

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業  
(2013～2017年度)

超音波を基軸とした新たな医療技術開発の拠点形成

—ヒトにやさしい医療を目指して—

2017年度  
最終成果公開シンポジウム

2018年3月4日(日)

同志社大学今出川校地良心館



主催 同志社大学超音波医科学研究センター

## 巻 頭 言

同志社大学超音波医科学研究センター主催の研究成果公開シンポジウムは平成25年度に第1回を実施し、その後毎年1回開催して、今回最終年度を迎えました。このシンポジウムは、平成25年度に採択されました文部科学省戦略的研究基盤形成支援事業「超音波を基軸とした新たな医療技術開発の拠点形成ーヒトにやさしい医療を目指してー」の研究成果を公開しています。このプロジェクトは、平成25年度から29年度の5年間において、以下のような4つの研究テーマに分かれて実施することとしています。これまでの公開シンポジウムにおきまして、ご来場の方々から貴重なご意見やアドバイスをいただきました。この場を借りまして、厚く御礼申し上げます。

### 4つの研究テーマ

#### 1. 医療における超音波技術の安全性の確立

超音波照射による生体組織への影響は、熱的作用と非熱的作用に分類される。熱的作用は温度上昇によるタンパク質の変性であり、非熱的作用はキャビテーションによる組織損傷である。これらの生体作用を実験的に検討する。特に、従来、DNAの損傷の有無は間接的な検証とすることが多かったが、本研究テーマではDNAの二本鎖切断を蛍光顕微鏡で経時的に直接観察する点を特色としている。

#### 2. 超音波による生体組織の熱的特性のイメージング

本テーマで着目する熱的特性は生体が体温を維持するために必要な機能を監視する物理量であり、それらの物理量から組織の生理学的状態を関連づけることにより、新しい診断情報を得ることを目的としている。特に、本研究テーマでは高磁場環境下で使用できる超音波イメージング装置を開発することによってMRIと超音波を同時撮像し、生体内部の熱的な特性の分布を映像化するだけでなく、超音波画像の高画質化、新しい高機能フュージョンイメージングを提案していくことも特色としている。

### 3. 生物補償行動アルゴリズムを用いた超音波イメージング技術の開発

コウモリに代表される、超音波によって環境を知覚する生物は、レーダやソナー等の信号処理アルゴリズムとは異なる特異なものを利用していることが知られている。本研究テーマではこの生物アルゴリズムを超音波イメージングに搭載して、ドプラ血流測定の精度向上と分解能向上を図り、日常生活圏で利用可能な携帯型超音波イメージングシステムの実現を目指すことを特色としている。

### 4. 生体組織のかたさ測定精度の向上

医用超音波の分野では生体組織のかたさを **shear wave** (ずり波) の速度から推定する手法が研究されている。生体内部で **shear wave** を伝搬させるために、音響放射力インパルスと呼ばれる持続時間の長い集束超音波が用いられている。本研究テーマでは、この音響放射力インパルスによる **shear wave** を安全性に配慮しつつ効率よく発生させる技術を開発する。そして、軟部組織だけではなく骨のような硬組織を含めて生体組織のかたさを測定する超音波技術を開発し、その有効性を総合的に検討することを特色とする。

平成30年3月4日

同志社大学超音波医科学研究センター  
センター長 秋山 いわき

文部科学省戦略的研究基盤形成支援事業（2013～2017年度）

「超音波を基軸とした新たな医療技術開発の拠点形成

—ヒトにやさしい医療を目指して—

2017年度 最終研究成果公開シンポジウム

日時：2018年3月4日（日）13：10～17：30

場所：同志社大学今出川校地良心館306教室

主催：同志社大学超音波医科学研究センター

## プログラム

13：10 開会の挨拶

同志社大学超音波医科学研究センター センター長 秋山 いわき

13：20

### テーマ1：医療における超音波技術の安全性の確立

「超音波照射および機械刺激によるゲノムサイズDNAの二重鎖切断：一分子観察による定量的計測」

○剣持貴弘<sup>1</sup>・吉川研一<sup>1</sup>

1) 同志社大学生命医科学研究科

----- 1

「超音波照射に伴う生体作用に関する研究」

○吉田憲司<sup>1</sup>・高野 わかな<sup>2</sup>・松本 恵李那<sup>2</sup>・阪口 裕暉<sup>2</sup>・古屋 元秀<sup>2</sup>・高山 法也<sup>3</sup>・利府 数馬<sup>3</sup>・笹沼 英紀<sup>3</sup>・谷口 信行<sup>3</sup>・池川雅哉<sup>2</sup>・廣瀬まゆみ<sup>2</sup>・渡辺好章<sup>2</sup>・秋山 いわき<sup>2</sup>

1) 千葉大学フロンティア医工学センター、 2) 同志社大学超音波医科学研究センター、 3) 自治医科大学

----- 7

### テーマ2：超音波による生体組織の熱的特性のイメージング

「超音波による生体組織の熱物性の測定とMRを用いたマルチモダリティイメージング」

○秋山いわき<sup>1</sup>・辻本祐加子<sup>1</sup>・稲垣拳<sup>1</sup>・新井慎平<sup>1</sup>・新田尚隆<sup>2</sup>・平井都始子<sup>3</sup>

1) 同志社大学超音波医科学研究、 2) 産業技術総合研究所、 3) 奈良県立医大

----- 13

テーマ3：生物補償行動アルゴリズムを用いた超音波イメージング技術の開発

「生物による超音波利用技術」

○飛龍 志津子<sup>1</sup>・小林 耕太<sup>1</sup>

1) 同志社大学超音波医科学研究センター

----- 17

テーマ4：生体組織のかたさ測定精度の向上

「骨組織の硬さ測定精度の向上－臨床応用を目指した骨組織計測技術の研究－」

○松川真美<sup>1</sup>・長谷芳樹<sup>2</sup>・細川篤<sup>3</sup>

1) 同志社大学超音波医科学研究センター、2) 神戸市立工業高等専門学校、  
3) 国立明石工業高等専門学校

----- 25

「Shear wave Elastography における符号化 push pulse 照射法」

椎名 毅<sup>1,2</sup>・近藤 健悟<sup>1,2</sup>・浪田 健<sup>1,2</sup>・山川 誠<sup>1,2</sup>

1) 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻、2) 同志社大学超音波医科学研究センター

----- 31

17：20 閉会の挨拶

同志社大学超音波医科学研究センター センター長 秋山 いわき

# 超音波照射および機械刺激によるゲノムサイズ DNA の二重鎖切断： 一分子観察による定量的計測

剣持 貴弘<sup>†</sup> 吉川 研一<sup>†</sup>

<sup>†</sup>同志社大学生命医科学部, 超音波医科学研究センター 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

E-mail: <sup>†</sup>tkenmots@mail.doshisha.ac.jp, <sup>†</sup>keyoshik@mail.doshisha.ac.jp

キーワード DNA 二重鎖切断, 超音波, ゲノムサイズ DNA, 振動刺激

## 1. はじめに

現在の医療分野では、超音波を利用した診断および治療技術の発達が目覚ましく、一般に広く普及しており、今後さらなる発展が期待されている。しかしながら、超音波照射による生体への影響については、知見が不足しており、生体に優しい超音波診断・治療技術開発のためには、超音波と生体との相互作用メカニズムを明らかにしていくことが必須である。本研究では、生体と超音波との相互作用として、超音波照射によるゲノムサイズ DNA の二重鎖切断メカニズムを明らかにすることを目的とする。特に、超音波パルス照射した場合の DNA 二重鎖切断に関するパルス回数依存性に注目し、実験結果をもとに、パルス照射による DNA 二重鎖切断に関する数理モデルを構築する。これまでの本研究グループの研究により、超音波照射によって生成されるキャビテーションが、DNA 二重鎖切断の主要な原因であることを明らかにしてきたが<sup>1,2)</sup>、そのメカニズムについては、キャビテーションの定量的な計測自体が困難であるため、その詳細は明らかにされていない。本研究において、実験および理論の両面からアプローチすることによって、超音波照射による DNA 二重鎖切断メカニズムを明らかにし、数理モデル構築を図る<sup>3)</sup>。また、本研究では、Vortex ミキサーを用いたミキシング時の機械刺激による DNA 二重鎖切断についても実験を実施し、超音波および機械刺激を含めた振動刺激に起因する DNA 二重鎖切断について包括的に研究を進める。

本研究を進めるに当たって、従来の DNA 二重鎖切断計測手法としては、 comet・アッセイ法<sup>4,5)</sup> と  $\gamma$ -H2AX の蛍光免疫染色法<sup>6)</sup> が代表的なものと上げられるが、これらの方法では、ゲノム DNA の二重鎖切断を定量的に計測することは困難であった。本研究では、本研究グループで確立した、蛍光顕微鏡による DNA 一分子計測の方法論<sup>7,8)</sup> を適用し、超音波照射によるゲノムサイズ DNA の二重鎖切断を定量的に評価する。

## 2. 実験結果

### 2.1 超音波照射による DNA 二重鎖切断

本研究では、ゲノムサイズの長鎖 DNA として、T4 GT7 DNA (166 キロ塩基対(kbp)) を用いる。また、DNA 二重鎖切断を定量的に評価するために、蛍光顕微鏡を用いた DNA 一分子計測を実施し、超音波照射前後の DNA の平均長を求めることによって、次式を用いて、二重鎖切断の平均切断回数  $\langle n \rangle$  を定量的に求めた<sup>1-4)</sup>。

$$\langle n \rangle = \frac{\langle L_0 \rangle}{\langle L \rangle} - 1 \quad (1)$$

ここで、 $\langle L_0 \rangle$  は照射前の DNA の平均長、 $\langle L \rangle$  は照射後の DNA の平均長である。

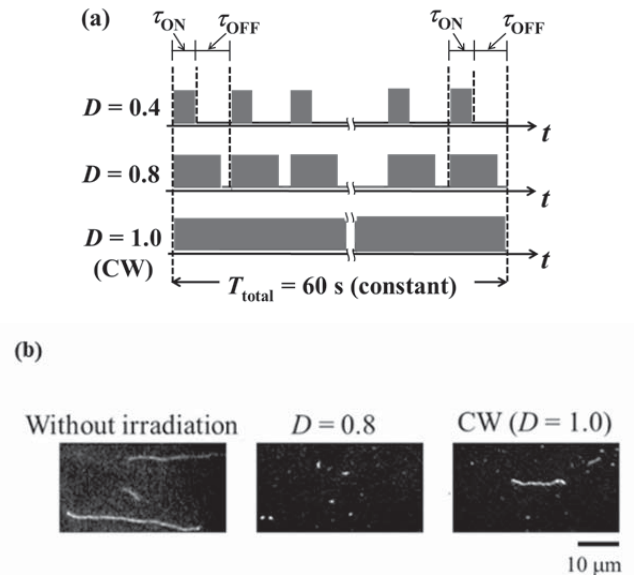


図 1 (a) 照射時間一定の場合の超音波照射方式. (b) 蛍光顕微鏡による DNA 一分子計測像<sup>3)</sup>.

図 1 に、超音波の照射時間を一定にした場合の照射方式と、振動数 30 kHz, 音圧 90 kPa の超音波照

射前後の DNA を蛍光顕微鏡によって、一分子計測した画像を示す<sup>3)</sup>。照射率  $D$  (Duty ratio) は、図 1(a) に示すように、パルス周期と実際の照射時間との比  $D = \tau_{\text{ON}} / (\tau_{\text{ON}} + \tau_{\text{OFF}})$  で定義され、 $D=1.0$  は連続波 (CW)

を意味する。図 1(b) で示される、蛍光顕微鏡による観察結果から、超音波照射によって、DNA が二重鎖切断を受け、DNA 長が短くなっていることが分かる。また、連続波 ( $D=1.0$ ) に比べて、パルス波 ( $D=0.8$ ) の方が、二重鎖切断によって、DNA が短く断片化しているという結果が得られた。

図 2 に、振動数 30 kHz、音圧 90 kPa の超音波を 60 秒間照射した場合の 10 kbp 当たりの DNA 二重鎖切断回数の照射率依存性を示す<sup>3)</sup>。図 2 に示されるように、 $D=0.8$  程度までは、切断回数が線形的に増加するが、 $D=0.9$  で、急激な増加が見られ、その後、再び減少する。 $D=1.0$  の場合が、連続波の切断回数を示すことから、 $D=0.6$  近傍以下のパルス波では、切断回数が連続波より少なく、 $D=0.6$  を超えると、逆に、切断回数が多くなり、 $D=0.9$  を超えると、再び切断回数が減少するという結果を得た。この実験条件では、連続波が最も入力エネルギーが大きくなるにも関わらず、照射率が 0.6 を超えると、DNA の切断効率が連続波よりパルス波の方が高くなること示された。

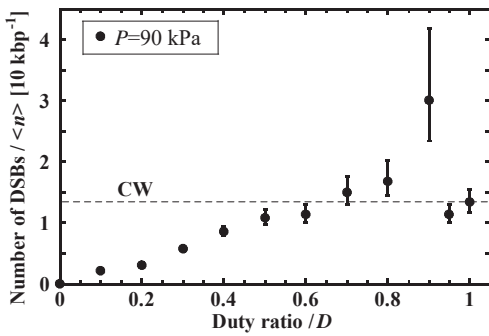


図 2 超音波照射による DNA 二重鎖切断の照射率依存性<sup>3)</sup> (振動数 30 KHz, 音圧 90 kPa).  $D=1.0$  は連続波 (CW) を示す。

図 3 に、超音波の照射エネルギーを等しくした場合の照射方式と、照射率 0.4, 0.8, 音圧 90 kPa の超音波を照射した場合の DNA 二重鎖切断のパルス回数依存性を示す<sup>3)</sup>。図 3(a) に示されるように、パルス回数  $N_p$  は  $N_p = T_{\text{total}} / \tau_T$  で定義され、 $T_{\text{total}}$  は、超音波の全照射時間を表す。図 3(b) より、パルス回数 20 回程度までは、連続波と比較して、切断効率が抑制され、それ以上のパルス回数では、逆に切断効率が促進される。パルス照射時間 ( $\tau_T$ ) で観ると、パル

ス照射時間が 1 秒程度以下で、連続波より二重鎖切断が促進され、1 秒以上では、二重鎖切断が抑制されるという結果が得られた。また、図 3(c) で示されるように、照射率 0.8 の場合でも、同様の傾向が観測され、パルス回数によって、連続波照射と比較して、二重鎖切断が促進される領域と抑制される領域が存在することが明らかとなった。

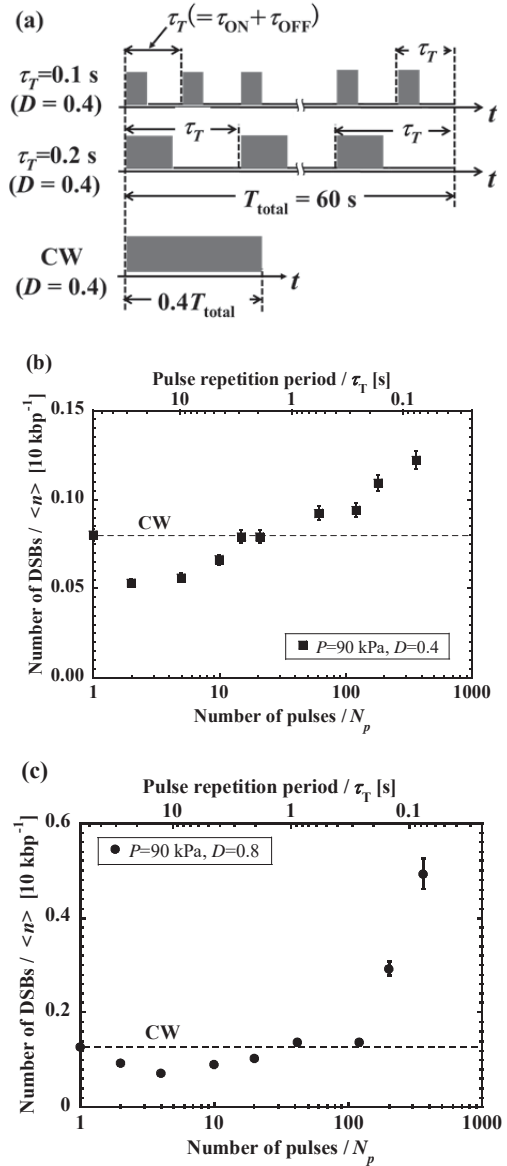


図 3 (a) 照射エネルギー一定の場合の超音波照射方式. (b) 超音波照射による DNA 二重鎖切断の照射率依存性 (照射率 0.4 の場合). (c) 照射率 0.8 の場合<sup>3)</sup>.  $N_p=1$  は連続波 (CW) を意味する。

## 2.2 機械刺激による DNA 二重鎖切断

超音波照射による DNA 二重鎖切断がキャビテーション消滅時の衝撃波によって引き起こされることの対比として<sup>1-3)</sup>、DNA サンプル混合時に使用する Vortex ミキサーの機械刺激による DNA 二重鎖切



断について、実験を実施した。図 4 に実験に使用した実験系を示す。本実験には、T4 GT7 DNA (166 kbp) と  $\lambda$  DNA (48 kbp) を使用した。

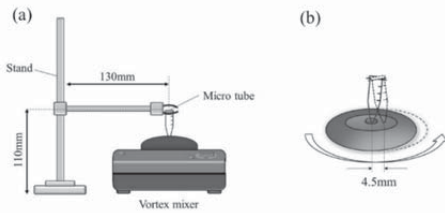


図 4 (a) 実験装置 (Vortex ミキサー) (b) Vortex ミキサーのミキシングによる機械刺激。

Vortex ミキサーを図 4(b)のように、回転させることによって、DNA サンプルを混合させた場合のミキシング時間による DNA 二重鎖切断の違いを、蛍光顕微鏡を用いて一分子計測した結果を図 5 に示す。計測結果から、時間が経過すると共に、Vortex によるミキシングによって、DNA が二重鎖切断を受け、DNA 長が短くなっていることが分かる。

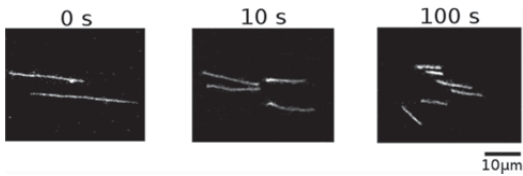


図 5 Vortex のミキシングによる DNA 二重鎖切断の蛍光顕微鏡による一分子計測像 (菊池, 野瀬らの研究結果, 論文未発表)。

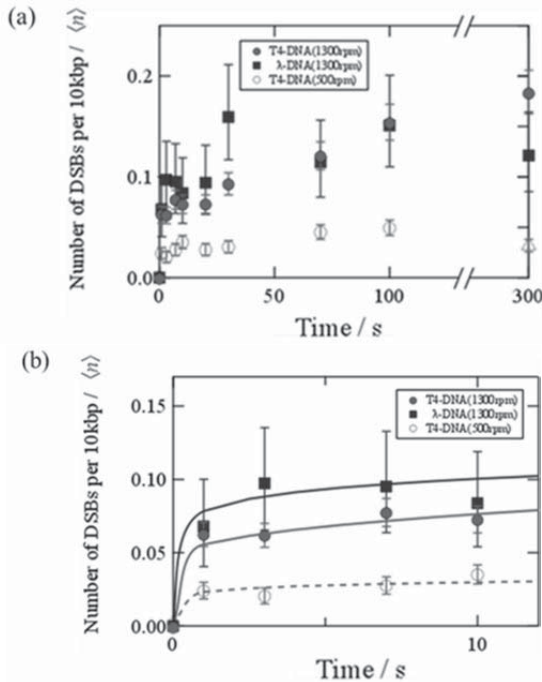


図 6 (a) Vortex ミキシングによる DNA 二重鎖切断の時間依存性. (b) 開始 10 秒までの時間依存性 (菊池, 野瀬らの研究結果, 論文未発表)。

図 6(a)に、Vortex のミキシングによる T4 DNA と  $\lambda$  DNA の二重鎖切断についての回転速度依存性を示す。本実験では、Vortex ミキサーの回転数を、500 rpm と 1300 rpm の場合で実験を行った。ここで、rpm は 1 分間当たりの回転数を表す。実験結果から、回転数が大きい 1300 rpm の方が、DNA 二重鎖切断効率が高いことが分かる。また、T4 DNA と  $\lambda$  DNA では、ミキシング前の DNA 長で、3 倍程度の T4 DNA の方が長い、今回の実験では、切断回数について、顕著な差は観られない。図 6(a)の Vortex ミキシング実験に関して、回転開始から 10 秒までの DNA 二重鎖切断の様子を示したものを図 6(b)に示す。図 6(b)から、回転開始数秒で著しい DNA 二重鎖切断が生じ、その後、時間経過と共に、徐々に二重鎖切断が増加していくことが明らかとなった。

### 3. 考察

#### 3.1 超音波による DNA 二重鎖切断メカニズム

本研究グループのこれまでの研究から、超音波による DNA 二重鎖切断は、活性酸素などの間接作用による切断ではなく、超音波照射によって、生成されたキャビテーションが消滅する時の衝撃波によって引き起こされる切断であることが示されている<sup>1-3)</sup>。しかしながら、その詳細な切断メカニズムについては、明らかにされていない。本研究では、図 2, 図 3 (a) に示されるように、超音波をパルス照射した場合の DNA 二重鎖切断についての照射率依存性およびパルス回数依存性を調査した。実験結果から、パルス照射において、連続波照射と比べて、DNA 二重鎖切断が、照射率とパルス回数に関して、促進される領域と抑制される領域があることが明らかとなった。

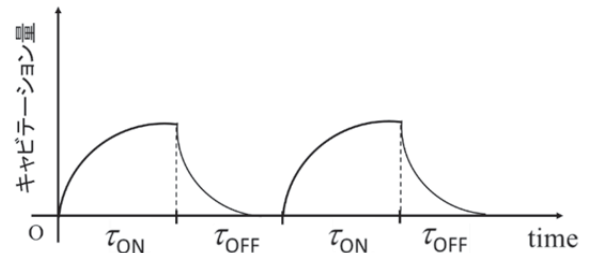


図 7 パルス照射におけるキャビテーション減少モデル。

本研究で得られた実験結果から、図 7 に示されるように、1 回のパルス照射中で、超音波照射 ( $\tau_{ON}$ ) によって生成されたキャビテーションが、超音波が照射されていない間 ( $\tau_{OFF}$ ) に、時間と共に減少し、



次のパルス照射までに消滅するという過程を考慮した数理モデルを考案し、次式で表される、DNA 二重鎖切断についてのパルス回数依存性に関する数理式を提案した<sup>3)</sup>。

$$\log_{10}\langle n \rangle = 0.2\log_{10}N_p + C + 0.3 / N_p^\beta \quad (2)$$

ここで、 $\langle n \rangle$ は平均の二重鎖切断回数、 $N_p$ はパルス回数を表し、 $\beta$ は比例係数、 $C$ は定数である。本研究では実験データとのフィッティングから、 $\beta=2$ 、照射率 0.4 の場合  $C=-1.4$ 、照射率 0.8 の場合  $C=-1.2$  とした。図 8 に、実験データと本研究グループが提案する数理モデルの比較を示す。図 8 の数理モデルの直線部分は、図 7 で示されるように、超音波によって生成されたキャビテーションが、次のパルス照射までに消滅するという、キャビテーション減少モデルを意味し、照射率 0.4 の場合の二重鎖切断は、提案した減少モデルによく従う。照射率 0.8 の場合も、数理モデルは、よく実験データを再現できているが、パルス回数が 200 を超えた場合（1 回の照射時間  $\tau_T=0.1s$  以下）では、減少モデルとの差が観られる。これは、パルス回数が増加すると、パルス照射間の時間間隔（ $\tau_{OFF}$ ）が狭くなるために、キャビテーションが消滅し切る前に、次のパルス照射が始まるため、前の照射によって生成されたキャビテーションが残り、キャビテーションの生成が促進（after effect）されるためである。

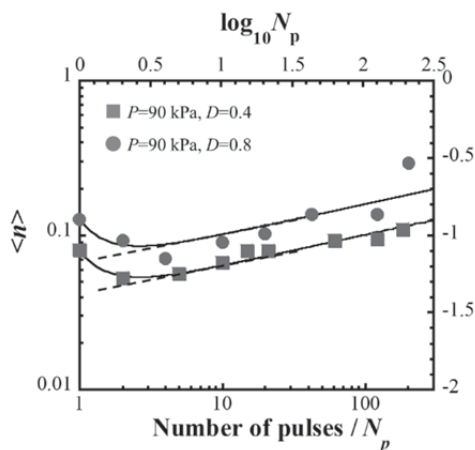


図 8 DNA 二重鎖切断に関するパルス回数依存性の実験データと数理モデルの比較。  $N_p=1$  は連続波を意味する。

超音波照射による DNA 二重鎖切断については、

これまでの研究により、キャビテーションが寄与していることが指摘されてきたが、その切断メカニズムの詳細は明らかになっていなかった。本研究により、キャビテーションがパルス照射間で減少するモデルを提案し、実験データとよく一致することを示した。また、パルス回数が多く、キャビテーション減少モデルに従わない場合は、前のパルス照射によるキャビテーションの寄与が残ることにより、キャビテーションの生成が促進されるという切断メカニズムを、新たに明らかにした。これらの知見については、これまで報告された例はなく、本研究によって、初めて明らかにされた知見である<sup>3)</sup>。

### 3.2 機械刺激による DNA 二重鎖切断メカニズム

Vortex のミキシング実験結果から、機械刺激による DNA 二重鎖切断は、ミキシング初期の数秒間で、顕著に増加することが明らかとなった。ミキシングによる機械刺激に起因する二重鎖切断のメカニズムの詳細は、現在のところ明らかではないが、ミキシングによって生じるズリ応力が寄与している可能性が考えられる。

本研究では、機械刺激による DNA 二重鎖切断メカニズム解明のために、回転速度  $\omega$  を徐々に上げた場合の実験も実施した。図 9 は、60 秒かけて、回転速度を 1300 rpm に上げた場合と、最初から 1300 rpm の回転速度でミキシング実験を行った場合の結果を示す。図 9 から、徐々に回転速度を上げた場合で、回転数が 1300 rpm に達した 60 秒後からの 20 秒間の二重鎖切断回数と、回転速度一定の場合の最初の 20 秒間の切断回数を比較すると、2 倍程度、回転速度一定の場合の方が多く、60 秒かけて徐々に回転速度上げていくことで、50%程度二重鎖切断を低減することができることが示された。

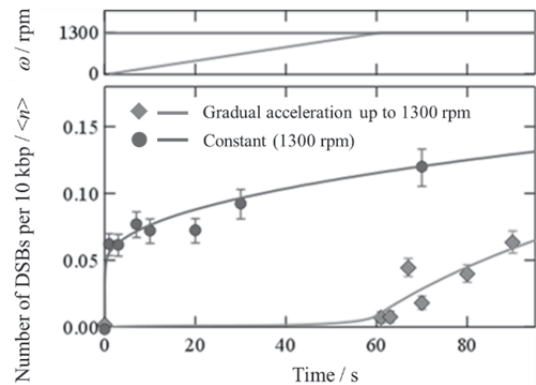


図 9 Vortex のミキシングによる DNA 二重鎖切断（回転速度  $\omega$  を 60 秒かけて 1300 rpm にした場合）。（菊池、野瀬らの研究結果。論文未発表）。

回転数を徐々に上げた場合の方が、DNA 二重鎖切断を低減させることができる理由については、現在のところ、その詳細は明らかではないが、ズリ応力の空間的勾配が最も大きい容器壁面近傍に存在する DNA が、徐々に回転速度を上げていくことによって、応力勾配の小さい容器内部に移動することで、ズリ応力による切断を低減している可能性が考えられる。

#### 4. まとめ

超音波照射による DNA 二重鎖切断については、これまでの研究により、キャビテーションが寄与していることが指摘されてきたが、その切断メカニズムの詳細は明らかにされていなかった。本研究により、キャビテーションがパルス照射間で減少する速度過程を取り入れた数理モデルを提案し、これが実験データとよく一致することを示した。また、パルス回数が 200 以上、1 回のパルス照射時間で 0.1s 以下では、前のパルス照射によるキャビテーションの after effect を数理モデルに取り入れることにより、キャビテーションの生成が促進される効果を定量的に記述できることを明らかにした。

Vortex のミキシングによる機械刺激に起因する DNA 二重鎖切断については、回転速度を徐々に上げることによって、二重鎖切断を低減させることができることを見出し、回転速度を 60 秒間かけて、1300 rpm にした場合、1300 rpm 一定の回転数の場合と比べて、二重鎖切断を 50% 程度低減できることを明らかにした。

本研究で得られた、超音波と機械刺激を含めた振動刺激によるゲノムサイズ DNA の二重鎖切断に関する知見は、飛躍的な進歩を続けている超音波診断および治療技術開発のための根本的な知見となるものである。

#### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、吉川祐子博士には、蛍光顕微鏡による DNA 一分子計測についてご指導頂き、DNA 二重鎖切断実験の実施、実験結果についての議論をして頂いた。また、野瀬啓二博士、院生の菊池駿斗君には、Vortex によるミキシング実験の実施、データ解析を行って頂いた。ここに、感謝の意を表する。

#### 文 献

- [1] K. Yoshida, N. Ogawa, Y. Kagawa, H. Tabata, Y. Watanabe, T. Kenmotsu, Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa, "Effect of low-frequency ultrasound on double-strand breaks in giant DNA molecules", *Appl. Phys. Lett.* vol. 103, 063705/pp. 1-3, 2013.
- [2] Y. Ma, N. Ogawa, Y. Yoshikawa, T. Mori, T. Imanaka, Y. Watanabe, K. Yoshikawa, "Protective effect of

ascorbic acid against double-strand breaks in giant DNA: Marked differences among the damage induced by photo-irradiation, gamma-rays and ultrasound", *Chem. Phys. Lett.* vol. 638, pp. 205–209, 2015.

- [3] R. Kubota, Y. Yamashita, T. Kenmotsu, Y. Yoshikawa, K. Yoshida, Y. Watanabe, T. Imanaka, K. Yoshikawa, "Double-Strand Breaks in Genome-Sized DNA Caused by Ultrasound High-Frequency Pulsing Induces Greater Damage Than Continuous-Wave Sonication and Low-Frequency Pulsing Causes Less Damage", *ChemPhysChem*, vol. 18, pp.959 – 964, 2017.
- [4] P.L. Olive, J.P. Banath, "The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells", *Nat. Protoc.* vol. 1, pp. 23-29, 2006.
- [5] W. Liao, M.A. McNutt, W.G. Zhu, "The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells", *Methods* vol. 48, pp. 46-53, 2009.
- [6] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM, "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139", *J. biological chem.*, vol. 273, pp. 5858–5868, 1998.
- [7] Y. Yoshikawa, T. Mori, N. Magome, K. Hibino, and K. Yoshikawa, "DNA compaction plays a key role in radioprotection against double-strand breaks as revealed by single-molecule observation", *Chem. Phys. Lett.* 456, pp. 80-83, 2008.
- [8] Y. Yoshikawa, T. Mori, M. Suzuki, T. Imanaka, and K. Yoshikawa, "Comparative study of kinetics on DNA double-strand break induced by photo- and gamma-irradiation: Protective effect of water-soluble flavonoids", *Chem. Phys. Lett.* 501, 146 (2010).



# 超音波照射に伴う生体作用に関する研究

吉田 憲司<sup>†</sup> 高野 わかな<sup>‡</sup> 松本 恵李那<sup>‡</sup> 阪口 裕暉<sup>‡</sup> 古屋 元秀<sup>‡</sup> 高山 法也<sup>†‡</sup>

利府 数馬<sup>†‡</sup> 笹沼 英紀<sup>†‡</sup> 谷口 信行<sup>†‡</sup> 池川雅哉<sup>‡</sup> 廣瀬まゆみ<sup>‡</sup> 渡辺好章<sup>‡</sup> 秋山 いわき<sup>‡</sup>

<sup>†</sup> 千葉大学フロンティア医工学センター 〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33

<sup>‡</sup> 同志社大学超音波医科学研究センター 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

<sup>†‡</sup> 自治医科大学 〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1

E-mail: <sup>†</sup>kenyoshi1980@chiba-u.jp

**キーワード** 音響放射力, 安全性, 期外収縮, 造影剤, キャビテーション, メダカ, プロテオミクス, バイオマーカー, 質量分析イメージング

## 1. はじめに

現在の医療診断において、超音波画像診断は必要不可欠なモダリティとなっている。また、エラストグラフィ、および包絡線統計解析や周波数スペクトル解析による散乱特性解析を用いることで、組織の形態情報に加えて質的な診断も可能となっている。近年の超音波診断装置の多様化に伴う高出力化を背景に、生体に対する安全性の視点から超音波が生体組織に与える作用についてより深い理解が求められている。本報告では、メダカを対象に超音波キャビテーションの生体作用をプロテオミクス、メタボロミクスの側面から検討した基礎研究事例と、診断応用における重要課題として超音波造影剤投与後の超音波照射によって誘発される心臓の期外収縮について検討した事例について述べる。

## 2. メダカ胚を用いたプロテオーム変動解析

メダカ胚を対象に 30 kHz の超音波を照射し、キャビテーションの発生とメダカ胚損傷の関連性について検討を行った。全胚を対象とした遺伝子の発現変動解析を行い、変動幅の大きい遺伝子群について考察している。また、タンパク質の網羅的解析であるプロテオーム解析に着目し、超音波照射の有無によってメダカ全胚から抽出したタンパク質の総体の変化を Blue Native/SDS 二次元電気泳動を用いて解析した後、質量分析によりあるタンパク質を同定した。

### 2.1. 対象

解析用サンプルを作製するにあたり、大きさ 1 mm、受精後 4 日目 (Stage32~334) のメダカ胚を用いた。超音波照射系を図 1 に示す。発振器 (Agilent, 33500B) とパワーアンプ (RF, RS-232) を用いて、周波数 30 kHz

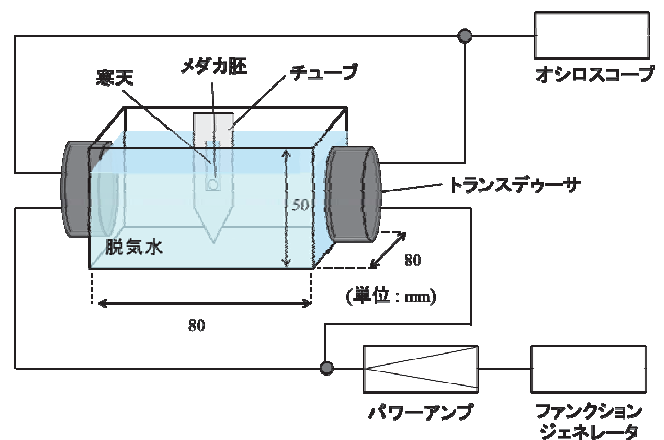


図1. 超音波照射システム

の連続波を照射した。照射音圧条件は、20, 100, 150 kPa と定め、非照射 (Control) と合わせて 4 条件とした。

超音波照射系の実験セル (80×80×50 mm<sup>3</sup>) を脱気水で満たし、定在波の腹の位置にマイクロチューブが来るように設置した。マイクロチューブ内に寒天ゲルで型を作り、中央部に設置した。チューブ内にメダカ胚と気泡核溶液 0.1 mL を入れ、60 秒間照射した。それらの解析用サンプルを 1 時間後、液体窒素を用いて凍結させて保存した。

### 2.2. タンパク質解析実験

質量分析によって同定されたタンパク質を再検証するために、Western blotting 法を用いた。抗体のメダカへの反応性を確認した後、電気泳動によりメダカ胚タンパク質を分離したゲルに対して検証実験を行った。準備として、メンブレン (PVDF) を横 8 cm×縦 7 cm の大きさに、電気泳動で用いたゲルの枚数分切り分けた。それを約 15 分メタノールに浸し、還元処理を行った。また、転写時に使用するクッションを、メンブレンと同じ大きさで、2 倍の枚数用意した。電気泳動終

了後、ゲルを取り出し、下側よりクッション、メンブレン、ゲル、クッションの順にはさみ、トランスブロット SD セル (BIO-RAD) にセットした。トランスブロット SDセルに Blotting Buffer(Tris 6.0 g, SDS 0.2 g, Glycine 28.8 g, メタノール 400 mL, に二回蒸留水を入れ 2 L) を入れ、12V に設定し 60 分間転写を行った。メンブレンのみ回収し、一次抗体 (Anti-AHCY antibody produced in rabbit, SIGMA-ALDAICH) を 2000 倍に希釈して用いたブロッキング剤を O/N でメンブレンに反応させた。これを回収し、PBS にて洗浄後、5000 倍希釈した二次抗体 (Peroxidase GoteAnti-Rabbit IgG, JACKSON) を 30 分間反応させた。回収後、PBS にて洗浄を行い、化学蛍光法にて特定タンパク質の検出を FUJIFILM LAS-1000 を用いて行った。

### 2.3. 結果および考察

Western Blotting 法による検証結果を図 2 に示す。抗体の働きを検証済みのマウスの血清と同時に観察しており、メダカ胚にもバンドのシグナルが確認されたことから、今回用いた抗体 (Anti-AHCY antibody produced in rabbit, SIGMA-ALDAICH) は正常に働いたことがわかる。また、図 3 より 150 kPa で超音波照射したラインにある矢印で示すバンドは非照射の同質量の位置に検出されないことから、超音波照射によって AHCY の構造が安定化した (または AHCY の分解が阻害された) ことが Western blotting 法により改めて確認された。

これらの結果より、この AHCY B-like の酵素タンパク質は超音波照射により構造が安定化されることが考えられた。また、この AHCY B-like の構造の安定化による胚発生への影響は、ゼブラフィッシュによる先行研究<sup>1)</sup>により示唆された。さらにこの酵素は、図 4 に示すメチオニン代謝の中核を担う酵素であるため、AHCY の増加に伴うメチオニン代謝への影響も改めて示唆された。

### 3. メダカの代謝のイメージング質量分析

遺伝子やタンパク質に比べてより表現型に直結する代謝物質を網羅的に解析することは、メタボロミクスと呼ばれる。代謝物質の解析には GC/MS や LC/MS 等の分離分析技術と質量分析を組み合わせた分析法が広く用いられている。しかし、これらの方法では試料をすり潰すため組織上で代謝物質がどこに局在しているのかは分からない。また、組織上の分子を可視化する技術には免疫染色法と呼ばれる手法も存在するが、多くとも 3 種類程の分子にしか適用できないという問題点がある。そこで新たに開発されたのが、イメージング質量分析法である。イメージング質量分析法は組織をすり潰さずに二次元的に局所イオン化し質量分析を

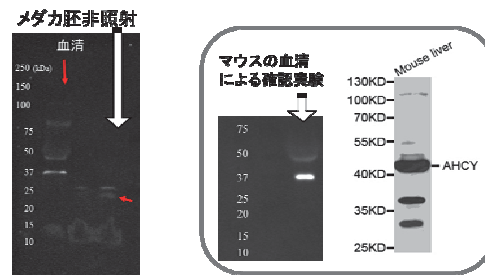


図 2. メダカ胚への反応性

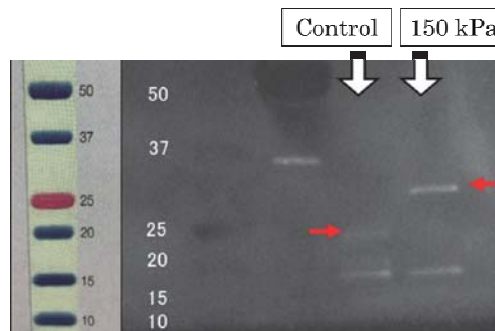


図 3. 非照射と超音波照射の比較

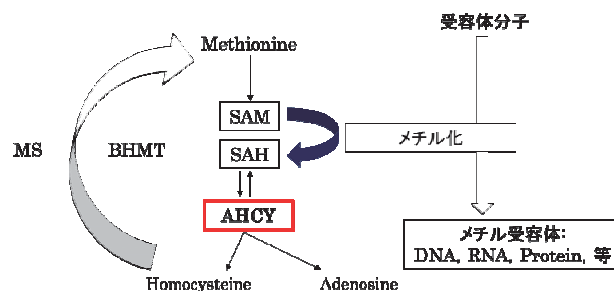


図 4. メチオニン代謝

おこなうことで、網羅的に代謝物質を分析することができ、その局在をマッピングすることができる。これにより、組織内における代謝経路を特定し疾患バイオマーカーの探索や創薬において重要な役割を果たしている。本節では、将来的に超音波照射の作用を代謝の側面から検討することを想定し、イメージング質量分析法をメダカに適用し、生体組織内での代謝物質の可視化を試みた。

#### 3.1. マトリックス支援レーザー脱離イオン化法

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization ; MALDI)<sup>2)</sup> は、マトリックスと試料を 10,000:1 程度のモル比で混合した凝縮相表面にパルスレーザー光を照射することにより、マトリックスと試料分子を脱離させながらイオン化する方法である。MALDI では、通常結晶性のマトリックスが使われ、時間幅 3~5 ns 程度のパルス状の窒素



レーザー光(波長 337 nm=3.72 eV)を結晶試料表面に照射する。レーザー光は、短時間で結晶試料表面の局所領域に吸収されアブレーションと呼ばれる爆発的気化が起こる。アブレーションによって結晶表面に生じる噴出柱のことをplumeと呼び、イオン化や各種反応がこの内部で起こると考えられる。MALDIでアブレーションを起こし、測定器で結果が得られるまでの流れの概略を図5に示した。分析計では、 $m/z$  値という質量  $m$  と電荷数  $z$  の比の違いから物質を振り分ける。振動する電場中では、イオン毎に振動の振幅が異なる。またイオンの質量が大きい程、一定の距離を移動するのに時間がかかる。

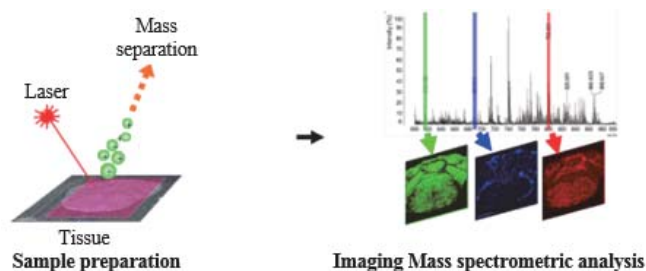


図5 イメージング質量分析法の概念

### 3.2. 対象

実験動物は、大学共同利用機関法人自然科学研究機構基礎生物学研究所から提供された成魚のメダカ(hi-medaka)オスを使用した(図6参照)。

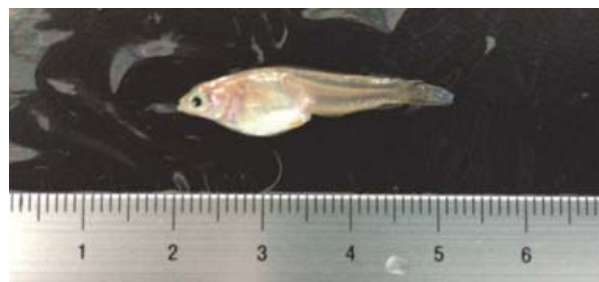


図6 メダカ(hi-medaka).

### 3.3. 方法

成魚のメダカを氷水で凍結させ、クライオスタット(Leica CM3050,Germany)をもちいて厚さ  $10 \mu\text{m}$  のメダカ全長を含む組織標本を作製した。凍結切片を導電性の Indium Tin Oxide(ITO)コーティングスライドガラス(Bruker Daltonik,Germany)にのせ 9-amino acridine( $40 \text{ mg/mL}$  9-amino acridine in 70% methanol)をハンドスプレー法で塗布した。顕微質量分析計 iMScope のプロトタイプ(Shimadzu,Japan)を用いてイメージング質量分析を行った。設定は、負イオンモードでピッチ  $50 \mu\text{m}$ 、測定範囲  $250\sim 900 \text{ m/z}$ 、積算回数 1 回/pixel、検出器電圧  $2.10 \text{ kV}$ 、レーザー照射径  $4 \mu\text{m}$ 、レーザー強度 58 とした。解析ソフトウェアは IMS Solution を用いた。

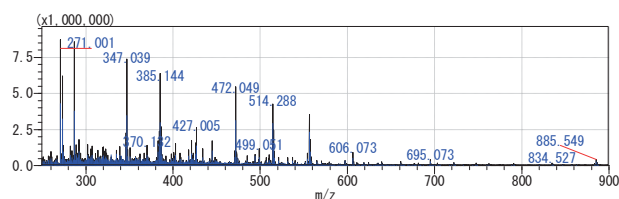


図7 メダカの質量スペクトル

### 3.4. 実験結果と考察

図7に、メダカ全長のイメージング質量分析を行った際の平均スペクトラムを示した。横軸が  $m/z$  値、縦軸がイオン強度を示している。この測定結果のうち主立った  $m/z$  値は既に分子予測のつくピークがほとんどで、表1にまとめた。

図8は  $m/z=514$  と  $m/z=556$  の分布強度画像である。同図に示すようにメダカ全長における  $m/z=514$  と  $m/z=556$  の分布は、非常に類似していることが分かった。これらは、それぞれ  $\text{C}_{24}$  trihydroxy bile acid および  $\text{C}_{27}$  trihydroxy bile acid であると予測された(図5参照)。 $\text{C}_{24}$  trihydroxy bile acid と  $\text{C}_{27}$  trihydroxy bile acid は肝臓や消化管周辺に分布が集中していることが確認できる。また、鰾の側面に胆汁酸の分布が確認できる。これまで胆汁酸は主に肝臓や消化管に存在することは知られていたが、今回のイメージングにより魚

表1 確認された代謝物

No	$m/z$	Formula	Identified
1	505.98	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{P}_3$	ATP
2	426.02	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2$	ADP
3	346.05	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}$	AMP
4	482.96	$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{P}_3$	UTP
5	402.99	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{P}_2$	UDP
6	323.03	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$	UMP
7	565.04	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_2$	UDP-glucose
8	606.07	$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{17}\text{P}_2$	UDP-HexNAc
9	514	$\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{NO}_7\text{S}$	$\text{C}_{24}$ bile acid
10	556	$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{NO}_7\text{S}$	$\text{C}_{27}$ bile acid

類においては鰾側面にも胆汁酸が存在することが初めて確認された。この鰾側面に存在する胆汁酸がメダカ体内においてどのような役割を果たしているのかを明らかにするためにはさらなる検討が必要である。

肝臓を対象とした疾患研究において胆汁酸の体内パターンが変化することが知られており、マウスを用いた



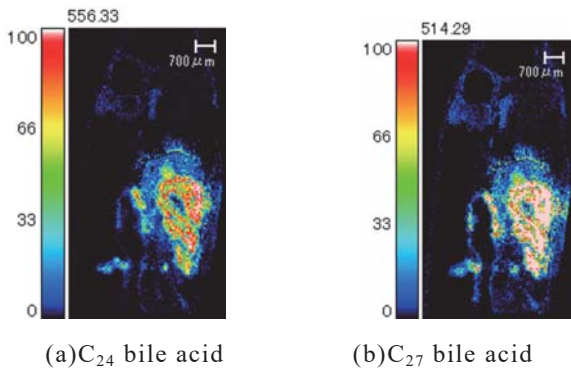


図 8 メダカにおける胆汁酸の二次元分布

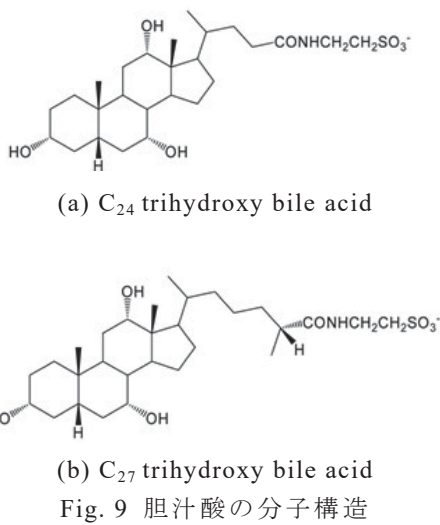


Fig. 9 胆汁酸の分子構造

疾患研究においても非常に重要なマーカーとされている 3)。また、ATP 等の物質と比較して死後変化の少ない分子としても知られている。2 つの胆汁酸の分布を比較することによりメダカにおける胆汁酸合成の経路や代謝異常や各種病態、環境からの影響における胆汁酸分布の変化をとらえ将来的にメダカを用いて肝臓を中心とした疾患を検討できる可能性が示唆された。

#### 4. 超音波照射に伴う心臓の期外収縮の誘発

近年、ARFI (Acoustic radiation force impulse) などの音響放射力を利用する超音波のイメージング技術が進んでいる。これは音響放射力によって軟部組織を微小変化させ、組織の歪から生じるせん断波の速度を測定し、組織の硬さを評価する技術である。この技術は主にびまん性肝疾患等の消化器領域や乳癌の診断において有用性が示されているが、心筋の硬度測定が心筋梗塞の診断において有用な情報を提供する可能性があり、循環器領域への応用が期待されている。このような技術では従来の超音波診断装置より持続時間が長く、強度が大きい超音波パルスが使用されている。日本国

内では超音波診断装置の音響出力の安全基準として  $I_{spta,3} \leq 720 \text{ mW/cm}^2$  かつ  $MI \leq 1.9$  が設定されている。しかし、ARFI などの技術で用いられる強力な超音波パルスではその規制範囲内であっても生体への影響が懸念される。このことから、ARFI などの技術に用いられる超音波パルスによる生体への影響を評価し、超音波の安全性について検討する必要がある。

また、治療用高強度集束超音波照射領域中に超音波造影剤のマイクロバブルとその残存物が存在する場合、キャビテーションの発生及び温度上昇が増強されると報告されている<sup>4,5)</sup>。しかし、ARFI 等の診断用の超音波強度レベルでの生体作用の増強については明らかではない。そこで、本研究では超音波造影剤投与後の超音波照射による生体への影響を明らかにする為に、ウサギを用いた動物実験において心臓へ超音波を照射し、心電図波形の期外収縮の発生頻度の割合から、造影剤の有無による期外収縮誘発の評価を行った。

#### 4.1. 超音波診断装置の安全基準

$I_{spta}$  は超音波バーストを照射したときの音場中で最大強度となる焦点における時間平均値であり、式 (1) で表される。

$$I_{spta} = \frac{1}{T} \int_T i(t) dt$$

$$= \frac{1}{T} \int_T \frac{p^2(t)}{\rho c} dt \quad [\text{mW/cm}^2] \quad (1)$$

ここで、 $T$  はバースト波の照射間隔、 $i(t)$  は超音波強度、 $p(t)$  は瞬時音圧、 $\rho$  は媒質中の密度、 $c$  は媒質中の音速である。生体内の軟部組織における減衰は平均で  $0.54 \text{ dB/cm/MHz}$  程度である。そのため実際より少ない値で仮定することで、より安全な基準を定めることができる。そこで生体内の超音波減衰を  $0.3 \text{ dB/cm/MHz}$  と仮定し計算したものを  $I_{spta,3}$  という。MI はキャビテーションの原因となる超音波負音圧の影響を表す。MI は式 (2) で表される。

$$MI = \frac{p_{r,a}(z_{sp})}{\sqrt{f_c}} \quad (2)$$

$f_c$  はパルス波の中心周波数 [MHz]、 $p_{r,a}$  はパルス強度積分値が最大となる点  $z_{sp}$  における生体の減衰を考慮した超音波の負音圧 [MPa] である。

#### 4.2. 実験方法

図 10 に、実験系および超音波照射時のウサギの画像を示す。日本白色種ウサギ (3kg, オス) を全身麻酔下に仰臥位とし前胸部と腹部を除毛した。第 II 誘導心電図をモニターし、ウサギの心電図波形から R 波を検

出した。Bモードで心臓を観察し、ARFI照射部位を①洞房結節、②房室結節、③左室の3点とした。焦点深度はそれぞれ①20 mm、②30 mm、③10 mmとした。不整脈の頻度と形状を造影剤投与の有無で比較・観察した。造影剤は Sonazoid®を使用し、静脈注射2分後にARFI照射を行った。照射条件は周波数 5.2 MHz、パルス持続時間 1 msec、照射回数 30 回、照射間隔は脈拍3回に1回、R波から 200 msecとした。

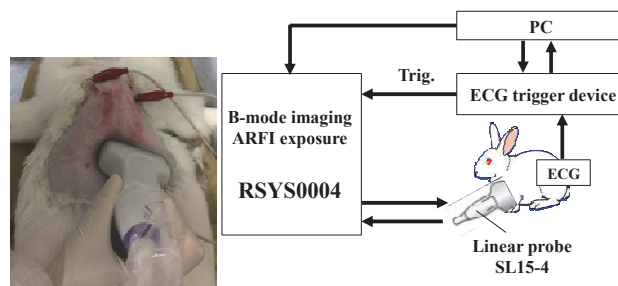


図 10 超音波照射システム

### 4.3. 実験結果および考察

図 11 に先行研究において得た期外収縮発生頻度の結果を示す。縦軸が期外収縮発生頻度、横軸の数字はそれぞれ異なるウサギ個体を示す。同図からウサギ個体によっては超音波照射を行っても期外収縮は誘発されていないことが分かる。これは先行研究では、超音波が照射されている心臓の部位を特定するためのリアルタイムモニタリングが出来なかった為に照射部位にずれが生じていたと考えられる。

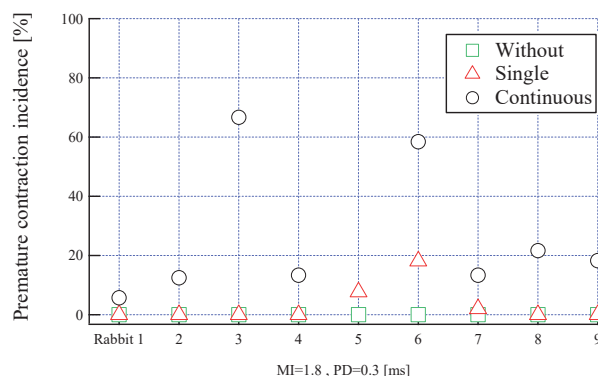


図 11 Sonazoid®投与による期外収縮

図 12 に RSYS0004 を用いて得た B モード画像を示す。本実験系ではこの様に照射部位をモニタリングしながら ARFI 照射を行うことが出来るため、先行研究に比べ、より精密に心臓の照射部位を設定することが可能となった。それぞれの焦点深度での MI は焦点深度 20 mm の時 1.17, 30 mm の時 0.84, 10 mm の時 1.15 であった。図 13 にこの実験系を用いた際の結果を示す。縦軸が期外収縮の発生率で横軸が照射部位である。またそれぞれの照射部位ごとに Sonazoid®投与前後による結果の違いを示した。結果からどの部位においても、Sonazoid®なしの場合期外収縮の発生はみられなかった。また Sonazoid®投与後では焦点深度 20 mm, 30 mm, 10 mm いずれの条件でも期外収縮が発生していた。Sonazoid®が存在する場合に期外収縮が生じた理由として Sonazoid®が超音波照射に伴い心筋表面で崩壊することにより、微細孔を生じさせ、それにより細胞膜の透過性やイオンの流入を一過性的に増加させたためだと考えられる。本実験の MI は音響出力の規制範囲内のレベルであるため、この条件で期外収縮が発生したことは安全上問題があると示唆される。

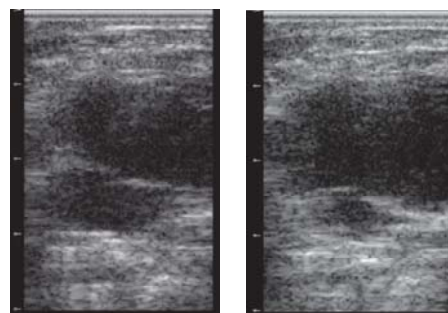


図 12 ウサギ心臓の B-mode 画像。

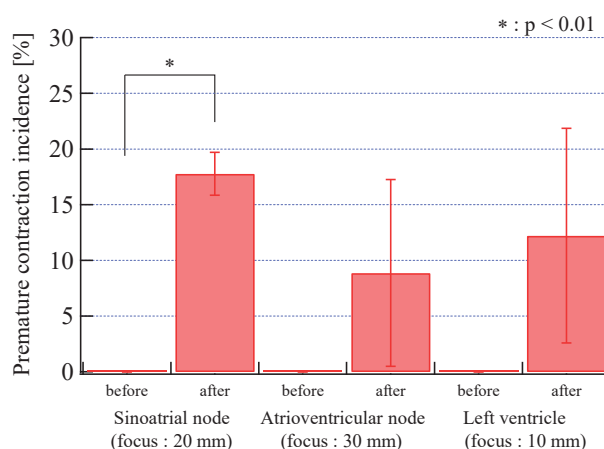


図 13 超音波照射部位と期外収縮頻度の関係。

## 5. まとめ

### 5.1. メダカ胚を用いたプロテオーム変動解析

超音波照射されたメダカ胚を対象にプロテオーム解析を行った。変動タンパク質として同定された AHCY B-like という酵素を Western Blotting 法により検証した結果、超音波照射されたメダカ胚の AHCY B-like は、非照射のものより高い分子量の位置に反応が確認された。この事実より、AHCY B-like の酵素タンパク質は超音波照射により構造が安定化されることが考えられ、胚発生への影響が示唆された。またこの酵素タンパク質は、メチオニン代謝の中核を担う酵素であり、AHCY B-like の安定化に伴うメチオニン代謝への影響が今後の検討すべき課題となると考えている。

### 5.2. メダカの代謝のイメージング質量分析

メダカ成魚を対象にイメージング質量分析を行った。その結果、種々の低分子代謝物の可視化に成功し、2種類のメダカ胆汁酸の局在を明らかにすることができた。今回の結果はメダカを用いた代謝疾患研究の基礎とし、より多種の代謝物の可視化へも発展させる予定である。

### 5.3. 超音波照射に伴う心臓の期外収縮の誘発

ウサギを対象に造影剤投与後の超音波照射による生体への影響を確認する為、心臓の期外収縮誘発の観測を行った。その結果、造影剤が存在する場合に安全基準の範囲内の超音波出力であるにも関わらず、期外収縮の発生を認めた。本実験において致命的な不整脈は認めなかったものの、音響出力の規制範囲内の出力であるにも関わらず期外収縮が発生したことは安全上問題があると示唆される。その為、ARFI 照射を行う際に心臓が照射野に入る場合は期外収縮が誘発される可能性を念頭に置く必要があると考えられる。

## 文 献

- [1] Benjamine J.Cooper, *et al*, Suppression and Overexpression of Adenosyl homocysteine Hydrolase-like Protein 1 (AHCYL1) Influences Zebrafish Embryo Development. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, P.22471-22484, (2006) .
- [2] 高山光男, 2013. 現代質量分析学. 化学同人, 2 : 44-46
- [3] Takashi Shimada *et.al*. "Potential Implications for Monitoring Serum Bile Acid Profiles in Circulation with Serum Proteome for Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury/ Regeneration Model in Mice.", *Journal of proteome*, 2010.9.pp4490-4500
- [4] Dalecki D, *et al*. The influence of contrast agents on hemorrhage produced by lithotripter fields. *Ultrasound in Medicine & Biology* 1997;23:1435-9.
- [5] Barnett SB, *et al* . Recommendations on the safe use

# 超音波による生体組織の熱物性の測定と MR を用いたマルチモダリティイメージング

秋山 いわき<sup>†</sup> 辻本 祐加子<sup>†</sup> 稲垣 拳<sup>†</sup> 新井 慎平<sup>†</sup>  
新田 尚隆<sup>†1)</sup> 平井 都始子<sup>†2)</sup>

<sup>†</sup> 同志社大学超音波医科学研究センター 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

1) 産業技術総合研究所 〒305-8564 茨城県つくば市並木 1-2-1

2) 奈良県立医科大学 〒634-0813 奈良県橿原市四条町 840

E-mail: <sup>†</sup> iakiyama@mail.doshisha.ac.jp, 1) n.nitta@aist.or.jp, 2) thirai@naramed-u.ac.jp

キーワード 超音波加温, 超音波パルスエコー法, MRI 同時撮像, 音速温度依存性, 生体熱輸送方程式

## 1. はじめに

生体軟部組織の音速範囲は 1400~1600 m/s であり, ±10% 以下の変動である. 音速値によって生体内部の組織性状診断を行うためには, 生体内部の音速値を 10% 以下の精度でかつ in vivo で測定する必要がある. 一方, 音速は温度に依存して変化し, その温度変化率は組織の状態によって大きく変化する<sup>1)</sup>. したがって, 温度変化率を in vivo で推定することができれば, 超音波による組織性状診断を期待できる<sup>2)</sup>. 本研究は, 超音波照射により生体内部を短時間加温し, その温度上昇に伴う音速変化を超音波パルスエコー法で推定し, 音速変化率から組織性状診断のためのパラメータを提案し, その有効性を確認することを目的としている. 音速変化率の測定精度は, 音速の予測値の精度に依存するため, 予め音速を推定しておくことが精度向上につながる. そこで, 本研究では, MR と超音波の同時撮像によって音速推定を試みる.

## 2. 方法

### 2.1. 超音波加温による生体組織の熱物性の測定

#### (1) 音速変化率

生体内部へ向けて超音波を照射すると生体組織中で熱が発生して, 温度が上昇する. 一方, 超音波が生体組織中を伝搬する速度は温度に依存し, この音速の温度変化率は組織によって大きく異なる. したがって, 音速の温度依存性を利用すると, 組織性状診断の情報が得られる可能性がある. したがって, 超音波加温による音速の時間変化率を測定できれば, これを組織性状診断のパラメータとして利用できる. 超音波加温による音速変化率  $\Delta c/c$  は生体熱輸送方程式を用いると, 次式で与えられる<sup>3)</sup>.

$$\frac{\Delta c(x)}{c(x)} = \frac{dc}{dT} \frac{2alt_h}{c(x)C_v} \quad (1)$$

ここで, 振動子からの距離  $x$  における生体組織の減衰

定数を  $\alpha$ , 音速  $c(x)$ , 体積熱容量  $C_v$ , 音速の温度係数  $dc/dT$ , 超音波強度を  $I$ , 照射時間  $t_h$  とする.

#### (2) 実験

超音波照射によって生体組織を加温して, その時の音速変化率を超音波パルスエコー法で計測するための超音波を送受信するための振動子を試作した. この振動子はリング形状の加温用振動子と同軸円形の音速変化率測定用の振動子を一体化した集束型プローブである. 実験システムを図 1 に示す. また, 実験条件を表 1 に示す.

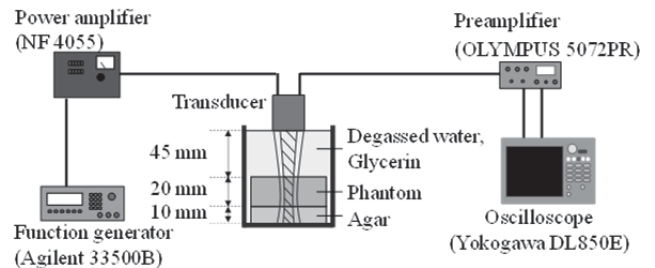


図 1 実験システム

表 1 実験条件

	周波数	負音圧ピーク	パルス持続時間	振動子サイズ	焦点距離
加温用超音波	3.2 MHz	1.0 MPa 以下	50 ms or 100ms (照射時間)	外径 28mm 内径 10mm	6cm
測定用超音波	5.2 MHz		10 $\mu$ s 以下	直径 10mm	6cm

被測定対象として, 生体組織模擬物質 (TMM:tissue mimicking material) ファントム, 豚の筋肉組織と脂肪組織を用いた. それぞれの各物性値の参照値として表 2 に示した.



表2 生体試料の物性値

試料	音速 m/s	密度 kg/m <sup>3</sup>	減衰係数 Np/cm	体積 熱容量 J/cm <sup>3</sup> /°C
TMM	1450	1050	0.18	3.9
豚筋肉組織	1585	1135	0.44	3.7
豚脂肪組織	1454	920	0.67	2.0

2.2. MR と超音波の同時撮像による音速推定

(1) 音速の推定方法

MRIでは生体内部の分布を3次元の空間座標として得られる。一方、超音波によるエコー画像では距離と超音波の伝搬時間の情報が得られる。両者を同時撮像することによって、MRIでは生体内部の距離を、超音波エコー画像では超音波の伝搬時間を得られるので、両者により音速を推定できる。この時、両者のモダリティで得られた画像の位置と方向を一致させる必要がある。そこで、本研究では超音波プローブにMRI撮像マーカーを取り付けて、MRIでプローブマーカーを撮像することによって、超音波撮像断面とMRI撮像断面を一致させる。

(2) MRI マーカー埋込超音波プローブ

本研究で開発したMR高磁場環境下で利用可能な非磁性材料で構成された超音波プローブとMRIマーカーを図2に、プローブの仕様を表2に示す。

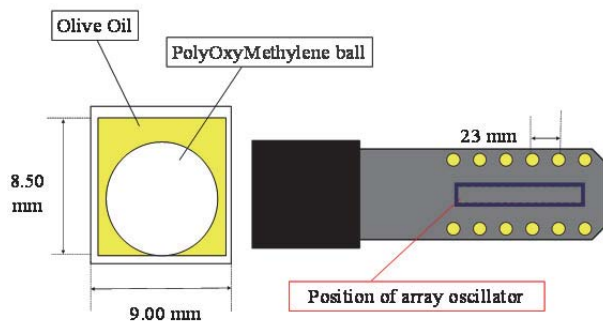


図2 超音波プローブとMRIマーカー

表2 プローブの仕様

圧電素子	中心周波数	素子ピッチ	素子サイズ	素子数	音響レンズ
1-3コンポジット	8 MHz	0.30 mm	0.26mm × 8.0mm	192	焦点距離 20mm

開発したプローブを接続して超音波RFエコー信号を取得するためのイメージング装置とその仕様を図3に示す。MRIと超音波を同時撮像すると両者に電氣的

雑音が混入するので、図3のように超音波装置をMRI制御室に配置し、プローブとの接続を壁に埋め込んだコネクタを介することとした。MRIは日立製 Echelon Vega 1.5Tである。

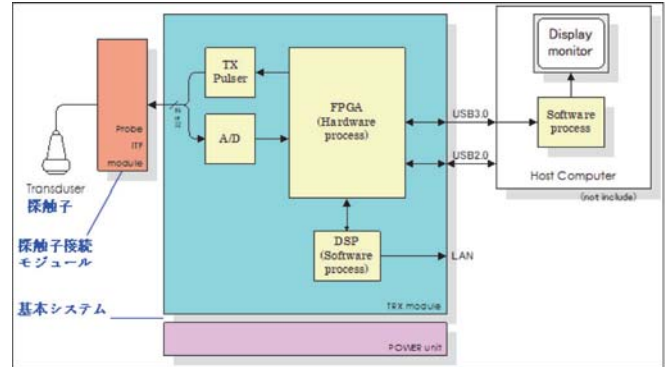


図3 超音波エコーRFデータ取得装置

表3 イメージング装置の仕様

プローブインターフェース [ch]	同時送受信チャネル [ch]	A/D分解能 [bits]	サンプリング周波数 [MHz]	キャプチャメモリ [MB/ch]
256	128	12	31.25	256

3. 実験結果と検討

3.1. 超音波加温による生体組織の熱物性の測定

(1) 試料の音速変化率の測定結果

測定試料の音速の変化率  $\Delta c/c$  を測定した結果を表4に示す。

表4 音速変化率

試料	豚筋肉組織	豚脂肪組織
音速変化率	$0.27 \times 10^{-3}$	$-2.4 \times 10^{-3}$

(2) 音速変化率から温度上昇の推定

音速変化率から温度上昇を推定するためには音速の温度係数  $dc/dT$  が必要であるので、これを測定する必要がある。インキュベータ内で温度範囲 24~35°Cで測定された、それぞれの試料の温度係数と計算された温度上昇値を表5に示す。

表5 音速温度係数と推定温度上昇値

試料	豚筋肉組織	豚脂肪組織
音速温度係数	1.2 m/s/°C	-3.1 m/s/°C
温度上昇値	0.33 °C	1.1 °C

(3) TMMの温度上昇曲線の測定

TMMについては、100ms照射100ms照射休止を繰り返しながら超音波加温した時の温度上昇曲線を測定

した結果を図4に示す。なお、TMM 音速の温度係数はインキュベータ内で測定した結果、 $1.6\text{m/s/}^\circ\text{C}$ であった。

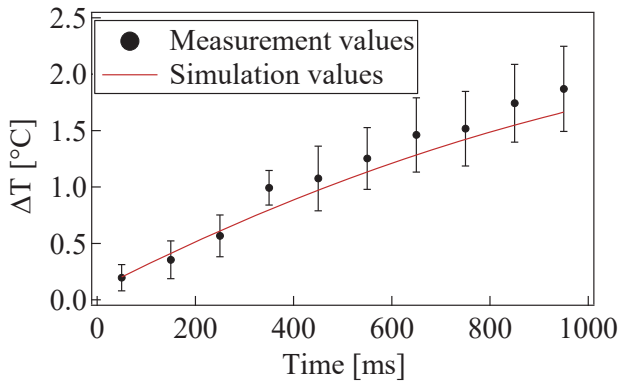


図4 超音波加温による TMM の温度上昇曲線

図4のように、測定された温度上昇曲線は、有限要素法によって計算された<sup>4)</sup>値とよく一致している。

#### (4) 物性値の比較

表4に示された音速変化率から超音波強度で補正された物性値を比較して表5に示す。表5に示したように推定値は文献による参照値と誤差率 10%以下で一致した。

表5 物性値の比較

試料	音速変化率 $\frac{\Delta c}{c}$	超音波強度	推定値 $\frac{\Delta c}{c} \left( \frac{\partial c}{\partial T} t_h \right)^{-1}$	参照値 $\frac{2\alpha l}{c(x)C_p}$
豚筋肉組織	$0.27 \times 10^{-3}$	10.5 W/cm <sup>2</sup>	$2.3 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C/m}$	$2.0 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C/m}$
豚脂肪組織	$-3.1 \times 10^{-3}$	14.2 W/cm <sup>2</sup>	$7.7 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C/m}$	$6.5 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C/m}$

### 3.2. MR と超音波の同時撮像による音速推定

#### (1) 下腿部の音速推定

MRI の撮像時間が長いので、呼吸等による体動の影響を受けない下腿部を対象として、音速推定を行った。MRI と同時撮像された超音波エコー画像を図5に示した。2つの画像から推定された皮下脂肪組織と筋肉組織の音速を表6に示す。推定値の誤差率はおよそ5-7%となった。

表6 推定された音速

組織	平均値 [m/s]	標準偏差 [m/s]
脂肪組織	1550	100
筋肉組織	1480	80

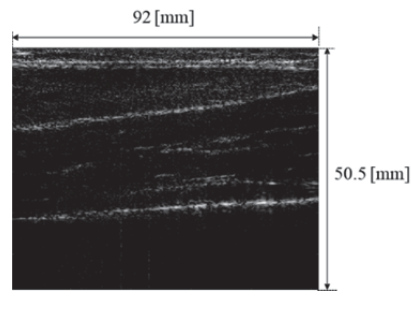
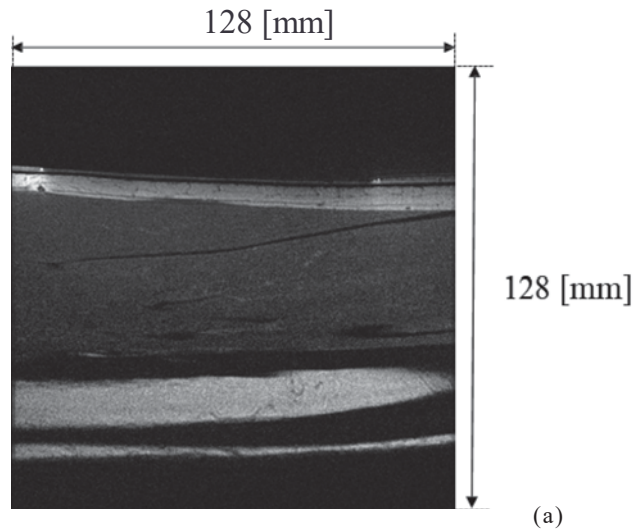


図5 下腿部の MRI 画像(a)と超音波エコー画像(b)

#### (2) 推定された音速分布を用いた画質改善

MR と超音波の同時撮像によるマルチモダリティ・イメージングによって、生体内部の音速分布を予め推定することができれば、超音波エコー画像の画質を改善することができる。一般的な超音波エコー画像の分解能向上の技術として、遅延時間制御によるダイナミックフォーカスと送信多段フォーカスが用いられている。この手法は映像化対象の音速分布が必要であるが、実際には、音速変動の範囲が 10%以下であることから、生体内部組織の平均値である  $1540\text{m/s}$  と仮定してフォーカスのための遅延時間が計算される。したがって、音速が平均値よりも 10%に近い変動がある場合では、分解能低下と画質劣化を伴う。特に、脂肪組織の音速は 10%近い変動があり、画質劣化を伴うことが知られている。そこで、マルチモダリティ・イメージングの応用の一つとして、推定された音速分布を用いた遅延時間の補正を行って、超音波エコー画像の画質改善を検討する。

対象は比較的体動の影響を受けにくいヒト頸部である。プローブと頸部体表面との間に脂肪層を模擬した音響カプラを挟んだ。撮像されたヒト頸部の MRI 画像を図6に示す。音響カプラの音速は  $1410\text{m/s}$  であった。同時撮像された超音波 RF エコーデータから従来手法



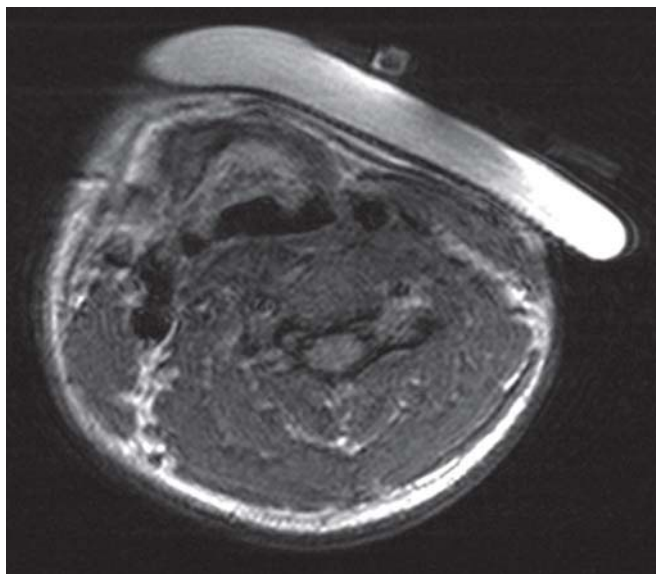


図6 ヒト頸部のMRI画像

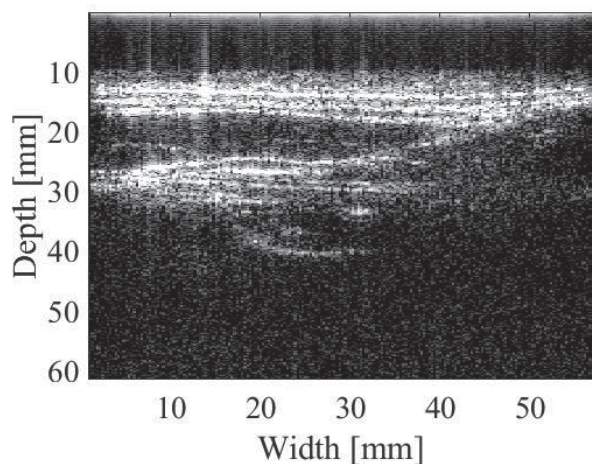


図7 従来手法による超音波エコー画像（音速分布の補正なし）

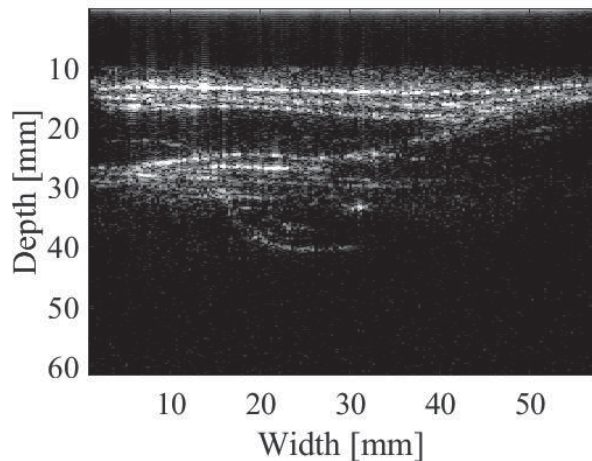


図8 音速分布による補正を行った超音波エコー画像

で構成された画像を図7に示す。音速を 1540m/s で一定と仮定して遅延時間を求めて構成された画像である。

次に、MRI画像から推定された音響カプラ領域（脂肪層を模擬した領域）を抽出して、遅延時間を計算して推定された画像を図8に示す。図7と図8を比較すると、画質が改善されていることがわかる。

#### 4. まとめ

生体組織の熱物性の一つである音速の温度依存特性に着目した超音波組織性状診断の可能性について検討した。超音波照射時間 100ms あるいは 50ms の加温によって世界的な安全な基準<sup>5)</sup>である音圧 1MP 以下、温度上昇 1.5 度以下で豚の筋肉組織と脂肪組織の測定を行ったところ、誤差率 10%以下で熱物性特性を推定することができた。生体内部の音速推定を行うと、さらに測定精度が向上することから、MRIを用いた超音波の同時撮像、すなわちマルチモダリティ・イメージングシステムを構築して、実験を行った。その結果、音速推定精度 5-7%で推定が可能であった。また、画質改善への応用としてヒト頸部へ適用した結果、画質改善を確認した。

#### 文献

- [1] U.Techavipoo, T.Varghese, Q.Chen, et al., "Temperature dependence of ultrasonic propagation speed and attenuation in excised canine liver tissue measured using transmitted and reflected pulses", J Acoust Soc Am., 115, pp.2859-2865, 2004.
- [2] Mano K, Tanigawa S, Hori M, et al., "Basic investigation on acoustic velocity change imaging method for quantitative assessment of fat content in human liver", Jpn. J. Appl. Phys., 55, 07KF20, 2016.
- [3] Simon C, VanBaren P, Ebbini ES., "Two-dimensional temperature estimation using diagnostic ultrasound", IEEE Trans UFFC, 45, pp.1088-1098, 1998.
- [4] Nitta N, Ishiguro Y, Sasanuma H, et al., "Experimental system for in-situ measurement of temperature rise in animal tissue under exposure to acoustic radiation force impulse", J Med Ultrasonics, 42, pp.39-46, 2015.
- [5] Harris GR, Church CC, Dalecki D, et al., "Comparison of thermal safety practice guidelines for diagnostic ultrasound exposures", Ultrasound Med Biol., 42, pp. 345-357, 2016.

# 生物による超音波利用技術

飛龍 志津子 小林 耕太

同志社大学超音波医科学研究センター 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

同志社大学生命医科学部 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

E-mail: shiryu@mail.doshisha.ac.jp, kkobayas@mail.doshisha.ac.jp

キーワード ドプラシフト補償行動, 生物ソナー, ドプラ血流計測, 混信回避行動

## 1. はじめに

テーマ3では、コウモリの高度なソナーシステムや生物による様々な音波利用の実態を行動学、生理学、工学的見地から明らかにし、これからの新たな医療技術の設計指針等に役立つ知見を提供することを目的としている。特に、超音波医用診断技術とも密接にかかわるコウモリのドプラ計測手法に関するアルゴリズムや、信号混信状況での適応的反応などに着目し、様々な行動実験を実施してきた。また一部のコウモリが行う「補償行動」アルゴリズム<sup>[1]</sup>に着目し、超音波ドプラ血流計測技術への応用展開に向けた実験的検討にも注力し、提案手法の有用性を実験的に明らかにしてきた。

本最終報告では、当該プロジェクトによって実施したコウモリの補償アルゴリズムを応用した超音波ドプラ計測手法の提案内容並びに検証結果について報告する。またさらにコウモリを用いた行動学的実証実験並びに群飛行や雑音提示環境などの音響的混信環境におけるコウモリの超音波利用に関する適応行動についても結果を報告する。

## 2. 生物補償行動アルゴリズムを用いた超音波イメージング技術の開発

### 2.1. ドプラシフト補償

一部のコウモリは、飛行に伴うドプラ効果を補償すべく、送波信号の周波数を逐次変化させ、エコーの周波数を一定に維持する「ドプラシフト補償」<sup>[1]</sup>を行う(図1)。コウモリの聴覚系はごく限られた周波数帯域に高い感度を持つ。飛行中、コウモリは自らの進行方向正面にある静止物体からのエコーに対して、ドプラシフト補償を行う。これによって、獲物である昆虫の動きや、さらにはその羽ばたきによって生じるドプラ周波数を感度よく検知できるのである。また同じ行動は音圧に対しても見られ、エコー音圧補償行動と呼ばれる<sup>[2]</sup>。このような補償アルゴリズムは、送信信号の特徴を一定に、受信側の信号変化を扱う従来の多くのセンシング手法とは、真逆の設計思想をコウモリが有することを意味している。

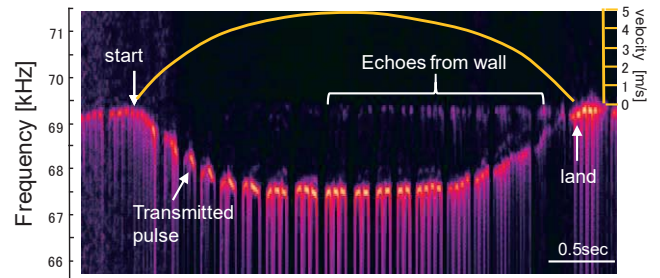


図1 コウモリのドプラシフト補償行動。飛行中、コウモリは送信する超音波の周波数を飛行速度に応じて低下させ、受け取るエコーの周波数を一定に保つ

一方、生体組織内を超音波パルスが伝搬すると、周波数に依存した生体内の伝搬減衰によって、エコーの中心周波数が低域側へシフトする<sup>[3]</sup>。そのため送波パルスの中心周波数で直交検波をすると、得られたエコー信号の信号対雑音比(SNR)が低下することに繋がる(図2)。携帯型の超音波診断装置等では、直交検波を受波信号のサンプリングと同時に進行方式が採用されることがあるため、このような周波数依存減衰によるSNRの低下が懸念される。

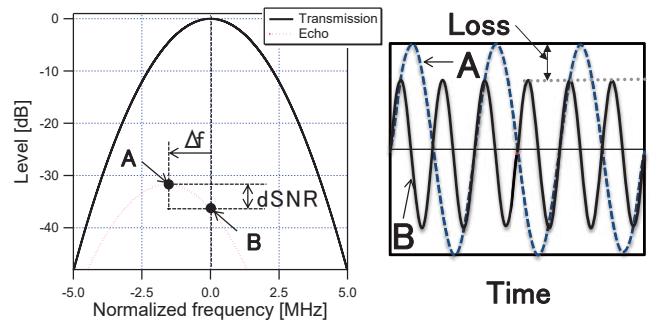


図2 周波数依存減衰による伝搬エコーの周波数特性の例(左)。中心周波数の低域シフトによりAD変換時にSNRが低下する(右)

そこで本研究では、この課題に対して、上述するコウモリの補償アルゴリズムを応用したドプラ計測手法の提案及び検証を進めてきた<sup>[4]</sup>。すなわち、受波信号

の中心周波数のシフト量をもとに、送波信号の中心周波数をあらかじめ補償して送波する、コウモリと同じドブラシフト補償アルゴリズムを組み入れた手法である。これまでのところ、血管を模擬したチューブの中を流れる散乱体からのエコーからドブラ周波数の計測を行ったところ、ドブラ・スペクトラムから算出した期待値は、補償によって上昇し、SNRの改善が期待される結果を得ている<sup>[5]</sup>。すなわち直交検波周波数を変えることなく、ドブラ周波数の測定時におけるSNRの低下を避けることができる可能性が示された。

## 2.2. FM 信号を用いたドブラ周波数の計測

コウモリは用いる超音波の時間周波数構造の違いから、大きくFM型とCF-FM型に分けられる。いずれのコウモリも、エコーロケーションには短い時間に周波数が変調するFM音を用いることが特徴としてあげられる。そこで本研究では、コウモリが使用するFM音にも着目し、ドブラ計測時の送信信号を周波数変調波とした上で、コウモリの周波数補償行動アルゴリズムを取り入れた超音波ドブラ血流計測についての検討を行った。

まずFM信号を送信した際の、エコーの中心周波数のシフトを実験的に計測する。超音波診断装置(Ula-Op, University of Florence)とセクタ型プローブ(PA230E, 日立メディコ社,  $f_c = 2.1$  MHz), 生体模擬ファントム(減衰定数: 0.7 dB/cm/MHz, 厚さ: 25 mm)を用いて、周波数1~3 MHzに下降するchirp信号のエコーを計測した。繰り返し周波数(PRF) 2 kHzで印加し、プローブの正面に設置した反射対(真鍮)からの受波信号のスペクトラムから、中心周波数のシフト量を計測し、補償後の最適周波数を決定する。具体的には、相互相関処理によりターゲットとする流速部からのエコーを特定し、周波数スペクトルを算出し、用いたプローブの中心周波数とエコーのピーク周波数との差を補償する。この際、送信信号と同じ周波数帯域におけるエコーエネルギーの積分値を指標とし、その大きさが最大になるように補償量の推定を進めた。その結果、今回用いた生体模擬ファントムにおける最適補償周波数は0.5 MHzとなった(図3)。

次に脱気水を満たした水槽内に血管を模擬したチューブを水平から15°傾けて通し、チューブ内にはデキストラン(Sephadex®, GEヘルスケア)を含んだ脱気水を速度一定で流した。チューブ内の流速は、直流電源(PMX18-5A, 菊水電子工業株式会社)によりリングポンプ(アクアテック)に加える電圧で制御した。設定流速から推定されるドブラ周波数は $4.2 \times 10^2$  Hzである。チューブ内に流れるデキストランからのエコー信号を、超音波イメージング装置に接続したセクタ型

プローブを用いて計測した。印加した信号は周波数変調波(3.0~1.0 MHz / down chirp)である。

使用した生体模擬ファントムは減衰定数: 0.70 dB/cm/MHz, 厚さ: 60 mmである。先ほど確認した最適補償周波数を基に送波信号の周波数を決定し、実験を行った。

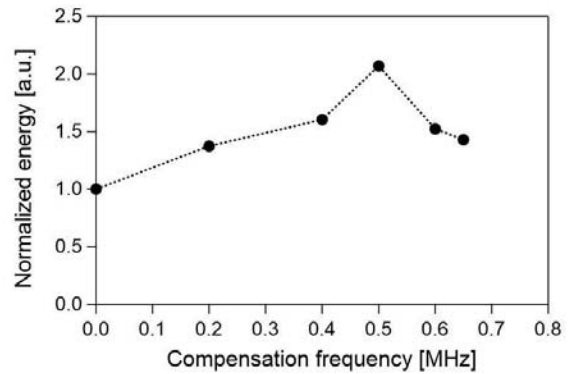


図3 FM信号使用時における周波数補償量とエコー音圧の関係

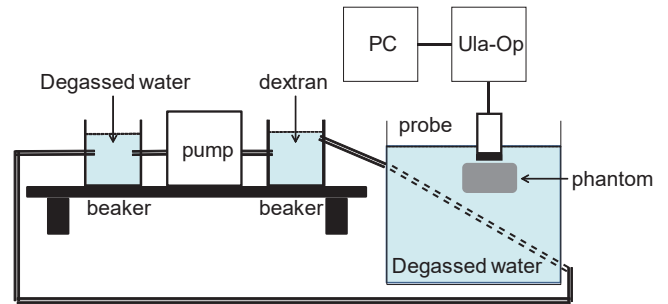


図4 模擬血管を用いたドブラ周波数計測の実験系

図5は周波数を補償する前のドブラスペクトルである。送信信号としては1~3 MHzのFM信号と、プローブの中心周波数である2.1 MHzの単一周波数の信号を用いた(2.5us)。これよりFM信号の方が、ドブラスペクトルがより明確に出ていることがわかる。20~420 Hz内におけるドブラ・スペクトラムを基に算出したエコーエネルギーは、FM信号を用いることで約24%上昇した。この要因としては、FM信号を用いることで、クラッタであるチューブを空間的に弁別しやすくなり、0 Hz付近に現れるスペクトル成分が減少している点が挙げられる。その結果、ターゲットエコーからのドブラ周波数の期待値が上昇し、SNRが改善されたと考えられる。また図5で示す結果より、周波数補償を行ったことにより、20~420 Hz内におけるドブラ周波数のエネルギーは周波数補償前後で14%上昇していることを確認した。



表 1 平均ドプラ周波数

Transmission waveform	Average frequency [Hz]
Sin wave / 2.1 MHz	$1.23 \times 10^2$
Chirp wave / 1 ~ 3 MHz	$1.77 \times 10^2$
Chirp wave / 1.5 ~ 3.5 MHz	$1.83 \times 10^2$
Theory	$4.20 \times 10^2$

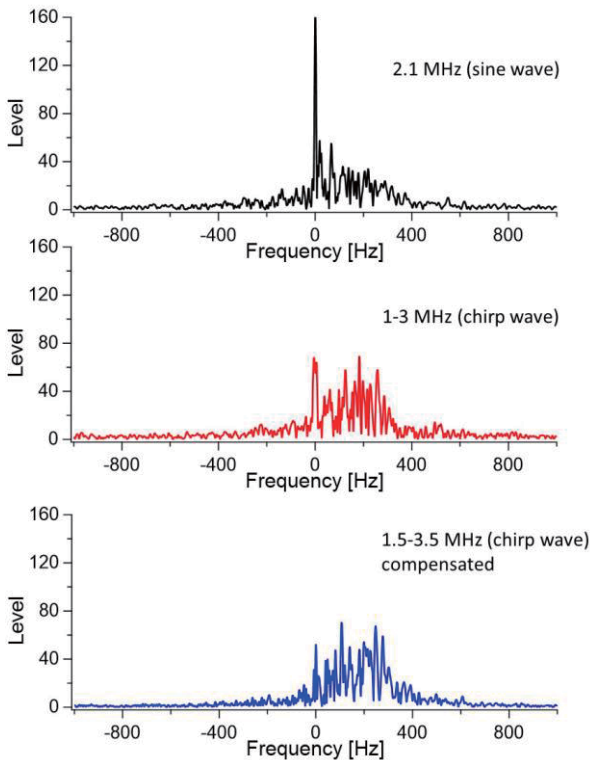


図 5 模擬血管からのドプラ・スペクトラム

次にそれぞれ 30 回の計測結果を図 6 に示す．平均ドプラ周波数を表 1 にまとめた．これより周波数補償による平均周波数の上昇はわずかであるが確認できた．

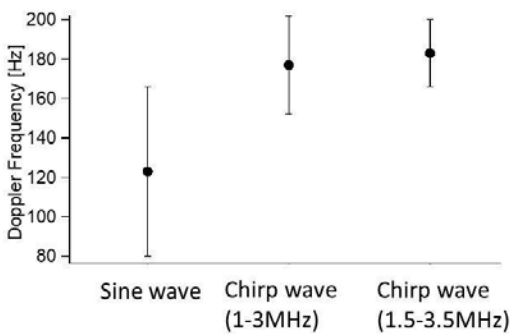


図 6 平均ドプラ周波数の変化

周波数補償による SNR 改善は、信号の広帯域化によってより効果が期待されることがわかっている<sup>[4]</sup>．今後、広帯域なプローブが一般化していくことで、周波数依存減衰に対応する SNR 改善の手段の一つとして、本提案手法の効果が期待される．

### 3. ノイズ環境下におけるコウモリの音響制御

#### 3.1. 妨害音提示実験

コウモリのノイズ耐性に関する超音波運用の実態を調べるため、コウモリを用いた飛行実験を通じた検討も行った．ノイズ環境下におけるコウモリの音響制御を調べるため、実験室内で飛行するコウモリに対して、ラウドスピーカより妨害音を提示し、その際のコウモリの行動を計測・分析した．用いたコウモリはニホンキクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum nippon*) で、鼻孔から超音波を放射する．基本周波数は約 30 kHz 付近で、数十ミリ秒の周波数定常部の前後に、数ミリ秒の短い FM 信号を伴う CF-FM 型パルスを発する (図 7 上図)．また、基底音は弱く、超音波は第 2 倍音が強く放射される．CF-FM 型のコウモリの脳内には、基底音と第 2 倍音の組み合わせ音刺激に対して反応する神経細胞が確認されており<sup>[6]</sup>、基底音は自身のみが聴取できることから、エコーに第 2 倍音を用い、その組み合わせ音刺激に対してのみ反応する機序により、他個体との信号混信を時間窓により回避していると考えられている．

本実験では、CF-FM 型コウモリの超音波パルスの倍音構造に着目し、妨害環境を構築した．具体的には、① 2 種類の帯域制限ノイズ (30 - 35 kHz, 65 - 70 kHz) と、② 定常部の周波数が異なる二種類の CF-FM 型信号 (CF= 66.5 kHz, 33.5 kHz) を妨害音として提示し、実験を行った (図 8)．妨害音を提示しない場合 (off) と妨害音を提示した場合 (on) でコウモリに 2 分間の繰り返し着地飛行を行わせ、妨害音が提示された際のコウモリの放射パルスの音響特性の変化を調べた．

実験は観測室 (9.0 × 4.5 × 2.35 m) をネットで区切った空間 (1.0 × 4.5 × 2.35 m) 内で行い、コウモリには自由飛行をさせた (図 7 下図)．空間の横に高さ 1.7 m で設置したスピーカ (PT-R7 III, PIONEER CORPORATION) 4 機から妨害音を提示することで音響混信環境を構築した．音声はコウモリの背部に搭載した小型ワイヤレスマイクロホンを用いて取得し、妨害音の有無によるコウモリの音声の変化を分析した．またマイクロホンには、観測室の壁からのエコーも観測される．コウモリのドプラシフト補償行動を観察するため、壁に向かって飛行する際にマイクロホンに観

測されたエコーの周波数を分析することで、妨害音呈示中のドプラシフト補償の精度についても検討を行った。

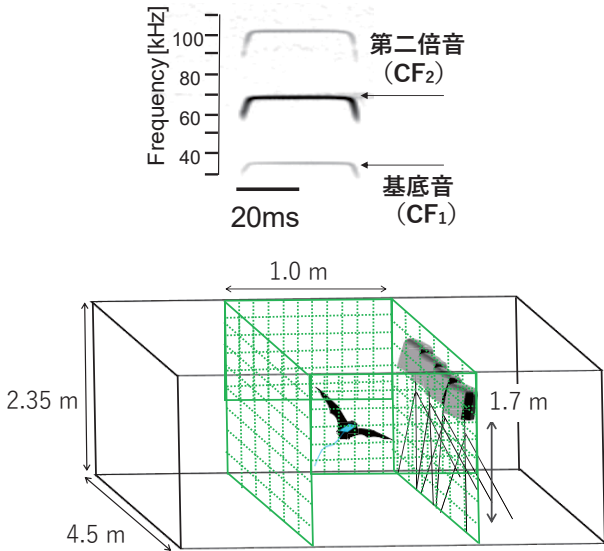


図 7 ニホンキクガシラコウモリの超音波（上）及び妨害音提示実験環境（下）

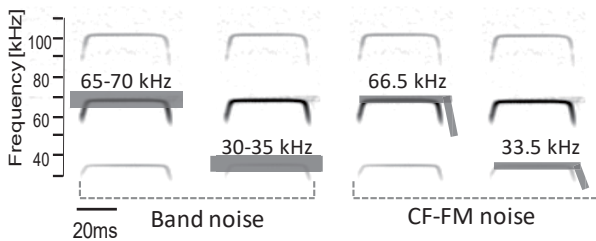


図 8 妨害音の種類

帯域制限ノイズ呈示・非呈示時におけるパルスの CF2 周波数、及びエコーの CF2 周波数の時間変化の一例を図 9A に示す。また、CF-FM 音を妨害音として呈示した際の一例を図 10A に示す。いずれの飛行でも、コウモリがパルスの周波数を変化させて、自身に届くエコーの周波数を一定に保つドプラシフト補償行動が確認できる。次に、各条件における CF2 周波数のエコーを図 9,10B にそれぞれ示す。これらの結果から、帯域制限ノイズ・CF-FM 型妨害音によらず、妨害音呈示時と非呈示時におけるエコー CF2 周波数の分散に有意な差は見られなかった。すなわち、コウモリは妨害音呈示環境下でも、精度を低下させることなくドプラシフト補償行動を行っていることがわかった。

これまでの研究で、2 個体を同時に飛行させた際におけるドプラシフト補償行動においても同様に、周波数補償の精度が変わらないことが報告されている<sup>[7]</sup>。本

報告においてより定量的な音響的干渉条件を構築した評価においても、コウモリがロバストなドプラ計測を実現していることが明らかとなった。

次に帯域制限ノイズ、及び、CF-FM 型妨害音の呈示・非呈示時における CF 長の変化を図 9C,10C にそれぞれ示す。これらの結果より、妨害音呈示時は、妨害音非呈示時に比べて CF 長が短くなるのがわかる。妨害音との時間的な重畳を回避するためと考えられる。

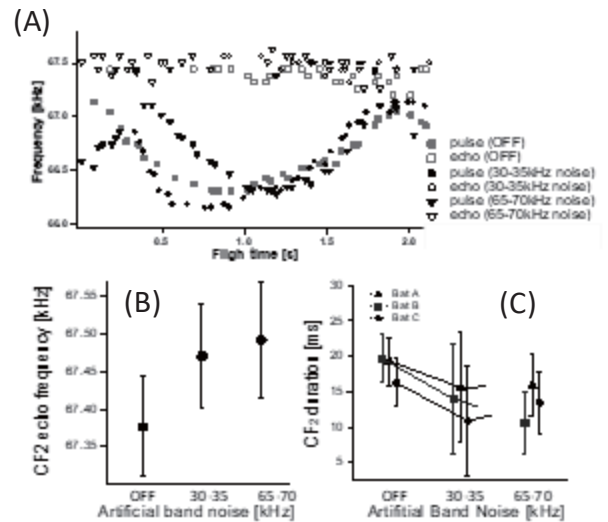


図 9 帯域制限ノイズ呈示時のコウモリの超音波パルスの周波数とエコーの周波数の時系列グラフ (A)、エコー周波数の平均値 (B)、CF 長の平均値 (C)

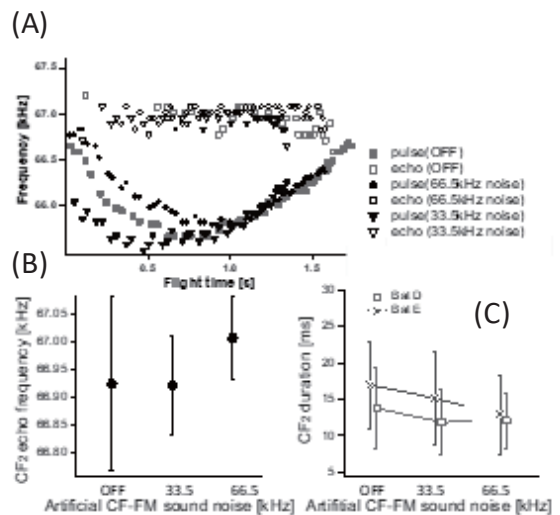


図 10 CF-FM 型妨害音提示におけるコウモリの超音波パルスの周波数とエコーの周波数の時系列グラフ (A)、エコー周波数の平均値(B)、CF 長の平均値(C)

さらに、倍音構造に着目し、基本音と第 2 倍音の CF 部の強さについて調べた。全パルスの最大音圧を基準として、妨害音呈示・非呈示時における CF1 と CF2 そ

それぞれの音圧を図 11 に示す．これより CF1 成分に妨害音(33.5 kHz)を重畳させた際にパルスの CF1 成分を僅かに強めて、一方 CF2 成分に妨害音(66.5 kHz)を重畳させると、CF1 成分を弱めていることがわかった．このことから、妨害音に対するマスキング回避のために、重畳する調波成分毎に、パルス音圧を独立して調節していることが示唆された．

基底音は弱く発声されることから、発したコウモリ自らが利用する音である．一方で第 2 倍音は強く放射され、エコーとして用いる．すなわち調波構造を用いるコウモリにおいて、基底音と第 2 倍音それぞれには異なる役割がある．またコウモリの脳内には基底音のパルスと第 2 倍音のエコーが対となった場合に処理する神経基盤があり、基底音と第 2 倍音との音圧比は重要な要素であることが考えられる．今回の実験より、コウモリが調波構造の各成分の比を調整し、妨害音によるマスキングを回避している可能性が示唆された．今後、調波構造に関するコウモリの超音波利用についても、詳しい検討を行っていく．

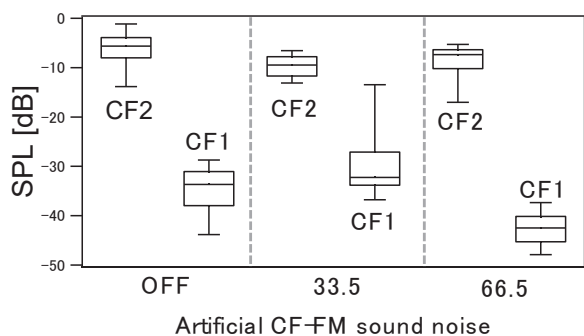


図 11 基底音と第 2 倍音成分の音圧の変化

### 3.2. 群飛行中のコウモリの超音波信号

次に音響混信環境として、実際に複数のコウモリを同時に飛行させ、各コウモリの超音波の変化を調べた．過去の研究では、飛行中のコウモリに音声を模擬した FM 音を呈示すると、妨害音との周波数重畳に応じて放射パルスの TF (Terminal frequency) 変化させることが報告されている<sup>[8]</sup>．このことから、コウモリは同時飛行時、自身の TF と他個体の TF との重畳を回避することが予想される．そこで、混信下で自身の音声を抽出するために、コウモリがどのように自身の放射パルスを変化させるかを検討した．そのために、小型 FM ワイヤレスマイクロホンを用いてグループで飛行する各コウモリの放射パルスを計測した．また、パルスを模擬した FM 信号を作成し、音響特性の変化に対し信号間類似度がどのように変化するかを評価した．

実験には、ユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) を用いた．ユビナガコウモリはエコーロケーションパ

ルスを口から放射する．パルスは 100 から 40 kHz に下降する FM 音である．19 個体を使用し、4 個体からなるグループを計 6 グループ作成した．

実験は、観測室 (9 × 4.5 × 2.35 m) をネットで区切った空間 (6 × 4.5 × 2.35 m) 内で行った．はじめに、グループの各コウモリを単独飛行させた．その後、グループの 4 個体を同時に飛行させた．最後に、再び各コウモリを単独飛行させた．小型 FM ワイヤレスマイクロホンを搭載することで、全個体の音声を分離して記録した．またコウモリの飛行は、観測室に設置した 2 台のビデオカメラ (MotionXtra NX8-S1, IDT Japan, Inc.) で撮影し、解析ソフト (DITECT DippMotion PRO version 2.2.2.0) を用いて 3 次元飛行軌跡を算出した．

同時飛行する 4 個体のコウモリの音声と飛行軌跡を計測することに成功した．また最も TF が近い個体との TF の差を  $\Delta TF$  と定義したところ、 $\Delta TF$  は単独飛行時の  $0.6 \pm 0.6$  kHz から、複数個体飛行時には  $1.2 \pm 0.6$  kHz に有意に増加した (図 12, Tukey's HSD test,  $P < 0.05$ )．

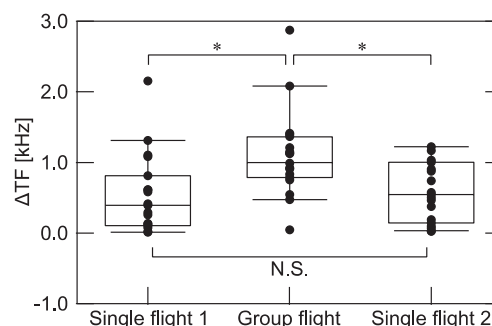


図 12 群飛行中の各個体の TF 差

次に確認された TF の変化が信号間類似度に及ぼす影響を調べるために、パルスを模擬した FM 音 (図 13a) と、そこから TF, IF (Initial frequency), Duration をそれぞれ変化させた信号との相互相関を行った．結果、半値半幅は、IF と Duration では約 8%であったが、TF は約 2%、つまりわずか 1 kHz であった (図 13c-d)．これより、TF のわずかな差が信号分離に有用であることが示唆された．さらに各コウモリが発する超音波の類似度を相互相関を用いて評価したところ (図 14)、群飛行中の方が類似度が有意に低下していることがわかった (図 15)．同時飛行する複数のコウモリの放射パルスを分離して計測し、それぞれの音響特性について検討した例はこれが初めてである．これにより、コウモリは複数個体飛行時に自身の TF を僅かに変化させ、他個体の TF との差を広げることで、お互いの信号間類似度を効果的に低下させていることが明らかとなった．コウモリのこのような超音波利用の側面から、



多くの超音波センシングが課題とする音響混信や信号分離に関する新たな知見に繋がることを期待している。

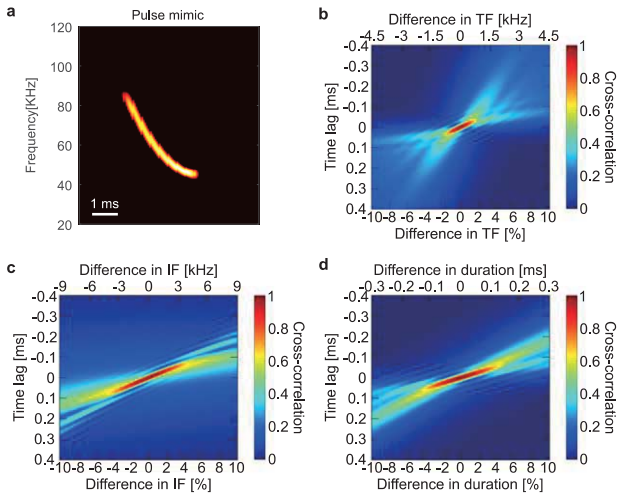


図 13 信号間の類似度評価. (a)コウモリの FM 信号を模擬した信号. (b-d)相互相関による信号の類似度評価. TF: terminal frequency, IF: initial frequency, duration: パルス長

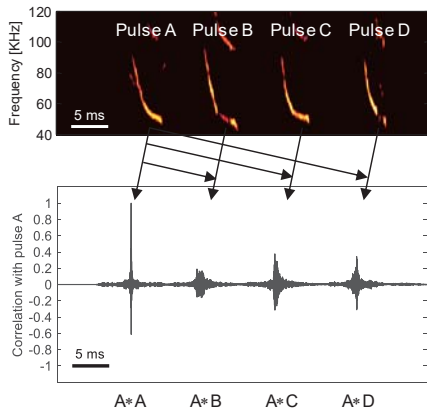


図 14 グループ飛行中のコウモリの超音波と相互相関波形

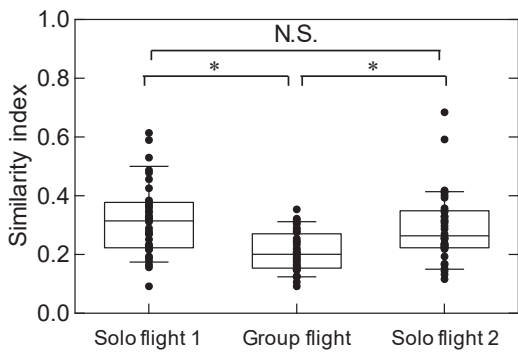


図 15 各個体間の超音波の類似度評価. コウモリの超音波の個体間類似度はグループ飛行中有意に低下.

#### 4. まとめ

本プロジェクトは、生物ソナーと呼ばれるコウモリの超音波利用の実態に学び、医療や工学分野への知見展開を目指して進めてきた。特に補償アルゴリズムは、様々なセンシングとの親和性も高く、医療超音波分野におけるドプラ計測における従来からの課題解決の一助となる可能性を示すことができた。今後、プローブの広帯域化が進み、簡易型で空間分解能の高い装置への応用展開が見込まれる中、生物が行うシンプルな発想に学ぶことで、新しい設計思想への着手が進むことが期待される。またコウモリが用いる広帯域超音波や調波構造の利用に関しても、検討を進めた。コウモリの超音波を基に、信号設計に関する検討も引き続き進めていくことが重要と考えている。

また本プロジェクトでは、コウモリを用いた様々な行動実験も実施した。特にノイズ環境下におけるコウモリの適応反応を調べるために、ラウドスピーカを用いた妨害音提示実験、またさらには実際に複数のコウモリを同時に飛行させる実験などを実施し、その際のコウモリの超音波利用について詳しく調べ、いくつかの新たな知見を得ることができた。本プロジェクトによって、生物ソナー研究者が工学現場での実際の課題を理解し、コウモリの適応行動をアルゴリズム化し、実装するという研究アプローチを実践する機会を得た。本プロジェクトで実施した、医療用超音波技術に関わる具体的な課題に対して生物ソナーより解決を指向する、という研究アプローチは世界的にも類を見ないと考えている。今後も引き続き、生物ソナーの工学応用をより実践的なステージへと発展させるべく、超音波利用技術の中でも最も重要な医療用超音波診断装置に関する技術的検討を、生物ソナーの知見を基に継続していきたいと考えている。

#### 謝辞

本研究は文科省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成25～29年度）ならびにJST さきがけの補助を受けて実施した。

#### 文献

- [1] S. Hiryu, Y. Shiori, T. Hosokawa, H. Riquimaroux, and Y. Watanabe, "On-board telemetry of emitted sounds from free-flying bats: compensation for velocity and distance stabilizes echo frequency and amplitude," *J Comp Physiol A*, vol. 194, pp. 841-851, 2008.
- [2] S. Hiryu, T. Hagino, H. Riquimaroux, and Y. Watanabe, "Echo-intensity compensation in echolocating bats (*Pipistrellus abramus*) during flight measured by a

telemetry microphone," *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 121, pp. 1749-1757, 2007.

[3] 秋山いわき, "超音波イメージングにおける生体組織の周波数依存減衰の影響について—映像化距離に対する送信波形の検討—," *電子情報通信学会技術研究報告*, vol. 111, pp. 43-48, 2012.

[4] 手嶋優風, 柏村祐樹, 飛龍志津子, and 秋山いわき, "受波信号によって送波信号を最適化する超音波ドプラ血流計測法の提案," in *日本音響学会2015年春季研究発表会*, 2015, pp. 136-137.

[5] 佐藤寛, 山名詩織, 藤岡慧明, 渡辺好章, 飛龍志津子, and 秋山いわき, "コウモリの周波数変調波を用いた超音波ドプラ血流計測法の検討," in *文部科学省戦略的研究基盤形成支援事業 2017年度研究成果公開シンポジウム*, 同志社大学 2017/8/23, 2017.

[6] N. Suga, "The extent to which biosonar information is represented in the bat auditory cortex," in *Dynamic aspects of neocortical function*, G. M. Edelman, W. E. Gall, and W. M. Cowan, Eds., ed New York John Wiley & Sons, 1984, pp. 315-373.

[7] Y. Furusawa, S. Hiryu, I. K. Kobayashi, and H. Riquimaroux, "Convergence of reference frequencies by multiple CF-FM bats (*Rhinolophus ferrumequinum nippon*) during paired flights evaluated with onboard microphones.," *J Comp Physiol A*, vol. 198, pp. 683-693, 2012.

[8] K. Hase, T. Miyamoto, K. I. Kobayasi, and S. Hiryu, "Rapid frequency control of sonar sounds by the FM bat, *Miniopterus fuliginosus*, in response to spectral overlap," *Behavioural processes*, vol. 128, pp. 126-133, 2016.



# 骨組織の硬さ測定精度の向上 —臨床応用を目指した骨組織計測技術の研究—

松川真美<sup>†</sup>，長谷芳樹<sup>†‡</sup>，細川篤<sup>†‡\*</sup>

<sup>†</sup>同志社大学超音波医科学研究センター 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

<sup>‡</sup>神戸市立工業高等専門学校 〒651-2194 兵庫県神戸市西区学園東町 8-3

<sup>\*</sup>国立明石工業高等専門学校 〒674-8501 兵庫県明石市魚住町西岡 679-3

E-mail: <sup>†</sup>mmatsuka@mail.doshisha.ac.jp, <sup>‡</sup>nagatani@ultrasonics.jp, <sup>\*</sup>hosokawa@akashi.ac.jp

## キーワード

皮質骨，海綿骨，超音波，FDTDシミュレーション

## 1. はじめに

骨の臨床的超音波評価手法（定量的超音波法 Quantitative ultrasound: QUS）は，人間ドックや健診でのスクリーニングを中心に全国で 7000 台以上も稼働しているものの，まだ原発性骨粗鬆症の診断基準をあてはめた確定診断に利用にはもちいられていない<sup>1)</sup>。しかし，臨床の現場では，QUS の測定結果が微細構造や骨代謝回転，マイクロクラック，石灰化度などの骨質情報を含むことが理解されている。被曝がないため，小児や妊産婦も測定でき，比較的安価で，専門技術者が不要であるなど，QUS は X 線法と比較して多くの長所をもつ<sup>2)</sup>。特に近年は，X 線の骨塩定量では評価できない骨折，例えば生活習慣病における原疾患の合併症として発症した骨粗鬆症などの評価手法として，超音波法が注目を浴びつつある。II 型糖尿病や慢性腎臓病による骨折リスクの評価はその例である。また，最近では 10 代の骨量低下やスポーツ選手の疲労骨折など，X 線法を使用できない若年層の骨評価にも超音波法が期待されつつある<sup>3)</sup>。

本報告ではこのような背景の下，臨床用超音波診断装置の基礎となる骨の弾性に着目し，MHz 域の超音波周波数帯域で骨の各部位の評価手法の開発と音波物性測定を行ったので報告する。特に骨の不均一性，異方性に着目して検討を進めた。

## 2. 皮質骨の評価と音波伝搬特性

荷重を支える皮質骨を評価するには，橈骨長手方向の幹部の皮質骨の強度や弾性を計測する必要がある。新しい超音波計測法として AT 法（Axial Transmission technique）がある。これは主に長管骨の皮質骨評価を行う手法である。AT 法は，フランス，フィンランド，中国で盛んに研究が行われており<sup>4-6)</sup>，近年は日本でも注目されている。しかし，多くはまだ異方性や不均一性を考慮した音波伝搬特性の検討まで進んでいない。

そこで我々は，皮質骨中の音速分布を実験的に測定

し，そのデータを用いて骨の不均一モデルを作成した。そして，不均一モデルと均一モデルを用いて，AT 法と同様に管骨の軸方向に伝搬する音波伝搬シミュレーションを行った。

## 2.1. 実験方法

73 月齢の健全な雌ウシの左橈骨の皮質骨から厚さが約 10mm の円環状試料を作成した(図 1)。試料表面は薄片自動研磨機（マルトー，ML-521）で研磨した。超音波測定の概要を図 2 に示す。送波・受波用トランスデューサには自作平面型 PVDF トランスデューサ（直径: 3 mm）を用いた。試料を透過した縦波超音波を受波用トランスデューサで受波し，試料を動かして受波波形の変化を測定した。測定の空間分解能は 1mm である。

## 2.2. 実験とシミュレーション

皮質骨を骨軸方向に伝搬した音波の音速分布を図 3 に示す。音速の最大値は約 4500m/s，最小値は約 3740m/s，平均値は約 4150m/s であった。後方部位の音速は他の部位と比べて低く，また外周より内側の方が音速が高い結果となった。この結果は，Yamato らの大腿骨骨幹部の音速分布と類似している<sup>7)</sup>。

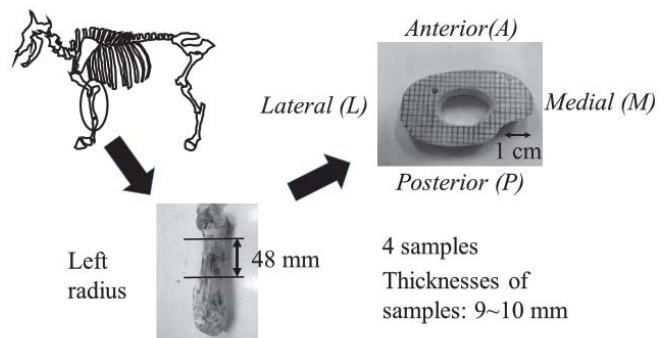


図 1 試料の作成方法

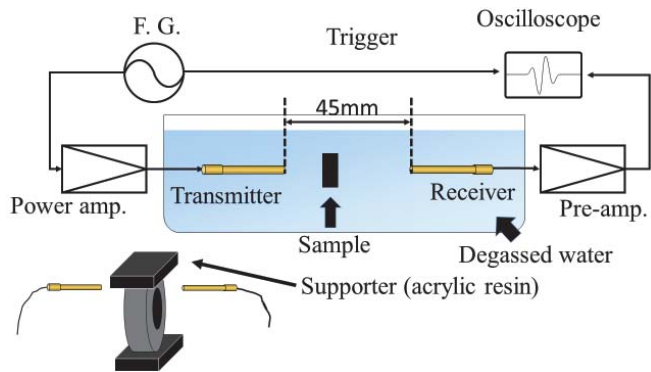


図2 測定システムの概要.

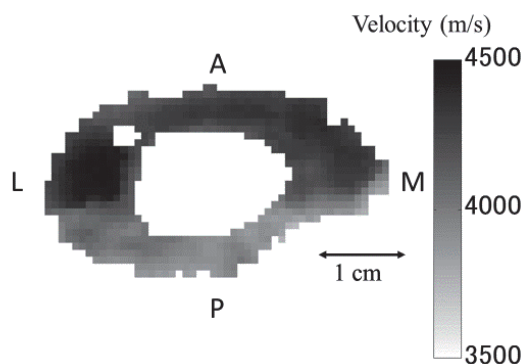


図3 骨軸方向を伝搬する縦波超音波音速分布の例

実験で得られたデータと Yamato や Nakatsuji<sup>8)</sup>らの研究成果を参照し、異方性と不均一を考慮した音波伝搬シミュレーションモデルを作成した。その際、共一次内挿法を用いて空間分解能を  $20\ \mu\text{m}$  まで拡張し、一軸異方性を仮定して、各位置における5つの独立な弾性率を決定した。例として骨軸-半径面内の骨軸方向縦波音速の分布を図4に示す。音速は  $4000\text{--}4500\text{m/s}$  の範囲で分布しており、不均一性が高いことがわかる。

なお、比較のため、全ての位置で弾性率を均一としたモデルも作成した。均一モデルの弾性定数の値は、不均一モデルの平均値である。

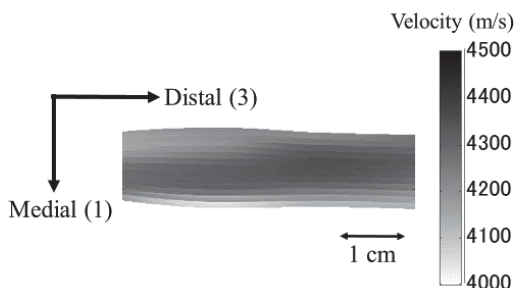


図4 骨軸方向を伝搬する縦波超音波音速分布の例

作成したモデルを用いて、弾性 FDTD 法により音波伝搬シミュレーションを行った<sup>9-10)</sup>。2次元における支配方程式を示す。今回は吸収境界条件として Higdon2 次の条件を用いた。シミュレーションの空間分解能は  $20\ \mu\text{m}$ 、時間分解能は  $3.2\text{ns}$  である。本シミュレーションの設定を図5に示す。骨中を骨軸方向に伝搬する AT 法の条件でシミュレーションを行い、受波素子をアレイ状に設定した。入力には  $1\ \text{MHz}$  の sin 波一波にハニング窓をかけた波形を用いた。

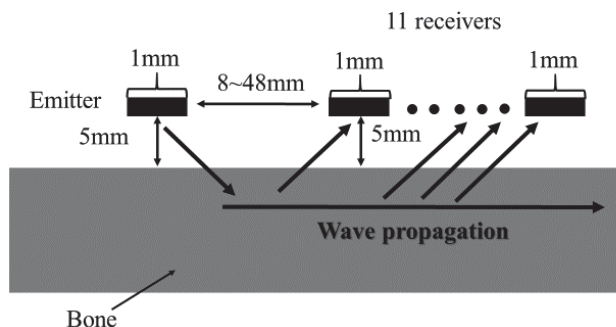


図5 FDTD シミュレーションの設定.

得られたシミュレーション結果を図6に示す。上部が不均一モデル中の音波伝搬で、下部が均一モデル中の音波伝搬の結果である。不均一モデルと均一モデルでは音波伝搬速度がわずかに異なる。また不均一モデル中ではわずかに音波の散乱が生じている。

送波器から  $44\text{mm}$  の位置での音波波形を図7に示す。  $30\ \mu\text{s}$  近傍の大きな波は、送波器からの直接到達波である。直接波より早く3波が観測され、不均一モデルでは、3波の他にも散乱波が観測されることがわかる。

この1波目は、骨の表面を伝搬する縦波で、均一モデルの場合のほうが、わずかに到達時間が早い。これは図3に示すように、用いた機骨皮質骨では、内部の音速が高く、平均値を用いた均一モデルより表面の弾性が約5%低かったためと考えられる。

一方、2波目の到達時間はほぼ同じであった。2波目は骨の内部を伝搬、裏面で反射して表面に到達した波である。内部を伝搬した波は、骨の平均弾性を反映し、均一モデルとほぼ一致したのであろう。

なお、図8の詳細な伝搬波面からわかるように3波目は骨内で主に横波として伝搬した波であり、不均一モデルではかなり小さく観測された。これは散乱による減衰の影響と考えられる。



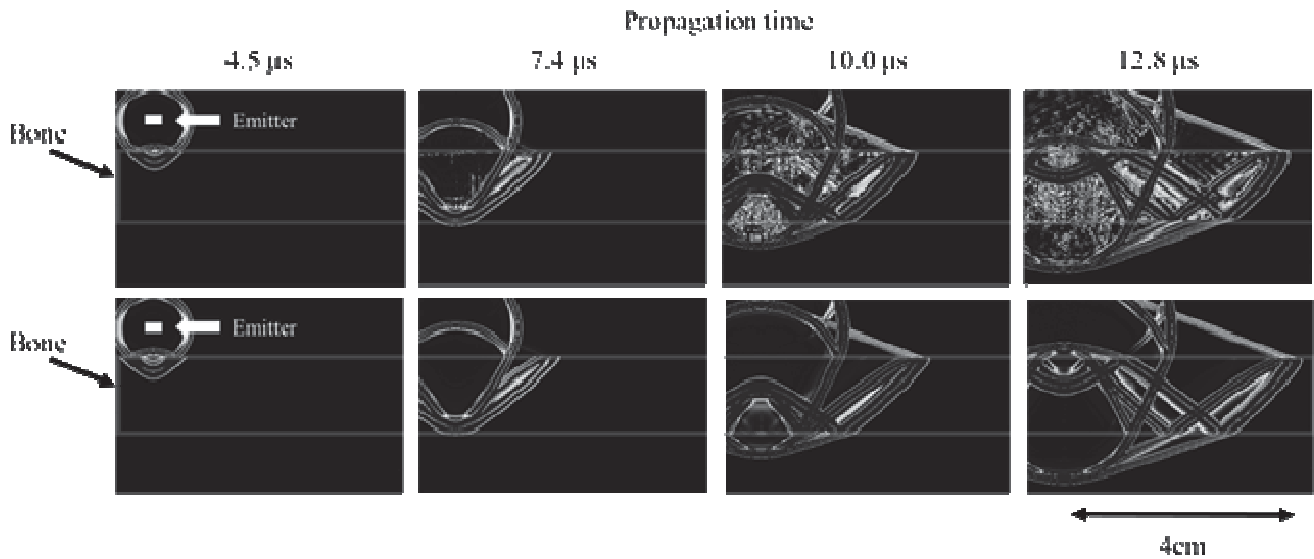


図 6 FDTD シミュレーションによる骨内超音波伝搬，上段 不均一モデル，下段 均一モデル。

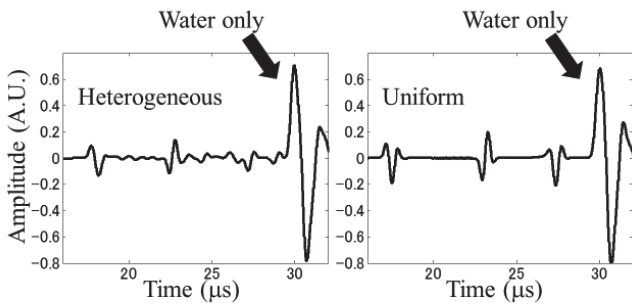


図 7 各モデルを伝搬した超音波波形

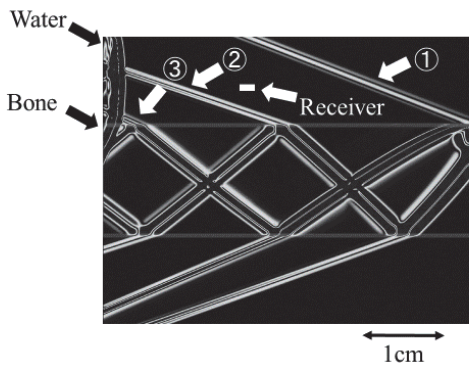


図 8 均一モデルを伝搬した超音波の波面 (伝搬時間 21.3 $\mu$ s).

## 2.2. 皮質骨の臨床評価に向けて

管骨の皮質骨を評価する AT 法では，最初に到達した波 (FAS) の伝搬時間で骨の弾性を評価することが多い<sup>11)</sup>。FAS は骨表面を伝搬した音波を反映している。従って，今回の骨のように骨の外周の音速が内部より低い場合，弾性が低めに見積もられる可能性がある。ただし，ウシ皮質骨はヒトよりかなり厚く密度も高い

と考えられる。実際に，X 線 CT などのデータでは，骨粗鬆症レベルの骨は薄く，皮質骨中に微細な骨孔が多くみられることが多い。このような骨中の音波伝搬では，異方性，不均一性だけでなく，伝搬モードの詳細な検討が必要となる。

本研究では，超音波測定により骨の音速値を実験的に得て，モデルを作成したが，高分解能 CT による臨床骨構造データを用いた，新たなシミュレーションモデルの構築も十分有用と考えられる。今後は，さまざまなファクターを含めて，皮質骨中の音波伝搬現象の解明が必要である。

## 3. 海綿骨中の超音波の二波伝搬現象の応用

二波伝搬現象とは，海綿骨の骨梁配向方向に伝搬する MHz 域の縦波超音波が高速波(主に海綿骨の骨梁部を伝搬)と低速波(主に海綿骨の間隙部内の骨髄を伝搬)に分かれる現象である。この高速波は海綿骨の骨梁を伝搬するため，骨梁の構造を反映して変化する。特に海綿骨部の骨密度や弾性定数が高いと高速波の伝搬速度が高くなることから，高速波の到達時刻や振幅は骨量や骨強度を反映するとして期待されている<sup>12-14)</sup>。

しかし，実際の *in vivo* の骨の海綿骨は皮質骨で覆われている。このため，海綿骨を伝搬する二波以外にも，皮質骨中を伝搬する周回波も観測される。周回波は骨の形状や皮質骨厚などによって変化し，条件によっては二波と重畳してしまう可能性がある。

そこで今回は，ウシ骨を用いてヒト橈骨モデルを作成し臨床用装置 LD-100 と同様な条件で超音波を伝搬させた。そして実験的に周回波の伝搬挙動の把握を試みた。



### 3.1. 実験試料および方法

pQCT (peripheral Quantitative Computed Tomography) を用いて 44 歳の男性の橈骨遠位部の断面 CT 画像を取得した。この断面画像を利用して、ウシの海綿骨と皮質骨でヒト橈骨モデルを作製した。なお、皮質骨と海綿骨はそれぞれ別々に加工し、二つを組み合わせるとヒト骨モデルを作成した。今回の実験ではヒト橈骨の海綿骨部を模した試料 A、皮質骨部のみを模した試料 B(内部に海綿骨を入れずに空気で満たした)、A と B を組み合わせたヒト橈骨モデルの試料 C の 3 種類を用いて実験を行った(図 9)。

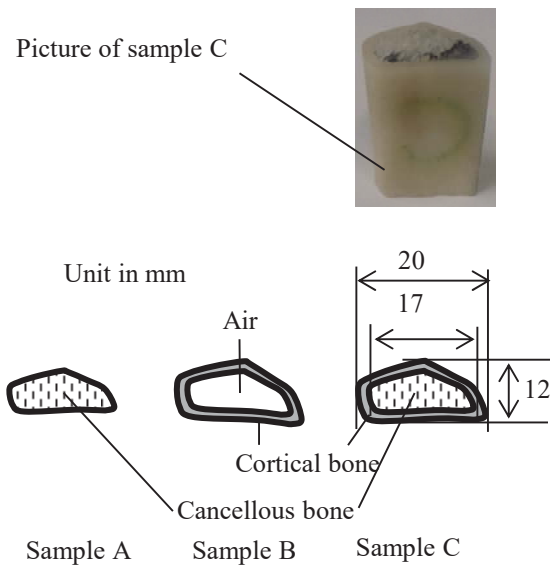


図 9 作成した試料概要.

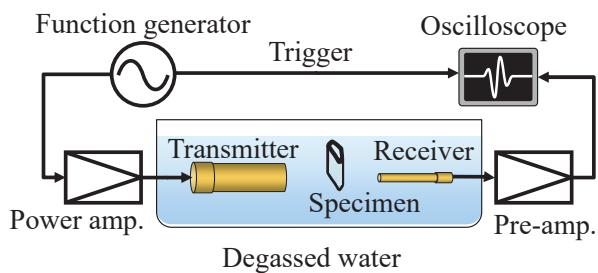


図 10 測定系概要

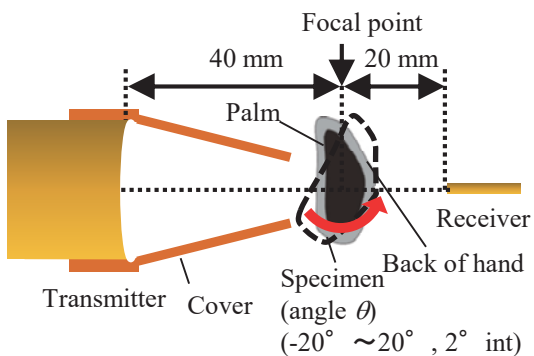


図 11 超音波送受波器と試料の設置

実験では超音波パルス法を用いて試料を透過した縦波を観測した。実験系の概略図を図 10 に示す。周波数 1 MHz の正弦波 1 波を、パワーアンプ(NF, HAS 401)で 20dB 増幅し、送波用トランスデューサに印加した。送波用トランスデューサには収束型 PVDF トランスデューサ (Toray Engineering, 直径: 20 mm, 曲率半径: 40 mm) を用いた。なお、収束型トランスデューサのセンサー表面には真鍮で作製したカバーを取り付け、センサーの端面からの回折波などを遮断した。受波用トランスデューサには平面型 PVDF トランスデューサ (自作 直径: 3 mm) を用いた。

実験では、試料の手のひらから甲の方向がトランスデューサの音軸と重なる角度を 0 度とし、試料を 2 度刻みで  $\pm 20$  度回転させた。(図 11)

### 3.2. 試料の回転による観測波形の変化

試料 A では海綿骨内を伝搬した高速波と低速波が観測された。試料 B の場合、皮質骨内部は空気であるため、内部に音波は侵入せず、皮質骨内を伝搬する周回波だけが観測された。試料 C を伝搬した波形は複雑であったが、これらの高速波、低速波と周回波が含まれていると考えられる。

試料 A を透過した波形の例を図 12 に示す。試料 A の回転が  $-2$  から  $4^\circ$  の範囲では高速波と低速波の二波は重畳しなかった。しかし、角度が大きくなると高速波の波尾と低速波の波頭が重なった。次に試料 B あるいは C を透過した波形の例を図 13 に示す。回転角が大きくなると周回波の振幅も増大した。また、周回波の波頭は試料の設置角度によらず、ほぼ低速波と重なる。ただし周回波の振幅は小さく、最大でも低速波振幅の  $1/8$  程度である。従って、周回波は高速波には重畳せず、また低速波には重畳するが振幅が小さいため、ヒト橈骨中の二波伝搬現象への影響は少ないと考える。

もっとも、今回の皮質骨内部を空気で満たした試料 B では骨中を伝搬する超音波はすべて皮質骨を伝搬し、

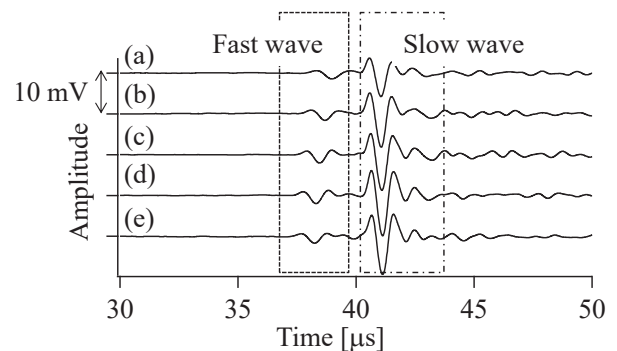


図 12 試料 A を透過した音波の観測波形。(a)- $20^\circ$ , (b)- $10^\circ$ , (c)  $0^\circ$ , (d)  $10^\circ$ , (e)  $20^\circ$  .

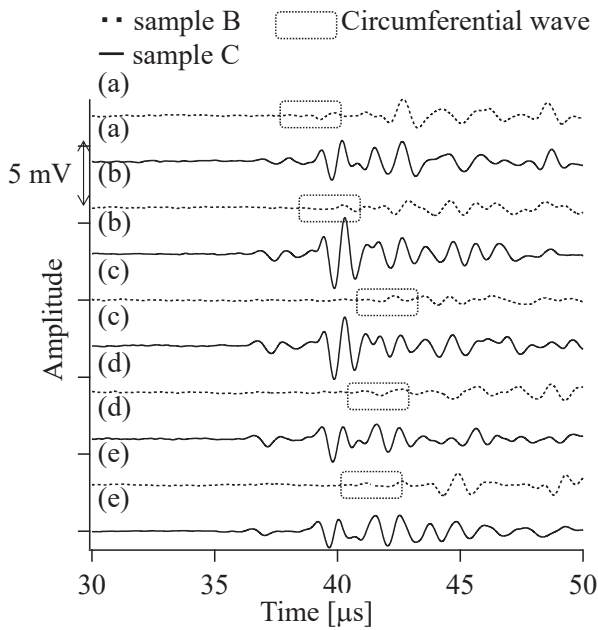


図 13 試料 B あるいは C を透過した音波の観測波形. (a)-20°, (b)-10°, (c) 0°, (d) 10°, (e) 20°.

実際より大きな周回波が観測されている可能性が高い. *in vivo* の測定では伝搬する周回波の一部は内部の海綿骨にも漏洩し, 周回波の影響はより小さくなると思われる. また, 今回の実験で用いた皮質骨の厚みは 2 mm であるが, 骨粗鬆症患者の皮質骨は 1.0-1.5mm とかなり薄い. *in vivo* の高齢者の測定では皮質骨を伝搬する周回波の影響はより弱い可能性が考えられる.

### 3.3. 橈骨モデル計測のまとめ

ヒト橈骨モデル中の超音波伝搬を実験的に検討した. その結果, 海綿骨を伝搬する高速波と低速波以外にも, 皮質骨内を伝搬する周回波が観測された. ただし, 送受波のトランスデューサが同一音軸上にある場合, この周回波はほぼ二波に影響しなかった. 実際の二波伝搬現象を利用した臨床用計測装置では, 送受波トランスデューサを対向して設置する. 測定時には, 腕の置き方で測定誤差が生じる可能性がある. しかし, 橈骨では設置時の骨のわずかな回転の影響は小さいことが確認された.

## 4. 軟骨中の音速異方性測定

骨には, 皮質骨や海綿骨のほかにも, 関節などに存在する軟骨が知られている. 軟骨はその基質内に血管や神経を含まず, 代謝を期待できない. このため軟骨を含む関節疾患の早期把握は高齢化社会の重要な課題である. 現在, 軟骨の臨床診断は高解像度 MRI や X 線が主流であり, 最近は超音波診断装置の利用も行われるようになってきた. しかし, これらの手法では軟

骨の硬さの評価が難しい. 石原らはレーザ超音波法と内視鏡を組み合わせた臨床装置を提案している<sup>14)</sup>, まだ実用に至っていない. もっとも, 半月板や関節軟骨中の超音波の伝搬速度については, あまり報告がなく, またその異方性についても知られていない. そこでここでは, 石原らと同様なパルスレーザを用いたレーザ超音波法を利用し, 半月板内の音波伝搬の異方性について基礎的な研究を行った.

### 4.1. パルスレーザを用いた半月板の評価

29 月齢の健常ウシ大腿骨遠位部に付着した半月板を切り出し, 十分乾燥させたのち, 立方体(3×3×3mm<sup>3</sup>) 試料 5 片に加工した. 試料 1 が近位部側, 試料 5 が遠位部側から採取した試料である. 試料表面は手研磨による十分なめらかな状態である. この立方体試料中に次のレーザパルス励起弾性波を伝搬させ, 各方向の超音波の伝搬速度を計測した.

まず, 半導体パルスレーザ (波長 532nm, パルス幅 500ps, 繰り返し周波数 1kHz, COHERENT) から放射した単パルス光をアルミニウム板に照射し, 超音波を励起した<sup>16)</sup>. 図 14 に示すように, 試料をアルミニウム板と自作 PVDF トランスデューサ (直径 3mm) で挟

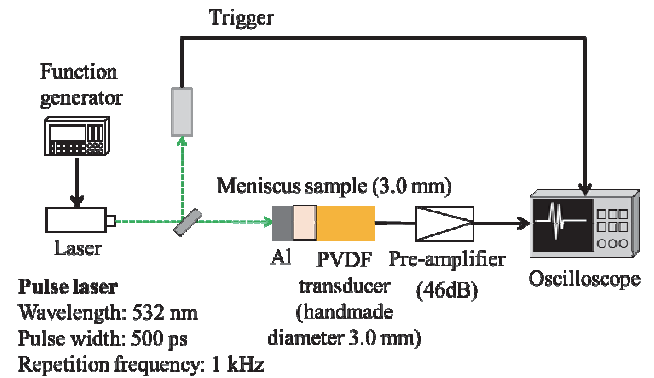


図 14 パルスレーザを用いた超音波音速測定システムの概要

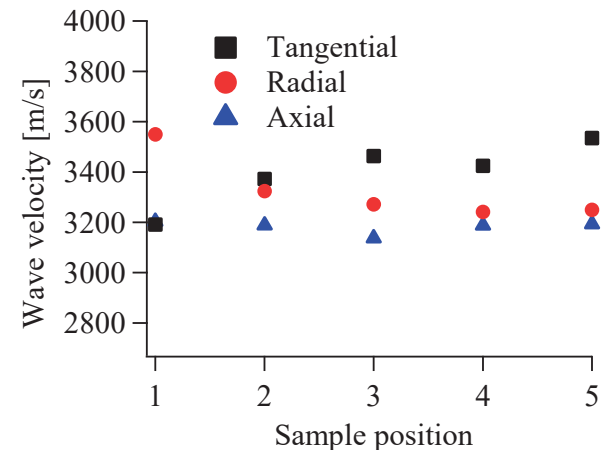


図 15 ウシ半月板内部の音速異方性

み込み、半月板試料中の音波の伝搬時間から伝搬速度を算出した。立方体試料の3方向から伝搬する音波の速度を推定し、音速異方性を調べた。

## 4.2. 半月板中の音速

今回作成した試料は、面の平行度、平滑性を確保するため、半月板の表層を削り、内部を立方体に加工して得ている。したがって、測定しているのは深層で、コラーゲン繊維は半月板の形状に沿って、円周状に配向していると考えられる。実際、図15に示すように、音速分布も円周方向の音速が高くなり、コラーゲンの配向を反映した。近位部の試料1では他の部位と異なり、半径(Radial)方向の音速が比較的高くなった。この変化は今後検討する必要があるが、試料1は腱に近く、構造が他部位と異なる可能性がある。

皮質骨部の音速(3600-4400m/s)と比較して、半月板中の音速が低いのは、半月板がコラーゲンで形成されている理由による。また、半月板を水で膨潤させるとその音速は明らかに低下した。実際、試料4では乾燥時に $3.42 \times 10^3$ m/sであった音速が、膨潤により $2.25 \times 10^3$ m/sとなり、大きな弾性の低下を示した。

## 4.3. 超音波による軟骨測定これから

これまで、コラーゲン主体の軟骨の音波物性はあまり研究されていなかったが、本研究により音速だけでなくコラーゲンの配向による異方性の程度も明らかになった。関節内の半月板、関節軟骨の評価手法として、関節内内視鏡に超音波の送受波機能を付加した手法も提案されている。これらは主に、軟骨表面からの反射音波でその硬さを判断するものであり、その評価には軟骨の音速・密度などの情報が重要となる。軟骨の形状は複雑で、その加工も難しいが、今後は疾患で編成した軟骨も含めて、基礎的なデータが必要となる。

## 5. まとめ

本研究では、「骨の硬さ測定」に焦点をあてて、皮質骨、海綿骨、軟骨など、特徴的な骨の超音波計測手法を検討した。その際には、将来的な臨床応用を目指し、臨床時に予想される問題も考慮した。

骨の複雑な形状、不均一性、異方性など、測定時に問題となる点が多いが、超音波音速の測定が可能となれば骨の弾性や骨量の推定ができる。弾性は骨の強度にも関連する量であり、X線法では測定ができない。

高齢者の原発性骨粗鬆症だけでなく、妊娠性骨粗鬆症、内分泌疾患による二次的な骨粗鬆症、小児の骨の成長の評価など、被曝のない超音波は今後も様々な利用が期待される。

## 文 献

[1] 日本骨粗鬆症学会, 日本骨代謝学会, 骨粗鬆症財団, 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015 年版, ライフサイエンス出版, 東京, 2015.

- [2] 日本骨粗鬆症学会, 骨強度測定機器の評価と臨床応用に関する委員会編, "QUS 使用法の実際," Osteoporosis Japan, 13, 別刷, 2005.
- [3] S.Bréban, F.Padilla, Y.Fujisawa, I.Mano, M.Matsukawa, CL.Benhamou, T.Otani, P.Laugier, C.Chappard, "Trabecular and cortical bone separately assessed at radius with a new ultrasonic device, in a young adult population with various physical activities," Bone, 46, pp.1620-1625, 2010.
- [4] E.Bossy, M.Talmant, M.Defonetaine, F.Patat and P.Laugier, "Bidirectional axial transmission can improve accuracy and precision of ultrasonic velocity measurement in cortical bone," IEEE TUFFC, 51, pp.71-79, 2004.
- [5] M.Talmant, S.Kolta, C.Toux, D.Haguenaer, I.Vedel, B.Cassou, E.Bossy, P.Laugier, "In vivo performance evaluation of bi-directional ultrasonic axial transmission for cortical bone assessment," *Ultrasound Med Biol*, 35, pp.912-919, 2009.
- [6] P.Moilanen, "Ultrasonic Guided waves in bone," *IEEE TUFFC*, 55, pp.1277-1286, 2008.
- [7] Y.Yamato, M.Matsukawa, T.Yanagitani, K.Yamazaki, H.Mizukawa, A.Nagano, "Correlation between hydroxyapatite crystallite orientation and ultrasonic wave velocities in bovine cortical bone," *Calcified Tissue International*, 82, pp.162-169, 2008.
- [8] T.Nakatsuji, K.Yamamoto, D.Suga, T.Yanagitani, M.Matsukawa, K.Yamazaki, Y.Matsuyama, "Three-dimensional anisotropy of ultrasonic wave velocity in bovine cortical bone: effects of hydroxyapatite crystallites orientation and microstructure," *Jpn.J.Appl.Phys.*, 50,07HF18, 2011.
- [9] Y.Nagatani, K.Mizuno, T.Saeki, M. Matsukawa, T. Sakaguchi, H.Hosoi, "Numerical and experimental study on the wave attenuation in bone - FDTD simulation of ultrasound propagation in cancellous bone", *Ultrasonics*, 48, pp.607-612, 2008.
- [10] T.Hata, Y.Nagatani, K.Takano, M.Matsukawa, "Simulation study of axial ultrasonic wave propagation in heterogeneous bovine cortical bone", *J.Acoust.Soc.Am.*, 140, pp.3710-3717, 2016.
- [11] P.Lauger, G.Haïat, eds., *Bone Quantitative ultrasound*, Springer, Dordrecht Heidelberg London New York, 2011.
- [12] A.Hosokawa, T.Otani, "Ultrasonic wave propagation in bovine cancellous bone," *J.Acoust.Soc.Am.*, 101, pp.558-562, 1997.
- [13] A.Hosokawa, T.Otani, "Acoustic anisotropy in bovine cancellous bone," *J.Acoust.Soc.Am.*, 103, pp.2718-2722, 1998.
- [14] I.Mano, K.Horii, S.Takai, T.Suzaki, H.Nagaoka, T.Otani, "Development of novel ultrasonic bone densitometry using acoustic parameters of cancellous bone for fast and slow waves", *Jpn.J.Appl.Phys.*, 45, pp.4700-4702, 2006.
- [15] M.Ishihara, M.Sato, N.Kaneshiro, G.Mitani, S.Sato, J.Mochida, M.Kikuchi, "Development of a diagnostic system for osteoarthritis using a photoacoustic measurement method", *Lasers in surgery and medicine*, 38, pp.249-255, 2006.
- [16] R.Nakase, M.Matsukawa, "Nondestructive micro crack evaluation by laser induced pulse wave and low frequency vibration", *Proc.Forum Acusticum*, Aalborg, Denmark, 2011.

# Shear wave Elastography における符号化 push pulse 照射法

椎名 毅<sup>†‡</sup>, 近藤 健悟<sup>†‡</sup>, 浪田 健<sup>†‡</sup>, 山川 誠, <sup>†‡</sup>

<sup>†</sup> 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 〒606-8507 京都市左京区聖護院河原町 53

<sup>‡</sup> 同志社大学超音波医科学研究センター 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

E-mail: <sup>†</sup> shiina.tsuyoshi.6w@kyoto-u.ac.jp,

キーワード 組織粘弾性, 超音波エラストグラフィ, 剪断波, 符号化パルス

## 1. 原稿用紙

Shear wave Elastography(SWE)は, push pulse の音響放射力により体内に剪断波を生じさせ, その伝搬速度を計測することにより組織の弾性率を定量的に評価する手法として臨床に用いられている. 剪断波速度を正確に推定するためには, shear wave 伝搬による粒子速度の振幅を大きくし SNR を向上させることが重要である. そのためには, まず剪断波生成の push pulse の振幅を大きくする, パルス幅を広くするなど挙げられるがハードウェアの限界や安全規格上の制限がある. また, push pulse の照射回数を増やし, 受信進行を加算平均する方法も考えられるが, これは計測時間がかかるという問題点がある.

これらの課題を解決する方法として, 符号化 push pulse 照射法を考案した. これは, push pulse の照射系列を符号化することで, 少ない照射回数でも高 SNR 画像の再構成を可能とするものである. また, 複数点からの剪断波を計測する場合においても, 直交する複数の符号を用いた符号化 push pulse を同時照射することで, 計測時間を短くする方法を提案し, ファントム実験によって確かめた.

## 2. Push pulse の符号化とパルス圧縮

従来の SWE 法では push pulse を照射して shear wave を発生させ, 伝搬するせん断波の様子を, 計測パルス(imaging pulse)を複数回照射して観察する. これに対し, 符号化 push pulse 法では, 符号化した系列での push pulse と imaging pulse を交互に照射して, せん断波の変位を符号化することで, 得られた受信信号の復号によりパルス圧縮を行い単一の大振幅の push pulse の照射に相当する効果を得る.

例として符号 A=(1,1,1,-1) B=(1,1,-1,1) (4bit Golay Code)で縦波を符号化した場合を図 1 (a)~(d)に示す.

(b)はそれぞれの符号の系列でパルス波を送信したときの受信信号でありパルス列と(a)とのコンボリューションとなる.(b)を復号化処理すると(c)とな

り, それらを足し合わせると(d)になる. d)は元の単一パルス照射の信号の(a)に比べ振幅が 8 倍となることがわかる. 一般に N [bit]の Golay Code(GC)で振幅は 2N 倍となることが知られている<sup>1,2)</sup>.

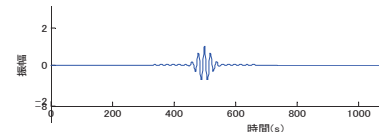
## 3. 符号化の計測時間と同時照射

従来の SWE 法の計測時間は, 以下で表される.

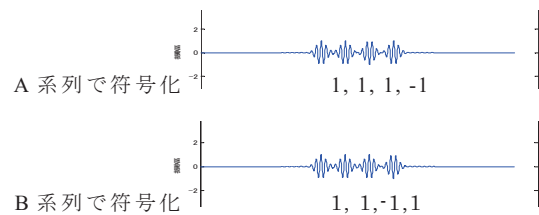
$$(1/PRF) \times (\text{撮像枚数}) \quad (1)$$

これに対して符号化した SWE 法の計測時間は Golay

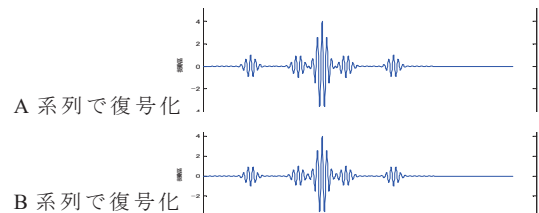
(a) 単一パルス波を送信時の受信信号



(b) A,B 系列でパルス波を送信時の受信信号



(c) (b)のそれぞれを復号化した信号



(d) (c)の 2 つを足し合わせた信号

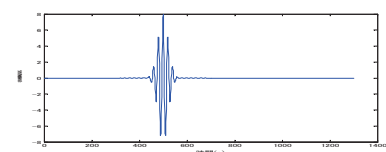


図 1 符号 A,B を用いた縦波の符号化



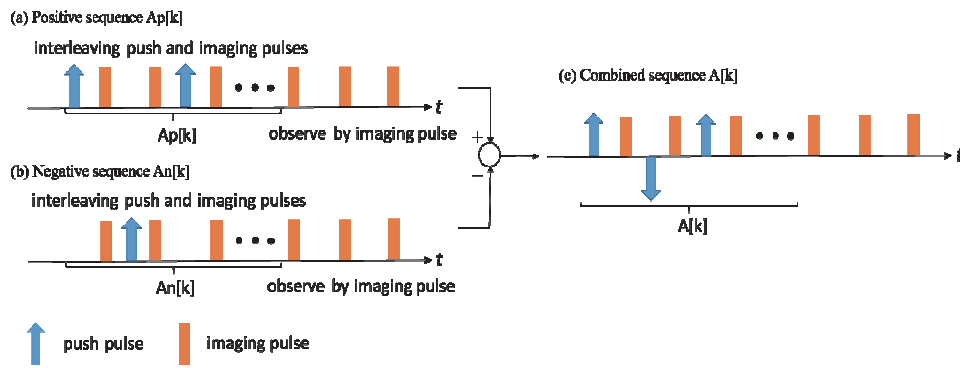


図2 符号化 push pulse と imaging pulse の照射

Code(GC)を例とすると、次のようになる。

$$(1/PRF) \times \{(\text{撮像枚数}) + (\text{符号長}) - 1\} \times 4 \quad (2)$$

式(2)で表される理由として、符号化では push pulse と imaging pulse を交互に照射している分、撮像枚数に  $\{(\text{符号長}) - 1\}$  を加える。更に push pulse では負の信号を送ることができないので、図2に示すように符号を正負の2回の送信に分けて出力結果の差として表す。GCは2組の符号なので計4回の撮像を行う。

ここで  $N$  [bit] GC と  $N$  回送信し平均化する手法( $N$  回平均)の計測時間を比較する。両者は SNR が  $\sqrt{N}$  倍となり同程度の SNR の向上が見込まれる。

$N=128$ ,  $PRF=2500\text{Hz}$ , 撮像枚数を 50 枚としたとき先ほどの式に代入すると計測時間は 128bit GC が 0.28(s)で 128 回平均が 2.56(s)となる。128 回平均は(従来手法の計測時間) $\times 128$  で与えられる。以上より、符号化により短時間での SNR の向上が可能であることが分かる。

Shear wave は伝搬により減衰するため、広範囲を計測するには、複数箇所 push pulse を照射する必要がある。この際、複数の push pulse で生じた, shear wave が干渉しないように、時間を空けて照射するため、計測時間が長くなる問題があった。

そこで、符号化した複数の push pulse を同時照射し、復号化により分離することで、複数回に分けて照射する場合よりも計測時間を短くする方法を考える。

即ち、超音波プローブの開口を分割し、各小開口から直交 Golay 符号を用いて符号化した push pulse を同時に照射する。これにより発生した shear wave は重なり合った状態で観測されるが、符号の直交性により、それぞれの符号で復号化することで分離することが可能となる。その結果、独立に shear wave 計測を行った場合と同等の結果が得られるとともに

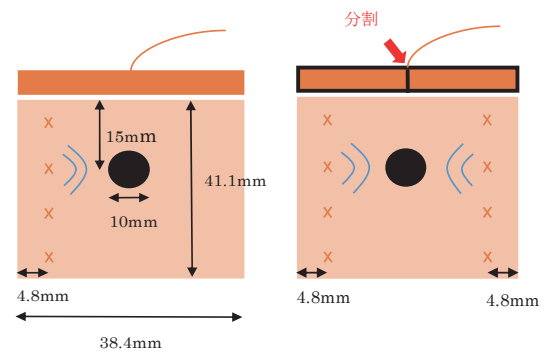
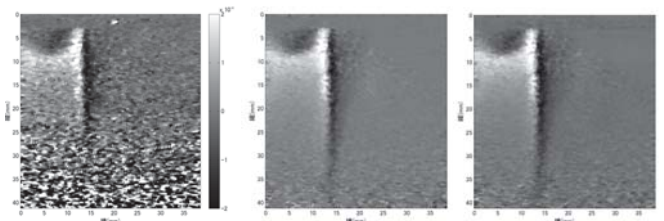


図3 ファントム実験

表1 実験条件

PRF	2500Hz
撮像枚数	50 枚
素子数	128 個
素子間隔	0.3mm
中心周波数	5MHz
push pulse 励起時間	12.8 $\mu$ s



(a) (b) (c)  
図4 加振開始から 4ms 後の shear wave  
(a)従来手法 (b)128bit Colay Code(GC) (c) 128 回平均



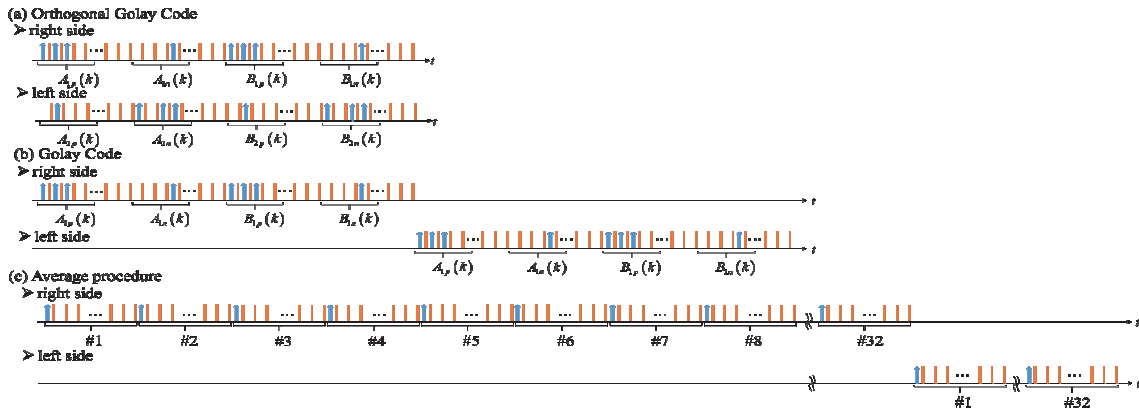


図5 符号化法および加算平均法における計測シーケンス

に符号化による shear wave のパルス圧縮によって SNR を向上の効果を得る。

#### 4. パルス圧縮についての実験<sup>3)</sup>

##### 4.1. ファントム実験

128bit Golay Code(GC), 128 回の加算平均, 従来手法の SNR を比較するためにファントム実験を行った。ファントムは図 3 に示すように内包物が 50kPa, 背景が 27 k Pa のものを使用した。実験の各パラメータを表 1 に示す。図 3 左のようにプローブの左端に push pulse を照射して剪断波を生起させた。3つの手法について push pulse による 4 点加振で shear wave を発生させ, その伝搬の様子を観察した。

##### 4.2. 結果

従来手法による shear wave を図 4 (a)に、128bit Golay Code(GC)で発生した shear wave を図 4 (b)に、128 回平均で発生した shear wave を図 4 (c)に示す。SNR の比較をしやすいように信号成分の振幅を全て従来手法に揃えた。

128bit GC は従来手法に比べ高い SNR が得られ、128 回平均と同程度の SNR が得られた。各符号での符号化法および加算平均法における計測シーケンスは図 5 のようになるが、計測時間は 128bit GC が 0.28(s)で 128 回平均が 2.56(s)となり 128bit GC の方が短かった。

#### 5. 同時照射法についての実験<sup>4)</sup>

##### 5.1. 方法

図 3 の右に示すように、上記と同じ弾性ファントムに対してプローブの右端と左端に push pulse を照射することで剪断波を生成し, 符号化

を施した場合と施していない場合で剪断波の伝搬を観察した。分割したプローブの右端と左端から 32bit 直交 Golay Code を用いて符号化した push pulse を同時に照射し, 復号化処理で右側と左側に分離できているかを確認した。ファントムおよびパラメータは, パルス圧縮の実験と同じものを用いた。

##### 5.2. 結果

符号化した push pulse により生じた shear wave を図 6 (a)に、復号化して得られる shear wave を図 6 (b)(c)に示す。SNR の比較をしやすいように信号成分の振幅を全て符号化したものに揃えた。図より、同時に生成した 2 つの shear wave を復号化により分離できていることがわかる。

また、計測時間と SNR は表 2 に示すようになった。これから、同等の SNR のものと、計測時間は、2 回に分けて符号化計測をした場合と比較して半分となり、32 回平均の場合と比較して約 10%と大幅に向上することが分かる。

これらの分離された剪断波から弾性率分布を求めた結果を図 7 に示す。

これから、単 1 照射では SNR が低いため十分な画質が得られていないが、32 回照射の加算平均では内包物の形状が明瞭に表示されている。符号化 push pulse による同時照射法でも同様の画質が得られていることが分かる。

#### 6. 結語

Shear wave elastography において push pulse の系列を符号化して照射する手法を提案し, パルス圧縮による粒子速度計測の SNR の向上や, 直交符号化 push pulse による複数の剪断波の同時照射による, 計測

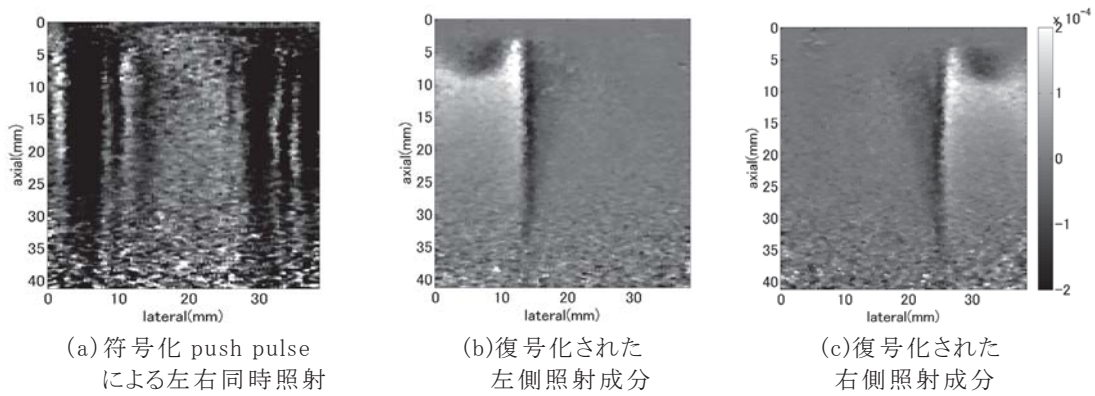


図6 同時照射法における加算開始から4ms後のshear wave

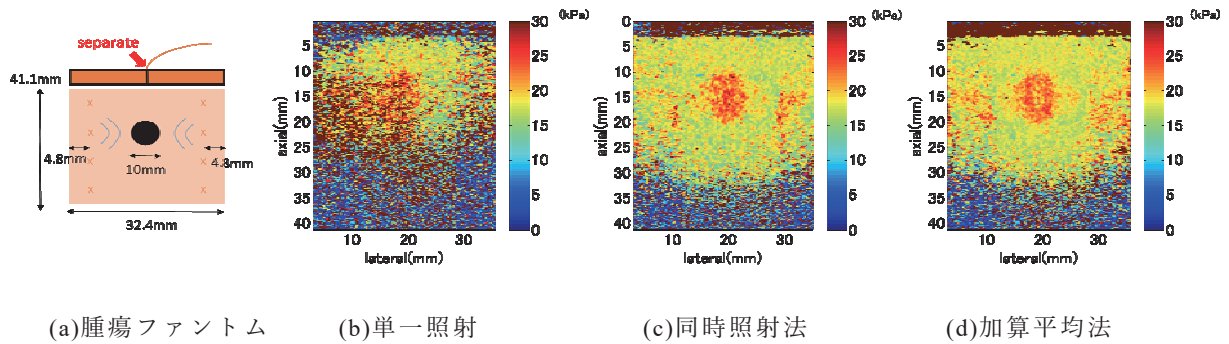


図7 再構成した腫瘍ファントムの弾性率分布の比較

表2 計測時間とSNRの比較

	計測時間	SNR
32-bit Orthogonal Golay Code	0.129 sec	14.5 dB
32-bit Golay Code	0.258 sec	14.9 dB
32 average procedure	1.28 sec	15.0 dB

時間の短縮の効果をファントム実験によって確かめた。加算平均法との比較実験では、GCにより高いSNRと短時間で計測できることが確認できた。

同時照射法の実験では同時照射したshear waveをそれぞれの箇所で照射したものとして分離でき通常の符号化より更に計測時間を短縮できること実証された。

## 文献

- [1] R. Y. Chiao and L. J. Thomas, "Synthetic transmit aperture imaging using orthogonal Golay coded excitation," Proc. IEEE Ultrason. Symp., vol. 2, pp. 1677–1680, October 2000.
- [2] A. Nowicki, J. Litniewski, W. Secomski, P. A. Lewin, and I. Trots, "Estimation of ultrasonic attenuation in a bone using coded excitation," Ultrasonics, vol. 41, pp. 615–621, November 2003.
- [3] K. Kondo, M. Yamakawa, and T. Shiina, "Coded Excitation Scheme for Acoustic Radiation Push pulse Compression," Proc. IEEE Ultrason. Symp., pp. 341–343, July 2013.
- [4] T. Matsumoto, K. Kondo, T. Namita, M. Yamakawa, and T. Shiina, "Experimental validation of simultaneous excitation of orthogonal coded push pulses for fast shear wave elastography," Proc. of IEEE Ultrason. Symp., 2017.

