

## 測定結果

### 症例1

左脛骨近位部の骨折に対し、ギプスによる保存治療を行った症例である。受傷後4週から47週の間11回の計測を行った。4週目より11週目まで急激なET変形角の減少を示し、その後も減少傾向が続き、21週以降の測定では健常側より少ないET変形角を示した(図4-1, 2)。

### 症例2

右脛骨骨幹部の骨折に対し、髓内釘により固定を行った手術症例で、術後5年2カ月から5年8カ月の間に3回の計測を行った。6カ月の経過にて明らかな減少傾向はみられず、健常側に対して通常に5倍以上の変形角を示していた(図5-1, 2)。

### 症例3

右脛遠位部の骨折に対し、ステンレス製プレートにより固定を行った手術症例で、術後9週から17週の間4回の計測を行った。8週の経過ではET変形角の減少傾向はわずかにみられる程度であったが、骨癒合の進行は確認できた(図6-1, 2)。

## 考察

いずれの骨折治療法においても骨癒合程度の判断は、治療上非常に重要な要件である。しかし現在、この判断の多くは前述のとおりレントゲンにより行われており、評価者によって判断が異なる。また、診察ごとに行われるレントゲン撮影による放射線被曝も問題である。非侵襲に、かつ正確な定量評価が不可能であった骨癒合程度の判断が、可能となればその臨床的意義は大きい。曲げ変形角の検出精度は、0.004度と骨癒合の経過を検出するに十分であった。

症例1はギプス治療が行われた症例であるが、

受傷後4週と早時期からの測定で、ET変形角も約1度と大きな値が検出された。受傷後4週では、血腫や繊維性組織による弱い結合がほとんどであり、レントゲンにても仮骨はほとんど確認できない。その後、レントゲンでは19週まで仮骨の領域が増した。その後、仮骨領域の骨硬化は進行し、周囲の皮質に近づいた。ET変形角は19週以降も減少を続けるが、21週以降では健常側より少なくなる。レントゲンにおいて26週以降では、仮骨部の変化はほぼ判別困難となるが、ET変形角はその後も減少した。ET変形角は指数関数的に有意に減少した。これらの結果より、ET計測による骨癒合部の剛性が定量的に評価可能であった。

症例2は髓内釘による手術症例である。手術後5年を経過した症例で、独歩は可能であるが、長時間の歩行や走行にて骨折部に痛みがあったためET測定を行った。レントゲンではHypertrophic Nonunionの様態を示していたが、レントゲンの経時変化からは骨癒合の進行が全くないとの判断は難しかった。ET測定の結果、ET変形角は指数関数的に優位な減少はなかった。ET計測により、定量的に骨癒合不全であることが評価できた。

症例3は金属プレートによる骨接合術の症例である。レントゲンでは骨折線が骨長軸方向に80mmに及ぶ斜骨折で、192mmの長いプレートにより固定された。骨折線が広範に及ぶこと、高齢であることから骨癒合の遅延が予想された症例である。レントゲンでも仮骨形成は測定期間において明らかな変化がなかった。ET測定では、0.265度と金属プレートの変形角が検出可能で、その後、わずかなET変形角の減少が検出されたが指数関数的な減少はなく、ET測定による評価により遅延治癒との判断が可能であった。内固定材料そのものの変形を生体内で検出可能であった。

BMD : bone mineral density (骨密度)

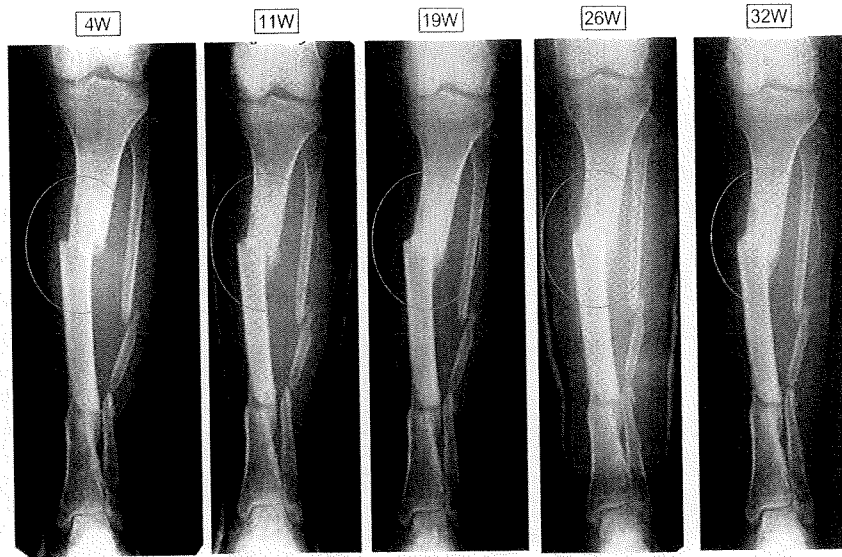


図 4-1 症例 1 の骨折部 X 線像の経時変化

24 歳女性。左脛骨近位部の骨折に対しギプスによる保存治療を行った症例の測定結果  
(文献 6 より引用改変)

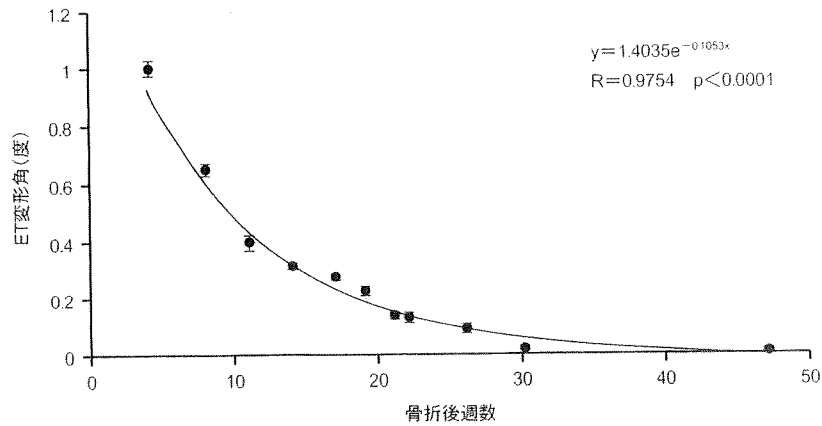


図 4-2 ET 変形角の経時変化

4 週目より 11 週目まで急激な ET 変形角の減少を示し、その後も減少傾向が続き、21 週以降の測定では健常側より少ない ET 変形角を示した。

(文献 6 より引用改変)

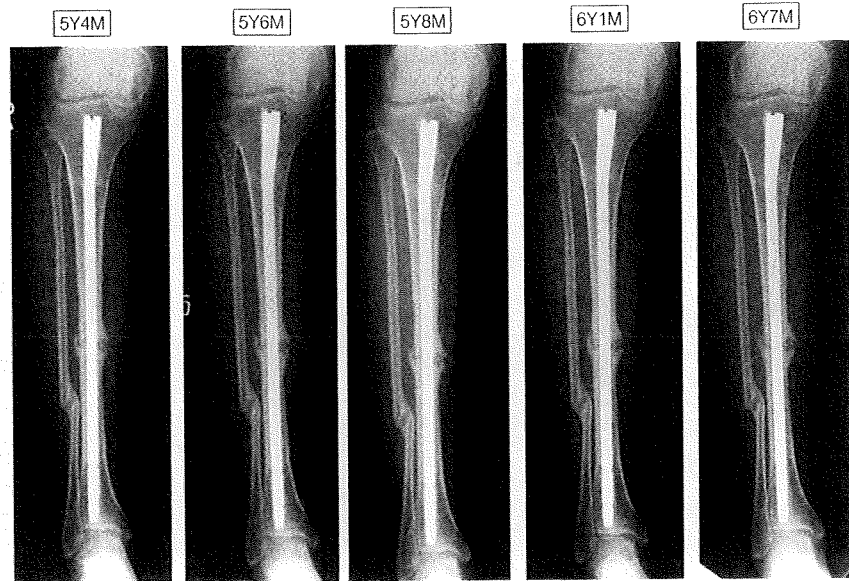


図 5-1 症例2のX線像の経時変化

26歳女性。右脛骨骨幹部骨折に対して、髓内釘による内固定術が行われた。  
(文献6より引用改変)

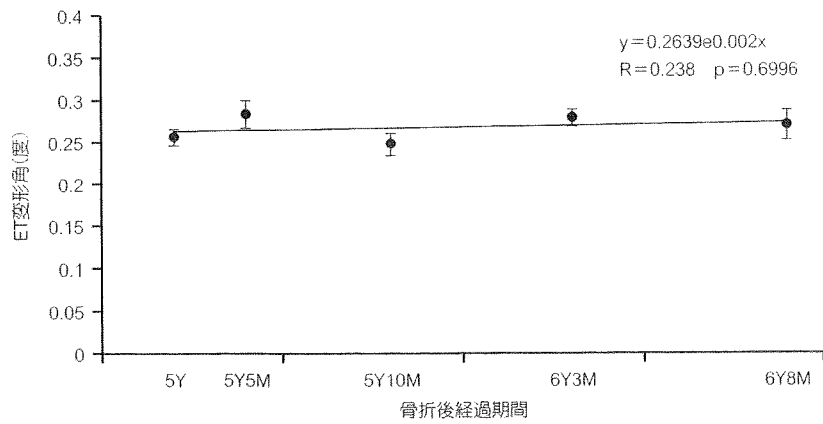


図 5-2 ET変形角の経時変化

6カ月の経過にて明らかな減少傾向はなく、健常側に対しても常に5倍以上の変形角を示していた。

(文献6より引用改変)

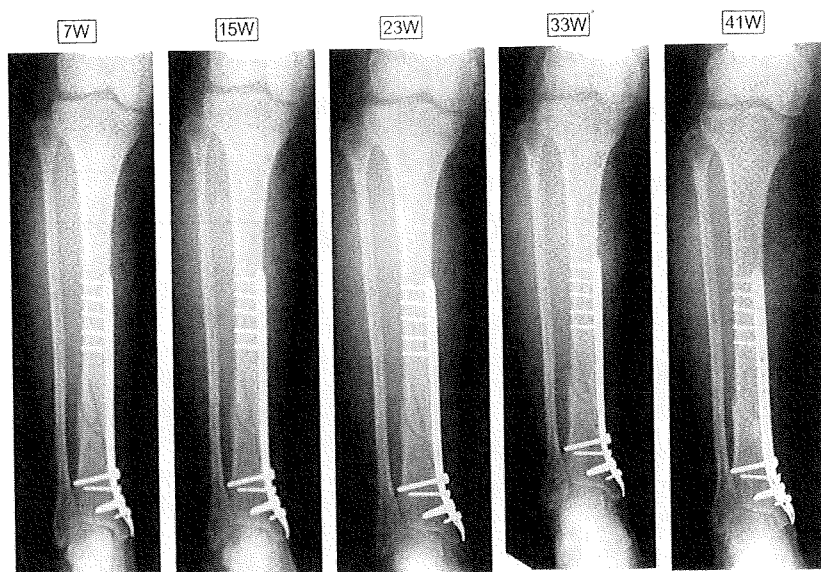


図 6-1 症例3の骨折部X線像の経時変化

右脛遠位部の骨折に対し、ステンレス製プレートにより固定を行った手術症例。  
(文献6より引用改変)

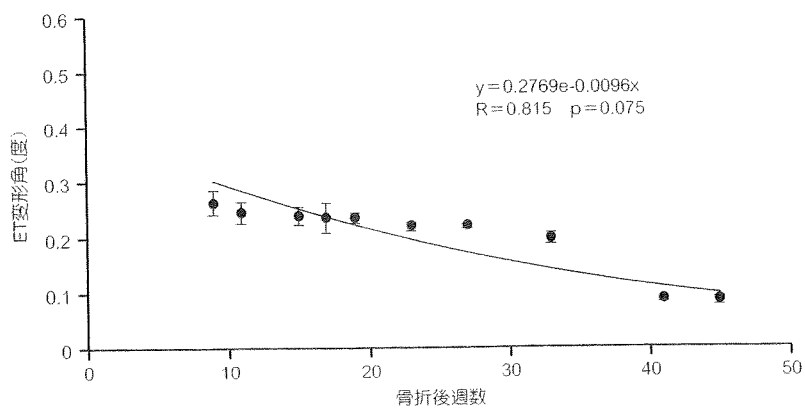


図 6-2 ET変形角の経時変化

術後9週から17週間に4回の計測を行った。8週の経過ではET変形角の減少傾向はわずかであった。

(文献6より引用改変)

この3点曲げによるET計測により、骨癒合の進行と遷延を非侵襲に定量的に判別可能であった。既存の骨癒合判定法において非侵襲に骨の力学的特性を高精度に定量評価できたものではなく、このET測定により初めて測定が可能となった。

骨癒合判定を目的とし骨折患者を対象に測定を行っているが、ET計測の対象としては健常骨の測定も可能である。年齢により骨強度が低下することは周知の事実であり高齢化が進む現在、骨粗鬆症患者の数は急速に増加し、社会問題になっている。現在、骨強度を非侵襲に評価可能な測定法は存在せず、現状においてそのほとんどが骨密度(bone mineral density:BMD)測定により代用されている。しかし、BMD測定が強度と必ずしも相関しないことはすでに明らかにされている<sup>5)</sup>。ET計測による骨強度判定が可能となれば、その応用範囲は飛躍的なものになると考える。

#### おわりに

本法は、非侵襲に骨癒合の強度(剛性)を定量的に評価でき、骨癒合の経過を力学的指標で診断ができる。骨癒合の遷延や不全を診断できるとともに、今後の治療法の効果判定にも適応できると思われる。特定の骨折に対して、実施している治療が効果的かあるいは治療法を追加・変更する必要があるかどうかを、感受性高く評価できれば、常に

最適な骨折の治療法を選択できる。そのための定量的診断法として有用性を発揮する可能性がある。

#### 文 献

- 1) Bhandari M, et al : A Lack of Consensus in the Assessment of Fracture Healing Among Orthopaedic Surgeons. *J OrthopTrauma* 16(8) : 562-566, 2002.
- 2) Hokanson DE, Mozersky DJ, Sumner DS, et al : A phase-locked echo tracking system for recording arterial diameter changes *in vivo*. *J Appl Physiol* 32 (5) : 728-733, 1972.
- 3) J Matsuyama, et al : A new method for measurement of bone deformation by echo tracking. *Med Eng & Phys* 28 : 588-595, 2006.
- 4) R Sakai, et al : A Minute Bone Bending Angle Measurement Method Using Echo-Tracking for Assessment of Bone Strength *In Vivo*. *Proc IEEE Ultrasonics Symposium*:241-244, 2008.
- 5) Cranney A, Guyatt G, Griffith L, et al : Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. IX : Summary of meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. *Endocrine Reviews* 23 (4) : 570-578, 2002.
- 6) Matsuyama J, Ohnishi I, Sakai R, et al : A New Method for Evaluation of Fracture Healing by Echo Tracking. *Ultrasound in Med & Biol* 34 (5) 775-783, 2008.

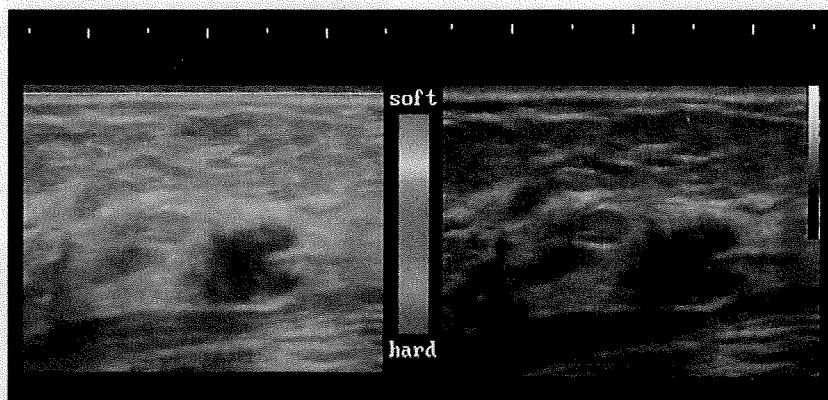


# 超音波医学

Vol.36, Supplement  
April 2009

JAPANESE JOURNAL OF MEDICAL ULTRASONICS

日本超音波医学会  
第82回学術集会プログラム・講演抄録集



OFFICIAL JOURNAL OF  
THE JAPAN SOCIETY OF ULTRASONICS IN MEDICINE  
社団法人日本超音波医学会

## 超音波による関節軟骨音速の高精度計測法

宮坂好一<sup>1</sup>、廣田浩二<sup>1</sup>、酒井亮一<sup>1</sup>、皆川栄一<sup>1</sup>、村下 賢<sup>1</sup>、大橋 暁<sup>2</sup>、大西五三男<sup>2</sup>、中村耕三<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>アロカ株式会社研究所、<sup>2</sup>東京大学医学部整形外科教室

## 【はじめに】

近年、高齢化の進展に伴い変形性関節症の患者数が増加している。超音波を用いて関節軟骨の厚みや体積を定量評価するためには、関節軟骨の音速を把握する必要がある。そこで、in-vitro で関節軟骨音速を高精度に計測する方法を考案したので報告する。

## 【方法】

反射法で軟骨媒質中の超音波の飛翔時間を計測し、この値と光学的な軟骨断面の厚み計測値から軟骨の音速を求める<sup>1)</sup>。超音波法での計測位置と光学的な厚み計測を行う断面位置とを高精度に一致させるために、Fig1 に示す専用の計測治具を開発した。Fig2 に示す軟骨試料を収納する専用アクリルボックスを用意し、このボックスの側面を基準面に設定することで、超音波法と光学法の音速計測位置を精度良く一致させた。目標の位置精度は0.1mm以内とした。使用した超音波探触子はPanametrics社製NDT-M311で、送波した超音波の中心周波数は7.3MHz、-3dB帯域幅は7.9MHz、焦点距離は63.5mm、焦点位置での-6dBビーム幅は1.03mmである。送受信機は同社製NDT-5800で、反射エコーはデジタルオシロスコープで収集し、このデータをパソコンへ転送してオフライン処理した。超音波の飛翔時間は、軟骨境界面からの反射エコー振幅のピーク位置を検出して求めるが、受信RF信号を解析信号に変換後、これの絶対値の最大値を測定媒質の境界位置とした。今回は、豚の膝軟骨を対象に音速計測を試みた。

## 【結果】

考案した軟骨音速計測治具を用いて、超音波法と光学法との計測位置を目標精度内で一致させることができた。そこで成豚と幼豚の大腿骨遠位顆部の膝関節軟骨を対象に、軟骨音速を計測した結果、成豚の軟骨音速は1717 ± 105m/s、幼豚は1488 ± 48m/sで、成豚軟骨の音速が速かった。

## 【まとめ】

関節軟骨の音速を精度良く計測する方法を考案し、性能を評価した。

## 【参考文献】

- 1) S.L.Myers et al., Experimental assessment by high frequency ultrasound of articular cartilage thickness and osteoarthritic changes, J. Rheumatol., 22, 109-116, 1995.



## Accurate Method for Measuring the Speed of Sound in Joint Cartilage by using Ultrasound

Koichi MIYASAKA<sup>1</sup>, Koji HIROTA<sup>1</sup>, Ryoichi SAKAI<sup>1</sup>, Eiichi MINAGAWA<sup>1</sup>, Masaru MURASHITA<sup>1</sup>, Satoru OHASHI<sup>2</sup>, Isao OHNISHI<sup>2</sup>, Kozo NAKAMURA<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Research Laboratory, Aloka Co., Ltd., Tokyo, Japan, <sup>2</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

## 82-H-002

## RVSの関節画像への応用：超音波画像と3T MRIの同時並列表示

新津 守

首都大学東京健康福祉学部放射線学科

## 【目的】

四肢関節の表在超音波画像と三次元撮像によるMR画像の同時表示を試みる。

## 【対象と方法】

超音波画像と三次元CT・MR画像を融合させるReal-time Virtual Sonography (RVS)法(日立メディコ)を関節画像に応用した。本手法は磁気発生器からの三次元空間位置情報を探触子に内蔵した磁気センサーで感知する。この超音波画像の断面位置(x, y, z空間位置とx, y, z軸に対する回転角度)を、双方の座標系を変換、対比することで、事前に撮像した三次元画像から、同一の断面をリアルタイムに描出するものである。すでに多列CTによる三次元CTデータを用いて、肝腫瘍の位置確認などに臨床応用がなされている。超音波診断装置はEUB-7500(日立メディコ)、リニア型プローブ(6-14MHz)、MRIはAchieva 3.0T(Philips)、8-channel Knee coilを使用した。既往症のない成人男性の膝関節と肩関節の三次元MR画像を撮像し、そのDICOMデータを超音波診断装置のRVSシステムに移行、MRI撮像時と同様の肢位にて超音波画像を得た。

## 【結果と考察】

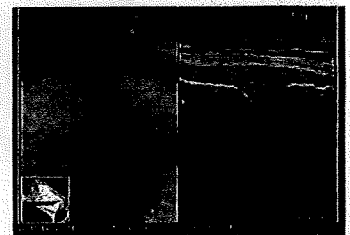
膝関節と肩関節の表在超音波画像に対応するMRI断面がほぼリアルタイムに表示できた。両者共に空間分解能は0.数mmのポテンシャルを有し、膝関節の内側側副靭帯(MCL)浅層と深層が超音波画像とMRIの両者で鑑別、確認可能であった。またMCL浅層と筋膜層の区別、MCL脛骨付着部の立体的構造の確認が可能であった。表在超音波画像は高詳細画像が得られ、関節の微細構造描出には今

後の応用が大いに期待されている。ただし関節の超音波画像は現在、広く普及したとは言えず、さらにその描出は術者の技量、つまりは解剖学的知識に大きく依存する。超音波画像断面を、すでに解剖学的に認識されているMR画像をリアルタイムに並列表示することにより、微細構造の把握、客観的評価が可能となり、初学者の教育にも有用とも思われる。

靭帯、半月板、軟骨など、微細な構成要素を有する関節画像の超音波とMRIの同時描出の精度は、初期ランドマーク設定に大きく左右される。この初期設定と操作中の微調整が今後の課題と考えられる。

## 【結論】

RVSを関節画像に応用し、超音波画像とMRIの同時並列表示が可能であった。



## Virtual Sonography of the Joints: Simultaneous Display of the Sonogram and 3T-MRI

Mamoru NIITSU

Radiology, Tokyo Metropolitan University

第23回

The 23rd Annual Meeting of Japanese Association of  
External Fixation and Limb Lengthening

# 日本創外固定・骨延長学会

プログラム・抄録集

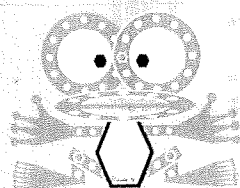


会期 2010.1/15(金)-1/16(土)

会場 秋葉原コンベンションホール

会長 落合 直之

筑波大学大学院人間総合科学研究科教授



Annual Meeting of  
JAFL 2010



## 2-02

### 創外固定を用いたウサギ脛骨骨切りモデルにおける低出力超音波パルスの効果—マイクロCTを用いた3次元の Bone Strength Indices 評価—

○飛田 健治、大西 五三男、松本 卓也、大橋 暁、別所 雅彦、金子 雅子、  
中村 耕三

東京大学整形外科

#### Effect of low-intensity pulsed ultrasound stimulation on gap healing in a rabbit osteotomy model with external fixation evaluated by micro computed tomography-based 3-dimensional Bone Strength Indices

○Kenji Tobita, Isao Ohnishi, Takuya Matsumoto, Satoru Ohashi, Masahiko Bessho,  
Masako Kaneko, Kozo Nakamura

Dept. of Orthop. Surg., Fac. of Med., Univ. of Tokyo

【背景】低出力超音波パルス（以下LIPUS）治療の骨癒合への促進効果は臨床・基礎研究から実証されている。マイクロCT（以下 $\mu$ CT）は硬組織試料の非侵襲的3次元形態評価ができ、骨折治癒過程の精確な評価が可能である。Bone Strength Indices (BSI's)を用いた先行研究による骨強度評価は2次元評価であり、3次元(3D)的に評価したものは無い。

【目的】創外固定を用いたウサギ脛骨骨切りモデルにおける低出力超音波パルスの効果を $\mu$ CTを用いて評価する。

【材料と方法】21-23週齢、体重約4kgで雄の日本白色家兎42羽を用いた。吸入麻酔下右脛骨の骨切りを行い、2mmのGapを作成し両側式の創外固定を行った。LIPUSの照射/非照射群に分け、観察期間を4,6および8週とした。術後3日より1週間に6日、吸入麻酔下に20分間照射し、非照射群は照射群と同様の条件でダミーの振動子を用いて模擬照射を行った。観察終了後と殺し、 $\mu$ CT撮影を行った。関心領域はgapの中心1mmとし、XYZ空間上に設置した。X,Y及びZ軸周りのBSI'sを求めそれぞれ評価した。統計にはa one-way ANOVA testを行い、有意水準は $p < 0.05$ とした

【結果】照射群は非照射群と比べ6週以降のBSI'sはX,Y及びZ軸すべての方向で有意に高値であった。4,6及び8週の非照射群間の比較では、BSI'sに有意差はなかった。また、4,6及び8週の照射群間の比較は3群間のBSI'sに有意差はなかった。

【考察】BSI'sは慣性モーメントである。Ferretti等によって力学試験による実測値とCT断面像による2次元のBSI'sとの相関関係は立証されている。今回、3次元評価を行いLIPUS照射は捻じれ強度、曲げ強度を骨癒合過程早期に回復させることが示唆された。しかし、その後の骨強度回復に関しては不明である。

第83巻

第8号

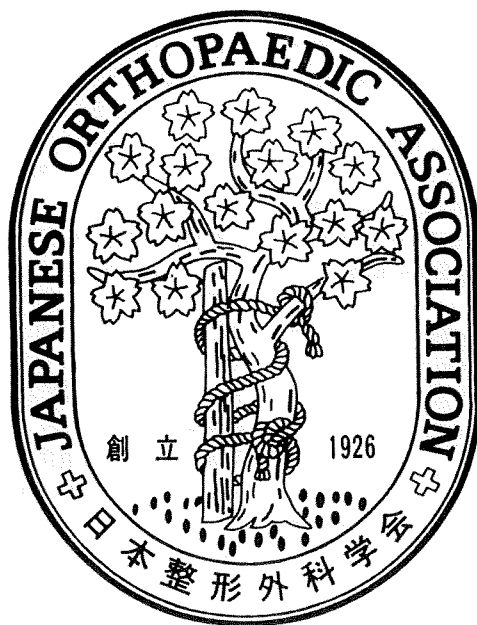
# 日本整形外科学會雜誌

NIPPON SEIKEIGEKAGAKKAI ZASSHI

## The Journal of the Japanese Orthopaedic Association

Vol.83 No. 8 August 2009

Proceedings of the 24th Annual Research Meeting  
of the Japanese Orthopaedic Association



日整会誌

社団法人 日本整形外科学会

J. Jpn. Orthop. Assoc.

## 2-E-5

GFP reporter を用いたマウス骨折治癒過程における woven bone 形成の評価

牛久 智加良<sup>1</sup> Douglas J. Adams<sup>2</sup>  
David W. Rowe<sup>3</sup> 斎藤 充<sup>1</sup> 丸毛 啓史<sup>1</sup>

【目的】われわれはこれまでに、ラット1型コラーゲン(Col 3.6)およびヒトオステオカルシン(hOC)プロモーター領域を使い、骨芽細胞の分化段階に応じて GFP (Green fluorescence protein) が発現する Dual Transgenic (Tg) マウスを作製し、石灰化過程における細胞分化と基質合成の関係について報告してきた。今回、骨折治癒における仮骨の石灰化過程について同モデルを用いて解析したので報告する。

【方法】Col3.6GFPcyan, hOCGFPtpz dual Tg マウス(8週齢)の脛骨に閉鎖式骨折を作製した。骨折後7, 10, 14と30日目に脛骨を回収し蛍光顕微鏡を用いて GFP の発現を観察した。また屠殺前に Xylenol orange (XO) を投与し、石灰化評価と HE および Safranin O 染色による組織学的評価も行った。

【結果】骨折後7日目になると、仮骨部に Col3.6 陽性細胞 (Col3.6+) に囲まれた XO 陽性の膜性骨化による woven bone (w/b) を認めた。10日目には、その表面に多くの Col 3.6-hOC 両陽性細胞が観察され、w/b はその厚みを増していた。14日目までに軟骨は内軟骨性骨化による w/b に置換された。この時、仮骨中心部の w/b は主に Col3.6+ に囲まれていたのに対し、骨折部、new cortical shell では主に Col3.6-hOC 両陽性細胞に囲まれていた。30日目には、仮骨中心部の w/b は骨髄様組織に置換されたが、骨折部、new cortical shell ではその厚みを増していた。

【考察】これまで仮骨石灰化過程は、w/b 形成を放射線、組織学的に観察することで評価されてきた。しかしその過程を GFP dual Tg マウスを用いて観察すると、hOC 陽性細胞に囲まれた w/b が仮骨部に残存するのに対し、Col3.6 陽性細胞に囲まれた w/b は早期に骨髄様組織に置換されることが明らかとなった。GFP トランスジェニックマウスを用いた骨折モデルでは、分化度の異なる細胞が仮骨石灰化過程に及ぼす影響を時間的に空間的に解析することが可能である。今後、骨折治癒過程に及ぼす薬剤や力学刺激などの影響を評価するモデルとして有用と考えられる。

<sup>1</sup>慈恵医大整形 <sup>2</sup>Dept. of Orthop. Surg., School of Medicine, Univ. of Connecticut Health Center, Farmington, CT, USA

<sup>3</sup>Dept. of Reconstructive Sciences, School of Dental Medicine, Univ. of Connecticut Health Center, Farmington, CT, USA

## 2-E-6

低出力超音波パルス治療の骨癒合リモデリング期に対する効果 —マイクロ CT を用いた仮骨の髄腔化・皮質骨化の定量評価—

飛田 健治 大西 五三男 松本 卓也 大橋 暁  
別所 雅彦 松山 順太郎 金子 雅子 中村 耕三

【背景】低出力超音波パルス(以下 LIPUS)治療の骨癒合への促進効果は臨床・基礎研究から実証されている。マイクロ CT (以下  $\mu$ CT) は硬組織試料の非侵襲的三次元形態評価ができ、骨折治癒過程の精確な評価が可能である。骨折のリモデリング期は仮骨の皮質骨化と共に髄腔化が起こり、骨癒合強度の回復に非常に重要であるが、これらを  $\mu$ CT を用いて三次元的に定量評価した先行研究はない。

【目的】LIPUS 照射がリモデリング期の仮骨に及ぼす効果を  $\mu$ CT を用いて評価する。

【材料と方法】21-23 週齢、体重約 4 kg で雄の日本白色家兎を用いた。吸入麻酔下右脛骨の骨切りを行い、2 mm の gap を作成し両側式の創外固定を行った。LIPUS の照射/非照射群に分け、観察期間を 4 および 8 週とした。LIPUS 照射は、術後 3 日より 1 週間に 6 日、吸入麻酔下に 20 分間行い、非照射群は照射群と同様の条件でダミーの振動子を用いて模擬照射を行った。観察終了後と殺し、仮骨の  $\mu$ CT 撮データを、骨量ファントムで定量化し評価した。対象部位は gap の中心 1 mm とし 200 mg/cm<sup>3</sup> で 2 値化した仮骨を endosteal (以下 E), intercortical (I), periosteal region (P) の 3 領域に分け、各領域における bone volume (以下 BV), bone mineral content (以下 BMC), BMC/BV の計測と、三次元的な二次モーメント、慣性モーメントと Stress-Strain Index (以下 SSI) から骨癒合強度予測を行った。LIPUS 照射/非照射群の差の検定には t 検定を行った (有意水準 < 0.05)。

【結果】4 週ではすべての評価項目で有意差が見られなかったが、8 週において、LIPUS 照射群は非照射群に対して BMC/BV は E, I, P 共に有意に高値、BMC は E では低下しており、I, P で有意に高値、BV は I で有意に高値であった。また 8 週では二次モーメント、慣性モーメント、SSI 共に有意に高値であった。

【考察】 $\mu$ CT を用いて、リモデリング期の仮骨髄腔化・皮質骨化に着目し定量評価した先行研究はない。今回の結果から LIPUS は仮骨の髄腔化・皮質骨化を促進した。またモーメント、SSI の増加から LIPUS は骨強度をより増加させることが示唆された。

東大大学院整形

# New Orleans

2010

56th Annual Meeting  
of the Orthopaedic Research Society

March 6 - 9, 2010 • New Orleans, LA



## Transactions

Bone & Joint  
DECADE  
2002 - USA - 2011

[Abstracts](#)

[Program](#)

[Copyright](#)

[Help](#)

# Effect of low-intensity pulsed ultrasound stimulation on gap healing in a rabbit osteotomy model evaluated by micro computed tomography-based 3-dimensional cross-sectional moment and cross-sectional moment of inertia

<sup>1</sup>Tobita, K; <sup>+</sup><sup>1</sup>Ohnishi, I; <sup>1</sup>Matsumoto, T; <sup>1</sup>Ohashi, S; <sup>1</sup>Bessho, M; <sup>1</sup>Kaneko M; <sup>1</sup>Matsuyama, J; <sup>1</sup>Nakamura, K  
<sup>+</sup><sup>1</sup> Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan  
ohnishii-dis@h.u-tokyo.ac.jp

## INTRODUCTION

Low-intensity pulsed ultrasound stimulation (LIPUS) reportedly enhances restoration of strength at fracture healing sites according to previous experimental studies [1]. However, evaluation of strength by mechanical testing is limited to only one direction, with either bending or torsion. Quantitative micro computed tomography ( $\mu$ CT) is able to acquire 3-dimensional (3D) histomorphometric data and density distributions of hard tissues, from which strength-related parameters can be calculated to allow strength analysis of the tissue. Strength-related parameters such as cross-sectional moment (CSM) and cross-sectional moment of inertia (CSMI) have been used to evaluate strength of the fracture healing site and reportedly correlate well with measured strength from mechanical testing [2]. However, previous studies have performed 2-dimensional (2D) analyses, and 3D evaluations have not been described. The purpose of this study was thus to investigate the effects of LIPUS on osteotomy healing using conducting 3D analyses of strength-related parameters of CSM and CSMI derived from  $\mu$ CT of the osteotomy gap.

## MATERIALS AND METHODS

### Surgical Procedures and LIPUS Treatment

A total of 42 skeletally mature between 21 and 23-week-old male Japanese white rabbits (Kitayama Labes, Nagano, Japan), weighing 3.4-4.0 kg, were used for this study. Under general anesthesia, four transfixation pins (diameter, 2 mm; length, 50 mm) were inserted at the metaphyseal regions of the tibia in the frontal plane using a custom-made surgical pin driver. Transverse osteotomy was performed using a T-saw (blade thickness, 0.36 mm) with continuous irrigation with saline solution across the mid-shaft of the tibia at 12 mm distal to the tibio-fibular junction. The osteotomy with a 2-mm gap was immobilized with four pins fixed to an external fixator with double side bars.

The LIPUS system (model SAFHS<sup>®</sup>2000J, Teijin Pharma, Tokyo, Japan), which transmits 200- $\mu$ sec burst of 1-MHz sine waves repeated at 1kHz with an average intensity of 30mW/cm<sup>2</sup>, was used. After postoperative day 3, LIPUS was continued under general anesthesia for both the treatment group (n=7/group/time point) and the control group (n=7/group/time point). The transducer was placed onto the anterior surface of the operated leg with ultrasound coupling gel, for 20 min, six times/week, for 4, 6, or 8 weeks. The control group also received a sham inactive transducer under exactly the same condition as the LIPUS group.

### $\mu$ CT Analysis

All animals were euthanized and the entire tibia was removed. The harvested tibia was scanned by  $\mu$ CT system (Scan X mate-E090, Comscantecno, Kanagawa, Japan). The scan was performed along the long axis of the diaphysis, with a voltage of 60 kVp and a current of 80 mA. Scan range covered 5 mm proximal and 5 mm distal to the center of the gap, with a resolution of 28.57  $\mu$ m<sup>3</sup> voxel size. The region of interest (ROI) was set at the callus healing area (Fig. 1) defined by the gap filled with callus in 2D CT and extended 0.5 mm proximally and distally to the center of the osteotomy gap with a total of 36 CT axial scans. 3D reconstruction of mineralized tissue was performed using a TRI-BONE system (Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan). A threshold for newly formed mineralized callus was set as 200 mg/cm<sup>3</sup>. Morphometric parameters used for evaluation were mineralized callus volume (BV, cm<sup>3</sup>) and mineralized callus contents (BMC, mg) calculated from the contoured ROI in 3D images, and volumetric bone mineral density of mineralized tissue comprising the callus (mBMD, mBMD = BMC/BV, mgHA/cm<sup>3</sup>).

Center of gravity for the ROI was calculated automatically. The Z (polar) axis was defined to coincide with the long axis of the tibia. The Y axis was defined as parallel to the transfixation pins, which were also parallel to the posterior surface of the tibia (mediolateral (ML) direction). The X axis was defined as perpendicular to the YZ plane, and was directed anteroposterior (AP) on the tibia (Fig. 2).

### Three-dimensional CSM and CSMI

An optional line (I) can be drawn in this XYZ coordinate. The angle of the Z axis ( $\theta$ ) was measured, and also the degree of angle of the X axis ( $\phi$ ) was measured (Fig. 3). The 3D CSM [I ( $\phi, \theta$ )] around this line was calculated as shown. 3D CSM was calculated using the following

equation:  $I(\phi, \theta) = \int r^2 dV$  (mm<sup>5</sup>), where r is the distance of a voxel to the center of gravity (mm) and dV (BV/voxel) is the area of a voxel (mm<sup>3</sup>). The axial CSM was defined as CSMx: I (0, 90), CSMy: I (90, 90), whereas the polar CSM was also defined as CSMp: I (any, 0). We evaluated these three parameters as bone strength indices.

3D CSMI weighted by density distribution was calculated using the following equation:  $I'(\phi, \theta) = \int r^2 dm = \int \rho r^2 dV$  (mgmm<sup>2</sup>), where r is the distance of a voxel to the center of gravity, dm is the measured mineral content of a voxel in callus (BMC/voxel),  $\rho$  is the measured volumetric callus mineral density (mBMD), and dV (BV/voxel) is the area of a voxel (mm<sup>3</sup>). CSMI x: I' (0, 90), CSMI y: I' (90, 90), and CSMI p: I' (any, 0) were calculated. These three parameters were evaluated as bone strength indices.

### Statistical Analysis

The  $\mu$ CT evaluations were analyzed using a one-way ANOVA test. Data were all presented in mean and standard deviation (SD). Statistically significant difference was set at p<0.05.

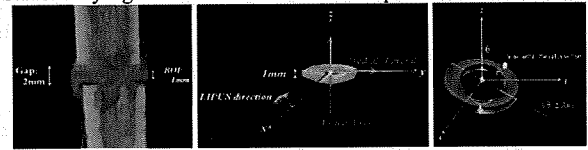


Fig. 1 (left): Region of interest was set at the callus healing area. It defined as a center of the osteotomy gap with a width of 1 mm.

Fig. 2 (middle): The XYZ plane was showed. The LIPUS transducer was placed onto the anterior surface of the operated leg

Fig. 3 (right): An optional line (I) can be drawn in this XYZ coordinate.

## RESULTS

### Three-dimensional CSM and CSMI

3D CSMs at the same time point were compared, values for the LIPUS groups were significantly higher than those for control groups for CSMx at 6 weeks (p < 0.05) and CSMp at 8 weeks (p < 0.05), Fig. 4A.

3D CSMI at the same time point were compared, values for the LIPUS groups were significantly higher than those of the control groups for MOIx, MOIy, and MOIp at 6 and 8 weeks (Fig. 4B).

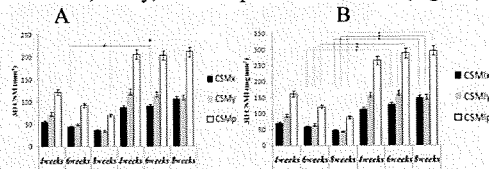


Fig. 4A-B. The result of 3D CSM (left) and 3D CSMI (right) were showed. \* = p < 0.05.

## DISCUSSION

CSM and CSMI are related to architectural strength and show bending and torsion properties. CSMI is a more reliable predictor than CSM for actual bone strength. CSMIp indicates torsional bone property, whereas the axial CSMI of CSMIx and CSMIy indicate bending properties around the X and Y axes, respectively. We adopted 3D strength-related architectural parameters derived from  $\mu$ CT scans of the callus to evaluate the effects of LIPUS on restoration of mechanical integrity of the gap healing site.

Our results demonstrate that these bone strength parameters improved with LIPUS during the early phases. However, whether the late phase of callus formation is influenced remains unclear. The present study did not conduct mechanical testing, but  $\mu$ CT scans evaluated strength-related parameters in three independent planes. Mechanical testing can evaluate strength in only one plane for one specimen. Our results demonstrated that LIPUS improves initial restoration of strength at the healing site in bending in AP and ML planes, as well as torsion.

## REFERENCES

- Pilla AA et al, *J Orthop Trauma*, 1990
- JL Ferretti et al, *J Musculoskel Neuron Interact*, 2001

## ACKNOWLEDGEMENT

This project was supported by Teijin Pharma Limited, Tokyo, Japan.

# Evaluation of the Accuracy of Articular Cartilage Thickness Measurement by Conventional and Real-time Spatial Compound Ultrasonography

<sup>1</sup>Ohashi, S; <sup>+</sup><sup>1</sup>Ohnishi, I; <sup>1</sup>Matsumoto, <sup>1</sup>Bessho, T; <sup>1</sup>Matsuyama, J; M; <sup>1</sup>Tobita, K; <sup>1</sup>Kaneko M; <sup>1</sup>Nakamura, K  
<sup>+</sup><sup>1</sup> Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan  
ohnishii-dis@h.u-tokyo.ac.jp

## INTRODUCTION

Articular cartilage thickness has previously been quantified by B-mode ultrasonography [1, 2]. However, cartilage surface and cartilage-bone borders have been decided manually in those studies. In addition, no studies have adopted real-time spatial compound ultrasonography for measuring cartilage thickness. The purpose of this study was to develop a method to objectively quantify articular cartilage thickness in vitro using both conventional and real-time spatial compound B-mode ultrasonography and to evaluate the accuracy of measurement.

## MATERIALS AND METHODS

### Cartilage samples

Knee joints were obtained for a 6-month- and a 3-year-old pig from a slaughterhouse (Tokyo Shibaura Zouki, Tokyo, Japan), as we assumed that thickness could differ between pigs at different ages. Femoral condyle articular cartilage was used in this study, since cartilage size and shape are relatively similar to those of human knee articular cartilage. After slaughter, whole bodies of pigs were kept at 3 °C in a refrigerated room. On the third day, the hind limbs were detached and sent to our laboratory under the same temperature. In our laboratory, limbs with intact knee joints were packed in plastic bags, degassed manually, sealed hermetically and stored at -20 °C. On the day of the experiment, soft tissues including joint capsules and ligaments were removed after the limbs were thawed in normal saline solution (Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) at room temperature. Osteochondral blocks with the surface size of 20 × 20 mm from the medial femoral condyle were acquired by cutting the bone with a band saw (SWD-250; Fujiwara Sangyo, Miki, Japan), then fixed on a custom-made acryl sample holder (30 × 30 × 13 mm; Murai & Co., Tokyo, Japan) with resin (GC-Ostron; GC Corporation, Tokyo, Japan). During preparation, samples were continuously cooled and moistened using normal saline solution.

### Acoustic measurement

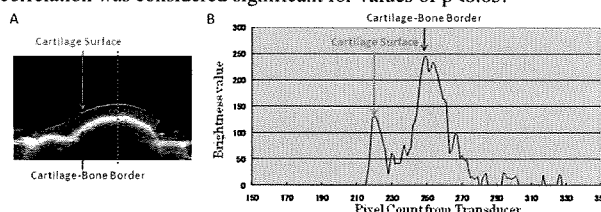
A B-mode 10.0-M Hz linear ultrasound probe (UST-5411; Aloka, Tokyo, Japan) connected to an ultrasound device (Prosound ALPHA 10; Aloka) was attached to a holding arm, which was fixed to a stage with an x,y micrometer for horizontal adjustment to enable identification of the location of cartilage measurement. In the water tank, osteochondral blocks and the transducer surface were placed in 20 °C water. The distance between transducer surfaces and the sample was kept as the transducer focus distance. Edges of the sample were identified by ultrasound signals, and the center of the sample was then identified from those points. B-mode images of the center line of the sample holder were acquired (Fig. 1A). Image settings were for both conventional imaging and real-time spatial compound imaging superimposed with three frames each from a different viewing angle of -20, 0, and 20 degrees to the right angle. System settings were optimized for imaging the cartilage surface. Brightness line data of 32 points at 0.5-mm intervals in each image were obtained from both the 6-month- and 3-year-old pigs (Fig. 1B). The cartilage surface and cartilage-bone border of the specimen were defined as the peaks of each reflected signal. Cartilage thickness (Tc-US) was measured as the distance between peaks, which was adjusted by the ultrasound speed for each age from our past study [3].

### Optical thickness measurement

The specimen fixed to the custom-made sample holder was mounted on a diamond saw device (Minitom; Struers, Westlake, OH), which offers an accuracy of 10 µm for adjustment of the cutting plane. A center-cut plane of the acryl sample holder was created, corresponding to the B-mode ultrasound image plane. Subsequently, each sample was mounted on a glass slide, covered with a cover glass after dripping normal saline onto the sample surface to keep the cartilage moistened and inhibit deformation during measurement due to drying. Cartilage thickness was measured using optical measuring microscopy (MM-400; Nikon, Tokyo, Japan). Using this optical measuring microscopy, points of line data acquisition on the cartilage surface and direction of the US beam were able to be identified from the position and orientation of the acryl sample holder surrounding the cartilage sample. Thickness of the cartilage (Tc) along the beam direction was measured at each point.

Mean and standard deviation (SD) of Tc for each sample were calculated. Linear regression analysis was performed and Pearson's

coefficient of correlation was used to compare Tc-US to Tc. A correlation was considered significant for values of  $p < 0.05$ .



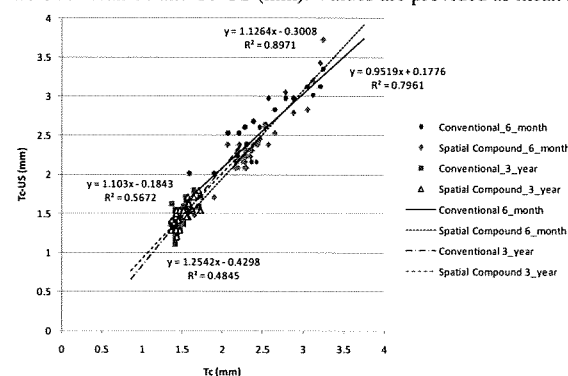
**Figure 1:** A) B-mode ultrasound image of the sample is shown. B) Line data acquired from the dotted line in the ultrasound image (A). Peak of the reflected ultrasound signal were defined as the surface and border of the tissue.

## RESULTS

In all B-mode line data, peaks of reflected ultrasound signals from the cartilage surface and cartilage-bone border were clear enough to be identified. Mean Tc and Tc-US (conventional, spatial compound) for both samples are shown in Table 1. Tc-US was significantly correlated with Tc in both the 3-year- and 6-month-old pigs ( $p < 0.0001$  each) (Fig. 2). Pearson's coefficient of correlation tended to be slightly higher with spatial compound in each sample.

|                          | 6-month-old pig | 3-year-old pig |
|--------------------------|-----------------|----------------|
| Tc (mm)                  | 2.40 ± 0.39     | 1.49 ± 0.10    |
| Tc-US (conventional)     | 2.46 ± 0.42     | 1.45 ± 0.18    |
| Tc-US (spatial compound) | 2.40 ± 0.47     | 1.47 ± 0.14    |

**Table 1.** Mean Tc and Tc-US (mm). Values are provided as mean ±SD.



**Figure 2.** Scatter plot of each ultrasound image setting and sample. Linear regression analysis shows good agreement between Tc and Tc-US in all plots.

## DISCUSSION

This is the first study to measure Tc using real-time spatial compound ultrasonography, which has been adopted in evaluating other tissues, such as tendon [4] and ligament [5]. From our results, real-time spatial compound ultrasonography may potentially have higher accuracy for measuring Tc than conventional methods, even though both showed good accuracy in our study. We believe the accuracy of our method is sufficiently high to allow application to measure human Tc in future studies.

## REFERENCES:

- [1] Myers et al. J Rheumatology, 1995; 22; 109-16.
- [2] Burkhard et al. Arthritis & Rheumatism, 2009; 61; 435-41.
- [3] Ohashi et al. 55th Orthopaedic Research Society, 2009.
- [4] Bartolotta et al. Radiol Med. 2007; 112; 562-71.
- [5] Sorrentino et al. Radiol Med. 2009; 114; 312-20.

## ACKNOWLEDGEMENT:

This work was funded by the grant in aid of the Comprehensive Research on Aging and Health H19-007 of the Health and Labour Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

