

NIPA ゲル流路を用いたソノポレーションの評価

Evaluation of sonoporation using NIPA gel flow channel

山越芳樹[‡], 三輪空司, 吉澤伸幸, 井野口博輝, 張東宇(群馬大 工)
Yoshiki Yamakoshi[‡], Takashi Miwa, Nobuyuki Yoshizawa, Hiroki Inoguchi and Dongyu Zhang
(Facult. Eng., Gunma Univ.)

It is considered that sonoporation, which makes small pores through cell membrane, may be a sophisticated method in order to improve efficacy in ultrasonic wave irradiated drug delivery system. However, neither precise mechanism of sonoporation nor optimum sequence of insonation has been clarified. In this paper, effects of pre-trapping of micro bubbles to the target wall, which is carried out by pumping ultrasonic wave before insonation using high intensity ultrasonic wave, is evaluated by N-isopropylacrylamide (NIPA) gel flow channel. Both amount of trapped bubbles on the wall during pre-trapping and density of micro hollows on the wall after insonation using high intensity ultrasonic wave are evaluated simultaneously.

1. はじめに

超音波により引き起こされる微小気泡のキャビテーションを用いた細胞膜への微小穿孔(ソノポレーション)は、超音波支援の Drug/Gene Delivery System においてペイロードを導入するための有効な手段として期待されているが、細胞への導入効果(Efficacy)向上のための超音波照射シーケンスなど条件の最適化が重要になる。従来ソノポレーションにおける Efficacy 判定のために培養細胞が主に用いられてきているが、この方法では得られた結果が直接 Efficacy の評価に繋がるという利点があるものの、条件の最適化を実験的に検討しようとすると再現性や簡便性に難点があり血管を模擬したソノポレーション評価用の流路ファントムが必要になってくる。今回、高分子ゲルである NIPA ゲルを用いて流路ファントムを作成し、気泡として超音波造影剤を用いて実験を行ったので報告する。

我々は、気泡への Pre-trapping がソノポレーションに与える効果に着目した。気泡の Pre-trapping とは、超音波ポンピング波と呼ぶ気泡を破壊しないが気泡に音響放射圧を加えて気泡の運動を制御できる超音波を、気泡破壊用の強力超音波を照射する前に与えることでソノポレーション時の Efficacy の向上を図ろうとする前処理としての気泡操作法である。

2. ソノポレーション時の気泡の Pre-trapping の効果

図 1 にソノポレーションに与える気泡の Pre-trapping の効果について図

示した。気泡を導入 (Step1) 後、Step2 に示したように気泡の Pre-trapping により、ターゲット付近における気泡の密度を向上させたり、気泡と壁面との距離を最適化したり、更に気泡の集合化による気泡群としての効果を生じさせる。この後、このような Pre-trapping を行った気泡に対して Step3 に示すように強力超音波を導入し、気泡が破壊するとにより生じる壁面への機械的作用や壁面へのマイクロジェットによるソノポレーションを行う。

我々は気泡の Pre-trapping 法として既に、気泡の壁面への自己トラッピング法¹⁾、ポンピング超音波を周波数変調することで壁面付近の気泡密度を向上させる方法²⁾を提案した。特に周波数変調法は、ポンピング超音波中で気泡が自ら放射する 2 次超音波により生じる 2 次 Bjerknes 力により気泡を集合化させ、集合化と同時に起こる集合化気泡のある間隔での整列化を利用して壁面に向かう力を気泡に加える方法である。具体的にはポンピング超音波の周波数を徐々に低下させていくことで集合気泡間の間隔を広げ、壁面へより多くの気泡を付着

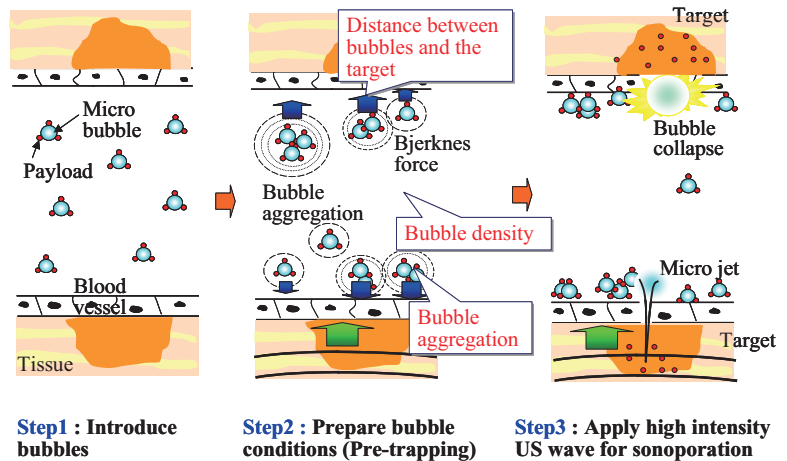


Fig.1 Features of pre-trapping of micro bubbles in enhancing the effects of sonoporation

e-mail:yamakosi@el.gunma-u.ac.jp

させる方法であるが、実際の気泡には 2 次 Bjerknes 力のほかに入射超音波の進行方向に働く 1 次 Bjerknes 力などの影響で気泡の運動はかなり複雑になるので、今回 NIPA ゲル流路ファントムを用いて検討を行った。

3. NIPA ゲルを用いた流路ファントム

NIPA ゲルは以下の方法で作成した。主鎖として NIPA : 3.395g、架橋剤として N-MBAA: 0.093g、反応開始剤として APS : 0.0135g を超純水 30ml に加え攪拌し、酸素を除去するために窒素バブリングを 40 分行った。その後反応促進剤として TEMED : 30 μ l を加えた。2 枚のガラス板 (シリコンゴムがスペーサー) の間に流路の模擬として直径 2mm のガラス棒を入れ上記溶液を導入し、その後、室温で 18 時間放置してゲル化させた。ゲル化後、水中に 4 日間放置して溶媒を交換した。このとき摂氏 15 度に温度管理を行った。作成したゲルの音速は 1539m/s ($\sigma=10.5$ m/s)、密度は 1.025g/cm³ ($\sigma=0.009$ g/cm³) であった。APS の量を変えることで音速を調整できることも確認した。作成した流路ファントムの写真を図 2 に示す。このゲルは光学的に透明であり内部に形成した流路の内面への Pre-trapping による気泡の付着や

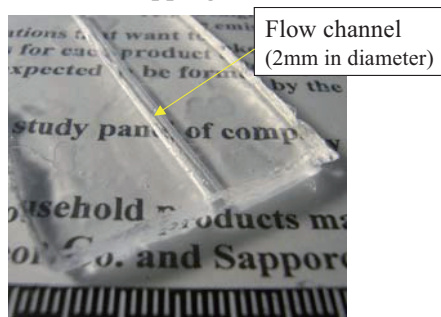


Fig.2 NIPA Gel Flow channel

高音圧超音波導入後の流路内面の微小窪みを外部から光学的に容易に観察できるという特徴がある。また NIPA ゲルは摂氏 34 度付近以上で相転移を生じ、これ以上の温度に曝されるとゲルが白色化するので超音波照射時の温度上昇の影響をも同時に光学的に観察できるという利点もある。

4. 実験結果

ファントムの流路内に超音波造影剤気泡(レボビスト)を流し、流路下部の 2 つの凹面型超音波振動子から超音波を放射した。まず気泡を流路内面にポンピング超音波 (音圧 50kPa) で捕捉させた後、キャビテーション用の強力超音波

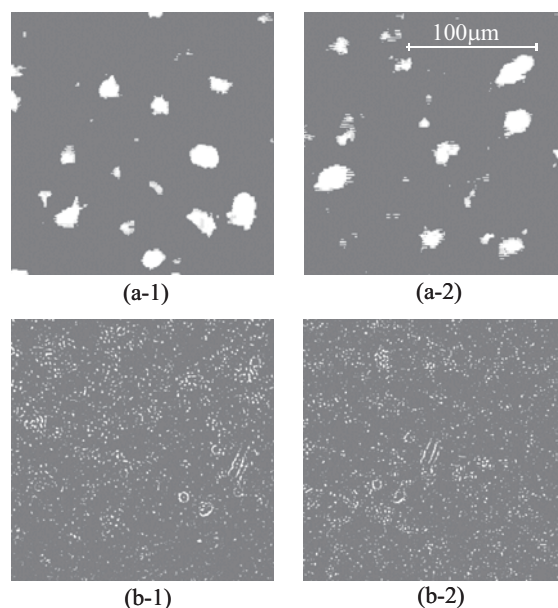


Fig.3 Photographs of the surface of the NIPA gel flow phantom. (a-1) and (a-2) are pre-trapped micro bubbles. (b-1) and (b-2) are micro hollows produced after irradiating high intensity ultrasonic wave.

(周波数 2.5MHz、音圧 1.5MPa、波数 10,000) を照射した。実験中および実験後にファントム上面から光学顕微鏡で内面の観察を行った。

図 3 に実験結果の例を示す。図 3(a-1)および (a-2)は Pre-trapping 後の集合気泡の流路内面への付着の様子である。図中白く写っている部分が集合気泡である。一方、図 3(b-1)および(b-2)は強力超音波照射後の流路内面に形成された微小窪みである。図中白く写っている部分に窪みが形成されている。光学顕微鏡による観察のために微小窪みの観察は難しいが、Pre-trapping により 10 ミクロンオーダーの気泡集合が形成され、強力超音波照射後にミクロンオーダー以下の多数の極微小窪みがゲル流路内面に形成されていることが分かる。この方法を用いて、ポンピング周波数を一定周波数とした場合と周波数走査を行った場合で極微小穴の総数を評価したところ周波数スイープ法により多数の穴が形成できることを確認した。

5. まとめ

音響特性が生体組織に近く、光学観察が容易な NIPA ゲルを用いて気泡キャビテーションに与える気泡の Pre-trapping の効果を検討した。

引用文献

- 1.Y. Yamakoshi and T. Miwa, J. Appl. Phys. **48** (2008) 4127.
- 2.Y. Yamakoshi and T. Miwa, J. Appl. Phys. **48** (2009) July.