

博士(工学)学位論文

研究題目

超音波低侵襲治療のための流路中微小気泡の
動態制御に関する研究

Study to control behavior of microbubbles in flow
for minimally invasive ultrasound therapy



東京農工大学大学院
生物システム応用科学府
生物システム応用科学専攻
循環生産システム学専修
平成 23 年度入学

研究者 江田 廉

指導教員 榊田 晃司 准教授

目次

第1章 序論

1.1	はじめに	1
1.1.1	超音波と微小気泡を用いた治療方法について	
1.1.2	微小気泡の制御技術に関する研究背景	
1.1.3	音響放射力の歴史的背景	
1.2	本研究の目的	8
1.3	本論文の構成	10

第2章 微小気泡に作用する力および音場形成に関する理論

2.1	緒言	13
2.2	微小気泡が超音波の進行波音場内で受ける推進力	13
2.2.1	Doinikov の理論式で表現される音響放射力	
2.2.2	Sapozhnikov の理論式で表現される音響放射力	
2.3	微小気泡が超音波照射により受ける推進力以外の作用	17
2.3.1	超音波による微小気泡の振動	
2.3.2	超音波による気泡の凝集体形成	
2.4	水流による微小気泡への抗力	20
2.5	入射音波のエネルギーの計算方法	21
2.6	超音波 2次元アレイによる音場形成	22
2.6.1	位相制御による焦点形成	
2.6.2	各素子の遅延時間の設定	
2.6.3	複数焦点の形成	
2.7	結言	25

第3章 実験装置とその概要

3.1	緒言	26
3.2	実験系の全体図	26
3.3	微小気泡の観測機器について	27
3.3.1	光学系	
3.3.2	超音波診断装置	
3.4	超音波照射制御系	29
3.4.1	各トランスデューサの詳細	
3.4.2	単板振動子の制御系	
3.4.3	アレイ型トランスデューサの制御系	
3.5	音圧分布の測定	33
3.5.1	音圧分布の測定方法	
3.5.2	アレイ型トランスデューサの音圧分布	

3.6	微小気泡の分類について	39
3.6.1	マイクロカプセル	
3.6.2	マイクロバブル	
3.6.3	バブルリポソーム	
3.7	実験で用いるパラメータについて	43
3.8	人工血管の概要と粘性流体および生体試料について	46
3.8.1	流路系の概要	
3.8.2	PEG 製流路作成方法	
3.8.3	PVA 流路（多分岐流路）について	
3.8.4	粘性流体および赤血球について	
3.8.5	ブタ血液について	
3.9	結言	51

第4章 微小気泡の評価方法

4.1	緒言	52
4.2	凝集過程の評価方法	52
4.3	誘導性能の評価方法	54
4.3.1	輝度値観測による評価法	
4.3.2	捕捉量による評価法	
4.3.3	超音波断層像による評価法	
4.4	結言	60

第5章 静水中における微小気泡の凝集体形成実験

5.1	緒言	61
5.2	微小気泡の振動特性測定と凝集実験の方法	61
5.2.1	気泡種類における振動特性測定の方法	
5.2.2	高速度カメラ観察における微小気泡の凝集体形成実験方法	
5.3	気泡の振動特性と凝集観測結果	64
5.3.1	気泡の種類に対する微小気泡の振動特性結果	
5.3.2	周波数変化に対する微小気泡の凝集観測結果	
5.3.3	濃度変化に対する微小気泡の凝集観測結果	
5.3.4	赤血球の有無に対する微小気泡の凝集観測結果	
5.4	結言	73

第6章 単板振動子の組み合わせによる微小気泡の経路選択実験

6.1	緒言	74
6.2	実験方法	74
6.3	単分岐部流路における微小気泡の経路選択	77
6.3.1	微小気泡の濃度と捕捉面積の関係	

6.3.2	単一音源による経路選択結果	
6.4	多段分岐部流路における微小気泡の経路選択	82
6.4.1	第1分岐のみに対する照射結果	
6.4.2	第2分岐のみに対する照射結果	
6.4.3	複数音源による連続経路選択結果	
6.4.4	連続波照射と間欠照射の比較結果	
6.4.5	投入エネルギーを揃えた照射パターンの比較結果	
6.5	結言	87

第7章 アレイ型トランスデューサを用いた微小気泡の経路選択実験

7.1	緒言	89
7.2	実験方法	89
7.3	単分岐部流路への焦点形成による微小気泡の経路選択	93
7.3.1	微小気泡の濃度と輝度値の関係	
7.3.2	分岐部への音場設計による経路選択結果	
7.4	多段分岐部流路への焦点形成による微小気泡の経路選択	99
7.4.1	第1分岐への焦点形成による経路選択結果	
7.4.2	第1分岐と第2分岐への焦点形成による経路選択結果	
7.4.3	焦点切り替えによる気泡の経路スイッチング	
7.4.4	非粘性媒質/粘性媒質の誘導性能比較	
7.4.5	気泡種類の違いに対する誘導挙動の比較	
7.5	結言	108

第8章 生体試料中における微小気泡の経路選択実験

8.1	緒言	109
8.2	実験方法	109
8.3	微小気泡の濃度と断層像の輝度値の関係	111
8.4	生理食塩水中での微小気泡の経路選択結果	112
8.5	血液中での微小気泡の経路選択結果	114
8.6	結言	116

第9章 考察と今後の課題

9.1	緒言	117
9.2	微小気泡の凝集に関する考察	117
9.3	単分岐血管における経路選択に関する考察	118
9.4	多分岐血管における経路選択に関する考察	118
9.5	血液中での制御に関する考察	119
9.6	臨床応用のための現状と課題	120
9.6.1	血管形状再構築システムの適用について	
9.6.2	音場可視化 AR システムの適用について	

9.7 結言 ····· 125

第 10 章 結論 ····· 127

謝辞

参考文献

関連発表論文

.....

第 1 章

序論

1.1 はじめに

1.1.1 超音波と微小気泡を用いた治療方法について

超音波による診断は、これまでに広く普及している。超音波による診断の利点は、2点考えられる。まず、CT や MRI 等の他の診断手法に比べて装置が小型かつ安価であるため、医療機関が容易に装置を入手できること。次に、超音波は放射線等と比べて生体への影響が少なく、診断回数などの制約が少ないことが挙げられる。しかしながら、超音波による診断には、組織コントラスト(生体組織間の境界の判別しやすさ)が低いという欠点があった。そこで、微小気泡からなる超音波造影剤を導入することで、診断画像の高解像度化が模索された。超音波造影剤が診断画像の解像度を大きく上昇させた直接的な要因は、ハーモニック法の確立である。超音波照射を受けた微小気泡は共振し、一定強度以上の音波を受けると崩壊するのだが、共振や崩壊に伴い非線形な信号を発生する。ハーモニック法とは、この非線形な信号から画像を構成する技術であり、生体内に注入された数 μm サイズの微小気泡からの反射波を検出することで、高感度の画像を構成することを可能にした[1]。超音波造影剤は、日本では、1999年に初めて Levovist®が発売され、続いて2007年に Sonazoid®が発売された。海外では、様々な超音波造影剤が使用されており、Table 1.1 に開発された超音波造影剤の一部を示す[2]。

Table 1.1 超音波造影剤の開発

Name	Manufacture	Material	Inner gas
AI-700	Acusphere	Polymer	Perfluorocarbon
SonoVue	Bracco	Phospholipid	Sulphur hexafluoride
Definity	DuPont	Lipid	Perfluoropropane
Optison	Mallinckrodt	Sonicated Albumin	Perfluoropropane
Albunex	Mallinckrodt	Sonicated Albumin	Air
Echovist	Schering	Galactose matrix	Air
Levovist	Schering	Galactose, Palmitic acid	Air
Sonavist	Schering	Polymer	Air
Echogen	Sonus Permac.	Surfactant	Dodecafluoropentane
Sonazoid	GE Healthcare	Lipid	Perfluorocarbon

以下に、超音波造影剤の肝疾患診断への適用例を挙げる。Levovist®や

Sonazoid®が、肝臓を構成する微小組織の1つであるクッパー細胞に貪食取り込みされる事実を利用し、肝臓の形態変化やびまん性肝疾患に伴う所見をとらえるものである。びまん性肝疾患が認められる肝臓中では超音波造影剤の取り込みが行われない様子を示している[3]。超音波造影剤は、病変の視認性向上に用いられるだけでなく、病変による肝機能低下の検知にも利用可能である。

次に、微小気泡の治療への応用例を挙げる。超音波造影剤を組み合わせることによる高密度焦点式超音波治療法(HIFU)の機能向上が報告されている。超音波には、そのエネルギーを熱エネルギーに変換する温熱作用や、放射圧や振動により組織を破壊する機械的な作用がある。HIFUは微小空間に高い強度の超音波を集中させることで、これら温熱作用や機械的な作用を高め、任意の生体組織を壊死させる治療法である。低侵襲な治療法として知られ、主にがん治療に役立てられている。東京大学の松本らの研究グループは、HIFU に超音波造影剤(微小気泡)を組み合わせると、温熱作用を増強することが出来るとする研究結果を挙げている[4]。HIFU 治療は、数時間を要する手術時間が問題視されており、超音波造影剤による手術時間の短縮が期待される。

HIFU の研究を行っている東北大の梅村らの研究グループは、凹面ドーナツ型の超音波 2次元アレイを用いて、パルス駆動による 3 焦点を高速に切り替えることによる、3 焦点の同時形成に成功している[5]。これは微小気泡の存在下では HIFU の治療効率が上昇することを利用し、高い強度の集束超音波でキャビテーションクラウドと呼ばれる微小気泡を形成し、後に HIFU 治療を行うものである。2次元アレイの照射パターンは 3 焦点のそれぞれに高い強度の集束超音波を 100 μ s、繰り返し周波数(PRF) 3.3 kHz で 10 回ずつ照射した後、強度の弱い音波を 10 s 照射する、というものである。

一方、非温熱効果を利用した治療方法としては、微小気泡を破壊した時に生じる物理的衝撃により、細胞への薬剤や遺伝子の導入効率を向上させる超音波遺伝子導入法(超音波ソノポレーション)が福岡大学の立花らの研究によって確立されつつある[6]。これは遺伝子を付着もしくは内包させた微小気泡を超音波エネルギーにより目標部位で破壊する事で、微小気泡のキャビテーション崩壊時に生じるマイクロジェット流もしくは圧力により細胞膜に穴をあけ直接細胞に遺伝子を導入する治療法である。

この超音波ソノポレーションに関してはそのメカニズムがまだ正確に判明していないが、北海道大学の工藤らの研究グループは微小気泡が崩壊する際に細胞へ与える影響の詳細解明に取り組んでおり、市販の超音波造影剤を細胞付近で破壊する事で細胞が損傷する様子の光学観測に成功している[7]。また、近年では群馬大学の山越らの研究グループにおいてもキャビテーションによる微小孔の形成における超音波照射条件の影響について研究が進められている[8]。キャビテーションとは超音波により液体に生じた真空の気泡が破裂することで生じる現象および超音波と気泡の相互作用によって生じる現象の総称である[9]。

この超音波ソノポレーションが実現する事で様々な疾患の治療が可能になると考え

られている。国立成育医療センターの千葉らの研究グループでは先天性の遺伝子疾患を持つ胎児に対し超音波ソノレーションを適用する研究を行っており、ウイルスベクターに変わる新たな治療方法が確立出来ると期待されている[10]。

さらに新しい微小気泡の開発も盛んに行われている。日立中央研究所の川畑らの研究グループではナノ液滴を使用した微小気泡の開発が行われている[11]。これはナノサイズの液滴に超音波を照射する事でバブルを生成する手法であり、超音波の照射位置を制御する事により生体内の任意の箇所でのバブル生成が可能となっており、HIFU 治療などへの応用が期待されている[12]。

また、帝京大学の丸山らの研究グループでは超音波と微小気泡を利用した選択的薬剤伝送システム(Drug Delivery System:DDS)に適した微小気泡の開発が進められており、血中安定性・滞留性に優れ、ポリエチレングリコール修飾により様々な薬物を微小気泡のシェルに装着できるバブルリポソームと呼ばれる微小気泡製造技術が確立されている[13]。超音波を用いた DDS とは、体表から超音波を照射して薬物を内包した微小気泡を目的の部位へ選択的に送り込み、微小気泡が目的部位に到達したところで超音波により微小気泡を破壊、薬効を発生させるシステムである[14]。例えば、抗がん剤などの強力な薬剤を微小気泡に含ませ、上記 DDS を実現できれば、副作用のない理想的な投薬治療を実現できると考えられる。また、微小気泡がさまざまな種類の薬物を含ませることが出来るならば、より汎用性の高い DDS を確立できる。

このように診断用に開発された超音波造影剤としての微小気泡を治療へ応用する研究が盛んに行われているが、生体内に注入された微小気泡は血流に乗り全身に拡散してしまうため、それらの治療を効率的に行うためには生体内における微小気泡の挙動制御技術が必要不可欠となっている。本研究室では、超音波を用いた DDS の実現および向上を目指し、超音波による生体内での微小気泡の効率的な動態制御を研究している。本手法の特徴は、微小気泡の目的部位への誘導、捕捉、破壊およびモニタリングを全て超音波で行う低侵襲なシステムであることである。Fig.1.1 に、超音波による DDS の構想図を示す。カテーテルにより注入した微小気泡を超音波で目的部位へ誘導した後、微小気泡を目的部位で捕捉する。最後に、高い強度の音波で微小気泡を破壊することで、微小気泡が保持する薬品を飛散させる様子を表したものである。

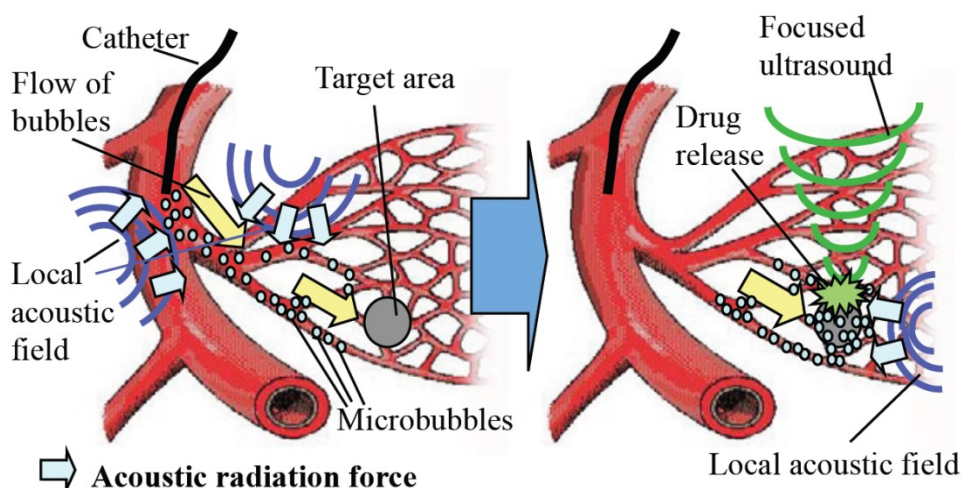


Fig.1.1 超音波を用いた DDS の概念図

1.1.2 微小気泡の制御技術に関する研究背景

超音波を受けた微小気泡の挙動には、主に気泡周囲の圧力勾配により励起される駆動力が関わってくるが、医学的応用以外の分野でも古くから研究が行われている。この駆動力は超音波が進行波である場合は基本的に音波の進行方向に物体を押し出す力となるが、定在波の場合は音波の腹もしくは節に物体を捕捉する力となる。物体に与える力は後者の方が強いため、微小気泡のようなマイクロオーダーの小さな物体の制御にはこれまで定在波を使用した研究が多く行われてきた。産業技術総合研究所の小塚らの研究グループでは複数の音源を使用して定在波を形成し、空気中において小物体(ポリスチレン粒子)を浮遊させ捕捉する技術[15]や静水中において複数音源の位相変化による小物体のマニピュレーション技術[16]が開発されてきた。近年では分岐や溜まり場を持つ流路内において定在波を形成し、周波数を変化させる事で音波の腹と節の間隔を調整し、任意の流路・場所への微小物体の誘導を行う手法が報告されている[17,18]。

群馬大学の山越らの研究グループでは、流路中を流れる超音波造影剤(レボビスト[®])を定在波で捕捉する手法[19-21]が研究されており、これまでに体積振動が小さく Bjerknes force があまり作用させられないターゲット気泡を比較的大きな体積振動を持つシード気泡を用いることで捕捉する手法[22]が提案され、シード気泡に Levovist[®]を用いて酵母細胞の捕捉に成功している[23]。また、周波数を掃引して再び元に戻すことにより、流路内に形成された定在波で捕捉されている気泡をより多く流路壁面へ附着させる手法を提案し、理論・実験の両方面からの検討を行なっている[24]。

一方、微小気泡の膨張・収縮運動に関しては自由気泡から発展した力学理論に関する研究が 1950 年代から行われてきたが、超音波造影剤に使用されるマイクロサイズの微小気泡に関しては最近になって研究が盛んになってきている。先に紹介した北海道大学の工藤らの研究グループでは超高速カメラを使用して、超音波により励起さ

れた微小気泡の振動を光学的に観察することに成功している[25]。シェルを有する第2世代超音波造影剤である Definity[®] (日本未認可)では各パルス照射で微小気泡の振動に大きな差は無いが、シェルを持たない第1世代超音波造影剤である Levovist[®]では複数回のパルス照射により微小気泡が崩壊して消失する様子が確認でき、シェルの有無によりその挙動が変化することを示した。

また、この微小気泡の振動により気泡自身が音源となり周囲に反射音波(2次超音波)を発生させることが知られている。複数の微小気泡に超音波が照射された場合、それぞれの微小気泡から励起される2次超音波により自発的に微小気泡の集合体を形成する事が報告されており[22]、ドイツ-Ruhr大学のKotopoulosらの研究グループでは静水中において超音波の照射により微小気泡が徐々に集合体を形成していく様子が観測されている[26]。同志社大学の渡辺らの研究グループでは、気泡の振動が他気泡や壁面に与える影響について実験的に検討を行なっている[27,28]。

上記のように、微小粒子や微小気泡を定在波で制御する研究は数多く行われている。しかしながら、生体内において血管壁からの反射などにより定在波を形成することは可能ではあるが、任意の定在波となると生体組織間の反射率や屈折率などを精密に考慮しなければならず、所望の定在波の形成は非常に困難となる。そのため、進行波での制御を実現することが望ましいと考えられる。

そこで本研究室では進行波による微小気泡の制御法の研究や超音波照射下の微小気泡の挙動観察を行ってきた。そして進行波による駆動力を利用した流路壁面への捕捉法[29]、流路選択技術[30]が考案されてきた。特に捕捉に関しては、現在臨床でも使用されている超音波造影剤である Sonazoid[®]の血管壁への捕捉や赤血球存在下での捕捉を確認[31]し、流路選択においても最適な超音波照射条件が検討されてきた[32]。Fig.1.2には進行波による流路分岐部での微小気泡の誘導の様子を示す。また、超音波による制御性を向上させるために凝集体の形成を利用した経路選択も行われており[33]、その結果を Fig.1.3 に示す。

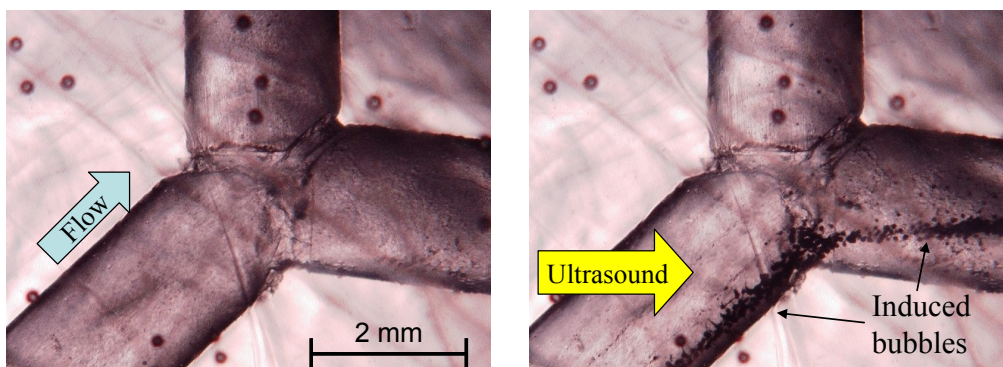


Fig.1.2 超音波の駆動力を利用した微小気泡の誘導

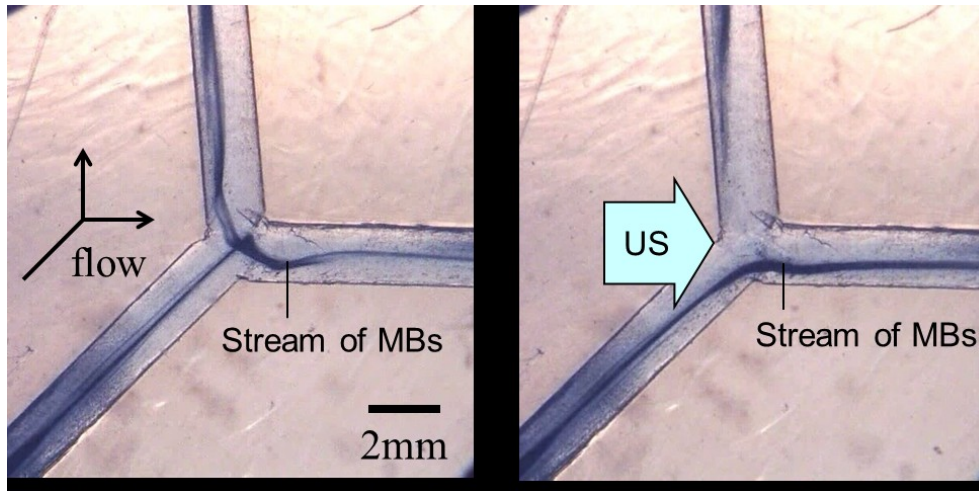


Fig.1.3 微小気泡の凝集体形成を利用した誘導

本研究室ではこれまでに造影微小気泡の動態制御実現を目指し、超音波照射を受けた微小気泡の挙動の解析を行ってきた。基礎的な解析は工業用のマイクロカプセル: マツモトマイクロスフェア®F シリーズ(松本油脂製薬)を用い、応用性の評価に第2世代超音波造影剤の Sonazoid®を用いてきた。先にも述べたように微小気泡の誘導に関してはこれまでに、単純な Y 字分岐構造を有する人工血管において、血管の本流から分岐後の派流に向かって押し出すように音波照射することで、微小気泡の動態を制御する手法を開発してきた。そして凝集体は流水中でも凝集した状態を維持すること、凝集体の形成を行うことで誘導精度が向上すること等を F-04E の微小気泡で示した。しかし、体表からの超音波照射に対応するような血流の流れに対向する向きの音波制御は報告されていない。

微小気泡の捕捉に関しては、静水・流水中における微小気泡の捕捉実験を通し、微小気泡の捕捉位置が周波数により異なること、音圧などのパラメータを変化させることで微小気泡の捕捉量を制御可能であることを示した。さらに、実際の生体組織を用いた微小気泡の捕捉実験を行い、赤血球と微小気泡とが懸濁した状態でも微小気泡の捕捉現象が確認できること、微小気泡の捕捉量が赤血球の懸濁により増加する傾向があることを示し、生体内でも超音波による微小気泡の制御が行えることを示唆している。

1.1.3 音響放射力の歴史的背景

水などの流体中に放射された超音波を物体でさえぎると、その物体には超音波による力が作用する。これが音響放射力と呼ばれる超音波による推進力であり、この力を利用して上記のマニピュレーションなどが行われている。しかし、その力の働く様子は音場の種類(進行波 or 定在波、平面波 or 球面波)、対象物体の性質(大きさ、圧縮性)、周囲媒質の粘性などに大きく依存し、統一的な理論が存在しない。

まず、物体の寸法が音波長に比べて十分大きく音波の回折が無視できる場合には

Brillouin 等の放射圧理論が存在する[34]。続いて音波の回折を考慮に入れた場合は、例えば、平面進行波および定在音場中の剛体球に作用する力に関しては King の理論[35]、同じく平面進行波および定在音場中の圧縮性を有する球に作用する力に関しては Yosioka and Kawasima の理論[36]が存在する。しかしこれらの理論と実験との一致条件は対象物体の大きさが波長と同等かそれ以上の時である。

近年の超音波マニピュレーションに関する研究においては、対象物体の大きさはマイクロメートルオーダーとなる。そのような場合、King や Yosioka らの理論に符合しない実験結果も報告されている。Yasuda らは水中、定在波音場中のポリスチレン粒子に作用する音響放射力を測定している[37]。その報告によれば、粒径が $5 \mu\text{m}$ 以下で、Yoshioka らの理論よりも放射力が大きくなり、粒径が実際の寸法よりも等価的に大きく振る舞うとの結果を得ている。

上記の理論研究のほとんどが流体の持つ粘性を無視し、完全流体を対象として取り扱われてきた。ところで Doinikov は流体の粘性を含めた放射力に関する理論研究で、一定条件内で平面進行波内に置かれた微小球に関する理論を報告している。このときの対象物体は剛体球および圧縮性を有する球であり、大きさが波長に比べ十分に小さい場合に作用する音響放射力の式を導いている[38,39]。

我々はこれまでにこの Doinikov の理論に基づき数値解析シミュレーションと微小気泡の経路選択実験との比較を行い、対象物体の膨張収縮性や音波の減衰に関する仮定条件を導入することで実験結果を再現できることを示した[40]。しかし、まだこの条件を満たす実験が不足していることから、Doinikov の理論の妥当性を確かめるまでには至っていない。特に上記の理論は平面進行波に関する理論であり、音波の進行方向且つ、音軸に沿った方向に働く力のみの記述である。

対象物体のサイズがビーム幅に比べ遥かに小さい球体の場合にはビームパターンを補正して平面波の理論が適用できるため、任意の音場分布に対しても適用可能な音響放射力が、Gor'kov と Nyborg により求められている[41,42]。この理論の場合、局所的な音圧勾配を持つ音場において微小気泡を球体と仮定し、かつ波長に対し微小気泡が十分小さい場合における進行波による力が示されている[43]。

高周波数の集束波の場合にはビームが細くなるため、その分布の影響が対象物のサイズから見て無視できなくなる。Sapozhnikov らは入射波が平面波の和で表現できることから任意の音場中の弾性球体に対して働く放射力がそれぞれの平面波の解で表せるとし、音響放射力を解析的に求める手法を提案している。これにより対象物のサイズに依らず音響放射力を解析的に表現でき、いくつかの条件下(平面波や非回折ビーム、 $ka \ll 1$ (k :波数、 a :対象物体の半径)における集束波など)においてはこれまでの理論と一致を見せている。そして音響放射力はビームの軸方向と径方向の成分を含み、集束させた進行波中で受ける力の方向について、音軸からの距離に応じて力の向きが変わると報告している[44]。このとき周波数 2 MHz 、弾性球の半径 $a = 1 \text{ mm}$ である。この解析によると、音軸上($x = 0 \text{ mm}$)では音波の進行方向に力を受けるが、 x

= 0.4 mm では音軸から遠ざかる方向に力が作用する。

以上の経緯から分かるように、微小物体に働く放射力の研究は音場・対象物体・粘性の条件によって様々行われており、統一されていない。また、いずれの理論も単一の物体を対象としたもので、本研究のような凝集気泡に対しての挙動は不明である。Sapozhnikov らの研究に関しても弾性体は圧縮性とは言えないため、膨張収縮によるサイズ変化が大きい気泡の条件とは異なる。本研究では単純のため、集束波の焦点近傍すなわち音軸上の1点では平面波と等価と見なせる理由から Doinikov の理論を採用する。音軸上以外に関しては Sapozhnikov の理論の要素も合わせて適用していく。各条件における音響放射力と対応する理論について **Table 1.2** にまとめる。ここで○は条件が該当することを意味する。

Table 1.2 各条件における音響放射力と対応する理論

		King[35]	Yoshioka and Kawashima [36]	Yasuda and Kamakura [37]	Doinikov [38,39]	Gor'kov and Nyborg [41,42]	Sapozhnikov [44]
周囲媒質の粘性	非粘性流体	○	○	○			○
	粘性流体				○	○	
音場	平面波	○	○	○	○	○	○
	集束波					○	○
進行波/定在波	進行波	○	○		○	○	○
	定在波	○	○	○			
対象物体の性質	圧縮性		○		○		
	剛体	○		○	○	○	○
対象物体の大きさ と波長との関係	$ka > 1$	○	○				○
	$ka < 1$						○
	$ka \ll 1$			○	○	○	○

1.2 本研究の目的

本研究では、体外からの音波照射を想定し、音軸方向およびビームの径方向に作用する力を利用して気泡の動態を制御する手法の開発を目的とする。1.1.2 節で述べたように、これまで気泡の伝送に関しては血管の本流から分岐後の派流に向かって押し出すように音波照射することで経路選択を実現していた。しかし、生体内の動脈系はや肝臓内の門脈は体の中心から外側に向かって走向しており、体表からの超音波照射においては血流の流れに対向する向きの音波制御が必要となる。体外からの音波照射による気泡動体制御の概念図を **Fig.1.4** に示す。

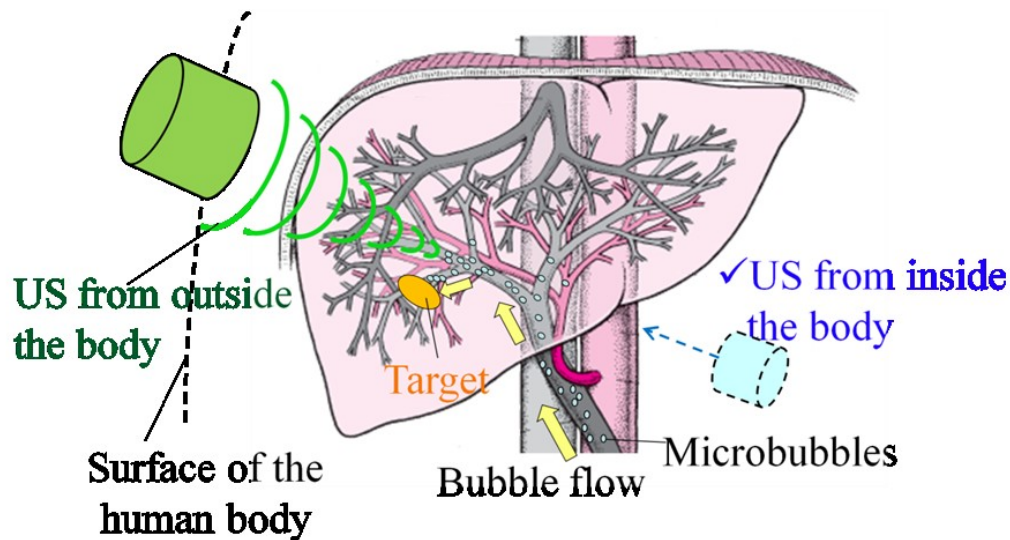


Fig.1.4 体外からの音波照射による微小気泡の動態制御

また、流れに対向する方向の制御では、順方向での制御よりもより大きな音圧が必要になると考えられるため、気泡の凝集体形成を利用する。これは 1.1.2 節で示したように分岐部手前であらかじめ超音波を照射して凝集体の形成を行い、分岐部でその凝集体をまとめて誘導するといった手法である。これにより流れに対向した方向でも効率的に微小気泡を誘導することが出来る。しかしながら、凝集体形成に関する現象確認の報告はあるものの、凝集体のサイズ制御や短時間で凝集を行う技術に関してはこれまで報告がない。そこで本論文ではまず、効率的な凝集体形成のための音波照射条件の解明を目的とし、静水中微小気泡の凝集体形成実験を行う。

さらに、複雑な血管形状になった場合、従来の単板振動子を用いた手法では分岐の数だけ音源が必要になり、一つ一つの位置合わせにも困難を伴う。そこで複数の焦点を同時に形成可能なアレイ型トランスデューサを導入する。1.1.3 節の Sapozhnikov の理論で示されたビーム径方向外側に向く力(音圧勾配方向の力)を利用し、非誘導側の分岐入口を塞ぐように音圧を形成することで所望の対向制御を実現する。Fig.1.5 に単板振動子を用いた対向制御と、アレイ型トランスデューサを用いた対向制御の概念図を示す。

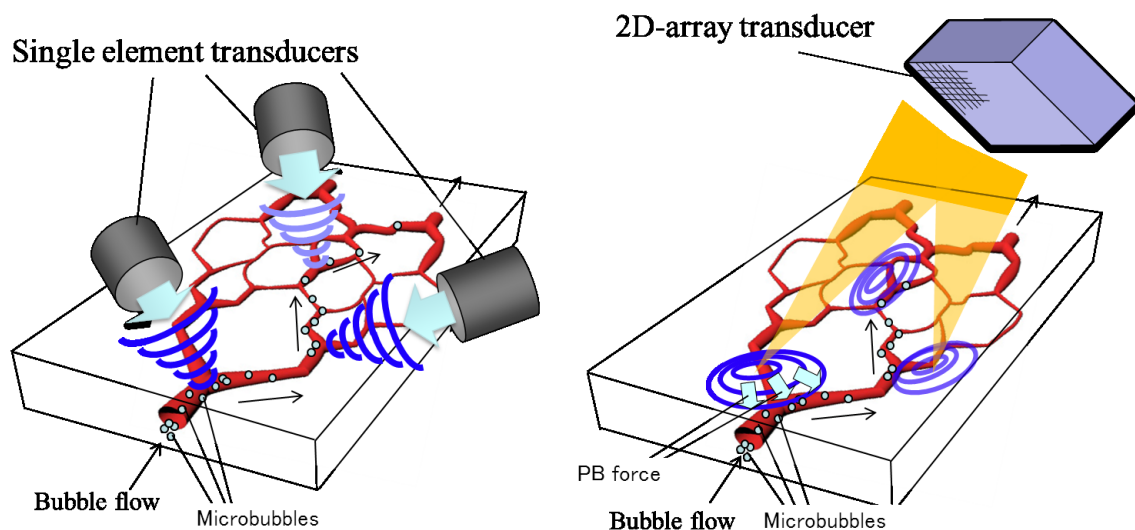


Fig.1.5 対向制御による微小気泡の動態制御
 (左:単板振動子を用いた場合、右:アレイ型トランスデューサを用いた場合)

最後に、これまで捕捉制御に関しては生体試料中での制御確認がされているものの、誘導制御に関しては光透過性の問題から確認できていなかった。そこで動物実験等にも適用できる観測系を構築し、生体試料を用いた気泡誘導を実現することを目指す。

1.3 本論文の構成

本論文は、体外からの超音波照射により気泡の動態を制御する手法の開発を目的とし、微小気泡の凝集現象を利用した動態制御手法および生体試料を用いた気泡制御の実現を目指すものである。

本章では、本研究に至るまでの先行研究や超音波・微小気泡を用いた医療応用について触れ、また、本研究の目的と概要を述べた。

第2章では、微小気泡に作用する力と超音波2次元アレイによる音場形成に関する理論について述べる。微小気泡への超音波の作用や、水流が微小気泡に与える影響、および超音波2次元アレイの焦点位置の制御理論を説明する。

第3章では、本研究において構築される様々な実験系の共通コンポーネントについて説明を行う。各トランスデューサの音圧分布の測定方法とその結果について述べ、実験で用いる音場の音圧分布を実際にハイドロホンで測定する。さらに実験で用いる人工血管および微小気泡についての詳細と特徴について説明する。

第4章では、微小気泡の評価法について述べる。本研究では透明媒質中の微小気泡の凝集サイズの測定や気泡量の推定には光学系および超音波診断装置を使用した画像処理を利用する。ここでは各実験での評価手法をまとめる。

第5章では、効率的な凝集体形成のための音波照射条件の解明を目的とし、静水中微小気泡の凝集体形成実験を行う。照射音波のパラメータに対する凝集体のサイズ

時間変化の観測と赤血球の凝集に及ぼす影響について述べる。

第 6 章では、単板振動子を用いて分岐構造を有する人工血管において気泡の経路選択を行う。従来の手法である押し出す方法の超音波照射では、標的指向性を付与可能なバブル製剤の制御を検討する。また、多段階に分岐する人工血管を用意し、各分岐点に対して単一音源を別々に照射することによる気泡の連続経路選択を行う。そして音場の波形や投入するエネルギーを考慮した照射法による制御性能を比較する。

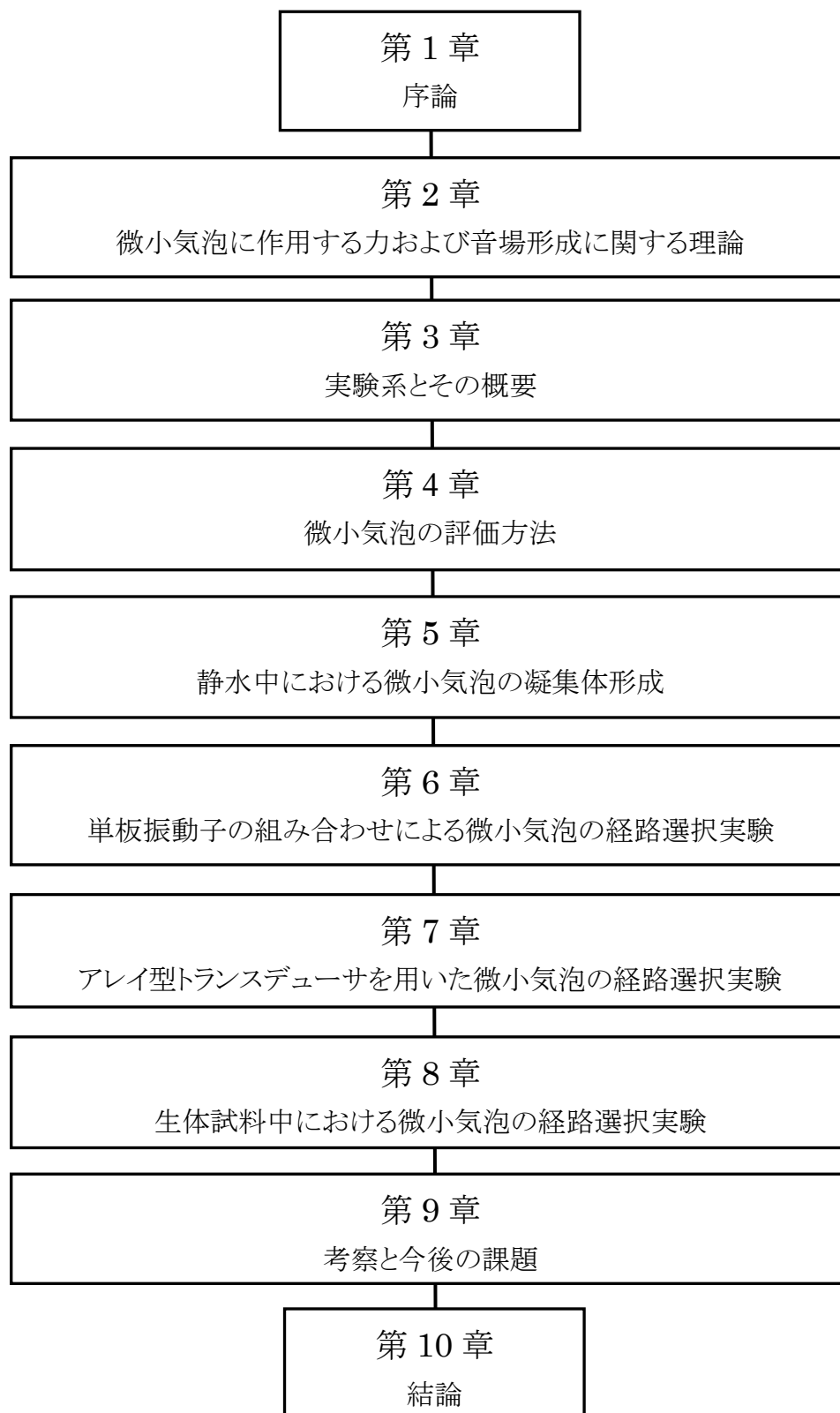
第 7 章では、アレイ型トランスデューサを用いて音場設計に基づく微小気泡の効率的な経路選択実験を行う。まず、単分岐構造の分岐に対して焦点形成を行い、凝集体形成を利用する場合としない場合の比較を行う。そして凝集用音源を別に用意し、アレイ型トランスデューサの複数焦点形成を利用した多分岐流路における連続動態制御を行う。これにより制御音源の数を削減した気泡の経路選択の実現を目指す。

第 8 章では生体応用を意識した実験条件における超音波を利用した微小気泡の経路選択について述べる。使用する媒質を脱気水や生理食塩水などの透明媒質から動物の血液に変更し、粘性や赤血球を含む媒質中における微小気泡の誘導の様子を観測する。従来は光学的に気泡を観測していたところを、超音波診断機を用いて観測する事で本手法の生体内における妥当性を検証する。また、媒質の違いによる気泡の経路選択性能について定量的な測定を行い、さらに得られた実験結果から生体応用への可能性について述べる。

第 9 章では、これまでの実験結果を理論的に考察する。そして今後の課題として、生体応用にいたるまでのアプローチについて言及する。

第 10 章では、本研究をまとめ総合的な結論を述べる。

各章の関連は以下のようなになる。



.....

第 2 章

微小気泡に作用する力および音場形成に関する理論

2.1 緒言

前章では、微小気泡の超音波制御実現への背景と目的を述べた。本章では、2.2 節で微小気泡が超音波の進行波音場内で受ける推進力について述べ、2.3 節では音波照射による推進力以外の作用について述べる。続いて 2.4 節では水流内に存在する気泡が受ける抗力を流体力学の観点から述べる。2.5 節では入射音波のエネルギーの計算方法について、2.6 節では超音波 2 次元アレイによる音場形成を述べる。最後に 2.7 節の結言で本章のまとめを述べる。

2.2 微小気泡が超音波の進行波音場内で受ける推進力

2.2.1 Doinikov の理論式で表現される音響放射力

水などの流体中に放射された超音波を物体でさえぎると、超音波はその物体を直線的に動かすことが出来る。これが音響放射力と呼ばれる超音波の推進力である。特に対象物体が微小気泡である場合に作用する音響放射力のことを Primary Bjerknes force ともいうが、表現が限定的であるという理由から本論文では音響放射力と呼ぶことにする。

音響放射力は、音場中に置かれた微小気泡が周囲の音圧勾配と気泡の体積振動との積を時間積分した値であり、式(2.1)の様に定義される[45]。ここで、 p は超音波の音圧、 V は気泡の体積振動、 $\langle \rangle$ は時間平均を表す。式(2.1)において、 p と V は共に振幅ではなく時間波形そのものであることに注意する必要がある。このため、例えば平面波のように音圧振幅が一定であったとしても ∇p と V は超音波の周波数で位相差を保ちながら変化しているので、それらの積の時間平均は値を持つようになる。

$$\mathbf{F}_{ac} = -\langle \nabla p \cdot V \rangle \quad (2.1)$$

音響放射力の中でも、進行波音場内で作用する F_{ac} については Doinikov の粘性の効果を含めた理論式(2.2)で示される[46]。

$$\mathbf{F}_{ac} = \pi a^2 \left(\frac{I}{c_0} \right) Y_p \quad (2.2)$$

ここで a は微小気泡の半径、 c_0 は媒質の音速、 Y_p は音響放射力関数である。また I は音響インテンシティと呼ばれ、音圧の 2 乗に比例した関数 $I = p^2 / 8\rho_0 c_0$ であるため、

結局(2.2)は式(2.3)となる。

$$F_{ac} = \pi a^2 \left(\frac{p^2}{8\rho_0 c_0^2} \right) Y_p \quad (2.3)$$

ところで音響放射力関数 Y_p は対象とする物体の性質により2種類導かれているが、両者ともその適用には以下の条件が必要となる[38,39,46]。

- 入射音波は平面波である。
- 入射音波の振幅は小さく、伝搬過程や散乱場は線形理論に従う。
- 物体に働く力は何等かの外力と釣り合っている。
- $|ka| \ll 1 \ll |k_0 a|$ (膨張収縮性を有する物体の場合、 $|\tilde{k}a| \ll 1 \ll |\tilde{k}_0 a|$ という条件も付与される) の関係が成り立つ、つまり音波の波長に対して微小気泡半径が十分小さい必要がある。ここで、 $k_0 = (1-j) / \delta_v$ である (j は虚数単位)。
- 熱伝導性を無視する。

まず1つ目の Y_p は対象とする物体の性質が剛体球の場合であり、式(2.4)で表現される。

条件① 剛体球の条件式: Y_{p1}

$$Y_{p1} = 12k\delta_v \left\{ \left(\frac{\tilde{\rho}_0 - \rho_0}{2\tilde{\rho}_0 + \rho_0} \right)^2 - \frac{2\tilde{\rho}_0^3 + 12\rho_0\tilde{\rho}_0^2 - 21\rho_0^2\tilde{\rho}_0 + 7\rho_0^3}{(2\tilde{\rho}_0 + \rho_0)^3} \frac{\delta_v}{a} \right\} \quad (2.4)$$

ここで $\tilde{\rho}_0$ は微小気泡の密度、 ρ_0 は媒質(流体)の密度を表わす。これ以降、 \sim は微小気泡内の特性を表すものと定義する。また k は媒質(流体)中の波数 ($k=2\pi/\lambda$, λ : 音波の波長) である。

続いて、もう一方の Y_p は対象とする物体の性質が膨張収縮性を有する場合であり、式(2.5)で示される。

条件② 膨張収縮性を有する条件式: Y_{p2}

$$Y_{p2} = \frac{4}{(ka)^2} \frac{(ka)^2 + \{7 - 3(\omega_0/\omega)^2\} \{(ka)(\delta_v/a)^2\} / 2}{\{1 - (\omega_0/\omega)^2\}^2 + \{(ka) + 2(\delta_v/a)^2\}^2} \quad (2.5)$$

ここで ω は媒質中の音波の角周波数、 ω_0 は微小気泡の共振角周波数であり式(2.6)から算出される。

$$\omega_0 = \frac{1}{a} \sqrt{3 \frac{\tilde{c}_0^2 \tilde{\rho}_0}{\rho_0} - 2 \frac{\zeta}{\rho_0 a}} \quad (2.6)$$

ここで ζ は表面張力である。また粘性境界層 δ_v は式(2.7)で示される。

$$\delta_v = \sqrt{2\nu/\omega} \quad (2.7)$$

ここで ν は流体の動粘性率であり、20°Cの水で約 $10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ である。式(2.2)で示す音響放射力のうち、 $a^2 Y_p (\propto F_{ac})$ に関して Y_p を条件①としたグラフを**Fig. 2.1**に、条件②としたグラフを**Fig.2.2**に示す。

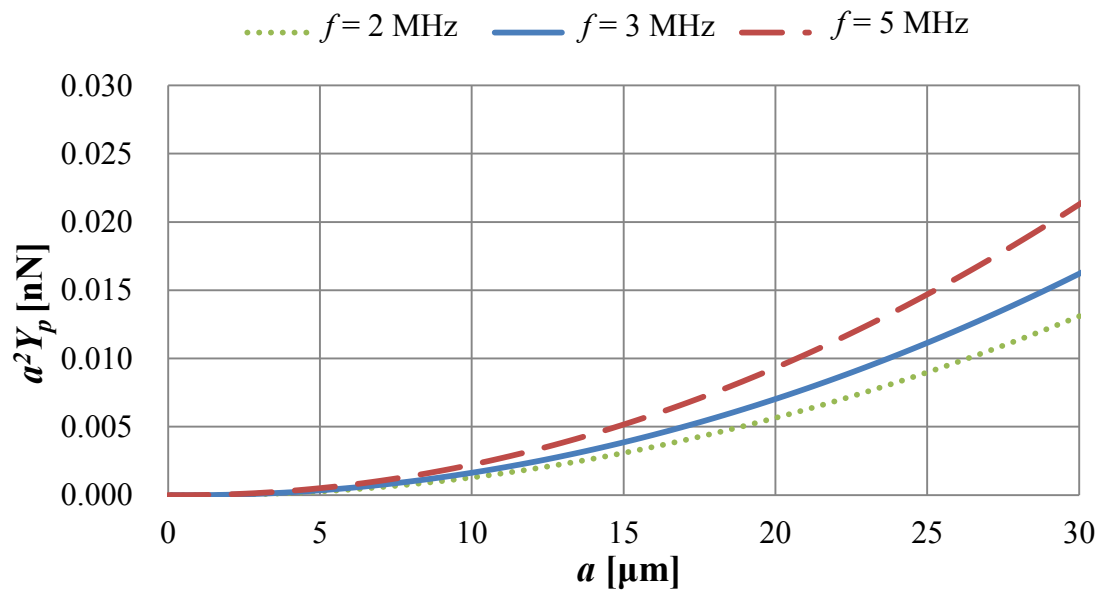


Fig. 2.1 微小気泡の半径に対する $a^2 Y_{p1}$ (条件①)

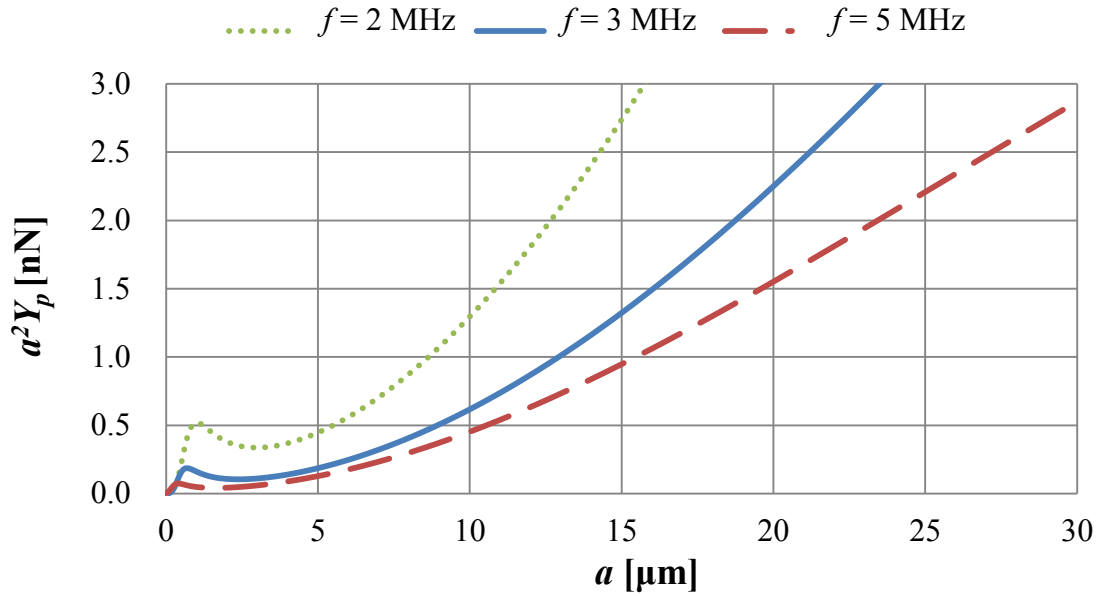


Fig.2.2 微小気泡の半径に対する $a^2 Y_p$ (条件②)

両グラフから、 $a^2 Y_p$ は微小気泡の性質や照射音波の周波数によって異なり、 Y_p に条件①を用いた場合では周波数が高いほど大きく、条件②を用いた場合では周波数が高いほど小さくなる。また条件①と②で $a^2 Y_p$ の値を比較すると、条件②を用いた場合は約 10^3 倍大きくなる。これは微小気泡の膨張収縮の原理が影響しており、一般的に収縮よりも膨張の方が半径の変動比率が大きいため、音響放射力が強く作用すると説明できる。

2.2.2 Sapozhnikov の理論式で表現される音響放射力

(2.2)式は対象物体が音軸上に存在する場合に適用できる。本論文では音軸上に沿って作用する力以外にも積極的に利用する。Sapozhnikov は上記の Doinikov や Gor'kov と Nyberg の式[41,42]を発展させて音軸上以外に存在する力も表現した[44]。音響放射力 F_{ac} はビームの軸方向(F_z)と径方向(F_x, F_y)の成分から成るとして、以下のよう計算した。

$$F_{ac} = r^2 \int_0^\pi \sin \theta d\theta \int_0^{2\pi} d\varphi \frac{dF_{ac}}{d\Sigma} \Big|_{r \rightarrow \infty} \quad (2.8)$$

$$\frac{dF_x}{d\Sigma} \Big|_{r \rightarrow \infty} = -E \sin \theta \cos \varphi$$

$$\frac{dF_y}{d\Sigma} \Big|_{r \rightarrow \infty} = -E \sin \theta \sin \varphi \quad (2.9)$$

$$\begin{aligned}\frac{dF_z}{d\Sigma}\bigg|_{r\rightarrow\infty} &= -E \cos\theta \\ x &= r \sin\theta \cos\varphi, \\ y &= r \sin\theta \sin\varphi, \\ z &= r \cos\theta,\end{aligned}\tag{2.10}$$

ただし、 $\cos\theta = z/r$ 、 $\sin\theta = \sqrt{1 - \cos^2\theta}$ 、 $\varphi = \arctan(y/x)$ 、 E は音響エネルギー密度である。

Sapozhnikov らの報告によると、リニア型のアレイ素子から $(x_F, 0, z_F)$ にフォーカスした音響放射力を計算したところ音軸からの距離に応じて力の向きが変わると報告している[44]。この解析によると、音軸上($x = 0$ mm)では音波の進行方向に力を受けるが、 $x = 0.4$ mm では音軸から遠ざかる方向に力が作用する結果となった。このときのパラメータは素子数 $M = 128$ 、素子の高さ $h = 15$ mm、素子の幅 $w = 0.25$ mm、素子間ギャップ $g = 0.05$ mm、焦点距離 $R = 40$ mm、周波数 5MHz として $x_F = 0$ 、 $z_F = R$ とした場合である。また、ターゲットの直径は $2a = 2$ mm である。

平面波の場合と違う点は音軸方向以外にも力が作用し、特に焦点よりも先では音軸から離れる方向に力が作用していることである。音軸と直交する成分はビームの端で大きくなる。

2.3 微小気泡が超音波照射により受ける推進力以外の作用

2.3.1 超音波による微小気泡の振動

まず、音圧すなわち圧力が微小気泡に加わった時の挙動について説明する。音波の波長に対してその半径が十分に小さな水中の微小気泡に音波が入射すると、気体の体積弾性率が液体に比べて極端に小さいため、微小気泡はその入射音波によって励振され膨張・収縮運動を行う。この場合、微小気泡振動が球対称性を保つならば気液境界面の振動は球面波を放射する呼吸球音源と等価な運動となるため、微小気泡の振動成分は球面音波として液体中に放射される。

入射音波の振幅が微小である場合には、この放射は入射音波が球面波状に散乱された現象として捉えることもできる。しかし、微小気泡振動は強い非線形を含むため、微小気泡から放射される音波には駆動入射波の周波数以外にも高調波などの2次周波数成分が多く含まれるようになる。(この2次周波数成分を利用した物が超音波造影剤である)このように微小気泡が非線形駆動の状態にある場合、微小気泡はその振動によって生成した新たな音波(2次超音波)の音源として機能する[47]。

水中の微小気泡は、その気圧と直径に応じて一定の共振周波数を持ち直径が小さい程、また気圧が増加する程その共振周波数が高くなる。

水中微小気泡の共振周波数は Doinikov により理論的に導出されており、式(2.11)

で示される[38,39]。

$$f_0 = \frac{1}{2\pi a} \sqrt{3 \frac{c_0^2 \rho_0'}{\rho_0} - 2 \frac{\gamma}{\rho_0 a}} \quad (2.11)$$

ここで a は微小気泡の半径、 c_0 は媒質の音速、 ρ_0 は媒質の密度、 γ は表面張力であり、 ρ_0' は微小気泡内の物理量を表す。

式(2.11)より微小気泡の粒子径とその共振周波数の関係をグラフ化したものを **Fig.2.3** に示す。共振周波数の特徴として、照射する超音波の周波数を共振周波数に近づけることで、微小気泡に作用する力が増加し崩壊しやすくなる。また、微小気泡の体積振動も増加するため、周囲に生じる微小気泡を音源とした 2 次超音波の強さも大きくなる。

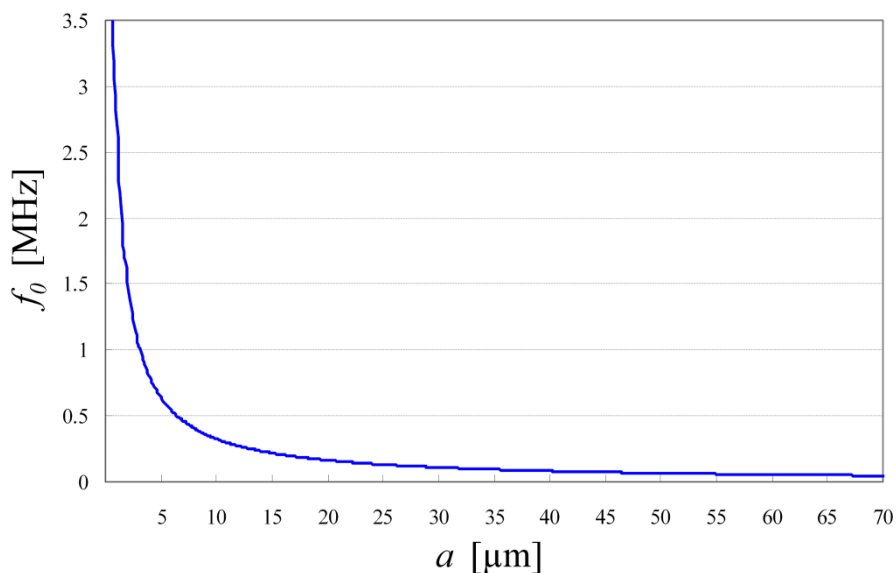


Fig. 2.3 微小気泡の粒子径に対する共振周波数

しかし、式(2.11)で示した共振周波数はシェルを持たない気泡を想定したもので、シェルを有する気泡はシェルの物性によりその共振周波数も変化する。産総研の安井らはシェルを持たない自由気泡とアルブミンのシェルを持つ気泡 (Albunex) の共振周波数を計算し、シェルを持つ気泡の共振周波数は自由気泡の共振周波数よりも約 4 倍高くなることを示した[48]。

2.3.2 超音波による気泡の凝集体形成

微小気泡の体積振動を音源とした 2 次超音波は周囲の微小気泡との間に引力、または斥力として作用する Secondary Bjerknes force(以下 S.B.F.)を発生させる。複数の気泡に超音波を照射すると、それぞれの気泡間に S.B.F.が働くため気泡の挙動は

複雑となるが、超音波を照射された微小気泡は複数集合し、自発的に凝集体を形成する事が実験で観測されている[26]。一方で最も基本的である 2 気泡間に作用する S.B.F.については理論的・実験的な解析が進められている。今、二つの気泡(気泡 1、気泡 2)が近接して存在し、それぞれの気泡が照射音波に対して位相 φ_1 、 φ_2 で線形振動している時、気泡 1 の放射音波により気泡 2 に加わる S.B.F. F_{SB} は、音響放射力の定義式から以下の式(2.12)で表される[27,28]。

$$\langle F_{SB} \rangle = -\frac{2\pi\rho r_1^3 r_2^3 \omega^2}{D^2} \varepsilon_1 \varepsilon_2 \cos(\varphi_1 - \varphi_2) \quad (2.12)$$

式(2.12)において $\langle \rangle$ は駆動超音波一周分の時間積分を、 ρ は媒質の密度、 r_1 と r_2 は気泡 1 と気泡 2 の初期気泡半径、 ε_1 と ε_2 は気泡 1 と気泡 2 の振動振幅値、 ω は照射音波の角周波数、 D は気泡の中心間距離を表す。式(2.12)より、S.B.F.の大きさは気泡の初期気泡半径、中心間距離、振動振幅、駆動周波数により決まり、向きは 2 気泡間の振動位相差により決まることがわかる。

ここで 2 気泡間の振動位相差について、気泡振動によって放射される 2 次超音波が他の気泡振動に影響を与えないと仮定した場合は以下の式(2.13)の様に表される。

$$\varphi_1 - \varphi_2 = \tan^{-1} A_1 - \tan^{-1} A_2 \quad (2.13)$$

ただし、

$$A_1 = \frac{-4\mu\omega}{\rho r_1^2 (\omega^2 - \omega_r^2)} \quad (2.14)$$

$$A_2 = \frac{-4\mu\omega}{\rho r_2^2 (\omega^2 - \omega_r^2)} \quad (2.15)$$

であり、 μ は流体の粘性係数、 ω_r は共振角周波数を表し、気泡の振動位相差 $\varphi_1 - \varphi_2$ は角周波数 ω 、初期気泡半径 r_1 及び r_2 で一意的に決まることがわかる。しかし、気泡間距離が短く気泡の振動振幅が大きいと 2 次超音波が他気泡の振動に影響を及ぼす。この場合の振動位相差は以下の式(2.16)の様に表される。

$$\varphi_1 - \varphi_2 = \tan^{-1} \frac{B_1}{A_1} - \tan^{-1} \frac{B_2}{A_2} \quad (2.16)$$

ただし、

$$A_1 = \frac{H_1 F + M_2 G}{F^2 + G^2} \quad (2.17)$$

$$B_1 = \frac{M_2 F - H_1 G}{F^2 + G^2} \quad (2.18)$$

$$F = L_1 L_2 - \frac{r_1 r_2}{D^2} \omega^4 - M_1 M_2 \quad (2.19)$$

$$G = L_1 M_2 - L_2 M_1 \quad (2.20)$$

$$H_1 = L_2 + \frac{r_2}{D^2} \omega^2 \quad (2.21)$$

$$L_1 = (\omega_1^2 - \omega^2) \quad (2.22)$$

$$L_2 = (\omega_2^2 - \omega^2) \quad (2.23)$$

$$\omega_1 = \sqrt{\frac{1}{\rho r_1^2} \left\{ \left(P_0 + \frac{2\sigma}{r_1} \right) 3\gamma - \frac{2\sigma}{r_1} \right\}} \quad (2.24)$$

$$\omega_2 = \sqrt{\frac{1}{\rho r_2^2} \left\{ \left(P_0 + \frac{2\sigma}{r_2} \right) 3\gamma - \frac{2\sigma}{r_2} \right\}} \quad (2.25)$$

$$M_1 = \frac{4\mu\omega}{\rho r_1^2} \quad (2.26)$$

$$M_2 = \frac{4\mu\omega}{\rho r_2^2} \quad (2.27)$$

であり、 P_0 は静水圧、 σ は流体の表面張力係数、 γ は気泡内部気体の比熱比を表わす。またここでは気泡 1 についての解のみ示しており、添え字の 1 と 2 を交換すれば気泡 2 についての解を得ることができる。式(2.16)から式(2.27)で示したように、2次超音波が他気泡の振動に影響する場合は気泡間の振動位相差 $\varphi_1 - \varphi_2$ は角周波数 ω 、初期気泡半径 r_1 及び r_2 以外に気泡間距離 D にも依存することとなる。すなわち、S.B.F.の向きは ω 、 r_1 、 r_2 、 D に依存することとなる。

他気泡が近接して存在している場合は、各気泡間に働く S.B.F.を求めて、それらを足し合わせることである気泡に作用する S.B.F.を求めることができると考えられるが、気泡数が増えれば増えるほどその解析は困難となる。

2.4 水流による微小気泡への抗力[49-51]

微小気泡が水流から受ける抗力について述べる。流体中の物体が流体と相対運動をすると、物体は移動方向とは逆向きの抗力を流体から受ける。微小球（気

泡) に作用する流体からの抗力 F_d はナビエ・ストークス方程式と連続の式を用いて、流体は非圧縮性流体であることと、レイノルズ数 $Re \ll 1$ 以下であることという二つの仮定の下で式(2.28)のように求められる。ここで、非圧縮性流体とは圧力や温度による密度変化がない流体のことであり、レイノルズ数 Re とは流体の慣性力と粘性力の比を表わす量で、レイノルズ数が小さいことは粘性が支配的に働き、慣性を無視できるということである。

$$F_d = 6\pi R\mu(v_f - v_b) \quad (2.28)$$

ここで R は気泡半径、 μ は粘性係数、 v_f は流体の速度、 v_b は気泡の速度を表わす。式(2.28)より微小気泡が受ける流体からの抗力は体積には依存せず、微小気泡の半径、流体の粘性係数、流体との相対速度によって決まってくる事が分かる。

2.5 入射音波のエネルギーの計算方法

バブルの運動エネルギーは音波の入射エネルギーの一部が変換されて生じる。ここでは入射音波の総エネルギーを揃えた実験のための計算方法について述べる。入力信号としてはバースト波と連続波の正弦波を用いる。バースト波(BW)および連続波(CW)の音圧時間変化を Fig.2.4 に示す。

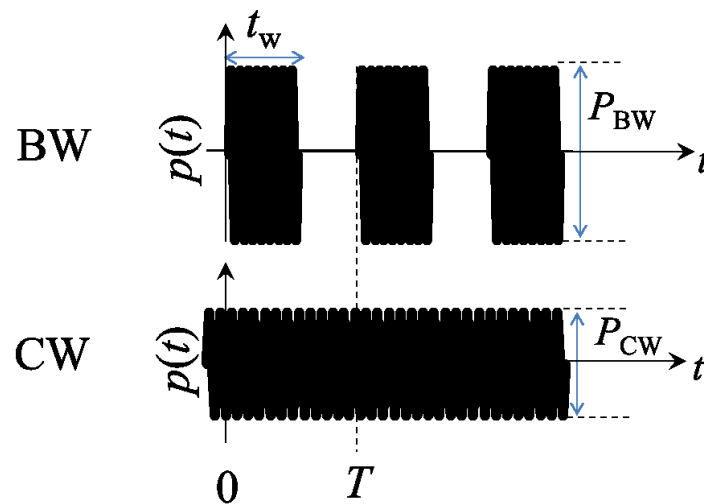


Fig.2.4 バースト波(BW)および連続波(CW)の音圧時間変化

グラフの縦軸は瞬時音圧 $p(t)$ 、横軸は時間である。ここで瞬時音圧と音波の瞬時強度 $i(t)$ の間には以下の関係が成り立つ[52]。

$$i(t) = \frac{p^2(t)}{\rho c} \quad [W/cm^2] \quad (2.29)$$

超音波音圧波形の単位面積当たりのエネルギー E は、パルス強度積分で表される。

$$E = \int i(t)dt = \frac{1}{\rho c} \int p^2 dt \quad [J/cm^2] \quad (2.30)$$

ここで正弦波においては音圧の実効値 P 、音圧の peak-peak 値 P_{p-p} に関して以下の関

係が成り立つ。

$$P = \sqrt{\frac{1}{T} \int_0^T p^2(t) dt} \quad , \quad P = \frac{P_{p-p}}{2\sqrt{2}} \quad (2.31)$$

すると(2.44)式はバースト波の場合、バースト波の周期 T 、バースト幅 t_w の時間範囲において以下ようになる。

$$\frac{1}{\rho c} \int_0^T p(t) dt = \frac{1}{\rho c} \int_0^{t_w} p(t) dt + \frac{1}{\rho c} \int_{T-t_w}^T p(t) dt = \frac{1}{\rho c} \cdot t_w \cdot \frac{P_{BW}^2}{8} + 0 \quad (2.32)$$

同様に連続波の場合もバースト周期 T の時間範囲において以下ようになる。

$$\frac{1}{\rho c} \int_0^T p(t) dt = \frac{1}{\rho c} \cdot T \cdot \frac{P_{CW}^2}{8} \quad (2.33)$$

例えば $t_w = 1/2T$ に設定した場合には、同じエネルギーを持つような P_{BW} と P_{CW} の関係は $P_{BW} = \sqrt{2}P_{CW}$ となる。

2.6 超音波 2 次元アレイによる音場形成

2.6.1 位相制御による焦点形成

超音波 2 次元アレイで音場を制御する方法は大きく 2 つあり、超音波 2 次元アレイの構成要素である振動子のそれぞれに位相を与える方法と、超音波 2 次元アレイの各振動子の位置を変える方法とがある。本研究では、前者の位相制御を用いる。

電子フォーカスとは、2 次元アレイトランスデューサの位相制御技術のことである。2 次元的に配列された各素子から照射する音波に位相差(遅延時間)を設けることで、任意の音場を形成することができる。正弦連続波の場合、位相制御による合成は遅延を持たせた波の重ね合わせと言い換えることが出来る。ここで装置の入力の都合上、位相差を遅延時間として計算する。本研究で使用される Rayleigh の積分式による数値計算シミュレーションでは時間から位相に変換した上で波を重ね合わせる操作を行い、再び位相から時間に戻すといった作業を行っている[53]。Fig.2.5 は同一の電源で、遅延線により複数素子に別々な遅延時間を設定する概念図である。

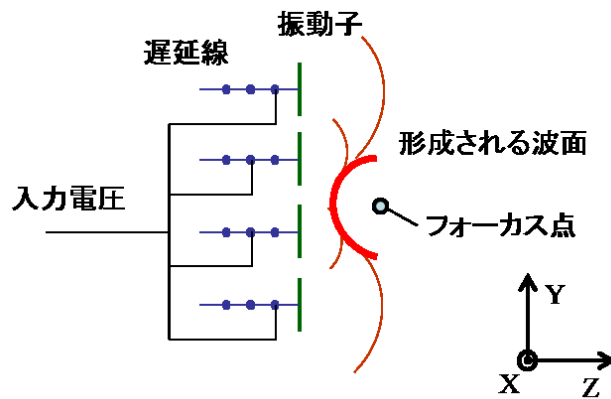


Fig.2.5 電子フォーカスによる単焦点形成の簡易モデル

2.6.2 各素子の遅延時間の設定

2次元アレイトランスデューサによる単焦点の形成とは、言い換えると電子フォーカスにより1つの座標に音波を同位相で集めることである。今、フォーカス点 $F = (X_F, Y_F, Z_F)$ に音波を集束させることを考える。素子を N 個持つ2次元アレイトランスデューサの i 番目 ($1 \leq i \leq N$) の素子の中心座標を $E_i = (X_i, Y_i, Z_i)$ とする。 i 番目の素子からフォーカス点に音波が到達するのにかかる時間を t_i とすると、式(2.34)により求めることができる。ここで、 c は音響伝搬媒質の音速を表す。

$$t_i = \frac{1}{c} \sqrt{(X_F - X_i)^2 + (Y_F - Y_i)^2 + (Z_F - Z_i)^2} \quad (2.34)$$

式(2.34)で求めた、時間 t_i の中で最も時間のかかる t_{Max} を基準に、 i 番目の素子に設定する遅延時間 θ_i を次の式(2.35)により定める。

$$\theta_i = t_{Max} - t_i \quad (2.35)$$

Fig.2.6 に、3枚の振動子で電子フォーカスを行う際の模式図を示す。図中の片矢印は、音波の伝搬にかかる時間を表し、両矢印は素子に設定する遅延時間を表す。

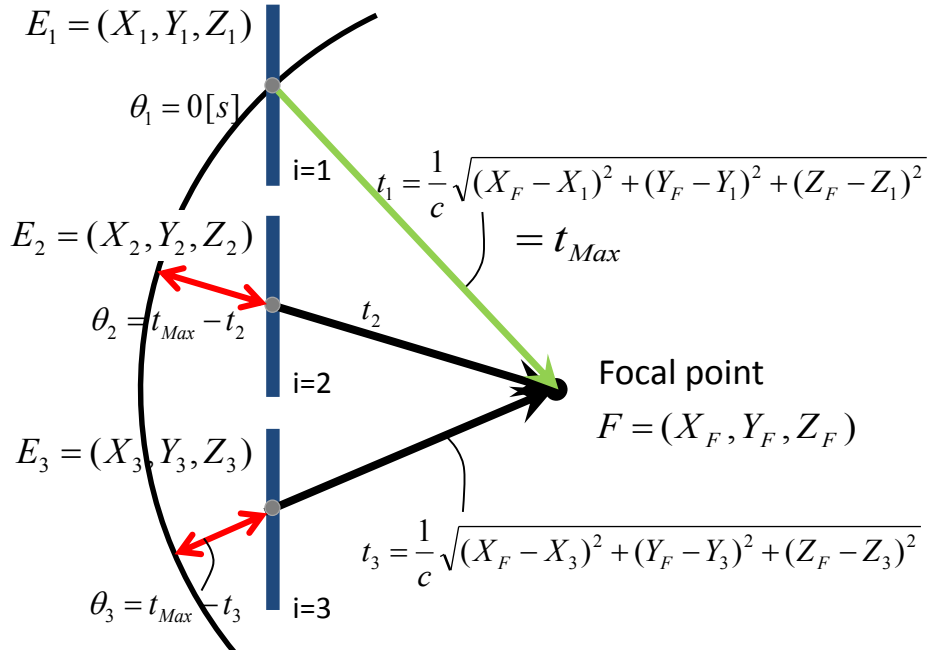


Fig.2.6 単焦点の形成に関する模式図

2.6.3 複数焦点の形成

単焦点の形成アルゴリズムを複数のフォーカス点に対しても適用可能にする。ここでは各素子から見て、複数あるフォーカス点のうち、最も空間的に近い位置にあるフォーカス点を選択して電子フォーカスを行う。

今、 M 個のフォーカス点に対し、焦点を形成することを考える。 h 番目 ($1 \leq h \leq M$) のフォーカス点の座標を $F_h = (X_{F,h}, Y_{F,h}, Z_{F,h})$ とする。素子を N 個持つ 2 次元アレイトランスデューサの i 番目 ($1 \leq i \leq N$) の素子の中心座標を $E_i = (X_i, Y_i, Z_i)$ とする。 i 番目の素子から h 番目のフォーカス点に音波が到達するのにかかる時間を $t_{i,k}$ とすると、式(2.36)により求めることができる。ここで、 c は音響伝搬媒質の音速を表す。

$$t_{i,h} = \frac{1}{c} \sqrt{(X_{F,h} - X_i)^2 + (Y_{F,h} - Y_i)^2 + (Z_{F,h} - Z_i)^2} \quad (2.36)$$

式(2.45)で求めた $t_{i,h}$ の内で、素子ごとに最も短い時間となる $t_{i,k}$ を t_i とする。 t_i の中で最も時間のかかる t_{Max} を基準に、 i 番目の素子に設定する遅延時間 θ_i を次の式(2.37)により定める。

$$\theta_i = t_{Max} - t_i \quad (2.37)$$

Fig.2.7 に、5 枚の振動子で電子フォーカスを行う模式図を示す。図中の片矢印は、音波の伝搬にかかる時間を表し、両矢印は素子に設定する遅延時間を表す。

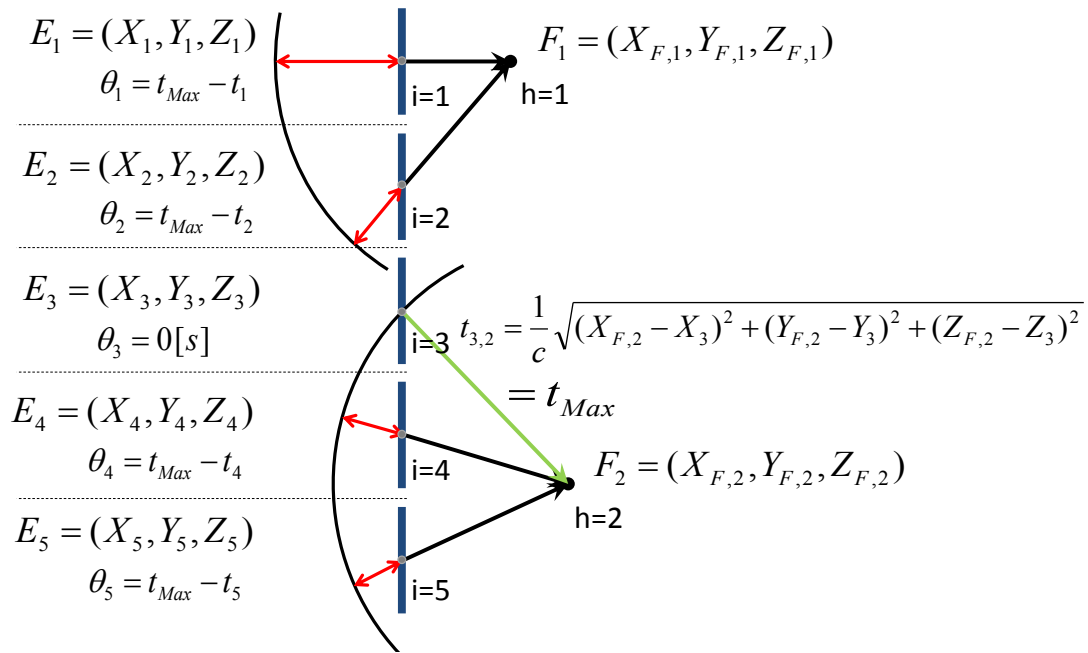


Fig.2.7 焦点ごとに素子を割り当てることによる複数焦点の形成模式図

2.7 結言

本章では水中微小気泡への音響放射力と音場形成に関する理論について述べた。2.2 節では微小気泡が超音波の進行波音場内で受ける推進力について、Doinikov の理論と Sapozhnikov の理論に基づく音響放射力の式について述べた。2.3 節では微小気泡に働く推進力以外の作用として、微小気泡の振動、2 次超音波により励起され凝集体を形成する力となる Secondary Bjerknes force について述べた。2.4 節では水流による気泡への抗力について述べた。2.5 節では入射音波のエネルギーの計算方法について述べ、2.6 節では超音波 2 次元アレイによる音場形成について述べた。次章では、本研究において構築される様々な実験系の共通コンポーネントについて説明を行い、各トランスデューサの音圧分布の測定方法とその結果について述べ、実験で用いる音場の音圧分布を実際にハイドロホンで測定する。また、実験で用いるパラメータについて言及する。

第3章

実験装置とその概要

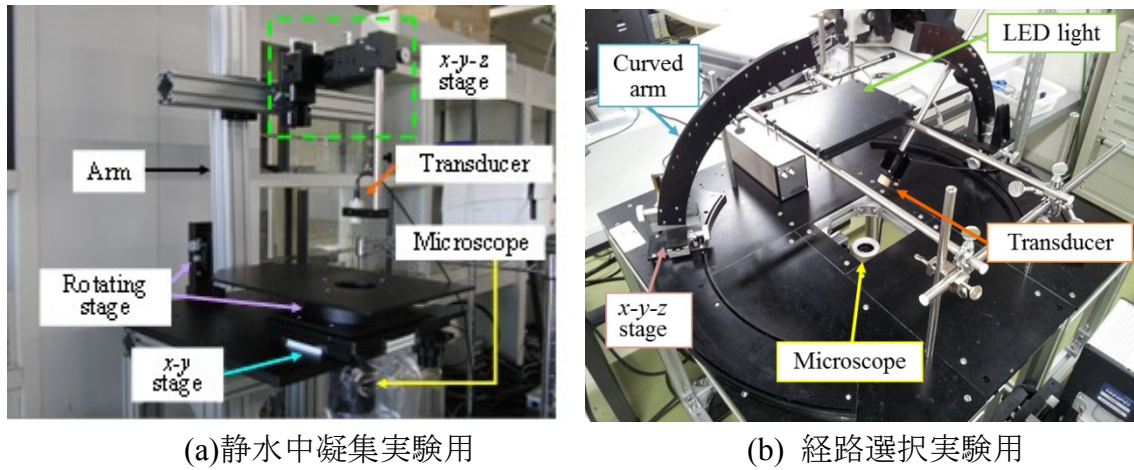
3.1 緒言

前章では、超音波照射による微小気泡の挙動、微小気泡に作用する力、および超音波2次元アレイによる音場形成について詳しく述べた。本章では本研究で行う検証実験に必要な器具及び装置の説明を行う。まず、3.2節で実験系の全体図について述べ、3.3節で気泡観測に用いる光学系のカメラ超音波診断装置について述べる。3.4節では超音波照射系について、単板振動子の場合と2次元アレイの場合を述べる。3.5節では実験で用いる各トランスデューサの音圧分布の測定とその結果について述べる。3.6節では用いる微小気泡の種類について触れる。3.7節では実験で用いるパラメータについて述べる。3.8節では人工血管の概要と粘性流体および実験に用いる生体試料について説明を行う。最後に3.9節の結言で本章のまとめを述べる。

3.2 実験系の全体図

微小気泡の挙動観測には微小気泡観測用実験系(ジグテックプレジション社)と次節で述べる光学観測機器を用いて行う。また、光学機器による観察領域とトランスデューサからの超音波照射位置を精密に制御できるように、実験では専用のトランスデューサ固定治具を用いた。**Fig.3.1(a)**には静水中凝集実験観察用トランスデューサ固定治具、**Fig.3.1(b)**には経路選択実験用トランスデューサ固定治具をそれぞれ示す。**Fig.3.1(a)**の静水中凝集実験用トランスデューサ固定治具は、水槽用ステージとトランスデューサを把持するアームが一体となっており、水槽用ステージの下に高速度カメラが設置できるようになっている。また、水槽用ステージとアームの根元にはそれぞれ回転ステージを有しているため、水槽用ステージを回転させることでトランスデューサの流路に対する方位角を、アームを回転させることで仰角をそれぞれ0.1 deg単位で制御することが可能となっている。さらにアーム先端にはx-y-zステージがそれぞれ付属されているので3次元的な照射位置合わせが0.1 mm単位で可能となっている。

Fig.3.1(b)の経路選択実験用トランスデューサ固定治具においては、湾曲アームの位置を外周レールに沿わせて変えることにより水平面の流路に対する方位角 θ を1 deg刻みに360 degの範囲で変更できる。また、仰角 ϕ は10 deg刻みに30~70 degの範囲で変更することができる。湾曲アームの根元にはx-y-zステージが付属されており、3次元的な照射位置合わせが0.1 mm単位で容易に行えるようになっている。角度の自由度は静水中凝集実験用の固定治具に劣るが、湾曲アームが複数取り付けられるので、複数のトランスデューサの照射位置を正確に制御できるメリットを持っている。**Fig.3.2**に経路選択用実験系の概略図を示す。



(a) 静水中凝集実験用

(b) 経路選択実験用

Fig. 3.1 実験系写真

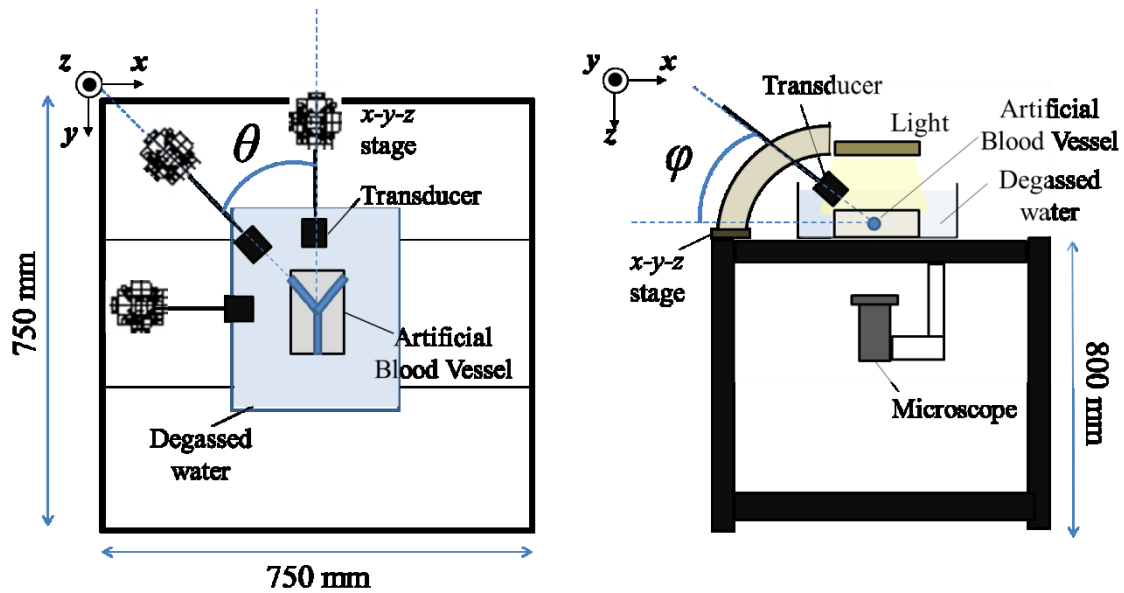


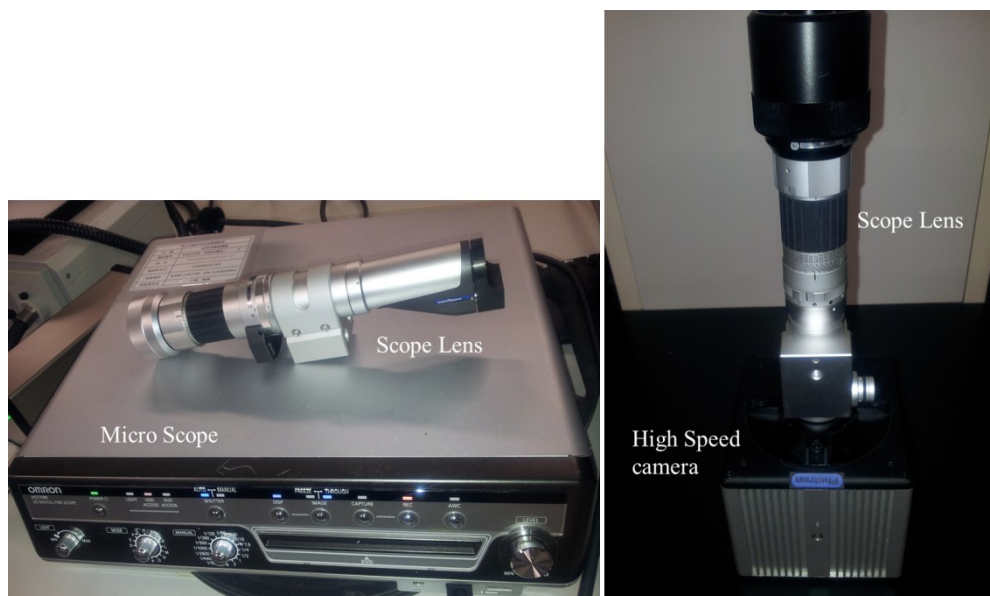
Fig. 3.2 経路選択実験系の概略図

3.3 微小気泡の観測機器について

3.3.1 光学系

透明媒質中の微小気泡の観測には2種類のカメラ(高速度カメラおよびマイクروسコープ)を用いて光学観測を行った。**Fig.3.1(a)**の静水中凝集挙動の観測系においては高速度カメラ(Photron, 1024-PCI)に倒立顕微鏡(Leica, DMRIB)またはズームレンズ(HIROX, CX5040SZ)を接続して観測を行った。高速度カメラに関しては最大フレームレートが109,500 fpsであるが、高フレームレートでは視野範囲や照明に制限があるため、本研究では125~500 fpsの範囲で撮影した。なお、発振器で生成したトリガ信号により、音波照射開始のタイミングと録画開始のタイミングを同期した録画が可能である。倒立顕微鏡の対物レンズは倍率10xと20xの2種類を使用した。ズームレンズは

可変倍率(50-400倍)で作動距離は63 mm、被写界深度は2.7 mmのものを使用した。また、**Fig.3.1(b)**の経路選択実験用にはマイクロ스코ープ(HIROX, VC7700R)に可変倍率のマクロズームレンズ(HIROX, MXG-MACROZ VI)を接続して使用した。マイクロSCOOPは最大15 fpsでカラー動画録画が可能であり、前項**Fig.3.2**の経路選択用実験系に取り付けることが出来る。マクロズームレンズの倍率は5-50倍、作動距離は60-90 mmである。各カメラの写真を**Fig.3.3**に示す。



(a) マイクロSCOOP

(b) 高速度カメラ

Fig.3.3 各カメラの写真

3.3.2 超音波診断装置

血液の気泡を観測する場合には光透過性が著しく低下し、光学観測が困難になることから超音波診断装置を用いる。装置はGE Healthcare社製LOGIQ7を用いた。**Table 3.1**に診断機のスペックを示す。

Table 3.1 超音波診断機のスペック

	LOGIQ7
寸法(幅×高さ×奥行) [mm]	599×1680×999
重量[kg]	215
表示モード	Bモード, Mモード, カラー, パワー, PW, CW
設定音速[m/sec]	1540

LOGIQ7に搭載されているプローブは、表在組織用のリニアプローブ(11L, GE Healthcare)と腹部用のコンベックスプローブ(4C, GE Healthcare)の2種類があるが、本実験ではリニアプローブを使用する。**Fig.3.4**にLOGIQ7に搭載されているリニアプロ

プローブの外観と画像の形状を示す。リニアプローブでは振動子が一直線上に配列されていることから描出される画像の形状は右図の様になる。電子走査によって振動子から超音波ビームが照射され画像が生成される。その際に照射される超音波ビームは、隣り合う複数個の振動子から生成することでフォーカスをつくることができ、方位分解能を向上させることができる。フォーカスの位置はユーザーが変更することが可能であり、人工血管を撮像する際には適切な位置に設定することで描出精度を向上させることができる。Table 3.2 に撮像パラメータを示す。



Fig.3.4 LOGIQ7 に搭載されているリニアプローブと画像の形状

Table 3.2 撮像パラメータ

Mode	B (CHI)
Frequency [MHz]	12
MI	0.23
Depth [mm]	30
Focal [mm]	20
Acoustic Output[%]	20
Frame rate [Hz]	21

3.4 超音波照射制御系

3.4.1 各トランスデューサの詳細

トランスデューサとは、内部のセラミック振動子が電圧印加により生じる固有の周波数振動を、音響レンズを通して一定の超音波ビームとして出力する装置である。そして形成される超音波ビームの形状により平面型(Plane)と集束型(Focal)の 2 種類に大別される。平面型はビーム幅が広く広範囲に安定した音圧をかけることができ、集束型は音波が焦点に集められるため焦点付近でしか高い音圧を得られないが、同じ入力電圧に対して平面型よりも高い音圧を得られるといった特徴がある。実験に使用した単板振動子の詳細を Table 3.3 に示す。各トランスデューサの表記は 3P-sin のようにした。先頭の数字は中心周波数[MHz]を示し、数字に続くアルファベット P もしくは F は平面

型(Plane)か集束型(Focal)の頭文字を示している。最後の-sin は単板振動子であることを示す。以降それぞれの単板振動子をこのように表記する。

Table 3.3 使用した単板振動子トランスデューサの詳細

Central frequency [MHz]	Symbolic number	Focus type	Focal length [mm]	Diameter of the elemnt [mm]	Beam width [mm] [31-33]
3	3P-sin	Plane	-	11	6.0
5	5P-sin	Plane	-	8.5	5.1
7	7P-sin	Plane	-	7.5	3.8
10	10P-sin	Plane	-	6.5	4.0
5 (Broad band)	5'P-sin	Plane	-	10	5.6
3	3F-sin	Focal	60	18	3.4
5	5F-sin	Focal	60	15	2.8
7	7F-sin	Focal	60	12	2.2
10	10F-sin	Focal	60	10	2.2

一方で、アレイ型トランスデューサは本研究室で 2 種類保有しており、中心周波数の帯域により開口、素子サイズが異なる。中心周波数 1 MHz の素子 (1K2.9x2.9I-64CH P=3.0, ジャパンプローブ)、および中心周波数 3 MHz の素子 (3K1.9x1.9I-64CH P=2.0, ジャパンプローブ)の詳細を **Table 3.4** に示す。各トランスデューサの表記は 1A-64ch のようにした。先頭の数字は中心周波数[MHz]を示し、数字に続くアルファベット A はアレイ型素子(Array)の頭文字を示している。最後の-64ch は配列された素子数が 64 素子であることを示す。以降それぞれのアレイ型トランスデューサをこのように表記する。

Table 3.4 使用したアレイ型トランスデューサの詳細

Central frequency [MHz]	Symbolic number	Element	Element size [mm]	I_{spta} (64 elements)
1	1A-64ch	64 (8x8)	2.9 x2.9	850 mW/cm ²
3	3A-64ch	64 (8x8)	1.9 x1.9	270 mW/cm ²

3.4.2 単板振動子の制御系

Fig.3.5 には単板振動子から音波を照射する際の超音波制御系の接続図を示す。本研究で用いた発振器(エヌエフ回路設計ブロック社、WF1946B)は外部トリガ信号により制御が行えるので、外部トリガ信号によりハイスピードカメラとの同期を行なってい

る。しかし、いずれの発振器も最大出力が 20 V-pp であり、そのままトランスデューサに印加しても十分な出力が得られないため、アンプで増幅させた信号をトランスデューサに印加した。なお、アンプはアンプ A(サムウェイ社、A50-1601)、アンプ B (サムウェイ社、T145-5016) の二台を用いた。また、アンプ接続による信号の遅れの可能性が考えられるため、音圧分布測定実験系において発振器出力とハイドロホン受信電圧をオシロスコープで行い遅れ時間の測定を行なったが、遅れ時間は 57.2 μ s であり、本研究で用いる最高フレームレートは 500 fps であるので、同期には影響しないものと考えられる。

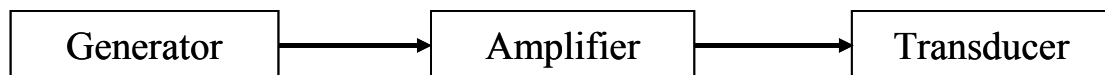


Fig.3.5 超音波照射制御系の接続図

ここでバースト発振を複数の単板振動子で行う場合、それぞれの駆動のタイミングと休止時間を同時に制御しなければならない。そこで発振器の内部トリガを用いた 2 チャンネル同時制御を用いる。発振器のシーケンス発振機能については波形・周波数・振幅などのパラメータの他、バースト発振の際には duty 比と PRF をプログラムして出力信号を自在に制御する機能である。内部トリガの設定では最大 2 チャンネルまで制御可能で、例えばチャンネルごとに発振の切り替えや同時発振、遅延を持たせた発振が設定可能となっている。2 チャンネル以上を同時に制御するには、別にもう 1 台の発振器を用意し、何らかの手段で外部トリガ信号を生成することで可能になるが、ここでは同時制御を 2 チャンネルまでとし、1 台の発振器のみで制御を行う。

3.4.3 アレイ型トランスデューサの制御系

Fig.3.6 に 64 チャンネルを持つ超音波 2D アレイ駆動装置(BASE64)を示す。駆動周波数は 1,3,5,7 MHz が設定可能で、矩形連続波による駆動としている。ここで、矩形連続波を用いるのは、正弦波での駆動に比較して、高い音響パワーを得やすいためである。BASE64 は、各素子に等しい電圧を印加することができ、各素子に異なる位相(遅延時間)を与えることができるフェーズドアレイである。遅延時間は 5,10,15,...,2000 ns の量子化遅延ピッチに、1~64 までの係数を掛けた時間を設定できる。



Fig.3.6 超音波 2次元アレイ(BASE64)のプロープ(左)と駆動装置(右)

超音波 2次元アレイを用いた送受波器の動作といものは、遅延線により振動子の振動する位相を制御することができ、これによりビーム方向を制御する[54]。超音波診断装置などの画像系は反射されたビームを検波することで、音響映像を獲得する。以下に音波の送信・受信(送受波)において、単板振動子に対する超音波 2次元アレイの利点まとめる。

単板の振動子を受波に用いる場合には指向性を変えることが物理的に不可能である。従って、音響映像を得ることを考えるならば、受波器を機械的に回転ないし移動させることで、送波された音波ビームを走査する必要がある。一方で超音波 2次元アレイは、複数の微小振動子に異なる電子的な遅延を与えることで指向性を変えることができる。原理上、複数のビーム制御回路を並列に用いることが出来るため、1回の受波で複数の試行特性を生成することができる。このことから、送波された音波ビームに対し、様々なデジタル処理を行うことで、音響映像形成の高速化・高精度化が実現可能である。

単板の振動子を送波に用いる場合、受波の場合と同様に、振動子の形状により音場形状が決定される。このため、例えばビームの照射位置を変更する必要があるならば、振動子の位置・姿勢を変えて目的の方向にビームを合わせる必要がある。一方で超音波 2次元アレイは、電子的な位相制御により任意の方向にビームを向けることが出来るので、振動子の位置決めの手間を減らすばかりか、数 10 μs 程度の間隔で非

常に高速なビームの切り替えが可能である。なお、送波の場合は、受波の場合とは異なり、振動子から音場を形成する過程が存在することから、複数のビーム制御回路を用いることは困難で、通常は1回の送波で1種類の音場しか形成出来ない[55]。

3.5 音圧分布の測定

3.5.1 音圧分布の測定方法

Fig. 3.7 には単板振動子に対し同じ 9.30 V-pp の入力電圧を印加した時の集束型 (5F-sin) と平面型 (5P-sin) の音圧分布を示す。

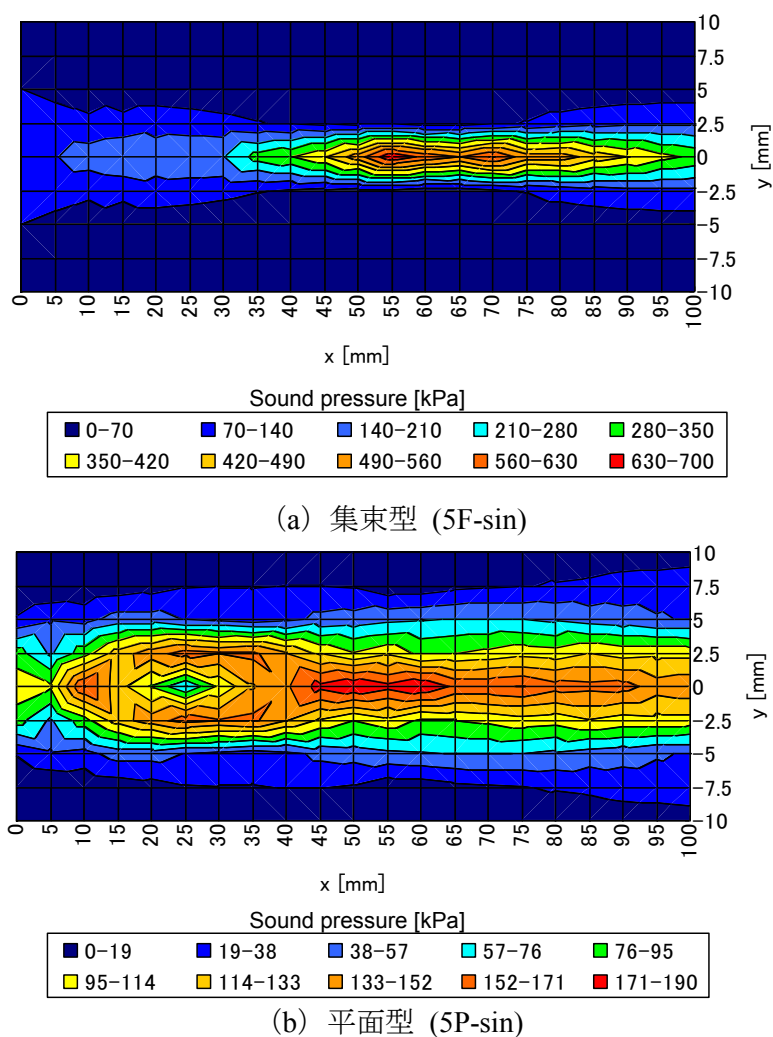


Fig. 3.7 同じ入力電圧に対する音圧分布

ここで、実験に用いる際にトランスデューサから照射される音圧分布を測定する必要があるが、平面型トランスデューサ (3P-sin、5P-sin、7P-sin、10P-sin) に関しては過去に測定が行われているため[29-32]、以降では集束型の単板振動子とアレイ型トランスデューサの音圧分布測定を示す。

まず、単板振動子の測定の場合を示す。音圧分布測定にはニードル型 hidroホン (ONDA 社、HNR-1000) を脱気水で満たした水槽内でトランスデューサと対向する向きに設置し、 $x-y-z$ ステージ (中央精機社) で移動させて各点における音圧を測定した。水槽には超音波の反射が起きないように縦横高さの十分な大きさを持つ水槽を使用した。得られた波形の解析は hidroホンに接続してあるオシロスコープ (LeCroy 社、waveRunner 44MXi) より行った。尚、測定にはデューティ比 0.1 以下のバースト正弦波を利用している。これは連続正弦波だとトランスデューサと hidroホン の間で超音波が多重反射して定在波を形成し、正確な音圧測定が行えなくなるためである。実際の測定の様子を Fig. 3.8 に示す。

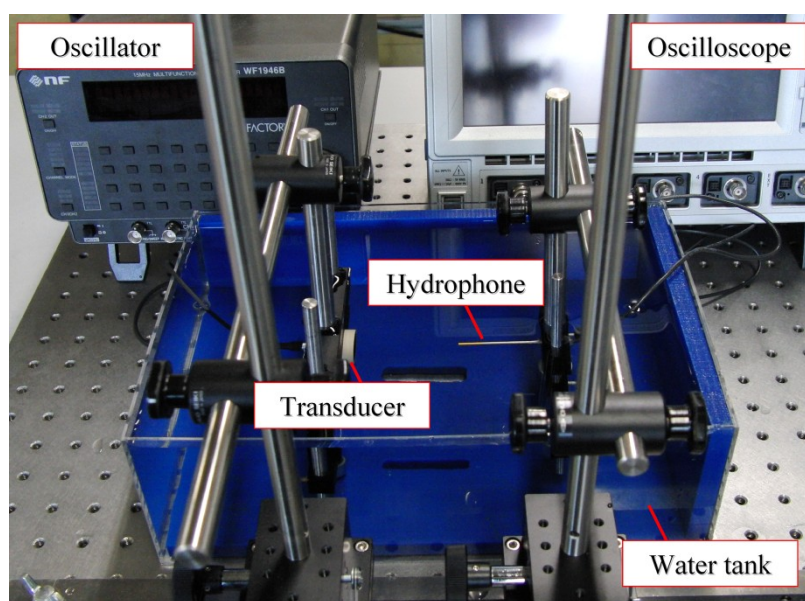


Fig. 3.8 単板振動子の音圧分布測定の様子

音圧の測定は音軸方向にトランスデューサ表面より 20~120 mm の範囲を 5 mm 間隔で、音軸に直交する方向には音軸から 5 mm までの範囲を 1 mm 間隔で行なった。オシロスコープより測定した電圧波形は式(3.1)を利用する事で音圧に変換出来る。

$$P = \frac{V_{-pp}}{K} \quad [\text{kPa}] \quad (3.1)$$

ここで V_{-pp} は測定した電圧波形の全振幅値、 K は hidroホン固有の周波数に対する校正定数である。

Fig.3.9 に用いた 4 種類の集束型トランスデューサ(3F-sin、5F-sin、7F-sin、10F-sin)の音軸上の分布と焦点部の音軸と垂直な向きでの音圧の分布を示す。音圧の縦軸は最大値で正規化した音圧で横軸はトランスデューサ中心からの距離である。

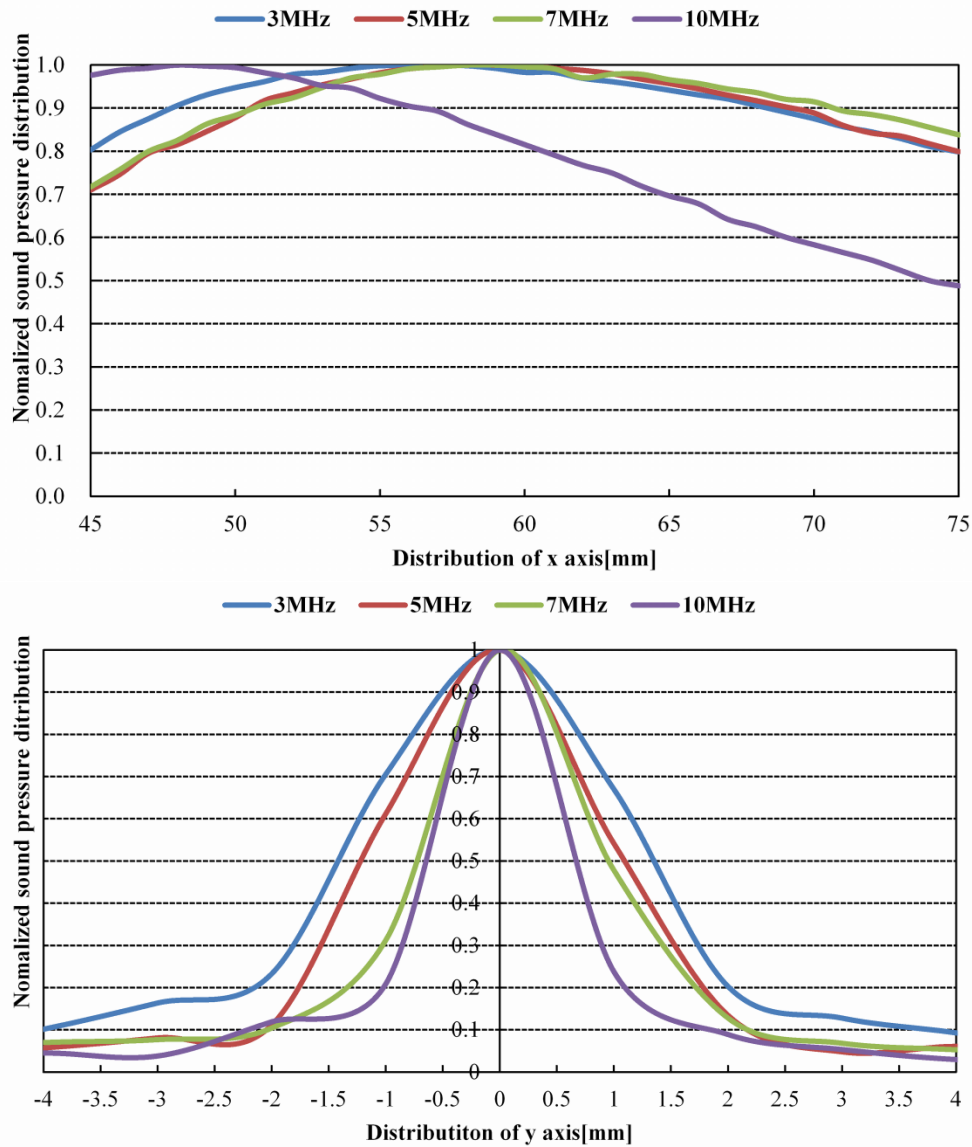


Fig.3.9 狭帯域トランスデューサの音圧分布

次にアレイ型トランスデューサの音圧分布測定を示す。**Fig.3.10** に音圧測定の実験系を示す。ハイドロホンを把持している治具は、自動音圧測定システム(ONDA AIMS)で、水槽との一体型である。水槽内でハイドロフォン(ONDA HNR-1000)とアレイ素子とを対向させ、実験で使用する各音場パターンの音圧分布の測定を行った。アレイ型トランスデューサはトランスデューサ表面の中央部を原点とし、音波の進行方向に z_{Tr} 軸を持つトランスデューサ座標系を定義する。各素子には 2.5 節の方法で計算した遅延時間を割り当てた。1A-64ch の測定時には音圧測定には、BASE64 から入力する矩形波の周波数は 1 MHz、各素子に印加する電圧を 10 V-pp とし、トランスデューサ表面の中央部を原点とした $z_{Tr} = 50$ mm もしくは $z_{Tr} = 60$ mm の x_{Tr} - y_{Tr} 平面で、 x_{Tr} 軸方向に -15~15 mm、 y_{Tr} 軸方向に -15~15 mm それぞれ 1.0 mm 間隔で 31 x 31 点で測定を行った。また、3A-64ch の測定時には音圧測定には、BASE64 から入力する矩形波の周波

数は3 MHz、各素子に印加する電圧を15 V-ppとし、トランスデューサ表面の中央部を原点とした $z_{Tr} = 60$ mm の x_{Tr} - y_{Tr} 平面で、 x_{Tr} 軸方向に-5~5 mm、 y_{Tr} 軸方向に-5~5 mm それぞれ 0.5 mm 間隔で 21 x 21 点で測定を行った。なお、AIMS の稼働領域は、800 x 510 x 510 mm³ である。また、AIMS の位置決め精度は 300 mm 以上の移動においても絶対精度が 25 μ m、繰り返し精度は 12 μ m である。

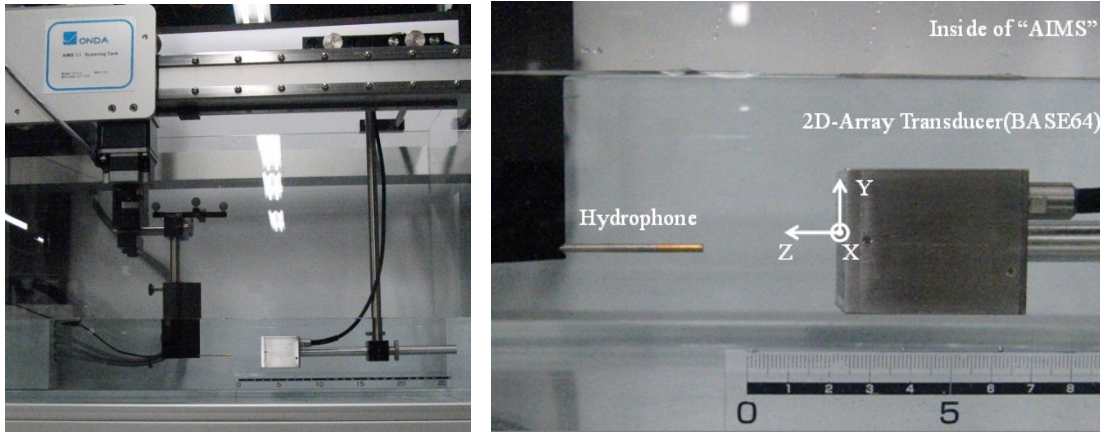


Fig.3.10 音圧測定の実験系 (左:AIMS 全体図、右:拡大図)

3.5.2 アレイ型トランスデューサの音圧分布

1A-64ch を用いてフォーカス点(0,0,50) [mm]に単焦点を形成したときの各素子に設定する遅延時間と、 $z_{Tr} = 50$ mm で測定した 2 次元の音圧分布を Fig.3.11 に示す。

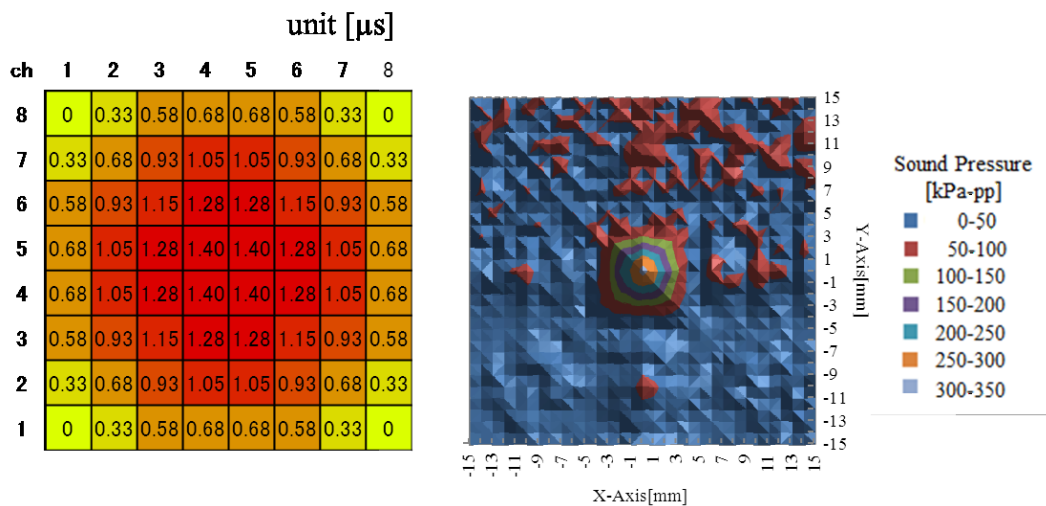


Fig.3.11 単焦点形成時の 1A-64ch の遅延パターンと音圧分布 (左:各素子の遅延パターン、右: $z_{Tr} = 50$ mm で実測した音圧分布)

複数焦点を形成する場合のアルゴリズムは各焦点に使用する素子をあらかじめ決

定し、各素子の遅延時間を計算する方法である。本実験ではこの方法で 32 素子ずつ斜めに分割して計算した。

Fig.3.12 に 1A-64ch を用いて(a)32 素子のみを用いて単焦点を形成した場合と、(b)もう一方の 32 素子も使用して複数焦点を形成した場合の遅延パターンと音圧分布を示す。なお、遅延時間が表示されていない素子は発振しないことを示す。

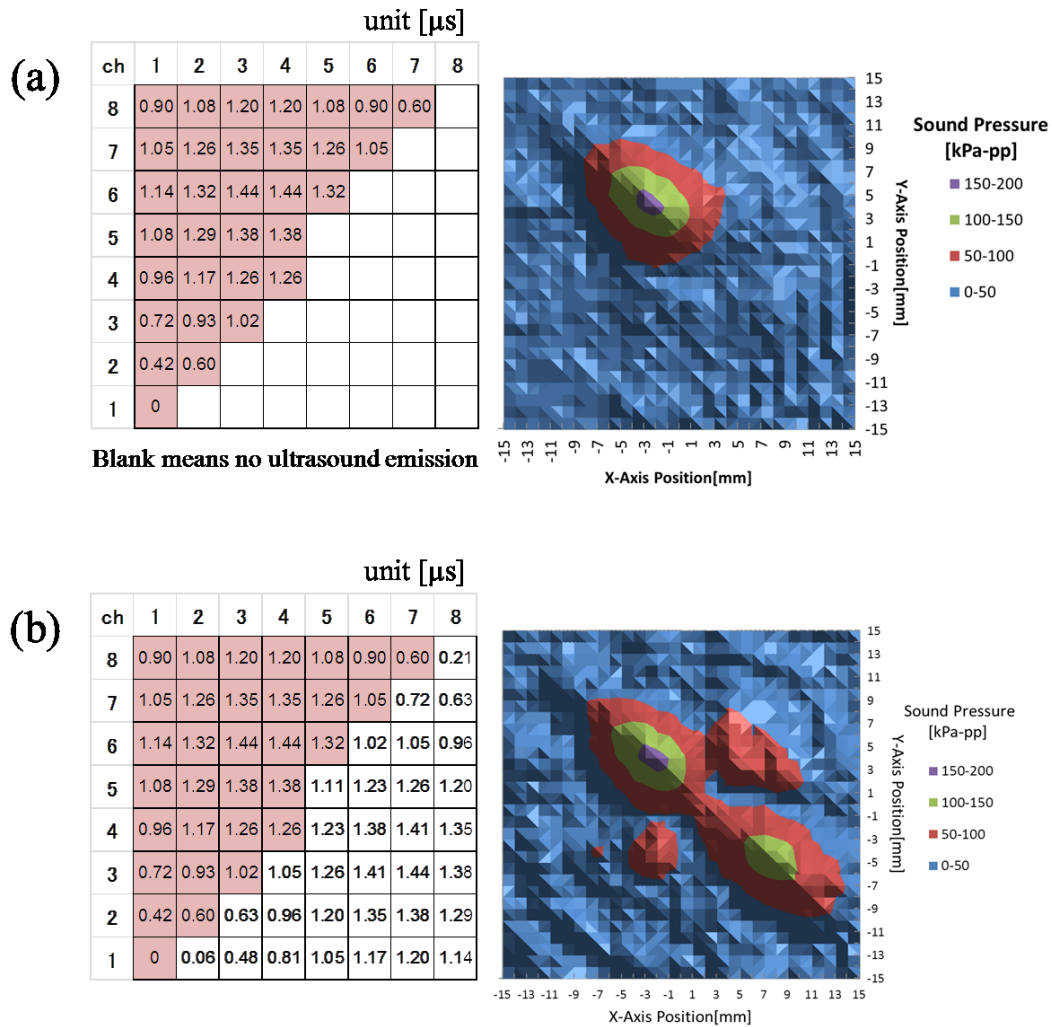


Fig. 3.12 分割使用時の 1A-64ch の遅延パターンと音圧分布
(左:各素子の遅延パターン、右: $z_{Tr} = 60 \text{ mm}$ で実測した音圧分布)

Fig.3.13 に 3A-64ch を用いて(a)32 素子のみを用いて単焦点を形成した場合と、(b)64 素子を用いて単焦点を形成した場合、(c)32 素子ごとに分割して複数焦点を形成した場合の遅延パターンと音圧分布を示す。

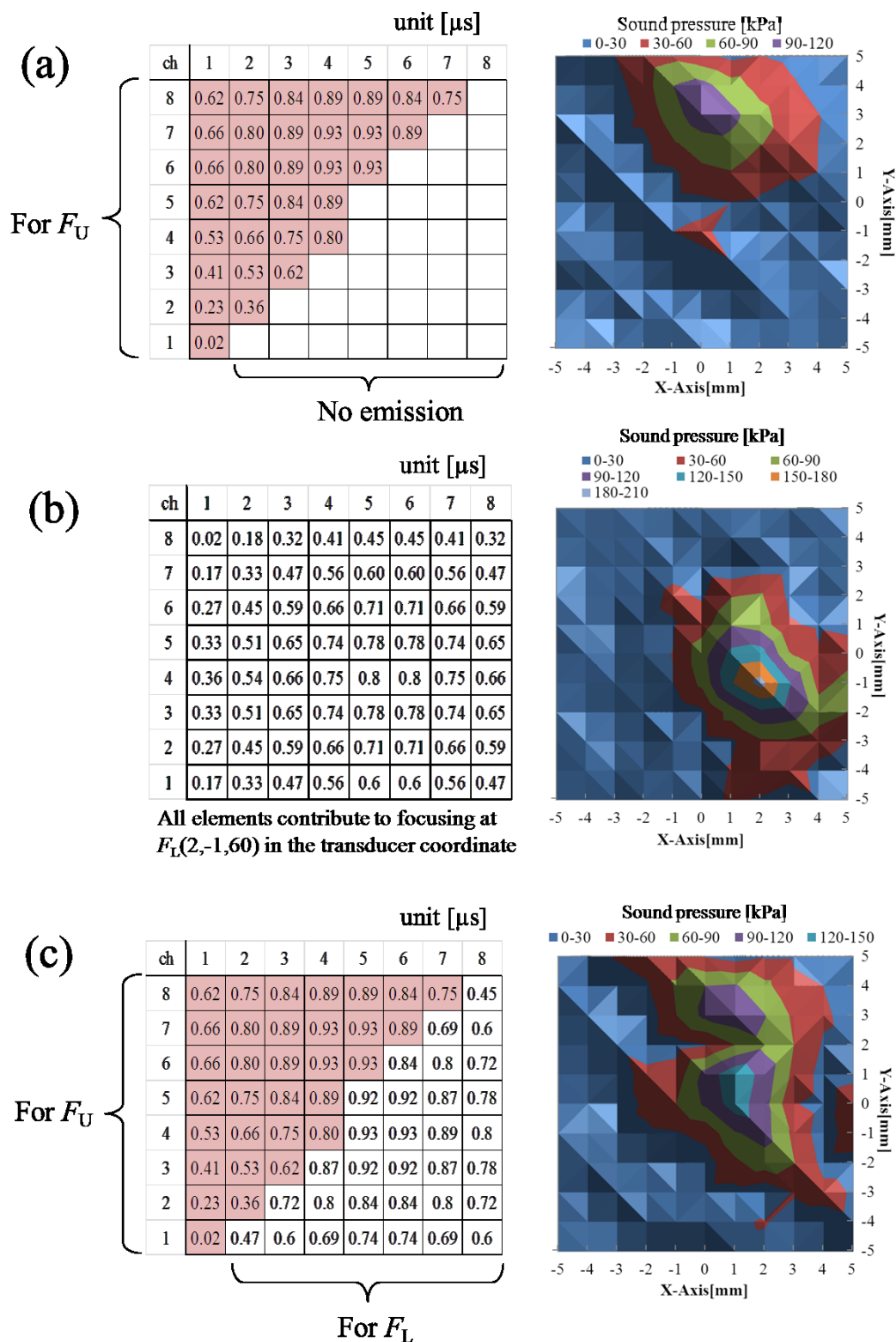


Fig. 3.13 分割使用時の 3A-64ch の遅延パターンと音圧分布 (左:各素子の遅延パターン、右: $z_{Tr} = 60$ mm で実測した音圧分布)

3.6 微小気泡の分類について

本研究で使用する微小気泡は殻の材質・サイズ・内包するガスの種類・使用する用途などによりマイクロカプセル、マイクロバブル、バブルリポソームに分類される。これまでの研究では、超音波を受けた微小気泡の挙動の基礎的な解析をマイクロカプセルを用いて行い、応用性の評価に第2世代超音波造影剤である医療用マイクロバブルを用いて、それぞれ制御可能であることを示してきた[29-33]。さらに本研究では造影目的だけでなく薬物遺伝子キャリアとしての観点からも開発が進められているバブルリポソームについても本手法への適用を行っていく。バブルリポソームはマイクロバブルと同様に医療目的で開発されており、速やかに生体適用に進むことが出来る。以下にそれぞれの特性を述べる。

3.6.1 マイクロカプセル[56]

マイクロカプセルとは、ミリオオーダーからナノオーダーの範囲の容器を意味する言葉として用いられたのが最初で、マイクロカプセルの膜物質を形成する材料は主に天然及び合成高分子が用いられる。マイクロカプセルの内部に封入される物質は、医薬・顔料・香料・反応触媒などで液体や気体の状態で用いられる。また最近ではマイクロカプセルの膜物質に生分解性高分子を使用することによって体内へ導入することができるものが開発され超音波造影剤として注目されている。今回の実験で使用するマイクロカプセルは、超音波断層像で観察する際に観察を容易に行え、市販されていて入手も容易にできるものとして、松本油脂製薬社製のマツモトマイクロスフェア[®]FシリーズのF-04Eを使用することにした。本来マイクロスフェア[®]Fシリーズは立体プリント用インキや断熱材、スリップ防止剤、クッション剤などとして使われている。その中で、マツモトマイクロスフェア[®]Fシリーズは、平均粒子5~50 μm、膜厚は2~15 μmであり、膨張剤として炭化水素が内包されている。耐圧製は300 kg/cm²以上であるため、機械強度は十分ある。また、AN-系コポリマーで組成されたシェルが厚いことにより、耐溶剤性も良好である。マイクロカプセルに関する松本油脂製薬社の製品データをTable 3.5に示す。

Table 3.5 マイクロカプセルの仕様

カプセルの種類	平均粒子径[μm]	固形分(%)	真比重
F-04E	3.51	39.7	0.1662

マイクロカプセルは保存しておくとかプセル同士がくっつき大きな塊となってしまうので、実験をする際は一度塊を潰しながらカプセルの懸濁液を作製し、その懸濁液を20 μmの篩にかけることで直径20 μm以下のカプセルを選別した。Fig.3.14に篩がけで選別した直径20 μm以下のマイクロカプセル(F-04E)の顕微鏡写真を示す。

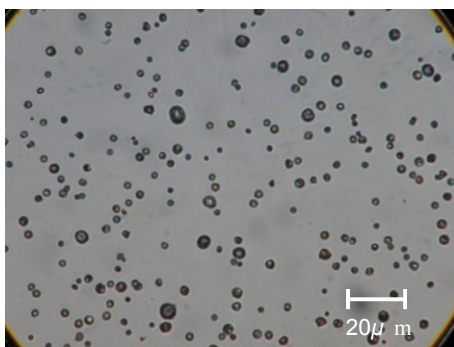


Fig.3.14 篩い分けしたマイクロカプセル(F-04E)の顕微鏡写真

3.6.2 マイクロバブル[57]

ここでは、本研究で用いたマイクロバブルについて説明する。本研究では、マイクロバブルとして、第一製薬(現・第一三共)と米ゼネラル・エレクトリック(GE)のヘルスケア事業部門である GE Healthcare との共同研究開発により創製された第二世代超音波診断用造影剤の Sonazoid[®]を用いた。Sonazoid[®]は 2007 年 1 月から発売された超音波診断用造影剤で、その構造は水素添加卵黄ホスファチジルセリンナトリウムのシェルを持ち、ペルフルブタンを内包する平均粒子径が 2~3 μm のマイクロバブルである。そして診断に用いられる周波数帯の超音波に対して安定である。Sonazoid[®]の顕微鏡写真を **Fig.3.15** に示す。

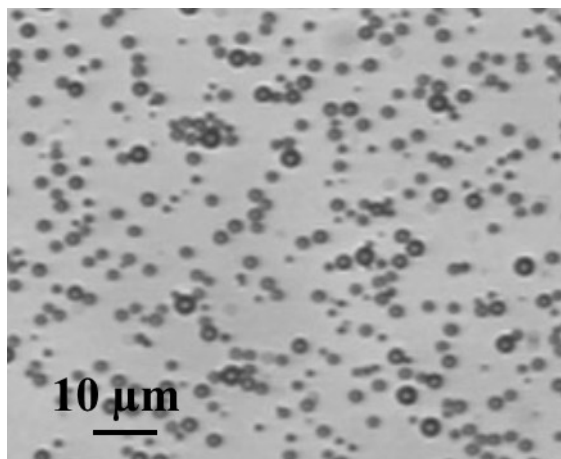


Fig.3.15 Sonazoid[®]顕微鏡写真

Sonazoid[®]は凍結乾燥粉末であるため、使用前には 2 ml の注射用水で懸濁液を調整しなければならず、調整した懸濁液は調整後 2 時間以内に使い切らなければならない。以下に懸濁液の調整手順を記す。

1. 空シリンジに、添付の注射用水から 2 ml を取る。
2. 本剤(凍結乾燥注射剤)に添付のケモプロテクトスパイクを挿入する。
3. 注射用水 2 ml を取ったシリンジをケモプロテクトスパイクに取り付け、注射用

- 水 2 ml をバイアルに入れ、シリンジを付けたまま、直ちに 1 分間振とうする。
4. ケモプロテクトスパイクの内部にあるデッドスペースには注射用水が残っているため、一度シリンジ内へ懸濁液を吸い取り、再度バイアル中に戻す。
 5. 懸濁液採取用の空シリンジをケモプロテクトスパイクに取り付け、投与に必要な量の懸濁液をシリンジに取る。

今回設定した Sonazoid の懸濁液の気泡濃度は 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60 $\mu\text{l/ml}$ の 6 種類であり、これは臨床で造影に使用される際の血液量に占める気泡体積濃度に対して約 30~1000 倍となっている。

3.6.3 バブルリポソーム[58]

本邦で使用できる超音波造影剤 Sonazoid はイメージングに最適化されており薬剤保持機能を有していない。これまでに帝京大学丸山研究室では、薬物・遺伝子キャリアとしての可能性・安全性・汎用性などの観点から新たなバブル素材としてリポソームに注目し、超音波造影ガスを封入したバブルリポソームの開発に成功した。バブルリポソームは従来のリポソームにおける製剤学的技術を応用し、膜表面をがんに吸着する分子(リガンド)で修飾し標的認識性を付与することができる。このバブルリポソームは PEG 修飾されたリポソーム膜にパーフルオロプロパンガスを封入することで調整される。バブルリポソームの光学式顕微鏡写真を **Fig.3.16** に、電子顕微鏡写真および模式図を **Fig.3.17** に示す。また、動的光散乱法により測定した粒径分布を **Fig.3.18** に示す(測定装置:大塚電子 ELS-Z)。

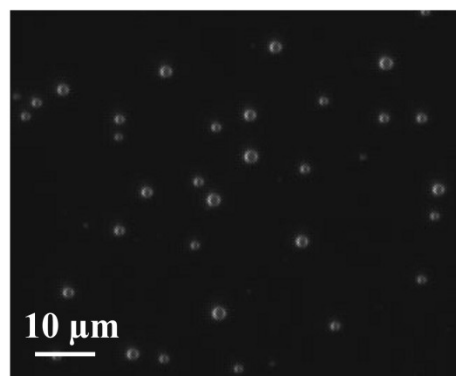


Fig.3.16 バブルリポソームの光学顕微鏡写真

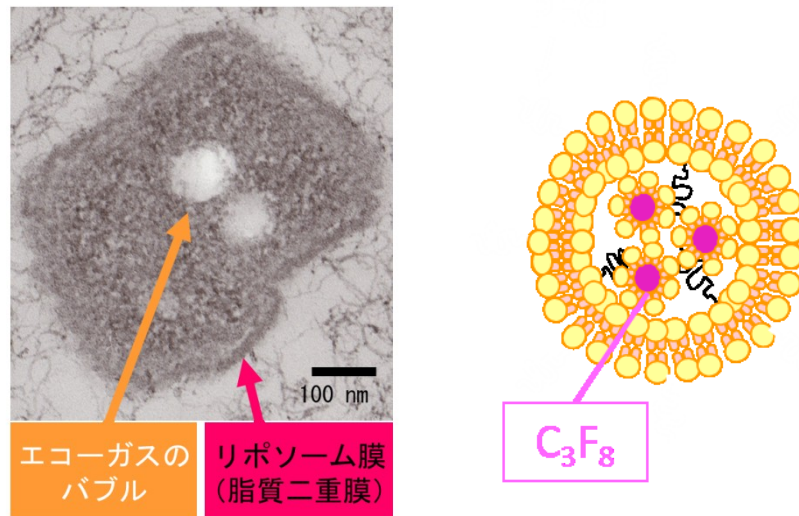


Fig.3.17 バブルリポソームの電子顕微鏡写真(左)と構造の模式図(右)

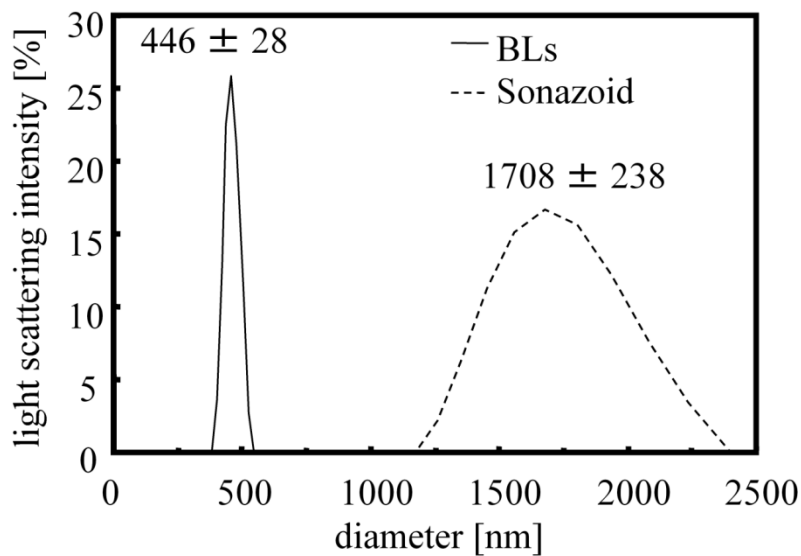


Fig.3.18 バブルリポソームと Sonazoid の直径分布

バブルリポソームの平均直径は約 500 nm である。サイズが小さくなると単位体積当たりの表面積が増えるため安定性に欠けるといった時間制限がある。そのため調整後数十分以内を目安に使い切らなければならない。以下に懸濁液の調整手順を記し、**Fig.3.19** に作成過程の模式図を示す。

1. シリンジを用いて予め空のバイアル容量よりも多い C3F8 ガスをバイアルに注入してガス置換しておく。
2. PBS(リン酸緩衝生理食塩水)もしくは生理食塩水を用いて所望の濃度に調整した liposome 懸濁液(1 mg/ml の脂質濃度が安定)をバイアルに封入後、ロック式シリン

- ジを用いて C3F8 ガスで加圧する。
3. 脱気水を入れたソニケーターにおいて一番波が立っているところで、少しバイアルを振りながら超音波照射(42 kHz, 130 W, 3-5 分間)する。
 4. 脂質安定のため冷蔵保存する。

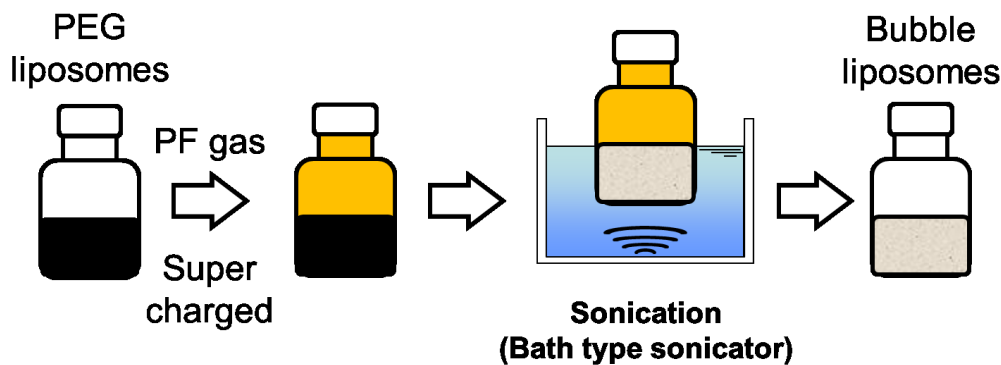


Fig.3.19 バブルリポソームの調整過程

本実験ではソニケーターにバスタイプの超音波振とう器(Branson 2500)を使用し、脂質濃度を 1 mg lipid/ml で調整した。実験の際は生理食塩水(0.9 %)を用いて希釈して使用する。Table 3.6 に Sonazoid との比較を示す。

Table 3.6 バブルリポソームと Sonazoid の比較

	バブルリポソーム	Sonazoid
リン脂質	PC(phosphatidylcholine)	PS(phosphatidylserine)
シェル構造	二重膜	単膜
内部構造	液相+気相	気相
内包ガス	Perfluoropropane(C3F8)	Perfluorobutane(C4F10)
サイズ	500 nm	2-3 μ m
共振周波数	約 8 MHz [59]	2-5 MHz
持続時間	約 10 分	2 時間

3.7 実験で用いるパラメータについて

本節では実験に用いる流速、人工血管流路の流路徑等のパラメータと生体との比較、さらにトランスデューサの周波数と最大音圧について述べる。まず、1.1.1 節で述べた本手法の対象となる流速や血管径に関しては、定常流で血管の太さが 2 mm 以下、流速 50 mm/sec 以下となる血管を対象とした。その理由を以下に述べる。

本研究では治療対象とする臓器は肝臓としている。肝臓に流入する血管は大動脈から分岐した肝動脈と腸管を循環してきた静脈血を集めた門脈の2本が存在し、肝血流のうち10-25%は肝動脈より、70-80%は門脈より供給されている[60]。肝動脈からの血液も門脈からの血液も肝臓内に入ってから同じ血管系に入って肝臓内を循環し、肝静脈より流出して下行静脈に入る。血流は心臓の拍動により、脈流になって全身をめぐっている。しかし肝臓の場合、供給される血液の70-80%は門脈に由来しているため動脈から直接血液供給を受ける他の臓器と異なり、*in vivo*では定常流に近い[61]。

まず、肝臓内門脈の血管径であるが、本幹入口の血管径は12 mm程度、第2次・第3次分枝で8-10 mm程度となり、以降分岐を繰返すごとに血管径は細くなっていく。そして肝臓内で分岐を繰返したのち毛細血管となり、これらは再び合流して肝静脈となる。このうち、本手法の適用範囲はカテーテルの到達限界を想定して決定した。現状のカテーテル治療では、カテーテルを目的位置まで挿入する際には多くの場合にガイドワイヤーが使用されている。これは長い金属性のワイヤーであり、熟練した医師または技師はこのワイヤーを用いてカテーテルの誘導を行う。まず、このワイヤーの根元の操作により血管内を通してこのワイヤーを治療目的の近くまで到達させ、そのあとにこのワイヤーに沿わせて目的部位までカテーテルを挿入し、その後不要となったガイドワイヤーを引き抜く方法となっている。この方法ではカテーテルを挿入できる血管の太さが、ガイドワイヤーとカテーテルが同時に挿入できる太さに制限されるため、現行の最小血管径は脳内血管の2 mm (6 Fr)程度が限界であると言われている[62]。よって本手法の適用血管径はカテーテルが到達できない2 mm以下の直径とした。

次に、対象の流速について述べる。亀子らの報告によると肝内門脈二次分枝血流速度は 7.3 ± 1.9 cm/sである[63](本幹の流速は13 cm/s程度)が、門脈の血流速度は末梢に行くに従い遅くなり、本研究の対象である2 mm以下の径となるような分枝では血流速度はさらに遅いことが予想される。よって本研究では流速50 mm/sec以下を対象とした。

また、門脈以外の血管径や流速に関して、Table 3.7、Table 3.8に示す。実験で用いる流速は40-50 mm/sであり、生体内においてはおよそ動脈～毛細血管～静脈のものになっている。そこで流路径が2 mmから始まり分岐を繰返すたびに径が徐々に小さくなり、最終的に1 mm以下の径になるようなモデル流路で制御可能であるならば、実際の生体内において動脈～毛細血管～静脈の範囲で実現が可能であると考えられる。

血管径と音波のビーム径に関しては、Table 3.1に示したように周波数によって音波のビーム径は異なるが、低い周波数の最も太いビームでスポット径は半値幅6 mm程度、高い周波数の最小スポット径が半値幅2 mm程度である。そのため、いずれの周波数においても超音波ビームが2 mm以下の血管径を覆うことができ、また照射箇所以外の周辺部への影響が少ないビーム径となっている。

Table 3.7 各血管における血流速度

	上行大動脈	動脈	毛細血管	静脈	大静脈
血流速度 (mm/sec)	300~600	200~500	0.5~1	150	110~160

Table 3.8 生体内における各血管径

	大動脈	動脈	細動脈	毛細血管	細静脈	静脈	大静脈
内径	25mm	4mm	20um	5um	20um	5mm	30mm
壁の厚さ	2mm	1mm	15um	1um	2um	0.5mm	1.5mm

続いて、超音波の周波数と最大音圧について説明する。超音波が生体に及ぼす機械的衝撃に対する指標としてMI(Mechanical Index)値が挙げられる。これは式(3.1)で表され1.0以下が安全使用範囲として定められている。ここで P [MPa]は超音波の負圧を表し、 f [MHz]はトランスデューサの中心周波数を表す。Fig.3.20 に各周波数でのMI値を示す。

$$MI = \frac{P}{\sqrt{f}} \quad (3.1)$$

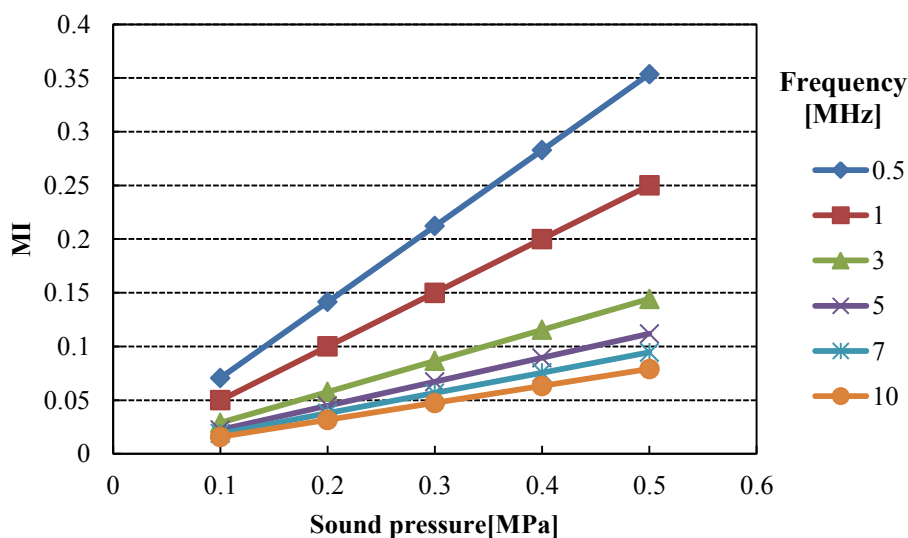


Fig.3.20 MI 値

本研究で使用するMI値は全て1.0以下に抑えており生体に対して有害な値は用いてはいない。

続いて生体内の構造物の影響について各臓器の音響インピーダンスの違いと減衰

率から説明する。Table 3.9 に各臓器の音響インピーダンスの値を示す。生体内では音響インピーダンスの違いにより反射が発生するが、骨やガスを含む肺や腸などの臓器以外では生体内臓器の音響インピーダンスは水に近い値である。よって生体内の構造物の位置情報をあらかじめ取得しておくことで、超音波ビームの経路が骨やガス臓器を通過しないように設定すれば、ほぼ反射の影響を受けずに音波照射が可能となる。さらに超音波は伝搬する距離に応じて減衰する特性がある。減衰率は液体の場合に周波数の2乗に比例した値であるが、生体組織内では拡散・吸収・散乱の各種減衰を合わせて周波数の1乗に比例した値として扱う。従って、人体深部を診断する際には低周波の超音波を、反対に浅い組織の診断には高周波の超音波が使われる[61]。一般に肝臓や胎児を検査する場合には3-5 MHzの比較的低い周波数が用いられ、眼科領域や頸動脈の検査などでは10-20 MHzの高周波数が用いられる。本研究では腹部・深部領域の検査に使われる周波数範囲として微小気泡誘導の際に用いる周波数を1-5 MHzと設定する。

Table 3.9 各臓器の音響特性[64]

	密度 $\times 10^{-3}$ (kg/m ³)	伝搬速度 (m/sec)	固有音響インピーダンス $\times 10^5$ (kg/m ² /sec)
血液	1.06	1560~1600	1.68~1.70
血漿	1.00	1530~1550	1.53~1.55
骨	1.38 ~1.8	2800~3700	3.86~6.70
脂肪	0.92	1480	1.35
腎臓 ¹⁾	1.04	1560~1590	1.62~1.64
肝臓	1.06	1550~1610	1.64~1.71
筋肉 ¹⁾	1.07	1580~1610	1.68~1.72
水	1.00	1480	1.48
空気 ²⁾	1.3×10^{-4}	344	0.0004

1) 犬 2) 20°C

3.8 人工血管の概要と粘性流体および生体試料について

3.8.1 流路系の概要

本研究で使用する流路系の接続図を Fig.3.21 に示す。上流から吸引用容器、模擬血管流路、空気ダンパー、ペリスタルティックポンプ (GILSON 社, MINIPULS evolution, 以下ポンプ)、排水用容器の順に PVC 製のチューブを用いて接続し、懸濁液注入用の注射器を吸引用容器と模擬血管流路をつなぐチューブに接続した。ポンプはロータリー式のもので、回転方向、及び回転数を任意に制御可能であり、スペック

シートに記載してあるグラフを利用し、各径のチューブに対する任意の流速を設定出来る。しかし、その原理上脈流が発生してしまうので空気ダンパーを用いて脈流の発生を抑えている。また、ポンプの位置であるが模擬血管流路に対して下流側から引っ張る形にすることで、Y字型分岐流路を用いた際に分岐後のそれぞれの流路に同量の水が流れるようになっている。

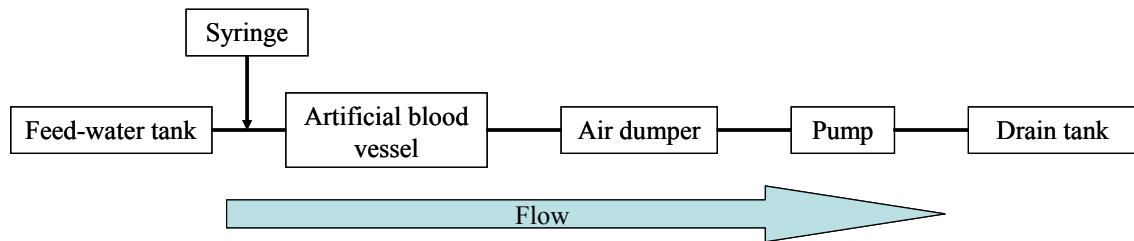
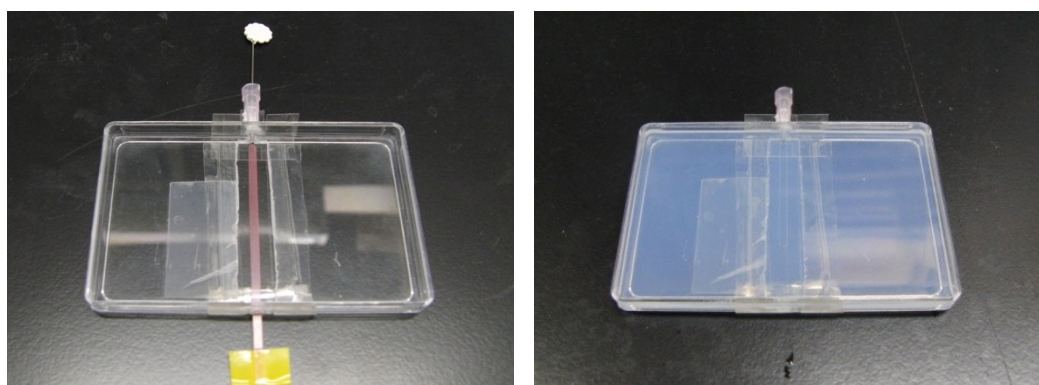


Fig. 3.21 流路系の接続図

3.8.2 PEG 製流路作成方法

微小気泡の観測に必要な模擬血管流路を作成するために、超音波透過性に優れたダイヤモンドスーパー(菱晃)を使用した。これはA液{主剤、促進剤、水}とB液{硬化剤、水}を混ぜることにより起こる化学反応を用いて、超音波透過性の良い Polyethylene Glycol (ポリエチレングリコール、以下 PEG：音速 1540-1560 m/s、密度 1.27 g/ml) の固体を作成する物である。よって、これらの分量をメスシリンダー及び電子秤で調節することにより、実験に必要なサイズの模擬血管流路を自由に作成することが可能であり、十数分もあれば作成できるので非常に便利である。模擬血管の作成は、プラスチック容器に型を形成し、そこに A 液、B 液を流し入れる。反応が収まり、PEG が形成されたら型を慎重に抜き取ることで、流路が完成する。以下に実験に用いた流路の詳細について述べる。静水中での挙動観測のため平板の断面を持つ流路を作成した。プラスチック容器に2ヶ所穴を開け、チューブ接続用のコネクタを取り付けてから、Fig. 3.22 に示すように厚さ 0.3 mm、幅 1.5 mm の断面を持つシート片を型とすることで平板流路を作成した。



(a) 型の作成

(b) 完成した平板流路の概観

Fig.3.22 平板流路の作成

同様の方法で Y 字型流路を作成した[32]。Y 字型分岐流路は寸法が $85 \times 55 \times 15 \text{ mm}^3$ のプラスチック容器側面の 3 ヶ所に穴を開けてチューブ接続用のコネクタを取り付け、型として直径 1.4 mm の棒 1 本と直径 1.0 mm の棒 2 本を Fig.3.23 のように 1 点で合わせることで作成した。なお、3 本の真鍮棒の先端は隙間なく噛み合うように加工してある。Fig.3.24 に使用した型と完成した流路の外観を示す。

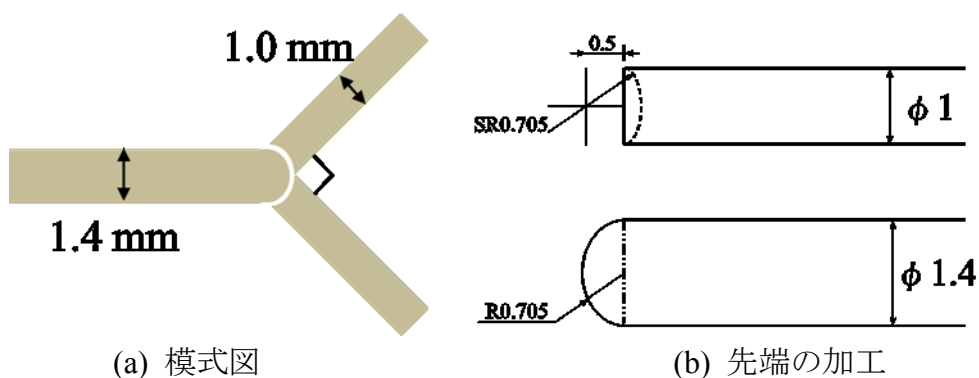


Fig. 3.23 Y 字型分岐支柱棒の模式図と先端の加工

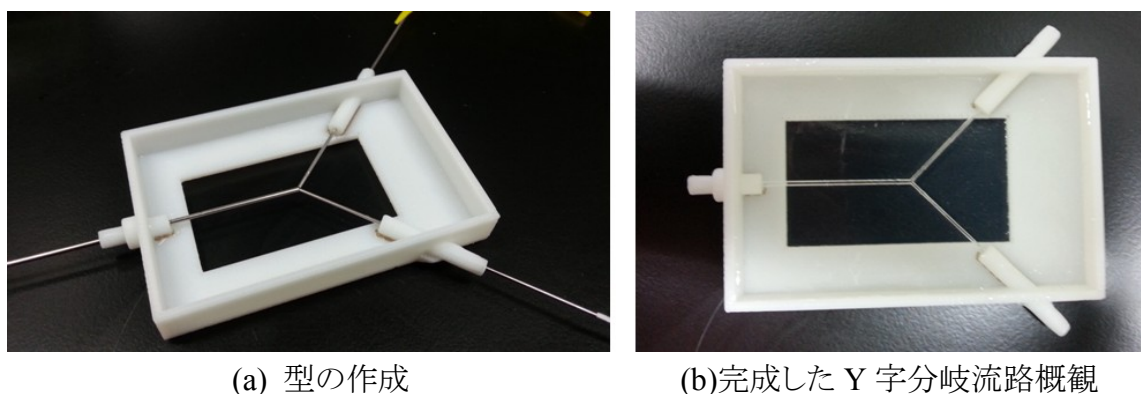


Fig.3.24 Y 字型分岐流路製作過程

3.8.3 PVA 流路(多分岐流路)について

多分岐流路は音速(1520-1550 m/s)、密度(1.2 g/mL)であるポリビニルアルコール(PVA)を原料とし、空間分解能 $100 \mu\text{m}$ を有するグレイスケールリソグラフィ技術を使用した流路型を用いて作製した。Fig.3.25 に多分岐流路の概略図および外観図を示す。この外形寸法 $180 \times 70 \times 8 \text{ mm}^3$ である。流入口における流路径は 2 mm であり、流路の断面は正方形、そして中央部まで分岐を繰り返し、徐々に流路径が細くなっていき、最小流路径は 0.5 mm となる。また中央部以降は分岐した流路同士が収束し合いながら 1 本の流路となる。Table 3.10 の I~V は流路の幅と断面積を表しており Fig.3.31 に示すものと一致している。さらに流路のどの部位においても流速が一定となるように

設計している。

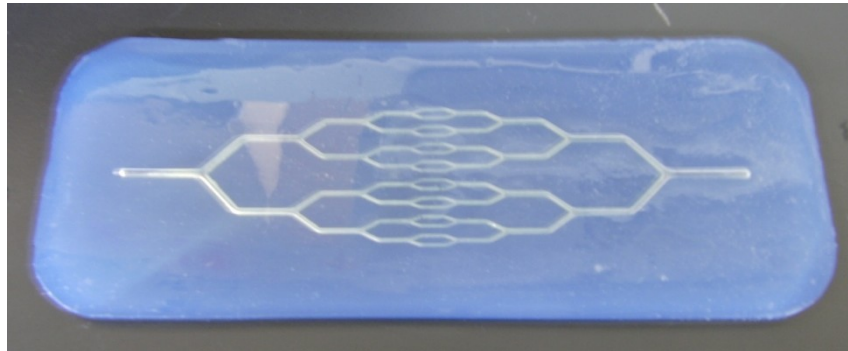
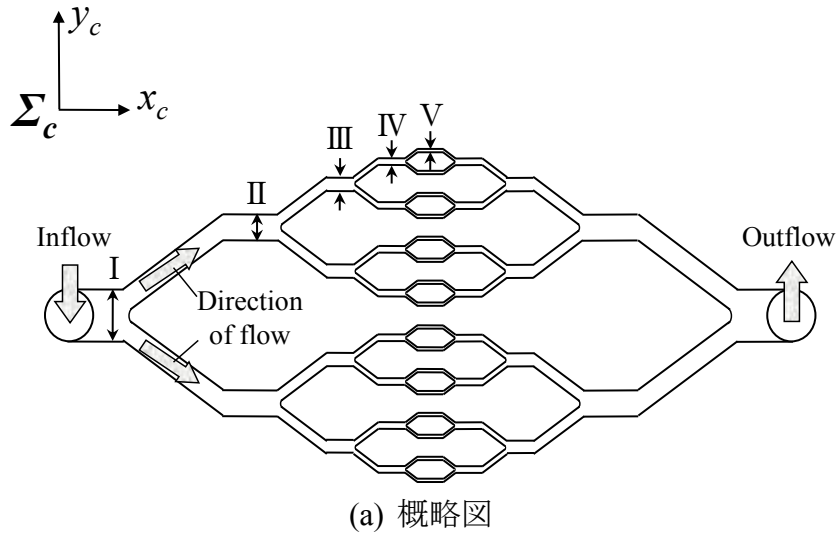


Fig.3.25 多分岐流路

Table 3.10 多分岐流路における流路 I から V の幅と断面積

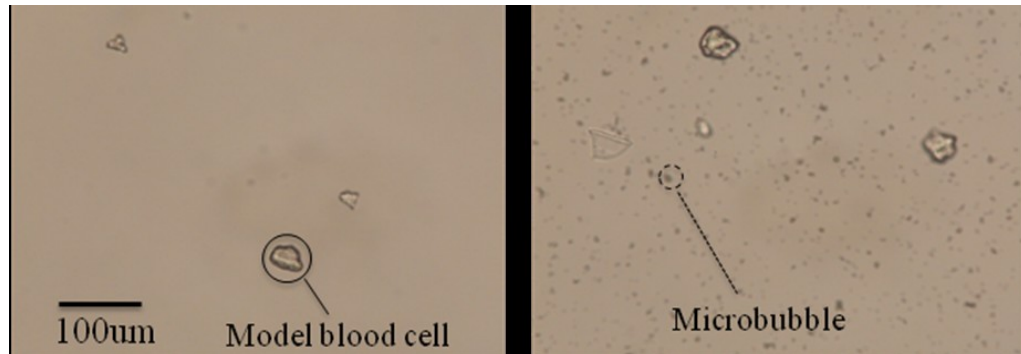
	I	II	III	IV	V
Path width (mm)	2.0	1.4	1.0	0.7	0.5
Section area (mm ²)	4.0	1.96	1.0	0.49	0.25

3.8.4 粘性流体および赤血球について

本実験では生体内での血管内治療に向けて、より生体に近い条件として粘性流体を用いた微小気泡の経路選択実験を行った。粘性流体にはドプラ疑似血液テスト材 (ATS 社製, 707-G) (以下ドプラ液) を使用した。水とドプラ液と血液の特性を **Table 3.11** に示す。また、ドプラ液中には粒子径約 30 μm の疑似赤血球粒子が含まれている。**Fig.3.26** にドプラ液の顕微鏡写真を示す。

Table3.11 各媒質の特性

	密度(g/cc)	動粘度 (mm ² /s)	音速(m/s)
水	1.00	1.00	1500
ドプラ液	1.04	1.66	1540
血液	1.06	4.43	1570



(a) ドプラ液のみ

(b) ドプラ液+Sonazoid

Fig.3.26 顕微鏡写真

赤血球の影響評価実験ではウサギの赤血球を使用した。懸濁液作成時にはウサギから採取された血液を 3 回遠心分離し、分離された赤血球を生理食塩水(食塩濃度 0.9 %)に懸濁させて使用した。赤血球濃度は光学観測できるように調整し、RBC1: 3.2×10^5 cells/ml、RBC2: 6.5×10^6 cells/ml の 2 種類を設定した。これらの濃度はヒトの赤血球濃度に比べてそれぞれ約 5.9×10^{-5} 、約 1.2×10^{-3} 倍の濃度となっている。今回の実験ではこの赤血球とマイクロバブル Sonazoid の懸濁液に音波を照射し、凝集現象を観察する。赤血球の大きさは約 $7 \mu\text{m}$ 、Sonazoid の平均直径は約 $2-3 \mu\text{m}$ である。正立顕微鏡(オリンパス社製、BX50F)で撮影した赤血球と微小気泡 Sonazoid の顕微鏡写真を Fig.3.27 に示す。

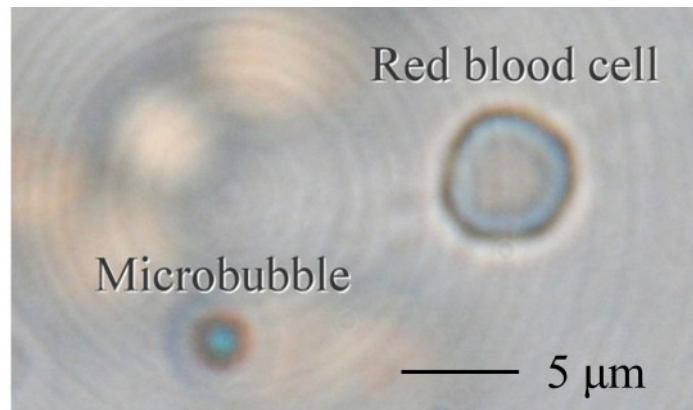


Fig. 3.27 微小気泡と赤血球の様子

3.8.5 ブタ血液について

本節では実験で使用するブタの血液について述べる。動物の血液は血球成分と血漿成分から出来ており、約 45:55 の割合で構成されている。この内、血球成分は赤血球(96%)、白血球(3%)、血小板(1%)で構成されており、血液中の微小気泡は最も多い赤血球の影響を主に受けると考えられる。血漿成分については水分が 96%を占めており、微小気泡に対する特別な影響は少ないと考えられる。赤血球の大きさは動物の種類により異なり、哺乳類は4-8 μm である。赤血球の濃度は赤血球の大きさや動物の種類により大きく異なり、ヒトの場合は約 $550 \times 10^4 \text{ counts}/\mu\text{L}$ である一方、マウスは赤血球の大きさが人の半分である代わりに赤血球濃度が人の 2 倍となっている。使用した血液はブタから採血し、抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを0.03 %添加している。文献によるとブタ血液の赤血球の大きさは約 6 μm 、赤血球数 ($\times 10^4 \text{ counts}/\mu\text{L}$) は 850 万から 1,100 万の範囲で、ヒトの赤血球 (7-8 μm 、550 万/ μL) と比べると大きさはやや小さく、数は多い[65]。しかし、全血液中容量中の赤血球容量の割合(ヘマトクリット)を見ると、ブタの場合は 45-50 %でヒトの場合 40-45 %に近い値となっている。そのため、ヘマトクリットが大きく関わる血液の粘性についてはヒトの血液に近いものとなっていると考えられる。

3.9 結言

本章では、まず 3.2 節において本研究で使用する実験系の全体図について、続く 3.3 節では気泡の観測に用いる光学系のカメラと超音波診断装置について述べた。また 3.4 節では超音波照射系とトランスデューサの制御について。3.5 節では、実験で用いる各トランスデューサの音圧分布の測定とその結果について述べた。3.6 節では実験に用いる微小気泡の比較について述べた。3.7 節では実験で用いるパラメータについて述べた。3.8 節では流路系の構成と粘性流体および実験に使用する生体試料について述べた。次章では微小気泡の評価手法について述べる。

.....

第 4 章

微小気泡の評価方法

4.1 緒言

本研究では微小気泡の凝集サイズの測定や気泡量の推定を画像処理を利用した観測により行う。ここでは各実験における評価手法を述べる。まず 4.2 節では、5 章で行う静水中での凝集体形成実験のための凝集過程の評価法について述べる。4.3 節では、6 章以降で行う気泡の経路選択実験のための誘導性能の評価方法について捕捉面積から評価する方法と輝度値から評価する方法について述べる。また、透明媒質以外の場合の気泡評価手法についても説明する。最後に 4.4 節の結言でこの章のまとめを述べる。

4.2 凝集過程の評価法

3.8.2 節で述べた平板流路内において静水中での凝集過程を評価するため、画像解析ソフト Image Pro Plus(日本ローバー)のラベリング機能を用いて凝集体サイズを測定した。その際、音波照射による反応を示さない気泡が観察画面内に数多く存在することや閉空間の凹凸による陰影が少なからず評価に影響してしまうため、背景画像を差分する処理を施した。処理の概要を Fig.4.1 に示す。

まず画像サイズ 1024×1024 pixel、256 階調の観測画像をグレースケール化する。次に音波照射前のフレーム(a)と音波照射開始から 3 秒以内の測定フレーム(b)の間の複数のフレームを選択し、それらを Max 処理する。Max 処理とは 2 枚の画像を参照し、画像間で同一位置の画素を比較して輝度値が同じ場合にはその値を保持するが、異なる場合には輝度値の高い値に更新する処理である。これによって選択した複数フレームの画素間で輝度値が一致する部分を保持した背景画像(c)が生成される。動いている気泡は参照画像間で同一位置に映らないため、背景画像には反映されない。そして得られた背景画像と原画像(d)を差分処理する。差分処理では出力結果が原画像の輝度値と背景画像の輝度値の差の絶対値となるため、結果がマイナスの値で出力されることはない。傾向としては原画像に凝集体が存在する画素では低輝度となる。最後に 2 値化することで(e)の測定画像を得る。また、フレーム数は最大で 1500 フレームであるが、全てのフレームに対し差分処理と 2 値化処理を行う。このようにして音波照射中のフレームの一致する部分を背景として除去する処理を行うことにより、照射前後で変化の見られなかった気泡や閉空間の陰影を評価から取り除くことができる。

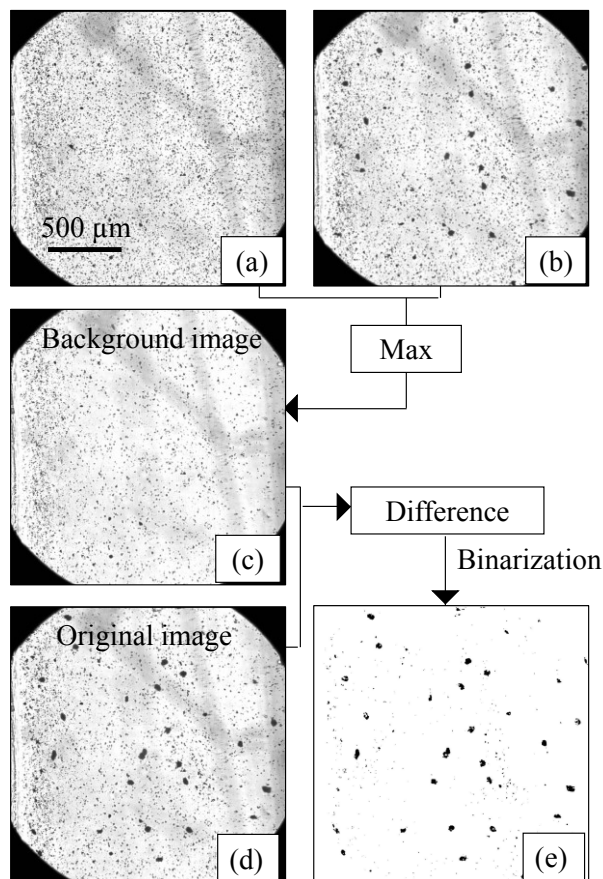


Fig.4.1 測定画像の背景除去処理

(a)初期フレーム、(b)音波照射中の任意フレーム、(c)背景画像、(d)原画像、(e)測定画像

前述の Max 処理、差分処理、2 値化処理といった画像処理により背景を除去した測定画像において、**Fig.4.2** のように凝集体の平均直径を測定した。画像解析ソフトの計測機能を用いて一つの凝集体に対して 2 deg ずつ 90 個の直径を測定し、その 90 個のデータの平均値を凝集体の平均直径とした。そして測定画面中では複数の凝集体が観測されるが、1 フレーム中で観測された全ての凝集体から個数平均値を算出し、すべてのフレームに適用した。そして、その値の照射開始からの時間変化を測定した。

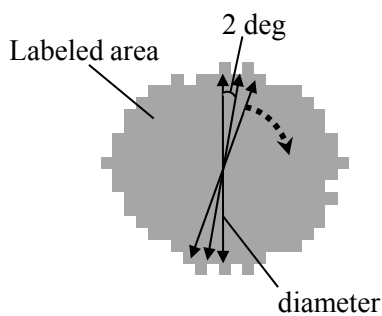


Fig.4.2 凝集体平均直径の計測法

4.3 誘導性能の評価法

4.3.1 輝度値観測による評価法

肝臓内の血管の最も単純な分岐部を想定し、3.6.3 節で述べた多分岐流路のうちの1分岐を対象とした気泡の経路選択において、分岐後の2経路を流れる気泡量を輝度値の変化から推定して以下のように評価を行った。

微小気泡が観察領域内に存在するとその濃度に比例して流路内が暗くなることを利用し、隣接する流路で生じた濃度差を、画像解析により気泡の誘導効率として評価した。まず経路幅が w_1 から w_2 へと分岐する経路において、分岐後の2経路に対し関心領域(ROI α , ROI β)を設定し、3.7.1 節で述べたF-04Eの微小気泡を流し録画した動画をグレースケールに変換した。設定した関心領域を Fig.4.3 に示す。

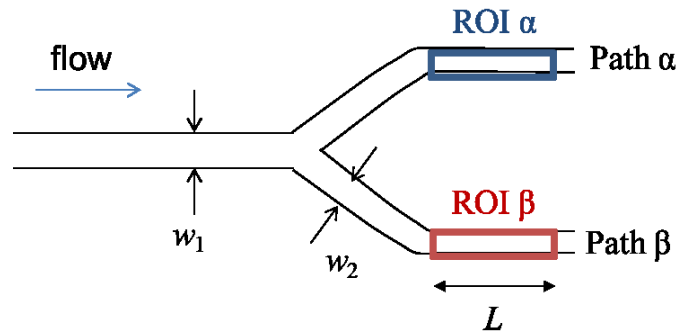


Fig. 4.3 2経路での輝度値観測のための関心領域の設定

関心領域のサイズは、幅は各実験の流路幅に合わせ、流れの方向は式(4.1)で表される L [pixel]を長さとする四角形とした。ここで L の値は、連続するフレームにおいて気泡を二重にカウントしないように、流速 v [mm/s]とカメラのフレームレート f [1/s]、さらに1 mmあたりのピクセル数である γ [pixel/mm]から算出した。

$$L = \frac{v}{f} \times \gamma \quad (4.1)$$

関心領域の平均輝度の時間変化から、測定する時間範囲の設定法を Fig.4.4に示す。ここでは微小気泡の懸濁液を注入して気泡の出現が確認された後、超音波照射が開始されることとする。まず初期状態では両領域の平均輝度値は I_{A0} 、 I_{B0} であるが、微小気泡の流入と共に I_A 、 I_B は共に減少する。理論的には懸濁液注入後、注入位置から関心領域までの距離と流速から導出される時間 Δt 後に輝度値が減少すると考えられる。また、超音波照射開始後、注入した懸濁液の総量が流れきる間において誘導の効果が現れる。懸濁液が流れきる時間は流速と流路断面積によって計算される。よ

って評価されるフレームは、超音波照射から Δt 後で、かつ気泡懸濁液の総量が流れきるまでの時間範囲の間の数秒間とする。この時、分岐部で Path B への誘導が行われていれば、 I_A の輝度値が初期値 I_{A0} へ回復するのに対して、 I_B では気泡が流出するまで低輝度の状態が持続することになる。この時間範囲内で評価フレームにおける誘導率を以下の式により算出する。

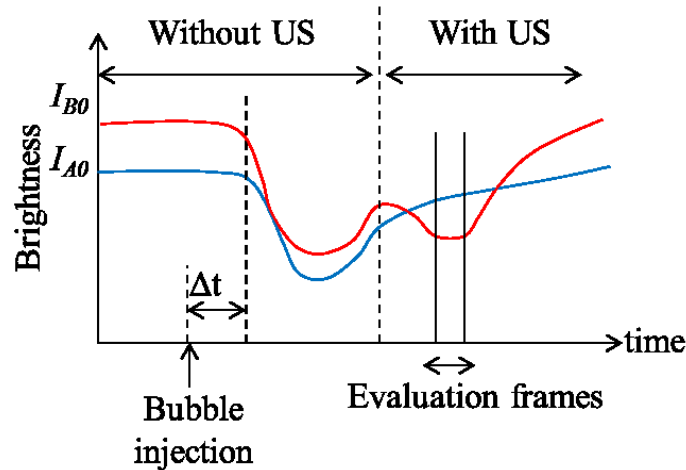


Fig.4.4 関心領域 ROIA,B の平均輝度値の時間変化に対する誘導率計測時間範囲の設定

両領域内の輝度平均値の変化から、各フレームにおける誘導率 (induction index) $\xi_{\text{Brightness}}$ を式(4.2)のように定義して評価した。通常、カメラには固有の感度及びガンマ特性が存在するが、このように変化分を抽出して正規化することにより、カメラに依存した画像の特性はほとんど影響しない。

$$\xi_{\text{Brightness}} = \frac{(I_{B0} - I_B) - (I_{A0} - I_A)}{(I_{B0} - I_B) + (I_{A0} - I_A)} \times 100 \quad [\%] \quad (4.2)$$

ここで I_{A0} 、 I_{B0} はそれぞれ気泡がない初期状態の各関心領域内の輝度平均値、 I_A 、 I_B はそれぞれ気泡が存在する時の各輝度平均値である。これにより導出される誘導率は、両流路に同量の気泡が流れた時に 0 %、全ての気泡が Path β に流入した場合は 100 %、Path β よりも Path α に多くの気泡が流れた場合は負の値となる。

次に、式(4.2)の指標は2経路以上の気泡量推定には対応していないため、4経路を評価する場合は各径路を流れる気泡の割合を以下のように算出した。経路幅が w_1 、 w_2 から w_3 へ2段階分岐する経路において、関心領域の設定を Fig.4.5に示す。関心領域のサイズは、これまでと同様に領域の幅は流路幅を、長さ方向は流速とフレームレートから算出し、Path A~Path D の各径路の下流領域に関心領域 ROIA, B, C, D を設定した。

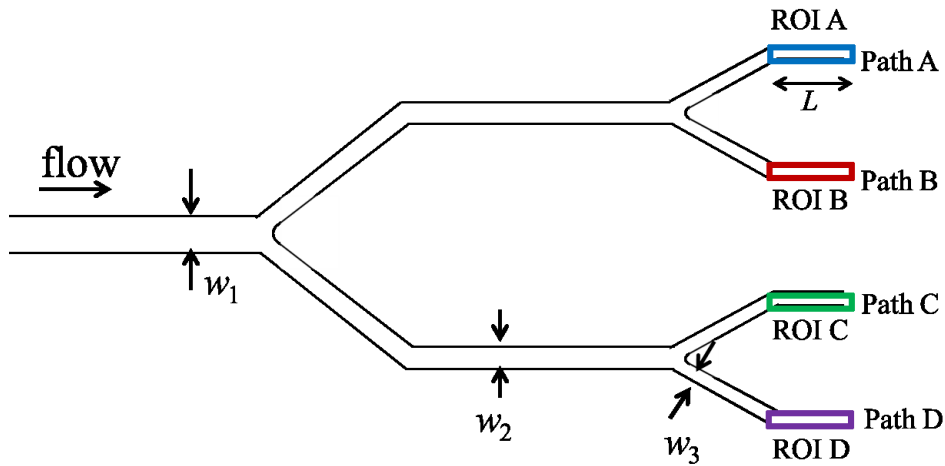


Fig. 4.5 4経路での輝度値観測のための関心領域の設定

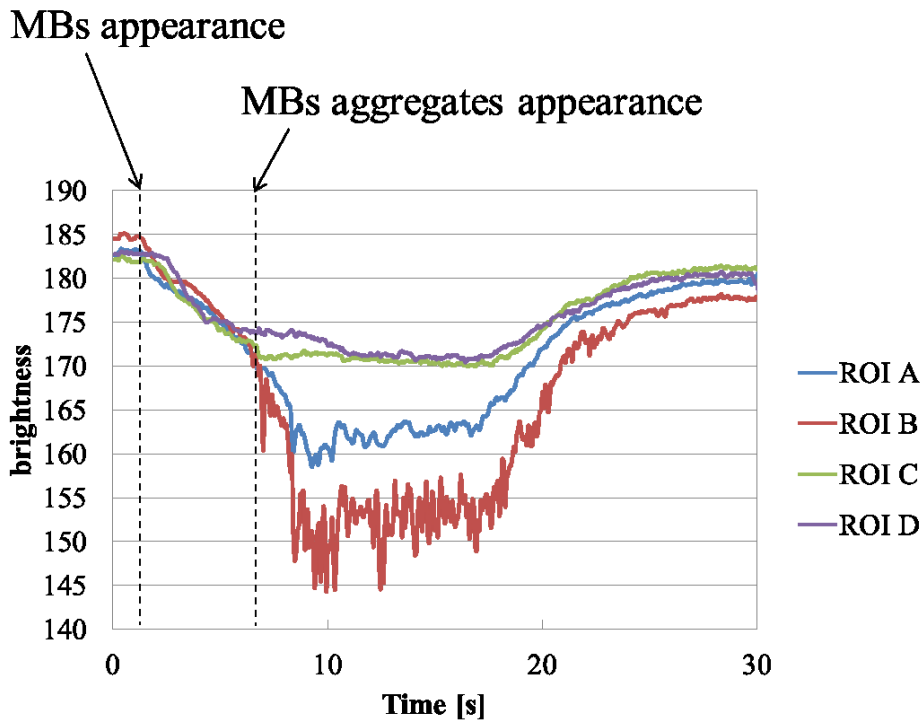


Fig.4.6 関心領域 ROIA,B,C,D の平均輝度値の時間変化

各領域で輝度値解析を行い、微小気泡 F-04E が流れてくることによって生じる輝度値の推移を測定した。Path B への誘導を行った時の各関心領域の輝度値の時間変化を Fig.4.6に示す。気泡が流れると各 ROI 内の輝度値が減少するため、音波照射時における誘導性能の評価を次式を用いて行った。Path A を流れる気泡量 δ_A を式(4.3)のように推定し、各径路を流れる気泡の割合を全経路を流れる気泡量で正規化した。この式は音波が照射されている時間の輝度値を評価する指標となっている。

$$\delta_A = (I_{A0} - I_A) \times \alpha \quad (4.3)$$

$$\varepsilon_A = \frac{\delta_A}{\delta_A + \delta_B + \delta_C + \delta_D} \times 100 \quad [\%] \quad (4.4)$$

ここで δ_A は推定される気泡量、 I_{A0} は気泡が流れてくる前の初期輝度値、 I_A は気泡が流れているときの平均輝度値、 α は変換係数である。流速40 mm/s では約2 s 後から注入した気泡のうち、上流で凝集されない気泡がまず観測され、その後約10~17 s の間に凝集気泡が流れるため、この間のフレーム約7 s 間(100 frame)の平均値を評価した。

4.3.2 捕捉量による評価法

バブルリポソーム(BLs)を使用する場合、平均直径500nm とマイクロバブルに比べ小さく、さらに体内での血液希釈を考慮して約20-100倍に希釈して使用するため、光学観測の際に検出されにくいため従来の輝度値による評価ができない問題がある。そこで下流部2か所で同時に集束音波を照射し、照射位置で捕捉される BLs 量を計測することで、分岐部での制御性能を評価する。評価用の素子には3.4.1節で述べた集束型を使用し、Path α 、 β に対して同じ型の素子を配置した。素子同士の物理的干渉を避けるため、方位角を持たせて時計回り・反時計回りにそれぞれ回転して配置し、流れに対向する向きに設置した。仰角はこれまでの気泡の流路内捕捉に関する研究[29,31]から決定した。評価用の素子の最大音圧に関しては取りこぼしを防ぐため素子の印加限界に設定した。

各関心領域内で捕捉される BLs 量の測定には4.3.1節と同様の画像解析ソフト Image Pro を用いた。Fig.4.8 に差分処理による捕捉量の測定方法を示す。超音波照射開始前の画像と測定を行う画像を差分処理し、捕捉された BLs 以外の情報を除去する。続いて生成された差分画像に対しラベリング処理を行い音波照射により捕捉された BLs の面積を測定した。

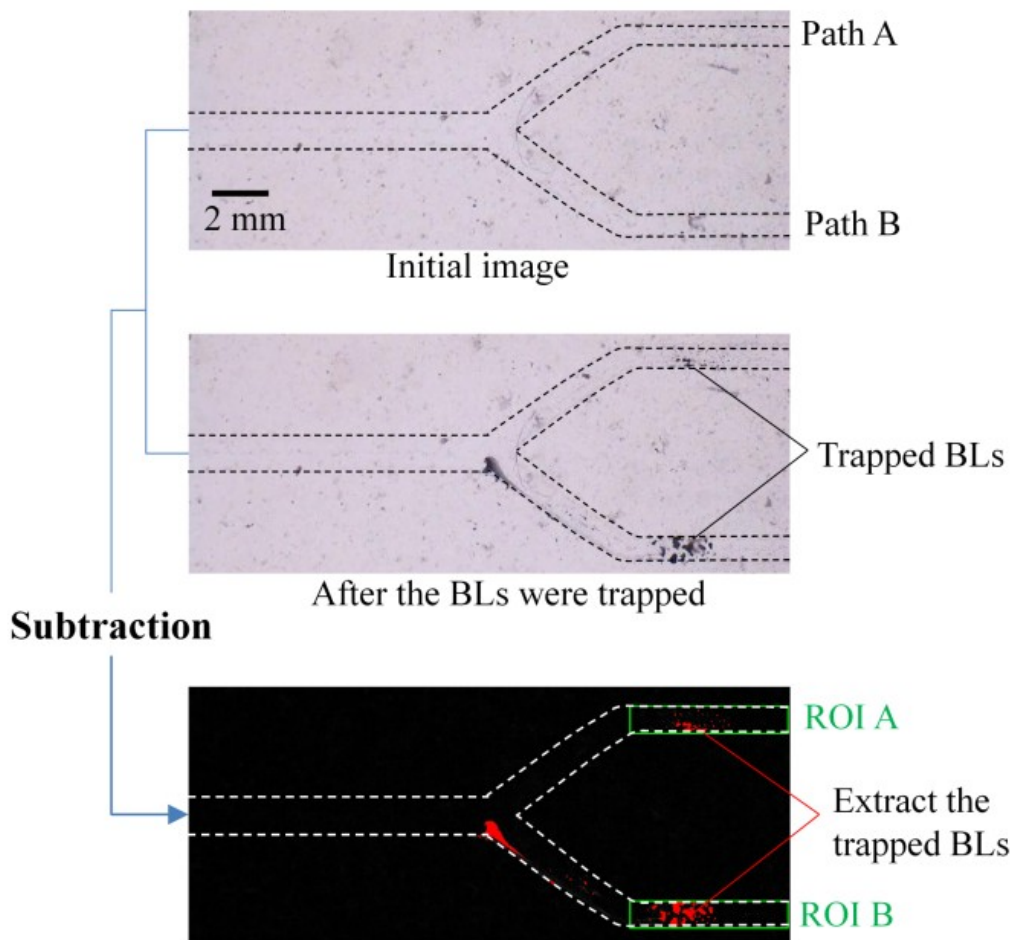


Fig.4.8 差分処理による捕捉面積の測定方法

BLs の制御性能評価には、これまでの Induction index を拡張して用い[32,33]、Path B への誘導率を $\xi_{Trap-area}$ で評価した。

$$\xi_{TrapArea} = \frac{\sigma_B - \sigma_A}{\sigma_A + \sigma_B} \times 100 \quad [\%] \quad (4.5)$$

ここで σ_A 、 σ_B はそれぞれ ROI A,B での BLs の捕捉量である。(4.2)式の誘導率の計算と同様、両流路に同量の気泡が流れた時に 0 %、全ての気泡が Path B に流入した場合は 100 %、Path B よりも Path A に多くの気泡が流れた場合は負の値となる指標となっている。

4.3.3 超音波断層像による評価法

血液中では主に赤血球が存在するため光透過性に限界があり、光学的観察が難しくなる問題がある。そこで超音波診断像(以下 B モード像) を観測手段として採用する。一般に B モード像上の輝度値は超音波反射体と周辺組織の音響特性の相対関係に

よって変化するが、気泡内の気体の音響インピーダンスは生体組織と大きく異なるため、反射率はほぼ 100 %である。よって生体内の微小気泡にて反射したエコー信号は気泡濃度と相関があると予想される。通常、輝度値はプローブからの距離や診断装置のゲイン調整等で簡単に変動する性質があるが、診断装置の設定を固定し、濃度変化に対する輝度値変化が線形になる条件において、濃度変化の測定は可能である [66]。ここでの微小気泡はバブルリポソーム(BLs)を想定し、超音波診断装置は GE Healthcare 社製 LOGIQ7 および中心周波数 11 MHz のリニアプローブ(11L)を使用した。2 本の平行直線流路の短軸断面が画像内で同じ高さに描出されるようにリニアプローブを配置した。撮像される断層像と設定した関心領域を Fig.4.9 に示す。ROI の形状は径路断面の形状に合わせ直径 2 mm の円形とし、Path A,B 短軸像の輪郭に重なるように設定した。そして関心領域内の輝度値の時間変化を観測し、Path B への誘導率をもとめた。

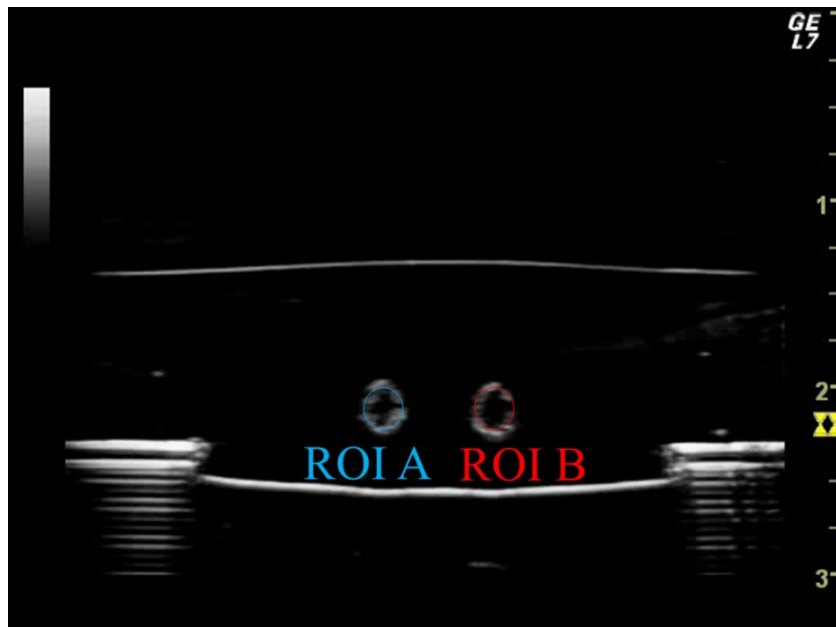


Fig.4.9 関心領域の設定

超音波診断機で観測される輝度値の時間変化の模式図を Fig.4.10 に示す。BLs が流れると各 ROI 内の輝度値が増加する。そして音波が照射されると非誘導側の ROI A には気泡が流れてこなくなるため輝度値は低くなる。そして音波照射が切れると輝度値は再び高くなり、BLs が流れて去っていくと輝度値は下がっていく。音波照射時における誘導性能の評価を次式を用いて行った。Path A を流れる BLs 量 σ_A を式(4.6)のように推定し、各径路を流れる BLs 量の割合を Path A と Path B を流れる量の和で正規化し式(4.7)のように定義した。この式は音波が照射されている時間の輝度値を評価する指標となっている。

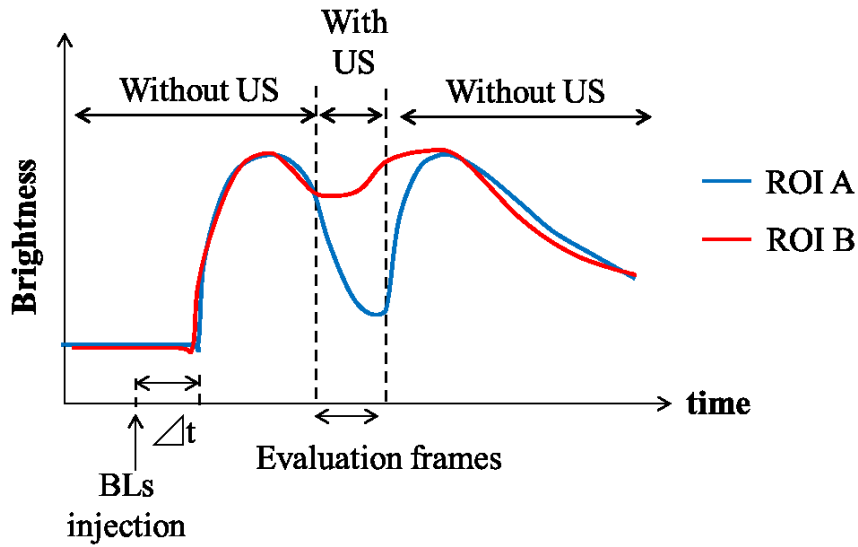


Fig.4.10 輝度値の時間変化

$$\sigma_A = (I_A - I_{A0}) \times \alpha \quad (4.6)$$

$$P_A = \frac{\sigma_A}{\sigma_A + \sigma_B} \times 100 \quad [\%] \quad (4.7)$$

ここで σ_A は推定される BLs 量、 I_{A0} は BLs が流れてくる前の断層像での初期輝度値、 I_A は BLs が流れているときの平均輝度値、 α は変換係数である。流速 30 mm/s では約 3 s 間 (100 frame) の平均値を評価した。

4.4 結言

本章では各実験で共通する微小気泡の光学的な評価手法について述べた。まず 4.2 節では、5 章で行う静水中での凝集体形成実験のための凝集過程の評価法について述べた。4.3 節では、6 章以降で行う気泡の経路選択実験のための誘導性能の評価方法について述べた。次章では前章で説明した実験機器を用いて行なった静水中における微小気泡の凝集体形成に関する実験について述べる。

.....

第5章

静水中における微小気泡の凝集体形成実験

5.1 緒言

本章では実際に静水中の微小気泡に音波を照射し、実験により凝集体形成を検証する。まず 5.2 節で気泡の振動特性測定と凝集実験の方法について述べる。5.3 節では気泡の種類による振動特性の結果と高速度カメラ観察によって観測された形成挙動について述べ、照射音波の周波数、濃度変化、赤血球の有無などパラメータの違いによる凝集挙動の観測結果について述べる。最後に 5.4 節の結言で本章をまとめる。

5.2 微小気泡の振動特性測定と凝集実験の方法

5.2.1 気泡種類における振動特性測定の方法

2.3.2 節で述べたように微小気泡の凝集体を形成する力である Secondary Bjerknes force には気泡の振動振幅値の項が含まれているため、気泡の共振周波数が大きく関わってくると考えられる。そこで本実験で使用する微小気泡の共振周波数を求める実験を行った。気泡振動による音波吸収は共振周波数付近で最大となるため、気泡による音波減衰の周波数特性を測定することで気泡の共振周波数を求めることができる。減衰の周波数特性の理論式は同志社大の吉元らによって導出され、寒天内 Sonazoid の共振周波数は約 4.7 MHz であるとすでに報告されているが[67]、本実験で使用する F-04E の共振周波数と合わせて Sonazoid の共振周波数も今回改めて測定した。バブルリポソームについては工藤らによって約 8.0 MHz であると報告されている[59]。実験に使用するトランスデューサは、気泡特性測定用の広帯域トランスデューサ 1 種類 (5'P-sin) を使用した。また、ハイドロホンの計測範囲内での現象を観測するため微小気泡の拡散を防ぐ必要があった。気泡特性測定時には音波照射による気泡の移動や凝集が起こらないよう固定するため狭い空間内に閉じ込める工夫をした。これらを満たすため、3.8.2 節で述べた超音波透過性に優れ音響特性が生体に近いポリエチレングリコール(以下 PEG)を気泡の封入容器として使用した。

実験系を Fig.5.1 に示す。まず水槽内を脱気水で満たし、振動子径 10 mm の広帯域トランスデューサと素子径 1 mm のニードル型ハイドロホン(HNR-1000、ONDA、応答周波数 0.2-10 MHz)を先端同士の距離が 60 mm となるよう対向させて設置した。それらの中央に PEG 容器のみ、または微小気泡を混ぜ込んだ PEG 容器を設置し、比較的広帯域の周波数特性を持つパルス波を照射した。微小気泡を混ぜ込んだ気泡封入 PEG は F-04E と Sonazoid を用いて 2 種類作成した。照射音波は最大音圧 200 kPa-pp となるよう設定した 5 MHz のバースト 1 波とし、ファンクションジェネレータ(WF1946B、エヌエフ回路)からトランスデューサにアンプで増幅した信号を印加した。そしてハイド

ロホンにより受波した信号をオシロスコープにより FFT 演算し、それぞれの場合の周波数スペクトルを得た。

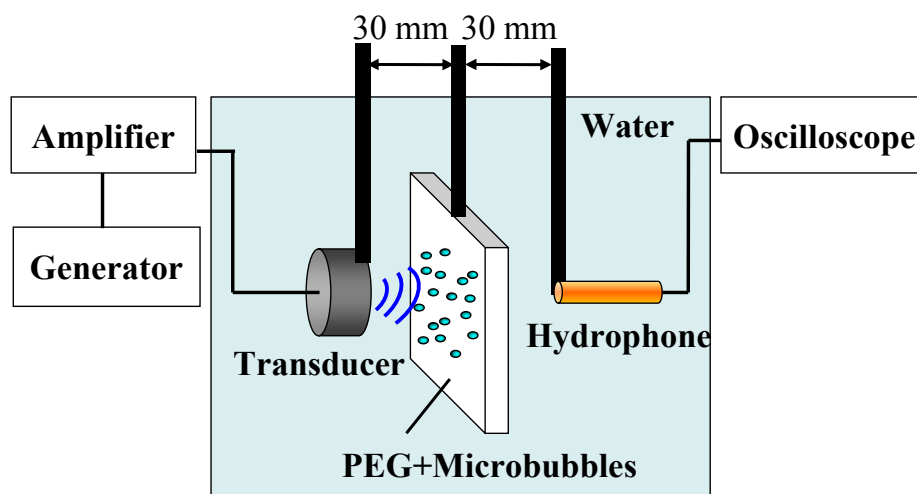


Fig.5.1 共振周波数測定のための実験系

5.2.2 高速度カメラ観察における微小気泡の凝集体形成実験方法

3.6.2 節で作成した平板流路中の静水中微小気泡に対し音波を照射し、凝集挙動を光学的に観測する実験を行った。Fig.5.2 に構築した実験系を示す。まず、平板流路内部を微小気泡と水の懸濁液で満たした。そして作成した流路を脱気水で満たした水槽の底面に固定し、流路内部の中央に最大音圧 100 kPa-pp、中心周波数 3~10 MHz の範囲の正弦波を照射した。その時の微小気泡群の挙動および凝集体形成過程を 3.3.1 節で述べた倒立顕微鏡(対物レンズの倍率 10.0x)に接続した高速度カメラにて 500 fps のフレームレートで録画した。なお、発振器で生成したトリガ信号により、音波照射開始のタイミングと録画開始のタイミングが同期されている。そして照射音波の中心周波数を変化させ、凝集過程を観察した。バブルリポソームの場合は周波数の範囲を 5~10 MHz、フレームレートを 125 fps、対物レンズの倍率を 20.0x に変更して同様の実験を行った。

Fig.5.3 にトランスデューサと作成した平板流路の配置を示す。トランスデューサは光源からの光量を確保するため流路平面に対し 70 deg の角度で設置した。この実験ではトランスデューサは全て平面型で、共振周波数付近の影響を調べるため、中心周波数が 3、5、7、10 MHz の 4 種類(3P-sin、5P-sin、7P-sin、10P-sin)を使用した。

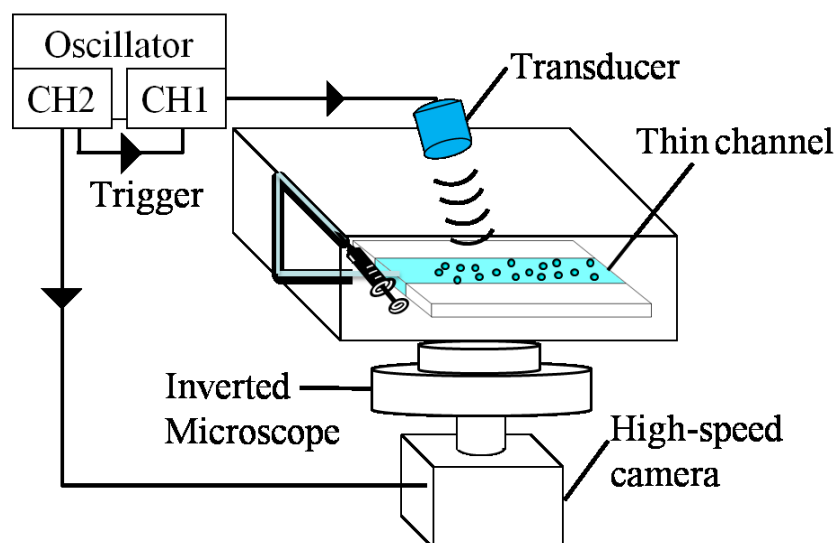


Fig. 5.2 高速度カメラによる凝集体形成観察のための実験系

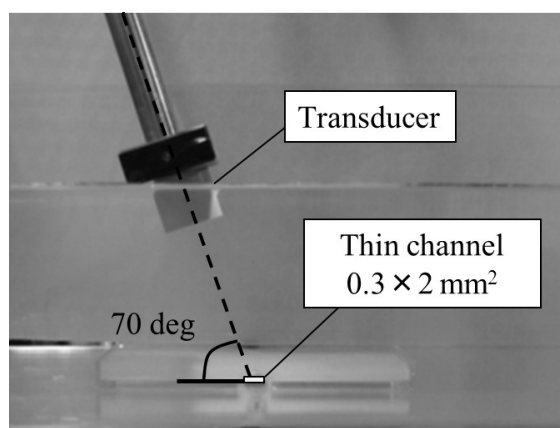


Fig.5.3 トランスデューサの配置

気泡濃度をパラメータにとる実験では 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60 $\mu\text{l/ml}$ の 6 種類の気泡濃度の Sonazoid 懸濁液に対し静水中において超音波を照射し、高速度カメラのフレームレートを 250 fps として観察を行った。ただし照射音波は中心周波数 5 MHz (5P-sin を使用)とした。

赤血球の影響を評価する実験においては赤血球溶液中の Sonazoid 懸濁液に対し静水中で超音波を照射し、高速度カメラのフレームレートを 125 fps として観察を行った。ただし、光学系をマイクロスコوپレンズ、照射音波の周波数を 3 MHz (3P-sin を使用)に変更した。

5.3 気泡の振動特性と凝集観測結果

5.3.1 気泡の種類に対する微小気泡の振動特性結果

5.2.1 節で述べた実験で PEG のみと、F-04E、Sonazoid をそれぞれ混ぜ込んだ PEG に対しバースト 1 波を照射したときの受波信号スペクトルを Fig.5.4 に示す。これより、1

から 10 MHz の周波数成分を得られていることが確認できる。また(PEG のみの信号) [dB] – (それぞれの気泡を含んだ PEG の受波信号) [dB]より求めた微小気泡による減衰の周波数特性を Fig.5.5 に示す。これにより F-04E では約 8.3 MHz、Sonazoid では約 5.5 MHz で減衰がそれぞれ最大になっていることが確認できる。よって、PEG 内 F-04E と PEG 内 Sonazoid の共振周波数はそれぞれ約 8.3 MHz、約 5.5 MHz であると推定できる。F-04E に関しては Hendrik らがシミュレーションによって気泡径 4 μm の F-04E においては 8 MHz で共振のピークを持つことを報告しており[68]、今回の測定では近い値を示した。以降の実験で使用する周波数範囲 3-10 MHz の範囲は、両気泡の共振周波数前後の範囲をカバーしていることを確認した。

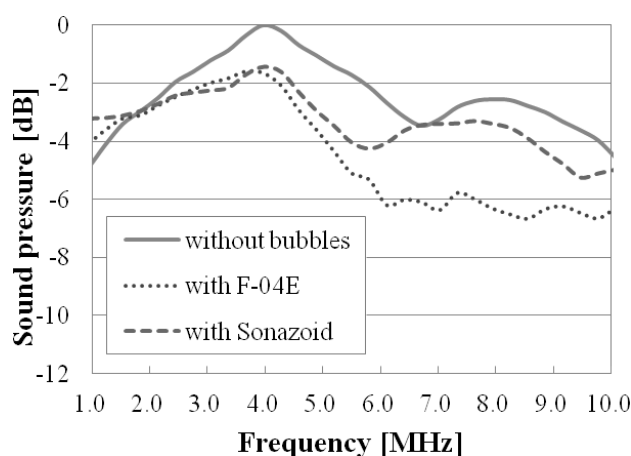


Fig.5.4 各 PEG 内での周波数スペクトル

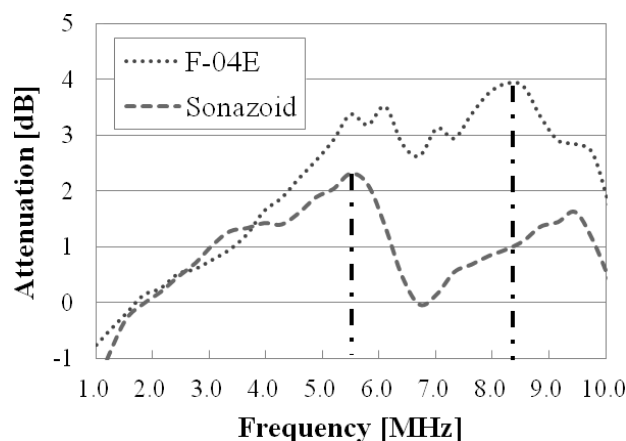


Fig.5.5 PEG 内気泡の減衰特性

5.3.2 周波数変化に対する微小気泡の凝集観測結果

5.2.2 節で述べた実験において静水中微小気泡に中心周波数 3、5、7、10 MHz、最大音圧 100 kPa の音波を照射し、照射開始から 3 秒間の凝集過程を観察した。F-04E、Sonazoid それぞれの凝集観察結果を Figs. 5.6、5.7 に示す。また、中心周波数 5、7、

10 MHz、対物レンズの倍率を 20.0x としたバブルリポソームの観察結果を Fig.5.8 に示す。いずれも低い周波数において凝集体サイズが大きくなり、高周波の照射においては小さいサイズで凝集することを確認した。Sonazoid の場合には F-04E、バブルリポソームの場合に比べ全体的に凝集サイズが小さくなる結果となった。

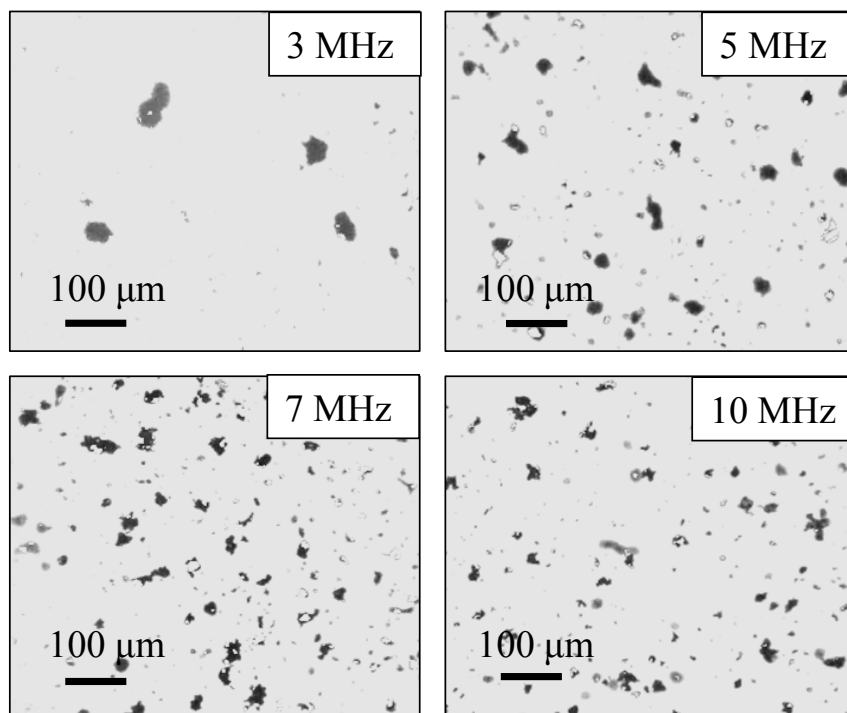


Fig.5.6 F-04E の凝集結果
(対物レンズ 10.0x、最大音圧 100 kPa、照射 3 秒後)

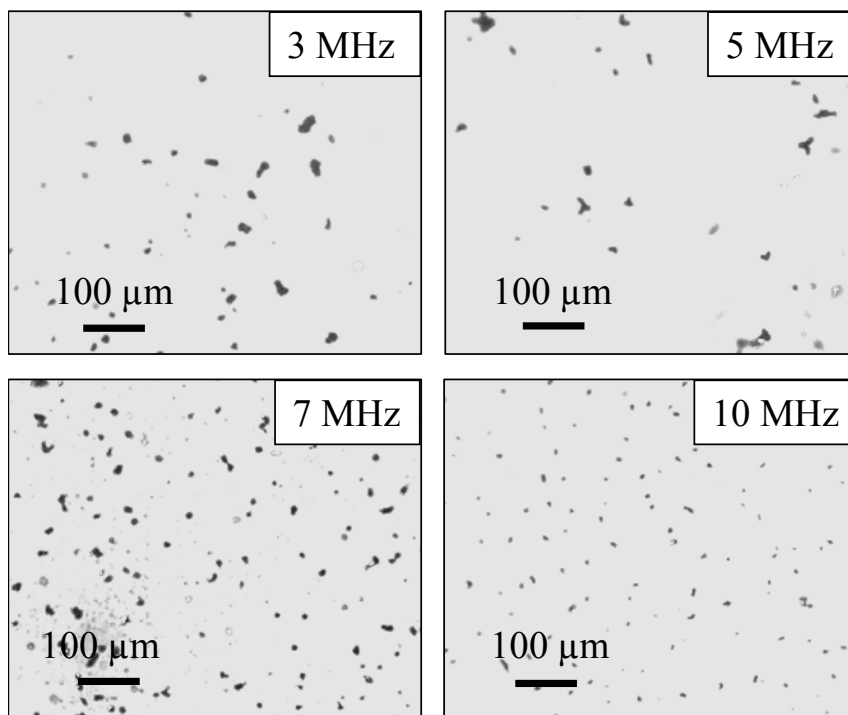


Fig.5.7 Sonazoid の凝集結果
(対物レンズ 10.0x、最大音圧 100 kPa、照射 3 秒後)

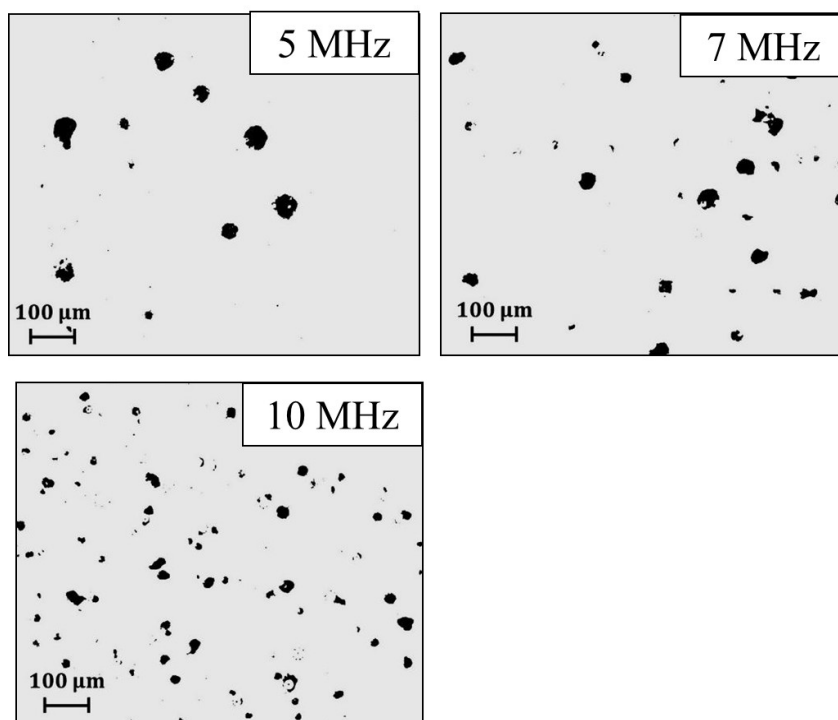


Fig.5.8 バブルリポソームの凝集結果
(対物レンズ 20.0x、最大音圧 100 kPa、照射 3 秒後)

次に、F-04E の場合の観察領域における凝集体平均直径の時間変化を **Fig.5.9** に示す。F-04E に関しては測定対象を 10 μm 以上の気泡とした。これらの結果は 3 回の試

行を平均しており、エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を示す。曲線は各現象の飽和を判断するために行った指数近似の近似曲線を示している。凝集サイズが飽和値の 90 %に達したときを飽和と見なし、現象が計測時間以内に飽和することを確認した。結果から、低い周波数においては徐々に凝集体は成長し最終的に大きなサイズで飽和することが分かる。一方、高周波数においては凝集の飽和サイズが初期直径からあまり変化しない結果となった。これは測定対象を 10 μm 以上の気泡で選別しているためと考え、対物レンズの倍率を 20.0x とし、周波数を 5,7,10 MHz とした同様の実験を行った。ここでは 5 μm 以上の気泡を測定対象とした。測定結果を **Fig.5.10** に示す。続いて Sonazoid の場合の同様の結果を **Fig.5.11** に、バブルリポソームの場合の結果を **Fig.5.12** に示す。Sonazoid の場合は対物レンズの倍率を 10.0x、バブルリポソームの場合には対物レンズの倍率を 20.0x、測定対象は両気泡とも 5 μm 以上の気泡をとした。

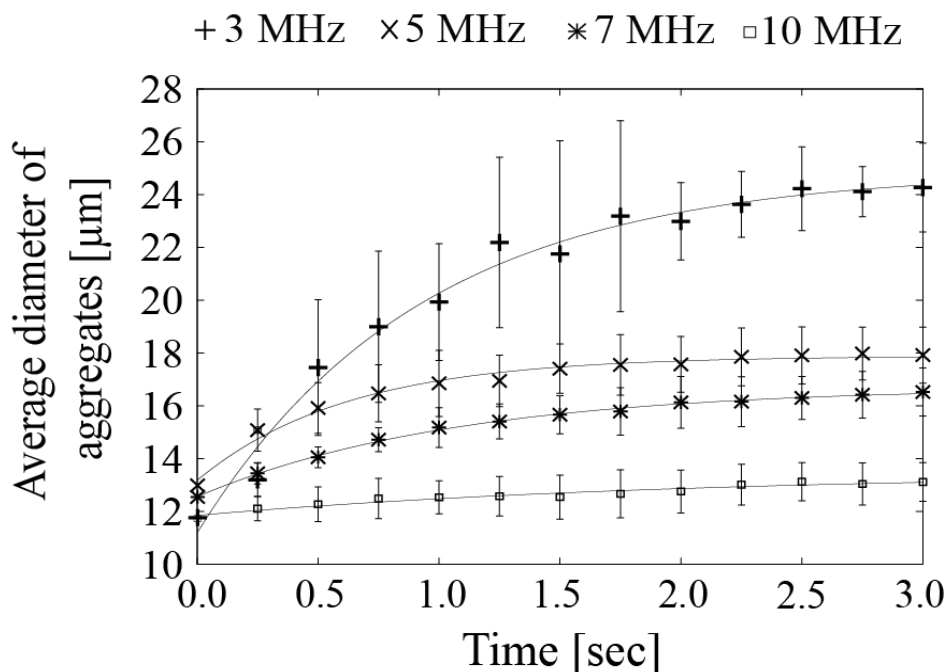


Fig.5.9 レンズ倍率 10.0x における F-04E の中心周波数に対する凝集サイズの時間変化

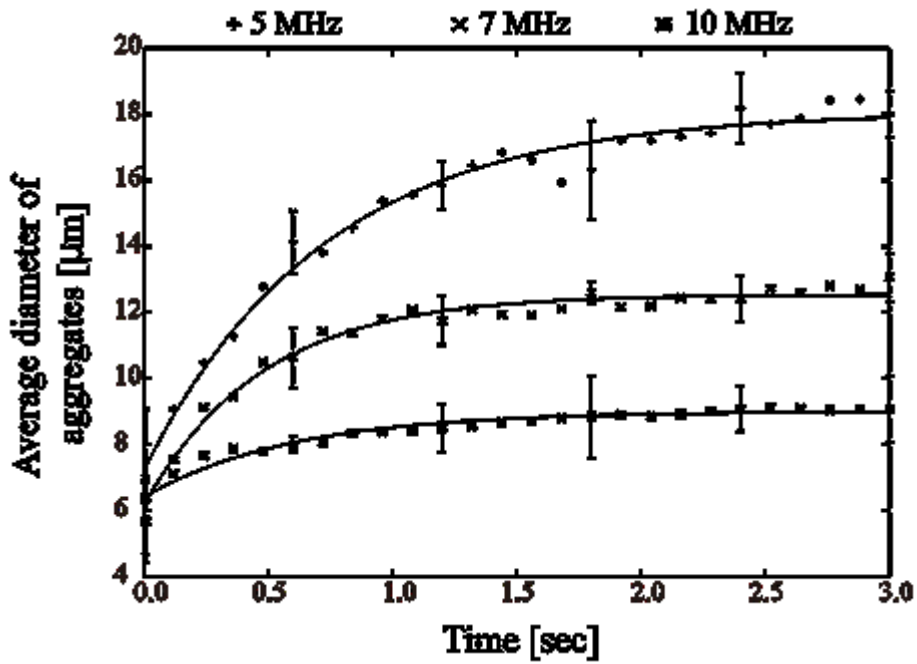


Fig.5.10 レンズ倍率 20.0x における F-04E の中心周波数 5 – 10 MHz に対する凝集サイズの時間変化

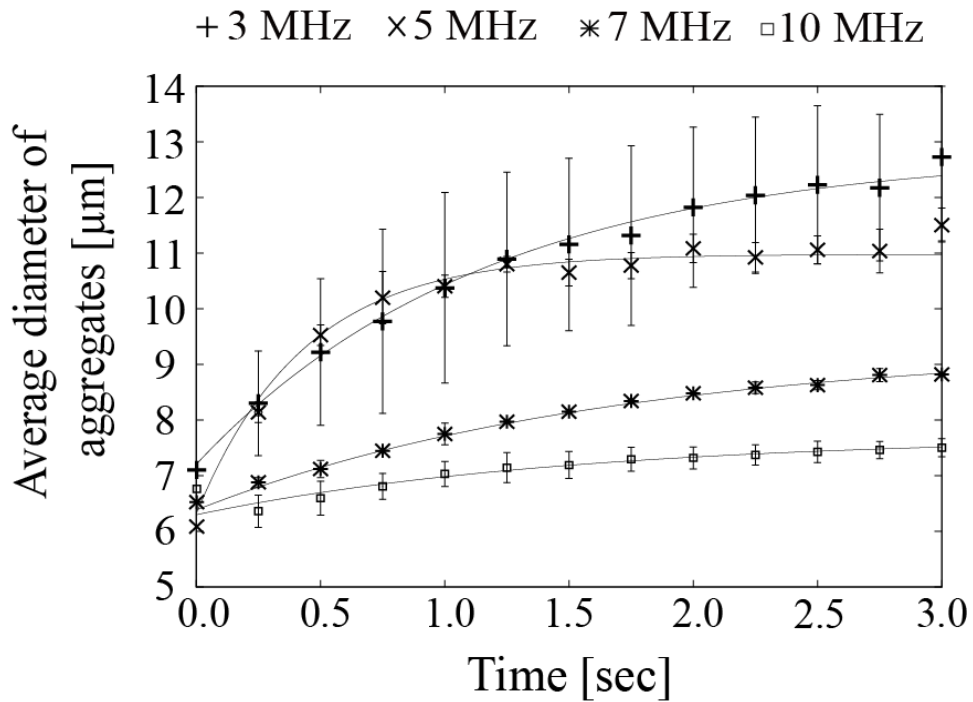


Fig.5.11 Sonazoid の各中心周波数における凝集サイズの時間変化 (対物レンズ 10.0x、最大音圧 100 kPa)

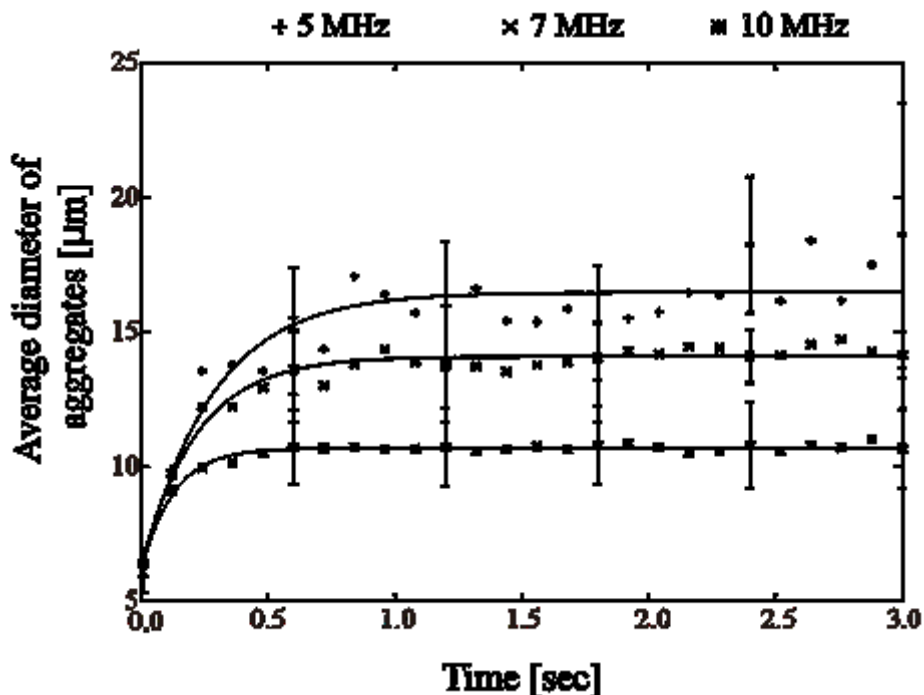


Fig.5.12 バブルリポソームの 5-10 MHz における凝集サイズの時間変化
(対物レンズ 20.0x、最大音圧 100 kPa)

Figs. 5.9、5.10、5.11、5.12 においていずれも低い周波数において凝集体サイズが大きくなり、高周波の照射においては小さいサイズで凝集することを測定値からも確認した。また、各照射条件の形成時間を比較するため、それぞれの近似曲線の時定数を比較したところ、対物レンズ 10.0x の場合は 3、5、7、10 MHz の順に F-04E では 0.80、0.64、1.00、1.69 sec、Sonazoid では 1.17、0.42、1.65、1.50 sec となった。対物レンズ 20.0x の場合は 5、7、10 MHz の順に F-04E では 0.73、0.48、0.60 sec、バブルリポソームでは 0.28、0.22、0.13 sec となった。特に Sonazoid では、他の周波数の場合に比べ 5 MHz の照射の場合に時定数が最も短くなった。Tables 5.1、5.2、5.3 に Figs. 5.10、5.11、5.12 の飽和サイズと時定数をそれぞれ示す。時定数はそれぞれ各気泡の共振周波数に近い周波数の照射時に最も短くなった。

Table 5.1 F-04E の 5,7,10 MHz における凝集飽和サイズと飽和に達するまでの時定数

Frequency [MHz]	3	5	7	10
Saturation size [μm]	-	18.07	12.55	9.01
Time constant [sec]	-	0.73	0.48	0.60

Table 5.2 Sonazoid の各中心周波数における凝集飽和サイズと飽和に達するまでの時定数

Frequency [MHz]	3	5	7	10
Saturation size [μm]	12.73	11.50	8.82	7.50
Time constant [sec]	1.17	0.42	1.65	1.50

Table 5.3 バブルリポソームの 5,7,10 MHz における凝集飽和サイズと飽和に達するまでの時定数

Frequency [MHz]	3	5	7	10
Saturation size [μm]	-	16.48	14.09	10.70
Time constant [sec]	-	0.28	0.22	0.13

5.3.3 濃度変化に対する微小気泡の凝集観測結果

0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60 $\mu\text{l/ml}$ の 6 種類の気泡濃度の Sonazoid 懸濁液に対し静水中において音波を照射し、照射開始から 3 秒間の凝集過程の観察を行った。気泡体積濃度 0.40、1.60 $\mu\text{l/ml}$ の懸濁液に対し、中心周波数 5 MHz の最大音圧 100 kPa の正弦波を照射した凝集結果を **Fig.5.13** に示す。気泡濃度 1.60 $\mu\text{l/ml}$ の場合には凝集体同士の集合により、さらに大きな凝集体を形成することを確認した。

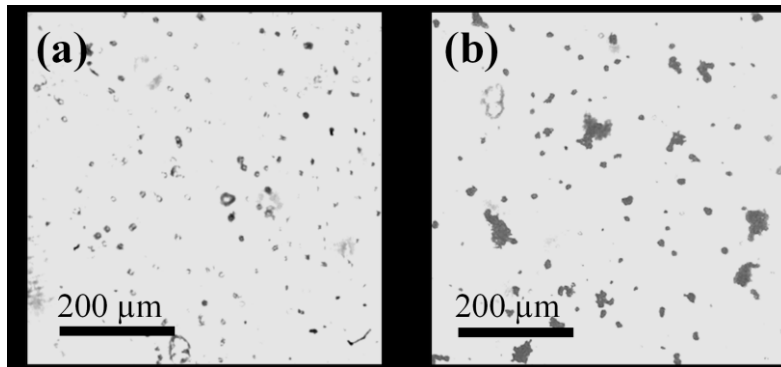


Fig.5.13 中心周波数 5 MHz、照射 3 s 後の Sonazoid の凝集結果
(a) 0.40 $\mu\text{l/ml}$ 、(b) 1.60 $\mu\text{l/ml}$

続いてそれぞれの濃度における凝集サイズの照射開始からの時間変化を **Fig.5.14** に示す。それぞれの近似曲線の時定数は気泡濃度 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60 $\mu\text{l/ml}$ の順に 1.17、1.22、1.03、0.91、0.53、0.25 sec となった。気泡濃度が薄いときにはそれほど差が見られないが、濃度が 0.80 $\mu\text{l/ml}$ 以上のときには有意な差が見られた。懸濁液の気泡濃度が高い方が時定数が短く、また凝集サイズも大きくなる結果となった。

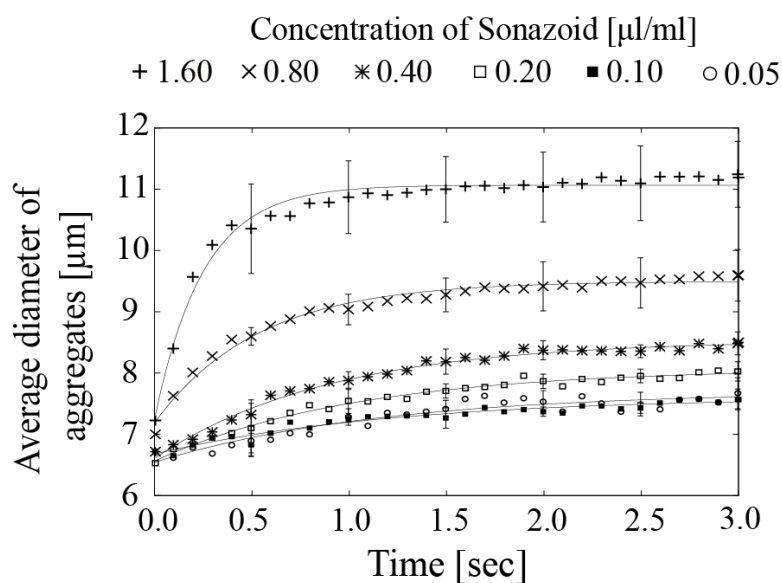


Fig.5.14 Sonazoid の各気泡濃度における凝集サイズの時間変化、中心周波数 5 MHz

5.3.4 赤血球の有無に対する微小気泡の凝集観測結果

微小気泡懸濁液と赤血球懸濁液をそれぞれ組み合わせ、Sonazoid のみ、RBC1 のみ、Sonazoid+RBC1、Sonazoid+RBC2 の 4 種類の懸濁液を作成した。Sonazoid が含まれている懸濁液では気泡濃度を 0.40 $\mu\text{l/ml}$ に統一した。これらの懸濁液に対し静水中で音波を照射し、凝集過程を観察する実験を行った。使用した懸濁液の種類を **Table 5.4** に示す。

Table 5.4 懸濁液中の Sonazoid と赤血球濃度

	Sonazoid [$\mu\text{l/ml}$]	RBCs [cells/ml]
Sonazoid only	0.40	-
RBC1 only	-	0.32×10^6
Sonazoid+RBC1	0.40	0.32×10^6
Sonazoid+RBC2	0.40	6.50×10^6

測定対象は懸濁液が RBC1 のみの場合には赤血球、それ以外の場合は Sonazoid の凝集体とした。また、Sonazoid+RBC2 の懸濁液では赤血球と Sonazoid 凝集体を区別して測定することが困難であったため、**Fig.5.15** に示すように測定画像の輝度値とコントラストを調整する前処理を行った。この処理により、平均直径を測定する際のラベリングの閾値を微小気泡の凝集体のみを測定する値に設定することが容易となる。

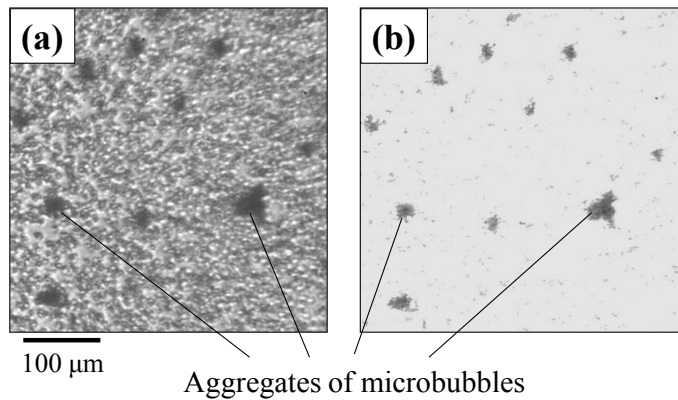


Fig.5.15 ラベリング前処理
処理前(a)、処理後(b)

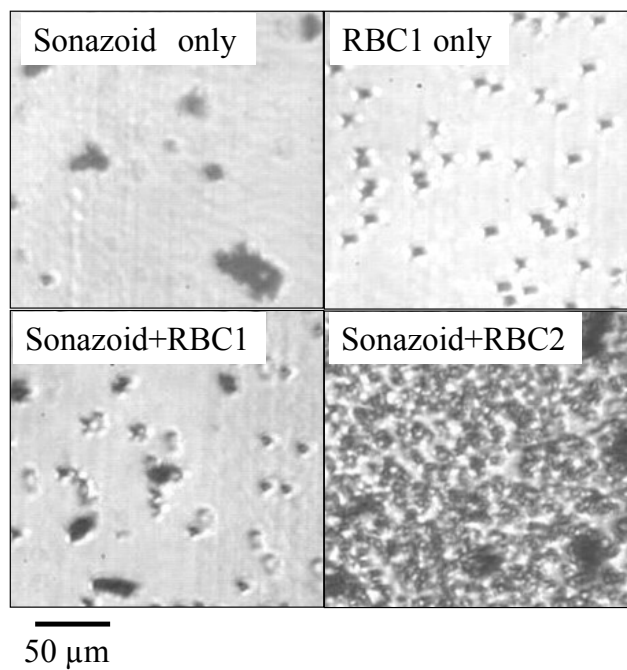


Fig.5.16 赤血球が存在する状態での Sonazoid の凝集結果、中心周波数 3 MHz、照射 4 秒後

Sonazoid のみ、RBC1 のみ、Sonazoid+RBC1、Sonazoid+RBC2 のそれぞれの懸濁液に対し、中心周波数 3 MHz、最大音圧 100 kPa の正弦波を 4 秒間照射し、照射開始からの平均直径の時間変化を測定した。照射開始 4 秒後の観察結果を **Fig.5.16** に、平均直径の照射開始からの時間変化のグラフを **Fig.5.17** に示す。それぞれの近似曲線の時定数は Sonazoid のみ、RBC1 のみ、Sonazoid+RBC1、Sonazoid+RBC2 の懸濁液の順に 0.95、0.27、1.12、1.05 sec となった。

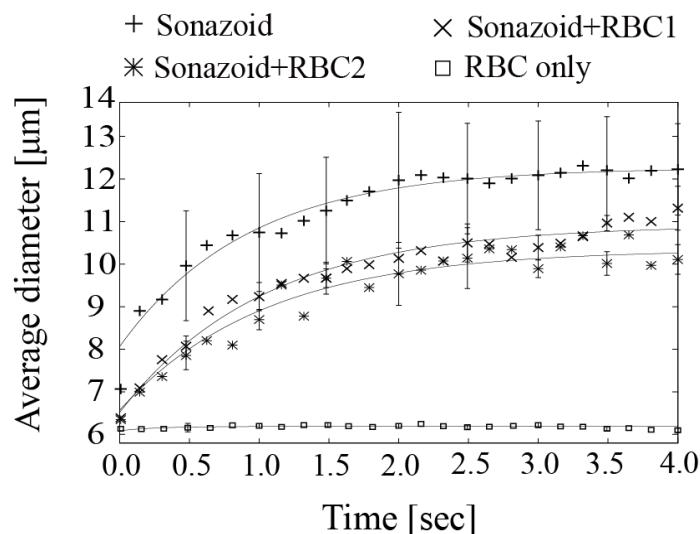


Fig.5.17 赤血球溶液中における Sonazoid の平均直径の時間変化
(中心周波数 3 MHz)

これらの結果から RBC1 のみの懸濁液以外において気泡の凝集現象を確認した。Sonazoid のみの場合に比べ、赤血球溶液中の Sonazoid は凝集サイズが小さくなる傾向を示したが、赤血球濃度の違いによる差はほとんど見られなかった。よって赤血球がヒトの赤血球濃度の約 1.2×10^{-3} 倍の濃度以下であれば、赤血球濃度に 20 倍の開きがあっても薄い赤血球濃度環境下と変わらず赤血球溶液中の Sonazoid を凝集できることが分かった。

5.4 結言

本章では平板閉空間を用いて静水中における微小気泡の凝集体形成実験を行った。まず 5.2 節で振動特性測定と凝集実験の方法について述べた。5.3 節では気泡の振動特性と凝集観測の結果について述べ、照射音波の周波数、気泡材質、気泡濃度、赤血球の有無が凝集に与える影響について述べた。次章では 3.4.1 節で説明した単板振動子を用いて分岐構造を有する人工血管内での気泡誘導実験を行う。

.....

第 6 章

単板振動子を用いた微小気泡の経路選択実験

6.1 緒言

本論文の目的は分岐血管を流れる微小気泡に対する超音波照射により、音軸方向に作用する力や音軸の外側に向かう力を利用して流体中の気泡の挙動を制御することである。微小気泡の凝集現象について述べた前章に対し、本章では単板振動子を用いた分岐血管中を流れる気泡の動態制御について述べる。まず 6.2 節で実験方法について述べる。6.3 節では単分岐構造の血管中を流れる気泡を観察した結果と定量的な評価をした結果を述べる。6.4 節では多段階に分岐した血管中での経路選択を行う。複数の単板振動子を用いて多分岐流路内での経路選択を行い、バースト波を利用した間欠照射など照射パターン毎に誘導性能を比較する。最後に 6.5 節の結言でこの章のまとめを述べる。

6.2 実験方法

Fig.6.1、Fig.6.2 に構築した実験系の模式図および概観図を示す。脱気水を満たした水槽内に、3.8.3 節で述べた PVA 製(多分岐)流路を反射波を避けるために水槽底面から底上げして設置した。血管の第1分岐の後の径路は Path α , β に分かれ、さらに第2分岐の後の経路は Path A, B, C, D に分かれている。第1分岐第2分岐それぞれの経路の分岐角度は ψ_1 , ψ_2 deg となっている。

そして第1分岐の分岐地点と第2分岐の分岐地点に対してトランスデューサ Tr1, Tr2 から焦点を形成し、単分岐および連続する分岐における気泡の動態制御を行った。観測はマイクロスコープまたはハイスピードカメラによって記録され、照射時間に合わせて録画が終了するよう設定した。なお、カメラのフレームレートは 15 fps もしくは 60 fps に設定した。

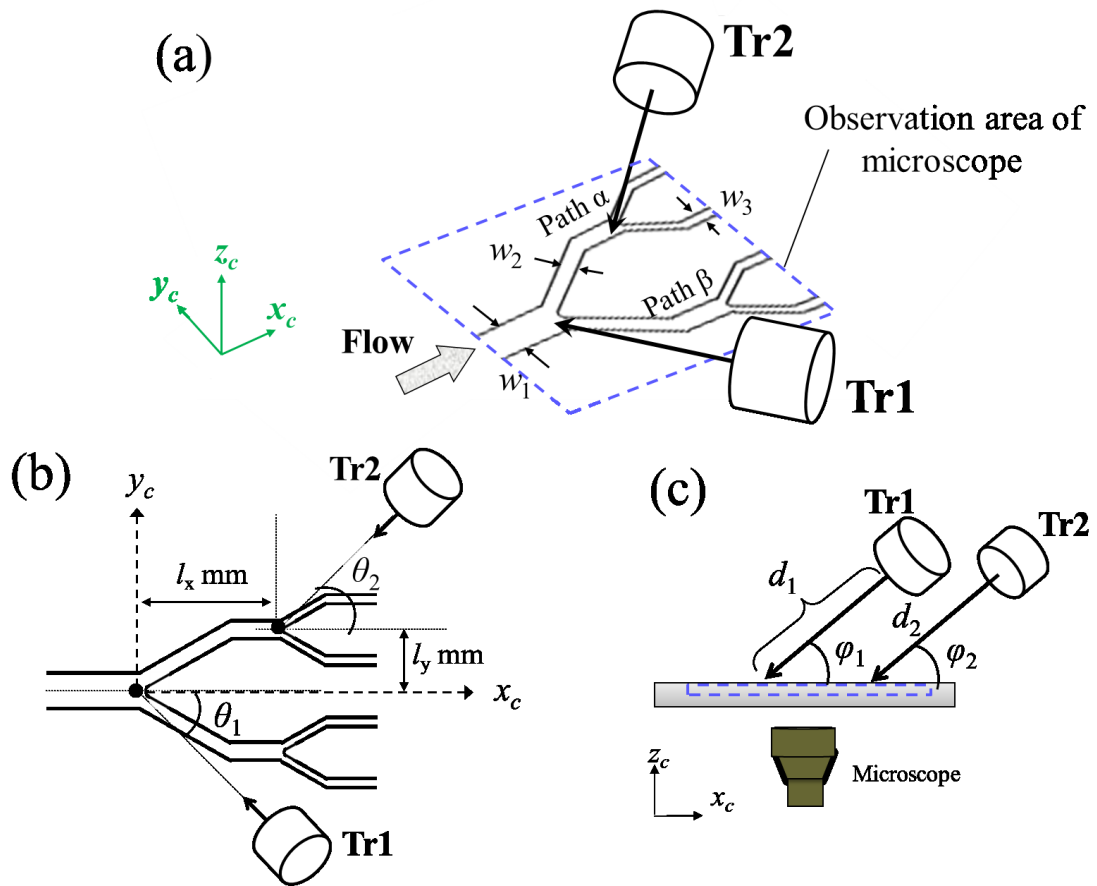


Fig.6.1 構築した実験系の模式図
 (a)概観図、(b)上方面図、(c)側面図

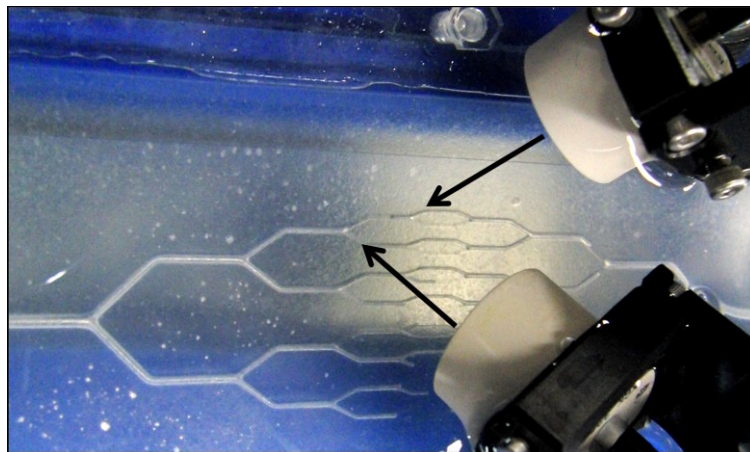


Fig.6.2 構築した実験系の概観図

これまでの研究において気泡量の推定は光学的に観測した懸濁液の輝度値を気泡濃度に置き換えて推定を行っていた[30,32,33]。前章で使用してきた従来の超音波

造影気泡の動態制御に関しては 1.1.2 節で述べたように、これまでに超音波照射による経路選択を実現してきた[30]。本実験でも F-04E を評価する場合には 4.3 節で設定した各径路の下流領域に関心領域 ROI A,B,C,D において輝度値解析を行い、気泡が流れてくることによって生じる輝度値の推移を測定した。ROI の幅は流路幅に合わせて、流れ方向の長さは L とした。そして(4.3)式を用いて評価した。

本節ではさらに従来のマイクロバブルに替わり、表面修飾することで標的指向性を容易に付与可能なバブルリポソーム(以下 BLs)を導入し、人工血管内での音波照射による動態制御・およびその評価について検討する。使用した BLs は平均直径 500 nm とマイクロバブルに比べ小さく、さらに体内での血液希釈を考慮して約 20-100 倍に希釈して使用するため、光学観測の際に検出されにくいため従来の輝度値による評価ができない問題がある。そこで 4.3.2 節の方法で評価できるよう分岐後の経路 2 か所に同時に集束音波を照射できるよう、捕捉用音源 T_{ag} を Path α , β の中腹部にそれぞれ配置し、それぞれの焦点位置で同時に捕捉される気泡量を計測する評価を行った。その際に関心領域の設定を以下のように行った。

気泡量評価のための捕捉用トランスデューサと関心領域の位置関係を Fig.6.3 に示す。下流に設置した 2 つの T_{ag} は Fig.6.1 の Tr1, Tr2 と異なり、気泡を流路中腹で捕捉するために配置している。また、分岐前後での捕捉される気泡の総量が変わらないことを確認するため分岐手前 5 mm の位置に T_{ag}' として他の 2 つの T_{ag} と同じ型番のトランスデューサ(5F-sin)を配置した。 T_{ag}' の流路平面に対する照射角度は 60 deg である。各関心領域の幅は流路幅に合わせて、領域の長さは音波ビームのスポット径[31]よりも十分広い範囲で設定し、ROI α , β の大きさは $1.1 \times 6.5 \text{ mm}^2$ 、ROI O は $1.6 \times 10.0 \text{ mm}^2$ とした。

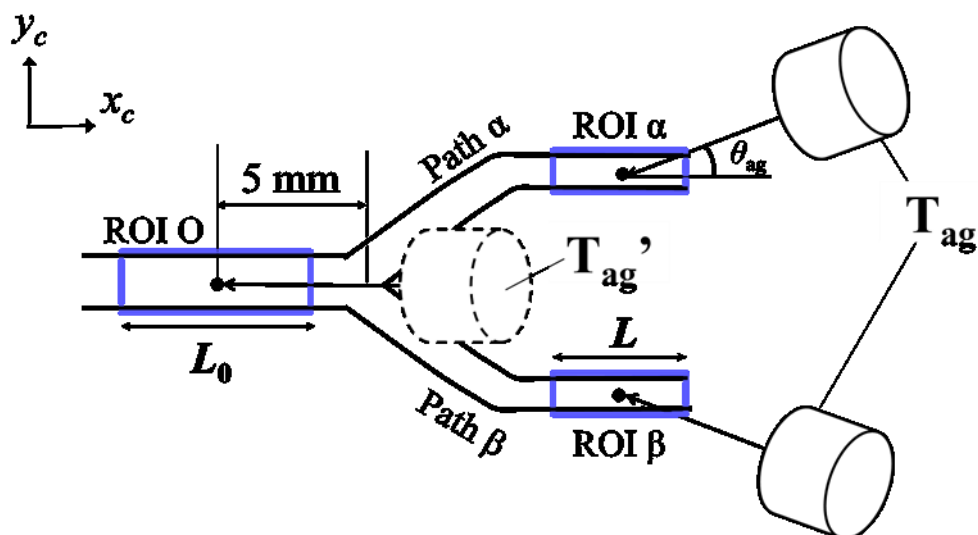


Fig.6.3 捕捉用トランスデューサと関心領域の位置関係

6.3 単分岐部流路における微小気泡の経路選択

6.3.1 微小気泡の濃度と捕捉面積の関係

Fig.6.3 の系において気泡濃度と捕捉面積の関係を確認するため、気泡の誘導を行わない状態で ROI α と ROI α, β の捕捉面積を計測した。生理食塩水(0.9%)媒質中に分岐部上流から希釈した BLs をシリンジを用いて 3 cc 注入した。この時の流速は 40 mm/s とし、脂質濃度 0.01 - 0.05 mg lipid /ml の 5 種類の異なる気泡濃度懸濁液を用意した。そして最大音圧 500 kPa-pp に設定した T_{ag} と T_{ag}' から連続波を照射した。そのときのそれぞれの捕捉面積の測定結果を Fig.6.4 に示す。ROI α, β の捕捉面積は同一の試行中に同時に計測し、ROI α の面積は別の試行で計測した。

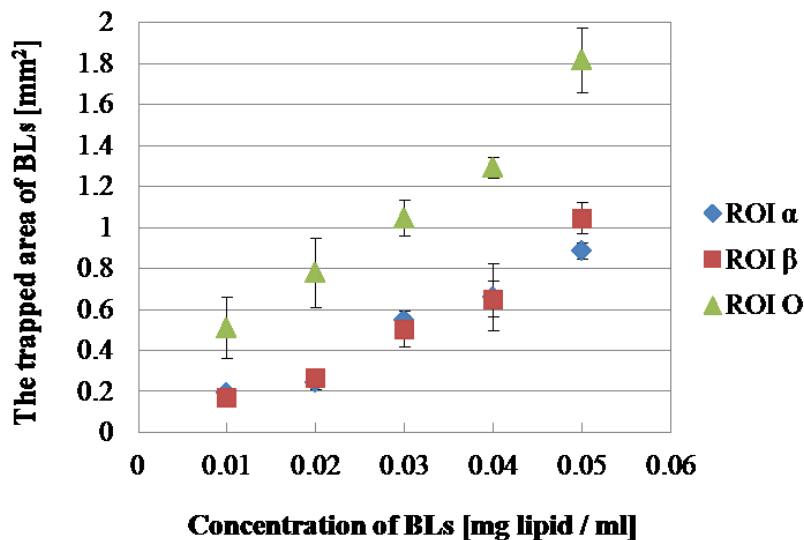


Fig.6.4 各関心領域における捕捉面積と気泡懸濁液濃度の関係

Fig.6.4 に示されたように 0.01 - 0.05 mg lipid /ml の範囲において捕捉面積は濃度変化に伴う変化を示すことを確認した。さらに ROI α, β における捕捉量は ROI α, β の約 2 倍であることから、分岐前後で気泡量が保存されることが確認された。以上より、この濃度範囲は捕捉面積の変化を顕著に示すことから、捕捉面積から気泡濃度および気泡量を推定可能であることが分かった。実験においては、100%誘導されても捕捉面積が計測可能範囲に収まるように 0.02 mg lipid/ml を使用することとする。

6.3.2 単一音源による経路選択結果

Fig.6.1 の実験系において、誘導用超音波 Tr1 のみを用いて BLs を誘導した結果を以下に示す。分岐間の距離が $l_x = 16$ mm、 $l_y = 4$ mm、分岐前後の流路幅が $w_1 = 1.4$ mm から $w_2 = 1.0$ mm に変化する箇所を対象とした。誘導用トランスデューサ Tr1 の照射角度は流路のプラスチック容器の音場への影響を避けるために x_c - y_c 平面からの仰角を $\varphi_1 = 30$ deg とし、Path β に押し出すように誘導できるように方位角を $\theta_1 = -225$ deg

とした。この方位角はこれまでの研究から最も精度良く誘導できる角度である[32,33]。尚、焦点距離 $d_1 = 60 \text{ mm}$ とした。

Tr1 のみ中心周波数 5 MHz、最大音圧 200 kPa-pp、流速 40 mm/sec として分岐地点に対し音波照射し、フレームレート 15 fps のマイクロスコープを用いて観測した結果を **Fig.6.5** に示す。この結果は 4.3.2 節の方法で画像処理された抽出画像であり、照射開始からの時間 $t = 1.0 \text{ s}$ の画像には人工血管の壁が白色の実線として重畳表示されている。さらに $t = 19.0 \text{ s}$ の画像において破線で囲われた分岐部分を拡大表示している。Tr1 照射位置の手前では流れている気泡は倍率の問題で観測されないが、Tr1 の照射後には凝集した気泡塊の流れが Path β において見えてくるのを確認した。流れる BLs は T_{ag} の照射により ROI α, β において捕捉され、特に ROI B の捕捉量増加が観測された。また、 $t = 20 \text{ s}$ までは Tr1 照射による分岐部での捕捉も確認された。Tr1 の照射が終わると分岐部で捕捉されていた BLs の大部分が崩れながら流れ、下流の両関心領域に流入した。 $t = 20 \text{ s}$ から 30 s の間で両関心領域の捕捉された気泡塊は成長し、そして T_{ag} の照射が切れる $t = 30 \text{ s}$ 後には捕捉されていた凝集塊が崩れながら観測画面から流されていった。

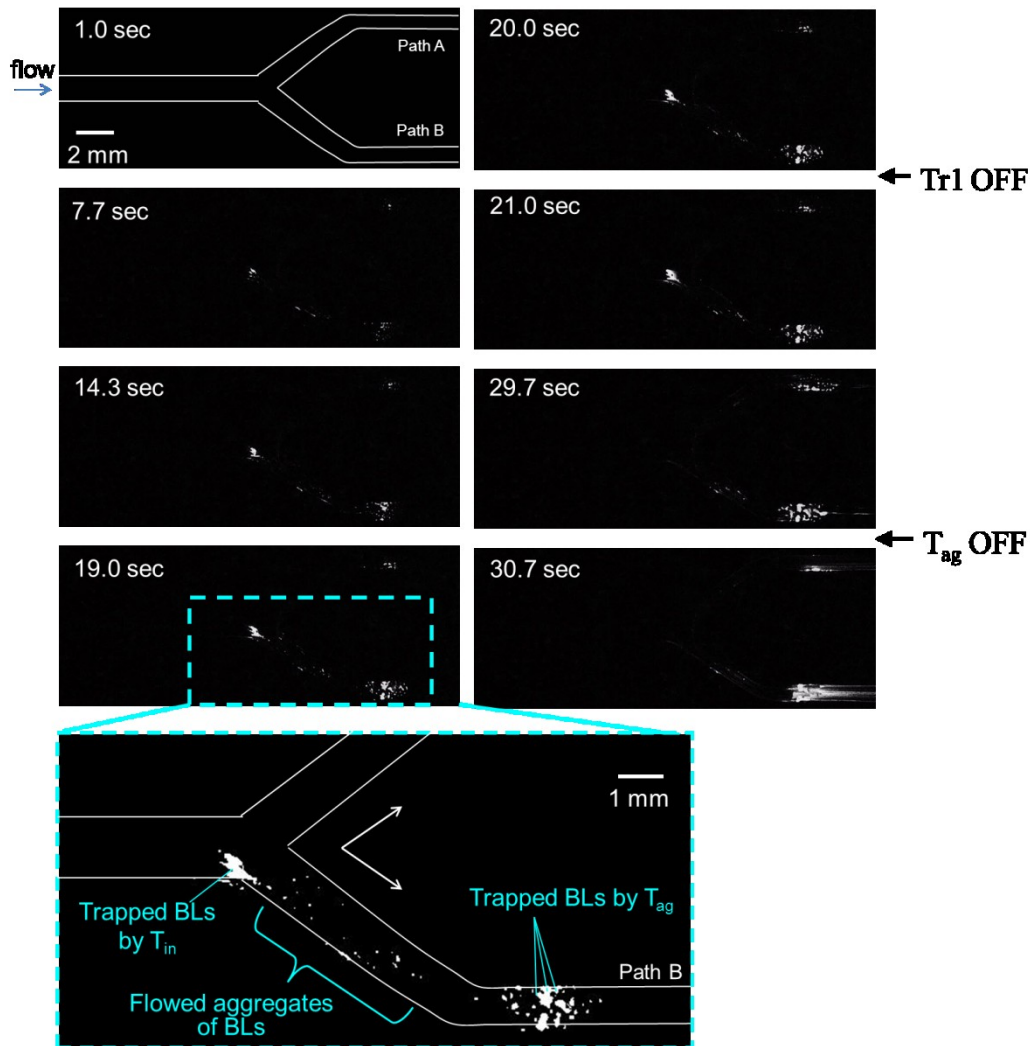


Fig.6.5 観測領域における抽出画像の連続写真

次に関心領域 ROI α , β の捕捉面積の時間変化を Fig.6.6 に示す。Tr1 の最大音圧は 200 kPa-pp である。BLs が流れてくる前は捕捉面積はほぼ 0 であり、BLs が下流に流れてくるのに伴い両 ROI での捕捉量が増加していき、Tr1 が照射されている場合には多くの BLs が Path β に流れるため、ROI α , β で明らかな差が表れる。 $t = 20$ s で Tr1 の照射が切れると、分岐部に捕捉されていた分が下流に流れていくため、ROI α , β での捕捉量が増加する。 $t = 30$ s で T_{ag} の照射が終わると、捕捉されていた塊が崩れながら観測されるため ROI α , β での計測量が最大となる。これは T_{ag} の照射により捕捉されていた気泡の凝集塊が崩れ、血管壁から剥がれて流れていく際に気泡塊の影が大きく映るためである。評価するタイミングはそれぞれの音波照射が切れる直前の $t = 20$ s と 30 s とした。

Tr1 には凹面振動子で中心周波数が 3, 5, 7, 10 MHz (3F-sin、5F-sin、7F-sin、10F-sin) の 4 種類の素子を用いた。

Table 6.1 各音波のパラメータ

	Tr1	T _{ag}
Type	Focused	Focused
Mode	CW	CW
Max. sound pressure [kPa-pp]	100, 200, 300, 400, 500	500
Frequency [MHz]	3, 5, 7, 10	5
Azimuth angle [deg]	$\theta_1 = -225$	$\theta_{ag} = 20, -20$
Elevation angle [deg]	$\varphi_1 = 30$	60

懸濁液の流れきる時間を考慮し、音波の照射時間 t を Tr1 の場合 20 s、T_{ag} の場合 30 s に設定した。制御性能を比較するため、Tr1 の中心周波数 3-10 MHz、および最大音圧 100-500 kPa-pp をパラメータとして変化させた。各音波のパラメータを **Table 6.1** に示す。

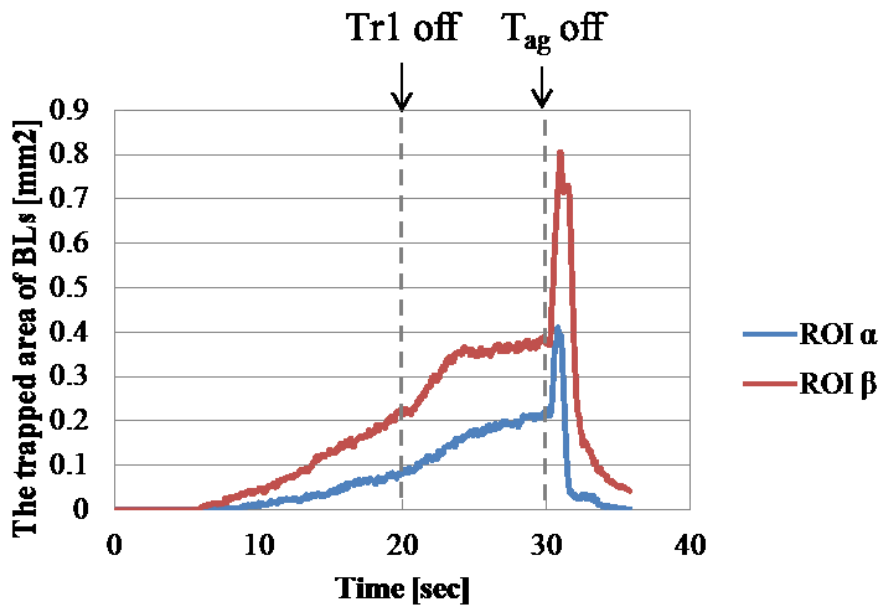


Fig.6.6 ROI α および ROI β における捕捉面積の時間変化

Tr1 の周波数を 5 MHz に固定し、音圧を 100-500 kPa-pp と変化させた ROI α, β における捕捉面積、および誘導率を **Fig.6.7** に示す。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を示している。統計学的検定手法である t 検定を用いて検定した結果、音圧 200 kPa-pp の場合において ROI β の捕捉面積は ROI α に比べ有意に高い値を示した。(* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.1$)。照射開始 20 s 後においては ROI β の捕捉面積は Tr1 の音圧に依らず約 0.2 mm^2 で一定であった。照射開始後 30 s においては Tr1 の

照射終了とともに分岐部で捕捉されていた分が下流まで流れ捕捉されるため、特に ROI β での捕捉面積が増加した。結果として Tr1 の音圧の増加に伴って 30 s 後の ROI β での捕捉面積が増加した。Figs.6.7 (a),(b)を比較すると ROI β での捕捉面積は 100, 200, 300, 400, 500 kPa-pp の音圧において それぞれ 1.35, 1.87, 1.81, 1.88, 2.03 倍となった。

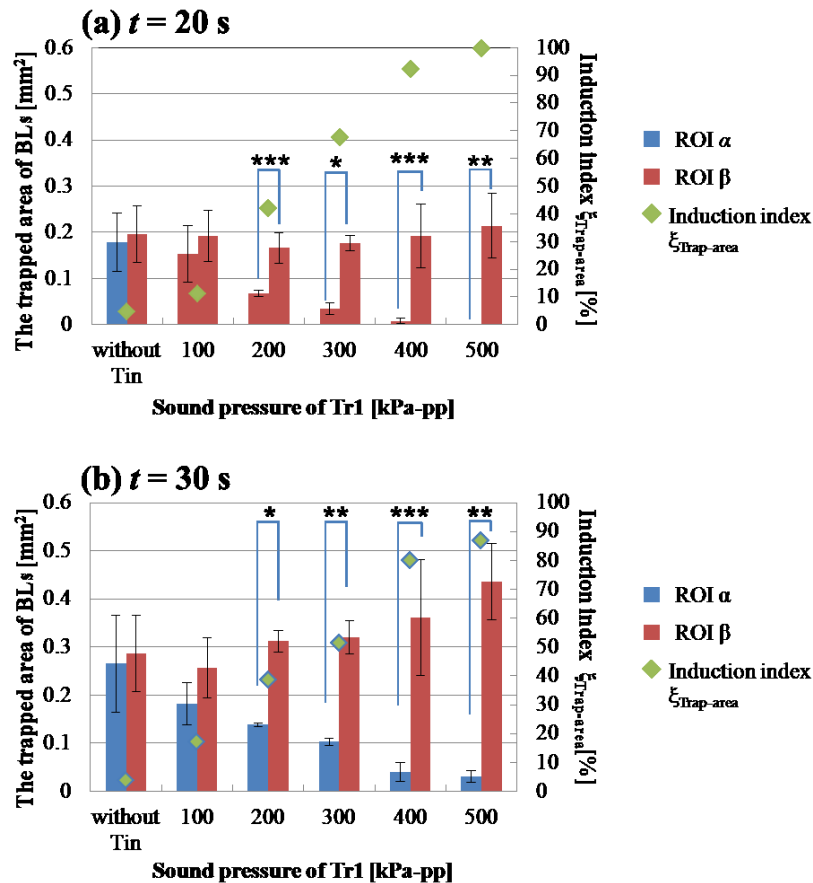


Fig.6.7 Tr1 の音圧に対する各関心領域での捕捉面積と誘導率
(a) 照射開始からの時間 $t = 20$ s, (b) 30 s

続いて、音圧を 200 kPa-pp に固定して、周波数を 3,5,7,10 MHz と変化させた ROI α , β における捕捉面積、および誘導率を Fig.6.8 に示す。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を示している。t 検定による検定の結果、全ての周波数において ROI β の捕捉面積は ROI α に比べ有意に高い値を示した(* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$)。Figs.6.8(a),(b)を比較すると ROI β での捕捉面積は 3, 5, 7, 10 MHz の順にそれぞれ 3.52, 1.49, 1.48, 1.36 倍となった。照射開始 20 s 後において、特に 3 MHz の照射の場合、分岐部で捕捉される割合が多く、ROI β の捕捉面積が小さくなった。

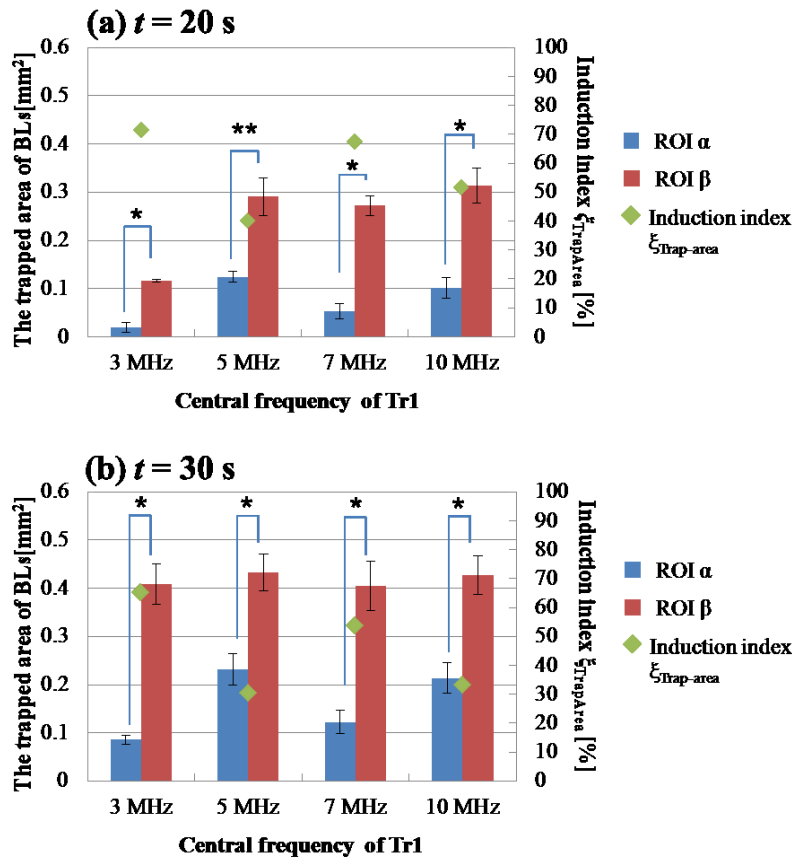


Fig.6.8 Tr1 の周波数に対する各関心領域での捕捉面積と誘導率
(a) 照射開始からの時間 $t = 20$ s, (b) 30 s

6.4 多段分岐部流路における微小気泡の経路選択

6.4.1 第1分岐のみに対する照射結果

Fig.6.1 の実験系において、誘導用超音波 Tr1 のみを用いて微小気泡 F-04E を誘導した結果を以下に示す。 x_c 軸に平行な分岐前後の経路間の距離が $l_x = 12$ mm、 $l_y = 2$ mm、分岐前後の流路幅が $w_1 = 1.0$ mm から $w_2 = 0.7$ mm、 $w_3 = 0.5$ mm に2段階分岐する箇所を対象とした。音源には 3.4.1 節で説明した1種類(5F-sin)を使用し、1段目の分岐と2段目の分岐に対し同じ型のトランスデューサをそれぞれ用意した。1つ目のトランスデューサ(Tr1)は第1分岐点の位置に、もう一方のトランスデューサ(Tr2)は第2分岐点の位置に素子の中心軸が重なるようにそれぞれ設置した。Tr1 を Path A,B に接続する流路の側に気泡を押し出せるように方位角を $\theta_1 = -45$ deg になるように固定した。尚、焦点距離 $d_1 = 60$ mm、平面に対する仰角は $\varphi_1 = 40$ deg とした。第1分岐点の分岐地点に向かって Tr1 から音波を照射した場合の観測結果を Fig.6.9 に示す。音波照射位置では分岐地点の画面上側の壁に気泡が押し付けられ、その後気泡凝集体の筋がスムーズに流れる様子が観測された。第1分岐後は Path A 側の壁に沿って Path A,B に繋がる経路を流れた。さらに第2分岐後にはそのまま Path A を多く流れる

ことが観測された。

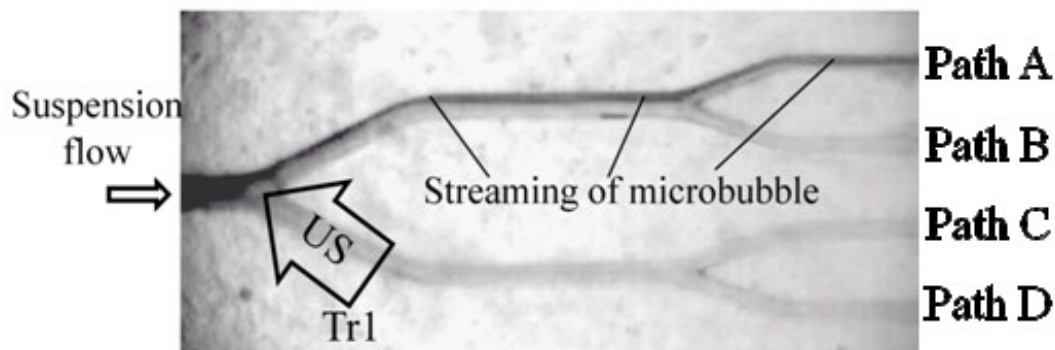


Fig. 6.9 第1分岐のみに対する音波照射による微小気泡の挙動観測結果 (Tr1:500kPa-pp, 40 mm/s)

Fig.6.10 に Tr1 の音圧を 100-400 kPa-pp まで変化させたときの各径路を流れる気泡量の割合を示す。この結果より 300 kPa-pp まで Path A を流れる気泡量の割合が増大し、それ以上の音圧では飽和する結果となった。

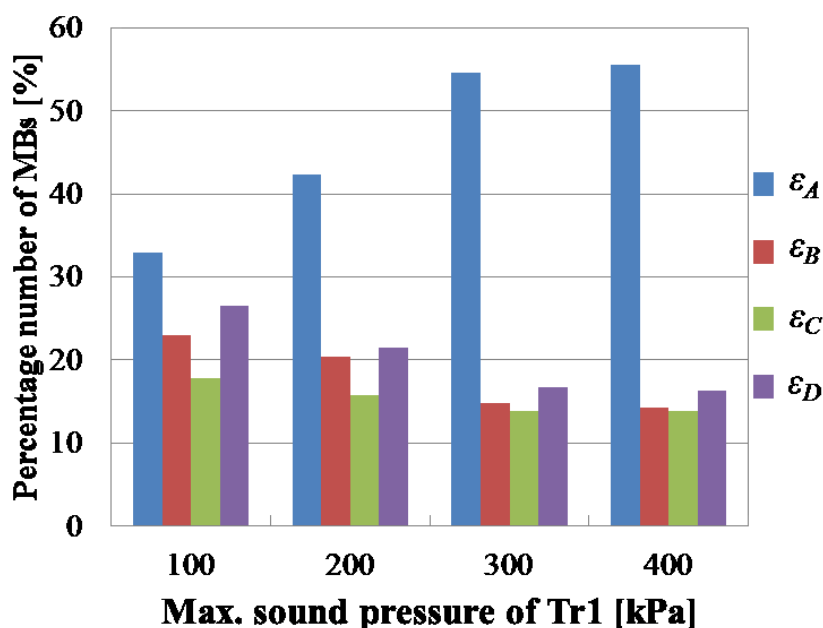


Fig. 6.10 第1分岐に対する音波照射による各径路を流れる気泡割合

6.4.2 第2分岐のみに対する照射結果

Fig.6.1 の実験系において第2分岐点の分岐地点に向かって Tr2 から音波を照射した場合の観測結果を Fig.6.11 に示す。Tr2 は 第2分岐地点から Path B の方向に気泡を押し出せるように Tr1 とは x_c 軸対象となる方向から $\theta_2 = 45 \text{ deg}$ となるように固定した。尚、焦点距離 $d_2 = 60 \text{ mm}$ 、平面に対する仰角は $\varphi_2 = 40 \text{ deg}$ とした。音波照射位置で壁に押し付けられる気泡が観測され、その後気泡凝集体の筋がスムーズに壁に沿

って Path B を流れる様子が観測された。

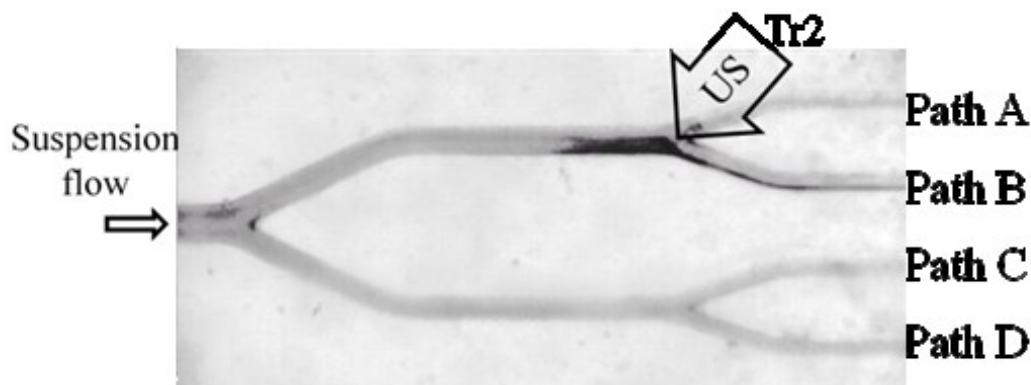


Fig. 6.11 第2分岐のみに対する音波照射による微小気泡の挙動観測結果
(Tr2:500kPa-pp, 40 mm/s)

Fig.6.12 に Tr2 の音圧を 100-400 kPa-pp まで変化させたときの各径路を流れる気泡量の割合を示す。この結果より 200 kPa-pp 以上の音圧で Path B を流れる気泡量の割合が多くなり、400 kPa-pp の音圧までその割合が微増する結果となった。

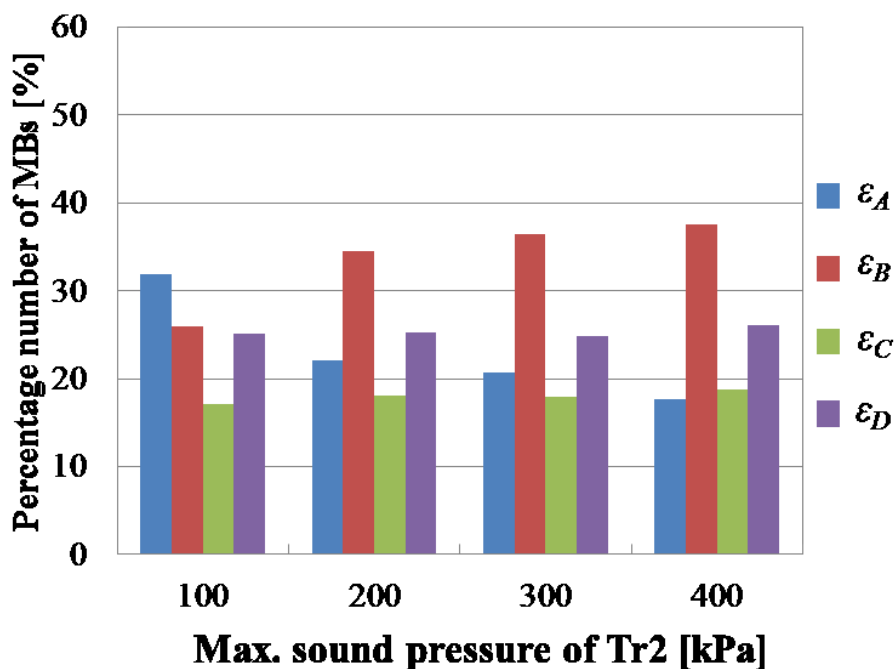


Fig. 6.12 第2分岐に対する音波照射による各径路を流れる気泡割合

6.4.3 複数音源による連続経路選択結果

Fig.6.1 の実験系において 6.4.1 節および 6.4.2 節と同様のセッティングで第1分岐と第2分岐点の分岐点に向かって Tr1 と Tr2 から同時に連続波を照射した場合の観測結果を Fig.6.13 に示す。第1分岐で押し付けられた気泡が Path A 側の壁を沿って

流れるのは Fig.6.9 の場合と同様であるが、第 2 分岐に対する照射によりコースが変わり、その後 Path B を流れる様子が観測された。

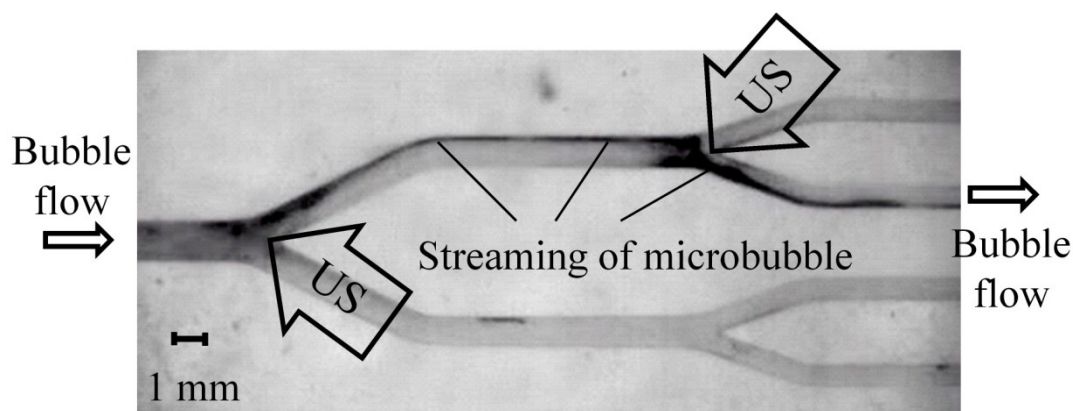


Fig. 6.13 第 1 分岐と第 2 分岐に対する同時照射による微小気泡の挙動観測結果 (Tr1,Tr2:500kPa-pp, 40 mm/s)

Fig.6.14 に照射パターン毎の各径路のバブル割合の測定結果を示す。横軸にそれぞれ Tr1 のみの照射、Tr2 のみの照射、両方照射した場合の照射パターンを示し、縦軸に各径路を流れたバブルの割合を示している。なおこの時の音圧は Tr1,Tr2ともに 500 kPa-pp である。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を示している。Tr2 のみの照射の場合に比べ、Tr1, Tr2 を同時に照射した場合に Path B を流れる気泡量の割合が増加した。この結果より、複数音源を用いることで、より多くのバブルを所望の経路に誘導できることを示した。

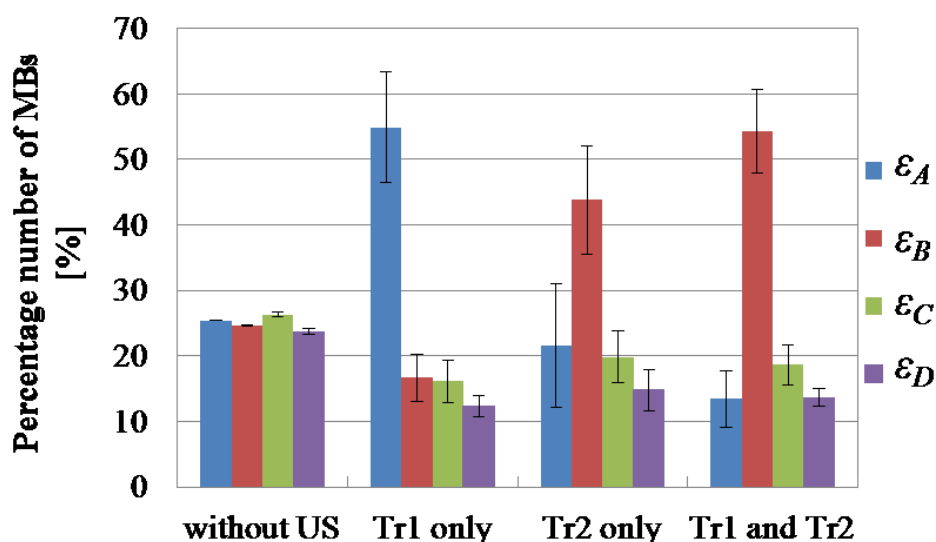


Fig. 6.14 第 1 分岐と第 2 分岐に対する照射パターン毎の各径路を流れる気泡割合

6.4.4 連続波照射と間欠照射の比較結果

Fig.6.1の実験系においてTr1とTr2からの音波照射を連続波とバースト波で比較した場合の各径路を流れる気泡割合の結果をFig.6.15に示す。その際、Tr1とTr2には同じ波形を入力し、単位時間当たりの音響エネルギーを揃えるため、音圧を $1/\sqrt{2}$ 倍した連続波(CW：最大音圧 200 kPa-pp)と照射時間を半分にしたバースト波(BW：最大音圧 256 kPa-pp, duty比 50%, PRF 2 kHz)を比較した。バースト波入力の際にはTr1とTr2が交互発振となるように3.4.2節で説明した発振器によって制御した。エラーバーは3回の試行の標準偏差を示している。連続波照射よりもバースト波を利用した間欠照射の方が有意にPath Bを流れる気泡割合が高くなった。

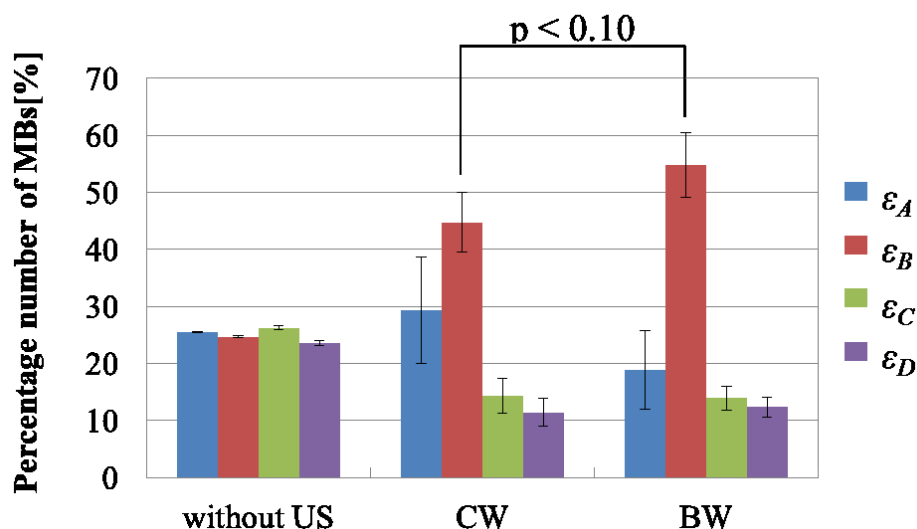


Fig. 6.15 第1分岐と第2分岐に対する照射の連続波とバースト波の比較 (CW:Tr1,Tr2_200kPa-pp,BW:Tr1,Tr2_256kPa-pp,duty比50%,PRF2kHz,交互発振)

6.4.5 投入エネルギーを揃えた照射パターンの比較結果

6.4.1節と6.4.3節の結果から第1分岐に対する照射によってその後もPath A側に偏って流れる様子が観測された。そこで、第1分岐と第2分岐に投入するエネルギー量の比率を変えて効率的な照射パターンを検討した。2.5節で述べた方法により投入する総エネルギーを最大音圧 300 kPa-ppのCW相当に揃えている。第1分岐と第2分岐に同エネルギーを投入する照射パターン i、第2分岐よりも第1分岐に高エネルギーを投入する照射パターン ii、パターン iiを逆にした照射パターン iiiの3通りを比較した。各照射パターンごとの波形モードと音圧をTable 6.3に示す。

Table 6.3 各照射パターンごとの波形モードと音圧

US pattern	Tr1		Tr2	
	Mode	Sound pressure[kPa]	Mode	Sound pressure [kPa]

i	CW	300	CW	300
ii	BW (duty 90 %,PRF 200 kHz)	200	BW (duty 90 %,PRF 200 kHz)	400
iii	BW (duty 90 %,PRF 200 kHz)	400	BW (duty 90 %,PRF 200 kHz)	200

第1分岐と第2分岐へ投入する総エネルギー量を最大音圧 300 kPa-pp の CW 相当に揃えた3種類の照射パターンの各径路を流れる気泡割合の結果を **Fig.6.16** に示す。エラーバーは3回の試行の標準偏差を示している。その結果、第1分岐より第2分岐に多くのエネルギーを割く照射パターン iii よりも、第1分岐により多くのエネルギーを投入する照射パターン ii の方が有意に Path B を流れる気泡割合が高くなった。これより1段目の制御で生じる偏りを考慮することで投入する総エネルギーを抑制できることが示唆された。

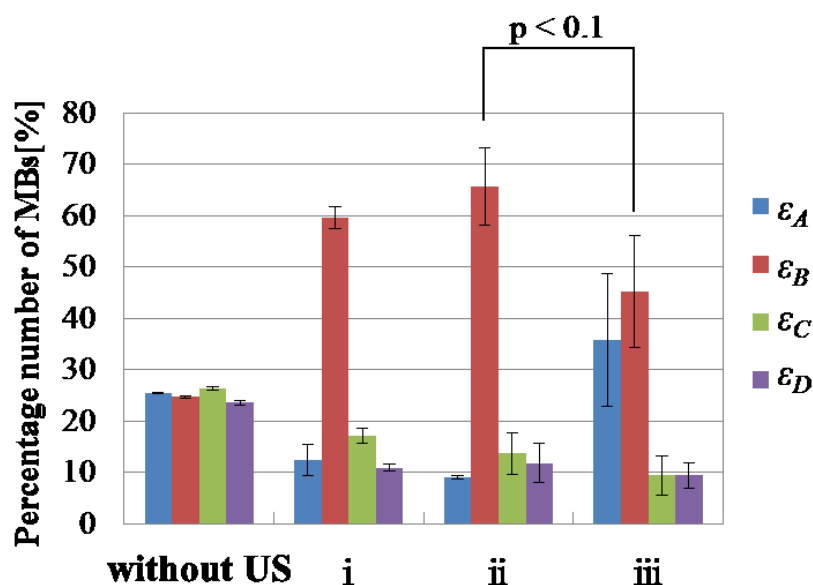


Fig. 6.16 照射パターン毎の各径路を流れる気泡割合

6.5 結言

本章では単板振動子を用いた分岐血管における微小気泡の経路選択制御について述べた。まず 6.2 節で単純分岐血管に超音波を照射する場合と分岐を繰り返す構造の血管に照射する場合の実験方法を述べた。6.3 節では単分岐血管を流れる気泡の様子を観察した結果と定量的な評価をした結果を示した。その結果、標的指向性を

付与可能なバブル製剤である BLs を超音波照射により制御できることを示した。6.4 節では多分岐血管に対する照射の場合には照射パターンや波形を変えて誘導効率が異なることを示した。その結果、第 1 分岐への照射で生じる気泡の偏りを考慮することで投入するエネルギーを抑制した制御が行えることを示した。次章ではアレイ型トランスデューサを用いた経路選択実験について述べる。

.....

第7章

アレイ型トランスデューサを用いた微小気泡の経路選択実験

7.1 緒言

単板振動子を用いて気泡の経路選択を行った前章に対し、本章では複数焦点を形成可能なアレイ型トランスデューサを利用した経路選択を行う。まず 7.2 節で実験方法について述べる。7.3 節では単分岐流路においてアレイ型トランスデューサのみの照射による気泡の経路選択結果を示す。7.4 節では凝集体形成を利用した多段分岐流路における経路選択を示し、焦点切り替えによる気泡の経路スイッチング、粘性流体中における検証、気泡種類の違いに対する誘導挙動の比較を行う。最後に 7.5 節の結言でこの章のまとめを述べる。

7.2 実験方法

構築した実験系の模式図と概観図を **Fig.7.1** と **Fig.7.2** にそれぞれ示す。PVA 製(多分岐)流路を対象とし、流路幅が w_1 から w_2 , w_3 に変化する箇所を観察した。前章と同様に流路を脱気水で満たされた水槽中に沈め、水槽底部から流路内の関心領域をマイクロスコプ(VC7700, Hirox)にて観察した。1 画素あたり $31.5 - 45 \mu\text{m}$ となる倍率に設定した。流路は音波照射の際多重反射を防ぐために流路を水槽底面から浮かせて固定した。音源には 3.4 節で説明した 2 種類を使用し、1 つ目のトランスデューサ(T_{ag})は分岐手前で微小気泡の凝集体を生成するため第 1 分岐点上流側へ 10 mm の位置に配置し、もう一方のトランスデューサ(T_{in})は凝集体を流路の任意方向に誘導するため第 1 分岐と第 2 分岐点から数 mm の範囲内に焦点を形成できるように流れに対向する向きに配置した。 T_{ag} には単板振動子 7P-sin を使用し、流路平面からの仰角を θ_{ag} となるように固定した。 T_{in} にはアレイ型トランスデューサ 1A-64c もしくは 3A-64ch を使用し、流路平面からの仰角が θ_{in} になるように固定した。それぞれ焦点距離 d_{ag} , d_{in} mm とした。各音波パラメータを **Table 7.1** に示す。この装置により、流路上流から注射器により一定濃度の微小気泡の懸濁液を注入し、観察領域内に現れる気泡の挙動を観察する。この時の流速は 40 mm/s とし、懸濁液の濃度は気泡体積濃度を $1.18 \mu\text{l/ml}$ に統一し、 3 cc 注入した。そして単一焦点の場合と素子を分割して複数焦点を形成した場合を比較した。なお、 T_{in} の素子への印加電圧を一定(10V-pp もしくは 15 V-pp)として実験を行った。関心領域の大きさは流路幅と流速から $1.0 \times 2.6 \text{ mm}^2$ とし、4.3.1 節の方法で誘導率を評価した。

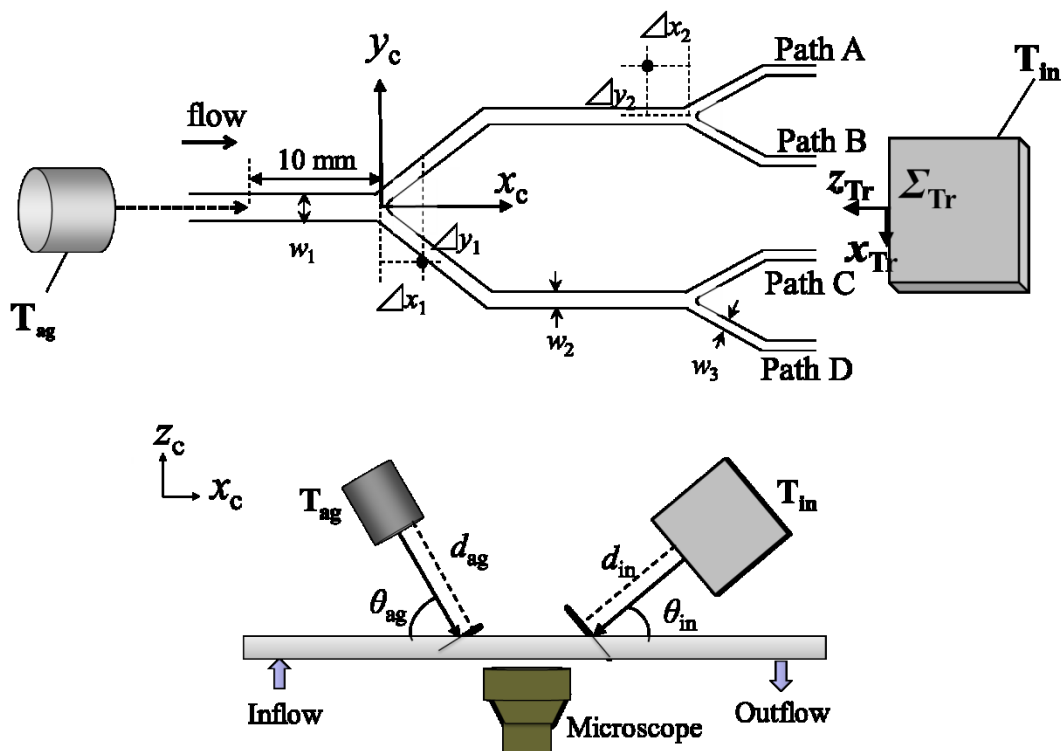


Fig.7.1 分岐位置以外への照射による誘導実験系の模式図

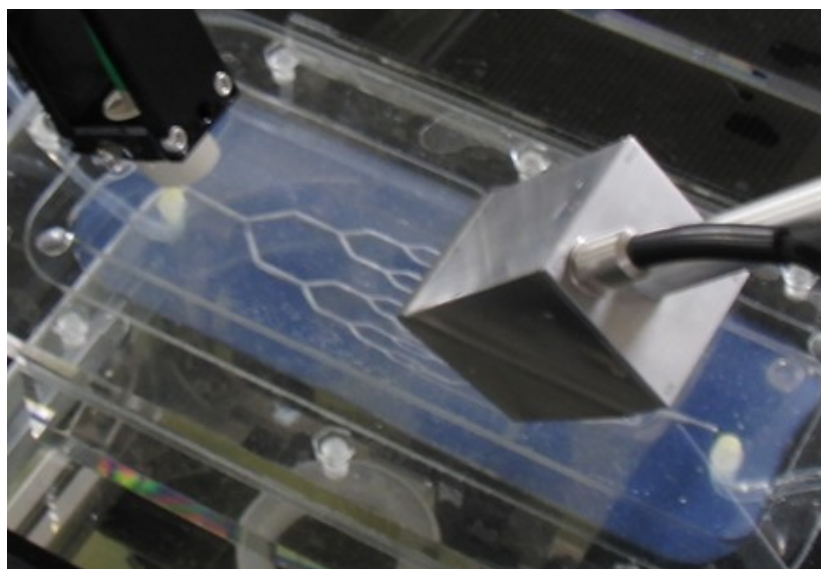


Fig.7.2 実験系の概観図

本実験では 64 素子を使用して 1 焦点を形成する場合と、斜めに 32 素子ずつに分割して 2 焦点を形成する場合を比較する。ここで 3.5.2 節で計測した音圧分布に対し、仰角 $\theta_{in} = 40, 60 \text{ deg}$ において、 F_L と F_U に焦点を形成した場合の数値計算による 3 次元音圧分布を Fig.7.3 に示す。

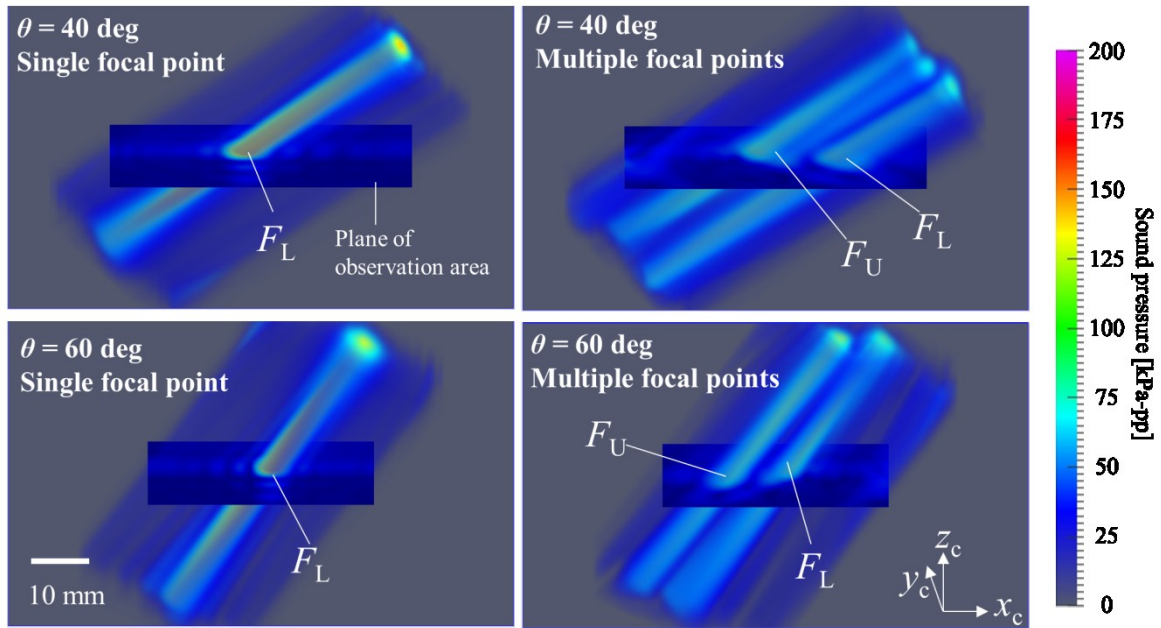


Fig. 7.3 1 焦点音場と2 焦点音場の3次元音圧分布(3A-64ch)
(上段: $\theta_{in}=40$ deg、下段: $\theta_{in}=60$ deg)

3.5.2 節で計測した音圧分布より、3A-64ch の焦点のビーム幅が約 2 - 3 mm であったため焦点の形成位置の間隔を最小で 1 mm とした。焦点形成位置と流路との位置関係を **Fig.7.4** に示す。焦点形成位置 $F_{L1} \sim F_{L6}$ はそれぞれ、3.5.1 節で定義したトランスデューサ座標系で $F_L(x_{Tr}, y_{Tr}, z_{Tr}) = F_{L1}(1,1,60)$, $F_{L2}(1,0,60)$, $F_{L3}(1,-1,60)$, $F_{L4}(2,1,60)$, $F_{L5}(2,0,60)$, $F_{L6}(2,-1,60)$ に対応する。1 焦点音場の場合は F_L のいずれかに焦点を形成し 2 焦点音場の場合は F_U と F_L の焦点のペアに形成した音場である。ここで $F_U(x_{Tr}, y_{Tr}, z_{Tr}) = (0,4,60)$ は凝集用焦点として形成する。

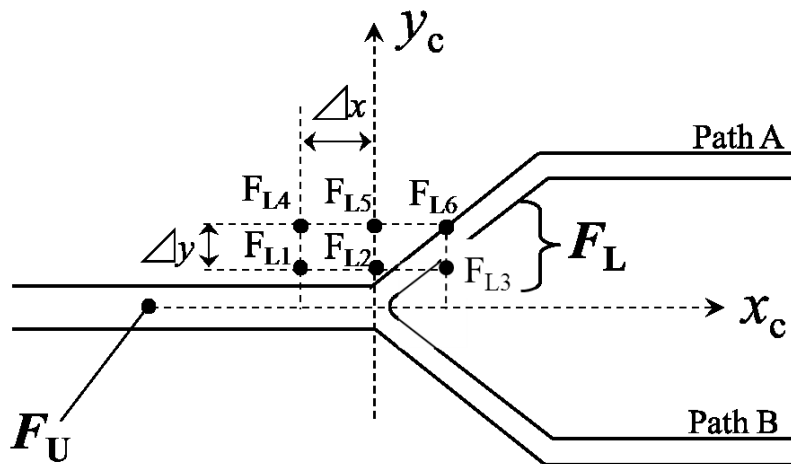


Fig.7.4 焦点形成地と第 1 分岐部との関係

同じく 3.5.2 節で計測した音圧分布より、1A-64ch の焦点のビーム幅が約 4-5 mm で

あつたため焦点の形成位置の間隔を最小で 2 mm とした。焦点形成位置と流路との位置関係を Fig.7.5 に示す。

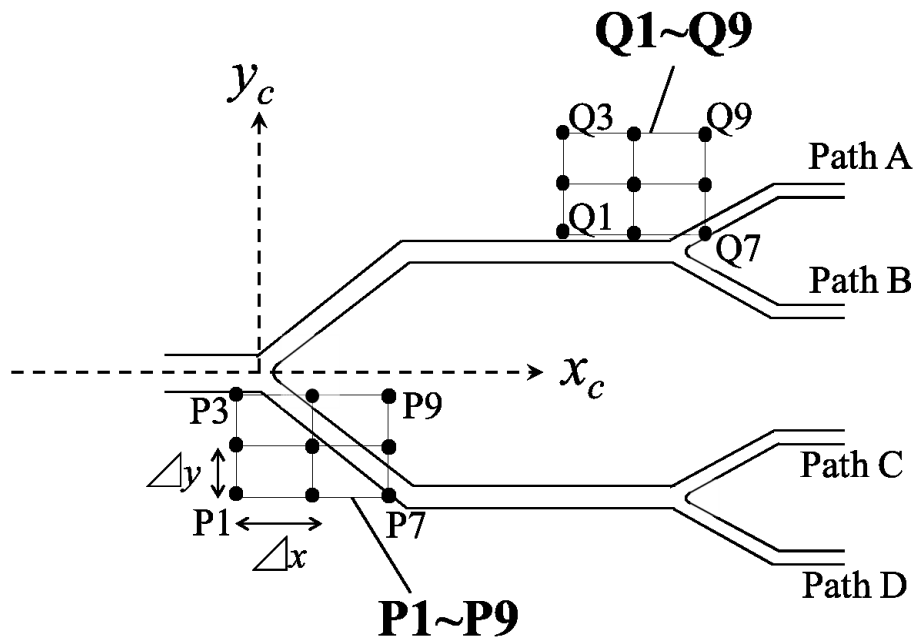


Fig.7.5 焦点形成地と第 1,第 2 分岐部との関係

7.3 単分岐部流路への焦点形成による微小気泡の経路選択

7.3.1 微小気泡の濃度と輝度値の関係

過去の実験で気泡サイズよりも画素サイズが十分小さい場合において流路内の輝度値の時間変化から流れる微小気泡の量を推定できるという結果を得ているが[32]、今回は気泡サイズよりも画素サイズが大きいため、輝度値と気泡濃度との関係をあらためて測定した。気泡濃度と輝度値との関係を Fig.7.6 に示す。

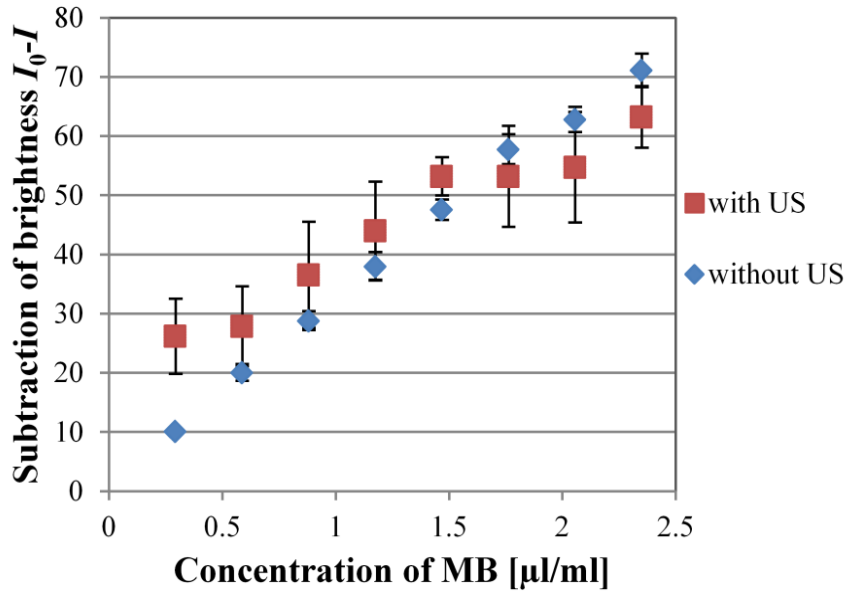


Fig.7.6 気泡濃度と輝度値との関係

ここでは第1分岐手前の流路に ROI を設定し、1 画素あたり 45 μm となる観察倍率において気泡濃度の異なる 6 種類の懸濁液を流し観測した。微小気泡には F-04E を用いた。さらに凝集用音波照射による凝集体形成の有無で比較した。結果より濃度変化に対して輝度値変化が線形に変化する範囲を確認した。以降の実験ではこの範囲を実験に使用する。

7.3.2 分岐部への音場設計による経路選択結果

上記の実験系において、 T_{ag} の照射を行わず T_{in} のみを用いて Fig.7.4 の位置に焦点を形成し、微小気泡を誘導した結果を以下に示す。このとき、第 1 分岐を基準として分岐点に素子の中心軸が重なるように T_{in} を設置した。分岐間の距離は $l_x = 16 \text{ mm}$ 、 $l_y = 4 \text{ mm}$ 、分岐前後の流路幅は $w_1 = 1.4 \text{ mm}$ から $w_2 = 1.0 \text{ mm}$ に変化する 1 分岐を対象とした。流路平面からの照射距離は $d_{\text{in}} = 60 \text{ mm}$ とした。流路平面からの仰角をパラメータとし $\theta_{\text{in}} = 40 \text{ deg}$, 60 deg の 2 つの照射角度を設定した。

仰角 $\theta_{\text{in}} = 40 \text{ deg}$ の照射角度により F_L に焦点を形成した場合の観測結果を Fig.7.7 に示す。分割された 32 素子のみを用いて F_U に焦点を形成した場合(i)と 64 素子全てを用いて F_U に焦点を形成した場合(ii)を比較した。どちらの場合も凝集体の筋が流れる様子が観測されたが、64 素子を用いた(ii)の方が太い筋となって流れる様子が観測された。尚、それぞれの最大音圧は 32 素子の場合(i)に約 100 kPa-pp、64 素子の場合(ii)に約 180 kPa-pp である。

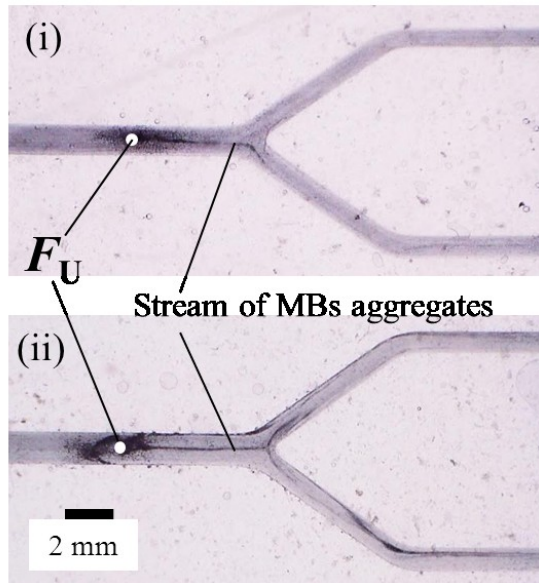


Fig.7.7 F_U に単焦点を形成したときの分岐部の観測結果
(32素子を用いた場合(i)、64素子を用いた場合(ii))

Fig.7.3 の設定のうち、分岐地点の近傍に仰角 $\theta_{in} = 40 \text{ deg}$ の照射角度により $F_{L6}, F_{L4}, F_{L3}, F_{L1}$ の位置にそれぞれ単焦点を形成した場合の観測結果を **Fig.7.8** に示す。このときアレイ型トランスデューサの 64 素子を使って 1 点に音波を集束させている。尚、Rayleigh の式に基づいて計算した音圧分布のうち、20 kPa-pp 以上の音圧を重畳表示している。単一焦点を F_{L6} に形成した場合は焦点のピーク地点で多少捕捉される様子が見られた(i)。 F_{L4} ではほぼ気泡の流れに影響を及ぼさなかった(ii)。 F_{L3} への照射では、気泡は一度分岐前で捕捉され、その後完全に捕捉されなかった気泡が Path B へ流れる様子が観測された(iii)。 F_{L1} では一部の気泡は Path B に誘導されるが音波照射により流れに影響を及ぼす量が少なかった(iv)。

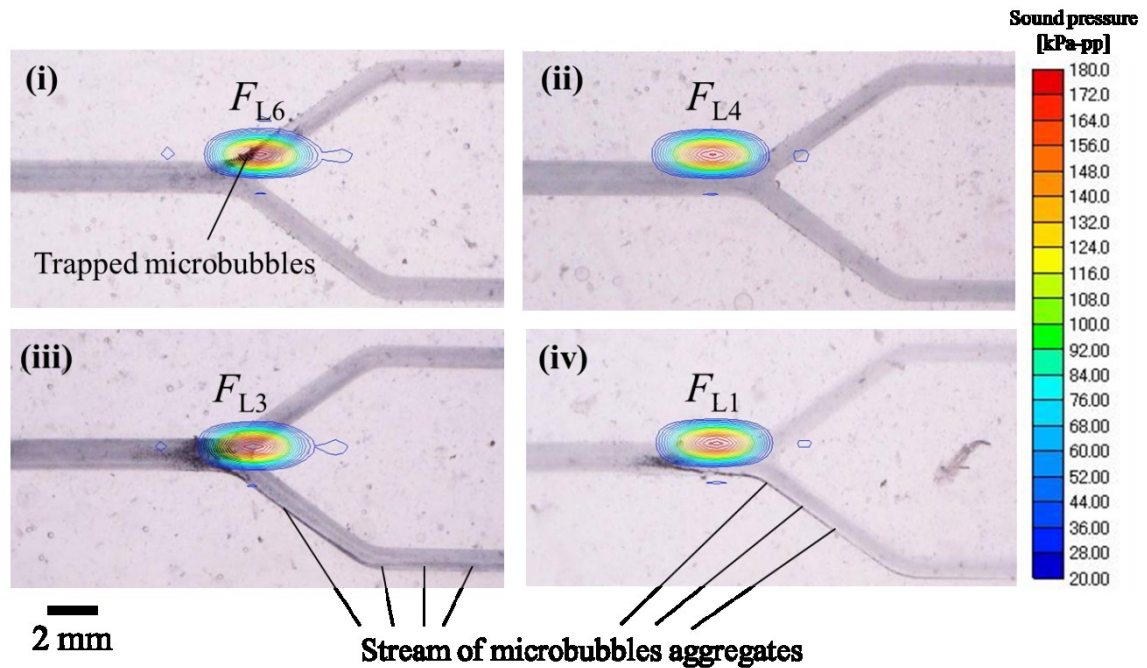


Fig.7.8 64 素子を用いて F_L に単焦点を形成した場合の分岐部の観測結果
(仰角 $\theta = 40$ deg、最大音圧 180 kPa-pp)

続いて分岐地点の近傍に仰角 $\theta_{in} = 40$ deg, において F_U と $F_{L6}, F_{L1}, F_{L3}, F_{L2}$ に対し複数焦点を形成した場合の観測結果を **Fig.7.9** に示す。このとき 32 素子ずつに分割して F_U と F_L それぞれの焦点を形成している。尚、Rayleigh の式に基づいて計算した音圧分布のうち、20 kPa-pp 以上の音圧を重畳表示している。分岐近傍用の焦点である F_{L6} に形成した場合には僅かに誘導されるもののほとんど影響が見られなかった(i)。 F_{L1} の場合は多くの気泡が捕捉された(ii)。 F_{L3} の場合はスムーズにかつ安定して気泡凝集体の筋が Path B を流れた(iii)。 F_{L2} の場合も安定して気泡凝集体の筋が Path B を流れるが、(iii) に比べ、その量は少なかった(iv)。

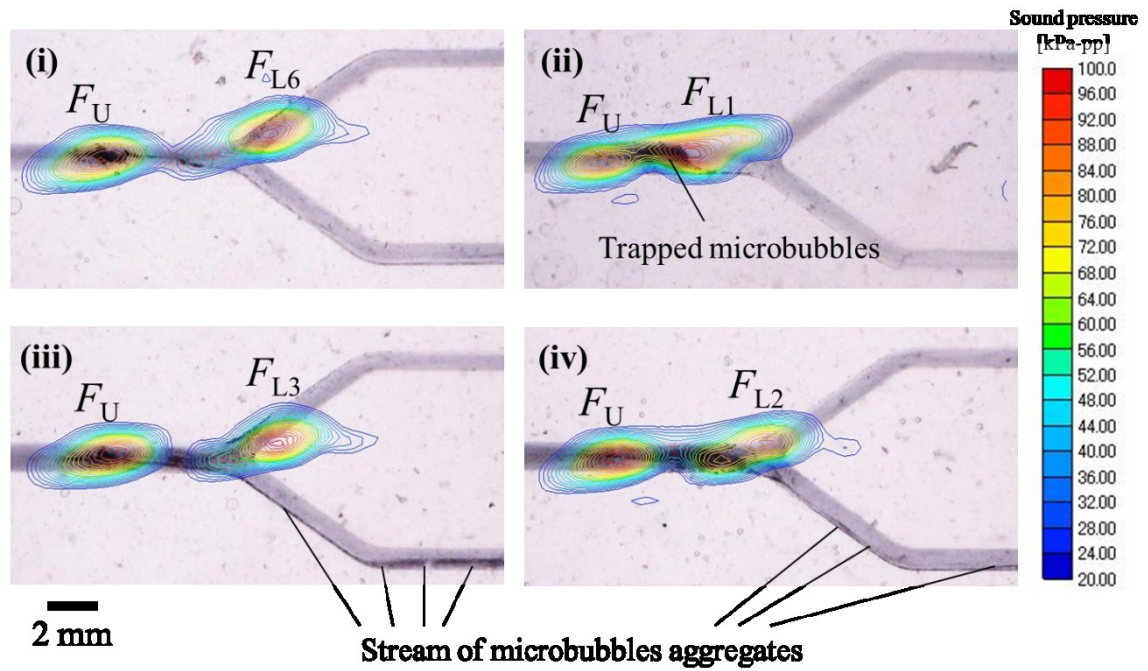


Fig.7.9 32 素子ずつに分割して F_U と F_L に対し複数焦点を形成した場合の分岐部の観測結果(仰角 $\theta = 40$ deg、最大音圧 100 kPa-pp)

次に、分岐点の近傍に仰角 $\theta_{in} = 60$ deg において F_{L3} , F_{L2} , F_{L6} , F_{L1} の位置にそれぞれ単焦点を形成した場合の観測結果を **Fig.7.10** に示す。このとき 64 素子を使って 1 点に音波を集束させている。尚、Rayleigh の式に基づいて計算した音圧分布のうち、20 kPa-pp 以上の音圧を重畳表示している。 F_{L3} の場合は焦点のピーク地点で捕捉される様子が見られた(i)。 F_{L2} でも分岐部付近で多少捕捉される様子が見られたが、その後気泡は両経路に流れた(ii)。 F_{L6} では分岐後で音波の影響は多少見られるが、気泡の流れには影響を与えなかった(iii)。 F_{L1} では分岐前で捕捉しつつ、その後少量の気泡が Path B を流れた(iv)。

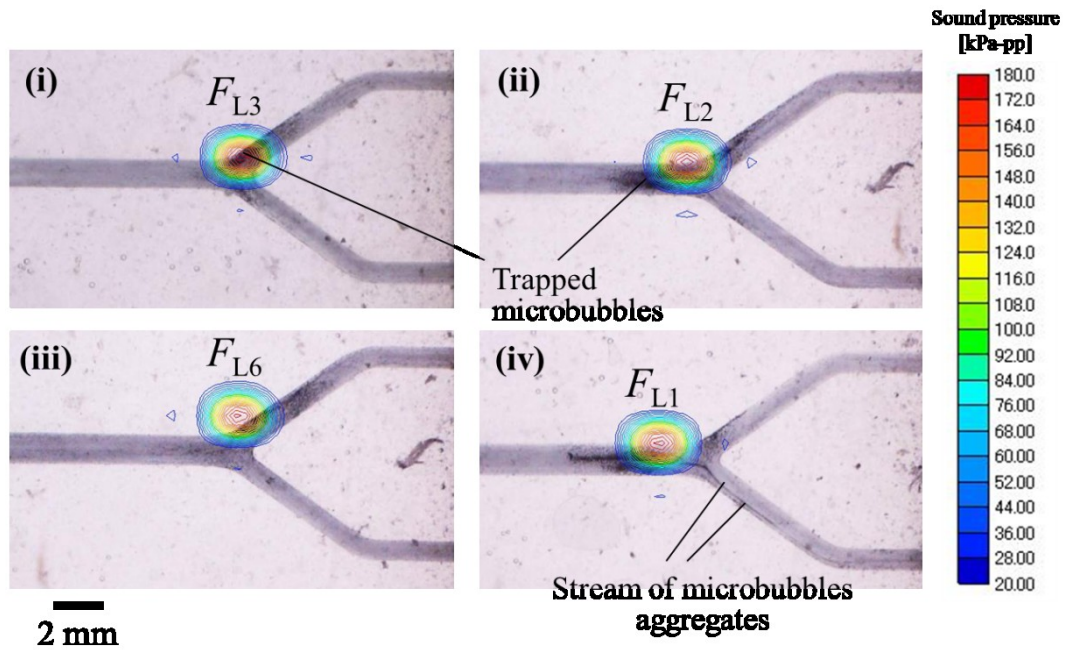


Fig.7.10 64 素子を用いて F_L に単焦点を形成した場合の分岐部の観測結果 (仰角 $\theta_{in} = 60 \text{ deg}$ 、最大音圧 180 kPa-pp)

最後に、分岐点の近傍に仰角 $\theta_{in} = 60 \text{ deg}$ において F_U と F_{L3} , F_{L1} , F_{L6} , F_{L4} に対し複数焦点を形成した場合の観測結果を **Fig.7.11** に示す。このとき 32 素子ずつに分割して F_U と F_L それぞれの焦点を形成している。尚、Rayleigh の式に基づいて計算した音圧分布のうち、20 kPa-pp 以上の音圧を重畳表示している。 F_{L3} に形成した場合にはほとんどの気泡が 2 焦点の音圧ピークの間で捕捉された(i)。 F_{L1} の場合は、気泡は一度分岐部手前で捕捉され、その後完全に捕捉されなかった気泡が Path B を流れた(ii)。 F_{L6} の場合は分岐後で音波の影響は多少見られるが、気泡の流れには影響を与えなかった(iii)。 F_{L4} の場合は気泡凝集体の筋は薄く、量は少ないが Path B を流れた(iv)。

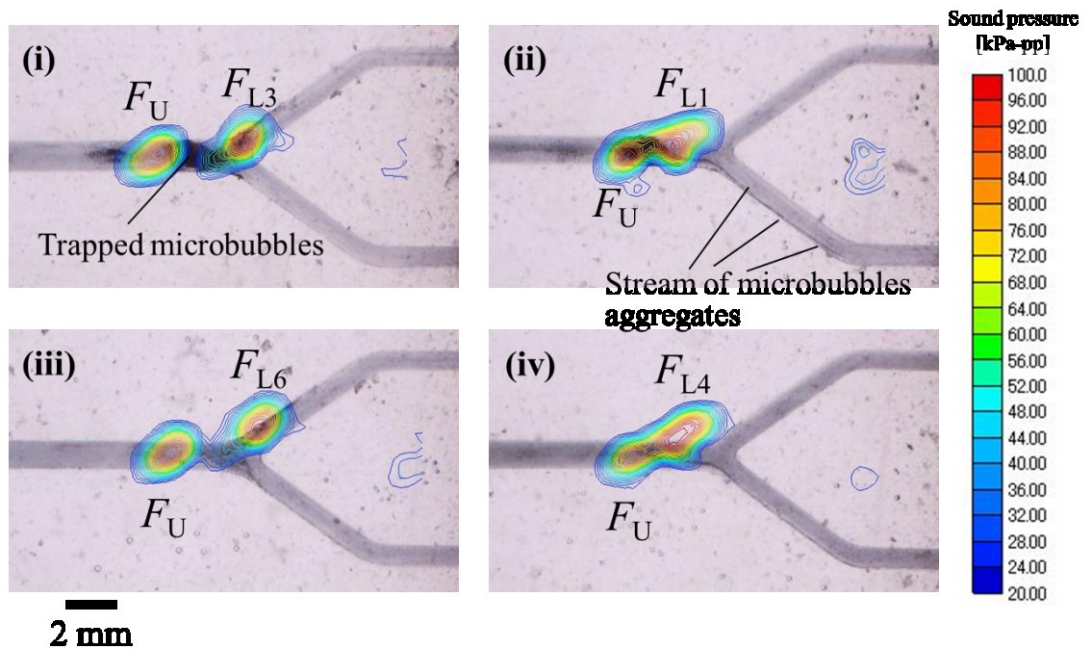


Fig.7.11 32 素子ずつに分割して F_U と F_L に対して複数焦点を形成した場合の分岐部の観測結果(仰角 $\theta_{in} = 60 \text{ deg}$ 、最大音圧 100 kPa-pp)

仰角 $\theta_{in} = 40 \text{ deg}$ の場合に、焦点形成位置 $F_{L1}-F_{L6}$ の音場パターンに対する誘導率のグラフを **Fig.7.12** に示す。いずれの場合も単一焦点の場合よりも複数焦点を形成した場合に誘導率は高い値を示した。

同様に仰角 $\theta_{in} = 60 \text{ deg}$ の場合に、焦点形成位置 $F_{L1}-F_{L6}$ の音場パターンに対する誘導率のグラフを **Fig.7.13** に示す。 F_{L1} , F_{L2} , F_{L3} の場合には誘導用焦点で捕捉してしまつたため、誘導率は単一焦点の場合よりも複数焦点形成時に低い値を示した。これにより気泡の経路選択には $\theta_{in} = 40 \text{ deg}$ のような流路平面に対して浅い照射角度が適しており、気泡を捕捉する場合には底面に押し付けられるよう $\theta_{in} = 60 \text{ deg}$ のような流路平面に対し深い照射角度が適していることを示した。

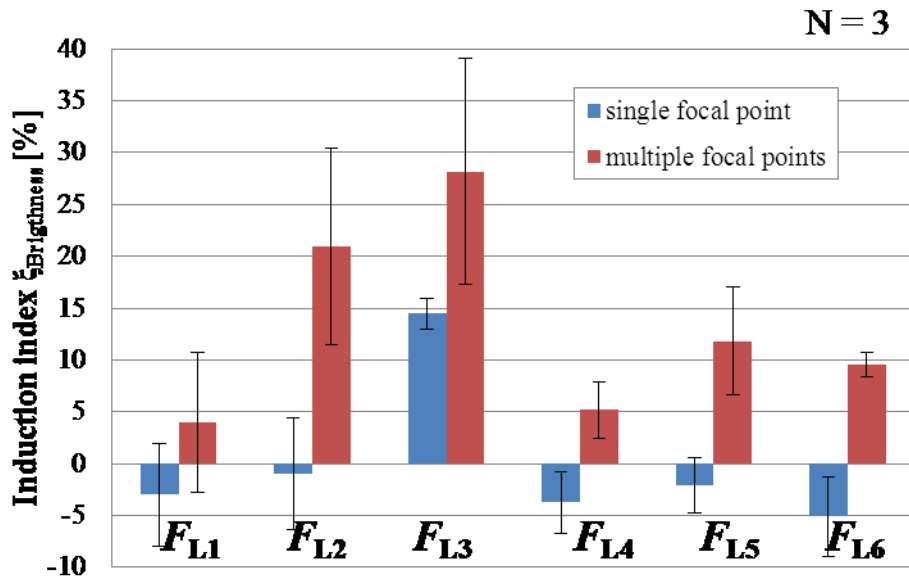


Fig.7.12 仰角 $\theta_{in} = 40 \text{ deg}$ のときの音場パターンに対する誘導率

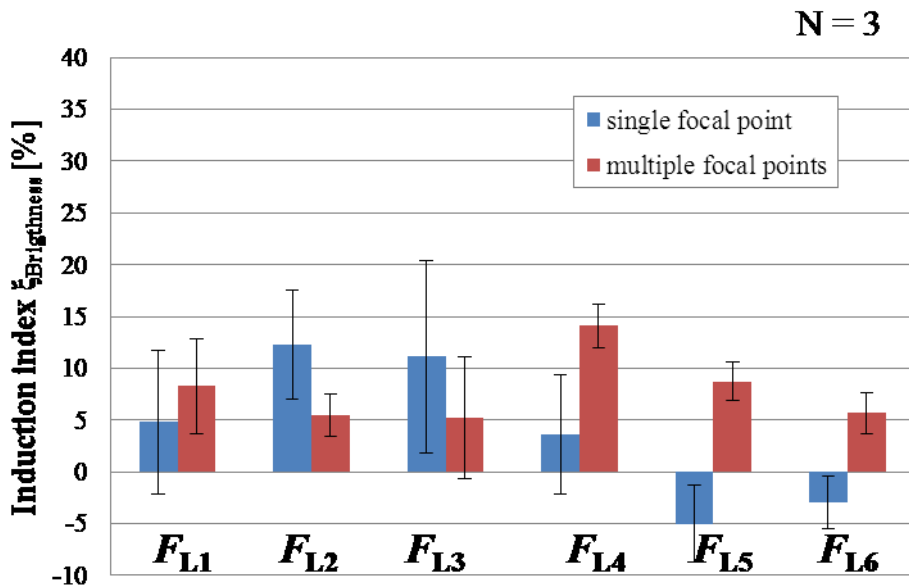


Fig.7.13 仰角 $\theta_{in} = 60 \text{ deg}$ のときの音場パターンに対する誘導率

7.4 多段分岐部流路への焦点形成による微小気泡の経路選択

7.4.1 第1分岐への焦点形成による経路選択結果

Fig.7.1の実験系において、 T_{ag} の照射を行い、 T_{in} を用いて第1分岐の近傍9点と第2分岐の近傍9点に焦点を形成し、誘導した結果を以下に示す。このときのパラメータは分岐間の中間位置を音軸が通るように T_{in} を設置し、分岐間の距離は $l_x = 16 \text{ mm}$ 、 $l_y = 4 \text{ mm}$ 、分岐前後の流路幅は $w_1 = 1.4 \text{ mm}$ から $w_2 = 1.0 \text{ mm}$ 、 $w_3 = 0.7 \text{ mm}$ に2段に分岐する箇所を対象とした。流路平面からの照射距離は $d_{ag} = d_{in} = 60 \text{ mm}$ とした。各

音源パラメータを **Table 7.1** に示す。

そして第 1 分岐の近傍 9 点 P1～P9 と第 2 分岐の近傍 9 点 Q1～Q9 に対して 2 次元アレイトランスデューサから焦点を形成し、気泡の対向制御における最適焦点形成位置の検討を行った。その際、3.5 節で説明したトランスデューサ座標系で x_{Tr}, y_{Tr} 軸方向に焦点の間隔がそれぞれ 2 mm となるように遅延時間を計算したが、仰角 40 deg 傾けているため、流路座標系で x_c 軸方向の間隔は約 3.1 mm となった。そして 4.4 節で説明した方法を用いて各関心領域の気泡量を推定し、各径路を流れる気泡量の割合を評価した。ROI の大きさは流路幅と流速から $0.7 \times 2.6 \text{ mm}^2$ (16 x 58 pixels) である。

Table 7.1 各音源のパラメータ

	T_{ag}	T_{in}
Symbolic number	7P-sin	1A-64ch
Mode	CW	CW
Max. sound pressure [kPa-pp]	350	200
Frequency [MHz]	7	1
Elevation angle [deg]	60	40

Fig.7.1 の実験系において第 1 分岐点の近傍 P1、P5、P6、P7 にそれぞれ焦点を形成した観測結果を **Fig.7.14 (i)-(iv)** に示す。このとき T_{ag} および T_{in} ともに照射している。尚、Rayleigh の式に基づいて計算した音圧分布のうち、50 kPa-pp 以上の音圧を重畳表示している。P1 のように音圧の分布がほとんど流路にかからない場合には、凝集体の筋の流れに照射による影響がほとんど見られなかった (i)。一方、P7 のように、分岐部付近では音圧の分布がほとんど重ならないが分岐後の経路に重なる場合には、分岐後の経路上での捕捉現象が見られた (ii)。P6 のように、分岐部全体にわたって音圧の分布が重なった場合には、分岐の流入口付近から気泡が大きな塊を形成してしまい、その後気泡の塊が断続的に Path A,B に繋がる経路に流れることが観測された (iii)。P5 のように音圧分布の端が分岐の流入口と重なるように焦点を形成した場合には、気泡凝集体の筋はスムーズに Path A,B 側の流路を流れ、その後の分岐後には Path A を多く流れた。

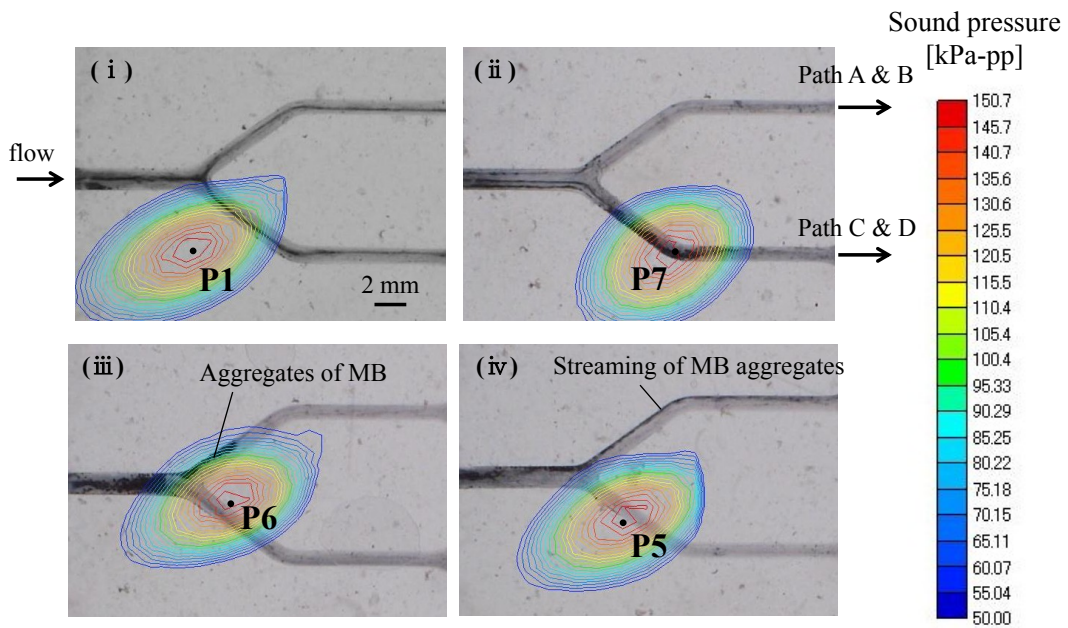


Fig. 7.14 第1分岐に対する焦点形成位置の違いによる気泡の挙動変化 (T_{ag} および T_{in} の照射開始から約 10 s 後)

(4.4)式を用いて計算した各径路を流れる気泡量の割合を **Fig.7.15** に示す。この結果より **Fig.7.1** のトランスデューサ座標系において x_{Tr} 軸方向に 3 mm ビームを振ったときの、P2 と P5 の位置に焦点を形成した場合に Path A を流れる気泡の割合が高くなった。また、 x_{Tr} 軸方向に 1 mm ビームを振ったときの P6 の場合も Path A を流れる気泡の割合が高くなった。以降は、Path A を流れる割合が最も高くなった条件として、第1分岐に対する照射位置を P5 に固定して実験を行った。

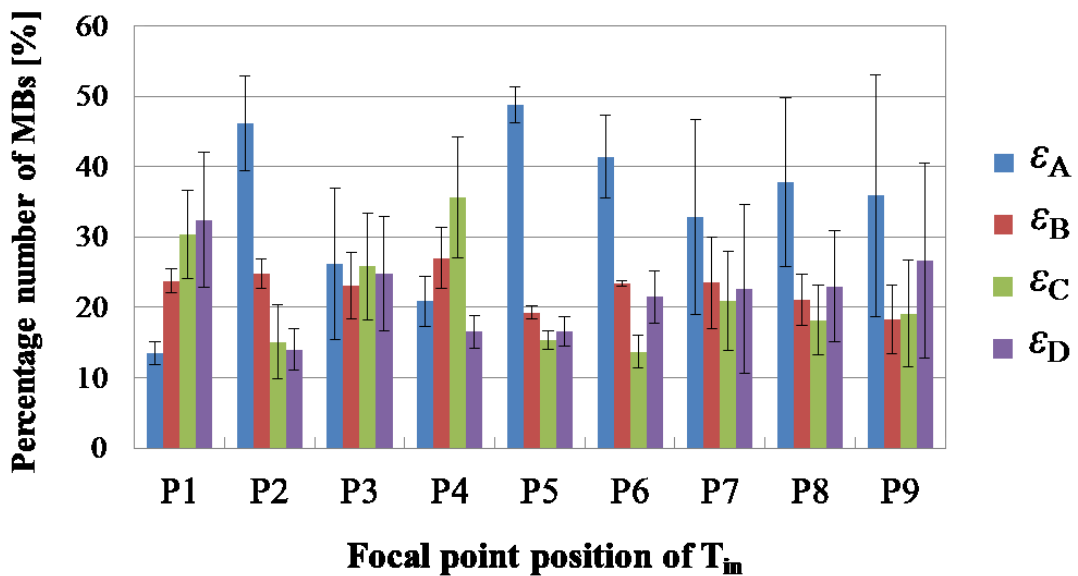


Fig.7.15 第1分岐に対する焦点形成位置による各径路の気泡量割合

7.4.2 第1分岐と第2分岐への焦点形成による経路選択結果

Fig.7.1の実験系において第1分岐に対する照射位置をP5に固定して、第2分岐の近傍Q1、Q2、Q5、Q8に対しても焦点形成を加えた場合の観測結果をそれぞれFig.7.16(i)-(iv)に示す。Q1のようにPath A,B側に繋がる経路に音圧分布の大部分が重なる場合には、経路上での捕捉現象が見られた(i)。一方、Q8のように、音圧分布が分岐後の経路に重なる場合には、分岐後の経路上での捕捉現象が見られた(ii)。Q2、Q5のように音圧のピークが分岐前の経路に対して外側に、かつ分岐より上流側に形成される場合には、経路途中で気泡のコースがPath A側からPath B側へ変わり、気泡凝集体の筋はPath Bを多く流れた(iii)(iv)。Q2、Q5よりもさらに流路の外側に焦点が形成された場合には、気泡凝集体の筋への音波照射による影響がほとんど見られなかった。

前節と同様に計算した各経路に流れる気泡量の割合をFig.7.17に示す。この結果より照射位置Q5の場合に最もPath Bを流れる気泡の割合が高くなった。また、Q2、Q5の照射位置で、Path AよりもPath Bを流れる気泡の割合が高くなった。

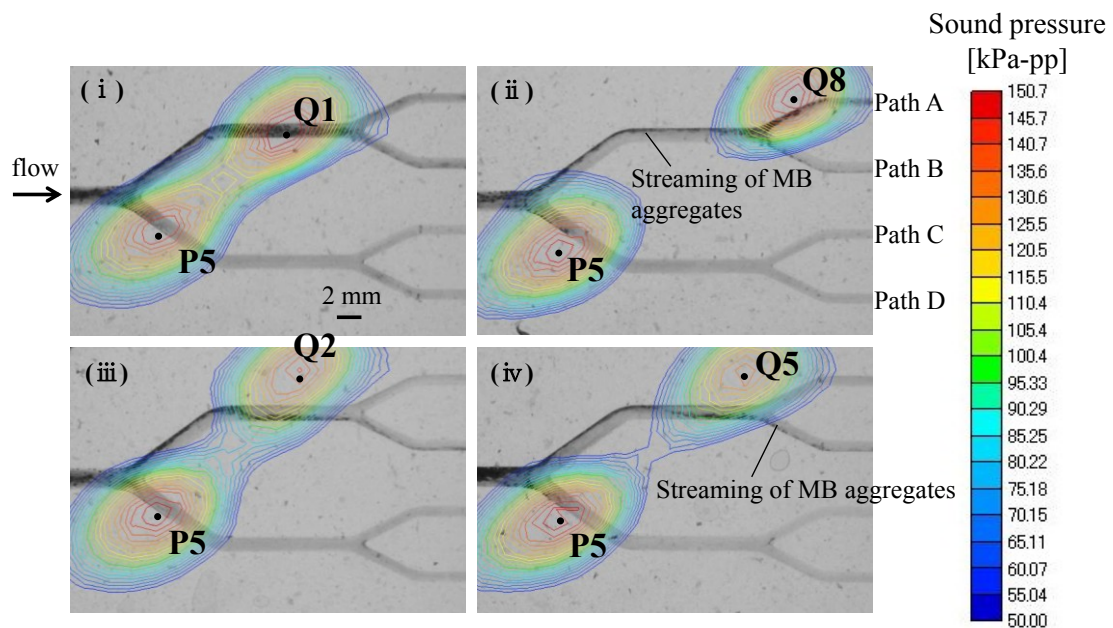


Fig. 7.16 第2分岐に対する焦点形成位置の違いによる気泡の挙動変化.
(T_{ag} および T_{in} の照射開始から約 10 s 後)

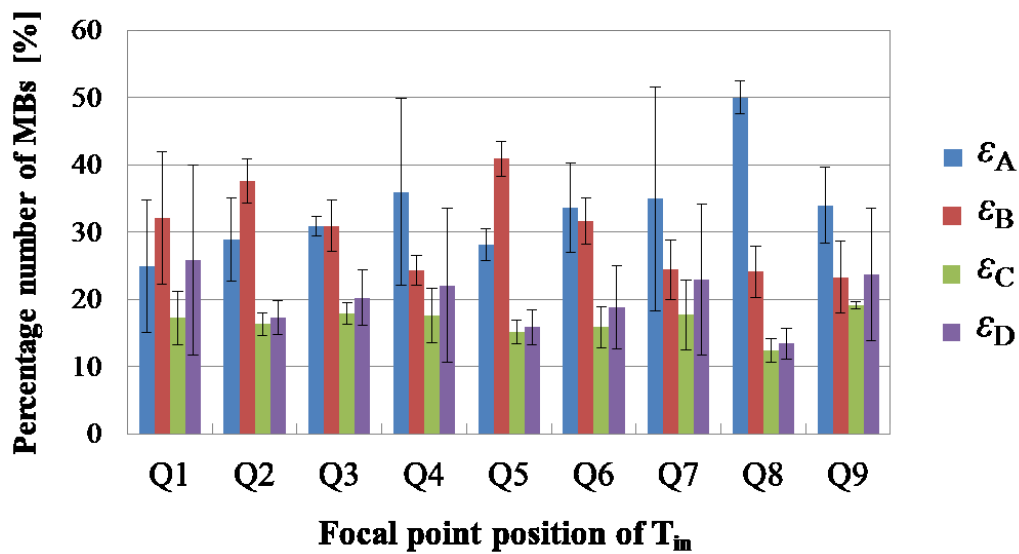


Fig. 7.17 第2分岐に対する焦点形成位置による各径路の気泡量割合

7.4.3 焦点切り替えによる気泡の経路スイッチング

上記より得られた焦点形成位置の条件を用いて、焦点位置の切り替えによる気泡の経路スイッチングを行った。ここでは第1分岐、第2分岐に対する焦点形成位置をそれぞれP5, Q5とし、そのY軸対称の位置をそれぞれP5', Q5'とした。多分岐流路内を流れる気泡にそれぞれの焦点形成パターンで照射した観測結果を Fig.7.18 に示す。尚、70 kPa-pp以上の音圧分布の計算結果を重畳表示している。まず、 T_{ag} のみに照射を行うと気泡の凝集体が筋となりどの経路にもほぼ同程度に流れた(i)。次に P5 への照射を加えると気泡の凝集体の筋が Path A に流れる結果となった(ii)。その後焦点切り替えのため一度発振を停止し、P5とQ5に同時に照射を行うと Path B を流れる気泡凝集体が多く観測された(iii)。続いて P5'とQ5'に同時に照射を行うと Path C を流れる気泡が多く観測された(iv)。さらに Q5'に照射を行うと Path D を流れる気泡が多く観測され(v)、最後に照射を止めると、再びどの経路にもほぼ同程度に気泡が流れた(vi)。以上より2次元アレイトランスデューサの位置・姿勢を変えずに気泡が流れる経路のスイッチングが可能であることを確認した。

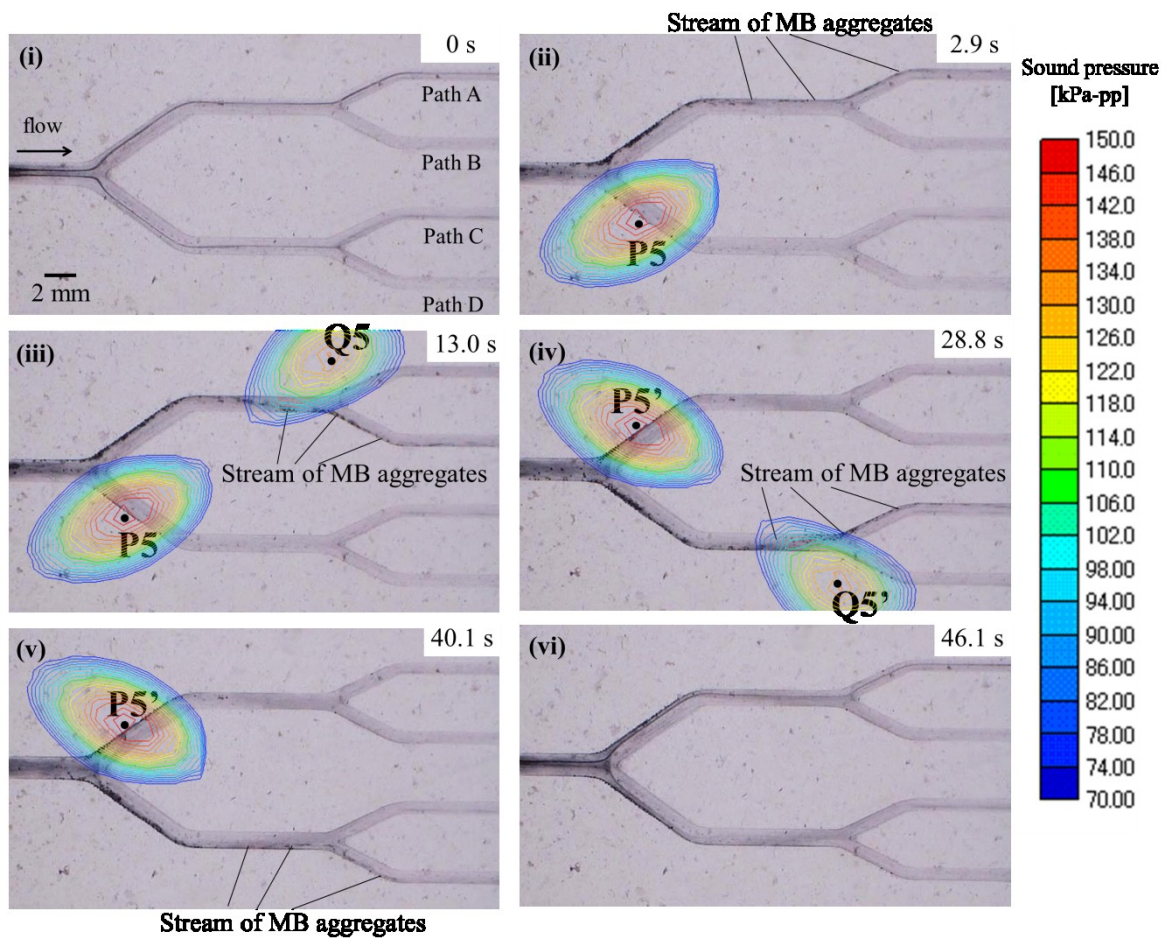


Fig. 7.18 焦点の切り替えによる気泡の経路スイッチング観測結果
 (i) T_{ag} のみの照射, (ii) P5 に対する T_{in} の照射, (iii) P5 と Q5 に対する照射, (iv) P5' と Q5' に対する照射, (v) P5' に対する照射, (vi) T_{ag} のみの照射

7.4.4 非粘性媒質/粘性媒質の誘導性能比較

本実験では粘性媒質を用い、上記実験系において周囲媒質の粘性が誘導性能に及ぼす影響を検討した。ここではポンプで流す媒質を脱気水の代わりに 3.6 節で説明した粘性流体を用いた。媒質以外の条件は 7.3.4 節と同様で、気泡体積濃度を 1.18 $\mu\text{l/ml}$ に調整した F-04E の懸濁液を流速 40 mm/s で流した。そして上記で得られた結果を基に、焦点形成位置を P5 と Q5 を選択した。粘性媒質中を流れる微小気泡をそれぞれ Path A、Path B に誘導している様子を **Fig.7.19** に示す。尚、70 kPa-pp 以上の音圧分布の計算結果を重畳表示している。まず第 1 分岐に対し P5 の位置に焦点を形成すると **Fig.7.19(i)** のように多くの微小気泡が Path A を流れる。続いて焦点パターンを切り替えて第 2 分岐に対して Q5 の位置にも照射を加えると、**Fig. 7.19(ii)** のように多くの微小気泡が Path B を流れる。以上より粘性媒質の場合も非粘性媒質の場合と同様に焦点形成位置による経路スイッチングが可能であることを示した。

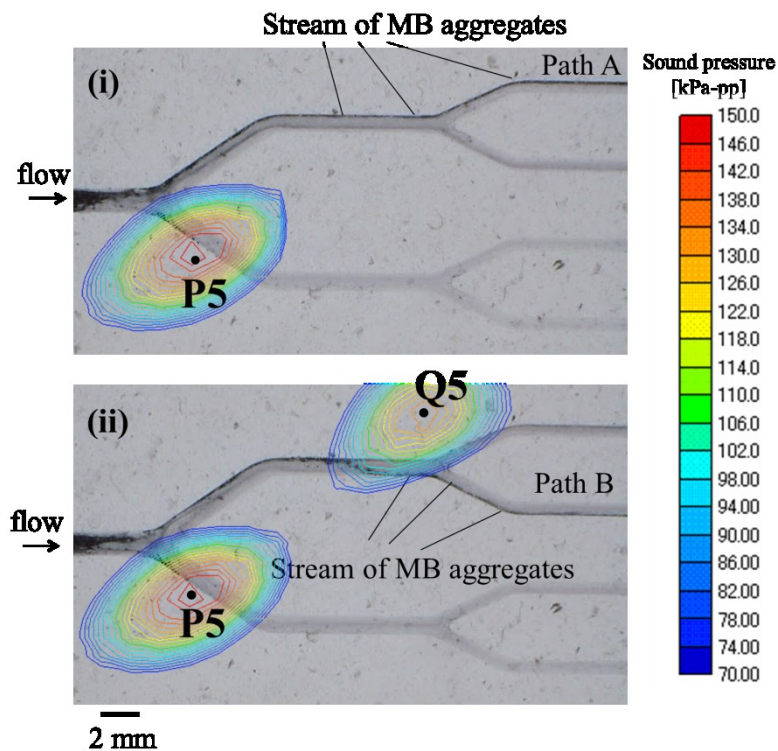


Fig.7.19 粘性流体中の気泡の経路選択
 (i) P5 に対する照射、(ii)P5+Q5 に対する照射

次に P5 と P5+Q5 の焦点形成位置において Path A、Path B それぞれの経路への誘導性能を非粘性媒質の場合と比較した。その結果をそれぞれ **Fig.7.20**、**7.21** に示す。この結果より、P5 に焦点を形成して Path A を流れる気泡割合は非粘性媒質の場合に比べ粘性媒質では約 5%低下し、同様に P5+Q5 に焦点を形成して Path B を流れる気泡割合は非粘性媒質の場合に比べ粘性媒質では約 3%低下した。以上の結果より Path A、Path B のどちらかに誘導する場合でも、全血の 1/3 程度の粘性条件では、その誘導効率は数%の低下に留まることを示した。

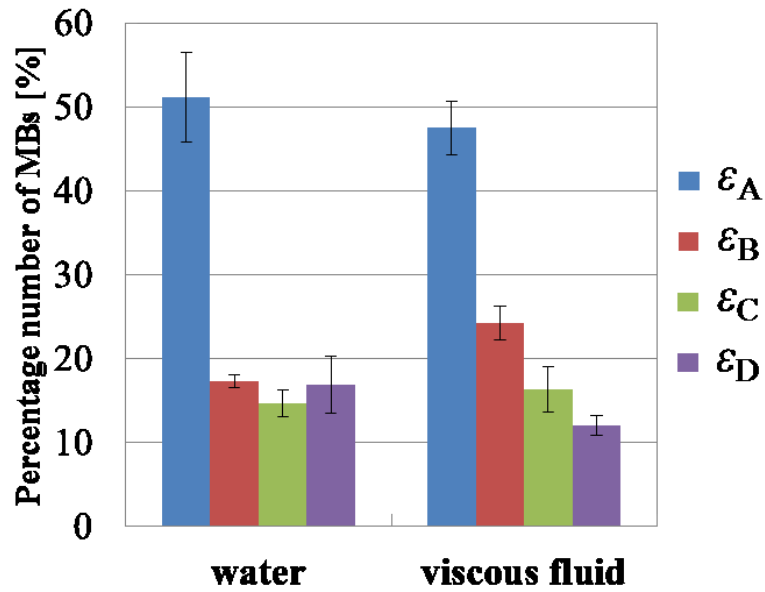


Fig.7.20 粘性媒質と非粘性媒質の誘導性能の比較
(P5 に焦点を形成)

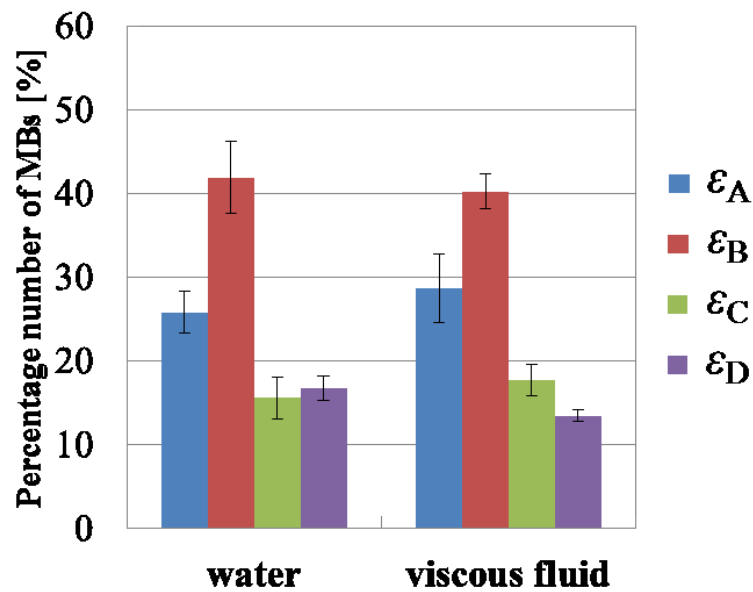


Fig.7.21 粘性媒質と非粘性媒質の誘導性能の比較
(P5 と Q5 に焦点を形成)

7.4.5 気泡種類の違いに対する誘導挙動の比較

上記実験系においてバブルリポソームを適用し、気泡の種類が誘導性能に及ぼす影響を検討した。非粘性媒質を流れるマイクロカプセルの最適焦点位置である P5 と Q5 に同時に焦点を形成し、Path B に気泡を誘導した。F-04E を Path B に誘導したときの観察画像を Fig.7.22 に、バブルリポソームを同じ条件で誘導したときの様子を Fig.7.23 に示す。どちらも 0 sec は分岐前の本流に気泡が到達したときを示している。

Fig.7.22 では F-04E は 10 sec 以内に Path B に到達している。一方で **Fig.7.23** ではバブルリポソームは粘性の高い挙動を示し、Path B に到達するのに F-04E と比べて 15sec 以上遅れて到達した。これは脂質膜の性質により流体中での巨大な凝集を形成したものと考えられる。しかしながら、F-04E に対する照射と同様の制御手法でバブルリポソームが制御可能であることを示した。

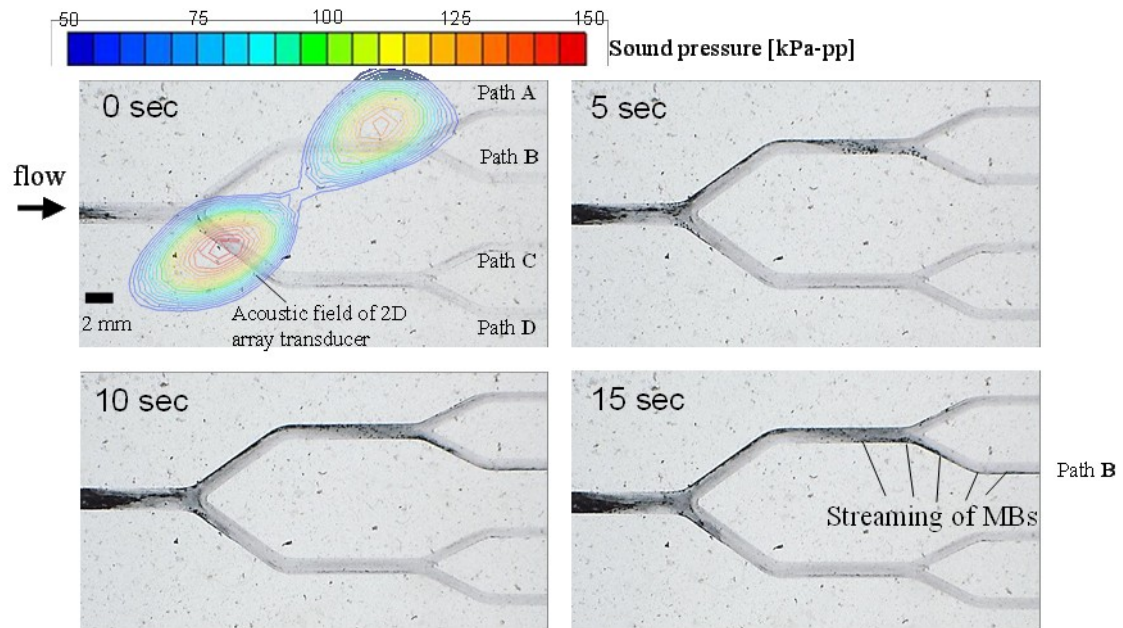


Fig.7.22 微小気泡 F-04E の非粘性媒質中での Path B への誘導

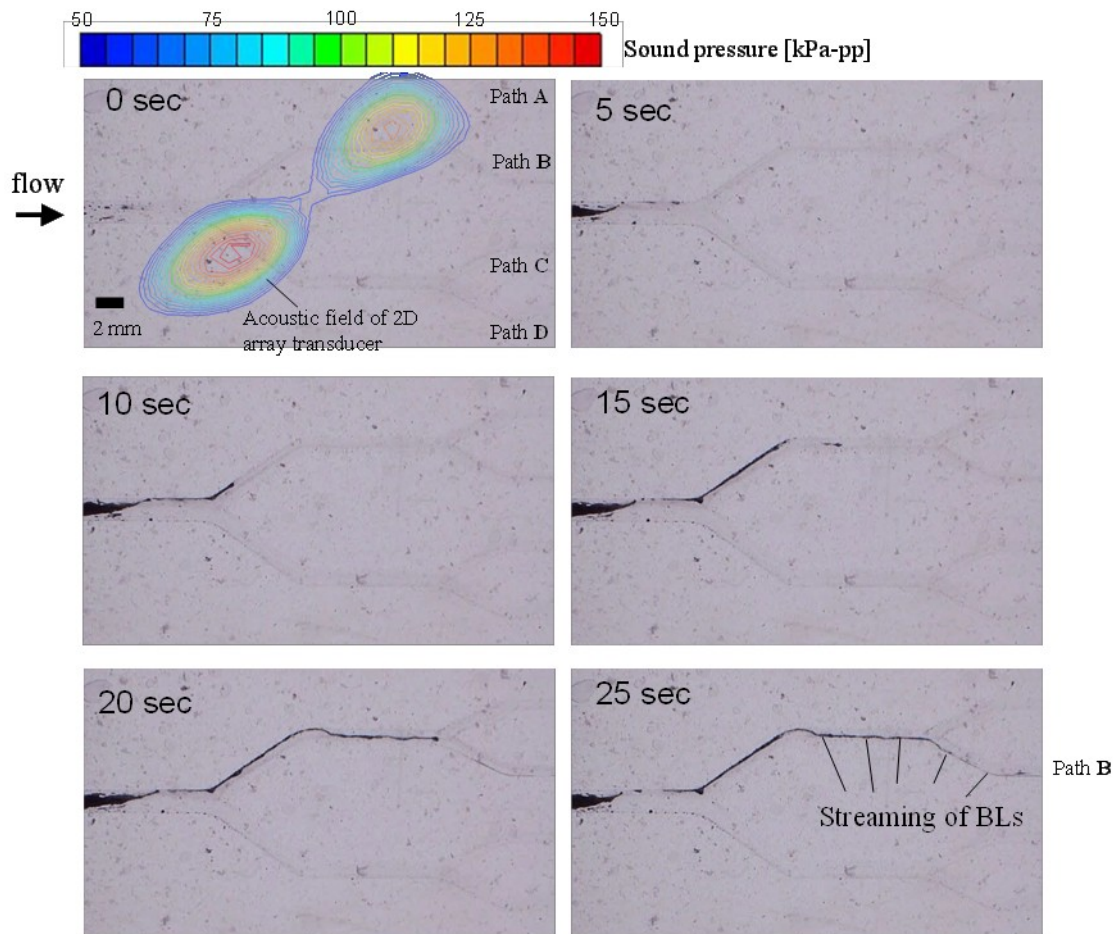


Fig.7.23 バブルリポソームの非粘性媒質中での Path B への誘導

7.5 結言

本章では複数焦点を形成可能なアレイ型トランスデューサを利用した気泡の経路選択について述べた。まず 7.2 節で血管の分岐点周辺に焦点を形成する実験方法を述べた。次に 7.3 節で単分岐流路に対する焦点形成による経路選択結果を述べ、照射パターンを変えて気泡の誘導効率を評価した。その結果、凝集用焦点を形成した場合に制御効率が向上することを示し、アレイ型トランスデューサ単体で凝集と制御を同時に達成できることを示した。また、続く 7.4 節では凝集体形成用音源を別に用意し、多段分岐流路に対する焦点形成位置において誘導性能を評価した。その結果、焦点切り替えによる気泡の経路スイッチングにより制御音源の数を削減した動態制御が可能であることを示した。また、周囲媒質の粘性が気泡の動態制御に及ぼす影響を検討した結果、全血の 1/3 程度の粘度では制御効率は数%程度しか低下しないことを示した。さらに BLs を適用し、高い粘性挙動を示すものの、従来のマイクロカプセルと同様の制御手法で制御可能であることを示した。次章では動物の血液中での気泡の経路選択について述べる。

第 8 章

生体試料中における微小気泡の経路選択

8.1 緒言

前章までは水流中での微小気泡の経路選択について述べ、超音波の軸方向と径方向の音響放射力を利用して経路選択が可能であることを示した。本章では本研究における手法の生体への適用を目指し、生体に近い環境下での気泡の誘導、すなわち動物の血液中での微小気泡の経路選択について述べる。まず、8.2 節では超音波診断装置による気泡観測を利用した実験方法について述べる。さらに超音波断層像上での輝度値と気泡濃度の関係について検証する。続く 8.3 節では血液中での経路選択の評価結果について述べ、血液中での制御の可否を検証する。最後に 8.4 節の結言でこの章をまとめる。

8.2 実験方法

3.3 節で説明した診断装置を観測に用いた実験系を構築した。**Fig.8.1** に構築した実験系の模式図を示す。脱気水を満たした水槽内に、3.8.2 節で述べた PEG 製の Y 字分岐流路を反射回避のために水槽底面から 30 mm 底上げして設置した。血管分岐後の各径路はそれぞれ Path A、Path B となっており、経路の分岐角度は 90 deg である。分岐前後の流路直径は 1.4 mm から 1.0 mm となる。水槽底部から流路内の関心領域をマイクロスコープ(VC7700, Hirox)にて観察した。上流から流れる BLs を Path B に誘導するため、分岐部での制御用音源を分岐部の中心に音軸が通過するように配置した。誘導用トランスデューサの照射角度は Y 字分岐流路のプラスチック容器の音場への影響を避けるために x_c - y_c 平面からの仰角を $\varphi = 30 \text{ deg}$ とし、方位角 (x_c - z_c 平面からの角度) を $\theta = 45 \text{ deg}$ とした。この設定は 6.2.1 節と同様とした。制御用音源には 3.4.1 節で述べた凹面振動子で中心周波数 5 MHz(5F-sin)の素子を用いた。

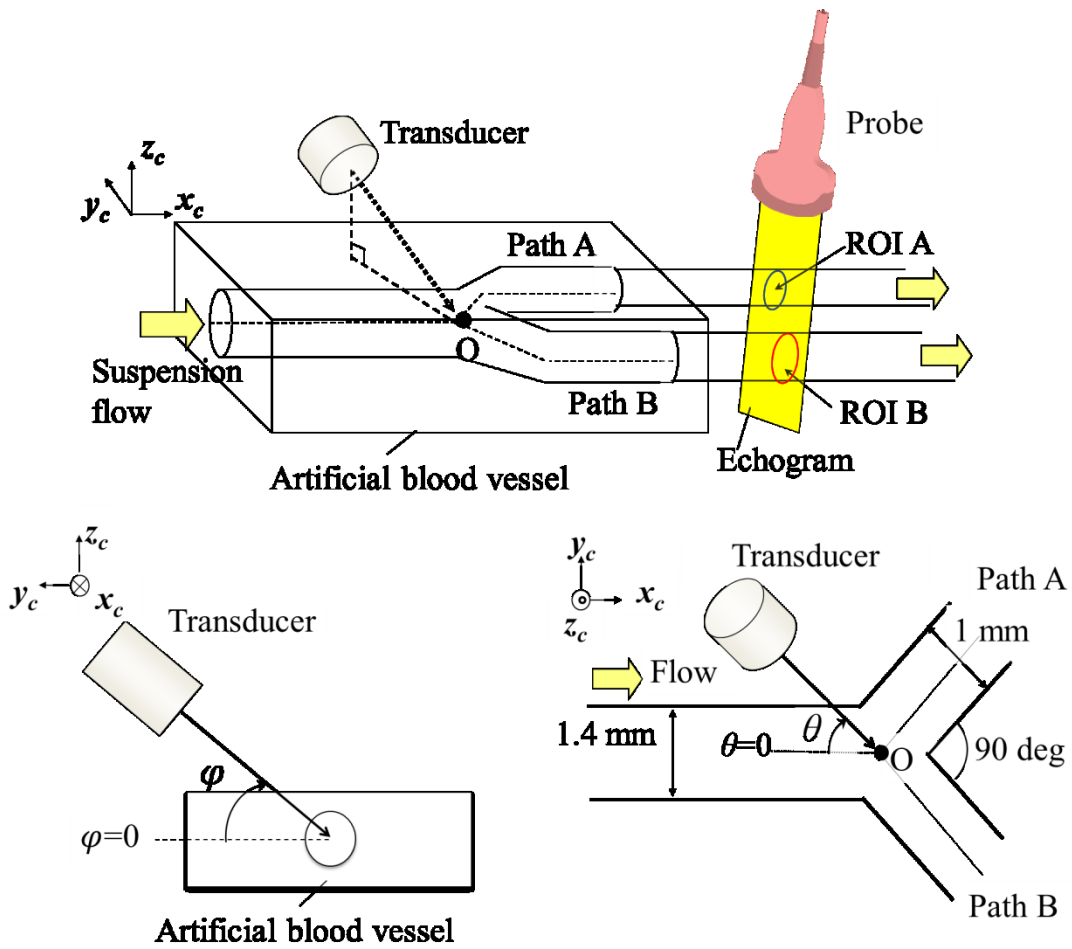


Fig.8.1 実験系の模式図

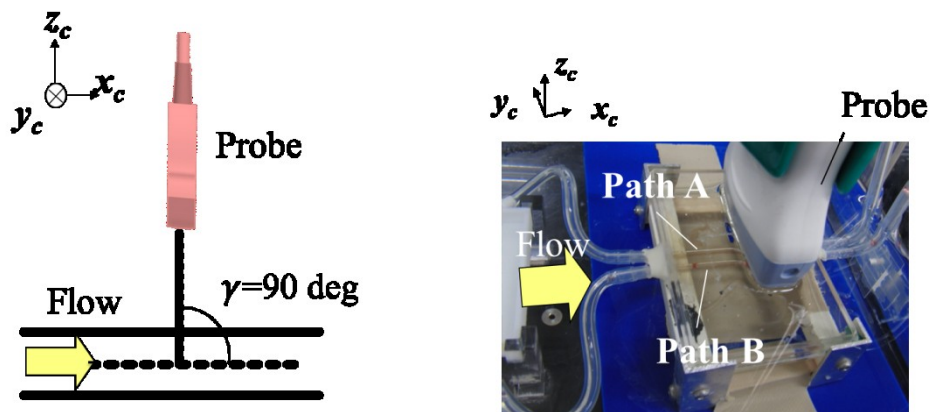


Fig. 8.2 リニアプローブの配置

次に直径 2 mm の直線が 2 本平行となるような流路を作成し、分岐後の経路の延長した先に接続した。そして 2 本の直線流路の断面を同時に観測できるよう、リニアプローブを直線流路 Path A,B の中腹部に垂直に配置した。リニアプローブの配置を Fig.8.2 に示す。この時、プローブ先端から観測する直線流路までの距離を 20 mm とし

た。

そして生理食塩水(0.9 %)媒質中もしくはブタの血液中に分岐部上流から希釈したBLsをシリンジを用いて注入した。この時の流速は30 mm/sとし、懸濁液は脂質濃度を0.001-0.1 mg lipid/mlの範囲に設定し、1 cc 注入した。

媒質の違いによる制御性能を比較するため、最大音圧 100-500 kPa-pp、および媒質の種類をパラメータとして変化させた。

8.3 微小気泡の濃度と断層像の輝度値の関係

Fig.8.1の実験系において、誘導用音波を照射せず、生理食塩水媒質中での気泡濃度と輝度値との関係を測定した結果を Fig.8.3 に、血液媒質中での気泡濃度と輝度値との関係を Fig.8.4 に示す。このときの流速は30 mm/sec、気泡の脂質濃度は7種類(0.001、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.1 mg lipid / ml)で比較した。グラフの縦軸は気泡が流れているときの輝度値から初期輝度値を引いた値である。エラーバーは3回の測定の標準偏差を示している。結果より、どちらの媒質の場合も0.04 mg lipid/mlよりも薄い濃度の範囲内では濃度変化に対して輝度値変化が線形に変化することを確認した。

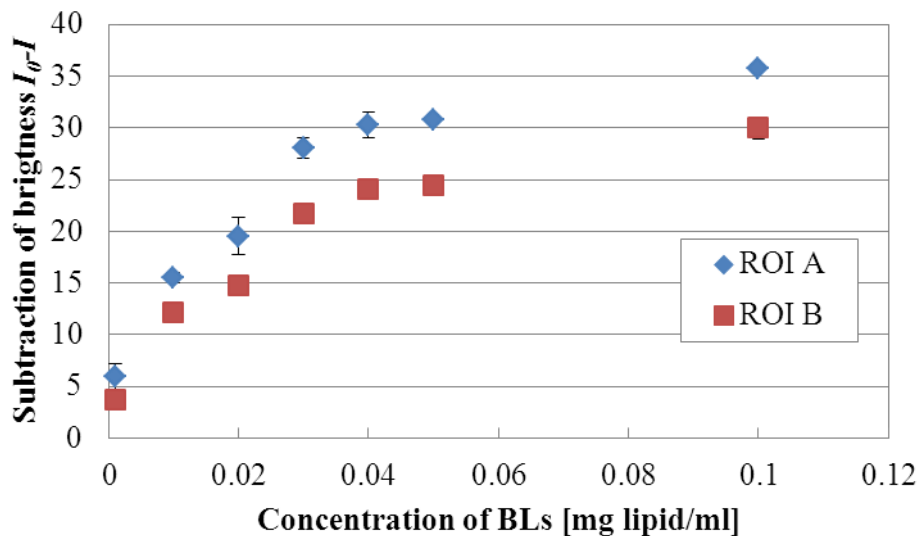


Fig.8.3 生理食塩水媒質中での輝度値と気泡濃度の関係

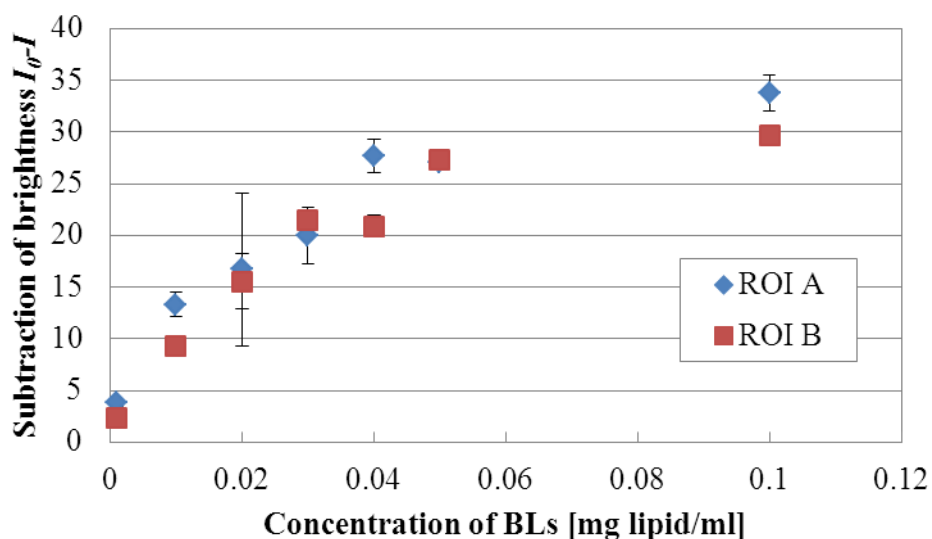


Fig.8.4 血液媒質中での輝度値と気泡濃度の関係

8.4 生理食塩水中での微小気泡の経路選択結果

誘導用超音波の最大音圧 500 kPa-pp、流速 30 mm/sec として、生理食塩水媒質中で音波照射した場合の観測結果を Fig.8.5 に示す。このときの生理食塩水媒質中の脂質濃度は光学観測できるよう、1.0 mg lipid/ml と最も濃く調整した懸濁液を使用した。

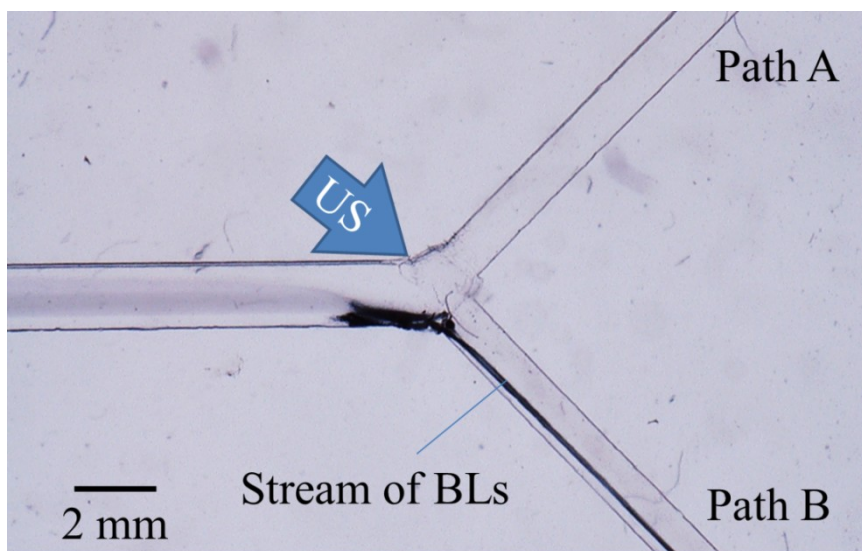


Fig.8.5 生理食塩水媒質中の分岐部の様子
(流速 30 mm/s、最大音圧 500kPa-pp、脂質濃度 1.0 mg lipid/ml)

生理食塩水媒質中では音波照射により凝集した気泡塊の流れが Path B をスムーズに流れるのを確認した。

次に、生理食塩水媒質中で超音波の最大音圧を 100-500 kPa-pp まで変化させたと

きの下流領域の短軸像を **Fig.8.6** に示す。このとき懸濁液の脂質濃度を 0.02 mg lipid/ml に統一した。音圧が 300 kPa-pp 以上場合に、音波照射時の観測領域内を比較すると ROI A 内の輝度値は明らかに ROI B よりも低くなった。

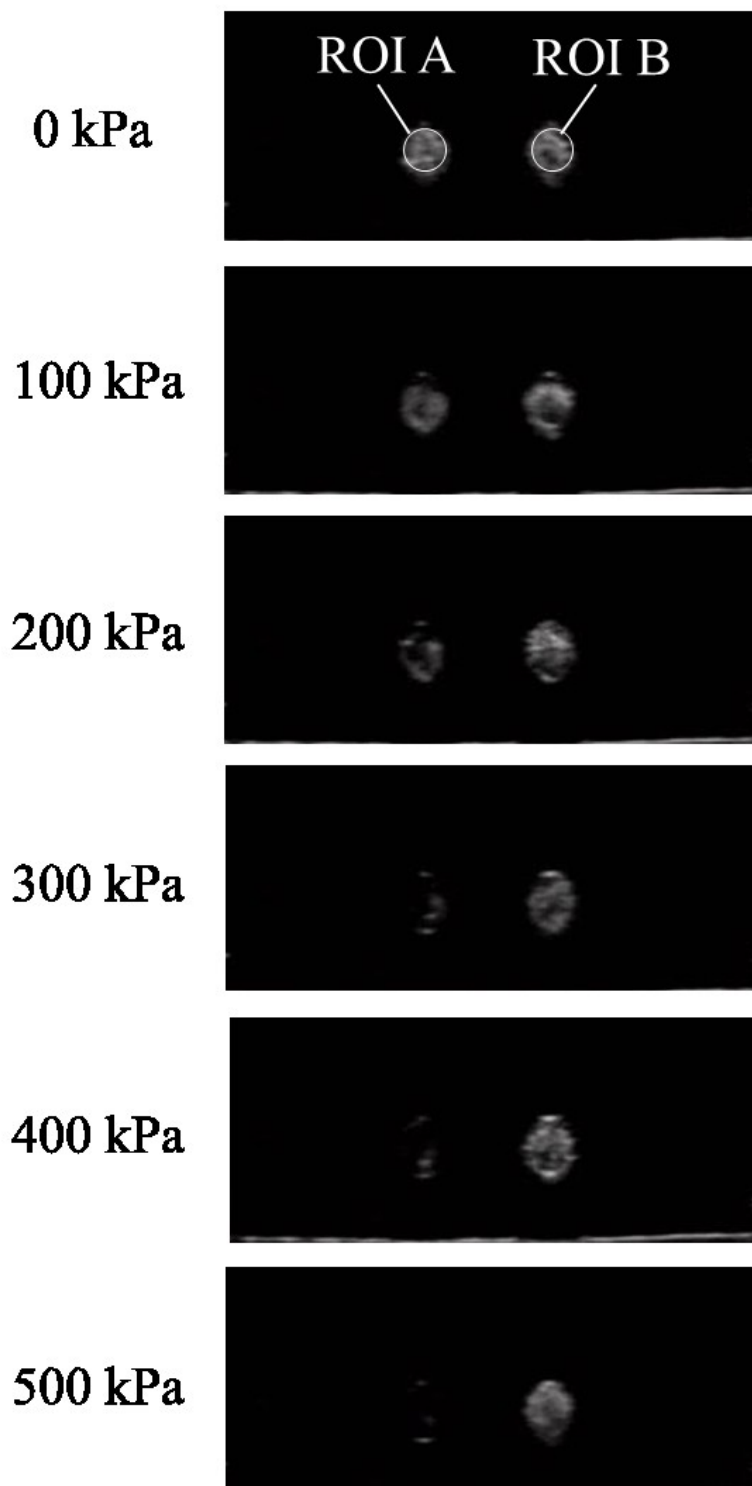


Fig.8.6 生理食塩水媒質中の各音圧における下流領域の短軸像

生理食塩水媒質中において音圧を 100-500 kPa-pp と変化させたとき(4.7)式を用いて計算した ROI A,B における気泡量の割合(P_A , P_B)の結果を Fig.8.7 に示す。エラーバーは 3 回の試行の標準偏差を示している。

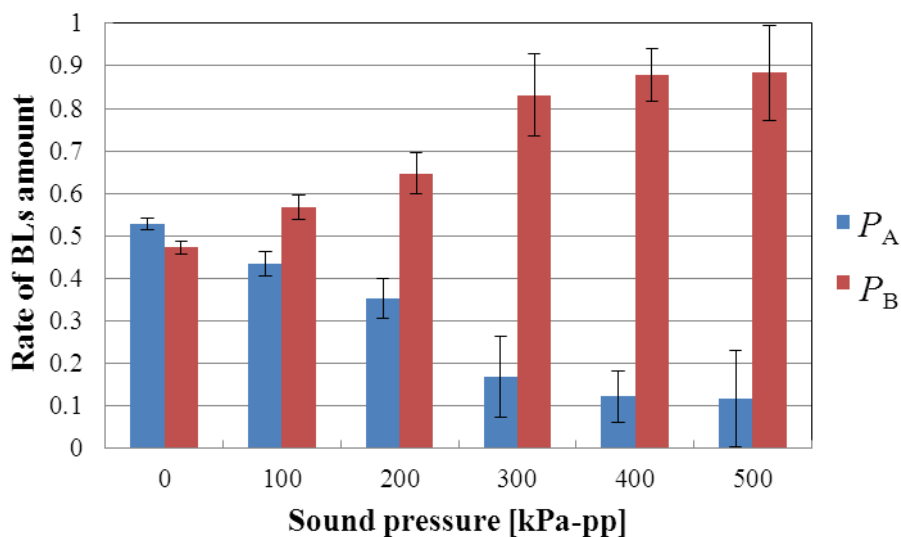


Fig.8.7 生理食塩水媒質中における各径路の気泡量割合

8.5 血液中での微小気泡の経路選択結果

誘導用超音波の最大音圧 500 kPa-pp、流速 30 mm/sec として、血液媒質中の観測結果を Fig.8.8 に示す。血液媒質中では照明の光がほとんど透過せず、流路内の気泡の流れを観測することは不可能であった。

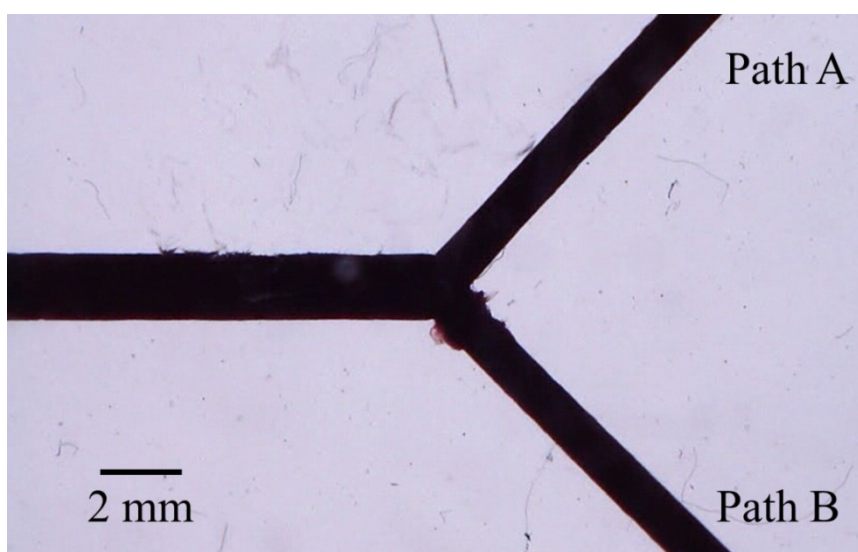


Fig.8.8 血液媒質中の分岐部の様子
(流速 30 mm/s、最大音圧 500kPa-pp、脂質濃度 0.1 mg lipid/ml)

生理食塩水中と同様に血液媒質中で超音波の最大音圧を 100-500 kPa-pp まで変化させたときの下流領域の短軸像を **Fig.8.9** に示す。生理食塩水媒質中で見られた現象と同様、音圧が 300 kPa 以上の時には ROI A 内の明るさは明らかに ROI B の輝度値よりも低くなった。

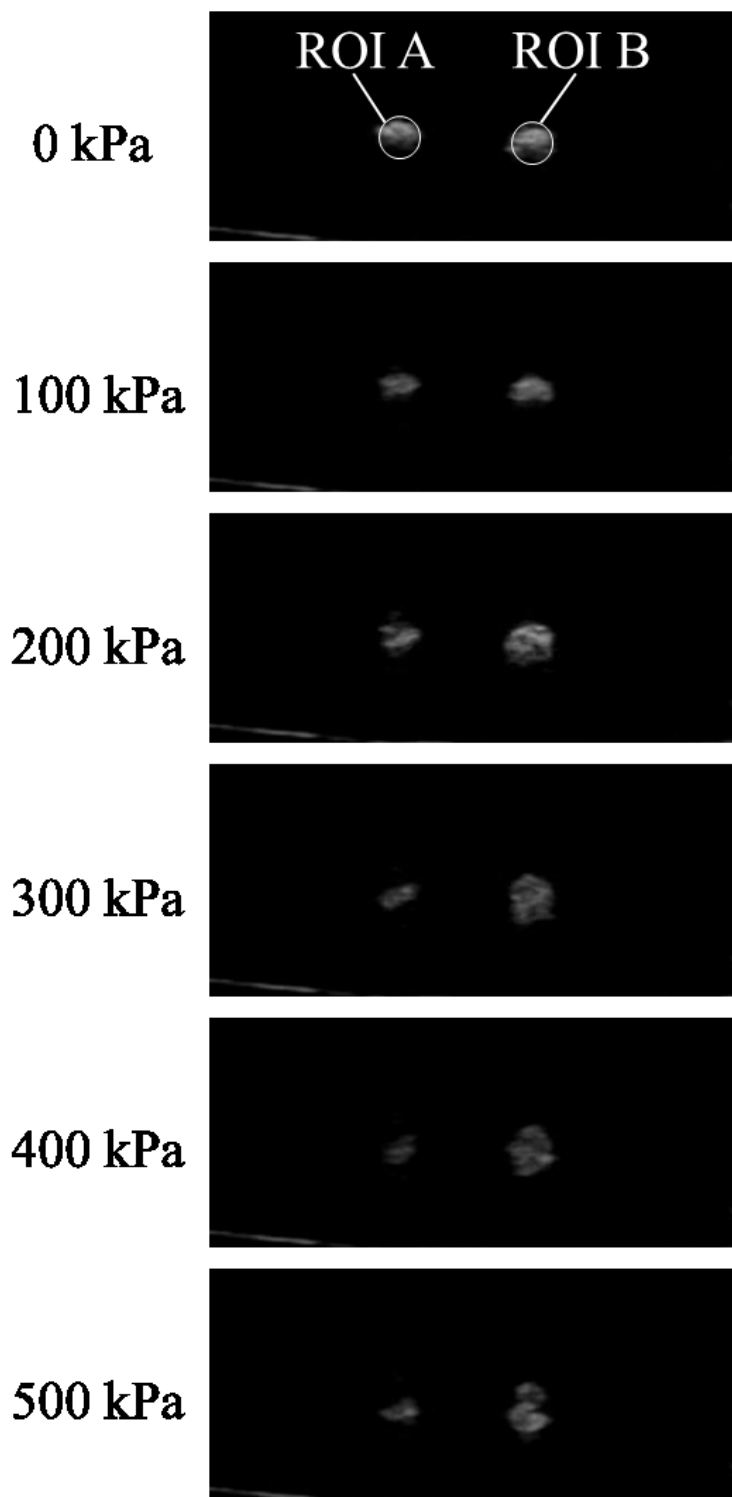


Fig.8.9 血液媒質中の各音圧における下流領域の短軸像

同じく、血液媒質中において音圧を 100-500 kPa-pp と変化させたときの ROI A,B における気泡量の割合(P_A 、 P_B)を Fig.8.10 に示す。エラーバーは2回の試行の標準偏差を示している。結果より血液媒質中の方が生理食塩水媒質中に比べて分離できる割合は低くなった。

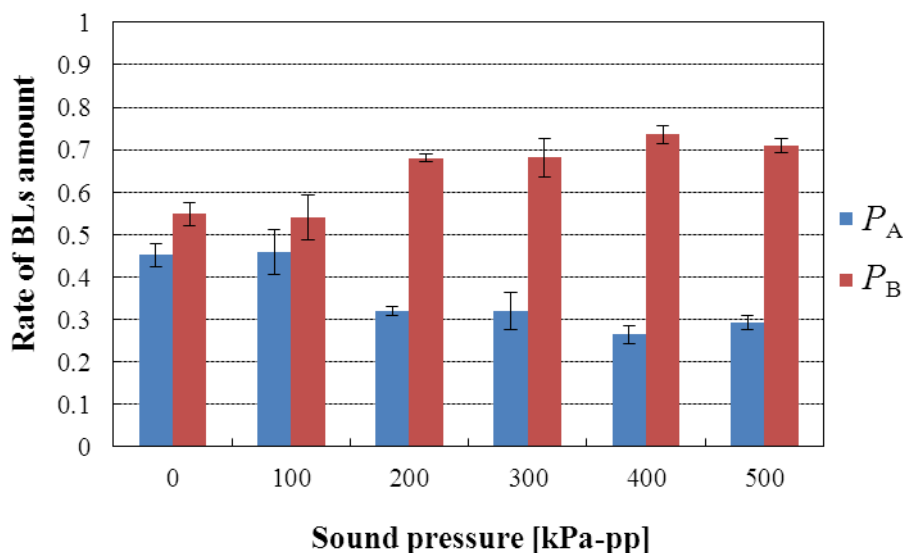


Fig.8.10 血液媒質中における各径路の気泡量割合

8.6 結言

本章では微小気泡の血液媒質中における経路選択について述べた。まず 8.2 節で生体組織(ブタ血液)と超音波診断機を用いた実験方法について述べた。8.3 節では懸濁液の気泡濃度変化に対し超音波画像の輝度値変化量が線形に変化する範囲を検討した。8.4 節では生理食塩水中で経路選択された微小気泡の割合を最大音圧のパラメータに対して検討した。その結果、音圧の増加に伴い制御される微小気泡の割合が増加する事を確認した。そして8.5 節では血液中において生理食塩水中と同様の実験を行い、媒質が変わっても微小気泡が制御されることを確認した。生理食塩水媒質中と血液媒質中での制御割合を比較した結果、血液中の方が低い値を示した。次章では考察と今後の課題について述べる。

.....

第9章

考察と今後の課題

9.1 緒言

前章までにおいて音響放射力を利用する事で水流中もしくは赤血球中の微小気泡が模擬血管流路内で制御される様子を実験によって確認した。本章では、まず 9.2 節で微小気泡の静水中の凝集挙動について考察を行う。続いて微小気泡の誘導について、単純分岐構造の血管内制御に関しては 9.3 節で、多分岐構造の血管内制御に関しては 9.4 節で考察する。そして血液中での制御については 9.5 節で考察を行い、実験結果より導かれる生体応用への可能性について検証する。9.6 節では生体応用の際に必要なる血管のボリュームデータ取得やナビゲーションに関する現状を紹介し、本手法に適応するための今後の課題を考察する。最後に 9.7 節で結言を述べこの章をまとめる。

9.2 静水中凝集挙動に関する考察

まず 5.3 節の結果をふまえ、気泡の種類の違いに対する凝集現象を考察する。F-04E と Sonazoid の凝集サイズを比べると Sonazoid の凝集サイズが全体として小さくなった。これは両者の気泡濃度の違いが考えられる。5.2 節の実験では F-04E の懸濁液中の気泡体積濃度は $2.35 \mu\text{l/ml}$ 、Sonazoid は $0.80 \mu\text{l/ml}$ であった。よって気泡体積濃度の高い F-04E の方が全体として凝集サイズが大きくなったと考えられる。バブルリポソームの気泡体積濃度は $3.0 \mu\text{l/ml}$ であったことから、F-04E と同程度の凝集サイズとなったと考えられる。

続いて凝集体の形成時間を考察する。5.3 節の結果においてすべての種類の気泡において共振に近い周波数の照射時に時定数が短くなった。駆動周波数が共振周波数に近い方が気泡の振動振幅値 ε が大きくなり、その分 Secondary Bjerknes force が増大したと考えられる。さらに 5.3.3 節の濃度検証実験では気泡濃度が濃い方が形成時間が速く飽和に達する結果となった。これは気泡の個数濃度が高くなることで凝集に関与する気泡間距離が短くなり、気泡間距離 D の 2 乗に反比例する Secondary Bjerknes force が増大したためと考えられる。よって振動振幅値 ε 、気泡間距離 D を検討した以上の結果から、形成時間に関しては Secondary Bjerknes force の大きさが関与することが示唆される。

次に 5.3 節の結果から凝集サイズについて考察する。5.3.1 節では気泡の種類と共振周波数に依らず、照射音波の周波数が低い方が凝集サイズは大きくなった。また 5.3.3 節の結果では照射音波の周波数が一定で気泡濃度を変更したが、このとき気泡濃度が濃い方が凝集サイズは大きくなった。これには凝集に関与する気泡の数に関与していると考えられる。照射音波の周波数が低いときには Secondary

Bjerknes force を発生する周囲気泡からの反射波の波長が長くなり、その結果 1 波長あたりに含まれる気泡数が多くなる。また懸濁液の気泡濃度が高いときには 1 波長あたりに含まれる気泡数が相対的に多くなる。このようにして凝集サイズが大きくなったと考えられる。よって照射音波の周波数と気泡濃度を検討したこれらの結果から、凝集サイズは反射音源の 1 波長あたりに含まれる気泡数に關与していることが示唆される。

5.3.4 節の赤血球の影響については、赤血球溶液中の Sonazoid が Sonazoid のみの場合に比べ凝集サイズが小さくなった。これは赤血球が障害物として存在することにより、音波が散乱され凝集が阻害される傾向を示したと考えられる。しかしながら、赤血球濃度に 20 倍の差があっても凝集サイズには差が見られなかった。今回用いた赤血球濃度が低すぎたために赤血球の濃度差が結果に表れなかった可能性がある。よって今後は高濃度の赤血球溶液中での検討が必要である。

最後に凝集体を制御する際の作用力の大きさについて考察する。5.3.1 節の結果では、F-04E に 3 MHz の音波を照射して凝集体を形成する場合、単一気泡のサイズに比べ凝集体の平均直径が約 6 倍大きくなった。凝集体を制御する際に作用する Primary Bjerknes force は式(2.2)より気泡半径の 2 乗に比例して作用する。凝集気泡を気泡半径が 12 μm の単一気泡と見なすことができれば、気泡半径 2 μm の単一気泡の場合と比べ約 36 倍の大きさで Primary Bjerknes force を作用させることができると期待できる。

9.3 単分岐血管における経路選択に関する考察

6.2.1 節のバブルリポソームの誘導率について考察する。バブルリポソームの半径はマイクロバブルに比べ 4-5 倍小さいため、音響放射力は 16-25 倍小さくなる。しかし、誘導実験の結果音圧が 100-500 kPa-pp の範囲で約 10-80 %の誘導率を示し、これは過去のマイクロバブルの結果と同程度の値を示したことになる[32]。まず、音響放射力と誘導率との関係であるが、音響と流体の数値シミュレーションにより過去の実験を再現したところ、シミュレーションでは誘導率は音圧の 2 乗(音響インテンシティ)に比例したカーブを描くが、実験値では 1 乗に比例した増加を示した[40]。シミュレーションでは凝集による気泡の半径拡大を考慮していないが、実際には凝集の効果が大きく寄与していると考えられる。そこで今回の実験結果を凝集効果から考察すると、個数濃度が過去の実験条件に比べ高くなったため、Secondary Bjerknes force が大きく作用して凝集が進み、その結果 Primary Bjerknes force の力で制御しやすくなったと考えられる。F-04E とバブルリポソームとの個数濃度の比は約 42.4 倍であった。実際、5.3 節の結果において BLs の方がマイクロバブルに比べ飽和に達するまでの時間が短いことは、個数濃度が高かったために Secondary Bjerknes force が大きく作用した結果である。このようにして実際に作用した音響放射力は 16-25 倍小さくはならず、従来のマイクロバブルと同程度の制御を実現できたと考えらえる。

9.4 多分岐血管における経路選択に関する考察

7.4 節で観測した 2 段階の分岐後の結果から、第 1 分岐・第 2 分岐の各分岐での気泡の分離率を考察する。例えば Fig.7.16 の焦点形成位置 Q5 の結果では約 40 % のバブルが所望の経路 Path B に流れたが、これは 2 回の分岐で 6:4 ~ 7:3 の分離率で制御できたということが出来る。以下に理由を述べる。まず、2 段階での制御は 1 段階目の制御で生じる偏りがある分、1 段階目の制御よりも高い音圧が必要になる結果を示した。そこで 1 段階目の制御では偏りが無い分 2 段階目の制御よりも高い分離率を達成できるとして、1 段階目の分岐では 7:3 の分離率、2 段階目の分岐では 6:4 の分離率で流れたとすることを考える。超音波照射しない場合には各分岐で 5:5 の分離率で流れると考えると、音波非照射時に比べて第 1 分岐では約 20 %、第 2 分岐では約 10 % 多くの気泡を制御できたと考察できる。7:3 の分離と 6:4 の分離を 2 度繰り返すと所望の経路には 42 % の気泡が流れることになるが、この値は Fig.7.16 の Q5 の結果や Fig.7.20 の water の値と一致している。音波非照射時には 25 % ずつそれぞれの経路に流れるので、今回の制御では約 15 % 多くの気泡を音波制御によって所望の経路に誘導できたと結論できる。

9.5 血液中での制御に関する考察

8.5 節では血液中と生理食塩水媒質中での誘導結果を比較し、血液中での誘導率が低い値を示した。これを周囲流体の粘性の違いにより考察する。水の動粘度 ν [m^2/s] は 1.00×10^{-6} 、血液の動粘度は 4.43×10^{-6} であり、流体からの抗力は血液の場合水に比べて約 4-5 倍になる。次に Doinikov の理論に基づく音響放射力について考察する。Doinikov の理論では音響放射力関数の項に粘性境界層が含まれており、媒質の粘性も考慮できる。式(2.2)で示す音響放射力のうち、 $a^2 Y_p (\propto F_{ac})$ に関して水と血液の粘性の条件で計算したグラフを Fig.9.1 に示す。この時の剛体球を仮定し、音圧は 300 kPa-pp とした。対象物体の半径 a によって大きさが異なるが、5 章の結果より凝集体の大きさが約 20 μm となることを考えると、粘性の違いによる音響放射力の差は約 2 倍になると見積もることができる。音響放射力は対象を剛体とするか圧縮性を有する気泡とするかでオーダーが $\times 10^3$ も変わるため、どのような条件を採用するかはまだ議論が必要なところである[40]。そのため、音響放射力と流体の抗力をそのまま計算することはできないが、単純に流体からの抗力が 4 倍になるからといって制御効率が 1/4 にはならないことが示唆される。実際、8 章の結果においてもそうはなっておらず、誘導率では 1/2 程度の低下に留まっている。今回使用したブタ血液の粘性はヒトの血液の粘性に近いことから、ヒトの血液においても非粘性媒質の条件に比べて 1/2 程度の誘導率で制御できることが示唆される。

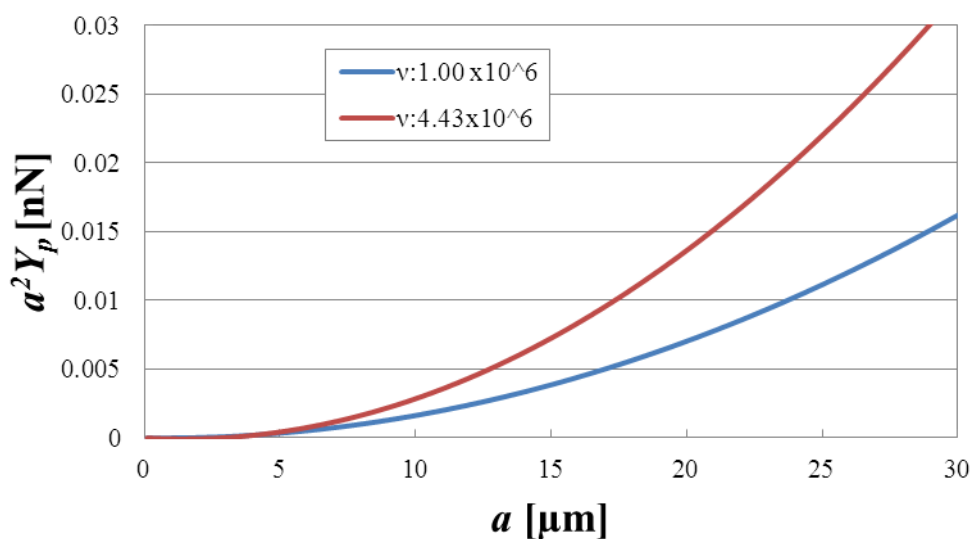


Fig. 9.1 微小気泡の半径に対する粘性を考慮した $a^2 Y_p$

また、音響流による影響も考えられる。音響流とは流体中に超音波を照射すると生じる直進流(音響流)のことで、超音波の伝搬過程で駆動力を得る。音響流の駆動力については粘性流体の運動方程式の非線形高周波成分の時間平均項から生ずるものであると考えられているので、水と血液の粘性の違いにより音響流の影響が表れることもありえる。しかし、本実験では素子の振動面と気泡との間に人工血管の壁があり、素子振動面から伝搬してきた流体の移動は伝わらない。これは音響流防止膜を設置するのと同等の効果がある。音響流防止膜を用いた実験の例では音波強度は本実験と同程度の数百 kPa で、厚さ 0.3 mm の膜で音響流を回避する効果が確認されている[69] ため、本実験のような厚みが 5 mm 程度の人工血管壁では十分に音響流の影響が回避されていると考えられる。

9.6 臨床応用のための現状と課題

9.6.1 血管形状再構築システムの適用について

本節では超音波 DDS を実現するためのナビゲーションシステムの現状について述べる。Fig.9.2 に血管形状再構築システム[70]の概要を示す。

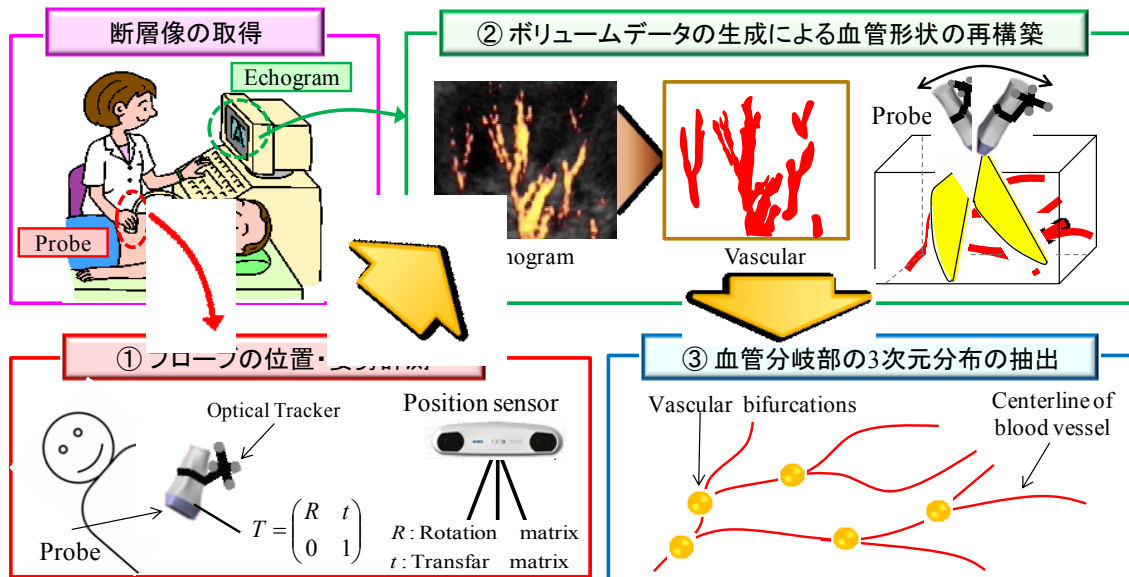


Fig.9.2 血管形状再構築システムの概要

このシステムでは光学式 3 次元位置計測センサ及び超音波診断装置を使用し、以下の I から III の処理によって構成される。まず計測センサによってリアルタイムにプローブの位置・姿勢情報を取得する(I)。それと同時に取得した超音波画像から画像処理で血管領域を抽出し、3 次元空間に展開することでボリュームデータを生成する(II)。この際に取得する超音波画像はドプラ画像であり、特に血管の描出に用いられる。最後にボリュームデータに対して三次元細線化処理で血管の芯線を抽出し、ボクセルの接続情報から分岐点の 3 次元位置座標を取得する(III)。なおこのシステムは二次元プローブと三次元プローブに対応可能であり、予めキャリブレーションを行うことでシステムへの適用が可能となる[71]。

Fig.9.3 に 3.3 節の多分岐流路のボリュームデータを 3 方向から取得し、データをマージしたボリュームデータを可視化した結果を示す。結果から、概ね 3 つのボリュームデータの位置合わせに成功し、多分岐流路全体の形状が再構築可能となったことを確認した。

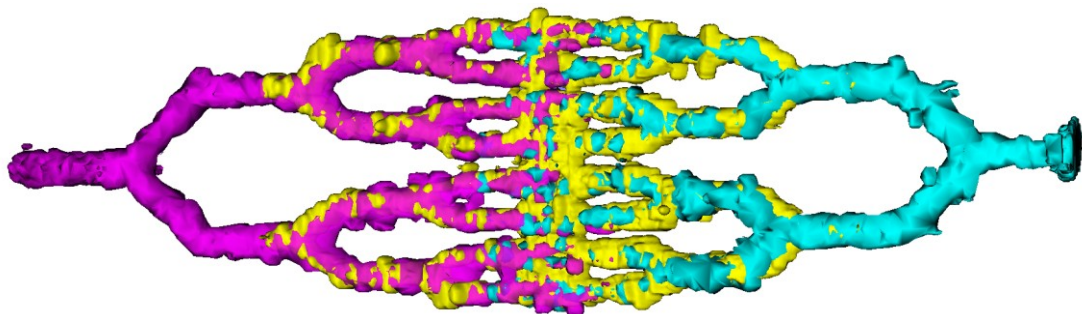
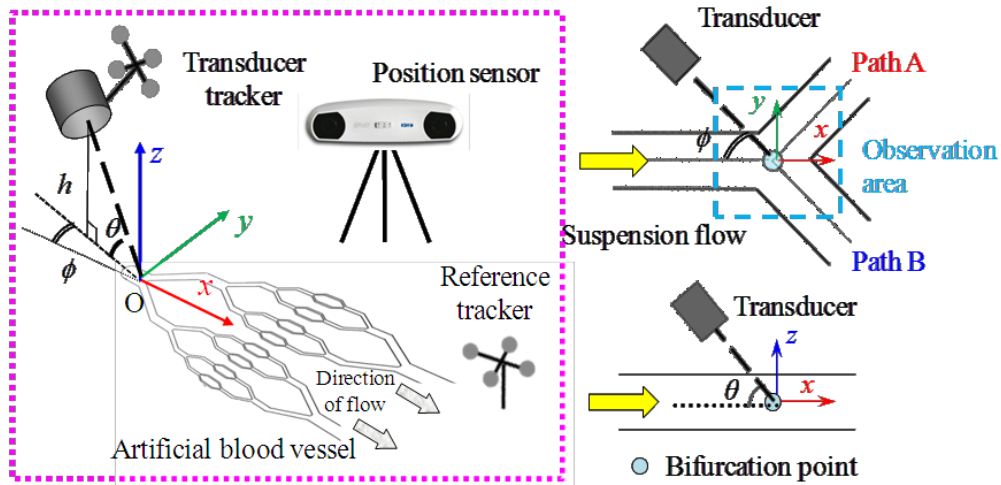


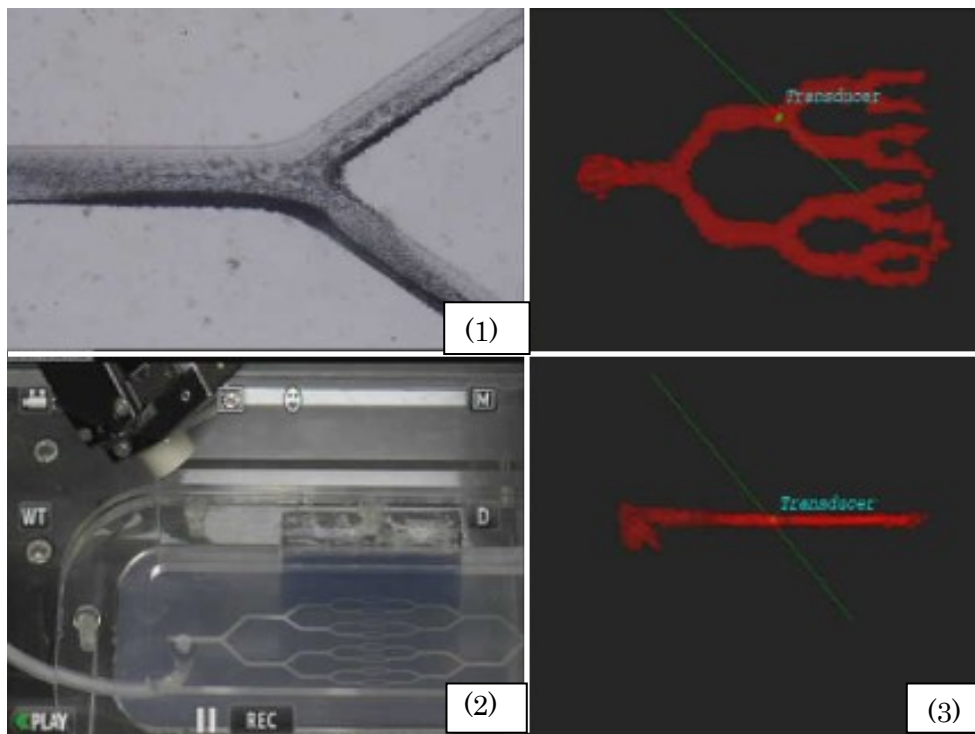
Fig.9.3 3 方向から取得した多分岐血管ボリュームデータのマージ結果

さらに超音波と微小気泡を利用した治療を想定し、取得したボリュームデータを用

いた微小気泡の誘導実験を行った[72]。多分岐流路を循環システムに接続し、以下のような手順で実験を行った結果を Fig.9.4 に示す。



(a) 音源と流路の位置関係



(b) ナビゲーションシステムによって微小気泡が誘導される様子

Fig.9.4 血管形状再構築システムを用いた微小気泡の誘導実験概略図と結果

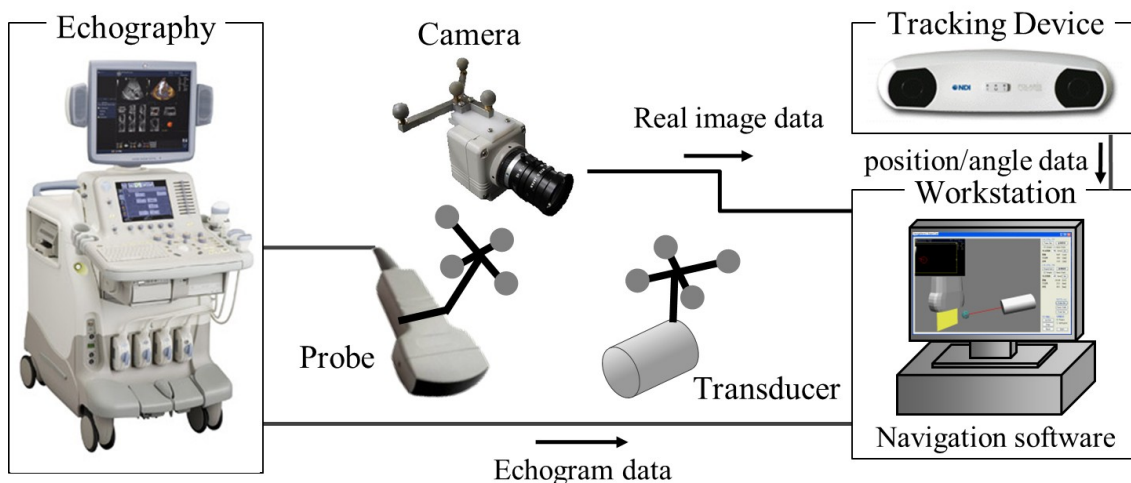
- ① 流路のボリュームデータを取得し、分岐点位置を抽出
- ② 計測用トラッカーを設置したトランスデューサの位置計測
- ③ 循環システムにおいて微小気泡を注入
- ④ 分岐点と音波焦点の位置合わせを行い、音波照射を開始
- ⑤ マイクロスコープの観察画像で微小気泡の誘導現象を確認する

③から⑤の微小気泡注入後の一連の動作を、ナビゲーションソフトウェアと observation area のマイクロスコープでフレームレート15fpsの動画を記録し、定性的な評価を行った。なお本実験に中心周波数 5MHz、焦点距離 50.0mm の平面型トランスデューサを用いて、焦点における最大音圧を 300kPa-pp とした。また微小気泡に F-04(粒子径 3.51 μ m)、懸濁液濃度が 4 倍希釈のものを使用した。位置計測センサに Polaris Spectra を使用し、超音波診断装置は 8.2.4 節で使用したものと同様である。

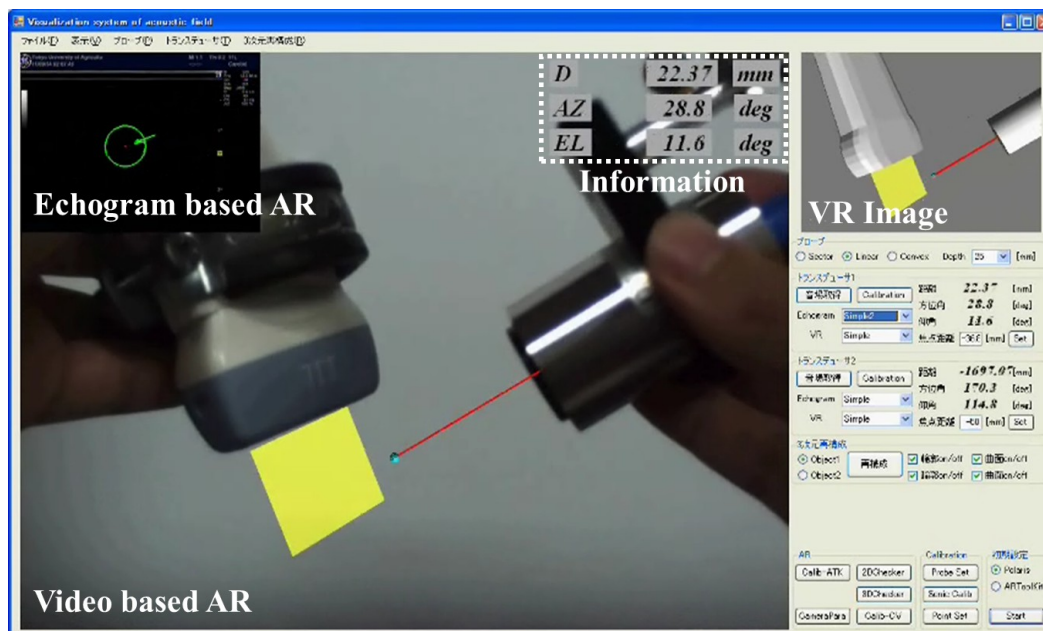
キャプチャ画像における(1)はマイクロスコープの観察画像、(2)はトランスデューサと流路の位置関係を示した実験環境、(3)は流路のボリュームデータと音軸を可視化したナビゲーション画像である。分岐部において微小気泡が Path B の方向へ多く流れている様子が観察された。この一連の結果から分岐部に音場の焦点位置を合わせることで、Path B へ微小気泡が誘導される様子を定性的に確認できた。この時は水槽に固定したトラッカーを基準としてトランスデューサの位置を計測しており、水槽内に固定した血管がボリュームデータ取得時から動かない必要がある。実際の生体内は呼吸などの影響で血管位置が変動することもあるため、そのような変動に対応することが今後の課題である。

9.6.2 音場可視化 AR システムの適用について

前節の解決策の一つとして以下に音場可視化システムの適用例を示す。このシステムは参照トラッカーを診断装置のプロープに装着しているため、プロープと治療用トランスデューサの位置関係を把握することが可能である。これによりプロープでリアルタイムに撮像した目標物に対して位置合わせを行うことが出来る。まず本研究室で開発された音場可視化 AR システム[73]の概要について述べる。Fig.9.5 にシステム構成と音場を可視化するときのインターフェイスを示す。このシステムでは拡張現実感 (Augmented Reality: AR) 技術を用いて治療用トランスデューサから照射される超音波を可視化することができる。このシステムは超音波診断装置、プロープ、治療用トランスデューサ、光学式 3 次元位置計測装置、実映像取得用 USB カメラ、ナビゲーションソフトウェアにより構成される。生体内の超音波照射目標を観察するための超音波画像と、プロープやトランスデューサ等の音源が映された実映像、各器具の 3 次元位置・姿勢をリアルタイムに取得し、ナビゲーションソフトウェアでデータ処理を行うことで、断層像上及び実映像上における微小気泡制御用の音場を可視化し、照射目標に音場の焦点位置を誘導するといった、微小気泡制御のための音源の操作支援を行う。このように超音波画像断面と治療用音場の位置関係を定量的かつ視覚的に把握できる。このシステムに本手法を適用し、精確な画像断面位置のキャリブレーションをすることで、精確な位置関係をリアルタイムに計測することができる。



(a) システム構成



(b) 音場可視化インターフェイス

Fig.9.5 システム構成とナビゲーションインターフェイス

このシステムを用いて可視化ソフトウェアで画像断面と照射用音波の位置合わせを行う様子を Fig.9.6 に示す。また Fig.9.7 に超音波照射後のマイクロスコープ画像を示す。黒い影は微小気泡を示し、超音波照射によって微小気泡が流路中に捕捉されたことを確認した。カメラキャリブレーションの誤差、超音波プローブキャリブレーションの誤差、マーカの計測誤差を総合したシステムの精度は約 1.0 mm であることから、ビーム径が 2.0mm 以上もしくは直径が 2.0mm 以上の太い血管に対して本手法が有用であることが示唆された[74]。

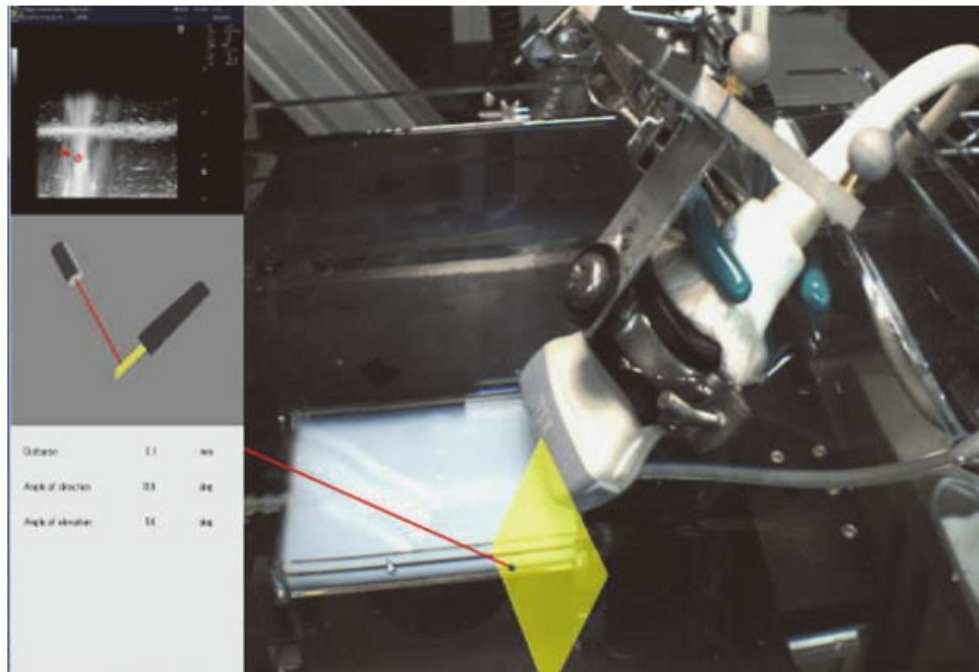


Fig.9.6 位置合わせ時の様子

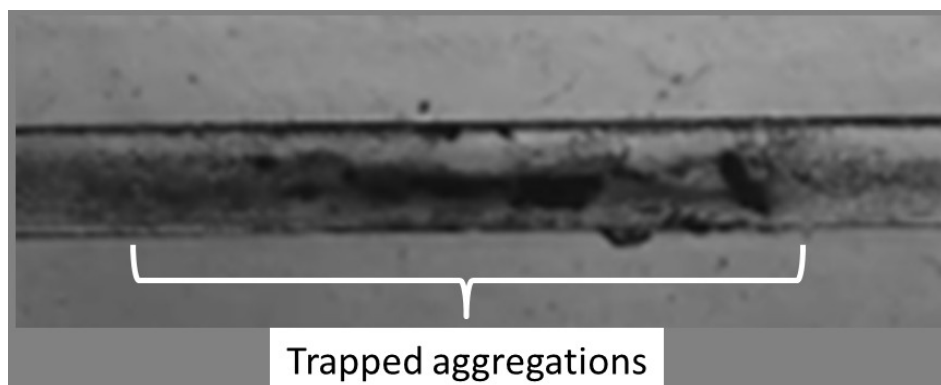


Fig.9.7 超音波照射後

以上のように、血管を可視化する技術および音場を可視化する技術といった微小気泡制御のための支援に関する研究が進められている。今後は精度向上、拍動や呼吸運動に対応するための追従機能の追加、前節で示された血管再構築手法の統合が必要である。また、ターゲットに繋がる血管の探索等の研究が 3 次元画像処理およびグラフ理論を用いた手法として進められている[75]。

9.7 結言

本章ではまず、本実験で得られた結果に対して理論的に考察を行い、その後臨床応用のための現状と課題に言及した。まず 9.2 節で微小気泡の静水中の挙動に関する考察を行い、Secondary Bjerknes force の含まれる項と実験条件を検証した。続いて 9.3 節で単純な構造の分岐血管を流れる気泡誘導の考察を行い、個数濃度の違いか

ら Secondary Bjerknes force による凝集効果を考察した。さらに 9.4 節においては 2 分岐した後の誘導率の結果から、各分岐での気泡の分離率を考察した。9.5 節では媒質の粘性が流体からの抗力と音響放射力に及ぼす影響を考察した。そして生体内の条件においても本研究の結果と同程度の効率で微小気泡が誘導出来る可能性があることを示した。そして 9.6 節では本研究室で開発されたナビゲーションシステムや血管形状再構築システムの本手法に対する適用に関して述べた。次章では本論文を統括したまとめを述べる。

.....

第 10 章 結論

本研究の目的は体外からの超音波照射により気泡の動態を制御する手法の開発である。本論文は、そのために必要となる実験的検証として水流中を流れる微小気泡の凝集現象を利用した動態制御手法を検討し、制御音源の数を削減した気泡の経路選択の実現可能性について取り組んだ。さらに生体内に近い条件における気泡制御の可能性について検証し、下記に示す成果が得られた。

- 静水中の凝集体形成過程の観測によって音波の中心周波数が低いほど凝集サイズは大きく、また気泡の共振付近の周波数において形成時間が短くなることを示した。
- 中心周波数 3 MHz、最大音圧 100 kPa-pp、F-04E の気泡濃度 2.30 $\mu\text{l/ml}$ のとき 10 MHz の照射に比べ凝集サイズは最大で 2 倍程度大きくなった。
- 最大音圧 100 kPa-pp、Sonazoid の気泡濃度 0.80 $\mu\text{l/ml}$ のとき共振に近い周波数 5 MHz の照射時に他の周波数に比べ形成時間が約 1/3 となった。
- 赤血球がヒトの赤血球濃度の約 1.2×10^3 倍の濃度以下であれば、中心周波数 5 MHz、最大音圧 100 kPa-pp の条件において赤血球溶液中の Sonazoid を凝集できることが分かった。
- 単板振動子を用いて内径 1.0 – 1.4 mm の分岐血管で経路選択を行った結果、中心周波数 3- 10 MHz、最大音圧 100-500 kPa-pp、流速 40 mm/s のとき直径約 500 nm のバブルリポソームを制御可能であることを示した。
- 複数の単板振動子を用いて内径 0.5 – 1.0 mm の 2 段分岐血管で F-04E の経路選択を行った結果、中心周波数 5 MHz、最大音圧 200 - 400 kPa-pp、流速 50 mm/s のとき第 1 分岐への照射で生じる気泡の偏りを考慮することで入射音波のエネルギーを抑制した制御が行えることを示した。
- アレイ型トランスデューサを用いて内径 1.0 – 1.4 mm の分岐血管で F-04E の経路選択を行った結果、中心周波数 3 MHz、流速 40 mm/s のとき凝集用焦点を形成した場合に制御効率が約 10 – 20% 向上することを示し、アレイ型トランスデューサ単体で凝集と経路選択を同時に達成できることを示した。
- アレイ型トランスデューサと凝集用音源を用いて 0.7 – 1.4 mm の 2 段分岐血管で F-04E の経路選択を行った結果、中心周波数 1 MHz、流速 40 mm/s のとき焦点切り替えによる気泡の経路スイッチングが可能であり、制御音源の数を削減した動態制御が実現された。
- 周囲媒質の粘性が気泡の動態制御に及ぼす影響を検討した結果、全血の 1/3 程

度の粘度では制御効率は数%程度しか制御効率が低下しないことを示した。

- 多段分岐流路内での気泡の経路選択にバブルリポソームを適用し、高い粘性挙動を示すものの、流速 40 mm/s のとき従来のマイクロカプセルと同様の制御手法で制御可能であることを示した。
- 超音波診断機を用いてブタの血液中のバブルリポソームの評価手法を検討した結果、流速 30 mm/s のとき、気泡濃度 0.001-0.4 mg lipid/ml の範囲で気泡量进行评估できることを示した。
- 内径 1.0 – 1.4 mm の分岐血管でブタの血液中のバブルリポソームの経路選択を行った結果、中心周波数 5 MHz、流速 30 mm/s のとき、粘性の影響により生理食塩水中の場合に比べ低い制御性能を示すが、約 1/2 程度の効率で動物の血液中でも気泡の経路選択制御が可能であることを示した。

以上の結果より、超音波治療実現のための微小気泡の血流内制御可能性が示された。

.....

謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官である東京農工大学大学院生物システム応用科学府 榊田晃司准教授には、このような研究の機会を与えていただいたことに加え、研究に対する御助言から姿勢まであらゆる面で有益なご指導をいただきました。ここに心から感謝の意を表します。本論文の作成につきまして、ご厚情に満ちた御指導をしてくださりました東京農工大学大学院生物システム応用科学府 山田晃教授に厚く御礼申し上げます。さらに、本論文の審査員を引き受けてくださった岩井俊昭教授、上田祐樹准教授、清水昭伸准教授に厚くお礼申し上げます。

本研究の途上、常日頃からお世話になり、数々の御激励・有益な御助言を頂いた本学大学院生物システム応用科学府 望月剛特任教授、小野木真哉特任助教に心から感謝いたします。

本研究を行うにあたり、実験器具の等のご支援、研究の推進方法等の助言を頂いた国立成育医療センター臨床研究開発部 千葉敏雄先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、生体組織の提供および助言を頂いた国立成育医療センター研究所移植・外科研究部 絵野沢伸先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、微小気泡の提供および助言を頂いた帝京大学 丸山一雄先生、鈴木亮先生に厚く御礼申し上げます。

本論文を作成するにあたり、多くの著作物・資料を参考・引用させて頂きました。それぞれの著者・編者の方々に感謝いたします。

また、研究室の皆さんには研究全般にわたりアドバイス、ご協力を頂きました。ともに同じ研究室で学んだ皆さんに感謝の意を表します。ありがとうございました。本研究の途上、常日頃からお世話になり、数々の御激励・有益な御助言を頂いた本学大学院生物システム応用科学府の小井土惇氏、出町文氏、保坂直斗氏本学工学部の鶴井信宏氏、澤口冬威氏、宮澤慎也氏をはじめとする研究室の皆様に深く御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、多くの著作物・資料を参考・引用させて頂きました。それぞれの著者・編集の方々に感謝いたします。

最後に、著者を理解し暖かく見守り続けてくださった家族に深く感謝いたします。

.....

参考文献

- [1] 木浦伸行：「ハーモニックイメージング」，日本放射線技術学会雑誌, 60 卷, 3 号, 2004
- [2] 森安史典,飯島尋子：「新しい超音波造影剤 Sonazoid による肝腫瘍診断」，INNERVISION 別冊付録”新 超音波診断”，2007, pp.2-7
- [3] 森安史典,飯島尋子：「微小気泡造影剤を使った造影超音波診断の現状と展望」,映像情報 Medical, 2006, pp.570-578
- [4] 松本洋一郎,葎仲 潔：「集束超音波とマイクロバブルによるガン治療法の開発」，日本機械学会誌, Vol.112, No1087, 2009, pp.468-469
- [5] Yuta Inaba, Moriyama Tatsuya, Shin Yoshizawa, and Shin-ichiro Umemura:”Ultrasonic Coagulation of Large Tissue Region by Generating Multiple Cavitation Clouds in Direction Perpendicular to Ultrasound Propagation”, Japanese Journal of Applied Physics, Vol,50, 2011, 07HF13
- [6] 立花克郎：「マイクロバブルの治療応用」，生体医工学, Vol.43, No.2, 2005, pp.211-215
- [7] Kengo OKADA, Nobuki KUDO ,Koichi NIWA, Katsuyuki YAMAMOTO: “A basic study on sonoporation with microbubbles exposed to pulsed ultrasound”, J. Med. Ultrasonics, Vol.32, No.1, 2005, pp.3–11
- [8] Yoshiki Yamakoshi, Takashi Miwa: “Effect of Ultrasonic Wave Irradiation Sequence in Microhollow Production Produced by Bubble Cavitation”, Jpn. J. Appl. Phys., Vol. 50, 2011, 07HF01
- [9] 工藤信樹, 山本克之：「微小気泡存在下におけるパルス超音波を用いたソノポレーション」，生体医工学, 43 卷, 2 号, pp231-237, 2005
- [10] 千葉敏雄：「エコーガンによる低侵襲の胎児期遺伝子治療：胎児腹腔内への非ウイルス性ベクター注入と胎児肝母体外超音波照射による遺伝子機能発現の出生前是正」，新しい医療機器研究, Vol.15, 2010, pp82-84
- [11] Kenichi Kawabata: “Nanoparticles with Multiple Perfluorocarbons for Controllable Ultrasonically Induced Phase Shifting”, Jpn. J. Appl. Phys., Vol.44, 2005, p4548
- [12] 日立ナノ液滴 HIFU,
URL: <http://www.hitachi.co.jp/New/cnews/month/2010/10/1012a.html>
last access 2014/01/23
- [13] Kazuo MARUYAMA, et al.: “Drug and Gene Delivery by ‘Bubble Liposomes and Ultrasound’”, YAKUGAKUZASSI, Vol.127, No.5, 2007, pp.781-787
- [14] 石原謙, 田内潤, 北畠顕：「共振超音波によるマイクロマシンとしてのマイクロカプセル DDS の計測と制御」，医用電子と生体工学, Vol.27, No.Supplement2, 1989, p.49
- [15] Teruyuki KOZUKA, Kyuichi YASUI, Toru TUZIUTI, Atsuya TOWATA, and Yasuo IIDA: “Noncontact Acoustic Manipulation in Air”, JJAP, Vol.46, No.7B, 2007,

pp4948-4950

- [16]小塚晃透,辻内亨,三留秀人,新井史人,福田敏男:「超音波の音軸を交差させて生成される定在波音場を用いた二次元マイクロマニピュレーション」, 日本機械学会論文集 (C編), 67巻, 657号, 2001, pp.1269-1275
- [17]Teruyuki Kozuka, Kyuichi Yasui, Shin-ichi Hatanaka, Toru Tuziuti, Judy Lee, Atsuya Towata: “Study of an Acoustic Field in a Microchannel”, Jpn. J. Appl. Phys., Vol.49, 2010, 07HE14
- [18]Teruyuki Kozuka, Kyuichi Yasui, Shin-ichi Hatanaka, Toru Tuziuti, Kazuyuki Suzuki, and Atsuya Towata: “Manipulation of Particles in a Microchannel with Various Geometric Spaces Using Ultrasound”, Jpn. J. Appl. Phys. Vol.50, 2011, 07HE27
- [19]Yoshiki YAMAKOSHI, Yoshiyuki OZAWA, Masato IDA, Nobuyuki MASUDA: “Effects of Bjerknes Forces on Gas-Filled Microbubble Trapping by Ultrasonic Waves”, Jpn. J. Appl. Phys., Vol.40, Part 1, No.5B, 2001, pp. 3852-3855
- [20]Yoshiki YAMAKOSHI, Naritsugu NAKAJIMA, Takashi MIWA, “Microbubble Trapping by Nonlinear Bubble Oscillation Using Pumping Wave”, Jpn. J. Appl. Phys., Vol. 46, No. 7B, 2007, pp. 4847-4850
- [21]Yoshiki YAMAKOSHI, Takashi MIWA: “Microbubble Self-Trapping to Surface of Target”, Jpn. J. Appl. Phys., Vol.47, No.5, 2008, pp. 4127-4131
- [22]Yoshiki YAMAKOSHI, Masato KOGANEZAWA: “Bubble Manipulation by Self Organization of Bubbles inside Ultrasonic Wave”, Jpn. J. Appl. Phys., Vol. 44, No. 6B, 2005, pp. 4583-4587
- [23]Yoshiki YAMAKOSHI, Yusuke KOITABASHI, Naritsugu NAKAJIMA, Takashi MIWA: “Yeast Cell Trapping In Ultrasonic Wave Field Using Ultrasonic Contrast Agent”, Jpn. J. Appl. Phys., Vol. 45, No. 5B, 2006, pp. 4712-4717
- [24]Yoshiki Yamakoshi, Takashi Miwa: “Microbubble Adhesion to Target Wall by Ultrasonic Wave Frequency Sweep Method”, Jpn. J. Appl. Phys., Vol.48, 2009, 07GK02
- [25]工藤信樹, 平尾紀文, 岡田健吾, 山本克之:「光学的高速度観測による超音波造影剤気泡のシェル特性の評価」, 電子情報通信学会論文誌,A Vol.J89-A, No.9, 2006, pp746-753
- [26]Spiros Kotopoulos, Michiel Postema: “Microfoam formation in a capillary”, Ultrasonics, Vol.50, 2010, pp.260-268
- [27]藤川貴杉,吉田憲司,渡辺好章:「超音波駆動された二気泡間に働く secondary Bjerknes force に関する実験的検討」, 電子情報通信学会技術研究報告. US, 超音波, Vol. 108, No. 19, 2008, pp.45-50
- [28]K. Yoshida, T. Fujikawa, and Y. Watanabe: “Experimental investigation on reversal of secondary Bjerknes force between two bubbles in ultrasonic standing wave”, J. Acoust. Soc. Am. Vol.130, 2011, pp.135-144
- [29]Ryusuke Nakamoto, Hayato Yamauchi, Yusuke Muramatsu, Kohji Masuda, Yoshitaka Miyamoto, Toshio Chiba: “Evaluation of trapping performance of fluid

- microcapsules to the parameter variation in acoustic radiation”, Proceedings of Symposium on Ultrasonic Electronics, Vol. 30, 2009, pp. 545-546
- [30] Kohji Masuda, Yusuke Muramatsu, Sawami Ueda, Ryusuke Nakamoto, Yusuke Nakayashiki, Ken Ishihara: “Active Path Selection of Fluid Microcapsules in Artificial Blood Vessel by Acoustic Radiation Force.” Jpn. J. Appl. Phys., Vol. 48, 2009, 07GK03
- [31] Kohji Masuda, Ryusuke Nakamoto, Nobuyuki Watarai, Ren Koda, Yuto Taguchi, Teruyuki Kozuka, Yoshitaka Miyamoto, Takashi Kakimoto, Shin enosawa, Toshio Chiba: “Effect of Existence of Red Blood Cells in Trapping Performance of Microbubbles by Acoustic Radiation Force”, Jpn. J. Appl. Phys., Vol. 50, 2011, 07HF11
- [32] Kohji Masuda, Nobuyuki Watarai, Ryusuke Nakamoto, Yusuke Muramatsu: “Production of local acoustic radiation force to constrain direction of microcapsules in flow”, Jpn. J. Appl. Phys., Vol. 49, 2010, 07HF11
- [33] 渡會展之, 榊田晃司, 中元隆介, 江田廉: “微小気泡の凝集体形成を利用した血管分岐部における能動的流路選択法”, 超音波医学, 38(4), 2011, pp.1-14
- [34] L. Brillouin, Ann. Phys. Paris 4, 528 (1925); Rev. Acoust. 5, 1936, pp.99-111
- [35] Louis V. King: “On the Acoustic Radiation Pressure on Spheres”, Proc. R. Soc. Lond. A **147**, 1934, p.212
- [36] K. Yoshioka and Y. Kawashima: “Acoustic radiation pressure on a compressible sphere,” ACUSTICA **5**, 1955, pp.167-173
- [37] K. Yasuda and T. Kamakura, “Acoustic radiation force on micrometer-size particles,” Appl. Phys. Lett., Vol. 71, No. 13, 1997, pp.1771-1773
- [38] A.A. Doinikov: “Acoustic radiation pressure on a rigid sphere in a viscous fluid”, Proc. R. Soc. Lond., A447, 1994, pp.447-466
- [39] A.A. Doinikov: “Acoustic radiation pressure on a compressible sphere in a viscous fluid”, J. Fluid Mech., 267, 1994, pp.1-21
- [40] Kohji Masuda, Takumi Ito, Ren Koda, Naoto Hosaka and Takashi Mochizuki: “Three-dimensional behavior reproduction of microbubbles in flow under local ultrasound exposure,” Proc. of the 6th Biomedical Engineering International Conference, Oct. 2013, Krabi, in press
- [41] L.P. Gor'kov: “On the forces acting on a small particle in an acoustical field in an ideal fluid”, Sov. Phys. Dokl. 6, 1962, pp.773-775
- [42] W.L. Nyborg: “Radiation pressure on a small rigid sphere”, J. Acoust. Soc. Am. 42, 1967, pp.947-952
- [43] 竹内正男: 「微小物体の超音波マイクロマニピュレーション」, 日本音響学会誌, 52 卷, 3 号, 1996, pp.203-209
- [44] O. A. Sapozhnikov and M. R. Bailey: “Radiation force of an arbitrary acoustic beam on an elastic sphere in a fluid”, J. Acoust. Soc. Am., Vol. 133, No. 2, 2013, pp.661-676
- [45] R. G. Leighton, The Acoustic Bubble (Academic Press, London, 1997), Chap. 4.

- [46]野村英之,鎌倉友男:「進行波内の微小粒子に作用する音響放射力」,日本音響学会誌,55巻,9号,1999,pp619-625
- [47]超音波便覧編集委員会編:「超音波便覧」,丸善株式会社,1999,pp205-208
- [48]Kyuichi Yasui, Judy Lee, Toru Tuziuti, Atsuya Towata, Teruyuki Kozuka, Yasuo Iida: “Influence of the bubble-bubble interaction on destruction of encapsulated microbubbles under ultrasound”, J. Acoust. Soc. Am., Volume 126, Issue 3, pp. 973-982, 2009, pp973-982
- [49]河村哲也:「基礎からの流体力学」,山海堂,2006,pp107-112
- [50]伊東章:「流体中の粒子・気泡の運動」,
URL:<http://chemeng.in.coocan.jp/fl/fl08a.html>
last access 2014/01/23
- [51]佐藤恵一,木村繁男,上野久儀,増山豊:「流れ学」,朝倉書店,2004,pp44-50
- [52]工藤信樹:「超音波の安全性について」,超音波医学,35(6),2008,pp.623-630
- [53]Naoto Hosaka, Ren Koda, Shinya Onogi, Takashi Mochizuki, and Kohji Masuda: “Production and validation of acoustic field to enhance trapping efficiency of microbubbles by using a matrix array transducer,” Japanese Journal of Applied Physics, Vol.52, 2013, 07HF14
- [54]Kazuyuki Nakahata and Naoyuki Kono: “3-D Modelings of an Ultrasonic Phased Array Transducer and Its Radiation Properties in Solid”, Ultrasonic Waves, Chapter.3, 2012
- [55]秋山いわき,蜂谷弘之,坂本慎一著:「日本音響学会編 音響テクノロジーシリーズ 15 アコースティックイメージング」,コロナ社,2010
- [56]松本油脂製薬株式会社,“マツモトマイクロスフェア F30・F50”,技術資料 FMC-003・004, pp2-3
- [57]松村学,杉原博:「超音波検査用造影剤ペルフルブタンの基礎および臨床試験成績」,日薬理誌,Vol.130,2007,pp.413-420
- [58]Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, Utoguchi N, Maruyama K: “Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology”, International Journal of Pharmaceutics, 354, 2008, pp.49-55
- [59]Kudo N, Sakaguchi K, Suzuki R, Maruyama K: Effects of Phase Transition of a Lipid Bilayer on Dynamics of Bubble Liposomes. Proc of IEEE Ultrasonics Symposium 2009. IEEE, Rome, 2009, pp. 1255 -1258.
- [60]吉本次郎,川崎誠治:「門脈血栓症」,外科 67,2005,pp.1069-1076
- [61]杉山高,秋山敏一:「腹部エコーの実学」,医療科学社,2005
- [62]岡本宗司,桑山直也,山本博道,久保道也,遠藤俊郎:「上腕動脈からのガイディングカテーテルの誘導,保持を目的とした GooseNeck Snare の使用」,脳神経血管内治療,Vol. 5,No. 1, 2011, pp.63-67
- [63]亀子文子,寺澤文子,小穴こず枝:「超音波パルスドップラ法を用いた 75g ブドウ糖経口負荷による門脈血流速度変化の評価とその有用性」,信州大学医療技術短期大学部,紀要,19,1994,pp.7-13

- [64]長井裕, 伊藤紘一:「絵で見る超音波」, 南江堂, 2000, p.136
- [65]齋藤敏樹:「食用以外に利用される豚について」, 日本SPF豚研究会, All About Swine, 35, 2009, pp.14-20
- [66]梶田晃司, 村松悠佑, 溝部一行, 石原謙:「超音波定在波の印加による流路中のマイクロカプセルの局所的濃度制御とその観測」, 生体医工学, Vol.46, No.2, 2008, pp.275-282
- [67]吉元直樹, 吉田憲司, 渡辺好章, 秋山いわき:「二周波数超音波ビーム交差領域で生成される和音成分 -コントラストエコー法への応用-」, 電子情報通信学会技術報告 US, 超音波, 107(468), 2008, pp.53-58
- [68]Hendrik J. Vos, Francesco Guidi, Enrico Boni, Piero Tortoli: “Method for Microbubble Characterization Using Primary Radiation Force”, IEEE Trans on Ultrason Ferroelectr and Freq Control. 54(7), pp.1333-1345, 2007
- [69]竹内真一, 内田武吉, 青木貴宏, 川島徳道:「超音波照射によるナノダイヤモンド微粒子の解凝集および表面改質に関する研究: 超音波照射時間と粒度分布, ゼータ電位の関係および音響流回避の効果」, 電子情報通信学会技術研究報告. US, 超音波 109(213), 2009, pp.47-52
- [70]加藤俊和, 田口侑人, 菅野悠樹, 齊藤俊, 吉永崇, 梶田晃司, 宮本義孝, 千葉敏雄: 「微小気泡の生体内制御支援のための血管分岐部の 3次元分布計測システムの開発」, 生体医工学, Vol.49, No.6, 2011, pp.884-895
- [71]菅野悠樹, 小野木真哉, 吉田寿夫, Antoine Bossard, 望月剛, 梶田晃司: 「金属球マーカーを用いた自動かつ高精度なフリーハンド超音波キャリブレーション」, 日本コンピュータ外科学会誌, Vol. 15, No.1, 2013, pp.11-21
- [72]Shinya Onogi, Tuan-Hung Phan, Antoine Bossard, Naoto Hosaka, Ren Koda, Takashi Mochizuki and Kohji Masuda: "3D Ultrasound Navigation System with a Reconstruction of a Blood Vessel Network for Microbubble Delivery Therapy," 生体医工学シンポジウム 2013 講演予稿集, 2013 年, 福岡, CD-ROM
- [73]田口侑人, 加藤俊和, 菅野悠樹, 江田廉, 吉永崇, 梶田晃司: 「微小気泡の生体内能動制御のための音場分布可視化 AR/VR システムの開発」, 電子情報通信学会論文誌, 111(88), 2011, pp.19-24
- [74]Shinya Onogi, Yuto Taguchi, Yuki Sugano, Nobuhiko Shigehara, Ren Koda, Antoine Bossard and Kohji Masuda: “Navigation system with augmented reality for ultrasonic microbubble delivery therapy,” Advanced Biomedical Engineering, Vol.1, 2012, pp.16-22
- [75]Antoine Bossard, Toshikazu Kato and Kohji Masuda: "Supporting Reconstruction of the Blood Vessel Network Using Graph Theory: An Abstraction Method," Proc. of 34th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society(EMBS), Aug. 2012, San Diego, pp.5470-5473
-

関連発表論文

I. 査読付き学会論文誌発表論文

- 1) Ren Koda, Jun Koido, Takumi Ito, Takashi Mochizuki, Kohji Masuda, Seiichi Ikeda, Fumihito Arai, Yoshitaka Miyamoto and Toshio Chiba: " Experimental study to produce multiple focal points of acoustic field for active path selection of microbubbles through multi-bifurcation," Japanese Journal of Applied Physics, Vol.52, 07HF13, 2013
- 2) 江田廉、渡會展之、重原伸彦、伊藤拓未、南出歩、榊田晃司、柿本隆志、絵野沢伸、宮本義孝、千葉敏雄:「超音波照射による微小気泡の凝集現象解析と赤血球の影響」、生体医工学、日本生体医工学会、Vol.50, No.1, pp.138-148, 2012

II. 査読付き国際会議発表論文

- 1) Ren Koda, Naoto Hosaka, Shinya Onogi, Takashi Mochizuki, Kohji Masuda, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama : "Active Control of Bubble Liposome through Artificial Capillary by Using Matrix Array Transducer," 2013 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), July 2013, Prague, in press.
- 2) Ren Koda, Jun Koido, Naoto Hosaka, Takumi Ito, Shinya Onogi, Takashi Mochizuki, Kohji Masuda, Seiichi Ikeda, Fumihito Arai: "Active Control of Microbubbles Stream in Multi-bifurcated Flow by Using 2D Phased Array Ultrasound Transducer," 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society(EMBS), July 2013, Osaka, pp.6277-6280
- 3) Ren Koda, Nobuyuki Watarai, Nobuhiko Shigehara, Takumi Ito, Ayumu Minamide, Kohji Masuda, Seiichi Ikeda, Fumihito Arai, Yoshitaka Miyamoto and Toshio Chiba: "Active Control of Microbubbles in a Capillary Flow by Producing Multiple Acoustic Radiation Forces," IFMBE Proceedings (World Congresson Medical Physics and Biomedical Engineering), Vol.39, May. 2012, Beijing, pp.1617-1619
- 4) Ren Koda, Nobuyuki Watarai, Ryusuke Nakamoto, Taku Ohta, Kohji Masuda, Yoshitaka Miyamoto and Toshio Chiba: "Dependence of Aggregate Formation of Microbubbles upon Ultrasound Condition and Exposure Time," Proc. of 33rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society(EMBS), Sep. 2011, Boston, pp.5589-5592

III. 査読なし国内学会発表論文

- 1) Ren Koda, Jun Koido, Naoto Hosaka, Shinya Onogi, Takashi Mochizuki, Kohji Masuda, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama: "Evaluation of path selection ability of microbubbles in a bifurcated flow based on acoustic field design" (音場設計に基づく分岐流路中での微小気泡の経路選択性評価), 第34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講演論文集、2013年、京都、(印刷中)
- 2) Ren Koda, Jun Koido, Naoto Hosaka, Shinya Onogi, Takashi Mochizuki, Kohji Masuda, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama: "Design of three-dimensional acoustic field for active control of bubble liposomes in a bifurcated flow," 生体医工学シンポジウム2013講演予稿集、2013年、福岡、CD-ROM
- 3) 江田廉、小井土惇、伊藤拓未、望月剛、榊田晃司:「超音波2次元アレイを用いた

- 生体条件を模擬した流路中での微小気泡の動体制御」、日本超音波医学会 第 86 回学術集会論文集、Vol.40, Suppl., 2013 年、大阪、p.S
- 4) 江田廉、保坂直斗、小井土惇、望月剛、榊田晃司:「複数の流路分岐部に対する 3 次元音場形成による流体中の微小気泡の能動制御」、電気学会研究会資料< 医用・生体工学研究会 >、2012 年、小金井、MBE-109, pp.9-12
 - 5) Ren Koda, Jun Koido, Takumi Ito, Takashi Mochizuki, Kohji Masuda, Seiichi Ikeda, Fumihito Arai, Yoshitaka Miyamoto and Toshio Chiba: "Experimental study to produce multiple focal points of acoustic field for active path selection of microbubbles through multi-bifurcation (多分岐流路における微小気泡の経路選択制御のための複数焦点形成法の検討)"、第 33 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講演論文集、2012 年、千葉、pp.517-518
 - 6) 江田廉、渡會展之、重原伸彦、伊藤拓未、南出歩、榊田晃司、池田誠一、新井史人、宮本義孝、千葉敏雄:「多分岐流路における微小気泡の経路選択制御のための音場形成法の検討」、日本超音波医学会 第 85 回学術集会論文集、Vol.39, Suppl., 2012 年、東京、p.S343
 - 7) 江田廉、渡會展之、重原伸彦、伊藤拓未、南出歩、榊田晃司、池田誠一、新井史人、宮本義孝、千葉敏雄:「複数音源を用いた超音波照射による多分岐血管を流れる気泡の連続経路選択の検討」、第 51 回日本生体医工学会大会プログラム・論文集、2012 年、福岡、CD-ROM
 - 8) 江田廉、渡會展之、重原伸彦、伊藤拓未、南出歩、榊田晃司:「超音波照射による微小気泡の凝集現象解析と流水中挙動制御の検討」、第 10 回日本超音波治療研究会抄録集、2011 年、東京、p.33
 - 9) 江田廉、渡會展之、重原伸彦、伊藤拓未、南出歩、榊田晃司、柿本隆志、絵野沢伸、宮本義孝、千葉敏雄:「超音波照射による微小気泡の凝集現象解析と赤血球の影響」、生体医工学シンポジウム 2011 講演予稿集、2011 年、長野、CD-ROM
 - 10) 江田廉、渡會展之、重原伸彦、伊藤拓未、榊田晃司:「微小気泡の凝集体形成における超音波照射条件と気泡特性の影響」、日本超音波医学会基礎技術研究会資料、Vol.2011, 2011 年、東京、pp.13-18
 - 11) 江田廉、渡會展之、太田拓、重原伸彦、榊田晃司、宮本義孝、千葉敏雄:「超音波照射による微小気泡 Sonazoid の凝集サイズ制御のための実験的検討」、日本超音波医学会 第 84 回学術集会論文集、Vol.38, Suppl., 2011 年、東京、p.S306
 - 12) 江田廉、渡會展之、中元隆介、重原伸彦、太田拓、榊田晃司、宮本義孝、千葉敏雄:「超音波照射条件に対する微小気泡の凝集体形成挙動の高速度観測」、第 50 回日本生体医工学会大会プログラム・論文集、2011 年、東京、CD-ROM