

國立台灣大學電機工程學研究所碩士論文

指導教授：李百祺 博士

超音波小動物影像之血流參數計算及應用

**Blood Flow Estimation and Its Applications in
Ultrasonic Small Animal Imaging**

研究生 陳彥甫

中華民國九十二年六月

摘要

以老鼠及其他小動物為主的動物模型，近年來被廣泛運用在人類疾病與基因研究等相關領域中。因此如何能夠更人性化、更簡便的以非侵入的方式檢視老鼠及其他小動物，是當前一個相當重要的研究課題。這樣的技術無論對藥物發展、基因體研究、腫瘤治療、發展生物學等方面都有很大的幫助，可以在提供研究者更多研究資訊的同時，減少對實驗動物的犧牲及傷害。

超音波影像系統具有價格低廉、快速顯像、可攜性等優點，然而由於傳統超音波影像系統的工作頻率較低、解析度不足，在小動物影像的應用上受到諸多限制。過去曾有許多研究探討如何利用超音波都卜勒效應測得血液流動相關資訊，本研究將針對這些傳統方法在高頻超音波系統上的限制，包括高頻系統的訊號強度不足、空間解析度要求較高、取樣數目不夠以及機械式掃瞄速度過慢等相關問題，從訊號處理以及硬體架構兩方面提出改良方法，發展一套小動物血流參數的量測系統，提昇現有的醫學影像技術，用來進行小動物胚胎影像以及腫瘤影像的評估。

從模擬及實驗結果證明，傳統的一維自相關函數流速處理演算法在高頻超音波的應用環境下受到嚴重的限制，評估包括二維自相關函數法、寬頻最大可能性評估法以及蝶狀搜尋法等四種演算法，考量對發射訊號頻寬以及抗雜訊能力等各方面的綜合效能後，確定蝶狀搜尋法是兼顧運算時間以及流速估算準確度的最佳演算法。本研究同時應用了掃掠式掃瞄技術，將超音波探頭在連續移動的同時發射超音波脈衝，可快速獲得二維的流速資訊，大幅改進傳統離散式機械掃瞄速度過慢的缺點。

應用上述流速演算法以及掃瞄技術建立的高頻超音波影像系統，目前已經可以呈現包括灰階組織影像、頻譜都卜勒、彩色都卜勒以及能量都卜勒等多種格式的超音波影像。在活體實驗的驗證上，已經順利取得包括老鼠胚胎以及腫瘤等部位的血流資訊，可達毫米每秒的流速解析度，並且可追蹤腫瘤在生長過程中微小血管的分佈形態，對於評估胚胎發育以及腫瘤血管增生等現象都有相當大的幫助。

關鍵詞：高頻超音波、都卜勒超音波、血流參數量測、小動物影像、腫瘤血流、老鼠胚胎。

Abstract

Small animal models have been used extensively in genomics research, drug development, and developmental biology. Hence, the development of advanced small animal imaging technologies in improving the research quality and efficiency has become increasingly important and is also the main goal of this study.

Ultrasound imaging has the advantages of cost-effectiveness, non-invasiveness, rapid imaging and portability. Optimal imaging of small animals, however, requires at least 10-fold improvement in resolution over the conventional ultrasound imaging system. In addition, traditional signal processing techniques are also inadequate to precisely estimate blood flow parameters in small vessels. Because resolution scales directly with frequency, the required level of resolution can be achieved by employing much higher ultrasound frequency. In this study, a high frequency ultrasound imaging system specifically designed for microimaging of the mouse is constructed. Not only limitations in traditional signal processing technique are overcome through the improvement of flow estimation strategies, but also the acquisition time associated with discrete mechanical scanning of a single piston transducer is reduced by utilizing a continuous scanning technique called swept-scan.

Simulation and experimental results show that the 2D autocorrelation technique, the wideband maximum likelihood estimator, and the butterfly search technique all can achieve better velocity resolution and are more robust to noise than the conventional 1D autocorrelation approach. The butterfly search technique is the best among these algorithms in terms of the tradeoff between the computation

time and the performance. *In-vivo* experiments on the mouse embryo and tumor model also demonstrate the ability to simultaneously acquire and display B-mode, color-mode, and power Doppler small animal images. Pulsed wave Doppler is also implemented. Experiments on mouse tumors successfully image tumor vascularity with flow velocities on the order of *mm/s*. This imaging system can be used to provide valuable information for biomedical research in the future.

Key words: High frequency ultrasound, Doppler ultrasound, Blood flow estimation, Small animal imaging, Tumor blood flow, Mouse embryo.

目錄

第一章 緒論.....	1
1.1 高頻超音波影像簡介.....	1
1.1.1 高頻超音波在醫學領域及小動物影像上的應用	1
1.1.2 超音波血流量測在醫學上的應用.....	3
1.2 高頻超音波在血流參數估算上的限制.....	5
1.3 研究動機與目標.....	8
1.4 論文架構.....	9
第二章 血流參數計算	10
2.1 都卜勒效應.....	10
2.2 血流參數之計算與討論.....	13
2.2.1 一維自相關函數法.....	15
2.2.2 二維自相關函數法.....	18
2.2.3 寬頻最大可能性評估法.....	21
2.2.4 蝶狀搜尋法.....	24
2.2.5 演算法之定性比較.....	28
2.3 常見影像格式.....	30
第三章 實驗架構	36
3.1 實驗系統架構與介面.....	36
3.2 掃掠式掃瞄法.....	42
3.2.1 掃掠式掃瞄法之原理與應用.....	42
3.2.2 掃掠式掃瞄法之可能影響.....	45
3.3 組織仿體及流速仿體之製作.....	49
3.4 血液模擬流體與超音波對比劑.....	51
3.4.1 血液模擬流體.....	51
3.4.2 超音波對比劑.....	51

第四章 結果分析與討論	54
4.1 計算血流參數演算法之評估.....	54
4.1.1 使用模擬血流訊號之評估.....	54
4.1.2 使用流速仿體之評估.....	58
4.2 彩色都卜勒影像之閾值處理.....	65
4.3 活體血流實驗.....	68
4.3.1 老鼠胚胎血流影像	68
4.3.2 老鼠腫瘤血流影像	74
4.4 超音波對比劑於小動物影像之初步探討.....	80
4.5 結論.....	83
4.6 未來工作	85
第五章 參考文獻	88

第一章 緒論

1.1 高頻超音波影像簡介

超音波影像系統因為具有可攜性、非侵入式、可即時反映組織特性等優點，已經成為實驗研究及臨床診斷上最常用的醫學影像系統之一。相較於其他醫學影像系統，傳統上工作頻率範圍在 2~10 MHz 的低頻超音波影像系統，其影像解析度並不能滿足許多較細微組織結構性觀察的需求。然而，超音波系統的影像解析度會隨著頻率的上升而改善，在中心頻率 50 MHz 的超音波影像系統中可達到約數十微米 (μm) 大小的空間解析度。近年來，由於電子元件、電路設計技術的創新，高頻超音波影像技術也逐漸應用於臨床診斷與實驗研究上，各種利用高頻超音波精細的解析度對人體以及小動物各表層組織的觀察也已開始被廣泛的研究。

1.1.1 高頻超音波在醫學領域及小動物影像上的應用

超音波影像系統由於其非侵入式且可即時顯像的優點，在生物醫學領域上早有廣泛的運用。相較於傳統頻率範圍較低 (2~10 MHz) 的超音波系統，高頻超音波影像系統 (>20 MHz) 隨著頻率的上升，其空間解析度亦隨之提高，並可以達到顯微鏡等級 (microscopic) 的解析度[1]-[2]。

藉由高頻超音波精細的解析度，在人體醫學影像的應用上，眼科方面可以評估眼睛之虹膜 (iris)、角膜 (cornea)、鞏膜 (sclera)、水晶體表面 (lens surface) 及眼球前腔 (anterior chamber) 中細微的組織變化。對於各種形式的青光眼 (glaucoma)、角膜病變及眼球組織的損害和眼睛外傷等亦可進行輔助性的診斷。在皮膚科的應用中，表皮層 (epidermis)、真皮層 (dermis) 中異常組織如黑色素瘤 (melanoma) 及其病灶、癌細胞、牛皮癬 (psoriasis)、苔癬病 (lichen rubber) 等

的組織變化，配合高解析度的超音波影像，可以顯著地提高臨床診斷的正確率，達到早期發現的功效。此外，血管內超音波（intravascular ultrasound）亦是高頻超音波的應用之一。因為高頻超音波探頭的體積較小，利用小型的環形陣列探頭進入血管內對周圍管壁做組織結構的觀察，可對於如主動脈剝離（aortic dissection）和冠狀動脈心臟病（coronary artery disease, CAD）等心血管疾病做即時的診斷與評估 [1], [3]-[7]。

在生物技術領域的研究與應用上，高頻超音波影像技術亦有相當大的發展潛力，可望在其中扮演重要的角色。由於老鼠在生理結構與基因組成上有諸多與人類相似之處，加上容易繁殖和低廉的飼養費用等優點，常被研究人員們用來做為替代人類實驗的模型，如利用老鼠實驗來模擬重現人類疾病以進行藥物研究，並且規劃使用老鼠小動物模型來從事人類基因序列定序等研究[48]。在人類疾病及藥物研究方面，目前已知血管新生（angiogenesis）在癌症發展中扮演著重要的角色，許多生長因子（growth factor）也已被證實和血管新生有極高的相關性[8]-[12], [61]-[62]，這些生長因子包括血管內皮細胞生長因子（vascular endothelial growth factor）、轉換生長因子（transforming growth factor）等等。雖然在動物實驗中已證實可以使用都卜勒超音波來偵測腫瘤的血管組織，利用彩色都卜勒影像也發現新生血管和正常血管具有不同的特性[13]，不過現行的超音波檢查仍有空間解析度上的限制，這些問題都可以經由高頻超音波影像系統加以克服。在老鼠基因相關研究中，高頻超音波影像系統具有足夠的解析度，可用來檢視基因變異鼠（mutant mouse）胚胎基因突變的影響，並允許以非侵入性的影像方式觀察母鼠子宮中胚胎的生長過程及血流資訊，做解剖學及生理學之評估[49]-[51]。

由於有越來越多的藥物發展和基因研究利用老鼠來當做實驗對象，對於小動物影像系統的需求也隨之會有大量的成長。目前每年約

有超過五千萬隻老鼠應用在生物醫學研究上，而且其數目以每年約百分之十五以上的成長率在快速成長。因此，如何能夠更人性化、更簡便的以非侵入的方式檢視老鼠與其他小動物，是當前一個相當重要的研究課題。這樣的技術無論對藥物發展（drug development）、基因體研究（genomics research）、心血管疾病（cardiovascular disease）、癌症治療（cancer therapy）、發展生物學（developmental biology）等方面都有很大的幫助，也可以減少此類研究對實驗動物的犧牲及傷害。高頻超音波影像系統正好是一項符合以上條件的工具。它除了能提供即時的高解析度影像之外，超音波都卜勒影像還可以量測血流相關資訊。因此，在使用較少量的實驗用動物及延長它們壽命的同時，也可以提供研究者更多的研究資訊，並在人性化的研究環境下，增進研究效率、縮短開發時程、降低開發成本以及提昇相關研究之品質。

1.1.2 超音波血流量測在醫學上的應用

人體血管中血流量的多寡及流速的快慢在臨床上代表了許多重要的意義，例如人體器官中動脈血管是否具有充足的微灌流（perfusion），代表著組織功能的正常與否；對於一個動過器官移植手術的病患來說，可以利用觀察血管微灌流量來了解植入的臟器在人體中運作代謝是否正常；許多心血管疾病以及腦中風（stroke）也跟血管阻塞、血壓變大、血流阻力增加、出血破裂等現象有密切的關係[54]-[55]。超音波因為其非侵入性、可即時顯像的特性，在量測人體血流相關參數方面已被研究多時，並大量應用於臨床診斷及治療上。傳統上工作頻率在 2~10 MHz 的超音波系統，受限於種種因素，在都卜勒超音波的應用上最小只能觀測到人體小動脈（arteriole）等級的血流資訊，而無法偵測到微循環或是小動物體內的微量血流[14]；除此之外，傳統超音波系統在空間解析度上仍然不適合做微細血管的量測，速度解析度和時間解析度也必須有所妥協。因此利用高頻超音波在解析度上的優點及特性，發展一套非侵入式、精確、高靈敏度和即

時的定量分析系統，將有助於臨床上疾病的診斷及治療。

另外以癌症來說，由於癌細胞本身經由血管新生（angiogenesis）過程所增生的新生血管，其形態往往是相當不規則的，它們的管徑大小不一，角度任意彎曲，不論在形態、血流特性和功能上都和周圍正常組織的血管有顯著的不同。所以一個可以用來觀測腫瘤微循環（microcirculation）的技術，在診斷、檢驗和評估一些癌症藥物及治療方法時都是十分重要的。近年來，利用超音波對比劑（contrast agent），更可找到人體中臟器局部缺血，以及微循環發生障礙的位置，不但不具有輻射危險，更可以將微小血管狹窄處清晰突顯出來，以供尋求病因及進一步治療之用[18]-[19]。

到目前為止，除了高頻都卜勒超音波之外，還沒有其他技術可以提供一種解析度可觀察到血管微循環等級，而且是非侵入性、穿透深度到達數毫米（mm）的方法來量測血流在空間上的分佈。高頻都卜勒超音波提供了以下的優點：（1）軸向和橫向解析度都隨著頻率的提高而線性增加，當超音波的中心頻率在 50 MHz 時，約可以達到 60 μm 見方的取樣區域，相當適合用來觀測微細血管中的血流；（2）在相同的觀測時間內，速度的解析度也隨著頻率的升高而線性提升，有助於解析低流速的血流資訊。綜合以上的特點，使用高頻超音波來評估血管尺寸小（~50 到 100 μm ）血液流速低（~0 到 50 mm/s）的人體微細血管或小動物體內的微量血流資訊相當具有進一步發展的潛力 [14]-[17]。

1.2 高頻超音波在血流參數估算上的限制

超音波運用在血流參數的計算上，取樣空間的選取對於流速量測有重要的影響。散射體通過超音波波束取樣範圍的時間稱為轉移時間 (transit time)，當散射體的轉移時間小於超音波的數個脈衝重覆時間 (pulse repetition interval, PRI) 時，所得到的超音波反射訊號並不能完整描述移動中血球的散射情形，以之計算出的血流速度當然也就有所誤差。若應用高頻超音波在量測微細血管的血流參數上，以中心頻率為 50 MHz，探頭孔徑大小 (aperture size) 0.6 cm，聚焦深度 1.2 cm (即 F-number = 2) 的超音波探頭而言，其在聚焦點處 - 6 dB 橫向波束寬度大約只有 60 μm ，對於平均直徑在 7 μm 左右的紅血球來說，取樣體積相對來說並不夠大，造成轉移時間短，必須縮短 PRI、增加重覆發射的頻率以取得足夠的取樣點數。

另一方面，從 Nyquist Criterion 可以推導出，在不發生訊號混疊 (aliasing) 的前提下，利用超音波的都卜勒效應所能夠量測到的最高流速為 $V_{\max} = \lambda / (4 \cdot \text{PRI})$ 。故為了要提高速度解析度，使得量測速度的範圍更符合微細血管的低流速，通常會選擇較大的 PRI，這和前一段提到的必須縮短 PRI 以取得足夠的取樣點數，兩者之間勢必得做出取捨，無法兩者兼顧。在此情況下若使用傳統以自相關函數法為基礎的流速分析方式，會產生相當的誤差，所以必須採用不同的估計流速演算法，使得系統在有限的取樣數目下能夠精確的估計血流參數。

另外超音波系統中之高通濾波器 (即俗稱的 wall filter) 最主要的功能是在超音波脈衝連續多次發射的時間軸方向上去除低頻訊號，這些低頻的反射訊號一般都是由超音波照射到移動較緩慢的血管管壁或周圍組織所反射產生，但是在濾除低頻訊號的同時，也有可能將原本我們所要的血流部份都卜勒訊號濾除，因此如何設計此濾波器，會對血液流速的量測有很大的影響。如果 wall filter 的截止頻率設得太低或轉移頻帶 (transition band) 的範圍太寬，則部份來自周圍

組織的低頻訊號不會被濾除，造成系統對低速物體的靈敏度不佳，進而影響到血流速度的估量，估計出來的值會往負方向偏移。此現象在觀測微細血管的低流速血流時更顯得重要，因為微細血管內的血液流速緩慢，速度約只有數 mm/s 到數 cm/s 之間，人體呼吸或身體運動所造成周圍組織的移動也在此速度範圍內，兩者造成的都卜勒頻率偏移在頻譜上的位置相當接近。因此如何設計一個高通濾波器，可以有效移除組織反射訊號，同時完整保留微細血管中的低流速血流資訊，也是在高頻超音波血流參數量測所須面對的關鍵問題之一。

隨著電子技術的發展，硬體的計算速度及效率大幅提昇，醫學超音波影像系統在近一、二十年來逐漸由傳統類比式的系統轉變成全數位式的架構，但目前在高頻超音波應用的頻率範圍內，全數位式的系統架構仍然會因為類比數位轉換器（analog-to-digital converter, ADC）的取樣頻率以及振幅解析度（amplitude resolution）之間的取捨，取樣電路所造成的量化雜訊（quantization noise），通常即限制了系統中經過各種訊號處理後所能得到的最佳訊雜比（signal-to-noise ratio, SNR），使得系統的動態範圍（dynamic range）受到限制。以目前電子的技術而言，在適用於高頻超音波系統、最高取樣頻率達 500 MHz 的 ADC 架構下，只能夠達到 8-bit 的振幅解析度，使得系統的動態範圍被限制在約 48 dB 以內；相較於在頻率較低的情況下，使用取樣頻率 100 MHz 的 ADC，已經出現 12-bit 以上的振幅解析度，可輕易達到 72 dB 以上的系統動態範圍，因此高頻超音波系統在硬體設計的考量上仍面臨相當大的挑戰。

另外由於目前超音波探頭製作技術以及壓電材料的限制，在高頻超音波運作的頻率範圍內（ > 20 MHz），仍沒有超音波陣列探頭可供電子式掃描以及波束成形器（beamformer）做動態聚焦之用；目前可見的高頻超音波系統多是利用馬達掃描定位系統搭載單一固定聚焦的超音波探頭，在橫向波束寬度的範圍上做機械式掃描，排列單一

方向上的反射訊號以得到二維的空間分佈資訊，再合成各種格式的空間影像；又為了取得額外的血液流速資訊，依照訊號處理方式的不同以及對訊號訊雜比的要求，必須在固定位置連續發射 10 到 60 次以上不等的超音波脈衝，並依此來計算血流參數資訊。從以上的限制可以發現，高頻超音波系統若要獲得即時的二維血流分佈資訊，以傳統的機械掃描方式來移動固定聚焦的單一探頭，在數據取得的時間上會是相當大的限制。

又超音波訊號在人體中的衰減與訊號中心頻率成正比，因此隨著頻率的提高，超音波在傳遞過程中與組織作用所產生的組織衰減效應也變得更加嚴重。組織衰減效應使得超音波訊號的能量大幅衰減，因此高頻超音波的穿透深度遠比低頻超音波來得淺，只適合用來觀測深度約在 2 cm 以內、接近體表的淺層組織構造，也較容易受到系統內部及外部雜訊的影響，其系統訊雜比、靈敏度（sensitivity）、動態範圍以及穿透深度等都受到嚴重的限制。因此發展高頻超音波系統時必須想辦法利用訊號處理的方法或是合適的硬體設計來克服以上種種限制。

1.3 研究動機與目標

以老鼠及其他小動物為主的動物模型，在近年來已被廣泛運用在人類疾病與基因研究等相關領域中，主要原因是老鼠的基因組成與生理結構和人類有諸多相似之處。使用非侵入的影像方式，可以讓研究人員進一步在結構及生理上理解老鼠胚胎在發育過程中的基因表徵（phenotype），以及腫瘤的血管新生等現象。目前藥物開發及基因研究等領域已有許多研究團體投入，以老鼠為主的動物實驗也愈趨普遍，使得小動物影像系統之重要性愈來愈高。

然而由於傳統超音波影像系統的工作頻率較低、解析度不足，在小動物影像的應用上受到諸多限制。過去曾有許多研究探討如何利用超音波都卜勒效應測得血液流動相關資訊，本研究將針對這些傳統方法在高頻超音波系統上的限制，包括高頻系統的訊號強度不足、空間解析度要求較高、取樣數目不夠以及機械式掃瞄速度過慢等相關問題，從訊號處理以及硬體架構兩方面提出改良方法。

因此，本研究希望能夠發展一套高頻超音波影像系統，同時具備呈現灰階組織影像及估算微量血流參數之功能，而且此系統之解析度足夠用來解析小動物之胚胎及腫瘤影像。配合台大醫院研究團隊所使用的老鼠動物模型，進行評估包括老鼠胚胎器官及血管之發展、腫瘤大小及腫瘤內血流資訊、血管的分佈形態等等。希望能夠利用高頻超音波的優點及特性，提昇現有的醫學影像技術，用來進行小動物胚胎影像以及腫瘤影像的評估，在未來對癌症治療、基因研究、藥物開發及發展生物學等目前生物醫學領域重要的研究課題做出貢獻。

1.4 論文架構

本論文在第一章首先對高頻超音波影像及其應用做一簡單的介紹，並討論高頻超音波在血流參數估算上的限制，提出本研究的動機與目標。第二章進一步闡述使用超音波計算血流參數的原理及訊號處理流程，說明各種計算血流參數演算法的理論基礎，包括一維及二維自相關函數法、寬頻最大可能性評估法以及蝶狀搜尋法，並對這四種演算法做定性的比較，最後介紹各種常見的超音波影像格式。第三章為實驗架構的介紹，內容包括實驗系統的硬體架構與影像仿體的製作，並對掃掠式掃瞄技術的原理與應用，以及血液模擬流體與超音波對比劑做一介紹。第四章的內容包括使用模擬血流訊號及流速仿體對四種計算血流參數演算法的評估、活體實驗中彩色都卜勒影像之閾值處理以及老鼠胚胎及腫瘤的活體血流實驗結果，最後對超音波對比劑於小動物影像之應用做初步的探討，並對所得的各項結果做歸納整理，勾勒未來高頻超音波影像後續的研究工作。第五章則是列出相關的參考文獻。

第二章 血流參數計算

2.1 都卜勒效應

超音波除了大家所熟知的功能：用來產生人體組織的解剖影像外，還可以利用都卜勒效應（Doppler effect）來偵測物體的運動。超音波都卜勒效應最主要的臨床應用是在血流的量測，藉由偵測血液和超音波探頭間之相對運動所產生的都卜勒效應，可以求得如血流方向、平均流速與血流能量等參數。

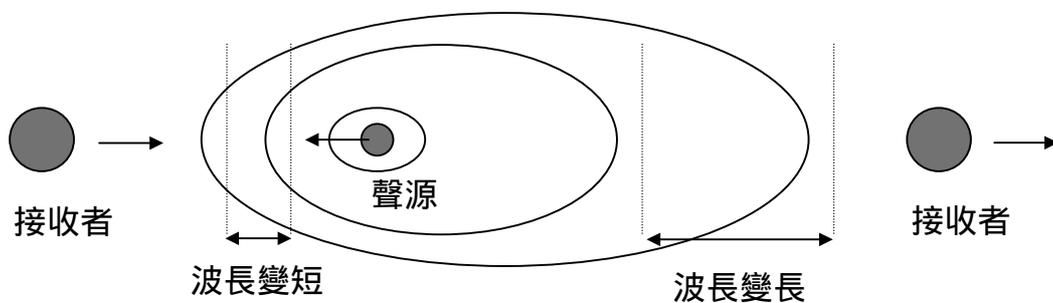


圖 2-1：都卜勒效應示意圖

圖 2-1 為都卜勒效應之示意圖。當聲源與接收者皆為靜止時，接收者所接收到的聲波頻率為 $f_s = c / \lambda$ ，其中 c 為聲速， λ 為波長。當聲源和接收者兩者間有相對移動時，接收者所接收到的聲波頻率將不再是 f_s ，而會有一都卜勒頻率偏移（Doppler frequency shift）產生。當聲源和接收者都在移動時，所造成的都卜勒頻率偏移為：

$$f_d = f_s (v_r + v_s) / (c - v_s)$$

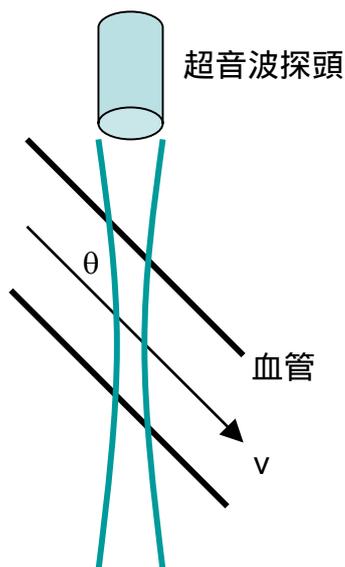
其中 f_d 代表都卜勒頻率偏移， v_r 和 v_s 則分別為接收者和聲源的移動速度。若假設聲源的運動速度遠小於聲波傳遞的速度（亦即 $v_s \ll c$ ），則上式可進一步簡化成

$$f_d \approx f_s (v_r + v_s) / c$$

一般人體內的血液流速最高約為每秒數公尺，絕大部份的血液速度都在每秒 1 公尺以下；而聲波在血液中的傳遞速度約為每秒 1500 公尺，故以上聲源運動速度遠小於聲波傳遞速度的假設對醫學用超音波是成立的。換句話說，都卜勒頻率偏移在醫用超音波的應用範圍內，可以視為只跟接收者及聲源兩者間的相對速度（即 $v_r + v_s$ ）有關。

由於聲源（超音波探頭）和接收者（血液）之間的相對運動，使得接收到的聲波頻率發生變化，因此我們可以利用此特性來量測血流對聲波反射回來的訊號，求出其都卜勒頻率偏移後，即可計算出相對應的血液速度。又血液之主要成份為紅血球、白血球以及血小板，但血小板之反射截面積約比紅血球小上 1000 倍，而白血球的數量相對於紅血球來說顯得微不足道，因此在血液中造成聲波散射的最主要成份是紅血球，其他白血球和血小板這兩種物質不至於對散射訊號造成顯著的影響，都卜勒頻率偏移也主要由紅血球之運動所產生。

都卜勒頻率偏移的基本公式可以用下圖來表示：



$$f_d = \left(\frac{2vf_s}{c} \right) \cos \theta, \quad (v \ll c)$$

其中 v 為血液流速， c 為聲波傳遞速度， f_d 是量測到的都卜勒頻率偏移， f_s 是聲波的原始頻率，而 θ 是血流方向與超音波波束的夾角，稱為都卜勒角 (Doppler angle)。在上式中，因為都卜勒效應在聲波發射與接收時皆會產生，在超音波探頭處做觀察時，聲波經過來回傳遞，所以造成的都卜勒頻率偏移量會加倍。此外也因為我們只能量測到與超音波波束趨於平行的血流，故須乘上 $\cos \theta$ 以代表血流在軸向 (axial) 上的速度分量，才能夠將血液在血管內的流速計算出來。唯有當血液流向在聲波傳遞方向上有分量時，才能夠利用都卜勒效應計算出血流速度[20]-[21]。

2.2 血流參數之計算與討論

對於在接收端所收到的超音波反射訊號，一般使用以下的流程來做處理，以估計相關的血流參數[17], [47]：

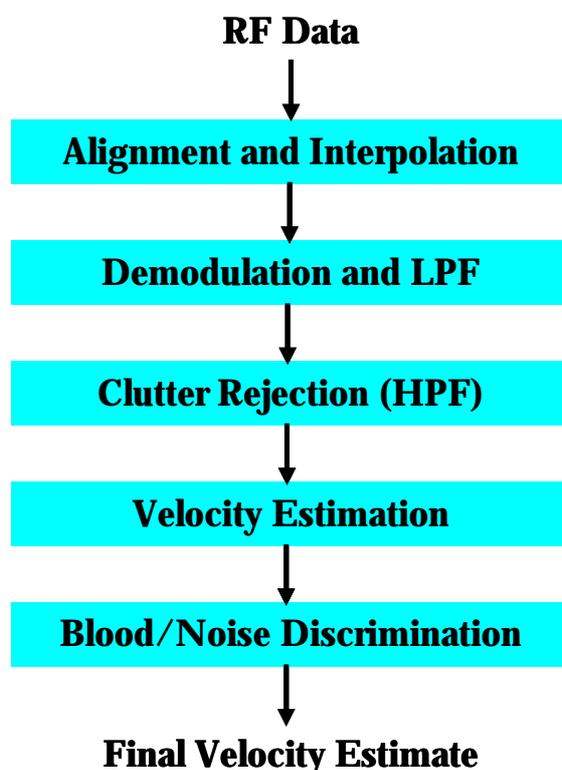


圖 2-2：超音波估算血流訊號處理流程

處理流速訊號之步驟如下：將所收到的原始射頻（radio frequency）訊號做解調變（demodulate），降到基頻（baseband）後，在沿著影像深度的方向上用低通濾波器（low pass filter）濾除所要訊號頻段之外的高頻部份，以降低雜訊的影響。clutter rejection 是在超音波脈衝連續多次發射的時間軸方向上加入一特別設計的高通濾波器（也就是一般所謂的 wall filter），因為流動的血液所造成的都卜勒頻率偏移量較大，而血管管壁及周圍組織的移動速度則相對較慢，這些訊號通常遠較血流訊號強得多，且所造成的都卜勒頻率偏移量較小，所以可以用一高通濾波器把不必要的低頻訊號濾除或抑制

(suppression)，留下我們想要的流速訊號，再進行下一步的流速估計運算。經過各種演算法計算出來的流速估計值，必須再設定諸如 wall filter 前後的流速量值、都卜勒能量等閾值 (threshold)，來進一步區別真正的流動訊號以及周圍不必要的組織或雜訊影響，最後才能夠得到準確的流速估計值。

而為了使用超音波得到血液流動的資訊，必須在同一個位置上連續發射一次以上的超音波脈衝，才轉換到下一個聲束位置。圖 2-3 為一個二維的彩色都卜勒影像，為了得到此影像中其中一行的流速量值，就必須以此多次發射的結果來共同運算，而每兩次發射之間的時間間隔稱為脈衝重覆時間 (pulse repetition interval, PRI)，其倒數即為脈衝重覆頻率 (pulse repetition frequency, PRF)。

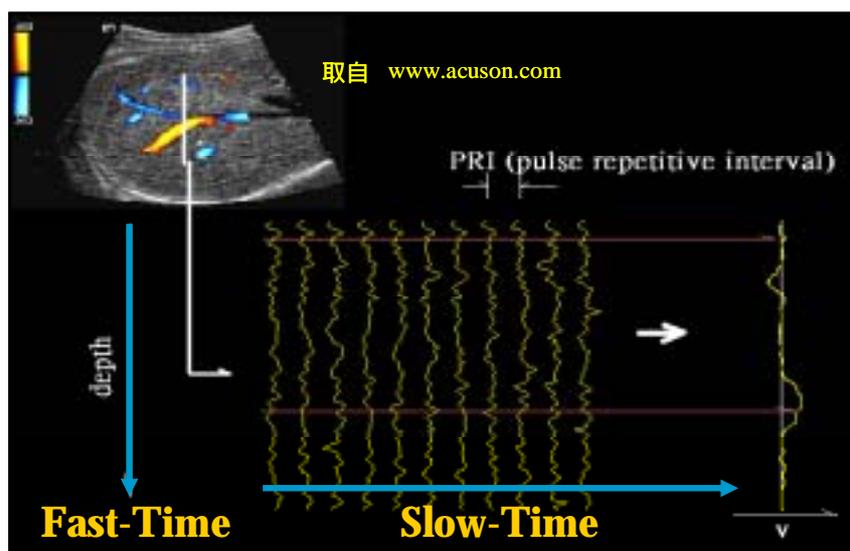


圖 2-3：超音波血流訊號取樣示意圖

另外在此必須先定義兩個時間軸的方向，以利後續各種流速演算法及實驗結果的說明。在沿著影像深度，也就是跟超音波訊號傳遞路徑平行的方向，在這個方向上超音波影像系統是以類比數位轉換器 (analog-to-digital converter, ADC) 的取樣頻率來對反射訊號做取樣，稱為 fast-time 方向。而在超音波脈衝連續多次發射的時間軸方

向，在這個方向上是以脈衝重覆頻率（PRF）來對被影像物體的移動狀態做取樣，稱為 slow-time 方向。可參考圖 2-3 中的標示。

由於高頻超音波在應用上會有訊號強度不足、空間解析度要求較高，以及取樣數目不夠等相關問題，傳統在低頻超音波系統上計算血流參數的方法在此或許會有所限制與不足，因此在這個研究中希望能夠評估多種計算血流參數的流速演算法，找出適用於寬頻（wideband）超音波訊號、抗雜訊能力佳、速度解析度高的演算法，以充分配合高頻超音波的特性與優點。在此一共評估了包括傳統的一維自相關函數法、二維自相關函數法、寬頻最大可能性評估法以及蝶狀搜尋法等四種演算法。

至於在流速演算法計算過後所必須加入的閾值處理，以進一步區別流動訊號與周圍組織，則將在第四章與實際的實驗結果一併討論。

2.2.1 一維自相關函數法

都卜勒效應所產生的都卜勒頻率偏移一般都是由傅立葉轉換（Fourier transform）或是自相關（autocorrelation）技術來計算。通常我們將前者所產生的影像稱之為頻譜都卜勒（spectral Doppler），只用來量測沿著單一方向超音波波束的血流（使用連續波超音波，continuous wave，CW）或是在一個特定取樣體積內的血流資訊（使用脈衝波超音波，pulsed wave，PW）。而利用一維自相關技術可用來計算簡單的血流參數，如平均流速、血流能量（energy）與流速變異量（velocity variance）等等，且一維自相關技術因為其運算簡單，只需要到時域（time domain）上的運算，運算時間短，目前已經被廣泛運用在商用超音波系統上，可用來即時顯示二維的血流資訊。又因為在超音波機器上係利用不同的顏色編碼來表示血流參數的量值變

化，所以一般稱之為彩色都卜勒（color Doppler）模式。

顧名思義，一維自相關函數法只有考慮到在一維方向，也就是 slow-time 方向上的流速資訊。實際做法是針對某段特定深度、想要用來計算流速資訊的距離閘（range gate）內，每筆接收到的訊號在做完降頻解調變以及濾波等前置處理之後，將其在 fast-time 方向上利用加總的方式縮減成單一取樣點，也就是每一筆超音波脈衝最後都只剩下單一點的資訊，再利用相關函數的方式來考慮訊號在 slow-time 方向上相位的變化。其處理過程如圖 2-4 所示。

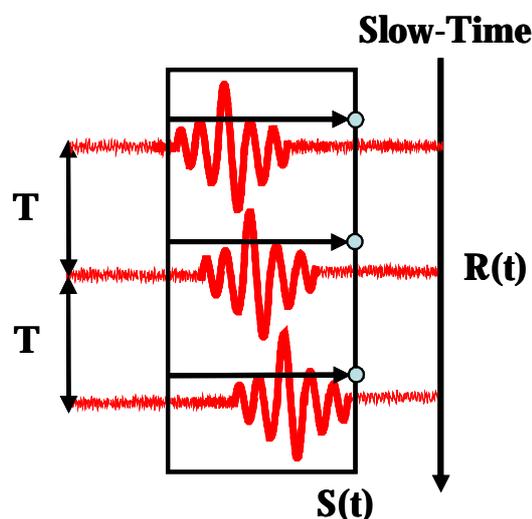


圖 2-4：一維自相關函數法示意圖

令 $S(t)$ 為接收自某特定深度距離閘的反射訊號，其在 slow-time 方向上的自相關函數 $R(t)$ 定義為：

$$R(t) \equiv \int_{-\infty}^{\infty} S(t+\tau) S^*(\tau) d\tau$$

其中 * 代表共軛複數（complex conjugate）。又根據 Wiener-Khinchine's 定理，功率頻譜（power spectrum） $P(\omega)$ 為自相關函數 $R(t)$ 的傅立葉轉換，亦即：

$$R(t) = \int_{-\infty}^{\infty} P(\omega) e^{j\omega t} d\omega$$

其中 $\omega = 2\pi f$, f 代表頻率。因此可以將平均速度所對應之都卜勒頻率偏移的平均值（也就是 first order moment）表示為：

$$\bar{\omega} = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} \omega P(\omega) d\omega}{\int_{-\infty}^{\infty} P(\omega) d\omega}$$

又將 $R(t)$ 分別表示成振幅及相位： $R(t) = |R(t)| e^{j\theta(t)}$ ，經過推導後可進一步將頻率的平均值 $\bar{\omega}$ 簡化成：

$$\bar{\omega} = \theta'(0) \approx \frac{\theta(T) - \theta(0)}{T} = \frac{\theta(T)}{T}$$

其中 T 是連續兩個超音波脈衝訊號的時間間隔（即 PRI）。因為訊號相位 $\theta(T)$ 與探頭到受測物體間的距離有關，所以都卜勒頻率偏移的平均值代表了時間 T 內的距離變化，也就是速度的基本定義。另外血流的方向可以由平均頻率的正負號來決定。平均頻率為正，表示血流朝向探頭移動，流速為正值；而平均頻率為負，則表示血流方向遠離探頭，流速為負值。

如果將功率頻譜在整個頻率範圍內做積分，可得出血流訊號的總能量 E ，亦即：

$$E = \int_{-\infty}^{\infty} P(\omega) d\omega = R(0)$$

所以能量 E 同樣可以由時域訊號求得。另一方面因為能量 E 是訊號在頻譜上的總面積，不會因為頻譜左右對稱的影響而等於 0，因

此能量模式可應用在不同的臨床診斷用途上，尤其適用於不考慮血流方向的檢查[20], [22]。

2.2.2 二維自相關函數法

相較於傳統的一維自相關函數法只考慮到在 slow-time 一維方向上的流速資訊，並以這些資訊來計算都卜勒頻率偏移。改良過後的二維自相關函數法則充分運用到反射訊號在 fast-time 及 slow-time 兩個時間軸上的變化。一維以及二維自相關函數法間的差異比較可以由圖 2-5 來表示。

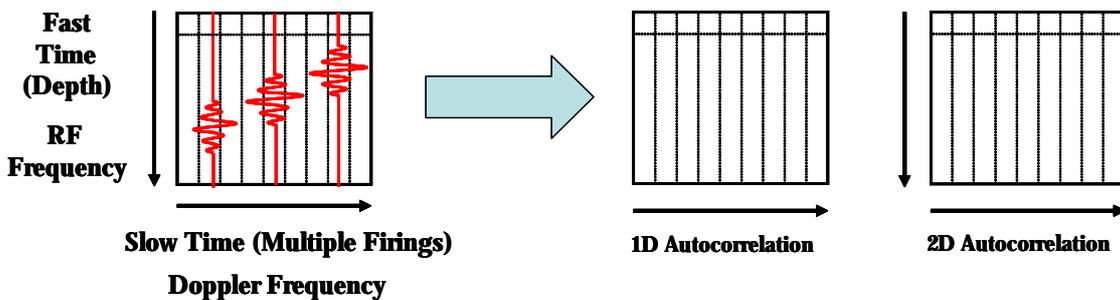


圖 2-5：一維以及二維自相關函數法比較圖

超音波訊號在 fast-time 時間軸上是以發射訊號的射頻中心頻率為基準在做變化；而在 slow-time 時間軸上，也就是超音波脈衝多次發射的方向，超音波反射訊號的變化所造成的結果就是都卜勒頻率偏移。二維自相關函數法就是在 fast-time 和 slow-time 二維的方向上，利用自相關函數來計算平均的都卜勒頻率偏移以及射頻的頻率變動。在深度（fast-time）方向的取樣範圍內以自相關函數法估算射頻頻率變動，補償了因為組織衰減效應以及散射子的隨機訊號特性所造成的中心頻率的改變，也就是說實際上我們收到超音波反射訊號的中心頻率並非永遠固定不動、跟發射訊號的中心頻率完全一樣，而是以發射訊號中心頻率為基準在上下隨機變動。一維自相關函數法則沒有考慮到在此 fast-time 方向上的資訊，而是假設在估算都卜勒頻率偏移

時所需要用到的散射子反射訊號中心頻率，跟原本發射訊號的中心頻率相同，造成估算得到的流速估計值會出現跟反射訊號中心頻率相似的波動。二維自相關函數法理論上對處理寬頻以及低訊雜比（SNR）的訊號可以比傳統的一維自相關函數法有更好的效能，也較不受組織衰減效應的影響。

二維自相關函數法在實做上可以用下列的運算式來實現：

$$\langle v_{2D} \rangle = \frac{c}{2} \frac{\frac{F_s}{2\pi} \tan^{-1} \left\{ \frac{\sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-2} [Q(m,n)I(m,n+1) - I(m,n)Q(m,n+1)]}{\sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-2} [I(m,n)I(m,n+1) + Q(m,n)Q(m,n+1)]} \right\}}{\frac{f_s}{2\pi} \left\{ 2\pi f_{dem} + \tan^{-1} \left[\frac{\sum_{m=0}^{M-2N-1} \sum_{n=0}^{M-2N-1} [Q(m,n)I(m+1,n) - I(m,n)Q(m+1,n)]}{\sum_{m=0}^{M-2N-1} \sum_{n=0}^{M-2N-1} [I(m,n)I(m+1,n) + Q(m,n)Q(m+1,n)]} \right] \right\}}$$

其中 v_{2D} 為以二維自相關函數法估算出來的軸向血流速度； c 為聲波在組織中傳遞的速度； f_s 為系統取樣頻率； F_s 為脈衝重覆頻率（PRF）； f_{dem} 為發射訊號的中心頻率跟系統取樣頻率的比值，假設發射訊號的中心頻率為 40 MHz，系統中 A/D 介面卡的取樣頻率為 200 MHz，則此處的 f_{dem} 即為 $40 / 200 = 0.2$ ； I 跟 Q 分別代表訊號在做解調變之後的同相位（in-phase）以及正交相位（quadrature phase）訊號； M 是選定的計算視窗在深度方向（fast-time 方向）的長度點數， N 則是計算視窗所包括的超音波脈衝數目（slow-time 方向）， m 及 n 則分別是這兩個方向上訊號取樣點的標號（index）。從以上運算式中可以得知，分子部份是對 n 標號不同的 I 、 Q 訊號做自相關函數運算，為在 slow-time 方向上針對都卜勒頻率偏移所做的估計；分母部份則是對 m 標號不同的 I 、 Q 訊號做運算，為在 fast-time 方向上針對超音

波反射訊號中心頻率變動所做的估計。從上式中也可以發現，二維自相關函數法充分運用到某段特定深度的距離閘 (range gate) 內所有的 I、Q 訊號，將其在 fast-time 及 slow-time 二維方向上的流速資訊都加以運算考慮。

由於傳統的一維自相關函數法只考慮到在 slow-time 一維方向上的流速資訊，因此可仿照上述的運算式，將一維自相關函數法的流速估計值表示如下：

$$\langle v_{1D} \rangle = \frac{c}{2} \frac{f_s \tan^{-1} \left\{ \frac{\sum_{n=0}^{N-2} \left[\sum_{m=0}^{M-1} Q(m,n) \sum_{m=0}^{M-1} I(m,n+1) - \sum_{m=0}^{M-1} I(m,n) \sum_{m=0}^{M-1} Q(m,n+1) \right]}{\sum_{n=0}^{N-2} \left[\sum_{m=0}^{M-1} I(m,n) \sum_{m=0}^{M-1} I(m,n+1) + \sum_{m=0}^{M-1} Q(m,n) \sum_{m=0}^{M-1} Q(m,n+1) \right]} \right\}}{f_s * f_{dem}}$$

其中 v_{1D} 為以一維自相關函數法估算出來的軸向血流速度，其餘變數皆同前面的定義。由於一維自相關函數法沒有考慮到超音波反射訊號在 fast-time 方向上的變動，因此分母部份並沒有相對應的自相關函數運算出現；分子部份則仍然是在 slow-time 方向上對都卜勒頻率偏移做計算，由於一維自相關函數法的做法是在某段特定深度、想要拿來計算流速資訊的距離閘內，將訊號在 fast-time 方向上縮減成單一取樣點，也就是每一筆超音波脈衝訊號最後只剩下單一點的資訊，因此在分子部份即是將 I、Q 訊號對標號同為 m 的取樣點做加總後，再對 n 標號不同的 I、Q 訊號做運算。

又因為欲以自相關函數來計算 fast-time 方向上射頻的頻率變動，在深度方向最少需要兩個取樣點，故二維自相關函數法運算式中所允許的最小 M 值為 2[14], [23]-[24]。

2.2.3 寬頻最大可能性評估法

在偵測血流速度的應用上，目標是要在盡可能小的區域內測量出血流的速度分佈，並快速而且準確的得到此測量結果。有研究曾經提出一個寬頻最大可能性評估法（wideband maximum likelihood estimation, WMLE），所謂最大可能性評估法這種統計模型，是指在想要得出的參數（在此即為血流速度）當中，找出一個最恰當的值，使得接收到的訊號在該參數值成立的條件下發生的可能性為最大。

對一個軸向速度為 v ，轉移時間為 d 的 WMLE 運算式為：

$$l(v) = \left| \sum_k \exp[j\sigma v k T] \int_{-\infty}^{\infty} r'(t) s_0'(t - d - kT[1 + 2v/c]) dt \right|^2$$

其中 $\sigma = 2\omega_c/c$ ， ω_c 為超音波反射訊號的中心角頻率；

c ：聲波在組織中傳遞的速度；

$l(v)$ ：速度為 v 時的可能性函數值；

$r'(t)$ ：接收訊號的複數波包（complex envelope）；

T ：發射訊號的周期，即脈衝重覆時間（PRI）；

$s_0'(t)$ ：接收訊號複數波包的模型。

此演算法在實做上可以看成設計一系列相關性接收器（correlation receiver）或是匹配濾波器（matched filter）。在使用相關性接收器時，原始的接收訊號會和一系列在訊號延遲（delay）以及中心頻率分別隨著不同速度成份變化的脈衝波相乘（圖 2-6（a））；在使用匹配接收器時有兩種選擇，一種是使濾波器的脈衝響應（impulse response）也是由一系列在訊號延遲以及中心頻率分別隨著不同速度成份變化的脈衝波組成（圖 2-6（b））；另一種在實際上比較簡單直接的方法，是利用一組可以把接收訊號延遲 $(P - k) * T * (1 + 2v/c)$

的延遲線 (delay lines) 所組成 (圖 2-6 (c)), 其中 P 為使用在估算血流參數的超音波脈衝數目, k 則是指其中特定的某個脈衝訊號, 這些延遲線的輸出值緊接著進入一個匹配到脈衝波包以及中心頻率的簡單濾波器內。上述的實做法可以用以下的示意圖來表示:

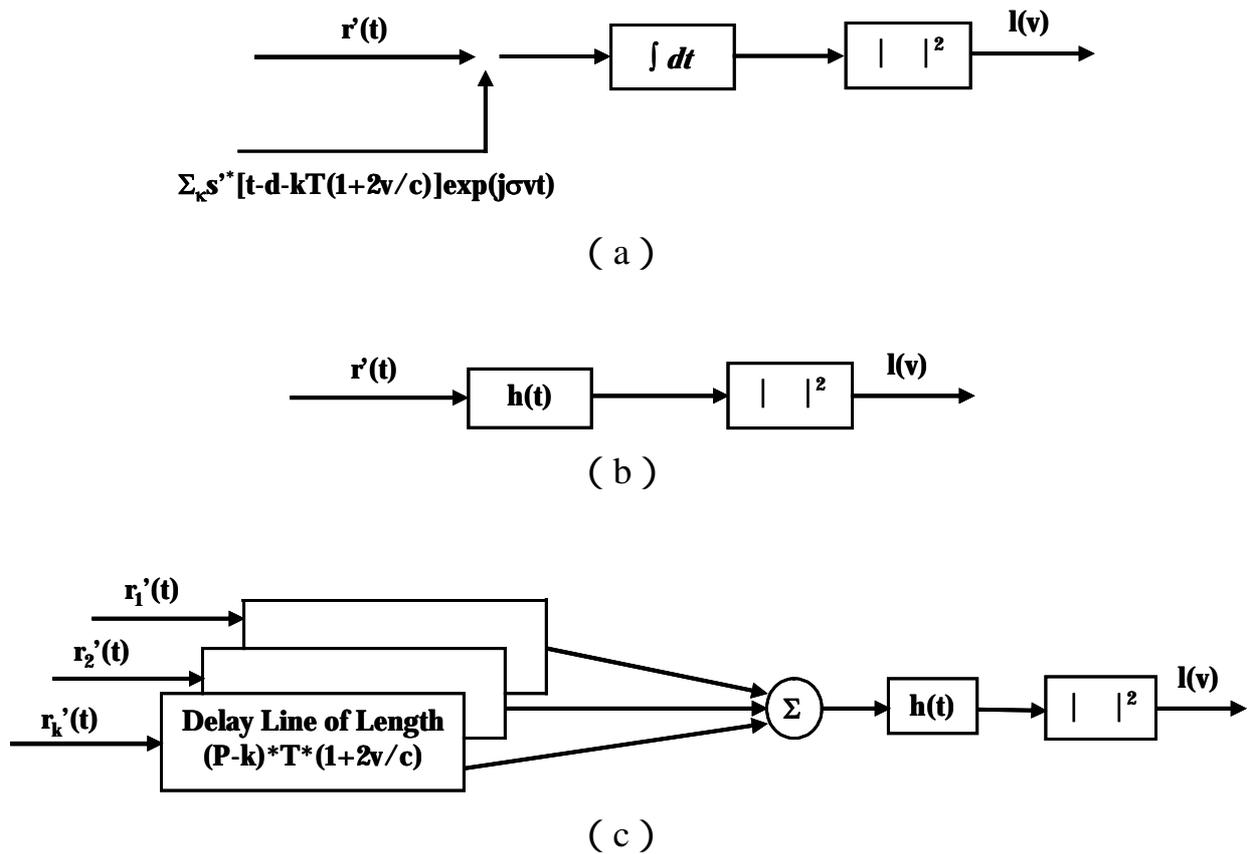


圖 2-6：寬頻最大可能性評估法之實做：(a) 相關性接收器；(b) 匹配濾波器，匹配至 $\sum_k S'^*[t-d-kT(1+2v/c)]\exp(j\sigma vt)$ ；(c) 設計一組延遲線，並加入一個匹配至 $S'^*(t)\exp(j\sigma vt)$ 的濾波器 $h(t)$ ，簡化過的濾波器在一次估算中共使用 P 個脈衝，其中 $r'_k(t)$ 代表第 k 個超音波脈衝的反射訊號。

本研究在實做上採用上述的第三種做法，其中 $r'_k(t)$ 代表第 k 個超音波脈衝的反射訊號， P 為在一次估算中所使用的脈衝總數。處理的流程大致如下：在對取到的超音波訊號做降頻解調變與濾波等基本處

理後，對於每一個不同的速度 v ，先讓每一筆數據在時域上做一個相對應的延遲，這部份是要把在不同速度下，自相關函數的峰值會有不同程度偏移的影響考慮進去；將得到的結果在 slow-time 方向上加總起來後，再通過匹配濾波器，用理想的發射波形來做匹配，取絕對值平方後即可得到在該速度 v 下的可能性函數值（likelihood function） $l(v)$ 。也就是說，我們分別以不同的可能速度量值來對得到的超音波反射訊號做檢驗，在每個速度下皆會得出相對應的可能性函數值 $l(v)$ ，把在不同速度 v 下的可能性函數值都求出來後，可得到如圖 2-7 的可能性函數分佈曲線，其中橫軸即為可能的流速範圍，縱軸則是可能性函數值的大小（已正規化至 0~1）。從圖中可看出可能的流速分佈情形，而可能性函數分佈曲線的峰值所對應到的 v 即為我們所要求出的流速值。

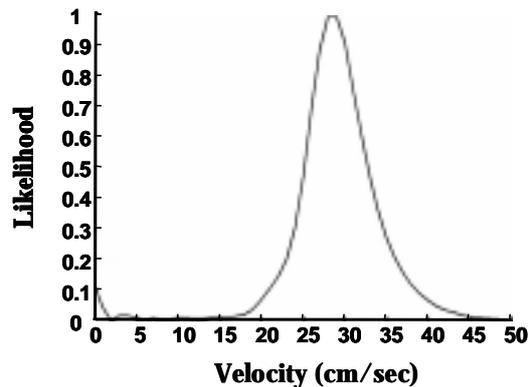


圖 2-7：可能性函數分佈曲線

此演算法分別匹配到不同速度所造成的訊號延遲及中心頻率，而最有可能的速度則是由具最大輸出值的濾波器所得出（即 $\max l(v)$ ）。此法同時利用了平均散射體速度在超音波反射訊號的訊號延遲和頻率偏移上的效應，也就是結合了傳統的都卜勒頻率偏移和時域上相關函數的分析法，可以提高速度的解析度，並且降低速度計算的變異值 [17],[25]-[27]。

2.2.4 蝶狀搜尋法

在由超音波探頭接收回來的射頻訊號中，散射子反射訊號平行於超音波傳遞方向上的移動，表現出來的是相位隨時間變化的波形（如圖 2-8 所示）。在傳統的一維自相關函數演算法中，是在 slow-time 方向上利用比對相鄰訊號間相關函數的變化以求出相位差，再反推回造成此相位差的血流速度。但從另一個角度思考，可以考慮如圖 2-8 中的蝶狀搜尋線（butterfly line），不同斜率的蝶狀搜尋線分別對應到不同的速度，當某條蝶狀搜尋線剛好對應到反射體的正確流速時，其在每筆射頻訊號上通過的對應值應該是相同的，如果沒有對應到正確流速，則在不同筆訊號上對應到的值則不會一致。加入考慮雜訊的影響以及散射子垂直於聲波傳遞方向上的移動，則對應到正確流速的蝶狀搜尋線，其在不同筆反射訊號上取樣值的變化應該是最小的，因此只要對所有可能的流速加以搜尋比對，找出變異值最小的該組蝶狀搜尋線，即對應到散射子正確的移動速度。因為此法是直接在還未經過解調變處理的射頻訊號上做搜尋，因而把此概念稱做射頻蝶狀搜尋法（RF butterfly search），可由圖 2-8 示意圖來表示。

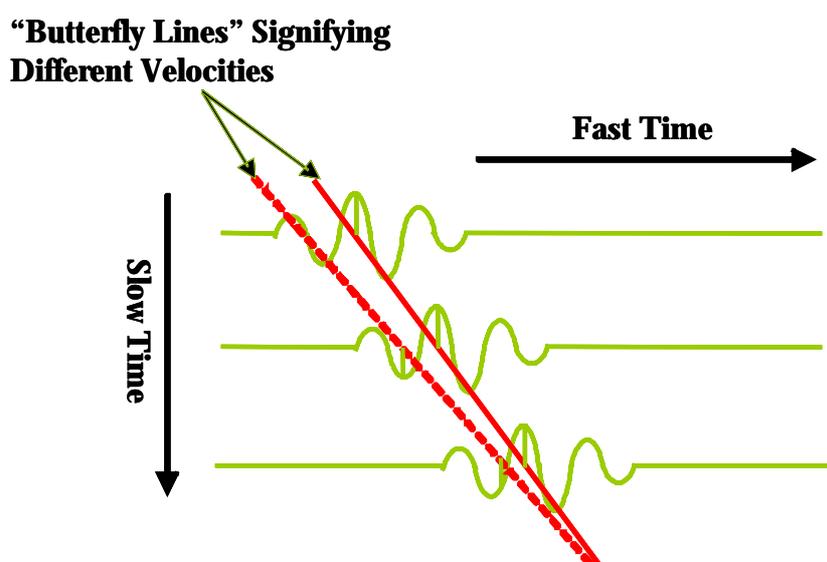


圖 2-8：射頻蝶狀搜尋法示意圖

將此概念推廣至經過降頻解調變到基頻的超音波訊號上，首先假

設接收到的射頻訊號為：

$$s[n, i] = A \times \cos \left\{ \omega_0 \left(\frac{i}{f_s} - 2 \frac{d}{c} + 2n \frac{v_0}{c} T \right) \right\} \times r \left(\frac{i}{f_s} - 2 \frac{d}{c} + 2n \frac{v_0}{c} T \right)$$

n ：第 n 次發射及接收 (slow time 方向)；

i ：第 i 個取樣點 (fast time 方向)；；

A ：射頻訊號振幅；

ω_0 ：超音波發射訊號的中心角頻率；

f_s ：系統取樣頻率；

c ：聲波在組織中傳遞的速度；

d ：散射子與超音波探頭間的初始距離；

v_0 ：散射子移動速度；

T ：脈衝重覆時間 (PRI)，即兩次發射接收間的時間間隔；

則解調變至基頻後的訊號可表示為：

$$\tilde{r}[n, i] = \frac{A}{2} \times \exp \left\{ -j \omega_0 \left(-2 \frac{d}{c} + 2n \frac{v_0}{c} T \right) \right\} \times r \left(\frac{i}{f_s} - 2 \frac{d}{c} + 2n \frac{v_0}{c} T \right)$$

當選擇的蝶狀搜尋線恰好對應到散射子正確的移動速度 v_0 時，蝶狀搜尋線上對超音波反射訊號的取樣值為：

$$\tilde{r}_{Bv_0}[n] = A' \times \exp \left\{ -j \omega_0 \left(2n \frac{v_0}{c} T \right) \right\} \times r(0)$$

上式恰好對應到一個特定的頻率 $2\omega_0 n(v_0/c)T$ ，其頻率值與散射子的移動速度有關，其他速度蝶狀搜尋線上的取樣值就不會落在此頻率

上。所以對於任一散射子移動速度，都只有唯一的正確蝶狀搜尋線，而此一正確蝶狀搜尋線上對超音波反射訊號的取樣值皆會對應到一特定的頻率值。將每一條蝶狀搜尋線對超音波反射訊號的取樣值，檢驗其是否符合在散射子移動速度恰等於蝶狀搜尋線代表的速度量值時所會對應到的特定頻率值，理論上正確蝶狀搜尋線上的訊號能量就會集中在此頻率值上。若加入考慮雜訊的影響，仍可預期在該頻率值會有最大的訊號能量存在。

故定義：

$$L(v) = \frac{\left| \sum_n \tilde{r}_{Bv}[n] \times e^{j2\omega_0 n(v/c)T} \right|^2}{\sum_n |\tilde{r}_{Bv}[n]|^2}$$

$L(v)$ 就是對應於某特定速度 v 的能量分布函數，其中分子是該特定速度 v 下（也就是該特定頻率值）的能量，分母則是在各個速度下的總能量。分別求出對應到不同蝶狀搜尋線，也就是個別速度下的 $L(v)$ ，當 $L(v)$ 為極大值時的速度 v 即為最有可能的散射子移動速度，此法稱為正交蝶狀搜尋法（quadrature butterfly search），其訊號處理流程可由圖 2-9 來表示。

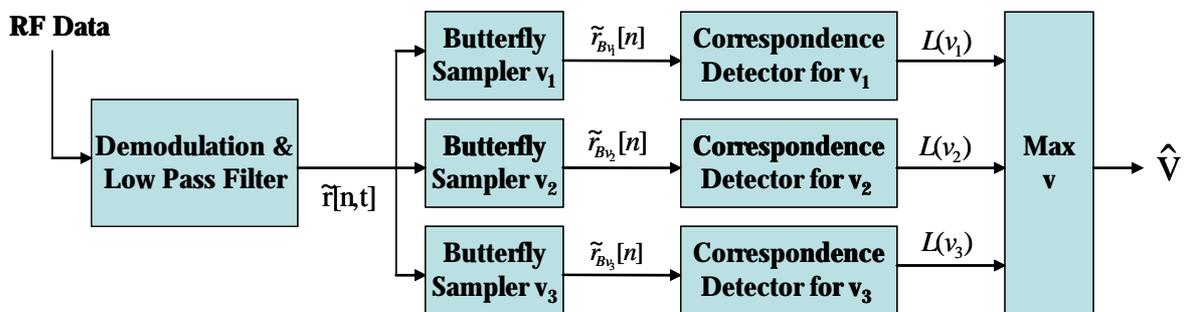


圖 2-9：正交蝶狀搜尋法訊號處理流程圖

對任何經降頻解調變、低通濾波過後的訊號 $r(n,t)$ 來說， $r_{Bv}[n]$ 可以直接使用如圖 2-10 的蝶狀取樣器 (butterfly sampler) 取樣而得，即相當於蝶狀搜尋線的取樣過程：

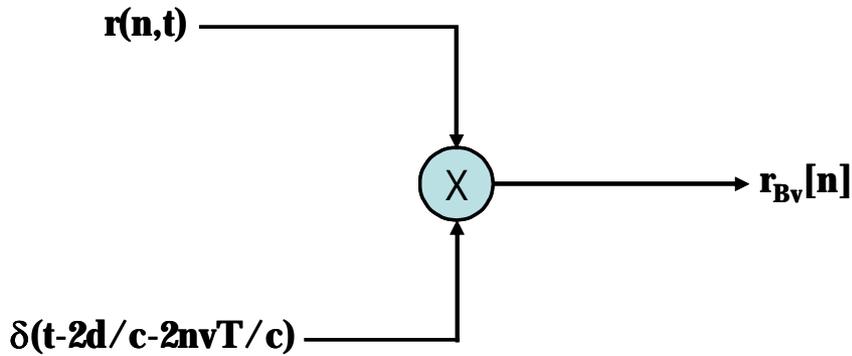


圖 2-10：蝶狀取樣器 (butterfly sampler)

每一個取樣器的輸出值接著進入一個一致性偵測器 (correspondence detector)，此一致性偵測器即為將經過蝶狀搜尋線取樣過後的取樣值，分別計算其在不同速度下的能量分布函數 $L(v)$ ，如圖 2-11 所示。其中上方路徑為計算能量分布函數的分子部份，為該特定速度 v_0 下的能量；下方路徑則跟能量分布函數的分母部份有關，代表在各個可能速度下的總能量[27]-[28]。

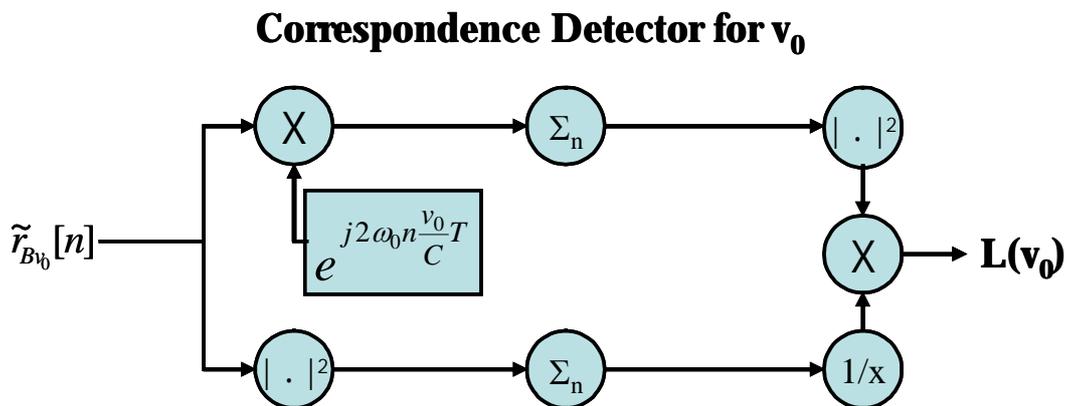


圖 2-11：正交蝶狀搜尋法的一致性偵測器 (correspondence detector)

對現行的商用超音波影像平台而言，使用蝶狀搜尋法可在不需要

大幅更改系統架構的前提下，運用現有的系統組件，只需要採用新的流速演算法核心即可實現。且以上的運算過程並沒有牽涉到任何複雜的數學函式運算，如相關函數、時域 / 頻域轉換或是疊代 (iteration) 等等，只有包括取樣、相乘、相加、比較大小等基本運算單元，因此在數位電路的實做上相當具有可行性，也不至於增加太多額外的硬體成本與運算複雜度。

2.2.5 演算法之定性比較

如前面提到的，運用高頻超音波在微量血流的量測上，由於取樣體積小、反射體轉移時間短，加上系統必須有良好的解析度以評估流速在 mm/s 等級以下的微循環血流，此情況下傳統的流速估算方法在使用上會受到限制，無法達到實際的需求，所以必須尋找一套合適的演算法，使得系統在有限的取樣數目下能夠精確的估計血流參數。傳統的一維自相關函數法是因應連續波 (continuous wave) 訊號所發展出來的窄頻 (narrowband) 技術，並沒有考慮到訊號在縱向深度，也就是 fast-time 上的變化，無法符合目前在短脈衝、寬頻 (wideband) 訊號上的應用，對於流速的估算會有高度的變異量出現。

二維自相關函數法在 fast-time 及 slow-time 二維的方向上，同時利用自相關函數來計算平均的都卜勒頻率偏移以及射頻訊號的頻率變動，充分運用到在某段特定深度的取樣範圍內所有的二維資訊，改進了一維自相關函數法只考慮在 slow-time 方向上資訊的缺點，理論上對處理寬頻以及低訊雜比 (SNR) 的訊號可以比傳統的一維自相關函數法有更好的效能，也較不受組織衰減效應的影響。

但是為了在空間中定位一個精確的取樣點，以得到較佳的空間解析度，必須盡量發射長度較短的脈衝波，脈衝越短則代表頻寬越寬，在此情形下都卜勒頻率偏移分佈的範圍較為廣泛，對於以自相關函數

技術為基礎來計算都卜勒頻率偏移，進而估算出血流速度的演算法來說皆會有不利的影響。

寬頻最大可能性評估法以及蝶狀搜尋法基本上可以視為是同一個演算法架構下的兩種版本。兩者皆結合了時域 (time domain) 以及頻域 (frequency domain) 上的運算，且兩種演算法針對各個不同的可能速度量值做比對，以最佳比對結果當做最終的流速估計值，皆是運用到了所謂的最大可能性評估法 (maximum likelihood estimation) 這種統計模型。所不同的是寬頻最大可能性評估法結合了傳統的匹配濾波器 (matched filter) 或相關性接收器 (correlation receiver) 的運算；蝶狀搜尋法則是採用在二維數據空間中取樣比對的方式。兩種演算法運算式間的關連性與互相轉換的方法也曾在文獻中被探討 [28]。這兩種演算法皆是針對寬頻的發射訊號所發展出來的，較不受訊號頻寬變動的影響，也會比以自相關函數法為基礎的演算法具有更佳的抗雜訊能力 [27], [29]。

對於以上四種估算流速演算法的評估，包括發射訊號頻寬、抗雜訊能力以及運算時間等問題，在第四章中會以模擬流速數據以及實際的體外流速仿體實驗來做詳細定量的探討。

2.3 常見影像格式

醫學超音波影像依其不同的應用與需求，具有許多不同種類的影像格式，例如：早期常使用的振幅模式（amplitude-mode, A-mode）一般內科以及婦產科常使用的亮度模式（brightness-mode, B-mode）心臟科常使用的移動模式（motion-mode, M-mode）顯示血流資訊的彩色都卜勒（color Doppler）頻譜都卜勒（spectral Doppler）以及能量都卜勒（power Doppler）等模式。另外也可組合多張二維B-mode影像以得到三維的立體超音波影像。

Amplitude-mode (A-mode) Image

高頻超音波最初的應用就是利用振幅模式的超音波反射訊號來觀察眼球組織，文獻中曾以反射信號的傳遞時間（time-of-flight）來約略觀察角膜的厚度[30]。A-mode影像的好處是所要分析的資料量比較少，分析的方法也較為簡單，使用類比訊號處理的方式即可完成處理的工作，不需要經過複雜的數位訊號處理電路來分析訊號。在早期電子技術以及硬體計算能力較差的年代常使用此種模式，振幅模式的缺點是無法利用此種影像格式對組織結構做較精確及大範圍的定性分析。

Brightness-mode (B-mode) Image

一般最常見的超音波影像格式就是所謂的B-mode影像，此模式是利用灰階的方式來表現組織所反射超音波訊號的強弱特性。在目前高頻超音波的頻率範圍內，由於尚無陣列探頭可供電子式掃瞄以及動態聚焦之用，因此目前多使用馬達定位系統帶動單一聚焦的超音波探頭做線性掃瞄，利用高速電子電路取樣，再將不同位置的一維超音波反射訊號加以組合，經過降頻解調變、低通濾波以及影像格式轉換等處理後，即可得到一張二維的B-mode影像。B-mode影像的特性在於以對數分佈和灰階表示組織影像，可定性地分析組織的結構特性，並且

可以觀察大範圍的組織解剖影像以輔助臨床診斷。圖2-11為使用本實驗室發展出來的超音波小動物影像系統所擷取到的老鼠胚胎頭部 B-mode 影像。

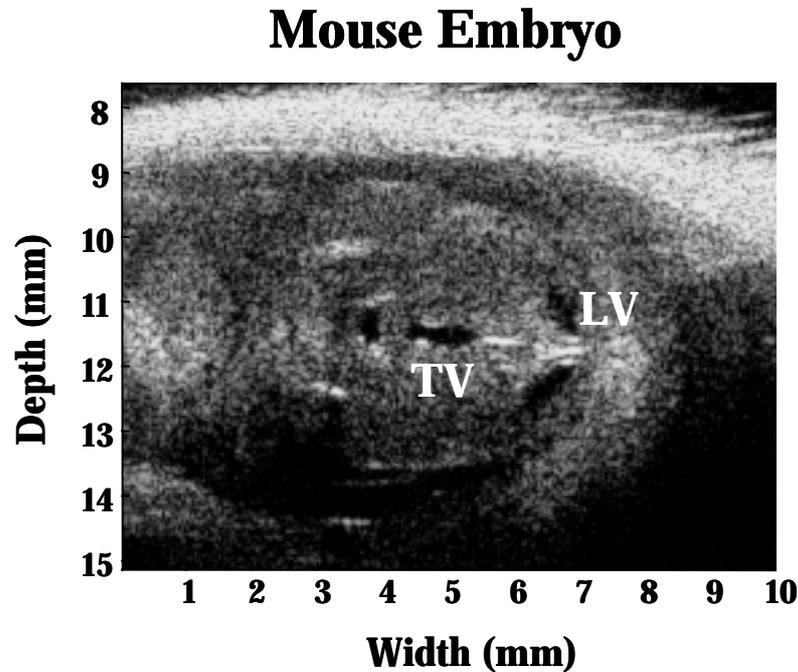


圖 2-11：老鼠胚胎頭部 B-mode 影像

Motion-mode (M-mode) Image

在人體中有許多會移動的組織，若將超音波探頭固定在同一個位置，並每隔一段時間連續發射多筆超音波訊號，觀察在此方向上組織反射訊號隨時間的變化情形，可以藉此描繪組織的移動狀態，如心肌的運動等等，此即所謂的移動模式 (M-mode) 超音波影像。顯示的方式則可仿照 B-mode 的灰階影像格式或是直接組合多條一維的 A-mode 訊號來表示，如圖2-12。

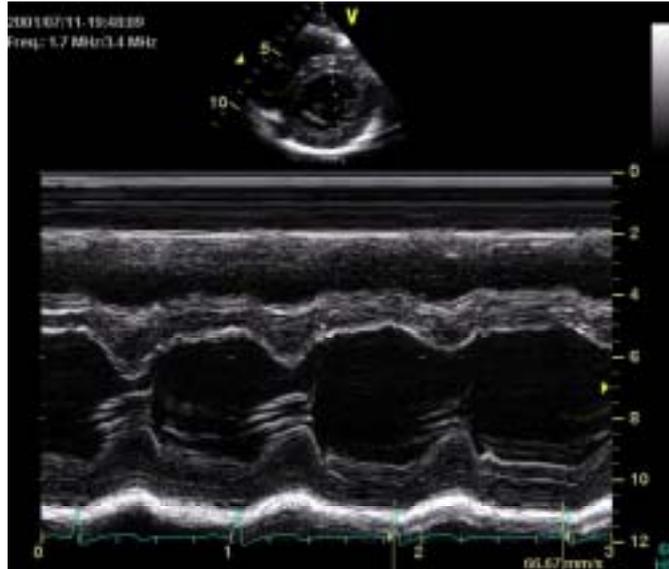


圖2-12：商用超音波系統（GE Medical Systems）中所顯示的心臟肌肉M-mode影像[31]

3-Dimensional Imaging

三維立體超音波影像能夠輔助醫師在臨床診斷上更加清楚地分辨各個器官組織的實際形狀、大小以及相對空間位置，以提供在醫學上的疾病判斷指標，並可創造一個虛擬實境的空間感，應用於臨床教學或是電腦輔助手術系統（computer-assisted surgery）。但因為目前二維超音波陣列探頭的製作技術尚未成熟，成本也太過昂貴，因此現有臨床超音波系統中的三維影像，大多採用外加定位裝置的方式來得到影像平面間應有的相對空間位置關係，所以若配合馬達定位系統和連續多次的線性掃描，輔以成像程式的處理，利用表面成像法（surface rendering）或是體積成像法（volume rendering），即可將數張二維B-mode影像合成為三維的立體超音波影像[60]。

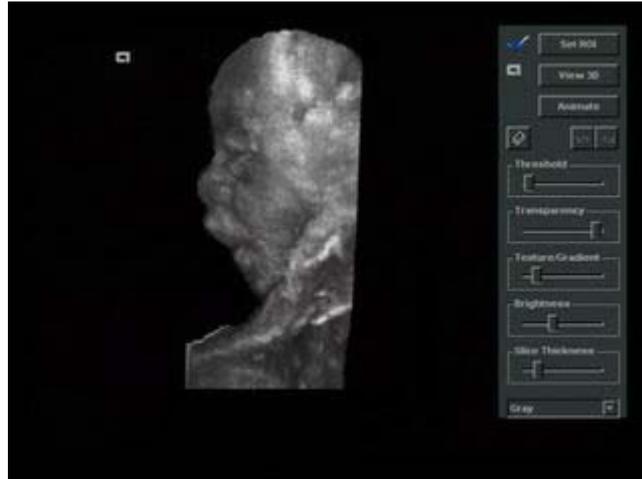


圖 2-13：商用超音波系統（SIEMENS Medical）中所顯示 31 週胎兒的三維超音波影像[32]

Spectral Doppler

都卜勒效應所產生的都卜勒頻移若是經由傅立葉轉換（Fourier transform）計算所產生的結果，通常稱之為頻譜都卜勒（spectral Doppler）。頻譜都卜勒可用來量測沿著單一方向超音波波束的血流（使用連續波超音波）或是在一個特定取樣體積內的血流資訊（使用脈衝波超音波）。選取一組時域移動視窗中的訊號，在經過傅立葉轉換處理後，所得出的頻譜就代表在這段時間內的血流速度分佈，也就是速度（影像縱軸，正比於都卜勒頻率偏移）對時間（影像橫軸）的變動情形[20]。

Color Doppler Imaging

彩色都卜勒影像是將利用都卜勒原理所計算得到的血液流速及流量等資訊，以相對於 B-mode 灰階影像的彩色編碼方式顯示出來，不同的顏色表示不同的血流速度與方向，有助於評估包括心臟及重要血管的血流分佈、血管構造等問題。彩色都卜勒影像的聲波訊號擷取過程與 B-mode 影像非常類似，唯一不同的是在同一位置的脈衝波必須沿相同方向連續發射多次，才轉換到下一個聲束位置。也就是說，每一個聲束方向上會有數個取樣點，再以此多次發射的結果來共同運

算，以計算出每一個取樣點的血流資訊。得到的血流資訊再用不同的色彩編碼呈現，重疊在二維的 B-mode 灰階影像上。使用彩色都卜勒量測血流資訊時，為了提升顯像速率(frame rate)以產生即時的影像，在同一個位置連續發射的次數及量測精確度上會有一定的限制，因此彩色都卜勒較適合用於如血流分佈情形等定性分析；而頻譜都卜勒則因為在同一個方向上所能夠得到的取樣數目較多，故較常用於如血流速度等定量的量測[20]。

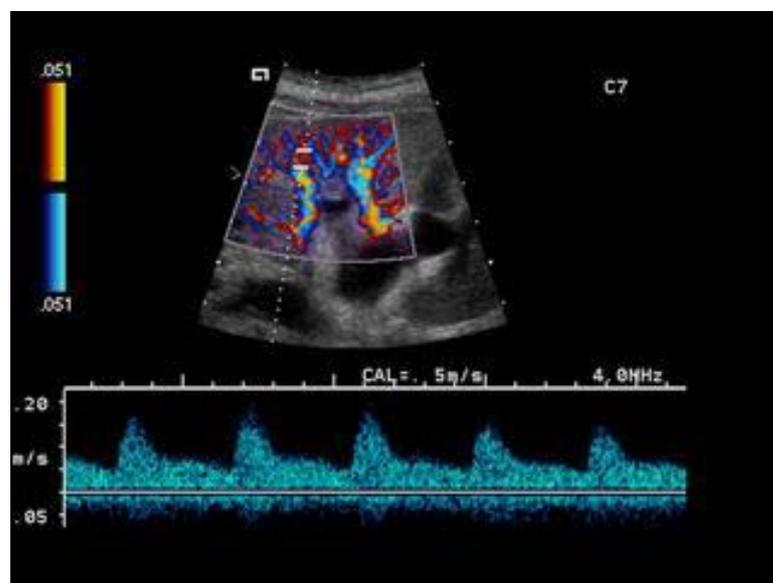


圖 2-14：商用超音波系統（SIEMENS Medical）中所顯示的腎臟血管彩色都卜勒以及頻譜都卜勒影像[32]

Power Doppler Imaging

能量都卜勒 (power Doppler) 模式由於是考慮都卜勒訊號在功率頻譜 (power spectrum) 上的總面積，不會發生因為頻譜左右對稱的影響而造成平均流速值等於 0，因此能量都卜勒模式可應用在不同的臨床診斷用途上，尤其適用於不考慮血流方向的檢查，例如血管的存在與否以及組織器官的灌流 (perfusion) 情形等等，對低流速的血管亦具有良好的顯像能力，對於血流動力學 (hemodynamics) 之研究、心血管疾病之診斷以及腫瘤血管新生 (angiogenesis) 之評估都有極

大的助益。近來更有運用能量都卜勒技術的都卜勒血流造影成像術（power Doppler angiography / ultrasound angiography）的發展。



圖 2-15：商用超音波系統（SIEMENS Medical）中使用能量都卜勒模式所顯示的腎臟血管影像[32]

第三章 實驗架構

3.1. 實驗系統架構與介面

隨著電子技術的發展，硬體的計算速度及效率跟著大幅提昇，因此自 80 年代開始，醫學超音波影像系統逐漸由傳統類比式的系統轉變成全數位式的架構，和早期架構中以類比訊號處理為主的計算方式不同。雖然目前在高頻超音波應用的頻率範圍內，全數位式的系統架構仍然會因為類比數位轉換器（analog-to-digital converter, ADC）取樣頻率以及振幅解析度之間的取捨，使得系統的動態範圍受到限制，但全數位式的系統架構可以讓使用者在發射端設計任意波形的發射訊號，以充分利用到各種如編碼波形（coded excitation）脈衝反相（pulse inversion）組織諧波影像（tissue harmonic imaging）等訊號處理的技術，來克服硬體上的限制、增進影像品質。而 ADC 取樣頻率以及振幅解析度間的取捨也可望隨著電子技術的發展，在未來幾年內逐步獲得改善。

本研究建立的高頻超音波小動物影像系統，簡單架構如圖 3-1 所示。此系統可以任意擷取一維至三維各種格式的超音波影像以及都卜勒血流訊號。以二維 B-mode 影像為例，利用步進馬達及伺服馬達等裝置帶動探頭做機械式的掃瞄，將空間中每一條一維資訊組合起來，即可得到一張完整的原始影像資料。而由探頭擷取到的射頻訊號必須經過降頻解調變、濾波及調整動態範圍等步驟才能成為一張一般常見的 B-mode 灰階超音波影像。此外並可配合馬達定位系統以及連續多次的線性掃瞄，將數張二維影像進一步合成為三維的立體超音波影像；而量測血流的都卜勒訊號除了以上步驟外，還需要加上計算相關函數或其他流速演算法的處理。這些功能可以用離線分析的方式或使用即時訊號處理來實現，而整個探頭掃瞄、擷取資料、數據處理及顯示影像等流程，則由個人電腦配合 LabVIEW、Visual C++ 控制程式以

及 MATLAB 處理程式來完成。

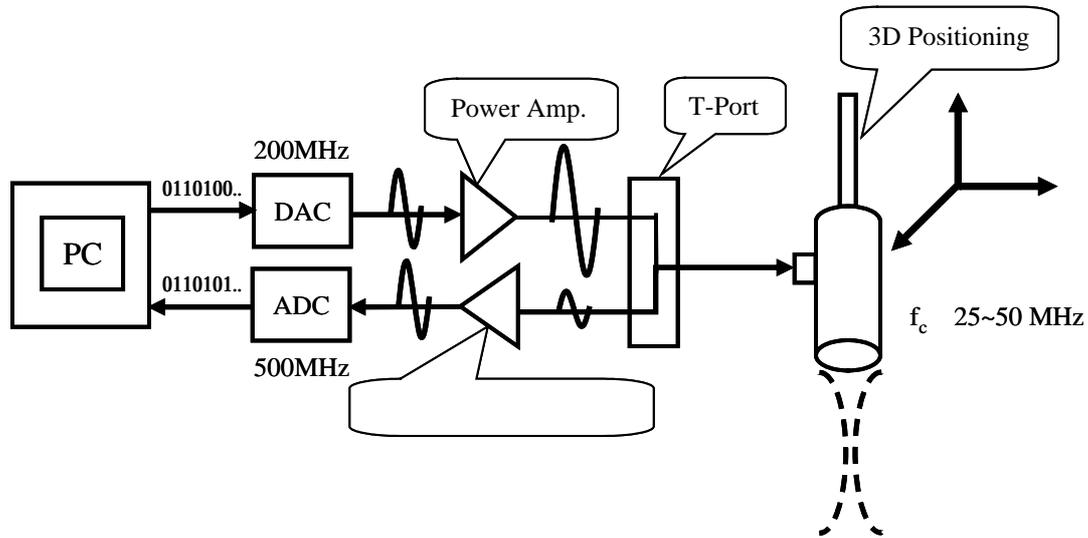


圖 3-1：全數位式超音波小動物影像系統架構圖

本研究中所使用的高頻超音波探頭是由美國南加州大學熊克平教授 (Professor Kirk K. Shung) 研究團隊特別製作的；此探頭是以 lithium niobate 為基礎材料來設計製造，具有中心頻率 45 MHz、相對頻寬為 55 % 的頻譜特性，其孔徑大小 (aperture size) 為 6 mm，聚焦深度 (focal length) 為 12 mm，嵌入損失 (two-way insertion loss) 約為 10 dB。另外還需搭配一條阻抗匹配的訊號線以避免高頻訊號反射所造成訊號的失真和干擾。

高頻超音波影像系統所使用之實驗器材另包含最高取樣頻率可達 500 MHz、振幅解析度 8-bit 的雙通道高速取樣電路 (analog-to-digital converter, PDA500, Signatec, Corona, California, USA) 和取樣頻率 200 MHz、振幅解析度 8-bit 的任意波形產生器 (digital-to-analog converter, DAC200, Signatec, Corona, California, USA) 射頻功率放大器 (low power RF amplifiers, 25A250A, Amplifier Research, Souderton, Pennsylvania, USA) 射頻濾波器 (RF filter, 濾波範圍 30~60MHz, BP11/60-60-3EE, Filtek, Oceanside, California,

USA) 及 Pulser / Receiver (5900PR, GE Panametrics, Waltham, Massachusetts, USA) 和函數 / 任意波形產生器 (arbitrary function generator, 33120A, Agilent, Palo Alto, California, USA) 等等。

其中 DAC200 可以載入我們在 MATLAB 程式上預先設計好的任意波形及頻寬的發射訊號，並與 PDA500 同步，依實際需要以不同的延遲時間、取樣頻率和取樣長度、位置深度等設定，將超音波探頭接收到的類比反射訊號轉換為數位格式，再進一步經由 MATLAB 程式來處理。Pulser / Receiver 5900PR 的功用在於：Pulser 部份可單獨經由外部觸發產生的高電壓脈衝 (>100 Volt.) 激發探頭的壓電材料，以發出超音波脈衝訊號；Receiver 部份則是由一組多級的放大器和濾波器組成，可將超音波探頭接收回來的微弱反射訊號加以放大並濾波，以利後續的 ADC 轉換與處理運算。函數 / 任意波形產生器則可以依實際需要設計不同的觸發訊號，提供給 DAC200 及 PDA500 做為同步之用。

在發射端單獨採用 Pulser 來觸發超音波探頭時，Pulser 會產生一個瞬間的高電壓脈衝來激發探頭的壓電材料，因此可以輕易達到高電壓的需求，也較不容易受到雜訊的影響，獲得較好的系統訊雜比。但我們希望建立一套全數位式的實驗系統架構，允許使用者在發射端設計任意波形、頻寬、中心頻率的發射訊號，以期能完整評估各種形式超音波訊號及演算法的效能，充分利用本實驗室在訊號處理技術上的優勢，來克服硬體的限制、增進影像品質，因此本研究建立的影像系統在發射端採用數位類比轉換器，搭配射頻功率放大器的組合來達成上述需求。此一做法所須付出的代價是用來激發探頭的電壓脈衝值不及單獨採用 Pulser 觸發時的脈衝訊號，且受到儀器多級串接以及功率放大器的雜訊影響較為嚴重，使得系統的訊雜比受到限制。不過此部份的限制可望隨著電子技術的發展，在未來幾年內逐步獲得改善。後續的流速仿體與活體老鼠實驗也都以此架構來實現。

本實驗系統允許使用者以軟體預先設計任意的發射波形，先經過高速的數位類比轉換器（DAC200）轉換成類比訊號，後經由功率放大器放大為高電壓（ $V_{pp} = 150 \text{ Volt.}$ ）訊號，並經過二極體電路（expander，圖 3-1 中的 T-Port）抑制發射端雜訊的作用，並可阻絕發射訊號直接穿透至接收端，進而激發高頻超音波探頭發出訊號。超音波訊號和被影像物體作用後，在接收端首先經過 Pulser / Receiver 5900PR 上的前級放大器以及外接的射頻濾波器，將從探頭接收回來的微弱反射訊號加以放大 26 ~ 54 dB，並濾除適當訊號頻率範圍之外的雜訊，使訊號能滿足高速取樣電路的取樣擺幅（voltage swing），且具有最適當雜訊反應的訊號範圍，以利之後使用高速的類比數位轉換器（PDA500）轉換成數位訊號，並降低量化雜訊的影響。經由此架構可高速擷取射頻訊號，再經過後續的訊號處理及配合馬達掃瞄技術，即可取得二維的超音波影像並計算流速相關資訊[33]。

在探頭定位方面，我們利用三個伺服馬達帶動探頭在 X，Y 和 Z 方向移動的三軸定位系統，達到三維空間定位的要求，並可掃瞄得到二維及三維超音波影像成像所需的資料。馬達最小移動距離可以達到 1 μm ，經由精確度為 1 μm 的光學尺回授定位座標參數即可即時得到空間定位的資訊。馬達定位控制及詳細參數的設定則是使用個人電腦配合 LabVIEW 5.0 軟體來控制，馬達定位控制介面如圖 3-2 (a)；整個系統從載入發射訊號、探頭移動掃描、資料擷取和結果影像顯示的流程，則由個人電腦配合由 Visual C++ 6.0 撰寫而成的實驗介面程式來達成，如圖 3-2 (b) 與 (c)；訊號處理及流速參數計算的過程則是使用個人電腦配合 MATLAB 6.1 來分析。

在活體老鼠實驗上，我們使用一特殊設計的掃瞄平台來輔助超音波影像的取得，掃瞄平台之照片及裝置示意圖如圖 3-2 (d)。平台的材質為透明壓克力，平台下方為一儲水槽，並可使用加熱器將清水加熱至溫度約 35 $^{\circ}\text{C}$ 。利用幫浦將加熱過的溫水抽取至平台上方，此水

浴 (water bath) 可當做超音波傳遞的介質及幫助保持實驗老鼠體溫。平台上並挖出一道長寬各約 2 cm 及 1 cm 的缺口 , 超音波探頭即可經由此缺口掃描欲取得影像的老鼠身體部位。

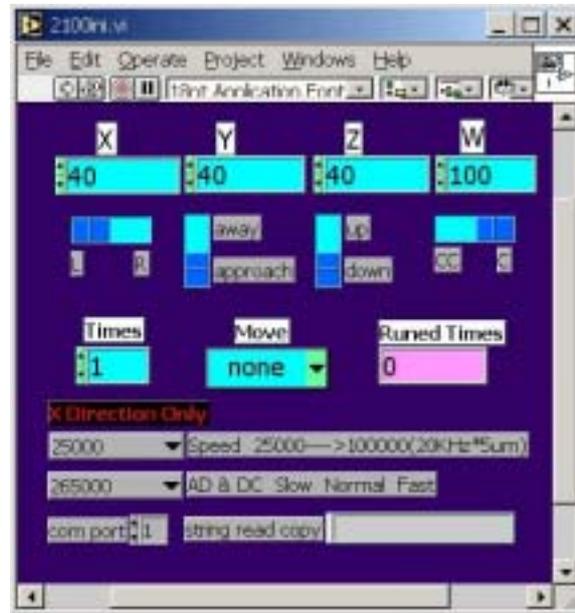


圖 3-2 (a) : 三軸馬達系統定位控制介面

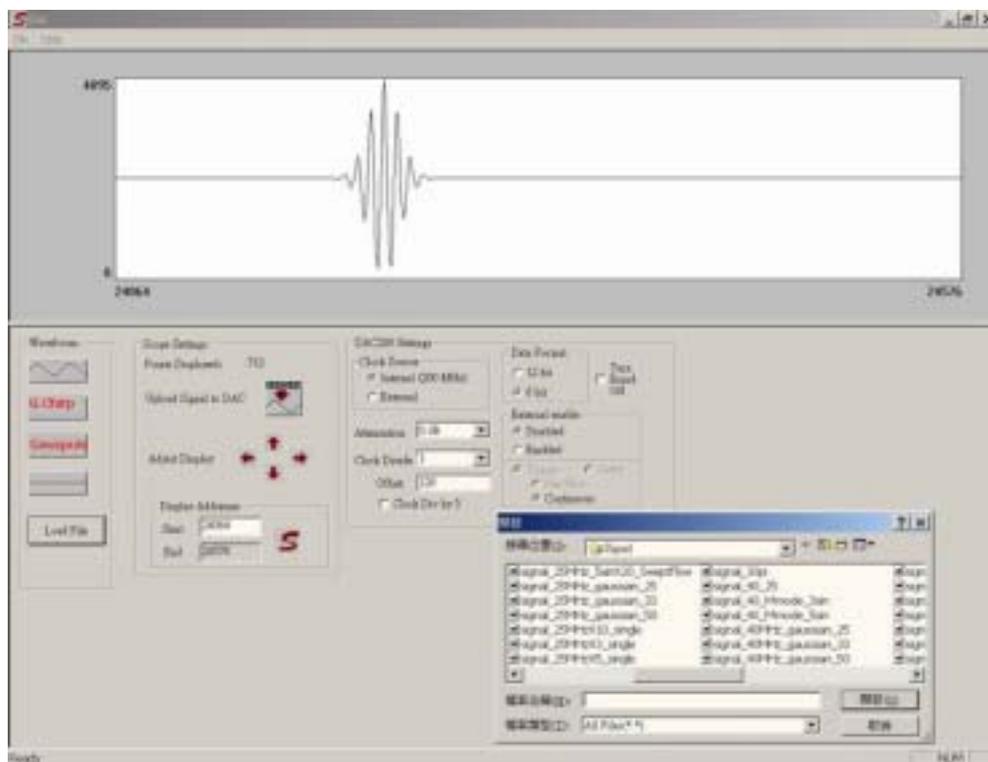


圖 3-2 (b) : 數位類比轉換器 DAC200 載入發射訊號及控制介面

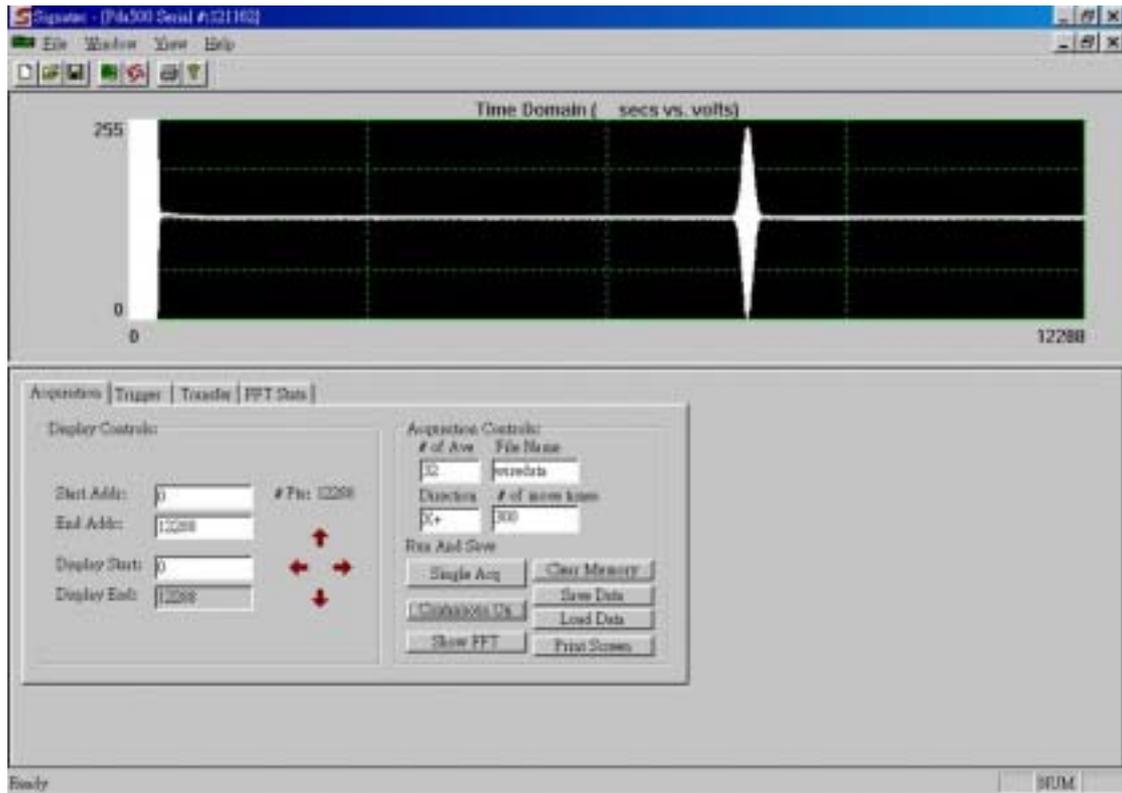


圖 3-2 (c): 類比數位轉換器 PDA500 接收訊號設定、馬達掃描控制介面

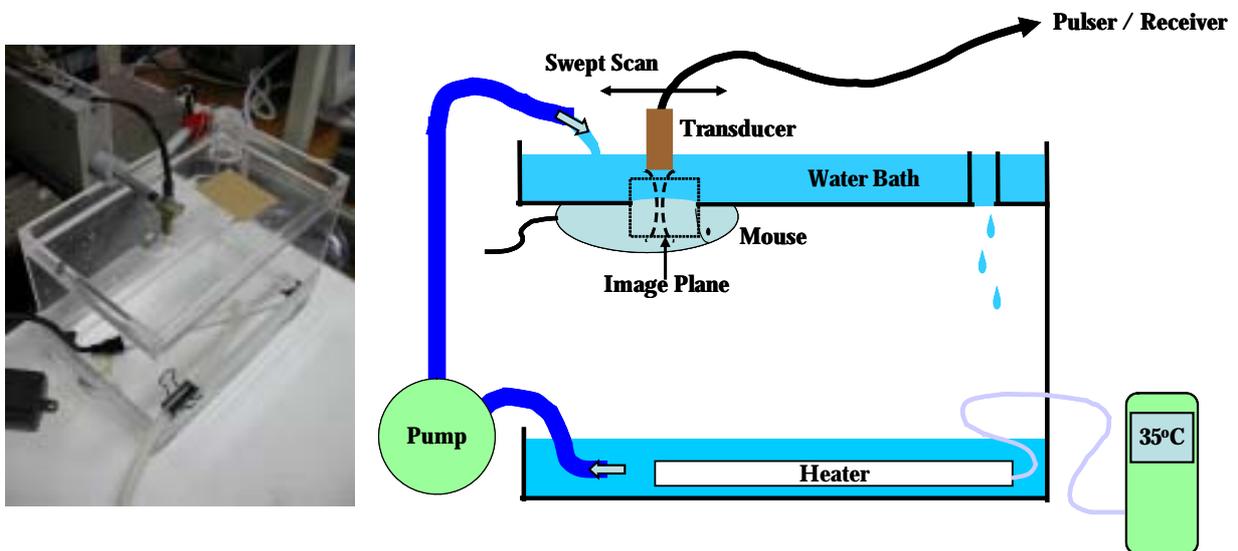


圖 3-2 (d): 壓克力掃描平台照片及裝置示意圖

3.2 掃掠式掃瞄法

3.2.1 掃掠式掃瞄法之原理與應用

由於探頭製作技術以及壓電材料的限制，目前在實際應用上並沒有中心頻率在 20 MHz 以上的陣列式超音波探頭。陣列探頭（transducer arrays）可以做動態聚焦及電子式掃瞄，即時的把視線範圍（lines of sight）內的反射訊號排列轉換為二維的 B-mode 超音波影像。高頻超音波在應用上由於缺乏陣列探頭的幫助，必須以單一固定聚焦的超音波探頭在橫向波束寬度範圍上做機械式的掃瞄，以得到二維的空間分佈資訊；又為了取得額外的血液流速資訊，依照訊號處理方式的不同以及對訊號訊雜比（signal-to-noise ratio, SNR）的要求，必須在固定位置同一個視線範圍內，連續發射 10 到 60 次以上不等的超音波脈衝，並依此來計算血流參數資訊。從以上的限制可以發現，高頻超音波系統若要獲得即時的二維血流分佈資訊，以傳統的機械掃瞄方式來移動固定聚焦的單一探頭，在數據取得的時間上會是相當大的限制。

PW Doppler（pulsed-wave Doppler）技術是把探頭聚焦對準單一固定的視線範圍，以適當的脈衝重覆頻率（PRF）連續發射並接收反射訊號，以量測單一方向上反射體位置隨時間的變化情形，雖然得到的資訊足以計算出血液平均流速以及流速對時間分佈的都卜勒頻譜（Doppler spectrum）等參數，但缺點是無法得到二維的流速分佈情形。若要獲得即時的二維血流分佈資訊，傳統離散式（discrete）的機械掃瞄法必須先將超音波探頭移動到固定位置，停止馬達後再開始連續發射多筆超音波脈衝，等到探頭髮射接收的程序結束，再啟動馬達移動到下一個位置，相鄰視線範圍內的取樣體積並不重疊。但此走走停停的掃瞄過程需耗費相當多的時間在處理及傳送馬達啟動 / 停止等控制指令上，對於想要即時取得活體動物的影像資訊具有相當不利的影響。

國外有研究提出了掃掠式掃瞄（swept-scan）的技術，此種掃瞄技術是將超音波探頭在連續移動的同時發射超音波脈衝，以快速獲得二維的流速資訊，而相鄰視線範圍間的距離則比橫向的波束寬度小很多，所以在聚焦範圍內的取樣體積會有大幅度重疊的現象，導致在橫向範圍能夠得到空間上的過度取樣（over-sampling），過度取樣能夠維持視線範圍間數據的高度相關性，對於評估流速演算法的運算可以維持較準確的結果，減少因每次取樣體積沒有完全重合所可能導致的誤差。掃掠式掃瞄技術由於是將超音波探頭在連續移動的同時發射超音波脈衝，在整個掃瞄的過程中馬達皆是不間斷地在移動，免除多餘的馬達控制時間，可以大幅提高數據擷取的速度，使得即時的二維血流資訊得以呈現。掃掠式掃瞄法以及傳統離散式掃瞄法的比較可參考以下的示意圖[34]-[36]：

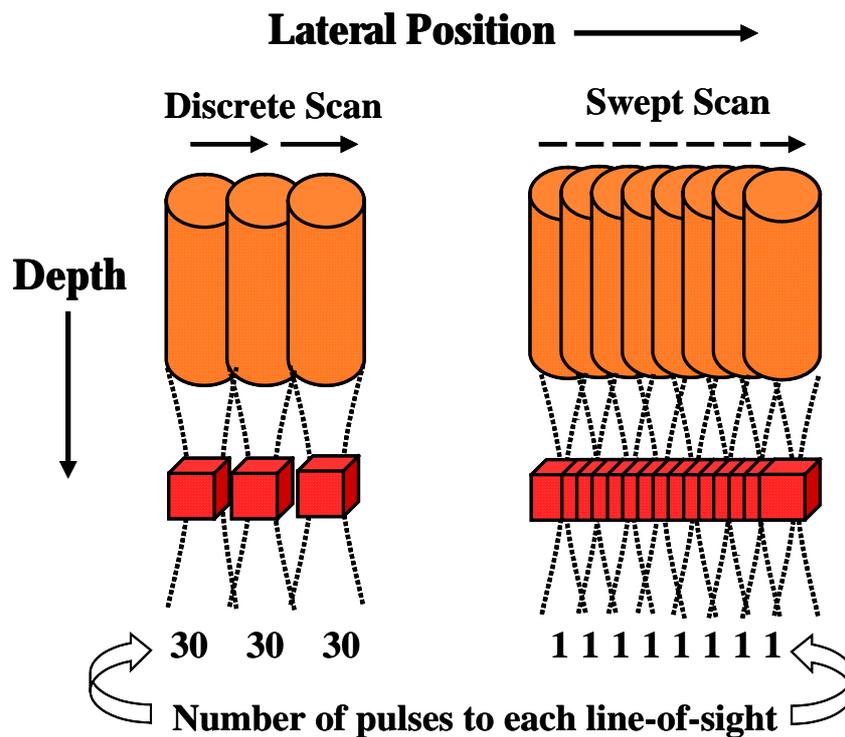


圖 3-3：單一超音波探頭的兩種可能掃瞄模式：圓柱體代表超音波探頭，立方體則代表聚焦體積（focal volume）。在離散式的掃瞄中，超音波脈衝皆指向獨立的聚焦體積；而在掃掠式掃瞄模式中，相鄰的超音波脈衝則指向彼此重疊的聚焦體積。

但在系統實做上，由於 ADC 介面卡上記憶體的大小受到限制，加上我們希望能夠一次取得較大範圍的流速資訊，因此在掃瞄取得影像的過程中，並無法從頭到尾都以等間距的方式來執行掃掠式掃瞄。在目前的系統上改採用不等間距的掃掠式掃瞄法，也就是在相鄰區域密集多次發射及取樣後，暫時停止發射接收，等到馬達帶動探頭移動一段較長的距離後，再重覆此密集多次發射及取樣的程序。當然在整個掃瞄的過程中，馬達仍是不間斷地在移動，以降低掃瞄所需的時間。至於此種不等間距發射及接收的訊號模式，則是透過任意波形產生器產生特殊設計的觸發波形來同步 ADC 以及 DAC 介面卡，並修改發射波形以符合密集多次發射的需求。不等間距的掃掠式掃瞄法可大幅減少記憶體的使用量，而在相鄰區域密集多次發射及取樣的作法則保有等間距掃掠式掃瞄法的特性，這些數據間仍具有高度的相關性，可以依此來計算流速資訊。

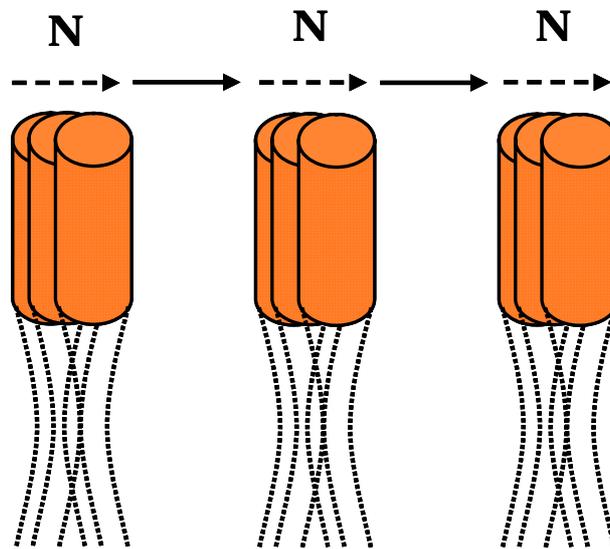


圖 3-4：不等間距掃掠式掃瞄示意圖

另外在掃掠式掃瞄法中，超音波探頭移動的速度是由我們要求的 PRF 所決定的。舉例來說，實際應用在我們小動物影像系統上的掃掠式掃瞄包含了橫向共 2000 條掃瞄線，分成 250 組，每組各包括 8 筆超音波脈衝掃瞄線，各掃瞄線之間的距離為 $1 \mu\text{m}$ ，各組間距為 40

μm ，橫向的掃瞄距離總共為 1 cm。所以在 20 KHz 的 PRF 下，探頭必須以 $1 \mu\text{m} / (1/20 \text{ KHz}) = 2 \text{ cm/sec}$ 的速度來移動，整個掃瞄的過程可以在 0.5 秒的時間內完成。而傳統離散式的機械掃瞄法欲達成類似的取樣要求，必須耗費數十秒甚至 1 分鐘以上的時間。掃掠式掃瞄法快速取得數據的方式，符合我們想要即時取得活體小動物影像資訊的需求，可大幅縮短實驗時間，減少不必要的組織移動的影響。

3.2.2 掃掠式掃瞄法之可能影響

傳統離散式的機械掃瞄法是先將超音波探頭移動到固定位置後，開始連續發射多筆超音波脈衝，等到發射接收的程序結束，再啟動馬達移動到下一個位置；而掃掠式掃瞄技術則是將超音波探頭在連續移動的同時發射超音波脈衝，馬達皆是不間斷地在移動，以快速獲得二維的流速資訊。然而以掃掠式掃瞄法取得的數據，每次的取樣體積並沒有完全重合，可能會對流速資訊的估算產生影響。以下分別從組織訊號頻譜加寬效應、橫向解析度以及血流訊號取樣數目等三方面來討論。

在使用掃掠式掃瞄法擷取流速資訊時，超音波探頭橫向的移動會造成時變的組織反射訊號，進而造成在 slow-time 方向上組織訊號頻譜加寬 (spectral broadening) 的效應，使得組織訊號頻譜跟血液流動訊號頻譜兩者間重疊的可能性變大，降低 wall filter 在 slow-time 方向上濾除低頻組織訊號的效果，系統所能偵測到的最低血流速度也因此受到影響。當散射子 (在此考慮人體組織) 橫向移動通過超音波波束在聚焦點處的取樣範圍時，其在都卜勒頻譜上的最高頻率成份 (F_{max}) 可以用以下方程式表示[52]：

$$F_{\max} = \frac{v_{\text{scat}} \cdot D}{\lambda \cdot L}$$

其中 λ 為超音波波長， L 為聚焦深度 (focal length)， v_{scat} 為散射子的橫向移動速度， D 為超音波探頭的孔徑大小 (aperture diameter)。若進一步將此方程式套用在我們的掃掠式掃瞄系統上，則由於頻譜加寬效應所造成組織訊號的最大移動速度為：

$$V_{\text{tissue}} = \frac{\lambda \cdot v_{\text{trans}}}{2 \cdot R_{\text{lat}}}$$

其中 v_{trans} 為探頭移動的速度， R_{lat} 則為聚焦點處橫向波束的寬度，定義為[43]：

$$R_{\text{lat}} \approx \frac{\lambda \cdot L}{D}$$

故組織訊號頻譜加寬的效應會跟超音波探頭橫向移動的速度 (v_{trans}) 成正比，而跟超音波橫向波束的寬度 (R_{lat}) 成反比。由於採用掃掠式掃瞄法時，超音波探頭在相鄰發射及接收訊號間有橫向的移動，有效的取樣波束寬度 ($B_{\text{effective}}$) 會比實際聚焦點處的橫向波束寬度來得窄，如圖 3-5 所示，所以會產生組織訊號頻譜加寬的效應。其他包括了非理想的聚焦波束型式、不穩定的馬達掃瞄速度等因素，也可能導致頻譜加寬效應。而組織訊號頻譜加寬所造成的影響，會使得在 slow time 方向上使用 wall filter 高通濾波時，為了濾除來自組織區域的反射訊號，連帶造成來自移動速度緩慢的血液反射訊號強度也受到影響；也就是說由於頻譜加寬效應所造成組織訊號的最大移動速度，會限制了使用掃掠式掃瞄技術所能正確量測到的最低血流速度。

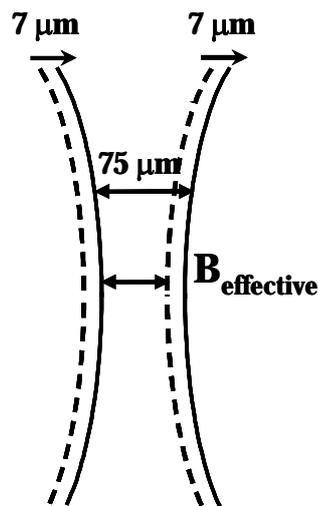


圖 3-5：掃掠式掃瞄技術相鄰位置取樣示意圖

當發射超音波訊號的中心頻率在 40 MHz 時，聚焦點處的橫向波束寬度約為 $75\ \mu\text{m}$ ，而在實際的實驗條件之下，每組用來計算流速的掃掠式掃瞄數據共 8 筆，每兩筆間相隔 $1\ \mu\text{m}$ ，也就是說在最差情況（worst case）下，第一筆和最後一筆數據間相距 $7\ \mu\text{m}$ ，此數字尚不及聚焦點處橫向波束寬度的 $1/10$ 。因為實際應用掃掠式掃瞄技術時，相鄰視線範圍間的距離比橫向的波束寬度小很多，所以在聚焦範圍內的取樣體積會有高度重疊的現象，導致在橫向範圍上能夠得到空間資訊的過度取樣，而過度取樣能夠維持視線範圍間數據的高度相關性，所以掃掠式掃瞄法在目前的實驗參數設定下可能造成的速度誤差應該是相當小的。

另外在使用掃掠式掃瞄技術的情況下，因為在取得一組用來計算血流速度的超音波訊號時，在發射與接收訊號間，超音波探頭會有橫向的移動，故造成等效橫向解析度（effective lateral resolution）除了跟超音波理想的波束寬度有關之外，還必須考慮探頭橫向移動的距離，使得橫向解析度受到影響。以我們的實驗參數設定來看，在最差情況下，超音波探頭會比在同一位置固定不動的情形多移動 $7\ \mu\text{m}$ 的距離，比起理想狀況聚焦點處的橫向波束寬度約為 $75\ \mu\text{m}$ ，等效的橫

向解析度降低不到 10%，仍舊是在可以接受的範圍內。關於等效橫向解析度的詳細數學分析，可參考文獻[43], [63]。

由於散射子的隨機訊號特性，因此對於在特定時間區間內觀察得到的都卜勒血流訊號，其平均頻率以及訊號能量等參數，會以它們的期望值（expected values）為基準在上下隨機變動[64]。一般來說，增加用來計算血流參數的超音波訊號筆數，可因為訊號平均的效應，改善血流參數估算的精確度，此藉由增加血流訊號取樣數目以改善估算精確度的方式，在受到大量雜訊影響的實驗條件下，其效果更為顯著 [23]-[24], [43]。但由以上關於組織訊號頻譜加寬效應以及等效橫向解析度的討論中可得知，增加血流訊號取樣數目會使得此兩種效應影響血流參數估算可靠性的程度變得嚴重，加上由於 ADC 介面卡上記憶體的大小受到限制，並希望能夠一次取得較大範圍的流速資訊，因此血流訊號的取樣數目，或是說超音波波束在取樣區域的停留時間（dwell time）無法大幅提高，使得系統必須在有限的取樣數目下精確的估計血流參數，傳統以自相關函數法為基礎的流速分析方式，在此條件下會產生相當的誤差，因此有必要評估並採用適合於此需求的計算血流參數演算法。

3.3 組織仿體及流速仿體之製作

為了評估各種計算流速演算法的效能，必須先在可控制的實驗參數條件下以體外仿體實驗來加以驗證，才能夠再進一步應用到實際活體實驗所取得的數據上。

受測物體與超音波間的作用會因為物體的尺寸大小而有不同的物理現象，尺寸較超音波波長來得大的物體與超音波作用會產生反射（reflection）的效應，尺寸較超音波波長來得小的物體與超音波作用則會產生散射（scattering）的效應。組織仿體主要用來模擬人體的軟組織結構，本研究中是採用吉利丁粉（gelatin powder）與水混合的濃度來控制所欲模擬的軟組織硬度，若吉利丁粉在熱溶液中的濃度越高，代表溶液凝結後此仿體的硬度越硬，可以代表越硬的人體組織；反之吉利丁粉熱溶液濃度越低則代表組織越軟。此外，在仿體內部還要加入直徑約為 1~2 μm 的石墨粉顆粒（graphite powder，Sigma-Aldrich，St. Louis，Missouri，USA）（如圖 3-6）[37]。因為石墨粉對超音波訊號能給予有效的散射，藉此來模擬人體軟組織中不規則分布的細胞散射體的散射特性。

製造過程為首先取適量的吉利丁粉加入熱水中，經均勻攪拌溶化後作為溶劑，再取適量的石墨粉經一定時間間隔逐次加入，冷卻過程需利用攪拌器慢慢攪拌至石墨粉均勻分佈，並將靠近表面之微小氣泡去除，經冷卻凝固後即可得到散射子均勻分佈之組織仿體。因為人體軟組織內有百分之七十以上的成份為水，而仿體以吉利丁熱溶膠凝固而成，其內部亦包含大量的水，加上以石墨粉顆粒來模擬組織中不規則分布的細胞散射體，故以此仿體來模擬人體組織的效果是適當的。



圖 3-6：石墨粉仿體外觀

而在流速仿體的製作上，先依上述方法做好代表周圍一般組織的仿體部分，待所製熱溶膠液體冷卻凝固之後（約需 5~6 小時），在其中心挖空出一個直徑約 0.5 mm 的圓洞，作為供液體流動的空腔區域，空腔內流動的液體則為血液模擬流體（blood-mimicking fluid，Shelby Medical Imaging Technologies，Toronto，Ontario，Canada），並以高精確度的低流速幫浦（high precision multichannel pump，Cole-Parmer Instrument Company，Vernon Hills，Illinois，USA）來推動血液模擬流體在空腔中流動，如圖 3-7 所示。再配合馬達帶動超音波探頭做橫向掃描，即可取得二維的流速資訊，藉此評估各種計算流速演算法在不同實驗條件（訊雜比、發射訊號頻寬等等）下的效能。

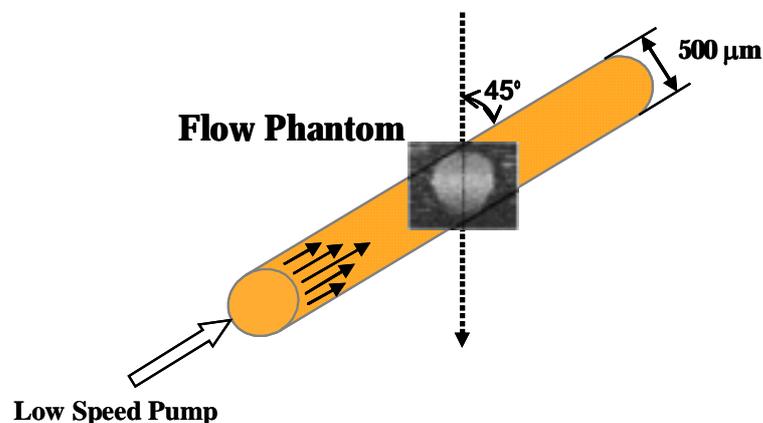


圖 3-7：流速仿體示意圖

3.4 血液模擬流體與超音波對比劑

3.2.1. 血液模擬流體

在超音波血流量測的體外 (*in-vitro*) 流速仿體實驗中，由於真實人體血液在取得及處理上的困難，所以血液模擬流體 (blood-mimicking fluid, BMF) 被廣泛使用在實驗室的研究上。典型的血液模擬流體是由內含懸浮顆粒的流體所組成，目前在文獻中曾被提出使用的懸浮粒子包括了澱粉顆粒 (starch)、尼龍分子 (nylon)、聚苯乙烯小球 (polystyrene microspheres)、纖維素粉末 (cellulose pulver) 和硬化處理過的紅血球 (hardened red blood cells) 等等。在血液仿體的使用上，有許多物理及聲學特性是必須和實際人體血液性質相近的，包括了密度、黏性 (viscosity)、顆粒大小與濃度、反射訊號的統計特性、聲波傳遞速度與衰減等等[38]。

目前本實驗室使用加拿大 Shelly Medical Imaging Technologies 所製作的血液模擬流體，重量組成包括 1.82 %，直徑 5 μm 的尼龍顆粒 (orgasol, FLF Atochem, Paris, France) 來模擬血液中的散射體、83.86 % 的純水、10.06 % 的純甘油 (glycerol)、3.36 % 的葡萄糖聚合物 (dextran) 以及 0.9 % 的界面活性劑 (surfactant) 等等。此種血液模擬流體的組成已被證實和人體血流有類似的物理及聲學特性，兩者在頻譜上也有極佳的一致性[38]，可運用此血液模擬流體在高頻超音波血流量測的體外仿體實驗中。

3.2.2. 超音波對比劑

在各種醫學影像的應用上，藉著加入各種對比劑 (contrast agents, 或稱顯影劑) 來增進影像品質的技巧早已有廣泛的運用，例如 X 光檢查時注射的硫酸鋇製劑 (barium sulphate, 俗稱鋇餐)、電腦

斷層掃描 (computed tomography, CT) 所使用的含碘顯影劑, 以及磁振造影 (magnetic resonance imaging, MRI) 檢查時使用的重金屬釷對比劑 (gadolinium diethylenetriamine pentaacetic acid, Gd-DTPA) 等等。在超音波的領域中, 超音波影像對比劑的主要機制為利用對比劑注射液中所存在的微氣泡反射, 以造成超音波反射訊號的增強 [21]。現今超音波對比劑也以微氣泡的形式為主流, 外表通常包覆有一層介面穩定膜, 使微氣泡能夠穩定通過心肺循環而不至於破裂。目前已發展出的超音波對比劑除了穩定性高、可通過心肺循環外, 還具有無毒性、易使用、分解慢、副作用少、效果明顯等優點, 在臨床應用上的使用已十分廣泛, 各種關於超音波對比劑的研究亦蓬勃發展。在高頻超音波的應用上, 由於種種技術上的限制, 使得超音波反射訊號的訊雜比還無法跟傳統低頻的商用超音波影像系統相抗衡, 因此適當地使用超音波對比劑來增強反射訊號的強度有其必要性存在。

超音波對比劑增進影像品質的效果主要是來自微氣泡對超音波的強烈回音反應, 一個散射子反射超音波訊號的能力可用其散射面積 (scattering cross section) 來衡量, 而散射面積的大小取決於散射子與其周遭介質特性的不同, 由文獻中可得知微氣泡在水中對超音波有極強的反射回音。此外, 微氣泡在特定頻率的共振現象 (resonance) 也是造成強烈回音的主因, 當發射的超音波頻率接近微氣泡的共振頻率時, 微氣泡的有效散射面積將遠大於其實際的散射面積。

另外當血管中注射有超音波對比劑時, 若發射訊號頻率接近微氣泡的共振頻率, 則有微氣泡灌注的區域 (如血管內部) 會有極強烈的諧波 (harmonic) 訊號生成, 此諧波的產生機制和組織諧波訊號的生成機制不同, 大小可能比組織諧波訊號大上 1000 倍, 若僅偵測超音波諧波訊號, 則血管與血液兩者的對比可大為增強, 因此具有觀測並分析微細血管灌注現象 (perfusion) 的潛力。由調整微氣泡的半徑大小以及介面穩定膜的彈性係數, 可使得微氣泡在目前臨床超音波常用

的頻率範圍下共振現象最為明顯，而有最顯著的回音增強效果。在微氣泡物理特性分析方面，還包括微氣泡濃度高低對超音波訊號的衰減以及超音波訊號傳遞速率的影響等等，這些因素對於影像品質的改良以及反射訊號的擷取都有很大的影響[21], [39]-[40], [59]。

目前本實驗室所採用的超音波對比劑為 Levovist (Schering AG , Berlin , Germany) 利保維斯注射劑，Levovist 注射劑為目前在台灣唯一核准可在臨床上使用的超音波對比劑，為一種用於靜脈注射之超音波對比劑，其主要的成分為半乳糖 (galactose) 微粒子及少許的棕櫚酸 (palmitic acid)。將 Levovist 粉末與無菌生理食鹽水混合搖動後，注入血液中可產生高濃度的微小氣泡 (平均直徑約為 3~5 μm ，見圖 3-8)，在目前臨床使用的超音波頻率下有極強的反射效應。且每個氣泡表面均由棕櫚酸所包圍，可以使氣泡穩定通過心肺循環而到達其他的身體器官。實驗中所配置的對比劑濃度可藉由 Levovist 藥劑溶解於不同體積的生理食鹽水中來決定[21]。

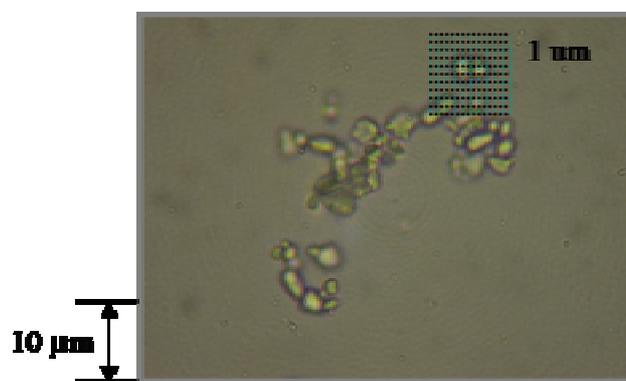


圖 3-8：光學顯微鏡下的 Levovist 對比劑微氣泡

第四章 結果分析與討論

4.1 計算血流參數演算法之評估

4.1.1 使用模擬血流訊號之評估

參考由 A. T. Kerr 和 J. W. Hunt 提出的數值分析方法[41]，以及 L. Y. L. Mo 和 R. S. C. Cobbold 所提出的模擬血液在血管內的流動模型[42]，本實驗室已建立一套超音波的血流都卜勒訊號模擬程式。利用此程式模擬一筆中心頻率在 50 MHz，系統取樣頻率 200 MHz，發射訊號為相對頻寬 (fractional bandwidth) 30 % 的高斯 (Gaussian) 脈衝波，管內最大流速設定在 40 cm/s，都卜勒夾角為 45 度的流速訊號。分別以一維自相關函數法、二維自相關函數法、寬頻最大可能性評估法以及蝶狀搜尋法等四種演算法來對此模擬血流訊號做處理，並對模擬血流訊號加入不同程度的隨機雜訊，以評估四種演算法在不同訊雜比下的表現。假設一筆模擬血流訊號中的訊號峰值為 S ，欲加入之隨機雜訊量值以 N 表示，則訊雜比 (SNR) 的關係式為：

$$SNR = 20 * \log_{10} \left(\frac{S}{N} \right)$$

在已知模擬訊號峰值以及可自行決定訊雜比的前提下，可得到所對應的隨機雜訊量值為：

$$N = \frac{S}{10^{SNR/20}}$$

將所得之 N 值乘上一組在 0 到 1 區間內均勻分佈 (uniformly distributed) 的亂數數列，並與原始模擬血流訊號相加，即可得到在不同訊雜比條件下的血流訊號。

分別以四種演算法處理模擬血流訊號後可得到以下的結果：

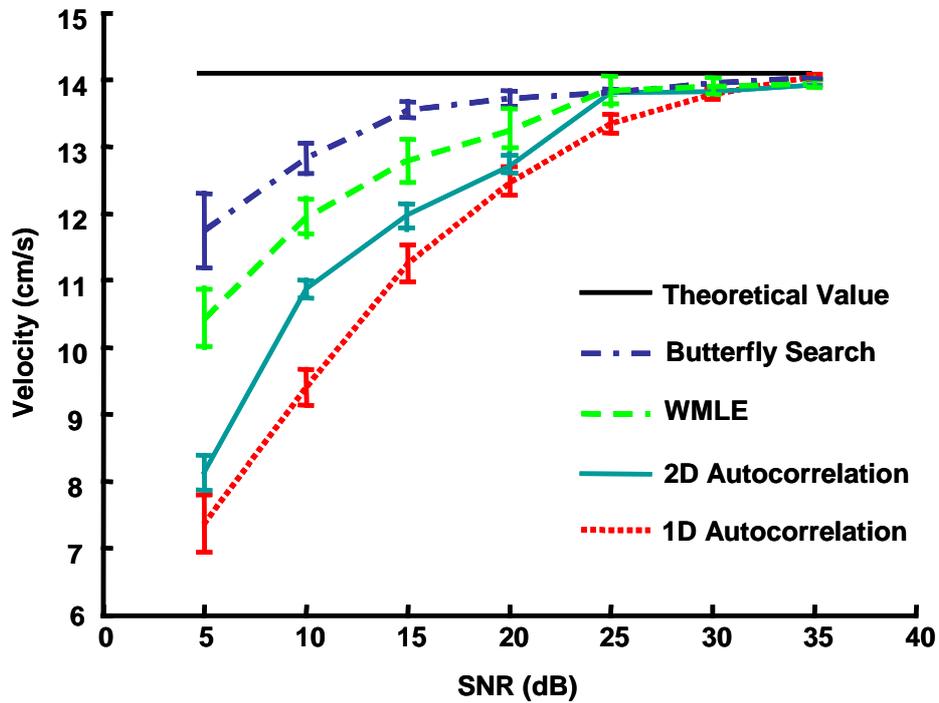


圖 4-1：使用模擬血流訊號評估演算法在不同訊雜比下的效能

其中圖形最上方的橫實線為圓管內平均流速的理論值，其餘曲線從上到下分別為蝶狀搜尋法（點虛線）、寬頻最大可能性評估法（長虛線）、二維自相關函數法（實線）以及一維自相關函數法（短虛線）。每種演算法在不同訊雜比的條件下皆分別經過 10 次的運算，且每次運算皆重新加入隨機雜訊，並在結果圖表中加入誤差圖（errorbar）以代表估算結果的變異值。理論值的計算是根據模擬程式內所設定流體在圓管內的流動為層流（laminar flow）分佈，層流為血管中心流速最大，四周呈對稱的流線形流速分布。圓管內層流的速度分佈可用以下公式表示：

$$V = V_{\max} \left[1 - \left(\frac{r}{r_v} \right)^2 \right]$$

其中 V 為圓管截面上，距離圓管中心 r 處的流體速度； V_{max} 為圓管中心處的最高流體速度； r_v 為圓管內徑； r 為與圓管中心點的距離。將上式對內徑積分後可得到層流時圓管內流體的平均速度 (V_{ave}) 與圓管中心處最高速度的關係為 $V_{ave} = (1/2) * V_{max}$ ，故軸向上平均流速的理論值應為 $40 \times (1/2) \times \cos 45^\circ = 14.1421 \text{ cm/s}$ 。

從圖 4-1 中可以發現：不管是使用自相關函數法、寬頻最大可能性評估法或是蝶狀搜尋法，都會有估計值跟理論值偏差、而且是低估 (underestimate) 的現象發生，合理的解釋是因為在此評估當中所計算的是模擬流速訊號在整個圓管範圍內的「平均流速」，而加入的雜訊是隨機分佈，所代表的平均流速值應該是 0，故受隨機雜訊影響的效應會使估計出來的流速值往負方向偏移。而且在訊雜比越低的情況下會有越大的 errorbar，代表受到雜訊的影響，估計值的變異數會增大，這是可以預見的。

在訊雜比不高的情況下，蝶狀搜尋法具有最佳的效能，估計值跟理論值的偏差最小，接下來依次為寬頻最大可能性評估法、二維自相關函數法以及一維自相關函數法。不管是蝶狀搜尋法、寬頻最大可能性評估法還是二維自相關函數法，在訊雜比較低的情況下都能夠比現行的一維自相關技術更準確的估算流速。在訊雜比提高到一定程度後，各演算法的差距就漸次縮小。不過蝶狀搜尋法在大多數的訊雜比條件下，估計值跟理論值的負偏差皆為最小，跟其他三種演算法相比，蝶狀搜尋法的估計值也具有相近或更小的變異量。在目前高頻超音波系統還沒有辦法輕易達到高系統訊雜比的情況下，使用蝶狀搜尋法來估算血液流速能夠得到比較穩定可靠的結果。

為了充分運用高頻超音波的特性，以得到較佳的空間解析度，必須盡量發射時間長度短的脈衝波，脈衝越短代表頻寬越寬，在此情形下都卜勒頻率偏移分佈的範圍較為廣泛，對於自相關函數法這種為因

應連續波訊號所發展出來的窄頻技術，以其來計算平均都卜勒頻率偏移、進而估算出流速會有不利的影響。在此也使用流速模擬程式來評估發射訊號頻寬對流速演算法的影響。使用前述的流速模擬程式來產生發射訊號為不同頻寬（相對頻寬 10 % ~ 100 %）高斯脈衝波（Gaussian pulse）的流速數據，中心頻率、取樣頻率、管內最大流速、都卜勒夾角等參數設定均同前述模擬，並加入適度的隨機雜訊，在訊雜比為 20 dB 的條件下分別以四種演算法來估算流速，可得到以下的結果：

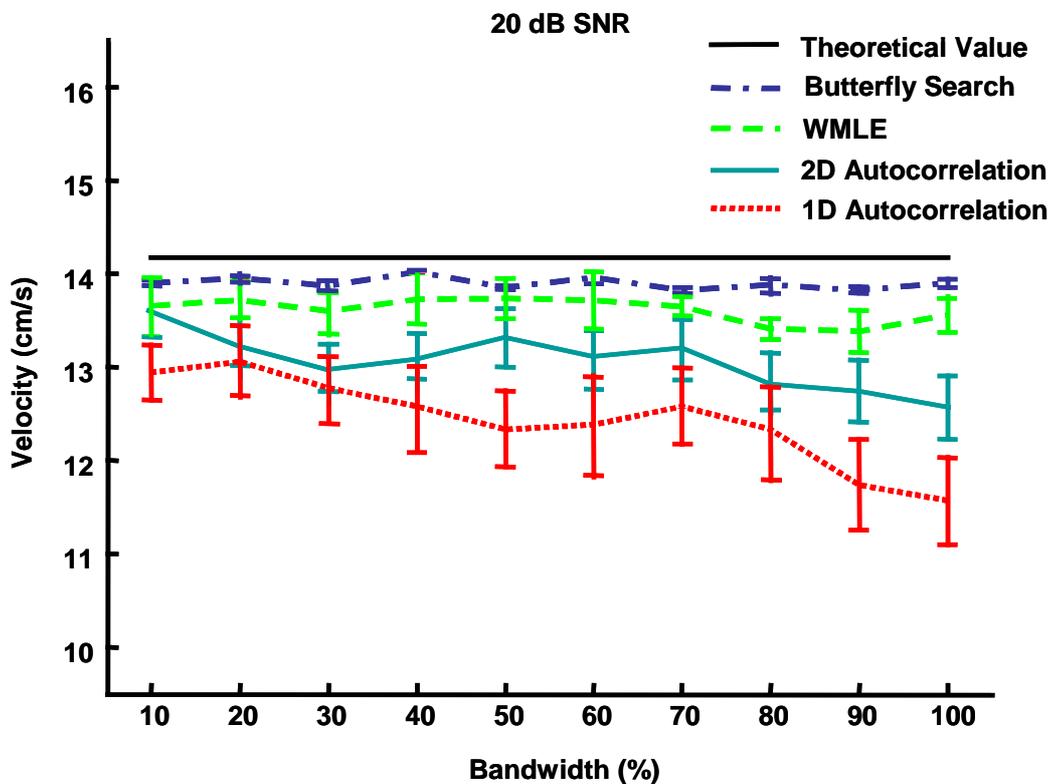


圖 4-2：使用模擬血流訊號評估演算法在不同頻寬發射訊號下的效能

其中圖形最上方的橫實線為圓管內平均流速的理論值，其餘曲線從上到下分別為蝶狀搜尋法（點虛線）、寬頻最大可能性評估法（長虛線）、二維自相關函數法（實線）以及一維自相關函數法（短虛線）。每種演算法在不同發射訊號頻寬的條件下皆分別經過 10 次的運算，且每次運算皆重新加入隨機雜訊，並在結果圖表中加入誤差圖

(errorbar) 以代表估算結果的變異值。在不同的發射訊號頻寬條件下，蝶狀搜尋法以及寬頻最大可能性評估法的估算結果並沒有受到明顯的影響，而兩種以自相關函數為基礎的演算法在發射訊號頻寬變大的情況下，估計值出現低估 (underestimate) 現象的問題變得較為嚴重，其中又以一維自相關函數法的誤差最為明顯。至於各種演算法在不同發射訊號頻寬條件下，估算結果的 errorbar 則沒有隨著頻寬的變動而出現明顯的差異。

在目前高頻超音波影像系統的應用環境下，為了在空間中定位一個精確的取樣點，以得到較佳的空間解析度及速度解析度，必須盡量發射時間長度短的超音波脈衝，脈衝越短則代表頻寬越寬，在此情形下都卜勒頻率偏移分佈的範圍較為廣泛。傳統為因應連續波 (continuous wave) 訊號所發展出來的窄頻 (narrowband) 演算法，如以自相關函數為基礎的流速估算演算法，由於沒有充分考量到訊號在縱向深度，也就是 fast-time 方向上的變化，無法符合目前在短脈衝、寬頻 (wideband) 訊號上的需求，對於流速的估算會有高度的變異量出現，在實際應用上受到不小的限制。寬頻最大可能性評估法以及蝶狀搜尋法這兩種演算法皆是針對寬頻訊號所發展出來的，較不受訊號頻寬變動的影響，符合高頻超音波影像系統的需求。

4.1.2 使用流速仿體之評估

為了評估各種計算流速演算法的效能，除了上述使用模擬流速數據的比較之外，還必須在可控制的實驗參數條件下以流速仿體體外 (*in-vitro*) 實驗來加以驗證，才能夠再進一步應用到實際活體 (*in-vivo*) 動物實驗所取得的數據上。

圖 4-3 為使用一維自相關函數法 (圖中標示為 1D

Autocorrelation) 二維自相關函數法 (2D Autocorrelation) 寬頻最大可能性評估法 (WMLE) 以及蝶狀搜尋法 (Butterfly Search) 等四種演算法, 在低訊雜比 (約 10 dB) 取樣數目只有 8 筆的實驗條件下所計算出來的彩色都卜勒影像。使用的組織仿體為加入石墨粉當做散射體的吉利丁凝膠, 流速仿體的製作過程與裝置示意圖已在 3.3 節中做過詳細說明。仿體空腔的直徑約為 500 μm , 空腔中流動的液體為血液模擬流體 (blood mimicking fluid), 並使用高精確度的低流速幫浦 (high precision multichannel pump) 來推動, 以目視配合量尺及碼表測得連接空腔的細管內的流速約為 20 mm/s。以馬達帶動超音波探頭橫向掃描取得二維流速分佈資訊後, 再分別以四種流速演算法來分析, 可得到以下的彩色都卜勒影像:

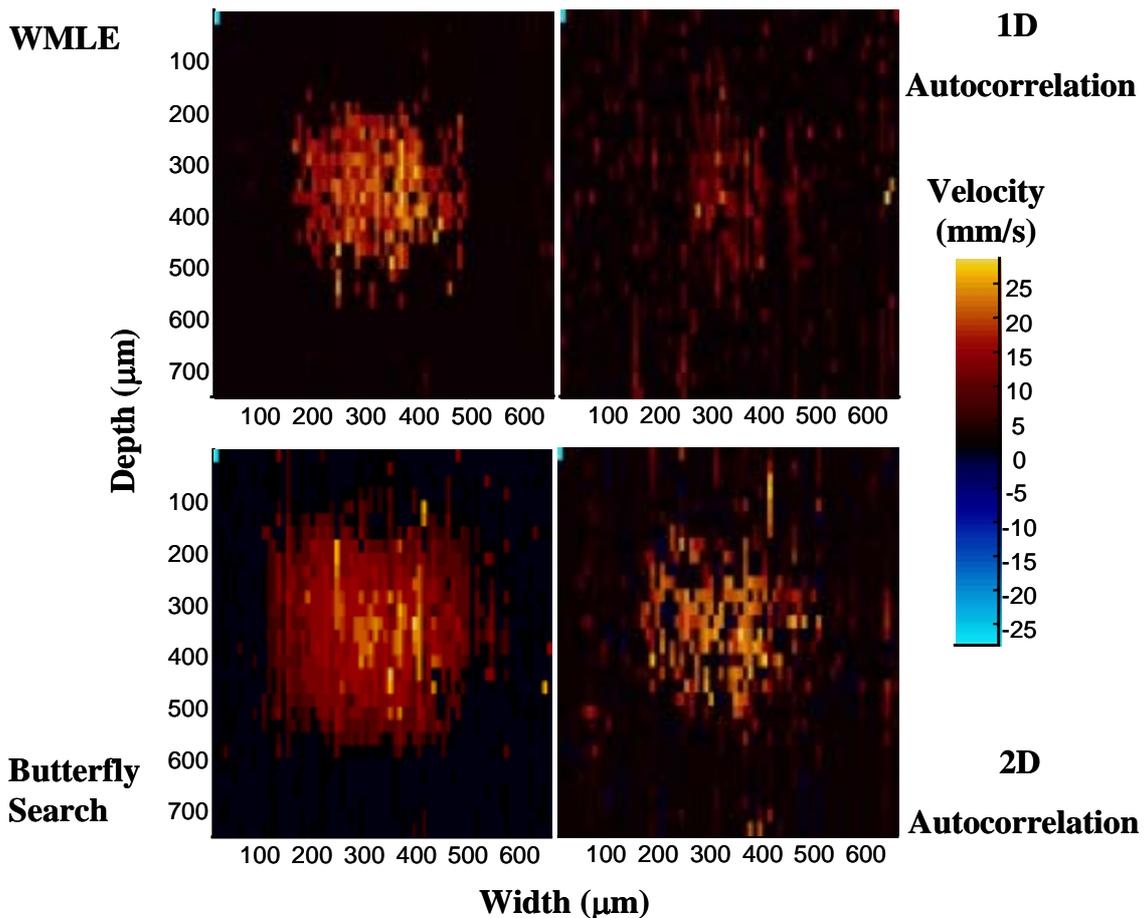


圖 4-3：四種演算法在低訊雜比條件下所得出的彩色都卜勒影像

在彩色都卜勒影像中，顏色越明亮的部份代表散射體移動的速度越快，而背景組織雜訊的部份則應為黑色（移動速度 = 0）。從圖 4-3 左下可以看出蝶狀搜尋法最能夠準確區分出仿體空腔與周圍組織仿體的邊界，空腔的形狀與尺寸也符合實際情形，並且清楚計算出相對應的流速及呈現流體在空腔內的層流（laminar flow）分佈；對比圖 4-3 右上方以一維自相關函數法所計算出來的流速分佈圖，在訊雜比只有 10 dB 左右的情況下，一維自相關函數法並無法區分出仿體空腔的邊界或是準確計算出空腔內液體的流速分佈。二維自相關函數法以及寬頻最大可能性評估法的效能則介於另外兩種演算法之間，但對空腔周圍的低流速區域仍無法正確解析，顯現出來的空腔與周圍組織仿體的邊界並不完整。

由於流速仿體空腔的內徑並不會剛好等於使用低流速幫浦推動、連接空腔的細管的內徑，且仿體空腔的內徑也很難從彩色都卜勒影像上正常估算，因此我們採用計算流量（flux）的方式來驗證流速演算法運算結果的正確性。將事先以目視配合量尺及碼表測得連接空腔的細管內的流速值，乘上可從規格上得知的細管內徑，可得到使用低流速幫浦推動、在單位時間內通過細管的血液模擬流體體積；另一方面，利用流速演算法估算得到的彩色都卜勒影像，將影像上各點代表的流速量值對相對應的截面積做積分，可得到流速仿體空腔內流體的流量值，將兩者相比較即可檢驗演算法估算流速的正確性。

以上述計算流量的方式對各流速演算法的估算結果加以檢驗，四種演算法中只有蝶狀搜尋法能夠得到正確的流量估計值，將其估算得到的流速仿體空腔內流量，與細管內的流量相比，兩者間的相對誤差在 10 % 以下，其他三種演算法由於無法正確解析出仿體空腔的邊界以及空腔邊緣的低流速區域，因此在流量計算上出現相當大的誤差，相對誤差可達 30 % 以上。可見得蝶狀搜尋法在有限的取樣數目條件下，能夠比傳統的一維自相關技術得到更準確的流速資訊，達到 mm/s

等級的流速解析度，並具有更佳的抗雜訊能力。

另外為了評估發射訊號頻寬對流速演算法的影響，除了在 4.1.1 節使用模擬流速數據的比較之外，在此也以流速仿體體外實驗來加以驗證。以數位類比轉換器 DAC200 發射預先設計的不同頻寬(相對頻寬 25 %、33 %、50 %、75 %) 的高斯脈衝波，訊號中心頻率皆設定在 40 MHz，組織仿體中的空腔內徑約為 500 μm ，空腔中流動的液體為血液模擬流體，並使用高精確度的低流速幫浦來推動，連接空腔的細管內的流速約為 10 mm/s。以馬達帶動超音波探頭做掃掠式掃描取得二維流速分佈資訊後，再分別以四種流速演算法分析，可得到圖 4-4 的彩色都卜勒影像。

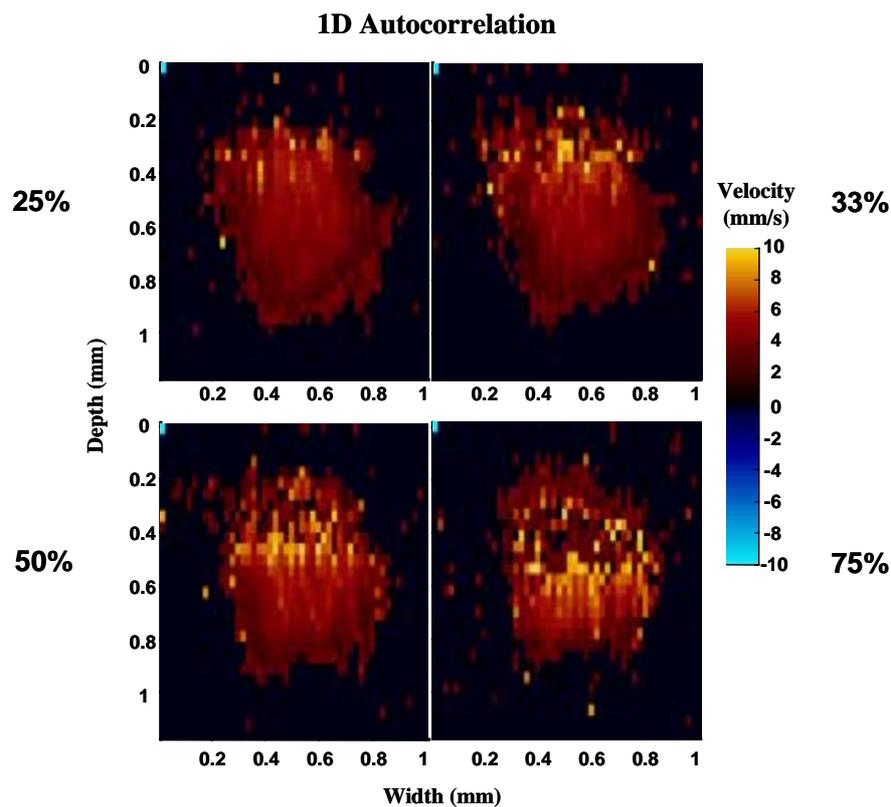


圖 4-4 (a) : 一維自相關函數法估算不同頻寬發射訊號的流速分佈圖

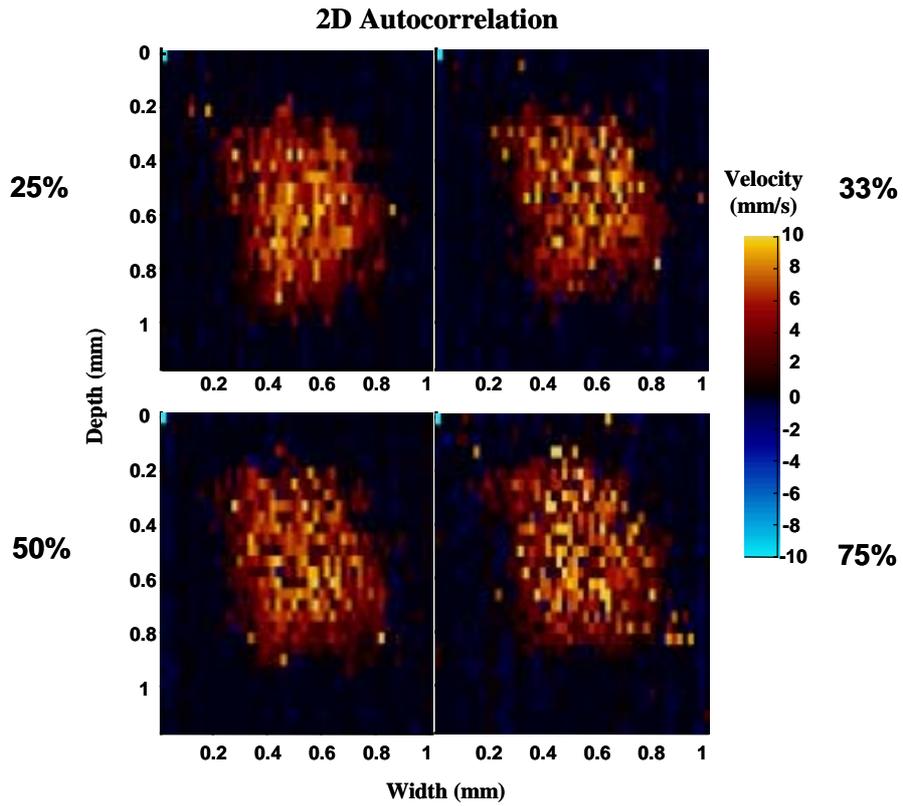


圖 4-4 (b): 二維自相關函數法估算不同頻寬發射訊號的流速分佈圖

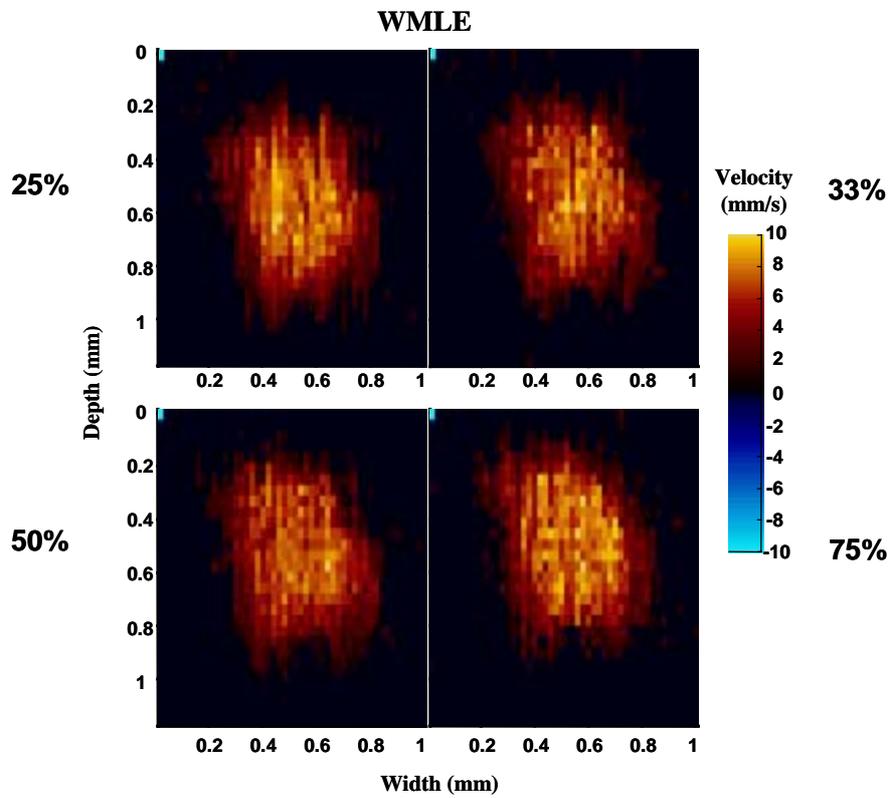


圖 4-4 (c): 以 WMLE 估算不同頻寬發射訊號的流速分佈圖

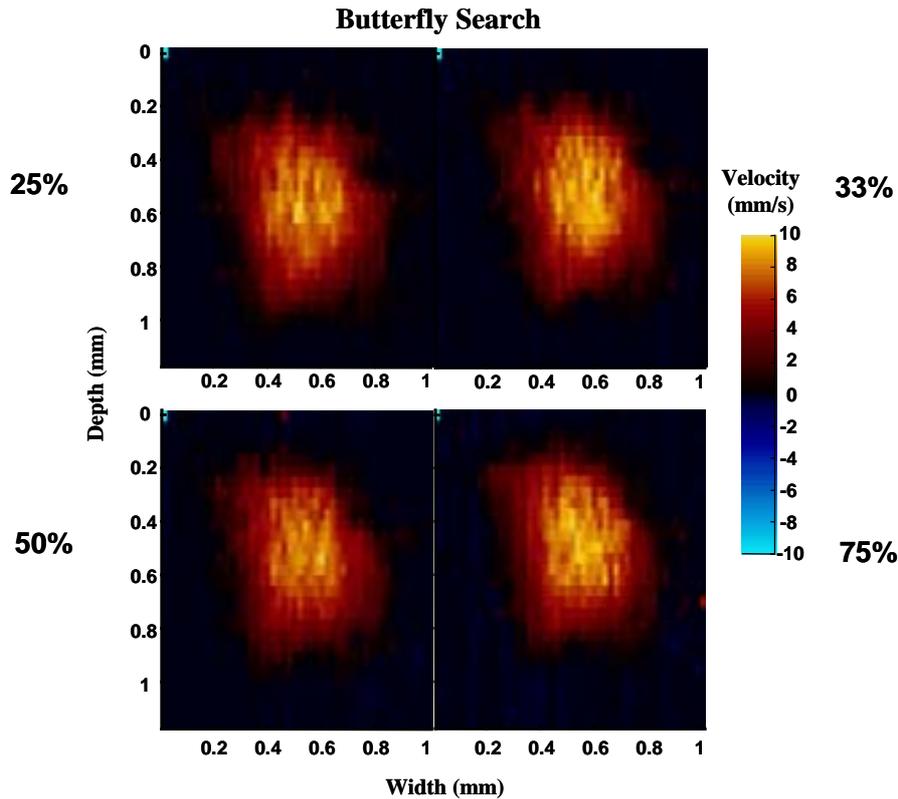


圖 4-4 (d)：以蝶狀搜尋法估算不同頻寬發射訊號的流速分佈圖

從圖 4-4 (a) ~ (d) 的彩色都卜勒影像中可以發現：在發射訊號頻寬從 25 % 增加到 75 % 的過程中，寬頻最大可能性評估法以及蝶狀搜尋法這兩種演算法的計算結果都不受頻寬變化的影響，而蝶狀搜尋法在空腔內能夠得到較為平滑的流速分佈，優於寬頻最大可能性評估法；一維自相關函數法的計算結果則隨著發射訊號頻寬的增加，圖形開始變得雜亂，而且就算在訊號頻寬不大的情況下，一維自相關函數法仍無法正確解析出空腔內流體的層流分佈；二維自相關函數法也略為受到頻寬增大的影響，隨著發射訊號頻寬的增加，彩色都卜勒影像開始變得雜亂，不過改變幅度不大。

使用實際流速仿體實驗來評估發射訊號頻寬對演算法的影響，和前述以模擬流速數據的評估有相同的結果：傳統為窄頻訊號發展出來的自相關函數演算法在寬頻訊號的應用環境下會受到一定程度的影響，也證明了採用適合於寬頻訊號演算法的必要。除了使用模擬程式

以及流速仿體實驗數據驗證出來的窄頻以及寬頻發射訊號在頻寬上的差異外，寬頻訊號由於發射脈衝長度較短、訊號能量較低，訊雜比會比窄頻訊號來得低一點，也是造成自相關函數演算法效能下降的可能原因之一。

另外在四種演算法運算時間的評估上，使用搭載 Athlon XP 1700+ CPU、512 MB DDR-266 DRAM 的個人電腦，作業系統為 Windows XP，運算平台為 MATLAB 6.1 版。以得到以上彩色都卜勒影像的時間，並重複 10 次運算求取平均值，四種演算法的運算時間為一維自相關函數法 (11.0313 秒) < 蝶狀搜尋法 (24.5727 秒) < 二維自相關函數法 (66.2550 秒) < 寬頻最大可能性評估法 (90.4872 秒)。雖然一維自相關函數法只運用到 slow-time 方向上一維資訊的特點，使其運算量最少、運算時間最短，但合併考量四種演算法在發射訊號頻寬以及抗雜訊能力等各方面的綜合效能，蝶狀搜尋法還是兼顧運算時間以及流速估算準確度的最佳演算法。

從體外仿體實驗的結果可證明目前的高頻超音波影像系統已經具備估算出直徑在 500 μm 以下空腔中血流參數的能力，可運用在人體微量血流的觀測或是小動物實驗的血流參數計算上，並將搭配適用於寬頻訊號的蝶狀搜尋法來對流速數據做定量的分析。

4.2 彩色都卜勒影像之閾值處理

在 2.2 節「血流參數之計算與討論」中曾經提到，欲顯示彩色都卜勒影像的訊號處理步驟大致如下：將所收到的原始射頻訊號解調變、降到基頻後，在 fast-time 方向上用低通濾波器濾除所要訊號頻帶之外的高頻部份，以降低雜訊的影響。接著必須在 slow-time 方向上加入一特別設計的高通濾波器(也就是一般所謂的 clutter filter 或 wall filter)，因為流動的血液所造成的都卜勒頻率偏移量較大，而血管管壁及周圍組織的移動速度相對較慢，所造成的都卜勒頻率偏移量較小，所以可以用一高通濾波器把 slow-time 方向上不必要的低頻移動訊號濾除或抑制 (suppression)，留下我們想要的流速訊號，再利用各種演算法進行流速估算。

而在實際實驗數據的處理上，尤其是對於不確定性高的活體血流資訊，在經過 wall filter 濾波以及流速演算法的估算之後，所得出的彩色都卜勒影像仍常常沒有辦法準確區分出流速區域以及背景組織的雜訊，對微小血管的偵測來說有相當不利的影響，所以必須再加入額外的步驟來進一步辨別血流以及雜訊的區域，以改善彩色都卜勒影像的品質。

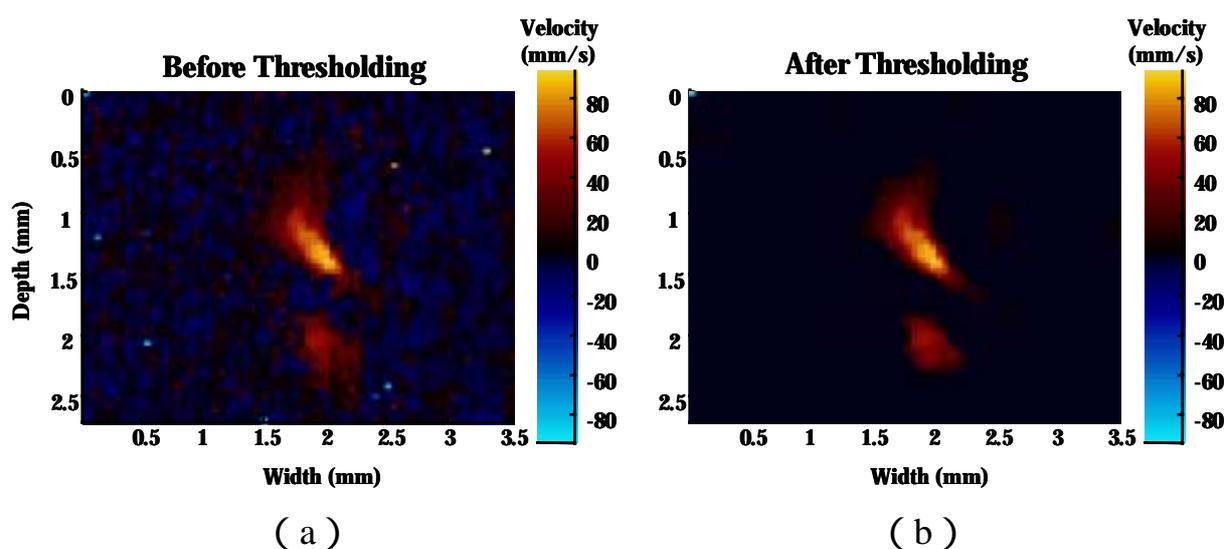


圖 4-5：加入閾值處理前後的老鼠胚胎血流彩色都卜勒影像

圖 4-5 為利用實際活體實驗取得的老鼠胚胎血流訊號所計算得到的彩色都卜勒影像。圖 4-5 (a) 是在經過一般 wall filter 以及蝶狀搜尋法估算過後的結果，雖然已經可以大致辨別出血管血流的區域，但背景組織的低速移動以及受雜訊影響所造成計算結果出現的跳點 (spike) 仍可從影像中發現，造成彩色都卜勒影像的品質不甚理想。而由於血管管壁及周圍組織的移動速度跟血液相比相對較慢，且從接收端收到的組織反射訊號通常遠較血流訊號來得強、能量較大，但在 slow-time 方向上經過 wall filter 高通濾波器的處理後，大部份屬於移動速度較慢的組織訊號會被濾除，而留下移動速度較快的血流訊號，此時組織部份訊號的都卜勒能量反而會小於血流訊號的能量。

所以欲進一步消除背景雜訊的影響，可以把經過 wall filter 處理前後的超音波訊號，分別計算其流速量值以及都卜勒能量，將這些參數當做閾值 (threshold) 來區分流速區域以及組織或背景雜訊。以能量來看：如果在某位置收到的反射訊號在經過 wall filter 前的都卜勒能量大過一給定的最大可接受值，且其在經過 wall filter 處理後的都卜勒能量小於一給定的最小可接受值，該位置即可能是接受到來自緩慢移動組織的反射訊號，血流區域相對的都卜勒能量變化情形則跟移動緩慢的組織區域相反，組織及血流區域在經過 wall filter 前後相對的能量大小如圖 4-6 所示。另外以速度來看：由於背景雜訊是隨機分佈的，因此對其做流速估算所得到的流速值應該會有相當大幅度的跳動，從圖 4-5 (a) 中可以知道，受雜訊影響所造成的跳點的速度量值通常會大於正常血流區域以及周圍組織的速度量值，而在一般緩慢移動的組織部份所估算得到的流速估計量值會是個接近於 0 的數字，所以太大或太小的流速估計量值都很有可能是背景或組織雜訊影響所造成的。將周圍這些不必要的組織或雜訊區域的流速值設定為 0，即可大幅改善彩色都卜勒影像的品質[14], [17], [43]。

		<i>Before Wall Filter</i>	
		Low	High
<i>After Wall Filter</i>	Low	Noise	Stationary Tissue
	High	Blood	Moving Tissue

圖 4-6：組織及血流區域經過 wall filter 前後相對能量大小示意圖

另外也由於實際取得活體實驗數據時運用了掃掠式掃瞄技術，超音波探頭移動取得相鄰流速資訊的間距，會遠小於在超音波聚焦點處的橫向波束寬度以及可能的血管內徑，因此在影像上的正確流速估計值不會單一存在，應該會與周圍相鄰且是同正負號的估計值一起出現，否則即很有可能是背景雜訊所造成的跳點，利用此相鄰區域流速估計量值的相似性也可以消除部份雜訊的影響[14], [43]。綜合應用以上幾種包括能量、速度、相似性等區辨血流區域以及背景組織雜訊的方法，最後才能夠得到準確的流速估計值以及彩色都卜勒影像。圖 4-5 (b) 為實際加入閾值處理後的彩色都卜勒影像，相較於經過閾值處理前的影像，整體影像品質有相當程度的改善，更能夠反應出實際活體實驗中的血流分佈資訊。

4.3 活體血流實驗

4.3.1 老鼠胚胎血流影像

在完成系統硬體的架設以及流速估計演算法的評估之後，我們進一步將整個實驗系統應用於活體小動物血流實驗。在實際小動物影像的取得上，我們使用懷孕的 ICR 小鼠（圖 4-7 (a)）以及預先植入腫瘤細胞的 C57BL/6 小鼠（圖 4-7 (b)）來做驗證。植入腫瘤的黑色 C57BL/6 小鼠平均重量在 20 克左右，懷孕的白色 ICR 小鼠平均重量則在 35 克左右，皆由台大醫學院實驗動物中心以及台大醫院周產期實驗室所提供。所有處理程序皆符合相關動物實驗規定。



(a)

(b)

圖 4-7 : (a) ICR 小鼠以及 (b) C57BL/6 小鼠

由於老鼠在生理結構與基因組成上有諸多與人類相似之處，加上容易繁殖和低廉的飼養費用等優點，常被研究人員們用來做為替代人類實驗的模型，如利用老鼠實驗來模擬重現人類疾病以進行藥物研究，並且規劃使用老鼠小動物模型來從事人類基因序列定序等研究 [48]。在老鼠基因相關研究中，高頻超音波影像系統具有足夠的解析度，可用來檢視基因變異鼠胚胎基因突變的影響，並允許以非侵入性的影像方式觀察母鼠子宮中胚胎的生長過程及血流資訊，做解剖學及生理學之評估 [49]-[51]。

以下影像中的老鼠胚胎天數都在約 10.5~16.5 天不等，母鼠懷孕天數的定義是在將公鼠及母鼠放在同一個籠子中隔夜交配後，隔天即以懷孕天數 0.5 天開始計算。另外在掃瞄取得超音波影像前，皆先以電動除毛器以及除毛軟膏脫去欲影像部位體表的老鼠毛髮，以降低體表毛髮對超音波訊號的遮蔽效應。

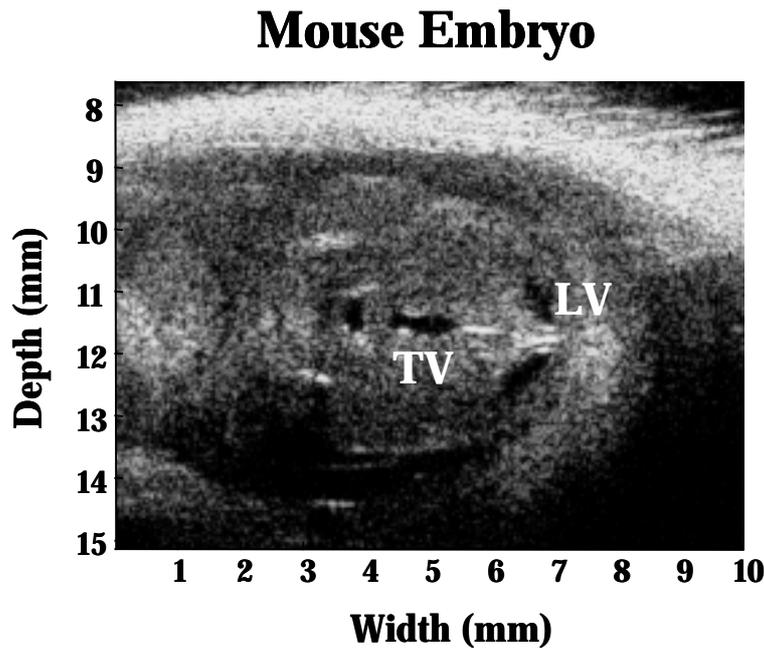


圖 4-8：老鼠胚胎頭部 B-mode 影像

圖4-8為使用本研究建立的超音波小動物影像系統所擷取到的老鼠胚胎頭部B-mode影像。超音波訊號的中心頻率為40 MHz，發射訊號波形為3個週期的正弦波，並使用掃掠式掃瞄法來發射與接收訊號，掃瞄取得一張如圖4-8大小的B-mode影像只需要不到0.5秒的時間。從影像中除了可以分辨出大小約5 mm的老鼠胚胎頭部以及周圍子宮壁的輪廓外，還可以清楚看到包括側腦室 (lateral ventricles , LV) 以及第三腦室 (third ventricles , TV) 等細微的腦部內部構造。

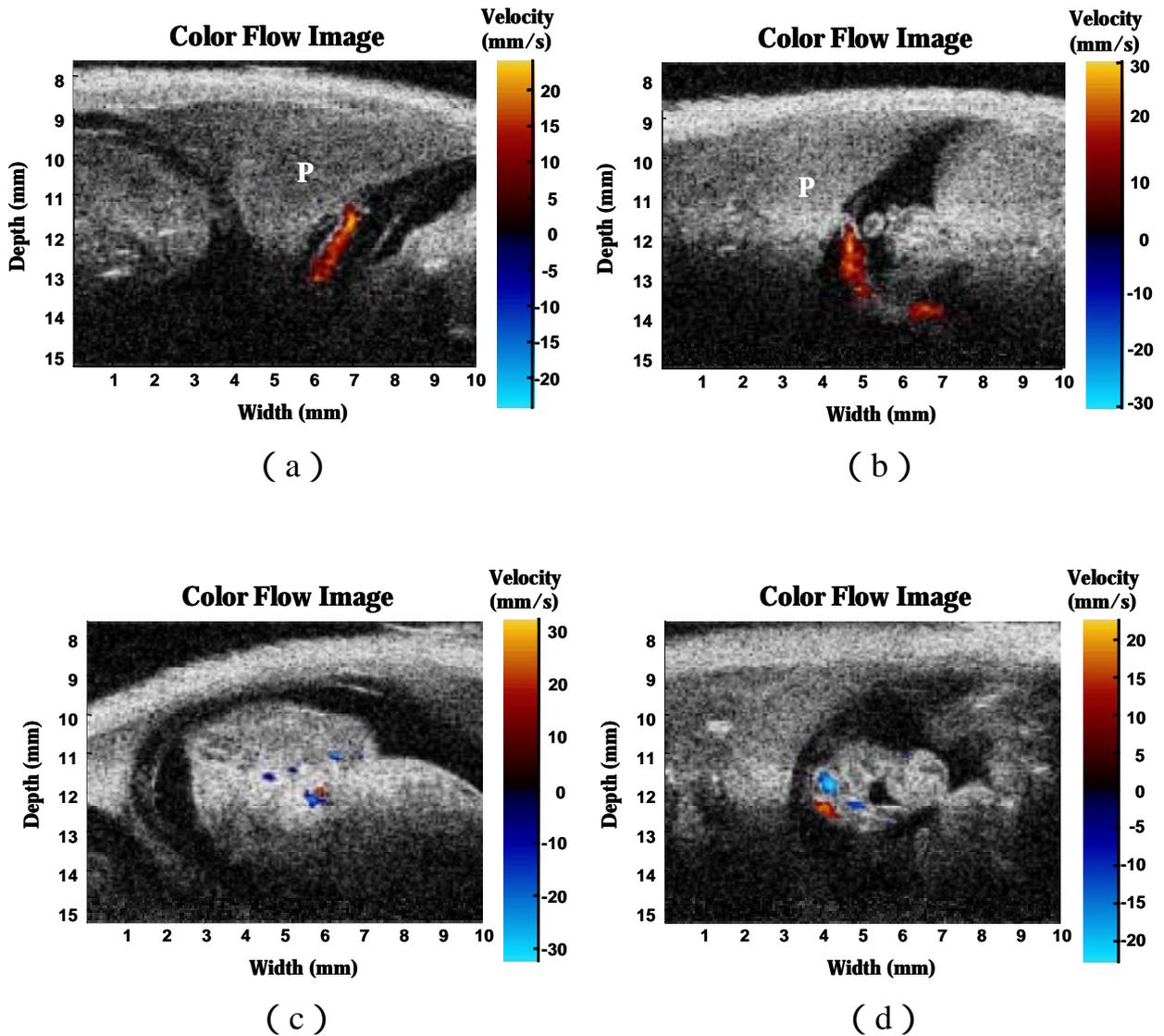


圖 4-9 : (a)、(b) 老鼠胚胎臍帶的彩色都卜勒影像 ; (c)、(d) 老鼠胚胎體內血管的彩色都卜勒影像

圖 4-9 (a)~(d) 皆為使用本研究建立的超音波小動物影像系統所擷取到的老鼠胚胎彩色都卜勒影像。所發射的超音波訊號中心頻率為 40 MHz，訊號波形在 B-mode 影像部份為單一週期的正弦波，彩色都卜勒影像部份則使用 5 個週期的正弦波，並使用掃掠式掃描法來發射與接收訊號，掃描取得一張如圖 4-9 的二維流速資訊只需要不到 1 秒鐘的時間，可將實驗動物身體組織移動的影響降至最低。在經過後續的流速訊號處理，並跟 B-mode 灰階影像結合後即可得到圖 4-9 的彩色都卜勒影像。圖 4-9 (a) 及 (b) 為老鼠胚胎臍帶的彩色都卜

勒影像，除了清楚呈現臍帶的血流分佈資訊外，在影像中同時也可以辨識出胎盤 (placenta, P) 等子宮內部的組織結構。圖 4-9 (c) 及 (d) 則為老鼠胚胎身體內部血管的彩色都卜勒影像，圖 4-9 (c) 可能是體內的大動脈以及相伴在側的下腔靜脈；圖 4-9 (d) 則可能為臍帶進入胚胎體內後在下腹部的分支血管。從影像中也可以辨識出血管內接近中心處流速較快、四周流速較慢的流速分佈模式。

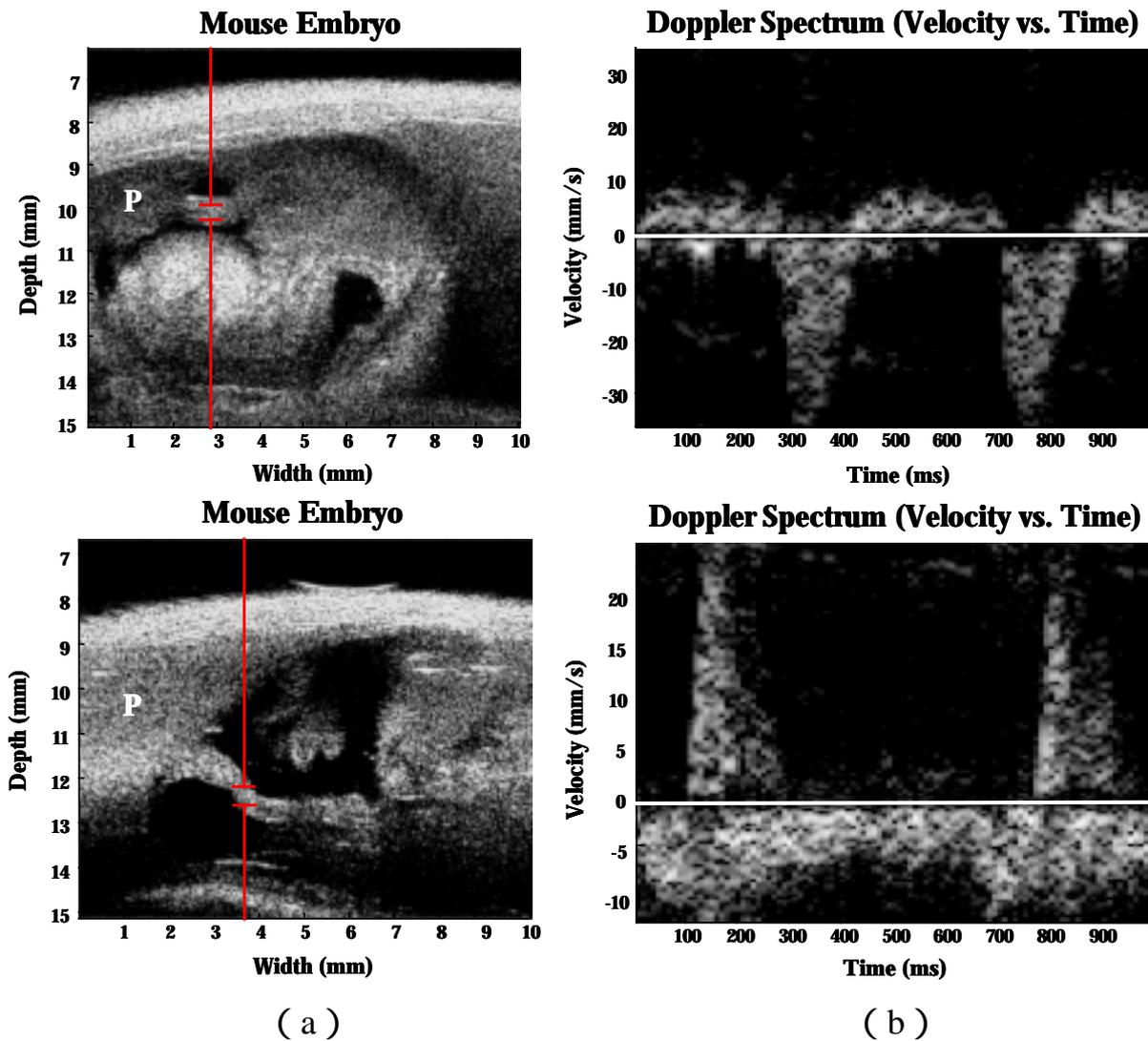


圖 4-10 : (a) 老鼠胚胎 B-mode 影像與臍帶位置示意圖 ; (b) 胚胎臍帶動脈血管的頻譜都卜勒影像

圖 4-10 (a) 為老鼠胚胎的 B-mode 影像，紅色線條標記出胚胎

臍帶的位置以及頻譜都卜勒訊號的計算取樣範圍，在影像中同時也可以辨識出胎盤（placenta, P）等子宮內部的組織結構。圖 4-10 (b) 則為相對應取樣範圍內胚胎臍帶血管的頻譜都卜勒影像，為將特定取樣體積內的血流資訊，選取一組時域移動視窗中的訊號，在經過傅立葉轉換處理後，所得出的都卜勒訊號頻譜就代表在這段時間內的血流速度分佈，也就是速度（影像縱軸，正比於都卜勒頻率偏移）對時間（影像橫軸）的變動情形。所發射的超音波訊號中心頻率為 40 MHz，訊號波形在 B-mode 影像以及頻譜都卜勒模式皆為 3 個週期的正弦波，並使用掃掠式掃瞄法來發射及與接收 B-mode 灰階影像資訊，訊號的脈衝重覆頻率（PRF）為 2 KHz，持續觀測的時間為 1 秒鐘。並搭配使用 MATLAB 撰寫而成的 GUI (graphical user interface) 程式介面以及 ADC 控制介面，來控制訊號的擷取以及完成 B-mode 影像成像、頻譜都卜勒的計算等工作。由於目前在高頻超音波應用的頻率範圍內仍無陣列探頭可供使用，因此若要取得在單一方向上速度對時間變化情形的頻譜都卜勒資訊，仍需要配合馬達帶動超音波探頭移動到指定位置來完成。

實驗介面操作程序如下：首先使用掃掠式掃瞄法取得二維的影像資訊，在 MATLAB GUI 程式中處理並顯示出一張 B-mode 影像，點選要進一步觀察頻譜都卜勒的可能臍帶血管位置後，ADC 控制介面可讀取滑鼠點選決定的位置參數，並移動馬達至指定位置後再連續發射取得 M-mode 格式流速訊號，接下來可在 MATLAB GUI 程式中計算並呈現指定深度的頻譜都卜勒資訊。整個 MATLAB GUI 實驗介面如圖 4-11 所示。

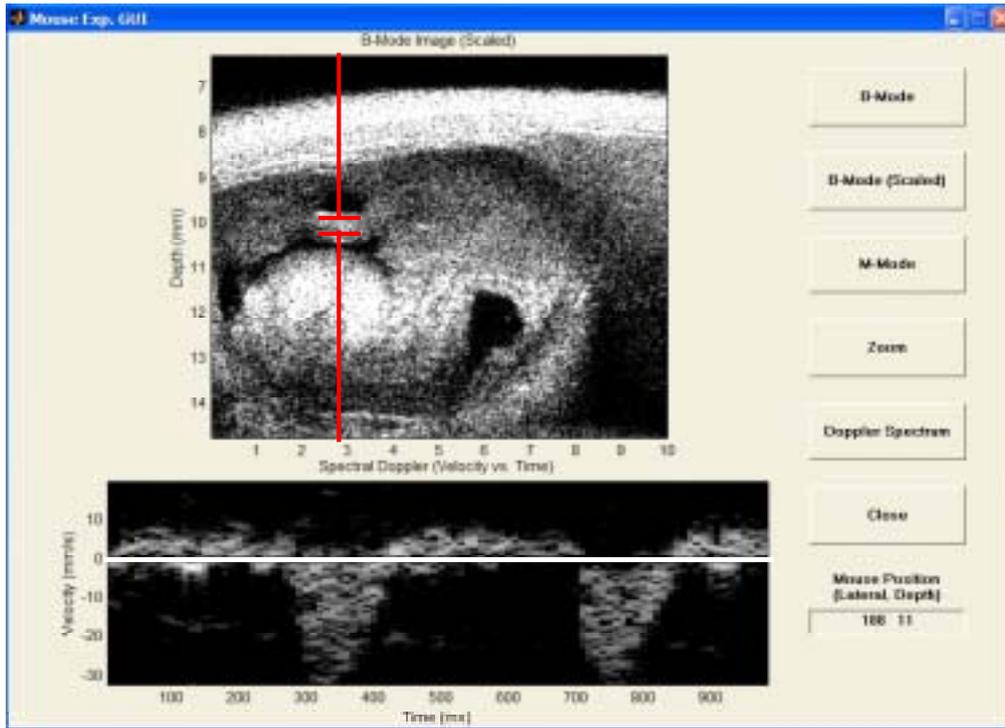


圖 4-11：MATLAB GUI 實驗介面、老鼠胚胎臍帶的 B-mode 以及頻譜都卜勒影像

從圖 4-10 及圖 4-11 中可以得知：在持續 1 秒鐘的觀測時間內，臍帶血管內血流速度的變化呈現了兩個完整的脈衝波形，臍帶血流速度的峰值、脈衝波形與相對應的心搏速率等資訊也與諸多文獻[1], [51], [56]-[58]中的記載相近。值得注意的是，彩色都卜勒影像所顯示出來的流速資訊是在一定計算視窗範圍內血液的平均流速，而頻譜都卜勒影像則是顯示出在特定波束方向上血流速度對時間的變化，雖然從圖 4-10 及圖 4-11 中的頻譜都卜勒影像得到的流速峰值約在 30 mm/s，跟文獻中的記載相近，但在一個完整心搏周期內的血液平均流速值僅約為 10~20 mm/s，跟圖 4-9 (a) \ (b) 中彩色都卜勒影像顯示的結果相吻合。另外也由於彩色都卜勒影像在量測精確度上有一定的限制，因此彩色都卜勒較適合用於血流分佈情形等定性分析，而頻譜都卜勒則因為在同一個方向上所能夠得到的取樣數目較多，故較常被用於血流速度等定量的量測。

臍帶是由母體供應胚胎氧氣與營養成份，以及胚胎排除代謝廢物的專用通道，也可以說是胚胎賴以生長發育和維繫生存的生命線，任何影響到臍帶血流通暢的因素，都有可能危及胚胎的健康狀況。臍帶血管的血流速率與阻力大小可做為胚胎生長發育及循環代謝的指標，對於評估基因變異鼠的心血管系統以及胎盤生長具有相當大的幫助[50]。

4.3.2 老鼠腫瘤血流影像

血管新生 (angiogenesis) 現象是一個從已存在之血管，如微血管 (capillary) 及微血管後小靜脈 (postcapillary venules) 長出新生血管的一個過程。在正常生理狀態下，血管新生是由血管新生促進因子 (proangiogenic factor) 以及血管新生抑制因子 (antiangiogenic factor) 間之平衡來做嚴格的生理調控，以致在健康的成人體內，極少有血管新生出現，而只有在如傷口癒合、發炎反應、月經週期以及胚胎成長等生理現象中，才會有血管新生加速之情形發生。血管新生現象在女性生理週期變化的組織，如卵巢的濾泡成熟、排卵以及黃體形成 (corpus luteum formation) 等過程中，扮演著血管增生、血流灌注、血氧供輸以及營養素分配供給等重要角色。而血管新生促進因子以及抑制因子間之不平衡，造成了很多病理狀態的高密度血管新生，如糖尿病視網膜病變 (diabetic retinopathy) 類風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis) 子宮內膜異位 (endometriosis) 以及惡性腫瘤等等[61]-[62]。

在癌症的相關研究中，腫瘤一旦生長到尺寸超過 $1\sim 2\text{ mm}^3$ ，即需要發展出微小血管網路 (microvessel network)，以利將養份及氧氣帶給腫瘤細胞，並將腫瘤所產生之代謝產物移除。且癌細胞血管新生過程是腫瘤增生 急速成長擴大 (proliferation) 表現局部侵犯 (invasion) 或遠方轉移 (metastasis) 的重要決定因素，因為新生之血管提供了一

個癌細胞能進入循環系統而轉移至身體其他部位的途徑。而在此過程中形成的新生血管 (neovasculature), 跟原本宿主組織 (host tissue) 的血管, 在形態 (morphology) 功能以及血流動力學 (hemodynamics) 等方面都有根本上的不同。腫瘤新生血管的形態通常具有異常的分枝 (branching) 曲折 (tortuous) 結構, 管徑大小並不一致, 血液流動的模式在空間上以及時間上的分佈也都雜亂無章, 無一定規則可循, 這些現象都造成腫瘤組織在微觀上是複雜且異質 (heterogeneous) 的。從臨床的角度來看, 腫瘤血管新生的程度跟病人存活及疾病復發時間有關, 所以腫瘤內血流的資訊對於診斷以及預後檢查 (prognosis) 都極具價值, 更可進一步作為評估治療效果的依據。從生醫研究的角
度來看, 因為現有的醫學影像方法尚無法提供定量、非侵入式、活體 (*in-vivo*) 估量新生血管的血流資訊, 在癌細胞血管新生以及藥物發展的研究上都受到限制[14], [43]。本研究所發展的高頻超音波小動物影像系統正好是一項符合以上估量新生血管血流資訊需求的工具。

在 C57BL/6 小鼠身上植入腫瘤細胞的細胞株 (cell line) 為 WF-3, 為台大醫院鄭文芳醫師所培養並命名。採用皮下注射 (subcutaneous injection) 的方式植入老鼠腹部或大腿內側, 每隻老鼠植入 WF-3 腫瘤細胞的總數量約為 10^5 個, 而植入腫瘤細胞的天數約在 30 ~ 50 天後才適於使用超音波影像系統觀察, 且因為植入部位的不同、個別老鼠體質的差異等因素, 在不同實驗老鼠身上腫瘤的生長速度會有很大的差異。

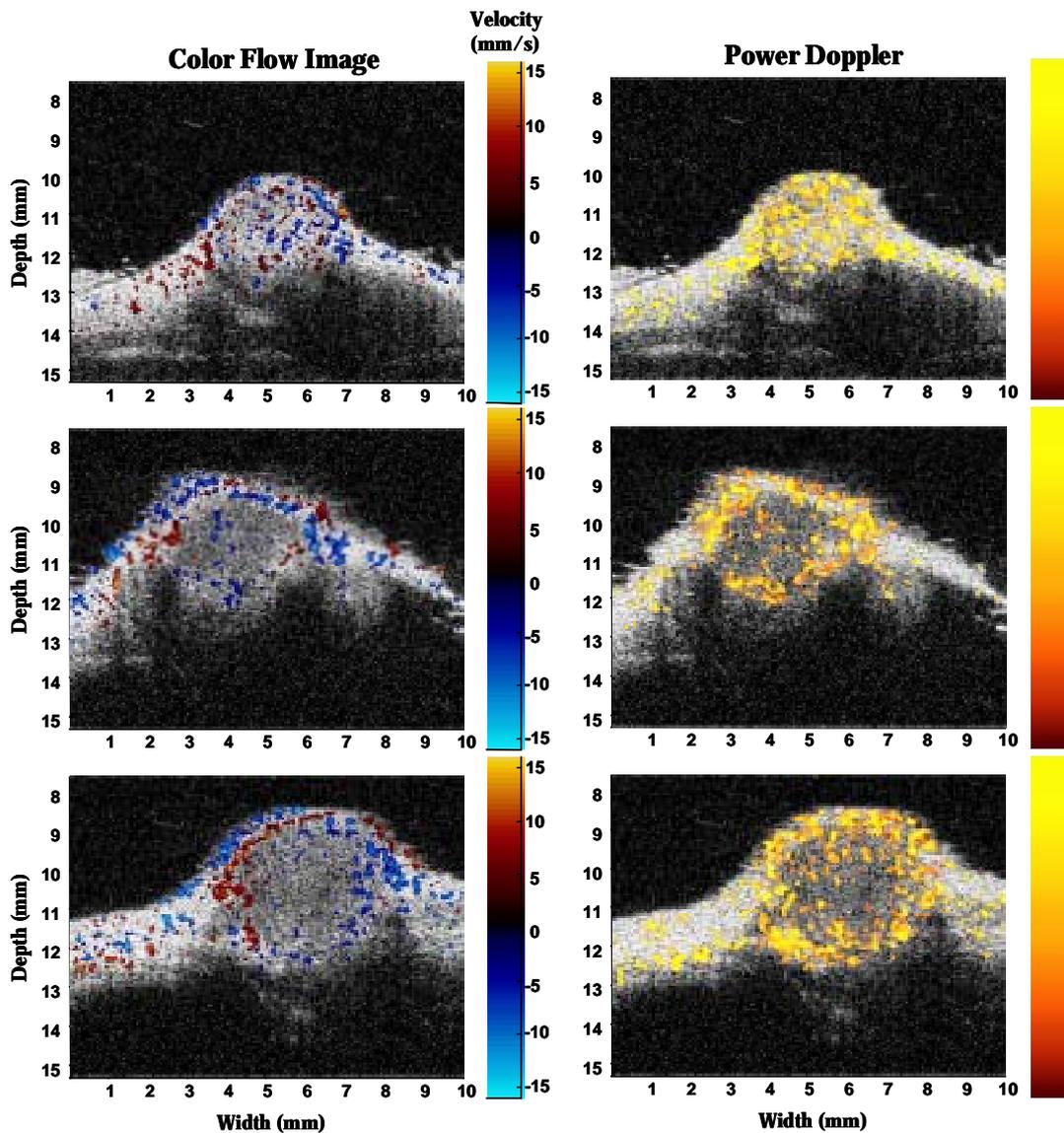


圖 4-12：老鼠腹部腫瘤的彩色都卜勒以及能量都卜勒影像，取得三組影像的時間從上到下各相隔 5~7 天。

圖 4-12 為老鼠腹部腫瘤的彩色都卜勒以及能量都卜勒影像，實驗系統的參數設定同前述的老鼠胚胎彩色都卜勒影像，取得三組影像的時間點各相隔 5~7 天。從背景灰階 B-mode 影像中可以清楚看到腫瘤尺寸的變化，從一開始直徑約 2 mm 成長到直徑約 5 mm 以上。從彩色都卜勒影像來看，在腫瘤還不是太大時，幾乎整個腫瘤內部都有血流存在，並沒有特殊的分佈模式；而隨著腫瘤的生長，血流開始往邊緣區域集中，且集中的情形越來越明顯，從能量都卜勒影像上也可以得到相同的結論。能量都卜勒模式是考慮都卜勒訊號在功率頻譜上

的總面積，可應用在不同的臨床診斷用途上，尤其適用於不考慮血流方向的檢查，例如血管的存在與否以及組織器官的灌流情形等等，對低流速的血管亦具有良好的顯像能力。造成血流往邊緣區域集中的原因，可能是因為腫瘤在生長到一定程度後，其內部組織開始壞死（necrosis），血流集中於邊緣區域供給腫瘤細胞血氧及營養，以供其繼續往四周增生、成長，從 B-mode 影像上看到腫瘤內部的組織對於超音波訊號屬於低度反射（hypoechogetic）[1], [14]的區域，也符合內部組織開始壞死的推論。彩色都卜勒影像所顯示出來的流速量值也與文獻[14], [43]中的記載相近。

目前在臨床研究上若要評估腫瘤組織的血管新生現象，多是採用侵入式取得腫瘤組織切片的方式。一般在醫院病理科中處理腫瘤組織切片的程序大致是：先將老鼠犧牲，將欲觀察的腫瘤組織以 10 % 的中性福馬林（formalin）固定，經過脫水、置換、浸洗等手續後，再以石蠟（paraffin）包埋組織塊，然後置於組織切片機上進行切片，切成厚度在 3 ~ 5 μm 左右的薄片，以利後續的染色與光學顯微鏡觀察。染色的方法是採用免疫組織化學（immunohistochemistry）的方式對組織切片加以染色（staining），免疫組織化學技術為利用免疫學的原理，標示特定細胞及組織中所含的酵素、蛋白質、抗原、核酸等的分佈，在此是只針對血管管壁的内皮細胞（endothelial cells）加以染色，除了方便觀察血管分佈型態之外，血管内皮細胞生長因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）也已被證實在血管新生的過程中扮演重要的角色。接著在顯微鏡底下計算其顯微血管密度（microvessel density, MVD），詳細的組織切片染色步驟與顯微血管密度的計數方法可參考文獻[53]。

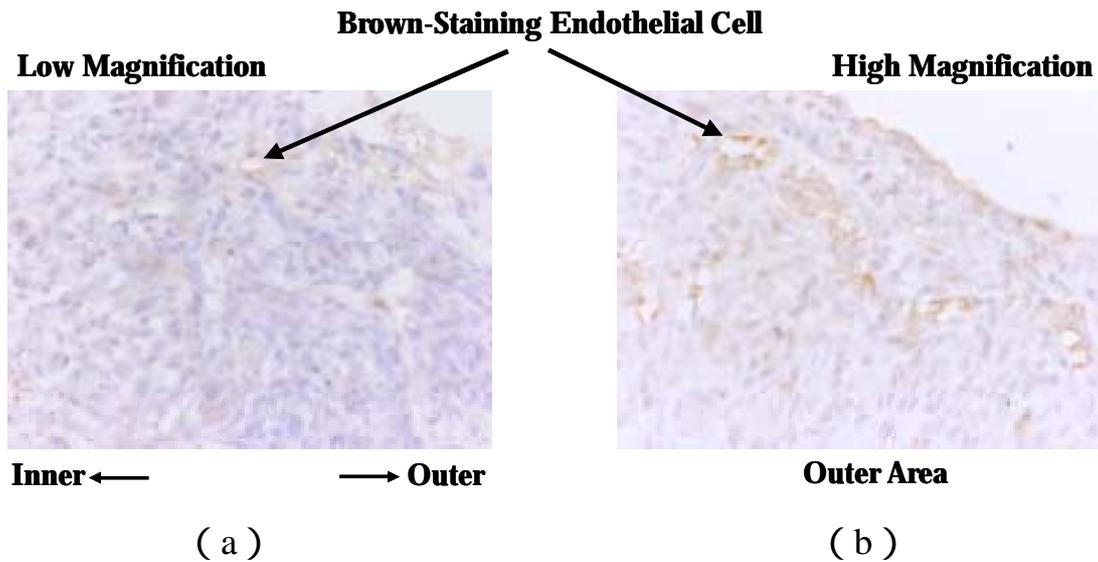


圖 4-13：光學顯微鏡下的腫瘤組織切片影像

圖 4-13 為在光學顯微鏡底下照相取得，以免疫組織化學技術染色過後的腫瘤組織切片影像，其中圖 4-13 (a) 影像的放大倍率為 100 倍 (10 倍物鏡，10 倍目鏡)，圖 4-13 (b) 影像的放大倍率則為 400 倍 (40 倍物鏡，10 倍目鏡)。切片的腫瘤即為取得上述彩色都卜勒與能量都卜勒影像的同一顆腫瘤，在取得最後一組影像後即送交台大醫院病理科做切片處理。影像中褐色的部份即為可能的血管內皮細胞，若褐色部份再包圍或連接著一空腔，則可確定是血管的位置，其餘若有單獨存在於組織間的褐色區域，則可能是偽陽性 (false positive) 的染色結果。從圖 4-13 (a) 影像來看，影像右方及上方為比較靠近腫瘤邊緣的區域，細胞生長得比較密實，靠近中心部份的細胞排列則較為鬆散，符合從超音波 B-mode 影像上觀察得知的結論：腫瘤內部組織對於超音波訊號屬於低度反射的區域。且在靠近邊緣的地方可清楚看到血管的存在，從影像中還可以看出血管從邊緣往中間生長的分佈型態。圖 4-13 (b) 則為在較高放大倍率下的腫瘤邊緣區域影像，可以清楚看到數條血管的存在，具有較高的血管分佈密度，也符合從超音波彩色都卜勒與能量都卜勒影像得到的結論：在腫瘤生長到一定大小之後，血流會開始往邊緣區域集中，供給腫瘤細胞血氧及營養，且集中的情形越來越明顯，以供其繼續往四周增生、成長。

曾有研究引介一血管分佈指標 (vascularity index, VI) [53], 利用都卜勒超音波血管成像術 (power Doppler angiography, 即前述的能量都卜勒模式), 可在活體 (*in vivo*) 及檢驗當場 (*in situ*) 的條件下, 將超音波影像呈現出來的腫瘤血流分佈情況做客觀的定量推估, 已經被證實與傳統的顯微血管密度具有良好的相關性, 可做為在診斷、治療與研究時一個定量量度血管分佈密度與評估癌細胞淋巴轉移 (lymph node metastases) 潛力的指標, 突破目前都卜勒超音波僅止於定性方面的評估。本研究發展的小動物影像系統所提供的能量都卜勒模式即適合於此一應用, 與組織切片比對的結果亦具有良好的相關性, 且解析度更勝於傳統的商用超音波系統, 可在小動物的腫瘤評估上, 提供定量、非侵入式、活體估量新生血管的血流資訊。

4.4 超音波對比劑於小動物影像之初步探討

發展超音波對比劑的主要動力，是因超音波訊號在人體中的衰減很快（衰減常數約為 $0.5 \text{ dB / cm / MHz}$ ），故超音波在臨床上有其穿透深度及診斷範圍的限制，而隨著頻率的上升，此衰減現象也跟著變得嚴重。為了要增加超音波影像的診斷資訊，從 1960 年代後期開始有超音波對比劑的發展，經過長時間的研究，發展出以微小氣泡為主體的超音波對比劑，其在注入人體後所產生的微小氣泡可增強超音波的反射訊號，使組織間影像的對比增強，可提高臨床診斷的正確性。此外，聲波撞擊到微小氣泡而產生的諧波效應（harmonics），可使血管與血液兩者間的訊號對比大為增強，亦有助於增加微弱血流訊號之敏感度。

在高頻超音波的應用環境下，關於超音波對比劑的使用雖然仍無完整廣泛的探討，但已有研究指出，在使用中心頻率接近 40 MHz 的超音波探頭，搭配 Albunex（Molecular Biosystems, San Diego, United States）超音波對比劑，仍然可以觀測到對比劑隨時間的濃度變化情形，此一結果可提供在充滿對比劑的器官內的微灌流資訊 [18]。在活體實驗方面，使用中心頻率在 40 MHz 的超音波系統，搭配 Albunex 超音波對比劑來觀測兔子眼睛的血液反射訊號，比起不使用對比劑的情況下，訊號強度至少可以得到 8 dB 的提升 [44]。先前研究證明了 Albunex 對比劑的使用在高頻超音波的環境下仍有其可行性及重要性。

Levovist 利保維斯注射劑為目前在台灣唯一核准可在臨床使用的超音波對比劑，因此我們先嘗試使用此商用的對比劑來評估其對於小動物影像的影響，期望在各項參數及性質上比較能夠事先掌握。從文獻中 [39] 可得知，對於不同大小的微氣泡，其對應的共振頻率（基頻）與氣泡大小有下列的關係：

$$f_0 \approx \frac{6500}{d}$$

其中 f_0 為共振頻率，以 KHz 為單位表示； d 為微氣泡直徑，以 μm 為單位表示。從以上關係式可得知，理論上直徑約為 $3 \mu\text{m}$ 的 Levovist 對比劑氣泡，其共振頻率約在 2.2 MHz 左右。

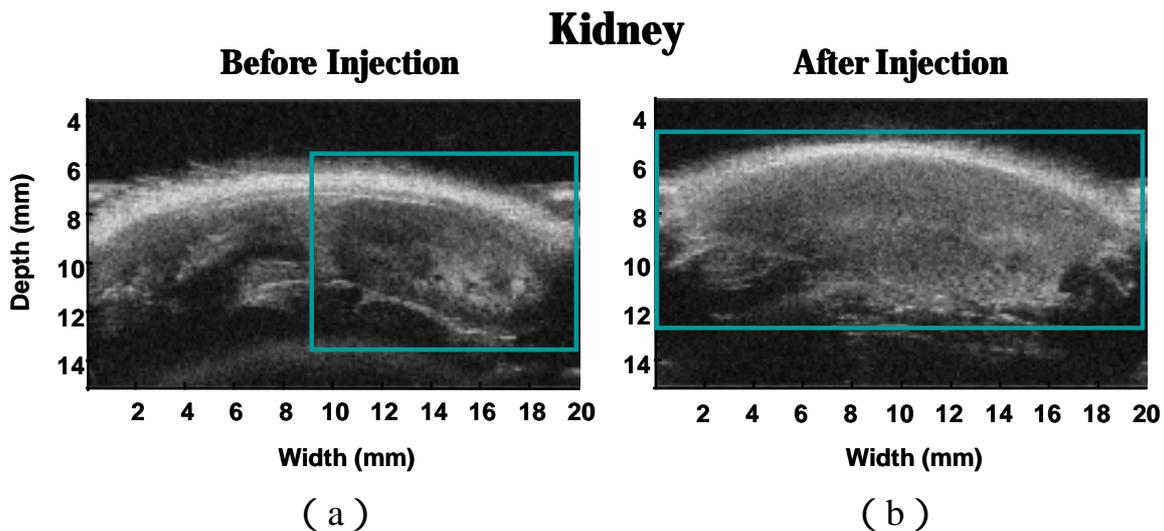


圖 4-14：注入 Levovist 對比劑前後的老鼠腎臟 B-mode 影像

為了驗證超音波對比劑在高頻小動物影像系統上的適用性，我們嘗試將 Levovist 對比劑注入老鼠體內，以觀察超音波反射訊號的訊號增強情形以及是否有不正常的生理反應。實驗方法是從老鼠尾部靜脈 (tail vein) 以瞬間注入 (bolus injection) 的方式注入 0.25 ml 的 Levovist 對比劑，注入的時間約持續 2 ~ 3 秒鐘。對比劑的混合比例為 0.25 g 的 Levovist 粉末搭配 1 ml 的無菌生理食鹽水，混合後的懸浮液濃度約為 200 mg 微粒 / ml 懸液，為藥廠建議的最低濃度。結果從 B-mode 影像上發現腎臟內部反射訊號的強度在施打對比劑後有明顯的增強，不過並非只是在部份有血管通過的區域的反射訊號變強，而是整個腎臟影像的亮度都跟著提升，一些腎臟內部的細部結構在注入對比劑後反而無法辨識；此外，腎臟的體積也在施打對比劑後明顯變大許

多，從影像中可以發現腎臟的縱向長度增加了一倍以上，如圖 4-14 (b) 所示。解剖後除了確認老鼠腎臟在尺寸上的變化外，另外也發現腎臟外觀的顏色從原本的深紅色變淺很多，推測是對比劑物質無法通過老鼠的腎臟，阻塞在腎臟裡所造成的。雖然 Levovist 對比劑微氣泡的平均直徑約為 3 ~ 5 μm ，理論上可以順利通過人體的心肺循環，但將其應用在小動物身上，有可能是對比劑氣泡在進入老鼠體內後聚集在一起，或是與血管內其他物質結合，形成尺寸較大的團塊 (aggregate)，造成腎臟或其他部位血管的栓塞 (embolism) 現象。

當超音波影像系統發展至頻率大於 20 MHz 的高頻範圍，而且要開發專門針對小動物的影像系統時，傳統的超音波對比劑在應用上可能會碰上一些瓶頸：首先是現行商用對比劑的氣泡尺寸較大，在進入小動物體內後容易結合成較大的團塊，造成小動物在肺臟及腎臟等部位血管的栓塞，從我們的實驗中已經證實了這一點。第二是現行超音波對比劑的共振頻率較低，約在 2 ~ 3 MHz 之間，雖然從實驗及文獻中證明其在高頻的應用環境下仍有訊號增強的效果，但高頻超音波的頻率範圍已遠遠超過現行對比劑氣泡所對應的共振頻率，無法有效運用對比劑氣泡的非線性特性，需要進一步縮小對比劑氣泡的尺寸以提高其共振頻率。第三是在近年來廣受注目的標的給藥 (targeting drug delivery) 研究中，對比劑微氣泡亦具有運送藥物到特定組織的能力，將欲運送的藥物包藏在對比劑微氣泡中並注入血管內，待微氣泡流經目標組織時，以高振幅的超音波傳入體內將微氣泡擊破，釋放出存放在氣泡內的藥物，而達到非侵入式精確運送藥物的目的。但組成現行對比劑氣泡的材料並不適合用來當做此種靶向性 (targeting) 以及控釋性 (controlled release) 的藥物載具，欲將超音波對比劑與標的給藥應用結合時，需要配合新的對比劑材料，如微脂體 (liposome) 來解決此問題。未來在對比劑的研究上，可朝向更小的對比劑氣泡尺寸以及新的對比劑材料等兩方面來著手，以發展出適用於小動物影像，甚至是可結合標的給藥應用的超音波對比劑。

4.5 結論

為了發展一套適用於微量血流量測以及小動物實驗的全數位式高頻超音波影像系統，必須面臨系統的訊雜比不夠高、流速估算演算法需具備良好速度解析度，以評估流速在 mm/s 等級以下微量血流等問題，傳統流速分析方式的效能在此應用條件下受到嚴重的限制。本研究以模擬流速數據及體外血流仿體實驗評估了包括傳統的一維自相關函數法、二維自相關函數法、寬頻最大可能性評估法以及蝶狀搜尋法等四種估算流速演算法的效能，後三者在速度解析度以及抗雜訊能力上都優於傳統的一維自相關函數法。合併考量四種演算法在發射訊號頻寬以及抗雜訊能力等各方面的綜合效能，蝶狀搜尋法是兼顧運算時間以及流速估算準確度的最佳演算法，可做為高頻超音波定量研究血流參數的基礎。

由於探頭製作技術以及壓電材料的限制，目前在高頻超音波的頻率範圍內並沒有陣列式的超音波探頭可供電子式掃瞄以及動態聚焦之用，必須以機械掃瞄的方式移動固定聚焦的單一探頭來取得二維的影像資訊。應用傳統離散式 (discrete) 的機械掃瞄方式於高頻超音波小動物影像系統上，其過於緩慢的掃瞄速度對於想要即時取得活體動物的影像資訊具有相當不利的影響。本研究應用了掃掠式掃瞄 (swept-scan) 技術，將超音波探頭在連續移動的同時發射超音波訊號，可大幅提高數據擷取的速度，快速獲得二維的流速資訊，縮短實驗時間，減少不必要的組織移動的影響。

應用上述流速演算法以及掃瞄技術建立的高頻小動物超音波影像系統，目前已經可以呈現包括 B-mode 灰階組織影像、頻譜都卜勒 (spectral Doppler)、彩色都卜勒 (color Doppler) 以及能量都卜勒 (power Doppler) 等多種格式的超音波影像。在活體 (*in vivo*) 實驗的驗證上，可順利以在子宮內 (*in utero*) 的影像方式取得老鼠胚胎及

臍帶的血流資訊；另外並成功取得老鼠腹部腫瘤的血流資訊，可達毫米每秒的流速解析度，並且可追蹤腫瘤在生長過程中微小血管的分佈形態，且與組織切片比對的結果具有良好的相關性，對於評估老鼠胚胎發育以及腫瘤血管增生等現象都有相當大的幫助。

在未來相關的高頻超音波研究中，可參考本論文所提出的系統架構及估算血流速度演算法，針對後續如系統顯像速率、訊號處理技術、組織諧波影像、超音波對比劑的特性等應用，甚至與其他醫學影像技術合作等相關領域做更進一步的探討，以期在生物醫學研究上有所貢獻。

4.6 未來工作

在本論文中評估了多種估算流速的演算法，改善傳統一維自相關函數技術在高頻超音波應用環境上的限制，並整合快速的掃掠式機械掃瞄技術，建立一套高頻超音波小動物影像系統。在未來高頻超音波的研究領域中，可參考本論文所提出的系統架構及估算流速演算法，做更進一步的改進與探討。未來後續的研究工作包括：

提升中心頻率

隨著頻率的升高、波長的縮短，超音波影像系統的空間解析度與發射訊號的中心頻率呈正比關係。所以在未來的研究中，可以使用本研究所建立的實驗系統架構以及演算法技術，加入振幅解析度以及取樣頻率更高的高速取樣電路，配合更高頻的超音波探頭以獲得更好的影像解析度。

使用高頻陣列探頭

高頻超音波陣列探頭可以改善現有系統中成像速度較慢的問題，利用陣列探頭可做電子式掃瞄以及動態聚焦等優點，達成即時顯像的灰階影像，讓生物組織特性能立即呈現，甚至是利用彩色都卜勒影像即將觀測血流資訊等應用應該都指日可待。如此可以大幅提升高頻超音波在臨床上的應用以及在生物醫學研究上的潛力，對眼科、皮膚科和實驗室的研究用途都有極大的幫助。

增進系統處理運算效能

不論是使用較短的脈衝重覆時間 (PRI) 加快馬達掃瞄的速度或是運用特殊的掃瞄方式，如小範圍的高速扇形 (sector) 掃瞄，以縮短掃瞄廣大影像區域所需的時間[45]，目前高頻超音波影像系統的顯像速度仍受限於個人電腦以及 MATLAB 程式的運算處理速度。為了提升顯像速率 (frame rate)，除了從硬體架構方面改進，例如前述陣

列探頭的使用之外；在軟體方面，可將 MATLAB 處理程式的程式碼轉移到 C++ 平台，或是將運算的工作交給專門的數位訊號處理晶片（DSP）來處理，都能夠大幅提升高頻超音波影像系統運算的效率；另外利用直接記憶體存取（direct memory access, DMA）的技術，使 ADC 介面卡可以直接存取個人電腦上的記憶體，能夠克服目前系統效能與掃描範圍受制於 ADC 上記憶體不足的限制；此外還有整合實驗介面、降低系統操作的困難度等等，都是未來想要達成即時顯像所必須完成的任務。

應用各式訊號處理技術

本研究所建立的全數位式影像系統架構可以讓使用者在發射端設計任意波形、頻寬的發射訊號，未來將可充分利用本實驗室所發展出來的各種如編碼波形（coded excitation）脈衝反相（pulse inversion）及組織諧波影像（tissue harmonic imaging）等訊號處理的技術，來克服硬體上的限制，進一步增進影像品質和分析準確度。

發展新的超音波對比劑

在高頻超音波小動物影像系統的應用上，傳統的超音波對比劑在應用上可能會碰上如氣泡尺寸較大，進入小動物體內後容易造成肺臟及腎臟等部位血管的栓塞；氣泡共振頻率較低，無法有效運用對比劑氣泡的非線性特性；以及現行對比劑的組成材料並不適合用來當做標的給藥的藥物載具等問題。未來可朝向更小的對比劑氣泡尺寸以及新的對比劑材料等兩方面來研究，以發展出適用於小動物影像，甚至是可結合標的給藥應用的超音波對比劑。

結合其他醫學影像技術

雖然超音波影像系統具有如非侵入偵測、即時顯像、可攜性等許多優點，但是對於如骨骼等部份人體組織的臨床影像應用仍有其先天上的限制，期望未來能和其他醫學影像技術合作，如小動物正子放射

斷層掃描影像 (Animal PET) 等等。除了臨床醫學的應用外，還能夠以非侵入性的方式輔助分析胚胎在發育期的基因表徵 (phenotype)，以及針對基因開發新藥物的研究等等，都是未來高頻超音波影像技術可應用的範圍。

此外，高頻超音波影像系統在實際人體臨床應用上，必須考慮其安全規範以避免造成組織的傷害。因為高頻超音波多用來觀察分佈於接近體表的淺層組織，例如眼球構造中如角膜、水晶體等部位，該部位中多為沒有血管分佈的組織，故超音波訊號所造成的熱效應並不能輕易經由血液流動帶走，所以在美國食品藥物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 的相關規定中，對於高頻超音波系統的安全規範是較為嚴格的。根據文獻的記載[46]，其 I_{SPPA} (spatial peak-pulse average intensity) 約為 28 W/cm^2 、 I_{SPTA} (spatial peak-temporal average intensity) 為 17 mW/cm^2 、MI 值 (mechanical index) 為 0.23。但此規定是於 1976 年所制訂，後於 1981 年修改而成，當時醫學用的高頻超音波系統卻仍未發展成熟，希望未來對於高頻超音波影像系統在臨床應用的安全標準能夠有更完整的評估與規範。

第五章 參考文獻

- [1] F. S. Foster, C. J. Palvin, K. A. Harasiewicz, D. A. Christopher, and D. H. Turnbull, “**Advances in Ultrasound Biomicroscopy,**” *Ultrasound in Medicine & Biology*, Vol. 26, No. 1, pp. 1-27, 2000.
- [2] D. A. Knapik, B. Starkoski, C. J. Palvin, and F. S. Foster, ”**A 100-200 MHz Ultrasound Biomicroscope,**” *IEEE Trans. on Ultrasound, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 47, No. 6, Nov. 2000.
- [3] C. Passmann and H. Ermert, “**Adaptive 150MHz Ultrasound Imaging of the Skin and the Eye Using an Optimal Combination of Short Pulse Mode and Pulse Compression Mode,**” *1995 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1661-1664.
- [4] C. Passmann and H. Ermert, “**A 100 MHz Ultrasound Imaging System for Dermatologic and Ophthalmologic Diagnostics,**” *IEEE Trans. on Ultrasound, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 43, No. 4, July 1996.
- [5] C. J. Pavlin and F. S. Foster, “**Ultrasound Biomicroscopy of the Eye,**” Springer-Verlag Press, 1995.
- [6] S. G. Ye, K. A. Harasiewicz, C. J. Pavlin, and F. S. Foster, “**Ultrasound Characterization of Normal Ocular Tissue in the Frequency Range from 50 MHz to 100 MHz,**” *IEEE Trans. on Ultrasound, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 42, No. 1, Jan. 1995.
- [7] G. R. Lockwood, D. H. Turnbull, D.A. Christopher, and F. S. Foster, ”**A 40-100 MHz B-scan Ultrasound Backscatter Microscope for Skin Imaging,**” *Ultrasound in Medicine & Biology*, Vol. 21, No. 1, pp. 79-88, 1995.
- [8] J. Folkman, “**Angiogenesis: Initiation and Control,**” *Ann N Y Acad Sci*, 401:212, 1982.

- [9] W. F. Cheng, C. A. Chen, C. N. Lee, T. M. Chen, F. J. Hsieh, and C. Y. Hsieh, "**Vascular Endothelial Growth Factor in Cervical Carcinoma,**" *Obstet Gynecol*, 93:761, 1999.
- [10] C. A. Chen, W. F. Cheng, C. N. Lee, T. M. Chen, C. C. Kung, F. J. Hsieh, and C. Y. Hsieh, "**Serum Vascular Endothelial Growth Factor in Epithelial Ovarian Neoplasms: Correlation with Patient Survival,**" *Gynecol Oncol*, 74:235, 1999.
- [11] T. Nakamura, Y. Mochizuki, H. Kanetake, and S. Kanda, "**Signals via FGF Receptor 2 Regulate Migration of Endothelial Cells,**" *Biochem Biophys Res Commun*, 289:801, 2001.
- [12] D. C. Darland and P. A. D'Amore, "**TGF Beta is Required for the Formation of Capillary-Like Structures in Three-Dimensional Cocultures of 10T1/2 and Endothelial Cells,**" *Angiogenesis*, 4:11, 2001.
- [13] I. Ramos, L. A. Fernandez, S. S. Morse, K. L. Fortune, and K. J. Taylor, "**Detection of Neovascular Signals in a 3 Day Walker 256 Rat Carcinoma by CW Doppler Ultrasound,**" *Ultrasound in Medicine & Biology*, 14:123, 1988.
- [14] D. E. Goertz, D. A. Christopher, J. L. Yu, R. S. Kerbel, P. N. Burns, and F. S. Foster, "**High-Frequency Color Flow Imaging of the Microcirculation,**" *Ultrasound in Medicine & Biology*, Vol. 26, No.1, pp. 63-71, 2000.
- [15] D. A. Christopher, P. N. Burns, B. G. Starkoski, and F. S. Foster, "**A High-Frequency Pulsed-Wave Doppler Ultrasound System for the Detection and Imaging of Blood Flow in the Microcirculation,**" *Ultrasound in Medicine & Biology*, Vol. 23, No. 7, pp. 997-1015, 1997.
- [16] D. Kruse, R. Silverman, S. Erickson, D. J. Coleman, and K. Ferrara, "**Optimization of Real-Time High Frequency Ultrasound for**

- Blood Flow Imaging in the Microcirculation,”** 2000 *IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1461-1464.
- [17] K. W. Ferrara, B. G. Zagar, J. B. Sokil-Melgar, R. H. Silverman, and I. M. Aslanidis, “**Estimation of Blood Velocity with High Frequency Ultrasound,**” *IEEE Trans. on Ultrasound, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 43, No. 1, Jan. 1996.
- [18] K. Morgan, P. Dayton, S. Klibanov, G. Brandenburger, S. Kaul, K. Wei, and K. Ferrara, “**Properties of Contrast Agents Insonified at Frequency Above 10 MHz,**” 1996 *IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1127-1130.
- [19] C. X. Deng, F. L. Lizzi, R. H. Silverman, R. Ursea, and D. J. Coleman, “**Imaging and Spectrum Analysis of Contrast Agents Using Very High Frequency Ultrasound,**” 1997 *IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1571-1574.
- [20] 李百祺, “**都卜勒影像,**” 醫用超音波原理及技術, pp. 42-64, 2000.
- [21] 王聖維, “**超音波對比劑應用於血流參數計算之研究,**” 國立台灣大學電機工程學研究所碩士論文, 民國九十年.
- [22] C. Kasai, K. Namekawa, A. Koyano, and R. Omoto, “**Real-Time Two-Dimensional Blood Flow Imaging Using an Autocorrelation Technique,**” *IEEE Trans. on Sonics and Ultrasonics*, Vol. SU-32, pp. 458-464, 1985.
- [23] T. Loupas, J. T. Powers, and R. W. Gill, “**An Axial Velocity Estimator for Ultrasound Blood Flow Imaging, Based on a Full Evaluation of the Doppler Equation by Means of a Two-Dimensional Autocorrelation Approach,**” *IEEE Trans. on Ultrasound, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 42, No. 4, July 1995.
- [24] T. Loupas, R. B. Peterson, and R. W. Gill, “**Experimental Evaluation of Velocity and Power Estimation for Ultrasound**

- Blood Flow Imaging, By Means of a Two-Dimensional Autocorrelation Approach,”** *IEEE Trans. on Ultrasound, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 42, No. 4, July 1995.
- [25] K. W. Ferrara and V. R. Algazi, “**A New Wideband Spread Target Maximum Likelihood Estimator for Blood Velocity Estimation - Part I: Theory,**” *IEEE Trans. on Ultrasound, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 38, No. 1, Jan. 1991.
- [26] K. W. Ferrara and V. R. Algazi, “**A New Wideband Spread Target Maximum Likelihood Estimator for Blood Velocity Estimation - Part II: Evaluation of Estimators with Experimental Data,**” *IEEE Trans. on Ultrasound, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 38, No. 1, Jan. 1991.
- [27] M. Vogt and H. Ermert, “**Application of High Frequency Broadband Ultrasound for High Resolution Blood Flow Measurement,**” *1997 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1243-1246.
- [28] S. K. Alam and K. J. Parker, “**The Butterfly Search Technique for Estimation of Blood Velocity,**” *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol.21, No. 5, pp. 657-670, 1995.
- [29] M. Vogt, A. Pluta, and H. Ermert, “**Comparison of Time and Frequency Domain Approaches for Blood Velocity Estimation in Small Vessels using High Frequency Ultrasound,**” *2000 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1521-1524.
- [30] G. R. Lockwood, D. H. Turnbull, D.A. Christopher, and F. S. Foster, “**Beyond 30MHz: Applications of High-Frequency Ultrasound Imaging,**” *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, Vol. 15, No. 6, pp. 60-70, 1996.
- [31] GE Medical Systems, <http://www.gemedicalsystems.com/rad/us/>
- [32] SIEMENS Medical, <http://www.siemensmedical.com/>

- [33] 何祚明, “**高頻超音波影像系統,**” 國立台灣大學電機工程學研究所碩士論文, 民國九十一年.
- [34] D. E. Kruse, R. H. Silverman, R. J. Fornaris, D. J. Coleman, and K. W. Ferrara, “**A Swept-Scanning Mode for Estimation of Blood Velocity in the Microvasculature,**” *IEEE Trans. on Ultrasound, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 45, No. 6, Nov. 1998.
- [35] D. Kruse, R. Silverman, D. J. Coleman, S. Erickson, and K. W. Ferrara, “**High Resolution Blood Flow Mapping in the Anterior Segment of the Eye,**” *1999 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1477-1480.
- [36] D. E. Kruse and K. W. Ferrara, “**A New High Resolution Color Flow System Using an Eigendecomposition-Based Adaptive Filter for Clutter Rejection,**” *IEEE Trans. on Ultrasound, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 49, No. 10, pp. 1384-1399, Oct. 2002.
- [37] N. A. Cohn, S. Y. Emelianov, M. A. Lubinski, and Matthew O'Donnell, “**An Elasticity Microscope - Part I: Methods**” *IEEE Trans. on Ultrasound, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 44, No. 6, Jan. 1997.
- [38] K. V. Ramnarine, D. K. Nassiri, P. R. Hoskins, and J. Lubbers, “**Validation of a New Blood-Mimicking Fluid for Use in Doppler Flow Test Objects,**” *Ultrasound in Medicine & Biology*, Vol. 24, No. 3, pp. 451-459, 1998.
- [39] F. Forsberg, “**Physics of Ultrasound Contrast Agents**”, *Ultrasound Contrast Agents*, pp. 9-20, 1997.
- [40] C. N. Navin, S. Reinhard, “**Advances in Echo Imaging Contrast Enhancement,**” *Kluwer Academic Publishers*, pp. 43-56, 1993.
- [41] A. T. Kerr and J. W. Hunt, “**A Method for Computer Simulation of Ultrasound Doppler Color Flow Images - I. Theory and Numerical Method,**” *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 8, No.

- 10, pp. 861-872, 1992.
- [42] L. Y. L. Mo and R. S. C. Cobbold, “**A Stochastic Model of the Backscattered Doppler Ultrasound from Blood,**” *IEEE Trans. on Biomedical Engineering*, vol. 33, No. 1, pp. 20-27, 1986.
- [43] D. E. Goertz, Joanne L. Yu, R. S. Kerbel, P. N. Burns, and F. S. Foster, “**High-Frequency 3-D Color-Flow Imaging of the Microcirculation,**” *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 29, No. 1, pp. 39-51, 2003.
- [44] R. Gramiak, P. M. Shah, D. H. Kramer, “**Ultrasound Cardiography Contrast Studies in Anatomy and Function,**” *Radiology* 92, 939-948, 1969.
- [45] W. H. Chen, E. J. Gottlieb, J. M. Cannata, Y. F. Chen, and K. K. Shung, “**Development of Sector Scanning Ultrasonic Backscatter Microscope,**” *2000 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1681-1684.
- [46] T. Christopher, “**Experimental Investigation of Finite Amplitude Distortion-Based Second Harmonic Pulse Echo Ultrasonic Imaging,**” *IEEE Trans. on Ultrasound, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 45, No. 1, Jan. 1998.
- [47] J. A. Jensen, “**Estimation of Blood Velocity Using Ultrasound, A Signal Processing Approach,**” *Cambridge University Press*, 1996.
- [48] D. Malakoff, “**The Rise of the Mouse: Biomedicine's Model Mammal,**” *Science*, vol. 288, pp. 248-253, 2000.
- [49] VisualSonics Inc., <http://www.visualsonics.com/>
- [50] C. K. L. Phoon, O. Aristizabal, and D. H. Turnbull, “**40 MHz Doppler Characterization of Umbilical and Dorsal Aortic Blood Flow in the Early Mouse Embryo,**” *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 26, No. 8, pp. 1275-1283, 2000.
- [51] F. S. Foster, M. Y. Zhang, Y. Q. Zhou, G. Liu, J. Mehi, E. Cherin, K. A. Harasiewicz, B. G. Starkoski, L. Zan, D. A. Knapik, and S. L.

- Adamson, "A New Ultrasound Instrument for *In Vivo* Microimaging of Mice," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 28, No. 9, pp. 1156-1172, 2002.
- [52] V. L. Newhouse, J. M. Reid, "Invariance of Doppler Bandwidth with Flow Axis Displacement," *1990 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1533-1536.
- [53] W. F. Cheng, C. N. Lee, J. S. Chu, C. A. Chen, T. M. Chen, W. Y. Shau, C. Y. Hsieh, and F. J. Hsieh, "Vascularity Index as a Novel Parameter for the In Vivo Assessment of Angiogenesis in Patients with Cervical Carcinoma," *Cancer*, vol. 85, No. 3, pp. 651-657, Feb. 1999.
- [54] K. Rasmussen, "Review: Methodological Problems Related to Measurement of Quantitative Blood Flow with the Ultrasound Doppler Technique," *Scand J Clin & Lab Invest.*, 47(4): 303-9, 1987.
- [55] K. Rasmussen, "Non-Invasive Quantitative Measurement of Blood Flow and Estimation of Vascular Resistance by the Doppler Ultrasound Method", "Methodological Studies and Clinical Application on the Fetus and the Transplanted Kidney Allograft," *Danish Medical Bulletin*, 39(1): 1-14, Feb. 1992.
- [56] O. Aristizabal, D. A. Christopher, F. S. Foster, and D. H. Turnbull, "Measuring Blood Flow in the Mouse Embryo", *1997 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1489-1492.
- [57] O. Aristizabal, D. A. Christopher, F. S. Foster, and D. H. Turnbull, "40-MHz Echocardiography Scanner for Cardiovascular Assessment of Mouse Embryos", *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 24, No. 9, pp. 1407-1417, 1998.
- [58] M. J. MacLennan and B. B. Keller, "Umbilical Arterial Blood Flow in the Mouse Embryo During Development and Following

- Acutely Increased Heart Rate**", *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 25, No. 3, pp. 361-370, 1999.
- [59] J. Enderle, S. Blanchard, and J. Bronzino, "**Introduction to Biomedical Engineering**", Academic Press, Inc., 2000.
- [60] 李承諺, "徒手掃描之三維超音波影像系統", 國立台灣大學電機工程學研究所碩士論文, 民國九十一年.
- [61] 袁昂, "非小細胞肺癌血管新生之研究", 國立臺灣大學醫學院臨床醫學研究所博士論文, 民國九十年.
- [62] 袁昂, "血管內皮生長因子對肺癌血管新生之影響", 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告, 民國八十七年.
- [63] D. S. Zrnic and R. J. Doviak, "**Effective Antenna Pattern of Scanning Radars**", *IEEE Trans. on Aerospace and Electronic System*, Vol. 12, pp. 551-555, 1976.
- [64] H. Torp, K. Kristoffersen, B. A. J. Angelsen, "**Autocorrelation Techniques in Color Flow Imaging: Signal Model and Statistical Properties of Autocorrelation Estimates**", *IEEE Trans. on Ultrasound, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 41, No. 5, Sep. 1994.