平面分布したマイクロカプセル群の数濃度と崩壊率に関する実験的解析

杉田 直広^{*1}, 進士 忠彦^{*1}

Experimental analysis of number concentration and disruption rate of two-dimensionally distributed microcapsules

Naohiro SUGITA^{*1} and Tadahiko SHINSHI^{*1}^{*1}Tokyo Institute of Technology

4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 226-8503, Japan

Received: 20 May 2020; Revised: 10 October 2020; Accepted: 25 February 2021

Abstract

Disruption of gas-filled microcapsules under pulsed ultrasound irradiation is experimentally studied. The goal of this study is to evaluate the disruption rate of the polymer-shelled microcapsules as a function of the mean number concentration of the microcapsule population. In the present study, we defined the disruption of a microcapsule as decapsulation of the shell layer followed by exposure of an internal gas bubble, growing to visually detectable size through mass diffusion. An experimental setup has been designed to sonicate two-dimensionally dispersed microcapsules in a planar microchamber. Pulsed ultrasound at 1 MHz is irradiated normal to the chamber from a planar ultrasound transducer. Pure water and glycerol aqueous solution of 30 wt. % were used as the dispersion media. Image processing of the recorded microscopic images yields capsule size distribution and local concentration distribution defined as an inverse of the occupied area of the capsule position (Voronoi area). The mean number concentration is controlled over a wide range from 5 to 200 capsules/mm², while the mean capsule diameter is controlled between 25 and 40 μ m regardless of the concentration. The disruption rate is evaluated comparing the number of disrupted microcapsules (gas bubbles) and the total number of microcapsules in the target area of the ultrasound irradiation. The disruption rate turned out to decrease with the mean concentration and is inversely proportional to the mean concentration for the particular case of the two-dimensional spatial distribution.

Keywords : Microcapsules, Ultrasound, Shell disruption, Concentration, Size distribution, Bubble cloud dynamics

1. 緒 言

生体組織への局所的な薬剤導入に利用されるドラッグデリバリーシステム (DDS) は、抗癌剤の局所的な送達 (Chowdhury et al., 2017) や特定の細胞への遺伝子導入 (Lentacker et al., 2006) において重要な技術と言える。DDS では、体内の目標位置まで薬剤を保持したまま輸送する安定性と、目標位置において薬剤を放出する制御性を兼ね備えた薬剤のキャリアが必要となる。超音波で薬剤の放出を制御する DDS では、マイクロカプセルがこのキャリアの役割を果たす。内部にガス気泡を含むマイクロカプセルの場合、音波照射によるカプセル周囲の周期的な圧力変動によって、内部気体の体積が膨張と収縮を繰り返す振動を行う。振動応力がカプセルの表面を覆うシェルに歪みを生じ、カプセルが破裂に至る。このような超音波による機械的刺激を用いて、シェル内側に薬剤を付加したマイクロカプセルを崩壊させることによって、目標位置と目標時間において、必要な量の薬剤を血液中に放出させることが可能となる (Ibsens et al., 2013; Wischhusen and Padilla, 2019)。これにより、健全な細胞に対する薬剤の副作用を低減する効果が期待できる。

しかしながら、血液に対する耐溶解性に優れ、液中で長時間安定に存在できるマイクロカプセルは、その機械強度が増強してしまう傾向がある。この場合、超音波照射によって崩壊しなかったマイクロカプセルが、全身を循環し、予期せぬ場所と時間に崩壊し、健全な細胞に対して毒性を発揮することが問題となる (Ibsen et al., 2013)。

したがって、薬剤による副作用を抑制しながら、目標位置の組織において、治療に必要な薬剤の取り込み量を得るためには、照射する超音波のパラメータを適切に設定する必要がある。強力集束超音波（HIFU）に代表される高強度の集束超音波は、その直接的な温熱作用と、キャビテーション気泡の圧壊による機械的な作用により、健全な細胞を損傷させる(Chowdhury et al., 2017)。標的ではない組織への副作用および損傷を最小限に抑えるためには、より低強度の超音波を用いてマイクロカプセルの崩壊確率を向上させる技術が必要である(Skachkov et al., 2014; Juang et al., 2018)。

超音波に対して応答性を有する種々のマイクロカプセルは、共通して、その内部に気泡核を含む中空構造を有する。このようなマイクロカプセルは、超音波振動子から直接照射される超音波ビーム（1 次音場）によって、その体積が膨張と収縮を繰り返す体積振動を行う。同時に、体積振動を行うマイクロカプセルは自身が音源となり、周囲に 2 次的な圧力波（2 次音場）を放射する。この音響放射圧を介して、集団中の気泡またはマイクロカプセルの体積振動は相互に干渉している。本稿では、2 次音場によって相互に干渉する複数のマイクロカプセルの集団をマイクロカプセル群と呼ぶ。超音波照射による崩壊挙動は、第一に表面を覆っているシェル材の機械的性質(Borden et al., 2005; Bouakaz et al., 2005)と内包する気体の種類(Chatterjee et al., 2005)に依存するが、集団内の音響的な相互干渉の効果によっても、崩壊挙動は大きく変化することが報告されている(Chang et al., 2001; Arora et al., 2007)。球形気泡の体積変化および音響放射による連成効果は、Plesset 型の運動方程式に基づいて数学的に記述することができる(Brennen, 2014; Zeravic et al., 2011)。気液界面にシェルを有するマイクロカプセルの場合には、シェルによる剛性と減衰の変化を記述する修正項を、運動方程式に追加したモデルが提案されている(Faez et al., 2012)。しかしながら、これらの数学モデルを用いてカプセル群の崩壊現象を予測するためには、シェルの機械強度のばらつき(Faez et al., 2012)を同定する必要がある、大規模なカプセル群において崩壊現象の定量的な予測には至っていない。

液中に孤立した単一のマイクロカプセルの崩壊挙動は、光学顕微鏡を用いた高速度撮影によって可視化することができる。Borden et al. (2005)は、マイクロカプセル内の気泡核の溶解と分裂現象をマイクロバブルの崩壊と定義し、シェルを構成する脂質分子の種類によって、超音波照射下における溶解と分裂に対する安定性が変化することを示した。より硬質なシェル（ポリマー）を有するカプセルの場合には、シェルの破裂とそれに続く内包ガスの漏出がマイクロカプセルの崩壊と定義されている(Bouakaz et al., 2005; Koyama et al., 2006; Helfield et al., 2017)。Koyama et al. (2006)は、熱可塑性ポリマーのシェルの崩壊に必要な超音波音圧の閾値を実験的に求めた。DDS で望まれる低音圧の超音波を用いた場合、マイクロカプセルの破壊は、カプセルの直径、超音波の周波数、音圧およびパルス幅に依存することを報告している。しかし、複数のマイクロカプセルが集合して存在する場合には、崩壊率を定量的に評価した実験結果は報告されていない。マイクロカプセル群の崩壊率を光学的観察から計測するためには、広範囲に分布した多数のマイクロカプセルを顕微鏡の同一の焦点面内に捕捉し、空間分解能を維持したまま同時に撮影する必要がある。

一方、Chang et al. (2001)の実験は、超音波造影剤マイクロバブルの崩壊に必要な音圧の閾値が、数濃度の増加に伴って急速に増大し、高濃度域で飽和することを明らかにしている。Arora et al. (2007)は、超音波造影剤マイクロバブルを気泡核として発生したキャビテーション気泡群の崩壊時間が、数濃度の増加とともに大きくなることを実験的に示し、数値解析からも同様の傾向を得ている。以上の実験による巨視的な観察結果は、崩壊挙動の数濃度依存性を示唆しているが、崩壊したカプセルのサイズ分布や崩壊したカプセルの割合等の微視的な情報は得られていない。したがって、崩壊率をマイクロカプセル群の数濃度と関連づけ、定量的に評価した研究が必要と言える。

本研究では、マイクロカプセル群の崩壊率の数濃度特性を明らかにするため、超音波照射前後のマイクロカプセル群を光学的に可視化し、画像解析を用いて崩壊したカプセルの割合（崩壊率）を定量的に算出する。2 次元的可視化を可能にするため、マイクロカプセルを平面状のマイクロチャンバー内に 2 次元的に分散させる。マイクロカプセル群の代表的な数濃度は、画像解析により算出された局所濃度分布の平均値として定義する。算出した崩壊率と平均濃度との間にべき乗則を導出し、数濃度の増加に伴う崩壊率の低下傾向を示す。カプセル分散媒の粘性の変化が数濃度特性に与える影響を示すため、分散媒が純水の場合と、血液と同程度の粘性をもつグリセリン水溶液の場合の崩壊率を比較する。

2. 実験方法

2・1 マイクロカプセルの分散液

マイクロカプセルを2次元平面内に拘束するため、細胞数のカウントに用いられるスライド型のマイクロチャンバー(SD100, Nexcelom Bioscience)を用いた。この樹脂製のスライドは、厚さ0.8 mmの基板に、厚さ0.25 mmのカバーを施した構造であり、透明の観察窓(チャンバー)の部分(19 mm×9 mm×0.1 mm)には、観察対象の分散液を導入するための2つの注入孔が設けられている。この平面状チャンバー内にマイクロカプセルの分散液を注入し、マイクロカプセルを2次元的に分散させた。チャンバー内に注入したマイクロカプセルは、浮力によって上昇し、チャンバーの上面に接触した状態で面内方向に2次元的に整列する。

本実験では、純水およびグリセリン水溶液を分散媒として用い、液相の粘性が異なる2つのマイクロカプセル分散液を調製した。調製した分散液の温度は22℃であった。血液の粘性を模擬するため、グリセリン水溶液の質量濃度は30 wt. %とした。この濃度のグリセリン溶液は、20℃における粘性係数が $2.5 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ であり(Segur and Oberstar, 1951)、同温度の純水よりも約2.5倍大きい。周囲流体の粘性は減衰力として働き、カプセルの振動振幅を減少させる。マイクロカプセル(松本油脂製薬社製 F-65D)は、アクリロニトリル系共重合ポリマーのシェルを有するバルーン状の中空カプセルであり、カプセル内部には炭化水素ガスが封入されている。平均粒径およびシェルの機械特性は、医療目的に用いられるマイクロバブルと異なるが、超音波照射下において凝集挙動(Yamakoshi and Koganezawa, 2005; 江田他, 2012)を示し、超音波の散乱体(Vos et al., 2007; 梶田他, 2008)の役割を果たすなど、マイクロバブルと共通の力学特性を有する。このため、超音波による薬剤放出を模擬したシェル崩壊の実験にも用いられている(Koyama et al., 2006)。

分散液中のマイクロカプセルの数濃度は、次に示す方法で調整した。まず、粉末状のマイクロカプセルに純水を加え、マグネティックスターラで攪拌しながら、分散液全体の体積を V_{tot} に調整した。室温における体積 V_{tot} の純水の重さ $\rho_w V_{tot}$ に対して、この分散液全体の重さは m_{tot} であった。これらの重さの差から、分散液中でマイクロカプセルが排除している水の重さは $\rho_w V_{tot} - m_{tot}$ となる。この重さを、純水の密度 ρ_w で除することにより、分散液中でマイクロカプセルが占める体積 V_c を算出した。これより、分散液のカプセル部分の体積分率(ボイド率)は、水とカプセルの占有体積の比から次式のように求めることができる。

$$\alpha = \frac{V_c}{V_{tot}} = 1 - \frac{m_{tot}}{\rho_w V_{tot}} \quad (1)$$

ここで、 $V_{tot}=50 \text{ ml}$ 、 $\rho_w=980 \text{ kg/m}^3$ とし、分散液の重さ $m_{tot}=27.8 \text{ g}$ を用いると、この分散液中のボイド率は0.43となる。本実験では、この体積分率を有する分散液を基準分散液と定め、基準分散液を純水で10~100倍に希釈することによって数濃度が異なる分散液を調製した。グリセリン水溶液の分散液を調製する場合には、基準分散液に15 gのグリセリンを加え、純水で体積を50 mlに調整し、質量濃度が30 wt. %のグリセリン水溶液による分散液を調製した。調製した分散液を、マイクロピペットを用いてマイクロチャンバー内に注入し、2次元的に分散したマイクロカプセル群の観察サンプルを得た。

2・2 超音波照射

図1(a)の示す実験装置を用いて、マイクロチャンバーに分散したマイクロカプセル群への超音波照射を行った。調製した分散液を導入した観察対象のチャンバーを、ポリプロピレン製のホルダーに挿入し、ホルダーとスライドの間に設けた19 mm×9 mm×1 mmの空間に、接触媒質として脱気した純水を注入した。模式図には、ホルダーと脱気水の断面を表示している。図2(a)の点線で示したチャンバー中央部に振動子中心を合わせ、ホルダー中心に設けた貫通穴から、直径6 mmの超音波振動子(PW-1.0-6MM, NEPA Gene)をチャンバーに対して垂直に挿入した。振動部の端面とスライド表面の距離が1 mmとなるように、スペーサを用いて振動子の軸方向位置の調節を行った。簡単のため、図には位置調節用のスペーサや固定に必要な治具等を省略している。

信号発生器(WF1973, NF)から出力した両振幅5.36 V、周波数1 MHzの正弦波パルスを、電力増幅器(HSA4101, NF)により20倍に増幅し、超音波振動子に入力した。この正弦波パルス数を決めるために、以下の実験を行った。周波数1 MHz、電圧両振幅40 Vの連続波を振動子に入力し、振動子端面の中心から軸方向に3 mm離れた点での

音圧を、同じニードル型ハイドロホン(HY05N, Toray Industries)を用いて測定した。超音波振動子の音圧波形を、水槽中で測定した場合の結果を図 1(b)に示す。この超音波振動子は減衰が小さく、定常な応答を示すまでに $100\ \mu\text{s}$ を要する。音場が定常状態になると、体積振動を行うカプセル間に働く引力（第 2 ビヤクネス力）によって、複数のカプセルの凝集が生じると同時に、凝集したカプセルは音響流によって解析範囲の外側に移動する。本実験では、カプセルの移動を最小限に抑えるため、照射する超音波のサイクル数を 100 とし、過渡的な音波照射に対するカプセル崩壊を観察した。

2・3 顕微鏡撮影と画像解析

チャンバー内に 2 次元的に分散させたマイクロカプセルの粒径分布と局所濃度分布を求めるため、光学顕微鏡を用いてチャンバー全体像の撮影を行い、画像処理ソフトウェアを用いてマイクロカプセル群の粒子解析を行った。分散液を注入したマイクロチャンバーを、XY 自動ステージ上に固定し、自動ステージを水平方向に $1.08\ \text{mm}$ ずつ断続的に移動させながら、格子状にチャンバーの全体像を撮影した。マイクロ스코プの露光時間を $8\ \mu\text{s}$ とし、ハロゲンランプ光源の透過照明を用いることにより、マイクロカプセルは図 2(a)に示すような影絵として撮影された。撮影した合計 162 枚の画像を、画像処理ソフトウェア ImageJ/FIJI(Schindelin et al., 2012)を用いて貼り合わせ、チャンバーの全体画像 ($8840 \times 4400\ \text{pixels}$) を得た。撮影された顕微鏡画像の空間解像度は $2.45\ \mu\text{m}/\text{px}$ である。

貼り合わせた全体画像の背景の陰影を、画像処理ソフトウェアを用いて除去した後、図 2(b)に示す二値化画像に変換した。前述の画像処理ソフトウェアの粒子解析機能を用いて、図 2(b)における粒子を検出した。ここで、図 3(b)のように、本実験で崩壊したマイクロカプセルの位置は、超音波振動子の直下に集中しており、振動子中心から半径 $3\ \text{mm}$ の円の内部を解析対象の領域 S と定義した。領域 S で影絵として検出された粒子の面積と、形状中心の位置座標を求めた。影絵の面積からマイクロカプセルの等価直径 d を求め、位置座標から次節で説明するボロノイ図を用いて局所濃度を算出した。撮影画像の空間解像度と同程度の粒子は除外するため、直径 $5\ \mu\text{m}$ に相当する $5\ \text{px}$ 以下の粒子を除外した。マイクロカプセルが凝集し、その輪郭が接触している場合には、watershed 変換による領域分割アルゴリズム(Sennoga et al., 2015)を用いて、接触した複数のカプセルを分離して検出した。また、検出した影絵の真円度が 0.7 以下の場合、この粒子も除外した。本研究で用いた異なる数濃度のカプセル分散液に対して、除外された粒子数の割合は、分散媒が純水の場合には平均 2.7% ($n=24$)、グリセリン水溶液の場合には平均 1.0% ($n=26$) であった。

Fig. 1 (a) Schematic illustration of the experimental setup for ultrasound irradiation. For clarity, the fixing jig is shown in cross section, and the other supporting parts used to fix the slide are omitted in the illustration. (b) Pressure wave form generated by the planar ultrasound transducer driven at $40\ \text{V}_{\text{p-p}}$ in a water container.

Fig. 2 (a) Recorded microscopic image and the results of image analysis; (b) binarization and (c) Voronoi diagram. The dashed circles represent the position of the ultrasound transducer. In (c), each Voronoi cell (polygonal shape) contains one microcapsule represented by a red point.

2・4 局所濃度の算出

マイクロカプセルの局所的な数濃度を求めるため、マイクロカプセルの位置座標から図 2(c)に示すボロノイ図を作成した。ボロノイ図は、空間に分散した粒子群中のある一つの粒子位置（母点）に対して、この粒子を内包する一つのボロノイ細胞を定義することによって構成される。ボロノイ細胞は母点を取り囲むように形成され、ある粒子に対応するボロノイ細胞内の点は、その粒子までの距離が他のどの粒子までの距離よりも小さくなる。2次元空間に定義されるボロノイ細胞は多角形となり、この面積をボロノイ面積という。ボロノイ面積は、一つの粒子がその平面内で占有する面積を表しており、ボロノイ面積の逆数は、ある粒子位置における局所的な数濃度とみなすことができる(Monchaux, 2012)。したがって、マイクロカプセルの座標位置を母点とするボロノイ図からボロノイ面積分布を求めることによって、この粒子群からなる離散的な濃度場を特徴づけることができる。本研究では、2次元平面内に定義したボロノイ面積 A [mm^2]の逆数を、2次元的に分散したマイクロカプセル群の局所濃度 C [mm^{-2}]と定義した。

3. 結果と考察

3・1 マイクロカプセルの崩壊挙動

図 3 を用いて、マイクロカプセルの崩壊挙動と、局所濃度および粒径分布の解析結果を説明する。図 3(a)は、マイクロチャンバー内に分散したマイクロカプセルの一部である。超音波照射によって、カプセルを覆っていたシェルが崩壊し、図 3(b)の拡大図に矢印で示すガス気泡を放出したと考えている。この例は、超音波照射から 40 分後の撮影結果である。本実験で用いた超音波パルスの強度（約 0.03 W/cm^2 ）は小さく、脱気水中に含まれる溶解ガスは音波照射によって析出しない。さらに、音圧 30 kPa の連続波を仮定すると、100 μs 間に照射領域 S (0.28 cm^2) に与えられる音響エネルギーはおよそ 1 μJ 程度であることから、音波照射による液体の温度上昇は無視できる。

露出したガス気泡は、気液界面における物質拡散によって図 4(a)のように成長した。露出した 25 個のガス気泡の内、崩壊直後の大きさが最大および最小のものを含む代表例の直径の時間変化を図 4(b)に示す。超音波の照射後、カプセルからガス気泡が脱離するまでに数分の時間を要することがあった。そのため、超音波の照射 1 分後の撮影画像では検出されなかったガス気泡は、照射 5 分後からの時間変化を示している。全ての実験において、超音波照射から 5 分経過後に新たなガス気泡は現れなかった。超音波照射後 30 分付近で、気泡直径がチャンバーの高さ 100 μm と同等になり、チャンバーの上下面に接触する。その後、チャンバーの面内方向に 2 次元的に成長するため、直径が 100 μm 付近で成長速度が増加している。

音波照射直後のガス気泡径は、崩壊前のカプセル径よりも大きくなる傾向が見られた。この理由は、本実験で用いたカプセルが、熱可塑性高分子で包み込んだ液体炭化水素の熱膨張により成形されており、平衡状態においてシェルに引張力が作用しているためと考えられる。したがって、平衡状態において、カプセル内部気体の圧力が静水圧よりも大きく、シェルの失って露出したガス気泡が、シェルから受けていた圧縮力が解放された分だけ元のカプセル径よりも大きくなる。図 4(b)に示すガス気泡の、超音波照射 1 分後の平均直径は $33.9 \mu\text{m}$ である。一方、粒子数濃度を約 1/6 に希釈した場合、崩壊するマイクロカプセルの直径が図 4(c)に示すように大きくなった。この場合、照射 1 分後における平均直径は $39.6 \mu\text{m}$ であった。以上より、平均直径 $30 \mu\text{m}$ 程度のマイクロカプセルが崩壊したと推測される。平均直径は分散媒が純水の場合も、図 4 の結果と同様の傾向を示した。

図 3 の破線で示した超音波の照射領域 S 内に含まれる粒子の総数を N 、上述のガス気泡の観察結果から計測したマイクロカプセルの崩壊数 n を用いて、次式の崩壊率を定義する。

$$\chi = \frac{n}{N} \quad (2)$$

図 3 の例では、 $N=1170$ 、 $n=25$ であったため、崩壊率は 0.021 となる。次節以降では、マイクロカプセル群の平均濃度 (3.2 節)、濃度を変化させた場合の崩壊率 (3.3 節) の算出結果を示し、3.4 節において崩壊率と平均濃度のべき乗則を導出する。

Fig. 3 Example of recorded microscopic images of microcapsules dispersed in glycerol aqueous solution (30 wt. %) before (left) and 40 minutes after (right) ultrasound irradiation. Enlarged views ($1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$) of the enclosed area denoted by squares in (a) and (b) are presented at the bottom row, where disrupted microcapsules (gas bubbles) are indicated by white arrows. The target area of ultrasound irradiation is shown by a dashed circle of 6 mm in diameter. The scale bar presents 1 mm.

Fig. 4 (a) Growth of a gas bubble decapsulated from a disrupted microcapsule shell in the 30 wt. % glycerol aqueous solution. The scale bar presents 100 μm . (b-c) Temporal evolution of the gas-bubble diameters after ultrasound irradiation for (b) moderate ($C_m=56 \text{ mm}^{-2}$) and (c) low ($C_m=9.5 \text{ mm}^{-2}$) geometric mean number concentration. The bubble diameter averaged over all samples is plotted and the error bar represents the standard deviation. The growth rates change when the bubbles contact to the chamber wall. The height of the microchamber is 100 μm .

3・2 平均濃度と平均粒径

図 5(a)に超音波照射前の局所濃度の度数分布を示す。図中の実線は、対数正規分布の近似曲線である。局所数濃度の度数分布は、近似曲線との比較から、左側に傾いた非対称となっており、最頻値 (29 mm^{-2}), 中央値 (55 mm^{-2}) および平均値 (76 mm^{-2}) が一致しないという特徴を有する。対数正規分布は、生体細胞のサイズ分布、物質の濃度が関係する分布(橋本他, 2015)などに多く見られ、その確率変数の対数値が正規分布に従う。対数正規分布に従う確率変数の算術平均は、分布の非対称性により実際の期待値よりも大きな値となるため、分布の特徴を表現する要約量に適さないことが知られている。このため、局所濃度の対数値が正規分布に従うと仮定し、 $\log C_i$ の算術平均 μ_C と標準偏差 σ_C を求め、この2つのパラメータを用いて局所濃度の平均濃度 C_m を定義した。

$$\mu_C = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \log C_i \quad (3a)$$

$$\sigma_C = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (\log C_i - \mu_C)^2} \quad (3b)$$

μ_C , σ_C は対数値 $\log C_i$ の算術平均および標準偏差であり、これらのパラメータを指数変換し、再び元のスケールに戻した $\exp(\mu_C)$, $\exp(\sigma_C)$ をそれぞれ幾何平均 (geometric mean), 幾何標準偏差 (geometric standard deviation) と呼ぶ。幾何平均は対数正規分布の中央値に一致し、 $\exp(\mu_C \pm \sigma_C)$ の範囲にサンプルサイズの 68% のデータが含まれる。本研究では、幾何平均をマイクロカプセル群の平均濃度 C_m と定義した。

$$C_m = \exp(\mu_C) \quad (4)$$

平均濃度 C_m は 2 次元マイクロチャンバーの単位面積に含まれるカプセル数の代表値を表している。チャンバーの高さが 0.1 mm であることから、 C_m を単位体積当たりの数濃度に換算すると、平均濃度 $C_m = 100 \text{ mm}^{-2}$ は 10^6 capsules/ml に相当する。

粒径分布も同様に、図 5(b) に示した度数分布の幾何平均 $\exp(\mu_d)$ を平均粒径 d_m と定義した。平均濃度 C_m を変化した場合の粒径分布を図 6 に示す。図中のプロット (黒○, 赤□) は、 C_m と同様に幾何平均によって定義された平均粒径 d_m , エラーバーはその幾何標準偏差である。平均濃度は純水の場合に $C_m = 8 \sim 184 \text{ mm}^{-2}$, グリセリン水溶液の場合に $C_m = 5 \sim 193 \text{ mm}^{-2}$ のように数十倍のオーダーで変化させた。平均粒径 d_m の算術平均値は、純水の場合に $d_m = 31 \pm 3 \text{ }\mu\text{m}$ ($n=24$), グリセリンの場合 $d_m = 30 \pm 2 \text{ }\mu\text{m}$ ($n=26$) となり、平均濃度を大きく変化させても平均粒径は約 $30 \text{ }\mu\text{m}$ にコントロールされている。

Fig. 5 Frequency distribution of (a) local number concentration and (b) capsule diameter of the sample distribution shown in Fig. 3(a) (before ultrasound irradiation). Red solid lines are lognormal fittings. The geometric mean concentration and the geometric mean diameter are $C_m = 55 \text{ mm}^{-2}$ and $d_m = 29 \text{ }\mu\text{m}$, respectively.

Fig. 6 Diameter distribution of two-dimensionally dispersed microcapsules in water and glycerol aqueous solution (30 wt. %) as a function of the mean concentration. Circle and square plots are the geometric mean diameter. The error bars present geometric standard deviations.

3・3 崩壊率

前節で求めた平均濃度に対して、式(2)で定義した崩壊率は図 7(a)のように変化した。崩壊率は低濃度のときに最大となり、濃度上昇とともに単調に低下した。この傾向は、分散媒が純水・グリセリン水溶液のどちらの場合にも共通して認められた。ここで、照射領域 S に含まれるマイクロカプセルの総数 N は、図 7(b)に示すように、平均濃度に対して線形的に増加している。したがって、マイクロカプセルの崩壊率は、濃度増加に対して加速的に低下したと結論づけられる。この理由は、崩壊したカプセル数 $n=\chi N$ が、濃度に比例して増加せず、同程度になったためである。実際に、図 7(c-e)に示した 3 つの平均濃度に対して、観測されたガス気泡の数濃度が同程度になっている。分散媒がグリセリン水溶液の場合、液体粘性の増加によりカプセルの高次振動モードの減衰が増大するため(Hilgenfeldt et al., 1996)、シェルのせん断変形を伴う振動が抑制される。このため、シェルに生じる亀裂などの進展速度が減少し、純水の場合よりも崩壊率が低下していると推察される。平均濃度が中程度 (25~100 mm^{-2}) の場合には、崩壊率が極端に小さくなることもあり、純水と比較して崩壊率のばらつきが大きくなった。この理由は、シェルの損傷の程度が小さ過ぎる場合には、ガス気泡を外部に放出しないカプセルの割合が増加するためと考えている。

Fig. 7 (a) Disruption rate defined as a ratio of the number of disrupted capsules (gas bubbles), n , and the total number of capsules, N . (b) Total number of capsules in the target area (6 mm in diameter) of ultrasound irradiation. The solid and dashed lines are linear approximation of the measurements for water and glycerol aqueous solution, respectively. (c-e) Comparison of the number of disrupted microcapsules for different mean concentrations. The decapsulated capsules (gas bubbles) are indicated by blue circles. The scale bar in (c) represents 1 mm.

3・4 平均濃度と崩壊率のべき乗則

前節では、濃度増加に伴って崩壊率が指数的に低下することを示した。本節では、崩壊率と平均濃度の間にべき乗則を仮定し、崩壊率の低下指数を定量的に考察する。音響放射圧による気泡間の相互作用は、気泡の代表径と気泡間距離の比によって変化するため(Zeravcic et al., 2011; Sugita and Sugiura, 2017), 平均粒径 d_m によって規格化した平均濃度を次式のように定義する。

$$C^* = \pi \left(\frac{d_m}{2} \right)^2 C_m \quad (5)$$

C^* はカプセル自身の大きさとカプセルの占有面積との比を表し、その定義から1以下の値をとる無次元の数濃度である。崩壊率が無次元濃度の β_1 乗に比例するとき、二つの変数の対数値の間に次式の関係が成り立つ。

$$\log \chi = \beta_0 + \beta_1 \log C^* \quad (6)$$

ここで、 β_0 は $C^* \rightarrow 0$ の極限における崩壊率を意味する比例係数、 β_1 は濃度増加に対する崩壊率の変化を表す低下指数である。図7(a)に示したデータ点列の対数値に対して、最小二乗法による線形近似を行い、パラメータ β_0 および β_1 を推定した。推定結果とその適合度を表す決定係数を表1に示す。両分散媒に対する決定係数は、それぞれ0.81(純水) および0.62(グリセリン)であり、図8に示した近似直線と実験結果との比較からも、無次元濃度と崩壊率の間にべき乗則が認められる。さらに、低下指数 β_1 は両分散媒ともに約-1.1であったことから、液体粘性に依らず平均濃度に反比例する崩壊率の低下傾向が示された。

同定したべき乗則に基づいて、崩壊数 n の濃度依存性を考察するため、図7(b)に示した平均濃度とカプセル総数の線形関係から次式の関係を仮定する。

$$N = SC_m \quad (7)$$

S は平均濃度 C_m で分散しているマイクロカプセル群が分布する実効的な面積であり、図7(b)に示した近似直線の傾きに相当する。式(7)および崩壊率の定義式である式(2)を、式(6)に代入することにより、崩壊数 n は無次元濃度の関数として次式で与えられる。

$$n = n_0 C^{*\beta_1+1} \quad (8)$$

ここで、 n_0 は群集を形成していない孤立したマイクロカプセルの崩壊率を表す量であり、次式で与えられる。

$$n_0 = \frac{4S \exp(\beta_0)}{\pi d_m^2} \quad (9)$$

β_0 は崩壊の閾値に関係する係数であり、シェル材の機械特性、超音波パラメータ(周波数、音圧、パルス幅)に加え、マイクロカプセル周囲の音響的な境界条件に依存して変化する。表1の推定値より、本実験で用いた超音波の照射条件では、30 wt. %質量濃度のグリセリン水溶液中における崩壊数が、純水中の場合の約0.32倍に低下したと見積もられる。分散液の粘性は崩壊率の低下傾向に影響せず、崩壊するカプセル数 n_0 のみを低下させたとと言える。すなわち、低下指数 β_1 は、音響放射を介したカプセル間の相互作用によって決まり、分散媒の液体粘性に依らない。低下指数が分散媒によらず $\beta_1 \approx -1$ であったことから、本研究の実験環境において期待される崩壊数は次式で与えられる。

$$n \approx n_0 \quad (10)$$

すなわち、式(10)は崩壊数が平均濃度に依らず一定値になることを意味しており、この傾向は、図7(c-e)に示した結果と符合している。

Table 1 The fitting parameters and the determination factor of the power law relationship between χ and C^* .

Dispersion medium	β_0	β_1	R^2
Water	-7.42	-1.14	0.81
Glycerol solution	-8.55	-1.13	0.62

Fig. 8 Disruption rate as a function of the normalized mean concentration. Solid and dashed lines are linear approximation of the experimental results for water (circle) and glycerol dispersion (filled square), respectively.

3・5 考察

以上の結果を整理すると、次のようになる。崩壊率を維持し、崩壊せずに生き延びるカプセル数を減少させるためには、平均濃度を低く保つ必要がある。一方、崩壊数を大きくして、マイクロカプセルからの薬剤放出量を増加させるためには、孤立した単独のマイクロカプセルが示す崩壊確率を向上させるしかなく、マイクロカプセルの濃度増加は放出量の増加に寄与しない。しかし、単に超音波音圧を増大させる、照射する超音波のパルス数を増やすといった方法では、カプセル間に働く相互作用力によってマイクロカプセルが短時間でより高密度な凝集体を形成し(Kotopoulis and Postema, 2010)、局所濃度が上昇するため、崩壊率が低下し放出量が改善されない可能性がある。したがって、高い崩壊率の下で、放出される薬剤の総量を増加させるためには、マイクロカプセルの数濃度を低くコントロールしながら、超音波パルスを繰り返し照射しなければならない。この場合、濃度コントロールに必要な音波音圧とその周波数に加えて(梶田他, 2008)、崩壊率の低下を最小限に抑えるための超音波パルス数とその繰り返し周波数の探索が必要となる。

本実験の超音波パラメータの範囲では、照射音圧が崩壊率に与える影響は、分散液が純水の場合には小さく、グリセリン溶液の場合には、純水と比較して大きくなると推測される。本実験において純水を用いた場合、崩壊によって露出したガス気泡は、照射領域全体に分布する傾向があり、照射位置を変化させて再度照射を行っても、新たに崩壊するカプセル数は非常に少ない。この理由は、純水中では周波数特性の共振点における鋭さを表す Q 値が比較的大きく、共振状態にある一部のカプセルのみが小さい音圧で破壊されるためと考えられる(Koyama et al., 2006)。一方、高粘性流体中では、共振の Q 値が小さく応答周波数幅が大きくなるため、音圧の変化によって崩壊するカプセル数が変化し易くなる。実際に、グリセリン水溶液において照射音波の音圧がより小さい場合、ある数濃度以上の高濃度領域でカプセルが崩壊しない場合がある。しかしながら、本実験では照射平面状の音圧分布が不明であり、図 8 に示す崩壊率は領域 S 内の平均的な値であることに注意する必要がある。

本研究は、2次元的に分布した静止状態のマイクロカプセル群を対象としており、流動場における3次元的な分布状態を考慮していない。同じ濃度の分散液が3次元的に広がる場合には、隣り合うカプセルの数が奥行き方向に増加する分、2次元分布よりも崩壊率の低下が増長すると予想される。さらに、共振径が広く分布する多分散のカプセル群に対して、照射する超音波の周波数を固定したため、崩壊率の周波数特性を考慮できていない。実環境において崩壊率をさらに向上させるため、数濃度のコントロールに加えて、粒径分布のコントロール(Segers and Versluis, 2014)によって、崩壊に関与しないカプセル径を粒径分布から除外することを検討する必要がある。

以下に、本実験に残された課題を示す。本実験の音波照射では、ガス気泡の非定常キャビテーションは発生せず、カプセルの体積振動は小さい。すなわち、崩壊率の数濃度依存性は、線形振動を行うカプセルが発する音響放射を介した、長距離の干渉効果(Zeravcic et al., 2011)に由来すると言える。これに対して、本実験では音波照射前後の静的な状態(図3)を観察しているため、カプセル間の相互作用による局所的なシェル変形の有無(Miyabe et al., 2008)、これに伴う崩壊の連鎖反応といった近距離の干渉効果は明らかではない。よって、音波照射中のカプセルの移動量、体積振動の振幅、非球形振動モードの有無(Koyama et al., 2003)の定量的な可視化を行うことによって、近接したカプセル間の相互干渉が崩壊率に与える影響を検討する必要がある。今後、音波照射中の高速観察からカプセル崩壊挙動の時間発展を取得し、カプセル群の動的かつ大域的な崩壊のメカニズムを解明することが、流動場における放出制御の実現にとって不可欠となる。

4. 結 言

マイクロカプセル群の崩壊率を定量的に評価することを目的とし、超音波照射後に崩壊したマイクロカプセルを可視化するための実験方法を示し、画像解析を用いてマイクロカプセル群の崩壊率を定量的に算出した。本研究では、パルス超音波の照射によって、マイクロカプセルを覆うシェルが損傷・脱離し、内包されていたガス気泡が露出することをマイクロカプセルの崩壊と定義した。算出した崩壊率と平均濃度との間にべき乗則を導出し、数濃度の増加に伴う崩壊率の低下傾向を示した。平面状チャンバー内に2次元的に分散させたマイクロカプセル群の場合、崩壊率は分散媒の液体粘性に依らず、数濃度のおよそ1乗に比例して低下する。この場合、崩壊するカプセル数は数濃度に依らず同程度となる。したがって、体内に導入するマイクロカプセルの数濃度増加は、薬剤放出量の増大に寄与せず、崩壊率の維持を阻害することが示唆される。実環境において崩壊率を向上させるためには、3次元流れ場においてマイクロカプセルの数濃度をリアルタイムで定量評価し、その値を低く保つ濃度制御が必要である。したがって、高い崩壊率の下で、薬剤の放出量を増加させるためには、振動振幅が小さいために崩壊に関与しないカプセル径の除去が不可欠と言える。

謝 辞

本研究は、JSPS 科研費 19K23484 の助成を受けたものである。

文 献

- Arora, M., Ohl, C. D. and Lohse, D., Effect of nuclei concentration on cavitation cluster dynamics, The Journal of the Acoustical Society of America, Vol.121, No.6 (2007), pp.3432–3436.
- Borden, M. A., Kruse, D. E., Caskey, C. F., Zhao, S., Dayton, P. A. and Ferrara, K. W., Influence of lipid shell physicochemical properties on ultrasound-induced microbubble destruction, IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control, Vol.52, No.11 (2005), pp.1992–2002.
- Bouakaz, A., Versluis, M. and de Jong, N., High-speed optical observations of contrast agent destruction, Ultrasound in medicine & biology, Vol.31, No.3 (2005), pp.391–399.
- Bremond, N., Arora, M., Ohl, C.D. and Lohse, D., Controlled multibubble surface cavitation, Physical review letters, Vol.96, No.22 (2006), 224501.
- Brennen, C. E., Cavitation and bubble dynamics (2014), pp.30–33, Cambridge University Press.
- Chang, P. P., Chen, W. S., Mourad, P. D., Poliachik, S. L. and Crum, L. A., Thresholds for inertial cavitation in albumin suspensions under pulsed ultrasound conditions, IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control,

Vol.48, No.1 (2001), pp.161–170.

- Chatterjee, D., Jain, P. and Sarkar, K., Ultrasound-mediated destruction of contrast microbubbles used for medical imaging and drug delivery, *Physics of Fluids*, Vol.17, No.10 (2005), 100603.
- Chowdhury, S. M., Lee, T. and Willmann, J. K., Ultrasound-guided drug delivery in cancer, *Ultrasonography*, Vol.36, No.3 (2017), pp.171–184.
- Faez, T., Emmer, M., Kooiman, K., Versluis, M., van der Steen, A. F. and de Jong, N., 20 years of ultrasound contrast agent modeling, *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, Vol.60, No.1 (2012), pp.7–20.
- 橋本敏夫, 山田雅之, 笠井英史, 第I相試験の薬物動態解析における統計的側面—薬物動態データの分布と要約統計量—, *計量生物学*, Vol.36(Special_Issue) (2015), pp.S19–S31.
- Helfield, B. L., Chen, X., Qin, B., Watkins, S. C. and Villanueva, F. S., Mechanistic insight into sonoporation with ultrasound-stimulated polymer microbubbles, *Ultrasound in medicine & biology*, Vol.43, No.11 (2017), pp.2678–2689.
- Hilgenfeldt, S., Lohse, D. and Brenner, M. P., Phase diagrams for sonoluminescing bubbles, *Physics of fluids*, Vol.8, No.11 (1996), pp.2808–2826.
- Ibsen, S., Schutt, C. E. and Esener, S., Microbubble-mediated ultrasound therapy: a review of its potential in cancer treatment, *Drug design, development and therapy*, Vol.7, (2013), pp.375–388.
- Juang, E. K., De Cock, I., Keravnou, C., Gallagher, M. K., Keller, S. B., Zheng, Y. and Averkiou, M., Engineered 3D microvascular networks for the study of ultrasound-microbubble-mediated drug delivery, *Langmuir*, Vol.35, No.31 (2018), pp.10128–10138.
- 江田廉, 渡會展之, 重原伸彦, 伊藤拓未, 南出歩, 榊田晃司, 千葉敏雄, 超音波照射による微小気泡の凝集現象解析と赤血球の影響, *生体医工学*, Vol.50, No.1 (2012), pp.138–148.
- Kotopoulos, S. and Postema, M., Microfoam formation in a capillary, *Ultrasonics*, Vol.50, No.2 (2010), pp.260–268.
- Koyama, D., Barbier, N. and Watanabe, Y., Shell effects on vibration behavior of a microcapsule in an acoustic field, *Japanese journal of applied physics*, Vol.42, No.10 (2003), pp.6700–6704.
- Koyama, D., Osaki, A., Kiyan, W. and Watanabe, Y., Acoustic destruction of a microcapsule having a hard plastic shell, *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, Vol.53, No.7 (2006), pp.1314–1321.
- Lentacker, I., De Geest, B. G., Vandenbroucke, R. E., Peeters, L., Demeester, J., De Smedt, S. C. and Sanders, N. N., Ultrasound-responsive polymer-coated microbubbles that bind and protect DNA, *Langmuir*, Vol.22, No.17 (2006), pp.7273–7278.
- 榊田晃司, 村松悠佑, 溝部一行, 石原謙, 超音波定在波の印加による流路中のマイクロカプセルの局所的濃度制御とその観測, *生体医工学*, Vol.46, No.2 (2008), pp.275–282.
- Miyabe, J., Yoshida, K., Koyama, D. and Watanabe, Y., Destruction of the gas-filled capsule using effects of the collapsing bubble near the capsule, *Journal of the Acoustical Society of America*, Vol.123, No.5 (2008), pp.8270–8273.
- Monchaux, R., Measuring concentration with Voronoï diagrams: the study of possible biases, *New Journal of Physics*, Vol.14, No.9 (2012), 095013.
- Skachkov, I., Luan, Y., van der Steen, A. F., de Jong, N. and Kooiman, K., Targeted microbubble mediated sonoporation of endothelial cells in vivo, *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, Vol.61, No.10 (2014), pp.1661–1667.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T. and Tinevez, J. Y., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nature methods*, Vol.9, No.7 (2012), pp.676–682.
- Segers, T. and Versluis, M., Acoustic bubble sorting for ultrasound contrast agent enrichment, *Lab on a Chip*, Vol.14, No.10 (2014), pp.1705–1714.
- Segur, J. B. and Oberstar, H. E., Viscosity of glycerol and its aqueous solutions, *Industrial & Engineering Chemistry*, Vol.43, No.9 (1951), pp.2117–2120.
- Sennoga, C. A., Kanbar, E. and Bouakaz, A., An ImageJ plugin for the sizing and counting of microbubbles, 2015 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS) (2015), pp.1–4.
- Sugita, N. and Sugiura, T., Nonlinear normal modes and localization in two bubble oscillators, *Ultrasonics*, Vol.74 (2017), pp.174–185.
- Vos, H. J., Guidi, F., Boni, E. and Tortoli, P., Method for microbubble characterization using primary radiation force, *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, Vol.54, No.7 (2007), pp.1333–1345.
- Wischhusen, J. and Padilla, F., Ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD) for localized drug delivery into tumor tissue, *IRBM*, Vol.40, No.1 (2019), pp.10–15.

- Yamakoshi, Y. and Koganezawa, M., Bubble manipulation by self organization of bubbles inside ultrasonic wave, Japanese journal of applied physics, Vol.44, No.6S (2005), pp.4583–4587.
- Zeravcic, Z., Lohse, D. and Van Saarloos, W., Collective oscillations in bubble clouds, Journal of fluid mechanics, Vol.680 (2011), pp.114–149.

References

- Arora, M., Ohl, C. D. and Lohse, D., Effect of nuclei concentration on cavitation cluster dynamics, The Journal of the Acoustical Society of America, Vol.121, No.6 (2007), pp.3432–3436.
- Borden, M. A., Kruse, D. E., Caskey, C. F., Zhao, S., Dayton, P. A. and Ferrara, K. W., Influence of lipid shell physicochemical properties on ultrasound-induced microbubble destruction, IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control, Vol.52, No.11 (2005), pp.1992–2002.
- Bouakaz, A., Versluis, M. and de Jong, N., High-speed optical observations of contrast agent destruction, Ultrasound in medicine & biology, Vol.31, No.3 (2005), pp.391–399.
- Bremond, N., Arora, M., Ohl, C.D. and Lohse, D., Controlled multibubble surface cavitation, Physical review letters, Vol.96, No.22 (2006), 224501.
- Brennen, C. E., Cavitation and bubble dynamics (2014), pp.30–33, Cambridge University Press.
- Chang, P. P., Chen, W. S., Mourad, P. D., Poliachik, S. L. and Crum, L. A., Thresholds for inertial cavitation in albumex suspensions under pulsed ultrasound conditions, IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control, Vol.48, No.1 (2001), pp.161–170.
- Chatterjee, D., Jain, P. and Sarkar, K., Ultrasound-mediated destruction of contrast microbubbles used for medical imaging and drug delivery, Physics of Fluids, Vol.17, No.10 (2005), 100603.
- Chowdhury, S. M., Lee, T. and Willmann, J. K., Ultrasound-guided drug delivery in cancer, Ultrasonography, Vol.36, No.3 (2017), pp.171–184.
- Faez, T., Emmer, M., Kooiman, K., Versluis, M., van der Steen, A. F. and de Jong, N., 20 years of ultrasound contrast agent modeling, IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control, Vol.60, No.1 (2012), pp.7–20.
- Hashimoto, T., Yamada, M. and Kasai, H., Statistical aspects in the pharmacokinetic analysis of clinical phase 1 trial—the distribution and summary statistics of pharmacokinetic data—, Japanese Journal of Biometrics, Vol.36(Special_Issue) (2015), pp.S19–S31 (in Japanese).
- Helfield, B. L., Chen, X., Qin, B., Watkins, S. C. and Villanueva, F. S., Mechanistic insight into sonoporation with ultrasound-stimulated polymer microbubbles, Ultrasound in medicine & biology, Vol.43, No.11 (2017), pp.2678–2689.
- Hilgenfeldt, S., Lohse, D. and Brenner, M. P., Phase diagrams for sonoluminescing bubbles, Physics of fluids, Vol.8, No.11 (1996), pp.2808–2826.
- Ibsen, S., Schutt, C. E. and Esener, S., Microbubble-mediated ultrasound therapy: a review of its potential in cancer treatment, Drug design, development and therapy, Vol.7, (2013), pp.375–388.
- Juang, E. K., De Cock, I., Keravnou, C., Gallagher, M. K., Keller, S. B., Zheng, Y. and Averkiou, M., Engineered 3D microvascular networks for the study of ultrasound-microbubble-mediated drug delivery, Langmuir, Vol.35, No.31 (2018), pp.10128–10138.
- Koda, R., Watarai, N., Shigehara, N., Ito T., Minamide, A., Masuda, K., Kakimoto, T., Enosawa, S., Miyamoto Y. and Chiba, T., Study of aggregate formation of microbubbles under ultrasound exposure and effect with red blood cells, Transactions of Japanese Society for Medical and Biological Engineering, Vol.50, No.1 (2012), pp.138–148 (in Japanese).
- Kotopoulos, S. and Postema, M., Microfoam formation in a capillary, Ultrasonics, Vol.50, No.2 (2010), pp.260–268.
- Koyama, D., Barbier, N. and Watanabe, Y., Shell effects on vibration behavior of a microcapsule in an acoustic field, Japanese journal of applied physics, Vol.42, No.10 (2003), pp.6700–6704.
- Koyama, D., Osaki, A., Kiyan, W. and Watanabe, Y., Acoustic destruction of a microcapsule having a hard plastic shell, IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control, Vol.53, No.7 (2006), pp.1314–1321.
- Lentacker, I., De Geest, B. G., Vandenbroucke, R. E., Peeters, L., Demeester, J., De Smedt, S. C. and Sanders, N. N., Ultrasound-responsive polymer-coated microbubbles that bind and protect DNA, Langmuir, Vol.22, No.17 (2006), pp.7273–7278.
- Masuda, K., Muramatsu, Y., Mizobe, I. and Ishihara, K., Control method of local density in fluid microcapsules by acoustic

- standing wave and its monitoring, Transactions of Japanese Society for Medical and Biological Engineering, Vol.46, No.2 (2008), pp.275–282 (in Japanese).
- Miyabe, J., Yoshida, K., Koyama, D. and Watanabe, Y., Destruction of the gas-filled capsule using effects of the collapsing bubble near the capsule, Journal of the Acoustical Society of America, Vol.123, No.5 (2008), pp.8270–8273.
- Monchaux, R., Measuring concentration with Voronoï diagrams: the study of possible biases, New Journal of Physics, Vol.14, No.9 (2012), 095013.
- Skachkov, I., Luan, Y., van der Steen, A. F., de Jong, N. and Kooiman, K., Targeted microbubble mediated sonoporation of endothelial cells in vivo, IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control, Vol.61, No.10 (2014), pp.1661–1667.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T. and Tinevez, J. Y., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, Nature methods, Vol.9, No.7 (2012), pp.676–682.
- Segers, T. and Versluis, M., Acoustic bubble sorting for ultrasound contrast agent enrichment, Lab on a Chip, Vol.14, No.10 (2014), pp.1705–1714.
- Segur, J. B. and Oberstar, H. E., Viscosity of glycerol and its aqueous solutions, Industrial & Engineering Chemistry, Vol.43, No.9 (1951), pp.2117–2120.
- Sennoga, C. A., Kanbar, E. and Bouakaz, A., An ImageJ plugin for the sizing and counting of microbubbles, 2015 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS) (2015), pp.1–4.
- Sugita, N. and Sugiura, T., Nonlinear normal modes and localization in two bubble oscillators, Ultrasonics, Vol.74 (2017), pp.174–185.
- Vos, H. J., Guidi, F., Boni, E. and Tortoli, P., Method for microbubble characterization using primary radiation force, IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control, Vol.54, No.7 (2007), pp.1333–1345.
- Wischhusen, J. and Padilla, F., Ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD) for localized drug delivery into tumor tissue, IRBM, Vol.40, No.1 (2019), pp.10–15.
- Yamakoshi, Y. and Koganezawa, M., Bubble manipulation by self organization of bubbles inside ultrasonic wave, Japanese journal of applied physics, Vol.44, No.6S (2005), pp.4583–4587.
- Zeravcic, Z., Lohse, D. and Van Saarloos, W., Collective oscillations in bubble clouds, Journal of fluid mechanics, Vol.680 (2011), pp.114–149.