

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：32407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01338

研究課題名(和文) 作製容易な超音波ファントム材料の創出と、その構造解析に関する研究

研究課題名(英文) Self-Made Ultrasound Phantom using Sodium Alginate as Gelling Agent

研究代表者

青柳 稔 (AOYAGI, Minoru)

日本工業大学・工学部・教授

研究者番号：00342436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研修医の人体へのカテーテルや針の挿入訓練、検査技師の超音波検査の訓練や装置の維持管理、また、メーカーにおける超音波診断装置の研究開発において超音波ファントムが用いられている。当該研究ではアルギン酸ナトリウム、硫酸カルシウム、リン酸三ナトリウム、グリセリン、水を、1.5:2:1:7.5:50の質量比率で作製した、アルギン酸カルシウムによるハイドロゲル超音波ファントムが、人体軟組織の超音波特性に近いことを明らかにした。また、その構造解析により、作製した超音波ファントムは、ネットワークで囲まれた分子サイズよりも大きなドメイン構造を有する部分と、ネットワークを有さない部分が混在する事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：For medical workers, ultrasonic phantoms are used not only for training on ultrasonic diagnostic equipment, but also to aid ultrasonic-guided needle and blind catheter insertion procedures. The target values of the acoustic characteristics of the phantoms are required to simulate the characteristics of human soft tissue. We propose the phantom made of sodium alginate, calcium sulfate dihydrate, trisodium phosphate dodecahydrate, glycerol, and water in the ratio of 1 : 2 : 1 : 10 : 50, respectively. The proposed phantom was able to obtain values close to the human soft tissue. Micrometer-sized structures of the proposed phantom were examined by optical microscopy, cryogenic scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy. Results revealed that the gel comprises a mixed structure of regions in which micrometer-sized gel networks and domains existed and regions in which they were absent.

研究分野：電気電子材料

キーワード：アルギン酸ナトリウム アルギン酸カルシウム ハイドロゲル Cryo-SEM Calcein 超音波ファントム

1. 研究開始当初の背景

研修医のカテーテルや針の人体への挿入訓練、検査技師の超音波検査の訓練や超音波観察装置の維持管理、また、超音波観察装置メーカーにおける診断装置の研究開発において超音波ファントムが用いられている。超音波ファントムは人体の音速、音の減衰特性、音響インピーダンス、感触に近い音響特性を持つ必要がある。市販品の超音波ファントムも存在するが、数万円から数百万円と高価であり、また、限られた形状と特性のために、超音波診断装置の性能の維持管理用のファントムを除いて、医療現場における実用上の自由度が低い。これらの問題を回避する為に、大学などでは超音波ファントムを自作している。自作用の超音波ファントムの材料としては安価な、寒天、ゼラチン、コンニャク等が用いられる。しかしながら、それらによる超音波ファントムに関する論文や文献等は極めて少ない。そのため、それらを参照して、意図した特性を有する超音波ファントムを作製する事は困難である。また、これらの食品材料を利用した超音波ファントムは異臭があり、室内に放置すると数日でカビが発生し腐敗してしまう。上記の他に、カードラン(Curdlan)と呼ばれる薬品を使って作製した超音波ファントムも存在する。カードランを用いて作製した超音波ファントムの特性は安定しており、腐敗などは起こさない。しかしながら、カードランは高価であり、かつ、ファントムの作製方法が煩雑で、専門外の人には敷居が高いことから、現場において使われるには至っていない。

超音波ファントムは 1971 年にペンシルバニア大学の Schwan が研究を始め、日本では 1980 年代に入ってから研究が進められているが、飛躍が期待される時期に来ている。安価、かつ、作製容易で、安定した特性を持つ超音波ファントムを開発する事は、医療現場や医用電子工学における実務上の貢献が大であり、学術的な研究を支える基礎に対する貢献が期待できる。

2. 研究の目的

申請者は当該助成金の申請以前から、約 50 種類の樹脂系の材料やゲル化剤を用いて超音波ファントムを作製し、ファントム中の音速と音の減衰特性を測定することで、候補となる材料を探してきた。その研究において、歯科用の型取材料であるアルジネートにより作製した超音波ファントムは、人体の軟組織の音速に近い事を見つけた。しかし、このファントムの減衰特性は、人体軟組織の減衰特性の数倍程度大きいという課題があった。申請者は、この歯科用材料のアルジネートには珪藻土が 70(wt%)程度混ぜられており、これが減衰率を大きくする原因と考えた。そこで、アルジネートから珪藻土抜いてファントムを作製すれば、目的とする特性を持った超音波ファントムを得る事ができる可能

性を考えた。つまり、アルジネートから珪藻土を除いた成分である、アルギン酸ナトリウム、硫酸カルシウム、リン酸三ナトリウム、水を適量混ぜる事で、目標に近い音響特性を持つ超音波ファントムを作製できると発想した。これらの薬品により作製されたファントムは、アルギン酸カルシウムにより構成されるハイドロゲルとなる。表 1 に目的とする人体軟組織の超音波特性を示す。

表 1 目標とする超音波ファントムの特性

Propagation velocity (ms <sup>-1</sup> )	Attenuation coefficient (dB/cm/MHz)	Acoustic impedance ×10 <sup>6</sup> (kg/m <sup>2</sup> /s <sup>2</sup> )
1530-1600	0.3-1.0	1.3-1.7

当該研究では、3年間の研究期間において、下記の2点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 人体軟組織の超音波特性と同等の特性の超音波ファントムを作製するために、アルギン酸ナトリウム、硫酸カルシウム、リン酸三ナトリウム、水を主成分として最適な混合比を模索し、これらを用いた超音波ファントムの作製方法を確立する。
- (2) 作製した超音波ファントムのハイドロゲル構造を明らかにする。

3. 研究の方法

次の研究方法により研究をおこなった。

- (1) 超音波ファントムを構成する、アルギン酸ナトリウム、硫酸カルシウム、リン酸三ナトリウム、水の最適な質量比を得るために、各薬品の量を変えながら超音波ファントムを作製し、音速、減衰特性を測定した。また、水の温度や、ゲル化に要する温度や時間に関しても、最適条件を実験により求めた。当該助成金により、超音波ファントムの音速や減衰特性を測定するための超音波探傷装置、超音波ファントム中の画像を観察する超音波画像装置、また、超音波ファントムを作製するのに要する薬品を購入した。
- (2) ゲル構造を明らかにするために、①カルシウムプローブである Calcein によりゲル構造解析を試みた。カルシウムは当該ファントムのゲル構造の中核を成す元素であり、カルシウムの分布を把握することは重要である。また、②Cryo-FIB-SEM (Cryo Scanning Electronscopy Combined with Focused Ion Beam) を用いて、作製したファントムのゲル構造の観察を試みた。Cryo-FIB-SEM は水分を含んだ試料を凍結することで、ハイドロゲル試料が水分を含んだ状態でも試料の SEM 観察が可能である。また、FIB により試料の表面スパッタも可能である。当該助成金は Calcein 等の薬品の購入、また、ゲル構造を Cryo-FIB-SEM で観察するため業務委託費に使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 人体軟組織の超音波特性を模擬した超音波ファントムの作製方法

アルギン酸ナトリウム、硫酸カルシウム、リン酸三ナトリウム、グリセリン、水を、1.5:2:1:7.5:50の質量比率で超音波ファントムを作製した。水の温度は40°C、ゲル化温度は30°C、24時間放置により、表2に示すような超音波特性を得ることができた。表2に示したデータは、40個の超音波ファントムの平均値と標準偏差である。その特性は、表1に示した人体軟組織の超音波特性の範囲内であり良好な結果を得ることができた。作製にあたり薬品にグリセリンを追加した。グリセリンは、アルギン酸ナトリウムが水と混合した時にダマになることを防ぐと共に、ファントム中の音速の調整剤の役割を有する。

表2 作製した超音波ファントムの特性

Propagation velocity (ms <sup>-1</sup> )	Attenuation coefficient (dB/cm/MHz)	Acoustic impedance ×10 <sup>6</sup> (kg/m <sup>2</sup> /s <sup>2</sup> )
1540±35	0.51±0.08	1.65±0.09

当該超音波ファントムの作製方法を図1に示す。超音波ファントムを作製するにあたり、複雑な工程は必要なく、また、入手し難い薬品や特別な作製装置を用いていない為、大学の研究室や医療従事者が手軽に作る事が可能である。作製方法は、①容器1にアルギン酸ナトリウムとグリセリンを入れて粘調になるまで混ぜる。②容器2に硫酸カルシウム、リン酸三ナトリウム、40°Cの水を混ぜて攪拌する。③容器2の内容物を容器1に投入して粘調になるまで攪拌する。この混合物を30°Cの恒温槽に24時間放置することでゲル化がおこなわれファントムが完成する。型に入れてゲル化させれば、任意の形状の超音波ファントムを作製することができる。

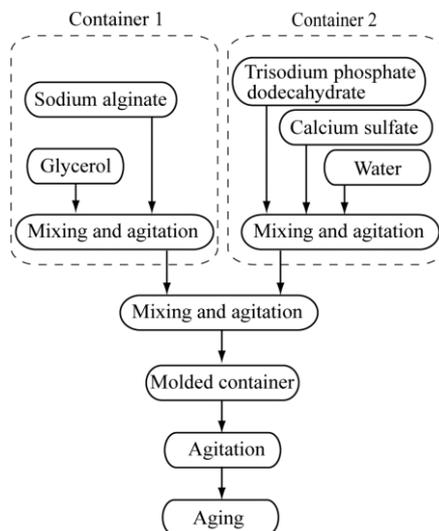


図1 超音波ファントムの作製方法

作製した超音波ファントムの外観を図2に示す。写真左から250cc、500cc、1000ccの容量のファントムである。人体の軟部の感触に近いファントムを得ることができた。また、図3に超音波観察装置で観察した超音波ファントムの画像を示す。図3の空洞部分は、血管に見立てた穴である。図3(A)の左側の穴は直径5mm、右側の穴は直径10mmである。図3(B)は直径5mmの穴の断面像である。穴には、血液の代わりに水を入れてある。直径5mmの空洞を明確に観察することができる。図3の超音波観察画像は実用上の問題ないが、空洞の周辺部分に輝点状のノイズが観察される。人体の超音波観察装置による画像には、このようなノイズは観察されない。このノイズは、作製した超音波ファントムの構造に起因すると考えられるが、特定できていない。

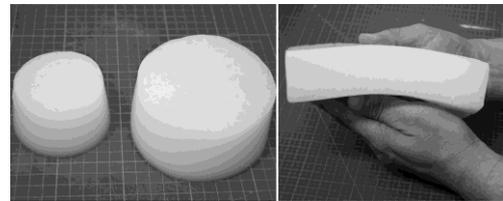


図2 作製した超音波ファントムの外観

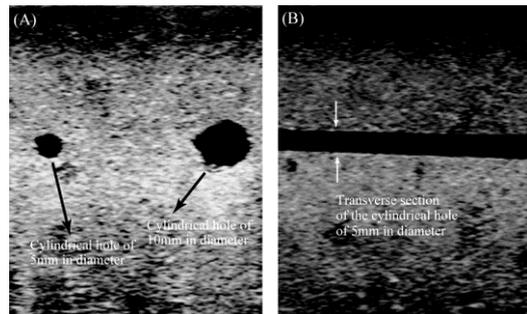


図3 血管に見立てた超音波観察装置画像

以上の研究において、人体軟組織の超音波特性、感触に近い超音波ファントムを作製する事ができた。この超音波ファントムは、入手しやすい薬品で作製でき、また、作製にあたり特殊な装置は使用していない。また、容量1000ccの超音波ファントムを500円程度で作製することが可能である。

この超音波ファントムには、幾つかの課題が残っている。①図3に示したように、超音波ファントムの超音波観察画像において、輝点状のノイズが観察される。このノイズはファントムのゲル構造に起因すると考えられるが、現時点では解決されていない。②作製した超音波ファントムはハイドロゲルであるため、常温の放置では離水により、最大1週間程度で変形やカビの発生が起こる。冷蔵庫に保管した場合には1ヶ月程度はその特性を維持するので、保管方法を工夫することで数週間は使用が可能である。

## (2) ゲル構造の解明

アルギン酸カルシウムによる水ゲルの構造は、一般的に分子レベルでは図4のように考えられている。原料であるアルギン酸ナトリウムは図4(a)-(d)のように、GブロックおよびMブロックと呼ばれる分子から構成され、それらが結合してG-G分子鎖、M-M分子鎖、G-M分子鎖が構成される。このうち、近接したG-G分子鎖間においてカルシウムが架橋剤となり、強固なゲルネットワークが構成される。そのネットワークに水分が貯えられることで水ゲルが作られる。

当該超音波ファントムにおいてアルギン酸ナトリウムはゲル化剤、硫酸カルシウムは架橋剤、リン酸三ナトリウムはPH調整とゲル化速度の遅延剤として使われている。

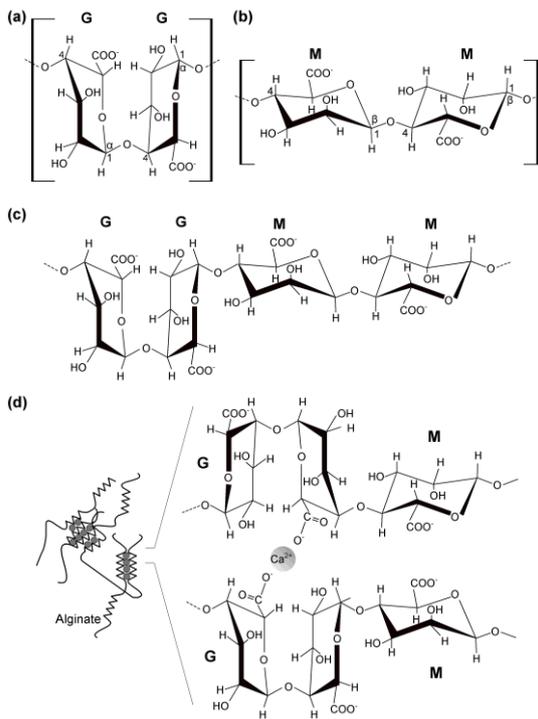


図4 分子サイズのゲル構造

### ① Calcein による構造解析

Calcein はカルシウムイオンと結合すると、波長 495nm の光による励起により、波長 515nm の蛍光を発する、カルシウムプローブである。この性質を利用して、生物化学の分野などで使用されている。本研究では、このカルシウムプローブを用いて、アルギン酸カルシウム水ゲルである超音波ファントムの解析をおこなった。試料を薄くスライスした後に Calcein 溶液に浸漬して光学顕微鏡で観察した。その結果、図5に示すように、超音波ファントムを構成するアルギン酸カルシウム水ゲルは、図5(a)に示すネットワーク構造を有しない部分と、図5(b)-(f)に示すアルギン酸カルシウムからなるネッ

トワークに囲まれたドメイン構造を有する部分が、混在している事が明らかになった。ドメインは様々な大きさであり、ネットワークが太くなるとドメインが消失して、一体化される様に見える。これらのネットワークやドメイン構造は、図4に示した分子サイズのネットワーク構造に比べて、大きな構造をしている。水分はドメイン内部、および、ネットワーク構造を有しない部分の両方に蓄えられていると考えられる。その為には、ドメイン内部やネットワーク構造を有しない部分に、図4に示した分子サイズのネットワーク構造が存在すると考えられる。また、図5(b)は、ネットワーク構造を有する部分と有しない部分の境界を示しているが、これらはなだらかに接続されている事がわかる。

### ② Cryo-FIB-SEM と EDX による構造解析

Cryo-FIB-SEM と EDX を用いて、ゲル構造の解析を行った結果を図6に示す。試料を -130°C で急速冷凍し、水を含んだ観察試料の表面を FIB でスパッタした後に SEM 観察した結果である。観察した部分では、図6(a)-(c)に見られるように、数ミクロンから数十ミクロンの大きさの様々な形状のドメイン構造が観察される。また、数百ナノメートルのゲルネットワークが観察される。図(d)と(e)に EDX による Ca と C の元素分布を示す。ネットワーク部分に Ca と C 元素が他の部分よりも高い濃度で観察される。先に示した Calcein を用いたカルシウム元素の分布は、ネットワーク部分で観察されることから、ネットワーク部分は、アルギン酸カルシウムで形成されていると考えられる。また、分子サイズのネットワーク部分に水が蓄えられていると考えられる。

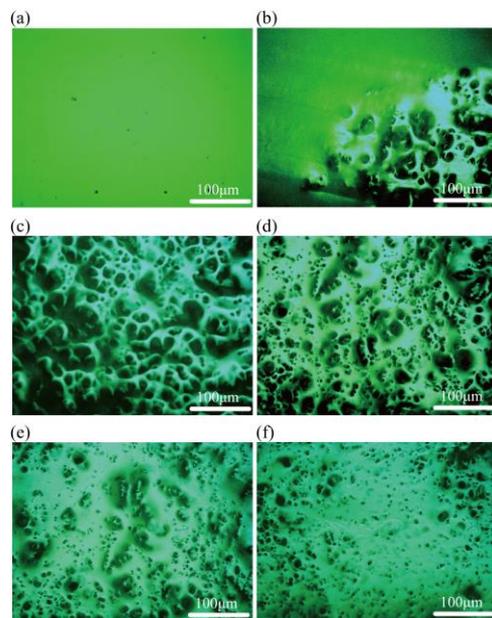


図5 Calcein によるゲル構造

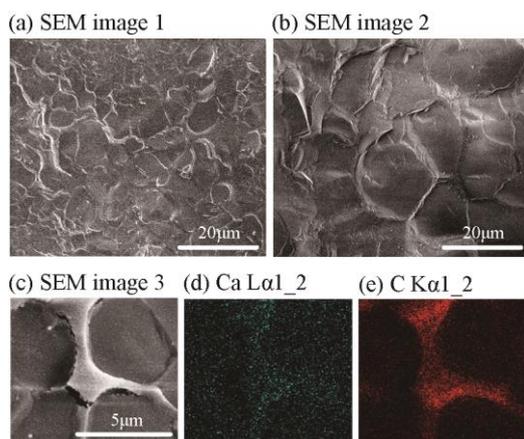


図6 Cryo-FIB-SEMによるゲル構造

以上の Calcein による構造解析、および、Cryo-FIB-SEM による構造解析結果から、作製した超音波ファントムは、①アルギン酸カルシウムで構成されるネットワークで囲まれた、最大数十ミクロンのドメイン構造を有する部分と、②ネットワーク構造が存在しない部分が混在していることが明らかになった。水はドメイン内部およびネットワーク構造が存在しない部分の両方に存在し、それらの内部にある分子サイズのアルギン酸カルシウムのネットワークに蓄えられると推定されるが、確認するには至っていない。

以上のように、当該研究では、3年間の研究期間において目的とした、(1)人体軟組織の超音波特性と同等の特性を有する、アルギン酸ナトリウム、硫酸カルシウム、リン酸三ナトリウム、水、および、グリセリンを主成分とする、超音波ファントムを作製することができた、また、これらを用いた超音波ファントムの作製方法を確立することができた。さらに、(2)作製した超音波ファントムのゲル構造を、マイクロメータのサイズで明らかにすることができた。

これらの研究は、当該助成金により達成することができました。深く感謝致します。

#### <引用文献>

- ①Pauly H and Schwan H. P, Mechanism of absorption of ultrasound in liver tissue, J. Acoustic Society of America, vol. 50, no 2, pp 692-699, 1971.
- ②出井正男, 第36回日本超音波医学会論文集, 36-B-83, p 435, 1980.
- ③Richardson C, Bernard S and Dinh VA, Cost-effective, gelatin-based phantom model for learning ultrasound-guided fine-needle aspiration procedures of the head and neck. J Ultrasound Med, 2015, 34, pp 1479-1484.
- ④Bude RO and Adler RS, An easily made, low-cost, tissue-like ultrasound phantom material. J. Clin. Ultrasound, 1995, 23, pp 271-273.

- ⑤Hopkins RE and Bradley M, In-vitro visualization of biopsy needles with ultrasound: A comparative study of standard and echogenic needles using an ultrasound phantom. Clin Radiol, 2001, 56, pp 499-502.
- ⑥August A. D, Kong H. J and Mooney D. J, Alginate hydrogels as biomaterials. Macromol. Biosci., 2006, 6, pp 623-633.
- ⑦Haug A, Larsen B and Smidsrod O, A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. Acta Chem. Scand., 1966, 20, pp 183-190.
- ⑧Muller-Ackermann E, Panne U and Niessner R, A fiber optic sensor array for the fluorimetric detection of heavy metals anal. Methods Instrum., 1995, 2, pp 182-189.
- ⑨Ashby RO and Roberts M, A Microdetermination of calcium in blood serum. J. Lab. & Clin. Med., 1957, 49, pp 958-961.
- ⑩Adrian M, Dubochet J, Lepault J and McDowell AW, Cryo-electron microscopy of viruses. Nature, 1984, 308, pp 32-36.
- ⑪Rahbani J, Behzad AR and Khashab NM, Characterization of internal structure of hydrated agar and gelatin matrices by cryo-SEM. Electrophoresis, 2013, 34, pp 405-408.
- ⑫Marmorat C, Arinstein A, Koifman N, Talmon Y, Zussman E and Rafailovich M, 2016, Scientific Reports 6, Article number: 25495.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ①Minoru Aoyagi, and Tomomi Hiraguri, Ultrasound Phantom using Sodium Alginate as a Gelling Agent, Journal of Ultrasound in Medicine, 2017, 36, 11, 2345-2353. DOI: <https://doi.org/10.1002/jum.14252>. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

- ①杉山友大、青柳稔、アルギン酸ナトリウムを用いた超音波人体擬似ファントムのゲル化構造の解析 2、2017年(平成29年)電子情報通信ソサイエティ大会、東京、9月、A-4-4.
- ②杉山友大、青柳稔、アルギン酸ナトリウムを用いた超音波人体擬似ファントムのゲル化構造の解析、2017年(平成29年)電子情報通信学会総合大会、名古屋、3月、A-4-5.
- ③杉山友大、青柳稔、アルギン酸ナトリウムを用いた超音波人体擬似ファントムの開発、2016年(平成28年)電子情報通信ソサイエティ大会、北海道、9月、A-4-8.

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

青柳 稔 (AOYAGI, Minoru)  
日本工業大学・工学部・教授  
研究者番号：00342436