

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

超音波を用いた非侵襲膝関節軟骨  
3次元定量診断装置の開発に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中村 耕三

平成20(2008)年3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
超音波を用いた非侵襲膝関節軟骨 3 次元定量診断装置の開発に関する研究	----- 1
中村 耕三	
II. 分担研究報告	
1. 超音波 B-mode 画像を用いた軟骨厚測定に関する研究	----- 5
大西 五三男	
2. 超音波を用いた軟骨音速測定値と軟骨変性度の関係に関する研究	----- 13
星 和人	
3. 超音波 B-mode 画像を用いたヒト大腿骨内側顆部形状に関する検討と 超音波プローブの関節軟骨に対する至適角度・距離に関する研究	----- 22
土肥 健純	
4. 超音波 B-mode 画像を用いた 3 次元軟骨形態計測測定に関する研究	----- 35
中島 義和	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 43
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 44

# I 総括研究報告書

超音波を用いた非侵襲膝関節軟骨 3次元定量診断装置の開発に関する研究

主任研究者 中村 耕三 東京大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨**

本研究の目標は、外来診療の現場で変形性関節症の重傷度を非侵襲的に定量診断を行うことができる関節軟骨用超音波診断装置を開発することである。その基礎研究として、摘出ヒト関節軟骨の音速を測定した。また、水槽内でブタ関節軟骨を超音波によって撮像し関節軟骨の厚みを測定、音速によって補正した後、実際の軟骨の厚みと比較し、非常に高い精度で測定されていることを示した。三次元評価も水槽内にて同様に超音波撮像によって行い、マイクロCTと比較、やはり軟骨の厚みや体積が近似していることが示され、関節軟骨の形態定量法として有用であると考えられた。臨床測定機器開発においては、最適な測定下肢保持具やプローブスキャナーの作製のために、大腿骨顆部の形状の検討・超音波プローブに対する関節軟骨の許容位置の評価を行った。これらを元に臨床測定装置を作製してゆく予定である。

分担研究者氏名	所属機関名	役職
大西 五三男	東京大学大学院医学系研究科専任講師	
星 和人	東京大学ティッシュエンジニアリング部客員准教授	
土肥 健純	東京大学大学院情報理工学系研究科教授	
中島 義和	東京大学大学院工学系研究科准教授	

方法の開発はこれまでに例がなかった。本研究は、完全無侵襲に超音波を用いて関節軟骨の変性・磨耗・菲薄の定量診断を行う装置の開発という超音波の新規応用を目指す研究であり、新しい診断法の分野を開拓し、さらには変形性関節症の新たな治療体系を確立する端緒となるものである。軟部組織と軟骨、軟骨と骨の境界面を超音波によって検出することにより関節軟骨を三次元的に抽出することができる。この原理を応用し、関節軟骨の変性から摩耗や菲薄、さらに欠損の起こる変形性関節症において関節軟骨を体外から非侵襲にリアルタイムに映像化し、軟骨表面の変性状態を評価することや、軟骨の厚さや体積を定量的に評価が可能な超音波装置を開発する。しかしながら、超音波を用いた検査法を開発する上で、超音波の伝わる音速が組織によって異なること、対象物が超音波送信波にできるだけ垂直であればあるほど、また超音波プローブの焦点距離に近ければ近いほどより良好な画像が得られる、といった特徴を認識する必要がある。これらより、本年度においては、基礎実験では、1. 超

**A. 研究目的**

本研究の目標は、外来診療の現場で変形性関節症の重傷度を非侵襲的に定量診断を行うことができる関節軟骨用超音波診断装置および軟骨下骨の 3次元評価を行うことができる硬組織用超音波診断装置を開発することである。超音波による画像診断法は近年著しく進歩し、画像の精度や3次元画像処理また動画像の撮像などさまざまな機能の付加や向上がある。しかし関節軟骨などの硬組織に応用する試みは、内視鏡視下に侵襲的に超音波診断する方法の開発はあるものの、非侵襲に診断する

音波画像評価の基礎となるヒト関節軟骨音速測定、2. 超音波 B-mode 画像による関節軟骨厚測定値の精度評価、3. 超音波 B-mode 画像による関節軟骨三次元的定量値の精度評価、また、機器開発においては、4. 評価対象として考えているヒト大腿骨内側顆部の形状評価、5. 超音波プローブの関節軟骨に対する至適相対角度・位置の評価を目的として研究を行った。

## B. 研究方法

それぞれの研究方法について以下にそれぞれ示す。1. ヒト関節軟骨の音速測定および軟骨の変性が音速に与える影響の検討においては、対象は変形性膝関節症の手術患者4名4膝関節であった。本人の同意のもと、手術時に採取された大腿骨顆部の骨軟骨片を音速測定の試料として使用した。音速測定は8部位で行った。超音波シングルプローブを用い超音波が関節軟骨を往復する時間を測定。時間測定部位が断面となるように精密切断機で試料を切断し、軟骨厚を顕微鏡で測定し、音速を算出した。骨軟骨片の組織標本を作製し、変性度を Mankin score にてスコアリング、音速に与える影響を相関・回帰分析によって検討した。2. 超音波 B-mode 画像を用いた関節軟骨厚測定値の精度評価については、実験材料は、形状・大きさが比較的ヒトに近いことから、豚大腿骨顆部の関節軟骨を用いた。骨軟骨片を超音波 B-mode 画像によって撮像を行った（撮像条件は、①1D probe, Tissue Harmonic, ②1D probe, 空間コンパウンド, ③1.5D probe, Tissue Harmonic, ④1.5D probe, 空間コンパウンド）。得られた画像について超音波ビーム方向の関節軟骨の厚みを専用ソフトを用いて測定し、また、音速による補正を行って算出した。一方、撮像した断面が切断面となるように試料を切断し、軟骨厚を顕微鏡にて測定、超音波による軟骨厚測定値と相関・回帰分析によって比較検討した。

3. 超音波 B-mode 画像を用いた三次元的関節軟骨評価の精度については、2.と同様に豚大腿骨顆部の関節軟骨を使用した。骨軟骨片全体を網羅するように、超音波プローブを平行移動させ超音波 B-mode 画像を 0.5mm 間隔で撮像した。得られた画像を専用ソフトに読み込み軟骨領域を抽出し、軟骨三次元モデルを作成した。一方、骨軟骨片を高解像度 CT を用いて撮像し、同様に軟骨三次元モデルを作成した。それぞれ体積・軟骨厚を測定し音速による補正を行い、比較検討した。4. 大腿骨内側顆部の形状評価においては、大腿骨内側顆部矢状断面における関節軟骨の曲率半径の測定を男女 3 名ずつのボランティアにおいて超音波 B-mode 画像を用いて行った。膝を固定し、リニアプローブを平行移動させることで、大腿骨内側顆部を網羅的に超音波によって撮像した。撮像した軟骨表面をプロットし、その平均曲率半径を各画像において算出した。5. 超音波プローブの関節軟骨に対する至適相対角度・位置の評価においては、男性ボランティア大腿骨内側顆部において、超音波プローブを関節軟骨表面がプローブ焦点距離にビーム方向に垂直に位置するように設置し B-mode 画像を取得した。その後、プローブを 10° 刻みに傾け、また、10mm 刻みに上下に移動させ、同様に関節軟骨 B-mode 画像を取得した。得られた画像をそれぞれ輝度プロファイルによって軟骨表面・骨軟骨境界における超音波反射波を評価した。

### （倫理面への配慮）

今回の研究において関節軟骨の取得に際しては対象者に口頭および文書を用いて説明を行い、十分に理解し同意を得られたもののみを対象とした。また、全研究を通して対象者の個人情報情報は公開されない。

## C. 研究結果・考察

1. ヒト関節軟骨の音速測定および軟骨

の変性が音速に与える影響の検討においては、関節軟骨音速の平均(±標準偏差)は、1762.0(±81.1) m/sであった。組織学的スコアと軟骨音速との一次回帰直線の式および相関係数の二乗はそれぞれ、 $y = -24.26x + 1877.2$ 、 $R^2 = 0.2237$ であった。p値は、0.251であり、有意ではなかったが、Mankin scoreが高いほど(軟骨の組織学的変性度が高いほど)軟骨の音速が減少する傾向にあった。2. 超音波 B-mode 画像を用いた関節軟骨厚測定値の精度評価については、顕微鏡による軟骨厚測定値を x、超音波による軟骨厚測定値を y としたときの一次回帰直線式はそれぞれ①： $y = 1.1017x - 0.2208$ 、②： $y = 1.0799x - 0.1582$ 、③： $y = 0.9519x + 0.1776$ 、④： $y = 1.1264x - 0.3008$ であった。また、相関係数の二乗はそれぞれ①0.7767、②0.8445、③0.7961、④0.8971であり、1D probe に比べ 1.5D probe の方が高い傾向が、tissue harmonic に比べ空間コンパウンドの方が高い傾向がみられた。いずれの設定においても p 値は 0.0001 以下であり顕微鏡による軟骨厚測定値と超音波による軟骨厚測定値の有意な相関が見られた。3. 超音波 B-mode 画像を用いた三次元的関節軟骨評価の精度については、超音波 3D モデルの軟骨体積と高解像度 CT モデルの軟骨体積はそれぞれ 866.4 mm<sup>3</sup>、823.8 mm<sup>3</sup>であった。超音波モデル軟骨厚、高解像度 CT モデル軟骨厚の平均はそれぞれ、 $1.97 \pm 0.21$  mm、 $2.09 \pm 0.25$  mm であった。前者を x、後者を y としたときの一次回帰直線式は  $y = 0.9641x + 0.1837$  であった。また、相関係数の二乗は 0.6409、p 値は 0.0001 以下であり有意な相関が見られた。以上より、適切な音速値を用い、関節軟骨を B-mode 画像をもとに測定した形態定量値は信頼性が高いと考えられた。また、4. 大腿骨内側顆部の形状評価においては、大腿骨内側顆部の曲率半径は女性・男性共においてほぼ 30~40mm であった。5. 超音波プロ

ープの関節軟骨に対する至適相対角度・位置の評価においては、取得した画像の輝度プロファイルによって軟骨表面・骨軟骨境界における超音波反射波は、上下方向は焦点距離から±20mm まで、傾きは 20° 以内が比較的明瞭に認識することが可能であった。これらの結果をもとに画質の高い B-mode 画像を得ることが可能な臨床超音波機器を作製する必要があると考えられた。

#### D. 結論

基礎研究として、超音波を用いたヒト関節軟骨の音速値の測定および関節軟骨の変性による音速値への影響を検討した。その結果、変性度が重度であるほど、音速が低下する傾向にあることが示された。ただし、音速低下は有意なものではなく、実際の軟骨形態定量評価においては、一定の音速値を用いることが可能であることが示唆された。また、超音波 B-mode を用いてブタ関節軟骨を水槽内で撮像し画像から関節軟骨厚を測定、実測した関節軟骨厚との相関を検討、いずれの画像設定でも有意な相関を示し、これらの手法による関節軟骨形態計測が有用であると考えられた。また、三次元の評価法として、超音波 B-mode 画像を用いて豚膝関節軟骨を撮像し得られた画像より三次元モデルを作成軟骨厚および軟骨の体積を計測した。高解像度 CT を用いて同様に軟骨三次元モデルを作成し、軟骨厚・体積を算出し、超音波による定量値の精度評価のため、それらを比較検討した。双方の間には有意な相関がみられ、超音波を用いた関節軟骨三次元評価は、関節軟骨の形態定量法として有用であると考えられた。機器開発では、超音波を用いた検査法では、対象物が超音波送信波にできるだけ垂直であればあるほど、また超音波プローブの焦点距離に近ければ近いほどより良好な画像が得られる、といった特徴があるため、大腿骨内側顆部

の矢状断面における関節軟骨の曲率半径、超音波プローブの関節軟骨に対する至適角度・位置を測定・検討した。結果、大腿骨内側顆部の曲率半径はほぼ 30mm～40mm であり、超音波プローブの関節軟骨に対する傾斜至適許容範囲・焦点からの深達方向への距離のずれの至適許容範囲は、それぞれ、 $0^{\circ} \sim 20^{\circ}$ 、 $\pm 0\text{mm} \sim 20\text{mm}$ であった。これらをもとに、今後、機器開発を進めていく予定である。

## E. 結論

今回我々は、大腿骨内側顆部の矢状断面における関節軟骨の曲率半径、超音波プローブの関節軟骨に対する至適角度・位置を測定・検討した。結果、大腿骨内側顆部の曲率半径はほぼ 30mm～40mm であり、超音波プローブの関節軟骨に対する傾斜至適許容範囲・焦点からの深達方向への距離のずれの至適許容範囲は、それぞれ、 $0^{\circ} \sim 20^{\circ}$ 、 $\pm 0\text{mm} \sim 20\text{mm}$ であった。これらをもとに、機器開発を進めていく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Matsuyama J, Ohnishi I, Sakai R, Bessho M, Matsumoto T, Miyasaka K, Harada A, Ohashi S, Nakamura K.

A New Method for Evaluation of Fracture Healing by Echo Tracking. *Ultrasound Medicine & Biol.*, In press

Y. Cheng, S. Wang, T. Yamazaki, J. Zhao, Y. Nakajima, S. Tamura, Hip cartilage thickness measurement accuracy improvement, *Computerized Medical Imaging and Graphics*, Vol.31,no.8, p.643-655, 2007

### 2. 学会発表

Matsuyama, J.; Ohnishi, I.; Sakai, R.; Miyasaka, K.; Harada, A.; Bessho, M.; Ohashi, S.; Matsumoto, T.; Nakamura, K., A new method for evaluation of fracture healing by Echo tracking, 8th EFORT congress, Transactions, F779, 2007

大橋 暁、大西 五三男、酒井 亮一、廣田 浩二、宮坂 好一、中村 耕三  
超音波を用いた Time of Flight 法による関節軟骨の音速測定、日本整形外科学会誌、81(8), S1012, 2007

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許取得

超音波骨癒合診断装置 特願 2007-177056  
2007.7.5

超音波骨癒合診断装置 特願 2007-231114  
2007.9.6

## Ⅱ 分 担 研 究 報 告 書



## 超音波 B-mode 画像を用いた軟骨厚測定に関する研究

分担研究者 大西 五三男 東京大学医学部附属病院整形外科脊椎外科 講師

**研究要旨** これまでに超音波 B-mode 画像を用いて客観的手法にて軟骨厚を測定評価した先行研究は皆無である。豚大腿骨顆部関節軟骨を用い、超音波 B-mode 画像を 4 種類の画像設定で取得し、軟骨厚を計測した。軟骨領域の決定においては、画像のラインプロファイルより客観的手法を用いて軟骨表面と骨軟骨境界を決定し軟骨厚を測定した。実際の軟骨厚との相関を解析したところ、いずれの画像設定でも有意な相関を示し、これらの手法による関節軟骨形態計測が有用であると考えられた。この結果を踏まえて生体内での計測を行っていく予定である。

### A. 研究目的

超音波による関節軟骨形態定量評価に関する研究は、これまでにほとんど行われてきていない。また、関節軟骨の厚みを評価している研究においても超音波画像の組織境界の決定が客観的に行われていないのが現状である。本研究の目的は、*in vitro* において軟骨の超音波画像を取得し、客観的に軟骨境界を決定し形態定量評価を複数の超音波プローブにて複数の設定で行い、その精度評価を組織学的定量評価値と比較し行うことである。

### B. 研究方法

#### 豚骨軟骨片の取得

実験材料は、形状・大きさが比較的にヒトに近いことから、豚大腿骨顆部の関節軟骨を用いた（図 1）。豚の月齢は 6 ヶ月のものを使用した。屠畜後約 3℃にて 3 日間冷蔵保存後、後肢を切断し -20℃にて冷凍保存した。

#### 骨軟骨片の保持具への固定

保存された骨軟骨片を実験当日冷凍庫より取り出し、室温下にて生理食塩水中にて解冻をおこなった。以降実験経過中、解冻後の軟骨試料は湿潤状態を常に維持した。解冻後、バンドソー（SWD-250、藤原産業株式会社、兵庫県三木市）を用いて、16 x 16 x 11 [mm]

の骨軟骨試料を切出した。骨軟骨片を特注の亚克力製試料保持具（30mm x 30mm）（村井電材株式会社、東京）にレジン（オストロン II、ジーシー、東京）にて固定を行った（図 2）。レジン硬化中は、熱が発生するため、軟骨を水にて十分に冷却を行った。

#### 超音波 B-mode 軟骨画像の取得

骨軟骨片が固定された亚克力保持具を専用に作成した水槽の中に設置した。水槽は事前に脱気水で満たし、常に 25℃に保った。また、リニアプローブを三関節アーム（MB-MX2-A、カネテック、長野県上田市）によって設置した（図 3）。水槽内に既知の位置に張り渡したテグス糸を B 画像にて確認することで所定の位置および方向にリニアプローブを設置することが可能であった。リニアプローブは、従来のプローブ（UST-5412、アロカ株式会社、東京都三鷹市）と新規のプローブ（UST-5411、アロカ株式会社）を使用した。新規プローブ（以下 1.5D probe）は、従来のプローブ（以下 1D probe）と比較し、焦点距離（約 20mm）周辺のエレベーション方向（プローブの短軸方向）の絞りに優れているという特徴がある。プローブはそれぞれ、プローブの素子表面が軟骨表面から焦点距離である 20mm の位置となるように設置した。診断装置は、Prosound - α10（アロカ株式会

社、東京都三鷹市)を使用した。リニアプローブは、tissue harmonic 使用(周波数:5MHz)、空間コンパウンド使用(周波数:13MHz、steering angle:20°)の各々の設定で B-mode 画像取得を行った。空間コンパウンドは、従来のプローブ素子面に垂直に超音波ビームを送信することで得られる画像に加え、左右に一定の傾き(今回の実験では20°)を与えて得られる2枚の画像と計3枚の画像を加算平均することで画像を得る手法である。すなわち、今回の画像取得の条件は、1D probe を使用し tissue harmonic を用いて撮像した画像①、空間コンパウンドを用いた画像②、1.5D probe を使用し tissue harmonic を用いて撮像した画像③、空間コンパウンドを用いた画像④の計4種類の設定にて行った。リニアプローブを保持する三関節アームはエレベーション方向に10ミクロン単位で平行移動可能なマイクロメーター付きのステージが装着しており、これを移動することで撮像断面を0.5m 間隔で撮影した(図4)。

#### 画像および輝度プロファイル解析

取得した画像を JPEG 形式にて外部出力し、コンピューターに読み込んだ。解析ソフトは、Mathcad 2001 Professional (Mathsoft Engineering & Education, Inc., Cambridge, MA)を用いた。画像上にてテグス糸の像を参照点とし、試料中央点を同定する。超音波ビーム方向にその中央点を通るラインを引き、ライン上の輝度プロファイルを csv 形式にて保存・出力する(図5)。同様の作業を中央点より左右に0.5mm 間隔に試料の端から端まで行った(32ライン)。出力された輝度プロファイルデータを Microsoft Office Excel において軟骨表面の反射波(以下、第一境界波)、骨軟骨境界の反射波(以下、第二境界波)に相当すると考えられる第一ピーク、第二ピークを同定する。第一ピークはノイズをピークとしないために、25mV 以上の最初のピーク、第二ピークは最大ピーク(第一ピークが最大の場合は、二番目に大きいピーク)と定義した(図6)。次に第一ピークから第二ピークま

での経過時間( $\Delta t$ )を算出し、先行研究において測定した同月齢の豚の関節軟骨音速( $V_{us}$ :1488 m/s)を用いて第一境界から第二境界までの距離( $T_{us}$ )を算出した。

$$T_{us} = V_{us} \times \Delta t / 2$$

この算出をそれぞれの輝度プロファイルにて行った(プロファイル数:32)。

#### 軟骨スライスの作成

切断面の作成は、Minitom (Struers Inc., Westlake, OH)を使用して行った。Minitom のアームにアクリル保持具を軟骨表面がダイヤモンドブレードに向くように固定する。ここで、アクリル保持具の既知の形状より、ミニトムの切断面調節ダイヤル(精度:10 $\mu$ m)を用いて、切断面が RF 信号を取得した横断線に一致するように切断面の調節を行った後、カッティングを行う。カッティングした骨軟骨片の切断面からアクリル端面までの距離を5箇所にてマイクロメーター(MDC-MJ/PJ、ミットヨ、神奈川県川崎市)を使用し計測しその平均値を算出する。この距離が B-mode 画像撮像断面に一致、あるいは $\pm 0.25$  mm 以内の誤差であるならば、それらの画像を使用し、 $\pm 0.25$  mm 以上の誤差が生じている場合はそれぞれ $\pm 0.5$  mm の横断線上で取得した撮像画像を用いることとした。

#### 測定顕微鏡による軟骨厚の測定

カットされた骨軟骨片をスライドガラス上に固定し、切断面に生理食塩水を滴下した後、カバーガラスを覆い、スライドガラスごと測定顕微鏡(MM-400/T、ニコン、東京)上に設置する(図7)。この測定顕微鏡には、音速測定保持具と同様に X 軸、Y 軸(いずれも平行移動可能)、 $\theta$  軸(円運動可能)を調節するためのマイクロメーターがついたステージ(NHS 2x2、ニコン、東京)を設置した。アクリル保持具が既知の寸法であることを用い、ステージを調節することで、32ヶ所の輝度プロファイルを取得したライン上にて軟骨表面から骨軟骨境界までの距離( $T_h$ )の測定を行う。

## 統計学的解析

Th と Tus の関係について回帰解析および相関解析を行った。p 値が 0.05 以下であったとき、有意であるとした。

## C. 研究結果

B-mode 画像について tissue harmonic と空間コンパウンドとを比較すると (図 4)、空間コンパウンドを用いた画像の方が、軟骨表面において比較的一様に高輝度となっていた。

Th を  $x$ 、Tus を  $y$  としたときの一次回帰直線式はそれぞれ ① (1D probe, Tissue Harmonic) :  $y = 1.1017x - 0.2208$ 、② (1D probe, 空間コンパウンド) :  $y = 1.0799x - 0.1582$ 、③ (1.5D probe, Tissue Harmonic) :  $y = 0.9519x + 0.1776$ 、④ (1.5D probe, 空間コンパウンド) :  $y = 1.1264x - 0.3008$  であった (図 8)。また、 $R^2$  (説明力) はそれぞれ① 0.7767、② 0.8445、③ 0.7961、④ 0.8971 であり、1D probe に比べ 1.5D probe の方が高い傾向が、tissue harmonic に比べ空間コンパウンドの方が高い傾向がみられた。いずれの設定においても p 値は 0.0001 以下であり Th と Tus の有意な相関が見られた。

## D. 考察

これまでに関節軟骨の二次元評価を超音波 B 画像を用いて行った研究はあるが (Myers, et al, 1995)、軟骨表面および骨軟骨境界の決定を手動で行っており、客観性・再現性に問題があると考えられる。今回我々は、超音波 B-mode 画像を用いて豚膝関節軟骨を撮像し、各画像において軟骨表面・骨軟骨境界を一定の客観的方法を用いて決定した。また、プローブを 2 種類使用し、それぞれのプローブで 2 通りの設定で画像取得を行った。

まず、プローブの種類では、1.5D プローブは、1D プローブと比較し、焦点距離周辺のエレベーション方向の絞りに優れているという理論上の特徴がある。

また、空間コンパウンドは、従来のプローブ素子面に垂直に超音波ビームを送信することで得られる画像に加え、左右に一定の傾き (今回の実験では  $20^\circ$ ) を与えて得られる 2 枚の画像と計 3 枚の画像を加算平均することで画像を得る手法である。この空間コンパウンド画像の特徴として、対象物の表面の輝度が表面の傾きに受ける影響が低減する点と、従来の超音波画像で出現するスペckルパターンと言われる模様やいわゆる画像ノイズが画像の加算平均効果によって平均化される点がある。

今回得られた結果では、1D よりも 1.5D の方が tissue harmonic よりも空間コンパウンドを用いた画像の方が実際の軟骨厚との相関が高く、上記の理論上の特徴が今回の実験にも差となって表れたと考えられる。特に、B-mode 画像そのものを比較すると (図 4)、tissue harmonic では、軟骨表面の中央部のみが高輝度となっており軟骨領域にスペckルパターンがみられるのに対して、空間コンパウンドを使用した画像では、軟骨表面は一様に高輝度となっており軟骨内部のスペckルパターンも低減していることがみられた。

しかし、定量値の実測値との比較においては全ての画像において高い相関がみられ、どの画像を用いることも軟骨厚測定において有用であると考えられた。

## E. 結論

豚大腿骨顆部関節軟骨を用い、超音波 B-mode 画像を 4 種類の設定で取得し、軟骨厚を計測した。軟骨領域の決定においては、画像のラインプロファイルより一定の手法を用いて軟骨表面と骨軟骨境界を決定した。

実際の軟骨厚との相関を解析したところ、いずれの画像設定でも有意な相関を示し、これらの手法による関節軟骨形態計測が有用であると考えられた。この結果を踏まえて生体内での計測を行っていく予定である。

## F. 研究発表

### 3. 論文発表

Matsuyama J, Ohnishi I, Sakai R, Bessho M, Matsumoto T, Miyasaka K, Harada A, Ohashi S, Nakamura K. A New Method for Evaluation of Fracture Healing by Echo Tracking. *Ultrasound Medicine & Biol.*, In press

Y. Cheng, S. Wang, T. Yamazaki, J. Zhao, Y. Nakajima, S. Tamura, Hip cartilage thickness measurement accuracy improvement, *Computerized Medical Imaging and Graphics*, Vol.31,no.8, p.643-655, 2007

### 4. 学会発表

Matsuyama, J.; Ohnishi, I.; Sakai, R.; Miyasaka, K.; Harada, A.; Bessho, M.;  
図1 豚大腿骨

Ohashi, S.; Matsumoto, T.; Nakamura, K., A new method for evaluation of fracture healing by Echo tracking, 8th EFORT congress, Transactions, F779, 2007

大橋 暁、大西 五三男、酒井 亮一、廣田 浩二、宮坂 好一、中村 耕三  
超音波を用いた Time of Flight 法による関節軟骨の音速測定、*日本整形外科学会誌*、81(8), S1012, 2007

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 2. 特許取得

超音波骨癒合診断装置 特願 2007-177056  
2007.7.5

超音波骨癒合診断装置 特願 2007-231114  
2007.9.6



図2 アクリル保持具にレジンで固定した骨軟骨片



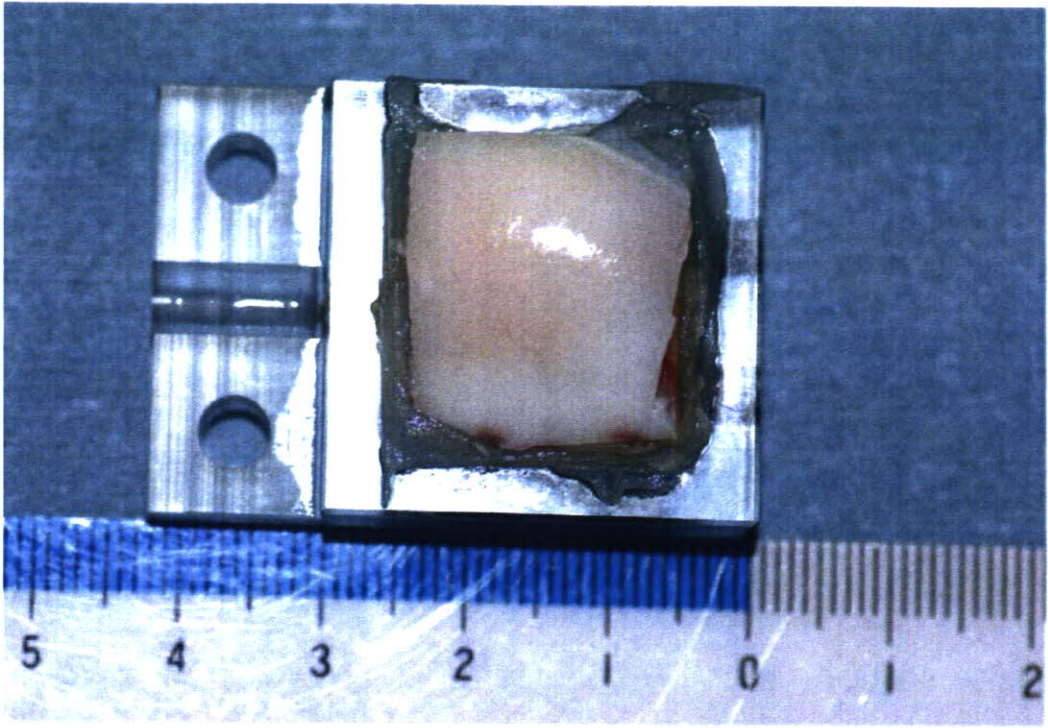


図3 水槽内の関節軟骨および超音波プローブ

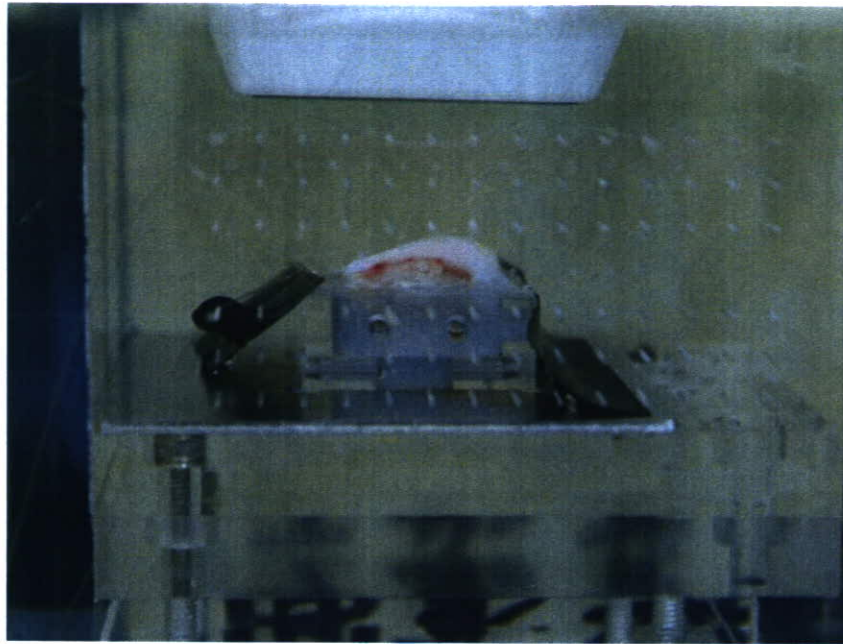


図4 関節軟骨超音波 B-mode 画像  
(左 : Tissue Harmonic 使用、右 : 空間コンパウンド使用)



図5 ラインプロファイル出力

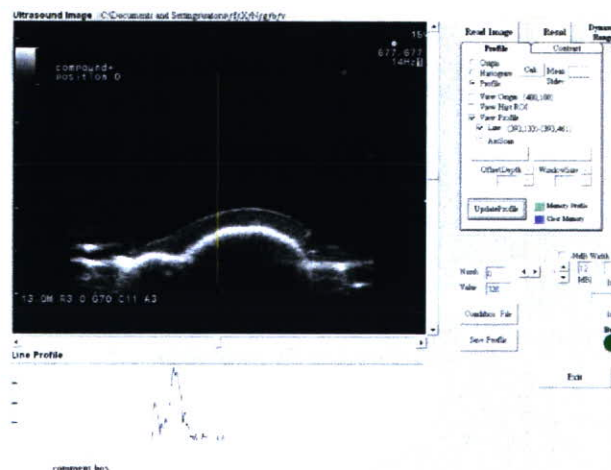


図6 ラインプロファイルを用いた境界決定 (青：軟骨表面、赤：骨軟骨境界)

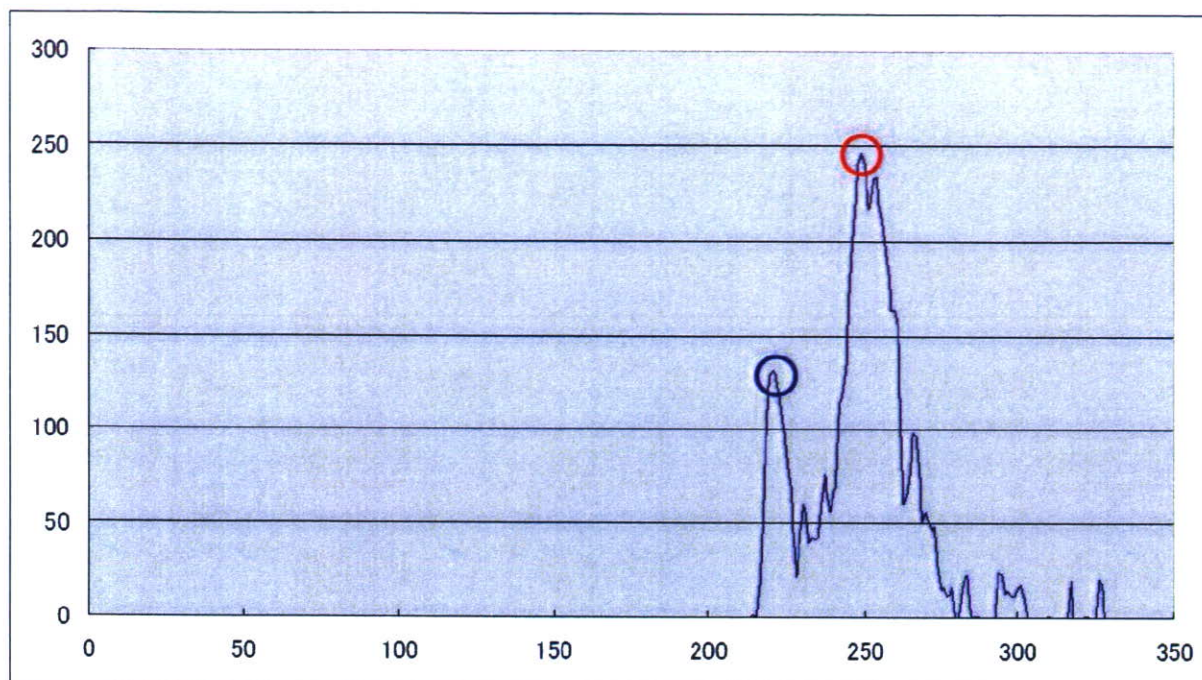


図7 骨軟骨の超音波撮像断層における切断面

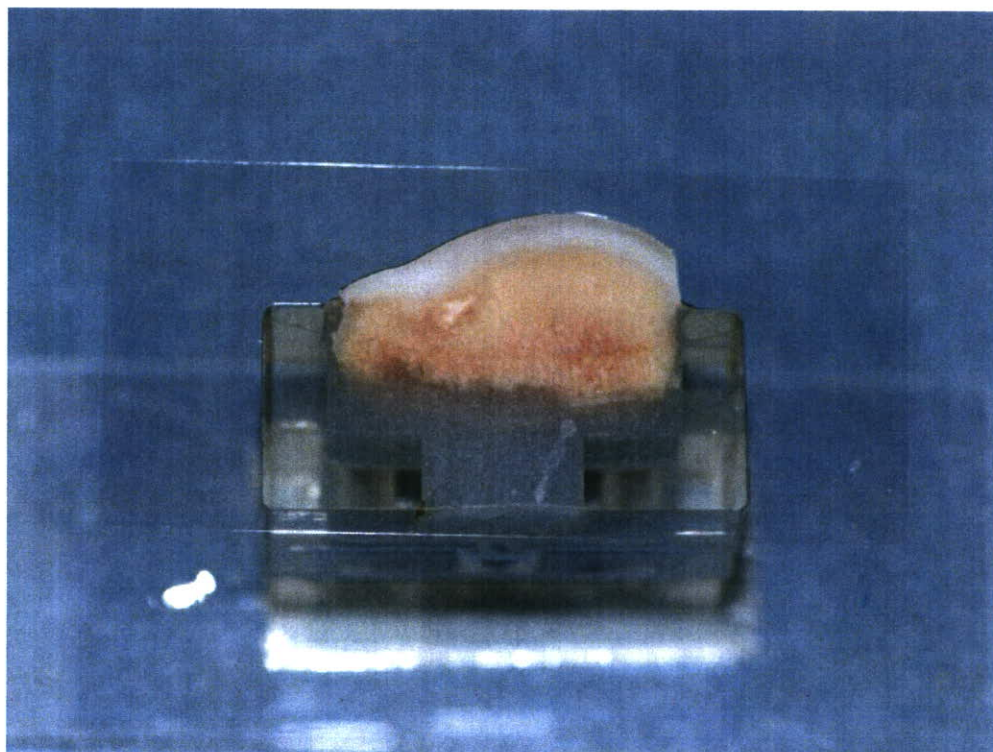
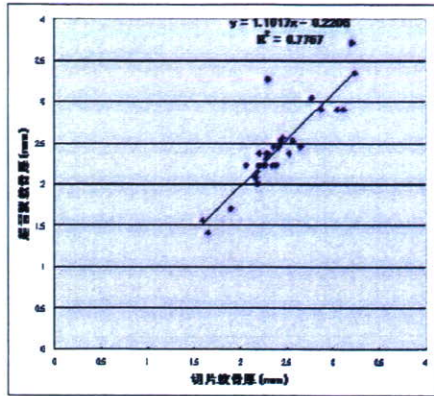


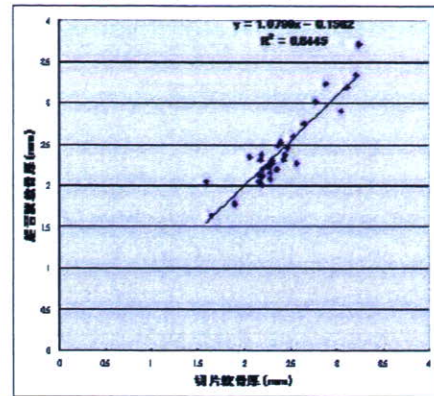


図8 解析結果

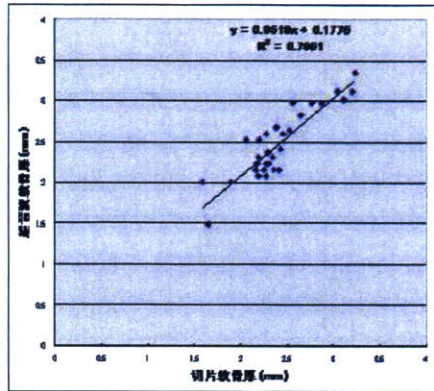
1Dプローブ ①Tissue Harmonic



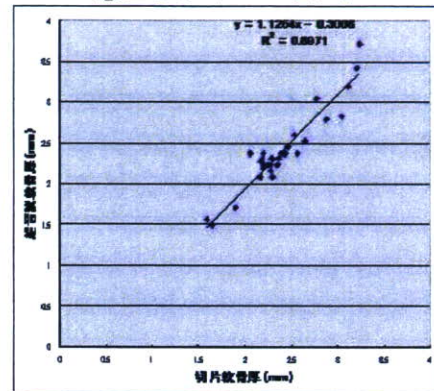
②空間コンパウンド



1.5Dプローブ ③Tissue Harmonic



④空間コンパウンド





## 超音波を用いた軟骨音速測定値と軟骨変性度の関係に関する研究

分担研究者 星 和人 東京大学ティッシュエンジニアリング部 客員准教授

**研究要旨** 超音波による関節軟骨形態定量評価を行うためには軟骨音速の高精度測定が必要である。基礎実験をもとにヒト関節軟骨の音速を測定し、軟骨の変性度による影響を検証した。その結果、変性度が重度であるほど、音速が低下する傾向にあることが示された。ただし、音速低下は有意なものではなく、実際の軟骨形態定量評価においては、一定の音速値を用いることが可能であることが示唆された。

### A. 研究目的

超音波による関節軟骨形態定量評価を行う上で、軟骨の音速を知ることは重要である。これまでの動物軟骨を用いた先行研究では、軟骨の変性が進行すると、軟骨音速が低下することが示唆されているが、ヒト関節軟骨においてはそのような研究がこれまでに行われていない。このため、手術中に切除されたヒト膝関節軟骨を用いて、軟骨音速値を計測し、その変性度による影響を検証した。

### B. 研究方法

超音波による生体組織音速測定法には、超音波が組織内を往復する時間を測定し、その往復距離を測定し算出する time of flight 法を用いることが一般的であり、今回この方法を用いて実験を行った。

#### ヒト骨軟骨片の取得

変形性膝関節症のために人工膝関節全置換術予定の患者より術前に同意を得た後、術中切除する大腿骨顆部の骨軟骨片を収集した。収集した骨軟骨片を速やかに生理食塩水に浸したガーゼにつつまみ、プラスチック製の袋に入れ、脱気密封し、 $-60^{\circ}\text{C}$ にて冷凍保存した。患者数4名、検体数は8であった。患者は全て女性で、平均年齢は  $73.8 \pm 5.4$  歳であった。また、術前に施行した患肢膝単純レントゲン像の変形性膝関節症重症度の指標である

Kellgren-Lawrence 分類（図1）は、全例においてIVであった。

#### 骨軟骨片の保持具への固定

保存された骨軟骨片を実験当日冷凍庫より取り出し、室温下にて生理食塩水中にて解凍をおこなった。以降実験経過中、解凍後の軟骨試料は湿潤状態を常に維持した。解凍後、バンドソー（SWD-250、藤原産業株式会社、兵庫県三木市）を用いて、 $16 \times 16 \times 11$  [mm]の骨軟骨試料を切出した（図2）。骨軟骨片を特注の亚克力製試料保持具（ $30\text{mm} \times 30\text{mm}$ ）（村井電材株式会社、東京）にレジン（オストロンII、ジーシー、東京）にて固定を行った（図3）。レジン硬化中は、熱が発生するため、軟骨を水にて十分に冷却を行った。

#### 軟骨の超音波往復時間の測定

##### 1. Radiofrequency（以下 RF）信号の取得

骨軟骨片を固定した亚克力保持具を円筒形の水槽を有する専用に作製した軟骨音速計測治具にマウントする（図4）。この治具には、X軸、Y軸（いずれも平行移動可能）、 $\theta$ 軸（円運動可能）を調節するためのマイクロメーターが水槽を保持するステージがついており、骨軟骨片の平面状の位置調節が可能となっている。また、トランスデューサーの保持具には、Z軸の調節マイクロメーターがついており、測定対象試料表面と超音波トランスデューサ

一との距離を調節できる機構となっている。水槽には、事前に脱気水を満たしておき、実験中、常時 25℃に保った。RF 信号の取得には、超音波パルサー (MODEL5800、オリンパス、東京) を使用し、信号の記録にはオシロスコープ (DPO4034、Tektronix、OR) を使用した。超音波トランスデューサー (V311-SU、オリンパス、東京) を保持具に取り付け、Z 軸調節機構にて軟骨試料表面から超音波トランスデューサーまでの距離を超音波トランスデューサーの焦点距離 (約 6mm) となるように調節した (図 5)。まず、アクリル保持具の RF 信号を用い、アクリル保持具の 4 つの角を同定する。 $\theta$  軸のマイクロメーターを使用し、アクリル保持具の端面がマイクロメーターの X 軸、Y 軸と平行となるように調節を行う。超音波パルサーの設定条件は、以下のごとく行った。

MODE=P/E, PRF=200Hz, ENERGY=25uJ, DAMPING=50ohm

次に、X 軸、Y 軸を調節し、軟骨表面および骨軟骨境界の反射波エコーが明瞭に確認できる点にて RF 信号の取得および記録を行った (サンプリング周波数: 1.25GHz)。ここで、記録点の X 軸 Y 軸の座標点を記録する。この記録点を通る X 軸 (後の試料切断方向) 断線上にてこの記録点から 0.5 mm 間隔に関節軟骨の試料の端から端まで RF 信号の取得および記録を行った。同様の記録をこの横断線から Y 軸方向に  $\pm 0.5$  mm ずらした横断線上にて行う。記録した RF 信号は、csv ファイルにて外部出力を行い、後の解析に用いた。

## 2. RF 信号の解析

出力された csv データを Microsoft Office Excel にて読み込み、グラフ表示する (図 6)。グラフより、軟骨表面からの反射 E<sub>1</sub>-波形と、さらに骨軟骨境界からの反射 E<sub>2</sub>- (石灰化軟骨) を特定する。特定した、2 つの波形の時間差 ( $\Delta t$ ) を求める。今回は、波形解析により RF 信号の Envelope (包絡線: 説明 1) を作成し、2 つのピーク間の時間差を  $\Delta t$  とした。

## 軟骨厚の測定

### 1. 軟骨スライスの作成

切断面の作成は、Minitom (Struers Inc., Westlake, OH) を使用して行った。ミニトームのアームにアクリル保持具を軟骨表面がダイヤモンドブレードに向くように固定する。ここで、アクリル保持具の既知の形状より、ミニトームの切断面調節ダイヤル (精度: 10 $\mu$ m) を用いて、切断面が RF 信号を取得した横断線に一致するように切断面の調節を行った後、カッティングを行う。カッティングした骨軟骨片の切断面からアクリル端面までの距離を 5 箇所にてマイクロメーター (MDC-MJ/PJ、ミットヨ、神奈川県川崎市) を使用し計測しその平均値を算出する。この距離が RF 信号取得横断線に一致、あるいは  $\pm 0.25$  mm 以内の誤差であるならば、それらの信号を使用し、 $\pm 0.25$  mm 以上の誤差が生じている場合はそれぞれ  $\pm 0.5$  mm の横断線上で取得した RF 信号を用いることとした。

### 2. 測定顕微鏡による測定

カットされた骨軟骨片をスライドガラス上に固定し、切断面に生理食塩水を滴下した後カバーガラスを覆う。スライドガラスごと測定顕微鏡 (MM-400/T、ニコン、東京) 上に設置する。この測定顕微鏡には、音速測定保持具と同様に X 軸、Y 軸 (いずれも平行移動可能)、 $\theta$  軸 (円運動可能) を調節するためのマイクロメーターがついたステージ (NH S 2x2、ニコン、東京) を設置した。アクリル保持具が既知の寸法であることを用いて、ステージを調節することで、RF 信号を取得した点にて RF 信号送信方向に軟骨表面から骨軟骨境界までの距離の測定を行う。(具体的には、アクリル保持具の外枠端面を利用して、顕微鏡ステージの  $\theta$  回転を使い、ステージの X-Y 軸とアクリル保持具の端面を一致させる。アクリル補治具の端面から音速計測部を特定し、その部分の軟骨厚 ( $T_c$ ) を測定する。)

### 軟骨音速の算出

求めた時間差は、音波が軟骨層を往復する

時間になり、次式により音速を算出する。

$$Vc = (2 \times Tc) / \Delta t$$

計測を行なった各ポイントに関して上式により音速を算出し、平均値とばらつきを持って、対象軟骨の音速とした。

### 組織学的評価

#### 1. 組織切片の作成

測定顕微鏡にて軟骨厚を測定した後、骨軟骨片を4%パラホルムアルデヒドに浸し固定を行う(4℃、3日間)。固定後、パラフィン包埋を行い、マイクロトームにて薄切を行う。薄切されたスライスのスライドガラス上に置き、固定を行う。染色は、Safranin O, Fast Greenを使用した二重染色にて行った(図7)。

#### 2. スコアリング

染色された組織切片を顕微鏡に乗せ、専用のデジタルカメラにて撮影を行った。撮影された画像データをパーソナルコンピュータ上にてスコアリングを行った。スコアリングはMankin score(図8)を用いて行った。

### 統計学的解析

組織学的スコアが軟骨音速値に与える影響・双方の相関を検証するために、回帰解析および相関解析を行った。p値が0.05以下であったとき、有意であるとした。

#### (倫理面への配慮)

今回の研究において関節軟骨の取得に際しては対象者に口頭および文書を用いて説明を行い、十分に理解し同意を得られたもののみを対象とした。また、全研究を通して対象者の個人情報には公開されない。

### C. 研究結果

試料全体のVcの平均(±標準偏差)は、1762.0(±81.1) m/sであった。組織学的スコアと軟骨音速との一次回帰直線の式および相関係数の二乗はそれぞれ、 $y = -24.26x + 1877.2$ 、 $R^2 = 0.2237$ であった(図

9)。p値は、0.251であり、有意ではなかったが、Mankin scoreが高いほど(軟骨の組織学的変性度が高いほど)軟骨の音速が減少する傾向にあった。

### D. 考察

#### 音速測定実験

これまでにヒト軟骨の音速を測定し報告している研究は数少なく、またその測定値にはばらつきがみられる。今回我々は、膝関節軟骨を用いた先行研究において精度が5%以内と検証されたTime of Flight法を用いてヒト関節軟骨の音速を測定した。その値は、1762 m/sと比較的これまでの報告と比較して大きく離れたものではなかった。

#### 組織学的スコアと音速の関係

今回、軟骨の変性度が音速に与える影響を検討するために、Mankin scoreを用いて検討を行った。その結果、関節軟骨の変性が重度であるほど、音速が低下する傾向がみられた。この結果は、これまでの動物の関節軟骨を用いた他の研究に合致するものである。軟骨の変性度が進行するとともに音速が低下する傾向にある結果が得られた。軟骨の音速が低下する原因としては、力学的特性の変化や組織の配向性の変化、組織組成の変化などが考えられる。

### E. 結論

ヒト大腿骨内側顆部の関節軟骨を用いて関節軟骨の音速を計測した。また、組織学的評価により関節軟骨の変性度をスコアリングし、その音速に与える影響を検討した。その結果、変性度が重度であるほど、音速が低下する傾向にあることが示された。ただし、音速低下は有意なものではなく、実際の軟骨形態定量評価においては、一定の音速値を用いることが可能であることが示唆された。

## F. 研究発表

### 5. 論文発表

Matsuyama J, Ohnishi I, Sakai R, Bessho M, Matsumoto T, Miyasaka K, Harada A, Ohashi S, Nakamura K. A New Method for Evaluation of Fracture Healing by Echo Tracking. *Ultrasound Medicine & Biol.*, In press

Y. Cheng, S. Wang, T. Yamazaki, J. Zhao, Y. Nakajima, S. Tamura, Hip cartilage thickness measurement accuracy improvement, *Computerized Medical Imaging and Graphics*, Vol.31,no.8, p.643-655, 2007

### 6. 学会発表

Matsuyama, J.; Ohnishi, I.; Sakai, R.; Miyasaka, K.; Harada, A.; Bessho, M.; Ohashi, S.; Matsumoto, T.; Nakamura, K.,

A new method for evaluation of fracture healing by Echo tracking, 8th EFORT congress, Transactions, F779, 2007

大橋 暁、大西 五三男、酒井 亮一、廣田 浩二、宮坂 好一、中村 耕三  
超音波を用いた Time of Flight 法による関節軟骨の音速測定、*日本整形外科学会誌*、81(8), S1012, 2007

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 3. 特許取得

超音波骨癒合診断装置 特願 2007-177056  
2007.7.5

超音波骨癒合診断装置 特願 2007-231114  
2007.9.6