超音波顕微鏡を用いた声帯組織の観察

—— 卵白グリセリンの音響像への影響とアーチファクトの検出 ——

久留米大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：平野 実教授）

井 上 要二郎, 平 野 実

金沢工業大学電子工学科

垣 田 有 紀

OBSERVATION OF THE VOCAL FOLD TISSUE
BY MEANS OF ACOUSTIC MICROSCOPE

—— ARTIFACTS OF EGG ALBUMIN

ON THE ACOUSTIC IMAGE AND THEIR DETECTION ——

YOJIRO INOUE, M. D. and MINORU HIRANO, M. D.

Department of Otolaryngology, School of Medicine, Kurume University, Kurume

YUKI KAKITA, ph. D., D. M. Sc.

Department of Electronics Kanazawa Institute of Technology, Kanazawa

As a part of the series of study of the mechanical properties of the human vocal folds by means of a scanning acoustic microscope (SAM), the effect of the egg albumin, which was used for fixating the specimen on a sample plate, on the acoustic image was examined.

In the first part of the study, a double blind comparison was made on the acoustic images of sample plates with and without the egg albumin. As a result, it was revealed that the egg albumin affected the acoustic image by giving unfavorable stains when the lens was focussed on the surface of the sample plate. The stains were observed even when the focus was set 20 μ m above the plate.

The following method was then devised to detect the stains or artifacts in the acoustic image obtained by SAM. First, two slides of acoustic images were made from two serial sections. The slides were then projected on a screen using two separate projectors with red and blue cellophane cover on the lens respectively. If there existed any artifacts in the acoustic image, they manifested themselves colored on the screen.

Key words: 声帯, 超音波顕微鏡, アーチファクト

A87—1120—61090

1. は じ め に

我々は、人の声帯の機械的性質を調べるために、超音波顕微鏡（Scanning Acoustic Microscope, 以下 SAM と略す）を用いた一連の実験を行っている¹⁾²⁾。SAM

は、物体の微細構造ばかりでなく、その物体の機械的性質（粘性や弾性）をも反映するからである。SAM で組織を観察して画像（音響像）を得、それより組織の機械的性質を論じるには、安定した画像すなわち、再現性が

あり、ムラのない像を得ることが必要となる。

我々は、SAM を用いて、反射モード^{注1)}で観察する場合に、試料台としてスライドガラスを用いている。このことにより、試料の平面性が向上し、また正確に音響レンズの焦点をあわせることができるようになった。こうして我々は、ほぼ目的にかなった再現性のある画像を得ることができた。スライドガラスを試料台として用いて、試料を固定する際に、我々は、卵白グリセリンを用いている。SAM で観察を行う時には、試料と音響レンズの間に水をはり、音響レンズが振動しながら試料上を走査して画像を描くという方式をとるため、試料が剥けないように試料台に固定するのである。この際、卵白グリセリンの音響像への影響について調べておく必要がある。本報告では、次の3点について論ずる。

- 1) 卵白グリセリンが、音響像に影響を及ぼすか否か、
- 2) どのくらいの範囲に影響を及ぼすか、
- 3) 卵白グリセリンを含めたアーチファクトの検出法について述べる。

2. 研究方法

装置：本多電子株式会社製 HMS 300K⁴⁾を用いた。これは、一台で反射、透過、干渉の3つの方法で観察を行えるものであるが、ここでは、そのうちの主に反射像について述べる。

試料：次の4つの群の試料を作製した。

Control 群 (C 群)

新品のスライドガラスの箱を1つ選び、その中より任意に1枚のスライドガラスを抜きとった。このスライドガラスの表面の任意の5点に焦点をあわせた⁵⁾。そしてこれらの点での画像をポラロイドカメラにて撮影した。つまり、5枚のスライドガラス表面そのものの音響像を得たことになる。この5枚の音響像をC群(Control 群)とした。

卵白グリセリンを塗布した試料は次の3群とした。

I 群

新品のスライドガラスの箱を1つ選び、その中より任意に5枚のスライドガラスをとり出した。そして、それ

ぞれの表面に卵白グリセリンを一滴おとし、指で薄く伸ばした。^{注2)}この5枚の各々のスライドガラスの表面より任意に一点を選んだ。選んだ点の位置は、スライドガラスごとに違った位置となった。そしてその点で、スライドガラス表面に焦点をあわせ、その時の音響像をポラロイドカメラで撮影した。この5枚の写真をI群とした。この群は、スライドガラスの違いによるばらつきのみでなく、スライドガラス内の部位の違いによるばらつきをも含むうる。

II 群

卵白グリセリンを塗布したI群の5枚のスライドガラスより、任意に一枚を抜きとった。このスライドガラスの表面で、任意の5点を選び焦点をあわせ、音響像をポラロイドカメラで撮影し、5枚の写真を得た。これをII群とした。この群は、スライドガラス内の部位の違いによるばらつきを含んでいる。

III 群

卵白グリセリンを塗布したI群の5枚のスライドガラスより、任意に1枚を抜きとった。このスライドガラス上で、任意の一点を選び、その表面に焦点をあわせた。次に、スライドガラスの表面から焦点の位置を5 μ m ごとに20 μ m まで離していき、各点での音響像をポラロイドカメラで撮影した。この5枚の写真をIII群とした。

なお、各群の音響写真を作製する際には、実験室の温度、SAM のコントロール回路の各調整ダイヤル、ポラロイド写真の絞り、シャッター速度、現像時間を一定にした。

推計学的検定：卵白グリセリンが、音響像に影響を及ぼすか否かを調べるために、Control 群と卵白グリセリンを塗布したI、II群とを比較し、両者の画像に差があるかどうかを検討した。これには、Wilcoxon の順位和検定⁶⁾を用いた。これは、少数例の2組の中央値の差の検定に威力を発揮する方法であり、正規分布が仮定できなくても用いることができる。また、この方法は、対象が数値でなくても、順番をつけられるものであればよいという利点をもっている。例えば、痛みの強さの比較などにも使用できる。これを用いて、次のような手順で検定した。

まず、評価者として、医師3人、医学関係者以外の人2人を選んだ。この5人の各々に、C群の5枚とI群の5枚を混ぜあわせた10枚の写真を見せ、像の汚ない順(不均一な順)に1, 2, ……10と番号をつけてもらった。この際、double blind methodを用いた。すなわち

注 1) 我々の用いている装置 HMS 300K では、一台で反射、透過、干渉の3つのモードで観察できる。しかし、試料作製や観察時の容易さ、画像の鮮明さなどの理由により、主に反射モードを用いている。

注 2) 霧吹きや、カバーガラスで広げるなど他の方法を試みたが、この方法が最も卵白グリセリンを薄く、均一に広げることができた。

表 1 コントロール群とⅠ群との画像の不均一さの検定
C群の標本数5, Ⅰ群の標本数5のときの危険率 10%(5%)でのⅠ群の順位和
の限界の値は19(17)

画像(順位)	不均一 ← ————— → 均一										順位和 $\left(\sum_{i=1}^n I_i\right)$	有意差 (危険率)
評価者	(1	2	3	4	5	6	7	8	9	10)		
A	I ₄	I ₅	I ₂	I ₁	C ₂	I ₃	C ₄	C ₃	C ₅	C ₁	4+3+6+2+1=16	あり(5%)
B	I ₄	I ₅	I ₂	I ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	I ₃	C ₁	4+3+9+1+2=19	あり(10%)
C	I ₄	I ₅	I ₂	C ₂	I ₁	C ₅	C ₄	I ₃	C ₃	C ₁	5+3+8+2+1=19	あり(10%)
D	I ₄	I ₅	I ₂	I ₁	C ₂	C ₅	C ₄	I ₃	C ₃	C ₁	4+3+8+2+1=18	あり(10%)
E	I ₄	I ₅	I ₂	I ₁	C ₂	I ₃	C ₃	C ₄	C ₅	C ₁	4+3+6+2+1=16	あり(5%)

表 2 コントロール群とⅡ群との画像の不均一さの検定
C群の標本数5, Ⅱ群の標本数5のときの危険率 10%(5%)でのⅡ群の順位和
の限界の値は19(17)

画像(順位)	不均一 ← ————— → 均一										順位和 $\left(\sum_{i=1}^n II_i\right)$	有意差 (危険率)
評価者	(1	2	3	4	5	6	7	8	9	10)		
A	Ⅱ ₁	Ⅱ ₅	Ⅱ ₃	Ⅱ ₄	Ⅱ ₂	C ₂	C ₄	C ₃	C ₁	C ₅	1+5+3+4+2=15	あり(5%)
B	Ⅱ ₁	Ⅱ ₅	Ⅱ ₃	Ⅱ ₄	Ⅱ ₂	C ₂	C ₄	C ₅	C ₃	C ₁	1+5+3+4+2=15	あり(5%)
C	Ⅱ ₅	Ⅱ ₁	Ⅱ ₃	Ⅱ ₄	C ₂	Ⅱ ₂	C ₅	C ₄	C ₃	C ₁	2+6+3+4+1=16	あり(5%)
D	Ⅱ ₁	Ⅱ ₅	Ⅱ ₄	Ⅱ ₃	Ⅱ ₂	C ₂	C ₅	C ₄	C ₃	C ₁	1+5+4+3+2=15	あり(5%)
E	Ⅱ ₁	Ⅱ ₅	Ⅱ ₃	Ⅱ ₄	C ₂	Ⅱ ₂	C ₅	C ₁	C ₃	C ₄	1+6+3+4+2=16	あり(5%)

著者にも評価者にも, 各写真がどちらの群のものか報せなかった. このようにして順番をつけたあとに, Wilcoxon の順位和検定を用いて, C群とⅠ群の間に差があるか否かを検定した.

C群とⅡ群についても, 同様の方法で検定を行った.

Ⅲ群については, 焦点の位置をずらせたとき, 卵白グリセリンの影響がスライドガラスの表面から, どのくらい離れた位置まで影響があるかを写真を見て検討した.

3. 成績と考按

3-1 音響像への影響

表1と表2に結果を示す. C群とⅠ群では, 少なくとも10%の危険率で, 差があるといえた. C群とⅡ群では5%の危険率で差があるといえた. すなわち, 卵白グリセリン群は, Control 群より像が汚ない(不均一)ということが, 10%(Ⅱ群では5%)の危険率をもって言うことができる. また, Ⅰ群, Ⅱ群の両方ともC群と差があったことより, この像の汚なさ(不均一さ)は, スラ

イドガラスの違いや, スライドガラス内の部位の違いによるものではなく, 卵白グリセリンを塗布したことに起因するといえる.

すなわち, 試料を試料台(スライドガラス)に固定する際に用いる卵白グリセリンは, 試料台の表面では, 音響像に影響を及ぼす. 図1のaは, C群の音響像で, bは, Ⅰ群の音響像である. bのように, スライドガラスの表面では卵白グリセリンにより, 像が不均一となり, 試料観察時のアーチファクトとなりうる. そこで, この汚れが, 試料表面からどのくらい離れた位置まで影響するかについて検討する.

3-1 どこまで影響を及ぼすか

図2のa, b, c, d, eは, Ⅲ群の5枚の音響像である. aは, 卵白グリセリンを塗布したスライドガラスを用いて, その表面に焦点をあわせてSAMで観察したものである. b, c, d, eは, それぞれ焦点を, スライドガラスより上へ5μm, 10μm, 15μm, 20μm 離して観察したものである. 図2からわかるように, スライドガラスの表

図 1 卵白グリセリンの音響像への影響

図 2 スライドガラス表面より焦点の位置を離れたときの卵白グリセリンの影響
A: III 群での各焦点の位置 B: 試料観察時の焦点の位置

20 μ m 離れても卵白グリセリンの音響像への影響は残っている。

図3 赤青スライド法

青(アーチファクト)

- (i) 音響像のスライドフィルムを、青色のセロハンを通してスクリーンに投影する。
 (ii) 音響像のスライドフィルムを、赤色のセロハンを通してスクリーンに投影する。
 (iii) (i), (ii)をスクリーン上で重ねあわせる (アーチファクトにのみ色がつく)。

面から離れるにしたがって汚れは少なくなるが、 $20\mu\text{m}$ 上でも汚れは認められた。したがって図2の模式図のように、厚さ $10\mu\text{m}$ の試料を観察する際には、焦点をあわせる試料表面において、この汚れが現われることになる。実際には、試料自身で音波が減衰され、この汚れの影響は小さくなるとは考えられるが、無視できない事実である。そこで、次章では、この卵白グリセリンによる汚れを、実際の音響像より検出する方法について検討する。

4. アーチファクトの検出

前章の結果より卵白グリセリンは、音響像に、画像の汚れとしてアーチファクトをもたらすことが判った。音響像に現われるアーチファクトの原因には、頻度は少ないが、ほかにもスライドガラスのキズや汚れ、脱パラフィン時につくゴミ、観察時の妨害音波等がある。これら

の原因は、完全に除去することは難しい。しかし、これらのアーチファクトを、音響像から識別できれば、その部分だけを無視して考えることができる。この考えに基づいて、我々は、卵白グリセリンを含むアーチファクトの検出法を考えた。

原理と方法

組織標本より2枚の連続切片を作製し、卵白グリセリンを塗布した別々のスライドガラスへ固定し、試料を作製する。これを脱パラフィンして、SAMで各々の試料を観察し、2枚の音響像を得る。この際、観察の条件は一定にする。このようにして得られた各々の音響像よりスライドフィルムを作製する。

次にこのスライドフィルムを、2台のスライドプロジェクターを用いてスクリーンに投影し、像を重ねあわせる。アーチファクトのない部分は、連続切片なので、像が完全に重なるが、アーチファクトの入っている部分は

像が異なり、完全には重ならない。卵白グリセリンによる汚れのおこり方は、2枚のスライドガラスで、同じにならないと考えられるからである。

ここで図3のように、音響像とスクリーンの間に赤と青のセロハンを入れると、像の重なった部分は白黒の画像のままで、アーチファクトの部分だけ色がついて見える。これは、互いに補色の関係にある2つの光は、重ねあわせると白になるという性質を利用したものである。すなわち、音響像の白い部分は、スクリーンでは青および赤に見え、これが重なった部分は白く見える。(実際には、赤と青は完全な補色ではないので、わずかにピンク色に見える。)音響像の黒い部分は、赤また青のセロハンを通っても黒く見え、両方の重なった部分もやはり黒く見える。いずれか一方の音響像にアーチファクトがあれば、その部分は像が重ならないので色は消えない。このようにして、スクリーン上の白黒の音響像より、色のついたアーチファクトがうきたって見えるのである。またこの際、スクリーン上のアーチファクトの色と、反対の色のセロハンをおいた方の音響像に、そのアーチファクトがあることがわかる。(図3では赤いセロハンをおいた方の音響像にアーチファクトがある。)

我々はこの検出法を「赤青スライド法」と呼んでいる。これには、次のような他の利点もある。

1) 卵白グリセリンに限らず、標本の薄切後におこりうるすべてのアーチファクトを検出できる。これには、スライドガラスの汚れ、脱パラフィン時の汚れ、観察時の妨害音波などが含まれる。2) アーチファクトが、2枚の連続切片のどちらによるものかが、目で見てすぐわかる。3) この方法は、連続切片を作ってさえおけば毎回行わなくとも、必要が生じたときに、あとから調べることができる。4) この方法は、SAMに限らず、通常の光学顕微鏡を用いて病理組織標本を観察する際にもアーチファクトを検出するのに利用できる。

5. 結 語

我々は、超音波顕微鏡(SAM)を用いて、声帯組織の機械的性質を調べている。この際に、試料を試料台(スライドガラス)に固定するために用いている卵白グリセリンの音響像への影響を調べた。成績は、以下の通りである。

1) 試料台表面では、卵白グリセリンは、音響像に影響を及ぼす。

2) 実際に試料を観察する際に焦点をあわせる位置

(試料台より10 μ m上)でも、音響像へ影響を及ぼす。

3) 試料薄切後におけるアーチファクト(卵白グリセリンによるものも含む)を簡単に検出できる「赤青スライド法」を考案した。

参 考 文 献

- 1) 垣田有紀 平野 実: 超音波顕微鏡の原理と組織の物性測定への応用について — 声帯の組織を例として — 日耳鼻 85: 1071-1075, 1982.
- 2) 井上要二郎: 超音波顕微鏡の声帯組織観察への応用 — その方法論と物性の推測 — 耳鼻と臨床 投稿中
- 3) 井上要二郎 垣田有紀: 超音波顕微鏡による声帯組織の観察 — 焦点のあわせ方について — 投稿予定
- 4) 垣田有紀 井上要二郎 平野 実: 声帯組織の観測に用いる超音波顕微鏡装置 (投稿予定)
- 5) 柏木 力: 医学統計解析, 朝倉書店, 東京都 1980.
- 6) 中鉢憲賢: 超音波顕微鏡の研究の現況 日本音響学会誌 36, 11: 572-575, 1980.
- 7) Thompson SW, Luna LG, 南風原英之, 中嶋安彬 (訳): 病理組織標本のアーチファクト. 医歯薬出版, 東京都 1982.
- 8) 増山元三郎: デタラメの世界 岩波新書, 東京都 1980.
- 9) 増山元三郎: 生化学的にみた個体差 自然 4: 26-44, 1978.

本研究は一部文部省科学研究費(課題番号57870103)の援助を受けた。

(原稿受付 昭和 59. 6. 16日急載)

別刷請求先 〒830 久留米市旭町 67

久留米大学医学部耳鼻咽喉科学教室

井上要二郎