

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. Oktober 2003 (09.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/082117 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61B 8/00**,
G01S 7/52, A61K 49/00, G01S 15/89

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/03227

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. März 2003 (27.03.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 15 335.3 28. März 2002 (28.03.2002) DE

(71) Anmelder: **SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT**
[DE/DE]; Müllerstrasse 178, 13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder: **REINHARDT, Michael**; Schlehdornsteig 5,
14129 Berlin (DE). **HAUFF, Peter**; Erich-Weinert Str.
23, 10439 Berlin (DE). **BRIEL, Andreas**; Gärtnerstr. 10,
10245 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): 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,
MX, 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.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (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), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

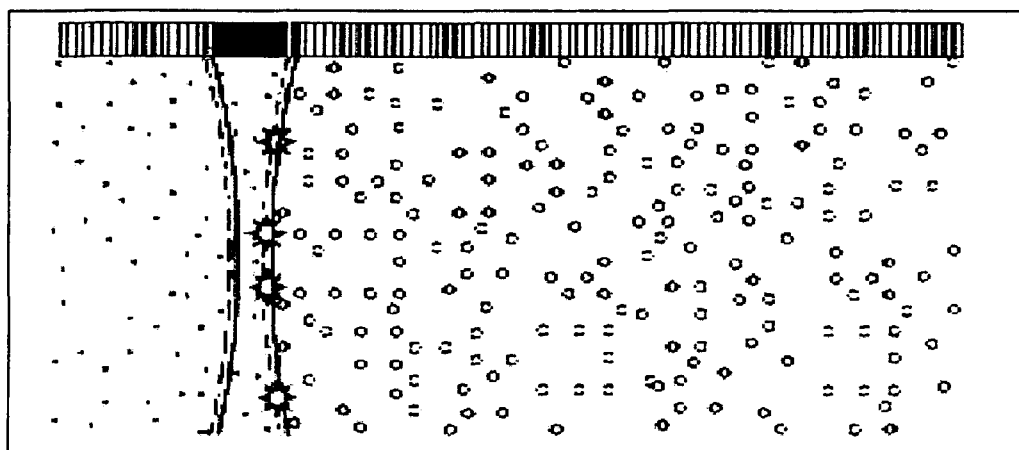
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR QUANTIFYING BODIES BY MEANS OF ULTRASOUND

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR QUANTIFIZIERUNG VON KÖRPERN MITTELS
ULTRASCHALL



(57) Abstract: The problem with quantifying bodies, particularly bubbles, in ultrasonic diagnostics is that the concentration of bodies, particularly bubbles, is often so high that the obtained image data is saturated concerning the representation thereof, rendering quantification impossible. In order to solve said problem, the bodies contained in cross-sectional layers of an object that is to be analyzed are stimulated by means of ultrasound so as to emit characteristic signals, whereupon said signals are recorded, sets of data are formed from the signals, the sets of data are transformed into a representation of the arrangement of the bodies in the object that is to be analyzed, and the number of bodies is detected therefrom. At least two sets of ultrasonic signals are recorded from overlapping cross-sectional layers in the object that is to be analyzed.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 03/082117 A1



-
- *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(57) Zusammenfassung: Bei der Quantifizierung von Körpern, insbesondere Blasen bei der Ultraschalldiagnostik besteht das Problem, dass die Konzentration an Körpern, insbesondere Blasen häufig so groß ist, dass die erhaltenen Bilddaten bezüglich der Darstellung gesättigt ist, so dass eine Quantifizierung unmöglich wird. Um dieses Problem zu lösen, wird vorgeschlagen, die in Schnittschichten eines Untersuchungsobjekts enthaltenen Körper mittels Ultraschall zunächst zu charakteristischen Signalen anzuregen und diese Signale aufzunehmen, aus den Signalen Datensätze zu bilden, die Datensätze in eine Abbildung der Körperanordnung im Untersuchungsobjekt umzuwandeln und daraus die Anzahl der Körper zu ermitteln, wobei mindestens zwei Ultraschallsignalsätze aus überlappenden Schnittschichten im Untersuchungsobjekt aufgenommen werden.

Vorrichtung und Verfahren zur Quantifizierung von Körpern mittels Ultraschall

5

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Quantifizierung von in einem Untersuchungsobjekt enthaltenen Körpern, die durch diagnostischen Ultraschall zu eigenständigen, charakteristischen Signalen angeregt werden können, insbesondere solchen Signalen, die mit der Zerstörung eines Körpers, bevorzugt von Blasen einhergehen. Ferner betrifft die Erfindung auch eine Verwendung der Vorrichtung für die Ultraschalldiagnostik und/oder Therapie am Menschen oder am Tier und eine Verwendung der Vorrichtung und ein Verfahren für das *in-vivo*- und *ex-vivo*-Mapping von physiologisch hoch oder herunter regulierbaren molekularen Markern in Organen und Geweben ab der postembryonalen Ontogenese und von pathologisch hoch oder herunter regulierbaren molekularen Markern in Organen und Geweben während der Pathogenese und für die Charakterisierung von Zellkulturen durch *in vitro*-Mapping von hoch und herunter regulierbaren molekularen Markern der Zellen.

Die Ultraschalldiagnostik hat einen festen Platz im klinischen Alltag gefunden. Details können in Ultraschallaufnahmen durch Injektion von Kontrastmitteln verbessert dargestellt werden, da hierdurch stärkere Ultraschallsignale erzeugt werden können. Als Kontrastmittel kommen alle sehr kleine Körper (Mikrokörper) in Frage, die ein detektierbares und vom Gewebesignal unterscheidbares Signal liefern, insbesondere gasgefüllte sehr kleine (Mikro)-Blasen. Diese Körper werden dem Untersuchungsobjekt zugeführt und können im Ultraschallfeld beispielsweise im Fall von Blasen unter bestimmten Bedingungen zerstört werden. Dabei senden diese Blasen eigenständige, charakteristische Ultraschallsignale aus. Werden die Blasen durch das Ultraschallfeld zerstört, so werden die eigenständigen, charakteristischen Signale als „stimulated acoustic emission (SAE) bezeichnet.

30

Blasen, die eigenständige charakteristische Signale aussenden können, werden beispielsweise beschrieben in EP 0 398 935 B1, EP 0 644 777 B1, EP 0 458 745 A1 und WO 01/68150 A1.

Das Prinzip der stimulated acoustic emission (SAE) ist schematisch in folgenden Figuren dargestellt. Es zeigen im Einzelnen:

- Fig. 1: das Prinzip der „stimulated acoustic emission“ anhand einer mit Ultraschall beschallten Blase,
Fig. 2: ein Ultraschallschnittbild, aus dem die Größe der SAE-Signale erkennbar ist,
Fig. 3: ein konventionell aufgenommenes Ultraschallschnittbild.

In Fig. 1 sind eine erste Schallwelle mit geringer Amplitude 1 und eine zweite Schallwelle mit hoher Amplitude 2 dargestellt. Bei Einstrahlung der Schallwelle mit geringer Amplitude 1 bleibt eine davon beschallte Blase 3 intakt. Dabei wird ein Streusignal erzeugt. Im Gegensatz hierzu wird die Blase 4 bei Einstrahlung einer Schallwelle mit hoher Amplitude zerstört, wobei ein SAE-Signal entsteht.

SAE-Signale verschiedenster Blasen können gemäß US 5,425,366 A, US 6,186,951 B1 und DE 198 13 174 A1 mittels Farbdoppler-mode detektiert werden.

Aber auch mit anderen Ultraschallgerätemodes, die ursprünglich vor allem zur Darstellung von Bewegung entwickelt wurden, sind SAE-Signale unabhängig von der Bewegung der Blasen darstellbar. Beispielhaft genannt werden die Spektraldoppler-, Power-Doppler-, Farbdoppler- und Harmonic-Methode (2nd-, sub-, wideband-, Pulse-Inversion-, Ultraharmonic-, Farbdoppler-, Harmonic-Powerdoppler-Methode).

Die SAE-Signalstärke ist so hoch, dass selbst einzelne Blasen detektiert werden können. Das einzelne SAE-Signal wird dabei auf dem Monitor erheblich größer dargestellt (Durchmesser ca. 0,5 - 1 mm je nach Gerät, Schallkopf und Settings), als es der tatsächlichen Größe der unzerstörten Blase ($< 10 \mu\text{m}$) entspricht. In Fig. 2 ist die Größe von SAE-Signalen im Schnittbild wiedergegeben. In vielen derzeit verfügbaren Ultraschalldiagnosegeräten liegt die Schichtdicke eines Einzelbildes je nach Geräteeinstellung bei ca. 1 mm. Dies ist in Fig. 3 veranschaulicht. Dort ist die Schichtdicke eines konventionellen Schnittbilds zu erkennen. In der Regel führt eine Blasenkonzentration von ca. 2.000-3.000 Blasen/ml Gewebe/Blut zu einem lückenlosen SAE-Kontrast im sonografischen Schnittbild.

Im zweidimensionalen Ultraschallschnittbild wird die Sättigungsblasen-Konzentration bestimmt durch die Schichtdicke des Ultraschallschnittbildes (beispielhaft gezeigt in Fig. 3) und durch die Größe eines im Ultraschallschnittbild dargestellten SAE-Signals bei Zerstörung einer einzigen Blase (mehrere einzelne Blasen sind in Fig. 2 dargestellt).

Für die qualitative Bildgebung kann eine geringe Sättigungs-Konzentration/ Sättigungsblasen-Konzentration von Vorteil sein, da insbesondere bereits bei geringen Blasenkonzentrationen ein lückenloser Kontrast im Schnittbild entsteht.

Für die Quantifizierung von Körpern ist eine geringe Sättigungs-Konzentration/ Sättigungsblasen-Konzentration dagegen von Nachteil, da insbesondere bereits geringe Konzentrationen an Körpern, insbesondere Blasen zur Kontrastsättigung im Bild führen und sich deren Konzentrationen oberhalb der Sättigungs-Konzentration im Bild nicht mehr absolut bestimmen bzw. Körper, insbesondere Blasen nicht mehr unterscheiden lassen.

Solange Körper, insbesondere Blasen, lediglich ungebunden im Blut verteilt sind, lässt sich deren Konzentration dort durch die Dosierung zwar so steuern, dass die Sättigungs-Konzentration/ Sättigungsblasen-Konzentration nicht erreicht wird.

Kommt es allerdings zu einer spezifischen oder unspezifischen Anreicherung der Körper beispielsweise in Zellen, Geweben, Organen oder an anderen anreichernden Strukturen, wird die Sättigungs-Konzentration/ Sättigungsblasen-Konzentration in der Regel überschritten, weil das anreichernde Gewebe oder die anreichernden Strukturen derart dicht vorliegen, dass sich die Körper dort in einer Konzentration oberhalb der Sättigungs-Konzentration/ Sättigungsblasen-Konzentration anreichern.

Durch eine Reduktion der Dosis könnte die Sättigungs-Konzentration/ Sättigungsblasen-Konzentration im Zielgebiet zwar auch hier unter Umständen unterschritten werden, aber die angereicherte Anzahl an Körpern, insbesondere Blasen läge in einem unbekannten Verhältnis zur maximalen Sättigung. Daher wäre eine solche Messung weder reproduzierbar, noch würde sie einen Wert liefern, der mit der Anzahl dort vorhandener Anreicherungsfaktoren korreliert.

Daher ist ein Verfahren zur Bestimmung der Anzahl der Körper (Blasenanzahl) oberhalb der Sättigungs-Konzentration/ Sättigungsblasen-Konzentration wünschenswert.

- 5 Körper, insbesondere Blasen können sich beispielsweise unspezifisch oder spezifisch an oder in Zellen, Geweben, Organen oder anderen Strukturen anreichern. Dieser Anreicherungsmechanismus wird in der Literatur oftmals auch als passives oder aktives Targeting bezeichnet (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).

Unspezifische Anreicherung von Körpern, insbesondere Blasen findet beispielsweise statt:

- 15
- a) durch Phagozytose von Körpern/ Blasen in Organen des Retikuloendothelialen Systems (RES) oder in anderen Zellen, die z.B. erkrankungsassoziiert vorliegen, wie z.B. in tumorassoziierten Makrophagen oder Makrophagen in atherosklerotischen Prozessen, oder Tumorzellen selbst oder Zellen, die zur Phagozytose stimuliert werden, wie z.B. Endothelzellen der Leber bei bestimmten Erkrankungen der Leber;
 - 20 b) durch Adhäsion bzw. durch langsames Entlangrollen von Körpern/ Blasen beispielsweise am Gefäßendothel;
 - c) durch Einwandern von Körpern/ Blasen in oder durch Fenestrierungen, z.B. des Endothels, in „Gefäßssackgassen“ oder „blind“ endenden Blutgefäßen; dies kann im Übergangsbereich zu Nekrosen, bei stark ödematösen oder entzündlichen Prozessen, Hämorrhagien, Hämatomen oder Gefäßausbuchtungen, wie Aneurysmen, gefäßbildenden Tumoren, wie Hämangiomen, oder durch Einspülen in Nekrosen auftreten;
 - 25 d) durch Transport von phagozytierten oder adhären Körpern/ Blasen, die z.B. durch Monozyten phagozytiert oder an Zellen des Blutes, wie beispielsweise Leukozyten, adhären sind, durch Endothelbarrieren, wie z.B. die Blut-Hirn-Schranke, zu beispielsweise pathologischen Arealen.
 - 30

Eine spezifische Anreicherung von Körpern, insbesondere Blasen kann durch eine kovalente oder nicht-kovalente, einschließlich einer elektrostatischen Bindung, Wasserstoffbrückenbindung oder Van der Waals-Bindung, an physiologische oder pathophysiologische Strukturen erreicht werden. In der Regel tragen die Körper, insbesondere Blasen in diesen Fällen target-spezifisch bindende Moleküle auf ihrer Oberfläche.

Zur Messung von Ultraschallkontrast gibt es die Möglichkeit, Videobilder zu digitalisieren, und die Helligkeit (Grau- oder Farbwerte) in definierbaren Bildregionen über die Zeit zu messen. Diese Art der Messung löst allerdings nicht das Problem der Kontrastsättigung bei hohen Konzentrationen an Körpern/ Blasen. Eine Quantifizierung ist, wenn überhaupt, nur bei sehr geringer Konzentration der Körper, insbesondere Blasen möglich.

Das Bedürfnis der Quantifizierbarkeit von Blasen hat auch 3D-Echotech, Halbergmoos, Deutschland, mit einem Ultraschallgerät zur Quantifizierung von Blasensignalen im Blut zu befriedigen versucht. Bei diesem Gerät wird das Videobild des Ultraschallgerätes digitalisiert, in Farb- und Grauwerte zerlegt und wahlweise nach mittlerem Helligkeitswert oder nach der Anzahl der Bildschirmpixel innerhalb eines definierten Messfensters (ROI) ausgewertet. Der Anwendungsbereich dieses Messsystems ist es, die Blasenansammlung in Blutgefäßen anhand der Helligkeitswerte innerhalb einer definierbaren ROI zu quantifizieren. Aber auch dieses Verfahren ist nicht geeignet, die Blasen oberhalb einer Konzentration von ca. 3.000 Partikeln bzw. Blasen/ml zu quantifizieren. Bereits unterhalb dieser Konzentration ist mit diesem Gerät keine reproduzierbare Messung möglich.

Kretztechnik, Zipf, Österreich, bietet ein 3D- (dreidimensionales) Ultraschall-Verfahren an, bei dem ein 2D-(zweidimensionales) Array (Linear-Array, Sektor-Array, Phased-Array, wie in der 2D-Sonografie) innerhalb eines Schallkopfes automatisch in einem bestimmten Winkel geschwenkt wird. Mit diesem Gerät können Blasen jedoch nicht reproduzierbar quantifiziert werden. Dies gilt insbesondere dann, wenn unterschiedliche Patienten untersucht werden und/oder verschiedene Untersucher die Untersuchung durchführen.

Mit keinem der genannten Geräte ist es möglich, Körper, insbesondere Blasen *in-vivo*, *ex-vivo* oder *in-vitro* zu quantifizieren, insbesondere nicht in Konzentrationen oberhalb einer Konzentration von ca. 3.000 Blasen/ml Gewebe bzw. Blut. Unterhalb dieser Konzentration ist die räumliche Auflösung nur im Millimeter-Bereich möglich.

5 Weitere Messverfahren zur Lösung dieses Problems sind bisher nicht bekannt.

Daher besteht ein Nachteil der bekannten Verfahren und Vorrichtungen darin, dass eine Darstellung kleiner Strukturen nicht möglich ist, da die von einem Schallkopf ausgehenden Schallkeulen Mindestausdehnungen aufweisen, die die Auflösung be-
10 grenzen. Beispielsweise ist schon die von den Schallwellen erfasste Dicke der Messschicht etwa 1 mm groß, so dass feinere Strukturen nicht mehr aufgelöst werden können.

Aus den vorstehenden Gründen ist es nicht möglich, die Ultraschalltechnik z.B. zur
15 Detektion molekularer Marker einzusetzen:

Biologische Schlüsseltechnologien, wie Genomics/Bioinformatics und Proteomics werden für die Identifizierung neuer molekularer Marker eingesetzt (Yao, T.: „Bioinformatics for the genomic sciences and towards systems biology. Japanese activities
20 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). Bei diesen Technologien werden die Sequenzen beispielsweise der menschlichen Gene mit speziellen Bioinformatik-Tools analysiert, um pharmakologisch interessanten Proteinfamilien angehörende Proteine,
25 insbesondere Rezeptoren und Enzyme, zu identifizieren und näher zu beschreiben. Bei diesen *in vitro*-Verfahren werden beispielsweise frisch isolierte (primäre) Zellen und (immortalisiert) Zellkulturen (aus erkranktem oder gesundem Gewebe) eingesetzt. Diese Zellkulturen sind jedoch nachteilig, da sich das Expressionsspektrum von molekularen Markern beispielsweise durch den Isolierungsprozess verändern
30 kann. Derartige untersuchte Zellkulturen spiegeln lediglich das Expressionsmuster molekularer Marker genau zu dem Zeitpunkt wieder, zu dem diese isoliert worden sind. Des Weiteren handelt es sich bei den Zellkulturen in der Regel um immortalisierte (*in vitro* unbegrenzt durch spezielle Manipulation vermehrbare) Zellen, die nicht die realen *in vivo*-Verhältnisse widerspiegeln können.

Eine weitere sehr geläufige Methode zur Identifizierung molekularer Marker ist die immunhistochemische Untersuchung von Geweben. Hierbei werden speziell interessierende Gewebe, beispielsweise von Tumoren, nach ihrer Entnahme histologisch aufgearbeitet und immunhistologisch gezielt auf die Expression eines oder mehrerer molekularer Marker untersucht. Erst nach histologischer Identifikation solcher Marker können diese später durch Verwendung entsprechender Antikörper, die mit entsprechenden Signalgebern gekoppelt sind, auch *in vivo* abgebildet werden. Solche Abbildungen sind in der Regel nur qualitativ möglich und meistens auch nur dann, wenn es zu einer sehr starken Anreicherung des antikörpertragenden Signalgebers kommt (Fonsatti, E., Jekunen, A.P., Kairemo, K.J.A. et al.: „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, Mai 2000:2037-2043).

Derzeit werden auch viele diagnostische Verfahren zur Detektion molekularer Marker *in vivo* getestet. Obwohl der Nachweis von bekannten molekularen Markern mit bekannten diagnostischen Verfahren möglich ist, fehlt diesen Verfahren in der Regel eine hohe räumliche Auflösung. Dies ist beispielsweise der Fall bei PET (Positron-Emissions-Tomografie), NIRF (Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Imaging) und Szintigrafie. In anderen Fällen werden hohe Konzentrationen an Signalgebern benötigt, beispielsweise bei MRI (Magnet-Resonanz-Imaging) und CT (Computer-Tomografie). Außerdem gibt es Literatur zur Verwendung von Ultraschallkontrastmitteln zum passiven Targeting (ohne Antikörperkonjugat, z.B. ohne spezifische Bindung an molekulare Marker) und zum aktiven Targeting (mit Antikörperkonjugat, z.B. mit spezifischer Bindung an molekulare Marker). Allerdings erreichen keine der bis heute beschriebenen diagnostischen Verfahren die Kriterien, wie sie unter Verwendung der aus DE 102 15 335 A bekannten Vorrichtung erzielbar sind, nämlich eine räumliche Auflösung im Mikrometer-Bereich und eine hoch sensitive Quantifizierung von Signalgebern im Targetbereich.

Der vorliegenden Erfindung liegt von daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung für die Quantifizierung von Körpern in einem Untersuchungsobjekt zu finden, mit dem eine Bestimmung der Konzentration der Körper *in-vivo*, *ex-vivo* und *in-vitro* oberhalb der Sättigungsblasen-Konzentration möglich ist. Mit dem Ver-

fahren und der Vorrichtung soll es möglich sein, Körpermengen reproduzierbar zu quantifizieren und deren Konzentration zu bestimmen. Außerdem soll es möglich sein, bezüglich der im Videobild dargestellten eigenständigen, charakteristischen Signale, beispielsweise der SAE-Signale, eine räumliche Auflösung vorzugsweise im histologischen Bereich zu ermöglichen, um beispielsweise auch molekulare Marker target-spezifisch identifizieren zu können.

Die Aufgabe wird durch die Vorrichtung zur Quantifizierung von in einem Untersuchungsobjekt enthaltenen Körpern nach Anspruch 1, deren Verwendung für die Ultraschalldiagnostik und/oder Ultraschalltherapie am Menschen oder am Tier nach Anspruch 10, deren Verwendung für das *in-vivo*- und *ex-vivo*-Mapping von molekularen Markern in Organen und Geweben und *in vitro*-Mapping von Zellen für die Charakterisierung von Zellkulturen nach Anspruch 11 und das Verfahren zur Quantifizierung von in einem Untersuchungsobjekt enthaltenen Blasen nach Anspruch 12 gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

Definitionen:

Hierzu wird ergänzend auf nachfolgend erläuterte Figuren Bezug genommen. Es zeigen im Einzelnen:

Fig. 4: Farbgesättigtes Schnittbild

Fig. 5: Prinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens:

- a: Verschiebungsstrecke: 100 μm
- b: Verschiebungsstrecke: 50 μm
- c: Verschiebungsstrecke: 10 μm

Fig. 6: Richtungen in Relation zum Schallkopf

Fig. 7: Multielement-Schallkopf mit definiert überlappenden Schallfeldern (2D-Array)

- a: Bildaufbau mit geringem beam-overlap
- b: Bildaufbau mit starkem beam-overlap

Fig. 8: 3D-Ansicht des mit unterschiedlichen Verschiebungsstrecken gescannten Agar-Phantoms aus Beispiel 1:

- a: SAE-Schichtdicke = 10 μm bis 100 μm ,
Schnittbild 13: Verschiebungsstrecke 10 μm
- b: SAE-Schichtdicke = 50 μm bis 100 μm
Schnittbild 14: Verschiebungsstrecke 50 μm
- c: SAE-Schichtdicke = 100 μm
Schnittbild 15: Verschiebungsstrecke 100 μm

Fig. 9: Abhängigkeit der MU von der SAE-Schichtdicke
(Agar-Phantom, Beispiel 1)

Fig. 10: Abhängigkeit der $MU_{\text{corr.}}$ von der SAE-Schichtdicke
(Agar-Phantom, Beispiel 1)

Fig. 11: Abhängigkeit der $SAE_{\text{corr.}}$ von der SAE-Schichtdicke
(Agar-Phantom, Beispiel 1)

a) Körper:

Körper im Sinne der vorliegenden Anmeldung sind solide Partikel und/oder Blasen mit einem Durchmesser $< 10 \mu\text{m}$. Solide Partikel enthalten mindestens eine oberflächenaktive Substanz (z.B. Tensid), mindestens ein Kohlenhydrat, Protein, Lipid und/oder natürliches und/oder synthetisches Polymer.

b) Blase:

Blasen im Sinne der vorliegenden Anmeldung sind Gas enthaltende Phasen mit einem Durchmesser $< 10 \mu\text{m}$, die entweder frei oder umhüllt sind. Die Phasen können im Wesentlichen kugelförmig sein. Im Fall umhüllter Blasen kann die Hülle mindestens eine oberflächenaktive Substanz (z.B. Tensid), mindestens ein Protein, Lipid und/oder natürliches und/oder synthetisches Polymer enthalten. Blasen gemäß der vorliegenden Anmeldung können beispielsweise auch gasgefüllte Mikrokapseln,

gasgefüllte Mikropartikel, gasgefüllte Mikrosphären, Mikroballoone und mit Tensid stabilisierte Mikrobläschen sein.

c) Ultraschallkontrastmittel:

5

Ultraschallkontrastmittel sind Mittel, die Körper, insbesondere Blasen zur Anwendung in der Ultraschalldiagnostik und/oder -therapie enthalten.

d) Eigenständiges, charakteristisches Signal:

10

Ein eigenständiges, charakteristisches Signal (CS-Signal, CS-Effekt) ist ein vom Streusignal unabhängiges Echo-Signal eines Körpers, insbesondere einer Blase. Dazu gehören auch alle nicht-linearen Signale wie beispielsweise 2nd harmonic-, subharmonic- oder ultra-harmonic, sowie insbesondere SAE-Signale, wie sie beispielsweise bei der Zerstörung von Blasen im Ultraschallfeld entstehen.

15

e) Stimulated Acoustic Emission (SAE):

Erfindungsgemäß bevorzugte Blasen können unter bestimmten Bedingungen bei Anregung mit Ultraschall zerstört werden. Dabei entsteht ein eigenständiges und vom Sendesignal abweichendes Signal, das von der Streuung und der Bewegung der Blasen unabhängig ist. Dieses eigenständige, charakteristische Signal wird als stimulated acoustic emission (SAE) bezeichnet (Synonym: Loss of Correlation (LOC)).

20

f) Sättigungs-Konzentration/ Sättigungsblasen-Konzentration:

25

Die Sättigungs-Konzentration/ Sättigungsblasen-Konzentration ist die Konzentration an Körpern/ Blasen pro Milliliter Untersuchungsobjekt, beispielsweise Gewebe oder Blut, oberhalb der es zu einer Überlagerung der eigenständigen, charakteristischen Signale, insbesondere der SAE-Signale, innerhalb eines Schallfeldes kommt und oberhalb der eine Quantifizierung der Blasen dadurch unmöglich wird, dass aus der Summe der CS-Signale auch bei Anwendung von rechnerischen Korrekturformeln nicht mehr auf die Anzahl der Körper/ Blasen zurückgeschlossen werden kann.

30

g) CS/SAE-Schichtdicke:

Für den Fall, dass die Blasen zerstört werden, handelt es sich hierbei um die Dicke der Schicht pro Ultraschallschnittbild (Schnittschicht), aus der die im Schnittbild dargestellten CS-Signale (in diesem Falle SAE-Signale) bei einem Scan mit paralleler Überlappung stammen. Für den Fall, dass die Körper/ Blasen bei der Beschallung mit den CS-Signalen nicht zerstört werden, handelt es sich um die Dicke der Schicht pro Ultraschallschnittbild, aus der die im Schnittbild dargestellten CS-Signale bei einem Scan mit paralleler Überlappung von Blasen stammen, die bei einer Verschiebung des Ultraschallfeldes jeweils neu hinzukommen. Die CS/SAE-Schichtdicke ist gleich der Verschiebungsstrecke pro Ultraschallschnittbild. Diese Schichtdicke ist vorzugsweise wesentlich geringer als die Schnittschicht. Die Schnittschicht entsteht im Untersuchungsobjekt durch Einstrahlung einer Schallkeule (Schallfeld). Dies geschieht auf herkömmliche Weise, indem Piezokristallelemente Schallimpulse aus-

5
10
15
20

senden, die durch geeignete Mittel in das zu beschallende Medium angekoppelt und fokussiert werden. Indem die in das Untersuchungsobjekt hineinragende Schallkeule beispielsweise entlang der Oberfläche des Untersuchungsobjektes verfahren wird, kann eine Schnittschicht von der Schallkeule nach und nach abgefahren und das entsprechende Bild durch die am Empfänger ankommenden Schallsignale erzeugt werden. Die Schichtdicke wird in beiden genannten Fällen durch den Vorschub zwischen zwei Bildern definiert.

h) Region of interest (ROI):

25 Hierbei handelt es sich um das Messfenster im Schnittbild.

i) Morphometric Units (MU):

Morphometric Units sind ein Maß für die Fläche, entsprechend einer Schnittschicht, ausgedrückt in der Bildschirmpixelanzahl, die dargestellte CS-Signale im Videobild einnehmen. Die Bildschirmpixel werden in der Regel automatisch durch Videodensitometrie gezählt. Ist die Anzahl der Bildschirmpixel eines einzelnen CS -Signals bekannt, kann aus den Morphometric Units auf die Körperanzahl/ Blasenanzahl geschlossen werden.

30

j) Korrigierte SAE ($SAE_{corr.}$) bzw. korrigierte MU ($MU_{corr.}$):

5 Wenn die Körper/ Blasen kleiner sind als die Dicke einer Schicht für ein Ultraschall-
schnittbild, kann es im Videobild zu überlagerten CS-Signalen kommen. Die Wahr-
scheinlichkeit für eine derartige Überlagerung steigt mit zunehmender Konzentration
an Körpern/ Blasen und Schichtdicke des Ultraschallschnittbildes, weil in diesem
Falle eine größere Anzahl von Körpern/ Blasen erfasst wird. Beide Parameter haben
10 direkten Einfluss auf die prozentuale Farbfläche der CS-Signale im Videobild. Bei
zufälliger Verteilung der Körper/ Blasen im untersuchten Volumen kann der Wert von
MU bei Überlagerung von CS-Signalen folgendermaßen korrigiert werden, solange
keine vollständige Farbsättigung in der ROI vorliegt:

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

15

FP: Bildschirmfarbpixel, die innerhalb des Messfensters (ROI) im Bereich der
dargestellten CS-Effekte liegen,

MU: $\sum FP$ innerhalb des Messfensters (ROI),

20

GP: Bildschirmgraupixel, die innerhalb des Messfensters (ROI), aber außer-
halb der dargestellten CS-Effekte liegen.

Über den Quotienten aus der Summe der Farbpixel und der Summe der CS-Signale

($F_{sae} = \frac{\sum FP}{\sum sae}$) innerhalb der ROI können die korrigierten MU ($MU_{corr.}$) in eine korri-

gierte CS-Signalanzahl ($SAE_{corr.}$) umgerechnet werden:

25

$$SAE_{corr} = \frac{MU_{corr}}{F_{sae}}$$

Die Anwendung dieser Korrekturformel setzt eine zufällige Verteilung der Körper/
Blasen im untersuchten Volumen voraus.

30

k) 2D-Array:

Ein 2D-Array besteht aus einer eindimensionalen Reihe von Piezo-Elementen.

5 l) 3D-Array:

Ein 3D-Array besteht aus mehreren nebeneinanderliegenden Reihen von Piezo-Elementen.

10 m) Schallkopf (Ultraschallwandler):

Vorrichtung zur Sonografie, enthaltend Piezoelemente.

n) Richtungen in Relation zum Schallkopf:

15

In Fig. 6 ist ein Schallkopf 23 schematisch gezeigt. Die Richtungen in Beziehung zum Schallkopf sind wie folgt definiert:

x = Quer zum Schallkopf (Bezugszeichen 24: 2D-Array)

20

y = lateral (Bezugszeichen 25)

z = axial (Schallausbreitungsrichtung) (Bezugszeichen 26)

o) Molekulare Marker:

25 Intra-, inter- und/oder extrazelluläre molekulare Strukturen, beispielsweise Rezeptoren, Liganden, Enzyme oder deren Strukturbestandteile.

30 Um Körper, bevorzugt Blasen in einem Untersuchungsobjekt quantifizieren zu können, werden insbesondere solche Blasen eingesetzt, die zu eigenständigen, charakteristischen Signalen angeregt werden können, und vor allem Blasen, die bei der Beschallung zerstört werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung und das erfindungsgemäße Verfahren dienen zur Quantifizierung von in einem Untersuchungsobjekt enthaltenen Körper, bevorzugt Blasen. Die Vorrichtung umfasst mindestens einen Schallkopf zur Aussendung eines Ultraschallfeldes, das die in einer Schicht in dem Untersuchungsobjekt enthaltenen Körper, bevorzugt Blasen zur Aussendung charakteristischer Ultraschallsignale anregt. Mindestens einer der Schallköpfe dient auch zum Empfang der charakteristischen Signale. Ferner ist mindestens ein Datenverarbeitungssystem zur Ermittlung der Anzahl der Körper, bevorzugt Blasen in der Schicht aus den charakteristischen Signalen vorgesehen. Ferner sind in erfindungsgemäßer Weise Mittel vorgesehen, mit denen das Ultraschallfeld nach einer Anregung der Körper, bevorzugt Blasen in einer ersten Schicht im Untersuchungsobjekt so verschiebbar ist, dass Körper/ Blasen nach der Verschiebung in einer zweiten Schicht anregbar sind, wobei die erste Schicht und die zweite Schicht überlappen und parallel und definiert gegeneinander verschoben sind. Somit werden Ultraschallsignaldatensätze aus unterschiedlichen Schnittschichten im Untersuchungsobjekt erhalten, die Informationen über das Vorhandensein von Körper/ Blasen in den einzelnen Schnittschichten enthalten, insbesondere über die räumliche Anordnung der Blasen in den Schnittschichten. Bezogen auf einen Schallkopf mit in Reihen angeordneten Piezokristallen, werden die Schichten vorzugsweise so gegeneinander verschoben, dass sie in Querrichtung (x-Richtung) zu den Piezokristallreihen überlappen.

Der Schallkopf kann entweder sowohl zum Aussenden von Ultraschallsignalen als auch zum Empfang der von den Körpern, bevorzugt Blasen herrührenden Signale ausgebildet sein. Alternativ kann der Schallkopf auch ausschließlich zum Aussenden der Ultraschallsignale ausgebildet sein. In diesem Falle ist ein weiterer Empfangskopf zur Detektion der ankommenden Ultraschallsignale von den Körpern, bevorzugt Blasen erforderlich.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Quantifizierung von im Untersuchungsobjekt enthaltenen Körpern, bevorzugt Blasen, werden in einer Schicht enthaltene Körper/ Blasen mit einem Ultraschallfeld zu charakteristischen Ultraschallsignalen angeregt. Die von den Körpern/ Blasen ausgesendeten charakteristischen Ultraschallsignale werden empfangen, und aus den empfangenen Ultraschallsignalen wird die Anzahl der Körper/ Blasen ermittelt, wobei jeweils durch die

Verschiebung des Ultraschallfeldes nach einer Anregung von Körpern/ Blasen in einer ersten Schicht im Untersuchungsobjekt Körper/ Blasen in einer zweiten mit der ersten Schicht überlappenden und parallel und definiert gegen diese verschobenen Schicht angeregt werden.

5

Die erfindungsgemäße Vorrichtung und das erfindungsgemäße Verfahren sind nicht auf Ausführungsformen unter Anwendung der Bildgebung oder des Videobildes limitiert. Die CS -Signale innerhalb einer Region of Interest (ROI) können auch bereits anhand der Empfangssignale (Radiofrequenz-(RF)-Daten) gezählt werden, wenn-

10 gleich sich die Sättigungsblasen-Konzentration bei Zählung der CS-Signale auf Ebene der Empfangssignale von der Sättigungsblasen-Konzentration bei Zählung der CS-Signale im zweidimensionalen Ultraschallschnittbild unterscheiden kann. Die erfindungsgemäße Vorrichtung und die Zählung der Empfangssignale kann in ein Ultraschall-Gerät integriert werden.

15

Im Gegensatz zu bekannten Vorrichtungen und Verfahren ist es mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung und dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, auch Konzentrationen an Körpern, bevorzugt Blasen zu bestimmen, die oberhalb einer Grenze liegen, die im Bereich von 1000 – 3000 Körper (Blasen)/ml liegt:

20

Mit bekannten radiologischen und kardiologischen Vorrichtungen und Verfahren, die vorzugsweise im Frequenzbereich von 2,5 – 12 MHz arbeiten, ist bei einer Konzentration über etwa 1000 Körpern (Blasen)/ml bereits eine Sättigung zu beobachten, so dass eine Quantifizierung unmöglich wird. Dies liegt daran, dass die räumliche Auflösung in diesem Falle nicht ausreichend hoch ist: Die räumliche Auflösung von Ultraschallwandlern ist nämlich durch deren Frequenz bestimmt. Mit höherer Frequenz steigt die räumliche Auflösung. Gleichzeitig werden aber der Schalldruck und damit die Eindringtiefe der Ultraschallwelle in das untersuchte Gewebe reduziert. Für die medizinische Diagnostik, für die größere Eindringtiefen benötigt werden, werden Ul-

25 traschallwandler im Frequenzbereich von etwa 2,5 MHz (Gewebe-Eindringtiefe von etwa 30 cm) bis 12 MHz (Gewebe-Eindringtiefe von etwa 7 cm) eingesetzt. Die räumliche Auflösung in x-Richtung oder x- und y-Richtung (in einer Ebene senkrecht zur Schallkeule) bei Verwendung eines Einzelkristall-Ultraschallwandlers mit rundem Querschnitt liegt in diesen Fällen im mm-Bereich. Daher liegt auch die Dicke des

30

Schallfeldes an der schmalsten Stelle in der von dem Wandler ausgesendeten Schallkeule im mm-Bereich. Aus diesem Grunde beträgt das kleinste von einem solchen Ultraschallgerät auflösbare Volumen ca. 1 mm^3 . Wird ein Körper, bevorzugt eine Blase in diesem Volumen durch Ultraschall zerstört, so kann die exakte räumliche Position des entsprechenden CS -Signals innerhalb dieses Volumens nicht genau bestimmt werden. Folglich wird dieses Signal im Bild in einer Größe dargestellt, die ebenfalls im Millimeter-Bereich liegt. Befinden sich in diesem Volumen mindestens zwei Körper, bevorzugt Blasen, so können diese von dem Ultraschallgerät mangels räumlicher Auflösung nicht mehr diskriminiert werden. Daher führen Konzentrationen an Körpern, bevorzugt Blasen von mehr als etwa 1000 Körper (Blasen)/ml zu einer Sättigung. Dies ist auch der Grund, warum das oben erwähnte Gerät von 3D-Echotech zur Quantifizierung der Körper, insbesondere Blasen nicht geeignet ist, da die Dicke des Schallfeldes im Bereich von ca. 1 - 2 mm liegt. Ein weiterer Grund dafür, dass dieses Gerät für die Quantifizierung von Körpern, insbesondere Blasen ungeeignet ist, besteht darin, dass der Schallkopf von Hand geführt wird, so dass einige Bereiche des Untersuchungsobjekts mehrfach oder in unterschiedlichem Masse überlappend, andere Bereiche gar nicht geschallt werden. Dieses Problem wird auch nicht durch die ebenfalls von 3D-Echotech entwickelte Möglichkeit der elektromagnetischen Positionsbestimmung des Schallkopfes gelöst, da diese nur etwa im Sub-Millimeter-Bereich genau ist.

Durch die vorliegende Erfindung wird erstmalig eine deutlich höhere räumliche Auflösung als mit bekannten Verfahren und Vorrichtungen ermöglicht. Gleichzeitig werden berechenbaren Volumina zugrunde gelegt. Dadurch ist erstmals eine Quantifizierung von Körpern, bevorzugt Blasen in einem Untersuchungsvolumen auch dann möglich, wenn die Sättigungskonzentration/ Sättigungsblasenkonzentration normalerweise überschritten würde.

Auch das Gerät von Kretztechnik ist für die Quantifizierung ungeeignet, da die Überlappung der Schallfelder in axialer Richtung (z) nicht gleichmäßig ist. Im Nahbereich überlappen mehrere benachbarte Schallfelder fast vollständig, während mit zunehmender Distanz zum Schallkopf Lücken entstehen, die dann interpoliert werden. Das hat zur Folge, dass auch die Signalausbeute in einem untersuchten Gewebe von der Distanz zum Schallkopf abhängt.

Erst durch die vorliegende Erfindung wird die vorgenannte Aufgabe gelöst.

Das Prinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens lässt sich besonders einfach am
5 Beispiel vollständiger Blasen-Zerstörung in jedem Ultraschallschnittbild verdeutlichen:

Mit Hilfe der Fig. 4, 5 b) und c) kann die Funktionsweise der Erfindung gezeigt werden:

- 10 a) Im ersten Bild wird ein kontrastgesättigtes Ultraschallschnittbild erhalten (Fig. 4).
- b) Die Blasen werden durch die Beschallung zerstört (Fig. 5a). SAE-Signale können danach nicht mehr detektiert werden. Eigenständige, charakteristische
15 Signale aussendende Blasen sind mit 6 bezeichnet, unzerstörte Blasen in der nicht angeregten Schnittschicht mit 5.
- c) Nachfolgend wird das Schallfeld zwischen zwei Bildern um eine definierte Verschiebungsstrecke gegen das Gewebe so verschoben, dass die beschallten Volumina des Untersuchungsobjektes einander überschneiden, wobei die
20 Längsachsen beider Volumina parallel zueinander liegen. Die Längsachse ist als Linie definiert, die in Richtung der Schallausbreitungsrichtung (Richtung z in Fig. 6; von oben nach unten in Fig. 5b) durch die Mitte des Schallfeldes läuft (siehe hierzu auch Fig. 7). Entsprechend ist im Sinne der vorliegenden Erfindung als parallele Verschiebung der beiden Schichten, die überlappen und
25 aus denen Ultraschallschnittbilder erhalten werden, zu verstehen, dass die Längsachsen der beiden Schichten parallel zueinander liegen.
- d) Wurden im ersten Bild alle Blasen zerstört, so können im zweiten Bild und allen nachfolgenden Bildern nur die neu hinzugekommenen detektiert werden. Bei einer Parallelverschiebung des Schallfeldes gegen das Untersuchungs-
30 objekt von beispielsweise 10 µm bedeutet dies, dass die im zweiten Bild neu hinzu kommenden Blasen aus einem Volumen mit einer Schichtdicke von 10 µm stammen. Da die Verschiebung im vorgenannten Sinne parallel ausgeführt wird, ist die Schichtdicke des Volumens, in dem sich die noch nicht zerstörten Blasen befinden, unabhängig von der Form des Schallfeldes, durchgehend

gleich, nämlich 10 μm . Diese noch nicht zerstörten Blasen sind quantifizierbar (Fig. 5 b) und c)). Zerstörte Blasen sind mit 7 bezeichnet.

Das Prinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens kann auch für solche Körper, bevorzugt Blasen genutzt werden, die mit diagnostischem Ultraschall zu einem eigenständigen und charakteristischen Signal unabhängig von einer Zerstörung angeregt werden können. Ein derartiges Signal kann beispielsweise ein harmonisches oder subharmonisches Signal sein.

Es wird hier analog wie bei einem SAE-Signal verfahren:

Im Fall von Blasen:

- a) im ersten Bild / einer ersten Schicht werden alle Blasen zerstört,
- b) in den nachfolgenden Bildern / Schichten werden die Blasen so angeregt, dass sie ein eigenständiges, charakteristisches Signal ergeben,
- c) solange die kumulative scan-distanz kleiner oder gleich der Schichtdicke des Schallfeldes ist, werden in jedem weiteren Bild / jeder Schicht werden die jeweils neu hinzukommenden Signale ermittelt,
- d) ist die kumulative scan-distanz größer als die Schichtdicke des Schallfeldes, oder wird die in einem Bild/ einer Schicht eine Signal-Sättigung erreicht, können die im Schallfeld befindlichen Blasen zerstört werden.

Im Fall von soliden Partikeln:

- a) im ersten Bild / einer ersten Schicht sind keine eigenständigen, charakteristische Signale soliden Partikel nach Anregung detektierbar; dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, dass der scan an einer Position begonnen wird, die frei von Partikeln ist, oder dadurch, dass vor Beginn des scans der Transducer aus einem Bereich heraus, in dem eigenständige, charakteristische Signale solider Partikel nach Anregung detektierbar sind, in einen benachbarten Bereich verschoben wird, in dem dies nicht der Fall ist,
- b) in den nachfolgenden Bildern / Schichten werden die soliden Partikel so

angeregt, dass sie ein eigenständiges, charakteristisches Signal ergeben,

- c) solange die kumulative scan-distanz kleiner oder gleich der Schichtdicke des Schallfeldes ist, werden in jedem Bild / jeder Schicht werden die jeweils neu hinzukommenden Signale ermittelt.

Die Ermittlung der neu hinzukommenden Signale kann, wenn das Aussenden des Signals nicht mit der vollständigen Zerstörung der Körper, bevorzugt der Blasen einhergeht, durch Subtraktion des jeweiligen Vorwertes oder durch einfache, vorzugsweise automatische Zählung der Signale nach Senden eines Zerstörungspulses ermittelt werden.

Gehen die eigenständigen, charakteristischen Signale mit der Zerstörung der Körper, bevorzugt der Blasen einher, kann die Signalanzahl des Überlappungsbereiches in der Regel wie bei SAE-Signalen durch einfache, vorzugsweise automatische Zählung ermittelt werden.

Bei einer parallelen Verschiebungsstrecke von 10 μm gegen das Gewebe und einer Schichtdicke des Schallfeldes von 1 mm beispielsweise überlappen sich die Schnittbilder (Schnittschichten) zu 99 %. Im zweiten Schnittbild werden nur die neu hinzugekommenen Körper, bevorzugt Blasen detektiert, die sich in der 10 μm -Schicht befinden.

Die Strecke der Verschiebung zwischen zwei Bildern beträgt mindestens 5 μm , vorzugsweise mindestens 10 μm und besonders bevorzugt mindestens 20 μm . In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform beträgt die Verschiebungsstrecke mindestens 50 μm . Die Verschiebungsstrecke ist kleiner als die Scandicke (ca. 1 - 2 mm). Die optimale Streckenverschiebung ist abhängig von der höchsten Körperkonzentration/ml, bevorzugt Blasenkonzentration/ml im gescannten Volumen. Es ist vorteilhaft, eine Überlappung der Volumina zwischen 20 % und 99,99 %, vorzugsweise zwischen 40 % und 99,9 % und insbesondere bevorzugt zwischen 70 % und 99 %, einzustellen.

Wenn die Verschiebungsstrecke zu groß gewählt wird oder sich die Ultraschallschnittbilder gar nicht überlappen (Fig. 5a), ist auch mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine absolute Quantifizierung nicht möglich, da es im Ultraschallschnittbild zu einer nicht korrigierbaren Überlagerung der CS-Signale kommt.

5

Die Verschiebungsstrecke kann beispielsweise zu groß gewählt werden, oder die Ultraschallschnittbilder können gegebenenfalls gar nicht überlappen, wenn der Anreicherungsgrad der Körper, bevorzugt Blasen unterschätzt wird. In diesen Fällen muss die Verschiebungsstrecke pro Ultraschallschnittbild reduziert werden, um die absolute Quantifizierbarkeit zu gewährleisten. Fig. 9 bis 11 zeigen den Zusammenhang zwischen der Verschiebungsstrecke und den Morphometric Units (MU) bzw. der Anzahl der eigenständigen, charakteristischen Signale im Schnittbild.

Die Konzentration an Körpern, bevorzugt Blasen wird bevorzugt bei solchen CS/SAE-Schichtdicken bestimmt, deren Schnittbilder jeweils 20 bis 80 %, vorzugsweise 30 bis 70 % Farbsättigung aufweisen. Zugunsten einer verringerten Untersuchungszeit kann die Verschiebungsstrecke aber erhöht werden, solange in keinem Schnittbild die Sättigungsblasen-Konzentration erreicht wird. Für einen optimalen Kompromiss zwischen Untersuchungszeit und Genauigkeit der Messung kann ein definiertes Programm, das die CS/SAE-Schichtdicke variiert, sorgen. Die durch das Programm gesteuerte optimale Verschiebungsstrecke kann beispielsweise anhand einer ausreichend großen Population an Patienten (Untersuchungsobjekten) ermittelt werden.

Kommt es dennoch zufällig zu einzelnen kontrastgesättigten Schnittbildern, ist die absolute Quantifizierbarkeit nicht mehr gegeben. Eine Quantifizierbarkeit über die nicht kontrastgesättigten Schnittbilder bleibt allerdings möglich.

Selbst wenn in bestimmten Bereichen des Untersuchungsgebietes eine Farbsättigung vorliegt, ist durch den standardisierten Scan-Prozeß mit definierter Parallelverschiebung der Schallfelder und durch die höhere räumliche Auflösung des erfindungsgemäßen Verfahrens eine reproduzierte Messung möglich. Eine solche Messung kann z.B. für einen Vergleich zwischen verschiedenen Patienten oder für eine Therapie-Verlaufskontrolle bei demselben Patienten ausreichen.

Werden in einem Schnittbild nicht alle Blasen zerstört, so kann man vor Anfahrt der nächsten Position auch einen oder mehrere weitere Zerstörungspulse senden.

- 5 Die Überlappung und Verschiebung der Volumina der Schnittschichten kann dadurch erreicht werden, dass der Schallkopf und das Untersuchungsobjekt gegeneinander (relativ zueinander) verschoben werden.

Die definiert parallele Verschiebung kann erreicht werden, indem

- 10 I. das Gewebe bzw. das Untersuchungsobjekt, beispielsweise ein Patient, gegenüber einem fixierten Schallkopf verschoben wird oder
- II. der Schallkopf gegenüber dem zu untersuchenden fixierten Untersuchungsobjekt, beispielsweise einem Gewebe, verschoben wird oder
- 15 III. ein Schallkopf verwendet wird, der in der Lage ist, zeitlich nacheinander sich überlappende und verschobene Schnittbilder zu erstellen, d.h. die Volumina werden mit einem Schallkopf verschoben und zur Überlappung gebracht, der selbst überlappende und parallel verschobene Ultraschallbilder aufnimmt; hierzu kann der Schallkopf so angesteuert werden, dass sich überlappende und
- 20 insbesondere quer verschobene Ultraschallschnittbilder bzw. Schallkeulen einer Schnittschicht aufgenommen werden.

Die verschiedenen Verschiebungsmöglichkeiten können auch kombiniert werden.

- 25 Beispielhaft seien folgende Varianten paralleler Verschiebung beschrieben:

- I. Das Untersuchungsobjekt (Patient, Tier, ein exenteriertes oder isoliertes Organ oder eine Zellkulturschale) wird automatisch (z.B. durch Servomotor oder DC-Motor angetrieben) am fixierten Schallkopf vorbeigefahren.
- 30 II. Der Schallkopf wird automatisch mit Hilfe einer speziellen Vorrichtung über dem / gegenüber dem Untersuchungsobjekt (Patient, Tier, ein exenteriertes oder isoliertes Organ oder eine Zellkulturschale) verschoben. Die Vorrichtung kann ein Rahmen sein, innerhalb dessen der Schallkopf in einer Halterung fixiert ist

und durch Motortrieb entlang einer Parallelführung bewegt wird.

Im einfachsten Fall kann ein Einzelkristall in x- und y-Richtung mit definierten Überlappungsbereichen verschoben werden. Diese Variante bietet sich z.B. für Kulturschalen von Zellen an, an deren Oberfläche sich Körper, insbesondere Blasen spezifisch oder in deren Inneren unspezifisch, beispielsweise durch Phagozytose, angereichert haben. Hier reicht die Aussage aus, wie viele Körper, insbesondere Blasen pro Fläche bzw. Volumen sich angereichert haben. Die Daten müssen nicht in Bilder umgerechnet werden.

Außerdem können mit einem Schallkopf, enthaltend ein 2D-Array, durch eine entsprechende Steuerung des Scans benachbarte Schallkeulen innerhalb einer Linie in Querrichtung definiert zur Überlappung gebracht werden.

III. Mit einem Schallkopf, enthaltend ein 3D-Array, können durch eine entsprechende Steuerung des Scans benachbarte Schallkeulen innerhalb einer Linie oder Schallkeulen benachbarter Linien in Querrichtung definiert zur Überlappung gebracht werden. Bei dieser Variante ist eine weitere Bewegung von Schallkopf oder Untersuchungsobjekt nicht mehr nötig.

Der Schallkopf kann auch ein 2D-Array enthalten, welches innerhalb des Schallkopfes parallel mit definierter Überlappung in Querrichtung (x-Richtung) bewegt wird. Die laterale Auflösung kann innerhalb eines 2D-Schnittbildes gesteigert werden, wenn sich die einzelnen Scan-Linien, aus denen das Schnittbild aufgebaut ist, ebenfalls definiert überlappen. Die einzelnen Schallfelder, die jeweils von einer Gruppe benachbarter Piezoelemente erzeugt werden, werden dabei im Gegensatz zur konventionellen Steuerung stärker und vor allem definiert zur Überlappung gebracht, indem kleine Schrittweiten (bis hinunter zu einem Piezo-Element) gewählt werden.

Dies ist beispielsweise in Fig. 7 gezeigt: Von einem Array von einzelnen Piezoelementen 11 wird ein kleiner Bereich 12 von Piezoelementen, umfassend wenige Arrayelemente, zu Schwingungen angeregt (Fig. 7a). Dadurch wird eine Schallwelle in Form einer Schallkeule 9 in das Untersuchungsobjekt emittiert.

Innerhalb der Schallkeule befindliche unzerstörte Blasen 8 werden zerstört und senden dadurch eigenständige, charakteristische Signale 9 aus. Die zerstörten Blasen sind mit der Bezugsziffer 10 bezeichnet. Anschließend wird eine neu gebildete Gruppe von Piezoelementen des Arrays zu Schwingungen angeregt, die sich von der bei der ersten Anregung verwendeten Gruppe nur um ein Piezoelement unterscheidet, um das die Gruppe nunmehr versetzt ist (Fig. 7b). Durch die Überlappung der dadurch entstehenden Schallkeule mit der zuvor ausgesendeten Schallkeule werden nur noch die neu erfassten Blasen zu eigenständigen, charakteristischen Signalen angeregt.

Wie beim definiert überlappenden Scan in Querrichtung zum Schallkopf erhöht sich die Auflösung um den Faktor, in dem die Verschiebung zur Breite der Piezo-Elementgruppe steht.

- 15 Zur Verschiebung des Schallkopfes und/oder des Untersuchungsobjektes ist daher mindestens ein Motorantrieb für die Verschiebung des Untersuchungsobjektes bzw. des mindestens einen Schallkopfes gegeneinander vorgesehen.

- 20 Falls der Schallkopf gegenüber dem Untersuchungsobjekt verschoben werden soll, muss dieses in definierter Weise bewegt werden. Hierzu ist eine verfahrbare Halterung für den Schallkopf vorgesehen. Das Untersuchungsobjekt wird in einer Haltevorrichtung fixiert. Es ist selbstverständlich nicht unbedingt erforderlich, das Untersuchungsobjekt durch Einspannen, Klemmen oder eine andere ähnliche Fixierung mit der Haltevorrichtung festzuhalten. Es genügt auch, dass das Objekt praktisch bewegungslos von der Haltevorrichtung gehalten wird. Beispielsweise kann ein Patient auf einer Liege platziert werden, auf der dieser während der Untersuchung ruht. Derartige Haltevorrichtungen können für die Halterung des Untersuchungsobjektes sowohl dann eingesetzt werden, wenn dieses während der Untersuchung nicht bewegt wird, sondern nur der Schallkopf, als auch dann, wenn das Untersuchungsobjekt bewegt wird und der Schallkopf nicht. Auch für den Fall, dass sowohl der Schallkopf als auch das Untersuchungsobjekt gleichzeitig gegeneinander bewegt werden, können die vorgenannten Haltevorrichtungen für das Untersuchungsobjekt eingesetzt werden.

Zur Quantifizierung der Körper, bevorzugt Blasen wird in einer bevorzugten Ausführungsform ein Bildauswertesystem zur Datenverarbeitung und Bildanzeige vorgesehen, mit dem die Quantifizierung videodensitometrisch durchführbar ist. Hierzu können die aus den Ultraschallsignalsätzen gebildeten Datensätze in bekannter Weise so umgeformt werden, dass ein Videobild der einzelnen Schnittschichten entsteht, wobei jede Schnittschicht die Information aus den Bereichen enthält, die mit einer vorausgehend angeregten Schnittschicht nicht überlappt (durch Verschiebung erreichter neuer Schnittschichtbereich (CS/SAE-Schicht)). Die in den einzelnen Videobildern dargestellten Körper, insbesondere Blasen können dann manuell ausgezählt oder durch videodensitometrische Ermittlung der Farbbildpunkte (Farbpixel) und Division des daraus erhaltenen Werts durch die mittlere Anzahl der Farbpixel pro Blasendarstellung erhalten werden.

Nachdem die Anzahl der Körper, bevorzugt Blasen nach vorstehend beschriebener Methode ermittelt worden ist, kann es zur korrigierten Ermittlung der Anzahl erforderlich sein, eine Korrektur nach folgender Formel vorzunehmen:

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

20 wobei

FP die die Körper-, insbesondere Blasensignale darstellenden Farbpixel in einer örtlich aufgelösten Bildschirmdarstellung innerhalb der Überlappungsschicht sind und

GP Bildschirmgraupixel in einer örtlich aufgelösten Bildschirmdarstellung sind, die nicht die die Körper, insbesondere Blasen darstellenden Pixel sind.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist insbesondere für die Ultraschalldiagnostik und/oder -therapie am Menschen oder am Tier geeignet.

30

Nicht nur in Bereichen der klinischen Diagnostik, sondern auch in der medizinischen und biologischen Grundlagenforschung und der vorklinischen Forschung und Entwicklung erschließen sich neue Untersuchungsmöglichkeiten:

- 5 Die Körper, bevorzugt Blasen können *in vivo* im Tierversuch, *ex vivo* in entnommenen Organen oder Geweben sowie *in vitro* z.B. in Zellkulturen quantifiziert werden, um pathologische oder physiologische Prozesse auf molekularer Ebene abzuklären.

- Bei der Wirkstofffindung und Entwicklung spezifischer Bindungssysteme kann mit
10 dem erfindungsgemäßen Verfahren geprüft werden, welche Bindungssysteme überhaupt funktionieren, welche Bindungsmoleküle unter welchen Bedingungen an welchen Stellen in welcher Menge vorliegen, welche Einflussgrößen die Bindungsfähigkeit und Anreicherung bestimmen, welche Kinetik die Körper, bevorzugt Blasen aufweisen oder, im Falle ultraschallinduzierter Wirkstofffreisetzung, welche Mengen eines verkapselten Wirkstoffes freigesetzt werden.
15

- Die erfindungsgemäße Vorrichtung und das erfindungsgemäße Verfahren können beispielsweise für das *in-vivo*-Mapping von physiologisch hoch oder herunter regulierbaren molekularen Markern in Organen und Geweben ab der postembryonalen
20 Ontogenese eingesetzt werden (Ontogenese: Gesamtheit der Entwicklung eines Individuums von der unbefruchteten/befruchteten Eizelle bis zum natürlichen Tod: diese umfasst vier Phasen: 1. Embryonalentwicklung, 2. postembryonale Entwicklung, 3. Zeit der Geschlechtsreife und Fortpflanzung und 4. Zeit des Alterns).

- 25 Hierzu können sowohl passiv als auch aktiv akkumulierbare Körper, bevorzugt Blasen verwendet werden: Die Körper können zu diesem Zweck mit für die Marker spezifischen Bindungsmolekülen versehen werden, die sich an der Oberfläche befinden (aktiv akkumulierbare Körper/ Blasen). In einer alternativen Ausführungsform der Erfindung können auch passiv akkumulierbare Körper eingesetzt werden, d.h. Körper/
30 Blasen ohne derartige spezifische Bindungsmoleküle.

Mit diesem Verfahren können molekulare Marker *in vivo* auf unterschiedlichen Zellen im Menschen und im Tier lokalisiert und deren Einfluss auf die Ontogenese bestimmt werden.

5 Ferner kann ein zeitlich gesteuertes Mapping von bekannten und neu identifizierten molekularen Markern im Gesamtorganismus *in vivo* durchgeführt werden. Dadurch kann eine bisher noch nicht bekannte Funktion der molekularen Marker in der Ontogenese *in vivo* ermittelt werden.

10 Für die Gerontologie besonders interessant ist eine Identifizierung von molekularen Markern in der 4. Phase der Ontogenese (Zeit des Alterns) und deren Einfluss auf Alterungsprozesse. Hierzu kann mittels der erfindungsgemäßen räumlich hoch aufgelösten Sonografie untersucht werden, aus welchen Alterserscheinungen diese molekularen Marker stammen und zu welchen diese führen können, ferner welche Basis diese Rezeptoren für altersbedingte Veränderungen oder Erkrankungen des Gesamtorganismus' darstellen und ob sich daraus Erkenntnisse für die Entwicklung von Medikamenten ableiten lassen, die altersbedingte Beschwerden lindern oder so-
15 gar vermeiden helfen.

20 In einer weiteren interessanten Anwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des erfindungsgemäßen Verfahrens kann ein *in-vivo*-Mapping von pathologisch hoch oder herunter regulierbaren molekularen Markern in Organen und Geweben während der Pathogenese, ebenfalls unter Verwendung von passiv und aktiv akkumulierbaren Körpern, insbesondere Blasen durchgeführt werden.

25 Mit diesem Verfahren können krankheitsassoziierte molekulare Marker *in vivo* auf unterschiedlichen Zellen im Menschen und im Tier lokalisiert und daher deren Einfluss auch auf die Pathogenese von Krankheiten *in vivo* bestimmt werden.

30 Weiterhin kann ein zeitlich gesteuertes Mapping von bekannten und neu identifizierten krankheitsassoziierten molekularen Markern im Gesamtorganismus während der Pathogenese *in vivo* durchgeführt werden. Dadurch kann eine bisher noch nicht bekannte Funktion der molekularen Marker in der Pathogenese *in vivo* ermittelt werden.

Ferner lassen sich aus diesen Erkenntnissen neue therapeutische Medikamente und/oder Behandlungsstrategien dadurch ableiten, dass zu bestimmten Zeitpunkten die ermittelten Oberflächenzustände von Zellen (Status der Zellen bezüglich der Ak-

tivierung / des Ruhezustandes) reguliert und diese Zustände mit dem erfindungsgemäßen Verfahren verfolgt werden.

5 Schließlich ist ebenfalls eine hoch sensitive Therapieverlaufskontrolle *in vivo* dadurch möglich, dass die Oberflächenzustände von Zellen verfolgt werden.

Die vorstehenden Verfahren können auch *ex vivo* an entnommenen Organen und Geweben durchgeführt werden.

10 Das *in vivo*-Mapping der molekularen Marker in den Organen und Geweben ab der postembryonalen Ontogenese und während der Pathogenese kann selbstverständlich an verschiedenen Tierarten und/oder Tiermodellen, insbesondere in der Gerontologie oder für Krankheitsmodelle angewendet werden. Das Mapping kann allge-
15 mein auch für alle Tierarten, beispielsweise landwirtschaftliche Nutztiere, Haus- und Heimtiere sowie Wildtiere, und für den Menschen angewendet werden. Da das Mapping *in vivo* eingesetzt werden kann, erübrigen sich in vielen Fällen zeitlich und finanziell aufwendige herkömmliche *in vitro*-Verfahren, beispielsweise die Immunhistochemie, die oftmals zusätzlich mit dem Nachteil der Notwendigkeit behaftet sind, molekulare Marker zu genau einem Zeitpunkt zu identifizieren und zu charakterisie-
20 ren.

Weiterhin können die erfindungsgemäße Vorrichtung und das erfindungsgemäße Verfahren auch für die Charakterisierung von Zellkulturen durch *in vitro*-Mapping von hoch und herunter regulierbaren molekularen Markern der Zellen unterschiedlicher
25 Herkunft eingesetzt werden, beispielsweise unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen oder zur Charakterisierung von neuen Zelllinien bzw. zur Neucharakterisierung von bestehenden Zelllinien nach verschiedenen Passagierungen bzw. unmittelbar vor deren Anwendung, insbesondere bei der Implantation von Tumorzellen in Mäusen, Ratten und anderen Tiermodellen. In diesem Fall können neben tierischen
30 und menschlichen Zellen auch pflanzliche Zellen charakterisiert werden.

Auch in diesem Falle können die Körper, bevorzugt Blasen mit für die Marker spezifischen Bindungsmolekülen versehen werden.

Zur Identifikation von molekularen Markern in den jeweiligen Anwendungsbereichen wird ausdrücklich auf folgende beispielhafte Publikationen hingewiesen, die hiermit als Referenz in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Anmeldung einbezogen werden, wobei die darin beschriebenen Fragestellungen mit der Vorrichtung und mit dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung untersucht werden können:

1. Phelps, M.: "Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes". Proc. Natl. Acad. Soc., USA 2000, 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.
4. Anderson, S.A., Rader, R.K., Westlin, W.F., et al., "Magnetic Resonance Contrast Enhancement of Neovasculature with $\alpha_v\beta_3$ -Targeted Nanoparticles". Magn. Reson. Med., 2000, 44:433-439.
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 $\alpha_v\beta_3$ -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.
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., Klibanov, 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.
10. Klibanov, A.L., Hughes, M.S., Marsh, J.N., et al., "Targeting of ultrasound contrast material: An in vitro feasibility study". Acta Radiol. Suppl., 1997, 38:113-120.

11. Demos, S.M., Dagar, S., Klegerman, M., Nagaraj, A., Mcpherson, D.D., Onyuksel, 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., Klibanov, S., et al., "Microbubbles Targeted to Intercellular Adhesion Molecule-1 Bind to Activated Coronary Artery Endothelial Cells". Circulation, 1998, 98:1-5.

Die Vorrichtung und das Verfahren zur Quantifizierbarkeit von Körpern, bevorzugt Blasen erlauben bzw. unterstützen somit beispielsweise auch:

- eine Dignitätsbestimmung von Tumoren,
- ein Staging von Tumoren,
- eine Therapieverlaufskontrolle z.B. bei der Chemotherapie,
- eine Erhöhung der Reproduzierbarkeit und damit der Vergleichbarkeit von Befunden unterschiedlicher Untersucher,
- eine Vermeidung von den Patienten belastenden Biopsien,
- eine Reduktion der Schichtdicke, aus der die im Ultraschallbild dargestellten CS-Signale stammen, wodurch sich Blasen-Anreicherungsgebiete im Millimeter-Bereich räumlich hochauflösend im Mikrometer-Bereich abbilden und bezüglich der Blasenkonzentration quantifizieren lassen.

Die Körper, insbesondere Blasen sind in der Regel in Ultraschallkontrastmitteln enthalten und werden vorzugsweise in Form von Suspensionen appliziert.

Prinzipiell können alle Körper, insbesondere (Mikro)-Blasen, die zur Anwendung als Ultraschallkontrastmittel geeignet sind, mit diagnostischem Ultraschall zu CS-Effekten angeregt werden. Für das im Handel befindliche Ultraschallkontrastmittel Levovist® (Schering AG, Berlin), das Mikropartikel aus Galaktose und Palmitinsäure enthält und nach Zugabe von Wasser eine Suspension stabilisierter Gasbläschen ergibt, wurden auch CS -Effekte nach unspezifischer Anreicherung in der Leber beobachtet (Blomley, M.J. et al.: „Stimulated acoustic emission to image a late liver and spleen-specific phase of Levovist in normal volunteers and patients with and without liver disease“. Ultrasound Med. Biol., 1999, Nov., 25(9):1341- .

Erfindungsgemäß bevorzugt sind partikuläre Ultraschallkontrastmittel, enthaltend Blasen in Form gasgefüllter Mikrokapseln bzw. gasgefüllter Mikropartikel, deren Hülle aus Polyalkylcyanacrylaten, insbesondere Polybutylcyanacrylat, besteht. Diese sind
5 beschrieben in EP 0 644 777 B1, insbesondere in den Beispielen: Danach wird Cyanacrylsäurealkylester, beispielsweise Cyanacrylsäurebutylester, in saurer wässriger Lösung, die zusätzlich ein Tensid enthält, dispergiert. Die entstehenden Mikropartikel können durch Zentrifugation gewonnen werden. Besonders bevorzugt sind Blasen mit funktionalisierten Polyalkylcyanacrylaten, die gemäß dem in WO 01/68150 A1
10 beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Daher wird das dort beschriebene Verfahren ausdrücklich in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Anmeldung mit aufgenommen. Zur Herstellung der erfindungsgemäß bevorzugten Blasen werden die in WO 01/68150 A1 beschriebenen Polymere verwendet. Daher werden auch diese Ausgangsstoffe zur Herstellung der Blasen ausdrücklich in den Offenbarungs-
15 inhalt der vorliegenden Anmeldung mit aufgenommen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch für Ultraschallkontrastmittel verwendet werden, die verschiedene Körperarten, bevorzugt Blasenarten enthalten.

20 Die Körper können sich in mindestens einem der folgenden Merkmale unterscheiden:

- Art des soliden Materials,
- Größe,
- Bindungsmoleküle auf deren Oberfläche,
- 25 - Anregbarkeit durch verschiedene Pulsformen,
- Zerstörbarkeit durch Schall,
- Art des charakteristischen Signals
- Art des Gases in dem Körper/ Blase,
- Art der Hülle eines Körpers/Blase, z.B. Materialdicke, Elastizität,.

30

Beispielsweise können solche Blasengemische bzw. deren Verteilungsmuster im Untersuchungsobjekt mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ebenfalls mit hoher räumlicher Auflösung quantifiziert werden,

- a) indem bei einer Position hintereinander verschiedene Pulsformen gesendet und/oder verschiedene charakteristische Signale empfangen werden; kommt es dabei nicht zur vollständigen Zerstörung der Blasen, kann ein Zerstörungspuls gesendet werden, bevor zur nächsten Position gefahren wird;
- 5 oder,

- b) indem das zu untersuchende Gebiet mehrfach mit entsprechender definierter Verschiebung gescannt wird, wobei jeder Scan mit einer anderen für die jeweilige Blasenart notwendigen Pulsform durchgeführt wird.

10 Es können sowohl verschiedene Pulsformen, als auch verschiedene Schallfeldverschiebungen miteinander kombiniert werden, solange die resultierende Überschneidung der Schallfelder definiert und in Bezug auf deren räumliche Ausdehnung berechenbar erfolgt und solange die eingesetzten Blasen anhand charakteristischer Signale detektiert werden können.

15

Unterscheiden sich die Blasen gleichzeitig in dem Bindungsmolekül auf der Oberfläche und in ihrer Zerstörbarkeit durch Schall, kann zur Ermittlung der *in-vivo*-, *ex vivo*- und *in vitro*-Verteilung der Bindungsstellen in der Untersuchungsregion folgendermaßen vorgegangen werden:

20

- a) es werden zwei unterschiedliche Blasenarten injiziert:
- Blasenart A, mit geringem Schalldruck zerstörbar und mit Bindungsmolekül Anti-X für *in-vivo*-Bindungsstelle X auf der Oberfläche, und
 - 25 Blasenart B, mit hohem Schalldruck zerstörbar und mit Bindungsmolekül Anti-Y für *in-vivo*-Bindungsstelle Y auf der Oberfläche,

25

- b) Anfahrt der errechneten Position,
- c) Aufnehmen von einem oder mehreren Bildern mit niedrigem Schalldruck, Datenspeicherung,
- d) Aufnehmen von einem oder mehreren Bildern mit hohem Schalldruck, Datenspeicherung,
- 30 e) definierte Verschiebung des Schallfeldes,
- f) Wiederholung der Schritte c) - e) bis zum Ende des Scans,
- g) Auswertung der Daten für die Bindungsmoleküle X und Y, deren Anzeige auf dem Monitor und Speicherung.

30

- Bei allen genannten Varianten wird die Sättigungsblasen-Konzentration um den Faktor erhöht, in dem die jeweils zwischen zwei Bildern bzw. Schallkeulen zurückgelegte Strecke zur Schichtdicke des gesamten Schallfeldes steht. Bei einer 10 μm -
- 5 Verschiebung und einer Schichtdicke von 1 mm erhöht sich die Sättigungsblasen-Konzentration um den Faktor 100. Gleichzeitig verringert sich die Schichtdicke des Gewebes, aus dem die neu hinzugekommenen Blasen stammen, um denselben Faktor.
- 10 Dadurch kann eine histologische Auflösung erreicht werden. Da dieses Prinzip auch *in vivo* anwendbar ist, kann man bezüglich der dargestellten Signale auch von einer „*in vivo*-Sono-Histologie“ oder im Fall einer spezifischen Blasen-Anreicherung von einer sonografischen „*in-vivo*-Immunohistologie“ sprechen.
- 15 Die gemessenen MU können für eine Diagnose beispielsweise folgendermaßen ausgewertet werden:
- A. Vergleich der gemessenen MU bei konstant gehaltener CS/SAE-Schichtdicke und Dosis zur intraindividuellen Verlaufskontrolle einer Therapie.
- 20 B. 1) Zunächst Ermittlung der Abhängigkeit der gemessenen MU von der CS/SAE-Schichtdicke und/oder Dosis in einem speziellen Messfenster (Leber, Tumoroberfläche, Gefäßendothel etc.) anhand einer möglichst großen Population. Die Population kann aus Individuen bestehen, die sich hinsichtlich der Verteilung und des Anreicherungsgrades der Blasen im Messfenster nicht unterscheiden, d.h. die homogen ist oder aber die diesbezüglich gruppiert ist. Diese Abhängigkeiten müssen in der Regel bei verschiedenen Ultraschallgerätesettings (Schallkopf, Detektionsmode usw.) ermittelt werden.
- 25 2) Ermittlung von linearen Korrelationsfunktionen im Bereich von 20 bis 80 %, vorzugsweise im Bereich von 30 bis 70 % Farbsättigung.
- 30 3) Ggf. Integration der linearen Korrelationsfunktionen in eine Auswertungssoftware des Ultraschallgerätes.
- 4) Zählung der CS-Signale im entsprechenden Messfenster eines Untersuchungsobjekts, beispielsweise eines Patienten.

- 5) Anhand der linearen Korrelationsfunktionen: Bestimmung der absoluten Blasenanzahl bzw. der Blasenkonzentration im speziellen Messfenster des Patienten, wenn Farbsättigung im Geltungsbereich der linearen Korrelationsfunktion liegt.

5

- C. 1) Zunächst Ermittlung der Abhängigkeit der absolut gezählten CS-Signale von der CS/SAE-Schichtdicke und/oder Dosis in einem speziellen Messfenster (Leber, Tumoroberfläche, Gefäßendothel usw.) anhand einer möglichst großen Population. Die Population kann aus Individuen bestehen, die sich hinsichtlich der Verteilung und des Anreicherungsgrades der Blasen im Messfenster nicht unterscheiden, d.h. die homogen ist oder aber die diesbezüglich gruppiert ist. Diese Abhängigkeiten müssen in der Regel bei verschiedenen Ultraschallgerätesettings (Schallkopf, Detektionsmode usw.) ermittelt werden.

10

15

- 2) Durchführung von Kurvenfits, Ermittlung von die jeweilige Kurve beschreibenden Korrelationsfunktionen.
- 3) Ggf. Integration der Korrelationsfunktionen in eine Auswertungssoftware des Ultraschallgerätes.
- 4) Zählung der CS-Signale im entsprechenden Messfenster eines Patienten.
- 5) Anhand der Korrelationsfunktionen: Bestimmung der absoluten Blasenanzahl bzw. der Blasenkonzentration im speziellen Messfenster des Patienten.

20

Die Erfindung soll mit folgenden Beispielen belegt werden, ohne dass der Schutzzumfang der Erfindung dadurch beschränkt wird. Hierzu wird erläuternd auch auf nachfolgende Figuren Bezug genommen. Es zeigen im Einzelnen:

25

Fig. 12: Blasenanreicherung in der Leber, Ratte 1 (Beispiel 2): $1 \cdot 10^8$ Blasen/ml; Messung *ex vivo*, 30 min. *p.i.*

a: SAE-Schichtdicke = ca. 1 mm

b: SAE-Schichtdicke = 20 μ m

30

Fig. 13: Blasenanreicherung in der Leber, Ratte 2 (Beispiel 2): $1 \cdot 10^7$ Blasen/ml; Messung *ex vivo*, 30 min. *p.i.*

a: SAE-Schichtdicke = ca. 1 mm

b: SAE-Schichtdicke = 20 μm

Fig. 14: Abhängigkeit der MU von der SAE-Schichtdicke

Ratte 1 (Beispiel 2): $1 \cdot 10^8$ Blasen/ml; Messung *ex vivo*, 30 min.

5

Fig. 15: Abhängigkeit der MU_{corr} von der SAE-Schichtdicke

Ratte 1 (Beispiel 2): $1 \cdot 10^8$ Blasen/ml; Messung *ex vivo*, 30 min.

Fig. 16: Abhängigkeit der SAE_{corr} von der SAE-Schichtdicke

10 Ratte 1 (Beispiel 2): $1 \cdot 10^8$ Blasen/ml; Messung *ex vivo*, 30 min.

Fig. 17: Abhängigkeit der MU von der SAE-Schichtdicke

Ratte 2 (Beispiel 2): $1 \cdot 10^7$ Blasen/ml; Messung *ex vivo*, 30 min.

15 Fig. 18: Abhängigkeit der MU_{corr} von der SAE-Schichtdicke

Ratte 2 (Beispiel 2): $1 \cdot 10^7$ Blasen/ml; Messung *ex vivo*, 30 min.

Fig. 19: Abhängigkeit der SAE_{corr} von der SAE-Schichtdicke

Ratte 2 (Beispiel 2): $1 \cdot 10^7$ Blasen/ml; Messung *ex vivo*, 30 min.

20

Fig. 20: Anreicherung von spezifischen Blasen, an deren Oberfläche anti-CD-105 Antikörper gekoppelt sind, im F9-Teratom einer Maus (Beispiel 3)

a: Grafische Darstellung

b: Sonografischer Längsschnitt des Tumors in Scan-Richtung

25 Bereich zwischen den Linien 16 und 17: Tumor beim ersten Scan

Bereich zwischen den Linien 18 und 19: Tumor beim zweiten Scan

Fig. 21: Farbsignale der im Tumor angereicherten spezifischen Blasen (vier Mäuse, Beispiel 3) im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (vier Mäuse, Beispiel 3).

30

Beispiel 1:

Agar-Phantom enthaltend 30.000 Blasen/ml:

5 (a) Herstellung der Blasen:

Die Blasen werden gemäß Beispiel 4 (a) hergestellt.

(b) Herstellung des Agar-Phantoms enthaltend 30.000 Blasen/ml:

10

665 ml Wasser (Ampuwa[®], Fresenius) wurden in einem Wasserkocher (Braun, Typ 3 217 WK 210) gekocht und in ein 1000 ml Becherglas überführt. Es wurden 1,7 g Benzoessäure (Merck) zur Konservierung und 10 g Agar (Merck) unter Rühren hinzugegeben. Die Agarlösung wurde in einer Mikrowelle (Bosch HMT 702 C, 800 W) erneut kurz aufgekocht und anschließend auf 40°C abgekühlt.

15

Vor Zugabe der Blasen zur Agar-Lösung wurde die Blasenkonzentration mit 0,02 %iger (m/m) Triton X 100-Lösung auf $6 \cdot 10^8$ Blasen/ml eingestellt. Davon wurden 33 µl ($2 \cdot 10^7$ Blasen) vorsichtig ohne Eintrag von Luftblasen in die Agarlösung eingebracht. Die Agarlösung wurde anschließend in eine Glasschale (14 cm * 19 cm * 4 cm) gegossen, in der sich diese als Gel verfestigte (Agar-Phantom).

20

(c) Versuchsaufbau und Durchführung:

25

Ein ca. 4 cm breiter Streifen des Agar-Phantoms wurde in ein mit Wasser gefülltes Kunststoffbecken gelegt. Ein Schallkopf (L 10-5, ATL UM9, Farbdoppler-Mode, MI: 1,1, Persistenz: 0, Priorität: maximal, Größe der Color-Box: maximal, Eindringtiefe: 3 cm, Focus: 2 cm) wurde mit einem Stativ senkrecht so über dem Phantom befestigt, dass er in das Wasser eintauchte.

30

Das Becken wurde zusammen mit dem Phantom

1. per Hand in Querrichtung unter dem Schallkopf mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 cm/s verschoben, was einer Verschiebungsstrecke von ca. 1 mm/frame entsprach, oder
2. auf einen Servomotor (Limes 150, OWIS GmbH, Motorcontroller DC 500) gestellt, und automatisch mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten unter dem fixierten Schallkopf vorbeigefahren. Die Geschwindigkeiten wurden dabei so gewählt, dass unter Berücksichtigung der gegebenen Bildrate des Ultraschallgerätes von 5,8 Bildern/Sekunde und kontinuierlicher Bewegung des Agar-Phantoms folgende Verschiebungsstrecken je Bild resultierten: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 $\mu\text{m}/\text{frame}$. Die dazu erforderlichen Geschwindigkeiten ($\mu\text{m}/\text{s}$) wurden wie folgt errechnet:

$$\text{Geschwindigkeit } [\mu\text{m}/\text{s}] = \text{Verschiebestrecke/Bild } [\mu\text{m}/\text{frame}] \times \text{Bildrate des Ultraschallgerätes } [\text{frame}/\text{s}]$$

(d) Quantifizierung der SAE-Signale:

Die entstehenden Videobilder wurden videodensitometrisch mit QuantiCon[®] (Echo-tech 3D Imaging Systems GmbH) wie folgt ausgewertet:

Während des Scans wurden die Videobilder mit einer Sample-Rate entsprechend der vom Ultraschallgerät gegebenen Bildrate (hier 5,8 Bilder/Sekunde) digitalisiert (QuantiCon). Dazu wurde in QuantiCon zuvor ein trigger-delay von 172 ms (1000 ms/5,8) eingegeben.

Um farbige Rauschsignale von SAE-Signalen abzutrennen, wurde für die Farbwerte vor der Auswertung des 3D-Datensatzes zunächst ein Schwellwert von 40 definiert. Nur die dann oberhalb dieses Schwellwertes verbleibenden „segmentierten Farbwerte“ (40 - 255) wurden zur Auswertung verwendet. In Fig. 8 ist die 3D-Ansicht des gescannten Agar-Phantoms gezeigt, wie es aus dem 3D-Datensatz in QuantiCon generiert wurde. Sowohl die Pixelanzahl der Grauwerte als auch die Pixelanzahl der segmentierten Farbwerte aller Bilder des Datensatzes wurden exportiert und mit MS-Excel[®] (Microsoft) weiterverarbeitet.

Die in MS-Excel[®] erstellte Grafik der segmentierten Farbwerte (MU) ist in Fig. 9 in Abhängigkeit von der SAE-Schichtdicke dargestellt. Entsprechend der unter „korrigierte MU“ definierten Korrekturformel wurde jeder einzelne Farbwert korrigiert. Die resultierende Abhängigkeit von der SAE-Schichtdicke ist in Fig. 10 (MU_{corr.}) dargestellt.

Um die Summe der segmentierten Farbwerte in einzelne SAE-Signale bzw. einzelne Blasen umzurechnen, wurde zunächst der Umrechnungsfaktor F_{sae} ermittelt. Dazu wurde in 20 Schnittbildern zunächst die Summe der SAE-Signale durch Zählung per Hand ermittelt. Anschließend wurde die Summe der segmentierten Farbpixel durch die Summe der in den entsprechenden Bildern per Hand gezählten SAE-Effekte dividiert. Es wurde ein Mittelwert von 44 Farbpixel pro SAE-Signal ermittelt. Die über diesen Faktor von MU_{corr.} auf die Anzahl der korrigierten SAE-Signale (SAE_{corr.}) umgerechnete Grafik ist in Fig. 11 dargestellt.

In Tab. 1 sind die den Fig. 9 bis 11 zugrundeliegenden Daten aufgelistet:

Tab. 1:

	SAE-Schichtdicke [$\mu\text{m}/\text{frame}$]									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Farbsättigung [%]	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
$\pm$	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
$\pm$	309	492	706	876	1.004	787	763	663	517	451
SAE / frame	19	44	78	109	135	157	170	182	191	195
$\pm$	6	8	9	10	10	7	7	6	4	4
SAE _{corr.} / frame	21	54	107	167	222	275	309	341	365	377
$\pm$	7	11	16	20	23	18	17	15	12	10
Blasenanzahl / ml	12.233	14.363	16.912	17.779	17.536	17.004	15.810	14.805	13.796	12.695
$\pm$	3.844	2.549	1.982	1.589	1.304	777	617	450	301	234
Blasenanzahl _{corr.} / ml,	13.438	17.483	23.291	27.128	28.877	29.753	28.662	27.674	26.361	24.516
$\pm$	4.566	3.632	3.476	3.236	2.967	1.938	1.610	1.224	848	667

Der Kurvenbereich zwischen 30 und 70 μm SAE-Schichtdicke ($\sim 37 - 81\%$ Farbsätti-

gung) lässt sich mit einer linearen Korrelationsfunktion beschreiben. Es ergeben sich Korrelationskoeffizienten von 0,990 für die unkorrigierten MU bzw. 0,996 für die korrigierten MU/SAE.

- 5 Werden auch die Punkte außerhalb dieses Bereiches bei der linearen Korrelation berücksichtigt, verschlechtern sich die Korrelationskoeffizienten bis auf 0,971 für MU, bzw. 0,981 für die korrigierten MU/SAE.

(e) Ergebnis:

10

(a) Alle Bilder, die beim Verschieben des Phantoms per Hand und einer Verschiebungsstrecke von ca. 1 mm/frame entstanden, sind vollständig mit SAE-Signalen gesättigt. Die Sättigungsblasen-Konzentration ist überschritten und eine Quantifizierung unmöglich.

15

(b) Bei der automatischen Verschiebung mit Überlappung der Schallfelder wurden bei einer Verschiebung von 10 $\mu\text{m}/\text{frame}$ nur vereinzelte SAE-Signale detektiert (Fig. 8). Mit zunehmender Geschwindigkeit nahm auch die Anzahl der SAE-Signale/frame zu. Erst ab einer Verschiebung von 100 $\mu\text{m}/\text{frame}$ kam es zu einer Farbsättigung im Bild.

20

Somit führt eine Blasenkonzentration von 30.000 Blasen/ml bei einer Schichtdicke von 100 μm zu einer SAE-Sättigung. Daraus ergibt sich für eine Schichtdicke von 1 mm eine Sättigungsblasen-Konzentration von ca. 3.000 Blasen/ml.

25

(f) Diskussion:

Im Gegensatz zu herkömmlichen Scanverfahren wird durch das erfindungsgemäße Verfahren eine Blasenquantifizierung selbst bei Blasenkonzentrationen größer als 3.000 Blasen/ml möglich.

30

Durch die definiert überlappende Verschiebung eines Objektes gegen den Schallkopf werden in jedem Schnittbild nur die neu hinzugekommenen Blasen aus dem nicht überlappenden Volumen detektiert. So kann die SAE-Schichtdicke auf die jeweilige Verschiebungsstrecke pro Bild reduziert werden. Die Sättigungsblasen-Konzentration

erhöht sich in dem Verhältnis, in dem die tatsächliche Schichtdicke des Schallfeldes zur Verschiebungsstrecke bzw. zur SAE-Schichtdicke steht. Eine 10 µm-Verschiebung von Bild zu Bild erhöht gleichzeitig die räumliche Auflösung und die Sättigungsblasen-Konzentration um den Faktor 100 bei einer Schichtdicke des Schallfeldes von 1 mm.

Beispiel 2:

Ex vivo Quantifizierung von unspezifisch angereicherten Blasen in der Leber von Ratten

(a) Herstellung der Blasen:

Die Blasen wurden gemäß Beispiel 4 (a) hergestellt.

(b) Untersuchung:

Es wurden zwei zwei Ratten (Wistar SCHOE, 220g, weiblich) untersucht. Den Ratten wurden verschiedene Dosen der nach a) hergestellten Blasensuspension *i.v.* über die Schwanzvene injiziert. Für Ratte 1 wurde eine Verdünnung auf $1 \cdot 10^8$ Blasen/ml, für Ratte 2 auf $1 \cdot 10^7$ Blasen/ml in 0,9 %iger (m/m) NaCl-Lösung, enthaltend 0,02 % (m/m) Triton X 100, hergestellt.

- 10 Ratte 1: $1 \cdot 10^8$ Blasen/kg ($1 \cdot 10^8$ Blasen/ml, 220 μ l *i.v.*)
Ratte 2: $1 \cdot 10^7$ Blasen/kg ($1 \cdot 10^7$ Blasen/ml, 220 μ l *i.v.*)

- 30 Minuten nach Injektion wurden die Ratten durch *i.p.* Injektion von 1 ml einer 1:1 Volumenmischung aus Rompun[®] 2 % (20 mg Xylazin/ml) und Ketavet[®] 100 mg/ml (100 mg Ketamin-Base/ml) getötet:

Der rechte Leberlappen wurde jeweils entnommen und in ein mit 0,9 %iger (m/m) Natriumchlorid-Lösung gefülltes Gefäß gelegt.

- 20 Die Gefäße mit den Leberlappen wurden:

1. per Hand in Querrichtung unter dem Schallkopf mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 cm/s verschoben, was einer Verschiebungsstrecke von ca. 1 mm/frame entsprach oder
- 25 2. auf einen Servomotor (Limes 150, OWIS GmbH, Motorcontroller DC 500) gestellt, und automatisch mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten unter dem fixierten Schallkopf vorbeigefahren; die Geschwindigkeiten wurden dabei so gewählt, dass unter Berücksichtigung der gegebenen Bildrate des Ultraschallgerätes von 5,8 Bildern/Sekunde und kontinuierlicher Bewegung
30 des Gefäßes folgende Verschiebungsstrecken je Bild resultierten:

Ratte 1 ($1 \cdot 10^8$ Blasen/kg): 15, 20, 30 μ m/frame

Ratte 2 ($1 \cdot 10^7$ Blasen/kg): 20, 40, 80, 120 μ m/frame

Die Ultraschalluntersuchung wurde analog Beispiel 1 mit den gleichen Gerätesettings durchgeführt. Die Leber wurde in einem Abstand von 2 cm am Schallkopf vorbeigefahren. Für alle Messungen wurde die gleiche ROI verwendet. Die Größe der ROI (ca. 2 mm * 6 mm, gemessen an der Skala des Ultraschallgerätes) wurde so gewählt, dass die ROI bei allen ausgewerteten Bildern vollständig im Bereich des Lebergewebes lag. Bei allen Messungen wurde die gleiche Vergrößerung in Quanticon[®] gewählt.

Zur Ermittlung des Verhältnisses von Bildschirmpixel zu Objekt-Länge [mm] wurde eine quadratische ROI von 2 mm Kantenlänge (ermittelt anhand der im Ultraschallbild dargestellten Längen-Messskala) im Ultraschallbild gemessen. Dazu wurde das Bild mit der in Quanticon[®] vorhandenen Zoom-Funktion entsprechend vergrößert. Die Pixelsumme in dieser ROI (MU) betrug 225. Daraus konnte ein Verhältnis von EINBETTEN56,25 Pixel/mm² (225/4) errechnet werden. Über das gemessene Volumen (Fläche der ROI x Verschiebestrecke/frame) wurde anschließend die Blasenkonzentration/ml Leber errechnet. Um die Rohdaten (FP, GP, S) in die Blasenkonzentration C im Gewebe umzurechnen, wurde folgende Formel angewendet:

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

C: Blasenkonzentration in [Blasen/ml] bzw. [SAE_{corr.}/ml]

S: SAE-Schichtdicke, bzw. die Verschiebung zwischen zwei Bildern in [mm]

FP: Bildschirmpixel, die innerhalb des Messfensters (ROI) im Bereich der dargestellten SAE-Effekte liegen.

GP: Bildschirmpixel, die innerhalb des Messfensters (ROI) außerhalb der dargestellten SAE-Effekte liegen.

Σsae: Summe der in einem Ultraschallbild dargestellten SAE-Signale

$$F_{sae} = \frac{\sum FP}{\sum sae}$$

F_f : Summe aller Bildschirmpixel in einem mm² (gemessen anhand der im Ultraschallbild angezeigten Längenscala)

5 (c) Ergebnis:

In Tab. 2 sind die Blasenkonzentrationen der Ratten einander gegenübergestellt. Tab. 2 enthält zusätzlich die Mittelwerte der prozentualen Farbsättigung bei der jeweiligen SAE-Schichtdicke.

10

Tab. 2

	SAE-Schichtdicke [$\mu\text{m}/\text{frame}$]			
Ratte 1 $1 * 10^8/\text{kg}$	15	20	30	
Blasenkonzentration [Blasen/ml]	43.288 $\pm$ 17.381 (n=88)	54.267 $\pm$ 16.371 (n=127)	60.498 $\pm$ 10.113 (n=88)	
Farbsättigung[%]	33	49	72	
Ratte 2 $1 * 10^7/\text{kg}$	20	40	80	120
Blasenkonzentration [Blasen/ml]	2.557 $\pm$ 4.581 (n=71)	5.791 $\pm$ 6.355 (n=80)	14.826 $\pm$ 4.410 (n=53)	15.562 $\pm$ 1.881 (n=42)
Farbsättigung[%]	3	13	53	74

15

1. Alle Bilder, die beim Verschieben der Leber per Hand und einer Verschiebungsstrecke von ca. 1 mm/frame entstanden, waren mit SAE-Signalen vollständig gesättigt (Fig. 12a, Fig. 13a). Die Sättigungsblasen-Konzentration war überschritten und eine Quantifizierung unmöglich.

20

2. Bei der automatischen Verschiebung mit Überlappung der Schallfelder wurden bei Ratte 1 (Dosis: $1 * 10^8$ Blasen/kg) bei SAE-Schichtdicken von 20 bis 120 $\mu\text{m}/\text{frame}$ SAE-Signale in einer quantifizierbaren Anzahl detektiert (Fig. 12b: SAE-Schichtdicke: 20 μm), bei Ratte 2 (Dosis: $1 * 10^7$ Blasen/kg) bei

SAE-Schichtdicken von 10 bis 30 $\mu\text{m}/\text{frame}$ (Fig. 13b: SAE-Schichtdicke: 20 μm). Mit zunehmender Geschwindigkeit nahm auch die Anzahl der SAE-Signale/frame zu.

3. Bei Ratte 1 wurde ein linearer Korrelationskoeffizient von 1,000 für die Abhängigkeit der unkorrigierten MU von der SAE-Schichtdicke errechnet (Fig. 14). Der lineare Korrelationskoeffizient für die Abhängigkeit der korrigierten MU ($\text{MU}_{\text{corr.}}$) bzw. korrigierten SAE ($\text{SAE}_{\text{corr.}}$) von der SAE-Schichtdicke zwischen 15 μm und 30 μm lag jeweils bei 0,995 (Fig. 15 und 16).

4. Bei Ratte 2 wurde ein linearer Korrelationskoeffizient von 0,984 für die Abhängigkeit der unkorrigierten MU von der SAE-Schichtdicke errechnet (Fig. 17). Der lineare Korrelationskoeffizient für die Abhängigkeit der korrigierten MU ($\text{MU}_{\text{corr.}}$) bzw. korrigierten SAE ($\text{SAE}_{\text{corr.}}$) von der SAE-Schichtdicke zwischen 20 μm und 120 μm lag jeweils bei 0,995 (Fig. 18 und 19).

5. Die Blasenanzahl steht in einem linearen Verhältnis zur SAE-Schichtdicke.

(d) Diskussion:

Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch in entnommenen Organen, in denen sich Blasen unspezifisch anreichern, anwendbar. Es besteht eine enge Korrelation zwischen der im Schnittbild dargestellten Anzahl von SAE-Signalen und der entsprechenden SAE-Schichtdicke. Die Blasenkonzentration in den Lebern der untersuchten Ratten unterscheidet sich deutlich in Abhängigkeit von der applizierten Dosis.

Beispiel 3:

In vivo-Quantifizierung von spezifisch angereicherten USKM im F9-Teratom der Maus:

Mit dem Verfahren gemäß Beispiel 1 wurde die Anreicherung von spezifischen Blasen, an deren Oberfläche anti-CD105-Antikörper gekoppelt waren, in Tumoren von F9-tumortragenden Mäusen (swiss-nude) nach *i.v.* Injektion *in vivo* untersucht. Als

Kontrollsubstanz dienten Blasen, an deren Oberfläche IgG2a-Antikörper (Isotyp-Kontrolle) gekoppelt waren.

(a) Herstellung der spezifischen Blasen:

5

Die spezifischen Blasen wurden gemäß Beispiel 4 (a) bis (e) hergestellt und charakterisiert. Die Antikörper-Kopplung wurde nach Beispiel 4 (f) durchgeführt.

10 (b) Herstellung der Isotyp-Kontrolle:

Die Isotyp-Kontroll-Blasen wurden nach Beispiel 4 (a) bis (e) hergestellt und charakterisiert. Die Isotyp-Kopplung wurde gemäß Beispiel 4 (g) durchgeführt.

15 (c) Tumorinokulation:

In Kultur subkonfluent gewachsene F9-Tumorzellen wurden trypsiniert, zentrifugiert und in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ resuspendiert. Nach Färbung mit Trypanblau und Berechnung der Zellkonzentration wurde die Zellsuspension auf eine Konzentration von
20 6×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde bis zum Gebrauch auf Eis gekühlt. Von dieser Zellsuspension wurden zehn weiblichen Nacktmäusen (Swiss nude, 18 - 20g KGW) je 50 μl pro Tier subkutan ($= 3 \times 10^6$ Zellen/Tier) mittels einer Hamiltonspritze und 27G-Kanüle in die linke Flankenregion inokuliert. Das Wachstum der Tumore (Länge und Breite) wurde durch Messung mit einer Schieblehre kontrolliert,
25 und das Volumen des Tumors nach folgender Formel näherungsweise bestimmt:

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

L: Länge [mm]

B: Breite [mm]

30 Die Tiere wurden 12 bis 14 Tage nach Tumorinokulation untersucht. In der vorliegenden Untersuchung lagen die Tumorgößen zu diesem Zeitpunkt zwischen 230 und 1600 mm^3 .

(d) Applikation der spezifischen Blasen und der Isotyp-Kontrolle

5 **Vier** Mäusen wurde ein Ultraschallkontrastmittel, enthaltend spezifische Blasen (hergestellt und charakterisiert nach Beispiel 4 (a) bis (e) und Antikörper-Kopplung nach Beispiel 4 (f)), im wachen Zustand *i.v.* in einer Dosis von $1 \cdot 10^9$ Blasen / kg KGW injiziert (entsprach 200 µl der Suspension nach Beispiel 4 (g) je 20 g Maus). Die spezifischen Blasen waren gasgefüllte Mikrokapseln, deren Hülle aus funktionalisiertem Polybutylcyanacrylat bestand und an deren Oberfläche anti-CD105-Antikörper gekoppelt waren. Als Kontrollsubstanz wurde vier weiteren Mäusen auf die gleiche Weise ein Ultraschallkontrastmittel, enthaltend unspezifische Blasen (hergestellt und charakterisiert nach Beispiel 4 (a) bis (e) und Isotyp-Kopplung nach Beispiel 4 (g)), injiziert. Die unspezifischen Blasen waren gasgefüllte Mikrokapseln, deren Hülle ebenfalls aus funktionalisiertem Polybutylcyanacrylat bestand, an deren Oberfläche aber IgG_{2a} (Isotyp-Kontrolle) gekoppelt war.

Die Tumore aller Tiere wurden 60 min nach Applikation des jeweiligen Ultraschallkontrastmittels hinsichtlich des Anreicherungsgrades mit dem Verfahren gemäß Beispiel 1 untersucht.

20

(e) Ultraschalluntersuchung:

Für die Untersuchung wurden die Mäuse mit einer 1 : 1 Volumenmischung aus einer Verdünnung (1 + 9) von Rompun[®] 2 % (20 mg Xylazin/ml) und einer Verdünnung (1 + 4) von Ketavet[®] 100 mg/ml (100 mg Ketamin-Base/ml) in jeweils physiologischer NaCl-Lösung narkotisiert. Von dieser Narkosemischung wurden 200 µl je 20 g Maus *i.p.* injiziert.

25

Die Maus wurde auf einem Träger, der am beweglichen Teil eines Servomotors (Limes 150, OWIS GmbH, Motorcontroller DC 500) befestigt war, mit Klebstreifen fixiert. Der Servomotor wurde vertikal mit einem Stativ so justiert, dass der Träger mit der Maus in ein Wasserbecken (zugeschnittene, eckige Plastikflasche) reichte. Vor jedem Scan wurde das Becken mit frischem und auf 37°C temperiertem Wasser ge-

30

füllt. Ein Schallkopf (L 10-5, ATL UM9) wurde mit Koppelgel versehen und mit einem Stativ horizontal auf die Seitenwand des Wasserbeckens aufgesetzt. Die Maus wurde unter visueller und sonografischer Kontrolle so weit in das Becken gefahren, dass der Tumor noch nicht in das Schallfeld geriet. Sollten Luftblasen auf der Haut anhaften, wurden diese entfernt, indem mit einem rund gebogenen Draht, der mit Flüssigseife bestrichen worden war, vorsichtig über die Haut gestrichen wurde. Danach wurde die Maus einige Millimeter zurückgefahren. Vor dem Scan wurden die nötigen Gerätesettings am Ultraschallgerät eingestellt (Farbdoppler-mode, MI: 1,1, Persistenz: 0, Priorität: maximal, Eindringtiefe: 3 cm, Focus: 2 cm). Der Scan wurde mit einer konstanten SAE-Schichtdicke von 285 $\mu\text{m}/\text{frame}$ gefahren. Dabei lag der Tumor im Bereich des Fokus. Nach dem Scan wurde das Bild „eingefroren“, so dass der Schallkopf kein Signal sendete. Die Maus wurde auf die Startposition zurückgefahren. Der Schallkopf wurde wieder eingeschaltet, und das Tier wurde erneut mit den gleichen Gerätesettings und der gleichen SAE-Schichtdicke gescannt. Der zweite Scan wurde benötigt, um Farbsignale zu identifizieren, die nicht durch SAE-Signale hervorgerufen wurden, und diente als Kontrollwert. Solche Signale konnten durch fließendes Blut oder größere Luftblasen hervorgerufen worden sein.

Bei der hier verwendeten Narkose war die Atemfrequenz des Tieres in der Regel tief genug, um einen Scan von ca. 3 cm bei der hier verwendeten SAE-Schichtdicke innerhalb einer Atempause ohne Bewegungsartefakte durchführen zu können (Fig. 20b). Bei längeren Untersuchungszeiten (z.B. bei geringerer SAE-Schichtdicke) oder bei höherer Atemfrequenz konnten Atmungsartefakte folgendermaßen vermieden werden:

- a) Fixierung des Tieres auf einem Kunststoffträger mit einer Aussparung von mindestens der Tumorgroße, so dass der Tumor in der Aussparung lag,
- b) Messung der Atembewegung des Tieres (z.B. mit Dehnungsmessstreifen, Staudruck-Messverfahren usw.) und Verwendung als Triggersignal zur Steuerung sowohl des Ultraschallgerätes, als auch des Servomotors.

(f) Auswertung:

Es wurde ein Schnittbild in Scan-Richtung generiert (Fig. 20b) und dieses mit der korrespondierenden Grafik der Messwerte (Fig. 20a) im gleichen Maßstab übereinandergelegt. Die Summe der farbigen Bildschirmpixel innerhalb des Tumors wurde mit Quanticon[®] (3D-Echotech) ausgewertet. Zur Auswertung wurden nur die im Tumor liegenden Farbsignale (MU_{FP} : 20) und nicht die Grausignale (MU_{GP} : 21) berücksichtigt. Die in Fig. 20a/b eingezeichneten Linien 16 und 17 grenzen den Tumorbereich während des ersten Scans ein. Der Bereich des zweiten Scans ist zwischen den Linien 18-19 gezeigt.

Im Übrigen bedeuten im Einzelnen: Bezugsziffer 20: Farbsignale (MU_{FP}), Bezugsziffer 21: Grausignale (MU_{GP}), Bezugsziffer 22: Summe aus MU_{FP} und MU_{GP} , bzw. das gemessene Gewebevolumen.

(g) Ergebnis:

Für die Isotyp-Kontrolle wurden im Tumor deutlich weniger Farbsignale (MU) gemessen (Fig. 21).

(h) Diskussion:

Das Ergebnis zeigt, dass das erfindungsgemäße Verfahren auch zur Quantifizierung von spezifisch angereicherten Blasen im lebenden Organismus geeignet ist. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist selbst dann ein signifikanter Unterschied detektierbar, wenn nicht mit maximaler räumlicher Auflösung gescannt wird und es in einigen Bereichen einiger Schnittbilder zu einer SAE-Sättigung kommt. Die Signalanzahl bei einer spezifischen Blasenanreicherung kann von Rest-Signalen des Blutgefäßsystems und/oder von Signalen einer unspezifischen Blasenanreicherung unterschieden werden.

Beispiel 4: Herstellung der Ultraschallkontrastmittel:

(a) Herstellung der Mikrokapselsuspension:

5 In einem zylindrischen Stahlreaktor (Innenmaße: Höhe = 37 cm, Durchmesser = 29 cm) wurden 7 l einer wässrigen 1 %igen (m/m) Octoxynol-Lösung bei einem pH-Wert von 2,5 vorgelegt und mit einem Mischer (Dissolverscheibe: Durchmesser = 60 mm, Rührwelle: Länge = 30 cm, Eintauchwinkel = 10°) bei hohem Schergefälle (4000 UpM) gemischt und temperiert (Temperatur der Lösung = 32°C), so dass eine
10 Selbstbegasung (d.h. ein durch das Dispergieren bedingter Lufteintrag ins Medium mit starker Schaumbildung) stattfand. 100 g Cyanacrylsäurebutylester wurden rasch (< 3 Minuten) zugegeben und dispergiert (direkt vor Zugabe wurde die Drehgeschwindigkeit des Mixers auf 8000 UpM erhöht). Es wurde 60 Minuten lang unter Selbstbegasung polymerisiert, wobei sich gasgefüllte Mikrokapseln (Blasen im Sinne
15 der der Anmeldung zugrundeliegenden Definition) ausbildeten. In einem Scheidetrichter wurde das Flotat im Schwerfeld der Erde drei Tage lang separiert, der Unterstand abgelassen und das Flotat mit 3 l einer wässrigen 0,02 %igen (m/m) Octoxynol-Lösung resuspendiert. Die so erhaltene Mikrokapselsuspension hatte einen Polymergehalt von 9,46 mg/ml, eine Dichte von 0,943 g/ml und einen pH-Wert von 3,5.

20

(b) Partikelgröße und -konzentration der gasgefüllten Mikrokapseln:

Die Partikelgrößenverteilung der Mikrokapselsuspension gemäß Beispiel 4 (a) wurde mit einem Partikelzähler der Firma Particle Sizing Systems, Typ AccuSizer 770, bestimmt (Messmedium: wässrige 0,02 % (m/m) Triton X100-Lösung). Die volumengewichtete Partikelgrößenverteilung reichte von 0,8 bis 10 µm mit einem Maximum bei
25 1,8 µm, und die Mikrokapselkonzentration betrug $7,2 \cdot 10^9 (\pm 1 \cdot 10^8)$ Partikel pro ml.

(c) Funktionalisierung der gasgefüllten Mikrokapseln durch partielle Seitenkettenhydrolyse:

30

2.500 g einer Mikrokapselsuspension gemäß Beispiel 4 (a) wurden unter Rühren mit 501 g Natronlauge mit der Konzentration $8 \cdot 10^{-2}$ mol/l versetzt. Im Reaktionsansatz

stellte sich ein pH-Wert von 12 ein. Es wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 N Salzsäure auf pH 3,5 eingestellt.

(d) Partikelgröße und -konzentration der gasgefüllten Mikrokapseln:

5

Die Partikelgrößenverteilung der Mikrokapselsuspension gemäß Beispiel 4 (c) wurde mit einem Partikelzähler der Firma Particle Sizing Systems, Typ AccuSizer 770, bestimmt (Messmedium: wässrige 0,02 % (m/m) Triton X100-Lösung). Die volumengewichtete Partikelgrößenverteilung reichte von 0,8 bis 10 µm mit einem Maximum bei 1,8 µm, und die Mikrokapselkonzentration betrug $6,0 \cdot 10^9 (\pm 1 \cdot 10^8)$ Partikel pro ml.

10

(e) Bindung von Streptavidin an funktionalisierte gasgefüllte Mikrokapseln:

Die Mikrokapselsuspension gemäß Beispiel 4 (c) wurde durch mindestens fünfmalige Flotation gegen 0,02 %ige (m/m) Triton-X100-Lösung (pH = 4,5, eingestellt mit Salzsäure) gereinigt. $7,5 \cdot 10^8$ Partikel der gereinigten Suspension wurden mit 15 ml Natriumacetat-Puffer in ein Scintillation-Vial gegeben und mittels Stickelrührer auf einem Magnetrührer gerührt. (Natriumacetat-Puffer = Lösung A: 1,36 g $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, M = 136,08 g/mol, Riedel-de Haen ad 500 ml Wasser, Lösung B: 571 µl Eisessig, M = 60,05 g/mol, ad 500 ml Wasser, 400 ml Lösung A wurden vorgelegt und mit Lösung B auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt.)

15

20

300 µg Streptavidin (Firma SIGMA) wurden in 300 µl sterilfiltriertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde zur Natriumacetatpuffer-Mikrokapselsuspension gegeben. Der pH-Wert sollte $4,5 \pm 0,2$ betragen. Anschließend wurden zügig 750 µg EDC (1 Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carboiimid Hydrochlorid (SIGMA) in 750 µl sterilfiltriertem Wasser gelöst und in die Pufferlösung gegeben.

25

Danach wurde eine Stunde lang nachgerührt unter gelegentlicher pH-Wert-Kontrolle. Es wurde über Nacht (ca. 17 h) bei 4°C weiter gerührt.

30

Zum Abschluss wurde eine Lösung aus 188 µl 1 M Ethanolaminlösung (SIGMA) in 3,75 ml Wasser zum Ansatz gegeben.

Nach Flotation (24 h) wurde der Ansatz durch Ablassen des Unterstandes bis auf ein Volumen von 1 ml eingeengt. Anschließend wurden 10 ml Hepes-Puffer / Triton Lösung 0,01% (m/m) (30 ml 5 M NaCl-Lösung + 10 ml 1 M Hepes-Lösung (Gibco 15630-056) ad 1000 ml Triton Lösung, 0,01 % (m/m), pH 7,4) dazugegeben, nochmals flотиert und der Unterstand wieder bis auf ein Volumen von 1 ml abgelassen. Die aufkonzentrierte Suspension wurde danach in ein silikonisiertes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und im Kühlschrank gelagert.

Der Kopplungserfolg wurde im FACS (Durchflußzytometer von der Becton Dickinson) mit FITC-Biotin geprüft. Mit Hilfe einer Sättigungsreihe wurden so 200.000 Streptavidin Moleküle pro Mikrokapsel quantifiziert.

(f) Bindung von biotinylierten anti-CD105-Antikörpern an funktionalisierte gasgefüllte Mikroblasen:

Die Suspension gasgefüllter Mikroblasen gemäß Beispiel 4 (a) bis (d), an die Streptavidin gemäß Beispiel 4 (e) gebunden worden war, wurde 10 Minuten lang bei Raumtemperatur mit biotinyliertem anti-CD105-Antikörper (Rat Anti-Mouse CD105/Endoglin, Biotin Conjugate, Southern Biotechnology Associates, Inc., Cat. Nr. 1860-08) im Verhältnis 0,5 µg Antikörper zu 1e6 Mikroblasen inkubiert. Nach Inkubation wurde die Suspension auf 1e8 Blasen/ml mit PBS-Puffer, enthaltend 0,02 % (m/m) Triton x 100, verdünnt. Die CD105-Kopplung und Verdünnung wurde für jedes Tier frisch hergestellt.

(g) Bindung von biotinylierten IgG_{2a} an funktionalisierte gasgefüllte Mikrokapseln:

Die Suspension gasgefüllter Mikroblasen gemäß Beispiel 4 (a) bis (d), an die Streptavidin gemäß Beispiel 4 (e) gebunden worden war, wurde 10 Minuten lang bei Raumtemperatur mit biotinylierter IgG_{2a} Isotyp-Kontrolle (Rat IgG_{2a} Isotyp-Control, Biotin Conjugate, Southern Biotechnology Associates, Inc., Cat. Nr. 0117-08) im Verhältnis 0,5 µg Antikörper zu 1e6 Mikroblasen inkubiert.

Nach Inkubation wurde die Suspension auf 1×10^8 Blasen/ml mit PBS-Puffer, enthaltend 0,02 % (m/m) Triton x 100, verdünnt. Die Isotyp-Kopplung und Verdünnung wurde für jedes Tier frisch hergestellt.

Patentansprüche

5

10

15

20

25

30

1. Vorrichtung zur Quantifizierung von in einem Untersuchungsobjekt enthaltenen Körpern, umfassend
 - a) mindestens einen Schallkopf zur Aussendung eines Ultraschallfeldes, mit dem die in einer Schicht in dem Untersuchungsobjekt enthaltenen Körper zur Aussendung charakteristischer Ultraschallsignale anregbar sind, und zum Empfang der charakteristischen Signale,
 - b) mindestens ein Datenverarbeitungssystem zur Ermittlung der Anzahl der Körper in der Schicht aus den charakteristischen Signalen, sowie
 - c) Mittel, mit denen das Ultraschallfeld nach einer Anregung der Körper in einer ersten Schicht im Untersuchungsobjekt so verschiebbar ist, dass Körper nach der Verschiebung in einer zweiten Schicht anregbar sind, wobei die erste Schicht und die zweite Schicht überlappen und parallel und definiert gegeneinander verschoben sind.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Körper Blasen darstellen.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Ultraschallfeld um mindestens 5 μm verschiebbar ist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Schallkopf ein zweidimensionales oder ein dreidimensionales Array von Piezokristallen aufweist.
5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass Mittel vorgesehen sind, mit denen das Untersuchungsobjekt und das zweidimensionale Array gegeneinander verschiebbar sind.

6. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass eine Steuerung für die Piezokristalle im dreidimensionalen Array vorgesehen ist, mit denen von Piezokristallen in einer Piezokristallreihe in dem Array ausgehende benachbarte Schallfelder oder von benachbarten Piezokristallreihen in dem Array ausgehende Schallfelder zur Überlappung bringbar sind.
7. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass Mittel vorgesehen sind, mit denen das Untersuchungsobjekt und mindestens ein Schallkopf gegeneinander verschiebbar sind.
8. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Motorantrieb für eine Verschiebung des Untersuchungsobjekts und des mindestens einen Schallkopfes gegeneinander vorgesehen ist.
9. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Haltevorrichtung, mit der das Untersuchungsobjekt einspannbar ist, und eine verfahrbare Halterung für den mindestens einen Schallkopf vorgesehen sind.
10. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Bildauswertesystem zur Datenverarbeitung und zur Bildanzeige vorgesehen ist, mit dem die Quantifizierung der Körper videodensitometrisch durchführbar ist.
11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Körper eine Blase darstellt.
12. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 - 11 für die Ultraschalldiagnostik und/oder Ultraschalltherapie am Menschen oder am Tier.
13. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 - 11 für das *in-vivo*- und *ex-vivo*-Mapping von physiologisch hoch oder herunter regulierbaren molekularen Markern in Organen und Geweben ab der postembryonalen On-

5 togenese, für das *in-vivo*- und *ex-vivo*-Mapping von pathologisch hoch oder herunter regulierbaren molekularen Markern in Organen und Geweben während der Pathogenese und für die Charakterisierung von Zellkulturen durch *in vitro*-Mapping von hoch und herunter regulierbaren molekularen Markern der Zellen, wobei die Körper für die Marker spezifische Bindungsmoleküle aufweisen.

10 14. Verwendung der Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Körper Blasen darstellen.

15 15. Verfahren zur Quantifizierung von in einem Untersuchungsobjekt enthaltenen Körpern, bei dem

a) in einer Schicht im Untersuchungsobjekt enthaltene Körper mit einem Ultraschallfeld zu charakteristischen Ultraschallsignalen angeregt werden,

15 b) die Ultraschallsignale empfangen werden,

c) aus den empfangenen Ultraschallsignalen die Anzahl der Körper ermittelt wird und

20 d) das Ultraschallfeld nach einer Anregung von Körpern in einer ersten Schicht im Untersuchungsobjekt so verschoben wird, dass Blasen nach der Verschiebung in einer zweiten Schicht angeregt werden, wobei die erste Schicht und die zweite Schicht überlappen und parallel und definiert gegeneinander verschoben werden.

25 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Körper Blasen darstellen.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Blasen bei der Anregung zerstört und dabei zur Aussendung der charakteristischen Signale angeregt werden.

30 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 - 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Ultraschallfeld um mindestens 5 µm verschoben wird.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 - 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Untersuchungsobjekt und mindestens ein das Ultraschallfeld aussendender Schallkopf gegeneinander verschoben werden.
- 5 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Untersuchungsobjekt gegenüber mindestens einem fixierten Schallkopf verschoben wird oder dass der mindestens eine Schallkopf gegenüber einem fixierten Untersuchungsobjekt verschoben wird.
- 10 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 – 20 für die Ultraschalldiagnostik und/oder -therapie am Menschen oder am Tier.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 – 20 zur Durchführung eines *in-vivo*- und *ex-vivo*-Mapping von physiologisch hoch oder herunter regulierbaren molekularen Markern in Organen und Geweben ab der postembryonalen Ontogenese, eines *in-vivo*- und *ex-vivo*-Mapping von pathologisch hoch oder herunter regulierbaren molekularen Markern in Organen und Geweben während der Pathogenese und zur Charakterisierung von Zellkulturen durch *in vitro*-Mapping von hoch und herunter regulierbaren molekularen Markern der Zellen, wobei Blasen eingesetzt werden, die für die Marker spezifische Bindungsmoleküle aufweisen.
- 15
- 20

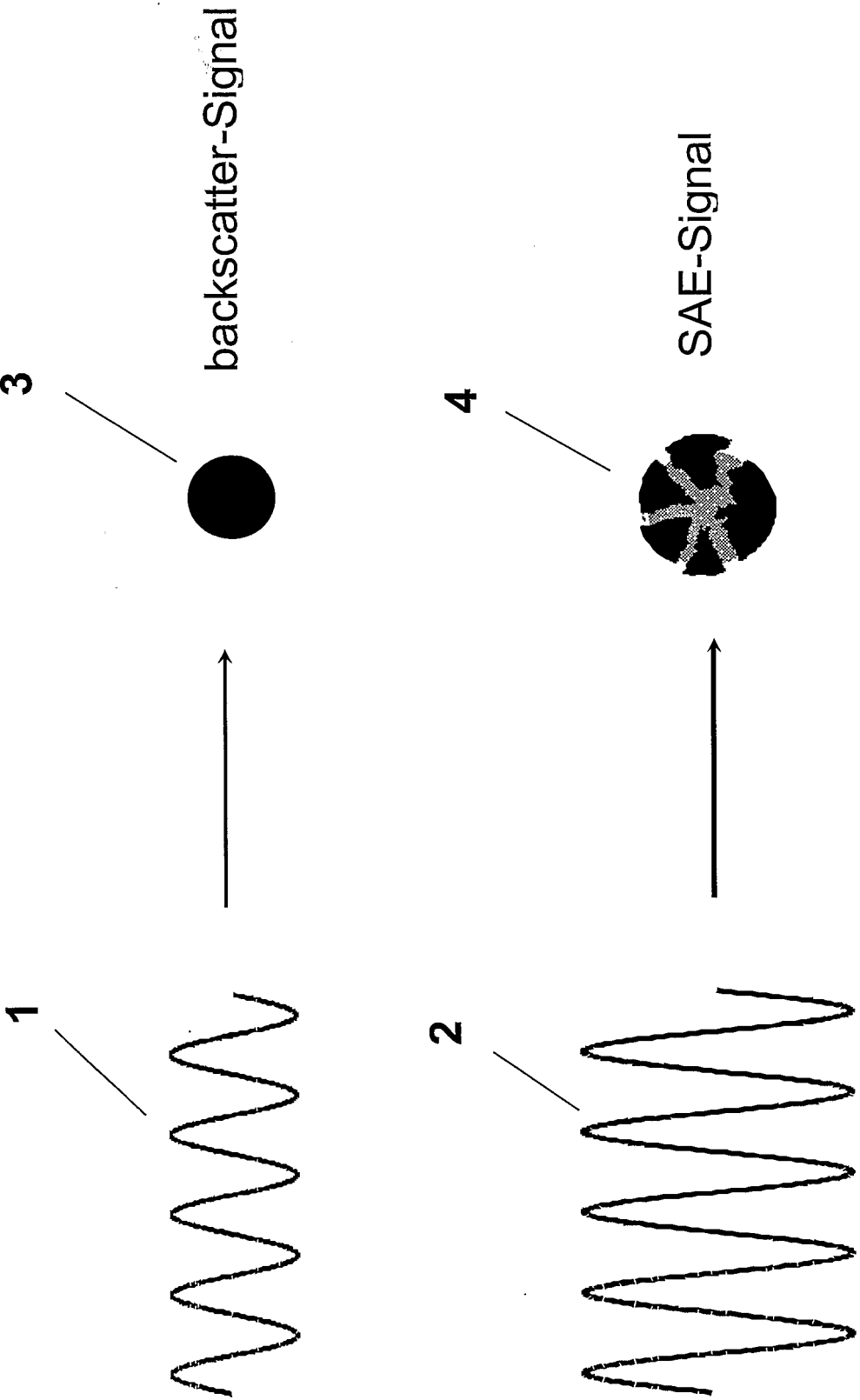


Fig. 1

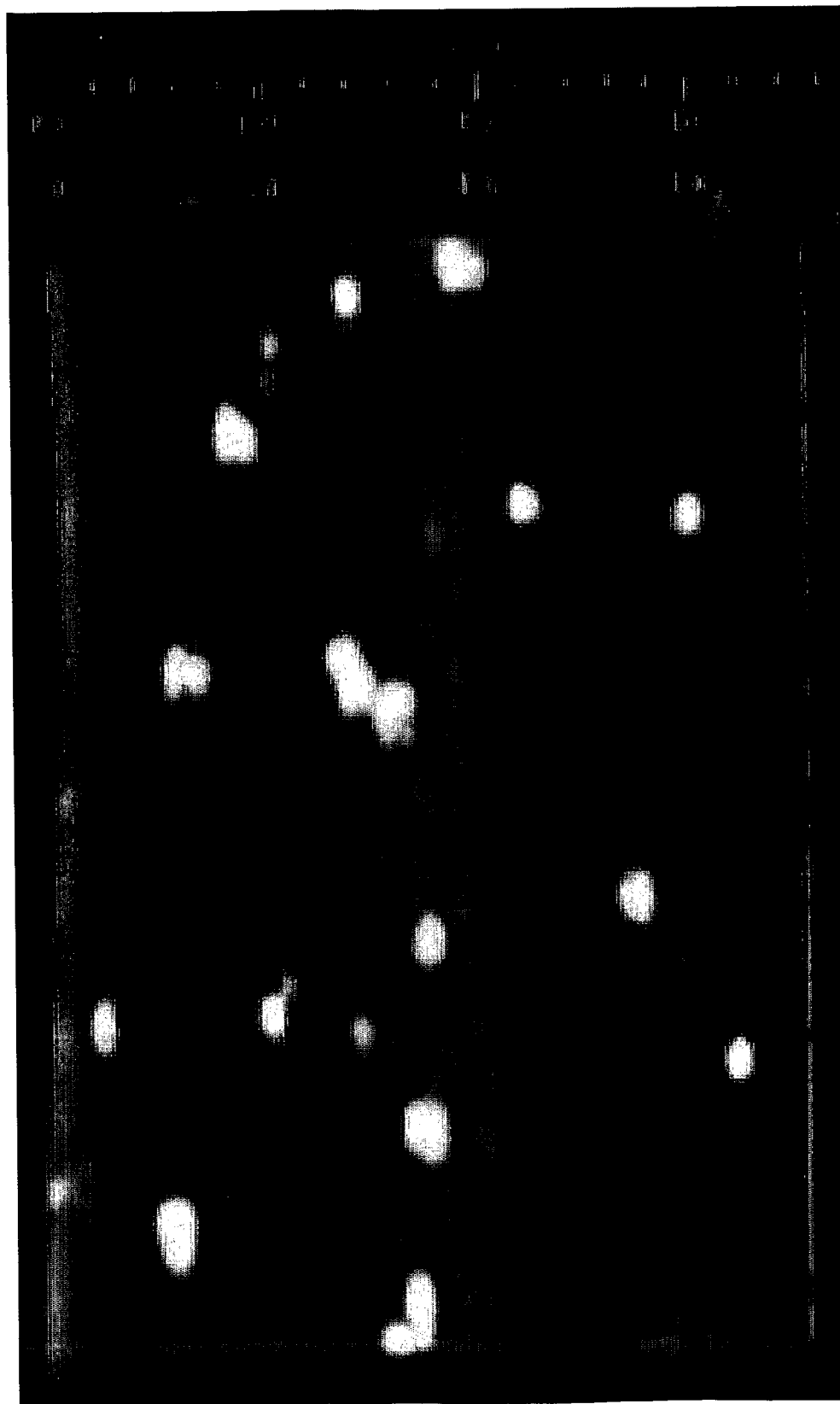


Fig. 2

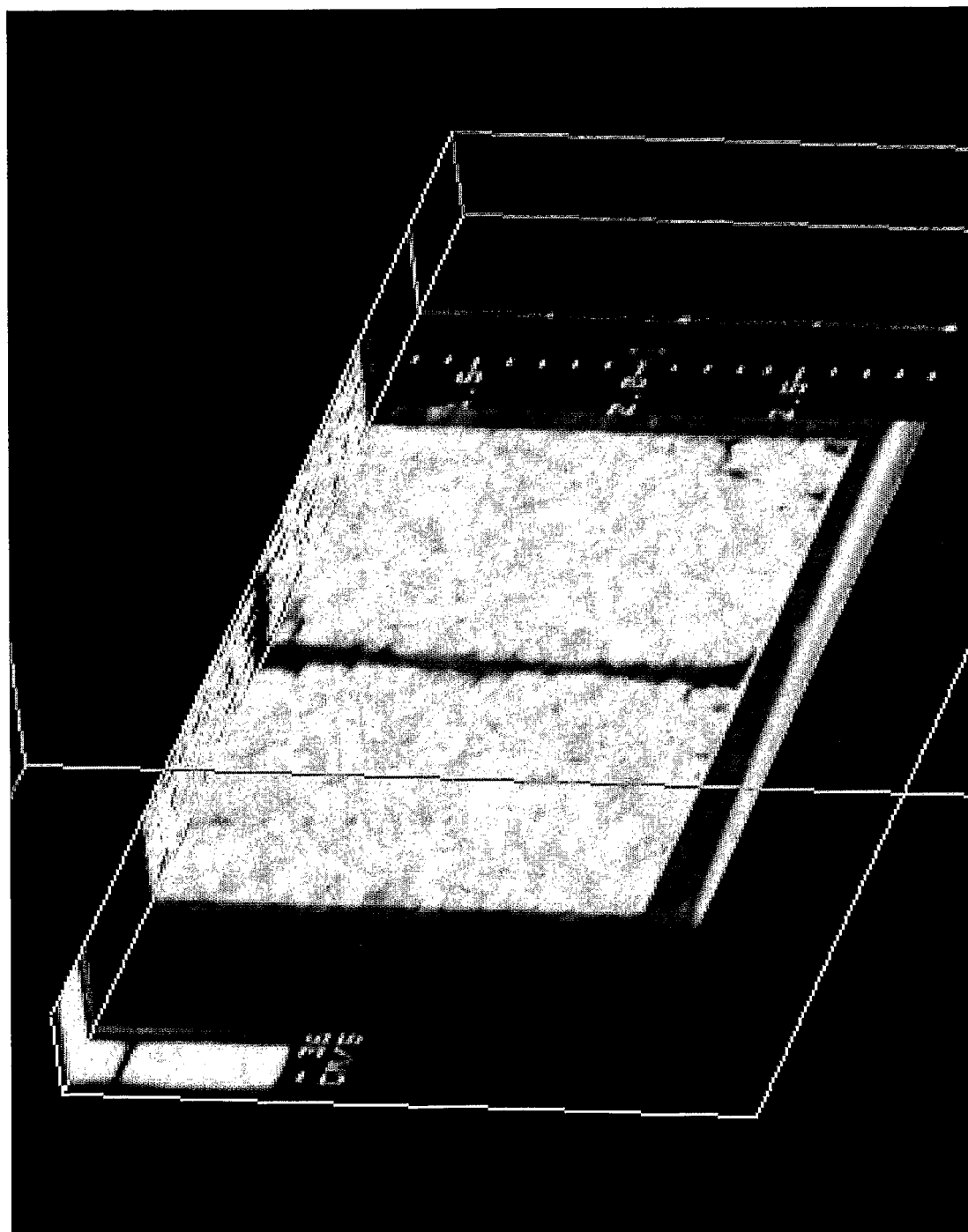


Fig. 3

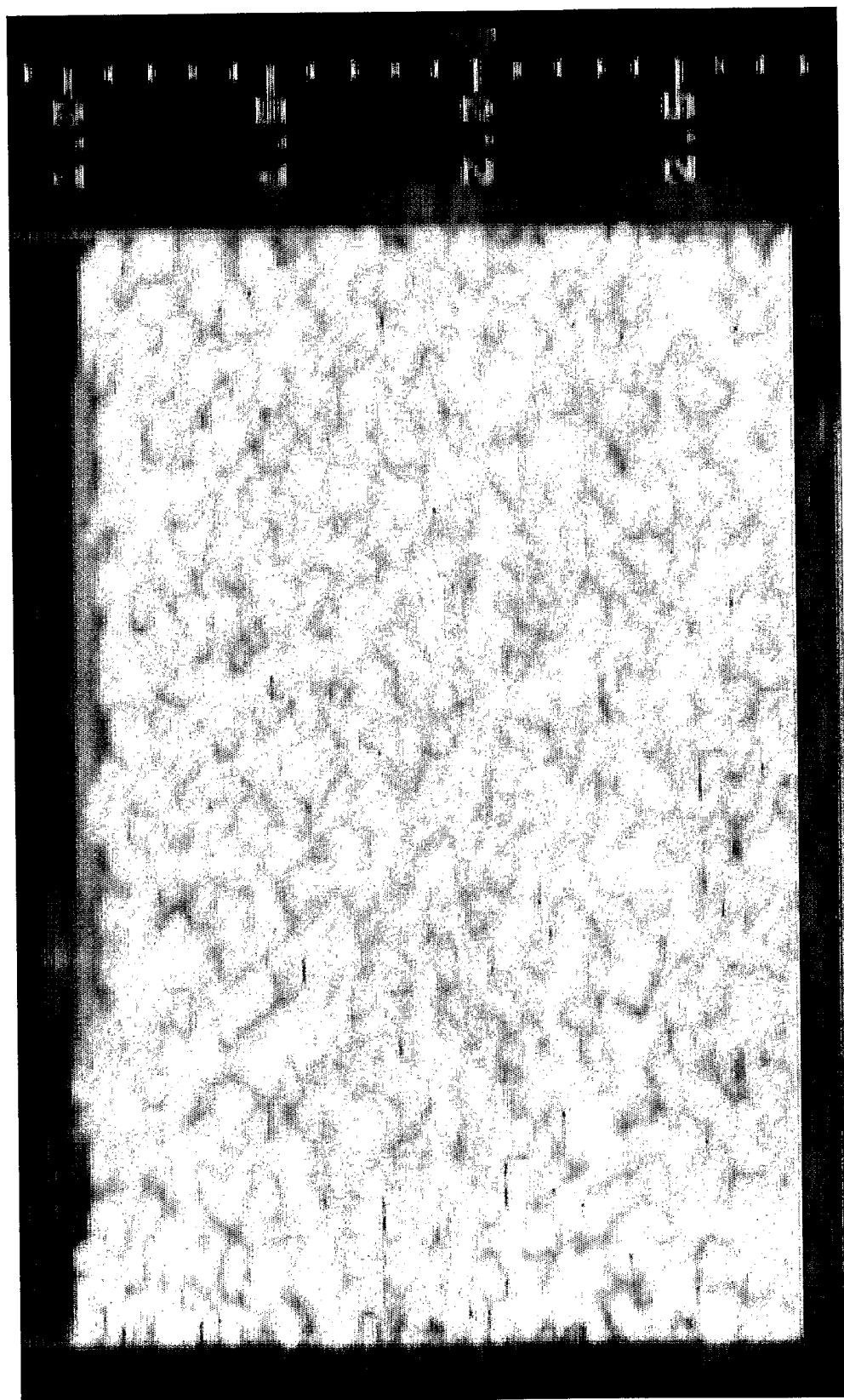
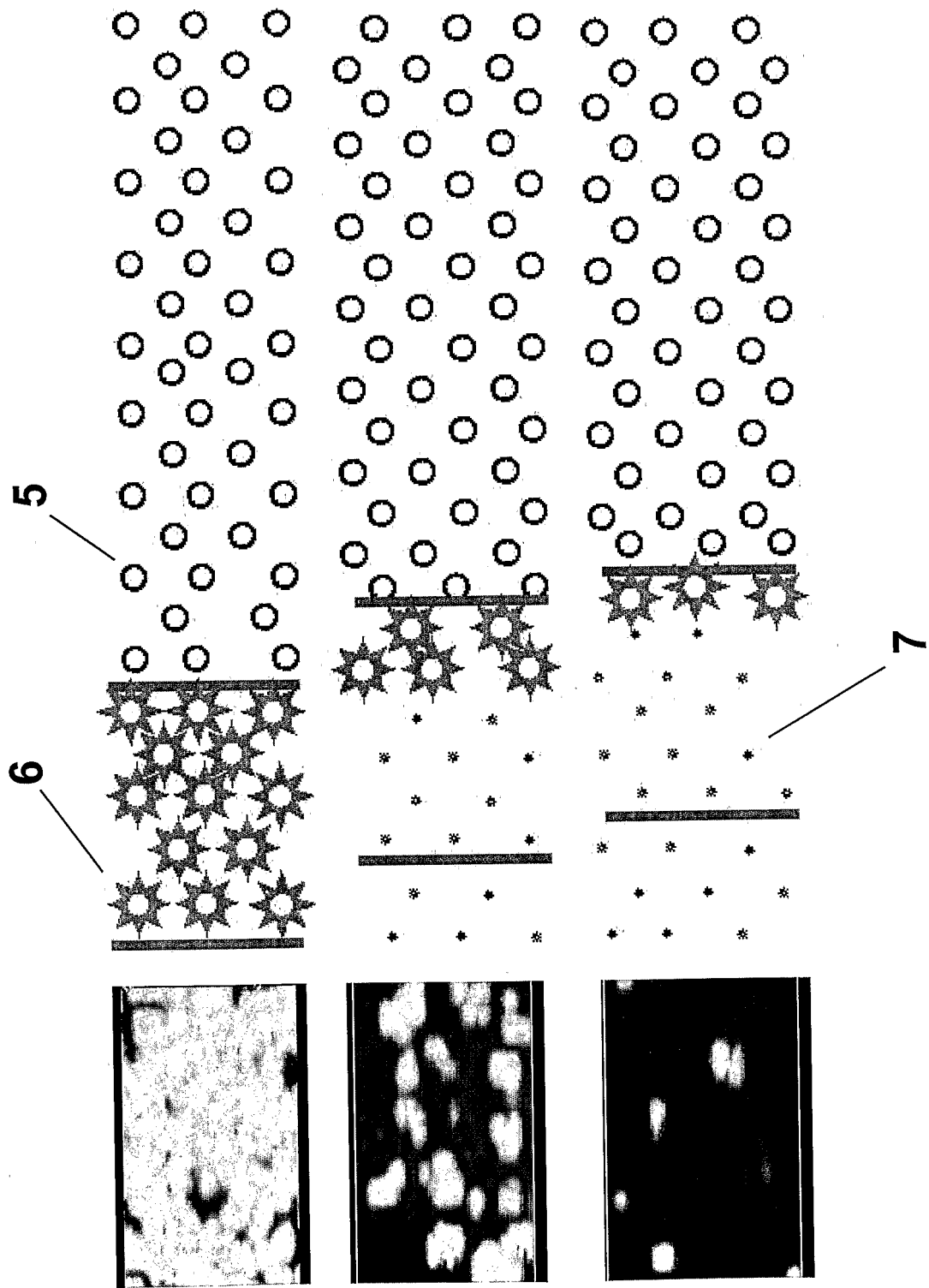


Fig. 4



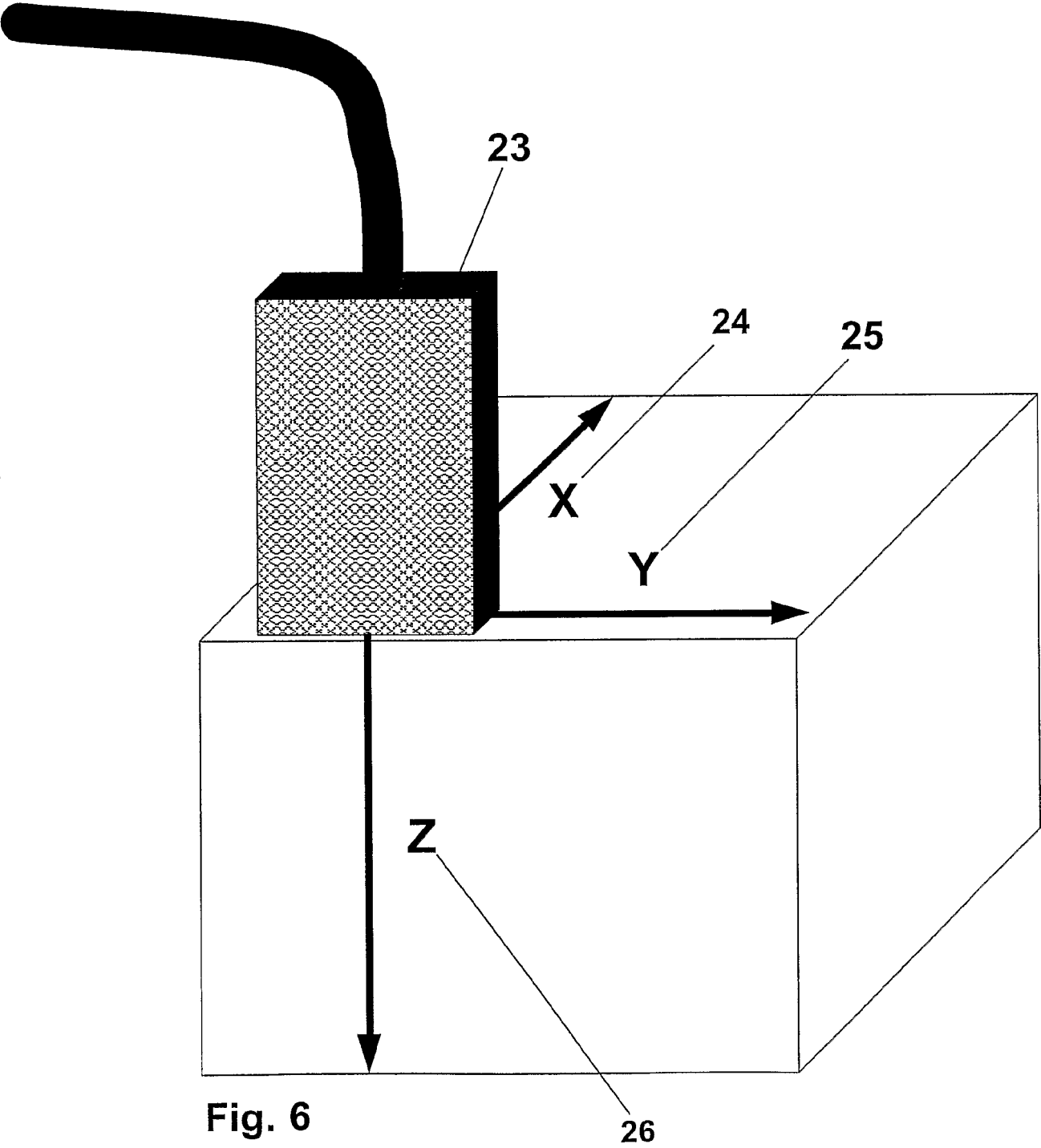
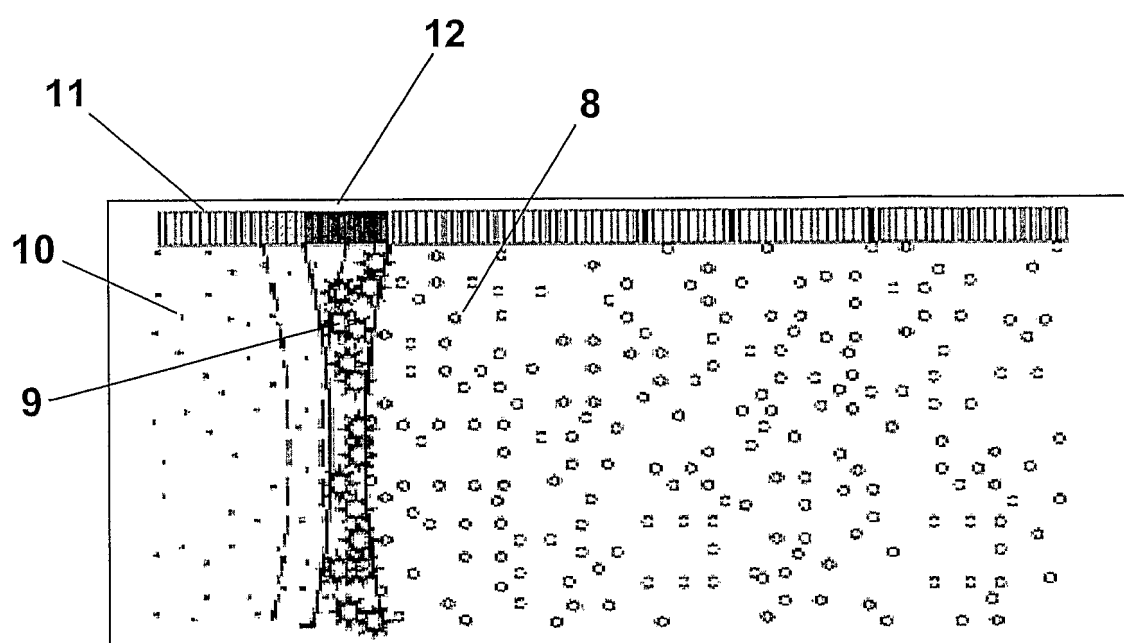
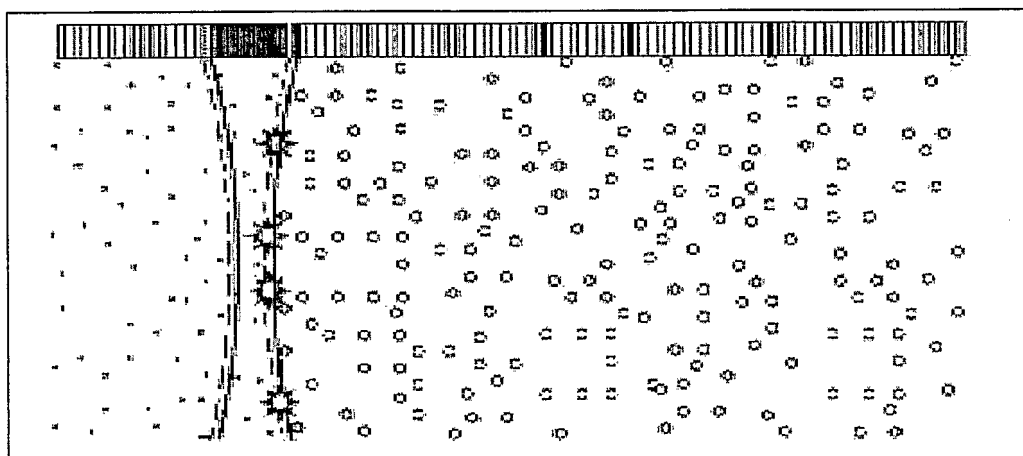
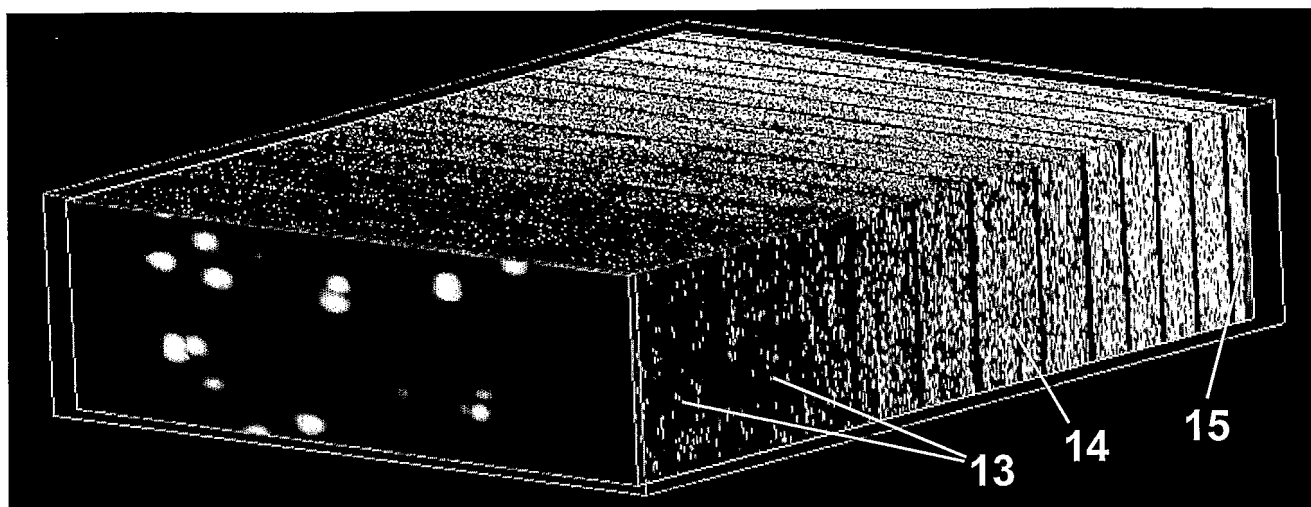
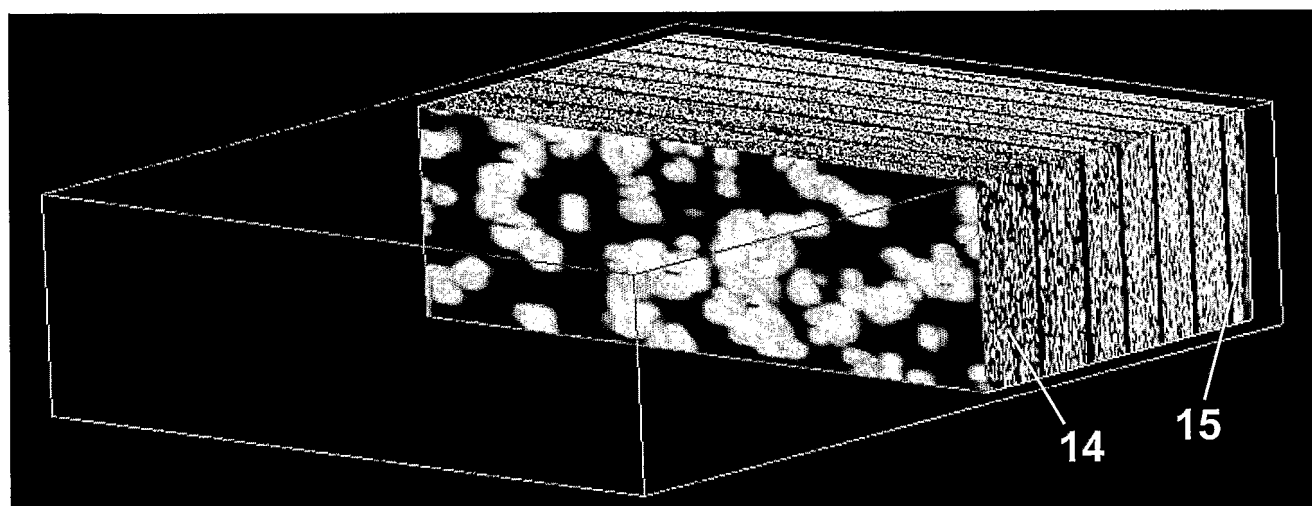
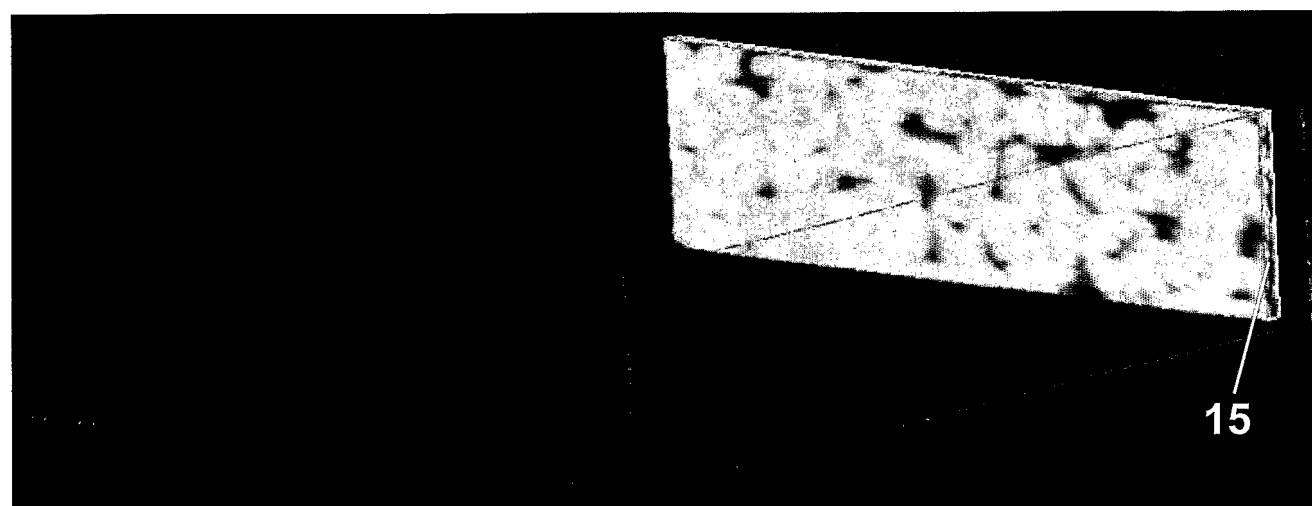


Fig. 6

**Fig. 7a****Fig. 7b**

**Fig. 8a****Fig. 8b****Fig. 8c**

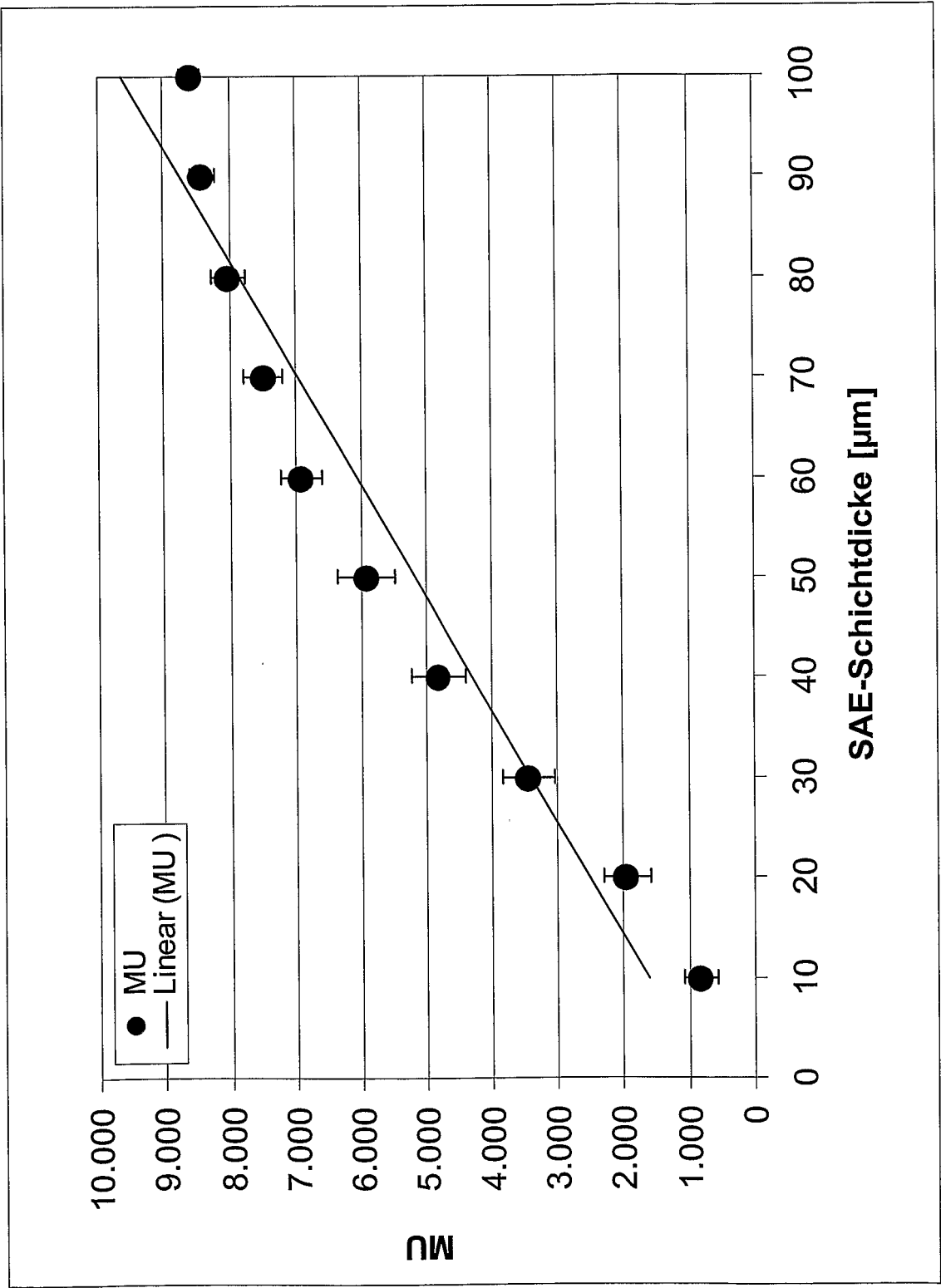


Fig. 9

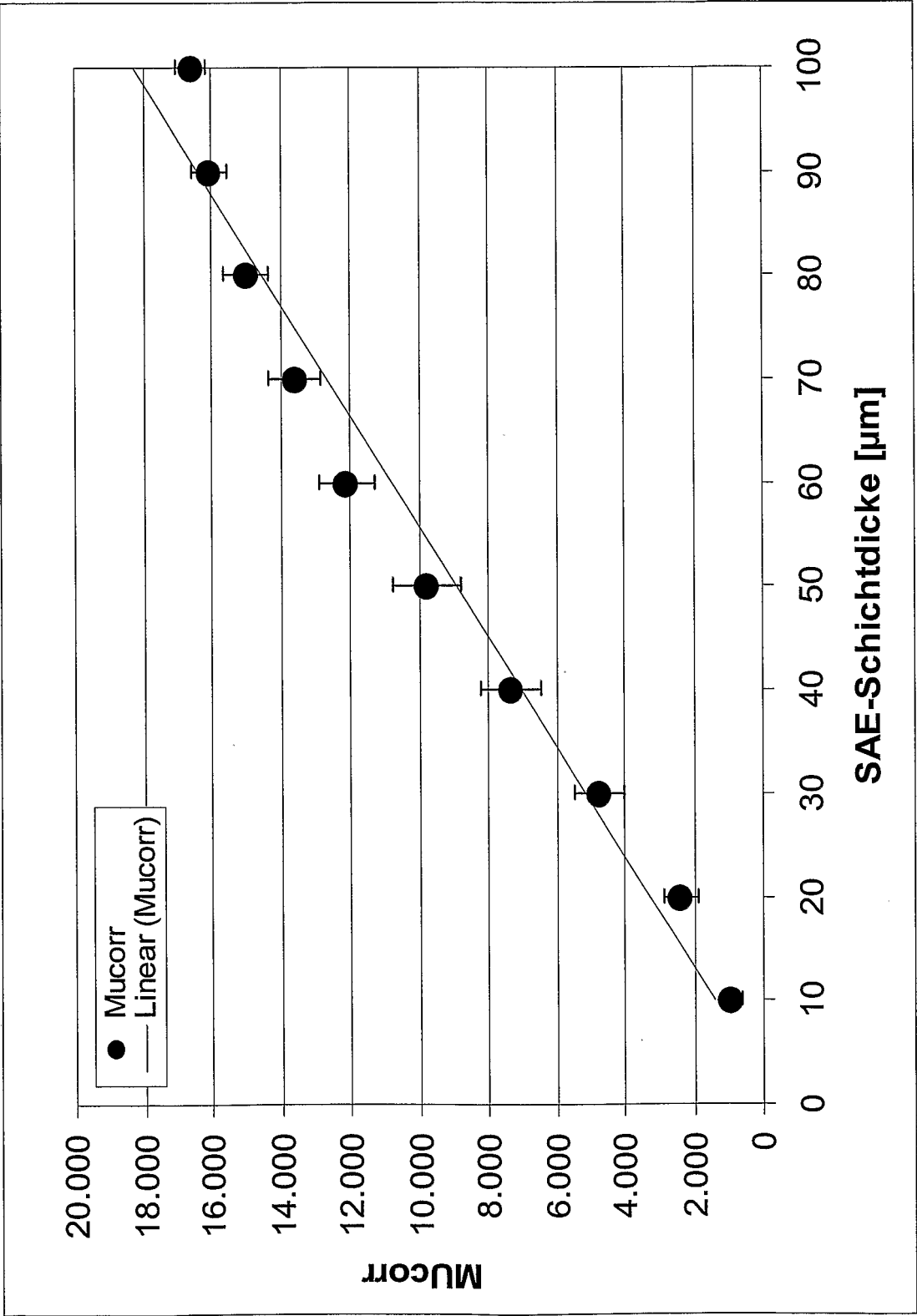


Fig. 10

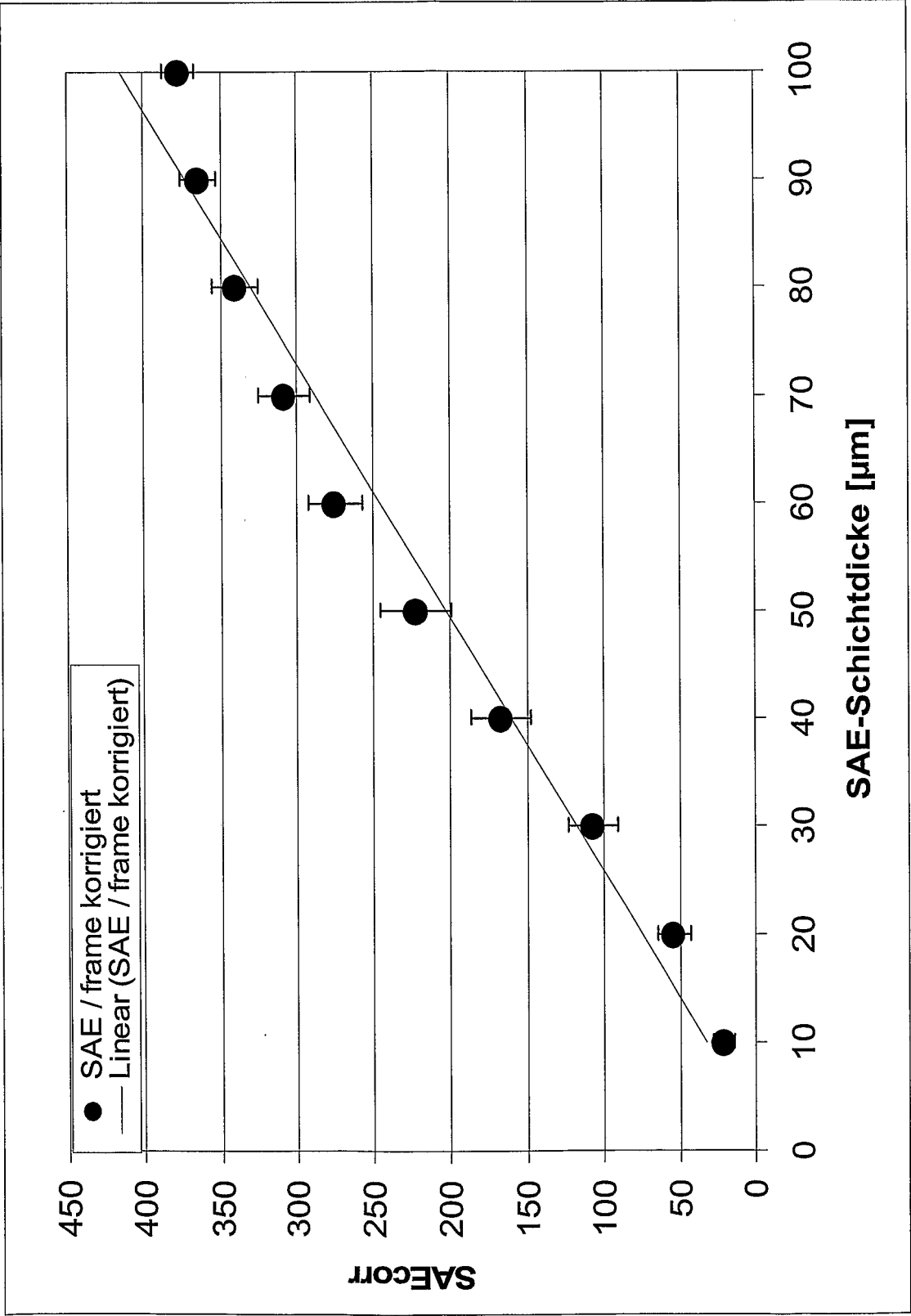


Fig. 11

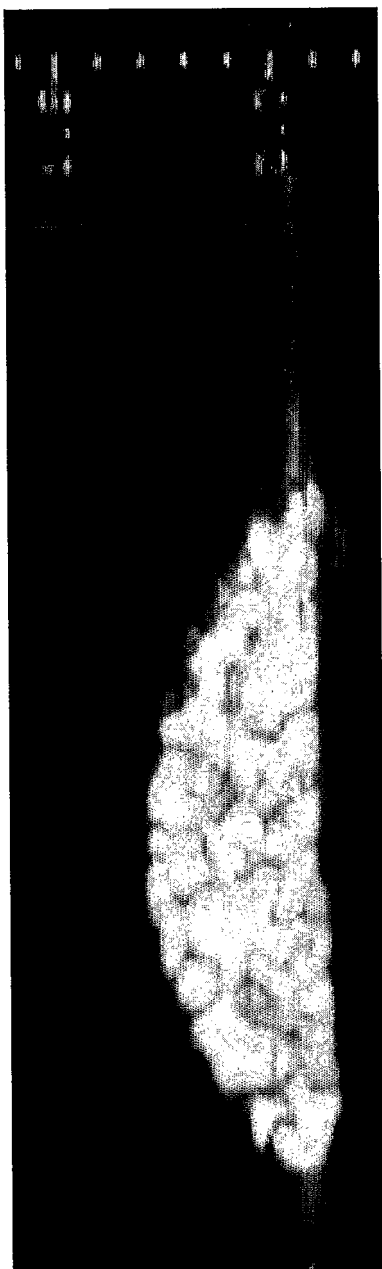


Fig. 12a



Fig. 12b



Fig. 13a

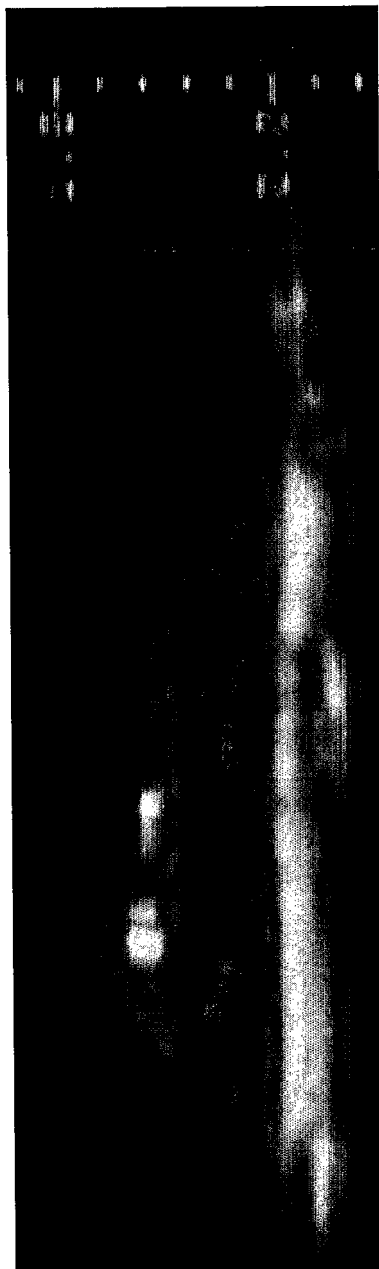


Fig. 13b

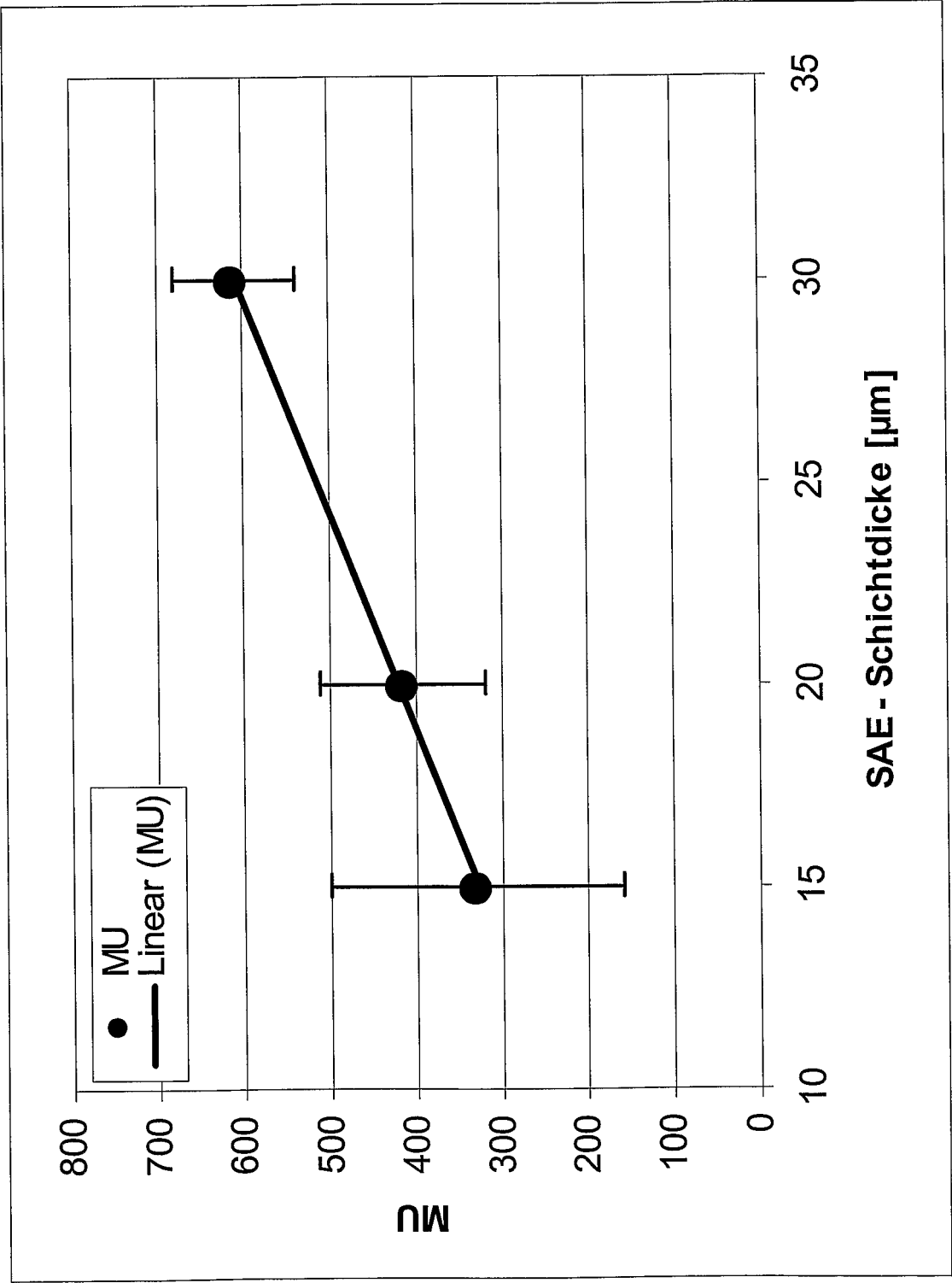


Fig. 14

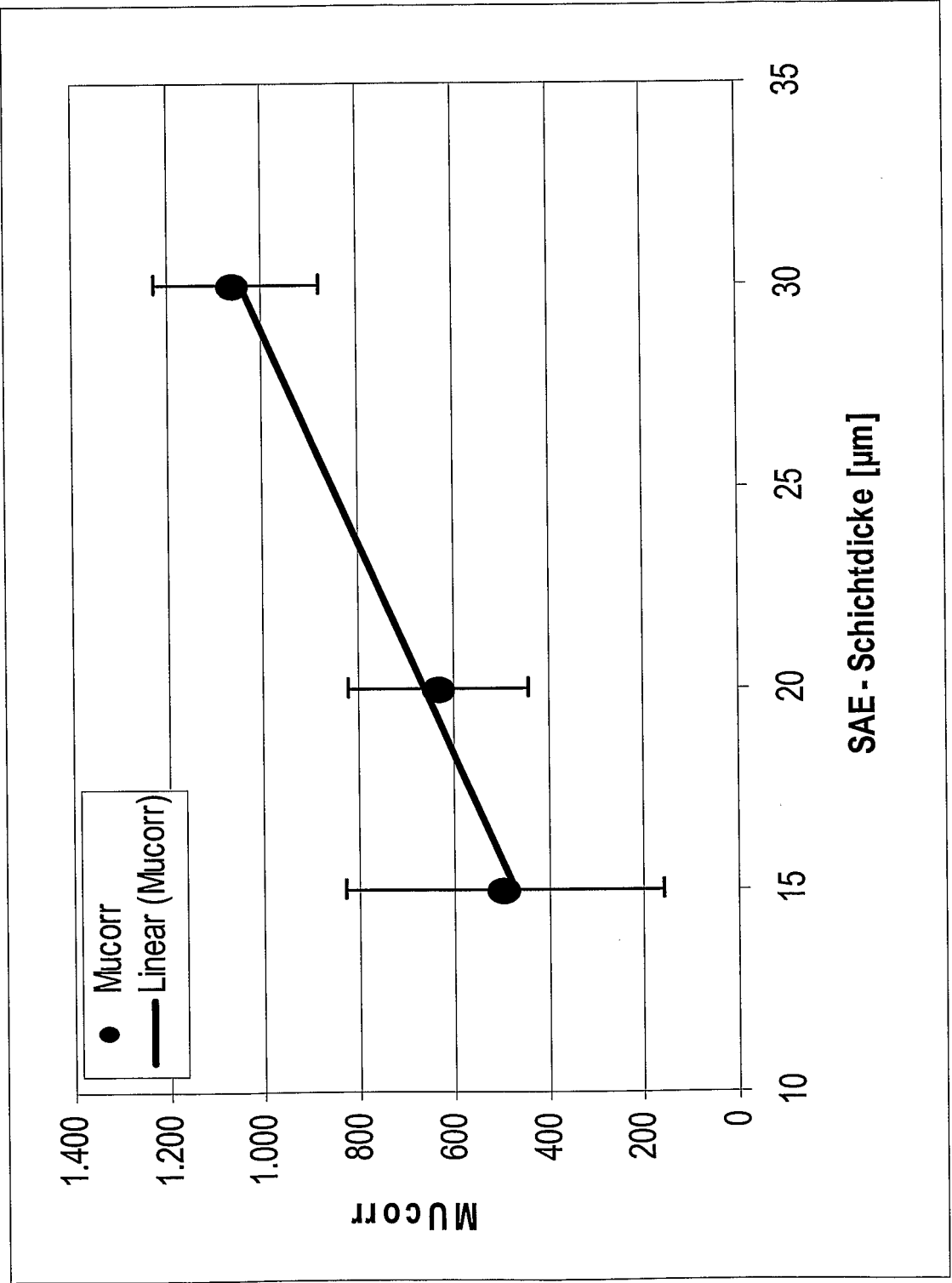


Fig. 15

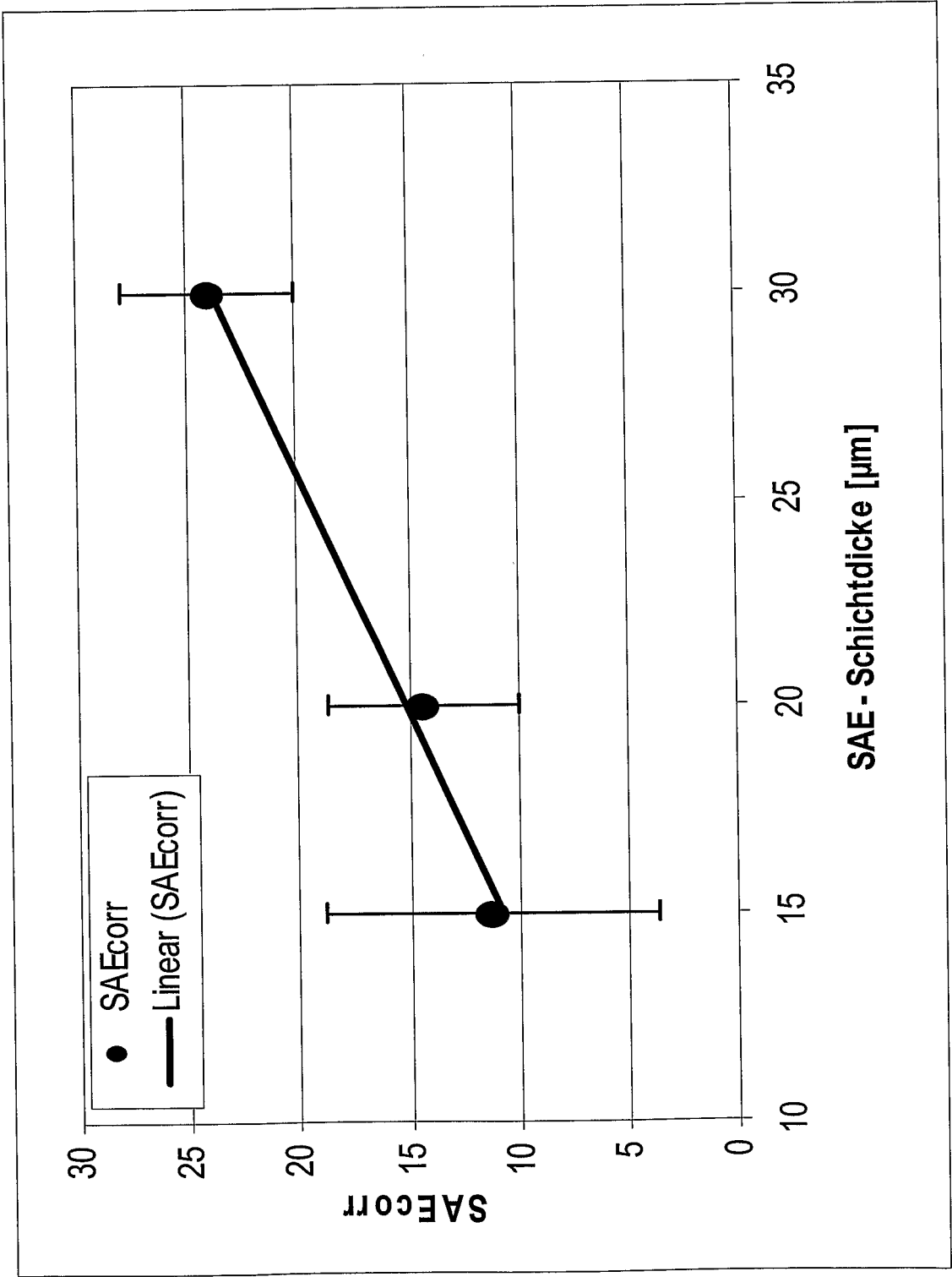


Fig. 16

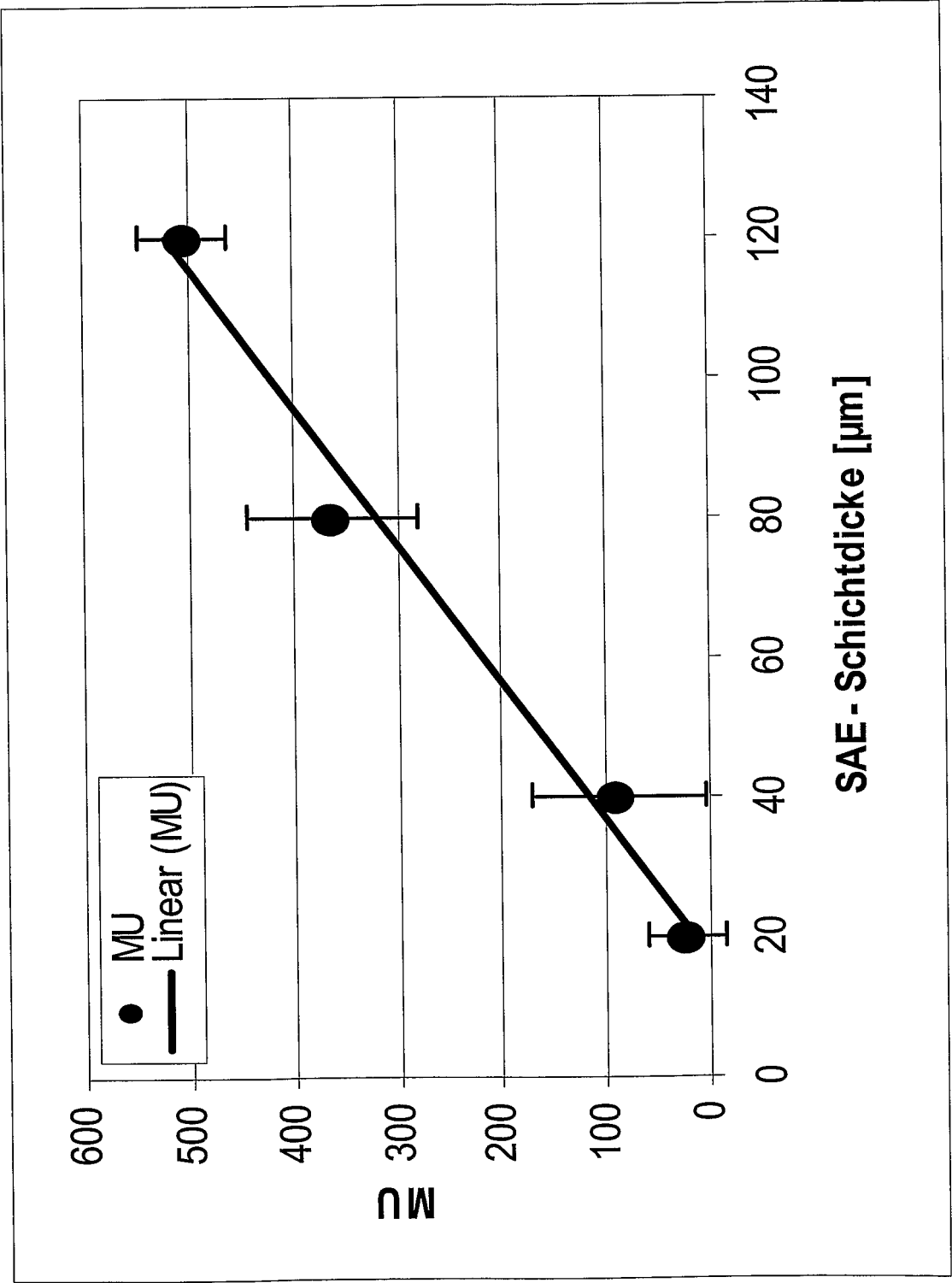


Fig. 17

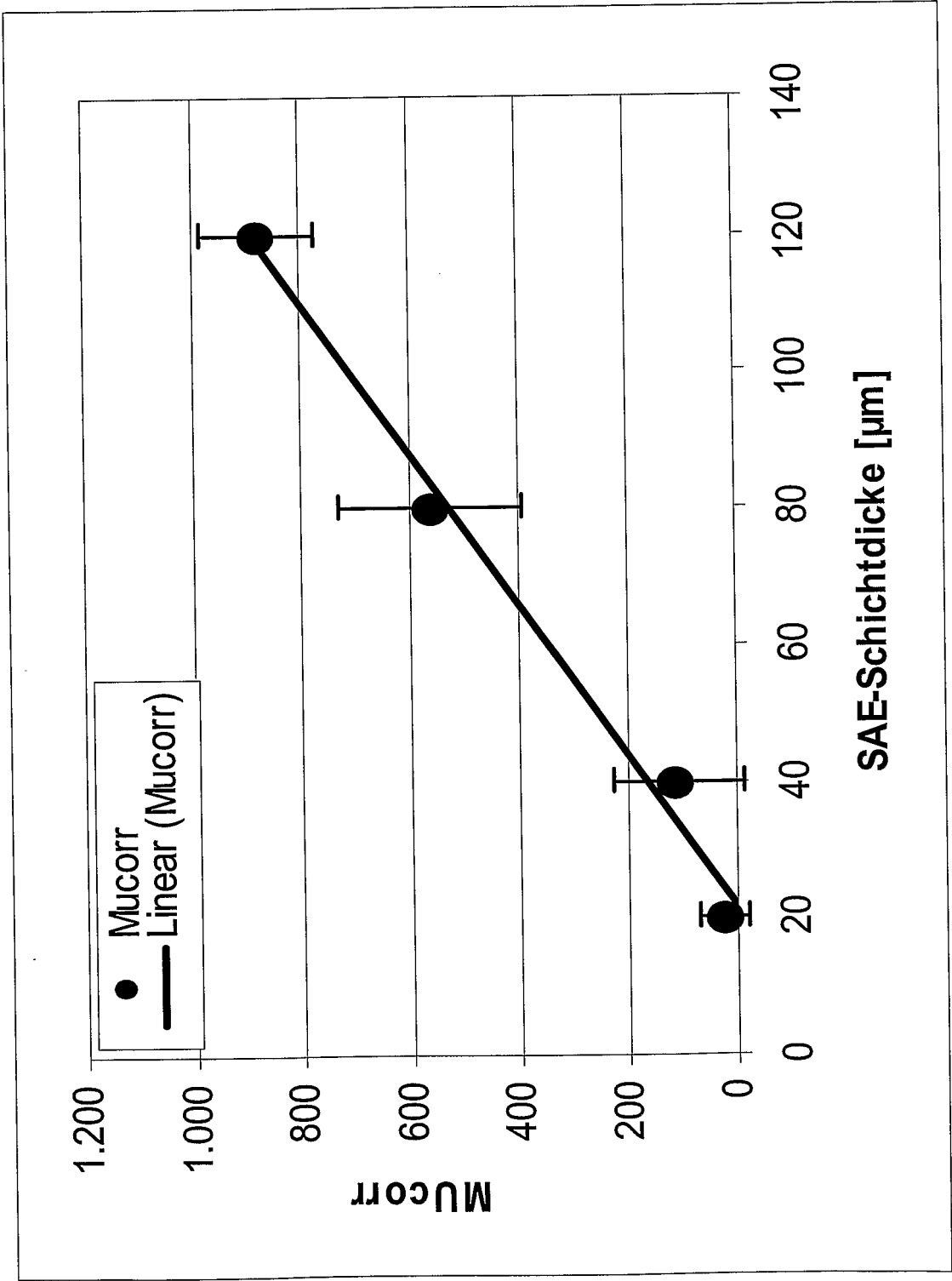


Fig. 18

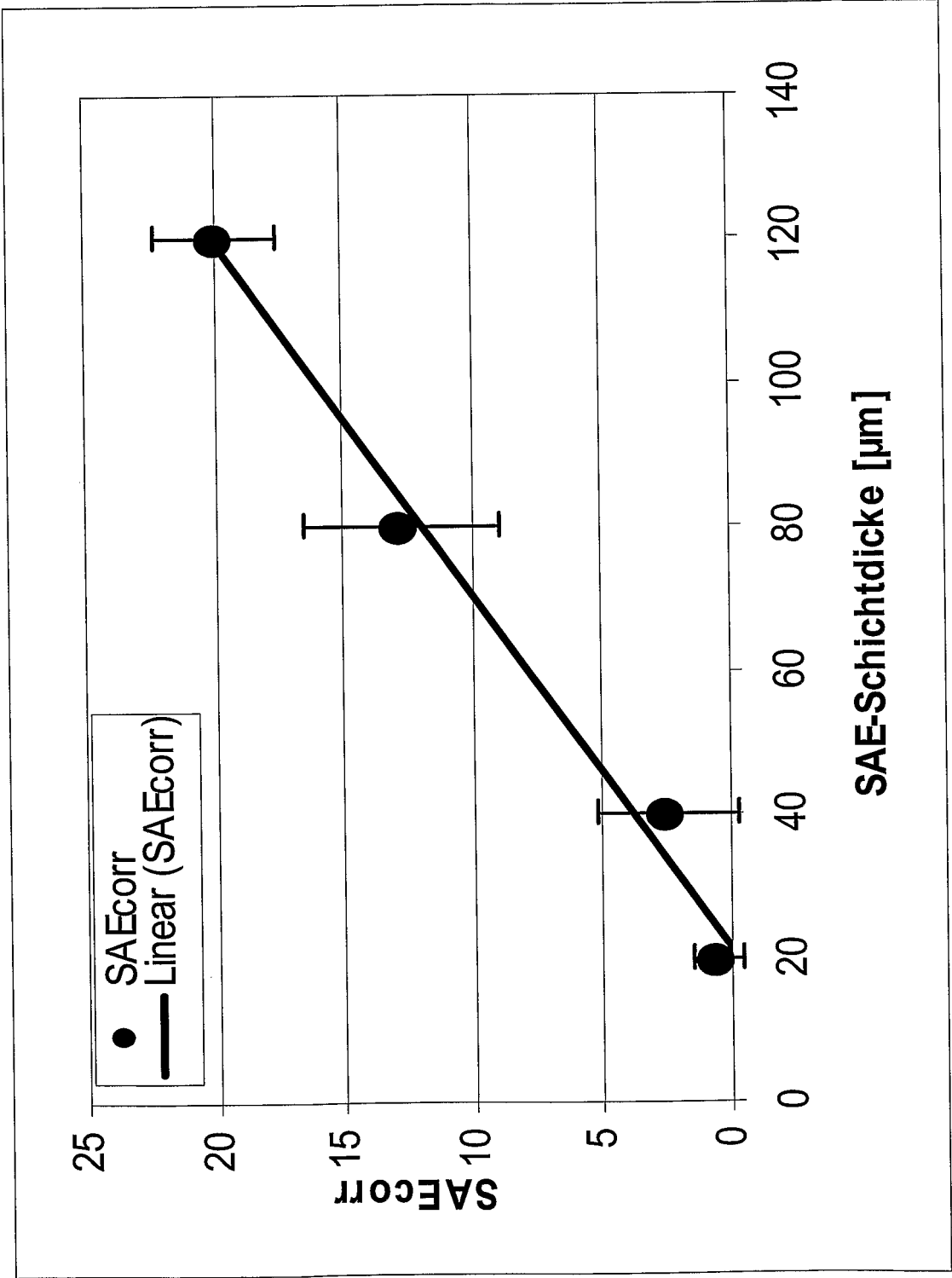


Fig. 19

21
22
20
Fig. 20a

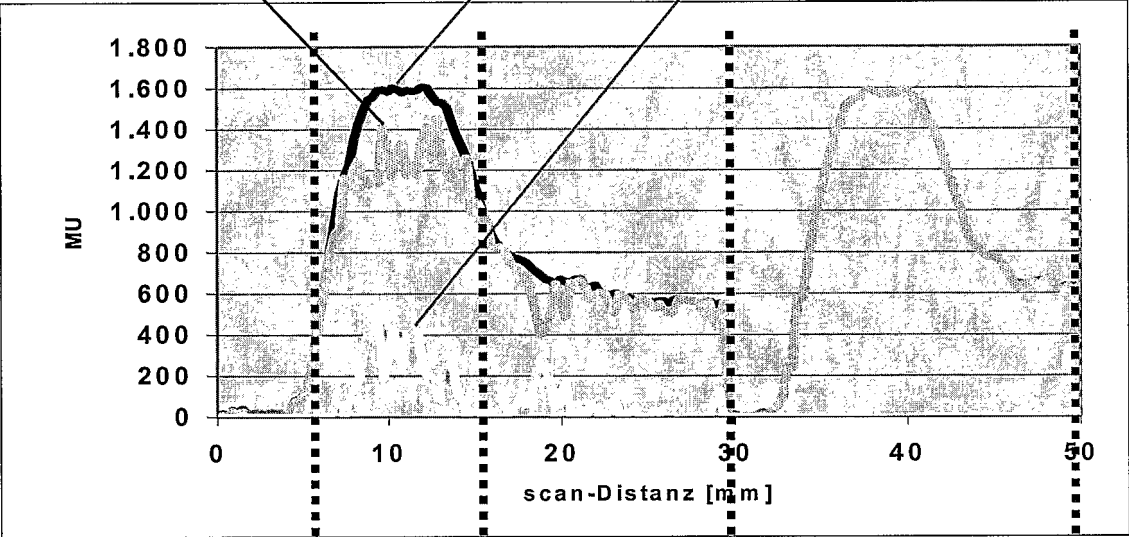
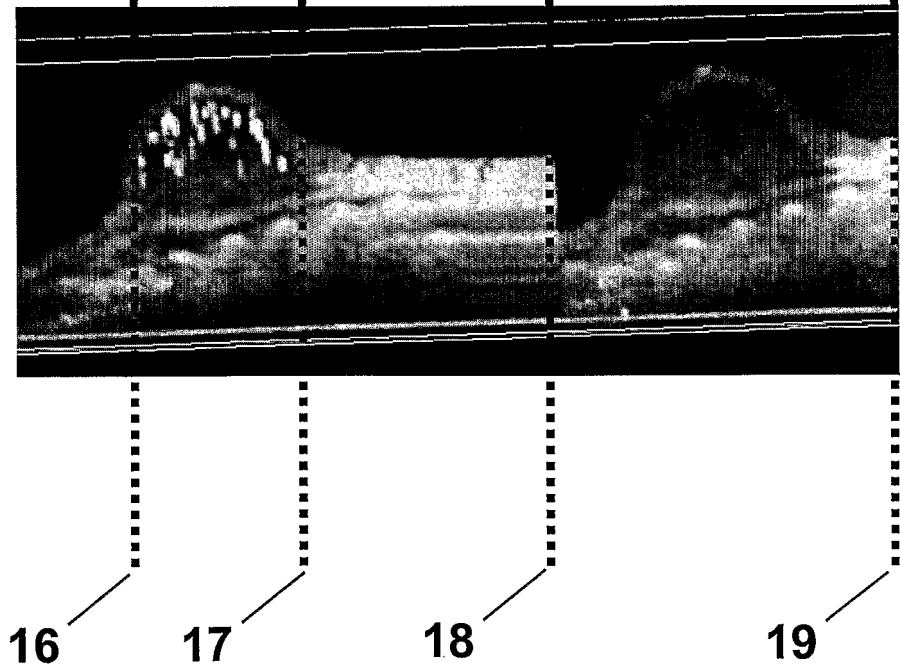


Fig. 20b



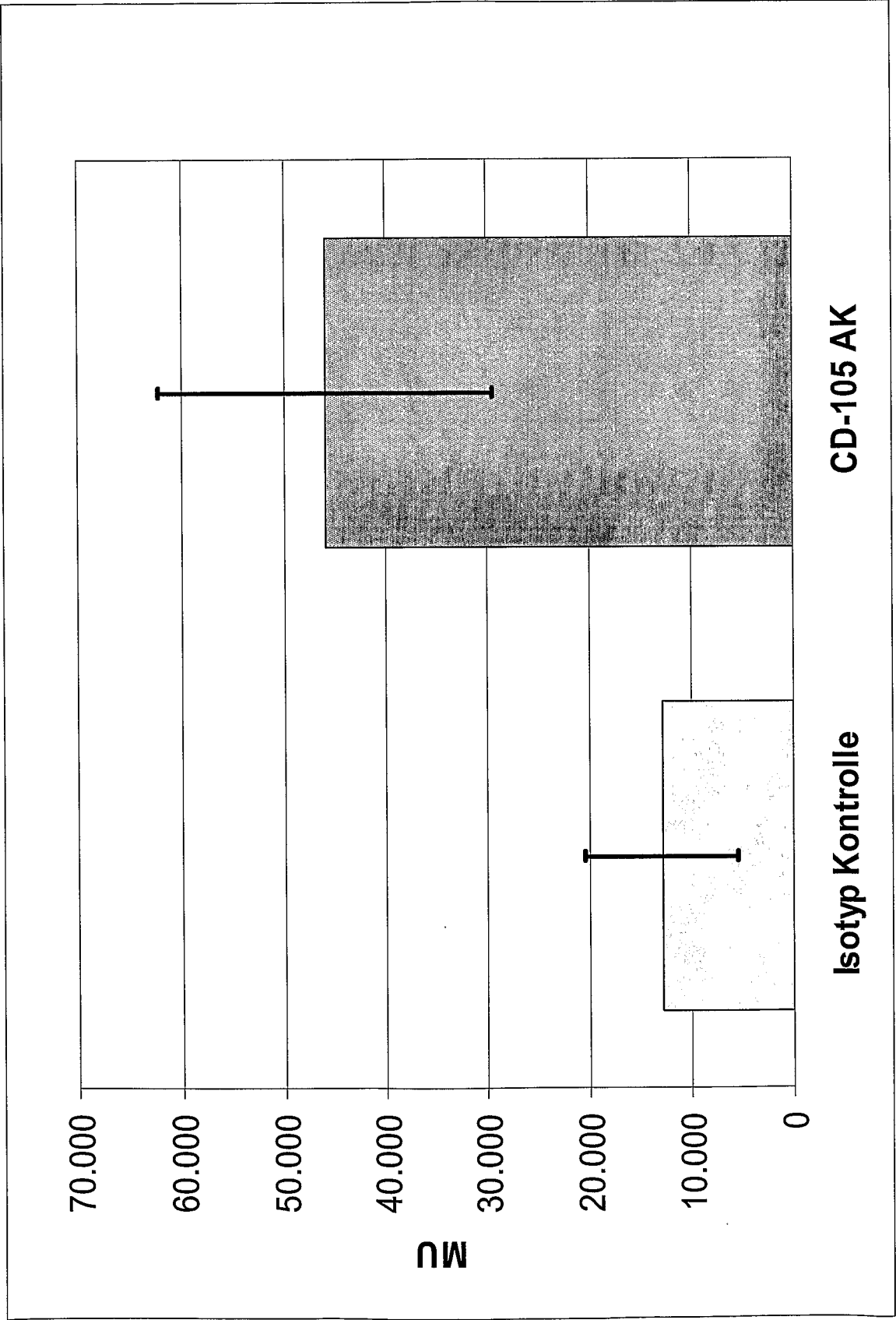


Fig. 21

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)
- *O* 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.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 August 2003

Date of mailing of the international search report

03/09/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 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 erscheinen 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

26. August 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

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 Bediensteter

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 Patentdokument		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	

专利名称(译)	用于通过超声来量化身体的装置和方法		
公开(公告)号	EP1487345A1	公开(公告)日	2004-12-22
申请号	EP2003745194	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)	SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		
当前申请(专利权)人(译)	ACUSPHERE INC.		
[标]发明人	REINHARDT MICHAEL HAUFF PETER BRIEL ANDREAS		
发明人	REINHARDT, MICHAEL HAUFF, PETER BRIEL, ANDREAS		
IPC分类号	A61B8/00 A61K47/48 A61K49/22 G01S7/52 A61K49/00 G01S15/89		
CPC分类号	B82Y5/00 A61B8/4218 A61B8/481 A61B8/483 A61K47/6898 A61K49/223 G01S7/52041		
优先权	10215335 2002-03-28 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在超声波诊断中量化物体，特别是气泡的问题在于物体的浓度，特别是气泡，通常很高，使得所获得的图像数据在其表示方面饱和，使得量化不可能。为了解决所述问题，通过超声波刺激待分析物体的横截面层中包含的物体以发射特征信号，于是记录所述信号，由信号形成数据组。将这组数据转换成待分析对象中的主体排列的表示，并从中检测主体的数量。从待分析的物体中的重叠横截面层记录至少两组超声信号。