

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

超音波を基軸とした新たな医療技術開発の拠点形成

—ヒトにやさしい医療を目指して—

平成28年度  
研究成果公開シンポジウム

平成28年8月29日(月)

同志社大学京田辺校地夢告館 MK101教室



主催 同志社大学超音波医科学研究センター

## 巻 頭 言

同志社大学超音波医科学研究センター主催の研究成果公開シンポジウムは平成25年度に第1回を実施し、今回で4回目を迎えました。このシンポジウムは、平成25年度に採択されました文部科学省戦略的研究基盤形成支援事業「超音波を基軸とした新たな医療技術開発の拠点形成—ヒトにやさしい医療を目指して—」の研究成果を中心に公開しています。このプロジェクトは、平成25年度から29年度の5年間において、以下のような4つの研究テーマに分かれて実施することとしています。これまでの3回の公開シンポジウムにおきまして、ご来場の方々から貴重なご意見やアドバイスをいただきました。この場を借りまして、深く感謝申し上げます。来年度がこのプロジェクトの最終年度となりますので、今回も忌憚のないご意見を賜れば幸甚です。

### 4つの研究テーマ

#### 1. 医療における超音波技術の安全性の確立

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

#### 2. 超音波による生体組織の熱的特性のイメージング

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

### 3. 生物補償行動アルゴリズムを用いた超音波イメージング技術の開発

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

### 4. 生体組織のかたさ測定精度の向上

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

平成28年8月29日

同志社大学超音波医科学研究センター  
センター長 秋山 いわき

## プログラム

### 13:10 開会の挨拶

同志社大学超音波医科学研究センター センター長 秋山 いわき

### 13:20 テーマ1「医療における超音波技術の安全性の確立」

同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 吉川 研一 . . . . . 1

千葉大学フロンティア医工学センター 助教 吉田 憲司 . . . . . 5

### 14:20 テーマ4「生体組織のかたさ測定精度の向上」

京都大学大学院医学研究科 教授 椎名 毅 . . . . . 7

同志社大学大学院理工学研究科 教授 松川 真美 . . . . . 9

### 15:20 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」

同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 秋山 いわき . . . . . 11

### 15:50 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」

同志社大学大学院生命医科学研究科 准教授 飛龍 志津子 . . . . . 13

### 16:30 研究員報告「超音波領域に関わるマウス深部下丘の生後発達における細胞表面マーカーの解析」

九州大学医学研究院神経解剖学 講師 藤本 久貴 . . . . . 15

## ポスター講演

### 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

・・・・・・・・・・ 17

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

② DNA二本鎖切断のDMSOによる保護作用の違いーガンマ線, 光誘起活性酸素, 凍結に引き起こされる損傷の比較ー

・・・・・・・・・・ 19

野田雅美, 吉川研一

同志社大学生命医科学研究科

③ 超音波照射下におけるマイクロバブルの膜材質と内部気体が振動特性に与える影響

・・・・・・・・・・ 21

安藤優<sup>1)</sup>, 西村ジュン<sup>1)</sup>, 香川幸大<sup>1)</sup>, 田畑拓<sup>1)</sup>, 吉田憲司<sup>2)</sup>, 小山大介<sup>1)</sup>, 渡辺好章<sup>1)</sup>, Krafft Marie Pierre<sup>3)</sup>

1) 同志社大学, 2) 千葉大学, 3) Institut Charles Sadron, Centre National de la Recherche Scientifique

④ 骨表面組織における超音波照射による温度上昇について

・・・・・・・・・・ 23

高野わかな<sup>1)</sup>, 新田尚隆<sup>2)</sup>, 石黒保直<sup>3)</sup>, 笹沼英紀<sup>3)</sup>, 谷口信行<sup>3)</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) 産業技術総合研究所, 3) 自治医科大学

⑤ 超音波照射による生体影響の検討ーメダカ胚プロテオーム解析と代謝物のイメージング質量分析法ー

・・・・・・・・・・ 25

阪口裕暉<sup>1)</sup>, 松本恵李那<sup>1)</sup>, 吉田憲司<sup>2)</sup>, 殿山泰弘<sup>3)</sup>, 池川雅哉<sup>4)</sup>, 廣瀬まゆみ<sup>1)</sup>, 秋山いわき<sup>1)</sup>, 渡辺好章<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, 3) 慶應義塾大学先端研・GSPセンター, 4) 同志社大学生命科学部医生命システム学科

⑥ MHz 帯超音波照射に伴う DNA 損傷の音圧依存性	・・・・・・・・・・	27
山下悠介 <sup>1)</sup> , 吉田憲司 <sup>2)</sup> , 剣持貴弘 <sup>1)</sup> , 吉川祐子 <sup>3)</sup> , 吉川研一 <sup>1)</sup> , 渡辺好章 <sup>1)</sup>		
1) 同志社大学, 2) 千葉大学, 3) 立命館大学		
⑦ 超音波パルス照射による血液への影響	・・・・・・・・・・	29
谷健太朗, 小山大介, 渡辺好章		
同志社大学		
⑧ Fiber Bragg Grating センサによる超音波音圧の計測	・・・・・・・・・・	31
松尾晃佑, 小山大介, 秋山いわき		
同志社大学超音波医科学研究センター		
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」		
⑨ MR で撮像された位置情報を用いた電子フォーカスの補正	・・・・・・・・・・	33
小南成史, 稲垣拳, 秋山いわき		
同志社大学超音波医科学研究センター		
⑩ MRI で撮像された画像情報を用いる超音波イメージング –高磁場対応超音波プローブを用いて–	・・・・・・・・・・	35
森泉裕貴, 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		
⑪ MRI と超音波を用いた生体内部の音速推定法の提案	・・・・・・・・・・	37
坂和直幸 <sup>1)</sup> , 安田光輝 <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) 産業技術総合研究所		
⑫ 超音波による生体組織の熱物性のイメージング –音速の温度依存性の測定–	・・・・・・・・・・	39
森本舞, 辻本祐加子, 秋山いわき		
同志社大学超音波医科学研究センター		
⑬ 超音波加温による体積熱容量の測定	・・・・・・・・・・	41
杉山真璃子, 秋山いわき		
同志社大学超音波医科学研究センター		

⑭ 2 ビーム方式コントラストエコー法の検討 –和周波数成分によるイメージング–	・・・・・・・・・・ 4 3
--	----------------

木原綾音, 金井一将, 秋山いわき  
同志社大学超音波医科学研究センター

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 コウモリの補償行動を模擬した超音波ドプラ血流計測法	・・・・・・・・・・ 4 5
-----------------------------	----------------

佐藤寛<sup>1)</sup>, 堀内彩瑛<sup>1)</sup>, 藤岡慧明<sup>2)</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

⑯ 複数個体飛行時におけるコウモリのソナー信号特性の変化 –テレメトリマイクを用いた複数個体の音声同時計測による検討–	・・・・・・・・・・ 4 7
---	----------------

長谷一磨<sup>1)</sup>, 角屋志美<sup>1)</sup>, 間井谷洋祐<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

⑰ 異なるクラッタ環境における野生 CF-FM コウモリの音響空間センシング戦略に関する検討	・・・・・・・・・・ 4 9
--	----------------

氏野友裕<sup>1)</sup>, 藤岡慧明<sup>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

⑱ Stimulating methods of pulsed infrared laser for creating intelligible speech perception	・・・・・・・・・・ 5 1
--	----------------

Yuta Tamai, Yuka Shinpo, Kensuke Horinouchi, Sizuko Hiryu and Kohta I. Kobayashi  
Doshisha University

⑲ 蝸牛マイクロフォン電位記録法の検討：スナネズミを被験体とした研究	・・・・・・・・ 5 3
------------------------------------	--------------

原田勇太, 小林 耕太  
同志社大学生命医科学部

⑳ 赤外光を用いた新型装用人工内耳の開発： 経鼓膜的な蝸牛神経刺激の有効性の検討	・・・・・・・・・・ 5 5
--	----------------

尾上幸太郎, 松井優, 玉井勇太, 飛龍志津子, 小林耕太  
同志社大学大学院生命医科学研究科

テーマ4 「生体組織のかたさ測定精度の向上」

⑳ 不均一な皮質骨中の超音波伝搬特性 高野幸樹 <sup>1)</sup> , 松川真美 <sup>1)</sup> , 長谷芳樹 <sup>2)</sup> 1) 同志社大学, 2) 神戸市立工業高等専門学校	57
㉑ 骨コラーゲン中の悪玉架橋が超音波音速に与える影響 上田涼平, 松川真美 同志社大学超音波医科学研究センター	59
㉒ 超音波照射による軟骨中の誘発電位の検討 森駿貴 <sup>1)</sup> , 松川沙弥果 <sup>1)</sup> , 高柳真司 <sup>2)</sup> , 松川真美 <sup>1)</sup> 1) 同志社大学, 2) 名古屋工業大学	61
㉓ 顕微 Brillouin 散乱法による関節軟骨の局所的音波物性評価 川瀬麻実, 柴垣慶明, 富田昇太, 森駿貴, 松川真美 同志社大学	63





# 超音波によって引き起こされるゲノム DNA の二本鎖切断

## —パルス波による損傷の定量的評価—

吉川研一

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: [keyoshik@mail.doshisha.ac.jp](mailto:keyoshik@mail.doshisha.ac.jp)

キーワード 二本鎖切断, ゲノム DNA, DNA 損傷, 単一分子観察

### 1. はじめに

癌化や放射線による障害において、DNA の損傷が関与していることは良く知られている。DNA 損傷のなかでも、二重鎖切断は最も重篤である。γ線・粒子線などによる悪性腫瘍の良好な治療方法の開発のためには、DNA 二重鎖切断を定量的に計測することは重要な課題となっている。しかしながら、既存の分析手法では、放射線障害を定量的に見積もることは極めて困難であった。これまでに知られている計測手法としては、コメット・アッセイと γ-H2AX の蛍光免疫染色法<sup>1)</sup>が代表的なものとなっているが、定量的な解析はほぼ不可能である。本研究では、蛍光顕微鏡により一分子観察の実験手法を応用することにより、ゲノムサイズの DNA の二重鎖切断を定量的に計測することが可能であることを明らかにし、研究を進めて来ている。<sup>2-6)</sup>今回は、振動数 30 kHz の超音波を用い、連続波とパルス波による DNA 二重鎖切断効率の違いを一分子観察の実験手法により計測したので報告する。

### 2. 超音波による二重鎖切断：実験方法

本実験で使用する装置の概略図を図 1 に示す。容器中央に T4-DNA (56 μm, 166 キロ塩基対) 溶液の入ったチューブを設置し超音波 (30 kHz) を照射した。

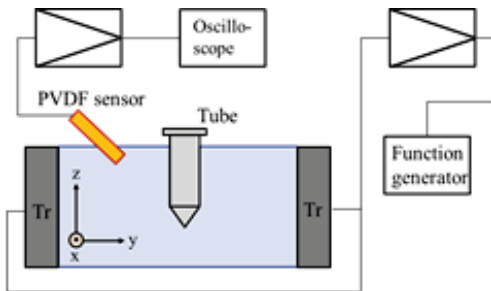


図 1. 超音波照射実験装置 (概略図)<sup>5)</sup>

### 3. 照射率 ( $D$ ) による DNA 切断効率の変化

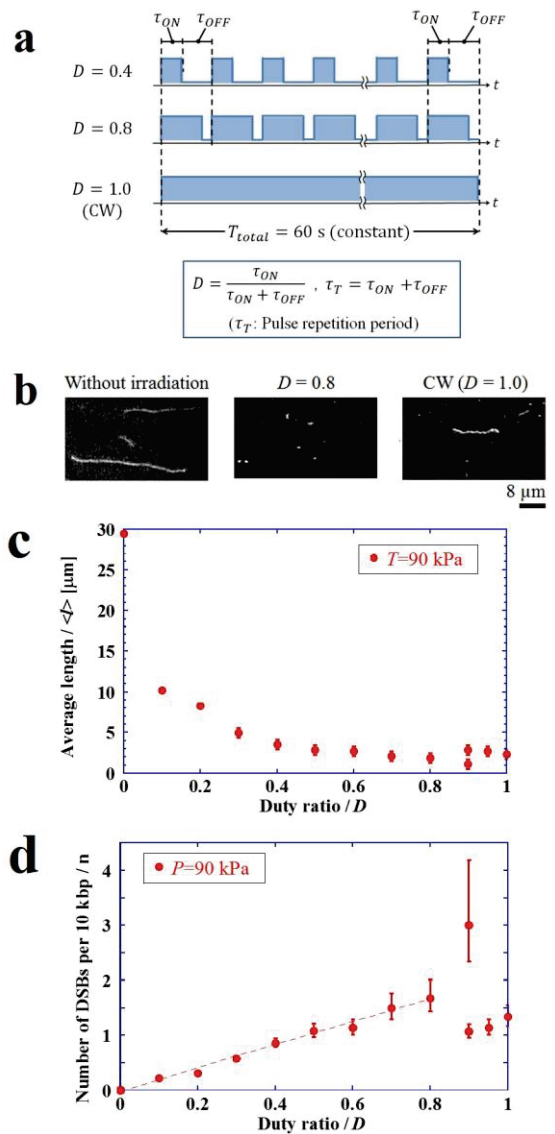


図 2. a) 照射率  $D$ , b) DNA 一分子観察例, c) 照射率による DNA 分子平均長の変化, d) DNA 二本鎖切断効率の照射率依存性。

図 2 に、振動数 30 kHz, 音圧 90 kPa の超音波を 60 秒間、連続、およびパルス照射した場合の実験結果を示した。本実験では、T4 DNA (166 kbp) を用い、照射率  $D$  (Duty ratio) は、図 2a) に示すように、パルス周期と実際の照射時間との比で定義され、 $D = 1.0$  は連続波を意味する。実験では、超音波照射後、YOYO-1 を加え DNA 分子を蛍光染色した。YOYO 染色された DNA を蛍光顕微鏡で観測し、DNA 分子の全長の測定を行った。超音波照射前 (control) の DNA 平均長を  $\langle L_0 \rangle$ 、超音波照射後の平均長を  $\langle L \rangle$  とすると、切断前の DNA 全長に対しての二本鎖切断回数  $n$  は次式の関係で求め、図 2 d) に示している。

$$n = \frac{\langle L_0 \rangle - \langle L \rangle}{\langle L \rangle}$$

図 2d) の結果から、 $D = 0.8$  程度までは、切断回数が線形的に増加するが、 $D = 0.9$  で、著しい増加が見られ、その後、再び減少を示す。 $D = 1.0$  の場合が、連続波の切断回数を示すことから、 $D = 0.6$  近傍以下のパルス波では、切断回数が連続波より少なく、 $D = 0.6$  を超えると、逆に、切断回数が多くなるという結果を得た。この実験条件では、連続波が、最も入力エネルギーが大きくなるにも関わらず、照射率が 0.6 を超えると、DNA の切断効率が連続波よりパルス波の方が高くなることが明らかとなった。

### 3. パルス幅による二本鎖切断効率の変化

図 3 に、照射率を 0.4、音圧を 90 kPa で一定にし、超音波の入力エネルギーを等しくした場合の DNA 二重鎖切断のパルス回数依存性を示す。パルス回数  $N_p$  は、図 3a) に示すように、全照射時間をパルス周期で割ったものであり、 $N_p=1$  は、連続波を表す。図 3b) より、パルス回数 30 回程度までは、連続波と比較して、切断効率が抑制され、それ以上のパルス回数では、逆に切断効率が促進される。さらに、パルス回数が 1000 に近くなると再び抑制される。本研究により、パルス回数の増加が DNA 切断効率の増大を引き起こしていることが明らかとなった。

同様の傾向は、照射率を 0.8、音圧を 90 kPa で一定としたときの、DNA 二本鎖切断効率の、パルス数依存性においても見られている。

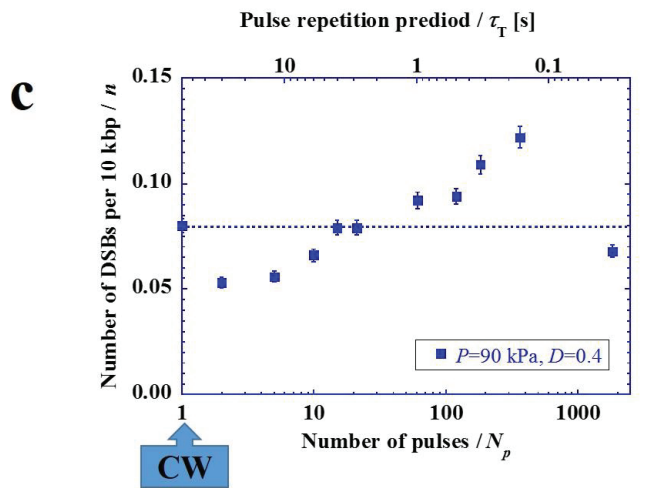
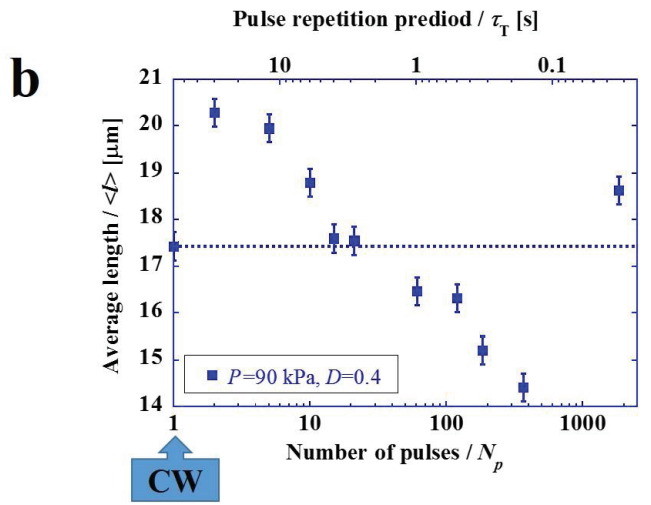
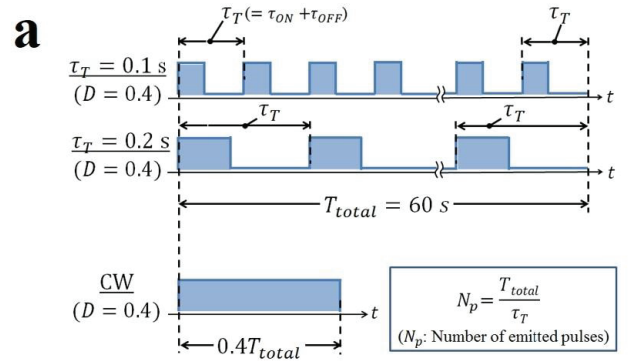


図 3. a) 連続波 (CW) とパルス波によるパルス回数. b) DNA 分子平均長のパルス回数依存性 (照射率 0.4, 音圧 90 kPa). c) DNA 二重鎖切断のパルス回数依存性

#### 4. 議論

パルス照射により,パルス幅の時間内で,DNA の損傷確立が指数関数的に減少する(半減期  $a$ )と仮定すると,以下のような関係が成り立つことが予想される.

$$\ln\left(\frac{n}{N_p}\right) \sim \frac{D}{aN_p}.$$

ここで, $D$  は照射率, $n$  は二本鎖切断数, $N_p$  は印加パルス数. 図 4 では,この式で表される直線関係が実際の実験の傾向を再現していることがわかる.

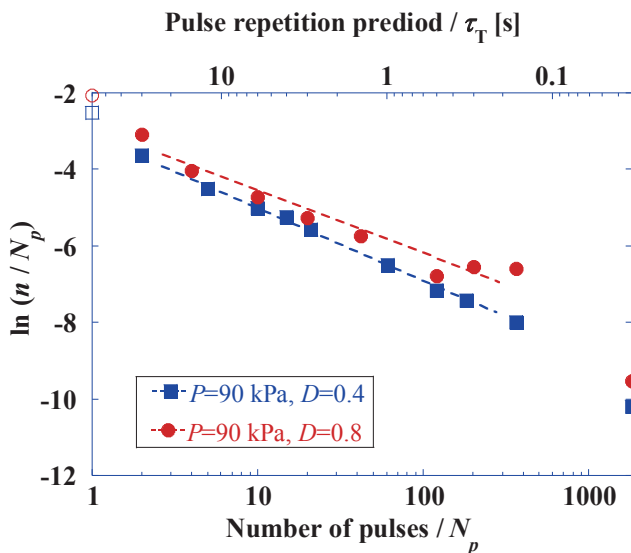


図 4. パルス数に依存した,DNA 二本鎖切断の理論モデル(破線)と実際の実験結果.

#### 4. 今後の発展方向

これまでの研究では,超音波の振動数を 30 kHz で一定として,実験を進めてきたが,今後は, MHz 程度の高周波の振動数領域における DNA 二重鎖切断について,研究を展開し,超音波照射による DNA 二重鎖切断の振動数依存について明らかにしていく.また,これまでの研究より,超音波による DNA 二重鎖切断は,キャビテーション消滅時に生じる衝撃波が主要な原因であることが考えられることから,キャビテーション生成量の定量測定を試みる.キャビテーション量の定量計測自体,困難な課題であるが,ソノルミネッセンスなどの測定方法を用いて研究を進めていき,超音波照射による DNA 二重鎖切断メカニズムを解明し, $\gamma$ 線・光励起などの他の損傷源との DNA 切断メカニ

ムの違いを明らかにしていく.その後,本研究で得られた知見を,実際の細胞に超音波を照射した場合の DNA 損傷評価につなげていく予定である.

#### 謝辞

共同研究を進めて来ている生命医科学部の渡辺研および生命物理科学研究室の方々に謝意を表したい.本稿で紹介した超音波パルスによる DNA 二本鎖切断の計測は窪田倫子氏らが行ったものである.本研究は,立命館大学生命科学部吉川祐子教授らとの共同研究である.

本研究は,私学戦略経費(S1311037)の助成を得ている.

#### 文 献

- [1] Y. Furusawa, Y. Fujiwara, P. Campbell, Q. L. Zhao, R. Ogawa, M. A. Hassan, Y. Tabuchi, I. Takasaki, A. Takahashi, and T. Kondo, "DNA Double-Strand Breaks Induced by Cavitation Mechanical Effects of Ultrasound in Cancer Cell Lines", *PLoS ONE*, vol 7, e29012, 2012.
- [2] Y. Yoshikawa, M. Suzuki, N. Yamada and K. Yoshikawa, "Double-strand break of giant DNA: Protection by glucosyl-hesperidin as evidenced through direct observation on individual DNA molecules", *FEBS Letters*, vol 566, 39–42, 2004.
- [3] S. F. Shimobayashi, T. Iwaki, T. Mori and K. Yoshikawa, "Probability of double-strand breaks in genome-sized DNA by  $\gamma$ -ray decreases markedly as the DNA concentration increases" *J. Chem. Phys.*, vol 138, 174907/1–5, 2013.
- [4] H. Takata, T. Hanafusa, T. Mori, M. Shimura, Y. Iida, K. Ishikawa, K. Yoshikawa, Y. Yoshikawa and K. Maeshima, "Chromatin compaction protects genomic DNA from radiation damage", *PLOS ONE*, vol 8, e75622, 2013.
- [5] K. Yoshida, N. Ogawa, K. Yukihiro, H. Tabata, Y. Watanabe, T. Kenmotsu, Y. Yoshikawa and K. Yoshikawa, "Effect of low-frequency ultrasound on double-strand breaks in giant DNA molecules", *Appl. Phys. Lett.*, vol 103, 063705, 2013.
- [6] Y. Ma, N. Ogawa, Y. Yoshikawa, T. Mori, T. Imanaka, Y. Watanabe, K. Yoshikawa, "Protective effect of ascorbic acid against double-strand breaks in giant DNA: Marked differences among the damage induced by photo-irradiation, gamma-rays and ultrasound", *Chem. Phys. Lett.*, vol. 638, 205–209, 2015.



# 医療における超音波技術の安全性について

## —MHz 帯における検討—

吉田 憲司<sup>†</sup> 山下 悠介<sup>‡</sup> 渡辺 好章<sup>‡</sup>

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

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

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

**キーワード** キャビテーション, マイクロバブル, DNA, 二重鎖切断

### 1. はじめに

超音波診断は、そのリアルタイム性、良好な操作性、非侵襲性という特長から胎児診断や各種臓器の疾患の診断に必要な不可欠な検査手法である。近年の装置機能や動作モードの多様化に伴い、超音波出力も増加する傾向にあり、一部の特殊な使用状況下においては安全性に関する再検証が求められている。一方で、超音波の生体作用を積極的に治療に利用する試みも多数報告されている。

本研究は、超音波の生体作用の中で非熱的作用、特にキャビテーションの機械的作用の影響に着目し、音圧や周波数などの超音波照射条件の違いによる生体作用の相違をその機序とともに理解することを目標としている。これまでの研究においては、DNA 分子やメダカ胚を対象に、30 kHz の低周波数超音波の影響を評価してきた。DNA 分子を対象にした結果ではキャビテーション発生の際音圧以上で DNA 分子の二重鎖切断が確認され、メダカ胚を対象にした結果では同様の条件において出血や胚収縮などの形態学的異常が観察されることを確認している。現在は、分子レベルでの生体作用を検討するため、メダカ胚を対象にプロテオーム解析を実施し、超音波照射の有無による相違や照射条件の違いによる相違を整理している段階である。一方で、超音波の医用応用では主に 1~10MHz の超音波が使用されるため、この周波数帯の超音波を使用した検討も開始した。本稿では、実験システムを試作し、1 MHz の超音波照射に伴う DNA 分子の損傷を定量評価した一例について紹介する。

### 2. 超音波照射システム

図 1 に構築した超音波照射システムの模式図を示す。水槽に脱気水を満たし、底部から 15 mm の位置に円筒形のシリコンチューブ（外径 2 mm, 内径 1 mm）を設置する。チューブ上方に凹面型の振動子（焦点距離 46 mm）を設置する。なお、水槽底部における反射を低減するため吸音版を設置している。振動子の位置を最適化するため、パルスレシーバーを使用し、チューブ

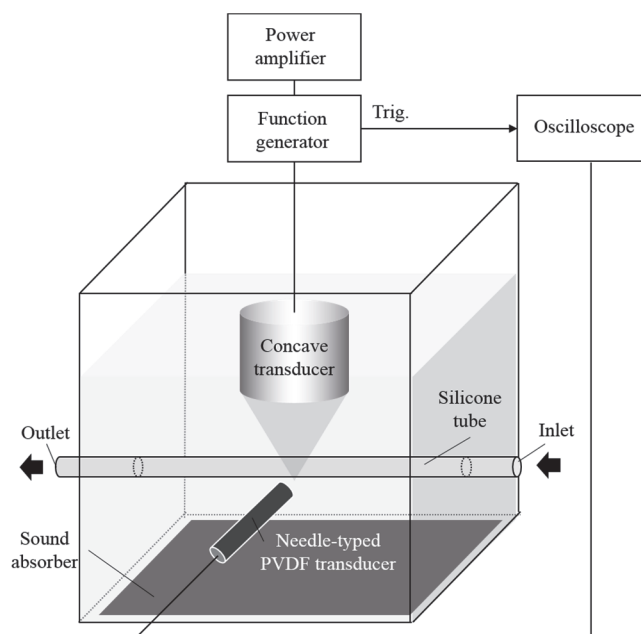


図 1 超音波照射システム

からのエコー信号の振幅が最大となるように振動子の位置を決定した。位置調整後に、発振器から中心周波数 1 MHz の正弦波信号（10 波）を増幅器を介して振動子へ入力する。繰り返し周期を 1 ms に設定し、60 s にわたって超音波を照射した。試料（DNA 分子含有溶液）はシリンジポンプを用いて、振動子の焦点へ送液される。シリンジポンプを用いて少量の液体を一定の流量で精度よく送液することで、実験条件の再現性の向上を図っている。ただし、超音波照射中においてシリンジポンプは稼動しておらず、チューブ内の溶液は静止した状態である。凹面型振動子の音場を計測した結果、焦点位置におけるビーム幅(-6dB 幅)は 3 mm であり、この範囲を音波が照射される領域として考えた。超音波照射後にシリンジポンプを再稼動し、チューブ内の液体をシリンジポンプとは反対方向に押し出し、回収する。超音波照射後の DNA 分子の切断頻度の評価は蛍光顕微鏡により直接 DNA 分子の長さを計測することにより実施する<sup>[1]</sup>。

### 3. 音圧に対する切断頻度の変化

図2に照射音圧(負圧のピーク値)に対するDNA分子の切断頻度の変化を示す。音圧が1 MPa以上の範囲ではDNA分子の切断頻度が急激に上昇していることが確認できる。DNA分子の二重鎖切断には閾音圧が存在するように見受けられ、低周波数超音波における結果と同様の特長が確認された<sup>[1]</sup>。

### 4. キャビテーション発生の評価

DNA分子の損傷とキャビテーション現象との関連性について検証するため、チューブから5 mm測方の位置に自作のPVDFトランスデューサを設置し、超音波照射時におけるキャビテーションノイズを評価した。トランスデューサの直径は3 mmであり、1 MHzにおける指向角半値幅は10度である。図3に受波音圧信号の負圧のピーク値が0.64, 1.27, 1.86 MPaの場合の受波波形を示す。15~27  $\mu$ sの期間に明瞭に観測されている波形は凹面振動子からの直接波である。この信号にキャビテーションノイズ(高調波成分, 分調波成分, 広帯域ノイズ)が重畳していると考えられるため、周波数解析を実施した。図4(b)に各波形のパワースペクトルを示す。ただし、各スペクトルは基本波成分の強度で規格化している。同図において、分調波成分の生成や広帯域ノイズの音圧に対する顕著な増加は確認されなかった。一方、音圧の増加に対して基本波成分に対する高調波成分の相対的強度が増加し、音圧が大きいほどより高次の高調波成分が発生していることが確認できる。高調波成分の生成要因として、音波伝播の非線形性(凹面振動子からの直接波)とキャビテーションの二つが考えられるが、今回の計測系においてこれら二つの要因を弁別することは難しく、キャビテーションとDNA分子の損傷の関連性を議論することが困難であった。この問題を解決するため、今後はキャビテーション発生の評価手法の改善を行う予定である。例えば、流路を挟んで二つのトランスデューサを対面させて設置し、キャビテーション気泡による音響吸収を評価する方法を検討している。キャビテーション発生の評価に使用する周波数と凹面型振動子の駆動周波数を異なる周波数帯に設定することにより、キャビテーションの発生を感度良く検知できると考えている。

### 5. まとめ

MHz帯の超音波によるDNA分子の二重鎖切断の頻度を評価するため、超音波照射システムを試作した。周波数1 MHzの超音波を使用し、照射音圧の増大に対する切断頻度の変化を調べた結果、キャビテーション発生の閾音圧以上で切断頻度が上昇するという低周波超音波を使用した場合と同様の結果が得られた。今後、実験結果の再現性、機序についてキャ

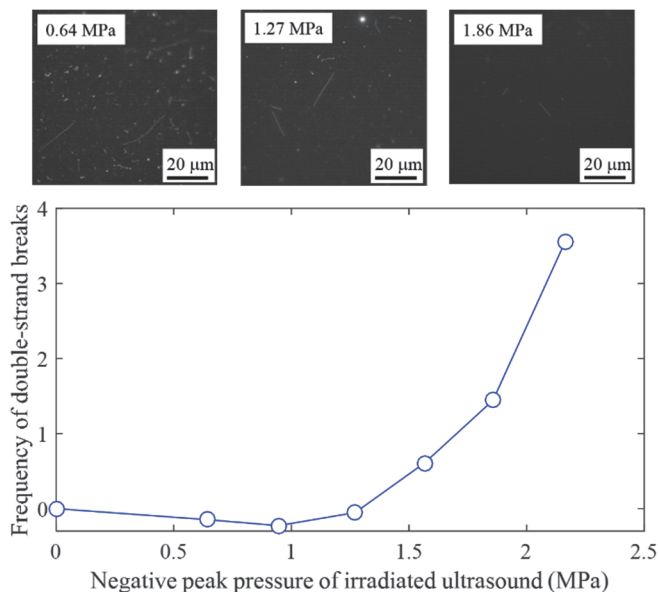


図2 超音波照射後におけるDNA分子の光学顕微鏡像と照射音圧に対するDNA分子の切断頻度の変化

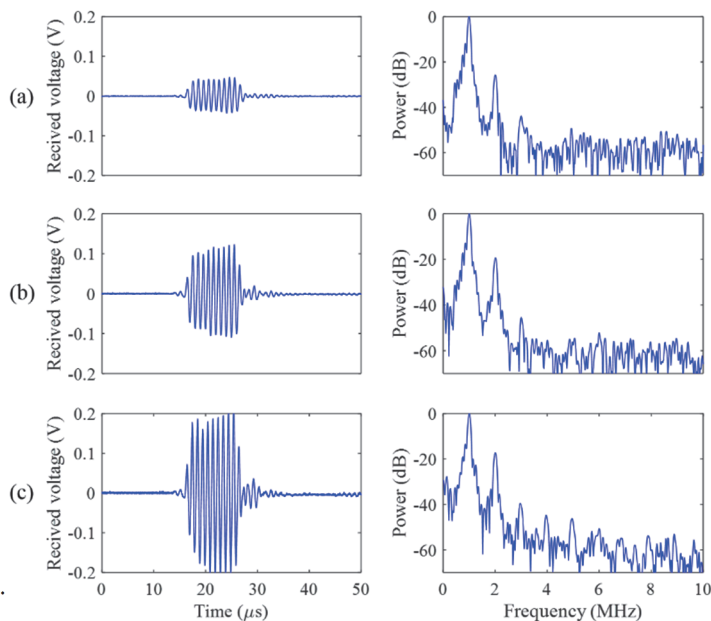


図3 ハイドロフォンの受波信号とパワースペクトル (a): 0.64 MPa, (b): 1.27 MPa, (c): 1.86 MPa.)

ビテーション現象以外の要因も想定し、慎重に検証していく必要がある。

### 文 献

[1] K. Yoshida, N. Ogawa, Y. Kagawa, H. Tabata, Y. Watanabe, T. Kenmotsu, Y. Yoshikawa and K. Yoshikawa, "Effect of low-frequency ultrasound on double-strand breaks in giant DNA molecules," *Appl. Phys. Lett.*, vol 103, no.6, 063705, 2013.

# Shear wave imaging を用いた動脈壁の弾性評価の高精度化

椎名 毅<sup>†‡</sup> 張 俊根<sup>†</sup>

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

<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> shiina.tsuyoshi.6w@kyoto-u.ac.jp

キーワード エラストグラフィ, 組織弾性, strain elastography, shear wave elastography, 剪断波

## 1. はじめに

動脈硬化は、突然死をもたらす心筋梗塞や脳梗塞などの心血管疾患の危険因子として考えられている。このため超音波を用いて非侵襲的かつ定量的に動脈壁硬化度を診断する研究開発が行われている。

超音波エラストグラフィは、組織の弾性を可視化する手法として、乳がんや、慢性肝炎での線維化の診断に用いられているが、その中でも超音波励起により体内に生じた shear wave の伝搬速度を用いる shear wave elastography は、患部の弾性が定量的に得られる手法として、近年、動脈壁の硬化度への診断の試みがなされている。

しかし、通常、shear wave elastography では、shear wave の伝搬速度の計測に、均一な媒質での伝搬方向を仮定した TOF (Time-of-flight) 法を用いるため、血管のような円管構造のものに、そのまま適用した場合、正確な値が求まらない可能性がある。

そこで、ここでは、shear wave を用いて動脈硬化度を高精度に評価するため、円管構造での shear wave 伝搬のモデルの導入と、伝搬速度の推定法について検討し、ファントム及び動物血管を用いた実験により有効性を実証した。

## 2. Shear wave elastography 法と媒質形状への依存性

現在の Shear wave elastography では、波長に比べて十分大きく均一な媒質内を shear wave が一方向に伝搬する場合を想定して、図 1 のように shear wave の波形の相関から伝搬時間を算出し伝搬速度  $c_s$  を求める TOF 法が使われ、ヤング率  $E$  は  $E = 3\rho c_s^2$  ( $\rho$ : 密度) の関係から求めている。しかし、軟組織での shear wave の速度は、1~10 m/s であり、測定可能な周波数が 100~1000Hz 程度とすると、波長は 1mm~10cm となる。一般に、波長に比較し薄い板状の媒質では、Lamb 波として伝搬速度分散を示すことが知られており、さらに血管壁のように円管状の構造を持つ媒質を伝搬する場合は、単純な TOF 法での計測では、正確な伝搬速度の評価が困難になることが予想さ

れる。実際、図 2 は同じ硬さの寒天ファントムを、ブロック状、薄板状、円管状にしたものを、市販の shear wave elastography の装置で評価した結果であるが、ヤング率  $E$  は、84.9kPa, 24.5 kPa, 62.8kPa と大きく異なった。

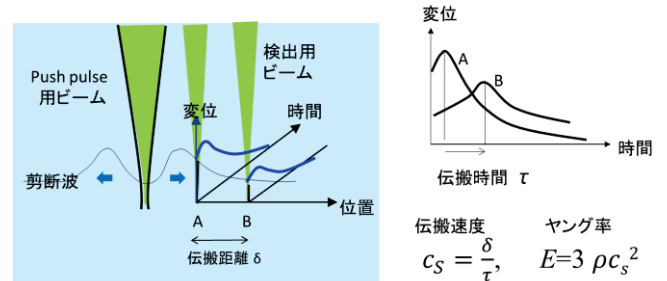


図 1 SWE で用いられる TOF 法による速度推定

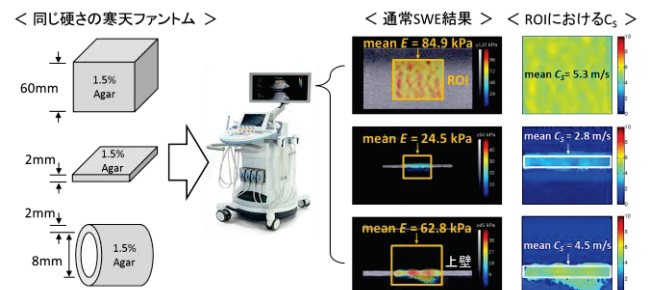


図 2 媒質の形状による通常 SWE 法の結果

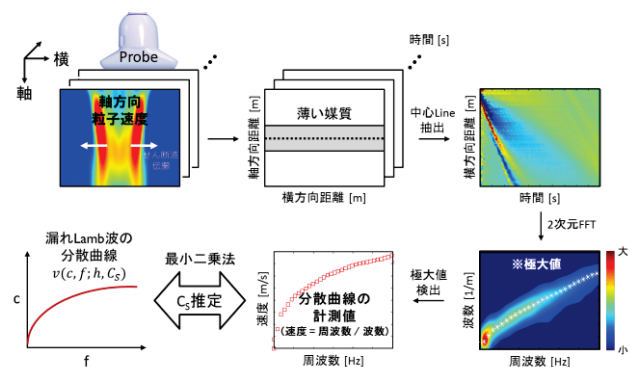


図 3 漏れ Lamb 波理論に基づく  $c_s$  の推定



### 3. 漏れ Lamb 波伝搬モデルによる伝搬速度推定

血管壁のように波長に比して薄い媒質の場合、Lamb 波として伝搬するため周波数成分ごとに異なる速度で伝搬する速度分散性を呈する。そこで、図 3 に示すように漏れ Lamb 波の反対称モードの分散方程式(式 1) から求められた分散曲線を理論値として用い、測定値に最小二乗法で近似した理論値から、伝搬速度( $C_s$ )を推定した。また、シミュレーション解析の結果、TOF 法に比較しより正確な値が得られることが示された。

$$V(k, f) = (k^2 - k_s^2)^2 \sin\left(\frac{k_L h}{2}\right) \cos\left(\frac{k_s h}{2}\right) + 4k^2 k_s k_L \cos\left(\frac{k_L h}{2}\right) \sin\left(\frac{k_s h}{2}\right) + i \frac{\rho_0 k_L (2\pi f)^4}{\rho c_s^2 k_0} \cos\left(\frac{k_s h}{2}\right) \cos\left(\frac{k_L h}{2}\right) = 0 \quad (1)$$

### 4. 円管状媒質における伝搬速度推定と ex vivo 計測

動脈を模擬した円管状の媒質に対して漏れ Lamb 波伝搬を用いた方法が有効であるかをファントム実験により検討した。

図 4 に示すように水中に置かれた寒天 1.5% で厚さ 2mm, 内径 8mm の円管状のファントムを計測した。まず、同じ 1.5% 寒天のバルク・ファントムに対して市販装置 (Aixplorer, プローブ SL15-4) での SWE 法で測定した値は  $C_s = 5.3 \pm 0.27 \text{ m/s}$  であった。

円管の場合、図 4 (b) に示されように軸方向に沿って粒子速度の時間変化の分布で、軸方向への伝搬の他に円周方向に伝わる波の成分が現れるので、この成分を除去することによって軸方向伝搬成分について漏れラム波でモデリングした。その結果、図 4 (c) のように推定された速度が  $5.3 \text{ m/s}$  とバルクでの値とほぼ一致した。一方、円管ファントムを SWE 法で計測した値は  $3.65 \pm 1.06 \text{ m/s}$  と、基準値より低く評価される傾向が見られた。

次に、図 5 に示すように、豚大動脈 (壁厚約 2.8mm, 内径約 12.4mm) を用いた ex vivo 実験を行った。基準値として、圧縮試験装置で測定したヤング率は  $130.3 \pm 18.4 \text{ kPa}$  であった。これに対し、SWE 法では  $44.6 \pm 3.9 \text{ kPa}$ , Lamb 波理論に基づく推定法では  $125.2 \pm 2.1 \text{ kPa}$  が得られ、円管の場合も、Lamb 波理論に基づく推定法が、TOF より精度が高いことが検証できた。

### 5. おわりに

動脈のように波長に比して厚みが薄く円管状の媒質の場合、従来の TOF 法では、速度分散性が原因で度が正確に推定できないが、円周方向伝搬

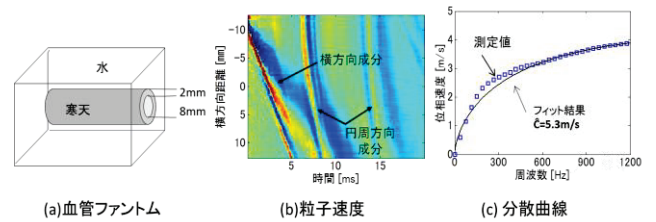


図 4 血管ファントムでの計測例

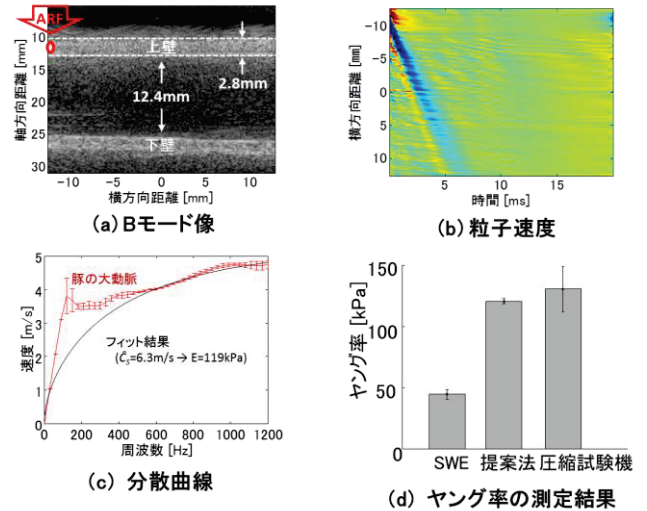


図 5 豚大動脈を用いた ex vivo 実験の結果

成分の除去と Lamb 波理論に基づく方法で  $C_s$  推定における精度向上が図れることが示した。また、ファントムや ex vivo 実験で有効性を実証した。一方で、ファントム実験結果から内径が小さくなる程、また硬くなる程、低周波数領域で Lamb 波による近似精度が低下する傾向が示された。

今後は、血管径や部位による適用限界や、拍動がある場合の測定精度への影響等の検討を通して、動脈硬化度診断への適用を進める必要がある。

### 謝辞

本研究で用いた血管ファントムの作成において、同志社大学 松川真美教授にご助言を頂きました。ここに感謝いたします。

### 文 献

- [1] 椎名 毅, “Shear wave を用いた組織粘弾性のイメージング” 日本音響学会 2016 年春季研究発表会, 139, 横浜, 2016.
- [2] J. Jang, et al., Study on the application of shear-wave elastography to thin-layered median and tubular structure: Finite-element analysis and experiment verification, Jpn. J. Appl. Phys. 55(7S1), 2016.

# 超音波による骨評価

—基礎と臨床から—

松川真美<sup>†</sup> 眞野 功<sup>†‡</sup>

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

<sup>‡</sup>応用電機株式会社 〒610-0101 京都府城陽市平川中道表 63-1

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

キーワード 超音波物性, 二波伝搬現象, 糖化, 臨床計測

## 1. はじめに

超音波による臨床用骨計測装置は定量的超音波 (Quantitative ultrasound: QUS) 測定法と呼ばれ, 日本では世界で唯一健康診断に取り入れられるなど先駆的状況にある. QUS 法はまだ骨粗鬆症の診断基準に取り入れられていないが, 骨粗鬆症のスクリーニングとして, また骨に関する関心の保持にも大きな役割を果たしている. また QUS 法は比較的安価で, 被曝がなく, 妊娠後骨粗鬆症の評価や, 子供の骨発達の評価にも利用できるなど, 大きな利点をもつ.

骨は形状が複雑で不均一, かつ異方性固液共存材料であり, 音波伝搬が極めて複雑であるため, 医用超音波装置の中でも骨計測は歴史が浅い. QUS 法の臨床用装置は現在踵骨を中心に日本で 8 機種ほど使用されており, 骨中を伝搬する超音波速度 (Speed Of Sound: SOS) や広帯域超音波減衰 (Broadband Ultrasound Attenuation: BUA) が測定される. 日本骨粗鬆症学会の QUS 標準化委員会を中心に, 異なる機種間の測定結果間の互換性も検討されている<sup>1)</sup>. 現在は骨粗鬆症だけでなく, 内分泌疾患による骨の強度低下や, スポーツ選手の疲労骨折の原因究明, 子供の骨の発達の評価など様々な視点で注目されており, 本稿では臨床と基礎の双方の視点で, 本センターで行われている超音波を用いた骨評価の成果の一部について触れる.

## 2. 骨中の超音波伝搬, 骨の超音波物性

骨の物性研究は古くから機械的手法を用いて行われてきたが, 1970 年代後半から超音波法が利用されるはじめ, 現在では MHz 域から超音波顕微鏡を用いた数百 MHz 域の測定により, マクロからサブミクロンレベルの評価が進んでいる. 特に四肢の長骨の評価が多く行われており, 外周の皮質骨や骨粗鬆症の初期症状がみられる長骨末端の海綿骨の評価が行われてきた. 前者では皮質骨を伝搬するガイド波や表面を伝搬する漏洩縦波や骨の弾性 (線形・非線形) について, 後者では大谷, 細川らが初めて観測した縦波超音波の二波伝搬現象を用いた異方性や骨密度の評価が進んでいる. ま

た, 内分泌疾患による骨折増加の原因を探るため, 骨の質的变化と超音波物性の関連も注目される.

### 2.1. 皮質骨中の超音波の伝搬

皮質骨を伝搬する超音波を利用した臨床用装置はフランス・フィンランドを中心に開発されており, 骨を伝搬する FAS (First Arriving Signal) の伝搬速度で骨の弾性を評価する. FAS に続いてラム波, 横波など様々な波が伝搬することから, FDTD や FEM などを用いた音波伝搬のシミュレーションと実測の比較が盛んに行われている. 近年は異方性を考慮したシミュレーションも見受けられるが, まだ骨の不均一性と異方性の双方を考慮した検討は極めて少ない.

図 1 に著者らのグループにより行われた不均一性と異方性を含むウシ橈骨皮質骨モデルを伝搬する MHz 域の超音波の様子を示す[1]. 音波伝搬のシミュレーションは 3 次元弾性 FDTD 法を用いた. 皮質骨表面で入射した音波は縦波, 横波, 表面波として 3 次的に伝搬し, 不均一なモデルでは音波の散乱が比較的大きく見られた. またウシ皮質骨では骨内部の音速が比較的高いため, 伝搬に伴って音波が屈折し, 音速が内部の構造を反映して変化する可能性も見出した.

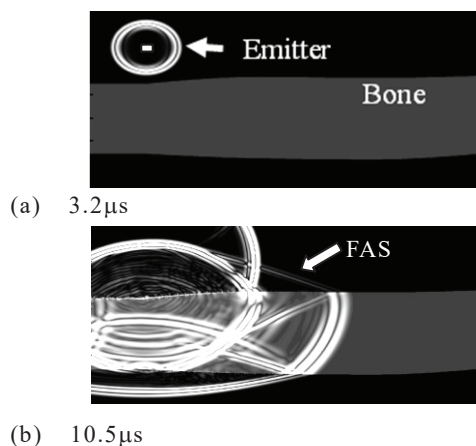


図 1 不均一かつ異方性のある骨中の超音波伝搬. FAS が骨表面から漏えいしながら伝搬している.

## 2.2. 糖化による骨の音速変化

内分泌疾患では、X線測定で骨密度は十分であるにも関わらず、骨折が増える症例が報告されている。この原因としてX線で評価できない骨マトリクスの物性変化の可能性が考えられる。そこで、骨孔や微細構造の影響をうけずに骨マトリクスの超音波物性を計測するため、顕微Brillouin散乱法を利用して、GHz域の音速の測定を試みた。この手法では、骨を研磨して薄層試料とする必要があるが、光を照射するだけで骨の音速異方性や不均一性を、非接触測定することが可能となる。

老化や糖尿病などによる骨の脆弱化の要因の一つとして、骨体積比のほぼ50%を占めるコラーゲンの分子間架橋の異常が指摘されている。これはAGE (advanced glycation end products: 糖化最終産物) 架橋と呼ばれ、糖化培養により人工的に生成することも可能である。

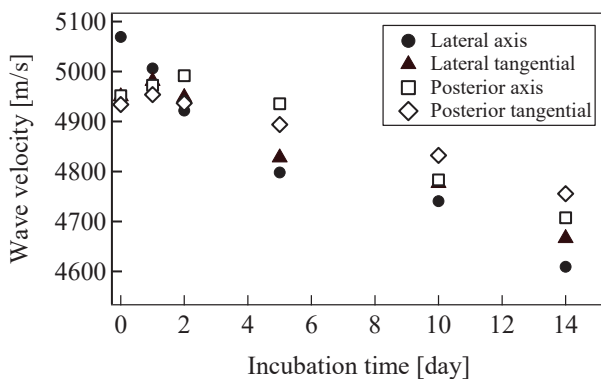


図2 糖化培養日数と音速の変化。

Lateral: 外側部, Posterior: 後部, Axis: 骨軸方向 Tangential: 接線方向, を示す。

ウシ大腿骨試料の糖化培養による音速変化を図2に示す。音速は初期にわずかに増大の後低下に転じた[2]。老化や疾病による骨の糖化の程度を臨床的に検討する必要があるが、この結果は糖化による骨の弾性低下を示唆している。音速で10%の低下は弾性としては20%程度の低下となりうる。弾性は強度とある程度相関することから、糖化による骨の脆弱化が確認された。

## 2. 二波伝搬現象を用いた臨床用骨計測装置

海綿骨を伝搬する二種類の縦波超音波（高速波，低速波）と骨からの反射波を用いた骨計測装置（同志社大学，応用電機(株)，LD-100 図3(a))はすでに認可され、研究用途を中心に広がりつつある。本装置は他の超音波骨計測装置と異なり、非荷重骨の橈骨の海綿骨密度や硬さ、皮質骨厚さを測定するため、測定結果へのライフスタイルの影響は小さい。現在では、骨粗鬆症の早期診断や薬物の効果の測定に使用されているが、

近年はスポーツのトレーニング効果の計測や、子供の骨の発達の評価方法としても期待されている。しかし、子供の小さい骨では、骨に照射した超音波が外周の皮質骨周囲をまわりこんで計測される可能性もあり問題となる。そこで、小さい骨の計測を行うため、図3(b)に示すアニュラアレイタイプの超音波トランスデューサを送受波に使用し、測定対象の骨の大きさに合わせて集束径を変更できるようにした[3]。この仕様では子供から大人まで一台の装置で測定可能である。

今後は中高生の骨の臨床計測を行い、これまで報告されていないジュニア層の超音波骨診断の基準値の検討を進める予定である。

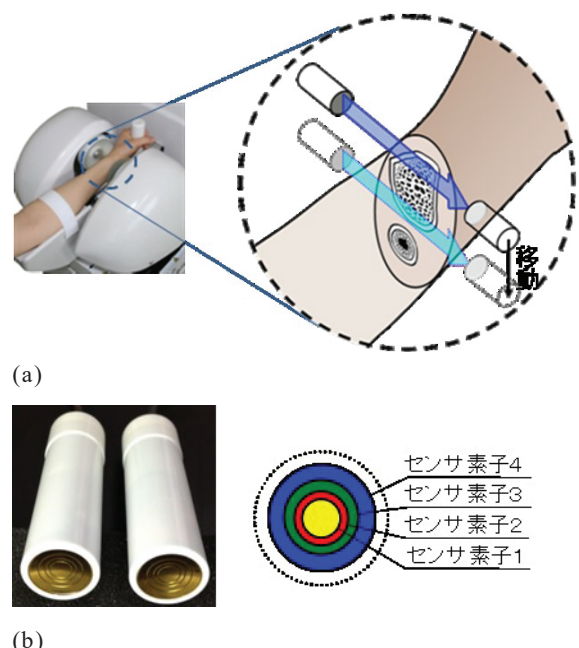


図3 超音波二波式骨密度計 (LD100) の概要とアニュラアレイトランスデューサ

## 3. まとめ

超音波による骨評価を手がける研究者は多くはないが、基礎から臨床まで幅広い研究内容を包含する興味深い分野である。近年は、工学，整形外科学だけでなく、内科学，スポーツ科学，小児科学，婦人科学なども関連する分野となっており、今後もますますの発展が期待される。

## 文 献

- [1] 松川真美, “超音波による骨評価技術の現状と課題,” 音響学会誌, Vol. 68, No. 6, pp. 293-299 (2012).
- [2] Y. Imoto, et al., “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 et al., “Two-wave propagation in in vitro swine distal ulna,” Jpn. J. Appl. Phys., Vol. 54, No. 7S1, art no. 07HF02 (2015).

# 超音波による生体組織の熱的特性のイメージング

秋山 いわき<sup>†</sup> 新田 尚隆<sup>‡</sup> 藤井 康友<sup>††</sup> 平井 都始子<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>産業技術総合研究所〒305-8564 茨城県つくば市並木 1-2-1

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

<sup>‡‡</sup>奈良県立医大〒634-8521 奈良県橿原市四条町 840

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

**キーワード** 体積熱容量, MRI 超音波同時撮像, 音速温度特性, 超音波加温, パルスエコー法, 脂肪肝,

## 1. はじめに

本プロジェクトのテーマ2は、生体組織の熱的特性のイメージングに関する。ここで着目する熱的特性は生体が体温を維持するために必要な機能を監視する物理量であり、それらの物理量から組織の生理学的状態を関連づけることにより、新しい診断情報を得ることを目的としている。生体中での温度変化は体積熱容量、熱伝導率、血液灌流率を用いた生体熱輸送方程式で記述される。本研究では超音波加温による温度上昇に関する体積熱容量に注目する。生体組織の体積熱容量  $C_v$  を表1に示した。

表1 生体組織の体積熱容量<sup>1)</sup>

生体組織名	体積熱容量 [J/cm <sup>3</sup> /K]
脂肪	2.0
筋肉	3.7
心臓	3.9
血液	3.8
肝臓	3.8

生体内部を超音波によって加温すると、組織中での温度上昇は、体積熱容量に加えて、超音波減衰係数、超音波強度に依存する。そこで、昨年度は超音波強度が既知、または注目領域で一定であると見なせるとし、減衰係数と体積熱容量の関数とする物理量の分布をイメージングできることを示した。これを  $C_\alpha = C_v/\alpha$  と定義した。表2に生体組織の  $C_\alpha$  の値を示した。表2に示した数値からわかるように脂肪が他の軟部組織にくらべて低い値を示している。

表2 生体組織の  $C_\alpha$  の値

Tissue name	$C_v$ [J/cm <sup>3</sup> /K]	$\alpha_0$ 2,3) [dB/cm/MHz]	$C_\alpha = C_v/\alpha_0$ [JMHz/dB/cm <sup>2</sup> /K]
脂肪	2.0	1-2	0.5-1.0
筋肉	3.7	0.5-1.0	3.7-7.4
心臓	3.9	0.2	20
血液	3.8	0.17-0.24	16-22
肝臓	3.8	0.6-0.9	4-6

一方、超音波加温によって組織の音速が変化するため、超音波パルスエコー法によって音速変化を推定する。そこで、イメージングのパラメータを音速変化とすると、それは  $C_v$  と減衰係数に加えて、音速の温度特性を反映した画像を得ることが期待される。生体軟部組織の音速は体温近傍に於いて正の温度係数を有するのに対して、脂肪は負の温度係数を有することが知られている。これらのことから脂肪肝のような病変の診断には有用な情報を提供することが期待される。

超音波加温によって生体内部の音速変化を測定する場合、加温前の生体内部の音速分布が既知であれば、測定精度は向上する。そこで、本研究では、MRI と超音波を同時撮像することによって音速を推定する手法についても検討を行ったので、報告する。

## 2. 超音波加温による熱的特性のイメージング

### 2.1. 超音波加温による音速変化の測定

生体内部を安全な温度上昇の範囲で超音波加温を行うと温度上昇は次式の生体熱輸送方程式で表される。

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

ここで、 $T$  は温度、 $t$  は時間、 $\kappa$  は熱伝導率、 $\Delta T$  は温度分布のラプラシアン、 $\varepsilon$  は血液灌流の時定数、 $q_v$  は熱発生量、 $C_v$  は体積熱容量である。超音波加温の場合は  $q_v$  は次式で与えられる。

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

ここで、 $\alpha$  は超音波の減衰定数、 $I$  は超音波強度である。超音波加温が比較的広い領域で温度上昇が短時間で小さければ、(1) 式の右辺第1項と第2項は無視できるため、温度の時間微分は次式で与えられる。

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

このときの音速変化は、次式で与えられる。

$$\frac{dc}{dt} = \frac{dc}{dT} \frac{dT}{dt} = \frac{dc}{dT} \frac{2\alpha I}{C_v} = \frac{dc}{dT} \frac{2I}{C_\alpha} \quad (4)$$

脂肪組織については  $dc/dT < 0$  であり、脂肪を除く生体軟部組織については  $dc/dT > 0$  であることが知られている。したがって、脂肪の含有率によって加温時の音速変化の時間微分値が大きく変動するため、音速変化のイメージングが期待される。

### 2.2. 実験

実験は図1に示すようなシングルプローブを用いた。このプローブは焦点距離 60 mm、直径 10 mm の凹面円形の共振周波数 5.2 MHz の音速測定用振動子の外周に、同軸で配置した内径 10 mm 外径 28 mm の凹面リング形状の共振周波数 3.2 MHz の加温用振動子を配置した。このプローブを用いて、生体組織模擬ファントムの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。試料は豚の筋組織と脂肪組織を用いた。

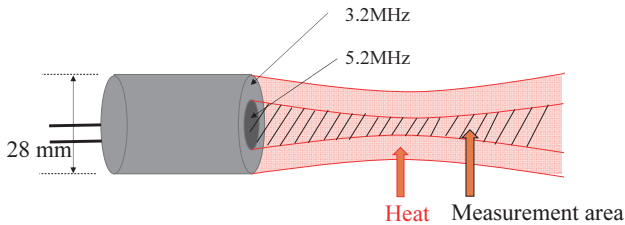


図1 同軸2周波数集束振動子による加温用超音波ビームとパルスエコー計測用超音波ビーム

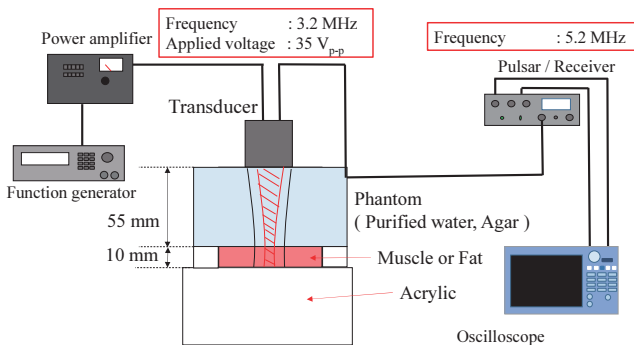


図2 実験系

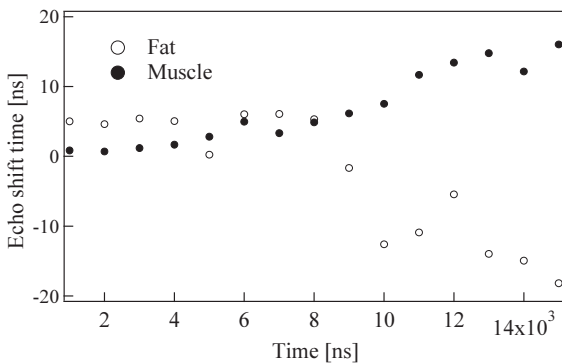


図3 測定結果

温度上昇前後に受信した2つのエコー信号に窓関数をかけてエコーシフト時間を算出した。窓関数の時

間幅を  $1 \mu s$  とし、時間軸方向に移動して算出したエコーシフト時間を図3に示す。焦点付近である横軸  $8 \mu s$  付近からエコーシフト時間に変化が生じた。筋組織の音速を  $1580 \text{ m/s}$ 、脂肪組織の音速を  $1444 \text{ m/s}$  とし、それぞれの音速変化を算出した<sup>3)</sup>。焦点距離における音速変化は筋組織では  $1.3 \text{ m/s}$ 、脂肪組織は  $-2.3 \text{ m/s}$  となった。

### 3. MRI 超音波同時撮像装置

MRI (日立メディコ社 1.5T) コイル内の高磁場環境下で使用可能な超音波プローブ (ジャパンプローブ社 256 素子) を試作した。ファントムは3層から構成され、シヨ糖濃度が上から 0%、10%、20%、境界にはパラフィルムを挿入した。超音波エコー画像は電子走査型装置 (マイクロソニック社 128 チャンネル) にプローブを接続して撮像した。ファントムの画像を図4に示す。MRI 画像から距離、超音波エコー画像から超音波伝搬時間を測定して、各層の音速を推定したところ、表3のような結果を得た。測定精度は 2 - 5 % となった。

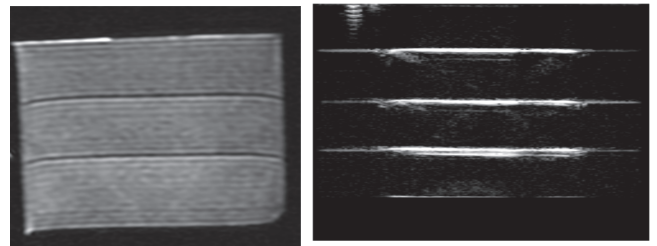


図4 ファントムの MR 画像(左)超音波エコー画像(右)

表3 音速推定値

シヨ糖濃度 [%]	0	10	20
音速 [m/s]	$1440 \pm 70$	$1570 \pm 40$	$1520 \pm 40$

### 4. おわりに

テーマ2の生体組織の熱的特性のイメージングに関する研究について述べた。

### 文献

- [1] National Council on Radiation Protection and Measurements, NCR Reports No.113, "Exposure Criteria for Medical Diagnostic Ultrasound: I. Criteria Based on Thermal Mechanisms", p.53, 1992
- [2] K.J.Parker, M.S.Asztely, R.M.Lerner, E.A.Shenk, R.C.Waag, "In-vivo Measurements of Ultrasound Attenuation in Normal or Diseased Liver", Ultrasound in Med. & Biol. 14(2), pp. 127-136, 1988
- [3] S.A.Goss, R.L.Johnston, F.Dunn, "Compilation of empirical ultrasonic properties of mammalian tissues.II", J.Acoust.Soc.Am, 68(1), 93-108,1980.
- [4] R.Seip, P.VanBaren, C.A.Cain, E.S.Ebbini, "Noninvasive Real-Time Multipoint Temperature Control for Ultrasound Phased Array Treatments", IEEE Trans. UFFC, 43(6), 1063-1073, 1996

# 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

飛龍 志津子<sup>†</sup> 小林 耕太<sup>‡</sup>

<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

E-mail: <sup>†</sup> shiryu@mail.doshisha.ac.jp, <sup>‡</sup> kkobayas@mail.doshisha.ac.jp

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

## 1. はじめに

テーマ3では, 生物による超音波利用の実態に学ぶべく, 音響行動に関する動態計測から生物による超音波の脳内信号処理に関する生理学的研究などを通じて, 医療技術への応用展開を目指している. 特に CF-FM 型コウモリが行う「補償行動」アルゴリズム<sup>[1]</sup>に着目し, 超音波ドプラ血流計測技術への応用へ向けた実験的検討も進めている.

今回, 野生下での CF-FM 型コウモリの超音波音声の記録に成功したことから, 彼らの超音波運用に関する考察を行った. 本研究で対象とするキクガシラコウモリは, 野生下での音響行動の計測はほとんど報告がない. また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への応用に関しては, 生体組織の周波数依存減衰がパルスドプラ法に与える影響を実験によって確認し, 中心周波数シフトと音圧を補償する手法による有効性の検討を行ったので報告する.

## 2. 野生下での CF-FM 型超音波の計測

キクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum nippon*) が生息する洞窟周辺の open space および雑木で覆われた cluttered space において, Y 字型マイクロホンアレイを用いて音声を記録した. また比較のため飼育下の同種個体を実験室下で自由飛行させ, その際の超音波音声の計測を行った. 野生下での cluttered space では, 実験室内と同じように超音波を 2-3 つ連続して放射していることがわかった. 一方, open space では interpulse interval (IPI) が非常に長く, 100-120 ms のほぼ一定の間隔で超音波が放射されていた (Fig. 1). また open space で放射されるパルスは, CF 部の前後の FM 部の周波数帯域がほぼ同じであるに対し, clutter space では連続パルスにおける 2 パルス目以降の開始 FM 部が殆ど放射されず, FM 音による情報更新が等間隔に繰り返されていた. またパルス長は open space の方が cluttered space よりも長く, キクガシラコウモリはパルスとエコーを時間的に重畳させてエコーロケーションを行うことから, パルス長より射程距離を推定したところ, Open space では約 8.5 -10 m, cluttered space では約 5.1 -6.8 m となった (Fig. 2). 野生下では周囲状況に応じて時間周波数構造やセンシングのタイ

ミングに変化がみられる結果となった. また野生下での飛行中におけるドプラシフト補償行動も確認できた.

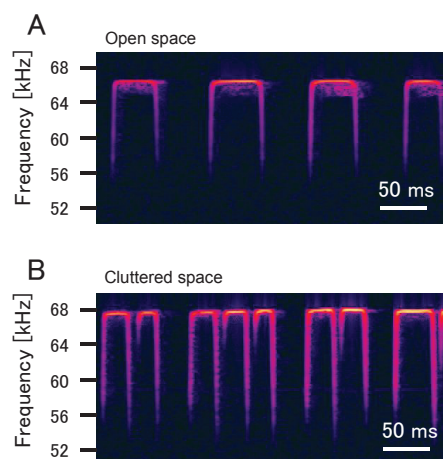


Fig.1 Spectrograms of typical echolocation pulses of wild *R. ferrumequinum nippon* in open space (A) and in cluttered space (B).

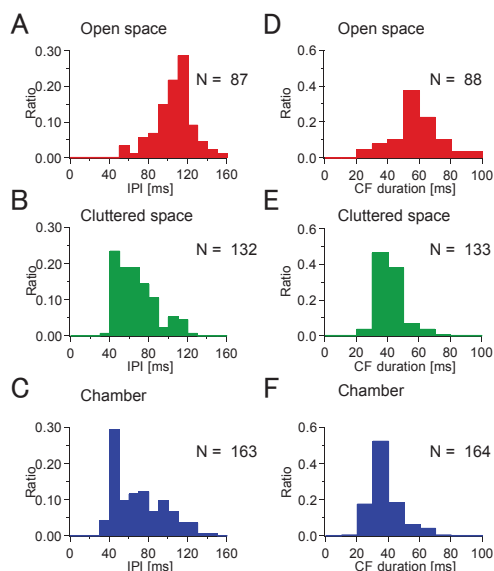


Fig.2 Histograms of IPI (left) and CF duration (right) of echolocation pulses emitted by wild *R. ferrumequinum nippon* in open space, cluttered space and flight chamber.

### 3. 超音波ドプラ血流測定精度に関する検討

生体組織内を超音波パルスが伝搬すると、周波数に依存した生体内の伝搬減衰によって、エコーの中心周波数が低域側へシフトする<sup>[2]</sup>。そのため送波パルスの中心周波数で直交検波すると信号対雑音比(SNR)が低下する。携帯型の超音波診断装置等では、直交検波を受波信号のサンプリングと同時に行う方式が採用されることがあるため、周波数依存減衰によってSNRが低下する。そこでコウモリの補償行動に学び、受波信号の中心周波数シフトから送波信号の中心周波数を補償して送波することで、直交検波周波数を変えることなくSNRの低下を避けることができる<sup>[3]</sup>。本報告ではその補償法の有効性を実験により確認した。

脱気水を満たした水槽内に流路として、血管を模擬したシリコンチューブを設置し、流路内には散乱体としてデキストラン(粒径 20 $\mu$ m)を含んだ脱気水を一定速度で流した。中心周波数 4.6 MHz、64 素子の超音波プローブ(ジャパンプローブ社曲探)を用いて生体組織模擬ファントムを透過した超音波を流路に照射し、得られたエコー信号のドプラ周波数を測定し、本補償法の適用有無による結果を比較した。ファントムの減衰定数は 0.6 dB/cm/MHz、厚さは 60 mm である。

例として、中心周波数 4.6MHz の超音波パルス(5波)を送信し、エコー信号に見られる中心周波数のシフト量(0.3 MHz)を補償した結果を Fig.3 に示す。エコーの中心周波数は 4.6 MHz に維持されている。また音圧の補償も同時に行い、周波数補償の有無によるドプラ・スペクトラムの比較から(Fig. 4)、補償によってピークがノイズレベルを超えることが確認できた。流路には一定流速で流しているが、径方向には流速分布があるため、ピークは広がった周波数範囲で観察されたと考えられる。ドプラ周波数の期待値は、補償前後で -49 Hz から 151 Hz へと上昇したことから、本補償法によってSNRが向上し、測定精度が向上する可能性が示唆された。

### 4. まとめ

CF-FM 型コウモリの野生下での超音波運用に関してはまだ多くが知られていない。コウモリの補償行動は元来、獲物からの弱いエコーを検知するための行動と考えられ、実際の野生下での行動適応の観測から新しい視点が得られると考えられる。引き続き動物を用いた行動実験を進めていきたい。また今回、生体組織の周波数依存減衰がパルスドプラ法に与える影響を、流路ファントムによる実験によって確認した。コウモリと同様に周波数と音圧の同時補償を適用したところ、その有効性が示唆される結果を得ることができた。

### 謝辞

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

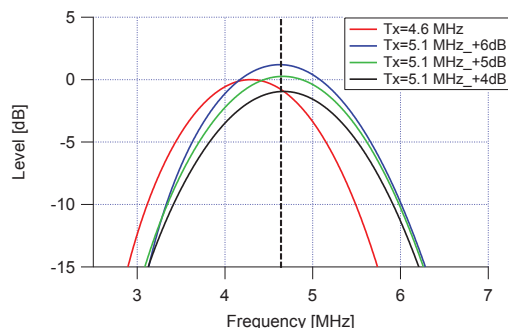


Fig. 3 Frequency characteristics of echoes returning from a water flow in a tube, transmitted through a 60 mm-thick phantom with 0.6 dB / (MHz\*cm).

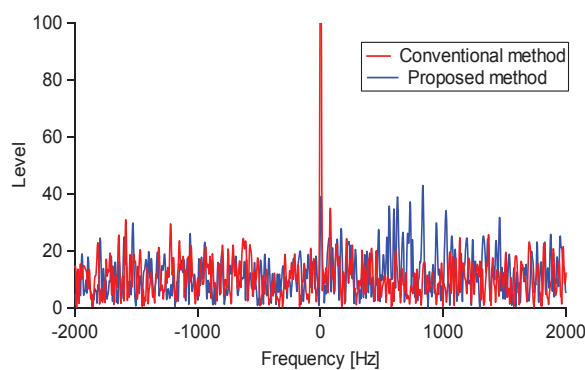


Fig. 4 Doppler frequency spectrum of echoes from a tube with frequency and intensity compensation (+0.5 MHz, +6dB).

### 文献

- [1] S. Hiryu, Y. Shiori, T. Hosokawa, H. Riquimaroux, and Y. Watanabe, "On-board telemetry of emitted sounds from free-flying bats: compensation for velocity and distance stabilizes echo frequency and amplitude," *J Comp Physiol A*, vol. 194, pp. 841-851, 2008.
- [2] 秋山いわき, "超音波イメージングにおける生体組織の周波数依存減衰の影響について—映像化距離に対する送信波形の検討—," *電子情報通信学会技術研究報告*, vol. 111, pp. 43-48, 2012.
- [3] 手嶋優風, 柏村祐樹, 飛龍志津子, and 秋山いわき, "受波信号によって送波信号を最適化する超音波ドプラ血流計測法の提案," *日本音響学会 2015 年春季研究発表会*, pp. 136-137, 2015.

# 超音波領域に関わるマウス深部下丘の生後発達における細胞表面マーカーの解析

藤本 久貴<sup>†</sup>

<sup>†</sup>九州大学 医学研究院 神経解剖学〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1

E-mail: <sup>†</sup>hisatakafujimoto328@gmail.com

キーワード 下丘, 抑制性, 興奮性, PV, NOS, GAD67, vGLUT2, ICC, 生理的聴覚形成後の生後発達

## 1. 背景

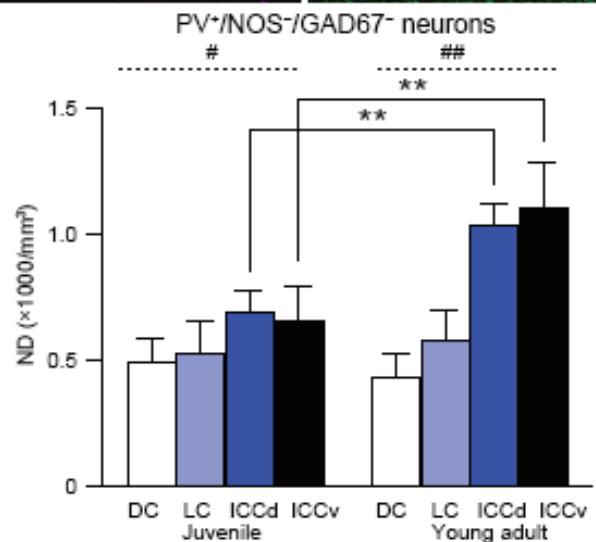
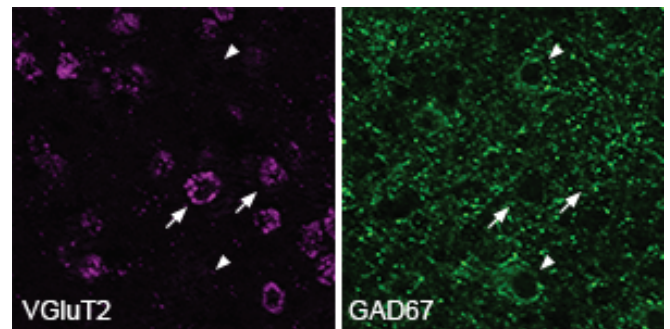
齧歯類の下丘 inferior colliculus(IC)は聴覚系の中で最も大きな神経核の一つで、神経細胞数は聴覚皮質とほぼ同じである。内耳よりの聴覚情報は様々な経路を経ていったん下丘に収斂したのち、上位に伝送される。下丘は聴覚情報を統合する神経組織として重要であるが、その神経回路特性は不明である。下丘特有の細胞マーカーは知られているが、多重染色を用いた詳細な解析は今までなされていなかった。また齧歯類においては、ICCと呼ばれる中心部の中でもより腹側にある領域 (ICCv) が超音波に対応すると言われているため、ICCvにおける細胞構築に特に注目して解析を行った。

## 2. 目的・方法

- マウス下丘の神経化学的細胞構築のP14以降の生後発達について調べた。この時期は生理的聴覚が概ね形成された以降に対応する。
- ニューロンをGABAergicとnon-GABAergicの二種類に分けて細胞密度を測定した。
- さらに parvalbumin (PV), nitric oxide synthase (NOS)を用いてニューロンを分類した。

## 3. 結果

- PV は代表的な抑制性神経のマーカーと考えられていたが、意外にも下丘では約50%のPV陽性細胞は興奮性であった。
- 生後発達において、抑制性ニューロン全体の細胞密度は変化しなかった。
- しかしPV, NOSで下位分類すると、生後発達に伴って細胞密度の変化が見られ、それは特にICCvで顕著であった。
- 抑制性ニューロンの中では、PV単独陽性ニューロンは生後発達で減少した。一方でPV・NOS両陽性ニューロンは増加し、逆方向の変化を見せた。
- 興奮性ニューロンの中ではPV陽性細胞は増加し、NOS陽性細胞は減少した。この傾向は、上記の抑制性ニューロンとは逆で鏡像のような変化であり、詳細は不明であるものの、システムチックな回路全体の再編成を示唆している可能性がある。



## 文 献

- [1] Adams JC. 1980. Crossed and descending projections to the inferior colliculus. *Neurosci Lett* 19(1):1-5.
- [2] Coote EJ, Rees A. 2008. The distribution of nitric oxide synthase in the inferior colliculus of guinea pig. *Neuroscience* 154(1):218-225.
- [3] Fredrich M, Reisch A, Illing RB. 2009. Neuronal subtype identity in the rat auditory brainstem as defined by molecular profile and axonal projection. *Exp Brain Res* 195(2):241-260.
- [4] Gray DT, Engle JR, Rudolph ML, et al. 2014. Regional and age-related differences in GAD67 expression of parvalbumin- and calbindin-expressing neurons in the rhesus macaque auditory midbrain and brainstem. *J Comp Neurol* 522(18):4074-4084.
- [5] Ito T, Bishop DC, Oliver DL. 2009. Two classes of GABAergic neurons in the inferior colliculus. *J Neurosci* 29(44):13860-13869.1989.





# 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

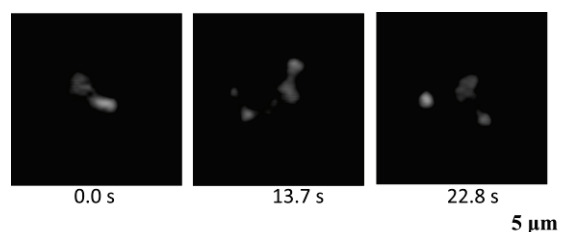
DNA damage can be categorized into base changes, cross linking, and single- and double-strand breaks (DSBs). Among them, the damage of DSBs is most serious and they lead to cancer and death.

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.

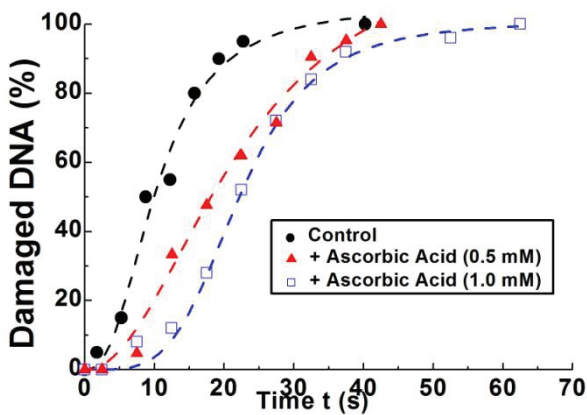


Figure 3: Protective effect of ascorbic acid against the double strand breaks caused by photo-irradiation.

#### 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.

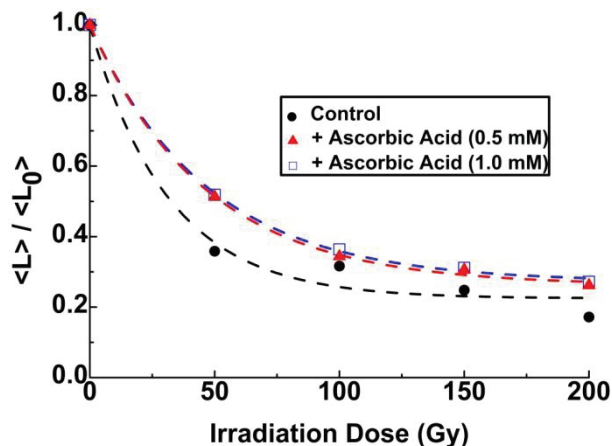


Figure 4: Protective effect of ascorbic acid against the double-strand breaks caused by  $\gamma$ -ray.

#### 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.

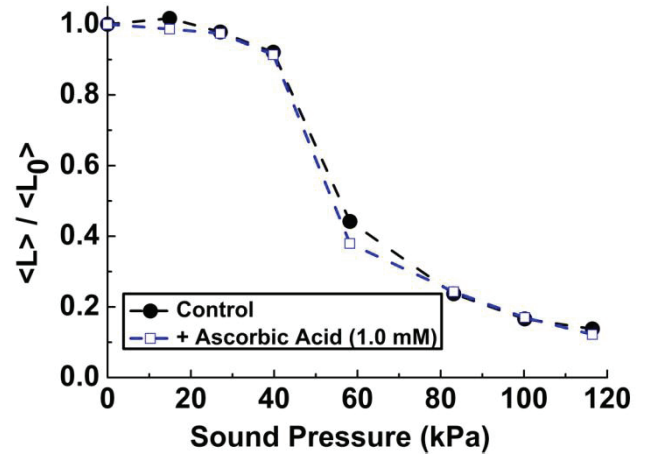


Figure 5: No apparent protective effect ascorbic acid against the double strand breaks caused by ultrasound.

### 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.

# DNA二本鎖切断のDMSOによる保護作用の違い —ガンマ線，光誘起活性酸素，凍結に引き起こされる損傷の比較—

野田雅美<sup>1</sup> 吉川研一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>同志社大学 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: 1 [dmp1024@mail4.doshisha.ac.jp](mailto:dmp1024@mail4.doshisha.ac.jp), [keyoshik@mail.doshisha.ac.jp](mailto:keyoshik@mail.doshisha.ac.jp)

キーワード DNA 二本鎖切断, DNA 一分子観察, 活性酸素, ガンマ線, 凍結保存

## 1. 研究背景

ヒトの DNA 分子は約 2m の巨大分子であり, この巨大な DNA 分子の二本鎖切断というものは, 放射線や紫外線の生体に対する影響の中でも, 最も重篤なものであるということはよく知られている. また, DMSO(dimethylsulfoxide) は, 細胞や組織の放射線障害, さらに凍結時の損傷を保護する作用のあることは経験的に知られている. しかしながら, DMSO の DNA に対する保護効果については不明な点が多い. そこで本研究では, 水溶液中に存在するゲノムサイズの DNA に対して, 様々な損傷刺激による DNA 二本鎖切断効率が, DMSO の存在によりどのような影響を受けるかを, 蛍光顕微鏡を用いた一分子観察の手法により, 定量的な計測を行ったので報告する<sup>[1][2]</sup>.

## 2. 研究方法

### 2.1 光照射実験

本研究では T4-DNA(166 kbp) を, 蛍光色素 YOYO-1 を用いて染色することで, 溶液中に活性酸素を発生させ, 溶液中の DNA 分子の一分子観察を行った. DNA 二本鎖切断を誘起する光源として, 青色光(450-490 nm)を用いて観察を行ない, 溶液に共存させる DMSO 分子の濃度を変化させて, DNA の二本鎖切断効率を調べた<sup>[1][2]</sup>.

### 2.2 ガンマ線照射

ガンマ線照射については, 光照射実験同様 DMSO 濃度を変化させた各サンプルに,  $\text{Co}^{60}$  による 0~1000 Gy のガンマ線照射を行った. 照射後のサンプルを蛍光顕微鏡により, DNA の全長を計測し, 非照射群と照射群で比較・検討を行った<sup>[1][2]</sup>.

### 2.3 凍結実験

凍結実験では, 各サンプルを  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  下で凍結させ, その後  $3\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下で解凍し, 観察した.

## 3. 実験結果

### 3.1 光照射実験

Fig.1 より, コントロール状態から, DMSO の濃度を高めることで, 未切断 DNA の割合が高まるこ

とが示され, DMSO は DNA 二本鎖切断の保護作用があることが示された. さらに, Fig.2 に示されるように, 切断時間の二乗に対して未切断 DNA の割合がほぼ比例関係に見られることから, 光による DNA 二本鎖切断は, 2段階で引き起こされているものと, 推定することができる.

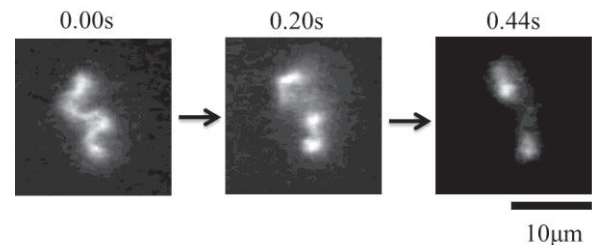


Fig.1 Fluorescence microscopic images of single DNA molecule under irradiation of blue (450-490 nm) light.

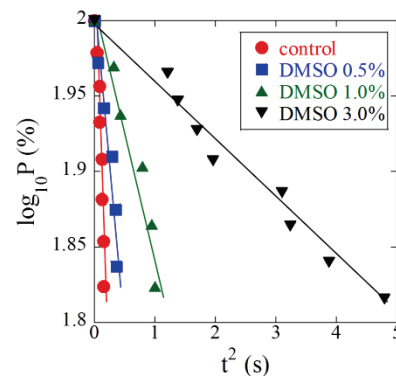


Fig.2 Probability of survival DNA after light irradiation at different concentrations of DMSO, vs. square of time ( $t^2$ ). (t: breaking time)

### 3.2 ガンマ線照射実験

Fig.4 より, DMSO 濃度を濃くすることで, 平均の DNA 長がより長く保たれる事から, DMSO によって DNA 二本鎖切断保護効果が確認された.

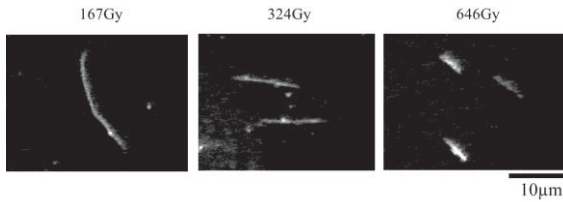


Fig.3 Fluorescence microscopic images of DNA molecules stretched on glass surface.

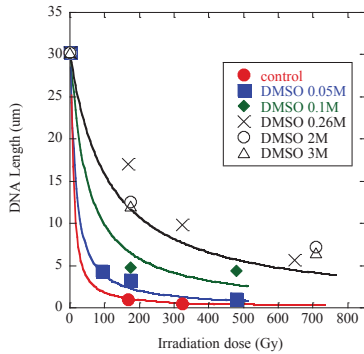


Fig.4 DNA length vs. dose of gamma ray (Co<sup>60</sup>)

### 3.3 凍結実験

Fig.5 より, DMSO 濃度を濃くすることで DNA 二本鎖切断が低減され, 平均の DNA 長がより長く保たれた。また, より低い温度で凍結させることで, DNA 長が保たれることが明らかとなった。

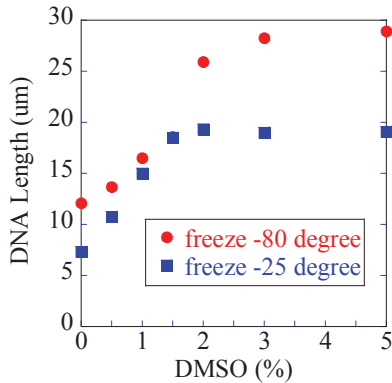


Fig.5 Probability of survival DNA after the procedure of freeze-and-thaw vs. DMSO concentration.

### 4. 考察

これらの3実験について, DMSO の効果を定量的に評価した。

光照射による DNA 二本鎖切断効率は, 実験結果により式(1)を用い, 評価した。ここで,  $x_0$ : コントロール時の未切断 DNA の割合,  $x$ : 未切断 DNA の割合,  $t$ : DNA 切断までの時間(s)とする。

$$\ln(x/x_0) = -At^2 \quad (1)$$

また, ガンマ線, 凍結実験については切断回数で評価を行った。これら3実験についてまとめたものが Fig.6 である。

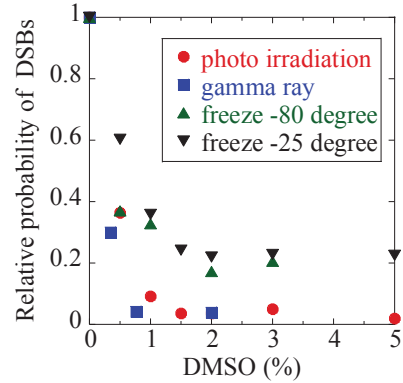


Fig.6 Comparison of protective effect of DMSO on DNA against the double strand breaks caused by light, gamma ray and freeze.

Fig.6 より, 光照射・ガンマ線照射による DMSO の損傷保護は, DMSO 約 1.5~2.0 % という低濃度で十分な効果が見られ, それ以上 DMSO 濃度を高めても, 保護効果は強まらないということが明らかとなった。

### 5. 結論

・光照射, ガンマ線照射, さらに凍結実験で, DMSO による DNA 二本鎖切断保護効果が確認された。

・光照射, ガンマ線照射に対しては, DMSO 約 1.5~2.0 % 以上で保護効果は強まらないのに対し, 凍結では, DMSO 5.0 % 程でも約 8 割程度の保護効果にとどまる。これは, 光照射やガンマ線による損傷では, 活性酸素が主たる原因となっており, これが DMSO の抗酸化作用により抑制されたものと推定される。一方, 凍結損傷では, 物理的なストレスによるものと考えられ, DMSO の添加は氷の結晶形成を抑制していると考えられる。

### 謝辞

本研究を遂行するにあたり, 適切なお指導を頂きました吉川研一教授始め, 同志社大学生命医科学研究科 剣持貴弘教授, 吉川祐子客員教授に深く感謝いたします。

### 参考文献

- [1] Y. Ma, et al., *Chem. Phys. Lett.*, 638, 205(2015).
- [2] Y. Yoshikawa et al., *Chem. Phys. Lett.*, 501, 146-151 (2010).

## 超音波照射下におけるマイクロバブルの膜材質と内部気体が振動特性に与える影響

安藤優<sup>1)</sup>, 西村ジュン<sup>1)</sup>, 香川幸大<sup>1)</sup>, 田畑拓<sup>1)</sup>, 吉田憲司<sup>2)</sup>, 小山大介<sup>1)</sup>, 渡辺好章<sup>1)</sup>,

Krafft Marie Pierre<sup>3)</sup>

1)同志社大学 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

2)千葉大学 〒263-8522 千葉県稲毛区弥生町 1-33

3)Institut Charles Sadron, Centre National de la Recherche Scientifique, France

E-mail: †dmp1001@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード Microbubble, Shell material, laser Doppler vibrometer

### 1. はじめに

マイクロバブルは現在の医療分野において、超音波診断時の悪性腫瘍の早期発見を助長するターゲティング・バブルや、超音波による薬物伝達システム (Ultrasound Drug Delivery System:UDDS) の薬物キャリアとして注目されている。一般的に超音波照射下におけるこれらのバブルの振動挙動は、バブル周囲に形成される分子膜材質の弾性率、界面張力、質量、粘性などに依存することが知られており、膜材質の濃度を変化させることでこれらの値は変化する。特に界面活性剤などの分子膜を持つマイクロバブルの共振周波数は、膜物質の質量、弾性、界面張力に依存することをChurchや、Strideらが報告している<sup>[1, 2]</sup>。分子膜の影響により、バブルの弾性率は上昇し、同じサイズの膜を持たない空気バブルと比較した場合、共振周波数は高くなる。いずれの応用例においても効率的にマイクロバブルを強く振動、もしくは破壊させることが必要であるため、バブルの振動特性を詳細に知ることは重要である。

これまで、低音圧駆動下における単一のマイクロバブルの振動観測の報告例は少ない。本報告では、マイクロバブル周囲に分子膜を形成させ、それが超音波照射下の振動に与える影響について検討する。

### 2. 膜材質

本報告では生体に対して無害であり、様々な分野で応用されている Pluronic F<sub>68</sub> を分子膜材質として使用した。構造として親水基ブロック (ポリプロピレンオキサイド) の両端に疎水基ブロック (ポリエチレンオキサイド) を持つトリブロックポリマで、非イオン性ポリマー界面活性剤である。マイクロバブルの作成にも応用されており、他の両親媒性分子の吸着速度を高める効果があると考えられている。

### 3. 実験方法

#### 3.1. マイクロバブルの振動挙動

Fig. 1 に実験系を示す。バブル振動の計測システムは、20倍対物レンズ (M Plan Apo20×, Mitutoyo) を装着したレーザドップラ振動計 (LDV, NLV-2500, Polytec) と観測セルで構成される。内部を脱気水で満たした直方体型アクリル製セルの底面にランジュバン型振動子 (Fuji ceramics, FBL28452HS) を接着する。作成したマイクロバブルをカバーガラスに付着させ、セル内に設置する。振動子に共振周波数 38.8kHz の連続正弦波を入力すると、セル内には定在波音場が形成される。セル上部に LDV を固定し、そのレーザ焦点をバブル頂点に合わせることで、バブルの振動振幅を測定する。本実験で用いた対物レンズの焦点距離は 20 mm、レンズで集光された LDV のレーザのスポット径は 1.5 μm である。LDV にはカメラが内蔵されており、その映像からバブルの初期半径を取得できる。

#### 3.2. Pluronic バブルの作成方法

Pluronic バブルの作成方法は以下の通りである。

##### ① Pluronic F<sub>68</sub> 水溶液

Pluronic F<sub>68</sub> 水溶液 (濃度 0.1, 1 mM/300 ml) を作成する。

##### ② 内部気体 N<sub>2</sub>/PFH の作成

内部気体であるパーフルオロヘキサン (PFH) は水への溶解度が低く、水中におけるバブルの時間安定性を高める。本実験では PFH と窒素の混合気体をバブルの内部気体として使用する。N<sub>2</sub>/PFH を PluronicF<sub>68</sub> 水溶液 (1 mL) が入った小瓶内の気体と置換する。その後、N<sub>2</sub>/PFH が充填された水溶液を超音波ホモジナイザ (LCC, QSONICA, Q125) で 1 分間混合しマイクロバブルを作成する。

#### 4. 実験結果

Fig. 2に超音波の振幅値 1.5 kPaにおける Pluronic バブルと比較のために作成した周囲膜を持たない PFH バブル, 空気バブルの振動特性を示す. 横軸はバブル半径, 縦軸は初期半径に対する振動変位  $(R-R_0)/R_0$  ( $R_0$ : 初期半径,  $R$ : 瞬時最大半径) である. Pluronic バブルは膜を持たない PFH・空気バブルに比べ, 最も振幅が大きくなる共振半径が小さいことがわかる. 超音波造影剤では, 周囲膜による弾性の増加によりその共振径は増大することが一般的であるが, 本結果はそれとは逆の特性を示している. また, Pluronic 濃度の増加と共に, 共振条件下における振動振幅は減少したが, その原因としては Pluronic 分子膜による粘性の増加が考えられる.

本計測システムではレーザ照射位置をバブル頂点に合わせる必要があるため, 観測するバブル径が小さくなるにつれ, 測定値の不確かさは増大する. そのためバブルの振動変位と駆動音圧の位相差を測定することで共振周波数を推定した(バブル振動は共振径を境に駆動音圧との位相差が 180 度反転する). Fig. 3 は各 Pluronic 濃度におけるバブル振動の音圧に対する位相変化を表している. また測定値に対する近似曲線を併せて示している(バブル半径 0, 200  $\mu\text{m}$  の位相差をそれぞれ 180,  $0^\circ$  と仮定している). 位相差  $90^\circ$  での半径を共振半径と仮定すると, Pluronic 濃度 0.1, 1 mM の共振半径はそれぞれ 55, 37 と推定される. Fig. 2 に示した 1 mM の結果では, 振動振幅が最も大きいのはおよそ  $39\mu\text{m}$  の時であることから, これと比較した場合ほぼ同じ値をとることがわかる. 一般的に界面活性剤は界面張力を下げる効果があるため, バブルの弾性が低下し, 共振半径が減少したと言える. 一方で Pluronic 周囲膜はバブル表面に単分子膜を形成し, 分子間力で分子同士が結合している. Pluronic 濃度が上昇すると, バブル表面の分子密度が増加し, 全体的な分子間の結合エネルギーが強まり, 弾性は増加すると考えられるが, Fig. 2 ではトータルの弾性は低下し, 共振半径は減少している. これより, 相対的に界面張力の低下により弾性を下げる働きが支配的であるため共振半径が低下したと考えられる.

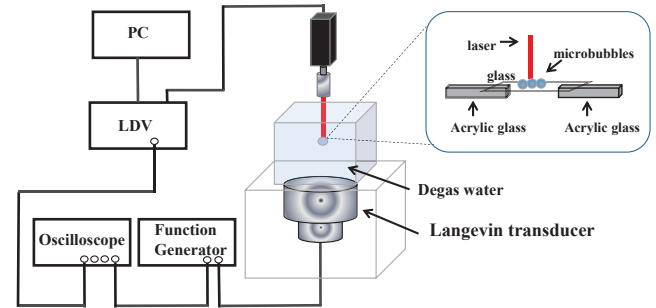


Fig. 1 Experimental system.

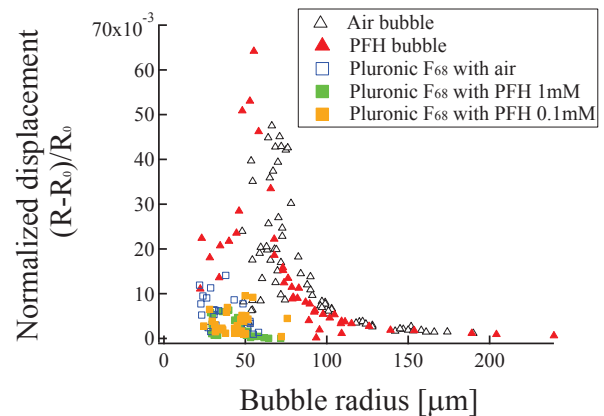


Fig. 2 Comparison between the normalized displacements of air, PFH and Pluronic bubbles excited at 1.5 kPa.

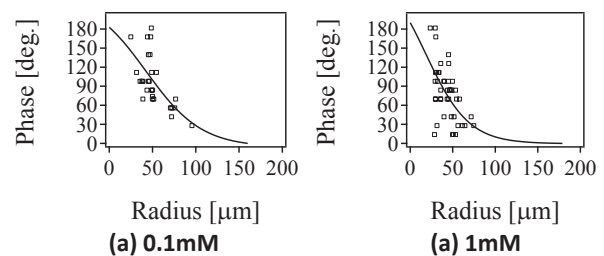


Fig. 3 Phase differences between the driving sound pressure and the vibrational displacement on Pluronic bubbles with several densities.

#### 文 献

- [1] Church, Charles C. "The effects of an elastic solid surface layer on the radial pulsations of gas bubbles", *J. Acoust. Soc. Am*, 97.3 (1995), 1510-1521.
- [2] E. Stride, "The influence of surface adsorption on microbubble dynamics", *Phil. Trans. R. Soc. A*, 366 (2008), 2103-2015.
- [3] S. Morioka, et al., "Sound pressure threshold of non-spherical oscillation of an attached bubble evaluated by a laser Doppler vibrometer", *Proc. IEEE IUS*, (2012), 767-770.

# 骨表面組織における超音波照射による温度上昇について

高野 わかな<sup>†</sup> 新田 尚隆<sup>††</sup> 石黒 保直<sup>†††</sup> 笹沼 英紀<sup>†††</sup>

谷口 信行<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> 産業技術総合研究所 〒305-8564 茨城県つくば市 1-2-1

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

E-mail: <sup>†</sup> dmq1040@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード 音響放射力, 温度上昇, 安全性, 骨表面, TMM ファントム, 安全指標

## 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  $I_{\text{spta},\alpha}$  (Intensity Spatial Peak Temporal Average)  $\leq 720 \text{ mW/cm}^2$  かつ MI (Mechanical Index)  $\leq 1.9$  が設定されている。Ispta 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る。

また, 超音波ビームの焦点近傍に骨が存在する場合, 骨表面での温度上昇が大きくなると指摘されている<sup>1)</sup>。そこで本報告では, ウサギ大腿骨に超音波照射し, 骨表面における温度上昇を測定した。また, 鶏骨を生体模擬ファントム TMM (Tissue Mimicking Material) に埋め込み, 超音波照射時間と骨表面温度を測定した。

## 2. 超音波診断装置の安全基準

### 2.1. MI

MI (Mechanical Index) 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, キャビテーションの原因となる超音波負音圧の影響を表す。MI は式 (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。

### 2.2. $I_{\text{spta}}$

$I_{\text{spta}}$  は超音波バーストを照射したときの音場中で最大強度となる焦点における時間平均値であり, 式 (2) で表される。

$$\begin{aligned} I_{\text{spta}} &= \frac{1}{T} \int_T i(t) dt \\ &= \frac{1}{T} \int_T \frac{p^2(t)}{\rho c} dt \quad [\text{mW/cm}^2] \end{aligned} \quad (2)$$

$T$  はバースト波の照射間隔,  $i(t)$  は超音波強度,  $p(t)$  は瞬時音圧,  $\rho$  は媒質中の密度,  $c$  は媒質中の音速である。生体内の軟部組織における減衰は平均で  $0.54 \text{ dB/cm/MHz}$  程度である<sup>2)</sup>。そのため実際より少ない値で仮定することで, より安全な基準を定めることができる。そこで生体内の超音波減衰を  $0.3 \text{ dB/cm/MHz}$  と仮定し計算したものを  $I_{\text{spta},3}$  という。

## 3. 実験方法

### 3.1. 動物実験

実験系を Fig. 1 に示す。体重約 3 kg のウサギ (ジャパニーズホワイト) を使用して麻酔下にて実験を行った。集束型超音波振動子 (共振周波数 2.5 MHz, 口径 12.5 mm, 焦点距離 25 mm) に Fig. 2 に示すように, 温度上昇を測定するための熱電対挿入用貫通孔  $\phi = 2.5 \text{ mm}$  を設けた。その孔にガイド用シースを装着し, その内部に熱電対を通すことで, 焦点位置に熱電対測温接点を容易に配置できる構造となっている。超音波出力が,  $I_{\text{spta},3} = 715 \text{ mW/cm}^2$ ,  $MI = 1.8$  となる条件で実験を行った。ファンクションジェネレーター (Tektronix, AGF3021B) の設定を, 入力電圧  $300 \text{ mV}_{\text{pp}}$ , 周波数 2.5 MHz とし, 持続時間及び PRT (Pulse repetition time) をそれぞれ (4.24 ms, 2 s), (10.6 ms, 5 s), (21.2 ms, 10 s) の 3 つの条件に設定してバースト波を出力し, 定格利得 55 dB のパワーアンプ (E&I, 1040L) で増幅し, 1000 秒間ウサギ大腿骨へ超音波照射を行った。熱



電対  $\phi = 0.15 \text{ mm}$  (K 型) を測定対象内に挿入し、超音波焦点と熱電対測温接点との位置合わせを行い、超音波照射時間と温度上昇の最大値、MTR (Maximum Temperature Rise) を測定した。

### 3.2. ファントム実験

ファントム実験も動物実験と同様の実験条件で行い、ファントム実験では持続時間及び PRT は (4.24 ms, 2 s), (10.6 ms, 5 s) の 2 つの条件で行った。ファントムの詳細を Fig. 3 に示す。動物実験と同様の振動子をアームで固定後、ガイド用シースを用いて超音波焦点と熱電対の測温接点との位置合わせを行い、1000 秒間骨表面へ超音波照射を行った。今回用いたファントムは IEC60601-2-37 の規格に基づき作成した。

### 4. 結果と検討

実験の結果を Fig. 4 に示す。Fig. 4 の結果から動物実験では、持続時間が 4.24 ms, 10.6 ms, 21.2 ms の時、MTR はそれぞれ最大で 0.60°C, 0.99°C, 1.78°C となった。世界超音波医学生物学連合 (WFUMB) のガイドラインでは温度上昇が 1.5°C 未満では生体に悪影響をおよぼさないとされているが個体によって、音響出力が規制範囲内であるにもかかわらず 1.5°C を超える値が測定された。ファントム実験では、持続時間が 4.24 ms, 10.6 ms の時、MTR はそれぞれ 1.16°C, 1.80°C となった。ファントム実験、動物実験共に音響出力が  $I_{\text{spta},3} = 715 \text{ mW/cm}^2$ ,  $MI = 1.8$  と同一にもかかわらず温度上昇の最大値はパルス持続時間と直線関係を示した。さらに動物実験とファントム実験を比較すると、どの持続時間でもファントム実験での MTR の方が大きかった。これは血液のかん流率が影響するため動物実験では温度上昇が抑制されたと考えられる。

### 5. まとめ

本報告ではウサギ大腿骨と TMM ファントム中の鶏骨に超音波照射した場合の、骨表面の温度上昇を測定した。その結果、 $I_{\text{spta},3} = 715 \text{ mW/cm}^2$ ,  $MI = 1.8$  の超音波照射に対してそれぞれの MTR は、ウサギ大腿骨表面で持続時間が 21.2 ms の時 1.78°C、ファントム中の鶏骨表面で持続時間が 10.6 ms の時 1.80°C であった。

### 文献

- [1] Herman BA, Harris GR. "Models and regulatory consideration for transient temperature rise during diagnostic ultrasound pulses. Ultrasound", in Medicine & Biology, pp.17-24, 2002
- [2] Martin O. Culjat; David Goldenberg, Tewari Priyamva, Rahul S. Singh, "A Review of Tissue Substituts for Ultrasound Imaging", in Medicine & Biology, pp.861-873, 2010

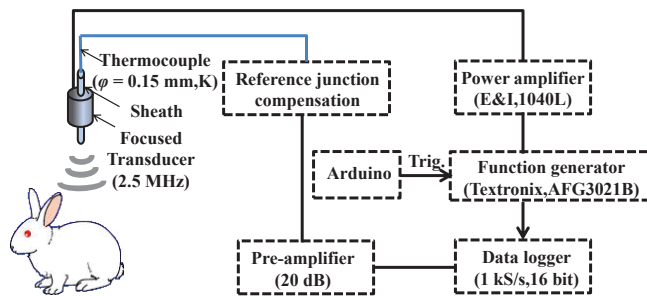


Fig. 1 Measurement system of temperature rise.

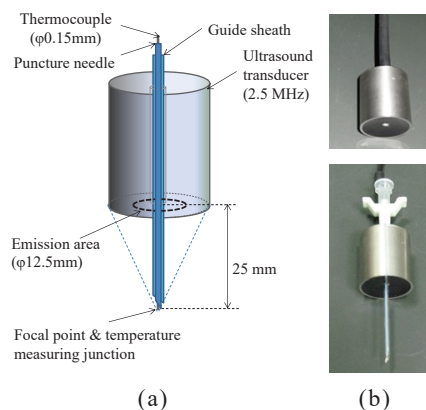


Fig. 2 (a) Schematic illustration of the transducer.  
(b) Transducer with needle and thermocouple.

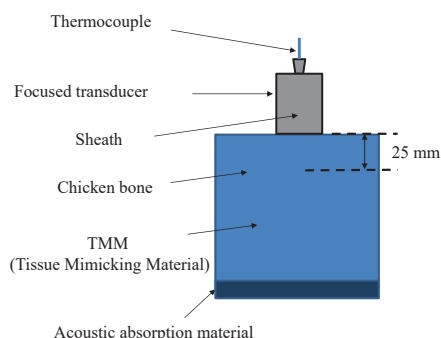


Fig. 3 Schematic illustration of experimental setup using chicken bone in TMM phantom.

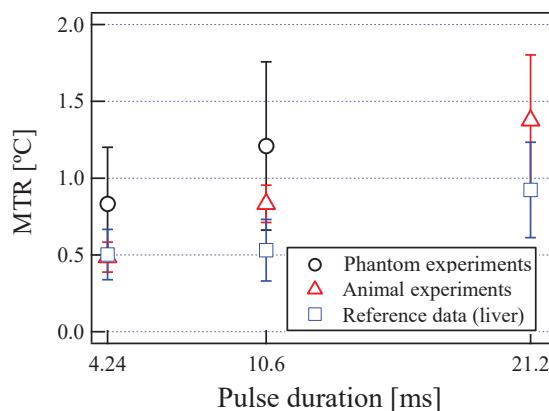


Fig. 4 The relationship MTR and pulse duration.

# 超音波照射による生体影響の検討 —メダカ胚プロテオーム解析と代謝物のイメージング質量分析法—

阪口 裕暉<sup>1)</sup> 松本 恵李那<sup>1)</sup> 吉田 憲司<sup>2)</sup> 殿山 泰弘<sup>3)</sup> 池川 雅哉<sup>4)</sup>

廣瀬 まゆみ<sup>1)</sup> 秋山 いわき<sup>1)</sup> 渡辺 好章<sup>1)</sup>

1) 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

2) 千葉大学 フロンティア医工学センター 〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33

3) 慶應義塾大学 先端研・GSPセンター 〒108-8345 東京都港区三田 2-15-45

4) 同志社大学 生命科学部 医生命システム学科 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

E-mail: 1) dmq1034@mail4.doshisha.ac.jp, 2) dmq1024@mail4.doshisha.ac.jp

**キーワード** 超音波, キャピテーション, メダカ, プロテオーム解析, イメージング質量分析

## 1. はじめに

超音波は放射線等に比べて非侵襲な方法として医療分野において広く普及している。近年、診断分野では装置機能や動作モードの多様化により音響出力は増加、治療分野では超音波の生体作用を積極的に利用する傾向にある。より安全に使用するためにも、超音波による生体影響の安全域について個体レベルから組織や細胞レベルを対象に、詳細に理解する必要がある。

本研究は、超音波の生体影響や、安全な照射条件の定量的評価の目安となるバイオマーカーの捜索を目標としている。実験動物として、メダカを用いた。これまでの実験で、メダカ胚を対象に低周波領域の照射実験をし、キャピテーションの発生とメダカ胚損傷の関連性について検討を行った。全胚を対象とした遺伝子の発現変動解析を行い、変動幅の大きかった遺伝子群からタンパク質や代謝物レベルの影響についての検討が必要と考えられた。そこで本研究では、まずタンパク質の網羅的解析であるプロテオミクスに着目した。超音波照射の有無によってメダカ全胚から抽出したタンパク質の総体の変化を解析する目的で複合体評価のための二次元電気泳動法を使用した。

本報告では、超音波照射により変化の見られた約45kDaのタンパク質を質量分析法によって決定した。その結果、高い信頼性を持って本タンパク質はメダカ由来の「酵素A」と同定できた。「酵素A」は、生体内の主要な代謝経路に関わる酵素であることから胚発生期における超音波照射の影響を受けた成魚の肝臓組織を対象とした代謝物の網羅的解

析を行うこととした。

## 2. 原理

### 2.1. 二次元電気泳動法 (2D BN/SDS-PAGE) <sup>[1]</sup>

タンパク質複合体をネイティブ状態で二段階に分けて分離する方法である。BN (Blue Native) -PAGE では、クマシーブルー染色液を用いてタンパク質を染色し、タンパク質の高次構造や複合構造を保持したまま分子の大きさによって分離する。さらに、還元剤を用いた SDS - PAGE で、標的の複合体に含まれる個々のタンパク質組成についても調べることが可能である。

### 2.2. 代謝物のイメージング質量分析法<sup>[2]</sup>

メダカ成魚の新鮮凍結切片を作製し、組織化学的に肝臓のオリエンテーションを決定した。定法に従いマトリクス 9-amino acridine (9AA) を塗布し、顕微質量分析 iMScope(島津製作所)を用いて代謝物のイメージングを試みた。

## 3. 実験方法

### 3.1. サンプル作製実験

解析用サンプル作製にあたり、超音波照射条件は、周波数 30 kHz で音圧 20, 100, 150 kPa と定め、非照射を含め 4 条件とした。また、メダカ胚は径 1 mm, 受精後 4 日目のものを用いた。サンプル数は各条件 5 個とし、計 20 個作製した。

超音波照射系を Fig. 1 に示す。実験セル(80×80×50 mm<sup>3</sup>) を脱気水で満たし、マイクロチューブ内に寒天ゲルで型を作り、中央部に設置した。チューブ内にメダカ胚と気泡核溶液 0.1 mL を入れ、60 秒間照射した。それらの解析用サンプルを 1 時間経過後、液体窒素を用いて凍結させて保存した。

### 3.2. タンパク質解析実験

凍結保存されていたサンプルを、氷上（0℃）で、ECL lysis buffer を用いて解凍した。次に、メダカ胚からのタンパク質抽出方法として、ジルコニア製破碎ビーズ（φ2.0 mm）を3個用いて破碎器（Micro Smash）で60秒（5500 rpm）振動させることで組織・細胞構造の破碎を確認し、可溶性タンパク質の回収を行った。その後、タンパク質の抽出溶液を一次元目のBN-PAGEを用いて分離し、さらに二次元目の電気泳動を行い、銀染色により染色像を得た。候補タンパク質はゲル上から切り出し、In-gel digestionにより処理を行った後、質量分析しタンパク質の同定を試みた。

### 3.3. 代謝物のイメージング質量分析法

通常の量の餌を与えた場合と通常の4倍の量の餌を与えた場合の雌の成魚のメダカ2匹を液体窒素で凍結させ、クライオスタットを用いて厚さ10μmの肝臓切片を作製した。作製した切片をITO膜スライドガラスにのせ9-amino acridine(40 mg/mL 9-amino acridine in 70% methanol)をハンドスプレー法で塗布した。顕微質量分析 iMScope の設定は、負イオンモードでピッチ50μm、測定範囲250~900 m/z、積算回数1回/pixel、検出器電圧2.10 kV、レーザー照射圧4、レーザー強度72とした。解析ソフトウェアはIMS Solution を用いた。測定原理を Fig.3 に示した。

## 4. 結果・考察

二次元電気泳動法の結果、銀染色により変化の認められた領域を Fig. 2 に示す。Control と比較して、150 kPa まで音圧を上げていくにつれ次第に濃く変化しているタンパク質スポットを確認した。

超音波照射により変化の見られた約45kDaのタンパク質を質量分析法によって「酵素A」と同定した。37%のペプチド配列が一致していたので、高い信頼性を持って本タンパク質はメダカ由来の酵素であると同定できた。「酵素A」は、生体内の主要な代謝経路に関わる酵素である。よって、抗体を用いたタンパク質レベルの再現性を確認すると同時にメタボロミクス観点からメダカ成体肝臓組織を対象とした代謝物の定量を行うことにより本観察を検証することが可能である。

現在、メダカ成魚の肝臓組織を対象とした代謝物のイメージング質量分析法の標準化を行っており、メダカに特異的な胆汁酸をはじめとする代謝物の解析が有効と考えられた。

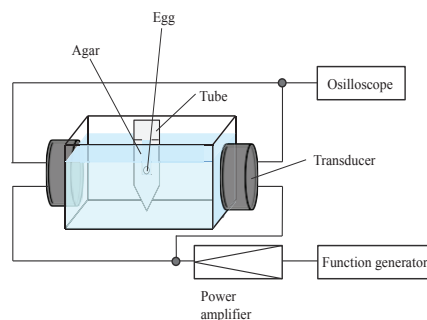


Fig. 1 Experimental System.

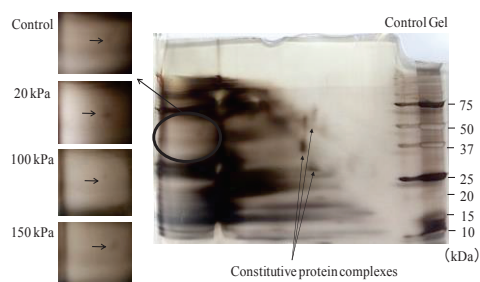


Fig. 2 The result of 2D BN/SDS-PAGE.

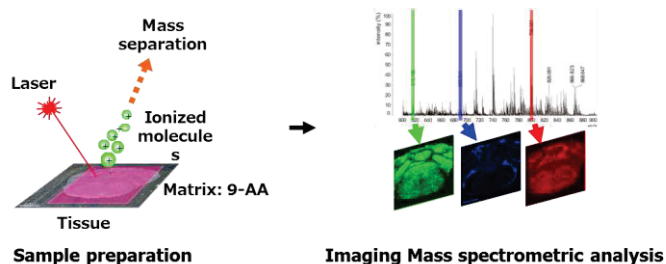


Fig. 3 MALDI-Imaging Mass Spectrometry

## 5. まとめ

本報告では、メダカ胚プロテオームに着目し、照射音圧の違いによるタンパク質複合体解析から、変動タンパク質として「酵素A」を同定した。さらに、超音波照射による代謝物の変化をイメージング質量分析計を用いて、特に成体肝臓における代謝物のイメージングを行った。今後は、メダカ胚への超音波照射とメダカ成魚肝臓組織を対象とした解析系の確立を目指す予定である。

## 参考文献

- [1] Margarita M. Camacho-Carvajal, *et al.* Two-dimensional Blue Native/SDS Gel Electrophoresis of Multi-Protein Complexes from Whole Cellular Lysates. *Molecular & Cellular Proteomics* 3.2. P. 176-182. (2004).
- [2] Toshihiko Matsumoto, Shuji Terai, Toshiyuki oishi, "Medaka as a model for human nonalcoholic steatohepatitis," *Disease Models & Mechanisms*, 3, pp. 431-440, 2010.

# MHz 帯超音波照射に伴う DNA 損傷の音圧依存性

山下 悠介<sup>†</sup> 吉田 憲司<sup>‡</sup> 剣持 貴弘<sup>†</sup> 吉川 祐子<sup>§</sup> 吉川 研一<sup>†</sup> 渡辺 好章<sup>†</sup>

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

<sup>‡</sup>千葉大学 〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33

<sup>§</sup>立命館大学 〒525-0058 滋賀県草津市野路東 1-1-1

E-mail: <sup>†</sup>dmp1038@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード DNA 二重鎖切断, キャビテーション, 周波数

## 1. はじめに

超音波照射が生体に対する影響を考えることは、超音波の生体に対する安全性の側面や次世代治療技術への応用展開にとって重要である。超音波照射による DNA 分子の損傷は細胞死との関連性が強く指摘されている現象であり、そのメカニズムの解明が求められている。過去の研究において超音波照射に伴うキャビテーションの発生と DNA 損傷の関連性が指摘され、キャビテーションが細胞膜やミトコンドリアに働きかけることで間接的に DNA 損傷を誘導することが報告されている<sup>1)</sup>。一方、キャビテーションが DNA 分子そのものに直接的に作用し、損傷を与えるのかは十分明らかになっていない。

DNA の損傷は塩基の置換や架橋、鎖の切断に分類される。DNA 分子の二本の鎖の両方が切断される二重鎖切断は特に修復が困難な損傷として知られており、これを定量評価することが課題となる。

また、生体外に存在する DNA 分子を対象にすることで、キャビテーションの直接的な作用によって引き起こされる二重鎖切断を評価できると考えられる。数十 kHz の低周波超音波を使用したこれまでの研究において、キャビテーションが発生する閾音圧と二重鎖切断が生じる閾音圧がほぼ同程度であることを確認し、キャビテーションにより DNA 分子の二重鎖切断が引き起こされることを実験的に示した。

超音波凝固切開装置などの治療デバイス応用も含めると超音波医用応用で使用される周波数帯は MHz 帯である。そこで本報告では、実際に医療応用で使用される MHz 帯超音波を照射した際、二重鎖切断の音圧依存性について検討する。

## 2. キャビテーション

キャビテーション現象とは、液体中の圧力が低下した際に液体の沸騰（蒸気キャビテーション）や溶解気体の析出（ガスキャビテーション）によって液体中に存在する気泡核と呼ばれる微小気泡が急激に成長する現象である<sup>2)</sup>。発生した気泡が超音波による圧力変動に伴って振動・消滅する際に、周囲に物理的、化学的作用を与えることが知られており、これらが生体に悪影響を与えることが懸念されてい

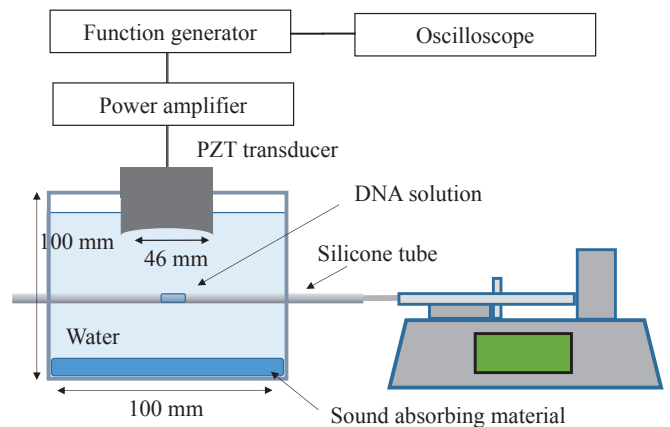


Fig. 1 Ultrasound exposure system.

る。また、音波の周波数が高くなるに伴いキャビテーション発生時の閾音圧は大きくなることが知られている。その要因として、音波の周波数が高くなり一周あたりの負圧の時間が短くなるため、気泡が成長するのに十分な時間が無くなるということが挙げられる。

## 3. 実験方法

### 3.1 照射用 DNA 溶液の作成

超音波照射用 DNA 溶液として 0.1  $\mu\text{M}$  の T4 フェージ DNA (165 kbp, 57  $\mu\text{m}$ ) 溶液を作成した。予め蛍光式溶存酸素計で溶存酸素量 (DO) を測定しておく。

### 3.2 超音波照射

超音波照射システムを Fig. 1 に示す。シリンジポンプ (アイシス Fusion 200) を用い、シリコンチューブ (外径 2 mm, 内径 1 mm) に流し、PZT 凹面振動子 (Japan prove 1Z401 R50, 焦点距離 46 mm) の焦点位置に設置します。そして、パルス超音波 (1MHz, PD (pulse duration)=10  $\mu\text{s}$ ) を duty 比 1,10 % に設定し、それぞれ音圧を変化させ、60 秒間照射した。

### 3.3 DNA 二重鎖切断評価

ゲノム DNA のような長分子 DNA の二重鎖切断発生の評価を行うために、蛍光顕微鏡で DNA 一分子全体の長さを直接観測する手法を用いた。この手法を用いることで低頻度の二重鎖切断の評価が可能であることが過去の研究から示されている<sup>3)</sup>。

超音波照射後の DNA 溶液に蛍光色素 YOYO-1 を添加して T4 フェージ DNA を染色したのち、ガラス板上に DNA を進展させて蛍光顕微鏡で観察する。観察された DNA 分子像から分子長を計測し、その結果から DNA 一分子あたりの二重鎖切断回数  $n$  を次式で計算した。

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

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受けていない DNA 分子平均長を表している。

### 3.4 キャビテーションの評価

DNA 溶液の近傍に PVDF ハイドロフォンを設置し、キャビテーションを評価しました。自作の直径 3 mm の PVDF ハイドロフォンによりキャビテーションノイズを観測し、その観測波形を周波数解析することにより評価した。100 MHz のサンプリング周波数でオシロスコープ (DPO7054, Tektronix) により記録した。Frohly らは高調波や分調波の生成強度やキャビテーションノイズパワー (CNP: Cavitation Noise Power indicator) (パワースペクトラムの積分値) を使用し、キャビテーションの活性を評価している<sup>4)</sup>。

$$\begin{aligned} \text{CNP} = & \int_0^{f_d - \frac{\Delta f}{2}} P(f) df + \int_{f_d + \frac{\Delta f}{2}}^{2f_d - \frac{\Delta f}{2}} P(f) df + \dots \\ & + \int_{\frac{f_s}{2}}^{\frac{f_s}{2(n-1)f_d + \frac{\Delta f}{2}}} P(f) df \end{aligned} \quad (2)$$

ここで、 $P(f)$  は観測した信号のパワースペクトルである。 $f_d$ ,  $f_s$  はそれぞれ照射音波の基本周波数成分、サンプリング周波数である。 $n$  は整数である。定義される基本波成分や高調波成分等の線スペクトルの影響を低減するため、線スペクトルを中心として周波数幅  $\Delta f$  の範囲を積分範囲から除いた。除外する周波数範囲は 400 kHz とした。計測システムで発生するノイズの影響を考慮し、下式に示す相対的な指標 RCNP を用いてキャビテーションの発生を評価した。

$$\text{ReCNP} = \frac{\text{CNP} - \text{CNP}_0}{\text{CNP}_0} \quad (3)$$

### 4. 実験結果及び考察

Fig. 2 に (1) 式を用いて評価した各 duty 比での音圧に対する DNA 一分子あたりの二重鎖切断発生回数、及び式 (2) により評価した ReCNP の音圧に対する依存性を示す。横軸に示した音圧は、今回使用した PZT 凹面振動子の焦点での最大負音圧値である。音圧に対する切断回数に着目する。各 duty 比において、音圧値が 1.5 MPa を超えると DNA 切断回

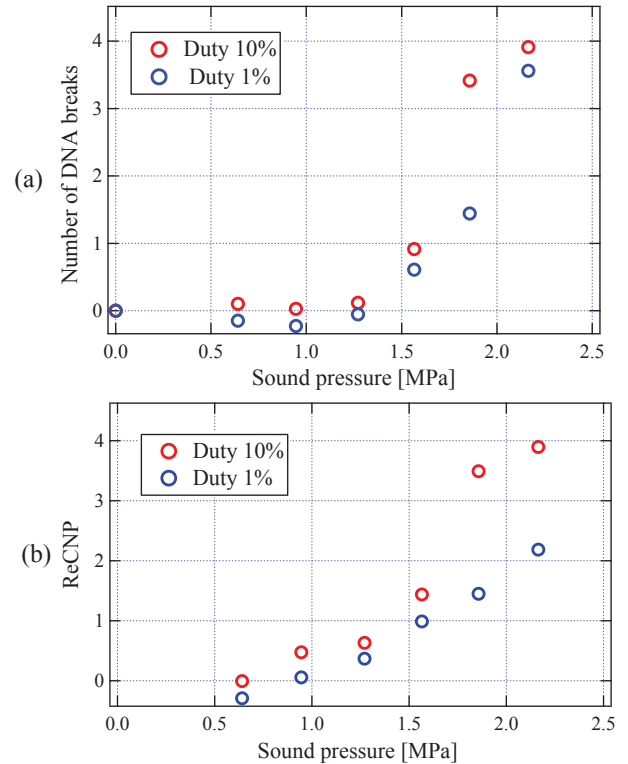


Fig. 2 (a) Number of DNA breaks and (b) relative cavitation noise power (ReCNP) as function of the sound pressure amplitude.

数が明らかに増加していることが確認できる。また、キャビテーションノイズの指標である ReCNP も同様の傾向を示し、キャビテーション現象が DNA 二重鎖切断に関与していることが示唆された。

### 5. まとめ

本報告では 1 MHz の超音波照射による DNA 二重鎖切断の音圧依存性を定量的に評価した。予想とは異なり周波数に対して切断回数の変化率や閾値音圧に一定の傾向が見られなかった。その要因として周波数毎の音圧分布の違いが考えられた。今後は音圧分布の影響を受けにくくするために試料設置範囲を狭くするといった改善が必要である。その結果、最大負音圧が 1.5 MPa 以上になると DNA 二重鎖切断が生じていることが確認できた。本結果により 1 MHz においてキャビテーション発生の閾値が存在し、キャビテーション現象が DNA 二重鎖切断に寄与していることが示唆された。

### 文 献

- [1] Bradury, J.M. and Jackson, S.P., *Biochem Soc Trans*, vol. 31, no. 1, pp. 40-44, 2003.
- [2] 亀田正治 他, “泡のエンジニアリング,” pp. 146-147, 2005.
- [3] Yoshikawa, Y. et al., *FEBS Letters*, no. 566, pp. 39-42, 2004.
- [4] J. Frohly, S. Labouret, C. Bruneel, I. Looten-Baquet and R. Torguet, “Ultrasonic cavitation monitoring by acoustic noise power measurement”, *J. Acoust. Soc. Am.* **108**, 2012, 2000.

# 超音波パルス照射による血液への影響

谷 健太郎<sup>†</sup> 小山 大介<sup>†</sup> 渡辺 好章<sup>†</sup>

<sup>†</sup>同志社大学 〒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 溶血 赤血球 キャビテーション

## 1. はじめに

超音波は医療診断分野において、非侵襲かつリアルタイムで生体情報を得られるため、臨床現場において広く普及している。しかし、技術の発展に伴う診断装置の高機能化によって、その音響出力レベルは増加傾向にある<sup>[1]</sup>。一方で、治療技術として超音波の生体作用を積極的に利用する傾向にあり、超音波が生体を与える影響について詳細に検討する必要がある。我々のグループでは、超音波の生体作用のひとつである溶血に着目している。本報告では、超音波パルスの照射条件が、ウシ血液（血液の凝固を避けるためにアルセバール液と質量比 1:1 で調整）に与える影響について *in vitro* 実験により検討した。

## 2. 溶血

溶血とは赤血球の細胞膜が物理的、化学的、生物学的な要因によって損傷を受け、赤血球中に含まれるヘモグロビン等の内包物が血漿中に流れ出る現象のことである。損傷を受けた赤血球は赤血球ゴーストと呼ばれる<sup>[2]</sup>。図 1 に正常な赤血球と赤血球ゴーストの顕微鏡画像を示す。本報告では、血漿中に含まれる赤血球ゴーストの数を指標とし、溶血の定量的評価を行った。

## 3. キャビテーション

キャビテーションとは、液体が気体に相変化する現象である。定圧下において、液体を加熱し気体に相変化する現象が沸騰であり、キャビテーションも物理的に同じ現象であると言える。キャビテーション現象の場合、定温度下で圧力が低下し、液体中の圧力が飽和蒸気圧より低くなり気泡が発生する。

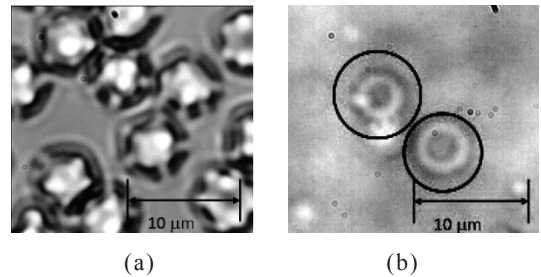


図 1, (a)正常な赤血球, (b)赤血球ゴースト.

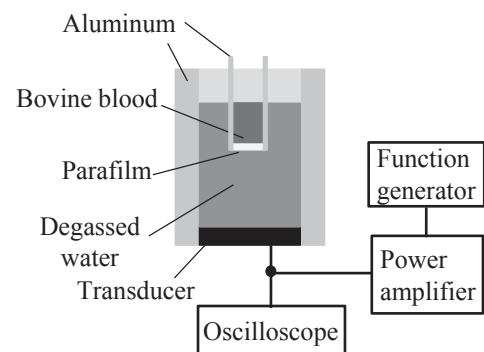


図 2, 超音波照射系.

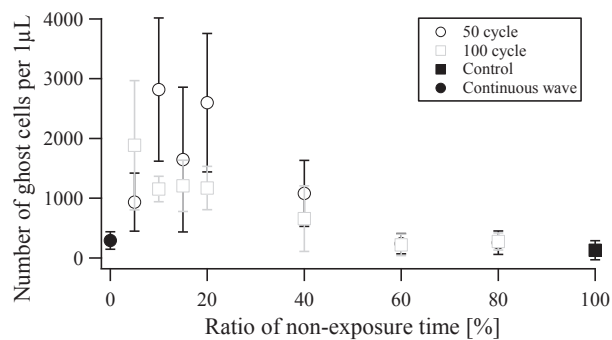
## 4. 実験方法

実験系を図 2 に示す。底面に超音波振動子を接着した内径 50 mm, 外径 60 mm, 高さ 80 mm のアルミニウム製円筒容器と、内径 10 mm, 外径 12 mm のアルミニウム円筒の底面にパラフィルムを貼り付けた血液容器を作成した。振動子付き容器は振動子の発熱による血液への影響を避けるために脱気水で満たした。ウシ血液を 1 mL 入れた血液容器を振動子付き容器の中心軸上に設置し、血液と脱気水の液面の高さを一致させた。超音波の照射条件を周波数 1 MHz, 最大音圧振幅値 200 kPa, 照射時間 1 分間一定とし、1 パルスのサイクル数を 50, 100 の 2 条件、それぞれのサイクル数における非照射時間の割合を 0~100% の範囲で変化させた。超音波非照射の血液を Control とし、超音波照射前後の

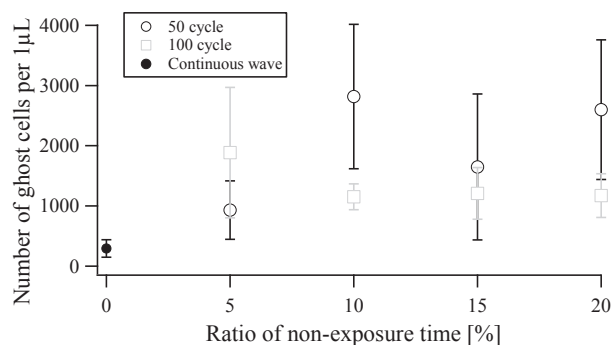
血液の温度を測定した。1 分間の超音波照射の後、血液を 6200 rpm で 5 分間遠心分離し、正常な赤血球を含む沈殿物と赤血球ゴーストを含む浮遊液に分け、浮遊液 10  $\mu\text{L}$  を採取した。採取した浮遊液をスライドガラスとカバーガラスで挟んだ状態で、光学顕微鏡によって浮遊液中の赤血球ゴースト数をカウントした。全ての実験条件において、赤血球ゴースト数のカウントを計 5 回行った。

## 5. 実験結果および考察

超音波照射による血液の温度上昇は、生体に影響を及ぼす 40 度に達しておらず、本実験の結果には超音波の熱的作用の影響はほとんどないと考えられる。本実験より得られた非照射時間割合と浮遊液 1  $\mu\text{L}$  あたりの赤血球ゴースト数の関係を図 3 に示す。サイクル数 50, 100 とともに非照射時間割合が 40%において急激な増加が見られ、非照射時間割合をさらに短くすることで、赤血球ゴースト数の増加が確認できた。また、非照射時間割合が 10~20%の間に赤血球ゴースト数は最大値に達すると考えられる。その一方で、サイクル数 50 の場合では非照射時間割合が 5%の条件で、赤血球ゴーストの減少が確認され、非照射時間割合 0% (連続波) において再び赤血球ゴースト数の減少が見られた。このことから、パルス波の非照射時間が溶血発生の重要な因子であると推測される。非照射時間が短い場合にはキャビテーションにより発生した気泡が残った状態で、再び超音波照射が行われることで、気泡の成長が継続され、気泡の圧壊が生じやすいと考えられる。非照射時間が長い場合にはキャビテーションにより発生した気泡が収縮、または消滅した状態で、再び超音波照射が行われるため、気泡の圧壊が生じにくいと考えられる。また、超音波照射直後に気泡が激しく振動することが知られている<sup>[3]</sup>。そのため、超音波照射と非照射が短時間で繰り返されるパルス波の条件において、連続波の条件よりも赤血球ゴーストの数が増加したと推測される。



(a)



(b)

図 3, (a)非照射時間割合の変化 (0 - 100%) に伴う赤血球ゴースト数の変化. (b)非照射時間割合の変化 (0 - 20%) に伴う赤血球ゴースト数の変化.

## 6. まとめ

本実験では、ウシ血液を用いて超音波照射による溶血を、赤血球ゴースト数を指標として定量的に評価した。その結果、連続波よりもパルス波の条件において、血液に与える影響が大きいことが確認できた。今後は、キャビテーションの発生量と赤血球ゴースト数の関連について検討する予定である。

## 文献

- [1] Henderson J, et al.: A survey of the acoustic outputs of diagnostic equipment in current clinical use. *Ultrasound Med Biol* ; 21:699-705,1995.
- [2] Mitsuhiro Nose, et al., *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 37(12), 3306-3310, 1989.
- [3] 崔博坤 他, 電子情報通信学会技術研究報告: 信学技報, 107(75), 27-32, 2007.

# Fiber Bragg Grating センサによる超音波音圧の計測

松尾 晃佑† 小山 大介 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: †dmq1025@mail4.doshisha.ac.jp

## 1. はじめに

近年, Fiber Bragg Grating (FBG センサ) が注目されている. 光ファイバに紫外線を照射して, 屈折率が周期的に変化するグレーティングを作ると, 特定の波長の光が反射する. この特定の波長はブラッグ波長と呼ばれ, グレーティングの周期と屈折率の関数で表される. グレーティングに外力が加わると, ブラッグ波長が変化するので, 地震の揺れを検知する歪みセンサや温度センサとして用いられている. FBG センサは低コスト, 高感度, 電磁ノイズに強いなどの利点がある. そこで著者らは, FBG センサを用いた超音波照射時の音響放射力による温度上昇と, 音圧の同時分離測定の有効性について検討している.

本報告は超音波照射時における超音波照射方向に対して音軸方向設置時による FBG センサとハイドロホンで得られた音圧波形の比較を行った.

## 2. 実験原理と方法

### 2.1 FBG の原理

FBG の概略図を Fig. 1 に示す. FBG センサに広帯域の波長を持つ光を入射させると格子部分で次式に示す特定の波長が反射される<sup>[1]</sup>.

$$\lambda_B = 2n\Lambda \quad (1)$$

$\lambda_B$  はブラッグ波長と呼ばれ,  $n$  は FBG のコアにおける屈折率,  $\Lambda$  は FBG のグレーティング周期である. FBG に超音波を照射することで温度上昇による FBG の膨張及び, 音圧により生じる歪みで  $\Lambda$  がそれぞれ変化し, それに伴い  $\lambda_B$  が変化する. ブラッグ波長は照射した超音波の周波数で振動し, 温度変化により低周波数で波長はシフトしていく. これらの二つのブラッグ波長の変化は高周波と低周波で異なるため, 信号を分岐しそれぞれにハイパスフィルタとローパスフィルタを用いることで音圧と温度変化の同時分離計測が可能である.

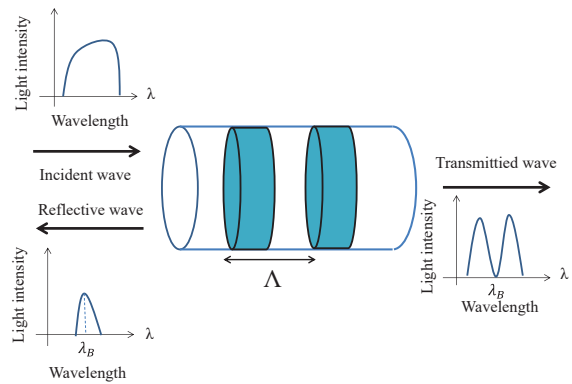


Fig. 1 FBG センサの原理

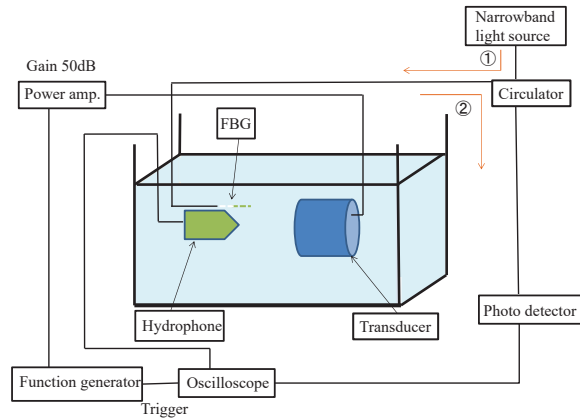


Fig. 2 超音波照射時における受信波形計測のための実験系

### 2.2 FBG とハイドロホンにおける音圧波形の計測

実験系を Fig. 2 に示す. 水中でハイドロホンと FBG センサを超音波照射軸に対して音軸方向で振動子の焦点に設置し, 狭帯域光源からファイバに光を入射させた. 次に, 振動子に印加電圧を 8 V から 106 V まで約 8 V 間隔で異なる電圧を与えた. 超音波は周波数 2.5 MHz, 繰返し周期 1 ms, 10 波のバースト波を使用した. 用いた振動子は凹面振動子, 焦点距離は 20 mm である. FBG センサからの反射光を Photo detector で電気信号に変換しハイパスフィルタを通じて, オシロスコープで超音波の受信波形を観測した. また, ハイドロホンでも同様にオシロスコープで超音波波形を観測した.



### 3. 実験結果

横軸が FBG で得られた各入力電圧における波形の最大正電圧および最大負電圧, 縦軸はハイドロホンで得られた各入力電圧における波形の最大正音圧および最大負音圧をプロットした図, またプロットを近似した曲線を Fig. 3 に示す. ハイドロホンで得られた音圧を  $P$ , FBG で得られた電圧を  $V$  とし, この近似曲線を 5 次式 (2) で表したときそれぞれの係数は Table. 1 で示す.

$$P = a_1V + a_2V^2 + a_3V^3 + a_4V^4 + a_5V^5 \quad (2)$$

式(2)を用いて FBG で得られた出力電圧を音圧に校正した. 入力電圧が 42 V での超音波照射時における FBG による受信波形を Fig. 4 に示す. また, 同入力電圧の超音波照射時におけるハイドロホンの受信波形を Fig. 5 に示す. Fig. 4 に示す 1-2  $\mu\text{s}$  付近で現れる微弱な波形は格子部分以外のガラス中における超音波伝搬によるものである. 水中を伝播した超音波波形は 2  $\mu\text{s}$  以後のものであり, Fig. 5 の波形と一致していることがわかる. このことから, 音軸方向に FBG センサを設置することで得られた超音波の波形が検出可能であることがわかった.

### 4. おわりに

本報告では, 超音波照射時における超音波照射方向に対して音軸方向による FBG センサとハイドロホンで得られた波形の比較を行った. 式 (2) の 5 次式を用いて, 音軸方向に FBG センサを設置することで得られた超音波の波形はハイドロホンで得られた超音波の波形と一致した. 従って, 音軸方向に FBG センサを音軸方向に設置して超音波の波形を観測することが可能である.

### 5. 参考文献

[1]Z. Zhou, J. Ou. Techniques of temperature compensation for FBG strain sensors used in long-term structural monitoring. Proceeding of Asian pacific fundamental problems of Opto- and Microelectronics. Russia. 2004: 465-71.

### 謝辞

本研究は文部科学省私立大学戦略基盤形成支援事業(2016-2017)の援助を受けている.

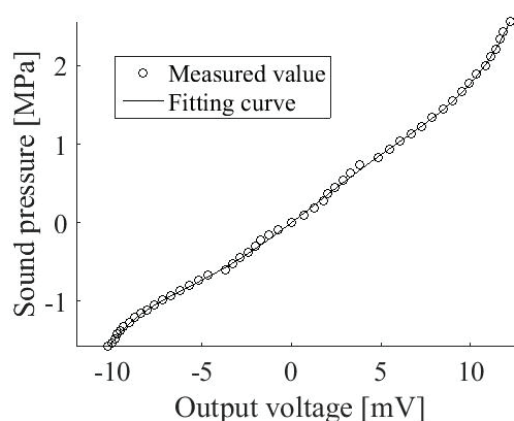


Fig. 3 Sound pressure value for the FBG of the output voltage

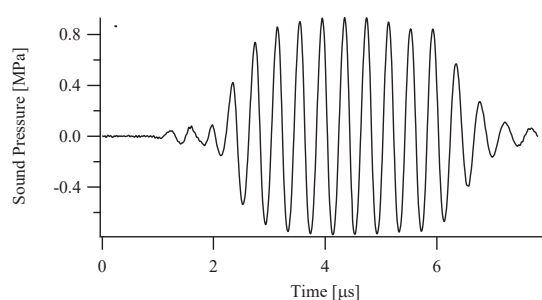


Fig. 4 音軸方向設置における FBG センサによる超音波受信波形

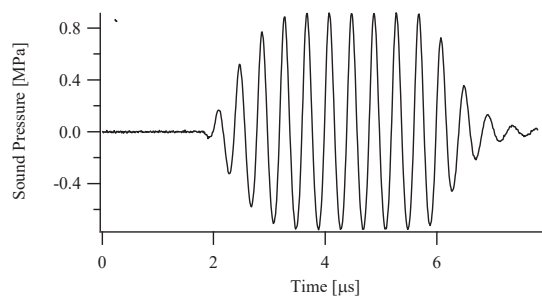


Fig. 5 ハイドロホンによる超音波受信波形

Table. 1 5 (2) 式の係数の値

Coefficient	value
$a_1$	173.6
$a_2$	$3.164 \times 10^3$
$a_3$	$-7.079 \times 10^5$
$a_4$	$-1.885 \times 10^7$
$a_5$	$6.178 \times 10^9$

# MR で撮像された位置情報を用いた電子フォーカスの補正

小南 成史<sup>†</sup> 稲垣 拳<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>dmp1012@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, シミュレーション, MRI

## 1. はじめに

超音波画像診断装置は, 超音波を生体内部へ送波し, 様々な組織からの反射波を解析して生体内部を断層画像として映像化する装置である. 近年, 画質が向上して, 臨床において多くの病変や疾患の診断に重要な情報を提供している. パルスエコー法による超音波イメージングでは, 生体内の音速分布情報が必要だが, 従来の画像構成方法では, 装置内で生体内の音速を一定と仮定して計算している. しかし, 生体内部は音速の異なる様々な組織が存在し, 装置内の設定音速と各組織との音速差が画質劣化に影響を与えている. 特に脂肪の音速は設定音速と 5%程度異なるため, 皮下脂肪層の厚い被験者では, 著しい画質劣化が生じる. そこで我々は, 生体内部の音速分布情報を考慮した電子フォーカスの補正法を検討している. そのための音速分布は, MR で撮像した画像情報から推定する.

本報告では, これまで既知の音速分布を使用してきたのに対し, MR で撮像した筋肉の脂肪・赤身の断面画像情報を用いた電子フォーカスの補正を, シミュレーションにより検討することを目的としている.

## 2. 方法

### 2.1 ビームフォーミングの計算<sup>1)</sup>

電子フォーカスと呼ばれるアレイ振動子によるビームフォーミングでは, 送信時には, 外側の振動子からパルス電圧を印加して, 少しずつ時間を送らせて内側の振動子に印加していく. これにより, 円弧状の波面が形成され, 焦点でビームを収束させることが出来る. 各振動子に与える遅延時間を変化させることによって, 曲率の異なる円弧を波面として超音波を送信させることで, 焦点位置を任意に決定することが出来る. 一方, 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加算することで任意の位置からの散乱波を増大し, それ以外の位置からの散乱波を減少させて表示することが可能である. 受信時では, 連続的に焦点距離を設定でき, ダ

イナミックフォーカスと呼ばれている. これらにより, 主に方位方向の分解能を向上させることができる.

$i$  番目の駆動振動子の遅延時間  $\tau_i$  は式 (1) 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,  $c$  は音速,  $n$  は振動子の数,  $\Delta x$  は振動子の間隔,  $l_f$  は焦点距離である. 式 (1) の計算では,  $c$  は装置の設定音速であり, 各組織の音速を考慮していないことがわかる. そこで, 式 (1) を下記の様に音速分布の層数に応じて項数を変化させることで, 各振動子において, 各組織の距離, 及び音速情報を考慮した遅延時間  $\tau_i$  を求めることが出来る. また, 各層の距離は MR で撮像した画像情報から求める. この式 (2) によって電子フォーカスの補正を試みる.

$$\tau_i = \frac{\left(\frac{l_1}{l_f}\right)^2 \left\{ \left(i - \frac{n}{2}\right)^2 \Delta x^2 \right\}}{2c_1 l_1} + \frac{\left(\frac{l_2}{l_f}\right)^2 \left\{ \left(i - \frac{n}{2}\right)^2 \Delta x^2 \right\}}{2c_2 l_2} + \frac{\left(\frac{l_3}{l_f}\right)^2 \left\{ \left(i - \frac{n}{2}\right)^2 \Delta x^2 \right\}}{2c_3 l_3} + \dots \quad (2)$$

### 2.2 有限要素法

有限要素法で計算するために ComWAVE (超音波解析シミュレーションソフト) を用いた. 計算は二次元で行い, 1 要素サイズは 14.5  $\mu\text{m}$ , 時間刻み幅は 4.4 ns とした. 探触子は中心周波数 5 MHz, 振動子素子数 128ch, 素子間隔の 0.36 mm のリニアアレイ型とし, 送信時には焦点距離を 50 mm に設定した. そして, MR で撮像した筋肉の脂肪・赤身の構造に対して, 有限要素法による超音波イメージングのシミュレーションを行い, 受信

波形を計算した。得られた受信波形に、遅延時間処理・加算・包絡線検波・対数変換の順に処理を行い B モード画像の計算をした。

### 2.3 シミュレーション・ファントム

図 1 に MR で撮像した豚肉の脂肪・赤身画像をシミュレーションソフトに取り込んだ解析領域を示す。脂肪領域の音速は 1430 m/s、赤身領域は 1520 m/s から 1560 m/s の範囲で任意に設定した。また、反射体として焦点位置の深さ 50 mm に音速 2620 m/s のナイロンワイヤを設置した。これらの条件において、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に対して送信・受信の電子フォーカスの計算を行った。

### 3. 画質の評価方法

従来手法と提案手法のそれぞれの方法で電子フォーカスを計算し、B モード画像上に表示された反射体領域の面積で比較した。反射体領域面積は、画像を対数表示したときのダイナミックレンジの -60 dB の半値 -30 dB を超えたピクセルをカウントし、1 ピクセルの面積との積から算出した。1 ピクセルの大きさは、縦が 6.8  $\mu\text{m}$ 、横が 0.36 mm である。さらに、反射体領域の最大輝度となる方位方向の 1 行に対して、半値幅を従来手法と提案手法で比較した。これら二種類の方法により分解能の評価を行った。

### 4. 結果と考察

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の計算による B モード画像を図 2 に示す。また、反射体領域の最大輝度となる方位方向の一行を図 3 に示す。

図 2 の結果より、反射体領域のピクセル数は、従来手法が 806、提案手法が 685 であった。また、反射体領域の面積を求めると、それぞれ 2.51  $\text{mm}^2$ 、2.13  $\text{mm}^2$  となり、面積比は 0.85 となった。

図 3 の結果より、半値幅による比較を行うと、提案手法において半値幅が小さくなっていることがわかる。また、最大輝度が提案手法の方が大きくなっていることから、音速分布を考慮することでより焦点でよりビームが収束したことがわかる。

この二つの結果より、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。つまり、MR 画像情報を用いた電子フォーカスの計算により、B モード画像の補正が確認できた。

### 5. まとめ

本報告では、これまで既知の音速分布を使用してきたのに対して、MR で撮像した画像情報を元に、音速分布を考慮した電子フォーカスの補正法をシミュレーションによって検討した。その結果、音速分布を考慮した電子フォーカスにより、画像の分解能向上を確認できた。

今後は、MR で推定した音速分布情報を実際に超音波診断装置に適応させ、電子フォーカスの補正について検討する。

### 参考文献

- [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”, PP70-80. 2010, コロナ社

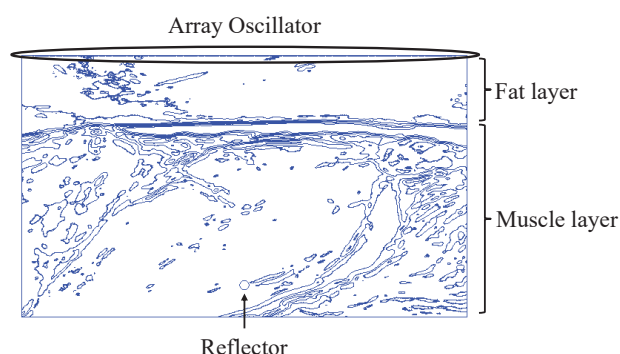


図 1 シミュレーション・ファントム

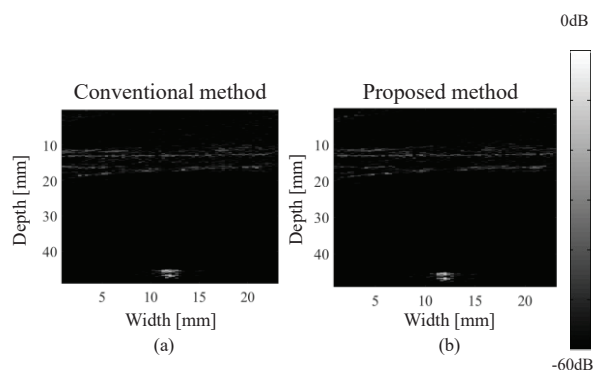


図 2 B モード画像 (a) 従来手法 (b) 提案手法

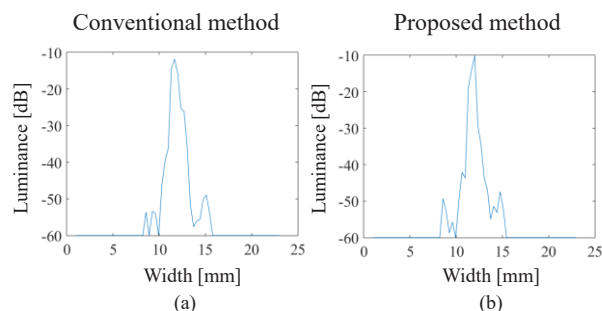


図 3 方位方向最大輝度領域 (a) 従来手法 (b) 提案手法

# MRI で撮像された画像情報を用いる超音波イメージング -高磁場対応超音波プローブを用いて-

森泉 裕貴<sup>†</sup> 新井 慎平<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>dmp1017@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード 同時撮像, 高磁場対応プローブ, MRI

## 1. はじめに

超音波画像診断装置は, 超音波を生体内部へ送波した際の様々な組織からの反射波を解析して生体内部を断面画像として映像化する装置である. この技術は臨床において多くの病変や疾患の診断に利用されている.

我々はその中でも肝臓がんの治療に用いられるラジオ波焼灼術という治療法に注目した. ラジオ波焼灼術とは腫瘍に電極針を挿入し, ラジオ波電流を流すことで熱により細胞としての機能を停止させるという方法である. この治療法における穿刺の際にガイドとして超音波画像診断装置が利用される. しかし, この治療法は複数回の穿刺が必要となる場合が多く, 患者の体勢や術者の違いによる再現性が低い点, 画像コントラストが他モダリティに比べて低いという欠点により穿刺の精度が下がるという問題点がある. 我々はこの問題点を補う方法として, MRI と超音波画像診断装置の同時計測技術について研究している. MRI は高コントラストという利点を持ち, 超音波画像診断装置と同時計測を行うことで現在使われているラジオ波焼灼術の欠点を補うことができる.

本報告では同時計測に向けた研究として, 高磁場環境下対応超音波プローブの作成・位置合わせ用マーカーの作成, 精度検討・同時計測の際に発生するノイズの対処についてそれぞれの進捗状況を述べる.

## 2. 方法

### 2.1 高磁場環境下対応プローブの作成

現在, 一般的に使用されている超音波プローブは常磁性金属を材料として用いているものがほとんどである. 我々が目指している MRI と超音波画像診断装置による同時撮像の実現には, 使用する超音波プローブが MRI 画像に影響を与えない必要がある. その為に非磁性材料を用いたプローブの作成を行った.

材料の選定方法を以下に示す. MRI 用ファントムに候補材料を乗せ T1 画像の撮像を行う. 各材料に対応する撮像画像を確認し, 画像にアーチファクトなどの影響

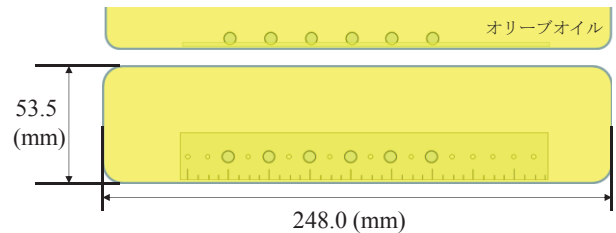


図1 プローブ検出用マーカー

を与えた材料を除く. このように選定した材料のみを用いて高磁場環境下でも使用が可能な超音波プローブを作成した.

### 2.2 位置合わせ用マーカーの精度検討

2.1で作成した高磁場環境下対応プローブはMRI画像に写らないという問題点がある. その点を解決する為に, 位置検出用マーカーの試作を行っている.

今回, 図1のようにマーカーを作成した. プラスチック製の容器を植物性油脂 (オリブオイル) で満たし, その中に直径 6.35 mm のポリアセタール球を 20.0 mm 間隔で 6 個並べた. 次に, 作成したマーカーを MRI に入れ, T1 画像を撮像した. この際, スライス間隔を 0.7 mm, 1.0 mm, 1.2 mm と変化させて撮像し, マーカーの中心間距離の平均とスライス間隔を変化させたことにより生じる影響について検討を行った.

### 2.3 同時撮像に向けたノイズ除去

2.1で高磁場環境下対応プローブを作成後, MRI室と操作室を繋ぐパイプにプローブを通して, MRIと超音波画像診断装置の同時計測を行った. MRIによるT1画像と超音波画像診断装置による撮像画像は図2のようになり, 共にノイズが乗る結果となった.

ノイズの原因としては2点考えられる. 1点目は超音波プローブとMRI双方より発生する異なる周波数帯域のノイズが互いに影響を与えているという点. 2点目は操作室内に存在する機器のノイズが超音波プローブのケーブルを通して影響を与えているという点である. 今

回は2点目の影響への対策として図3のようなコネクタをMRI壁面に取り付け、操作室からのノイズがMRI室に影響を与えない実験系を作成した。このコネクタを用いて以前の実験と同様に同時撮像を行った。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 高磁場環境下対応プローブ

材料を選定する際、材料が画像に影響を与えた例を図4に示す。このような材料を除外し作成した高磁場環境下対応プローブが図5である。

#### 3.2 位置合わせ用マーカの精度検討

今回、3種類のスライス間隔で撮像したマーカ間の平均距離は19.84 mmとなり実測値との誤差率は0.80%となった。この誤差は画像処理の際に生まれるものだと考えられるが、肝臓がん検出の際には無視できる程度の誤差である。各スライス間隔における違いも無視できる程度の誤差だと確認できた。

#### 3.3 同時撮像に向けたノイズ除去

コネクタを使用した同時計測時のMRIによるT1画像と超音波画像診断装置による撮像画像は図6のようになり、図2、3と比較してノイズが軽減されていることが確認された。これにより我々が提示したノイズ原因の2点目が正しい予測であったと示唆された。

### 4. まとめ

本報告では超音波画像診断装置とMRIの同時計測技術構築の為に必要な3点について注目して検討した。作成した高磁場環境下対応プローブは画像に影響を与えず、MRIガントリー内で使用可能だと確認できた。マーカの検出方法に関して、実測値との誤差は肝臓がんを発見する際に無視できる程度だと分かった。最後に同時撮像時におけるノイズに関して、コネクタを壁面に設置することで軽減することができた。しかし、撮像タイミング自体を重ねた際にMRI画像上にノイズがでるとい問題があるので、今後はこのノイズを軽減すると共にMRI画像と超音波画像を組み合わせるアルゴリズムにも着手していこうと考えている。

#### 参考文献

- [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”, 2010, コロナ社
- [2] 笠井 俊文, 土井 司, “MR撮像技術学”, 2008, オーム社

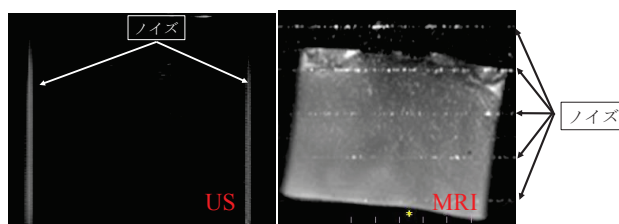


図2 同時撮像時におけるUS&MRI画像 (コネクタなし)

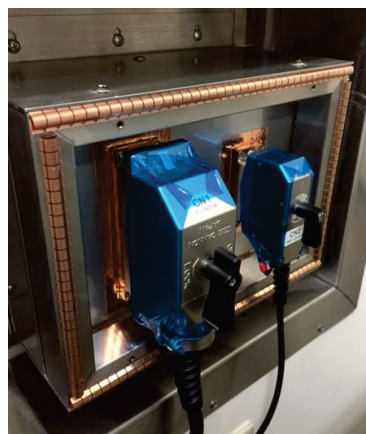


図3 MRI室に設置したコネクタ



図4 影響を与えた材料のT1画像例



図5 高磁場環境下対応超音波プローブ

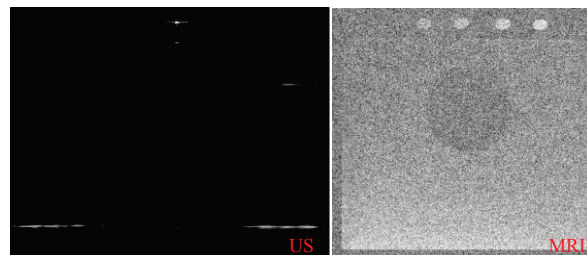


図6 同時撮像時におけるUS&MRI画像 (コネクタあり)

# MRI と超音波を用いた生体内部の音速推定法の提案

坂和 直幸<sup>†</sup> 安田 光輝<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>産業技術総合研究所 〒〒565-0456 茨城県つくば市 4-5-6

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, 提案手法の有効性を検討するため, 生体内部を模擬した寒天ファントムを用いて 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, 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,



図1 3層の寒天ファントム

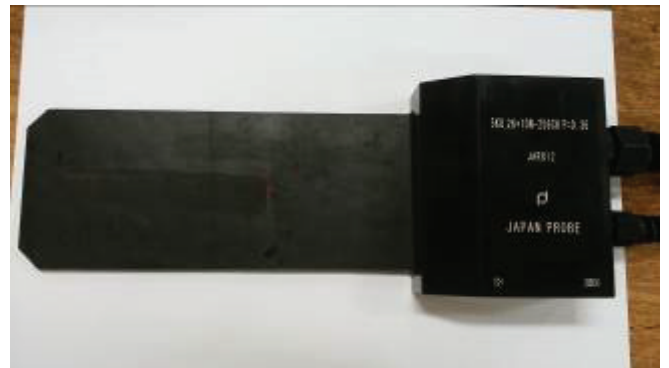


図2 超音波プローブ

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. 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. 3層寒天ファントムの作成

シヨ糖水溶液を寒天を用いてゲル化すると, 音速が変化することが知られている. そこで, 図1のように, 3層の上部からそれぞれ 0%, 10%, 20%のシヨ糖水溶液の濃度としたゲルファントムを計4つ作成した. 散乱体として, グラファイト粉末を拡散させた. また各層のシヨ糖濃度が変化しないように層間にはパラフィルムを挟んだ.

### 3.2. MRI による距離情報の取得

作成したファントムを頭部用の受信コイル内に設置し、スピネコー法により MRI 撮像を行った。得られた画像から各層の距離を測定した。なお、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。

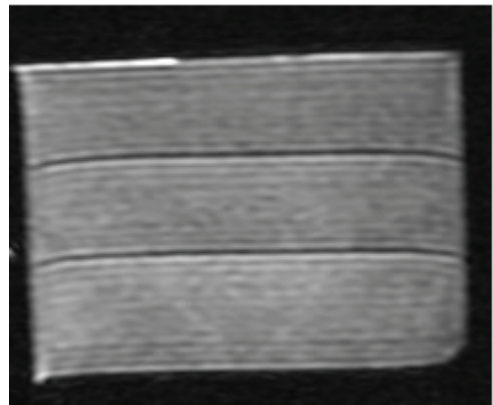


図 3 MRI 撮像画像

### 3.3. 超音波による時間情報の取得

作成したファントムに図 2 の超音波プローブから超音波を照射し、ファントム内の各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寒天ゲルファントムの伝搬時間を求めた。

## 4. 結果と検討

2.2 の MRI 撮像により得られた画像を図 3 に、2.3 の超音波の反射波により得られた画像を図 4 に示した。図 3 の距離情報と、図 4 の時間情報から各ファントム内の各層の音速値を算出した。結果は表 1 のようになった。

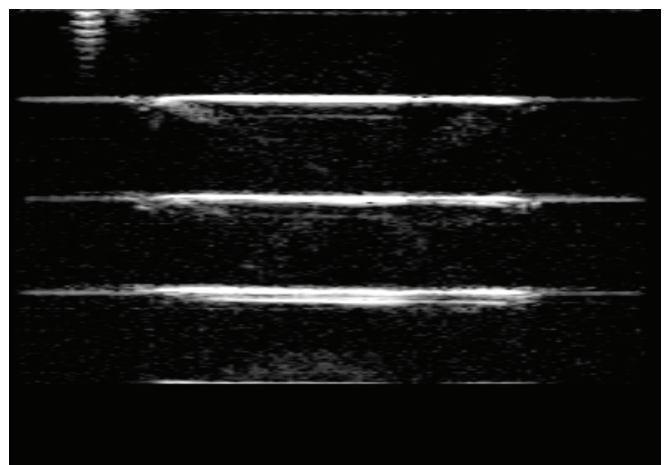


図 4 超音波 B モード画像

表 1 に示されるように、測定値の誤差率が 2-5 % となった。今後、測定精度の向上を検討することが重要である。

## 5. まとめ

本報告では、生体内部の音速測定法を提案した。生体組織を模擬した 3 層寒天ゲルファントムを用いて、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、音速値を算出した。その結果、誤差率 2-5 % で推定することができた。今後は測定精度の向上を検討することが重要である。

表 1 寒天ゲルファントムの音速値

	砂糖濃度 [%]	0	10	20
音速 [m/s]	ファントム1	1467	1537	1538
	ファントム2	1492	1564	1451
	ファントム3	1340	1628	1527
	ファントム4	1458	1562	1551
	平均	1440±70	1570±40	1520±40

## 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.

# 超音波による生体組織の熱物性のイメージング —音速の温度依存性の測定—

森本 舞<sup>†</sup> 辻本 祐加子<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

E-mail: <sup>†</sup> dmp1018@mail4.doshisha.ac.jp

**キーワード** 組織性状診断, 熱容量, 生体組織模擬ファントム, エコーシフト, 相関法

## 1. はじめに

無侵襲・非観血でリアルタイムに生体内部を映像化する超音波診断装置は、重要な診断手段として臨床現場で広く普及している。しかし、現在の超音波エコー画像は組織の輪郭情報を中心に構成した定性的なものであるため、検者の経験や熟練に負うところが大きい。一方、組織の音響特性を指標に定量診断を行う超音波組織性状診断が期待されており、音速や減衰係数などの粘弾性に係わる物理量を測定することで組織性状診断への応用を目指す研究が試みられている<sup>[1]</sup>。

本研究は組織性状診断を支援する新しいパラメータとして単位体積当たりの熱容量  $C_v$  と音速の温度依存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。特に、生体軟部組織における音速の温度依存性は、脂肪組織が負の傾きを有することに対して、脂肪以外の組織では正の傾きを有することが知られており、脂肪肝の診断に有用であると期待される。最近では肝硬変へと進行する脂肪肝の診断が重要となっている。本研究は、超音波照射によって微小時間加温した生体組織の音速変化を超音波パルスエコー方式で測定することを特徴とするため、*in vivo* での測定が可能である。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作成し、豚の脂肪と筋組織を試料として、超音波加温と超音波パルスエコー方式による音速変化を測定した。その結果、超音波ビームの焦点近傍において脂肪と筋組織で異なる音速変化を測定した。これらの結果から、脂肪と肝実質が混在する脂肪肝の進行度を定量的に評価する可能性が示唆される。

## 2. 超音波による熱物性のイメージング

### 2.1. 加温による音速変化と組織特性

超音波加温による生体組織の温度上昇  $T$  の時間変化率  $dT/dt$  は生体熱輸送方程式で表され、短時間の加温であれば血液循環項を、温度上昇が微小であれば熱伝導項を無視できるため、 $dT/dt=2\alpha I/C_v$  と近似される。ここで、 $\alpha$  は生体組織の減衰定数、 $I$  は超音波強度で

ある。一方、超音波加温による音速の時間変化  $dc/dt$  は  $dc/dt=(dc/dT)2\alpha I/C_v$  と表せる。つまり、超音波加温による音速の時間変化  $dc/dt$  は、 $I$  が既知であれば、減衰係数  $\alpha$ 、体積熱容量  $C_v$ 、音速の温度微分  $dc/dT$  の関数となっていることがわかる。したがって、この  $dc/dt$  のイメージングによって組織での熱物性分布を映像化できる<sup>[2]</sup>。過大な温度上昇はタンパク質変性を引き起こすため、生体組織の加温は  $4.0\text{ }^\circ\text{C}$  以下で行う。

### 2.2. 超音波による音速変化の測定

超音波加温による生体組織の温度上昇により音速音速が変化するため、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。本手法ではこの時間シフトから音速変化を求め、温度上昇を推定している。温度上昇が微小であれば  $\Delta c \ll c$  となり、音速変化  $\Delta c$  は以下の式で近似できる。

$$\Delta c(x) \cong \frac{c^2(x)}{2} \frac{\Delta \tau}{\Delta x} = c(x) \frac{\Delta \tau}{\Delta t} \quad (1)$$

$c(x)$ ,  $\Delta c(x)$  は試料内の任意の2点間  $\Delta x$  における音速と音速変化である。温度上昇前後のエコー信号を Fig. 1 に示す。任意の時間が  $t_1$ ,  $t_2$ 、任意の時間でのエコーシフト時間が  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  である。それぞれの差分である  $\Delta \tau$ ,  $\Delta t$  より任意の空間における音速変化が求まる。

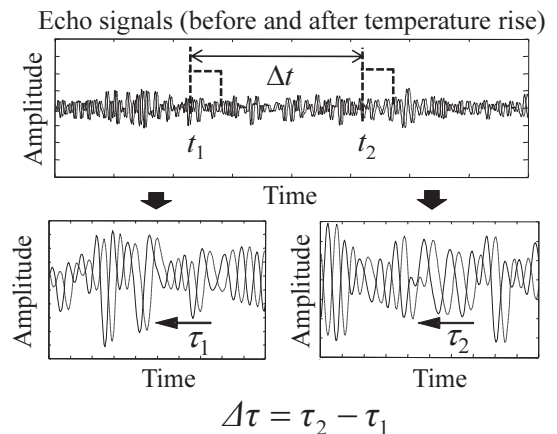


Figure 1 Calculating process of  $\Delta \tau / \Delta t$ .



### 3. 実験

#### 3.1. 実験方法

実験は Fig.2 に示すような、焦点距離 60 mm、直径 10 mm の凹面円形の共振周波数 5.2 MHz の音速測定用振動子の外周に、同軸で配置した内径 10 mm 外径 28 mm の凹面リング形状の共振周波数 3.2 MHz の加温用振動子を用いて、生体組織模擬ファントムの超音波加温前後の音速変化を測定した。実験系を Fig.3 に示す。厚み 10 mm の豚の脂肪と筋組織を測定試料とした。加温用振動子に 35 V の電圧を印加し、測定試料を加温した。音速測定用の振動子にパルサー (OLYMPUS, 5072PR) でインパルス電圧を印加し、加温前と加温 5 秒後のエコーからエコーシフト時間を算出した。その際の量子化ビット数は 12 bit, サンプリング周波数は 100 MHz とした。

#### 3.2. 実験結果および検討

測定した温度上昇前後のエコー信号に窓関数をかけてエコーシフト時間を算出した。窓関数の時間幅を 1  $\mu$ s とし、時間軸方向に移動して算出したエコーシフト時間を Fig.4 に示す。焦点付近である 8  $\mu$ s からエコーシフト時間に変化が生じた。Fig.4 から筋組織は温度上昇によりエコーの到着時間が早くなり、脂肪組織は遅くなるのが分かった。筋組織の音速を 1580 m/s, 脂肪組織の音速を 1444 m/s とし、それぞれの音速変化を算出した<sup>[3]</sup>。焦点距離における音速変化は筋組織では 1.3 m/s, 脂肪組織は -2.3 m/s となった。焦点近傍においては急激な温度変化があるので、この領域でエコーシフト時間の傾きに変化があることは、超音波加温によって脂肪と筋組織の識別が可能であることを示唆している。

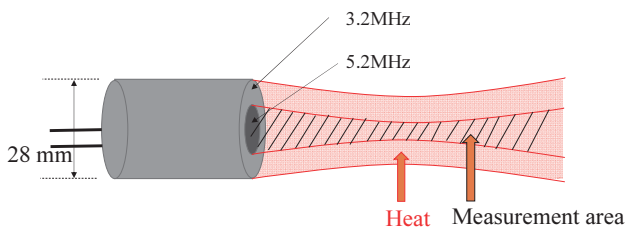


Figure 2 Integrated coaxial focused double transducers with different resonance frequencies.

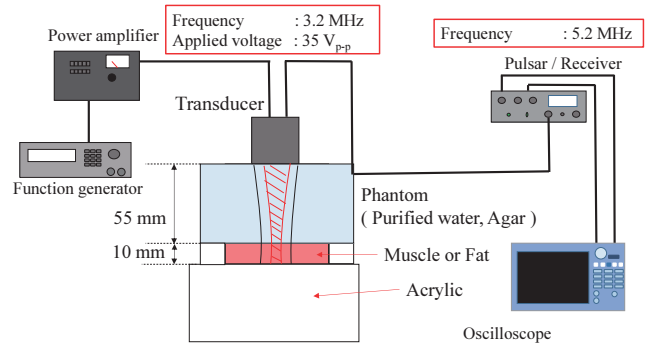


Figure 3 Experimental setup

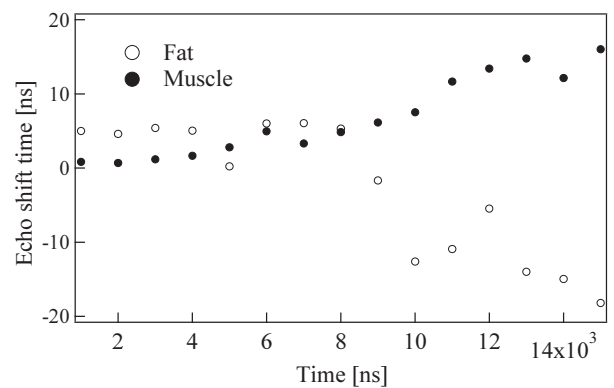


Figure 4 Echo shift time vs. time for fat and muscle tissues.

#### 4. おわりに

本報告では超音波加温により生じる豚の脂肪と筋組織それぞれの音速変化を同軸 2 共振周波数探触子によって測定した。その結果、超音波加温によって焦点近傍において脂肪については負の傾き、筋組織においては正の傾きを測定した。超音波加温による生体組織の音速の変化に着目して、脂肪肝を中心とした組織性状診断の可能性を示唆していると考えられる。

#### 文 献

- [1] H. Hachiya, "Present Status and Future Prospects of Ultrasonic Quantitative Diagnosis," IEICE Fundamentals Review Vol. 5, No. 3 pp. 244, 2012.
- [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.13, pp. 52-60, 1992.
- [3] S. A. Goss, "Compilation of empirical ultrasonic properties of mammalian tissues. II," J. Acoust. Soc. Am., Vol. 68, No. 1, July 1980 CONTROL, VOL 41, NO.3, pp314-317, 1994.

# 超音波加温による体積熱容量の測定

杉山 真璃子<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

E-mail: <sup>†</sup>dmp1029@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード 組織性状診断, 生体熱輸送方程式, 熱電対, 温度上昇, Viscous heating,

## 1. はじめに

従来, 組織性状診断のためのパラメータとして組織の粘弾性に関する物理量が報告されてきた. 例えば, 音速, 減衰係数, 音響インピーダンスなどである. 一方, 組織の熱物性に関する物理量については, 生体の体温維持機能などの生理機能を示す情報を有しており, 従来では得られなかった診断情報を提供できる可能性がある. 熱物性を表す物理量として体積熱容量, 熱伝導率, 熱拡散などがあるが, 本研究では超音波体積熱容量に注目する.

生体中に超音波を照射すると音響エネルギーが組織に吸収され, 熱が発生する. 超音波照射による生体内部の温度分布は生体熱輸送方程式を解くことによって求められる. 本研究では超音波加温によって発生する温度上昇を短時間で測定して, 体積熱容量を推定する手法を提案し, その有効性について検討することを目的としている. 生体の物理的性質を反映する超音波の伝搬特性を指標として, 病変による組織変化を定量化するためには, 生体中の音響特性と病変による組織変化との関係を把握することが極めて重要である. 音響特性と病変の関係性を理解することは, がん診断だけでなく病気の種類や状態の診断に繋がる可能性もある.

生体組織の体積熱容量を表 1 に示す. 脂肪は 2.0, 肝組織は 3.8 であるため, 脂肪肝の状態を体積熱容量で測定できる可能性がある. このように, さまざまな生体組織とその病変組織の体積熱容量を測定し, 病変による組織変化と体積熱容量の関係性を表す基礎データを蓄積する必要がある. 著者らは *in vitro* で簡易に体積熱容量を測定できるシステムを構築し組織性状診断の指標となる基礎データの蓄積が重要であると考えている.

表 1 生体組織の体積熱容量の値

	体積熱容量 $C_v$ [ $J/cm^3 \cdot ^\circ C$ ]
脂肪	2.0
筋肉	3.7
心臓	3.9
肝臓	3.8

## 2. 体積熱容量の測定法

超音波加温によって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,  $C_v$  は体積熱容量,  $q_v$  は熱生成率である<sup>[2]</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 項と第 2 項を無視できるため, 温度上昇は  $q_v$  と単位体積当たりの  $C_v$  の比によって決まる. ここで, 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)を変形した式(3)により  $C_v$  を求める.

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

## 3. 実験

### 3.1 減衰定数及び超音波強度測定

提案手法の有効性を検討するため, 豚の筋肉の体積熱容量を測定した. 測定に用いた実験系を図 1 に示す. 減衰係数の測定では, 反射体を用いた反射波測定より試料中における減衰係数を求めた. 超音波強度の測定では, 温度上昇測定で用いる凹面振動子の焦点部の反射波測定に加えハイドロフォンを用いて水中での焦点音圧を測定し  $I$  を算出した. 今回は, 反射体としてタングステンを実験に用いた.

### 3.2 温度上昇測定と Viscous heating の補正

実験系を図 2 に示す。温度上昇測定では熱電対の先端部と凹面振動子の焦点部が一致するように熱電対を試料中に設置し、超音波加温を行い測定した。ここで、超音波照射時に試料と熱電対の間に発生する熱のことを Viscous heating という。正確な体積熱容量の測定にはこの Viscous heating の補正が必要である。水は粘性が小さいため水中での温度上昇は Viscous heating による温度上昇値と考えることができる。そこで、試料中の温度上昇値から水中での温度上昇値を減算することにより Viscous heating の補正を試みた。

### 3.3 実験結果

平面振動子での反射波の測定結果から、試料の減衰係数は  $0.16 \text{ Np/cm}$  となった。また反射波と水中での焦点音圧から超音波強度  $I$  は  $8.0 \text{ W/cm}^2$  となった。温度上昇測定結果を図 3 に示す。水中での温度上昇値を試料中の温度上昇値から減算することで Viscous heating の補正を試みた。減算した曲線から差分を計算して温度上昇  $dT/dt$  をプロットした結果を図 4 に示す。温度は短時間であれば時間に比例して上昇する。図 4 から超音波照射時の温度上昇値が大きくなっており、 $0 \sim 100 \text{ ms}$  においては Viscous heating の補正が十分でないことが示唆される。そこで Viscous heating の影響が小さく、一定に温度上昇している  $200 \sim 1000 \text{ ms}$  間の温度上昇値  $dT/dt$  の平均値を図 4 から算出した。算出した結果の  $0.77 \text{ }^\circ\text{C/s}$  と他の測定値を式(3) に代入し、 $C_v$  を算出した結果、 $3.3 \text{ J/cm}^3/\text{K}$  となり、参照値  $3.7 \text{ J/cm}^3/\text{K}$ <sup>[3]</sup> より小さい値となった。測定値をまとめて表 2 に示す。

表 2 測定値

減衰係数	超音波強度	$(dT/dt)_{t=0}$	$C_v$ 参照値	$C_v$ 測定値
$0.16 \text{ Np/cm}$	$8.0 \text{ W/cm}^2$	$0.77 \text{ }^\circ\text{C/s}$	$3.7 \text{ J/cm}^3/\text{K}$	$3.3 \text{ J/cm}^3/\text{K}$

### 4. おわりに

超音波加温によって短時間に体積熱容量を測定する手法を提案し、その有効性を豚の筋肉を用いて検討した。熱電対で温度上昇を測定する場合、Viscous heating の補正が重要である。今後は温度センサとして FBG センサを用いることなどを検討する予定である。FBG センサは温度上昇測定時に Viscous heating がおきない上に、音圧も同時に測定することが可能なセンサであり、より簡便な  $C_v$  測定手法に繋がると考えられる。

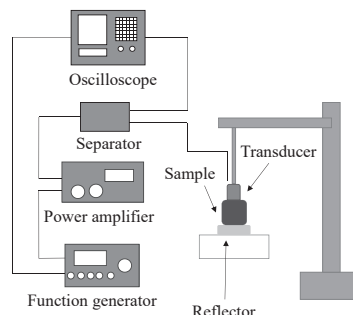


図 1 Measurement system of acoustic pressure.

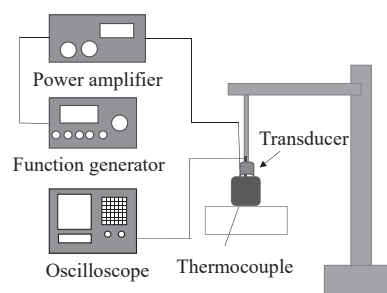


図 2 Measurement system of temperature rise.

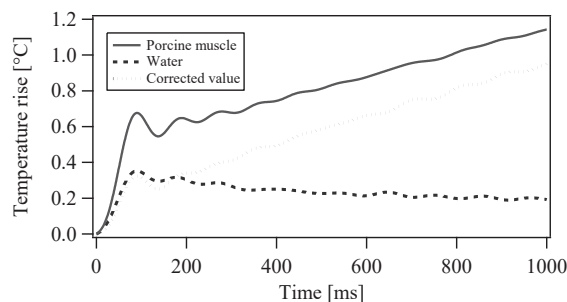


図 3 Relationship between temperature rise and time.

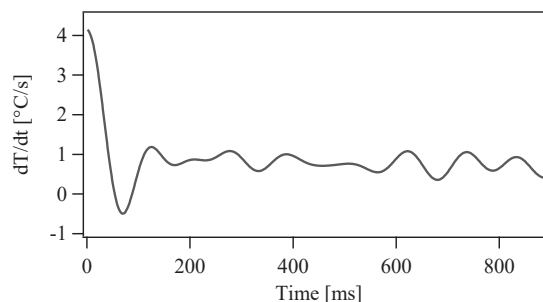


図 4 Relationship between temperature rise and time.

### 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] Sekins, K.M. and Emery, A.F. "Thermal science for physical medicine," Therapeutic Heat and cold, chapter 3, pp. 70-132, 1982
- [3] 超音波編集委員会編, "超音波便覧" 東京: 丸善, p474, 1999
- [4] F. Dunn, P. D. Edmonds and W. J. Fry. Absorption and Dispersion of Ultrasound in Biological Media. In Biological Engineering, ed. by H.P. Schwan, 205-332, McGraw-Hill Book Co., New York, 1969

## 2 ビーム方式コントラストエコー法の検討 —和周波数成分によるイメージング—

木原 綾音<sup>†</sup> 金井 一将<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> dmp1009@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード 造影剤, 乳がん診断, 非線形振動, マイクロバブル

### 1. はじめに

超音波造影剤である Sonazoid<sup>®</sup>は 2007 年に肝がん診断用として保険適用が認可され, 超音波診断を補完する造影剤として用いられている. また, 2012 年には, 乳癌診断用としても認可された<sup>[1]</sup>. コントラストエコー法は, 造影剤を静脈注射し, 超音波の送受波を行うことにより造影剤からのエコーを血流情報として強調造影する. ハーモニクイメージングはこの原理を利用し, 造影剤の非線形振動によって生じる第 2 高調波を観測する. しかしながら, 第 2 高調波は超音波の組織伝搬の非線形性によっても生じる. よって受信エコーには造影剤からのエコーと造影剤の存在しない組織からのエコーが混在し, 両者を分離することができない場合がある.

そこで, 著者らは周波数の異なる 2 つの超音波ビームを交差させるコントラストエコー (Cross Beam Contrast Echo ; CBCE) 法を提案した<sup>[2,3]</sup>. CBCE 法は 2 つのビームの交差領域にあるマイクロバブルが, 異なる 2 つの周波数によって非線形振動を行い, それぞれの第 2 高調波成分と和音・差音の周波数成分を有する超音波を再放射する. 和音と差音はビームの交差領域のみで生成されるため, 造影剤の存在しない組織からのエコーと造影剤からのエコーを分離することが可能となる. 乳がん診断においては 7.5MHz 以上の高い周波数が用いられる. 臨床で用いられる造影剤 Sonazoid<sup>®</sup> は 2 MHz 近傍の超音波に対してマイクロバブルが共振するような粒径分布となっているため, 5 MHz と 2 MHz の超音波ビームを交差させた場合に, 7 MHz の和音の発生を確認できるかどうかを確認する必要がある. そこで, 本報告では臨床で用いられる血液中造影剤濃度での高周波の和音の発生を確認する.

### 2. CBCE 法の原理

Figure1 は CBCE 法の概念図である. Transducer A より  $f_1$ , Transducer B より  $f_2$  の中心周波数を持つ超音波が照射されるとする. また, すべての領域にマイクロバブルが存在するとする. その際, Transducer A の領

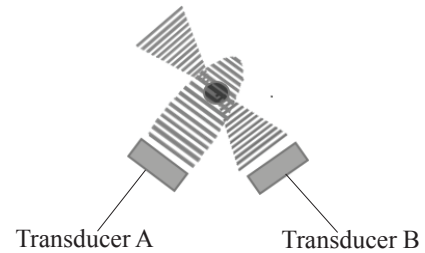


Fig. 1 CBCE method

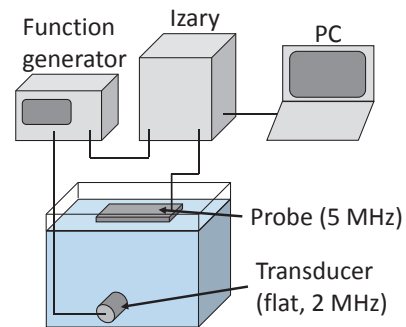


Fig. 2 Experiment system

域では基本波  $f_1$ , 第 2 高調波である 2 倍の  $f_1$  つまり  $2f_1$ ,  $3f_1$ ...が発生する. Transducer B の領域では基本波  $f_2$ , 第 2 高調波である 2 倍の  $f_2$  つまり  $2f_2$ ,  $3f_2$ ...が発生する. また, Transducer A と Transducer B が交差する領域では基本波, 高調波に加え, 和音成分である  $f_1+f_2$ , 差音成分である  $f_1-f_2$  が発生する. この和音・差音成分はビームの交差領域のみの情報を有している. また, 和音・差音などの周波数成分は組織伝搬の非線形性では交差領域以外で生成されないため, ほとんど無視することが可能となる.

### 3. 実験

#### 3.1. 実験方法

Figure2 に実験系の写真及び概念図を示す. Sonazoid<sup>®</sup>は約 12.15 L の脱気水に 2.43 mL の懸濁液を入れた. このときのソナゾイド濃度は, 臨床で用いられる 60 kg のヒトの血液中濃度と同じである.

周波数が 2 MHz と 5 MHz の 2 つの超音波を用いて, 和音である 7 MHz 成分を観測する. 上部にプローブを

設置し、プローブから 5.5 cm 離れた位置において 90 度でビームが交差するように平面振動子を設置した。プローブの送信周波数は 5 MHz とした。また、平面振動子の中心周波数は 2 MHz であり、発振器 (Agilent, 33500B) で Burst 波を出力した。

### 3.2. イメージングシステム

本報告ではサンプリング周波数 31.25 MHz, 64 チャンネルのイメージングシステムを用いた。また送受信の素子として中心周波数 6 MHz のリニアアレイ型のプローブを用いた。素子の素材は 1-3 コンポジット材, 素子数 192, 素子間隔 0.36 mm, 素子サイズ  $0.26 \times 10$  mm である。

### 4. 実験結果

Figure3 から Fig. 6 に 2 MHz の超音波が交差するときと交差しないときにおけるプローブの距離と強度の関係の結果を示す。横軸はプローブからの距離、縦軸はそれぞれのスペクトルの強度の最大値で正規化したものである。Fig. 3, Fig. 4 は 5 MHz を 6 cycles, 入力電圧は  $14.4 V_{pp}$  とした。Fig. 5, Fig. 6 は 5 MHz を 6 cycles, 入力電圧を  $14.4 V_{pp}$  とし, 2 MHz を 200 cycles, 入力電圧を  $10 V_{pp}$  とした。Fig. 3 においてほとんど観測されない 7 MHz を Fig. 5 においては観測した。これは、7 MHz が和音によって生じたものであるということを表す。

### 5. まとめ

本報告では新しい造影超音波イメージング手法として検討している CBCE 法によって得られたエコー信号における和音成分を観測した。ビームを固定したときにおける和音成分の発生を確認した。その結果、血液中の造影剤濃度において 7 MHz の和音が発生することを確認した。

今後は、電子走査を行い、ファントムの 2 次元断層画像を表示することが重要である。

### 文 献

- [1] 平井都始子, 中村卓, 丸上亜希, 小林豊樹, “乳房の造影超音波,” Japanese Journal of Medical Ultrasonics, vol. 41, no. 3, pp. 353-365, 2014.
- [2] T. Eura, K. Yoshida, Y. Watanabe, “Blood Flow Measurement by the Counter-Crossed Beam Contrast Echo Method,” Japanese Journal of Applied Physics, vol. 49, 07HF05-1-6, 2010.
- [3] N. Yoshimoto, K. Yoshida, Y. Watanabe, I. Akiyama, “A New Contrast Echo Imaging Method Using Crossed Beams of Two Ultrasonic Frequencies,” Japanese Journal of Applied Physics, vol. 47, no. 5, pp. 4188-4192, 2008.

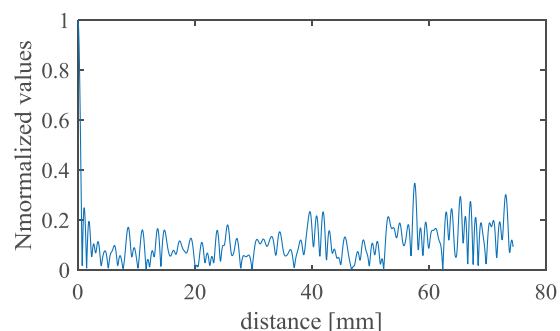


Fig. 3 Sum frequency (7 MHz) components in the echo signals, when transmitting the pulse of 5 MHz.

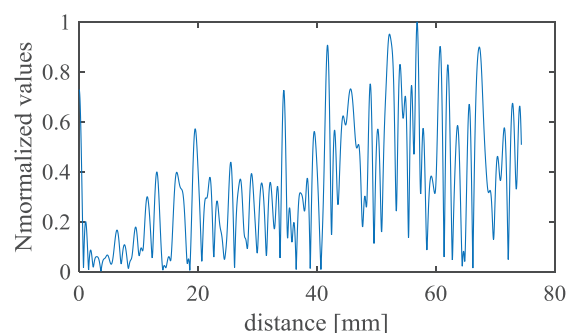


Fig. 4 Fundamental components in the echo signals, when transmitting the pulse of 5 MHz.

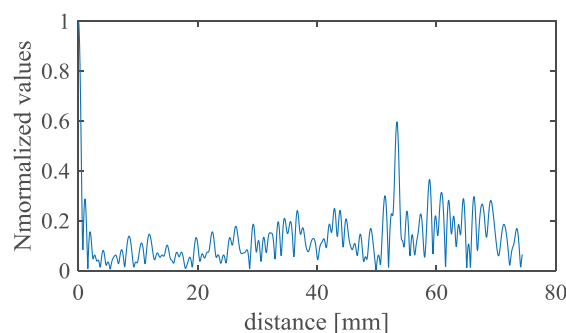


Fig. 5 Sum frequency (7 MHz) components in the echo signals, when transmitting the pulses of 5 MHz and 2 MHz.

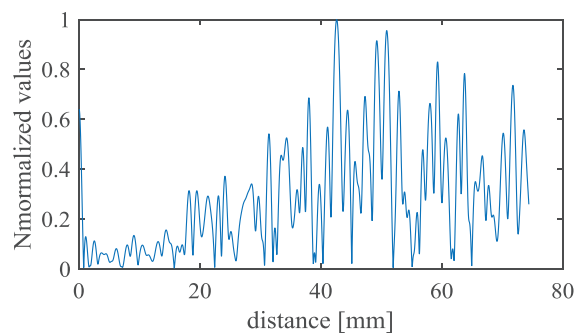


Fig. 6 Fundamental components in the echo signals, when transmitting the pulse of 5 MHz and 2 MHz.

# コウモリの補償行動を模擬した 超音波ドプラ血流計測法

佐藤 寛<sup>†</sup> 堀内 彩瑛<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

臨床医学において超音波診断は、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おり、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、超音波を用いて空間を把握する能力を有しており、その空間把握能力は非常に高いことが知られている。

本研究では、コウモリ特有の超音波放射戦略である補償行動<sup>[1]</sup>に着目する。コウモリは受信信号の音圧、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を行っている。これまで我々は、SNR 向上のために、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てきた<sup>[2-3]</sup>。本報告ではコウモリの周波数補償行動をパルスドプラ法に導入した時の有効性の確認を、生体組織模擬ファントムを用いた実験を通じて行った。SNR の向上を確認するとともに、流速測定精度に関する検討を行った。

## 2. 生体組織減衰のエコーへの影響

生体組織は周波数に依存して増大する減衰係数を有することが知られている。そのため、広帯域な超音波パルスを生体中に送信すると、高い周波数成分の方が低い周波数よりもより減衰する。よって、相対的に低い周波数成分が主体となり、エコー信号の中心周波数 ( $f_e$ ) は低域へシフトする<sup>[1]</sup>。特に、市販のパルスドプラ装置では受信信号の AD 変換のサンプリング周波数 ( $f_s$ ) と直交検波の参照周波数を一致させて、両者を同時に行う方式を採用している。このとき、組織の減衰係数が小さいか、比較的浅い

部位であれば、受信信号の中心周波数と直交検波周波数 ( $f_r$ ) が一致するため、SNR の劣化は問題とならない。しかし、減衰係数が大きい深部からのエコーに関しては  $f_e$  が低減へシフトするために  $f_r$  成分は  $f_e$  成分より低下する (Fig. 1 (left))

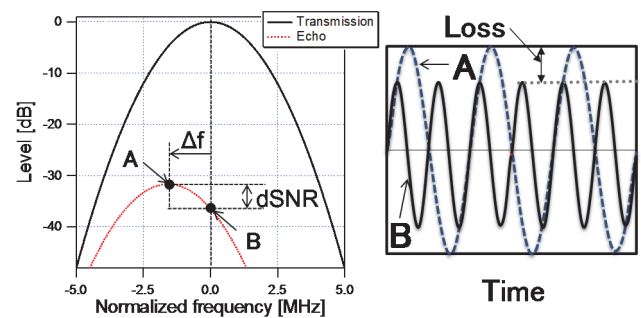


Fig. 1 Simulated frequency characteristics (left) and temporal waveforms (right) of echoes with frequency-dependent attenuation.

Fig. 1 (left) より、A 点のエコーの中心周波数成分がピークの最大となり、流速の算出に必要な B 点のサンプリング周波数成分はピークとはならない。このとき、エコーの中心周波数成分が妨害波となり、サンプリング周波数成分との差を dSNR (degradation signal to noise ratio) と定義する。dSNR により AD 変換時に A 点成分のエコーにより B 点成分のエコーがレンジの最大を取ることができず、その差が Loss となる (Fig. 1 (right))。

## 3. 実験方法

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. 2)。チューブ内には流れる Sephadex からエコー信号を 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. 次に, 周波数を補償した送信信号を印加し, 提案法の定量性と波数変化による提案法の効果について検証した.

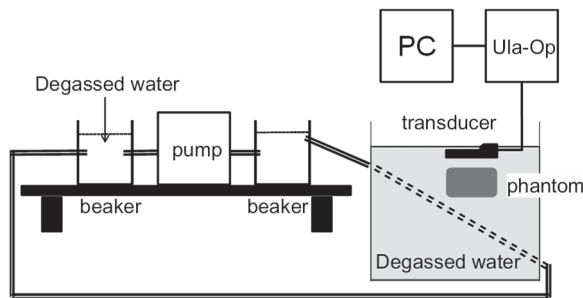


Fig. 2 Experimental system of measuring Doppler frequency.

#### 4. 実験結果・考察

実験方法で示した生体模擬ファントムを使用し, 従来法と提案法でのエコーの周波数特性を, Fig. 3 に示す. 4.6 MHz で送信したときのシフト量が 0.3 MHz であり, このときの dSNR の値は 0.6 dB であった. そこで, エコーの中心周波数と参照周波数を一致するように中心周波数を 5.1 MHz とし, 音圧も +4, +5, +6 dB 増大して送波した. Fig. 3 にチューブからのエコーのスペクトルを示した. 同図からわかるように, 補償後のエコーの中心周波数は 4.6 MHz に一致した. 4.6 MHz で直交検波した際の従来法と提案法のドプラ信号のスペクトラムを Fig. 4 にそれぞれ示す. 送信波補償時のドプラ・スペクトラムは,  $6.0 \times 10^2$  Hz から  $7.0 \times 10^2$  Hz 近傍の周波数において補償によるピークが見られた. また, 30 データより得られたドプラ周波数の期待値を Fig. 5 に示す. 設定流速から推定されるドプラ周波数は  $7.8 \times 10^2$  Hz であり, 補償の効果によってドプラ周波数が設定値に近づき, 測定精度が向上したことがわかる.

提案法により, SNR の改善が成されたことが定量的に示された. しかしまだ十分な SNR が得られておらず, また算出されるエコーの中心周波数の変動による問題も挙げられる. 今後は, さらなる SNR の改善に向けて補正法についての考察や, 提案法の適応範囲等を詳しく調べている必要がある.

#### 5. まとめ

本報告では, 送信波の中心周波数と音圧を補償す

るドプラ血流計測法の有効性を実験によって検討した. その結果, ドプラ周波数の検出精度の向上が見られた.

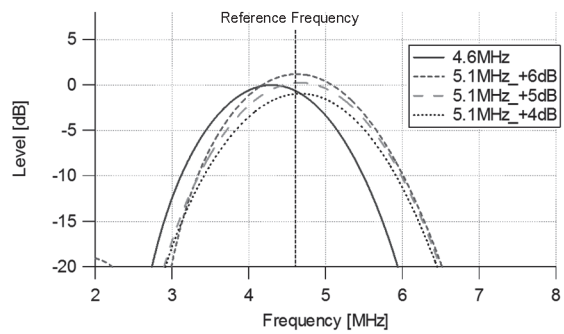


Fig. 3 Frequency characteristics of echoes with and without compensation. Center frequency of transmitted signal was 5.1 MHz.

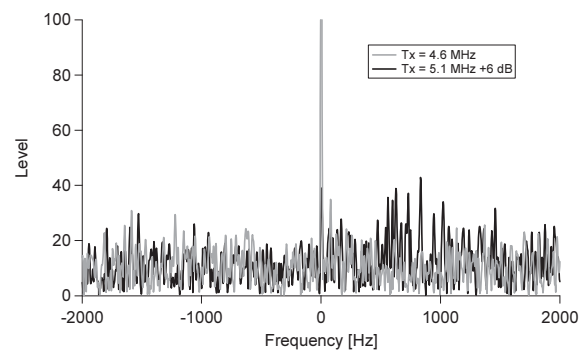


Fig. 4 Doppler spectrum of echoes from water flow in a tube, demodulated by 4.6 MHz with and without frequency compensation.

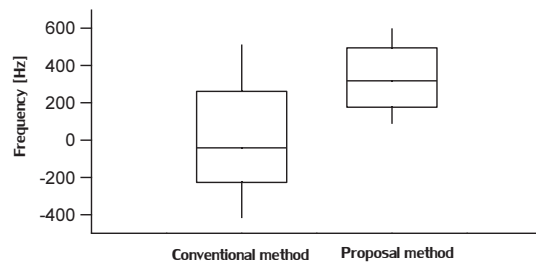


Fig. 5 Comparison of the expectations of Doppler frequencies between with and without compensation.

#### 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 (平成 25 ~ 29 年度) の補助を受けた.

#### 7. 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.

# 複数個体飛行時におけるコウモリのソナー信号特性の変化 —テレメトリマイクを用いた複数個体の音声同時計測による検討—

長谷一磨<sup>‡</sup>, 角屋志美<sup>‡</sup>, 間井谷洋祐<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: emq1003@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, 信号間類似度

## 1. はじめに

自ら放射した超音波パルスに対するエコーを分析し周囲の状況を把握するコウモリは, 他の個体の音声や, 密集した木々からの多重エコー等の音響的干渉を受ける[1]. にもかかわらず, 他の個体や障害物と衝突せず飛行するため, コウモリは混信環境下でも自身に必要なエコーを抽出する能力を持つと考えられる. しかし, コウモリが自身の音声のみを選択的に抽出し処理するメカニズムについてはいまだ不明な点が多い.

過去の研究では, 標的検知課題中のコウモリに CF (Constant frequency) 音を呈示すると, コウモリは放射パルスの TF (Terminal frequency) を変化させマスキングを回避することが報告されている[2]. また, コウモリの音声を模擬した FM (Frequency modulated) 音を飛行中に呈示すると, 自身の放射パルスの TF との周波数重畳に応じて, TF を僅かに変化させることが報告されている[3]. これらのことから, 複数のコウモリが同時飛行する際には, 他個体の TF と重畳しないように自身の TF を変化させることが予想される.

本報告では, 複数の他のコウモリが飛行する中, コウモリがどのように自身の放射パルスを変化・適応させるかを検討することを目的とした. 小型 FM ワイヤレスマイクロホンを各コウモリに搭載し, 同時に飛行する複数のコウモリそれぞれの放射パルスの計測に初めて成功した. また, 飛行実験で得られた結果の考察のため, コウモリのパルスを模擬した FM 信号を作成し, 音響特性の変化に対し信号の類似度がどのように変化するかを評価した.

## 2. 実験方法

実験には, ユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) を用いた. ユビナガコウモリはエコーロケーションパルスを口から放射する. エコーロケーションパルスは 100 から 40 kHz に下降する FM 音である. 4 個体を 1 つのグループとし, 15 個体を使用し計 5 グループを作成した.

実験は, 観測室 (9 × 4.5 × 2.35 m) をネットで区切った空間 (6 × 4.5 × 2.35 m) 内で行った. はじめに, 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 4 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

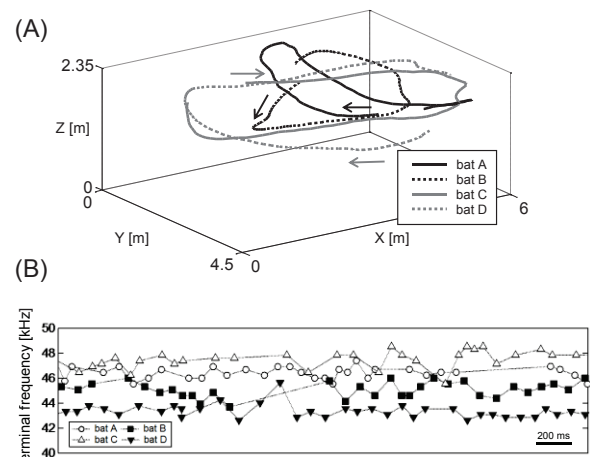


Fig. 1 (A) Flight trajectories of the four bats during group flight. (B) TF of the emitted pulses by each individual.

イクロホンを搭載し, 全個体の音声を分離して記録した. 計測した音声信号は観測室内に設置した無指向性のアンテナ (Terk Technologies Corporation, Model FM+) を介し, FM レシーバーで受信した. 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 台の高速度ビデオカメラ (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 4 個体のコウモリの音声と飛行軌跡を計測することに成功した (Fig. 1). 同時飛行中, 各コウモリは個体間で異なる TF を使用していた (Fig. 1B). 平均の TF が単独飛行と複数個体飛行でどのように変化したかを Fig. 2 に示す. 単独飛行時には, 各コウモリの TF は類似していたが, 複数個体飛行時には TF を遠ざける傾向が見られた (Fig. 2A). この傾向は全グループで確認された (Fig. 2B). 平均の TF の平均値は, 単独飛行時には 47.1 kHz, 複数飛行時には 47.0 kHz と差はなかった. 一方標準偏差は, 単独飛行時の 1.0 kHz に対し, 複数飛行時には 1.9 kHz に増加した.



この傾向が、他の個体の放射パルスの TF と自身の放射パルスの TF の周波数差を広げるためであるかどうかを調べるため、最も TF が近い個体との TF の差を Neighboring TF と定義した。Neighboring TF は単独飛行時の  $0.6 \pm 0.6$  kHz から、複数個体飛行時には  $1.2 \pm 0.6$  kHz に有意に増加した (Fig. 2C, Tukey's HSD test,  $P < 0.05$ )。すなわち、コウモリは他の個体との TF の差を広げるように自身の TF を変化させた。

#### 4. 考察

本報告では、複数個体同時飛行中に、コウモリは他の個体との TF の差を広げるように自身の TF を変化させた。過去の研究では、コウモリが音響混信に対し、周波数重畳を回避するように自身の TF を変化させることが報告されている [2, 3]。また、エコーの周波数帯域のうち、TF の帯域を除去されると距離測定精度が悪化することが、音響心理実験により明らかになっている [4]。エコーロケーションによる 3 次元空間の再構築には、物体との距離を正確に算出する必要がある。そのため、コウモリは距離測定に重要な TF を変化させ他個体の TF との周波数重畳を回避したと考えられる。

同時飛行するコウモリ同士の音声の特徴が類似している場合、類似度を低下させるように自身の音声の特徴を変化させると考えられてきた [5]。本報告で確認された TF の変化が信号間類似度に及ぼす影響を調べるために、コウモリの放射パルスを模擬した FM 音 (Fig. 3 A, B) を作成し、放射パルスの周波数, IF, TF, Duration の変化に対する相互相関の値を計算した。その結果、相互相関の値を半値にするためには、IF と Duration を約 8% 変化させる必要があるが、TF は 2%, つまり約 1 kHz 変化させるだけでよいことがわかった。これより、コウモリのパルスの信号間類似度を低下させるためには、TF の変化が有用であることが示唆された。

#### 5. まとめ

本報告では、同時飛行する複数のコウモリの放射パルスの音響特性について検討した。結果、コウモリは複数個体飛行時に自身の TF と他個体の TF との差を広げる傾向が見られた。また、計算により、TF の僅かな差によって信号間類似度が低下することがわかった。

#### 文 献

- [1] Moss, C. F., & Surlykke, A. (2001). The Journal of the Acoustical Society of America, 110(4), 2207-2226.
- [2] Bates, M. E., Stamper, S. A., & Simmons, J. A. (2008). Journal of Experimental Biology, 211(1), 106-113.
- [3] Hase, K., Miyamoto, T., Kobayasi, K. I., & Hiryu, S. (2016). Behavioural processes, 128, 126-133.
- [4] Bates, M. E., & Simmons, J. A. (2010). The Journal of the Acoustical Society of America, 128(2), 936-946.
- [5] Masters, W. M., Jacobs, S. C., & Simmons, J. A. (1991). The Journal of the Acoustical Society of America, 89(3), 1402-1413.

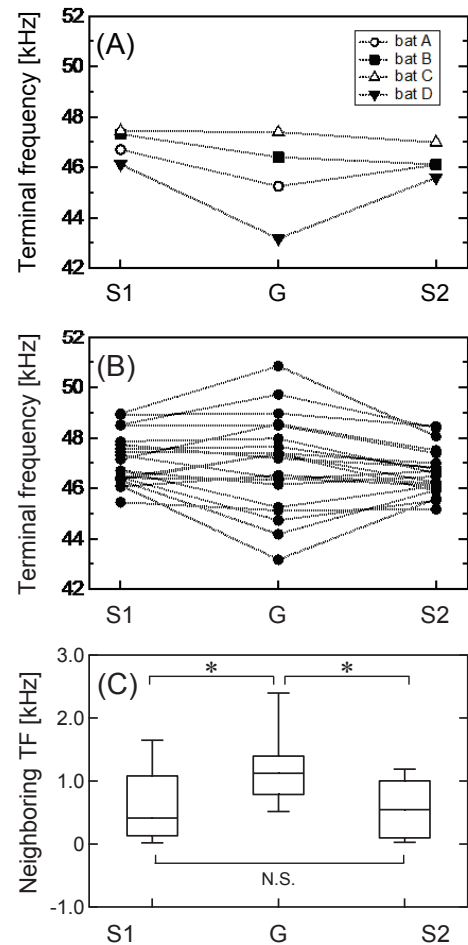


Fig. 2 (A) Representative changes in mean TF of the pulses. (B) Changes in mean TF by all grouped bats. (C) Differences in TF of a bat from the nearest TF of the other bat (Tukey's HSD test,  $P < 0.05$ ).

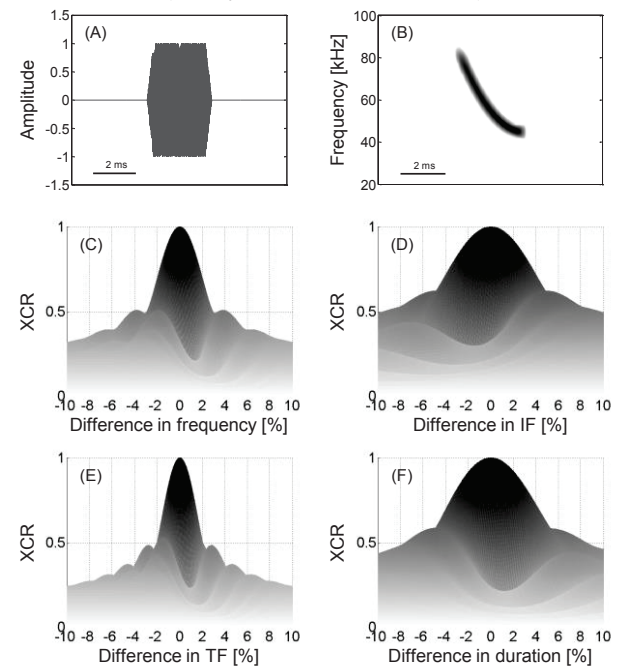


Fig. 3 Oscillogram (A) and spectrogram (B) of artificially generated echolocation pulses. Changes in cross-correlation value of the pulses in response to changes in frequency (C), initial frequency (D), TF (E), and duration (F).

# 異なるクラッタ環境における野生 CF-FM コウモリの音響空間センシング戦略に関する検討

氏野 友裕<sup>†</sup>, 藤岡 慧明<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: dmq1048@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード 生物ソナー, 超音波パルス, ドブラシフト補償, マイクロホンアレイ

## 1. はじめに

コウモリは超音波パルスを放射し、返って来るエコーを聴取・分析することで周囲の環境把握を行う(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>。一方で、CF-FMコウモリにおい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、エコーロケーションに関する報告も殆どない。

そこで、本報告ではマイクロホンアレイを用いて、野生CF-FMコウモリの音声計測を行った。またクラッタ環境の異なる場所で超音波パルスと3次元飛行軌跡の計測を行った。また実験室内での飛行実験と比較することで、それぞれの環境下でのパルスの音響特性の適応やその目的に関して検討を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 野外での音声計測

実験は2015年7月20日、10月5日に兵庫県佐用郡佐用町にて行った。観測対象種はCF-FMコウモリであるキクガシラコウモリ(*Rhinolophus ferrumequinum nippon*)とした。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)。このコウモリが生息する洞窟周辺(Fig. 1B)で4つのマイクで構成されたY字型のマイクロホンアレイ(Fig. 1C)を2基構築し、飛行するコウモリの音声を計測した。そして、各マイクに到達する時間差から3次元飛行軌跡を算出した<sup>[2]</sup>。

### 2.2 観測室内での音声計測

室内実験は9m×4.5m×2.35mの観測室内でキクガシラコウモリ1匹を自由飛行させた。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アンテナを介し、FM

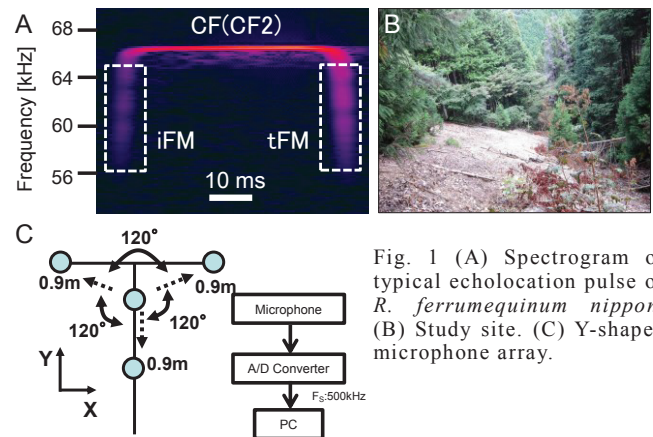


Fig. 1 (A) Spectrogram of typical echolocation pulse of *R. ferrumequinum nippon*. (B) Study site. (C) Y-shaped microphone array.

レシーバー(DIA MEDICAL SYSTEM, DTT-1000, Tokyo, Japan)で受信し、A/Dコンバータ(NI PXIe-6358, fs=500 kHz)を介してPCに記録した。

## 3. 実験結果

### 3.1 野外での音声計測

Figure 2AはOpen spaceにて計測したパルスのスペクトログラムで、Fig. 2Bに3次元飛行軌跡を示す。第2倍音のCF(CF2)周波数、パルス放射間隔(Inter-pulse interval, 以後IPI), CF長(CF duration)の時間変化をFig. 2Cに示す。IPIは40-160msの間で、CF長は20-90msの間で変化していた。クラッタの多い環境(Cluttered space)においては、IPIは30-100msの間で、CF長は20-60msの間で変化していた。Open spaceに比べ、Cluttered spaceではIPIとCF長が短く、ダブルパルスやトリプルパルス<sup>[4]</sup>を多く放射している様子が見られた。

### 3.2 観測室内での音声計測

Figure 3Aは観測室内にて計測したパルスのスペクトログラムで、Fig. 3Bに3次元飛行軌跡を示している。CF2周波数、IPI、CF長の時間変化をFig. 2Cに示す。IPIは40-100msの間で長短を繰り返しながら変化していることがわかる。一方で、2, 5, 8 sec付近に見られるように100-120msの付近の間隔でパルスを放射する場面も旋回に合わせて周期的に見られた。CF長は20-60msの間で変化していた。

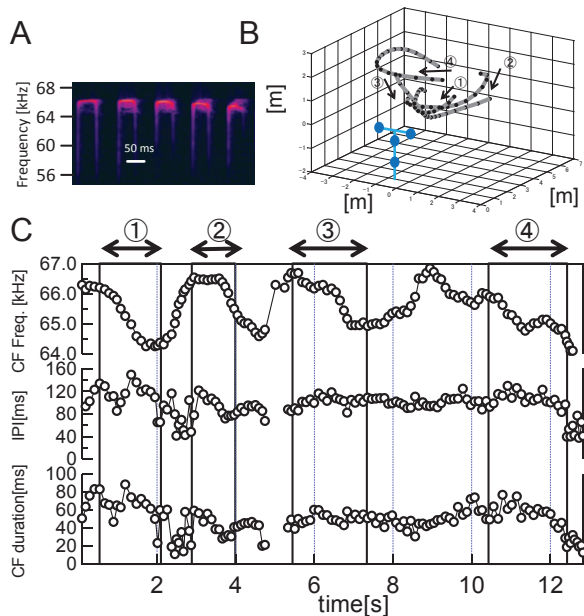


Fig. 2 (A) Spectrogram of *R. ferrumequinum nippon* in the open field. (B) Three-dimensional flight trajectory. Arrow shows flight direction. Four filled circles show microphones. (C) Change in CF2 frequency, IPI, CF duration.

#### 4. 考察

Open space では Cluttered space と観測室内と比べ単発で長めのパルスを多く放射する傾向が見られた。CF 部を長くすることで一定の周波数域にエネルギーを集中させ、より遠くのエコーを聴くことができることから、主に広い範囲をセンシングしていたと考えられる。一方、Cluttered space と観測室内ではパルスを多く放射していたことから、情報の更新頻度を上げ、周囲の環境を詳しくセンシングしていたと考えられる。観測室内においては、飛行方向先の壁までの距離が遠い地点で、長いパルスを放射している様子が見られた (Fig. 3B, 軌跡上の丸印。2, 5, 8 sec 付近)。これよりコウモリは、障害物までの距離やそのエコー特性に応じて IPI や CF 長を変化させることで、巧みに FM 部と CF 部を利用したセンシングを行っていると考えられる。

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、ターゲットとの相対速度に応じてパルスの CF 部の周波数を変化させる (ドプラシフト補償, Doppler Shift Compensation, 以後 DSC) [4]。そこで、3 次元飛行軌跡からコウモリが放射したパルス周波数を算出し、コウモリの進行方向からのエコー周波数を算出したところ (Fig. 4), コウモリの進行方向からのエコー周波数がほぼ一定に保たれており、コウモリは進行方向の障害物に対して DSC を行っていたと考えられる。今後は獲物を捕食する際の DSC を観測することで、自然環境下における DSC の運用の実態を明らかにしたいと考えている。

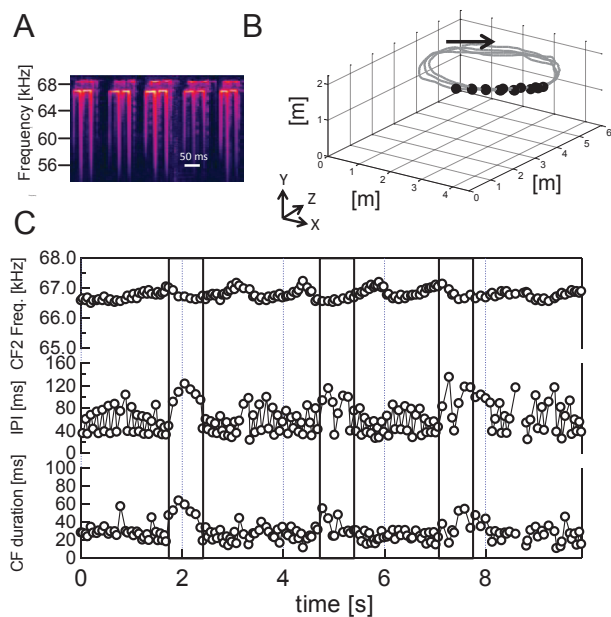


Fig. 3 (A) Spectrogram of *R. ferrumequinum nippon* in flight chamber. (B) Three-dimensional flight trajectory. Arrow shows flight direction. (C) Change in CF2 frequency, IPI, CF duration.

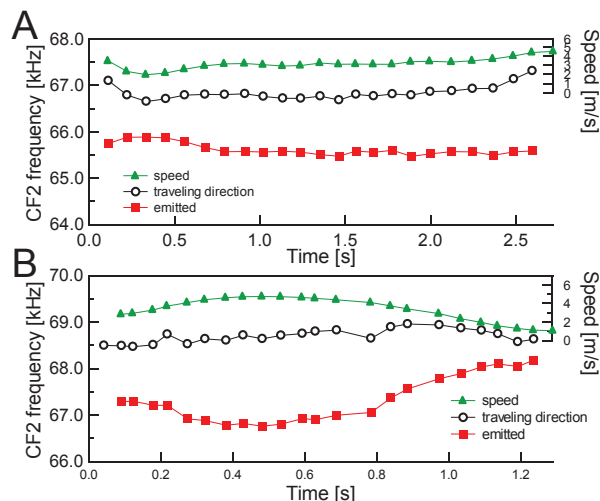


Fig. 4 Changes in flight speed (triangle) and the CF2 frequency of measured emitted pulses (square) and the calculated returned echoes (circle) in (A) open and (B) cluttered spaces.

#### 5. まとめ

野生キクガシラコウモリは、狭い環境やクラッタ環境では短いパルスを連続して放射しているのに対し、開けた環境では単発で長めのパルスを放射していることが分かった。また、飛行方向先からのエコー周波数が一定となる傾向が見られた。

#### 文献

- [1] Altringham, J. D., "コウモリ 進化・生態・行動," 八坂書房, 1998.
- [2] Fujioka, E., 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.

# Stimulating methods of pulsed infrared laser for creating intelligible speech perception

Yuta Tamai<sup>†</sup> Yuka Shinpo Kensuke Horinouchi Sizuko Hiryu Kohta I. Kobayasi

Doshisha University, 1-3 Tatara Miyakodani, Kyotanabe-shi, Kyoto-fu, Japan

E-mail: <sup>†</sup>dmq1041@mail4.doshisha.ac.jp

**Keyword:** auditory prosthesis, cochlear implant, noninvasive stimulating system, speech perception

## 1. Introduction

Action potentials can be evoked by irradiating infrared laser (IL) to neurons [1]. The laser stimulation is gathering much attention as substitution of electric stimulation because IL is able to stimulate nerves without contacting tissues. In general, severely hearing impair people has been encouraged to wear cochlear implants. However, invasive surgery is needed to wear cochlear implants. Our goal is to develop the noninvasive hearing aids using IL as a substitute for an electrode stimulation.

The purpose of this study was to develop a speech encoding scheme for the noninvasive hearing aid to convey intelligible speech. Previous our studies revealed that rodents perceived laser-evoked sounds which resembled click sounds. We therefore created a click-modulated speech sound as a simulation of the noninvasive hearing aid system. In this experiment, five Japanese native speakers were participated. The simulated sounds were presented to the subjects, and they answered how they perceived. Our data suggest that click-modulated speech sounds were at least partially intelligible and that the speech encoding scheme can be applied to the noninvasive hearing aids to restore speech perception in hearing-impaired people.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Five Japanese people (22-27 years old) who had not listen the simulated sounds of pulsed laser were used as subjects.

### 2.2. Stimuli

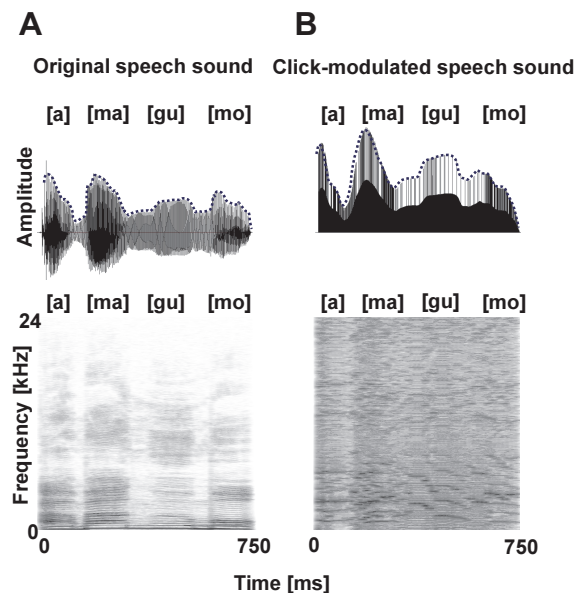
Fifty simulated sounds were presented to the subjects. The simulated sounds exhibited in the experiments were 60 dB SPL and synthesized from the 4-mora words which have 5.5-7.0degree of intimacy in development of Familiarity-controlled Word-lists (FW03). These words were uttered by a woman.

The simulated sounds were click train, repetition

rate of which followed formant frequency and amplitude envelope transition of an original speech sound (Fig.1). Frequency information were derived every15 msec for the center frequencies of the first two formants. Amplitude envelope information was extracted using half-wave rectification and low pass filter (LPC).

### 2.3. Experimental procedure

Experiments were conducted under following procedures. In experiment I, four alternative choices were presented before subjects listened to the simulated sounds. Then, the subjects answered what they heard from the alternative choices within 5 seconds after the stimulus was presented. The trial was carried out 50 times. The simulated sounds were presented randomly. In experiment II, the subjects listened to the simulated sounds and dictated how they perceived on response sheets in roman



**Fig. 1** An example of the stimulus. Upper figures show the waveform and amplitude envelope (dotted line), and lower figures show spectrograms. (A) Original speech sound. A Japanese word “[a][ma][gu][mo].” (B) Click-modulated speech sound synthesized from the original sound (A).

letters within 10 seconds after the sounds were presented. The same sounds were used as the sounds which the subjects listened to in Experiment I.

### 3. Results

#### 3.1 Experiment I (alternative choice task)

The results of experiment I was shown in Fig.2A. Fig.2A shows when the subjects answered what they heard from four alternative choices, percentage of correct answer was 73 % on average. The value was significantly higher than chance level (25 %).

#### 3.2 Experiment II (dictation test)

Correctly perceived vowel rate was shown in Fig.2B. Correctly perceived consonant rate was shown in Fig.2C. Correctly perceived mora rate was shown in Fig.2D. Fig.2B shows that the average of accuracy reached 40 % on average. The percentage was also significantly higher than chance level (20 %). Fig.2C shows that the average of accuracy reached 40 % on average. The percentage was also significantly higher than chance level (20 %). Fig.6 shows that correctly

perceived mora rate exceeded 19 % on average.

### 4. Discussion

Our data showed that subjects were able to understand the contents of the click-vocoded speech sounds to at least some extent (Fig. 2). As seen in Fig. 2A, subjects were able to comprehend the contents of CMS relatively easily, if the right answer was provided as an option. The relatively high performance in the alternative-choice compared with the dictation task (Fig. 2B–D) could be due partly to top-down cognitive processing.

### 5. Conclusion

Our data shows that laser-evoked sounds are at last partially intelligible as speech sound. These results open up the possibility of the speech encoding scheme can be applied to the noninvasive hearing aids to restore speech perception in hearing-impaired people.

### 6. Reference

- [1] J. Wells, C. Kao, K. Mariappan, J. Albea, E. D. Jansen, P. Konrad, and A. M. Jansen, "Optical stimulation of neural tissue in vivo," *Optics letters*, vol.30, no.5, pp.504-506, 2005.

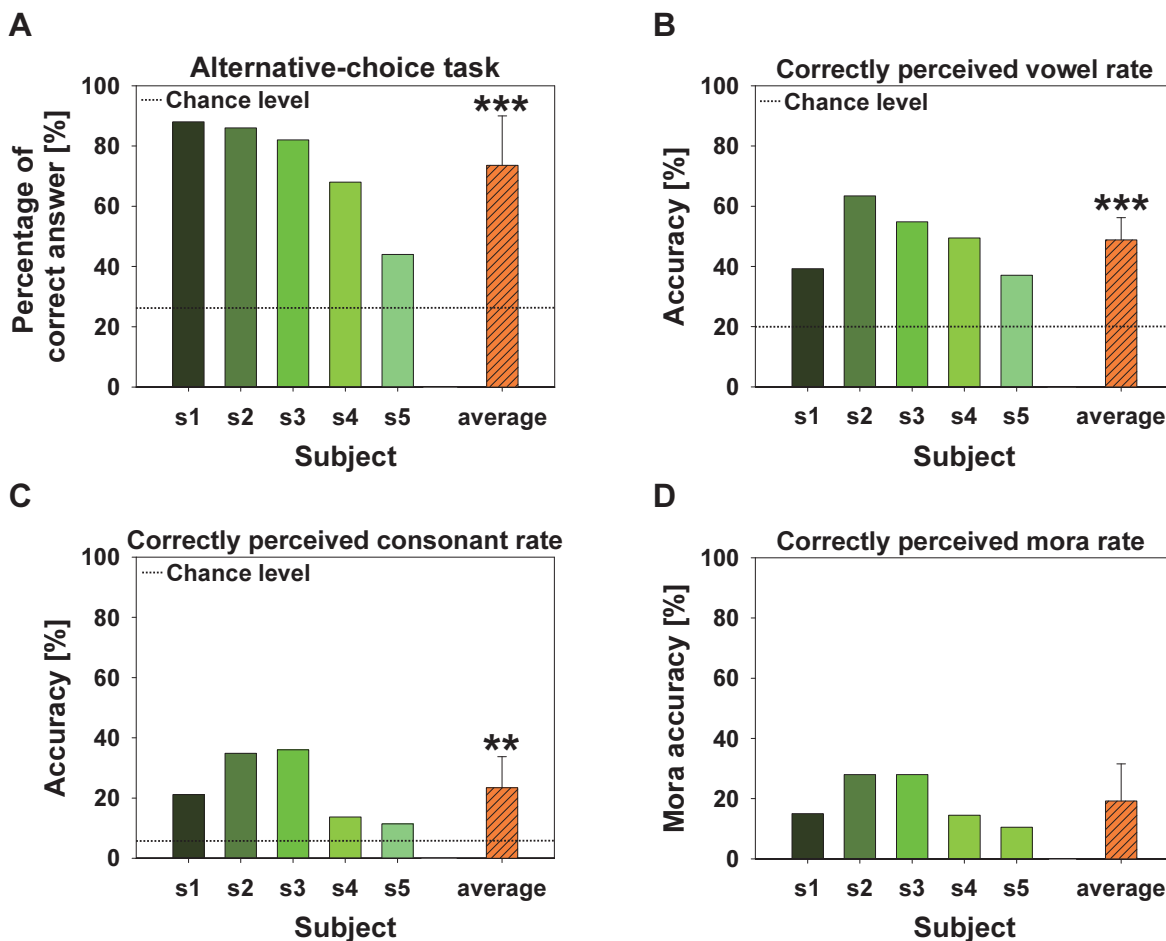


Fig. 2 Intelligibility of click-modulated speech sound. Error bar represents standard deviation of the mean, and the horizontal dotted line indicates chance level. Average scores were compared with chance level (CL) using a one-sample t-test (\*\* <math><0.01</math>, \*\*\* <math><0.001</math>). (A) Results of alternative-choice task. Vertical axis shows percentage of correct answers. CL is 25%. (B) Correctly perceived vowel rate in dictation task. CL is 20%. (C) Correctly perceived consonant rate. CL is 6%. (D) Number of correctly perceived morae.

# 蝸牛マイクロフォン電位記録法の検討：スナネズミを被験体とした研究

原田 勇太<sup>†</sup> 小林 耕太

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

Email: <sup>†</sup>dmq1007@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード 蝸牛マイクロフォン電位, マスキング

## 1. はじめに

蝸牛マイクロフォン電位(Cochlear microphonics: CM)とは、蝸牛に到達した音の周波数、強さ、位相、時間情報を忠実に再現する電気信号で、蝸牛の内部または周辺組織から計測することができる。

蝸牛基底膜上の周波数の場所表示は入口である基部が高周波数の音声、先端部が低周波数の音声によく反応するようにできている。このため基部では低周波数の波にも刺激されるので、音圧レベルが高い時には低周波数の音声にも反応することになる。

CM の計測手法としては骨胞から電極を挿入し、正円窓に当てる手法があるが、蝸牛基部付近の電位を計測しているため正円窓から計測するCMは蝸牛の基部の電位がより強調されていつと考えられる。したがって蝸牛先端部の電位は正確に計測されていない可能性がある。

そこで 本研究ではマスキングを用いてどの部位のCMであるかを検討することを目的とする。

マスキングとは物理的には存在する音であるが遮蔽音(Masker)によって知覚することが困難になる現象である。Masker と被遮蔽音(Maskee)を短い間隔で呈示することで Maskee が聞こえづらくなる現象を時間(経時)マスキングという。

Maskerの周波数、音圧レベルを変化させることによって、どのように Maskee の振幅が変化するかを解析することによって検討する。

## 2. 実験方法

### 2.1 CM 電極留置手術

手術は強心剤、麻酔を適量打った後に毛を剃り、止血剤を打った後に皮膚を切開した。その後ピンセットで骨胞を露出させ、骨胞にメスで穴を開け、電極を挿入し、正円窓付近に触れさせることで CM を計測した。

### 2.2 実験環境

実験は、防音・防磁箱内で麻酔下のスナネズミを用いて計測した。スピーカーと耳の距 10cm で計測した。

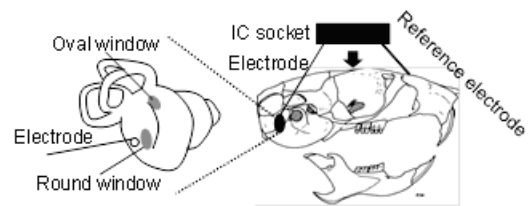


Fig.1 Recording site of Cochlear microphonics  
Measured Cochlear microphonics by inserting a silver line electrode in the hole of bulla. The electrode was hooked onto the round window of cochlear. Reference electrode was placed on a brain surface.

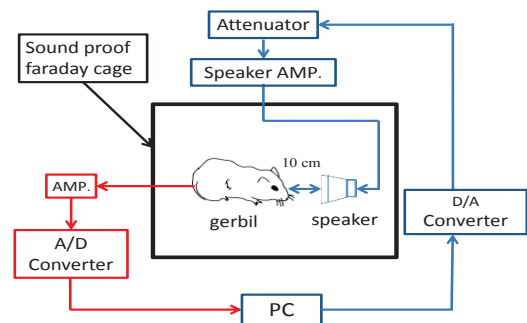


Fig.2 Experimental environment. All experiments were held in sound proof faraday cage. Sound stimuli were presented from a speaker placed 10 cm from the right ear.

## 2.3 音刺激

### 2.3.1 Maskee

周波数は 2, 8, 22.6 kHz, 継続時間は 91 ms 立ち上がり時間は 1 ms 立ち下がり時間は 10 ms のトーンバーストを使用した。音圧レベルは 60 dB SPL を使用した。

### 2.3.2 Masker

周波数は 1 から 32 kHz(1.4kHz を除く)2 分の 1 オクターブ刻みで使用した。継続時間は 452 ms

立ち上がり時間は 50 ms 立ち下がり時間は 2 ms のトーンバーストを使用した。

音圧レベルは Maskee から -10 dB から +30 dB まで 10 dB 刻みで使用した。

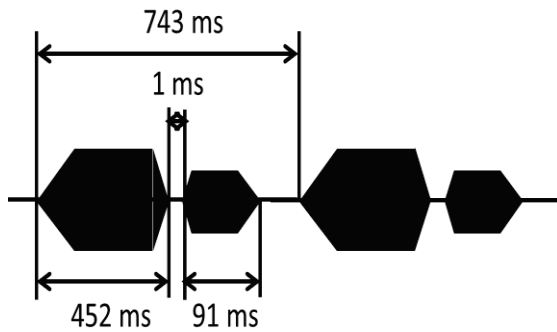


Fig.3 Temporal structure of the test sound. All stimuli were tone bursts. Masker of intensity was -10, 0, +10, +20 dB SPL from the threshold maskee. Duration of a masker was 500 ms(rise/fall time 50 ms). Duration of a maskee was 100 ms(rise/fall time 10ms). Interval was 199 ms. Interstimulus interval was 1 ms.

## 2.4 実験手順

まず、被検体の最小可聴域を計測した。Maskeeの音圧を決定した上で、その後可聴域に応じてMaskeeの音圧を決定、計測用音声を作成した。最後に作成した音声を呈示し、CMを計測、Maskeeの振幅値を計測した。

## 3. 実験結果

各周波数の呈示 Masker 音に対しての 2, 8, 22.6 kHz Maskee の振幅変化量は下記の Fig.5.A, B, C のようになった。CM の振幅変化量は Masker と Maskee の周波数が一致した時に最も大きな減少が確認された。また呈示 Maskee 周波数周辺でも大きな減少が確認された。

## 4. 考察

マスキングによって振幅が減少することが確認できた。MaskerとMaskeeが一致すると最も振幅が低下していた。Maskeeが2, 8 kHzの場合Maskerの周波数がMaskeeの周波数より大きい周波数でも減少が確認された。高周波数で減衰が比較的大きく見られたのは、今回用いたCM計測手法が正円窓からのCMで蝸牛の基部に近い位置に電極を留置しているため、高周波数の感度が高く、減衰量も大きく出たと考えられる。8 kHzのMaskeeでは8 kHzから22.6 kHzの区間でより大きな減少が見られ、22.6 kHzのMaskeeでは16 kHzで減少が確認された。このことから特に高周波数のCMでは呈示周波数付近に信号源があると推定される。

## 5. まとめ

マスキングによってCM振幅値の減少が確認出来た。しかし、Maskerの最大音圧レベルが90 dB SPLとなっており、基底膜の全体を振動させてしまった

ために呈示周波数以外の有毛細胞の反応を抑制していたことが考えられる。よって、最大音圧を下げる必要があると考える。また、今回は正円窓からCMを計測していたので他のCM計測手法でも検討する必要もあると考える。

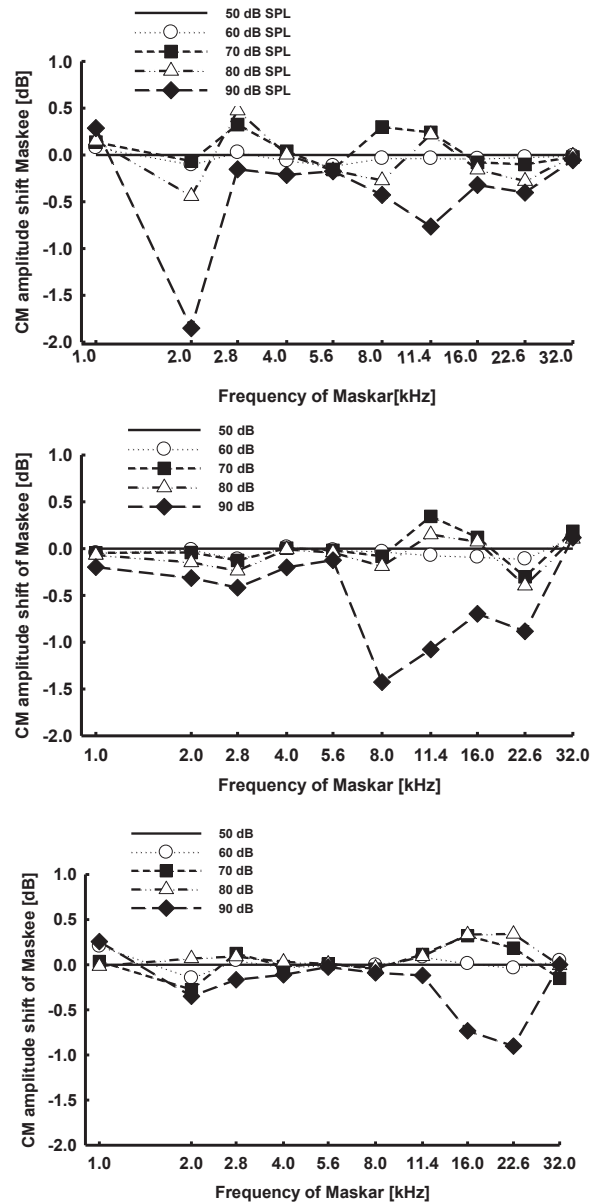


Fig.4 Amplitude shift of the 2 kHz Maskee CM (A), 8 kHz Maskee CM (B) and 22.6 kHz Maskee CM (C) in each frequency. In both figures show the amount of amplitude shift between 50 dB Masker (dot line) and 60,70,80,90 dB Masker.

## 参考文献

[1] Robert V. Shannon (1976) Two-tone unmasking and suppression in a forward-masking situation. J Acoust Soc Am. 59 (6):1460-70.

# 赤外光を用いた新型装用人工内耳の開発： 経鼓膜的な蝸牛神経刺激の有効性の検討

尾上幸太郎<sup>†</sup> 松井 優 玉井勇太 飛龍志津子 小林耕太

同志社大学大学院 生命医科学研究科 脳神経行動工学研究室 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

E-mail: <sup>†</sup>dmq1032@mail4.doshisha.ac.jp

**キーワード** 赤外光, 人工内耳, 蝸牛神経, 経鼓膜刺激

## 1. はじめに

Izzoらはスナネズミ(*Meriones unguiculatus*)を用いた実験で、赤外光を正円窓から蝸牛に向かって照射することで複合活動電位(CAP)を記録することに成功している<sup>1)</sup>。この報告以前にも光刺激は電気刺激に対していくつかの利点があり、電気刺激と比較する形で注目されている。電気刺激法に対する光刺激法の主なメリットは組織と非接触で刺激できること、刺激の分解能が高いことなどが挙げられる。

我々の研究室では光刺激法の「組織と非接触で刺激できる」という利点を活かして着脱可能な新しい人工内耳の開発を試みている。この人工内耳は電極留置手術を必要としないため、従来の体内に刺激電極を埋め込む人工内耳よりも少ない負担で使用できるようになると想定している。Izzoらの研究ではスナネズミの皮膚を切開し骨胞を露出させることにより、正円窓越しに蝸牛神経を刺激していたが、低侵襲性を実現するには経鼓膜的に刺激する必要がある。

本研究ではスナネズミを用いて、経鼓膜的な光刺激によっても蝸牛神経の応答を得ることができるのかを確認する実験を行った。またその時の光刺激が蝸牛神経のどの部位を刺激しているのかについての検討を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 被験体と実験準備

被験体として生後1年以内のスナネズミを用いた。実験を行う前に麻酔前投薬として硫酸アトロピン(約0.7 mg/kg)を投与した後に麻酔としてケタミン(約47 mg/kg)とキシラジン(約14 mg/kg)の混合麻酔を投与した。

まず、脳に基準電極と聴性脳幹反応(ABR)測定用の銀電極を留置するために頭部の皮膚を切開し、デンタルドリルで頭蓋骨に直径約1 mmの穴を2つ開けた。ABR測定用電極を挿入する穴は、十字縫合線から後方に約5 mm、右側に約2 mmの位置に開けた。基準電極は脳表に触れるように挿入し、ABR測定用電極は下丘に当たるように穴から垂直に約2 mmの深さに刺した。

次にスナネズミの左肩から左前足にかけて首の外周を切開し、骨胞を露出させた。正円窓が見えるように骨胞に約1 mmの穴を開け、そこからCAP計測用銀電極を挿入した。この電極からは蝸牛マイクロフォン電位(CM)も計測できるので、反応を確認しながら正円窓のふちに当たるように固定した。

光刺激提示用のレーザーファイバー(口径:400 μm, 開口数:0.22)はスナネズミの左耳の外耳道に沿って鼓膜に垂直になるように挿入した。(図1)

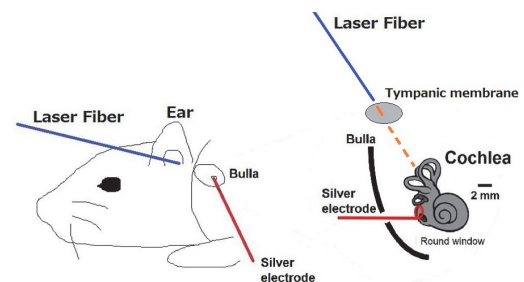


図1 被験体のスナネズミに施した手術の概略図。骨胞内に挿入された銀線のほかに、脳表と下丘の電位を計測する銀線が留置された。

### 2.2 実験環境

音刺激提示用のスピーカーを被験体の正面10 cmの位置に固定し、PCで生成した刺激をD/Aコンバータで変換してからスピーカーおよびレーザーファイバーから提示した。被験体から得た電気反応は生体アンプで1000倍増幅したのちにA/Dコンバータで変換しPCで記録した。実験は全て防音・防磁箱の中で行った。

### 2.3 ABR計測とCAP経時マスキング

ABRを計測するためABR測定用電極と基準電極を生体アンプに繋ぎ、レーザーファイバーから継続時間100 μsのパルス波を9.9 Hz周期で1000回提示した。

光刺激により生じたCAPの発生源を検討するために音刺激による経時マスキングを行った。スピーカーからマスキングである音刺激を、レーザーファイバーからマスキングとなる光刺激を提示した。音刺激は継続時間が200 ms、立上り、立下り時間が10 msのトーンバーストで、周波数を1 kHz - 60 kHzで対数刻みに変化



させ、音圧は減衰器を用いて 20 dB SPL - 90 dB SPL で 10 dB SPL 刻みに変化させた。元音声は 90 dB SPL に校正した。光刺激は波長 1.87  $\mu\text{m}$  でパルス幅 100  $\mu\text{s}$  のパルス波を用いた。このときの 1 パルス分の露光量は 0.19  $\mu\text{J}$  だった。光刺激は音刺激の 10 ms 後に提示され、同じ刺激の組み合わせをそれぞれ 10 回繰り返した。繰り返しの周期は 500 ms であった。

### 3. 実験結果

#### 3.1 ABR の確認

計測信号を 1000 回加算した結果、振幅約 14  $\mu\text{V}$  の反応が確認できた(図 2)。

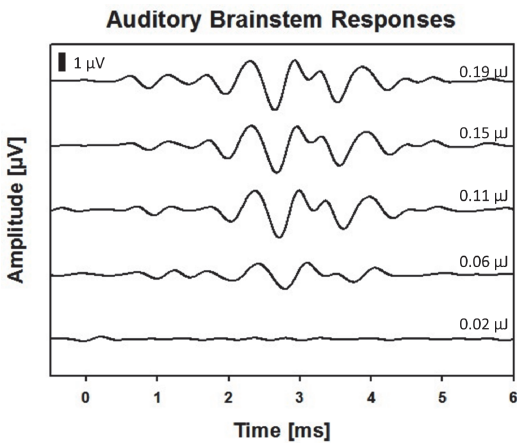


図 2 赤外光による経鼓膜刺激により誘発された聴性脳幹反応 (ABR)。光刺激の露光量が大きくなるにつれて反応も大きくなっている。

#### 3.2 各周波数によるマスキング効果

計測した CAP に対する各周波数のマスキング効果を CAP の振幅で評価した。CAP の振幅は 1 つ目の正のピークと負のピークの差分から求めた。(図 3)

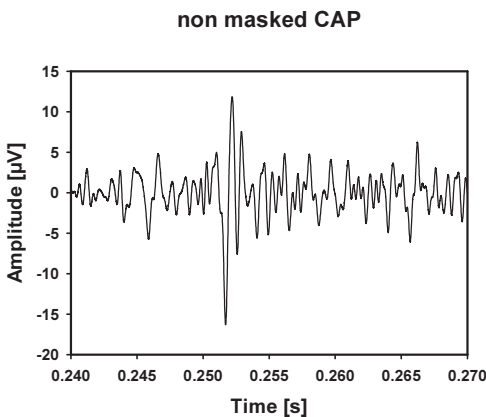


図 3 光刺激によって誘発された CAP。この図はマスキングをしなかった時の反応である。CAP の振幅は正のピークと負のピークの差とした。2 赤外光による経鼓膜刺激により誘発された聴性脳幹反応 (ABR)

マスキナーの音圧や周波数によって CAP の振幅の大きさに違いが見られた。マスキナーの音圧が大きいほど、

周波数が低いほど CAP の振幅が小さくなる傾向が見られた(図 4)。

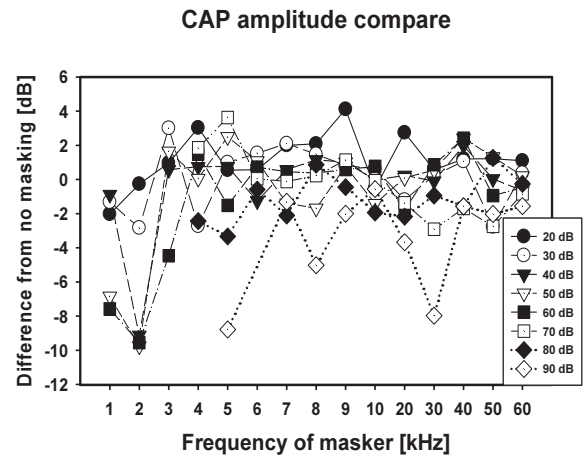


図 4 全てのマスキナーの音圧と周波数に対する CAP の振幅を比較した。低周波のマスキナーが高い効果を示している傾向が見られる。

### 4. 考察

蝸牛から出ている聴神経は、高周波を伝搬する神経が低周波を伝搬する神経を包み込むような構造となっているため<sup>2)</sup>、この束が外部から赤外光によって刺激されるのであれば束の内側に存在する低周波の神経よりも外側に位置する高周波の神経の方が刺激の影響を強く受けると考えられる。このことから本実験のマスキング実験では、高周波のマスキナーがより高い効果を得られるであろうと予想していたが、図 4 で示した通り 3 kHz 以下の低周波のマスキング効果が他のマスキナーと比べて高いという結果が得られた。刺激箇所が神経束の中心から外れていた場合、生じる CAP には高周波成分が多くなると考えられるため、照射された赤外光は聴神経束の中心をとらえ、聴神経全体を刺激したと考えられる。低周波マスキナーが比較的高い効果を示した原因は光刺激によって生じたマスキナーではなく、周波数によるマスキナーの信号の強さの違いにあるのではないかと考えられる。

### 5. 参考文献

- [1] Agnella D. Izzo, Claus-Peter Richter, E. Duco Jansen, and Joseph T. Walsh, Jr, "Laser Stimulation of the Auditory Nerve," *Lasers in Surgery and Medicine*, 38, 745-753 (2006).
- [2] Yehoash Raphael, Richard A Altschuler, "Structure and innervation of the cochlea" *Brain Research Bulletin*, 60, 397 - 422 (2003).

# 不均一な皮質骨中の超音波伝搬特性

高野 幸樹<sup>†</sup> 松川 真美<sup>†</sup> 長谷 芳樹<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

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

E-mail: <sup>†</sup> duq0366@mail4.doshisha.ac.jp, [mmatsuka@mail.doshisha.ac.jp](mailto:mmatsuka@mail.doshisha.ac.jp), <sup>‡</sup> nagatani@kobe-kosen.ac.jp

キーワード Axial Transmission, 皮質骨, 不均一性

## 1. はじめに

骨粗鬆症は加齢や生活習慣など様々な要因により発症し、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として定義されている<sup>1)</sup>。超音波法<sup>2)</sup>は、X線には測定できない骨質評価が可能で、専門技師と設備の必要がなく、非侵襲、安価であることから集団スクリーニングに適している<sup>3-5)</sup>。現在、新しい超音波計測法としてAT法(Axial Transmission technique)がある。AT法は、フランス、フィンランド、中国で行われており、近年は日本でも注目されている。これは主に長管骨の皮質骨評価を行う手法である。皮質骨は体荷重を支えており、その骨折は寝たきりなどを招くことが多く、生活の質に大きく影響する。

AT法は、アレイセンサを用いて橈骨の長管骨皮質骨を骨軸方向に伝搬する超音波を受波する。そして、伝搬音速から皮質骨の弾性的性質を評価している<sup>6)</sup>。しかし、多くの研究では骨を均一媒質と仮定しており、骨の不均一性や異方性の検討まで進んでいない。そこで、骨の不均一モデルを作成し、シミュレーションを行うことで、骨の不均一性が超音波伝搬に与える影響を調べる。

今回は、皮質骨中の音速分布を実験的に測定し、そのデータを用いて骨の3次元不均一モデルを作成したので報告する。

## 2. 実験

### 2.1. 実験試料

73月齢の健常な雌ウシの左橈骨の皮質骨を用いた。長管骨皮質骨から、厚さが約10mmの円環状の4つの連続した試料を作成した。また円環状試料の作成前に、モデル作成の際に位置を同定するための穴を二か所作成した。円環状試料の表面は薄片自動研磨機(マルト一, ML-521)を用いて研磨した。作成した試料を図1に示す。

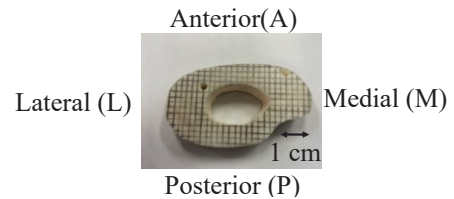


図1 実験試料

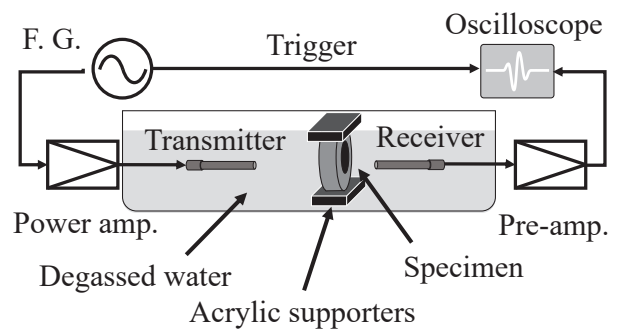


図2 実験系

### 2.2. 実験手法

超音波パルス法を用いて、試料を透過した縦波を観測した。実験系の概略図を図2に示す。発信器(Agilent Technologies, 33250A)から出力した振幅 $5V_{p-p}$ , 1.3MHzの正弦波1波を、パワーアンプ(NF, HAS 401)で20dB増幅し、送波用トランスデューサに印加した。送波用、及び受波用トランスデューサには平面型PVDFトランスデューサ(自作, 直径: 3mm)を用いた。試料をそれぞれのトランスデューサの音軸上に置き、試料を透過した縦波超音波を受波用トランスデューサで受波した。その信号を、プリアンプ(Tektronix, TDS520D)を用いて20dB増幅し、オシロスコープ(Tektronix, DPO3054)で観測した。実験試料はアクリル板で挟んで固定し、音軸と骨軸が平行になるように調整した。そして試料をTangential方向とRadial方向に1mmずつ動かして波形を観測した。また、マイクロメータを用いて各測定点での試料の厚さを測定した。

### 2.3. 実験結果

骨の透過波の波頭を到達時刻として、各測定点の骨内の音速を算出した。一試料における音速分布の結果を図3に示す。MedialとLateral側の音速値が高く、Posterior側の音速値が低い結果となった。骨内の音速値は約20%変化しており、音速の最大値は4500 m/s、最小値は約3700 m/s、平均値は約4150 m/sであった。

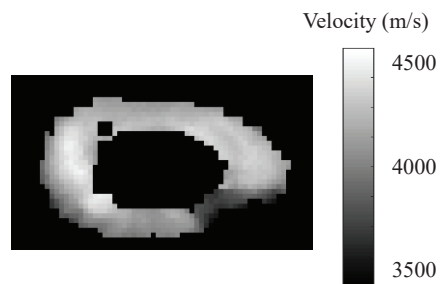


図3 実験結果

## 3. モデル作成

### 3.1. 2次元補間

骨を一軸異方性と仮定し、弾性 FDTD 法 (Finite Difference Time Domain method) を用いて音波伝搬シミュレーションを行う。そのために、本研究では空間分解能 40  $\mu\text{m}$  の骨の3次元不均一モデルを作成した。

はじめに、実験で得られた分解能 1 mm の音速結果を、共一次内挿法を用いて境界部分以外を補間した。次に、PCHIP (Piecewise Cubic Hermite Interpolating Polynomial) を用いて、境界部の角を曲線で結んだ。そして、その曲線までの音速値を、距離の反比例の重みで補間した。一試料における補間結果を図4に示す。

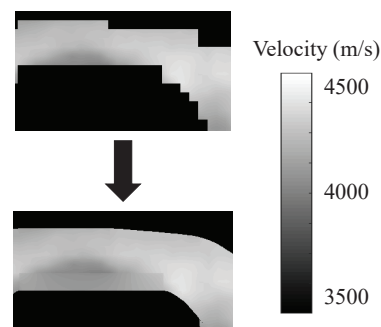


図4 モデルの2次元補間

### 3.2. 3次元補間

2次元補間を行った4つの試料の位置を合わせるために、実験の際に開けていた穴の位置が一致するように補間した。次に、同じ位置にある音速値が4つの試料で連続するように、その間の音速データを、PCHIPを用いて補間した。作成した3次元不均一モデルを図5に示す。

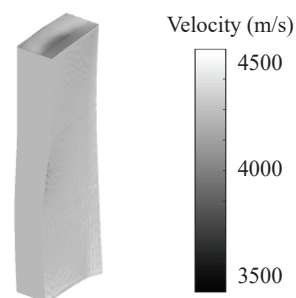


図5 3次元不均一モデル

## 4. まとめ

実験的に分解能 1 mm の音速データを得た。その結果を元に、共一次内挿法、PCHIPを用いて補間を行い、3次元不均一モデルを作成した。今後は骨の不均一性が超音波伝搬に与える影響を検討するため、弾性 FDTD 法を用いてシミュレーションを行う。

## 文 献

- [1] NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Disgnosis, and Therapy: J.A.M.A., 285. (2001), pp. 785-795.
- [2] L. Pascal, H. Guillaume, "Bone Quantitative Ultrasound," 1st ed. Springer, (2011).
- [3] R. Siffert, J. Kaufman, "Ultrasonic bone assessment: 'The time has come'", Bone, 40-1 (2007), pp. 5-8.
- [4] C. F. Njeh, "Quantitative Ultrasound: Assessment of Osteoporosis and Bone Status," 1st ed. Taylor and Francis, 1999.
- [5] C. M. Langton, S. B. Palmer, and S. W. Porter, "The measurement of broadband ultrasonic attenuation in cancellous bone," Eng. Med., 13. (1984), pp. 89-91.
- [6] M. Talmant, S. Kolta, C. Roux, D. Haguenaer, I. Vedel, B. Cassou, E. Bossy and P. Laugier, "In vivo Performance Evaluation of Bi-Directional Ultrasonic Axial Transmission for Cortical Bone Assessment", Ultrasound Med Biol, 35. (2009), pp. 912-919.

# 骨コラーゲン中の悪玉架橋が超音波音速に与える影響

上田 涼平<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, 皮質骨, 悪玉架橋

## 1. はじめに

現在の骨粗鬆症の診断基準では X 線で測定した骨組織のカルシウム塩の密度である骨密度 (BMD: Bone Mineral Density) が用いられる。しかし、骨強度に関連する要因は骨密度以外にも骨の弾性、石灰化状態などの骨質、内部微細構造、皮質骨の菲薄化などの影響が指摘されている。特に、1990 年以降、骨密度が十分でも骨折リスクが高いケースが報告されており、この一因として、糖尿病や老化による骨中コラーゲンの架橋異常が指摘されている。現在、骨中コラーゲンを非侵襲的に評価する手法は確立されておらず、血中や尿中に含まれるペントシジン (悪玉架橋)<sup>1,2)</sup>の濃度を調べることで非侵襲的に評価する手法が中心である。しかし、この架橋異常は骨の弾性的性質にも影響を与えると考えられるため、骨の弾性的性質を定量的に測定できる超音波測定法 (QUS: Quantitative Ultrasound) も次世代の評価手法として期待できる。超音波法により、将来的には臨床の場で非侵襲的に骨診断が可能となる可能性がある。

そこで本研究では、悪玉架橋が骨に及ぼす影響を明らかにするため、その生成と骨中の超音波の伝搬速度 (音速) の関連を実験的に検討する。

## 2. 実験方法

### 2.1. 試料

本実験では 175 日齢の左右のブタ橈骨及び大腿骨幹部から円環状に皮質骨を切り出し、プレート状 (20 × 5 × 0.5 mm<sup>3</sup>) 試料を作製した。なお、骨軸方向 (Axial) から悪玉架橋作製用と比較参照用に 2 個ずつ試料を作製した。その後、悪玉架橋作製用試料は、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、比較参照用試料は PBS と Penicillin-Streptomycin を調整した溶液に浸し、ヒトの体温に近い 37°C で培養を行った<sup>3)</sup>。なお、骨試料内に溶液がより浸透しやすくなるように、デシケーター中で真空ポンプを用いて、骨試料内の空気を十分に脱気した後に試料を溶液に浸した。

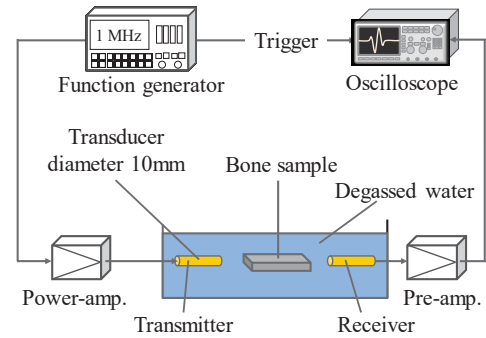


図 1. 実験系.

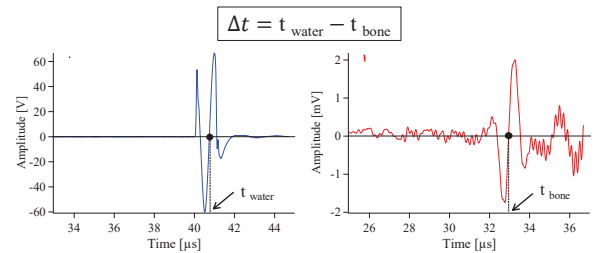


図 2. (a) 水を伝搬した波形. (b) 骨を伝搬した波形.

### 2.2. 超音波音速測定

本実験で用いた実験系を図 1 に示す。PVDF 圧電膜平面型トランスデューサ (直径 10mm) を十分に脱気した水の中に同軸上に設置した。発振器から振幅 7 V<sub>p-p</sub>、周波数 1 MHz の正弦波 1 波を、パワーアンプで 20 dB 増幅し、送波側の PVDF 圧電膜平面型トランスデューサに印加し、音波を発生させ試料の長手方向に伝搬させた。その後、脱気水と試料を透過したパルス音波をもう一方の PVDF 圧電膜平面型トランスデューサで受波し、得られた信号をプリアンプで 40 dB 増幅した後、オシロスコープで波形を観測した。

音速は以下の手法で算出した。まず、試料がない状態で、脱気水のみを透過した超音波の伝搬波形を観測する (図 2 (a))。この観測波形で、立ち上がりのゼロクロスの時間を  $t_{\text{water}}$  とする。また、試料を設置し、水と試料を透過した音波の波形を観測する (図 2 (b))。この波形の立ち上がりのゼロクロスの時間を  $t_{\text{bone}}$  と、これら 2 つの時間差  $\Delta t$  から次式より試料の音速  $v_{\text{bone}}$  が求められる。

$$v_{bone} = \frac{v_{water}}{1 - v_{water}(\Delta t/d)}$$

ここで、 $v_{water}$  は水の音速、 $d$  は試料の長手方向の長さである。試料を音波の伝搬方向にそって厳密に平行に設置し、複数回の伝搬時間測定を行う。得られた測定値の平均を各試料の音速値とした。

### 2.3.3 点曲げ試験方法

悪玉架橋が骨試料の弾性的性質に与える影響を確認するため、音速測定後の試料の3点曲げ試験を行った。試料は音速測定後に、十分乾燥した状態とした。小型卓上試験機を用い、骨の試料測定用に治具を作成した。骨の計測では、約 60 mN の荷重までの応力-ひずみ曲線を測定した。

## 3. 実験結果

図 3 に 37°C で 14 日間培養した悪玉架橋生成試料と比較参照試料の音速変化の代表例を示す。悪玉架橋生成試料は、培養 0 日目から 2 日目にかけて 50 m/s 程度音速が増加し、その後は音速が単調に減少した。培養前と 14 日間の培養後と比較すると、試料 A においては 95 m/s、試料 B において 107 m/s の音速減少がみられた。一方で比較参照試料は、初期の音速増加は観測されず、培養日数に応じて音速が単調に減少した。培養前後では、試料 C においては 152 m/s、試料 D において 180 m/s の音速減少がみられた。つまり、架橋を作製した試料は比較参照試料よりも、初期の音速増加の影響により、全体の音速低下が小さい傾向を示した。

図 4 に 3 点曲げ試験の測定結果を示す。比較参照試料は約 60 mN で降伏したのに対して、悪玉架橋を生成した試料は約 46.1 mN で降伏し、脆いことが確認された。ただし、加重-変位曲線の傾きは約 74 mN/mm と約 71 mN/mm であり、試料による変化はわずかであった。この結果より、悪玉架橋の形成により骨強度の低下が確認された。

## 4. まとめ

本報告ではブタ皮質骨をもちいて、悪玉架橋が生成された試料と参照試料を比較検討した。超音波骨粗鬆症診断に使用される MHz 域の超音波音速を測定したところ、初期に音速が増大した後、低下の傾向を示した。これは、悪玉架橋形成初期では骨の弾性的性質が増大し、その後低下することを示唆している。また、悪玉架橋の生成により、骨強度が低下することを 3 点曲げ試験結果より確認した。今後これらの影響をより定量的に臨床で評価できれば、超

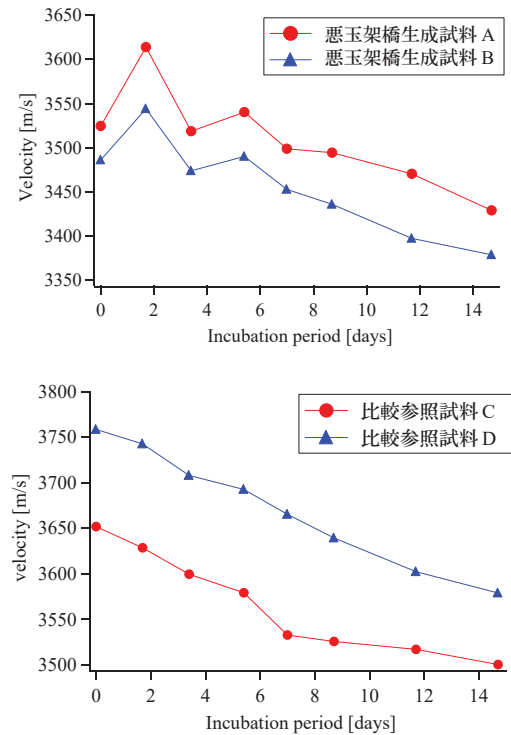


図 3. 培養日数経過による超音波音速変化。

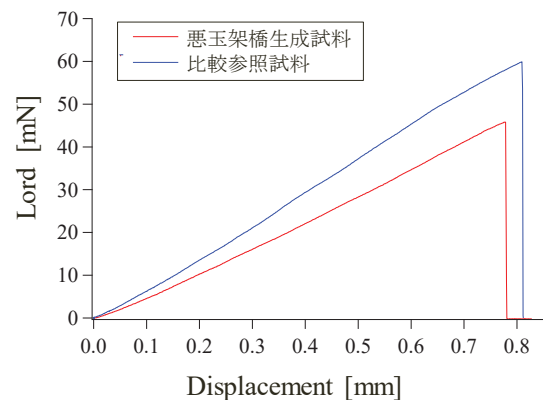


図 4. 3 点曲げ試験結果。

音波法による骨強度診断がより正確なものになると期待できる。

## 文 献

- [1] M. Saito et al., "An in vitro model to test the contribution of advanced glycation end products to bone biomechanical properties, osteoporosis, and diabetes mellitus," *Osteoporosis Int.* Vol.17, pp.1514-1523 (2006).
- [2] M. Saito et al., "Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging," *Osteoporosis Int.* Vol.21, pp.195-214 (2010).
- [3] S. Viguet-Carrin et al., "An in vitro model to test the contribution of advanced glycation end products to bone biomechanical properties," *Bone*, 42, pp. 139-149 (2008).

# 超音波照射による軟骨中の誘発電位の検討

森 駿貴<sup>†</sup>, 松川 沙弥果<sup>†</sup>, 高柳 真司<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

<sup>‡</sup> 名古屋工業大学 〒466-8555 愛知県名古屋市昭和区御器所町

E-mail: <sup>†</sup> dmq1028@mail4.doshisha.ac.jp

キーワード 超音波, 軟骨, 圧電現象

## 1. はじめに

近年, 超音波骨折治療が応用されている. 超音波骨折治療では骨折部に MHz 域の低強度超音波パルス (Low Intensity Pulsed Ultrasound : LIPUS) を照射することで骨の癒合を早めることができる. 臨床試験の結果から, 超音波骨折治療により骨の癒合に要する日数が 30-40 % 近く短縮されることも明らかにされている<sup>1)</sup>. しかし, 超音波の照射により骨の癒合が促進されるメカニズムの全容は未だ解明されていない<sup>2,3)</sup>

一般に, 応力負荷による骨再生プロセスの一つとして, 保田らは, 繰り返し応力により骨中に電位が誘発されることを報告した<sup>4)</sup>. この誘発電位の要因として流動電位と圧電性が指摘されている<sup>5)</sup>. kHz 域以下の低周波域では流動電位が主な原因と考えられているが, LIPUS と同じ MHz 域では流動電位の発生があまり期待できない. そのため, MHz 域での骨中誘発電位は圧電性に起因する可能性が高い.

これまで骨を圧電材料とみなし超音波トランスデューサ (以下, 骨トランスデューサ) を作製し, MHz 域の超音波照射による骨中の電位誘発を報告した<sup>6)</sup>.

本研究では生体の圧電性をより詳しく検討するため, 軟骨を圧電材料とみなし超音波トランスデューサ (以下, 軟骨トランスデューサ) を作成した. また, 軟骨トランスデューサの受波感度特性について検討した.

## 2. 実験方法

### 2.1. 実験試料

実験試料の作製手順を図. 1 に示す. 34-36 月齢の健康なウシ大腿骨骨幹部中央から皮質骨の円環試料を切り出した. その後, 骨軸 (Axial) 方向に沿って円柱を切り出し, 円板状に加工した. 骨円板試料の直径は 11.0 mm, 厚さは  $1.00 \pm 0.01$  mm とした. 一方, 34-36 月齢の健康なウシ大腿骨骨端遠位部半月板から軟骨を切り出し十分に乾燥させ, 直径 11.0 mm, 厚さ  $1.00 \pm 0.03$  mm の円板状に加工した. 本研究では, 骨試料と軟骨試料を各 4 枚作成し, それらの試料を圧電材料とみなし, 超音波トランスデューサを 8 本作製した. (図. 2)

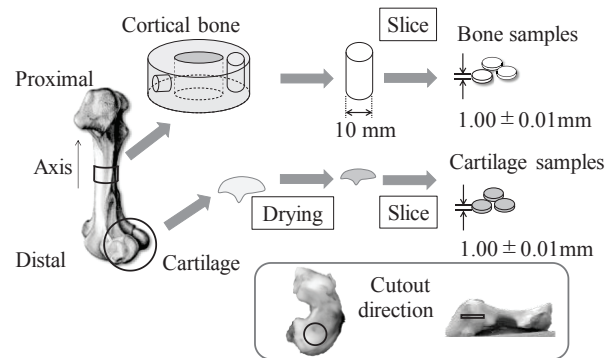


図. 1 Fabrication process of bone and cartilage plate samples.

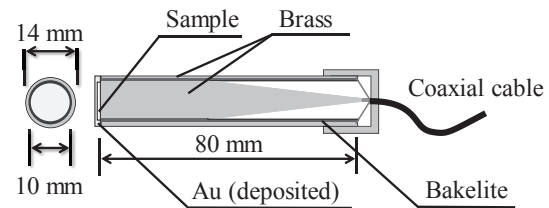


図. 2 Construction of ultrasound transducer.

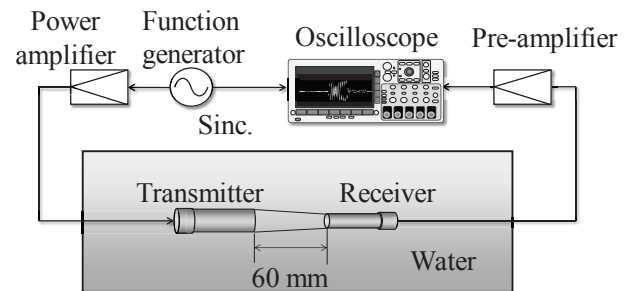


図. 3 Experimental setup.

### 2.2. 実験方法

超音波照射の実験系を図. 3 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, 発振器 (33250A, Agilent) とパワーアンプ (HAS 4101, NF) を用いて  $70 V_{pp}$  0.7 - 2.0 MHz の正弦波 10 波のバースト信号を印加した. 受波側に参照用 PVDF トランスデューサあるいは (軟) 骨トランスデューサを音軸が一致するように設置した. 測定では受波信号をプリアンプ

(BX-31A, NF) で 40 dB 増幅し, オシロスコープ (DPO3054, Tektronix) で波形を観測した.

### 2.3. トランスデューサの評価

各トランスデューサの超音波受波感度を計測するため, 0.25 MHz 間隔で 0.7–2.0 MHz の超音波を照射し, トランスデューサで音波を測定し, 感度が既知の PVDF トランスデューサとの相対校正により導出した.

### 3. 実験結果および考察

例として 950 kHz の超音波パルスを, 骨トランスデューサに照射した際の観測波形を図. 4 (a) に示す. また, 775 kHz の超音波パルスを軟骨トランスデューサに照射した際の観測波形を図. 4 (b) に示す. 軟骨トランスデューサで観測した波形の振幅値は 44.6  $\mu\text{V}_{pp}$  となり, 骨トランスデューサで観測した振幅値 (38.4  $\mu\text{V}_{pp}$ ) と同程度の値を示した. これらの値は PVDF トランスデューサの約 150 分の 1 の大きさであった. 以上より, 超音波帯で軟骨の圧電性を確認した.

次に, (軟) 骨トランスデューサの受波感度特性を測定した. 比較のため図. 5 (a) に皮質骨のトランスデューサの受波感度特性を, 図. 5 (b) に軟骨トランスデューサの受波感度特性を示す. 骨トランスデューサにおいて 1.0–1.2 MHz 付近にピークが見られた. これは骨の音速が 3600–4400 m/s であるため, 厚さ 1 mm の試料では, 1/4 波長の厚み共振が起きていることを示している. また, 1.0 MHz における乾燥状態の軟骨の音速は 2500–2540 m/s であった. 従って厚さ 1 mm の試料における 1/4 波長の厚み共振は 625 kHz 付近と推定される. なお, 周波数は異なるが今回測定した範囲では, 軟骨トランスデューサの最大感度 (93.6 nV/Pa) は骨トランスデューサの最大感度 (27.5 nV/Pa) より約 3.4 倍大きいことがわかった.

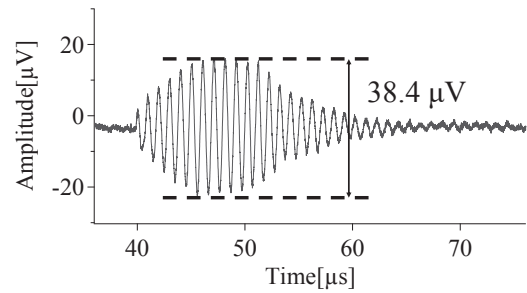
今回用いた軟骨を X 線解析装置で評価したところ, ほとんどハイドロキシアパタイトが含まれておらず, コラーゲンが主であった. つまり, 本結果はコラーゲンの MHz 域の圧電性を示唆していると考えられる.

### 4. まとめ

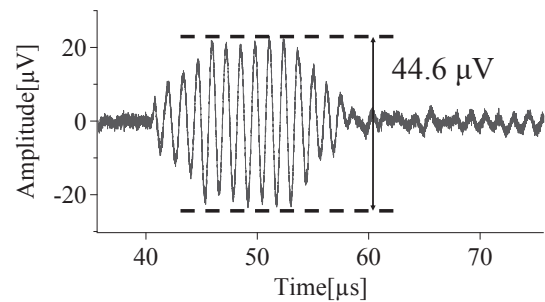
MHz 域の超音波パルスを骨あるいは軟骨に照射した際に生じる誘発電位について調べた. (軟) 骨トランスデューサの受波感度特性から, 軟骨の圧電性は骨と同程度あるいは少し高かった. なお, 今回用いた軟骨は II 型コラーゲンが主成分で HAp はほとんど含まない. 従って, 得られた圧電性はコラーゲンによるものと考えられる.

### 文 献

[1] JD. Heckman, JP. Ryaby, J. McCabe, JJ. Frey, RF. Kilcoyne, *J. Bone Joint Surg. Am.* 76, 26-34 (1994).  
 [2] S. Mitragotri, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 255-60 (2005).  
 [3] LR. Duarte, *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 101, 153-9 (1983).

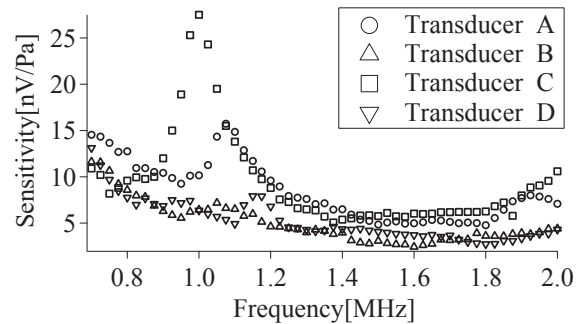


(b) a bone transducer (950kHz).

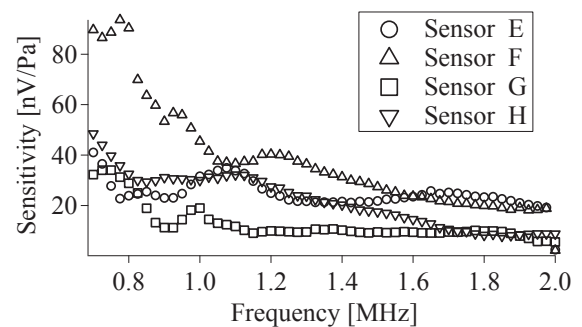


(b) a cartilage transducer (775kHz).

図. 4 Received waveforms.



(a) bone



(b) cartilage

図. 5 The received sensitivity of transducers as a function of frequency.

[4] E. Fukada, I. Yasuda, *Journal of the Physical Society of Japan*, 12, pp1158-1162 (1957).  
 [5] JC. Anderson, C. Eriksson, *Nature*, 227, pp.491-492 (1970).  
 [6] M. Okino et al., *Appl. Phys. Lett.* 103, 103701 (2013).

# 顕微 Brillouin 散乱法による関節軟骨の局所的音波物性評価

川瀬 麻実<sup>†</sup> 柴垣 慶明<sup>†</sup> 富田 昇太<sup>†</sup> 森 駿貴<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 軟骨, Brillouin 散乱, 音速

## 1. はじめに

関節軟骨は、関節のスムーズな運動の実現や、荷重等による衝撃の緩和に貢献する。近年の超高齢化社会に伴い、変形関節症などの関節疾患が深刻な問題となっている。しかし、現在主流である X 線を用いた骨の診断では、軟骨組織の詳細な評価は難しい。

軟骨は、軟骨細胞と細胞外マトリクス(II 型コラーゲンやプロテオグリカンなど)で構成される。細胞外マトリクスの骨格をなすコラーゲンネットワークの間隙には、多量の水を吸収したプロテオグリカンが存在する。これらによって拘束された軟骨内の水は、圧縮ストレスが加わると、自由水へと性状を変え、衝撃を分散させる。このように軟骨の機能を果たす上で、軟骨の構造は重要な力学的意味を持つ[1]。

軟骨の評価方法としては高解像度 MRI や、近年は超音波診断装置の利用も進んでいる。力学的特性の評価方法としては、in vitro の低周波粘弾性測定や、力学試験が挙げられる。不均一な軟骨マトリクスの評価にはナノインデンテーションも用いられるが、主に厚さ方向の硬さ分布の測定となる[2]。したがって、軟骨の性状を局所的にかつ異方性も考慮して検討することは難しい。

そこで本研究では、非破壊・非接触で、試料面内の音速や異方性の評価が可能な顕微 Brillouin 散乱法[3]に着目し、関節軟骨中の局所的な音速評価を試みた。本報告ではマトリクス中の音速分布測定と湿潤軟骨と乾燥軟骨における音速の比較を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1. 試料作成

試料は 31 月齢のウシ左大腿骨の遠位部より採取した。まず、大腿骨遠位部から関節軟骨と下骨を含む 2 枚の薄片試料を作成した。なお切断面は、骨軸方向と内外方向を含む面とした。試料 1 枚は、37.0 °C のインキュベータ中で十分に乾燥させ、乾燥試料とした。もう 1 枚は湿潤の影響を検討するために用いた。なお、2 枚の試料の厚さは、約 200  $\mu\text{m}$  と約 150  $\mu\text{m}$  である。

### 2.2 顕微 Brillouin 散乱法[4]

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。

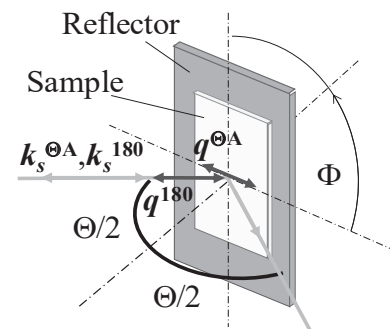


Fig. 1 Reflection induced  $\Theta A$  scattering geometry.  
 $k_i$ : wave vector of the incident light.  
 $k_s$ : wave vector of the scattered light.  
 $q$ : wave vector of the sound wave.  
 $\Theta/2$ : angle between the incident laser beam and the normal line of the specimen surface.  
 $\Phi$ : the rotation angle in the plane.



### 3. 実験結果及び検討

#### 3.1. 関節軟骨一枚中の音速分布と音速異方性

乾燥試料中の 50 点を測定し、試料内における音速分布を確認した。なお、この時の音波伝搬方向は、関節軟骨下骨面に対して平行な方向とした。試料内における音速分布を Fig. 2 に示す。今回測定今回測定した軟骨中の縦波音速は、 $3.36\text{-}3.83 \times 10^3 \text{ m/s}$  であり、試料内での音速のばらつきが見られた。これは、軟骨マトリクスが複雑な弾性特性を持つことを示している。また、下層では比較的音速が高い傾向が確認できた。これは軟骨細胞やプロテオグリカンの量が下層に多いことも関連すると考えられる [1]。

また一般に、関節軟骨は層状で配向性があることが報告されている [1]。そこで、関節軟骨中の音速異方性の評価も試みた。その際、軟骨下骨から  $150 \mu\text{m}$ 、 $500 \mu\text{m}$ 、 $950 \mu\text{m}$  の点を測定した。それぞれの点における音速異方性を Fig. 3 に示す。散乱光スペクトルの強度が十分でない場合も見られたが、弱い異方性が見出された。また、測定点により異方性は変化した。これは化学的に報告されているコラーゲンの配向と同方向に音速値が高い傾向を確認することができた。またそれぞれの測定点における音速異方性（最大と最小の音速差/最大音速）を Tab 1 に示す。先行研究の海綿骨骨梁の音速異方性と比較して、関節軟骨試料の異方性は小さいと考えられる [5]。

#### 3.2. 湿潤軟骨と乾燥軟骨の縦波音速

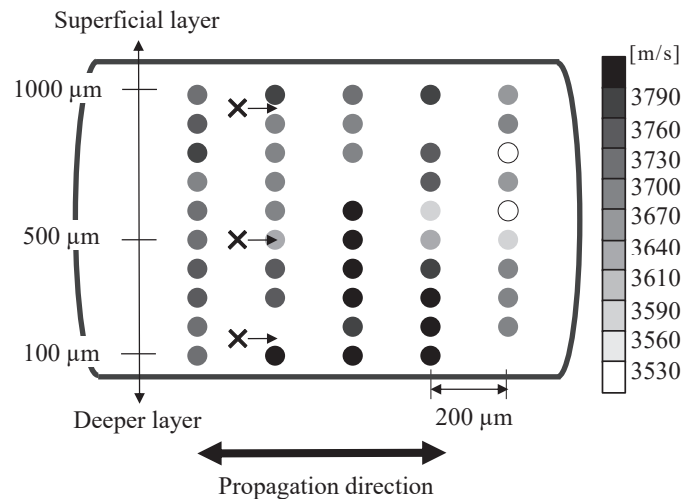
同一試料における湿潤状態と乾燥状態の比較を行った。湿潤軟骨中のシフト周波数は約  $5.28 \text{ GHz}$  となり、音速値は約  $2.04 \times 10^3 \text{ m/s}$  となった。同様に、乾燥軟骨ではシフト周波数が約  $9.5 \text{ GHz}$  となり、音速値は約  $3.58 \times 10^3 \text{ m/s}$  となった。よって、乾燥試料の音速は湿潤試料の音速の 1.75 倍となり、含水量が弾性に大きな影響を与えていると考えられる。また、市販のコラーゲンフィルムを用いて同様に乾湿比較を行った。乾湿状態での音速差は  $300 \text{ m/s}$  程度であった。軟骨の構造において、プロテオグリカンが水の拘束に大きな影響を与えていると報告されている [1]。ゆえに、コラーゲンフィルムは水をあまり拘束しないため、関節軟骨と比較しても音速差が小さいと考えられる。

### 4 まとめ

本研究では、顕微 Brillouin 散乱法を用いて、関節軟骨中の音速測定を行った。軟骨下骨から  $150 \mu\text{m}$ 、 $500 \mu\text{m}$ 、 $950 \mu\text{m}$  の点において、試料内の音速異方性が確認できた。また、湿潤軟骨と乾燥軟骨では、縦波音速の差が大きく、含水量が関節軟骨の弾性に大きな影響を与えることが示唆される。

Tab 1. Maximum and minimum velocity and anisotropy

	Max [m/s]	Min[m/s]	anisotropy
Trabecula [5]	$5.25 \times 10^3$	$5.01 \times 10^3$	4.5%
Cartilage $150 \mu\text{m}$	$3.82 \times 10^3$	$3.72 \times 10^3$	2.6%
Cartilage $500 \mu\text{m}$	$3.67 \times 10^3$	$3.62 \times 10^3$	1.2%
Cartilage $950 \mu\text{m}$	$3.73 \times 10^3$	$3.58 \times 10^3$	—



X marks mean measurement points in Fig. 3.

Fig. 2 Wave velocity distribution in a direction parallel to the subchondral bone.

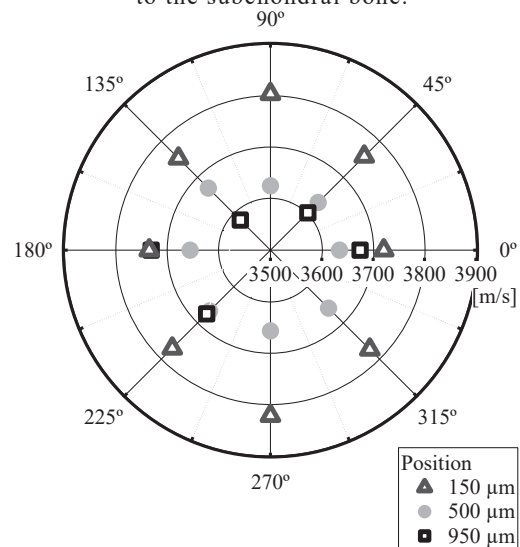


Fig. 3 Velocity anisotropy in the cartilage. 0 degree indicates wave propagate

### 参考文献

- [1] 藤井克之 他, 金原出版, pp.90-92, 2002.
- [2] O. Franke, *et.al.*, Acta Biomaterialia.,3, pp. 3, pp.873-881, 2007.
- [3] V. Mathieu, *et.al.*, J. Biomech. Eng., 133, 021006, 2011.
- [4] J. K. Krüger, *et.al.*, J. Phys. D, 31, pp.1913-1917, 1998.
- [5] K.Fukui, *et.al.*, Proceed of EAA, 2011.