



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	超音波生体作用研究用照射容器の内部音場の可視化と制御に関する研究
Author(s)	相川, 武司
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(情報科学)
Dissertation Number	甲第15216号
Issue Date	2022-09-26
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15216
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87203
Type	doctoral thesis
File Information	Takeshi_Aikawa.pdf



博 士 論 文

超音波生体作用研究用照射容器の

内部音場の可視化と制御に関する研究

Studies on visualization and control of ultrasound fields inside exposure chambers used for
evaluation of ultrasound-related biological effects

北海道大学 大学院情報科学研究科

生命人間情報科学専攻

相川 武司

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（情報科学） 氏名 相川 武司

学位論文題名

超音波生体作用研究用照射容器の内部音場の可視化と制御に関する研究
(Studies on visualization and control of ultrasound fields inside exposure chambers used
for evaluation of ultrasound-related biological effects)

診断や治療の分野で広く利用されている超音波の分野では、強度や圧力をはじめとする種々の照射量と生体作用を関連づける研究が古くから行われてきた。安全な超音波診断の実現には、生体に作用を与えない超音波出力の上限値を、確実な超音波治療の実現には生体に作用を与える下限値を、様々な機序について明らかにする必要がある。

上限値と下限値を明らかにする基礎実験として、容器内の培養細胞に超音波を照射する実験が広く行われているが、細胞が実際に受ける超音波照射量を正確に評価することは難しい。超音波と同様に診断と治療に利用される放射線では、照射量として放射線源の放射線量が用いられる。放射線は透過性が高く、細胞が受ける照射量はほぼ放射線量のみで決まるためである。一方、超音波でも強度や負圧が照射量の主な指標として用いられるものの、細胞が実際に受ける照射量が超音波振動子の出力のみでは決まらないという問題点がある。これは、超音波が音響インピーダンスの境界で容易に反射・屈折を生じることから、細胞が受ける照射量が照射対象や容器などの周囲環境の影響を受けて複雑に変化するためである。それゆえ、培養細胞に超音波を照射する実験の再現性は低く、これを解決するための超音波照射容器の改良が行われてきた。最近の研究では細胞培養に適したシャーレと吸音材を組み合わせた容器が反射の起きにくい照射容器として使われているが、小型閉空間内に生じる複雑な音場の計測は難しく、内部音場の均一性は実証されていない。

さらに、高強度超音波治療における主要な作用機序であるキャビテーションの発生と内部音場の関連も十分に解明されていない。超音波の生体作用機序は、大きく熱的作用と非熱的作用に分けられる。熱的作用は超音波の吸収に基づく生体組織の温度上昇に起因し、非熱的作用は主として圧力振動に基づく機械的作用に起因する。非熱的作用の一種であるキャビテーションが起きると、振動する気泡の周囲に激しい機械的作用が生じ、気泡の断熱圧縮場内で発生するフリーラジカルが音響化学的作用を生じる。このキャビテーションの発生は定在波音場内で増強されることが知られているが、照射容器内に生じる定在波音場とそれがキャビテーションの発生に与える影響は十分明らかにされていない。

そこで本研究では、超音波の生体作用研究が行われる 2 つの標準的な超音波照射条件、すなわちシャーレ内に低強度超音波を照射する条件と、水面に向けて高強度超音波を照射

する条件で発生する超音波音場を光学的手法により可視化することで、照射環境による超音波音場の変化を明らかにし、生体作用の発生機序の理解を深めることを目的とする。

まず、低強度超音波を用いる実験を想定し、小型容器内で反射・伝導する超音波と、音響放射力により生じる水面の波立ちで反射する超音波が内部音場に与える影響をフォーカストシャドウグラフ法により可視化した。その結果、壁内を伝搬する超音波が容器内に漏れ出し内部音場を乱すこと、容器の開口制限を受けた超音波の回折波が容器側壁で反射し内部音場を乱すことを確認した。また、波立ちの形状を模擬した容器の音場を可視化し、波立ちの内部に音圧の高い集束点が生じることを明らかにした。これらの結果は、内部音場の不均一性が細胞への作用実験の再現性の低さの原因となっている可能性を示していた。さらに、これらの影響を受けない超音波照射容器を提案し、その均一性を音場可視化により確認した。

次に水面に向けて高強度超音波を照射した際に生じる水面の盛り上がりの内部音場について検討した。連続超音波により水面の盛り上がりが発生させ内部音場を可視化するとともに、その形状を模擬した容器の内部音場も可視化した。その結果、盛り上がりの高さが高くなるにつれて定在波のパターンが線状から格子状に変化し、ピーク音圧が増強されることが確認できた。また、有限要素法を用いたシミュレーションでは、定在波音場のパターンや音圧の変化の傾向に一致が見られた。特に、高音圧下では盛り上がりの水面直下に音圧の高い腹点群が発生することが確認され、腹点群が水面でのキャビテーション発生に重要な役割を果たすものと示唆された。

最後に、超音波の生体作用発生の重要な機序の一つであるキャビテーションによるフリーラジカルの発生について検討した。実験の結果、フリーラジカルの発生、超音波霧化の発生、水面盛り上がりから水柱への水面形状の移行の超音波強度閾値が全て一致することを明らかにした。この結果は、水面形状の変化による超音波の集束が生体作用の発生に関する超音波強度閾値を見かけ上低下させることを意味している。

以上本論文では、超音波の生体作用研究に用いられる超音波照射容器において音波の反射・屈折により音場が不均一となることを音場可視化により示し、音場を乱す要因を制御することで音場の均一性を向上する方策を示した。また、高強度超音波によって生じた水面の盛り上がり格子状の定在波音場を形成し、それにより生体作用の発生に関する超音波強度の閾値を見かけ上低下させることを示した。これらの結果は超音波の生体作用研究において超音波照射容器内音場を可視化により把握し、音場制御や作用機序解明に応用することの重要性を示している。

目次

第 1 章	序論	1
1.1	本研究の目的	1
1.2	本論文の構成	3
第 2 章	背景	4
2.1	超音波の生体作用	4
2.1.1	超音波と放射線の生体作用の違い	4
2.1.2	超音波の熱的作用	4
2.1.3	超音波の非熱的作用	4
2.2	超音波の治療応用	6
2.2.1	低強度パルス超音波 (LIPUS: Low Intensity Pulsed Ultrasound)	6
2.2.2	強力集束超音波 (HIFU: High Intensity Focused Ultrasound)	6
2.2.3	音響力学療法 (SDT: Sonodynamic Therapy)	6
2.3	強力超音波に特徴的な現象	8
2.3.1	キャビテーション	8
2.3.2	超音波霧化	8
2.4	超音波の生体作用研究	10
2.4.1	培養細胞への超音波照射	10
2.4.2	ハイドロホンを用いた音場測定	11
2.4.3	シミュレーションによる音場評価	11
2.5	超音波音場可視化法	13
2.5.1	超音波音場を透過する光	13
2.5.2	シュリーレン法	15
2.5.3	シャドウグラフ法	17
2.5.4	フォーカストシャドウグラフ法	19
2.5.5	パルス超音波音場の可視化	20
2.5.6	音場可視化例	21
第 3 章	細胞培養容器内に生じる低強度超音波音場	23
3.1	音場可視化法	24
3.2	容器の壁が音場に与える影響	25
3.2.1	容器の壁が音場に与える影響の可視化法	25
3.2.2	容器壁による音場への影響	27
3.2.3	アクリル容器とポリオレフィン樹脂容器の音場形成についての考察	29

3.3	水面傾きが音場に与える影響	32
3.3.1	水面傾きの音場への影響の実験方法	32
3.3.2	水面傾きによる音場への影響	32
3.3.3	水面傾きの音場へ与える影響についての考察	33
3.4	吸音材が音場に与える影響	35
3.4.1	吸音材の音場への影響を検討するための実験方法	34
3.4.2	吸音材による音場への影響	36
3.4.3	吸音材が音場に与える影響の考察	37
3.5	音響放射力により生じる波立ちの影響	38
3.5.1	音響放射力により生じる波立ちの影響についての実験方法	38
3.5.2	水面波立ちの影響	39
3.5.3	水面波立ちが音場に与える影響の考察	43
3.6	均一な音場の発生手法	44
3.6.1	実験方法	44
3.6.2	実験結果	45
3.6.3	考察	48
3.7	フォーカストシャドウグラフ法における境界の輝度低下の検討	52
3.7.1	実験方法	52
3.7.2	実験結果	52
3.7.3	考察	53
第4章	高強度超音波照射による水面盛り上がりと水柱の内部音場	55
4.1	実験方法	56
4.1.1	可視化のための水面盛り上がりの形成法	56
4.1.2	霧化水柱の形状	57
4.1.3	模擬容器の形状	58
4.1.4	音場シミュレーション法	60
4.2	水面盛り上がり内部音場	63
4.2.1	水面盛り上がり内部の音場可視化	63
4.2.2	水面盛り上がり模擬容器の音場可視化	64
4.2.3	シミュレーションによる音場可視化と有効性の考察	64
4.3	霧化水柱の内部音場	68
4.3.1	霧化水柱模擬容器の内部音場可視化	68
4.3.2	シミュレーション	69
4.3.3	考察	71
4.3.3.1	超音波霧化における水柱発生機序に関する考察	73

4.3.3.2	液滴と霧化の発生機序に関する考察	73
第5章	高強度超音波照射による霧化とフリーラジカルの発生	74
5.1	実験方法	74
5.1.1	超音波照射強度変化による霧化とフリーラジカル発生の関係	75
5.1.2	水面形状とフリーラジカル発生量の関係	75
5.1.3	フリーラジカルの測定によるキャビテーション発生の評価	76
5.2	実験結果	78
5.2.1	水面形状と霧化	78
5.2.2	水面形状とフリーラジカル発生	80
5.3	考察	82
5.3.1	超音波照射強度とキャビテーション閾値, 霧化発生に関連	82
5.3.2	水面形状とキャビテーションの関連	82
5.3.3	超音波霧化におけるキャビテーション閾値の低下	83
5.4	キャビテーション発生の評価による音圧推定の可能性	84
5.4.1	超音波振動子を水槽底部に配置する実験	84
5.4.1.1	実験方法	84
5.4.1.2	結果	84
5.4.1.3	考察	85
5.4.2	超音波振動子を水槽側面に配置する実験	86
5.4.2.1	実験方法	86
5.4.2.2	結果	87
5.4.2.3	考察	88
第6章	結論	90
	参考文献	94
	謝辞	98

第1章 序論

1.1 本研究の目的

医療において超音波は診断と治療の両面に利用されている。超音波を応用することの利点としては、生体組織における散乱や減衰の少ない伝搬特性や生体への侵襲性の低さが挙げられ、生体深部組織の診断や治療が実現されている。X線と異なり被爆の問題が無いことから、超音波は胎児診断に広く利用されている。それゆえ、妊娠初期の胚や胎児への超音波の生体作用を明らかにすることは超音波診断の安全性を示す上で必須であり、超音波の生体作用に関する研究が古くから行われている^[1.1-1.3]。また、超音波の生体作用は治療にも応用されており、超音波が生体に与える作用機序や強度閾値の解明に向けた研究が盛んに行われている。

超音波の生体作用機序は、大きく熱的作用^[1.4]と非熱的作用^[1.5]に分類される。熱的作用は超音波の吸収に基づく生体組織の温度上昇に起因し、非熱的作用は主として超音波の圧力振動に基づく機械的作用に起因する。特に、強力超音波の照射下では超音波の負圧により気泡が生じるキャビテーション現象が生体作用の原因となることが知られている^[1.6]。この現象が起きると、振動する気泡は周囲の生体組織に激しい機械的作用を与え、気泡の断熱圧縮場内で発生するフリーラジカルは周囲に音響化学的作用^[1.7]を与える。

超音波の生体作用実験では実験の再現性を確保することが大きな課題となっている。超音波の生体作用研究において、照射量とその結果生じる作用を正しく対応づけることは必ずしも簡単ではない。これは超音波が音響インピーダンスの異なる境界で容易に反射・屈折するため、それぞれの波が干渉して複雑な定在波音場を生じるためである。医用超音波では数 MHz の周波数帯多く使われるが、その波長は 1 mm 以下であり、定在波の腹の間隔はその半分となる。このように超音波音場が複雑だと、超音波の照射量と生体作用を正しく対応づけることは難しい。

このような音場分布を正しく評価することも難しい。音場評価法としてハイドロホンを用いた音場計測がある。ハイドロホンは超音波の音場の評価に用いられる水中マイクロホンである。水中にハイドロホンを置くとハイドロホン自体が超音波の反射・散乱の原因となり、内部音場を変化させてしまう。その他に音場分布を評価する方法として、超音波音場中で光が屈折する現象を利用し音場を可視化するシュリーレン法がある。シュリーレン法は、非接触な音場計測として古くから利用されているが、シュリーレン法は連続超音波の包絡線を可視化する手法であるため、パルス波の伝搬や波長レベルで変化する複雑な定在波音場を可視化することは困難である。

さらに、低強度の超音波が生体に与える作用を調べる研究では、シャーレ内の培養細胞に下方から超音波を照射し、その作用を培養を継続して調べる手法が多く用いられる。この条

件では、振動子を出た進行波と水面で反射した反射波が干渉して定在波音場が生じることが知られており、これを避けるために水面に吸音材を置く照射方法が提案されている。このような条件では小型閉空間内に生じる複雑な音場の評価はハイドロホンでもシュリーレン法でも難しく、内部音場の均一性は実証されていない。

高強度の超音波は、熱的作用や機械的作用を利用する強力集束超音波治療(HIFU therapy: high-intensity focused ultrasound therapy) や、音響化学的作用を利用する音響力学療法(SDT: sonodynamic therapy) などに応用されている。これらの治療では、キャビテーションが生じる機械的作用や音響化学的作用が重要な役割を果たしている。キャビテーションは超音波強度に関する閾値がある現象であるため、安全で効果的な治療を実現するにはキャビテーションの発生と超音波強度の関連を十分に理解する必要がある。

キャビテーションの発生には、超音波の強度以外にも様々な要因が関与していることが知られている。例えば、キャビテーションの発生はキャビテーション核の存在に強く依存し、同じ音圧であっても進行波音場よりも定在波音場内ではキャビテーションの発生閾値が低下する。

そこで本研究では、超音波の生体作用研究が行われる 2 つの標準的な超音波照射条件、すなわちシャーレ内に低強度超音波を照射する条件と、水面に向けて高強度超音波を照射する条件で発生する超音波音場を光学的手法により可視化することで、照射環境による超音波音場の変化を明らかにし、生体作用の発生機序や発生閾値の理解を深めることを目的とする。

1.2 本論文の構成

本論文の構成を以下に示す。

第 2 章では、本研究の背景として超音波の生体作用機序である熱的作用と非熱的作用について述べる。また、超音波の治療応用について述べ、特に高強度超音波における特徴的な現象であるキャビテーションと超音波霧化について述べる。さらに超音波の生体作用研究に用いられる細胞に超音波を照射する容器内に生じる音場の特徴について述べ、ハイドロホンによる超音波音場の測定方法とシミュレーションによる音場評価法については先行研究をまじえ現状と課題について述べる。最後に超音波の可視化法であるシュリーレン法とシャドウグラフ法、そして著者が所属する研究室で考案され本研究で用いたフォーカストシャドウグラフ法の特徴と利点について述べる。

第 3 章では、まず細胞培養容器内に生じる低強度超音波音場の可視化方法について述べ、その可視化法を用いて容器の壁や水面の傾き、吸音材、音響放射力により生じる水面の波立ちを観察した結果について述べる。そして、それらの知見を基に考案した均一な音場の発生手法についても述べる。さらに、フォーカストシャドウグラフ法により可視化した音場像の定量化に向けた検討についても述べる。

第 4 章では高強度超音波照射により生じる水面の盛り上がりが音場に与える影響を検討した結果について述べる。まず、水面盛り上がりの形成法について述べ、次にその水面盛り上がりと盛り上がりを模擬した容器の内部音場をフォーカストシャドウグラフ法により可視化した結果について述べる。さらに有限要素法によるシミュレーションを行ない水面盛り上がりの内部音場検討における模擬容器とシミュレーションの有用性を検討した結果について述べる。また、超音波霧化に関する水柱の内部音場についても述べる。

第 5 章では、強力超音波照射によるキャビテーションの発生を、ヨウ素デンプン反応法でフリーラジカルを検出することにより評価し、水面の形状とキャビテーション発生の関連を調べた結果について述べる。さらにキャビテーション発生閾値を調べるために行った局所音圧推定に関する検討についても述べる。

第 6 章では、本研究のまとめを述べる。

第2章 背景

本章では、本研究の背景である超音波の生体作用研究の現状と問題点について述べる。次に、光学的手法を用いた音場の可視化法であるシュリーレン法とフォーカストシャドウグラフ法について説明し、本研究で使った音場可視化法であるフォーカストシャドウグラフ法の利点を明らかにする。

2.1 超音波の生体作用

超音波の生体への作用は超音波の照射時間と強度によって決定される。Fig. 2.1 に示すように生体作用閾値以下の超音波は主に診断に用いられ、生体作用閾値以上の超音波は治療に用いられる。超音波が生体に与える作用としては、音響エネルギーの吸収による熱的作用と、放射圧や振動による機械的作用を中心とする非熱的作用がある^[2.1]。

2.1.1 超音波と放射線の生体作用の違い

Fig. 2.2 はそれぞれの照射を受けた分子が得るエネルギーレベルを表す。図に示すように、超音波のエネルギーレベルは PET や SPECT などの装置が使う電離放射線のエネルギーレベルよりも非常に低く安全性が高いとされている。なお、放射線の 1 つである X 線は電磁波であり、組織の X 線吸収量の違いによる透過性を画像としている。X 線の生体作用は、細胞が吸収する X 線の吸収量に応じて変化し、その作用は塩基や DNA の損傷である^[2.2]。

2.1.2 超音波の熱的作用

生体内を伝搬した超音波の音響エネルギーが吸収されることにより熱が発生する。組織の温度が 42°C を超えるとタンパク質に不可逆的な変化が起こり、細胞に障害を与える。なお、骨や神経組織は熱の吸収が大きく高温になりやすい。アメリカ超音波医学会 (AIUM) の超音波安全に関する見解では、非集束超音波では 100 mW/cm² 以下、集束超音波では 1 W/cm² 以下、もしくは温度上昇が 1.5°C 未満であれば安全としている。

2.1.3 超音波の非熱的作用

非熱的作用には機械的作用と音響化学的作用がある。非熱的作用を発生させる主な機序はキャビテーションである。キャビテーションは、超音波の負の圧力がある閾値を超えると発生する。液体のキャビテーション発生閾値は、溶存気体が不純物の量に依存して大幅に変化する。キャビテーションとは超音波の負圧により気泡が発生し、膨張と収縮を繰り返す現象である。機械的作用はこのキャビテーションにより発生した気泡が膨張と収縮をすることで細胞が受ける刺激である。比較的低音圧下で気泡が膨張と収縮を安定に繰り返すキャ

ビテーションはノンイナーシャルキャビテーションと呼ばれる。非熱的作用は、キャビテーションにより生じた気泡が非常に速い圧縮により断熱圧縮し圧壊することにより生じる。その際、気泡の内部の温度と圧力は数万℃、千数百気圧にまで達すると言われており、ホットスポットとも呼ばれている。このホットスポットの高温・高圧力により水分子が O^+ と OH^- に熱分解されることでフリーラジカルが発生する。この気泡の圧壊を伴うキャビテーションはイナーシャルキャビテーションと呼ばれている。

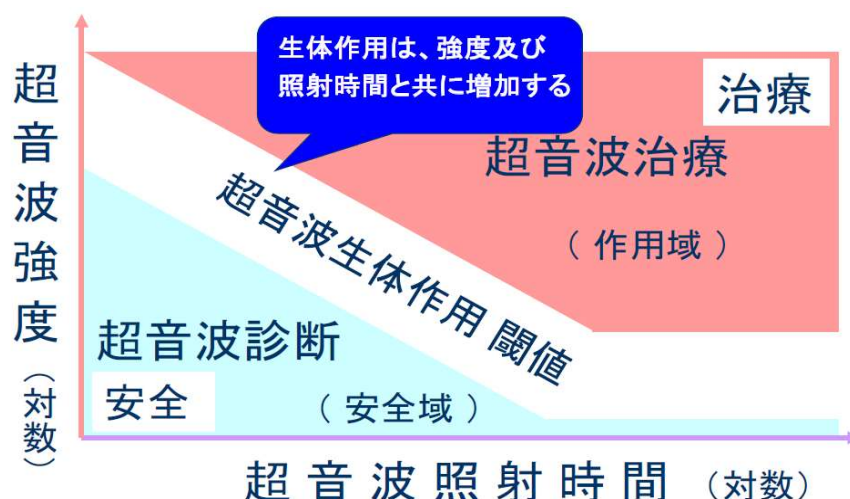


Figure 2.1 超音波による診断と治療の作用域^[2.1]（日本超音波医学会 機器及び安全に関する委員会，電子情報技術産業協会 超音波専門委員会，“超音波診断装置の安全性に関する資料”，第4版，2020.）

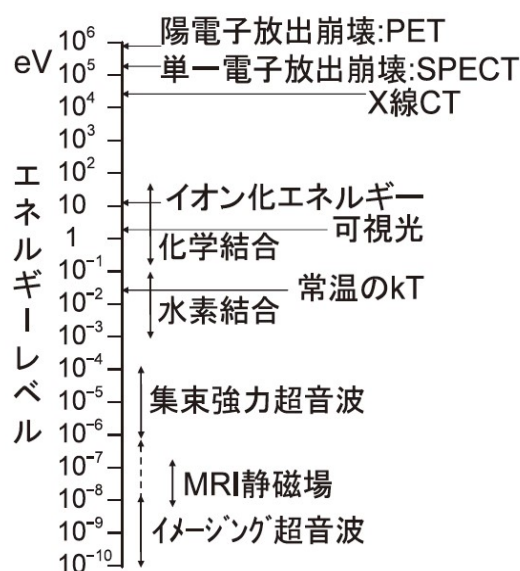


Figure 2.2 超音波医用装置と他手法とのエネルギーレベル（eV）の違い^[2.3]（Jpn. J. Med. Ultrasonics 41.5(2014): 678.）

2.2 超音波の治療応用

超音波は診断で広く利用されている。近年は治療への応用も拡大されており、生体に照射される超音波の出力は年々増大している。超音波を用いた治療法は主として 3 つに分類される。

2.2.1 低強度パルス超音波 (LIPUS: Low Intensity Pulsed Ultrasound)

低強度超音波パルス (Low Intensity Pulsed Ultrasound: LIPUS) は現在骨折治療に使われており、1997 年に薬事承認を取得し、1998 年には保険収載されている。LIPUS ではバースト長が 1,000–10,000 周期程度のバーストパルスが用いられ、超音波の機械的振動による線維芽細胞の増殖やキャビテーションの音響流が骨芽細胞の新生を促すことにより骨癒合を促進すると考えられている。現在、治療に広く用いられている照射条件は、周波数 1.5 MHz、繰り返し周波数 1.0 kHz、デューティ比 20%、超音波強度 30 mW/cm²、照射時間 20 min/日である。しかしながら、その作用機序は完全に解明されておらず、骨細胞が LIPUS の刺激を感知する分子メカニズムについての研究^[2,4]などが行われている。

2.2.2 強力集束超音波 (HIFU: High Intensity Focused Ultrasound)

強力集束超音波治療は、患部に体外から集束させた超音波を病変部に照射し、主として熱的作用によるタンパク質変性を利用した治療手法である。生体組織への加熱効果を利用した超音波治療で近年世界的に普及に成功しているのは、イスラエルの InSightec 社が開発した ExAblate シリーズ超音波治療装置である。MRI と超音波エコーの 2 つのモダリティで患部を特定し、その患部に体外からの超音波を一点に集束し、組織を加熱凝固する。適応部位は肝臓や腎臓、膵臓などである。さらに、最近では脳腫瘍への応用も広がっている。超音波の集束は小型の振動子を半球面上に配列した円盤型トランスデューサーを用いる^[2,5]。

2.2.3 音響力学療法 (SDT: Sonodynamic Therapy)

癌治療には放射線治療や化学療法など多く行われているが、近年新たな治療として光線力学療法 (PDT: Photodynamic Therapy) が確立されつつある。PDT は光エネルギーにより腫瘍細胞に選択的に取り込まれた光感受性物質を励起し、これが基底状態に戻る際に発生する活性酸素 (ROS: Reactive Oxygen Species) が腫瘍細胞のみに酸化的損傷を引き起こし細胞死に誘導するという、正常組織にとってはきわめて低毒性の画期的な治療とされている。しかし、PDT の問題は光線深達度から表在性の病変に限られることである。そこで注目されたのが超音波を用いて PDT と同様の効果を狙う音響力学療法 (SDT: Sonodynamic Therapy) である。

SDT の機序は、超音波のイナーシャルキャビテーションによる音響化学作用が関係していると考えられている。音響化学作用の 1 つに発光現象を伴うソノルミネッセンスがある。

ポルフィリン系物質やキサンテン系物質などの感受性物質がソノルミネッセンスで発生する光により励起され ROS に変換されることで細胞に酸化的損傷を引き起こし細胞死に誘導すると考えられている。また、音響化学作用により発生する $\text{OH}\cdot$ などのラジカルが直接関与しているとも考えられている。しかし、不明な点も多く残されている^[2,6]。

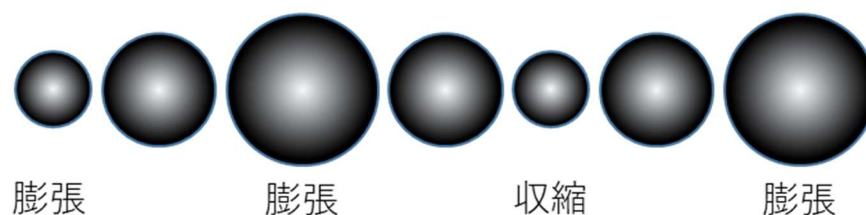
2.3 強力超音波に特徴的な現象

強力超音波の照射下では、低強度超音波では見られない特徴的な現象が発生する。その代表的な現象であるキャビテーションと超音波霧化について説明する。

2.3.1 キャビテーション

超音波を水や液体に照射した際に微小気泡が発生する現象をキャビテーションと呼ぶ。キャビテーションには Fig. 2.3(a)に示す微小気泡が膨張と収縮を繰り返すノンインナーシャルキャビテーションと Fig. 2.3(b)に示す膨張と収縮を繰り返しながら運動エネルギーを蓄積し、その後に圧壊を生じるインナーシャルキャビテーションがある。ノンインナーシャルキャビテーションで気体の膨張と収縮により気体の周りの液体に流れが発生する現象をマイクロストリーミング現象と呼ぶ。インナーシャルキャビテーションでは、気泡の断熱圧縮に伴い発生する高圧・高温状態により OH・ラジカルが発生する音響化学作用や、プラズマの発生による発光現象であるソノルミネッセンスなど特徴的な現象が発生する^[2.6, 2.7]。

a. ノンインナーシャルキャビテーション



b. インナーシャルキャビテーション

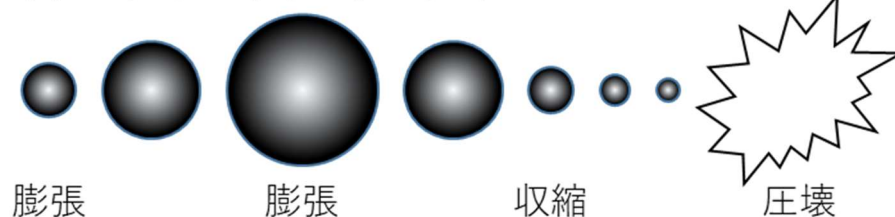


Figure 2.3 キャビテーションの種類. (a) ノンインナーシャルキャビテーション. (b) インナーシャルキャビテーション.

2.3.2 超音波霧化

強力超音波を水などの液体に照射すると液体が微細な液体となる霧化現象が発生する。その際、液面の盛り上がりが水柱に成長し、そこから粒径の大きい液滴や粒径の小さい霧化

が発生する。超音波霧化の発生機序としては3つの説が考えられている。まず、キャビテーションに基づくとする説^[2.8, 2.9]では、音響放射力による盛り上がり内にキャビテーションが発生し、そのキャビテーションが圧壊する際に生じるジェット流により霧化が生じるとされている (Fig. 2.4)。また、キャピラリー波（表面波）に基づくとする説^[2.10, 2.11]では、音響放射圧により水柱の表面に干渉波が発生し、それがキャピラリー波を形成、キャピラリー波の成長に伴い先端が千切れることで霧化を生じるとされている (Fig. 2.5)。3番目の説はキャビテーションとキャピラリー波の両方の機序に基づくとする説^[2.12]である。

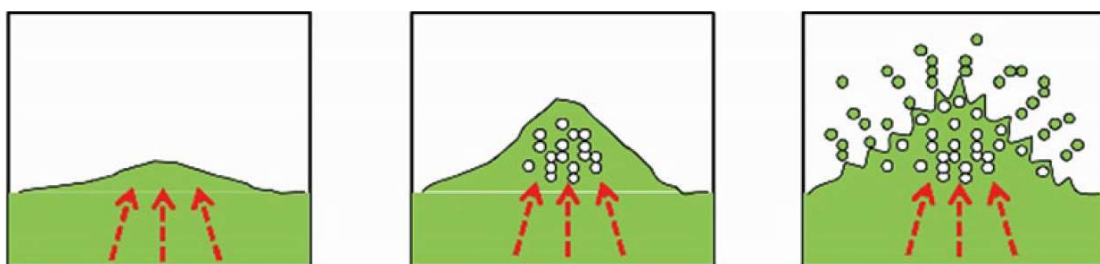


Figure 2.4 キャビテーションによる超音波霧化の発生機序^[2.9] (Copyright © © 2015 Cambridge University Press)

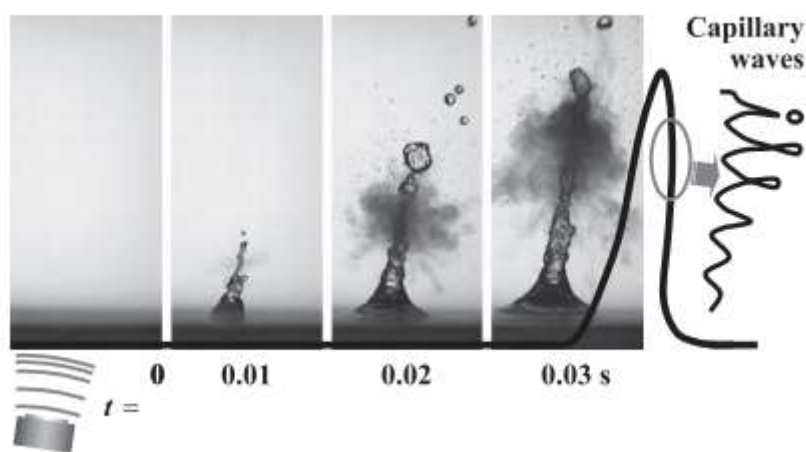


Figure 2.5 キャピラリー波による超音波霧化の発生機序^[2.11] (*Earozoru Kenkyu*, 26 (1), 12 (2011))

2.4 超音波の生体作用研究

超音波の生体作用研究にはシャーレに培養した細胞を対象とするものが多い。これは超音波照射が生体機能の最小構成要素である細胞に与える影響を調べるには、照射中や照射後も培養状態を保持し長期間に渡る作用を調べる必要があるからである。ここではいくつかの研究を紹介するとともに、細胞への超音波照射の一般的な手法をまとめる。

2.4.1 培養細胞への超音波照射

超音波による遺伝子発現の制御に関する研究としては、Ogawa らの酸化ストレスの超音波誘導による人工プロモータの活性についての報告^[2.13]があり、シャーレに培養した Hela 細胞にゲルを介して超音波を照射している。

Steele らの線虫を用いた治療用超音波の生体作用研究用モデルの構築^[2.14]では、寒天培地に線虫を入れ緩衝液で満たしたシャーレをプラスチックラップで密閉した状態で水中に設置し、水面側に置いた振動子から超音波を照射している。

Fig. 2.6 にシャーレに培養した細胞に超音波を照射する際の一般的な方法を示す。Fig. 2.6(a)は振動子とシャーレの間を超音波ゲルで満たし超音波を照射する方法である。Fig. 2.6(b)は脱気水で満たした水槽に設置した振動子の直上の水面にシャーレを配置し、脱気水を媒介して超音波を照射する方法である。どちらの方法においてもシャーレ内の培養液表面は空気となっているため、培養液と空気の界面で強い反射が起こり培養液内部に定在波が発生する。この定在波の発生を抑制する方法として Fig. 2.6(c)の様な手法が用いられる。内部をすべて培養液で満たし、薄いプラスチックラップで覆ったシャーレを脱気した水で満たした水槽の内部に設置する。そのシャーレ上方に吸音材を配置することで反射波の発生を防ぎ、定在波の発生を抑えることにより、細胞の存在する場所に依存しない均一な超音波照射が実現できると考えられている^[2.15]。

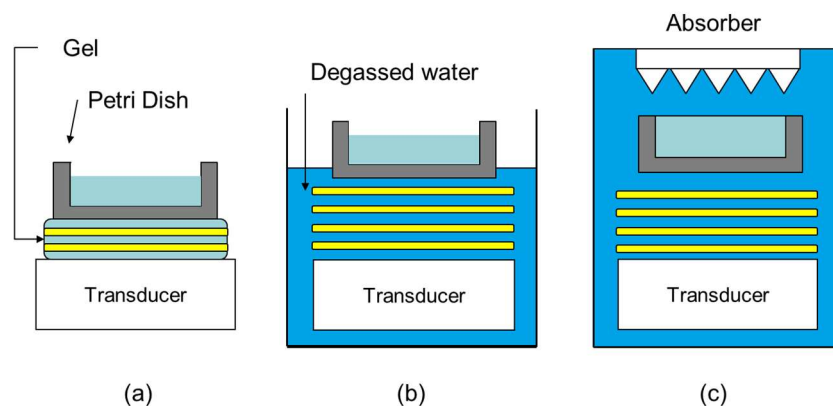


Figure 2.6 シャーレを用いた細胞実験における超音波照射方法. (a) ゲルを用いる方法. (b) 水槽を用い水を媒介させる方法. (c) 吸音材により定在波の発生を抑制する方法

2.4.2 ハイドロホンを用いた音場測定

超音波が細胞に与える作用の検討には細胞が照射されている超音波の強度を正しく測定できなければならない。現在、音場の測定には、しばしばハイドロホンが使用される。ハイドロホンは水中用のマイクロホンであり、圧電素子により水中のある一点における音圧信号を電気信号に変換し記録することができる。水槽内の音場測定は Fig.2.7(a)のように、シャーレに入れたニードル型ハイドロホンを x , y , z 方向に移動させ各座標における音圧を測定していくことにより実現される。各座標で測定した値を平面に記録すると Fig. 2.7(b)のような音圧分布を示すマップを作成できる。より詳細に音圧分布を調べるためにはハイドロホンを X-Y テーブル等を用いて機械的に走査し測定する必要がある。

ハイドロホンを使用し、シャーレ内の音場を測定した研究として、Hensel^[2,16]らがシャーレ内の音場をシミュレーションとハイドロホンによる音場測定により求めた結果が報告されている。水と空気の界面での反射による定在波の発生と、同心円状に広がる干渉パターンの発生が明らかにされている。

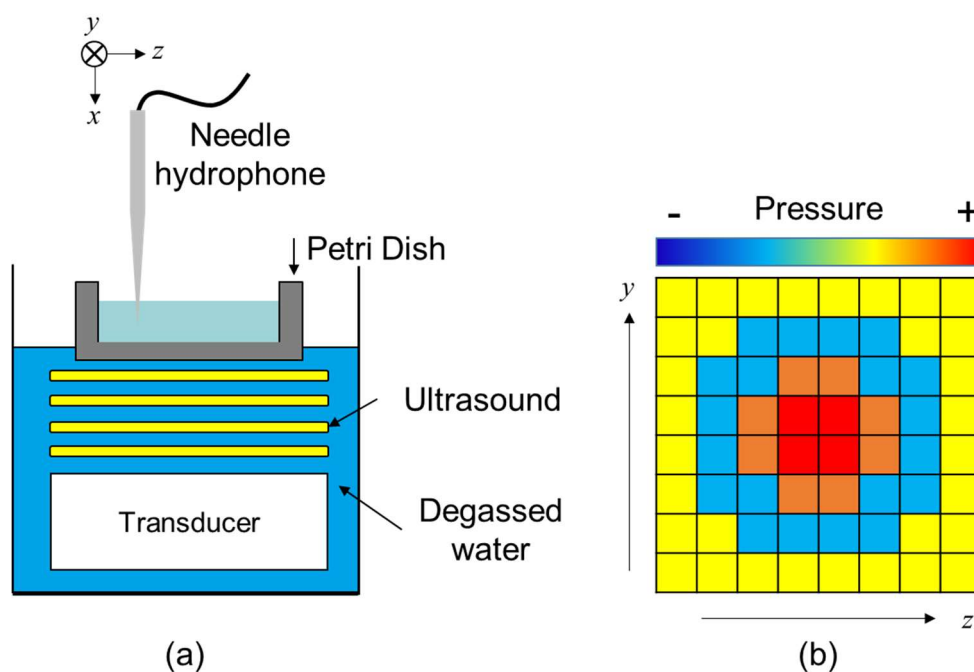


Figure 2.7 ハイドロホンを用いた音場測定(a)と測定結果(b)の模式図

2.4.3 シミュレーションによる音場評価

超音波音場の評価方法の 1 つに、コンピュータシミュレーションがある。コンピュータシミュレーションの代表的な手法として Finite-Difference Time-Domain method (FDTD 法)や有限要素法 (Finite Element Method: FEM) がある。ここでは FEM によりシャーレ

内の音場を評価した研究について紹介する。

Tani らはシャーレ内に培養した Hela 細胞の増殖と生存率が超音波照射によりどのように変化するかを調べている。この研究では、音場とシャーレの振動を FEM シミュレーションソフトウェアである Ansys により求め、細胞増殖が音場とシャーレの振動分布の両方に強く依存すること示した^[2.17]。

次に、Rahimi らのシャーレ外の超音波吸音材の影響を評価した研究^[2.18]では、FEM シミュレーションソフトウェアの COMSOL を用い、シャーレ内に満たした培養液上面に設置した振動子とシャーレ底面の距離を変えた条件、シャーレ外を空気または吸音材とした条件でシャーレ内の音場分布を求めている。空気がある場合、超音波の反射が強くなり定在波が発生することから、定在波音場の音圧最大値（腹）と最小値（節）の比は 6.5 倍となり、吸音材を置いた場合は 1.8 倍まで低下することから、シャーレを用いた実験における吸音材設置の有効性を示した。

ここで紹介した Hensel^[2.16]や Rahimi^[2.18]の研究では、振動子の上に設置するシャーレの位置やシャーレ内の培地の高さ、振動子とシャーレの距離、吸音材の有無等が音場に影響することが示されている。実際の実験条件では、さらにシャーレの壁内を伝搬する超音波や音響放射力による水面の波立ちがあり、それらが音場に影響を与えていると考えられるが十分な検討がなされていない。その原因の 1 つとしてハイドロホンではシャーレの壁からの超音波と振動子からの直接の超音波を分離して測定することができないことが挙げられる。また、ハイドロホンを測定領域に入れることによりハイドロホン自体が超音波を反射すること、水面の波立ちを変化させることにより音場が乱れ、正確に測定ができないためである。

2.5 超音波音場可視化法

2.5.1 超音波音場を透過する光

水や気体など透明な物質を光が透過する場合、光の速度は物質の屈折率に依存して変化する。Fig. 2.8(a)のような均質な屈折率 n を持つ場 ($\partial n / \partial x = 0$) に平面波が入射した場合、平面波の波面は変化しない。しかし、Fig. 2.8(b)のように屈折率が n_1 と n_2 で異なる場合には、屈折率の高い物質中では光の速度は遅くなるため n_1 と n_2 を透過した光の波面には位相差が生じる。しかし、光の強度には変化を生じない。Fig. 2.8(c)のように屈折率の変化が繰り返される場合、例えば超音波の縦波（粗密波）では密度勾配に応じて光の波面が変化する。また、Fig. 2.8(d)のように入射光と垂直な方向に線形な屈折率の変化をもつ物質の場合 ($\partial n / \partial x = \text{const.}$) は光の波面には x 軸に対して一定の角度が生じる。光は波面に垂直な方向に伝搬するので光の屈折が起きる。その際の屈折角を示したものが Fig. 2.9 である。密度の低い部分の屈折率を n 、密度の高い部分の屈折率を $n + dn$ とすると、光の波面はホイヘンス-フレネルの原理により発生するそれぞれの波面を結んだ包絡線となる。また、その際の圧力変化を dp 、進んだ距離の差を dx 、超音波を照射していない場合の屈折率 n_0 、超音波を照射した場合の屈折率 Cn_0 光が透過する超音波音場の距離を w とすると屈折角 θ_r は式 2-1 で表される [2.19, 2.20]。

$$\tan \theta_r = -\frac{Cn_0}{n_0} \cdot \frac{dp}{dx} \cdot w$$

式 2-1

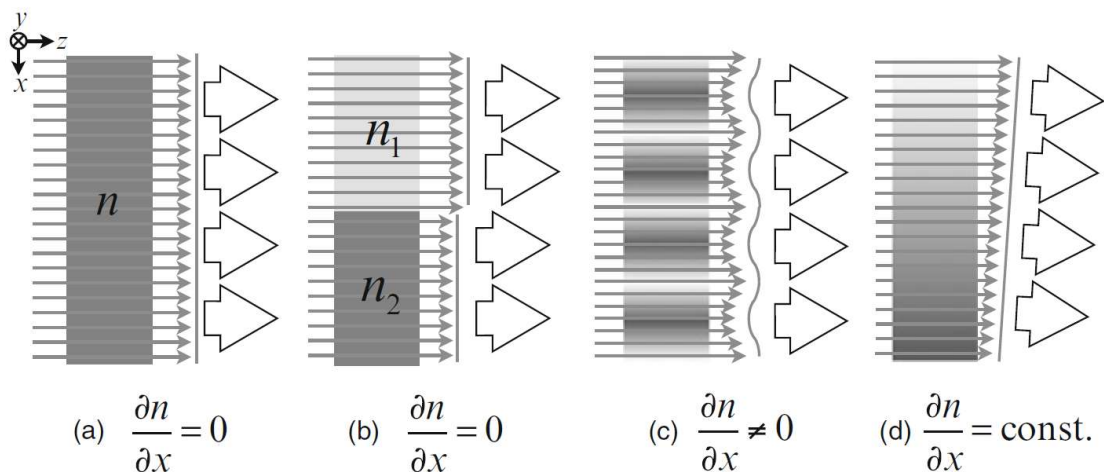


Figure 2.8 様々な屈折率勾配場での光の屈折^[2.19] (Reprinted by permission from Springer, Experimental Observation of an Acoustic Field, Nobuki Kudo, Copyright (2016))

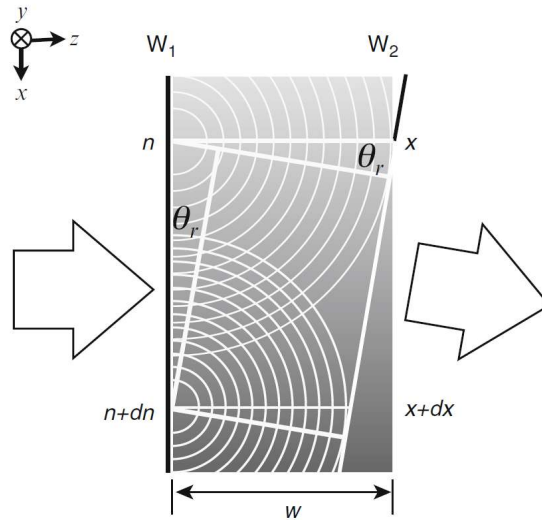


Figure 2.9 屈折率勾配場 ($\partial n / \partial x = \text{Const.}$) での光の屈折角^[2.19] (Reprinted by permission from Springer, Experimental Observation of an Acoustic Field, Nobuki Kudo, Copyright (2016))

超音波の波長に対して光の波面の口径が十分に大きい場合、超音波の圧力変化により生じる物質の密度変化は回折格子として働く。その際、音場から近いところではフレネル回折が見られ、無限遠のような遠い部分ではフラウンホーファー回折となる。Fig. 2.10 に観察距離による回折現象の違いを示す。フレネル回折領域ではホイヘンスの定理によって生じる球面波の干渉が、フラウンホーファー回折領域では0次光を中心に高次の干渉縞が観察される^[2.19, 2.20]。

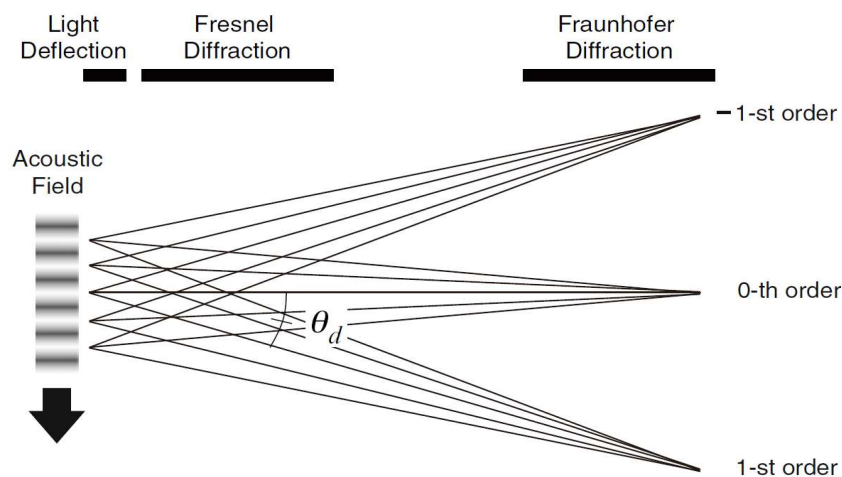


Figure 2.10 観察距離による回折現象の違い^[2.19] (Reprinted by permission from Springer, Experimental Observation of an Acoustic Field, Nobuki Kudo, Copyright (2016))

2.5.2 シュリーレン法

シュリーレン法は 1859 年から 1864 年の間にオーガスト・テプラーにより提唱された、媒質の屈折率変化による光の屈折を光学的に可視化する手法である。基本的なシュリーレン法の光学系の構成を Fig. 2.11 に示す。この光学系は点光源と撮影用カメラ、2 つのフィールドレンズとナイフエッジで構成される。点光源からの光を 1 つ目のレンズにより平行光とし、光を透過する気体や液体、固体に照射すると密度勾配が生じている部分では光が屈折する。この光を 2 つ目のレンズで再び集束させると、焦点に集束した光はフラウンホーファー回折領域の光とみなすことができる。つまり、0 次光から高次の干渉光に分離できる。また、超音波が無い領域を透過した光は平行光のままなのでレンズの焦点に集束する。それゆえ、焦点を遮るようにナイフエッジを設置すると、高次の回折光のみがカメラで撮影される^[2.20]。なお、明確な屈折光の分離を得るには、十分な長さの回折格子が必要となるため、本手法で可視化できる超音波は連続超音波もしくは波数の多いバースト波に限られる。

医用超音波に用いられる数 MHz の超音波を可視化する場合、光の屈折角は 10^{-3} 度のオーダーと小さいので高品質な光学系が必要となる。高品質に平行光にされた光で超音波領域を照明するためには、点光源特性の高い単色光源と収差の少ない第 1 レンズが必要となる。また、明確な回折光を得るためには、収差の少ない第 2 レンズが必要となる。シュリーレン装置の空間フィルタにはナイフエッジが用いられるが、撮影される画像はこのナイフエッジの設定位置によって大きく変化する^[2.19]。

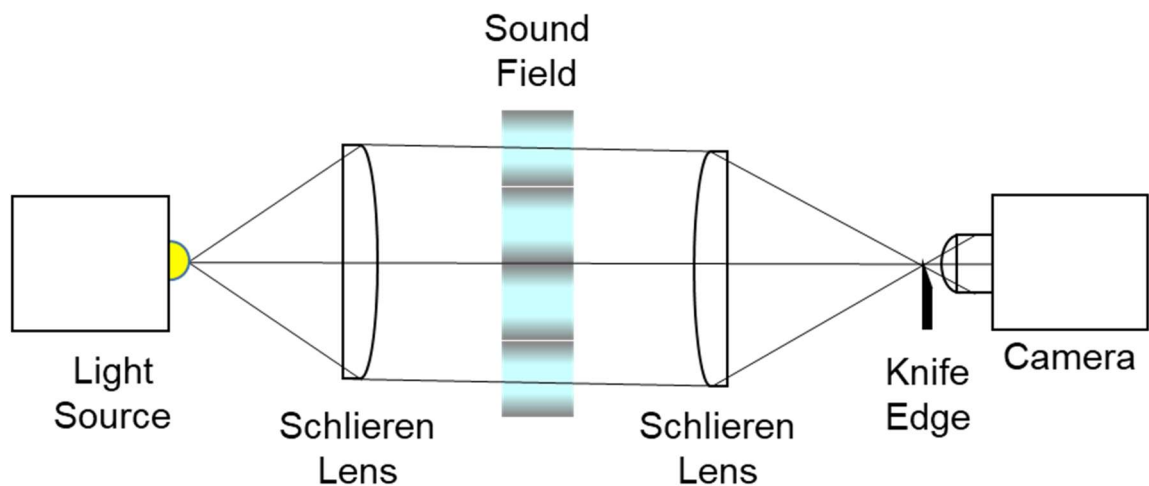


Figure 2.11 基本的なシュリーレン法の光学系の構成

Fig. 2.12 に示す光の進行方向 z に対する垂直な超音波による光の x 方向への位相変化 φ は式 2-2 で表される。 w は超音波の振幅であり、 Δn_{amp} は屈折率の変化量を、 λ は超音波の波長、 Ω は超音波の角周波数を表わす。

$$\varphi(x, t) = w\Delta n_{\text{amp}} \sin \left(\Omega t - \frac{2\pi}{\Lambda} x \right)$$

式 2-2

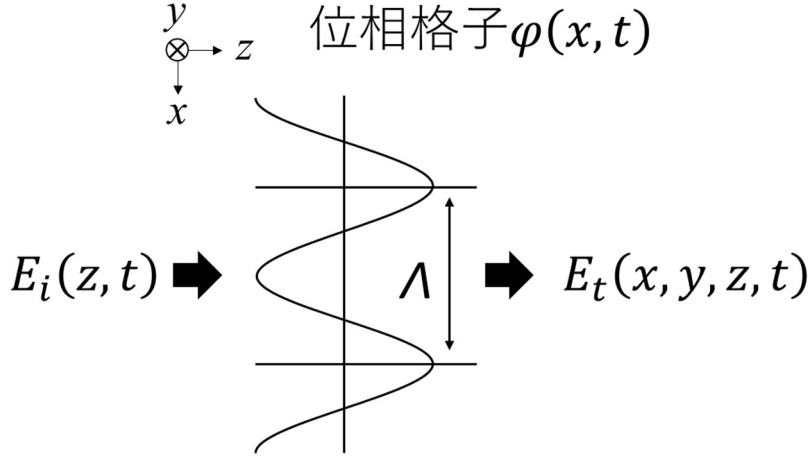


Figure 2.12 超音波による光の回折

位相格子への入射光を $E_i(z, t) = E_0 e^{i(wt - \frac{2\pi}{\lambda} z)}$ とおくと、位相格子の透過光 $E_t(x, y, z, t)$ は式 2-3 で与えられる。

$$E_t(x, y, z, t) = E_0 e^{i(wt - \frac{2\pi}{\lambda} z)} e^{ia(x, y) \sin(\Omega t - \frac{2\pi}{\Lambda} x)}$$

式 2-3

この式をテイラー展開し、 $\varphi \ll 1$ として 2 次以降の高次項を無視すると次式となる。

$$\begin{aligned} E_t(x, y, z, t) &\cong E_0 e^{i(wt - \frac{2\pi}{\lambda} z)} \left(1 + ia(x, y) \sin \left(\Omega t - \frac{2\pi}{\Lambda} x \right) \right) \\ &= E_0 e^{-i(wt - \frac{2\pi}{\lambda} z)} \left(1 + a(x, y) \frac{e^{i(\Omega t - \frac{2\pi}{\Lambda} x)} - e^{-i(\Omega t - \frac{2\pi}{\Lambda} x)}}{2} \right) \end{aligned}$$

式 2-4

式 2-4 の右辺のカッコ内の第 1 項の「1」は 0 次回折光を表し、その他の項は正・負の 1 次回折光を表している。一般的にナイフエッジの先端は 0 次光の中心に設置するため、0 次光の半分と 1 対の 1 次回折光のどちらかがナイフエッジによって除去される。したがって空間フィルタ $E_t(x, y, z, t)$ を透過する光は式 2-5 で与えられる。

$$E'_t(x, y, z, t) \cong E'_0 e^{i(\omega t - \frac{2\pi}{\lambda} z)} \left(\frac{1}{2} + \frac{a(x, y)}{2} e^{i(\Omega t - \frac{2\pi}{\Lambda} x)} \right)$$

式 2-5

その際の可視化されるシュリーレン画像の強度分布は $a^2(x, y)$ が 1 よりも十分に小さいため、式 2-6 で与えられる。

$$|E'_t(x, y, z, t)|^2 \cong \left(\frac{E_0}{2} \right)^2 \left(1 + 2a(x, y) \cos \left(\Omega t - \frac{2\pi}{\Lambda} x \right) \right)$$

式 2-6

式 2-6 において $|E'_t(x, y, z, t)|^2$ の時間平均は $\frac{E_0^2}{2}$ となり $a(x, y)$ が消えるため、この式はストロボ観察では伝搬する超音波の波面を可視化できるが、時間平均観察では波面を可視化できないことを示している。

超音波の可視化には、0 次光のみを除去するドットストップが用いられる。この場合、空間フィルタを通過した光 $E'_t(x, y, z, t)$ とシュリーレン画像の強度分布 $|E'_t(x, y, z, t)|^2$ は、式の右辺のカッコ内の最初の項の「1」が式 2-3 が式 2-7 で「0」となるため、式 2-7、2-8 で与えられる。

$$E'_t(x, y, z, t) \cong iE_0 a(x, y) \sin \left(\Omega t - \frac{2\pi}{\Lambda} x \right) e^{i(\omega t - \frac{2\pi}{\lambda} z)}$$

式 2-7

$$|E'_t(x, y, z, t)|^2 \cong E_0^2 a^2(x, y) \left(\Omega t - \frac{2\pi}{\Lambda} x \right)$$

式 2-8

式 2-7 においては、 $|E'_t(x, y, z, t)|^2$ を時間平均しても $a^2(x, y)$ の項が消えずに残ることから、ストロボ撮影と時間平均撮影の両方で超音波を観察できることを意味している^[2.19, 2.20]。

2.5.3 シャドウグラフ法

様々な屈折率勾配場における光線の屈折の模式図を Fig. 2.13 に示す。Fig. 2.13(a) のように一様な屈折率 n を持つ物質を透過した光は、光が屈折しないためスクリーン上の輝度は均一になる。Fig. 2.13(b) のように x 軸方向に線形に屈折率が変化する場合 ($\partial n / \partial x = \text{Const.}$)

は屈折によりスクリーン上の光の照射位置は変化するが、みな同じ屈折角なのでやはりスクリーンの輝度は一定となる。Fig. 2.13(c)のように屈折率勾配が繰り返し変化する超音波音場のような場合は、屈折率の勾配 $\partial n/\partial x$ に比例して光が屈折する結果、屈折率が極大となる超音波圧が高い部分では光が集束し輝度が高くなり、屈折率が極小となる低音圧部では透過光の輝度が低くなる。なお、この際の超音波音場における輝度は屈折率の2階空間微分となり、屈折による変位の大きさを反映している^[2.21]。

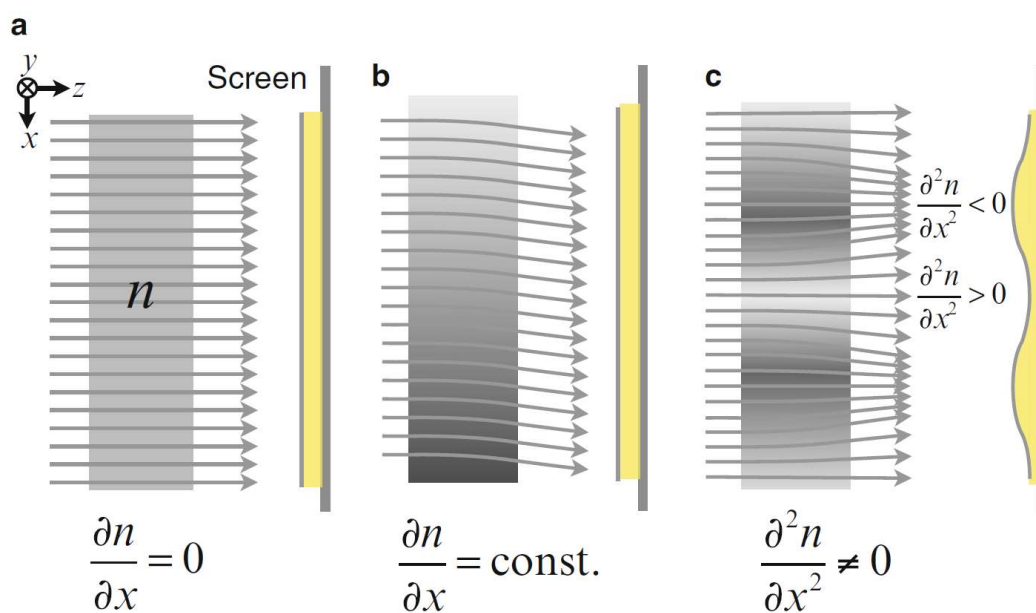


Figure 2.13 屈折率勾配場による輝度分布^[2.20] (Copyright (2015) The Japan Society of Applied Physics)

Fig. 2.14 に直接シャドウグラフ法の光学系を示す^[2.19]。基本的なシュリーレン法の光学系からシュリーレンレンズとナイフエッジを除いたものが直接シャドウグラフ法の光学系であり、非常に単純な構成となっている。超音波音場に点光源からの光を照射すると、点光源からの原光線は c のように進む。しかし、音場で屈折した光は c' のように進み、スクリーン上では Δa の光線位置のずれが発生する。この屈折による光線の偏角 ε と変位 Δa 、音場からスクリーンまでの距離 g の関係は式 2-9 で表される。

$$\varepsilon \cdot g = \Delta a$$

式 2-9

なお、直接シャドウグラフ法で超音波を可視化する際の感度は光の変位と像の大きさに関係する。最も感度が高くなるのは、点光源からスクリーンまでの距離 h と音場からスクリーンまでの距離 g の比が 2 : 1 の場合である。それゆえ感度を向上するには、 h は可能な限り大きくし、音場は点光源とスクリーンの中間に位置することが重要である。また、シャド

ウグラフ法はフレネル回折領域の光を可視化するものであり屈折しない光を含んでいるためシュリーレン法に比べコントラストが低い。一方、シュリーレン法と異なり、位相格子による回折を利用していないため、ストロボ撮影することでパルス超音波の瞬時音場の可視化が可能である [2.19, 2.20]。

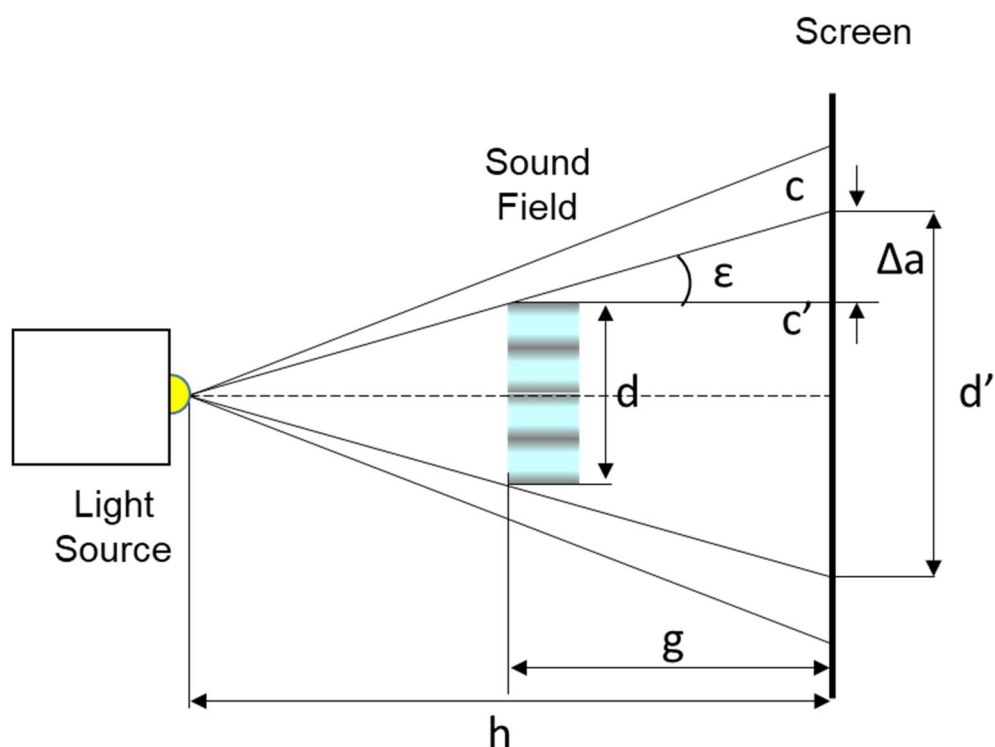


Figure 2.14 直接シャドウグラフの構成

2.5.4 フォーカストシャドウグラフ法

本研究では水中の超音波音場をフォーカストシャドウグラフ法を用いて可視化している。Fig. 2.15 にフォーカストシャドウグラフ法の光学系を示す。Fig. 2.14 に示した直接シャドウグラフ法との最も重要な相違点はスクリーンがカメラに置き代わっている点である。カメラのフォーカスをもとスクリーンがあった位置（仮想スクリーンと呼ぶ）に設置すると仮想スクリーン上のシャドウグラフがカメラのフィルムの上に投影される。このような構成とすることによりカメラのフォーカス位置を変更するだけで仮想スクリーンの位置を変えたことと同等の効果を得ることができる。超音波の焦点位置をカメラの焦点位置とした場合は、屈折による変位が小さくなるため像を結ぶことができない。

さらに次の 2 つの工程を加えることで屈折光のみを抽出することが可能となる。まず、

超音波の照射下で密度勾配により屈折が生じている画像と、超音波の照射を止め密度勾配による屈折が生じていない画像を撮影する。次に、その 2 枚の画像の差分をコンピュータで行う。シュリーレン法では、光の位相変調とそれによる光の回折を利用しているが、シャドウグラフ法では、光の屈折とそれによるスクリーン上の入射光の位置ずれを利用している。そのため超音波で偏向されていない光は単純な画像の減算で除去可能である。屈折していない光と共に時間的に変化しない画像ノイズも除去可能であるためこの工程によりシャドウグラフの低コントラストを改善することができる^[2.19, 2.20]。

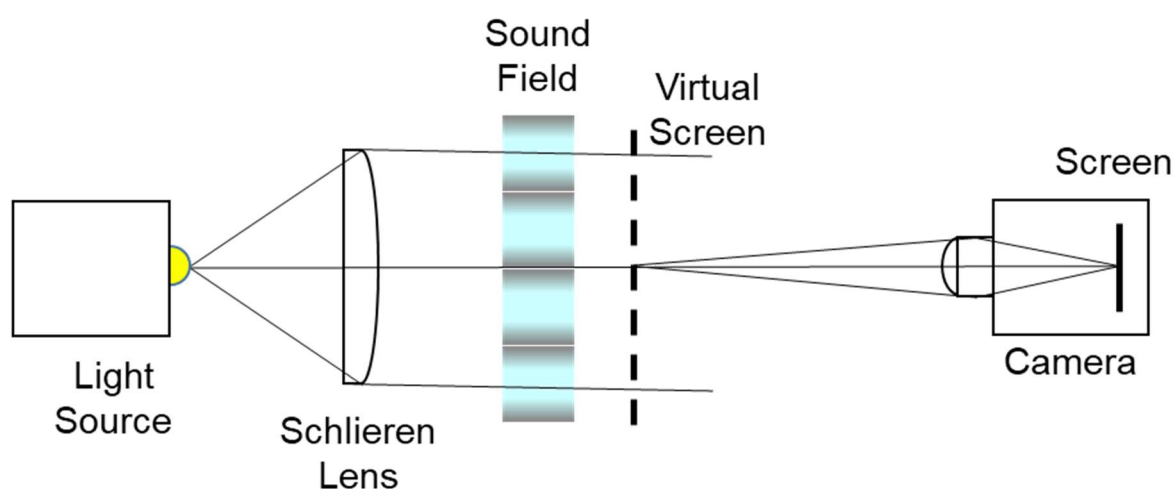


Figure 2.15 フォーカストシャドウグラフの構成

2.5.5 パルス超音波音場の可視化

シャドウグラフ法では超音波に同期したパルス光源を使用することによりパルス超音波の瞬時音場を可視化することができる。さらに、超音波照射からパルス光照射までの時間遅れを制御することにより、任意の時相におけるパルス音場を可視化することができる。しかし、一般の LED やレーザダイオードで発生した短いパルス光のエネルギーは小さいので 1 回のパルス光発生で得られる画像の光量は少ない。それゆえ、カメラのシャッターを開放し、長時間露光した状態でパルス光照射を多数回くり返すことで十分な光量を得ることができる。

また、時相を変え撮影した画像をアニメーション表示することで、超音波の伝搬を動画として観察することも可能である^[2.19, 2.20]。

2.5.6 音場可視化例

オプティカルストップの設置位置を変えてシュリーレン法により集束超音波音場を可視化した結果を Fig. 2.16 に示す. Fig. 2.16(a)は0次光のみの音場可視化であり, Fig. 2.16(b)は0次光の半分と1次光による音場可視化である. Fig. 2.16(c)は1次光のみの音場可視化例であり, 超音波の音圧が高い部分が非常に高いコントラストで描出されている^[2.19]. しかし, 超音波の一周期内の圧力変化は確認できず, 圧力変化の包絡線が輝度変化として描出されている.

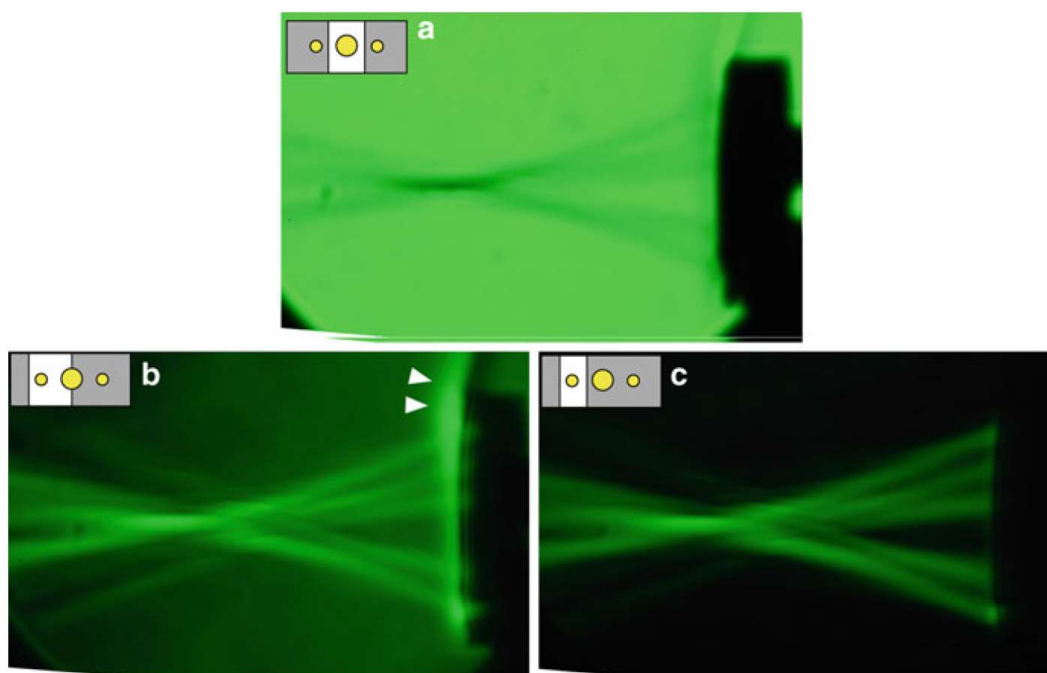


Fig. 2.16 オプティカルストップの設置位置の違いによるシュリーレン法音場可視化例.
(a) 0次光のみの場合. (b) 半分の0次光と1次光の場合. (c) 1次光のみの場合. ^[2.19]
(Reprinted by permission from Springer, Experimental Observation of an Acoustic Field, Nobuki Kudo, Copyright (2016))

Fig. 2.17 にフォーカストシャドウグラフ法により血管内で使用される IVUS (Intravascular Ultrasound) の小型振動子から出る超音波音場を可視化した結果を示す^[2.22]. 赤色で示した部分が正音圧部位であり, 青い場所が負音圧部位である. 振動子から出たパルス超音波の波面が伝搬していく様子が確認できる.

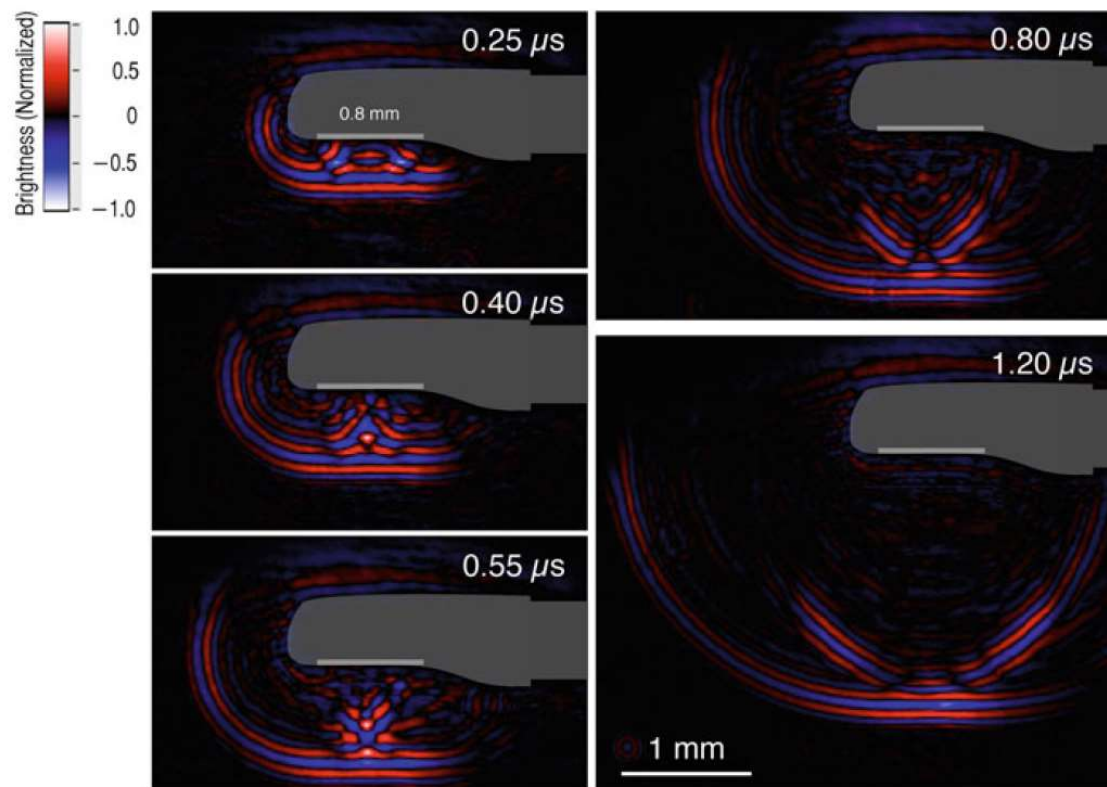


Fig. 2.17 IVUS の小型振動子から出る超音波の伝搬の様子^[2.22] (Ultrasound in Medicine & Biology, 41/7, Nobuki Kudo, A Simple Technique for Visualizing Ultrasound Fields Without Schlieren Optics, 2078, Copyright (2015), with permission from Elsevier)

第3章 細胞培養容器内に生じる低強度超音波音場

医療の分野においては、X線などの電離放射線、電界や磁界、さらには超音波などが利用されている。特にX線、超音波、強磁界が診断に用いられる。これらの診断法の生体作用を明らかにすることは、安全な診断を実現する上で必須である。

生体への安全性を検討する際に、生体の最小単位として細胞を用いるのが便利である。特に培養細胞は、実験が手軽で再現性の高い試料を準備できるため広く研究に利用されている。培養細胞にX線や超音波を照射する場合には、コンタミネーション（細胞の汚染）をさけるために培養に使うシャーレに入れたままで行うことが多い。さらに作用の評価には、照射後も培養を継続する必要があるからである。

X線を照射する場合、シャーレや培養液によるX線の減衰は非常に小さく、その影響を考慮する必要はほとんど無い。これに対し、超音波の場合には、超音波振動子とシャーレ間の伝搬、シャーレと培養液、培養液と空気の境界面で強い反射や減衰が起き、反射波と進行波の干渉によって波長0.1から1mmオーダーで定在波音場を生じるため、細胞に実際にどの程度の超音波が加わっているかを明確にすることが難しい。

本章では、シャーレ等の容器に培養した細胞に低強度超音波を照射する *in vitro* 実験において音場形成に影響を与えと考えられる、容器壁内を伝搬する超音波、容器の傾きによって生じる超音波と水面の角度、定在波の発生を抑制するとされている吸音材、音響放射力により発生する細かな波立ちの音場をフォーカストシャドウグラフ法により可視化し、それらが音場に与える影響について述べる。さらに、得られた知見を基に均一な音場発生手法について検討した結果も示す。

3.1 音場可視化方法

フォーカストシャドウグラフ法を用いた音場可視化装置の構成について述べる．Fig. 3.1 にシステム構成を示す．ファンクションジェネレータ（SONY Tektronix, AFG-320）で作成した正弦波をパワーアンプ（Tokin, UODWB-1000）で増幅し，直径 40 mm の円形平板振動子を 1 MHz で駆動した．

音場の撮影には冷却 CCD カメラ（Bitran, BU-51LN）とマクロレンズ（Nikon, micro Nikkor 55 mm）を使用し，レンズ前面は容器から 30 cm（音場像の焦点からは CCD カメラ側に 16 cm）に設置した．

超音波照射から任意の時相における瞬時音場像を撮影するために，ファンクションジェネレータで作成したパルス繰り返し周波数 1 kHz の矩形波を同期信号としてディレイジェネレータ（Stanford Research System, DG535）に入力し，超音波照射から音場撮影開始までの時間を変化させながら音場を撮影した^[3.1, 3.2]．

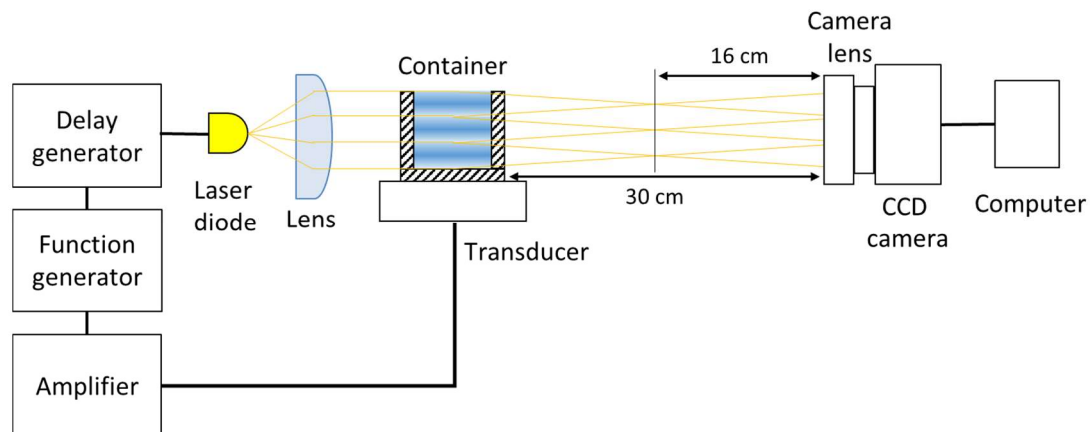


Figure 3.1 フォーカストシャドウグラフ法を用いた小型容器内音場像撮影システム

3.2 容器の壁が音場に与える影響

シャーレ内の細胞に下方に置いた振動子から超音波を照射する場合、超音波は培養液中を伝搬するだけではなく容器の底部や壁の内部も伝搬すると考えられる。容器の壁内を伝搬する超音波が音場に与える影響を調べるため、超音波が伝搬する素材としない素材で2種類の容器を作製して超音波の伝搬の様子を撮影し、音場の違いを調べた。

3.2.1 容器の壁が音場に与える影響の可視化法

本実験で使用した容器の素材と寸法、音場可視化法について述べる。

超音波が伝搬する素材としてアクリル板を使用し容器を作製した。また、比較対象として、独立気泡構造を内包するスポンジ状のポリオレフィン樹脂製の板材（高洋産業、コーヨーボード）を使用し超音波が伝搬しない容器を作製した。アクリル板の音波伝搬速度は $2.7 \times 10^3 \text{ m s}^{-1}$ であり、音響インピーダンスは $3.2 \times 10^6 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ である。ポリオレフィン樹脂の音波伝搬速度は $2.4 \times 10^3 \text{ m s}^{-1}$ であり、音響インピーダンスは $2.7 \times 10^5 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ である。なお、アクリル板とポリオレフィン樹脂の伝搬速度は実測により求めたものである。

作製したアクリル容器の寸法と実物の写真を Fig. 3.2(a)に示す。内寸は $12 \times 10 \times 12 \text{ mm}^3$ (W × D × H) であり、市販の厚さ 2 mm の透明アクリル板をコンピュータ数値制御加工機で切削し、溶剤接着し作製した。

ポリオレフィン樹脂容器の寸法と実物の写真を Fig. 3.2(b)に示す。ポリオレフィン樹脂は熱により変形するため、アースアテンド株式会社に依頼し、ウォータージェット加工にて作製した。Fig. 3.3 にポリオレフィン樹脂容器の音場像撮影方法を示す。光の入出面には 2 mm の透明アクリル板を設置することで脱気水の漏出を防止し、光の入出射を可能とした。また振動子と容器の間には(a)の水槽の底板を模擬して厚さ 2 mm のアクリル板を挟んだ。

超音波の照射条件として音圧を $0.39 \text{ MPa}_{\text{p-p}}$ 、波数を 1 波の正弦波とした。1 波にすることで波面の先端を見分けることができるので壁からの漏れ出しや反射が観察しやすくなる。なお、アクリル容器の場合は容器底面から超音波を照射し、ポリオレフィン樹脂容器の場合は水が漏れないように振動子を反転させ、容器上面から超音波を照射した。

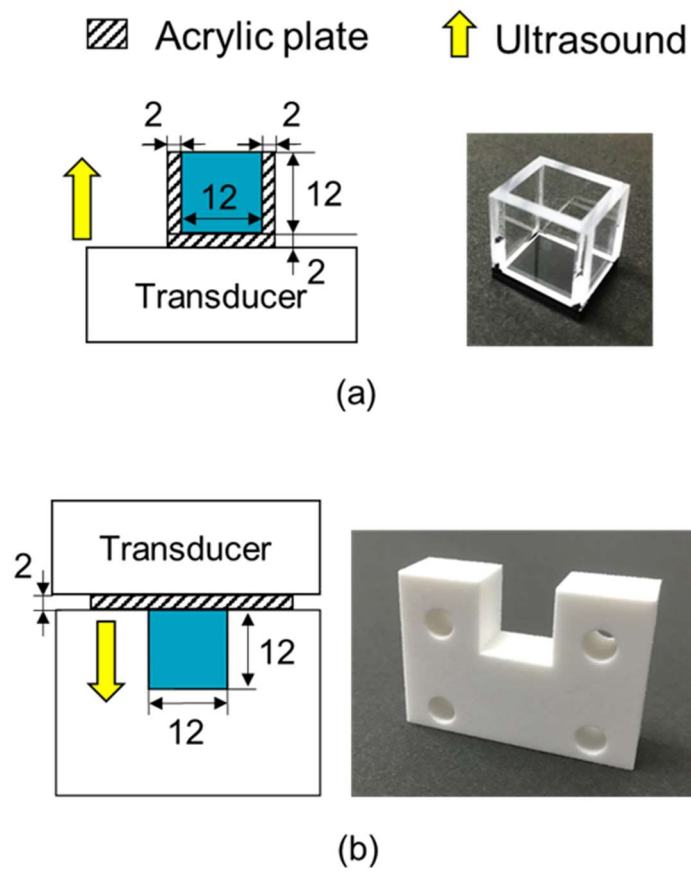


Figure 3.2 直方体容器の寸法と写真. (a) アクリル容器. (b) ポリオレフィン容器.

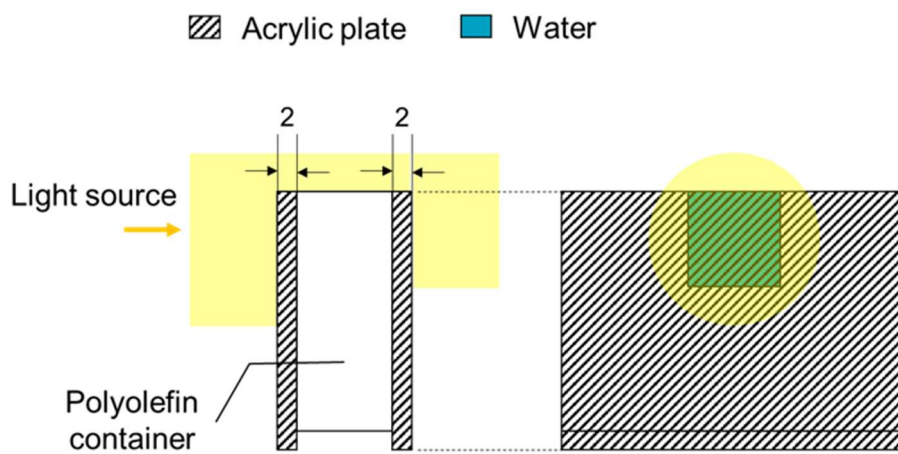


Figure 3.3 ポリオレフィン樹脂容器の音場撮影方法

3.2.2 容器壁による音場への影響

Fig. 3.4 は波数 1 波の正弦波波形で振動子を駆動することにより発生した超音波短パルス
をアクリル容器に照射し、超音波照射直後 0 s から 5 μ s の超音波の伝搬の様子を示した瞬
時音場像である。水槽の底面に平行な波面(A)とその波面より先行し斜方に伝搬する波面
(B)が確認できる。なお、最初の波面に続く波面(C)は超音波短パルスの尾引きによるもの
であり、正弦波一波の電気信号で振動子を駆動しても発生する機械的振動には 3~4 波の尾
ひきがあることがわかる。Fig. 3.5(a)は超音波照射から 5.8 μ s 後の瞬時音場像である。Fig.
3.5(a)のコントラストを改善し平面波と斜方に伝搬する波の角度を測定した結果を Fig.
3.5(b)に示す。平面波と斜方に伝搬する波面のなす角度は約 56° であった。

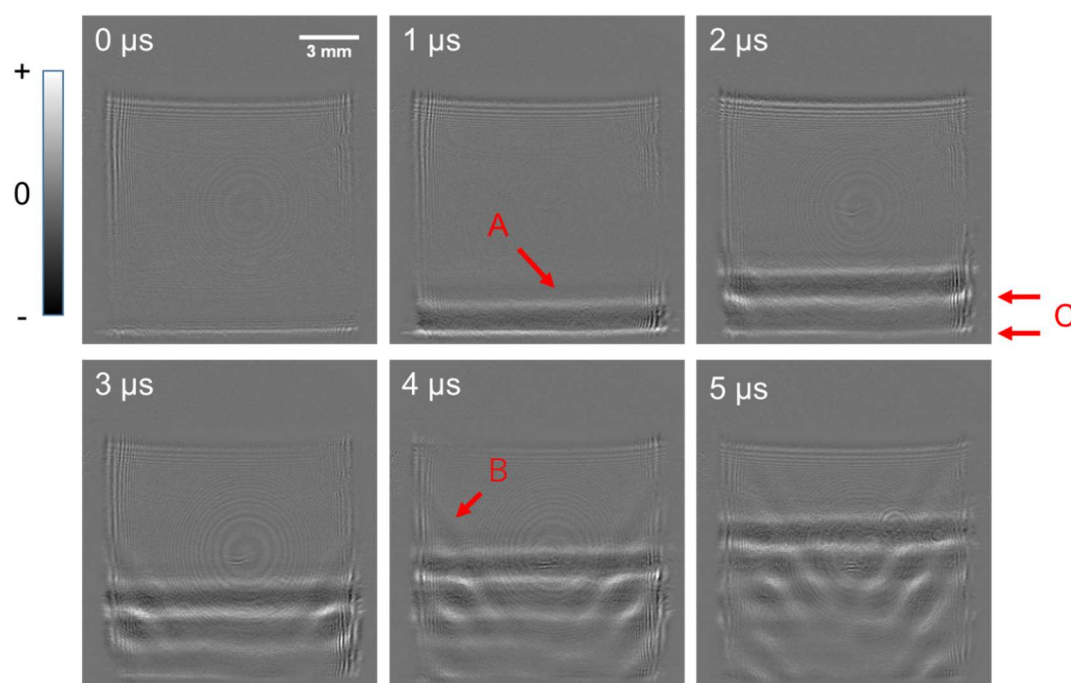


Figure 3.4 アクリル容器内部を超音波が 5 μ s の間に伝搬する様子

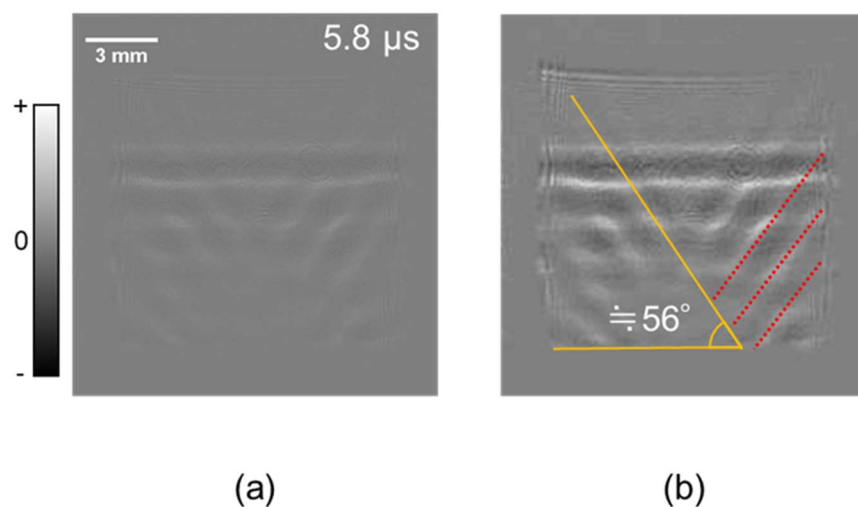


Figure 3.5 アクリル容器の瞬時音場像. (a) 超音波照射から $5.8 \mu\text{s}$ 後の音場像. (b) 斜方に伝搬する波面と底辺のなす角度.

Fig. 3.6 にポリオレフィン樹脂で作製した直方体容器に波数 1 波の短パルス超音波を照射し、超音波照射直後 0 s から $5 \mu\text{s}$ の超音波の伝搬の様子を示す。水槽底面に平行な波面(A)と扇形に広がる波面(B)が確認されている。扇形の波面の上端は常に平行な波面と同じ位置に生じていることから、壁内ではなく水中を伝搬する波が原因となり発生していることがわかる。Fig. 3.7(a)は超音波照射から $5.8 \mu\text{s}$ 後の瞬時音場像であり、Fig. 3.7(b)に扇状に広がる波面を赤色の破線で示した。

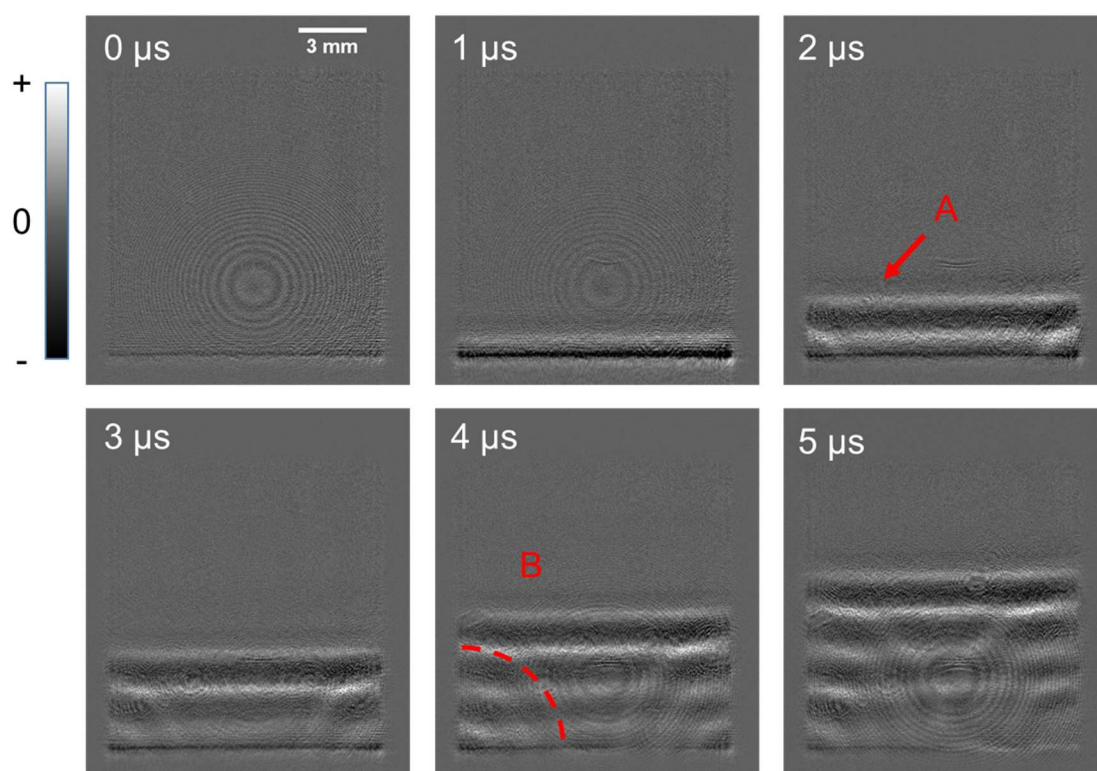


Figure 3.6 ポリオレフィン容器内を超音波が伝搬する様子

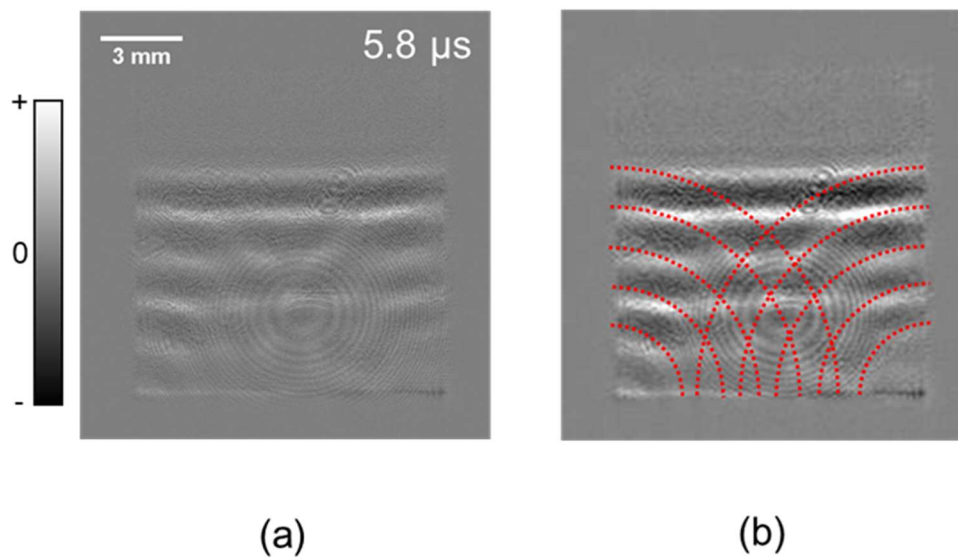


Figure 3.7 ポリオレフィン容器の瞬時音場像. (a) 超音波照射から 5.8 μs 後の音場像. (b) 扇状に広がる波面

3.2.3 アクリル容器とポリオレフィン樹脂容器の音場形成についての考察

超音波の壁内伝搬の有無により異なった波面が確認された。壁内伝搬が生じるアクリル容器では斜方に伝搬する直線状の波面が発生し、壁内伝搬が生じないポリオレフィン容器

では扇状の波面が発生した。アクリルの縦波速度は 2,730 m/s である。一方、水の音速は 1,483 m/s (20°C) であり、アクリルよりも遅い。そのため、照射された超音波は水よりも先にアクリル内を伝搬する。そのアクリル内を伝搬した超音波が容器内の水に漏れ出たものが斜方に伝搬する波面であると考えられる。アクリルから漏れ出た球面波（黒色線）とその球面波を繋いだ包絡面（赤色線）は Fig. 3.8 のようになる。また、アクリル内の伝搬速度 v_a と水に漏れ出た伝搬速度 v_w の音波伝搬速度を用いると包絡面と底辺のなす角度 θ は式 3-1 を用いて求められる。式 3-1 より求めた角度 θ は 62° となり、Fig. 3.5(b) に示した音場像から実測された角度 56° とは一致しない。角度 56° が正しいとして求めたアクリル内伝搬速度は 2,160 m/s となる。この速度はアクリルの縦波伝搬速度 2,730 m/s より遅く横波伝搬速度 1,270 m/s（プレキシグラス、文献値）より速い。このことは超音波の漏れ出しでは、単純な縦波と横波の理論だけでは取り扱えない現象が関与していることを示唆している。

$$\theta = \tan^{-1} \frac{v_s}{v_w}$$

式 3-1

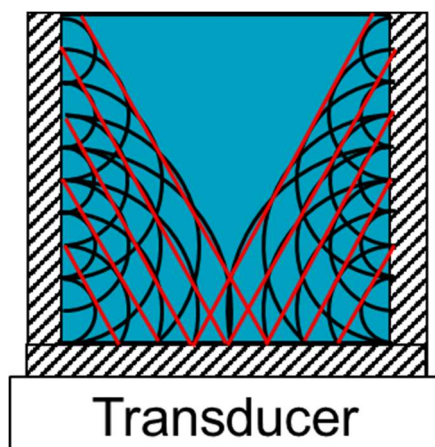


Figure 3.8 アクリル容器の壁から漏れ出す超音波とその超音波（黒色線）が作り出す包絡面（赤色線）

ポリオレフィン容器の作成に用いた板材は空気を含んでおり反射が非常に強いため、内部を超音波がほぼ伝搬しない構造となっている。そのため容器壁からの超音波の漏れ出しは無視できる。また、今回使用した振動子の直径は容器の開口部よりも大きい。そのため、容器の幅で開口制限を受けた超音波はホイヘンスの原理による回折によって Fig. 3.9 に示す球面波（赤色破線）を形成する^[3.3, 3.4]。また、ポリオレフィン樹脂と水の音響インピーダ

ンスはそれぞれ $2.7 \times 10^5 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ と $1.5 \times 10^6 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ であり、水とポリオレフィン樹脂境界における反射係数強度は 0.48 と計算できる。このように反射率が高いことから球面波の反射波（赤色実線）が水槽内に形成されたものと考えられる。

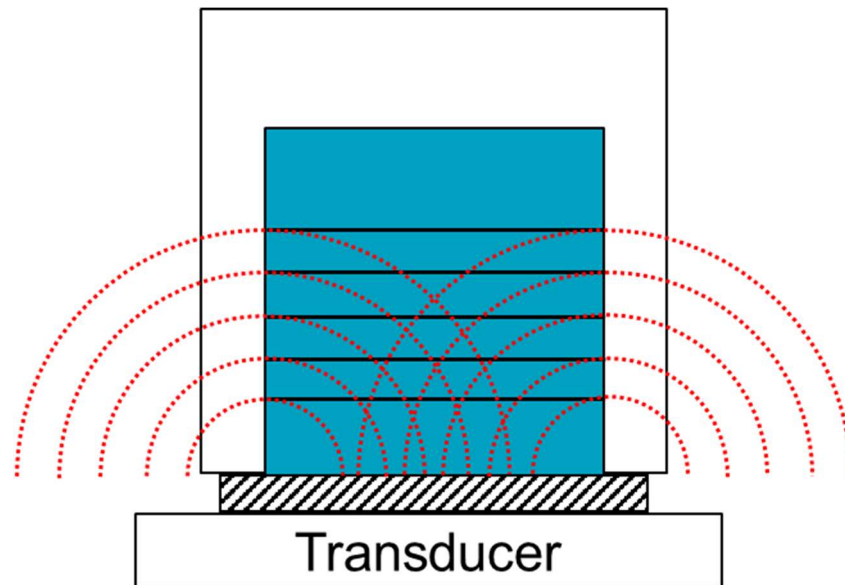


Figure 3.9 開口制限を受けホイヘンスの原理により発生する球面波（赤色破線）

3.3 水面傾きが音場に与える影響

シャーレに培養した細胞に超音波を照射する場合、振動子上のゲルの上にシャーレを載せたり、水中に振動子を沈めその水面にシャーレを設置したりすることがあるが、振動子が傾くことで、液面と超音波の進行方向が直角とならない場合がある。

3.3.1 水面傾きの音場への影響の実験方法

今回は Fig. 3.10 に示すように、振動子の下に入れたアクリル板の数と位置により水平線と振動子のなす角度を調節し、 0° 、 1° 、 5° とした。

アクリル容器に脱気水を入れ、音圧 $0.39 \text{ MPa}_{\text{p-p}}$ 、波数 40 波の正弦波で振動子を駆動することで、発生したバースト超音波が生じる音場像をフォーカストシャドウグラフ法にて可視化した。

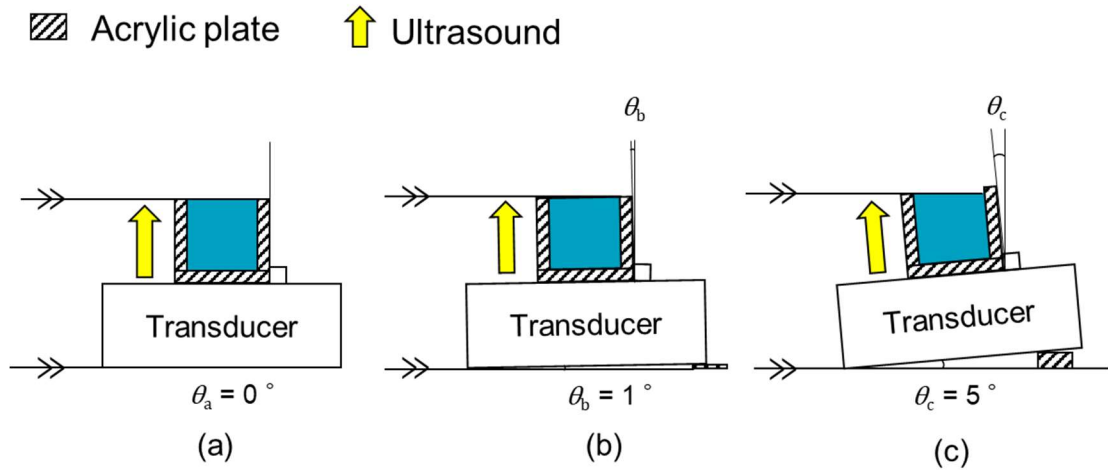


Figure 3.10 容器の設置方法と水面の傾斜角度. (a) 0° . (b) 1° . (c) 5° .

3.3.2 水面の傾きの音場への影響

Fig. 3.11(a)–(c)は 0° 、 1° 、 5° にアクリル容器を傾け、波数 40 波の正弦波波形で振動子を駆動することで超音波パルスが発生し、超音波照射後 $23.5 \mu\text{s}$ に撮影した瞬時音場像である。進行波と水面での反射により容器内部の音場は平面波の伝搬で予想される単純な超音波の進行方向に平行な波面では無く複雑な形状になっている。Fig. 3.11(d)–(f)は定在波音場像を表す 1 周期 ($37 \mu\text{s}$ から $38 \mu\text{s}$) の最大輝度合成画像を示す。最大輝度合成画像は 1/10 周期毎に撮影した 10 枚の瞬時音場像の同一ピクセルにおける最大輝度で画像を再構成したものである。容器の傾きが無い Fig. 3.11(d)では容器内ほぼ全域に均等な音圧の集束点が発生していることが確認できる。しかし、容器の傾きがある Fig. 3.11(e), (f)では容器の右上の集束点が少なくなっている。特に Fig. 3.11(e)ではその傾向が顕著となっている。

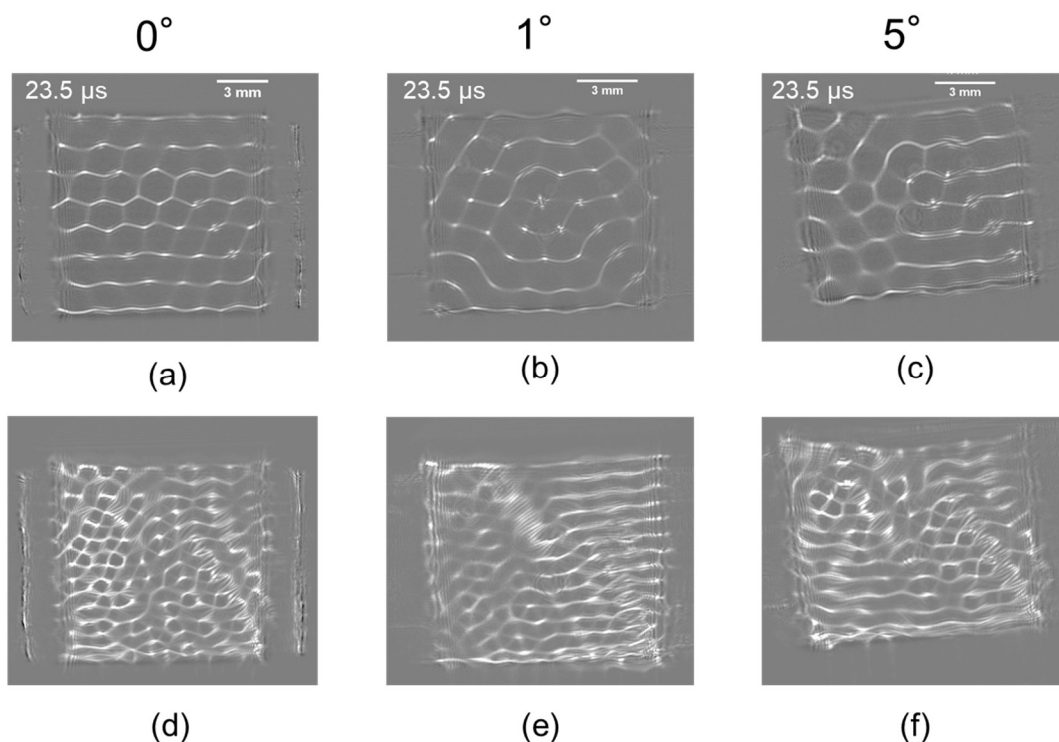


Figure 3.11 容器の各傾きにおける瞬時音場像(a)–(c) ($t = 23.5 \mu s$) と定在波音場像(d)–(f) ($37 \mu s$ から $38 \mu s$) .

3.3.3 水面の傾きの音場へ与える影響についての考察

容器に傾きが無い場合には、容器内の音場はおおよそ左右対称となった。しかし、水面に傾きを生じさせると容器が高くなっている側の定在波の減少が認められた。水面の傾きが変化することにより水面と振動子面での超音波の反射角度が変化する。振動子の傾き角を t_1 とすると Fig. 3.12 のように、当初水面に垂直に入射した超音波が次に水面に戻るときには $t_2 = 2t_1$ の角度で水面に入射し、さらに次に水面に戻るときには $t_3 = 4t_1$ の角度で入射する。そうすると反射した超音波は容器の底面が低くなっている方へ移っていく。そのため容器の底が高くなっている側で定在波が減少することになったと考えられる。

$$t_2 = 2t_1 \qquad t_4 = 2t_3 = 8t_1$$

$$t_3 = 2t_2 = 4t_1$$

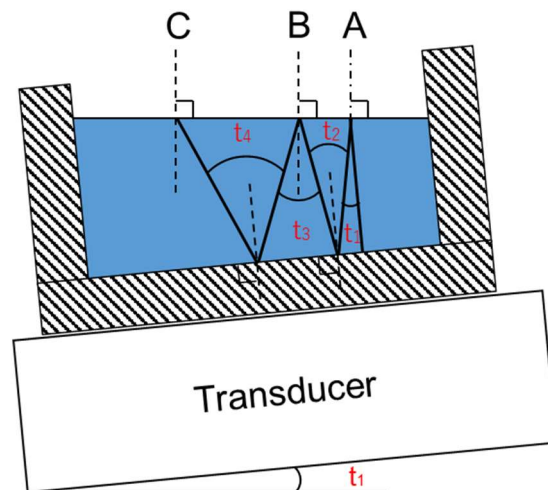


Figure 3.12 容器に傾きがある場合の水面と容器底面での超音波の反射

3.4 吸音材が音場に与える影響

シャーレ内の細胞に下方に置いた振動子から超音波を照射する場合、水面での超音波の反射が定在波発生の原因となることから、これを低減するために吸音材が用いられる。その吸音材が音場にどのような影響を与えるか調べた。

3.4.1 吸音材の音場への影響を検討するための実験方法

吸音材にはピラミッド型やクサビ形等の様々な形状があるが、本実験では Fig. 3.13 に示す波型の吸音材を使用した。吸音材の素材はシリコンゴムである。山と谷の角度が直角になっており、超音波を吸収すると共に、この斜面で超音波を反射し、反射した先にある吸音材でさらに超音波を吸収し減衰する構造となっている。この吸音材をアクリル容器に入るよう切断し、Fig. 3.14 のように脱気水で満たした容器の中に入れ、音圧 $0.39 \text{ MPa}_{\text{p-p}}$ 、波数 40 波の正弦波で振動子を駆動し、バースト超音波が生じる音場像をフォーカストシャドウグラフ法により可視化した。

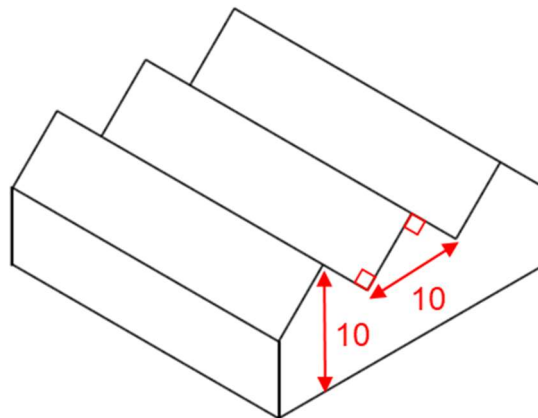


Figure 3.13 吸音材の形状

 Acrylic plate
  Absorber
  Ultrasound

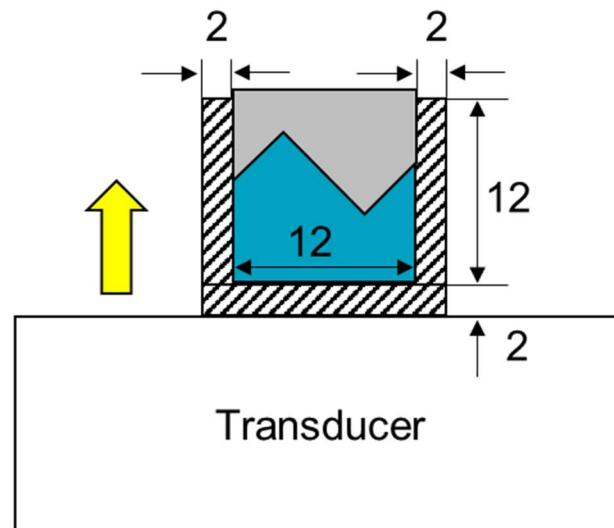


Figure 3.14 吸音材を設置したアクリル容器

3.4.2 吸音材による音場への影響

Fig. 3.15(a)はアクリル容器内に吸音材を設置し、波数 40 波の正弦波波形で振動子を駆動することにより発生した超音波短パルス照射し、超音波照射後 $20\ \mu\text{s}$ に撮影した瞬時音場像である。容器内部の音場は平面波が形成する定在波音場とは異なり複雑な形状になっている。Fig. 3.15(b)は定在波音場像である 1 周期 ($23.5\ \mu\text{s}$ から $24.4\ \mu\text{s}$) の最大輝度合成画像を示す。吸音材よりも下方では定在波の発生は認められず波面が移動する進行波音場となっている。しかし、吸音材の下端よりも上の部分には容器上部に縦に延びる輝線すなわち定在波の腹が認められる。

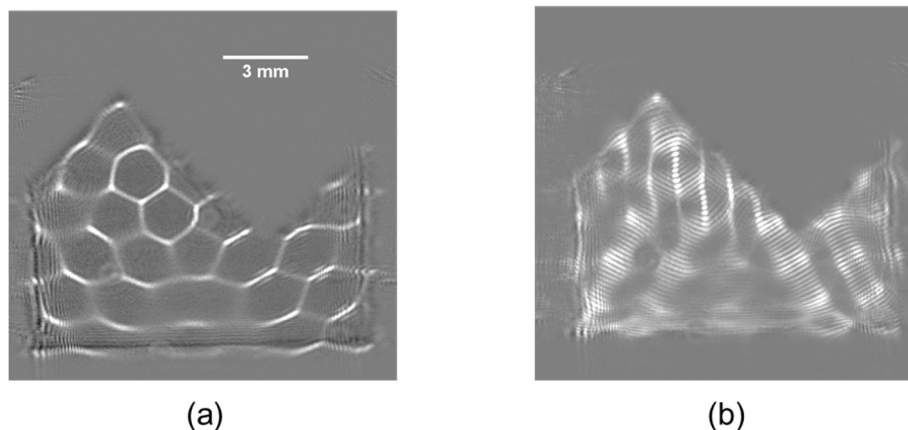


Figure 3.15 吸音材を設置した容器内部の瞬時音場像 ($t = 20 \mu s$) と定在波音場像 ($23.5 \mu s$ から $24.4 \mu s$) .

3.4.3 吸音材が音場に与える影響の考察

吸音材を設置して音場像を可視化した場合、吸音材の無い部分の瞬時音場像は水面の傾きが 0° の際のものに類似していた。しかし、最大輝度合成画像は全く異なるものとなった。音場像の撮影間隔 ($0.1 \mu s$) に起因する縞模様はあるが、吸音材の最下部より下の部分に定在波が発生している様子は認められない。一方、吸音材の山と山の間には縦に延びる輝線が確認できる。吸音材は超音波のエネルギーを吸収するが一部は反射する。今回用いた吸音材は頂角が 90° となっているため超音波は Fig. 3.16 のように反射する。その際、吸音材の等辺で反射した反射波どうしが干渉することで定在波が発生したと考えられる。

このことは、吸音材を用いた場合にも吸音材の山と山の間に定在波が発生する可能性があること、従って、今回の実験のように吸音材が培養液中に浸るような配置とすると、定在波音場中で発生したキャビテーションの影響が細胞に及ぶ可能性があることを示している。

これを避けるためには、超音波を照射する水槽内に密封した細胞培養容器を入れる方式とすれば良い。

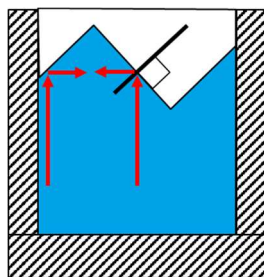


Figure 3.16 吸音材での超音波の反射

3.5 音響放射力により生じる波立ちの影響

シャーレ内の細胞に下方に置いた振動子から連続もしくは波数の多いバースト波超音波を照射すると、超音波の音響放射力により水面には常に変動している細かい波立ちが発生する。この音響放射力により生じる波立ちの影響を調べるため、波立ちを模擬した容器を作製し、内部の音場を撮影した。

3.5.1 音響放射力により生じる波立ちの影響についての実験方法

ポリオレフィン樹脂で波立ちを模擬した容器を作製し、音圧 $0.39 \text{ MPa}_{\text{p-p}}$ 、バースト超音波が生じる音場像をフォーカストシャドウグラフ法にて可視化した。

短パルス超音波が生体に与える熱的作用は小さく、超音波の生体作用研究では熱的作用の大きい連続波超音波が使われる。連続超音波を用いると進行波と反射波が干渉して定在波を発生させる。本節の実験では、定在波音場を評価するために波数 40 波のバースト超音波を用いた。また比較対象としてさざ波がない単純な直方体容器である Fig. 3.2(b)の容器内部の定在波音場像も可視化した。

作成した容器の寸法と実物の写真を Fig. 3.17 に示す。形状は Fig. 3.17(a)に示す直方体に周期の長い半径 6 mm の半円状の大きな波立ちを模擬した容器と Fig. 3.17(b)に示す周期の短いさざ波を模擬した波立ちの波高 1.5 mm、波立ち周期 1.5 mm（波数 7）の容器を作製した。シャーレに培養した細胞に超音波を照射した場合に発生した波成ちは、後者に類似している。

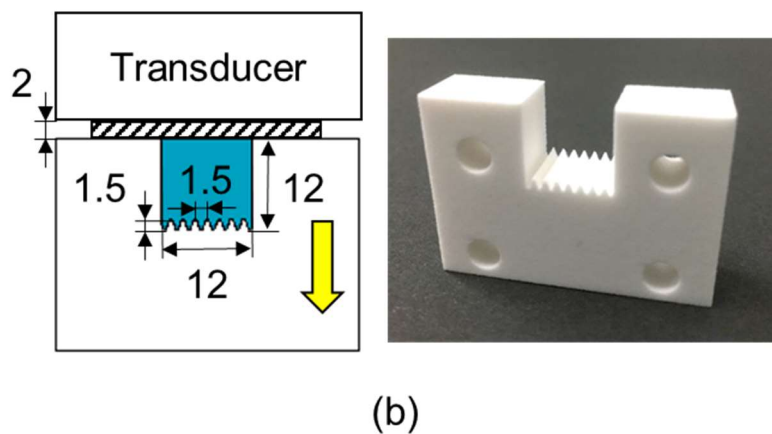
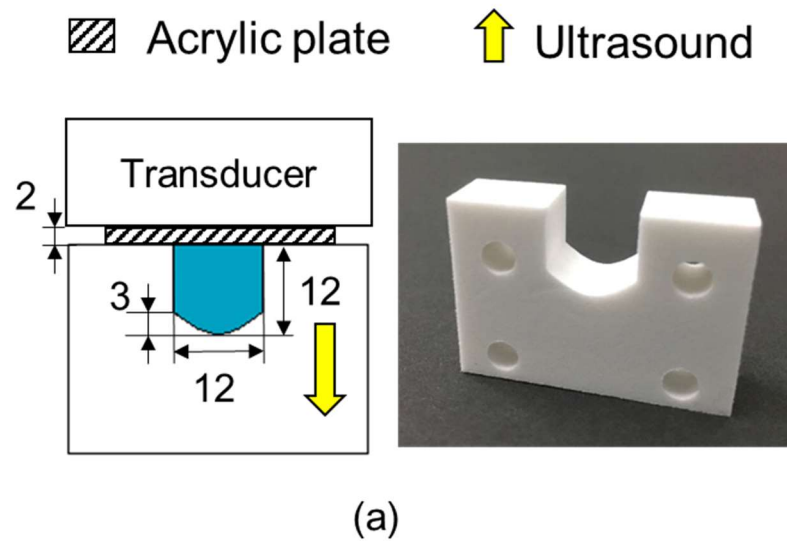


Figure 3.17 波立ち模擬容器の寸法と写真. (a) 周期の長い大きな波立ちを模擬した容器. (b) 周期の短いさざ波を模擬した容器.

3.5.2 水面波立ちの影響

比較対象として直方体容器を使用し撮影した音場像を Fig. 3.18 に示す. Fig. 3.18(a)は超音波照射から $23.5\ \mu\text{s}$ 後の瞬時音場像を, Fig. 3.18(b)に定在波音場像である 1 周期の最大輝度合成画像を示す. また, Fig. 3.18(b)の黄色で示した枠内の輝度を Fig. 3.18(c)に示す. Fig. 3.18(a)(b)の赤色の破線は容器と水の境界を示す. 境界部は低輝度の部分として描出されており, 音圧の節となっていることが分かる. このことは, 水と空気の界面が音響的に開口端に対応することから理解できる. また, Fig. 3.18(c)の輝度の山の間隔は波長の $1/2$ 倍となっており, 定在波が発生していることを示している.

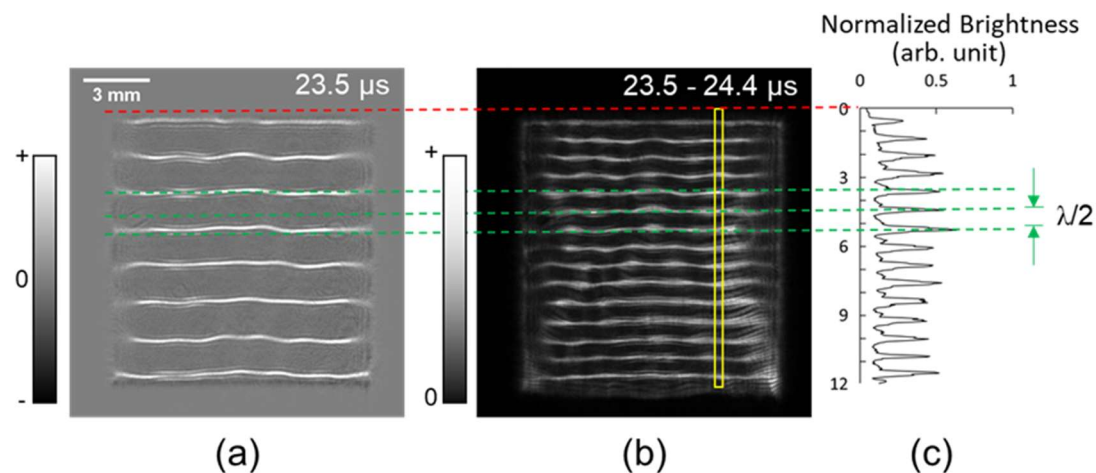


Figure 3.18 ポリオレフィン直方体容器の定在波音場像. (a) 超音波照射から $23.5\ \mu\text{s}$ 後の瞬時音場像. (b) $23.5\text{--}24.4\ \mu\text{s}$ (1 周期) の最大輝度合成画像. (c) Fig. 3.11(b)の黄色の枠線内の輝度分布. (Copyright (2021) The Japan Society of Applied Physics)

波長が大きな波立ちを模擬した容器 (Fig. 3.17(a)) の先端に超音波が到達するまでの時間帯 (進行波状態) とその後水面で反射が起こり進行波と反射波の干渉により定在波が生じている状態 (定在波状態) の瞬時音場像を Fig. 3.19(a) と (d) に示す. また, それぞれの状態における 1 周期の最大輝度合成画像を Fig. 3.19(b) と (e) に, 黄色で示した枠内の輝度を Fig. 3.19(c) と (f) に示す. 進行波状態の最大輝度合成画像では, Fig. 3.19(c) に示す通り, その輝度はほぼ一様となっている. しかし, 定在波状態では, Fig. 3.19(f) に示すように場所によって輝度に差があり, 定在波の発生が描出されている. また, Fig. 3.19(e) に青枠で示す領域の輝度のピーク値は他の部分のピーク値の約 4 倍となっており, 水槽の中心軸上に音圧が最も高くなる点が生じることが確認できた.

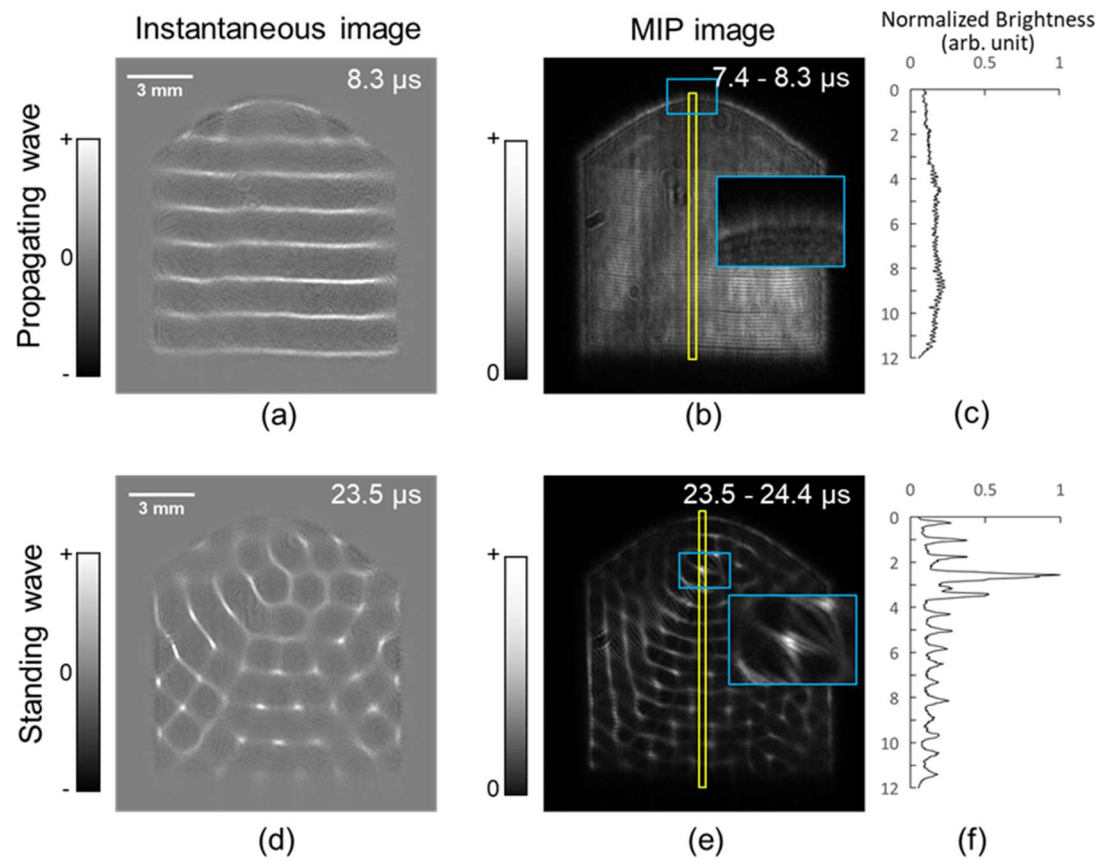


Figure 3.19 大きな波立ちを模擬した容器の進行波音場像と定在波音場像. (a) 超音波照射から 8.3 μs 後の瞬時音場像. (b) 超音波照射後 7.4–8.3 μs (1 周期) の最大輝度合成画像. (c) Fig. 3.19(b) の黄色の枠線内の輝度分布. (d) 超音波照射から 23.5 μs 後の瞬時音場像. (e) 超音波照射後 23.5–24.4 μs (1 周期) の最大輝度合成画像. (f) Fig. 3.19(e) の黄色の枠線内の輝度分布. (Copyright (2021) The Japan Society of Applied Physics)

次に、周期の短いさざ波を模擬した容器の進行波状態と定在波状態の瞬時音場像と最大輝度合成画像、その黄色で示した枠内の輝度を Fig. 3.20 に示す。Fig. 3.20(b) に示した進行波状態の最大輝度合成画像では、超音波が波立ち内部まで一様に伝搬している。しかし、Fig. 3.20(e) に示した定在波状態では、波立ち内部に点状の輝点が描出されている。また、その輝度を示した Fig. 3.20(c) と Fig. 3.20(f) の比較から、輝点の輝度は進行波の 4 倍となることが示された。

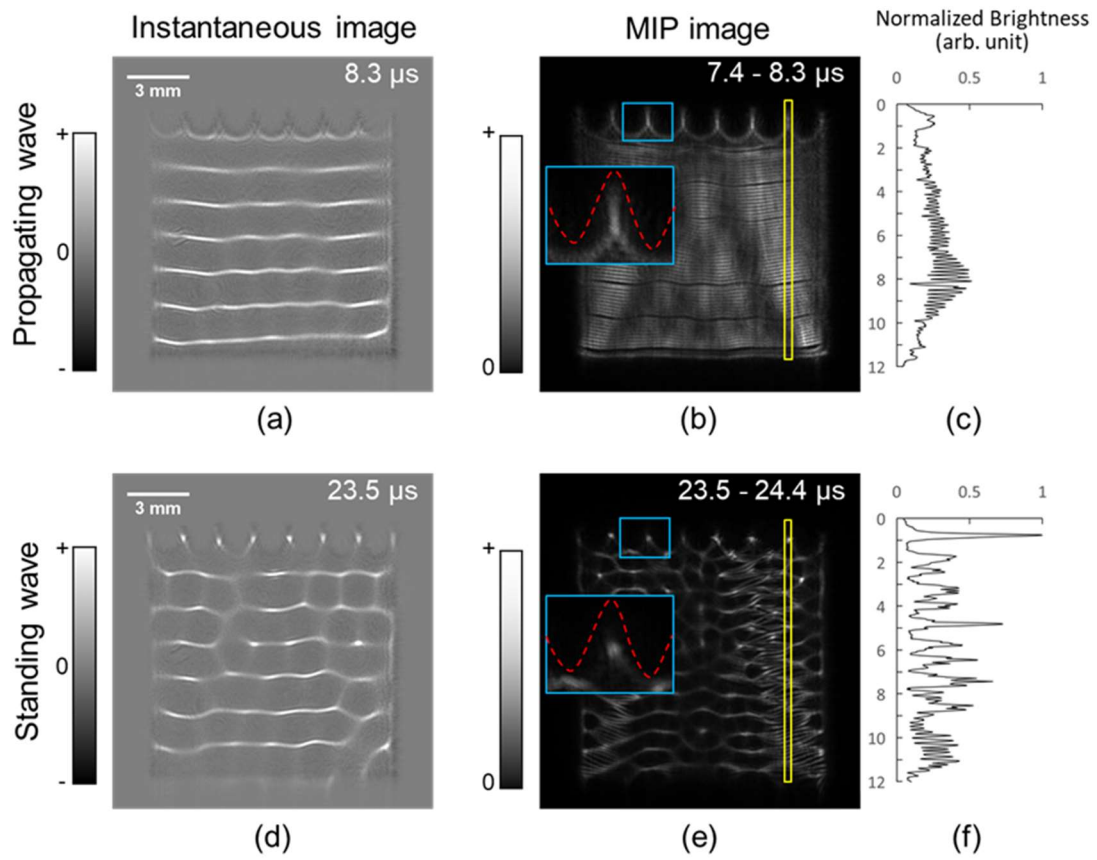


Figure 3.20 さざ波を模擬した容器の進行波音場像と定在波音場像. (a) 超音波照射から $8.3 \mu\text{s}$ 後の瞬時音場像. (b) 超音波照射後 $7.4-8.3 \mu\text{s}$ (1 周期) の最大輝度合成画像. (c) Fig. 3.20(b) の黄色の枠線内の輝度分布. (d) 超音波照射から $23.5 \mu\text{s}$ 後の瞬時音場像. (e) 超音波照射後 $23.5-24.4 \mu\text{s}$ (1 周期) の最大輝度合成画像. (f) Fig. 3.20(e) の黄色の枠線内の輝度分布. (Copyright (2021) The Japan Society of Applied Physics)

3.5.3 水面波立ちが音場に与える影響の考察

水面に周期の長い大きな波立ちが生じる状態を模擬した容器と、周期の短いさざ波が生じる状態を模擬した容器内の定在波音場は、平坦な水面をもつ容器内の音場と比べ複雑になっていた。平坦な水面の容器内の定在波音場が比較的平面波に近い波面となっていたことから、波立ち部分での反射波が容器全体の領域に及んでいることがわかる。今回の波立ちを模擬した容器の内部には定在波が発生していたが、水面の波成ちは常に動いているため、発生した定在波音場の影響は時間的に平均化されることになり、シャーレ内の音響エネルギーは均一になる可能性がある。

曲面状の波成ちがある場合、反射によりその内部に音圧の集束点が発生した。細かい波成ちの内部にも、1点ずつ集束点が発生していた。そのため、波成ちが生じる空気と液体の界面付近に存在する細胞は集束した音圧の影響を受けると考えられるため注意が必要である。また、超音波による特徴的な現象として超音波霧化があるが、その際に発生する水柱の形状は、今回さざ波を模擬した容器の波成ちに似ている。そのため、超音波霧化の際の水柱内でも音圧の集束点が発生していると考えられ、これが霧化現象に関与しているものと予想される。

3.6 均一な音場の発生手法

シャーレ内に培養した細胞に超音波を照射し生体作用を評価する実験において再現性の良い結果を得るためには、シャーレ内に均一な超音波を発生させる必要がある。本節では容器の壁や音響放射力による波立ちが音場に与える影響、吸音材の効果に関する考察などに基づき、容器内の音場を均一化する手法を提案する。その効果をフォーカストシャドウグラフによる音場可視化により検証した。

3.6.1 実験方法

Fig. 3.21(a)に示す構成で実験を行った。厚さ 5 mm のポリオレフィン樹脂板に 10 mm 四方の穴を開け、その上に Fig. 3.21(b)の亚克力容器（内寸 $12 \times 10 \times 12 \text{ mm}^3$ (W $\times$ D $\times$ H)) を置き、容器上方には吸音材を設置した。直径 40 mm の円形平板振動子から周波数 1 MHz、繰り返し周波数 1 kHz、音圧 0.39 MPa_{p-p} 、波数 40 波の正弦波を発生させた。なお、壁伝搬や水面での反射の影響を比較するために Fig. 3.22 に示す組合せで実験を行った。

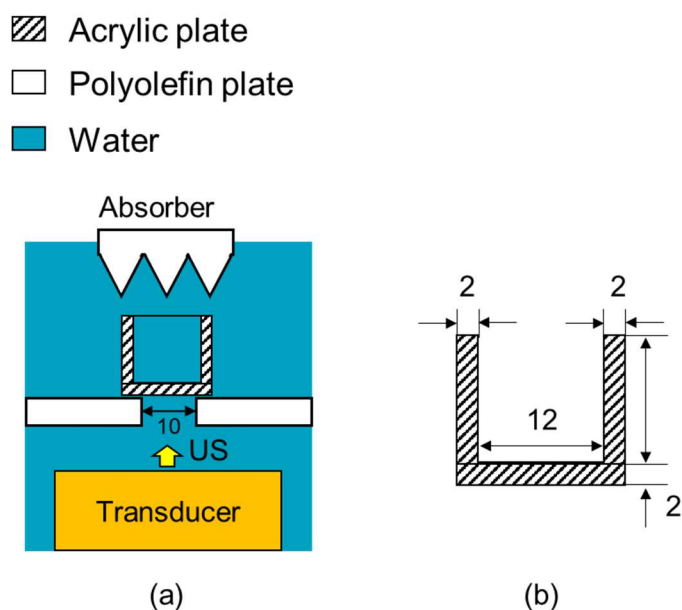


Figure 3.21 均一超音波音場を作成するために開口制限と吸音材を設置した実験構成

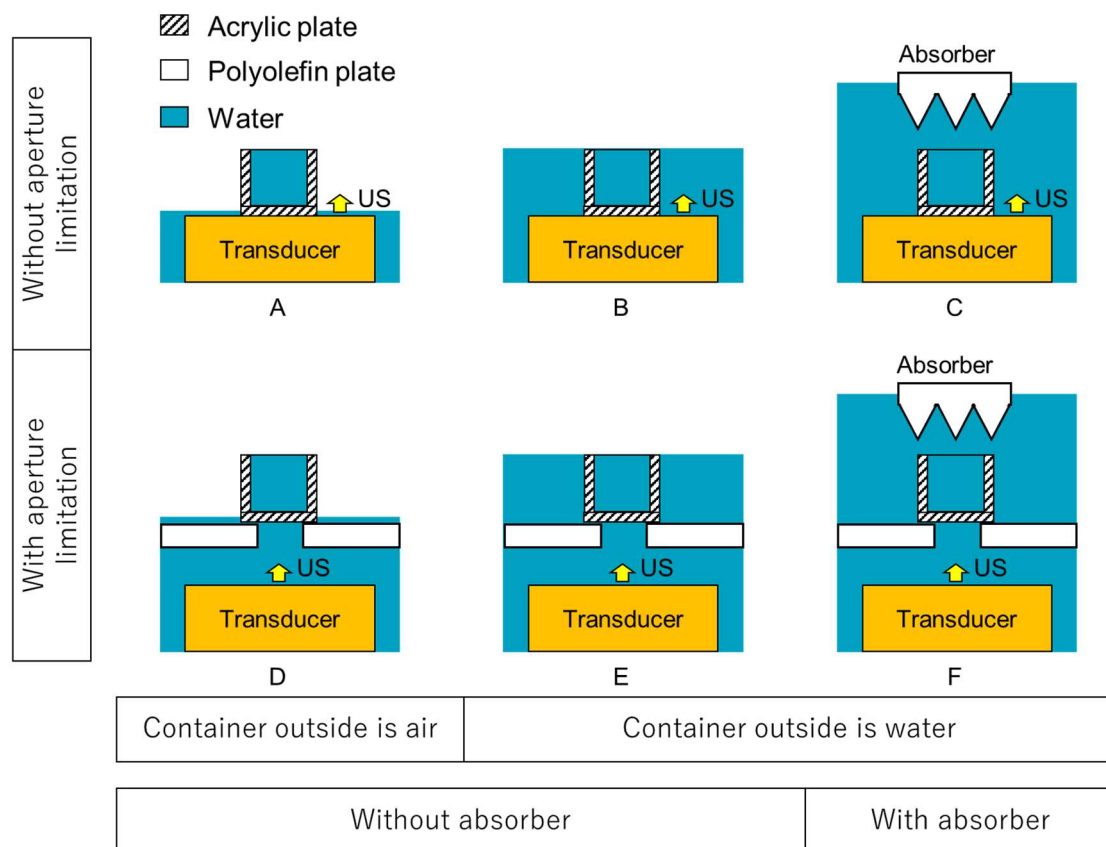


Figure 3.22 実験条件の組み合わせ.

3.6.2 実験結果

Fig. 3.23 に進行波状態の瞬時音場像を上段に、1 周期の画像 10 枚で作成した最大輝度合成画像を下段に示す。開口制限の無い実験条件すなわち壁内を伝搬する超音波が存在し、これが水槽内に漏れ出る条件では、A, B, C の瞬時音場像には斜方に伝搬する波面が確認できる。これに対し、開口制限のある実験条件 D, E, F ではそのような波面は確認できない。また、最大輝度合成画像も実験条件 A, B, C では斜方に伝搬する波面の影響を受け音場が不均一になっているが、実験条件 D, E, F では比較的均質な音場となっている。

Propagating Wave Condition

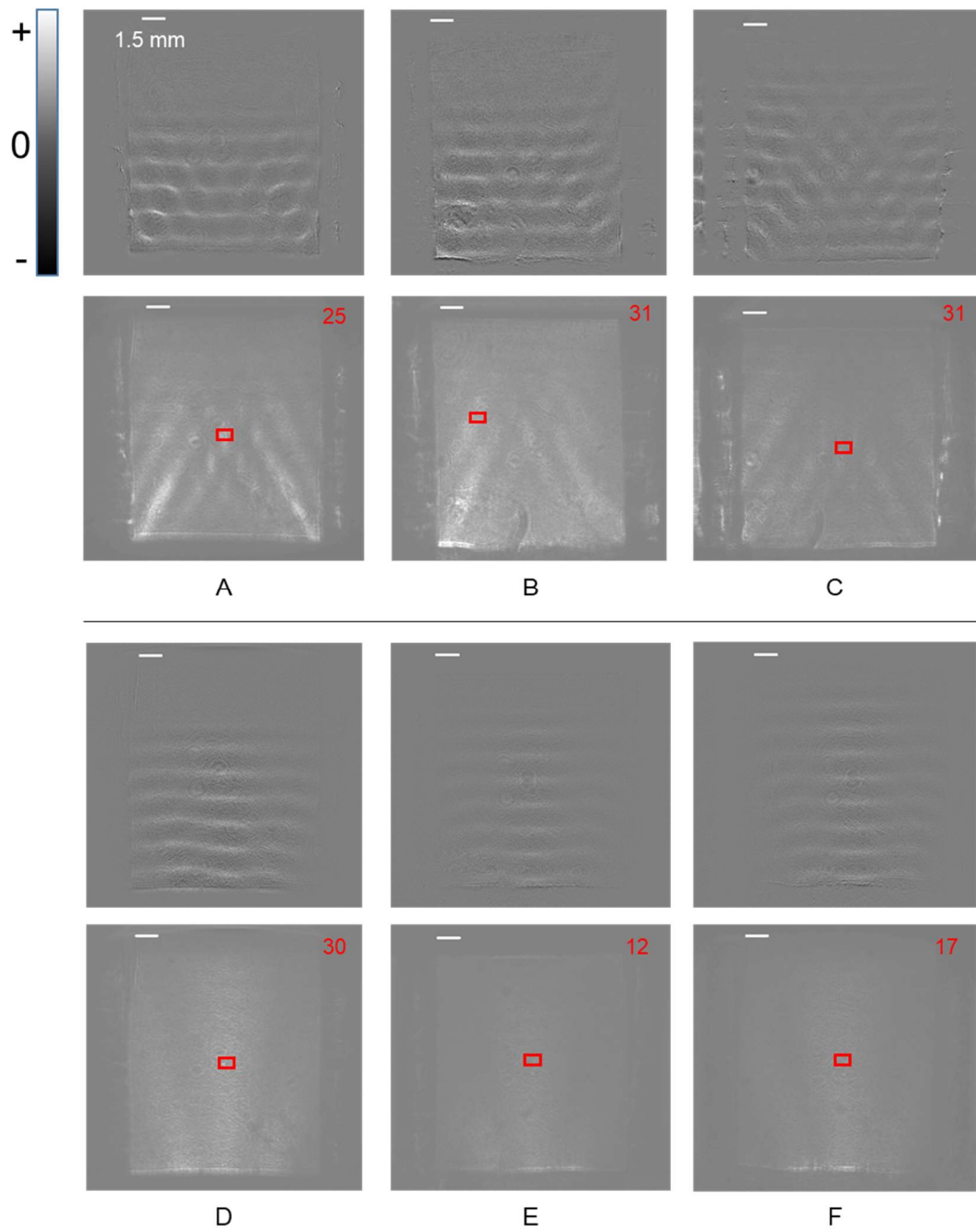


Figure 3.23 Fig. 3.22 の実験条件 A から F の進行波状態における瞬時音場像（上段）とその瞬時音場像 1 周期の最大輝度合成画像（下段）. 右上の赤字の数字は赤枠内の平均輝度を示す.

次に、超音波照射から十分に時間が経過し、定在波音場が形成される時間における瞬時音場像とその最大輝度合成画像を Fig.3.23 に示す. 開口制限の無い実験条件 A, B, C の瞬時

音場像では複雑なハニカム状の音場像が観察できる．これに対し，開口制限のある実験条件 D, E, F では平面波に近い形状となっている．

また，吸音材を設置していない実験条件 A, B, D, E の最大輝度合成画像を見ると水面での反射波が存在することから定在波の発生が確認できる．しかし，開口制限をして吸音材を設置した実験条件 F では進行波状態 (Fig. 3.23 F) と定在波状態における音場像 (Fig. 3.24 F) に違いが無く均一な音場が実現されている．

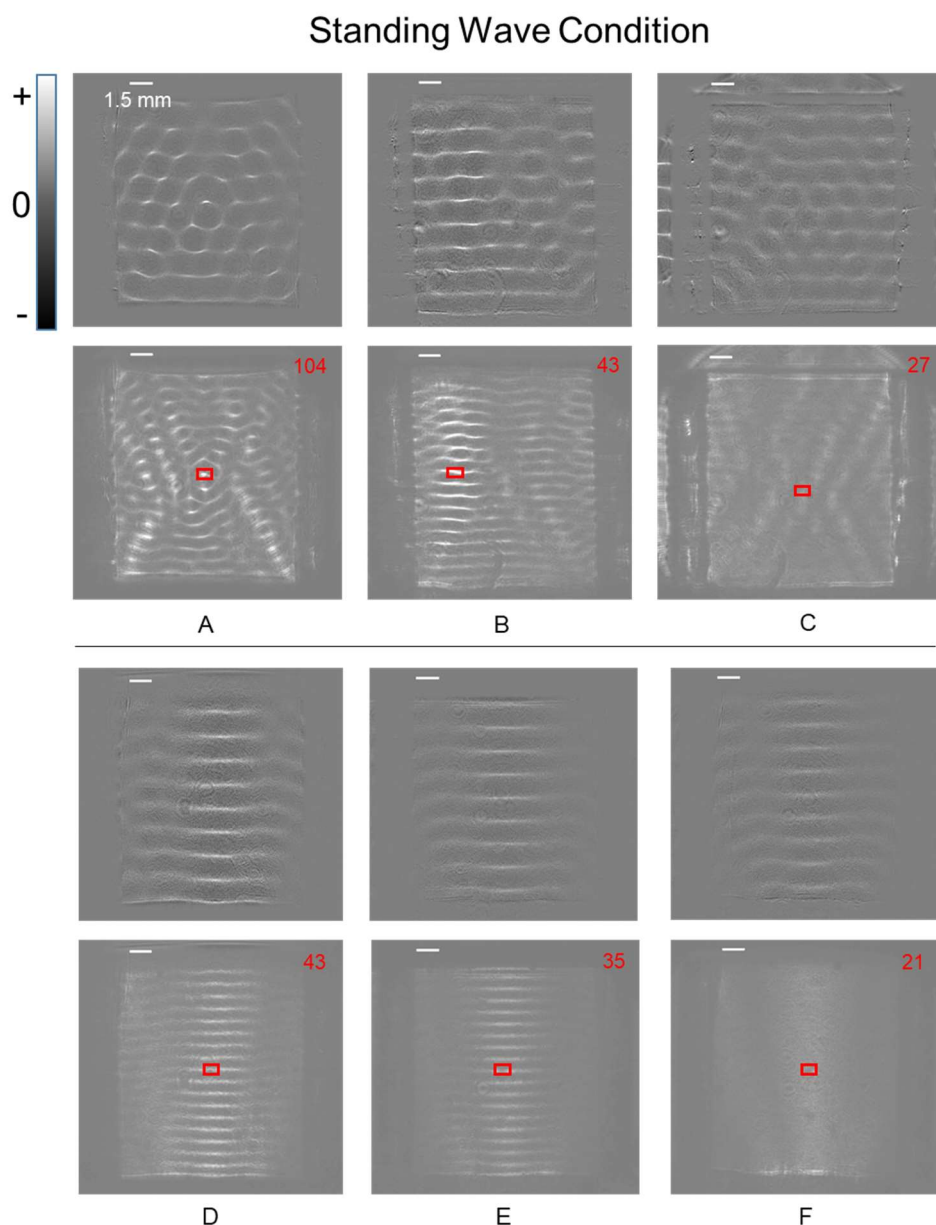


Figure 3.24 Fig. 3.22 の実験条件 A から F の定在波が生じる時間における瞬時音場像（上段）とその瞬時音場像 1 周期の最大輝度合成画像（下段）．右上の赤字の数字は赤枠内の平均輝度を示す．

3.6.3 考察

Fig. 3.25 にシャドウグラフの撮影条件と定在波条件で得られた画像をまとめて示す。これらの結果を見ると壁伝搬が存在する条件 (A, B, C) では斜め方向に伝搬する漏出波が内部音場の空間的な一様性を強く乱していることがわかる。また水面での反射の有無を比較すると (A・B と C, D・E と F), 反射波が存在する条件で観察される定在波の腹と節が, 反射波の吸収によりほぼ消失していることがわかる。しかし, 特に A と C の結果を比較すると, 空間的な一様性が低い点については大きな違いはなく, 壁伝搬の影響を取り除くことの重要性を示している。

さらに, 壁による反射の有無を比較すると, 反射を低減した条件で空間的な一様性が向上 (A に比べ B が一様) し, 定在波の腹と節の輝度のコントラストが低下 (D に比べ E が低下) している様子がわかる。しかし, 改善の程度は少ない。

また, 空間の一様性が比較的高い D, E, F の結果について音場像の輝度分布をグラフ化した結果を Fig. 3.26 に示す。壁伝搬を取り除いた状態では腹と節で輝度差は 45 程度であるが, 壁反射の影響を取り除くと輝度差は 20 程度に減少し, 水面反射を取り除くと定在波はほとんど観察されていない。

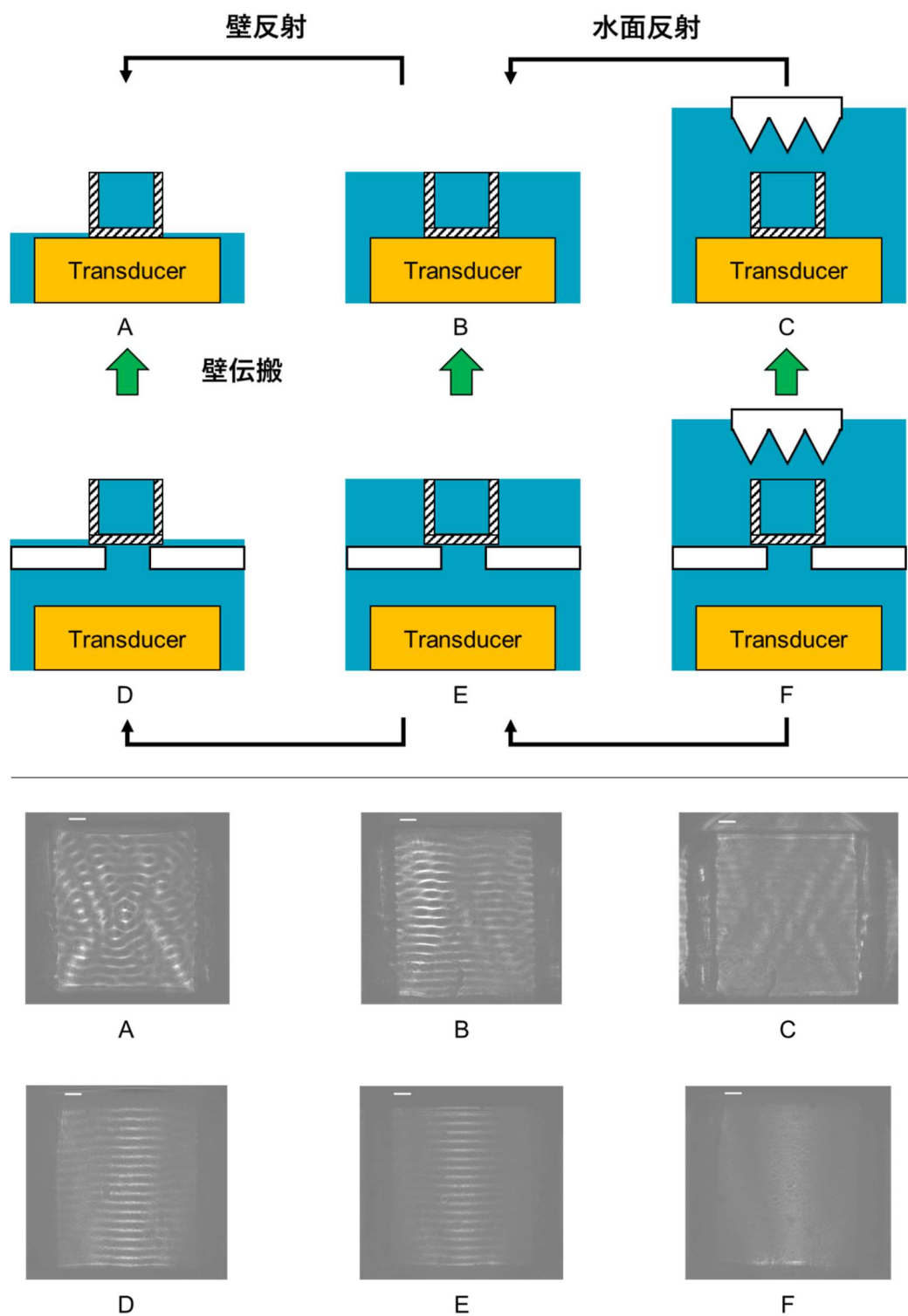


Figure 3.25 シャドウグラフ撮影条件（上段）と定在波条件（下段）. A・B・Cは壁内伝搬が存在する条件, D・E・Fは壁内伝搬が存在しない条件. A・Dは壁反射あり, B・CとE・Fは壁反射なしの条件. A・BとD・Eは水面反射あり, CとFは水面反射なしの条件

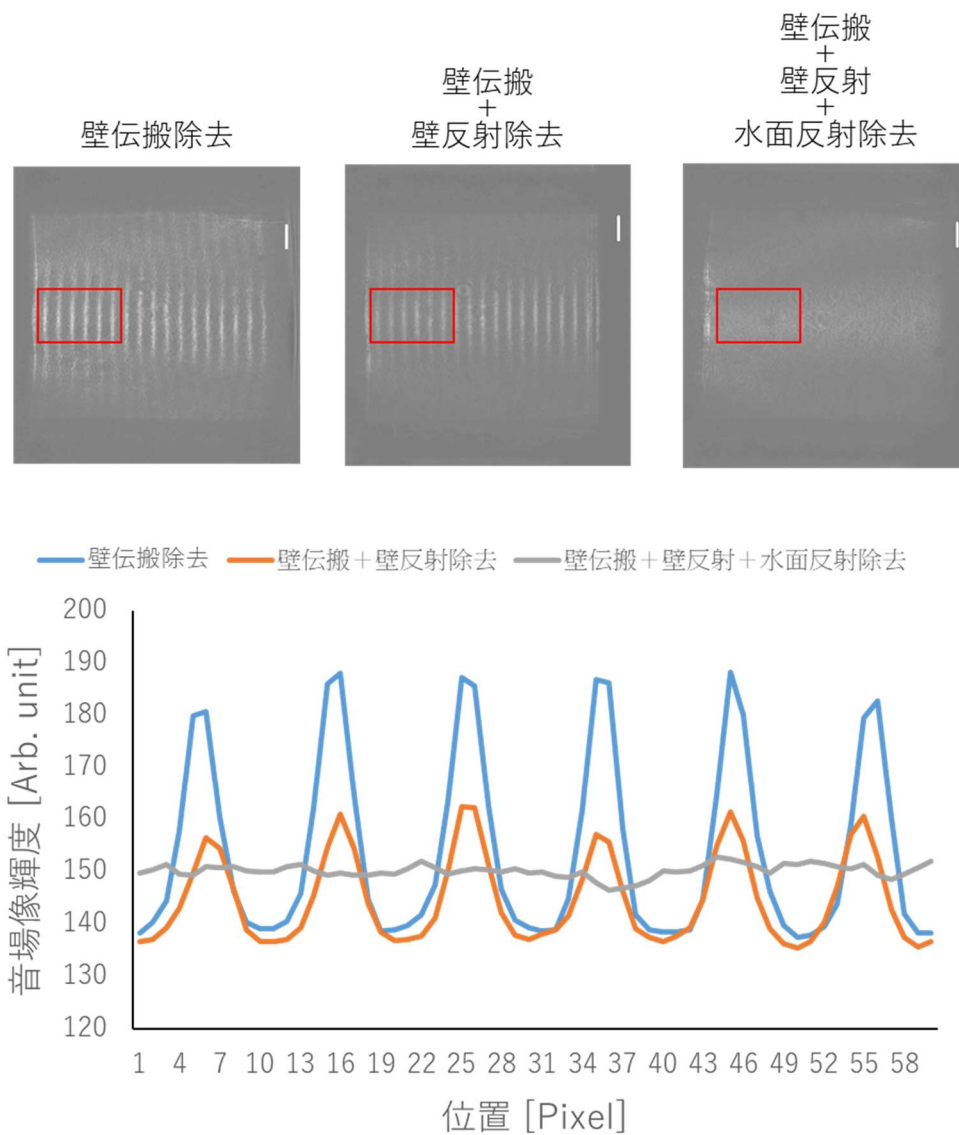


Figure 3.26 赤線内の水平方向の輝度グラフ

以上より，シャーレの様な小型容器に培養した細胞に超音波を照射する際には，Fig. 3.27(a)に示す壁伝搬を防ぐようなアダプターを取り付け，Fig. 3.27(b)のようにシャーレの上方に吸音材を設置することで定在波の発生を十分抑制でき，ばらつきの少ない照射実験が実現できると考えられる．しかし，この定在波発生抑制効果については実際の培養細胞を用いて確認する必要があると考える．

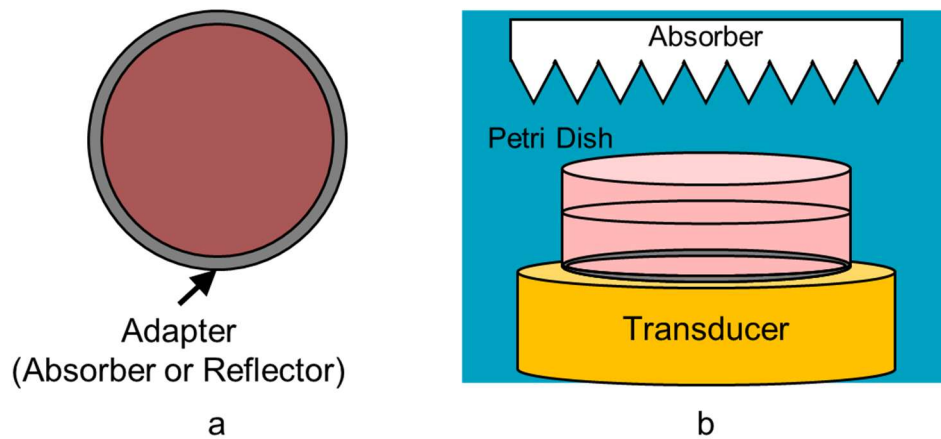


Figure 3.27 シャーレに均一な超音波を照射するための(a)アダプターと(b)装置の構成.

3.7 フォーカストシャドウグラフ法における境界の輝度低下の検討

フォーカストシャドウグラフ法では超音波の音圧によって生じる媒質の密度勾配による光の屈折を音場像として描出している．そのため，水と空気，水と容器の境界では光の屈折率の違いや光が遮られることにより輝度と音圧の関係が変化することが考えられる．ここでは屈折率の境界における輝度の変化について調べた．

3.7.1 実験方法

Fig. 3.2(b)のポリオレフィン樹脂容器を用い，Fig. 3.28 に示すように光の出射側に厚さ 2mm の黒色のアクリル板を挿入して境界を模擬した．アクリル板の先端位置は音圧の腹である輝線から超音波波長の $1/8$ ($=\lambda/8$) と $1/16$ ($=\lambda/16$) の位置に設置した場合と，何も設置しなかった場合の 3 つの条件とした．音圧 $0.39 \text{ MPa}_{\text{p-p}}$ ，波数 40 波のバースト超音波が生じる音場像をフォーカストシャドウグラフ法で可視化した．

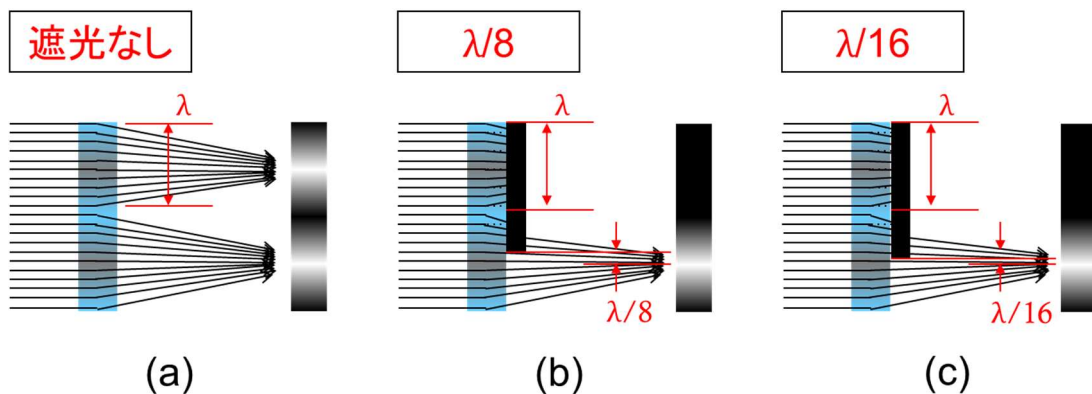


Figure 3.28 アクリル板による屈折光遮光位置. (a) 遮光なし. (b) $\lambda/8$. (c) $\lambda/16$.

3.7.2 実験結果

Fig 3.29 にポリオレフィン樹脂容器内の音場像を屈折光の遮光位置を変えて撮影した結果と緑色枠内の輝度分布を示す．遮光をしていない条件において，Fig. 3.29(a)の矢印で示した部分の輝度を 1 とした場合，音圧は変化していないのにも関わらず， $\lambda/8$ の位置にアクリル板を設置した条件の輝度は 0.6 倍， $\lambda/16$ の位置に設置した条件の輝度は 0.4 倍に低下した．

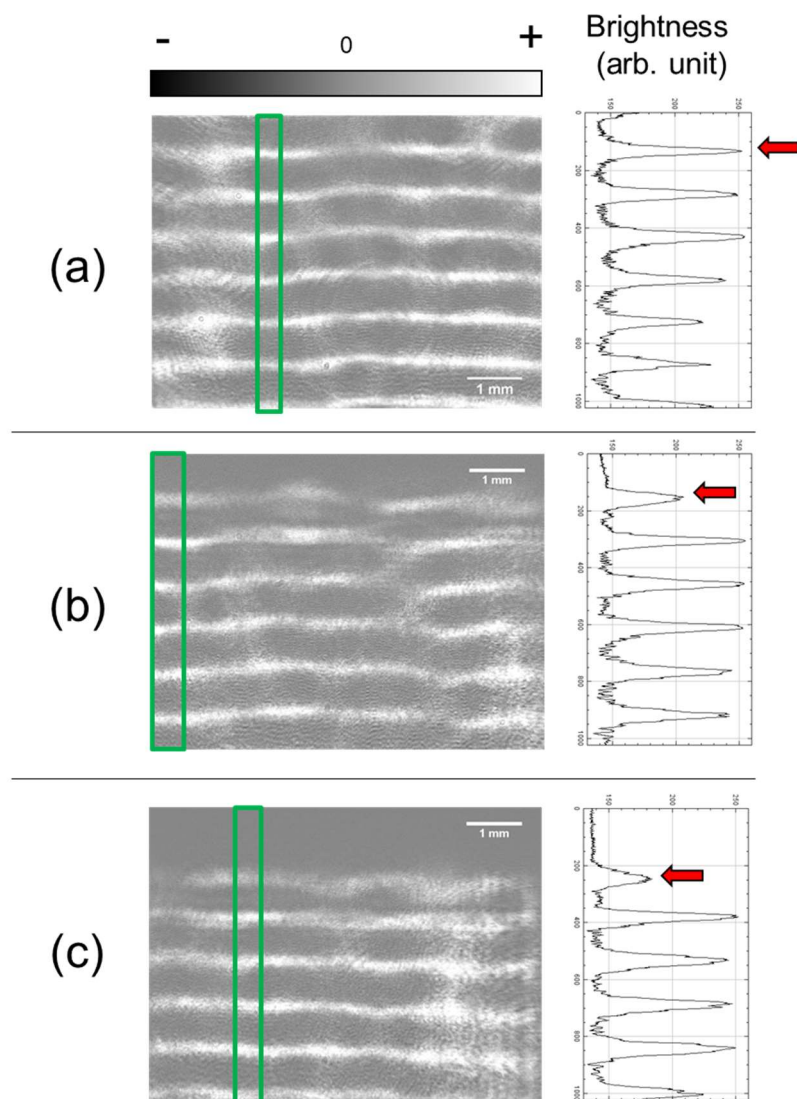


Figure 3.29 遮光位置を変えた際の最大輝度合成画像と緑色枠内の輝度グラフ. (a) 遮光なし. (b) 超音波波長の $\lambda/8$ の位置にアクリル板を設置した場合. (c) 超音波波長の $\lambda/16$ の位置に設置した場合.

3.7.3 考察

超音波による屈折光の一部を遮光すると、超音波の強度は変化しないのかかわらず遮光部の直近のみ音場像の輝度が低下した。この結果からポリオレフィン樹脂容器を使用して音場像を撮影した Fig. 3.18 や Fig. 3.19, Fig. 3.20 の容器先端における音圧は、輝度から推定される音圧よりも高い可能性がある。直方体の定在波の輝度を示した Fig. 3.18(c)では容器境界直下の輝線の輝度は 1 つ下の定在波の腹の輝度の $1/2$ に低下していたが、直方体容器の境界は音圧の節となっているため実際の音圧は低下していなかったものと推定され

る．一方， $\lambda/8$ （0.125 倍）と $\lambda/16$ （0.0625 倍）の位置にアクリル板を設置した場合の輝度の低下率は，それぞれ遮光しなかった条件の 0.6 倍と 0.4 倍であり，遮光板の先端と輝線の中心との距離とは比例関係にはなっていなかった．これは，超音波による媒質の密度分布が距離と比例関係になっていないことが関係していると考えられる．

第4章 高強度超音波照射による水面盛り上がりと水柱の内部音場

現在、強力集束超音波 (High-Intensity Focused Ultrasound: HIFU) 治療や音響力学療法 (Sono-Dynamic Therapy: SDT) などの超音波を用いた治療が確立されつつある。これらの治療では超音波の熱的作用に加え、キャビテーションが発生する非熱的作用が大きな役割をはたす。HIFU 治療の一種であるヒストトリブシー^[4.1]ではキャビテーションの機械的作用により細胞溶解が起き、音響力学療法では、キャビテーションが生じるフリーラジカルにより薬物が活性化され、超音波照射部位にのみ治療効果をもたらす。このように強力超音波を用いた治療ではキャビテーションが重要な役割を果たすと言われているが、キャビテーションは非常に複雑な現象であり、それぞれの具体的な治療機序の解明は十分に進んでいない。

高強度超音波により発生したキャビテーションが生体に与える作用を解明するために様々な実験が行われてきたが、特に *in vitro* の検討では Fig. 4.1 に示すような照射装置が用いられることが多い。このような条件では高強度超音波が生じる大きな音響放射圧や音響流により水面に盛り上がりが生じる。前章で述べたシャーレ内の水面に生じるさざ波とは異なり、盛り上がりは大きく時間的に変動しない。このような水面の変化は水中音場に大きな変化をもたらす、引いてはキャビテーションの発生状況にも重大な影響を与えることが予想される。しかし、これまでに内部音場を具体的に評価した報告は行われていない。そこで本章では連続超音波の照射により生じる水面盛り上がりや水柱内部の超音波音場について検討した。

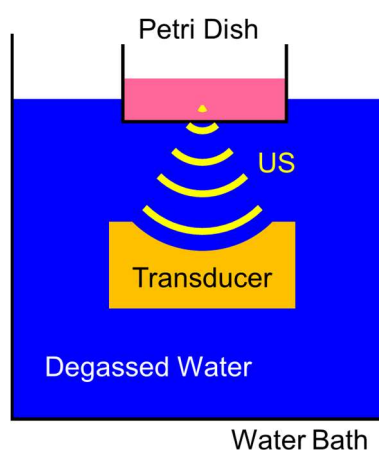


Figure 4.1 高強度超音波による生体作用基礎実験の実験系の一例

4.1 実験方法

連続超音波の照射により生じる水面盛り上りを以下の3つの方法で検討した。

- 二次元的な水面盛り上がりを作成し、その内部音場をフォーカストシャドウグラフ法で可視化
- 上記水面盛上りの形状を模擬した水槽を作成し、その内部音場をフォーカストシャドウグラフ法で可視化
- 上記模擬水槽の内部音場をシミュレーションにより可視化

4.1.1 可視化のための水面盛り上りの形成法

フォーカストシャドウグラフ法により水面盛り上がり内の音場像を可視化するシステム構成を Fig. 4.2 に示す。水面盛り上がり作成には超音波霧化装置（HMC-2400, Honda Electronics）を用いた。円形平板振動子の直径は 20 mm であるが、水槽に固定することによる開口制限により有効振動子径は 15 mm となっている。また、発生する連続超音波の中心周波数は 2.4 MHz であり、電源電圧 5 V, 7 V, 9 V における超音波の圧力は 0.077 MPa_{p-p}, 0.103 MPa_{p-p}, 0.129 MPa_{p-p} である。水面の高さは超音波霧化装置の駆動回路の電源電圧を 5 から 9 V の範囲で変化させることにより調節した。

また、フォーカストシャドウグラフ法では一般にパルス超音波を可視化するため、パルスの打ち出しのタイミングに対してディレイを与えストロボ観察することにより、進行波音場の瞬時音場を可視化している。しかし、連続超音波を利用する霧化装置では、打ち出しのタイミングを得ることができない。そこで、連続正弦波を矩形波に変換した後にカウンタ回路で分周することにより超音波の位相と同期した約 1 kHz の矩形波信号を作成し、これを照射用光源のタイミング信号として使用することにより連続波超音波の瞬時音場の可視化を実現した。

フォーカストシャドウグラフ法では音場による光の屈折を画像化するため、音場以外の原因による光の屈折を発生させないようにする必要がある。そのため、撮影対象の光入出射面が光軸に垂直な平面である必要があり、Fig. 4.3 に示す方法を用いてこの条件を実現した。厚さ 3 mm のアクリル板をスペーサとして 50 × 2 × 50 mm³ (W × D × H) の 2 枚のガラス板で挟んだものを振動子の直上にガラス板下端が水に 2 mm 程度入るように設置し、ガラス板の間に水面の盛り上りを発生させた。

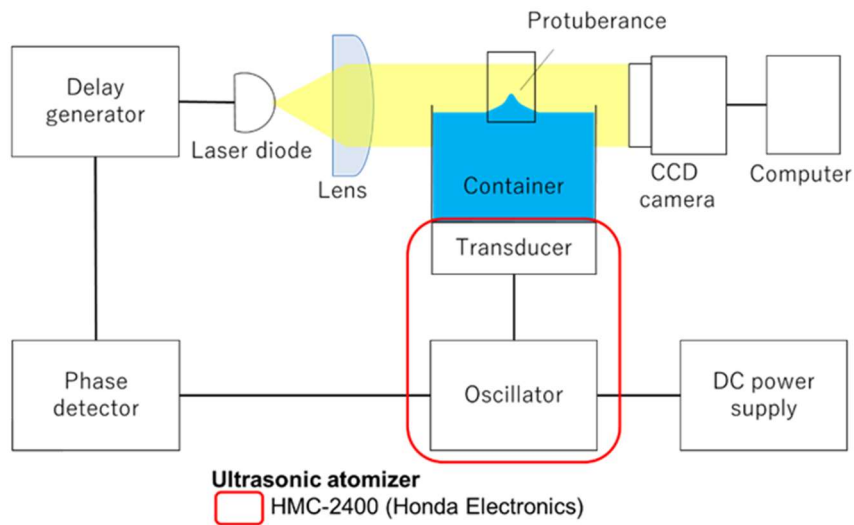


Figure 4.2 連続超音波照射による水面盛り上がり音場像撮影システム

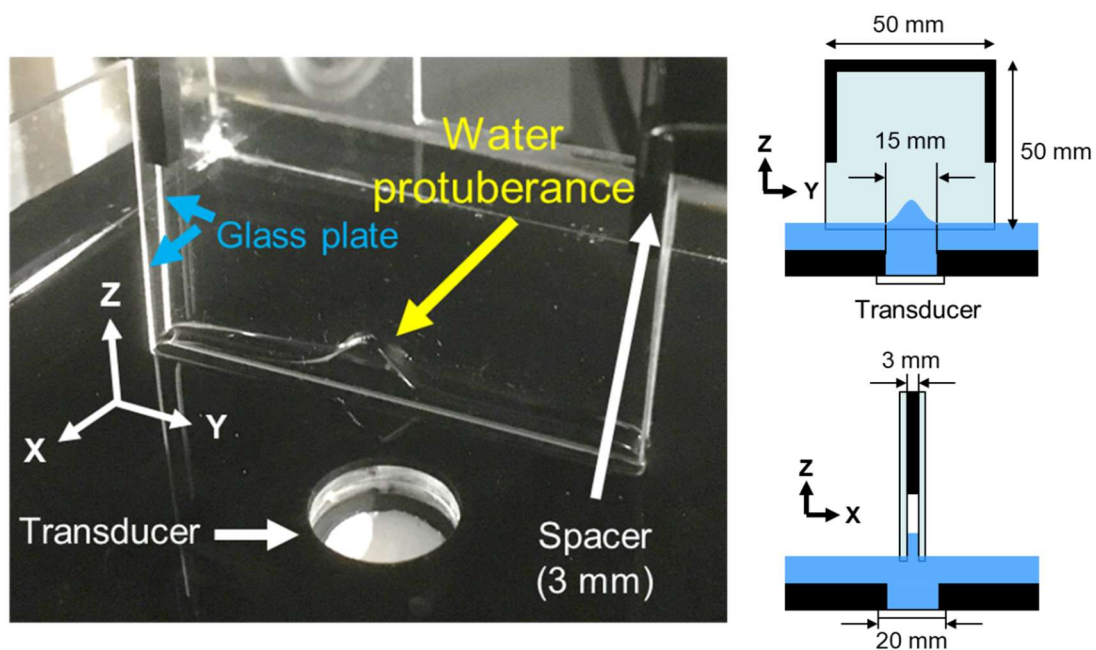


Figure 4.3 水面盛り上がりの光入出射面を平面にするための方法

4.1.2 霧化水柱の形状

超音波の出力を上げたり，凹面振動子により超音波を集束したりすると水面の形状が盛り上がりから水柱に移行する．ガラス板ではさみ込む方法ではその間に水柱を作成することが出来なかったため水柱の観察例を参考にポリオレフィン樹脂容器やシミュレーションのための 3D モデルを作成した．

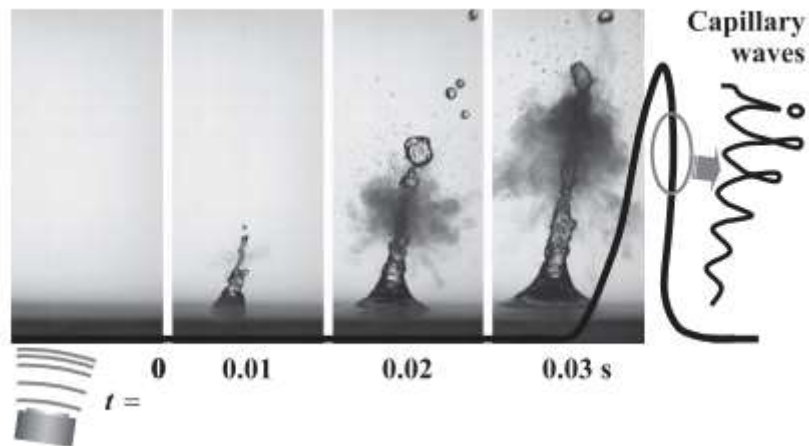
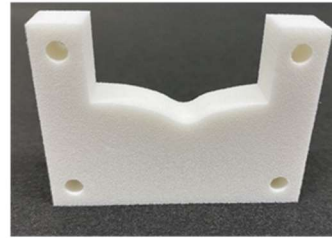
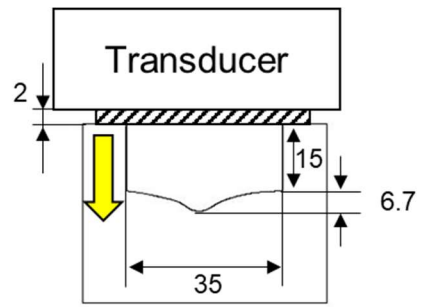


Figure 4.4 超音波霧化の際に生じる水柱^[2.11] (*Earozoru Kenkyu*, 26 (1), 12 (2011))

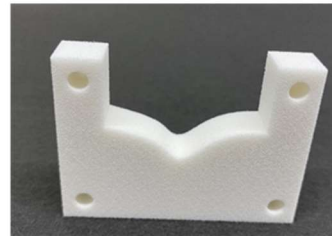
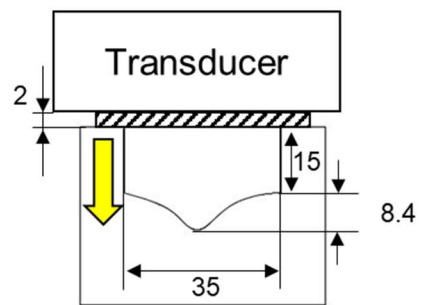
4.1.3 模擬容器の形状

4.1.1 の方法を用いて発生させた水面の盛り上がりの形状をフォーカストシャドウグラフ法で撮影した音場分布画像から読み取り，それを模擬する容器を厚さ 10 mm のポリオレフィン樹脂で作成した．超音波霧化装置の駆動電圧 8 V，9 V，10 V でフォーカストシャドウグラフ法で撮影した音場像を基に，水面盛り上がりの高さが異なる 3 種類の模擬容器を作成した．作成した容器の形状と外観を Fig. 4.5 に示す．

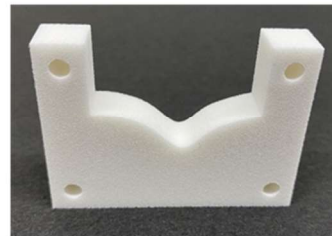
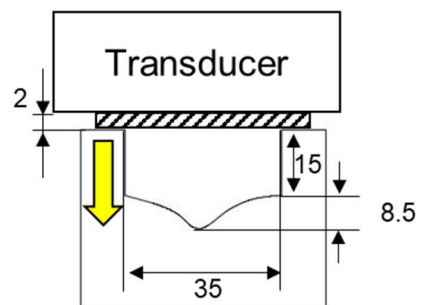
また，超音波霧化時に発生する水柱を高速度カメラで撮影した土屋らの研究^[2.11]を基に，超音波霧化の直前に生じる水柱を模擬する容器を Fig. 4.6 のように作製した．水柱の高さは波長の 10 倍と 5 倍に，幅は波長の 1 倍と 2 倍に設定した．それらの容器を用い，フォーカストシャドウグラフ法にて波数 40 波のバースト波が発生する音場像を可視化した．なお，模擬容器を用いた実験には第 3 章の実験で用いた振動子（中心周波数 1 MHz）を使用することとしたため，周波数の違いを考慮して模擬容器の大きさは 2.4 倍拡大して作製した．



(a)



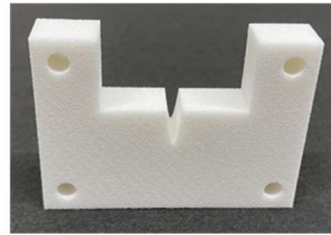
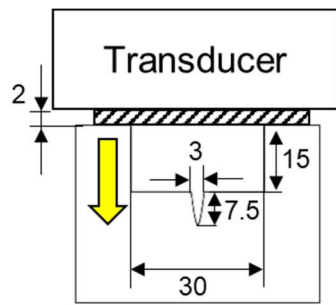
(b)



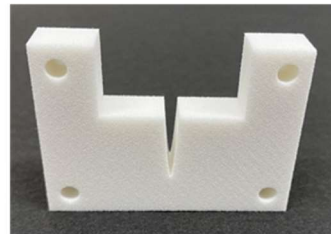
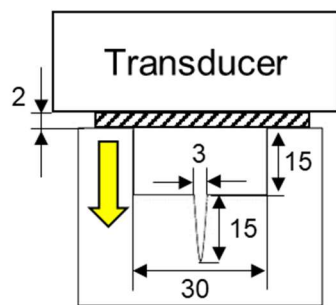
(c)

 Acrylic plate
  Ultrasound

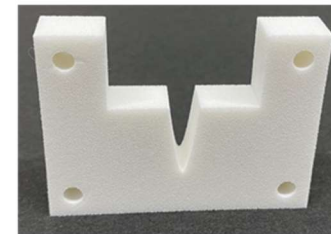
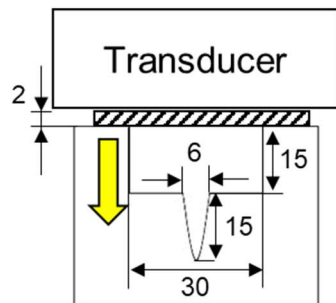
Figure 4.5 水面の盛りりを模擬したポリオレフィン樹脂容器の形状と寸法. (a) 波立ち 6.7 mm 容器. (b) 波立ち 8.4 mm 容器. (c) 波立ち 8.5 mm 容器.



(a)



(b)



(c)

▨ Acrylic plate ↓ Ultrasound

Figure 4.6 水柱を模擬したポリオレフィン樹脂容器の形状と寸法. (a) 高さ 7.5 mm, 幅 3 mm の容器. (b) 高さ 15 mm, 幅 3 mm の容器. (c) 高さ 15 mm, 幅 6 mm の容器.

4.1.4 音場シミュレーション法

水面の盛り上がり内部の音場像は実験的に可視化できたが、霧化が発生するような水

柱はガラス板の間では定常状態を維持できなかった．そこでシミュレーションにより水柱内の音場を求めた．ガラス板間に発生させた水面の盛り上がりとその形状を模擬した容器内に発生する音場の実測結果が，シミュレーションにより求めた音場とどの程度一致するかを比較した．シミュレーションの妥当性を評価するため水面の盛り上がり形状を参考に 3D モデルを作成し検討した．2 次元形状に厚みを加えた 3 次元形状の 3D モデルの作成にはオープンソース (LGPL ライセンス) の FreeCAD 0.19 を使用し，音場のシミュレーションには有限要素シミュレータである OnScale Lab (OnScale) を用いた．

Fig. 4.7(a)–(c)に水面の盛り上りを模擬した 3D モデルの形状と寸法を示す．また，Fig. 4.6 の水柱の形状と寸法を基に奥行き 10 mm で Fig. 4.7(d)–(f)の 3D モデルを作成した．

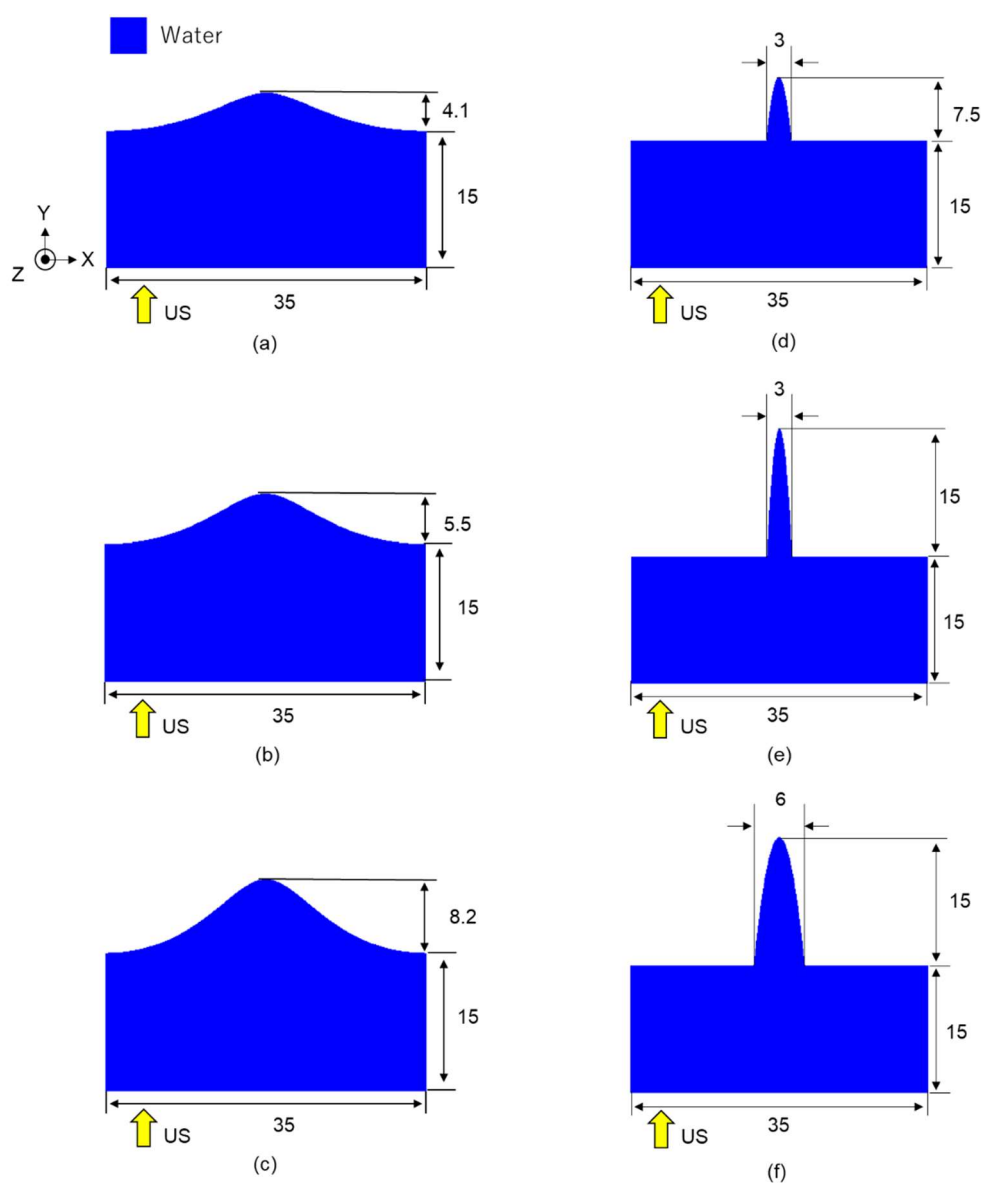


Figure 4.7 水面盛り上がり 3D モデル(a)–(c)と水柱 3D モデル(d)–(f)の形状と寸法

シミュレーションを行う際の周波数や境界条件の設定を Table 4.1 に示す。OnScale は、有限要素法により音場を計算するため、シミュレーションに先立ってモデルを格子点の集合体に離散化する。今回の計算では、空間離散化幅（Elements Per Wavelength）は発散を防ぐために十分とされる値である波長^[4.2]の 1/15 とした。また、定在波が発生する時間帯まで音場を求めるため、シミュレーション時間幅（Simulation Run Time）は、振動子を出た超音波が水面の先端に達し、反射波が振動子まで戻る時間を考慮して 30–60 μs に設定した。境界条件は、空気と水の界面を表す Ymax は自由端に設定した。Z 方向には音場を観察するためのガラス板が存在するため、固定端とした。振動子からの出力は振幅 1 V_{p-p}, 40 波の正弦波とした。

Table 4.1 シミュレーション設定

Forcing Function	
Function Type	Sinusoid Pulse
Frequency (MHz)	1
Number of Cycles	40
Amplitude – Peak (V)	1.0
Mesh	
Definitions	Wavelength Based
Elements Per Wavelength	15
Boundary Conditions	
X minimum	Free
X Maximum	Free
Y minimum	Free
Y Maximum	Free
Z minimum	Fixed
Z Maximum	Fixed
Analysis	
Simulation Run Time (μs)	30 μs (Fig. 4.7a, b, c)
	45 μs (Fig. 4.7d)
	60 μs (Fig. 4.7e,f)

4.2 水面盛り上がり内部音場

4.2.1 水面盛り上がり内部の音場可視化

Fig. 4.8 に音響放射圧により生じた水面盛り上がり内部の瞬時音場像と定在波音場像をフォーカストシャドウグラフ法を用いて撮影した結果を示す。振動子駆動電圧の上昇に伴い、水面盛り上がりの高さが増大した。これに伴い、図中の拡大図に示すように定在波音場像が、Fig. 4.8(a)での線状パターンから、Fig. 4.8(b)(c)での格子点状パターンに移行していく様子が見られた。なお、図中の波立ちの高さは実測値を示す。

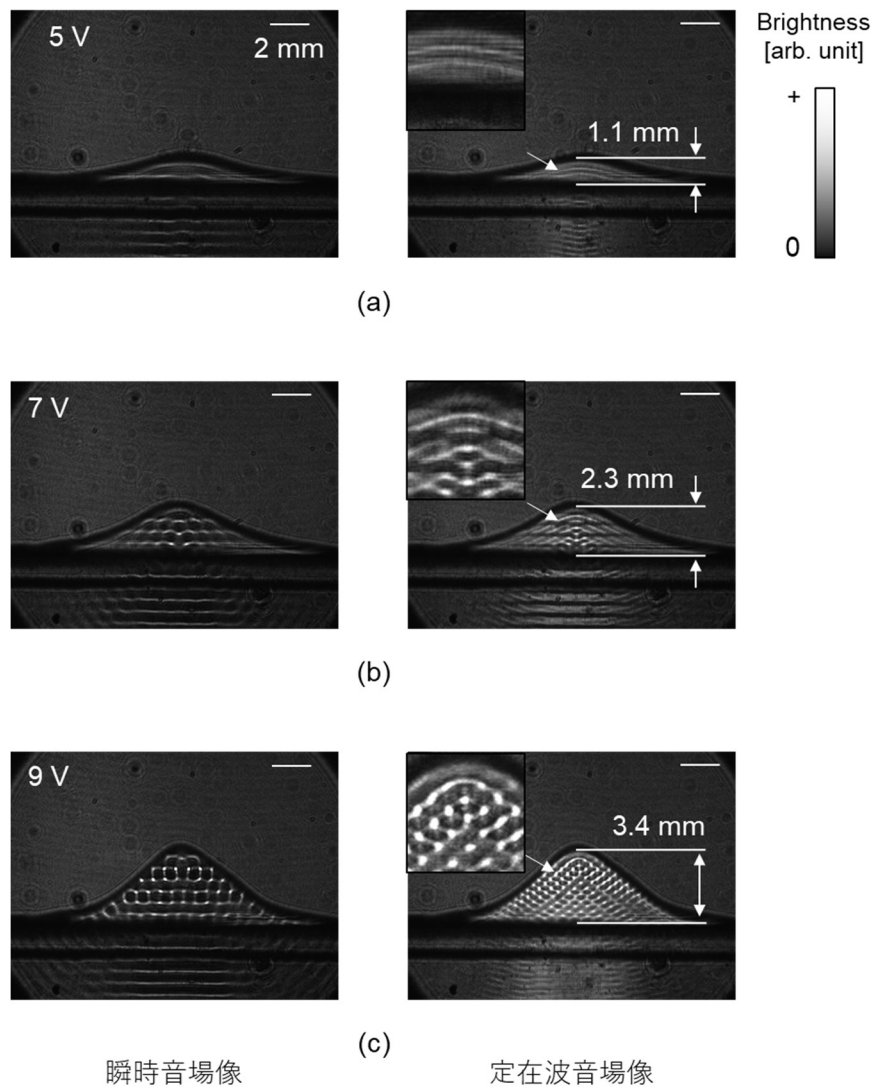


Figure 4.8 超音波霧化装置による水面盛り上がり内部の瞬時音場像と定在波音場像. (a) 駆動電圧 5 V. (b) 駆動電圧 7 V. (c) 駆動電圧 9 V.

4.2.2 水面盛り上がり模擬容器の内部音場可視化

Fig. 4.9 にポリオレフィン樹脂を用いた水面盛り上がり模擬容器内部に発生する瞬時音場像と定在波音場像を示す．音響放射圧により生じた水面盛り上がり内部の音場像と同様に，ポリオレフィン樹脂を用いた模擬容器でも，盛り上がりが大きくなるにつれて定在波音場像の音圧の腹を表す高輝度部分の形状が線状から格子点状に変化する様子が確認された．また，その間隔は波長の $1/2$ となっていた．

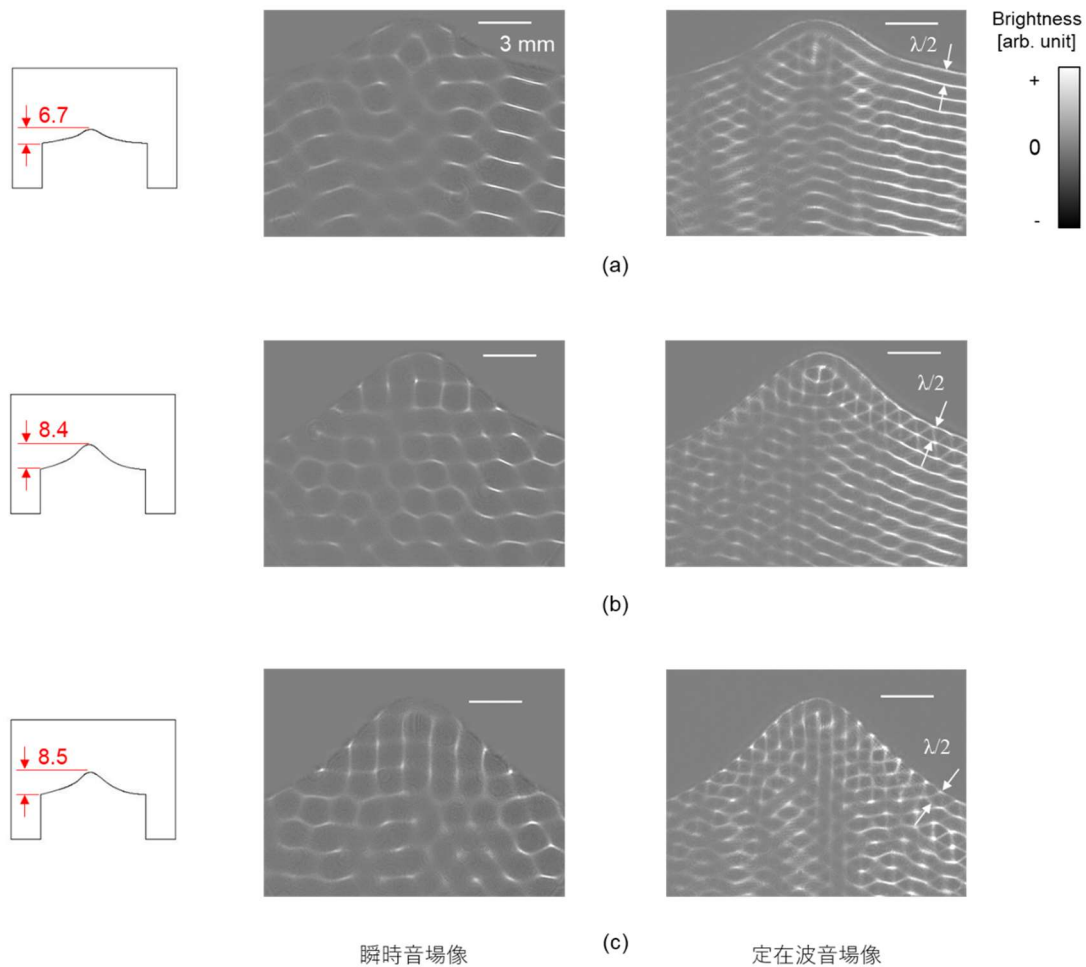


Figure 4.9 ポリオレフィン樹脂を用いた水面盛り上がり模擬容器内部の瞬時音場像と定在波音場像. (a) Fig. 4.5(a)の模擬容器音場像. (b) Fig. 4.5(b)の模擬容器音場像. (c) Fig. 4.5(c)の模擬容器音場像.

4.2.3 シミュレーションによる音場可視化と有効性の考察

Fig. 4.10(a)–(c)に水面盛り上がりを模擬した 3D モデルの内部音場をシミュレーションにより求めた結果を示す．超音波照射開始から $30 \mu\text{s}$ まで 7 ns 毎に瞬時音場を求め，各座

標における最大値を投影して作成した図である．いずれのモデルにおいても音圧が最大になる腹点がモデルの中心軸上に生じており，腹点の位置は盛り上がりが大きくなるにつれて水面に近づいていくことが分かる．また，盛り上がり周辺部の輝点も，盛り上がりが大きくなるのに伴い表面に近づいていくことが分かる．

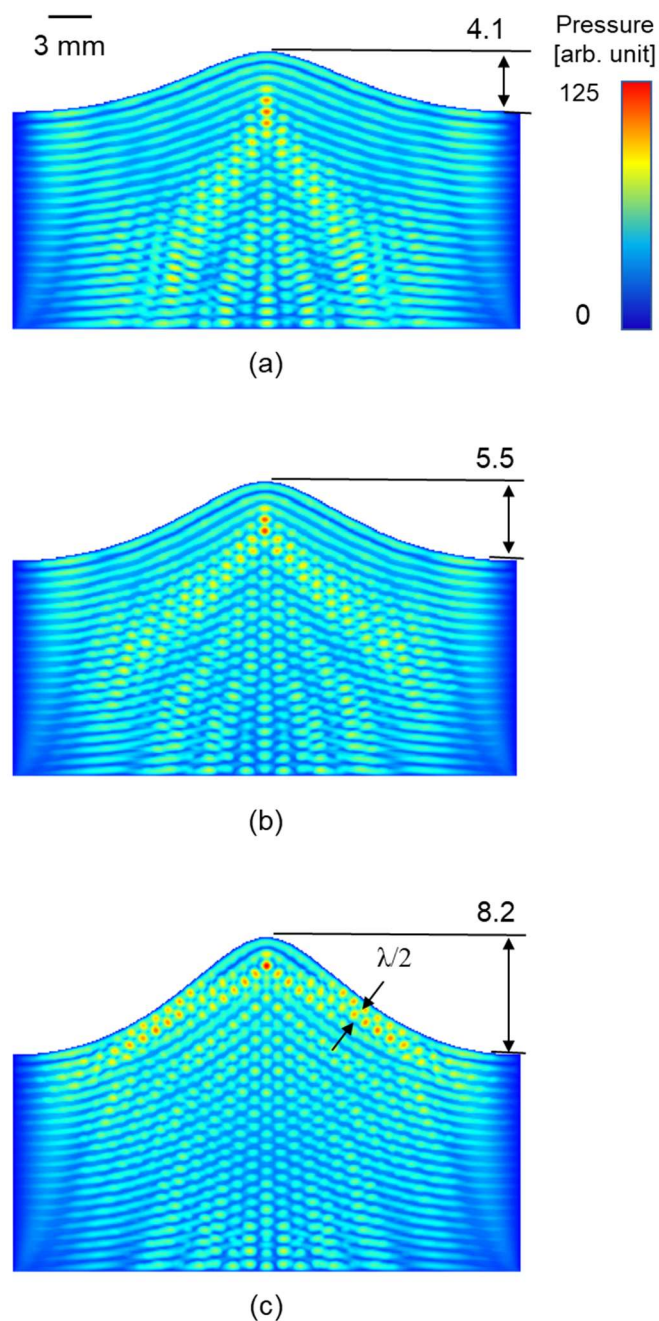


Figure 4.10 水面盛り上がり 3D モデルの音圧分布シミュレーション結果. (a) Fig. 4.7(a)の模擬容器の音圧分布. (b) Fig. 4.7(b)の模擬容器の音圧分布. (c) Fig. 4.7(c)の模擬容器の音圧分布.

また、シミュレーションでは、実際には可視化できない空気と水の境界面 (Fig. 4.11(a)矢頭部) の音場像も可視化できる。水には表面張力があり Fig. 4.11(b)に示すように水がガラスに付着するため、光の屈折が起きる。そのためフォーカストシャドウグラフ法では空気との界面に黒い帯となって可視化できない部分が発生する。しかし、シミュレーションではそのようなことは生じないため境界部分も明確に確認できる。また、ポリオレフィン樹脂で作成した模擬容器でも Fig. 4.11(b)に示すような光線の曲がりが生じないので、境界面直近の音場分布まで可視化することができる。

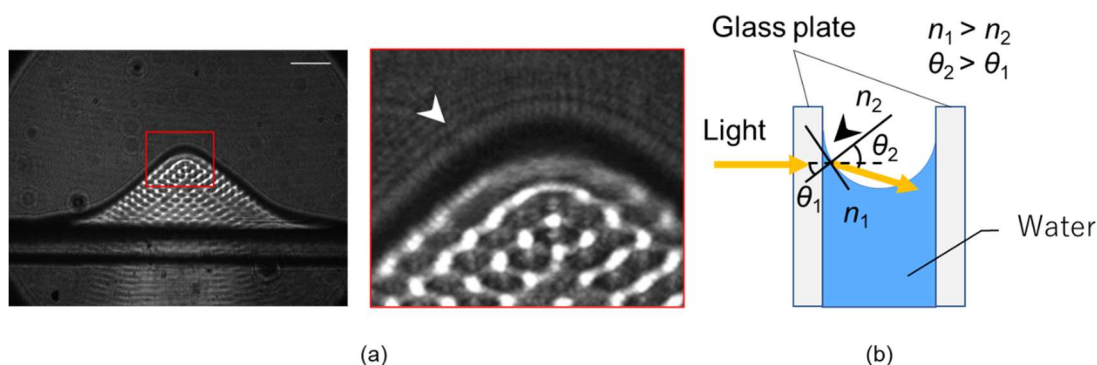


Figure 4.11 水面の盛り上がり撮影時に生じる可視化不能帯とその原因。(a) 水面の盛り上がり内部の音場像 (左) と赤枠内の拡大図に示す可視化不能帯 (矢頭) (右)。(b) 可視化不能帯の発生機序。

3つの手法により取得した水面の盛り上がり内部の音場拡大図を Fig. 4.12 に示す。定在波の音圧分布は、盛り上がりが高くなるにつれ、線状の波面から格子点状の輝点の集まりになる傾向が一致していた。また、線状の定在波の間隔は1波長の1/2である0.75 mmにほぼ等しく、点状になると1/2波長よりも若干長い0.8 mm前後になるという点が一致していた。特に、霧化水面盛り上がり音場の $h = 5.22$ mm と $h = 8.16$ mm、シミュレーション水面盛り上がりの高さ $h = 5.5$ mm と $h = 8.2$ mm ではその傾向が明確であった。

しかし、シミュレーションの音圧とシャドウグラフ法における輝度では異なる傾向も見られた。霧化盛り上がりの $h = 8.16$ mm の輝度は $h = 2.64$ mm の輝度の約1.9倍であった。シミュレーションの $h = 8.2$ mm は $h = 4.1$ mm の2.7倍であった。これは、シャドウグラフの輝度と音圧の関係が線形ではないこととシミュレーション時刻が影響しているものと考えられる。今回、シミュレーションは底面での反射が起こらない時刻設定になっている。そのため、シミュレーションは進行波と水面反射波の干渉により生じる強度となる。しかし、霧化盛り上がりでは連続波で十分に時間が経過してからの音場であるため、底面からの反射波が含まれている。そのため霧化盛り上がりの $h = 2.64$ mm は多重反射状態での輝度(強度)になるためシミュレーションよりも高くなることが考えられる。しかし、霧化盛り上がり音場の輝度は露光時間が長すぎたことにより飽和しているため実験条件の設定見直しが必要である。

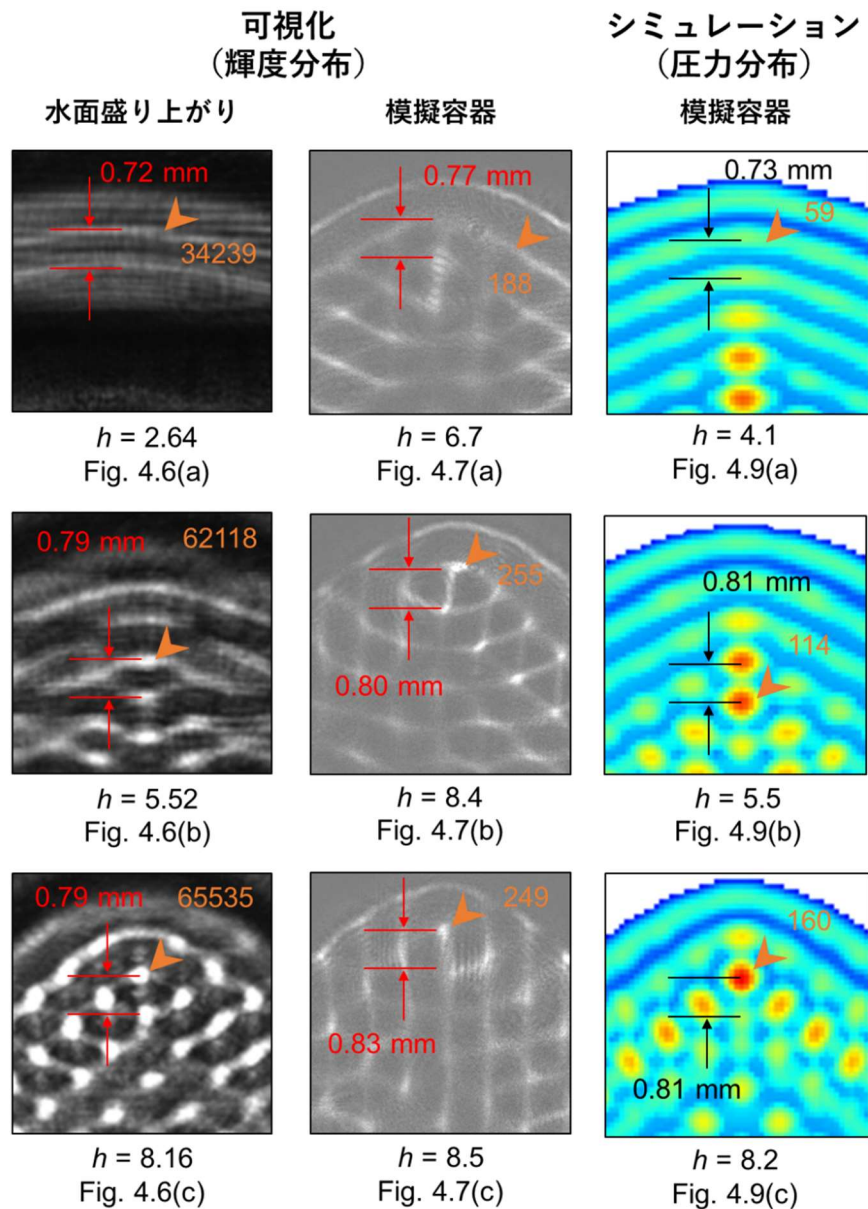


Figure 4.12 水面盛り上がり内部の定在波音場像の腹点の間隔と輝度・強度（矢頭部）。左から超音波霧化装置による水面盛り上がり，ポリオレフィン樹脂容器内の音場可視化像，同容器内の音場シミュレーションの結果である。各画像の下には盛り上がりの高さと元の音場像の図番号を示した。（水面盛り上がりの音場像とそこに示した数値は周波数の違いを考慮し 2.4 倍に拡大してある）。

4.3 霧化水柱の内部音場

4.3.1 霧化水柱模擬容器の内部音場可視化

Fig. 4.13 にフォーカストシャドウグラフ法を用いて撮影した霧化水柱模擬容器の瞬時音場像と定在波音場像を示す. 定在波音場像の水柱内にも水平な輝線を認めることから, 水柱内で定在波が発生していることが確認できた. また, 水柱の内部に点状の集束点が 1 から数点発生していることも確認できた.

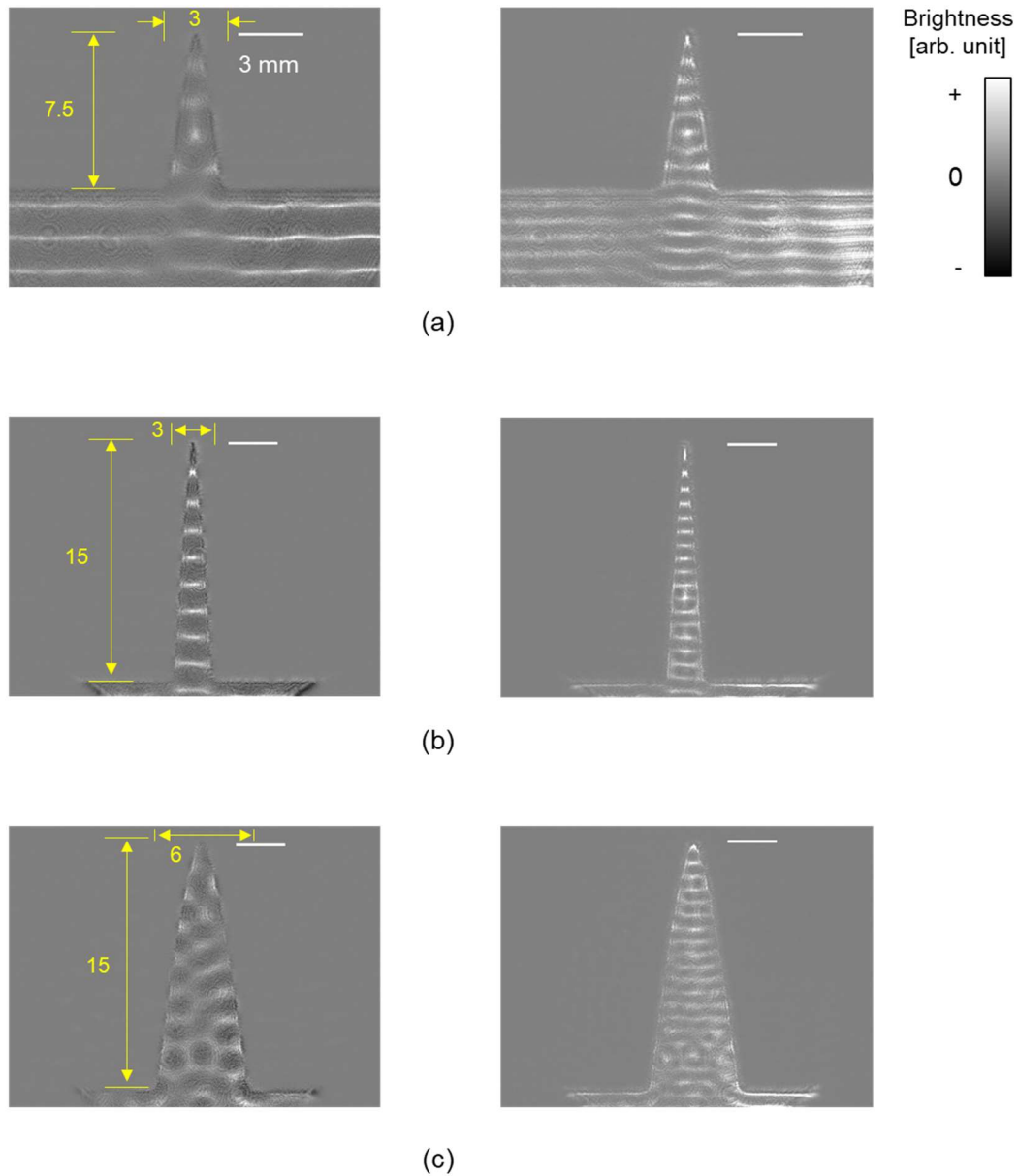


Figure 4.13 ポリオレフィン樹脂を用いた水柱模擬容器の瞬時音場像と定在波音場像. (a) Fig. 4.6(a)の音場像. (b) Fig. 4.6(b)の音場像. (c) Fig. 4.6(c)の音場像.

4.3.2 シミュレーション

Fig. 4.14 に水柱 3D モデルのシミュレーション結果を示す。図は、水面盛り上がりのシミュレーションと同様に超音波照射開始から 45–60 μs まで 7 ns 毎に瞬時音場を求め、各座標における最大値を投影して作成したものである。図に示すカラーバーを用いて、音圧振幅の大きさを疑似カラー表示してある。こちらでも、水柱模擬容器内の定在波音場をフォーカストシャドウグラフ法で可視化した結果(Fig. 4.13)とよく似た音圧分布が得られた。すなわち、線状と格子点状両方の高音圧部の形成が確認された。また、水柱の先端は音圧の節であり、その直下に最も音圧の高くなる点が発生していた。さらに、水面に生じた水柱の下の中では、定在波音場の音圧低下が見られ、水柱が吸音材に近い機能を持つことが確認された。

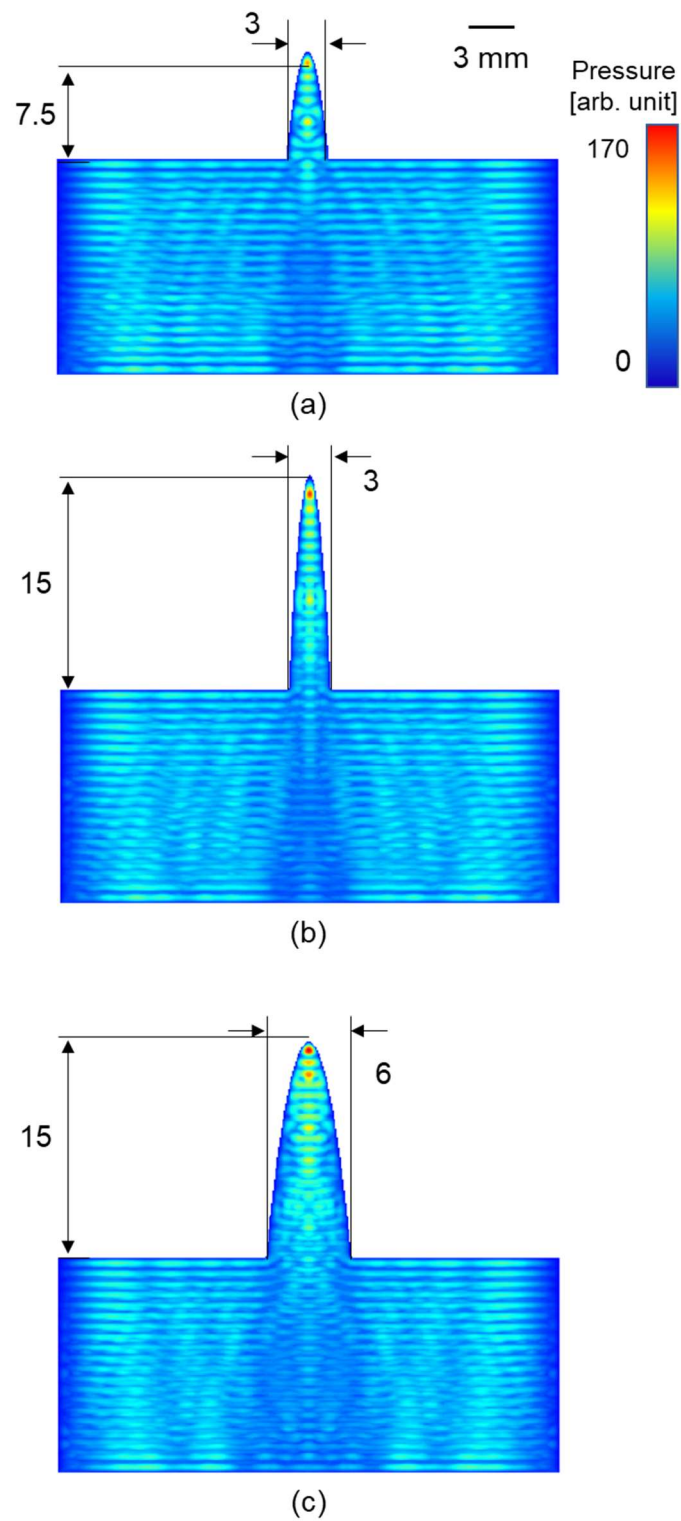


Figure 4.14 水柱 3D モデルのシミュレーション結果. (a) 水柱の高さ 7.5 mm, 幅 3 mm の Fig. 4.7(d)の音場像. (b) 水柱の高さ 15 mm, 幅 3 mm の Fig. 4.7(e)の音場像. (c) 水柱の高さ 15 mm, 幅 6 mm の Fig. 4.7(f)の音場像.

4.3.3 考察

Fig. 4.15 に 3 種類の水柱形状について内部音場の可視像とシミュレーション結果を比較した結果を示す. どの水柱の音場像においても $1/2$ 波長に近い間隔の定在波が確認でき, さらに先端の腹点が最も輝度 (音圧) が高くなっている. また, 水柱の高さが高く, 幅が広くなるにつれ先端集束点の輝度 (音圧) が高くなる傾向にあった. これは, 水柱の高さが高くなると先端部が細くなるため, その部分での反射が多くなることが原因であると考えられる. 幅が広くなると音圧が高くなるのは, 水柱内に入る超音波のエネルギーが増加することが原因と考えられる.

また, 水柱の幅 3 mm の条件 (高さが 7.5 mm と 15 mm) では, 水柱の中央付近に独特な形状の音場像が形成されていた. どちらも中心の音圧が高く, その上下の波面が歪んでいる. 可視化した実際の音場像がシミュレーションと異なる点は, Fig. 4.15(b) $h = 15$ mm, $w = 3$ mm の場合に, 独特な形状の音場像が発生する位置が輝線 1 本分ずれていることである. 実際の音場像では先端から 9.77 mm, シミュレーションでは 8.87 mm の位置に独特形状の音場が形成されている. これはシミュレーションのモデルが細く長くなったことで, 水柱の曲線部分が粗く階段状に表現され, 反射の角度が変化したことが影響しているかもしれない.

シャドウグラフ法で可視化した実際の音場とシミュレーションは良い一致を示したものの, 完全には一致しなかった. 実際の盛り上がりは水面がわずかに振動していたり, 水の表面張力により水面が超音波の進行方向に対し直角でなかったりする. 一方, シミュレーションでは, モデルが細かく分けられた格子点の集合で構成されているなど実際と異なる点もあるが, モデルの形状や空間離散化幅等の条件を適切に設定することで物理的手法による音場可視化と同等の結果が得られる可能性はある. しかし, シミュレーションの場合は各種条件が全て網羅されており, なおかつ正しい値となっていることが前提である. 例えば本研究では, 小型容器内の音場形成に容器壁内を伝搬する超音波の漏れ出しが重要な役割をはたしていることが音場可視化により明らかにされた. しかし, 壁内伝搬波の速度や漏れ出しの程度は理論的に求めることが困難であり, これをシミュレーションに組み込むことはできない. 未知のシミュレーション結果が正しいと判断するには別の手法による確認が必要であり, 本研究で行った音場可視化はこれを実現する上で有用である. その一方, 円錐や球形などフォーカストシャドウグラフ法では音場像を撮影できないものについては, シミュレーションは非常に有効な手段であると言える.

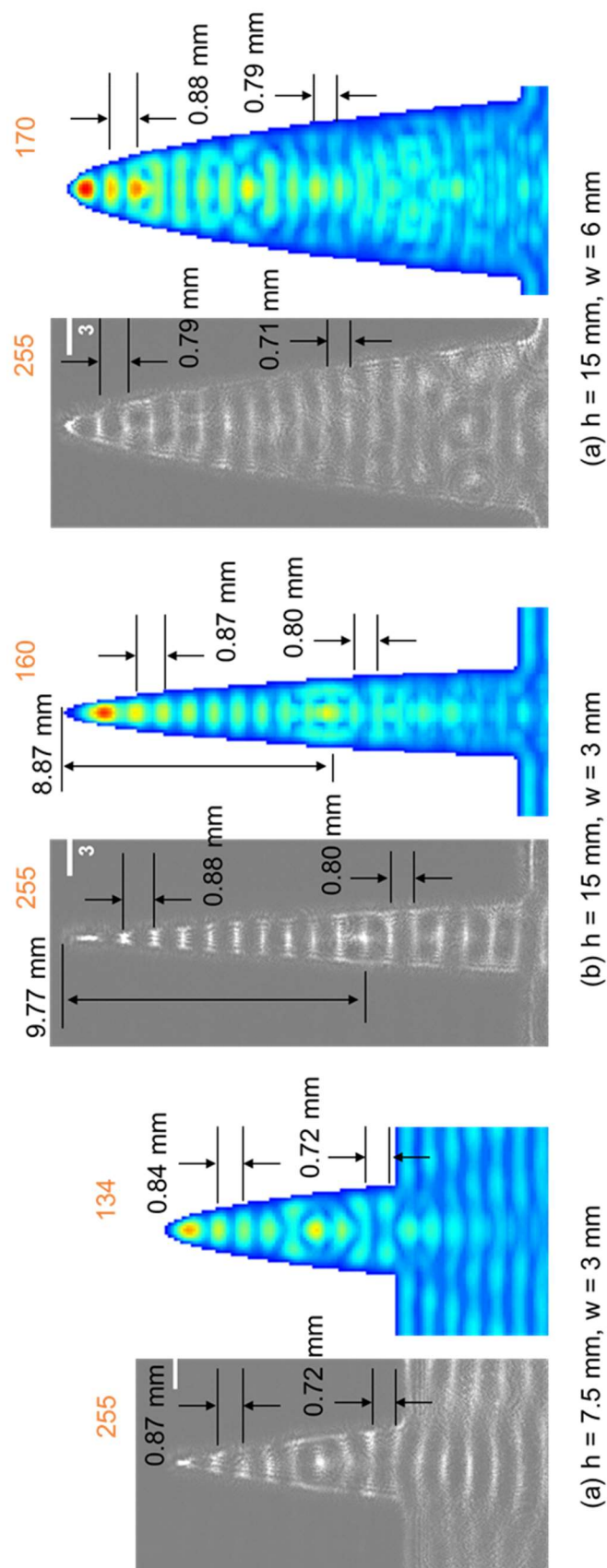


Figure 4.15 水柱内部の定在波音場像の腹点の間隔と水柱先端腹点の輝度・強度 (左: ポリオレフィン樹脂容器, 右: シミュレーション) (a) 水柱の高さ 7.5 mm, 幅 3 mm. (b) 水柱の高さ 15 mm, 幅 3 mm. (c) 水柱の高さ 15 mm, 幅 6 mm.

4.3.3.1 超音波霧化における水柱発生機序に関する考察

超音波霧化の際に生じる水柱は、音圧の上昇に伴い徐々に水柱の高さが高くなるのではなく、ある閾値を超えた音圧で水面の盛り上がりが突如として水柱の状態に遷移する。これは水面盛り上がり内部で生じる超音波の集束が関係していると考えられる。水面盛り上がり (Fig. 4.8)、水面盛り上がり模擬容器 (Fig. 4.9) 内の定在波音場をシャドウグラフ法で観察した結果において、盛り上がりが大きくなると内部に音圧の高い集束点が発生していることが確認できた。また、模擬容器内の定在波音場をシミュレーションで求めた結果 (Fig. 4.10) によれば、集束点における最大音圧は、盛り上がりのない場合に比べ 4.7 倍に増強されていた。このことから、水面盛り上がり内部の集束点ではキャビテーションが発生していると考えられる。キャビテーションは超音波により気泡が発生する現象を指す。キャビテーションはある負圧の閾値を超えて初めて発生し、一旦発生すると強い音響放射圧を受ける。このことが水面盛り上がりから水柱の状態に急激に移行する原因と考えられる。発生したキャビテーション気泡は連続超音波の照射下で徐々に成長し、共振気泡付近で圧壊し、衝撃波を発生する。水面近傍で衝撃波が生じることが、霧化の発生機序の一つと考えられている (キャビテーション説)。

4.3.3.2 液滴と霧化の発生機序に関する考察

超音波霧化で生じる水柱からは比較的粒径の大きい液滴と粒径が非常に小さい霧滴が生じることが知られている^[4.3]。キャビテーションが発生すると増強された音響放射圧により発生した水柱の慣性力によって上方に移動し、水柱の先端で液体の表面張力に打ち勝つことで液滴が形成される。水柱の先端部分で空気との界面で反射した超音波が液滴の中心に集束されると、高い音圧により再びインナーシャルキャビテーションが形成され、圧壊により衝撃波を発生する。この衝撃波が一助となって水滴表面に表面波 (キャピラリー波) が生じ、そのキャピラリー波の波頭が破断することで霧化となると考えられる (キャピラリー説)。

第5章 高強度超音波照射による霧化とフリーラジカルの発生

水槽に入れた水に超音波を加え、その音圧を徐々に高くしていくと、ある閾値以上でキャビテーションが発生する。キャビテーションの発生は、強力超音波に特徴的な現象として広く知られている。キャビテーションが誘導する特徴的な現象としてフリーラジカルの発生があり、化学工業への応用が注目されるとともに、医用超音波においても重要な生体作用機序の一つと考えられている。

キャビテーションの発生閾値は再現性が乏しいパラメータと言われる。その理由の一つとして、水槽の壁内を伝搬する超音波や高強度超音波の照射で水面に生じる小さな波立ちが生じる反射超音波による内部音場の変化が挙げられる。すなわち、キャビテーション閾値が一定値であっても容器形状等に依存して内部音場が不均一になるためキャビテーション閾値が変化したように見えてしまう。特に高強度超音波の領域においては、超音波の放射圧が水面に大きな盛り上りを定常的に生じたり、家庭用加湿器に利用される霧化現象を生じたりする。また治療応用においては、加熱作用により超音波の焦点に沸騰気泡を生じ、生体と気泡との界面での反射や霧化が生じることが報告されている^[5.1, 5.2]。そこで本章では、比較的強い連続超音波の照射下で、水面の形状変化とキャビテーション発生との関連を調べるとともに、霧化現象の発生との関連についても検討した。

5.1 実験方法

本実験のシステムを Fig. 5.1 に示す。ヨウ素デンプン水溶液が入れられた水槽には超音波霧化装置が設置されている。超音波霧化装置（HMC-2400, Honda Electronics）の振動子は周波数 2.4 MHz の直径 20 mm の円形平板 PZT 振動子であり、連続波超音波を発生する。なお、超音波の出力はニードルハイドロフォン（PAL HPM05-S, Precision Acoustics）により測定した。連続波駆動による定在波発生の影響を避けるために、測定は十分大きな水槽（W 500 mm, H 400 mm, D 400 mm）の内部で行い、ハイドロフォンは振動子前面から 25 mm の位置に配置した。超音波霧化装置の駆動電圧を $8 V_{p-p}$ に設定した場合の音圧は、120 kPa であった。

本システムを用い 2 つの実験を行った。

第 1 の実験として駆動回路の電源電圧を制御することにより超音波の圧力振幅を変化させ、水槽内に入れた液体の水面形状とフリーラジカル発生量の関連を調べた。

第 2 の実験では超音波の圧力振幅を一定とする条件で、水量の変化や反射体の設置により水面形状を変化させ、フリーラジカルの発生量との関連を調べた。

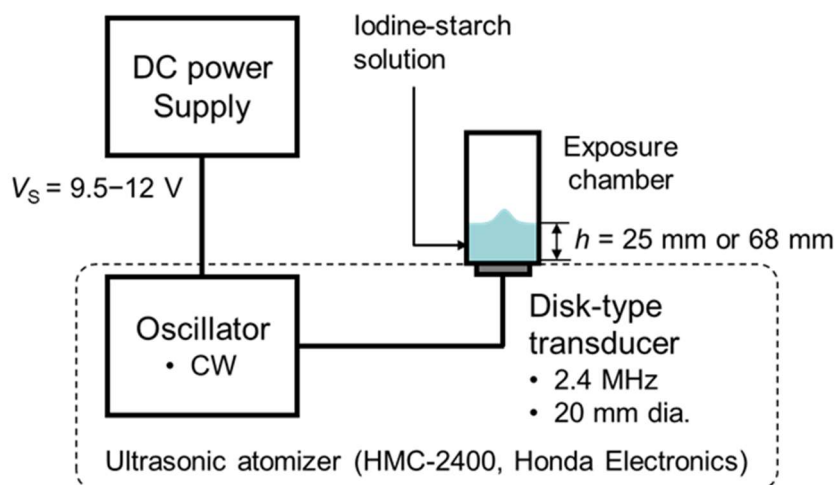


Figure 5.1 超音波霧化におけるヨウ素デンプン反応を用いたフリーラジカル測定システム
(Copyright (2021) The Japan Society of Applied Physics)

5.1.1 超音波照射強度変化による霧化とフリーラジカル発生の関係

超音波照射強度と霧化、フリーラジカルとの関係を調べるために、Fig. 5.2 Experiment 1 に示す方法で実験を行った。ヨウ素デンプン水溶液が入る水槽は内寸の1辺が25 mmであり、底面の厚さが10 mmで、振動子を取り付けるため中央に直径15 mmの穴が開いている。水槽内には振動子上面から高さが25 mmとなるようにヨウ素デンプン水溶液を入れた。この状態で、超音波霧化装置の駆動電圧を9.5–12.0 Vの範囲で0.5 Vずつ変化させ、30分間超音波を照射した。なお、超音波照射を行わないFig. 5.2 (a)の状態をコントロール ($V_S=0$ V) としてt検定によりフリーラジカル発生量の有意差を調べた。

5.1.2 水面形状とフリーラジカル発生量の関係

水面盛り上がりの形状とフリーラジカル発生量の関連を調べるために Fig. 5.2 Experiment 2 に示す方法で30分間超音波を照射し、フリーラジカル発生量を調べる実験を行った。Fig. 5.2 (b)は超音波霧化の際に見られる水柱や液滴、霧化が絶え間なく発生している状態である。Fig. 5.2 (c)では水面の高さを68 mm (水溶液量3倍)とし、水面の盛り上がりは発生しているが霧化は起きていない状態とした。なお、水量増加に伴う単位体積当たりの超音波照射量減少を補正するために、超音波の照射時間は3倍の90分とした。Fig. 5.2 (d)は超音波放射圧により発生する水柱を直径15 mmの円形カバーガラス (Matsunami, 厚さ0.13–0.17 mm) で強制的に押さえた。なお、その際に霧化は生じていないことを確認した。また、この実験でも超音波を照射していないFig. 5.2 (a)をコントロールとしてt検定を行い、フリーラジカル発生量の有意差を調べた。

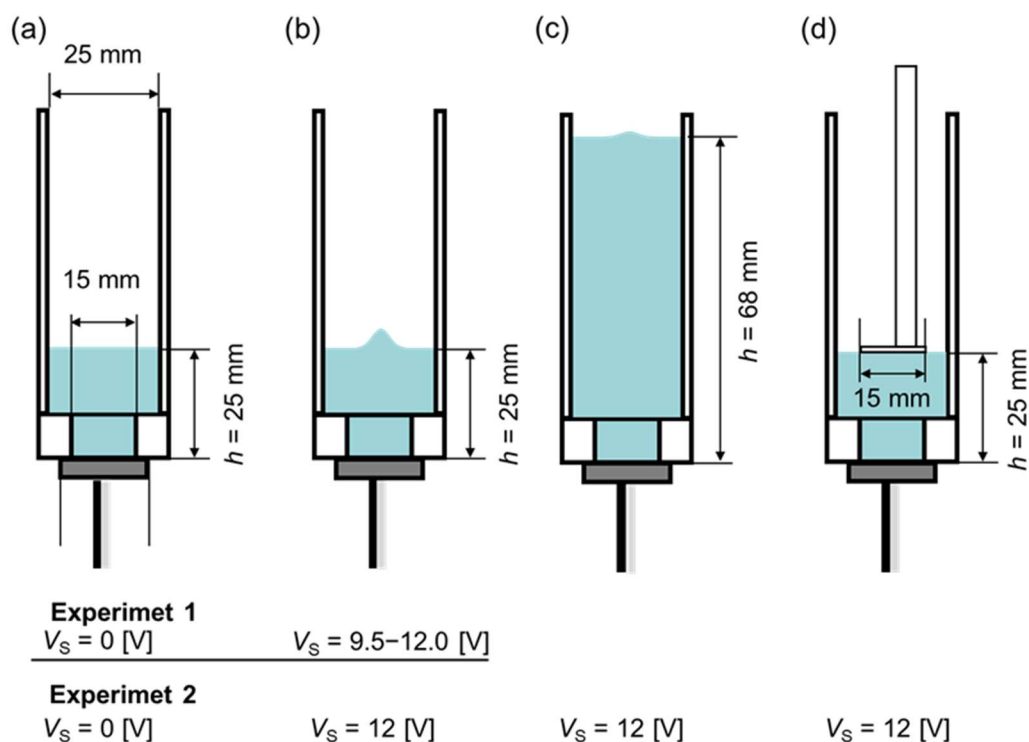


Figure 5.2 水面の状態と超音波霧化装置駆動電圧の設定. (a) 超音波無照射, 水面の高さ 25 mm. (b) 超音波照射あり, 水面の高さ 25 mm. (c) 超音波照射あり, 水面の高さ 68 mm. (d) 超音波を照射しカバーガラスで水面の盛り上がりを平らにした状態, 水面の高さ 25 mm. (Copyright (2021) The Japan Society of Applied Physics)

5.1.3 フリーラジカルの測定によるキャビテーション発生の評価

超音波照射によりイナーシャルキャビテーションが発生すると, 水分子 H_2O が熱分解されて $\cdot\text{OH}$ (hydroxyl radical) と $\cdot\text{H}$ (hydrogen atom) が生じる. そこで, キャビテーションの発生をフリーラジカルの発生量で評価することとし, その検出にヨウ素デンプン反応を用いた. ヨウ素デンプン水溶液の組成^[5.3]を Table 5.1 に示す. 各実験条件に従ってヨウ素デンプン水溶液を水槽に入れ, 指定時間超音波を照射の後に水槽内の液体を保存容器に移し 4°C で 24 時間以上冷却した. その後, ヨウ素デンプン水溶液を 96 穴マイクロプレート (F8 Maxisorp Loose-Nunc-Immuno Module, Thermo Fisher scientific) に 300 μl 入れ, マイクロプレートリーダー (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific) で波長 570 nm における吸光度を測定した.

Table 5.1 ヨウ素デンプン水溶液の組成

KI (Kanto chemical, 32351-00)	0.01 M
CCl_3CHO (Kanto chemical, 07208-01)	0.1 M
NaCl (Kanto chemical, 37144-00)	1 M
Soluble starch (Kanto chemical, 37328-01)	0.3 g/l

5.2 実験結果

5.2.1 水面形状と霧化

超音波照射強度を変化させた場合の水面の変化を Fig. 5.3 に示す. Fig. 5.3 (a)の電圧 9.5 V から Fig. 5.3 (d)の電圧 11.0 V まで水面の盛り上がり徐徐に大きくなっていく様子が観察されたが霧化は生じていなかった. しかし, Fig. 5.3 (e)に示す電圧 11.5 V の条件では, 水柱とそこから液滴が飛び出す様子が断続的に観察された. また, 写真ではわかりにくいものの, わずかな霧化の発生も認められた.

Fig. 5.4 に各設定電圧におけるヨウ素デンプン水溶液の吸光度 (波長 570 nm) を示す. 電圧 11.0 V までは超音波を照射していないコントロール条件と吸光度に有意な差は見られなかった. しかし, 水柱や液滴, 霧化が発生する電圧 11.5 V の条件からは有意な差を認めた. その危険率 p は電圧 11.5 V で 2.1×10^{-5} であり, 12 V では 7.7×10^{-8} となった.

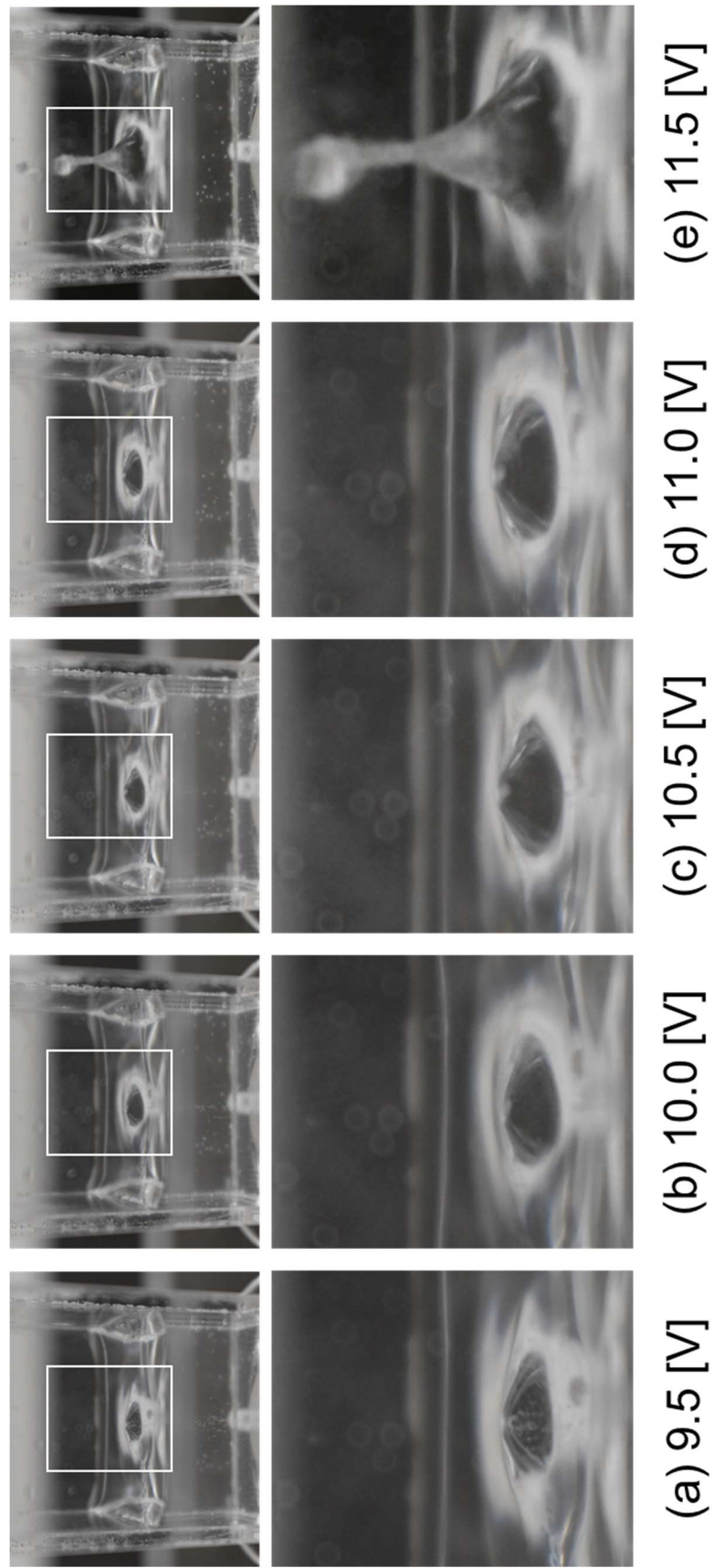


Figure 5.3 超音波霧化装置の駆動電圧 V_s 増加に伴なう水面の変化の様子 (Copyright (2021) The Japan Society of Applied Physics)

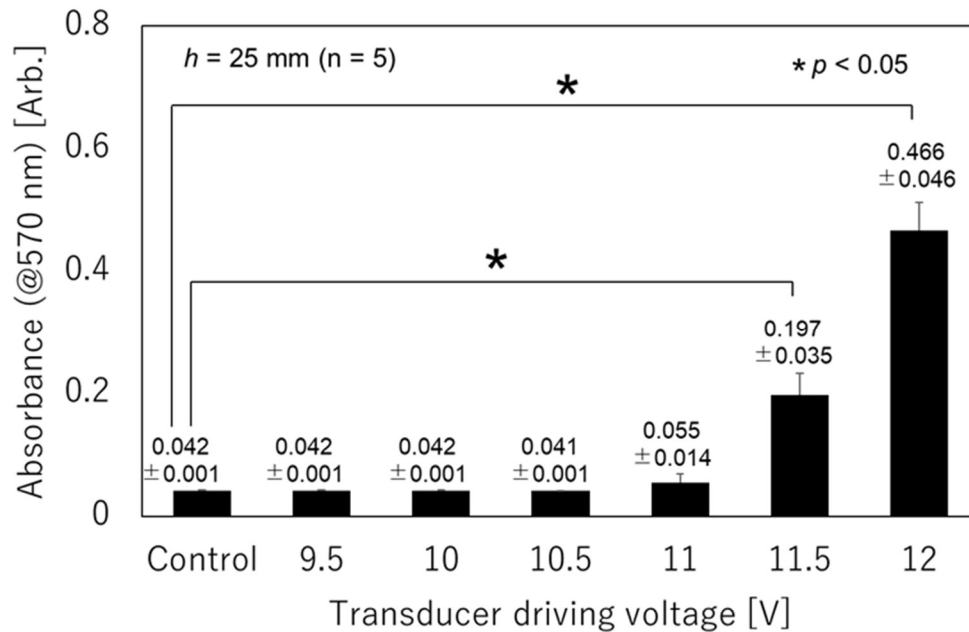


Figure 5.4 超音波霧化装置駆動電圧 V_s に対する波長 570 nm におけるヨウ素デンプン水溶液の吸光度 (Copyright (2021) The Japan Society of Applied Physics)

5.2.2 水面形状とフリーラジカル発生

水面の形状とフリーラジカルの発生に関する実験の結果を Fig. 5.5 と Fig. 5.6 に示す. Fig. 5.5 (a)は水面の高さが 25 mm の際の超音波照射時の水面の様子である. 水面の盛り上がりから水柱と液滴が発生している様子が確認できる. また, 水柱の形状は前実験で霧化が生じた Fig. 5.4 (e)の条件よりも急峻であり, その先端から霧化が生じている様子も明瞭に確認できる. Fig. 5.5 (b)は水面の高さを 68 mm とした際の水面の様子である. 水面の盛り上がりは見られるが霧化は生じていない. Fig. 5.5 (c)はカバーガラスにより強制的に水面を平面にした際の水中の様子である. 霧化は発生していないがカバーガラスの下に気泡と思われるものが白い線に等間隔に並んでいる. また, その間隔は波長の約 1/2 である 0.33 mm であった.

超音波無照射, 水面盛り上がり状態 (Fig. 5.5(b)), 水面平面状態 (Fig. 5.5(c)), 水柱が生じ霧化が発生している状態 (Fig. 5.5(d)) のヨウ素デンプン水溶液の吸光度を Fig. 5.6 に示す. コントロールに対し水面盛り上がり状態では吸光度の上昇は認められなかった. 水面平面状態は若干の吸光度の上昇は見られるがコントロールに対し有意な差は認められなかった. しかし, 霧化が発生している水柱状態では p 値が 3.1×10^{-8} と有意な差を認めた ($p=3.1 \times 10^{-8}$).

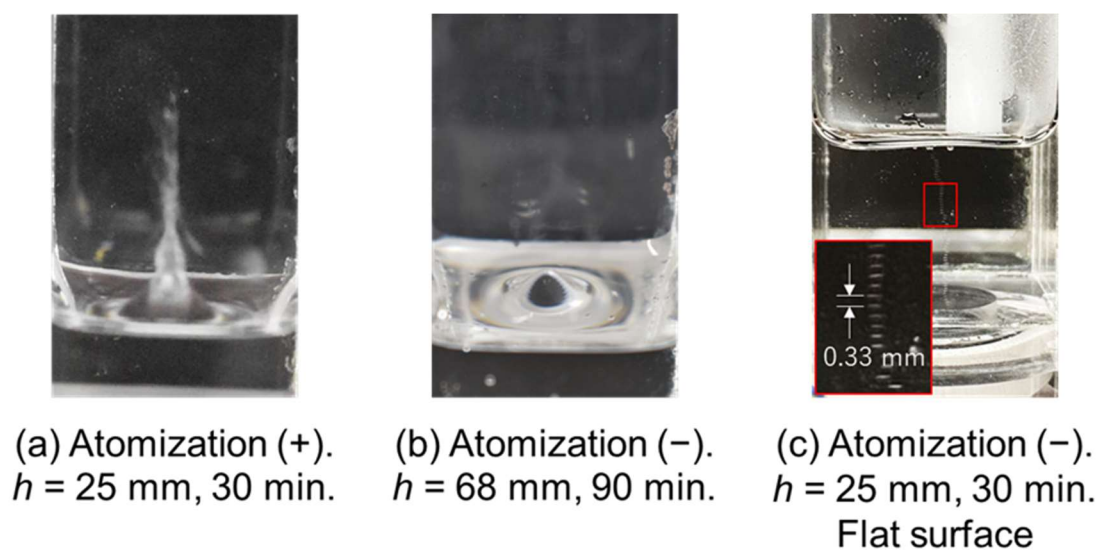


Figure 5.5 超音波放射強度を統一した際の各水面の様子. (a) 水面の高さ 25 mm, 霧化あり. (b) 水面の高さ 68 mm, 霧化なし. (c) カバーガラスの下に発生した等間隔に並ぶ気泡.

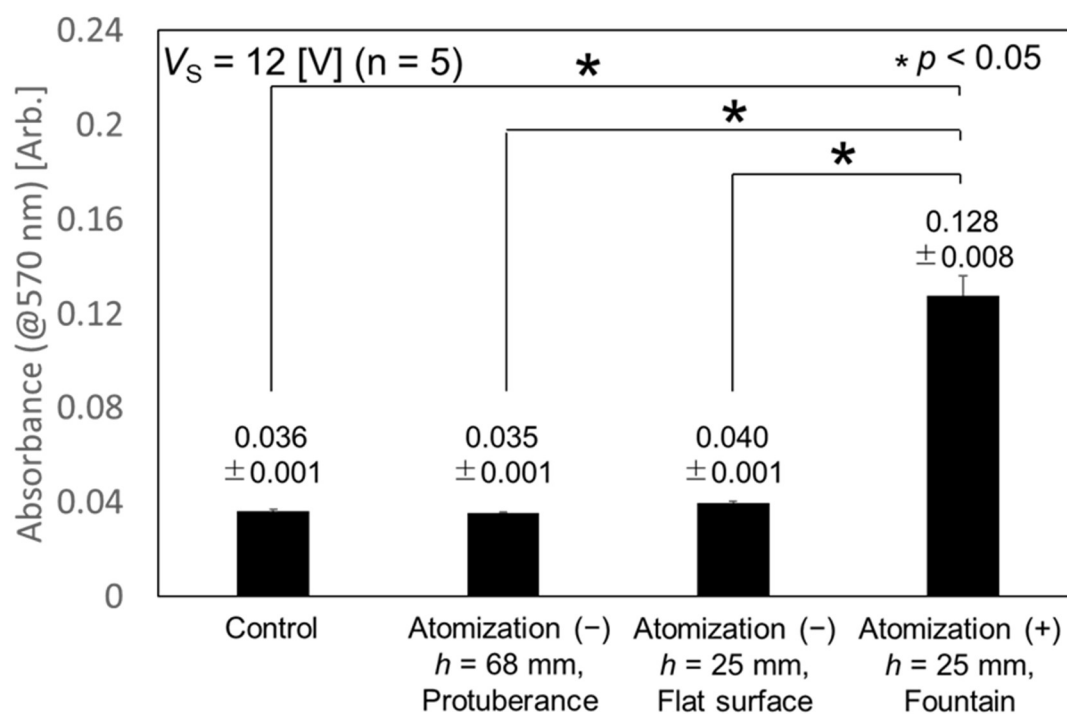


Figure 5.6 超音波照射強度を一定とし水面の状態を変化させた場合の波長 570 nm におけるヨウ素デンプン水溶液の吸光度 (Copyright (2021) The Japan Society of Applied Physics)

5.3 考察

5.3.1 超音波照射強度とキャビテーション閾値、霧化発生に関連

超音波照射強度を変化させた実験において、フリーラジカルの発生を示すヨウ素デンプン水溶液の吸光度の値が変化した際の超音波霧化装置駆動電圧は 11.5 V であった (Fig. 5.4). そのため、キャビテーションの発生閾値は、駆動電圧 11 V と 11.5 V の間に存在することになる。以下、キャビテーションの発生閾値が 11.5 V であったと仮定すると、ハイドロホンでの音圧測定値から換算した音圧閾値は 173 kPa_{p-p} で、強度閾値に換算すると 0.25 W/cm² となる。

この超音波強度は水面形状が水柱となり、液滴と霧化が発生する閾値でもあった。閾値以下では、盛り上がりの高さは徐々に増加するものの形状自体に大きな変化はないが、閾値以上では、盛り上がりからの水柱の成長と、水柱先端からの液滴の発生が断続的に見られた (Fig. 5.3). 水柱の発生は Fig. 5.5 に示すように霧化現象と密接に関連していると考えられ、断続的な水柱の発生時にもわずかな霧化現象が認められた。

5.3.2 水面形状とキャビテーションに関連

第 1 の実験では、超音波の強度を制御することにより水面形状を変化させているため、水面形状がキャビテーションの発生閾値に与える影響を単独で評価することができていない。そこで、超音波照射強度を統一し、水面の形状のみを変化させる第 2 の実験を行った。その結果、振動子の駆動電圧が同じ条件においても、水面の形状に依存してキャビテーションの発生の有無が変化することが確認され、水柱と霧化の発生閾値がフリーラジカルが発生閾値と一致していた。このことから霧化とキャビテーションの発生には強い関連があることが示された。

また、水面をカバーガラスで平坦にした条件でも水中に微小な気泡が 1/2 波長間隔で発生する様子が観察された。これは、キャビテーションにより発生した気泡が定在波にトラップされたものと考えられる。この現象はキャビテーションの発生と水面の状態、霧化の発生との関連を否定するようにみえるが、この 2 つのキャビテーションは種類の異なるものであると考える。キャビテーションにはノンイナーシャルキャビテーションとイナーシャルキャビテーションがある。ノンイナーシャルキャビテーションでは、気泡は音響エネルギーを吸収して膨張収縮し、気体内部の温度を上昇させるが、その熱エネルギーは周囲の水に散逸するため、膨張と収縮を安定に繰り返すことになる。イナーシャルキャビテーションでは気体の膨張・収縮に伴う周囲の液体の慣性力が加わることで、気泡はさらに強い圧縮力を受け、その際の気泡内部の温度は数千度に達し、水分子が熱分解されフリーラジカルが発生する。そのため、水面を平らにした際に発生しているのはノンイナーシャルキャビテーションであり、水柱と霧化が発生している際にはイナーシャルキャビテーションが発生している

と考えられる。

振動子の駆動電圧を一定とした実験を通じて、水面形状がキャビテーション発生に強い影響を与えることを示したが、この議論には、注意すべき点がある。これは、水面の形状や水量を変えることによる音響的な負荷の変化が電気回路から見た振動子の電氣的インピーダンスの変化をもたらすことから、振動子に入力される電力（水に加わる強度）がわずかに変化することを考慮できていない点である。今後さらに詳細な検討を行う場合には、振動子に入力される電力も計測する必要がある。

5.3.3 超音波霧化におけるキャビテーション閾値の低下

厳密に不純物を取り除き、溶存気体も脱気して作成した純水では、超音波によるイナーシャルキャビテーションの発生閾値は超音波の周波数の増加とともに指数関数的に増大し、周波数 2.4 MHz では約 10^3 W/cm^2 となることが報告されている^[5.4]。これに対し、室内に放置した水道水では、閾値が低下することが知られているが、今回の実験では、 0.25 W/cm^2 という非常に低い超音波強度でイナーシャルキャビテーションが発生していた。

超音波霧化における水柱の高さと超音波強度、霧化量と超音波強度の関係を調べた Yasuda らの研究^[5.5]においても水柱の発生閾値は 0.5 W/cm^2 、霧化量が増加するのは 1 W/cm^2 であることが報告されている。本研究と Yasuda らのキャビテーション発生閾値測定の共通点は、超音波霧化の発生閾値を評価している点にある。水面の盛り上がりや水柱の音場像の可視化とそのシミュレーションに関する検討でも示したように、水面の盛り上がりや水柱の内部には音圧の集束点が生じる。本章の実験においても水中に音圧の集束が発生しており、集束点における強度が霧化発生閾値を生じた時点でイナーシャルキャビテーションが発生したと考えられる。本実験で求めたキャビテーション閾値である 0.25 W/cm^2 は Yasuda らの閾値の $1/4 - 1/2$ となった。この値は、超音波霧化装置の振動子から出力される超音波強度を進行波条件で測定した結果であるため、集束点での超音波強度は数倍のオーダーで増強されていると推定される。それゆえ、あたかもキャビテーションの閾値が $1/4 - 1/2$ に低下したように見えたものと結論できる。

5.4 キャビテーション発生の評価による音圧推定の可能性

4 章では、水面の盛り上がりや超音波霧化の際に生じる水柱の内部に音圧の集束が生じることを示した。その音圧は進行波の数倍となっていると考えられるが、音場の可視化方法では、音圧を具体的な数値として示すことはできていない。そこで本章では、イナーシャルキャビテーションが閾値を持ち、フリージカルを発生するという特徴を利用し、イナーシャルキャビテーションの発生閾値を調べることで、水柱内部に生じる集束音圧値を推定することの可能性について検討した。

5.4.1 超音波振動子を水槽底部に配置する実験

5.4.1.1 実験方法

目的を実現するためには、振動子の出力とキャビテーション発生に関連を調べる必要がある。しかし、霧化装置で用いられる水槽底部に振動子を配置した水槽では、水面に盛り上がりを生じ、反射・集束により局所的に音圧が高い部分を生じるため、正しい評価ができない。そこで、音圧を変化させても水面を平坦に保つ反射体を設置した水槽 (Fig. 5.2 (d)) を用いて、超音波霧化装置の駆動電圧を 16–20 V の範囲で 1 V ずつ変化させ、30 分間超音波を照射した。その後、5.1.3 で用いた手法で波長 570 nm におけるヨウ素デンプン水溶液の波長吸光度を測定した。

5.4.1.2 結果

2 回行った実験の吸光度測定結果のグラフを Fig. 5.7 に、1 回目と 2 回目のそれぞれの測定値を Table 5.2 に示す。1 回目の実験では、駆動電圧 19 V の時、超音波を照射していないコントロール条件に比べ、吸光度が上昇し 20 V でも高い吸光度が継続している。2 回目の実験では 19 V において吸光度が 0.075 と上昇している。また、2 回目の実験においては 17 V で吸光度が 0.133 と上昇したが、18 V では 0.072 と低下しており、19 V ではさらに 0.036 と低下した。20 V では 0.127 と高値となった。このように、本実験においては再現性のある結果を得ることはできなかった。

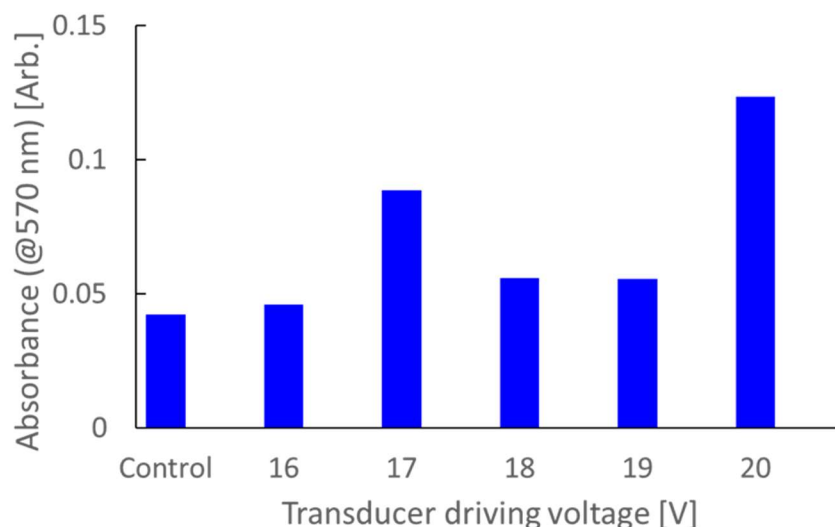


Figure 5.7 水面の盛り上がりをカバーガラスで消失させた際の各駆動電圧におけるヨウ素デンプン水溶液の波長 570 nm における吸光度（平均値）

Table 5.2 各駆動電圧における各 2 回の超音波照射後の波長 570 nm の吸光度

		Transducer driving voltage [V]					
		Control (0)	16	17	18	19	20
No. 1	0.042		0.047	0.044	0.040	0.075	0.081
No. 2			0.044	0.133	0.072	0.036	0.165
Average		0.042	0.046	0.089	0.056	0.056	0.123

5.4.1.3 考察

本実験では再現性のある結果を得ることができなかった。その原因として、水面を平坦にしたカバーガラスに気泡が付着したことが考えられる。Fig. 5.8 に超音波霧化装置の駆動電圧が 16 V (Fig. 5.8 (a)), 18 V (Fig. 5.8 (b)), 20 V (Fig. 5.8 (c)) の際の水槽とカバーガラスの様子を示す。電圧が高くなるにつれ水槽の壁とカバーガラスへの気泡の付着が多くなることが確認できる。カバーガラスに気泡が付着すると超音波の反射角が変化し平坦な音場を形成できなかったものと考えられる。なお、この気泡は、元々水溶液に溶存していた気体が、水溶液温度の上昇とともに析出したものと考えられる。

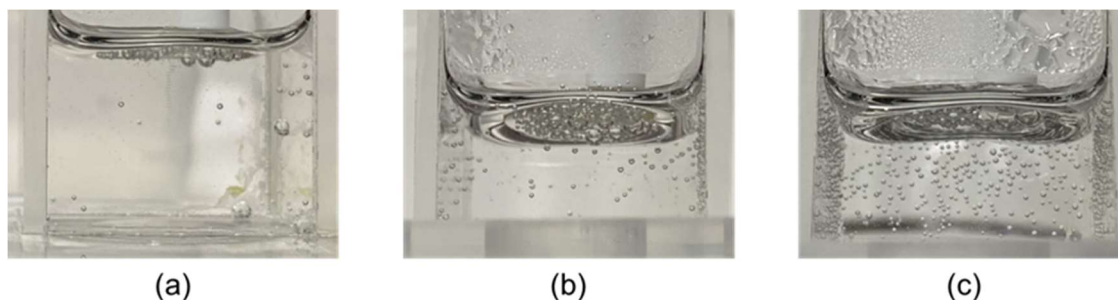


Figure 5.8 連続超音波照射中の水槽とカバーガラスに付着する気泡. (a) 駆動電圧 16 V では気泡の付着が少ない. (b) 駆動電圧 18 V ではカバーガラスへの気泡の付着が多くなる. (c) 駆動電圧 20 V では水槽とカバーガラス共に多数の気泡の付着が認められる.

5.4.2 超音波振動子を水槽側面に配置する実験

5.4.1 の実験ではヨウ素デンプン水溶液の温度上昇により発生した気泡が反射体に付着することで、平坦な音場を形成することができず、再現性に乏しい結果となった. そこで、気泡の付着を防ぎ、平坦な音場を形成するために水槽の側面に振動子を取り付けることで気泡の付着を避ける実験装置を作製し、振動子の出力とキャビテーション発生の関連を調べる実験を再び試みた.

5.4.2.1 実験方法

気泡の付着を防ぎ平坦な音場を形成するための水槽を Fig. 5.9 に示す. 5 章の実験で用いた周波数 2.4 MHz の振動子をアクリルで作製した水槽の側面に設置した. 振動子が設置されている水槽側面の厚さは 10 mm で中心に直径 15 mm の穴が開いており、その反対側には中心に直径 18 mm の穴の開いた厚さ 2 mm のアクリル板がある. その 18 mm の穴を直径 18 mm 厚さ 1 mm のオーリング、反射体となる 24 mm 四方のカバーガラス (Matsunami, 厚さ 0.13–0.17 mm)、直径 18 mm の穴の開いたアクリル板の順に固定した. この様にすることで、キャビテーションや温度上昇により発生した気体は、気体の浮力により液面に向かって上昇し空気中に排出される. この水槽にヨウ素デンプン水溶液を 12 g 入れ、超音波霧化装置の駆動電圧を 18–22 V の範囲で 2 V ずつ変化させ連続超音波を 15 分間照射した. その後、波長 570 nm における吸光度を測定した.

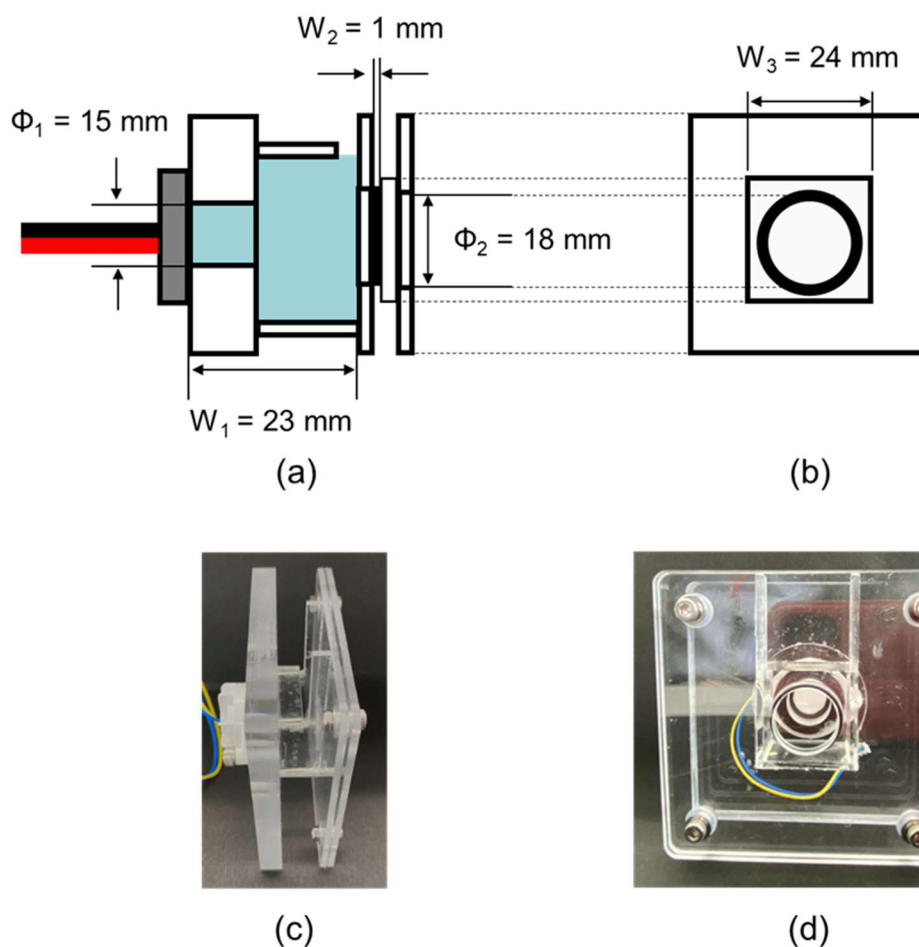


Figure 5.9 気泡の付着を防ぎ平坦な音場を形成するために作製した水槽. (a) 寸法（側面図）. (b) 寸法（正面図）. (c) 写真（側面）. (d) 写真（正面）.

5.4.2.2 結果

各駆動電圧にて2回行った実験の測定結果の平均を Fig. 5.10 に示す. 超音波を照射していない control と比較すると, すべての駆動電圧において吸光度が高くなっている. 吸光度が最大となったのは駆動電圧 20 V であった. 各回の吸光度を示した Table 5.3 を見ると, 駆動電圧 20 V 以外は1回目と2回目で値が大きく異なっている. 1回目の実験では, 19 V で吸光度が増加したが, 20 V でまたコントロールと同じレベルに吸光度が低下していた. 2回目の実験では, 18 V の条件から吸光度は大きく増加し, 22 V で逆に低下した.

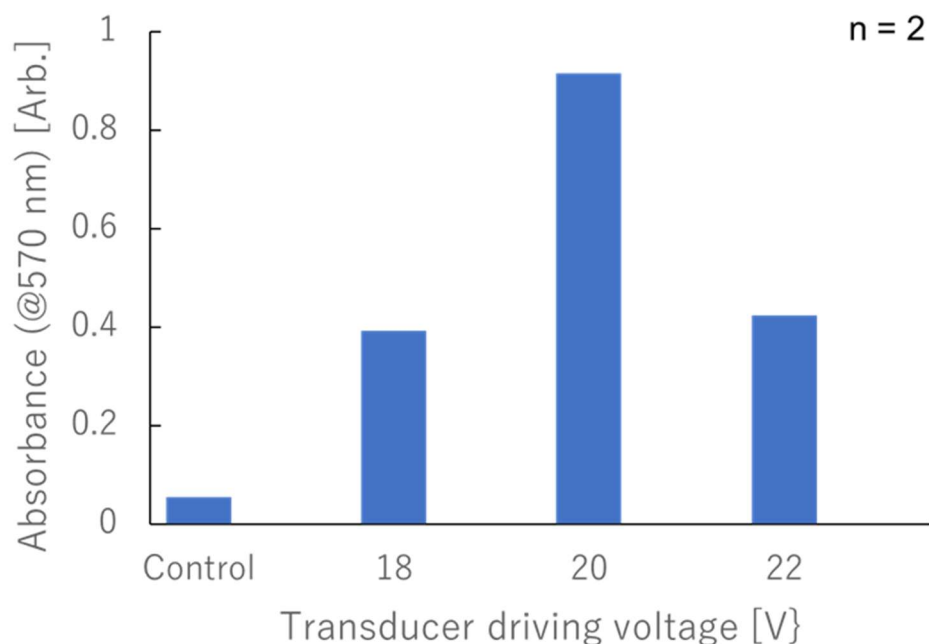


Figure 5.10 改良した水槽における各駆動電圧でのヨウ素デンプン水溶液の波長 570 nm の吸光度（平均値）

Table 5.3 改良した水槽における各駆動電圧 2 回の超音波照射後の波長 570 nm の吸光度

	Transducer driving voltage [V]			
	Control (0)	18	20	22
No. 1	0.056	0.036	0.919	0.043
No. 2		0.751	0.911	0.807
Average	0.056	0.394	0.925	0.425

5.4.2.3 考察

Fig. 5.11 に超音波照射中の水槽とカバーガラスの様子を示す。水槽内部には多数の気泡が付着しているのが確認できるが、超音波が照射されていると思われるカバーガラスの中央付近には気泡の付着は認められない。それにも関わらず再現性の良い結果は得られなかった。その原因としては、音響流が関係していると考えられる。超音波の照射に伴い、水槽の内部に音響流が発生すると、キャビテーション気泡は流れから強い力を受け、対流によって平坦な音場から外れてしまう。そうすると気泡は液面で大気に放出されるため、液体中の気泡が減少しキャビテーションは発生しにくくなる。本実験でも超音波照射中は気泡が対流する様子が観察され、特にフリーラジカルが発生しない場合はその傾向は顕著であった。

また、超音波霧化装置を駆動する電圧は一定に制御していたが、電流値には変動も見られた。一般に、キャビテーションが発生していると思われる状態では電流値が高く、キャビテーションが発生していないと思われる状態では電流値が低くなる傾向があった。これは、音響負荷が変化したことにより、電気回路から見た振動子の電気的インピーダンスが変化したことを裏付けるものであると言える。これも音響流により音場内から気泡が無くなることが原因と考えられる。

以上のように、水面の条件を平坦にする努力をしたにも関わらず、反射面への気泡の付着や伝搬経路中に存在する気泡の状態の恒常性が保てなくなり、イナーシャルキャビテーションの発生閾値の再現性は乏しい結果となった。また、この結果は、気泡の存在が超音波的に、さらには電氣的にも大きな影響を与えることを示しており、超音波の生体作用実験において、所望の強度で細胞や生体に超音波を照射することの難しさを示している。

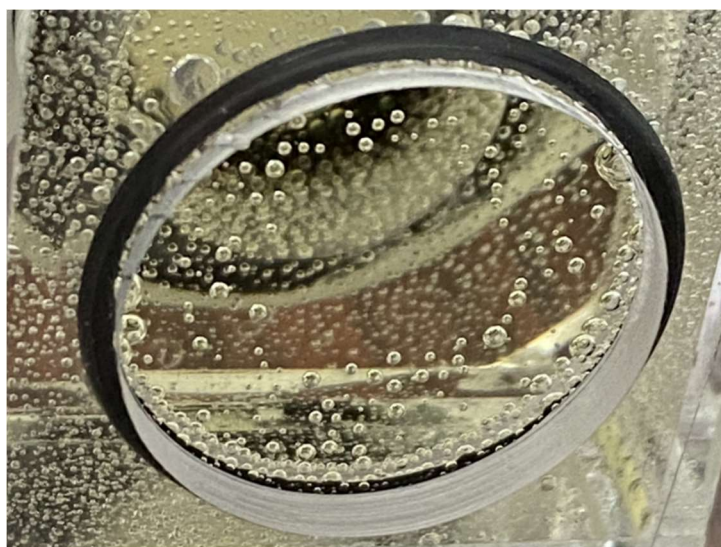


Figure 5.11 超音波照射中の水槽とカバーガラス表面の様子（カバーガラスの中央部分には気泡の付着は認められない）

第 6 章 結論

本研究では、超音波の生体作用研究が行われる 2 つの標準的な超音波照射条件すなわち、シャーレ内の細胞に低強度超音波を照射する条件と水面に向けて高強度超音波を照射する条件で発生する超音波音場をフォーカストシャドウグラフ法により可視化し以下の知見を得た。

I. 細胞培養容器内に生じる超音波音場

- (1) 細胞培養容器を模擬し、超音波が伝搬する素材（アクリル）で作製した小型容器内部に発生する音場をフォーカストシャドウグラフ法により可視化した。その結果、このような容器では水中を伝搬する平面波とともに、壁中を水中よりも速く伝搬し水中に漏れ出すことで斜め方向に伝搬する平面波が生じること、この 2 つの波が干渉して定在波を発生させることが示された。

シャーレ内の細胞に超音波を照射する場合、進行波と水面での反射波が干渉して生じる定在波を避ける必要があることはすでに広く知られている。本研究の成果は、容器壁を伝搬する超音波が漏れい波を発生させることが、水槽内部に定在波音場を形成する要因になり得ることを初めて指摘した点にある。

- (2) 壁内を伝搬する超音波の影響を避けるために超音波が伝搬しない素材（ポリオレフィン樹脂）で作製した容器内部に発生する音場をフォーカストシャドウグラフ法により可視化した。この条件では、水槽底面の隅を中心とし、水の音速で伝搬する球面波が観察され、これは振動子を出た超音波が容器の幅で開口制限を受けることにより回折波が生じ、これが壁と水の境界で反射することにより生じる波と考えられた。

本結果は、容器の壁内超音波伝搬がない条件でも回折波が発生し、干渉により定在波音場が生じることを初めて明らかにした点で重要であるが、その程度は壁内伝搬波の影響よりも軽微であった。

- (3) 実際の実験条件では振動子上に容器が傾いて設置されることがある。これを模擬して音場可視化したところ、定在波の発生に偏りが生じた。このことから、シャーレに超音波を照射する際には水面と超音波の進行方向が垂直となるように設置する必要があることが確認された。
- (4) 水面での反射波による定在波の発生を避けるために使われる吸音材の効果について検討した。吸音材は反射波の方向を 90° 曲げることで振動子に反射波が戻らないようにするものであるが、曲げた方向に新たに定在波が生じることが示された。このことは、

吸音材をシャーレ中に設置するとやはりシャーレ内に定在波が生じることを示している。

- (5) シャーレに培養した細胞に超音波を照射する実験では、超音波の音響放射力により水面の波立ちが生じる。そこで、水面の波立ちが内部音場に与える影響について検討した。独立気泡を内包し比較的空氣に近い音響インピーダンスを有するポリオレフィン樹脂を用いて波立ちを模擬した容器を作成し、内部音場の可視化を行った。その結果、波立ちが超音波の反射方向を変えることにより、波立ちの内部に音圧の集束点を発生させることが確認された。集束点の輝度は進行波の約 4 倍、波立ちが無い水面で生じる定在波の約 2 倍であり、集束点近傍の細胞や液体は増倍された音圧の影響を受ける可能性があることが示された。一方、シャーレ内に発生する水面の波成ちは常に動いているため、発生した定在波音場の影響は時間的に平均化されることが予想され、シャーレ内の音響エネルギーは空間的に平均化されることで実験の再現性には大きな影響を与えない可能性がある。
- (6) シャーレ等の容器に均一な超音波を照射するには容器の壁を伝搬する超音波を無くすために開口制限が有効である。また、水面での反射を防ぐには容器の上方（容器外）に吸音材を設置するのが有効である。これら 2 つを組み合わせることで、容器内に均一な超音波を照射することを実験的に確認した。この結果はシャーレに培養した細胞に超音波を照射する実験の再現性を向上に有効である。
- (7) 最後にフォーカストシャドウグラフ法で得られる画像の定量性について検討した。可視化時に出射光を遮る位置を変えると、同じ場所の音場を可視化しているにもかかわらず輝度が低下した。容器の先端や空氣の境界の輝度は實際の音圧を反映せず、低輝度に可視化されたことから、物質境界における音圧の推定には注意が必要である。

II. 強力超音波照射による水面盛り上がり・水柱内部の音場

- (8) 連続超音波の照射下では、超音波の放射圧により水面に盛り上がりが生じる。ここでは、水面の盛り上がり内部の音場像を可視化した。フォーカストシャドウグラフ法で可視化するため、2 枚のガラス板の間に盛り上がりを作る実験装置を作成した。水面近傍では水の表面張力が生じる水面の曲がりにより光の伝搬方向が変わるため、音場が可視化できなかった。一方その内部では、水面の盛り上がりにより平行な形で曲線状の定在波音場が観察され、盛り上がりの高さが高くなるにつれて多数の集束点（腹点）が一定間隔で格子状に整列する音場像に移行した。腹点はキャビテーションが発生する部位になると考えられ、腹点でキャビテーションが発生することが霧化発生の引き金になる可能性が示唆された。

- (9) 水面の盛り上がり形状を模擬した容器をポリオレフィン樹脂にて作成し、内部音場を可視化した。その結果、模擬容器でも $1/2$ 波長間隔で格子状に整列する腹点群が観察され配列のパターンも良く一致した。また、模擬容器では、容器と水の境界付近の音場も観察可能であり、腹点が境界面の直近にも発生することが確認できた。

この結果は、キャビテーションが盛り上がりの内部や表面の腹点で発生していることを示唆する。キャビテーションは超音波強度に関する閾値をもつ現象であり、一旦発生すると強い音響放射圧を受ける。音響放射力により水面の盛り上がりが生じ、腹点において超音波の音圧が増強されキャビテーションが生じやすくなることにより、水面の形状が水柱の状態に急激に移行するものと考えられた。

- (10) ポリオレフィン樹脂を用いて水柱の形状を模擬する容器を作製し、内部の音場を可視化した。その結果、波長の $1/2$ に近い間隔で並ぶ波面と、水柱の先端と中央付近に集束点が生じる様子が観察された。特に先端とその直下における音圧の集束が強く、高い音圧下でイナーシャルキャビテーションがフリーラジカルを発生させる可能性が考えられる。

- (11) 水面の盛り上がりと水柱の内部に生じる音場を、有限要素法シミュレーション (OnScale) により求めた。水面の盛り上がりや水柱の内部に発生する腹点の位置は部位によってわずかな違いが見られるものの、全般的なパターンとしては非常に良く一致した。一方、シャドウグラフ像の輝度とシミュレーションで求めた音圧の強度については違いが見られた。シャドウグラフ音場の分布パターンを定性的に評価することはできるが定量性には乏しいので、強度情報が必要な場合にはシミュレーションを参照すべきと考えられた。

- (12) 今回用いた有限要素法シミュレーションでは、空間離散化による誤差や境界での反射の記述に関して限界がある。また実際の水面盛り上がりでは水面が自由に振動できるのに対し、模擬水槽やシミュレーションモデルでは水面が固定されている点が大きく異なる。このような違いにもかかわらず、3つの可視化結果の音場分布の傾向がよく一致したことから、模擬水槽やシミュレーションを用いることの実用性を検証することができた。また、シャドウグラフ法では、原理的に円錐や球形といった形状の容器の内部音場を可視化することは難しい、これに対しシミュレーションは自由な形状に関して計算が可能である点において有効である。

- (13) 水面の形状とキャビテーション発生との関係を明らかにするために、キャビテーションの指標であるフリーラジカルをヨウ素デンプン反応により検証する実験を行った。そ

の結果、水面形状が盛り上がりから水柱に移行する超音波の強度閾値とフリーラジカル発生閾値が一致することを初めて明らかにした。この結果は、水面形状の変化によりその内部に音圧の集束点を生じることが、キャビテーション発生音圧閾値を見かけ上低下させていることを示しており、キャビテーションを利用する超音波治療では超音波の出力だけでなくその音場変化も考慮に入れる必要があることを示している。

以上本論文では、超音波の生体作用研究に用いられる超音波照射容器において音波の反射・屈折により音場が不均一となることを音場可視化により示し、音場を乱す要因を制御することで音場の均一性を向上する方策を示した。また、高強度超音波によって生じた水面の盛り上がり格子状の定在波音場を形成し、それにより生体作用の発生に関する超音波強度の閾値を見かけ上低下させることを示した。これらの結果は超音波の生体作用研究において超音波照射容器内音場を可視化により把握し、音場制御や作用機序解明に応用することの重要性を示している。

参考文献

第 1 章

- [1.1] AIUM. “Communication from the AIUM bioeffect committee”. J. Clin. Ultrasound, **5**(1976): 2–4.
- [1.2] NCRP. “Biological effects of ultrasound: mechanisms and clinical implications”. NCRP Report No.74, Bethesda, MD, USA, National Council on Radiation Protection and Measurements, 1983.
- [1.3] 日本超音波医学会. 診断用超音波の安全性に関する見解. 超音波医学, **11**(1984): 41–46.
- [1.4] NCRP. “Exposure criteria for medical diagnostic ultrasound: I. Criteria based on thermal mechanisms”, NCRP Report No.113, Bethesda, MD, USA, National Council on Radiation Protection and Measurements, 1992.
- [1.5] NCRP. “Exposure criteria for medical diagnostic ultrasound: II. Criteria based on all known mechanisms”, NCRP Report No. 140, Bethesda, MD, USA, National Council on Radiation Protection and Measurements, 2002.
- [1.6] M. W. Mille, D. L. Miller, A. A. Brayman. “A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective”. Ultrasound in Med. & Biol., **22.9**(1996): 1131-1154.
- [1.7] P. Riesz, T. Kondo. “Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications”. Free Radic. Biol. Med., **13.3**(1992): 247-270.

第 2 章

- [2.1] 日本超音波医学会 機器及び安全に関する委員会, 電子情報技術産業協会 超音波専門委員会. 超音波診断装置の安全性に関する資料. 第 4 版. 2020.
- [2.2] 環境省. 放射線による健康影響等に関する統一的な基礎資料 (令和 2 年度版). 2021.
- [2.3] 梅村晋一郎, 集束超音波治療の基礎. Jpn. J. Med. Ultrasonics, **41.5**(2014): 677-686.
- [2.4] Y. Tabuchi, H. Hasegawa, N. Suzuki, Y. Furusawa, T. Hirano, R. Nagaoka, J. Hirayama, T. Mochizuki. “Genetic response to low-intensity ultrasound on mouse ST2 bone marrow stromal cells”. Molecular Medicine Reports, **23.3**(2020): 173.
- [2.5] R. Takagi, T. Washio, Y. Koseki. “The feasibility of a noise elimination method using continuous wave response of therapeutic ultrasound signals for ultrasonic monitoring of high-intensity focused ultrasound treatment”. Journal of Medical Ultrasonics, **48**(2021): 123-135.

- [2.6] 小林浩之, 悪性神経膠腫に対する経頭蓋集束超音波照射を用いた音響力学療法 (sonodynamic therapy: SDT) , 日本レーザー医学会誌, **41.4**(2021): 308-317.
- [2.7] M. W. Miller, D. L. Miller and A. A. Brayman, "A review of *in vitro* bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective". *Ultrasound in Med. & Biol.*, **22.9**(1996): 1131-1154.
- [2.8] K. Eknadiosyants, "Role of cavitation in the process of liquid atomization in an ultrasonic fountain". *Sov. Phys. Acoust.*, **14.17**(1968): 80-84.
- [2.9] J. C. Simon, O. A. Sapozhnikov, V. A. Khokhlova, L. A. Crum and M. R. Bailey. "Ultrasonic atomization of liquids in drop-chain acoustic fountains". *J. Fluid Mech.*, **766**(2015): 129-146.
- [2.10] R. J. Lang, "Ultrasonic Atomization of Liquids". *J. Acoust. Soc. Am.*, **34.6**(1962): 6-8.
- [2.11] 土屋活美, 林秀哉, 藤原和久, 松浦一雄. 超音波霧化現象の可視化解析. *Eurozoru Kenkyu*, **26.1**(2011): 11-17.
- [2.12] Y. Y. Boguslavskii and O. K. Eknadiosyants, "Physical mechanism of the acoustic atomization of a liquid". *Sov. Phys. Acoust.*, **15.1**(1969): 14-21. .
- [2.13] R. Ogawa, S-il Lee, H. Izumi, G. Kagiya, T. Yohsida, A. Watanabe, A. Morii, S. Kakutani, T. Kondo, L. B. Feril Jr., T. Ishimoto. "Enhancement of artificial promoter activity by ultrasound-induced oxidative stress". *Ultrasonics Sonochemistry*, **16.3**(2009): 379-386.
- [2.14] L. M. Steele, T. J. Kotsch, C. A. Legge, and D. J. Smith. "Establishing C. Elegans as a model for studying the bioeffects of therapeutic ultrasound". *Ultrasound in Med. & Biol.*, **47.8**(2021): 2346-2359.
- [2.15] W. Secomski, K. Bilmin, T. Kujawska, A. Nowicki, P. Grieb, P. A. Lewin. "In vitro ultrasound experiments: Standing wave and multiple reflections influence on the outcome". *Ultrasonics*, **77**(2017): 203-213.
- [2.16] K. Hensel, M. P. Mienkina, and G. Schmitz. "Analysis of ultrasound fields in cell culture wells for in vitro ultrasound therapy experiments". *Ultrasound in Med. & Biol.*, **37.12**(2011): 2105-2115.
- [2.17] K. Tani, K. Fujiwara, D. Koyama. "Adhesive cell patterning technique using ultrasound vibrations". *Ultrasonics*, **96**(2019): 18-23.
- [2.18] A. Rahimi, N. Cae. "Computational model to evaluate modulation of the acoustic fields in an ultrasonic bioreactor by incorporation of a water layer bounded by an acoustic absorbent boundary layer". *Ultrasonics*, **103**(2020): 106086.
- [2.19] N. Kudo, "Handbook of Ultrasonics and Sonochemistry" (Springer, Singapore, 2016).

- [2.20] N. Kudo, “Optical methods for visualization of ultrasound fields”. Jpn. J. Appl. Phys., **54**(2015): 07HA01.
- [2.21] G. S. Settles, “Schlieren and shadowgraph techniques: Visualizing phenomena in transparent media” (Springer, Heidelberg, 2001).
- [2.22] N. Kudo, “A simple technique for visualizing ultrasound fields without Schlieren optics”. Ultrasound in Med. & Biol., **41.7**(2015): 2071-2081.

第 3 章

- [3.1] H. Obara, N. Kudo, K. Shimizu: Proc. Symp. Ultrason. Electro., 2012, Vol. 33.
- [3.2] Y. Iijima and N. Kudo, “Evaluation of frequency-dependent ultrasound attenuation in transparent medium using focused shadowgraph technique”. Jpn. J. Appl. Phys., **56**(2017): 07JF13.
- [3.3] 田中雄介, シミュレータによる超音波伝搬の可視化とその活用. 非破壊検査, **68.2**(2019): 63-68.
- [3.4] Y. Tanaka, A. Abe and Y. Ogura, “Ultrasonic waves transmitted from the probe and phenomena caused by edge waves”. Proc. 39th Symp. Ultrason. Electron., 2018, 1J4-3.

第 4 章

- [4.1] K. B. Bader, E. Vlaisavljevich, and A. D. Maxwell. “For whom the bubble grows: Physical principles of bubble nucleation and dynamics in histotripsy ultrasound therapy”. Ultrasound in Med. & Biol., **45.5**(2019): 1056-1080.
- [4.2] 日本音響学会, FDTD 法で見る音の世界. コロナ社, 東京, 2015
- [4.3] T. Kudo, K. Sekiguchi, K. Sankoda, N. Namiki, S. Nii. “Effect of ultrasonic frequency on size distributions of nanosized mist generated by ultrasonic atomization”. Ultrason. Sonochem., **37**(2017): 16-22.

第 5 章

- [5.1] J. C. Simon, O. A. Sapozhnikov, V. A. Khokhlova, Y. Wang, L. A. Crum and M. R. Bailey. “Ultrasonic atomization of tissue and its role in tissue fractionation by high intensity focused ultrasound”. Phys. Med. Biol. **57.23**(2012): 8061-8078.
- [5.2] M. Hoogenboom, D. Eilelenboom, M. H. Den Brok, A. Heerschap, J. J. Futterer, and G. J. Adema. “Mechanical high-intensity focused ultrasound destruction of soft tissue: Working mechanisms and physiologic effects”. Ultrasound in Med. & Biol., **41.6**(2015): 1500-1517.

- [5.3] T. Kondo, J. Nishimura, H. Kitagawa, S. Umemura, K. Tachibana, and K. Toyosawa. "Optimization of enhancement of therapeutic efficacy of ultrasound: Frequency-dependent effects on iodine formation from KI-starch solutions and ultrasound-induced killing of rat thymocytes". *J. Med. Ultrasonics*, **30**(2003): 93-101.
- [5.4] T. J. Mason and J. P. Lorimer. "Sonochemistry: Theory, application and uses of ultrasound in chemistry" (Ellis Horwood Limited, West Sussex, 1988).
- [5.5] K. Yasuda, H. Honma, Z. Xu, Y. Asakura, and S. Koda. "Ultrasonic atomization amount for different frequencies". *Jpn. J. Appl. Phys.*, **50**(2011): 07HE23.

謝辞

本研究は，2018 年 4 月より北海道大学大学院情報科学研究科生命人間情報科学専攻人間情報工学研究室でなされたものです．

本研究を進めるにあたり，多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りました．

指導教員の工藤信樹准教授からは，ご多忙の中，多大なご指導をいただき感謝の念に堪えません．心より感謝申し上げます．また，副査の橋本守教授，平田拓教授，渡邊日出海教授には，多くの示唆ならびに貴重なお助言をいただきました．深く御礼申し上げます．本研究は，先輩諸兄，同輩諸氏，後輩諸氏のご協力なくして遂行することはできませんでした．ご協力に感謝いたします．

北海道科学大学保健医療学部臨床工学科の同僚の皆様には，在学中に多大なご配慮を賜り感謝の念に堪えません．厚く御礼申し上げます．

最後に，関係各位のご協力の下，本研究を論文としてまとめることが出来ました．皆様方に改めて御礼申し上げます．

2022 年 9 月 相川 武司