

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-527270

(P2005-527270A)

(43) 公表日 平成17年9月15日(2005.9.15)

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 B 8/00

F I

A 6 1 B 8/00

テーマコード (参考)

4 C 6 0 1

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 42 頁)

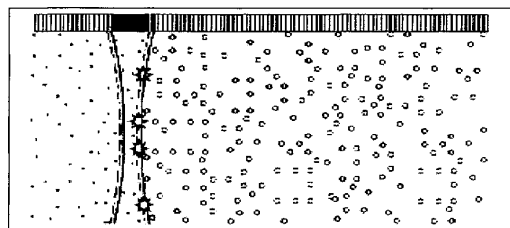
(21) 出願番号	特願2003-579664 (P2003-579664)	(71) 出願人	300049958
(86) (22) 出願日	平成15年3月27日 (2003. 3. 27)		シーリング アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月28日 (2004. 9. 28)		ドイツ連邦共和国 デー ー 1 3 3 5 3 ベ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/003227		ルリン ミューラーシュトラーセ 1 7 8
(87) 国際公開番号	W02003/082117	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成15年10月9日 (2003. 10. 9)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	102 15 335.3	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成14年3月28日 (2002. 3. 28)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 超音波により物体を定量するための装置及び方法

(57) 【要約】

超音波診断における物体、特にバブルの定量化においては、物体、特にバブルの濃度がしばしば高く、その結果、可視化のために得られる像データが飽和状態になり、従って定量化が不可能である問題が存在する。この問題を解決するために、試験下の目的物の断面層に含まれる物体がまず、特徴的なシグナルを生成し、そしてそれらのシグナルを採集し、そのシグナルからデータ組を形成し、試験下の目的物における物体配置の像に前記データ組を転換し、そしてそれから、物体の数を決定し、それにより、試験下の目的物におけるオーバーラップする断面層からの少なくとも2つの超音波シグナル組が採集されることが提案されている。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試験下の目的物に含まれる物体を定量するための装置であって、

a) 超音波フィールドを発するための少なくとも 1 つの変換器、この超音波フィールドにより、試験下の目的物中の層に含まれる物体が、特徴的な超音波シグナルを発し、そして特徴的なシグナルを受けるために励起され得る、

b) 特徴的なシグナルから成る層における物体の数を決定するための少なくとも 1 つのデータ処理システム、及び

c) 超音波フィールドが、試験下の目的物中の第 1 層における物体の励起の後、シフトされ、その結果、物体が第 2 層中へのシフトの後、励起され、ここで前記第 1 層及び第 2 層がオーバーラップし、そしてお互い、平行で且つ定義された態様で配置されている手段を含んで成る装置。

10

【請求項 2】

前記物体がバブルを表す請求項 1 記載の装置。

【請求項 3】

前記超音波フィールドが少なくとも $5\ \mu\text{m}$ 、シフトされ得る請求項 1 又は 2 記載の装置

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つの変換器が piezo 結晶の二次元又は三次元アレイを示す請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の装置。

20

【請求項 5】

前記試験下の目的物及び前記二次元アレイがお互いに対してシフトされている手段が提供される請求項 4 記載の装置。

【請求項 6】

前記三次元アレイにおける piezo 結晶のための対照が供給され、これにより、アレイにおける piezo 結晶列における piezo 結晶から発する隣接する音フィールド又はアレイにおける隣接する piezo 結晶から発する音フィールドがオーバーラップされ得る請求項 4 記載の装置。

【請求項 7】

試験下の目的物及び少なくとも 1 つの変換器がお互いに対してシフトされている手段が供給される請求項 4 記載の装置。

30

【請求項 8】

少なくとも 1 つのモータドライブが、試験下の目的物又は少なくとも 1 つの変換器をお互いに対してシフトするために供給される請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の装置。

【請求項 9】

試験下の目的物が固定されている保持装置、及び少なくとも 1 つの変換器のための移動可能保持装置が供給される請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の装置。

【請求項 10】

データ処理及び像表示のための像評価システムが供給され、これにより、物体の定量化がビデオ濃度計により実行される請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項記載の装置。

40

【請求項 11】

前記物体がバブルを示す請求項 10 記載の装置。

【請求項 12】

ヒト又は動物における超音波診断及び/又は超音波治療のための請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の装置の使用。

【請求項 13】

後 - 胚固体発生から出発して器官及び組織における生理学的に上方又は下方に調節できる分子マーカーのインビボ及びエクスピボマッピングのための、病原の間、器官及び組織における生理学的に上方又は下方に調節できる分子マーカーのインビボ及びエクスピボマッピングのためへの、及び細胞の上方及び下方に調節できる分子マーカーのインビトロマ

50

ッピングによる細胞培養物の特徴づけのための(それにより前記物体が前記マーカ-のための特異的結合分子を有する)請求項1~11のいずれか1項記載の装置の使用。

【請求項14】

前記抗体がバブルを表す請求項13記載の装置の使用。

【請求項15】

試験下の目的物に含まれる物体を定量するための方法であって、

a) 試験下の目的物中の層に含まれる物体が超音波フィールドにより特徴的な超音波シグナルを生成するために励起され、

b) 前記超音波シグナルが受信され、

c) 物体の数が、受信された超音波シグナルから決定され、そして

d) 物体が試験下の目的物中の第1層において励起された後、前記超音波フィールドがシフトされ、その結果、バブルが、第2層中への置換の後、励起され、ここで、前記第1層及び第2層がオーバーラップし、そして平行し、且つ定義された態様でお互いに対してシフトされることを特徴とする方法。

10

【請求項16】

前記物体がバブルを表す請求項15記載の方法。

【請求項17】

前記バブルが、励起される場合、破壊され、そしてこの場合、特徴的なシグナルを発するために励起される請求項16記載の方法。

【請求項18】

前記超音波フィールドが少なくとも5 μ mシフトされる請求項15~17のいずれか1項記載の方法。

20

【請求項19】

前記試験下の目的物及び超音波フィールドを放す少なくとも1つの変換器がお互いに対してシフトされる請求項15~18のいずれか1項記載の方法。

【請求項20】

前記試験下の目的物が少なくとも1つの固定された変換器に対してシフトされるか、又は少なくとも1つの変換器が試験下の固定された目的物に対してシフトされる請求項19記載の方法。

【請求項21】

ヒト又は動物における超音波診断及び/又は超音波療法のための請求項15~20のいずれか1項記載の方法。

30

【請求項22】

後-胚固体発生から出発して器官及び組織における生理学的に上方又は下方に調節できる分子マーカ-のインビボ及びエキスピボマッピング、病原の間、器官及び組織における生理学的に上方又は下方に調節できる分子マーカ-のインビボ及びエキスピボマッピング、及び細胞の上方及び下方に調節できる分子マーカ-のインビトロマッピングによる細胞培養物の特徴づけ(それにより前記物体が前記マーカ-のための特異的結合分子を有する)を実行するための請求項15~20のいずれか1項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、独立した特徴的なシグナル、特に物体、好ましくはバブルの破壊に伴うそれらのシグナルを生成するために、診断用超音波により励起され得る試験下の目的物に含まれる物体を定量するための装置及び方法に関する。本発明はまた、ヒト又は動物における超音波診断及び/又は治療のための装置の使用、及び後-胚固体発生から出発して器官及び組織における生理学的に上方又は下方に調節できる分子マーカ-のインビボ及びエキスピボマッピングのための、病原の間、器官及び組織における生理学的に上方又は下方に調節できる分子マーカ-のインビボ及びエキスピボマッピングのためへの、及び細胞の上方及び下方に調節できる分子マーカ-のインビトロマッピングによる細胞培養物の特徴づけ

50

のためへの前記装置及び方法の使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

超音波診断は、規則的な臨床学的実施に固有の場所を見出した。より強い超音波シグナルが結果的に生成され得るので、詳細は、コントラスト媒体の注入により改良される超音波像に示され得る。コントラスト媒体として、組織シグナルとは区別され得る検出可能なシグナル、特に非常に小さな気体封入（微小）バブルを生成するすべての非常に小さな物体（微小物体が）適切である。それらの物体は、試験下の目的物に供給され、そして例えばバブルの場合、超音波フィールドにおいて一定の条件下で破壊され得る。この場合、それらの気泡は独立した特徴的な超音波シグナルを放す。バブルが超音波フィールドにより破壊される場合、独立した特徴的なシグナルは、“刺激されたアコースティックエミッション（SAE）”として言及される。

10

【0003】

独立した特徴シグナルを放すことができるバブルは、例えばEP0398935B1号、EP0644777B1号、EP0458745A1号及びW001/68150A1号に記載されている。

刺激されたアコースティックエミッション（SAE）は、下記に図示されている。

図1においては、第1の低-振幅音波1及び第2の高-振幅音波2が示されている。低-振幅音波1が照射される場合、それに対してゆだねられる気泡3は損なわれないうまま存続する。この場合、錯乱されたシグナル生成される。それとは対照的に、高-振幅音波が照射される場合、気泡4は破壊され、それによりSAEシグナルが生成される。

20

【0004】

最も変更されたバブルのSEAシグナルは、アメリカ特許第5,425,366A号、アメリカ特許第6,186,951B1号及びDE19813174A1号に従って、色ドップラーモードにより検出され得る。

シフトを主に可視化するために、元来開発された他の超音波装置方法によってされ、SAEシグナルは、バブルのシフトに関係なく示され得る。例えば、スペクトルドップラー方法、パワードップラー方法、色ドップラー方法及び調和方法（第2方法、副方法、ワイドバンド方法、パルス-逆転方法、超調和方法、色ドップラー方法及び調和-パワードップラー方法）が言及されている。

30

【0005】

SAEシグナル強度は、個々のバブルがそれら自体、検出され得るほど高い。この場合、個々のSAEシグナルは、破壊されていないバブルの実際のサイズ（ $<10\mu\text{m}$ ）に対応するサイズよりも、モニター上で相当に大きく可視化される（装置、変換器及び設定に依存して約0.5~1mmの直径）。図2においては、SAEシグナルの値は、横断像で再生される。現在入手できる多くの超音波-診断装置においては、装置の設定した依存して個々の像の層厚さは、約1mmである。これは図3に示されている。従来の横断像の層厚さはここで検出され得る。組織/血液1m当たり約2,000~3,000のバブルの濃度が一般的に、ソノグラフ横断像における滑らかなSAE対比をもたらす。

【0006】

二次元超音波横断像においては、飽和バブル濃度は、超音波横断像の層厚（図3に例により示される）、及び単一のバブルが破壊される場合、超音波横断像において可視化されるSAEシグナルの値により決定される（いくつかの個々バブルが図2に示されている）。

40

定性的な像に関しては、低飽和濃度/飽和バブル濃度が好都合である。なぜならば、特に低いバブル濃度でさえ、滑らか対比が横断像をもたらすからである。

しかしながら、物体の定量化に関しては、低飽和濃度/飽和バブル濃度は好都合ではない。なぜならば、特に低濃度の物体、特にバブルは、像における対比飽和をもたらし、そして像における飽和濃度以上のそれらの濃度をもはや絶対的に決定することができず、又は物体、特にバブルをもはや区別することができないからである。

【0007】

物体、特にバブルが血液において単に未結合のまま分散されるまで、それらの濃度は、

50

飽和濃度/飽和バブル濃度が達成されないような手段で、用量により調節され得る。

しかしながら、例えば細胞、組織、器官又は他の蓄積する構造体における特定又は非特定濃度の物体がもたらされる場合、飽和濃度/飽和バブル濃度は一般的に卓越する。なぜならば、蓄積する組織又は蓄積する構造体は、物体が飽和濃度/飽和バブル濃度以上の濃度で蓄積するよう強くパッケージングされるからである。

【0008】

用量の低下により、一定の環境下での標的領域における飽和濃度/飽和バブル濃度以下にたぶん進行するが、しかし物体、特にバブルの累積数は、最大飽和に対して未知の比で存在した。従って、そのような測定は、再生できず、又はそこに存在する濃度因子の数に相互関係する値を生成もしなかった。

10

従って、飽和濃度/飽和バブル濃度以上の物体の数（バブル数）の決定のための方法が所望される。

【0009】

物体、特にバブルは、例えば細胞、組織、器官又は他の構造体上に又はその中に、非特異的に又は特異的に蓄積することができる。この蓄積機構はしばしば、受動的又は活性的標的化として文献においては言及されている（Lanza, G., Wickline, S.: "Targeted Ultrasonic Contrast Agents for Molecular Imaging and Therapy," Prog. Cardiovasc. Dis., 2001 44: 13-31; Dayton, P.A., Ferrara, K. W.: "Targeted Imaging Using Ultrasound," J. Magn. Reson. Imaging, 2002, 16: 362-377）。

【0010】

20

物体、特にバブルの非特異的蓄積は、例えば下記により生じる：

a) 細網内皮系統（RES）の器官、又は疾病に関連する他の細胞、例えば腫瘍 - 関連のマクロファージ又は動脈硬化工程におけるマクロファージ、又は腫瘍細胞自体又はファゴサイトーシスに対して刺激される細胞、例えば肝臓の一定疾患における肝臓の内皮細胞における物体/バブルのファゴサイトーシスにより；

b) 血管内皮上への物体/バブルの付着又はそれに沿ってのゆっくりした回転により；

【0011】

c) "血管閉鎖末端" 又は "ブラインド - アレイ" 血管における内皮中への又は内皮の開窓を通しての物体/バブルの移動により；これは、強い水腫性又は炎症性工程、出血、血腫又は血管膨張、例えば動脈癌、血管 - 形成性腫瘍、例えば血管腫における壊死への遷移領域において、又は壊死中へのフラッシングにより生じることができ；

30

d) 単球により食作用されるか、又は血液の細胞、例えば白血球に付着する、食作用された又は付着性物体/バブルの内皮バリアー、例えば血液 - 脳バリアーによる、例えば病理学的領域への輸送による。

【0012】

物体、特にバブルの特定濃度は、生理学的には病理生理学的構造体への共有又は非共有結合、例えば静電結合、水素結合又はファンデルワールス結合により達成され得る。それらの場合、特にバブルは一般的に、それらの表面に標的 - 特異的に結合する分子を担持する。

超音波対比を測定するために、ビデオ像をデジタル化し、そして時間に対して定義され得る像領域における明るさ（灰色又は明度）を測定する可能性が存在する。しかしながら、このタイプの測定は、高濃度の物体/バブルでの対比飽和の問題を解決しない。定量化は、あったとしても、非常に低い濃度の物体、特にバブルでのみ可能である。

40

【0013】

3D - Echotech, Halbergmoos, Germanyはまた、血液におけるバブルシグナルを定量化するために超音波装置によりバブルの定量化能力の必要性を満たすために試みて来た。この装置により、超音波装置のビデオ像がデジタル化され、明度及び灰色度に分離され、そして任意には、平均明度に従って、又は定義された測定窓（ROI）内のスクリーン画素の数に従って評価される。この測定システムの適用は、定義できるROI内の明度に基づいて血管中へバブルの注入を定量化することである。この工程はまた、1ml当たり約3,000個の

50

粒子又はバブルの濃度以上のバブルを定量化するには適切でない。この濃度以下でさえ、再生できる測定は、この装置により不可能である。

【0014】

Kretztechnik, Zipf, Austriaは、2D(二次元)アレイ(2D-ソノグラフにおけるように、線状アレイ、セクターアレイ、相化されたアレイ)が変換器内の一定角度で自動的に回転される3D(三次元)超音波工程を提案する。この装置により、バブルの定量化は、非再生手段で行われ得る。これは、異なった患者が試験され、そして/又は種々の試験者が試験を行う場合、特に適用できる。

物体、特にバブルを、インピボ、エクスピボ又はインピトロで上記装置により定量化することは不可能であり、特に約3,000個のバブル/ml組織又は血液の濃度以上の濃度では不可能である。この濃度以下で、空間解像度は、mmの範囲においてのみ可能である。この問題を解決するための他の測定方法は、今日まで知られていない。

10

【0015】

従って、既知方法及び装置の欠点は、小さな構造体の可視化が、変換器から発する音ロブが解決を制限する最小拡張レベルを有するので、不可能であることから成る。例えば、音波により検出される測定層の厚さが約1mmのサイズである場合でさえ、そのような細かな構造体はもはや、解決され得ない。

上記理由のために、例えば分子マーカーを検出するために超音波技法を用いることは不可能である。

【0016】

20

生物学的キー技法、例えばGenomics/Bioinformatics and Proteomicsが、新規分子マーカーを同定するために使用される(Yao, T.: "Bioinformatics for the Genomic Sciences and Towards System Biology. Japanese Activities in the Post-Genome Era" Prog. Biophys. Mol. Biol., 2002, Jul-Aug., 80 (1-2): 23-42; Wu, W.; Hu, W.: Kavanagh, J.J.: "Proteomics in Cancer Research." Int. J. Gynecol. Cancer, 2002, Sep.-Oct., 12 (5): 409-423)。この技法により、例えばヒト遺伝子の配列が、薬理学的に好都合なタンパク質ファミリーに属するタンパク質、特に受容体及び酵素を同定し、そしてそれを詳細に記載するための特別な生物情報手段により分析される。

【0017】

インピトロ工程においては、例えば新しく単離された(一次)細胞及び(不滅化された)細胞培養物(疾病又は健康な組織からの)が使用される。しかしながら、それらの細胞培養物は好都合ではない。なぜならば、分子マーカーの発現範囲は、例えば単離工程により変更することができるからである。そのような試験された細胞培養物は、分子マーカーが単離された正確な時点で、その発現パターンのみを明らかにする。さらに、細胞培養物は一般的に、真インピボ状態を表すことができない不滅化された細胞(特別な操作によりインピトロで明確に増殖され得る)である。

30

【0018】

分子マーカーを同定するためのもう1つの非常に知られた方法は、組織の免疫組織化学研究である。これに関しては、腫瘍からの特に好都合な組織は、それらの除去の後、組織学的に作業され、そして特に1又は複数の分子マーカーの発現について免疫組織学的試験される。そのようなマーカーの組織学的同定の後でのみ、後者はまた、対応するシグナルトランスミッターに結合される対応する抗体を用いることによってインピボで表され得る。そのような像は一般的に、単に定量的に可能であり、そしてほとんどの場合、またそれが抗体-担持シグナルトランスミッターの非常に強い濃縮をもたらす場合のみ可能である(Fonsatti, E.; Jckunen, A.P.; Kairemo, K.J. A. など.: "Endoglin is a Suitable Target for Efficient Imaging of Solid Tumors: In-Vivo Evidence in a Canine Mammary Carcinoma Model," Clinical Cancer Research, Vol. 6, May 2000: 2037-2043)。

40

【0019】

この時点で、分子マーカーを検出するための多くの診断方法また、インピボで試験される。既知診断方法による既知分子マーカーの検出は可能であるが、この工程は一般的に高

50

い空間解像度を欠いている。これは、例えばPET（陽電子放射断層撮影法）、NIRF（赤外線に近い蛍光イメージング）及びシンチグラフィによる場合である。他の場合、高濃度のシグナルトランスミッターが、例えばMRI（磁気共鳴イメージング）及びCT（コンピューター断層撮影法）に関して、必要とされる。さらに、それは、受動標的化（抗体接合体、例えば分子マーカーに対する特異的結合を有する）への超音波コントラスト媒体の使用のための文献を提供する。しかしながら、現在まで記載されている診断方法のどれも、それらはDE10215335A号から知られている装置の使用、すなわち μm 範囲での空間解像度、及び標的領域におけるシグナルトランスミッターの高い感受性の定量化により達成され得るので、基準に達しない。

【0020】

10

従って、本発明の目的は、試験下の目的物における物体を定量するための方法及び装置を見出すことであり、これにより、飽和バブル濃度以上の濃度の物体のインピボ、エキスピボ及びインピトロでの決定が可能になる。前記方法及び装置により、要素量を再生可能な態様で定量化し、そしてそれらの濃度を決定することが可能である。さらに、例えば分子マーカーを標的物・特異的に同定できるよう、組織学的領域において空間解像度を可能にすることが、ビデオ像において可視化される独立した特徴的シグナル、例えばSAEシグナルに関して可能にされる。

【0021】

前記目的は、請求項1に従っての試験下の目的物に含まれる物体を定量するための装置、請求項10に従ってのヒト又は動物における超音波診断及び/又は超音波療法へのそれらの使用、請求項11に従っての器官及び組織における分子マーカーのインピボ及びエキスピボマッピング及び細胞培養物の特徴化のための細胞のインピトロマッピングのためへのそれらの使用、及び請求項12に従っての試験下の目的物に含まれるバブルを定量するための方法により達成される。

20

【0022】

定義：

これに関しては、下記に説明される図面がさらに言及される。

a) 物体：

本出願における物体とは、 $10\mu\text{m}$ 以下の直径を有する固体粒子及び/又はバブルである。固体粒子は、少なくとも1つの表面活性物質（例えば、界面活性剤）、少なくとも1つの炭水化物、タンパク質、脂質及び/又は天然及び/又は合成ポリマーを含む。

30

【0023】

b) バブル：

本出願におけるバブルとは、被覆されていないか又は被覆されている、 $10\mu\text{m}$ 以下の直径を有するガス含有相である。前記相は実質的に球体であり得る。被覆されたバブルの場合、被膜は少なくとも1つの表面活性物質（例えば、界面活性剤）、少なくとも1つのタンパク質、脂質及び/又は合成ポリマーを含むことができる。本出願のバブルはまた、ガス充填されたマイクロカプセル、ガス充填された微粒子、ガス充填された微小球体、微小バルーン、及び界面活性剤・安定化された微小バブルでもあり得る。

c) 超音波コントラスト媒体：

超音波コントラスト媒体は、超音波診断及び/又は超音波療法への使用のための物体、特にバルブを含む媒体である。

40

【0024】

d) 独立した特徴的なシグナル：

独立した特徴的なシグナル（CSシグナル、CS効果）は、散乱されたシグナルとは無関係である物体、特にバブルのエコーシグナルである。それらはまた、それらが例えば、超音波フィールドにおけるバブルの破壊において生成されるので、すべての非線状シグナル、例えば二次調和、副調和、又は超・調和、及び特にSAEシグナルを包含する。

【0025】

e) 刺激されたアコースティックエミッション（SAE）：

50

本発明に従っての好ましいバブルは、超音波により励起される場合、一定の条件下で破壊され得る。この場合、伝達シグナルから逸脱する独立したシグナルは、バブルの分散及びシフトに関係なく生成される。この独立した特徴的なシグナルは、刺激されたアコースティックエミッション (SAE) (類似語：相互関係の損失 (LOC)) として言及される。

【0026】

f) 飽和濃度/飽和バブル濃度：

飽和濃度/飽和バブル濃度は、試験下の目的物、例えば組織又は血液1ml当たりの物体/バブルの濃度であり、それ以上で、それは音フィールド内で独立した特徴的なシグナル、特にSAEシグナルの重ね合わせをもたらし、そしてそれ以上で、バブルの定量化は、物体/バブルの数がコンピューター補正式を用いてさえ、CSシグナルの合計からもはや誘導され得ないことにおいて不可能である。

10

【0027】

g) CS/SAE層厚：

バブルが破壊される場合、これに関しては、これは超音波横断像 (断面層) 当たりの層の厚さであり、これから、横断面像において可視化されるCSシグナル (この場合、SAEシグナル) が平行したオーバーラッピングを伴って走査において生じる。生物/バブルがCSシグナルによる照射において破壊されない場合、これは超音波横断像当たりの層の厚さであり、これから、横断面像において可視化されるCSシグナルが、個々の場合、超音波フィールドのシフトにおいて新しく付加されるバブルの平行したオーバーラッピングを伴って走査において生じる。

20

【0028】

CS/SAE層厚は、超音波横断層当たりの移動の距離と同じである。この層厚は好ましくは、断面層よりも有意に薄い。断面層は、音ローブ (音フィールド) の照射により、試験下の目的物において生成される。これは、照射される媒体への適切な媒体によりカップリングされ、そして焦点を合わせられる音パルスを発するピエゾ結晶要素により、従来の手段で生じる。試験下の目的物の表面に沿って実施される試験下での目的物中に放される音ローブを有することによって、その音ローブからの断面層が少しずつ被覆され、そしてその対応する像が受信器に達する音シグナルから生成され得る。上記の両者の場合、層厚は、2つの像間の供給量により定義される。

30

【0029】

h) 興味ある領域 (ROI)：

これに関しては、これは、横断面像における測定窓である。

i) 体型測定単位 (MU)：

体型測定単位は、可視化されたCSシグナルがビデオ像において支配する、スクリーン画素数で表される断面層に対応する表面積の尺度である。スクリーン画素は一般的に、ビデオ濃度計により自動的に計数される。個々のCSシグナルのスクリーン画素が知られている場合、物体数/バブル数は、体型測定単位から推定され得る。

【0030】

j) 補正されたSAE (SAEcorr.) 又は補正されたMU (MUcorr.)：

物体/バブルが超音波横断像についての層の厚さよりも薄い場合、重ねられたCSシグナルがビデオ像をもたらすことができる。そのような重なりの可能性が、物体/バブルの濃度及び超音波横断像の層厚の上昇と共に上昇する。なぜならば、この場合、多数の物体/バブルが検出されるからである。両パラメーターは、ビデオ像におけるCSシグナルの色彩表面積の%に対する直接的な影響を有する。試験される体積での物体/バブルのランダム分散の場合、MUの補正は、CSシグナルが重ねられる場合、次の通りに行われ得る：完全な色彩飽和がROIにおいて存在しないまで：

40

【0031】

【数 1】

$$MU_{corr} = \sum FP \times \left(1 + \frac{\sum FP}{\sum FP + \sum GP} \right)$$

10

【0032】

FP：可視化されたCS効果の領域における測定窓（ROI）内に存在する色彩画素、

MU：測定窓（ROI）内の ΣFP

GP：窓（ROI）内であるが、但し可視化されたCS効果の外部に存在する灰色画素。

CSシグナルの補正された数（SAEcorr.）における補正されたMU（MUcorr.）は、色彩画素の合計及びROI内のCSシグナルの合計（Fsae = $\Sigma FP / \Sigma sae$ ）の商を通して計算され得る：

$$SAEcorr. = MUcorr. / Fsae.$$

20

【0033】

この補正式の適用は、試験される体積における物体/ランダム分散を必要とする。

k) 2D - アレイ：

2D - アレイは、ピエゾ要素の一次元列から成る。

l) 3D - アレイ：

3D - アレイは、ピエゾ要素のいくつかの隣接する列から成る。

m) 変換器（超音波変換器）：

ピエゾ要素を含むソノグラフィーのための装置。

n) 変換器に関する指図：

【0034】

図6においては、変換器23が図示されている。変換器に関する指図は次の通りに定義される：

30

x = 変換器に対する横断（参照番号24：2D - アレイ）

y = 側部（参照番号25）

z = 軸（音の成長方向）（参照番号26）

o = 分子マーカー：

細胞内、細胞間及び/または細胞外分子構造体、例えば受容体、リガンド、酵素又はそれらの構成成分。

【0035】

試験下の目的物における物体、好ましくはバブルを定量するためには、独立した特徴的なシグナル、及び主に照射において破壊されるバブルを生成するために励起され得るそれらのバブルが使用される。

40

【0036】

本発明の装置及び方法は、試験下の目的物に含まれる物体、好ましくはバブルの定量化のために使用される。装置は、特徴的な超音波シグナルを発するよう、試験下の目的物における層に含まれる物体、好ましくはバブルを励起する超音波フィールドを放すための少なくとも1つの変換器を含んで成る。少なくとも1つの変換器はまた、特徴的なシグナルを受けるためにも使用される。また、少なくとも1つのデータ処理システムが、特徴的なシグナルから成る層における物体、好ましくはバブルの数を決定するために供給される。

【0037】

また、本発明の手段においては、超音波フィールドが試験下の目的物における第1層に

50

おける物体、好ましくはバブルの励起の後、励起され得、それにより、第1層及び第2層がオーバーラップし、そして平行し、且つ定義された態様でお互いに対してシフトされる。試験下での目的物における異なった断面層から成る超音波データ組が得られ、これは、特に断面層におけるバブルの空間的配置を伴って、個々の断面層における物体/バブルの存在に対する情報を含む。横列に配置される piezo 結晶を有する変換器に関しては、層に好ましくは、piezo 結晶列が横断方向（x - 方向）にオーバーラップするよう、お互いに対して配置される。

【0038】

変換器は、超音波シグナルを発し、そして物体、好ましくはバブルに起因するシグナルを受けよう企画され得る。他方では、変換器はまた、独占的に超音波シグナルを発するよう企画され得る。この場合、物体、好ましくはバブルからの入力超音波シグナルを検出するためのもう1つの受容器ヘッドが必要である。

10

【0039】

試験下の目的物に含まれる物体、好ましくはバブルの定量化のために本発明の方法を行うためには、層に含まれる超音波フィールドを有する物体/バブルが、特徴的な超音波シグナルを生成するために励起される。物体/バブルから送られる特徴的な超音波シグナルが受動され、そして物体/バブルの数が受け入れられる超音波シグナルから決定され、それにより、個々の場合、物体/バブルが試験下の目的における第1層において励起された後、超音波フィールドの置換が、第1層をオーバーラップし、そして平行し且つ定義された態様でこの層に関して、置換される第2層における物体/バブルを励起する。

20

【0040】

本発明の装置及び方法は、イメージング又はビデオ像を用いる態様を制限するものではない。興味ある領域（ROI）内のCSシグナルは、受信するシグナル（高周波（RF）データ）に基づいてすでに計数され得るが、但し受信シグナルのレベルに基づいてCSシグナルを計数する場合の飽和バブル濃度は、CSシグナルが二次元超音波横断像において計数される場合の飽和バブル濃度とは異なる。本発明の装置及び受信シグナルの計数は、超音波装置に組込まれ得る。

既知の装置及び方法に比較して、1000～3000個の物体（バブル）/mlの範囲の限界以上にある物体、好ましくはバブルの濃度を決定することがまた、本発明の装置及び方法により可能である。

30

【0041】

好ましくは2.5～12MHzの周波数範囲で作動する既知の放射線学的及び心臓学的装置に関しては、飽和は約1000個の物体（バブル）/ml以上の濃度ですでに観察され得、その結果、定量化は不可能である。これは、この場合、十分ではない空間解像度に依存し：超音波変換器の空間的分離能はすなわち、それらの周波数により決定される。しかしながら、同時に、音波圧及び従って、試験下の組織における超音波の波長の侵入の深さが減じられる。より大きな侵入深さが必要とされる医学的診断に関しては、約2.5MHz（約30cmの組織侵入深さ）～12MHz（約7cmの組織侵入深さ）の周波数範囲の超音波変換器が使用される。x - 方向又はx - 及びy - 方向（音ローブに対して垂直な平面）における空間解像度は、それらの場合、丸の横断面を有する単一結晶 - 超音波変換器を用いる場合、mm範囲で存在する。

40

【0042】

従って、変換器により放される音ローブにおける最も狭い点での音フィールドの厚さはまた、mm範囲で存在する。この理由のために、そのような超音波装置により解像され得る最小体積は約1 mm³である。物体、好ましくはバブルが超音波によりこの体積において破壊される場合、その対応するCSシグナルの正確な空間位置は、この体積内で正確には決定され得ない。従って、このシグナルは、mm範囲でまた存在する値で像において示される。少なくとも2つの物体、好ましくはバブルがこの体積において見出される場合、後者は、空間解像度の欠失のために、超音波装置によりもはや区別され得ない。従って、約1000よりも多くの物体（バブル）/mlの濃度の物体、好ましくはバブルが飽和をもたらす。これ

50

はまた、3D - Echotechの上記装置が、音フィールドの厚さが約 1 ~ 2mmの範囲であるので、物体、特にバブルを定量化するためには適切でない理由である。

【 0 0 4 3 】

この装置が物体、特にバブルの定量化の不適切でない理由である。この装置が物体、特にバブルの定量化のために不適切である事実のもう 1 つの理由は、変換器の手動的にガイドされ、その結果、試験下のいくつかの領域が数回、音波発生されるか、又は種々の程度のオーバーラップにより音波発生され、ところが他の領域はまったく音波発生されないことから成る。この問題はまた、3D - Echotechにより開発される変換器の電磁位置決定の可能性により解決されない。なぜならば、後者は、例えばmm範囲以下でのみ正確であるからである。

10

【 0 0 4 4 】

本発明によれば、既知の方法及び装置よりも有意に高い空間解像度が最初に可能にされる。同時に、計算され得る体積は基線として取られる。結果として、試験下の体積での物体、特にバブルの定量化はまた、飽和濃度/飽和バブル濃度が通常、限界を超える場合、最初に可能される。

Kretztechnik装置はまた、抽方向 (z) での音フィールドのオーバーラップが均等でないので、定量化のためには不適切である。非常に接近すると、隣接する音フィールドはほとんど完全にオーバーラップし、ところが変換器への距離が上昇すると、ギャップが進行し、これは続いて、補正される。これは、試験される組織におけるシグナル生成が変換器への距離に依存する結果を有する。

20

【 0 0 4 5 】

上記目的は、本発明により達成される。

本発明の方法の原理は、個々の超音波横断像における完全なバブル破壊の例において、特に単純に例示され得る：

図 4、5 b) 及び c) の助けにより、本発明の操作の態様は下記のように示され得る：

a) 第 1 の像においては、対比 - 飽和された超音波横断像が得られる (図 4) 。

b) バブルが照射により破壊される (図 5 a) 。次に、SAEシグナルは検出され得ない。独立した特徴的なシグナルを発するバブルは 6 として言及され；非励起断面層における破壊されていないバブルは 5 として言及されている。

【 0 0 4 6 】

c) 下記に、2 種の像間の音フィールドは、定義された移動距離により組織に対して置換され、その結果、試験下での目的物の照射された体積がお互いオーバーラップし、それにより両軸の縦軸はお互いに対して平行である。その縦軸は、音フィールドの中央を通して音の増強方向 (図 6 の方向 z ; 図 5 b) における上部から下部まで) に流れるラインとして定義される (これに関しては、また図 7 を参照のこと) 。従って、本発明に関しては、オーバーラップし、そして超音波横断像が得られる、2 つの層の平行したシフトとして、2 つの層の縦軸がお互い平行であることが提供され得る。

30

【 0 0 4 7 】

d) すべてのバブルが第 1 像において破壊される場合、新規バブルのみが第 2 像及び続くすべての像に検出され得る。例えば、10 μ m の試験下の目的物に対しての音フィールドの平行したシフトにおいては、これは、第 2 において新しく添加されるバブルが 10 μ m の層厚を有する体積に起因することを意味する。上記に定義されるような置換は平行な態様で行われ得るので、まだ破壊されていないバブルが、音形の形状に関係なく見出される体積の完全層厚は、拡張し、すなわち 10 μ m である。それらのまだ破壊されていないバブルは定量化され得る (図 5 b 及び c)) 。破壊されたバブルは、7 として言及される。

40

本発明の方法の原理はまた、破壊に関係なく、独立し且つ特徴的なシグナルを生成するために診断用超音波により励起され得るそれらの物体、好ましくはバブルのためにも使用され得る。そのようなシグナルは例えば、調和又は副調和シグナルであり得る。

【 0 0 4 8 】

ここで、前記方法は、SAEシグナルを伴っての方法に類似する：

50

バブルの場合：

- a) 第1像/第1層においては、すべてのバブルは破壊され、
- b) 続く像/層においては、バブルは励起され、その結果、それらの独立した特徴的なシグナルを発し、
- c) 累積走査距離が音フィールドの層厚以下であるか又は等しい限り、新しく添加されたシグナルは、個々の場合、個々の追加の像/個々の層において決定され、
- d) 累積走査距離が音フィールドの層厚よりも大きい場合、又はシグナル飽和が像/層において達成される場合、音フィールドに見出されるバブルは破壊される。

【0049】

固体粒子の場合：

10

- a) 第1像/第1層においては、固体粒子の独立した特徴的なシグナルは、励起の後、検出され得る；これは、例えば走査が粒子を有さない位置で開始されるか、又は走査の開始の前、変換器が、固体粒子の独立した特徴的なシグナルが、これが問題でない隣接する領域への励起の後、検出され得る領域から除去されることにおいて達成され得、
- b) 次の像/層においては、固体粒子が励起され、その結果、それらは独立した特徴的なシグナルを生成し、
- c) 累積走査距離が音フィールドの層厚以下であるか又は等しい限り、新しく添加されたシグナルは、個々の場合、個々の追加の像/個々の層において決定される。

【0050】

新しく添加されるシグナルの決定は、シグナルの放出が物体、好ましくはバブルの完全な破壊を伴わない場合、それぞれのこれまでの値を控除することによって、又は破壊するパルスに送った後、シグナルの単純な、好ましくは自動計数によって行われ得る。

20

独立した特徴的なシグナルが物体、好ましくはバブルの破壊により付随される場合、オーバーラップ領域のシグナルの数は、一般的に、SAEシグナルの場合におけるように、単純な、好ましくは自動計数により決定され得る。

【0051】

組織から10 μ mの平行した移動距離、及び1mmの音フィールドの層厚においては、横断像（断面層）が99%までオーバーラップする。第2の横断像においては、10 μ mの層に見出される、新しくは添加される物体、好ましくはバブルのみが検出される。

2種の像間のシフトの距離は、少なくとも5 μ m、好ましくは少なくとも10 μ m、及び特に好ましくは少なくとも20 μ mである。特に好ましい態様においては、移動距離は少なくとも50 μ mである。移動距離は、走査（約1～2mm）よりも短い。最適移動距離は、走査される体積における再考の物体濃度/ml、好ましくはバブル濃度/mlに依存する。20%～99.9%、好ましくは40%～99.9%及び特に好ましくは70%～99%の体積のオーバーラップを設定することが好都合である。

30

【0052】

移動距離が高過ぎるように選択されるか、又は超音波横断像がまったくオーバーラップしない場合（図5a）、絶対的定量化はまた、超音波横断像において、補正され得ないCSシグナルの重ね合わせが生じるので、本発明の方法により不可能である。

移動距離は、例えば長過ぎるように選択され得るか、又は超音波横断像は任意には、物体、好ましくはバブルの濃度の程度が過小評価される場合、まったくオーバーラップし得ない。それらの場合、超音波横断像当たりの移動距離は、絶対的定量化を確めるために減じられるべきである。図9～11は、移動距離と体型測定単位（MU）又は横断像における独立した、特徴的シグナルの数との間の関係を示す。

40

【0053】

物体、好ましくはバブルの濃度は好ましくは、個々の場合、横断像が20～80%、好ましくは30～70%の色の飽和を有するそれらのCS/SAE層厚さにおいて決定される。低められた試験時間のために、移動距離は、飽和バブル濃度がいずれかの横断像において到達されないまで、高められ得る。CS/SAE層厚を変更する定義されたプログラムが、試験時間と測定の正確性との間の最適な妥協性を提供することができる。プログラムにより制御される最

50

適移動距離は例えば、最適に大きな集団の患者（試験下の目的物）に基づいて、決定され得る。

【0054】

しかしながら、個々の対比 - 飽和された横断像が偶然に生じる場合、絶対的な定量化能力はもはや提供されない。しかしながら、非対比 - 飽和された横断像に対する定量化能力は、可能のまま存続する。

色彩飽和が試験領域中の一定領域に存在する場合、再生される測定は、本発明の方法の音フィールドの定義された平行シフト及びより高い空間解像度を伴って、標準化された走査方法により可能である。そのような測定は、例えば異なった患者間の比較のために、又は同じ患者における治療の間のモニターリングのために十分であり得る。

10

【0055】

すべてのバブルが横断像において破壊されるとは限らない場合、1又は複数の追加の破壊パルスがまた、次の位置に近づく前、伝送され得る。

断面層の体積のオーバーラッピング及び置換は、変換器及び試験下の目的物がお互いに対して（お互いに関して）シフトされることにおいて達成され得る。

【0056】

定義される平行置換が達成され得、ここで、

I. 組織又は試験下の目的物、例えば患者は、固定された変換器に対してシフトされ、又は

II. 変換器は、試験下での固定された目的物、たとえば試験されるべき組織に対してシフトされ、又は

20

III. 連続的にオーバーラップし、そして横断像を生成できる変換器が使用され、すなわち体積が変換器によりシフトされ、そしてオーバーラップが引き起こされ、それにより、変換器自体はオーバーラッピング及び平行 - シフトされた超音波像を受け；これに関しては、変換器は、オーバーラッピング及び特に交叉するようシフトされた超音波横断像又は断面層の音ローブが取られるように調節され得る。

【0057】

種々のシフト可能性がまた組み合わせられ得る。

例によれば、平行シフトの次の変法が記載され得る：

I. 試験下の目的物（患者、動物、除臓された又は単離された器官又は細胞培養皿）は、固定された変換器を通り越して自動的に移動される（例えば、サーボモーター又はDCモーターにより）。

30

【0058】

II. 変換器は、試験下の目的物（患者、動物、除臓された又は単離された器官又は細胞培養皿）上の又はそれに対する特定装置の助けにより自動的にシフトされる。装置は、フレームであり得、この内部に、変換器が保持装置により固定され、そしてモーターにより平行したガイドに沿って移動される。

最も単純な場合、個々の結晶は、定義されたオーバーラッピング領域によりx-及びy-方向にシフトされ得る。この変法は、例えば細胞の培養皿のために提供され、その表面上に、物体、特にバブルが特異的に蓄積しており、又はその内部に、物体が例えば、ファゴサイトーシスにより非特異的に蓄積されている。ここで、いかに多くの物体、特にバブルが表面領域又は体積当たりに蓄積しているかの言及は十分である。データは、像に転換されるべきではない。

40

【0059】

さらに、2D-アレイを含む変換器により、ライン内の隣接する音ローブが、走査を方向づけることによって、定義された態様で、交叉するような方向でのオーバーラップを引き起こされ得る。

【0060】

III. さらに、3D-アレイを含む変換器により、ライン内の隣接する音ローブが、走査を方向づけることによって、定義された態様で、交叉するような方向でのオーバーラッ

50

ブを引き起こされ得る。この変法においては、変換器又は試験下の目的物のもう1つの移動は、もはや必要ではない。

変換器はまた、定義されたオーバーラップを伴って、変換器内の交叉できるような方向（x-方向）で平行に移動される1D-アレイを含む。側面解像度は、横断像が構築される個々の走査線がまた、定義された態様でオーバーラップする場合、2D-断面像内で高められ得る。個々の場合、隣接するピエゾ要素のグループから生成される個々の音フィールドは、この場合、従来の対照に比較して強く、そして主に、選択される小さな段階幅（下方のピエゾ要素の方向）により、定義された態様でのオーバーラップを引き起こされる。

【0061】

これは図7に示され：個々のピエゾ要素11のアレイから、少数のアレイ要素を含んで成るピエゾ要素のより小さな領域12が、振動を生成するために励起される（図7a）。結果として、音ローブ9の形での音波が、試験下の目的物において発せられる。

10

音ローブ内に見出される、破壊されていないバブル8が破壊され、そして従って、独立した特徴的なシグナル9を放す。破壊されたバブルは、参照番号10により示される。次に、アレイのピエゾ要素の新しく形成されたグループは、1つのピエゾ要素によってのみ、第1の励起に使用されるグループと区別される振動を生成するために励起され、これにより、前記グループは現在、オフセットされる（図7b）。前もって放された音ローブによる、このようにして生成された音ローブのオーバーラッピングにより、新しく検出されるバブルは、独立した特徴的なシグナルを生成するために、単に励起される。

【0062】

20

変換器に対して交叉するような方向での定義されたオーバーラッピング走査におけるように、解像度は、置換がピエゾ-要素のグループの幅に存在する因子により高められる。

従って、変換器及び/又は試験下の目的物をシフトするために、少なくとも1つのモータードライブが、試験下の目的物又は少なくとも1つの変換器を、お互いに対してシフトするために供給される。

【0063】

変換器が試験下の目的物に対してシフトされる場合、後者は定義された手段で移動されるべきである。これに関しては、変換器のための移動可能保持装置が供給される。試験下の目的物は、保持装置に取り付けられる。もちろん、保持装置により固定し、取り付けるか、又は他の類似する結合により試験下の目的物を固定することは、絶対的に必要ではない。目的物は保持装置により実質的に固定して保持されることはまた十分である。例えば、患者は、試験の間、ソファ上に入れられ、この上で休息する。次に、そのような保持装置は、目的物が試験の間、除去されないで、むしろ変換器のみが除去される場合、及び試験下の目的物が除去され、そして変換器は除去されない場合、試験下の目的物を保持するために使用され得る。変換器及び試験下の目的物の両者がお互い同時に除去される場合、上記保持装置は試験下の目的物のために使用され得る。

30

【0064】

物体、好ましくはバブルを定量化するために、定量化がビデオ濃度計により実施され得る、データ処理及び像表示のための像評価システムが、好ましい態様において提供される。これに関しては、超音波シグナル組から形成されるデータ組が、既知手段により転換され、この結果、個々の断面層のビデオ像が生成され、それにより、個々の断面層は、前記励起された断面層（達成される新規断面層領域（CS/SAE層）の置換による）をオーバーラップしない領域からの情報を含む。次に個々のビデオ像において可視化される物体、特にバブルが手動的に計数されるか、又は色彩画素のビデオ濃度計測定、及びそれらから得られた値のバブル可視化当たりの色彩画素の平均数による割り算により得られる。

40

【0065】

物体、好ましくはバブルの数は上記方法に従って決定されたので、次の式：

【数 2】

$$MU_{corr} = \sum FP \times \left(1 + \frac{\sum FP}{\sum FP + \sum GP} \right)$$

10

【0066】

[ここで、FPは、オーバーラッピング層内の局部解像度を有するスクリーン可視化において、物体シグナル、特にバブルシグナルを可視化する色彩画素であり、そして

GPは、物体、特にバブルを可視化した画素ではない、局部解像度を有するスクリーン表示における灰色画素である]に従って補正を行うことが、数の補正された決定のために必要である。

【0067】

本発明の装置は、ヒト又は動物において、特に超音波診断及び/又は超音波療法のために適切である。

20

新規可能な研究達成方法は、臨床学的診断の領域においてのみならず、また、基本的な医学的及び生物学的研究及び前臨床学的研究及び開発においても開かれている。

物体、好ましくはバブルは、分子レベルで病理学的又は生理学的工程を解明するために、動物試験においてインビボで、除去される器官又は組織においてエクスピボで、及び例えば細胞培養においてインビトロで定量化され得る。

【0068】

活性成分の発見及び特異的結合システムの開発においては、試験は、本発明の方法により行われ得、これに関して、結合システムが完全に機能し、この結合分子は、影響変数が結合能力及び濃度、物体、好ましくはバブルが有する運動学、又は超音波 - 誘発された活性成分が、包入された活性成分をいかにして多く放出するかを決定する、点及び量での条件下で存在する。

30

【0069】

本発明の装置及び方法は、後 - 胚性固体発生（固体発生：自然な死まで、受精されていない/受精された卵母細胞からの独立した化合物の進行の完全性：後者は次の4期を含んで成る：1．胚の成長、2．後 - 胚性成長、3．性的熟性及び生殖の時間、及び4．老化の時間）から開始する、器官及び組織における生理学的に上方又は下方に調節できる分子マーカーのインビボマッピングのために使用される。

【0070】

これに関しては、受動的に及び活動的に蓄積する物体、好ましくはバブル使用され得る：このためには、物体は、表面上に見出されるマーカー（活動的に蓄積することができる物体/バブル）のための特異的結合分子を供給される。本発明の他の態様においては、受動的に蓄積する物体、すなわちそのような特異的結合分子を有さない物体/バブルがまた使用され得る。

40

【0071】

この方法に関しては、分子マーカーは、ヒト及び動物における異なった細胞上にインビボで位置し、そして固体発生に対するそれらの影響が決定され得る。

インビボでの全生物における既知の及び新しく同定された分子マーカーの時間 - 調節されたマッピングがまた行われ得る。結果として、インビボでの固体発生における分子マーカーのまだ知られている機能が決定され得る。

【0072】

50

老年医学に関しては、固体発生の第4期（老化の時期）における分子マーカー及び老化学工程に対するその影響の同定は特に好都合である。これに関して、本発明の高い空間的解像度ソノグラフィーにより、それは試験され得、この年齢から、それらの分子マーカーは起因し、そして後者がもたらされ、または、これに基づいて、それらの受容体が、年齢 - 誘発された変化又は全体の生物の疾病、及び医薬の開発のための発見がそれらに起因するか、年齢 - 誘発された徴候を緩和するか又はさらに、それらの回避を助けるかどうかを示す。

【0073】

本発明の装置及び方法のもう1つの好都合な使用においては、器官及び組織における生理学的に上方に又は下方に調節できる分子マーカーのインビボマッピングが、受動的に及び誘導的に蓄積され得る物体、特にバブルの使用により、病因の間、実施され得る。

10

この方法に関しては、疾病関連分子マーカーは、ヒト及び動物における異なった細胞上にインビボで位置し、そして従って、疾病の病因に対するそれらの影響がまた、インビボで決定され得る。

さらに、既知の及び新しく同定された疾病関連分子マーカーの時間 - 調節されたマッピングは、病因の間、全生物においてインビボで行われ得る。結果として、さらにまだ知られていない、病因における分子マーカーの機能が、インビボで決定され得る。

【0074】

また、新規治療用医薬及び/又は処理方法が、それらの発見から誘導され、その結果、一定時間で、細胞の決定された表面状態（活性化/休止位置に関する細胞の状態）が調節され、そしてそれらの状態は、本発明の方法により）追跡される。

20

上記方法はまた、除去された器官及び組織に対してエクスピボで行われ得る。

【0075】

もちろん、後 - 胚固体発生から出発して及び病因の間、器官及び組織における分子マーカーのインビボマッピングが、異なった動物型及び/又は動物モデルに対して、特に老年医学において、又は疾患モデルのために使用され得る。前記マッピングは一般的に、また、すべての動物型、例えば農業用動物、家畜及びペット、並びに野生動物及びヒトのためにも使用され得る。マッピングはインビボで使用され得るので、正確に時間の1点で分子マーカーを同定し、そして特徴づけることが必要である欠点の他に、しばしば関連する、時間 - 強調の及び高価な従来のインビトロ工程、例えば免疫組織化学を使用することが、多くの場合、不必要である。

30

【0076】

さらに、本発明の装置及び方法は、種々の起源の、例えば種々の培養条件下で細胞の上方に調節できる分子マーカーのインビトロマッピングによる細胞培養物の特徴づけるために、又は新規細胞系の特徴づけるために、又は特にマウス、ラット及び他の動物モデルにおける腫瘍細胞の移植において、種々の継代の後、又はその使用の直前、存在する細胞系の新規特徴づけのためにも使用され得る。この場合、動物及びヒト細胞の他に、植物細胞がまた、特徴づけられ得る。

また、この場合、物体、好ましくはバブルは、マーカーに対して特徴的である結合分子を供給される。

40

【0077】

使用のそれぞれの領域において分子マーカーを同定するためには、本出願の開示内容において引例として本明細書に包含される次の出版物が特に言及され、それにより、本明細書に記載される問題提示が本発明の装置及び方法により試験され得る：

1. Phelps, M.; "Positron Emission Tomography Provides Molecular Imaging of Biological Processes." Proc. Natl. Acad. Soc., USA 200, 97: 9226-9233.

2. Weissleder, R., "Molecular Imaging: Exploring the Next Frontier." Radiology, 1999, 212: 609-614.

3. Bremer, C., Tung, C.H., Weissleder, R., "In Vivo Molecular Target Assessment of Matrix Metalloproteinase Inhibition." Nat. Med., 2001, 7:743-748.

50

4 . Anderson, S.A., Rader, R.K., Westlin, W.F., など., “ Magnetic Resonance Contrast Enhancement of Neovasculature with Alpha β 3-Targeted Nanoparticles.” Magn. Reson. Med., 2000, 44: 433-439.

【 0 0 7 8 】

5 . Sipkins, D.A., Cheresch, D.A., Kazemi, M.R., Nevin, L.M., Bednarski, M.D., Li, K.C., “ Detection of Tumor Angiogenesis In Vivo by alpha V beta3-Targeted Magnetic Resonance Imaging.” Nat. med., 1998, 4:623-626.

6 . Bredow, S., Lewin, M., Hofmann, B., Marecos, E., Weissleder, R., “ Imaging of Tumour Neovasculature by Targeting the TGF- β binding Receptor Endoglin.” Eur. J. Cancer, 2000, 36: 675-681.

10

7 . Sipkins, D.A., Gijbels, K., Tropper, F.D., Bednarski, M., Li, K.C.P., Steinman, L., “ ICAM-1 Expression in Autoimmune Encephalitis Visualized Using Magnetic Resonance Imaging.” J. Neuroimmunol., 2000, 104:1-9.

8 . Lindner, J.R., Song, J., Christiansen, J., Klivanov, A. L., Xu, F., Ley, K., “ Ultrasound Assessment of Inflammation and Renal Tissue Injury with Microbubbles Targeted to P-Selectin,” Circulation, 2001, 104: 2107-2112.

【 0 0 7 9 】

10 . Klivanov, A.L., Hughes, M.S., Marsh, J.N., など., “ Targeting of Ultrasound Contrast Material: An In-Vitro Feasibility Study.” Acta Radiol. Suppl., 1997, 38: 113-120.

20

11. Demos, S.M., Dagar, S., Klegerman, M., Nagaraj, A., Mcpherson, D.D., Onyuk sel, H., “ In Vitro Targeting of Acoustically Reflective Immunoliposomes to Fibrin under Various Flow Conditions.” J. Drug Target., 1998, 5: 507-518.

12. Villanueva, F.S., Jankowski, R.J., Klivanov, S., など., “ Microbubbles Targeted to Intercellular Adhesion Molecule-1 Bind to Activated Coronary Artery Endothelial Cells.” Circulation, 1998, 98: 1-5.

【 0 0 8 0 】

前記装置及び方法は、物体、好ましくはバブルの定量化能力及び従ってまた、下記のことを可能にするか又は支持する：

- 腫瘍段階の決定、
- 腫瘍の程度、
- 例えば、化学療法の場合における治療の間のモニターリング、
- 再生能力、及び従って、異なった試験者の発見を比較する能力の上昇、
- 患者に負担を与える生検の回避、
- 超音波像において可視化されるCSシグナルが起因する層厚の低下、これにより、 μ m

30

範囲内での高い空間的解像度を伴って、mm範囲でのバブル濃度フィールドが映像化され、そしてバブル濃度に対して定量化される。

【 0 0 8 1 】

物体、特にバブルは一般的に、超音波コントラスト媒体に含まれ、そして好ましくは、懸濁液の形で投与される。

40

【 0 0 8 2 】

原則的に、超音波コントラスト媒体としての使用のために適切であるすべての物体、特に（微小）バブルが、CS効果を生成するために、診断用超音波により励起され得る。ガラクトース及びパルミチン酸からの微粒子を含み、そして水が添加された後、安定化されたガスバブルの懸濁液を生成する、市販の超音波コントラスト媒体Levovist（商標）（Schering AG, Berlin）に関しては、CS効果がまた、肝臓における非特異的濃度の後、観察された（Blomley, M. J.など.: “ Stimulated Acoustic Emission to Image Late liver and Spleen-Specific Phase of Levovist in Normal Volunteers and Patients With and without Liver Disease”, Ultrasound Med. Bio., 1999 November: 25 (9): 1341）.

【 0 0 8 3 】

50

ガス充填されたマイクロカプセル又はガス充填された微粒子（このシェルはポリアルキルシアノアクリレートから成る）の形でバブルを含む特定の超音波コントラスト媒体は、本発明のために好ましい。後者は、EP064477B1号、特に例に記載されている：次に、シアノアクリル酸アルキルエステル、例えばシアノアクリル酸ブチルエステルが、さらに界面活性剤を含む酸性水溶液に分散される。生成される微粒子が遠心分離により得られる。W001/68150A1号に記載される方法に従って生成される、官能化されたポリアルキルシアノアクリレートを含むバブルが特に好ましい。従って、そこに記載される方法は、本出願の開示内容中に組み込まれる。本発明に従って好ましいバブルの生成に関しては、W001/68150A1号に記載されるポリマーが使用される。従って、バブルの生成のためのそれらの出発物質はまた、本出願の開示内容において明確に記録される。

10

【0084】

本発明の方法はまた、種々の型の物体、好ましくはバブル型を含む超音波コントラスト媒体のためにも使用され得る。

前記物体は、次の特徴の少なくとも1つにおいて変化することができる：

- 固体材料の型、
- サイズ、
- それらの表面上での結合分子、
- 種々のパルス形による励起能力、
- 音による破壊能力、
- 特徴的シグナルの型、
- 物体/バブルにおけるガスの型、
- 物体/バブルのシェルの型、例えば材料の厚さ、弾性。

20

【0085】

例えば、試験下の目的物におけるようなバブル混合物又はその分布パターンが、より高い空間的解像度を有する本発明の方法により定量化され得る：

a) お互い後部の位置で伝達される種々のパルス形及び/又は受容される種々の特徴的シグナルによる；この場合、これは、バブルの完全な破壊をもたらすのみならず、また、破壊パルスが次の位置に移動する前、伝達され得、又は

b) 相応じて定義されたシフトを伴って、数度、走査され、試験されるべきフィールドによる；これにより、個々の走査は、それぞれの型のバブルに必要であるもう1つのパルス形により行われる。

30

【0086】

種々のパルス形、及び種々の音フィールドシフトの両者は、その音フィールドの得られるオーバーラップが定義され、そしてそれらの空間的拡張に関して計算できる態様で行われるまで、及び使用されるバブルが特徴的シグナルに基づいて検出され得るまで、お互い組み合わせられ得る。

バブルが、試験領域における結合部位のインビボ、エクスピボ及びインビトロ分散性を決定するために、表面上の結合分子及び音によるそれらの破壊能力において、同時に区別される場合、方法は次の通りであり得る：

【0087】

a) 次の2種の異なったタイプのバブルが注入される：

i. 低い音圧力により、及び表面上のインビボ結合部位Xに対する結合分子抗-Xにより破壊され得るバブル型A、及び

ii. 高い音圧力により、及び表面上のインビボ結合部位Yに対する結合分子抗-Yにより破壊され得るバブル型B。

b) 計算された位置へのアプローチ、

c) 低音圧力による1又は複数の像の記録、及びデータ貯蔵、

d) 高音圧力による1又は複数の像の記録、及びデータ貯蔵、

e) 音フィールドの定義されたシフト、

f) 走査の最後まで、段階c) - e)の反復、

40

50

g) 結合分子X及びY、モニター及び貯蔵に基づくそれらのインジケーターについてのデータの評価。

【0088】

上記変法のすべてにおいては、飽和バブル濃度は、個々の場合、2種の像又は音ロープ間の距離が完全な音フィールドの層厚に関する倍率、高められる。10 μ mのシフト及び1mmの層厚の場合、飽和バブル濃度は、100倍、高められる。同時に、新しく添加されたバブルが起因する組織の層厚は同じ倍率、低められる。

従って、組織学的解像度が達成され得る。この原理はまた、インビボで適用され得るので、“インビボ音 - 組織学”又は特定のバブル蓄積の場合、可視化されたシグナルに関してソノグラフ“インビボ免疫 - 組織学”を言及することが可能である。

10

【0089】

測定されたMUはまた、次の通りに、診断のためにも評価され得る：

A. CS/SAE層厚、及び治療の間の個々内のモニターリングのために一定に保持される用量での測定されたMUの比較。

B. 1) できるだけ大きな集団に基づいてのCS/SAE層厚及び/又は特定の測定窓（肝臓、腫瘍表面領域、血管の内皮、等）における用量に対する測定されたMUに依存性の第1の決定。前記集団は、測定窓におけるバブルの分散及びその濃度の程度に関して区別されない個人から成り、すなわちそれは同種であるか又は他に、これに関しては、グループ分けされている。それらの依存性は一般的に、種々の超音波装置（変換器、検出モード、等）で決定されるべきである。

20

【0090】

2) 20～80%、好ましくは30～70%の色彩飽和での線状相関関数の決定。

3) 任意には、超音波装置の評価ソフトウェアへの前記線状相関関数の組込み。

4) 試験下の目的物、例えば患者のその対応する測定窓におけるCSシグナルの計数。

5) 前記線状相関関数に基づいて、色彩飽和が線状相関関数の範囲にある場合、患者の特定の測定窓におけるバブルの絶対数又はバブル濃度の決定。

【0091】

C. 1) できるだけ大きな集団に基づいてのCS/SAE層厚及び/又は特定の測定窓（肝臓、腫瘍表面領域、血管の内皮、等）における用量からの計数された絶対シグナルの依存性の第1の決定。前記集団は、測定窓におけるバブルの分散及びその濃度の程度に関して区別されない個人から成り、すなわちそれは同種であるか又は他に、これに関しては、グループ分けされている。それらの依存性は一般的に、種々の超音波装置（変換器、検出モード、等）で決定されるべきである。

30

2) 曲線適合の実施、それぞれの曲線により記載される相関関数の決定。

3) 任意には、超音波装置の評価ソフトウェアへの前記線状相関関数の組込み。

4) 患者のその対応する測定窓におけるCSシグナルの計数。

5) 前記線状相関関数に基づいて、患者の特定の測定窓におけるバブルの絶対数又はバブル濃度の決定。

【0092】

本発明は、次の例により確められるべきであるが、それらは本発明を制限するものではない。このために、下記に図が説明される。

40

さらなる詳細を伴わないで当業者は、前述の記載を用いて、本発明をその十分な程度、利用できると思われる。従って、次の好ましい特定の態様は、単なる例示であって、本発明を制限するものではない。

前述及び次の例において、すべての温度は、特にことわらない限り、 $^{\circ}$ Cで示され、そしてすべての部及び%は重量によってである。

【実施例】

【0093】

例1. 1ml当たり30,000のバブルを含む転換シルエット

(a) バブルの生成：

50

バブルを、例 4 (a) に従って生成する。

【 0 0 9 4 】

(b) 1 m l 当たり 30,000 のバブルを含む寒天シルエットの生成：

665ml の水 (Ampuwa (商標), Fresenius) を、ポイラー (Braun, Type32WK210) において煮沸し、そして 1000ml のピーカーに移した。1.7g の安息香族 (Merck) を、保存するために添加し、そして 10g の寒天 (Merdu) を、攪拌しながら添加した。寒天溶液を、電子レンジ (Bosch HMT702C, 8000W) において再び煮沸し、そして油に、40 に冷却した。

バブルが寒天溶液に添加される前、バブル濃度を、0.02% (m/m) の Triton X100 溶液により、 6×10^8 個のバブル/ml に調節した。それからの 33 μ l (2×10^7 個のバブル) を、空気バブルを導入しないで、寒天溶液中に注意して攪拌した。次に、その寒天溶液を、ゲル (寒天シルエット) として固化されているガラス皿 (14cm $\times$ 19cm $\times$ 4cm) 中に注いだ。 10

【 0 0 9 5 】

(c) 実験設定及び実施：

前記寒天シルエットの約 4cm のストリップを、水により満たされたプラスチック深皿中に配置した。変換器 (L 10-4, ATL UM9, 色ドップラーモード、MI : 1.1、持続性 : 0、優先 : 最大、色彩ボックスのサイズ : 最大、侵入深さ : 3cm、焦点 : 2cm) を、それが水に浸没されるような手段で、前記シルエットを通して支持スタンドに垂直に固定した。

【 0 0 9 6 】

深皿を、前記シルエットと共に、

1 . 約 1mm/フレームの移動距離に対応する、約 2cm/秒の速度で変換器を、交叉するような方向に手動的にシフトするか、又は 20

2 . サーボモーター (Lines 150, OWIS GmbH, Motorコントローラー DC500) 上に固定し、そして固定された変換器下で異なった速度で自動的に移動した。速度を、この場合、5.8 の像/秒の超音波装置の与えられた像速度及び寒天シルエットの連続運動を考慮することによって、像当たりの次の移動距離をもたらすよう選択した : 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μ m/フレーム。このために必要である速度 (μ m/秒) を、次の通りにして計算した：

速度 (μ m/秒) = 移動距離/像 (μ m/フレーム) $\times$ 超音波装置の像速度 (フレーム/秒)

。

【 0 0 9 7 】

(d) SAE シグナルの定量化：

生成されたビデオ像を、QuantiCon (商標) (Echotech 3D Imaging Systems GmbH) を用いてビデオ濃度計により次の通りにして評価した：

走査の間、ビデオ像を、超音波装置 (5.8 像/秒) (QuantiCon) により提供される像属性に対応するサンプル速度でデジタル化した。このためには、172ms (1000ms/5.8) のトリガー遅延を、QuantiCon 中にあらかじめ入力した。

【 0 0 9 8 】

SAE シグナルから着色されたノイズシグナルを分離するために、最初に、40 の限界値を、3D - データ記録の評価の前、着色のために定義した。この限界値以上に残る “ セグメント化された着色 ” (40 ~ 255) を、評価のために使用した。図 8 は、QuantiCon における 3D データ記録から生成されるように、走査された寒天シルエットの 3D - 図を示す。灰色値の画素数及びデータ記録のすべての像のセグメント化された着色力の画素数の両者を獲得し、そしてさらに、MS-Excel (商標) (Microsoft) により処理した。 40

セグメント化された着色力 (MU) の MS - Excel (商標) において製造されたダイアグラムを、SAE 層厚に基づいて図 9 に示す。 “ 補正された MU ” 下で定義される補正式に対応して、それぞれ個々の着色力を補正した。その得られる SAE 層厚に対する依存性を図 10 に示す (MU_{corr}) 。

【 0 0 9 9 】

セグメント化された着色力の合計を個々の SAE シグナル又は個々のバブルに転換するために、第 1 の計算因子 F_{sac} を決定した。このためには、最初に、SAE シグナルの合計を、 50

手動的に計数することにより、20の横断像において決定した。次に、セグメント化された色彩画素の合計を、その対応する像において手動的に計数されるSAE効果の合計により割り算した。SAEシグナル当たり44の色彩画素の平均値を決定した。そのMUcorr. の因子により、補正されたSAEシグナル (SAEcorr.) の数に転換されるダイアグラムを、図11に示す。

【 0 1 0 0 】

表 1 は、図 9 ~ 11が基づくデータを列挙する：

【表 1】

表 1：

	SAE層厚 [μm /フレーム]									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
色彩飽和[%]	9	21	37	52	64	75	81	87	91	93
MU	828	1.944	3.433	4.813	5.934	6.904	7.489	8.015	8.402	8.591
±	260	345	402	430	441	316	292	243	183	158
Mu _{corr.}	909	2.366	4.728	7.343	9.771	12.081	13.577	14.982	16.055	16.591
±	309	492	706	876	1.004	787	763	663	517	451
SAE/フレーム	19	44	78	109	135	157	170	182	191	195
±	6	8	9	10	10	7	7	6	4	4
SAE _{corr.} / フレーム	21	54	107	167	222	275	309	341	365	377
±	7	11	16	20	23	18	17	15	12	10
バブルの数/ml	12.233	14.363	16.912	17.779	17.536	17.004	15.810	14.805	13.796	12.695
±	3.844	2.549	1.982	1.589	1.304	777	617	450	301	234
バブル _{corr.} の数 /ml	13.438	17.483	23.291	27.128	28.877	29.753	28.662	27.674	26.361	24.516
±	4.566	3.632	3.476	3.236	2.967	1.938	1.610	1.224	848	667

【 0 1 0 1 】

30 ~ 70 μm の SAE 層厚 (約 37 ~ 81% の色彩飽和) 間の曲線領域は、線上相関関数により記載され得る。0.990 の相関係数は補正されていない MU のためであり、又は 0.996 の相関係数が補正された MU/SAE のためである。

線状相関におけるこの領域外の点がまた、考慮される場合、相関係数は、MU に関して、0.971 又は補正された MU/SAE に関して、0.981 になる。

【 0 1 0 2 】

(e) 結果：

(a) 手動的にシフトされるシルエットにより生成されたすべての像、及び約 1mm/フレームの移動距離は、SAEシグナルにより完全に飽和される。飽和バブル濃度は限度を越え

10

20

30

40

50

、そして定量化は不可能である。

(b) 音フィールドのオーバーラッピングを伴っての自動シフトにおいては、個々のシグナルのみが $10\mu\text{m}$ /フレームのシフトにより検出された(図8)。速度が早まると、SAEシグナル/フレームの数が高まる。 $100\mu\text{m}$ /フレームのシフトでの開始のみが、像結果における色彩飽和をもたらした。

従って、 $100\mu\text{m}$ の層厚を伴っての30,000バブル/mlのバブル濃度が、SAE飽和をもたらす。これから、約3,000バブル/mlの飽和バブル濃度が、1mmの層厚に関して結論づけられ得る。

【0103】

(f) 議論：

通常使用される走査方法とは対照的に、3,000バブル/ml以上のバブル濃度でのバブル定量化自体は、本発明の方法により可能である。

変換器からの目的物の定義されたオーバーラッピングシフトにより、個々の横断像において、オーバーラップしない体積からの新しく添加されたバブルのみが検出される。従って、像当たりのそれぞれの移動距離におけるSAE層厚は減じられ得る。飽和バブル濃度は、音フィールドの実際の層厚が移動距離又はSAE層厚を表す比で高められる。像から像への $10\mu\text{m}$ のシフトは、空間的解像度、及び1mmの音フィールドの層厚で100倍、飽和バブル濃度を同時に高める。

【0104】

例2. ラットの肝臓における非特異的に濃縮されたバブルのエキスピロ定量化

(a) バブルの生成：

バブルを、例4(a)に従って生成した。

(b) 試験：

2匹のラット(Wistar SCHOE, 220g, 雌)を試験した。a)に従って生成された、種々の用量のバブル懸濁液を、ラットの尾の静脈にi.v. 注入した。ラット1に関しては、 1×10^8 バブル/mlの希釈溶液を生成し、そしてラット2に関しては、0.02%のTriton $\times 100$ を含む0.9% NaCl溶液中、 1×10^7 バブル/mlの希釈溶液を生成した。

【0105】

ラット1： 1×10^8 バブル/kg (1×10^8 バブル/ml、 $220\mu\text{l}$ i.v.)

ラット2： 1×10^7 バブル/kg (1×10^7 バブル/ml、 $220\mu\text{l}$ i.v.)

注入の30分後、ラットを、Rompun(商標)2% (20mgのキシラジン/ml)及びKetavet(商標)100mg/ml (100mgのケタミン塩基/ml)から成る1:1の体積比の混合物/mlのi.p. 注射により殺害した。

肝臓の右葉を、個々の場合、除去し、そして0.9%(m/m)の塩化ナトリウム溶液により満たされた容器中に置いた。

【0106】

前記肝臓の右葉を含む容器を：

1. 約1mm/フレームの移動距離に対応する、約2cm/秒の速度で変換器下の交叉するような方向に手段的にシフトするか、又は

2. セルボモーター(Limes 150, OWIS GmbH, Motor コントローラーDC500)上にセットし、そして固定された変換器下で種々の速度で自動的に移動し；速度を、5.8の像/秒の超音波装置の所定の像速度及び容器の連続運動を考慮することによって、像当たり次の移動距離がもたらされる手段で選択した：

【0107】

ラット1 (1×10^8 バブル/kg)：15, 20, $30\mu\text{m}$ /フレーム、

ラット2 (1×10^7 バブル/kg)：20, 40, 80, $120\mu\text{m}$ /フレーム。

超音波研究を、同じ装置設定を用いて、例1に類似して行った。肝臓を、変換器上に、2cmの距離で移動した。すべての測定に関して、同じROIを使用した。ROIの値(約 $2\text{mm} \times 6\text{mm}$ 、超音波装置の規模で測定される)を、すべての評価された像において、ROIが肝臓組織の領域に完全に向けられるような手段で選択した。すべての測定においては、同じ拡大が

10

20

30

40

50

Quanticon (商標) において選択された。

【0108】

目的物の長さ (mm) に対するスクリーン画素の比を決定するために、2mmの縁長の二次ROI (超音波像に示される縦の測定尺度に基づいて決定された) を、超音波像において測定した。このためには、像を、Quanticon (商標) に存在する拡大機能により相応じて拡大した。これから、EINBETTEN 56.25画素/mm² (225/4) の比を計算した。最終的に、肝臓 1 ml 当たりのバブル濃度を、測定された体積 (ROIの表面積 × 移動距離 / フレーム) を通して計算した。組織におけるバブル濃度Cにおける生データ (FP、GP及びS) を転換するために、次の式を用いた：

【0109】

10

【数3】

$$C = 1000 \times \left(\frac{\sum FP \times \left(1 + \frac{\sum FP}{\sum FP + \sum GP} \right)}{Fsae \times S \times \frac{\sum GP + \sum FP}{Ff}} \right)$$

20

【0110】

式中、C：(バブル/ml) 又は (SAEcorr./ml) でのバブル濃度、

S：2種の像間でのSAE層厚又はシフト (mm)、

FP：示されるSAE効果の領域における測定窓 (ROI) の内部に存在するスクリーン画素、

GP：示されるSAE効果の外部の測定窓 (ROI) の内部に存在するスクリーン画素、

Σ sae：超音波像において示されるSAEシグナルの合計：

30

Fsae：Σ FP / Σ sae，

Ff：mm²でのすべてのスクリーン画素の合計 (超音波像において示される縦方向尺度に基づいて測定される)。

【0111】

(c) 結果：

表2は、ラットのバブル濃度を比較し、そして対比する。さらに、表2は、それぞれのSAE層厚の場合、%色彩飽和の平均値を含む。

【0112】

【表 2】

表 2 :

	SAE層厚 [μm /フレーム]			
ラット 1 $1 \times 10^8/\text{kg}$	15	20	30	
バブル濃度 [バブル/ml]	43.288 ± 17.381 ($n=88$)	54.267 ± 16.371 ($n=127$)	60.498 ± 10.113 ($n=88$)	
色の飽和 [%]	33	49	72	
ラット 2 $1 \times 10^7/\text{kg}$	20	40	80	120
バブル濃度 [バブル/ml]	2.557 ± 4.581 ($n=71$)	5.791 ± 6.355 ($n=80$)	14.826 ± 4.410 ($n=53$)	15.562 ± 1.881 ($n=42$)
色の飽和 [%]	3	13	53	74

10

20

【0 1 1 3】

1. 手動的にシフトされる、肝臓により生成されるすべての像、及び約1mm/フレームの移動距離を、SAEシグナルにより完全に飽和した(図12a, 図13a)。飽和バブル濃度は限界を越え、そして定量化は不可能であった。

2. 音フィールドのオーバーラッピングを伴っての自動シフトにおいては、定量化できる数のSAEシグナルを、20~120 μm /フレームのSAE層厚でラット1(用量: 1×10^8 バブル/kg)において(図12b: SAE層厚: 20 μm)及び10~30 μm /フレームのSAE層厚でラット2(用量: 1×10^7 バブル/g)において(図13b: SAE層厚: 20 μm)検出した。速度の上昇で、フレーム当たりのSAEシグナルの数はまた上昇した。

30

【0 1 1 4】

3. ラット1の場合、1,000の線状相関係数を、SAE層厚に対する補正されていないMUの依存性について計算した(図14)。15 μm ~30 μm のSAE層厚に対する補正されたMU(MUcorr.)又は補正されるSAE(SAECorr.)の依存性の線状相関係数は、好ましくは約0.995であった(図15及び16)。

4. ラット2においては、0.984の線状相関係数を、SAE層厚に対する補正されていないMUの依存性について計算した(図17)。20 μm ~120 μm のSAE層厚に対する補正されたMU(MUcorr.)又は補正されるSAE(SAECorr.)の依存性の線状相関係数は、好ましくは約0.995であった(図18及び19)。

40

5. バブル数は、SAE層厚に対して線状比で存在する。

【0 1 1 5】

(d) 議論:

本発明の方法はまた、バブルが非特異的に蓄積する、除去される器官に使用され得る。横断像に示されるSAEシグナルの数とその対応するSAE層厚との間に狭い相関性が存在する。試験下のラットの肝臓におけるバブル濃度は、投与される用量に基づいて明確に区別される。

50

【0116】

例3. マウスのF3-Ter Atomにおける特異的に濃縮されたUSKMのインビボ定量

例1の方法に従って、表面抗-CD105-抗体が結合された、特異的バブルの蓄積を、インビボでのi.v.注射の後、F9-腫瘍-担持のマウス(Swissヌード)の腫瘍において試験した。対照物質として、表面IgG2a-抗体(アイソタイプ対照)が結合されているバブルを用いた。

【0117】

(a) 特異的バブルの生成：

特異的バブルを、例4(a)~4(e)に従って生成し、そして特徴づけた。抗体結合を、例4(f)に従って行った。

10

(b) アイソタイプ対照の生成：

アイソタイプ-対照バブルを、例4(a)~(e)に従って生成し、そして特徴づけた。アイソタイプ結合を、例4(g)に従って行った。

【0118】

(c) 腫瘍接種：

培養において副集密的に増殖されたF9-腫瘍細胞を、トリプシン処理し、遠心分離し、そして $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ と共にPBSに再懸濁した。トリプシンプルーによる染色及び細胞濃度の計算の後、細胞懸濁液を、 6×10^7 細胞/mlの濃度で設定した。その細胞懸濁液を、それを使用するまで、氷上で冷却した。10匹の雌ヌードマウス(Swissヌード、18~20gの体重)を、動物当たりそれぞれ50 μl のこの細胞懸濁液($= 3 \times 10^6$ 細胞/動物)により、Hamilton注射器及び27Gのカニューレを用いて、左横腹の領域に皮下接種した。

20

【0119】

腫瘍の増殖(長さ及び幅)を、スライド規則による測定により制御し、そして腫瘍の体積を、次の式に従って決定した：

$$L \times B^2 / 2$$

式中、L：長さ(mm)；B：幅(mm)。

動物を、腫瘍接種の12~14日で試験した。この試験においては、この時点での腫瘍サイズは、230~1600 mm^3 であった。

【0120】

(d) 特異的バブル及びアイソタイプ対照の適用：

30

蠟質状態で特異的バブル(例4(a)~(e)に従って生成され、そして特徴づけられる)及び例4(f)に従って結合する抗体を含む超音波コントラスト媒体を、kg体重当たり $1 \sim 10^9$ バブルの用量(それぞれ20gのマウスに関して、例4(g)に従っての懸濁液200 μl に対応した)で、4匹のマウス中に、i.v.注射した。特異的バブルは、ガス充填された微小カプセルであり、このシェルは、官能化されたポリブチルシアノアクリレートから成り、そして抗-CD105-抗体をそれらの表面に結合した。

【0121】

対照物質として、四匹の追加のマウスを、非特異的バブル(例4(a)~(e)に従って生成され、そして特徴づけられる)及び例4(g)に従って結合するアイソタイプを含む超音波コントラスト媒体により同じ手段で注射した。非特異的バブルは、ガス充填されたマイクロカプセルであり、このシェルはまた、官能化されたポリブチルシアノアクリレートから成るが、しかしIgG_{2a}(アイソタイプ対照)は、それらの表面に結合された。

40

すべての動物の腫瘍を、例1の方法により、濃度の程度に関して、それぞれの超音波コントラスト媒体の投与の60分後、試験した。

【0122】

(e) 超音波試験：

試験のために、マウスを、Rompun(商標)2%(20mgのキシラジン/ml)の希釈溶液(1+9)及び100mg/mlのKetavet(商標)(100mgのケタミン塩基/ml)の希釈溶液(1+4)(それぞれの場合、生理食塩溶液中)から成る1:1体積の混合物により麻酔した。この麻酔混合物から、20gのマウス当たりそれぞれ200 μl をi.p.注射した。

50

【0123】

マウスを、サーボモーター（Limes150, OWIS GmbH, Motor コントローラーDC500）の移動可能部分に結合されたキャリアーに、接着剤ストリップにより固定した。サーボモーターを、マウスを有するキャリアーが水深皿（四角のプラスチックフラスコ）中に拡張するような手段で支持スタンドにより垂直に調節した。個々の走査の前、水深皿を、37 に調節された新鮮な水により充電した。変換器（L10-5、ATL UM9）は、結合ゲルにより供給され、そして水深皿の側壁に対して水平な支持スタンドにより重ねられた。可視的に且つソノグラフィ的にモニターしながら、マウスを、腫瘍が音フィールドに出現する点で水深皿中を移動した。空気バブルが皮膚に付着する場合、後者は、皮膚上の液体石鹼により被覆された、丸くて、曲がったワイヤを注意して伸ばすことにより除去された。

10

【0124】

次に、マウスを、数ミリ引き戻した。走査の前、必要な装置設定を、超音波装置（色ドップラーモード、MI：1.1、持続性：0、優先：最大、侵入深さ：3cm、焦点：2cm）に対して行った。走査を、フレーム当たり285 μm の一定SAE層厚で行った。この場合、腫瘍は、焦点の領域に存在する。走査の後、像を“凍結し”、その結果、変換器はいずれのシグナルも伝達しなかった。マウスを出発位置に引き戻した。変換器を再び、スイッチを入れ、そして動物を再び、同じ装置設定及び同じSAE層厚で走査した。第2走査は、SAEシグナルにより引き起こされなかった、及び対照値として使用された色彩シグナルを同定するために必要とされた。そのようなシグナルは、血液又はより大きな空気バブルを流動することによって生成され得る。

20

【0125】

本明細書において使用された麻酔においては、動物の呼吸速度は一般的に、運動の人口産物を伴わないで呼吸についての小休止内で使用されるSAE層厚において約3cmの走査を行うことができるほど十分に低かった（図20b）。長い試験時間（例えば、薄いSAE層厚を有する）の場合、又は高い吸収速度で、呼吸人口産物は次の通りにして回避され得る：

a）少なくとも腫瘍サイズを有するプラスチックキャリアー上に動物を固定し、その結果、腫瘍はそのくぼみに配置され、

b）動物の呼吸運動の測定（例えば、ワイヤー - 歪ゲージ、力学的圧力測定工程、等を用いての）、及び超音波装置及びサーボモーターの両者を調節するためのトリガーシグナルの使用。

30

【0126】

（f）評価：

横断像を走査方向に生成し（図20b）、そして後者を同じ尺度で、測定された値のその対応するダイアグラム上に重ねた（図20b）。腫瘍内の着色されたスクリーン画素の合計を、Quantican（商標）（3D-Echotech）により評価した。評価に関しては、腫瘍に存在する色彩シグナル（ MU_{pp} ：20）のみが考慮され、そして灰色シグナル（ MU_{GP} ：21）は考慮されなかった。図20a/bに示されたライン16及び17は、第1走査の間、腫瘍領域の限界を定める。第2走査の領域は、ライン18と19との間に示されている。

さらに、詳細には、参照番号20は色彩シグナル（ MU_{FP} ）を意味し；参照番号21は灰色シグナル（ MU_{GP} ）を意味し；参照番号22は MU_{FP} 及び MU_{GP} 又は組織体積の合計を意味する。

40

【0127】

（g）結果：

アイソタイプ対照に関しては、相当に少ない色彩シグナル（MU）が腫瘍において測定された（図21）。

（h）議論：

結果は、本発明の方法がまた、生存生物における特異的に蓄積されるバブルを定量化するためにも適切であることを示す。有意な差異が、最大の空間的解像度により走査されない場合、本発明の自体の方法により検出され得、そしてSAE飽和は、いくつかの横断像のいくつかの領域をもたらす。特異的バブル濃度におけるシグナルの数は、血管系の残留シグナル及び/又は非特異的バブル濃度のシグナルから区別され得る。

50

【 0 1 2 8 】

例 4 . 超音波コントラスト媒体の生成

(a) マイクロカプセル懸濁液の生成 :

円柱状の鋼製反応器 (内径 : 高さ = 37cm、直径 = 29cm) において、1% (m/m) オクトキシノール溶液 7 L を、2.5 の pH で導入し、そしてミキサー (溶解機ディスク : 直径 = 60mm、攪拌シャフト : 長さ = 30cm、浸没角度 = 10 °) により、高い剪断グラジエント (4000rpm) で混合し、そして調整し (溶液の温度 = 32 °)、その結果、自己ガス抜き (すなわち、強い気泡形成を伴って、分散により生成される媒体中への空気の導入) が生じた。

【 0 1 2 9 】

100g のシアノアクリル酸ブチルエステルをすばやく添加し (3 分以下)、そして分散した (添加の前、ミキサーの回転速度は 8,000rpm に高められた)。それを 60 分間、自己ガス抜きにより重合せしめ、それにより、ガス充填されたマイクロカプセル (本出願に基づく定義に関しては、パブル) を形成した。球形の分離用漏斗において、浮遊する材料を、重力場において 3 日間、分離し、上清液を排水し、そして浮遊する材料を、0.02% (m/m) のオクトキシノール水溶液 3L により再懸濁した。このようにして得られたマイクロカプセル懸濁液は、9.46mg/ml のポリマー含有率、0.943g/m の密度及び 3.5 の pH を有した。

【 0 1 3 0 】

(b) ガス充填されたマイクロカプセルの粒子サイズ及び粒子濃度 :

例 4 (a) に従ってのマイクロカプセル懸濁液の粒子サイズ分布を、Particle Systems Company, AccuSizer 770 タイプ (測定媒体 : 0.02% (m/m) Triton X100 水溶液) の粒子カウンターにより決定した。体積 - 計算された粒子サイズ分布は、0.8 から 10 μ m に拡大し、そして最大 1.8 μ m であり、そしてマイクロカプセル濃度は、1 ml 当たり 7.2×10^9 ($\pm 1 \times 10^8$) 個の粒子であった。

【 0 1 3 1 】

(c) 部分的側鎖加水分解によるガス充填されたマイクロカプセルの官能化 :

例 4 (a) のマイクロカプセル懸濁液 2500 g を、 8×10^{-2} モル / l の濃度の水酸化ナトリウム溶液 501 g と共に、攪拌しながら混合した。12 の pH を、反応バッチにおいて設定した。それを、室温で 20 分間、攪拌した。次に、pH を、1N の塩酸により 3.5 に設定した。

【 0 1 3 2 】

(d) ガス充填されたマイクロカプセルの粒子サイズ及び粒子濃度 :

例 4 (a) に従ってのマイクロカプセル懸濁液の粒子サイズ分布を、Particle Systems Company, AccuSizer 770 タイプ (測定媒体 : 0.02% (m/m) Triton X100 水溶液) の粒子カウンターにより決定した。体積 - 計算された粒子サイズ分布は、0.8 から 10 μ m に拡大し、そして最大 1.8 μ m であり、そしてマイクロカプセル濃度は、1 ml 当たり 6.0×10^9 ($\pm 1 \times 10^8$) 個の粒子であった。

【 0 1 3 3 】

(e) 官能化されたガス充填されたマイクロカプセルに対するストレプトタビジンの結合 :

例 4 (c) のマイクロカプセル懸濁液を、0.02% (m/m) の Triton - X100 溶液 (pH = 4.5、塩酸により設定される) からの少なくとも 5 倍の浮選により精製した。精製された懸濁液の 7.5×10^8 個の粒子を、シンチレーションバイアルにおける酢酸ナトリウム緩衝液 15ml 添加し、そして磁気攪拌器上で攪拌した。(酢酸ナトリウム緩衝液 = 溶液 A : 1.36g の $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, M = 水 500ml 当たり 136.08g / モルの Riedle-de Haen, 溶液 B : 571 μ l の氷酢酸、M = 水 500ml 当たり 60.65g / モル、400ml の溶液 A を導入し、そして 4.5 の pH で溶液 B により設定した)。

【 0 1 3 4 】

300 μ g のストレプトタビジン (SIGMA Company) を、濾過により殺菌された水 300 μ l に溶解した。その溶液を、酢酸ナトリウム緩衝液 - マイクロカプセル緩衝液に添加した。pH は 4.5 ± 0.2 であるべきである。次に、750 μ g の EDC (1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (SIGMA)) を、濾過により殺菌された水 750 μ l にすばやく溶解し、そして緩衝溶液に添加した。

次に、攪拌を断続的pH制御下で1時間、続けた。さらに、それを4 で一晚(約17時間)、攪拌した。

【0135】

最後に、水3.75ml中、1Mのエタノールアミノ溶液(SIGMA)188 μ lから成る溶液を、バッチに添加した。

浮選(24時間)の後、バッチを、上清液を1mlの体積に排水し、蒸発することによって濃縮した。次に、10mlのHepes緩衝液/0.01%(m/m) Triton溶液(5MのNaCl溶液30ml + 0.01%(m/m) Triton溶液(pH7.4)1000ml当たり1MのHepes溶液(Gibco15630-056)10ml)を添加し、再び浮選し、おして上清液を再び排水し、1mlの体積にした。濃縮された懸濁液を、シリコーン処理されたEppendorf反応容器中に移し、そして冷蔵庫に貯蔵した。

10

結合の成功を、FITC-ビオチンを用いてFACS(Becton Dickinsonの流動細胞計測計)により調べた。一連の飽和の助けにより、マイクロカプセル当たり200,000のストレプトビジン分子を定量化した。

【0136】

(f)官能化されたガス充填されたマイクロカプセルへのビオチニル化された抗-CD105抗体の結合:

ストレプトビジンが例(e)に従って結合されている、例4(a)~(d)に従ってのガス充填されたマイクロバブルの懸濁液を、ビオチニル化された抗-CD105-抗体(ラット抗-マウスCD105/エンドグリン、ビオチン接合体、Southern Biotechnology Associates, Inc., カタログ番号1860-08)と共に、 1×10^6 個のマイクロバブルに対して0.5 μ gの割合で、室温で10分間インキュベートした。インキュベーションの後、懸濁液を、0.02%(m/m)のTriton X100を含むPBS緩衝液により 1×10^8 のバブル/mlに希釈した。CD105結合及び希釈を、個々の動物のために新しく生成した。

20

【0137】

(g)官能化されたガス充填されたマイクロカプセルへのビオチニル化されたIgG_{2a}の結合:

ストレプトビジンが例(e)に従って結合されている、例4(a)~(d)に従ってのガス充填されたマイクロバブルの懸濁液を、ビオチニル化されたIgG_{2a}アイソタイプ対照(ラットIgG_{2a}アイソタイプ対照、ビオチン接合体、Southern Biotechnology Associates, Inc., カタログ番号0117-08)と共に、 1×10^6 個のマイクロバブルに対して0.5 μ gの割合で、室温で10分間インキュベートした。

30

【0138】

インキュベーションの後、懸濁液を、0.02%(m/m)のTriton X100を含むPBS緩衝液により 1×10^8 のバブル/mlに希釈した。アイソタイプ結合及び希釈を、個々の動物のために新しく生成した。

本明細書に引用されるすべての出願、特許及び出版物、及び2002年5月28日に出願された対応するドイツ特許出願番号第10215335.3号及び2002年5月8日に出願されたアメリカ仮出願第60/378,358号の全開示は、引用により本明細書に組込まれる。

前述の例は、本発明の一般的に又は特異的に記載された反応体/又は操作条件を、前述の例に使用されるそれらに代わって用いることによって、類似する成功を伴って反復され得る。

40

前述の記載から、当業者は本発明の実質的な特徴を、容易に確めることができ、そして本発明の範囲内で、本発明の種々の変更及び修飾を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0139】

【図1】図1は、超音波にゆだねられるバブルに基づいての“刺激された音放出”の原理を示す。

【図2】図2は、SAEシグナルの値が明白である超音波横断像を示す。

【図3】図3は、従来の記録、された横断像を示す。

【図4】図4は、色彩-飽和された横断像を示す。

50

【図 5】図 5 は、本発明の方法の原理を示す：a：移動の距離：100 μm 、b：移動の距離：50 μm 、c：移動の距離：10 μm 。

【図 6】図 6 は、変換器に関する方法性を示す。

【図 7】図 7 は、定義されたオーバーラップする音フィールドを有する多要素変換器（2D-アレイ）を示す：a：わずかなビーム - オーバーラップを伴っての像蓄積、b：重度のビーム - オーバーラップを伴っての像蓄積。

【図 8】図 8 は、異なった移動距離により走査された例 1 の寒天シルエットの 3 - D 図：a：SAE 層厚さ = 10 μm ~ 100 μm ：横断像 13：移動距離：10 μm ；b：SAE 層厚さ = 50 μm ~ 100 μm ：横断像 14：移動距離：50 μm ；c：SAE 層厚さ = 100 μm ；横断像 15：移動距離：100 μm 。

10

【図 9】図 9 は、SAE 層厚さに対する MU の依存性を示す（寒天シルエット、例 1）。

【図 10】図 10 は、SAE 層厚さに対する MUcorr. の依存性を示す（寒天シルエット、例 1）。

【図 11】図 11 は、SAE 層厚さに対する SAEcorr. の依存性を示す（寒天シルエット、例 1）。

【図 12】図 12 は、肝臓におけるバブル蓄積を示す、ラット 1（例 2）： 1×10^8 個のバブル/ml；エキスピボ測定、30 分の p.i.：a：SAE 層厚 = 約 1mm、b：SAE 層厚 = 20 μm 。

【図 13】図 13 は、肝臓におけるバブル蓄積を示す、ラット 2（例 2）： 1×10^8 個のバブル/ml；エキスピボ測定、30 分の p.i.：a：SAE 層厚 = 約 1mm、b：SAE 層厚 = 20 μm 。

【図 14】図 14 は、SAE 層厚に対する MU の依存性を示す、ラット 1（例 2）： 1×10^8 個のバブル/ml、エキスピボ測定、30 分。

20

【図 15】図 15 は、SAE 層厚に対する MUcorr. の依存性を示す、ラット 1（例 2）： 1×10^8 個のバブル/ml、エキスピボ測定、30 分。

【図 16】図 16 は、SAE 層厚に対する SAEcorr. の依存性を示す、ラット 1（例 2）： 1×10^8 個のバブル/ml、エキスピボ測定、30 分。

【図 17】図 17 は、SAE 層厚に対する MU の依存性を示す、ラット 2（例 2）： 1×10^7 個のバブル/ml、エキスピボ測定、30 分。

【図 18】図 18 は、SAE 層厚に対する MUcorr. の依存性を示す、ラット 2（例 2）： 1×10^7 個のバブル/ml、エキスピボ測定、30 分。

【図 19】図 19 は、SAE 層厚に対する SAEcorr. の依存性を示す、ラット 2（例 2）： 1×10^7 個のバブル/ml、エキスピボ測定、30 分。

30

【図 20】図 20 は、表面抗 - CD - 105 抗体がマウスの F9 - ter Atom において結合されている特定のバブルの蓄積を示す（例 3）：a：グラフ可視化、b：走査方向における腫瘍のソノグラフ縦断面、ライン 16 と 17 の間の領域：第 1 走査の間の腫瘍、ライン 18 と 19 の間の領域：第 2 走査の間の腫瘍。

【図 21】図 21 は、アイソタイプ対照（4 匹のマウス、例 3）に比較しての、腫瘍に蓄積される特定バブルの色シグナル（4 匹のマウス、例 3）を示す。

【図 1】

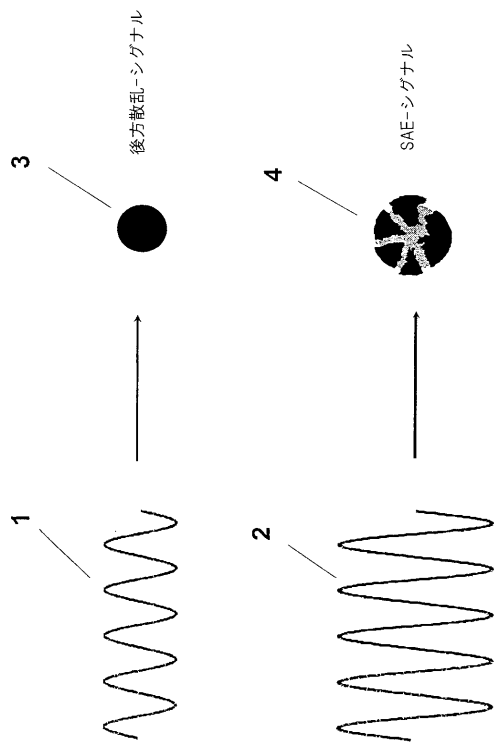


Fig. 1

【図 2】

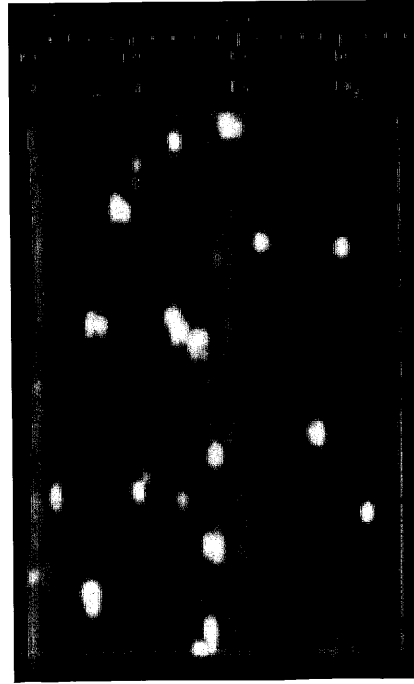


Fig. 2

【図 3】

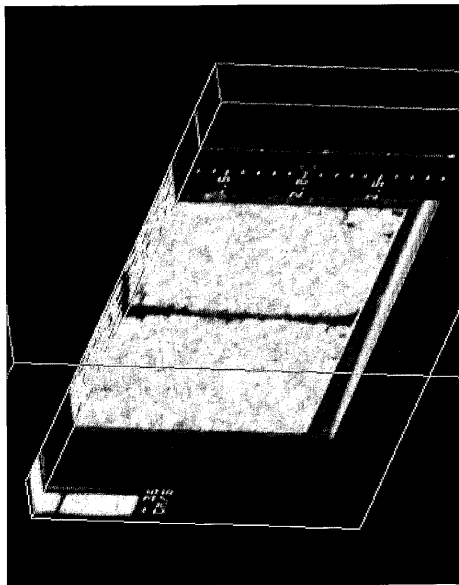


Fig. 3

【図 4】

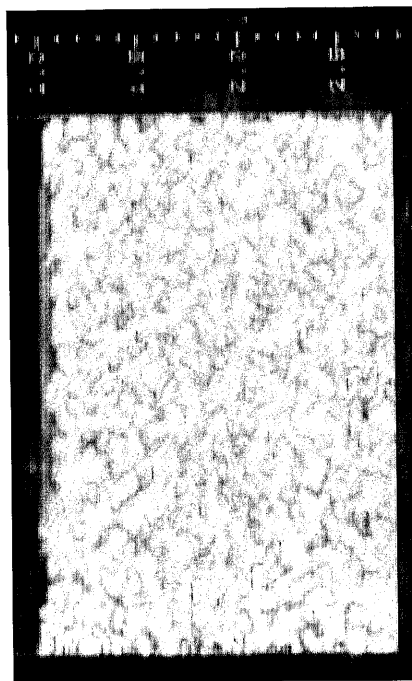


Fig. 4

【図 5 a】

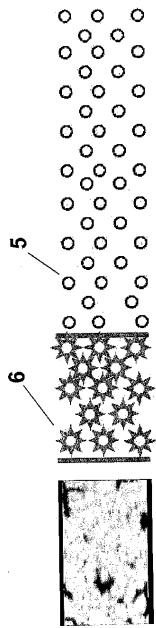


Fig. 5a

【図 5 b】

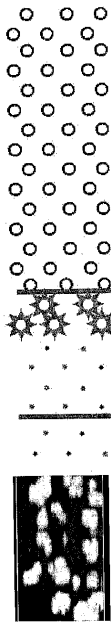


Fig. 5b

【図 5 c】

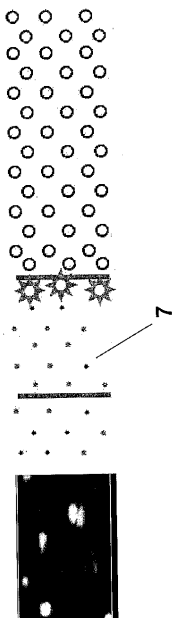


Fig. 5c

【図 6】

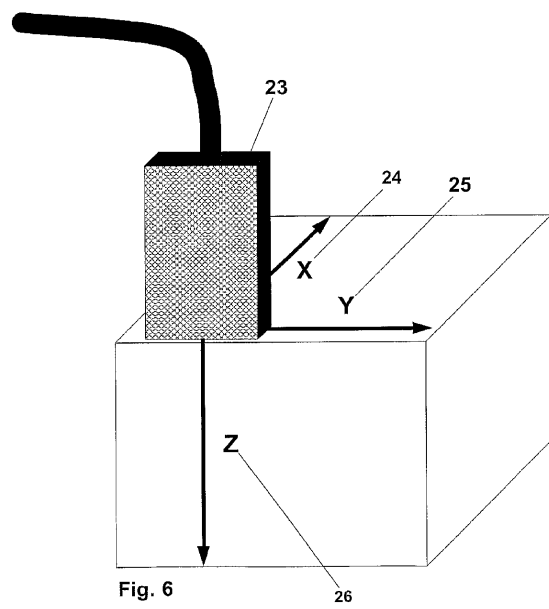


Fig. 6

【図 7 a】

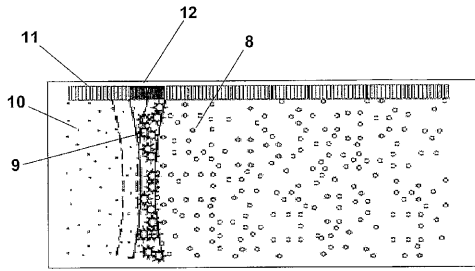


Fig. 7a

【図 7 b】

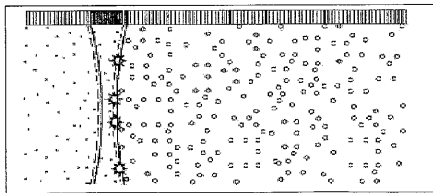


Fig. 7b

【図 8 a】

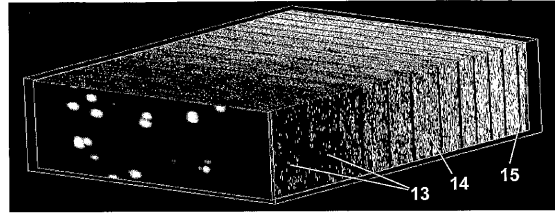


Fig. 8a

【図 8 b】

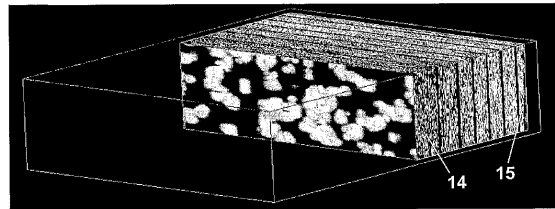


Fig. 8b

【図 8 c】

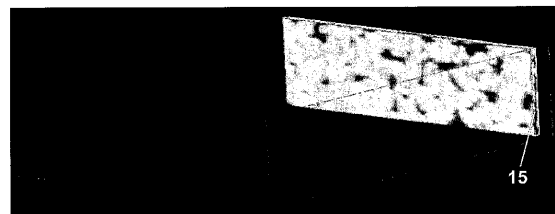


Fig. 8c

【図 9】

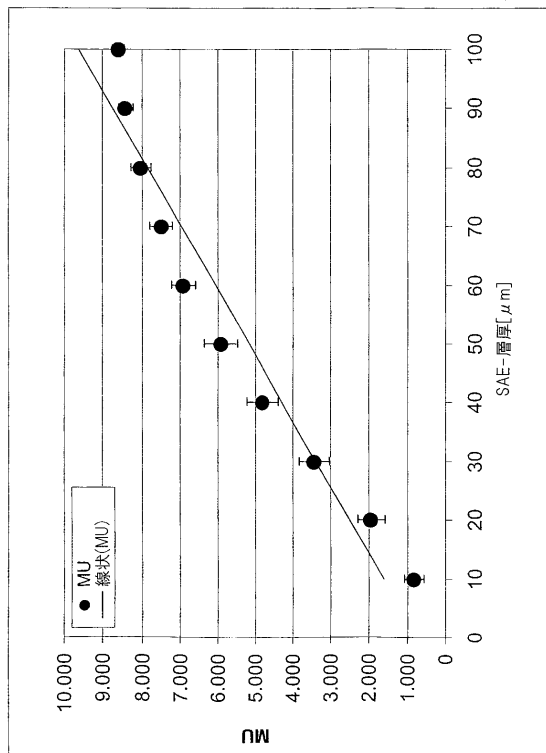


Fig. 9

【図 10】

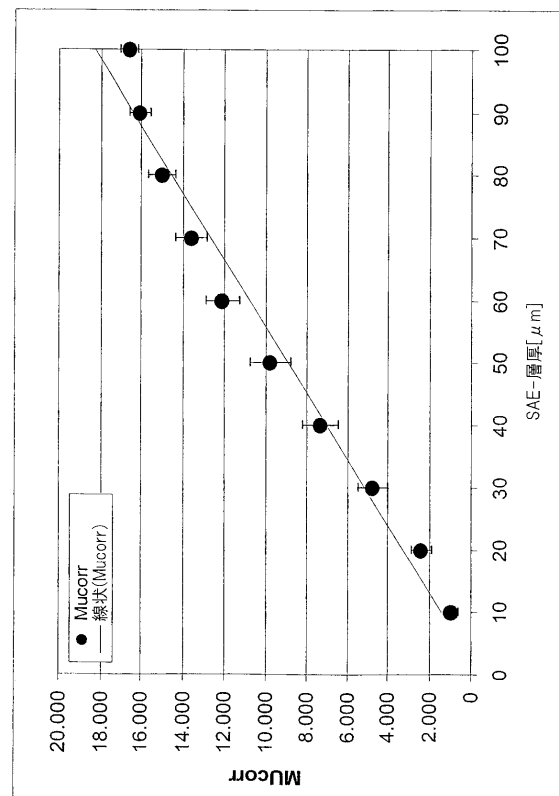


Fig. 10

【図 1 1】

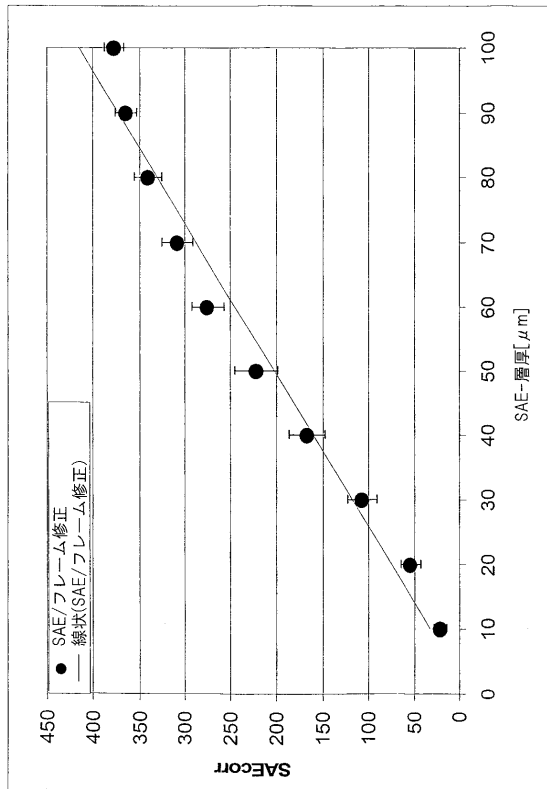


Fig. 11

【図 1 2 b】



Fig. 12b

【図 1 2 a】

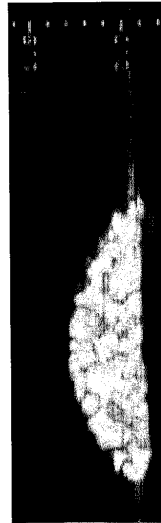


Fig. 12a

【図 1 3 a】

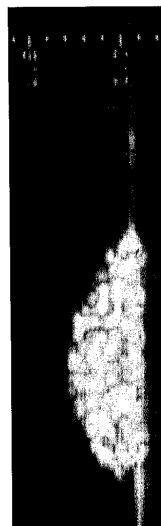


Fig. 13a

【 図 1 3 b 】



Fig. 13b

【 図 1 4 】

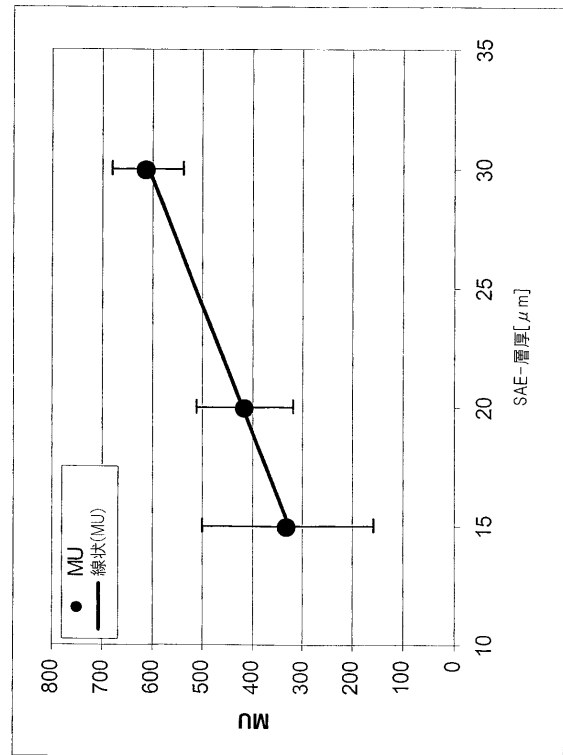


Fig. 14

【 図 1 5 】

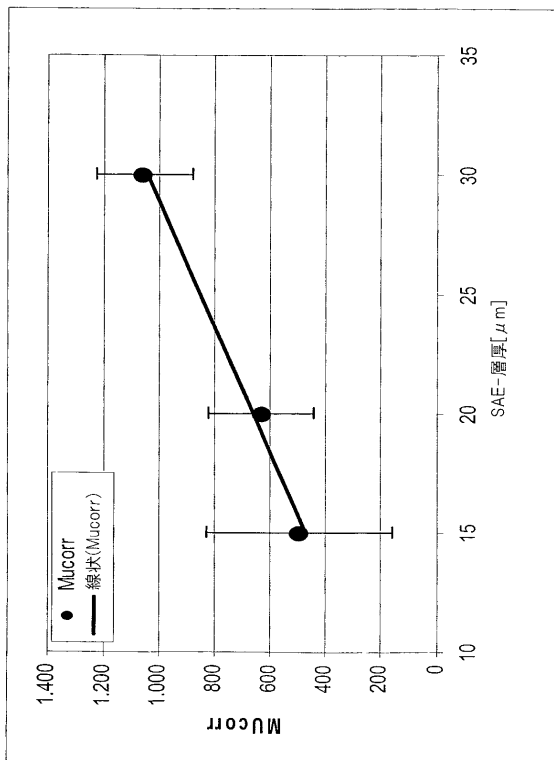


Fig. 15

【 図 1 6 】

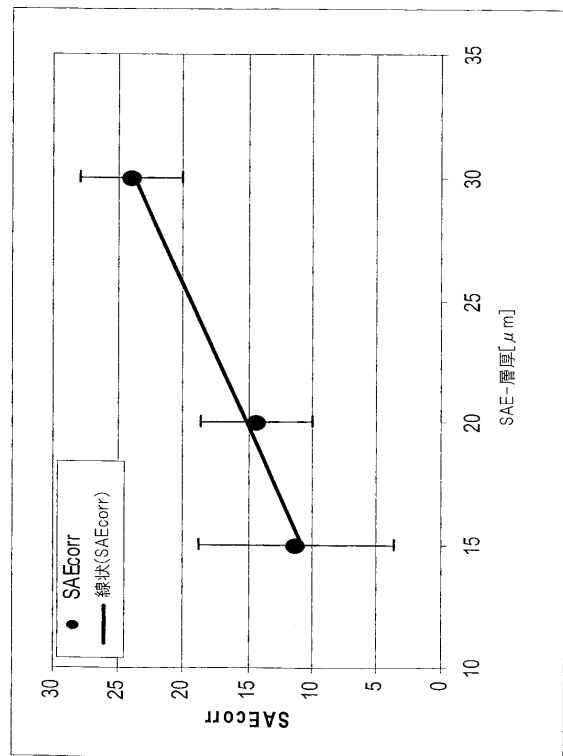


Fig. 16

【図 17】

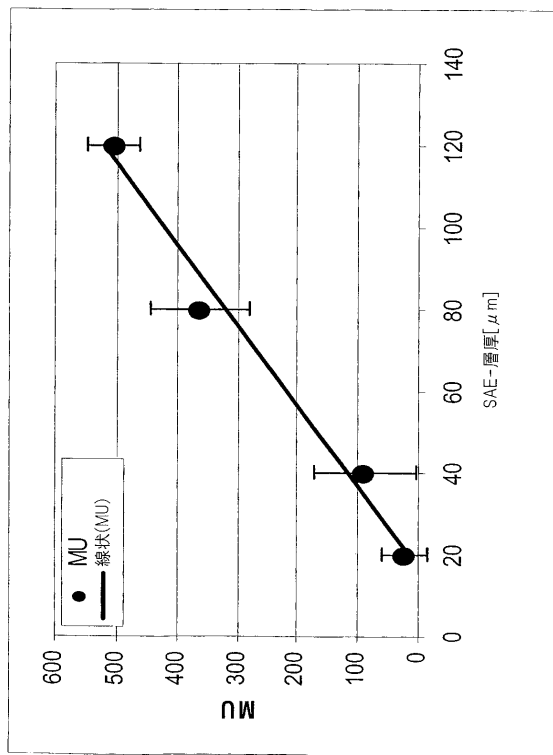


Fig. 17

【図 18】

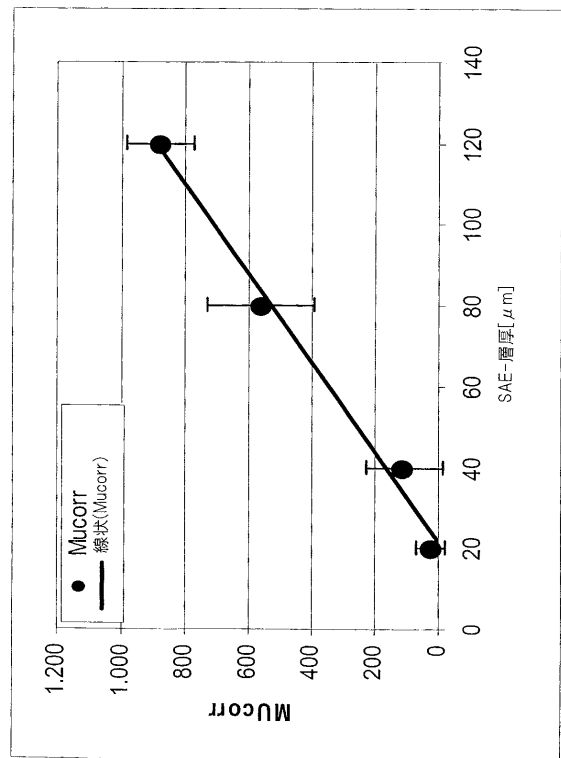


Fig. 18

【図 19】

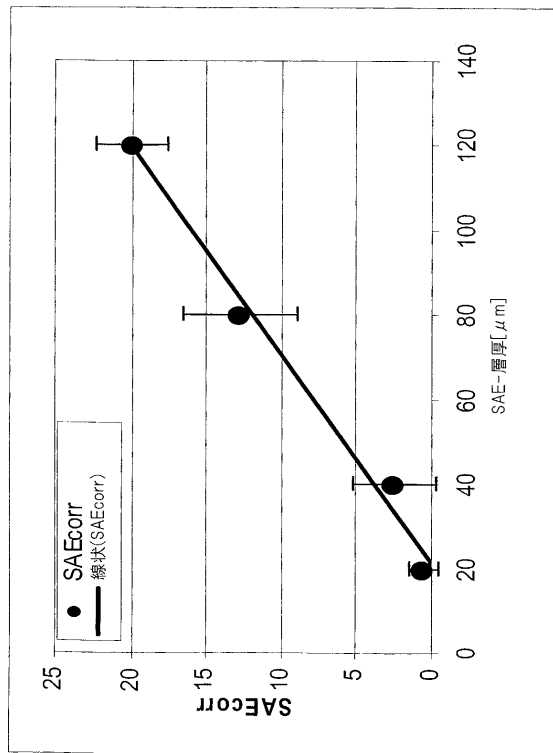
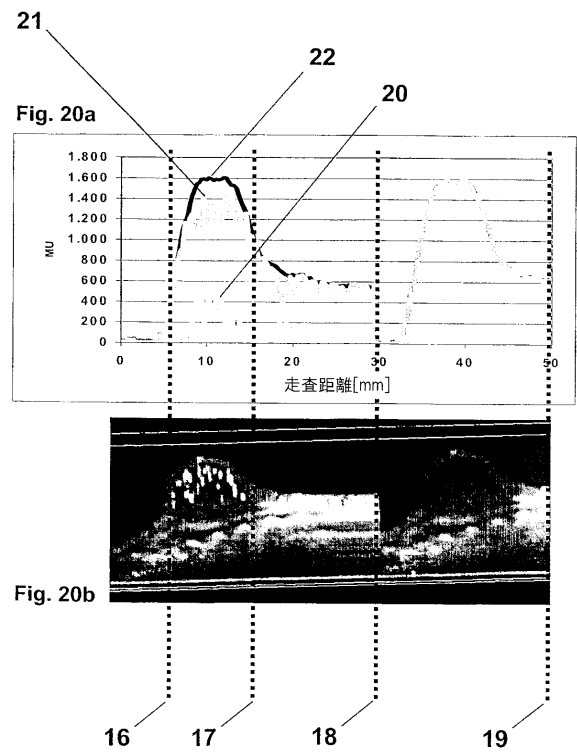


Fig. 19

【図 20】



【図 21】

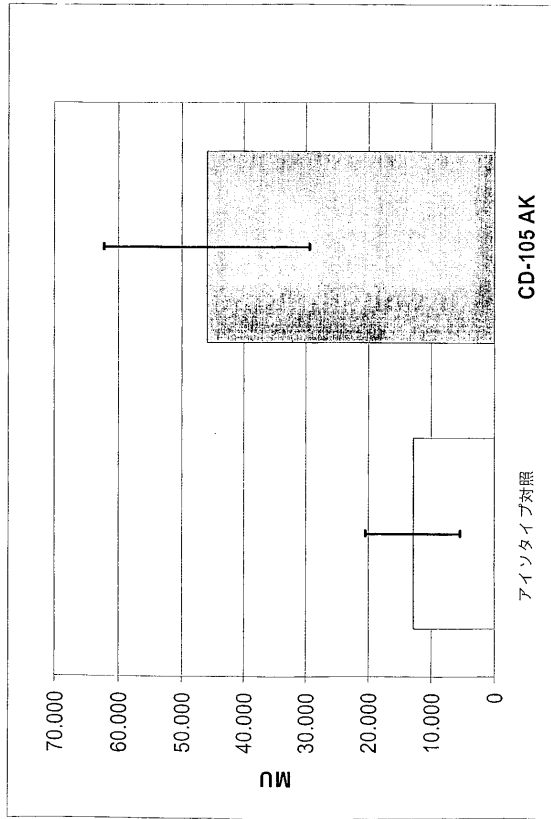


Fig. 21

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/03227

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	A61B8/00	G01S7/52 A61K49/00 G01S15/89
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7	A61B	G01S A61K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 860 931 A (CHANDLER PAUL E) 19 January 1999 (1999-01-19) column 1, line 43 -column 6, line 44 column 8, line 50 -column 10, line 46; figures 1,2	1-11
A	US 5 947 904 A (CHANDLER PAUL E ET AL) 7 September 1999 (1999-09-07) column 2, line 35 -column 6, line 26; figures 1,2,6,10,12	1-6,10, 11
A	US 6 302 846 B1 (GARDNER EDWARD A) 16 October 2001 (2001-10-16) column 2, line 31 -column 7, line 54; figures 2,3	1,4,10
☐ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 August 2003		03/09/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Artikis, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/03227

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5860931	A	19-01-1999	NONE	
US 5947904	A	07-09-1999	US 5944666 A AU 9027598 A WO 9908599 A1	31-08-1999 08-03-1999 25-02-1999
US 6302846	B1	16-10-2001	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/03227

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 7	A61B8/00	G01S7/52 A61K49/00 G01S15/89
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
IPK 7 A61B G01S A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 860 931 A (CHANDLER PAUL E) 19. Januar 1999 (1999-01-19) Spalte 1, Zeile 43 -Spalte 6, Zeile 44 Spalte 8, Zeile 50 -Spalte 10, Zeile 46; Abbildungen 1,2	1-11
A	US 5 947 904 A (CHANDLER PAUL E ET AL) 7. September 1999 (1999-09-07) Spalte 2, Zeile 35 -Spalte 6, Zeile 26; Abbildungen 1,2,6,10,12	1-6,10, 11
A	US 6 302 846 B1 (GARDNER EDWARD A) 16. Oktober 2001 (2001-10-16) Spalte 2, Zeile 31 -Spalte 7, Zeile 54; Abbildungen 2,3	1,4,10
☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft or scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
26. August 2003		03/09/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Artikis, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/03227

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 12-22
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Regel 39.1(iv) PCT - Verfahren zur chirurgischen und/oder therapeutischen
Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers und/oder
Diagnostizierverfahren, die am menschlichen oder tierischen Körper vorgenommen
werden
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03227

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5860931	A	19-01-1999	KEINE		
US 5947904	A	07-09-1999	US	5944666 A	31-08-1999
			AU	9027598 A	08-03-1999
			WO	9908599 A1	25-02-1999
US 6302846	B1	16-10-2001	KEINE		

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ラインハルト, ミヒャエル

ドイツ連邦共和国, 1 4 1 2 9 ベルリン, シュレードルンシュタイク 5

(72)発明者 ハウフ, ペーター

ドイツ連邦共和国, 1 0 4 3 9 ベルリン, エリッヒ - バイネルト シュトラッセ 2 3

(72)発明者 ブリール, アンドレス

ドイツ連邦共和国, 1 0 2 4 5 ベルリン, ゲールトネールシュトラッセ 1 0

Fターム(参考) 4C601 DE06 DE10 EE30 HH05 JB36

专利名称(译)	用于通过超声量化物体的装置和方法		
公开(公告)号	JP2005527270A	公开(公告)日	2005-09-15
申请号	JP2003579664	申请日	2003-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	先灵公司		
申请(专利权)人(译)	先灵股份公司		
[标]发明人	ラインハルトミヒヤエル ハウフペーター ブリールアンドレス		
发明人	ラインハルト,ミヒヤエル ハウフ,ペーター ブリール,アンドレス		
IPC分类号	A61B8/00 A61K47/48 A61K49/22		
CPC分类号	B82Y5/00 A61B8/4218 A61B8/481 A61B8/483 A61K47/6898 A61K49/223 G01S7/52041		
FI分类号	A61B8/00		
F-TERM分类号	4C601/DE06 4C601/DE10 4C601/EE30 4C601/HH05 4C601/JB36		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 西山雅也		
优先权	10215335 2002-03-28 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在物体的量化中，尤其是超声波诊断中的气泡，物体（尤其是气泡）的浓度通常很高，因此用于可视化的图像数据变得饱和，因此量化是不可能的。存在。为了解决这个问题，被测物体的横截面层中包含的物体首先产生特征信号并收集这些信号，从信号中形成数据集，并在测试中将所述数据集转换为对象对象中的对象排列的图像，然后确定对象的数量，以便在被测对象中已经提出，收集来自重叠横截面层的至少两组超声信号。

