

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-287686

(P2005-287686A)

(43) 公開日 平成17年10月20日(2005. 10. 20)

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 M 37/00

A 6 1 B 18/00

// C 1 2 M 1/00

F I

A 6 1 M 37/00

A 6 1 B 17/36 3 3 O

C 1 2 M 1/00 A

テーマコード (参考)

4 B O 2 9

4 C O 6 O

4 C 1 6 7

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2004-105221 (P2004-105221)

(22) 出願日 平成16年3月31日 (2004. 3. 31)

(71) 出願人 504130245

有限会社ソノポール

福岡県福岡市中央区草香江 1 丁目 6 の 1 8

(74) 代理人 100082164

弁理士 小堀 益

(74) 代理人 100105577

弁理士 堤 隆人

(72) 発明者 立花 俊郎

福岡県福岡市中央区草香江 1 丁目 6 の 1 8

有限会社ソノポール内

(72) 発明者 立花 克郎

福岡県福岡市中央区草香江 2 丁目 1 の 1 1

F ターム (参考) 4B029 AA23 BB11 BB12

4C060 FF25 JJ30 MM24

4C167 AA80 BB26 BB31 BB45 CC04

CC08 CC29

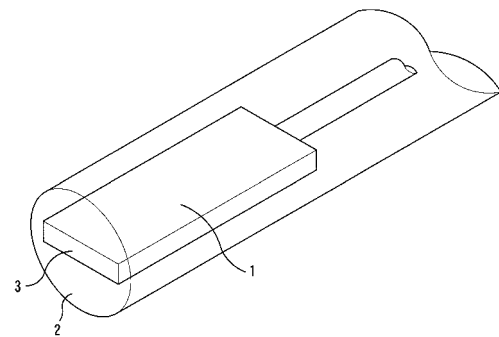
(54) 【発明の名称】 音波微細穴開け装置

(57) 【要約】

【課題】大掛かりな装置を使わずして個体の表面に微細な穴を開けることができるとともに、穴の周囲すぐ近くにおける破壊作用を抑制することができる音波微細穴開け装置を提供する。

【解決手段】音波エネルギーで水中の膜または固体表面に微細な穴を開ける音波微細穴開け装置であって、音波発振駆動信号の波形のプラスマイナス電圧差が非対称で鋭角なピーク波形であり、音波発振部の表面に厚さ10ミクロン以上の厚さの電気絶縁性、音波透過性のある被膜又は保護剤を有する。

【選択図】 図 2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

音波エネルギーで水中の膜または固体表面に微細な穴を開ける音波微細穴開け装置において、音波発振駆動信号の波形のプラスマイナス電圧差が非対称で鋭角なピーク波形であることを特徴とする音波微細穴開け装置。

【請求項 2】

音波発振部の表面に厚さ 10 ミクロン以上の厚さの電気絶縁性、音波透過性のある被膜又は保護剤を有することを特徴とする請求項 1 記載の音波微細穴開け装置。

【請求項 3】

音波発振部に温度センサーおよび電気インピーダンスセンサーを有することを特徴とする請求項 1 記載の音波微細穴開け装置。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、音波エネルギーにより、水中の膜および個体の表面に微細な穴を開ける音波微細穴開け装置に関する。

【背景技術】

【0002】

水中の膜および個体の表面にミクロ単位、ナノ単位の直径の微細な穴を多数開ける従来技術として、レーザー法、エレクトロポレーション法やマイクロニードル法などの技術が挙げられる。 20

【0003】

音波エネルギーおよび超音波エネルギーは工業用途として洗浄や破碎に利用されてきた。また、超音波エネルギーは、医療分野では心疾患、腹部疾患、頭頸部疾患などの診断に広く用いられてきた。一方、強力音波（衝撃波）で体内の胆石、腎結石の破碎や音波エネルギーを熱エネルギーに変換して癌を局所的に焼いてしまう、治療目的にも使われている。超音波エネルギーを薬物の組織内浸透の助けに応用する研究も進められている。（特許文献 1、2 参照）。

【特許文献 1】米国特許 6,676,963 号明細書

【特許文献 2】米国特許 6,528,039 号明細書 30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

水中で薄い膜や個体の表面に微細な穴（1ミリメートルから 10 ナノメートル直径）を多数（1ミリ平方当たり1個から 100 万個）作るのは困難である。レーザーは水中で吸収され、散乱されるため、微細な穴を作るには不向きである。また、マイクロニードルやエレクトロポレーション法で安定的に、しかも効率良く微細な穴を多数開けることは困難である。音波エネルギーの破壊作用と非破壊作用の中間的な現象を利用する穴開け技術もある。超音波エネルギーで水中に微細な気泡（0.1 ミリから 0.1 ミクロン直径）を作り、また音波でそれを破裂させ、瞬時に発生したジェット流を用いて膜や個体の表面に穴を開ける試みはなされている。しかし、気泡の発生と破壊をうまくコントロールすることは極めて困難とされている。その大きな理由は、対象の音場が非常に複雑で非線形な性質を持つため、単一の周波数、音圧、波形を発生させる汎用の音波発振素子および駆動電源では不可能に近いからである。また、適切な音場を作るには専門的知識と高度な技術が必要で、限定した状態に限られ、使われる用途が極めて少ない。しかしながら、音響学の専門でない研究者や技術者においても、様々な状況で微細な穴を開ける必要性に直面することが多く、大掛かりな装置を使わずして水中の膜や個体の表面に微細な穴を開けることができれば、広く一般的な用途にこの現象を応用することができる。 40

【0005】

また、穴を開けたい目標物に音波発信振動部分を接近または直接接触させると、機械破 50

壊的作用が増強され、微細な穴を開ける前に対象目的物を破壊してしまうことが多い。このことが穴を開けるための安定した音場や最適な条件を作る上で大きな障害となる。振動する部分の表面すぐ近く（２ミリ周囲）で破壊作用を抑制かつ微細な穴を開ける装置は現在存在しない。

【０００６】

そこで、本発明は、大掛かりな装置を使わずして個体の表面に微細な穴を開けることができるとともに、穴の周囲すぐ近くにおける破壊作用を抑制することができる音波微細穴開け装置を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本発明の音波微細穴開け装置は音波発振部分と駆動電源部分に分けられ、それぞれがある条件に最適化されることで初めて微細な穴を正確かつ安定して開けることができる。音波の発振部位の大きさ、数、形をあらかじめ設定・作成し、目的に合わせて選択する。

【０００８】

また、電気エネルギーを供給する駆動電源装置の信号発信の周波数、振幅、波形、パルス切り替えはあらかじめプログラム設定する。一方、音波発振部位に設置されているセンサーから電氣的インピーダンス、温度、共振情報などを装置の本体のＣＰＵにフィードバックすることによって、発振駆動信号を再度調整し、もっとも安定して穴が開くような状態に制御する。調整制御する電気信号の電氣的要素としては、周波数（１Ｈｚから２０ＭＨｚ）、電圧（０．１Ｖから２００Ｖ）、波形、バースト波時間、バースト波繰り返し頻度（０．０１Ｈｚから１００Ｈｚ）、位相（０から３６０度）、デューティ比（０から１００％）、パルス波オン・オフ頻度（０．０１Ｈｚから１００Ｈｚ）などが上げられる。最低１ｍＷから最高４００Ｗまでの電気出力が必要である。

【０００９】

発信信号波形として従来多く使われた矩形波、正弦波、のこぎり波などの単純な波形とは異なる、図１（ａ）に示すように、非対称的な波形を使うことにより従来よりも効率的に穴を開けられる。各信号波形のプラスマイナス電圧差が非対称でより鋭角なピーク波形である必要がある。

【００１０】

一方、音波発振のバースト波やパルス波におけるオン・オフの切り替えを厳密化することで安定した穴開け効果が得られる。一般に駆動電気信号をゼロ電圧にすることで音波の発振を一時的に停止させられることが可能であるが、振動の停止直後の発振素子の固有振動や周囲の音場の残音を完全に排除させるために、駆動信号の終了直後に１８０度の逆位相の電圧をかけることで、積極的に無音状態を作ることができる。このような厳密な無音状態を頻繁に作ることで効率的かつ安定的に微細な穴を開ける状態を生みだせる。同様な現象は図１（ｂ）に示す、ランダム変化する周波数の信号で音波を発生するときやいわゆるホワイトノイズで音波発振部を駆動したときに出現する。音波発振部分の大きさ、形、材質によって共振周波数は異なるが、ランダムな周波数をブロック毎に駆動する場合、共振周波数とちょうど合致した時に音波エネルギーが発生するが、その次の瞬間に全く共振周波数と異なる信号で駆動されるため、振動が急速に停止し、無音状態が発生する。これを繰り返すことにより、音波エネルギーが有効に利用できる。ランダムやホワイトノイズの周波数変化は、中心周波数のプラスマイナス１０％以内のとどめ、その範囲内で乱数表に従い発生させるようにする。その変化速度は１Ｈｚから３００Ｈｚとする。本発明はこの原理を駆動電源部分のプログラム回路に組み込み、効率的に音波エネルギーを発振される、基本的な技術を大きな特徴とする。

【００１１】

また、図２において、音波発振素子１を保護することに関しては、電氣的に絶縁性があり、且つ、音波の伝達が良好なポリエチレン、ナイロン、ウレタン、シリコン等の保護膜２でＰＺＴ振動子などの振動部３の周囲を覆うことで、無用な破壊作用をさけ、効率的に目的の物に微細な穴を開けることができる。保護膜の厚さは１０ミクロンから１センチ程

10

20

30

40

50

度で音波振動素子の形に必ずしも捕われる必要はない。

【 0 0 1 2 】

また、図 3 に示すように、音波素子駆動電極 1 a に接続された音波発振素子 1 の周囲に、電氣的に絶縁性があり、なおかつ音波を良好に透過する流動体 4 として超純水蒸留水、ハイドロゲル、流動パラフィン、油、脂質などを音波発振素子 1 とともにポリエチレン、ナイロン、ウレタン、シリコン等の薄い被膜 5 に封入することで同様の効果が得られる。被膜 5 の厚さは 10 ミクロンから 1 センチ程度でよい。この場合、振動面と被膜との間隔の距離は、振動面の振幅の長さと同じ、またはより長い必要がある。また、被膜に封入された流動体の中に気泡などが発生しないように粘性の調整が必要である。音波振動素子が平面であるときはその中心部分がもっとも振動振幅が大きいいため、その部分の振動面により厚く個体または流動体で被覆する必要がある。なお、6 は流動体 4 の抵抗を測定するインピーダンス電極、7 は温度センサーである。

10

【発明の効果】

【 0 0 1 3 】

本発明装置により、大掛かりな装置を使わずして個体の表面に微細な穴を開けることができるとともに、穴の周囲の破壊作用を抑制することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 4 】

医療分野や生物研究分野の研究において遺伝子、薬物、化学物質など様々なものを細胞・組織内へ注入させる試みがなされている。そのためには、細胞・組織の表面に微細な穴を開ける必要がある。

20

【 0 0 1 5 】

図 4 に示すように、癌細胞培養株が多数含まれる細胞培養容器 8 に本発明装置の音波発振素子 1 を保護膜 2 を介して挿入し、癌細胞に注入したい物質を添加するとともに駆動電源を作動させると、音波エネルギーが癌細胞に照射され、微細な穴が多数作られる。この穴から遺伝子、薬物、化学物質が癌細胞内へ流れ込む。ほとんどの生体の細胞は水溶液に近い環境でしか存在しないため、本発明を水中で実施することに意義がある。従来の技術では音波エネルギーで細胞が破壊されることがあったが、本発明の音波発振部周囲は被膜されているため、細胞へのダメージは最小限に抑制される。また、ランダム周波数、ホワイトノイズ、逆位相波長などの駆動信号を使うことで、各細胞に均等に微細な穴を作ることができる。音波発振素子の別の使用形態として、音波振動部をあらかじめ細胞培養容器 6 の底の部分に組み込めば、新たに音波発振装置を水中に挿入する手間が省けるので、音波振動装置を各培養容器 6 に設置することで多数の細胞へ同時に音波を照射することが可能となる。また、音波振動部を小型化することで、極く少量の細胞培養溶液でも効率的に細胞に穴を開けることができる。多数の音波発振素子 1 を同時に駆動させるために、各素子 1 の電気供給を音波素子駆動電極 1 a に並列に接続して並べることが可能である。

30

【 0 0 1 6 】

図 5 において、11 は周波数表示、12 はパルス頻度及デューティ比表示、13 は出力表示、14 はタイマー時間表示、15 は温度表示、16 は周波数調整つまみ、17 はパルス調整つまみ、18 はデューティ比調整つまみ、19 は出力調整つまみ、20 はタイマー設定つまみ、21 はホワイト・ランダム周波数切替つまみである。駆動装置には音波発振部位の実測の温度、実測電圧、実測電気エネルギー（ワット）消費量、実測駆動周波数（周波数カウンター）、デューティ比（%）、バースト頻度（Hz）が表示される。また自動タイマー（0.1 秒から 3600 秒）で駆動電源のオン・オフが可能とする。また、音波振動部位からフィードバックされてくる各情報をもとに、駆動信号を最適化するための切り替えスイッチも設置する。上記のランダム周波数、ホワイトノイズ、逆位相波長などの駆動信号を用いる、音波エネルギー有効利用モードの切替スイッチも設ける。

40

【 0 0 1 7 】

培養細胞のみならず動物の中でも、音波発振部を用いて、目的部位に照射することで微細な穴を開けることが可能である。音波発振部を一直線上に数個並べて、消化管や血管内

50

に挿入し周囲の細胞や生体組織に微細な穴を多く開けることも可能である。多数の微細の穴を通して中枢神経系用薬、末梢神経系用薬、感覚器官用薬、循環器用薬、呼吸器用薬、消化器用薬、ホルモン剤、泌尿生殖器用薬、外皮用薬、血栓溶解剤、抗腫瘍薬、抗アレルギー薬、抗生物質、代謝性医薬品、遺伝子治療薬、診断用造影剤、染色剤、光感受性薬、超音波性薬、血管拡張剤、新生血管抑制剤、ビタミン剤、抗酸化剤、抗炎症剤、等を効率良く投与できる。また、動物の卵、鶏の胚、マウス胚、牛胚などのクローニング技術などの実験にも応用できる。植物の細胞壁に微細な穴を開けるときにも本発明装置を使用することによって品種改良に利用できる。工業用途としては乾燥させられない膜や材料の表面に多数の穴を開ける用途に使える。

【0018】

10

その他の実施形態として、マイクロ単位およびナノ単位の大さの脂質、ポリマーでできた粒子または気体を含んだカプセルを本装置使用時に併用すると、より効率的に穴を開けられることもある。一般に超音波造影剤やMRI造影剤として現在するものや特定の組織に集積する性質をもつ診断治療用薬物のナノパーテクル(ナノサイズの微粒子)を液中に混合させて併用することで安定して微細な穴を多数開けることができる。穴の大きさや、穴の面積当たりの数を調整することが可能である。

【実施例1】

【0019】

水中に1センチ角のアルミフォイルを浸し、表面の1ミリの距離から本発明の音波発振部で2メガヘルツ付近(± 0.1 メガヘルツ)のランダム周波数、10ワット平方センチ、パルス頻度30ヘルツ、照射時間60秒で10ミクロン大の微細な穴を、平均1ミリ角中1万個作ることができた。

20

【実施例2】

【0020】

ニワトリ胚肢芽(ステージ20~21)に遺伝子を導入する際に本発明装置を用いる。まず、ニワトリ卵を、湿度を保った38.5の孵卵器で、目的のステージになるまで発生させる。卵殻の鈍端に穴を開け、18Gニードルを付けたシリンジで4~5ml程度抜く。卵殻側面上方を眼科剪刀で切り、丸く窓を開ける。肢芽に遺伝子{GFP(pEGFP)、LacP(pEF-LacZ)}を顕微鏡下で直接注入する。本発明の音波振動子を目的の場所の近くまで挿入する。目的部位に穴を開けて遺伝子を導入する際の条件は超音波エネルギー 2.0 W/cm^2 、デューティサイクル20%、照射時間60秒。ランダム周波数モードで実施する。その結果、発現ベクターの肢芽への導入、従来のエレクトロポレーションの50倍得られた。GFP遺伝子の発現は一過性であり、導入から3時間後にはすでに遺伝子が発現しており、12時間後にはほぼ発現のピークに達し、48時間後までにはほとんど発現は観察されなくなったLacZ遺伝子の発現を遺伝子導入12時間後の肢芽においても遺伝子導入が確認された。同様の手順によってShh遺伝子の発現ベクター(pCAGGS-cShh)を用いた場合には過剰指を誘導することができることを確認できた。

30

【実施例3】

【0021】

40

新鮮抜去ウシ前歯の歯根側面よりタービン用ダイヤモンドラウンドバー#440を用いて歯髄に到達する窩洞を形成し、pEGFP-N3(Clontech, Palo Alto)にTIMP promoterを結合させたプラスミド(TIMP-pEGFP)を注入した。プラスミドDNA(25 μg)はあらかじめ超音波造影剤Optison(Molecular Biosystems Inc. San Diego)を1:3で混合した。窩洞内を完全にUltrasonic Conductivity Gel液(Nishimoto Sangyo Co. LTD)で覆い、Gel面上から本発明装置を用いて1MHzにて音波を照射した。超音波強度は 0.5 W/cm^2 あるいは 1 W/cm^2 、周波数は1MHzを使用した(照射時間15、30、60秒)。その後歯髄を摘出して、10%仔ウシ血清含有DMEM中で、Trowell型の器官培養を行った。

50

24時間後、実体蛍光顕微鏡にてGFPの蛍光発色の観察を行った。

【0022】

その結果、超音波を照射した群のGFPの量有意に認められ、組織や表面の膜に微細な穴が多く開けられたと思われる。遺伝子導入効率の促進作用が証明され、その導入効率は超音波の強度および照射時間に依存した。本発明装置の周波数1MHzの場合、強度は0.5W/cm²、ホワイトノイズモードの照射時間30秒が最もGFPが窩洞内の歯髄組織にびまん性に分布しており、大きな組織傷害性がなく、遺伝子導入効率が最も良いと考えられた。

【実施例4】

【0023】

血管内皮組織への影響について試験した。血管内皮組織に20μgのTIMP-pEGFPプラスミドを応用し、本発明装置の音波発振部分から0.5W/cm²、周波数1MHz、照射時間30秒で超音波照射し、器官培養1日後に組織を急速凍結した。20μmの凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡（カールツアイス社、LSM410、アルゴンレーザー、B 488nm、30mW）にて細胞内GFPの蛍光発色をコンピュータ画像観察した。また、HE染色により、炎症や壊死所見の観察を行った。

【0024】

その結果、遺伝子導入して器官培養1日後の血管組織をHE染色して形態観察したところ、炎症や壊死所見は認められなかった。また、共焦点レーザー顕微鏡下でGFPの蛍光発色をコンピュータ画像解析したところ、遺伝子導入により表層下200μmまで、細胞内にGFP遺伝子を取り込まれていることが判明した。

【実施例5】

【0025】

ウサギの腹部大動脈の血管内に作成した人工血栓の中に本発明装置を挿入し、1ワット、2メガヘルツ、30秒間の音波を照射し、血栓溶解剤を加えたところ、コントロールの音波照射していない群に比べ、有意に短い時間で血栓溶解が認められた。血栓の表面に微細な穴が多数、開いた結果と思われる。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】本発明装置で使用する波形の図である。

【図2】本発明装置の一実施例を示す図である。

【図3】本発明装置の別実施例を示す図である。

【図4】本発明装置の別実施例を示す図である。

【図5】本発明装置の駆動装置の一例を示す図である。

【符号の説明】

【0027】

1：音波発振素子

1a：音波素子駆動電極

2：保護膜

3：振動部

4：流動体

5：皮膜

6：インピーダンス電極

7：温度センサー

8：細胞培養容器

11：周波数表示

12：パルス頻度及デューティ比表示

13：出力表示

14：タイマー時間表示

15：温度表示

10

20

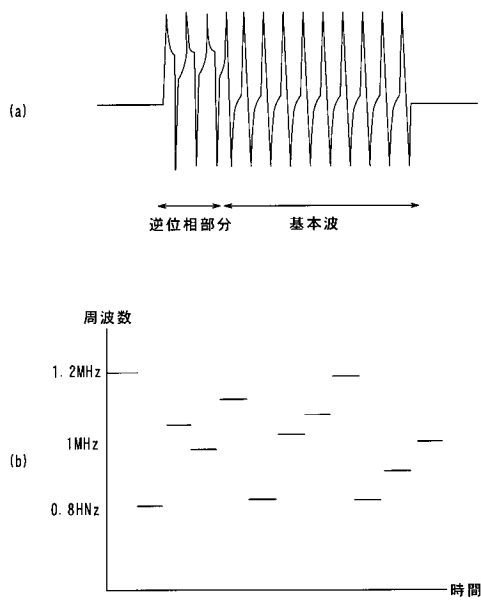
30

40

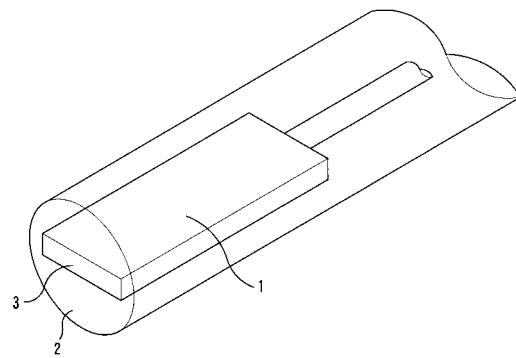
50

- 16 : 周波数調整つまみ
- 17 : パルス調整つまみ
- 18 : デューティ比調整つまみ
- 19 : 出力調整つまみ
- 20 : タイマー設定つまみ
- 21 : ホワイト・ランダム周波数切換つまみ

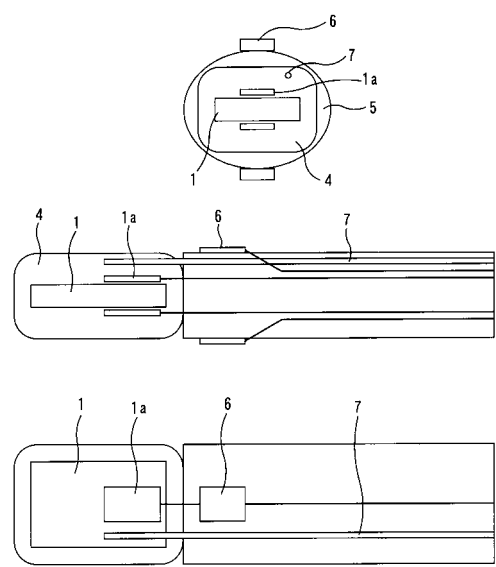
【図1】



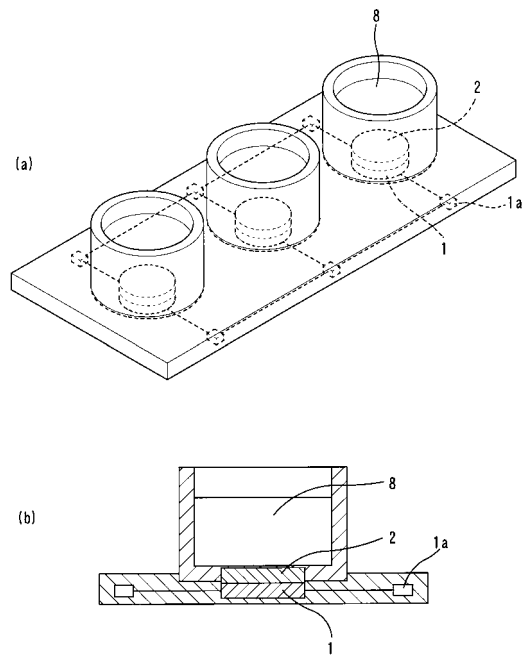
【図2】



【図 3】



【図 4】



【図 5】

