

図 43 乳腺組織の(a)光学顕微鏡像、(b)超音波顕微鏡元画像、(c)超音波顕微鏡画質改善画像

## 5. 培養細胞の音響インピーダンス像

### (1) 培養 glia 細胞

図 44 に培養 glia 細胞の光学顕微鏡像、図 45 に音響インピーダンス顕微鏡で観察された画像の一例を示す。音響インピーダンス像の画素は  $2\mu\text{m}$  毎に並んでいるが、焦点径は概ね  $3\sim 4\mu\text{m}$  程度と考えられる。細胞試料は音響物性が明らかでない培養液で満たされ

ているため、これとは別に純水を満たした試料を観察し、水を基準として細胞の音響インピーダンスを校正した。細胞組織の音響インピーダンスは  $1.55\sim 1.65 \text{ MNs/m}^3$  程度と表示されているが、集束角が大きいため、垂直入射を仮定して校正された表示値は、真値より若干大きく計算されていると考えている。今後斜め入射を考慮した補正により正しい値に近づける。

アストロサイトの突起とひだ上偽足（ラメリポディア）など、グリア細胞の特徴を示す形状が現われており、光学顕微鏡による観察結果と形態学的によく一致する画像となっている。

正確に形状が観察できるのは細胞とフィルムが接触する部分のみであるため、光学顕微鏡による観察結果とは完全に一致しないが、非接触で物性値を定量化して観察できる利点があるので、培養細胞の状態モニタ用ツールとしての有用性が期待できると考えている。

### (2) 音響インピーダンスの分布

図 46(a)に示した四角い領域の音響インピーダンスの分布を調べた結果を同図(b)に示す。累積確率で表示されているので、これを微分すると確率密度分布が得られる。領域には細胞と接触していない部分すなわち培養液と接触している部分が含まれる。培養液と接触する部分のみの音響インピーダンス測定値の分布は同図(c)のようになっている。一様な媒質であるにもかかわらずこのような分布をもつのは、測定系のノイズとフィルムの不均一性に由来すると考えている。この分布を考慮し、関心領域の音響インピーダンス分布を細胞部分と媒質部分に分離した結果を同図(d)に示す。

斜め入射の補正をしていないため、正し

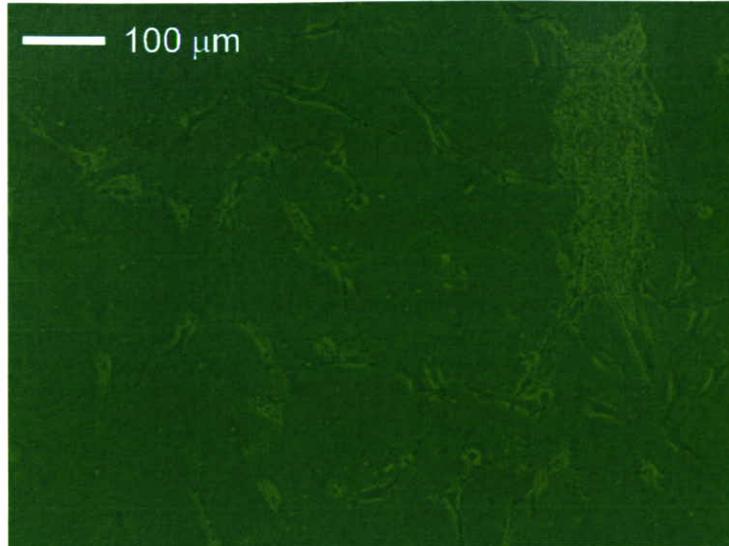


図 44 glia 細胞の光学顕微鏡像

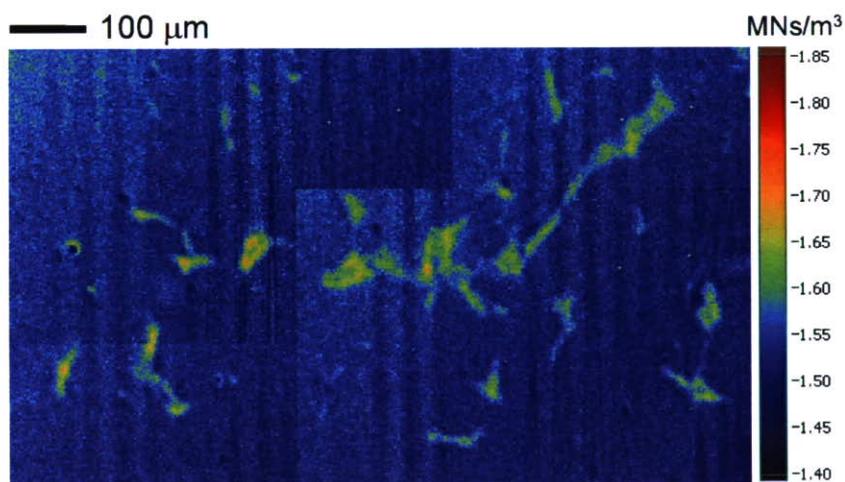
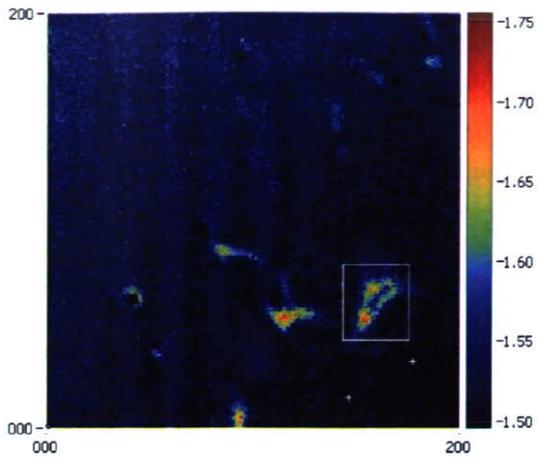


図 45 glia 細胞の音響インピーダンス画像

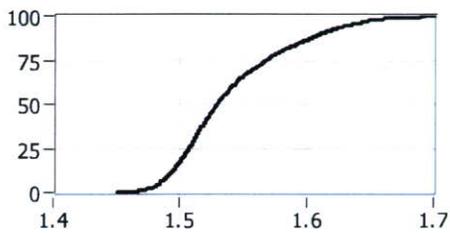
い音響インピーダンスよりも若干高い値を表示していると考えられるが、相対比較と分布形状の把握という目的からは問題が少ないと考えている。これは必要な補正パラメータを得て将来補正できるようにする。

glia 細胞の音響インピーダンスは 1.5 から 1.7 MNs/m<sup>3</sup> に亘る広い範囲に分布している。また、分布の形状から、単一の正規分布で

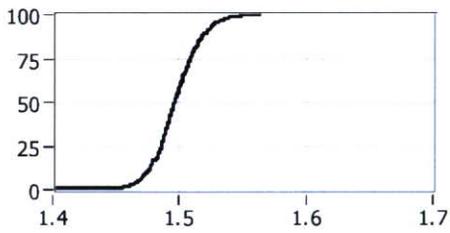
はなく、少なくとも 2 種類の分布から構成されているように見える。核と周辺部に明確に分かれることに原因していると考えられる。



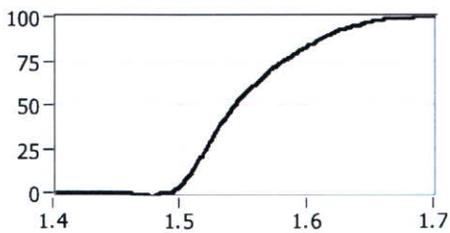
(a) 関心領域の設定



(b) 関心領域の音響インピーダンス分布



(c) 細胞がない部分の音響インピーダンス分布

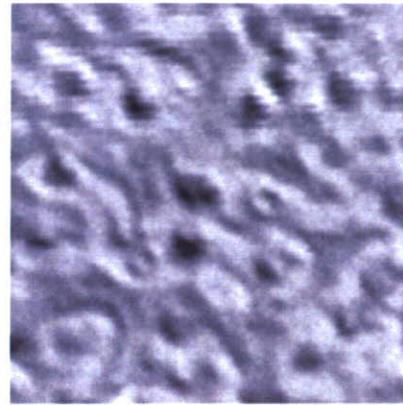


(d) 分離された細胞部分の音響インピーダンス分布

図 46 ラットの小脳組織観察結果。  
横軸 MNs/m<sup>3</sup>、縦軸 %

## 6. ナノ・イメージングシステムによる生体組織の観察例

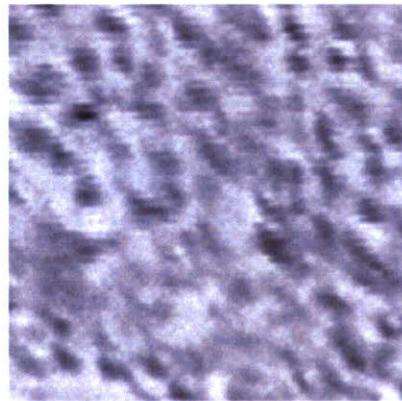
図 47 は平成 19 年度に作製したナノ・イメージングシステムによるマウスの正常肝臓の表面像である。



20μm

図 47 マウスの正常肝臓

図 48 は肝臓に発生した腫瘍部分である。



20μm

図 48 マウスの腫瘍組織

図 49 は、正常肝細胞と線維化組織が同一視やの中に認められ、音響インピーダンスの違いが明瞭に認められる。

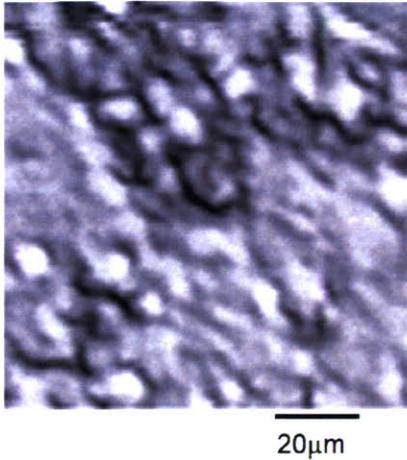


図 49 マウスの正常肝臓と線維化組織

このように、周波数ナノスケールに及ぶ超音波を用いることで、表面組織が細胞レベルで観察することができ、正常組織と腫瘍組織の鑑別や線維化組織の鑑別などが可能であることが実証された。

#### D. 考察

従来の超音波顕微鏡では、平面振動子に音響レンズを接着することで、超音波を絞り込むため、超音波プローブと観察対象との間の距離が音響レンズの焦点に合うときにはじめて観察対象からの強い反射を得ることが出来た。したがって、超音波プローブを2次元走査するときにも、プローブと対象との間は常に一定である必要があり、結果的に、薄切した組織または血管内皮細胞など基質に対して1層に固着するような性質の培養細胞の観察のみが可能であった。

本研究では、この超音波顕微鏡の限界を打破すべく、薄いプラスチック板と超音波振動子の間の距離が一定になるように一体成型し、通常の超音波診断装置と同様に、対象物に接触させるだけで、表面形状が観察できる、生体内超音波ナノ・イメージングシステムの開発を最終的な目標とした。

平成17年度には、最新のナノテクノロ

ジーを駆使して、従来の超音波顕微鏡と同等以上の性能を有する超音波ナノ・イメージングシステムを作製した。摘出冠動脈の薄切組織のイメージングを行ったところ、従来開発したパルス励起型超音波音速顕微鏡よりも高解像度で正確な音速測定の出来るシステムが完成した。

平成18年度には、イメージングシステムの最大の特長である、プラスチック板越しの組織表面形状の可視化を実現した。ラット脳組織を薄切せずにイメージングすることが可能で、培養線維芽細胞については細胞分裂における各の分裂像まで観察することが可能であった。

平成19年度には、イメージングシステムの最大の特長である、プラスチック板越しの生体組織表面形状の可視化を実現した。マウス肝組織にプラスチック板を接触させるだけで、高解像度のイメージングが可能で、*in vivo*において細胞レベルでの診断が可能である。

本方式により、超音波顕微鏡研究は研究室レベルから臨床レベルへと一気に発展し、特に脳神経外科や心臓の外膜側など、術前の組織診断が難しい領域の術中診断への応用により、より多くの国民の健康に福音をもたらすものと考えられた。

#### E. 結論

平成17～19年度に開発した超音波ナノ・イメージング装置により、生体組織のイメージングを行った。最終年度には、マウスに吸入麻酔を施し、肝臓表面を露出させ、薄いプラスチック板を接触させることで、腫瘍組織と正常組織、あるいは正常組織と線維化組織の相違について細胞レベルで検討しうるイメージングが可能で、当初の目標とした800ナノメートルの解像度を実現

した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### (1) 英文論文

- 1) Funamoto K, Hayase T, Saijo Y, Yambe T. Detection and correction of aliasing in ultrasonic measurement of blood flows with Ultrasonic-Measurement-Integrated simulation. *Technol Health Care*. Vol 13, No.4: 331-44, 2005.
- 2) Saijo Y, Sasaki H, Hozumi N, Kobayashi K, Tanaka M, Yambe T. Sound speed scanning acoustic microscopy for biomedical applications. *Technol Health Care*. Vol. 13, No. 4: 261-7, 2005.
- 3) Funamoto K, Hayase T, Shirai A, Saijo Y, Yambe T. Fundamental study of ultrasonic-measurement-integrated simulation of real blood flow in the aorta. *Ann Biomed Eng*. Vol. 33, No. 4: 415-28, 2005.
- 4) Watanabe S, Suzuki N, Kudo A, Suzuki T, Abe S, Suzuki M, Komatsu S, Saijo Y, Murayama N. Influence of aging on cardiac function examined by echocardiography. *Tohoku J Exp Med*. Vol. 207, No.1: 13-9, 2005.
- 5) Watanabe M, Sekine K, Hori Y, Shiraishi Y, Maeda T, Honma D, Miyata G, Saijo Y, Yambe T. Artificial esophagus with peristaltic movement. *ASAIO J*. Vol. 51, No.2: 158-61. 2005.
- 6) Santos Filho E, Yoshizawa M, Tanaka A, Saijo Y, Iwamoto T. Moment based texture segmentation of intravascular ultrasound images. *J Med Ultrasonics*. Vol. 32, No. 3: 91-99, 2005.
- 7) Saijo Y, Santos Filho E, Yambe T, Tanaka A, Iwamoto T, Yoshizawa M, Akino Y, Hanadate Y. Parametric intravascular ultrasound imaging - Two-dimensional tissue velocity imaging and self-organizing map imaging. *Proc 8th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 1-4, 2005.
- 8) Santos Filho E, Saijo Y, Yoshizawa M, Tanaka A. Automatic luminal contour and calcification detection in intravascular ultrasound images. *Proc 8th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 5-8, 2005.
- 9) Saijo Y, Sasaki H, Santos Filho E, Yambe T, Tanaka M, Hozumi N, Kobayashi K. Speed-of sound microscopy for biomedical applications. *Proc 8th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 26-29, 2005.
- 10) Kimura A, Terauchi S, Murakami Y, Hozumi N, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Saijo Y. Image processing for pulse driven biological microscope based on frequency spectrum. *Proc 8th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 30-31, 2005.
- 11) Hagiwara Y, Matsumoto F, Chimoto E, Kokubun S, Saijo Y, Sasano Y. Increased sound speed of synovial membrane after immobilization assessed by scanning acoustic microscopy. *Proc 8th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 32-35, 2005.
- 12) Sano H, Hattori K, Kokubun S, Saijo Y. Material properties of the rabbit supraspinatus tendon and its insertion - A measurement with the scanning acoustic microscopy. *Proc 8th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 36-38, 2005.
- 13) Hozumi N, Kimura A, Terauchi S, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Saijo Y. Acoustic Impedance Micro-imaging for Biological Tissue Using a Focused Acoustic Pulse with a Frequency Range up to 100 MHz. *Proc 2005 IEEE International Ultrasonics Symposium*, 170-173, 2005.
- 14) Saijo Y, Sasaki H, Yambe T, Tanaka M,

- Hozumi N, Kobayashi K, Okada N. Speed of Sound Microscopy for Biomedical Applications. *Proc 2005 IEEE International Ultrasonics Symposium*, 423-426, 2005.
- 15) Iwamoto T, Tanaka A, Saijo Y, Yoshizawa M. Coronary plaque classification through intravascular ultrasound radiofrequency data analysis using self-organizing map. *Proc 2005 IEEE International Ultrasonics Symposium*, 2054-2057, 2005.
- 16) van der Steen AFW, Baldewsing RA, Degertekin FL, Emelianov S, Frijlink ME, Furukawa Y, Goertz D, Karaman M, Khuri-Yakub PT, Kim K, Mastik F, Moriya T, Oralkan O, Saijo Y, Schaar JA, Serruys PW, Sethuraman S, Tanaka A, Vos HJ, Witte R, O'Donnell M. IVUS beyond the horizon. *Eurointerv*, Vol. 2; 132-142, 2006.
- 17) Sano H, Hattori K, Saijo Y, Kokubun S. Does decalcification alter the tissue sound speed of rabbit supraspinatus tendon insertion? In vitro measurement using scanning acoustic microscopy. *Ultrasonics*, Vol. 44, No. 3: 297-301, 2006.
- 18) Saijo Y, Hozumi N, Lee C, Nagao M, Kobayashi K, Oakada N, Tanaka N, Santos Filho ED, Sasaki H, Tanaka M, Yambe T. Ultrasonic speed microscopy for imaging of coronary artery. *Ultrasonics*, Vol. 44; Suppl. 1: e51-55, 2006.
- 19) Saijo Y, Tanaka A, Iwamoto T, Dos Santos Filho E, Yoshizawa M, Hirotsuka A, Kijima M, Akino Y, Hanadate Y, Yambe T. Intravascular two-dimensional tissue strain imaging. *Ultrasonics*, Vol. 44; Suppl. 1: e147-151, 2006.
- 20) Liu H, Saijo Y, Zhang X, Shiraishi Y, Luo Y, Maruyama M, Higa M, Sekine K, Yambe T. Impact of type A behavior on brachial-ankle pulse wave velocity in Japanese. *Tohoku J Exp Med*, Vol. 209, No. 1: 15-21, 2006.
- 21) Saijo Y, Tanaka A, Santos Filho ED, Iwamoto T, Li S, Yoshizawa M, Yambe T. Multiple parametric IVUS imagings for detection of vulnerable plaque. *Proc 9th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 13-17, 2006.
- 22) Hozumi N, Terauchi S, Kimura A, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Saijo Y. Development of cerebella tissue of rat characterized by acoustic impedance microscope. *Proc 9th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 18-21, 2006.
- 23) Sasaki H, Saijo Y, Kanno T, Tanaka M. Classification of flow-limiting thrombus in acute coronary syndrome by acoustic microscopy. *Proc 9th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 29-31, 2006.
- 24) Sano H, Hattori K, Komatsuda T, Saijo Y, Sugita T, Itoi E. Tissue sound speed of anterior cruciate ligament in estrogen-controlled rabbits. - A measurement using the scanning acoustic microscope - *Proc 9th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 32-35, 2006.
- 25) Sano H, Saijo Y, Kokubun S. Non-mineralized fibrocartilage shows the lowest elastic modulus in the rabbit supraspinatus tendon insertion: measurement with scanning acoustic microscopy. *J Shoulder Elbow Surg*, Vol. 15, No. 6: 743-9, 2006.
- 26) Hagiwara Y, Saijo Y, Chimoto E, Akita H, Sasano Y, Matsumoto F, Kokubun S. Increased elasticity of capsule after immobilization in a rat knee experimental model assessed by scanning acoustic microscopy. *Upsala J Med Sci*. Vol. 111, No. 3: 303-313. 2006.
- 27) Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Santos Filho ED, Sasaki H, Yambe T, Tanaka M. Ultrasonic tissue characterization of atherosclerosis by a speed-of-sound microscanning system. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. Vol. 54, No. 8: 1571-1577, 2007.
- 28) Hattori K, Sano H, Saijo Y, Kita A, Hattori M, Kokubun S, Itoi E. Measurement of soft

- tissue elasticity in the congenital clubfoot using scanning acoustic microscope. *J Pediatr Orthop B*. Vol. 16, No. 5: 357-362, 2007.
- 29) Tanaka A, Saijo Y. Blood flow visualization of left atrial spontaneous echo contrast (SEC) using gradient based optical flow estimation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. Vol. 1: 4500-3, 2007.
- 30) Shiraishi Y, Yambe T, Saijo Y, Sato F, Tanaka A, Yoshizawa M, Ogawa D, Wada Y, Itoh S, Sakata R, Park Y, Uematsu M, Umezumi M, Fujimoto T, Masumoto N, Liu H, Baba A, Konno S, Nitta S, Imachi K, Tabayashi K, Sasada H, Homma D. Morphological approach for the functional improvement of an artificial myocardial assist device using shape memory alloy fibres. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. Vol. 1: 3974-7, 2007.
- 31) Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Ishiguro T, Hagiwara Y, Dos Santos Filho E, Yambe T. Ultrasound speed and impedance microscopy for in vivo imaging. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. Vol. 1: 1350-3, 2007.
- 32) Liu H, Luo Y, Higa M, Zhang X, Saijo Y, Shiraishi Y, Sekine K, Yambe T. Biochemical evaluation of an artificial anal sphincter made from shape memory alloys. *J Artif Organs*. Vol. 10: 223-227, 2007.
- 33) Okazaki T, Ebihara S, Asada M, Yamanda S, Saijo Y, Shiraishi Y, Ebihara T, Niu K, Mei H, Arai H, Yambe T. Macrophage colony-stimulating factor improves cardiac function after ischemic injury by inducing vascular endothelial growth factor production and survival of cardiomyocytes. *Am J Pathol*. Vol. 171, No. 4: 1093-1103, 2007.
- 34) Saijo Y, Hagiwara Y, Kobayashi K, Okada N, Tanaka A, Hozumi N, Tomihata K. B-mode and C-mode imaging of regenerated 3D skin model with 100 MHz ultrasound. *Proc 2007 IEEE International Ultrasonics Symposium*: 244-247, 2007.
- 35) Hozumi N, Nakao A, Terauchi S, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Yamamoto S, Saijo Y. Precise calibration for biological acoustic impedance microscope. *Proc 2007 IEEE International Ultrasonics Symposium*: 801-804, 2007.
- 36) Santos Filho E, Saijo Y, Tanaka A, Yambe T, Yoshizawa M. Fractal dimension of 40 MHz intravascular ultrasound radio frequency signals. *Ultrasonics*, 2007 Nov 7 [Epub ahead of print]
- 37) Santos Filho E, Saijo Y, Tanaka A, Yoshizawa M. Detection and quantification of calcifications in intravascular ultrasound images by automatic thresholding. *Ultrasound Med Biol*. Vol. 34, No. 1: 160-165, 2008.

## (2) 和文論文

- 1) 西條芳文. 特集 心血管画像診断の新しい展開 超音波顕微鏡. 循環器科 Vol. 57, No. 5: 440-446, 2005.
- 2) 西條芳文. 特集 DES 時代の Beyond Angiography Virtual Histology の基礎. Coronary Intervention Vol. 2, No. 1: 82-87, 2006.
- 3) 西條芳文. 特集 DES 時代の Beyond Angiography Virtual Histology の基礎. Coronary Intervention Vol. 2, No. 1: 82-87, 2006.
- 4) 西條芳文、佐藤正明、穂積直裕、鈴木聡、小林和人. 科研費研究課題の成果 ●基盤研究 (B) 超音波による血管内皮細胞のナノ・イメージング. *INNERVISION* Vol. 21, No. 7: 48, 2006.
- 5) 西條芳文. 医用超音波ナノ・イメージング = 周波数 500MHz の医学用超音波音速顕微鏡の開発 = . *超音波 TECHNO* Vol. 19, No. 1; 4-9, 2007.
- 6) 西條芳文. パラメトリック IVUS の臨床応用. *Jap J Cardiovasc Cathet Therap*. Vol. 7, No. 2: 131-139. 2007.
- 7) 西條芳文. 医用超音波ナノ・イメージング

＝周波数 500MHz の医学用超音波音速顕微鏡の開発＝. *超音波 TECHNO* Vol. 19, No. 1: 4-9, 2007.

- 8) 西條芳文. 超音波顕微鏡により動脈硬化病変を見る. *Vascular Medicine*. Vol. 3, No. 3: 45-52, 2007.

## 2. 学会発表

### (1) 国際学会

- 1) Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Fukuma K, Tanaka N, Sasaki H, Tanaka M, Yambe T. Acoustic Microscopy Based on Frequency Domain Analysis of A Single Pulsed Wave. *6th Asian-Pacific Conference on Medical and Biological Engineering*. Tsukuba, Apr 26, 2005.
- 2) Saijo Y, Akino Y, Watanabe S, Oba K, Tamamura K, Yamazaki Y, Ishiguro T. Fully-Automatic Measurement of Flow Mediated Dilatation. *6th Asian-Pacific Conference on Medical and Biological Engineering*. Tsukuba, Apr 27, 2005.
- 3) Saijo Y, Tanaka A, Iwamoto T, Hirosaka A, Kijima M, Yoshizawa M, Akino Y, Hanadate Y, Yambe T. Intravascular two-dimensional tissue strain imaging. *Joint Meeting of Ultrasonics International and World Congress on Ultrasonics 2005*. Beijing, China, Aug 30, 2005.
- 4) Saijo Y, Hozumi N, Lee C, Nagao M, Kobayashi K, Okada N, Tanaka N, Santos Filho E, Sasaki H, Tanaka M, Yambe T. Ultrasonic speed microscopy for imaging of coronary artery. *Joint Meeting of Ultrasonics International and World Congress on Ultrasonics 2005*. Beijing, China, Sep 1, 2005.
- 5) Hozumi N, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Saijo Y. Acoustic impedance micro-imaging for biological tissue using a focused acoustic pulse with a frequency range up to 100 MHz. *2005 IEEE International Ultrasonics Symposium*. Rotterdam, The Netherlands, Sep 19, 2005.
- 6) Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Sasaki H, Santos Filho E, Yambe T, Tanaka M. Speed of sound microscopy for biomedical applications. *2005 IEEE International Ultrasonics Symposium*. Rotterdam, The Netherlands, Sep 20, 2005.
- 7) Iwamoto T, Tanaka A, Saijo Y, Yoshizawa M. Coronary plaque classification through intravascular ultrasound radiofrequency data analysis using self-organizing map. *2005 IEEE International Ultrasonics Symposium*. Rotterdam, The Netherlands, Sep 21, 2005.
- 8) Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Lee CK, Sasaki H, Yambe T, Tanaka M. Development of ultrasonic nano-imaging system for visualization of cells. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006*. Seoul, Korea, Aug 31, 2006.
- 9) Santos Filho E, Saijo Y, Tanaka A, Yambe T, Li S, Yoshizawa M. Automated calcification detection and quantification in intravascular ultrasound images by adaptive thresholding. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006*. Seoul, Korea, Sep 1, 2006.
- 10) Saijo Y, Kobayashi K, Hozumi N, Okada N, Santos Filho ED, Yambe T. 3D Acoustic Microscopy for Imaging of Liver Tissue with 100 MHz Ultrasound. *5th International Conference on Ultrasonic Biomedical Microscanning*. Cargese, France, Sep 14, 2006.
- 11) Saijo Y, Tanaka A, Saiki Y, Tabayashi K, Yambe T. Two-dimensional blood flow vector in left atrium obtained by pattern matching. *International Congress on Ultrasonics 2007*. Vienna, Austria, Apr 10, 2007.
- 12) Iwamoto T, Saijo Y, Tanaka A, Santos Filho ED, Li S, Yoshizawa M. Coronary plaque classification with intravascular ultrasound radio-frequency signal analysis using self-organizing map. *International Congress on Ultrasonics 2007*. Vienna, Austria, Apr 10, 2007.

- 13) Hattori K, Sano H, Saijo Y, Itoi E. Tissue sound speed of anterior cruciate ligament in estrogen-controlled rabbits - a measurement using the scanning acoustic microscope. *International Congress on Ultrasonics 2007*. Vienna, Austria, Apr 10, 2007.
- 14) Sasaki H, Saijo Y. Ultrasonic tissue characterization of thrombus in coronary atherosclerosis. *International Congress on Ultrasonics 2007*. Vienna, Austria, Apr 12, 2007.
- 15) Saijo Y, Kobayashi K, Hozumi N, Santos Filho ED, Yambe T. Ultrasonic nano-imaging of living cells. *International Congress on Ultrasonics 2007*. Vienna, Austria, Apr 12, 2007.
- 16) Saijo Y, Tanaka A, Santos Filho ED, Iwamoto T, Li S, Yambe T. Visualization of vulnerable plaque by multiple parametric IVUS. *International Congress on Ultrasonics 2007*. Vienna, Austria, Apr 12, 2007.
- 17) Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Hagiwara Y, Sasaki H, Santos Filho ED, Yambe T. Ultrasonic nano-imaging system for medicine and biology. *29th International Symposium on Acoustical Imaging*. Shonan, Japan, Apr 18, 2007.
- 18) Hagiwara Y, Chimoto E, Ando A, Saijo Y, Itoi E. Elastic changes of capsule in a rat knee contracture model assessed by scanning acoustic microscopy. *29th International Symposium on Acoustical Imaging*. Shonan, Japan, Apr 18, 2007.
- 19) Hozumi N, Terauchi S, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Yamamoto S, Saijo Y. Development of acoustic impedance microscope and its biological and medical applications. *29th International Symposium on Acoustical Imaging*. Shonan, Japan, Apr 18, 2007.
- 20) Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Ishiguro T, Hagiwara Y, Dos Santos Filho E, Yambe T. Ultrasound Speed and Impedance Microscopy for in vivo Imaging. *29th IEEE EMBS Annual International Conference*, Lyon, France, Aug 23, 2007.
- 21) Saijo Y, Hagiwara Y, Kobayashi K, Okada N, Tanaka A, Hozumi N, Tomihata K. B-mode and C-mode imaging of regenerated 3D skin model with 100 MHz ultrasound. *2007 IEEE International Ultrasonics Symposium*, New York, USA, Oct 29, 2007.
- 22) Hozumi N, Nakao A, Terauchi S, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Yamamoto S, Saijo Y. Precise calibration for biological acoustic impedance microscope. *2007 IEEE International Ultrasonics Symposium*, New York, USA, Oct 30, 2007.

## (2) 国内学会

- 1) 西條芳文, 沢田圭介, 吉澤誠, 田中明, 阿部健一, 山家智之. 撓骨動脈圧と左室流出路血流計測による Emax の推定. 第 16 回日本心エコー図学会. 神戸、2005 年 4 月 21 日.
- 2) 西條芳文, 穂積直裕, 小林和人, 田中直彦, 福間功史, 佐々木英彦, 田中元直, 山家智之. 医学用超音波音速顕微鏡の開発. 第 16 回日本心エコー図学会. 神戸、2005 年 4 月 21 日.
- 3) 西條芳文, 岩本貴宏, Esmerald dos Santos Filho, 吉澤誠, 秋野能久, 花立安志, 山家智之. 自己組織化マッピングによる IVUS 画像の自動解析. 第 53 回日本心臓病学会. 大阪、2005 年 9 月 19 日.
- 4) 西條芳文, 秋野能久, 花立安志, 渡辺さち子, 玉村一樹, 大庭和夫. 脈波の圧-容積解析による FMD の自動計測法の開発. 第 53 回日本心臓病学会. 大阪、2005 年 9 月 20 日.
- 5) Saijo Y, Tanaka A, Akino Y, Hanadate Y, Yambe T. Automatic segmentation of IVUS image by self-organizing map. 日本循環器学会第 70 回学術集会. 名古屋、2006 年 3 月 25 日.

- 6) 西條芳文、Esmerald dos Santos Filho、田中明、吉澤誠、秋野能久、花立安志、山家智之。組織の自動解析を目的としたIVUS信号の自己組織化マッピング。第17回日本心エコー学会学術集会。さいたま、2006年4月28日。
- 7) 西條芳文、齋木佳克、井口篤志、田林暁一、白石泰之、関根一光、山家智之。左心補助装置装着症例の術中経食道心エコー所見。第17回日本心エコー学会学術集会。さいたま、2006年4月28日。
- 8) 西條芳文、穂積直裕、小林和人、Esmerald dos Santos Filho、田中元直、山家智之。超音波によるナノ・イメージングの医療への応用。第45回日本生体医工学会大会。福岡、2006年5月15日。
- 9) 西條芳文、齋木佳克、井口篤志、田林暁一、白石泰之、関根一光、山家智之。経食道心エコーによる左室補助装置装着患者の心機能評価。第45回日本生体医工学会大会。福岡、2006年5月16日。
- 10) 西條芳文、大庭和夫、玉村一樹、山崎豊、秋野能久、花立安志、渡辺さち子。圧・容積脈波の左右同時計測によるFMDの自動計測。第45回日本生体医工学会大会。福岡、2006年5月16日。
- 11) 西條芳文、岡田長也、小林和人、穂積直裕、Esmerald dos Santos Filho、白石泰之、関根一光、山家智之。100MHz超音波による肝組織の3次元イメージング。日本超音波医学会第79回学術集会。大阪、2006年5月27日。
- 12) 西條芳文、白石泰之、関根一光、山家智之、佐野博高、萩原嘉広、服部弘之、田中明、穂積直裕、小林和人。再生医療の評価方法としての高周波数超音波の可能性。第44回日本人工臓器学会大会。横浜、2006年11月2日。
- 13) Saijo Y, Tanaka A, Santos Filho ED, Iwamoto T, Yambe T. Development of IVUS attenuation imaging and comparison with multiple parametric imagings. 日本循環器学会第71回学術集会。神戸、2007年3月15日。
- 14) 藤田雅史、高山沙織、塩入裕樹、小山二郎、堀口聡、井上寛一、田中明、西條芳文。IVUS Attenuation Imagingによる冠動脈深部の音響特性解析。第18回日本心エコー学会学術集会。軽井沢、2007年4月13日。
- 15) 西條芳文、穂積直裕、小林和人、Esmerald dos Santos Filho。生体内超音波ナノ・イメージング法の開発。第46回日本生体医工学会大会。仙台、2007年4月26日。
- 16) 西條芳文、穂積直裕、小林和人、Santos Filho Esmeraldo。生体内超音波ナノ・イメージング法による線維芽細胞の可視化。日本超音波医学会第80回学術集会。鹿児島、2007年5月19日。
- 17) 西條芳文、田中明、田林暁一、山家智之。オプティカルフロー法による心血管内血流の可視化。第55回日本心臓病学会。千葉、2007年9月11日。

### 3. 招待講演

#### (1) 海外での招待講演

- 1) Saijo Y: Intravascular 2D Tissue Velocity Imaging and Clinical Validation. Invited Lecture in the *3rd International Vulnerable Plaque meeting*, Capri, Italy, Jun 12, 2005.
- 2) Saijo Y: Evaluation of Cardiac Function of the Patients with Left Ventricular Assist Device by Transesophageal Echocardiography. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006*, Seoul, Korea, Aug 28, 2006.
- 3) Saijo Y: Twenty Years' Development of Acoustic Microscopy for Medicine and

Biology. 4th joint meeting of the Acoustical Society of America and the Acoustical Society of Japan (152nd Annual Meeting on Acoustical Society of America), Honolulu, HI, USA, Nov 30, 2006.

- 4) Saijo Y: Recent Progress of Biomedical Acoustic Microscopy and Multiple Parametric IVUS Imaging at Tohoku University. *Invited lecture at Paris-Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization and Small Animal Imaging*, Paris, France, Apr 6, 2007.
- 5) Saijo Y: Toward in vivo acoustic microscopy in medicine and biology. *Invited lecture at Fraunhofer Institute of Biomedical Engineering*, Saarbruecken, Germany, Apr 13, 2007.

## (2) 国内での招待講演

- 1) 西條芳文. 医工学的アプローチによる動脈硬化の診断. 第10回東北生活習慣病懇話会. 仙台、2005年7月16日.
- 2) 西條芳文. 加齢による左室拡張能の変化. 第5回宮城循環器シンポジウム. 仙台、2005年7月16日.
- 3) 西條芳文. 超音波による心血管系診断の最前線. 宮古医師会学術講演会. 宮古、2005年7月21日.
- 4) 西條芳文. 超音波の基礎知識. 第6回IVUSガイド冠インターベンション研究会. 東京、2005年8月20日
- 5) 西條芳文. Vulnerable Plaqueに対するDistal Protection - Parametric IVUS -. Complex Coronary Therapeutics 2005. 神戸、2005年9月26日
- 6) 西條芳文. 動脈硬化の高周波数超音波組織性状診断. 第5回 Cardiovascular Imaging Frontier. 東京、2005年11月26日.
- 7) 西條芳文. 動脈硬化 Step by Step. 宮城社会保険病院 連携の集い. 仙台、2006年1月27日.

- 8) 西條芳文. 超音波による心臓・血管の中の流れの医工学的解析. 第43回日本小児外科学会総会. 秋田、2006年6月8日.
- 9) 西條芳文. 誰も語らなかったVH-IVUSの光と影. 第11回i-IVUS.jp研究会, 名古屋、2006年7月8日.
- 10) 西條芳文. Visualization of Vulnerable Plaque by Serial Parametric IVUS Imagings. 第6回日本心血管カテーテル治療学会. 広島、2006年11月24日.

## H. 知的所有権の取得状況

- 1) 特願 2006-142040  
バイパスグラフト評価のための超音波血流診断装置  
出願日：2006年4月21日
- 2) 特願 2006-287512  
フレーム相関法を用いた血流の検出  
出願日 2006年10月23日

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
西條芳文	2章 診断—その原理と限界 超音波顕微鏡の原理とプラークの評価.	堀正二	冠動脈疾患プロフェッション7 冠動脈疾患の New Concept	中山書店	東京	2006	72-79
西條芳文	1. IVUS の基礎と特性 超音波について.	本江純子、齋藤穎	IVUS マニュアル	中山書店	東京	2006	2-6
西條芳文	8. 冠動脈イメージングの新技术 超音波顕微鏡と intravascular tissue velocity imaging.	本江純子、齋藤穎	IVUS マニュアル	中山書店	東京	2006	308-314
Saijo Y	Ultrasonic measurement of micro-acoustic properties of the biological soft materials.	Tribikram Kundu	<i>Advanced Ultrasonic Methods for Material Characterization</i>	ISTE	London	2007	89-113
西條芳文	第2章. 第4節. 4. 超音波顕微鏡による組織性状の可視化.	小川誠二、上野照剛	非侵襲・可視化技術ハンドブック	株式会社エヌティーエス	東京	2007	241-249

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Saijo Y, Sasaki H, Hozumi N, Kobayashi K, Tanaka M, Yambe T	Sound speed scanning acoustic microscopy for biomedical applications.	<i>Technol Health Care</i>	Vol. 13, No. 4	261-267	2005
Funamoto K, Hayase T, Saijo Y, Yambe T	Detection and correction of aliasing in ultrasonic measurement of blood flows with Ultrasonic-Measurement-Integrated simulation	<i>Technol Health Care</i>	Vol. 13, No. 4	331-344	2005

Funamoto K, Hayase T, Shirai A, Saijo Y, Yambe T	Fundamental study of ultrasonic-measurement-integrated simulation of real blood flow in the aorta.	<i>Ann Biomed Eng</i>	Vol. 33, No. 4	415-428	2005
Watanabe S, Suzuki N, Kudo A, Suzuki T, Abe S, Suzuki M, Komatsu S, Saijo Y, Murayama N	Influence of aging on cardiac function examined by echocardiography.	<i>Tohoku J Exp Med</i>	Vol. 207, No.1	13-19	2005
Watanabe M, Sekine K, Hori Y, Shiraishi Y, Maeda T, Honma D, Miyata G, Saijo Y, Yambe T	Artificial esophagus with peristaltic movement.	<i>ASAIO J</i>	Vol. 51, No.2	158-161	2005
Santos Filho E, Yoshizawa M, Tanaka A, Saijo Y, Iwamoto T.	Moment based texture segmentation of intravascular ultrasound images.	<i>J Med Ultrasonics</i>	Vol. 32, No. 3	91-99	2005
Miyasaka M, Sakai S, Kusaka A, Endo Y, Kobayashi M, Kobayashi K, Hozumi N, Tanino R	Ultrasonic tissue characterization of photodamaged skin by scanning acoustic microscopy.	<i>Tokai J Exp Clin Med</i>	Vol. 30, No. 4	217-225	2005
Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Fukuma K, Tanaka N, Sasaki H, Tanaka M, Yambe T	Acoustic microscopy based on frequency domain analysis of a single pulsed wave.	<i>Proc 6th Asian-Pacific Conference on Medical and Biological Engineering</i>	N.A	N.A	2005
Saijo Y, Akino Y, Watanabe S, Oba K, Tamamura K, Yamazaki Y, Ishiguro T	Fully-automatic measurement of flow mediated dilatation.	<i>Proc 6th Asian-Pacific Conference on Medical and Biological Engineering</i>	N.A	N.A	2005
Saijo Y, Santos Filho E, Yambe T, Tanaka A, Iwamoto T, Yoshizawa M, Akino Y, Hanadate Y	Parametric intravascular ultrasound imaging - Two-dimensional tissue velocity imaging and self-organizing map imaging.	<i>Proc 8th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization</i>	Vol. 1	1-4	2005

Santos Filho E, Saijo Y, Yoshizawa M, Tanaka A	Automatic luminal contour and calcification detection in intravascular ultrasound images.	<i>Proc 8th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization</i>	Vol. 1	5-8	2005
Saijo Y, Sasaki H, Santos Filho E, Yambe T, Tanaka M, Hozumi N, Kobayashi K	Speed-of sound microscopy for biomedical applications.	<i>Proc 8th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization</i>	Vol. 1	26-29	2005
Kimura A, Terauchi S, Murakami Y, Hozumi N, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Saijo Y	Image processing for pulse driven biological microscope based on frequency spectrum.	<i>Proc 8th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization</i>	Vol. 1	30-31	2005
Hagiwara Y, Matsumoto F, Chimoto E, Kokubun S, Saijo Y, Sasano Y	Increased sound speed of synovial membrane after immobilization assessed by scanning acoustic microscopy.	<i>Proc 8th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization</i>	Vol. 1	32-35	2005
Sano H, Hattori K, Kokubun S, Saijo Y	Material properties of the rabbit supraspinatus tendon and its insertion - A measurement with the scanning acoustic microscopy.	<i>Proc 8th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization</i>	Vol. 1	36-38	2005
van der Steen AFW, Baldewsing RA, Degertekin FL, Emelianov S, Frijlink ME, Furukawa Y, Goertz D, Karaman M, Khuri-Yakub PT, Kim K, Mastik F, Moriya T, Oralkan O, Saijo Y, Schaar JA, Serruys PW, Sethuraman S, Tanaka A, Vos HJ, Witte R, O'Donnell M	IVUS beyond the horizon.	<i>Eurointerv</i>	Vol. 2	132-142	2006
Sano H, Hattori K, Saijo Y, Kokubun S	Does decalcification alter the tissue sound speed of rabbit supraspinatus tendon insertion? In vitro measurement using scanning acoustic microscopy.	<i>Ultrasonics</i>	Vol. 44, No. 3	297-301	2006

Saijo Y, Hozumi N, Lee C, Nagao M, Kobayashi K, Oakada N, Tanaka N, Santos Filho ED, Sasaki H, Tanaka M, Yambe T	Ultrasonic speed microscopy for imaging of coronary artery.	<i>Ultrasonics</i>	Vol. 44; Suppl. 1	e51-55	2006
Saijo Y, Tanaka A, Iwamoto T, Dos Santos Filho E, Yoshizawa M, Hirosaka A, Kijima M, Akino Y, Hanadate Y, Yambe T	Intravascular two-dimensional tissue strain imaging.	<i>Ultrasonics</i>	Vol. 44; Suppl. 1	e147-151	2006
Liu H, Saijo Y, Zhang X, Shiraishi Y, Luo Y, Maruyama M, Higa M, Sekine K, Yambe T	Impact of type A behavior on brachial-ankle pulse wave velocity in Japanese.	<i>Tohoku J Exp Med</i>	Vol. 209, No. 1	15-21	2006
Saijo Y, Tanaka A, Santos Filho ED, Iwamoto T, Li S, Yoshizawa M, Yambe T	Multiple parametric IVUS imagings for detection of vulnerable plaque.	<i>Proc 9<sup>th</sup> Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization</i>	Vol. 1	13-17	2006
Hozumi N, Terauchi S, Kimura A, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Saijo Y	Development of cerebella tissue of rat characterized by acoustic impedance microscope.	<i>Proc 9<sup>th</sup> Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization</i>	Vol. 1	18-21	2006
Sasaki H, Saijo Y, Kanno T, Tanaka M	Classification of flow-limiting thrombus in acute coronary syndrome by acoustic microscopy.	<i>Proc 9<sup>th</sup> Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization</i>	Vol. 1	29-31	2006
Sano H, Hattori K, Komatsuda T, Saijo Y, Sugita T, Itoi E	Tissue sound speed of anterior cruciate ligament in estrogen-controlled rabbits. - A measurement using the scanning acoustic microscope -	<i>Proc 9<sup>th</sup> Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization</i>	Vol. 1	32-35	2006
Kobayashi K, Hozumi N, Ohtsuki S	Image Processing for Scanning-type Biological Ultrasonic Microscope Considering its Beam Characteristics.	<i>Proc 9<sup>th</sup> Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization</i>	Vol. 1	36-38	2006
Sano H, Saijo Y, Kokubun S	Non-mineralized fibrocartilage shows the lowest elastic modulus in the rabbit supraspinatus tendon insertion: measurement with scanning acoustic microscopy.	<i>J Shoulder Elbow Surg</i>	Vol. 15, No. 6	743-749	2006

Hagiwara Y, Saijo Y, Chimoto E, Akita H, Sasano Y, Matsumoto F, Kokubun S	Increased elasticity of capsule after immobilization in a rat knee experimental model assessed by scanning acoustic microscopy.	<i>Upsala J Med Sci</i>	Vol. 111, No. 3	303-313	2006
Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Santos Filho ED, Sasaki H, Yambe T, Tanaka M.	Ultrasonic tissue characterization of atherosclerosis by a speed-of-sound microscanning system.	<i>IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control</i>	Vol. 54, No. 8	1571-1577	2007
Tanaka A, Saijo Y	Blood flow visualization of left atrial spontaneous echo contrast (SEC) using gradient based optical flow estimation.	<i>Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc</i>	Vol. 1	4500-3	2007
Shiraishi Y, Yambe T, Saijo Y, Sato F, Tanaka A, Yoshizawa M, Ogawa D, Wada Y, Itoh S, Sakata R, Park Y, Uematsu M, Umezu M, Fujimoto T, Masumoto N, Liu H, Baba A, Konno S, Nitta S, Imachi K, Tabayashi K, Sasada H, Homma D	Morphological approach for the functional improvement of an artificial myocardial assist device using shape memory alloy fibres.	<i>Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc</i>	Vol. 1	3974-7	2007
Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Ishiguro T, Hagiwara Y, Dos Santos Filho E, Yambe T	Ultrasound speed and impedance microscopy for in vivo imaging.	<i>Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc</i>	Vol. 1	1350-3	2007
Liu H, Luo Y, Higa M, Zhang X, Saijo Y, Shiraishi Y, Sekine K, Yambe T	Biochemical evaluation of an artificial anal sphincter made from shape memory alloys.	<i>J Artif Organs</i>	Vol. 10	223-227	2007
Saijo Y, Hagiwara Y, Kobayashi K, Okada N, Tanaka A, Hozumi N, Tomihata K	B-mode and C-mode imaging of regenerated 3D skin model with 100 MHz ultrasound.	<i>Proc 2007 IEEE International Ultrasonics Symposium</i>		244-247	2007

Hozumi N, Nakao A, Terauchi S, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Yamamoto S, Saijo Y	Precise calibration for biological acoustic impedance microscope.	<i>Proc 2007 IEEE International Ultrasonics Symposium</i>		801-804	2007
Okazaki T, Ebihara S, Asada M, Yamanda S, Saijo Y, Shiraishi Y, Ebihara T, Niu K, Mei H, Arai H, Yambe T	Macrophage colony-stimulating factor improves cardiac function after ischemic injury by inducing vascular endothelial growth factor production and survival of cardiomyocytes.	<i>Am J Pathol</i>	Vol. 171, No. 4	1093-1103	2007
Santos Filho E, Saijo Y, Tanaka A, Yambe T, Yoshizawa M	Fractal dimension of 40 MHz intravascular ultrasound radio frequency signals.	<i>Ultrasonics</i>		[Epub ahead of print]	2007
Santos Filho E, Saijo Y, Tanaka A, Yoshizawa M	Detection and quantification of calcifications in intravascular ultrasound images by automatic thresholding.	<i>Ultrasound Med Biol</i>	Vol. 34, No. 1	160-165	2008

## 研究成果の刊行物・別刷

# Sound speed scanning acoustic microscopy for biomedical applications

Yoshifumi Saijo<sup>a,\*</sup>, Hidehiko Sasaki<sup>a</sup>, Naohiro Hozumi<sup>b</sup>, Kazuto Kobayashi<sup>c</sup>,  
Motonao Tanaka<sup>a</sup> and Tomoyuki Yambe<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Department of Medical Engineering and Cardiology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan*

<sup>b</sup>*Department of Electrical and Electronic Engineering, Toyohashi University of Technology, Sendai, Japan*

<sup>c</sup>*Honda Electronics Co. Ltd., Sendai, Japan*

Received 30 August 2004

Revised 27 January 2005

**Abstract.** Since 1985, we have been developing a scanning acoustic microscope (SAM) system for biomedical use and have been investigating the acoustic properties of various organs and disease states by using this SAM system. In biomedicine, SAM is useful for intraoperative pathological examination, study of low-frequency ultrasonic images, and assessment of biomechanics at a microscopic level. Recently, we have proposed a new concept – acoustic microscopy – using a single pulsed wave instead of continuous waves used in conventional SAM systems. In the present study, we compared two systems by measuring the same biological material. The sound speed image obtained by sound speed microscopy corresponded well to that obtained using a conventional SAM system. Lesions with hyaline degeneration showed a lower sound speed when compared with that of normal myocardium. Frequency domain analysis of amplitude and phase by both methods also showed similar characteristics. Although the data acquisition time of one frame was greater than that in conventional SAM, the total time required for calculation was significantly shorter. The SAM system can be applied to intraoperative pathological examination.

## 1. Introduction

Since 1985, we have been developing a scanning acoustic microscope (SAM) system for biomedical use and have been investigating the acoustic properties of various organs and disease states by using this SAM system [1–9]. In biomedicine, SAM is useful for intraoperative pathological examination, study of low-frequency ultrasonic images, and assessment of biomechanics at a microscopic level. The originality of the traditional SAM system lies in providing quantitative values of attenuation and sound speed of thin slices of soft tissue. Although the system may be currently in use, it cannot be repaired because it was constructed using precise hand-crafted technologies and analog signal acquisition circuits. In particular, the x-axis scan is driven by a spiral spring technique that originated from the technologies used in the Japanese watch industry.

---

\* Address for correspondence: Yoshifumi Saijo, Affiliation: Department of Medical Engineering and Cardiology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, 4-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan. Tel.: +81 22 717 8517; Fax: 81 22 717 8518; E-mail: saiyo@idac.tohoku.ac.jp.

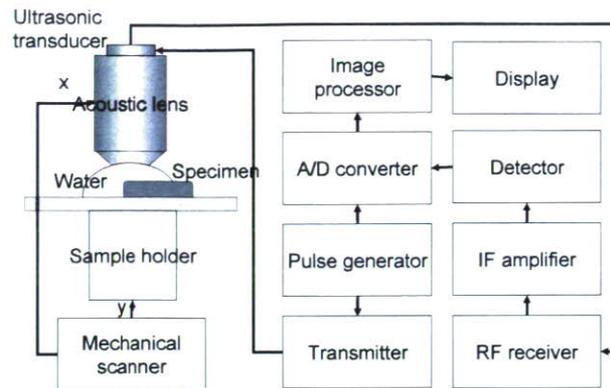


Fig. 1. Block diagram of the scanning acoustic microscope system developed by Tohoku University and Honda Electronics Co. Ltd. in 1985.

Recently, we have proposed a new concept – acoustic microscopy – using a single pulsed wave instead of continuous waves used in conventional SAM systems. In the present study, we compared two systems by measuring the same biological material.

## 2. Methods

### 2.1. Tissue preparation

A heterotopic abdominal cardiac transplantation was performed in a mouse. The mouse was not administered any anti-immune drugs. The mouse was killed 7 days after surgery. In order to obtain cross sections of the heart, histological specimens were prepared, and  $10\ \mu\text{m}$  and  $4\ \mu\text{m}$  thick sections were obtained for scanning acoustic microscopy and Elastica-Masson staining for optical microscopy, respectively. The specimen was ranked AR grade 3 based on the following scale of increasing levels of allograft rejection (AR): AR grade 0 (normal), AR grade 1 (lymphocyte infiltration), AR grade 2 (focal necrosis), AR grade 3 (diffuse necrosis), and AR grade 4 (presence of hemorrhages) as proposed in the Journal of Heart and Lung transplantation.

### 2.2. Conventional scanning acoustic microscopy

Figure 1 shows a block diagram of the conventional SAM system that operates in the frequency range of 100–200 MHz. The acoustic focusing element comprises a ZnO piezoelectric transducer with a sapphire lens whose aperture half angle is  $30^\circ$ . The lens focuses the acoustic beam with lateral resolution. Its half power width is from approximately  $6\ \mu\text{m}$  at 200 MHz to  $12\ \mu\text{m}$  at 100 MHz in water at  $20^\circ\text{C}$ . Forty continuous ultrasonic pulses were input to the transducer from an analog pulse generator at an arbitrary frequency. The focusing element is mechanically scanned at 60 Hz by using a precise spiral spring in the lateral direction (x) above the specimen. The sampling holder is scanned in the other lateral direction (y) by a stepping motor in 8 s, thus providing two-dimensional scanning. Two-dimensional distribution of amplitude and phase is obtained in a 0.5 mm, 1 mm, or 2 mm field of view. The image processor stored the eleven frames of amplitude images in 10 MHz steps in the range 100 to 200 MHz and 5 phase images in 10 MHz steps in the range 100 to 140 MHz. The thickness of the specimen was determined from the frequency-dependent characteristics of the amplitude and phase of the received signals obtained at the