

2005a). Several studies have shown that there was an increased expression of heat shock proteins (HSPs) in the peri-ablated area after thermal ablation by immunohistochemistry study (Nikfarjam *et al.* 2005b; Rai *et al.* 2005; Schueller *et al.* 2004a, 2004b; Yang *et al.* 2004). On the one hand, HSPs induced by thermal ablation therapy have the effect to enhance the survival of cells by protecting cell structures from heat injury, facilitating recovery of damaged cells and inhibiting apoptosis and necrosis, which may result in tumor residual or recurrence post ablation. Conversely, the increased HSPs expression could produce tumor peptide complexes after focal thermal ablation which has been shown to be involved in tumor antigen presentation to macrophages and other antigen-presenting cells for elimination by the host immune system. Therefore, the use of HSPs as adjuvants could be valuable in the ablation therapy of liver cancer (Jaattela 1999; Javid *et al.* 2007; Jolly and Morimoto 2000; Li *et al.* 2002; Takayama *et al.* 2003).

Perflubutane microbubbles (Sonazoid™, Amersham Health, Oslo, Norway) have been proved to be phagocytosed by Kupffer cells in both *in vitro* and *in vivo* studies (Watanabe *et al.* 2007; Yanagisawa *et al.* 2007). Under ultrasound insonation, the free microbubbles could behave as stabilization, oscillation, transposition, shrinkage and destruction with MI increasing, and the microbubbles inside the Kupffer cells could also behave as shrinkage and destruction when MI is higher enough (Liu *et al.* 2008). The interaction of ultrasound pulses with microbubbles produces mechanical perturbation and even acoustic cavitation, which produce potential bioeffects on nearby cells or tissues, including sonoporation of cell membrane, cell death, microvascular leakage, petechiae, inflammatory cell infiltration and even temperature rise of tissue (Miller *et al.* 2008). We presume that microbubbles' oscillation under low MI insonation and destruction under high MI insonation are also kinds of stress for the cell, and could increase HSPs expression *in vivo*. This paper reported our preliminary research of HSPs induction by CEUS using Sonazoid and RF ablation in rabbit liver.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Male New Zealand white rabbits with body weight 2.5–3.0 kg were used in this study (CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan). A total of 25 rabbits were divided into five groups as: control group ( $n=5$ ), ultrasound group ( $n=5$ ), CEUS group ( $n=5$ ), RF group ( $n=5$ ) and CEUS + RF group ( $n=5$ ). No other procedure was applied to the animals in the control group except anesthesia and shaving. Animals in the ultrasound group were only examined with conventional baseline ultrasound using abdominal examination settings; animals of

CEUS group received both low MI real-time CEUS examination and high MI destruction of UCA microbubbles 15 min after the UCA administration; the RF group received RF ablation under baseline ultrasound guidance; the CEUS + RF group received pre-ablation CEUS study first (including both low MI real-time CEUS and high MI destruction of microbubbles), followed by RF ablation under baseline ultrasound guidance, and post-ablation CEUS study the same with the pre-ablation procedure in the end. Intravenous injection of pentobarbital sodium (25 mg/kg, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Osaka, Japan) was used for anesthesia in all animals. All animals were treated humanely during the whole experiment. The experimental protocols were approved by the animal ethical committee of Tokyo Medical University.

### Baseline and CEUS examination

A clinical ultrasound scanner (Toshiba Aplio XV, Toshiba Corp., Tokyo, Japan) and a convex probe with a frequency range of 1–6 MHz (PVT 375BT, Toshiba Corp., Tokyo, Japan) were used in the present study. For baseline ultrasound examination, the conventional abdominal examination mode was used, and MI was 1.48 as read on the screen. The liver was scanned thoroughly with baseline ultrasound for 5 min. The imaging settings of the ultrasound scanners were optimized to get the best depiction of the liver (Table 1). For low MI real-time CEUS examination, pulse inversion contrast imaging mode was used and MI was 0.18 as read on the screen. Sonazoid (Daiichi Sankyo Company) was used as contrast agent. After initiation of contrast-specific imaging mode, the imaging settings including the gain, depth and focus were readjusted for best visualization of the liver (Table 1). A volume of 0.02–0.03 mL (0.01 mL/kg) of contrast agent was injected into the ear vein in a bolus fashion through a 22-gauge intravenous cannula, followed by a flush of 2 mL of 0.9% normal saline solution. No animal received an additional administration of the contrast agent in this study. The timer was

Table 1. Setting of ultrasound scanner used in the study

Parameter	Baseline Examination	CEUS Examination
Machine type	Toshiba Aplio XG with PVT 375BT probe	
Imaging mode	Conventional 2-D imaging	Pulse inversion imaging
MI (as read on screen)	1.48	0.18; 1.6
Frequency (MHz)	5.0	4.0
Pulse repetition frequency (PRF) (KHz)	3-5	3-5
Frame rate (Hz)	22	15
Depth (cm)	4	4
Focus position (cm)	2	2
Focus number	1	1

activated simultaneously at the beginning of UCA administration. The liver was first observed continuously for 5 min after UCA administration as vascular phase, and then from the 10th min to 15th min as Kupffer phase under contrast-specific imaging, and high MI (MI=1.6) imaging mode for 3 min to break the microbubbles in the end. The digital cine clips of both baseline grey-scale ultrasound and the whole process of CEUS images were stored in the hard disk incorporated in the scanner.

#### *Radiofrequency ablation*

RF ablation was performed with the RITA 1500 system (RITA Medical Systems, Mountain View, CA, USA) and 18-gauge Starburst multiarray electrode (RITA Medical Systems). After successful anesthesia, the electrode was inserted percutaneously into the liver under baseline ultrasound guidance and expanded to 1 cm in diameter. The circuit pad was placed on the back of the rabbit. The generator was switched to power control mode in which the generator will fix the power output of radiofrequency current at 20 W. Radiofrequency energy lasted for 4 min for each energy delivery. The temperature at the tip of the electrode was monitored automatically by the RF generator.

#### *Sample collection*

All the animals were sacrificed by intravenous injection of overdose pentobarbital sodium 24 h after the experiment, and the livers were excised and dissected. For the samples of the RF and CEUS + RF groups, the ablated lesion and nonablated surrounding liver parenchyma were incised perpendicular along the long axis; half of the sample was placed immediately in liquid nitrogen for protein extraction, and the other half was fixed in 10% formalin for pathological analysis. For the samples from the remaining groups (control group, ultrasound group and CEUS group), livers were divided and kept in liquid nitrogen and 10% formalin as described, respectively.

#### *Immunohistochemistry*

Tissue samples embedded in paraffin were sectioned at 4  $\mu\text{m}$ . The samples were deparaffinized at 67° for 2 h and washed in phosphate-buffered saline (PBS) (pH=7.4). Antigen retrieval was performed by incubating the samples in boiling citrate buffer (pH=6.0) for 10 min and cooled to room temperature. Tissue slices were incubated with primary antibody of mouse monoclonal to HSP70 (1:100) (Abcam PLC., Cambridge, UK) for 2 h. A mouse polymer kit was used for immunostaining according to the manufacturer's instructions (PV6005, Zhong-Shan Golden Bridge biotechnology, Beijing, China). Diaminobenzidine (DAB) stain was used to detect the positive cells with HSP70 expression. The

same procedures were carried out on negative controls by replacing the primary antibody with PBS.

#### *Imaging analysis*

After immunohistochemistry staining, all the specimens were studied under an optical microscope (BX50, Olympus, Tokyo, Japan). Each specimen was divided into three different areas under optical microscope observation as ablated area (complete necrotic area surrounding the electrode), marginal area (area surrounding the ablated tissue) and normal liver area (at least 1 cm away from the ablated area). Six photographs were taken for each area per specimen at 200 $\times$  magnification through a high-speed real-time digital camera (MicroPublisher 5.0 cooled, Qimaging, BC, Canada) with compatible QCapture-pro software (Qimaging). Image-Pro Plus software (version 6.0, Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) was used for imaging analysis. The mean density of HSP70 expression was calculated automatically.

#### *Western blot analysis*

Tissue samples were taken from each lesion, including three areas for protein abstraction as ablated area (complete necrotic tissue around the electrode), marginal area (within 0.5 cm away from the margin of ablated tissue) and normal liver area (at least 1 cm away from the ablated area). Tissue samples from those three areas were lysed on ice for 30 min in RIPA lysis buffer (1 $\times$ TBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate and 0.004% sodium azide) containing a protease inhibitor cocktail and sodium orthovanadate (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) respectively, and then centrifuged at 10,000 $\times g$  for 10 min. A Pierce BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) was used to determine the protein concentration. Protein was electrophoresed on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and transferred to pure nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in Tween-20 buffered TBS (1 $\times$ TBS, 0.1% Tween-20). Membranes were incubated with primary antibody against HSP70 (Abcam PLC.) and  $\beta$ -actin (Streegen, Victoria, BC, Canada), followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Streegen). An enhanced luminescence Western blotting detection reagent (GE Healthcare) was used for chemiluminescence and photographed by Versa-Doc model 5000 imaging system (Bio-Rad).

#### *Statistical analysis*

Quantitative data were expressed as mean  $\pm$  standard difference and compared with Student's *t*-test. A *p*-value less than 0.05 was statistically significant. Statistical analysis was performed using the SPSS 16.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

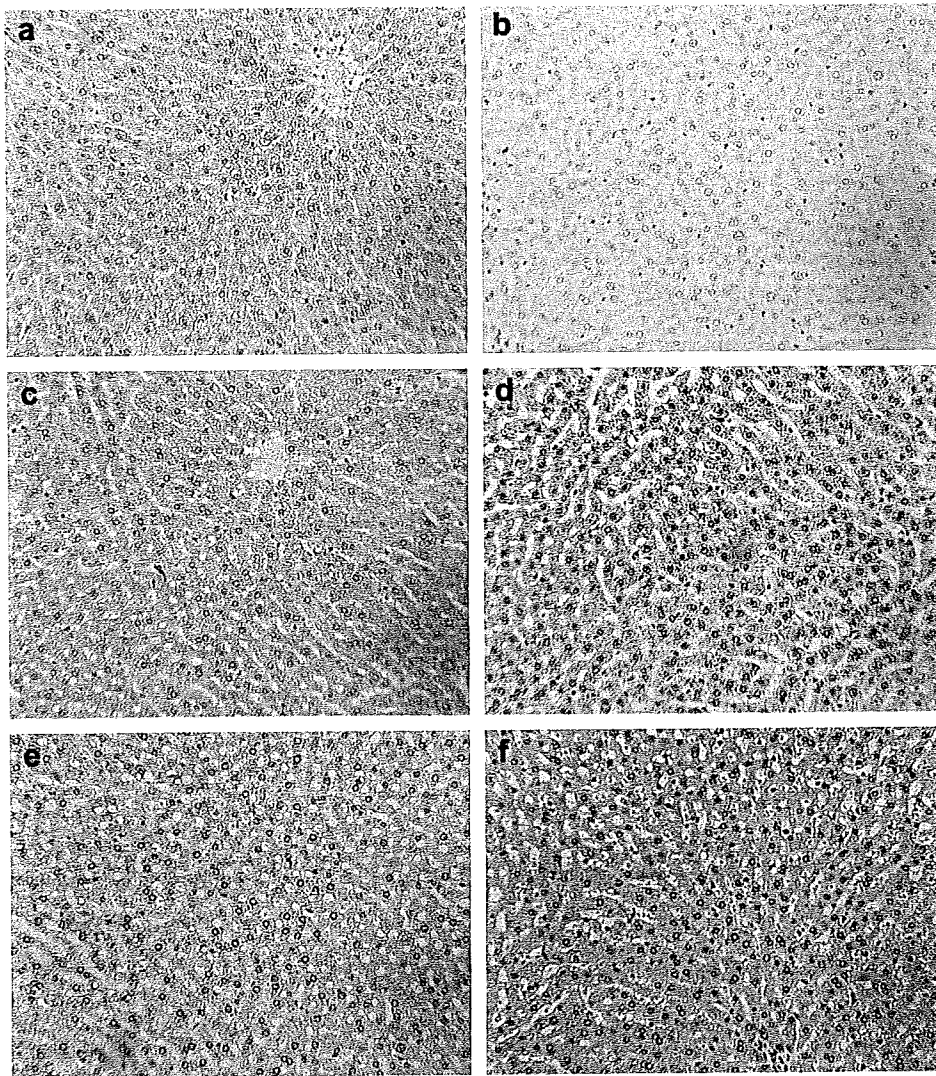


Fig. 1. Expression of HSP70 in the liver parenchyma in immunohistochemistry study. Immunohistochemistry study findings of expression of HSP70 in liver parenchyma. (200 $\times$  magnification). (a) The control group shows no significant evidence of HSP70 expression; (b) negative control stain of the same sample with 1a; (c) the ultrasound group shows no obvious induction of HSP70; (d) increased HSP70 expression in the liver parenchyma of the CEUS group; (e) faint HSP70 expression in the liver parenchyma 1 cm away from the ablated area of the RF group; (f) CEUS + RF group shows stronger expression and more homogeneous distribution in the liver parenchyma 1 cm away from the ablated area compared with the RF group.

## RESULTS

### *Immunohistochemistry study*

There was no significant evidence of HSP70 expression in the liver parenchyma in both the control group and the ultrasound group (Fig. 1). HSP70-positive stain cells were only shown in liver tissue of the CEUS group, and normal liver tissue was situated away from ablation region of the RF and CEUS + RF groups (Fig. 1). The mean density of HSP70 expression in the liver tissue was  $0.33 \pm 0.04$  in CEUS group,  $0.31 \pm 0.01$  in RF group and  $0.35 \pm 0.02$  in CEUS + RF group, respectively (Table 2). There was significant difference between the

CEUS + RF group and the RF group ( $p=0.010$ ). No significant differences of HSP70 expression were shown between the CEUS group and the RF group ( $p=0.141$ ) or CEUS + RF group ( $p=0.362$ ).

RF ablated areas were clearly demarcated from surrounding liver parenchyma on immunohistochemistry stain. The normal liver architecture was destroyed in the ablated area; cells in this area showed paler cytoplasmic stain and thick stain pyknotic nuclei compared with normal liver parenchyma cells. There were some cells surrounding the ablated area with thick positive HSP70 stain, whereas the ablated area showed no evidence of HSP70 expression

Table 2. Mean density of HSP70 expression in immunohistochemistry study

	Liver <sup>§</sup>	Margin <sup>  </sup>
CEUS	0.33±0.04	
RF	0.31±0.01* <sup>†</sup>	0.47±0.07 <sup>†</sup>
CEUS + RF	0.35±0.02* <sup>‡</sup>	0.42±0.04 <sup>†</sup>

\* $p = 0.010$ ; <sup>†</sup> $p=0.000$ ; <sup>‡</sup> $p=0.001$ ; <sup>§</sup>Liver=liver parenchyma 1 cm away from the margin of ablated tissue; <sup>||</sup>Margin=marginal area surrounding the ablated tissue.

(Fig. 2). Both the RF group and CEUS + RF group showed stronger and more intensive stain in the marginal area of the ablated region compared with normal liver tissue 1 cm away from the margin ( $p=0.000$ ,  $p=0.001$ ). With regard to the distribution of HSP70 in positive stain cells, staining of nuclei was more intense than the cytoplasm. The mean density of HSP70 expression in the marginal areas was  $0.47±0.07$  in RF group and  $0.42±0.04$  in CEUS + RF group (Table 2).

#### Western blot analysis

A total of 20  $\mu\text{g}$  of protein from tissue lysate was subjected to Western blot analysis against an indicated anti-HSP70 antibody. There was positive HSP70 expression

in the livers of the CEUS group and the marginal and normal liver area in the RF group and CEUS + RF group (Fig. 3).

## DISCUSSION

HSPs are ubiquitous and highly conserved proteins in all organisms under a wide variety of stress conditions including heat shock, oxidative stress and heavy metals, or pathologic conditions such as ischemia and reperfusion, inflammation, tissue damage and infection, their predominant function being the folding and unfolding of protein substrates, which may result in protecting cells against the damage from those stresses (Jaattela 1999; Jolly and Morimoto 2000; Takayama et al. 2003). HSPs are divided into six major families according to their molecular size: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 and small heat shock proteins (Lindquist and Craig 1988). Among them, HSP70 is the primary one found in the marginal area of ablated tumor tissue or normal liver after focal thermal ablation from previous studies (Nikfarjam et al. 2005b; Rai et al. 2005; Schueller et al. 2004a, 2004b; Yang et al. 2004). Nikfarjam et al. (2005b) studied the pattern of HSP70 after laser thermal ablation using a murine model of colorectal liver metastases. They found

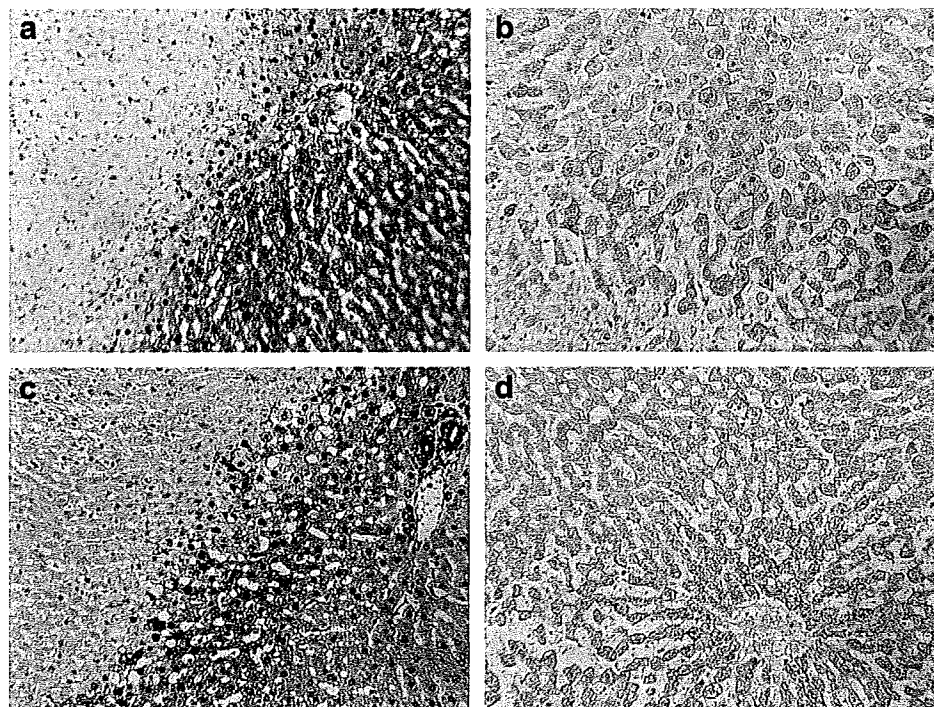


Fig. 2. Induction of HSP70 in the marginal area and necrosis area. Immunohistochemistry study findings of expression of HSP70 in the marginal area and ablated area (200 $\times$  magnification). (a) Many prominent HSP70 staining cells are in the marginal area of RF group; (b) ablated area shows coagulative necrosis of cells; cells show faint cytoplasmic staining and pyknotic nuclei compared with normal liver. (c) Marginal area of the CEUS + RF group shows cells with dense HSP70-positive stain; (d) necrosis area of the CEUS + RF group shows similar findings as the RF group. No positive HSP70 stain cell is available.

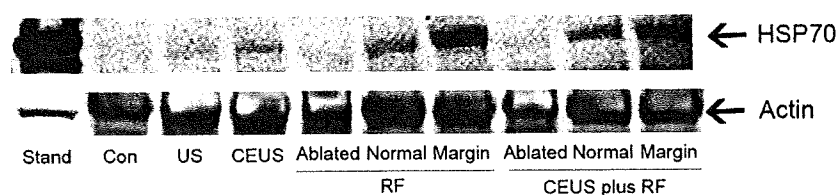


Fig. 3. Western blot analysis of HSP70. Western blot analysis shows negative expression in the liver of the control group (Con) and ultrasound group (US), and in the ablated tissue of the RF and CEUS + RF groups. In the livers of the CEUS group (CEUS), the normal liver parenchyma is 1 cm away from the margin of the RF and CEUS + RF groups, and the marginal area of the RF and CEUS + RF groups shows positive induction of HSP70. Actin was used as an internal control.

HSP70 was faintly expressed in the cytoplasm of the tumor cells, whereas it was uncommon in control liver tissues before laser ablation. After thermal ablation, increased expression of HSP70 at coagulated tumor margins was significantly stronger than those of liver tissue, with peak response in tumor tissue at 2 d and liver tissue at 12 h after ablation, and remained for 7 d in tumor tissue and only 3 d in liver, respectively. Rai *et al.* (2005) found there was a transitional zone surrounding the necrotic ablated area, showing apoptosis and increased HSP70 expression 30 min and 5 d after RF ablation in the pig's liver. Schueller *et al.* (2004b) also reported that there was an eight-fold increase in HSP70 and a 1.2-fold increase in HSP90 in the cytoplasm and at the tumor cell surface from the residual tumor margin 24 h after RF ablation in a patient suffering from unresectable hepatocellular carcinoma. In the present study, we also showed a significantly increased expression of HSP70 in the marginal area of rabbit livers 24 h after RF ablation. The ablation protocol used in the present study was different from some previous studies that used temperature control mode and only induced sublethal damage to the liver or tumor tissues (Nikfarjam *et al.* 2005b; Yang *et al.* 2004). We used the power control mode and limited the power output at 20 W for 4 min. The temperatures at the end of the ablation automatically measured at the tip of each multiarray electrode by the RF equipment were all between 65° and 123°, which was much higher than the 50°C threshold that caused tissue destruction (Dickson and Calderwood 1980). Thus, we believe that induction of HSP70 in the marginal areas of the residual tumor tissue or liver parenchyma is available even after lethal thermal ablation similar with clinical situation. Because HSPs may function as protecting cell structures from heat injury, facilitating recovery of damaged cells and inhibiting apoptosis and necrosis and enhancing the survival of cells, it was blamed as a reason of residual tumor or recurrence post ablation (Nikfarjam *et al.* 2005b; Yang *et al.* 2004). However, several studies also found that the induced HSP70 could bind to the antigenic peptides of the tumor cells and deliver them to macrophages and other antigen-presenting cells both *in vitro* and *in vivo* (Javid *et al.* 2007; Li *et al.* 2002; Srivastava and Udono 1994;

Suto and Srivastava 1995). Therefore, HSPs could also potentially be valuable as an adjuvant immune therapy to the ablation therapy of liver cancer, which may result in elimination of the tumor by the immune system.

Aside from confirmation of increased expression of HSP70 after RF ablation, we also found that CEUS using Sonazoid could induce HSP70 expression in the normal liver parenchyma compared with the ultrasound and control groups. And the CEUS + RF group showed stronger HSP70 expression in normal liver parenchyma 1 cm away from the ablated area compared with the RF group. We presumed that the induction of HSP70 was a consequence of the biological effects of CEUS. As has been proven by previous studies, the interaction of ultrasound pulses with the UCA gas bubbles will produce several bioeffects on nearby cells or tissues, including sonoporation and cell death, microvascular leakage, petechiae, cardiomyocyte death, inflammatory cell infiltration, *etc.* (Miller *et al.* 2008). In this study, we supposed the main reasons to induce HSP70 expression by CEUS were the tissue heating effect caused by microbubbles oscillation and acoustic cavitation of microbubbles (Fujishiro *et al.* 1998; Miller *et al.* 2008; Prosperetti 1991; Stride and Saffari 2004; Wu 1998). Under low MI insonation, Sonazoid microbubbles in the blood pool and Kupffer cells may oscillate nonlinearly. The pulsation of microbubbles may cause frictional heating of the surrounding tissue, and the high-frequency components of acoustic radiation generated from the oscillation of microbubbles could also be dissipated effectively as heat at the same time (Miller *et al.* 2008). Several studies have proven the heating effect of microbubbles under insonation. Fujishiro *et al.* (1998) reported that the temperature elevation rate of beef samples under ultrasound insonation was by 1.7°C with an air contrast agent and only about 1°C with the control materials. They concluded that the administration of UCA significantly increased the temperature in ultrasound hyperthermia. Wu (1998) also reported that the temperature rise in the heart was about 2°C after intravenous administration of contrast agent (Albunex, Molecular Biosystems, San Diego, CA) and insonation for 10 s with 2-MHz ultrasound. Under high MI insonation, both the Sonazoid microbubbles in the blood pool

and those in the Kupffer cells may be destroyed and generate huge energy through the acoustic cavitation process, which may result in various bioeffects on the surrounding tissues and cells caused by sonoporation, fluid jets and extreme heating (Miller et al. 2008); however, it has been reported that high acoustic pressure frequently caused distortion or immediate rupture of the leukocyte cell membranes within seconds of microbubble destruction (Dayton et al. 2001; Lindner et al. 2000; Takeuchi et al. 2004). In our previous study, no cell damage was found optically after Sonazoid microbubbles were destroyed both inside and outside of the Kupffer cells (Liu et al. 2008). Therefore, we would believe that liver CEUS using Sonazoid microbubbles may cause some bioeffects such as induction of HSP70, but is not powerful enough to cause lethal cell damage after bubble destruction in clinical practice.

Several studies showed that the HSPs-tumor antigenic peptide complexes can activate the immune response, resulting in elimination of the tumor by the immune system (Javid et al. 2007; Li et al. 2002; Srivastava and Udono 1994; Suto and Srivastava 1995). This theory is based on the appearance of HSPs on the tumor cell surface, although HSP70 induced by thermal ablation were reported in the cytoplasm and nuclei in our study and other previous studies. Most of the researchers would consider that HSPs were released by neighboring dead cells and adsorbed onto the tumor antigens on the cell surface after thermal ablation (Srivastava and Udono 1994; Suto and Srivastava 1995). Because it has been reported that microbubbles under ultrasound exposure could increase the transparency of the cell membrane, which showed great potential to increase the efficiency of drug or gene delivery (Pislaru et al. 2003; Taniyama et al. 2002), we presume that CEUS will not only induce HSPs expression but also be helpful for the HSPs to move to the surface of the cell, which will make the tumor antigen presentation to the immune system more efficient.

In the present study, we used the same parameter settings of ultrasound equipment and almost the same recommended dosage of Sonazoid (0.01 mL/kg) with clinical CEUS examination. We first performed low MI CEUS for the whole vascular phase (0 to 5 min) and Kupffer phase (10 to 15 min), and used high MI ultrasound to destroy the microbubbles after Kupffer phase. CEUS was performed before and immediately after RF ablation, which was also similar with the clinical RF ablation procedure. We think that the induction of HSP70 by CEUS and RF ablation would also happen in the clinical situation, although further study is needed for confirmation.

The limitation of this study was that only Sonazoid was used as UCA; other kinds of UCA should also be included and compared with Sonazoid. The other limitation was that we only checked the expression of HSP70

by immunohistochemistry and Western blot study, and further study, such as reverse transcriptase-polymerase chain reaction should be used to make further confirmation.

## CONCLUSION

CEUS examination using Sonazoid may produce HSP70 expression in the rabbit liver parenchyma alone or in combination with RF ablation with similar dosage of contrast agent and equipment settings of clinical procedure. This useful biological effect of CEUS examination may have some therapeutic implications for the treatment of liver.

## REFERENCES

- Claudon M, Cosgrove D, Albrecht T, Bolondi L, Bosio M, Calliada F, Coreas JM, Darge K, Dietrich C, D'Onofrio M, Evans DH, Filice C, Greiner L, Jäger K, Jong N, Leen E, Lencioni R, Lindsell D, Martegani A, Mearns S, Nolsøe C, Piscaglia F, Ricci P, Seidel G, Skjoldbye B, Solbiati L, Thorelius L, Tranquart F, Weskott HP, Whittingham T. Guidelines and good clinical practice recommendations for contrast enhanced ultrasound (CEUS)—Update 2008. *Ultraschall Med* 2008;29:28–44.
- Dayton PA, Chomas JE, Lum AF, Allen JS, Lindner JR, Simon SI, Ferrara KW. Optical and acoustical dynamics of microbubble contrast agents inside neutrophils. *Biophys J* 2001;80:1547–1556.
- Dickson JA, Calderwood SK. Temperature range and selective sensitivity of tumors to hyperthermia: a critical review. *Ann N Y Acad Sci* 1980;335:180–205.
- Fujishiro S, Mitsumori M, Nishimura Y, Okuno Y, Nagata Y, Hiraoka M, Sano T, Marume T, Takayama N. Increased heating efficiency of hyperthermia using an ultrasound contrast agent: a phantom study. *Int J Hyperthermia* 1998;14:495–502.
- Goldberg SN, Grassi CJ, Cardella JF, Charboneau JW, Dodd GD 3rd, Dupuy DE, Gervais D, Gillams AR, Kane RA, Lee FT Jr, Livraghi T, McGahan J, Phillips DA, Rhim H, Silverman SG. Society of Interventional Radiology Technology Assessment Committee; International Working Group on Image-Guided Tumor Ablation. Image-guided tumor ablation: Standardization of terminology and reporting criteria. *Radiology* 2005;235:728–739.
- Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 1999;248:30–43.
- Javid B, MacAry PA, Lehner PJ. Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *J Immunol* 2007;179:2035–2040.
- Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1564–1572.
- Li Z, Menoret A, Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol* 2002;14:45–51.
- Lindner JR, Dayton PA, Coggins MP, Ley K, Song J, Ferrara K, Kaul S. Noninvasive imaging of inflammation by ultrasound detection of phagocytosed microbubbles. *Circulation* 2000;102:531–538.
- Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988;22:631–677.
- Liu GJ, Moriyasu F, Hirokawa T, Rexiati M, Yamada M, Imai Y. Optical microscopic findings of the behavior of perflubutane microbubbles outside and inside Kupffer cells during diagnostic ultrasound examination. *Invest Radiol* 2008;43:829–836.
- Lu MD, Yu XL, Li AH, Jiang TA, Chen MH, Zhao BZ, Zhou XD, Wang JR. Comparison of contrast enhanced ultrasound and contrast enhanced CT or MRI in monitoring percutaneous thermal ablation procedure in patients with hepatocellular carcinoma: A multi-center study in China. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:1736–1749.
- Miller DL, Averkiou MA, Brayman AA, Everbach EC, Holland CK, Wible JH Jr, Wu J. Bioeffects considerations for diagnostic ultrasound contrast agents. *J Ultrasound Med* 2008;27:611–632.

- Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Mechanisms of focal heat destruction of liver tumors. *J Surg Res* 2005;127:208–223.
- Nikfarjam M, Muralidharan V, Su K, Malcontenti-Wilson C, Christophi C. Patterns of heat shock protein (HSP70) expression and Kupffer cell activity following thermal ablation of liver and colorectal liver metastases. *Int J Hyperthermia* 2005;21:319–332.
- Pislaru SV, Pislaru C, Kinnick RR, Singh R, Gulati R, Greenleaf JF, Simari RD. Optimization of ultrasound-mediated gene transfer: comparison of contrast agents and ultrasound modalities. *Eur Heart J* 2003;24:1690–1698.
- Prosperetti A. The thermal behavior of oscillating gas-bubbles. *J Fluid Mech* 1991;222:587–616.
- Rai R, Richardson C, Flecknell P, Robertson H, Burt A, Manas DM. Study of apoptosis and heat shock protein (HSP) expression in hepatocytes following radiofrequency ablation (RFA). *J Surg Res* 2005;129:147–151.
- Schuelter G, Kettenbach J, Sedivy R, Bergmeister H, Stift A, Friedl J, Gnant M, Lammer J. Expression of heat shock proteins in human hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation in an animal model. *Oncol Rep* 2004;12:495–499.
- Schuelter G, Kettenbach J, Sedivy R, Stift A, Friedl J, Gnant M, Lammer J. Heat shock protein expression induced by percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma in vivo. *Int J Oncol* 2004;24:609–613.
- Srivastava PK, Udono H. Heat shock protein-peptide complexes in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 1994;6:728–732.
- Stride E, Saffari N. Theoretical and experimental investigation of the behaviour of ultrasound contrast agent particles in whole blood. *Ultrasound Med Biol* 2004;30:1495–1509.
- Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 1995;269:1585–1588.
- Takayama S, Reed JC, Homma S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 2003;22:9041–9047.
- Takeuchi H, Ohmori K, Kondo I, Shinomiya K, Oshita A, Takagi Y, Yoshida J, Mizushige K, Kohno M. Interaction with leukocytes: phospholipid-stabilized versus albumin-shell microbubbles. *Radiology* 2004;230:735–742.
- Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, Aoki M, Yamamoto S, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: Enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther* 2002;9:372–380.
- Watanabe R, Matsumura M, Munemasa T, Fujimaki M, Suematsu M. Mechanism of hepatic parenchyma-specific contrast of microbubble-based contrast agent for ultrasonography: microscopic studies in rat liver. *Invest Radiol* 2007;42:643–651.
- Wu J. Temperature rise generated by ultrasound in the presence of contrast agent. *Ultrasound Med Biol* 1998;24:267–274.
- Yanagisawa K, Moriyasu F, Miyahara T, Yuki M, Iijima H. Phagocytosis of ultrasound contrast agent microbubbles by Kupffer cells. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:318–325.
- Yang WL, Nair DG, Makizumi R, Gallos G, Ye X, Sharma RR, Ravikumar TS. Heat shock protein 70 is induced in mouse human colon tumor xenografts after sublethal radiofrequency ablation. *Ann Surg Oncol* 2004;11:399–406.

## VII. 肝癌の診断

### 画像診断

#### 超音波検査(US) 血流動態診断

### 造影超音波検査

Contrast enhanced ultrasound

今井康晴 森安史典

**Key words** : 肝癌, 造影超音波, Sonazoid

#### はじめに

1999年, 我が国において経静脈性超音波造影剤である Levovist が発売された。以後, 多くの造影超音波診断法や診断技術が開発されたが, いずれも高規格超音波装置のみでしか映像化できなかった。2007年1月, 次世代超音波造影剤である Sonazoid が世界に先駆けて我が国で発売され, 肝疾患における造影超音波検査の役割が高まりつつある。

本稿では, 造影超音波の撮像原理, 造影剤の特性を述べた後, 造影超音波検査の手法について具体的に解説する。

#### 1. 造影超音波の撮像原理

静脈内に投与された超音波造影剤の微小気泡は, 低い音圧の超音波照射を受けることで共振し, 一定の閾値以上の音圧の超音波により崩壊する。この共振・崩壊の際に, 照射した超音波の周波数の整数倍の非線形信号(ハーモニック成分)を発する。このハーモニック成分を受信して映像化する技術が非線形映像法(ハーモニック映像法)である。ハーモニック映像法には, フィルター法や, 位相反転法などの方法がある<sup>1)</sup>。フィルター法とは, 受信した信号を帯域

通過フィルターに通す方法であるが, 抽出される周波数帯域が狭いため距離分解能が劣化する。位相反転法は, 送信パルスの極性を反転して同一方向に2回送受信し, 2つの受信信号を加算することで基本波成分を抑制し, 同一極性に発生するハーモニック成分を増幅する手法である。これにより, 広帯域のままハーモニック成分を抽出することが可能となり, 距離分解能の劣化を避けることができる。

#### 2. 超音波造影剤の特性

##### a. Levovist

気泡の大きさは約2-4 $\mu\text{m}$ で, 殻(シェル)はもたず, 気体は空気である。静脈投与した Levovist に対して高音圧, MI値(mechanical index)1.0前後の超音波を照射し, 気泡が崩壊するに伴い発せられるハーモニック成分を映像化する。したがって, 超音波を照射後1-2フレームの一瞬のみしか造影像が得られないことから, 間欠的に超音波を照射して, 造影剤をためておいて気泡を崩壊する操作を繰り返す必要がある。

##### b. Sonazoid

気泡の大きさは約2-3 $\mu\text{m}$ で, 卵黄からのリン脂質(ホスファチジルセリン)の殻をもち, 気

Yasuharu Imai, Fuminori Moriyasu: Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokyo Medical University  
東京医科大学 消化器内科

0047-1852/09/¥40/頁/JCLS



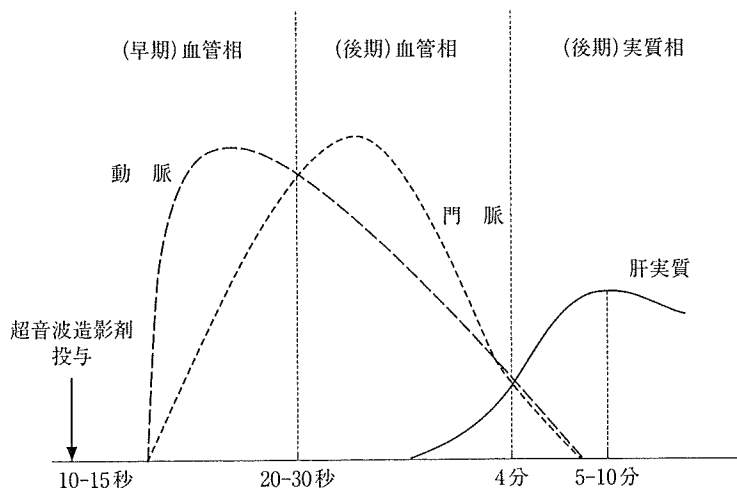


図1 肝臓における造影超音波の時相

横軸は超音波造影剤投与後の経過時間、縦軸は信号強度を表す。

体はフッ化炭素(C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>)と空気である。中音圧(MI値0.2前後)の超音波を照射し、気泡が共鳴する際に持続的に発せられるハーモニック成分を映像化する。したがって、Sonazoidは気泡を壊さずに映像化するため、Levovistと比較して、少量の造影剤の静脈内投与で、持続的にリアルタイムに造影像が観察される<sup>2)</sup>。

### 3. 超音波造影剤の投与・撮像

超音波装置に搭載されている造影モードを起動し、フォーカス位置、音圧、ゲインの設定を行う。Levovistは1-1/2パイアルを、Sonazoidは0.5-1.0mL(推奨投与量は0.015mL/kg)を投与する。超音波造影剤および静脈ラインフラッシュ用の生理食塩液はおよそ1秒間に1mLの速さで投与する。投与開始とともに超音波装置のタイマーを開始する。

超音波造影剤投与後、肝内における造影の時相を図1に示す。約1分以内で動脈に引き続き、門脈も描出される(血管相)。Levovistでは5分以降、Sonazoidでは10分以降に肝内の血管よりも肝実質にたまった微小気泡による造影が優位となる。これは、微小気泡が肝類洞壁にあるKupffer細胞に貪食され、信号を与えるもので、Levovistでは実質相、SonazoidではKupffer相と呼ばれている。

血管相において微小血管にある微小気泡からの信号は弱いため、そのままでは微小血管の良好な造影像を得ることができない。そこで、Sonazoid投与後の血管相における微弱な信号を加算していくことで微小血管の映像化を可能にする加算画像が用いられる<sup>3)</sup>。

Sonazoidによる造影超音波検査におけるフォーカス位置は、血管相では腫瘍の下端、Kupffer相では画面の最下部、加算画像では腫瘍の中心付近とすることで良好な造影像が得られる。音圧の設定は各機種により異なるためメーカーからの推奨値を参考にする。ただし、肥満の症例や脂肪肝・進行した肝硬変症例では比較的音圧を高く設定した方が良好な造影が得られる。ゲインはフォーカス位置、音圧を設定後に調節するが、全体のゲインだけでなく、深さに応じてゲインを調節する必要がある。

### 4. 造影超音波による肝癌の診断

肝癌では、造影超音波血管相で肝動脈の造影とともに腫瘍濃染を認め、バスケット状の腫瘍血管も認める。Kupffer相では周囲肝より造影が低下し、欠損像となることもある(図2)。更に、肝癌は病理学的に高分化型、中分化型、低分化型に分類されるが、造影超音波加算画像の所見により分化度診断まで可能であると報告さ

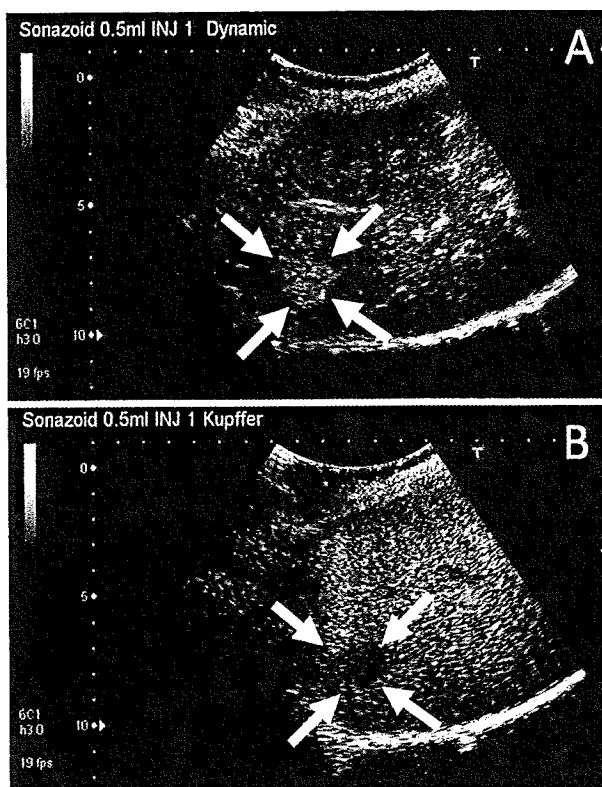


図2 肝癌の Sonazoid による造影超音波画像  
A: 血管相, B: Kupffer 相.  
矢印: 肝癌病変

れている<sup>9)</sup>。

一般に、腫瘍の存在診断(病変検出)を造影剤投与10分以降の Kupffer 相における信号が欠損した領域ないし信号の低下した領域の有無で行い、腫瘍の鑑別診断(質的診断)は造影剤投与後早期の血管相で行うのが原則である。

肝癌以外の肝腫瘍の造影超音波検査所見については他稿<sup>9)</sup>に譲るが、造影超音波検査は経静脈的な造影剤投与で腹部血管造影検査に匹敵する情報が非侵襲的に得られることから、肝腫瘍の鑑別診断において非常に有用である。

## 5. 肝癌治療支援

Sonazoid 投与10分以降の Kupffer 相では、肝癌は低エコー領域として描出され、腫瘍の境界がBモードに比べてより明瞭となる。更に、低音圧ハーモニックの造影モードのまま、腫瘍お

よび針先を描出しながら、針先を腫瘍へ穿刺する様子を観察することも可能である(図3)。

また、肝癌病変が Kupffer 相でも描出不良の場合、局所療法後の残存あるいは局所再発の場合などにおいては、Sonazoid 投与直後に濃染している多血性病変を確認しながら、穿刺針を目的部位へ挿入することも可能である。

ラジオ波焼灼療法(radiofrequency ablation: RFA)の効果判定は一般にCTで行われているが、放射線被曝や造影剤の副作用の問題のほかに、術後のCTでは治療された腫瘍が不明瞭になるため、必ずしも判定は容易ではない。造影超音波は条件が良ければ、治療された腫瘍と治療域が同一画面で描出できるため、CTより有用な場合もある(図4)。

局所療法における治療支援以外に、肝動脈塞栓療法後の効果判定や肝切除術中のガイドとし

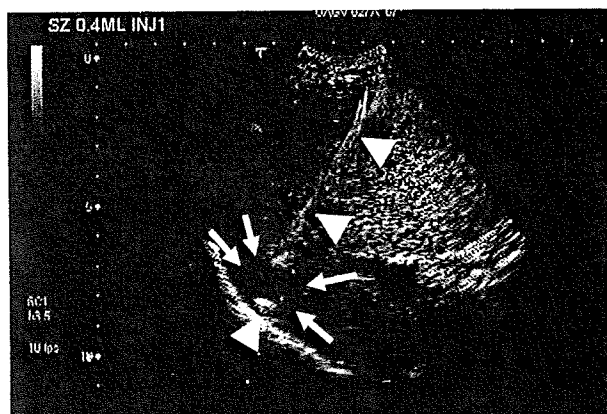


図3 Sonazoid 造影超音波ガイドによる肝癌病変の穿刺  
矢印：肝癌病変，矢頭：ラジオ波電極針。

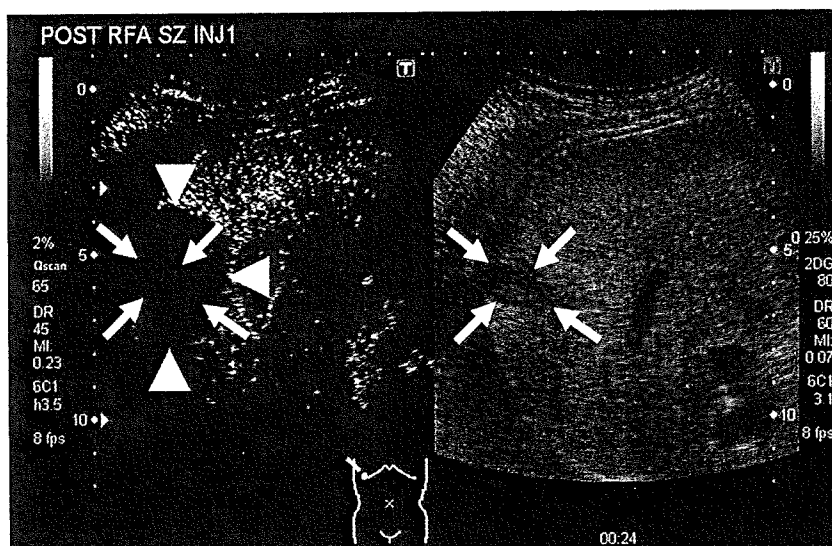


図4 造影超音波検査によるラジオ波焼灼療法の効果判定  
矢印：肝癌病変，矢頭：ラジオ波による治療域。

でも造影超音波検査の有用性が報告されつつあり、今後の症例の積み重ねにより有用性が明らかになると期待される。

#### おわりに

Sonazoidが発売されて約2年となるが、造影超音波検査を行うにあたって比較的高規格の超

音波装置が必要であること、撮像におけるフォーカス位置、音圧、ゲインなどの調節にやや経験が必要であることなどの理由から、いまだに造影超音波検査が普及するまでに至っていない。今後、細かな設定が自動でなされるような造影モードが開発されて、CTやMRIと同じくらいに造影超音波検査が普及することを期待したい。

文献

- 1) 鈴木陽一, 東京隆夫: 映像技術. 超音波造影ガイドブック(森安史典ほか編), p21-27, 金原出版, 2003.
- 2) 飯島尋子, 森安史典: 次世代造影剤による造影超音波診断. 肝胆膵 47: 203-212, 2003.
- 3) 西田 睦ほか: 頸部リンパ節微細血管描出のための新しい造影US法. Jpn J Med Ultrasonics 31: J347-J353, 2004.
- 4) Sugimoto K, et al: Analysis of morphological vascular changes of hepatocellular carcinoma by micro-flow imaging using contrast-enhanced sonography. Hepatol Res 38: 790-799, 2008.
- 5) 今井康晴, 森安史典: 一般医のためのエコー活用法 造影エコー. Medicina 44: 391-395, 2007.

## VII. 肝癌の診断

### 画像診断

#### 超音波検査(US) 血流動態診断

### 三次元(3D), 四次元(4D)超音波画像

Three-dimensional and four-dimensional ultrasound

山田昌彦 森安史典

**Key words** : 三次元超音波, 造影超音波, 肝腫瘍

#### 1. 背景

##### a. 超音波断層法の進化と造影超音波の開発

超音波断層法は1970年代に臨床応用されたが、長く非造影のBモード断層の時代があり、その後超音波のドプラ効果を利用したドプラモードがそれに加わった。対象は、腫瘍の血管を可視化することによる良悪性の鑑別診断や、血管病変の診断である。しかし、細動脈-毛細血管に至る微小循環の血流表示はできなかった。主に水からなる生体において、生体と最も音響インピーダンスに差があるのは気体である。そこで、微小気泡からなる超音波造影剤が開発された。更に、非線形信号を映像化するハーモニック技術が開発され、大血管から毛細血管まで、その中を流れる血流を映像化することができるようになった。

また、微小気泡の造影剤のレボピストおよびソナゾイドは、血管から間質へは出ないものの、血管内腔にあるマクロファージによって貪食を受ける。すなわち、従来の血管内血流の増感剤である blood pool agent と、細胞標的造影剤である Kupffer cell agent としての2つの造影効果をもつことになった。

##### b. 3D および 4D 超音波の開発

三次元超音波(3D-US)は連続した二次元の断層画像から3D画像を構築し、いわばレトロスペクティブに画像を見て診断する検査であった。近年はプローブの内部で自動的に sweep を行うメカニカル4Dプローブが開発され、腹部用の比較的細径のプローブもでき、自動的に正確な位置情報が付加された連続断面から瞬時に3D画像をレンダリングし、腹部領域でも容易に描出および保存ができるようになった。更に画像処理能力の向上により、三次元画像をリアルタイムに表示できるようになり、四次元超音波(4D-US)が可能となった。

##### c. 造影4D-US

4D-USは既に造影剤を用いることも可能となっている。造影4D-USにおいては、高いフレームレートから得られる連続断層画像を高い処理能力でレンダリングすることができるようになり、高いボリュームレートで画像の描出と保存が自動的にできるようになった。

#### 2. 方法

超音波診断造影はAplio XG(東芝メディカルシステムズ)を用いた。肝疾患において4D-USおよび造影4D-USを行い、造影4D-USによる

Masahiko Yamada, Fuminori Moriyasu: Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokyo Medical University  
東京医科大学 消化器内科

0047-1852/09/¥40/頁/JCLS

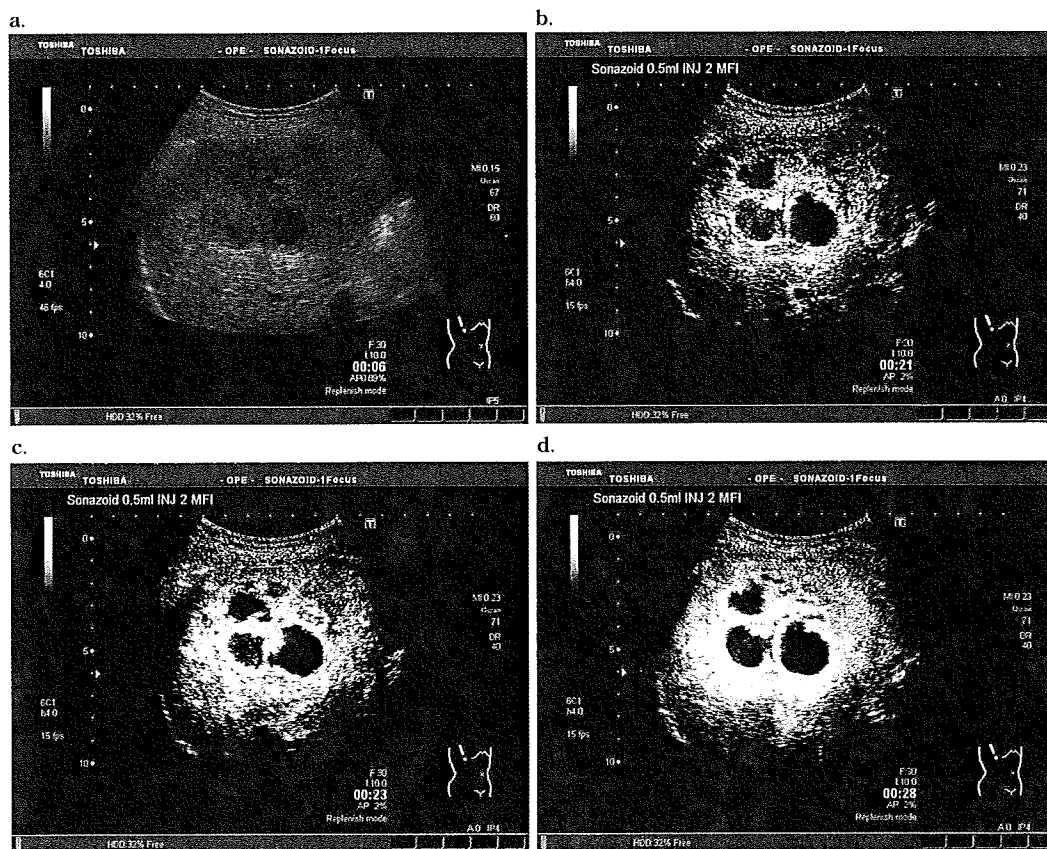


図 1 肝膿瘍のソナゾイド造影 2D-US

a: Bモード像. b: 造影USの21秒後. c: 造影USの23秒後. d: 造影USの28秒後.  
膿瘍腔の周囲および境界に高血流な部分が観察された.

診断, 4D-USガイドによるRFA穿刺, RFAの治療モニター, RFAの効果判定を施行できる. 4D-USの表示方法は, 通常の断面をA面とし, それに直行する2面をそれぞれBおよびC面として示すmulti-planar reconstruction(MPR)表示を用いた. MPR表示のとき4分割された画面の右下はA面のmaximum intensity projection(MIP)を表示した. また, RFAの穿刺時などはVolPure表示とし, 左をA面, 右をA面に直交し, 穿刺ラインを含む面のMIP像とした.

### 3. 症例呈示

#### a. 肝膿瘍の診断

Bモードでは辺縁はやや低エコーで内部に無エコーの腔が認められた. ソナゾイドで造影超

音波を行うと, 腔の周囲はおよび境界に多血流の部分観察され, 内部に腫瘍を示す結節は認められず, 肝膿瘍と診断した(図1).

#### b. 肝血管腫の診断

Bモードでは肝右葉に約7cmの境界やや高エコーの低エコー腫瘍が認められた. これに対し造影4D-USを施行した. 時間経過とともに造影態度を多方向から観察できた. まず, 周囲の流入血管が観察され, その後, 腫瘍は周囲よりゆっくり造影されていき, 内部の血管は微細で, 明らかな悪性腫瘍を考える異常血管は認められず, 肝血管腫と診断した(図2).

#### c. 肝細胞癌の診断

Bモードでは肝S5に約2cmの低エコー腫瘍が認められた. これに対し造影4D-USを施行

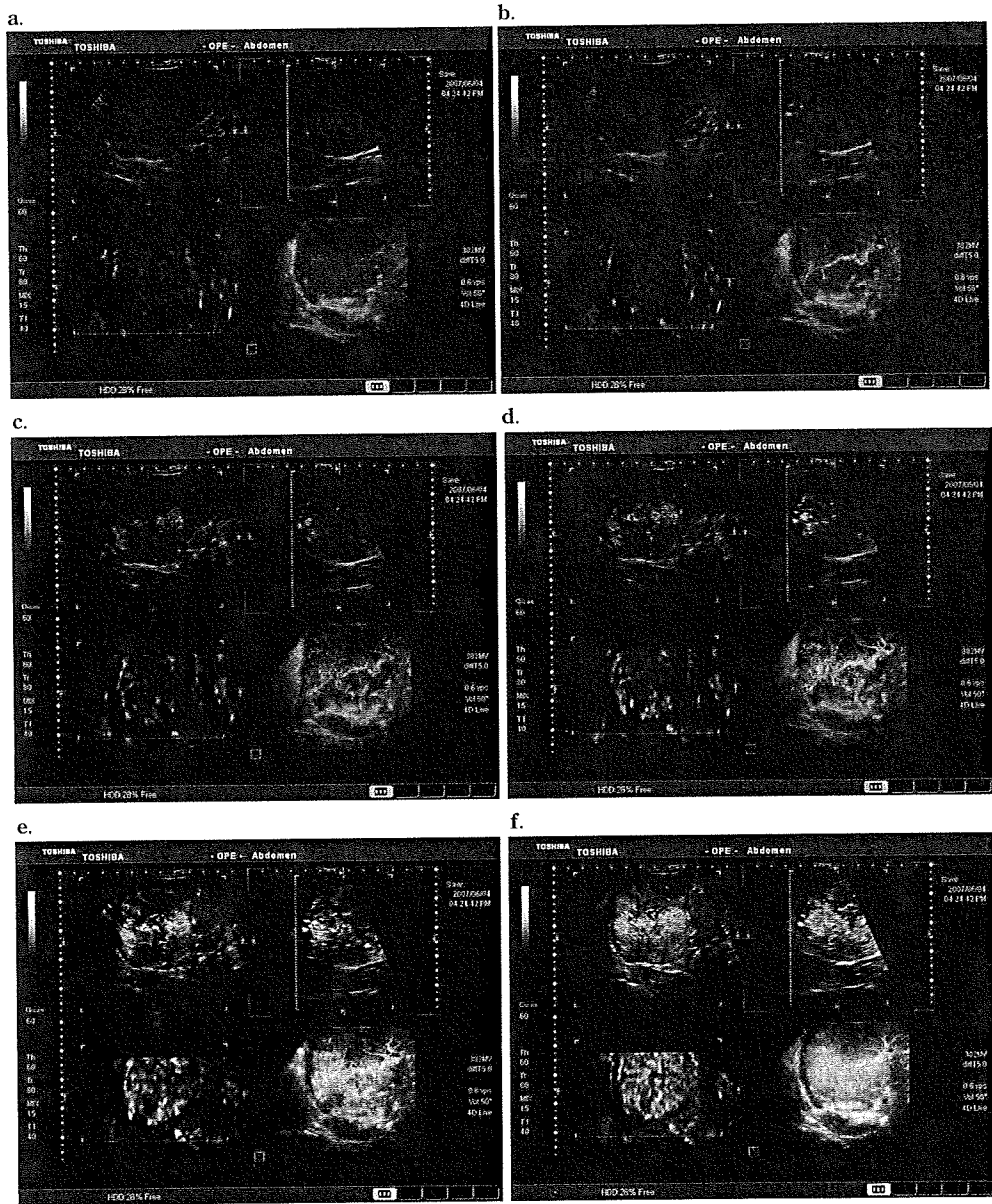


図2 肝血管腫の造影4D-US(MPR表示)

a-fは時間経過を示し、それぞれ上段は左がA面、右がB面、下段は左がC面で、右はMIP。周囲より血流が流入していく様子が観察できた。

した。MIP像でわかりやすいと考えられるが、まず腫瘍に流入する肝動脈が描出され、その後腫瘍は全体が急速に濃染し、流出血管も描出された(図3)。造影剤投与より10分後の実質相では肝腫瘍にソナゾイドの残存はほとんど認められず、肝細胞癌と診断した。

この症例は肝細胞癌が単発であったため、ラジオ波焼灼術(RFA)を施行した。RFA穿刺時にはVolPureで観察し、穿刺を施行すると、肝細胞癌の中央に穿刺針が刺入され、展開が肝細胞癌の周囲まで広がっていることが2方向から確認することができ、穿刺および展開が正確にさ

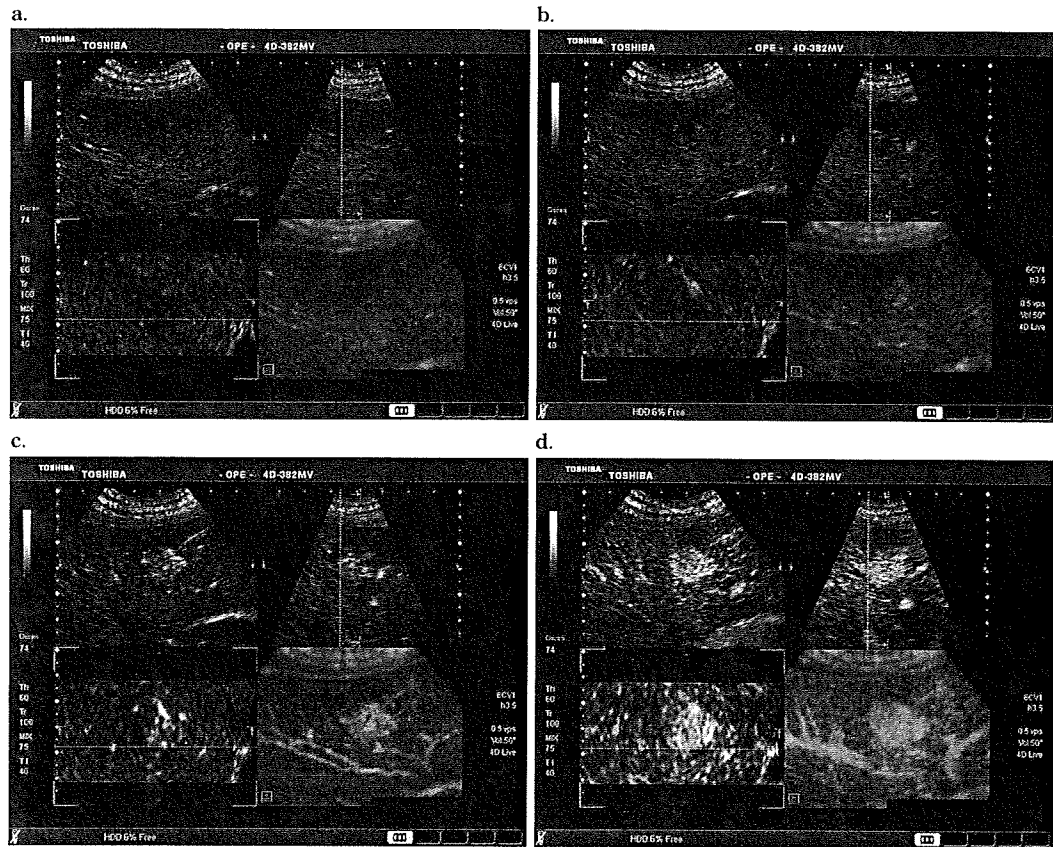


図3 肝細胞癌の造影4D-US(MPR表示)

a-dは時間経過を示す。右下のMIP像を見ると、右下から血流が流入し、右上に流出している門脈と考えられる像が観察された。

れていることが確認できた(図4)。

翌日、治療した領域の造影4D-USを施行した。肝細胞癌の残存を示す染色は認められず、肝細胞癌は十分焼灼されていたことが多方向から確認できた。

#### 4. 考 察

4D-USおよび造影4D-USにより、肝腫瘍を三次元的に診断することが可能となり、多方向から詳細に肝腫瘍や周囲の構造を観察、診断することが可能となった。

また、RFAにおいて、今までの断層像では左右方向のズレは容易に観察することができたが、これと直交する前後方向のズレを確認すること

は難しかったが、穿刺に4D-USを用いることにより、前後方向のズレまで容易に確認することができ、正確な穿刺ができ、RFAの治療効果に寄与することが考えられた。

RFAの効果判定では多方向から焼灼域を観察することができ、効果を判定することが可能であった。

現在、周囲の脈管や臓器の構造をもとに、RFAの術前、術中、術後のボリュームデータをもとに、3Dまたは4D-USの位置を合わせるソフトウェアが開発されてきている。これにより位置合わせを正確に行うことができれば、造影エコーのみで正確なRFAの治療、効果判定が可能となる。



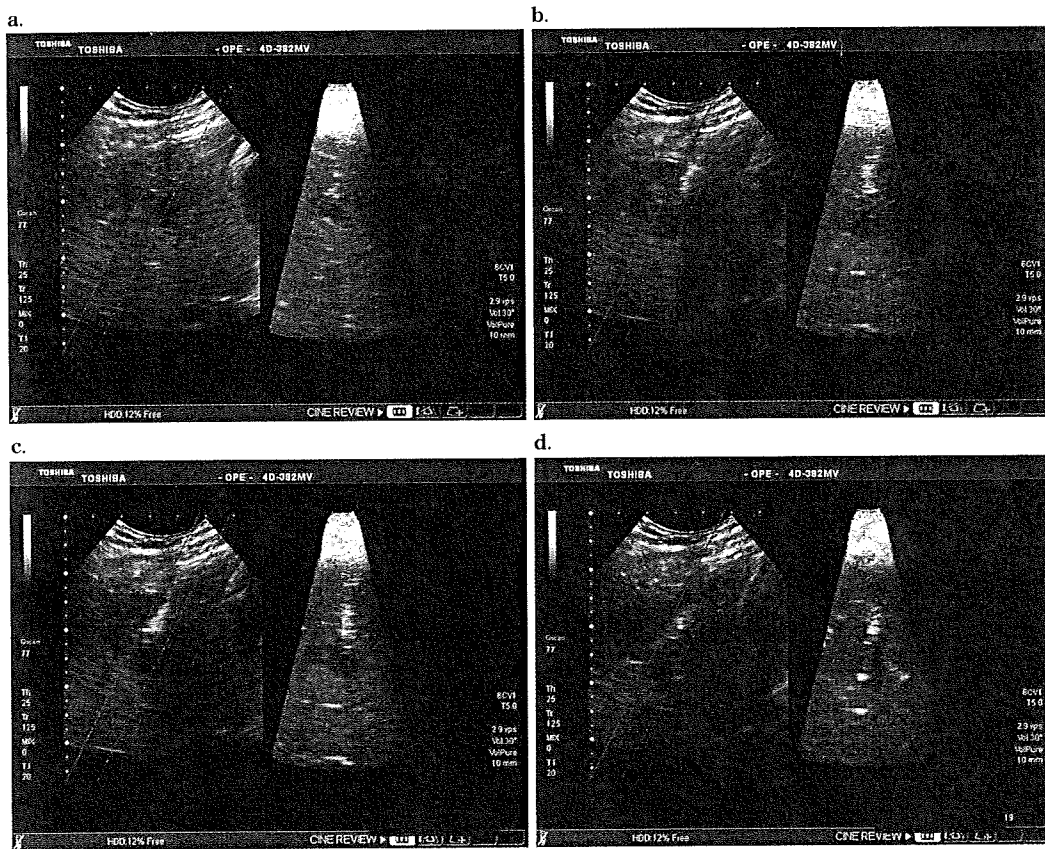


図4 肝細胞癌のRFA穿刺時の4D-US (VolPure表示)

a-dは時間経過を示す。肝細胞癌の中心にRITA針が穿刺され、展開される様子が2方向から観察された。

## 特集II 新世代超音波造影剤導入による肝癌診断・治療の変革

# 4D超音波による肝癌の診断とRFAの治療ガイドおよび効果判定\*

山田昌彦\*\*  
佐野隆友\*\*  
森安史典\*\*

**Key Words** : four-dimensional ultrasound, contrast-enhanced ultrasound

### はじめに

3次元超音波(3D-US)は2次元画像から3次元画像を構築し, いわばレトロスペクティブに画像をみて診断する検査であったが, 現在ではリアルタイムに3D画像を表示できるまでに装置が進歩した. リアルタイムに3D-USを表示する4D超音波(4D-US)は, 産科領域や循環器科領域では普及しているが, 腹部領域では4D-USには高い関心が寄せられているものの, その適応や有用性に関してはいまだ研究段階の部分も多く, 開発の余地を残している.

ソナゾイド®は高いフレームレートで観察でき, マイクロバブルを壊すことなく超音波検査を行えるため, 実時間性が大きく向上し, また空間分解能も向上した. 今回われわれは, ソナゾイド®を用い, 肝腫瘍を対象として4D-USを行った. さらに肝細胞癌のラジオ波焼灼療法(RFA)治療の効果判定も試みた.

4D-USは, B-modeではリアルタイムにmulti-planar reconstruction (MPR)表示ができるため, 腫瘍や肝の立体構造を即座に理解することにより有用であり, さらに, 造影4D-USは造影態度を立体

的に把握することに有用であった. 肝腫瘍の診断においては, 血管相の観察が有用であり, RFAの治療後の効果判定には, 血管相とともに実質相が有用であった. また, RFAの穿刺においては, 4D-USは, 3次元的なズレを把握することを容易とした.

### 背景

1. 超音波断層法の進化と造影超音波の開発  
超音波断層法は1970年代に臨床応用されたが, 長く非造影のBモードの時代があり, その後超音波のドプラ効果を利用したドプラモードがそれに加わった. 対象は, 腫瘍の血管を可視化することによる良悪性の鑑別診断や, 血管病変の診断である. しかし, 細動脈~毛細血管に至る微小循環の血流表示はできなかった. 主に水からなる生体において, 生体ともっとも音響インピーダンスに差があるのは気体である. そこで, 微小気泡からなる超音波造影剤が開発された. さらに, 非線形信号を映像化するハーモニック技術が開発され, 大血管から毛細血管まで, その中を流れる血流を映像化することができるようになった.

また, 微小気泡の造影剤のレボビスト®およびソナゾイド®は, 血管から間質へは出ないものの, 血管内腔にあるマクロファージによって貪食を

\* Three-dimensional and four-dimensional ultrasound of liver cancer.

\*\* Masahiko YAMADA, M.D., Takatomo SANO, M.D. & Fuminori MORIYASU, M.D.: 東京医科大学消化器内科 [〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1]; Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokyo Medical University, Tokyo 160-0023, JAPAN

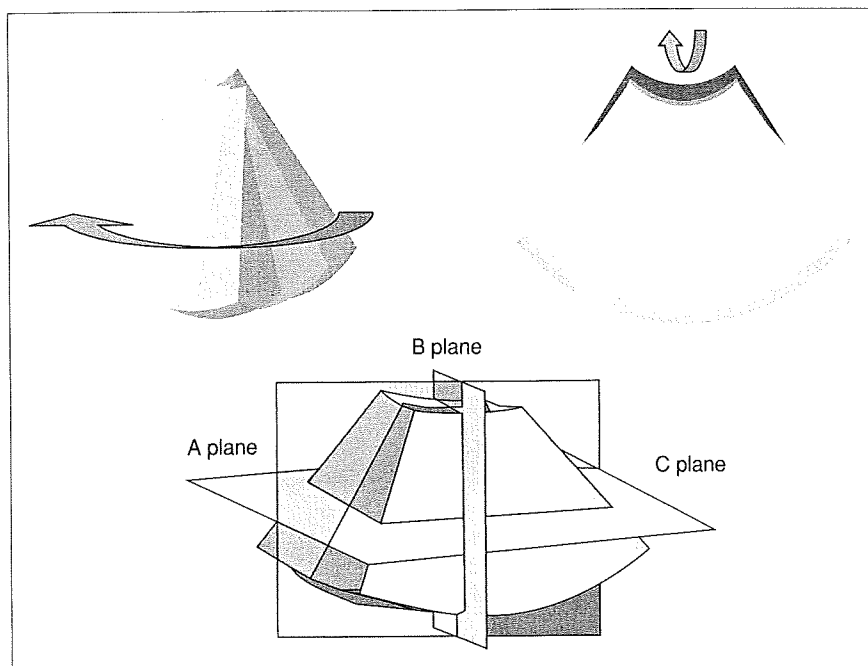


図1 3Dおよび4D-USの撮像方法

ボリュームは図の上段のようにスイープして得られた画像をレンダリングしたもの、Multi-planar reconstruction (MPR)ではこれを図のようにA面、B面、C面として観察した。

受ける。すなわち、従来の血管内血流の増感剤であるblood pool agentと、細胞標的造影剤であるKupffer cell agentとしての2つの造影効果をもつことになった<sup>2)</sup>。

## 2. 3Dおよび4D超音波の開発

超音波診断装置の画像処理能力の向上と画像処理技術の進歩により、超音波技術も飛躍的な進歩を遂げた。3次元超音波検査(3D-US)は連続した2次元の断層画像から3D画像を構築し、いわばレトロスペクティブに画像をみて診断する検査であった。初期には、プローブを手動でSweepして、連続的に断面を保存し、プローブの移動距離と振り角を入力することにより3D画像をレンダリングしていた。その後、位置情報を画像に付加できる磁気センサー付きのプローブが開発され、プローブをSweepすることにより得られた連続断面のそれぞれに自動的に位置情報が付加され、3D画像を自動的にレンダリングすることができるようになった。さらに、近年はプローブの内部で自動的にSweepを行うメカニカル4Dプローブが開発され、腹部用の比較的細径のプ

ローブもでき、自動的に正確な位置情報が付加された連続断面から瞬時に3D画像をレンダリングし、腹部領域でも容易に描出および保存ができるようになった。さらに画像処理能力の向上により、3次元画像をリアルタイムに表示できるようになり、リアルタイム3次元超音波(4D-US)が可能となった<sup>3)</sup>。

## 3. 造影4D-US

4D-USはすでに造影剤を用いることも可能となっている。初期にはドップラー画像よりレンダリングした3D画像をBモードよりレンダリングした3D画像と融合させることにより、組織内の血流を3D表示していたが、レボビスト®の登場により造影3次元超音波が可能となった。さらに、ソナゾイド®の開発およびこれに対応した低音圧を用いた造影超音波モードが開発され、レボビスト®に比較して高いフレームレートで観察でき、実時間性が大きく向上した。すなわち、ソナゾイド®の登場により、造影4D-USにおいては、高いフレームレートから得られる連続断層画像を高い処理能力でレンダリングすることができるようになり、

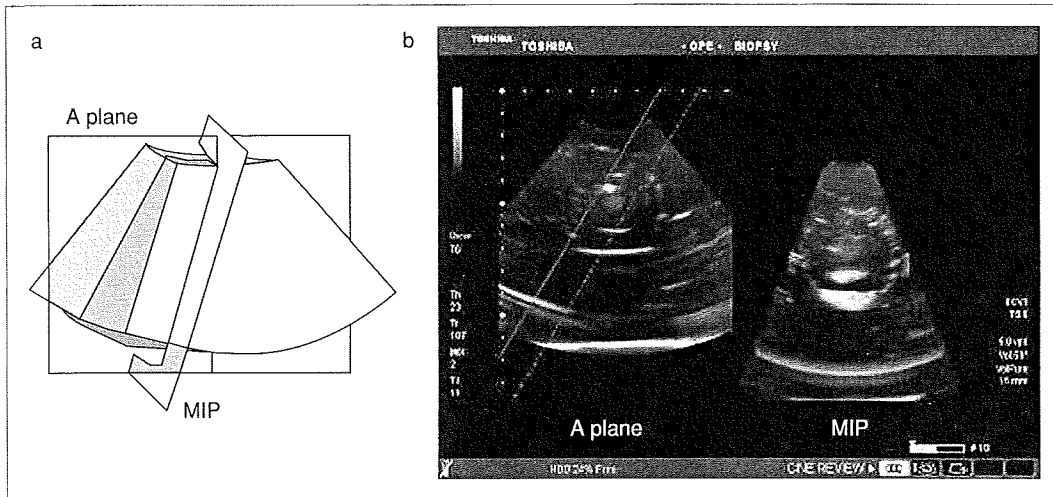


図2 穿刺時に用いたVolPureモード

a : B面を穿刺ラインに沿って傾けたシェーマ, b : 寒天と半熟の鶏卵から作ったファントム, 左はA面で, 右はA面に直交し, 穿刺ラインを含む面のmaximum intensity projection (MIP)表示.

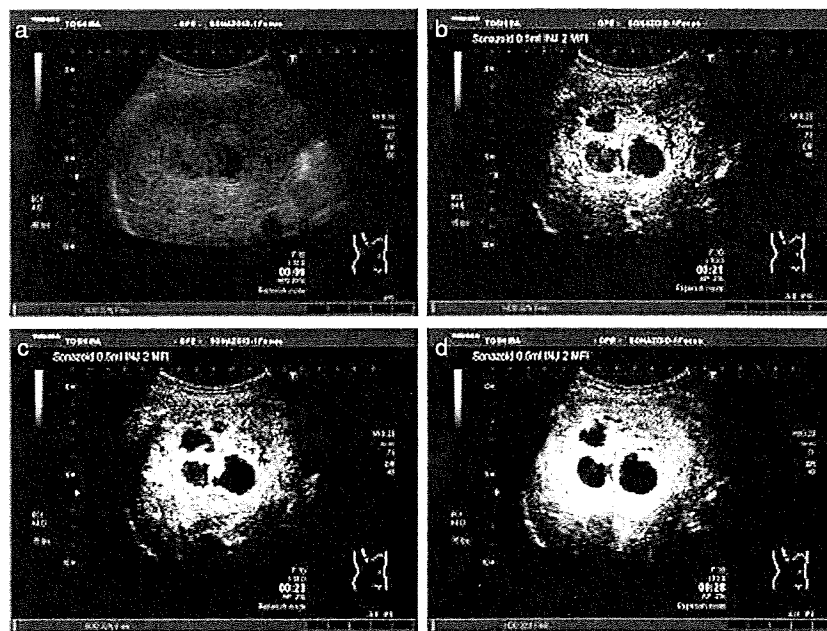


図3 肝膿瘍のソナゾイド®造影2D-US

a : Bモード像. b : 造影USの21秒後. c : 造影USの23秒後. d : 造影USの28秒後. 膿瘍腔の周囲および境界に高血流な部分が観察された.

高いボリュームレートで画像の描出と保存が自動的にできるようになった。また、レボビスト®のようにマイクロバブルを壊すことなく超音波検査を行えるため、造影超音波のためのデータが大幅に増加し、空間分解能も向上した。

### 方 法

超音波診断造影はAplio XG(東芝メディカルシステムズ)を用いた。4D-USのボリュームレートは0.3~5 vpsとした。周波数はBモードは5 MHz,