

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

研究成果公開シンポジウム

2017年8月23日(水)

同志社大学京田辺校地夢告館 MK102教室

主催 同志社大学超音波医科学研究センター

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 研究成果公開シンポジウム

日時：2017年8月23日（水）13：15～18：30

場所：同志社大学京田辺校地夢告館 MK102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

13：15 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 「乳房腫瘍の画像診断 —造影超音波への期待—」

奈良県立医大 平井都始子教授

-----1

14：20 高速超音波断層法による循環器動態計測

富山大学工学部 長谷川英之教授

-----3

15：20 休憩

15：30 ポスター講演

17：30 閉会の挨拶

テーマ1 「医療における超音波技術の安全性の確立」

1. Protect Effects of Ascorbic Acid against Double-strand Breaks in Giant DNA Molecules:  
Comparison among the Damages Induced by Photo, Ultrasound and Gamma-Ray Irradiation  
Yue Ma<sup>1)</sup>, Naoki Ogawa<sup>1)</sup>, Yuko Yoshikawa<sup>2)</sup>, Toshiaki Mori<sup>3)</sup>, Tadayuki Imanaka<sup>2)</sup>, Yoshiaki Watanabe<sup>1)</sup>, Kenichi Yoshikawa<sup>1)</sup>  
1) Faculty of Biological and Medical Sciences, Doshisha University, 2) Laboratory of Environmental Biotechnology, Ritsumeikan University, 3) Radiation Research Laboratory, Osaka Prefecture University -----5
2. 攪拌操作が引き起こすゲノム DNA の二本鎖切断 — 良く混ぜてかつ損傷を最小に —  
菊池 駿斗, 野瀬啓二, 吉川祐子, 吉川研一  
同志社大学生命医科学研究科 -----7
3. 超音波照射下のマイクロバブル表面における分子膜形成と脱離  
谷村 望美<sup>1)</sup>, 中田真希子<sup>1)</sup>, 小山大介<sup>2)</sup>, Marie Pierre Krafft<sup>3)</sup>  
1) 同志社大学生命医科学部, 2) 同志社大学理工学部, 3) Institut Charles Sadron (CNRS),  
University of Strasbourg -----9
4. 超音波照射によるゲノム DNA 二重鎖切断メカニズムの物理モデル構築 — 蛍光顕微鏡  
による DNA 一分子観察の活用 —  
剣持 貴弘, 馬 越, 菊池 駿斗, 吉川 祐子, 吉川研一  
同志社大学超音波医科学研究センター -----11
5. 活性酸素が引き起こす DNA 二本鎖切断の PEG による保護効果 — DNA1 分子観察法に  
おける定量的評価 —  
臼井萌絵, Ma Yue, 吉川祐子, 吉川研一  
同志社大学生命医科学研究科 -----13
6. 超音波振動を用いた HeLa 細胞の培養制御  
谷健太郎, 小山大介  
同志社大学理工学部 -----15

7. 超音波照射下におけるリン脂質バブルの振動・崩壊が HeLa 細胞に与える影響  
平山有沙<sup>1)</sup>, 安藤優<sup>1)</sup>, 小山大介<sup>2)</sup>, Marie Pierre Krafft<sup>3)</sup>  
1) 同志社大学生命医科学部, 2) 同志社大学理工学部, 3) Institut Charles Sadron (CNRS),  
University of Strasbourg -----17

8. 集束超音波による DNA 二重鎖切断について  
石原和也<sup>1)</sup>, 山下悠介<sup>1)</sup>, 吉田憲司<sup>2)</sup>, 秋山いわき<sup>1)</sup>, 吉川研一<sup>1)</sup>  
1) 同志社大学超音波医科学研究センター, 2) 千葉大学フロンティア医工学センター  
-----19

9. 音響放射力インパルスの心臓への照射システムの試作  
高野わかな, 古屋元秀, 秋山いわき  
同志社大学超音波医科学研究センター -----21

## 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」

10. MRI と超音波を用いた生体内部の音速推定法の検討  
坂和直幸, 栗原啓輔, 秋山いわき  
同志社大学超音波医科学研究センター -----23

11. 音速分布を考慮した超音波イメージング —超音波と MR による音速分布の推定とその  
補正—  
稲垣 拳, 小南成史, 秋山いわき  
同志社大学超音波医科学研究センター -----25

12. MR と超音波の融合イメージング -MRI 座標系におけるプローブ位置推定法の検討-  
新井慎平, 秋山いわき  
同志社大学超音波医科学研究センター -----27

13. 超音波加温による牛の肝臓の体積熱容量の測定  
金山寛明, 秋山いわき  
同志社大学超音波医科学研究センター -----29

14. 超音波による生体組織の加温と熱物性測定  
辻本祐加子<sup>1)</sup>, 森本舞<sup>1)</sup>, 新田尚隆<sup>2)</sup>, 秋山いわき<sup>1)</sup>  
1) 同志社大学超音波医科学研究センター, 2) 産業総合技術研究所 -----31

### 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」

- 15.** 音声の時間周波数構造の違いがコウモリの Jamming Avoidance 反応に与える影響  
間井谷洋祐<sup>1)</sup>, 長谷一磨<sup>1)</sup>, 鈴木優子<sup>1)</sup>, 小林耕太<sup>1)2)</sup>, 飛龍志津子<sup>1)2)</sup>  
1) 同志社大学 生命医科学部, 2) 同志社大学超音波医科学研究センター  
-----33
- 16.** 複数個体飛行時における CF-FM コウモリの混信回避戦略 コウモリの混信回避戦略  
角屋志美<sup>1)</sup>, 竹内由紀<sup>1)</sup>, 長谷一磨<sup>1)</sup>, 小林耕太<sup>1)2)</sup>, 飛龍志津子<sup>1)2)</sup>  
1) 同志社大学 生命医科学部, 2) 同志社大学超音波医科学研究センター  
-----35
- 17.** 採餌行動時における野生 CF-FM コウモリの超音波センシング戦略に関する検討  
氏野 友裕<sup>1)</sup>, 中井元貴<sup>1)</sup>, 藤岡慧明<sup>1)</sup>, 飛龍志津子<sup>1)2)</sup>  
1) 同志社大学超音波医科学研究センター, 2) 同志社大学生命医科学部  
-----37
- 25.** コウモリの周波数変調を用いた超音波ドプラ血流計測法の検討  
佐藤 寛<sup>1)</sup>, 山名詩織<sup>1)</sup>, 藤岡慧明<sup>1)</sup>, 渡辺好章<sup>1)2)</sup>, 飛龍志津子<sup>1)2)</sup>, 秋山いわき<sup>1)2)</sup>  
1) 同志社大学生命医科学部, 2) 同志社大学超音波医科学研究センター  
-----39
- 26.** 生物音響イメージング：感覚統合の行動応答および脳機能マップ計測  
伊藤優樹<sup>1)</sup>, 佐藤涼, 古山貴文, 飛龍志津子, 小林耕太  
1) 同志社大学生命医科学研究科  
-----41
- 27.** Speech encoding methods for pulsed infrared laser stimulation to a cochlea  
Yuta Tamai<sup>1)</sup>, Kazuyuki Matsumoto, Sizuko Hiryu, Kohta I. Kobayashi  
1) Doshisha University  
-----43

### テーマ4 「生体組織のかたさ測定精度の向上」

- 18.** 顕微 Brillouin 散乱法を用いた AGEs 架橋が縦波音速に及ぼす影響の検討  
川瀬麻実, 松川真美  
同志社大学  
-----45
- 19.** 不均一な皮質骨中の超音波伝搬シミュレーション  
高野幸樹 佐伯誠哉, 松川真美  
同志社大学  
-----47

<b>20. 海綿骨の骨密度が超音波二波伝搬現象に与える影響</b> 中西 翔子, 松川 真美 同志社大学超音波医科学研究センター	-----49
<b>21. 糖化した海綿骨が超音波の音速に与える影響</b> 村島和, 中西翔子, 松川真美 同志社大学超音波医科学研究センター	-----51
<b>22. 粘性内包物を含むファントムを用いた Shear Wave Elastography の検討</b> 藤岡亮輔 <sup>1)</sup> , 加藤寛基 <sup>1)</sup> , 秋山いわき <sup>1)</sup> , 近藤健悟 <sup>2)</sup> , 山川誠 <sup>2)</sup> , 椎名毅 <sup>2)</sup> 1) 同志社大学超音波医科学研究センター, 2) 京都大学大学院医学研究科	-----53
<b>23. 骨コラーゲンの超音波誘発電位の検討</b> 森駿貴, 牧野大輝, 松川真美 同志社大学超音波医科学研究センター	-----55
<b>24. ブタ大腿骨皮質骨中における誘発電位の異方性評価</b> 牧野大輝, 森駿貴, 松川真美 同志社大学超音波医科学研究センター	-----57



# 乳房腫瘍の画像診断 — 造影超音波への期待 —

平井都始子

奈良県立医科大学付属病院総合画像診断センター

〒634-8522 奈良県橿原市四条町 840

E-mail: thirai@narmed-u.ac.jp

キーワード contrast enhanced US, breast tumor, Sonazoid

## 1. はじめに

ソナゾイドを用いた乳房造影超音波は 2012 年 8 月より、乳房腫瘍性病変に対して保険適用となった。第 3 相臨床試験では乳房腫瘍性病変の良悪性の鑑別診断において、造影超音波は B モードや造影 MRI に比べて有意に診断能が高い<sup>1,2)</sup> という結果が得られているが、実臨床では鑑別診断よりも乳癌の広がり診断や術前化学療法の効果判定などへの応用が期待されている。そこで、乳房腫瘍が疑われる症例に対する診断の流れに沿って、造影を含めた超音波検査の役割と造影超音波に期待される情報や問題点について症例を中心に提示する。

## 2. 乳房腫瘍の診断の流れ

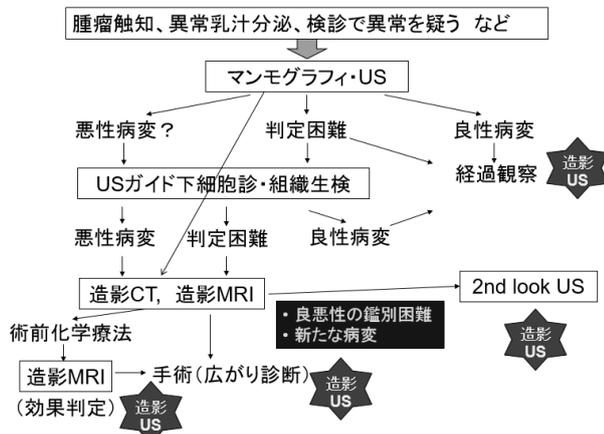


図 1 乳房腫瘍診断の流れ

図 1 に診断の流れを示す。「乳房にしこりが触れる」、「異常乳汁分泌がある」、「検診で異常を指摘された」などの主訴で来院した患者さんには診察と同時にマンモグラフィと超音波検査が施行される。そこで、良性病変であると診断されれば経過観察となるが、悪性を疑う場合や悪性を否定できない場合は、超音波で観察しながら細胞や組織を取って検査をする。

悪性病変であると診断された場合は、造影 CT、MRI で

病変の広がり診断をして手術または化学療法が選択される。

手術では病変の範囲を過不足なく切除することが重要である。病変局所の広がり診断は造影 MRI が有用とされているが、MRI は腹臥位で撮影するため手術の体位では病変の形態や位置が変化する。切除範囲は超音波ガイド下に病変を確認しながらマーキングして手術に臨むが、MRI での病変の広がりを正確に反映することは難しい。

術前に化学療法を行った場合は、主に造影 MRI で効果判定をして手術される。

良性または判定困難の場合は、経過観察、造影 MRI による鑑別診断、摘出生検などが選択される。

広がり診断のための造影 MRI を実施すると、37% の症例に新たな別の病変が検出され、その病変が悪性である確率は、同側で 6.2%、対側で 3.9%とされている。そのため新たに見つかった病変の良悪性の鑑別診断のために、造影 MRI の所見を参考にしながら再度超音波検査が施行される。これを 2nd look US と呼んでいる。2nd look US で病変が確認された場合は、その病変の細胞や組織を超音波ガイド下に採取して良悪性を鑑別するが、超音波では視認困難な小病変が多く問題となっている。

以上のような診断と治療の流れの中で、組織を取っても良悪性の鑑別ができなかった場合、術前の広がり診断、術前化学療法の効果判定、2nd look US などに造影超音波が期待されている。

## 3. 造影超音波の方法<sup>3)</sup>

### 3.1. 造影モードと条件設定

肝臓の造影超音波では一般的に中音圧のハーモニック法が用いられているが、この手法では組織からの信号が完全には抑制されず、高輝度病変では造影効果の視認性が不良である。乳腺組織は高輝度で、低エコーを示す乳房腫瘍の造影効果は明瞭であるが、腫瘍を形成せず乳管内を進展する病変や乳癌の浸潤部分など病変境界部は高エコーのため造影効果の視認性が不良と

なる。そこで、ハーモニック法に比べて空間分解能には劣るが、組織からの信号抑制が良好で造影感度が高く、高輝度病変でも造影効果を認識しやすい振幅変調法を用いている。乳房の造影超音波では6 MHz程度の高周波リニアプローブを用い、MI値は0.2前後、フォーカス位置は病変の深部としている。

### 3.2. 造影剤投与量

乳房造影超音波では1回0.5ml/bodyの静注で十分な造影効果が得られる。また、正常乳腺の造影効果は通常弱く、肝臓のような後血管相がないため、ソナゾイドの血中濃度が下がり、造影効果が弱くなった時点で（造影剤投与後3~5分程度）再投与すれば、初回と同様の造影効果が観察できる。ソナゾイドは1バイアル2mlの製剤であり、乳房領域では必要に応じて、再投与することにより多断面での評価が可能である。

### 3.3. 造影プロトコール

乳房腫瘍の良悪性の鑑別診断に対する造影超音波の臨床試験時のプロトコール<sup>1,2)</sup>では、関心領域に断面を固定して、ソナゾイド静注前から1分後まで観察し、その後数回の積算画像を作成した。積算画像は、Micro flow imaging (MFI), microbubble trace imaging (MTI), accumulation, capture など装置により様々な名称で呼ばれているが、いずれも基本的には同一断面で一定の時間経過内の数十フレームの画像を足し算した画像である。

## 4. 造影超音波による良悪性の鑑別診断

乳腺領域では超音波で確認できる病変は、細胞診や組織診が比較的容易である。しかし、超音波像から悪性を否定できないが細胞診ができない場合や、細胞診で判定不能であった場合には造影超音波が有用と思われる。良性病変の造影所見は、染影がないまたは均一であるのに対し、悪性病変は造影欠損を伴う、または不均一な染影で、washoutが速い、Bモードで病変として認識できるより広く染影されるなどの特徴がある。

## 5. 造影超音波による広がり診断

広がり診断には造影MRIが実施されるが、腹臥位で撮影するため、MRIで確認した濃染域を手術体位で正確に把握するのは困難なことも多い。手術体位で実施できる造影超音波により造影MRIと同等の広がり診断が可能になれば、直接造影超音波をガイドに切除範囲をマーキングし、より適切な手術が可能になる。今後、造影範囲と病理組織との対比の蓄積が必要ではあるが、術前にMRIが実施できない症例、MRIで乳管内病変を伴うと判断される病変や非腫瘍性病変の術前マーキングに造影超音波は非常に有用な検査法になる。

## 6. 造影超音波による術前化学療法の効果判定

術前薬物療法により病理学的完全奏功が得られた症例は、進行乳癌であっても予後良好で、良好な腫瘍縮小効果が得られれば乳房温存手術が可能となる。術前薬物療法の効果判定について、造影MRIが有用であるとの報告もあるが、MRIでは化学療法により引き起こされた線維化や炎症などの造影効果により過大評価される場合があることや、造影効果の減少した非浸潤性乳管癌は逆に過小評価されるなどの問題点も指摘されている。超音波造影剤は血管外への漏出がないため、MRIとは異なり純粋に腫瘍新生血管の多寡を反映した評価ができる可能性がある。薬物療法の効果判定において造影超音波による腫瘍内部や周囲の染影の評価が有用であるとする報告や、動物実験でも造影超音波の有効性が示されている。

## 7. 造影超音波を用いた2nd look US

マンモグラフィやMRIで検出されるが、初回の超音波では確認できなかった病変については、2nd look USが行われる。最近では、CTやMRIの画像を参照しながら超音波で同一断面をリアルタイムに観察できる機能を備えた超音波装置も用いられているが、乳房ではCTやMRIと断面を正確に一致させることは難しい。特に、MRIは腹臥位で撮影されることが多く、CTでは同じ背臥位でも上肢を拳上するため、手術体位の超音波と病変の位置が大きくずれることを、しばしば経験する。2nd look USで病変を疑う部位で、造影超音波をすることにより、MRIと同様に造影される病変が確認できれば、造影所見を参考にして細胞診や生検をすることが可能になる。

## 文 献

- [1] Miyamoto Y, Ito T, Takada E, Omoto K, Hirai T, Sekiguchi R, Okuno T, Kanazawa S, Nakata N, Igarashi T, “Phase II clinical study of DD-723(perflubutane); Dose-response study in patients with breast tumors” J. Med. Ultrasonics, vol.39, no.2, pp.79-86, 2012.
- [2] Miyamoto Y, Ito T, Takada E, Omoto K, Hirai T, Moriyasu F, “Efficacy of SONAZOID (perflubutane) contrast-enhanced ultrasound in the differentiation of focal breast lesions: Phase 3 multicenter clinical trial,” AJR, vol.202, no.4, pp.400-407, 2014.
- [3] 平井都始子, 中村卓, 丸上亜希, 小林豊樹. “乳房の造影超音波” Jpn J Med Ultrasonics, vol.41, no.3, pp.353-365, 2014.

# 高速超音波断層法による循環器動態計測

長谷川英之<sup>†</sup>

<sup>†</sup> 富山大学大学院理工学研究部 〒930-8555 富山県富山市五福 3190

E-mail: <sup>†</sup> hasegawa@eng.u-toyama.ac.jp

キーワード 高速超音波イメージング, ビームフォーミング, 動態計測

## 1. はじめに

超音波断層法は、体内臓器の断層像が非侵襲かつリアルタイムに得られる大変有用な技術である。超音波断層像により、心臓などのマクロな運動や形状を肉眼で観察し、異常を診断することができる。また、超音波ドプラ法など超音波信号の解析により血流動態や壁運動の定量計測を行うことができるなど[1], 超音波診断技術の果たす役割は大きい。超音波断層法は、CTやMRIなど他の画像診断技術に比べ時間分解能が高く、動的な循環器の観察には好適である。しかし近年、心機能・心筋性状の評価のためには、非常に短時間(10 ms程度)の心筋の収縮弛緩の遷移や弁の開閉などにより発生した心臓壁振動の伝搬を計測することが有用であることが示される[2,3]など、更なる高時間分解能が望まれるようになってきている。著者らはこれまでに、リニア型超音波プローブを用いた表在血管計測におけるフレームレートを、従来の数十 Hz から 3500 Hz 程度まで向上させることにより血管壁および血流の動態を同時に計測できることを示すとともに[4], セクタ型超音波プローブを用いた心臓のイメージングにも適用可能としてきた。それにより、複雑な心臓内の血流動態も高時間分解能で観察することを可能とした[5]。本報告では、このような循環器動態の高精度計測を可能とする高速超音波イメージング法について述べる。

## 2. 原理

### 2.1. 高速超音波イメージング法

従来のセクタ走査では送信・受信ともに集束ビームを形成するため、送信繰り返し周波数を  $f_{PRF}$ , 走査線数を  $N_{bm}$  とするとフレームレートは  $f_{PRF} / N_{bm}$  となる。一方、並列ビーム形成法(parallel beam forming: PBF)[6]では、平面波などの非集束ビームを送信し、そのビーム内に複数の受信集束ビームを形成するため、従来のセクタ走査と同じ走査線数を得るために必要な送信回数を減少させることができる。ただし、最終的なビームの指向性は、送信ビームと受信ビームの指向性の積となるため[7], 従来のセクタ走査に比べ方位方向の指向特性は劣化する。

### 2.2. 高空間分解能化法

前節で述べたように、高速超音波イメージング法においては平面波などの非集束送信ビームを用いるため、方位分解能が劣化する。したがって、それを補うための高空間分解能化法が有用である。本研究では、受信超音波信号の位相に着目した高空間分解能化、不要エコー低減法を開発した[8]。図1は、不要エコー抑圧法の原理を説明した図である。超音波プローブの各素子(圧電振動子)で受信した信号は、超音波散乱源の位置から各素子までに距離に応じて遅延して受信される。受信ビームフォーミングでは、設定した受信焦点位置から各素子までの距離に応じた遅延時間により受信信号の遅延を相殺する。そのため、超音波散乱体位置と受信焦点位置が一致する場合(図1左), 各素子で受信した信号は時間的に揃ったものとなる。つまり、素子の配列方向に受信信号の位相が揃うことになる。この場合は、受信した超音波信号が受信焦点位置から発生したものであり、強調すべき信号(所望信号)である。一方、図1(中央)および図1(右)に示すように、超音波散乱体波が、受信焦点からずれた点から発生する場合、その受信信号は抑圧されるべき不要信号である。実際の処理においては、所望信号の場合は受信信号の素子配列方向の位相分散が小さく、不要信号の場合は位相分散が大きいことを利用している。

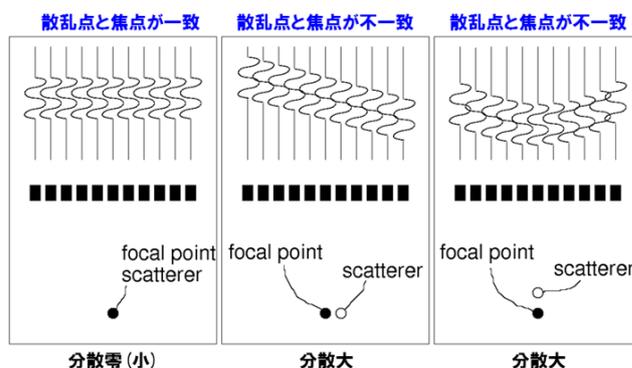


図1: 超音波プローブの素子で受信した信号の模式図。(左) 受信焦点位置と超音波散乱体位置が一致する場合。受信焦点位置が超音波散乱体位置から水平方向(中央)および垂直方向(右)にずれた場合。

### 3. 実験結果

#### 3.1. 高空間分解能化法の効果

超音波断層像の画質評価用ファントム(model 040GSE, CIRS)を用いて、高速超音波イメージング法により得られる断層像の空間分解能等の評価を行った。図2は、ファントムの超音波断層像である。図2(a)の従来法による断層像に比べ、不要エコーが低減しコントラストが向上していることが分かる。また、点散乱体からのエコーのサイズが小さくなっていることから、空間分解能も向上していることが分かる。

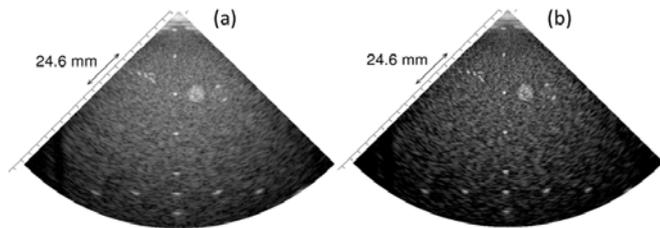


図2: (a) 従来のビームフォーミング法により得られた超音波断層像。(b) 本研究で開発した高コントラスト化手法を用いて得られた超音波断層像。

#### 3.2. 高速超音波イメージング法

前述した高速イメージング法により心臓の超音波断層像の計測を行った。図3(a)に模式的に示すように、心尖部方向から断層像を測定した。図3(b)は球面拡散送信波を用いた高速イメージングにより得られた心臓の超音波断層像であり、2.2節に述べた手法により高空間分解能化を行ってある。撮像速度は6250フレーム毎秒である。血液の流れは心筋などの組織の動きに比べて早いため、受信信号の時間(フレーム)方向の変動周波数が高い。したがって、時間方向に高域通過フィルタを適用することにより、移動速度の大きい対象からのエコーのみを抽出したものが図3(c)である。図3(c)の左心室内腔に、大動脈に駆出される血球からのエコーが描出されている。図3(c)の結果に示されるように、高速超音波イメージング法により心臓内腔の血球からのエコーを超高速に描出することができ、心臓内の複雑な血流動態を観察することが可能となった。

#### 4. まとめ

高フレームレート超音波撮像法は、秒間数千枚の高時間分解能計測により、従来は計測することができなかった高速な組織動態を捉えることを可能とする。音響放射圧を印加することで発生させた軟組織中のずり波の伝搬を計測[9]することに端を発した高速超音波イメージング法は、その適用領域を急激に拡大している。本報告に示した血流動態の計測だけでなく、近年では高強度集束超音波治療における治療効果のモニタ

リング目的にも用いられるようになってきている。時間分解能の高さは超音波診断の大きな強みの一つであり、それを増強する高速超音波イメージング法は、様々な用途への応用が期待される。

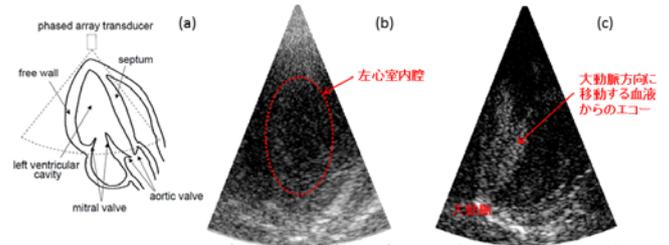


図3: 心臓の超音波断層像。(a) 測定断面の模式図。(b) 超高速イメージングにより得られた心臓の超音波断層像(6250 フレーム毎秒)。(c) 高域通過フィルタ後の超音波断層像。

#### 文 献

- [1] G. R. Sutherland, G. D. Salvo, P. Claus, J. D'hooge, and B. Bijnens, "Strain and strain rate imaging: A new approach to quantifying regional myocardial function," J. Am. Soc. Echocardiogr., vol. 17, pp. 788-802, 2004.
- [2] H. Yoshiara, H. Hasegawa, H. Kanai, and M. Tanaka, "Ultrasonic imaging of propagation of contraction and relaxation in the heart walls at high temporal resolution," Jpn. J. Appl. Phys., vol. 46, pp. 4889-4896, 2007.
- [3] H. Kanai, "Propagation of spontaneously actuated pulsive vibration in human heart wall and in vivo viscoelasticity estimation," IEEE Trans. Ultrason. Ferroelect. Freq. Contr., vol. 51, pp. 1931-1942, 2005.
- [4] H. Hasegawa and H. Kanai, "Simultaneous imaging of artery-wall strain and blood flow by high frame rate acquisition of RF signals," IEEE Trans. Ultrason. Ferroelect. Freq. Contr., vol. 55, pp. 2626-2639, 2008.
- [5] H. Takahashi, H. Hasegawa, and H. Kanai, "Echo speckle imaging of blood particles with high-frame-rate echocardiography," Jpn. J. Appl. Phys., vol. 53, pp. 07KF08-1-07KF08-7, 2014.
- [6] D. P. Shattuck, M. D. Weinschenker, S. W. Smith, and O. T. Von Ramm, "Explososcan: A parallel processing technique for high speed ultrasound imaging with linear phased arrays," J. Acoust. Soc. Amer., vol. 75, pp. 1273-1282, 1984.
- [7] B. R. Mahafza, Introduction to Radar Analysis, CRC Press, Boca Raton, 1998.
- [8] H. Hasegawa, "Enhancing effect of phase coherence factor for improvement of spatial resolution in ultrasonic imaging," J. Med. Ultrason., vol. 43, pp. 19-27, January 2016.
- [9] M. Tanter, J. Bercoff, L. Sandrin, and M. Fink, "Ultrafast compound imaging for 2-D motion vector estimation: Application to transient elastography," IEEE Trans. Ultrason. Ferroelect. Freq. Contr., vol. 49, pp. 1363-1374, 2002.

# Protect Effects of Ascorbic Acid against Double-strand Breaks in Giant DNA Molecules: Comparison among the Damages Induced by Photo, Ultrasound and Gamma-Ray Irradiation

Yue Ma,<sup>1</sup> Naoki Ogawa,<sup>1</sup> Yuko Yoshikawa,<sup>2</sup> Toshiaki Mori,<sup>3</sup>  
Tadayuki Imanaka,<sup>2</sup> Yoshiaki Watanabe,<sup>1</sup> Kenichi Yoshikawa<sup>1</sup>

1. Faculty of Biological and Medical Sciences, Doshisha University, Kyotanabe 610-0394, Japan

2. Laboratory of Environmental Biotechnology, Ritsumeikan University, Kusatsu 525-8577, Japan

3. Radiation Research Laboratory, Osaka Prefecture University, Sakai 599-8570, Japan

E-mail: emp1501@mail4.doshisha.ac.jp (Yue Ma)

Keyword: Ascorbic Acid, Giant DNA, Double-strand Breaks, Real-time Observation

## 1. Introduction

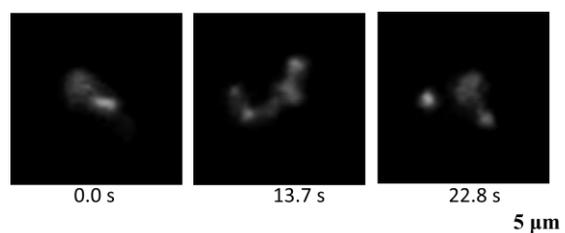
DNA damage can be categorized into base changes, cross linking, and single- and double-strand breaks (DSBs). Among them, the damage of DSBs is most serious and they lead to cancer and death.

Ascorbic acid, vitamin C, is a well-known naturally occurring organic compound with antioxidant properties. In order to evaluate the protective effects of ascorbic acid (AsA), as a representative chemical among antioxidants, on genomic giant DNA molecules, we studied the double-strand breaks of DNA caused by different damage source, visible light in the presence of photo sensitizer,  $\gamma$ -ray and ultrasound through single-molecule observation by use of fluorescence microscopy.

## 2. Methods

### 2.1 Real-time observation of photo-induced breakage under fluorescence microscopy

A low DNA concentration (0.1  $\mu\text{M}$  in nucleotide units) with AsA's final concentrations as 0.5 mM and 1.0 mM was used for photo-irradiation.<sup>1</sup> Fig. 1 shows an example of observation on the time process of double-strand break on a single DNA molecule under photo irradiation.



**Figure 1:** Real-time observation of double-strand break caused under stationary light illumination with 450–490 nm for a single T4 DNA molecule stained by YOYO-1, as observed by fluorescence microscopy.

### 2.2 Gamma-ray irradiation and ultrasound irradiation

T4 phage DNA (final concentration: 0.1  $\mu\text{M}$ ) was irradiated by  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays at a dose rate 3860 Gy/h after added ascorbic acid with a concentration as 0.5 and 1.0 mM.

The strength of ultrasound could be controlled by the repositioning of transducers. Ascorbic acid's final concentration is 1.0 mM.<sup>2-3</sup>

### 2.3 Measurement of single-DNA molecules' length by fluorescence microscopy

DNA molecules were fixed on a glass surface after added YOYO-1. Glasses were pre-treated with 0.05% (v/v) poly-(L-Lysine) solution. Fig. 2 showed a group of representative images.



Figure 2: Examples of DNA images fixed on a glass slide after irradiation with different doses of  $\gamma$ -rays.

### 3. Results

#### 3.1 Protective effect of ascorbic acid against photo-induced DNA double-strand breaks

Fig. 3 showed the relationship between the content of damage DNA and time, which demonstrates that AsA has a good protection on photo-induced DNA damage.

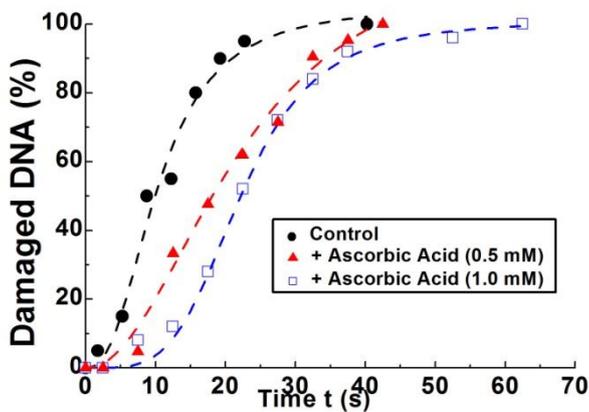


Figure 3: Protective effect of ascorbic acid against the double strand breaks caused by photo-irradiation.

#### 3.2 Protective effect of ascorbic acid against gamma-ray-induced DNA double-strand breaks

The result of the observation was showed by Fig. 4. It is found that the average length of DNA molecules is longer after add AsA into samples, indicating the protective effect of AsA against DSBs caused by  $\gamma$ -rays.

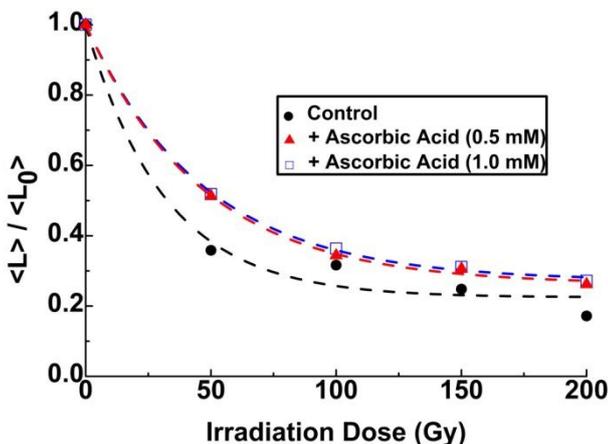


Figure 4: Protective effect of ascorbic acid against the double-strand breaks caused by  $\gamma$ -ray.

#### 3.3 Ultrasound-induced DNA double-strand breaks

As Fig. 5 showed, the average length of DNA remained essentially constant, indicating the absence of protective effect of AsA against ultrasound-induced damage.

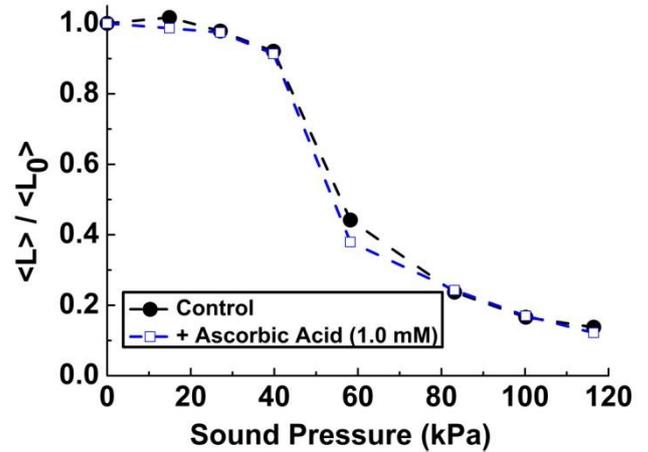


Figure 5: No apparent protective effect ascorbic acid against the double strand breaks caused by ultrasound.

### 4. Conclusion

Comparing the protective effect of AsA among three different radiation resources, the followings have it become clear: For the photo-induced DSBs, AsA obviously slows down the breaks and this protective effect is enhanced at higher AsA concentration; With regard to the damage caused by  $\gamma$ -ray, AsA still exhibits protective effect being not so significant compared to that for the photo irradiation. In the experiment of ultrasound irradiation, AsA shows no apparent protective effect against the DSBs.

### Reference

1. Y. Yoshikawa, M. Suzuki, N. Yamada, &K. Yoshikawa, Double-strand break of Giant DNA, FEBS Lett., 566 (2004) 39.
2. Y. Yoshikawa, T. Mori, M. Suzuki, T. Imanaka, &K. Yoshikawa, Comparative study of kinetics on DNA double-strand break induced by photo- and gamma-irradiation, Chem.Phys. Lett., 501 (2010) 146.
- 3.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., 103 (2013) 063705.

# 攪拌操作が引き起こすゲノム DNA の二本鎖切断

— 良く混ぜてかつ損傷を最小に —

菊池 駿斗 野瀬啓二 吉川 祐子 吉川 研一

†同志社大学生命医科学研究科生命物理学研究室 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

E-mail: kyouj0903@gamil.com

キーワード Double-strand break, single molecular observation, mechanical vibration, genomic DNA

## 1. 緒言

長いゲノム DNA (100 kbp~) は、組織および細胞からの単離の過程で断片化される傾向があることが知られている。特に攪拌およびピペッティングのような機械的処理は、100 kbp のサイズを超える長い DNA 分子に対して大きな影響を与える。生体内のゲノム DNA をそのまま扱うことは遺伝情報を素早く解析でき、また、その構造的特性の研究にもつながる。実験手順中の損傷を最小限に抑えて巨大な DNA 分子を調製する実験方法の開発が非常に望まれている。今回我々は、蛍光顕微鏡を使用して、ボルテックスミキサーなどの振動を伴う混合手順下での巨大 DNA 分子上の二本鎖切断 (DSB) の定量的評価に関する結果を報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料調整

本実験では、自然長が異なる T4-DNA (57  $\mu\text{m}$ , 166 kbp) と、 $\lambda$ -DNA (16  $\mu\text{m}$ , 48 kbp) の 2 種類を使用した。DNA の最終濃度が 0.03  $\mu\text{l}$  になるようサンプルを調整した。機械的刺激として、DNA 溶液を入れたマイクロチューブをボルテックスミキサーに固定し、刺激を与えた。加振する時間は 1 s~300 s まで変化させた。本実験の回転数は 1300 rpm と 500 rpm とした。

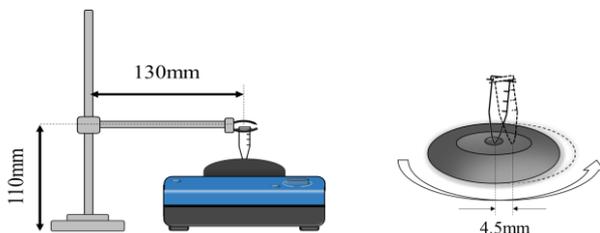


Fig.1 Schematic view on the mechanical agitator on the solution in a test-tube. The moving part performs orbital motion with the radius of 4.5 mm.

### 2.2 蛍光顕微鏡による DNA の一分子観察

ガラスベースディッシュ表面を Poly-L-lysine 水溶液でカチオン処理し、DNA がガラス基板表面に弱く吸着されるようにした。加振後の DNA 溶液を、図 2 に示すようにガラスベースディッシュにピペットで滴下し、溶液を基板上で軽く引き伸ばすことにより、溶液中の DNA を伸展させ吸着させ蛍光顕微鏡 (蛍光色素: YOYO-1) により観察した。

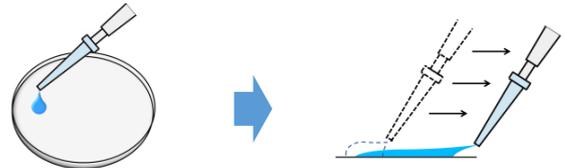


Fig.2 Experimental procedure to evaluate the number of double-strand breaks based on the measurements on full-stretch length of DNA.

## 3. 実験結果

### 3.1 加振による DNA 切断

Fig.1b にそれぞれの加振時間での DNA の平均長を示す。DNA の種類に関わらず、加振時間の増加に伴い DNA の平均長が短くなることから、超音波のような高周波でなく、低周波の振動においても DNA 二本鎖切断が引き起こされることが明らかとなった。また、最終的に T4・ $\lambda$  共に 10  $\mu\text{m}$  付近に漸近することが明らかとなった。

次に単位長さ当たりの DNA 二本鎖切断回数を求めた (Fig.3c)。0~1 s 間加振した際、切断速度は急激な増加傾向を示す。しかし、さらに加振を続けると、加振時間の増加に伴い切断速度が緩やかに減少していく傾向が見られた。このことより加振時間の短い 0~1 s における急激な切断速度の増加は、加振前の DNA の平均長の影響は受けにくく、回転数の大きさの影響を受けやすいことが明らかとなった。

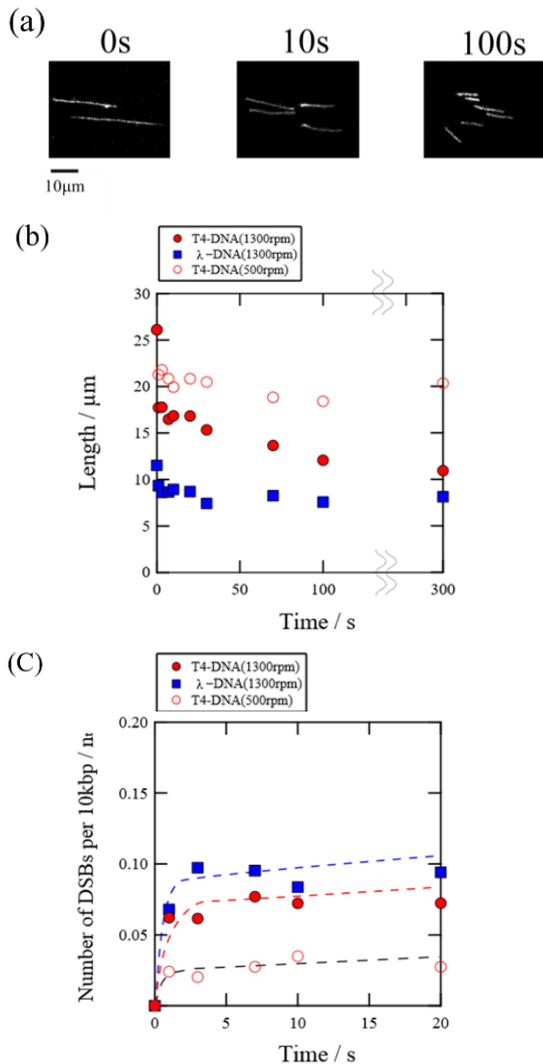


Fig.3. (a) Fluorescence microscopic images on single T4 DNA molecule stretched on a glass slide as in the procedure shown in Fig.2. (Fluorescent dye YOYO-1: 0.05  $\mu\text{M}$ ) (b) DNA length of T4-DNA (circle: 57  $\mu\text{m}$ , 166 kbp) and  $\lambda$ -DNA (square: 16  $\mu\text{m}$ , 48 kbp) as a function of mixing time. Mechanical agitation of T4-DNA was conducted with 500 rpm (blank circle) and 1300 rpm (circle). (c) The breakage increases for the period of a few seconds and then goes into the stage almost no additional damage.

### 3.2 新規手法の提案

Fig.3より初期の振動が切断に大きく影響していることが示唆された。そこで初期の加速度を抑えるため、60秒間で回転数1300rpmに到達するようゆっくり加速後、規定時間の振動を与えることを試みた(Fig.4a)。回転数1300rpmで加振後、0~30sの切断頻度が、従来の方法に比べて減少し、30s以後は、切断頻度は緩やかに増加した(Fig.4b)。これよりDNAの切断は①初期の振動による影響②一定の振動での影響(特に溶液とDNAのずり応力)の二段階によって進行していくことが推測された。

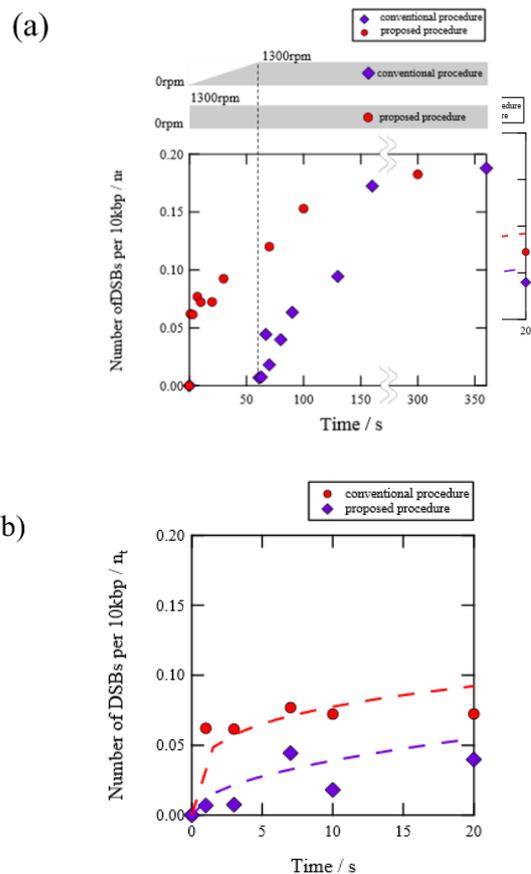


Fig.4. (a) Number of DSBs per 10kbp as a function of mixing time. (circle: The rotation speed was 1300 rpm during the mechanical agitation.; diamond: The rotation speed was gradually accelerated to 1300 rpm over 60 sec.) (b) X-axis of proposed procedure was shifted 60 sec to the left in order to compare the results.

### 4. 結論

- ①低周波振動DNAは断片化されるが、一定の長さに漸近することがわかった(1300rpmでは10 $\mu\text{m}$ 付近に漸近した)。
  - ②切断速度は加振時間の短い0~1sの加振時間では大きく増加するが、その後は減少する。
  - ③振動初期の加速度を減少させることで、切断頻度を減少させることに成功した。
- 今後、より周波数の高い超音波洗浄機などでのDNA二本鎖切断の頻度の比較を行っていく予定である。

### 5. 参考文献

[1] K. Yoshida, et al., Appl. Phys. Lett., 103, 063705 (2013).  
 [2] Y. Yoshikawa, et al, Chem. Phys. Lett., 456, 80(2008).

# 超音波照射下のマイクロバブル表面における分子膜形成と脱離

谷村 望美<sup>†</sup> 中田 真希子<sup>†</sup> 小山 大介<sup>††</sup> Marie Pierre Krafft<sup>†††</sup>

<sup>†</sup> 同志社大学生命医科学部 〒610-0321 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

<sup>††</sup> 同志社大学理工学部 〒610-0321 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

<sup>†††</sup> Institut Charles Sadron (CNRS), University of Strasbourg, 23 rue du Loess, 67034 Strasbourg, France

E-mail: <sup>†</sup>tctub1039@mail4.doshisha.ac.jp, <sup>††</sup>dkoyama@mail.doshisha.ac.jp

キーワード マイクロバブル, 分子膜, 崩壊, 表面張力

## 1. はじめに

血管投与型の薬物治療において、体内の正常な組織が薬物の影響を受け、副作用が発生することが問題となる。この問題を解決するため局所的薬剤投与方法である各種のドラッグ・デリバリー・システム(DDS)が考案されている。超音波を組み合わせたDDSは、薬物を含むマイクロバブルを薬物キャリアとして血管内投与し、血流によって患部まで運搬した後、体表からの超音波照射をトリガとしてマイクロバブルを振動・崩壊させることにより、患部のみ薬物を放出する技術である<sup>1)</sup>。超音波によって生体に安全かつ効率的な薬物投与を実現するためには、マイクロバブルの周囲分子膜の選定や、超音波照射による周囲分子のふるまい、バブルの振動および崩壊特性を明らかにすることが重要となる。そこで本報告では、マイクロバブルの崩壊に着目し、周囲分子膜が超音波照射下におけるバブル崩壊に要する音圧閾値に与える影響について実験的に検討した。また、バブル周囲に吸着する周囲分子膜の形成状態を評価した。

## 2. 実験原理

### 2.1 バブルの振動・崩壊特性

本報告で取り扱うマイクロバブルは、周囲分子膜と内部気体から構成されており、超音波照射に伴い、それと同期した膨張収縮運動を繰り返す。超音波の音圧振幅を徐々に増加させると、球形振動、非球形振動を経て、最終的に崩壊する傾向がある<sup>2)</sup>。本報告では、マイクロバブルから内部気体(いわゆるDaughter bubble)が飛び出る現象を崩壊と定義した。

### 2.2 分子膜形成状態の評価

#### (1) 接触角

一般的に気体中において固体面に付着した液滴の接触角は、液面と固体面のなす角である。本報告では、液体中において固体面に付着する気体を観測するため、液面と固体面のなす角(図1中 $\theta$ )を接触角と定義し、次の(1)式より算出した<sup>3)</sup>。

$$\theta = \cos^{-1} \left( \frac{2H}{D} \right) \quad (1)$$

ここで $H$ はマイクロバブルの中心からガラス表面までの距離、 $D$ はマイクロバブルの水平方向の直径を表す。

#### (2) 表面張力との関係

表面張力は異なる物体間に働く界面を小さくしようとする力であり、マイクロバブルの表面に界面活性剤分子が吸着すると、気液界面の表面張力が小さくなる。表面張力が小さくなると、図1において

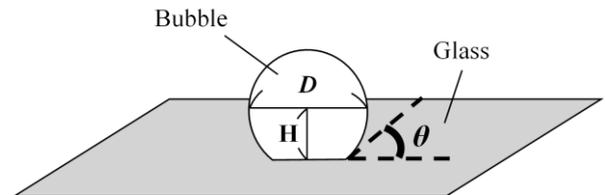


図1 接触角

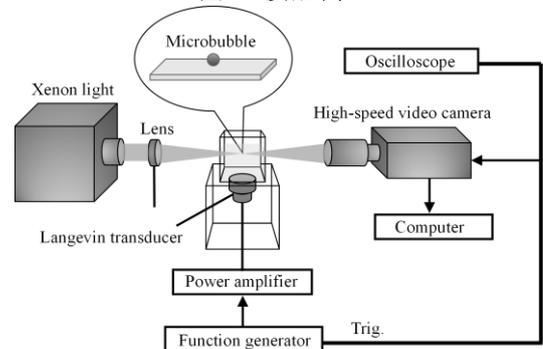


図2 高速度カメラによるバブル観測システム

接触角 $\theta$ は小さくなる関係にある。従って、本報告では接触角を計測することにより周囲分子膜の形成状態を評価した。

## 3. 実験方法

### 3.1 膜材質溶液の作製

膜材質には低毒性で生体適合性が良い Pluronic F<sub>68</sub> を選択した。ガラス瓶に純水と Pluronic F<sub>68</sub> を入れ、24 時間攪拌し 1 mM の膜材質溶液を作製した。

### 3.2 マイクロバブルの作製

実験セル内を Pluronic F<sub>68</sub> 溶液で満たし、電気分解で発生した Air バブルをセル内に設置したガラスに付着させて作製した。マイクロバブルのガラス付着後から、マイクロバブルの表面張力が安定するとされる約 3600 秒時間を置き、溶液中の分子をマイクロバブルに吸着させ、周囲分子膜を形成した。

### 3.3 分子膜形成状態の評価

図2にマイクロバブルの接触角の観測システムを示した。3.2の手順で作製したマイクロバブルをガラス付着時から約 360 秒毎に計 10 回高速度カメラ(Shimadzu, HPV-1)で撮影し、それぞれの時間における接触角を計測し、時間経過に伴う分子膜の形成状態を評価した。

### 3.4 マイクロバブルの崩壊の観測

図2の観測システムを用いてマイクロバブルの崩

壊を観測した。3.2 の手順で作製したマイクロバブルに、セルの底面に設置した共振周波数 38.8 kHz のランジュバン型振動子から超音波を 15 波照射し、マイクロバブルの振動、崩壊の様子を高速度カメラ（撮影速度 63,000 fps）で撮影した。超音波の音圧は低音圧から徐々に増加させ、バブルが崩壊するまで各音圧で上記観測を繰り返し行い、初期半径と崩壊時の負音圧を測定した。また、周囲分子膜がマイクロバブルの崩壊に与える影響を比較検討するため、脱気水中で作製した膜なしのマイクロバブル（Air バブル）を用いて同様の実験を行った。

#### 4. 実験結果・考察

##### 4.1 分子膜形成状態の評価

Pluronic F<sub>68</sub> 溶液中における様々な径のマイクロバブルの接触角の時間変化を図 3 に示した。横軸は時間、縦軸は接触角  $\theta$  を表しており、バブルの初期半径毎に 4 つに分けて表示している ((a) は 50-70  $\mu\text{m}$ , (b) は 70-90  $\mu\text{m}$ , (c) は 90-110  $\mu\text{m}$ , (d) は 110-140  $\mu\text{m}$ )。同図より、すべてのバブルにおいて時間経過に伴い周囲に分子膜が形成され、接触角が低下する、すなわち表面張力が下がったことがわかる。

##### 4.2 マイクロバブルの崩壊の観測

測定したバブルおよび Air バブルの初期半径と崩壊時の負音圧ピーク値の関係を図 4 に示した。横軸はマイクロバブルの初期半径、縦軸は崩壊時の負音圧である。同図より、周囲分子膜を形成したバブルと Air バブルについて、崩壊に要する負音圧には大きな差は認められなかった。この原因として、マイクロバブルに吸着した分子が超音波照射の影響で脱離した可能性を考え、超音波照射前後のバブルの接触角を計測することで、バブルへの超音波照射が分子膜の形成状態に与える影響を検討した。

図 5 は超音波照射によるバブルの接触角変化を表しており、横軸は超音波照射回数（正弦波 15 波の超音波パルスを 1 回とカウント）、縦軸は接触角である。同図(a)は音圧 10 kPa, (b)は 15 kPa, (c)は 20 kPa の場合の結果である。これらの結果より、超音波パルスの照射回数を重ねるにつれ、接触角が徐々に上昇する、すなわち表面張力が増加する傾向が観測された。このことは、超音波によって引き起こされるバブルの振動によって、バブル表面に吸着した界面活性剤分子の一部が、気液界面から脱離した可能性を示唆している。

##### 5. まとめ

本研究では、接触角の時間変化の観測から分子膜の形成を評価し、超音波照射によるマイクロバブルの崩壊について検討を行った。長期的な超音波照射によるマイクロバブルの崩壊時には、周囲分子膜が脱離している可能性が示唆された。接触角の変化から分子吸着を評価した結果においても、同様の傾向が観測されたため、今後より詳細に分子脱離メカニズムについて検討する必要がある。

#### 文 献

- [1] 山田正敏 他, “超音波と DDS を組み合わせたがん治療法”, 生体医工学 43 巻 2 号, 6 月 2005.
- [2] 別府慎太郎, “コントラストエコー法, 泡のエンジニアリング”, pp.436-437, 3 月 2005.
- [3] K. Yoshida, et al., “Power-law dependence describing subharmonic generation from a non-spherically oscillating bubble”, 2014

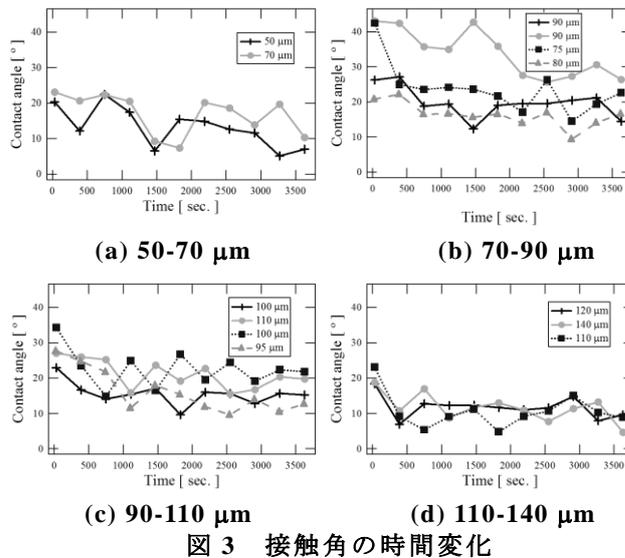


図 3 接触角の時間変化

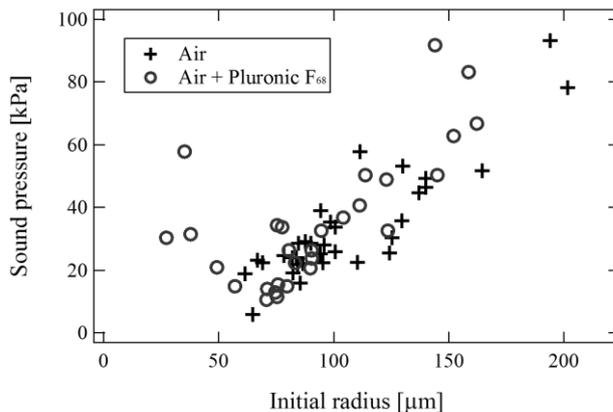


図 4 バブルの初期半径と崩壊時の負音圧の関係

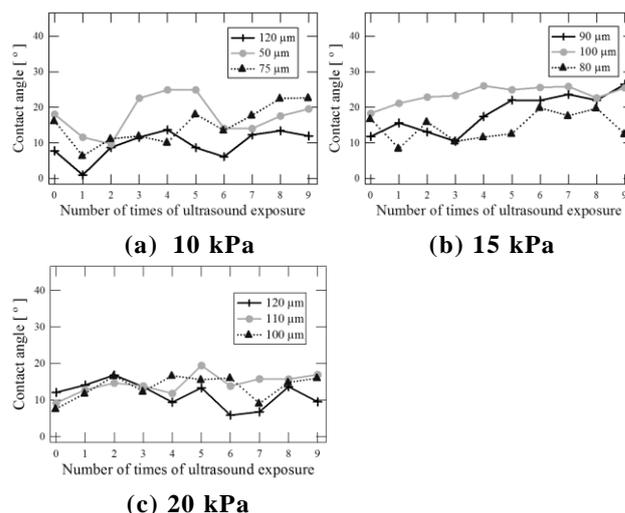


図 5 超音波照射によるバブルの接触角の変化

#### 謝 辞

本研究は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）の助成を受け実施したものである。

# 超音波照射によるゲノム DNA 二重鎖切断メカニズムの物理モデル構築 — 蛍光顕微鏡による DNA 一分子観察の活用 —

剣持 貴弘, 馬 越, 菊池 駿斗, 吉川 祐子, 吉川 研一

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: tkenmots@mail.doshisha.ac.jp

キーワード 超音波, ゲノム DNA, 二重鎖切断

## 1. Introduction

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. 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て, 研究を進め, 超音波パルス照射による DNA 二重鎖切断に関する物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, DNA 二重鎖切断メカニズムの詳細については, 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, 物理モデル構築に至っていない. 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の物理モデル構築を図る.

## 2. Experimental results

本研究では, 振動数 30 kHz, 音圧 90 kPa, 照射時間 60 s, 照射率  $D=0.4, 0.8, 1.0$  の条件で超音波パルス照射実験を行った. ここで, 照射率  $D$  は,  $D = \tau_{ON} / (\tau_{ON} + \tau_{OFF})$  で定義され,  $\tau_{ON}$  は照射が ON,  $\tau_{OFF}$  は照射が OFF の時間幅であり,  $D=1.0$  は連続波照射を意味する. 今回の超音波照射実験には, 100 kbp を超えるゲノムサイズ DNA である T4 GT7 DNA (166 kbp, contour length 57  $\mu\text{m}$ ) を使用した. 図 1 に, 照射率を 0.4 として, 超音波の入力エネルギーを一定にした場合の超音波パルス照射方法を示す. また, DNA 二重鎖切断回数は, 蛍光顕微鏡による DNA 一分子観察により, 超音波照射前後の DNA 長を計測することによって, 評価した<sup>1)</sup>.

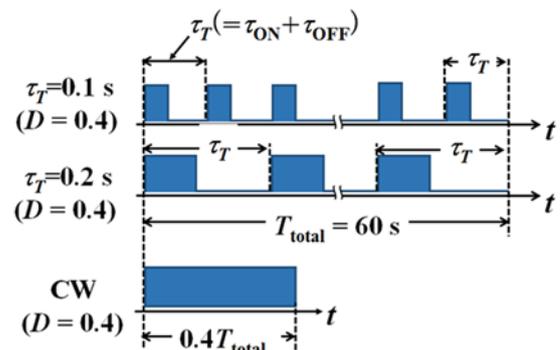


図 1 入力エネルギーを一定にした場合の超音波パルス照射方法 (照射率 0.4 の場合). ここで, CW は連続波を意味する<sup>1)</sup>.

図 2 に, 超音波照射によって, 二重鎖切断が生じた T4 DNA を, 蛍光顕微鏡によって観察した結果を示す<sup>2)</sup>. 蛍光顕微鏡による DNA 一分子観察から, 連続波照射 ( $D=1.0$ ) に比べて, パルス照射の方が, DN 長が短く, 二重鎖切断回数が多いことが分かる.

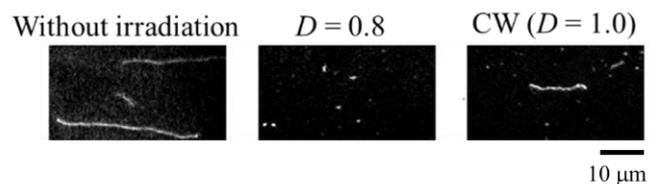


図 2 超音波照射による T4 DNA 二重鎖切断の蛍光顕微鏡観察像<sup>1)</sup>.

図 3 に, 超音波照射による 10 kbp 当たりの DNA 二重鎖切断のパルス回数依存性に関する実験結果を示す. ここで, パルス回数  $N_p$  は,  $N_p = T_{total} / \tau_{ON}$  で定義され,  $T_{total}$  は, 超音波の全照射時間を表す. 図 3 から, パルス回数が, 10 回程度までは, 連続波照射の方が, パルス照射より, DNA 二重鎖切断を多く引き起こすが, 10 回程度以上になると, 逆に, パルス照射の方が, 二重鎖切断回数が多くなるという結果を得た.

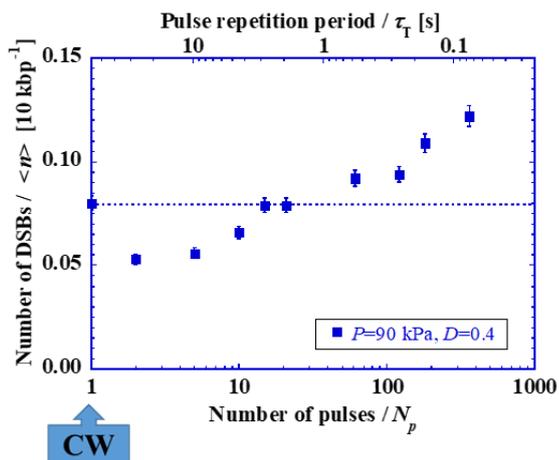


図3 超音波照射による T4 DNA 二重鎖切斷のパルス回数依存性<sup>1)</sup>.  $N_p=1$ は連続波を意味する。

### 3. Discussion

図3で示される、DNA二重鎖切斷のパルス回数依存性の実験データから、本研究グループでは、1回のパルス照射で、超音波照射中 ( $\tau_{ON}$ ) に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に ( $\tau_{OFF}$ )、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物理モデルを考案した<sup>2)</sup> (図4)。

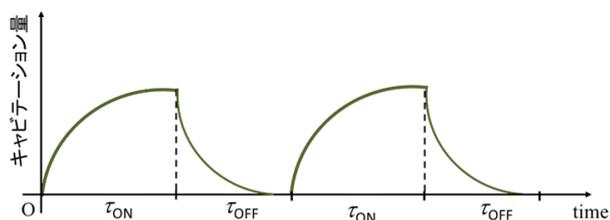


図4 パルス照射におけるキャビテーション減少モデル。

式(1)に、本研究グループが提案する DNA 二重鎖切斷回数パルス回数依存性の物理モデル式を示す<sup>1)</sup>。

$$\log_{10}\langle n \rangle = 0.2 \cdot \log_{10} N_p + C + 0.3 / N_p^\beta. \quad (1)$$

ここで、 $\langle n \rangle$ は平均の二重鎖切斷回数、 $N_p$ 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、 $\beta=2$ 、 $C$ については、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5に、実験データと本研究グループが提案する物理モデルの比較を示す。図5の物理モデルの直線部分は、図4で示されるキャビテーション減少過程を意味し、照射率 0.4 の場合の二重鎖切斷は、提案した減少モデルによく従う。照射率 0.8 の場合も、

物理モデルは、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  $\tau_T=0.1$  s 以下) では、減少モデルとのずれが観られる。

これは、パルス回数が増加すると、パルス照射間のパルス幅 ( $\tau_{OFF}$ ) 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されるためである。

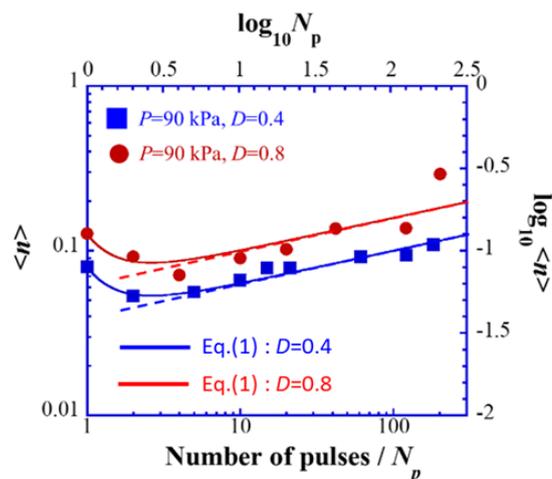


図5 DNA二重鎖切斷に関するパルス回数依存性の実験データと物理モデルの比較<sup>1)</sup>。

### 4. Conclusion

超音波照射による DNA 二重鎖切斷については、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確認されてきたが、その切斷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 を物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。

### 5. Reference

- [1] 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, 2017.

# 活性酸素が引き起こす DNA 二本鎖切断の PEG による保護効果

## —DNA1 分子観察法における定量的評価—

白井 萌絵<sup>†</sup> Ma Yue 吉川 祐子 吉川 研一

同志社大学大学院生命医科学研究科 生命物理科学研究室〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

E-mail: <sup>†</sup> ctub1051@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード DNA 二本鎖切断, 混雑環境モデル

### 1. 緒言

生体の細胞内ではタンパク質などの高分子が混み合った状態で存在しており, その中で各分子は機能を発揮している。このような混雑環境効果により, *in vitro* で行うような希薄溶液中では, 生体内細胞中の分子は異なるふるまいをする可能性がある。また DNA は日々損傷を受けており, DNA の損傷には一本鎖切断と二本鎖切断などがある。一本鎖切断は容易に修復されるが, 二本鎖切断は突然変異や細胞死を引き起こすと指摘されている。二本鎖切断は損傷の中で最も重篤な損傷であり, 二本鎖切断の保護が重要である。活性酸素によって DNA は損傷を受けるが, 抗酸化作用を持つ物質によって活性酸素は失活する。抗酸化作用をもち中性高分子である PEG(polyethylene glycol)に着目し, 本研究ではこれを用いた。従来の研究では, 数キロ塩基対に断片化された短い DNA を用いたものが多く, ヒトの生体内にあるような長鎖 DNA に関しては, 研究が遅れている。その理由として, 長鎖 DNA 二本鎖切断を定量的に観察するのに優れた実験方法が確立していなかったことが挙げられる。本研究では定量的に計測する実験方法を採用し, 研究を進めた。

### 2. 実験方法

#### 2.1 実験試薬

光照射実験では, 以下の試薬を使用した。

- T4-DNA(57  $\mu$ m, 166kbp)
- YOYO-1
- Tris-HCl
- PEG(分子量 600, 6000)

T4-DNA は, 最終濃度 0.2  $\mu$ M とした。YOYO-1 は蛍光剤, Tris-HCl は緩衝剤として使用した。PEG の濃度は, いずれの分子量もそれぞれ最終濃度 10g/L, 20g/L, 30g/L とした。

#### 2.2 蛍光顕微鏡による DNA1 分子観察法

本研究では蛍光顕微鏡による液中 DNA1 分子観察法を用いた。蛍光剤 YOYO-1 が DNA と結合し, 励起光

を受け, 蛍光を出すことによって DNA 一分子観察が可能となる。蛍光が出る時, 活性酸素が発生し, この活性酸素が DNA を損傷させ, DNA の二本鎖切断が起こる。DNA 一分子観察法ではこの切断の様子も観測でき, 照射開始から初めて切断されるまでの時間を計測することによって保護定量的作用の定量的評価が可能となった。

### 3. 実験結果

光照射による DNA 二本鎖切断の蛍光顕微鏡画像を Fig.1 に示す。焦点を当ててから 1.2 sec 後には完全に切断されていることが確認できる。

Fig.2, Fig.3 では, 未切断の DNA の割合と照射時間の関係を表している。Fig.2 のグラフでは PEG の濃度毎の DNA 未切断率と時間の関係を示し, いずれの分子量の PEG(分子量 600, 6000)でもコントロール状態よりも切断されるまでの時間が延びていることがわかり, 濃度が上がるにつれて切断時間が延びていることもわかる。この結果から PEG が DNA の二本鎖切断に対する保護作用を持っていることが明らかとなった。また Fig.3 は PEG の濃度毎の DNA 未切断率の対数をとったものを縦軸にとり, 照射時間の二乗を横軸にとったものである。グラフからわかるように光の照射時間の二乗に対して DNA の未切断率は線形に依存していることがわかる。

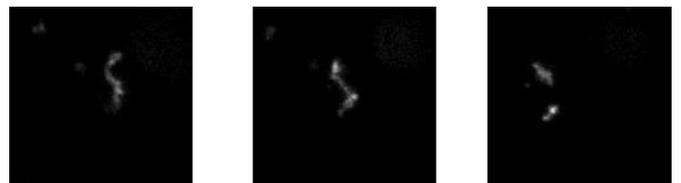


Fig.1 Real-time observation on double-strand break induced by light under fluorescence microscopy. Total observation time is 1.2 sec.

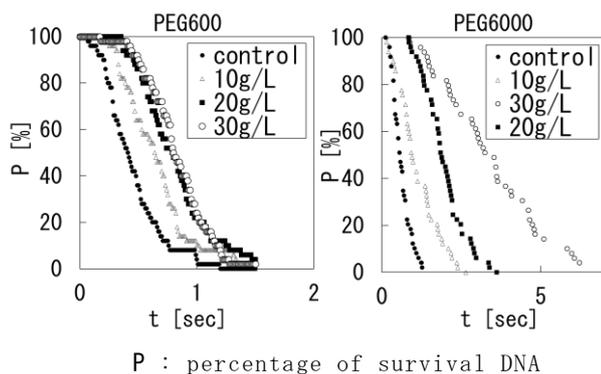


Fig.2 Survival DNA under light irradiation at difference concentrations of PEG.

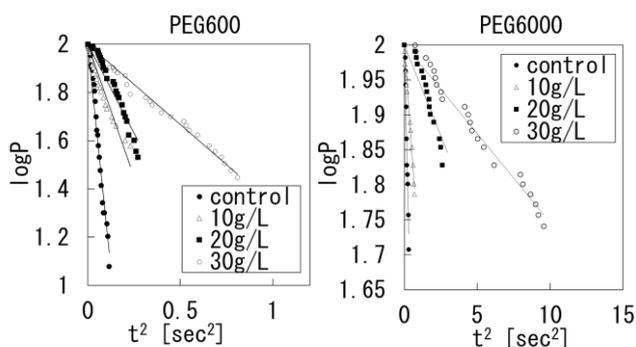


Fig.3 Kinetic analysis on the double-strand breakage based on eq. (1) for the experimental data given in Fig.2.

#### 4. 考察

Fig.4 のグラフからわかるように、DNA の未切断割合が時間の二乗に線形に依存していることがわかる。このことから、DNA 未切断割合と照射時間の理論式は以下の式(1)のように表される。式(1)では、P を DNA 未切断割合、t を時間、A を定数とする。

$$\log(P) \propto -At^2 \quad (1)$$

式(1)が成り立つということは、Fig.5 のように DNA 二本鎖切断が二段階で起こっていることを示している。この式での定数 A は、Fig.3 の直線の傾きであり、反応速度係数を表している。この反応速度係数の大きさによって、保護作用の定量的評価を行った。本実験では、分子量 600, 6000 という異なる分子量の PEG を使って実験を行った。実験結果でも述べたように、いずれの分子量でも保護作用が見られたが、同じ濃度であっても分子量毎に反応速度係数の違いがみられた。Fig.4 は、コントロール状態での反応速度係数と PEG 濃度毎の反応速度係数の比を縦軸にとり、横

軸には PEG 濃度をとったものである。比の値が小さくなるほど保護作用が高い。このグラフから PEG の分子量が高いほど、保護作用が高いことがわかる。これは重合度の違いによって活性酸素による DNA の損傷が起こる確率に違いがみられ、保護作用に違いが出たと考えた。

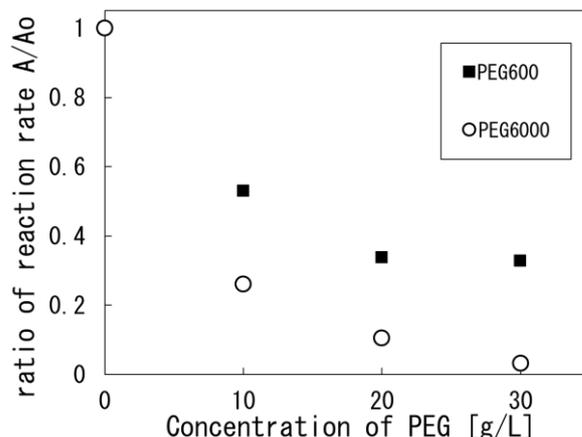


Fig.4 Relative reaction rate of double-strand breaks at different concentrations of PEG.

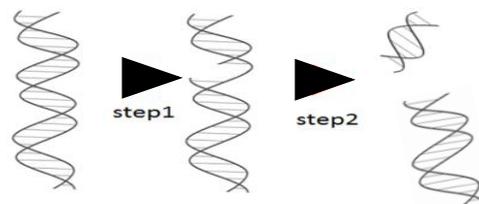


Fig.5 Schematic illustration on double-strand breaks.

#### 5. 結論

実験結果から、PEG には光誘起活性酸素による DNA 二本鎖切断に対する保護作用があること、そして同じ濃度でも分子量が高いほど、DNA の保護作用が高くなることが分かった。このことから、PEG は生体毒の少ない新たな DNA 保護剤としての可能性があることが示された。また、PEG の保護作用としての定量的評価を行うことができ、従来にはなかった長鎖 DNA に関する二本鎖切断を定量的に観察する手法を示すことができた。今後は、超音波による DNA 二本鎖切断が、PEG などの高分子存在下でどのように変化するかといった点を明らかにすることを予定している。

#### 文 献

- [1] Y. Yoshikawa, M. Suzuki, N. Yamada, K. Yoshikawa, FEBS Lett., 566, 39-42 (2004)
- [2] Y. Yoshikawa, T. Mori, M. Suzuki, T. Imanaka, K. Yoshikawa, Chem. Phys. Lett., 501, 146-151 (2010).

# 超音波振動を用いた HeLa 細胞の培養制御

谷 健太郎<sup>†</sup> 小山 大介<sup>†</sup>

<sup>†</sup> 同志社大学理工学部 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

E-mail: <sup>†</sup> duq0369@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード Ultrasound, cell culture, HeLa cell

## 1. はじめに

近年、再生医療の分野において、細胞を *in vitro* で培養し、人工的に組織を形成する組織工学が注目されている。その中で、細胞の培養環境を制御し、細胞の分化や増殖を制御・解析する技術が検討されており、化学素材や各種試薬を用いた手法が報告されている<sup>[1]</sup>。しかしながら、これらの手法においては細胞毒性やコンタミネーションの懸念などの問題がある。そこで、本研究では超音波が細胞に与える影響および、それを利用した培養細胞の制御技術について検討している。本報告では、超音波によるたわみ振動を用いた HeLa 細胞の剥離技術について検討した。

## 2. 培養細胞

培養細胞とは、生体組織から分離され、*in vitro* で増殖・維持する細胞である。培養細胞は培養容器に付着し増殖する接着細胞と培養液に浮遊した状態で増殖する浮遊細胞に分類される。本報告で使用した HeLa 細胞はヒト由来の接着細胞である。

## 3. たわみ振動

物体にひずみが加わったときに、弾性力が復元力となって起こる振動である。駆動周波数を変化させることでたわみ振動のモード変換が可能となる<sup>[2]</sup>。

## 4. 実験方法

実験系を図 1 に示す。ディッシュ底面(直径 27 mm の範囲が厚み 0.18 mm のガラス製)に接着培養した HeLa 細胞を死細胞染色色素である PI 溶液 1 mL で浸した。細胞に超音波振動を加えるため、アニュラ

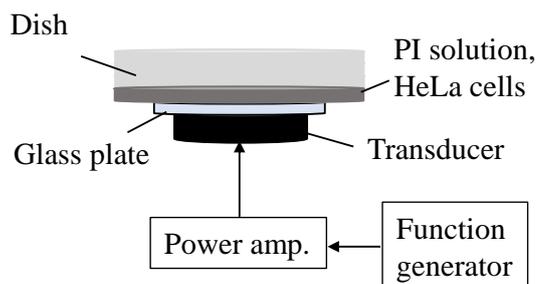


図 1, 実験系

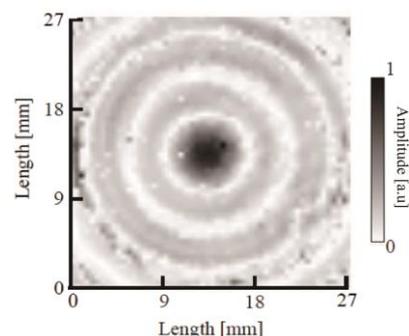


図 2, ディッシュ底面の振動分布

型圧電超音波振動子(内径 10 mm, 外径 20 mm, 厚み 2 mm)をガラス円板(直径 27 mm, 厚み 1.1 mm)に接着し、界面での音波の反射・減衰を抑制するため、少量の水を介してディッシュ底面中心部の外側にガラス円板を貼り付けた。超音波振動子とガラス円板の形状は、ディッシュ底面に所望の超音波振動モード(節円 3 個)が励振されるように有限要素解析によって決定した。信号発生器からの電気信号を電力増幅器によって増幅し、超音波振動子に入力した。超音波振動子の駆動条件は周波数 94 kHz の連続正弦波、駆動時間 30 s とし、入力電圧を 2 - 10 V<sub>p-p</sub> の範囲で変化させた。図 2 にレーザドップラ振動計を用いて測定したディッシュ底面の振動分布を示す。各条件での超音波駆動前後の位相差画像および蛍光画像を撮像した。その後、ピペッティングを行

い、再び画像を撮像した。画像の撮像範囲は同心円上の振動分布が得られていることを考慮し、半径方向とした。得られた画像の輝度を求めることで、細胞の剥離および、生死の評価を行った。そして、細胞の剥離と振動振幅の関係について検討した。

## 5. 実験結果および考察

本実験により得られた位相差画像の一例を図3に示す。写真の白く表示された部分が細胞である。そのため、細胞が接着したままの範囲では輝度値に変化が見られず、細胞が剥離した範囲では輝度値が減少する。図4に位相差画像におけるディッシュ中心からの距離と輝度値および振動振幅の関係の一例を示す。すべての条件において超音波駆動前後では、細胞の剥離はほとんど見られず、ピペッティングすることにより、細胞が剥離した。また、細胞が剥離した範囲は振動振幅が最も大きくなる中心付近であった。そのため、たわみ振動により細胞の接着力が減少したと考えられ、細胞が剥離する振動振幅の閾値が存在する可能性が示唆された。

図5に蛍光画像におけるディッシュ中心からの距離と輝度との関係の一例を示す。蛍光画像では死細胞のみが赤く染色されることから、輝度が大きいほど細胞死が生じていると考えられる。すべての条件において、超音波駆動による輝度の変化が小さかったため、本実験条件では細胞に与える影響は小さいと考えられる。

したがって、超音波の振動モードを制御することにより、HeLa細胞の密度を制御できる可能性が示唆された。

## 6. まとめ

本報告では、超音波振動によるたわみ振動を用いたHeLa細胞の剥離について検討した。その結果、振動振幅に応じて細胞が剥離した。このことから、超音波の振動モードを組み合わせることで接着細胞の密度を制御できる可能性が示唆された。



(a)超音波駆動前

(b)超音波駆動後

(c)ピペッティング後

図3, 位相差画像 (7 V<sub>p-p</sub>)

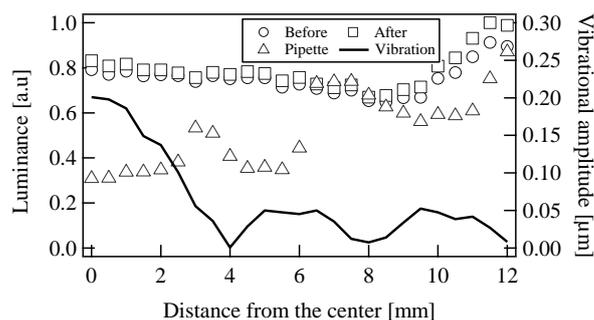


図4, 中心からの距離と輝度, 振動振幅の関係 (位相差画像, 7 V<sub>p-p</sub>)

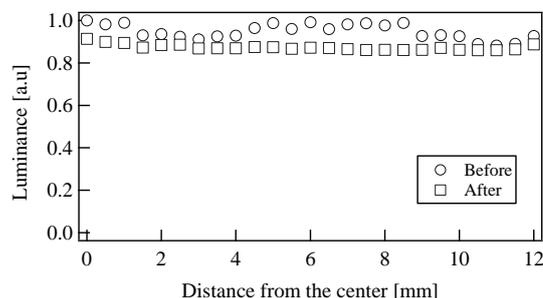


図5, 中心からの距離と輝度, 振動振幅の関係 (蛍光画像, 7 V<sub>p-p</sub>)

## 文献

- [1] 西澤松彦, 梶弘和, 田光公康, 末永智一, “バイオチップ表面への細胞のマイクロパターニング”, 表面科学 Vol 25, No.5, pp. 290-295, 2004
- [2] 関本仁, “振動モードと等価回路” 超音波便覧, 超音波編集委員会 (編), 第 5.3.2 章, 丸善株式会社, 1999.

## 謝辞

本研究は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) の助成を受け実施したものである。

# 超音波照射下におけるリン脂質バブルの振動・崩壊が HeLa 細胞に与える影響

平山 有沙<sup>†</sup> 安藤 優<sup>†</sup> 小山 大介<sup>††</sup> Marie Pierre Krafft<sup>‡</sup>

<sup>†</sup>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

<sup>††</sup>同志社大学 理工学部 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

<sup>‡</sup> Institute Charles Sadron (CNRS) University of Strasbourg, 23 rue du Loess, 67034 Strasbourg, France

E-mail: <sup>†</sup> ctub1010@mail4.doshisha.ac.jp, <sup>††</sup> dkoyama@mail.doshisha.ac.jp

キーワード 超音波, マイクロバブル, HeLa 細胞

## 1. はじめに

がんなどの薬物治療においては、病変部位だけでなく、正常な周辺部位にまで薬物が作用することで生じる副作用が常に問題となる。現在この問題を解決するため、超音波画像診断で造影剤として用いられるマイクロバブルを利用し、病変部位のみへ選択的に投薬する技術である超音波ドラッグ・デリバリー・システム (UDDS) が注目されている<sup>[1]</sup>。UDDS とは、薬剤を内包、もしくは外部に吸着させたマイクロバブルを血流内に投与し、血流循環時に病変部位に化学的に付着させ、超音波照射によってマイクロバブルを振動・崩壊させ、薬剤を局所的に放出する技術である。

細胞の近傍にマイクロバブルが存在する状態で超音波を照射することにより、細胞膜に一時的な穿孔が生じることが知られている。この穿孔より薬剤が細胞内部へ導入されることで、より正確かつ効率的に病変部位のみへの投薬が可能になり、副作用の軽減につながると考えられる<sup>[2]</sup>。

より安全かつ正確な投薬技術を確立するためには、マイクロバブルの振動・崩壊が細胞に与える影響について検討し、定量的に評価する必要がある。本稿では、生体適合性の高いリン脂質バブルを用いて、超音波照射によるマイクロバブルの崩壊が HeLa 細胞に与える影響について検討した。また、その影響を死細胞の割合で評価した。

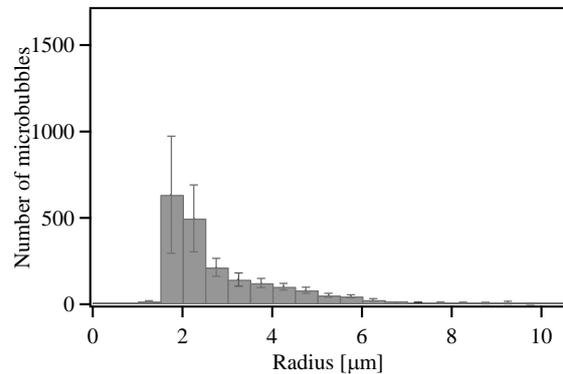
## 2. 実験方法

### 2.1 リン脂質バブルの作製方法

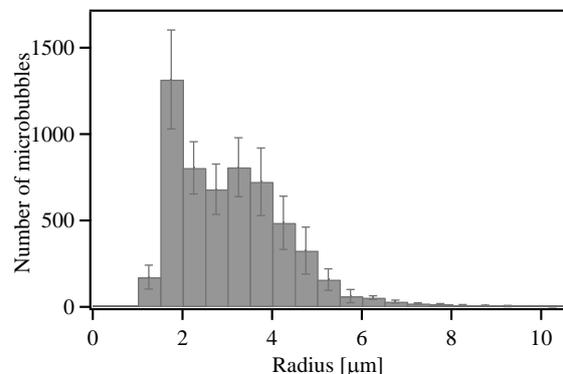
リン脂質である L- $\alpha$ -phosphatidylcholine-distearoyl (DSPC) を 15 mg, PEG 修飾脂質 (DSPE) を 10 mg, PEG-monostearate40.E.O. を 10 mg, PBS 10 mL に溶解させ、リン脂質溶液とした。シリンジの一方にマイクロバブルの膜材質となるリン脂質溶液 1 mL を、もう一方のシリンジを内部気体となる Fluorocarbon (C<sub>4</sub>F<sub>8</sub> 8%, N<sub>2</sub> 92%) 2 mL で満たし、2つのシリンジを結合した後 30 回手で攪拌することでマイクロバブル溶液を作製した。作製したマイクロバブル溶液をさらに超音波ホモジナイザを用いて 1 分間攪拌した。

### 2.2 リン脂質バブルの半径測定

リン脂質バブルの作製時における超音波ホモジナイザへの入力電力を 25, 50 W に設定し、粒径の異なるマイクロバブルを作製した。ガラス板上に 2×2 mm<sup>2</sup> の溝を作製し、その部分にマイクロバブルを滴下し、各条件で作製したリン脂質バブルの半径を測定した (図 1)。図 1 より、超音波ホモジナイザの入力電力に依存して、マイクロバブルが粉碎され、粒径の小さなマイクロバブルの個数が増加してい



(a)電力 25W



(b)電力 50W

図 1 バブルの半径分布

ることがわかる。周波数 2.5 MHz における自由気泡の共振半径は約 1.7  $\mu\text{m}$  である<sup>[3]</sup>。

### 2.3 超音波照射実験

実験系を図 2 に示す。水槽を脱気水で満たし、共振周波数 2.5 MHz の PZT 凹面振動子 (焦点距離 20 mm, ビーム幅 2 mm) を用いて超音波を照射した。細胞培養ディッシュの底面に 2×2 mm<sup>2</sup> の凹部を作製し、凹部分全領域の観察を行った。超音波照射前に、底面に HeLa 細胞が吸着している培養ディッシュに死細胞の判定が可能な蛍光標識物質 PI と生理食塩水を加え、これをコントロールとした。その後、先ほど作製した溝にマイクロバブルを滴下した。超音波照射前後の細胞の様子を蛍光顕微鏡で観察し、死細胞の割合を評価した。超音波振動子を正弦波 10

波で駆動し、負音圧振幅値を 0.3, 0.6 MPa に設定した。

### 3. 結果・考察

#### 3.1 バブル粒径分布と死細胞の割合

実験結果を図 3 に示す。横軸は共振半径 (1.5-2.0  $\mu\text{m}$ ) のバブルの個数、縦軸は死細胞の割合を表している。ここで、横軸の共振半径のバブルの個数は、図 1(a),(b)で測定したものを使用しており、図 3 中の With MB は左から順に図 1(a), (b)のマイクロバブルを用いた。図 3 より、マイクロバブルが存在することで死細胞の割合が増加していることが確認できる。これは、超音波照射によってマイクロバブルが振動・崩壊し、これによって発生する衝撃波やジェット流が、細胞に損傷を与えたことを示唆している。また、バブル作製時の超音波ホモジナイザの入力電力を増加させると、結果的に死細胞の割合が増加する傾向が見られた。マイクロバブルは共振条件下においても最も振動振幅が大きくなる。そのため、共振半径付近のマイクロバブルの個数が多いほど、マイクロバブルの振動による死細胞の割合が高くなると考えられる。

#### 3.2 超音波音圧と死細胞の割合

図 4 は細胞周囲にバブルが存在する場合としない場合における、音圧振幅値に対する死細胞の割合の変化を表している。同図より、マイクロバブルが存在しない場合、死細胞の増加は微量であるのに対して、マイクロバブルを含む場合は死細胞の割合が有意に増加することがわかる。照射音圧を増加すると、死細胞の割合が増加した本結果より、高音圧の超音波照射によって、マイクロバブルの振動振幅が増大、もしくは崩壊し、これによってバブル周囲の死細胞の割合が増加したと考えられる。また、共振条件から外れた範囲の粒径のマイクロバブルも振動し、細胞に損傷を与えた可能性があると思われる。

また図 4 において、全体的にマイクロバブルを含むサンプルのエラーバーが大きいことがわかる。細胞のみの結果には見られないことから、マイクロバブルが HeLa 細胞に影響を与えていることが示唆された。中心周波数 1 MHz、波数 3 波、最大負圧 1.1 MPa の条件下において、細胞とマイクロバブルの距離が 1 mm 以上離れている場合では、細胞に損傷が生じないことが知られている<sup>[4]</sup>。このことから、マイクロバブルと細胞の距離は非常に重要である。本実験では、マイクロバブルを滴下した際、マイクロバブルの分布にばらつきがあり、細胞とマイクロバブルの距離にばらつきが生じたため、死細胞の割合にもばらつきが生じたと考えられる。以上のことから、マイクロバブルと細胞を吸着させた状態で検討していく必要がある。

#### 4. まとめと今後の展望

本稿では、超音波照射によるマイクロバブルの振動・崩壊が HeLa 細胞に与える影響について検討した。その結果、共振条件下の粒径のマイクロバブルの個数が多いほど HeLa 細胞の死細胞の割合が高くなることがわかった。また、高音圧であるほど死細胞の割合が高くなったことから、マイクロバブルの振動・崩壊が死細胞の発生を増加する要因であることが示唆された。今後細胞とマイクロバブルを吸着させ同様の検討していく予定である。

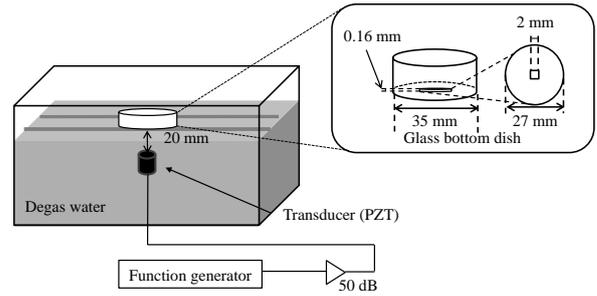


図 2 HeLa 細胞への超音波照射システム

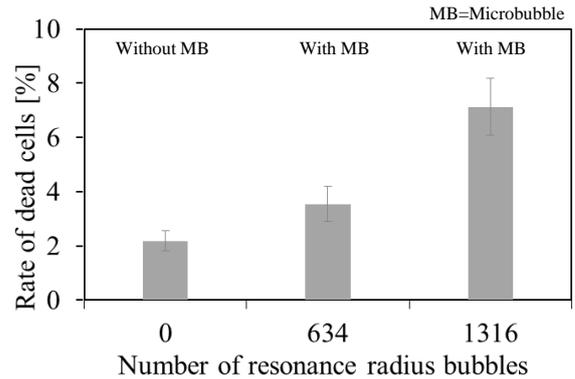


図 3 共振半径のバブル個数と死細胞の割合

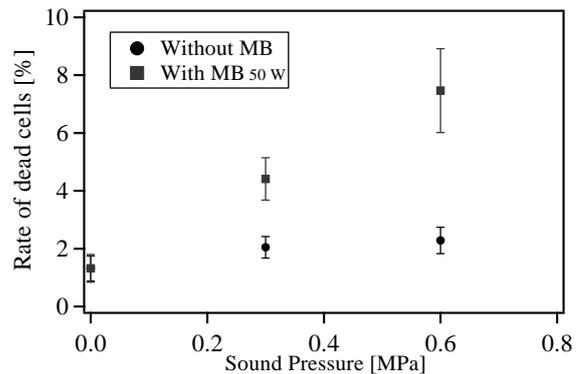


図 4 音圧と死細胞の割合

#### 文献

- [1] Alexander L. Klibanov, "Targeted delivery of gas-filled microspheres, contrast agents for ultrasound imaging", *Advanced Drug Delivery Reviews* 37 pp. 139-157, 1999
- [2] Nobuki Kudo, Katsuyuki Yamamoto, "Sonoporation with Microbubbles Exposed to Pulsed Ultrasound", *生体医工学* 43 (2) :231-237, 2005
- [3] Hiraku Tabata, Shu Suematsu, et al., "Acoustic destruction of microcapsules and release of internal substance" *IEICE Technical Report US2012-74* (2012-11)
- [4] Miller DL, Quddus J: "Sonoporation of monolayer cells by diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies." *Ultrasound Med Biol*.26 (4) :661-667, 2000.

#### 謝辞

本研究の一部は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) からの研究助成金により行われた。ここに謝意を表す。

# 集束超音波による DNA 二重鎖切断について

石原和也<sup>†</sup> 山下悠介<sup>†</sup> 吉田憲司<sup>‡</sup> 秋山いわき<sup>†</sup> 吉川研一<sup>†</sup>

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

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

ctwb0313@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード DNA 分子, 二重鎖切断, 超音波パルス

## 1. はじめに

近年, 超音波は医療分野において診断技術だけでなく治療技術にも幅広く利用されている. 診断技術では, 反射やドップラー効果等といった超音波の性質を利用することで対象の情報を得ている. 治療技術では, 熱的作用を利用した高強度集束超音波法 (HIFU: High Intensity Focused Ultrasound) 等や, 非熱的作用であるキャビテーション等を利用した治療法が用いられている. これらの熱的作用や非熱的作用は生体に影響を与えるとされている. その中でも, 非熱的作用であるキャビテーションは, DNA 分子レベルの損傷を引き起こすと考えられている. DNA の損傷には, 二重鎖切断と一本鎖切断が存在する. そのなかでも, DNA 二重鎖切断は一本鎖切断に比べて治療や修復が困難とされている. また, この損傷により生体に細胞死や発がん等といった影響を与えるとされている<sup>[1]</sup>. ゆえに, 超音波照射が DNA 分子に与える影響を定量的に評価することが必要となっている.

本研究では, 医療分野で実際に使用されている MHz 帯の超音波パルスを用いて, キャビテーションと DNA 損傷の関連について検討を行うために, 非照射時間と音圧変化に着目し, DNA 二重鎖切断の発生について定量的に評価を行った.

## 2. 実験原理

### 2.1 二重鎖切断の測定方法

本研究では, 蛍光顕微鏡による一分子観測の手法を用い, DNA 分子の観察を行った. 蛍光顕微鏡は DNA 溶液に蛍光色素を添加する処理を行うことで DNA を直接観測することが可能な測定方法となっている. この手法はゲノム DNA のような長分子 DNA の二重鎖切断の発生を評価することが可能であると過去の研究により示されている<sup>[2]</sup>.

### 2.2 キャビテーション

キャビテーションとは液体中の気圧が低下することで液体の溶解度が低下し, 溶けきれなくなった

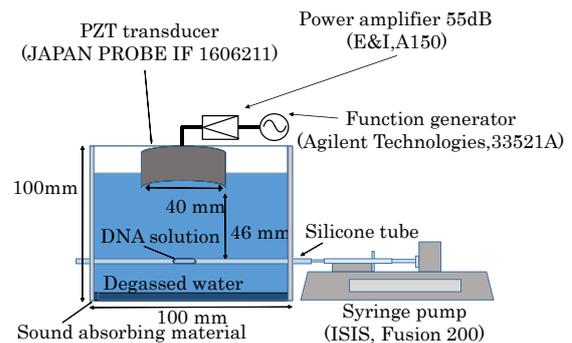


Fig. 1 Ultrasound exposure system to DNA solution.

気体が気泡として発生する現象のことである. 発生した気泡が超音波照射による圧力変化により膨張と収縮を繰り返し, 圧壊する. 圧壊した際に DNA 分子の切断を引き起こすことが知られている<sup>[3]</sup>.

## 3. 実験方法

### 3.1 DNA 溶液

今回使用した DNA は T4 フェージ DNA (165 kbp) である. DNA を 9  $\mu$ L, 脱気水を 846  $\mu$ L, 緩衝溶液である Tris-HCl を 45  $\mu$ L 添加し, 濃度が 0.1  $\mu$ M となるように DNA 溶液を作成した.

### 3.2 超音波照射条件

実験系を Fig. 1 に示す. 本実験では PZT 凹面振動子 (共振周波数 1.0 MHz, 口径約 46 mm, ビーム幅約 2.0 mm, 焦点距離 46 mm) を使用した. 実験セルを脱気水で満たし, シリコンチューブが PZT 凹面振動子の焦点位置になるように設置した. シリコンチューブに DNA 溶液を流す際にはシリンジポンプ (Fusion 200) を用い, 一定の速度で振動子の焦点まで流した. 照射条件は, 周波数を 1 MHz とし, パルス繰り返し周期 (PRT: Pulse Repetition Time) を 2 ms, 5 ms, パルス持続時間 (PD: Pulse duration) を 5  $\mu$ s, 10  $\mu$ s, 100  $\mu$ s とした. また, それぞれの条件において照射時間を変化させエネルギー量が等しくなるようにした.

### 3.3 DNA 二重鎖切断の評価方法

本研究では、蛍光顕微鏡で DNA 一分子の長さを直接観測する手法を用いた。超音波照射後の DNA 溶液に蛍光色素である YOYO-1 を添加して T4 フェージ DNA を染色した。その溶液をスライドガラス上に滴下し、蛍光顕微鏡で観測した。観測する際、DNA を伸びた状態にする必要があるため、スライドガラスにカチオン処理を行った。画像化した DNA の分子長を計測し、その結果から DNA 一分子あたりの二重鎖切断回数 (Number of DNA double-strand breaks)  $n$  を次式により求めた。

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

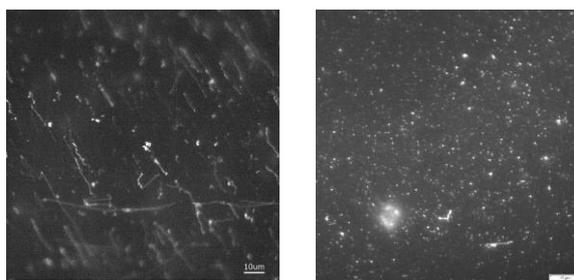
ここで、 $L$  は超音波照射後の DNA 分子平均長、 $L_0$  は基準となる超音波照射をうけていない DNA 分子平均長を表している。Fig. 2(a) に超音波照射前の DNA 分子画像を、(b) に超音波照射後の DNA 分子画像の例をそれぞれ示す。

### 4. 結果及び考察

Fig. 3 に (1) 式を用いて評価を行ったそれぞれの PRT の値における音圧と DNA の二重鎖切断発生回数の関係の結果を示す。また、この音圧は PZT 凹面振動子の焦点での最大負音圧である。Fig. 3 より PRT 2 ms と 5 ms において、PD を長くすると DNA の二重鎖切断が発生する閾音圧が減少することが確認できた。Fig. 3 (a) と (b) の同じ PD 条件を比較すると、PRT 2 ms の条件において、PRT 5 ms の条件の場合より DNA 二重鎖切断が発生する閾音圧が減少していることが確認できた。これらの結果から、超音波パルスの PD が長くなればなるほど、二重鎖切断が起こりやすくなるのがわかる。これは、PD が長くなるにつれて DNA 溶液に照射される超音波パルスの負音圧の照射時間が長くなるので、キャビテーションが多く発生してしまっているためであると考えられる。また、PRT 5 ms が 2 ms より切断しにくくなる理由としては、超音波パルスの非照射時間が長くなったために、DNA 溶液中でキャビテーションにより発生した気泡が、その非照射時間の間に消滅または小さくなってしまいうために気泡の圧壊が起こらなくなってしまうことが原因ではないかと考えられる。このことから、キャビテーションの発生と圧壊には超音波パルスの非照射時間が深く関係していると考えられる。

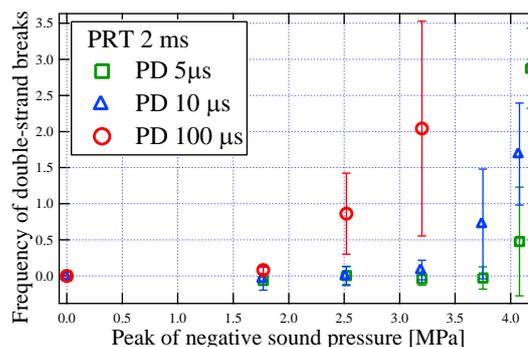
### 5. まとめ

今回、超音波パルスの非照射時間に着目し、その

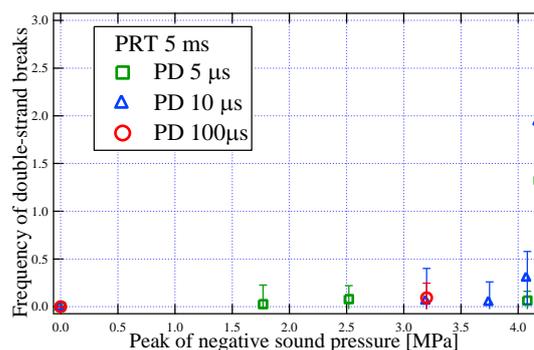


(a) Before ultrasound exposure. (b) After ultrasound exposure.

Fig. 2 DNA molecule image.



(a) PRT 5 ms.



(b) PRT 2 ms.

Fig. 3 Sound pressure characteristics of DNA breaks.

非照射時間の変化に伴う DNA 二重鎖切断の変化を評価した。その結果、非照射時間が長くなるほどに DNA 二重鎖切断が発生する閾音圧が大きくなることが確認できた。その結果、非照射時間が長くなったことにより、キャビテーションが起こりにくくなり、その結果 DNA 二重鎖切断が発生しにくくなったのではないかと考えられる。

### 参考文献

- [1] 吉田憲司他, キャビテーション核の存在が DNA 分子の二重鎖切断に与える影響, 信学技報, vol. 114, pp. 7-12, 2014.
- [2] Y.Yoshikawa, T.Mori, M.Suzuki, T.Imanaka, K. Yoshikawa, Chemical Physics Letters, 501, pp. 146-151, 2010.
- [3] 近藤隆 他 Proc. Symp Uotrason, 27, (2006)

# 音響放射力インパルスの心臓への照射システムの試作

高野 わかな<sup>†</sup> 古屋 元秀<sup>†</sup> 秋山 いわき<sup>†</sup>

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

E-mail: dmq1040@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード 音響放射力, 安全性, 期外収縮

## 1. はじめに

近年, ARFI (Acoustic radiation force impulse) などの音響放射力を利用する超音波診断技術が進んでいる. 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, 組織の弾性を評価する技術である. このような技術で用いられる超音波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安全基準として  $I_{spta,\alpha}$  (Intensity Spatial Peak Temporal Average)  $\leq 720$  mW/cm<sup>2</sup> かつ MI (Mechanical Index)  $\leq 1.9$  が設定されている.  $I_{spta}$  は空間ピーク時間平均強度を表し, MI は超音波による非熱的作用の安全性を評価する指標である. 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ており, 特に超音波造影剤投与後における ARFI の生体作用の増強については明らかでない.

そのためこれまでにウサギを用いた動物実験を行い, この実験結果から超音波造影剤を投与後に心臓に対し超音波を照射した場合, 超音波出力に関する基準値以下でも期外収縮が発生する確率が高くなることを示した.

ARFI によって期外収縮が発生する機序を明らかにする為には, 超音波を照射される心臓の部位と期外収縮発生率を関連付けるデータが必要である. しかし, これまでの実験システム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困難であった. そこで ARFI 照射をモニタリングしながら期外収縮発生率を測定する実験システムの構築を行った.

## 2. 超音波診断装置の安全基準

### 2.1. MI

MI は超音波による非熱的作用の安全性を評価する指標であり, キャピ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 (1) で表される.

$$MI = \frac{p_{r,\alpha}(z_{sp})}{\sqrt{f_c}} \quad (1)$$

$f_c$  はパルス波の中心周波数 [MHz],  $p_{r,\alpha}$  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.

### 3. 実験システムの概要

本研究では超音波造影剤投与後の心臓に ARFI 照射を照射した場合に生じる期外収縮を検知し, 発生頻度と超音波の物理特性の関係を明らかにすることで, 期外収縮の発生メカニズムを解明することを目的としている. そのためには心臓のどの領域に照射が行われているかモニタリングしながら期外収縮発生率を測定する必要がある. そこで本研究では RSYS0004 を用いて ARFI 照射と B モードイメージングを同一の超音波プローブで行うことを可能にした.

次に, 図 2 は動物実験における超音波照射のタイミングを表している. R 波から T 波の頂点までを計測し, T 波頂点から R 波まで 10 ms 刻みで 5 点照射を行う. また各点で 10 回照射を行い, 期外収縮の発生頻度を求める. この照射を行うために本実験システムでは PC で R 波検出のための閾値, R 波検出からトリガパルスを出力するまでの遅延時間を設定し, R 波検出後 arduino を用いて矩形信号を出力する. 図 1 に実験システムのブロック図を示した.

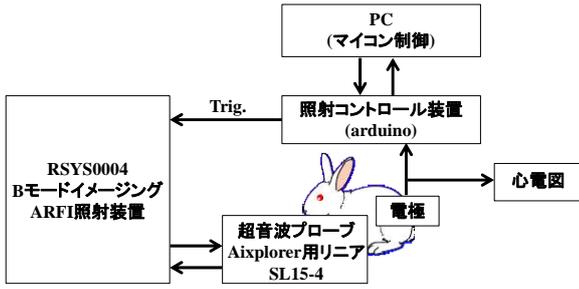


図 1 実験システム

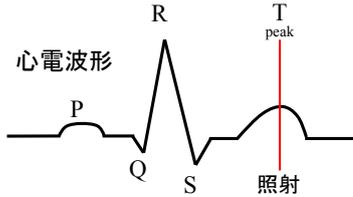


図 2 照射タイミング

明らかにできると考えている。

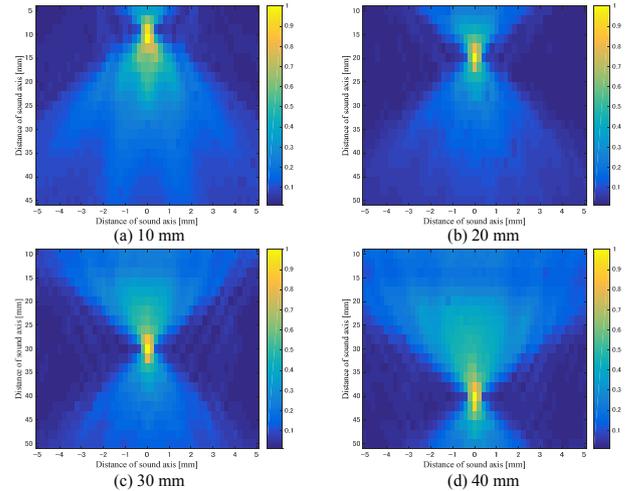


図 3 フォーカス点の違いによる音場の変化

## 4. ARFI 照射装置の基本特性

### 4.1. 音場の測定

ARFI 照射装置の基本特性としてフォーカス点を変化させた際の音場の測定を行った。周波数 7.8 MHz, 送信電圧 10 Vpp, バースト期間 10  $\mu$ s とし, フォーカス点を 10, 20, 30, 40 mm に設定した。深さ方向に 10-50 mm を 2 mm 刻み, 方位方向に 10 mm を 0.2 mm 刻みで測定を行った。フォーカス点が 10 mm の際の深さ方向は 5-45 mm とした。

結果を図 3 に示した。この結果からフォーカス点の変更に伴い正確に動作していることを確認した。

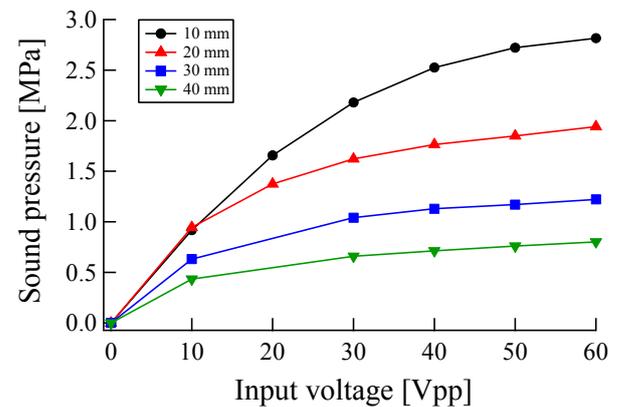
### 4.2. 音圧の測定

音圧の測定はフォーカス点 10, 20, 30, 40 mm のそれぞれでバースト期間 10  $\mu$ s, 送信電圧を 10 V 間隔で 0-60 V とした。また周波数は 7.8 MHz, 5.2 MHz の 2 条件とした。

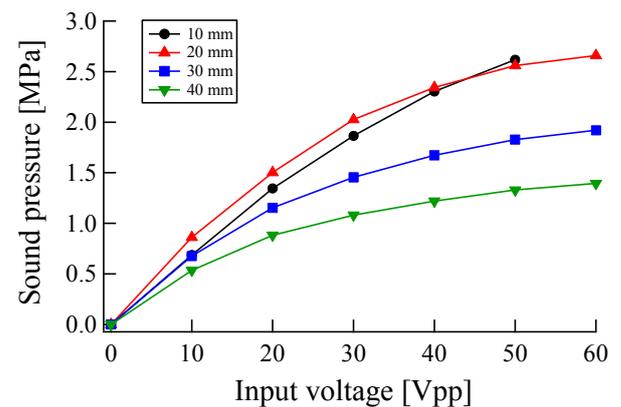
実験結果を図 4 に示した。縦軸が負音圧, 横軸が送信電圧である。

## 5. まとめ

本報告では ARFI 照射をモニタリングしながら期外収縮発生率を測定するための実験システムの構築を行った。今後は測定した基本特性を利用し, 動物実験において超音波造影剤投与後の心臓に ARFI 照射を照射した場合に生じる期外収縮の測定を行う。またモニタリングをしながら照射が行えるため, 照射対象部位の違いによる期外収縮発生率の差異を明らかにすることで発生部位, 発生メカニズムを



(a) 7.8 MHz



(b) 5.2 MHz

図 4 音圧測定値

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり, ご指導を頂きました産総研新田尚隆氏, 自治医科大学谷口信行教授, 笹沼英紀講師に感謝いたします。

# MRI と超音波を用いた生体内部の音速推定法の検討

坂和 直幸<sup>†</sup> 栗原 啓輔<sup>†</sup> 秋山 いわき<sup>†</sup>

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

E-mail: <sup>†</sup>dmq1035@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード MRI, 高磁場対応プローブ, 距離情報, 時間情報

## 1. はじめに

現在, 多くの医療現場で超音波画像診断装置が使用されている. 利点として装置が安価, 検査時間が短い, 無侵襲などが挙げられる. しかし, 被検者の体型によっては画質劣化が生じるという報告がある. これは, 生体軟部組織はそれぞれ固有の音速値を有するにも関わらず, 超音波画像診断装置の設定音速値を生体軟部組織の平均音速 1540 m/s として画像構成を行っているためである<sup>[1]</sup>. その中でも脂肪の音速は約 1470 m/s と他の臓器と比べて遅い<sup>[2]</sup>. 皮下脂肪層の厚い被検者の場合, 画質劣化が生じた報告がある. そこで生体内の音速分布が既知であれば, それを考慮してエコー画像の画質改善が期待できる. この音速分布を作成するために, 生体内部の音速推定法として, MRI (Magnetic Resonance Imaging) と超音波の同時計測による音速測定法を提案する. MRI を用いることで *in vivo* で生体内部の距離を測定することが可能となる. MRI で撮像した画像から距離情報を, 高磁場環境下対応超音波プローブから超音波を照射し, その反射波から時間情報を取得して, 音速値を算出する生体内部の音速推定法を提案する. 従来, MRI と超音波を同時に測定すると, それぞれの画像に顕著なノイズが存在するため, MRI と超音波は同時には撮像されていない.

本報告では, ヒトのふくらはぎを測定対象とし, MRI から距離情報を, 超音波の反射波から時間情報を取得し, 音速値を算出した.

## 2. MR 信号<sup>[3]</sup>

荷電粒子であるプロトンはスピンを持っており, 静磁場にプロトンを置くことで電磁誘導が生じて電流が流れ, プロトンに磁化ベクトルが発生する. そのプロトンが静磁場の影響で歳差運動することで, 磁化ベクトルが回転し, ラジオ波を測定対象に照射するとプロトンがラジオ波を吸収し放出する.



図 1 膝用コイル



図 2 超音波プローブ

この放出された電磁波を測定することで画像化する.

## 3. 実験方法

### 3.1. MRI による距離情報の取得

被検者は 20 代男性 1 名とした. ふくらはぎ用の受信コイルが無かったため, 図 1 の膝用コイルを用いた. 膝用コイルの中に図 2 の高磁場対応超音波プローブを左ふくらはぎの位置にセットし, スピンエコー法により MRI 撮像を行った. 得られた画像からふくらはぎの皮下脂肪層, 筋肉層の距離を測定した. なお, 超音波プローブ上の全てのマーカーを MR 画像上で検出するため, 撮像視野 (FOV) は 128 mm<sup>2</sup> とした. 使用した MRI は日立メディコ製の Echelon Vega で, 静磁場は 1.5 T であった.

### 3.2. 超音波による時間情報の取得

MRI 撮像後に図 2 の超音波プローブから超音波を照射し、ふくらはぎの皮下脂肪、筋肉層の境界面からの反射波を受信し、得られた信号の時間差から各層の伝搬時間を求めた。

### 4. 結果と検討

3.1 の MRI 撮像のより得られた画像を図 3 に、3.2 の超音波による B モード画像を図 4 に、超音波の反射波により得られた波形の 1 つを図 5 に示した。図 3 の距離情報と、図 4 の時間情報から超音波プローブ上のマーカー 3 点における、ふくらはぎの各層の音速値を算出した。結果は表 1 のようになった。

図 3 の MR 画像から、図 5 のエコー信号の 5  $\mu\text{s}$  付近の波形は、皮下脂肪層と筋肉層の境界での反射波、27  $\mu\text{s}$  付近の波形は、筋肉層中の筋での反射波、70  $\mu\text{s}$  付近の波形は筋肉層と血管の境界での反射であることが分かった。しかし、50  $\mu\text{s}$  付近の波形はどの境界での反射波か特定することができなかった。

### 5. まとめ

本報告では、生体内部の音速推定法を提案した。測定対象にヒトのふくらはぎを用いて、MRI から距離情報を、超音波の反射波から時間情報を取得した。その結果、各層の音速値を算出し、それぞれの境界での反射波を特定することができた。今後は測定対象を増やしていき、ふくらはぎの他、甲状腺や腹部も音速測定を行っていく予定である。

### 参考文献

- [1] T .Douglas Mast, “Empirical relationships between acoustic parameters in human soft tissues”, pp37-41.2000.
- [2] Sheng-Wen Huang and Pai-Chi Li, “Computed Tomography Sound Velocity Reconstruction Using Incomplete Data” , pp329-341. 2004.
- [3] 荒木 力, “MRI 完全解説”, pp46-99. 2008.

表 1 ふくらはぎの音速値

皮下脂肪層			筋肉層		
距離 [mm]	時間 [ $\mu\text{s}$ ]	音速 [m/s]	距離 [mm]	時間 [ $\mu\text{s}$ ]	音速 [m/s]
7.00	4.960	<b>1411</b>	33.00	21.92	<b>1505</b>
4.50	3.168	<b>1420</b>	30.50	20.22	<b>1508</b>
7.50	5.248	<b>1429</b>	21.00	13.86	<b>1516</b>

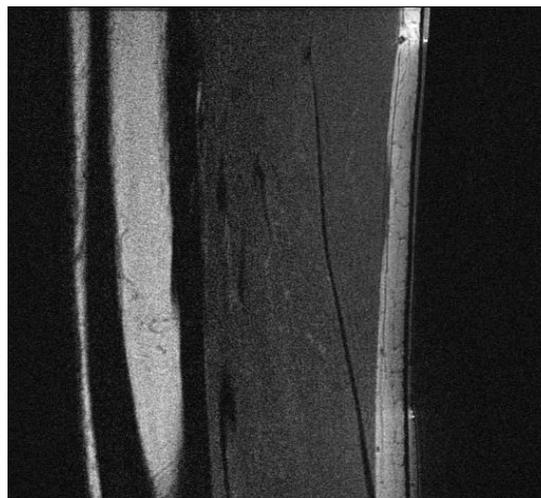


図 3 MR 撮像画像

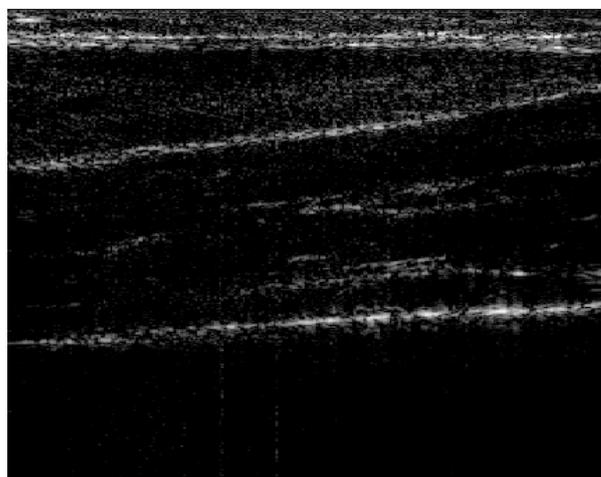


図 4 超音波 B モード画像

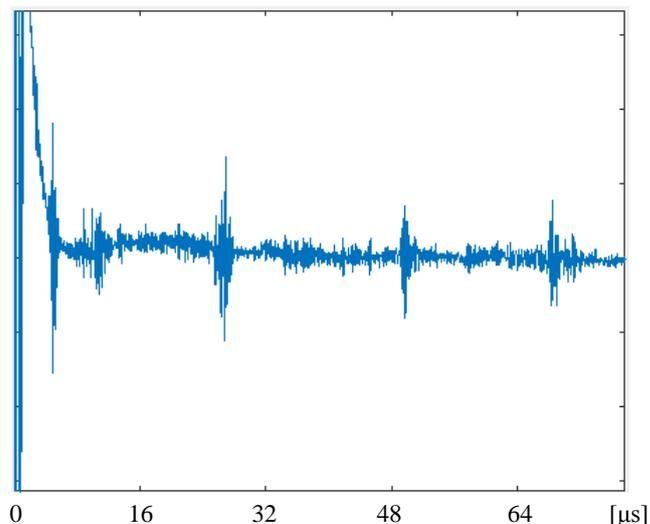


図 5 エコー信号

# 音速分布を考慮した超音波イメージング —超音波とMRによる音速分布の推定とその補正—

稲垣 拳 小南 成史 秋山 いわき

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

E-mail: †, ctub1016@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード Bモード画像, 音速分布, 電子フォーカス, MRI, 高磁場環境対応プローブ

## 1. はじめに

臨床診断で用いられている超音波診断装置は分解能向上のためにアレイ振動子を用いた電子フォーカスと呼ばれるビームフォーミングが行われている。電子フォーカスの計算には生体内の各組織の音速情報が必要だが、従来は音速一定と仮定して計算している。しかし、生体内は各組織により音速が異なるため、設定音速と各組織の音速差が画質劣化に影響を与えている。特に皮下脂肪の厚い被験者では、著しい画質劣化が生じる。本報告では、腹部模擬ファントム(Triple modality 3D abdominal phantom, イーステック)に対する電子フォーカスの補正について検討した。その際に使用した音速分布はMRIと同時取得された超音波エコー信号を用いて推定した。

## 2. 電子フォーカス<sup>[1]</sup>

電子フォーカスは、送信時には焦点でビームを集束させるように送信信号に遅延時間を与え、受信時には、複数の振動子で受信した信号に、遅延時間を与えてから加算することによって任意の位置からの散乱波の振幅を増大し、それ以外の位置からの散乱波の振幅を低減させる技術である。特に、受信フォーカスはダイナミックフォーカスとも呼ばれ、連続的に仮想焦点を設定することで、画像全体の方位方向の分解能を向上させる。各振動子で受信された信号に与える遅延時間は以下の(1)式で表される。

$$\tau_i = \frac{\left(i - \frac{n}{2}\right)^2 \Delta x^2}{2cl_f} \quad (1)$$

ここで、 $c$  は媒質音速、 $n$  は同時に駆動させる振動子の数、 $i$  は振動子の番号、 $\Delta x$  は振動子の間隔、 $l_f$  は焦点距離である。(1)式の計算は各組織の音速の違いを考慮していない。音速の異なる二層媒質が存

在する場合に、音速分布を考慮した遅延時間の計算は以下の(2)式で表される。

$$\tau_i = \frac{\left(\frac{l_1}{l_f}\right)^2 \left\{ \left(i - \frac{n}{2}\right)^2 \Delta x^2 \right\}}{2c_1 l_1} + \frac{\left(\frac{l_2}{l_f}\right)^2 \left\{ \left(i - \frac{n}{2}\right)^2 \Delta x^2 \right\}}{2c_2 l_2} \quad (2)$$

各振動子の遅延時間を求める際に音速分布の層数に応じて(2)式の項数を変化させることで音速分布を考慮した遅延時間を計算できる。今回は(2)式を用いて電子フォーカスの補正を行う。

## 3. 実験方法

### 3.1 実験系

超音波プローブをリニア走査式として使用するために、腹部ファントムの上に寒天ファントムを置き、撮像を行った(Fig. 1参照)。実験系をFig. 2に示す。

### 3.2 音速分布の推定

MRI室内で超音波プローブを撮像対象の上に置き、MRIとBモード画像の撮像断面を固定し、MR撮像を行った。MR画像より取得した媒質の距離情報と超音波パルスの反射時間より音速を算出した。算出した寒天ファントム、脂肪、筋肉の音速はそれぞれ1520 m/s, 1430 m/s, 1540 m/sであった。

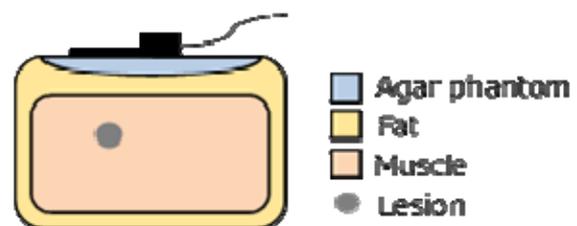


Fig. 1 Schematic illustration of the phantom and the probe.

### 3.3 Bモード画像の計算

実験で使用したプローブは、1-3 コンポジット材を用いた素子数 256、素子ピッチ 0.36mm の高磁場環境対応プローブ(ジャパンプローブ社・曲探)である。超音波の送受波信号の取得はチャンネル数 128 のイメージング装置(マイクロソニック社・RSYS0006MRFP)を用いた。送信波形は正弦波 1.5 波の矩形波である。音速分布を考慮した場合としていない場合それぞれで電子フォーカス及び B モード画像の計算を行った。

### 3.4 画質の評価方法

計算された B モード画像より、音速分布を考慮していない従来手法と考慮した提案手法のそれぞれで、2次元自己相関関数を任意の 4 箇所 で計算し、それぞれの半値幅を比較した。

## 4. 結果と考察

計算された 2 つの B モード画像を Fig. 3 に示す。また、それぞれの B モード画像の自己相関の方位方向の半値幅の比を Table 1 に示す。Table 1 の結果より全ての領域で従来手法に対し提案手法が改善されていることが分かる。すなわち、MR で推定した音速分布を考慮した電子フォーカスの計算により、B モード画像の分解能が向上した。一方、MRI と超音波診断装置での撮像断面のずれや、音速分布の推定精度が今後の課題として残された。

## 5. まとめ

本報告では、MRI と超音波診断装置で推定された音速分布を超音波診断装置に適応して、腹部模擬ファントムの B モードの計算及び電子フォーカスの遅延時間の補正について検討した。その結果、音速分布を考慮した電子フォーカス補正により、画像の分解能の向上を確認した。今後は、実際に生体に対して実験を行い、音速推定精度と画質改善との関係を検討することが重要であると考ええる。

## 文献

[1] 秋山 いわき, 蜂屋弘之, 坂本慎一, アコースティックイメージング, 70-80, 2010, コロナ社

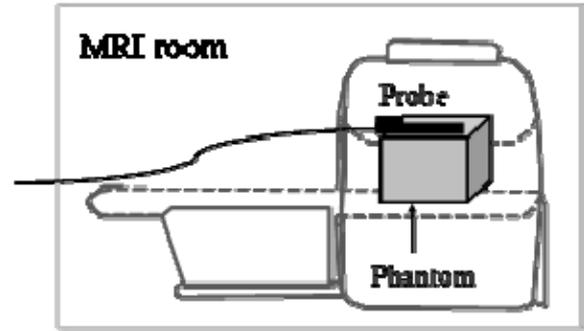


Fig. 2 Experimental system for ultrasonic image.

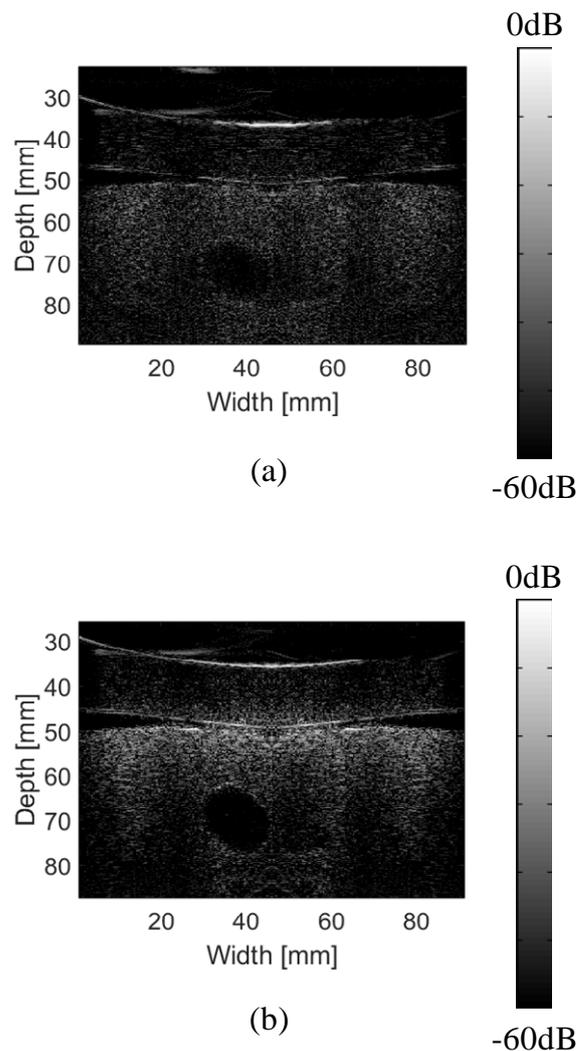


Fig. 3 B-mode images of the phantom.

(a) Conventional (b) Proposed

Table 1 Improvement of half width of auto correlation.

Proposed/Conventional			
0.5	0.9	0.8	0.8

# MR と超音波の融合イメージング

## -MRI 座標系におけるプローブ位置推定法の検討-

新井 慎平 秋山 いわき

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

E-mail: †ctub1002@mail4.doshisha.ac.jp,

キーワード マルチモダリティイメージング, MRI, 超音波イメージング

### 1. はじめに

近年の臨床現場では、複数のモダリティを使用し画像化を行うマルチモダリティイメージングが行われている。その中でも我々は被爆の無い MRI と超音波診断装置に注目した。現在行われているこの手法は、MRI で得た患者の体内情報を超音波診断装置に適応させ、肝癌等に対するラジオ波焼灼治療などの穿刺治療のガイドとして用いられている<sup>[1]</sup>。しかし、個々のモダリティにおける撮像時の患者の姿勢や術者の超音波プローブ使用法等が異なるため、正確な体内の位置情報を取得することが困難である。本研究では、そのような問題の解決策として、非磁性体プローブを作製し、高磁場環境下で行う超音波イメージングの開発を目指している。この方法を用いると、それぞれのモダリティにおいて正確に同断面を撮像可能であり、体内の位置情報取得精度が向上すると考えられる。本実験は、寒天ファントムを作成し、非磁性体プローブを用いたマルチモダリティイメージングにより取得される画像の位置精度を検討した。

### 2. MR 高磁場対応超音波プローブ

本研究は、高磁場環境で使用可能な超音波プローブを用いて撮像を行った。試作したフレキシブルアレイプローブ(ジャパンプローブ社)の部材は、19種類の部品をMRI撮像し、アーチファクトの有無を確認することで選定した。またこのプローブには、MRI3次元データ内の振動子撮像断面を推定するためのMRマーカーを2列貼付している。マーカーは直径6.35mmのPOM球をアクリルケース内部に入れ、オリーブオイルで満たしたものをマーカーとして使用した。マーカーとプローブの図をFig.1に示す。

### 3. MRI と超音波診断装置による撮像実験方法

上記の超音波プローブを用いて超音波診断装置とMRIの撮像実験を行った。実験試料は底面の直径30mm、高さ90mmのアクリル円錐を内包物と

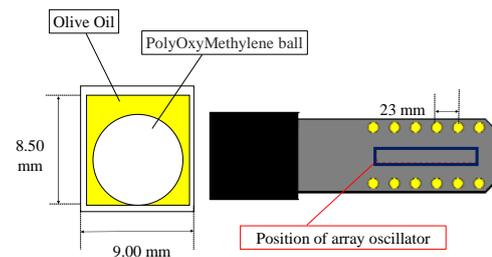


Fig.1 Non-magnetic probe with MR marker

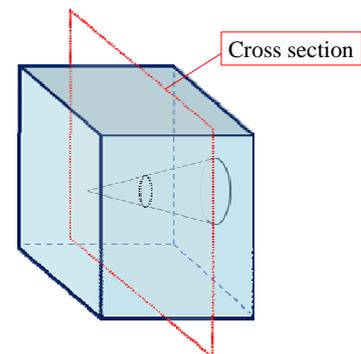


Fig.2 Agar phantom of imaging cross section

する1辺が100mmの寒天ファントムを作製し、使用した。MRIの撮像シーケンスはSE(Spin Echo)法を用いた<sup>[2]</sup>。試作した超音波イメージング装置(マイクロソニック社RSYS0006MRFP)の仕様は以下の通りである。チャンネル数128、AD変換12ビット、サンプリング周波数??Hz。プローブの素子間隔は0.36mmである。入力波形は正弦波1.5波で、中心周波数は5MHzとし、送信時の焦点は40mmに設定した。実験系とファントムの撮像断面をFig.2に示す。撮像後、MRマーカーより、MRI3次元データ内におけるプローブ位置を推定し、超音波撮像断面をMR画像で推定し、表示した。そして推定されたMR画像とBモード画像における撮像位置精度を検討するため、それぞれの画像上でファントム上面からアクリル円錐までの距離測定を行い、その後融合画像を作成した。

#### 4. 結果と検討

それぞれのモダリティから得られた画像を Fig.3.4 に示す. 距離測定結果は, MR 画像で 36.8 mm, 34.6 mm となりモダリティ間における誤差は 2.2 mm となった. 誤差原因として, スライス方向のビーム幅の長さと考えられる. そこで, 焦点距離を 40 mm に設定し送信フォーカスをかけた際の音場測定を行った. 音場測定結果を Fig.5 に示す. 音場測定よりスライス方向のビーム幅が 7.95 mm あることが分かった. 今後は, スライス方向にビームを集束させる音響レンズを装着し, 位置精度を向上させる必要がある. また, MRI の推定断面の画像上において, 超音波プローブに塗布するゲルの厚みが考慮されていなかった点, プローブに接着されている MR マーカーと振動子との位置の誤差, マーカーから断面を推定する際のプログラムによる誤差が挙げられる. これらの誤差原因についても今後検討する必要がある. また, 予備実験として推定した寒天ファントム内の音速値が実際のファントム内音速と異なる可能性も考えられる. そのため, MRI の距離情報と超音波診断装置の時間情報から計算された音速値を用いて作成された超音波画像に MR 画像を重ね合わせた. 融合画像を Fig.6 に示す. このような MRI 情報と超音波情報を含んだ融合画像は, 個々のモダリティによる診断が困難な膵癌や乳癌の診断精度が向上すると考えられる.

#### 5. まとめ

本研究では, MRI と高磁場環境対応超音波プローブを用いて, 超音波診断装置と MRI による融合画像を作製した. その結果, 超音波のスライス方向分解能に起因する誤差が示された. 今後は音響レンズを取り付けたプローブを作製し, 位置精度の向上したマルチモダリティイメージングの開発が重要と考える.

#### 文 献

- [1] 寺谷卓馬, 小尾俊太郎, 佐藤新平, 小池幸宏, 段佳之, Cool-tip 型電極を用いた経皮的ラジオ波焼灼治療による肝細胞癌の治療
- [2] 笹井俊文, 土井司, 日本放射線技術学会, MR 撮像技術学, p68-p69, オーム社 (2008)

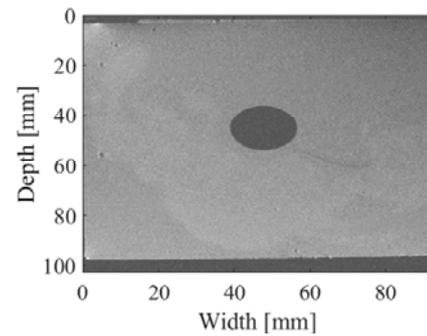


Fig.3 MRimage

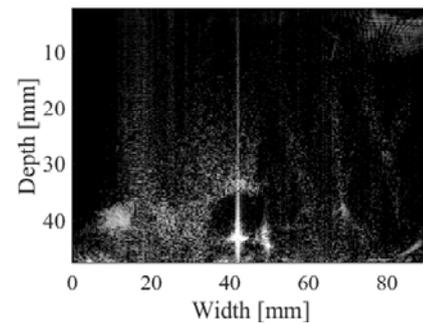


Fig.4 US image

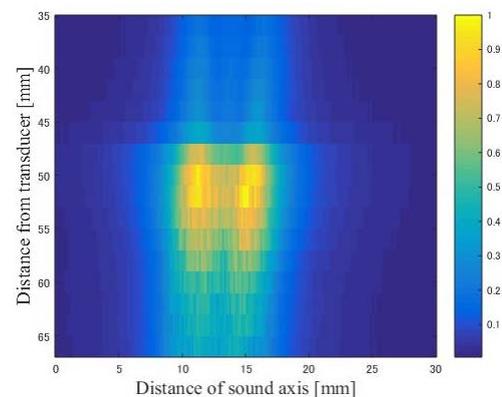


Fig.5 Sound field of the flexible probe

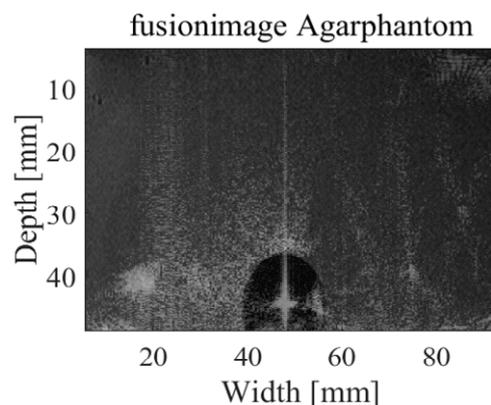


Fig.6 Fusion image of MRI and US image

## 超音波加温による牛の肝臓の体積熱容量の測定

金山 寛明<sup>†</sup> 秋山 いわき<sup>†</sup>

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

E-mail: <sup>†</sup> ctub1021@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード 超音波加温, 体積熱容量, viscous heating

### 1. はじめに

本研究は, 超音波組織性状診断の新たなパラメータとして生体組織の単位体積あたりの熱容量  $C_v$  に着目している. 我々は超音波照射による生体組織の温度上昇曲線から,  $C_v$  を *in vitro* で測定する手法を検討している. 本報告では微小な生体組織の熱容量  $C_v$  の測定法の測定精度について牛の肝臓を用いた実験によって検討した.

### 2. 生体熱輸送方程式

超音波加温により生体組織の体積熱容量を測定するために使う生体熱輸送方程式を式 (1) に示す.

$$\frac{dT}{dt} = \kappa \nabla^2 T - \frac{\Delta T}{\tau} + \frac{q_v}{C_v} \quad (1)$$

ここで,  $\kappa$  は熱拡散率,  $\Delta T$  は超音波照射時の温度変化,  $\tau$  は血液灌流の時定数,  $q_v$  は熱生成率,  $C_v$  は体積熱容量である<sup>[1]</sup>. 第 1 項は周辺部の生体組織に拡散する熱であり, 第 2 項は血液循環によって奪われる熱である. 温度の時間変化曲線を  $t = 0$  に外挿した値を用いることで, 右辺の第 1 項を無視することができる. また, 本実験は *in vitro* での測定であるため第 2 項を無視することができる. よって温度上昇率は  $q_v$  と単位体積あたりの  $C_v$  の比によって決まる. また, 超音波における  $q_v$  は生体組織の超音波減衰係数  $\alpha$ , 超音波強度  $I$  を用いて式 (2) で表される.

$$q_v = 2\alpha I \quad (2)$$

式 (1) に式 (2) を代入し, 変形した式 (3) により熱容量  $C_v$  を求める.

$$C_v = \frac{2\alpha I}{(dT/dt)_{t=0}} \quad (3)$$

### 3. 実験手順

#### 3.1 生体組織

本実験では, 100 mm×100 mm×70 mm のアクリルケースに厚さ 20 mm の牛の肝臓を厚さ 9mm のタングステン板の上に設置した. 周囲をゼラチンで固定し, その上部は脱気水で満たした.

#### 3.2 減衰係数測定<sup>[2]</sup>

実験系を Fig. 1 に示す. 試料の上部にアクリル板を設置し, パルサーレシーバを用いて中心周波数が 2.5 MHz の平面振動子から超音波を照射し, アクリルと試料 (A), 試料と反射体 (B) からの反射波を測定した. 同様の測定をアクリルと空気 (A<sub>0</sub>) からの反射波においても行い, これらの結果を周波数解析し, 式 (4) に代入することで減衰係数  $\alpha$  を求めた.

$$\alpha(f) = \frac{1}{2h} \ln \left( \frac{A_0(f)^2 - A(f)^2}{A_0(f)B(f)} \right) \quad (4)$$

#### 3.3 超音波強度測定

ハイドロフォンを用いて凹面振動子の焦点音圧を測定した. 減衰係数  $\alpha$ , 試料内伝搬距離  $d$ , 試料の密度  $\rho$ , 音速  $c$  により補正することで試料中の超音波強度  $I$  を算出した.

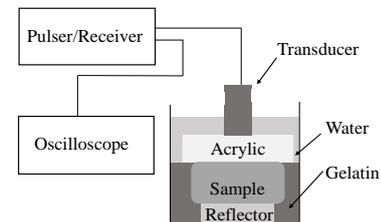


Fig. 1 Measurement system of attenuation coefficient.

#### 3.4 温度上昇測定

実験系を Fig. 2 に示す. 焦点が試料内部に位置するように凹面振動子を試料上部に設置した. また, 振動子の中心の空孔から熱電対を挿入し, 先端が焦点に位置するように設置した. 凹面振動子の焦点距離は 35 mm である. 2 MHz, 25 V の正弦波を印加し, 熱電対

を用いて 2 s 間の超音波照射による温度上昇を測定した。viscous heating の補正を行うために同様の測定を寒天ファントムにおいても行った。熱電対は K 型で線径が 0.1 mm のものを使用した。

#### 4. 実験結果と考察

減衰係数測定による反射波を周波数解析した結果を Fig. 3 に示す。これらの値  $A_0$ ,  $A$ ,  $B$  を式 (4) に代入することにより得られた 2 MHz における減衰係数の値は 0.21 Np/cm となり、この減衰定数を用いて補正した試料内の超音波強度の値は 14 W/cm<sup>2</sup> となった。温度上昇測定により得られた試料の温度変化から寒天による温度変化を減算することにより viscous heating の補正を行った結果を Fig. 4 に示す。この補正值を用いて温度上昇率  $dT/dt$  を求めた結果を Fig. 5 に示す。Fig. 5 より  $(dT/dt)_{t=0}$  の値を算出した。これらの測定値を式 (3) に代入することにより熱容量を算出した。測定結果と参照値<sup>[3]</sup>を Table 1 に示す。本手法により測定した体積熱容量の値は 3.5 であり、参照値との誤差は 0.1 であった。

#### 5. まとめ

本報告では超音波照射による牛の肝臓の温度上昇曲線を熱電対により測定して熱容量  $C_v$  の値を算出した。その結果、算出した値は参照値に近い値が得られた。今後は、再現性を確認するとともに病変した組織の体積熱容量  $C_v$  の測定を行い、正常組織と病変組織における変化について検討することが重要であると考えられる。

Table 1 Measured values and refereed value.

$\alpha$ [Np/cm]	$I$ [W/cm <sup>2</sup> ]	$(dT/dt)_{t=0}$ [K/s]
0.22	14	1.7
Measured $C_v$ [J/cm <sup>3</sup> · K]	Refereed $C_v$ [J/cm <sup>3</sup> · K]	
3.5	3.6	

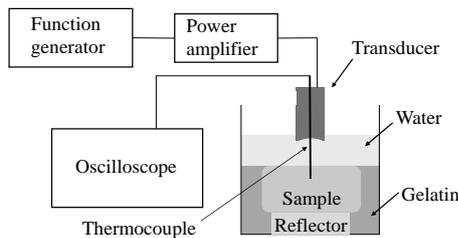


Fig. 2 Measurement system of temperature rise.

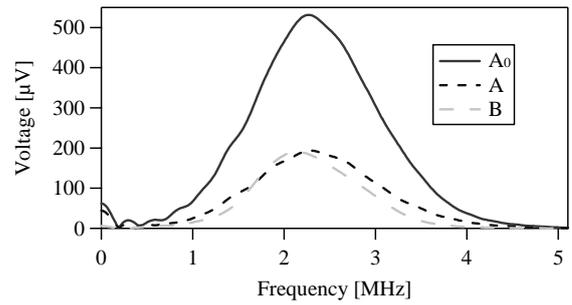


Fig. 3 Frequency analysis of reflected wave.

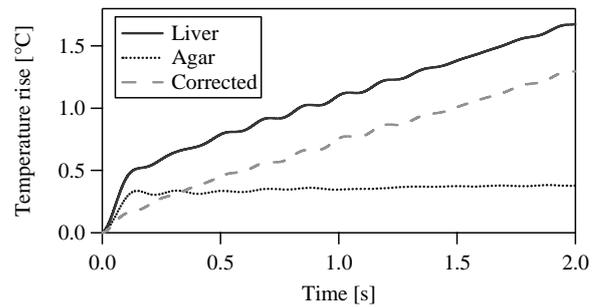


Fig. 4 Relationship between time and temperature rise.

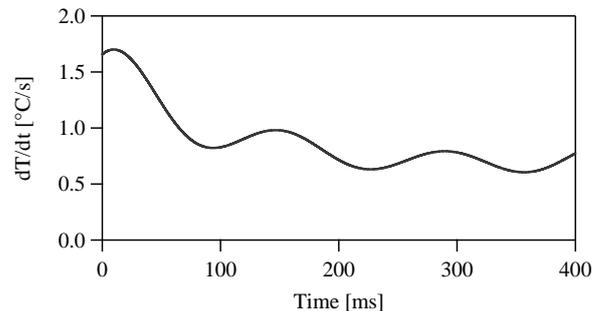


Fig. 5 Relationship between time and  $dT/dt$ .

#### 文献

[1] Wesley L Nyborg et al, "EXPOSURE CRITERIA FOR MEDICAL DIAGNOSTIC ULTRASOUND: I. CRITERIA BASED ON THERMAL MECHANISMS" National Council on Radiation Protection and Measurements, No.13, pp. 52-60, 1992.  
 [2] Junjie Chang (Dalian Maritime), Evaluation of Rubber Viscoelasticity by Pulse Echo Method, Proc Symp. Ultrason. Electron., Vol.27, (2006) pp.427-428 15-17 November, 2006.  
 [3] Thermophysical constants adapted from Sekins and Emery, 1982. Units have been chosen (within the extended SI system) for convenience, in that multiplying factors of ten have been avoided.

# 超音波による生体組織の加温と熱物性測定

辻本 祐加子<sup>†</sup> 森本 舞<sup>†</sup> 新田 尚隆<sup>‡</sup> 秋山 いわき<sup>†</sup>

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

<sup>‡</sup>産業総合技術研究所〒305-8564 茨城県つくば市並木 1-2-1

E-mail: <sup>†</sup> ctub1049@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード 組織性状診断, 熱物性, 生体組織模擬ファントム, エコーシフト, 音速の温度係数

## 1. はじめに

近年, 超音波診断装置は無侵襲かつリアルタイムで生体内部を画像化できることから臨床医学において広く普及している. しかし, 現在の超音波診断は形状情報が主で組織の物性に関する評価は難しいため, 病理診断には専門技術者の熟練度が重要であることが課題となっている. そこで, 組織の物性を評価する組織性状診断が注目されている<sup>[1]</sup>. 現在の形状情報のみの画像に対して組織の物性に関する情報を加えることにより, がんをはじめとした病変部の診断が容易になることが期待される. 本研究は, 生体の熱物性に着目した新しい超音波イメージングを目指している.

本報告では, 共振周波数の異なる2つの振動子を同軸一体型とした集束探触子を用いて, 超音波加温した生体模擬ファントムの音速変化を超音波パルスエコー法で測定し, 音速変化より温度上昇値を算出した. さらに, シミュレーションにより生体模擬ファントムの温度上昇値を算出し, 測定値と比較を行った.

## 2. 超音波による温度上昇測定

本手法は, 音速の温度係数と加温に伴う試料内での音速変化を測定し, 温度上昇値を算出する.

### 2.1 試料内における音速の温度係数

静置した試料に超音波パルスを照射すると, 試料上面と下面からの反射波が観測される. 反射波から得られる試料内での伝搬時間と試料の厚みから, 試料内の音速を求める.

### 2.2 生体熱輸送方程式

超音波加温による生体組織の温度上昇  $T$  の時間変化は式 (1) の生体熱輸送方程式で表される.

$$\frac{dT}{dt} = \kappa \nabla^2 T - \frac{\Delta T}{\varepsilon} + \frac{2\alpha I}{C_v} \quad (1)$$

ここで,  $\kappa$  は組織の熱拡散率,  $\varepsilon$  は血液循環による冷却の時定数,  $\alpha$  は生体組織の減衰係数,  $I$  は超音波

強度,  $C_v$  は体積熱容量である<sup>[2]</sup>. 温度上昇が微小であれば右辺第1項の熱拡散項を, 短時間の加温であれば第2項の血液循環項を無視できるため,  $dT/dt = 2\alpha I/C_v$  と近似される.

### 2.3 超音波による音速変化の測定

音速は超音波加温による生体組織の温度上昇により変化するため, 照射した超音波パルスのエコー信号に時間シフトが生じる. 温度上昇が微小であれば  $\Delta c(x) \ll c(x)$  となり, 音速変化  $\Delta c(x)$  は式 (2) に近似できる.

$$\Delta c(x) \cong \frac{c^2(x)}{2} \frac{\Delta \tau}{\Delta x} = c(x) \frac{\Delta \tau}{\Delta t} \quad (2)$$

$c(x)$  は試料の音速,  $\Delta c(x)$  は試料内の任意の2点間  $\Delta x$  における音速変化である. 任意の時間  $t_1, t_2$  におけるエコーシフト時間を  $\tau_1, \tau_2$  とすると, それぞれの差分である  $\Delta t, \Delta \tau$  より任意の空間における音速変化が求まる.

## 3. 実験系及び解析方法

### 3.1 音速の温度係数

実験系を図1に示す. IEC60601-2-37規格に準拠して  $100 \times 100 \times 20 \text{ mm}^3$  のファントムを作製し, 測定試料とした. 中心周波数が5 MHzの平面振動子にパルサー (OLYMPUS, 5072PR) でインパルス電圧を印加した. また熱電対を用いてファントム内の5点において温度を観測した. 初期温度  $22^\circ\text{C}$  から  $30^\circ\text{C}$  の範囲で, 温度が  $1^\circ\text{C}$  上昇するごとに試料からの反射波を計8回測定した. 反射波から得た試料内での伝搬時間と試料の厚み20 mmより, 各温度における試料内の音速を求めた.

### 3.2 温度上昇測定

焦点距離60 mm, 直径10 mmの凹面円形 (共振周波数5.2 MHz) の音速測定用振動子の外周に, 内径10 mm, 外径28 mmの凹面円環状 (共振周波数3.2 MHz) の加温用振動子が同軸で配置された集束探触子を用いて, 試料内における超音波加温前後の音速

変化を測定した。実験系を図2に示す。測定試料は3.1と同様とし、試料内の4点において測定した。加温用振動子に100 V<sub>p-p</sub>, BurstPeriod 100 ms, 160000 Cycleを印加し、試料を加温した。音速測定用振動子にパルサーでインパルス電圧を印加し、加温前と加温後0.1 s間隔で1 s間エコー信号を記録した。窓関数の時間幅を1 μsとし、測定した加温前後のエコー信号からエコーシフト時間を算出した。さらに、式(2)におけるΔtを7 μsとし、エコーシフト時間から振動子の音軸上における温度上昇の時間変化を求めた。

### 3.3 温度上昇解析

式(1)を用いて生体模擬ファントムの温度上昇に関するシミュレーションを行った。深さ20 mm, 幅12 mmのモデルを用いた。内部条件として減衰係数0.5 dB/cm/MHz, 熱拡散率0.15 mm<sup>2</sup>/sを用いた<sup>[3]</sup>。さらに血流なしと仮定したため、式(1)の右辺第2項の血液循環項は0とした。また加温用振動子の照射条件は3.2と同様とした。

## 4. 実験結果及び考察

温度を22 °Cから30 °Cの範囲で変化させたときの音速変化を図3に示す。この結果を直線近似すると、ファントム内における音速の温度係数は1.9 m/s/°Cとなった。この近似における決定係数の値は0.97となった。

焦点付近である深さ53 mmから58 mmにおける温度上昇の測定結果とシミュレーションを行った結果から算出した温度上昇の解析結果を図4に示す。測定値は加温時間が経過すると温度上昇値は大きくなり、加温開始から950 ms後で1.6 °Cの温度上昇となった。シミュレーションにより算出した値は、加温開始から950 ms後において1.7 °Cの温度上昇となり、音速変化より算出した値の標準偏差内に収まった。

以上より、ファントム内において超音波による加温と温度上昇測定が可能であることが示された。

## 5. まとめ

本報告では超音波加温により生じる生体模擬ファントム内の音速変化を2周波同軸一体型の集束探触子によって測定し、温度上昇値を算出した。またシミュレーションにより生体模擬ファントムの温度上昇値を算出した。測定値とシミュレーション値がほぼ一致したことから、本手法により生体組織の熱物性を測定できる可能性が示唆された。今後、生体組織を用いた熱物性イメージングの測定手法について検討を行う必要がある。

## 文献

[1] H. Hachiya, "Present Status and Future Prospects of Ultrasonic Quantitative Diagnosis," IEICE Fundamentals Review Vol. 5, No. 3, p. 244, 2012.

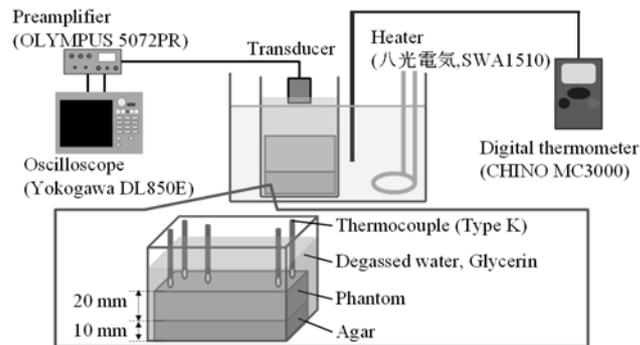


図1 実験系(音速の温度係数)

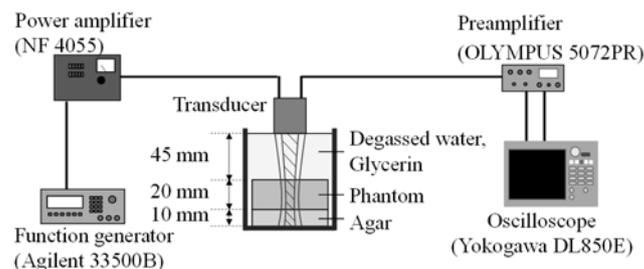


図2 実験系(温度上昇)

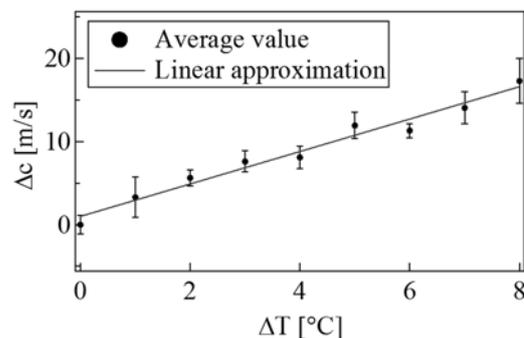


図3 音速の温度係数

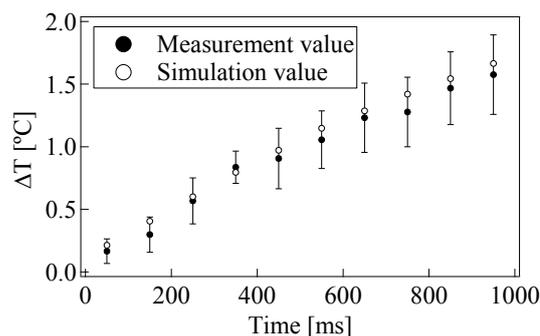


図4 温度上昇

- [2] Wesley L Nyborg *et al.*, "EXPOSURE CRITERIA FOR MEDICAL DIAGNOSTIC ULTRASOUND: I. CRITERIA BASED ON THERMAL MECHANISMS," National Council on Radiation Protection and Measurements, No. 113, pp. 52-60, 1992.
- [3] Medical electrical equipment - Part 2 - 37: Particular requirements for the basic safety and essential performance of ultrasonic medical diagnostic and monitoring equipment. IEC (International Electrotechnical Commission) IEC 60601-2-37 Ed 2.0; 2007.

# 音声の時間周波数構造の違いが コウモリの Jamming Avoidance 反応に与える影響

間井谷洋祐<sup>†</sup>, 長谷一磨<sup>‡</sup>, 鈴木優子<sup>‡</sup>, 小林耕太<sup>†‡</sup>, 飛龍志津子<sup>†‡</sup>

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

<sup>‡</sup> 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: ctub1027@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード エコーロケーション, テレマイク, 混信回避行動, Terminal frequency

## 1. はじめに

コウモリは飛行する際、環境把握のために自ら発するパルス・エコーに加え、同種他個体のパルス・エコーによって音響的に混信した状況が生じる<sup>[1]</sup>. しかしながら、コウモリは音響的な混信環境下においても、他個体や障害物に衝突せずに飛行できる. 同種他個体の音響的に類似する音声の中から、自身のエコーのみを抽出するメカニズムは不明である.

コウモリが使用するエコーロケーションパルスには、周波数、パルス長等の違いによって生じる個体差があり、先行研究では、音響的な干渉に対する、放射パルスの周波数やパルス長、音圧、放射タイミングについての検討が行われてきた<sup>[2]</sup>.

本研究では、コウモリのパルスの個性を特徴付けるパラメータとして、新たに周波数掃引の形に着目した. コウモリのパルスには周波数掃引の形によって特徴付けられる個性があり、混信する音声の周波数掃引の形が、自身の放射パルスの周波数掃引の形と類似する場合、より顕著な混信回避行動が観測されると仮説を立てた.

本研究では、飛行中のコウモリに対し、パルスを模擬した妨害音を呈示した. 呈示する妨害音の周波数掃引の形を変化させ、周波数掃引の形に対するコウモリのパルス音響特性の変化を検討した.

## 2. 実験方法

### 2. 1. 観測対象種

本実験では、エコーロケーションに FM (Frequency-modulated) 型のパルスを使用するユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) 8 個体 (bat A-H) を用いた. bat A, B の典型的なパルスのスペクトログラムを Fig. 1A, B に示した.

### 2. 2. 実験手順

実験は観測室 (9.0 × 4.5 × 2.35 m) をネットで区切った空間 (3.0 × 4.5 × 2.35 m) 内で行った. 空間の 4 隅に設置したスピーカ (PIONEER CORPORATION, PT-R7Ⅲ) から妨害音を呈示することで音響混信環境を構築した. 飛行中のコウモリの放射パルスは頭部に搭載した小型 FM ワイヤレスマイクロホン (テレマイク) で録音した. テレマイクにより録音された音声は、観測室内に設置したアン

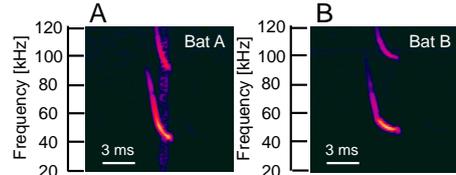


Fig. 1 Spectrograms of echolocation pulses of the bat A (A) and the bat B (B).

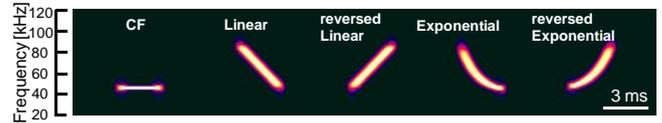


Fig. 2 Spectrograms of jamming sounds that had five different shapes of sweeps: CF (a), Linear (b), reversed Linear (c), Exponential (d) and reversed Exponential (e).

テナを紹介し、FM レシーバーで受信したのち、DAQ (NI PX1e-6358, fs = 500 kHz) を用いて PC に記録した. bat A, B に対しては、それぞれが飛行している間、妨害音を呈示しない状況 (off 1), 呈示する状況 (on), 再び呈示しない状況 (off 2) と切り替え, Bat C-H に対しては、妨害音を呈示しない状況 (off), 妨害音を呈示する状況 (on) と切り替え, 計測した.

### 2. 3. 刺激

妨害音として、信号長 3 ms, 周波数が 45 kHz の FM 音を用いた. 線形 (Linear) および、コウモリの音声に類似した Exponential 型として、それぞれを時間反転させた妨害音の 5 種類を以下の式<sup>[3]</sup>に従って、作成した.

$$f(t) = \frac{f_0}{f_0 - a f_1} \left\{ (f_0 - f_1) \left( \frac{a f_1}{f_0} \right)^t + (1 - a) f_1 \right\} \quad (1)$$

ここで、 $f_0$  は開始周波数、 $f_1$  は終端周波数、 $a$  は掃引の形を決定する定数である.  $a$  の値を変化させることで、掃引の仕方が異なる妨害音を作成した.

## 3. 実験結果

Exp を呈示した際、コウモリは自身の放射パルスの TF を素早く変化させた (Fig. 3). Exp, Lin 音を呈示した際の TF の変化をそれぞれ Fig. 4(a)(b) に示す. Lin の呈示に対し、明確な TF の差がみられなかった. 一方、Exp の呈示に対しては、bat A-H は TF を急激に上昇させる傾向がみられた. Exp において、

妨害音を呈示しない-5 - 0 秒間における TF の平均値は 46.4 kHz であり，妨害音を呈示する 0 - 5 秒間における平均値は 48.4 kHz であった．ここで，これらの平均値を一定の値とすると，妨害音が呈示される 0 秒における TF の平均値から妨害音呈示時の TF の平均値に達するまでの時定数は 100-150 ms であった．

さらに，各妨害音の呈示に対するコウモリの TF の変化量を Fig. 5 に示す．bat C を除くと全ての個体において，CF, Exp, rev-Exp の呈示に対して TF の変化量が大きく，Lin, rev-Lin の呈示に対しては TF をあまり変化させなかった．

#### 4. 考察

飛行中のコウモリに対しパルスを模擬した妨害音を呈示すると，コウモリは TF を上昇させる傾向がみられた (Fig. 4a)．さらに，周波数掃引が線形な妨害音よりもコウモリの音声に比較的近い指数関数的な周波数掃引を持つ妨害音を呈示した場合の方が TF の変化量は増加した (Fig. 4)．このことから，コウモリが自身のパルスと類似した掃引を持つ音声に対して，TF を変化させることで信号間類似度を低下させる可能性が示唆された．

また，CF, Exp および rev-Exp に対する TF の変化が大きかった．このことから，コウモリは自身の放射パルスの TF 付近である 45 kHz にスペクトルが集中しているこれらの 3 種類の妨害音との重畳を避けるために周波数を変化させた可能性が示唆された (Fig. 6)．コウモリは妨害音声の周波数情報に基づいて素早く自身の音声の特徴を変化させることで，混信を回避する可能性が示唆された．

#### 5. まとめ

本報告では単体で飛行中のコウモリに時間情報を反転させた音声を含む 5 種の妨害音をそれぞれ呈示した．その結果，TF 付近のパワースペクトルの強い CF, Exp, rev-Exp を呈示した際の TF の変化量が大きかった．このことから，コウモリの混信問題は周波数マスキングである事が示唆された．

#### 参考文献

- [1] Moss, C. F., & Surlykke, A. (2001). Auditory scene analysis by echolocation in bats. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 110(4), 2207-2226.
- [2] Hase, K., Miyamoto, T., Kobayasi, K. I., & Hiryu, S. (2016). Rapid frequency control of sonar sounds by the FM bat, *Miniopterus fuliginosus*, in response to spectral overlap. *Behavioural processes*, 128, 126-133.
- [3] Parsons, S., & Jones, G. (2000). Acoustic identification of twelve species of echolocating bat by discriminant function analysis and artificial neural networks. *Journal of Experimental Biology*, 203(17), 2641-2656.

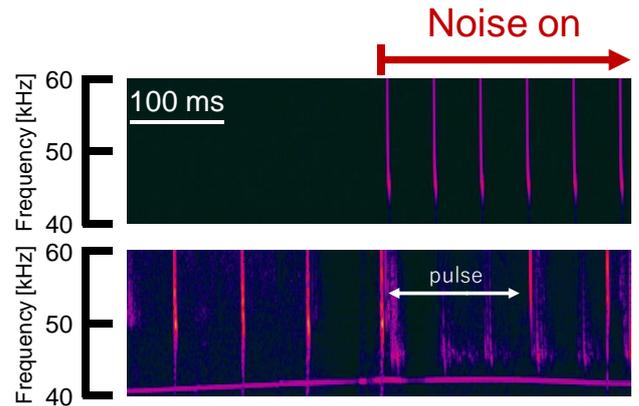


Fig. 3 This figure is a spectrogram that a bat flew in the chamber. The bat changed TF of pulses suddenly while presenting Exponential jamming sounds of 85 - 45 kHz.

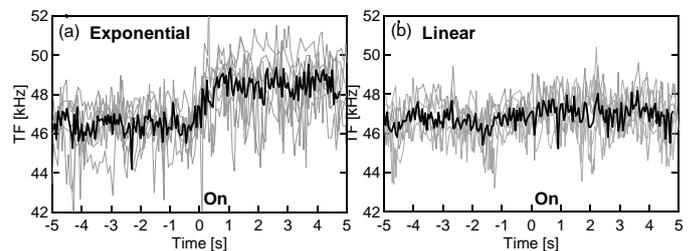


Fig. 4 (a) Gray lines are changes in TF of each bat (A-H). "0" shows a time that jamming sound presented. While presenting jamming sound of Exp, bats changed TF of pulses that they emitted about 2 kHz. Then, black line is average of pulses that entered within 50 ms from -5 s to 5 s. (b) While doing it of Lin, they did not their TF of that. However, we considered bat A-G.

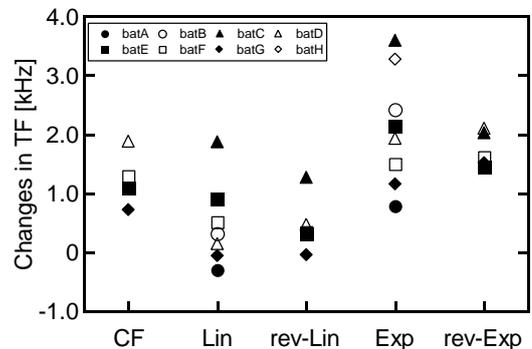


Fig. 5 Changes in pulse TF of Bat C, D, E and F in response to jamming sounds. Frequency of the jamming sounds is 85 - 45 kHz. Dashed line indicates terminal frequency of the jamming sounds.

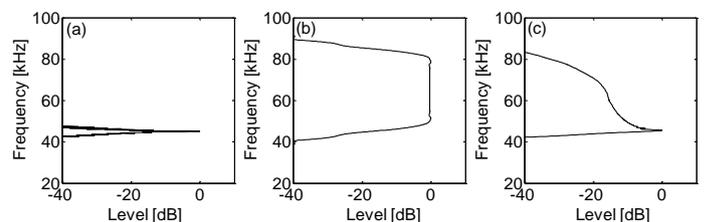


Fig. 6 (a)(b)(c) are spectral of CF, Linear and Exponential. Spectral value about 45 kHz of (a) and (c) is close to TF of bats. Spectral of reversed Linear is same to Linear. Spectral of reversed Exponential is same to Exponential.

# 複数個体飛行時における CF-FM コウモリの混信回避戦略

角屋志美<sup>‡</sup>, 竹内由紀<sup>‡</sup>, 長谷一磨<sup>‡</sup>, 小林耕太<sup>†‡</sup>, 飛龍志津子<sup>†‡</sup>

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

<sup>‡</sup>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: dmq1013@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード エコーロケーション, テレマイク, 混信回避, 参照周波数, パルス放射タイミング

## 1. はじめに

コウモリは超音波パルスを放射し、返ってくるエコーを聴取して周囲の環境を把握する。コウモリは群れで生活するため、飛行する際には自身のパルス・エコーに加え、同種他個体の音声も混在した音響的な混信状況が起こる[1]。その状況下においてもコウモリは他個体と衝突せず飛行するため、自身に必要なエコー情報を抽出していると考えられている。しかしながら、類似する他個体の音声から自身の微弱なエコーのみを抽出し分析するメカニズムはいまだ解明されていない。

コウモリと同様アクティブセンシングを行う弱電気魚は、信号混信時に自身の発する電場の発電周波数の差を互いに広げることで混信を回避する[2]。一方で、周波数定常 (CF) 成分と周波数変調 (FM) 成分の合成音をエコーロケーションに用いるキクガシラコウモリは、放射パルスの周波数を変化させることで、飛行によって生じるドップラー効果によるエコー周波数の変化を打ち消し、エコー周波数を聴覚感度が極めて高い帯域内 (参照周波数) に保つドップラーシフト補償行動を行う[3]。キクガシラコウモリは電気魚とは対照的に、2 個体同時飛行時に互いに参照周波数を接近させることが報告されている[4]。しかし、この戦略をどのように応用し、複数個体飛行時の音響混信を回避しているのかは不明である。

本報告では、小型 FM ワイヤレスマイクロホンを搭載し、同時に飛行する複数のコウモリそれぞれの放射パルスとエコーを計測した。

## 2. 実験方法

実験には、9 個体のニホンキクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum nippon*) を用いた。このコウモリは 70 kHz 付近の CF 成分の前後に FM 成分 (iFM, tFM) が伴う複合音を放射する。

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。3 個体からなるグループを 6 つ作成した。はじめに作成したグループの各コウモリをそれぞれ単独飛行させた (S1)。その後、グループの 3 個体を同時に飛行させた (G)。最後に、再び各コウモリを単独飛行させた (S2)。全てのコウモリに小型 FM ワイヤレスマイクロホンを搭載し、全個体の音声を分離して記録した。マイクロホンからの送信信号は観測室内に設置した無指向性のアンテナ (Terk

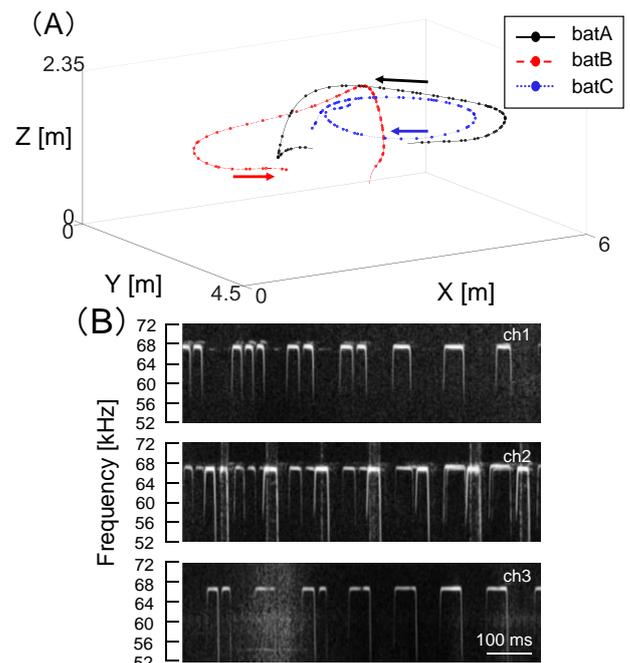


Fig. 1 (A) Flight trajectories of the three bats during group flight. (B) Echolocation pulses and echoes emitted by each bat of a group of the three individuals recorded with on-board microphones

Technologies Corporation, Model FM+) を介し、FM レシーバー (アルモテック社製) で受信した。その後、DAQ (National Instruments, Model NI PXI-6358, 16 bit, fs = 500 kHz) を用いて PC に記録した。

コウモリの飛行は、観測室に設置した 2 台の高速ビデオカメラ (IDT Japan, Inc., MotionXtra NX8-S1) で撮影した。撮影した画像は、モーションキャプチャソフト (DITECT DippMotion PRO version 2.2.2.0) を用いて解析し、3 次元飛行軌跡を算出した。ビデオカメラで撮影した画像とテレマイクで計測した音声はトリガ信号で同期した。

## 3. 実験結果

同時飛行する 3 個体のコウモリのパルスとエコー、飛行軌跡を計測することに成功した (Fig.1)。tFM 長, CF 長の変化を Fig. 2 に示す。tFM 長は単独飛行時では  $2.0 \pm 0.1$  ms から複数個体飛行時には  $2.3 \pm 0.1$  ms と増加傾向, CF 長は単独飛行時では  $23.1 \pm 0.8$  ms から複数個体飛行時には  $20.9 \pm 1.0$  ms と減少傾向がみられた。また、観測されたエコーより参照周波数

の変化を Fig. 3A に、単独飛行時と 3 個体飛行時における参照周波数の差の変化を Fig. 3B に示す。Group1 では参照周波数を近づけるような傾向がみられたが、他のグループでは遠ざけている個体も確認でき、明確な傾向がみられなかった。

次に、パルス放射タイミングと飛行の関係に着目した。3 個体飛行時の各コウモリの飛行軌跡を Fig. 4A に、パルス放射タイミングを Fig. 4B に示す。追いかける飛行や、すれ違い飛行の際に他のコウモリと自身の音声の重畳を回避するように、互いに放射タイミングを同調する傾向がみられた。

#### 4. 考察

本研究では、3 個体飛行時において参照周波数の明確な変化は確認できなかった。他種の CF-FM コウモリにおいて、エコー周波数の分解能は 0.1% 以下であると報告されている [5]。キクガシラコウモリも 0.1% (=70 Hz) の周波数差を弁別できると仮定すると、本研究でみられた個体間の参照周波数差は平均で 230 Hz であったため、周波数差を広げなくても、自身と他個体の音声は弁別可能であったと考えられる。また、参照周波数の接近がみられた先行研究と本研究では実験状況が異なる (着地飛行 vs 自由飛行)。参照周波数の接近行動がどのような状況で誘発されるかについて、今後検討していきたい。

Duty 比の低い FM パルスを用いるコウモリは、雑音や他個体の呈示に対しパルス放射頻度を低下させることが報告されている [6]。本研究は、音声の Duty 比が高く他個体の音声との時間的な重畳が問題となると予想されるキクガシラコウモリが、パルス放射タイミングを適応的に変化させ重畳を回避する可能性を示唆する。

#### 5. まとめ

本報告では、同時飛行する 3 個体のキクガシラコウモリの放射パルスだけでなく、エコーを計測することに成功した。多個体飛行時、参照周波数の明確な変化は見られなかった。一方、すれ違いや追いかけるなどの特定の飛行状況で、放射タイミングをずらす傾向がみられた。このことから、キクガシラコウモリはパルス放射タイミングを適応的に変化させ、時間的な重畳を回避していると示唆される。

#### 文 献

- [1] Moss, C. F., & Surlykke, A. (2001). *The Journal of the Acoustical Society of America*, 110(4), 2207-2226.
- [2] Bullock TH, Behrend K, & Heiligenberg W (1975) *Journal of Comparative Physiology A* 103(1):97-121.
- [3] Hiryu, S., Shiori, Y., Hosokawa, T., Riquimaroux, H., & Watanabe, Y. (2008). *Journal of Comparative Physiology A*, 194(9), 841-851.
- [4] Furusawa, Y., Hiryu, S., Kobayasi, K. I., & Riquimaroux, H. (2012). *Journal of Comparative Physiology A*, 198(9), 683-693.
- [5] Riquimaroux, H., Gaioni, S. J., & Suga, N. (1991). *Science*, 251(4993), 565-569.
- [6] Jarvis, J., Bohn, K. M., Tressler, J., & Smotherman, M. (2010). *Animal behaviour*, 79(4), 787-796.

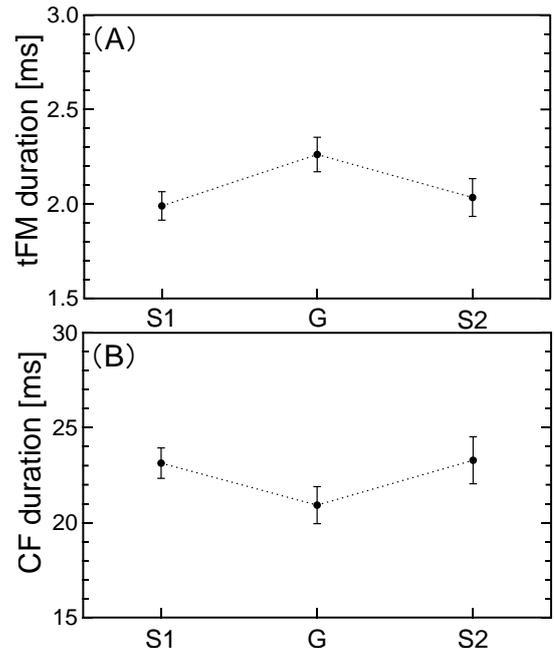


Fig. 2 Changes in mean acoustic characteristics by six groups. (A) tFM duration, (B) CF duration.

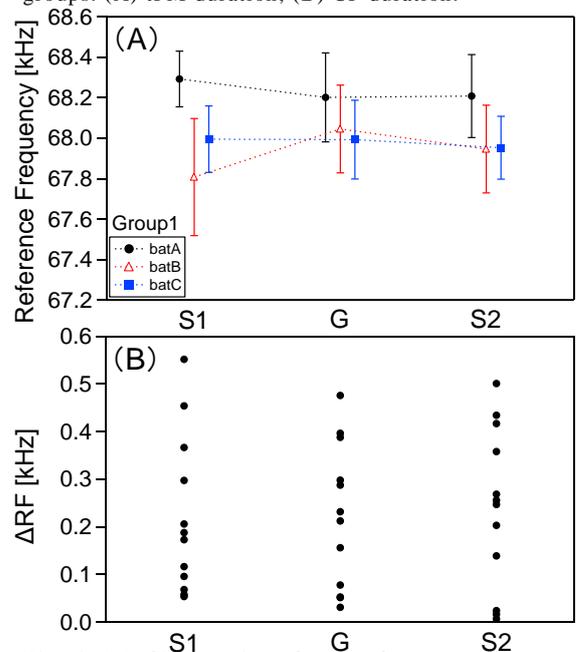


Fig. 3 (A) Changes in reference frequency in group1. (B) Relationships between  $\Delta$ RF during single and group flight

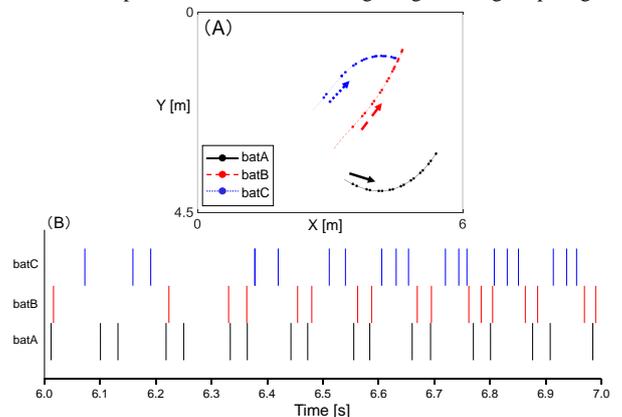


Fig. 4 (A) Flight trajectories of the three bats during flight. (B) Emission timing of each bat during group flight.

## 採餌行動時における野生 CF-FM コウモリの超音波センシング戦略に関する検討

氏野 友裕<sup>‡</sup> 中井 元貴<sup>‡</sup> 藤岡 慧明<sup>‡</sup> 飛龍志津子<sup>†‡</sup>

† 同志社大学超音波医学研究センター 〒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 医心館

E-mail: dmq1048@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード 超音波パルス, ドブラシフト補償行動, マイクロホンアレイ, バイオロギング

## 1. はじめに

エコーロケーションコウモリは FM(Frequency Modulation)型と CF(Constant Frequency)-FM 型の超音波パルスを放射するコウモリの 2 種類に大別される<sup>[1]</sup>. これまで我々の野外生物ソナー研究では FM コウモリを対象に研究を行ってきた<sup>[2]</sup>. 一方, CF-FM コウモリに関しては観測室内におけるソナー分析を行ってきたものの<sup>[3]</sup>, 自然環境下における実態に関して不明な点が多く, 音響行動の報告も殆どない.

近年, 動物の軌道計測に GPS ロガーが広く利用され, バイオロギング研究が注目されている. 技術の進歩に伴い, 小型化・高性能化してきており, コウモリにも搭載できるほど小型のロガーが登場した. そこで, 本研究ではまず GPS ロガーを用いて CF-FM コウモリが一晩に移動する飛行経路の全体像の取得を試み, 計測することに成功した. そして, GPS ロガーで特定した採餌場所でマイクロホンアレイを構築し, コウモリのパルスを計測し, 採餌飛行時における音響センシング戦略の検討を行った.

## 2. 実験方法

観測対象種はキクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*)で体重は 20~30 g の種である. 放射パルスは第 2 倍音が最も強く, 周波数定常部(CF 部)とその前後に周波数変調部(iFM, tFM)で構成された超音波パルスを放射する(Fig. 1A). 第 2 倍音の CF 部の周波数を CF2 周波数, パルス放射間隔を IPI (Inter-pulse interval), CF 部の長さを CF 長(CF duration)と呼ぶ. 長距離移動計測には, PinPoint-50 (約 1.9 g,

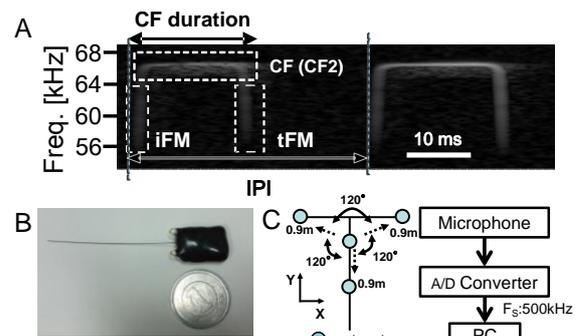


Fig. 1(A) Spectrogram of typical echolocation pulses of *Rhinolophus ferrumequinum*. (B) GPS data logger (PinPoint-50) (C) Y-shaped microphone array system.

Biotrack Ltd.)を使用した(Fig. 1B). 捕獲の翌々日(2017年5月15日)の19:00から3分間隔で測位を行う設定とした. 福井県大野市にて捕獲したコウモリ10頭に搭載し, その翌々日以降にロガー装着を行ったねぐらにてロガーを回収した. また, GPS ロガーにて特定した場所で4つのマイクロホンで構成されたY字型のマイクロホンアレイ(Fig. 1C)<sup>[2]</sup>を1基構築し, 採餌飛行するコウモリの音声を計測した.

## 3. 実験結果

我々はGPSロガーを5つ回収し, 内4つデータを取得することに成功した(Fig. 2, Bat A-D). いずれのコウモリも川沿いの林で停滞しており, 移動と停滞を繰り返す様子が見られた. Bat A, B, C はねぐら付近に飛行し, 一か所に集中して暫く留まっている様子が見られた. Bat D はねぐらから北東方向の離れた場所に同様の様子が見られた. また, Bat B が停滞していた場所(Fig. 2, □部分)でコウモリは採餌行動を

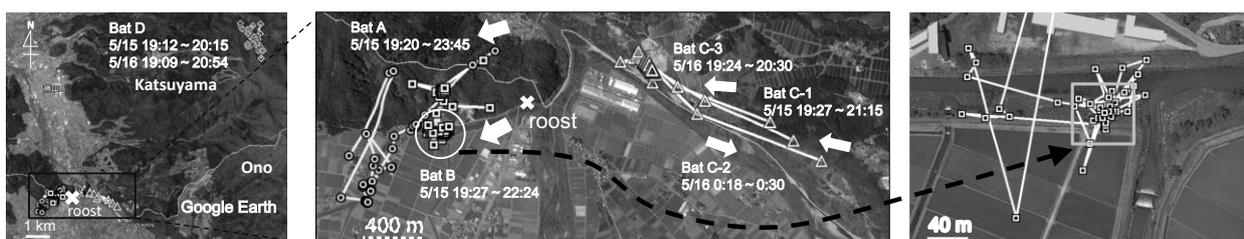


Fig. 2 Large-scale flight paths of wild echolocating bats measured by PinPoint-50 (Bat A, B, C, D). Flight path of Bat C and Bat D were fragmentally reconstructed over two days. In right side, we measured pulses of the bats by microphone array system in square area.

行っていたと考え、その場所の付近にマイクロホンアレイを設置して音声計測を試みた。すると、約1時間の計測中に3回、1~3分間の連続したソナー音声を確認できた。Figure 3Aはその際に計測したパルスのスペクトログラムで、CF2周波数、IPI、CF長の時間変化をFig. 3Bに示す。CF2周波数は約68 kHz付近でほぼ一定であった。キクガシラコウモリは、エコー周波数を一定に保つために、標的との相対速度に応じてパルスのCF周波数を変化させる(ドプラシフト補償行動)<sup>[4]</sup>。このことから、コウモリは木の枝などに懸下しながら周囲の獲物を探索していたと考えられる。IPIはおよそ100 ms前後で推移し、時折長いIPIが見られた。CF長は10-70 msの間で変化し、平均値は $45.7 \pm 9.9$  ms(標準偏差)であった。

#### 4. 考察

我々はこれまでにキクガシラコウモリのねぐら付近にてマイクロホンアレイを用いて、飛行中の音響計測を行っている<sup>[5]</sup>。Figure 4は、Open spaceとCluttered spaceにて計測したパルスのスペクトログラム(Fig. 4A, C)とCF2周波数、IPI、CF長の時間変化(Fig. 4B, D)を示す。停滞時の特性はOpen spaceと同様で、Cluttered spaceと比べて単発で長めのパルスを多く放射する傾向が見られた。キクガシラコウモリはパルスとエコーを重畳させることから、Fig. 3B, Fig. 4B, DのCF長の平均値と標準偏差から射程距離を推定したところ、停滞時では $7.7 \pm 1.7$  m、飛行時(Open space)では $8.1 \pm 2.5$  m、Cluttered spaceでは $5.3 \pm 1.4$  mであった。よって、停滞時ではCF部を長くすることで、より遠くのエコーを聞くことができ、主に広い範囲をセンシングしていたのではないかと考えられる。キクガシラコウモリは、木に止まりながら獲物を探索し、見つけると捕まえ、再び木に戻り捕食することが確認されている(fly-catcher style)<sup>[6]</sup>。停滞時ではパルス周波数を一定に保ち、返って来るエコー周波数の変化を感じることで獲物を検知しようとしていたのではないかと考えられる。

現在、コウモリの超音波放射時刻を同時計測できる音響GPSロガーを開発している。コウモリはIPIから、その行動を推測することができる。音声情報と位置情報を組み合わせることで捕食地点の特定のみならず、探索戦術の分析にも非常に有用であると考えられる。

#### 5. まとめ

本報告ではコウモリの探索行動戦略の解明のために、GPSデータロガーを用いて長距離軌道計測を行った。それにより特定された場所でマイクロホンア

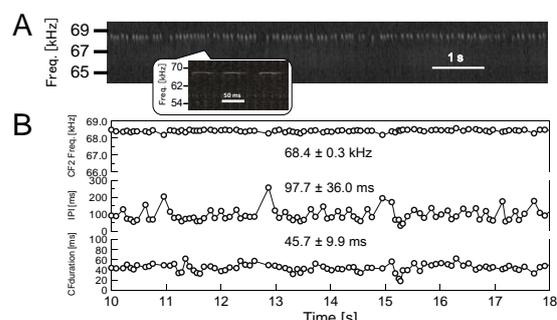


Fig. 3 Echolocation characteristics of *R.ferrumequinum* in Stay area. (A) Spectrograms of echolocation pulse train. (B) Change in CF2 frequency, IPI, and CF duration.

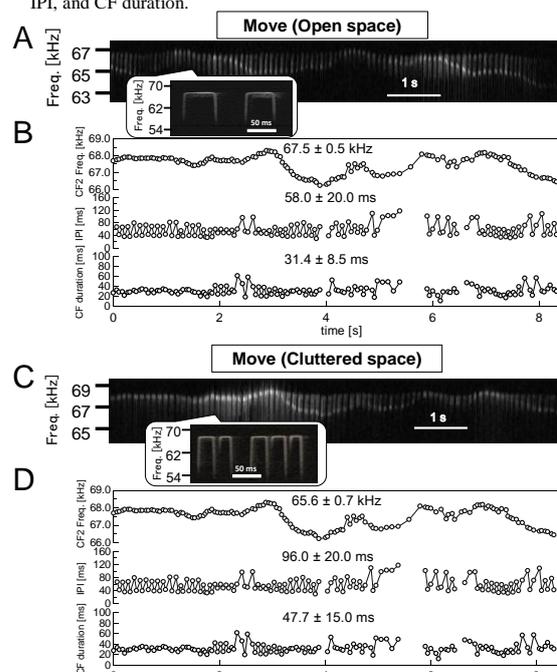


Fig. 4 Echolocation characteristics of *R.ferrumequinum* in Open (A, B) and Cluttered (C, D) space. (A, C) Spectrograms of echolocation pulse train. (B, D) Change in CF2 frequency, IPI, and CF duration.

レイを用いてコウモリの音声計測に初めて成功した。その結果、コウモリは移動と停滞を繰り返し飛行し、停滞時では主に広い範囲をセンシングしていることが示唆された。

#### 6. 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(H 25 - 29), 新学術領域研究(H 28 - 32), 基盤 A(H 28 - 31), 若手研究 B(H 27 - 29)の補助を受けた。

#### 7. 参考文献

- [1] J.D. Altringham, (1998). "コウモリ 進化・生態・行動", 八坂書房
- [2] E. Fujioka, et al., (2014). "Rapid shifts of sonar attention by *Pipistrellus abramus* during natural hunting for multiple prey." J. Acoust. Soc. Am., 136, 3389-3400.
- [3] Mantani, S., et al., (2012). "Echolocation behavior of the Japanese horseshoe bat in pursuit of fluttering prey." J. Comp. Physiol. A., 198, 741-751.
- [4] Hiryu, S., et al., (2008). "On-board telemetry of emitted sounds from free-flying bats: compensation for velocity and distance stabilizes echo frequency and amplitude." J. Comp. Physiol. A, 194, 841-851.
- [5] 氏野友裕, (2016). 私大戦略研究成果公開シンポジウム, pp 49-50.
- [6] HU. Schnitzler, et al., (1985). Journal of Comparative Physiology A, January 1985, Volume 157, Issue 1, pp 39-46.

# 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

佐藤 寛<sup>‡</sup> 山名 詩織<sup>‡</sup> 藤岡 慧明<sup>‡</sup> 渡辺 好章<sup>†‡</sup> 飛龍志津子<sup>†‡</sup> 秋山 いわき<sup>†‡</sup>

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

<sup>‡</sup>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 医心館

E-mail: dmq1037@mail4.doshisha.ac.jp

**キーワード** SN比, 周波数減衰, 送信信号の最適化, コウモリのドプラシフト補償行動

## 1. はじめに

超音波診断は、柔軟な検査環境、高い安全性から多くの疾患や病変に対して有効な検査方法として位置づけられているが、診断精度の向上には信号対雑音比 (SNR) の改善が重要と認識されている。また、最近の振動子の広帯域化は送受信信号の制御による SNR の改善を可能としている。一方でコウモリは、簡素なセンシング機構にも関わらず、高度な空間把握を行っており、超音波を用いて受信信号の音圧、周波数共に一定となるように送信信号を柔軟に変化させる補償行動 (DSC) <sup>[1]</sup> や、混信回避行動における強固な雑音耐性が報告されている。

これまで我々は、SNR 向上のためにコウモリ特有の超音波放射戦略である補償行動に着目し、コウモリの補償行動アルゴリズムの超音波診断装置への応用を検討し、SNR の改善を確認した<sup>[2-3]</sup>。

本報告では、提案手法の適応範囲の検証を超音波機器を用いて行うと同時に、SNR に応じたコウモリのドプラ計測における行動戦略を見るべく、雑音を呈示し、コウモリの DSC の精度や放射パルスの特徴変化について行動実験による検討を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 超音波機器を用いた水中実験

脱気水を満たした水槽内に血管を模擬したチューブを通し、チューブ内には Sephadex を含んだ脱気水を速度 150 mm/s 一定で流した (Fig. 1)。チューブ内には流れる Sephadex からのエコー信号を計測用超音波機器 Ula-Op (University of Florence) に接続した広帯域フレキシブルアレイプローブ (B5K0.8×10N-64CH P=1.0 樹脂用, ジャパンプローブ社,  $f_c=4.6$  MHz) を用いて計測した。またチューブとプローブの間には生体模擬ファントム (黒鉛濃度 4%, 減衰定数: 0.6 dB/cm/MHz, 厚み 57 mm) を配置した。

次に、得られたエコー信号から、ドプラ周波数を算出すると共に、エコーの中心周波数、音圧を求めた。そして、周波数を補償した送信信号を印加し、提案法の効果の適応範囲について検証した。

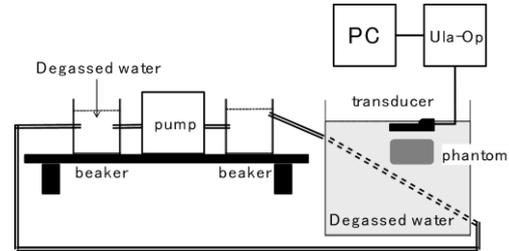


Fig. 1 Experimental system of measuring Doppler frequency.

### 2.2 コウモリの雑音呈示実験

実験では、キクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum Nippon*; 体長 6-8cm, 体重約 20-30g) 2 個体を用いた。コウモリの放射パルスと実験系を Fig. 2 に示す。キクガシラコウモリは飛行中、送信周波数を変化させることで、エコーの第 2 高調波の定常周波数 (CF<sub>2</sub>) を一定に維持するドプラシフト補償行動を行う。観測室内 (9.0 × 4.5 × 2.4 m) をネットで区切った空間 (3.0 × 4.5 × 2.4 m) の 4 隅に設置したスピーカ (PIONEER CORPORATION, PT-R7 III) から、妨害音 (帯域制限ノイズ, 30 kHz~50 kHz または 50 kHz~80 kHz) を呈示し、飛行するコウモリに対して人工的に音響混信環境を構築した。飛行中のコウモリの放射パルスは、頭部に搭載した小型 FM ワイヤレスマイクロホン (テレマイク) で録音した。テレマイクにより録音された音声は、観測室内に設置したアンテナを介し、FM レシーバーで受信したのち、DAQ (NI PXIe-6358, fs = 500 kHz) を用いて PC に記録した。妨害音を呈示しない条件 (off) および呈示した条件 (on) において、コウモリがネットに着地に向かうまでの音声列を取得し、エコー

並びにパルスの音響分析を行った。

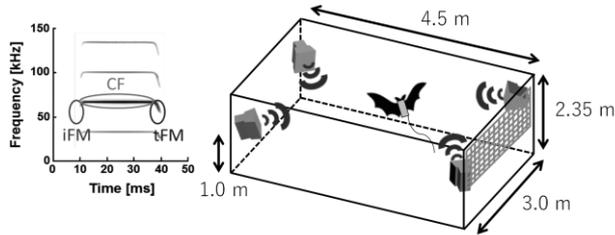


Fig. 2 (A) Spectrogram of echolocation pulse of *R. ferrumequinum nippon*. (B) Measurement system of echolocation sounds of the bat during flight in acoustic jamming condition.

### 3. 実験結果・考察

Fig.3 は、超音波機器からの送信周波数を変化させた際のエコーの中心周波数（上図）及びドプラ周波数（下図）の変化を示している。送信周波数の補償によって、エコーの中心周波数が直交検波の周波数（4.6 MHz）にほぼ一致した際、ドプラ周波数は補償をしない場合と比較して約 300~400 [Hz]上昇し、精度の向上が確認できた。

次に、Fig.4 はコウモリ 2 個体に 2 種類の雑音を呈示した際の、エコーCF<sub>2</sub>周波数を示している。呈示音の有無によらず、エコー周波数が一定に保たれ、ドプラ計測の精度が変わらないことがわかる。また Fig. 5 からは、コウモリが発する超音波の終端 FM 部 (tFM) の周波数帯域幅を、ノイズ呈示時には広げることが確認出来た。さらに Fig. 6 は、放射パルスの CF<sub>2</sub> に対する CF<sub>1</sub> の音圧比を示している。ノイズを呈示することで CF<sub>1</sub> の音圧を上昇させていることがわかった。SN 比が悪い状況下でのドプラ計測に際し、コウモリが放射パルスの特徴を変化させる適応を行っていることがわかった。特に倍音の使用に関しては、不明な点が多いことから、その用途や効果に関してより検討を進める必要がある。

### 4. まとめ

ドプラ計測に関わる提案法の適応範囲を検証することに加え、コウモリの超音波運用に関して新たな知見を見出すために、コウモリの有する強固な雑音耐性に着目し、行動実験を行った。その結果、コウモリが雑音環境下において、超音波の特徴を変化させていることを確認した。

今後は、コウモリの雑音耐性に関する更なる検討と、これらの知見を踏まえて、ドプラ計測で用いる信号の検討を進めていく。

### 5. 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）の補助を受けた。

### 6. 参考文献

[1] S. Hiryu, et al., *J. Comp. Physiol. A.*, Vol. 194, pp.841-851, 2008.

[2] 秋山いわき, 電子情報通信学会技術研究報告, Vol. 111, pp.43-48, 2012.  
 [3] 手嶋優風他, 日本音響学会講演論文集, pp136, 2015.

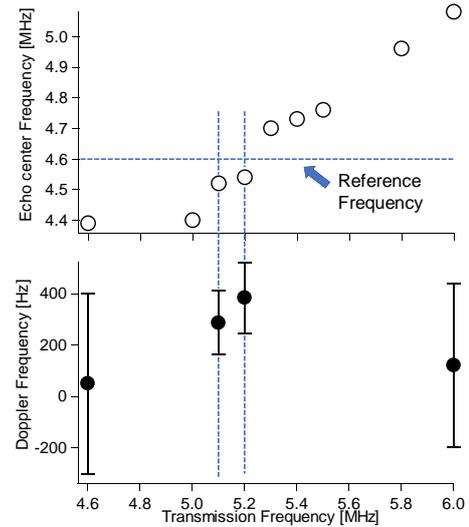


Fig. 3 Compensated echo center frequencies (top) and variations of expected values of Doppler frequency (bottom) as a function of transmitted frequency of Ula-Op (reference frequency = 4.6 MHz).

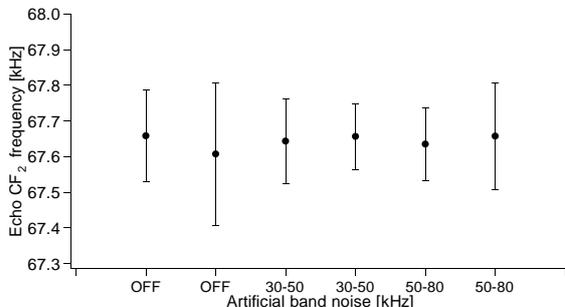


Fig. 4 Echo CF<sub>2</sub> frequency of pulses emitted by the bats under acoustic jamming condition.

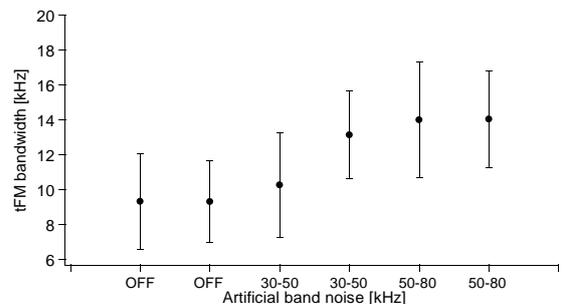


Fig. 5 Variations in tFM frequency band of pulses emitted by the bats under acoustic jamming condition.

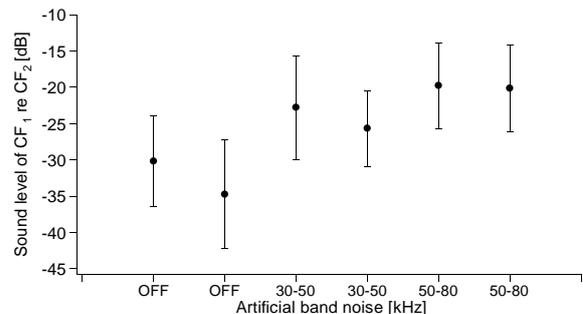


Fig. 6 Variations in sound pressure of pulse CF<sub>2</sub> with respect to CF<sub>1</sub>.

# 生物音響イメージング：感覚統合の行動応答および脳機能マップ計測

伊藤 優樹<sup>†</sup> 佐藤 涼 古山 貴文 飛龍 志津子 小林 耕太

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

E-mail: <sup>†</sup> ctub1018@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード 視聴覚統合, ダブルフラッシュ錯覚, 誘発電位, スナネズミ

## 1. はじめに

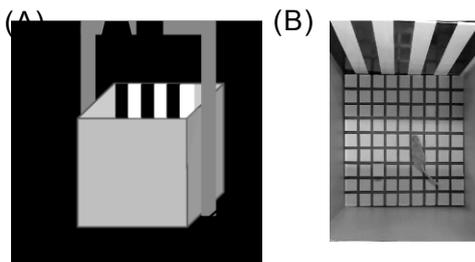
ヒトは無意識のうちに様々な感覚から情報を得て、色々なものを知覚している。その複数の感覚情報は脳内で統合されている。情報を統合することによって、単一の感覚だけでは外界の正確な把握が難しい際の補完<sup>1)</sup>や、定位能力の向上<sup>1)</sup>、反応時間の短縮<sup>2)</sup>などの効果がもたらされている。このように多感覚統合は生活していく上で非常に重要な役割を果たしている。しかしながら、視覚情報と聴覚情報を統合することによって間違っただ認識を起こすことがある。その例がダブルフラッシュ錯覚である。ダブルフラッシュ錯覚とは光刺激を一回提示すると同時に短い音刺激を2回提示することで光が2回点滅したと知覚してしまう錯覚現象である<sup>3)</sup>。先行研究において、このような錯覚はヒトを対象とする場合がほとんどであり、良いモデル動物がない。そのため脳内でどのように統合処理が行われているかは不明である。

この実験の目的はダブルフラッシュ錯覚がスナネズミにも生じるかどうかを確認し、視聴覚頭語に関与している脳部位を特定することである。

## 2. 実験 1

### 2.1. 手続き

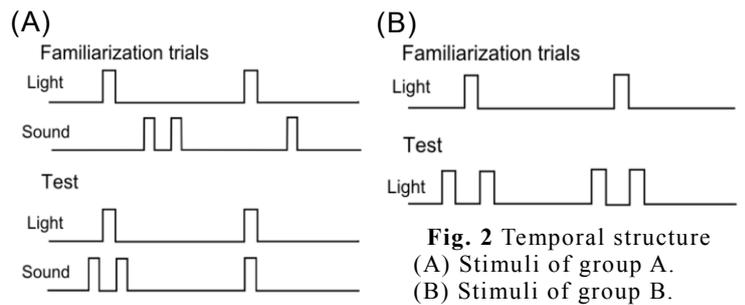
被験体としてスナネズミ 23 匹 (グループ A: 14 匹, グループ B: 9 匹) を用いた。実験環境は、防音室内に、実験箱 (Fig.1 (A)) を設置し、その実験箱の中央に白色の発光ダイオードを内部に入れた直方体型の物体を配置した (Fig.1 (B))。実験の流れは、各被験体ごとに 30 分ずつ 5 日間、オープンフィールドになっている実験箱内を探索させ実験箱に慣れさせた。6 日目は、物体を実験箱の中央に設置し、被験体に実験箱内を探索させた。また、探索の様子をカメラで記録し、1 試行 5 分の馴化試行を 5 回、1 試行 5 分のテスト試行を 1 回行い、各試行初めの 90 秒間の探索量を測定した。



**Fig. 1** The image of experimental condition (A) The box (45×45×50) was used. Experiment was conducted on the open field. Black squares are a camera and a loud speaker. (B) Top view of the open field. Black square is object which embedded a LED.

### 2.2. 刺激

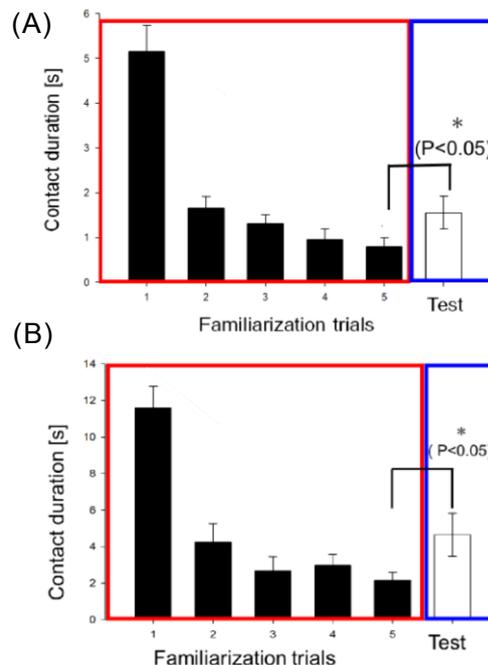
グループ A ではスナネズミにおいてダブルフラッシュ錯覚が生じているかどうかを確認した。馴化試行時、実験箱の中心に設置した物体から 1 回の光刺激を提示し、スピーカーから光刺激と同期しないように 2 回の音刺激を提示した。テスト試行時では光と音を同期させて提示した (Fig.2 (A))。グループ B はスナネズミが光を 1 回と 2 回を見分けているときの反応を確認した。馴化試行時、1 回の光刺激を提示し、テスト試行時では光を 2 回にして提示した (Fig.2 (B))。



**Fig. 2** Temporal structure (A) Stimuli of group A. (B) Stimuli of group B.

### 2.3. 結果

グループ A の物体への探索時間の平均を Fig. 3(A) に、グループ B の探索時間の平均を Fig. 3(B) に示した。1 試行目が最も探索量が多く、試行数を重ねるごとに探索量が減少していた。テスト試行時になると最後の馴化試行時から探索量が増加していた。



**Fig.3** Searching time at Experiment I (A,B) represents that average contact time of 14 gerbils for the object. Over the course of five familiarization trials, the contact time gradually decreased. At the test trial, contact time for object increased when stimuli changed.

### 3. 実験 2

#### 3.1. 被験体

生後 24 カ月以内のスナネズミ 3 匹（オス 2 匹，メス 1 匹）を被験体として使用した。

#### 3.2. 刺激

視覚刺激には提示時間 5ms，繰り返し時間が 1s のパルス波を用いた。聴覚刺激も提示時間 5ms，立ち上がり・立ち下がり時間 1ms，繰り返し時間は 1s のホワイトノイズバースト（周波数帯域 5~70kHz，サンプリング周波数 192kHz）を用いた。提示方法は計測部位につき，視覚刺激のみ（V），聴覚刺激のみ（A），視聴覚同時刺激（AV）の 3 つの刺激を提示した。それぞれの刺激は 128 回提示された。

#### 3.3. 電位記録

実験はすべて防音室の中で行い被験体は気化麻酔（イソフルラン）下にあった。脳開口手術を行い，ヘッドポルを取り付け，頭蓋にある骨縫合線で囲まれている左半球位置の頭蓋骨を除去し脳を露出させた。脳定位固定装置を用いて，Lambda の位置を基準に外側に 1~5mm，前方に 0~3mm の位置にそれぞれ電極を挿入した。計測位置の間隔はそれぞれ約 1mm であった。被験体の右側に白色 LED とスピーカー（ES1，TDT，USA）を設置し，被験体との距離はともに約 5cm であった。タングステン電極（200~400k $\Omega$ ）を使用しフィルター（0.1~5000 Hz）をかけて記録した。

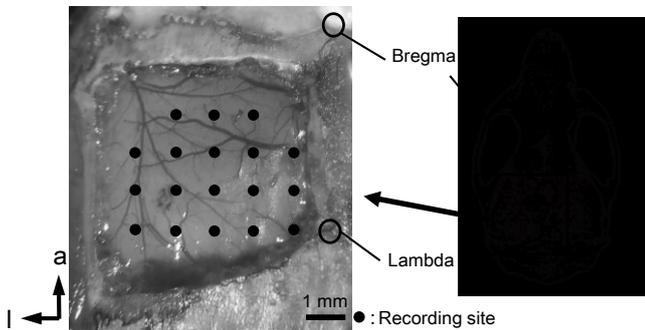


Fig.4 Top view of the recording sites in the left hemisphere of gerbil. Close circle is recording sites.

#### 3.4. 結果

Lambda から外側に 4mm，前方に 2mm の位置で 3 つの刺激を提示・計測し，加算平均した図を以下の Fig.5 (a) に示した。0ms は刺激の開始点を示している。視覚刺激を提示している場合には VEP が観測でき，聴覚刺激を提示している場合は AEP が観測されていた。また，A と V を足し合わせた波形（A+V）と AV の波形を表した図が Fig.5 (b) である。刺激が互いに影響を及ぼしているかを調べるために A+V と AV の相関係数をとり，類似性を確認した。計測部位ごとに相関係数を示した図が Fig.6 である。Fig.6 より Lambda から lateral 方向に 2mm，anterior 方向に 1mm 程度離れた場所の周辺での相関係数は 1 に近く，lateral 方向に 4mm 程度離れたところでは，相関係数が低くなっていた。

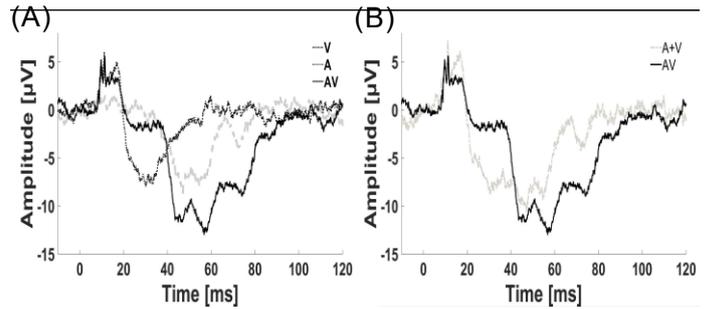


Fig. 4 Evoked potential in occipital cortical area. (a) showed the waveforms recorded at 4 mm lateral and 2 mm anterior to Lambda. (b) showed the waveforms between A+V and AV.

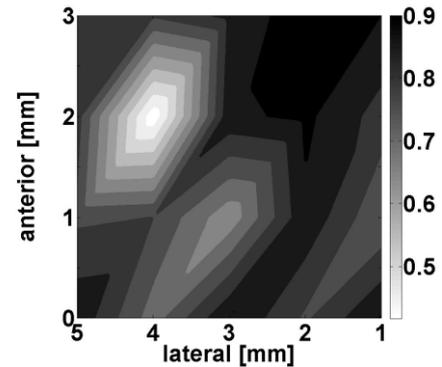


Fig. 5 Waveform similarity map We compared waveform similarity between sum of each unimodal stimulus (A+V) and audio-visual stimulus (AV). The lateral region around V1 is the position that waveform similarity is low between A+V and AV

### 4. 考察

実験 1 より，最後の馴化試行時に比べテスト試行では探索時間が有意に増加していることから，見え方が変わっており，光 1 回と 2 回を区別している。私たちのデータは，さらにダブルフラッシュ錯覚が生じている可能性を示唆している。実験 2 より，Lambda から外側に 4mm，前方に 2mm の位置は他の場所に比べ類似度が低かった。このことから単独の刺激を足し合わせただけでは生じない脳内処理が行われていることが考えられる。このことから視聴覚統合に関係のある脳部位が誘発電位の差をマップ化することである程度特定でき，Lambda から外側に 4mm，前方に 2mm 離れた場所の周辺が視聴覚統合に関わる領域であることが示唆される。より確かな特定をするために内因性イメージングをしていく必要がある。

### 文 献

- [1] Sekuler R, Sekuler A B, Lau R, “Sound alters visual motion perception”, Nature, 385, 1997.
- [2] Sakata S, Kitsukawa T, Kaneko T, Yamamori T, Sakurai Y, “Task-dependent and cell-type-specific Fos enhancement in rat sensory cortices during audio-visual discrimination”, European Journal of Neuroscience, 15, 2002.
- [3] Shams L, Kamitani Y, Shimojo S, “Visual illusion induced by sound”, Cognitive Brain Research, 14, 2002.

# Speech encoding methods for pulsed infrared laser stimulation to a cochlea

Yuta Tamai<sup>†</sup> Kazuyuki Matsumoto Sizuko Hiryu Kohta I. Kobayasi

<sup>†</sup>Doshisha University, 1-3 Tatara Miyakodani, Kyotanabe-shi, Kyoto-fu, Japan

E-mail: [†dmq1041@mail4.doshisha.ac.jp](mailto:†dmq1041@mail4.doshisha.ac.jp)

**Keyword: cochlear implant, noninvasive stimulating system, click-modulated speech sound, sine-wave speech sound**

## 1. Introduction

Action potentials were evoked by irradiating infrared laser to neurons *in vivo* [1]. Because the infrared laser can stimulate nerves without contacting tissue, the novel stimulation has gained much attention as a possible substitute for electrical stimulation. Our group wants to apply infrared laser to hearing aid. We can develop noninvasive hearing aid with infrared laser because the laser can reach a cochlea from outer canal through a tympanic membrane. Hence, we can develop noninvasive hearing aid with infrared laser that does not need invasive surgery.

The purpose of this study was to develop speech encoding scheme by hearing aid with infrared laser. Our previous studies revealed that similar compound action potentials were observed by irradiating infrared laser to cochlear nerves as by presenting clicking sounds[2]. Thus, we created a click modulated speech sound as a simulated sound of the hearing aid. The sound was a click train, whose repetition rate followed formant center frequencies and amplitude envelope transition of an original speech sound. In this study, we investigated what is the optimal method for creating speech perception with hearing aid with infrared laser.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Six native Japanese speakers (23–24 years old) participated in the experiment as subjects. All subjects had not listened to the stimulus before they became subjects.

### 2.2. Stimuli

#### 2.2.1. Click-modulated speech sound

We synthesized click-modulated speech sound (CMS) as a simulated sound of noninvasive hearing aid (Fig.1) [2]. We randomly selected 50 various familiarity words. In this experiment, we used eight kinds of CMS: Constant-frequency (CF), which were average of first

formant frequency; first formant frequency (F1); first and second formant frequencies (F1+F2); first, second and third formant frequencies (F1+F2+F3). For all these conditions, the stimulus with amplitude envelope (w/ AE) and without amplitude envelope (w/o AE) were presented. The sound pressure level of all stimuli were measured by microphone (ER-7C Series B, Etymotic Research) and calculated from 60 to 70 dB SPL.

#### 2.2.2. Sine-wave speech sound

The same words as producing CMS were vocoded to sine-wave speech sound (SWS) [3]. We used eight kinds of stimulus as a same as CMS (frequency: CF, F1, F1+F2, F1+F2+F3; Amplitude: w/ AE, w/o AE).

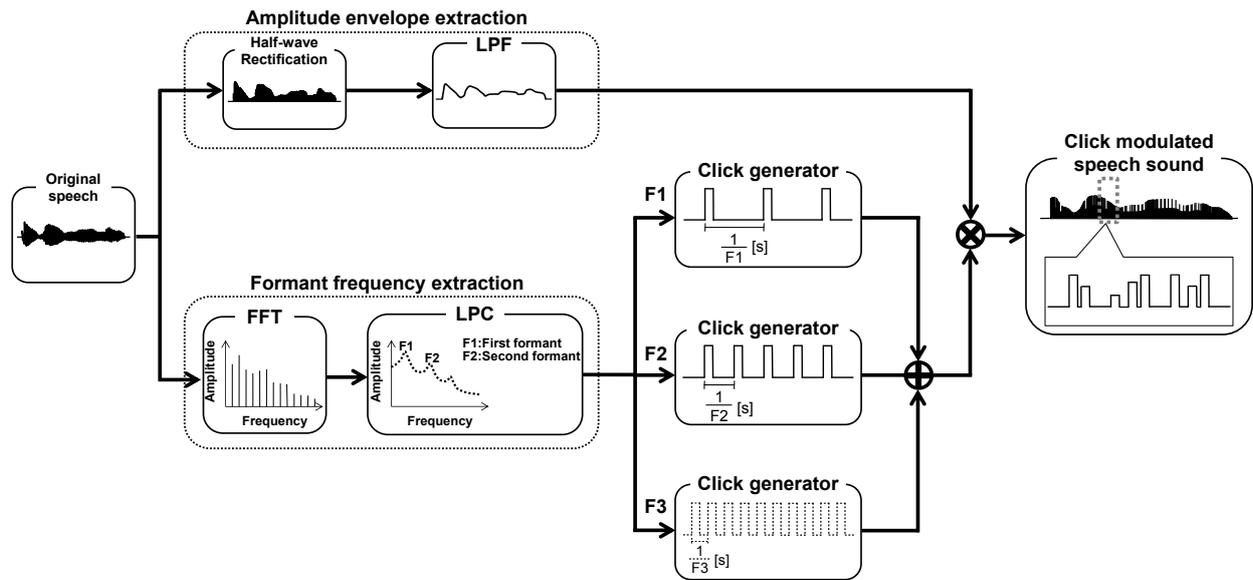
### 2.3. Experimental procedure

All subjects participated sixteen sessions. Fifty trials (=50 words) were conducted in each session. The subjects listened to the stimulus and wrote their perception on response sheets using Roman letters within 10 seconds.

## 3. Results

Fig.2A shows correctly perceived vowel rates of SWS. For the CF condition, averaged correctly perceived vowel rates were 21 % (w/ AE) and 19 % (w/o AE). These values were almost the same as a chance level (=20 %). For the F1 condition, the values were 45 % (w/ AE) and 40 % (w/o AE). For the F1+F2 condition, the values were 46 % (w/ AE) and 41 % (w/o AE). For the F1+F2+F3 condition, the values were 46 % (w/ AE) and 43 % (w/o AE).

Fig.2B shows correctly perceived vowel rates of CMS. For the CF condition, averaged correctly perceived vowel rates were 21 % (w/ AE) and 23 % (w/o AE). These values were almost the same as a chance level (=20 %) as like the result of SWS. For the F1 condition, the values were 33 % (w/ AE) and 32 % (w/o AE). For the F1+F2 condition, the values were 38 % (w/ AE) and 38 % (w/o AE). For the F1+F2+F3 condition, the values were 41 %



**Fig.1.** Encoding scheme of click-modulated speech sound (CMS). The schematic diagram shows how to process the speech signal for synthesizing the CMS.

(w/ AE) and 36 % (w/o AE).

#### 4. Discussion

Our results indicated that CMS were at least partially intelligible as speech sounds. As many previous studies have demonstrated, formant information is important for speech perception [4][5]. Remez and his colleagues (1981) developed distorted speech sound combining several sine waves, each of which followed frequency and amplitude of formants (SWS). His group showed that the sound was intelligible [3][6]. The CMS is similar to SWS in a sense that CMS have information of formant frequency and amplitude envelope of sound. This means that CMS can be perceived as speech sound like SWS.

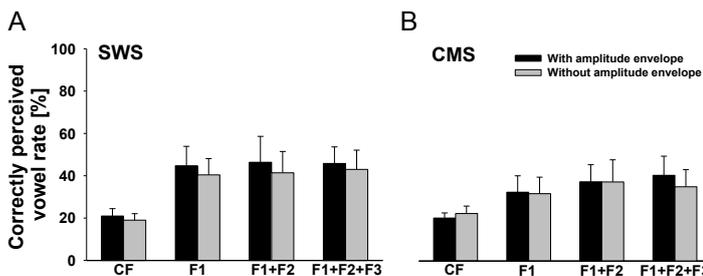
#### 5. Conclusion

In this experiment, we quantified the intelligibility of CMS. The sound was developed as simulated sound of hearing aid with infra

formant frequencies were replicated, the intelligibility of the sounds was above chance level. In all, our results demonstrated that hearing aid with infrared laser could create speech perception and it could be a new alternative to conventional cochlear implant for restoring speech perception.

#### 6. Reference

- [1] J. Wells, C. Kao, K. Mariappan, J. Albea, E. D. Jansen, P. Konrad, and A. Mahadevan-Jansen, "Optical stimulation of neural tissue in vivo.," *Opt. Lett.*, vol. 30, no. 5, pp. 504–506, 2005.
- [2] Y. TAMAI, Y. SHINPO, and K. HORINOCHI, "Infrared Neural Stimulation Evokes Auditory Brain Stem Responses following the Acoustic Feature of Speech Sounds," *haris Sci. Rev. doshisha Univ.*, vol. 4, no. 57, pp. 42–49, 2017.
- [3] R. E. Remez, P. E. Rubin, D. B. Pisoni, and T. D. Carrell, "Speech Perception without Traditional Cues," *Science*, vol. 212, no. 22. pp. 947–950, 1981.
- [4] G. Peterson and H. L. Barney, "Control Methods Used in a Study of the Vowels," *Jarnal Acoust. Soc. Am.*, vol. 24, no. 2, pp. 175–184, 1952.
- [5] J. Hillenbrand, L. A. Getty, M. J. Clark, and K. Wheeler, "Acoustic characteristics of American English vowels.," *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 97, no. 5 Pt 1, pp. 3099–111, May 1995.
- [6] R. E. Remez, J. M. Fellowes, D. B. Pisoni, W. D. Goh, and P. E. Rubin, "Multimodal perceptual organization of speech: Evidence from tone analogs of spoken utterances.," *Speech Commun.*, vol. 26, no. 1, pp. 65–73, 1998.



**Fig.2.** Intelligibility of click-modulated speech sound and sine-wave speech sound. Error bars indicate standard deviation of the mean. (A) Correctly perceived vowel rate of SWS. (B) Correctly perceived vowel rate of CMS.

# 顕微 Brillouin 散乱法を用いた AGEs 架橋が縦波音速に及ぼす影響の検討

川瀬 麻実<sup>†</sup> 松川 真美<sup>‡</sup>

<sup>†</sup>同志社大学 〒610-0321 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

E-mail: <sup>†</sup> mmatsuka@mail.doshisha.ac.jp

キーワード 骨, Brillouin 散乱, 音速

## 1. はじめに

骨は、複雑な構造をしており、マトリックスレベルではコラーゲンやヒドロキシアパタイト結晶からなる不均一な複合材料である。そのため骨強度の評価には、骨密度だけでなく微細構造や異方性などの骨質の物性を把握することが重要である。また近年、糖尿病により骨密度や骨構造が維持されているにも関わらず、骨が脆弱することが報告されている [1,2]。これは、コラーゲン分子間に異常架橋 (AGEs (advanced glycation end products) 架橋) [3] が生成されることによる骨質の劣化が原因と考えられている。そこで本研究では、骨マトリックス中の音波物性の評価が可能である顕微 Brillouin 散乱法を用いて、AGEs 架橋を人工的に作成した海綿骨および準海綿骨の骨梁中における音速評価を行った。特に、培養前後の音速値を比較することによって、AGEs 架橋が骨の弾性特性に及ぼす影響を検討した。

## 2. 実験原理および測定方法

### 2.1 試料作製

試料は、31 月齢のウシ左大腿骨から採取した。大腿骨遠位部の海綿骨と準海綿骨から 1.5 cm 角の立方体試料を 1 個切り出した。そして X-ray micro CT 装置 (Shimadzu, SMX-160CTS) により骨梁構造 (骨体積比 (BV/TV), 異方性度 (DA)) を評価した。その後、Fig. 1 のように、海綿骨および準海綿骨の立方体試料から骨軸と内外方向を含む平面の薄片試料を、AGEs 架橋作製用と参照用に 2 枚ずつ切り出した。これらの試料を研磨し、厚さを約 140  $\mu\text{m}$  とした。

### 2.2 顕微 Brillouin 散乱法

音響的振動 (音響フォノン) と励起光の相互作用により散乱された光は、励起光とは異なる周波数の光を含んでいる。その散乱光の観測により、媒質中の音速を得ることが可能となる。光源には波長 532 nm の固体レーザー、分光器は JRS 社製のタンデム型ファブリペロー干渉計を用いた。また、励起光の集束にラマン用顕微システムを用い、測定領域径を約 10  $\mu\text{m}$  とした。測定には、Fig. 1 に示す RI $\Theta$ A 散乱配置を用いた。この

散乱配置は、試料の背面にミラーを設置することで試料面内方向 ( $q^{\Theta A}$  方向) に伝搬する縦波音速を観測することができる [4]。本実験では、観測されたスペクトル中の Brillouin ピークを Voigt 関数でフィッティングし、シフト周波数を決定する。このシフト周波数と式 (1) を用いて、試料中の音速を推定できる。

$$v^{\Theta A} = \frac{f^{\Theta A} \lambda_i}{2 \sin\left(\frac{\Theta}{2}\right)} \quad (1)$$

ここで、 $f^{\Theta A}$  は RI $\Theta$ A 散乱スペクトルのシフト周波数、 $\lambda_i$  はレーザー波長である。

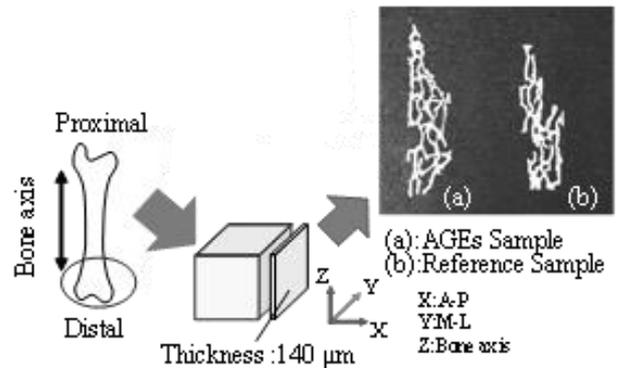


図 1 試料作製方法

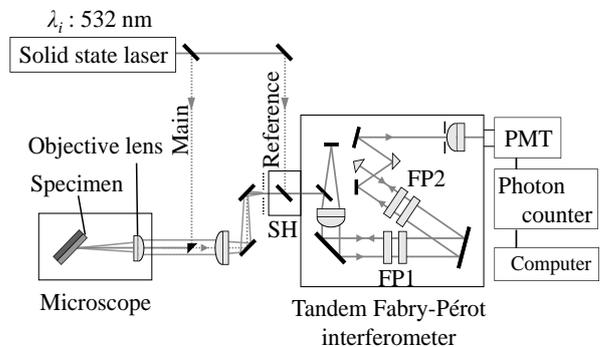


図 2 実験系

### 2.3 AGEs 架橋の生成

AGEs 架橋作製用試料を PBS, Penicillin streptomycin,

D-(-)-Ribose, Protease inhibitor を調整した溶液中に入れた。溶液は毎日交換し、37.0°Cのインキュベーター中で14日間培養をした。なお、参照試料をPBS, Protease inhibitor を調整した溶液中に置いた。

本研究では、海綿骨と準海綿骨ともに、骨梁1本中の異なる12点を測定し、その平均値を縦波音速とした。なお、音波伝搬方向は骨軸方向とした。培養前後の音速値を比較することで、AGEs架橋が骨の弾性に与える影響を検討した。

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1 骨梁構造

海綿骨と準海綿骨のDA, BV/TVの値はそれぞれ、2.6-1.6, 0.18-0.43となった。先行研究より本研究の海綿骨と準海綿骨試料のDA値は比較的高いことが分かった。また海綿骨において、ヒトの骨におけるBV/TVは15-30%程度であるため、顕微 Brillouin 散乱法を用いて検討するのに適した試料であることが分かった。準海綿骨は、皮質骨と海綿骨の間の部位となるため、BV/TVの値も高いことが確認できた。

#### 3.2 AGEs 架橋による音速変化

培養前後の音速変化を Fig.4 に示す。海綿骨と準海綿骨ともに、AGEs 架橋培養前の縦波音速に比べ、培養後の縦波音速が有意に低下した(8.9 %-7.9 %,  $p < 0.01$ )。それに対し、参照用試料では、海綿骨と準海綿骨ともに縦波音速変化量は0.6 %-0.8 %となり、大きな差は見られなかった。これは先行研究である皮質骨と同様の結果を確認することが出来た。AGEs 架橋培養前後の音速変化量に注目したところ、BV/TV が低いほど音速変化量が大きいことが分かった。これは培養液と触れ合う表面積が大きいため、糖化の進行が速いことが原因であると考えられる。一方、14日間の培養日数における縦波音速の変化は Fig.5 のようになり、AGEs 架橋を培養するにつれて音速は、徐々に減少することが分かった。Brillouin 散乱法は10nm以上の構造に影響されず評価が可能である。よって、音速の変化は、AGEs 架橋の形成が骨質の変化に影響をもたらしたためであると考えられる。

#### 4. まとめ

本研究で、顕微 Brillouin 散乱法を用いて、AGEs 架橋培養前後における海綿骨と準海綿骨梁中の縦波音速の測定を行った。AGEs 架橋の培養後、音速値が下がったことより、コラーゲン架橋の異常が骨の弾性特性に影響を与えることが示唆された。今後は、音速変化だけでなく骨の内部構造の変化に注目することで、物性変化の解明につなげていきたい。

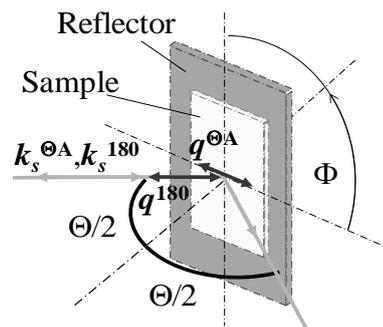


図3 RIA 散乱配置

$k_i$ : The wave vector of the incident light,  $k_s$ : The wave vector of the scattered light,  $q$ : the wave vector of the sound wave,  $\theta/2$ : the angle between the incident laser beam and the normal line of the sample surface.

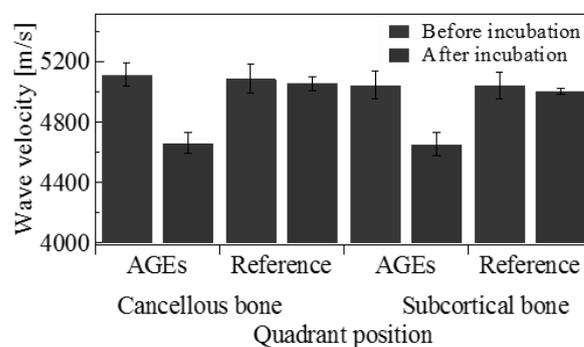


図4 培養前後の音速結果

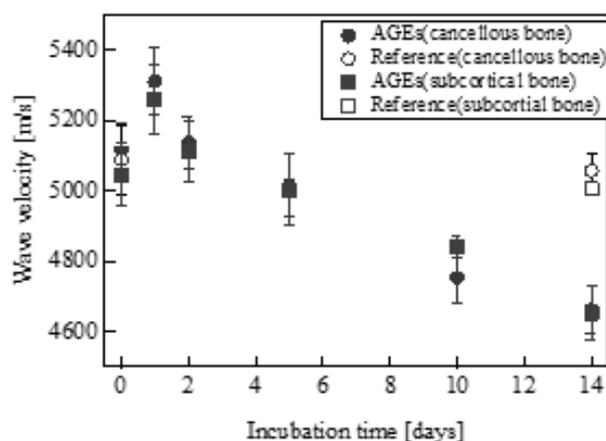


図5 培養日数に伴う音速変化

#### 文献

- [1]. M.Inada, *et al.*, Metabolism vol.148, pp.904-909, 1999.
- [2]. K.Atsumi, *et al.*, Am J Kidney Dis vo.33, pp289-293, 1999.
- [3]. M.Saito, *et al.*, Osteoporosis Int. Vol. 17, pp. 1514-1523, 2006.
- [4]. Y.Imoto, *et al.*, Glycative Stress Research, submitted.

# 不均一な皮質骨中の超音波伝搬シミュレーション

高野 幸樹<sup>†</sup> 佐伯 誠哉<sup>†</sup> 松川 真美<sup>†</sup>

<sup>†</sup>同志社大学 〒610-0321 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

E-mail: <sup>†</sup> duq0366@mail4.doshisha.ac.jp, buo3067@mail4.doshisha.ac.jp, mmatsuka@mail.doshisha.ac.jp

キーワード Axial Transmission, 皮質骨, 不均一性

## 1. はじめに

近年、高齢化に伴い骨粗鬆症が深刻な問題となっている。骨粗鬆症は骨密度の低下により骨折のリスクを増加させる骨格疾患である。現在、骨粗鬆症の診断基準には、X線法が用いられている<sup>[1]</sup>。しかしX線法には、侵襲性があり、専門技師や設備が必要といった問題がある。一方、超音波法は骨質評価が可能で、これらの問題なく測定することができる。そのため集団スクリーニングに適しており、早期発見が可能となる。

超音波法の1つに Axial Transmission (AT) 法がある。AT 法では、アレイセンサを用いて橈骨や脛骨の皮質骨を骨軸方向に伝搬する超音波を評価する。特に皮質骨表面から漏洩した最初の波 (First Arriving Signal (FAS)) から骨内の音速を算出し、皮質骨の弾性評価を行うことが多い<sup>[2]</sup>。皮質骨は体荷重を支えており、その骨折は Quality of Life の低下に直結する。そのため、皮質骨の弾性評価が重要である。

現在、フランスやフィンランドにおいて、AT 法を用いた装置の開発が進んでいる。しかし、臨床を除く AT 法の基礎研究の多くは、骨の異方性や不均一性を考慮していない。そこで我々は、皮質骨中の音波伝搬に骨の不均一性が与える影響について、シミュレーションを用いて検討した。また、直方体モデルと比較することで、骨の形状が超音波伝搬に与える影響も検討した。

## 2. 骨の3次元不均一モデルの作成

骨の3次元モデルを作成するために、MHz 域のパルス法で測定したウシ皮質骨の軸方向縦波音速分布を用いた<sup>[3]</sup>。空間分解能 1 mm の音速分布をシミュレーションで用いるために、共一次内挿法と独自にアレンジした共一次内挿法を用いて 40  $\mu\text{m}$  の空間分解能となるように補間した。次に、区分的3次エルミート内挿多項式を用いて、4つの2次元データから3次元モデルを作成した。この3次元不均一モデルは、骨軸方向に縦波音速分布がある。

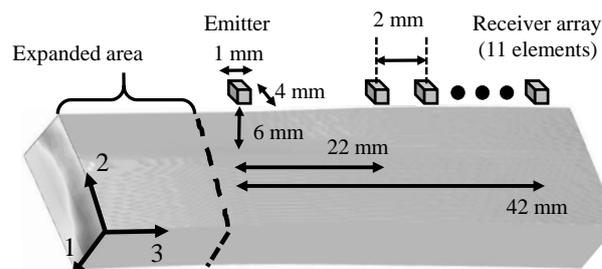


図1 シミュレーション条件

本研究では、骨を一軸異方性と仮定し弾性定数を推定した<sup>[4]</sup>。1方向を円周方向、2方向を半径方向、3方向を骨軸方向とした。骨の密度を 2000  $\text{kg}/\text{m}^3$  <sup>[5]</sup>、ポアソン比を 0.33<sup>[6]</sup>と仮定することで、 $c_{33}$ 、 $c_{44}$ 、 $c_{66}$ を算出した。 $c_{11}$ は大和らによる研究を参照して推定した<sup>[5]</sup>。 $c_{13}$ は中辻らの音速異方性の測定結果を参照して推定した<sup>[7]</sup>。なお、参考のために各弾性定数の平均値を用いた均一モデル、及び形状比較を行うための直方体均一モデルも作成した。

## 3. 音波伝搬シミュレーション

シミュレーション手法には弾性 Finite Difference Time Domain (FDTD) 法を用いた<sup>[8]</sup>。ただし伝搬減衰は考慮していない。吸収境界条件に、Higdon 2次の条件を用いた。また、Courant の安定条件より、空間分解能を 40  $\mu\text{m}$ 、時間分解能を 4.6 ns とした。モデルの設定を図1に示す。骨モデルは水浸状態とした。水の密度は 1000  $\text{kg}/\text{m}^3$  とし、縦波音速を 1500 m/s と仮定した。また、送波側において、骨端面での反射波を防ぐためにモデルを拡張した。送波には 1 MHz の正弦波一波にハニング窓をかけた音圧波形を用いた。それぞれのモデルの平均厚さは 2.7 mm である。

## 4. 結果及び検討

モデル中央部の音波伝搬の様子を図2に示す。(a)は直方体モデル、(b)は不均一骨モデル、(c)は均一骨モデルにおける音場を示す。それぞれのモデルにおいて、

骨の表面からの漏洩波をアレイセンサで観測した。FASの第1ゼロクロス点を到達時間とし、波の到達時間差から算出した各受波器間における音速を図3に示す。

不均一モデルと均一モデルにおいて、各センサ間における音速差は小さく、ほとんど同じ音速結果となった。この結果から、骨の不均一性の影響は小さいと考えられる。直方体モデルにおける音速は、どのセンサ間でも4200 m/s程度で一定となった。しかし均一、不均一モデルにおける音速は、直方体モデルの音速結果より低い音速値となり、伝搬距離が大きくなるに連れて音速が徐々に低下する結果となった。この結果から、モデルの表面形状がFASの音速結果に大きな影響を与えたと考えられる。

表1に各センサにおけるFASの到達時間を示す。全ての到達時間において不均一モデル中の到達時間の方が速い。しかしセンサ1とセンサ11の到達時間差は、不均一モデル、直方体モデルにおいて5.2  $\mu$ s, 4.8  $\mu$ sとなった。この到達時間差からFASの音速を算出するため、直方体モデルより不均一モデルでの音速が低下したと考えられる。表面形状の不均一性を補正すれば、AT法による診断の測定再現性の向上が見込まれる。

## 5. まとめ

本研究では、皮質骨中の異方性や不均一性が超音波伝搬に及ぼす影響について検討した。AT法を用いた測定では、不均一性の影響は小さく、表面形状の影響が大きいことが示唆された。この結果から、骨の表面形状を補正した測定が出来れば、測定再現性の向上に繋がると考えられる。そのため形状補正手法について、さらなる検討が必要である。

## 文 献

[1] H. Orimo et al.: “Japanese 2011 guidelines for prevention and treatment of osteoporosis – executive summary”, Arch Osteoporosis, **7**, 3, 2012.

[2] L. Pascal et al.: Bone Quantitative Ultrasound, (Springer, Dordrecht, 2011) 1st ed., 468.

[3] T. Hata et al.: “Simulation study of axial ultrasonic wave propagation in heterogeneous bovine cortical bone”, J. Acoust. Soc. Am. **140**, 3710, 2016.

[4] J. L. Rose: Ultrasonic Waves in Solid Media, (CAMBRIDGE, 1999) 367.

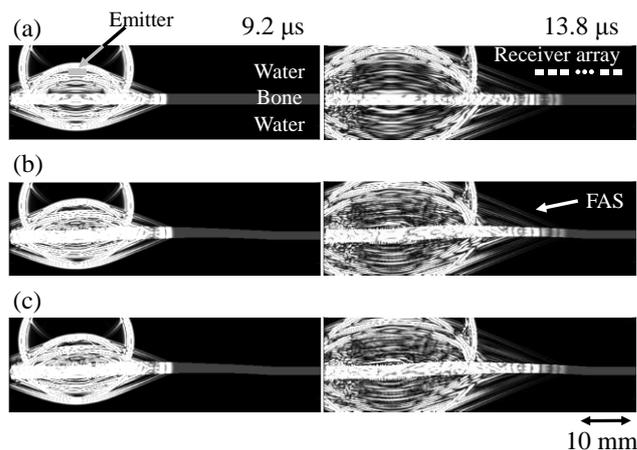


図2 各モデルにおける音場

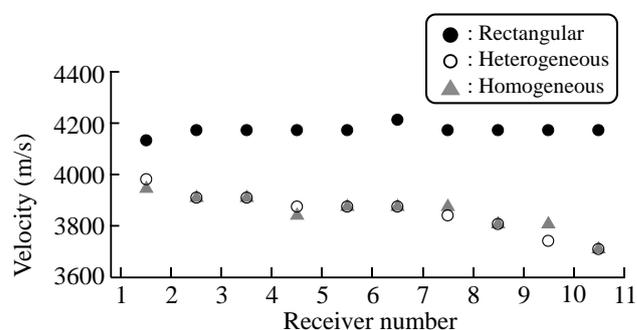


図3 各受波器間におけるFAS音速

表1 各受波器におけるFASの到達時間

Receiver number	1	3	5	7	9	11
Heterogeneous model	12.4	13.4	14.5	15.5	16.6	17.6
Rectangular model	13.4	14.3	15.3	16.3	17.2	18.2

[5] Y. Yamato et al.: “Correlation between hydroxyapatite crystallite orientation and ultrasonic wave velocities in bovine cortical bone,” Calcif. Tissue Int. **82**, 162, 2008.

[6] A. Hosokawa et al.: “Ultrasonic wave propagation in bovine cancellous bone”, J. Acoust. Soc. Am. **101**, 558, 1997.

[7] T. Nakatsuji et al.: “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.

[8] Y. Nagatani et al.: “Numerical and experimental study on the wave attenuation in bone – FDTD simulation of ultrasound propagation in cancellous bone”, Ultrasonics, **48**, 607, 2008.

# 海綿骨の骨密度が超音波二波伝搬現象に与える影響

中西 翔子<sup>†</sup> 松川 真美<sup>‡</sup>

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

E-mail: <sup>†</sup> dmq1029@mail4.doshisha.ac.jp, <sup>‡</sup> mmatsuka@mail.doshisha.ac.jp

キーワード 二波伝搬現象, 海綿骨, 骨密度

## 1. はじめに

近年, 高齢化に伴い深刻な社会問題として骨粗鬆症が危惧されている. 骨粗鬆症とは, 骨密度が低下し骨折のリスクを高める骨格疾患であり, 自覚症状が乏しいため早期発見が重要視されている<sup>[1]</sup>. 骨の表面は緻密な皮質骨で覆われておられる. 内側には骨梁からなる多孔質媒質の海綿骨があり, 骨粗鬆症になるとこの骨梁が細くなる. また, 骨幹部中央と海綿骨の間隙部は液体状の骨髄で満たされている. この海綿骨に超音波を照射すると, 高速波(主に骨梁を伝搬)と低速波(主に骨髄を伝搬)の二波が観測される. この現象を二波伝搬現象と呼び, 二波伝搬現象と骨体積比(BV/TV: Bone Volume / Total Volume, 骨密度を反映)との関係は数多く報告されている<sup>[2]</sup>. しかし, これらは骨梁構造の異なる骨を用いた結果である. 実際の骨粗鬆症では, 海綿骨は配向方向などの構造情報を保持したまま, 骨体積比が低下する.

そこで本研究では, ヒトの橈骨をモデルに作成した骨試料を用いて, 骨体積比の低下に伴う二波(高速波・低速波)の変化について実験的に検討した.

## 2. 実験方法

### 2.1. 実験試料

28 月齢の健全なメスのウシの左橈骨遠位部から海綿骨 1 つを直方体(10.7×8.0×11.6 mm), 32 月齢の健全なメスのウシの左橈骨骨幹部から皮質骨 2 つを直方体(10.7×1.9×11.6 mm)に切り出した. これらを用いて海綿骨のみのモデルと, 海綿骨と皮質骨を組み合わせたヒト骨モデルを用意した(図 1). 人工的に骨梁を細くし, 骨体積比を低下させるために硫酸を用いた. pH 0.1 の硫酸にこれらのモデルを 1 分刻みで計 5 分間浸し, 1 分毎に超音波照射実験に用いた. このとき X 線マイクロ CT 装置(Shimadzu, SMX-160CTs)を用いて 1 分毎の海綿骨の 3D データを採取し, 骨体積比 BV/TV (Bone Volume / Total Volume)を解析ソフト(Ratoc, 3D-Bon)により調べた. また, 別個体のウシの皮質骨を用い硫酸に浸す前後における骨の結晶配向のピークを X 線回折装置(Philips, X' Pert Pro MRD)により, 骨表面の粗さを触針段差計(ミットヨ, SJ-400)

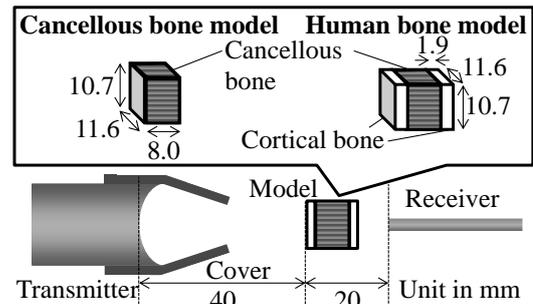


図 1 試料とセンサの位置

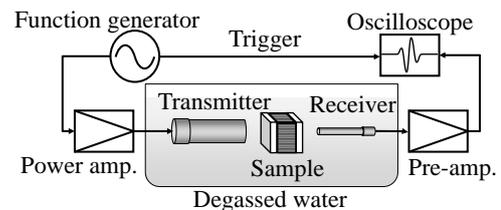


図 2 実験系

により計測した.

### 2.2. 超音波照射実験

発振器(Agilent, 33250A)とパワーアンプ(nf, HAS 4101)を用い中心周波数 1 MHz, 振幅 70 Vpp の正弦波 1 波を発振した. この信号を送波用集束型 PVDF トランスデューサ(東レ, 直径: 20 mm, 曲率半径: 40 mm)に印加し, 海綿骨の骨梁配向方向に縦波を照射した. このとき送波用トランスデューサには回折波の影響を減少させるカバーを付けた. 試料を透過した縦波を受波用平面型 PVDF トランスデューサ(自作, 直径: 3 mm)で受波し, 信号をプリアンプ(nf, BX-31A)で 10 倍に増幅した後, オシロスコープ(Tektronix, DPO 3054)で観測した. このとき試料は十分に脱気し, 試料とトランスデューサは脱気水中に設置されている(図 2). また, 2 つのトランスデューサは同一音軸上で, 励振面間の距離は 60 mm である. また試料はトランスデューサの音軸上で, 送波用トランスデューサから 40 mm の位置に設置した(図 1).

## 3. 実験結果と考察

直方体形状の海綿骨試料を硫酸に浸漬したところ, 骨体積比は, 24.0%から 19.8%に徐々に減少した. し

たがって、この試料では人工的に骨梁を細くできたものとする。

図 3 (a) (b)にこの海綿骨モデルにおける超音波照射実験の観測波形を示す。骨体積比の低下に伴い高速波の振幅は小さくなった (図 4 (a))。これは、高速波の伝搬経路である骨梁が細くなったためと考えられる。また、高速波の到達時刻は、骨体積比の低下に伴い遅くなった。この結果は、先行研究と同じ傾向である [2]。

ただし、これらの結果では、硫酸浸漬に伴い骨梁が細くなったことだけでなく、骨質が変化した可能性も考えられる。そこで、骨に含まれる成分を確認するため、X線回折装置を用いて、硫酸浸漬前後での骨中の結晶配向を計測した。その結果、浸漬 10 分前後で骨の主成分であるハイドロキシアパタイト (Hap) が減少し、硫酸カルシウム二水和物の増加が見られた。また、顕微 Brillouin 散乱法で硫酸浸漬 10 分前後での骨中の音速を測定した結果、浸漬後の骨中では音速が低下した。これらの結果より、高速波の到達時刻が遅くなった原因は、硫酸浸漬による骨体積比の減少だけでなく、骨質の変化の可能性も考えられる。一方、低速波は、骨体積比の低下に伴い振幅が小さくなった (図 4(a))。この原因として、硫酸による骨表面の粗さの変化が考えられる。そこで、触針段差計を用いて硫酸浸漬前後での骨表面の粗さを計測した結果、浸漬後には骨表面の粗さが 18 倍増加したことがわかった。このため、骨梁と水の界面の摩擦が増大し、低速波が減衰した可能性があると考えられる。

図 3 (c) (d)にヒト骨モデルにおける超音波照射実験の観測波形を示す。サンドイッチ構造のヒト骨モデルでは、海綿骨のみのモデルに比べて音速の高い皮質骨を透過するので、波が早く観測された。海綿骨モデルと同様に高速波・低速波の振幅や到達時刻を解析したところ、骨体積比の低下に伴い、高速波の振幅は小さくなり、その到達時刻は遅くなった (図 4 (b))。一方で、低速波の振幅も小さくなった。骨体積比が 19.8% のとき増加に転じたが、この増加は海綿骨のみの試料では観測されていない。骨体積比が極端に低下した場合、海綿骨の表面積も減少し、界面摩擦の影響が減少した可能性もあるため検討が必要である。

以上より、高速波の振幅を用いることで、海綿骨の骨梁の太さ変化 (骨体積比、つまり骨密度の低下) を評価できる可能性が示唆された。ただし、硫酸による骨質の変化や、低速波の振幅の減少については、詳細に検討しなければならない。また、今後の検討では骨梁の太さ減少と硫酸による骨質の変化を分離して考察する必要がある。

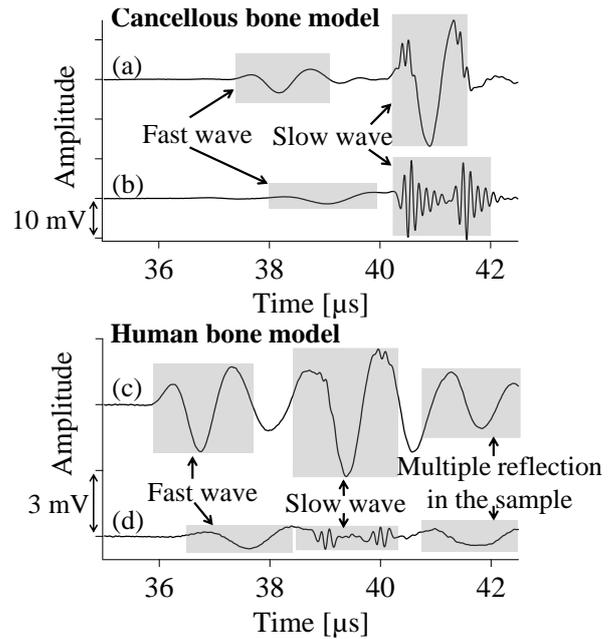


図 3 観測波形 ( (a), (c) 硫酸浸漬前, (b), (d) 硫酸浸漬 4 分後)。

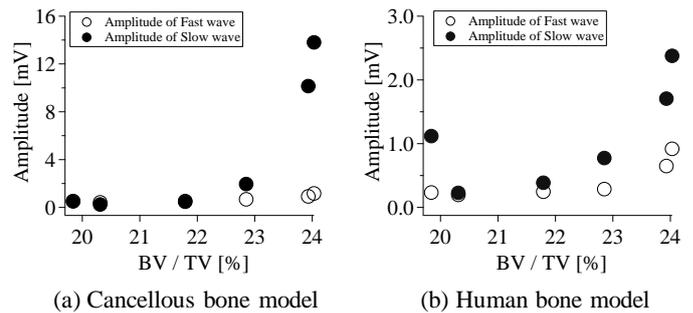


図 4 高速波・低速波の振幅と BV / TV の関係

#### 4. まとめ

本研究では、海綿骨の骨体積比の低下が二波 (高速波・低速波) に与える影響について実験的に検討した。その結果、海綿骨の骨体積比の低下に伴い高速波の振幅は減少し、低速波の振幅も減少した。

今後、硫酸による骨物性の変化や低速波の振幅減少の要因を検討していく必要がある。また、二波の変化の要因が骨体積比の低下によるものか、硫酸による骨質変化によるものであるのか、要因を分離して検討する必要がある。

#### 文 献

- [1] NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Disgnosis, and Therapy: J.A.M.A 285(2001), 785-795.
- [2] T. Otani, "Quantitative Estimation of Bone Density and Bone Quality Using Acoustic Parameters of Cancellous Bone for Fast and Slow Waves", Jpn. J. Appl. Phys., 44-6B (2005), pp. 4578-4582.

# 糖化した海綿骨が超音波の音速に与える影響

村島 和<sup>†</sup> 中西 翔子 松川 真美

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

E-mail: <sup>†</sup> ctub1035@mail4.doshisha.ac.jp, dmq1029@mail4.doshisha.ac.jp, mmatsuka@mail.doshisha.ac.jp

キーワード 海綿骨, 二波伝搬現象, AGEs 架橋

## 1.1. はじめに

糖尿病等の内分泌疾患では骨量が十分であっても骨強度が低下する症例が報告されている。この理由として糖尿病によるコラーゲン中の善玉架橋の低形成と、終末糖化産物 (AGEs: Advanced Glycation End products) の過剰な形成が指摘されている [1]。骨強度は骨の弾性とも密接に関連するため、我々は Brillouin 光散乱法を用いて皮質骨中の微小領域の音速を測定した。その結果、骨の糖化による特異な音速変化を観測した [2]。

また我々は、海綿骨内の縦波の二波伝搬現象を利用した橈骨臨床用装置 LD-100 (応用電機・同志社大) を開発し、橈骨遠位部の評価を可能にした [3]。二波伝搬現象とは、骨内部の多孔質媒質である海綿骨の骨梁配向方向を伝搬する音波が、主に骨梁部分を伝搬する高速波と、主に骨髄部分を伝搬する低速波に分離する現象である [4]。

そこで、本報告では LD-100 による臨床評価を念頭に、超音波二波伝搬現象を用いて、糖化した海綿骨の MHz 域における音速変化を検討した。

## 1.2. 実験試料

試料 A~D は 30, 33 月齢, 試料 E~J は 32 月齢のウシ大腿骨遠位部及び近位部から海綿骨を切り出し、実験試料とした (Fig. 1)。AGEs 架橋形成試料は、生理食塩水 (PBS), D- (-) -Ribose, Protease Inhibitor Cocktail Set III, Penicillin-Streptomycin を調整した溶液に浸し、培養した [5]。また、比較参照試料は PBS と Penicillin を調整した溶液に浸したものを培養液とした。試料数は AGEs 架橋形成試料が 5 個 (試料 A, B, E, F, G), 比較参照試料が 5 個 (試料 C, D, H, I, J) で試料 A~D は培養時間を 144 時間, 試料 E~J を 24 時間とした。培養温度はヒトの体温に近い 37 °C で行った。

## 2. 実験手順

本実験で用いた実験系を Fig. 2 に示す。自作の PVDF 圧電膜平面型トランスデューサ (15×15 mm<sup>2</sup>) を音響管の両端に 100 mm の間隔で設置し、送波側トランスデューサから 70 mm 離れた位置に試料を設置した。発振器 (Agilent 33250A) から振幅 7 Vp-p, 周波数 1 MHz の正弦波 1 波をパワーアンプ (NF HAS 4101) で 20 dB 増幅し、送波側のトランスデューサに印加して音波を

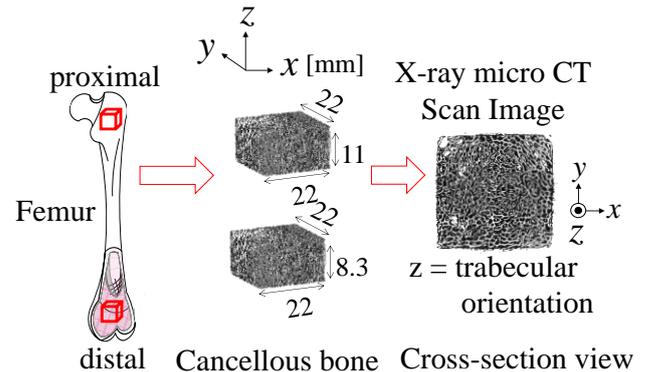


Fig. 1 Sample.

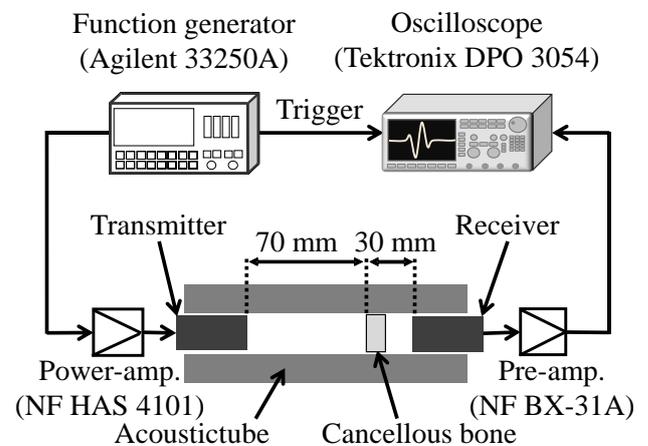


Fig. 2 Experimental system.

発生させた。その後、脱気水と試料を透過した音波を受波側のトランスデューサで受波し、得られた信号をプリアンプ (NF BX-31A) で 20 dB 増幅した後、オシロスコープ (Tektronix DPO 3054) で波形を観測した。

## 3. 結果および考察

海綿骨試料の測定を行った後、同条件で音響管内が脱気水のみの場合の測定も行った。式 (1) より、骨の音速  $v_{bone}$  を算出した。脱気水のみを透過した際の観測波形と、海綿骨試料を透過した際の観測波形のそれぞれの第一ピークの 20% の到達時間差、水の音速、試料の厚さ (試料 A~D: 11 mm, 試料 E~J: 8.3 mm)、水の

音速[6]より算出した。このとき、各試料において5回の測定を行い、その平均値を各試料の音速値とした。本実験における測定誤差は0.5%であった。

Figures 3にAGEs架橋形成試料と比較参照試料の音速変化を示す。AGEs架橋形成試料は培養0~12時間にかけて音速が上昇し、その後低下した。

そこで、試料作成において試料E~Jは骨梁配向方向と音軸が揃うよう切り出した。また、培養0~12時間に至るまでの音速変化を把握するために全体の培養時間を24時間、初期培養間隔を3時間とした(Fig. 4)。培養3時間でAGEs架橋形成試料Eは音速が上昇した。しかし、試料Fは音速変化が確認されなかった。一方比較参照試料は音速が単調に低下する傾向が観測された。音速が上昇した理由として、AGEs架橋が骨中で過剰に形成され、弾性強度が上昇したと考えられる。その後の音速低下は、今後検討が必要である[6]。

次に、培養12時間で一度音速が上昇したことに着目した。音速が低下した後、もう一度上昇する傾向が観測された。この要因として、骨梁部位によりAGEs架橋形成の促進度が違うことが原因で音速変化が安定しなかったと考えた。また、比較参照試料Iも培養12時間で音速が上昇していた。培養時間ごとの実験における水温が大きく違ったため、同じ条件下で実験を行っていなかったことが要因として考えられる。

#### 4. 結論

ウシ海綿骨を用いてAGEs架橋が縦波超音波の音速に与える影響について検討した。AGEs架橋が音速変化に影響を及ぼす可能性があると考えられた。しかし、水温が20~25℃の範囲で変化したため水の音速は15m/s程度異なる。今後一定温度で測定できるよう、測定機器に改良を加えて検討をする必要がある。

#### 文 献

- [1] M. Saito, K. Fujii, Y. Mori, K. Marumo, "Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats," *Osteoporos Int.*, vol. 17, no. 10, pp. 1514-1523, 2006.
  - [2] Y. Imoto, R. Tsubota, M. Kawabe, M. Saito, K. Marumo, M. Matsukawa, "Effects of abnormal collagen crosslinks on hypersonic longitudinal wave velocity in bovine cortical bone," *Glycative Stress Research*, vol. 2, no. 3, pp. 101-103, 2015.
  - [3] I. Mano, K. Horii, S. Takai et al., "Development of novel ultrasonic bone densitometry using acoustic parameters of cancellous bone for fast and slow waves," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 45, no. 5B, pp. 4700-4702 (2006).
  - [4] A. Hosokawa, T. Otani, "Ultrasonic wave propagation in bovine cancellous bone," *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 101, no. 1, pp. 558-562 (1997).
- S. Viguier-Carrin, et al., "An in vitro model to test the contribution of advanced glycation end products to bone biomechanical properties," *Bone*, vol. 42, pp. 139-149 (2008)

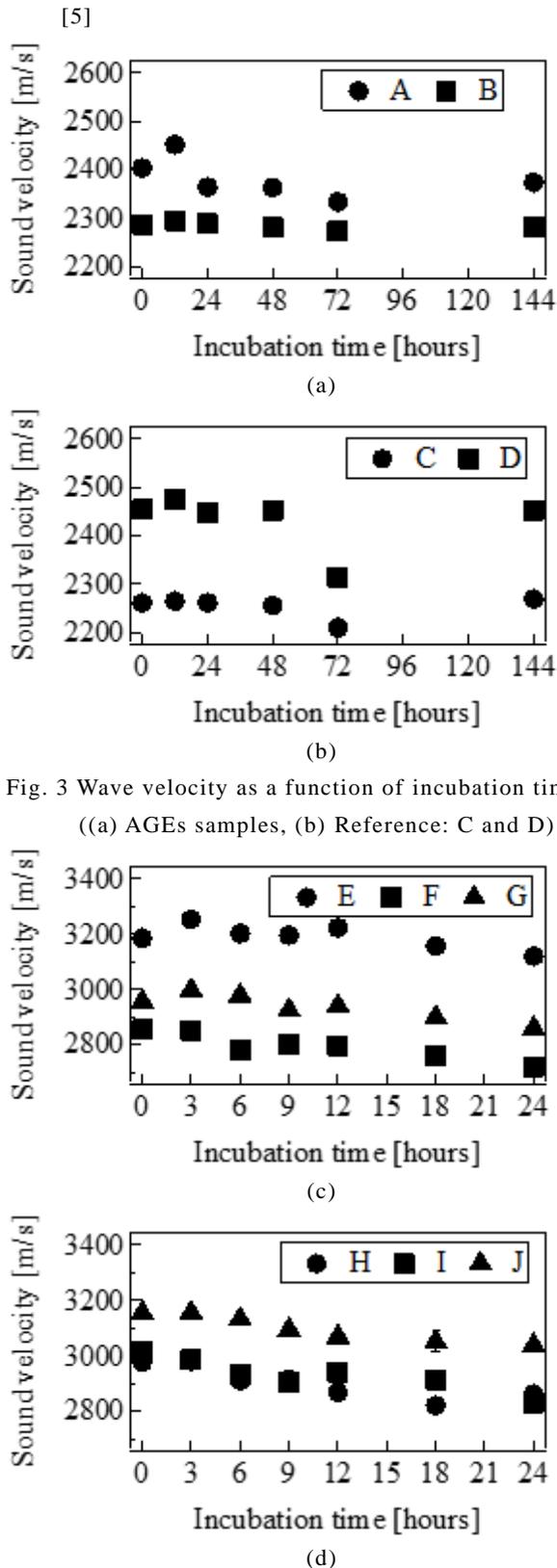


Fig. 3 Wave velocity as a function of incubation times. ((a) AGEs samples, (b) Reference: C and D)

Fig. 4 Wave velocity as a function of incubation time ((c) AGEs samples, (d) Reference samples).

- [6] M. Greenspan et al., "Speed of sound in water by a direct method," *J. Res. Nat. Bureau of Standards.*, vol. 59, pp. 249-254 (1957).

# 粘性内包物を含むファントムを用いた Shear Wave Elastography の検討

藤岡 亮輔<sup>†</sup> 加藤 寛基<sup>†</sup> 秋山 いわき<sup>†</sup> 近藤 健悟<sup>‡</sup> 山川 誠<sup>‡</sup> 椎名 毅<sup>‡</sup>

<sup>†</sup> 同志社大学超音波医学研究センター 〒610-0321 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

<sup>‡</sup> 京都大学大学院医学研究科 〒606-8507 京都府左京区聖護院川原町 53

E-mail: <sup>†</sup> dmq1002@mail4.doshisha.ac.jp, <sup>‡</sup> shiina.tsuyoshi.6w@kyoto-u.ac.jp

キーワード Shear Wave Elastography, Artifact

## 1. はじめに

近年、組織の硬さによるせん断波の伝搬特性の違いを利用して、硬さの情報を画像化する Shear Wave Elastography (SWE) と呼ばれる技術が開発された。SWE では検査者の習熟度に依存せず、再現性が高い画像診断法としてその有用性が報告されている<sup>[1]</sup>。一般的に病変組織は正常組織よりも硬くなることが知られている<sup>[2]</sup>。しかし、実際には硬いはずの腫瘍中心部が辺縁に比べて柔らかく表示される一種のアーチファクトが報告されており、臨床の場で問題となっている。超音波検査においてアーチファクトは診断・所見の見落としにつながるほか、特徴的な像を呈するケースにおいては診断にあたって有用な情報源として活用できるものもある<sup>[3]</sup>。このアーチファクトの原因は明らかにされていない。そこで本研究はこのアーチファクトの発生条件を探ることを目的とし、ファントム実験においてアーチファクトの再現を試みている。本報告ではカスターオイルを用いて内包物に粘性を与え、報告されているアーチファクトと類似した弾性分布画像の再現を試みた。

## 2. 生体模擬ファントム

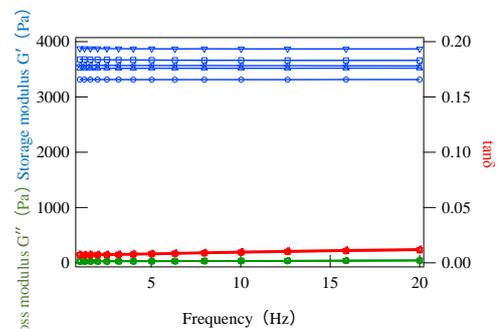
本報告ではゼラチンを主剤とした生体模擬ファントムを作成した。作成したファントムの濃度表を表 1 に示す。また、それぞれの濃度比における動的粘弾性測定の結果を図 1, SWE での撮像結果を図 2 に示す。動的粘弾性測定は DHR-3 (TA Instruments) を用い、プレートの温度は 10°C に保ち測定を行った。サンプルの大きさは 4.0 ± 1.5 mm とし、回転の角周波数を時間的に 0.1 - 20Hz まで変化させて測定した。

生体模擬ファントムの作成方法を次に示す。

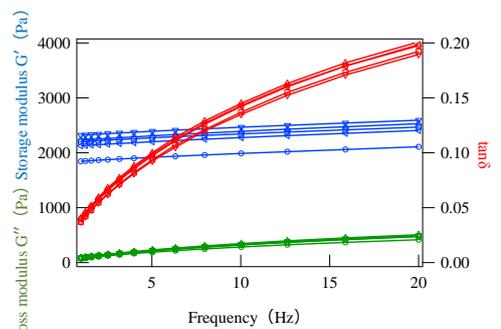
- (1) 脱気水とゼラチンを攪拌 (380 rpm) しながら 65 °C まで加温する。
- (2) (1) にプロパノール, カスターオイル, グラファイトパウダーを加える。
- (3) 攪拌しながら 25°C まで冷まし, 型枠に流し込み 6.5°C に設定した冷蔵庫の中で 24 時間保管した。

表 1 ファントムの濃度情報

Phantom	Concentration of Castor oil	Concentration of Gelatin
I	0%	6%
II	10%	6%



a) DMA 結果：カスターオイル濃度 0%



b) DMA 結果：カスターオイル濃度 10%

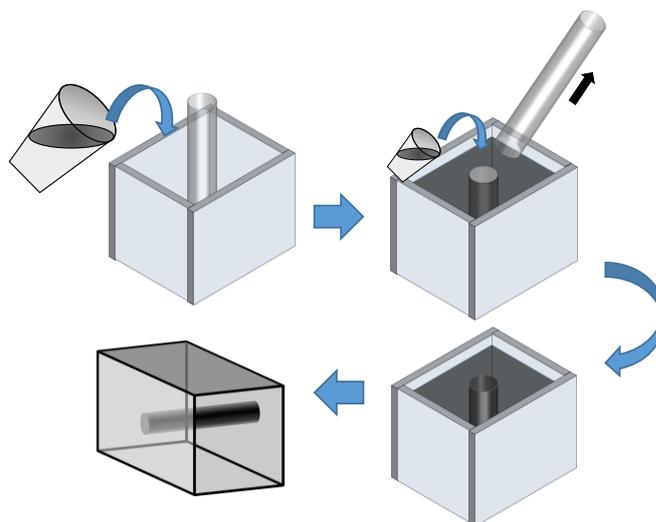
図 1 濃度別 動的粘弾性測定結果

	SWE	B-mode	Average [kPa]
I			9.2
II			14.4

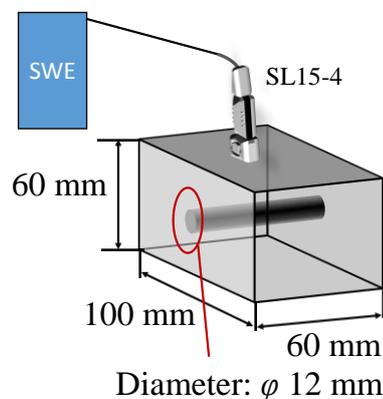
図 2 濃度別 SWE 撮像結果

### 3. ファントムの作成方法及び SWE 撮像方法

円柱型内包物を含む生体模擬ファントムの作成方法及び撮像方法を図 3 に示す。円柱型内包物を含むファントムは、まず型枠にバックグラウンド用ゲルを流し込み、24 時間冷蔵庫で保管した後、パイプを抜き内包物用ゲルを流しこみ再び 24 時間冷蔵庫で保管をした。今回作成したファントムの濃度比は、バックグラウンドは表 1 の I、内包物は表 1 の II を用いた。内包物の直径は 12mm とした。冷蔵庫の温度は 6.5 °C に保ち保管した。SWE での撮像は、生体模擬ファントムを設置し、内包物上部のファントム表面に超音波プローブ (SL15-4, SuperSonic Imagine) をスタンドで固定し、十分に安定した弾性分布画像を超音波診断装置 (AIXPLORER, SuperSonic Imagine) の SWE モードより得た。円柱型内包物を含む生体模擬ファントムの測定点は内包物に沿って任意の 3 点とした。また、撮像はファントムの温度が 10 °C のときに行った。



a)円柱型内包物を含むファントムの作成方法



b)実験系

図 3 ファントムの作成方法及び SWE 撮像方法

### 4. 結果及び考察

円柱型内包物を含む生体模擬ファントムの撮像結果を図 4(A,B)に示す。上から順に SWE 画像, B モード画像, 内包物のヤング率である。

本実験で、ファントムのバックグラウンドの値は約 10 kPa, 内包物中心は 13 - 14 kPa, 内包物の辺縁は 16 - 18 kPa となり、臨床で報告されているアーチファクトと類似した弾性分布画像を得ることができた。更に、同濃度比で作成したファントムにおいての結果を図 4(C -E)に示す。このファントムにおいても同様の弾性分布画像を得ることができた。内包物に粘性を与えることでアーチファクトが生じていることから、アーチファクトの発生条件の一つとして、粘性が関係していることが示唆された。

### 5. まとめ・今後の展望

本報告ではカスターオイルを用いて粘性を加えた円柱型内包物を含む生体模擬ファントムとの弾性分布画像について検討した。その結果、臨床と類似したアーチファクトを再現することができた。この結果より、SWE で生じるアーチファクトの原因の一つとして粘性が関与していることが示唆された。今後の展望として、SWE で示されている内包物の値を示すファントムをカスターオイル抜きで作成し、同様の円柱型内包物を含む生体模擬ファントムを作成し、アーチファクトの発生条件の一つに粘性が関係していることの裏付けをとる。また、内包物の直径や形状を変化させることによる弾性分布画像への影響についても検討していく。

Phantom	A	B	C	D	E
SWE					
B mode					
Center [kPa]	14.0	13.3	12.3	11.2	11.7
Margin [kPa]	18.0	16.9	14.0	13.3	15.1
Background [kPa]	10.5	10.7	9.4	10.1	9.2

図 4 円柱型内包物を含む生体模擬ファントムの撮像結果

### 文 献

- [1] T. Sato, et al., “患者の負担軽減に貢献する超音波診断装置”, 東芝レビュー, 2015.
- [2] K. Nakashima, et al., “乳房超音波エラストグラフィ 2013”, JSUM, 2013.
- [3] 日本超音波医学編, “新超音波医学 1 医用超音波の基礎”, 医学書院, 2000.

# 骨コラーゲンの超音波誘発電位の検討

森 駿貴<sup>†</sup> 牧野 大輝<sup>†</sup> 松川 真美<sup>†</sup>

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

E-mail: <sup>†</sup> mmatsuka@mail.doshisha.ac.jp

キーワード 超音波, コラーゲン, 圧電現象

## 1. はじめに

超音波骨折治療法では、低出力超音波パルス (Low Intensity Pulsed Ultrasound, 以下 LIPUS) の物理刺激により骨の癒合が促進される。しかし、超音波刺激が骨の癒合を促進するメカニズムは未だ明確ではない。

超音波のような物理刺激が骨再生プロセスに与える影響の一つとして、深田らは、低周波の繰り返し応力により骨中に電位を誘発することを報告した<sup>[1]</sup>。この誘発電位が発生する要因は、流動電位と圧電性の二つが指摘されている。MHz 域における骨中誘発電位は、流動電位の発生があまり期待できないため、圧電性に起因する可能性が高い。

そこで、我々は LIPUS が利用される MHz 域において骨中に電位が誘発されるかを調べるため、骨を圧電材料とみなして超音波トランスデューサ (以下、皮質骨トランスデューサ) を作製し、検討を行なった<sup>[2]</sup>。なお骨の主成分は骨軸方向に強く配向して存在する I 型コラーゲンとハイドロキシアパタイト (HAp) で構成されている。

本研究では、皮質骨の圧電性をより詳細に検討するため、骨中に存在する I 型コラーゲンに注目し、このコラーゲンを起因とする超音波誘発電位について検討したので報告する。

## 2. 実験試料・方法

### 2.1 試料作成手順

Figure 1 に試料作製手順の概略を示す。30 月齢の健康なウシ大腿骨骨幹部中央から皮質骨の円環状試料を切り出した。その後、骨軸 (Axial) 方向、半径 (Radial) 方向、及び接線 (Tangential) 方向に沿って円柱を切り出し、円板状に加工した。各骨円板試料の直径は 11.0 mm、厚さは  $1.00 \pm 0.01$  mm である。これらの試料の一部で、脱灰骨試料を作成した。25 °C の EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acid) 溶液を用い、HAp を溶出した。脱灰骨試料は十分に乾燥させ、再度円板状に加工した。各脱灰骨円板試料の直径は 11.0 mm、厚さは 0.65 ~ 1.00 mm である。各試料の厚さを Fig. 1 に示す。

次に、皮質骨試料 6 枚 (Radial, Axial, Tangential 方向

に各 2 枚ずつ) と脱灰骨試料 3 枚 (Radial 方向) を用いて、超音波トランスデューサを 9 本作製した<sup>[3]</sup>。以後、脱灰骨を用いて作成した超音波トランスデューサを脱灰骨トランスデューサと呼ぶ。皮質骨及び脱灰骨トランスデューサには、水が浸透しないように被膜を施し、実験を行った。また、比較参照用に PVDF を用いて超音波トランスデューサを作成した。

### 2.2 実験方法

実験系を Fig. 2 に示す。送波器として PVDF 集束型凹面トランスデューサ (直径 20 mm, 曲率半径 40 mm, Toray Engineering) を使用し、受波器として、自作の平面型トランスデューサ (PVDF, 皮質骨, 脱灰骨) を使用した。実験では、発振器 (33250A, Agilent) とパワーアンプ (HAS 4101, NF) を用いて 70 V<sub>p-p</sub> の信号を送波器に印加した。超音波は受波器の励振面に照射され、受波器で観測された信号をプリアンプ (BX-31A, NF) で 40 dB 増幅し、オシロスコープ (DPO3054, Tektronix) で受波波形を観測した。

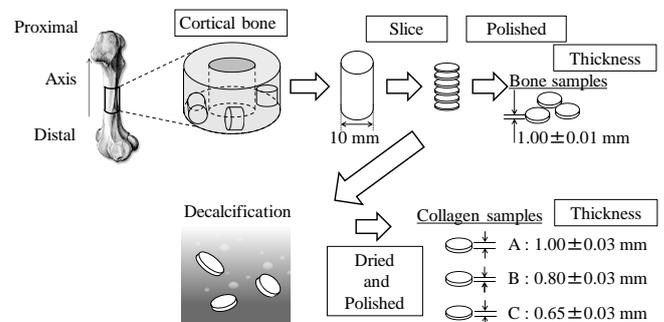


Fig. 1 Fabrication process of samples.

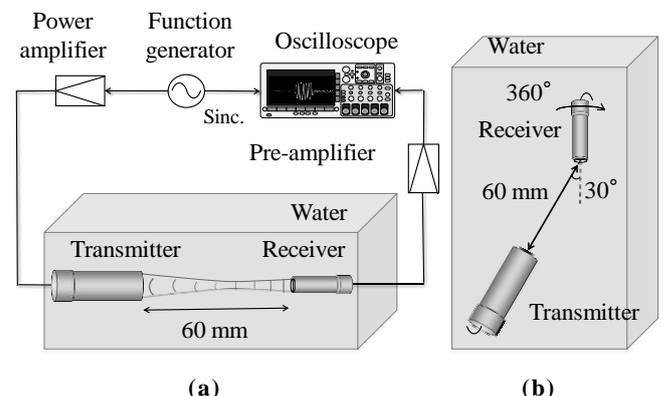


Fig. 2 Experimental setup.

まず, Fig. 2 (a) に皮質骨あるいは脱灰骨トランスデューサの受波感度特性を測定するための実験系を示す. 受波器と送波器の音軸が一致するように設置されており, 0.7 – 2.0 MHzの正弦波10波のバースト音波 (音圧は約10 kPa<sub>p-p</sub>) をPVDF, 皮質骨あるいは脱灰骨トランスデューサに照射した. Fig. 3 (b) に脱灰骨及び皮質骨の圧電異方性を測定するための実験系を示す. 受波器と送波器の角度を音軸から30° 傾いた位置に設置し, 10 kHzのステップ信号を送波器に印加し. ステップの立ち上がり時に送波されるパルス音波 (音圧は約1.3 kPa<sub>p-p</sub>) を測定し, 受波器を10度ごとに回転させた.

### 3. 結果と考察

測定時の各トランスデューサは全乾状態とした. Fig. 3 に示すように脱灰骨中にも MHz 域で圧電性が確認できたが, 受波感度は同一構造の PVDF トランスデューサの約 1/1000 であった. Fig. 4 に脱灰骨トランスデューサと皮質骨トランスデューサの受波感度特性を示す. すべての周波数において, 脱灰骨トランスデューサの受波感度は皮質骨トランスデューサより大きな値を示し, 最大受波感度で比較では, 感度差が6倍程度となった. 今回用いた構造のトランスデューサでは, トランスデューサの静電容量が小さいと, 見かけ上測定電位が低くなる. 脱灰骨トランスデューサの静電容量は皮質骨トランスデューサの35%程度と小さかったが, 実際観測された受波波形の振幅値は脱灰骨トランスデューサの方が皮質骨トランスデューサよりも大きいことから, 脱灰骨の圧電性は皮質骨よりも高い可能性がある.

Figure 5 に誘発電位の照射方向依存性を示す. 受波感度特性と同様に脱灰骨トランスデューサの誘発電位は皮質骨トランスデューサよりも大きくなった. これまで我々のグループは MHz 域における皮質骨の圧電性は骨の軸方向ではなく, 各軸からずれた方向に音波が伝搬する際に大きくなり, 極性が変化することを報告した<sup>[4]</sup>. 立ち上がりが正圧の超音波パルスを送波したにもかかわらず皮質骨トランスデューサ及び脱灰骨トランスデューサは共に圧電性が軸からずれた方向で最大となることと, 極性が変わることを確認できた.

### 4. まとめ

MHz 域の超音波パルスを皮質骨あるいは脱灰骨に照射した際, 誘発電位が観測されることを示した. 電位を (脱灰) 骨トランスデューサの受波感度特性から評価し, 脱灰骨の圧電性が皮質骨より高いことを実験的に確認した. 脱灰骨の主成分はI型コラーゲンであるため, 皮質骨の圧電性はI型コラーゲンによるものと考えられる. また, 皮質骨と脱灰骨共に音波を照射する方向とにより受波波形の極性が変化した.

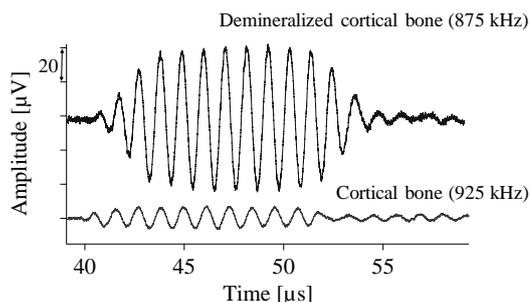


Fig. 3 Received waveforms at resonance frequency.

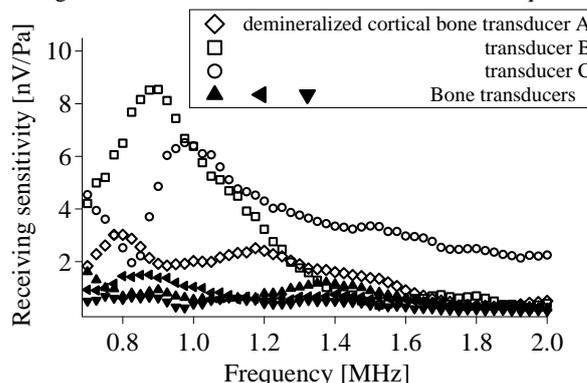


Fig. 4 Receiving sensitivity by decalcified cortical bone transducers and bone transducers.

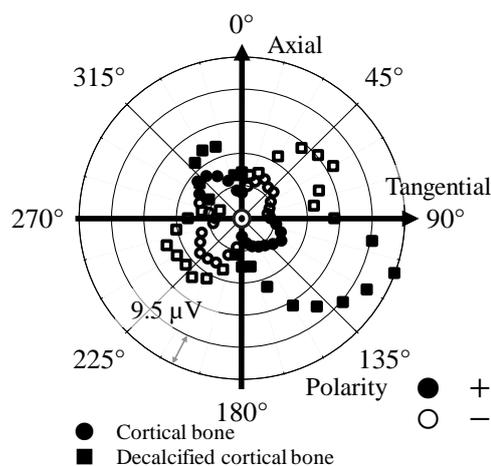


Fig. 5 Anisotropic character of the induced electric potentials in Axial-Tangential directions by the ultrasound irradiation.

### 文 献

- [1] E. Fukada, I. Yasuda, Journal of the Physical Society of Japan, 12, 1158-1162 (1957).
- [2] M. Okino, et. al., Appl. Phys. Lett. 103, 103701 (2013).
- [3] S. Matsukawa, S. Mori, E. Fontanel, I. Mano, K. Mizuno, T. Yanagitani, S. Takayanagi, M. Matsukawa Proceedings of Symposium on Ultrasonic Electronics, 36 5-7 (2015)
- [4] Y. Nakamura, T. Otani, J. Aconst. Sci., Am, 94, 1191-1199 (1993).

# ブタ大腿骨皮質骨中における誘発電位の異方性評価

牧野 大輝<sup>†</sup> 森 駿貴<sup>†</sup> 松川 真美<sup>†</sup>

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

E-mail: <sup>†</sup> ctub1028@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード 大腿骨, 皮質骨, 圧電性, トランスデューサ

## 1. はじめに

近年, 低強度超音波を用いた骨折治療 (LIPUS : Low Intensity Pulsed Ultrasound) が注目されている. LIPUS は MHz の超音波を用い, 骨の細胞を刺激して骨折の治癒を促進させる. しかし, 超音波が骨の再生を促進させるメカニズムの全容は不明である.

1953年, 保田らは機械的応力の印加により骨内部に誘発電位が発生し, この電位が骨のリモデリングに関与すると指摘した<sup>1)</sup>. さらに, 誘発電位の要因として骨の圧電性が報告されている. しかし, 超音波骨折治療で用いられる MHz 域における骨の圧電性に関する研究は数少ない. そこで我々は MHz 域における骨の圧電性に着目し, 骨を圧電材料として超音波トランスデューサを作製し, MHz 域で骨内部に発生する誘発電位の観測に成功した<sup>2-4)</sup>.

本研究は, 臨床に近い形で誘発電位を確認するため, 円筒状のブタ大腿骨を圧電材料とみなして超音波トランスデューサを作製し, 前方 (Anterior) 部, 内側 (Medial) 部, 後方 (Posterior) 部の3部位で圧電異方性について検討を行った.

## 2. 実験方法

### 2.1. 実験試料

ブタの皮質骨は, レンガ状の層板骨から形成される Plexiform 構造と, オステオンを中心とした同心円状の Haversian 構造の二つの特徴的な微細構造から形成される<sup>5)</sup>. また, 骨の主成分であるコラーゲンやヒドロキシアパタイト (HAp) は骨軸方向 (Axial 方向) に沿って配向しており, 骨は弾性的に一軸異方性を示す<sup>6)</sup>.

実験試料の作製手順を図1に示す. 本実験では, ブタ178日齢メス大腿骨骨幹部中央から皮質骨を切り出し, 厚さ 3.5-3.8 mm, 高さ 13.00 ± 0.01 mm の円筒状骨試料を作製した. 光学顕微鏡を用いてこの骨試料を観察すると, 前方部は Plexiform 構造, 後方部は Haversian 構造, 内側部は両方が混在する Mixture 構造に分類された. 作製した円筒状骨試料を圧電材料とみなして, 超音波トランスデューサ (大腿骨トランスデューサ, 空気バックング) を作製した.

### 2.2. 実験系および測定方法

実験系を図2に示す. 送波側に集束型凹面 PVDF トランスデューサ (直径 20 mm, 曲率半径 40 mm, Toray Engineering), 受波側に自作の大腿骨トランスデューサを用い, 両者の音軸が直交するように設置した. この時, 骨試料の側面が送波器の焦点に位置するようにセンサ間距離を 40 mm とした. 発振器 (33250A, Agilent Technologies) から電圧振幅 7 V<sub>p-p</sub> のパルス信号をパワーアンプ (HAS 4101, NF) で 20 dB 増幅した後, 送波器に印加し, 音圧 7.4 kPa<sub>p-p</sub> の超音波パルスを照射した. 大腿骨トランスデューサで受波した信号は, プリアンプ (BX-31A, NF) で 40 dB 増幅後, オシロスコープ (DPO3054, Tektronix) で観測した. 誘発電位の測定は  $\theta$  (骨軸-半径面内) 方向,  $\varphi$  (円周-半径面内) 方向に -60° から 60° まで送波器を回転させて行った. 本実験は前方部, 内側部, 後方部の3部位で測定を行った.

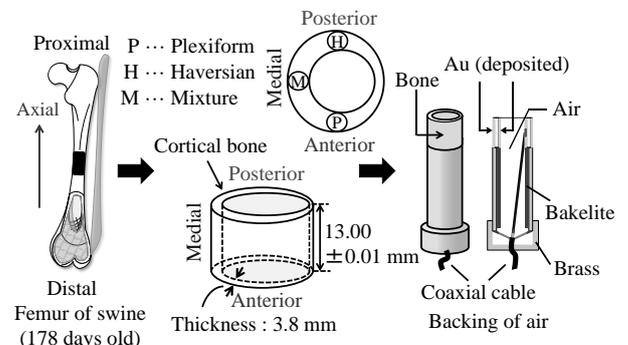


図1 実験試料

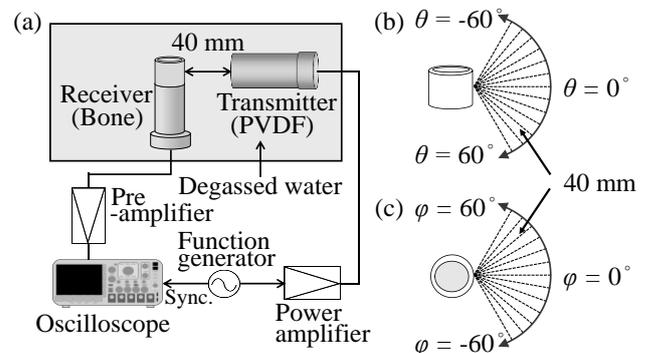


図2 (a) : 実験系, (b), (c) : 超音波入射方向 ( $\theta$ ,  $\varphi$ )

### 3. 実験結果と考察

$\theta = 20^\circ$  (図 2 (b)) で超音波を照射したときの観測電位波形を図 3 に示す. 本実験では大腿骨トランスデューサを受波器に用いて観測し波形 1 波目の peak to peak 値を誘発電位の振幅値と定義した.

前方部, 内側部, 後方部の測定結果を図 4 (a) に示す. その結果,  $\pm 45^\circ$  付近で電位振幅が最大値となり,  $0^\circ$  (半径方向) で最小値を示した. 加えて, 観測波形 1 波目の極性が, 前方部では  $20^\circ$  から  $10^\circ$ , 内側部, 後方部では  $0^\circ$  から  $-10^\circ$  で反転した. 低周波を用いた先行研究では, ウシのアキレス腱の骨軸-円周面に応力の角度を変えて印加している. その結果, 骨軸から  $45^\circ$  の方向に応力印加時に, 圧電定数が最大となり,  $0^\circ$  で極性が反転することを示した<sup>7)</sup>. 本研究でも, 骨軸-半径面に超音波の照射角度を変えることで, 極性の反転と振幅値の変化が確認できた.

続いて, 前方部, 内側部, 後方部の測定結果 (角度  $\varphi$ ) を図 4 (b) に示す. その結果, 電位振幅に大きな変化が見られなかった. 我々の以前の研究においても, ウシの皮質骨の円周-半径面に超音波を照射した場合, 入射角度を変えても電位振幅の変化は小さかった. この要因として, 作製した骨試料がほぼ一軸異方性で, 弾性的に円周-半径面内では等方に近いことが関連していると考えられる. また, 観測波形 1 波目の電位振幅値が小さかったため, 超音波の入射角度により極性の変化を観測することはできなかった. なおこれらの傾向は, 前方部, 内側部, 後方部の全部位で同様であった. つまり, 骨の圧電異方性の特徴は部位や微細構造に影響されないことが示唆された.

### 4. まとめ

ブタ大腿骨を用いて円筒状の超音波トランスデューサを作製し, MHz 域における骨の圧電異方性について検討を行った. その結果, 前方部, 内側部, 後方部の全部位で同様な異方性が見られた.

誘発電位の  $\theta$  角度依存性では,  $\pm 45^\circ$  付近で電位振幅が最大値を示し,  $0^\circ$  で最小となった. 一方,  $\varphi$  角度依存性では, 電位振幅にあまり変化が見られなかった. 従って, 超音波骨折治療に圧電が寄与する場合,  $\theta$  方向に照射方向を制御することで効率化が期待できる. ただし, ヒトの皮質骨の特徴を考慮する必要がある.

### 文 献

[1] E. Fukada *et al.*, J. Phys. Soc. Jpn., Vol. 12, pp. 1158-1162 (1957).  
 [2] M. Okino *et al.*, Appl. Phys. Lett. Vol. 103, 103701 (2013).

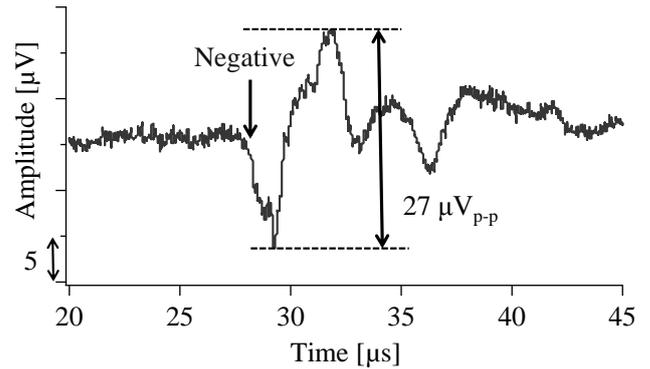
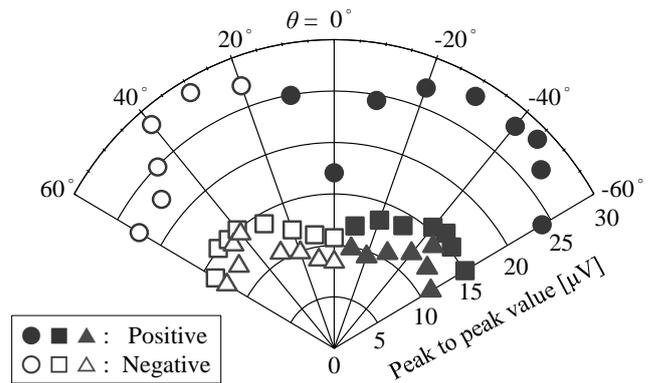
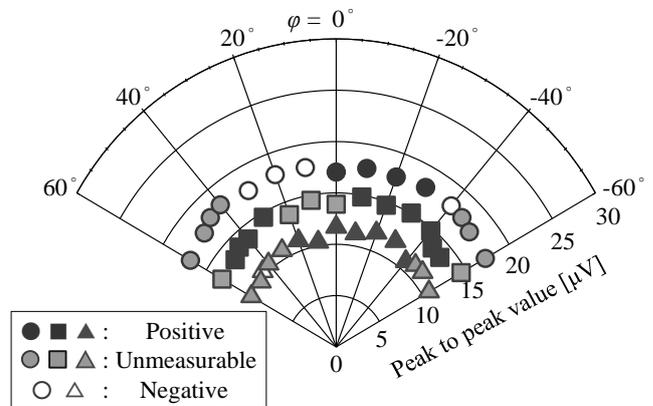


図 3 観測波形 ( $\theta = 20^\circ$ )



(a) 角度  $\theta$  (● ○ : 前方部, ■ □ : 内側部, ▲ △ : 後方部).



(b) 角度  $\varphi$  (● ● ○ : 前方部, ■ ■ : 内側部, ▲ ▲ △ : 後方部).

図 4 誘発電位と超音波照射角度の関係

[3] H. Tsuneda *et al.*, Appl. Phys. Lett. Vol. 106, 073704 (2015).  
 [4] S. Matsukawa *et al.*, Appl. Phys. Lett. Vol. 110, 143701 (2017).  
 [5] Y. Yamato *et al.*, IEEE TUFFC., Vol. 55, pp. 1298-1303 (2008).  
 [6] Y. Yamato *et al.*, Calcif. Tissue Int., Vol. 82, pp.162-169 (2008).  
 [7] E. Fukada *et al.*, Jpn. J. Appl. Phys., Vol.3, pp. 117-121 (1964).