

糖尿病用血管機能検査装置の開発

—検査機能—

Development of The Specialty Ultrasonic Medical Apparatus for Diabetes

-Test Functions-

平尾 友二^{*1}

Yuji Hirao

抄 録

糖尿病の重症化は、合併症によって引き起こされる。合併症は、長期の高血糖による血管の損傷に起因することが多い。そこで、無侵襲で安全な超音波を使って糖尿病患者の血管性状を数値評価可能な医用検査機を開発することを目標に5年間の研究開発を行い、糖尿病用血管機能検査装置を新たに開発した。この装置では、1回の検査で血管の機能変化から器質変化までを追うことができるように、血管機能の評価として血流依存性血管拡張反応（FMD）検査を、器質変化の評価として脈波伝播速度（PWV）、コンプライアンス、血管壁弾性率（stiffness β ）、血管壁厚（IMT）検査などを同時に行うことができる。また、臨床でのエビデンスが多いこれらの指標以外に、血管機能の評価を補完するために血流粘度推定、血流速度分布計測、ずり応力（あるいはずり速度）の推定算出、トレンド解析などの機能も新たに開発し搭載した。本報告ではその原理と医学的意義について具体的導入方法と共に解説した。

1 はじめに

徳島県は、長年、糖尿病死亡率ワースト1を記録しており、その対策は喫緊の課題となっている。そこで、文部科学省・イノベーションシステム整備事業（地域イノベーション戦略支援プログラム）において、平成21～25年度の5カ年間、徳島大学などが中心となって糖尿病対策の多角的研究が行われた。本報告は、その中で我々のグループが行った検査・診断開発に関する1テーマである「糖尿病用血管機能検査装置の開発と臨床上的有効性の検証」についてまとめたものである。

糖尿病の重症化は、合併症によって引き起こされる。合併症は、長期の高血糖による血管の損傷に起因することが多い。そこで、本研究では、無侵襲で安全な超音波を使って糖尿病患者の血管の健康状態の推移を数値化することにより、早期治療の指針となり、且つ、改善効果の目視化が可能な医用検査機を開発することを目的に、1回の検査で血管の性状を機能変化から器質変化まで追うことが出来る新たな装置の開発を行った。本報告では、開発した装置に搭載するべく研究開発された検査機能について解

説する。

2 試作機の検査機能

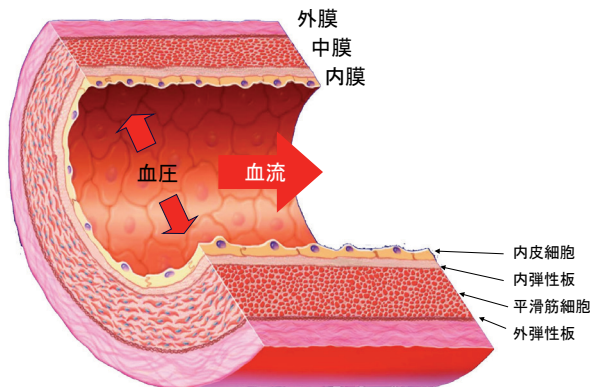
2・1 基本機能^{1)・3)}

本研究開発事業では、早期の事業化が求められていた。早期の事業化には、医学的有用性の検証と認知が不可欠である。そこで、主に搭載する検査機能は、すでに医学的に有用であることが確立されて、広く認知されている既存のパラメータが測定できる、あるいは、測定値から同等のパラメータを推定算出できることを基本とした。

検査対象となる動脈は、図1のように内側から内膜、中膜、外膜の3層の構造をなしており、内膜は細胞1個分の厚みの内皮細胞が血液と接する最も内側にあり、内皮下細胞とそれを包み込む基底膜により成っている。内膜と中膜は内弾性板により隔てられ、中膜は主に平滑筋細胞で構成され、血管の太さや硬さ調整を担っている。中膜と外膜は外弾性板によって隔てられ、外膜は各種繊維細胞や末梢神経で構成されている。

図2に示すように、糖尿病による血管障害は、広義の動脈硬化であり、高血糖ストレスによって最初に内皮障害を生じ、血管の機能低下を生じる。この

*1 電子技術担当



Ross R. Nature. 1993;362:801-809.

図1 血管の構造

血管内皮機能障害の評価は、血流依存性血管拡張反応 (FMD) 検査 (パラメータは%FMD) によって評価することが出来る。次に、血管の機能低下が進展すると血管内皮の損傷箇所から内膜にコレステロールや単球などの血液成分が入り込み、血管器質の変化を生じる。器質の変化は血管の硬さの変化として現れるので、血管弾性の計測いわゆる狭義の動脈硬化検査により捉えることができ、脈波伝播速度 (PWV) やコンプライアンス、血管壁弾性率 (stiffness β) などのパラメータにより評価できる。

また、器質変化が進展すると、血管壁の厚みにも変化が生じ、血管壁厚 (IMT) 検査によって、評価することが出来る。そして、内膜に入り込んだ血液成分などが粥状 (じゅくじょう) のプラークを形成するようになると血管の形態変化を生じるようになり、狭窄や閉塞による種々の合併症を発症するに至る。

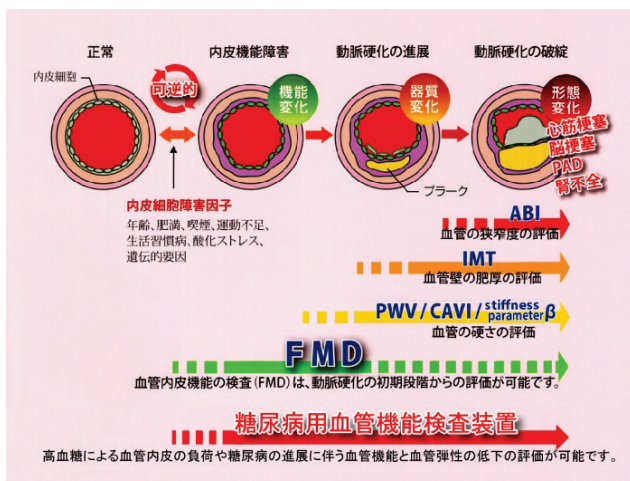


図2 動脈硬化の進展と検査パラメータ

これまで、前述の様なパラメータを同時に計測することが出来る検査装置は無かった。本研究では、1回の検査で血管の性状を機能変化から器質変化まで追うことを目的としている。このため、前述の血流依存性血管拡張反応 (FMD) 検査、脈波伝播速度 (PWV)、コンプライアンス、血管壁弾性率 (stiffness β)、血管壁厚 (IMT) 検査などを1台で同時に行える検査装置を開発することとした。また、糖尿病においては、血液特性も変化し、血液の凝集を生じやすくなる。このため、血流粘度や血流速度分布、後述するずり応力 (あるいはずり速度) など同時計測の対象とした。

2・2 血流依存性血管拡張反応 (FMD) ^{4),5)}

図3に示すように、糖尿病境界域では、インスリン抵抗性あるいは糖化最終物質 (AGEs) が増加すると、内皮細胞が過剰に活性化して、酸化ストレスが上昇状態となる。酸化ストレスは、内皮細胞から産生される抗動脈硬化作用のある一酸化窒素 (NO) の不活性化や内皮細胞そのものの損傷を引き起こす。また、糖化最終物質 (AGEs) により活性酸素消去酵素も不活性化し、酸化ストレスの増強を生じるため、内皮機能の低下が促進される。

内皮細胞には、血管の収縮・拡張調整機能、血管内皮の損傷箇所の修復機能、血管内皮の損傷箇所から内膜に入り込んだ血液成分の排除機能、血管平滑の増殖と抗増殖、凝固と抗凝固作用などがある。

血流依存性血管拡張反応 (FMD) のメカニズムは、図4に示すように、血流によるずり応力によりカル

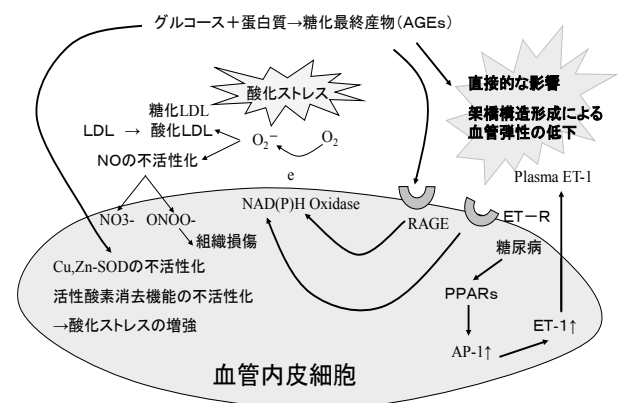


図3 高血糖による血管内皮機能への影響

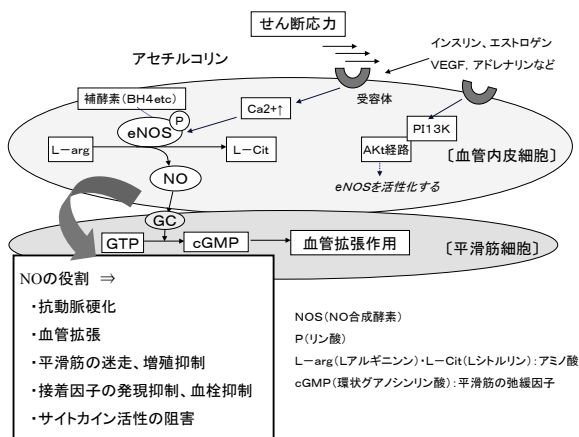


図4 NO 産生と NO の役割

シウムイオン濃度が上昇すると NO 合成酵素 (NOS) が活性化されて NO を産生する。NO は環状グアノシンリン酸 (cGMP) の生成を刺激し、この cGMP が平滑筋を弛緩して血管が拡張するというものである。

2・2・1 血流依存性血管拡張反応 (FMD) 検査^{6),7)}

FMD 検査では、図 5 のように、まず安静時の血管径 (拍動平均値) を測定する。その後 5 分間駆血することにより血流を止めて、内皮へのずり刺激を軽減した後、駆血解放すると血流が再開されると共に内皮へのずり刺激が増加して、解放後 40～60 秒後に最大血管拡張径が観測される。%FMD は、安静時血管径に比べてどれだけ拡張したかの比率を%表記したパラメータである。

FMD 検査は、20 年以上の歴史と多くのエビデンスがあったものの、検査には極めて高い技術練度を必要としたため、安定性や再現性などの面からこれ

までは普及していなかった。当センターでは、(株) ユネクスと共同で世界で初めて比較的扱い易い専用検査機を開発した。現在では保険適用にもなり、広く医療現場で認知されている。このような経緯もあり、本研究開発においては、この FMD 検査装置をベースに、新たな機能を追加搭載して、検査機能の有用性を検証すると共に、新たなコンセプトの糖尿病用検査装置を開発した。

2・2・2 検査プロトコルの検証

FMD 検査は、5 分間駆血することにより血流を止めるというプロトコルで実施されているが、医療現場からは駆血時間の短縮が要望されていた。本研究では、駆血時間を 3 分、4 分、5 分、6 分の 4 つのパターンについて、10 名の被験者で駆血時間の計測結果への影響について調査した。

計測は 1 被験者に対し 1 日 1 回いずれかのパターンを適用するものとし、計測の結果は各パターン毎に 3 回計測した平均値を用いた。

図 6 に実験結果を示すように、駆血時間が 4 分以下では十分な拡張反応が得られず、5 分以上では十分な拡張反応が得られている。この結果から、新たに開発する糖尿病用検査装置においても、駆血時間は 5 分間とすることとし、将来的に十分なエビデンスが得られて、短い駆血時間でも最大拡張径が推定できるようになることも考慮して、システム設定で任意に時間変更できるようにした。

図5 FMD 検査とパラメータ算出式

図6 駆血時間と %FMD 値の関係

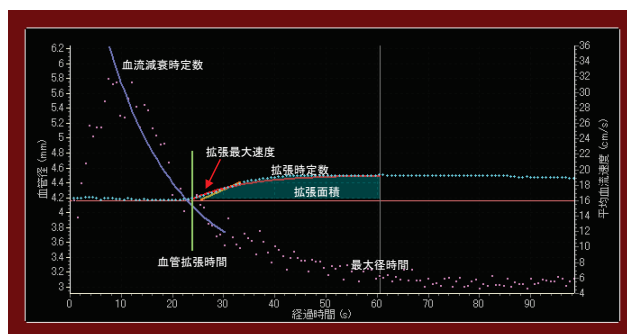


図7 トレンドグラフ

2・2・3 トレンド解析^{8),9)}

FMD 検査の指標は、最大拡張径のみに着目したものであるが、本機が備える FMD 検査機能では、図7のように血管径の時間的変化を記録できる。このグラフは、駆血解放後の血管拡張反応の応答特性を示すものであるが、システムとして見ると1次遅れ特性のグラフとなっている。このことから、拡張の始まりを拡張時間、その時の接線の傾きを拡張最大速度、最大径を観測した時間を最大径時間、最大径の約63%まで拡張するのに要した時間を拡張時定数、拡張時間から最大径時間までの径の変化を拡張面積などと規定し、数値化することとした。

これらの新たなパラメータは、個人毎に異なり、後述する血流速度やずり応力、心機能、血管弾性特性、血液粘度などとの相関が考えられ、本機で新たな指標として提供することにより、今後の研究でエビデンスが蓄積され、医学的意義が見出されるものと期待する。

2・3 ずり応力（ずり速度）の推定¹⁰⁾⁻¹³⁾

血流依存性血管拡張反応（FMD）は、血流に伴う内皮とのずり刺激により誘発される。このため、心疾患患者など血流が低下している場合には、ずり刺激が少なく%FMD 値が低く計測されてしまい血管機能の低下が疑われる懸念がある。また、糖尿病患者では、血液凝集による粘度の上昇などからずり刺激が健常者とは異なることも考えられる。そこで、本研究では、血流に伴う内皮へのずり刺激（ずり応力あるいはずり速度）を推定し数値化した。

2・3・1 血流速度計測とずり速度^{14),15)}

図8に示すとおり、ずり速度 (γ) は、次式のよう

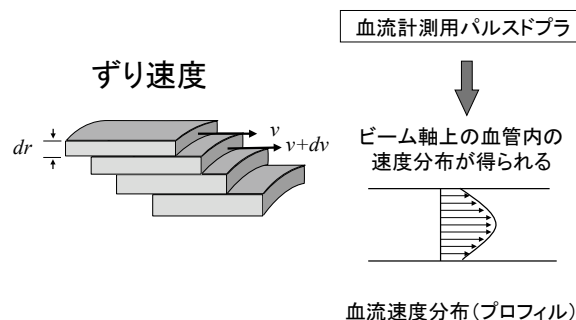


図8 ずり速度の求め方

に血管断面を円周方向に微小領域 (dr) で n 分割した時の速度差 (dv) で規定される。

$$\gamma = \frac{dv}{dr}$$

超音波パルスドプラで計測された血流速度は血管内を貫くビーム軸線上のすべての血管内血流速度の総和となるため、血管の中心部が最も高速であり、周辺に行くほど速度が低下するものと仮定し、次式のように、血流速度分布（プロファイル）からずり速度を求めた。

$$v(dr) = v_{max} \left[1 - \left(\frac{dr}{r} \right)^n \right]$$

n : 流速パターン (n=2: 層流)

2・3・2 血液粘度とずり応力の推定¹⁶⁾

血液は粘度の異なる血球成分と血漿成分の混在流体であることから、血液内の粘性は一律ではなく分布を持っていると考えられる。そこで、血管内を2次元の微小領域に分割し、それぞれの微小領域内では粘度が一樣であると仮定した。血液は粘性を持った非圧縮流体であることから、動粘度を求める。

図9のようにパルスドプラをこの微小領域を被うように長軸方向に複数照射して計測してやると、非圧縮流体の運動方程式であるナビエ・ストークスの方程式から、 x と y の2次元の運動方程式が求められる。この2式から圧力項を代入消去することによって、各微小領域での動粘度を算出した。

ずり応力は、ずり速度と動粘度との積で表されるので、密度を一定と仮定してずり応力を算出した。

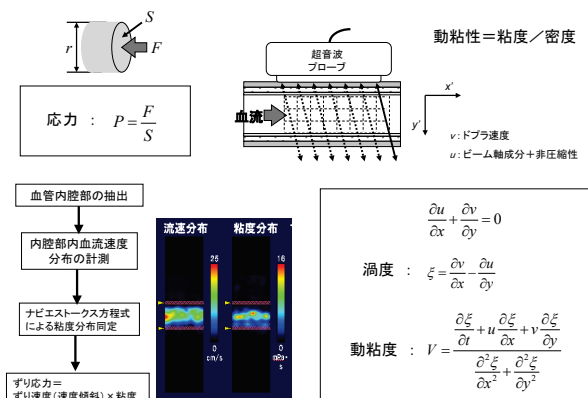


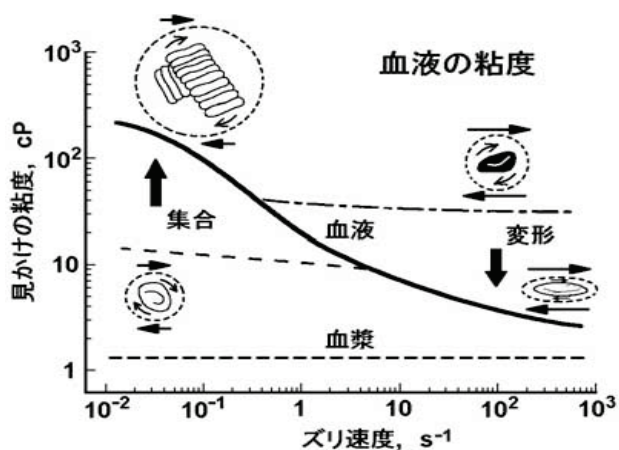
図9 動粘度とずり応力の求め方

一般的に、血液の粘度とずり速度の関係は、図10のように血液が凝集するとずり速度が低下し、その関係は曲線を示すものと公知されている。初期の糖尿病患者や健常者においては凝集や血球の変形が無いと考えられることから、図10の曲線の中央部付近の特性を示すものと考えられる。

ここで、5名の健常者を対象に行った実験結果を図11に示す。この結果から、本研究で開発したアルゴリズムとハードウェアによる計測結果は良好であると考えられる。

2・4 血管弾性計測

血管の弾性特性を表す指標は複数あり、それぞれ適用条件や医学的有用性が若干異なる。本研究では、可能な限り多くの指標で表すことにより、血管の性状を多角的に検証できるものと考え、上腕動脈で測定可能な脈波伝播速度 (bPWV)、血管壁弾性率 (stiffness β)、血管伸展性 (ディステンシビリティ :



日生誌 Vol. 66, No. 7・8 2004

図10 血液の粘度とずり速度の関係

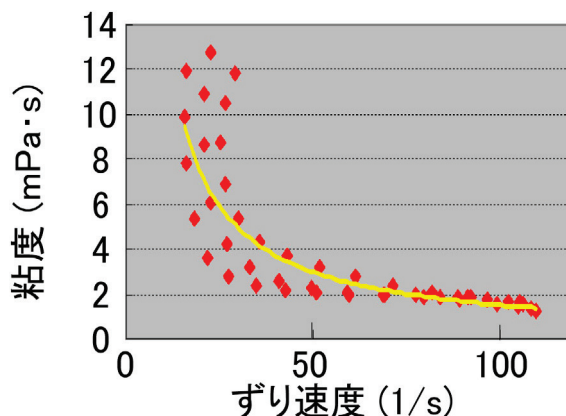


図11 ずり速度と動粘性の計測結果

distensibility), コンプライアンスなどを採用した。

2・4・1 脈波伝播速度^{17),18)}

脈波伝播速度 (PWV : Pulse Wave Velocity) とは、心臓から押し出された血液により生じた拍動が心臓から動脈を伝わっていく速度のことで、血管が硬いほどその速度は速くなる。脈波伝播速度 (PWV) 検査は、検査部位によって cfPWV (頸動脈—大腿動脈)、baPWV (上腕動脈—足首動脈) などがあるが、ここでは、最近多くを占めている baPWV について、説明する。baPWV 検査は、図12のように、四肢 (両上腕動脈と両足首) に血圧測定用カフを巻き付け、体内の動脈をさほど圧迫することのない低圧でこれらのカフを膨らませ、カフ内に取り付けられた容積脈波センサで脈波を測定するものである。baPWV 値の算出は、心臓から上腕動脈までの距離 (Lb)、心臓から足首までの距離 (La) と、上腕で計測された

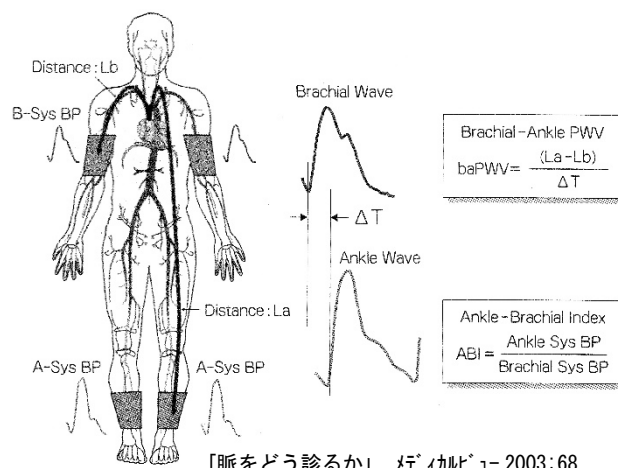


図12 脈波伝播速度 (baPWV) 検査法

脈波時間と足首で計測された脈波時間の差 (ΔT) から、次式のような関係式で求められる。ここで、 La , Lb の値は一般的に身長を基にした近似式から算出される。

$$baPWV = \frac{La - Lb}{\Delta T}$$

本研究では、FMD 検査に伴って上腕動脈で血管径の変化をエコー画像から、血流速度分布の変化をパルスドプラからそれぞれ計測できる。いずれの情報からでも脈波を得ることができるが、ここでは、後者を用いた。また、計測箇所が上腕動脈のみであることから、上腕動脈で観測された脈波時間と心電位 (ECG) から脈波速度を求めた $bPWV$ をパラメータとした。

2・4・2 血管壁弾性率 (stiffness β)

血管壁弾性率 (stiffness β) は、安静時の血管径と血圧から求められる。具体的には、長軸・短軸両エコー画像から観測された収縮期血管径 (Ds) と拡張期血管径 (Dd)、血圧計で計測された収縮期血圧 (Ps) と拡張期血圧 (Pd) から、次式を用いて算出した。

$$Stiffness\beta = \frac{\log (Ps/Pd)}{(Ds - Dd)/Dd} = \frac{\log \Delta P}{\Delta D/Dd}$$

ちなみに、血液密度 (ρ) を用いると、stiffness β は、Bramwell-Hill の公式より、局所的 PWV と次式の関係が成り立つ。

$$PWV = \sqrt{\frac{stiffness\beta}{2\rho}} = \sqrt{\frac{\Delta P}{2\rho} \times \frac{Dd}{\Delta D}}$$

2・4・3 血管の伸展性 (distensibility)

血管の伸展性 (distensibility) は、1 心拍中の血管内容積の変化量を血圧の変化量と元の容積で除した値として求められる。具体的には、エコー画像から観測された収縮期血管径と拡張期血管径の値から単位長あたりの収縮期内容積 (Vs) と拡張期内容積

(Vd)、その差 (ΔV) を算出し、血圧計で計測された収縮期血圧と拡張期血圧の差 (ΔP) から、次式を用いて算出した。

$$distensibility = \frac{\Delta V}{\Delta P + Vd}$$

2・4・4 コンプライアンス¹⁸⁾

血管のコンプライアンスも血管の伸展性あるいはやわらかさを表す指標で、伸展性に容量を乗じた形で表される。つまり、どれだけの血液を溜めることができるかを示したものである。血管のコンプライアンスは、血管壁の弾性特性は血圧に大きく依存し、血圧が 150mmHg 以上の高血圧領域では血管のコンプライアンスに変化が認められるとの報告もある。

2・4・5 その他の指標^{20),21)}

血圧歪み弾性係数 (Ep) は、静力学的な血圧と径変化の関係から定義された指標で、血管が硬くなるほど値が高くなる。血圧歪み弾性係数 (Ep) は、次式から算出した。

$$Ep = \frac{\Delta P}{\Delta D/Dd}$$

増分弾性係数 ($Einc$) は、1 心拍中の血圧の変化量 (ΔP) に対する周方向の応力の変化量 (ΔT) と歪みの比で定義される。動脈の半径 (r : 血管径 $D = 2r$)、血管壁の厚み (h) を用いると、圧力と周方向の応力は次式で表される。

$$\Delta P = \frac{\Delta T \times h}{r} \quad \text{or} \quad \Delta T = \frac{\Delta P \times r}{h}$$

また、歪みは次式で表されるので、

$$\frac{\Delta r}{r} = \frac{\Delta (2\pi r)}{2\pi r}$$

増分弾性係数 ($Einc$) は次式を用いて算出した。

$$E_{inc} = \frac{(\Delta P \times r) / h}{\Delta r / r}$$

2・5 血管壁厚（IMT）検査

IMTとは「Intima Media Thickness」の略で、動脈血管壁の内膜と中膜を合わせた厚さを意味している。通常、IMT検査は頸動脈を対象に行われることが多い。これは、頸動脈が粥状動脈硬化（アテローム性動脈硬化）の好発部位であり、仮にその粥状の隆起（プラーク）が破綻し、血栓となって流出すると、脳血管に詰まって脳梗塞を引き起こすためである。

新しく開発する装置では、FMD検査の対象が上腕動脈であるため、IMT検査も上腕動脈を対象に行うこととした。対象部位の違いについては、様々な議論のあるところではあるが、内膜中膜複合体の厚さは動脈硬化の進行程度と比例することが解っており、初期の動脈硬化は全身の動脈ではほぼ同時に進行すると考えられることから、意義あるものと考えた。

具体的には、FMD検査において、安静時の血管径は、血管の長軸方向の断面エコー画像から測定しているため、IMT検査もこのエコー画像から同時並行で計測した。

3 まとめ

糖尿病に伴う高血糖は、血液の成分や粘度を変化させる。そして、血流や血管内皮へのずり刺激の変化を及ぼし、血管内皮を傷つけ動脈硬化を誘引する。動脈硬化は血管機能の変化から始まり血管器質の変化を経て血管形態の変化に至る。

5年間の研究では、装置に搭載する検査機能のアルゴリズム研究からハードウェア（試作機）開発まで幅広く行うと共に、臨床現場での検査機能の評価検証も行った。

本報告は、その内の装置に搭載する検査機能のアルゴリズム研究について、概要をまとめたもので、非侵襲で安全な超音波を使って、上腕動脈の血管性状の変化の推移を医学的根拠に基づいた複数の指標で同時検査し、数値化するためのアルゴリズム群を完成させた。

今後、ハードウェア（試作機）開発に関する技術

報告を、臨床現場での検査機能の評価検証結果をそれぞれまとめていく予定である。

謝辞

本研究開発において、試作機の製作に尽力いただきました（株）ユネクスの皆様に感謝いたします。

参考文献

- 1) 伊藤紘一, 平田経雄. 血管・血流超音波医学. 医歯薬出版, 2002, p. 269, ISBN4-263-22254-7.
- 2) 梶尾裕, 安田和基, 石本洋子. 動脈硬化症と糖尿病の血管合併症. メヂカルフレンド, 2008, p. 241, ISBN978-4-8392-1450-0.
- 3) Ryotaro, Bouchi.; Tetsuya, Babazono.; Michino, Mugishima.; Naoshi, Yoshida.; Izumi, Nyumura.; Kiwako, Toya.; Ko, Hanai.; Nobue, Tanaka.; Akiko, Uchigata.; Yasuhiro, Iwamoto. Arterial Stiffness Is Associated With Incident Albuminuria and Decreased Glomerular Filtration Rate in Type 2 Diabetic Patients. Diabetes Care. Am-Diabetes Association, 2011, p. 1-6.
- 4) Nobuyuki, Takahashi.; Satoshi, Morimoto.; Mitsuhiro, Okigaki.; Maiko, Seo.; Kazunori, Someya.; Tatsuyori, Morita.; Hiroaki, Matsubara.; Tetsuro, Sugiura.; Toshiji, Iwasaka. Decreased plasma level of vitamin C in chronic kidney disease : comparison between diabetic and non-diabetic patients. Nephrology Dialysis Transplantation, 2010, p. 1-6.
- 5) Masanobu, Yoshida.; Hirofumi, Tomiyama.; Jiko, Yamada.; Chisa, Matsumoto.; Mari, Odaira.; Kazuki, Shiina.; Akira, Yamashina. Relationship of Insulin Resistance to Macro- and Microvasculature Reactivity in Hypertension. Am J Hypertension, 2010, p.1-6.
- 6) Teruo, Inoue.; Hidehiro, Matsuoka.; Yukihito, Higashi.; Shin-ichiro, Ueda.; Masataka, Sata.; Ken-ei, Shimada.; Yutaka, Ishibashi.; Koichi, Node. Flow-Mediated Vasodilation as a Diagnostic Modality for Vascular Failure. Hypertens Res Review, 2008, 31, p.2105-2113.
- 7) 西田将司, 黒田隆, 林幸宏, 平尾友二, 張達力, 木内陽介, 山口久雄, 吉崎和男. 計測対象血管の位置ずれが単一ビームを使った超音波血流計に及ぼす影響. 信学技報.電子情報学会, 2002, MBE2002-34,

p.29-32.

8) Steven, K.; Nishiyama, D.; Walter, Wray.; Kimberly, Berkstresser.; Murali, Ramaswamy.; Russell, S, Richardson. Limb-specific differences in flow-mediated dilation : the role of shear rate. J Appl Physiol, 2007, 103, p.843-851.

9) Steven, K.; Nishiyama, D.; Walter, Wray.; Russell, S, Richardson. Aging affects vascular structure and function in a limb-specific manner. J Appl Physiol, 2008, 105, p.1661-1670.

10) Greg, Atkinson.; Alan, M. Batterham.; Mark, A. Black.; Nigel, T. Cable.; Nicola, D. Hopkins.; Ellen, A. Dawson.; Dick, H. J. Thijssen.; Helen, Jones.; Toni, M. Tinken.; Daniel, J. Green. Is the ratio of flow-mediated dilation and shear rate a statistically sound approach to normalization in cross-sectional studies on endothelial function? . J Appl Physiol, 2009, 107, p. 1893-1899.

11) Andrew, C. Betik.; Victoria, B. Luckham.; Richard, L. Hughson. Flow-mediated dilation in human brachial artery after different circulatory occlusion conditions. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004, 286, p.H442-H448.

12) Kenneth, S. Dyson.; J. Kevin, Shoemaker.; Richard, L. Hughson. Effect of acute sympathetic nervous system activation on flow-mediated dilation of brachial artery. Am J physiol Heart Circ Physiol. 2006, 290, p.H1446-H1453.

13) 前田信治. 血液のレオロジーと生理機能－血行力学の基礎と血液粘度－. 日生誌. 2004, 66(7・8), p. 234-224.

14) 平尾友二. 血管位置追尾型ドプラ血流計の開発. 超音波テクノ. 2004, 16(6), p. 70-73.

15) 平尾友二, アズラン・アズビム, 木内陽介. 血管位置追尾型血流計の開発と肘の屈伸運動中の血流計測. 電子情報学会論文誌. 2009, J92-D(1), p.162-175.

16) Naotaka Nitta. Experimental verification of blood characterization based on ultrasonic blood flow measurement. International Ultrasonics Symposium Proceedings, 2012, 1, p.1379-1382.

17) 小澤利男, 増田善昭, 山科章. 脈をどう診るか－新しい脈波の臨床応用－. メディカルビュー, 2003, 114p, ISBN4-7583-0111-5.

18) 平尾友二, 田向健吾, 木内陽介, 山口久雄, 吉崎和男. 頸動脈, 上腕動脈, 大動脈における血流速度と脈波伝搬速度の3動脈同時計測. 生体生理シンポジウム論文集. 自動制御学会, 1999, p. 457-460.

19) 松本健郎. ”動脈硬化度の精密測定を目指した多角的血管機能評価装置のご紹介”. <http://www.nitech.ac.jp/news/files/110106-1.pdf>

20) 池下和樹, 長谷川英之, 金井浩. 内皮反応時の橈骨動脈壁粘弾性毒性変化計測. 超音波テクノ, 2010, 3(4), p.84-88.

21) 小澤利男. 動脈スティフネスに関するヨーロッパ専門医の合意事項: 方法論と臨床応用について. Arterial Stiffness. メディカルビュー, 2007, 12, p.10-17.