

### 3.2. テーマ1 医療用超音波技術の安全性の確立

#### 3.2.1 光ファイバセンサによる生体組織の超音波音圧・温度上昇の同時計測

同志社大学理工学部・小山大介

同志社大学大学院生命医科学研究科・渡辺好章, 秋山いわき

同志社大学大学院理工学研究科博士前期課程・今出圭亮, 松尾晃佑, 陰山譽

#### (1) 研究計画の概要

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けられ, 本研究は前者について動物実験によってその影響を調査することを目的としている. 従来, 動物実験において温度上昇は熱電対によって測定されていたが, 热電対測温接点での viscous heating による影響を無視できない. Viscous heating は媒質と熱電対の密度の差に依存して発生するため, 密度の低い(水に近い)光ファイバでは viscous heating の影響は小さい. 本研究で開発しようとしてファイバブラッググレーティング(FBG)センサは生体内部での温度上昇と超音波音圧を同一点で同時に測定することができるだけでなく, このように viscous heating の影響が小さいため精度良く測定できることになる.

#### (2) 研究成果

水中での実験で, viscous heating の影響を熱電対と比較して検討を行った. 水中の超音波照射における温度上昇を測定した結果を図1に示す. 热電対による測定値では viscous heating により  $1.2^{\circ}\text{C}$  の温度上昇を認められるが, FBG センサーによる測定値では  $0.1^{\circ}\text{C}$  以下であり, viscous heating の影響は小さいことがわかる. 生体組織模擬ファントムを作成して, 超音波照射によるファントム内部の加温を行ったときの温度上昇と超音波音圧を同時計測した. 超音波照射用の振動子は, 凹面型集束 PZT 振動子で, 共振周波数  $2.0\text{MHz}$ , 口径  $20\text{mm}$ , 焦点距離は  $35\text{mm}$  である. ニードル型ハイドロロン(Force Technology: MH-28)を2次元走査して得られた音場を図2に示す. ファントムは  $11.21\%$  のグリセリン水溶液を寒天でゲル化したものである. 使用した FBG センサの感度は,  $30.5\text{mV}/^{\circ}\text{C}$ ,  $13.0\text{mV}/\text{MPa}$  である. 焦点位置で測定された音圧と温度の結果をそれぞれ図3および4に示す. これらの図より超音波照射によって正音圧  $3.0\text{MPa}$ , 負音圧  $2.1\text{MPa}$  であり, 超音波照射に同期した温度上昇  $5.3^{\circ}\text{C}$  を確認できる. 热電対で測定された温度と比較した結果を図5に示す. 次に, 超音波音圧測定時の FBG センサの周波数特性を測定した. 共振周波数  $2.0\text{MHz}, 3.0\text{MHz}, 5.0\text{MHz}, 6.0\text{MHz}, 8.0\text{MHz}$  の5個の振動子を用いた. メ

ンブレイン型ハイドロロン(Onda: HGL-400)を用いて校正した結果を図6に示す。このFBGセンサが広帯域な特性を有することがわかる。

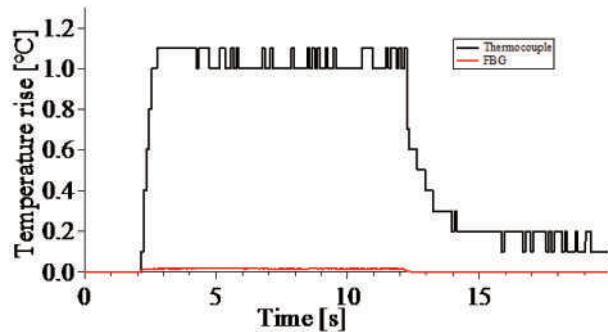


図1 水中の温度上昇測定結果  
熱電対との比較

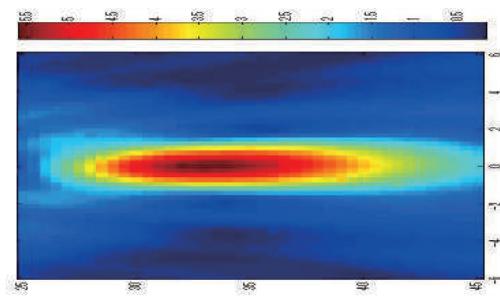


図2 振動子の音場（単位 mm）

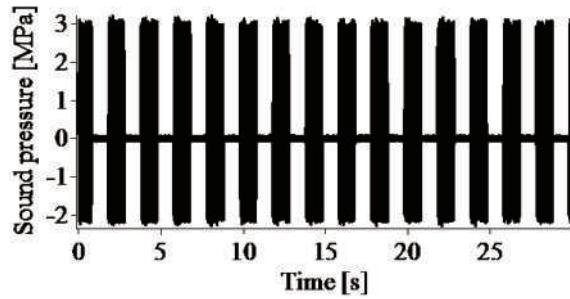


図3 超音波音圧測定結果

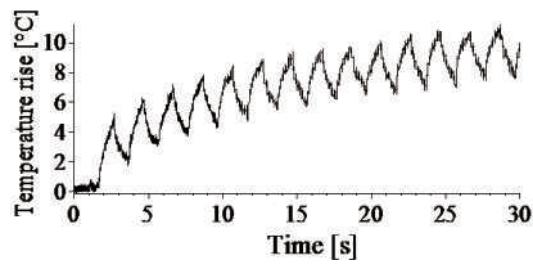


図4 温度測定結果

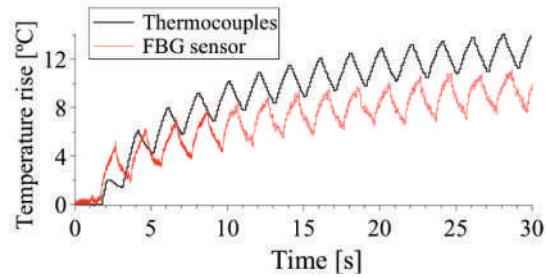


図5 温度測定結果の比較。

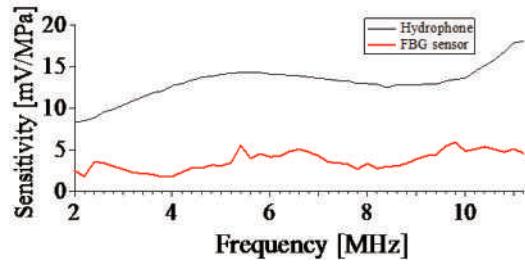


図6 周波数特性

### (3) 自己評価

A 期待通りの成果があった

FBG センサの周波数特性を測定した。生体組織模擬ファントムを用いて集束超音波照射による焦点での温度上昇と音圧波形を FBG センサで測定した。測定結果を熱電対による測定結果とハイドロフォンによる音圧波形と比較したところ一致した。

#### (4) 研究成果

##### 原著論文

- [10] Keisuke Imade, Takashi Kageyama, Daisuke Koyama, Yoshiaki Watanabe, Kentaro Nakamura & Iwaki Akiyama, "Measurement of sound pressure and temperature in tissue-mimicking material using an optical fiber Bragg grating sensor", Journal of Medical Ultrasonics, Vol.43, Issue 4, pp 473–479, 2016

##### 国際会議発表

- [11] K. Imade, D. Koyama, I. Akiyama, Simultaneous measurement of sound pressure and temperature of tissue mimicking material by an optical fiber Brag grating sensor, Acoustical Society of America Spring 2015 Meeting (2015.5)
- [12] T. Kageyama, D. Koyama, I. Akiyama, "Multipoint measurement of sound pressure and temperature in biological tissues by using optical fiber sensors", 166th Meeting of the Acoustical Society of America, (2013.12)

##### 国内発表

- [13] 松尾晃佑, 秋山いわき, "FBG センサによる MHz 超音波音圧計測", 日本超音波医学会第 89 回学術集会, 2016
- [14] 今出圭亮, 松尾晃佑, 小山大介, 秋山いわき, ファイバプラッググレーティング(FBG)センサを用いた超音波音圧と温度の同時計測, 第 56 回光波センシング技術研究会講演会, 2015
- [15] 今出圭亮, 陰山誉, 小山大介, 秋山いわき, "光ファイバセンサを用いた超音波・温度の同時多点計測", 日本音響学会 2014 年春季研究発表会, 1333-1334, 2014
- [16] 陰山誉, 小山大介, 秋山いわき, 光ファイバセンサを用いた超音波と温度変化の分離測定, 電子情報通信学会超音波研究会, 2013

ORIGINAL ARTICLE

# Measurement of sound pressure and temperature in tissue-mimicking material using an optical fiber Bragg grating sensor

Keisuke Imade<sup>1</sup> · Takashi Kageyama<sup>1</sup> · Daisuke Koyama<sup>1</sup> · Yoshiaki Watanabe<sup>1</sup> ·  
Kentaro Nakamura<sup>2</sup> · Iwaki Akiyama<sup>1</sup>

Received: 30 June 2015 / Accepted: 9 May 2016  
© The Japan Society of Ultrasonics in Medicine 2016

## Abstract

**Purpose** The experimental investigation of an optical fiber Bragg grating (FBG) sensor for biomedical application is described. The FBG sensor can be used to measure sound pressure and temperature rise simultaneously in biological tissues exposed to ultrasound. The theoretical maximum values that can be measured with the FBG sensor are 73.0 MPa and 30 °C.

**Methods** In this study, measurement of sound pressure up to 5 MPa was performed at an ultrasound frequency of 2 MHz. A maximum temperature change of 6 °C was measured in a tissue-mimicking material.

**Results** Values yielded by the FBG sensor agreed with those measured using a thermocouple and a hydrophone.

**Conclusion** Since this sensor is used to monitor the sound pressure and temperature simultaneously, it can also be used for industrial applications, such as ultrasonic cleaning of semiconductors under controlled temperatures.

**Keywords** FBG · Viscous heating

## Introduction

In recent years, acoustic radiation force impulse (ARFI) has attracted attention in the field of ultrasound diagnosis [1]. With ARFI, biological tissues are exposed to long-

duration ultrasound bursts, causing a micro-displacement in soft tissues from the acoustic radiation force and producing shear elastic waves [2, 3]. This technology is used to estimate the elasticity of tissues from the speed of the shear waves propagating through the body to differentiate between benign and malignant liver tumors [4]. Since ARFI has been widely studied [5–8], it is used for such things as in vivo observations of the viscoelastic features of cysts and chemical and thermal damage in tissues. In addition, in vitro observations of thrombus formation has been studied, as well [9, 10]. Ultrasonic diagnosis equipment is thought to have a high level of safety, with a little effect on the tissue. However, since ARFI uses bursts of large amplitude waves for durations of several hundred microseconds or more, there is concern about temperature increases and non-thermal effects due to cavitation in the exposed area of the body [11]. In evaluating the safety of ultrasonic diagnosis equipment, a number of values must be computed. They are spatial-peak temporal-average intensity ( $I_{SPTA}$ ), which is the temporal-average value of the spatial-peak value of the intensity of the sound beam; mechanical index (MI), which is an index for evaluating the effect of negative sound pressure that causes cavitation; and thermal index (TI), which is determined from the ratio of the total acoustic power to the acoustic power required to raise the tissue temperature by 1 °C. These parameters have upper limitations given by the following formulas [12–14]:

$$I_{SPTA,3} \leq 720 \text{ mW/cm}^2 \quad (1)$$

$$MI \leq 1.9 \quad (2)$$

$$TI \leq 6. \quad (3)$$

Simultaneous measurement of temperature increases, negative sound pressure, and cavitation at a focus point

✉ Kentaro Nakamura  
knakamur@sonic.pi.titech.ac.jp

<sup>1</sup> Medical Ultrasound Research Center, Doshisha University, Kyotanabe, Kyoto, Japan

<sup>2</sup> Precision and Intelligence Laboratory, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan

receiving the highest ultrasound intensity is very important [15].

Usually, this has been measured using hydrophones and thermocouples. However, when ultrasound pressure and temperature are measured in biological tissue or tissue-mimicking material (TMM) using a hydrophone or thermocouple, it is difficult to fix them at the focus point, because the focus point is usually in a restricted, narrow space. In this paper, we propose a system for simultaneous measurement of temperature changes and sound pressure using optical fiber sensors, which cause a little disturbance to ultrasonic fields. Using ultraviolet light transmitted along an optical fiber, bands with a different refractive index than the main fiber can be created at equal intervals in the fiber, which act as a diffraction grating, so that light of specific wavelengths is reflected. Such a grating is referred to as a fiber Bragg grating (FBG), and is often used in sensors, since the reflected Bragg wavelength is sensitive to both strain and temperature [16–19]. When an FBG sensor is exposed to ultrasound, the refractive index of the optical fiber changes due to the effects of sound pressure and temperature, leading to fluctuations in the Bragg wavelength. However, since the frequencies of fluctuations caused by sound pressure and temperature variations are very different, they can be easily separated by filtering. If this device was applied to ARFI, the fiber would presumably experience the shear wave and the corresponding tissue displacements. These displacements, corresponding to strain, cause changes in the optical signal being detected. According to the guidelines of the World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology, adverse thermal effects on fetuses or embryos should be considered when the temperature in the body is raised by 4 °C or for a period of 5 min or longer [20]. When the negative sound pressure is calculated for a frequency of 2.0–10 MHz and an MI of 1.9, which is commonly used during ARFI imaging of biological tissue, it is found to be 2.7–6.0 MPa. The purpose of this study is to explore the simultaneous measurement of temperature changes up to 6 °C and negative ultrasound pressure of up to 6 MPa. The measurement range of sound pressure and temperature using an FBG sensor is theoretically up to 73.0 MPa and 30 °C, respectively.

The range of the values in this research may also be applicable to industrial applications, such as ultrasonic cleaning of semiconductors under controlled temperatures.

## Methods

An FBG has several advantages when used as a sensor, including resistance to electromagnetic noise. When broadband light enters an FBG sensor, only the Bragg

wavelength,  $\lambda_B$ , is reflected, and this is given by the following [21]:

$$\lambda_B = 2n\Lambda \quad (4)$$

where  $n$  is the refractive index in the core and  $\Lambda$  is the grating period. The Bragg wavelength is known to change linearly with strain produced by an external force. This change in the Bragg wavelength is due to changing the period of the grating as the fiber physically deforms.

When an FBG is exposed to ultrasound waves,  $\lambda_B$  changes due to changes in  $n$  and  $\Lambda$  resulting from the strain produced by thermal expansion of the FBG and the sound pressure, whereas temperature changes cause a gradual shift in  $\lambda_B$ , fluctuations due to sound pressure occur at ultrasound frequencies. Since the difference between these frequencies can be in the high MHz range, when the optical signals are converted into electrical signals, those associated with changes in temperature and sound pressure can be separated using high- and low-pass filters, and simultaneous measurement of ultrasound waves and temperature changes is possible. Hydrophones are generally used for ultrasound wave detection and thermocouples for measurement of temperature changes caused by ultrasound irradiation. However, it is difficult to measure sound pressure and temperature simultaneously in an exposed area. Moreover, when thermocouples are placed in the body and are exposed to ultrasound, viscous heating can occur due to differences in the acoustic impedance of the tissue and thermocouple [22]. These issues can, perhaps, be overcome, however, with use of the FBG sensor. The principle of ultrasound wave and temperature detection using an FBG is as follows. The wavelength of a narrow-band light source is adjusted, so that it is in a linear region of the wavelength response curve for the FBG. When the FBG is exposed to ultrasound waves, strain is introduced due to the sound pressure and the Bragg wavelength is changed, leading to a change in the reflected light intensity. Consequently, ultrasound waves can be detected as electrical signals from the percentage change in the light intensity. If the temperature is uniform, thermal components are theoretically detected as direct current components. Since temperature changes occur slowly, they give rise to a low-frequency electrical signal. In contrast, the signals due to ultrasound exposure occur at a high frequency, and can be easily separated from the low-frequency thermal components using high- and low-pass filters after the output signal is split.

## Experiments

### A. Measurements of ultrasound waves and temperature rise in water with FBG sensor

This section describes ultrasound and temperature

measurements using an FBG sensor (SM(B)-1550-60-1.0-N-1-N-A-1.5-N-F/S, Shinkodensen Co., Ltd.) with a length of 1 mm (which is the size of the sensitive region), diameter of 0.25 mm, and reflectivity ratio of 60 %.

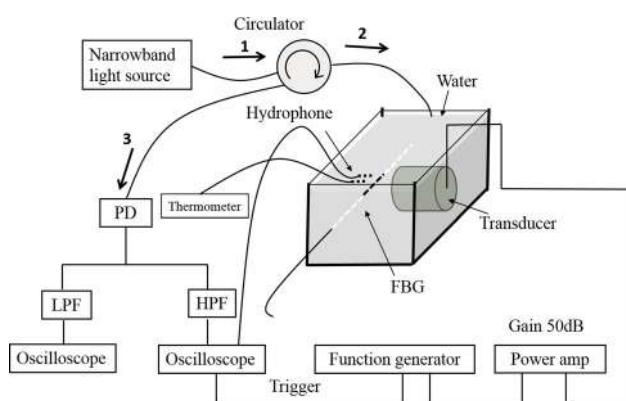
### 1. Experimental setup

The ultrasound wave pressure and temperature were measured. The experimental system is shown in Fig. 1. In this case, a narrowband light source (N7711A, Agilent Technologies) was used. The input conditions were a frequency of 2 MHz and a total of 10 cycles with a repetition cycle of 1 ms. Signals were amplified by 50 dB with a power amplifier (A075, Electronics & Innovation, Ltd.). Input voltages of 8–100 V<sub>pp</sub> were applied to a concave transducer (2.5Z25I, Japan Probe Co., Ltd.) with a focal length of 35 mm and –6 dB beam widths of 3.5 mm, with a diameter of 20 mm. Incident light from the light source was passed through the FBG, then reflected light from the FBG was split using an optical fiber coupler (10202A-50-FC, Thorlabs Japan, Inc.), after which it was converted to electrical signals using two photo detectors (2053-FC-M, Japan Laser Corp.). The signal associated with ultrasound waves was passed through a high-pass filter, while the signal associated with temperature was detected without amplification after being passed through a low-pass filter. The water temperature was changed 6 °C in 1 °C steps starting at 36 °C, and ultrasound waves were detected at each temperature. The temperature was measured using an YR520-323 resistance thermometer from Chino Corp. Since the MI value is defined by negative sound pressure, the absolute value of the negative sound

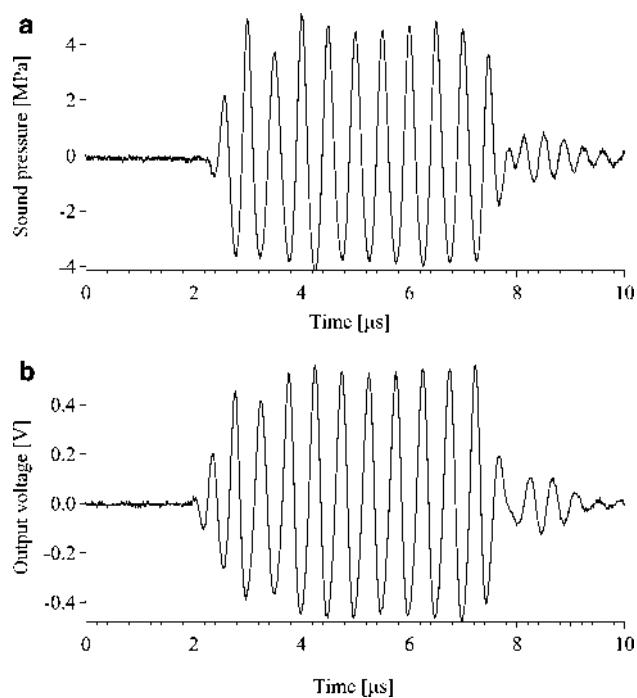
pressure was measured for each input voltage using a hydrophone (HGL-0200, ONDA) in the ultrasound focal site; it was measured at the center of the waveform to avoid transducer ring-up and ring-down. Since the temperature signal had a low frequency, 60,000 point signals were acquired over 1 min and the mean and standard deviation were obtained. The input wavelength of the narrowband light source was 0.57 nm less than the Bragg wavelength.

### 2. Experimental results

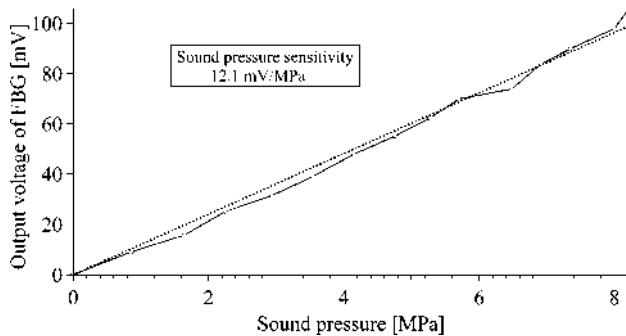
Figures 2a, b show the ultrasound waveforms measured using the hydrophone and the FBG sensor, and Fig. 3 shows plots of the FBG signal against the sound pressure measured with the hydrophone. Since the Bragg wavelength changes linearly with strain produced by an external force, the output voltage measured using FBG also changes linearly with sound pressure. The slope of the approximately linear line is the sound pressure sensitivity. Sound pressure can be obtained by dividing the output voltage of ultrasound waves received by the FBG sensor by the sensitivity. From the slope of the line, the sound pressure sensitivity was determined to be 12.1 mV/MPa. Error of mean square was 2.98 mV; this accuracy is expressed in sound



**Fig. 1** Experimental system for measurement of ultrasound and temperature change in water



**Fig. 2** Ultrasound waves when the transducer was driven by burst waves of 10 cycles, 74 V<sub>pp</sub>, and 2 MHz. **a** Hydrophone and **b** FBG sensor



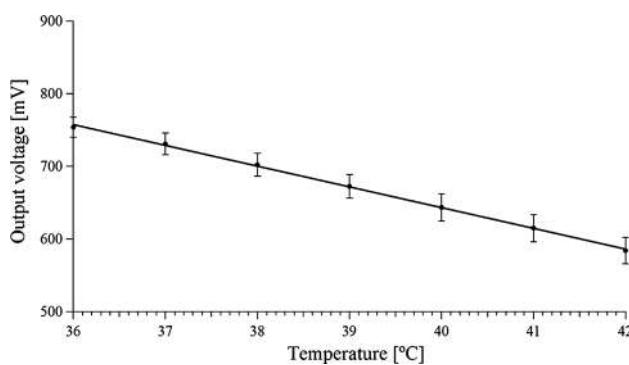
**Fig. 3** Relationship between sound pressure measured with a hydrophone and output voltage passed through a high-pass filter measured with an FBG sensor

pressure of 0.25 MPa. Figure 4 shows the dependence of the FBG signal on temperature. Theoretically, when temperature is constant, the output voltage is constant, but since noise was present; the mean value and standard deviation of the 60,000 points acquired over 1 min were obtained. Temperature rise can be obtained by dividing the output voltage change received by the FBG by the sensitivity. From the slope of the line, the temperature detection sensitivity was calculated to be  $-28.6 \text{ mV}^{\circ}\text{C}$ .

#### B. Measurements of ultrasound waves and temperature rise in tissue-mimicking material (TMM) with FBG sensor

##### 1. Experimental setup

The experimental system is shown in Fig. 5. Everything was the same as in the prior trials except for measuring sound pressure and temperature rise with an FBG sensor in a TMM, with a cycle number of 2,000,000, a repetition cycle of



**Fig. 4** Relationship between temperature rise measured with a thermometer and output voltage passed through a low-pass filter measured with an FBG sensor (1 mm)

2 s, and an input voltage of 80 Vpp. In addition, a thermocouple was fixed at the focus of ultrasound with the FBG. Table 1 shows the constituents of the TMM.

#### 2. Experimental results

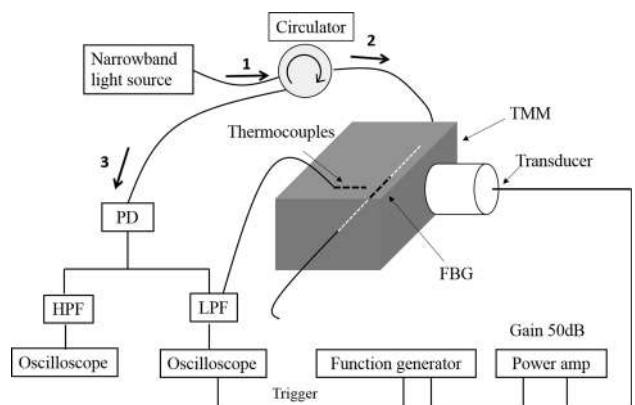
Figure 6 shows the waveform of the ultrasound pressure, and Fig. 7 shows the temperature change caused by ultrasound exposure in the TMM measured with the FBG sensor and the thermocouples. A greater temperature rise was measured with the thermocouples than the FBG sensor. The authors consider that it is because viscous heating affected the thermocouples. Viscous heating is considered in Discussion B.

Ultrasound pressure and  $>4^{\circ}\text{C}$  temperature rise were measured simultaneously in the TMM with the FBG sensor. Assuming that the sensitivity of the FBG sensor does not depend on the acoustic impedance of the medium, the FBG sensor allows for measurement of sound pressure in the TMM. In general, the sound pressure measured with an FBG sensor is not dependent on the acoustic impedance of the medium at frequencies below 0.1 MHz. Therefore, further studies are necessary for higher frequencies over 0.1 MHz.

## Discussion

#### A. Resolution of FBG sensor for measuring sound pressure

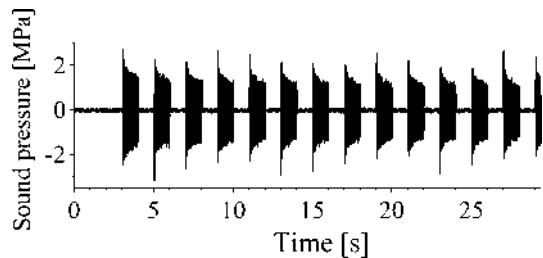
Figure 8 shows the sound pressure distribution along the lateral direction measured using an FBG sensor with a length of 1 mm and a hydrophone with a diameter of 0.6 mm at the focal distance. The half bandwidth is 1.39 mm for the hydrophone and



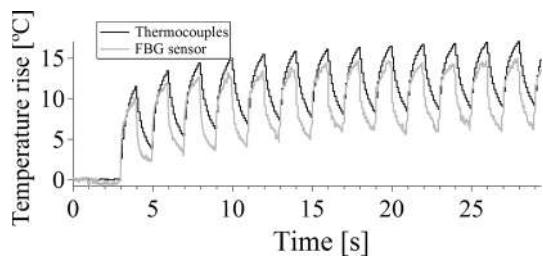
**Fig. 5** Experimental system for measurement of ultrasound and temperature change in a TMM

**Table 1** Contents of the TMM

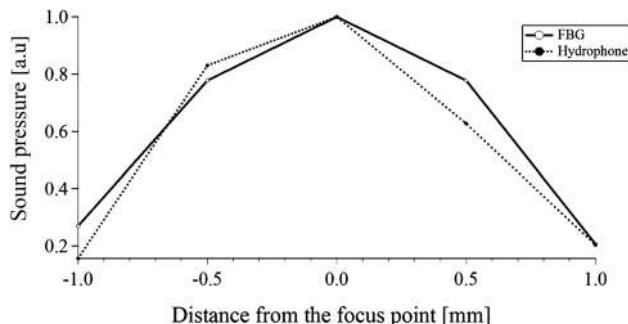
Constituent	Manufacture	Mass fraction (%)	Mass (g)
Degassed water	–	85.77	857.7
Glycerin	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	11.21	112.1
Agar	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	3.02	30.2



**Fig. 6** Ultrasound pressure measured with an FBG sensor, with an input voltage of 80 Vpp, frequency of 2 MHz, and burst of 2,000,000 cycles in a TMM

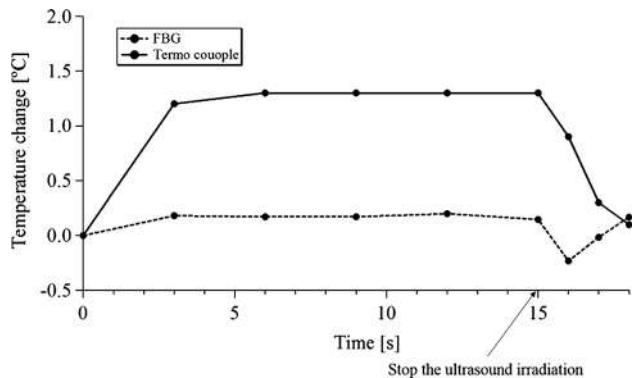


**Fig. 7** Temperature rise caused by exposure to ultrasound measured with an FBG sensor and a thermocouple in a TMM



**Fig. 8** Sound pressure distribution along the lateral direction measured with an FBG sensor with a length of 1 mm and a hydrophone with a diameter of 0.6 mm at the focal distance

1.51 mm for the FBG sensor. Since the actual beam width was 0.79 mm because of the half bandwidth value and diameter of the hydrophone, the resolution of the FBG sensor, which is the value obtained by subtracting the actual beam width from the half bandwidth value of the FBG, is 0.72 mm.



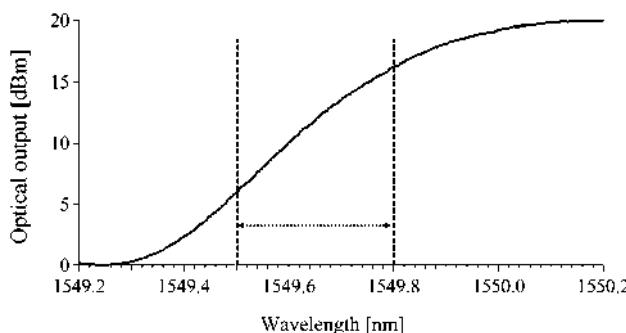
**Fig. 9** Comparison of temperature rise caused by exposure to ultrasound. Temperatures were measured with an FBG sensor and thermocouples at the focal point in water

#### B. Comparison of FBG sensor and thermocouples

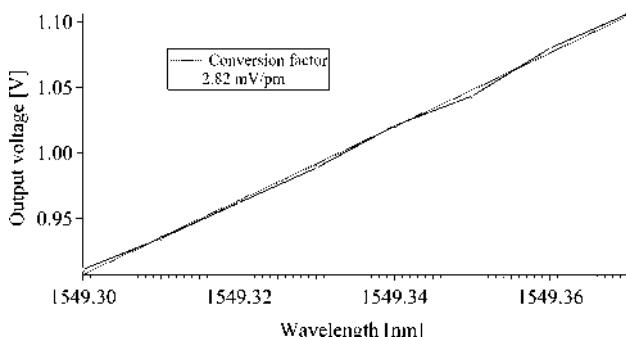
Figure 9 shows a comparison of temperature change measured with an FBG sensor and a thermocouple set at the focal point in water. Since there is a little attenuation in water [23], a rise in temperature caused by ultrasound exposure should not occur. As such, the temperature rises detected by the thermocouple are assumed to be errors. When thermocouples are exposed to ultrasound, they can induce an error called viscous heating. This error is caused by relative motion between the thermocouples and the surrounding medium when exposed to ultrasound. However, there is very little motion when using an FBG sensor as compared to using thermocouples, because the difference between the density of the FBG sensor and water (or biological tissue) is smaller than that of thermocouples [24]. Thus, an FBG sensor is able to measure temperature rises without the viscous heating effect caused by ultrasound.

#### C. Range of measurable ultrasound waves and temperature change

In this case, a broadband light source (ASE-1550-25, FiberLabs Inc.) was used. Incident light from the broadband light source passed through the Bragg grating, then reflected light from the grating was observed using an optical spectrum analyzer (MS9780A, Anritsu Corp.). Figure 10 shows the wavelength response of the reflected light. In the



**Fig. 10** Wavelength response of reflective light from the FBG



**Fig. 11** Wavelength response of output voltage

wavelength range bounded by the dotted lines, the response can be considered roughly linear, and this region has a width of about 0.3 nm. Since the measured static temperature property was  $0.01 \text{ nm}/^{\circ}\text{C}$ , and the pressure property of the FBG was  $4.07 \text{ pm}/\text{MPa}$ , the measurement range of rises in temperature is a maximum of  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , and sound pressure can be measured up to  $73.0 \text{ MPa}$ .

Figure 11 shows the wavelength property of conversion from reflected light signals into electric signals using PD. The conversion factor, which is the slope of this property, is  $2.82 \text{ mV/pm}$ . The sound pressure sensitivity of  $11.5 \text{ mV/MPa}$  can be determined by multiplying the conversion factor and the pressure property ( $4.07 \text{ pm/MPa}$ ) of the FBG. This calculation sensitivity is almost coincident with the sound pressure sensitivity measured in Experiment A.

## Conclusion

In this study, simultaneous and separate measurements of ultrasound waves and temperature were carried out using an FBG sensor, which is a type of optical fiber sensor. The results showed that when an FBG sensor is placed in water with a temperature of  $36\text{--}42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , similar to human body temperature,

and exposed to ultrasound waves, separate measurements of the high-frequency ultrasound signals due to ultrasound pressure and low-frequency signals due to the water temperature could be performed simultaneously. Furthermore, simultaneous measurements of ultrasound waves and temperature in a TMM were successfully carried out using an FBG sensor.

**Acknowledgments** This study is supported by the MEXT-Supported Program for the Strategic Research Foundation at Private Universities, 2013–2018.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that there is no conflict of interest.

**Ethical consideration** This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

## References

- Nightingale K, Soo M, Nightingale R, et al. Acoustic radiation force impulse imaging: *in vivo* demonstration of clinical feasibility. *Ultrasound Med Biol*. 2002;28:227–35.
- Palmeri ML, Wang MH, Dahl JJ, et al. Quantifying hepatic shear modulus *in vivo* using acoustic radiation force. *Ultrasound Med Biol*. 2008;34:546–58.
- Bercoff J, Chaffai S, Tanter M, et al. Ultrafast imaging of beam formed shear waves induced by the acoustic radiation force in soft tissue: application to transient elastography. In: Proceedings of the 2002 IEEE Ultrasonics Symposium. 2002;1899–902.
- Fatemi M, Greenleaf JF. Probing the dynamics of tissue at low frequencies with the radiation force of ultrasound. *Phys Med Biol*. 2000;45:1449–64.
- Nightingale KR, Bentley R, Trahey G. Observations of tissue response to acoustic radiation force: opportunities for imaging. *Ultrasound Imaging*. 2002;24:129–38.
- Sugimoto T, Ueha S, Itoh K. Tissue hardness measurement using the radiation force of focused ultrasound. In: Proceedings of the 1990 IEEE Ultrasonics Symposium. 1990; 1377–80.
- Nightingale K, Kornguth P, Walker W, et al. A novel ultrasonic technique for differentiating cysts from solid lesions: preliminary results in the breast. *Ultrasound Med Biol*. 1995;21:745–51.
- Walker W, Fernandez F, Negron L. A method of imaging viscoelastic parameters with acoustic radiation force. *Phys Med Biol*. 2000;45:1437–47.
- Fahy B, Nightingale K, Stutz D, et al. Acoustic radiation force impulse imaging of thermally- and chemically-induced lesions in soft tissues: preliminary *ex vivo* results. *Ultrasound Med Biol*. 2004;30:321–8.
- Viola F, Kramer M, Lawrence M, et al. Sonorheometry: a non-contact method for the dynamic assessment of thrombosis. *Ann Biomed Eng*. 2004;32:696–705.
- Herman BA, Harris GR. Models and regulatory considerations for transient temperature rise during diagnostic ultrasound pulses. *Ultrasound Med Biol*. 2002;28:1217–24.
- FDA Guidance for Industry and FDA Staff. Information for manufacturers seeking marketing clearance of diagnostic ultrasound systems and transducers. Rockville: US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health; 2008.

13. AIUM Clinical Standards Committee. How to interpret the ultrasound output display standard for higher acoustic output diagnostic ultrasound devices: version 2. *J Ultrasound Med.* 2004;23:723–6.
14. Ter Haar G. The Safe use of ultrasound in medical diagnosis. London: Br Inst Radiol; 2000.
15. Dalecki D, Raeman CH, Child SG, et al. Remnants of Albunex nucleate acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol.* 1997;23: 1405–12.
16. Rao Yun-Jiag. In-fibre grating sensors. *Meas Sci Technol.* 1997;8:355.
17. Fishery NE, Surowiecy J, Webby DJ, et al. In-fibre Bragg gratings for ultrasonic medical applications. *Meas Sci Technol.* 1997;8:1050–4.
18. Takahashi N, Hirose A, Takashashi S. Underwater acoustic sensor with fiber bragg grating. *Opt Rev.* 2006;4:691–4.
19. Fujisue T, Nakamura K, Ueha S. Demodulation of Acoustic Signals in Fiber Bragg Grating Ultrasonic Sensors Using Arrayed Waveguide Gratings. *Jpn J Appl Phys.* 2006;45(5B):4577–9.
20. Barnett SB, Duck F, Ziskin M. Recommendations on the safe use of ultrasound contrast agents. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33: 173–4.
21. Zhou Z, Ou J. Techniques of temperature compensation for FBG strain sensors used in long-term structural monitoring. In: Proceeding of Asian pacific fundamental problems of opto- and microelectronics, Russia. 2004. p. 465–71.
22. Hyynnen K, Martin CJ, Watmough DJ, et al. Errors in temperature measurement by thermocouple probes during ultrasound induced hyperthermia. *Br J Radiol.* 1983;56:969–70.
23. Martinez R, Leija L, Vera A. Ultrasonic attenuation in pure water: comparison between through-transmission and pulse-echo techniques. In: Pan American health care exchanges, PAHCE 2010; 2010. p. 81–4.
24. Morris H, Rivens I, Shaw A, et al. Investigation of the viscous heating artefact arising from the use of thermocouples in a focused ultrasound field. *Phys Med Biol.* 2008;53:4759–76.

### 3.2.2 造影剤投与後のウサギ心臓超音波照射による期外収縮の誘発

同志社大学大学院生命医科学研究科・秋山いわき

同志社大学大学院生命医科学研究科博士前期課程・高野わかな, 赤井一輝

自治医科大学・谷口信行, 笹沼英紀, 高山法也, 石黒保直, 小形幸代

#### (1) 研究計画の概要

音響放射力インパルス (ARFI: Acoustic Radiation Force Impulse) を伴う弾性超音波は肝臓の硬さや肝腫瘍、乳腺腫瘍の質的診断のために臨床現場で既に広く利用されている。診断用超音波と比較して持続時間が長い高強度のパルス波を使用するため、一定条件下の照射で組織破壊や有意な温度上昇を来すことが危惧されている。我々は、これまでのウサギを用いた動物実験で造影剤投与後の心臓照射で期外収縮が誘発されることを報告してきた。しかし、これまで使用してきた振動子では B モードで確認した場所に正確に ARFI 照射できない点に課題があった。今年度は新たに B モード画像を得ながら焦点深度を調整して照射できる動物実験用 ARFI システムを導入した。心臓の照射部位を刺激伝導系内の特定の場所に設定し、造影剤の有無によって不整脈が誘発されるかを再検証した。

#### (2) 研究成果

##### 【方法】

日本白色種ウサギ (3kg, オス) を全身麻酔下に仰臥位とし前胸部と腹部を除毛し、呼吸に伴う照射位置の変動を極力減らすため気管切開し呼吸調整した。

B モードで心臓を観察し、4chamber view で右房、右室、長軸像で左室を描出し、ARFI 照射部位は A.右室、B.右房、C.左室壁の 3 点とした(図 2)。不整脈の頻度と形状を造影剤投与の有無で比較・観察した。造影剤はペルフルブタン(ソナゾイド®)を使用し、静脈注射

2分後に ARFI 照射を行った。照射条件はパルス幅：1 msec, 照射回数：30回, 照射間隔は脈拍3回に1回, R波から200msecとした。3羽に対して照射を行った。



図1 ウサギへのARFI照射実験

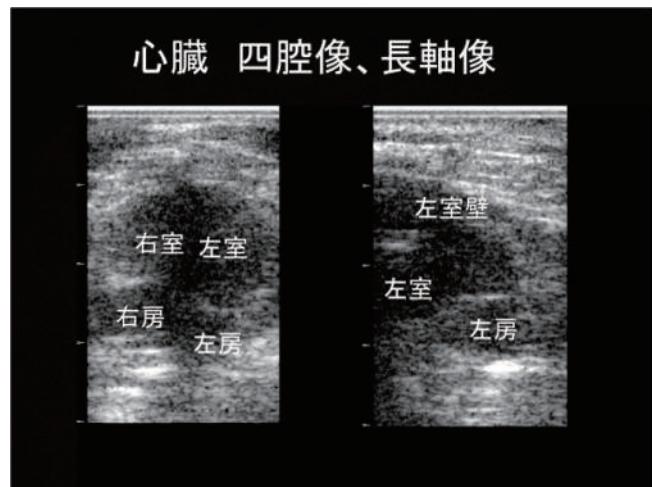


図2 Bモード画像と照射部位

- ① 右房, 焦点深度 20mm (MI1.16), 造影剤なし
- ② 右室, 焦点深度 30mm (MI0.84), 造影剤なし
- ③ 左室壁, 焦点深度 10mm (MI 約 1.1), 造影剤なし
- ④ 右房, 焦点深度 20mm (MI1.16), 造影剤あり
- ⑤ 右室, 焦点深度 30mm (MI0.84), 造影剤あり
- ⑥ 左室壁, 焦点深度 10mm (MI 約 1.1), 造影剤あり

### 【結果】

造影剤なしの照射では不整脈は認めなかった。造影剤ありの照射では不整脈を認めた（表1）。不整脈は単発の心室性あるいは上室性期外収縮で、致死的な不整脈は認めなかつた。右心系の照射と左心系の照射では起源の異なる期外収縮が確認された。

No.	照射部位	焦点深度	MI値	造影剤	不整脈 (平均値)
①	右房	20mm	1.16	なし	0
②	右室	30mm	0.84	なし	0
③	左室壁（長軸）	10mm	1.1	なし	0
④	右房	20mm	1.16	単回静注	5.33
⑤	右室	30mm	0.84	単回静注	2.66
⑥	左室壁（長軸）	10mm	1.1	単回静注	3.66

表1 照射部位、造影剤の有無による不整脈の発生頻度

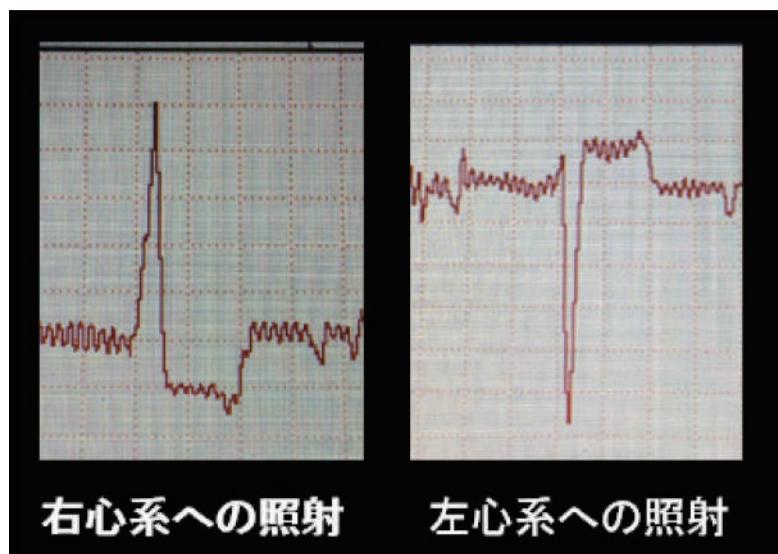


図3 照射部位による不整脈の形状

### 【考察】

これまでの実験で MI1.8 以上の条件下において造影剤の持続静注下で肝臓の温度上昇や、心臓において不整脈が検出されることを報告してきた<sup>1)4)</sup>。しかし、これまでの実験では B-モードで確認した照射部位に ARFI が正確に照射されているか不確実である点に問題があった。今回導入した動物実験専用の新システムによりでは、B モード画像を得ながら ARFI 照射を狙った場所に確実に照射できるようになった。また、新システム導入により、MI0.8～1.1 とこれまでより小さい MI 値でも造影剤投与下にお

いてのみ不整脈が誘発されることが明らかになった。さらに、Bモード画像を得ながら、ARFIの焦点深度を変更することができるようになったため刺激伝導系の特定の部位に照射することが可能となった。右心系と左心系への照射で不整脈波形が反転することから、ARFI照射が不整脈の誘発により確実に影響を及ぼしていると考えられた。

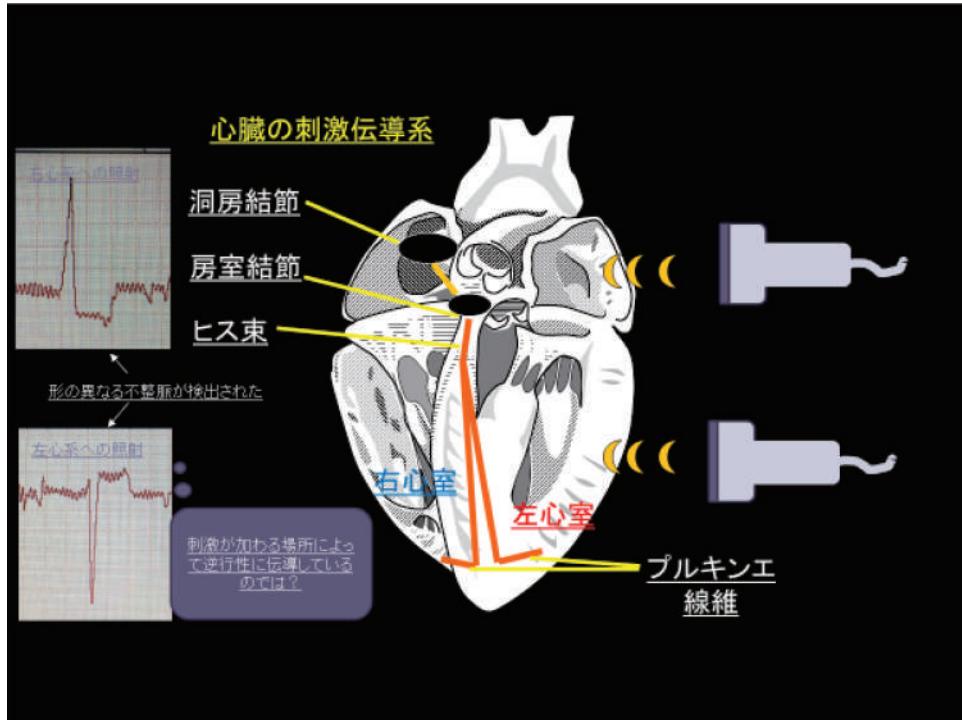


図4 刺激伝導系への照射イメージ

これまでの実験では、心臓が外からの刺激に対して最も影響を受けるとされる受攻期を、T波の頂点から30msec前までをVulnerable、それ以前をPre Vulnerable、T波の頂点以降をPost Vulnerableの3群に分け、それぞれにARFIの照射を行い、群間で不整脈の発生に差がないことを報告した<sup>1)4)</sup>。しかしながら、前述の通り旧システムでの実験のため、各群で不整脈の誘発に差が無いか追試する予必要がある。新システムを用いた今回の実験ではR波から200msecで固定照射しており、Post Vulnerable期に

照射が行われている。照射部位と照射タイミングの両方の側面から不整脈発生に関してさらに実験を進めていく予定である。

### (3) 自己評価

#### A 期待通りの成果があった

MI1.8 以上の条件下において、造影剤の持続静注下で不整脈が誘発されることを報告してきた。新しいシステムでは、B モード画像を観察しながらこれまでより精密に照射対象をしづかってできるようになった。これまでの実験では、MI 値 1.8 の造影剤単回静注では不整脈が誘発されることはなかったが、本実験では、MI 値 1.8 以下でも造影剤単回静注で不整脈が誘発された。照射部位は刺激伝導系を考慮し 3 箇所に分けたが、部位により不整脈波型が変化することを明らかにした。また、外的刺激に対して被刺激性の高い T 波の頂点前後の受攻期をターゲットに照射を行い、タイミングによって不整脈誘発に差がないことを報告してきたが、新システムの使用により照射部位と照射タイミングに関して、更に詳細な検討が可能になると考えられた。

### (4) 成果発表など

#### 論文発表：

- [1] Noriya Takakayama ,Yasunao Ishiguro, Nobuyuki Taniguchi, Kazuki Akai, , Hideki Sasanuma, Yoshikazu Yasuda, Naotaka Nitta, Iwaki Akiyama , “The effect of ultrasound with acoustic radiation force on rabbit lung tissue: a preliminary study”. J Med Ultrasonics vol43, pp.481-485, 2016
- [2] Y.Ishiguro, H.Sasanuma, N.Nitta, N.Taniguchi, Y.Ogata, Y.Yasuda, I.Akiyama, “The arrhythmogenic effect of ultrasonic exposure with acoustic radiation force (ARF) impulse on the rabbit heart with ultrasound contrast agent; perfluorobutane”, J Med Ultrasonics vol.42, pp47-50, 2015
- [3] Yasunao Ishiguro, Naotaka Nitta, Nobuyuki Taniguchi, Kazuki Akai, Noriya Takakayama, Hideki Sasanuma, Yukiyo Ogata, Yoshikazu Yasuda, Iwaki Akiyama,

“Ultrasound exposure (mechanical index 1.8) with acoustic radiation force impulse evokes extrasystolic waves in rabbit heart under concomitant administration of an ultrasound contrast agent”, J Med Ultrasonics, vol43, pp3-7,2016.

- [4] N.Nitta, Y.Ishiguro, H.Sasanuma, N.Taniguchi, I.Akiyama, “Experimental System for In-Situ Measurement of Temperature Rise in Animal Tissue under Exposure to Acoustic Radiation Force Impulse”, J Med Ultrasonics, vol.42, pp39-46, 2015

国際会議発表：

- [1] (Invited) I. Akiyama, W. Takano, K. Rifu, N. Takayama, H. Sasanuma and N. Taniguchi, “Effect on Rabbit Heart Exposure to Ultrasound with Long Pulse Duration” International Congress on Ultrasonics (ICU), December 18 -20, Honolulu Hawaii, USA, 2017
- [2] W. Takano, M. Furuya, C. Okamoto, H. Ichikawa, I. Akiyama, “The promotion of muscle synthesis of skeletal muscle cell exposed to ultrasound”, International Congress on Ultrasonics (ICU), December 18 -20, Honolulu Hawaii, USA, 2017
- [3] H. Sasanuma, N. Takayama, K. Rifua, W. Takano, Y. Ishiguro, N. Taniguchi, A. Kawarai Lefor and I. Akiyama, “The Effect of Ultrasound with Acoustic Radiation Force Impulse on the Lung: A Preliminary Study in Rabbits”, International Congress on Ultrasonics (ICU), December 18 -20, Honolulu Hawaii, USA, 2017
- [4] K. Akai, Y. Ishiguro, N. Nitta, H. Sasanuma, N. Taniguchi, I. Akiyama, “On the thermal effect in biological tissues exposed to ultrasound of longer pulse duration after administration of contrast agents”, IEEE International Ultrasonics Symposium, 2015
- [5] (Invited) Iwaki Akiyama, “Safety of Medical Ultrasound”, Asian Symposium on Advanced Ultrasound Technology, Taipei, Taiwan, 2015
- [6] (Invited) Iwaki Akiyama, “Biological effects of tissue exposed to ultrasound with acoustic radiation force”, The 11th Congress of the Asian Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology, 2014.
- [7] Notaka Nitta, Yasunao Ishiguro, Hideki Sasanuma, Nobuyuki Taniguchi, Iwaki Akiyama, Proceedings of IEEE International Ultrasonics Symposium, pp. 1175-1178, 2014

国内発表：

- [8] 利府数馬, 笹沼英紀, 高山法也, 高野わかな, 石黒保直, 小形幸代, 秋山いわき, 谷口信行, 造影剤投与後の音響放射力インパルスを伴う超音波照射による期外収縮の誘発, 日本超音波医学会第91回学術集会, (2018.6)

- [9] 高山法也, 笹沼英紀, 利府数馬, 高野わかな, 石黒保直, 秋山いわき, 谷口信行, 音響放射力インパルスが肺に及ぼす影響—ウサギを用いた動物実験—, 日本超音波医学会第91回学術集会, (2018.6)
- [10] 高山法也, 笹沼英紀, 利府数馬, 高野わかな, 新田尚隆, 石黒保直, 秋山いわき, 谷口信行, 音響放射力インパルスが肺に及ぼす影響—ウサギを用いた動物実験, 日本超音波医学会第90回学術集会, (2017.5)
- [11] (依頼講演) 石黒保直, 新田尚隆, 赤井一輝, 高野わかな, 高山法也, 小杉幸代, 笹沼英紀, 安田是和, 谷口信行, 秋山いわき, 音響放射力インパルス (ARFI) を伴う超音波と期外収縮, 日本超音波医学会第89回学術集会, 2016.5
- [12] (依頼講演) 新田尚隆, 石黒保直, 赤井一輝, 笹沼英紀, 谷口信行, 高野わかな, 秋山いわき, 音響放射力を伴う超音波による生体組織の温度上昇, 日本超音波医学会第89回学術集会, 2016.5
- [13] 石黒保直, 新田尚隆, 笹沼英紀, 安田是和, 秋山いわき, 谷口信行. 超音波造影剤投与下のウサギ心臓における音響放射力インパルス (ARFI:Acoustic Radiation Force Impulse)の心電図波形に与える影響についての検討; 日本超音波医学会 基礎技術研究会資料, p51-54, 2013.

展示：なし

その他：

- [14] 秋山いわき, 超音波照射による生体への影響について, バイオメクニコラム 2017, 大阪大学, (2017.7)
- [15] 秋山いわき, 超音波照射による生体への影響と新しい医療技術開発について, 同志社大学リエゾンフェア 2017, 2017年11月28日

## (6) 参考文献・引用

- [1] Y. Ishiguro, H. Sasanuma, N. Nitta, N. Taniguchi, Y. Ogata, Y. Yasuda, I. Akiyama. The arrhythmogenic effect of ultrasonic exposure with acoustic radiation force (ARF) impulse on the rabbit heart with ultrasound contrast agent; perfluorobutane J Med Ultrasonics vol.42, pp47-50, 2015

- [2] H Kadowaki, T Hayase, K Funamoto, and N Taniguchi, Study of Estimation Method for Unsteady Inflow Velocity in Two-Dimensional Ultrasonic-Measurement-Integrated Blood Flow Simulation. IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING 2015,
- [3] N. Nitta, Y. Ishiguro, H. Sasanuma, N. Taniguchi, I. Akiyama , Experimental System for In-Situ Measurement of Temperature Rise in Animal Tissue under Exposure to Acoustic Radiation Force Impulse. J Med Ultrasonics vol.42, pp39-46, 2015
- [4] Yasunao Ishiguro, Naotaka Nitta, Nobuyuki Taniguchi, Kazuki Akai, Noriya Takakayama, Hideki Sasanuma, Yukiyo Ogata, Yoshikazu Yasuda, Iwaki Akiyama , Ultrasound exposure (mechanical index 1. 8) with acoustic radiation force impulse evokes extrasystolic waves in rabbit heart under concomitant administration of an ultrasound contrast agent. J Med Ultrasonics vol43, pp3-7,2016
- [5] T Kameda, F Kawai, N Taniguchi, Evaluation of whether the ultrasonographic onion skin sign is specific for the diagnosis of an appendiceal mucocele. J Med Ultrasonics vol41, pp439-443, 2014
- [6] 笹沼英紀, 佐田尚宏, 遠藤和洋, 小泉大, 安田是和 肝内結石症に合併する肝内胆管癌の Profile 調査 ; 胆道 vol 28, 5 号, pp741-746, 2014
- [7] 石黒保直, 新田尚隆, 笹沼英紀, 安田是和, 秋山いわき, 谷口信行 超音波造影剤投与下のウサギ心臓における音響放射力インパルス(ARFI:Acoustic Radiation Force Impulse)の心電図波形に与える影響についての検討. 超音波医学, vol41 pp464-65, 2014
- [8] N Taniguchi, N. Hayashida, et al . Ultrasonographic thyroid nodular findings in Japanese children. J Med Ultrasonics, vol40, pp 219-24, 2013
- [9] Kasper Jarlhelt Andersen, Anders Riegels Knudsen, Anne-Sofie Kannerup, Hideki Sasanuma, Jens Randel Nyengaard, Stephen Hamilton-Dutoit, Morten Ladekarl, Frank Viborg Mortensen. Sorafenib inhibits liver regeneration in rats. HPB vol15, pp944-950, 2013
- [10] 石黒保直, 新田尚隆, 笹沼英紀, 安田是和, 秋山いわき, 谷口信行. 超音波造影剤投与下のウサギ心臓における音響放射力インパルス (ARFI:Acoustic Radiation Force Impulse)の心電図波形に与える影響についての検討 ; 日本超音波医学会 基礎技術研究会資料, p51-54, 2013.
- [11] Yoshito Nihei, Hideki Sasanuma, Yoshikazu Yasuda. Experimental evaluation of portal venous pulsatile flow synchronized with heartbeat intervals: effects of vascular clamping on portal hemodynamics, J Med Ultrasonics, Vol 40, pp 9-18, 2013

- [12] Shimodaira K, Miyakura Y, Sadatomo A, Miyazaki C, Sasanuma H, Koinuma K, Horie H, Hozumi Y, Lefor AT, Yasuda Y. Penetration of a divided cystoperitoneal shunt catheter into the transverse colon inducing acute mastitis. Journal of surgical case reports vol5, 2013
- [13] Andersen KJ, Knudsen AR, Kannerup AS, Sasanuma H, Nyengaard JR, Hamilton-Dutoit S, Erlandsen EJ, Jø. The natural history of liver regeneration in rats: description of an animal model for liver regeneration studies.
- [14] Hayashida N, Imaizumi M, Shimura H, Okubo N, Asari Y, Nigawara T, Midorikawa S, Kotani K, Nakaji S, Otsuru A, Akamizu T, Kitaoka M, Suzuki S, Taniguchi N, Yamashita S, Takamura N Thyroid ultrasound findings in children from three Japanese prefectures: aomori, yamanashi and nagasaki. Investigation Committee for the Proportion of Thyroid Ultrasound Findings. PLoS One. vol8(12)2013.
- [15] Koibuchi H, Tsuda K, Taniguchi N, et al. The effectiveness of “Protex” for disinfection of the ultrasound probe. J Med Ultrasonics vol40, pp175-176, 2013.
- [16] Koibuchi H, Kotani K, Taniguchi N. Ultrasound probes as a possible vector of bacterial transmission. Med Ultrason vol15, pp41-44, 2013.
- [17] Nobuyuki Taniguchi, Naomi Hayashida, Hiroki Shimura, et al. Ultrasonographic thyroid nodular findings in Japanese children. Journal of Medical Ultrasonics vol40(3), pp219-224,2013

( 7 ) 参考資料

なし

International Congress on Ultrasonics,  
18-20 December, 2017, Honolulu, HI, USA

# Effect on Rabbit Heart Exposure to Ultrasound with Long Pulse Duration

I.Akiyama and W.Takano,  
Doshisha University, Kyoto, Japan  
K.Rifu, N.Takayama, H.Sasanuma and N.Taniguchi  
Jichi Medical School, Tochigi, Japan

This study is supported by MEXT Supported Program for the Strategic Research Foundation at Private Universities, 2013-2017 and JSPS KAKENHI grant number 16H03198.

## Heart Exposed to Ultrasonic Pulse after Administration of Contrast Agents

Authors	Journal	Animal	Year	Arrhythmia	Freq. [MHz]	Sound Pressure	Pulse D. [ms]	UCA
van der Wouw et al.	JASE	Human	2000	PVC*	1.66	MI1.5	NA (HDI3000)	AIP101
T. Ay et al.	Circulation	Rabbit	2001	PVC	1.8	MI1.6	NA	PESDA**
J. Zachary et al.	JUM	Rat	2002	PVC	3.1	-15.9 MPa	1.3	Optison
P.Li et al.	UMB	Rat	2002	PVC	1.7	+3 MPa	0.01	Optison

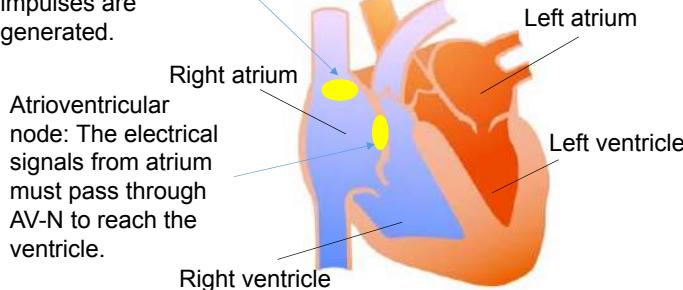
\*PVC (premature ventricular contraction)

\*\*PESDA(perfluorocarbon-enhanced sonicated dextrose albumin)

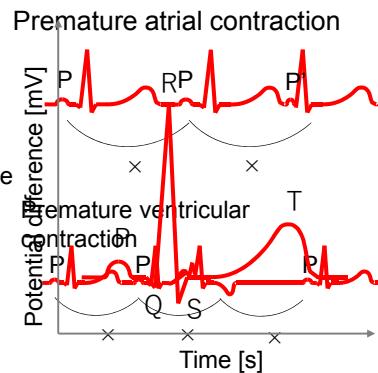
## Premature contraction

heart contraction early from the original cycle.

Sinoatrial node:  
The heart's natural pacemaker is S-N, where electrical impulses are generated.



- **Premature atrial contraction**
- **Premature ventricular contraction**



3

## Heart Exposed to Ultrasonic Pulse with Contrast Agents

Authors	Journal	Animal	Year	Arrhythmia	Freq. [MHz]	Sound Pressure	Pulse D. [ms]	UCA
D.Dalecki et al.	JASA	Mice	2005	PC	1.2	+3 MPa	0.01	Optison
T.Tran et al.	UMB	Rat	2007	PVC	1	-300 kPa	60s	Sonovue
T.Tran et al.	UMB	Rat	2009	PVC	1	-300kPa	60s	Sonovue
Y.Ishiguro et al.	J.Med. Ultrason.	Rabbit	2015	Extra-systolic waves	2.5	MI4.0	10	Sonazoid
Y.Ishiguro et al.	J.Med. Ultrason.	Rabbit	2016	Extra-systolic waves	2.5	MI1.8	0.3	Sonazoid

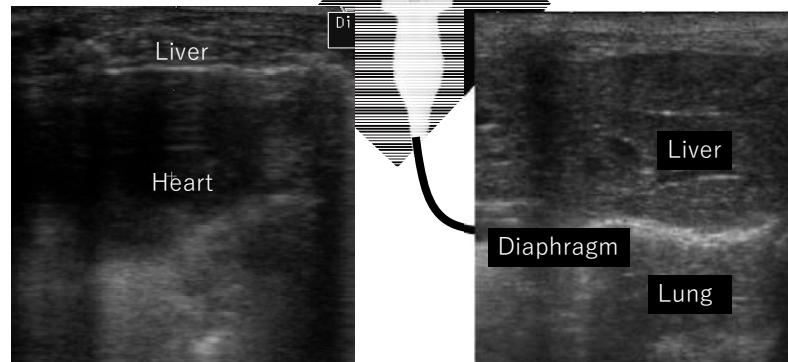
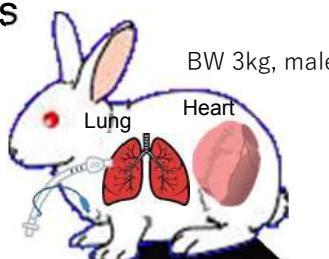
## Purpose

- To discuss arrhythmogenic effect of heart exposed to ultrasound with long pulse duration after intravenous injection of contrast agents by animal experiments.

### Materials & Methods

Japanese white rabbit

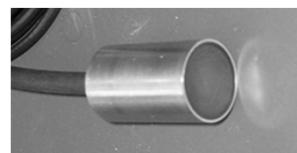
Under general anesthesia  
tracheotomy and  
tracheal intubation was  
carried out.



B-mode image  
by 7.5MHz in  
frequency before  
the exposure.

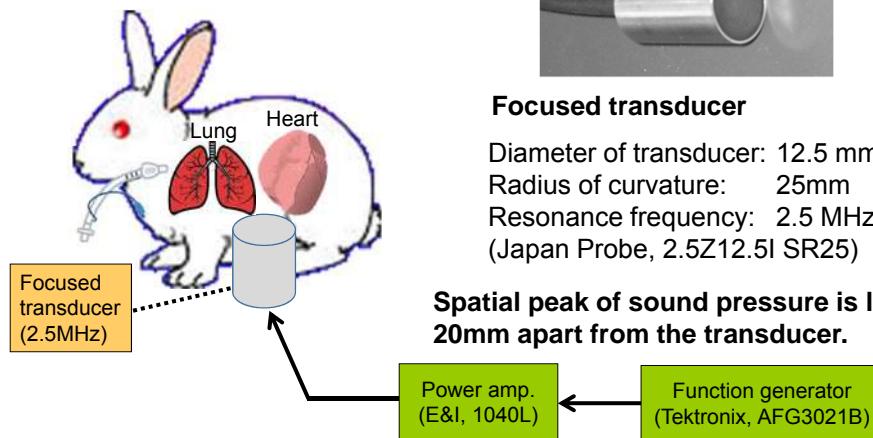
## Experimental setup

### Exposure to ultrasound



#### Focused transducer

Diameter of transducer: 12.5 mm  
Radius of curvature: 25mm  
Resonance frequency: 2.5 MHz  
(Japan Probe, 2.5Z12.5I SR25)



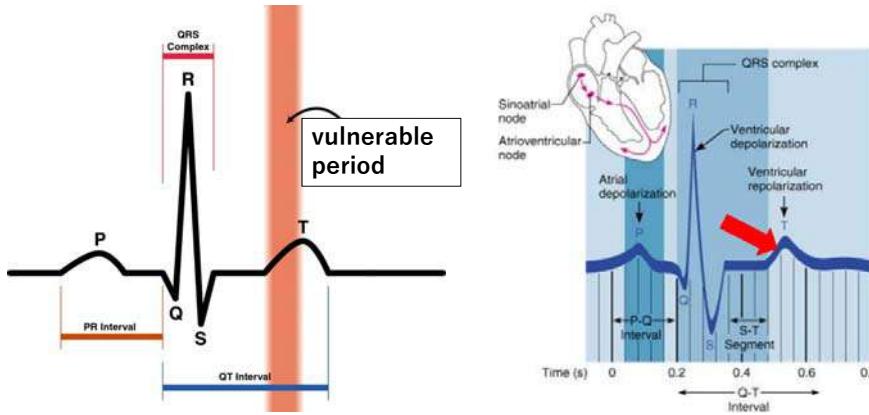
## Materials & Methods

Focused Transducer

\* Ventilation was stopped during the exposure

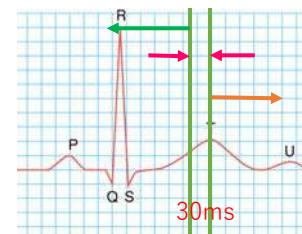
## Experimental conditions of exposure to ultrasound

- Heart:
  - Transhepatic exposure at 120–160ms after the R wave



## Experimental conditions of exposure to ultrasound

- Heart:
  - A total of fifty exposures were synchronized with the heart beats at one pulse per 6 heart beats.
  - The exposure timing is classified by the difference from the peak of the T-wave (POT);
    - More than 30ms before POT → **Pre-vulnerable**
    - 0-30ms before POT → **Vulnerable**
    - After POT → **Post-vulnerable**
  - Ultrasonic conditions:
    - ① MI = 1.8, 4.0, PD = 10ms
    - ② MI = 1.8, PD = 0.3ms



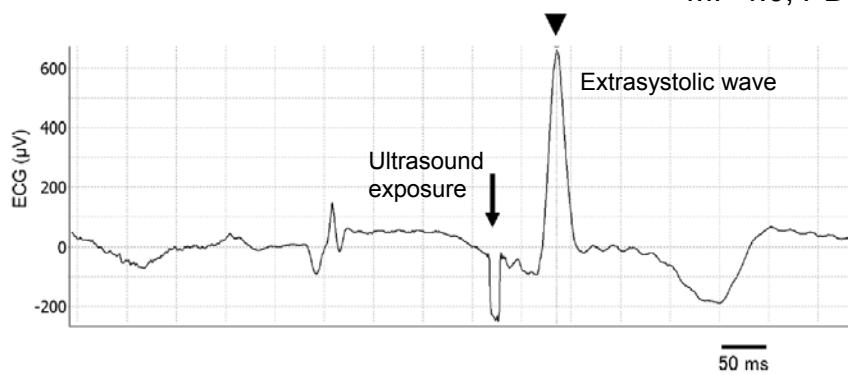
## Materials & Methods

- Heart:
  - Arterial pressure were monitored using right femoral artery catheter.
  - Three condition of UCA administration
    - None
    - Single injection: 0.8 $\mu$ L microbubbles,
      - Exposure: 10min after
    - Drip infusion: 2.6 $\mu$ L/hr microbubbles,
      - Exposure: 3min after

## Results; Heart

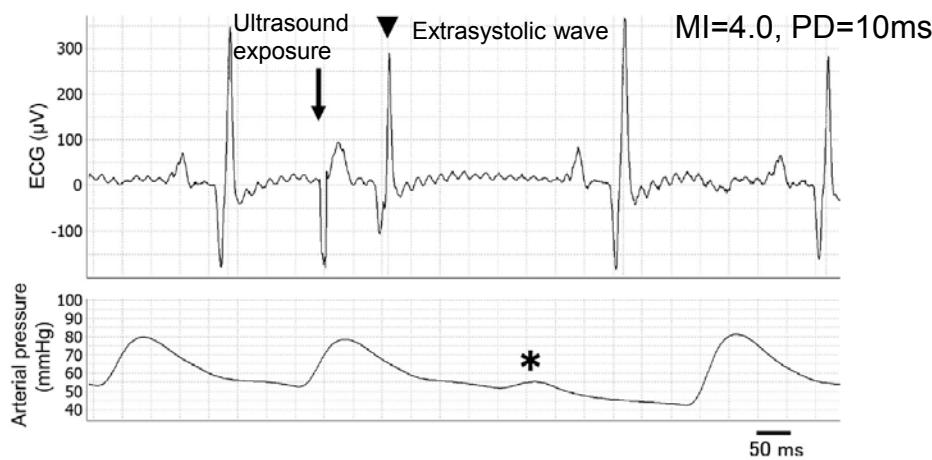
An extra systolic wave (arrowhead) on ECG was evoked by ultrasound with UCA.

MI=4.0, PD=10ms



## Results; Heart

The exposure to ultrasound (black arrow) was followed by an extra wave (arrowhead) and a rise in arterial pressure (asterisk).



## Results; Heart

The frequency of extra wave and arterial pressure change

MI=4.0, PD=10ms

	Extra wave	Arterial pressure change
	+	-
Single injection	8	42
Drip infusion	35*	5

\* A statistically significant increase in the frequency of extra waves was observed with the drip infusion compared with the single injection ( $P<0.05$ ).

## Results; Heart

The frequency of the extrasystolic waves with the different infusional method of UCA  
 $MI=1.8$ ,  $PD=0.3ms$

Infusion	Extra wave	
	+	-
No	0	149
Single	0	147
Drip	36 *	109

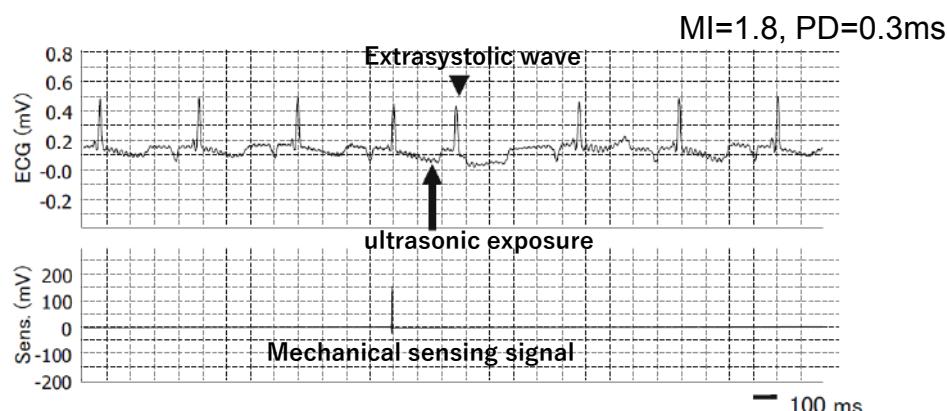
The unit is the number of times that the extrasystolic wave is evoked or not evoked. Each infusional condition had 150 exposures of ARFI and ineffective exposures by incorrect sensing were excluded

\*  $P < 0.05$  with Fisher's exact test

No extra waves were found without UCA or with single injection of UCA

## Results; Heart

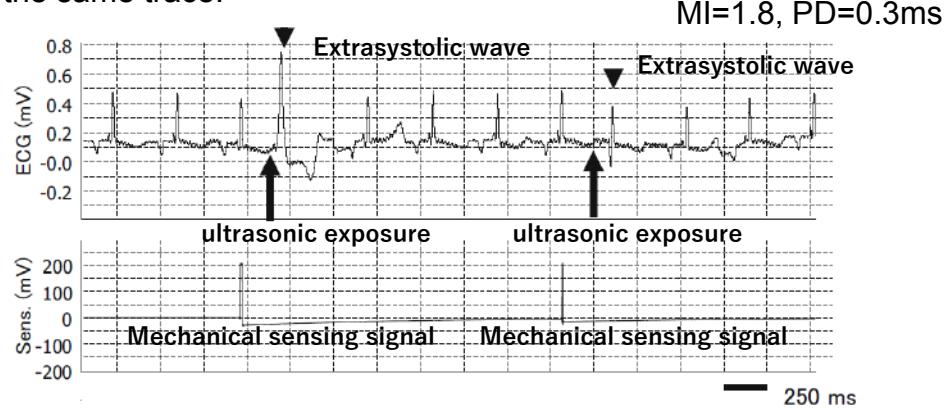
An extrasystolic wave is observed and the RR interval doubled because the regular QRS complex is delayed.



Extrasystolic waves were observed only after drip infusion of UCA.

## Results -Heart

A wide QRS complex and a narrow complex are observed on the same trace.



## Results -Heart

**The relationship between the exposure period and the number of the evoked extrasystolic waves with continuous infusion of UCA**

MI=1.8, PD=0.3ms

Timing	Extra wave	
	+	-
Pre-vulnerable	11	48
Vulnerable	23	53
Post-vulnerable	2	8

The unit is the number of times that the extrasystolic wave was evoked or not evoked

Not significant with Fisher's exact test

There were no differences in the extra wave frequency according to the exposure period.

## Short summary 1

### **MI = 4.0, PD = 10ms**

- Extrasystolic waves were observed both single injection and drip infusion of UCA.
- Drip infusion has more frequent extrasystolic waves than single injection.
- Sixteen percent of the extra waves were followed by arterial pressure variation.

### **MI = 1.8, PD = 10ms**

- No extra waves were found after exposure to ultrasound with a MI1.8 even with concurrent administration of UCA.  
✓ Life-threatening arrhythmia was not observed.

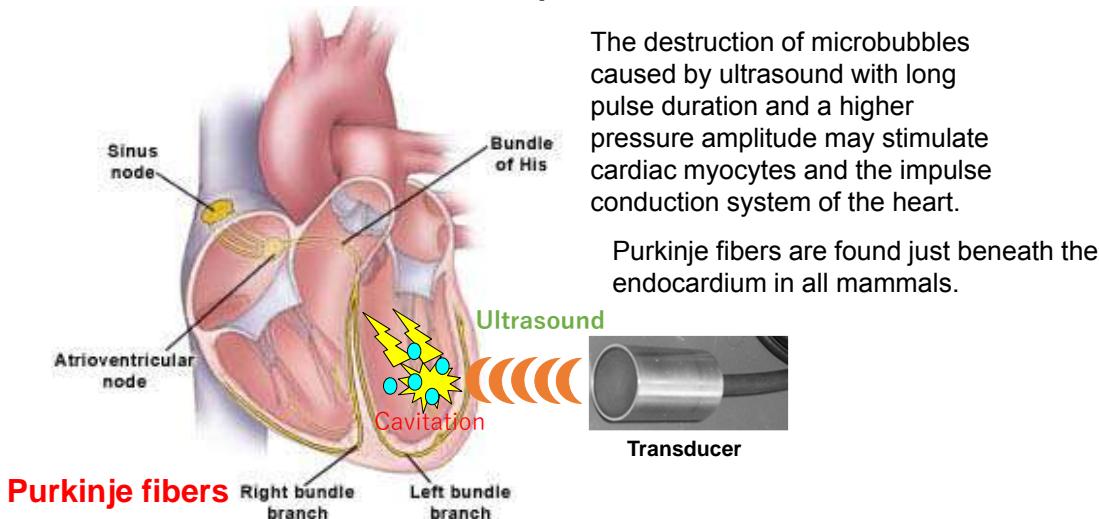
## Short summary 2

### **MI = 1.8, PD = 0.3ms**

- Extrasystolic waves were observed only after continuous administration of UCA.
- During the drip (bolus) infusion of UCA, there were no extra waves.
- No differences were found in the extra wave frequency due to the exposure period.

## Discussion -Heart

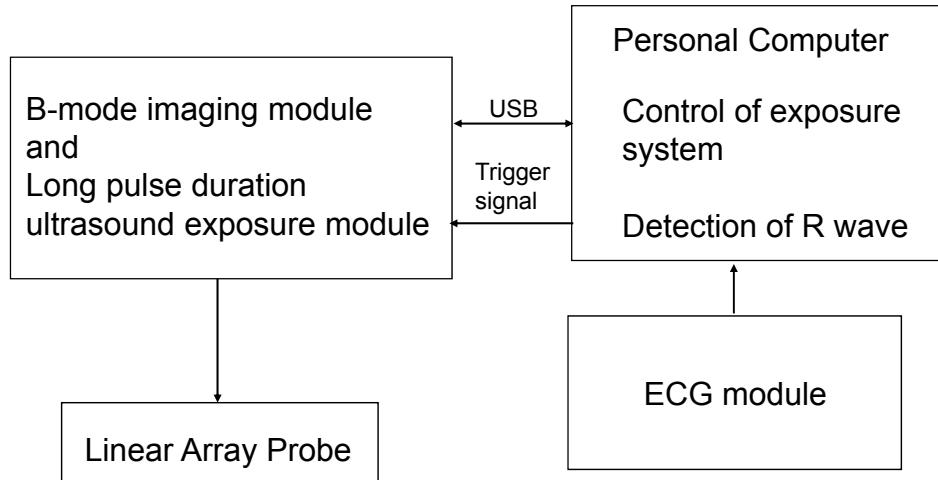
### Speculation on the mechanism



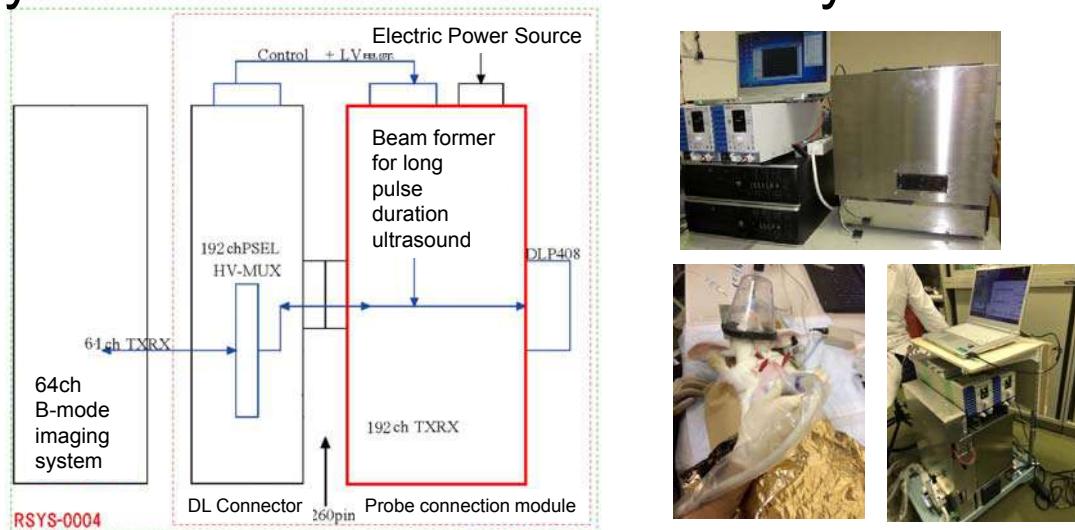
## System requirements for new experiments

- It is required to determine and confirm the exposure spot in the heart on B-mode images.
  - It switches the pulse transmission from the B-mode imaging module to the exposure module.
- The heart is exposed to ultrasound with long pulse duration at vulnerable period.
  - Exposure period is controlled by the delayed time from R wave triggers detected by ECG.

## Experimental system for heart exposure



## Long pulse duration ultrasound exposure system combined with B-mode system



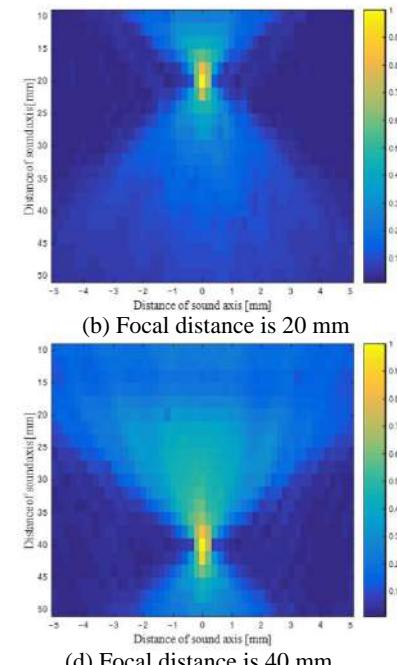
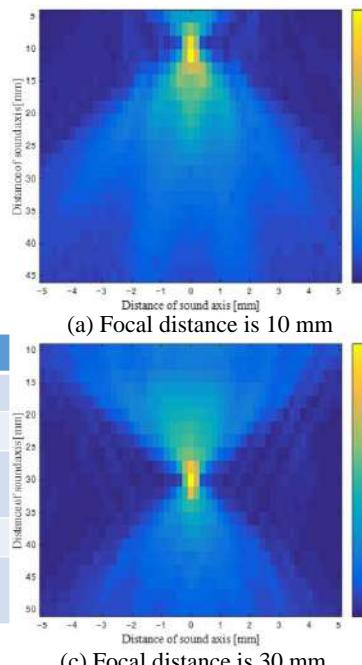
# Specifications

	B-mode Imaging Module	Long Pulse Exposure Module		Ultrasonic Probe
Number of Channels	64	64	Number of elements	192
Pulse Duration	1-10 $\mu$ s	1 $\mu$ s – 10 ms	Frequency range	4-15 MHz
Pulse Repetition Time	0.1 - 1 ms	Triggered by ECG	type	Linear array
Driving Voltage	10 - 30 Vpp	10 - 100 Vpp		
Focal distance	-	10 - 40 mm		
MI	<1.9	0.8 - 1.2		

Sound pressure distributions of the pulsed ultrasound at 5.2 MHz and low MI.  
Beam width in range and lateral direction is 5-7mm and 0.5 mm, respectively.

Hydrophone

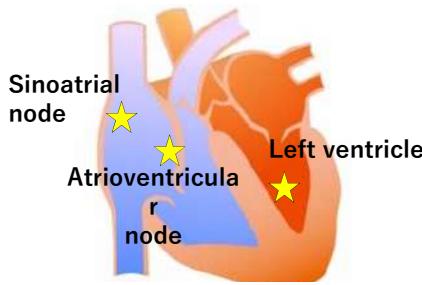
Manufacturer	ONDA co.
Type	HNR-0500
diameter	0.5 mm
Frequency Range	0.25-10 MHz
Piezoelectric Element	PZT
Acceptance Angle	30 degrees



(c) Focal distance is 30 mm

(d) Focal distance is 40 mm

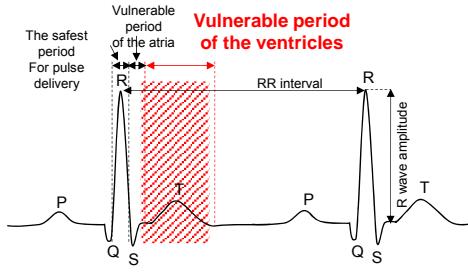
## Experimental setup



B-mode image of the heart

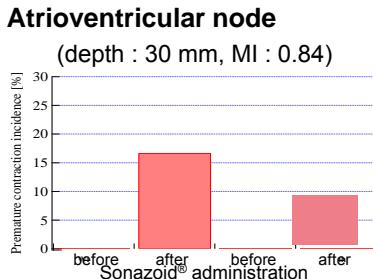
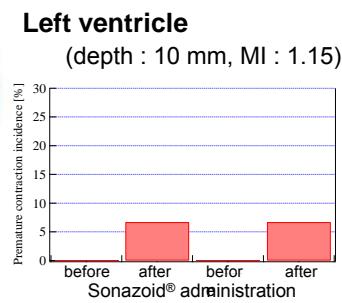
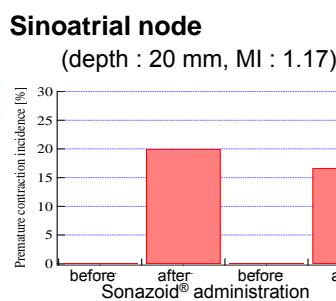
### Experimental conditions

Frequency : 5.2 MHz  
 Sound pressure : 0.8~1.2 MPa  
 Pulse duration : 1 ms  
 Number of times of exposure : 30  
 UCA : Sonazoid®, 0.1 ml bolus administration (drip infusion)



27

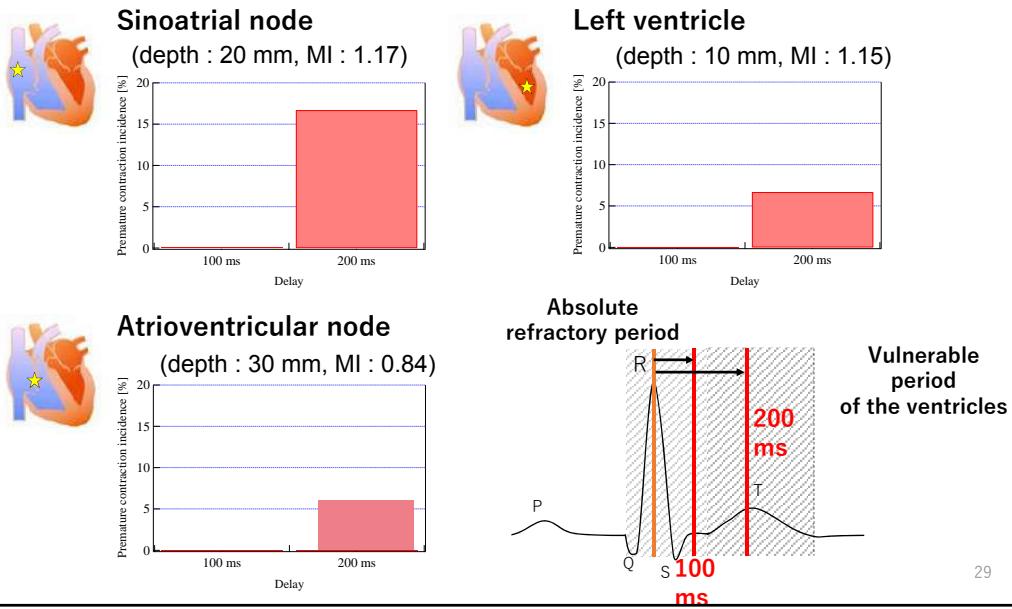
## PVC was evoked by the exposure after administration of UCA



- After Sonazoid® administration, PVC was evoked by the exposure.
- The incidence was higher in the right heart system than in the left heart system.

28

PVC was evoked by the exposure at vulnerable period



29

## Conclusion

**As a result of the rabbit experiments,**

PVC was evoked by exposure to ultrasound with 1ms of PD and approximately 1 of MI at vulnerable period, after administration of contrast agents of Sonazoid.

30

### 3.2.3 超音波照射によるメダカ胚への影響について

同志社大学生命医科学部・渡辺好章, 池川雅也、秋山いわき

同志社大学大学院生命医科学研究科・博士前期課程 松本恵李那, 阪口裕暉

千葉大学フロンティア医工学センター・吉田憲司

#### (1) 今年度の研究計画の概要

超音波キャビテーションの生体作用, 特に遺伝的影響を遺伝子, タンパク質, 代謝レベルで検証することを目標に, メダカ胚を対象とした評価プロトコールの確立を行う. 前年度までに, メダカ胚を対象に数十 kHz 帯の低周波数超音波の影響を遺伝子レベルで検討し<sup>[1-3]</sup>, 遺伝子発現解析に対する相補的なデータを取得するためのタンパク質解析の実験手法の構築を行ってきた. Blue Native/SDS 二次元電気泳動を用いて超音波照射の影響を受けるタンパク質を同定し, Western blotting 法により再検証する. また, 生体内の代謝レベルでの影響を検討する手法として, 組織をすり潰さずに二次元的に代謝物質の局在を分析することができるイメージング質量分析<sup>[4]</sup>をメダカに適用し, その有効性について検討する.

#### (2) 研究成果

今年度では, 1) Blue Native/SDS 二次元電気泳動を用いて超音波照射の影響を受けるタンパク質を同定し, Western blotting 法により再検証すること, 2) 超音波照射の代謝レベルでの影響を検討する手法としてイメージング質量分析に注目し, メダカ成魚を対象に組織内分子の可視化プロトコールを確立することを目標とした.

前者については, Blue Native/SDS 二次元電気泳動により同定された AHCY B-like というタンパク質を対象に, Western Blotting 法を適用した. 図 1 に超音波照射（音圧振幅 150 kPa）と非照射の場合の比較を示す. 超音波照射のライン上の赤矢印で示すバンドは, 非照射の同質量の位置に検出されないことから, 超音波照射によって AHCY の構造が安定化したことが改めて確認された. AHCY B-like は図 2 に示すメチオニン代謝の中核を担う酵素であるため, 今回の結果は AHCY の増加に伴うメチオニン代謝への影響（タンパク質, DNA のメチル化修飾）が示唆された結果として理解できる. また, 構造の安定化による胚発生への影響はゼブラフィッシュによる先行研究<sup>[5]</sup>においても示唆されており, この点が今後の検討課題の一つとなる.

後者については, メダカ（成魚）全長の組織標本を対象にマトリックス支援レーザー脱離イオン化法を用いて, 組織内の生体分子の局在の可視化を試みた. 図 8 は二種の胆汁酸

(C24 trihydroxy bile acid と C27 trihydroxy bile acid) の分布画像の一例である。同図に示すようにメダカ全長における両者の分布は非常に類似しており、肝臓や消化管周辺、鰓の側面に分布していることが確認できる。このように特定の生体分子の臓器内の分布を観察可能であることから、超音波照射の代謝レベルの影響を観察する手法として期待できる。

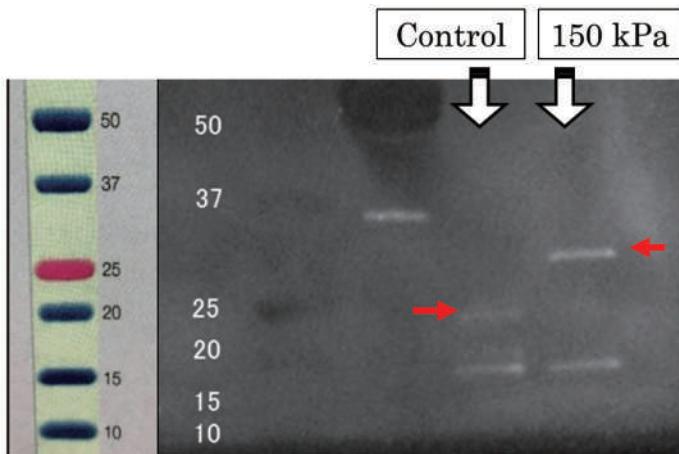


図 1 非照射（コントロール）と超音波照射の比較（Western Blotting 法）

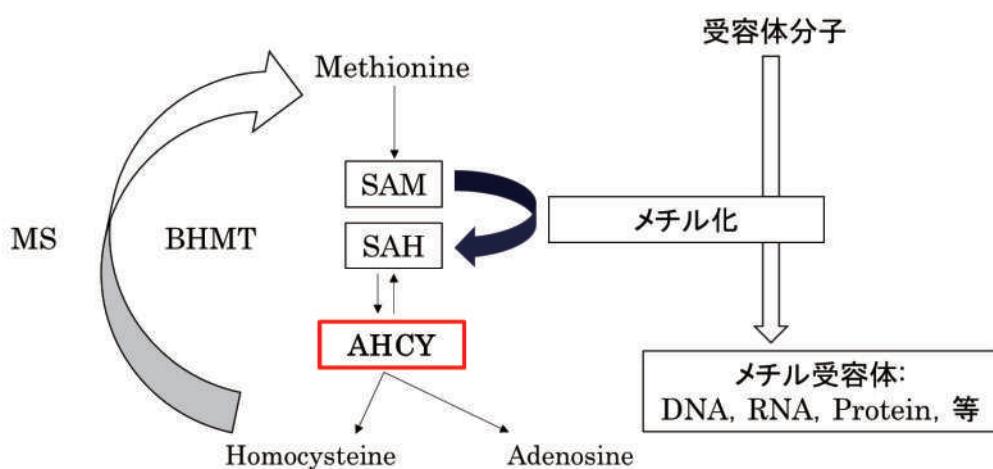


図 2 メチオニン代謝

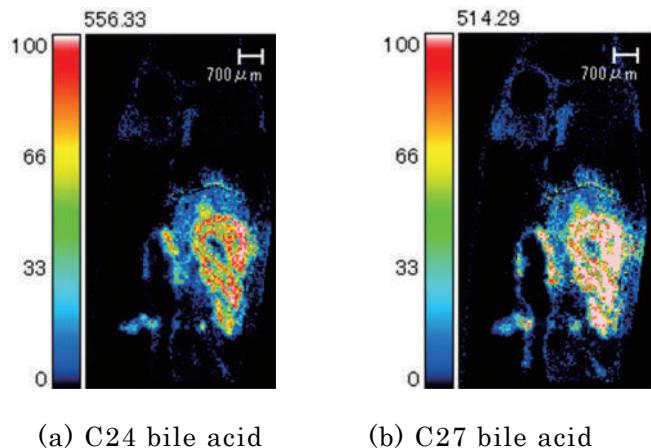


図 3 メダカ全長における胆汁酸の二次元分布

#### (3) 自己評価 (400字以内 398)

##### A 期待通りの成果があった

研究プロジェクトを通じて、世代のサイクルが短く、多産という特徴を有するメダカを検討対象として設定し、課題として遺伝子およびタンパクの評価プロトコールの確立をあげた。超音波の遺伝的影響を網羅的解析するための DNA マイクロアレイを実施し、遺伝子解析に対する相補的なデータをタンパク質もしくは代謝レベルで確認することを目指した。今年度は、タンパク質解析法の最適化および信頼性の確認を行った上で、AHCY B-like という分子に対する超音波照射の影響を確認した。代謝レベルでの影響を検討する手法としてイメージング質量分析を候補技術として選定し、メダカを対象にした評価プロトコールの確立、および一例として胆汁酸の組織内分布の可視化を実施した。遺伝子、タンパクレベルで評価対象分子を選定し、イメージング質量分析において関連分子の組織内分布を可視化することで代謝レベルでの作用を評価できることが期待される。

#### (4) 成果発表など

##### 国際会議発表

- [1] E. Matsumoto, K. Kawanabe, K. Yoshida, I. Akiyama, M. Hirose, M. Ikegawa, Y. Watanabe, “Proteomic analysis of developmental effect on medaka embryo exposed by ultrasound”, International Congress on Ultrasonics, Honolulu, Hawaii, USA December 18-20, 2017.

##### 国内発表

- [2] (依頼講演) 池川雅哉, 松本恵李那, 吉田憲司, 秋山いわき, 廣瀬まゆみ, 渡辺好章, 超音波照射によるメダカ胚のプロテオーム解析, 日本超音波医学会第 91 回学術集会, 2018.6
- [3] 阪口裕暉, 松本恵李那, 辻雄大, 池川雅哉, 秋山いわき, 中郷智之, 廣瀬まゆみ, 渡辺好章, “生体影響解析システムとしてのメダカのオミクス解析”, 第 23 回 Hindgut Club Japan シンポジウム, 2017.
- [4] 松本恵李那, 吉田憲司, 秋山いわき, 廣瀬まゆみ, 池川雅哉, 渡辺好章, “超音波照射されたメダカ胚のプロテオーム解析”, 平成 29 年度第 2 回アコースティックイメージング研究会, 2017
- [5] 山田健人, 阪口裕暉, 松本恵李那, 吉田憲司, 殿山泰弘, 廣瀬まゆみ, 秋山いわき, 渡辺好章, “音響キャビテーションに伴うメダカ胚への影響,” 日本音響学会・春季研究発表会講演論文集, 1-Q-28, pp. 55, 2016
- [6] 山田健人, 上田優都, 吉田憲司, 殿山泰弘, 清水信義, 渡辺好章, “低周波超音波により引き起こされたメダカ胚における卵黄球の収縮と出血,” 第 52 回日本生物物理学会年会, p. S103, 2014
- [7] 上田優都, 山田健人, 吉田憲司, 殿山泰弘, 清水信義, 渡辺好章, “超音波照射がメダカに与える影響の検討,” 2014 年第 61 回応用物理学会春季学術講演会, 18p-F5-14, 2014

#### (5) 参考文献・引用

- [1] 上田優都, 山田健人, 吉田憲司, 殿山泰弘, 清水信義, 渡辺好章, “超音波照射がメダカに与える影響の検討,” 2014 年第 61 回応用物理学会春季学術講演会, 18p-F5-14, 2014.
- [2] 山田健人, 上田優都, 吉田憲司, 殿山泰弘, 清水信義, 渡辺好章, “低周波超音波により引き起こされたメダカ胚における卵黄球の収縮と出血,” 第 52 回日本生物物理学会年会, p. S103, 2014.
- [3] 山田健人, 阪口裕暉, 松本恵李那, 吉田憲司, 殿山泰弘, 廣瀬まゆみ, 秋山いわき, 渡辺好章, “音響キャビテーションに伴うメダカ胚への影響,” 日本音響学会・春季研究発表会講演論文集, 1-Q-28, pp. 55, 2016.
- [4] 志田保夫, 笠間健嗣, 黒野定, 高山光男, 高橋利枝, “これならわかるマススペクトロメトリー (第 1 版), ” 化学同人, pp. 96-110, 2011.

[5] Benjamine J.Cooper, et al, "Suppression and Overexpression of Adenosyl homocysteine Hydrolase-like Protein 1 (AHCYL1) Influences Zebrafish Embryo Development", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 281, no. 32, pp.22471-22484, 2006.

### 3.2.4 超音波照射および機械刺激によるゲノムサイズ DNA の二重鎖切断：

#### 一分子観察による定量的計測

同志社大学大学院生命医科学研究科・吉川研一, 劍持貴弘

同志社大学超音波医科学研究センター・吉川祐子, 野瀬啓二

同志社大学生命医科学研究科博士後期課程・馬 越

同志社大学生命医科学研究科博士前期課程・菊池駿斗

#### (1) 今年度の研究計画の概要

これまでの本研究グループの研究成果から、超音波照射によるゲノムサイズ DNA の二本鎖切断は、キャビテーション消滅時の衝撃波による機械刺激によって生じることが明らかとなったが<sup>1, 2)</sup>、現在までのところ、キャビテーションの生成量を定量的に計測することが困難であるため、詳細な切断メカニズムについては、不明な点も多い。そのため、今年度は、機械刺激による DNA 二本鎖切断メカニズム解明のため、超音波洗浄機と Vortex ミキサーを用いた実験を実施し、超音波キャビテーションによる機械刺激とミキシングによる機械刺激とを対比させ、機械刺激による DNA 二重鎖切断メカニズムについて調査を進めた。本研究では、ゲノムサイズ DNA の二重鎖切断を定量的に評価するために、本研究グループで確立した蛍光顕微鏡を用いた DNA 一分子計測の方法論を適用した。

#### (2) 研究成果

図 1 に実験に使用した超音波洗浄機と Vortex ミキサーの模式図を示す。また、本実験では、T4 GT7 DNA (166 kbp) と λ DNA (48 kbp) を使用した。

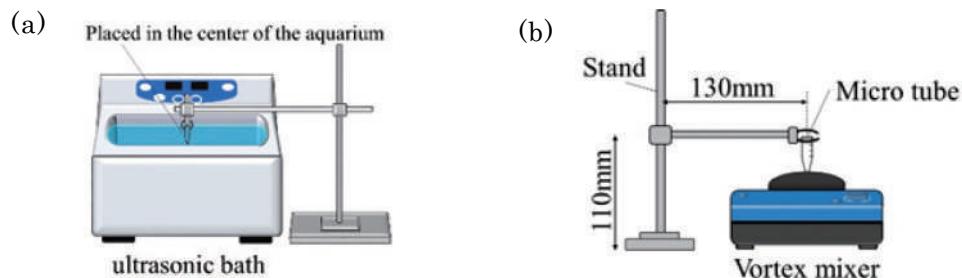


図 1. (a) 超音波洗浄機

(b) Vortex ミキサー。

図 2 に超音波洗浄機による DNA 二重鎖切断実験結果を示す。実験に使用した超音波周波数は、43 kHz である。超音波照射開始数秒間で、二重鎖切断の頻度が著しく高く、その後、切断頻度は低下している。

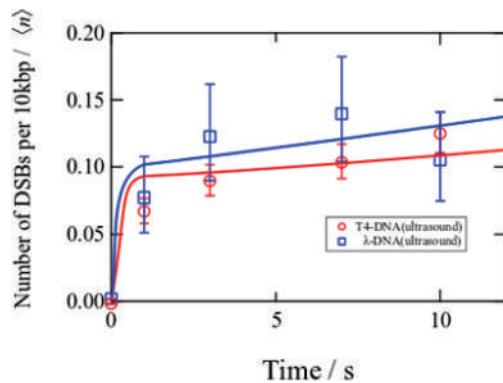


図 2. 超音波洗浄機による DNA 二重鎖切断の照射時間依存性。超音波周波数：43 kHz。  
(菊池, 野瀬らの研究結果. 論文投稿中) .

次に、Vortex ミキサーのミキシング機械刺激による DNA 二重鎖切断の様子を図 3 に示す。計測結果から、時間経過と共に、ミキシングの機械刺激によって DNA が二重鎖切断を受け、DNA 長が短くなっていることが分かる。

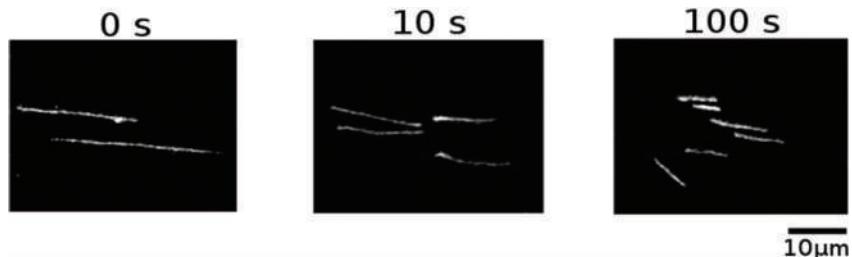


図 3. Vortex のミキシングによる DNA 二重鎖切断の蛍光顕微鏡による一分子計測像  
(菊池, 野瀬らの研究結果. 論文投稿中) .

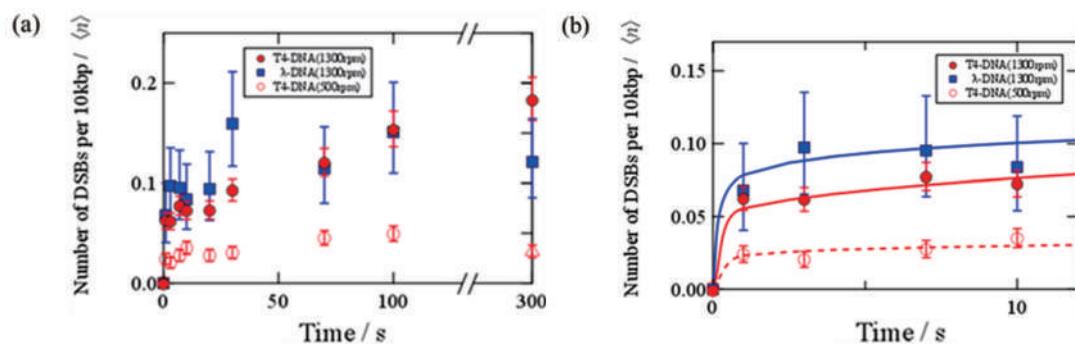


図 4. (a) Vortex ミキシングによる DNA 二重鎖切断の時間依存性. (b) 開始 10 秒までの時間依存性. ここで, rpm は 1 分間当たりの回転数を表す. (菊池, 野瀬らの研究結果. 論文投稿中) .

図 4 (a)に, Vortex ミキサーのミキシングによる T4 DNA と  $\lambda$  DNA の二重鎖切断についての回転速度依存性を示し, 回転開始から 10 秒までの DNA 二重鎖切断の様子を図 4 (b) に示す. 実験結果から, 回転開始数秒で著しい DNA 二重鎖切断が生じ, その後, 時間経過と共に, 徐々に二重鎖切断が増加していくことが分かる.

図 5 に, 回転数を一定にして機械刺激を与えた場合と徐々に回転数を上げた場合の, 二重鎖切断回数を計測した結果を示す. 実験結果から, 20 秒間のミキシングによる切断回数を比較すると, 徐々に回転数を上げた場合, 壁付近に存在する DNA が, 容器中心付近に移動できるため, 50% 程度切断を低減できることが明らかとなった (図 6 参照). このことから, ミキシング機械刺激による二重鎖切断が, 速度勾配に起因するせん断応力によって引き起こされると結論付けられる.

本研究によって, 超音波キャビテーションの機械刺激による切断メカニズムは, ミキシングの機械刺激によるものとは異なることを示し, 二重鎖切断に関して閾値をもつ超音波切断が, 他の DNA 損傷源にない特徴をもつことを明確にした.

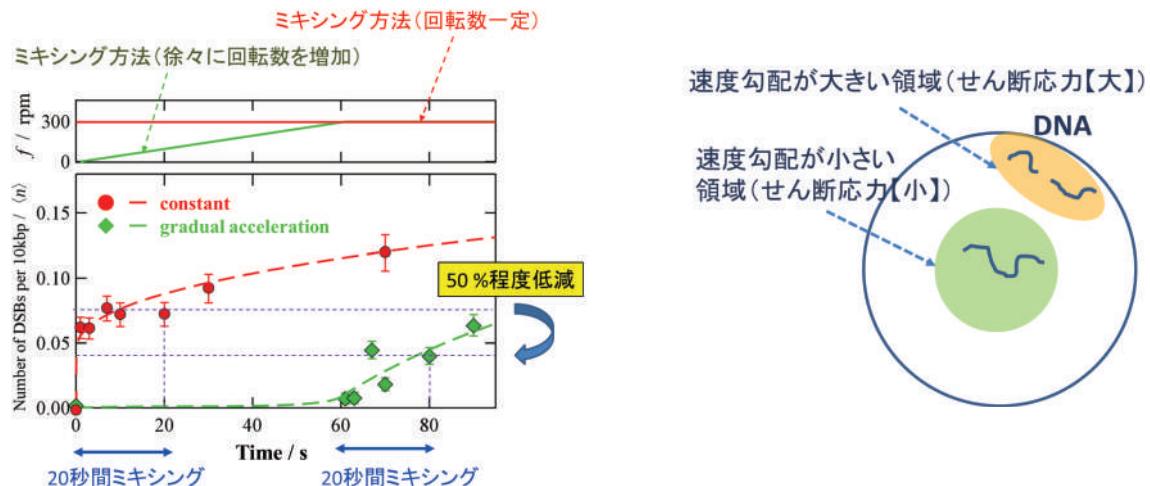


図 5. Vortex のミキシングによる DNA 二重鎖切断 (回転速度  $f$  を 60 秒かけて 1300 rpm にした場合) . (菊池, 野瀬らの研究)

図 6. Vortex ミキサーによる機械刺激による二重鎖切断メカニズム (容器を上から見た図) .

### (3) 自己評価 : A+ 期待以上の成果があった

これまでの研究成果から、超音波照射による DNA 二重鎖切断に切斷の閾値が存在し、ガンマ線や光誘起活性種などの他の DNA 損傷源にはない特徴をもつことを明らかにしてきたが<sup>1, 2)</sup>、本研究によって、ミキシングによる機械刺激に起因する切斷とも異なることが示され、超音波照射による DNA 二重鎖切断の特徴が鮮明になった。さらに、本研究によって、ミキシングの機械刺激によっても、DNA が二重鎖切斷を受けることが明らかとなり、回転速度を調整することで、二重鎖切斷を低減することができるを見出した。この研究成果は、これまで注目されていなかったが、ゲノムサイズ DNA を取り扱う際の重要な知見である。

本研究で得られた研究成果は、超音波による DNA 二重鎖切斷メカニズムを明確に特徴付けるもので、今後の医学・医療分野における超音波装置開発および安全指標作成に極めて重要な知見となるものである。

### (4) 成果発表

#### 論文発表

- [1] R. Kubota, Y. Yamashita, T. Kenmotsu, Y. Yoshikawa, K. Yoshida, Y. Watanabe, T. Imanaka, K. Yoshikawa, "Double-Strand Breaks in Genome-Sized DNA Caused by Ultrasound", *ChemPhysChem*, 18, pp.959-964, 2017.
- [2] M. Noda, Y. Ma, Y. Yoshikawa, T.i Imanaka, T. Mori, M. Furuta, T. Tsuruyama, K. Yoshikawa, "A single-molecule assessment of the protective effect of DMSO against DNA double-strand breaks induced by photo-and g-ray-irradiation, and freezing", *Scientific Reports*, 7, 8557, pp1-8, 2017.
- [3] T. Mori, Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa, "放射線が引き起こすゲノム DNA 二本鎖切斷の可視化と定量化: DNA 凝縮と放射線耐性", 放射線生物研究 (Radiation Biology Research Communications), 52, pp.239-253, 2017.

#### ・招待講演 (Plenary Lecture)

- [4] \*Kenichi Yoshikawa, How to Bridge the Gap between Life and Matter, Italy meets Asia: Scientific Venue in Kyoto 2017 (Nov. 11, 2017), Kyoto, Japan.
- [5] \*Kenichi Yoshikawa, Playing with Crowding: Creation of Cell-Mimicking Structure & Function, First International Symposium on Chemistry for Multimolecular Crowding Biosystems (CMCB2017) (Dec. 12-13, 2017), Kobe, Japan.

#### (Invited Lecture)

- [6] \*Kenichi Yoshikawa, Emergence of Cell-Like Structure & Function under Crowding Condition, International Conference: The Origin of Life (May 29-30, 2017), Tokyo, Japan.

( 5 ) 出版論文

- [7] 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, Applied Physics Letters, 103, 063705/pp. 1-3, (2013).
- [8] 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", Chemical Physics Letters, 638, pp. 205–209, 2015.

( 6 ) 参考資料

本年度の「最終研究成果公開シンポジウム」で使用した講演スライドを添付する。

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

## 超音波出力の安全指標

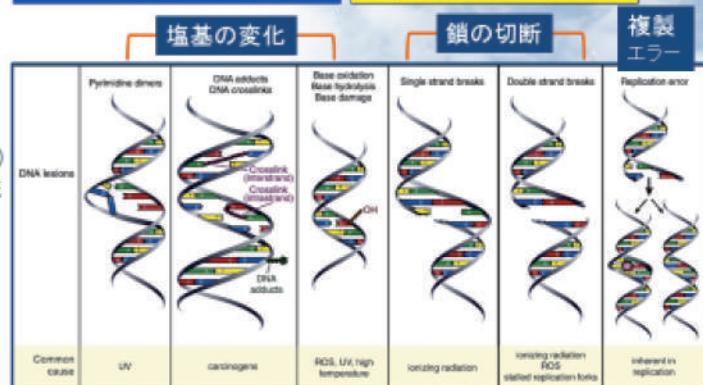
- Thermal Index(温度上昇)  
超音波による熱的作用の安全性を評価する指標
- Mechanical Index(キャビテーション)  
超音波による非熱的作用の安全性を評価する指標

DNA二重鎖切断を指標とした、新たな安全指標

- 超音波によるDNA二重鎖切断メカニズムの解明

## DNA損傷の多様性

### 二重鎖切断が最も危険



E. Clare et al., BBA - Molecular Basis of Disease 1864 (2018) 89,

文部科学省戦略的基盤形成支援事業  
「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—」



同志社大学  
Doshisha University

生命医学部 剣持 貴弘、吉川 研一

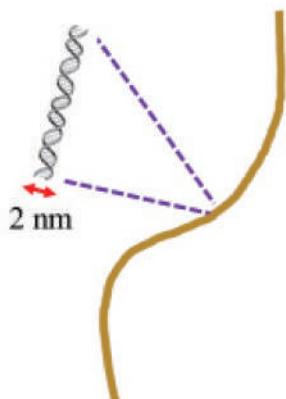
2018年3月4日(日) 於: 同志社大学今出川キャンパス良心館306

# ゲノムサイズDNA

1

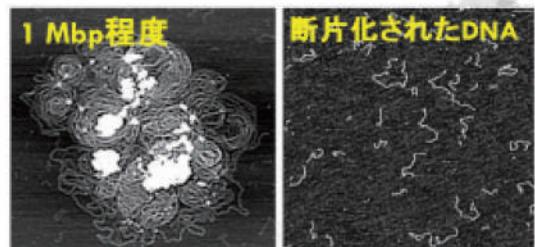
## 従来の二重鎖切断に関する研究

- 1 μm(数キロ塩基対[kbp])以下の短い断片化されたDNAが殆ど。
- ✓ 長いDNAを細胞から抽出することが困難。
- ✓ DNA二重鎖切断が頻繁に起こる高線量の場合が多い。



### ヒトの細胞内

- DNA分子1本: ~数センチ  
(数十億塩基対: 数Gbp)
- 46本: 2メートル程度



Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa, et al., JCP(2011).

1 μm

Doshisha University

## 従来のDNA二重鎖切断評価法

2

### ■ コメット・アッセイ法

電気泳動を利用した計測方法。アガロースゲルにDNAを封入し、電気泳動を行い、DNA損傷を計測する方法。彗星状の蛍光の尾(コメットテイル)を観察する。

問題点：

- ・100 kbpを超える長いDNAの計測が困難。
- ・低線量の二重鎖切断の定量的な評価に向かない。



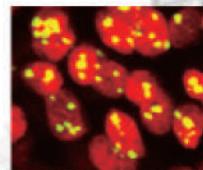
W. Liao et al., Methods 48, 46–53 (2009).

### ■ 蛍光免疫染色法

二重鎖切断の修復過程で出現するリン酸化ヒストンを検出する方法

問題点：

- DNA損傷の修復過程を検出することはできても、  
DNA二重鎖切断そのものを観測していない。

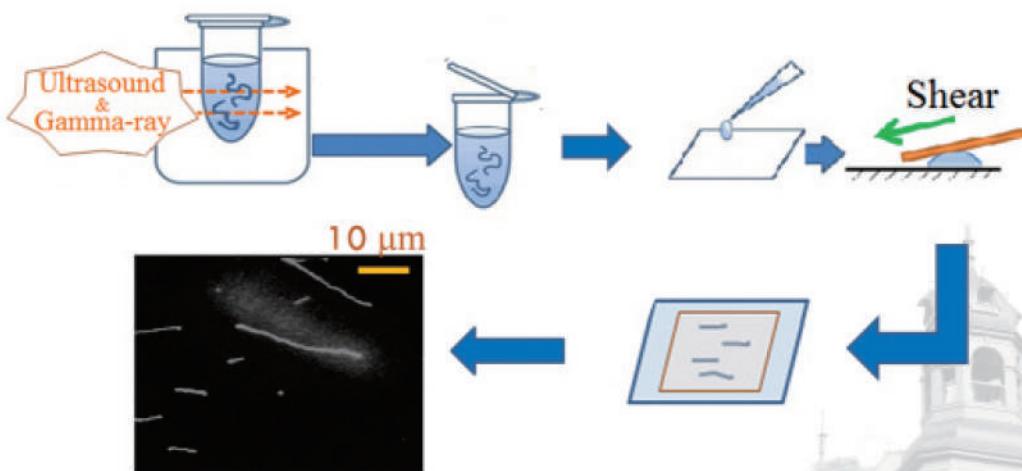


サルの毛にガンマ線照射(8.5 Gy)した場合のDNA二重鎖切断(緑色)

C. E. Redon et al., Radiat Meas, 46(9), 877–881 (2011)

## 蛍光顕微鏡によるDNA一分子観察

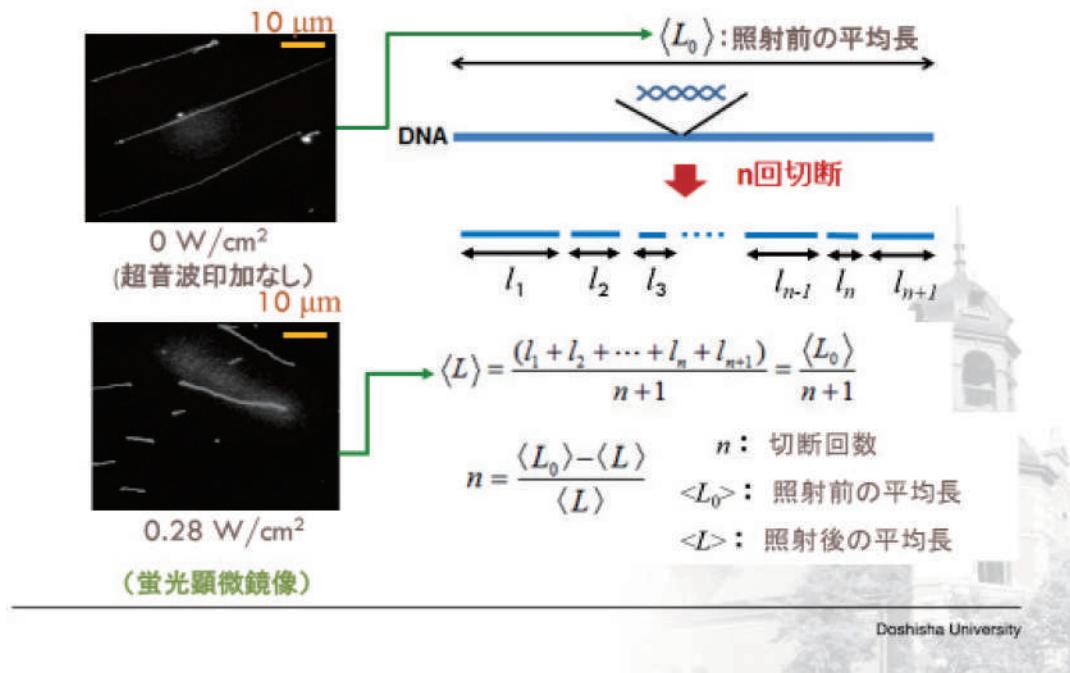
3



蛍光顕微鏡像から、長さを測定

## DNA二重鎖切断回数評価方法:DNA長測定

4



## 超音波実験装置 & 条件

5

### ■ DNAサンプル

- T4 DNA: 166 kbp, 57mm
- Tris-HCl(緩衝剤, pH=7.6, 10 mM)

### ■ 超音波

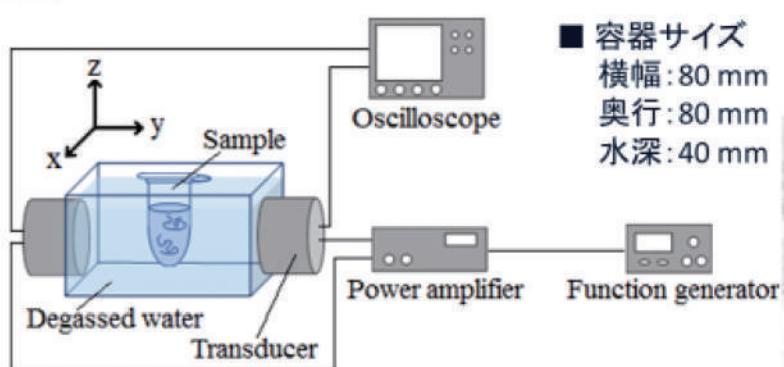
- 振動数: 30 kHz
- 照射時間: 60 s
- 音圧: 90 kPa (380 mW/cm<sup>2</sup>)

### ■ 蛍光染色色素

- YOYO-1

### ■ 容器サイズ

横幅: 80 mm  
 奥行: 80 mm  
 水深: 40 mm

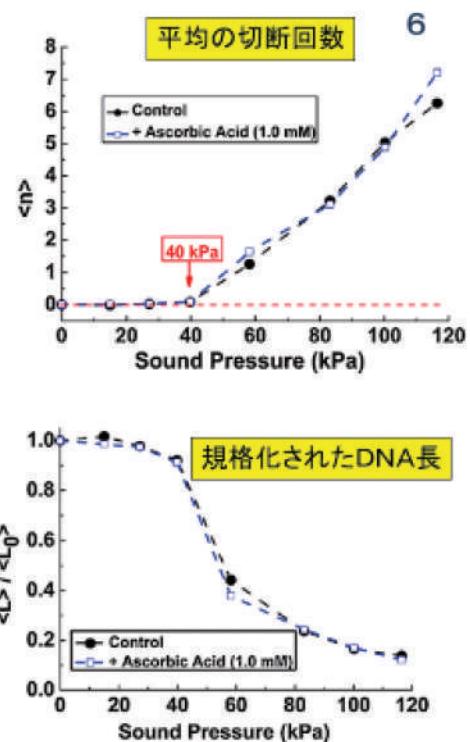
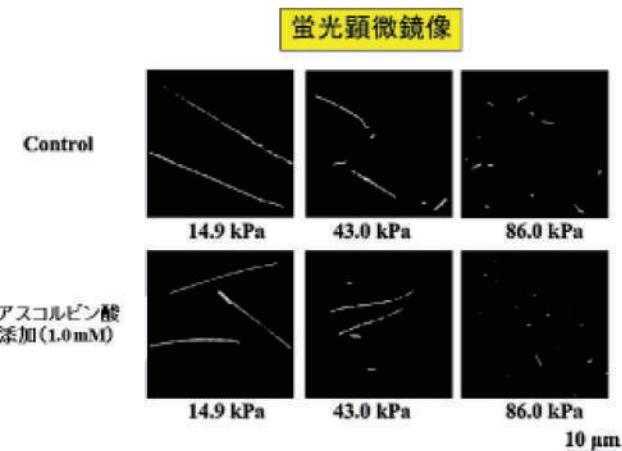


超音波印加装置の概略図(生命医科学部・超音波研提供)

Doshisha University

## 超音波実験装置 & 条件

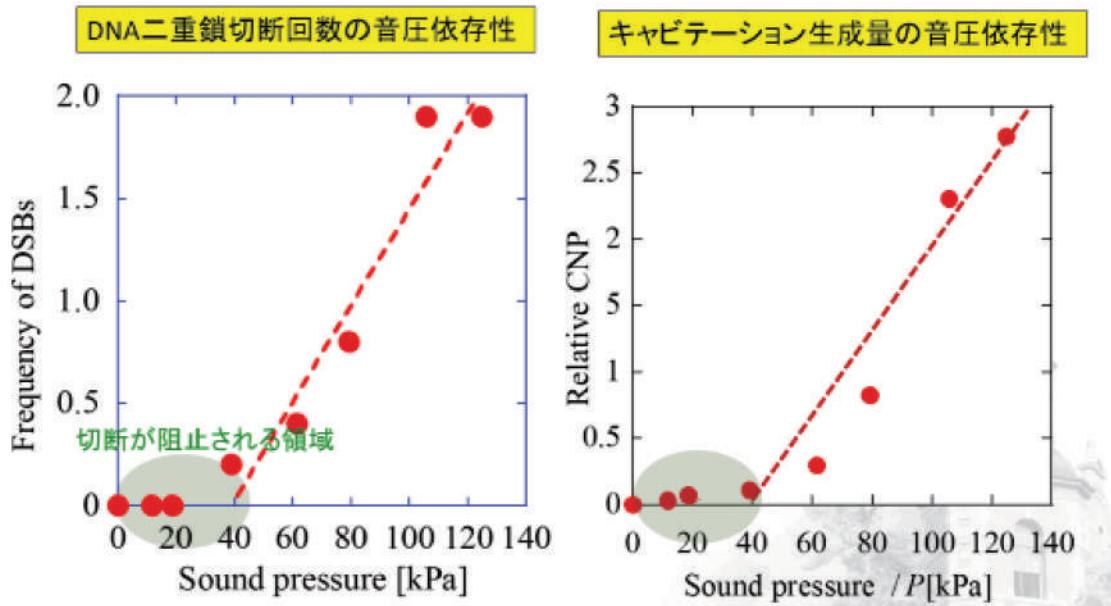
- ☑ アスコルビン酸は活性酸素の生成を抑制する。
  - ➡ 間接作用による二重鎖切断を抑制



Y. Ma, K. Yoshikawa et al., Chem. Phys. Lett., 638, 205–209 (2015).

## 超音波によるDNA二重鎖切断メカニズム(2)

7

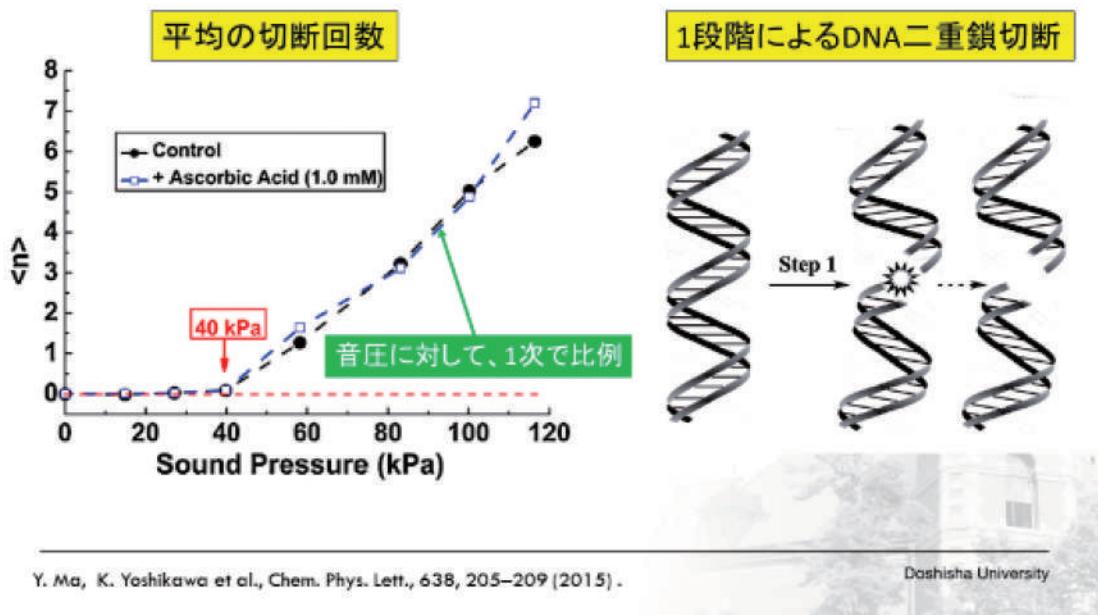


K. Yoshida, K. Yoshikawa et al., Appl. Phys. Lett., vol. 103, 063705 (2013)

Doshisha University

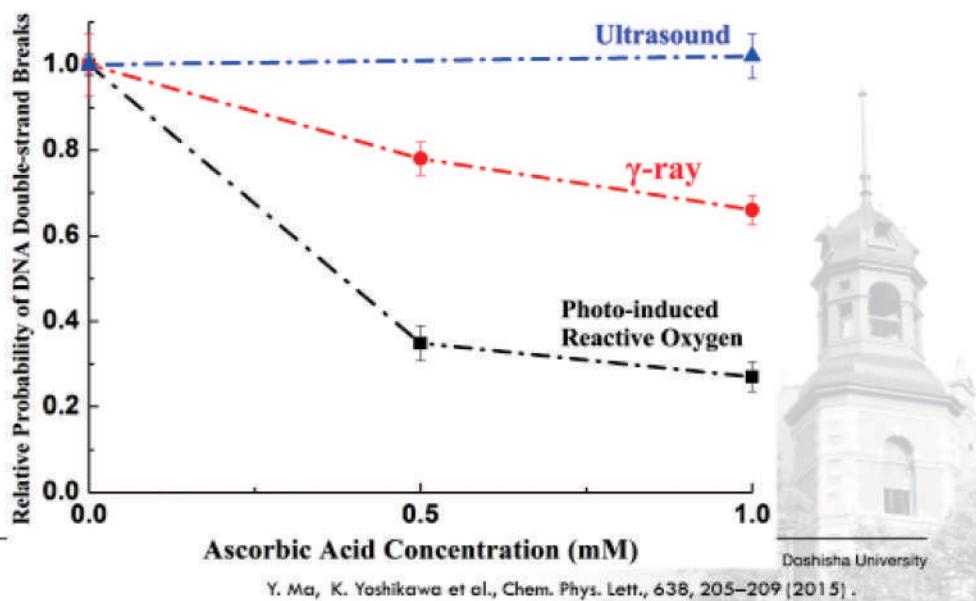
## 超音波によるDNA二重鎖切断メカニズム(1)

8



## 超音波、活性酸素、 $\gamma$ 線照射によるDNA二本鎖切断のアスコルビン酸による保護作用の比較 9

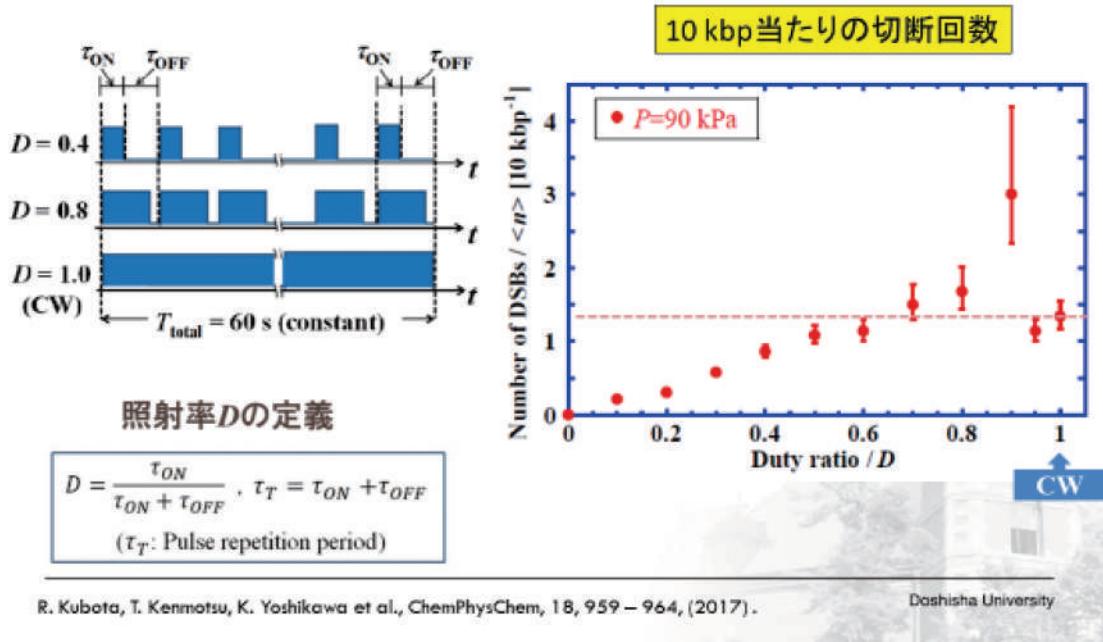
アスコルビン酸は活性酸素の生成を抑制する。→ 間接作用による二重鎖切断を抑制



## DNA二重鎖切断の照射率依存性

10

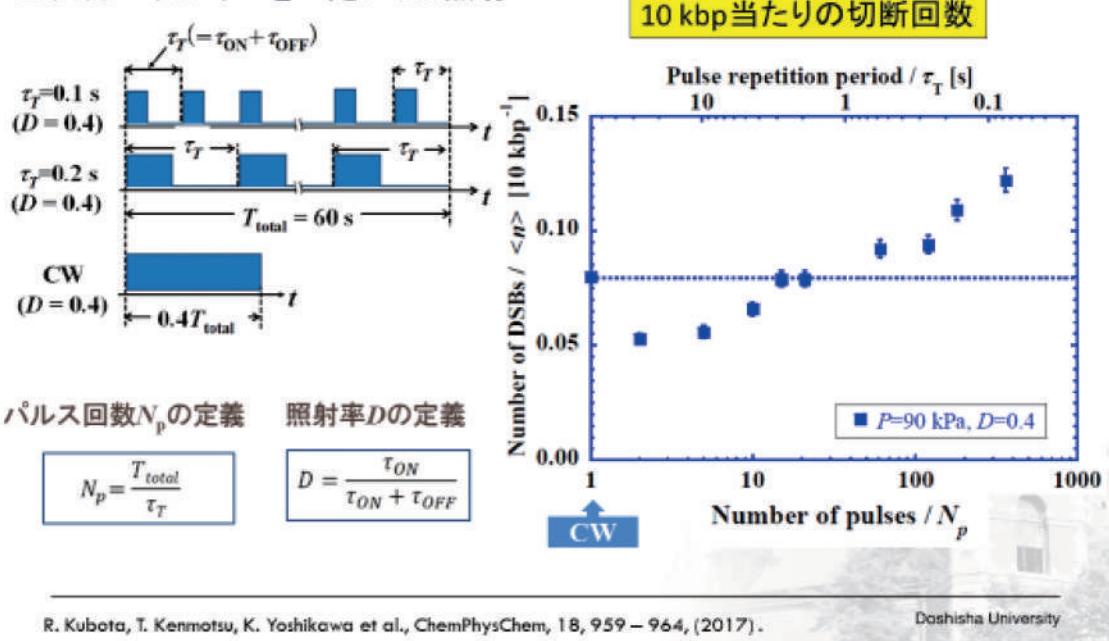
### ■ 照射時間を一定(60秒)にした照射



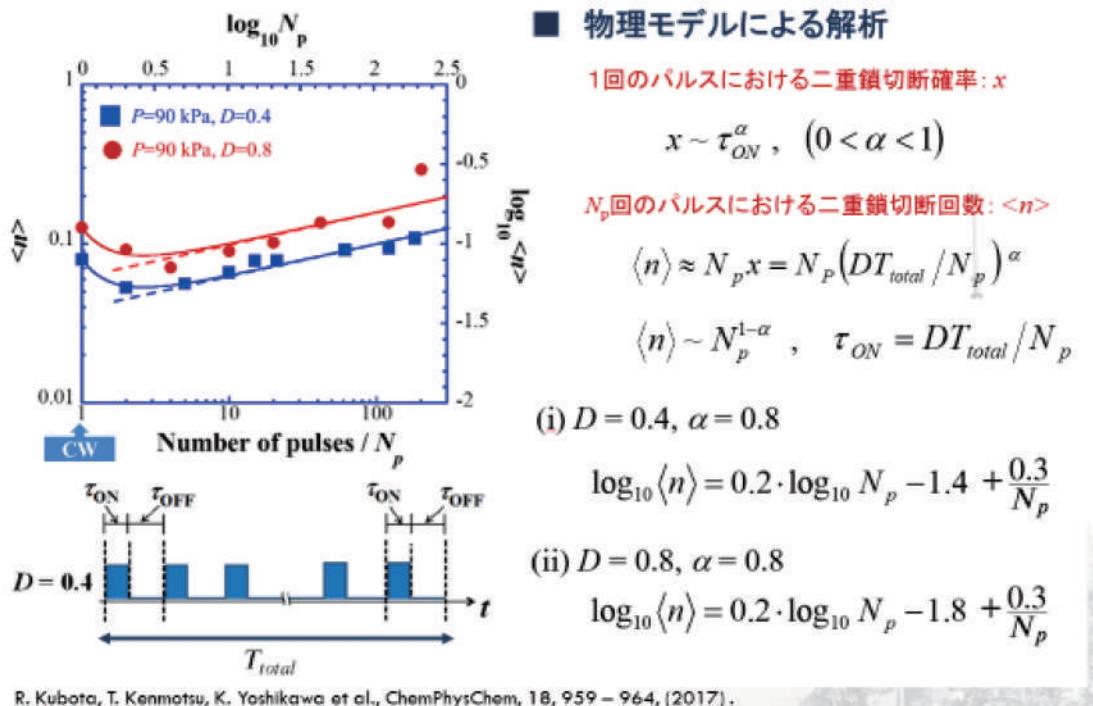
## DNA二重鎖切断のパルス回数依存性

11

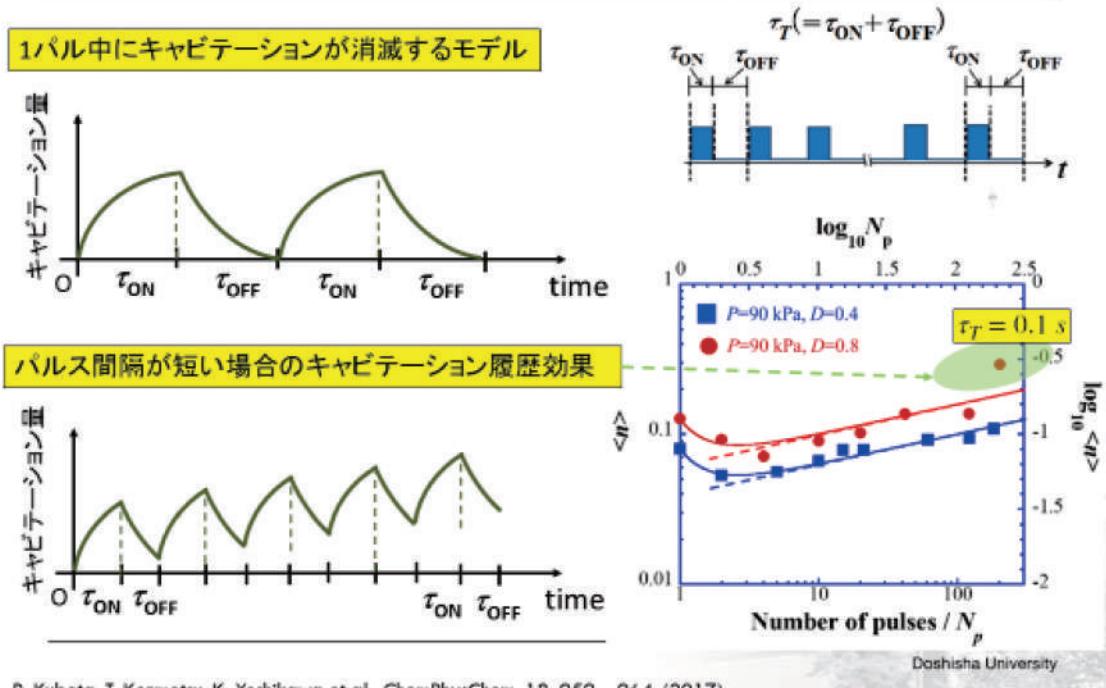
### ■ 入力エネルギーを一定にした照射



## パルス波によるDNA二重鎖切断メカニズムの物理モデル(1) 12



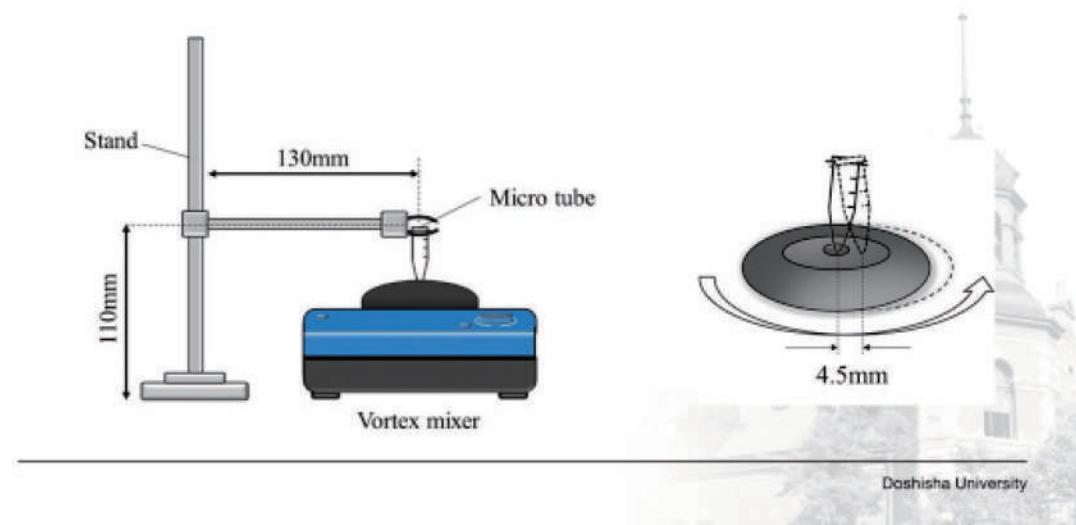
## パルス波によるDNA二重鎖切断メカニズムの物理モデル(2) 13



## ミキシング操作による機械刺激

14

- DNAサンプルを混合する一般的な方法であるVortexミキサーによるミキシング操作（機械刺激）によって、どの程度ゲノムサイズDNAは、二重鎖切断を受けるのか？
- 超音波の振動刺激による二重鎖切断とどのように違うのか？



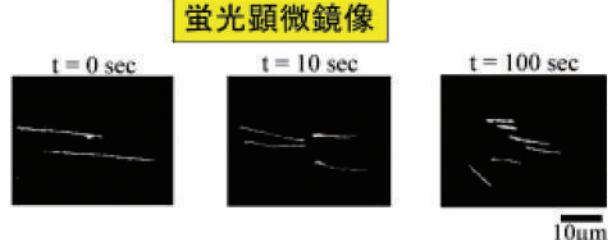
## ミキシング機械刺激によるDNA二重鎖切断(1)

15

### 実験条件

#### ■ DNAサンプル

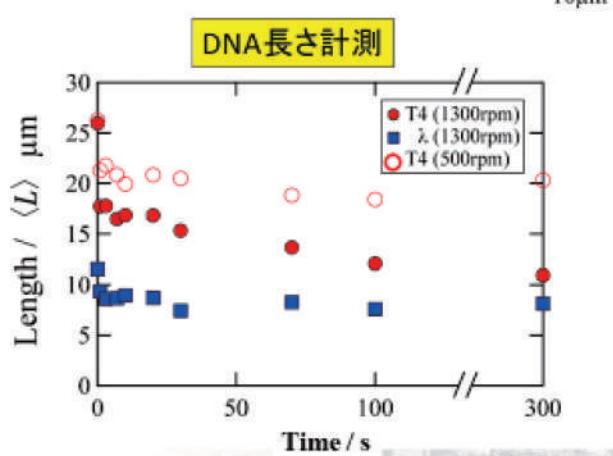
- T4 DNA: 166 kbp, 57 μm
- λ DNA: 48 kbp, 16 μm



#### ■ ミキシング回転数

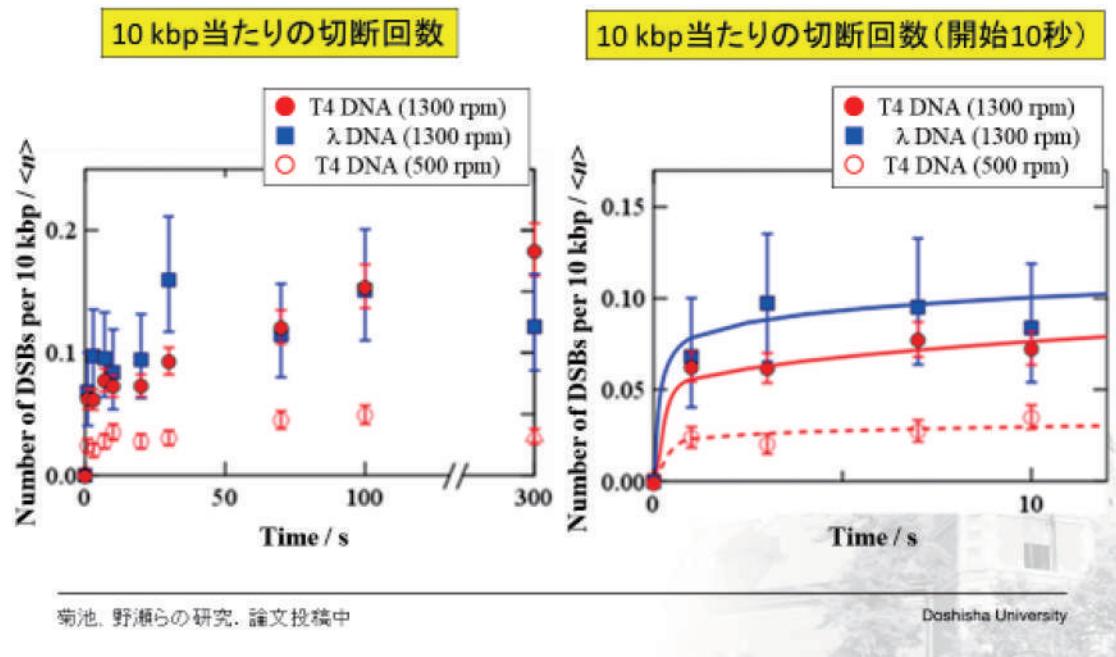
- 500 rpm
- 1300 rpm

rpm:1分間当たりの回転数

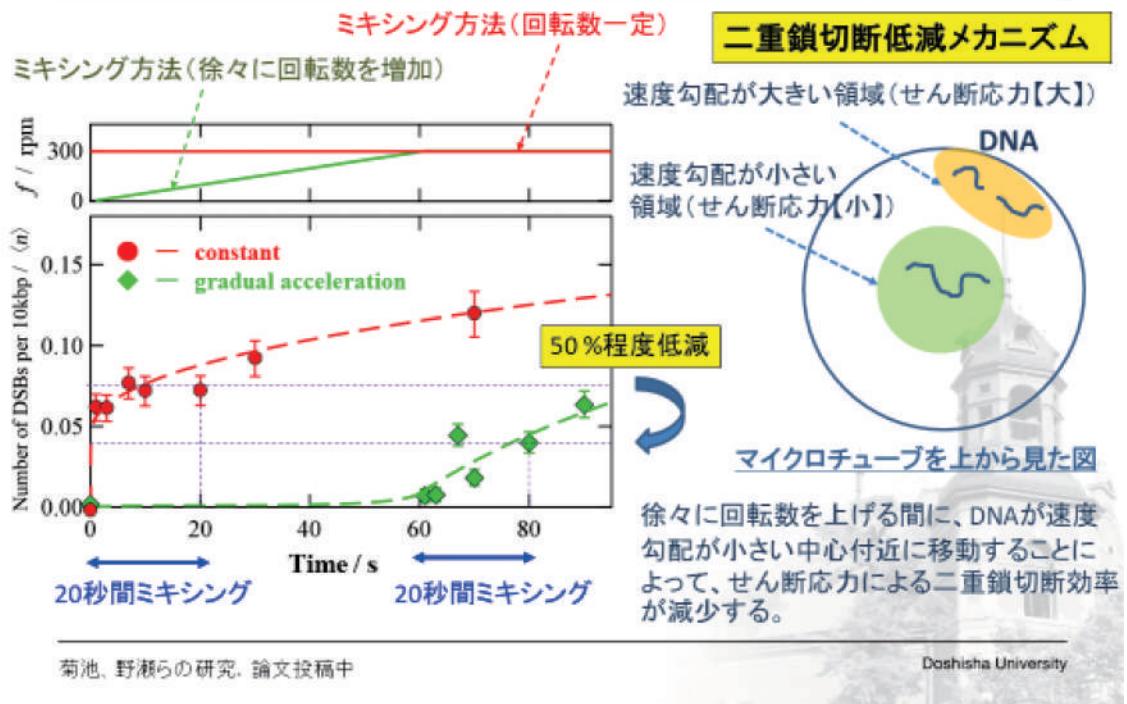


菊池、野瀬らの研究、論文投稿中

## ミキシング機械刺激によるDNA二重鎖切断(2) 16



## ミキシング機械刺激による切断メカニズム 17



## まとめ(1)

18

- 超音波照射によるゲノムサイズDNAの二重鎖切断は、キャビテーションに起因し、1段階の切断メカニズムで生じる。
- 30kHzの超音波では、20Pa以下の音圧ではゲノムDNA二重鎖切断は実質的に皆無となり。40kPa以上ではほぼ線形に二本鎖切断が増加する。これは、ガンマ線や光照射などの、他の損傷源には見られない特徴である。
- パルス照射によるDNA二重鎖切断効率は、連続波照射の場合に比べて、パルス幅が1秒を越える領域では抑制され、パルス幅が1秒よりも短くなる領域では、パルス幅が短くなるほど顕著に増大することが分かった。

Doshisha University

## まとめ(2)

19

- パルス1回照射中に、DNA二重切断確率が時間とともに減少するというモデルによって、実験データのパルス回数依存性を再現することができ、超音波照射中での二重鎖切断確率の時間的減少メカニズムが本質的に重要であることが示される。
- ミキシングによる機械刺激によるDNA二重鎖切断は、せん断応力に起因し、回転数一定(1300 rpm)の場合に比べて、60秒間かけて回転数1300 rpmに上げた場合、二重鎖切断を50 %程度低減することができる。徐々に回転数を上げて、壁付近のDNAを中心近傍に移動させることができ、二重鎖切断低減に効果的である。

### 謝辞

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

### 3.2.5 超音波振動が接着細胞に与える影響と培養制御技術への応用

同志社大学理工学部・小山大介

同志社大学大学院理工学研究科博士前期課程・谷健太朗,

同志社大学理工学部・藤原滉二

#### (1) 研究計画の概要

分子生物学の分野において、細胞の増殖・進展方向の制御や分化誘導技術について種々検討されている<sup>[1-3]</sup>。本研究では、細胞培養環境下における超音波振動が細胞分裂に与える影響および超音波による細胞培養環境制御を応用したパターニング技術について検討する。実験には接着細胞のひとつである HeLa 細胞を用い、超音波振動子と培養ディッシュで構成される超音波細胞培養セルを設計する。細胞培養ディッシュ底面に超音波たわみ振動<sup>[4,5]</sup>を励振することによって、細胞の接着範囲及び増殖方向の制御を試みる。24 時間の超音波駆動による細胞培養の変化の様子を顕微鏡観測し、その効果について考察する。ディッシュ底面に発生する超音波振動および培養液中に発生する音場分布について、有限要素法による数値シミュレーションによって解析し、細胞培養との関連性について議論する。

#### (2) 研究成果

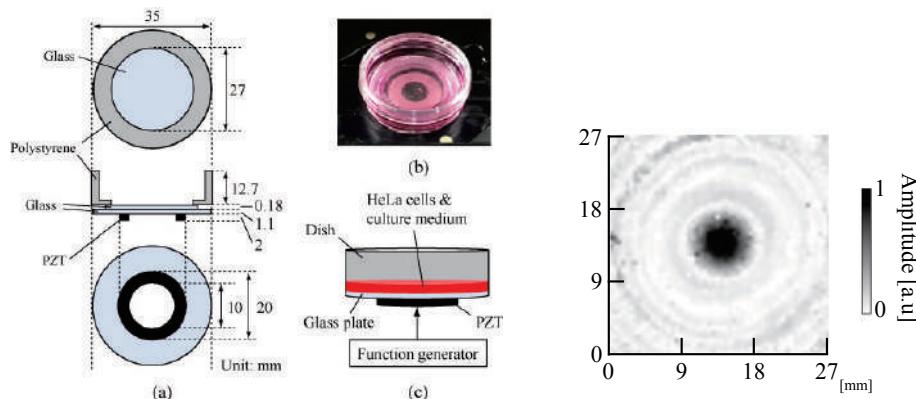
超音波細胞培養セルの試作を行った(図 1)。底面がガラス板の細胞培養ディッシュに HeLa 細胞を培養液と共に滴下した。リング型圧電超音波振動子をガラス円板に接着し、ディッシュ底面に固定した。超音波振動子とガラス板の形状は、ディッシュ底面に所望の共振振動モード(節円 3 個のたわみモード)が励振されるように決定した(図 2 は周波数 78 kHz の振動分布)。超音波セルを温度、湿度および CO<sub>2</sub> ガス濃度を制御可能なチャンバー内に設置し細胞培養の変化を顕微鏡で 24 時間観察した<sup>[6]</sup>。

図 3 は細胞培養の観測結果を表しており、特徴的な(a)駆動前、(b)15 分後、(c)24 時間後の順に、それぞれ異なる駆動電圧の結果を示している。同図(a)より、超音波駆動前では細胞は全体にほぼ一様に分布している。15 分後(同図(b))では、細胞が移動し特定の位置に集まつた。特に 10 V<sub>pp</sub> の場合、細胞は中心から特定の半径において円周状に集合することがわかり、駆動電圧の上昇と共にその傾向がより顕著である。また 24 時間後(同図(c))では、細胞が集合した範囲から広がる様に、全体的に増殖することが確認できる。

細胞の増殖範囲と培養ディッシュ底面の振動分布の関係について検討するため、観測画像の輝度を用いて評価を行った(図 4)。同図より 10 V<sub>pp</sub> 駆動時には、15 分後に土

1.7 mm 近辺で輝度が徐々に増加し、24 時間後に中心部（0 mm）で輝度は減少した。図 5 はシリカ微小球が培養液中の音響定在波中で捕捉される様子を表しており、ディッシュ底面の振動の節円部分ではなく、細胞の増殖が確認された位置で球が捕捉された。すなわち細胞はまず定在波音場<sup>[7]</sup>によって捕捉され、その後ディッシュ上に接着した後分裂することがわかる。またディッシュ上の振動が大きい方向へは増殖しないことが明らかとなった。このことからディッシュに発生する共振たわみ振動モードを切り替えることより、任意形状に細胞パターニングが行えると考えられる。

また今回の実験条件下で PI による細胞の生死判別を行った結果、死細胞率はコントロールと比較して有意な差はなく（約 2%），超音波振動が細胞の生死に与える影響はほとんど認められなかった（図 6）。



(左) 図 1 超音波細胞培養セル (右) 図 2 培養ディッシュ底部に励振される超音波振動 (78 kHz)

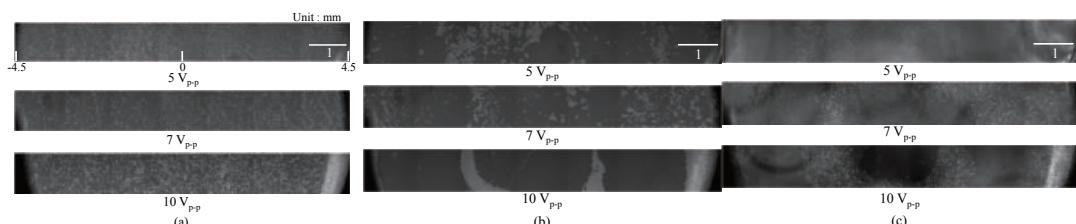


図 3 ディッシュ上の HeLa 細胞の顕微鏡像 ((a) 超音波駆動前, (b) 超音波駆動開始 15 分後, (c) 24 時間後)。位相差観測により細胞は明るく表示される。

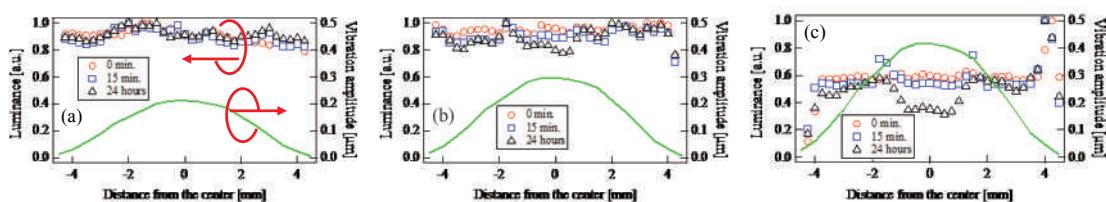


図 4 HeLa 細胞の顕微鏡像の輝度分布と超音波振動分布の比較 ((a) 5, (b) 7, (c) 10 V<sub>pp</sub>)

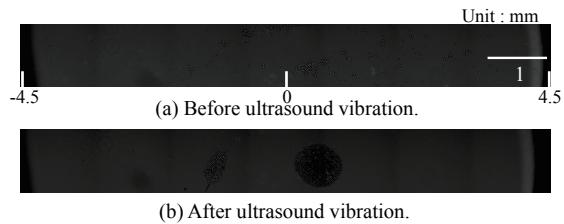


図 5 ディッシュ上のシリカ球の様子.

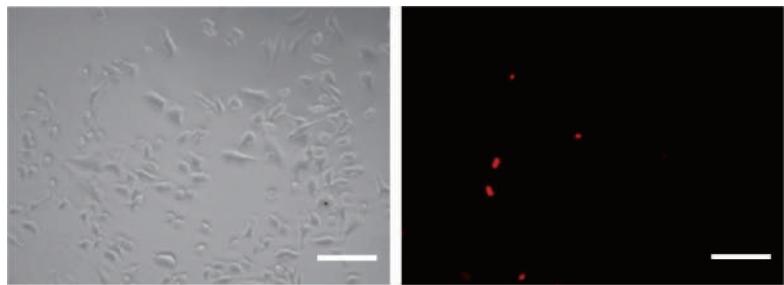


図 6 HeLa 細胞の位相差画像（左）と蛍光画像（右）. 死細胞は蛍光画像上で赤く表示される.

### (3) 自己評価

#### A 期待通りの成果があった

研究計画に沿って実験を行い、期待していた通りの成果が得られた。特に HeLa 細胞の培養制御技術について、細胞増殖がディッシュ上に励振される振動分布のみならず、培養液中の音場分布にも依存することがわかり、その培養メカニズムを明らかにすることができた。

### (4) 平成 29 年度の成果発表など

#### 論文発表

- [1] K. Tani, M. Imura, D. Koyama, Y. Watanabe, "Quantitative evaluation of hemolysis on bovine red blood cells caused by acoustic cavitation under pulsed ultrasound," *Acoust. Sci. & Tech.*, Vol. 38, No. 3, pp.161-164 (2017)
- [2] K. Tani, K. Fujiwara, D. Koyama, "Adhesive cell patterning technique using ultrasound vibrations," *Ultrasound in Medicine and Biology*, (submitted)

#### 学会発表

- [3] 谷健太朗, 小山大介, 渡辺好章, 超音波振動を用いた HeLa 細胞の培養制御, 日本組織培養学会第 90 回大会 (2017.7)
- [4] 谷健太朗, 小山大介, 培養ディッシュの超音波振動を用いた細胞培養の制御, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017.12)
- [5] 谷健太朗, 藤原滉二, 小山大介, 超音波振動を用いた接着細胞のパターンニング技術 電子情報通信学会 超音波研究会 (2018.1)
- [6] 藤原滉二, 谷健太朗, 小山大介, 超音波振動を用いた細胞パターンニング, 日本音響学会 2018 年春季研究発表会 (2018.3)

#### (6) 参考文献・引用

- [1] N. M Alves, et al., “Controlling cell behavior through the design of polymer surfaces”, *Small: nano micro*, 6 2208-2220 (2010)
- [2] V. Sivagnanam et al., “Selective breast cancer cell capture, culture, and immunocytochemical analysis using self-assembled magnetic bead patterns in a microfluidic chip”, *Langmuir*, 26 6091–6096 (2010)
- [3] H. Zhang, et al., “Optical tweezers for single cells”, *Journal of the Royal Society Interface*, 5 671-690 (2008)
- [4] 谷 健太朗, 他, “培養ディッシュの超音波振動を用いた細胞接着の制御”, 生命科学系学会合同年次大会 (2017)
- [5] Y. Kurashina, et al, “Efficient subculture process for adherent cells by selective collection using cultivation substrate vibration”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 64 580–587 (2016)
- [6] H. Lodish, et al., 分子細胞生物学 第 7 版, “細胞の培養, 観察, 操作”, 347–348, 東京化学同人 (2016)
- [7] D. Koyama, et al., “An ultrasonic air pump using an acoustic traveling wave along a small air gap”, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 57 253–261 (2010)

## (7) 参考資料

*Acoust. Sci. & Tech.* **38**, 3 (2017)

©2017 The Acoustical Society of Japan

## ACOUSTICAL LETTER

## Quantitative evaluation of hemolysis in bovine red blood cells caused by acoustic cavitation under pulsed ultrasound

Kentaro Tani<sup>1</sup>, Masato Imura<sup>1</sup>, Daisuke Koyama<sup>1,\*</sup> and Yoshiaki Watanabe<sup>2</sup><sup>1</sup>*Faculty of Science and Engineering, Doshisha University,  
1-3 Tataramiyakodani, Kyotanabe, 610-0321 Japan*<sup>2</sup>*Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University,  
1-3 Tataramiyakodani, Kyotanabe, 610-0321 Japan*

(Received 31 October 2016, Accepted for publication 14 December 2016)

**Keywords:** Red blood cell, Hemolysis, Pulsed ultrasound, Acoustic cavitation**PACS number:** 43.35.+d, 43.35.Ei, 43.35.Wa [doi:10.1250/ast.38.161]

### 1. Introduction

The safety criteria of ultrasound for live bodies are one of the important factors in the development of ultrasound imaging and therapeutic techniques using high-intensity ultrasound such as shear-wave elastography [1] and high-intensity focused ultrasound therapeutic techniques [2]. These functional techniques enable the visualization of additional information and expected treatment effects. However, the local temperature rise and high stress caused by high-intensity ultrasound will induce biological effects. Several researchers have reported the effects on blood under high stress or high-intensity ultrasound [3,4]. The effect on blood can be evaluated quantitatively by the amount of hemolysis, in which the cell membrane of red blood cells is ruptured by physical, chemical and biological factors, and hemoglobin included in the red blood cells flows out plasma [5]. Our group has developed an ultrasonic bubble filter for extracorporeal circulation and investigated its effect on blood [6,7], and it was found that ultrasound exposure at lower frequencies induced greater damage to blood at the same sound pressure level. These experimental results imply that the hemolysis is related to acoustic cavitation since the sound pressure threshold for cavitation generation increases with the ultrasound frequency. Acoustic cavitation increases the dose efficiency in ultrasound-triggered gene and drug delivery techniques [8], and the ultrasound pulse length is one of the important factors in cavitation generation and in determining the efficiency [9].

In this paper, we focused on hemolysis caused by pulsed ultrasound and performed *in vitro* experiments using bovine blood. Temporal changes in the generation of cavitation were measured while changing the pulse repetition frequency (PRF) and pulse length, and the relationship between the hemolysis and the acoustic cavitation was evaluated quantitatively.

### 2. Evaluation of cavitation generation

The cavitation noise power indicator (CNP) [10] was used for an evaluation index of cavitation generation. The CNP can be estimated from the frequency spectrum of an observed ultrasound waveform  $p(t)$  and is expressed as

$$\text{CNP} = \int_0^{f_d - \Delta f/2} P(f)df + \int_{f_d + \Delta f/2}^{2f_d - \Delta f/2} P(f)df + \dots + \int_{(n-1)f_d + \Delta f/2}^{f_s/2} P(f)df, \quad (1)$$

where  $P(f)$  is a frequency component of  $p(t)$ ,  $f_d$  is the fundamental frequency of the ultrasound,  $f_s$  is the sampling frequency,  $n$  is a natural number and  $\Delta f$  is the frequency range. Equation (1) indicates that the CNP is determined as the summation of the frequency components except the fundamental and harmonic components  $n f_d$  with the frequency range  $\Delta f$ . This means that the effects of the fundamental and harmonic components generated by the wave distortion through acoustic nonlinearity can be excluded and that only the acoustic signal generated by the cavitation microbubbles is taken into account since the microbubbles regenerate not only the fundamental and harmonic components but also distinctive subharmonic and superharmonic components [11]. In addition, the chaotic behavior and the shock wave generated by bubble collapse will increase the white-noise level. Therefore, a larger CNP means that a larger acoustic signal generated by the cavitation will be observed. In this paper, cavitation generation was evaluated by the relative CNP (ReCNP) [10], expressed as

$$\text{ReCNP} = \frac{\text{CNP} - \text{CNP}_0}{\text{CNP}_0}, \quad (2)$$

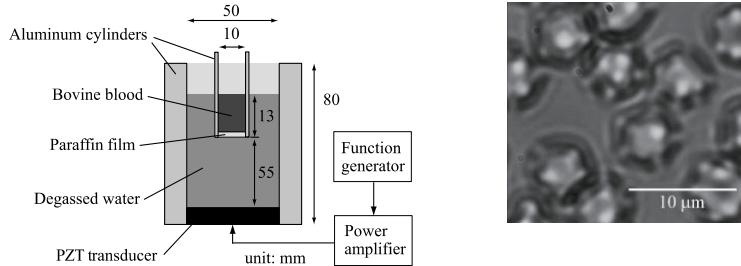
where  $\text{CNP}_0$  is the CNP in the case without ultrasound exposure; the cavitation generation can be evaluated accurately by subtracting the electric and acoustic background noises.

### 3. Methods

#### 3.1. Ultrasound exposure

Figure 1 shows the experimental setup used for ultrasound exposure. An aluminum cylindrical container (inner diameter: 50 mm; height: 80 mm) filled with degassed water was prepared as the ultrasonic reactor for hemolysis evaluation, and pulsed ultrasound was radiated from a circular piezoelectric lead zirconate titanate (PZT) transducer (diameter: 50 mm; thickness: 2 mm; resonance frequency: 1 MHz; C-213,

\*e-mail: dkoyama@mail.doshisha.ac.jp



**Fig. 1** Experimental setup used for ultrasound exposure.

Fuji Ceramics, Fujinomiya, Japan) attached on the bottom of the reactor. Bovine blood was employed in the experiments because the size of the red blood cells and the volume density are almost the same as those of human blood. The bovine blood was purchased from Nippon Bio-Test Laboratories Inc. (Tokyo, Japan) and employed as blood samples. The ratio of blood to Alsever's solution was 1:1. A small container with an inner diameter of 10 mm, in which a 1.0 ml blood sample was placed, was arranged 55 mm above the PZT transducer on the center axis of the reactor. The heights of the blood and water surfaces were equal, and the bottom of the small container was sealed with a thin paraffin film. The water level was controlled so that an acoustic standing-wave field could be generated efficiently in the blood sample. Pulsed ultrasound at 1 MHz with a maximum sound pressure amplitude of 200 kPa (sound intensity of  $2.4 \text{ W/cm}^2$ ) in the container was irradiated for 1 min, and the number of cycles (50 or 100 cycles) and the PRF were changed. These experimental conditions were determined by considering the clinical applications using a long pulse duration such as shear-wave elastography and sonoporation. The sound pressure threshold for cavitation generation at 1 MHz in bovine blood is approximately 200 kPa [7]. For comparison, a continuous wave was also applied. The room temperature was 25°C, and the maximum rise in temperature due to ultrasound exposure was approximately 6°C, which will not induce the denaturation of proteins [12]. After ultrasound exposure, the blood samples were centrifuged and divided into two layers: blood cells and plasma components including ghost red blood cells, which are ruptured red blood cells [13]. Only the plasma component was sampled and observed optically. The sample without ultrasound exposure was the control.

The acoustic signal in the blood sample was measured to evaluate the CNP. A wide-band needle-type polyvinylidene fluoride hydrophone with a diameter of 1 mm was installed at the center of the sample, 6 mm below the blood surface. The sampling frequency was 10 MHz and the total data length was 20,000 points, so that 100 cycles of pulsed ultrasound at 1 MHz could be recorded. The pulse signals were sequentially recorded 500 times for 1 min, and the average CNP was calculated from each CNP. The frequency range  $\Delta f$  in Eq. (1) was 50 kHz, which is four times the full width at half maximum of the fundamental component, to exclude the fundamental and harmonic components.

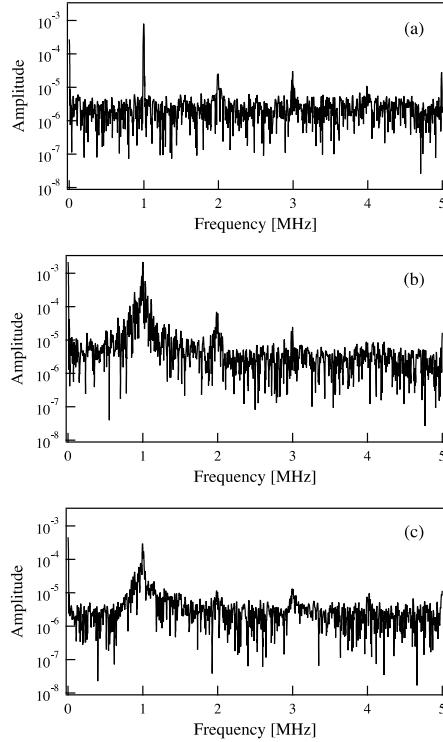
ghost red blood cells in the plasma components after ultrasound exposure.

### 3.2. Optical observations

The effects of ultrasound exposure on red blood cells were investigated from microscopic observation and the optical transparency. The hemolysis was evaluated by the number of ghost red blood cells [13] in the plasma component sampled after ultrasound exposure. The number of ghost red blood cells in 1  $\mu\text{l}$  of plasma components was counted using an optical microscope. The optical transparency of the plasma component was also measured. The plasma component was poured into a disposable acrylic cell ( $10 \times 10 \times 4.5 \text{ mm}^3$ ). A laser beam with a wavelength of 540 nm and a power of 2 mW penetrated through the sample and the transmitted light was received by a photodiode. The absorbance through the sample  $A (= -\log(V/V_0))$  was measured by comparison with the control ( $V$  and  $V_0$  are the output voltages of the photodiode for each sample and the control, respectively). The free hemoglobin was estimated from the absorbance [14].

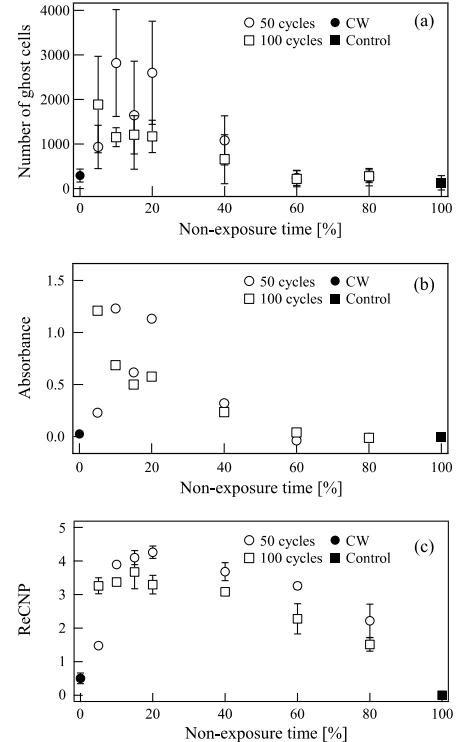
## 4. Results

Figure 2 shows typical microscopic images of intact red blood cells and ghost red blood cells in the plasma after ultrasound exposure. Compared with the intact cells (Fig. 2(a)), the ghost red blood cells are more transparent since the cell membranes were ruptured and the backlight was not refracted at the edge of the cells (Fig. 2(b)). Figure 3 shows the representative frequency spectra in the cases with a continuous wave and high and low PRFs. A higher PRF increased the harmonic components and the noise level between these harmonic components, resulting in a higher CNP. Figures 4(a)–4(c) show the relationships between the ultrasound non-exposure time and the number of ghost red blood cells, the absorbance and the ReCNP, respectively. The horizontal axes indicate the ratio of ultrasound non-exposure time in 1 min; 0 and 100% mean the cases with continuous wave exposure and without ultrasound exposure, respectively. This is because the total acoustic energy for 1 min changes with the number of cycles for the same PRF. The plots and error bars in Figs. 4(a) and 4(c) express the average value and the standard deviations for five and three trials, respectively. The results in Figs. 4(a) and 4(b) were obtained from the same blood sample. The number of ghost cells was counted five times by repeatedly sampling 1  $\mu\text{l}$  of the plasma components

K. TANI *et al.*: HEMOLYSIS CAUSED BY ACOUSTIC CAVITATION

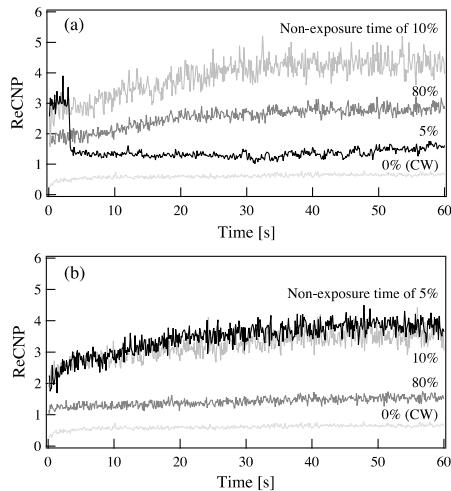
**Fig. 3** Frequency spectra in the cases with (a) a continuous wave, (b) high (non-exposure time of 20%) and (c) low PRFs (non-exposure time of 80%) for pulsed ultrasound of 50 cycles.

from the blood sample. The ReCNP was measured three times using intact blood samples, and  $\text{CNP}_0$  in Eq. (2) was 0.018. In Fig. 4(a), the number of ghost red blood cells increased gradually with decreasing non-exposure time and decreased again at 0% (continuous wave); the hemolysis was maximized at around 5 to 10%. Compared with the control (100%), the results between 5 to 40% showed a significant difference according to the results of a *t*-test. The same tendencies were observed for the absorbance (Fig. 4(b)) and ReCNP (Fig. 4(c)). It should be noted that sharp spectral peaks appear upon the Fourier transform of a continuous periodic signal, and this fact means that the continuous wave essentially gives a small ReCNP. These results imply that cavitation generation mainly induces hemolysis and that the ultrasound non-exposure time is one of the important factors affecting hemolysis in a low-intensity ultrasound field. An unstable transient cavitation bubble with a short lifetime generates a shock wave by collapsing [11]. As the non-exposure time is reduced, transient cavitation bubbles can grow sufficiently to generate broadband shock waves by collapsing [9,15]. On the other hand, stable cavitation bubbles under continuous



**Fig. 4** Relationships between the non-exposure time and (a) the number of ghost red blood cells, (b) the absorbance and (c) the ReCNP. The plots and error bars respectively indicate the average values and the standard deviations.

excitation will maintain a periodic oscillation without collapsing and this behavior will suppress hemolysis. Figure 5 shows the temporal changes in the ReCNP for several ultrasound non-exposure times. Each average value between 0 and 60 s corresponds to the ReCNP in Fig. 4(c). The ReCNP increased gradually with time and then attained a steady state since the number of transient cavitation bubbles increased. It is noteworthy that the ReCNP decreased rapidly at approximately  $t = 3$  s in the case of a non-exposure time of 5% with pulsed ultrasound of 50 cycles (Fig. 5(a)). Comparing this result with the result for a non-exposure time of 5% and pulsed ultrasound of 100 cycles (Fig. 5(b)), this result can be attributed to the transient cavitation changing to stable cavitation over time since a larger number of cycles gives a lower PRF for the same non-exposure time. Although the average values of the ReCNP for the non-exposure times of 10 and 40% are almost the same, as shown in Fig. 4(c), significant differences can be seen in the number of ghost cells (Fig. 4(a)) and the absorbance (Fig. 4(b)). The instantaneous increases in the ReCNP generated by the transient cavitation shown in Fig. 5(a) will induce hemolysis.



**Fig. 5** Temporal changes in the ReCNP for several ultrasound non-exposure times with pulsed ultrasound of (a) 50 and (b) 100 cycles.

## 5. Conclusions

The effects of pulsed ultrasound on bovine blood were discussed. The relationship between the changes in red blood cells and the acoustic cavitation was investigated acoustically and optically. The experimental results implied that the shockwave generated by acoustic cavitation bubbles induced hemolysis and that the non-exposure time of ultrasound is one of the important factors in hemolysis.

## Acknowledgements

This work was partially supported by a bilateral program from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) and the MEXT-supported Program for the Strategic Research Foundation at Private Universities 2013–2018.

## References

- [1] J. L. Gennisson, N. Grenier, C. Combe and M. Tanter, "Supersonic shear wave elastography of in vivo pig kidney: Influence of blood pressure, urinary pressure and tissue anisotropy," *Ultrasound Med. Biol.*, **38**, 1559–1567 (2012).
- [2] A. Blana, B. Walter, S. Rogenhofer and W. F. Wieland, "High-intensity focused ultrasound for the treatment of localized prostate cancer: 5-year experience," *Urology*, **63**, 297–300 (2004).
- [3] D. Miller, R. Thomas and A. Williams, "Mechanisms for hemolysis by ultrasonic cavitation in the rotating exposure system," *Ultrasound Med. Biol.*, **17**, 171–178 (1991).
- [4] R. Paul, J. Apel, S. Klaus, F. Schügner, P. Schwindke and H. Reul, "Shear stress related blood damage in laminar couette flow," *Artif. Organs*, **27**, 517–529 (2003).
- [5] L. Gershfeld and M. Murayama, "Thermal instability of red blood cell membrane bilayers: Temperature dependence of hemolysis," *J. Membr. Biol.*, **101**, 67–72 (1988).
- [6] K. Mino, M. Kataoka, K. Yoshida, D. Koyama, K. Nakamura, M. Omori, S. Kawarabata, M. Sato and Y. Watanabe, "Ultrasound bubble filter using the flexural vibration of a cylinder for an extracorporeal circulation circuit," *Sens. Actuators A*, **199**, 202–208 (2013).
- [7] K. Mino, M. Imura, D. Koyama, M. Omori, S. Kawarabata, M. Sato and Y. Watanabe, "Meshless bubble filter using ultrasound for extracorporeal circulation and its effect on blood," *Ultrasound Med. Biol.*, **41**, 465–471 (2015).
- [8] L. Somaglino, G. Bouchoux, J. L. Mestas and C. Lafon, "Validation of an acoustic cavitation dose with hydroxyl radical production generated by inertial cavitation in pulsed mode: Application to in vitro drug release from liposomes," *Ultrason. Sonochem.*, **18**, 577–588 (2011).
- [9] W. Chen, A. Brayman, T. Matula, L. Crum and M. Miller, "The pulse length-dependence of inertial cavitation dose and hemolysis," *Ultrasound Med. Biol.*, **29**, 739–748 (2003).
- [10] J. Frohly, S. Labouret, C. Bruneel, I. Looten-Baquet and R. Torquet, "Ultrasonic cavitation monitoring by acoustic noise power measurement," *J. Acoust. Soc. Am.*, **108**, 2012–2020 (2000).
- [11] K. Yasui, T. Tuziuti, J. Lee, T. Kozuka, A. Towata and Y. Iida, "Numerical simulations of acoustic cavitation noise with the temporal fluctuation in the number of bubbles," *Ultrason. Sonochem.*, **17**, 460–472 (2010).
- [12] J. Schellman, "Temperature, stability, and the hydrophobic interaction," *Biophys. J.*, **73**, 2960–2964 (1997).
- [13] M. Nose, S. Amagaya and Y. Ogihara, "Effects of saikogenin metabolites on the hemolysis of red blood cells and their adsorbability on the cell membrane," *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 3306–3310 (1989).
- [14] I. Oshiro, T. Takenaka and J. Maeda, "New method for hemoglobin determination by using sodium lauryl sulfate (SLS)," *Clin. Biochem.*, **15**, 83–88 (1982).
- [15] M. Ashokkumar, M. Hodnett, B. Zeqiri, F. Grieser and G. Price, "Acoustic emission spectra from 515 kHz cavitation in aqueous solutions containing surface-active solutes," *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 2250–2258 (2007).

2018年1月 超音波研究会

## 超音波振動を用いた接着細胞のパターニング技術

○谷 健太郎, 藤原 混二, 小山 大介

(同志社大学 理工学部)



### 背景

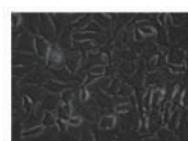
#### 培養細胞の利用

- 細胞や組織の性質や機能の評価
- 新薬開発における薬物が生体へ与える影響の評価
- 医療機器などの安全性評価

動物実験



細胞実験



<http://www.learningatthebench.com/subculturing-adherent-and-suspension-cells.html>

#### 細胞実験の利点

in vitroで実験することが可能  
小さなスペースで集団スクリーニングが可能  
培養細胞を用いて、組織の構造などを模擬することで、より生体に近い状態で利用することが求められる

## 背景

### 治療への応用

臓器不全などの病気



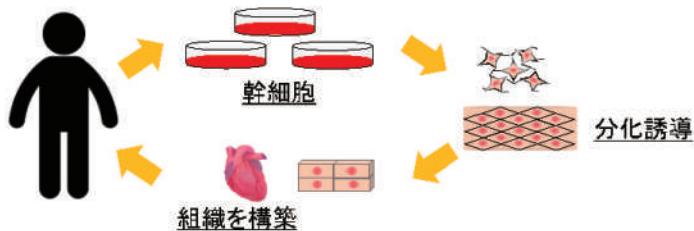
臓器移植が必要

### 問題点

ドナーを待つ必要  
適合性がないと移植は不可能

### 再生医療

多機能性幹細胞(iPS細胞, ES細胞, etc.)が注目されている  
培養細胞を用いてin vitroで臓器を再現する



## 背景

### 治療への応用

臓器不全などの病気



臓器移植が必要

### 問題点

ドナーを待つ必要  
適合性がないと移植は不可能

### 再生医療

多機能性幹細胞(iPS細胞, ES細胞, etc.)が注目されている  
培養細胞を用いてin vitroで臓器を再現する

### 細胞培養を制御する技術の向上が必要

- 細胞のマニピュレーション
- 細胞の増殖や伸展方向の制御



## 背景

### 細胞培養制御技術

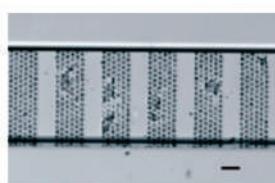
#### ・磁気操作<sup>[1]</sup>

##### 利点

細胞の凝集・分散が容易  
特定の細胞を選択的に制御可能

##### 問題点

細胞毒性の懸念



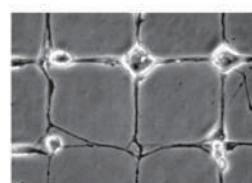
#### ・微細加工技術<sup>[2]</sup>

##### 利点

精密な加工が可能

##### 問題点

コンタミネーションの懸念  
高コスト化



[1] V. Sivagnanam, et al., "Selective Breast Cancer Cell Capture, Culture, and Immunoassay to chemical Analysis Using Self-Assembled Magnetic Bead Patterns in a Microfluidic Chip", *Langmuir*, 2010, 26 (9), pp 6091-6096  
[2] 西澤松彦, 他, "バイオチップ表面への細胞のマイクロパターンング", 表面科学, 25, pp. 290 - 295 (2004)

## 背景

### 細胞培養制御技術

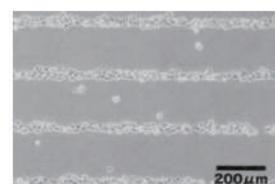
#### ・光レーザ<sup>[3]</sup> (光ピンセット)

##### 利点

非接触で細胞操作が可能  
操作が容易

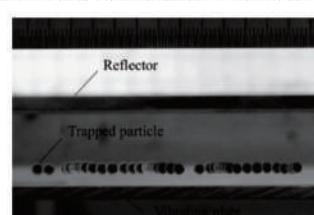
##### 問題点

扱える細胞が限定的  
装置の高コスト化, 大型化



### 超音波

非接触, 低コスト,  
人工材料への加工が不要  
粒子の非接触搬送<sup>[4]</sup>などが報告されている



簡単で小型なシステム

培養制御と細胞応答の評価を  
ひとつの装置で行える可能性

[3] 須丸公祐, 他, "細胞の接着状態を光で自在に制御する技術", レーザー研成, 35, pp. 436 - 440 (2007)  
[4] D. Keyama and K. Nakamura, "Noncontact ultrasonic transportation of small objects over long distances in air using a bending vibrator and a reflector", *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelectr., Freq. Contr.*, Vol. 57, No. 5, pp. 1152 - 1159, 2010.

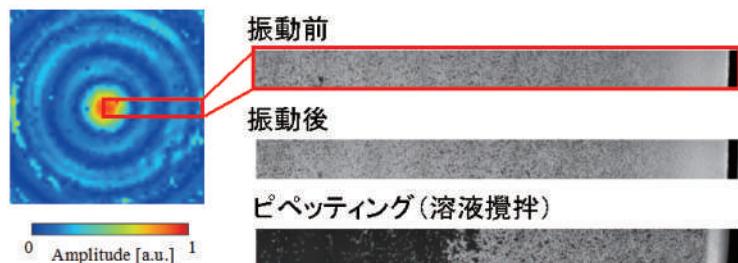
## 目的

### 提案手法

超音波たわみ振動に着目  
-細胞の接着範囲や増殖範囲を制御-

### 先行研究<sup>[5]</sup>

- たわみ振動により、接着細胞をディッシュ底面から選択的に剥離



[5] 谷 智太郎, 他: “培養ディッシュの超音波振動を用いた細胞接着の制御”, 生命科学系学会合言次大会(2017)

## 目的

### 提案手法

超音波たわみ振動に着目  
-細胞の接着範囲や増殖範囲を制御-

### 本研究

#### 最終目標

- 超音波による細胞パターニング技術の確立
- 細胞の配向制御や分化誘導への超音波の応用



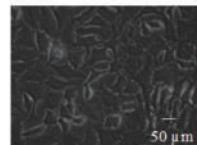
#### 本報告

たわみ振動によって接着細胞であるHeLa細胞の接着範囲や増殖範囲の制御

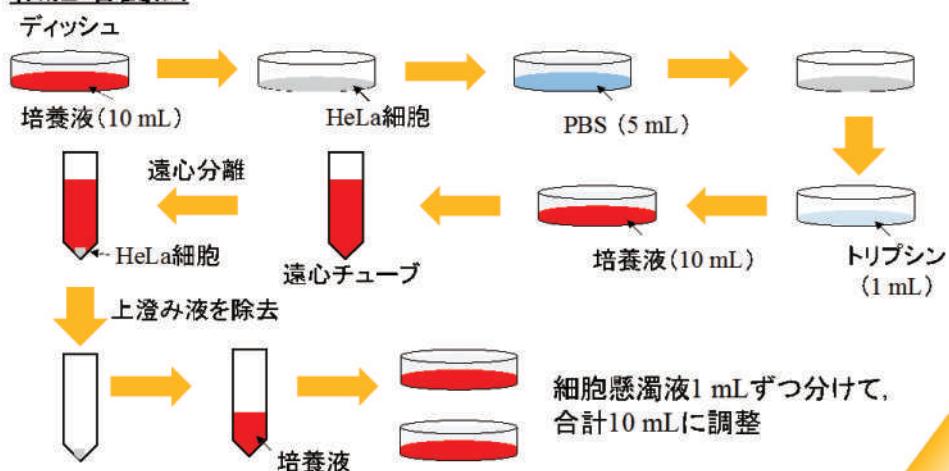
## 細胞情報と細胞培養法

### HeLa細胞(理化学研究所から購入)

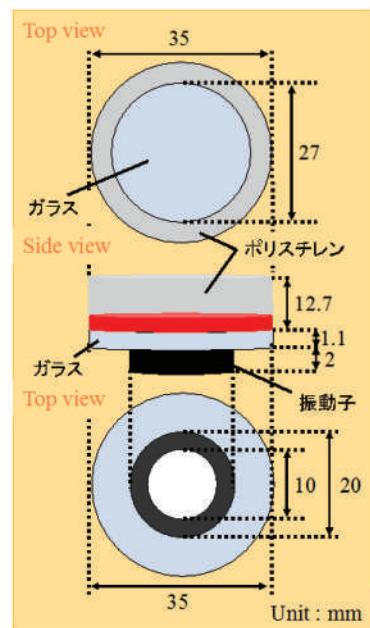
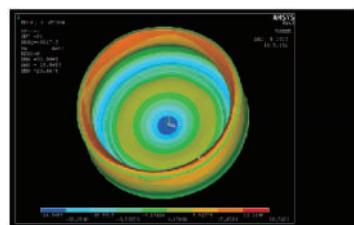
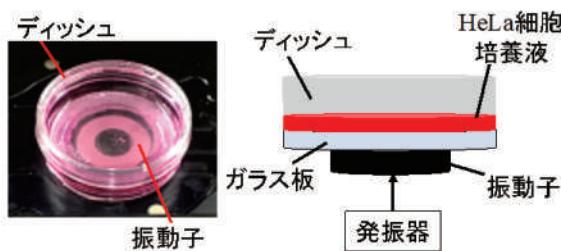
ヒト子宮頸癌由来の接着細胞  
増殖能に優れ、比較的扱いやすい



### 細胞培養法



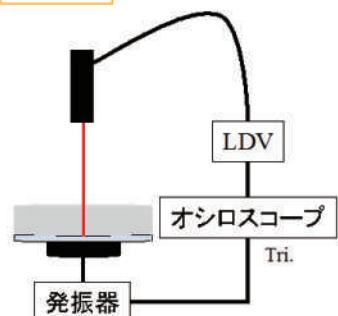
## 実験系



## ディッシュ底面の振動分布の測定

レーザドップラ振動計による測定

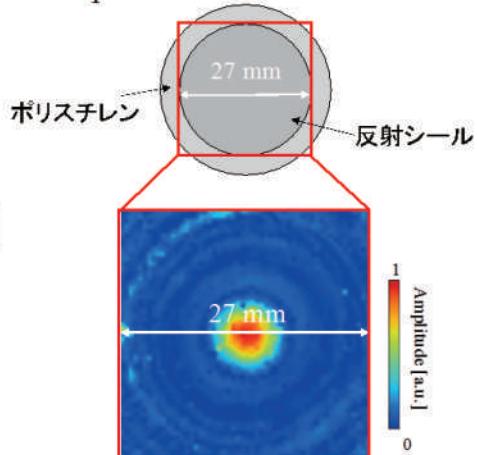
### 実験系



### 実験条件

周波数 : 83.0 kHz

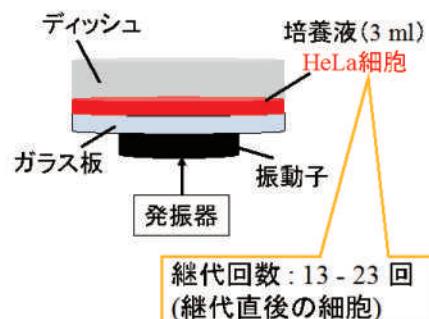
Top view



同心円状の振動分布が形成されている

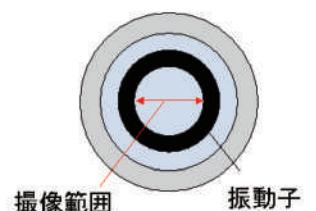
## 実験方法

### 振動子駆動



継代回数 : 13 - 23 回  
(継代直後の細胞)

### 顕微鏡観察



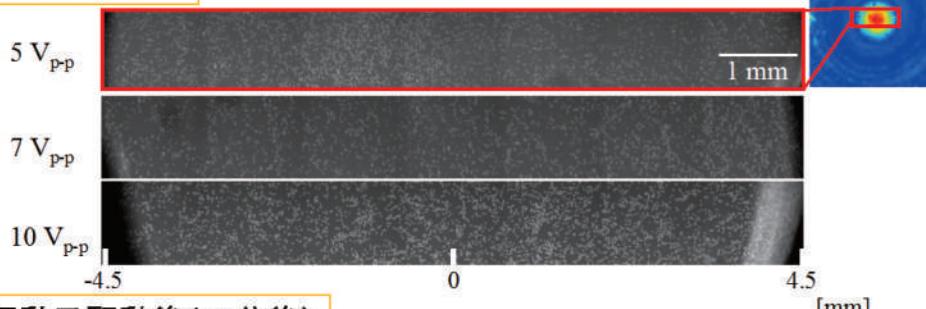
位相差画像を直径方向に撮像

### 駆動条件

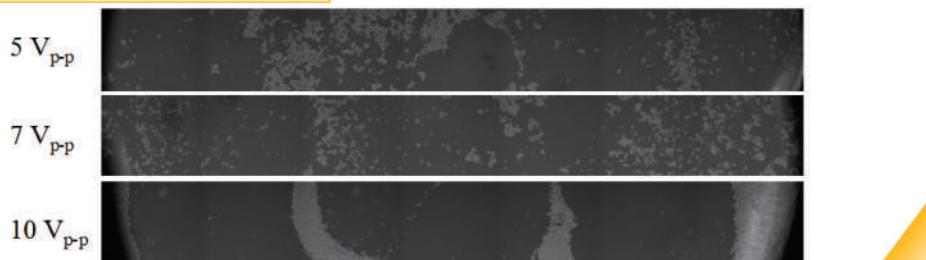
周波数 : 78 kHz  
電圧 : 5 ~ 10 V<sub>p-p</sub>  
駆動時間 : 24 hours.  
(連続波)

## 結果 & 考察

### 振動子駆動前

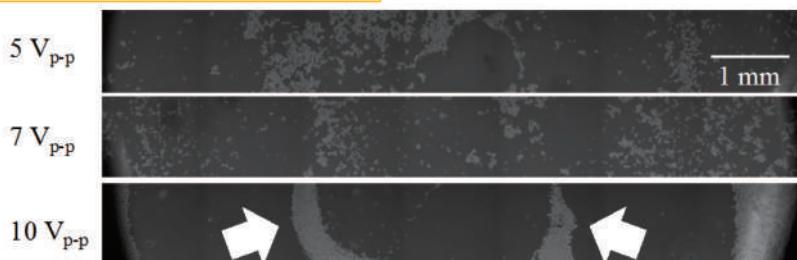


### 振動子駆動後(15分後)



## 結果 & 考察

### 振動子駆動後(15分後)



たわみ振動により、細胞は特定の位置に捕捉され、細胞密度は増加

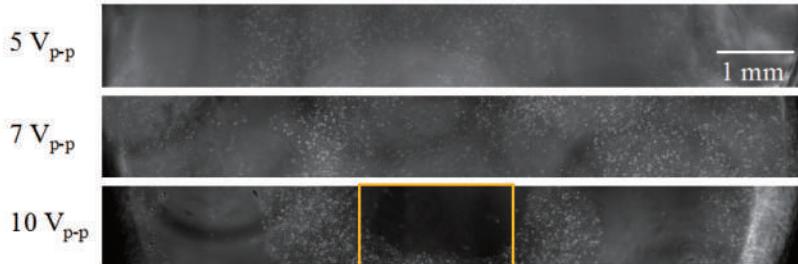


たわみ振動により細胞の接着範囲を制御できる可能性



## 結果 & 考察

### 振動子駆動後(24 時間後)



- ・10 V<sub>p-p</sub>の条件で、細胞の増殖範囲や方向を制御できる可能性

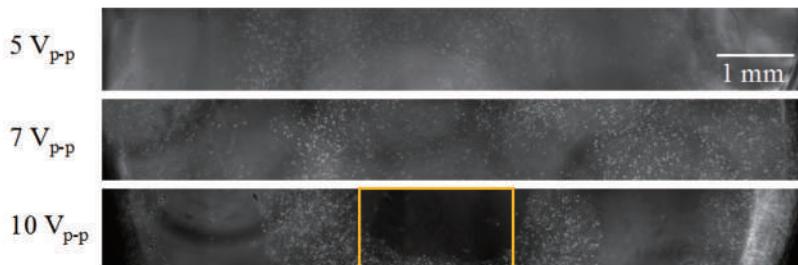


画像の輝度を用いて、細胞の接着範囲および増殖範囲と  
振動分布の関係について評価



## 結果 & 考察

### 振動子駆動後(24 時間後)



- ・10 V<sub>p-p</sub>の条件で、細胞の増殖範囲や方向を制御できる可能性

### 輝度の求め方

画像の輝度を1 pixelごとに出力

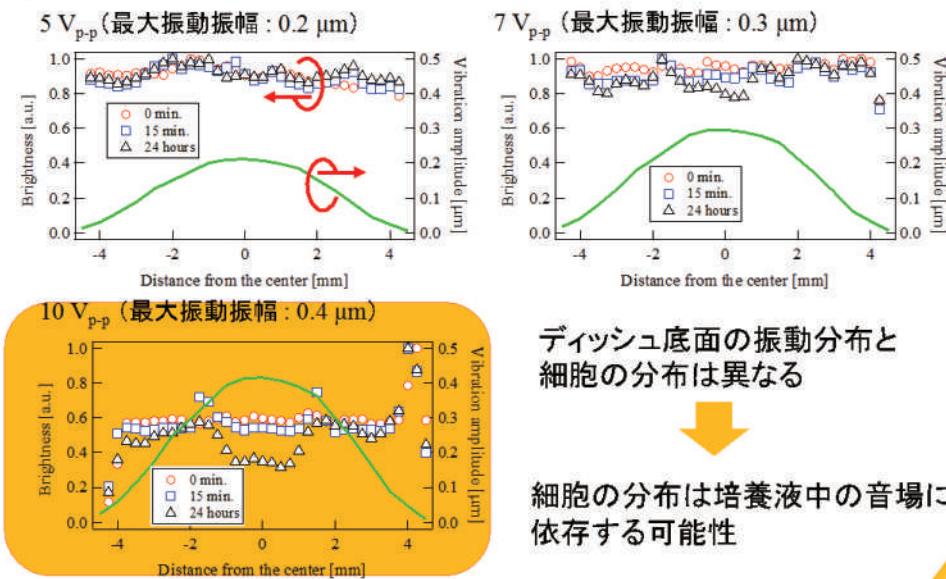


画像を0.25 mmごとに分割し、その範囲での平均輝度を算出



## 結果 & 考察

### 画像の輝度と振動振幅の関係

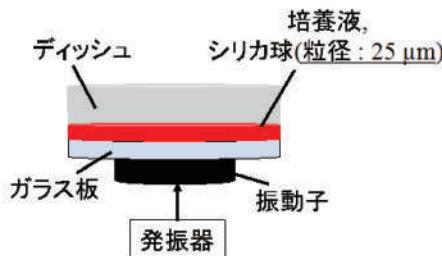


ディッシュ底面の振動分布と  
細胞の分布は異なる

細胞の分布は培養液中の音場に  
依存する可能性

## 培養液中の音場推定

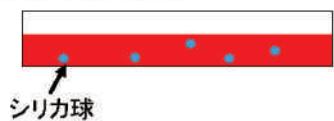
### シリカ球による音場推定



### 駆動条件

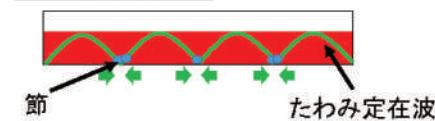
周波数 : 78 kHz  
電圧 : 10 V<sub>p-p</sub>  
駆動時間 : 15分  
(連続波)

### 振動子駆動前



シリカ球

### 振動子駆動中



節

たわみ定在波

## 結果 & 考察

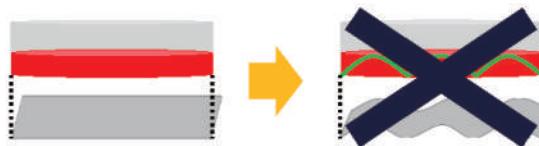
### 振動子駆動前



### 振動子駆動後(15分後)



シリカ球が捕捉された位置が培養液中の音場の節



## 結果 & 考察

### シリカ球と細胞の捕捉位置の比較(15分後)

#### シリカ球



#### HeLa細胞



- シリカ球とHeLa細胞はほぼ同じ位置に捕捉されている  
(位置の違いはシリカ球と細胞の密度差によると考えられる)



- 細胞の捕捉・接着範囲は培養液中の音場に依存する



## 結論

### 実験内容

- たわみ振動を用いた細胞の培養制御

### 実験結果

- たわみ振動を用いることで細胞の接着範囲や増殖範囲を制御できる可能性
- 細胞の捕捉・接着位置は培養液中の音場に依存する

振動子駆動後15分 (10 V<sub>p-p</sub>)



振動子駆動後24時間 (10 V<sub>p-p</sub>)



### 謝辞

本研究は文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(2013~2017年度)の助成を受け実施したものである。ここに感謝の意を示す。

### 3.3. 超音波を用いた生体組織の熱的特性の測定

#### 3.3.1 超音波加温による生体組織の音速変化の測定

同志社大学大学院生命医科学研究科・秋山いわき

同志社大学大学院生命医科学研究科博士前期課程・辻本祐加子, 金山寛明, 森本舞, 杉山真璃子, 森田晟央, 清水冠太郎

奈良県立医科大学・平井都始子

産業技術総合研究所主任研究員・新田尚隆

#### (1) 研究計画の概要

今年度は、生体組織の音速の温度特性に着目した組織性状診断のためのパラメータとして超音波加温による音速の時間変化率とその測定手法の検討を行う。また、臨床における安全性の見地から組織中での加温温度の推定を行い、温度上昇 1.5°C 以内、測定時間 1 秒以内で熱物性量を誤差率 10 % 以下の測定を目指す。本手法は、超音波照射によって生体組織を加温し、組織の温度上昇に伴う音速変化を測定する。超音波加温による音速の時間変化率は超音波強度だけでなく、体積熱容量、超音波減衰係数、音速温度係数に依存する。牛の肝臓、脂肪組織、筋肉組織、豚の脂肪組織、筋肉組織および生体組織模擬ファントムを用いる。まず、生体組織の音速の温度特性を測定する。脂肪組織は負の温度係数を有すること、非脂肪組織は生の温度係数を有することを確認する。同時にそれぞれの組織における温度係数を記録し、測定された音速変化の値から温度上昇の値を計算するために用いる。

#### (2) 研究成果

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

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

ただし、照射時間は十分短いとし、振動子からの距離  $x$  における生体組織の減衰定数を  $\alpha$ 、音速  $c(x)$ 、体積熱容量  $C_v$ 、音速の温度係数  $dc/dT$ 、超音波強度を  $I$  とする。

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

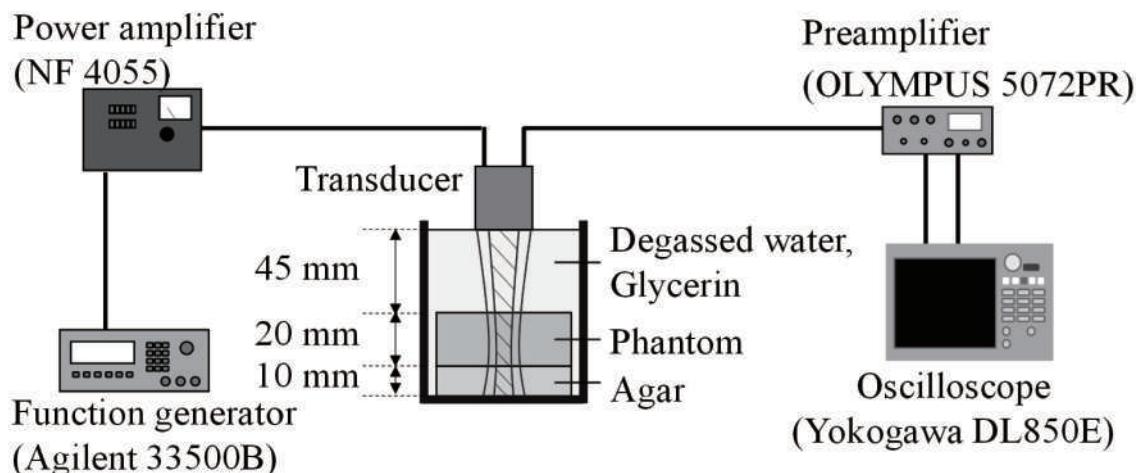


図1 実験システム

表1 実験条件

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

被測定対象として、生体組織模擬物質（TMM: tissue mimicking material）ファントム、豚の筋肉組織と脂肪組織を用いた。それぞれの各物性値の参照値として表2に示した。また、測定試料の単位時間あたりの音速変化率 $\Delta c/c/t_h$ を測定した結果を表3に示す。

表2 生体試料の物性値

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

豚脂肪組織	1454	920	0.67	2.0
-------	------	-----	------	-----

表 3 音速変化率

試料	豚筋肉組織	豚脂肪組織
音速変化率 [s <sup>-1</sup> ]	$2.7 \times 10^{-3}$	$-24 \times 10^{-3}$

音速変化率から温度上昇を推定するためには音速の温度係数  $dc/dT$  が必要であるので、これを測定する必要がある。インキュベータ内で温度範囲 24~35°Cで測定された、それぞれの試料の温度係数と表 3 の測定値から計算された温度上昇値を表 4 に示す。

TMM については、100 ms 照射 100 ms 照射休止を繰り返しながら超音波加温した時の温度上昇曲線を測定した結果を図 2 に示す。なお、TMM 音速の温度係数はインキュベータ内で測定した結果、1.6 m/s/°Cであった。

表 4 音速温度係数と推定温度上昇値

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

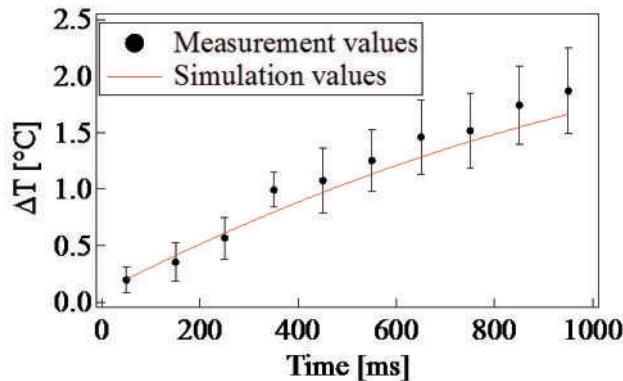


図 2 超音波加温による TMM の温度上昇曲線

(a)

図 2 のように、測定された温度上昇曲線は、有限要素法による手法<sup>4)</sup>によって計算された値とよく一致している。

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

表 5 物性値の比較

試料	音速変化率 $\frac{\Delta c}{ct_h}$	超音波強度	推定値 $\frac{\Delta c}{c} \left( \frac{\partial c}{\partial T} t_h \right)^{-1}$	参照値 $\frac{2\alpha I}{c(x)c_v}$
豚筋肉組織	$2.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	10.5 W/cm <sup>2</sup>	$2.3 \times 10^{-3} \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{m}$	$2.0 \times 10^{-3} \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{m}$
豚脂肪組織	$-24 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	14.2 W/cm <sup>2</sup>	$7.7 \times 10^{-3} \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{m}$	$6.5 \times 10^{-3} \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{m}$

本研究では、超音波加温による組織性状診断のためのパラメータとして単位時間当たりの音速変化率を提案する。試料として豚筋肉組織と脂肪組織を用いた実験結果から、測定値から推定される熱物性値は文献による参考値と誤差率 10 %以下で一致した。

### (3) 自己評価

今年度の研究成果を以下のランクで自己評価する。

#### A 期待通りの成果があった

超音波で加温し、超音波で音速変化を測定する実験システムを構築し、臨床で適用するための条件であった、測定時間 1 秒以下、温度上昇 1.5 度以下、測定誤差 10 %以下で測定することができたので、当初予定していた成果があったと評価する。

### (4) 成果発表など

#### 論文発表

- [1] Yukako Tsujimoto, Mai Morimoto, Naotaka Nitta, Iwaki Akiyama, Ultrasonic measurement of sound velocity fluctuations in biological tissue due to ultrasonic heating and estimation of thermo-physical properties, Journal of Medical Ultrasonics, (投稿中)

#### 学会発表

- [1] 辻本祐加子、森本舞、新田尚隆、秋山いわき、超音波加温による生体組織の熱物性の超音波測定、日本超音波医学会第 90 回学術集会 (2017.5)
- [2] 金山寛明、杉山真璃子、新田尚隆、秋山いわき、超音波加温による生体組織の体積熱容量の測定、日本超音波医学会第 90 回学術集会 (2017.5)
- [3] Iwaki Akiyama, Yukako Tsujimoto, Measurement of thermal properties of the biological tissues by ultrasonic heating, Artimino Conference 2017 on Medical Ultrasound Technology, June 11-14, 2017

- [4] M. Morimoto, Y. Tsujimoto, I. Akiyama, Proposal of Ultrasonic Imaging of thermophysical property distribution in vivo by ultrasonic heating, 5th Joint Meeting of the Acoustical Society of America and Acoustical Society of Japan, Honolulu, USA (2016.12)
- [5] M. Sugiyama, H. Kanayama, I. Akiyama, Measurement of volumetric heat capacity of biological tissues heated by ultrasound exposure, 5th Joint Meeting of the Acoustical Society of America and Acoustical Society of Japan, Honolulu, USA (2016.12)
- [6] 森本舞, 森田晟央, 渡辺好章, 秋山いわき, 超音波パルスエコー方式による生体内部の温度上昇分布のイメージング, 日本超音波医学会第 88 会学術集会 (2015.5)
- [7] 杉山真璃子, 清水冠太朗, 渡辺好章, 秋山いわき, 超音波加温による生体組織の体積熱容量の測定法, 日本超音波医学会第 88 会学術集会 (2015.5)
- [8] 森田晟央, 森本舞, 渡辺好章, 秋山いわき, 生体組織の局所加熱による温度上昇分布の超音波計測, 第 35 回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (2014.12)
- [9] 清水冠太朗, 杉山真璃子, 渡辺好章, 秋山いわき, 超音波による体積熱容量の測定, 平成 26 年度第 4 回アコースティックイメージング研究会 (2014.12)
- [10] 森本舞, 森田晟央, 秋山いわき, 超音波による生体組織の温度上昇測定, 日本超音波医学会第 41 回関西地方会学術集会 (2014.11)
- [11] 杉山真璃子, 清水冠太朗, 渡辺好章, 秋山いわき, 超音波による生体組織の熱的特性の測定法の提案, 日本超音波医学会第 41 回関西地方会学術集会 (2014.11)
- [12] Akihisa Morita, Mai Morimoto, Yoshiaki Watanabe, Iwaki Akiyama: Measurement of temperature rise of tissue heating by ultrasonic pulse-echo method, 11th Congress of Asian Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology, Kuala Lumpur, Malaysia (2014.10)
- [13] 清水冠太朗, 村上真一, 渡辺好章, 秋山いわき, 超音波による生体組織の単位体積あたりの熱容量の測定 ーファントム実験ー, 電子情報通信学会 超音波研究会 (2014.6)

#### その他の発表

- [14] (依頼講演) 秋山いわき, 超音波照射による生体への影響について, バイオメクフオーラム 2017, 大阪大学, (2017.7)
- [15] 秋山いわき, 超音波照射による先端医療技術開発について, 同志社大学第 5 回新ビジネスフォーラム, 2018 年 1 月 29 日

## (6) 参考文献

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

### 3.3.2 MR 高磁場環境で同時撮像する超音波イメージング

同志社大学大学院生命医科学研究科・秋山いわき

同志社大学大学院生命医科学研究科修士課程・稻垣拳, 新井慎平, 坂和直幸, 小南成史,  
森泉裕貴, 三原伸公, 五島僚太郎

奈良県立医科大学・平井都始子

京都大学大学院医学研究科・藤井康友

## (1) 研究計画の概要

MRI と超音波の同時撮像で生体内部の音速を *in vivo* で推定する手法について検討する。MRI 撮像マーカーを取り付けた超音波プローブを体表面に配置して MRI と超音波で同時撮像し, MRI 画像からマーカー位置を抽出し, 超音波エコー断面を MRI 3 次元空間座標系で特定する。MRI 画像から推定される組織の境界と超音波エコーのピークを対応させて, MRI 画像から距離情報を, 超音波エコーから伝搬時間を得る。両者の比から音速を推定する。対象として, 拍動や呼吸の影響を受けにくいヒト下腿部を用いる。また, 皮下脂肪層による超音波エコー画像の画質劣化補正を目的として, ヒト頸部に脂肪層を模擬した音響カプラを超音波プローブと体表面の間に配置して同時撮像を行う。音響カプラの音

速推定と推定された音速による補正を行って超音波エコー画像の画質改善効果を検討する。

## (2) 研究成果

MRI では生体内部の分布を 3 次元の空間座標として得られる。一方、超音波によるエコー画像では距離と超音波の伝搬時間の情報が得られる。両者を同時撮像することによって、MRI では生体内部の距離を、超音波エコー画像では超音波の伝搬時間が得られるので、両者により音速を推定できる。この時、超音波エコー画像が MRI 3 次元空間座標のどの 2 次元断面に相当しているかを知る必要がある。そこで、本研究では超音波プローブに MRI 撮像マーカーを取り付けて、MRI で撮像されたマーカー位置から超音波エコー画像の 2 次元断面を MRI 3 次元空間座標で表現する。本研究で開発した MR 高磁場環境下で利用可能な非磁性材料で構成された超音波プローブと MRI マーカーを図 1 に、プローブの仕様を表 1 に示す。開発したプローブを接続して超音波 RF エコー信号を取得するためのイメージング装置とその仕様を図 2 と表 2 に示す。MRI と超音波を同時撮像すると両者に電気的雑音が混入するので、図 3 のように超音波イメージング装置を MRI 制御室に配置し、プローブとの接続を壁に埋め込んだコネクタを介すことにより雑音を抑制した。MRI は日立製 Echelon Vega 1.5T である。

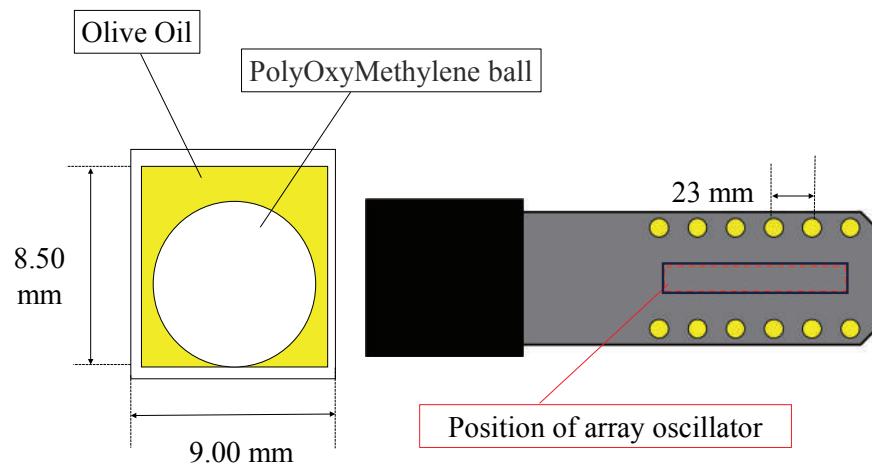


図 1 超音波プローブと MRI マーカー

表 1 プローブの仕様

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

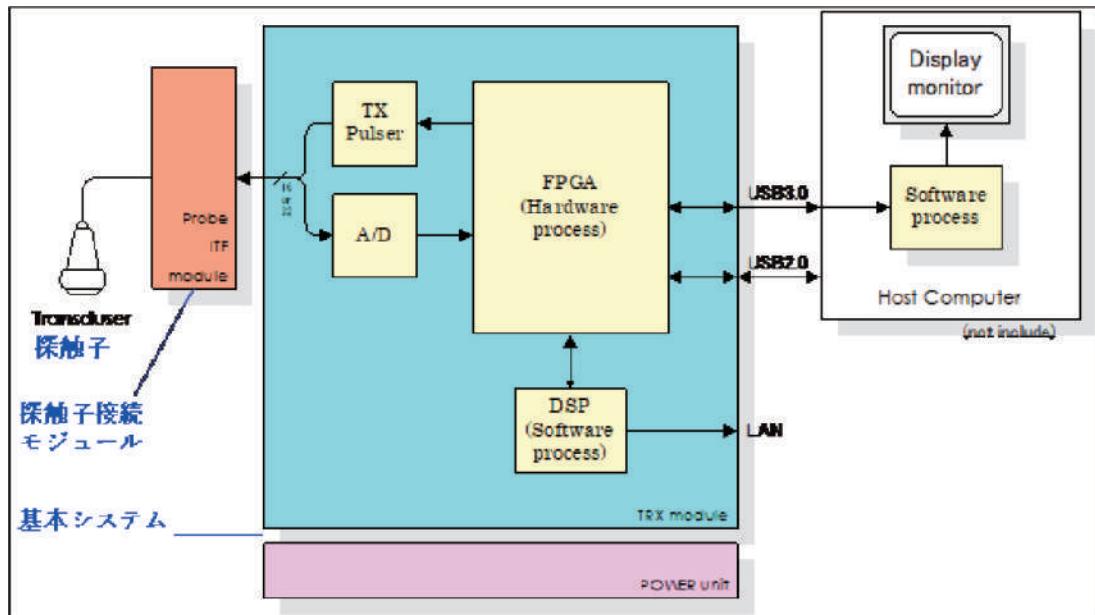


図 2 超音波エコーRFデータ取得装置

表 2 イメージング装置の仕様

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

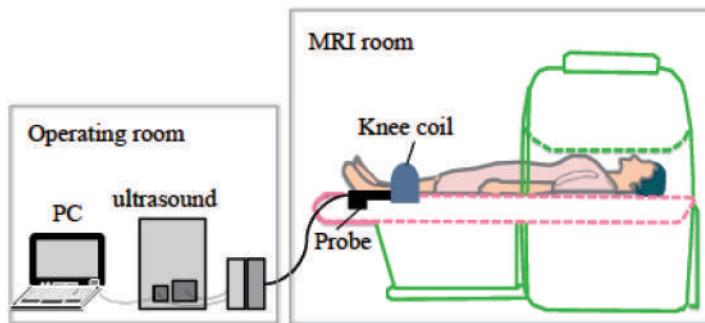


図 3 MR 高磁場環境における同時撮像超音波イメージングシステム

(1) 下腿部の音速推定

MRI の撮像時間が長いので、呼吸等による体動の影響を受けない下腿部を対象として、音速推定を行った。MRI と同時撮像された超音波エコー画像を図 4 に示した。2つの画像から推定された皮下脂肪組織と筋肉組織の音速を表 3 に示す。推定値の誤差率はおよそ 5-7% となった。

表 3 推定された音速

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

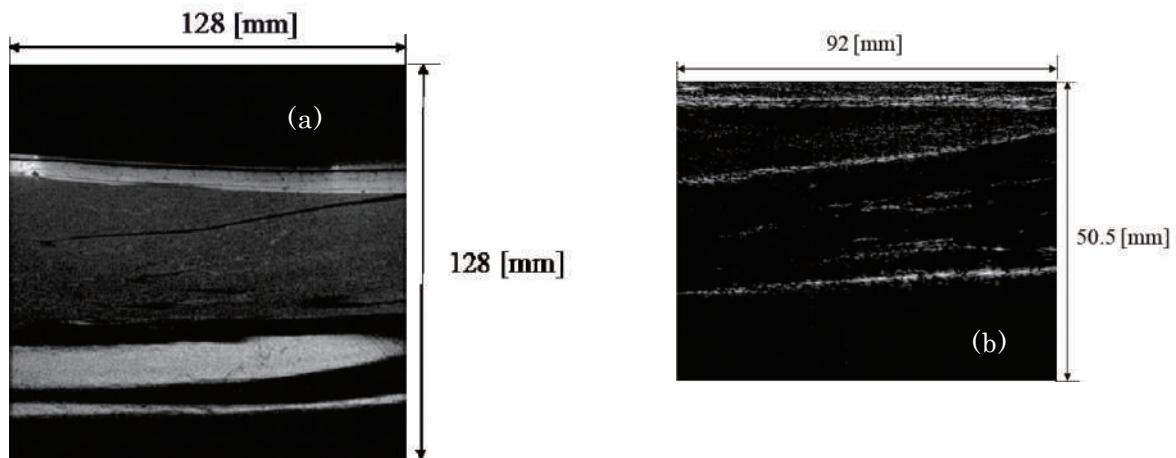


図 4 下腿部の MRI 画像(a)と超音波エコー画像(b)

## (2) 推定された音速分布を用いた画質改善

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

対象は比較的体動の影響を受けにくいヒト頸部である。プローブと頸部体表面との間に脂肪層を模擬した音響カプラーを挟んだ。撮像されたヒト頸部の MRI 画像を図 5 に示す。音

響カプラの音速は 1410m/s であった。同時撮像された超音波 RF エコードーデータから従来手法で構成された画像を図 6 に示す。音速を 1540m/s で一定と仮定して遅延時間を求めて構成された画像である。次に、MRI 画像から推定された音響カプラ領域（脂肪層を模擬した領域）を抽出して、遅延時間を計算して推定された画像を図 6 (b) に示す。図 6 (a) と (b) を比較すると、画質が改善されていることがわかる。

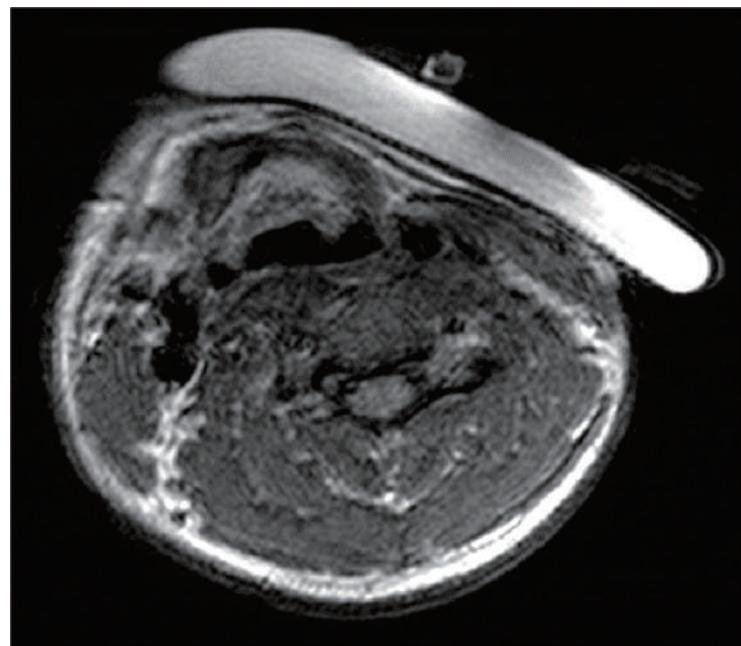


図 5 ヒト頸部の MRI 画像

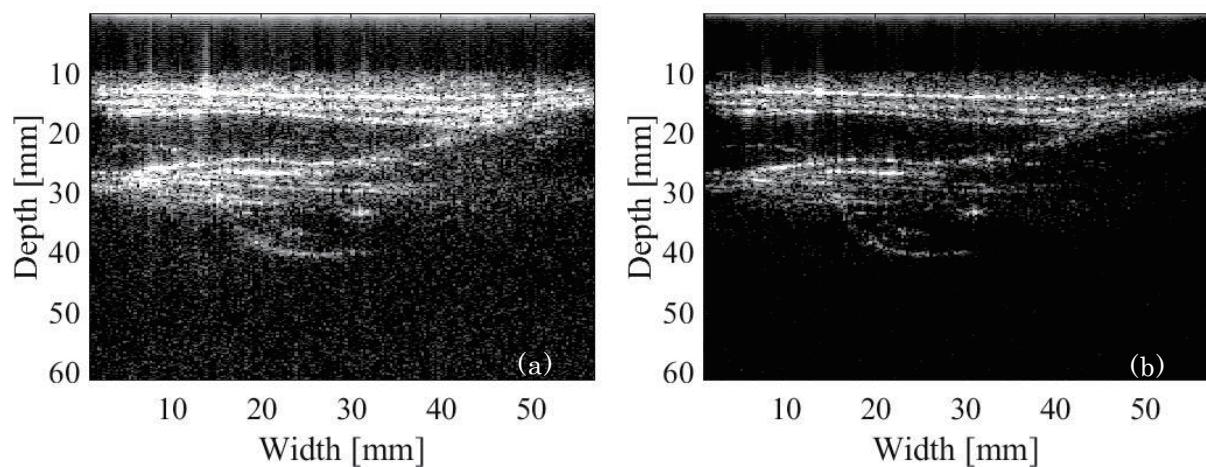


図 6 従来手法による超音波エコー画像（音速分布の補正なし）(a)

音速分布による補正を行った超音波エコー画像(b)

A- 概ね期待どおりの成果があったが、一部に遅れが認められた

MRI と超音波を同時撮像するマルチモダリティ・イメージング・システムを構築した。このシステムを用いて、下腿部の筋肉と脂肪の音速を *in vivo* 測定を行い、測定値の変動が 10 % 以下で測定した。また、MRI で計測された音速分布の情報を用いて超音波の画質補正を行った。画質改善の効果を確認した。しかし、腹部における音速測定や画質改善を行うことができなかった。この原因は MRI の撮像時間の長さに起因するもので、呼吸や拍動による生体内部の組織運動による位置ずれを解決する必要がある。この解決は MRI 本体の改善が必要であるため、プロジェクト期間に実現することができなかった。

#### (4) 研究成果発表

国際会議発表

- [1] Ken Inagaki, Shinpei Arai, Iwaki Akiyama, "Development of simultaneous ultrasonic imaging system under high magnetic fields of MRI", 40<sup>th</sup> International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Honolulu, HI, 2018

学会発表

- [1] (依頼講演) 秋山いわき, MR と超音波のマルチモダリティイメージング, 日本超音波医学会第 91 回学術集会, (2018.6)
- [2] 坂和直幸, 秋山いわき, MRI の画像情報を用いる音速推定のためのモデル式構築 – 拡散係数有無による影響及び有意性 –, 日本超音波医学会第 44 回関西地方会学術集会 (2017.9)
- [3] 新井慎平, 森泉裕貴, 小南成史, 稲垣拳, 二矢川和也, 秋山いわき, MR 高磁場環境下で用いる超音波イメージングの開発, 第 56 回日本生体医工学会大会 (2017.5)
- [4] 稲垣拳, 小南成史, 秋山いわき, 生体内部の音速分布を考慮した超音波イメージング – 超音波と MR の同時撮像による音速分布の推定とその補正 –, 日本音響学会 2017 年春季研究発表会 (2017.3)
- [5] 小南成史, 稲垣拳, 秋山いわき, MR で撮像された画像情報を用いた超音波イメージングの歪み補正, 日本超音波医学会第 43 回関西地方会学術集会 (2016.10)
- [6] 森泉裕貴, 新井慎平, 二矢川和也, 秋山いわき, 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の試作 –, 日本超音波医学会第 43 回関西地方会学術集会 (2016.10)

- [7] 三原伸公, 秋山いわき, 渡辺好章, MRI の画像情報を用いた生体組織の音速推定について –T1・T2 値と音速の関係–, 日本超音波医学会 第 42 回関西地方会学術集会 (2015.9)
- [8] 三原伸公, 高杉一等, 渡辺好章, 秋山いわき, 音速分布を考慮した超音波イメージング –MRI の T1・T2 値による音速の推定–, 2015 年電子情報通信学会総合大会 (2015.3)
- [9] 五島僚太郎, 小南成史, 渡辺好章, 山谷裕哉, 丸上永晃, 平井都始子, 秋山いわき, 超音波 B モード像における音速分布の補正, 日本超音波医学会第 41 回関西地方会学術集会 (2014.11)
- [10] 五島僚太郎, 大谷真穂, 渡辺好章, 山谷裕哉, 丸上永晃, 平井都始子, 秋山いわき, 音速分布を考慮した超音波イメージング –MRI による音速推定の試み– 日本超音波医学会第 87 回学術集会 (2014.5)

#### その他の発表

- [11] 秋山いわき : 医用超音波技術の最新動向, Innervision vol.31, No.3 pp2-4 (2016.3)
- [12] 秋山いわき, 超音波照射による生体への影響と新しい医療技術開発について, 同志社大学リエゾンフェア(2017.11)
- [13] 秋山いわき, 超音波照射による先端技術開発について, 同志社大学新ビジネスフェア(2018.1)
- [14] 特願 2015-140910 超音波診断装置及びその画像形成方法 発明者 秋山いわき (2015-7-15 出願)