

國立臺灣大學電機資訊學院生醫電子與資訊學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biomedical Electronics and Bioinformatics

College of Electrical Engineering and Computer Science

National Taiwan University

Master Thesis

以光聲效應為主之雷射光熱治療定量式熱影像

Photoacoustic quantitative thermal imaging for
laser-induced thermotherapy



王修含

Shiou-Han Wang, M.D.

指導教授：李百祺 博士

紀秀華 醫師

Advisor: Pai-Chi Li, Ph.D.

Shiou-Hwa Jee, M.D. & Ph.D

中華民國 98 年 6 月

June, 2009

目 錄

口試委員會審定書

誌謝

中文摘要

英文摘要

第一章 緒論.....	1
1.1 熱治療簡介.....	1
1.1.1 射頻腫瘤消融術.....	1
1.1.2 微波消融術.....	3
1.1.3 高強度聚焦超音波.....	5
1.1.4 雷射誘導熱治療.....	7
1.2 雷射與溫度對生物組織的作用.....	8
1.2.1 雷射對生物組織的作用.....	9
1.2.1.1 光化學反應.....	9
1.2.1.2 熱交互作用.....	11
1.2.1.3 光剝離作用.....	13
1.2.1.4 電漿誘發剝離作用.....	13
1.2.1.5 光分裂效應.....	14
1.2.2 溫度對生物組織的作用.....	15
1.3 使用金奈米粒子進行雷射誘導熱治療.....	18
1.3.1 金奈米粒子的表面電漿共振.....	18
1.3.2 馬克斯威爾方程式.....	20
1.3.3 表面電漿共振.....	22
1.3.4 利用表面電漿共振之雷射誘導熱治療.....	25
1.4 各種監測熱治療溫度的方法.....	26

1.4.1 非侵入式監測溫度法.....	26
1.4.2 超音波測溫法.....	29
1.4.2.1 聲速法.....	31
1.4.2.2 衰減係數法.....	32
1.4.2.3 反散射能量變化法.....	34
1.4.2.4 回音偏移法.....	37
1.5 光聲效應.....	40
1.6 利用超音波與光聲效應對軟組織造影.....	41
1.7 光聲效應測溫法與研究動機.....	43
第二章 光聲效應測溫法之理論基礎.....	44
2.1 光聲信號之產生.....	44
2.2 由熱力學推導光聲信號之振幅.....	45
2.3 光聲信號與溫度之關係.....	50
2.4 影響解析度的因素.....	54
2.4.1 解析度.....	54
2.4.2 空間解析度.....	54
2.4.3 溫度解析度.....	55
第三章 實驗方法.....	56
3.1 實驗所用之高頻光聲探頭與雷射系統.....	56
3.2 仿體實驗架構.....	59
3.3 活體實驗架構.....	63
第四章 實驗結果與討論.....	67
4.1 光聲信號產生的位置與振幅.....	67
4.2 溫度對吸收係數之影響.....	71
4.3 溫度對光聲信號位置之影響.....	73
4.4 熱效應對光聲信號振幅之影響.....	88

4.4.1 以脈衝式雷射加熱仿體.....	88
4.4.2 以熱水浴槽加熱仿體.....	95
4.4.3 不同物質對於光聲信號振幅與溫度線性關係之影響.....	100
4.5 系統之解析度與誤差來源.....	105
4.6 光聲信號對溫度變化之靈敏度與穩定性.....	110
4.7 以光聲-超音波雙重造影辨識腫瘤.....	112
4.8 連續波雷射與金奈米粒子對於腫瘤的熱效應.....	115
4.9 以連續波雷射為熱源進行熱治療的光聲信號強度.....	119
4.10 定量式熱影像技術.....	124
4.11 標靶式雷射光熱治療之定量式熱影像.....	131
第五章 結論.....	140
5.1 溫度與光聲造影的關係.....	140
5.2 定量式熱影像技術.....	142
5.2 未來展望.....	143
第六章 參考文獻.....	144
第七章 聲明.....	153

誌 謝

歷經一年多的實驗與研究，在繁重的臨床工作壓力下，終於完成這篇論文了。感謝李百祺老師與台大皮膚科紀秀華醫師在研究過程中的指導與鼓勵，讓這個研究能在明確的方向下順利地進行，並在最短的時間內取得最豐碩的成果。

這個研究經歷了四十次以上的實驗，可說是由上百次的進度報告濃縮積累而成的。此過程最應該感謝魏振璋同學的實驗協助，藉由他豐富的光電雷射與超音波實作經驗、敏銳的程式功力，讓這個研究大幅度減少摸索的時間，並提昇結果的準確度，同時恭喜他於這個夏天順利取得了台大電機工程學博士學位。在理論推導方面，則應該感謝許曄琳同學的協助，使本研究能在複雜的數學公式與物理模型之間，得到最清晰的戰略行進方向，靈巧地避免研究路線的偏斜。

在此跨領域的研究中，用到了眾多的實驗材料與設備，感謝廖超康博士建立的光聲實驗平台、蔡於璫與劉建宏博士提供多組穩定的高頻超音波探頭與數位式電表，以及陳思嘉與鄭博文同學熱心提供石墨瓊脂糖仿體，還有中正大學王崇人教授與胡彩玲、陳志盟同學提供的金奈米粒子與紅外線攝影設備，成功大學謝達斌醫師團隊提供的實驗動物與病理染色切片。此外，感謝台大醫院病理部蕭正祥醫師指導組織病理方面的判讀，也謝謝程健銘、謝寶育、王昱欣同學參與的豐富討論與實驗協助。陳思嘉、邱博冠、吳詩盈同學在研究過程中的相互支援，張理涵、張力文、翁乾修、王珣力博士、莊岳勳醫師、廖愛禾博士、與實驗室眾多成員的相互協助，也是這個論文能順利完成的重要因素。

本研究得到台大醫學卓越研究中心—基因體醫學組、台大尖端奈米材料中心的設備支援，以及行政院國家科學委員會經費補助(NSC 97-3011-P-002-009)，在此一併致謝。最後，感謝家人的支持，這是個人進行此研究最大的動力來源，感恩之情，非三言兩語所能道盡，謝謝你們！

王修含

June, 2009

中文摘要

本研究結合超音波與雷射的非侵入式光聲技術，應用於雷射光熱治療時的溫度量測，並進行複合式超音波與光聲的疊合造影，同時發展定量式熱影像之成像技巧。光聲信號可用來研究金奈米粒子受連續波雷射照射後，因表面電漿共振效應所產生的加熱反應。此種結合超音波與光聲效應的方法，在治療前與治療中可分析腫瘤的解剖學構造，並於治療期間監測雷射電漿光熱治療時的組織溫度，有助於維持光熱治療的安全性與有效性。許多形式的能量皆可產生光聲信號，本研究選擇脈衝式雷射為光聲信號來源，同時搭配高頻超音波探頭，以利於產生高解析度的光聲影像。

光聲信號可用於非侵入式組織造影，影響聲波振幅壓力 $P(z)$ 的關係式為 $P(z) = \Gamma \mu_a F_0 e^{(-\mu_a z)}$ ，在能量穩定的雷射系統中，振幅 $P(z)$ 除了受Grüneisen參數 Γ 影響之外，尚與吸收係數 μ_a 有關。溫度變化不會影響吸收係數，而水的 Γ 參數對溫度呈線性關係，軟組織具有大於70%的水份，故可借用水的 Γ 參數，由光聲效應的壓力信號，測量熱治療過程中，富含水份的組織溫度。

溫度除了影響光聲振幅外，尚會造成光聲射頻超音波信號的位置偏移，若以聲速公式校正，並扣除熱膨脹的效應，可將這些超音波信號調整至相同的位置。熱膨脹與聲速雖對超音波信號時間偏移量產生影響，但不影響光聲信號振幅，故適宜採用光聲信號來測量較大範圍的溫度變化。

光聲影像系統品質與本系統之空間解析度有關，超音波探頭中心頻率愈高，空間解析度將會愈高。本研究採用的20MHz高頻超音波探頭，可達200-300 μm 的空間解析度。提高脈衝式雷射系統的能量輸出穩定度，可減少脈衝能量的標準差，進而提高溫度準確度。本系統可快速對熱流反應，並可長時間工作，對於連續波雷射的開閉與輸出功率的波動，立即產生振幅的改變，此特性可提昇熱治療過程的安全性與有效性。

金奈米粒子的存在、連續波雷射的照射，皆可增加光聲信號的振幅。與組織原本就存在的載色體相較，金奈米粒子在吸收脈衝式雷射能量後，可激發更高的光聲信號振幅，所以適合擔任光聲造影的「對比劑」。在雷射光熱治療前後，本系統可疊合超音波與光聲影像，準確定位腫瘤與奈米粒子所在位置，有利於擬定治療計劃與提昇治療品質。

以光聲效應為主的溫度量測方法，具有應用於熱治療監測的潛力，且使用金奈米粒子輔助的雷射電漿光熱治療模式，特別適用於配合雷射的光聲效應測溫法，同時也可利用定量式熱影像的熱測繪技術，進行雷射光熱治療過程的即時監控。

關鍵字：金奈米粒子、雷射誘導熱治療、光聲效應、定量式熱影像、表面電漿共振、溫度量測



英文摘要(Abstract)

This study applied the ultrasound (US) and laser for the non-invasive photoacoustic (PA) technology to monitor the temperature during laser-induced photothermal therapy. The US and PA images were also combined for imaging purpose, and technology for quantitative thermal imaging was developed. PA signal can be used to research the thermal reaction of the surface plasmon resonance of the gold nanoparticles irradiated with the continuous wave mode laser. The safety and efficacy of the laser-assisted plasmonic photothermal therapy were kept by combining the US and PA signals to elucidate the anatomical structure of the tumor, and to monitor the tissue temperature during therapy. Many kinds of energy may trigger PA signal. We selected the pulsed laser to produce the PA signal and used the high-frequency ultrasonic transducer to obtain PA images with high resolution.

PA signal may be used for non-invasive tissue imaging. The amplitude of the PA pressure $P(z)$ is governed by the equation $P(z) = \Gamma \mu_a F_0 e^{(-\mu_a z)}$. Under the stable laser system, the amplitude is affected by the Grüneisen parameter Γ and the absorption coefficient μ_a . However, the absorption coefficient is independent to temperature change, and the Grüneisen parameter Γ for water is a linear relationship to the temperature. The soft tissue is composed of more than 70% of water, and thus we can use the Grüneisen parameter Γ of water to measure the temperature of the water-contained tissue during the thermotherapy.

Temperature may not only have influence on the amplitude of PA signal, but also cause the echo-shift of the ultrasound signal. With the correction of the speed of sound and thermal expansion according to the temperature change, the ultrasound radiofrequency signals can be adjusted to the same position. Though thermal expansion and speed of sound affect the ultrasound echo time shift, they are independent to the amplitude of PA signal. We may use the PA signal to measure the temperature change

for a large range.

The quality of PA imaging system is related to our spatial resolution. By increasing the central frequency of the ultrasound transducer, the spatial resolution is able to be improved. We used the 20MHz high frequency transducer to approach the spatial resolution of 200-300 μm .

We can increase the accuracy of temperature measurement by improving the stability of output energy of the pulsed laser. This system can respond to the heat flux quickly and produce change of the amplitude of PA signal immediately according to the output power of the CW laser. It may secure the safety and efficacy of the thermotherapy.

The gold nanoparticles and irradiation of CW laser can increase the amplitude of the PA signal. Compared to the intrinsic chromophores of soft tissue, the gold nanoparticles may trigger higher PA amplitude after absorption the energy of the pulsed laser and thus are suitable for contrast agent during PA imaging. Before and after the laser-induced thermotherapy, this system can combine the UA and PA images to locate the position of the tumor and the nanoparticles to facilitate better treatment plan and therapeutic quality.

Photoacoustic technology for temperature measurement has the potential to monitor the thermotherapy and is suitable for gold nanoparticle-assisted laser-induced plasmonic photothermal therapy. We can also use the technique of quantitative thermal imaging for real-time monitoring during the laser-induced thermotherapy.

Keywords: *gold nanoparticles, laser-induced thermotherapy, photoacoustic effect, quantitative thermal imaging, surface plasmon resonance, temperature measurement*

第一章 緒論

1.1 熱治療簡介

熱治療是治療癌症的方式之一，利用熱源加熱，使組織達到攝氏 41-47 度以上，並持續數十分鐘，可破壞腫瘤細胞(Huang et al. 2008)。熱治療的能量來源相當多樣化，可來自無線電射頻(radiofrequency)、微波(microwave)、超音波(ultrasound)，以及雷射(laser)等裝置。單極或雙極的無線電射頻裝置，對於無法切除的肝癌，是最具潛力的治療方式之一，而超音波熱治療技術的臨床應用，也是近年來相當受矚目的治療方法(Mast et al. 2008)。射頻或微波之類的熱消融術，常使用傳統的二維 B-mode 超音波影像導引，以便正確地定位腫瘤，並可藉由不同的方式，例如穿腹(transabdominal)、內視鏡(laparoscopic)之類的手術技巧，將治療探針置放於腫瘤部位(Mast et al. 2008)。

在熱治療過程中，溫度的監控相當重要，與治療的安全性(safety)與有效度(efficacy)相關。組織溫度分布圖的空間解析度(spatial resolution)最好須達到次毫米(submillimeter)的尺度，而溫度解析度(temperature resolution)則須小於攝氏 1 度(Larina et al. 2005)。

1.1.1 射頻腫瘤消融術

「射頻腫瘤消融術」又稱為「射頻腫瘤消融術」或「射頻腫瘤滅除術」(radiofrequency tumor ablation, RFTA)，利用單極或雙極治療探針插入待治療部位，並施以 460-550kHz 的高頻交流電流，電流在體內行進後，可經由貼在病患背部或大腿的接地貼片導出體外。交流電通過組織時，可藉由稱為「離子騷動」(ionic agitation)的過程，變換離子的流動方向，產生摩擦生熱的效應，將電磁能量轉換為熱能，在腫瘤部位可達大約攝氏 100 度的高溫，進而破壞腫瘤。但高於攝氏 100 度的溫度可導致組織碳化(carbonization)，降低熱傳導，減少熱凝

結組織的體積，影響治療效果(Daniels et al. 2007)，因此可配合灌注生理食鹽水於電極附近，減少組織碳化的可能性(Kettenbach et al. 2003)。熱能產生於電極附近，並於擴散一段距離後，隨即迅速消散掉(Baronzio et al. 2008)。

射頻腫瘤消融術可應用於肝癌(Kettenbach et al. 2003; Daniels et al. 2007; Shiina 2009)、乳癌(Noguchi, 2009)、前列腺癌(Baronzio et al. 2008)、肺癌(Pua & Solomon 2009)、腎臟腫瘤(Kawamoto et al. 2009)等治療。

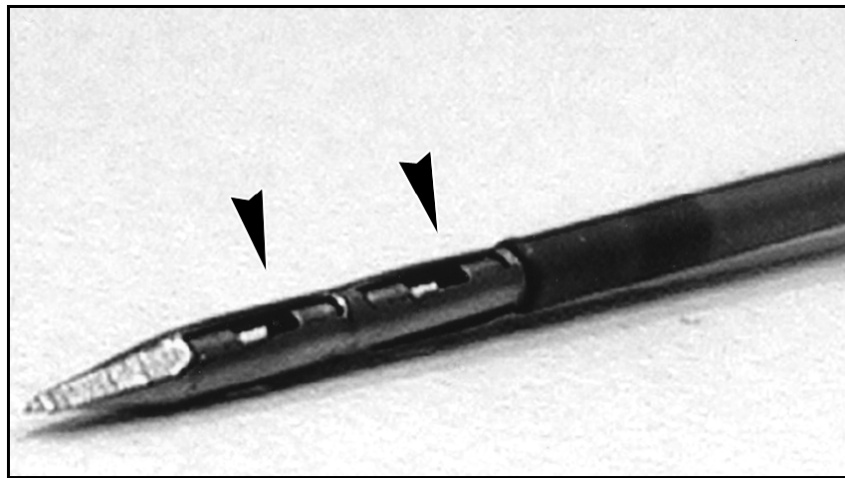


圖 1-1 射頻腫瘤消融術所使用的電極，直徑為 15-gauge，長度 20 公分。此電極可配合灌注生理食鹽水(箭頭處)，減少組織碳化(carbonization)的可能性(Kettenbach et al. 2003)。

1.1.2 微波消融術

微波消融術(microwave ablation)，又稱為微波熱凝治療 (microwave coagulation therapy, MCT)。將尺寸約為14.5-gauge的治療探針(微波天線，microwave antenna)導入腫瘤內部，放置探針的方式頗為多元化，可直接穿過皮膚(percutaneously)、藉由內視鏡的輔助(laparoscopically)、直接外科開腹(open surgical access)，在治療前列腺腫瘤時，亦可經由尿道放在前列腺附近。開啟裝置後，微波產生器(microwave generator)可於天線未絕緣的暴露部位，產生電磁波，此電磁微波可激發附近組織的水分子，若微波震盪頻率為 $9.2 \times 10^8 \text{ Hz}$ ，則水分子極化方向改變的次數可達每秒兩億次，進而藉由摩擦生熱的方式，使治療部位達到攝氏50-70度的溫度，此熱能可於腫瘤部位形成凝結性壞死，造成腫瘤細胞的死亡(Caroline et al. 2005; Baronzio et al. 2008)。微波熱治療的優點，在於可產生較高的腫瘤內部溫度(intratumoral temperatures)、可破壞較大體積的腫瘤、可同時置入多條探針、較快的破壞速度、較低的疼痛感等。此方法可應用於肝癌、腎臟與腎上腺腫瘤、轉移性骨癌等疾病(Caroline et al. 2005)。

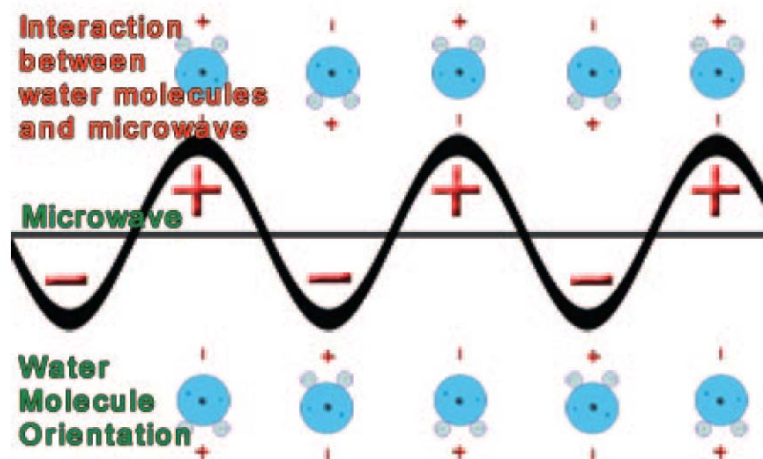


圖1-2 組織內部水分子與微波的交互作用示意圖(Caroline et al. 2005)



圖1-3 (a) 使用於經皮腫瘤消融術(percutaneous tumor ablation)的微波探針 (microwave applicators, Vivant Medical™)(b) 使用於經皮微波熱治療的裝置，圖中可見到三組微波產生器，各自連接一根微波探針(Caroline et al. 2005)



1.1.3 高強度聚焦超音波

高強度聚焦超音波(High-intensity focused ultrasound, HIFU)是利用超音波探頭，於焦點處產生高時間平均強度(time-averaged intensity)的超音波，對組織產生破壞。一般診斷用的超音波探頭，其時間平均強度大約介於 $0.1-100\text{mW/cm}^2$ 之間，疏密波的壓力介於 $0.001-0.003\text{MPa}$ ，但高強度聚焦超音波探頭的焦點區域強度，可達 $100-10000\text{W/cm}^2$ ，疏密波的壓縮區域壓力，可達 30MPa ，而稀疏區域壓力，則為 10MPa 。組織吸收高音波強度後，可轉化為熱能，使區域溫度達到 60°C 以上的數值，並於數秒之內造成凝結性壞死(Dubinsky et al. 2008)。高強度聚焦超音波除了造成熱效應之外，尚可引發機械現象(mechanical phenomenon)，例如穴蝕效應(cavitation)、微流(microstreaming)，以及輻射力(radiation forces)等。超音波熱治療可提高腫瘤細胞對於化學治療(俗稱「化療」)與放射線治療(輻射治療，俗稱「放療」或「電療」)的感受性，增強化學治療與放射治療的治療效果(Lai 2005)。

自1940年代起，高強度聚焦超音波逐漸被應用於臨床治療，亦即所謂的「超音波手術」。至1970年代，超音波高熱療法已被廣泛運用，利用高強度超音波，可將組織加熱至 $42-45^\circ\text{C}$ 之間，並持續30-60分鐘。1990年代之後，出現許多與高強度聚焦超音波相關的研究(Lai 2005)。高強度聚焦超音波採用大面積且幾何聚焦特性較好的探頭，有利於發射較高的能量，且可精確定位於病灶部位，在多次治療下，也不會出現累積性的劑量傷害，在治療過程中，亦可同時進行超音波造影。除了用於破壞腫瘤組織，高強度聚焦超音波也有不錯的止血效果，可處理大血管破裂導致的內出血問題(Lai 2005)。

高強度聚焦超音波在臨床上的用途，包括治療良性或惡性腫瘤，例如肝癌、胰臟癌、前列腺癌、腎細胞癌(renal cell carcinoma)、膀胱癌、肉瘤(sarcoma)等(Dubinsky et al. 2008; Baronzio et al. 2008)；此外，HIFU尚可運用於血

栓溶解、止血、藥物與基因傳遞等(Dubinsky et al. 2008)。

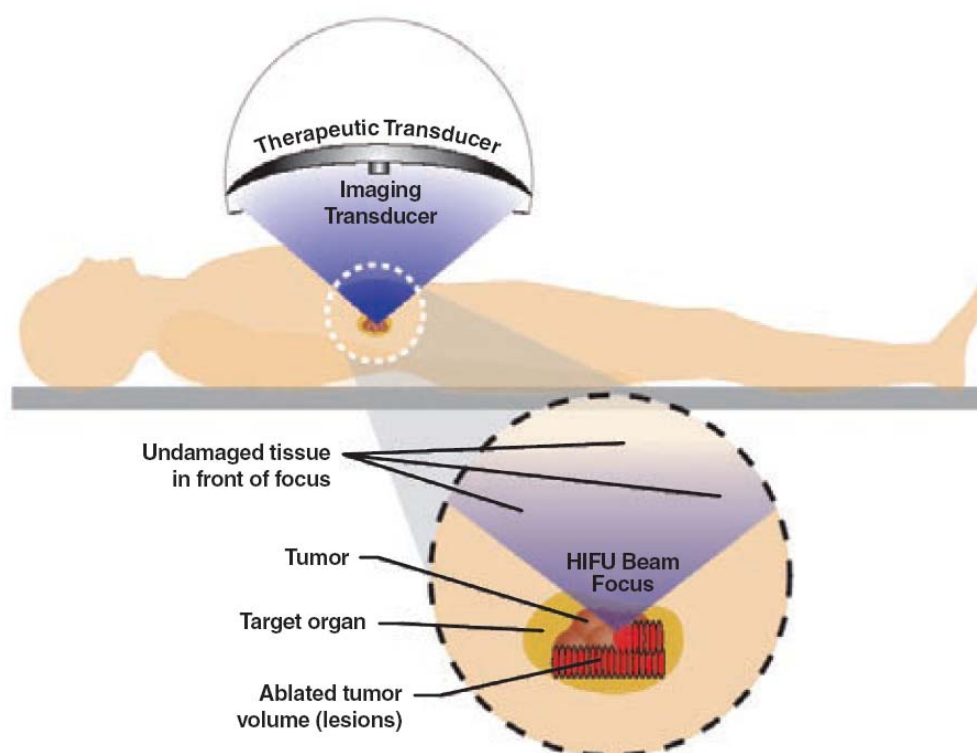


圖1-4 治療腹內腫瘤的體外高強度聚焦超音波示意圖(Dubinsky et al. 2008)



1.1.4 雷射誘導熱治療

雷射誘導熱治療(laser-induced thermotherapy, LIT)乃利用雷射光束，例如近紅外線的鈦雅克(neodymium: yttrium-aluminum-garnet, Nd: YAG)雷射，造成組織加熱效應，導致凝固性壞死，進而破壞腫瘤細胞(Veenendaal et al. 2006)。隨著近年來奈米科技的進步，以奈米粒子輔助雷射誘導熱治療，可使組織的高熱治療具有空間選擇性(spatial selectivity)，稱為「電漿光熱治療」(plasmonic photothermal therapy, PPTT)。目前可運用的金屬奈米粒子，包括奈米球(nanospheres)、奈米桿(nanorods)、奈米殼(nanoshells)、奈米籠(nanocages)等(Huang et al. 2008; Terentyuk et al. 2009)。金奈米粒子(gold nanoparticles)可有效吸收特定波長的光線，並轉化為熱能，使得奈米粒子周圍的溫度上昇攝氏數十度的程度，達到熱治療的效果(Huang et al. 2008)。

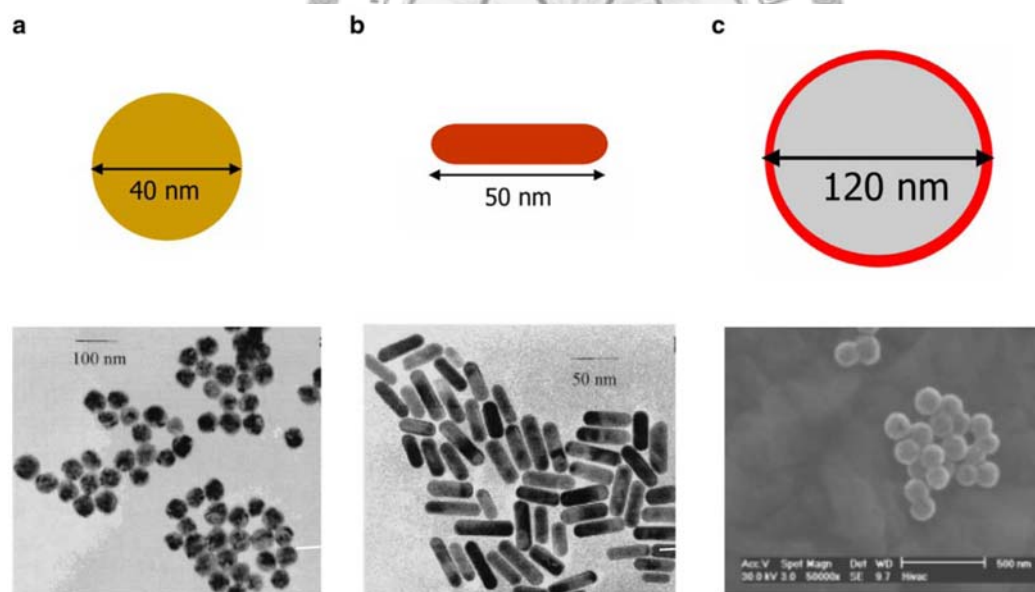


圖1-5 運用於電漿光熱治療的各種金屬奈米粒子，由左至右分別為奈米球(nanospheres)、奈米桿(nanorods)、奈米殼(nanoshells)。上方為示意圖，下方為穿透式電子顯微鏡(transmission electron microscopy, TEM)的攝影圖(Huang et al. 2008)。

1.2 雷射與溫度對生物組織的作用

1.2.1 雷射對生物組織的作用

雷射與生物組織之間的交互作用相當複雜，相關的變數為生物組織的性質與使用的雷射參數。生物組織的性質，包括光學性質：吸收、散射、反射、折射，以及熱學性質，如熱傳導係數與比熱。雷射參數則包括波長、脈衝寬度(pulse duration)、能量密度(energy density)、功率密度(power density)、暴露時間(exposure time)、焦點光束大小(focal spot size)等，其中「暴露時間」是決定光生物效應特性的重要參數(Niemz 2003)。

依照雷射暴露時間、功率密度與能量密度等決定性參數，雷射對生物組織的作用可分為五類，包括光化學反應(photochemical interaction)、熱交互作用(thermal interaction)、光剝離作用(photoablation)、電漿誘發剝離作用(plasma-induced ablation)、光分裂效應(photodisruption)，如下圖所示：

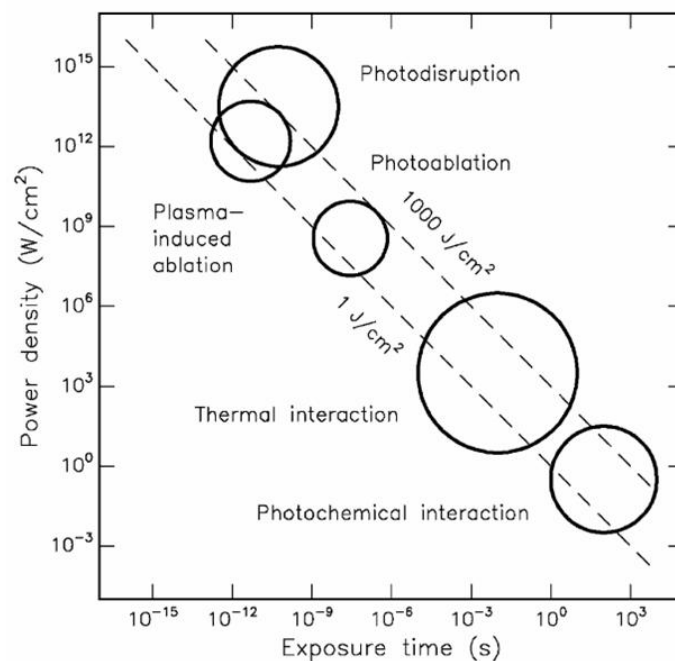


圖1-6 雷射與生物組織作用圖，具決定性的雷射參數包括暴露時間、功率密度與能量密度(Niemz 2003)。

1.2.1.1 光化學反應(photochemical interaction)

光化學反應藉由紅色染料雷射(red dye lasers)、二極體雷射(diode lasers)作用，常使用脈衝寬度長達數秒的脈衝式雷射或連續波雷射，以介於 $0.01\text{--}50\text{ W/cm}^2$ 低功率密度的雷射照射組織，例如生物刺激(biostimulation)與光動力療法(photodynamic therapy)(Niemz 2003)。透過光敏感劑(photosensitizer，又稱為「激化藥物」)的催化，可進行光動力治療。光敏感物質受到光線長時間照射下，在吸收光能後，由基態轉化至激發態，當還原至基態時，可釋放能量，產生單原子氧及自由基，進而氧化破壞周圍細胞，但生物組織不會出現巨觀上的變化(Kalka 2000)。



圖1-7 使用低功率氦氖雷射進行生物刺激治療，此為頭部第五對腦神經第一分枝皰疹後神經痛病患(攝於台大醫院皮膚部光線治療中心)。



圖1-8 使用藍光進行光動力療法，治療難癒性足部病毒疣(註：本圖之光源並非雷射，攝於台大醫院皮膚部光線治療中心)



1.2.1.2 熱交互作用(thermal interaction)

熱交互作用又稱為光熱效應，此為一般雷射手術的原理，亦為雷射光熱治療所採用的光生物效應。常用的雷射包括氬離子(argon ion)、二氧化碳(CO₂)、鉕雅克(Er:YAG)、鈦雅克(Nd:YAG)、釹雅克(Ho:YAG)與二極體(diode)等雷射系統，使用的脈衝寬度介於 1 μ s至 1 min，亦可採用連續波雷射，典型的能量密度介於 10-10⁶ W/cm²。利用雷射輸入熱能，使組織達到目標溫度，得到光熱效應。

依據目標溫度差異，生物組織在巨觀下可呈現凝結(coagulation)、汽化(vaporization)、碳化(carbonization)或熔化(melting)等外觀，相關的組織區域如下圖所示。在未達60°C的組織區域，具有高熱治療(hyperthermia)的作用。當溫度高於60°C時，組織會逐漸凝結，具止血效果，凝結後的組織會呈現壞死的狀態(necrosis)。若組織溫度到達100°C時，會出現汽化現象，常見於波長2940 nm 鉕雅克雷射的治療。水份可強烈吸收此雷射波長，進而產生汽化，當水分子汽化時，水的體積會迅速擴大，造成局部的微爆炸(microexplosion)，並引發熱機械效應(thermomechanical effect)，使局部組織消融，此現象稱為熱分解(thermal decomposition)。當組織溫度超過攝氏100度時，例如使用連續波二氧化碳雷射照射皮膚，生物組織會開始呈現碳化現象，將有機成分中的碳原子釋出，所以組織會呈現黑色外觀。在使用雷射進行醫療行為時，應儘量避免碳化，因為在較低的溫度下，組織仍可因凝結而壞死，進而達到治療目的，而不必要的碳化，將干擾手術視野(Niemz 2003)。此外，組織中的碳化物，也有引發異物肉芽腫(foreign body granuloma)的可能性。若溫度高過組織熔點，該組織將會出現熔化的現象。例如若以釹雅克雷射照射牙齒，當組織因熱能的過度累積，到達攝氏數百度的高溫，牙齒內部由鈣與磷酸構成的的氫氧基磷灰石(hydroxyapatite)將會熔化，並於冷卻後出現氣泡狀外觀(Niemz 2003)。

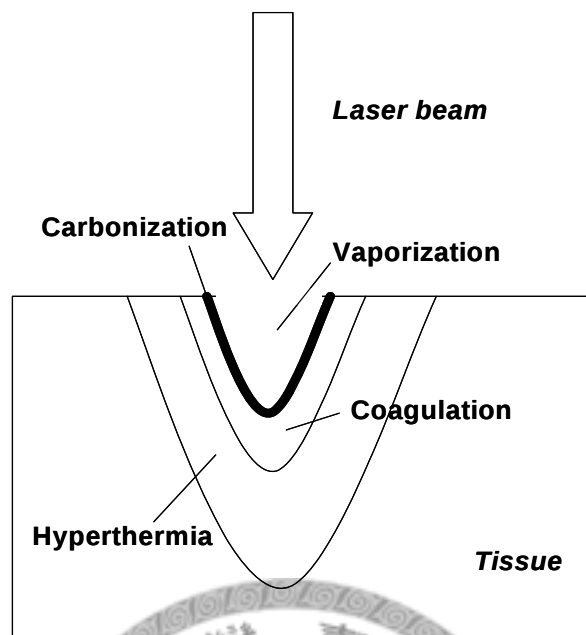


圖1-8 雷射光熱效應下的組織反應區域



圖1-9 使用鉕雅克(Er:YAG)雷射，以磨皮法(dermabrasion)治療皮膚青春痘疤痕後的皮膚反應，可見到皮膚表面受雷射作用而汽化消失。

1.2.1.3 光剝離作用(photoablation)

光剝離作用又稱為光切反應，利用高能量的紫外線光子，直接打斷組織分子的鍵結，可形成非常乾淨的組織斷面。常用的雷射為各類準分子雷射，例如ArF, KrF, XeCl, XeF等，其脈衝寬度介於10-100 ns，功率密度介於 10^7 - 10^{10} W/cm²。此類光生物效應常應用於眼科角膜屈光手術(refractive corneal surgery) (Niemz 2003)。眼科早期用來治療屈光異常的雷射屈光角膜切除術 (photorefractive keratectomy, PRK)，即利用波長193 nm的氟化氬(argon fluoride)準分子雷射，在機械式切除上皮細胞後，再以光剝離作用切削角膜基質前緣(Taneri et al. 2004)。

1.2.1.4 電漿誘發剝離作用(plasma-induced ablation)

在雷射聚焦高能量作用下，出現熱游離輻射，產生許多自由電子，生物組織成分受自由電子撞擊而解離，形成離子化的電漿態物質，局部可達攝氏數萬度的高溫。電漿物質以超音速向外膨脹，產生局部高壓震波(shock wave)，使組織瓦解，此時組織斷面可呈現非常乾淨的剝離現象，且出現藍色的電漿閃爍火花(plasma sparking)。常用的雷射包括鉕-氟化釔鋰(Neodymium-doped yttrium lithium fluoride, Nd:YLF)、鉕-雅克(Nd:YAG)、鈦-藍寶石 (Ti:Sapphire)等雷射，脈衝寬度介於 100 fs 至 500 ps之間，功率密度則介在 10^{11} - 10^{13} W/cm²，常運用於眼科角膜屈光手術、牙科齲齒手術(caries surgery) (Niemz 2003)。

1.2.1.5 光分裂效應(photodisruption)

光分裂效應利用高能量雷射，以機械作用力造成生物組織碎裂與切割現象。雷射誘發電漿形成過程中，電漿態物質以超越音速的速度迅速膨脹，並產生瞬間震波，同時高溫的電漿態物質使生物組織汽化，產生氣泡，氣泡內爆導致穴蝕效應(cavitation)，爆裂的氣泡同時以超音速衝擊組織，形成噴射狀態(jet formation)。震波、穴蝕效應與噴射形成這些現象，皆會以機械作用力破壞組織。一般常使用固態雷射達到光分裂效應，例如鉦-氟化釔鋰(Nd:YLF)、鉦-雅克(Nd:YAG)、鈦-藍寶石 (Ti:Sapphire)等雷射，脈衝寬度介於 100 fs 至 100 ns 之間，功率密度則介於 10^{11} - 10^{16} W/cm²，常運用於眼科水晶體手術、雷射碎石手術(lithotripsy) (Niemz 2003)。



1.2.2 溫度對生物組織的作用

不同溫度會造成不同的組織熱效應，影響熱治療效果。在溫度高於體溫5°C之內的範圍內，也就是小於42°C的情形下，生物組織不會出現可量測的變化。當溫度升高至42-50°C時，組織開始出現分子構形的改變，伴隨著鍵結的破壞與細胞膜變化。高熱狀態持續數分鐘後，一部份的組織可能出現壞死，存活細胞的比例可透過Arrhenius方程式(Arrhenius' equation)來估算，此方程式如下：

$$\ln \frac{C(t)}{C_0} = -A \int_0^t \exp\left(-\frac{\Delta E}{RT(t')}\right) dt' \equiv -\Omega$$

其中C₀代表初始的分子或細胞濃度，C(t)表示在時間t的濃度，R代表通用氣體常數(universal gas constant)， ΔE 與 Ω 各自代表特定的組織性質，A為Arrhenius常數，其近似值如下：

$$A = \frac{kT}{h} e^{\frac{\Delta S}{R}}$$

其中T為溫度， ΔS 為活化熵(activation entropy)，k為Boltzmann常數，h為Planck常數。

若溫度超過50°C，則生物系統內的酵素活性將出現下降的情況，降低細胞內部的能量傳遞，導致細胞活動力下降，同時細胞的修復機制也會受損，使存活的細胞比例進一步減低。小於60°C的治療，皆稱為「高熱治療」(hyperthermia)。

當溫度達到60°C時，組織外觀開始出現變白的情況，成因於膠原蛋白與細胞內蛋白質開始變性(denaturation)，使得組織凝結與細胞壞死，因此許多熱治療的治療目標，皆訂於小於或約略等於60°C左右的溫度。

若組織溫度大於80°C，細胞膜的穿透性將大幅增加，破壞細胞內部的化學濃度平衡。當溫度達到100°C，組織內的水分子開始汽化，由於水的汽化熱(vaporization heat)相當高，達到2253 kJ/kg，所以在汽化的同時，也會帶走多餘的熱能，阻止治療區域附近的正常組織累積過多的熱量，可避免不必要的傷害。皮膚科常用於

除痣、磨皮的鉀雅克雷射(波長2940 nm)治療，就是利用此原理，汽化皮膚以移除病灶。水分子汽化時，體積會迅速擴大，產生氣泡並造成局部機械性破壞，使組織消融，此現象稱為熱分解(thermal decomposition)。

若所有的水分子都汽化完畢，但熱源仍持續供應，組織溫度就會高於100°C，同時出現碳化現象，組織外觀變成黑色，同時產生煙霧。當組織溫度超過300°C，若大於組織熔點，將會出現熔化的現象(Niemz 2003)。

不同溫度下產生的組織熱效應整理如下表：

溫度	組織的熱效應
37°C	正常體溫
45°C	高熱治療(hyperthermia)
50°C	1. 酵素活性降低 2. 細胞活動力下降(immobility)
60°C	1. 蛋白質與膠原蛋白變性 2. 組織凝結，細胞壞死
80°C	細胞膜通透性大增
100°C	1. 水分子汽化 2. 熱分解(thermal decomposition/ ablation)
> 100°C	碳化(carbonization)
> 300°C	熔化(melting)

細胞出現不可逆的傷害後，會出現壞死的現象，但細胞開始壞死的溫度並非定值，除了溫度之外，要造成組織壞死，尚需考慮該治療溫度的持續時間，例如60°C的溫度持續6秒後，可形成不可逆的傷害，但在50°C之下，可能需要持續150秒

才可得到相同的治療效果。溫度與持續時間的關係，圖示如下(Niemz 2003)：

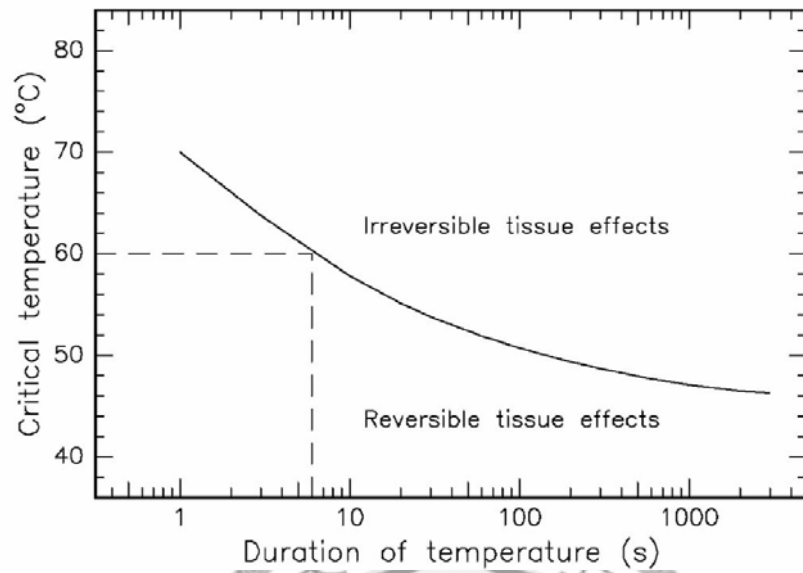


圖1-10 造成細胞壞死的臨界溫度曲線(Niemz 2003)



1.3 使用金奈米粒子進行雷射誘導熱治療

1.3.1 金奈米粒子的表面電漿共振

許多新近發展的技術皆應用到金奈米粒子的性質，例如奈米醫學(nanomedicine)、光電子學(optoelectronics)、生物感測器(biosensors)、奈米觸媒(nanocatalysis)等，這些學科共同促成了奈米科技的進步。與一般金元素塊材(bulk)相較，金奈米粒子對於光線的吸收與散射，可達更高的程度。隨著體積與維度(dimensionality)的縮小，金屬元素電子運動的空間長度規模(spatial length scale)也跟著限縮，使得金奈米粒子的電子性質產生劇烈的變化，因此金奈米粒子具有與大塊金屬迥異的特殊性質(El-Brolossyl et al. 2008)。

金屬奈米粒子吸收特定波長的光線能量後，奈米粒子對光能的吸收遠大於散射效應，傳導帶的電子(conduction band electrons)，亦即表面的自由電子雲會產生極化的效應，出現瞬間的誘導式偶極，隨著光波頻率進行同調式的偶極震盪(coherent dipole oscillation)，因此出現強烈共振的現象，稱為「表面電漿共振」(surface plasmon resonance) (El-Brolossyl et al. 2008 ; Huang et al. 2008)。球狀的金奈米粒子，最佳的吸收波峰位於520 nm附近，但圓柱形的金奈米桿，則隨著長寬比(aspect ratio)的不同，除了520 nm之外，另有不同的吸收波峰，長寬比愈大，則吸收波峰有紅位移的現象 (Huang et al. 2008)。

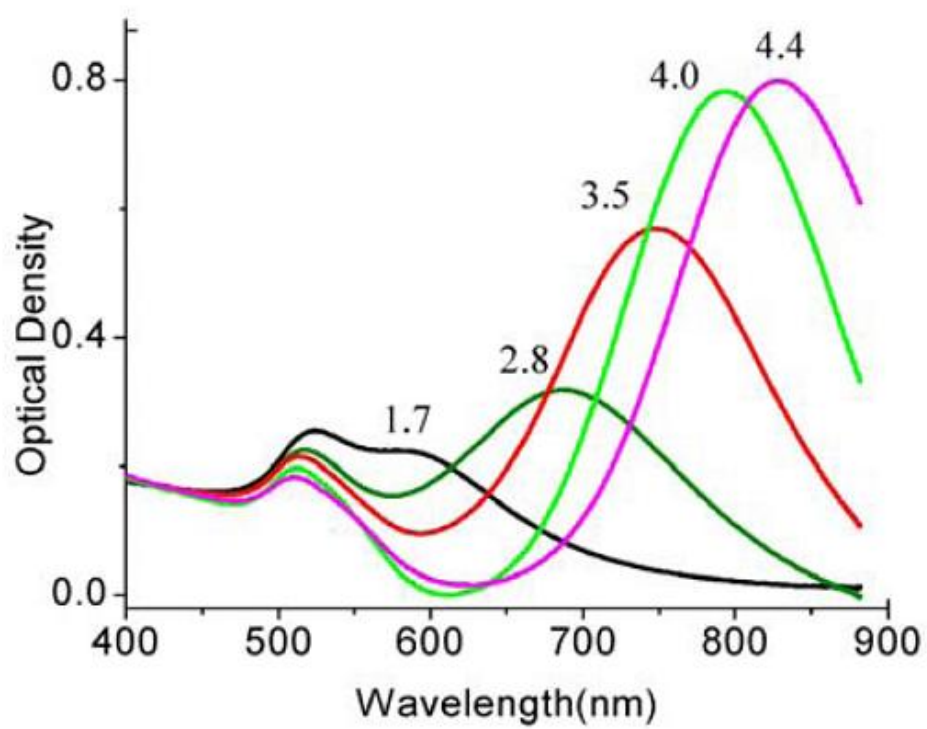


圖1-11：金奈米桿有兩個吸收波峰，則隨著長寬比(aspect ratio)的增加，除了520 nm之外，另有不同的吸收波峰，長寬比愈大，則吸收波峰有紅位移的現象(Huang et al. 2008)。

1.3.2 馬克斯威爾方程式

馬克斯威爾(James Clerk Maxwell, 1831~1879)於十九世紀提出整合電磁現象的四大方程式，現今稱為馬克斯威爾方程式(Maxwell equations)，描述物質與電磁波之間的交互作用關係：

$$\begin{aligned}\nabla \times \vec{E} &= -\mu_0 \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} - \mu_0 \frac{\partial \vec{M}}{\partial t} \\ \nabla \cdot \vec{E} &= -\frac{1}{\epsilon_0} \nabla \cdot \vec{P} + \frac{1}{\epsilon_0} \rho \\ \nabla \times \vec{H} &= \epsilon_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} + \frac{\partial \vec{P}}{\partial t} + \vec{J} \\ \nabla \cdot \vec{B} &= 0\end{aligned}\tag{1.3.1}$$

其中的 $\vec{E}$ 與 $\vec{H}$ 為電磁波之電場與磁場， $\vec{B}$ 為磁感應(magnetic induction)，Maxwell方程式顯示這些電磁狀態，可利用磁極化強度 ($\vec{M}$)、電極化強度 ($\vec{P}$)、淨電荷密度 (ρ)、淨電流密度 ($\vec{J}$) 這四個代表物質狀態的物理量描述。方程式中有兩個常數， ϵ_0 表示真空的介電係數(dielectric constant)，而 μ_0 表示真空磁導率(permeability)。

物質內部受外界電磁場影響，會產生感應電場與磁場。物質內部的電場與磁場合向量，可採用電位移(electric displacement, $\vec{D}$)與磁感應(magnetic induction, $\vec{B}$)來表示：

$$\begin{aligned}\vec{D} &= \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P} \equiv \epsilon_0 \epsilon \vec{E} \\ \vec{B} &= \mu_0 (\vec{H} + \vec{M}) \equiv \mu_0 \mu \vec{H}\end{aligned}\tag{1.3.2}$$

ϵ 表示相對於真空的物質介電係數(dielectric constant)，而 μ 表示物質的磁導率(permeability)，此兩者代表此物質對於外界電磁場的反應與光學性質(Chiu & Tsai 2006)。

藉由上述電位移與磁感應的定義，可進一步將Maxwell方程式簡化如下：

$$\begin{aligned}
\nabla \times \vec{E} &= -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \\
\nabla \cdot \vec{D} &= \rho \\
\nabla \times \vec{H} &= \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} + \vec{J} \\
\nabla \cdot \vec{B} &= 0
\end{aligned} \tag{1.3.3}$$

若整體物質系統不具淨電荷密度($\rho=0$)，亦無淨電流密度($\vec{J}=0$)，由上列方程式組(1.2.3)，可推導得電磁波之波動方程式如下：

$$\begin{aligned}
\nabla \times (\nabla \times \vec{E}) &= -\frac{1}{c^2} \epsilon \mu \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \\
\nabla \times (\nabla \times \vec{H}) &= -\frac{1}{c^2} \epsilon \mu \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2}
\end{aligned} \tag{1.3.4}$$

其中， $c = \sqrt{\epsilon_0 \mu_0}$ ，代表真空中的光速。

若電磁波的電場 $\vec{E}$ 與磁場 $\vec{H}$ 為諧波振盪(harmonic oscillation)，則電場與磁場隨時間與空間的變化將正比於 $e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)}$ ，此電磁波的在空間中傳播的相位速度(phase velocity)為 $\frac{\omega}{k}$ ，波數(波向量)則為 k 。由方程式組(1.2.4)，可知波數 k 的量值如下：

$$k^2 = \frac{\omega^2}{c^2} \epsilon \mu \tag{1.3.5}$$

藉由 Maxwell 方程式與電磁波的波動方程式，可推導金屬物質與電磁波的交互作用，並得到金屬塊材與金屬奈米粒子表面電漿共振的性質([Chiu & Tsai 2006](#))。

1.3.3 表面電漿共振

於1908年，德國物理學家Gustav Mie為了模擬膠體金粒子的光線散射情況，在適合的邊界條件下，計算球狀金屬粒子在受到電磁輻射作用下的行為，提出馬克斯威爾方程式的解析解(analytical solution)，以描述球狀金奈米粒子在可見光區域的高度吸收波段。金奈米粒子的共振頻率(resonance frequencies)與電漿吸收帶(plasmon absorption band)與奈米粒子的大小有關。球狀奈米粒子的電漿共振不具方向性，但對奈米桿而言，其電漿共振則會分裂為平行與垂直奈米桿長軸的兩種模式(El-Brolossyl et al. 2008)。Gustav Mie研究球狀粒子對於電磁輻射的散射現象，此散射又稱為「Mie散射」(Mie scattering)，而此解析解稱為「Mie理論」(Mie theory)，又稱為「Mie解」(Mie solution)，亦可稱為Lorenz-Mie或Lorenz-Mie-Debye理論。直至今日，Mie理論仍廣泛運用於許多電磁學領域，而氣候研究(climate research)、天體物理學(astrophysics)，亦包括於其中(Wriedt 2008)。

在1902年，R. W. Wood發現刻有光柵(grating)的金屬表面，在照射連續光源之後，可產生明暗帶的交互現象，這種異常的反射光譜與沿著金屬表面傳播的電磁波共振有關，亦即金屬的表面電漿(surface plasma)現象。電漿原本用來表示解離態的帶電離子系統，而金屬物質的內部自由電子相當於高密度的電子流體(electron liquid)，這些帶電粒子分布於金屬體積之內，因此金屬可類比於電漿系統(Chiu & Tsai 2006)。

電磁波在金屬塊材內部行進時，波向量為複數形態 $\vec{k} = \vec{k}_R + i\vec{k}_I$ ， $\vec{k}_R$ 與 $\vec{k}_I$ 分別為波向量的實部與虛部， $k_R = (\omega/c)n$ 與 $k_I = (\omega/c)\kappa$ ，其中的n與k來自複數折射率 $\tilde{n} = \sqrt{\epsilon} = n + i\kappa$ 。電場 $\vec{E}$ 可表示為 $\vec{E} = \vec{E}_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)}$ ，代入波向量化簡可得 $\vec{E} = [\vec{E}_0 e^{-\vec{k}_I \cdot \vec{r}}] e^{i(\vec{k}_R \cdot \vec{r} - \omega t)}$ 。此方程式的振幅為 $\vec{E}_0 e^{-\vec{k}_I \cdot \vec{r}}$ ，相位為 $(\vec{k}_R \cdot \vec{r} - \omega t)$ 。

在金屬內部傳播的電磁波，其電場或電子振盪可分為兩種模態：

1. 橫波 (transverse wave)：電場($\vec{E}_T$)垂直於電磁波傳播方向 (波向量, $\vec{k}_T$)
2. 縱波 (longitudinal wave)：電場($\vec{E}_L$)平行於電磁波的傳播方向 (波向量, $\vec{k}_L$)

在縱波模態中，金屬中的自由電子會隨著電場，進行縱向振盪的集體運動，因此空間中的自由電子密度分布，可隨著時間變化，形成縱波形式的振盪模式，此即金屬自由電子的體積電漿振盪(volume plasma oscillation)。

若金屬之自由電子密度為 n ，此即單位體積內的自由電子數量，面電荷密度為 σ ，電子電荷 e ，電子有效質量(effective mass)為 m ，在金屬內部某極小厚度 x 的無限大平板內的自由電子，受外力 $\vec{f}$ 影響產生偏移，造成正負電荷均勻分布於相距 x 的兩個無限大平面，在此無限大薄板上，面積 A 上的電荷量為 $Q = \sigma A = nexA$ ，因此正負電荷間的電場 $\vec{E} = \frac{Q}{\epsilon_0 A} = \frac{nex}{\epsilon_0}$ ，該電場對偏離的自由電子施加庫倫回復力，因此自由電子受到內部電場作用力與外力兩者共同作用，所有的自由電子受到的合力 $\vec{F} = -ne\vec{E} + \vec{f}$ ，引入牛頓第二運動定律 $\vec{F} = nm \frac{d^2 \vec{x}}{dt^2}$ ，可知 $-ne\vec{E} + \vec{f} = nm \frac{d^2 \vec{x}}{dt^2}$ ，代換電場向量 $\vec{E} = \frac{nex}{\epsilon_0}$ ，最後可得下列方程式：

$$nm \frac{d^2 \vec{x}}{dt^2} + \frac{n^2 e^2}{\epsilon_0} \vec{x} = \vec{f} \quad (1.3.6)$$

(1.3.6)式表示金屬自由電子的行為，係受外力驅動的簡諧振盪(simple harmonic oscillator)，其共振頻率即為金屬自由電子的電漿頻率(plasmon frequency) ω_p ，由簡諧振盪方程式(1.3.6)，可得此電漿共振頻率

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{m\epsilon_0}}。 \quad (1.3.7)$$

若該金屬受到頻率為 ω_p 的外部電場驅動(例如入射光之震盪電場)，自由電子

將在金屬內部產生縱波形式的體積電漿共振振盪，且該縱波的傳播方向平行於電場振盪方向，稱為「表面電漿共振」(surface plasmon resonance, SPR)。這類金屬塊材內部自由電子產生的電漿共振，所形成的電磁波可沿著金屬表面傳播，又稱為「傳導型表面電漿共振」(propagation SPR, PSPR)。但若金屬塊材縮小至奈米尺度，成為奈米粒子時，表面電漿共振會被限制於奈米結構內，稱為「局限型表面電漿共振」(localized SPR, LSPR) (Chiu & Tsai, 2006)。



1.3.4 利用表面電漿共振之雷射誘導熱治療

以金奈米粒子輔助進行雷射誘導之熱治療，又稱為「電漿光熱治療」(plasmonic photothermal therapy, PPTT)，是利用奈米粒子(nanoparticles)表面電漿共振的原理，藉由金屬奈米粒子對雷射能量的良好吸收性質，使組織達到高溫，以熱效應治療癌症的新科技(Huang et al. 2008)。

金奈米粒子受到雷射照射時，依據不同的長寬比，不同的金奈米粒子對於特定的雷射波長可有效吸收，隨後的表面電漿共振，使得這些奈米結構物的熱電子(hot electrons)，在大約100皮秒(picosecond)的時間尺度下，昇溫至凱氏數千度(thousands of kelvins)的高溫，使得奈米粒子周圍的軟組織溫度，可上昇至攝氏數十度的程度，產生熱治療的效果(Huang et al. 2008)。不同的奈米粒子，有不同的共振波長，一般的治療波長，多選擇介於750至1100 nm之間的「治療窗口」(therapeutic window)，可藉由改變奈米粒子的大小、形狀，與結構來調整合適的表面電漿共振波長(Terentyuk et al. 2009)。



1.4 各種監測熱治療溫度的方法

以熱電偶(thermocouple)直接插入治療區域進行量測，可獲得區域溫度的直接數據(Lin et al. 2008)，此為最精確的溫度監測方式，其準確度可小於 0.1°C ，但此法具有高度侵襲性(highly invasive)，只能施用於動物實驗，無法推展至人體治療之用。熱電偶置入組織的方向，也會影響量測的溫度上昇數值，同時熱電偶只能測量小範圍的溫度，無法定位出空間內最高的溫度位置，也無法描繪熱影像圖(Liang et al. 2009)。因此熱電偶並非理想的臨床實用方式。針對此臨床需求，目前已發展多種非侵入式的溫度量測方式。

1.4.1 非侵入式監測溫度法

有許多非侵入式方法可運用於監測熱治療之組織溫度，下列各種方法皆可進行二維熱影像造影。遠紅外線之熱影像(infrared thermography)可用於即時測量，且可達 0.1°C 之準確度，但此法只能測得表淺的組織溫度；超音波(ultrasound)亦可用於即時測量，且有不錯的解析度與穿透深度，適用於多種不同的熱治療模式，例如射頻腫瘤消融術、微波消融術、高強度聚焦超音波，但較不適於較大溫度變動的情況，此法有數種不同的演算法，例如可透過量測熱能造成的斑點雜訊(speckles)的運動得到結果 (Larina et al. 2005; Shah et al. 2006; Sethuraman et al. 2008)。

亦有研究者運用核磁共振造影(MRI)原理，但此法需要較長的量測時間，故時間解析度差，雖有高解析度與準確度，但無法即時掃描。核磁共振(magnetic resonance)可測量水的質子共振頻率(proton resonance frequency)，此頻率與溫度呈線性關係，因而可藉此推估組織溫度。此法具有高度空間解析度與溫度準確度，但需較長的量測時間(long acquisition time)，而且受測者在量測時的呼吸或肢體運動，皆會影響準確度，造成不利於即時應用的缺點(Shah et al. 2008)，

易言之，核磁共振法具有較差的時間解析度，而且價格昂貴，並非理想的臨床測溫工具(Liang et al. 2009)。

軟組織受電磁能量照射後，可產生光聲效應(photoacoustic/ PA effect)，而光聲信號壓力振幅與 Grüneisen 參數成正比，該參數與溫度具有線性關係，故可利用此方程式測量溫度，此法具有光學與聲學法的優點，可即時量測，空間解析度佳，準確度亦高，可測量較大的溫度變動範圍(Larina et al. 2005)。但此法同時亦有其缺點，受限於光學性質，穿透深度受限制，無法如同超音波、磁共振法可量測深部內臟的溫度 (Wang et al. 2009)。由於雷射輔助電漿光熱治療與金奈米粒子之表面電漿共振現象有關，採用的奈米粒子有最佳的吸收波長，若可利用該波長的連續波雷射提供熱能，並以相同波長低脈衝能量的脈衝式雷射量測光聲信號，即可同時進行熱治療，並監測治療時的溫度，故使用金奈米粒子的雷射輔助光熱治療模式，特別適合利用光聲效應原理來測量溫度。

將前述各種溫度量測方式之優缺點列表整理如下：

分 類		優 點	缺 點
侵入式	熱電偶 (thermocouple)	1. 即時 2. 準確度最高	1. 侵入式 2. 無法得知治療區域最高溫度 3. 無法進行二維熱影像造影
	遠紅外線熱影像 (Infrared thermography)	1. 即時 2. 準確度高 3. 可進行二維熱影像造影	僅限於組織表面
非侵入式	超音波 (Ultrasound, US)	1. 即時 2. 空間解析度佳 3. 穿透深度佳 4. 可進行二維熱影像造影 5. 可適用於多種熱治療模式	有四類的量測原理，其性質各不相同，例如： 1. 聲速法 測量聲速時，需同時度量距離與時間，困難度較高，因此至目前為止，未曾使用於臨床實際應用

		2. 衰減係數法 (1)各種軟組織的變化幅度不同，病灶組織的成份複雜，造成衰減動態變化分析的困難 (2) 目前僅應用於離體組織研究 3. 後向散射能量法 (1) 同一軟組織內部具有多樣性的散射子，各有不同的散射與密度性質 (2) 散射子之挑選，需於溫度變化後，藉由它們的超音波振幅變化來選擇性量測，它們的性質無法事先得知 (3) 不同組織的散射子性質也不相同，尚待更多的相關研究支持 (4) 尚未應用於活體實驗 4. 回音偏移法 (1) 需事先知道組織在溫度變化時，聲速與熱膨脹係數的變化 (2) 小幅度的溫度變化時(小於5-10℃)較為準確
磁共振 (Magnetic resonance, MR)	1. 高空間解析度 2. 準確度高 3. 可進行二維熱影像造影	1. 非即時 2. 量測時間長，時間解析度差 3. 受到活動或呼吸運動影響 4. 昂貴
光聲效應 (Photoacoustic effect, PA)	1. 即時 2. 空間解析度佳 3. 準確度高 4. 可量測較大溫度變動範圍 5. 可進行二維熱影像造影 6. 適宜量測金奈米粒子輔助之雷射電漿光熱治療	穿透深度受限於光學性質，無法監測深部內臟溫度

1.4.2 超音波測溫法

單純利用超音波測量溫度的方式，可概分為四大類。第一種方式藉由溫度與聲速變化成正比的關係測量聲速(Johnson et al. 1977; Prakash et al. 1980)；第二種方式則根源於溫度與超音波衰減係數(attenuation coefficient)成正比的性質(Damianou et al. 1995; Tyreus & Diederich 2004)；第三種方式的原理，利用超音波反散射的功率(backscattered power)，在 37-50°C 的範圍內，當溫度上昇時，會呈現對數變化的現象(Straube & Arthur, 1994; Arthur et al. 2003a; Arthur et al. 2003b)；第四種方法，也是近年來最常用的方式，稱為超音波回音偏移法(ultrasound echo-shift)，利用溫度上昇會造成組織超音波的回音時間偏移，藉由追蹤偏移量，進而反推溫度的變化(Seip et al. 1995; Ebbini & Simon 1999; Pernot et al. 2004; Shi et al. 2005; Zohdy et al. 2006; Abolhassani et al. 2007; Anand et al. 2007; Daniels et al. 2007; Mast et al. 2008; Mehrabani et al. 2008; Sethuraman et al. 2008; Liang et al. 2009)。

茲將前述四大類超音波溫度量測方式的原理，列表整理如下：

測量物理量	基本原理	優點	缺點	相關論文
聲速(speed of sound, SOS)	溫度上昇，聲速變大	使用簡單的線性方程式	1. 測量聲速時，需同時度量距離與時間，困難度較高 2. 至目前為止，未曾使用於臨床實際應用	Johnson et al. 1977; Prakash et al. 1980
衰減係數(attenuation coefficient)	溫度上昇，衰減係數變大	溫度與衰減係數呈線性變化關係	1. 各種軟組織的變化幅度不同，病灶組織的成份複雜，造成衰減動態變化分析的困難	Damianou et al. 1995; Tyreus & Diederich 2004

			2. 目前僅應用於離體組織(ex vivo)研究	
後向散射能量變化 (change of backscattered energy, CBE)	在 37 至 50°C 的範圍內，溫度上昇，後向散射能量呈對數式變化	散射子在此溫度範圍內的位移甚小，小於 $2\mu\text{m}$ ，受熱膨脹的影響可忽略不計	1. 同一軟組織內部具有多樣性的散射子，各有不同的散射與密度性質 2. 散射子之挑選，需於溫度變化後，藉由它們的超音波振幅變化來選擇性量測，其性質無法事先得知 3. 不同組織的散射子性質並不相同，尚待更多的相關研究支持 4. 尚未應用於活體實驗	Straube & Arthur, 1994; Arthur et al. 2003a; Arthur et al. 2003b
回音偏移法 (ultrasound echo-shift)	溫度上昇造成組織超音波的回音時間偏移，藉由追蹤偏移量，可反推溫度的變化	1. 同時考慮聲速變化與熱膨脹 2. 溫度解析度良好($<0.5^\circ\text{C}$) 3. 高空間解析度	1. 需事先知道組織在溫度變化時，聲速與熱膨脹係數的變化 2. 小幅度溫度變化(小於 $5 - 10^\circ\text{C}$)較為準確	Seip et al. 1995; Simon et al. 1998; Ebbini & Simon 1999; Pernot et al. 2004; Shi et al. 2005; Zohdy et al. 2006; Abolhassani et al. 2007; Anand et al. 2007; Daniels et al. 2007; Mast et al. 2008; Mehrabani et al. 2008; Sethuraman et al. 2008; Liang et al. 2009

1.4.2.1 聲速法

聲速測溫法利用溫度與聲速成正比的關係式，假設各種組織皆有相同的聲速，藉由測量聲速推得組織溫度(Johnson et al. 1977; Prakash et al. 1980)。其公式原理為 $T = T_0 + \frac{1}{m}(v - v_0)$ ，其中T為溫度， T_0 為初始溫度，v為聲速， v_0 為初始聲速，m對37-44°C之間的各種組織皆為常數(Johnson et al. 1977)。此法早在1970年代就被研究，但其缺點在於測量聲速時，需同時度量距離與時間，困難度較高，因此至目前為止，未曾落實於臨床實際應用(Arthur et al. 2003b)。

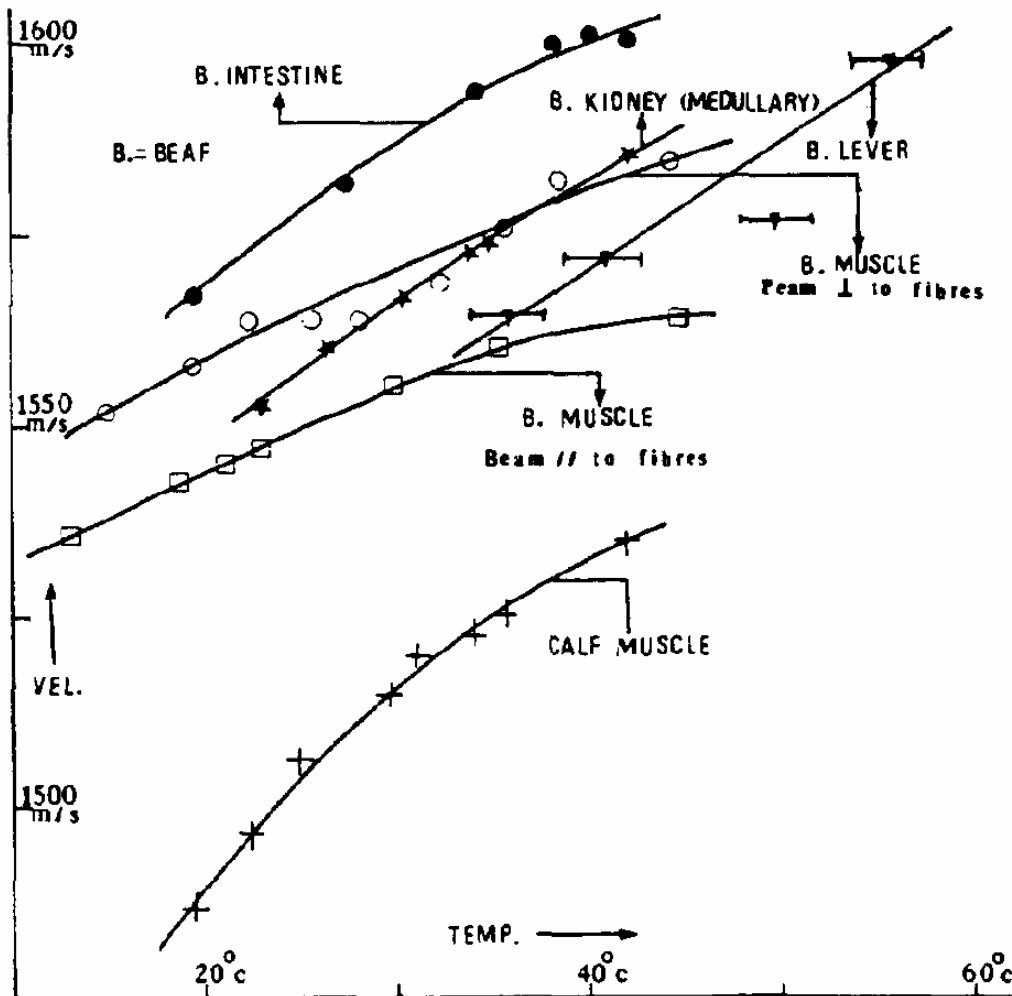


圖 1-12 各種組織之溫度與聲速的關係，橫軸為溫度，縱軸為聲速(Prakash et al. 1980)

1.4.2.2 衰減係數法

利用溫度與超音波衰減係數(attenuation coefficient)關係，推導得組織溫度(Damianou et al. 1995; Tyreus & Diederich 2004)。此法的限制在於各種軟組織的變化幅度不同，病灶組織的成份複雜，造成衰減動態變化分析的困難，所以本法目前僅應用於離體組織(ex vivo)研究。在犬類肝臟、肌肉、腎臟等器官的實驗顯示，軟組織的超音波衰減係數在攝氏 50 度之後，會隨著溫度的上昇而增加，如下圖所示：

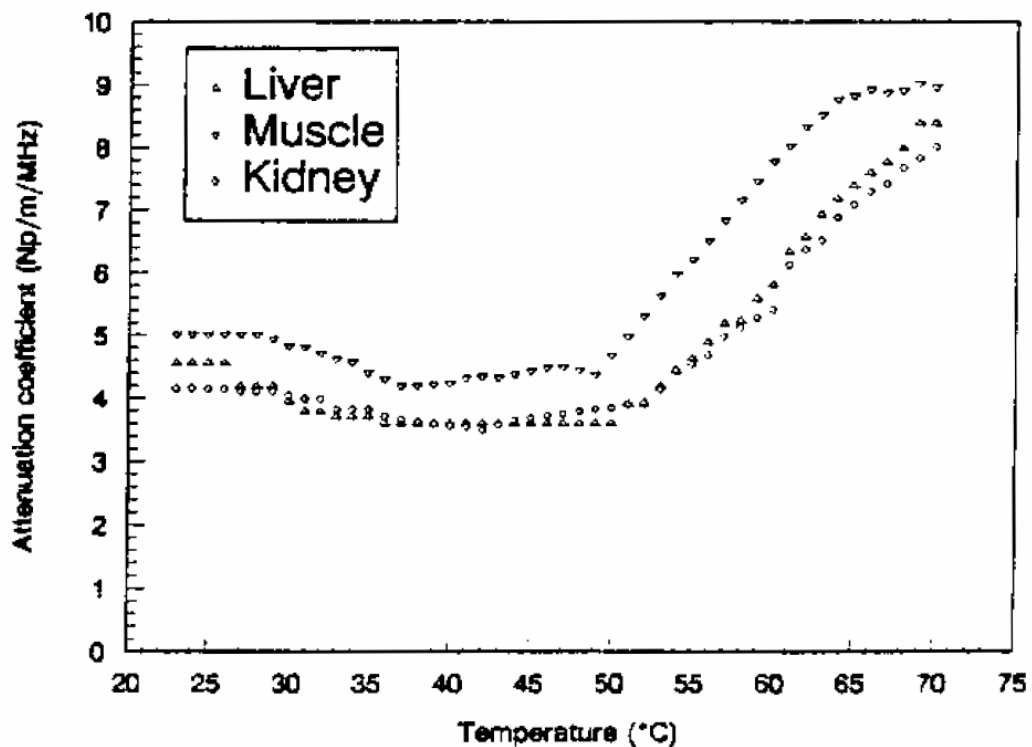


圖 1-13 溫度與衰減係數的關係(Damianou et al. 1995)

在牛腦皮質、雞肉、牛肝等軟組織的實驗中，當進行介於攝氏 50 度至 90 度的十分鐘水浴之後，亦呈現溫度與衰減係數同步上昇的趨勢，如下圖所示(Tyreus & Diederich 2004)：

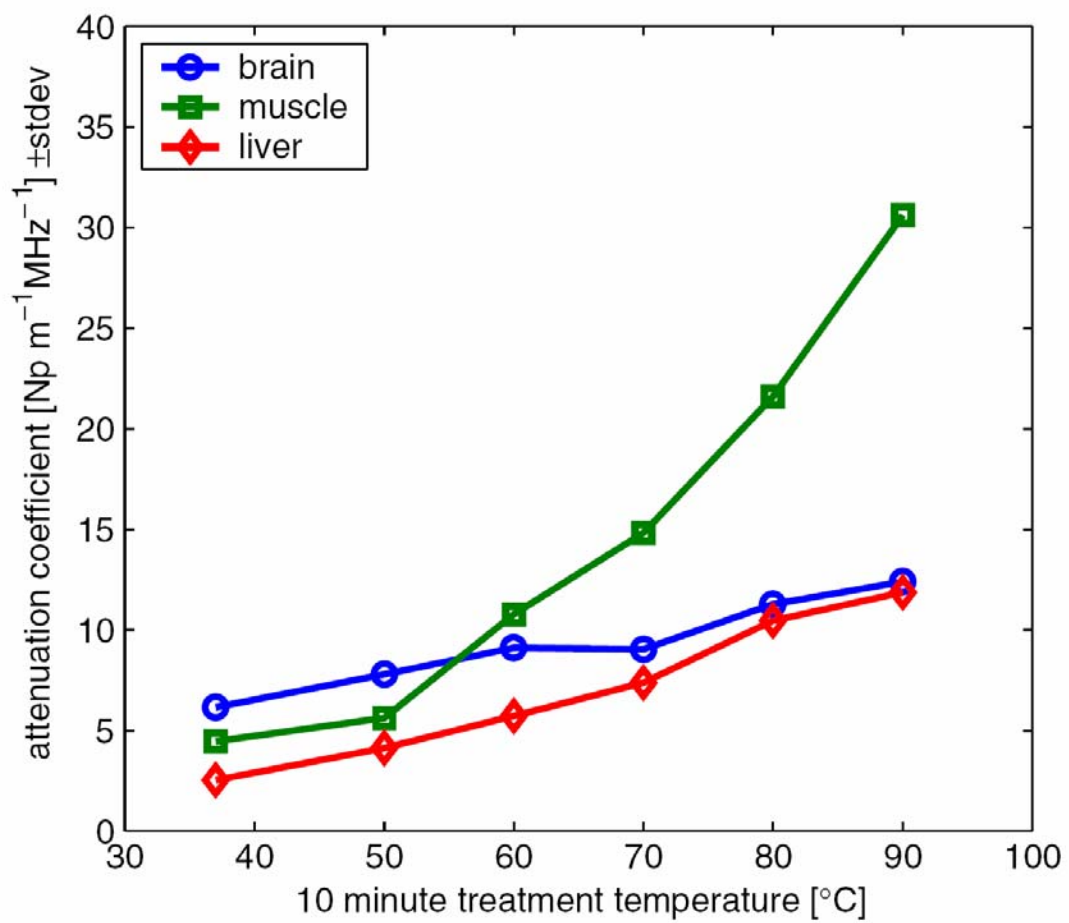


圖 1-14 在溫控熱水浴槽浸置 10 分鐘後，牛腦、雞肉、牛肝等軟組織的溫度與超音波衰減係數之關係(Tyreus & Diederich 2004)。

1.4.2.3 反散射能量變化法

在 37-50°C 的範圍內，當溫度上昇時，超音波反散射的能量變化(changes in backscattered energy, CBE)會呈現特殊的關係(Straube & Arthur, 1994; Arthur et al. 2003a; Arthur et al. 2003b; Arthur et al. 2005)；以脂肪為主的組織散射子，呈現與溫度呈對數正比的關係，但以水為主的組織散射子，則與溫度呈對數反比的關係。CBE 可表示為下列關係式：

$$CBE(T) = \frac{\alpha(T_R)}{\alpha(T)} \cdot \frac{\eta(T_R)}{\eta(T)} \cdot \frac{[1 - \exp(-2\alpha T x)]}{[1 - \exp(-2\alpha T_R x)]}$$

其中 $\alpha(T)$ 為組織對溫度的衰減量(attenuation)， x 為組織體積的路徑長度， T_R 為參考溫度，例如正常體溫下的 $T_R = 37^\circ\text{C}$ ，而 $\eta(T)$ 為組織對溫度的反散射係數(backscatter coefficient)，其定義為散射子每單位體積的反散射截面積(backscattering cross section) σ 。

若散射子的尺度小於超音波波長，則反散射截面積 σ 可表示為

$$\sigma = \frac{4\pi k^4 a^6}{9} \cdot \left[\left(\frac{\kappa_s - \kappa_m}{\kappa_m} \right) + \frac{1}{3} \left(\frac{3\rho_s - 3\rho_m}{2\rho_s + \rho_m} \right)^2 \right]$$

其中 a 為散射子半徑， k 為波數(wave number)， κ 為壓縮率(compressibility)， ρ 為密度，而 s 與 m 分別代表散射子(scatterer)與介質(medium)。此公式成立於超音波波長 λ 大於散射子截面積周長 $2\pi a$ 的情況。

根據上述關係式，則 $\frac{\eta(T)}{\eta(T_R)}$ 的比值可近似為

$$\frac{\eta(T)}{\eta(T_R)} = \frac{\left(\frac{\rho_m c(T) m^2 - \rho_s c(T) s^2}{\rho_s c(T) s^2} \right)^2 + \frac{1}{3} \left(\frac{3\rho_s - 3\rho_m}{2\rho_s + \rho_m} \right)^2}{\left(\frac{\rho_m c(T_R) m^2 - \rho_s c(T_R) s^2}{\rho_s c(T_R) s^2} \right)^2 + \frac{1}{3} \left(\frac{3\rho_s - 3\rho_m}{2\rho_s + \rho_m} \right)^2}$$

其中以 $\kappa = \frac{1}{\rho c(T)^2}$ 表示壓縮率， a 為常數， k 為波數(wave number)，且 $k = \frac{2\pi f}{c(T)}$ ，

在在 37-50°C 的範圍內，其變化造成的效應僅約 1.5%，可忽略不計(Arthur et al. 2003b)。超音波反散射能量變化與溫度如下圖所示(Arthur et al. 2003b; Arthur et al. 2005)：

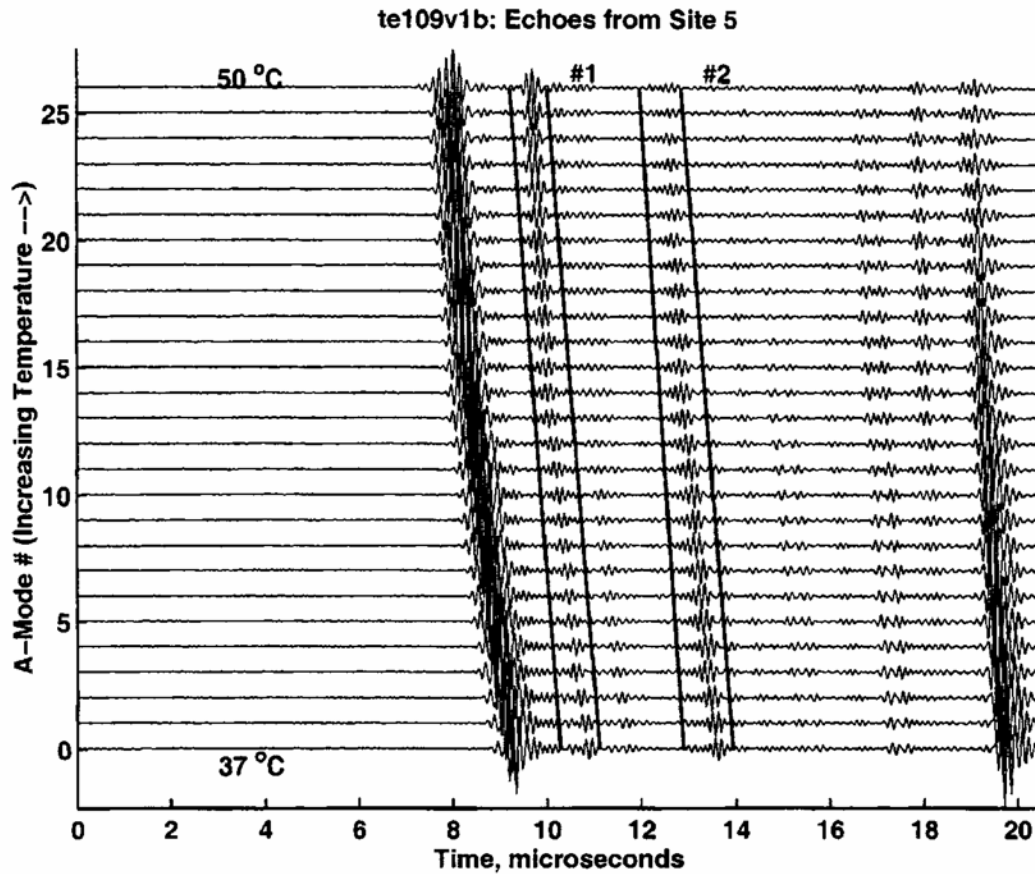


圖1-15 在37°C至50°C之間的溫度範圍內，量測厚約1公分的牛肝檢體，可得其中某位置散射子的回音變化如本圖所示。#1是以脂肪為主的區域，可見到隨著溫度上升，回音振幅逐漸變大；而#2是以水為主的區域，其回音振幅變動趨勢，恰與#1相反(Arthur et al. 2003b)。

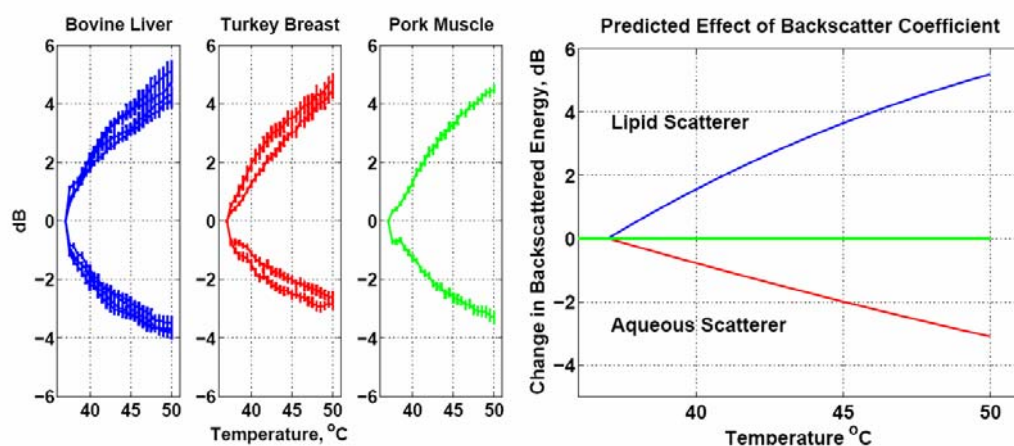


圖 1-16 牛肝、火雞胸肉、豬肉等三種組織的超音波反散射能量變化，右圖為預測值，左圖為實際數據 (Arthur et al. 2005)

此法之限制在於同一軟組織內部具有多樣性的散射子，各有不同的散射與密度性質；而且散射子之挑選，需於溫度變化後，藉由它們的超音波振幅變化來選擇性量測，它們的性質無法事先得知；此外，不同組織的散射子性質也不相同，尚待更多的相關研究支持 (Arthur et al. 2003b)。

1.4.2.4 回音偏移法

近年來最常用的超音波測溫方式，稱為超音波回音偏移法(ultrasound echo-shift) (Seip et al. 1995; Simon et al. 1998; Ebbini & Simon 1999; Pernot et al. 2004; Shi et al. 2005; Zohdy et al. 2006; Abolhassani et al. 2007; Anand et al. 2007; Daniels et al. 2007; Mast et al. 2008; Mehrabani et al. 2008; Sethuraman et al. 2008; Liang et al. 2009)。溫度上昇會造成組織內部聲速的變化，使散射子位置偏移，同時也會造成傳遞介質的熱膨脹，使組織產生實質上的物理性偏移，這兩個效應皆可造成超音波的回音時間偏移(echo time-shift)。藉由追蹤回音偏移量，可反推溫度的變化(Simon et al. 1998; Ebbini & Simon 1999; Liao 2002)。

$$\text{一般定義的超音波信號回音時間為 } t(d) = 2 \int_0^d \frac{dx}{c(x)}, \quad (1.4.1)$$

其中 d 為超音波探頭與目標物的距離， $c(x)$ 為不同深度的聲速。

$$\text{因為溫度可影響聲速，因此上式可改寫為 } t(d) = 2 \int_0^d \frac{dx}{c(x, T(x))}, \quad (1.4.2)$$

其中 $T(x)$ 表示不同深度的溫度。

若再考慮組織熱膨脹的影響，須將溫度引起介質路徑的脹縮考慮到回音時間公

$$\text{式，所以此公式可進一步修正為 } t(d) = 2 \int_0^d \frac{1 + \alpha(x) \delta T(x)}{c(x, T(x))} dx, \quad (1.4.3)$$

其中 $\alpha(x)$ 表示不同深度的熱膨脹係數， $\delta T(x)$ 則為溫度變化。

由公式(1.4.3)，可推導溫度造成的超音波回音時間偏移量 $\delta t(d) = t(d) - t_0(d)$ 。在

溫度變動前， $\delta T(x) = 0$ ，因此溫度變化前的回音時間

$$t_0(d) = 2 \int_0^d \frac{1 + \alpha(x) \cdot 0}{c(x, T_0(x))} dx = 2 \int_0^d \frac{dx}{c(x, T_0(x))}, \quad (1.4.4)$$

溫度造成的超音波回音時間偏移量

$$\delta t(d) = t(d) - t_0(d) = 2 \int_0^d \left[\frac{1 + \alpha(x) \delta T(x)}{c(x, T(x))} - \frac{1}{c(x, T_0)} \right] dx, \quad (1.4.5)$$

進一步分析上式中的聲速，設 $\beta(x)$ 為聲速的熱變化係數，可改寫聲速為

$$c(x, T(x)) = c_0(x, T_0)[1 + \beta(x)\delta T(x)] \quad (1.4.6)$$

$$\text{其中 } \beta(x) = \frac{1}{c_0(x)} \cdot \frac{\partial c(x, T)}{\partial T} \Big|_{T=T_0} \quad (1.4.7)$$

當溫度變化量介於 5-10°C 時，聲速對溫度的變化可視為線性關係 (Abolhassani et al. 2007)。

$$\begin{aligned} \text{因此，可推導 } \delta t(d) &= 2 \int_0^d \left[\frac{1 + \alpha(x)\delta T(x)}{c_0(x, T_0)[1 + \beta(x)\delta T(x)]} - \frac{1}{c_0(x, T_0)} \right] dx \\ &= 2 \int_0^d \left[\frac{[1 + \alpha(x)\delta T(x)] - [1 + \beta(x)\delta T(x)]}{c_0(x, T_0)[1 + \beta(x)\delta T(x)]} \right] dx \\ &= 2 \int_0^d \left[\frac{[\alpha(x) - \beta(x)]\delta T(x)}{c_0(x, T_0)[1 + \beta(x)\delta T(x)]} \right] dx, \end{aligned} \quad (1.4.8)$$

$$\begin{aligned} \text{對兩邊微分，可得 } \frac{\partial}{\partial x} \delta t(x) &= \frac{\partial}{\partial x} \left\{ 2 \int_0^d \left[\frac{[\alpha(x) - \beta(x)]\delta T(x)}{c_0(x, T_0)[1 + \beta(x)\delta T(x)]} \right] dx \right\} \\ &= 2 \frac{[\alpha(x) - \beta(x)]\delta T(x)}{c_0(x, T_0)[1 + \beta(x)\delta T(x)]}, \end{aligned} \quad (1.4.9)$$

$$\text{化簡後可得 } \delta T(x) = \frac{c_0(x, T_0)}{2} \cdot \frac{1 + \beta(x)\delta T(x)}{\alpha(x) - \beta(x)} \cdot \frac{\partial}{\partial x} \delta t(x), \quad (1.4.10)$$

在聲速的熱變化係數 $\beta(x)$ 不大，或小幅度的溫度變化時(小於 5-10°C)，上式可近似為

$$\delta T(x) = \frac{c_0(x)}{2} \cdot \frac{1}{\alpha(x) - \beta(x)} \cdot \frac{\partial}{\partial x} \delta t(x), \quad (1.4.11)$$

可定義 $k(x) = \frac{1}{\alpha(x) - \beta(x)}$ ，此為與介質(組織)有關的參數，並與溫度變化無關，若

組織為均質結構，則可由實驗得知 $k(x)$ 的量值 (Ebbini & Simon 1999; Liao 2002)。

對一般超音波探頭的波束形成演算法 (beam-forming algorithm) 而言，往往設定

聲速為定值，因此時間偏移 δt 造成的散射子位移 (scatters displacement)

$\Delta d = \delta t \cdot c_0$ (Abolhassani et al. 2007)，代回上式可得 $\Delta T(x) = k \cdot \frac{\partial \Delta d}{\partial x}$ ，代表散

射子位移與溫度變化之間存在著線性關係式 (Mehrabani et al. 2008)。為提高時

間偏移的估測準確性，可採用多種方式，例如空間複合式影像(spatial compound imaging)技術(Pernot et al. 2004)；亦可利用溫度變化時，超音波造成的熱應變(thermal strain)會與溫度變化量呈反比的關係，在溫度變動不大時，熱膨脹造成的位移可忽略不計，該位移主要由聲速變化所致，因此應變(strain)即為聲速的函數，而聲速為溫度的函數，故可由應變推估組織溫度，採用斑點雜訊追蹤的方式，測量回音偏移量，可即時量測較深層的組織溫度 (Sethuraman et al. 2008)。在溫度變化相當低時(小於 $5-10^{\circ}\text{C}$)，可利用上述公式，由超音波的回音時間偏移量推估溫度變化量(Sethuraman et al. 2008)。

超音波回音偏移法的優點在於同時考慮聲速變化與熱膨脹，溫度解析度良好 ($<0.5^{\circ}\text{C}$)，且具有高空間解析度(Pernot et al. 2004)。但其限制在於，需事先得知組織在溫度變化時，聲速與熱膨脹係數變化性質，以便產生此法的校正曲線，進而利用此校正曲線，以斑點雜訊追蹤 (speckle tracking) 的技巧，量測組織位移，並監控溫度分布(Daniels et al. 2007)。此外，若溫度變動範圍大於 $5-10^{\circ}\text{C}$ 以上，此法之準確度將受到影響(Sethuraman et al. 2008)。

1.5 光聲效應

光聲效應(又稱為「光音效應」，photoacoustic 或 optoacoustic effect)來自受測物吸收電磁能量之後，因受熱變形產生的聲波，收集此聲波，可得光聲信號。光聲效應最早是由貝爾(Alexander Graham Bell)於 1881 年發表，他發現旋轉的薄圓盤在快速間歇照射日光後，可產生人耳可察覺的聲音頻域，因而發現光聲信號的存在(Bell 1881)。光聲效應可運用於許多與物理、化學、工業相關的研究，而與生物醫學有關的應用，在近年來亦逐漸受到研究者的注意。誘發光聲效應的電磁能量來源，包括無線電射頻(radiofrequency, RF)、微波(microwaves)或光能輻射(optical irradiation)等，其中的光能包括非同調性(non-coherent)的光源或同調性的雷射(Xu M & Wang 2006)。

在二十世紀時，光聲效應已廣泛運用在吸收光譜之研究，光聲技術(photoacoustic technique)已應用於許多生醫領域，包括乳癌造影(breast tumor imaging)、腦部功能性與結構性造影(brain functional and structural imaging)、即時血氧監測(real-time blood oxygen monitoring)、血紅素濃度(hemoglobin concentration)量測、腫瘤之血管新生(tumor angiogenesis)等，近年來亦有研究者運用此技術於監測冷凍治療(cryotherapy)時的組織溫度變化，亦可施用於熱治療(thermotherapy)的溫度監控(Emelianov et al. 2006; Xu M & Wang 2006)。

光聲影像是目前與光聲效應相關，最受矚目的研究方向之一。光聲影像(photoacoustic imaging)是基於光聲效應的造影方式，它是偵測物體吸收電磁能量後放出的聲波，利用超音波的成像原理，組合出受測物內部構造之影像。光聲影像之信號具有光學之高對比與聲學之低散射性質，可運用於生醫影像之研究。

1.6 利用超音波與光聲效應對軟組織造影

光聲造影是利用光聲光聲超音波探頭，對軟組織進行掃描造影。因此可同時取得超音波與光聲信號，並將兩者的影像重疊。超音波影像一般以灰階顯示，而光聲影像則以假彩色(pseudo-color)表達。此種多重造影方法(multi-modality imaging method)，可在光熱治療前，以超音波將腫瘤的解剖位置清楚地標示，提供良好的治療規劃。配合金奈米粒子，將腫瘤部位明確地與其它的軟組織區別，有助於確認金奈米粒子的分布狀況，可提昇雷射光熱治療的安全性(Shah et al. 2008)。

與光聲影像相關的斷層掃描技術，可根據使用的能量不同，分為「光聲斷層掃描」(optoacoustic tomography, OAT)，著重於以「光」、「雷射」產生的光聲信號，與「熱聲斷層掃描」(thermoacoustic tomography, TAT)，係以無線電射頻或微波所產生的光聲信號。

光聲影像結合光學或射頻之電磁能量與聲學之性質，可適用於具有非均質性光學或射頻吸收性，但聲學性質較均勻的生物組織造影；超音波則主要運用在聲學異質性高(acoustic heterogeneity)的組織造影，因此，光聲影像比超音波較能容忍組織的音波速度差異(sound speed variation)。此外，光聲影像不會有「斑點效應」(speckle effect)，但傳統的超音波則會有斑點雜訊(speckle artifacts)。光聲影像之信號來自光學吸收度，所以可直接反應組織特性，擁有高對比的優點，而且使用雷射或無線電射頻，與X光等游離輻射造影方式相比，較無健康疑慮，而且聲波之散射與衰減優於光波，可維持較深層組織的解析度。結合雷射等電磁能量與超音波系統之光聲造影系統架構圖如圖1-17所示。

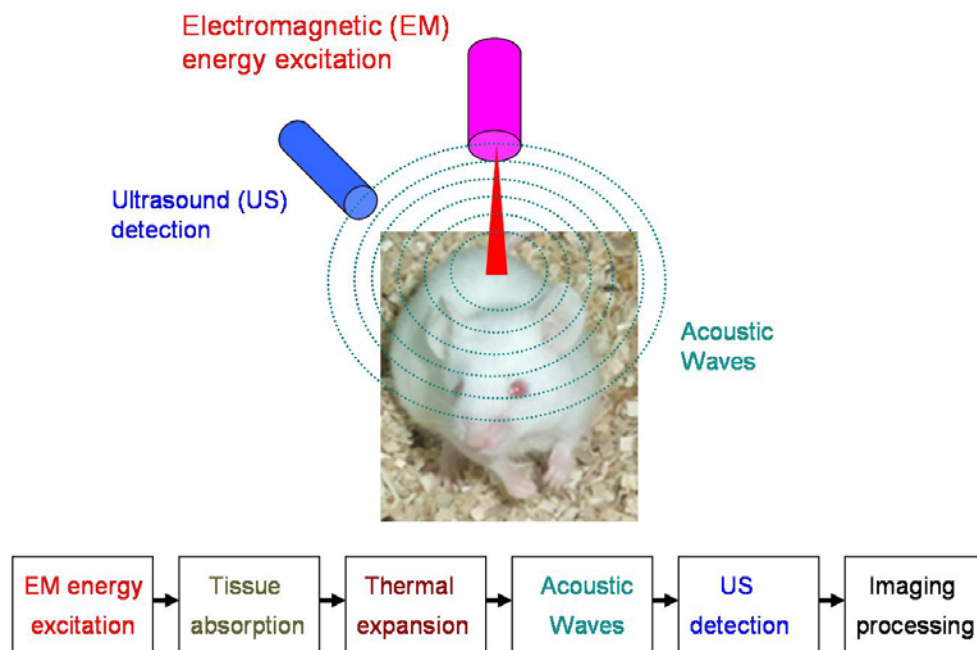


圖1-17 結合雷射等電磁能量與超音波系統之光聲造影系統架構圖

光聲影像具有電磁能量(光學)與聲學之優點，但同時也有來自這兩方面的限制。例如硬質構造會造成強烈的超音波傳遞偏差，故不適用於堅硬組織，無法穿透頭蓋骨，所以不易進行大腦斷層造影；此外，光聲影像也需與組織接觸，以利聲學匹配(acoustic coupling)；光學特性也造成較強的散射(scattering)，使得光聲信號的動態範圍(dynamic range)相當寬廣，所以不易對深層的微小腫瘤造影。

1.7 光聲效應測溫法與研究動機

光聲信號可用來對於真皮層結構進行非侵入性即時造影，受測物在照射雷射之後產生光聲效應，造成壓力的變化，同時使溫度上昇，且光聲壓力振幅與 Grüneisen 參數成正比，該參數與溫度具有線性關係，故可利用此方程式，測量壓力再換算成溫度(Larina et al. 2005)。在操作實驗時，可使用雷射照射組織與仿體，並利用光聲技術監控其溫度。例如，可用Nd:YAG laser產生光聲波，並同時利用壓力與溫度之關係式探求受測物之溫度。在實驗時，同時利用熱電偶插入待測物，測量實際的溫度。

利用光聲信號測量溫度，可符合臨床上對於空間與溫度解析度 (spatial and temperature resolution) 的要求，以及即時測量的需要，故適於發展成熟治療的即時監測工具，例如運用於離體犬類肝臟與心肌組織溫度測量(Larina et al. 2005)、離體豬眼基底部組織 (Schüle et al. 2004)、兔子視網膜溫度(Kandulla et al. 2006)，亦有癌症熱治療溫度監控方面的相關研究，例如離體豬肉的熱治療(Shah et al. 2008)，但尚未運用於活體實驗。良好的監控須能即時掌握各組織解剖切面的溫度資訊，定量式熱影像是相當重要的臨床訊息，然而目前尚未有相關研究發表，因此我們企圖以光聲信號，重建組織在進行雷射光熱治療時的定量式熱影像資訊，此工作將有助於提昇雷射光熱治療的安全性與有效性。

第二章 光聲效應測溫法之理論基礎

2.1 光聲信號之產生

許多能量形式皆可產生光聲信號，包括微波與脈衝式(pulsed)或連續波雷射(CW laser)，受測物在吸收這些電磁能量後，可產生震波(shock wave)，造成光聲效應，造成壓力的變化。在本研究中，我們選擇脈衝式雷射產生光聲信號，以利於進行高解析度的光聲造影。

軟組織照射脈衝式雷射後，會產生聲波，此現象若符合兩條件，則有助於光聲造影。第一條件稱為「熱限制」(thermal confinement)，意指雷射脈衝作用時間很短，使得雷射激發時，熱擴散(heat diffusion)的程度可忽略不計，因此組織吸收脈衝能量的時間 τ_p 小於熱散失的時間(thermal dissipation duration) τ_{th} 。第二條件稱為「應力限制」(stress confinement)，表示組織產生應力的時間 τ_p 小於應力向外傳遞的時間。當這兩個條件皆成立時，脈衝雷射的能量可產生組織的熱膨脹(thermal expansion)，進而誘發壓力上昇 $P(z)$ ，並產生光聲信號，利用此信號，可用來對於軟組織結構進行非侵入性即時造影，稱為「光聲造影」(Xu & Wang 2006; Shah et al. 2008)。

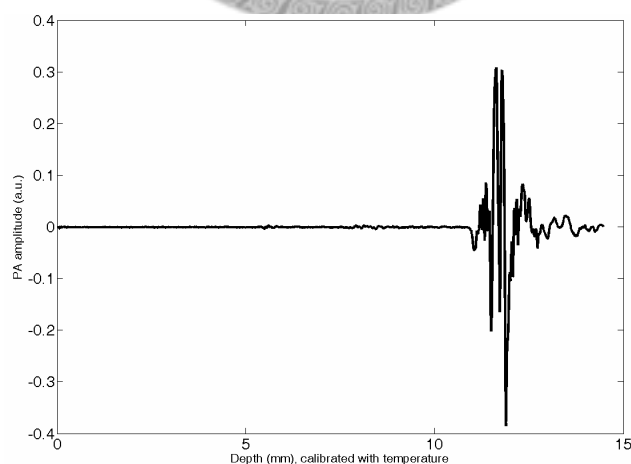


圖2-1 溶有石墨的瓊脂糖仿體受脈衝式雷射照射後產生的光聲信號。

2.2 由熱力學推導光聲信號之振幅

在光聲信號產生的液態熱力學系統中，可定義溫度 $T \equiv (\frac{\partial h}{\partial s})_p$ ，等壓比熱 $C_p \equiv (\frac{\partial h}{\partial T})_p$ ，體積膨脹係數 $\beta \equiv \frac{1}{v}(\frac{\partial v}{\partial T})_p$ ，單位密度 $\rho \equiv \frac{1}{v}$ ，其中 h 為熱焓 (enthalpy)、 s 為熵 (entropy)、 p 為壓力、 v 為體積 (p. 42, p. 51, p. 85, Engel & Reid 2006)。

當系統處於熱力學平衡 (thermodynamic equilibrium) 狀態時，系統的性質與熱力學座標 (thermodynamic coordinates) 有關，例如體積與壓力、溫度與體積、壓力與熵值等，而與達到此狀態的過程無關，用來描述此系統性質的方程式，稱為狀態函數 (state functions)，例如 $T = T(p, v)$ 、 $v = v(T, p)$ 、 $p = p(T, v)$ (p. 9, Bowley & Sánchez 1999)。若溫度 T 為壓力 p 與熵 s 的狀態函數，則可表示為

$$T = T(p, s), \text{ 其微分形態為 } dT = (\frac{\partial T}{\partial p})_s dp + (\frac{\partial T}{\partial s})_p ds, \quad (2.2.1)$$

同理，若壓力 p 為單位密度 ρ 與熵 s 的狀態函數，則 $p = p(\rho, s)$ ，其微分形態為

$$dp = (\frac{\partial p}{\partial \rho})_s d\rho + (\frac{\partial p}{\partial s})_\rho ds. \quad (2.2.2)$$

由熱力學原理可知，壓力 p 、體積 v 、內能 (internal energy) u 皆為狀態函數，由這些狀態函數，可組合成狀態函數「熱焓」 h ，其定義為 $h \equiv u + pv$ (p. 20, Engel & Reid 2006)。熱焓的微分形式可表示為 $dh = d(u + pv)$ ，由於 $Tds = du + pdv$ (p. 9, Müller & Weiss 2005)，因此 $dh = d(u + pv) = du + pdv + vdp = Tds + vdp$ ，亦即

$$dh = Tds + vdp, \quad (2.2.3)$$

(2.2.3) 式與全微分式 $dz = (\frac{\partial z}{\partial x})_y dx + (\frac{\partial z}{\partial y})_x dy$ 相似，故可改寫為

$$dh = (\frac{\partial h}{\partial s})_p ds + (\frac{\partial h}{\partial p})_s dp, \text{ 可得溫度與體積的偏微分形式如下：}$$
$$T = (\frac{\partial h}{\partial s})_p, v = (\frac{\partial h}{\partial p})_s. \quad (2.2.4)$$

由於 $\frac{\partial}{\partial y}(\frac{\partial z}{\partial x})_y = \frac{\partial}{\partial x}(\frac{\partial z}{\partial y})_x = \frac{\partial^2 z}{\partial y \partial x} = \frac{\partial^2 z}{\partial x \partial y}$ ，因此 $\frac{\partial}{\partial p}(\frac{\partial h}{\partial s})_p = \frac{\partial}{\partial s}(\frac{\partial h}{\partial p})_s$ ，故 $(\frac{\partial T}{\partial p})_s = (\frac{\partial v}{\partial s})_p$ ，此即為馬克斯威爾關係式(Maxwell relations)之一(p.118, Engel

& Reid 2006)。前述 (2.2.1) 式 $dT = (\frac{\partial T}{\partial p})_s dp + (\frac{\partial T}{\partial s})_p ds$ 可進一步改寫為

$$T = (\frac{\partial v}{\partial s})_p dp + (\frac{\partial h / \partial s}{\partial h / \partial T})_p ds = (\frac{\partial h / \partial s}{\partial h / \partial T} \cdot \frac{\partial v}{\partial T}) dp + (\frac{\partial h / \partial s}{\partial h / \partial T})_p ds，代入 T \equiv (\frac{\partial h}{\partial s})_p，$$

$$C_p \equiv (\frac{\partial h}{\partial T})_p，\beta \equiv \frac{1}{v}(\frac{\partial v}{\partial T})_p，\rho \equiv \frac{1}{v}，可整理得$$

$$dT = \frac{T\beta}{C_p \rho_0} dp + \frac{T}{C_p} ds， \quad (2.2.5)$$

其中 ρ_0 為起始單位密度。

由於 $p=p(\rho, s)$ ，若 s 保持定值，則 $p=p(\rho)$ ，可針對 $\frac{\rho-\rho_0}{\rho_0}$ 進行泰勒-馬克勞林展開式(Taylor-Mclaurin expansion)如下：

$$p(\rho)=p_0+a \cdot \frac{\rho-\rho_0}{\rho_0}+\frac{b}{2!} \cdot\left(\frac{\rho-\rho_0}{\rho_0}\right)^2+\cdots \quad (2.2.6)$$

在光聲信號產生過程中，介質體積與密度的變化甚小，故 $(\frac{\rho-\rho_0}{\rho_0})^2 \rightarrow 0$ ，更高次項亦可忽略不計，上式可簡化為 $p(\rho)=p_0+a \cdot \frac{\rho-\rho_0}{\rho_0}$ ，移項後

$$a=\rho_0 \cdot \frac{p-p_0}{\rho-\rho_0}=\rho_0 \cdot \frac{\Delta p}{\left(\frac{1}{v}-\frac{1}{v_0}\right)}，可得$$

$$a=v \cdot \frac{\Delta p}{\Delta v}， \quad (2.2.7)$$

此即液體的體積係數(bulk modulus)，因此 $a=\rho_0 c^2$ ，其中 c 為聲速。

進一步可得 $p-p_0=\rho_0 c^2 \cdot \frac{\rho-\rho_0}{\rho_0}=c^2(\rho-\rho_0)$ 。設 $dp=p-p_0$ ， $d\rho=\rho-\rho_0$ ，因

此在 s 保持定值的情況下， $dp=c^2 d\rho$ ，此亦即 $dp=(\frac{\partial p}{\partial \rho})_s d\rho+(\frac{\partial p}{\partial s})_\rho ds$ 的第一項，

$$可知 dp=c^2 d\rho+(\frac{\partial p}{\partial s})_\rho ds。 \quad (2.2.8)$$

設 $x=x(y, z)$, $y=y(x, z)$, 可知 $dx = \left(\frac{\partial x}{\partial y}\right)_z dy + \left(\frac{\partial x}{\partial z}\right)_y dz$, $dy = \left(\frac{\partial y}{\partial x}\right)_z dx + \left(\frac{\partial y}{\partial z}\right)_x dz$, 因此 $\left(\frac{\partial x}{\partial y}\right)_z dy = dx - \left(\frac{\partial x}{\partial z}\right)_y dz$, $\left(\frac{\partial x}{\partial y}\right)_z dy = \left(\frac{\partial x}{\partial y}\right)_z \left(\frac{\partial y}{\partial x}\right)_z dx + \left(\frac{\partial x}{\partial y}\right)_z \left(\frac{\partial y}{\partial z}\right)_x dz$, 兩式相減可得 $\left[1 - \left(\frac{\partial x}{\partial y}\right)_z \left(\frac{\partial y}{\partial x}\right)_z\right] dx = \left[\left(\frac{\partial x}{\partial z}\right)_y + \left(\frac{\partial x}{\partial y}\right)_z \left(\frac{\partial y}{\partial z}\right)_x\right] dz$ 。若 $dx=0$, 可知 $\left(\frac{\partial x}{\partial z}\right)_y + \left(\frac{\partial x}{\partial y}\right)_z \left(\frac{\partial y}{\partial z}\right)_x = 0$, 進一步化簡可得 $\left(\frac{\partial x}{\partial y}\right)_z \left(\frac{\partial y}{\partial z}\right)_x \left(\frac{\partial z}{\partial x}\right)_y = -1$, 此即「三重積規則」(triple product rule), 又稱為「環狀連鎖律」(cyclic chain rule)。

分別以壓力 p 、體積 v 、熵 s 代入環狀連鎖律, 可得下列關係式 $\left(\frac{\partial p}{\partial v}\right)_s \left(\frac{\partial v}{\partial s}\right)_p \left(\frac{\partial s}{\partial p}\right)_v = -1$, 可知 $\left(\frac{\partial p}{\partial s}\right)_\rho = \left(\frac{\partial p}{\partial s}\right)_v = -\left(\frac{\partial p}{\partial v}\right)_s \left(\frac{\partial v}{\partial s}\right)_p$, 由於 $\left(\frac{\partial v}{\partial s}\right)_p = \frac{T\beta}{C_p \rho_0}$, 因此 $\left(\frac{\partial p}{\partial s}\right)_\rho = -\left(\frac{\partial p}{\partial s}\right)_v \cdot \frac{T\beta}{C_p \rho_0} = \rho^2 \left(\frac{\partial p}{\partial \rho}\right)_s \cdot \frac{T\beta}{C_p \rho_0}$, (2.2.9)

由前述推導過程可知, 在 s 保持定值的情況下, $dp = c^2 d\rho$, 因此

$$\left(\frac{\partial p}{\partial \rho}\right)_s = c^2, \quad (2.2.10)$$

故可得

$$\left(\frac{\partial p}{\partial s}\right)_\rho = \rho_0^2 c^2 \frac{T\beta}{C_p \rho_0}, \quad (2.2.11)$$

$dp = c^2 d\rho + \left(\frac{\partial p}{\partial s}\right)_\rho ds$ 可進一步化簡為

$$dp = c^2 d\rho + \rho_0 c^2 \frac{T\beta}{C_p} ds. \quad (2.2.12)$$

結合(2.2.5)式 $dT = \frac{T\beta}{C_p \rho_0} dp + \frac{T}{C_p} ds$ 與(2.2.12)式 $dp = c^2 d\rho + \rho_0 c^2 \frac{T\beta}{C_p} ds$ 兩項

方程式, 推導壓力 p 與溫度 T 之關係式可得

$$\left(1 + \frac{c^2 \beta^2}{C_p} T\right) dp = c^2 d\rho + \rho_0 c^2 \beta dT. \quad (2.2.13)$$

一般水溶液之 β 值皆甚小, 以水為例, 在 20°C 下, $\beta = 207 \times 10^{-6} / \text{K}$ (Efunda, “Properties of Common Liquid Materials”), 此時水中聲速 $c=1481 \text{ m/s}$

(EngineeringToolBox, “Water - Speed of Sound”), 水的等壓比熱 $C_p=4183 \text{ J/kgK}$

(EngineeringToolBox, “Water - Thermal Properties”), 所以在 S.I 制下，

$$\frac{c^2 \beta^2}{C_p} T = 4.49 \times 10^{-4} \text{ m}^2 \text{Kgs}^{-2} \text{J}^{-1}, \text{ 亦即 } \frac{c^2 \beta^2}{C_p} T \ll 1, \text{ 壓力與溫度的關係式 (2.2.13)}$$

可化簡為

$$dp = c^2 d\rho + \rho_0 c^2 \beta dT, \quad (2.2.14)$$

在光聲信號產生過程中，由於介質密度的變化極小(Karabutov et al. 1996)，(2.2.14)

式可進一步簡化，成為

$$dp = \rho_0 c^2 \beta dT. \quad (2.2.15)$$

對一個熱學系統而言，輸入能量等於系統質量、比熱、溫度變化量之乘積，所以在脈衝式雷射的照射系統中，可使用

$$E = \rho_0 v C_p \Delta T \quad (2.2.16)$$

表示雷射的照射能量，其中照射能量 E 為能量密度 F (fluence, 亦稱光通量) 與雷射光束截面積的乘積， v 為受雷射照射的體積、 ΔT 為溫度變化量。

考慮圖 2-2 光吸收介質的物理模型，在介面受到短脈衝雷射照射下，介面下方距離 z 處有一層薄介質 δz ，在吸收雷射能量密度 δF 後，受激化而產生光聲信號，同時產生溫度變化 ΔT 與壓力變化 ΔP 。

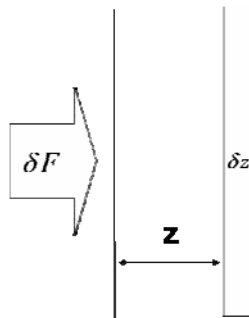


圖 2-2 光吸收介質的物理模型

可得溫度變化量

$$\Delta T = \frac{\delta F}{\rho_0 C_p \delta z}, \quad (2.2.17)$$

將(2.2.17)式代入(2.2.15)式(Karabutov et al. 1996)，可得

$$\Delta p = \frac{c^2 \beta}{C_p} \frac{\delta F}{\delta z}. \quad (2.2.18)$$

由 Beer-Lambert Law，可推測光的能量傳遞函數如下：

$$F(z) = F_0 e^{-\mu_a z}, \quad (2.2.19)$$

其中 F_0 為雷射初始能量密度， μ_a 為介質的吸收係數。對(2.2.19)式取能量密度之微小變動量，可得

$$\delta F = -\mu_a F_0 e^{-\mu_a z} \delta z, \quad (2.2.20)$$

取絕對值後， $\frac{\delta F}{\delta z} = \mu F_0 e^{-\mu z}$ ，代回(2.2.18)式可得

$$\Delta p = \frac{\beta c^2}{C_p} \mu_a F_0 e^{-\mu_a z}, \quad (2.2.21)$$

因此，介質在接受雷射光刺激後，產生的壓力變化，亦即光聲信號的振幅，可表示為熱體積膨脹係數、聲速、等壓比熱、吸收係數、雷射光通量的函數(Gusev & Karabutov 1993; Larina et al. 2005)，如下所示：

$$p(z) = \frac{\beta c^2}{C_p} \mu_a F_0 e^{-\mu_a z}. \quad (2.2.22)$$

2.3 光聲信號與溫度之關係

光聲信號可用於非侵入式組織造影，當組織受到脈衝式雷射照射後，會造成局部壓力上昇，若符合時間應力限制的條件(Xu & Wang 2006; Shah et al. 2008)，則上昇的壓力 $P(z)$ 與無因次(dimensionless)的 Grüneisen 參數(Grüneisen parameter) Γ 有關，由 2.2 節之推導，重新整理其關係式(2.2.22)如下(Gusev & Karabutov 1993; Larina et al. 2005)：

$$P(z) = \left(\frac{\beta c^2}{C_p}\right) \mu_a F_0 e^{-\mu_a z}, \quad (2.3.1)$$

此處的 $\beta [1^\circ\text{C}^{-1}]$ 為熱體積膨脹係數(thermal volume expansion coefficient)， $c [\text{ms}^{-1}]$ 為聲速(sound speed)， $C_p [\text{Jg}^{-1}\text{C}^{-1}]$ 為等壓比熱(heat capacity at constant pressure)， $\mu_a [\text{cm}^{-1}]$ 為吸收係數(absorption coefficient)， $F [\text{Jcm}^{-2}]$ 則為雷射光通量(fluence)。對脂肪與富含水分的組織(water-based tissue)而言，在 10 至 55 $^\circ\text{C}$ 之間的熱體積膨脹係數，為溫度的線性函數(Shah et al. 2008)；水的 Grüneisen 參數則對溫度呈現如下的線性關係(Larina et al. 2005)：

$$\Gamma = a + bT(z), \quad (2.3.2)$$

此處的 a 與 b 皆為常數，而 T 則為組織溫度，因此，方程式(2.3.1)可改寫如下：

$$P(z) = [a + bT(z)] \mu_a F_0 e^{-\mu_a z}, \quad (2.3.3)$$

對強烈散射介質的深部區域，上式可改寫為

$$P(z) = [a + bT(z)] k \mu_a F_0 e^{(-\mu_{\text{eff}} z)}, \quad (2.3.4)$$

其中 μ_{eff} 為等效衰減係數(Larina et al. 2005)。移項後可得

$$T(z) = \frac{P(z)}{bk \mu_a F_0 e^{(-\mu_{\text{eff}} z)}} - a, \quad (2.3.5)$$

由(2.3.4)式，可得初始壓力 $P_0(z)$ 與初始溫度 $T_0(z)$ 之關係如下：

$$P_0(z) = [a + bT_0(z)]k\mu_a F_0 e^{(-\mu_{eff}z)}, \quad (2.3.6)$$

由(2.3.4)式與(2.3.6)式可得

$$P(z) - P_0(z) = b[T(z) - T_0(z)]k\mu_a F_0 e^{(-\mu_{eff}z)}, \quad (2.3.7)$$

因此

$$\frac{P(z) - P_0(z)}{P_0(z)} = \frac{b[T(z) - T_0(z)]}{a + bT_0(z)},$$

$$\text{整理上式可得 } T(z) - T_0(z) = \frac{P(z) - P_0(z)}{P_0(z)} \cdot \frac{a + bT_0(z)}{b}, \quad (2.3.8)$$

進一步移項，可將上式改寫為如下的溫度-壓力關係式：

$$T(z) = \left(\frac{a + bT_0(z)}{b} \right) \frac{P(z)}{P_0(z)} + \left(T_0(z) - \frac{a + bT_0(z)}{b} \right), \quad (2.3.9)$$

將上式化簡，我們可以得到下列方程式：

$$T(z) = cP(z) + d, \quad (2.3.10)$$

此處的 $c = \frac{a + bT_0(z)}{bP_0(z)}$ ， $d = T_0(z) - \frac{a + bT_0(z)}{b}$ ，而 T_0 與 P_0 則分別表示初始溫度與壓力。

利用此方程式，可利用光聲效應的壓力信號，測量熱治療過程中的溫度。由於腫瘤與一般的軟組織，大於70%的成分皆由水構成，故可借用水的Grüneisen參數特性，合理估算腫瘤的溫度。

金奈米粒子的尺寸小於100 nm，其聲學與熱緩解時間約為數個皮秒(picosecond)，而一般使用的脈衝式雷射的脈衝寬度約為5-10 奈秒(nanosecond)，因此金奈米粒子在照射脈衝式雷射時，會迅速將熱量散佚至周圍組織，不符合應力與熱學侷限(stress & thermal confinement)的要件，所以不會產生(2.3.1)式的效應。但若以光聲信號偵測混有金奈米粒子的軟組織溫度，上式仍可適用。因為金奈米粒子雖可強力吸收特殊波長的雷射光束，使得整體的吸

收係數 μ_a 大幅增加，由 $P(z) = \Gamma \mu_a F_0 e^{(-\mu_a z)}$ 關係式可知，光聲信號 $P(z)$ 也會同步大幅揚升，但實際與溫度有關的 Grüneisen 參數 Γ 是由組織(bulk tissue)性質所決定，並不受到金奈米粒子存在與否的影響，故(2.3.10)式可仍用於金奈米粒子輔助之雷射電漿光熱治療(Shah et al. 2008)。

利用水的熱學性質(EngineeringToolBox, “Water - Thermal Properties”)，可計算純水的溫度與 Grüneisen 參數 Γ 關係圖 (Wei 2009)，如圖 2-3 所示：

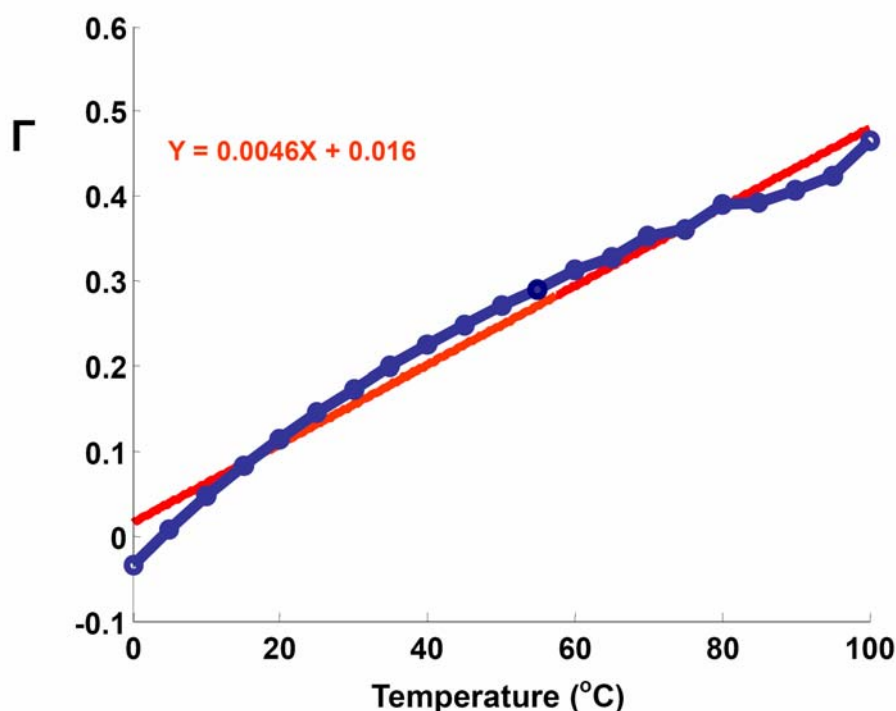


圖 2-3 水的溫度與 Grüneisen 參數 Γ 關係圖

一般的水溶液仍遵循 Grüneisen 參數 Γ 與溫度成正比的關係，以鉻酸鉀 (potassium chromate) 水溶液為例，其光聲信號強度與 Grüneisen 參數，對溫度的變化關係如下圖：

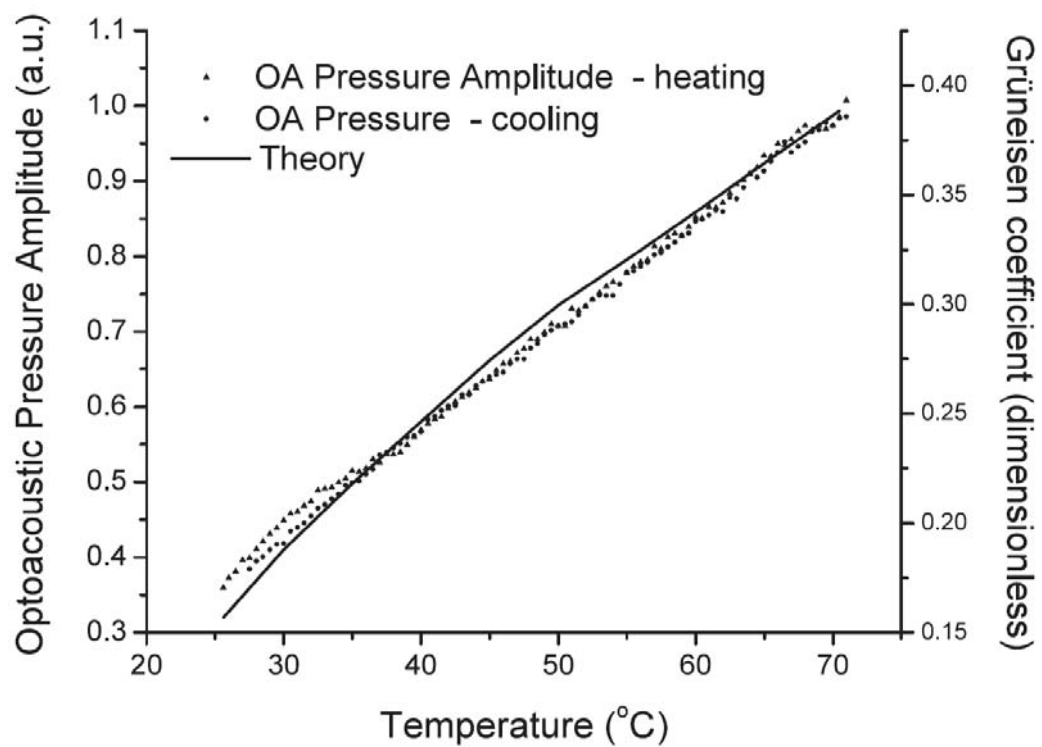


圖2-4 鉀鉻酸(potassium chromate)水溶液在不同溫度下，呈現的光聲信號強度與Grüneisen參數變化呈現正比例關係(Larina et al. 2005)。



2.4 影響解析度的因素

2.4.1 解析度

本研究的目標，在於利用光聲信號，結合光聲造影的技巧，重組出定量式熱影像(quantitative thermal imaging)。因此在解析度方面，著重於空間解析度與溫度解析度兩個面向。解析度的基本概念，就是兩個不同信號可分辨的最小差值，在空間解析度方面，為兩個可分辨的點之最小距離，而溫度解析度則為兩個可分辨熱狀態的最小溫度差額。

2.4.2 空間解析度

本系統利用脈衝式雷射進行光聲造影的方式，達到空間定位的目標，故系統的空間解析度，與使用的超音波探頭有關，並影響光聲造影的影像品質。決定超音波空間解析度的因素，包括探頭活動孔徑(active aperture)的尺寸、探頭中心頻率(central frequency)、探頭頻寬(bandwidth)，以及選擇的對焦深度(focal depth)。空間解析度包括兩個概念，即「橫向解析度」(lateral resolution)與「軸向解析度」(axial resolution) (p. 22, Szabo 2004)。

橫向解析度是指同一平面上，兩個獨立的點，系統所能分辨的最小距離。橫向解析度等於波束寬度(beam width)，所以探頭寬度愈窄，橫向解析度愈高。一般使用的對焦深度與孔徑的比值(focal-depth-to-aperture)為5，半功率波束寬度(half power beam-width)約為中心頻率的2倍波長。橫向的空間解析度可估算為 $LR\text{ (mm)} = 2C_s/f_c = 3/f_c\text{ (MHz)}$ ，其中 C_s 為聲速(1540 m/s)， f_c 為探頭中心頻率(MHz) (p. 22, Szabo 2004)。最佳的橫向解析度位於對焦深度附近，臨床常使用的探頭中心頻率為1-10MHz，因此橫向解析度約為3000-300 μm ，若使用中心頻率為20MHz的高頻超音波探頭，橫向解析度可達150 μm 。

軸向解析度又稱為縱向解析度，為前後兩個反射體(reflector)，所能被系統

(如超音波螢幕)分辨的最小距離(minimal reflector separation)。軸向解析度等於空間脈衝長度(spatial pulse length)的一半，所以脈衝愈短，軸向解析度愈高(p. 76, Kremkau 2006)。例如，10MHz的超音波系統，波長為 $1540/10\text{MHz} = 0.154\text{ mm}$ ，若每個脈衝有三個循環(cycle)，則脈衝長度為三倍波長，亦即 0.462 mm ，故軸向解析度為 0.231 mm 。在每個脈衝有三個循環的情況下，中心頻率為20MHz的高頻超音波探頭，理想上的橫向解析度可達 $115\text{ }\mu\text{m}$ 。

2.3.3 溫度解析度

本實驗系統利用光聲信號強度與Grüneisen參數成正比的關係式：

$$P(z) = \left(\frac{\beta C_s^2}{C_p}\right) \mu_a F(z) = \Gamma \mu_a F_0 e^{(-\mu_a z)}$$
，進一步化簡得 $T(z) = cP(z) + d$ ，若可知信號強度 $P(z)$ ，則可換算得溫度 $T(z)$ 。我們利用脈衝式雷射產生光聲信號，如果雷射系統的每個脈衝能量皆恒定，則溫度與信號強度可完美地對應，然而在實際情況下，脈衝式雷射的輸出並不是恒定的，所以在相同組織溫度的情況，能量較高的脈衝，會造成較高的光聲信號強度，反之亦然，這個現象造成測量誤差的來源。因此，脈衝式雷射的穩定度成為限制溫度解析度的重要因素。

第三章 實驗方法

3.1 實驗所用之高頻光聲探頭與雷射系統

我們製造數個自行設計的超音波探頭，具中心頻率(central frequency) 20 百萬赫茲，分頻寬(fractional bandwidth) 50%，聚焦深度(focal depth) 9.5 mm-12 mm，採用鈮酸鋰(LiNbO₃, lithium niobate)為壓電材料(piezoelectric material)，在實際操作下，此探頭的空間解析度約為 200-300 μm 。該探頭中心配置一條直徑 600 μm 的同軸光纖導管(Thorlabs, Newton, NJ)，實驗前先使用由粗而細的砂紙研磨光纖兩端。該光纖可發出同軸脈衝式雷射光束(LOTIS TII Ltd., Minsk, Belarus)，並同時以超音波探頭進行聲波接收。此探頭之設計目標，在於達到高解析度的光聲造影系統，並同時進行空間熱影像的精確定位，如下圖所示。

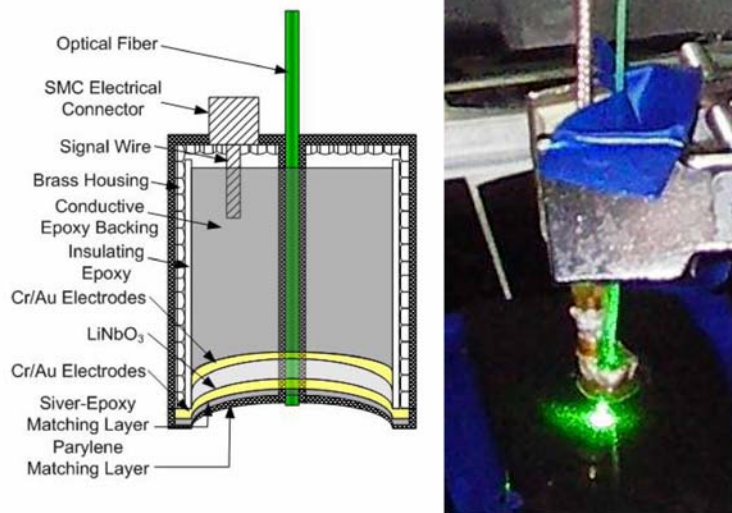


圖 3-1 自行設計的光聲實驗超音波探頭。使用同軸光纖管(coaxial optical fiber)穿過超音波探頭中心，以便同時發射脈衝雷射，並反向式(backward)接收光聲信號。

我們利用低能量(約2-3mJ/pulse)的脈衝式鈹雅各雷射(Nd: YAG laser, 532 nm, LOTIS TII, LS-2137)與可調式鈹藍寶石雷射(tunable Ti: sapphire laser, 800 nm, LOTIS TII, LS-2132)產生光聲信號。雷射脈衝寬度(pulse width)約為5-6 ns, 光束直徑(beam size)為4mm, 脈衝頻率則為15Hz, 並以光纖傳導至仿體表面。同時將脈衝雷射的能量調低, 使其造成的組織加熱效應不明顯, 小於針型熱電偶溫度探針所能偵測的下限。

在模擬熱治療的實驗中, 利用連續波雷射(continuous wave mode laser, 簡稱CW laser)為熱源, 照射關注區域(region of interest, ROI)。仿體分別以低功率連續波雷射(808 nm, 660 mW, ONSET Electro-optics, Taipei, Taiwan)與高功率可調式連續波雷射(808 nm, 最高10W, Newport, CA, USA)照射。雷射系統的能量, 使用雷射能量功率計(laser energy meter & power meter, Ophir Laser Measurement Group, North Logan, UT, USA)監測。



圖 3-2 高功率可調式連續波雷射(808 nm, 最高 10W, Newport, CA, USA)之雷射二極體(laser diode)



圖 3-3 高功率可調式連續波雷射(Newport, CA, USA)之雷射二極體控制器(Laser diode driver)



圖 3-4 高功率可調式連續波雷射(Newport, CA, USA)之溫度控制器(temperature controller)



圖3-5 雷射能量功率計(Ophir Laser Measurement Group, North Logan, UT, USA)

3.2 仿體實驗架構

在仿體實驗中，為驗證光聲信號與溫度的關係，採用數種實驗仿體，包括黑色頭髮、光纖管、溶有不同濃度石墨粉(0.80%, 0.40%, 0.20%, 0.10%, 0.05%)的瓊脂糖(agarose)仿體、具有染料與玻璃散射子核心的瓊脂糖仿體，以及吸收波峰 520 nm 與 792 nm 的金奈米桿 (gold nanorods, AuNR800)水溶液(注射於內徑 0.58mm/ 外徑 0.965mm 的動物插管 polyethylene tubing, PE-50)，研究不同溫度下的光聲信號特性，並以連續波雷射照射金奈米粒子，探討表面電漿共振效應產生的加熱反應所引發的光聲信號變化。金奈米桿長度 38.6 ± 4.8 nm，長寬比(aspect ratio) 4.3 ± 0.6 。這些仿體皆浸置於可調控仿體溫度的熱水浴槽(thermal bath tank)中。

為探討熱效應對光聲信號的影響，我們除了以熱水浴槽或連續波雷射加熱仿體之外，亦試驗以波長 532 nm 的脈衝式鈦雅各雷射，加熱溶有不同濃度石墨的瓊脂糖仿體。使用 Fluke® 軟體串聯針型熱電偶與數位式三用電表，如下圖所示，並以雷射功率計測量，得知雷射功率為 310 mW。將超音波光聲探頭(對焦深度 9.5 mm)置於仿體上方，針型熱電偶由側面插入(距仿體表面 10mm)，然後以脈衝式雷射直接照射不同石墨濃度之仿體。在 0-40 sec 時，監測雷射未照射下的溫度，在 40 sec-4 min 時，啟動脈衝式雷射，並監測溫度，在 4 min 時，關閉脈衝式雷射，並於 4-5 min 時，觀察雷射未照射下的溫度。同步接收溫度與光聲信號，並以 Matlab 撰寫程式分析。



圖 3-6 針型熱電偶與數位式三用電表

金奈米粒子使用電化學(electrochemical)方法合成，並均勻分布於水溶液中 (Li PC et al. 2007)，如下圖所示：

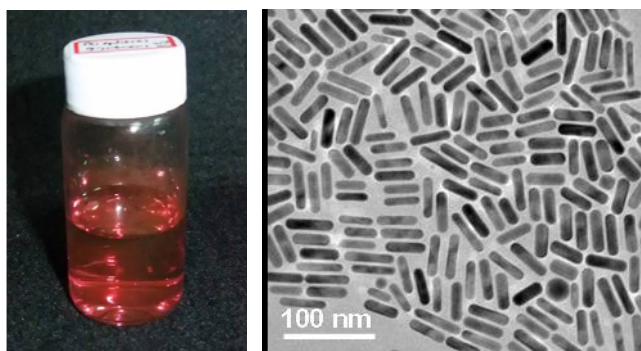


圖 3-7 金奈米粒子水溶液(吸收波峰為 520 nm 與 792 nm)，金奈米桿長度 38.6 ± 4.8 nm，長寬比(aspect ratio) 4.3 ± 0.6 。(奈米粒子樣本與顯微鏡照片由中正大學王崇人老師實驗室提供)

在模擬熱治療的實驗中，仿體以連續波雷射照射，並浸於熱水浴槽中。在關注區域(region of interest, ROI)附近置放針型電熱偶(fine-needle thermal couple)，但雷射光束並未直接照射於該裝置。針型電熱偶的準確度可達 0.1°C (EDL NCF-06GS4TL3M, Danville, VA, USA)，偵測的信號傳遞至數位式多功能三用電表(digital multimeter)讀取(Fluke Model 189 True RMS Multimeter, Everett, WA)。

光聲信號傳送到超音波信號觸發接收器(Model 5077PR，前置放大器 pre-amplifier) (5077PR, Panametrics, Waltham, MA)(圖 3-8)，使用取樣頻率 200 百萬赫茲的 12 位元類比數位轉換卡(12-bit data acquisition card)收集(CompuScope 12100, Gage, Lachine, QC, Canada)，並以光偵測器(photodetector)驅動(ET-2020, Electro-Optics Technology, Inc., Traverse City, MI)。整體實驗系統使用 LabVIEW[®]編譯的軟體 3dCS14200_1.vi(自行編譯)調控(圖 3-9)，並

截取光聲信號，最後以 MATLAB® 軟體分析數據。實驗架構圖示如圖 3-10。



圖 3-8 超音波信號觸發接收器(Model 5077PR，前置放大器 pre-amplifier)
(5077PR, Panametrics, Waltham, MA)

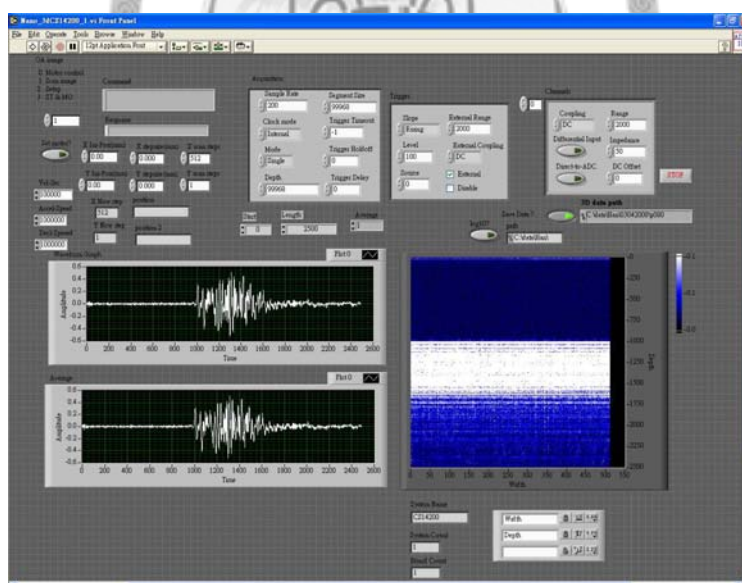


圖 3-9 自行編譯的 LabVIEW® 軟體 3dCS14200_1.vi

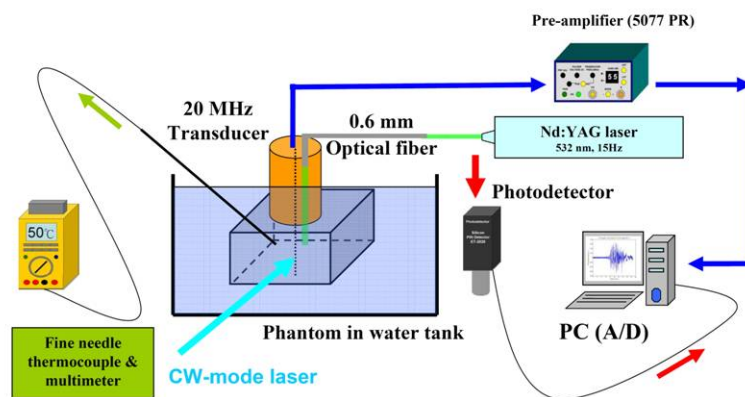


圖 3-10(a) 實驗架構(一) 塊狀仿體

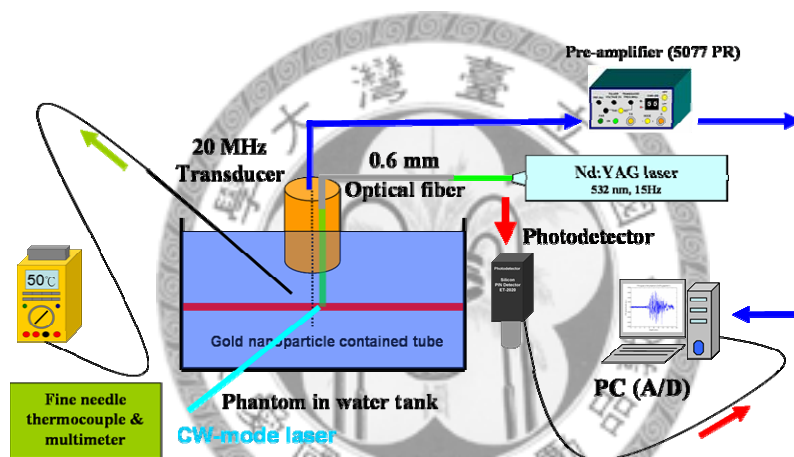


圖 3-10(b) 實驗架構(二) 金奈米粒子水溶液

3.3 活體實驗架構

在活體實驗中，我們利用「非肥胖糖尿病-重症聯合免疫缺陷」(Non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency，簡稱NOD-scid)雄性小鼠為實驗動物，將口腔鱗狀細胞癌(oral squamous cell carcinoma)細胞株OECM1接種至背部皮下部位(圖3-11，圖3-12)，大約在接種後10-15日，待癌細胞發育後，可用於活體實驗。

實驗全程使用isoflurane (2% with Matrx VIP-3000 veterinary anesthetic vaporizer)進行全身麻醉，避免動物的活動影響實驗，並供應氧氣(700 ml/min flow rate)。以皮下注射方式，將金奈米粒子打入腫瘤部位後，以低功率連續波雷射(808 nm, 660 mW, ONSET Electro-optics, Taipei, Taiwan)或高功率可調式連續波雷射(808 nm, 最高10W, Newport, CA, USA)照射，進行雷射誘導電漿光熱治療。在此同時，使用波長可調脈衝式Ti-sapphire 雷射 (800 nm, 2.5 mJ/pulse, pulse duration 16 ns, CF-125, SOLAR TII, Minsk, Belarus)產生光聲信號。光聲超音波探頭架設於精密調節平台(precision translation stage, HR8, Nanomotion, Yokneam, Israel)，並以步距0.2 mm的方式，利用運動控制器(motion controller, DMC-1842, Galil Motion Control, Rocklin, CA)進行一維截面掃描，以重建光聲影像。



圖3-11 接種至小鼠背部的口腔鱗狀細胞癌細胞株OECM1

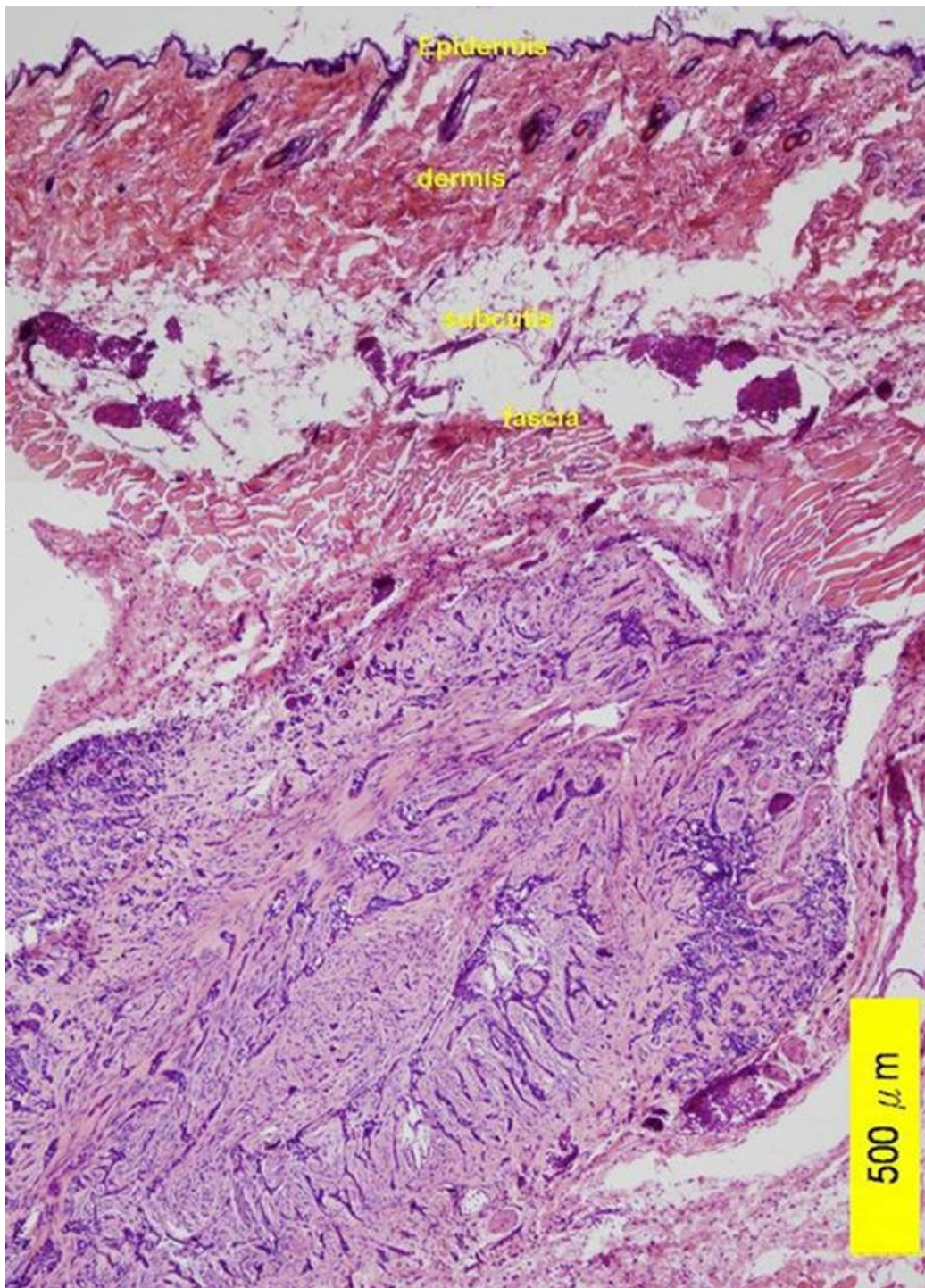


圖3-12 鱗狀細胞癌腫瘤與皮膚相關位置的組織病理切片圖(H&E stain, x40)

關注區域(region of interest, ROI)的溫度，同時使用準確度達 0.1°C 的針型熱電偶(EDL NCF-06GS4TL3M, Danville, VA, USA)量測，並以數位式三用電表

(Fluke Model 189 True RMS Multimeter, Everett, WA)讀取數據。光聲信號傳送至前置放大器(pre-amplifier, 5077PR, Panametrics, Waltham, MA)，以200MHz的頻率，使用12位元資料擷取卡(12-bit data acquisition card, CompuScope 12100, Gage, Lachine, QC, Canada)取樣，並以光偵測器(photodetector, ET-2020, Electro-Optics Technology, Inc., Traverse City, MI)驅動資料擷取卡。

利用自行以LabVIEW[®]軟體編譯的程式，協調整個系統，最後使用MATLAB[®]軟體分析取得的數據。整體實驗架構顯示於圖3-13，活體實驗過程中的維生系統與光聲探頭相關位置如圖3-14。

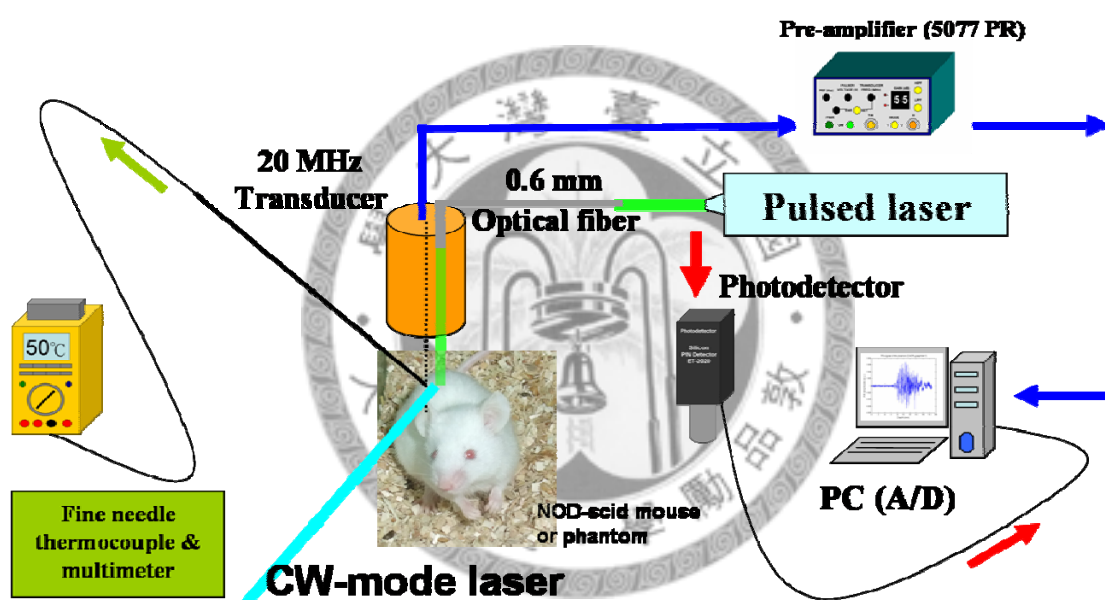


圖 3-13 活體實驗的系統架構圖。在活體實驗中，以 NOD-scid 雄性小鼠為實驗動物，將口腔癌(oral squamous cell carcinoma)細胞株 OECM1 接種至皮下部位。

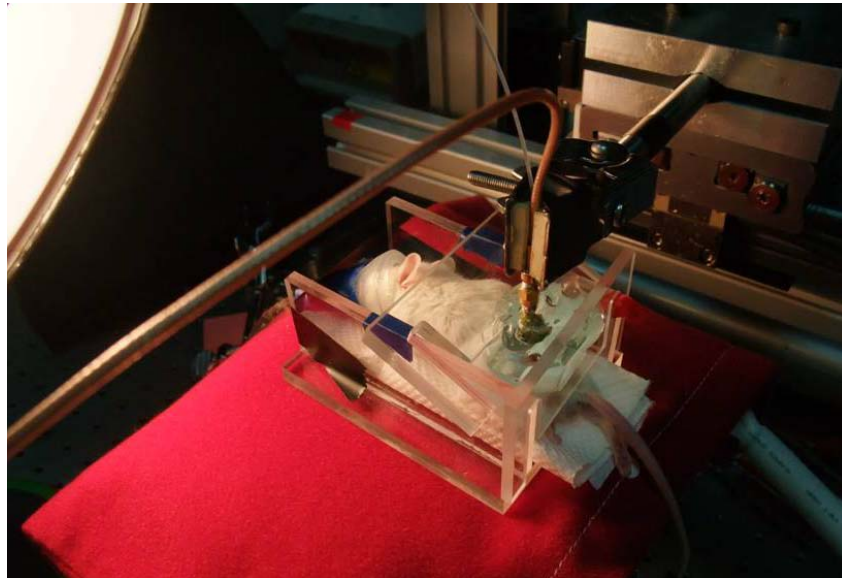


圖3-14 活體實驗過程中的維生系統與光聲探頭相關位置，實驗全程使用 isoflurane (2% with Matrx VIP-3000 veterinary anesthetic vaporizer)進行全身麻醉，並供應氧氣(700 ml/min flow rate)，動物腹部以保暖墊加熱，並佐以烤燈避免動物失溫。腫瘤表面與光聲探頭之間，塗抹超音波凝膠，做為系統的聲阻匹配層 (impedance matching layer)。

第四章 實驗結果與討論

4.1 光聲信號產生的位置與振幅

光聲信號產生的位置在吸收係數改變的邊界處，但對水溶液這類對光線為均勻吸收的介質，不存在光吸收係數改變的邊界，其聲源分布來自「等效光場」的分布。等效光場相當於雷射光有效穿透的距離，光線在介質中行進時，因吸收與散射現象，造成能量衰減的變化，設光在介質中的等效衰減係數為 μ_{eff} ，參考(2.2.19)式，可知光的能量傳遞函數為 $F(z) = F_0 e^{-\mu_{eff} z}$ ，其中 z 為深度， F_0 為光通量初始值， $F(z)$ 為該深度的光通量。隨著行進距離的增加，光通量呈現指數衰減的趨勢，若能量衰減至小於初始能量的 e^{-1} 時，可忽略光通量所造成的物理效應，因此可推論雷射光有效的穿透距離為衰減係數的倒數 $1/\mu_{eff}$ ，此距離即為「等效光場」(p. 27, Hsu 2006)。

吸收係數均勻的介質並無吸收係數變化的邊界，所以等效光場的分布可代表光聲信號的聲源分布；但對吸收係數不均勻的介質而言，其聲源分布，來自吸收係數變化的邊界與等效光場的交集(p. 27, Hsu 2006)。

由(2.3.1)式可知，光聲信號的振幅 $P(z) = \left(\frac{\beta c^2}{C_p}\right) \mu_a F(z) = \Gamma \mu_a F_0 e^{(-\mu_a z)}$ ，其中的 $\beta [1^\circ\text{C}^{-1}]$ 為熱體積膨脹係數(thermal volume expansion coefficient)， $c [\text{ms}^{-1}]$ 為聲速(sound speed)， $C_p [\text{Jg}^{-1}\text{C}^{-1}]$ 為等壓比熱(heat capacity at constant pressure)， $\mu_a [\text{cm}^{-1}]$ 為吸收係數(absorption coefficient)， $F [\text{Jcm}^{-2}]$ 則為雷射通量(fluence)。振幅 $P(z)$ 受兩大因素影響，即 Grüneisen 參數(Grüneisen parameter) Γ 與吸收係數 μ_a ，其中 Grüneisen 參數為溫度的線性函數，而吸收係數與物質特性有關。

以溶有不同濃度石墨粉的瓊脂糖仿體為例，於 49.7°C 的溫度下，石墨濃度 0.80% 瓊脂糖的光聲信號如圖 4-1：

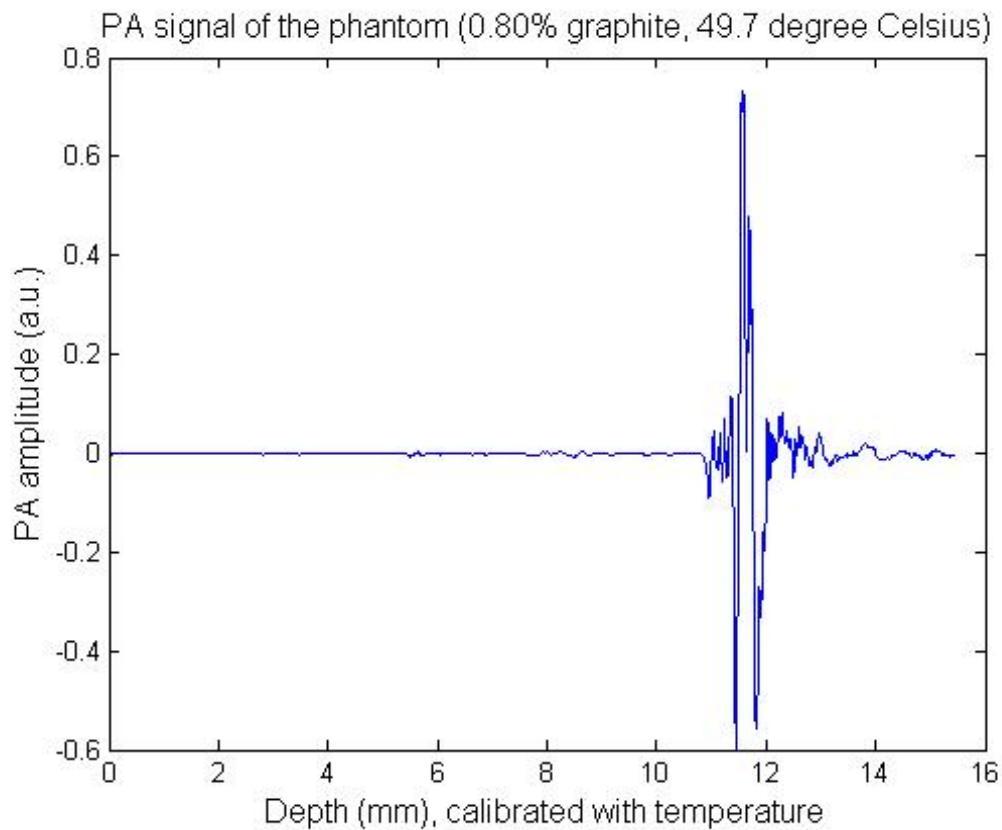
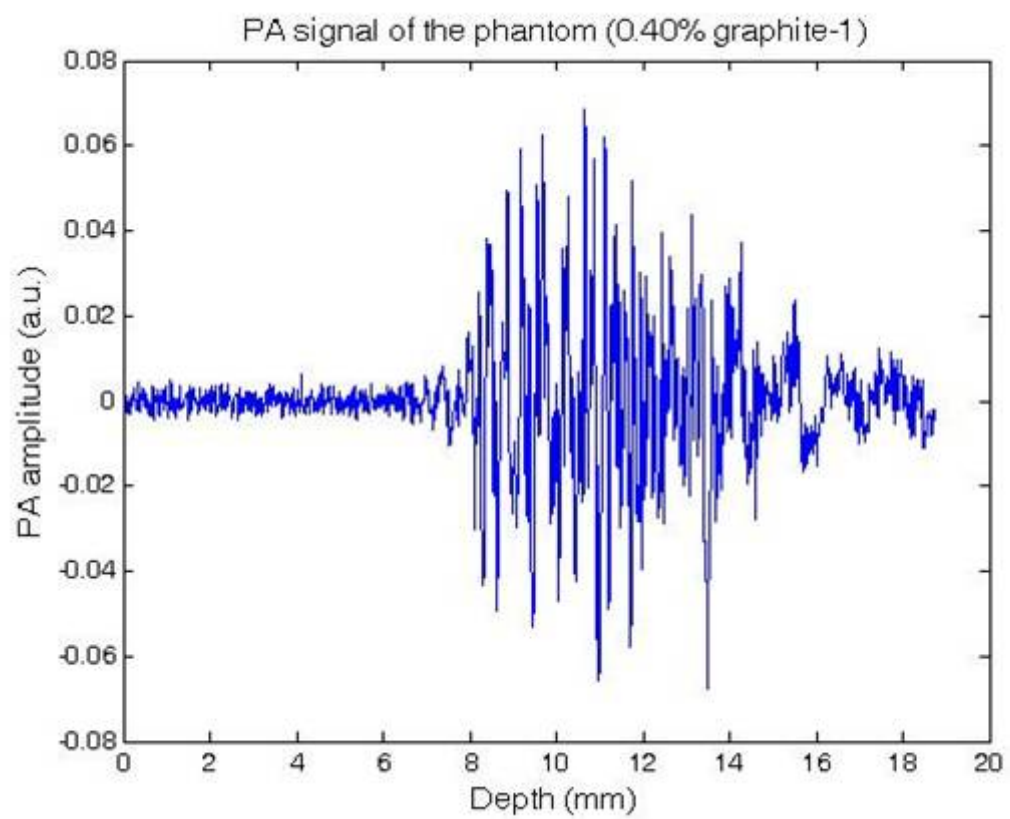
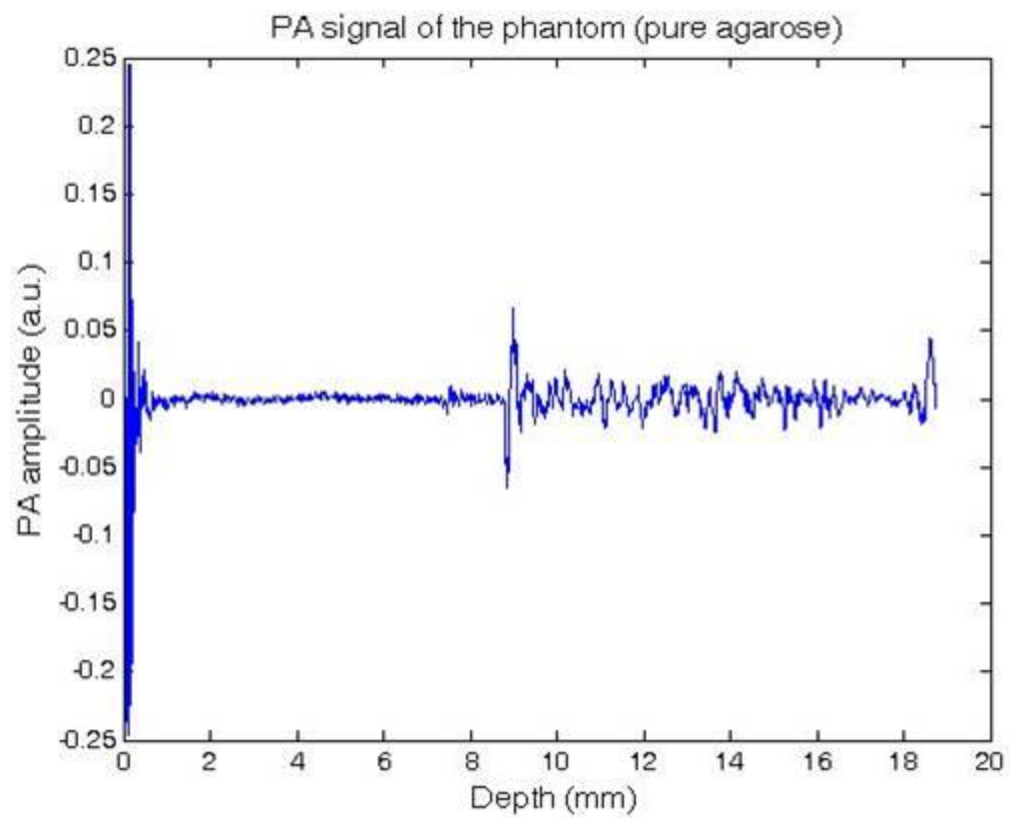


圖 4-1 石墨濃度 0.80%瓊脂糖，於 49.7°C 的溫度下，光聲信號的振幅與空間分布（聚焦深度 12 mm）

進一步比較各種不同濃度石墨粉的瓊脂糖仿體(0.80%, 0.40%, 0%)之光聲信號，可發現光聲信號的振幅的確與仿體中的石墨濃度相關，石墨濃度愈高，則雷射光的吸收係數愈高，因此振幅愈大。將各不同時序之信號疊加如圖 4-2：



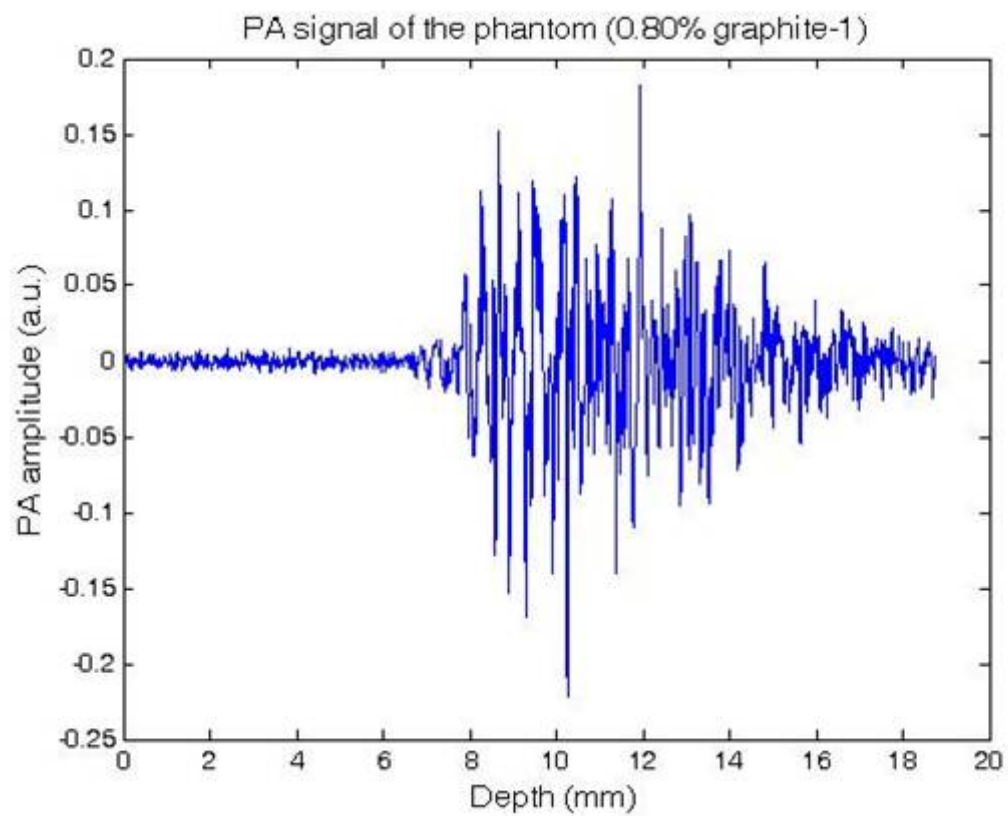


圖4-2 光聲信號的振幅與仿體石墨濃度相關，石墨濃度愈高，則雷射光的吸收係數愈高，因此振幅愈大。本圖仿體中的石墨濃度，由上至下依序為0%、0.40%、0.80%。

4.2 溫度對吸收係數之影響

本研究的理論基礎為(2.3.1)式，亦即下列光聲信號強度 $P(z)$ 與Grüneisen參數 Γ 的方程式：

$$P(z) = \left(\frac{\beta c^2}{C_p}\right) \mu_a F(z) = \Gamma \mu_a F_0 e^{(-\mu_a z)}$$

其中 μ_a [cm^{-1}] 為吸收係數， F [Jcm^{-2}] 為雷射光通量，而 z 為位置[cm]。基本假設在於 Grüneisen 參數 Γ 為溫度的函數，而吸收係數 μ_a 、雷射光通量 F ，以及位置 z 皆為溫度無關。雷射光通量 F 受到脈衝式雷射輸出的影響，為固定的實驗參數，而位置 z 則與光聲超音波探頭的聚焦深度有關，亦為固定的實驗參數。至於吸收係數 μ_a ，是否的確與溫度無關，則尚待釐清。

我們在不同溫度下，針對呈現洋紅色(carmine)的壓克力廣告顏料(acrylic colors)水溶液，以積分球(integrating sphere)測定其吸收係數(圖4-3)。

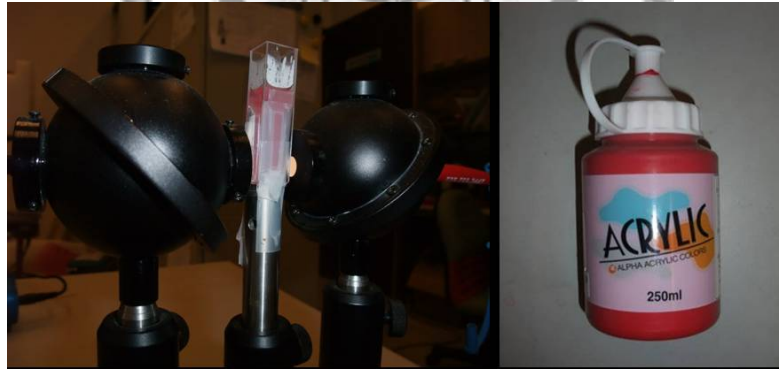


圖4-3 以積分球(integrating sphere)測定不同溫度下，廣告顏料(acrylic colors)水溶液的吸收係數變化。

我們測量了五種不同溫度下的吸收係數：40.2°C、34.6°C、29.6°C、28.5°C、28.2°C，其中28.2°C測量三筆，做為觀察系統誤差(systemic errors)的內部控制(internal control)實驗。由積分球的測定結果，顯示吸收係數與溫度變化無關，結果如下圖。

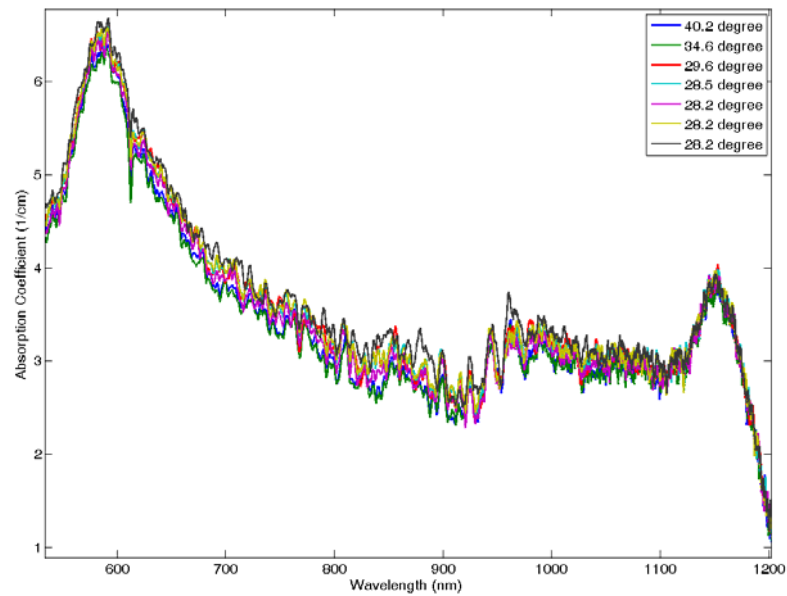


圖4-4 不同溫度下，洋紅廣告顏料水溶液對各種波長的吸收係數。

針對光波波長800 nm為中心，上下5 nm的範圍，將上圖放大如下：

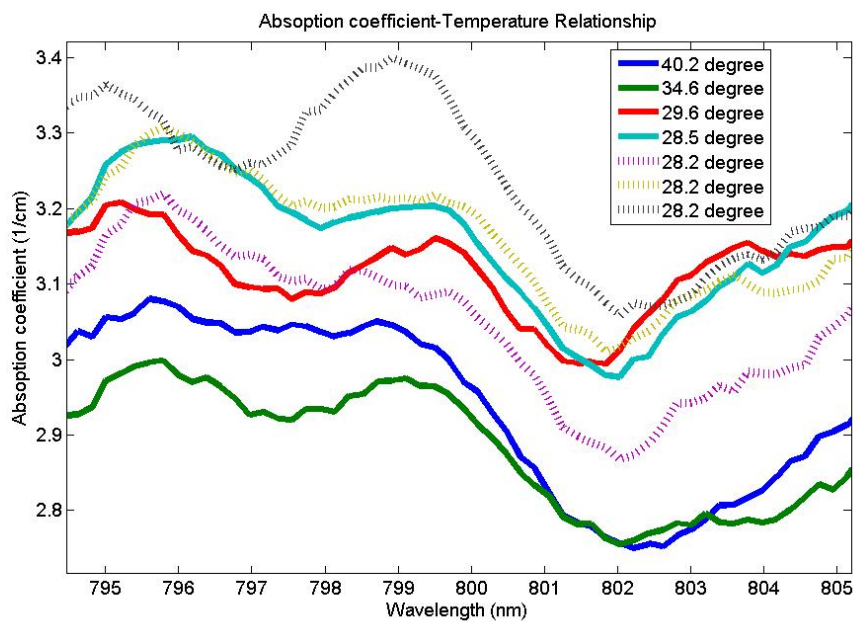


圖4-5 不同溫度下，洋紅廣告顏料水溶液在波長800nm附近的吸收係數。

在此五種不同溫度的七筆數據中，其中攝氏28.2度共測試3筆做為控制實驗(圖中虛線)，發現吸收係數的變化應為系統誤差所致，與溫度實際變動並無關聯。

4.3 溫度對光聲信號位置之影響

我們測量了不同溫度下，溶有不同濃度石墨粉(0.80%, 0.40%, 0.20%, 0.10%, 0.05%)的瓊脂糖(agarose)仿體、具染料與玻璃散射子核心的瓊脂糖仿體、黑色頭髮、光纖管，以及吸收波峰 520 nm 與 800 nm 的金奈米桿水溶液(注射於內徑 0.58mm/外徑 0.965mm 的 PE-50 動物插管)的光聲信號，發現隨著溫度變化，光聲信號的位置也會改變。溫度會影響聲速，造成時間偏移(time shift)，使得超音波位置改變(Shah et al. 2008)；此外，熱膨脹(thermal expansion)也會使得仿體分子的相對位置改變，造成光聲信號的位移。

為免除仿體或環境本身熱膨脹造成的誤差，我們以傳遞脈衝式雷射能量之光纖尖端的光聲信號為標的，該光纖固定於超音波探頭，且體積甚小(直徑 1mm)，可合理假設光纖尖端的熱膨脹位移可忽略，其實驗結果顯示，在不同溫度下，未經聲速公式校正前，光纖尖端造成的光聲信號，這些信號散布在不同的位置。但若使用聲速校正公式，將溫度造成的誤差予以修正後，可發現這些光纖尖端產生的光聲射頻信號，可調整至相同的位置。如圖 4-6 所示：

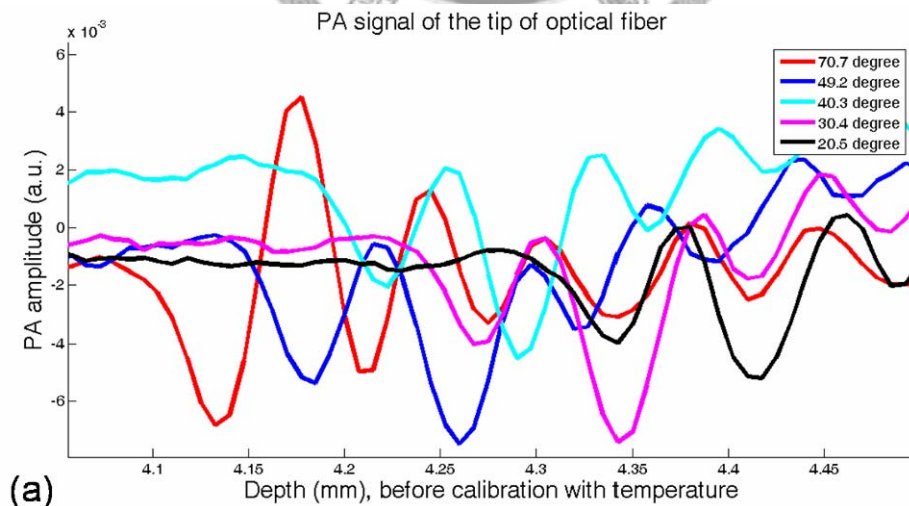


圖 4-6(a) 在不同溫度下，未經聲速公式校正前，光纖尖端造成的光聲信號，這些信號散布在不同的位置。

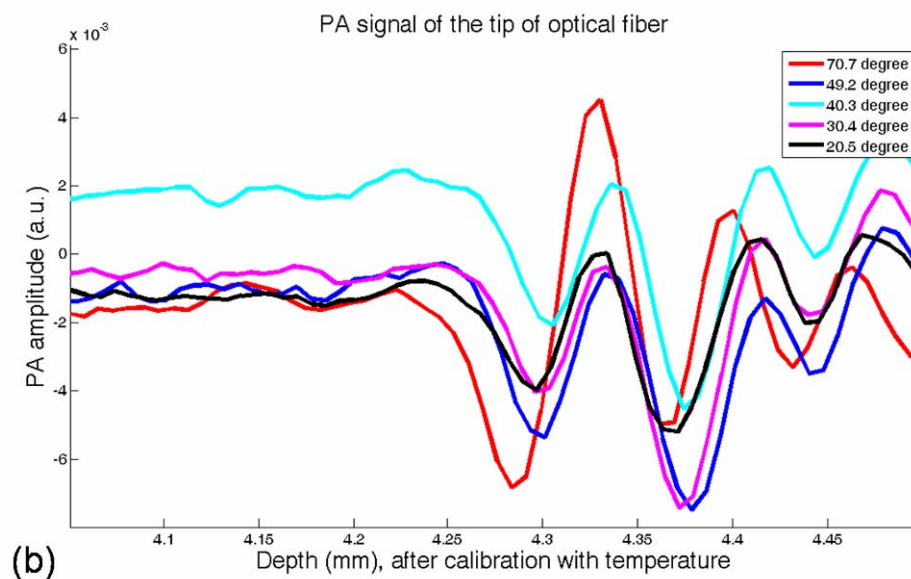


圖 4-6(b) 傳遞脈衝式雷射能量之光纖尖端的光聲信號，使用聲速校正公式，將溫度造成的誤差予以修正後，光纖尖端產生的光聲信號。光纖本身外徑極小，僅有 1 mm，且光纖架設於超音波探頭上，幾乎不受容器熱膨脹的影響，所以測量的位置與容器無關，因此其信號位置與熱膨脹無關，所以修正聲速之後，可發現這些射頻信號的尖端可調整至相同的位置。

在圖4-6(a)中，在相異溫度下，光聲信號的射譜波峰，隨著聲波的時間偏移，座落在不同的位置。這些信號可藉由聲速校正公式，例如 Marczak fifth order polynomial $C = 1.402385 \times 10^3 + 5.038813T - 5.799136 \times 10^{-2}T^2 + 3.287156 \times 10^{-4}T^3 - 1.398845 \times 10^{-6}T^4 + 2.787860 \times 10^{-9}T^5$ (valid between 0-95 °C)(Marczak 1997)，重新校正後，重疊於相同的位置，如圖4-6(b)所示。

對體積較大的仿體而言，溫度造成的熱膨脹無法忽略，因此即使針對溫度造成的聲速變化修正，相異溫度下的光聲信號，仍無法重疊於相同位置，利用此性質，可估算該物質的熱膨脹係數。以圖 4-7 所示 0.80%石墨濃度的瓊脂糖仿體光聲信號圖為例，該仿體厚度為 12 mm，因熱膨脹造成的仿體體積變化，造成 68°C 與 3.3°C 時的光聲信號尖峰相距 $-(11.4324 - 11.8294) \text{ mm} = 0.3970 \text{ mm}$ ，平均每 1°C 的

溫差，造成的信號平移量為 $0.3970/(68-3.3) = 0.00614 \text{ mm}$ 。易言之，由 68°C 變化至 3.3°C 時，不同溫度下的熱膨脹造成的信號平移量 $= 0.3970 \text{ mm}$ ；不同溫度下的聲速差異造成的信號平移量 $= 1.4775-0.3970 = 1.0805 \text{ mm}$ ；不同溫度下的聲速差異造成的測量誤差 $= (1.4775-0.3970)/0.3970 = 272.17\%$ 。該仿體的一維線性熱膨脹係數，可估算為 $0.00614/12 = 5.12 \times 10^{-4}$ 。

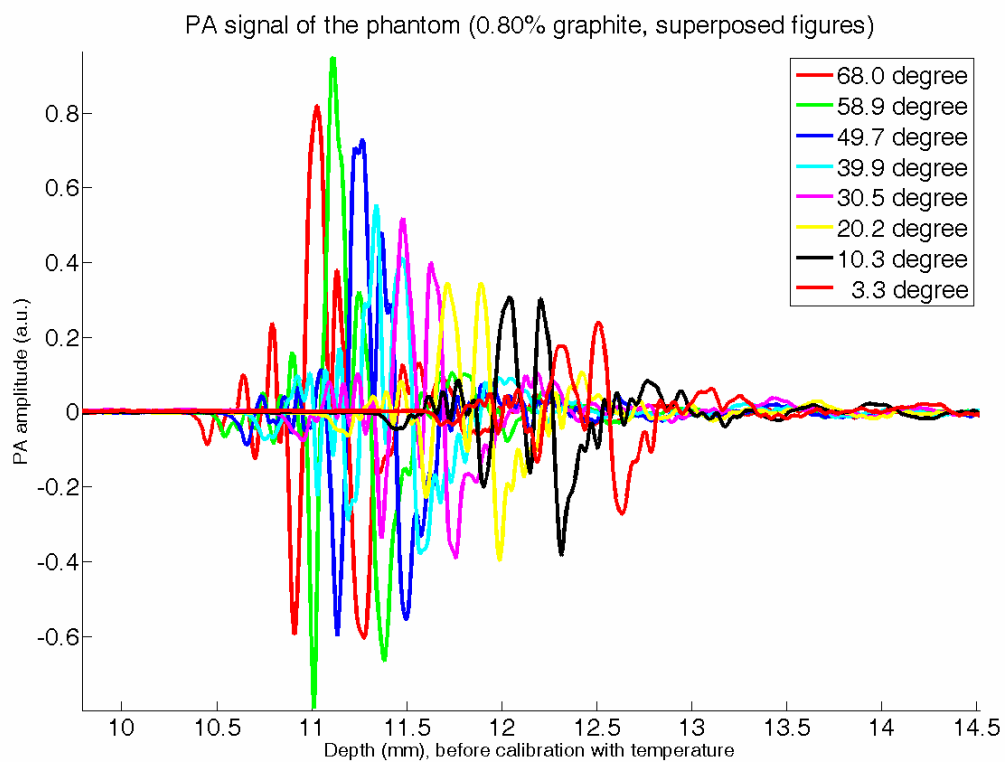


圖 4-7(a) 0.80%石墨濃度的瓊脂糖仿體，厚度為 12 mm。在針對溫度修正聲速前的光聲信號分布位置。

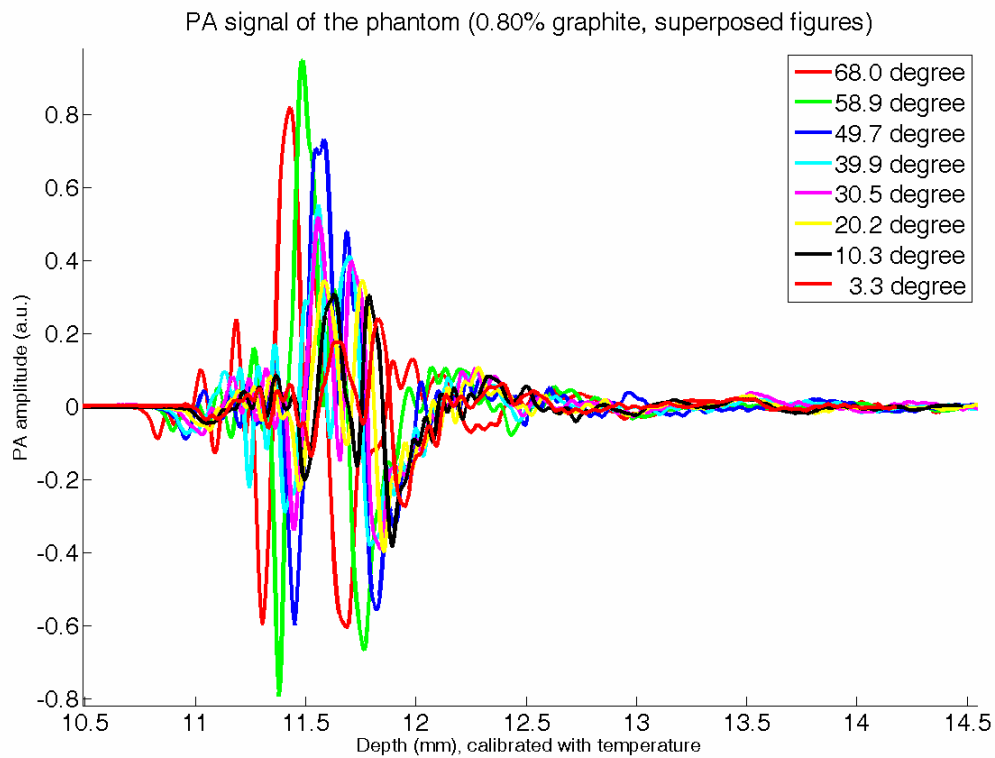
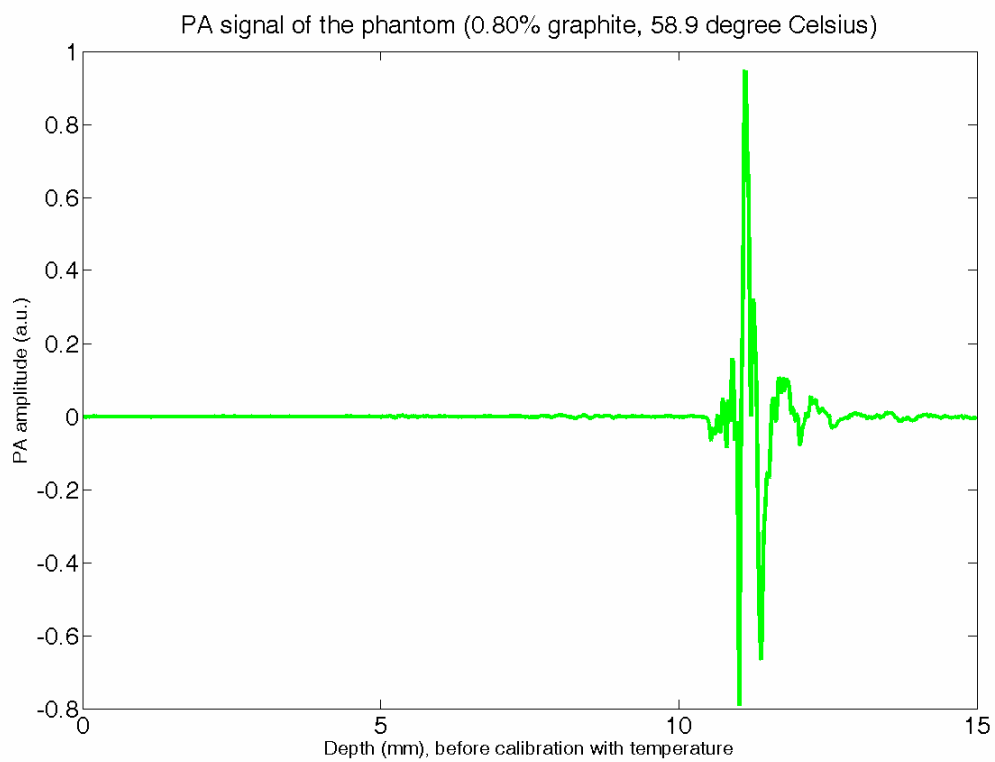
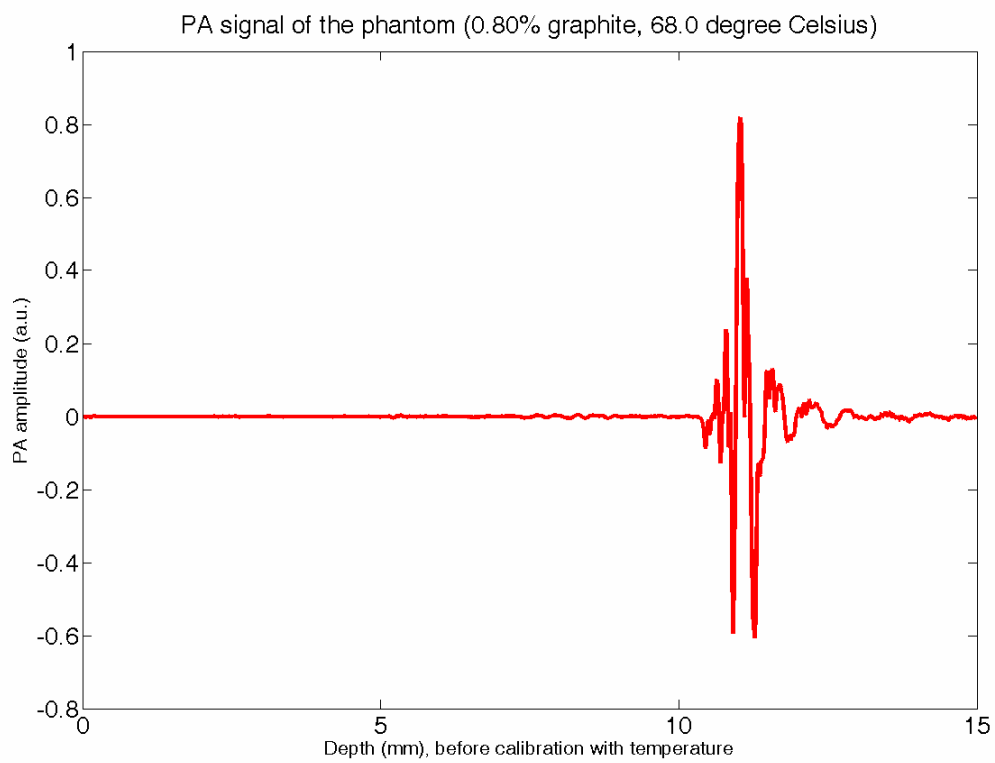
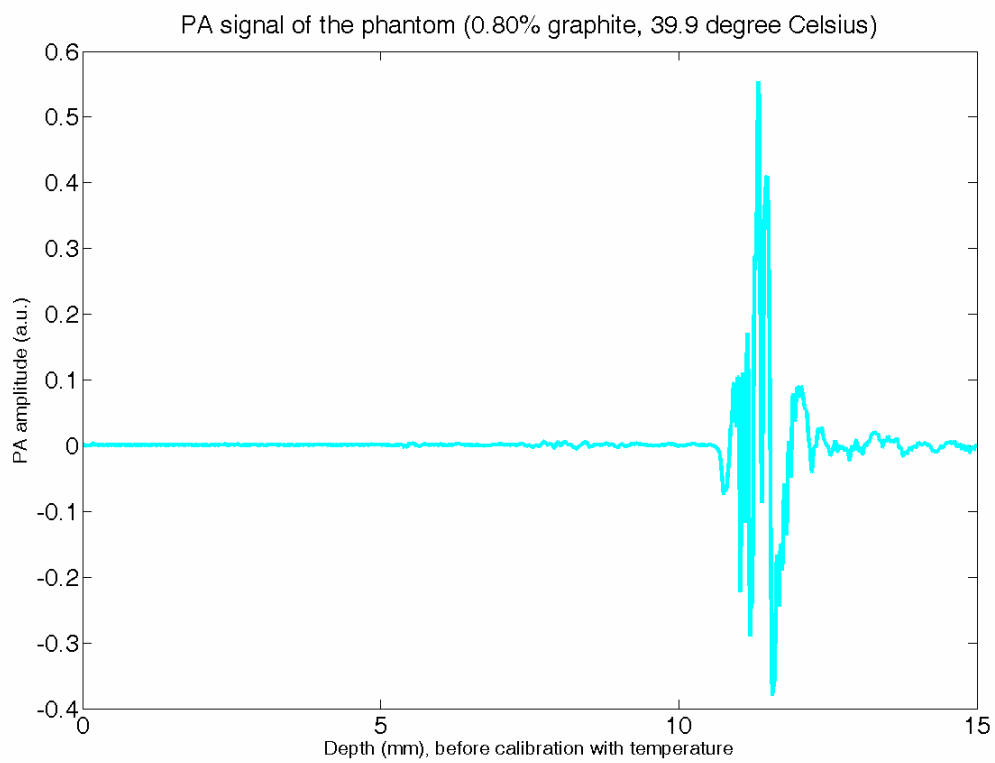
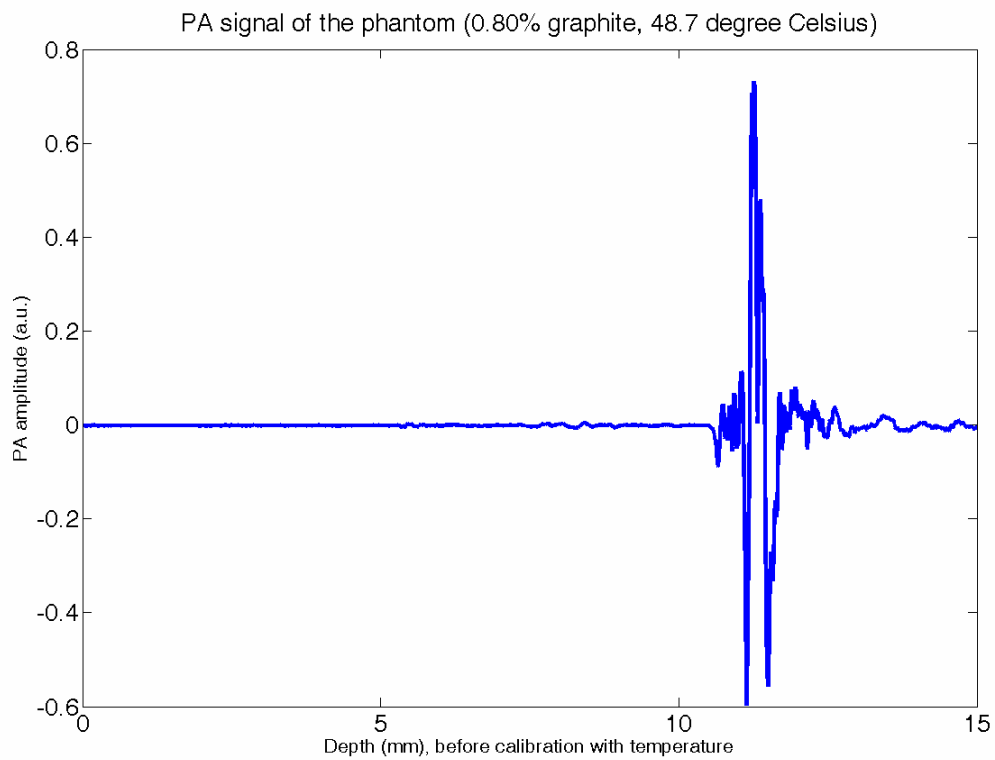


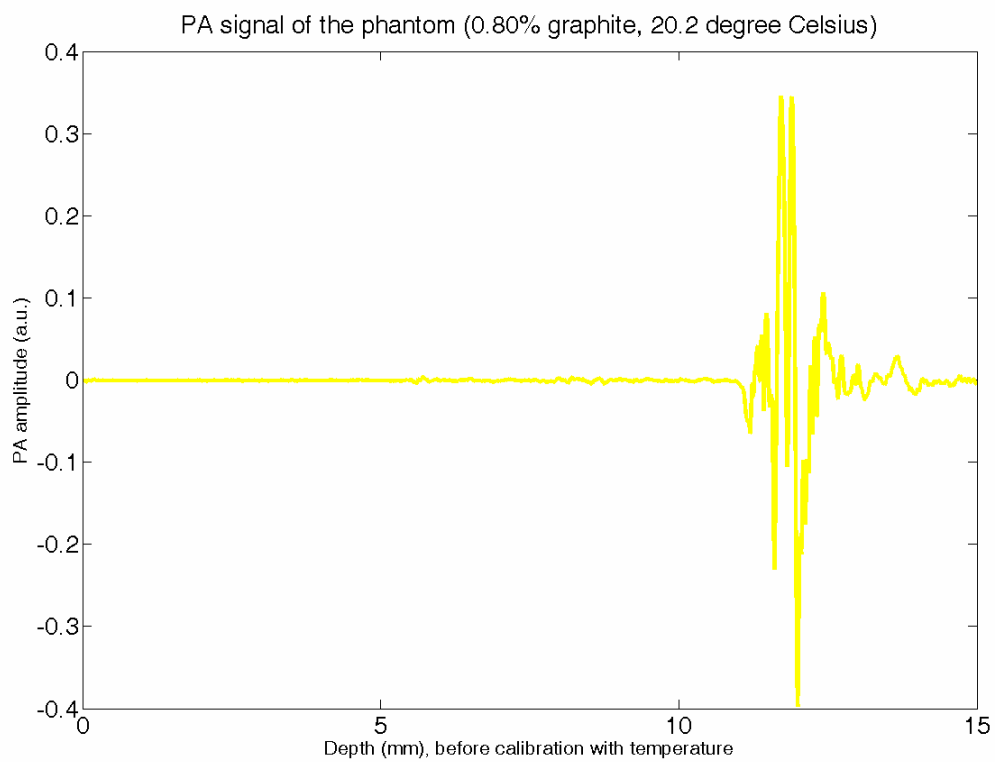
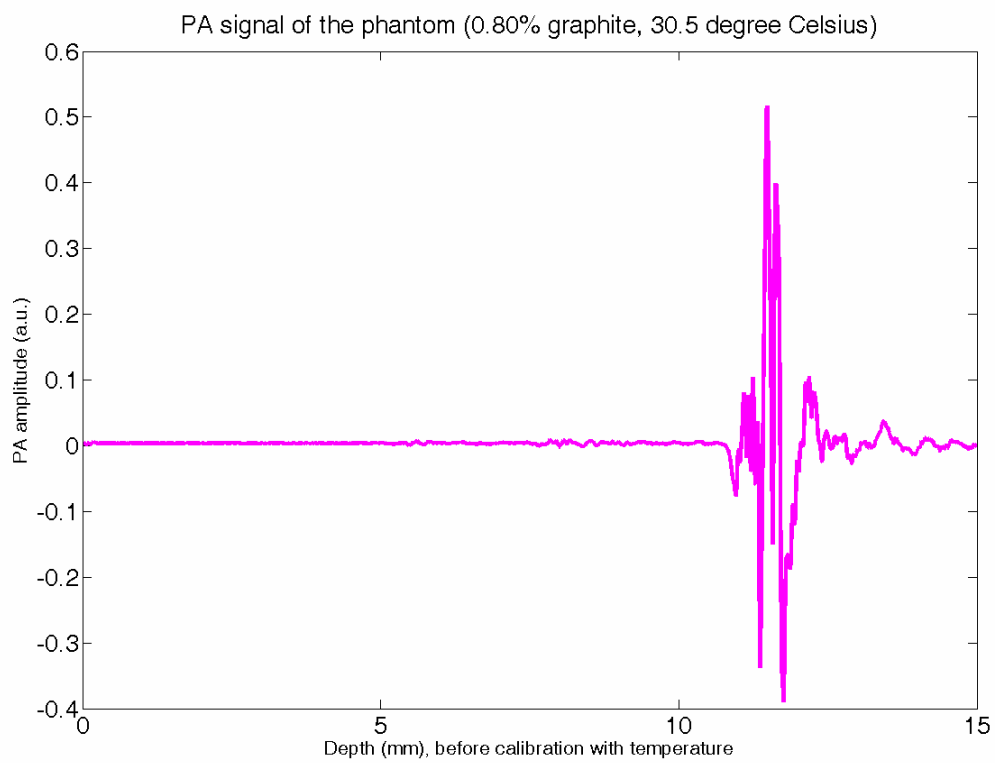
圖 4-7(b) 0.80%石墨濃度的瓊脂糖仿體，厚度為 12 mm。在針對溫度修正聲速後，因熱膨脹性質，使得 68°C 與 3.3°C 時的光聲信號尖峰相距 0.3970 mm，平均每 1°C 的溫差，造成的信號平移量為 0.00614 mm，可合理估算該仿體的一維線性熱膨脹係數為 $0.00614/12 = 5.12 \times 10^{-4}$ 。

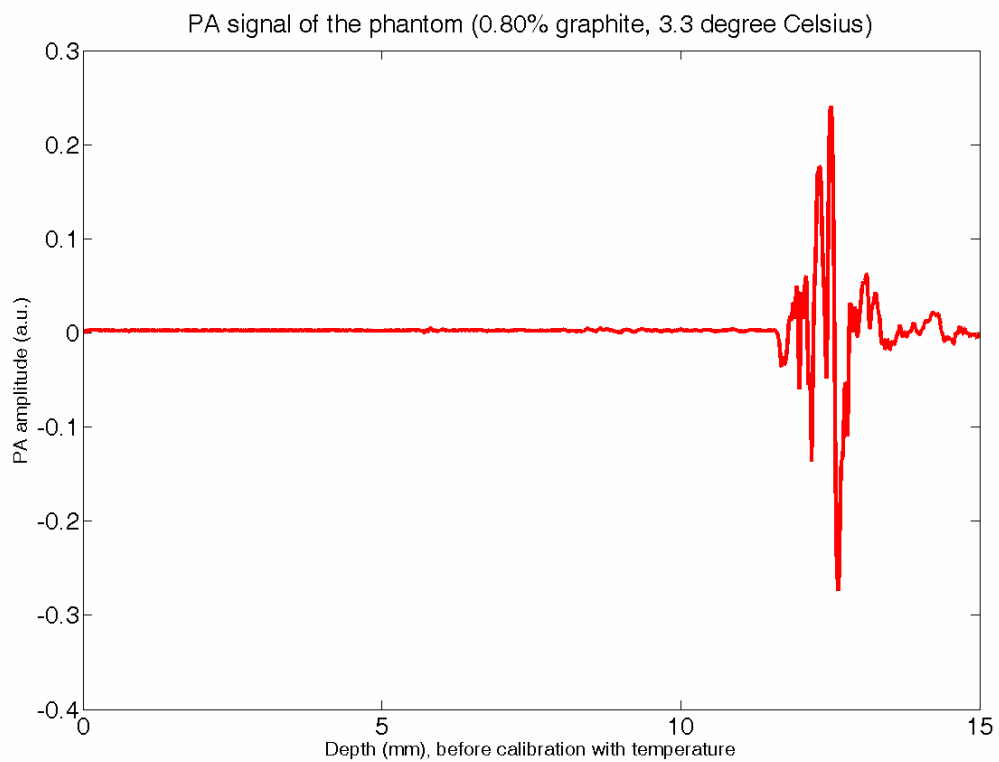
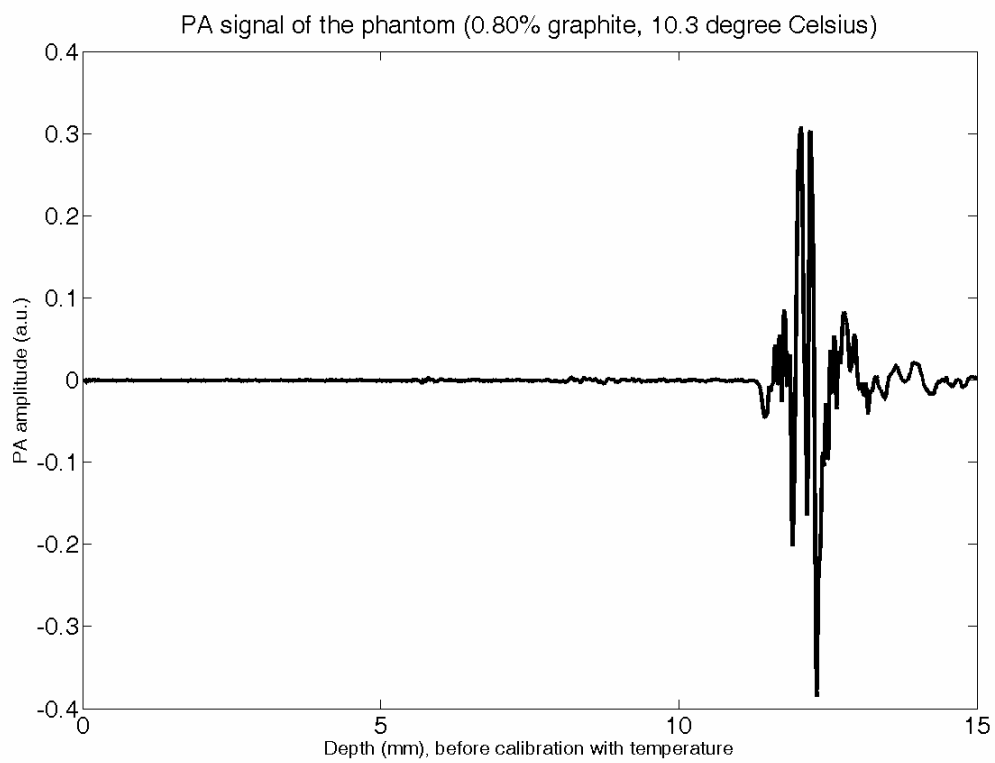
將圖 4-7 的光聲信號，依據不同溫度下的深度-光聲信號關係，拆解如下圖：

A. 尚未根據溫度，校正水中聲波速度前的曲線(圖 4-8(a))

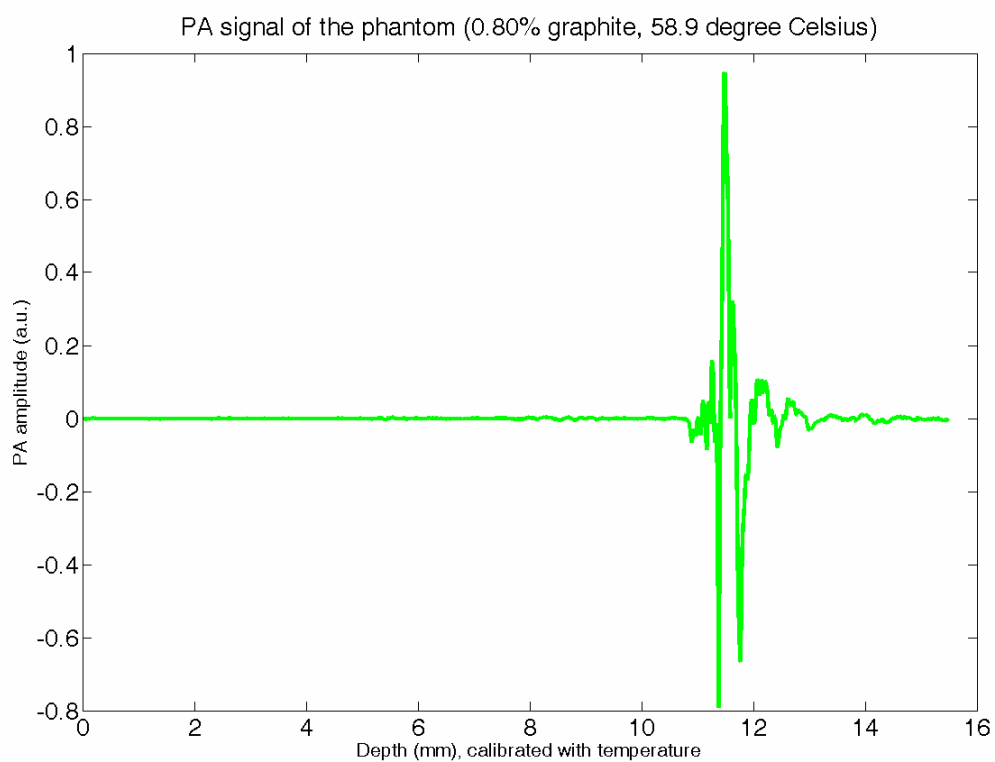
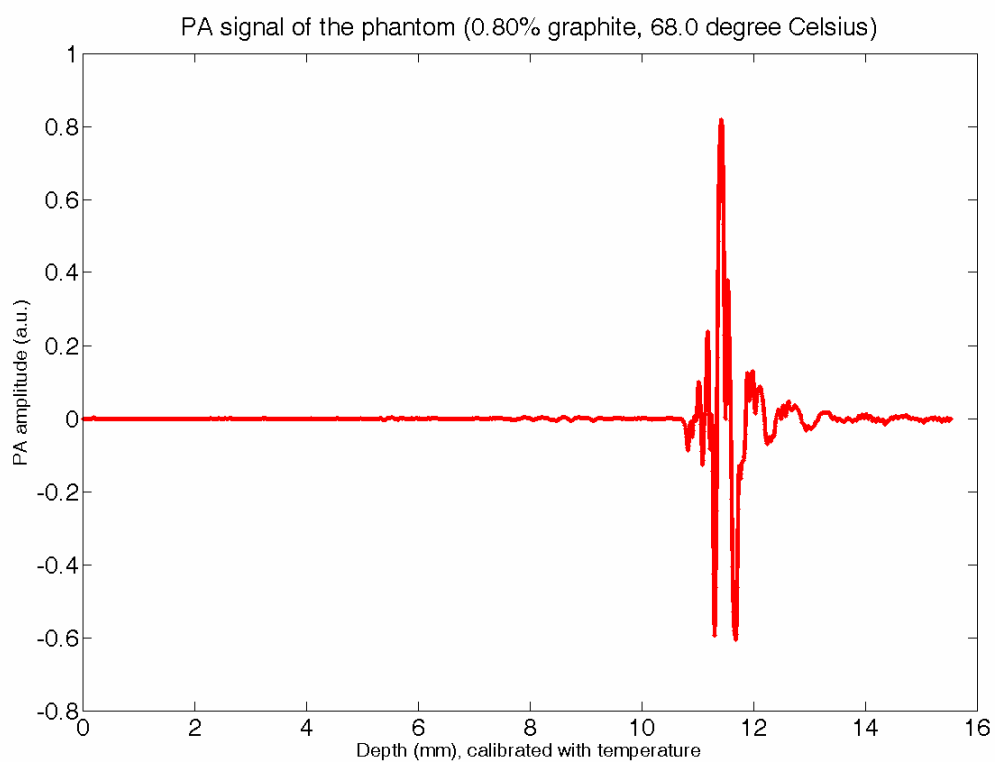


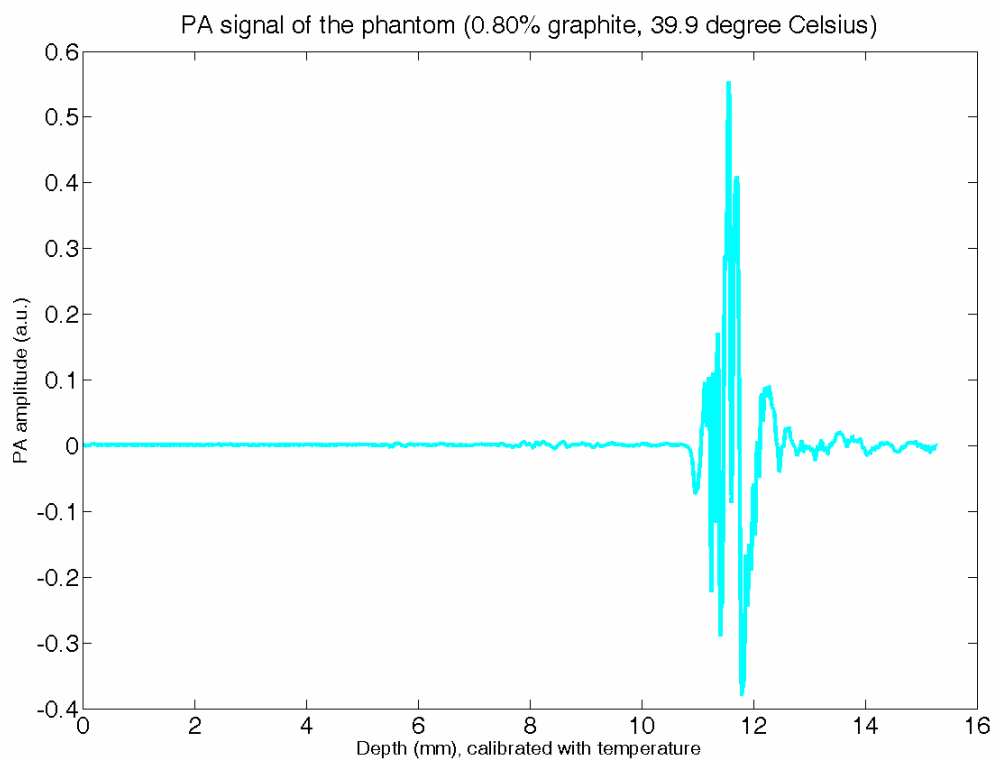
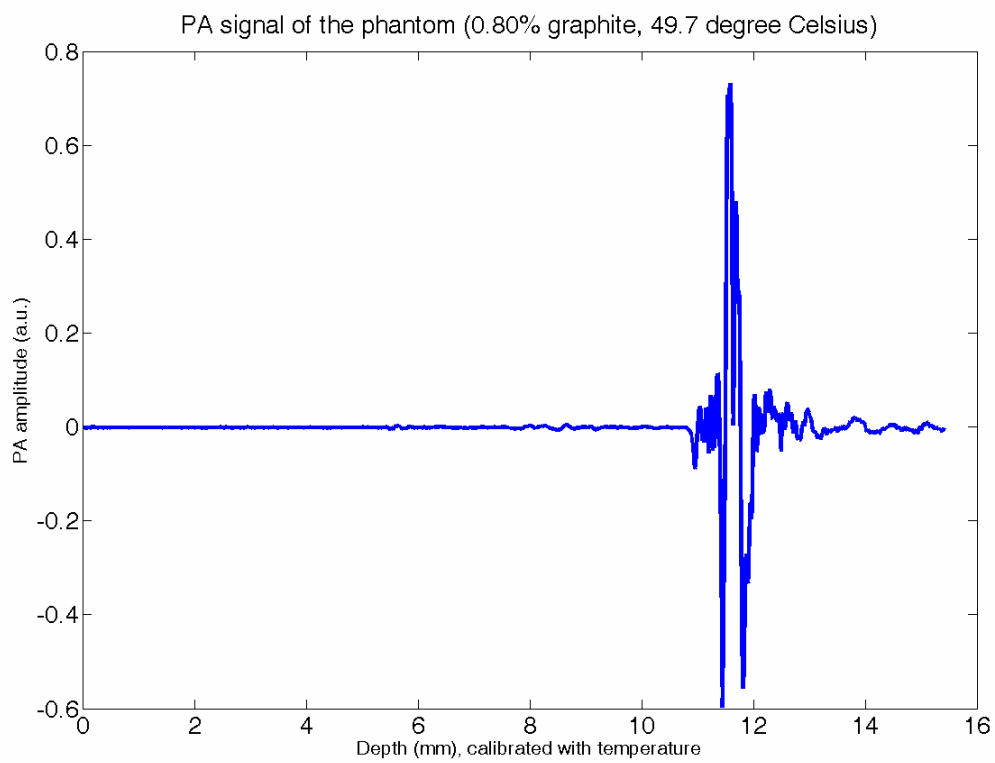


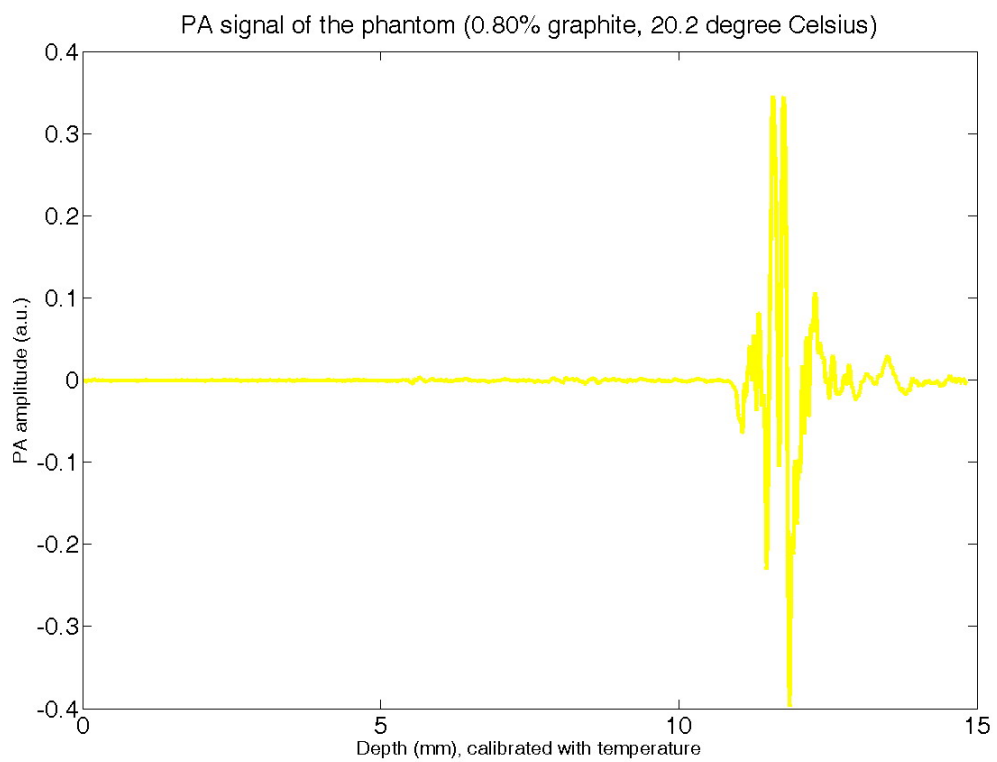
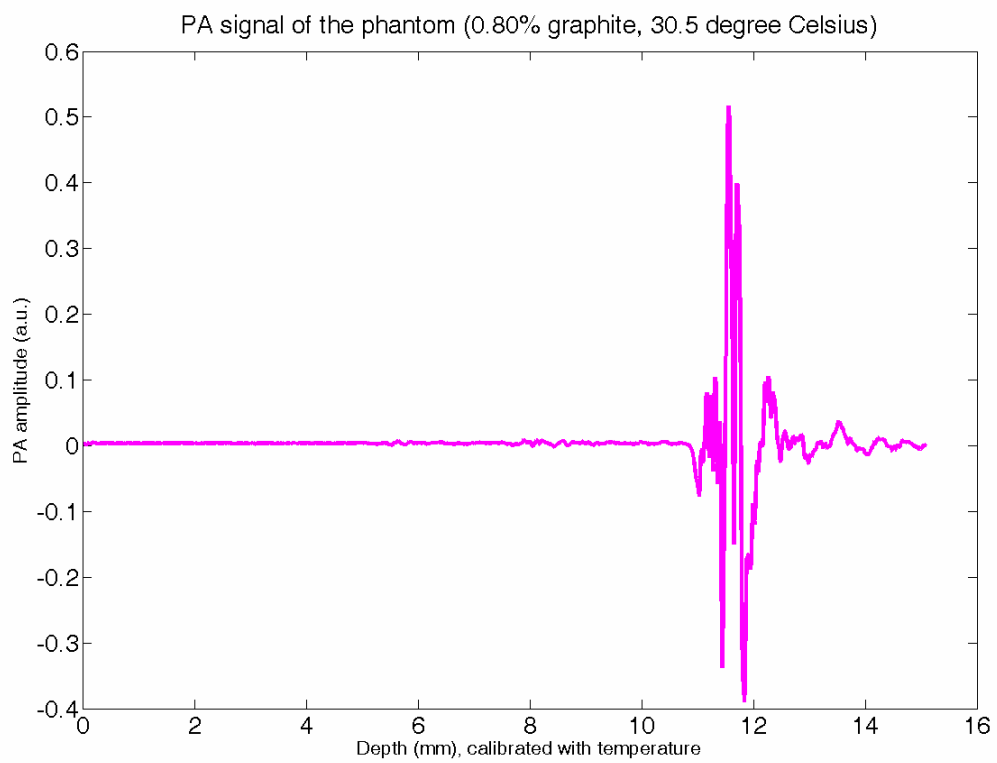


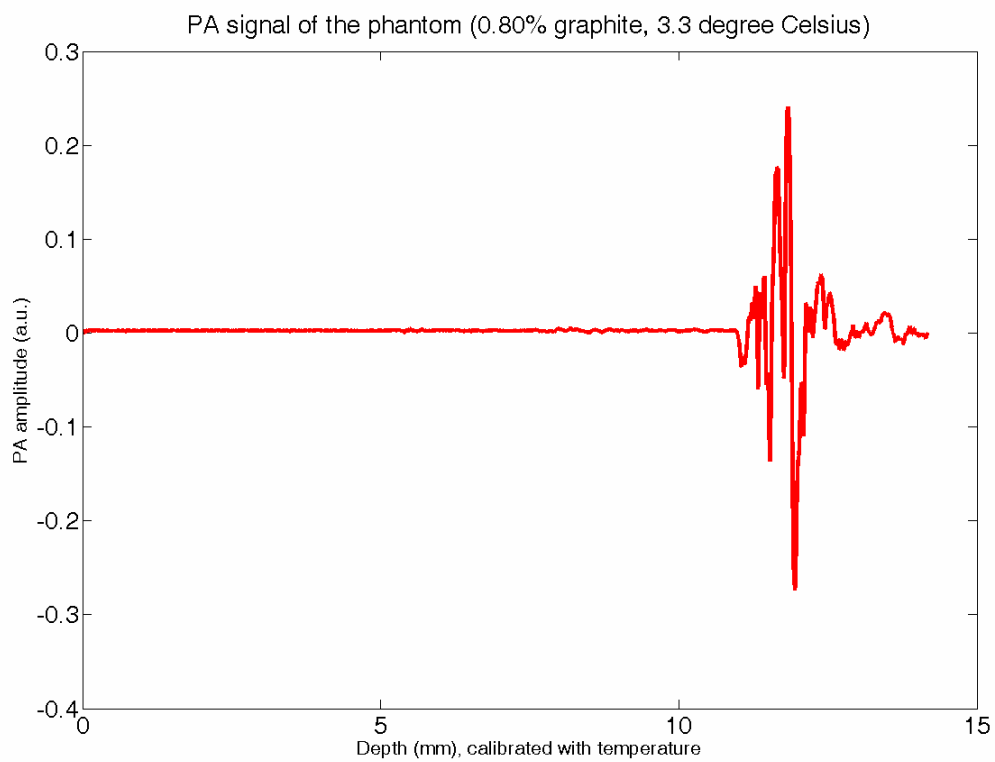
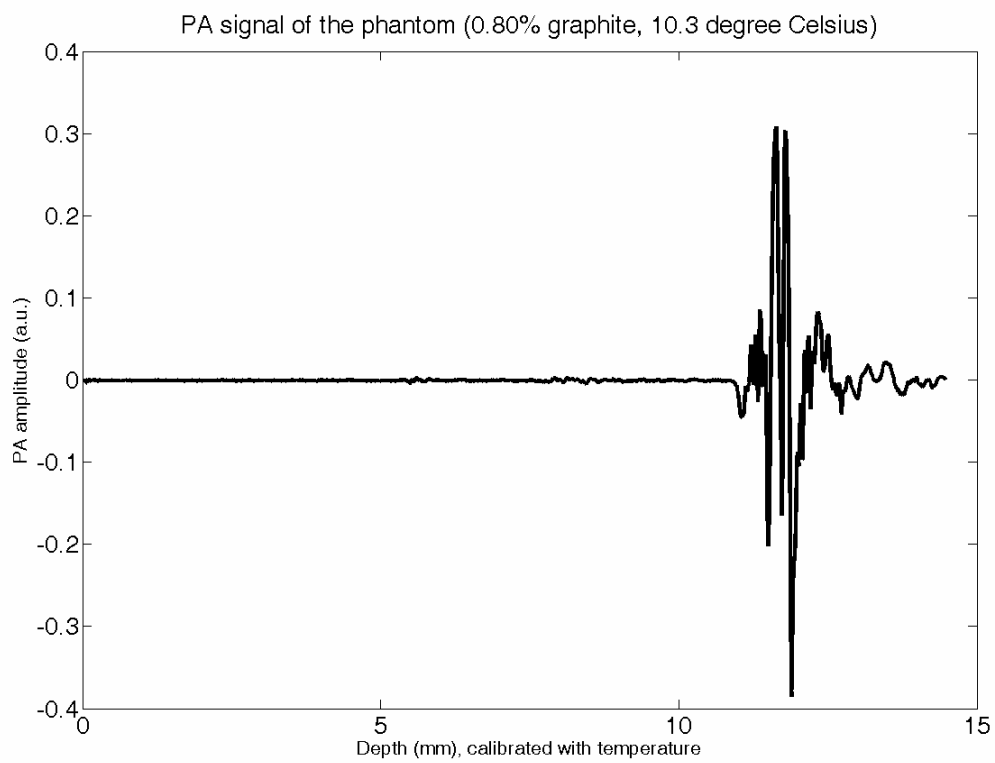


B. 根據溫度，校正水中聲波速度後的曲線(圖 4-8(b))

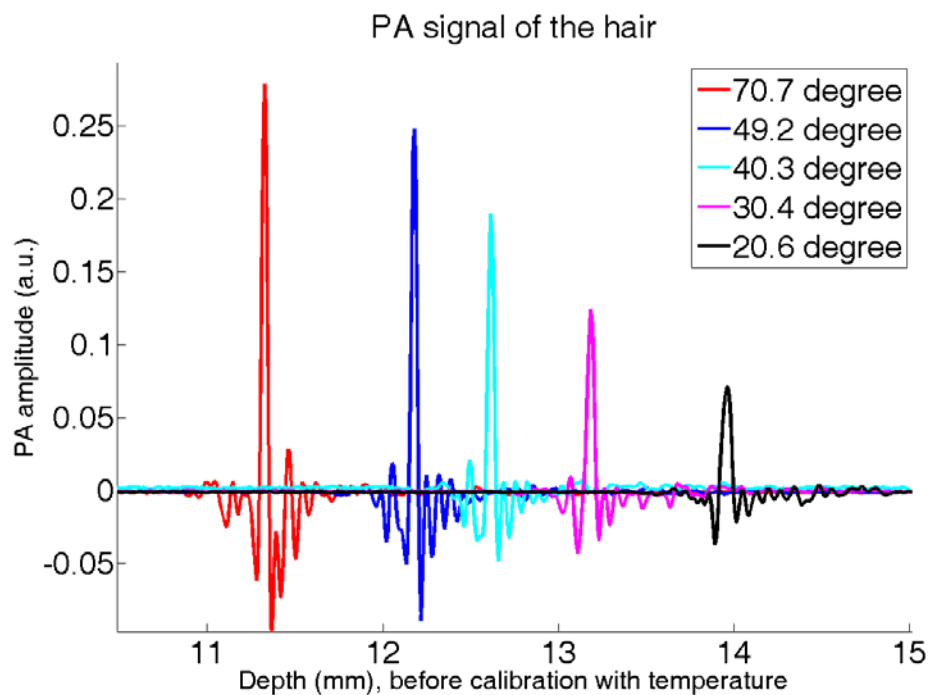




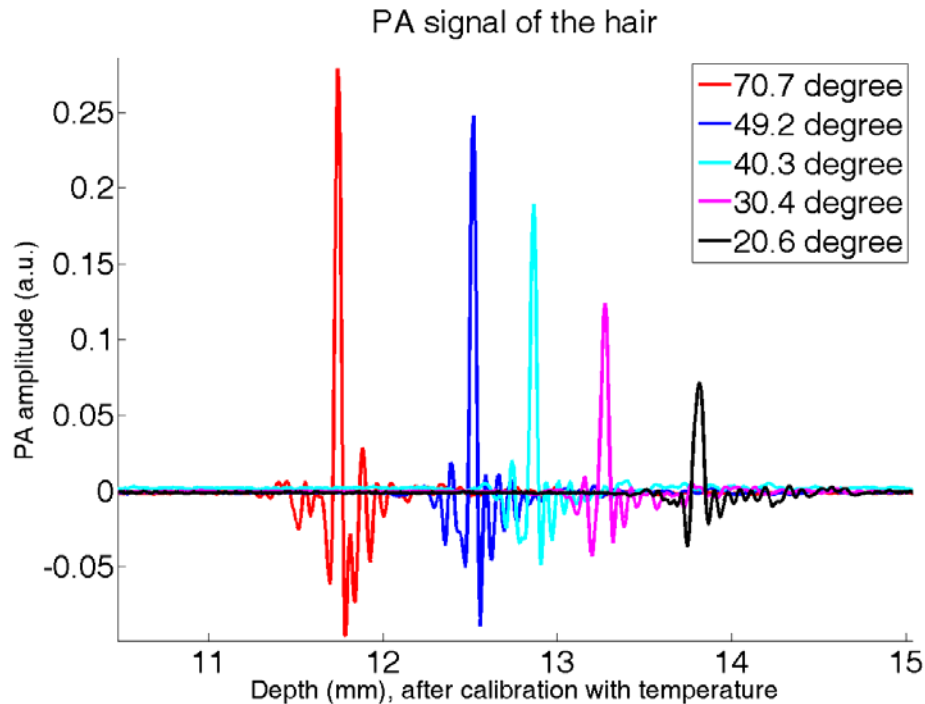




以相同的方式，探討極細之黑色頭髮的光聲信號，該髮絲係固定於熱水浴槽相對的兩面容器壁。理論上，髮絲的外徑比前述的光纖管徑還小，故應可忽略熱膨脹造成的變化，所以透過溫度公式修正聲速誤差後，各溫度下的光聲信號須重疊於相同位置。但事實上，我們發現修正聲速後，這些信號的尖峰仍散布在不同位置，且偏移量大於頭髮直徑，故應為熱水浴槽本身熱膨脹現象，使得依附在容器壁上的髮絲，產生信號位置的偏移。如下圖所示：



a. 針對溫度修正聲速之前的光聲信號圖形



b. 針對溫度修正聲速之後的光聲信號圖形

圖 4-9 (a) 針對溫度修正聲速之前的光聲信號圖形 (b) 針對溫度修正聲速之後的光聲信號圖形。黑色頭髮產生的光聲信號。即使針對溫度修正聲速，射頻信號的位置仍座落在不同的位置。本實驗使用極細的頭髮，熱脹冷縮造成的體積變化應可忽略不計，且偏移量大於頭髮直徑，故應為水浴容器本身熱膨脹，影響固定於器壁上的頭髮仿體位置，造成信號測量的誤差。但光聲信號的振幅並不受改變，仍隨著溫度的增加，呈現上昇的趨勢。

光纖尖端本身的體積很小，外徑僅有 1 mm，且懸掛於超音波探頭中心，該探頭只有前端小部份浸入熱水浴槽內，所以光纖本身與容器造成的熱膨脹皆可忽略不計。依照相同的原理，石墨仿體、黑色頭髮，以及金奈米粒子水溶液的光聲信號，雖可重新校正，但無法重疊在相同的位置，這是因為仿體本身與熱水浴槽的熱膨脹所造成的影響。儘管如此，光聲信號的振幅與超音波信號的時間偏移量無關，不受聲速校正影響，因而仍可進一步用於估測溫度。

若溫度變化小於 $5-10^{\circ}\text{C}$ ，則熱膨脹造成的位移量可忽略不計，位移可視為純由聲速在不同溫度下的差異所造成，超音波測溫法中的「回音偏移法」(echo shift)，即透過斑點雜訊追蹤 (speckle tracking) 的方法來測量此位移，可推估小範圍溫度變動下的溫度(Sethuraman et al. 2008)。但若溫度變化大於 $5-10^{\circ}\text{C}$ ，則熱膨脹與聲速皆對信號位移產生影響，斑點雜訊追蹤方式顯不適用，而光聲信號在此溫度變動範圍具有明顯的線性關係，適宜用於測量較大範圍的溫度變化。



4.4 熱效應對光聲信號振幅之影響

為探討熱效應對光聲信號振幅的影響，我們以脈衝式雷射逐步加熱仿體，觀察溫度上昇曲線，以及光聲信號的變化；此外，亦將仿體置放於恒溫熱水浴槽中，待熱平衡後，分析不同溫度下的光聲信號變化。

4.4.1 以脈衝式雷射加熱仿體

為了解熱效應與光聲信號之間的關係，我們以波長 532 nm 的脈衝式鈷雅各雷射（功率 310 mW），逐步加熱溶有不同濃度石墨的瓊脂糖仿體，將超音波光聲探頭（對焦深度 9.5 mm）置於仿體上方，針型熱電偶由側面插入（距仿體表面 10mm），然後以脈衝式雷射直接照射不同石墨濃度之仿體（圖 4-10）。

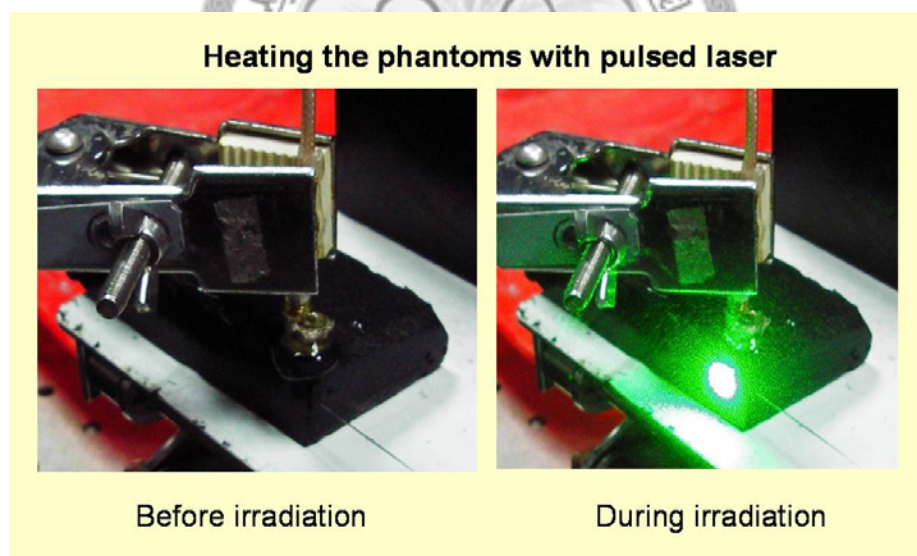


圖 4-10 以波長 532 nm 的脈衝式鈷雅各雷射，加熱不同濃度石墨的瓊脂糖仿體

在 0 -40 sec 時，監測雷射照射前的溫度；在 40 sec- 4 min 時，啟動脈衝式雷射，並監測雷射照射期間的溫度；在 4 min 時，關閉脈衝式雷射，並於 4-5 min 時，觀察雷射關閉後的溫度。得到下列的加熱曲線：

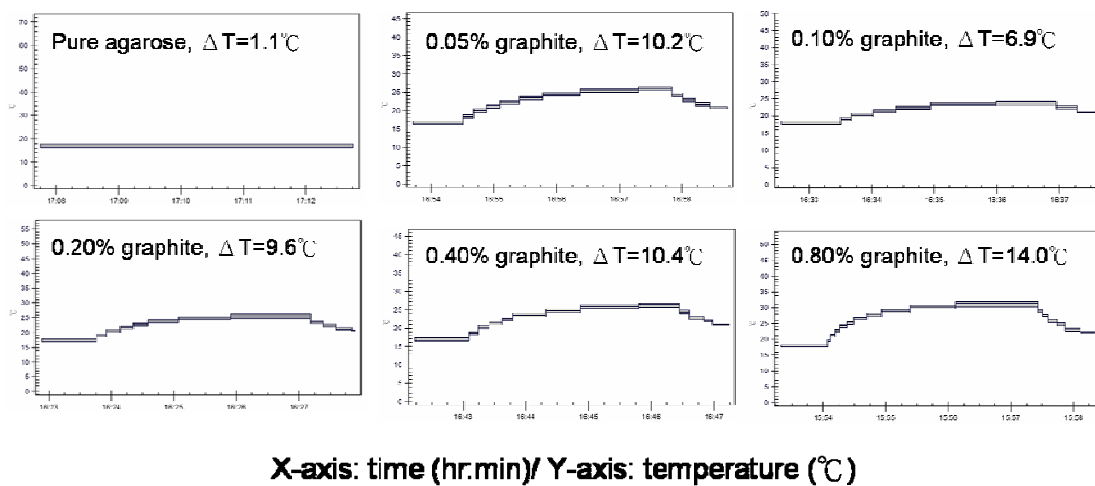


圖 4-11 不同濃度石墨的瓊脂糖仿體之加熱曲線

整理上述資料，可得石墨濃度與上昇溫度的關係如下：

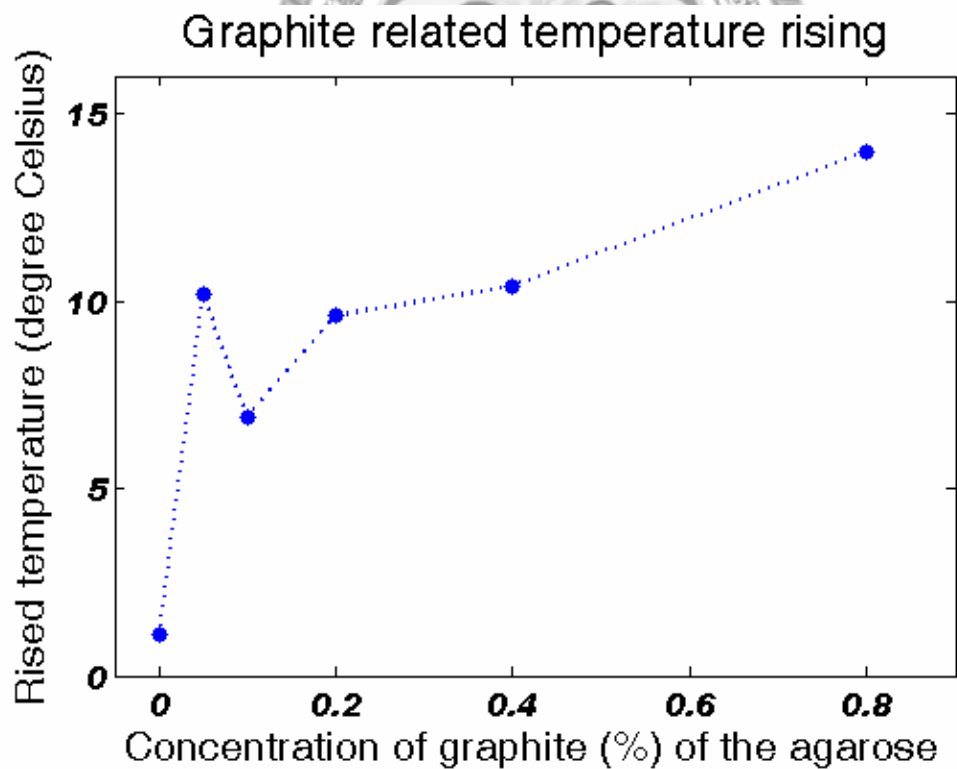


圖 4-12 不同濃度石墨的瓊脂糖仿體之上昇溫度

實驗結果顯示，無石墨的瓊脂糖仿體僅上升 1.1°C ，石墨濃度愈高，吸熱效應愈好，因此溫度變化愈大。但石墨濃度 0.05% 的瓊脂糖仿體，上升溫度比 0.10%、0.20%，與 0.40% 的仿體還高，這是因為熱電偶溫度探針的位置在仿體表面 10mm 下方處，石墨濃度較低的仿體，雷射穿透深度較大，故傳遞至熱電偶的熱量較多，而濃度較高的仿體，雷射穿透深度較小，故熱量傳遞至熱電偶較少，所以上升溫度反而比石墨濃度稀薄的仿體為低。

探討仿體石墨濃度與光聲信號強度的關係，每個雷射脈衝可產生一筆光聲信號的資料，在未考慮個別脈衝能量差異下，將室溫下的仿體石墨濃度對光聲信號強度作圖如圖 4-13，並依據光聲信號強度與雷射光通量成正比的關係式，利用雷射脈衝能量計(energy meter)，將該圖進一步校正為圖 4-14。

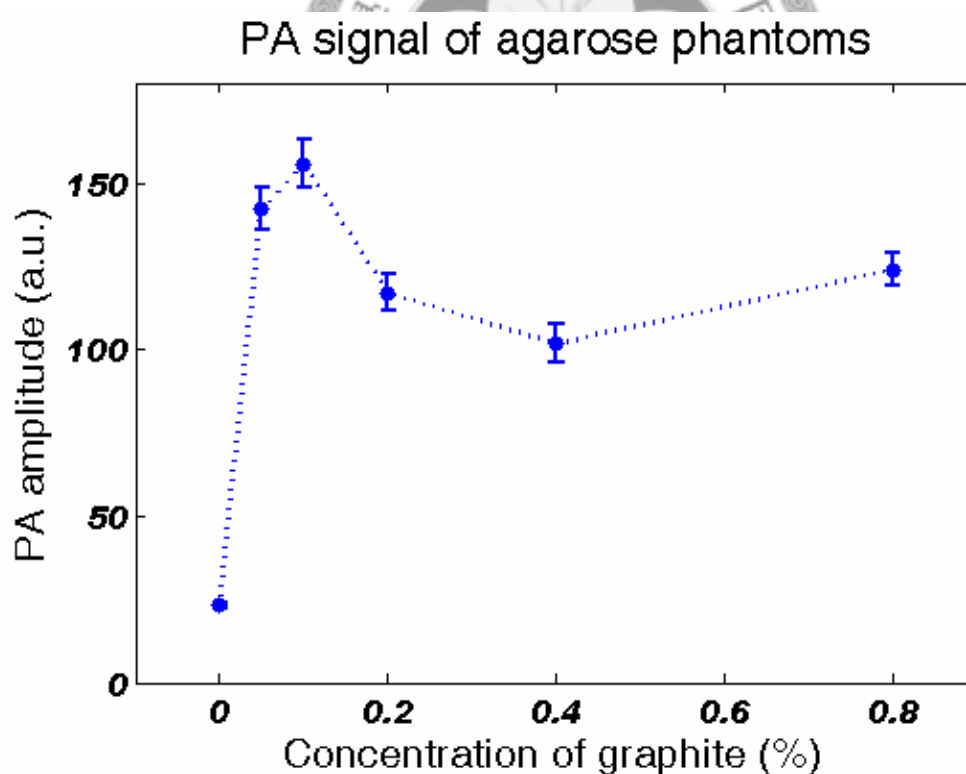


圖 4-13 不同濃度石墨的瓊脂糖仿體產生的光聲信號強度(尚未依照脈衝能量修正)

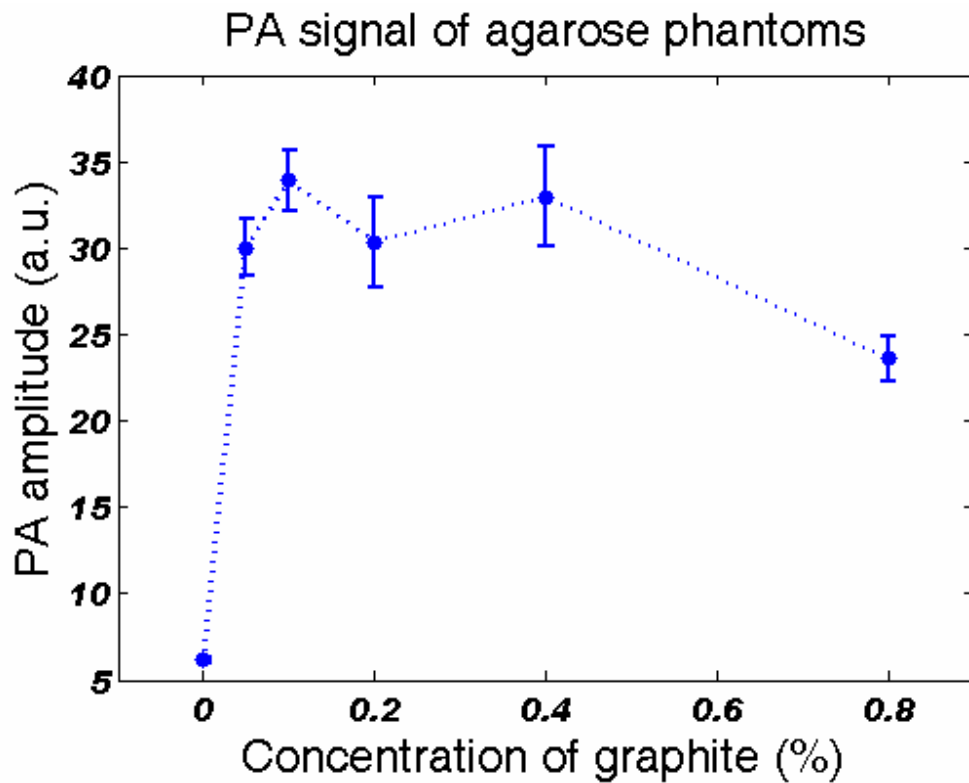


圖 4-14 不同濃度石墨的瓊脂糖仿體產生的光聲信號強度(依照脈衝能量修正)

由上圖的結果，可發現無石墨的瓊脂糖仿體幾乎不產生光聲信號的強度，在添加石墨後，光聲信號的強度隨之變大，且濃度對信號強度無明顯影響，但在石墨濃度高達 0.80% 的情況下，光聲信號的強度反而變小。這是因為我們偵測的光聲信號來自超音波探頭的焦點位置，雖然石墨可提昇光聲信號強度，但石墨也會減低雷射光線的穿透深度，二者有相互抵消(trade off)的現象，所以石墨濃度 0.05%、0.10%、0.20%、0.40% 的瓊脂糖仿體，產生的光聲信號強度相近。但若石墨濃度增加至 0.80% 之後，穿透至探頭聚焦深度的雷射能量已大幅減弱，雖然高濃度的石墨可提昇光聲信號強度，但仍無法彌補雷射光通量不足造成的不利影響，最後使得光聲信號強度反而比石墨濃度較低的仿體還小。

我們進一步研究，溫度與仿體產生的光聲信號強度關係，以石墨濃度 0.40% 的瓊脂糖仿體為例，將針型熱電偶測量到的溫度，與該溫度期間的光聲信號的強

度作圖如下：

(1) 未針對雷射脈衝能量修正前：

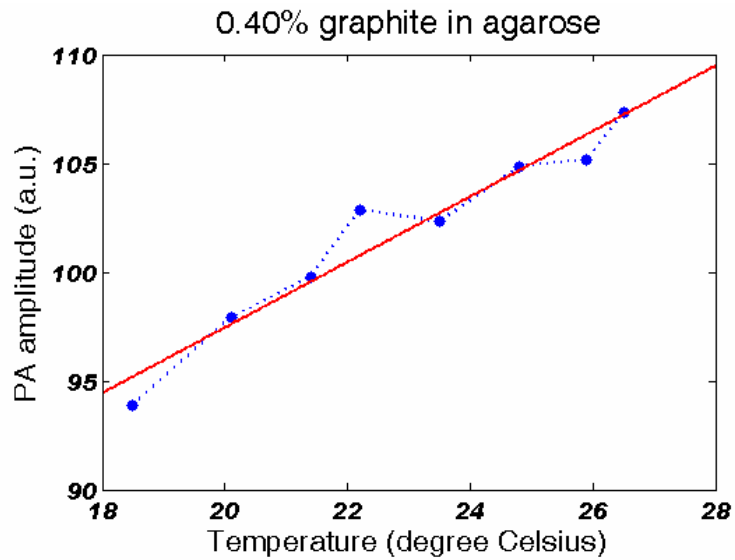


圖 4-15 未針對雷射脈衝能量修正前，石墨瓊脂糖仿體之溫度-光聲信號關係圖

(2) 針對雷射脈衝能量修正後：

針對雷射脈衝能量修正後，石墨瓊脂糖仿體之溫度-光聲信號實驗結果顯示，溫度與光聲信號強度，對石墨濃度 0.40%的瓊脂糖仿體呈正相關之變化。

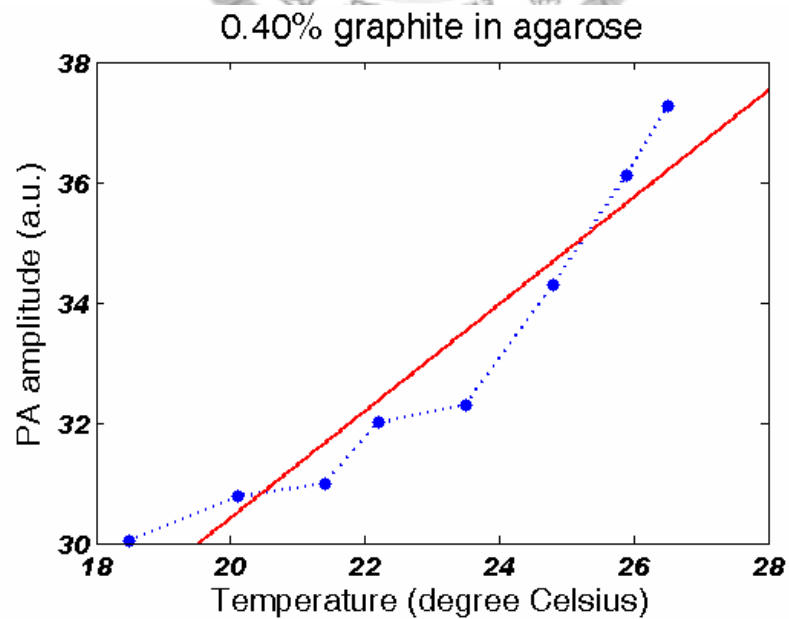


圖 4-16 針對雷射脈衝能量修正後，石墨瓊脂糖仿體之溫度-光聲信號關係圖

實驗結果顯示，雖然溫度與光聲信號強度對石墨濃度 0.40% 的瓊脂糖仿體呈正相關，但此結果並不穩定，在實驗過程中，我們發現再現性較差，會出現曲線變化不一致的狀況，如下圖：

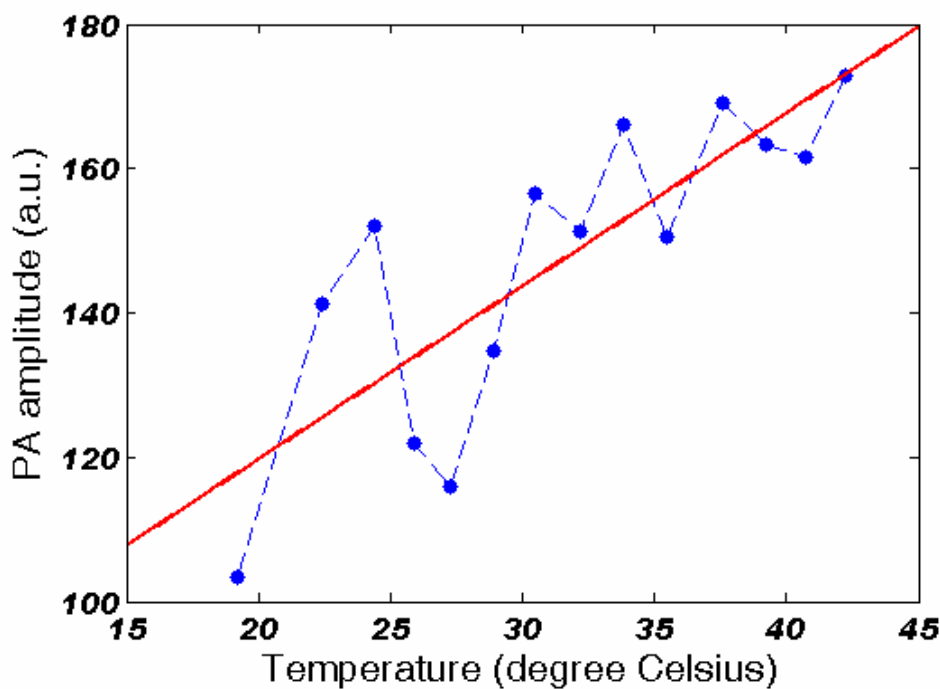


圖 4-17 以脈衝式雷射對石墨濃度 0.80% 瓊脂糖仿體加熱後，溫度與光聲信號強度關係圖。

分析可能原因，可能與下列因素有關：

- (1) 針型熱電偶影響超音波探頭的信號。
- (2) 石墨仿體吸收雷射能量，造成光漂白(photobleaching)或光熱分解(photothermolysis)之變化。
- (3) 記錄溫度所用的數位式三用電表軟體，採用步進式(stepwise)的方式記錄針型熱電偶測量溫度，亦即溫度變化大於軟體內定的範圍，才會當成有變動，並予以記錄，並非真正即時(real time)的記錄方式。

- (4) 加熱熱源不夠穩定，脈衝式雷射的能量並非持續保持定值，而在某範圍內變動，即使以脈衝能量計予以修正，亦因系統誤差(systemic error)的可能性，無法真正反映雷射脈衝能量恒定時的狀態，而且按照脈衝能量修正後，未必能讓結果更符合理論預期值。
- (5) 本實驗之計時係利用光二極體(photodiode)感測雷射之脈衝，在時間測量上可能產生誤差。



4.4.2 以熱水浴槽加熱仿體

為免除熱源不穩定所產生的誤差，我們使用溫度恒定的熱水浴槽為熱源，在不同溫度下(大約在 5-95℃ 的區間)，分別測量石墨仿體、黑色頭髮、光纖管，以及金奈米粒子水溶液的光聲信號。發現光聲信號的振幅，可隨著溫度的變化，無論是由低溫加熱至高溫，或由高溫降溫至低溫區域，皆可呈現正相關的關係。如下圖所示：

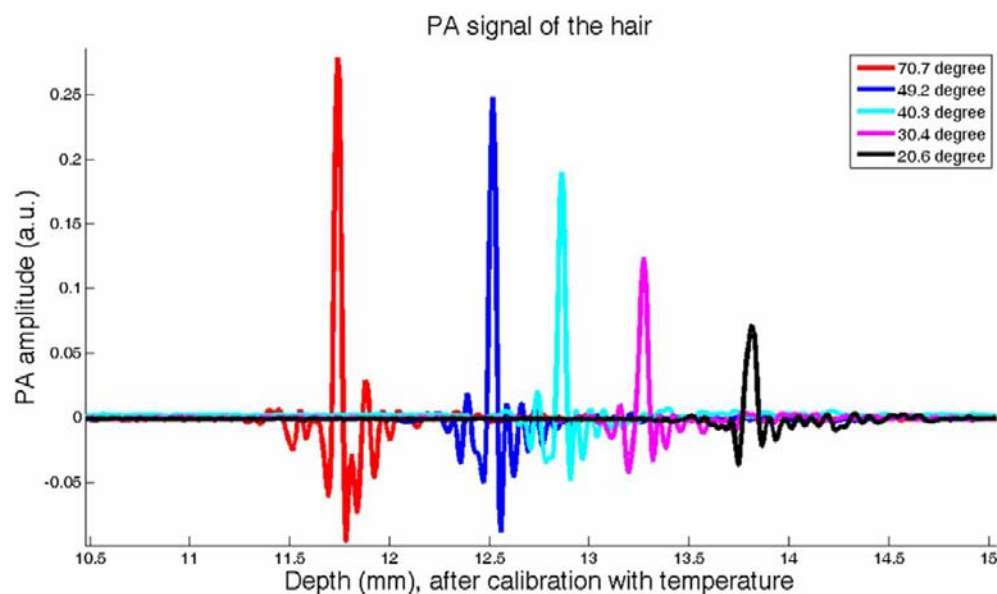


圖 4-18 黑色頭髮產生的光聲信號。光聲信號的振幅隨著溫度的增加，呈現上升的趨勢。

在不同仿體下，光聲信號的振幅隨著溫度的變化，仍呈現正相關的關係。以石墨濃度 0.80%的瓊脂糖仿體為例，不同溫度下的光聲信號振幅如下圖所示：

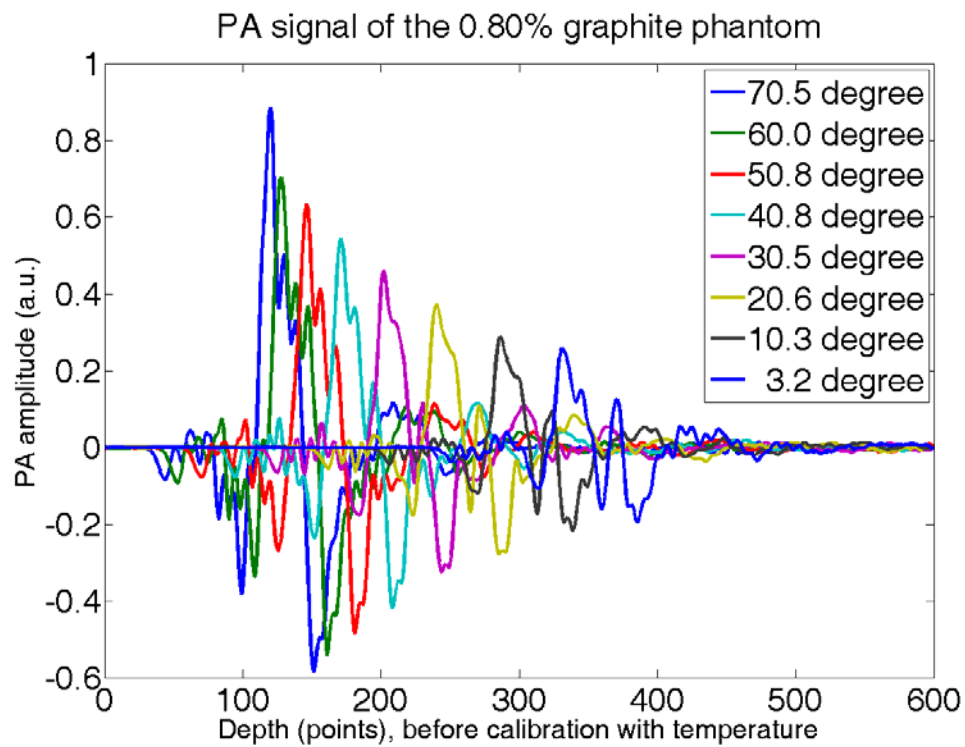


圖 4-19 石墨濃度 0.80% 的瓊脂糖仿體，不同溫度下的光聲信號振幅

將上圖的曲線下面積積分，可得溫度與光聲信號強度(a.u., arbitrary units)之間，具有良好的線性關係，如圖 4-20：

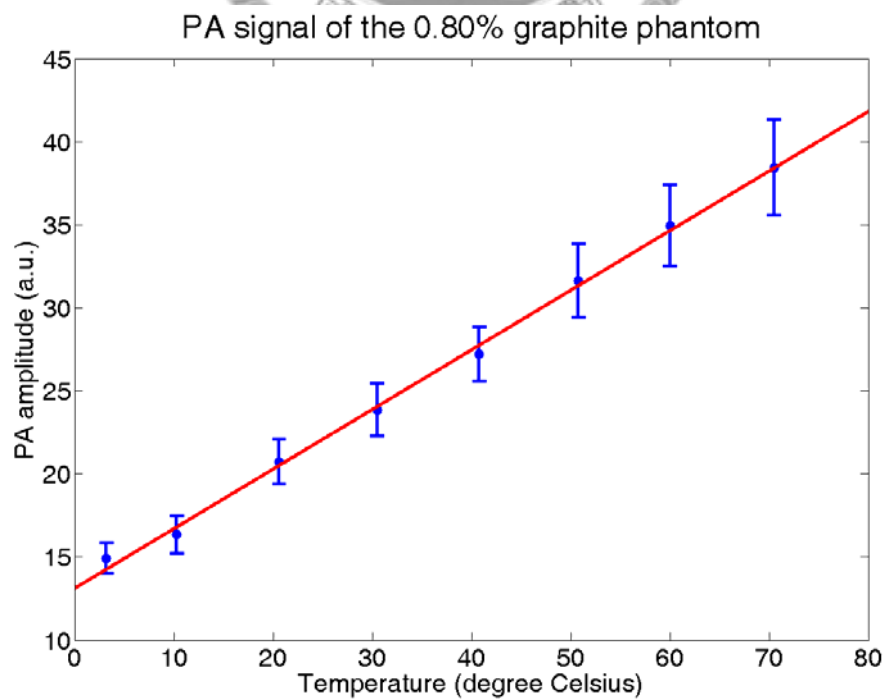


圖 4-20 石墨濃度 0.80%的瓊脂糖仿體，不同溫度下的光聲信號振幅曲線下面積分值，可發現溫度與光聲信號強度之間，具有良好的線性關係

在前述的先驅實驗結果中，顯示光聲信號與溫度呈現良好的正比例線性關係。我們進一步測量在小溫度變動下，此關係是否仍穩定存在。圖 4-21(a)顯示對於溶有 0.40%石墨的瓊脂糖仿體，光聲信號的強度與溫度具有良好的正比關係。圖 4-21(b)則顯示金奈米粒子水溶液亦具有相同的關係。

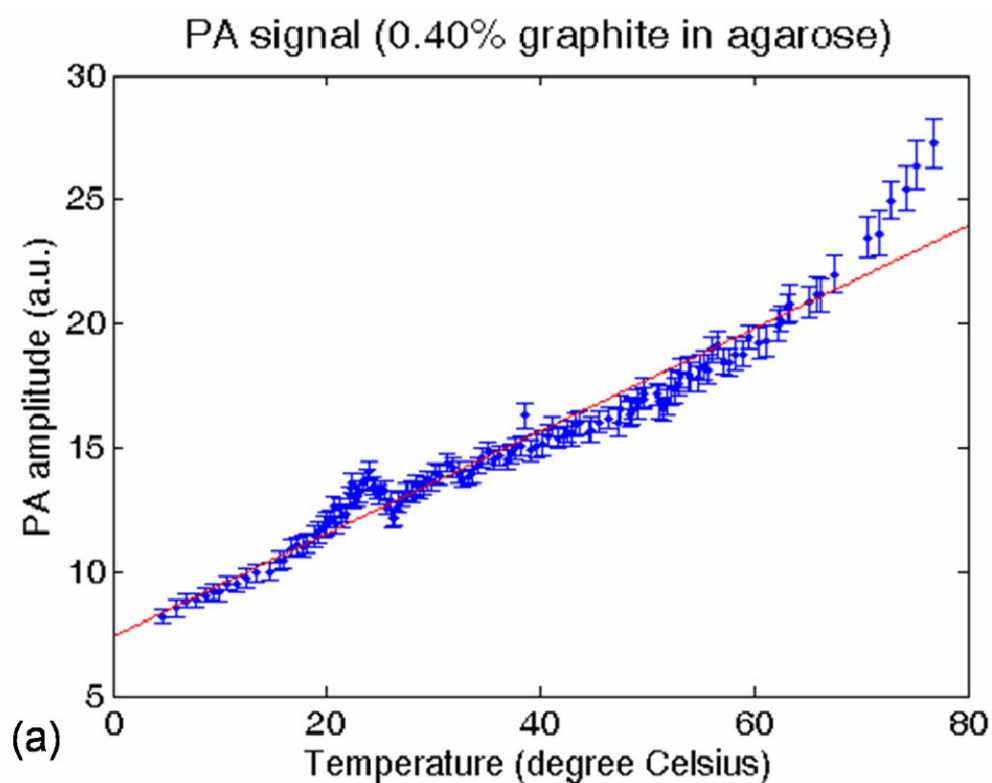


圖 4-21(a) 0.40%石墨瓊脂糖仿體之溫度與光聲信號關係圖(曲線下積分值)

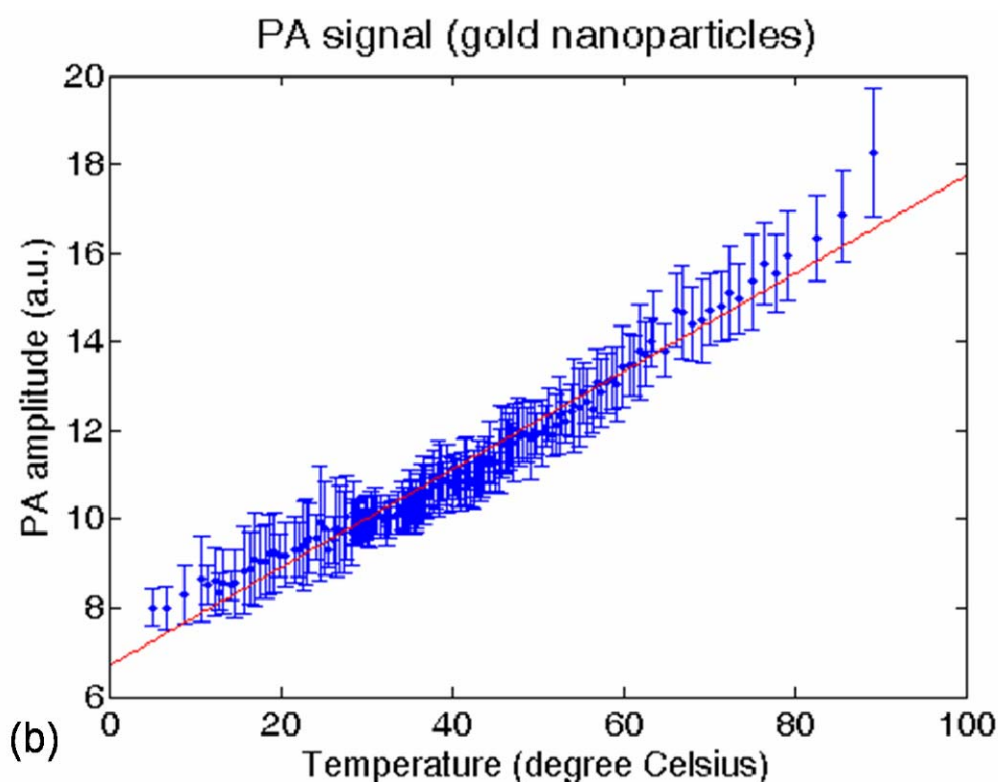


圖 4-21(b) 金奈米粒子水溶液之溫度與光聲信號關係圖(曲線下積分值)。將光聲信號曲線下的面積積分，可發現溶有 0.40% 石墨的瓊脂糖仿體，以及金奈米粒子水溶液，兩者的溫度與光聲信號振幅皆具有具有良好的線性關係，但當溫度高於大約 65°C 時，會有偏離線性關係的狀況。

雖然溫度與光聲信號振幅具有線性正比例的關係，我們的實驗數據顯示，大約 65°C 以上或 10°C 以下的溫度，有傾離線性關係的傾向，這可能因為體積熱膨脹係數(thermal volume expansion coefficient) 導致的影響。熱膨脹係數是影響 Grüneisen 參數的主要因素之一。Grüneisen 參數 Γ 由體積熱膨脹係數 β [$^{\circ}\text{C}^{-1}$]、聲速 c [ms^{-1}]，與等壓比熱 C_p [$\text{Jg}^{-1}\text{C}^{-1}$] 所構成，其關係式為 $\Gamma = \beta c^2 / C_p$ ，其中聲速 c 雖亦為溫度 T 的函數， $c = 1.402385 \times 10^3 + 5.038813T - 5.799136 \times 10^{-2}T^2 + 3.287156 \times 10^{-4}T^3 - 1.398845 \times 10^{-6}T^4 + 2.787860 \times 10^{-9}T^5$ (溫度有效範圍介於 0-95°C) (Marczak 1997)，但在 c 平方之後，溫度造成的聲速變化，對 Grüneisen 參

數 Γ 影響並不大。溫度對於等壓比熱 C_p 的變化亦不顯著，所以在探討溫度對於 Grüneisen 參數 Γ 的影響時，主要可看成受到體積熱膨脹係數 β 的影響。

對以水為主的軟組織而言，熱膨脹係數 β 在 10 至 55°C 的區間，對溫度呈現線性關係，所以 Grüneisen 參數在理論上與實驗上，皆對溫度呈現線性函數的關係(Shah et al. 2008)，但若超過此區間，線性關係就會出現變化，進而使得溫度與 Grüneisen 參數不再呈現良好的線性比例關係(Larina et al. 2005)。

由我們的實驗結果可知，即使不在此區間，溫度上昇仍會造成光聲信號振幅上昇的趨勢，只是會出現較大的量測誤差。小於 60°C 的治療，稱為「高熱治療」，而溫度達到 60°C 後，開始出現組織凝結與細胞壞死(Niemz 2003)，一般熱治療的目標溫度常設定於小於或約略等於 60°C 左右的溫度，例如可將組織加熱至 41-47°C，然後維持數十分鐘(Huang et al. 2008)。因此由正常體溫至溫度 65°C 之間的區段準確度，對於熱治療的監測較為重要，光聲信號壓力量值偏離線性關係的區段，並不致影響光聲測溫法用於熱治療監測的應用。

4.4.3 不同物質對於光聲信號振幅與溫度線性關係之影響

在先前的實驗結果中，已確立光聲信號振幅與溫度呈現線性正相關。我們變換各種不同的實驗仿體，整理四種實驗模式，分別是針對整塊的石墨瓊脂糖仿體、黑色頭髮、瓊脂糖仿體中的染料核心，以及細管中的金奈米粒子水溶液，皆可得到相同的線性正比例關係。

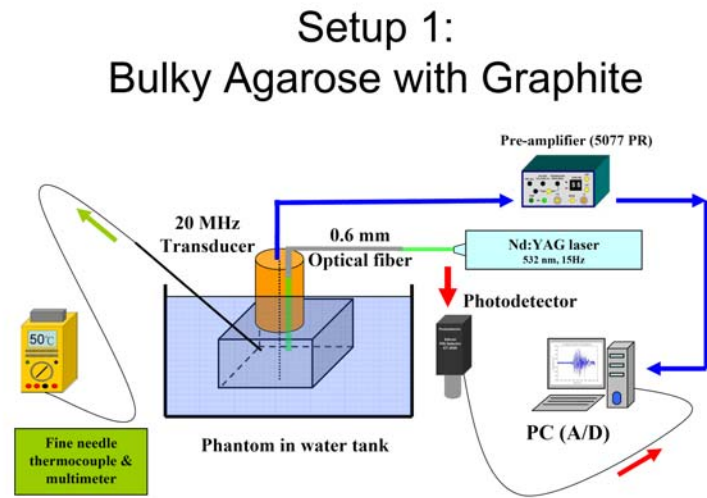


圖4-22(a) 溶有石墨之大塊瓊脂糖仿體之實驗架構

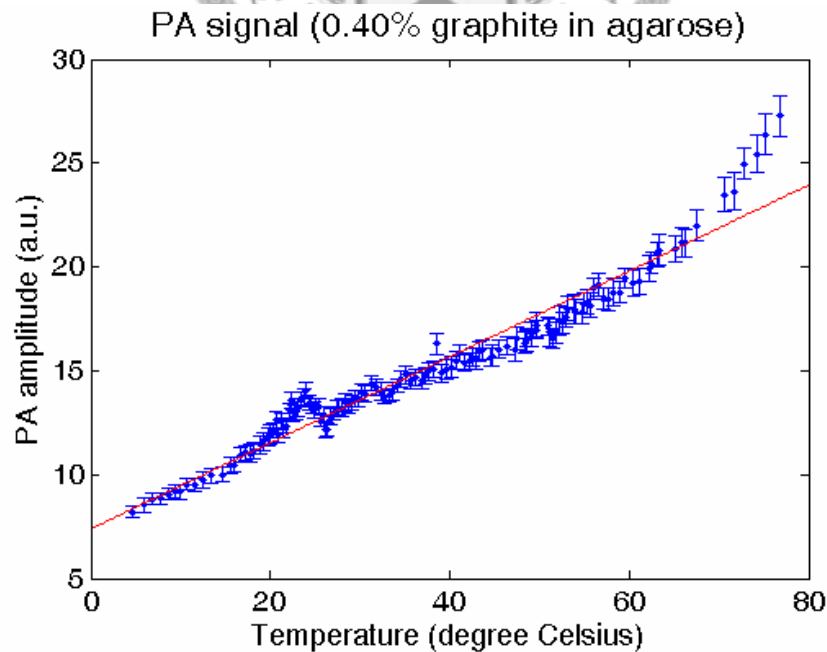


圖4-22(b) 溶有石墨之大塊瓊脂糖仿體之實驗結果

Setup 2: Hair

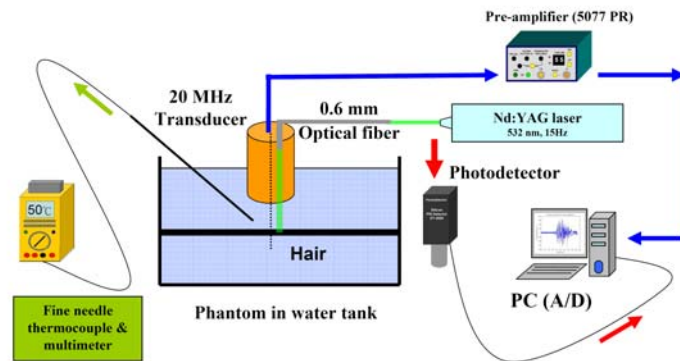


圖4-23(a) 以黑色頭髮為仿體之實驗架構

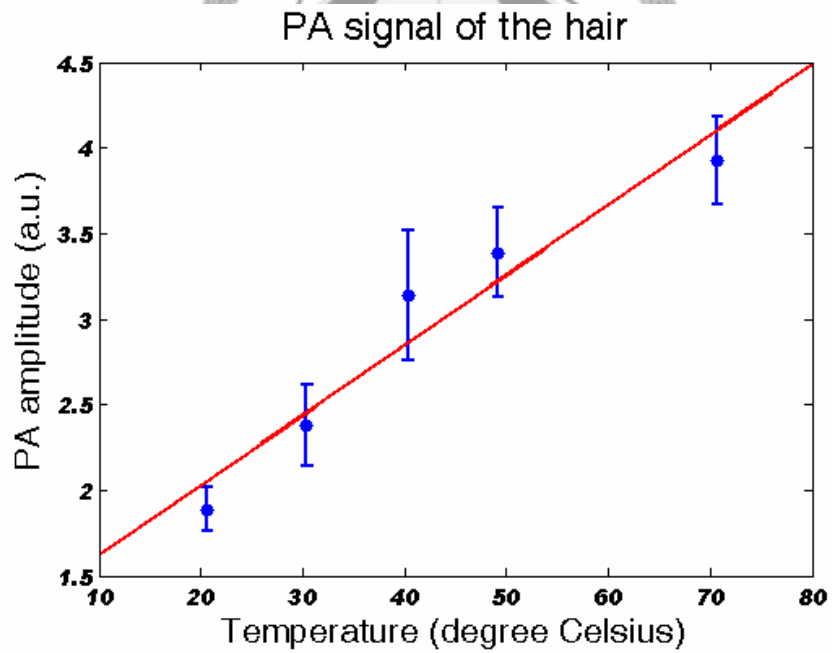


圖4-23(b) 以黑色頭髮為仿體之實驗結果

Setup 3: A Dye Core in the Agarose

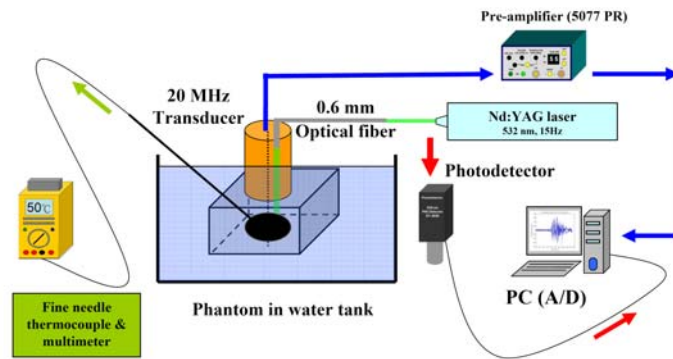


圖4-24(a) 以黑色染料與玻璃散射子為核心的瓊脂糖仿體實驗架構

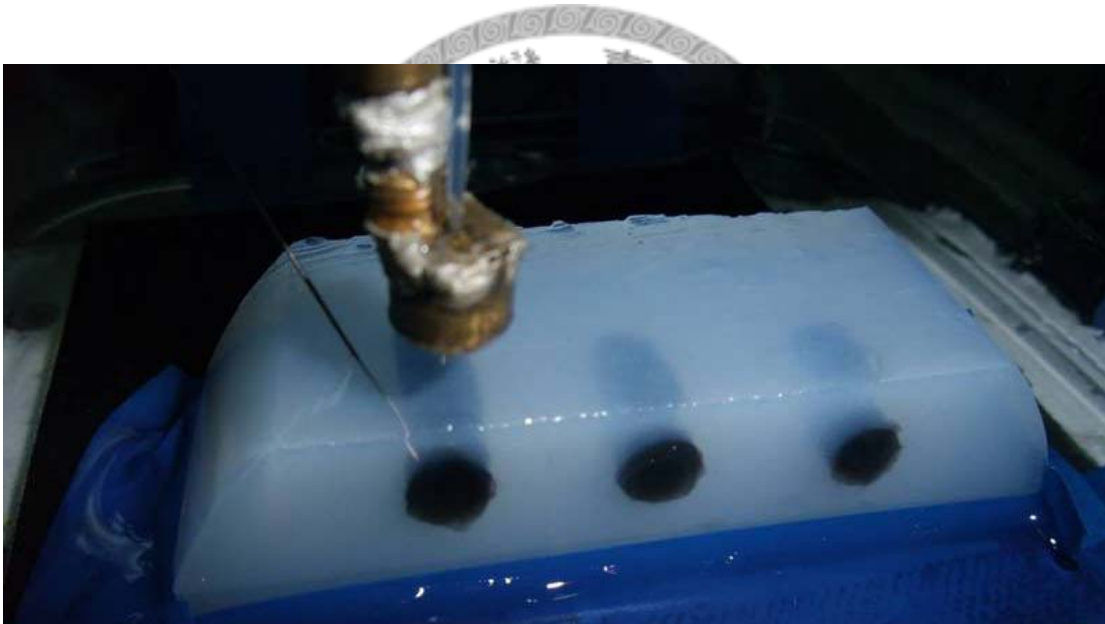


圖4-24(b) 具有內容物為染料與玻璃散射子核心的瓊脂糖仿體，上方為光聲探頭，左方為針型熱電偶

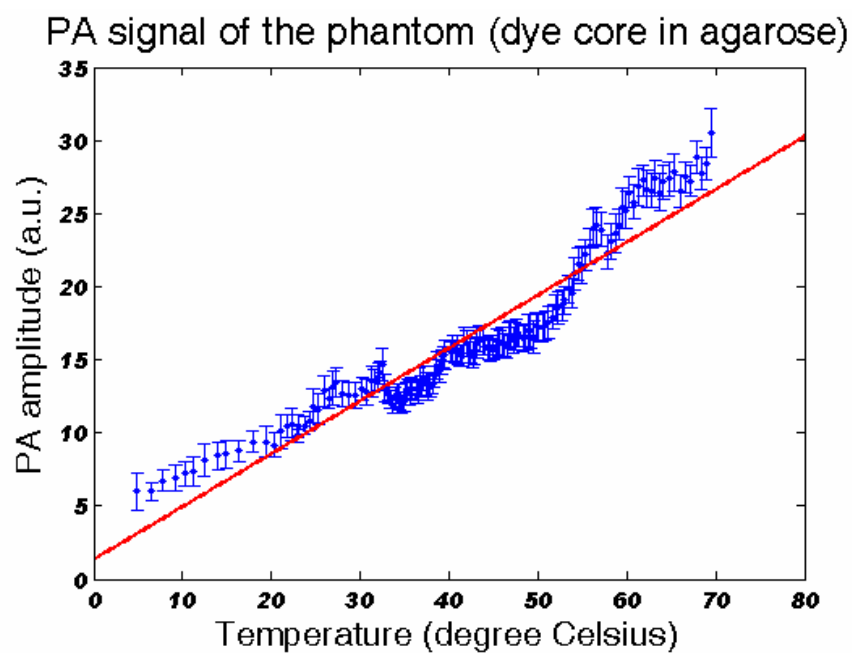


圖4-24(c) 以黑色染料與玻璃散射子為核心的瓊脂糖仿體實驗結果

Setup 4: Gold Nanoparticles in the Tube

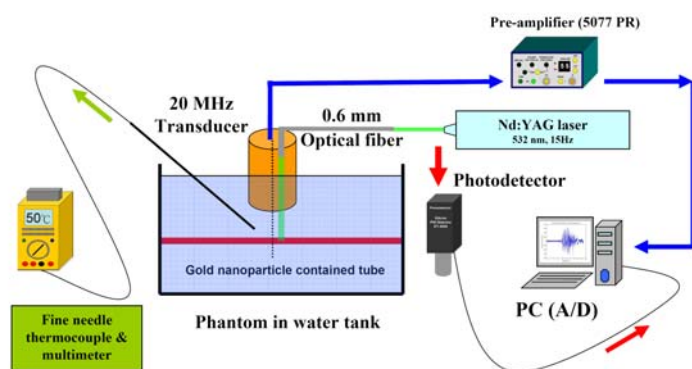


圖4-25(a) 以金奈米粒子水溶液為仿體之實驗架構

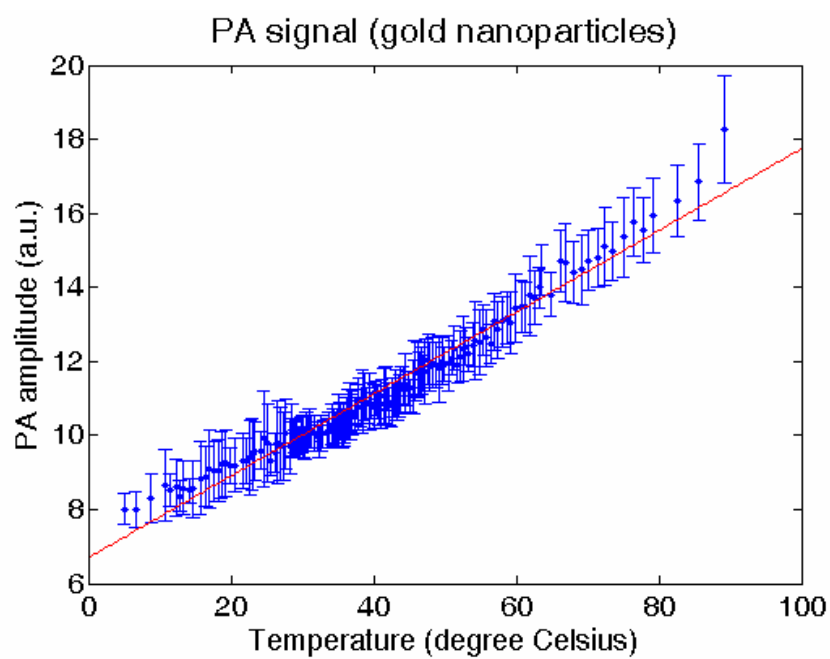


圖4-25(b) 以金奈米粒子水溶液為仿體之實驗結果



4.5 系統之解析度與誤差來源

本系統之解析度可分為空間解析度與溫度解析度兩面向。空間解析度決定於光聲影像系統的品質，由第2章的分析得知，超音波探頭的中心頻率愈高，則空間解析度愈高。我們所使用的20MHz高頻超音波探頭，可達空間上200-300 μm 的解析度。

在溫度準確度方面，本實驗系統利用熱力學上的溫度與壓力狀態函數(2.2.1)式 $dT = (\frac{\partial T}{\partial p})_s dp + (\frac{\partial T}{\partial s})_p ds$ 與(2.2.2)式 $dp = (\frac{\partial p}{\partial \rho})_s d\rho + (\frac{\partial p}{\partial s})_\rho ds$ ，推導得光聲信號強度與Grüneisen參數成正比的(2.3.1)式 $P(z) = \Gamma \mu_a F_0 e^{(-\mu_a z)}$ ，進一步化簡可得(2.3.10)式 $T(z) = cP(z) + d$ ，因此若可知信號強度 $P(z)$ ，則可換算得溫度 $T(z)$ 。

溫度準確度與「光聲信號強度-溫度」圖形中資料的標準差(standard deviation)有關，若標準差愈低，則溫度準確度也就愈高。本研究的目的是在於應用至雷射光熱治療，目標區域溫度大約介於42-60 $^{\circ}\text{C}$ ，理想上的溫度準確度應小於1 $^{\circ}\text{C}$ (Larina et al. 2005)。

若能提高脈衝式雷射系統的能量輸出穩定度，則可減少系統的誤差。我們發現本研究採用的脈衝式鈦雅各雷射(Nd: YAG laser, 532 nm, LOTIS TII, LS-2137)與可調式鈦藍寶石雷射(tunable Ti: sapphire laser, 800 nm, LOTIS TII, LS-2132)，在高脈衝能量輸出時較穩定，但高脈衝能量會破壞受測物體，不符合非侵入式檢測的目標。因此，我們一方面將脈衝能量提高，以增進穩定度，另一方面在光路(optical path)增添一面衰減器(attenuator)的鏡片，配合直徑600 μm 的同軸光纖導管(Thorlabs, Newton, NJ)，將實際輸出至受測物體表面的能量，降低至低能量(約2-3mJ/pulse)的水準，避免受測物體被加溫與受破壞。易言之，雷射能量變異大的情況，在低脈衝能量輸出時特別明顯，可利用「衰減器」改善，先將能量提高，再以衰減器降低至適合的能量輸出，如下圖所示。

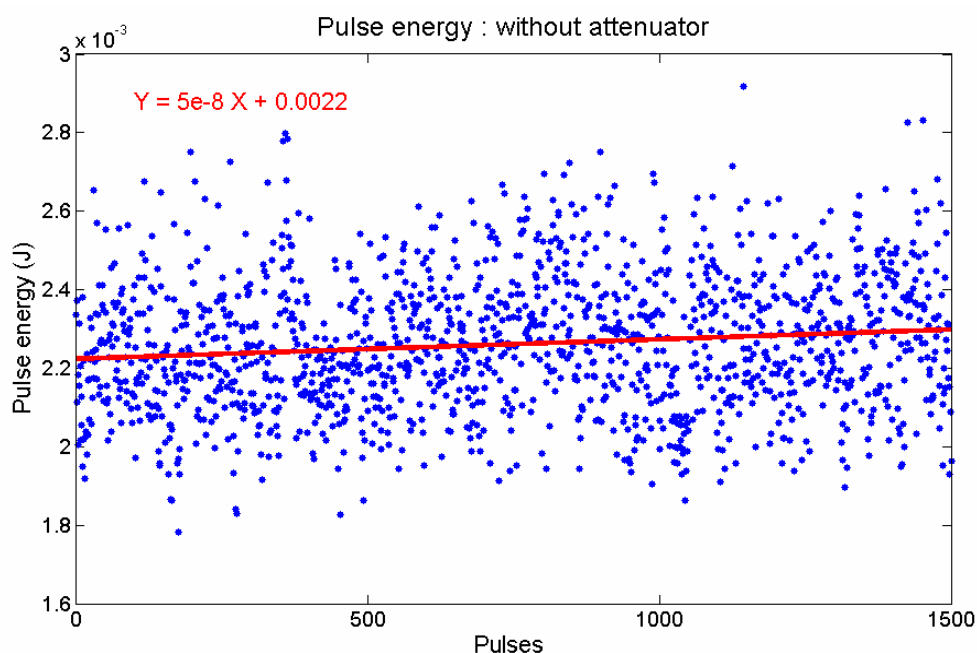


圖4-26(a) 直接以低脈衝能量輸出，未經過衰減器之脈衝能量分布。本系統採用的脈衝式雷射，雷射光束直徑4 mm。於實驗過程中，使用雷射能量計(energy meter)感測每個脈衝，量測相對的能量大小，由本圖可發現脈衝式雷射輸出的能量平均值，對時間而言尚稱穩定(斜率不大)，但每個脈衝的能量變化相當大。

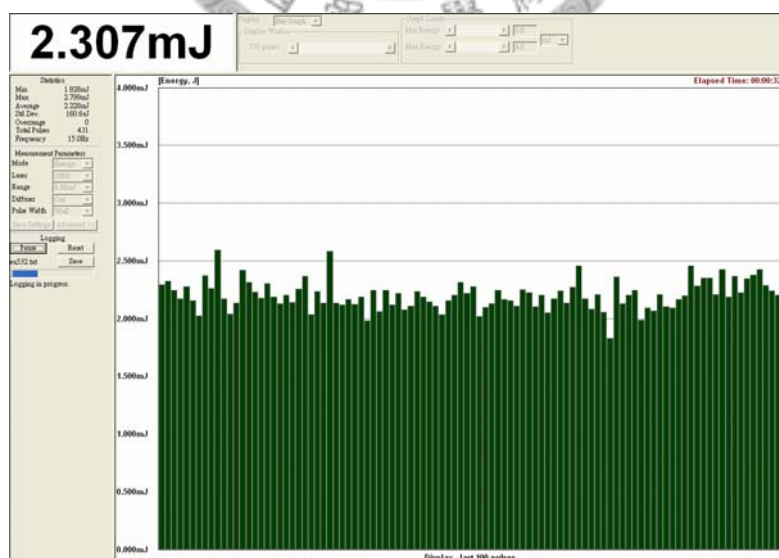


圖4-26(b) 未經過衰減器，直接以低脈衝能量輸出，以能量測量計(energy meter)測得的數據。共測量431個脈衝，頻率15Hz，可得脈衝能量數據如下：最小值1.828

mJ，最大值2.799 mJ，平均值2.228 mJ，標準差160.6 μ J。

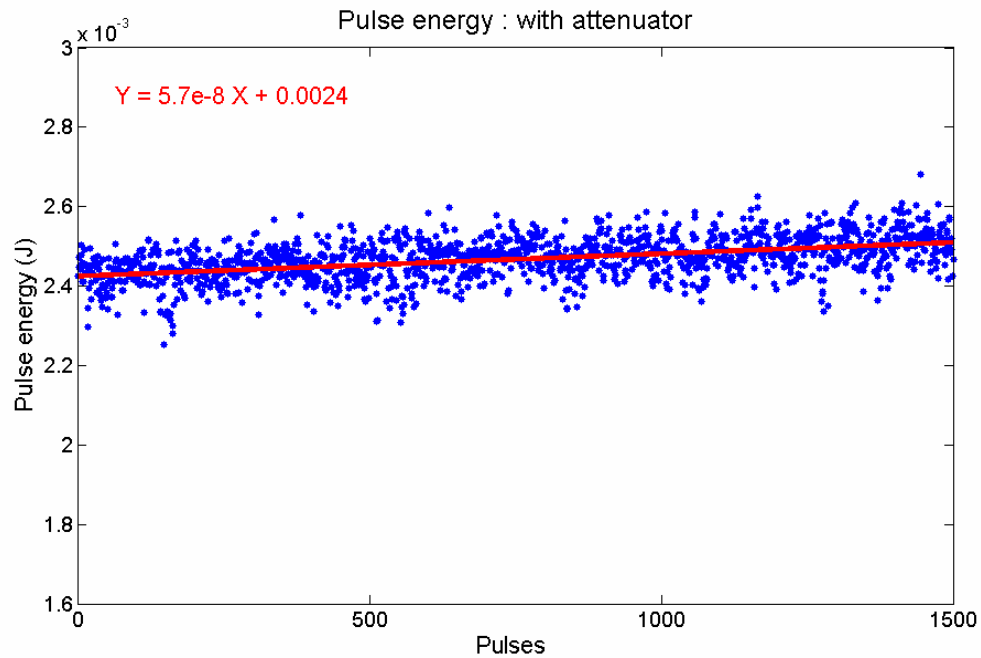


圖4-27(a) 以較穩定的高脈衝能量輸出後，再經過衰減器降低為適合的能量條件，其脈衝能量分布。與圖4-25相較，明顯可見到脈衝能量的標準差大為降低。

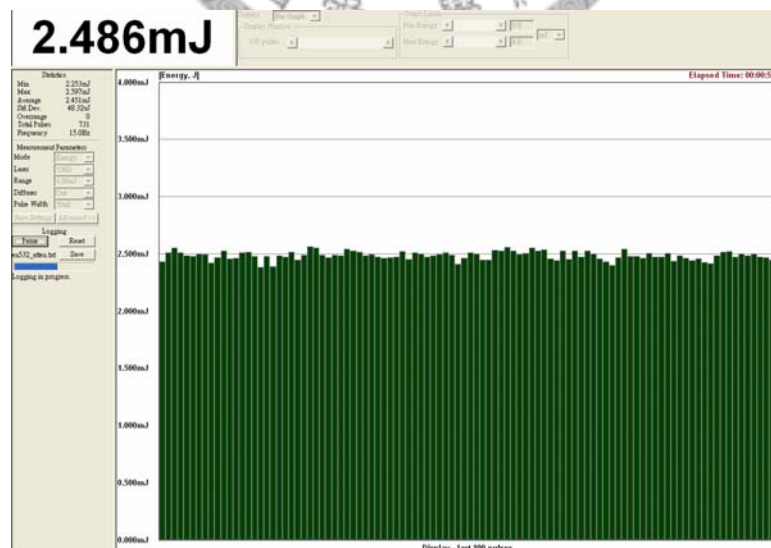
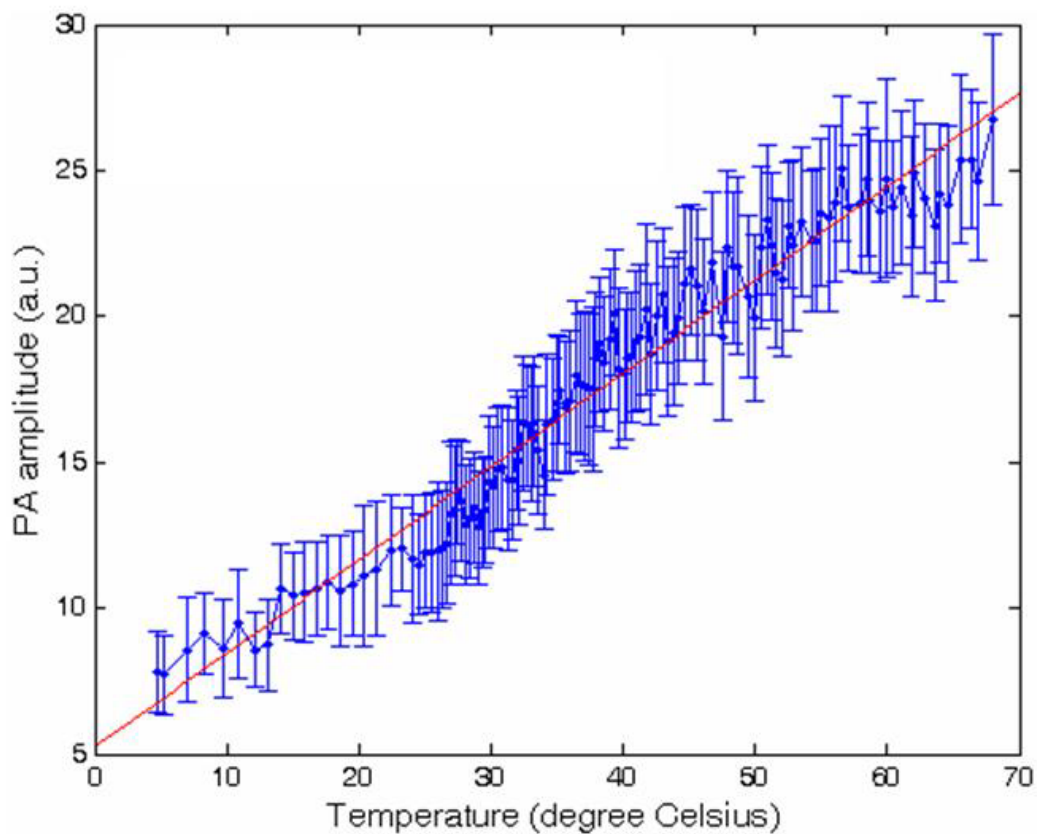


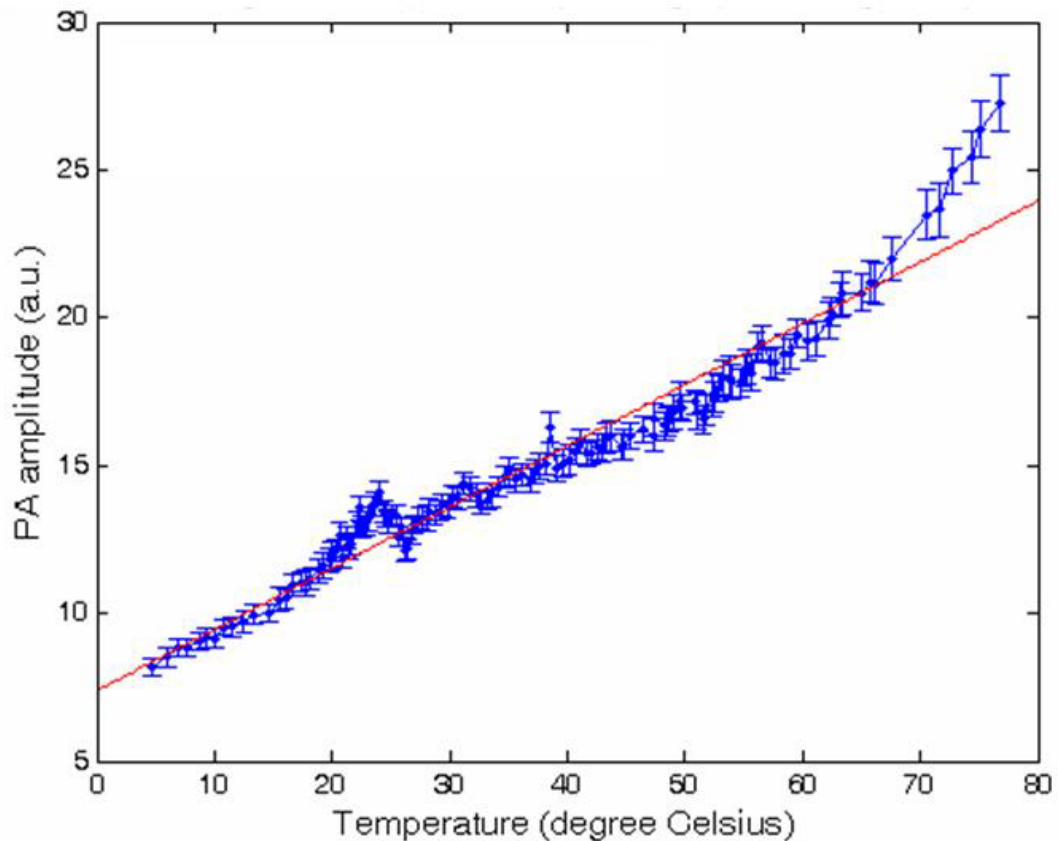
圖4-27(b) 經過衰減器，將高脈衝能量輸出降低後，以能量測量計(energy meter)測得的數據，共測量731個脈衝，頻率15Hz。其脈衝能量數據如下：最小值2.253 mJ，

最大值2.597 mJ，平均值2.451 mJ，標準差48.32 μ J。兩圖相較，可發現我們的措施，確實大幅降低了脈衝能量的標準差。

在實際情況中，脈衝式雷射的輸出並不是恒定的，造成光聲信號強度的不穩定性，脈衝式雷射的穩定度成為限制溫度準確度的重要因素。改善脈衝能量的穩定度之後，的確有效地降低「光聲信號強度-溫度」圖形中的標準差，提昇系統的溫度準確度，如下圖所示：



(a)



(b)

圖4-28 脈衝式雷射穩定度對溫度解析度的影響。(a)圖為直接利用低能量脈衝產生的圖形，(b)圖則先將雷射能量提高至較穩定的狀況，再使用衰減器，降低雷射脈衝之能量至不破壞仿體的程度。

在本研究中，藉由自行研發的高頻超音波探頭，我們可獲得空間解析度 200-300 μm 的影像，利用減少脈衝式雷射能量變異的方式，可將溫度解析度提昇至 1°C 以下，進而使得本系統達成非侵入式溫度量測方式的解析度要求，亦即空間解析度須達次毫米(submillimeter spatial resolution)，而溫度解析度小於 1°C (Larina et al. 2005)。

4.6 光聲信號對溫度變化之靈敏度與穩定性

在生醫工程上，利用連續波雷射照射金奈米粒子，因為表面電漿共振性質，可在極短的時間內昇溫攝氏數十度，以得到熱治療的效果，因此熱治療的溫度監測與安全性(safety)有關，測溫系統必須能即時靈敏地反應溫度的變化；而熱治療的時間往往長達數十分鐘，以達到治療的有效性(efficacy)，所以系統也必須能在這段長時間內穩定地工作。

若以數值表示金奈米粒子之瞬間加熱性質，如圖 4-29 所示，檢體之光聲信號在加熱瞬間，可於一秒鐘內上昇至飽和值，在關閉雷射熱源後，此信號值則瞬間下降至背景值。表示我們的系統可快速對熱流(heat flux)做出反應。

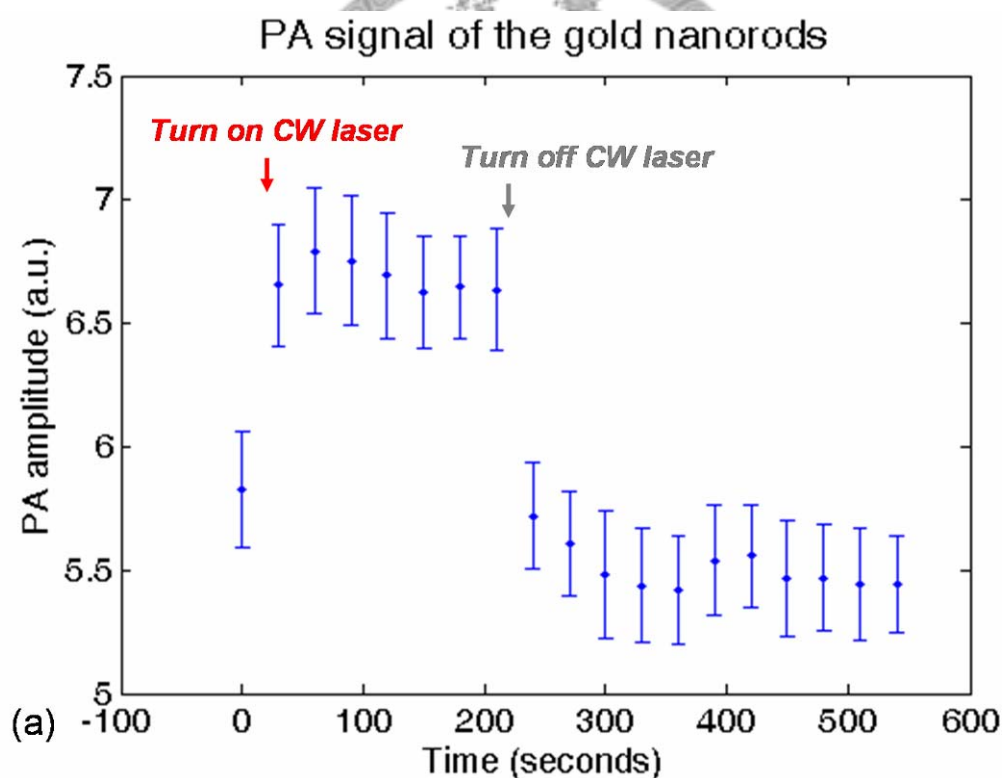


圖 4-29 光聲測溫法的靈敏度(sensitivity)試驗：在 30-210 秒之間，開啟連續波雷射，以加熱金奈米粒子，在此同時，光聲信號強度同步上揚。表示金奈米粒子水溶液之瞬間加熱性質，可利用光聲方式的測溫方式，在短時間(short-term)內即時反應。

熱治療的作用時間須長達數十分鐘，需要長時間監控溫度。若以光聲信號長時間監測金奈米粒子在連續波雷射照射下的反應，顯示光聲信號強度會隨著連續波雷射的開關，以及功率之變化，產生振幅的改變，如下圖所示。

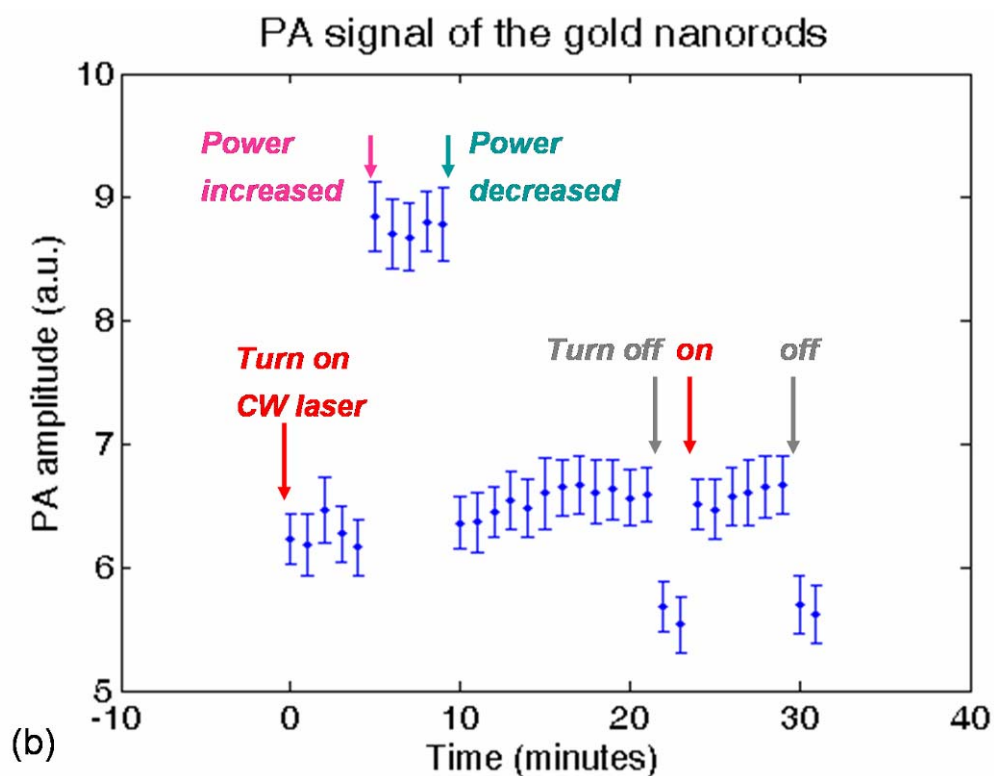


圖 4-30 光聲測溫法的穩定度(stability)試驗：以光聲信號長時間(long-term)監測金奈米粒子在連續波雷射照射下的熱效應，在實驗開始時，開啟連續波雷射加熱金奈米粒子水溶液，在第 5-9 分鐘的區間增加雷射功率，其後降回原本的功率，於第 22 分鐘時關閉連續波雷射，並於第 24 分鐘重新開啟，在第 30 分鐘時關閉連續波雷射，光聲信號則連續紀錄至連續波雷射關閉後 2 分鐘。

4.7 以光聲-超音波雙重造影辨識腫瘤

為模擬金奈米粒子在腫瘤內，受到雷射光熱治療後的热效應，我們將濃度 3nM 的金奈米桿直接注射 40 μ l 至小鼠背部的腫瘤內部，如下圖所示：



圖 4-31 將體積 40 μ l 濃度 3nM 的金奈米桿直接注射至小鼠背部腫瘤內部

將金奈米粒子皮下注射至腫瘤部位前後，我們以光聲超音波探頭進行掃描造影，同時取得超音波與光聲信號，並將兩者的影像重疊。超音波影像以灰階顯示，而光聲影像則以黃紅色的假彩色(pseudo-color)製作。在熱治療前的預備動作中，藉由此種多重造影方法(multi-modality imaging method)，臨床治療人員可將腫瘤更清楚地標示出來，在光熱治療前進行更好的治療計劃。此外，若選用與金奈米粒子吸收波峰對應的脈衝式雷射波長，用於光聲造影，可將金奈米粒子所在位置明確地與其它的軟組織區別，有助於治療人員在開啟連續波雷射進行熱治療前，先確認金奈米粒子是否完善地分布在腫瘤內部，可大幅提昇雷射光熱治療的安全性。

In-vivo Results: Before Injection

US: gray scale

PA 800 nm: pseudo-color

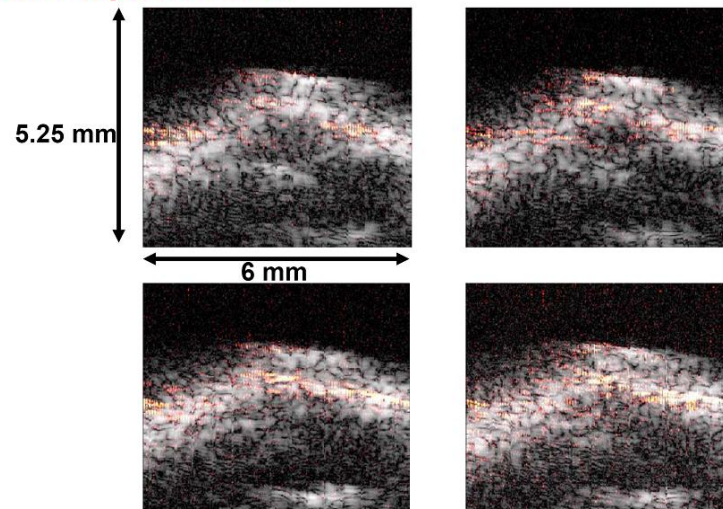


圖 4-32 此為注射金奈米粒子至腫瘤部位前的光聲-超音波疊合影像，共有四組切面，超音波影像中的上半部的白色高回音(hyperechoic)部份為正常的真皮層(dermis)軟組織，被白色部位包圍的低回音(hypoechoic)橢圓狀構造則為腫瘤組織。

30 Minutes After Injection

US: gray scale

PA 800 nm: pseudo-color

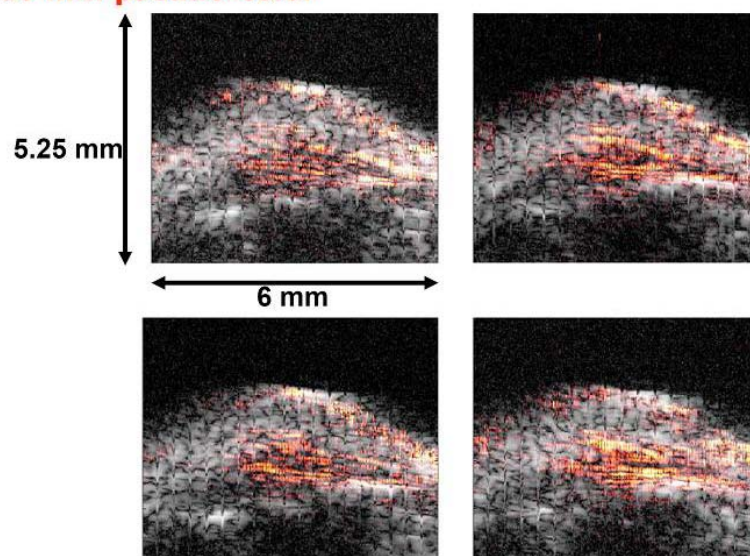


圖4-33 金奈米粒子注射三十分鐘後，再次進行光聲-超音波造影，可見到低回音

的腫瘤部位出現明顯的光聲信號，表示光聲影像之成像，有助於辨識小鼠腫瘤部位。

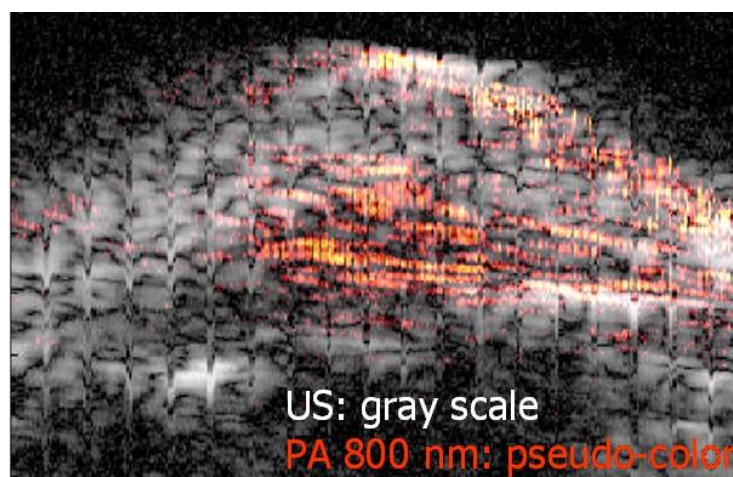
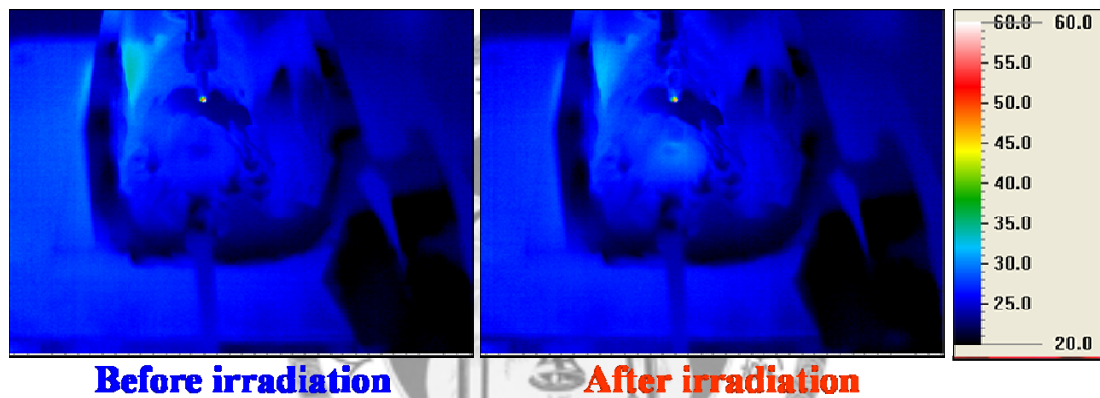


圖 4-34 以皮下注射方式將金奈米桿送入腫瘤後，在開啟連續波雷射前，先以超音波與光聲方式進行造影，並將兩種影像疊合。浸潤金奈米粒子後的腫瘤，可顯示高強度的光聲影像。超音波影像的縱向規則性偽影(artifacts)，是因小鼠呼吸運動造成的現象，一般小鼠的平均呼吸速率，可高達每分鐘 130 下。在實驗過程中，我們將小鼠進行全身麻醉，並供應氧氣與保溫措施以維持生命跡象，小鼠可於鎮靜狀態下平順呼吸，但快速的呼吸運動，仍可能造成超音波影像上的偽影。

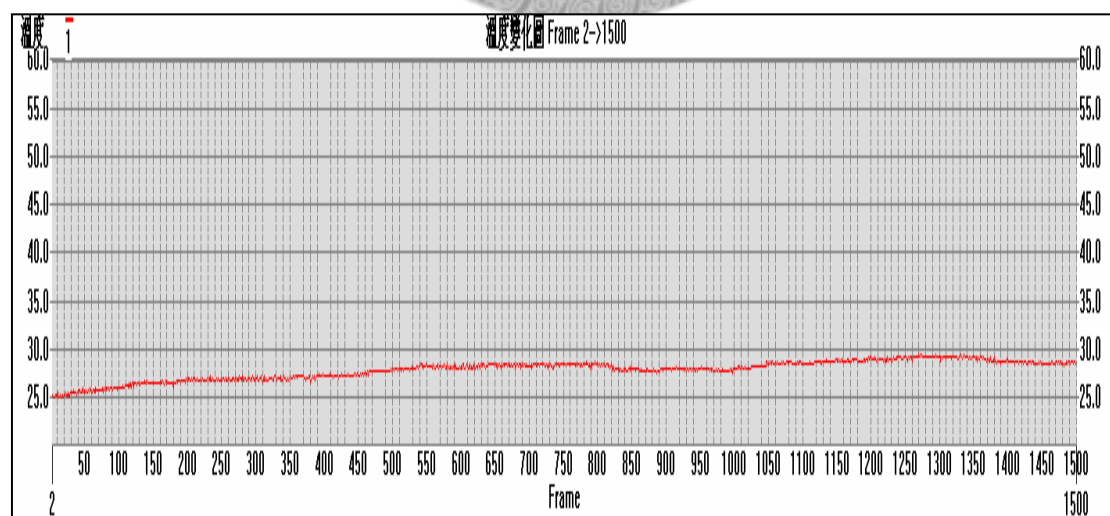
4.8 連續波雷射與金奈米粒子對於腫瘤的熱效應

光聲超音波造影之後，準備開啟連續波雷射，進行光熱治療。於正式以光聲方式測量溫度前，我們預先以畫面更新頻率(frame rate)達每秒 10 張影像的紅外線攝影機(infrared camera)，記錄注射金奈米桿前後的腫瘤，在照射連續波雷射前後的體表溫度，以確認連續波雷射可迅速將治療部位加熱至目標溫度，其紀錄如下圖所示。

Tumor: Not injected with gold nanorods



(a)



(b)

圖 4-35 尚未將金奈米桿以皮下注射方式送入腫瘤前，以紅外線攝影機紀錄小鼠體表在開啟連續波雷射前後的溫度變化，以了解連續波雷射對組織的熱效應。(a)左圖：開啟連續波雷射前，右圖：開啟連續波雷射後的遠紅外線熱影像(infrared thermography)圖形。(b)連續記錄 150 秒之體表昇溫曲線。

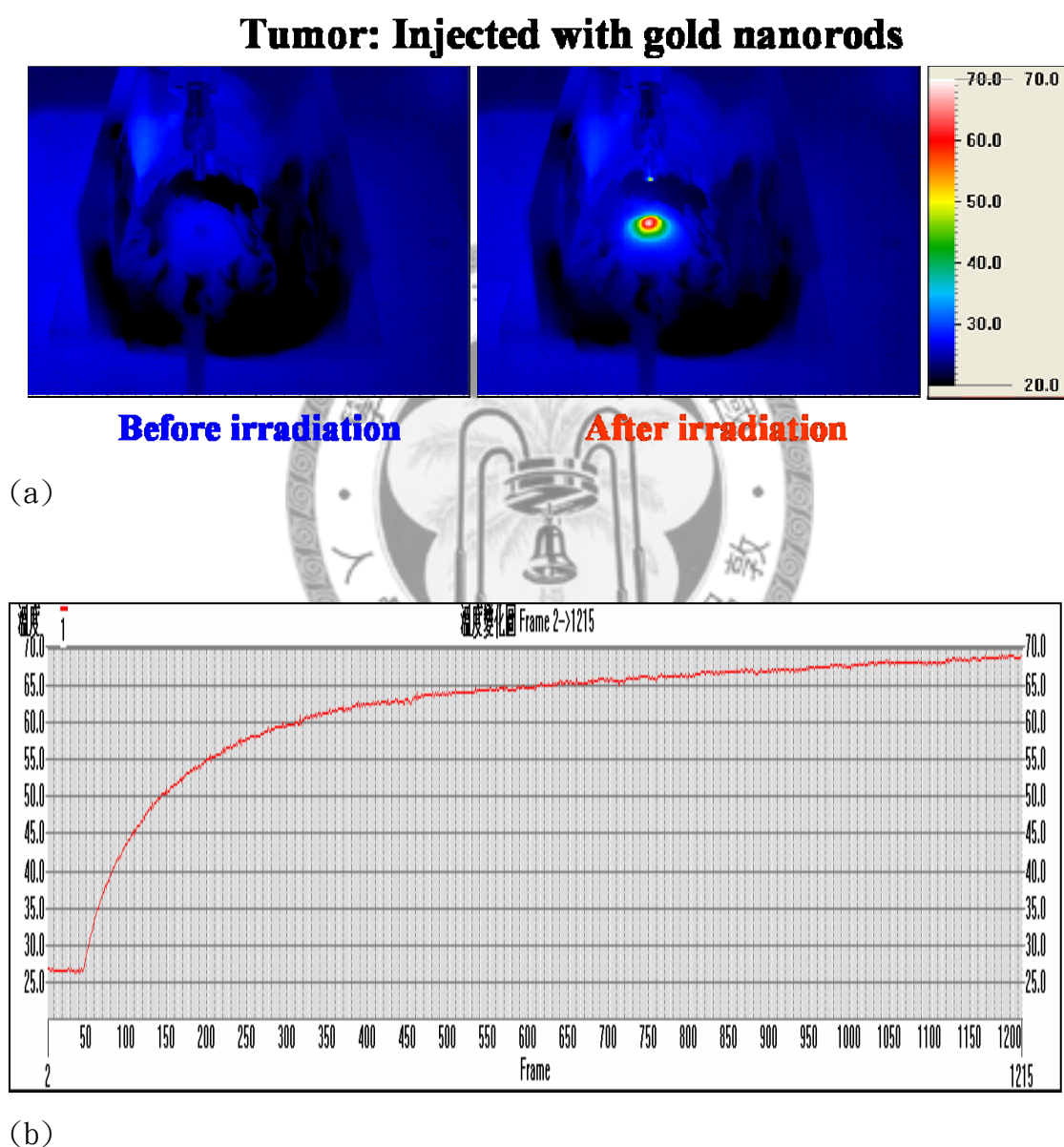


圖 4-36 將金奈米桿以皮下注射方式送入腫瘤後，在開啟連續波雷射前後，以紅外線攝影機紀錄小鼠體表的溫度變化，確認連續波雷射可迅速將治療部位加

熱至目標溫度。(a)左圖：開啟連續波雷射前，右圖：開啟連續波雷射後的遠紅外線熱影像圖形。(b)連續記錄 120 秒之體表升溫曲線。

室溫控制於 20.0°C ，利用連續波二極體雷射(CW diode laser, 808 nm, 660 mW, ONSET Electro-optics, Taipei, Taiwan)加熱組織。同一隻小鼠的體表溫度以紅外線照相方式，紀錄四組數據。

第一組數據：注射奈米粒子前的腫瘤表面溫度，保持在 $24.86 \pm 0.15^{\circ}\text{C}$ 。

第二組數據：在照射連續波雷射後，紀錄溫度數據，其表面溫度由 25.32 上升至 29.04°C ($\Delta T = 3.72^{\circ}\text{C}$)。

第三組數據：在注射金奈米粒子之後，紀錄第三組數據，可發現溫度保持於 $25.45 \pm 0.12^{\circ}\text{C}$ 。

第四組數據：於照射連續波雷射 2 分鐘後，體表溫度由 26.89 上升至 68.89°C ($\Delta T = 42.00^{\circ}\text{C}$)。

分析這四組溫度數據，我們可發現金奈米粒子配合連續波雷射的加熱效果($\Delta T = 42.00^{\circ}\text{C}$)，遠高於對腫瘤單純照射連續波雷射($\Delta T = 3.72^{\circ}\text{C}$)，整理如下表。

	紅外線熱影像溫度			
	未注射奈米粒子		注射奈米粒子後	
	CW laser off	CW laser on	CW laser off	CW laser on
腫瘤表面溫度	$24.86 \pm 0.15^{\circ}\text{C}$	由 25.32 上升至 29.04°C	$25.45 \pm 0.12^{\circ}\text{C}$	由 26.89 上升至 68.89°C
加熱效果	$\Delta T = 3.72^{\circ}\text{C}$		$\Delta T = 42.00^{\circ}\text{C}$	

這個結果顯示在無奈米粒子的環境，僅利用 660 mW 的連續波雷射是不足以達到高熱條件(hyperthermic condition)的，除非採用更高功率的連續波雷射，但

功率過高的雷射，會造成全面性的破壞，無法達到選擇性光熱治療(selective photothermotherapy)的目標。在奈米粒子存在的情形下，相同功率的連續波雷射可發揮超過十倍的昇溫效果，並輕易達到高熱(hyperthermia)狀態，這個差異來自於奈米粒子表面電漿共振的振盪現象，此為奈米粒子內在的性質之一(Huang et al. 2008)。奈米粒子可被寬頻的白光光譜激發，但只有合乎表面電漿共振波長的光子，才有強烈的昇溫效果(Jain et al. 2008)。



4.9 以連續波雷射為熱源進行熱治療的光聲信號強度

在室溫攝氏 19.9 度，以保溫燈 60W 的環境下，對小鼠進行全身麻醉，並供應異氟醚(isoflurane)與氧氣的混合氣體。注射 40 μ l 濃度 3nM 的金奈米粒子 AuNR₈₀₀-RGD4C 至腫瘤部位，以功率 660mW/波長 800nm 的連續波雷射，對腫瘤部位進行加熱時間 5 分鐘的光熱治療，同時以波長 800nm，脈衝能量 2.5 mJ 的脈衝式雷射，偵測光聲信號。在關注區域(ROI)附近，以針型熱電偶紀錄溫度，但避開連續波雷射直接照射的位置(圖 4-37)，並利用偵測的光聲信號，重建腫瘤截面的光聲影像，如圖 4-38。

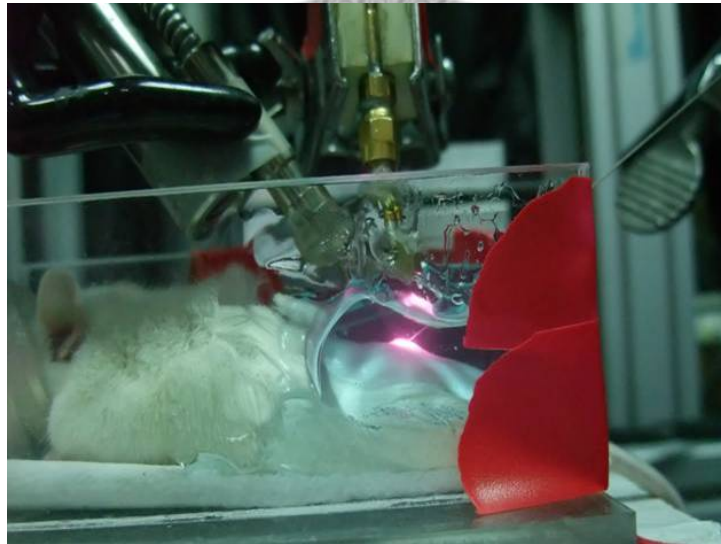


圖4-37 在全身麻醉，並供應異氟醚(isoflurane)與氧氣混合氣體的環境下，以連續波雷射為熱源，為小鼠腫瘤進行熱治療，同時偵測光聲信號強度與關注區域溫度。左方金屬夾為連續波雷射，中間金黃色物體為光聲超音波探頭，右方金屬細針則為針型熱電偶，透明狀物質為超音波傳導用凝膠。

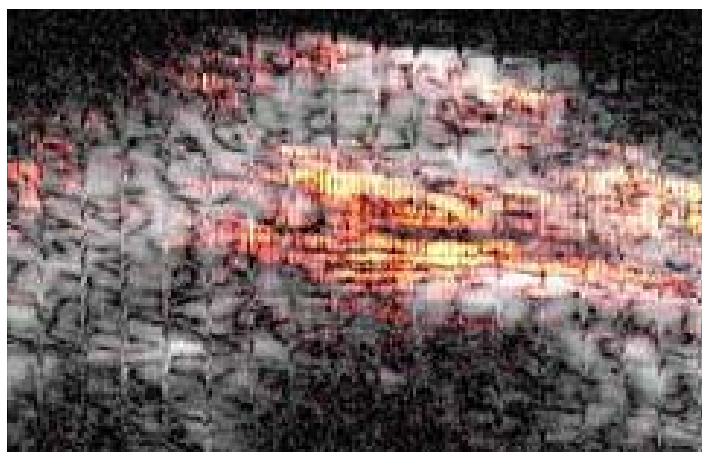


圖4-38 光聲溫度量測之活體實驗，用於監測雷射誘導光熱治療的過程，並將光熱治療過程的超音波影像(以灰階顯示)與光聲影像(以紅黃色假彩表示)疊合如圖示。

在此節的實驗中，我們使用的金奈米粒子為 AuNR₈₀₀-RGD4C，此係結合 RGD (Arg-Gly-Asp) 胜肽的金奈米粒子，而此胜肽可結合至腫瘤血管新生(tumor angiogenesis)內皮細胞之細胞膜上的 $\alpha_v\beta_3$ 結合蛋白(integrins)(Zitzmann et al. 2002)，可做為血管新生的標記，用來監測腫瘤的生長(Su et al. 2002; Line et. 2005)，因此 AuNR₈₀₀-RGD4C 對血管有較高的親和力。

大部份的光聲信號分布於腫瘤區域，表示金奈米粒子已良好地注射至目標區，一方面由於我們直接注射藥劑至腫瘤，另一方面也代表腫瘤區域對金奈米粒子表現較高的親合力(affinity)，因為腫瘤組織會增加新陳代謝(metabolism)，誘發腫瘤血管新生(tumor angiogenesis)，並使得注射的奈米粒子可被腫瘤的新生血管組織抓住(trap)，此生物學現象可提供更特定的腫瘤摧毀效果。此外，金奈米粒子亦可與具腫瘤特異性的抗體(tumor-specific antibodies)結合，例如 anti-EGFR, anti-Her2 以及 anti-CXCR4 (Li et al. 2007; Huang et al. 2008)。藉由此基本原理，針對癌症的複合式多重目標奈米探針(nanoprobes)，可有利於同時進行光聲造影與雷射光熱治療(Li et al. 2007)。

在注射奈米桿三十分鐘後，進行連續波雷射照射，並取得腫瘤切面的光聲影像，選取其中信號最強的區域進一步分析，選取的區域愈小，愈能準確地代表熱治療過程中，溫度最高的點。與上一節所提的分組方式類似，針對同一隻實驗動物，我們將取得的光聲壓力強度分為四組，並列表與製圖如下：

- (1) 第一組：未注射奈米桿，也未照射連續波雷射。光聲信號強度平均值 $\mu = 0.0174$ ，標準差 $\sigma = 0.0054$ 。
- (2) 第二組：未注射奈米桿，但照射連續波雷射。光聲信號強度平均值 $\mu = 0.0139$ ，標準差 $\sigma = 0.0034$ 。
- (3) 第三組：注射奈米桿，但未照射連續波雷射。光聲信號強度平均值 $\mu = 0.1726$ ，標準差 $\sigma = 0.0785$ ，溫度 $26.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- (4) 第四組：注射奈米桿，也照射連續波雷射。光聲信號強度平均值 $\mu = 0.5286$ ，標準差 $\sigma = 0.1237$ ，腫瘤附近的溫度達到 $40.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

	治療狀態		光聲信號強度 平均值	光聲信號強度 標準差	腫瘤附近溫度
	注射金 奈米桿	照射連續 波雷射			
第一組	否	否	0.0174	0.0054	與第三組相近
第二組	否	是	0.0139	0.0034	與第三組相近
第三組	是	否	0.1726	0.0785	$26.4\text{ }^{\circ}\text{C}$
第四組	是	是	0.5286	0.1237	$40.0\text{ }^{\circ}\text{C}$

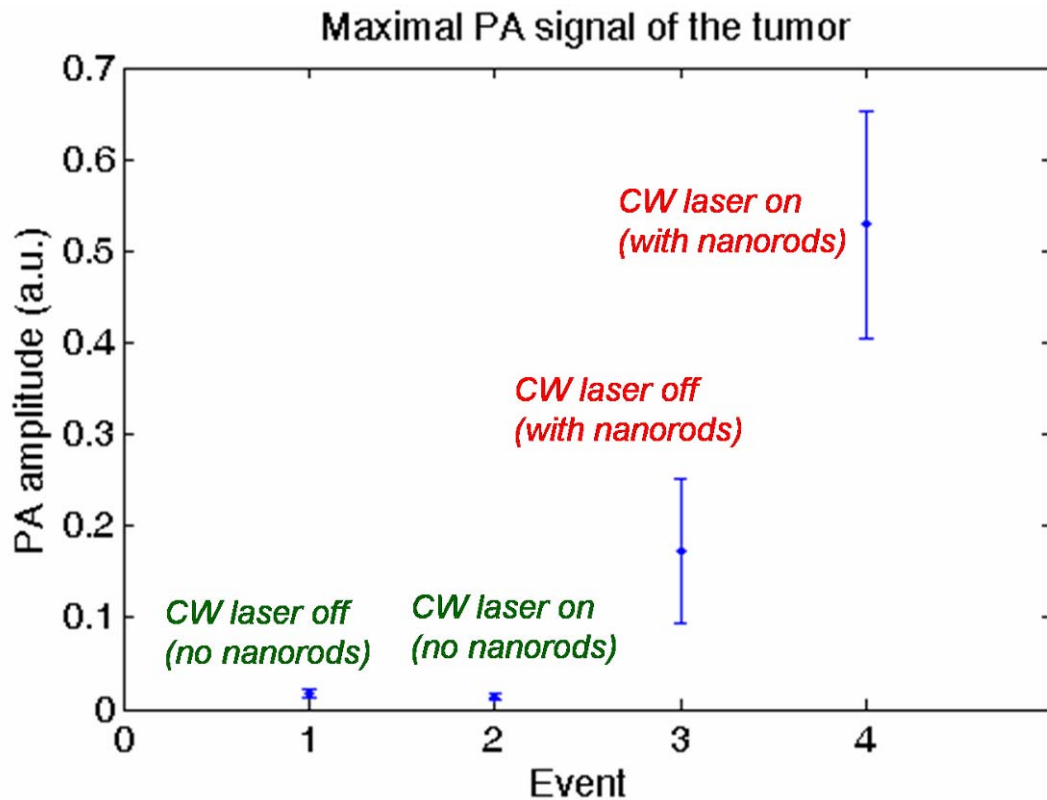


圖 4-39 在雷射電漿光熱治療活體實驗過程中，光聲信號強度的記錄。事件一 (event 1) 代表「未注射奈米桿，也未照射連續波雷射」；事件二代表「未注射奈米桿，但照射連續波雷射」；事件三表示「未注射奈米粒子，也未照射連續波雷射」；事件四則為「同時注射金奈米粒子，亦以連續波雷射照射」。在缺乏金奈米粒子輔助下，可發現事件一與事件二的光聲信號強度並無明顯差異。注射金奈米粒子後，即使未照射連續波雷射，亦使光聲信號的強度上昇(事件一與事件三)，這是因為金奈米桿具備有效吸收脈衝式雷射能量的效果，造成光聲信號變大。在奈米桿的輔助下，使用連續波雷射加熱，腫瘤的光聲信號可大幅上昇(事件二、三、四)。

在第一組與第二組的數據中，光聲信號強度並無明顯差別，表示缺乏奈米粒子的協助下，僅照射連續波雷射並無法達到高熱效應(hyperthermic effect)。

比較第一組與第三組的數據，可發現光聲信號強度增加大約 10 倍，顯示金奈米桿可有效吸收脈衝式雷射的能量，產生較高的光聲信號。因此金奈米粒子的表現優於組織內部的載色體(intrinsic tissue chromophore)，適於做為光聲影像的「顯影劑」(contrast medium)。

第三組與第四組的光聲信號強度有明顯的差異存在，這是因為照射連續波雷射可激發奈米粒子的表面電漿共振效應，導致軟組織的高熱。上述結果皆與上一節使用紅外線熱影像量測的結果符合(圖 4-35、圖 4-36)，進一步支持光聲系統用於溫度監測能力的可靠性與穩定性。但本節實驗中，連續波雷射照射後，昇高的溫度量值較低，是因為光聲造影過程，須於皮膚表面塗抹超音波凝膠，會連續波雷射光束的散射與吸收等效應，減少真正抵達病灶的能量，而且凝膠具冷卻效果，會降低治療部位熱量的累積，所以減少溫度升高量。



4.10 定量式熱影像技術

前述的實驗結果與討論，已顯示光聲系統對於雷射光熱治療過程，監測溫度的潛在能力與實用性。本節將進一步討論將此系統實踐於「定量式熱影像」(quantitative thermal imaging))之熱測繪技術(thermal mapping technique)。

在「2.3 光聲信號與溫度之關係」一節中，顯示當組織受到脈衝式雷射照射後，會造成局部壓力上昇，上昇的壓力 $P(z)$ 與 Grüneisen 參數 Γ 有關，具有如下的關係式：

$$P(z) = \left(\frac{\beta C_s^2}{C_p} \right) \mu_a F(z) = \Gamma \mu_a F_0 e^{(-\mu_a z)},$$

水分豐富的軟組織在 10 至 55 °C 之間的熱體積膨脹係數，為溫度的線性函數(Shah et al. 2008)；水的 Grüneisen 參數對溫度呈現如下的線性關係(Larina et al. 2005)：

$$\Gamma = a + bT,$$

進一步移項化簡，可以得到下列方程式：

$$T(z) = cP(z) + d,$$

此處的 $c = \frac{a + bT_0(z)}{bP_0(z)}$ ， $d = -\frac{a}{b}$ ，而 T_0 與 P_0 分別為初始溫度與壓力(光聲信號強度)。腫瘤與一般的軟組織 70% 以上的成分皆由水組成，故可借用水的 Grüneisen 參數特性，只要初始溫度與光聲信號強度已知，根據上述原理，即可合理估算它們的溫度。

經由查閱水的熱學性質文獻，可描繪出圖 4-40 之曲線，代表水的溫度與 Grüneisen 參數的關係，此方程式為 $\Gamma = a + bT$ ，其中的 $a = 0.016$ ， $b = 0.0046$ ， $d = -a/b = -3.4783$ ，若能掌握初始溫度與初始壓力，則可求得 c ，進而解出溫度 T 的數值。

利用水的熱學性質(EngineeringToolBox, “Water - Thermal Properties”),可計算純水的溫度與 Grüneisen 參數 Γ 關係圖如下(Wei 2009)：

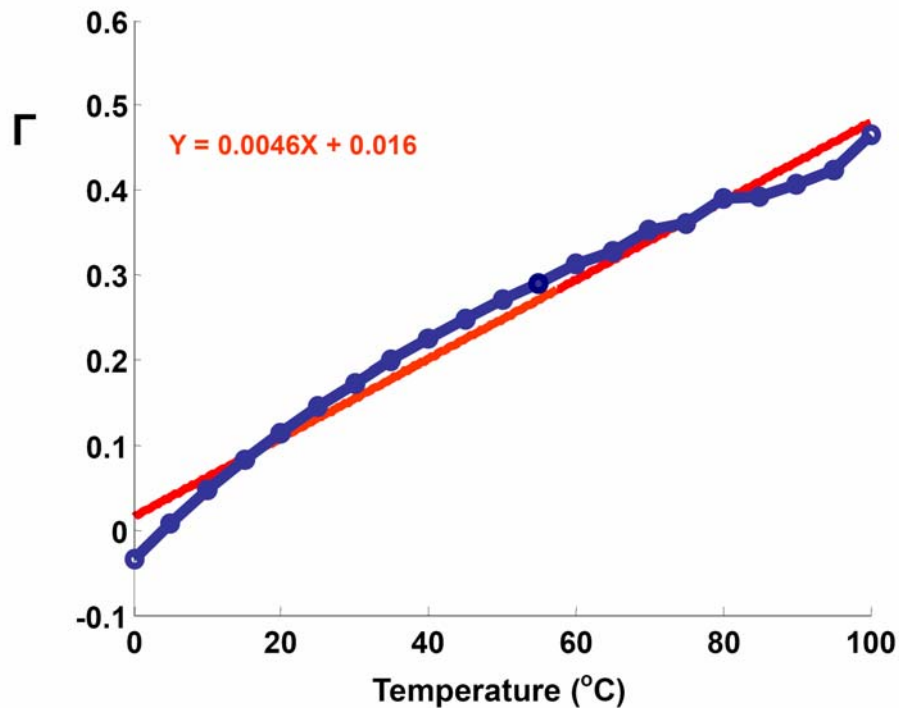


圖 4-40 水的溫度與 Grüneisen 參數 Γ 關係圖

在瓊脂糖仿體或常溫水浴槽中，放置PE-50細管或一般的吸管，其中灌注金奈米粒子或二次去離子水，以脈衝式雷射2.0mJ/pulse進行光聲信號偵測，並分別以低功率720mW與可調式高功率連續波雷射(7.90W與2.73W)照射，如下圖所示。



圖4-41 模擬小鼠之瓊脂糖仿體，以PE-50細管插入淺層位置，模擬皮膚腫瘤，並灌注二次去離子水或濃度3nM的金奈米粒子水溶液。上方金黃色物體為光聲超音波

探頭與脈衝式雷射的光纖，左側黑色膠布包覆之金屬，為連續波雷射之光纖輸出口。

在低功率(720mW)連續波雷射 800nm 照射下，比較金奈米粒子水溶液與二次去離子水加熱後的溫度分布圖。本實驗之初始溫度 $T_0 = 22.3^\circ\text{C}$ ，代入 $c = \frac{a + bT_0(z)}{bP_0(z)}$ ，可得 $c = 25.7783/P_0(z)$ ，進而可重建定量式熱影像。下圖中分別代表金奈米粒子(左)與二次去離子水(右)受低功率雷射加熱後的溫度分布圖。

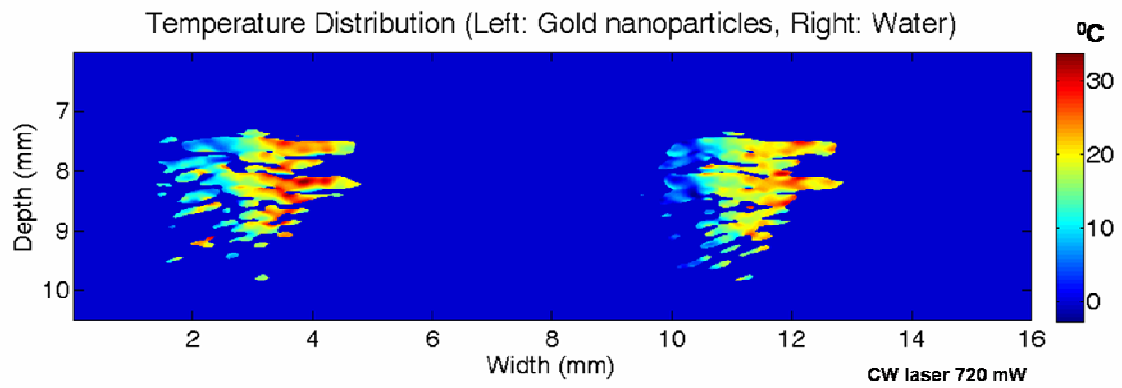


圖4-42 在720mW的連續波雷射之下，金奈米粒子水溶液的最高溫度為 38.8°C ，二次去離子水則為 31.4°C 。

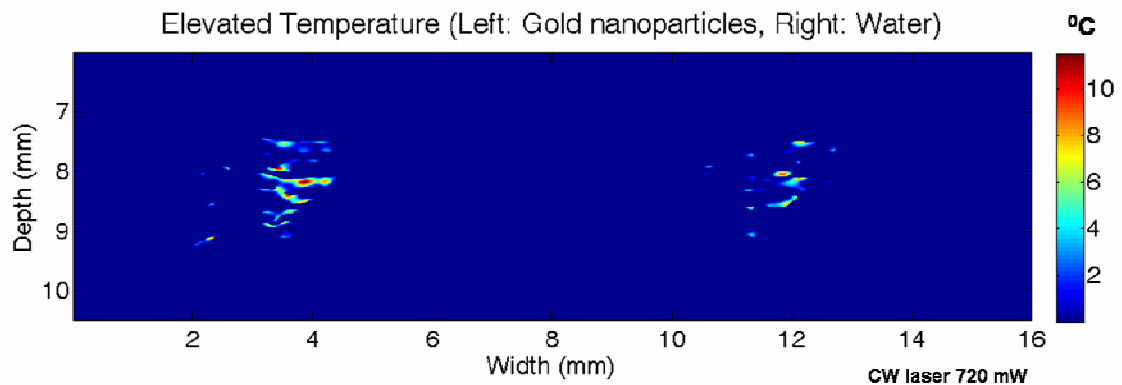


圖4-43 在720mW的連續波雷射之下，金奈米粒子水溶液的最高上升溫度為 11.5°C ，二次去離子水則上升 9.1°C 。

在高功率連續波雷射(7.90W)照射下，比較金奈米粒子水溶液與二次去離子水加熱後的溫度分布圖。本實驗之初始溫度 $T_0 = 20.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，代入 $c = \frac{a + bT_0(z)}{bP_0(z)}$ ，可得 $c = 23.4783/P_0$ ，進而可重建定量式熱影像如下圖：

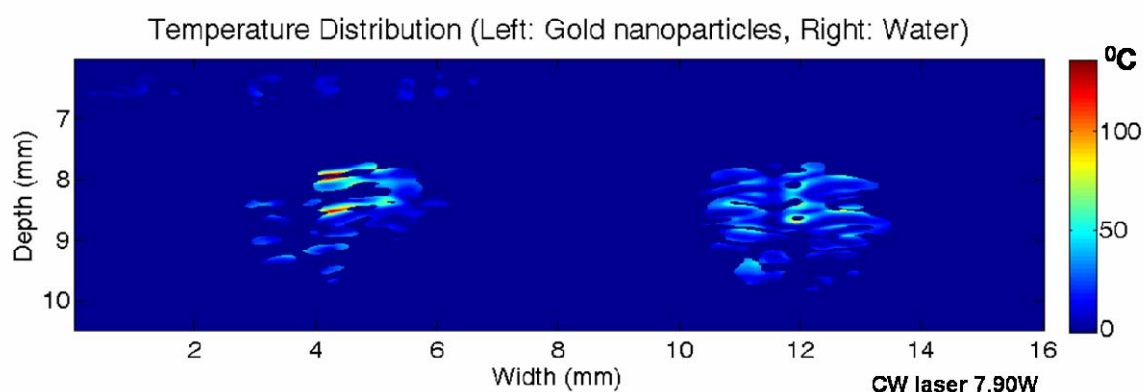


圖4-44 在7.90W的連續波雷射照射下，金奈米粒子水溶液(左)與二次去離子水(右)受加熱後的溫度分布圖。最高溫度：奈米粒子136.7 $^{\circ}\text{C}$ ，二次去離子水86.8 $^{\circ}\text{C}$ 。

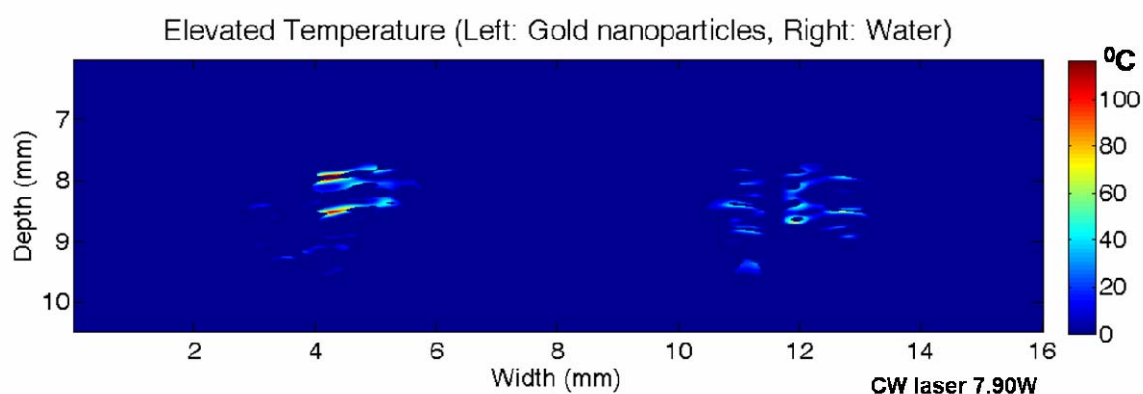


圖4-45 以7.90W的連續波雷射照射下，金奈米粒子水溶液(左)與二次去離子水(右)受加熱後的上昇溫度分布圖。最高上昇溫度：奈米粒子116.7 $^{\circ}\text{C}$ ，二次去離子水66.8 $^{\circ}\text{C}$ 。

比較高功率7.90W與較低功率2.73W連續波雷射對相同濃度的金奈米粒子水溶液的影響，其熱影像測繪圖如下：

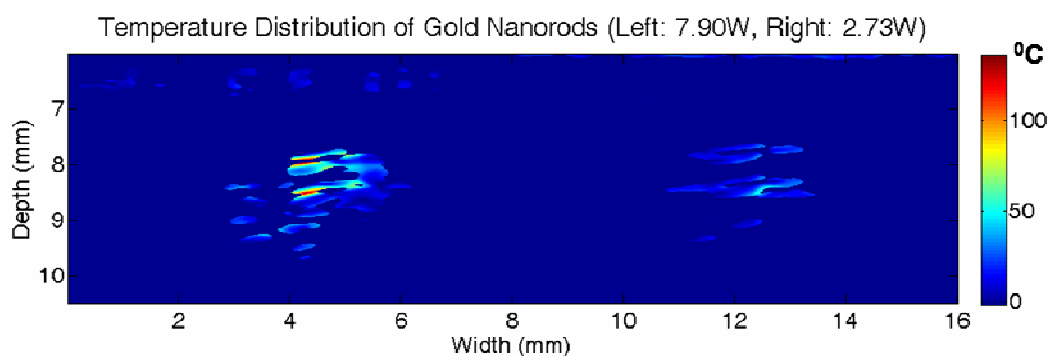


圖4-46 金奈米粒子水溶液分別以連續波雷射在7.90W(左)與2.73W(右)照射，加熱後的溫度分布圖。最高溫度：7.90W可加熱至136.7°C，而2.73W僅加熱至51.1度°C。

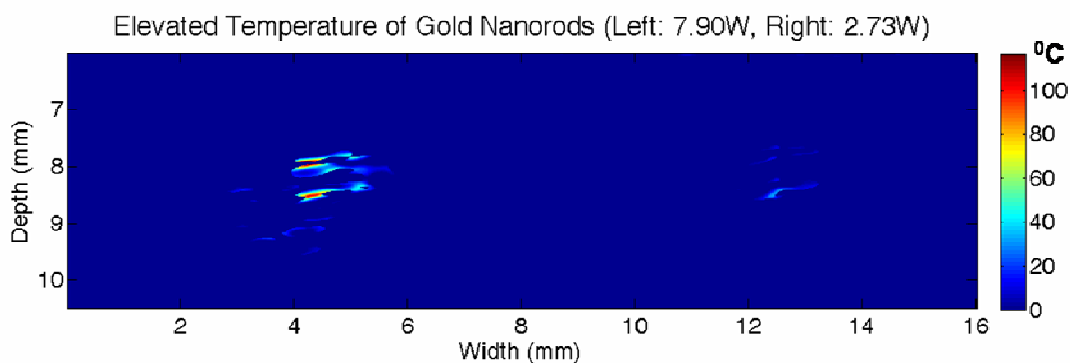


圖4-47 金奈米粒子水溶液分別以連續波雷射在7.90W(左)與2.73W(右)照射，加熱後的溫度分布圖。7.90W加熱後的上昇溫度為116.7°C，而2.73W加熱後，可上昇31.1度°C。

在上圖的實驗中，可發現在7.90W高功率雷射加熱下，金奈米粒子水溶液可上昇至136.7°C的高溫，已超過水的沸點，應可觀察到沸騰的現象；而2.73W與720mW

的連續波雷射，則不致發生沸騰。因此，我們使用較大的吸管，管中填塞棉花，分別以金奈米粒子水溶液與二次去離子水浸潤，並以7.90W與2.73W的連續波雷射照射。發現金奈米粒子水溶液在7.90W連續波雷射照射下，確實有沸騰的現象，可清楚以肉眼觀察，雷射關閉後，其內的綿花亦有燒黑的現象；但2.73W連續波雷射則無此現象。比較兩者的結果，可間接證明熱影像圖的準確性。沸騰現象的圖片如下：



圖4-48 在7.90W的高功率808nm連續波雷射加熱下，金奈米粒子水溶液產生沸騰的現象，雷射關閉後，吸附水溶液的棉花團被燒黑(左上圖)，證明在此情況下，連續波雷射的確將奈米粒子水溶液昇溫至水的沸點以上的溫度，支持利用光聲影像重建的熱影像圖結果。以相同的設施，高功率加熱二次去離子水，或以較低的功率加熱金奈米粒子水溶液，皆未發現沸騰，亦與熱影像圖的結果相符。

將上述三種功率的連續波雷射，對濃度3nM的金奈米粒子水溶液的昇溫結果製表：

		720mW	2.73W	7.90W
金奈米粒子水溶液 (濃度3nM)	最高溫度(°C)	38.8	51.1	136.7
	溫度升高量(°C)	11.5	31.1	116.7

熱治療的目標溫度，在42-60°C之間，比較上列三組數據，可發現「過猶不及」的現象，功率過低，則無法達到治療目標溫度，但功率過高，則造成過度的破壞。

在此濃度的金奈米粒子水溶液，較適宜進行熱治療的能量，應在2.73W附近的功率，使最高溫度可達51.1度，上升溫度31.1度，具有最佳的治療效益，如下圖所示：

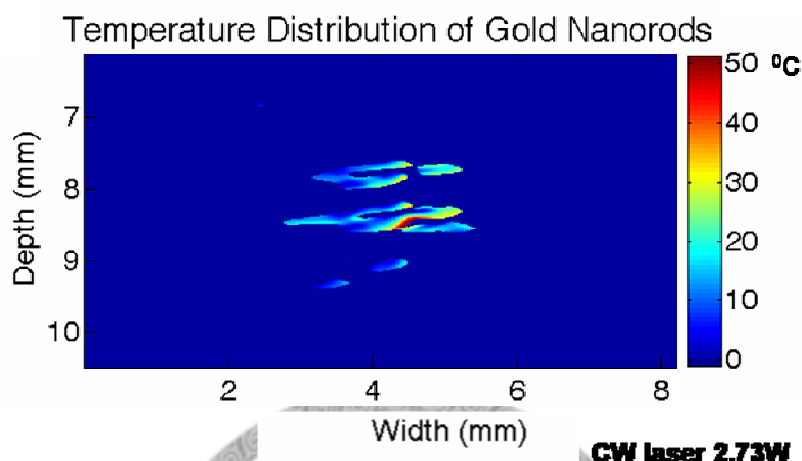


圖4-49 在3nM濃度的金奈米粒子水溶液，以2.73W功率的連續波雷射進行熱治療，最高溫度可達51.1度，上升溫度31.1度，具有最佳的治療效益。

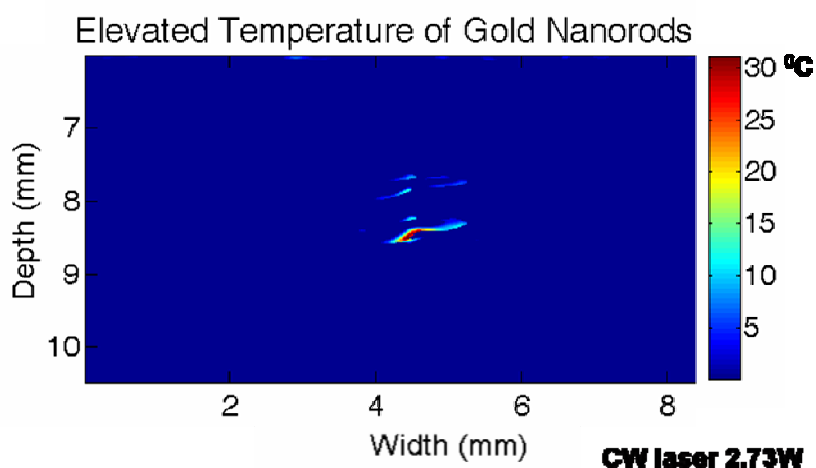


圖4-50 在3nM濃度的金奈米粒子水溶液，以2.73W功率的連續波雷射進行熱治療，上升溫度為31.1度，此昇溫幅度之治療效益較佳。

4.11 標靶式雷射光熱治療之定量式熱影像

我們所用的腫瘤細胞株OECM1會表現出大量的Her2蛋白，因此可用Her2抗體加以標定(Wei 2009)。為進行標靶式雷射光熱治療，我們將結合Her2抗體的金奈米粒子AuNR₈₀₀-antiHER2由老鼠之尾靜脈(tail vein)注入體內，並於24小時之後，以連續波雷射進行雷射光熱治療，實驗配置如下圖。

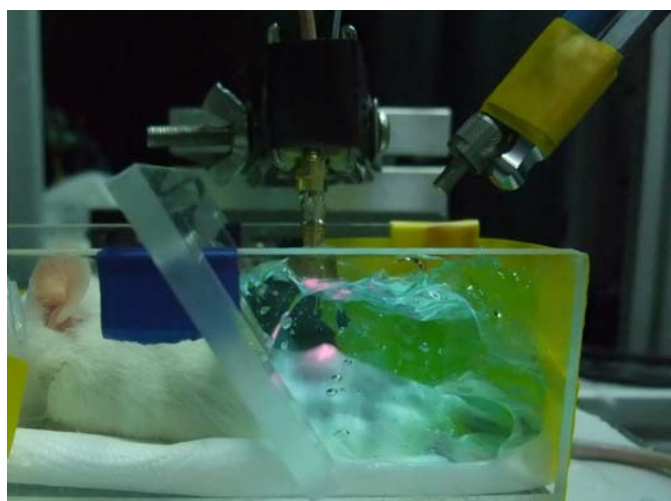


圖4-51 使用AuNR₈₀₀-antiHER2探針注入老鼠尾靜脈，並於24小時之後以連續波雷射進行雷射光熱治療。

遵循先前之實驗分析方式，我們進一步使用光聲信號，計算組織溫度，以探討標靶式雷射光熱治療過程的熱影像。若採用功率高達約3W的連續波雷射，照射與金奈米粒子結合後的腫瘤，可達攝氏200度以上的高溫，治療後區域有燒焦之跡象，如下圖所示：



圖4-52 採用功率高達約3W的連續波雷射照射腫瘤，治療後區域有燒焦之跡象。

上述實驗之數據分析如下 (Wei 2009)：

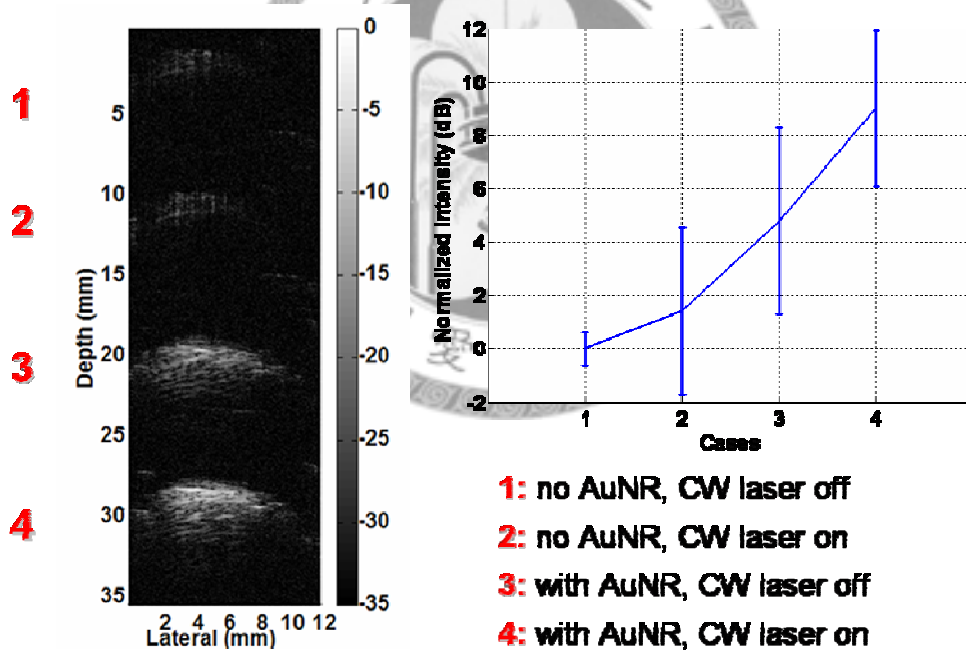


圖 4-53 左圖為光聲信號，由上至下共分為四組，分別為未注射金奈米粒子下，連續波雷射開啟前後，與注射金奈米粒子二十四小時後，照射連續波雷射前後。右圖：此四組情況的光聲信號強度(Wei 2009)。

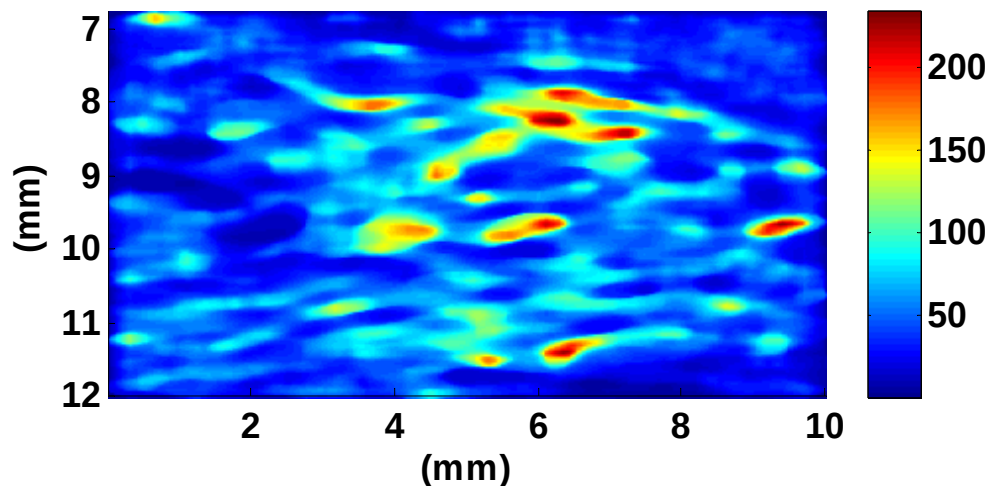


圖 4-54 注射 AuNR 二十四小時後，以功率約 3W 之連續波雷射，進行雷射光熱治療的腫瘤熱影像圖。可使腫瘤內部溫度處於高達攝氏 200 度以上的溫度，但因雷射功率過強，造成非選擇性的全面破壞，無法達成標靶式雷射光熱治療的目標 (Wei 2009)。

在連續波雷射功率過強的情況下，無法達到標靶式雷射光熱治療的目標，也就是選擇式地破壞腫瘤組織，但保留正常組織的完整與不受傷害。因此，在尾靜脈注射照射 AuNR₈₀₀-HER2 probe 二十四小時後，我們進一步以合乎安全規範的連續波雷射重新照射腫瘤部位，以進行熱治療。為防止皮膚受損，因此採用低能量連續波雷射功率(約 70mW)加熱小鼠腫瘤，換算功率密度約為 320 mW/cm²，符合 Z136.1 皮膚照射量的安全規範，實驗後腫瘤外觀並無明顯變化，如下圖所示。



(a) 連續波雷射照射前



(b) 連續波雷射照射後

圖 4-55 參照 ANSI Z136.1 之皮膚照射量安全規範，採用低能量連續波雷射功率（約 70mW）加熱小鼠腫瘤，換算功率密度約為 320 mW/cm^2 ，實驗後腫瘤外觀並無明顯變化。

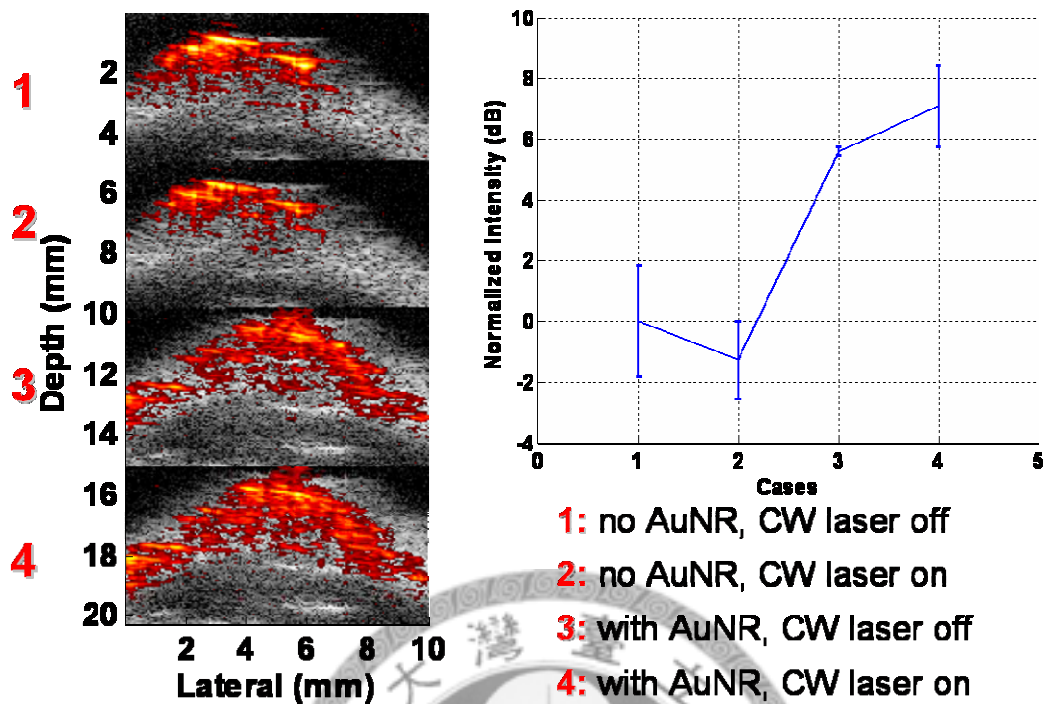


圖 4-56 左圖為超音波與光聲之複合影像，由上至下分別為第 1 組：注射金奈米粒子前，未照射連續波雷射；第 2 組：注射金奈米粒子前，照射連續波雷射；第 3 組：注射金奈米粒子 24 小時後，尚未開啟連續波雷射；第 4 組：金奈米粒子注射 24 小時後，照射連續波雷射。右圖為對應之光聲信號強度，趨勢與先前之實驗結果吻合(Wei 2009)。

在注射金奈米粒子達二十四小時後，開啟連續波雷射，進行雷射光熱治療，可得如下之熱影像圖，證實我們的系統亦可用於標靶式雷射光熱治療之定量式熱影像。

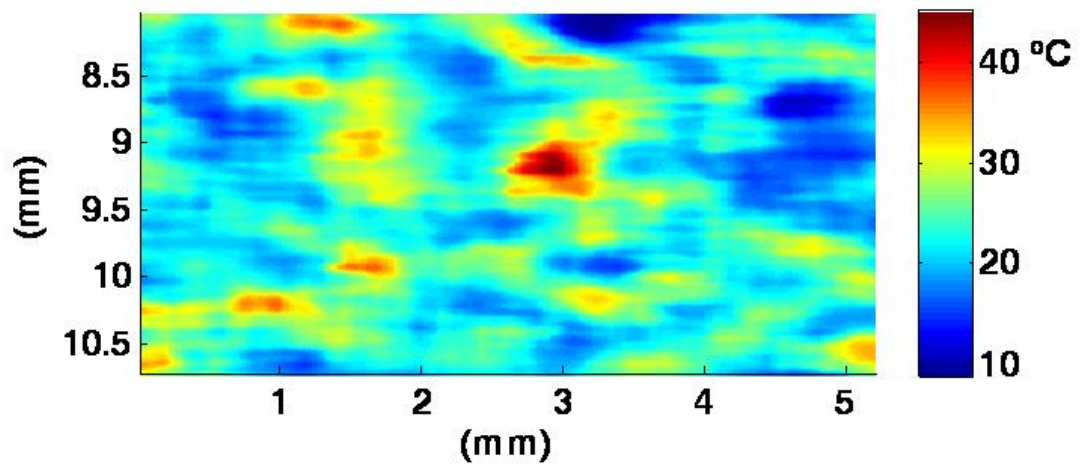


圖4-57 標靶式雷射光熱治療之定量式熱影像，腫瘤中心部位可達攝氏45度以上之溫度，符合熱治療之目標(Wei 2009)。

標靶式雷射光熱治療前的腫瘤組織病理圖，顯示腫瘤細胞排列緻密，無壞死現象，如下圖所示。

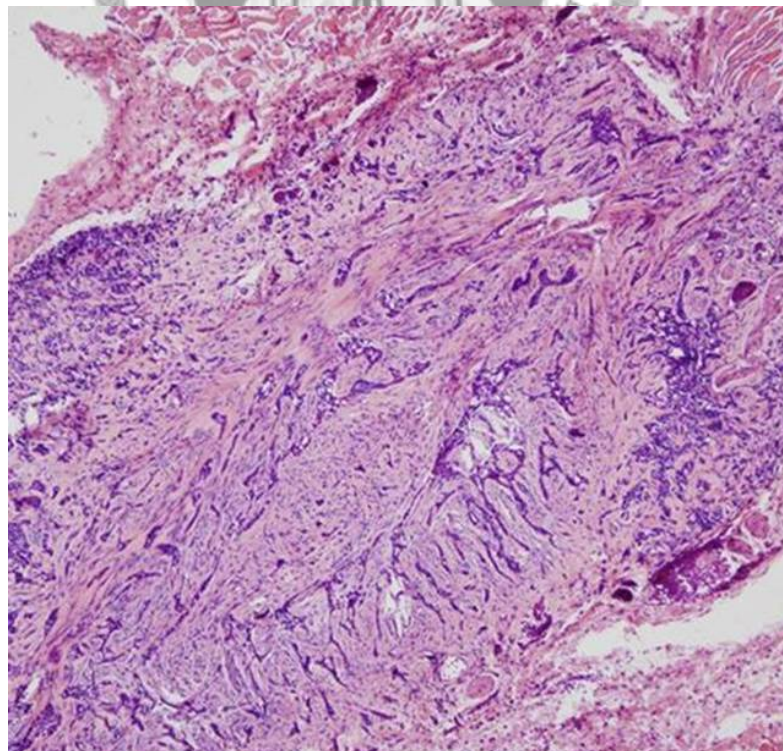


圖4-58 標靶式雷射光熱治療前的腫瘤組織病理圖

但若將上述實驗中，經過雷射光熱治療後的小鼠腫瘤進行病理檢查，可發現腫瘤內部發生細胞壞死，但周邊軟組織保持完整的現象。如下圖所示：

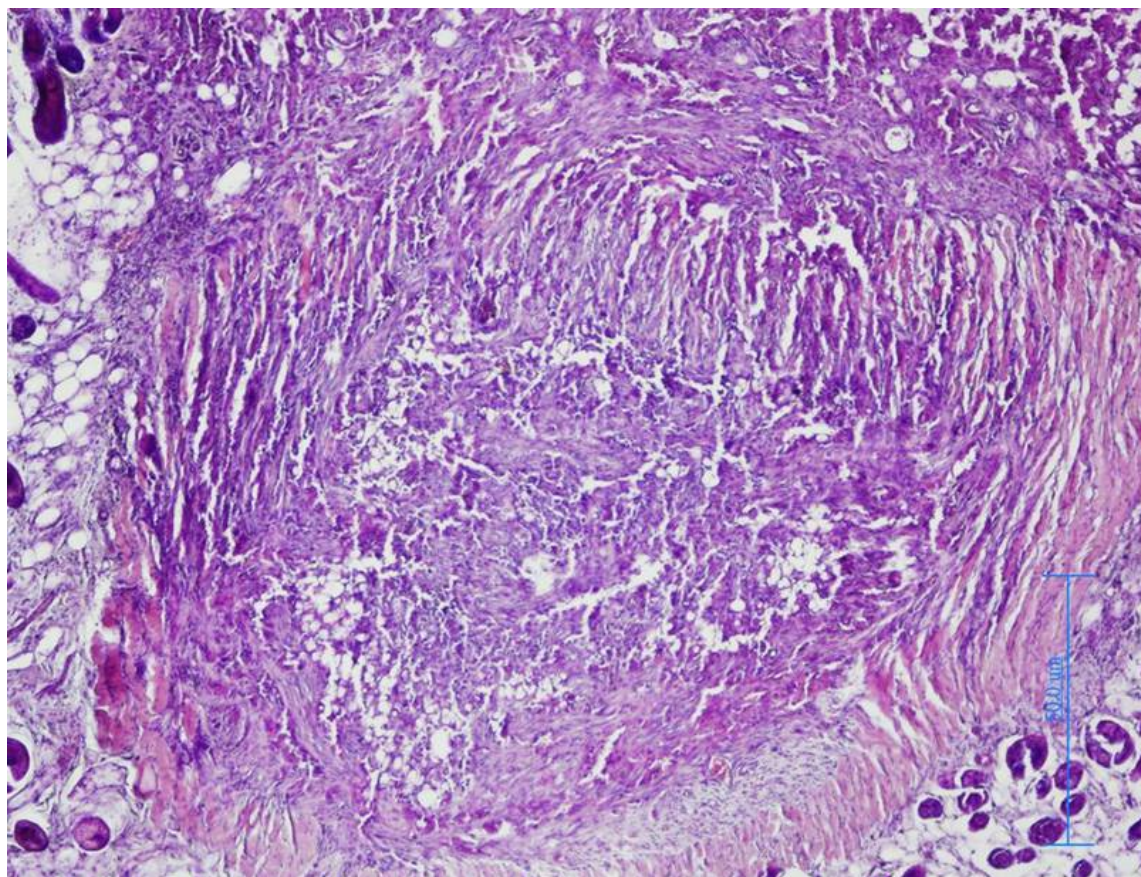


圖4-59 標靶式雷射光熱治療後的腫瘤組織病理圖，顯示腫瘤內部出現細胞壞死，但周邊軟組織保持完整。

在下圖中顯示，腫瘤組織內部的腫瘤細胞遭受光熱治療的破壞，產生壞死現象，但腫瘤組織附近的毛囊組織，並未受到雷射光熱治療的破壞，因此仍保持健全的状态(如黃色指標所示)。

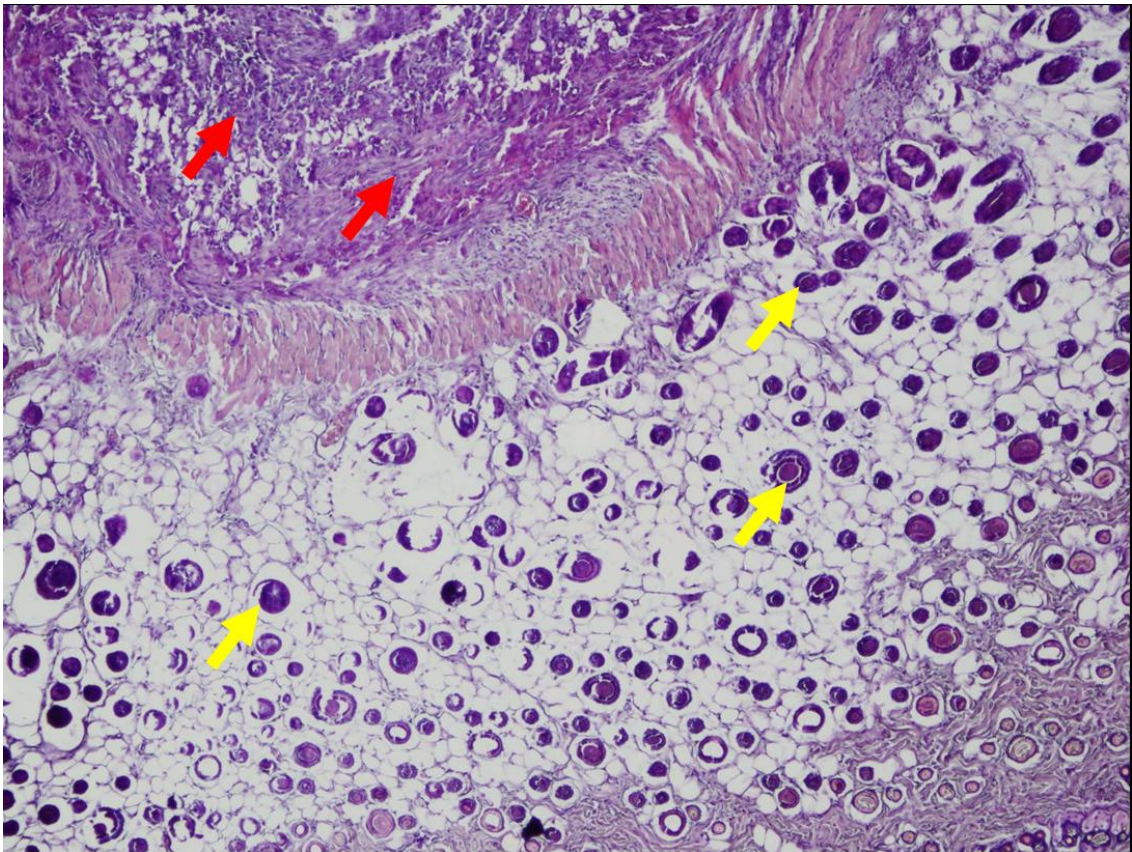


圖4-60 腫瘤組織內部的腫瘤細胞受到雷射光熱治療破壞，而產生壞死，但附近的毛囊組織，並未受到光熱治療影響，仍保持完整 (如黃色指標所示)。

進一步將圖4-59放大如下，亦可發現腫瘤內部的癌細胞壞死(如紅色指標所示)，但附近的纖維母細胞(fibroblasts)則保持完整(如綠色指標所示)的情況，顯示本實驗的確達到標靶式雷射光熱治療的目的，亦即利用特定抗體來標定腫瘤組織，並以抗體所附著的金奈米粒子於加熱後破壞癌細胞，但仍保有腫瘤以外的組織之完整性。

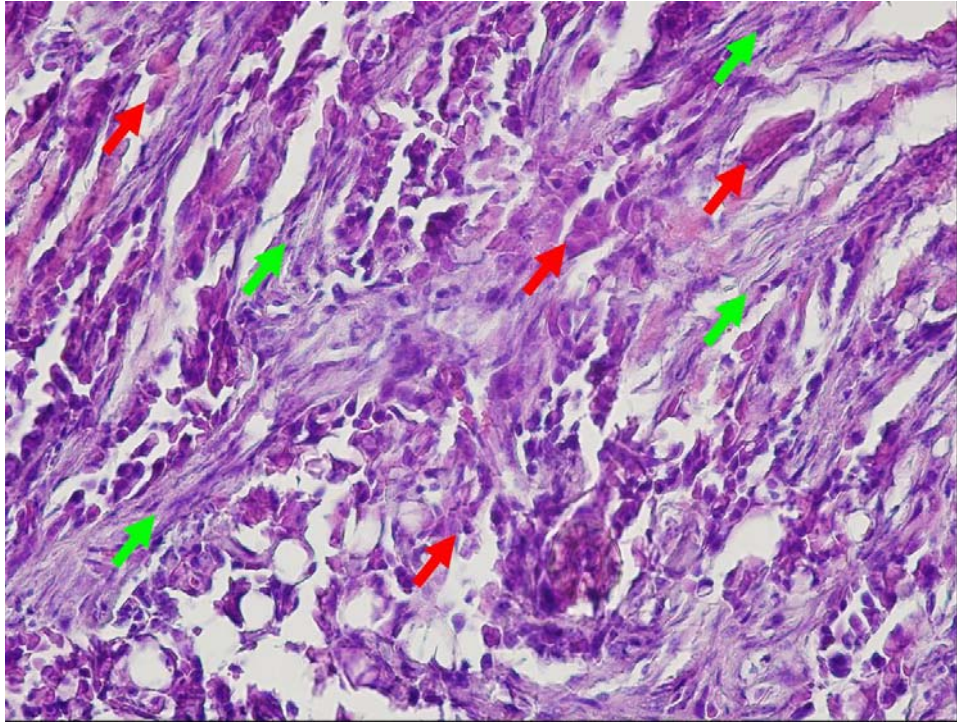


圖4-61 標靶式雷射光熱治療後的腫瘤組織病理圖，顯示腫瘤內部的癌細胞壞死(如紅色指標所示)，但附近的纖維母細胞(fibroblasts)則保持完整(如綠色指標所示)。

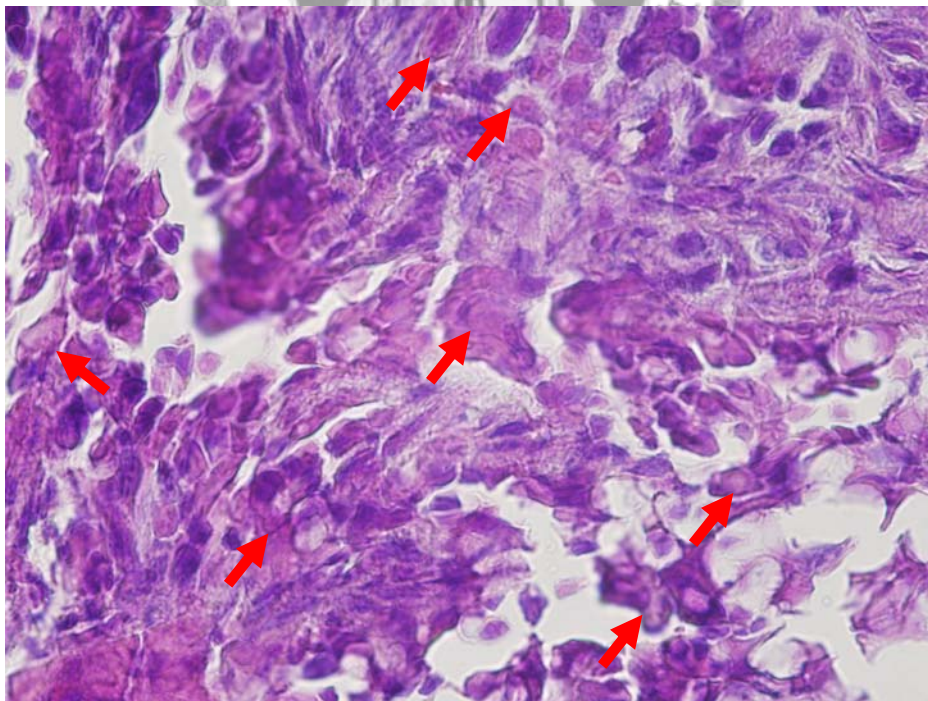


圖4-62 標靶式雷射光熱治療後的腫瘤組織病理圖，顯示腫瘤內部的癌細胞壞死(如紅色指標所示)。

第五章 結論

5.1 溫度與光聲信號的關係

本研究顯示結合超音波與雷射的非侵入式即時光聲技術，可用於複合式超音波與光聲的疊合造影，並用於雷射光熱治療時的溫度量測。光聲信號可用來研究金奈米粒子受連續波雷射照射後，因表面電漿共振效應所產生的加熱反應。此種結合超音波與光聲信號的方法，在治療前與治療中研究腫瘤的解剖學構造，並於治療期間監測雷射電漿光熱治療時的組織溫度，有助於維持光熱治療的安全性與有效性。許多形式的能量皆可產生光聲信號，本研究選擇脈衝式雷射為光聲信號來源，同時搭配高頻超音波探頭，可產生高解析度的光聲造影。

光聲信號可用於非侵入式組織造影，影響聲波振幅壓力 $P(z)$ 的關係式為 $P(z) = \Gamma \mu_a F_0 e^{(-\mu_a z)}$ ，在能量穩定的雷射系統中，振幅 $P(z)$ 除了受 Grüneisen 參數 Γ 影響之外，尚與吸收係數 μ_a 有關。水的 Γ 參數對溫度呈線性關係，軟組織具有大於 70% 的水份，故可借用水的 Γ 參數，利用光聲效應的壓力信號，測量熱治療過程中，富含水份組織的溫度。吸收係數與物質特性有關，雷射光的吸收係數愈高，振幅將愈大，然而我們的實驗結果顯示，溫度變化不會影響吸收係數。因此，溫度對光聲振幅的作用，全然透過參數 Γ 的作用，使光聲信號振幅呈現與溫度正相關的趨勢，且與吸收係數無關，此趨勢在變換各種不同實驗仿體的情況下，皆得到相同的線性正比例關係。

溫度除了影響光聲振幅外，尚會造成光聲射頻超音波信號的位置偏移，若以聲速公式校正，並扣除熱膨脹的效應，可將這些超音波信號調整至相同的位置。但超音波信號時間偏移量與光聲信號振幅無關，不受聲速校正影響，所以仍適用於估測溫度。溫度變化若小於 5-10°C，熱膨脹產生的位移量可忽略，絕大部份的位移來自不同溫度下的聲速變化，超音波「回音偏移法」，可藉由此原理推估小範圍溫度變動下的溫度。但若溫度變化大於 5-10°C，則熱膨脹與聲速皆對信號位移

產生影響，適宜採用光聲信號來測量較大範圍的溫度變化。

溫度與光聲信號振幅雖然具線性比例關係，我們的實驗顯示 65°C 以上或 10°C 以下的溫度範圍，有偏離此關係的傾向。這是因為參數 Γ 由體積熱膨脹係數 β 、聲速 c ，與等壓比熱 C_p 組成，關係式為 $\Gamma = \beta c^2 / C_p$ ，其中 C_p 對溫度的變化不明顯，聲速 c 雖亦為溫度的函數，但 $c \approx 1402 + 5T$ (T 為攝氏溫度)，在平方後，溫度造成的聲速變化，對參數 Γ 的影響可忽略。文獻指出，以水為主成份的軟組織，熱膨脹係數 β 在 10 至 55°C 的區間對溫度呈線性關係，此區間外的溫度會有偏離線性關係的傾向。但實驗結果顯示，即使不在此區間，溫度上昇仍會造成光聲信號振幅上昇的趨勢，只是會出現較大的量測誤差。一般熱治療目標溫度常設定於小於或等於 60°C 左右的溫度，例如將組織加熱至 41-47°C 維持數十分鐘，體溫至 65°C 之間的區段準確度，對於熱治療的監測較為重要。因此光聲信號振幅偏離線性關係的區段，不致影響光聲測溫法監測熱治療的溫度。

本系統之空間解析度與光聲影像系統品質有關，超音波探頭中心頻率愈高，空間解析度則會愈高。本研究採用的 20MHz 高頻超音波探頭，可達 200-300 μm 的空間解析度。溫度準確度受「光聲信號強度-溫度」資料的標準差影響，提高脈衝式雷射系統的能量輸出穩定度，可減少資料的標準差，進而提高溫度準確度。

使用連續波雷射照射金奈米粒子，由於表面電漿共振的性質，可使組織在極短的時間內昇溫攝氏數十度。本系統可快速對熱流反應，光聲信號可在連續波雷射照射時，於一秒鐘內上昇至飽和值，關閉雷射熱源後，信號值則瞬間降回背景值，可維護熱治療過程的安全性。熱治療時間可長達數十分鐘，本系統的光聲信號強度，可長時間對於連續波雷射的開閉與輸出功率的波動，立即產生振幅的改變，這個長時間的穩定工作狀態，有助於維持熱治療的有效性。

5.2 定量式熱影像技術

仿體與活體實驗結果顯示，金奈米粒子的存在與否，以及連續波雷射的照射，會影響光聲信號的振幅。金奈米粒子可有效吸收脈衝式雷射能量，並誘發較高的光聲信號振幅，其表現優於組織的內部載色體，可擔任光聲造影的「對比劑」。本系統可疊合超音波與光聲影像，在雷射光熱治療前後將腫瘤與奈米粒子的位置清楚標示，提供雷射光熱治療前後，更好的治療計劃與治療品質。缺乏奈米粒子的軟組織，若以符合能量安全規範下的連續波雷射照射，無法達到高熱條件，功率過高的雷射雖可加熱組織，但引發全面破壞，違反選擇性光熱治療的目標。具備奈米粒子的情形下，由於表面電漿共振的現象，使得連續波雷射可發揮超過十倍的昇溫效果，以達到高熱狀態。

比較熱電偶與紅外線攝影機的量測結果，光聲系統顯示了應用於熱治療監測的潛力。利用金奈米粒子之表面電漿共振現象，可進行雷射輔助電漿光熱治療，每種金奈米粒子有最佳的吸收波長，以該波長的連續波雷射照射浸潤金奈米粒子的病灶組織，可對組織加熱，達到熱治療的效果，同時利用相同波長的脈衝式雷射量測光聲信號，則可監測治療時的溫度，故這類型的雷射輔助光熱治療模式特別適用於光聲效應測溫法，也適用於標靶式雷射光熱治療之溫度量測。本研究結果顯示，光聲信號不只可以用來進行光聲造影與量測溫度，亦可用於定量式熱影像之熱測繪技術，可進行雷射光熱治療的即時監控。

5.3 未來展望

脈衝式雷射能量不穩定為本研究值得改進之處，不穩定的脈衝能量，除了影響溫度解析度之外，也會影響定量式熱影像之熱測繪。要進行定量式熱影像造影的要點之一，在於光聲造影的品質。目前我們所得到的光聲影像，因為脈衝能量不穩，可能會產生多條縱向的偽影，影響熱影像的作圖。除了採用穩定度更佳的脈衝式雷射之外，亦可改用陣列式探頭(array transducer)，一次將信號收齊，可加快信號分析與影像處理的速度。

在目前的研究成果中，金奈米粒子採用兩種方法浸潤至腫瘤部位，第一種方式直接注射金奈米桿至病灶位置，隨即進行光熱治療與量測光聲信號，此方式較不符合臨床應用所需，第二種方式則將結合 Her2 抗體的金奈米桿，由老鼠的尾靜脈注射至體內，等待二十四小時後，於抗體結合至腫瘤時，再進行熱治療與相關量測，此法較適合推展至臨床實際應用。

我們未來期待設計數種連結奈米粒子的抗體，同時在注入體內的血管後，可藉由血液循環遍布全身，並主動且特異性地結合到腫瘤上，應用於選擇性光熱治療(selective photothermotherapy)。

第六章 參考文獻

- [1] Abolhassani MD, Norouzy A, Takavar A, Ghanaati H, “Noninvasive temperature estimation using sonographic digital images”, J Ultrasound Med, 26(2), 215-222 (2007).
- [2] Anand A, Savéry D, Hall C, “Three-dimensional spatial and temporal temperature imaging in gel phantoms using backscattered ultrasound”, IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 54(1), 23-31 (2007).
- [3] ANSI Z136.1 Safe Use of Lasers, Laser Institute of America (2007).
- [4] Arthur RM, Trobaugh JW, Straube WL, Moros EG, Sangkatumvong S, “Temperature dependence of ultrasonic backscattered energy in images compensated for tissue motion”, IEEE Ultrasonics Symposium, Proc. 990-993 (2003).
- [5] Arthur RM, Straube WL, Starman JD, Moros EG, “Noninvasive temperature estimation based on the energy of backscattered ultrasound”, Med Phys, 30(6), 1021-1029 (2003).
- [6] Arthur RM, Trobaugh JW, Straube WL, Moros EG, “Temperature dependence of ultrasonic backscattered energy in motion-compensated images”, IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 52(10), 1644-1652 (2005).
- [7] Baronzio G, Gramaglia A, Fiorentini G, “Current role and future perspectives of hyperthermia for prostate cancer treatment”, In Vivo, 23(1), 143-146 (2009).
- [8] Bell AG, “The production of sound by radiant energy,” Science. 2(49), 242-253 (1881).

- [9] Bowley R, Sánchez M, “Introductory statistical mechanics”, Oxford : Clarendon Press, Oxford, New York : Oxford University Press, 2nd ed. (1999) ISBN: 0198505760
- [10] Caroline JS, Damian ED, William WMS, “Microwave Ablation: Principles and Applications”, RadioGraphics, 25, S69-S83 (2005).
- [11] Chiu KP (邱國斌), Tsai DP (蔡定平), “金屬表面電漿簡介”, 物理雙月刊, 28(2) (2006).
- [12] Damianou CA, Sanghvi NT, Fry FJ, “Ultrasonic attenuation of dog tissues as a function of temperature”, IEEE Ultrasonics Symposium, Proc. 1203-1206 (1995).
- [13] Daniels MJ, Varghese T, Madsen EL, Zagzebski JA, “ Non-invasive ultrasound-based temperature imaging for monitoring radiofrequency heating-phantom results”, Phys Med Biol, 52(16), 4827-4843 (2007).
- [14] Dubinsky TJ, Cuevas C, Dighe MK, Kolokythas O, Hwang JH, “High-intensity focused ultrasound: current potential and oncologic applications”, AJR Am J Roentgenol, 190(1), 191-199 (2008).
- [15] Ebbini ES, Simon C, “Temperature imaging using diagnostic ultrasound: methods for guidance and monitoring of thermal treatments of tissue”, Proc. SPIE, 3594, 150-158 (1999). DOI:10.1117/12.348733
- [16] Efunfa, “Engineering fundamentals”, “Properties of Common Liquid Materials”, http://www.efunda.com/materials/common_matl/Common_Matl.cfm?MatlPhase=Liquid&MatlProp=Thermal#Thermal
- [17] El-Brolossy1 TA, Abdallah1 T, Mohamed MB, Abdallah S, Easawi K, Negm S, Talaat H, “Shape and size dependence of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles studied by photoacoustic technique”, Eur Phys J Special Topics, 153, 361–364 (2008).

- [18] Emelianov SY, Aglyamov SR, Karpiouk AB, Mallidi S, Park S, Sethuraman S, Shah J, Smalling RW, Rubin JM, and Scott WG, “Synergy and applications of combined ultrasound, elasticity, and photoacoustic imaging”, IEEE Ultrasonics Symposium, Proc. 405-415 (2006).
- [19] Engel T, Reid P, “Thermodynamics, statistical thermodynamics, kinetics”, Pearson Education, Upper Saddle River, USA (2006). ISBN : 9780805338447
- [20] EngineeringToolBox, “The Engineering ToolBox”, “Water - Speed of Sound”, http://www.engineeringtoolbox.com/sound-speed-water-d_598.html
- [21] EngineeringToolBox, “The Engineering ToolBox”, “Water - Thermal Properties”, http://www.engineeringtoolbox.com/water-thermal-properties-d_162.html
- [22] Gouesbet G, “Generalized Lorenz–Mie theories, the third decade: A perspective”, Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, (2009). doi:10.1016/j.jqsrt.2009.01.020
- [23] Gusev VE, Karabutov AA, “Laser optoacoustics”, New York : American Institute of Physics (1993).
- [24] Hsu CW (許智威), “Glucose concentration measurements utilizing a photoacoustic Technique (使用光聲效應量測葡萄糖濃度)“, Master Thesis (碩士論文), Department of Electrical Engineering, College of Electrical Engineering and Computer Science, National Taiwan University (國立台灣大學電機工程學研究所) (2006).
- [25] Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, and El-Sayed MA, “Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles,” Lasers Med Sci, 23(3), 217-228 (2008).
- [26] Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, and El-Sayed MA, “Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine,” Acc Chem Res, 18447366 (2008).

- [27] Johnson SA, Christensen DA, Johnson CC, Greenleaf JF, Rajagopalan B, “Non-intrusive measurement of microwave and ultrasound-induced hyperthermia by acoustic temperature tomography”, IEEE Ultrasonics Symposium, Proc. 977-982 (1977).
- [28] Kalka K, Merk H, Mukhtar H, “Photodynamic therapy in dermatology”, J Am Acad Dermatol, 42, 389-413 (2000).
- [29] Kandulla J, Elsner H, Birngruber R, and Brinkmann R, “Noninvasive optoacoustic online retinal temperature determination during continuous-wave laser irradiation”, J Biomed Opt, 11(4), 041111 (2006).
- [30] Karabutov AA, Podymova NB, Letokhov VS, “Time-resolved laser optoacoustic tomography of inhomogeneous media”, Appl Phys B, 63, 545-563 (1996).
- [31] Kawamoto S, Solomon SB, Bluemke DA, Fishman EK, “Computed tomography and magnetic resonance imaging appearance of renal neoplasms after radiofrequency ablation and cryoablation”, Semin Ultrasound CT MR, 30(2), 67-77 (2009).
- [32] Kettenbach J, Köstler W, Rücklinger E, Gustorff B, Hüpfl M, Wolf F, Peer K, Weigner M, Lammer J, Müller W, Goldberg SN, “Percutaneous saline-enhanced radiofrequency ablation of unresectable hepatic tumors: initial experience in 26 patients”, AJR Am J Roentgenol, 180(6), 1537-1545 (2003).
- [33] Kremkau FW, “Diagnostic Ultrasound: Principle and Instruments”, 7th ed., Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, 76 (2006).
- [34] Lai CY (賴俊延), “A study on acoustic cavitation assisted gene delivery (超音波穴蝕效應於基因傳遞效率之研究)”, Master Thesis (碩士論文), Department of Electrical Engineering, College of Electrical Engineering and Computer Science, National Taiwan University (國立台灣大學電機工程學研究所) (2005).

- [35] Larina IV, Larin KV, and Esenaliev RO, "Real-time optoacoustic monitoring of temperature in tissues," J Phys D: Appl Phys, 38, 2633-2639 (2005).
- [36] Li PC, Wei CW, Liao CK, Chen CD, Pao KC, Wang CR, Wu YN, and Shieh DB, "Photoacoustic imaging of multiple targets using gold nanorods," IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 54(8), 1642-1647 (2007).
- [37] Liang HD, Zhou LX, Wells PN, Halliwell M, "Temperature measurement by thermal strain imaging with diagnostic power ultrasound, with potential for thermal index determination", Ultrasound Med Biol, 35(5), 773-780 (2009).
- [38] Liao CK (廖超康), "Non-invasive ultrasound tissue temperature estimation (非侵入式超音波溫度量測技術研究)", Master Thesis (碩士論文), Institute of Biomedical Engineering, National Yang-Ming University (國立陽明大學醫學工程學研究所) (2002).
- [39] Lin KH, Young SY, Hsu MC, H Chan, YY Chen, WL Lin, "Focused ultrasound thermal therapy system with ultrasound image guidance and temperature measurement feedback", Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2522-2525 (2008).
- [40] Line BR, Mitra A, Nan A, Ghandehari H, "Targeting tumor angiogenesis: comparison of peptide and polymer-peptide conjugates", J Nucl Med, 46(9), 1552-1560 (2005).
- [41] Marczak W, "Water as a standard in the measurements of speed of sound in liquids," J Acoust Soc Am, 102(5), 2776-2779 (1997).
- [42] Mast TD, Pucke DP, Subramanian SE, Bowlus WJ, Rudich SM, Buell JF, "Ultrasound monitoring of in vitro radio frequency ablation by echo decorrelation imaging", J Ultrasound Med, 27(12), 1685-1697 (2008).

- [43] Mehrabani BM, Tavakoli V, Abolhassani MD, Alirezaie J, Ahmadian A, “An efficient temperature estimation using optical-flow in ultrasound B-mode digital images”, Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 86-89 (2008).
- [44] Müller I, Weiss W, “ Entropy and Energy: A Universal Competition”, Springer Berlin Heidelberg, New York (2005). ISBN : 9783540242819
- [45] Niemz MH, “Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications”, Springer Berlin Heidelberg, New York, 3rd enlarged ed. (2003). ISBN: 9783540721918
- [46] Noguchi M, “Radiofrequency ablation therapy for small breast cancer”, Semin Ultrasound CT MR. 30(2), 105-112 (2009).
- [47] Pernot M, Tanter M, Bercoff J, Waters KR, Fink M, “Temperature estimation using ultrasonic spatial compound imaging”, IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 51(5), 606-615 (2004).
- [48] Prakash O, Fabbri M, Drocourt M, Escanye JM, Marchal C, Gaulard ML, Robert J, “Hyperthermia induction and its measurement using ultrasound”, IEEE Ultrasonics Symposium, Proc. 1063- 1066 (1980).
- [49] Pua BB, Solomon SB, “Radiofrequency ablation of primary and metastatic lung cancers”, Semin Ultrasound CT MR, 30(2), 113-124 (2009).
- [50] Schüle G, Hüttmann G, Framme C, Roeder J, and Brinkmann R, “Noninvasive optoacoustic temperature determination at the fundus of the eye during laser irradiation,” J Biomed Opt, 9(1), 173-179 (2004).
- [51] Seip R, VanBaren P, Simon C, Ebbini ES, “Non-invasive spatio-temporal temperature estimation using diagnostic ultrasound”, IEEE Ultrasonics Symposium, Proc. 1613-1616 (1995).

- [52] Sethuraman S, Aglyamov SR, Smalling RW, and Emelianov SY, "Remote temperature estimation in intravascular photoacoustic imaging," *Ultrasound Med Biol*, 34(2), 299–308 (2008).
- [53] Shah J, Aglyamov SR, Sokolov K, Milner TE, and Emelianov SY, "Ultrasound-Based Thermal and Elasticity Imaging to Assist Photothermal Cancer Therapy - Preliminary Study," *IEEE Ultrasonics Symposium, Proc.* 1029-1032 (2006).
- [54] Shah J, Park S, Aglyamov S, Larson T, Ma L, Sokolov K, Johnston K, Milner T, and Emelianov SY, "Photoacoustic imaging and temperature measurement for photothermal cancer therapy," *J Biomed Opt*, 13(3), 034024 (2008).
- [55] Shi Y, Witte RS, O'Donnell M, "Identification of vulnerable atherosclerotic plaque using IVUS-based thermal strain imaging", *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 52(5), 844-850 (2005).
- [56] Shiina S, "Image-guided percutaneous ablation therapies for hepatocellular carcinoma", *J Gastroenterol*, 44 Suppl 19, 122-131 (2009).
- [57] Simon C, VanBaren P, Ebbini ES, "Two-dimensional temperature estimation using diagnostic ultrasound", *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 45(4), 1088-1099 (1998).
- [58] Straube WL, Arthur RM, "Theoretical estimation of the temperature dependence of backscattered ultrasonic power for noninvasive thermometry", *Ultrasound Med Biol*, 20(9), 915-922 (1994).
- [59] Su ZF, Liu G, Gupta S, Zhu Z, Rusckowski M, Hnatowich DJ, "In vitro and in vivo evaluation of a Technetium-99m-labeled cyclic RGD peptide as a specific marker of $\alpha(V)\beta(3)$ integrin for tumor imaging.", *Bioconjug Chem*, 13(3), 561-570 (2002).

- [60] Szabo TL, “Diagnostic Ultrasound Imaging: Inside out”, Elsevier Academic Press, London, UK, 22 (2004).
- [61] Taneri S, Zieske JD, Azar DT, “Evolution, techniques, clinical outcomes, and pathophysiology of LASEK: review of the literature”, *Surv Ophthalmol*, 49(6), 576-602 (2004).
- [62] Terentyuk GS, Maslyakova GN, Suleymanova LV, Khlebtsov NG, Khlebtsov BN, Akchurin GG, Maksimova IL, Tuchin VV, “Laser-induced tissue hyperthermia mediated by gold nanoparticles: toward cancer phototherapy”, *J Biomed Opt*, 14(2), 021016 (2009).
- [63] Tyreus PD, Diederich C, “Two-dimensional acoustic attenuation mapping of high-temperature interstitial ultrasound lesions”, *Phys Med Biol*, 49, 533-546 (2004).
- [64] Veenendaal LM, de Jager A, Stapper G, Borel Rinkes IH, van Hillegersberg R, ” Multiple fiber laser-induced thermotherapy for ablation of large intrahepatic tumors”, *Photomed Laser Surg*, 24(1), 3-9 (2006).
- [65] Wang SH, Wei CW, Jee SH, Li PC, “Photoacoustic temperature measurements for monitoring of thermal therapy”, *Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing*, 71771S (2009). [DOI: 10.1117/12.809973]
- [66] Wei CW (魏振瑋), “Applications of gold nanoparticles in photoacoustic biomedical imaging (奈米金粒子在光聲生醫影像之應用)”, PhD Dissertation (博士論文), Department of Electrical Engineering, College of Electrical Engineering and Computer Science, National Taiwan University (國立台灣大學電機工程學研究所) (2009).
- [67] Wriedt T, “Mie theory 1908, on the mobile phone 2008”, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 109, 1543-1548 (2008).

- [68] Xu M, and Wang LV, “Photoacoustic imaging in biomedicine,” *Rev Sci Instruments*, 77, 041101 (2006).
- [69] Zitzmann S, Ehemann V, Schwab M, “Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-peptide binds to both tumor and tumor-endothelial cells in vivo”, *Cancer Res*, 62(18), 5139-5143 (2002).
- [70] Zohdy MJ, Tse C, Ye JY, O'Donnell M, “Acoustic estimation of thermal distribution in the vicinity of femtosecond laser-induced optical breakdown”, *IEEE Trans Biomed Eng*, 53(11), 2347-2355 (2006).



第七章 聲明

本研究受到行政院國家科學委員會經費支持(NSC 97-3011-P-002-009)，部份研究內容已發表於下列會議與論文：

1. Shiou-Han Wang, MD; Chen-Wei Wei, MSE; Pai-Chi Li, PhD; Shiou-Hwa Jee, MD, PhD. Using photoacoustic signal for temperature monitoring during gold nanoparticles assisted plasmonic photothermal therapy with laser irradiation. (以光聲信號進行金奈米粒子輔助雷射電漿光熱治療之溫度監測) The 34th Annual Meeting of Taiwanese Dermatological Association (台灣皮膚科醫學會第 34 屆年會暨學術研討會), Taipei, Taiwan, November 22-23, 2008.
2. Shiou-Han Wang, MD; Chen-Wei Wei, MSE; Shiou-Hwa Jee, MD, PhD; Pai-Chi Li, PhD. Monitoring the laser-induced plasmonic photothermal therapy with photoacoustic signal. (以光聲信號監測雷射電漿光熱治療) 2008 International Symposium on Biomedical Engineering (ISOBME, 2008 年生物醫學工程科技研討會), Taipei, Taiwan, December 12-13, 2008.
3. Shiou-Han Wang; Chen-Wei Wei; Shiou-Hwa Jee; Pai-Chi Li. Photoacoustic temperature measurements for monitoring of thermal therapy. SPIE Photonics West 2009, San Jose, California, United States, January 24-29, 2009.
4. Shiou-Han Wang; Chen-Wei Wei; Shiou-Hwa Jee; Pai-Chi Li. Photoacoustic temperature measurements for monitoring of thermal therapy. Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2009, Alexander A. Oraevsky; Lihong V. Wang, Editors, 71771S, 12 February 2009. [DOI: 10.1117/12.809973]