルの表面は回転しないので、速度ポテンシャル ϕ は以下の通りとなる。

$$\phi = \int_r^\infty \dot{r}(t) = -\frac{R^2(t)}{r(t)} \dot{R}(t), \quad (4.2)$$

そして、式(4. 1)、(4. 2)とベルヌーイの定理から液体の動きを求めることができる。

$$\frac{P-P_\infty}{\rho} = -\frac{\partial\phi}{\partial t} - \frac{1}{2}\dot{r}^2 = \frac{2R\dot{R}^2+R^2\ddot{R}}{r} - \frac{1}{2}\frac{R^4\dot{R}^2}{r^4}, \quad (4.3)$$

P と ρ はそれぞれ周囲液体の圧力と密度であり、 P_∞ は無限遠における周囲液体の圧力である。ここで、バブル表面に注目すると、 $r = R$ となるため、式(4. 3) は以下の通りとなる。

$$\frac{P-P_\infty}{\rho} = R\ddot{R} - \frac{3}{2}\dot{R}^2, \quad (4.4)$$

ここで $P = P(t)$ はバブル表面の圧力である。そして無限遠における周囲液体の圧力 P_∞ は $P_\infty = P_0 + P_a(t)$ と表すことができる。 P_0 は周囲液体の圧力であり、 $P_a(t)$ は超音波によって与えられる圧力である。バブル内の圧力分布が一様であると仮定すると内部気体の圧力 P_g

は $r = R_0$ で以下の通りに表すことができる。

$$P_g = P_0 + \frac{2\sigma}{R_0}, \quad (4.5)$$

σ は周囲液体の表面張力で、 R_0 は平衡時のバブルの半径である。温度一定でバブルの半径が R_0 から R に変化する時、ボイル - シャルルの法則から内部気体の圧力 P_i を求めることができる。

$$P_i = P_g \left(\frac{\frac{4}{3}\pi R_0^3}{\frac{4}{3}\pi R^3} \right)^\gamma = \left(P_0 + \frac{2\sigma}{R_0} \right) \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\gamma}, \quad (4.6)$$

γ は内部ガスの比熱比である。したがって、式 (4. 4) と (4. 6) から

$$R\ddot{R} - \frac{3}{2}\dot{R}^2 = -\frac{1}{\rho} \left\{ \left(P_0 + \frac{2\sigma}{R_0} \right) \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\gamma} - \frac{2\sigma}{R} - P_0 - p_a(t) \right\} \quad (4.7)$$

周囲液体の粘性 μ を考慮すると、式 (4. 7) は以下のように示すことができる [1].

$$R\ddot{R} - \frac{3}{2}\dot{R}^2 = -\frac{1}{\rho} \left\{ \left(P_0 + \frac{2\sigma}{R_0} \right) \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\gamma} - \frac{2\sigma}{R} - \frac{4\mu\dot{R}}{R} - P_0 - p_a(t) \right\} \quad (4.8)$$

式 (4. 7) および (4. 8) が一般的に “Rayleigh-Plesset 方程式” とよばれている。

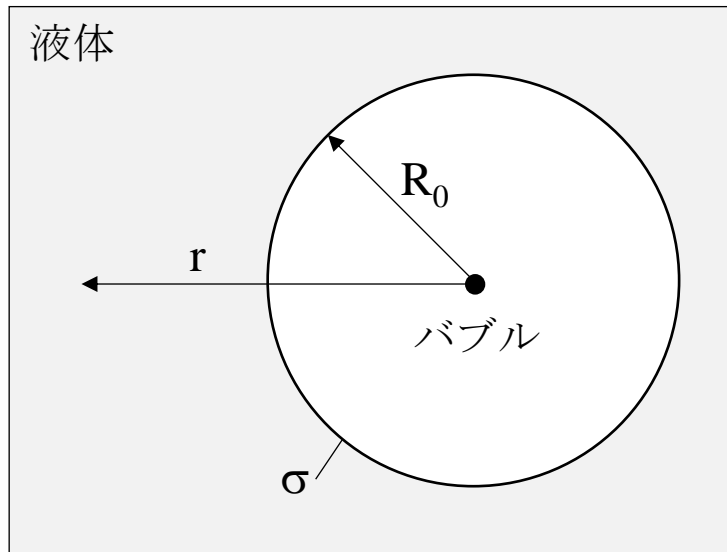


図4.1 水中の自由気泡の模式図。 R_0 はバブル半径、 r はバブル原点からの距離、 σ は水の表面張力。

4.3 バブルの線形振動と膜の粘弾性

診断および治療応用が期待されるバブルは、リン脂質やタンパク質、界面活性剤などがバブル周囲に吸着し膜を自己組織化する。周囲の膜がない自由気泡と比較して、バブルの振動挙動は膜の粘性や弾性に影響を受ける。本項では、脂質や界面活性剤などの両親媒性物質が周囲を覆うバブルについて、超音波照射下における振動挙動の理論モデルを示す。自由気泡の理論モデルである Rayleigh-Plesset 方程式を基に、分子膜が振動挙動に与える効果を考慮した理論モデルはいくつか検討されてきた。de Jong らは初めて膜の摩擦係数とばね定数を理論モデルに組み込み、続いて、Church[2]や Hoff [3]らが膜厚と表面張力を検討することでモデルを進展させた。Chatterjee と Sarkar は、膜厚が無限小であり膜の構造は厚み方向に対して非均質でかつ異方性であると仮定してモデルを構築した[4]。リン脂質バブルでは超音波の照射音圧上昇に伴い、“Compression only behavior”や“Rupture”といった非線形振動が現れる。前者は負圧時にバブルがほとんど拡張せず、正圧時にバブル

が収縮する現象である。特に、収縮時にはリン脂質の膜に皺が発生し表面張力は0として扱われることが妥当と考えられている。後者は、正圧時にほとんど収縮せず、負圧時は顕著にバブルが拡張する現象である。拡張時、界面に整列する分子同士は極端に離れるため拡張率に応じて表面張力が増加する[5-7]。リン脂質バブルの場合、10kPa程度の音圧でこの非線形振動はみられる[8]。非線形振動である”Compression only behavior”や”Rupture”は、どちらも経時的に変化するバブル径によって表面張力が変化する。Marmottantらは、バブル径によって表面張力が変化する項を組み込んだ非線形モデルを構築している[7]。

これまでに Pluronic F-68 分子単体でバブルを作製し膜の物性を評価した報告はほとんどない。したがって本論文では Pluronic F-68 分子膜の基本的な物性を検討するため、Sarkar と Chatterjee による線形振動のモデルを使って Pluronic F-68 膜の粘弾性を検討する。Sarkarらは初め、バブル界面の膜に粘性のみを適応 (Newtonian viscous rheology) してモデルを構築した。このモデルの妥当性は臨床ですでに使用されている Optison (GE Healthcare, Princeton, NJ,)をつかって検証された。しかしながら、このモデルから推定された表面張力は、 900 mN m^{-1} と顕著に高い値を示した。水と空気界面の表面張力は 72 mN m^{-1} 程度であり通常脂質分子が界面に吸着するとさらに表面張力は低下する。これらの現象を考慮すると、明らかに実際の表面張力とかけ離れた数値を推定している。この結果から、臨床で使われるバブルについて周囲の膜は粘性だけではなく弾性も考慮すべきであると彼らは考察した[4,9]。

周囲の膜について粘性のみを考慮すると、界面応力の一般形 τ_s と力のつり合いによって生じる周囲の粘性応力による力 $[\tau \cdot \mathbf{n}]_{\text{surface}}$ は以下のように記述できる。

$$\begin{aligned} \tau_s &= \sigma I_s + (\kappa^s - \mu^s)(I_s : d_s)I_s + 2\mu^s d_s \\ [\tau \cdot \mathbf{n}]_{\text{surface}} &= \Delta_s \cdot \tau_s \end{aligned} \tag{4.10}$$

κ^s と μ^s はせん断方向と径方向の粘性であり、 I_s と Δ_s 、 d_s はそれぞれ表面の応力テンソル、勾配演算子、歪率テンソルである[10]。式(4.6)で示された内部気体の圧力は以下の通り変形することができる。

$$P_i = (P_g) \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\gamma} - 4\mu \frac{\dot{R}}{R} - \frac{4\kappa^s \dot{R}}{R^2} - \frac{2\sigma}{R}, \quad (4.11)$$

したがってニュートンレオロジーを使ったRayleigh-Plesset-type方程式は以下の式の通りになる。

$$R\ddot{R} - \frac{3}{2}\dot{R}^2 = -\frac{1}{\rho} \left\{ \left(P_0 + \frac{2\sigma}{R_0} \right) \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\gamma} - 4\mu \frac{\dot{R}}{R} - \frac{4\kappa^s \dot{R}}{R^2} - \frac{2\sigma}{R} - P_0 - p_a(t) \right\}, \quad (4.12)$$

ここで吸着した分子の数が少ない場合、内部気体は膜のない自由気泡のようにふるまう。しかしながら、臨床で使われるようなバブルは吸着した分子が高密度で存在しバブルの周囲を覆っている。このような状況で隣接するような分子は互いに相互作用し、バブル表面に弾性的な影響を与える[10]。Gibbsによると、バブルの拡張に対する弾性 E^s は以下の示すように、表面張力の勾配による効果として扱うことができる[10]。

$$E^s = A \frac{\partial \sigma}{\partial A} = \frac{\partial \sigma}{\partial D}, \quad (4.13)$$

ここで $A = 4\pi r^2$ はバブルの表面積である。 D はバブルの表面の拡張率であり以下の通りである。

$$D = \ln \left(\frac{A}{A_0} \right), \quad (4.14)$$

A_0 は表面積の初期値である。バブルが振動している間は溶液中に溶けている分子は追加で吸着することはない、吸着している分子は界面から離れることはないと仮定する。表面積の変化が表面積の初期値に対して十分に小さい時 ($\Delta A \ll A_0$)、表面の拡張率 D は以下のよう示せる。

$$D = \ln\left(\frac{A_0 - \Delta A}{A_0}\right) \approx \frac{\Delta A}{A_0} = \frac{A - A_0}{A_0} = \left(\frac{R}{R_E}\right)^2 - 1, \quad (4.15)$$

$$\Delta\sigma \approx \frac{\partial\sigma}{\partial A} \Delta A = A \frac{\partial\sigma}{\partial A} \frac{\Delta A}{A} \approx E^S D, \quad (4.16)$$

したがって、

$$\sigma = \sigma_0 + \Delta\sigma = \sigma_0 + E^S D, \quad (4.17)$$

膜の弾性項を検討すると内部気体の圧力は $r = R$ で次のようになる。

$$P_i = P_g - 4\mu \frac{\dot{R}}{R} - \frac{4\kappa^S \dot{R}}{R^2} - \frac{2\sigma_0}{R_0} - \frac{2E^S}{R_0} \left[\left(\frac{R}{R_E}\right)^2 - 1 \right], \quad (4.18)$$

内部気体の初期圧力は以下の通りである。

$$P_g = P_0 + \frac{2\sigma_0}{R_0} + \frac{2E^S}{R_0} \left[\left(\frac{R}{R_E}\right)^2 - 1 \right], \quad (4.19)$$

式 (4.12) と (4.18) から弾性項を考慮した modified Rayleigh-Plesset 方程式を得ることが

できる。

$$R\ddot{R} - \frac{3}{2}\dot{R}^2 = -\frac{1}{\rho}\left\{\left(P_0 + \frac{2\sigma_0}{R_0} + \frac{2E^s}{R_0}\left[\left(\frac{R}{R_E}\right)^2 - 1\right]\right)\left(\frac{R_0}{R}\right)^{3\gamma} - 4\mu\frac{\dot{R}}{R} - \frac{4\kappa^s\dot{R}}{R^2} - \frac{2\sigma_0}{R_0} + \frac{2E^s}{R_0}\left[\left(\frac{R}{R_E}\right)^2 - 1\right] - P_0 - p_a(t)\right\}, \quad (4.20)$$

駆動する超音波の圧力 $p_a(t) = P_A \sin \omega t$ と仮定する。ここで f は駆動周波数、 $\omega = 2\pi f$ は角周波数であり、 P_A は音波の振幅である。バブルの振動振幅が初期径に対して非常に小さい場合、バブルの振動振幅を ΔR とし、初期径を R_0 すると、 $R = R_0 + \Delta R = R_0(1 + \varepsilon)$, $\varepsilon \ll 1$ と書ける。したがって式 (4.20) の理論モデルは以下のように表現できる

$$\ddot{\varepsilon} + \frac{1}{\rho R_0^2}\left(4\mu + \frac{4\kappa^s}{R_0}\right)\dot{\varepsilon} + \frac{1}{\rho R_0^2}\left(3kP_0 - \frac{4\sigma_0}{R_0} + \frac{4E^s}{R_0}\right)\varepsilon = \frac{P_A}{\rho R_0^2}\sin \omega t, \quad (4.21)$$

4.6 項では導出した式 (4.21) を使って膜の粘弾性を導出する。

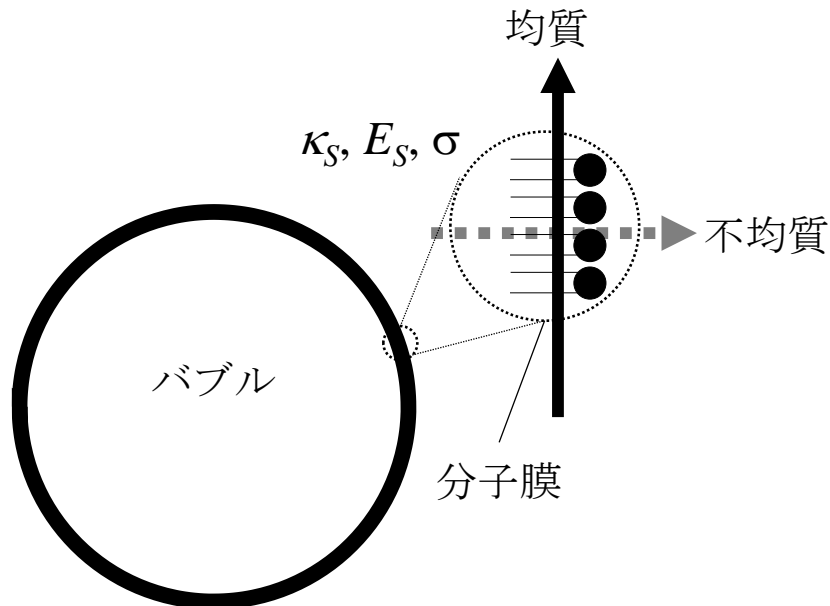


図 4.2 内部気体の周囲を膜が覆うバブルの模式図。 κ_s が膜の粘性、 E_s が膜の弾性。

4.4 光学システムで測定した Pluronic F-68 バブルと DMPC バブルの振動特性

通常、光学顕微鏡とハイスピードカメラを組み合わせた場合、解像度の問題からバブルの微小振動をとらえることは難しい。線形領域でバブルを振動させるためには低音圧の音波を照射する必要があり、振動振幅は極めて小さい ($0.5 \mu\text{m}$ 程度)。したがって、振動挙動を正確に測定するためには極めて高い解像度が求められる[5,11]。過去に微小振動を測定するために、反射光のドップラー効果によって振動挙動を計測できるレーザードップラー振動計 (LDV) と光学顕微鏡組み合わせたシステム開発し、 10nm 以下の微小振動が測定可能であることを示した[5,11,12]。本研究でも同様の光学測定システムを使ってバブルの微小振動を測定する。

4.4.1 実験方法

実験で使用する材料

Pluronic F-68 は Sigma - Aldrich [(PEO)A(PPO)B(PEO)A; CAS 登録番号 9003-11-6;]の物を使用した。分子量 (M_w)は製造元によると $\sim 8400 \text{ g mol}^{-1}$ であったが、光学測定システムで実際に測定した結果は $\sim 9050 \text{ g mol}^{-1}$ であった。各ブロックの重合度 ($NA = 2 \times 76$, $NB = 29$) は基準値から計算した。多分散指数 ($M_w/M_n = 1.15$, M_n は数平均分子量)は テトラヒドロフラン (THF) を溶媒としてゲル浸透クロマトグラフィーを使って得た。リン脂質の一種である 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)は日油株式会社 [CAS 登録番号 18194-24-6; 分子量 677.9]の物を使用した。Pluronic F-68 と DMPC はバ

ブルの周囲を覆う分子膜として使われた。超純水(CAS 登録番号 7732-18-5)は富士フィルム和光純化学会社の物を使用した。

超音波照射による振動特性を測定するための光学システム

超音波照射下における DMPC バブルと Pluronic F-68 バブル（内部気体は、空気もしくは PFH と空気の混合ガス）の振動特性を光学システムで観測した。図 4.3 に単一バブルの振動挙動を測定するシステムを示す。透明な実験セル(50 × 50 × 50 mm)に $0 \sim 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ のいくつかの濃度で Pluronic F-68 もしくは DMPC 水溶液を満たした。空気もしくは混合気体（PFH と空気）を満たしたシリンジから実験セル内に気体を注入し、実験セル中央に固定したスライドガラスにバブルを付着させた。いずれの気体で作成したバブルも粒径はおよそ 20~150 μm であった。スライドガラスにバブルを付着させた後、Pluronic F-68 分子や DMPC 分子は気液界面に吸着する。他グループの先行研究や過去の研究で、本実験で検討する Pluronic F-68 や DMPC の濃度範囲において分子の吸着が平衡状態に至るまでにおよそ 10~60 分程度かかることを報告した[13,14]。したがって Pluronic F-68、DMPC のいずれの濃度条件においても超音波照射までに 60 分間時間を置いた。ボルト締めタイプのランジュバン振動子（Fuji Ceramics, Fujinomiya, Japan）は実験セルの底部に接着した。38.8 kHz の連続正弦波の電気信号を入力し、半波長共振モードで振動子は駆動させた。音波は実験セルの底面を介して水溶液中に放射される。照射した音波について水面と実験セル底面間を反射する音波によって定在波を形成させる。そのため実験セル内に入れる水溶液の水位を $n\lambda/2$ となるように調整する。ここで n は整数で λ は照射した超音波の波長である。実験中は振動子の電気的アドミタンスをモニタリングすることによって、共振条件を維持し実験セル内の音圧分布を一定にした。中央に設置したガラスプレートの厚みは数百マイクロメートル程度で照射下超音波の波長に対して極めて薄い。したが

って、音圧分布への影響は極めて小さい。効率的にバブルを振動させるため、ガラスプレートとマイクロバブルは定在波の腹に位置させた。対物レンズ (M Plan Apo 20× or 100×, Mitutoyo, Kanagawa, Japan) がつながった LDV (NLV2500, PI Polytech, Waldbronn, Germany) のセンサーヘッドは定在波中のバブルの振動を測定するため実験セル上部に設置した。LDV から照射される赤色のレーザーは収束点でおよそ $1.5\ \mu\text{m}$ であり、これが垂直にバブルの表面に集中するよう LDV に接続した 3 軸ステージで移動させた。反射光のドップラー効果によってバブルの径方向の振動成分を計測し、振動特性を測定する。測定したバブルの振動波形と振動子に入力した電流波形から位相特性をもとめ、振動特性から求めたバブルの共振特性と比較する。計測点における音圧はニードルハイドロホン (Type 8103, Brüel & Kjær, Nærum, Denmark) を使い測定し、約 $7.2\ \text{kPa}$ の音圧だった。バブルの振動モードは音圧上昇にともない線形から非線形に遷移する。リン脂質を使ったバブルではこれらの振動モードの閾値は $10\ \text{kPa}$ 程度であることが先行研究で報告されている[8]。この閾値はバブルの作成方法やシェルの材質によって変化するが[15]、本実験環境の音圧は十分に小さいためバブルの線形振動を測定していると考ええる。バブルの振動挙動の測定中、照射した音波によってガラスプレートが屈曲しバブルの振動と重畳した。しかし、ガラスプレートの振動振幅はバブルの振動と比べて非常に小さいため無視した。LDV のセンサーヘッドに備え付けられた CCD カメラによって振動挙動の測定と同時にバブルの初期径を計測する。カメラで撮影した画像の解像度は $1.02\ \mu\text{m}\ \text{pixel}^{-1}$ で今回測定したバブルの径分布 (半径約 $20\sim 160\ \mu\text{m}$) に対して十分に小さい。径の異なるバブル 1209 個を測定し、これらの実験は全て約 $22\ ^\circ\text{C}$ 環境下で行われた。

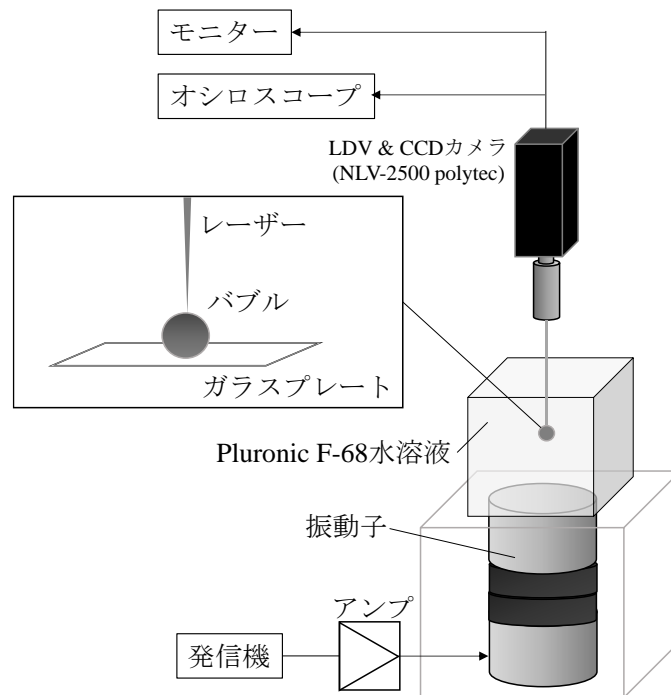


図 4.3 ランジュバン振動子及び laser Doppler vibrometer (LDV)が接続された単一バブルの振動挙動観測システム。

4.4.2 実験結果と考察

超音波照射によるバブルの振動挙動について Pluronic F-68 分子膜と DMPC 分子膜の影響を検討するため、いくつかの濃度でバブルを作成し単一のバブル振動を測定した。図 4.4 は濃度範囲が $0 \sim 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ の Pluronic F-68 と濃度 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ の DMPC で作成したバブルの振動特性である。水平軸は初期バブル径 R_0 であり、垂直軸は初期径で規格化した振動振幅 ($\Delta R/R_0$) である。測定した全ての濃度条件において $\Delta R/R_0$ のピークは R_0 が $40 \sim 80 \text{ }\mu\text{m}$ で見られた。各濃度の振動特性から共振径を決めるため Lorentz 関数を用いてフィッティングを行い振幅がピークとなる径を共振径と定義した[15]。共振径付近で音波とバブルの振動の位相差は 0 から 180° に変わる。共振径より大きいバブルは照射した音波から正圧をうける時収縮する。一方共振径より小さいバブルは音波が正圧の時拡張す

る。駆動している電気信号とバブルの振動との位相を求め、位相が 90° となる径を共振径と定義し位相特性から推定した[15]。図 4.5 にいくつかの Pluronic F-68 と DMPC の濃度で作成したバブルの位相特性を示す。水平軸はバブルの初期径である。位相特性は濃度に依らずほとんど変化がなかった。図 4.5 に示す位相特性は図 4.4 に示す共振カーブにくらべばらつきが少ない。位相は照射する音波の周波数やバブル径によって変化するが、ガラスプレートとの接触や溶液中の温度の影響などをほとんど受けなかったことが要因であると考えられる。位相特性から共振径を推定するために sigmoid 関数を使ってフィッティングを行った。

図 4.6 は図 4.4 の共振カーブと図 4.5 の位相特性から求めた DMPC バブルと Pluronic F-68 バブルの共振径の濃度特性である。図 4.6 の各プロットとエラーバーは共振径の平均値と標準偏差を示している。図 4.4 と図 4.5 の特性から得られた共振径は Pluronic F-68 と DMPC の濃度や内部気体の種類（空気もしくは空気と PFH の混合気体）によらずほとんど変化しなかった。4.5 項に示すが式 4.26 に示す通り、表面に膜を持つバブルは膜を持たない自由気泡の共振径と比較して膜の弾性や表面張力の低下によって共振径がシフトする[16]。Rooij らや、Tu らのバブルの振動特性のシミュレーションからも、膜の弾性や表面張力が共振径に影響することがわかっている[5,16,17]。臨床現場で使われる造影剤は一般に自由気泡と比較すると共振径は大きくなる[16]。両親媒性分子が界面に吸着すると表面張力が低下し弾性率を低下させるが、一方でバブル表面を覆う分子膜によって界面の弾性が高まる。結果として、膜の弾性による影響が支配的に寄与するため共振径が小さくなると考えられる。今回作成したバブル径は臨床で使われるバブル径（ $\sim 5 \mu\text{m}$ ）より大きい（ $20 \sim 150 \mu\text{m}$ ）。単一バブルを測定する光学観測システムに組み込んだカメラの解像度が低い（ $1.02 \mu\text{m pixel}^{-1}$ ）ためである。4.5 項の式 4.26 のとおり、表面張力や膜の弾性はバブル径の 3 乗に反比例して共振径に影響する。一方周囲液体の圧力による項はバブル径の 2 乗に反比例して共振径に影響する。本実験の粒径分布では周囲液体の圧力による項が支配的

となり、膜の弾性は振動挙動にほとんど影響しなかったと考えられる。したがって図 4.4 に示した共振径は膜材質の濃度によらず変化しなかったものと考えられる。全ての条件で推定された共振径は 50~70 μm であった。理論モデルから、照射した超音波の周波数 38.8 kHz で自由気泡の共振径を計算すると 85 μm であり、本結果とは乖離がある。バブルがガラスプレートに接触しているため壁面からの影響を受けたことによって共振径が下がったと考えられる[15]。

図 4.7 は Pluronic F-68 バブルと DMPC バブルについて、共振径における最大振幅の濃度特性を示す。本結果は図 4.4 の Lorentz 関数のフィッティングカーブの極大値から推定したものである。垂直軸は最大振幅 ΔR を共振径で規格化したものであり、プロットとエラーバーは各濃度条件で推定した値の平均値と標準偏差である。膜材質 (Pluronic F-68 および DMPC) に依らず、定在波音波中の最大振幅は濃度条件によってほとんど変化しなかった。図 3.5 に示した通り、濃度上昇に伴い表面張力は低下しているため界面の分子の密度は上昇している。界面の分子濃度が上昇すると粘性は増加するためバブルの振動速度に比例して振動を抑制させるはずである[16]。しかしながら、本実験の粒径分布では熱による振幅の減衰が支配的に寄与し、膜の粘性はほとんど影響しなかったと考えられる。[4,16,17]。

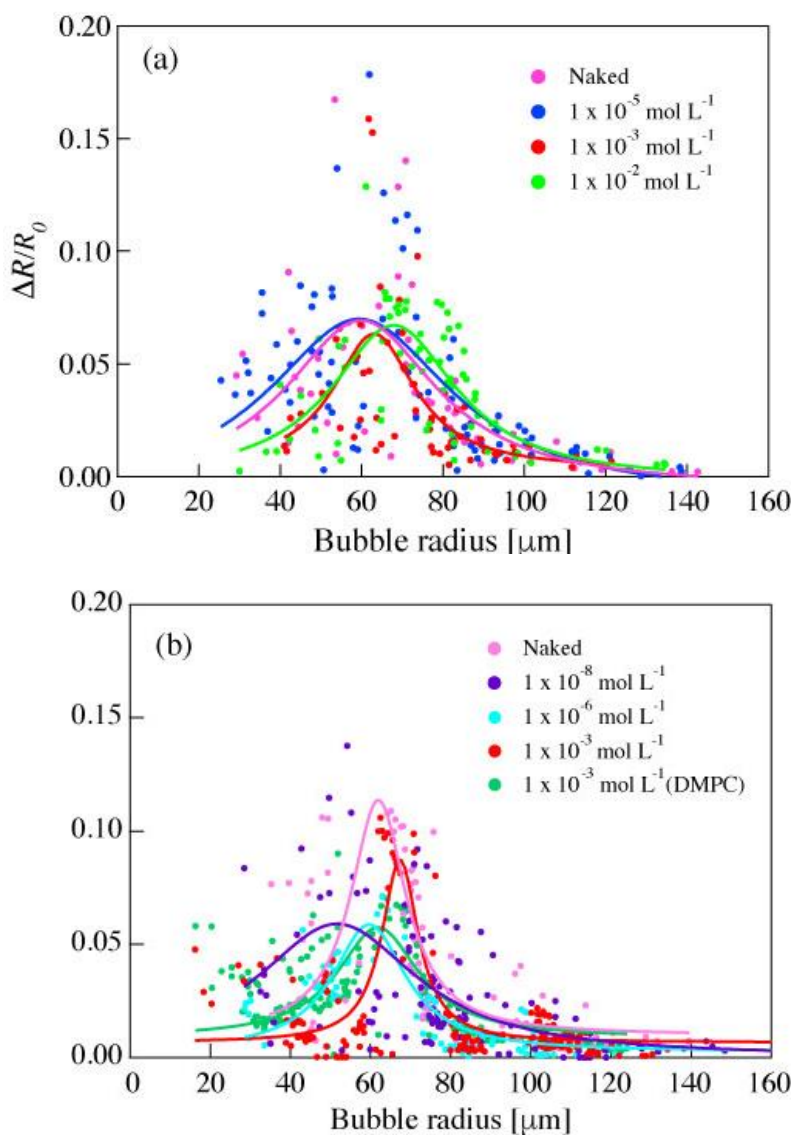


図 4.4 規格化した振動振幅 ($\Delta R/R_0$) とバブルの初期径の関係。(a) 1×10^{-5} 、 1×10^{-3} 、と $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ の Pluronic F-68 で作成したバブル (内部気体は空気) と (b) 1×10^{-8} 、 1×10^{-6} 、 $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ の Pluronic F-68 と $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ の DMPC で作成したバブル (内部気体は PFH と空気)。フィッティングカーブは Lorentz 関数から得られた。

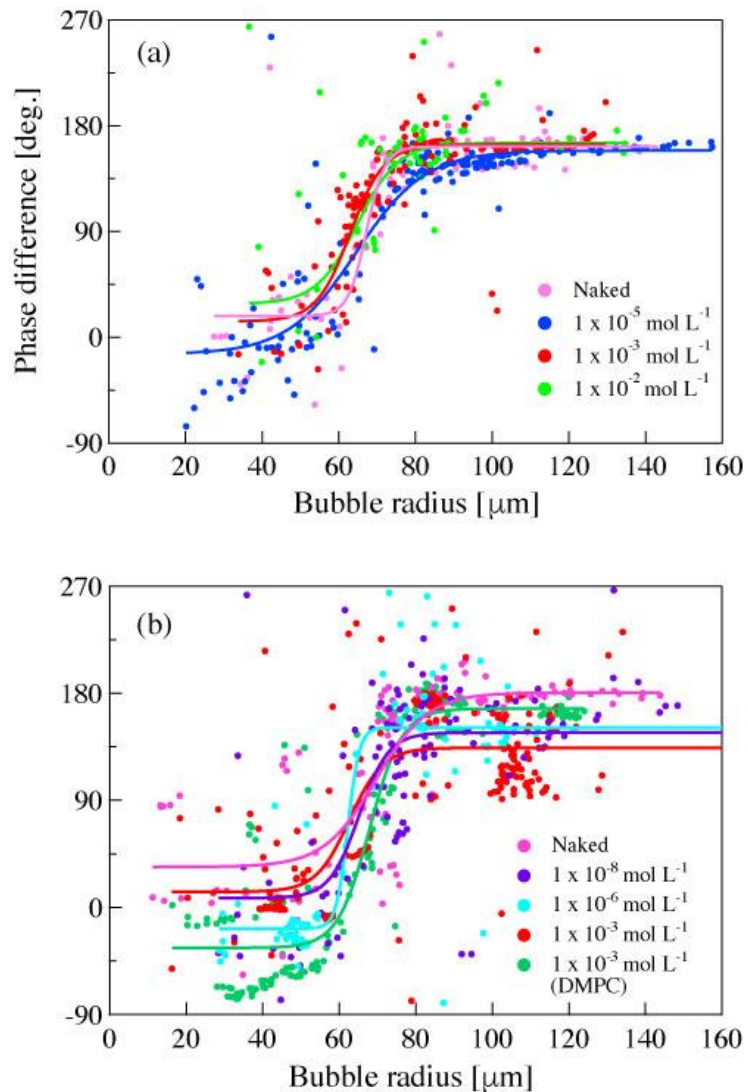


図4.5 入力信号に対する振動挙動の位相差とバブルの初期径との関係。(a) 1×10^{-5} 、 1×10^{-3} 、と $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ のPluronic F-68作成したバブル（内部気体は空気）と (b) 1×10^{-8} 、 1×10^{-6} 、 $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ のPluronic F-68と $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ のDMPCで作成したバブル（内部気体は空気とPFH）。フィッティングカーブはsigmoid関数によって得られた。

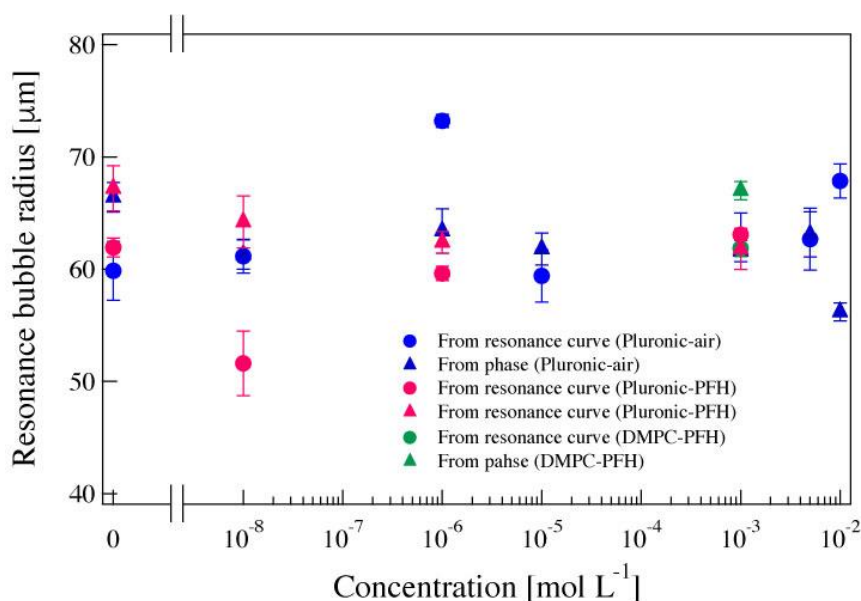


図 4.6 共振カーブ (図 4.4) と位相特性 (図 4.5) から推定した共振径の Pluronic F-濃度特性。青プロットは内部気体が空気の Pluronic F-68 バブルで、ピンクプロットは内部気体が PFH と空気の混合気体の Pluronic F-68 バブルである。緑プロットは空気と PFH の混合気体で作成した DMPC バブルである。

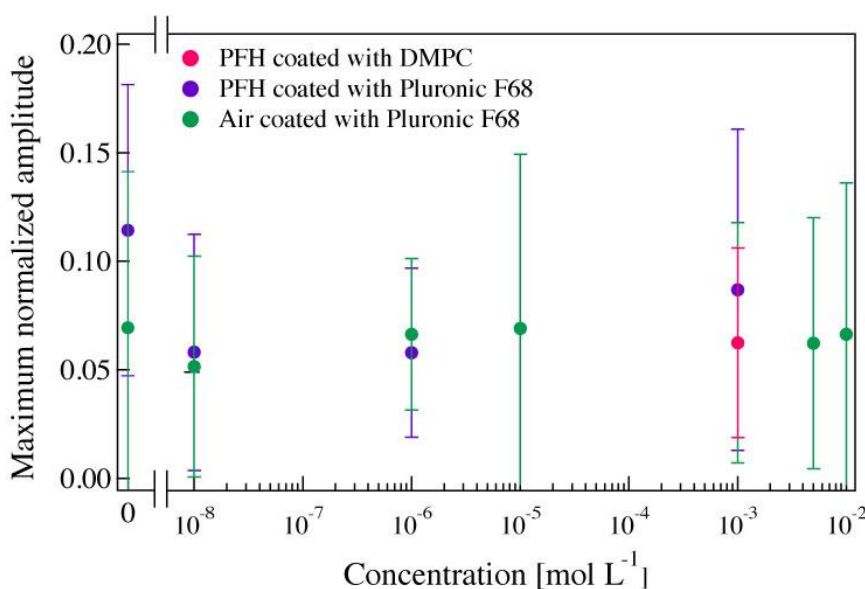


図 4.7 最大振幅の濃度依存性。緑プロットは内部気体が空気の Pluronic F-68 バブルで青は混合気体 (空気+PFH) の Pluronic F-68 バブルの結果である。ピンクは混合気体 (空気+PFH) で作成した DMPC バブルの結果である。

4.5 音響パルスの減衰特性から求めたバブルの振動特性と膜の粘弾性

4.4 項では、LDV に内蔵されている CCD カメラの解像度による制限から臨床に使われるマイクロバブルに比べ、粒径が大きいバブル (20~150 μm) の振動特性を測定した。結果として、超音波照射下のバブルの振動挙動に周囲膜の粘弾性や表面張力が与える影響はほとんどなかった。粒径の大きいバブルでは共振径は周囲の液体の圧力の項が支配的となり、振動振幅の減衰は熱的な効果が支配的になったと推定した。本項では、臨床応用可能な半径数 μm のマイクロバブルについて実験結果を報告する。

初めにバブルの振動挙動に対する Pluronic F-68 分子膜の影響を推定するために、いくつかの Pluronic F-68 濃度でパルス音波の減衰特性を測定する。パルス音波をバブルに照射すると、バブルの振動によって音波のエネルギーが消費される。したがって音波の減衰特性からバブルの振動挙動が推定できる。続いて、測定した減衰特性に理論モデルをフィッティングすることによってバブル表面膜の粘弾性を推定する。ここでは、減衰特性から推定したバブルの振動挙動と膜の粘弾性、3章で示した Pluronic F-68 分子の吸着特性について、それぞれの関係性を考察する。

4.5.1 実験方法

Pluronic F-68 水溶液

Pluronic F-68 は 4.4 項ですでに記載したものと同一のものであり、単一の膜材質として使用する。Arium Mini plus (H20-MA-UV-T, Sartorius, Germany) を使い超純水は用意した。

溶液中の酸素飽和度は酸素計 (FDO380, AS ONE, Osaka, Japan) を使い測定し 95-98 % であった。

Pluronic F-68 バブルの作製

Pluronic F-68 バブルの作製には 2 つのシリンジを使用した。一方のシリンジには Pluronic F-68 水溶液 ($5.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) を 5 mL 入れ、もう一方のシリンジには PFH が飽和した空気を 5 mL 入れる。PFH は 4.4 項で記載したものと同一のものを使用しておりバブルの内部気体となる。気体と液体が入ったそれぞれのシリンジはコネクタを介して接続し、シリンジを交互に 50 回程度押下する。作成した懸濁液はバイアルに入れバブルの粒径を制御するため超音波ホモジナイザー (NR-50M, MICROTEC, Japan) で 1 分間攪拌する。攪拌後、数分程度で浮力によって 3 層に分かれ、バイアル底面から溶液層・バブル層・泡沫層で構成される。3 章で記載した通り気液界面の Pluronic F-68 分子の吸着動態は本実験の濃度範囲においては約 10 分で平衡状態に至る [14]。したがって、超音波ホモジナイザーで攪拌後 10 分ほど時間を置きバイアルから懸濁液を採取した。より狭帯域の粒径分布にするため、溶液層のバブル懸濁液を使用した。

バブルの粒径分布

作成したバブルの粒径分布を測定するため、600 倍の対物レンズ (VHX-7000, Keyence, Osaka, Japan) を接続した光学顕微鏡 (VH-Z100UT, Keyence, Osaka, Japan) で懸濁液を観測した。MATLAB (The MathWorks, Natick, MA, USA) を使い光学顕微鏡画像を解析することで粒径分布は計測した。光学画像はピクセルあたりの長さが $0.27 \mu\text{m}$ であり、バブル径より小さい。一回の実験で、十分な解像度で広い領域を撮影するために複数枚の光

学画像を撮影した。撮影時間は約 10 秒であり、粒径の経時的な変化はほとんどない。図 4.6 はいくつかの Pluronic F-68 濃度で作成したバブルの典型的な粒径分布である。実線は一般化極値分布をフィッティングしたカーブである。一般化極値分布の数密度関数 F は以下のとおりである [27]。

$$F = \left(\frac{1}{\theta}\right) \exp\left(-\left(1 + \xi \frac{(R-M)}{\theta}\right)^{-\frac{1}{\xi}}\right) \left(1 + \xi \frac{(R-M)}{\theta}\right)^{-1-\frac{1}{\xi}}, \quad (4.22)$$

ここで θ 、 ξ 、 M は一般化極値分布のフィッティングパラメータでそれぞれ“*location parameter*”、“*scale parameter*”、“*shape parameter*”である。 R はバブルの半径である。表 4.1 はそれぞれの Pluronic F-68 濃度での実験の試行回数、表面張力そして一般化極値分布のフィッティングパラメータをまとめたものである。減衰特性測定時には粒径分布を測定したサンプルと同一のものを使用して測定を行った。

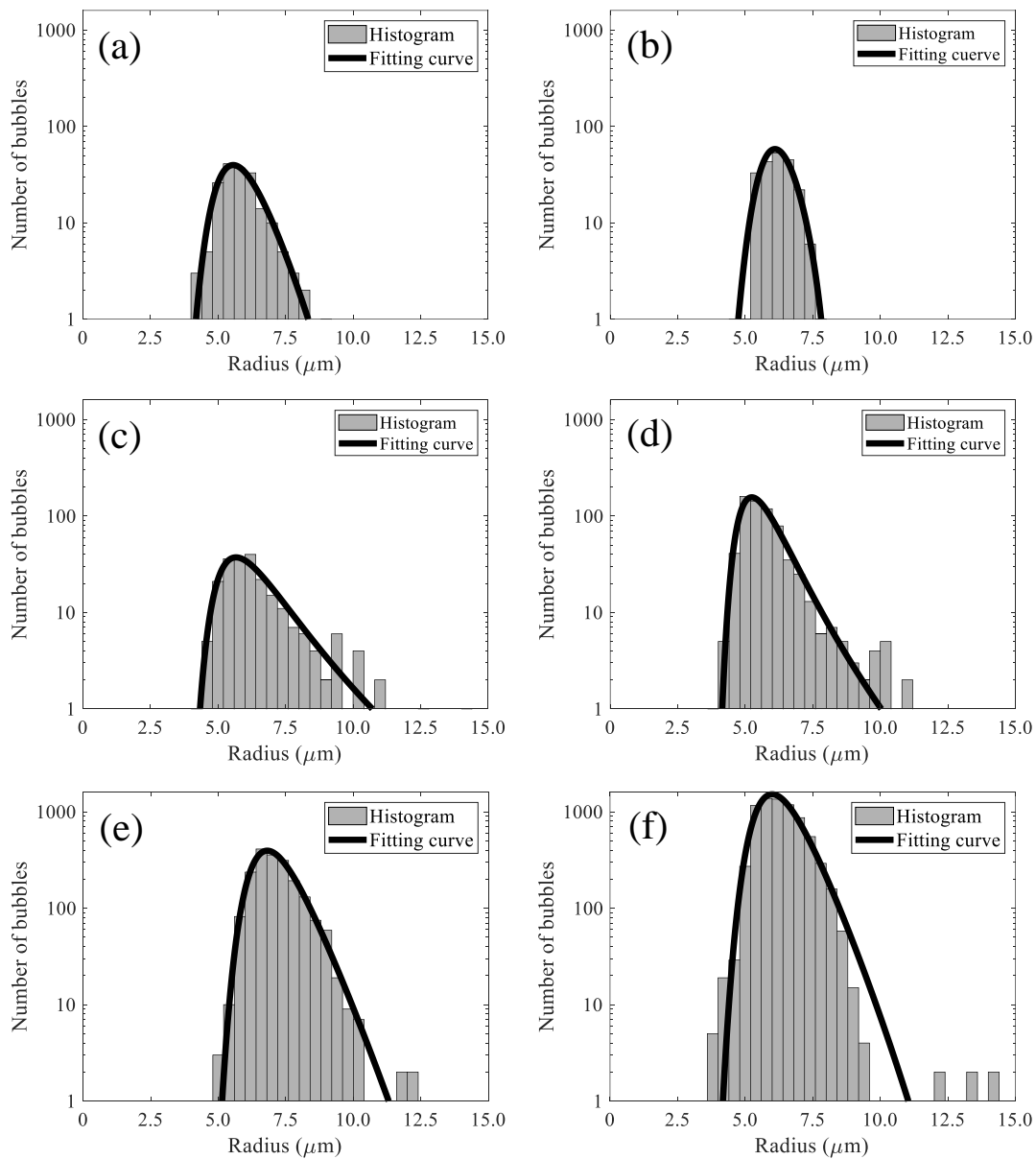


図 4.6 各濃度における典型的な Pluronic F-68 バブルの粒径分布。(a) $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 、(b) $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 、(c) $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 、(d) $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ 、(e) $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ 、(f) $5.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ 。実線は一般化極値分布をフィッティングしたカーブである。

表 4.1 ADSA で測定した平衡状態の時の表面張力[14]、実験の試行回数 (n)、バブル数、
 粒径分布のピーク値の平均値と各濃度におけるバブルの粒径分布にフィッティングした一
 般化極値分布のパラメータ。

濃度 [mol L ⁻¹]	表面張力 [mN m ⁻¹]	n	バブル数	バブルの粒径分布			
				粒径分布の 最大値の 平均径 [μm]	フィッティングパラメータ		
					<i>Location</i> <i>parameter</i> (θ)	<i>Scale</i> <i>parameter</i> (ξ)	<i>Shape</i> <i>parameter</i> (M)
5.0×10^{-5}	46.0 ± 0.5	7	187 ± 76	6.84 ± 0.80	6.53 ± 0.81	0.99 ± 0.30	-0.13 ± 0.08
1.0×10^{-4}	45.0 ± 0.6	8	173 ± 57	6.17 ± 0.57	5.98 ± 0.58	0.86 ± 0.25	-0.20 ± 0.11
1.0×10^{-3}	40.0 ± 0.5	8	155 ± 47	5.49 ± 0.91	5.56 ± 0.87	0.81 ± 0.23	0.11 ± 0.13
1.0×10^{-2}	35.0 ± 0.5	7	2506 ± 3608	4.88 ± 0.32	4.80 ± 0.42	0.59 ± 0.20	0.13 ± 0.08
2.0×10^{-2}	33.0 ± 0.4	17	1540 ± 1155	6.97 ± 0.66	6.99 ± 0.65	0.79 ± 0.17	0.02 ± 0.11
5.0×10^{-2}	32.0 ± 0.5	8	5449 ± 3141	5.85 ± 0.49	5.84 ± 0.45	0.94 ± 0.18	-0.01 ± 0.05

パルス音波の減衰特性測定

パルス音波の散乱や減衰を測定することはバブルの振動特性や膜の粘弾性を推定するシンプルな方法の 1 つである。図 4.7 にパルサーレーザと送受波兼用の振動子を接続したパルス音波の減衰・散乱測定システムを示す。透明の観測用実験セル (30 × 30 × 30 mm) を Pluronic F-68 水溶液で満たす。セル内の Pluronic F-68 水溶液濃度は、作成したバブルと同一の濃度にする。バブルの気液界面に吸着した Pluronic F-68 分子が平衡状態を維持するためである[33,34]。底面には反射板としてアクリルのブロックを設置する。平面振動子 (V303, Olympus, Tokyo, Japan) は反射板から 10 mm に設置し音波を送受信した。電気信号はアッテネータ (FAT-5030B, Nidec Copal Electronics Corp., Tokyo, Japan) を介してパルサーレーザから入出力した。パルス音波の中心周波数は約 1 MHz である。先端径 0.2 mm で有効な周波数帯域が 0~30 MHz のニードルハイドロホン (Precision Acoustic, Dorchester, UK) で測定した観測用の実験セル中央のピーク音圧はおよそ 4 kPa であった。このような低い音圧条件によって線形振動中の膜の粘弾性を推定することができる[18]。パルス音波を用いた周波数帯域の広い減衰特性の測定ではいくつか懸念点があるが、本実

験のような低音圧条件では信頼性の高い推定値が得られる[19,20]。2軸のゴニオメータを接続した高精度3軸ステージは振動子の設置位置の制御のために使われた。

初めに、バブルを注入する前の Pluronic F-68 水溶液中にパルス音波を照射する。中心周波数 1 MHz のパルス音波は 2 秒間にわたって繰り返し周波数 5 kHz で 10,000 回繰り返し照射した。反射した音波は参照信号としてオシロスコープ (5444D MSO, Pico Technology, Wales, England) で記録し、水平軸の解像度は 8 bit に設定した。オシロスコープのサンプリング周波数は 1 GHz だが、記録時に 9.6 MHz にダウンサンプリングした。シグナル/ノイズ比を改善するために 10,000 回照射した音波の平均を記録した。この平均した波形をフーリエ変換することでパワースペクトルがえられる。つづいて、数十マイクロリットルのバブル懸濁液を実験セルに注入する。注入したサンプルはバブルの粒径分布を測定した際に使用したサンプルと同一のものである。バブルの寿命は Pluronic F-68 濃度の上昇に伴って延長する[21]。したがって、懸濁液中のバブルの数密度は濃度に応じて変化する。パルス音波の最適な減衰波形を得るために各 Pluronic F-68 濃度で実験セルに注入するバブル懸濁の量を調節した。バブル懸濁液注入後の反射波は、参照信号取得時と同様の手順で取得する。これらの実験は $22.0 \pm 1.0^\circ \text{C}$ の温度環境で実施した。図 4.8 はバブル懸濁液注入前後で取得した典型的な反射波波形と周波数スペクトルである。減衰係数 α は以下の方程式によって計算した。

$$\alpha(f) = -8.686 \frac{1}{4d} \log_{10} \frac{S(f)}{S_{\text{ref}}(f)} \quad (4.23)$$

S と S_{ref} は、それぞれバブル懸濁液注入前後のパワースペクトルの平均値であり、 d は射板と振動子の距離である。

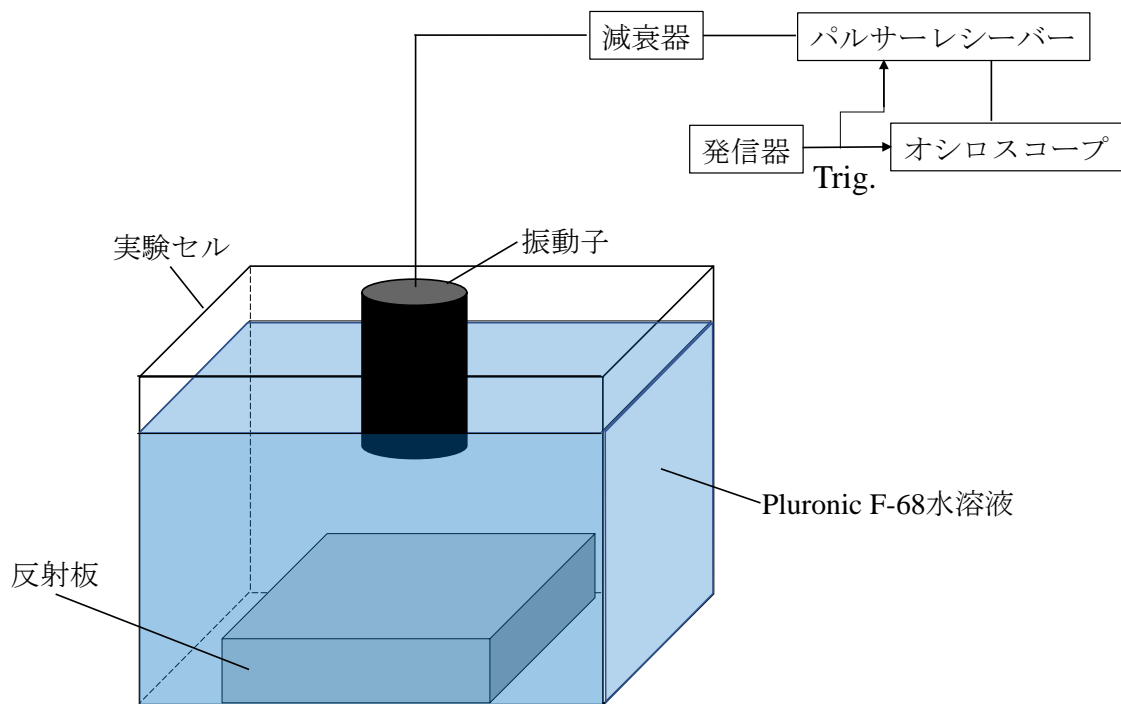


図 4.7 パルサーレシーバを使った音響パルス の散乱・減衰を測定するシステム。

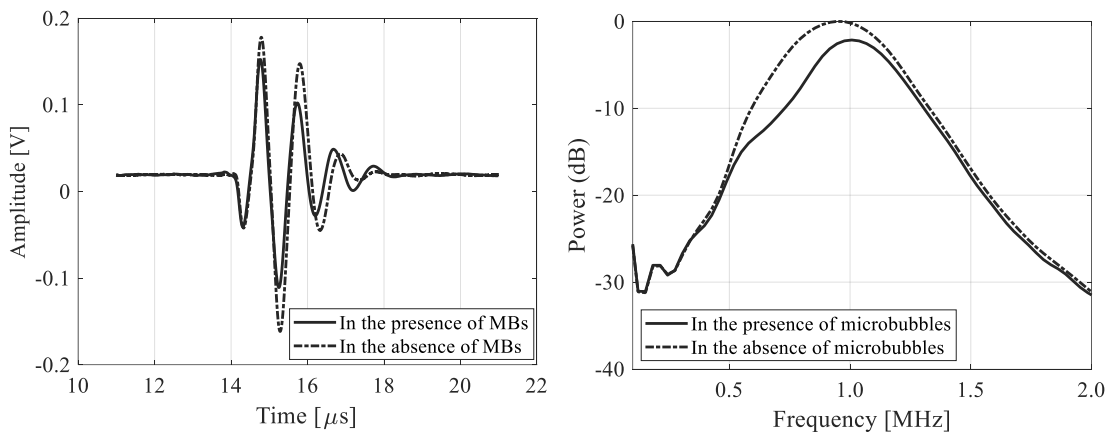


図 4.8 バブル懸濁液注入前後の典型的な反射波波形および周波数スペクトル。

音響パルスの散乱および減衰と膜の粘弾性との関係

パルス音波のエネルギーはバブル懸濁液を伝搬することによって減少する。このエネルギー損失はバブルの再放射によるもの ($\delta_{\text{radiation}}$)、周囲液体の粘性 (δ_{liquid})、膜の粘性

($\delta_{\text{interface}}$)、熱的なダンピング (δ_{therm})に分類することができる。先行研究によると、医療診断で使われる周波数帯では熱的なエネルギー損失は粘性による損失とほぼ等しい [33,18]。したがって、損失全体は δ_{tot}

$$\delta_{\text{tot}} = 2\delta_{\text{liquid}} + \delta_{\text{interface}} + \delta_{\text{radiation}} \quad (4.24)$$

とあらわすことができる。ここで

$$\delta_{\text{liquid}} = \frac{4\mu}{\rho\omega_0 R_0^2}, \quad \delta_{\text{interface}} = \frac{4\kappa^S}{\rho\omega_0 R_0^3}, \quad \delta_{\text{radiation}} = \frac{\omega^2 r_0}{\omega_0 v}, \quad (4.25)$$

となる。 v は周囲液体の音速である。また式(4.21)から共振角周波数 ω_0 は以下の通りとなる

$$\omega_0^2 = \frac{1}{\rho R_0^2} \left(3\gamma P_0 - \frac{4\sigma_0}{R_0} + \frac{4E^S}{R_0} \right), \quad (4.26)$$

それらの値は単位バブル当たりの減衰を示す減衰断面積 (ECS) と散乱確率を示す散乱断面積 (SCS) を使って以下の通り示すことができる。

$$ECS = \frac{\delta_{\text{tot}}}{\delta_{\text{radiation}}} SCS, \quad (4.27)$$

ここで SCS は、以下のように定義される [29]。

$$SCS = \frac{4\pi r^2}{\left[\left(1 - \frac{\omega_0}{\omega} \right)^2 \right]^2 + \left(\frac{\omega_0}{\omega} \right)^2 \delta^2}, \quad (4.28)$$

ω は角周波数である。パルス音波の減衰係数 α は ECS を使って表現すると以下のように定義される[29]。

$$\alpha = H \int_{-\infty}^{\infty} ECS \times p_n dr_0, \quad (4.29)$$

H はバブルの数密度で、 p_n はバブルの半径の確率分布である。したがって、ECS は実際に測定した減衰係数 α に式 (4.29) を適応することによって得られる。式 (4.22)、(4.23)、(4.25)、(4.26) によって膜の粘性と弾性を推定することができる。

4.5.2 実験結果と考察

音響パルスの減衰特性

バブルの振動挙動をパルス音波の減衰特性を観測することで評価する。図 4.9 は様々な Pluronic F-68 濃度で測定した減衰特性である。垂直軸は式 4.24 で定義した減衰係数 \cdot である。それぞれの実線波形は一回の試行で照射した 10,000 回のパルス音波の減衰特性を平均したものである。

低濃度条件 ($5.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) においては、減衰特性の 600-700 kHz 付近に鋭いピークが見られた。一方で、高濃度条件 ($2.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ および $5.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) ではピークは見られず平坦な減衰特性を得た。各濃度で測定した粒径分布の差は小さく、明らかにバブルの粒径分布の差によるものではない。図 4.6 で示した通り、 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ と $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ と $5.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ を比較

するとその差は平均粒径でそれぞれ約 $0.13 \mu\text{m}$ と 約 $0.36 \mu\text{m}$ である。2次関数は各濃度で測定した減衰特性の差を評価するために使用し、減衰係数のピーク値から半値になるまでの帯域でフィッティングをした。平坦な減衰特性の場合には、鋭いピークがないため2次関数は測定した全帯域でフィッティングを実施した。2次関数のフィッティングにおける決定係数 (X^2) はそれぞれの実験条件で計算し、 $X^2 < 0.95$ となるデータのみを評価対象として採用した。表 4.2 は決定係数の平均値、決定係数の閾値 ($X^2 < 0.95$) を超えられず除外となったデータ数、および除外となったデータ比率をまとめたものである。決定係数の平均値は濃度上昇に伴い減少し、 $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ と $5.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ では全てのデータが閾値を下回った。これらのデータは Pluronic F-68 濃度に強く依存していることがわかる。図 4.10 の (a) と (b) はそれぞれ低濃度 ($5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)、高濃度 ($5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) でえた典型的な減衰特性の実測値とフィッティングカーブを示している。典型例として表示している特性はそれぞれの濃度で決定係数が最大となったものである。

先行研究で、バブル間の相互作用が減衰特性に重要な影響を与え、それはボイド率 β によって決定されることが報告されている [22,23]。本実験のボイド率は測定したバブルの粒径分布が実験セル内に一様に分布していると仮定して推定した。表 4.3 に各濃度のバブルの数密度とボイド率をまとめた。過去の報告されている先行研究では、バブル間の相互作用をシミュレーションしており、低値 ($\beta < 10^{-7}$) ではほとんど影響しないことを示した [24]。低濃度条件で実施した実験では、ボイド率は低く、バブル間の相互作用はほとんど発生しなかったと考えられる。一方、高濃度条件で実施した実験ではボイド率は高値 ($< 10^{-5}$) となった。先行研究では、理論的にバブル間の相互作用を数値計算しているが、ボイド率 $\beta = 10^{-6}$ 半径 $r_0 = 2 \mu\text{m}$ の条件で減衰特性が低周波側にシフトすることを示した。したがって、バブル間の相互作用によって減衰特性は影響を受けた可能性がある。しかしながら、図 4.9 や図 4.10 で観察された傾向は、減衰特性が平坦化することであるため本データにおける減衰特性の変化は、バブル間の相互作用ではなく、Pluronic F-68 の濃度によるもので

あると考えられる。図 4.10 (a) から図 4.10 (b) に減衰特性が変化する境界濃度 ($1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) では、それら 2 つのタイプの減衰特性がえられた。臨界ミセル濃度 (CMC) はおよそ $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ であるため[25-27]、ミセルの状態に影響された可能性がある。吸着特性は分子の濃度や温度、ミセルの有無に影響をうける[28]。バブルの作成過程において粒径制御のため超音波ホモジナイザーで懸濁液を攪拌する。CMC 条件下では、このプロセスによってミセルが破壊し吸着特性が変化したことによって同一濃度にも関わらず 2 つのタイプの減衰特性が発生した可能性がある。

先行研究で図 4.10 (a) から図 4.10 (b) に示したような減衰特性の変化がリン脂質バブルを使用した評価ですでに報告されている[29]。彼らは 2 種類のバブルを作製し、これらの変化を観測している。1 つは DSPC を膜材質としてバブルを作製し、図 4.10 (b) のような減衰特性をえている。もう一方のバブルは DSPC に加えて、lecithin や cholesterol を含むいくつかのリン脂質を混合し膜材質としてバブルを作製した。このバブルでは図 4.10 (a) のような減衰特性がえられた。バブル表面の膜について、前者はゲル相を形成し後者は液相を形成していると考えられている。本実験では Pluronic F-68 濃度に依存してバブル表面の膜が液相からゲル相に相転移が発生したと考えられる。

図 4.11 および図 4.12 はいくつかの濃度で作成した Pluronic F-68 バブルと自由気泡（膜無し）の理論モデルから求めた共振周波数と半値幅を比較したものである。実線は Rayleigh-Plesset 方程式から数値計算で求めた自由気泡の特性を示したものであり、プロットとエラーバーは、Pluronic F-68 バブルの特性の平均値と標準偏差である。Pluronic F-68 バブルの共振周波数と半値幅は、測定した減衰特性に 2 次関数をフィッティングして決めた値である。この図におけるバブルの半径は、すべての試行のうち有効回における粒径分布の最頻値の平均値である。Pluronic F-68 バブルの共振周波数と半値幅は自由気泡よりいずれも高値となる傾向だった。これは Pluronic F-68 膜の弾性と粘性の増加による影響かもしれない。

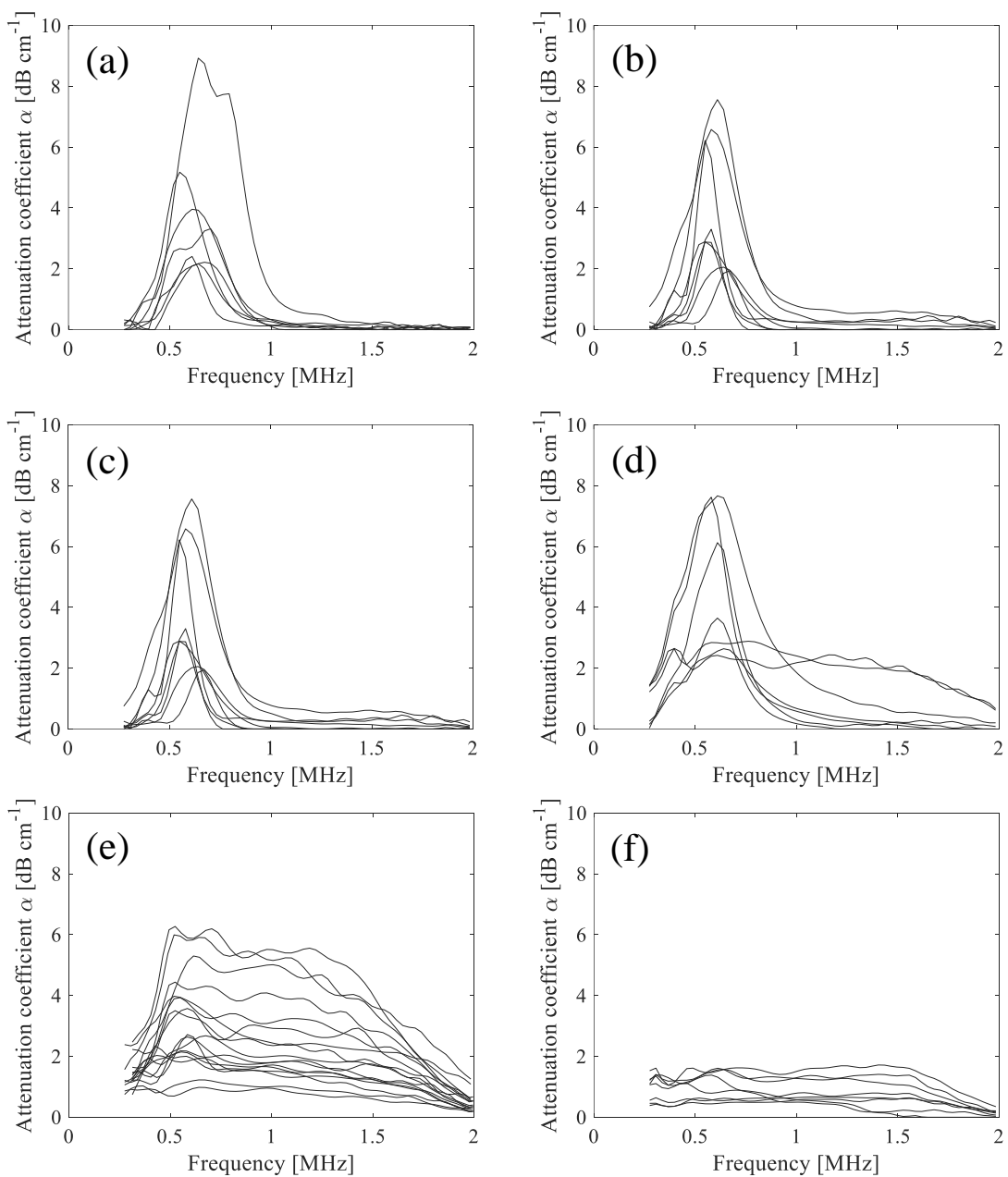


図 4.9 様々な Pluronic F-68 濃度で測定した減衰特性。実験の試行回数はそれぞれ (a : $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) 7 回、(b : $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) 8 回、(c : $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) 8 回、(d : $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) 7 回、(e : $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) 17 回、(f : $5.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) 8 回。

表 4.2 フィッティングの決定気数の平均、除外されたデータ数およびそれらの比率。

濃度 [mol L ⁻¹]	n	決定係数 (R^2) [平均 ± 標準偏差]	閾値以下の データ数	閾値以下の データ割合[%]
5.0×10^{-5}	7	0.91 ± 0.10	3	42
1.0×10^{-4}	8	0.94 ± 0.08	3	37
1.0×10^{-3}	8	0.89 ± 0.12	5	62
1.0×10^{-2}	7	0.83 ± 0.20	4	57
2.0×10^{-2}	17	0.63 ± 0.16	17	100
5.0×10^{-2}	8	0.60 ± 0.20	8	100

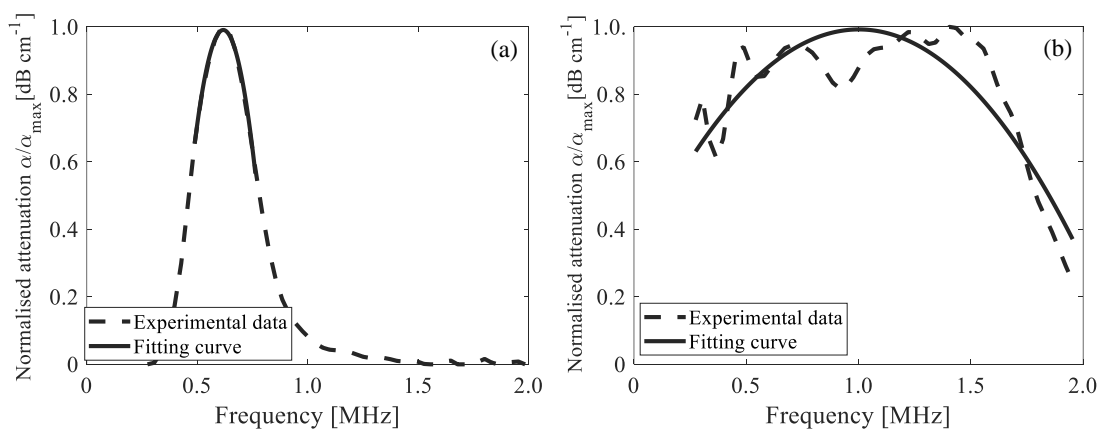


図 4.10 高濃度および低濃度の Pluronic F-68 濃度で測定した典型的な減衰特性。赤の実線は実験値を示し緑の実線は2次関数でフィッティング下カーブである。(a) と (b) はそれぞれ $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ と $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ の Pluronic F-68 濃度で測定したものである。

表 4.3 減衰測定におけるバブルの数密度とボイド率。

濃度 [mol L ⁻¹]	バブルの数密度 [MBs m ⁻³]	ボイド率 β [%]
5.0×10^{-5}	$(3.0 \pm 1.2) \times 10^8$	$(4.4 \pm 1.3) \times 10^{-7}$
1.0×10^{-4}	$(2.8 \pm 0.92) \times 10^8$	$(2.9 \pm 1.2) \times 10^{-7}$
1.0×10^{-3}	$(2.5 \pm 0.77) \times 10^8$	$(2.9 \pm 1.4) \times 10^{-7}$
1.0×10^{-2}	$(4.1 \pm 5.9) \times 10^9$	$(1.4 \pm 1.6) \times 10^{-6}$
2.0×10^{-2}	$(2.5 \pm 1.9) \times 10^9$	$(4.3 \pm 2.8) \times 10^{-6}$
5.0×10^{-2}	$(8.9 \pm 5.1) \times 10^9$	$(1.1 \pm 0.68) \times 10^{-5}$

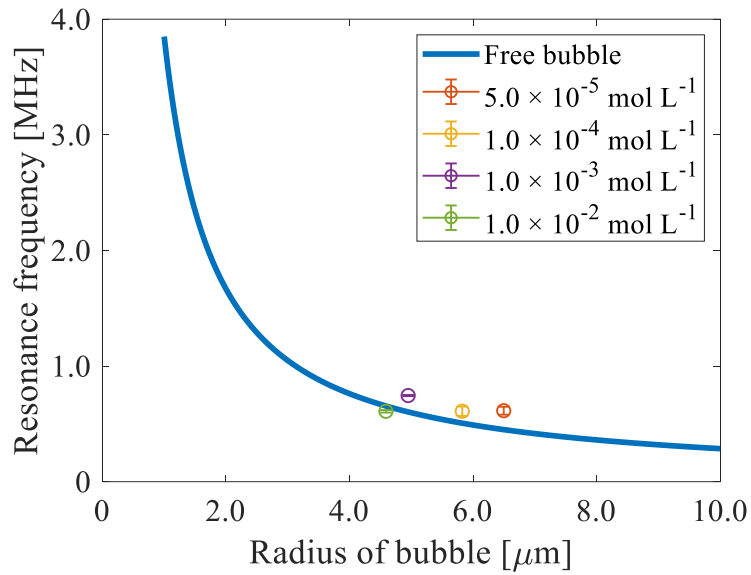


図 4.11 自由気泡の理論モデルから計算された共振カーブと様々な濃度作成した Pluronic F-68 バブルの共振特性の比較。

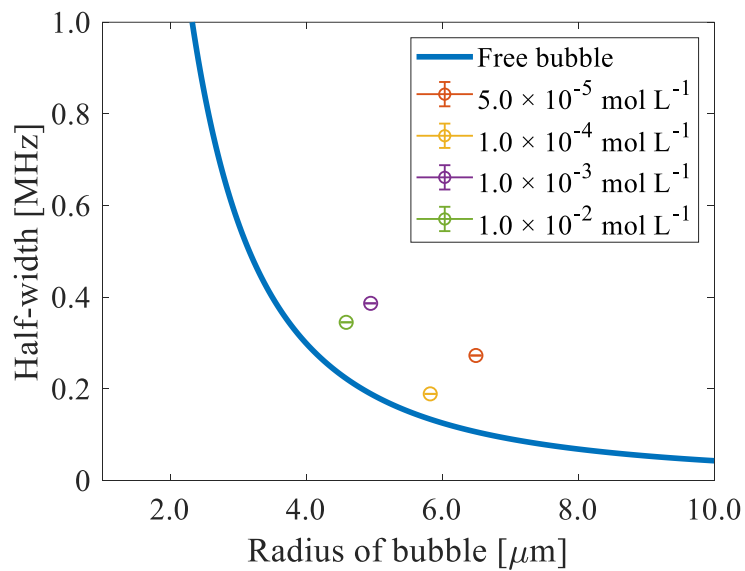


図 4.12 自由気泡の理論モデルから計算された振動特性の半値幅と様々な濃度作成した Pluronic F-68 バブルの振動特性の半値幅の比較。

膜の粘弾性の推定

膜の粘弾性を推定するために、測定した減衰係数 α に理論モデルをフィッティングする。最小二乗法を使い、0-2 MHz の帯域で理論的に計算した減衰特性と測定値の差 $Err(N, \kappa^S, E^S)$ が最小となるように粘性と弾性を決めた。この差は以下の方程式で定義した。

$$Err(N, \kappa^S, E^S) = \sum_i [\alpha_{\text{theo}}(\omega_i) - \alpha_{\text{bubble}}(\omega_i)]^2, \quad (4.30)$$

α_{theo} と α_{bubble} はそれぞれ理論モデルと実験値からえた減衰特性である。N は任意の定数である。

バブル表面を覆う膜の粘弾性の特徴

様々な Pluronic F-68 濃度で作成したバブルを使い、減衰特性を測定する。各濃度で測定した減衰特性に Sarkar モデルをフィッティングすることによって、膜の弾性と粘性を推定する。リン脂質バブルの振動挙動は音圧の上昇に伴って線形から非線形振動に変化する。非線形領域では、収縮時に膜に皺 (buckling) が発生し、拡張時には膜を構成する分子同士が離れる (rupture) [6,31]。この現象によって、非線形振動中はバブルの振動挙動に同期して動的に膜の粘弾性が変化する。したがって、線形振動中の膜の粘弾性とは異なり、誤った推定値を導く [8,31,32]。いくつかの先行研究では音圧 20 kPa ではリン脂質バブルは線形に振動しており、50 kPa 程度で中程度の非線形性を示した [24,33]。他の研究グループは 12.5 kPa から 25 kPa に音圧を上げた時、リン脂質バブルの非線形振動が現れたと報告している [22]。線形振動から非線形振動に遷移する閾値は膜材質やバブルの作成手法

に強く影響されるが、本実験環境の音圧は特に低い（4 kPa）ため、線形振動していると考えられる。図 4.13 および図 4.14 はバブル径の関数として示した膜の粘性と弾性である。各プロットのバブル径は光学顕微鏡画像から評価した粒径分布の最大値とした。5.0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ と 1.0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ において、粘性が非常に低かったため 4 回の試行で数値を求めることができなかった。リン脂質バブルにおいて膜の粘弾性の径依存性はすでに報告されており、それらの現象は shear-thinning や strain-softening によるものだと考えられていた[2,18,34,35]。非線形振動（compression-only behavior など）が発生するほど強い音圧の超音波を照射した時に、せん断速度や変形強度が膜の粘弾性と負の相関を示すことは報告されている[18]。一方、他の先行論文では線形振動か非線形振動かにかかわらず相関がないという報告もされている[4,34]。本実験結果について、径依存性が存在するか検証するためにスピアマンの相関係数を計算した。結果として表 4.4 および表 4.5 に示したとおり、弾性と粘性についていずれの場合にも径依存性は確認されなかった。これは、バブルの粒径分布が多分散であったために測定精度が低かったことによるものかもしれない[6]。Pluronic F-68 バブルの径依存性を検証するためには、狭帯域の粒径分布で検証する必要があると考えられる。

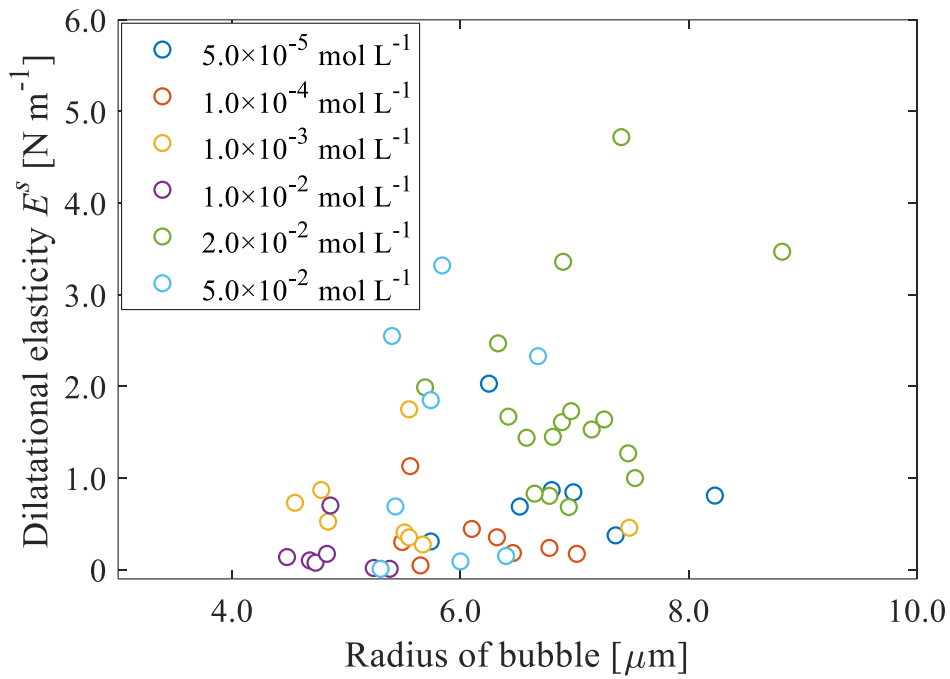


図 4.13 膜の弾性 E^s の径特性。 E^s は実験値に理論モデルを適応することで推定した。

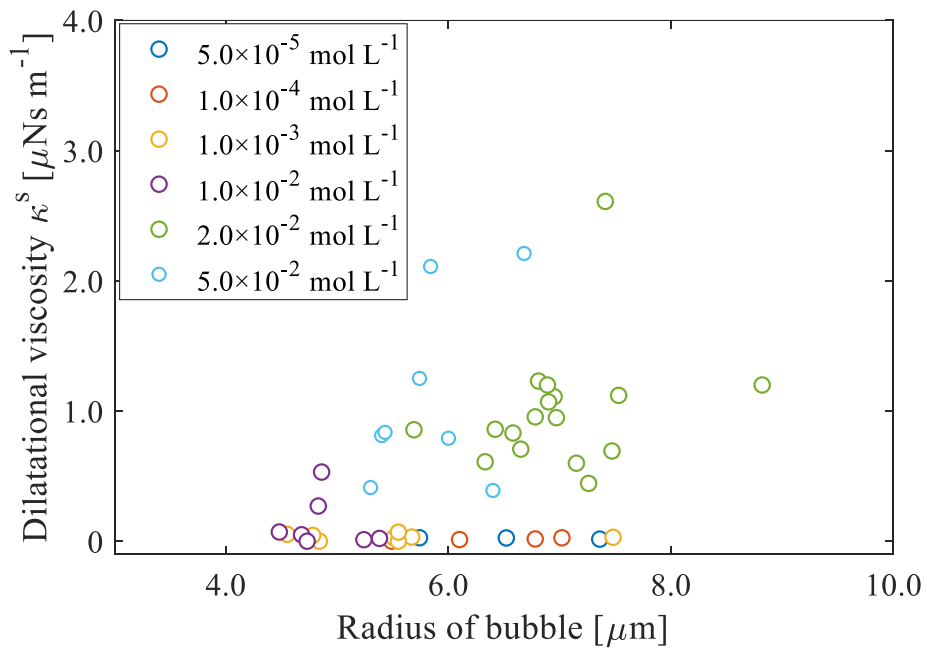


図 4.14 膜の粘性 κ^s の径特性。 κ^s は実験値に理論モデルを適応することで推定した。

表 4.4 各 Pluronic F-68 濃度条件でのシェルの粘性とバブル径の相関係数、p-値、およびサンプル数。

濃度 [mol L ⁻¹]	相関係数	p-値	サンプル数
5.0×10 ⁻⁵	-	-	3
1.0×10 ⁻⁴	1.00	0.08	4
1.0×10 ⁻³	-0.17	0.67	8
1.0×10 ⁻²	-0.14	0.78	7
2.0×10 ⁻²	0.25	0.32	17
5.0×10 ⁻²	0.48	0.19	8

表 4.5 各 Pluronic F-68 濃度条件でのシェルの弾性とバブル径の相関係数、p-値、およびサンプル数。

濃度[mol L ⁻¹]	相関係数	p-値	サンプル数
5.0×10 ⁻⁵	0.50	1.00	3
1.0×10 ⁻⁴	-0.42	0.30	8
1.0×10 ⁻³	-0.50	0.21	8
1.0×10 ⁻²	-0.43	0.35	7
2.0×10 ⁻²	0.05	0.85	17
5.0×10 ⁻²	0.14	0.75	8

図 4.15 および図 4.16 は各濃度における Pluronic F-68 膜の弾性と粘性の平均値をそれぞれ示したものである。図 4.13 に示した実験値のうち半径が 5~6 μm のバブルで測定した実験値のみを本評価では採用した。図 4.15 と図 4.16 で、5 × 10⁻⁵ mol L⁻¹、1.0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ (粘性のみ)、1.0 × 10⁻² mol L⁻¹ と 2.0 × 10⁻² mol L⁻¹ ではエラーバーを表示していない。当該の濃度条件では、バブル半径が 5~6 μm となる実験データ数が 1 もしくは 2 であったためである。1.0 × 10⁻¹ mol L⁻¹ の Pluronic F-68 濃度で得られたデータは図 4.10 (a) に示したような鋭いピークの減衰特性を示した実験データである。2.0 × 10⁻² mol L⁻¹ の Pluronic F-68 濃度で膜の弾性と粘性は 1.0 × 10⁻² mol L⁻¹ に対して顕著に高値を示しそれぞれ約 3 倍と約 40 倍となった。3 章で示した Pluronic F-68 の気液界面の吸

着特性のとおり[13]、本実験で測定した濃度条件において、Pluronic F-68 分子の親水基部分は液相にむくような配向をしている。濃度上昇に伴って、この配向を維持したまま気液界面での分子の密度が上昇する。 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ の平衡状態においては、追加でさらに分子が吸着するスペースがない[13,36]。吸着した分子が高密度な膜を構成したことで弾性は急激に増加し、バブルの振動時に分子同士がそれぞれ強く擦れ合うことによって粘性も急激に増加したと考えられる。粘弾性が急激に増加したことから、吸着した分子の密度によって膜の状態が液相からゲル相に相転移を起こしたと示唆される[37]。

本実験で求めた推定値は先行研究で報告されているリン脂質バブルの膜の弾性と粘性に比べて高値を示した ($E^s \leq 1 \text{ N m}^{-1}$ 、 $\kappa^s \leq 10^{-7} \text{ N s m}^{-1}$) [7,16,17,34]。この高い粘弾性の値は吸着した分子の密度と、膜の厚み方向における分子の有効長が影響したと考えられる。

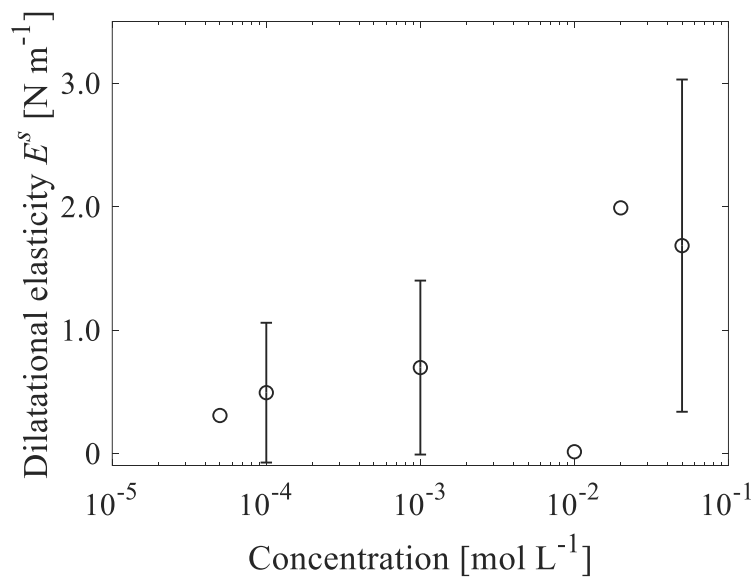


図 4.15 膜の弾性 E^s の Pluronic F-68 濃度特性。サンプルは図 4.13 に示した推定値のうち、半径が $5\sim 6 \mu\text{m}$ のものを採用した。

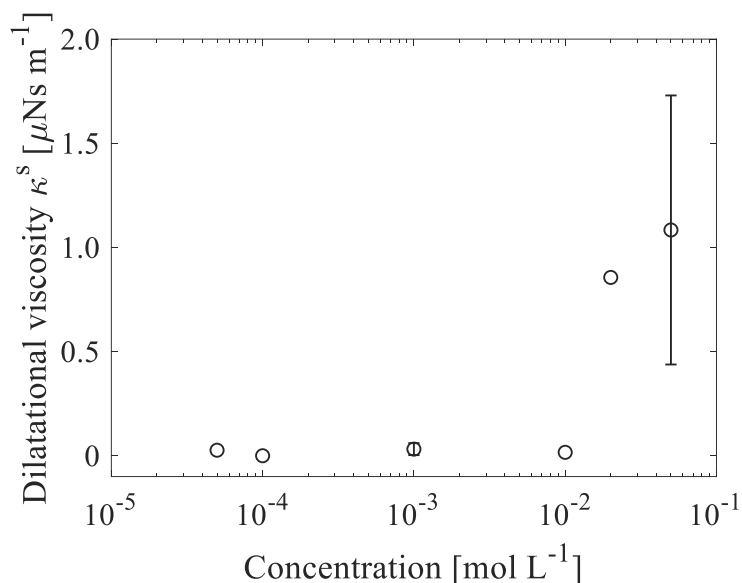


図 4.16 膜の粘性 κ^s の Pluronic F-68 濃度特性。サンプルは図 4.14 に示した推定値のうち、半径が 5~6 μm のものを採用した。

4.6 総括

超音波照射下における Pluronic F-68 バブルの振動特性や内部気体を覆う分子膜の粘弾性を決定するために、いくつかの Pluronic F-68 濃度でバブルを作製した。粒径の大きい Pluronic F-68 バブル (数十 μm) では、周囲の膜を形成する Pluronic F-68 の濃度は振動挙動に影響を与えなかった。一方、臨床応用が期待できる小さい粒形のバブルでは、Pluronic F-68 の濃度によって振動挙動は変化した。さらに、推定した Pluronic F-68 膜の粘弾性の値は、Pluronic F-68 濃度と強い相関があった。気液界面に吸着した分子が飽和状態に達すると、Pluronic F-68 膜の弾性値と粘性値が顕著に増加することを明らかにした。このことは、Pluronic F-68 膜が液相からゲル相に相転移を起こしたことを示唆している。Pluronic F-68 濃度が高い場合、吸着した Pluronic F-68 分子の親水性セグメントは液相に向かって配向している。一方で低濃度領域では界面で分子の配向は平坦である。Pluronic

F-68 について親水性セグメントと疎水性セグメントの配向の違いにより分子の相互作用は変化するはずである。分子の配向が振動挙動や膜の粘弾性に与える効果についてはさらなる検討が必要である。

参考文献

- [1] Young, F. R. Cavitation, Book, McGraw-hill Company, 1989, 8-17.
- [2] de Jong, N. Hoff, L. Skotlandt, T. Born, N. Absorption and scatter of encapsulated gas filled microspheres: theoretical considerations and some measurements. *Ultrasonics*, 1992, 30, 95–103.
- [3] Church, C. C. The effects of an elastic solid surface layer on the radial pulsations of gas bubbles. *J. Acoust. Soc. Am.*, 1995, 97, 1510– 1521.
- [4] Chatterjee, D. Sarkar, K. A Newtonian rheological model for the interface of microbubble contrast agents. *Ultrasound Med. Biol.*, 2003, 29, 1749–1757.
- [5] van Rooij, T. Luan, Y. Renaud, G. van der Steen, A. F. W. Versluis, M. de Jong, N. Kooiman, K. Non-linear response and viscoelastic properties of lipid-coated microbubbles: DSPC versus DPPC. *Ultrasound Med Biol* 2015, 41, 1432–1445.
- [6] de Jong, N. Emmer, M. Chin, C. T. Bouakaz, A. Mastik, F. Lohse, D. Versluis, M. "Compression-only" behavior of phospholipid-coated contrast bubbles. *Ultrasound Med Biol*. 2007, 33, 653-656.
- [7] Marmottant, P. van der Meer, S. Emmer, M. Versluis, M. de Jong, N. Hilgenfeldt, S. Lohse D. A model for large amplitude oscillations of coated bubbles accounting for buckling and rupture. *J Acoust Soc Am*, 2005, 118, 3499–3505.
- [8] Segers, T. de Jong, N. Versluis M. Uniform scattering and attenuation of acoustically sorted ultrasound contrast agents: Modeling and experiments. *J Acoust Soc Am*, 2016, 140, 2506–2517.
- [9] Sarkar, K. Shi, W. T. Chatterjee, D. Forsberg, F. Characterization of ultrasound contrast microbubbles using in vitro experiments and viscous and viscoelastic interface models for encapsulation. *J Acoust Soc Am*, 2005, 118, 539–550.
- [10] Edwards DA, Brenner H, Wasan DT. Interfacial transport processes and rheology. Book, Butterworth-Heinemann, 1991.
- [11] Doinikov, A. A. Haac, J. F. Dayton, P. A. Modeling of nonlinear viscous stress in encapsulating shells of lipid-coated contrast agent microbubbles. *Ultrasonics*, 2009, 49, 269–275.

- [12] Koyama, D. Kotera, H. Kitazawa, N. Yoshida, K. Nakamura, K. Watanabe, Y. Vibration of a single microcapsule with a hard plastic shell in an acoustic standing wave field. *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.* 2011, 58, 737–743.
- [13] Szijjarto, C. Rossi, S. Waton, G. Krafft, M. P. Effects of perfluorocarbon gases on the size and stability characteristics of phospholipid-coated microbubbles - Osmotic effect versus interfacial film stabilization. *Langmuir* 2012, 28, 1182–1189.
- [14] Ando, Y. Tabata, H. Sanchez, M. Cagna, A. Koyama, D. Krafft, M. P. Microbubbles with a self-assembled poloxamer shell and a fluorocarbon inner gas. *Langmuir* 2016, 32, 12461–12467.
- [15] Yoshikawa, T. Kotera, H. Yoshida, K. Koyama, D. Nakamura, K. Watanabe, Y. Measurement of the resonant characteristics of a single bubble vibration by using a laser Doppler vibrometer. *Jpn. J. Appl. Phys.* 2011, 50.
- [16] Tu, J. Guan, J. Qiu, Y. Matula, T. J. Estimating the shell parameters of SonoVue® microbubbles using light scattering. *J. Acoust. Soc. Am.* 2009, 126, 2954–2962.
- [17] van Rooij, T. Luan, Y. Renaud, G. van der Steen, A.F. W. de Jong, N. Kooiman, K. Acoustical response of DSPC versus DPPC lipid-coated microbubbles. *Proc. 2013 IEEE Int. Ultrason. Symp.* 2013, 310–313.
- [18] Lum, J. S. Dove, J. D. Murray, T. W. Borden, M. A. Single microbubble measurements of lipid monolayer viscoelastic properties for small-amplitude oscillations. *Langmuir*, 2016, 32, 9410–9417.
- [19] Shekhar, H. Smith, N. J. Raymond, J. L. Holland, C. K. Effect of temperature on the size distribution, shell properties, and stability of Definity®. *Ultrasound Med. Biol.* 2018, 44, 434–446.
- [20] Xia, L. Porter, T. M. Sarkar, K. Interpreting attenuation at different excitation amplitudes to estimate strain-dependent interfacial rheological properties of lipid-coated monodisperse microbubbles. *J. Acoust. Soc. Am.* 2015, 138, 3994–4003.
- [21] Tabata, H. Koyama, D. Matsukawa, M. Yoshida, K. Krafft, M. P. Vibration characteristics and persistence of poloxamer-or phospholipid-coated single microbubbles under ultrasound irradiation. *Langmuir* 2019, 35, 11322-11329
- [22] Sojahrood, A. J. Li, Q. Haghi, H. Karshafian, R. Porter, T. M. Kolios, M. C. Investigation of the nonlinear propagation of ultrasound through a bubbly medium

- including multiple scattering and bubble-bubble interaction: Theory and experiment. 2017 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), 2017, 1 –4.
- [23] Sojahrood, A. J. Earl, R. Haghi, H. Li, Q. Porter, T. M. Kolios, M. C. Karshafian, R. Nonlinear dynamics of acoustic bubbles excited by their pressure-dependent subharmonic resonance frequency: influence of the pressure amplitude, frequency, encapsulation and multiple bubble interactions on oversaturation and enhancement of the subharmonic signal. *Nonlinear Dyn.* 2021, 103, 429–466.
- [24] Sojahrood, A. J. Li, Q. Haghi, H. Karshafian, R. Porter, T. M. Kolios, M. C. Probing the pressure dependence of sound speed and attenuation in bubbly media: Experimental observations, a theoretical model and numerical calculations. 2022, arXiv preprint arXiv, 2211.00148.
- [25] Zhou, Z. Chu, B. Light-scattering study on the association behavior of triblock polymers of ethylene oxide and propylene oxide in aqueous solution. *J. Colloid Interface Sci.* 1988, 126, 171–180.
- [26] Muñoz, M. G. Monroy, F. Ortega, F. Rubio, R. G. Langevin, D. Monolayers of Symmetric Triblock Copolymers at the Air–Water Interface. 1. Equilibrium Properties. *Langmuir* 2000, 16, 1083–1093.
- [27] Moghimi, S. M. Hunter, A. C. Dadswell, C. M. Savay, S. Alving, C. R. Szebeni, J. Causative factors behind poloxamer 188 (Pluronic F68, Flocor)-induced complement activation in human sera. A protective role against poloxamer-mediated complement activation by elevated serum lipoprotein levels. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1689, 103–113.
- [28] Eastoe, J. Dalton, J. S. Dynamic surface tension and adsorption mechanisms of surfactants at the air-water interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2000, 85, 103–144.
- [29] Yoshida, K. Ebata, M. Kaneko, C. Zhang, Y. Shibata, Y. Saito, K. Toyota, T. Hayashi, H. Yamaguchi, T. Fluorescence intensity changes depending on viscoelasticity of lipid shell coating microbubbles labeled with an indocyanine green derivative. *Jpn. J. Appl. Phys* 2021, 60.
- [30] Presset, A. Bonneau, C. Kazuyoshi, S. Nadal-Desbarats, L. Mitsuyoshi, T. Bouakaz, A. Kudo, N. Escoffre, J. M. Sasaki, N. Endothelial cells, first target of drug delivery using microbubble assisted ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 2020, 46, 1565–1583.

- [31] Overvelde, M. Garbin, V. Sijl, J. Dollet, B. De Jong, N. Lohse, D. Versluis, M. Nonlinear shell behavior of phospholipidcoated microbubbles. *Ultrasound Med. Biol.* 2010, 36, 2080–2092.
- [32] Gandhi, K. Barzegar-Fallah, A. Banstola, A. Rizwan, S. B. Reynolds, J. N. J. Ultrasound-Mediated Blood–Brain Barrier Disruption for Drug Delivery: A Systematic Review of Protocols, Efficacy, and Safety Outcomes from Preclinical and Clinical Studies. *Pharmaceutics* 2022, 14, 833.
- [33] Epstein, P. S. Plesset, M. S. On the Stability of Gas Bubbles in Liquid-Gas Solutions. *J. Chem. Phys.* 1950, 18, 1505–1509.
- [34] Parrales, M. A. Fernandez, J. M. Perez-Saborid, M. Kopechek, J. A. Porter, T. M. Acoustic characterization of monodisperse lipidcoated microbubbles: Relationship between size and shell viscoelastic properties. *J. Acoust. Soc. Am.* 2014, 136, 1077–1084.
- [35] Segers, T. Gaud, E. Versluis, M. Frinking, P. High-precision acoustic measurements of the nonlinear dilatational elasticity of phospholipid coated monodisperse microbubbles. *Soft Matter* 2018, 14, 9550–9561.
- [36] Svitova, T. F. Radke, C. J. AOT and Pluronic F68 coadsorption at fluid/fluid interfaces: a continuous-flow tensiometry *study*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2005, 44, 1129–1138.
- [37] Tabata, H. Koyama, D. Matsukawa, M. Yoshida, K. Krafft, M. P. Concentration-Dependent Viscoelasticity of Poloxamer-Shelled Microbubbles. *Langmuir* 2023, 39, 1, 433–441.

5. 超音波照射によるバブルの内部気体放出

5.1 緒言

造影剤や DDS に使用されるマイクロバブルは、体内を長時間循環させるためバブルの安定化（長寿命化）が重要である。純粋な空気のバブルを人体に注入すると、血圧やラプラス力などにより瞬く間に消える。そのため第 2 世代以降、臨床で使用されるバブルは不溶性の気体を内部気体として採用し、脂質や界面活性剤で気体を覆うことによって安定化をはかっている。また、超音波照射によって内部気体の放出が促進され、液中での安定性が低下することが知られている。しかしながら、超音波照射が与えるバブルの安定性への影響については、単一バブルで検討された報告はなく詳細な検討にはいたっていない。

本章では内部気体の拡散について超音波による影響を実験的に検討する。はじめに静的条件下（超音波照射なし）でのバブルの内部気体拡散の理論モデルについて説明する。そして、超音波照射下において、いくつかの濃度で作製した Pluronic F-68 バブルの安定性に関する実験結果を報告する。特にここでは、膜材料の吸着状態、バブルの振動特性、バブルの安定性の相互作用について検討する。

5.2 自由気泡の溶解

自由気泡（膜無し）の安定性については Esptein と Plesset によって既に理論モデルが検討されている[1]。彼らは拡散方程式を基に理論的に気体の溶解プロセスを表現している。

$$\frac{\partial c_g}{\partial t} = D_w \nabla^2 c_g = D_w \left(\frac{2}{r} \frac{\partial c_g}{\partial r} + \frac{\partial^2 c_g}{\partial r^2} \right), \quad (5.1)$$

D_w は液中の気体の拡散係数で、 c_g はガス濃度である。バブルの体積に対して周囲液体の体積が極めて大きいと仮定すると、バブル内の平衡時の気体濃度は飽和状態 C_s とされ、 $r = \infty$ での液中での気体濃度は C_0 とされる。したがって、濃度勾配は式 (5.1) から以下のとおりとなる。

$$\left(\frac{\partial c_g}{\partial t}\right)_{r=R} = (C_0 - C_s) \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{\sqrt{\pi D_w t}}\right), \quad (5.2)$$

バブル表面から出る気体の流れ J によってバブルの質量 m は減少する。

$$\frac{\partial m}{\partial t} = -4\pi r^2 J = 4\pi r^2 \rho \frac{\partial R}{\partial t}, \quad (5.3)$$

バブル径の経時的な変化は以下のように示すことができる。

$$\frac{\partial R}{\partial t} = -\frac{J}{\rho}, \quad (5.4)$$

したがって、フィックの拡散の第一法則から気体の流れ J は以下のようになる。

$$J = -D_w \frac{\partial c}{\partial t}, \quad (5.5)$$

式 (5.2)、(5.4) と (5.5) 不飽和状態の周囲液体に対する気体の拡散率は以下のように表現される。

$$\frac{dR}{dt} = -\frac{D_w(C_s - C_0)}{\rho} \left\{ \frac{1}{R} + \frac{1}{\sqrt{\pi D_w t}} \right\}, \quad (5.6)$$

ここでヘンリーの法則によると、飽和溶存気体濃度の気体密度に対する比 L_d と初期溶存濃度の飽和濃度に対する比 L_f はそれぞれ以下のとおりに定義される。

$$L_d = \frac{C_s}{\rho}, \quad (5.7)$$

$$L_f = \frac{C_0}{C_s}, \quad (5.8)$$

式 (5.7) と式 (5.8) より式 (5.6) は以下の通り表現される。

$$\frac{dR}{dt} = -D_w L_d (1 - L_f) \left\{ \frac{1}{R} + \frac{1}{\sqrt{\pi D_w t}} \right\}, \quad (5.9)$$

5.2.1 表面張力による影響

バブルの溶解は気体の濃度勾配によって発生するだけでなく、表面張力 σ とバブル表面の曲率 R_c で求められるラプラス力 ΔP も影響する。

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R_c}, \quad (5.10)$$

したがって、バブル径の減少に伴いバブル内の圧力は上昇する。内部気体は理想気体であると仮定すると、圧力は以下のように書ける。

$$P_{\infty} + \frac{2\sigma}{R_c} = \frac{nBT}{V}, \quad (5.11)$$

P_{∞} は外部から加わる圧力、 T は絶対温度、 n は分子数、 V は体積で B は気体定数である。
 $\frac{n}{V}$ は分子量 M_w であり理想気体方程式によると、バブルの気体密度 ρ_b は以下のようになる。

$$\rho_b = \frac{M_w}{BT} P_{\infty} + \frac{2M_w\sigma}{BT} \frac{1}{R} = \rho_g + \frac{2M_w\sigma}{BT} \frac{1}{R}, \quad (5.12)$$

ρ_g は曲率 0 の時の気体密度である。表面張力の影響を検討すると、バブルの溶解は式 (5.9) と式 (5.12) を組み合わせることによって示すことができる。

$$\frac{dR}{dt} = -D_w L_d \frac{1-L_f + \frac{2M_w\sigma}{\rho BTR}}{1 + \frac{4M_w\sigma}{3\rho BTR}} \left\{ \frac{1}{R} + \frac{1}{\sqrt{\pi D_w t}} \right\}, \quad (5.13)$$

したがって、以下のとおりに書くことができる。

$$\frac{dR}{dt} = -L_d \frac{1-L_f + \frac{2M_w\sigma}{\rho BTR}}{1 + \frac{4M_w\sigma}{3\rho BTR}} \left\{ \frac{D_w}{R} + \sqrt{\frac{D_w}{\pi t}} \right\}, \quad (5.14)$$

先行研究によると空気の D_w は $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ [2] である。実際に、臨床応用が期待できる半径数 μm のバブルの場合、空気は数百ミリ秒程度で完全に溶解する。

5.3 フッ化炭素ガスの溶解度

バブルを安定化させるために内部気体の溶解度は重要である。フッ化炭素やフッ化硫黄は生体適合性を示し、造影剤として臨床使用可能なバブルにも使用されている。表5.1にフッ化炭素やフッ化硫黄、酸素、窒素の分子量、水に対する溶解度、血液への溶解を決めるオストワルト係数や飽和水蒸気圧をまとめる[3]。

表5.1 バブルの安定化に伴う気体の重要パラメータ

気体の種類	分子量	水への溶解度 [mol m ⁻³](25°C)	オストワルト係数 L (×10 ⁻⁶)	飽和水蒸気圧 [kPa](37°C)
N ₂	30	0.63	14480	—
O ₂	32	1.32	27730	—
C ₂ F ₆	138	1.45	1272	3500
SF ₆	146	0.27	—	2530
C ₃ F ₈	188	0.19	530	1160
C ₄ F ₁₀	238	0.021	202	380
C ₅ F ₁₂	288	4×10 ⁻³	117	130
C ₆ F ₁₄	338	2.7×10 ⁻⁴	23	48

空気に含まれる窒素 (N₂) や酸素 (O₂) と比較しフッ化炭素やフッ化硫黄は水に対する溶解性が極めて低い。Sonovue[®]では六フッ化硫黄 (SF₆)、Optison[®]、Definity[®]ではペルフルオロプロパン (C₃F₈)、Sonazoid[®]ではペルフルオロブタン (C₄F₁₀) が使われ安定性を向上させている[4]。本実験では水への溶解性がより低いペルフルオロヘキサン (C₆F₁₂) を使用して実験を行った。

5.4 内部気体溶解に対する周囲膜の効果

リン脂質や界面活性剤はバブルを覆う膜を形成することによって、安定性を向上させる。両親媒性物質の分子が気液界面に吸着すると、表面張力は低下し式 (3.2) のとおりラプラス圧も低下する。ラプラス圧の低下でバブル内の圧力上昇が抑制され内部気体の拡散は緩やかになる。加えて、バブルを覆う膜分子は内部気体が外部液体への拡散を抑制する。図 5.3 にこれらの概略を示す。

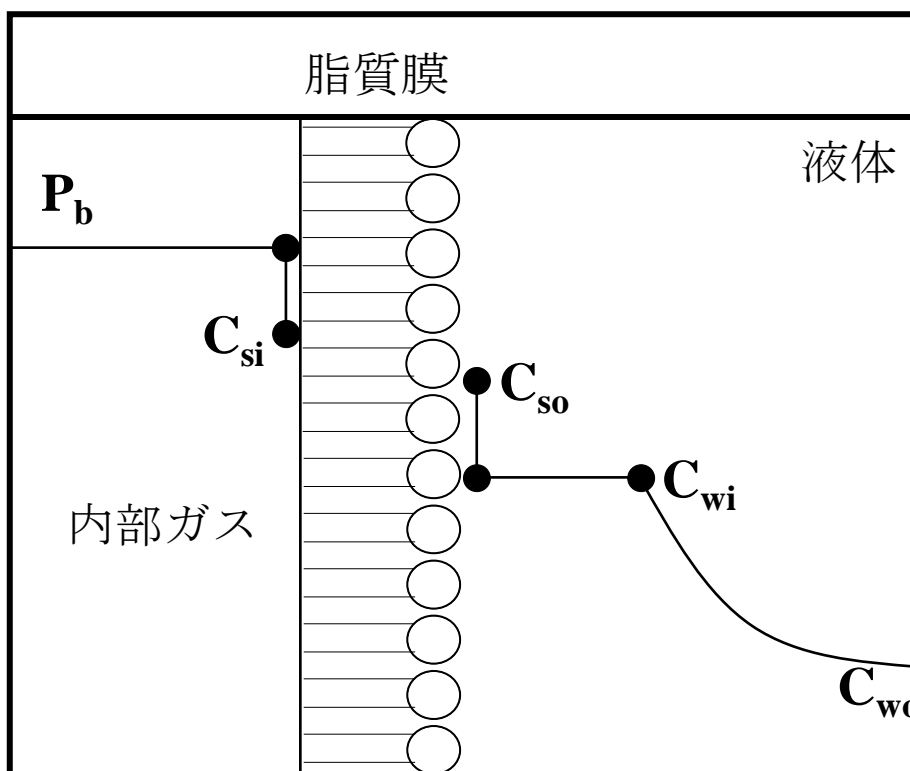


図 5.3 両親媒性物質がバブル周囲を覆う際の内部ガス分子の周囲液体への拡散と濃度推移の概略図。

バブルの内部気体は図 5.3 の通り膜を介して周囲の液体に拡散する。気体の拡散に対する個別の抵抗の総和値が全体の抵抗値 R_{total} となり以下のように与えられる。

$$R_{total} = R_{shell} + R_{water}, \quad (5.15)$$

R_{shell} と R_{water} はそれぞれ周囲膜と水の抵抗値である。 R_{water} の逆数が式(5.14)内の括弧内に等しい。

$$R_{water} = 1 / \left(\frac{D_w}{R} + \sqrt{\frac{D_w}{\pi t}} \right), \quad (5.16)$$

第一項 $\frac{D_w}{R}$ は定常項であり。第二項 $\sqrt{\frac{D_w}{\pi t}}$ は過渡項である[5]。第二項は、バブルの周囲液体の溶存気体が平衡状態に至るまでの時間で影響する。ランダムウォーク理論、フィックの拡散第一法則によると、粒子が移動する距離は $2D_w T$ の平方根であり、空気の場合0.06秒ほどかかる[5]。

式(5.16)に単分子膜に対する輸送抵抗 R_{shell} を加えるため、周囲膜を超えて流れる気体の境界条件を考慮すると

$$N_{shell} = K_{shell}(C_{si} - C_{so}) = K_{water}(C_{wi} - C_{wo}), \quad (5.17)$$

となる。

図5.3に示す通り N_{shell} は膜と水の境界を介して流れるモル流束である。 K_{shell} と K_{water} は膜と水の透過性であり、 C_{si} と C_{so} は境界における気体のモル濃度である。そして C_{wi} と C_{wo} は液相境界での気体のモル濃度である。局所的な平衡状態を仮定するとバルク層間に以下の分配係数を定義すると $k_1 = P_g/C_{si}$ 、 $k_2 = C_{so}/C_{wi}$ 、 $h = k_1 k_2 = L_f P_0/C_{wo}$ と書ける。式(5.17)に代入すると

$$N_{shell} = \frac{1}{R_{shell}} \left(\frac{P_b}{h} - C_{wi} \right) = \frac{1}{R_{water}} \left(C_{wi} - \frac{L_f P_a}{h} \right), \quad (5.18)$$

ここで P_g は内部気体の圧力（以下のようにあたえられる $P_g = P_0 + \frac{2\sigma}{R_c}$ 、 $R_{shell} = 1/k_2 K_{shell}$ 、 $R_{water} = 1/K_{water}$ ）である。内部気体が理想的であると仮定して、膜上のモルバランスを計算すると、バブル内部から出る気体分子の流れについて次の式がえられる。

$$N_{shell} = \frac{-1}{4\pi R^2} \frac{L_d}{dt} \left(\frac{P_g}{BT} \frac{4\pi R^3}{3} \right), \quad (5.19)$$

B は気体定数で T は温度である。式 (5.18) および式 (5.19)、そして単純化すると分子膜で覆われたバブルの溶解に対する微分方程式を得られる。

$$-\frac{dR}{dt} = \frac{O}{R_{water} + R_{shell}} \left(\frac{\left(1 + \frac{2M_w\sigma}{\rho_g BTR}\right) - L_f}{1 + \frac{4M_w\sigma}{3\rho_g BTR}} \right), \quad (5.20)$$

ここで O はオストワルト係数である。式 (5.20) 右辺の第二項にある R_{water} はバブルの周囲液体の溶存気体が平衡状態に至るまでの十分な時間を経過すると $\frac{R}{D_w}$ となるため、式 (5.20) は以下の式に変換される。

$$-\frac{dR}{dt} = \frac{O}{R/D_w + R_{shell}} \left(\frac{\left(1 + \frac{2M_w\sigma}{\rho_g BTR}\right) - L_f}{1 + \frac{4M_w\sigma}{3\rho_g BTR}} \right), \quad (5.21)$$

図5.4は式 (5.21) から求めた、数値計算の結果である。(a)は $R_{shell}=1$ として表面張力を変

化させた時の結果であり、(b)は $\sigma = 72 \text{ mN m}^{-1}$ として R_{shell} を変化させた時の結果である。バブルの初期径は $100 \mu\text{m}$ として計算し、その他条件は内部気体が窒素と仮定して決めた。徐々に粒径は収縮し、 $20\sim 30 \mu\text{m}$ から急激にバブルが収縮することを確認した。ラプラス圧が有意に働いている領域であると考えられる。

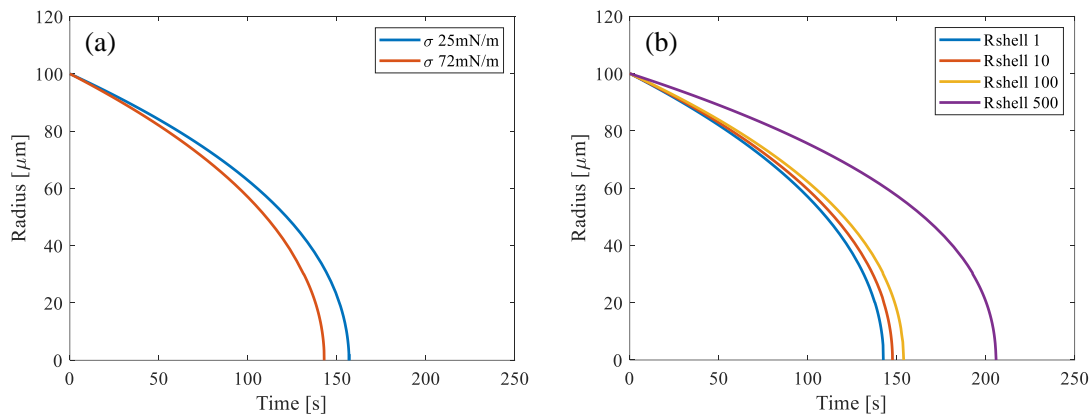


図5.4 バブル径の時間変化を示す数値計算結果。 $D_w = 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, $M_w = 28.014$, $\rho_g = 1.251 \text{ g/L}$, $B = 30.29$, $T = 295.15 \text{ K}$, $O = 14480 \times 10^{-6}$, $L_f = 0.8$ 。

5.5 超音波照射下における Pluronic F-68 バブルの溶解

5.5.1 実験方法

本項の実験は図 4.1 の単一バブルの振動特性を測定した光学システムで測定を行った。実験セル内は Pluronic F-68 水溶液を満たし、中央に固定したバブルの超音波照射中の振動挙動とバブル径を、それぞれ LDV と CCD カメラを使って測定した。底面に接着した振動子には 38.8 kHz の連続正弦波の電気信号を入力し、半波長共振モードで駆動させ、測定部での音圧は約 7.2 kPa である。

5.5.2 実験結果と考察

界面活性剤で構成される膜は周囲液体に対して、内部気体の拡散を防ぐ効果がありバブル寿命を延長させる。加えて、内部気体の溶解度も寿命に強く影響する。Kabalnov らによると、マイクロバブルの体積変化は3つのステージに分けて説明することができる[2,6]。最初のステージでは、表面張力や内部気体の圧力、周囲液体の圧力が平衡につりあうまで急激に拡張、もしくは縮小する。2番目のステージでは、バブルは徐々に収縮し、内部の圧力も上昇する。最終的にバブルの内部気体は圧力の上昇によって、気体から液体に状態変化を起こしバブルは消失する。超音波照射下のバブルの安定性はバブルの経時的な粒径変化を測定することによって評価した。図 5.5 は定在波照射下におけるバブル径と粒径の変化率の関係を示している。図 4.2 と図 4.5 で示した通り、バブルの振動振幅 ΔR は Pluronic F-68 濃度や DMPC 濃度、内部気体に依存しない。粒径の変化率は連続正弦波を 10 秒から 1 時間照射した際の平均径の変化から計算し、2.5 μm 毎の平均値をプロットした。図 5.5 に示した実験結果で、変化率は内部気体が空気の場合と混合気体（PFH と空気）の場合で明らかに異なる特性を示した。内部気体に混合気体を使った場合には、PFH の水への溶解度が非常に低いため、初期バブル径からほとんど変化しなかった。一方で内部気体に空気を使った場合には、バブル径が減少するとラプラス圧 $\Delta P = 2\sigma/R$ （ σ :表面張力; R :バブルの半径）が増加するため、全ての濃度条件で粒径の変化率は増加した。また、内部気体が空気の場合には Pluronic F-68 濃度が上昇すると径の平均変化率は低下し、エラーバーも小さくなる。これは Pluronic F-68 膜によってバブルの内部気体の拡散が抑制されたためである。

図 5.6 は定在波下におけるバブルの体積変化と粒径の関係を示したグラフであり、図 5.5 の結果から計算したものである。粒径の大きい空気バブルは粒径変化のバラつきは小さい。しかし、径の減少とともにバラつきは大きくなる。注目すべき点として、いずれの

Pluronic F-68 濃度でも空気バブルは $60\ \mu\text{m}$ で体積変化率が最大となり、その径は照射音波の周波数に対する共振径である (図 4.6)。したがって、超音波照射下におけるバブルの振動挙動はバブルの寿命に影響を与え、振動振幅の増加によって内部気体の拡散を加速させたと考えられる。図 5.7 は超音波照射下において、共振径付近のバブルの半減期と Pluronic F-68 濃度の関係を示したものである。周囲膜である Pluronic F-68 の濃度上昇に伴い、明らかに空気バブルの半減期は延長し、DMPC バブルについても DMPC 膜によって半減期は延長している。今回の実験結果において、Pluronic F-68 バブルの半減期は DMPC バブルより延長していた。バブル表面に Pluronic F-68 分子が高密度に吸着したことで表面張力が低下した効果や内部気体の拡散抑制の効果が考えられる。

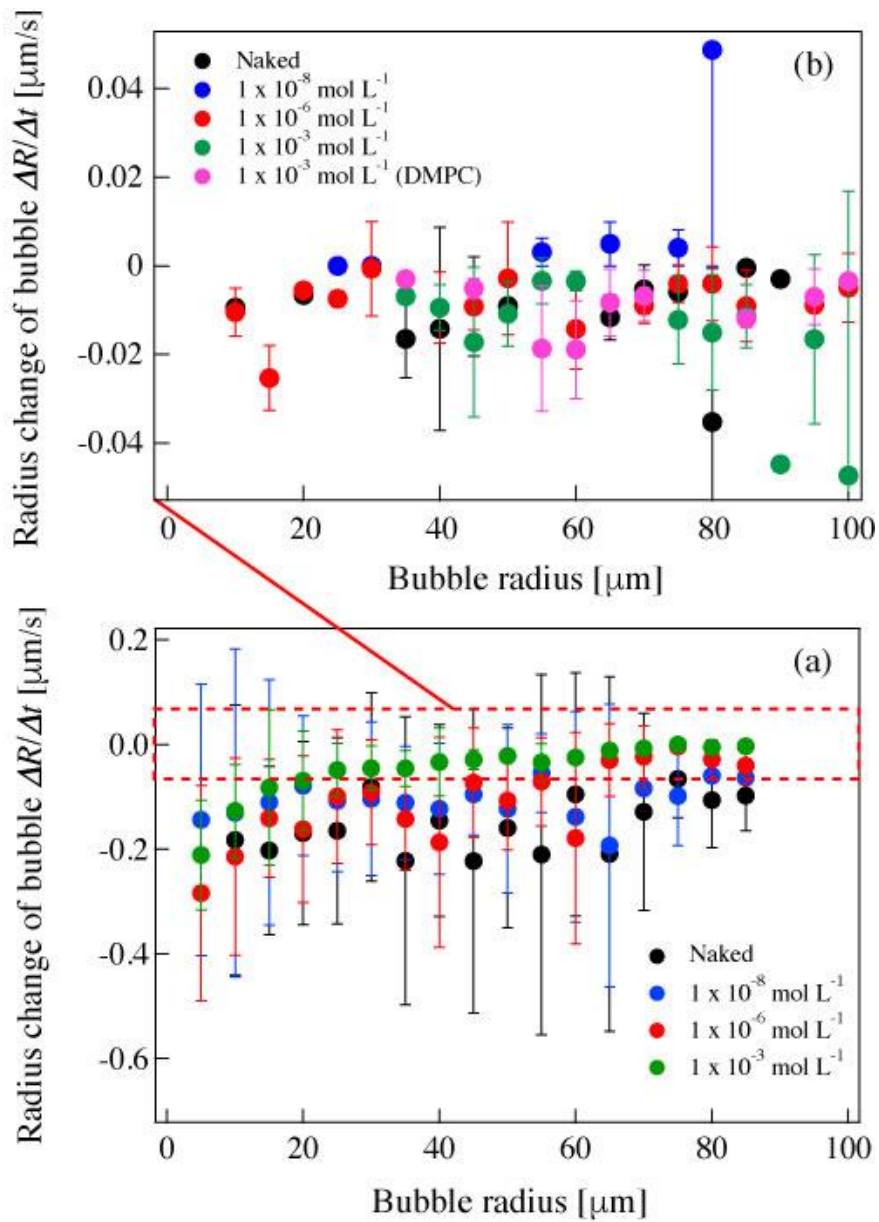


図 5.5 Pluronic F-68 と DMPC 膜で覆った (a) 空気バブル径と (b) 混合気体 (PFH+ 空気) バブル径の経時的変化。

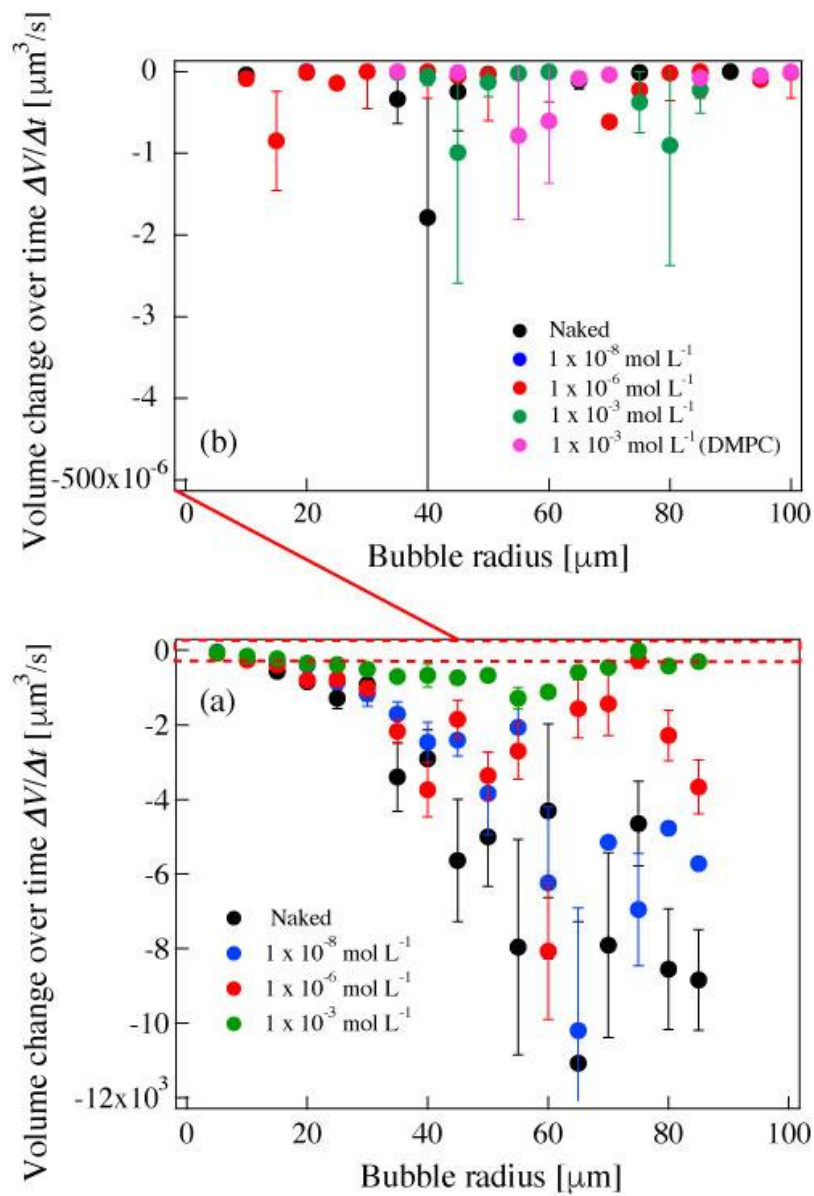


図 5.6 Pluronic F-68 と DMPC をコーティングした (a) 空気バブル体積と (b) 混合気体 (PFH+空気) バブル体積の経時的変化。

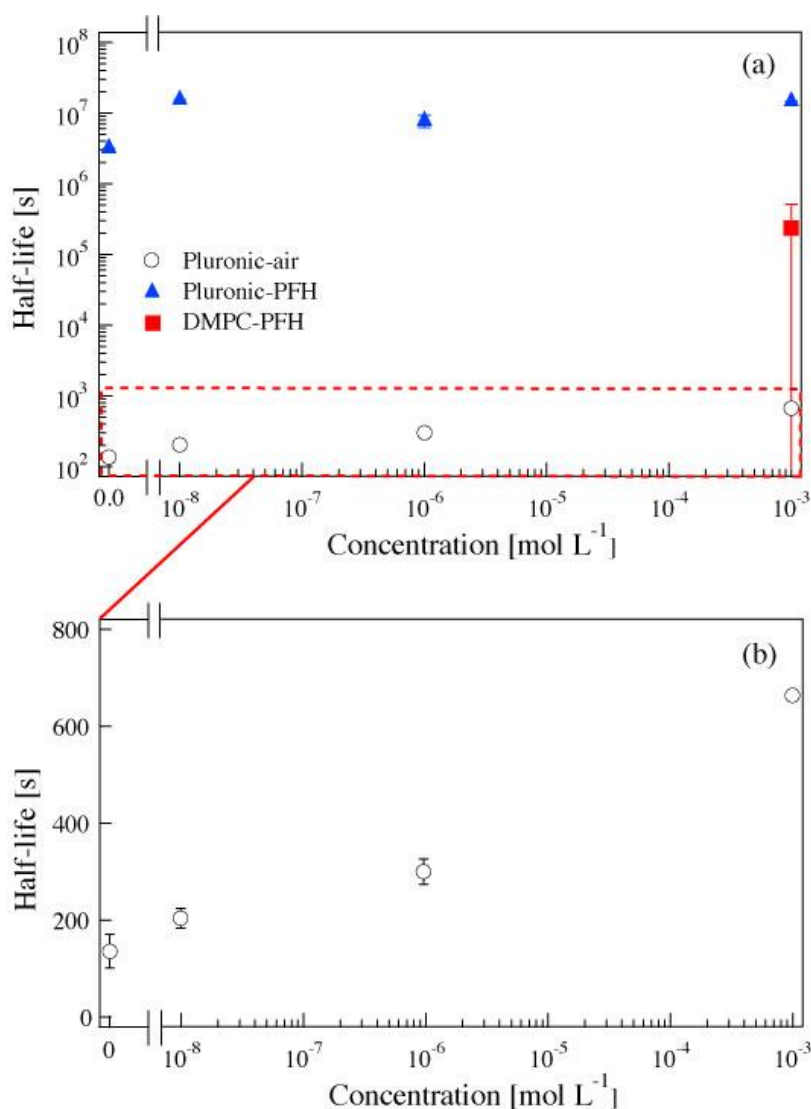


図 5.7 超音波照射下における Pluronic F-68 バブルの半減期の濃度特性と DMPC バブルの半減期。中空の円プロットは Pluronic F-68 空気バブルを示し、三角のプロットは Pluronic F-68 混合気体バブルを示す。四角のプロットは Pluronic F-68 混合気体バブルと DMPC 混合気体バブルを示している。

5.6 総括

Pluronic F-68 とリン脂質の一種である DMPC の膜で覆った単一バブルの超音波照射時における安定性について検討した。超音波照射下で、Pluronic F-68 と DMPC の膜で覆わ

れたバブルの安定性は、内部気体、バブル径、振動振幅、膜材料の濃度によって変化した。本方法で作製した粒径の大きい PFH を内部気体にもつバブルの安定性は、超音波照射中も強力な不溶性の影響を受けることがわかった。圧力変動の影響を受ける領域では、バブルの振動により内部気体の圧力が変化するため、超音波照射により内部気体の溶解が促進されると考えられる。

参考文献

- [1] Epstein, P. S. Plesset, M. S. On the Stability of Gas Bubbles in Liquid-Gas Solutions. *J. Chem. Phys.* 1950, 18, 1505–1509.
- [2] Kabalnov, A. Klein, D. Pelura, T. Schutt, E; Weers, J. Dissolution of multicomponent microbubbles in the blood stream 1. Theory. *Ultrasound Med. Biol.* 1998, 24, 739–749.
- [3] Schutt, E.G. Klein, D.H. Mattrey, R. M. Riess, J. G. Injectable Microbubbles as Contrast Agents for Diagnostic Ultrasound Imaging: The Key Role of Perfluorochemicals. *Angewandte Chemie International Edition*, 2003 42, 3218-3235.
- [4] Zhao, Y. Z. Du, L. N. Lu, C.T. Jin, Y. G. Ge, S. P. Potential and problems in ultrasound-responsive drug delivery systems. *Int J Nanomedicine*. 2013, 8, 1621-1633.
- [5] Borden, M. A. Longo, M. L. Dissolution Behavior of Lipid Monolayer-Coated, Air-Filled Microbubbles: Effect of Lipid Hydrophobic Chain Length. *Langmuir*, 2002, 18, 9225–9233.
- [6] Kabalnov, A. Bradley, J. Flaim, S. Klein, D. Pelura, T. Peters, B. Otto, S. Reynolds, J. Schutt, E. Weers, J. Dissolution of multicomponent microbubbles in the blood stream 2. Experiment. *Ultrasound Med. Biol.* 1998, 24, 751–760.

6. 結語

本章では、これまで記載した全ての検討や考察について簡単にまとめる。

第1章では、造影剤として開発されたマイクロバブルの歴史を簡単に紹介し、実際にゴールドスタンダードとして応用されている症例について示した。加えて、マイクロバブルの応用が期待されている DDS について、その概要を示した。ここでは、特に有望な臨床アプリケーションである脳を対象にした DDS について、臨床的な価値を明確にした。

第2章では、マイクロバブルの造影効果を明らかにするために、超音波診断装置の画像化技術を説明した。つづいてマイクロバブルの造影効果について、実際に診断装置と寒天ベースのファントムを使い示した。マイクロバブルは造影剤としてだけでなく、DDS への応用が期待されている。超音波とバブルを組み合わせることによって局所的に薬物の血管透過性を亢進させる効果がある。この技術はすでに動物実験や人を対象にした臨床研究が実施されており、それら先行研究の結果をここにまとめた。血管透過性亢進の現象を解明するために、先行研究では培養した細胞やファントムを使用して検討されている。それらの先行研究から、ここでは現状考えられている透過性亢進の詳細なメカニズムを示し、バブルの安定性や振動挙動の重要性を示した。

第3章ではバブルの周囲膜について、微細な構造を検討するために気液界面における膜分子の吸着動態について示した。本研究ではバブルの膜材質として有望な Pluronic F-68 を使いバブルを作製するため、Pluronic F-68 の気液界面に対する吸着動態を測定した結果を示した。濃度上昇にともない Pluronic F-68 の分子配向が変化し、吸着が平衡状態に推移するまでの緩和時間が変化することを確認した。本結果は次項以降の実験でバブルを作製する際に考慮された。

第4章では2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。粘弾性の推定には測定した振動

特性に理論モデルを適応する必要がある。そのため本章では初めに、自由気泡の理論モデルである Rayleigh-Plesset 方程式を基に開発された両親媒性物質が気体を覆うバブルの線形振動モデルを示した。3章の結果を基に Pluronic F-68 バブルを作成し、超音波照射時における振動挙動を計測し、線形振動モデルを適応することで周囲膜の粘弾性を推定した。バブル径によって膜の粘弾性が振動挙動に与える影響が異なることを発見し、臨床応用が期待されるバブル径においては膜の粘弾性が振動挙動に強く影響を与える結果となった。加えて、バブルの表面に吸着した分子の密度が膜の粘弾性に重要な影響を与えることを報告した。

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の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。本実験では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。結果として、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。

謝辞

博士課程後期課程を修了するために、大変多くの方々にご支援をいただきました。心から感謝の意を示すとともにここにご紹介させていただきます。

実験の準備やサポート、環境構築などご支援いただいた同志社大学超音波エレクトロニクス応用計測研究室の学生皆様に感謝申し上げます。

うまくいかない時、難しい時に、いつも共に時間を過ごし研究に向かう新たなモチベーションを与えていただいた超音波研 OB の柴田 健次氏と池永 雄貴氏に心から感謝申し上げます。

超音波の画像化技術や臨床についての助言、また博士課程と仕事との両立がうまく果たせるように様々なサポートをしていただいた日本光電工業荻野記念研究所 TU チーム 熊谷 壮祐氏、大浦 光宏氏、鈴木 隆夫氏、谷口 英剛氏に感謝申し上げます。

修士課程の留学時から今に至るまで界面化学の専門家としていつも貴重なご助言をいただくとともに、論文投稿のご指導など様々なご支援をいただいたストラスブール大学 Marie Pierre Krafft 教授に心から感謝申し上げます。

研究計画の立案から、実際の実験、実験結果の考察、論文の投稿に至るまで本当に多くのご助言とご指導、ご支援をいただいた千葉大学 フロンティア医工学センター 吉田 憲司助教授に深く心から感謝申し上げます。

博士課程進学にあたり、研究ができる環境を与えていただいたこと、研究の相談や論文執筆に至るまでこれまで本当に多くのご支援をいただいた同志社大学 小山 大介教授に深く心から感謝申し上げます。

いつも学生第一に振る舞い、研究室配属時や博士後期課程進学時にも温かく超音波研に向かい入れていただき今日に至るまで大変に多くのご指導ご支援をいただいた同志社大学 松川 真美教授に深く心から感謝申し上げます。

知的でユーモアに溢れる授業で超音波研に入りたいと思うきっかけを作っていただき、配属後も物事を俯瞰で見る視点、考えることの魅力をご教示し続けていただいた同志社大学 渡辺 好章名誉教授に心から感謝申し上げます。

最後に、家族に心から感謝を申し上げます。卒業にいたるまで本当に難しく長い時間を支えていただいたことに深く心から感謝申し上げます。