

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20706

研究課題名（和文）高感度ナノバブル検出を目的とした低音圧超音波イメージング

研究課題名（英文）Low-intensity ultrasound imaging for high-sensitivity nanobubbles detection

研究代表者

江田 廉（Koda, Ren）

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：40734273

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：生体内の薬物濃度を制御するDDSにおいて、気泡のナノサイズ化および低音圧超音波送信に伴う低出力化により検出感度の低下が懸念されるため、従来に比べ格段の高感度観測が必要になる。本研究では、これまでに開発した波動逆伝播に基づく映像化法を応用し、超音波パルス反転送信の時間間隔を従来のミリ秒オーダーからマイクロ秒オーダーに短縮した新たなパルスインバージョン法（時分割PI法と呼ぶ）を適用する方法を開発した。結果、本手法は従来のBモード観測法に比べおよそ1/5の音圧にも関わらず、100倍高い感度をもつことを確認し、ナノバブル検出にも有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法の特徴であるマイクロ秒オーダーの反転送信の複数回加算により、従来のBモード観測法に比べ1/5の音圧で100倍高い感度をもつことを確認した。低音圧超音波送信に伴う低出力化により新たな応用が考えられる。低音圧化が達成されれば製薬分野での気泡製剤開発の発展に寄与するだけでなく、近年骨折治療などで注目されている低音圧超音波治療への応用が可能となり、低出力・高感度な「新たな検出法」を開発・実現する可能性がある。今後の発展により、ナノサイズ化した気泡を破壊することなく深部癌の超早期発見が可能になるなど、気泡観測だけでなく、革新的な治療診断技術創出を拓く基盤技術になる。

研究成果の概要（英文）：In the ultrasound-mediated drug delivery systems (US-DDSs), which controls the drug concentration in the living body, there is a concern that the detection sensitivity will decrease due to the application of nanobubbles and low-sound-pressure ultrasound transmission. In this research, we have developed a method to apply a new pulse inversion method (called time division PI method) that shortens the time interval of ultrasonic pulse inversion transmission from the conventional millisecond order to the microsecond order. As a result, it was confirmed that even though the sound pressure was about 1/5, the sensitivity was 100 times higher than that of the conventional B-mode observation method, and it was shown that it was also effective in detecting nanobubbles.

研究分野：超音波工学

キーワード：超音波援用ドラッグデリバリシステム ナノバブル 高感度検出 パルスインバージョン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内の薬物濃度を制御する DDS においては組織深部への到達を可能とするナノキャリアの開発が薬学分野で進められており、超音波援用 DDS においてもマイクロバブルより極小なナノバブルの採用が進められようとしている。超音波援用 DDS では治療効果をその場で観測し、これを超音波の照射シーケンスにフィードバックし効率向上を図ることが重要になるが、気泡のナノサイズ化および低音圧超音波送信に伴う低出力化により検出感度の低下が懸念されるため、従来に比べ格段の高感度化に繋げられるかがポイントになる。従来の造影超音波法であるパルスインバージョン法(PI 法)は原理的に送信パルス間の時間差(ミリ秒オーダー)以内の時間で生じる体動ノイズに弱く、組織信号ノイズのキャンセルが不十分になるという課題があるため、解決には全く新しい映像化手法が必要になる。

(2) 気泡キャビテーションの観察技術として、すでにいくつかの方法が提案されている。音響化学的方法は、気泡の圧壊に伴う活性酸素による効果を可視化する方法であるが、基本的にオフラインでの処理で、その場計測には向かない。音響電気的方法は、気泡キャビテーションに伴う 2 次超音波音響雑音を観測する方法であるが、空間分解能が得にくいという課題がある。一方、エコー装置を使った画像化法は、時間分解能や信号の定量性に劣るとい課題がある。我々はパワードプラ画像を使い時間分解能を有する T 画像と呼ぶ画像を用いて気泡キャビテーションを観察する方法を提案してきた。この方法は汎用の超音波映像装置のパワードプラ画像を検出手段として用い、映像用超音波に対して強力超音波を遅延同期させて照射させることで気泡キャビテーション信号を高時間分解能で観測する手法であるが、T 画像は基本的に気泡キャビテーションによる 2 次超音波の信号強度しか観察できず、また十分な空間分解能が得られないという問題があった。研究代表者は 2017 年に従来の超音波画像の映像化原理とは全く異なる気泡キャビテーションの音源可視化法を提案した。この方法は、点音源を仮定した信号源のサブマイクロ秒での時間分解能とサブミリメートルの空間分解能を併せ持つ観察が両立できる画期的な方法で、気泡キャビテーション信号の時間発展が記録される。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、これまでに開発した波動逆伝播に基づく映像化法を応用し、従来と異なる新しい PI 法を適用した新規計測法で高感度検出を行う。本研究では、波動逆伝播に基づく映像化法を可視化原理とし、超音波パルス反転送信の時間間隔を従来のミリ秒オーダーからマイクロ秒オーダーに短縮した新たな PI 法(時分割 PI 法と呼ぶ)を適用する。

(2) 開発した可視化システムを展開し、ナノバブル検出への適用および生体応用を見据えた実験に取り組む。超音波の生体作用を定量するための基礎的な実験においては、浮遊細胞および蛍光色素を用いた実験系を構築することで超音波照射による生体作用効果の計測を図る。

3. 研究の方法

本研究で実現しようとする映像系基本原理の従来法との比較を表 1 に示す。生体からの信号を打ち消し、気泡からの信号を強調する原理は従来の PI 法と同様であるが、1 フレーム中の繰り返しパルス間での加算処理ではなく、本手法では一連の送信波形を時間的に分割し、反転して採用するため、従来ミリ秒オーダーであった送信の時間差がマイクロ秒オーダーに短縮される。そのため従来の体動に起因する組織信号ノイズをキャンセルでき、S/N 比の向上が期待される。

構築した実験系を図 1 に示す。RF 信号を採

表 1 基本原理の従来法との比較

	従来法	本方法
原理		
送受信	同一走査線上で正負反転パルスの送受信	送信: 強力超音波の正負反転パルス 受信: 送信と異なるプローブ
パルス送信時間差	ミリ秒オーダー	マイクロ秒オーダー

取するために RSYS0003 (マイクロソニック、サンプリング周波数: 31.25 MHz) を用いた。実験ではマイクロバブルとして Sonazoid およびナノバブルとして株式会社ナノクスの高密度ウルトラファインバブル発生装置 nanoQuick により生成した超高密度ウルトラファインバブル (UFB) を用いた。Sonazoid および UFB の平均直径はそれぞれ約 2-3  $\mu\text{m}$ 、約 60 nm、希釈前の個数濃度はそれぞれ  $1.2 \times 10^7$  [/mL]、 $9.4 \times 10^9$  [/mL] である。この懸濁液をカンテン

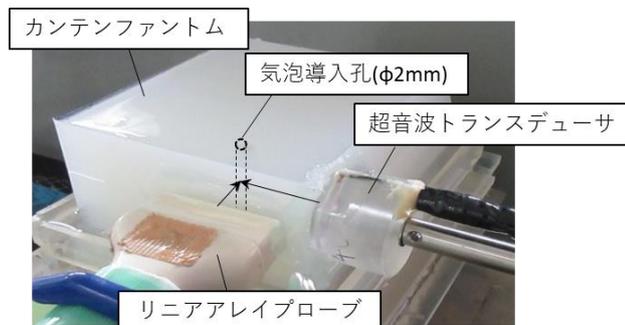


図1 構築した実験系

ファントム中の気泡導入孔 (直径 2 mm) に入れ、導入孔に対して外部から強力超音波を照射するために使用するトランスデューサ (中心周波数: 2.5 MHz) を導入孔から 40 mm (超音波の収束点) の位置に、そのビームの軸が導入孔の中心軸と直交するように設置した。次に気泡から放射された二次的な超音波信号を受信するために使用するリニアアレイプローブ (中心周波数: 7.5 MHz、素子ピッチ: 0.6 mm) を導入孔から 20 mm 離れた位置に配置し、リニアアレイプローブとトランスデューサのビーム軸が直交するように調整した。そして強力超音波の照射時間中のキャビテーション信号を記録した RF データから波動逆伝播の計算を行い、PC 上で像再生を行った。送信の強力超音波のバースト長は 40 マイクロ秒程度を基本とし、時分割 PI 法適用にあたってはバースト長内で超音波パルスの反転送信を繰り返す照射シーケンスとした。実験で用いた強力超音波照射シーケンスの一例を図2に示す。ここでは 8 cyc 励振、4 cyc 休止の反転送信を 8 回 (偶数回) 繰り返している。実際の駆動では休止の部分でも励振の尾引きが生じると考えられる。

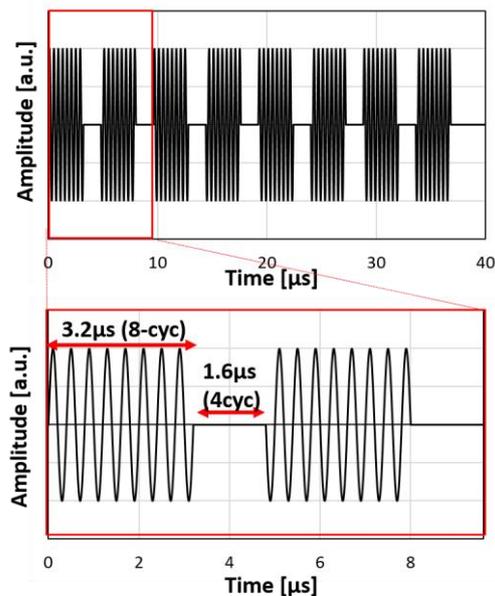


図2 強力超音波送信波形の一例

#### 4. 研究成果

強力超音波の音圧を 0.5 MPa に設定し、 $1 \times 10^6$  倍に希釈した Sonazoid 懸濁液に対し、パルス反転送信繰り返し照射シーケンスを適用したときの像再生画像、および時分割 PI 法適用による加算結果を図3に示す。照射シーケンスは 4 cyc 励振と 8 cyc 休止の反転送信を 10 回繰り返す照射とした。加算後の結果は枠内のパルスに反転パルス照射により得られる像再生結果を加算することで得られる。画像中心ライン上の RF 波形の加算後の結果より、振幅が加算前の約 10 倍となる結果を得た。また気泡導入孔以外の寒天ブロック内のわずかな散乱体からの信号については打ち消されていると考えられ、加算後の結果では S/N 比の向上が確認された。

同様の送信条件を用いて提案法の感度評価を行った。

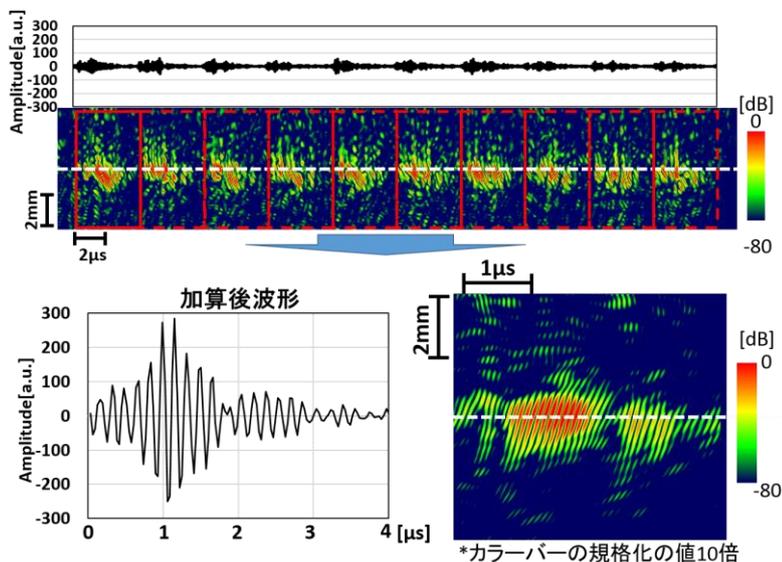


図3 提案法を用いた気泡観測の一例(加算結果)

Sonazoid 懸濁液の希釈率に対して S/N 比を算出した結果を図 4 に示す。高い希釈率の場合には S/N 比は下がるが、提案法では  $1 \times 10^8$  倍希釈まで検出可能であることを確認した。従来の B モード観察においては  $1 \times 10^6$  倍希釈の気泡濃度が検出限界であり、B モード観察で使用される超音波パルスの最大音圧 2.5 MPa に比べ、およそ 1/5 の音圧にも関わらず、提案法は B モード観測と比べ 100 倍高い感度をもつことが確認された。

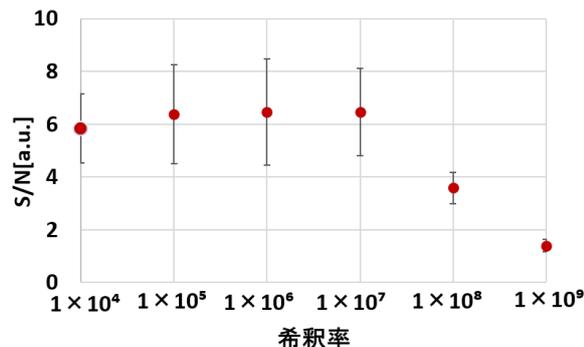


図 4 Sonazoid 希釈率に対する提案法の S/N 比

従来の PI 法と提案法のパルス送信間隔(PRI)で像再生および加算を行い、模擬的に体動の影響を比較した結果を図 5 に示す。映像プローブから軸方向に遠ざかる方向へ、数 cm/s の動きを想定し、体動がない場合から 1 cm/s、2 cm/s、3 cm/s の場合を比較した。強力超音波の音圧を 0.3 MPa に設定し、 $1 \times 10^5$  倍に希釈した Sonazoid 懸濁液に照射を行った。照射シーケンスは 8 cyc 励振と 4 cyc 休止の反転送信とし、加算回数は 1 回とした。信号とノイズそれぞれの白枠部分から S/N 比を算出した。結果、体動の速さが 3 cm/s 程度になると従来の PI 法のパルス送信間隔では S/N 比の低下が見られたが、提案法では S/N 比の低下は見られなかった。提案法の送信時間間隔と受信信号の波長の長さから考えると、提案法は数 m/s 程度の体動でも S/N 比を低下させずに適用可能であると考えられる。

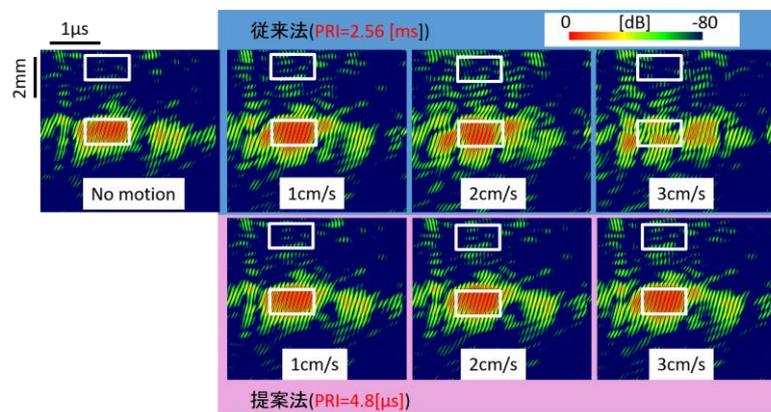


図 5 従来 PI 法と提案法のパルス送信間隔(PRI)での像再生結果および体動の影響の比較

提案法を用いたナノバブル検出への適用を図るため、マイクロバブル検出との比較実験を行った。個数濃度  $1.2 \times 10^7$  [1/ml] の Sonazoid 懸濁液、個数濃度  $9.4 \times 10^9$  [1/ml] の UFB 懸濁液に対して音圧を 1.0 MPa に設定した強力超音波を照射した。励振を 100 cyc とし、加算回数を 8 回とした。Sonazoid および UFB に対する時分割 PI 法の像再生結果を図 6(a)(b)にそれぞれ示す。UFB は Sonazoid に比べ超音波応答感度が低いため、像再生時の規格化の値を 1/15 としている。UFB の像再生結果は Sonazoid に比べ強力超音波照射方向に空間的に広い分布を示した。これは Sonazoid と UFB の遮蔽効果の違いによると考えられる。すなわち、Sonazoid は UFB と比べて個数濃度は低い、気泡径が大きいため強力超音波の遮蔽効果が大きく、一方で UFB は気泡の径が小さいため遮蔽効果が小さくなり、空間上では強力超音波照射方向に広範囲で強度分布が得られたと考えられる。

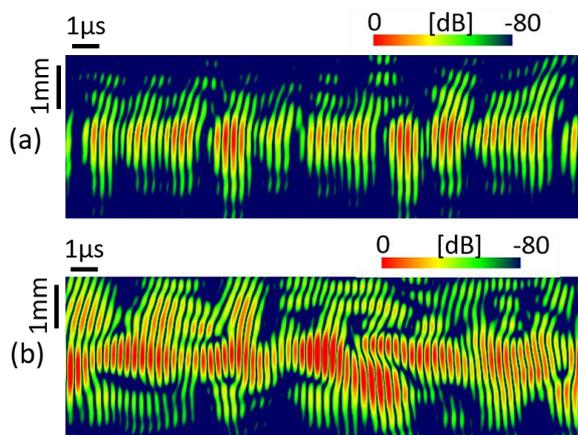


図 6 時分割 PI 法での像再生結果  
(a) Sonazoid、(b) UFB(規格化の値 1/15)

生体応用を見据えた実験として、浮遊細胞に対する生体作用効果を評価する実験を行った。浮遊細胞としてほ乳類白血球由来の HL-60 を用いた。HL-60 の直径は約 10  $\mu\text{m}$  である。また音響穿孔による試薬の膜透過を評価するため NucBlue (ThermoFisher Scientific)を蛍光試薬として用いた。この色素は正常な細胞膜を透過せず、細胞膜が壊れて DNA に結合する

と、青色の蛍光を発する特徴を持つ。蛍光顕微鏡 BZ-9000(KEYENCE)を使用し、青・シアンフィルタを用いて蛍光観察を行った。寒天ファントムの導入孔をφ2 mm から 2×5 mm の角柱型に変更し浮遊細胞懸濁液に蛍光色素および微小気泡として Sonazoid を加えた溶液に強力超音波照射を行った。色素導入用照射シーケンスとして音圧を 1 MPa に設定し 1 秒間の連続照射を行ったときの蛍光色素導入の例を図 7 に示す。明視野像と蛍光像に対してそれぞれエッジ検出を利用した細胞のカウントプログラムを使用して細胞の個数を計測し、導入率をもとめた。

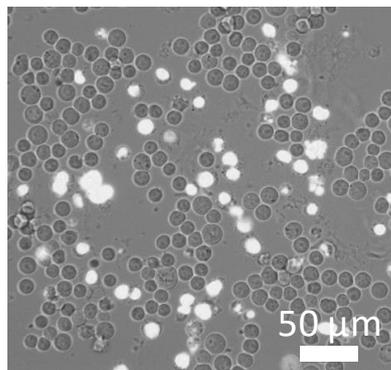


図 7 浮遊細胞に対する蛍光色素導入の例

得られる信号観測結果と細胞への色素導入率の関係を調べるため、色素導入用照射の直前に信号取得用の超音波照射を行った。信号取得用超音波照射(1 MPa、バースト長 30 マイクロ秒、50 照射)により得られる振幅像から照射フレーム毎に平均値を算出した。結果を図 8 に示す。照射に伴って振幅の平均値が減少していく前期、変動が起こらなくなる後期と定義した。取得されたエネルギーの総量と、生体作用との関係性を評価したところ、前期フレームまでの総量との相関係数は 0.113、後期フレームまでの総量との相関係数は 0.400 であり、後期フレームの方が高い相関を得る興味深い結果が得られた。今後更なる検討が必要であるが、割れ残る気泡が細胞への生体作用と関連する可能性を示しており、提案法による微弱信号検出がフィードバックシステム構築に有効であることが示唆された。

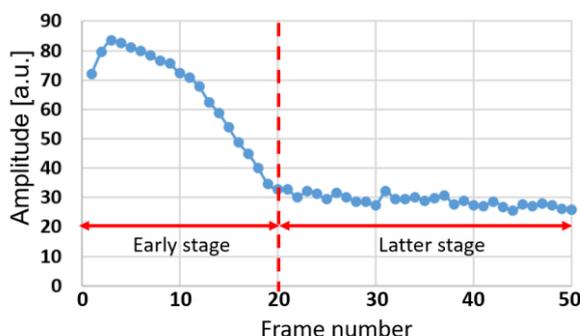


図 8 振幅平均値の推移

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) 江田 廉, 山越芳樹, 超音波カラー Doppler を用いた気泡キャビテーション信号観測法, 超音波テクノ, 32, pp.61-66 (2020), 査読無.
- 2) Ren Koda, Toshitaka Nakajima, Hiroki Horiuchi and Yoshiki Yamakoshi, Real-time visualization of instantaneous frequency from bubble cavitation using color Doppler ultrasound imaging, Japanese Journal of Applied Physics, 58, pp. 117001\_1-9 (2019), 査読有.

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Yusuke Sakamura and Ren Koda, Application of Super-resolution Technique to Spatiotemporal Observation of Bubble Cavitation, The 41th Symposium on Ultrasonic Electronics, Online Symposium, (2020).
- 2) 向井 太一, 江田 廉, 波動逆伝搬を用いた気泡キャビテーション時間発展 2 方向観測, 日本超音波医学会第 93 回学術集会抄録, S327, web 開催, (2020).
- 3) Ren Koda and Tetsuya Hashimoto, Measurement of biological effects by bubble cavitation using backpropagation of acoustic emission, International Conference on Mechanical, Electrical and Medical Intelligent System 2019, Kiryu, (2019).
- 4) 江田 廉, 菊澤朋弥, パルスインバージョン法を応用した極微量気泡の高感度検出, 日本超音波医学会第 92 回学術集会抄録, S570, 東京, (2019).

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koda Ren, Nakajima Toshitaka, Horiuchi Hiroki, Yamakoshi Yoshiki	4. 巻 58
2. 論文標題 Real-time visualization of instantaneous frequency from bubble cavitation using color Doppler ultrasound imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 117001 ~ 117001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/1347-4065/ab4eb1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 江田 廉、山越 芳樹	4. 巻 32
2. 論文標題 超音波カラードブラを用いた気泡キャピテーション信号観測法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 超音波テクノ	6. 最初と最後の頁 61-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 江田 廉, 菊澤朋弥
2. 発表標題 パルスインバージョン法を応用した極微量気泡の高感度検出
3. 学会等名 日本超音波医学会第92回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向井 太一, 江田 廉
2. 発表標題 波動逆伝搬を用いた気泡キャピテーション時間発展2方向観測
3. 学会等名 日本超音波医学会第93回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusuke Sakamura, Ren Koda
2. 発表標題 Application of Super-resolution Technique to Spatiotemporal Observation of Bubble Cavitation
3. 学会等名 The 41st Symposium on Ultrasonic Electronics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ren Koda, Tetsuya Hashimoto
2. 発表標題 Measurement of biological effects by bubble cavitation using backpropagation of acoustic emission
3. 学会等名 International Conference on Mechanical, Electrical and Medical Intelligent System 2019 (ICMEMIS2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------