

國立台灣大學 電機工程學研究所

碩士論文

指導教授：李百祺教授

高頻超音波血流成像

High Frequency Ultrasonic Flow Imaging

研究生：李承翰

中華民國九十四年六月



致謝

回首兩年的碩士班生涯，在一次一次的實驗中，伴隨著一篇一篇進度報告的產生，累積了約一百篇的進度報告之後，轉眼間這個階段即將告一段落。這段日子以來在專業領域上著實成長了不少，也了解到一個研究成果，是需要許多人的幫忙與扶持下才能順利誕生的，在此感謝這一路上曾經幫助我的每一份子。

首先要感謝的是李百祺老師，老師豐沛的學識涵養與為人師表的身教最令我們折服，無論是在專業知識的教導，或是為學處事的方法與態度上，都讓我獲益良多。無論是在過去的研究工作，或是未來踏入社會之後，這些學習到的收穫都讓我受用無窮。此外，也非常感謝何佳安老師，在研究工作上給我寶貴的協助與建議。

實驗上最要感謝的是愛禾與建宏的幫忙，有了你們的幫助我才可順利完成許多的實驗。此外，許多的學長姐，諸如維中、彥甫、維寧、郭翰、夢麟、聖文、超康、耿璽、哲州、秩光、東格與葉醫師，在研究工作上都給了我許多的指導建議與協助，讓我深深的感受在此間實驗室做研究是多麼的幸福阿~ 小咪、振瑋、俊延、珣力、坤翰、慧敏以及其他學弟妹們，有了你們的陪伴，給了我許多有形與無形的支持與鼓勵，都豐富了我這兩年的研究生生活，謝謝你們。

最後要感謝我的父母，自幼及長一路的照顧與培育我，使我能無後顧之後的接受挑戰，追求自己想要的一片天。如果我今日能有些許的成就，些許的榮耀，些許的能力，都要歸功於你們的栽培與支持。雅珮，謝謝你這四年多來的陪伴與關懷，讓我在台大奮鬥的日子不至於孤單。僅將此篇論文呈獻給我摯愛的每一個人。

李承翰 謹誌於

台大電機工程研究所 303 實驗室

中華民國九十四年六月



摘要

在人類疾病研究、基因體研究、藥物發展等生物醫學研究上，常使用以老鼠或是其他小動物的動物模型，因此若能有一套高解析度、高靈敏度以及非侵入式小動物成像系統，可提供上述研究領域很大的幫助，並減少對實驗動物的犧牲與傷害。高頻超音波成像系統 (>20 MHz) 由於有較高的空間解析度以及流速解析度，使我們能即時觀察小動物體內微細的組織與血流情況。在高頻超音波血流成像方面，偵測緩慢血流時會遇到一些問題。目前高頻超音波掃描的方式，是將單一固定聚焦的探頭以馬達帶動來做機械式的掃瞄，此種掃掠式掃瞄方式容易造成緩慢血流信號與組織信號發生混疊的情況，進而造成彩色都卜勒成像中血流流速估計的誤差。此外，由於微細血管內血流的超音波散射信號十分微弱，因此在血流成像上難以獲得較高的訊雜比。本研究的目標在於進一步改進小動物血流成像，期望提升系統偵測緩慢血流速度的能力，以及提高偵測微小血管的靈敏度。為了提升彩色都卜勒成像對於微細緩慢血流的偵測能力，我們針對掃描方式以及信號處理方面來做探討。掃掠式掃瞄可分為「分段掃掠式掃描」與「連續掃掠式掃描」兩種方式，為了能有效區分緩慢血流信號與組織信號，以利緩慢血流流速的估計，我們最後選擇使用低掃描速度 (2mm/sec) 的連續掃掠式掃描，使我們能在彩色都卜勒影像上偵測到流速 5mm/sec 以下的微血管。在對比劑成像方面，使用對比劑可增加血流成像的訊雜比，對比劑非線性成像技術可進一步提升偵測血流的靈敏度。我們採用自製的微脂體來當作高頻對比劑，此對比劑可由製程控制微氣泡的尺寸大小，使微氣泡的共振頻率接近高頻超音波的頻率範圍(20MHz~50MHz)。此外，利用微氣泡對正、負聲壓的非線性響應，我們使用脈衝反相基頻成像技術來壓制組織信號而留下微氣泡信號，以提升血流與組織在影像上的對比度以及增加偵測血流的靈敏度。體外的仿體實驗結果顯示，氣泡直徑大小 1 μ m 的微脂體在高

頻超音波(25~50MHz)下可有效增強流體信號。使用脈衝反相基頻成像技術可成功壓制組織信號，與傳統的基頻成像比較，當發射信號為頻率範圍 25~50MHz 的十個週期正弦波時，脈衝反相基頻成像可提升流體與組織的對比度 7~18 dB，隨著發射信號週期數的提升，其對比度提升效果越佳。在活體實驗部份，我們發現微脂體微氣泡在血液中會發生破裂的現象，無法有效增強血流散射信號，微氣泡在血液中球殼內外部的滲透壓不等可能是造成微氣泡破裂的原因之一，針對此問題我們必須改變微氣泡內部的滲透壓，期望能將對比劑成功應用在小動物血流成像上，以達到提升血流偵測靈敏度的目的。

關鍵詞：高頻超音波、小動物影像、都卜勒超音波、掃掠式掃描、對比劑成像、微脂體、脈衝反相基頻成像。



Abstract

Small animal models have been used extensively in disease research, genomics research, drug development, and developmental biology. A non-invasive, small animal imaging system with high spatial resolution and high sensitivity is beneficial to the above-mentioned research. With such a system, the need to sacrifice animals can be reduced. The high frequency ultrasound imaging system (>20MHz) is ideal for such applications. However, one of the major limitations is the ability to detect slow and weak flows. A mechanical swept-scan technique is adopted in our study, but the continuous movement of the transducer during data acquisition also potentially causes ambiguities in the Doppler spectrum. In addition, it is difficult to obtain high signal-to-noise ratio in this case due to weak backscattering in micro circulation. Therefore, the main goal of this study is to improve the high frequency ultrasonic flow imaging on small animals in both areas. First, the scanning technique and signal processing on color Doppler imaging for improvement of slow flow estimation is discussed. The swept-scan technique includes “block swept-scan” and “continuous swept-scan”. Continuous swept-scan with slow scanning velocity (2mm/sec) is found to be desired for slow flow slower than 5mm/sec. On the other hand, contrast agents are used to enhance the signal-to-noise ratio and develop non-linear imaging methods. Liposome micro-bubbles are made in-house as the high frequency ultrasonic contrast agent. Based on *in vitro* results, it is shown that liposome bubbles can enhance the back-scattering signals in flow region at high frequencies (20~50MHz). The pulse-inversion based fundamental imaging technique is also tested to improve the contrast-to-tissue ratio. Compared to fundamental imaging, the contrast-to-tissue ratio can be improved by 7~18dB. For the *in-vivo* experiments, on the other hand, the

liposome bubble appears to break in the blood. So the contrast imaging of small animal is not as effective. The osmosis pressure is considered to be the major problem, and improving the effectiveness for in vivo flow imaging will be the primary future work of this research.

Key words : High frequency ultrasound, Small animal imaging, Doppler ultrasound, Swept-scan, Contrast imaging, Liposome, Pulse-inversion based fundamental imaging.



目錄

第一章 緒論.....	1
1.1 高頻超音波影像系統.....	1
1.2 高頻超音波在小動物影像及血流量測的應用	1
1.3 高頻超音波在血流成像的限制.....	2
1.4 高頻對比劑.....	4
1.5 研究動機與目標.....	5
1.6 論文架構.....	6
第二章 傳統彩色都卜勒成像的限制	8
2.1 都卜勒效應.....	8
2.2 超音波血流信號取樣方式.....	10
2.3 都卜勒血流成像之處理流程.....	12
2.4 掃掠式掃瞄技術.....	14
2.5 組織頻寬增寬效應.....	18
2.6 雜波高通濾波器.....	22
2.7 高頻系統硬體架構.....	26
2.8 實驗結果.....	30
第三章 對比劑成像	34
3.1 超音波對比劑.....	34
3.1.1 對比劑的應用	34
3.1.2 微氣泡的物理特性.....	35
3.2 非線性成像.....	36
3.2.1 非線性響應.....	36
3.2.2 諧波成像.....	37
3.2.3 脈衝反相基頻成像	38
3.3 高頻對比劑成像.....	40

3.3.1 對比劑應用在高頻超音波的問題	41
3.3.2 高頻對比劑.....	41
3.3.3 高頻超音波下的非線性響應	42
第四章 對比劑實驗結果	45
4.1 實驗設定.....	45
4.2 微脂體微氣泡的散射特性.....	46
4.2.1 微氣泡尺寸的影響.....	47
4.2.2 微氣泡濃度的影響	48
4.3 脈衝反相基頻成像	50
4.3.1 對比劑仿體影像	52
4.3.2 微氣泡的頻率響應	58
4.3.3 與諧波成像的比較	60
4.3.4 組織移動的影響	61
4.4 活體實驗	64
第五章 結論與未來工作	69
5.1 結論.....	69
5.2 未來工作	70
5.2.1 都卜勒血流成像	71
5.2.2 對比劑成像	72
第六章 參考文獻	74

第一章 緒論

1.1 高頻超音波影像系統

超音波影像系統由於其非侵入式且可即時顯像的優點，在臨床診斷以及實驗研究上早已有廣泛的運用。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（>20 MHz）隨著頻率的上升，波長縮短，其空間解析度亦隨之提高，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 [1]-[2]，因此相當適合用來觀察較微細的組織結構。此外，以超音波來觀測血流速度時，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，由於高頻超音波擁有較高的空間解析度及流速解析度，適合用來觀察血管尺寸小（~50 到 100 μm ）、血液流速低（~0 到 50 mm/s）的微血管組織，因此可讓我們用來評估人體微細血管或是小動物體內的血流資訊。

1.2 高頻超音波在小動物影像及血流量測的應用

以老鼠及其他小動物為主的動物模型，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。由於老鼠在生理結構與基因組成上與人類有許多相似之處，常被研究人員用來做為替代人類實驗的模型，例如利用老鼠實驗模擬重現人類疾病以進行藥物研究。以癌症方面的研究為例，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）已被證實與血管新生有很高的相關性 [3]-[7]。當腫瘤一旦生長到尺寸超過 1~2 mm^3 ，即需要發展出微小血管之網路（microvessel network），以利將養份以及氧氣帶給腫瘤細胞，所以我們需要一個可用來觀測腫瘤微循環（microcirculation）的技術。目前在動物實驗中已可證實使用彩色都

卜勒影像可發現新生血管與正常血管具有不同的特性，不過現行的低頻超音波系統在空間解析度上仍顯不足，而具有高空間解析度及高流速解析度的高頻超音波系統正符合此項需求，使我們可以觀察到腫瘤內微循環的生長情況。此外，在老鼠基因相關研究中，高頻超音波影像系統也具有足夠的解析度來觀察基因變異鼠胚胎基因突變的影響，使我們可以非侵入式的影像方式觀察母鼠子宮中胚胎成長過程與血流資訊，以做為解剖學以及生理學之評估[8]-[10]。除了老鼠之外，由於斑馬魚在胚胎發育上的機制與哺乳動物非常相似，許多重要的調控蛋白質的表現位置與時間也都與哺乳動物相似，加上有易於繁殖，成長週期快速等優點，因此斑馬魚已成為研究癌症、心血管疾病、器官發育、脊椎動物胚胎發育、神經發育、細胞凋亡的重要模式，在藥物毒性的篩檢也扮演重要角色[46]。

目前每年約有超過五千萬隻老鼠應用在生物醫學研究上，因此對於小動物影像系統的需求也會有大量的成長，而高頻超音波系統可提供即時、高解析度、高靈敏度的影像，也能量測到血流相關資訊，使我們能以更人性化、更簡便的非侵入方式檢視老鼠及其他小動物，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，可提供研究者更多研究資訊並減少對動物的犧牲與傷害。

1.3 高頻超音波在血流成像的限制

目前在高頻超音波探頭的製作技術上，仍無商品化的高頻陣列探頭可供電子式掃描，因此目前我們高頻超音波系統的掃描方式，是以馬達掃描定位系統搭載一個單一固定聚焦的高頻探頭，使用馬達帶動探頭進行機械式的掃描，以取得二維的空間分佈資訊。當我們要計算血流參數時，必須在固定位置連續發射多次的超音波脈衝，如欲提升偵測流速解析度，則必須延長多次超音波脈衝的總取樣時間，因此若要獲得及時的二維血流分布資訊的話，以機械式掃描方式來移動固定

聚焦的單一探頭，在掃瞄時間上會有很大的限制。

從上述可知，高頻超音波系統在取得二維的血流資訊時，必須在同一位置發射多筆超音波脈衝後，將探頭移到下一個位置後繼續發射，此種走走停停的掃描方式相當耗時。我們為了取得即時的二維活體影像，採用國外研究所提出的掃掠式掃描 (swept-scan) 技術[16]，此種掃描方式是在探頭連續移動的同時發射超音波脈衝，以快速取得二維的流速資訊，由於相鄰的取樣體積有大幅重疊的現象，因此可將鄰近幾筆數據視為同一位置所取得的資訊，以用來計算血流速度。超音波估計血流速度的原理，是藉由偵測血流移動所產生的都卜勒效應，將偵測到的都卜勒頻率偏移換算為移動速度。掃掠式掃描可以快速取得二維的流速資訊，然而由於相鄰的取樣體積並沒有完全重合，對於血流計算會產生影響。由於探頭的橫向移動會造成時變的組織信號，進而造成都卜勒頻譜上組織信號頻譜增寬的現象，在頻譜上容易使得組織信號與緩慢流速的血流信號發生混疊情形，因此組織頻譜增寬效應限制了系統可偵測的最小流速。

此外，超音波系統在做血流流速計算之前，需要一個雜波高通濾波器 (即俗稱的 wall filter) 來濾除組織信號以留下血流信號。此高通濾波器主要是在超音波脈衝連續發射的時間軸方向進行濾波，由於組織以及血管管壁的移動較緩慢，而血流移動速度較快，因此在超音波脈衝連續發射時間軸方向的頻譜表現上，組織及血管管壁信號屬於較低頻的成分，而血流信號屬於較高頻的成分，因此在血流計算前需要一個高通濾波器來濾除低頻的組織信號。當我們欲偵測微細血管內的血流流速時，由於血流速度緩慢，與呼吸或身體移動的速度非常接近，因此兩個信號在頻譜上的位置也很接近，加上掃掠式掃描所帶來的頻譜增寬效應，會使得血流信號與組織信號更難以區隔，所以高通濾波器的效果就顯的更加重要，我們必須設計出一個擁有良好頻率響應的高通濾波器。此外，輸入濾波器的信號長度也是能否有效濾波的

考量之一，輸入信號過短會使得輸出信號受到濾波器的暫態響應影響嚴重，無法發揮其應有的濾波效果，因此，在超音波脈衝連續發射的時間軸方向的信號擷取上，也必須有足夠的長度來進行濾波。從上述可知，當我們欲偵測微細血管內的緩慢血流流速時，必須針對資料擷取方式、探頭掃描方式與 wall filter 濾波的效果加以考量，才能降低其他干擾而準確估計出血流流速。

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。此外，高頻超音波在成像上若空間解析度提升 10 倍，則取樣體積相較於低頻超音波小 1000 倍，因此取樣體積內的散射子較少，其散射強度相較於低頻也因此而較弱，所以高頻超音波影像較無法獲得高的訊雜比 (signal-to-noise ratio, SNR)。在血流成像上為了增加血流信號的散射強度，以提升偵測微細血流的靈敏度，使用超音波對比劑是必須的。

1.4 高頻對比劑

在超音波影像上為了提升影像品質，使用對比劑是一個有效的方法。超音波對比劑即為微氣泡，當微氣泡在流體中時，由於微氣泡氣體與週遭液體之間的聲抗 (acoustic impedance) 不匹配，會造成微氣泡對超音波的強烈回音，因此可以提升微氣泡灌注區的血流信號強度，以提升血流與組織在影像上的對比度，以及提高偵測血流的靈敏度。此外，由於微氣泡在聲波下會有非線性振盪的行為，所以我們可以藉由組織與微氣泡對於聲波的非線性響應差異，使用非線性成像技術降低組織信號強度，來進一步提升血流與組織信號的對比度，以提高影像上血流對於組織的對比亮度 (contrast-to-tissue ratio, CTR)，即為對比劑非線性成像的目的。在本研究中，我們採用脈衝反相基頻成

像的非線性成像技術。由於組織對於正、負聲壓的響應較為線性，而微氣泡對於正、負聲壓的響應是非線性的，因此若將正、負聲壓所得到的回波信號相加之後，可壓制組織信號並留下微氣泡信號，達到提升 CTR 的目的。在高頻超音波下使用此技術可提高系統偵測微小血管的靈敏度，使我們能觀察小動物體內微循環的現象。微氣泡在聲波下的散射強度與其共振頻率有關，當發射頻率接近微氣泡的共振頻率時，微氣泡的共振現象最明顯，此時的非線性響應也最大。因此，我們必須探討微氣泡在高頻超音波下的散射特性，使得對比劑非線性成像效果最佳。

當超音波進展到高频 (>20MHz) 以上，針對小動物影像開發系統時，傳統對比劑在應用上遇到了一些瓶頸，首先是現行商用對比劑尺寸較大，在進入小動物體內後容易結合成較大的團塊，造成小動物在肺及腎臟等部位血管的栓塞。第二是現有對比劑共振頻率較低 (2~3MHz)，無法有效應用在高频非線性影像上，我們需要進一步縮小對比劑氣泡的尺寸以提高共振頻率。第三是我們希望對比劑具有靶向性(targeting)，也就是對比劑微氣泡具有聚集並附著在特定組織的能力，除了可以有效觀察目標組織外，也可在氣泡內包覆藥物達到運送藥物的目的。因此，我們希望能找到一種尺寸較小，並可達到靶向性功能的對比劑微氣泡。在本研究中，我們使用微脂體 (liposome) 當做高频對比劑，其構造為以磷脂質雙層膜包覆的空氣泡。此種對比劑皆可由製程控制微氣泡的大小，使微氣泡的共振頻率落在高频超音波的範圍，並且可製作為具有靶向性功能的對比劑。

1.5 研究動機與目標

以老鼠及其他小動物為主的動物模型，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。高频超音波系統由於具備有高空間解析度與高流速解析度的優勢，很適合當作一套非侵入式的小動物影像系統，使我們能觀察小動物微細的組織結構與微細血管的微循環現

象。然而在高頻系統的都卜勒血流成像上，仍面臨許多的挑戰，在偵測低流速的緩慢血流方面，掃掠式掃描所帶來組織頻譜增寬效應會限制系統可偵測的最小流速。此外在都卜勒頻譜上，組織信號與流速緩慢的血流信號的頻率十分接近，用來濾除組織信號的 wall filter 是否能有效濾波會影響血流估算的正確性。在本研究中，我們希望能從掃描方式與信號處理兩方面來做探討與改善，以提升系統偵測緩慢流速的能力。

高頻超音波由於聲波頻率較高，傳遞的衰減效應也會較嚴重，因此在血流成像上難以獲得較高的訊雜比，所以我們希望能使用對比劑來增強血流的散射信號。並利用微氣泡對比劑的非線性響應來做非線性成像，以壓制組織信號而留下血流信號，進一步提高血流信號與組織信號的對比度，使系統偵測緩慢微細血流的靈敏度提升。相較於都卜勒血流成像，對比劑成像可使用非線性成像技術直接在 B-mode 影像上觀察血流，由於微細血管的流速緩慢，其都卜勒效應較不明顯，而對比劑成像可不受限於流速，使我們省去都卜勒成像過程中的演算法，直接在 B-mode 影像上觀察小動物體內的微氣泡灌注區。

因此，在本研究中，首先希望能改善高頻系統在都卜勒血流成像上對於緩慢血流的偵測能力，並找到一種適合用在小動物身上的高頻對比劑，藉著微氣泡對於聲波的非線性響應來達成非線性成像的目的，進一步提升血流信號與組織信號的對比度，以期在微小血管成像或是腫瘤微循環血流成像上提升靈敏度。本研究的最終目的在發展小動物分子影像，將具有靶向性功能的對比劑注射入小動物體內，使微氣泡聚集在腫瘤組織上，以脈衝反相基頻成像技術觀察腫瘤內部微血管增生的情況，以發展具有分子探測功能的小動物分子影像。

1.6 論文架構

本篇論文首先在第一章中簡介高頻超音波影像的應用，並闡述高

頻超音波在血流成像掃描所遭遇到的問題，以及提出對比劑在血流成像上的應用，而提出研究動機與目標。在第二章中，進一步闡述血流成像掃描中擷取資料與信號處理的方式。在都卜勒血流成像上，我們討論如何設定掃掠式掃描，才能使組織頻譜增寬效應降低，並使後端信號處理中的 wall filter 濾波效果最佳，以達到提升系統偵測微小緩慢血流能力的目的。在第三章中，首先介紹微氣泡對比劑在血流成像的應用，描述高頻對比劑的需求以及微氣泡的散射特性，並簡述各種對比劑非線性成像的方式，提出本研究主要所用的脈衝反相基頻成像技術。在第四章中，一開始簡述高頻系統的硬體架構與掃描設定，接著即為使用微脂體微氣泡對比劑的仿體實驗結果，包含散射特性、頻率響應與非線性響應的探討，並顯示出脈衝反相基頻成像的結果與討論。最後將本研究中各項結果做出歸納整理，提出在高頻超音波血流成像上的可進行的後續研究工作。第五章則列出相關的參考文獻。



第二章 傳統彩色都卜勒成像的限制

2.1 都卜勒效應

在超音波影像中，除了觀察組織結構的 B-mode 影像，此外還有觀察血流流速的彩色都卜勒影像 (color Doppler image)，以及觀察血流能量的能量都卜勒影像 (power Doppler image)。使用超音波量測血流流速的原理主要是利用都卜勒效應，藉由超音波探頭與血液之間相對運動所產生的都卜勒效應，可讓我們求得血流的方向、速度以及能量等血流資訊。

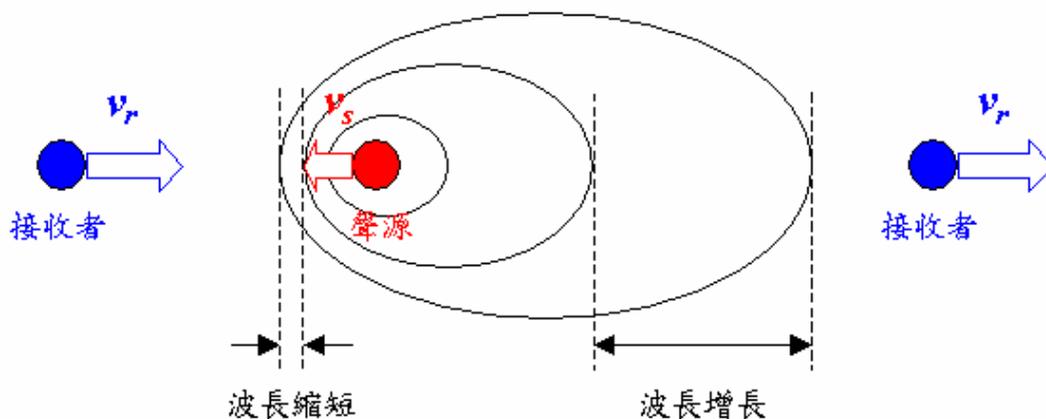


圖 2-1：都卜勒效應示意圖

如上圖 2-1，假設聲源的頻率為 $f_s = c / \lambda$ ，其中 c 為聲速， λ 為波長，當聲源與接收者皆靜止時，接收者所觀察到的聲波頻率也是 f_s 。然而當聲源與接收者之間有相對運動時，由於波長的變化 ($\lambda' = \lambda + \Delta\lambda$)，接收者所觀察到的頻率將會有所偏移 ($f_s' = c / \lambda'$)，此頻率偏移量 $f_d = f_s - f_s'$ 即為都卜勒頻率偏移 (Doppler frequency shift)。假設接收者的移動速度為 v_r ，聲源的移動速度為 v_s ，則都卜勒頻率偏移 f_d 如下所示：

$$f_d = f_s (v_r + v_s) / (c - v_s) \quad (\text{式 2-1})$$

在醫用超音波的應用上，我們使用探頭向血液發射聲波，再利用探頭所接收到血液的散射聲波估計都卜勒頻率偏移，以求出血液流速。因此在接收時可將血液視為聲源，探頭視為接收者。一般在人體內大部分的血流速度都在每秒 1 公尺以下，而聲波在血液中傳遞的速度約為每秒 1500 公尺，所以聲源的運動速度遠小於聲波的傳遞速度（即 $v_s \ll c$ ），因此式 2-1 可簡化為：

$$f_d \approx f_s(v_r + v_s)/c \quad (\text{式 2-2})$$

由式 2-2 可知在醫用超音波的應用上，都卜勒頻率偏移只跟聲源與接收者的相對速度 $v_r + v_s$ 有關。血液中主要成分為紅血球、白血球與血小板，其中以紅血球所佔的數量最多，因此血液中造成聲波散射的主要成分是紅血球。假設我們考慮超音波探頭與血管的空間位置如下：

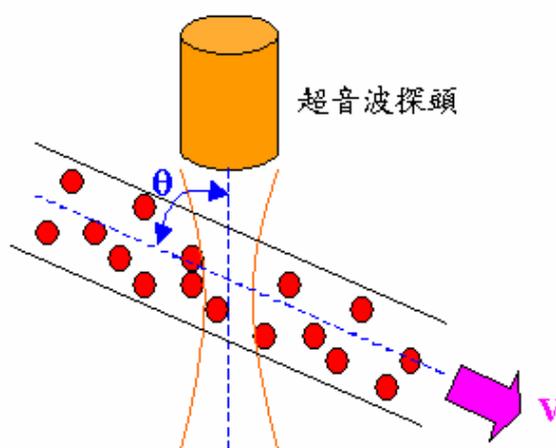


圖 2-2：探頭與血管示意圖

那麼我們可將式 2-2 的都卜勒頻率偏移 f_d 改寫為：

$$f_d = \left(\frac{2vf_s}{c} \right) \cos \theta \quad (\text{式 2-3})$$

其中 v 為血液流速， c 為聲波傳遞速度， f_s 是探頭髮射聲波的原始頻率， θ 是血流方向與超音波波束的夾角，我們稱為都卜勒角 (Doppler angle)。由於都卜勒效應在探頭髮射聲波與接收聲波時都會產生，因此造成的都卜勒頻率偏移會加倍。由式 2-3 可知當血流速度在軸向上有速度分量 $v \cos \theta$ 時，才會造成都卜勒頻率偏移 f_d ，因此由都卜勒效應所量測出流速皆為血流在軸向上的速度，即為與超音波傳遞平行方向上的速度。

2.2 超音波血流信號取樣方式

當我們使用超音波來量測血液流動資訊時，必須在同一個位置上連續重複發射超音波脈衝，再移到下一個位置重複發射，以計算在每個位置上的血流參數。

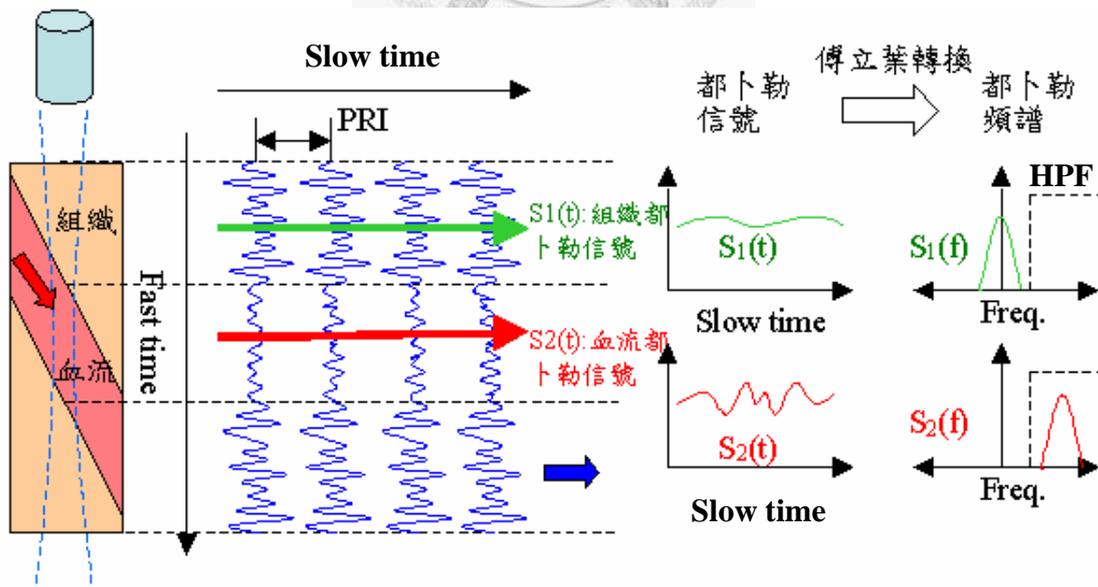


圖 2-3 超音波血流信號取樣示意圖

如上圖 2-3 所示，假設探頭在此位置連續發射多筆超音波脈衝，

得到多筆的組織與血流散射信號，我們將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)。接著定義兩個時間軸方向，延著超音波傳遞方向的時間軸，此方向上超音波系統使用類比數位轉換器 (analog-to-digital converter, ADC) 來對反射信號取樣，稱為 fast time 方向。而超音波連續發射多次脈衝的時間軸，此方向是以脈衝重複頻率 (PRF) 來對影像物體做取樣，稱為 slow time 方向。

參考圖 2-3，在多筆組織與血流的散射信號中，如果我們在某個深度沿著 slow time 方向對多筆信號取樣，可得取樣率為 PRF 的都卜勒信號 (Doppler signal)，將此信號做傅立葉轉換 (Fourier transform) 可得都卜勒頻譜 (Doppler spectrum)，而都卜勒頻譜上的頻率成份即為都卜勒頻率偏移。因此在圖 2-4 中如果我們取組織區域的都卜勒信號 $S_1(t)$ ，由於組織移動速度緩慢，所以變化較小的組織都卜勒信號在都卜勒頻譜上是屬於低頻的成分 $S_1(f)$ ；相對的如果我們取血流區域的都卜勒信號 $S_2(t)$ ，由於血流的移動速度較快，所以變化較大的血流都卜勒信號在都卜勒頻譜上是屬於高頻的成分 $S_2(f)$ 。在做流速估計前，我們希望能壓制組織信號，留下血流信號，以便做正確的血流參數計算，因此會在 slow time 方向使用一個雜波高通濾波器 (clutter filter)，即為俗稱的 wall filter，此為一個高通濾波器，如此就可將移動較慢的低頻組織信號與血管管壁信號濾除。

在偵測血流速度時，同一位置上的脈衝重複頻率 (PRF) 與最大可偵測速度有關。脈衝重複頻率 (PRF) 即為都卜勒信號的取樣頻率，因此從 Nyquist Criterion 可以推導出，在都卜勒頻譜不發生訊號混疊 (aliasing) 的前提下，使用超音波都卜勒效應可量測到的最高流速為 $V_{\max} = \lambda / (4 \cdot \text{PRI})$ 。因此為了提高流速解析度，使量測速度範圍更符合微細血管的流速，我們會選擇較大的脈衝重複時間 (PRI)。

2.3 都卜勒血流成像之處理流程

在超音波血流成像中，從探頭所擷取到的信號，會經過下列的信號處理程序，以求得血流參數[13]-[14]。

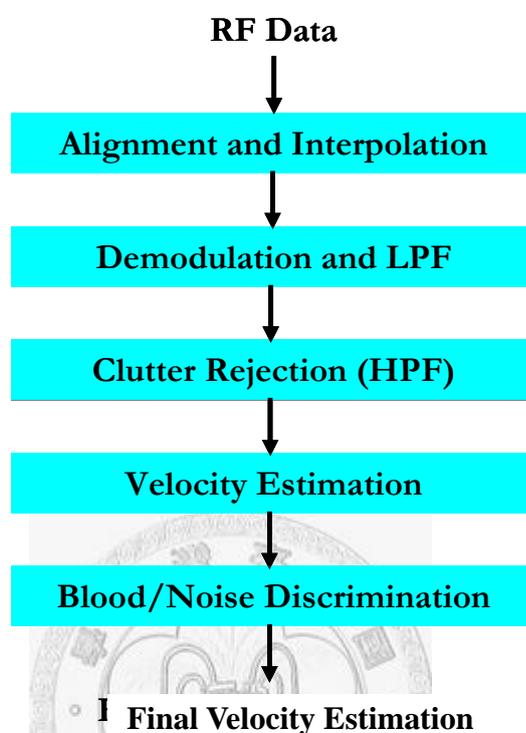


圖 2-4：超音波計算血流參數之流程

首先探頭所接收到的原始射頻信號資料 (RF data) 需先經過時序對齊與內插的動作，時序對齊為了修正接收端與發射端電路不同步啟動 (jitter effect) 所造成的誤差，而內插是為了增加取樣頻率，以提升計算可得的流速解析度。接著將信號解調 (demodulation) 降為基頻 (baseband) 信號後，沿著影像深度方向進行低通濾波，以消除發射頻帶外的高頻雜訊，降低雜訊對流速計算的影響。clutter rejection 是指在超音波脈衝連續多次發射的時間軸方向上，使用一個雜波高通濾波器來濾除低頻的組織與血管管壁信號，以留下高頻的血流信號，再進行下一步的流速估計。使用各種演算法所求出來的流速估計值，必須再經過一些閾值調整，才能區分出真正的血流信號與其他組織或雜訊信號，以準確的顯示出血流參數。

從上述的信號處理步驟得到血流參數後，即可進行血流成像。超音波血流成像最常使用的兩種影像格式為彩色都卜勒影像（color Doppler image）以及能量都卜勒影像（power Doppler image），以下針對此兩種影像格式分別說明。

彩色都卜勒影像（color Doppler imaging）

從都卜勒效應中我們可以求得血流流速，彩色都卜勒影像就是將血流流速用顏色表示在 B-mode 影像的血流區域上，B-mode 影像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，可定性的分析組織結構。在彩色都卜勒影像中，我們將兩種不同的血流方向（朝向探頭方向與遠離探頭方向）使用兩種不同的顏色表示，將血流速度大小用顏色深度變化所表示。所以從彩色都卜勒影像中，我們可以觀察到血流的流速與方向，有助於評估心臟以及重要血管的血流分佈、血管構造等問題。

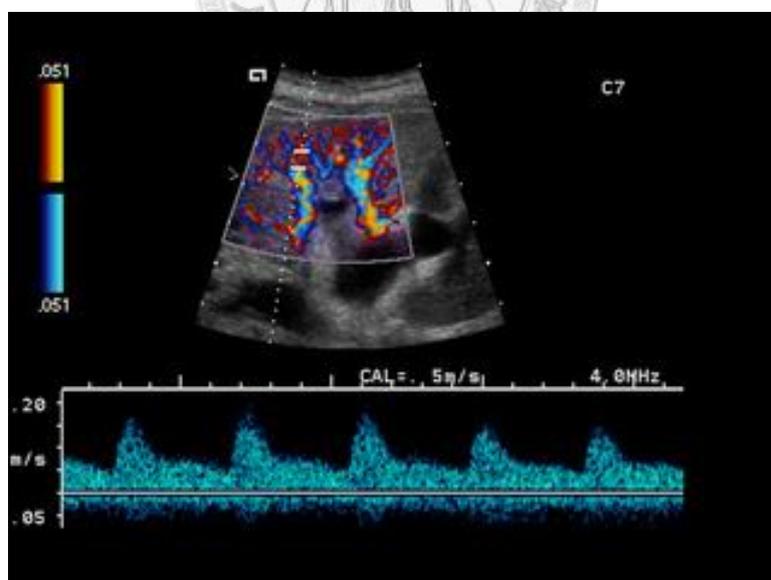


圖 2-5：商用超音波系統（SIEMENS Medical）中所顯示的腎臟血管彩色都卜勒影像[15]

能量都卜勒影像 (power Doppler imaging)

能量都卜勒影像是將血流信號的能量大小用顏色深淺表示出來。由於是考慮血流都卜勒信號在功率頻譜上的總面積，可避免因為頻譜左右對稱而造成平均流速值等於零的情況，因此能量都卜勒影像適用於不考慮血流方向的檢查，對於低流速的血管有較好的顯像能力。例，可應用在偵測血管的存在與否或是組織器官的灌流情況，有助於血流動力學 (hemodynamics) 研究、心血管疾病診斷以及腫瘤血管新生 (angiogenesis) 的評估。



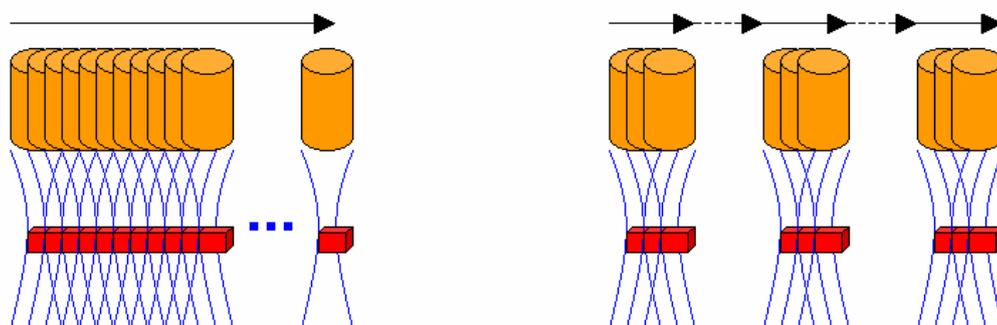
圖 2-6：商用超音波系統 (SIEMENS Medical) 中使用能量都卜勒模式所顯示的腎臟血管影像[15]

2.4 掃略式掃描技術

目前商用的低頻超音波成像系統中，超音波探頭皆為陣列探頭，因此在進行掃描時可做動態聚焦與電子式掃描，能即時的把視線範圍內的反射信號排列轉換為二維的超音波影像。然而由於探頭製作技術以及壓電材料的限制，目前尚無中心頻率超過 20 MHz 以上的商用高頻陣列探頭，因此必須以單一固定聚焦的探頭以馬達帶動做機械式的掃描，以取得到二維的空間分佈資訊。

從本章 2-2 節的敘述可知，若要進行都卜勒血流成像，以機械式掃描方式取二維的血流資料時，則探頭必須停在同一個位置重複連續發射超音波脈衝後，再將探頭移到下一個位置重複發射，以求出每個位置的血流參數。如此走走停停的步進式掃描方式非常耗時，因此國外有研究提出掃略式掃描 (swept-scan) 的技術[16]，此種掃描方式就是在探頭連續移動的同時連續發射超音波脈衝，以快速獲得二維的血流資訊，由於相鄰發射波束的取樣體積有大幅重疊的現象，在橫向範圍可得到空間的過取樣 (over sampling)，因此我們可將鄰近幾筆高度相關性的反射信號視為同一位置上的反射信號，以進行血流速度的估計。使用掃略式掃描可讓我們省去步進式掃描的馬達控制時間，以快速取得二維的血流速度資訊。

掃描方式：



二維取樣資料：

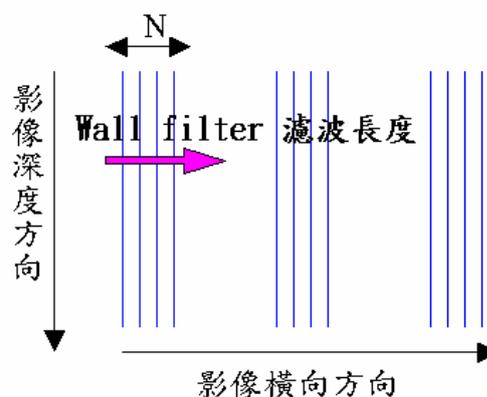
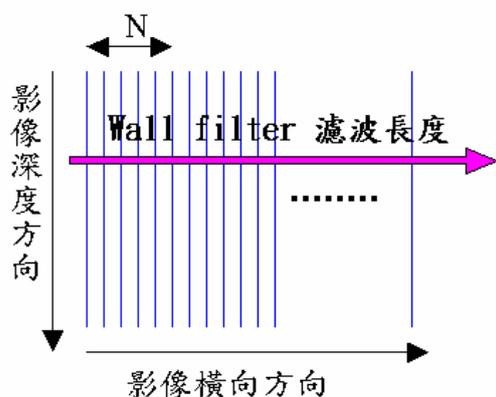


圖 2-7：連續掃掠式掃描。

(Continuous swept-scan)

圖 2-8：分段掃掠式掃描

(Block swept-scan)

在此我們將掃略式掃描分為連續掃掠式掃描(Continuous swept-scan)以及分段掃掠式掃描(Block swept-scan)，圖 2-7 以及圖 2-8 分別為兩種掃描的掃描方式以及所取得的二維資料格式圖示。此兩種掃掠式掃描的差異之處只在於發射超音波脈衝的時序安排上，以下針對此兩種方式分別進行說明。

連續掃掠式掃描

如圖 2-7 所示，連續掃掠式掃描即從頭到尾皆以等間距密集的連續發射進行掃描，此種方式的優點在於所有相鄰的波束取樣區域皆有大幅重疊的現象，可圈選取樣體積密集重疊的相鄰 N 筆反射信號視為同一位置上的取樣以進行血流計算，在彩色都卜勒影像的血流速度表示上可有較密集的橫向解析度。用來計算血流參數的 N 筆反射信號必須有所限制，因為此 N 筆超音波發射波束取樣體積必須有一定程度的重疊，才可視為在同一個位置上的取樣，通常我們假設兩筆超音波波束的橫向位移間距若小於單一波束其聚焦點處 FWHM (full width of ultrasound beam at half maximum) 的一半的話，那即可視為同一個位置上的取樣。舉例來說，假設探頭發射中心頻率為 50MHz 的超音波訊號時，其聚焦點的橫向波束寬度 (FWHM) 為 $60\mu\text{m}$ ，當每兩筆超音波波束的位移為 $2\mu\text{m}$ 時，可得知第 1 筆與最後 1 筆發射波束的橫向最大間距為 $30\mu\text{m}$ ，所以在連續掃掠式掃描時可取相鄰的 15 筆反射信號視為同一位置上的取樣以進行血流計算。

此外，連續掃描方式所取得的二維資料中，所有的反射信號在影像橫向的 slow time 時間軸上皆有相關性，因此在血流成像處理 (圖 2-4) 的 clutter rejection 步驟中，在 slow time 上使用 wall filter 濾波時，可取整張影像的所有信號進行濾波[17]，如此輸入信號長度夠大，幾乎不會受到濾波器暫態響應的影響，可得到較好的濾波效果。然而在實際應用上，由於擷取資料的 ADC 介面上記憶體大小的限制，連續掃掠式掃描如此密集的擷取資料很快就會用完的所有的記憶體空

間，因此不能取得較大空間範圍的流速資訊，此為連續掃掠式掃描的缺點。

分段掃掠式掃描

如圖 2-8 所示，分段掃掠式掃描是在相鄰區域密集的發射 N 次超音波脈衝後，暫時停止發射接收，等探頭移動一段較長距離後在重複密集發射的過程，以鄰近的 N 筆取樣做此位置的血流計算。此種掃描方式在擷取資料上較不密集，所以可以減少類比數位轉換器（analog-to-digital converter, ADC）的記憶體使用量，使得探頭橫向移動的總距離較大，可取得較大範圍的流速資訊。如同在連續掃掠式掃描中的敘述，此 N 筆超音波發射波束取樣體積必須有一定程度的重疊，才可視為在同一個位置上的取樣，在單一波束其聚焦點處 FWHM 一半寬度的限制下，當發射頻率為 50MHz 時，假設兩筆超音波波束的位移為 $2\mu\text{m}$ ，則在分段掃掠式掃描中的同一群的超音波脈衝發射總次數最多可為 15 筆。

在分段掃掠式掃描中，只有同一群鄰近的 15 筆反射信號在 slow time 方向有相關性，因此在都卜勒血流成像的處理步驟中，使用 wall filter 在 slow time 上進行濾波時，輸入濾波器的信號長度只有 15 點，容易受到濾波器暫態響應的影響，而使得濾波效果不佳，在頻率響應上難以有陡峭的轉移帶（transition band）來區分組織信號與血流信號，無法有效壓制組織與血管管壁的信號，因此在後續的血流流速估計上容易產生誤差。

從以上兩種掃掠式掃描的比較可得知，連續掃掠式掃描無法取得較大範圍的二維血流資訊，但在 wall filter 的應用上可以有較佳的濾波結果；而分段掃掠式掃描可以有較大範圍的二維血流資訊，但在 wall filter 的應用上會使得濾波效果不佳，我們必須在其中做一個取捨。在高頻超音波系統中，由於我們想要觀察到流速緩慢的微小血流資訊，當血流速度緩慢時，都卜勒頻譜上血流信號與組織信號的頻率

位置會十分接近，因此如何有效壓制組織信號，並且完整保留血流信號，是一個關鍵性的問題，此高通濾波器除了截止頻率要善加選擇外，還必須有夠陡峭的轉移帶，才能符合此濾波器其頻率響應的需求。因此我們選擇連續掃掠式掃描，這樣一來雖然掃描範圍較小，但能得到較好的 wall filter 濾波效果，所以能有效壓制組織信號並保留完整的緩慢血流資訊，使後續的血流參數估計較準確。至於掃描範圍較小的缺點，只要將 ADC 介面的記憶體容量擴充即可得到改善。

2.5 組織頻寬增寬效應[17]-[18]

當使用掃掠式掃描法擷取流速資訊時，探頭與組織之間有相對的橫向移動，使得組織經過超音波波束時有一個有限的轉移時間，此時變的反射信號會造成都卜勒頻譜上組織信號頻寬增寬效應（tissue spectral broadening），如此一來在都卜勒頻譜上，血流信號與組織信號發生重疊的可能性提升，會降低 wall filter 在 slow time 上濾除組織信號的效果，系統可偵測到的最低血流速度因此而受限。由以上敘述可知組織頻寬增寬效應對於低流速的血流偵測影響甚巨，以下我們分析組織頻寬增寬效應的原因以求降低其所造成的不良影響。

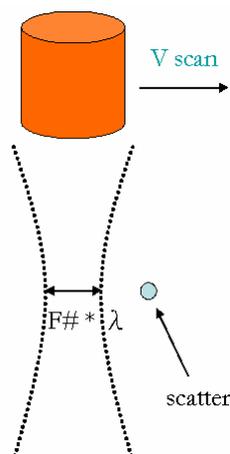


圖 2-9：組織頻寬增寬效應的探討，假設探頭以 V_{scan} 的橫向掃描速度掃描過一個單一散射子，聲波橫向波束寬度為 $F\#\lambda$ 。

如圖 2-9，我們簡化掃描物為單一散射子以方便說明，假設探頭以 V_{scan} 的橫向速度掃描過去靜止的單一散射子，探頭聲波強度在 -6dB

以上的橫向波束寬度 R_{lat} (FWHM) 定義如下:

$$R_{lat} \approx \frac{\lambda \cdot L}{D} = F\# \cdot \lambda \quad (\text{式 2-4})$$

其中 λ 為超音波波長, L 為聚焦深度 (focal length), D 為超音波探頭的孔徑大小 (aperture diameter), 而 L / D 即定義為 $F\#$ (F number)。

因此我們可以推得散射體橫切過超音波波束的轉移時間 $T_{tran.}$ 如下:

$$T_{tran.} = \frac{F\# \cdot \lambda}{V_{scan}} \quad (\text{式 2-5})$$

如圖 2-10 所示, 假設探頭髮射信號為單一頻率的連續波, 則超音波在發射與接收往返間的橫向波束強度分布為 sinc 函數的平方, 此強度變化即為單一散射子通過橫向波束後, 在 slow time 方向上的都卜勒訊號強度變化。我們將都卜勒信號做傅立葉轉換可得到都卜勒頻譜, 所以此強度變化為 sinc 函數平方的都卜勒信號, 做傅立葉轉換後在都卜勒頻譜上可得三角形的頻譜強度分布。從傅立葉轉換的關係可知, 頻譜的最大頻率 F_{max} 即為轉移時間 $T_{tran.}$ 的倒數。

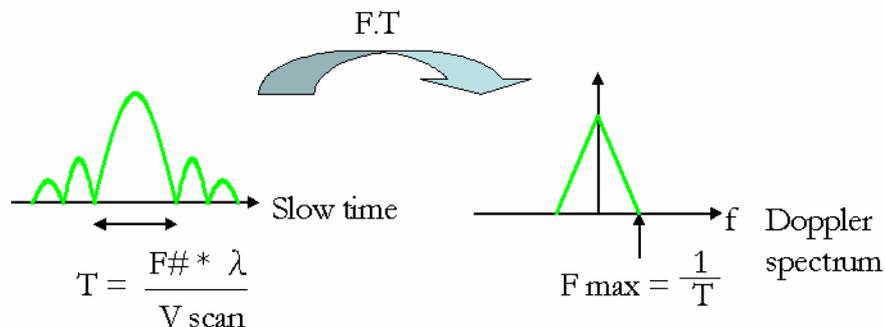


圖 2-10: 探頭以 V_{scan} 掃描過單一散射子後, 其都卜勒信號以及都卜勒頻譜。

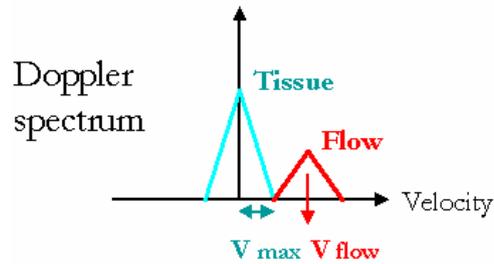
從都卜勒效應中的都卜勒方程式(式 2-3),可推得此最大頻率 F_{\max} 所對應的最大速度 V_{\max} 如下:

$$F_{\max} = \frac{2 \cdot V_{\max}}{\lambda} \quad (\text{式 2-6})$$

結合式 2-5、式 2-6 可得關係式 2-7 如下:

$$V_{\max} = \frac{V_{scan}}{2 \cdot F\#} \quad (\text{式 2-7})$$

由式 2-7 我們可知,若以橫向掃描速度 V_{scan} 掃描一靜止物體,由於頻寬增寬效應,仍會造成一最大可能速度 V_{\max} 。組織頻寬增寬效應會與探頭的橫向掃描速度 (V_{scan}) 成正比,而與超音波橫向波束的寬度 ($R_{lat} = F\# \cdot \lambda$) 成反比。上式中的數學推導是在發射波型為單一頻率的連續波假設下,而實際應用上我們所發射的波型為寬頻的脈衝波,因此在 slow time 上的都卜勒信號強度分布為每個頻率成分的加總效應,然而都卜勒信號的轉移時間與都卜勒頻譜的最大頻率成分的反比關係仍然成立,所以我們可以用式 2-7 做一個概略性的說明。在偵測緩慢血流時,由於低流速血流信號落在都卜勒頻譜較偏低頻的區域,倘若組織頻寬增寬的範圍涵蓋到血流信號頻譜,在以 wall filter 濾除組織信號時連帶會濾除掉部分的血流信號,而造成流速估計的誤判。由以上的敘述我們知道,頻寬增寬效應會限制了掃略式掃描所能偵測的最低血流流速,因此為了降低最低可偵測流速,我們必須設法降低頻寬增寬效應。從式 2-7 中可知若要降低頻寬增寬效應所造成的最大可能速度 V_{\max} ,則必須降低掃描速度 V_{scan} 或是增加 $F\#$,然而單一聚焦高頻探頭的 $F\#$ 是無法改變的,因此我們唯一可行的作法就是降低探頭的橫向掃描速度。



$$V_{flow} = 2 * V_{max} = 2 * \frac{V_{scan}}{4}$$

圖 2-11：都卜勒頻譜，其頻率軸已經換算為對應速度，在不發生組織與血流頻譜重疊的情況下，假設掃描速度為 V_{scan} ，組織無移動而血流軸向速度為 V_{flow} 。

接著討論最低可偵測流速與橫向掃描速度的關係，假設我們使用 $F\# = 2$ 的單一聚焦探頭，代入式 2-7 可知頻寬增寬效應對應的最大速度 V_{max} 為掃描速度 V_{scan} 的四分之一。參考圖 2-11，假設組織為靜止的物體，而血流的軸向速度為 V_{flow} ，無橫向速度分量，那麼上述的頻寬增寬效應會使得都卜勒頻譜上血流信號與組織信號有相同大小的頻寬。從圖 2-11 的都卜勒頻譜上我們可知，在完全不發生血流信號頻譜與組織信號頻譜重疊的情況下，可允許的最大掃描速度 V_{scan} 為血流速度 V_{flow} 的兩倍，這時候的血流流速 V_{flow} 即為最低可偵測流速。然而以上的敘述皆建立在組織與血流皆無橫向速度的假設上，在式 2-7 中的 V_{scan} 可視為是物體與探頭之間的相對橫向速度，倘若組織或是血流本身有橫向速度存在的話，會使得橫向相對速度 V_{scan} 變大或變小，頻寬增寬的程度也會隨之變寬或變窄，所以圖 2-11 中頻譜的頻寬也會有些許的改變。

從以上的敘述中我們可以知道，以高頻超音波系統欲觀察緩慢血流時，若要降低最低可偵測流速，則必須限制探頭的橫向掃描速度，以避免組織頻寬增寬效應造成都卜勒頻譜上組織信號與血流信號的重疊。在組織為靜止，而血流只有軸向速度的假設情況下，如欲組織

信號與血流信號在都卜勒頻譜上完全無信號混疊，那麼探頭的橫向掃描速度就必須小於最低可偵測流速的兩倍。

在活體實驗中，為了降低組織頻寬增寬效應，而降低探頭的橫向掃描速度，帶來的問題是會增長取一張影像的掃描時間，使得顯像速率（frame rate）下降。在即時（real time）成像系統中，顯像速率下降將會使得系統無法觀察到變化速率較快的移動，並且有可能會因為組織移動而造成組織影像變形的問題。

從 2-4 與 2-5 節的討論可知，我們為了使系統能偵測緩慢血流速度，在掃描方式上必須選擇掃描速度低的連續掃掠式掃描。降低橫向掃描速度可降低組織頻寬增寬效應的影響，使得都卜勒頻譜上血流信號與組織信號不發生混疊；而連續掃掠式掃描可使得 slow time 方向有足夠長度的信號進行 wall filter 的濾波，以有效壓制組織信號，完整保留血流信號。

2-6 雜波高通濾波器

在使用各種演算法估計流速前，我們必須在 slow time 方向使用一個雜波高通濾波器（另稱 wall filter）進行濾波，以壓制移動緩慢的低頻組織信號，並留下移動較快速的高頻血流信號。在高頻超音波血流成像的應用上，由於我們想要偵測微細血管內緩慢的血流速度，因此都卜勒頻譜上血流信號與組織信號的中心頻率位置十分接近，加上機械式掃描所帶來的組織頻寬變寬效應，會使得都卜勒頻譜上組織信號與血流信號的頻寬增大，更容易發生頻譜混疊的情況，所以高頻超音波系統中 wall filter 的設計更顯的重要，此高通濾波器在強度的頻率響應上必須選擇正確的截止頻率（cut-off frequency）以及陡峭的轉移帶，才能有效壓制組織信號並留下大部分的血流信號[19]。

從 2-4 節的討論中，我們選擇了連續掃掠式掃描的方式，因此整

張影像在 slow time 方向上，相鄰的取樣皆有高度相關性，所以 wall filter 可沿著整張影像上的 slow time 方向上進行濾波，由於濾波信號長度夠長，輸出信號通過濾波器時的暫態響應影響極低，因此在濾波器的設計上我們只需考慮穩態頻率響應即可。

在 wall filter 的選擇上，倘若使用有限脈衝響應濾波器 (Finite impulse response filter, FIR filter)，其濾波器階數必須非常高才能有陡峭的轉移帶，高階數代表濾波器的脈衝響應較長，假設一個 N 階的有限脈衝響應濾波器，其脈衝響應長度即為 $N+1$ 點。在連續掃掠式掃描中，slow time 上經過 PRF 取樣的離散都卜勒信號，其每一點在空間上都有些許的位移，假設超音波在聚焦點的橫向波束寬度內有 M 點的都卜勒信號，那麼一個 N 階的 wall filter 的脈衝響應長度點數 $N+1$ 必須小於 M ，以避免將非取樣體積內的信號包含入濾波器的運算而造成有誤差的濾波結果。所以倘若使用有限脈衝響應濾波器當作 wall filter，其濾波器階數會有一定的限制，在強度的頻率響應上較無法得到陡峭的轉移帶。

因此在低階數下即有陡峭轉移帶的無限脈衝響應濾波器 (infinite impulse response filter, IIR filter) 較符合我們在 wall filter 的需求，在此選用五階的第一形式柴彼雪夫高通濾波器 (type I Chebyshev High Pass Filter) 來做 wall filter 的使用，關於高通濾波器截止頻率的選擇，則須介於在最大組織信號頻率及最小血流信號頻率之間，才能使得組織信號通過濾波器的死帶 (dead band)，而血流信號通過濾波器的通帶 (pass band)。

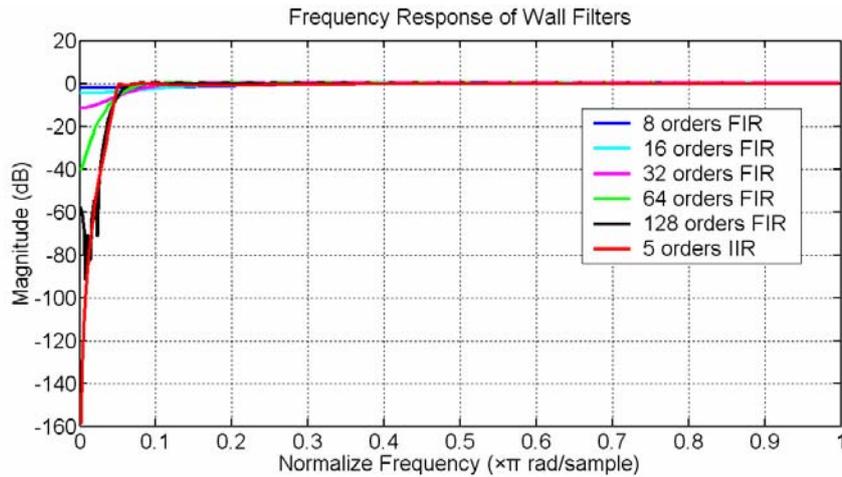


圖 2-12：各種高通濾波器其穩態頻率響應的比較

根據我們的高頻系統規格，系統在做血流掃描時，採用連續掃掠式掃描，橫向掃描速度設定為 2 mm/sec，PRF 設定為 2kHz，因此每條掃描線的橫向間距為 1 μ m。當發射超音波的中心頻率為 40MHz 時，聚焦點的橫向波束寬度為 75 μ m，並可由 Nyquist Criterion 推算出可偵測的最高流速約為 19 mm/sec，假設我們欲濾除 0.95mm/sec 以下的組織信號，則 wall filter 正規化後的截止頻率需設為 0.05 (0.95 / 19 mm/sec)。圖 2-12 即為各種截止頻率為 0.05 的高通濾波器其穩態頻率響應圖，我們比較 8 ~ 128 階的有限脈衝響應濾波器以及五階的第一形式柴彼雪夫濾波器，從圖中可觀察到柴彼雪夫濾波器擁有最陡峭的轉移帶，可作為濾波效果極佳的 wall filter，而有限脈衝響應濾波器必須到 128 階才有近似柴彼雪夫濾波器的陡峭轉移帶，然而若使用 128 階的有限脈衝響應濾波器進行濾波，從波束寬度可知，會將非取樣體積內的信號包含入濾波器的運算，而造成有誤差的濾波結果，所以經過比較之後，我們選擇五階的第一形式柴彼雪夫濾波器做為本系統的 wall filter。通常在使用無限脈衝響應濾波器時，為了希望濾波器能及早脫離暫態而進入穩態，會需要初始化(initialization)的動作，而初始化的值將會一直保留它的影響至濾波器進入穩態。當濾波器的輸入信號長度短時，其輸出容易受暫態響應所影響，因此濾波器初始化將會影響其頻率響應表現。當初入信號越長時，濾波器的輸出會逐

漸趨於穩態，初始值設定的影響就因此而越不明顯。圖 2-13 即為不同輸入信號長度在不同初始化的情況下，五階第一形式柴彼雪夫濾波器的頻率響應，截止頻率所對應速度為 1 mm/sec，可以觀察到輸入信號較短時，不同初始化其頻率響應的差異也較大，當輸入信號越長時，不同初始化的頻率響應皆會越趨於穩態響應。在我們的應用下，由於可以沿著整張影像的 slow time 方向進行濾波，輸入信號長度有 4000 點，因此頻率響應趨於穩態，濾波器初始化對於頻率響應的影響極小，所以我們將濾波器的初始值皆設為零。

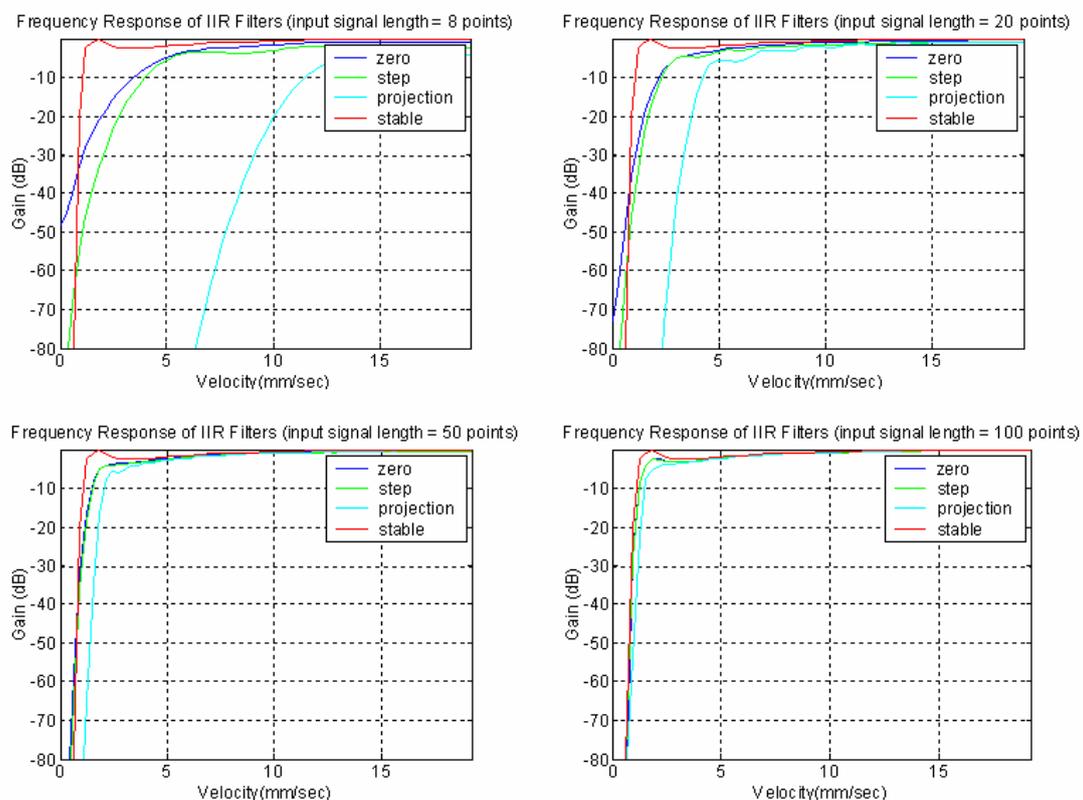


圖 2-13：當輸入信號長度為 8、20、50、100 點時，五階第一形式柴彼雪夫高通濾波器在各種初始化下的頻率響應。

2.7 高頻系統硬體架構

從 80 年代開始，由於電子技術的發展，硬體的計算速度與效率隨之大幅提升，醫用超音波影像系統也由傳統的類比系統轉為全數位系統。全數位超音波影像系統的優勢在於可讓使用者在發射端設計任意的發射信號，經過數位類比轉換以後，將類比發射信號放大至足夠的電壓來驅動探頭的壓電材料，以發射超音波脈衝信號，而探頭所得到的回波信號經過前端放大以後，也由類比數位轉換轉回數位信號，再由電腦做後續的信號處理與成像。當我們可以在發射端設計任意的發射波型時，即可採用如編碼波形 (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，來增進影像品質。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 (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，然而隨著電子技術的發展，我們可望這些限制在未來幾年內能逐步獲得改善。

本研究所建立的全數位化高頻超音波影像系統，其系統架構如圖 2-14 所示。在發射端設計任意發射波型上，可由使用者在電腦上以軟體預先設計任意的發射波型，經過高速的數位類比轉換器轉換為類比信號，我們也可以用任意波型產生器來取代此部分，直接在任意波型產生器內編輯欲發射的波型。接著經過功率放大器將此類比小信號放大為高電壓信號，由於放大器也會同時放大雜訊，因此必須通過二極體電路 (expander) 限制發射端的雜訊，進而觸發高頻探頭髮射超音波信號。接著探頭接收超音波回波信號後，首先經過經過 Pulser / Receiver 上的前級放大器以及射頻濾波器，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[43]。

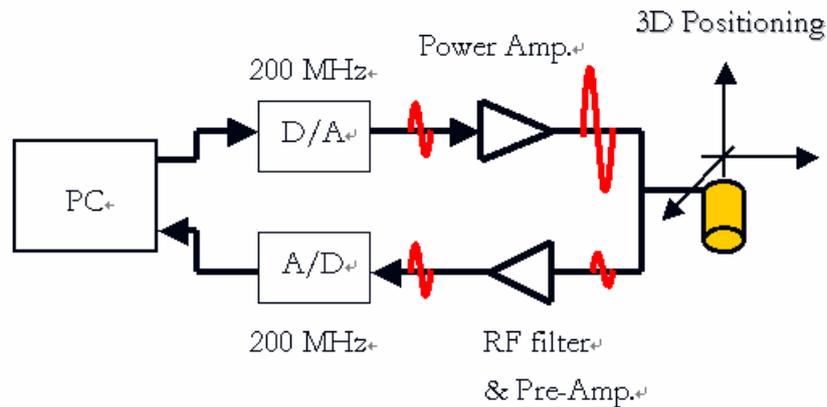


圖 2-14：全數位式超音波實驗系統架構圖

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) 研究團隊所製作；此探頭以 lithium niobate 為基礎材料所設計製造，具有中心頻率 45 MHz、相對頻寬約為 55 % 的頻譜特性，其孔徑大小為 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。

在系統進行掃描影像方面，由於高頻系統使用的是單一聚焦的高頻探頭，必須由三維馬達來帶動探頭以進行掃描。舉二維 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，將空間中每一條線的資訊組合起來，即可得到一張完整的原始影像資料，也可將數張二維影像進一步合成為三維的立體超音波影像。我們利用三個伺服馬達帶動探頭在 X, Y 和 Z 方向移動，達到三維空間定位的要求，並可掃瞄得到二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。

在系統控制方面，整個移動探頭、擷取資料、顯示結果影像和數據等流程，則由個人電腦配合 LabVIEW、Visual C++ 控制程式來完成。我們使用 Visual C++ 中的 MFC 來實現操作的視窗介面，如圖 2-15 所示，在視窗介面下達掃瞄的指令後，系統即可進行 B-mode 掃描或是都卜勒血流掃描，擷取原始資料後，由程式即時處理降頻解調變、濾波及調整動態範圍等步驟或是經過流速估計演算法後，即時顯示一般常見的 B-mode 灰階超音波影像或是都卜勒血流影像。在此介面上我們也可以直接儲存類比數位轉換器所擷取的原始資料，再後續自行處理資料。

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（RF power amplifiers, 25A250A, Amplifier Research, Souderton, Pennsylvania, USA）、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。

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，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。

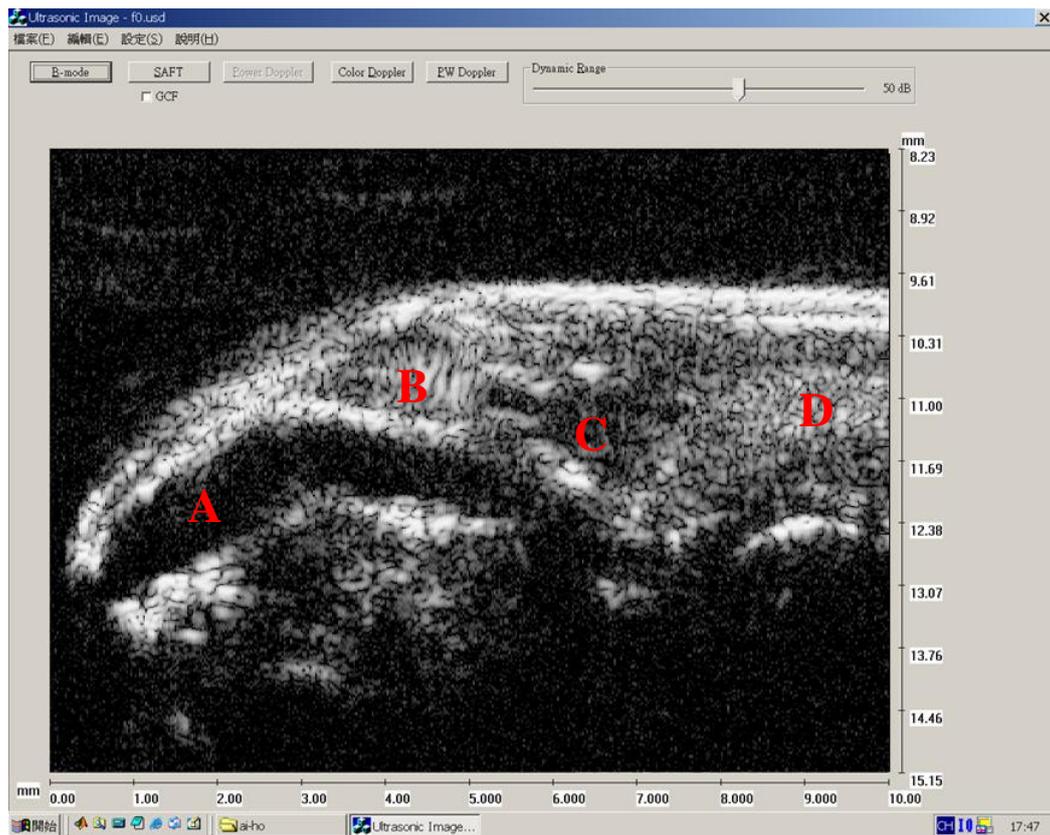


圖 2-15: 高頻系統操作視窗介面，圖中顯示為斑馬魚的 B-mode 影像，可以觀察到 A-咽頭、B-腮、C-心臟、D-腸等的生理結構。

2-8 實驗結果

在本章中，我們探討了掃掠式掃描所帶來的頻譜增寬效應，並針對高頻系統血流量測的流速範圍，設計出符合需求的 wall filter。在最後我們以實際的實驗來觀察不同掃描速度下頻譜增寬現象，與理論做一個比對，並驗證 wall filter 壓制組織信號的效果。

實驗中以不同掃描速度的連續掃掠式掃描方式來掃描一塊組織仿體，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) 與熱水混合後，加入直徑約為 $1\sim 2\mu\text{m}$ 的石墨粉顆粒，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散射特性。掃掠式掃描的設定上我以 $2\text{mm}/\text{sec}$ 、 $5\text{mm}/\text{sec}$ 、 $10\text{mm}/\text{sec}$ 三種不同掃描速度進行掃描，發射頻率為 40MHz ，高頻探頭的 F-number = 2，掃描後的 B-mode 影像如下圖。

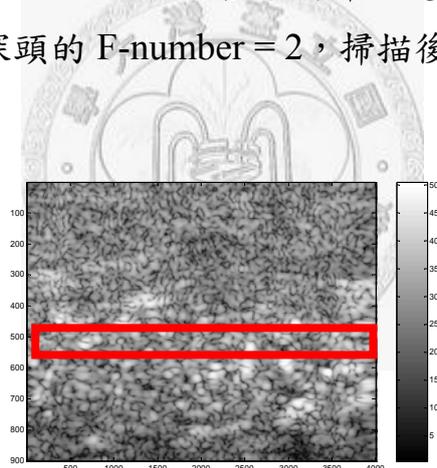
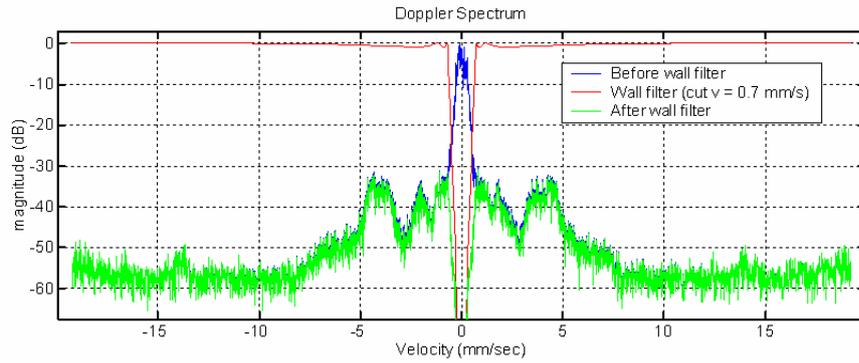


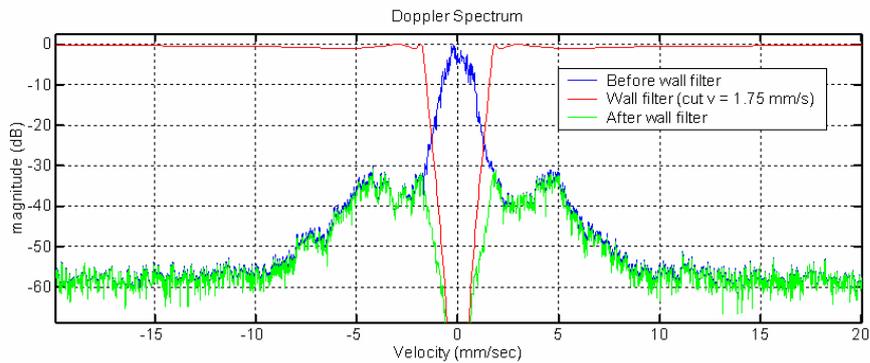
圖 2-16：組織仿體的 B-mode 影像

信號處理流程敘述如下，將信號解調降到基頻後，如圖 2-16 取聚焦區軸向共 50 點(10 倍發射波長)的紅框範圍，將整段信號沿軸向方向加總後得都卜勒信號，接著將都卜勒信號乘以一個 Hamming window 以將頻譜平均化並壓低旁瓣 (sidelobe)，之後做傅立葉轉換得到都卜勒頻譜。如上述方式總共取五個 frame 來計算(每個 frame 間距 $100\mu\text{m}$ ，無取樣體積重疊)，並做功率頻譜的平均得下列結果。

(a) Scanning Velocity = 2 mm/sec



(b) Scanning Velocity = 5 mm/sec



(c) Scanning Velocity = 10 mm/sec

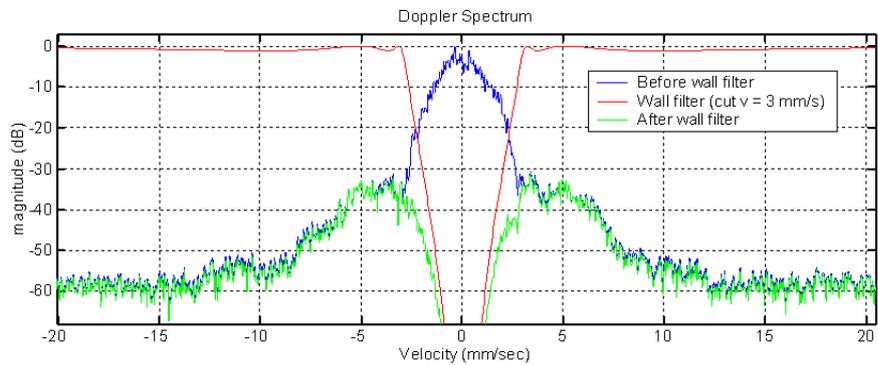


圖 2-17：各種不同掃描速度下組織信號的都卜勒頻譜

由以上三張頻譜可得組織信號的頻寬所對應的速度值如下：

掃描速度	2 mm/s	5 mm/s	10 mm/s
-20dB 頻寬 對應速度(mm/sec)	-0.42 ~ +0.44	-1.15 ~ +1.15	-2.15 ~ +2.28
-30dB 頻寬 對應速度(mm/sec)	-0.61 ~ +0.60	-1.6 ~ +1.69	-2.61 ~ +2.63

從實驗結果可發現掃描速度與組織頻譜增寬效應有正比的關係，因此我們必須按照不同的掃描速度來設計 wall filter 的截止頻率，當掃描速度越快時，wall filter 的截止頻率就要越高，以壓制頻寬增寬的組織信號，當然可偵測最小流速就會越受到限制。圖 2-17 中的 wall filter 使用五階第一形式柴彼雪夫高通濾波器，依據不同的截止頻率皆可將組織頻譜壓低至 30dB 以下。然而實際進行活體實驗時組織會因心跳及呼吸而移動，所以截止頻率要比上述值略大。由以上三種掃描速度的都卜勒頻譜顯示，為了能使高頻系統能偵測到 1mm/sec 以上的微小流速，我們必須選擇 2 mm/sec 的橫向掃描速度。

最後簡述高頻系統在彩色都卜勒掃描時的設定，我們採用連續掃掠式掃描，橫向掃描速度設定為 2 mm/sec，PRF 為 2kHz，因此每條掃描線的橫向間距為 1 μ m。在 40MHz 下聚焦處的橫向波束寬度約為 75 μ m，因此可將鄰近具有高度相關性的 8~15 條掃描線視為在同位置的取樣，以計算此位置的血流速度。我們使用五階的柴彼雪夫高通濾波器做為 wall filter，其截止頻率對應的速度為 0.7 mm/sec。此外由 Nyquist Criterion 推算出可偵測的最高流速約為 19 mm/sec，因此本高頻超音波系統偵測的流速範圍約為 0.7 mm/sec 至 19 mm/sec 之間。

圖 2-18 與圖 2-19 為活體實驗的結果，圖 2-18 為老鼠腫瘤局部的彩色都卜勒影像與能量都卜勒影像，而圖 2-19 為掃描人體手指末梢血管的彩色都卜勒影像。我們可以從影像上觀察到最小的微血管等級約為管徑為 100~200 μ m，而流速在 5 mm/sec 以下，因此可證實系統在上述規格設定下，有能力偵測微小血管的緩慢血流。

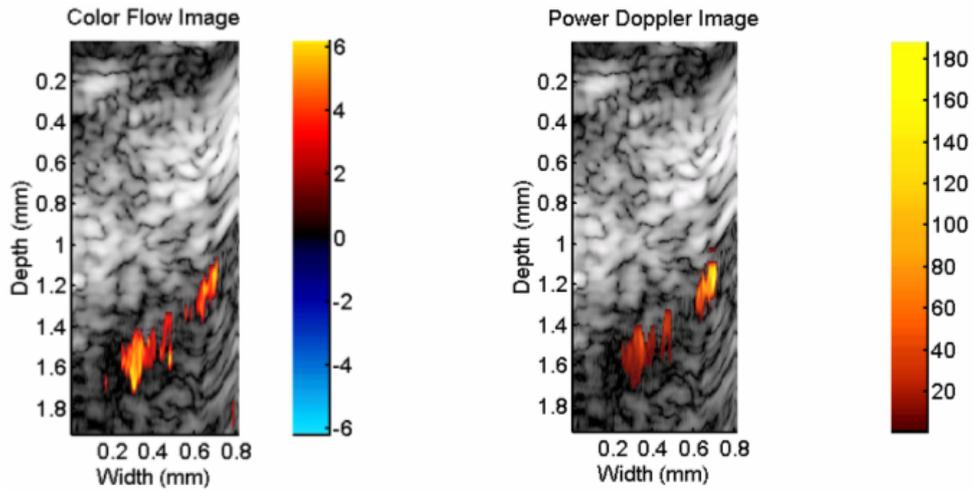


圖 2-18 老鼠腫瘤內部的彩色都卜勒影像以及能量都卜勒影像

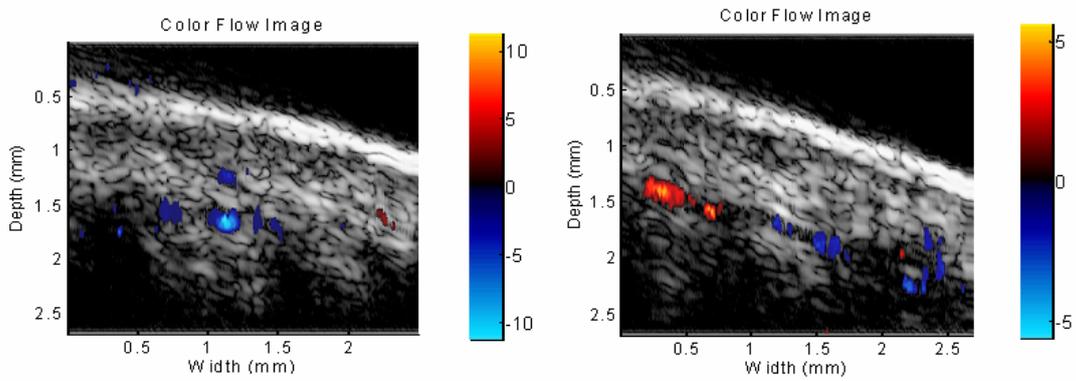


圖 2-19 人體手指末梢血管的彩色都卜勒影像

第三章 對比劑成像

3.1 超音波對比劑：

3.1.1 對比劑的應用

在各種醫學影像中，常使用對比劑來增進影像品質，而在超音波領域的應用上，超音波影像對比劑的主要機制是利用微氣泡對超音波的強烈回音反應，來增強超音波反射信號[12]。因此現今商用的超音波對比劑皆以微氣泡的形式為主流，並以一層介面穩定膜包覆空氣泡，使得微氣泡能穩定通過人體的血液循環過程而不至於破裂。目前已發展出的超音波對比劑除了穩定性高，還有具備無毒性、分解慢、副作用少的優點，使我們能安全的應用在人體上。超音波對比劑在臨床應用上已十分廣泛，將微氣泡以靜脈注射進入血液循環之後，在超音波影像上可有效增強血流區域的信號，以偵測微灌注（perfusion）現象，也可將血管或心臟腔室的輪廓明顯化，幫助診斷正常與病變的區域，以提高臨床診斷的正確性。

使用微氣泡對比劑可有效增強血流信號，無論是在 B-mode 影像上，或是都卜勒影像上，皆可提升血流成像的訊雜比。此外，由於微氣泡會隨著血液而移動，我們可以藉由發射多次的脈衝信號，以偵測回波信號之間的非相關性或是都卜勒效應，來達到偵測微氣泡灌注區的效果[21]。或是以脈衝波擊破微氣泡，藉由量測微氣泡擊破前後的訊號差異，來求得微氣泡灌注的血流區域[22]。對比劑成像上另外一個重要的應用，就是非線性成像，由於微氣泡對於聲波會有非線性響應，而產生許多諧波頻率成份。所以我們可以藉由組織與微氣泡對於聲波非線性響應的差異，來提升血流與組織信號的對比度，以提高影像上血流對於組織的對比亮度。

3.1.2 微氣泡的物理特性[36]

一個散射子反射超音波的能力可用其散射面積（scattering cross section， σ ）來衡量，而散射面積的大小取決於散射子及其週遭介質特性的不同，散射面積與週遭介質壓縮度及密度的關係可表示如下：

$$\sigma = \frac{4\pi}{9} \kappa^4 r^6 \left[\left(\frac{\kappa_s - \kappa}{\kappa} \right)^2 + \frac{1}{3} \left(\frac{3(\rho_s - \rho)}{2\rho_s + \rho} \right)^2 \right] \quad (\text{式 3-1})$$

式 3-1 中 κ 為壓縮度（compressibility）， ρ 為密度，有下標 s 的為散射子的參數，而 r 表示散射子的平均半徑大小。當散射子為微氣泡的形式時，由於空氣和水的壓縮度約有 10^7 倍的差距，使得大括弧中的 $(\kappa_s - \kappa)$ 值極大，因此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。假設 r 為微氣泡的半徑大小，微氣泡週遭介質的壓力及密度分別為 P_0 及 ρ_0 ， γ 為理想氣體常數，則此微氣泡的共振頻率（ f_0 ）可表示為：

$$f_0 = \frac{1}{2\pi r} \sqrt{\frac{3\gamma P_0}{\rho_0}} \quad (\text{式 3-2})$$

當微氣泡表面附有一層介面穩定膜，使氣泡較穩定而不易破裂時，以 S_e 表介面穩定膜的彈性係數，則此式需修改如下：

$$f_0 = \frac{1}{2\pi r} \sqrt{\frac{3\gamma}{\rho_0} \left(P_0 + \frac{\pi S_e}{3 \gamma r} \right)} \quad (\text{式 3-3})$$

因此從式 3-3 中我們可知，微氣泡的共振頻率與半徑有反比的關係，當微氣泡有球殼覆蓋時，共振頻率也會增加。目前臨床上使用的

超音波對比劑，藉由調整微氣泡的半徑大小以及界面穩定膜的彈性係數，可使得微氣泡在臨床超音波的頻率範圍下共振現象最為明顯，能有最顯著的回音增強效果。

3.2 非線性成像

使用對比劑另外一個重要的應用是在諧波成像（harmonic imaging）或是非線性成像（nonlinear imaging）。當微氣泡在聲波下產生非線性震盪的過程中，會產生許多諧波頻率成份，而對於組織而言，聲波在組織中傳遞時，也會產生諧波頻率成份。因此所謂的非線性成像，就是以發射基頻（fundamental frequency）訊號，而接收基頻的整數倍或半整數倍的頻率成分來成像[23]-[24]。通常將基頻的二倍頻率成分稱為二次諧波信號（second harmonic）；基頻的半倍頻率成分稱為次諧波信號（subharmonic）；而基頻的 1.5 倍頻率成分稱為超諧波信號（ultraharmonic）[25]-[26]。由於探頭的接收頻寬有限，因此非線性成像皆以上述的頻率成分為主。我們在超音波成像系統上可利用發射端與接收端電路的頻寬設計，來取得想要的頻帶範圍來成像，並可避免發射頻率的干擾[27]。

3.2.1 非線性響應

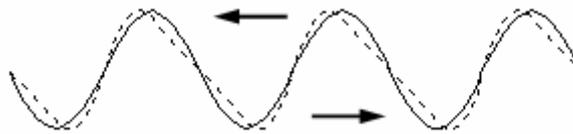


圖 3-1：聲波傳遞時發生波形失真示意圖，實線為失真前的波型，虛線為失真後的波型。

當聲波在介質中傳遞時，傳遞速度會隨著瞬時壓力而變化，壓力越大則波速越快，因此聲波在介質中傳遞時的壓力變化會造成傳遞速度的變異，如圖 3-1 所示，聲波在波峰部分正壓力會壓縮介質而提高了介質密度，使得傳遞速率加快；在波谷部份負壓力會拉伸介質而降

低了介質密度，使得傳遞速率減慢，因此造成波型產生變化失真，產生組織諧波頻率成分[33]-[34]。

而當聲波打在微氣泡上時，微氣泡在非線性振盪的過程也會產生諧波信號，尤其當發射聲波頻率接近微氣泡的共振頻率時，微氣泡會產生極強烈的諧波信號 [20]，此諧波信號的產生機制與組織諧波不同，強度可比組織諧波信號大上好幾倍。

3.2.2 諧波成像

組織諧波信號由於頻率成份較高，且其聲波波束聲場的旁瓣較低，因此相較於基頻成像來說，組織諧波影像能有較高的空間解析度與對比解析度，此為組織諧波影像的優點。而在對比劑成像上，由於微氣泡所產生的諧波信號可比組織諧波信號強上好幾倍，因此對比劑諧波成像可提升組織與血流的對比度，有助於增加微弱血流訊號的敏感度。和基頻訊號的成像相較，對比劑諧波成像可有較高的訊雜比，以及濃度限制較寬的優點。在基頻的成像中，太低的對比劑濃度沒有明顯的回音增強效果，而太高的濃度則可能會使超音波訊號衰減地太嚴重，造成影像上的遮蔽效應。研究顯示諧波訊號成像有較寬的濃度限制，在某些組織中基頻訊號成像無法找到合適的注射濃度時，諧波訊號往往具有較好的成像品質。目前已有許多研究針對臨床使用的超音波對比劑（Albunex[®]、Levovist[®]）探討其諧波特性和

二次諧波影像雖然可以提升血流與組織信號的對比度，但由於聲波傳遞過程中組織會產生明顯的諧波信號，使得二次諧波成像的對比度提升效果有限，因此有研究提出結合諧波成像與都卜勒效應的微氣泡成像技術[21]，藉由偵測微氣泡的移動來進一步提升對比度，或是藉由微氣泡破裂前後的不相關性，來偵測微氣泡灌注區域[28]。另外，還可藉由微氣泡獨特產生的次諧波信號與超諧波信號，來壓制組織信號並留下微氣泡灌注的血流信號[29]-[31]。這些方式皆可以較不

易受到傳遞諧波的干擾來有效偵測微氣泡灌注區[32]。

3.2.3 脈衝反相基頻成像

脈衝反相技術 (pulse inversion, PI)

傳統超音波的成像方式，是在每個位置發射一次脈衝後取其回波信號來做成像，而脈衝反相技術就是在同一個位置發射兩個正負相反的波型，兩次發射信號的相位差 180 度，取兩者的回波信號做相加後再成像[35]。

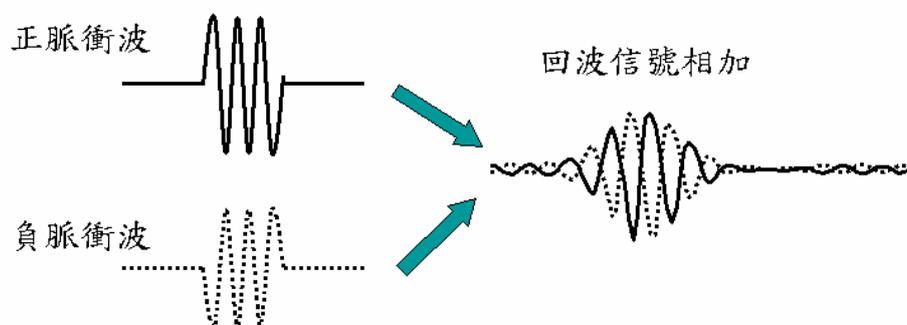


圖 3-2：脈衝反相技術示意圖

對於組織而言，假設組織回波信號為 $y(t)$ ，那麼 $y(t)$ 可以用基頻回波信號 $x(t)$ 的冪級數來表示如下：

$$y(t) = a_1x(t) + a_2x^2(t) + a_3x^3(t) + \dots \quad (\text{式 3-4})$$

其中 $x(t)$ 即代表線性的基頻散射信號，而 $x^2(t)$ 與 $x^3(t)$ 即為二階與三階的非線性響應，大於三階的非線性信號由於相對強度較弱可以忽略掉，式 3-4 即表示了組織的諧波響應。

因此如果我們將正脈衝波的組織回波信號 $y^+(t)$ 與負脈衝波的組織回波信號 $y^-(t)$ 兩者相加後，基數階的諧波信號都被消除了，只有偶數階的諧波信號可以留下，如以下的表示：

$$\left. \begin{aligned} y^+(t) &= a_1x(t) + a_2x^2(t) + a_3x^3(t) \\ y^-(t) &= -a_1x(t) + a_2x^2(t) - a_3x^3(t) \end{aligned} \right\} y^+(t) + y^-(t) = 2a_2x^2(t)$$

所以脈衝反相的相加結果對於組織回波信號而言，會只剩下偶數階的諧波信號成分。

然而對於微氣泡而言，微氣泡對於聲波的非線性響應主要是來自於微氣泡的非線性震盪。正聲壓會將微氣泡壓縮，而負聲壓會將微氣泡脹大，而微氣泡在壓縮與脹大的響應上有所不同，所以正脈衝波與負脈衝波所得到的回波信號並不會完全的上下反向，因此微氣泡對於正、負聲壓的響應是非線性的。此外，當發射聲壓越大時，可以觀察到正脈衝的回波信號與負脈衝的回波信號會有時間偏移的現象[37]，甚至還會發生兩個回波信號中心頻率偏移的現象[38]。因此當正與負脈衝波兩者的回波信號產生時間偏移與頻率偏移時，脈衝反相疊加後的結果就不會只留下偶數階的諧波信號成分。所以對於微氣泡的而言，脈衝反相疊加後會同時留下基數階與偶數階的諧波信號成分。

所謂的脈衝反相基頻成像 (PI fundamental imaging)，就是使用脈衝反相技術後，取基頻頻率成份進行成像。由前述可知，組織信號在疊加後只會剩下偶數階的諧波信號，而線性的基頻頻率成份都會被消除；相較之下微氣泡信號在疊加後，基頻頻率成份仍然可以保留。因此可以提升組織信號與微氣泡信號在基頻上的強度對比，在基頻影像上可以有效壓制組織信號而留下微氣泡的信號，達到提高 CTR 的效果。由於此技術是利用微氣泡對於正、負聲壓的非線性響應來成像，因此也算是一種非線性成像技術。

在諧波成像上，我們發射基頻信號並接收基頻的半整數倍或是整

數倍頻率成份來成像，由於探頭的頻寬有限，因此諧波成像時的發射信號與接收信號兩者的頻率都必須落在探頭的有效頻寬內，容易遇到接收信號頻寬受限或是發射與接收無法同時有效落在探頭高響應區的問題。而在脈衝反相基頻成像上，發射與接收皆為基頻信號，因此可將基頻信號設計在探頭的中心頻率位置，以充分利用探頭的頻寬，在成像上可有最佳的軸向空間解析度，並使得探頭在發射與接收信號有最佳的效率。相較於諧波成像，此為脈衝反相基頻成像的優點[35]。

此外，脈衝反相技術也可改善諧波成像的影像品質。在 3.2.2 節中我們提到，組織諧波影像可有較佳的空間解析度與對比解析度，然而在實際應用上，由於系統中有許多訊號來源也會產生諧波信號，包括放大器失真，線路阻抗不匹配等等，這些信號會在發射時線性地傳遞出去並造成組織諧波影像品質的下降。由於其頻率相近，故很難以濾波的方式將線性的系統諧波信號和非線性產生的組織諧波信號區分開來。如果使用脈衝反相技術，就可以把線性的系統諧波信號消去，所得到的主要成份即為二次組織諧波訊號。此外，在正與負脈衝的回波信號相加後，可將諧波信號提升為兩倍，以提升訊雜比。

3.3 高頻對比劑成像

3.3.1 對比劑應用在高頻超音波的問題

在高頻超音波上，對比劑也可有相同的功能來幫助我們增強血流信號，並提升血流與組織信號的對比度。尤其在高頻超音波下，聲波傳遞的衰減效應隨著頻率而更加嚴重，超音波波束的取樣體積較小也使得散射強度較弱，因此高頻超音波成像較難獲得高的訊雜比，更需要微氣泡對比劑的幫助來提升血流成像品質，並增加偵測血流的靈敏度。然而當超音波進展到高頻 ($>20\text{MHz}$)，針對小動物影像開發系統時，傳統對比劑在應用上遇到了一些瓶頸，首先是現行商用對比劑尺寸較大 ($2\sim 10\mu\text{m}$)，注射入小動物體內容易結合成較大的團塊，造

成小動物在肺及腎臟等部位血管的發生栓塞而死亡。第二是現有對比劑共振頻率較低(2~3MHz)，雖然在文獻中可證實在高頻超音波下仍有信號增強的效果，但高頻超音波的頻率範圍與氣泡的共振頻率差距甚遠，無法有效誘發微氣泡的非線性震盪來做非線性成像，從式 3-3 中可知，有球殼包覆的微氣泡其共振頻率與半徑成反比關係，因此我們需要進一步縮小對比劑氣泡的尺寸以提升共振頻率。第三是我們希望對比劑具有靶向性 (targeting) 的功能，也就是對比劑微氣泡具有聚集並附著在特定組織的能力，除了可以有效觀察目標組織外，也可在氣泡內包覆藥物達到運送藥物的目的，而現行對比劑的材料並不適合當作此種靶向性的藥物載具，我們需要一種新的對比劑來解決。

3.3.2 高頻對比劑

由前一節中我們知道，應用在小動物身上的高頻對比劑需要有較小的微氣泡直徑，以及可以製作為靶向性功能的球殼材料。根據許多文獻記載，以脂質為基礎的對比劑很適合製作為具有靶向性功能，也就是所謂的微脂體 (liposome)，其構造為以磷脂質雙層膜所包覆的空氣泡，球體結構如圖 3-3 所示，磷脂質雙層膜內外兩層為親水端 (頭)，內部為親油端 (尾) 相接。我們可由製程來控制脂質包覆氣泡的尺寸大小，使氣泡的共振頻率接近高頻超音波的頻率範圍 (20MHz~50MHz)，較小的尺寸也可降低注入小動物體內發生血管栓塞的可能性。此外，微脂體的球殼材料與生物體細胞膜同樣皆為脂質，與生物體有極佳的相容性，因此使用在人體或是小動物身上無副作用產生。在製作具有靶向性對比劑方面[39]，經過化學鍵結的方式我們可以在磷脂質雙層膜上覆蓋 ligand，其可視為一種抗體 (antibody)，針對腫瘤表面的抗原 (antigen) 可互相結合，以達到靶向性的功能。因此若將具有靶向性功能的微脂體微氣泡注入老鼠體內，可讓微氣泡聚集在腫瘤區域的微血管組織上，如此一來對比劑的效果可更加集中與明顯，達到觀察特定組織的目的。此外我們也能在氣泡內包覆藥物，來做藥物傳輸以及治療的目的。所以在本研究中，

我們使用微脂體來當作高頻對比劑。

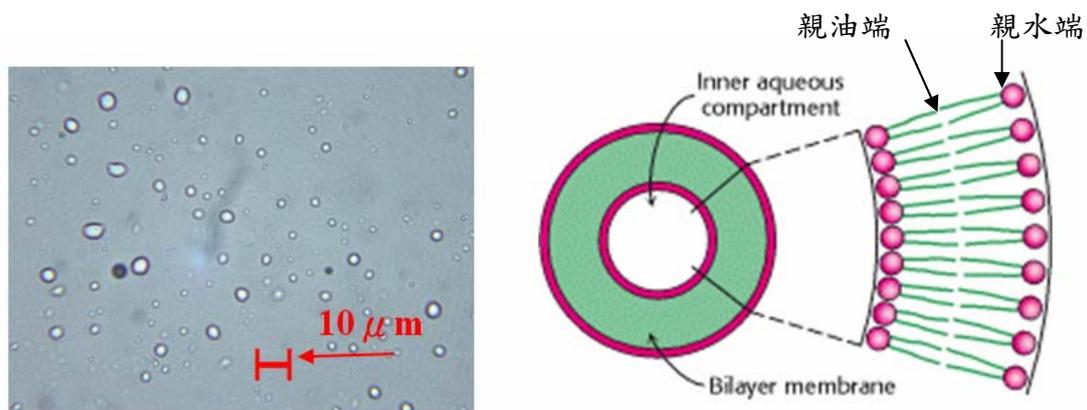


圖 3-3：左圖為顯微鏡下微脂體微氣泡的影像，右圖為微脂體的結構

3.3.3 高頻超音波下的非線性響應

我們希望在高頻超音波下也能使用上述的非線性成像的技術，以提升血流與組織信號的對比度，因此首先必須能在高頻超音波下成功誘發微氣泡的非線性響應。文獻上指出，當發射頻率接近微氣泡的共振頻率時，有最強的二次諧波散射信號產生[23]-[24]；當發射頻率接近微氣泡兩倍的共振頻率時，有最強的次諧波信號產生[25]。以無球殼的空氣泡為例，直徑 $1.1\mu\text{m}$ 的氣泡其共振頻率為 10MHz ，直徑 $0.65\mu\text{m}$ 的氣泡其共振頻率為 20MHz [40]。當有球殼覆蓋時，共振頻率會因此而提升[41]-[42]，從式 3-3 可知，我們需要知道球殼的彈性係數才可推算其共振頻率，目前對於直徑 $1\sim 2\mu\text{m}$ 的軟球殼（例如脂質）微氣泡而言，我們在其共振現象上的了解極為有限，只能從空氣泡的共振頻率推斷，直徑接近 $1\mu\text{m}$ 大小的軟球殼微氣泡，其共振頻率應可落在高頻超音波的頻率範圍（ $20\sim 50\text{MHz}$ ）。

在高頻非線性成像上，已有研究指出，使用直徑大小約為 $1\sim 2\mu\text{m}$ 的商用對比劑 Definity[®]，在發射頻率 20MHz 下可有效誘發微氣泡的諧波信號、次諧波信號與超諧波信號[27]。然而在諧波成像的結果上，血流與組織信號對比度的提升效果，並無低頻超音波下的效果顯

著，可能原因有二，首先是微氣泡產生的諧波信號與基頻信號的強度比值，會隨著氣泡直徑縮小而減小[40][42]。此外，由於對於小直徑軟球殼微氣泡的共振現象了解有限，可能大部分的微氣泡在 20MHz 下無法誘發其共振現象。然而在次諧波成像與超諧波成像上，可有效壓制組織信號而留下微氣泡信號，來提升血流信號與組織信號的對比度，有效偵測微氣泡灌注區。在微氣泡的次諧波與超諧波響應上，當發射信號為正弦波信號時，若正弦波的週期數越多，或是發射聲壓越大時，微氣泡所產生的次諧波信號與超諧波信號越明顯，CTR 提升效果也隨之越佳。

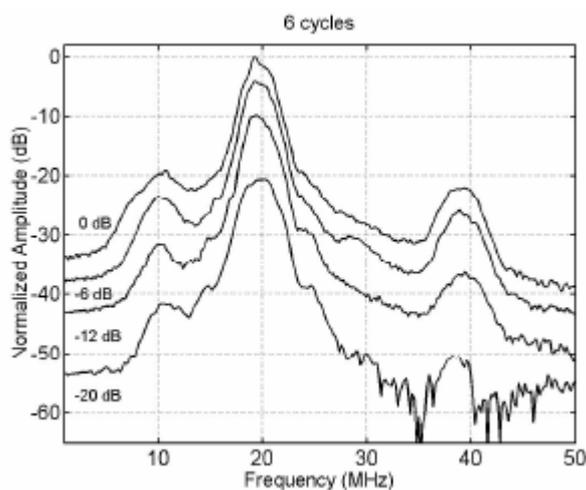


圖 3-5：Definity[®] 微氣泡在 20MHz 下的頻率響應，可有效誘發微氣泡的二次諧波、次諧波與超諧波頻率成分。[27]

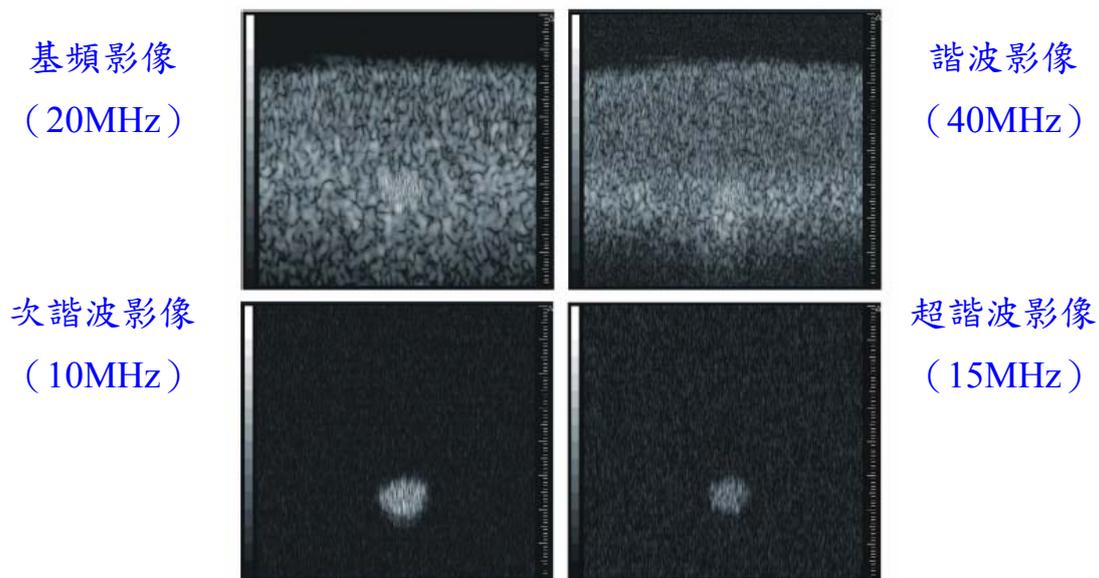


圖 3-6：當發射信號為 6 個週期 20MHz 正弦波，聲壓在 2.7MPa 時，組織仿體實驗的結果，紅圈處為 Definity[®] 微氣泡灌注區，可觀察到次諧波成像與超諧波成像可有效壓制組織信號，留下微氣泡的信號。

[27]

由上述的內容可知，次諧波成像與超諧波成像可以有效壓制組織信號，達成提升血流與組織對比度的效果。然而首先我們必須能夠成功激發微氣泡的次諧波信號或是超諧波信號，此與微氣泡的共振頻率有關，在本研究中我們使用微脂體當作高頻對比劑，微脂體為非商用化的對比劑，因此我們對於其共振行為的了解極為有限。此外，文獻上顯示次諧波信號必須在聲壓夠大的窄頻發射信號下，才能有較明顯的響應，因此當系統發射端無法發射較大的超音波聲壓時，可能會無法觀察到微氣泡的次諧波信號。而脈衝反相基頻成像技術，在低頻超音波下已證實可以有效壓制基頻組織信號，並留下微氣泡的信號，我們期望此種技術也能成功應用在高頻下的微脂體微氣泡上，達到提升血流信號與組織信號對比度的目的。

第四章 對比劑實驗結果

4.1 實驗設定

在本章中我們使用 2-7 節所描述的高頻超音波系統（圖 2-13）進行對比劑成像實驗，對比劑成像中我們主要使用 B-mode 成像，首先簡述 B-mode 影像掃描的參數設定。為了快速取得影像資訊並即時成像，在 B-mode 影像掃描上我們採用掃掠式掃描技術，由於 B-mode 成像時不用考慮組織頻譜增寬效應的影響，所以可以使用較快的掃描速度來提升顯像速率，我們設定探頭的橫向掃描速度為 100 mm/sec，PRF 為 5 kHz，因此每條掃描線的間距為 20 μm 。每條掃描線在 fast time 上的取樣，是以 A/D 介面的 200 MHz 取樣頻率以及振幅解析度 8 bits 的設定下共擷取 4096 點，按照聲速的換算可取得探頭以下軸向深度約 15.5 mm 的資訊。在此掃描設定下 A/D 介面的 4MB 記憶體大小抓滿以後，探頭可橫向移動擷取資料的範圍共為 20 mm，因此將原始的二維資料做降頻解調之後，我們可以得到一張深 15.5 mm、寬 20 mm 的 B-mode 二維影像。

在脈衝反相基頻成像的掃描上，由於我們在每個位置上要同時擷取正脈衝波與負脈衝波的回波信號，因此在 B-mode 影像掃描設定上要有所變動。在掃掠式掃描的設定中，探頭的橫向掃描速度為 50 mm/sec，PRF 為 2.5 kHz，因此每條掃描線的間距為 20 μm 。在每個位置上探頭髮射一個正脈衝波後間隔 20.5 ms 馬上再發射一個負脈衝波，此 20.5 ms 的時間間隔內探頭橫向移動 1 μm ，由於探頭的橫向波束寬度在 40MHz 下約為 75 μm ，因此仍可將正脈衝波與負脈衝波所擷取的回波信號視為同一個位置的回波信號。為了配合發射信號，我們在每條掃描線在 fast time 上的取樣，是以 A/D 介面的 200 MHz 取樣頻率以及振幅解析度 8 bits 的設定下共擷取 8192 點，使我們能同時擷取到正脈衝波與負脈衝波所擷取的回波信號。在此掃描設定下

A/D 介面的 4MB 記憶體大小抓滿以後，探頭可橫向移動擷取資料的範圍共為 10 mm，將每個位置的正與負的回波信號相加之後，取基頻部分做降頻解調成像，即可得一張深 15.5 mm、寬 10 mm 的 B-mode 影像。

4.2 微脂體微氣泡的散射特性

在本研究中我們採用自製的微脂體當作高頻對比劑[44]，其構造為以磷脂質雙層膜所包覆的空氣泡，我們可由製程中控制其包覆空氣泡的大小。由於微氣泡的共振頻率與直徑大小有反比的關係，因此我們必須縮小微氣泡的尺寸，才能使微氣泡的共振頻率接近高頻超音波頻率（20MHz~50MHz）。以無球殼的空氣泡為例，直徑 1.1 μm 的氣泡其共振頻率為 10MHz，直徑 0.65 μm 的氣泡其共振頻率為 20MHz [40]，當有球殼覆蓋時，共振頻率會因此而提升[41]-[42]。因此我們可以推斷，直徑接近 1 μm 大小的軟球殼微脂體微氣泡，其共振頻率應可落在高頻超音波的頻率範圍（20~50MHz）。

為了測試我們所自製的微脂體微氣泡在高頻超音波下是否足夠強的散射信號，以作為有效的高頻對比劑，我們必須先進行體外的仿體實驗測試。對比劑仿體實驗架構如圖 4-3 所示，我們使用一塊組織仿體來模擬人體的軟組織結構，在組織仿體中挖一個垂直的圓形隧道，在其中注入對比劑，再以探頭進行組織仿體橫截面的掃描成像，即可觀察洞中的對比劑與周圍組織的散射信號強弱對比情況。圖 4-1 中右圖即為洞中注入水後，以 40MHz 的頻率進行掃描後的 B-mode 影像，可與洞中注入對比劑後的影像來做一個對照。組織仿體的製作上，本研究中是採用吉利丁粉（gelatin powder）與熱水混合後，加入直徑約為 1~2 μm 的石墨粉顆粒，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散射特性。

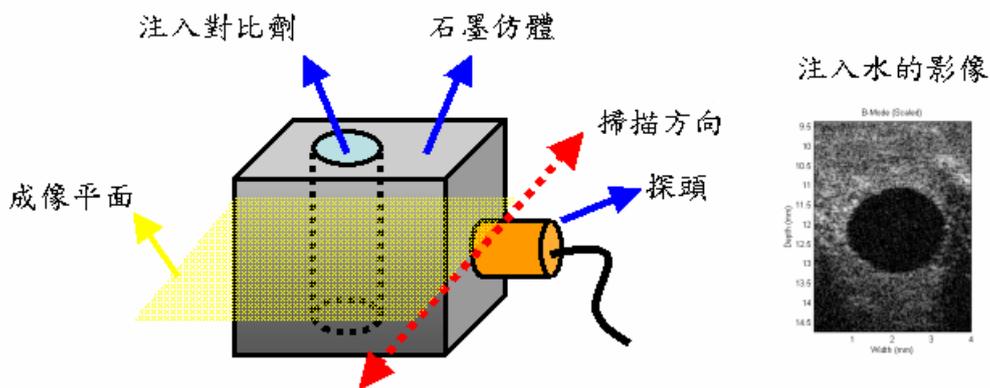


圖 4-1：對比劑仿體實驗架構圖，右圖為洞內注入水後，掃描所得的 B-mode 影像

4.2.1 微氣泡尺寸的影響

我們首先探討各種不同尺寸大小的微脂體微氣泡，在高頻超音波下其散射強度的變化。我們在微脂體的製程中可以控制其包覆空氣泡的大小，再以粒徑分析儀量測微氣泡的平均直徑大小，以下我們分別製作了直徑大小為 300nm、750nm、1099nm 三批微脂體對比劑來進行實驗。

我們在前述組織仿體的洞中注入直徑分別 300nm、750nm、1099nm 的微脂體對比劑，分別以 25MHz、40MHz、50MHz 進行掃描，觀察對比劑的散射信號強度，圖 4-2 即為掃描後的 B-mode 影像，可以觀察到直徑 300nm 的微脂體微氣泡在每個頻率只有非常微弱的散射信號；而直徑 750nm 的微脂體微氣泡在每個頻率下有稍微強一點的散信信號；相較之下直徑 1099nm 的微脂體微氣泡有最強的散射信號，可以有效的增強流體區域的散射強度。此結果與前述的推斷符合，直徑接近 $1\mu\text{m}$ 大小的微脂體微氣泡，其共振頻率可落在高頻超音波的頻率範圍（20~50MHz）內，因此有較強的散射信號。相較之下，小於 $1\mu\text{m}$ 的微脂體微氣泡由於散射面積不足，在高頻超音波下無法有較大的散射強度，而大於 $1\mu\text{m}$ 的微脂體微氣泡（如 2~8 μm ）

其共振頻率可能會低於高頻超音波的範圍，也無法使用在小動物身上。因此，在接下來的研究當中，我們皆以直徑接近 $1\mu\text{m}$ 的微脂體微氣泡當作高頻對比劑來使用。

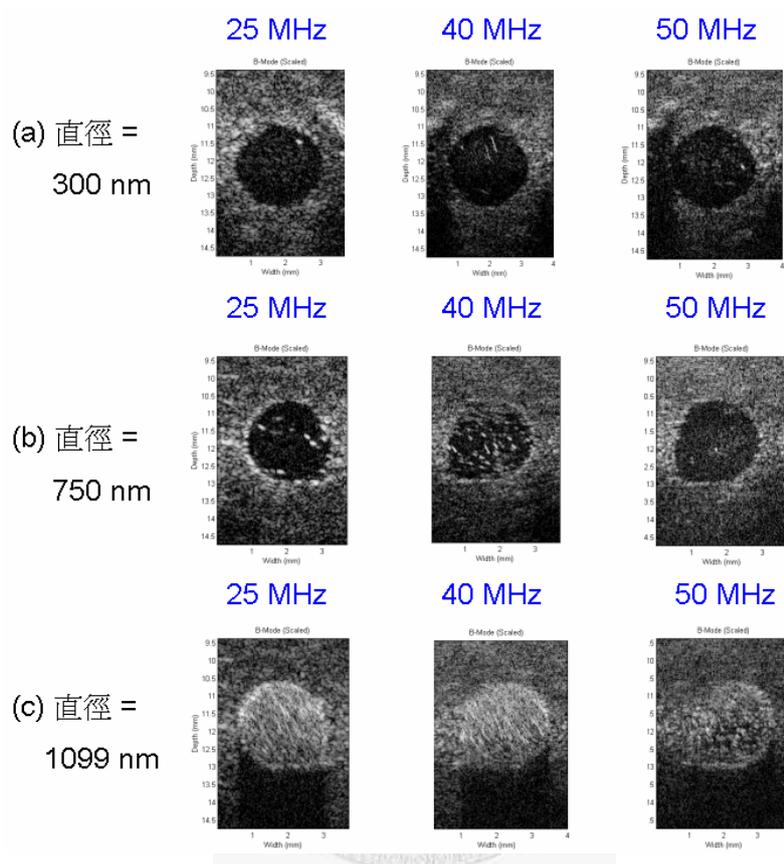


圖 4-2：微氣泡直徑分別 300nm、750nm、1099nm 的微脂體對比劑，在 25MHz、40MHz、50MHz 頻率下的 B-mode 影像。

4.2.2 微氣泡濃度的影響

在使用對比劑時，我們必須討論微氣泡濃度的影響，微氣泡濃度過低可能會沒有足夠強的散射信號，而微氣泡濃度過高可能會使得超音波在微氣泡灌注區傳遞時衰減太嚴重，使得在微氣泡之後的物體無法成像，即為所謂的遮蔽現象。因此，我們必須找到一個合適的濃度範圍來使用。此外，在活體實驗的考量上，對比劑濃度也是一個重要的因素，當我們將對比劑以靜脈注射的方式注射入小動物體內時，由於微氣泡濃度會經由體內的血液循環而稀釋，因此散射強度會隨之減

小。然而，如果使用濃度過高的對比劑濃度注射入小動物體內，可能會使得微氣泡聚集 (aggregate) 成較大的尺寸，造成腎臟或其他部位血管栓塞 (embolism) 的現象。因此，在活體實驗上，我們必須找到一個適當的對比劑注射濃度，使得微氣泡經過小動物血液循環的稀釋以後，仍然可以有足夠強的散射強度，並且不會造成小動物的血管栓塞現象。

在微脂體對比劑製程的最後一步，我們會將液態的微脂體對比劑冷凍成固態後，進行真空乾燥，因此最後得到的微脂體對比劑成品是粉末狀的型態。在使用前，必須以生理食鹽水將粉末狀的對比劑重新泡製成液體再來使用，因此我們可以調整不同重量百分比濃度的對比劑，來配置不同的微氣泡濃度。我們將微脂體粉末視為溶質，生理食鹽水視為溶液，配置重量百分濃度從 0 mg/cc. 到 10 mg/cc. 的對比劑溶液來進行實驗，圖 4-3 即為各種不同濃度的對比劑，在 30MHz 下的 B-mode 影像。我們可以在影像上對比劑灌注區的中央處圈選一塊區域，計算其平均散射強度隨濃度變化的情形，如圖 4-4 所示。

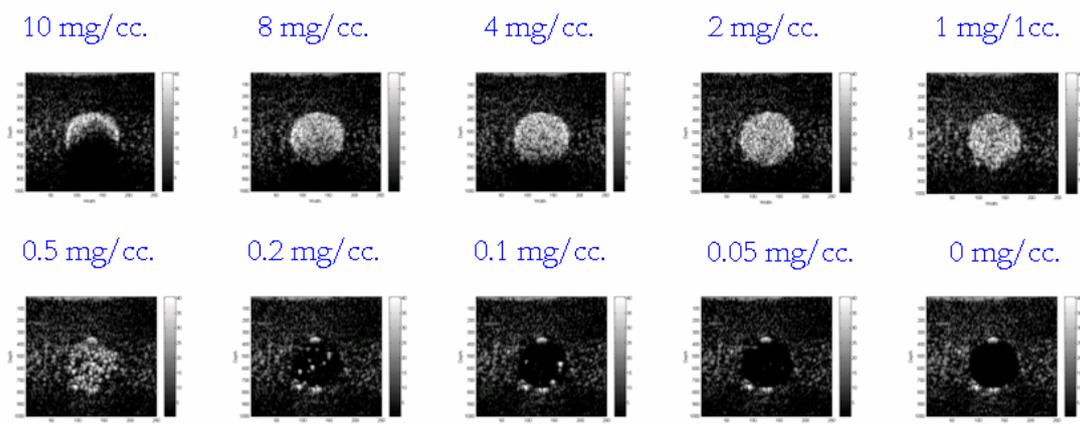


圖 4-3：各種不同濃度的微脂體對比劑，在 30MHz 頻率下的 B-mode 影像。

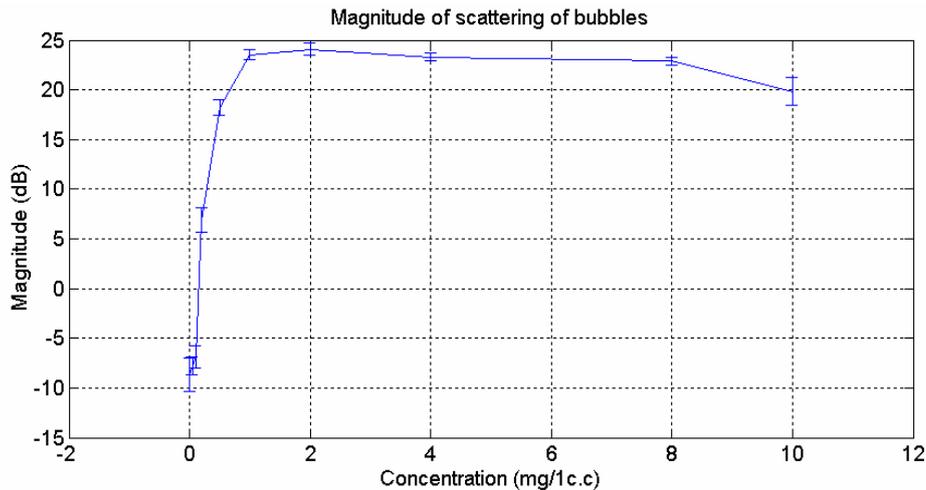


圖 4-4：各種不同濃度的微脂體對比劑，在 30MHz 頻率下的散射信號強度變化。

從圖 4-3 與圖 4-4 中可以觀察到，對比劑區域的平均散射強度最強時的濃度為 2 mg/cc. 與 1 mg/cc.，濃度大於 2 mg/cc. 後，會因為產生超音波傳遞衰減而使得對比劑區域的平均散射強度下降。當濃度低於 1 mg/cc. 後，平均散射強度逐漸下降，從圖 4-3 中的 B-mode 影像上可知最低有效濃度為 0.5 mg/1cc.，濃度再往下降則因為微氣泡濃度不足，而無法有效增強流體信號。

因此我們製作的微脂體對比劑，可有效增強流體信號的適當濃度範圍為 0.5 mg/cc. 到 2 mg/cc.，此結果可讓我們評估在活體實驗中最合適的對比劑注射濃度。假設微氣泡注射入小動物體內後，可均勻的被全身血液所稀釋，我們在得知小動物全身血量後，即可推算出一個適當的濃度，此濃度經過全身血液的稀釋後，必須大於 0.5 mg/cc.，才能有效增強血流信號。

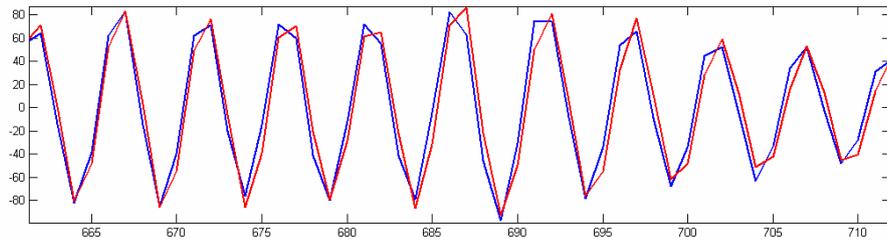
4.3 脈衝反相基頻成像

從 4.2 節中，我們可以證實自製的微脂體對比劑在適當的尺寸大小（接近 $1\mu\text{m}$ ）與適當的濃度下（ $0.5\text{ mg/cc.} \sim 2\text{ mg/cc.}$ ），在高頻超音波下有足夠強度的散射信號，可成功的作為高頻對比劑。接著，我們進一步探討微脂體微氣泡的非線性響應，測試在不同的發射頻率與發射週期下，是否可觀察到微氣泡對於聲波的非線性響應，以讓我們能有機會進行對比劑非線性成像。

脈衝反相基頻成像是利用脈衝反相技術，在每個位置連續發射一個正脈衝波與負脈衝波，將兩者所得到的回波信號做相加以後，取基頻成分來做成像。由於組織對於正、負脈衝波的響應較為線性，因此正、負回波信號相加之後，基頻的成分就被消除了，只留下偶數階的諧波成分。而微氣泡對於正、負脈衝波的響應較不線性，因此正、負回波信號相加之後，基頻成分不會完全消除，而仍有一定的強度。所以使用脈衝反相基頻成像可以壓制掉組織信號，而留下微氣泡信號，在影像上可提升組織與血流區域的對比度。

當發射信號為 40MHz 十個週期的正弦波時，使用脈衝反相技術得到微氣泡與組織的正回波信號與負回波信號如圖 4-5 所示，此為以 200MHz 的取樣頻率下所得到的射頻信號。為了觀察正、負回波信號的差異，我們將負回波信號上下反向來觀察兩者的相似程度。可以觀察到微氣泡的正回波信號與反向的負回波信號有些許的時間偏移現象，而組織的正回波信號與反向的負回波信號非常近似，因此在正、負回波信號疊加以後，微氣泡信號的基頻部份可以留下，而組織信號的基頻部份則幾乎被完全消除。

微氣泡的正回波信號（藍色）與反向後的負回波信號（紅色）



組織的正回波信號（藍色）與反向後的負回波信號（紅色）

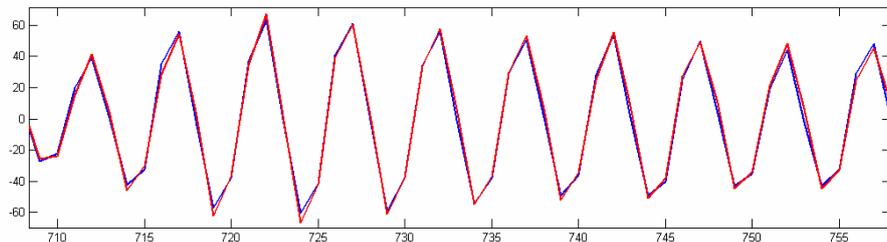


圖 4-5：微氣泡與組織對於正、負聲壓的響應比較

在此我們先定義一個參數 CTR，來量化評估組織與血流之間的對比程度。所謂的 CTR 即為血流區域（對比劑灌注區域）相對於組織區域在信號強度上的對比比值，通常以單位以 dB 來顯示，其定義如下，如圖 4-6 的對比劑仿體影像，假設散射信號振幅為 s ，我們在對比劑區域以及組織區域各圈選一塊 ROI (region of interest)，則 CTR 即為式 4-1 所表示。

$$CTR = 10 \log \left[\frac{\sum_{Contrast} s \cdot s^*}{\sum_{Tissue} s \cdot s^*} \right] \quad (\text{式4-1})$$

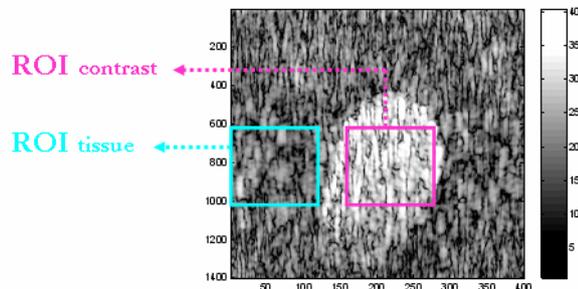


圖 4-6：CTR (Contrast-to-tissue ratio) 的定義

4.3.1 對比劑仿體影像

以下我們使用直徑大小接近 $1\mu\text{m}$ ，濃度為 1 mg/cc 的微脂體對比劑，注入同 4.2 節所述的組織仿體，來進行脈衝反相基頻成像實驗。在發射信號的設計上，我們發射 $20 \sim 50\text{ MHz}$ 頻率範圍的正弦波信號，發射週期使用 3、6、10 三種不同週期數，以觀察在不同發射頻率以及不同發射週期下，微氣泡的非線性響應的情況。

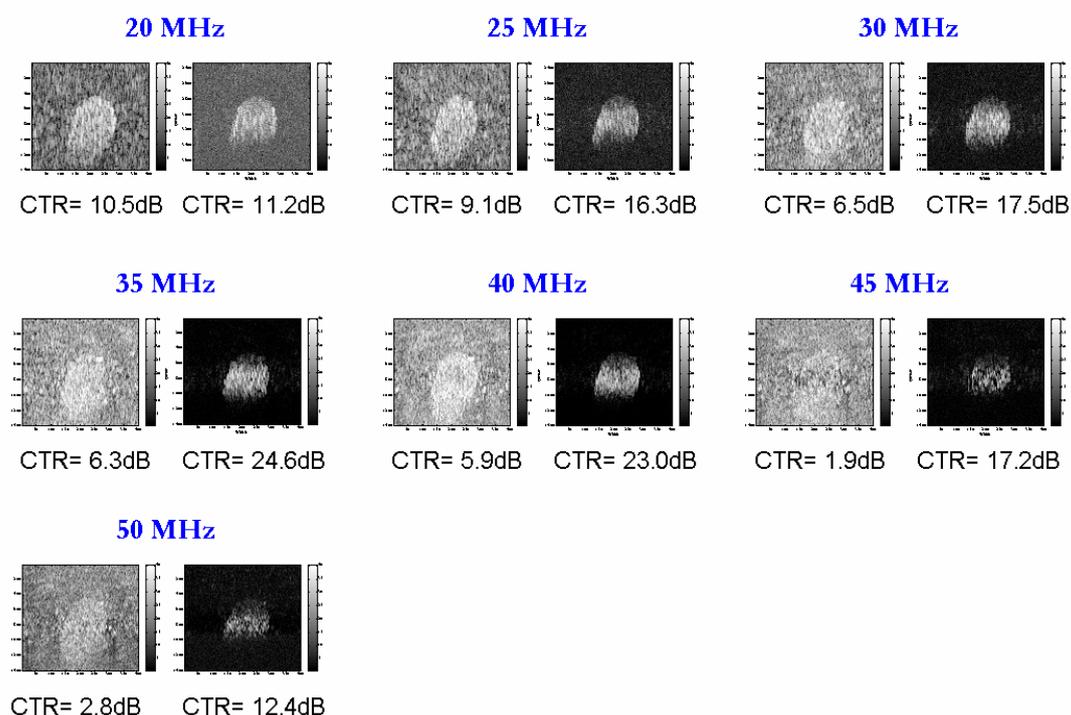


圖 4-7：發射信號為 10 個週期的正弦波，在各種頻率下，基頻成像(左邊)以及脈衝反相基頻成像(右邊)的比較。

上圖 4-7 即為各種不同發射頻率下，正弦波為 10 個週期時的對比劑仿體影像。右邊為傳統的基頻成像，左邊為脈衝反相基頻成像，以及每張影像的 CTR 值。從影像上我們可以觀察到，脈衝反相基頻成像的結果可以將組織信號壓制到雜訊等級以下，而只留下對比劑灌注區的微氣泡信號，與基頻成像相較，在每個頻率下皆可有效提升 CTR 值。我們將脈衝反相基頻成像的 CTR 值減去基頻成像的 CTR 值，即可得到 CTR 改善值。

接著我們探討在各種發射頻率以及各種發射週期下，使用脈衝反相基頻成像所得到的 CTR 改善值的變化。圖 4-8 即為 CTR 改善值的變化曲線，圖中的三條線分別代表發射週期為 3、6、10 時，在每個頻率下 CTR 改善值的變化。從圖中我們可以觀察到，在同一個發射頻率下，CTR 改善值會隨著發射週期數增加而增加；在同樣的發射週期數時，發射頻率 20~50MHz 的 CTR 改善值在 35MHz 與 40MHz 時最佳。除了當發射週期為三週期時的 20、25、50MHz 頻率下無法提升 CTR 值以外，其他情況下皆可有效提升 CTR 值

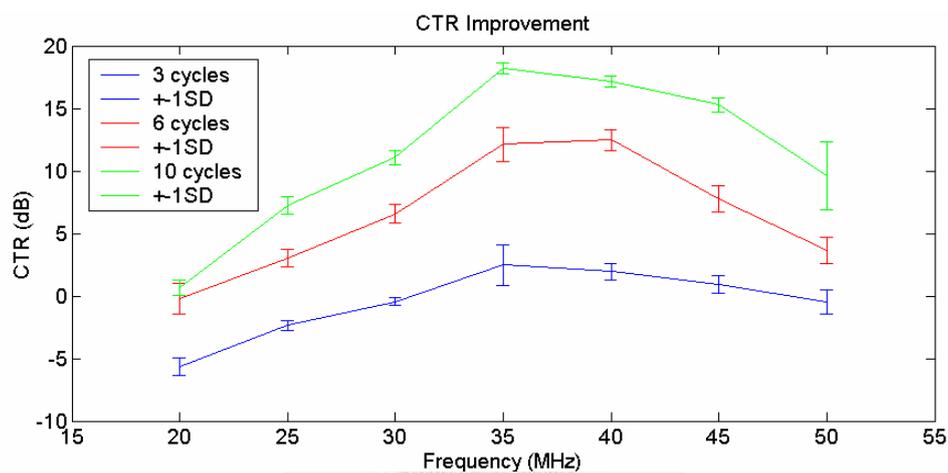


圖 4-8：在各種發射頻率及發射週期下，使用脈衝反相基頻成像技術所得到的 CTR 改善值。

接著我們欲討論在不同頻率以及不同發射週期下，微氣泡對於正、負聲壓的非線性響應強度。如果在訊雜比皆相同的情況下，理論上 CTR 改善值越大則代表微氣泡的非線性響應越明顯，然而當我們增加發射週期時，訊雜比也會隨之上升。此外，在不同發射頻率下由於探頭的頻率響應有所差異，訊雜比也會有所不同，因此我們必須將這些造成訊雜比不同的因素補償回來，才能探討微氣泡在各種情況下的非線性響應。

發射週期數與 CTR 改善值的關係

超音波影像的軸向空間解析度與發射信號的頻寬成正比，當發射信號的頻寬越寬時，軸向解析度越佳。因此，當我們增加發射信號的週期數時，由於頻寬變窄，影像的軸向解析度會下降，然而由於發射信號的能量隨著週期數增加而增加了，因此所獲得的訊雜比會因此而提升。從上述可知，在選擇發射信號的週期數時，我們必須在解析度與訊雜比之間做一個取捨。圖 4-9 為當發射頻率為 40MHz 時，各種不同發射週期下的對比劑仿體的脈衝反相基頻影像，可以觀察到 CTR 改善值隨著發射週期增加而上升的情形。

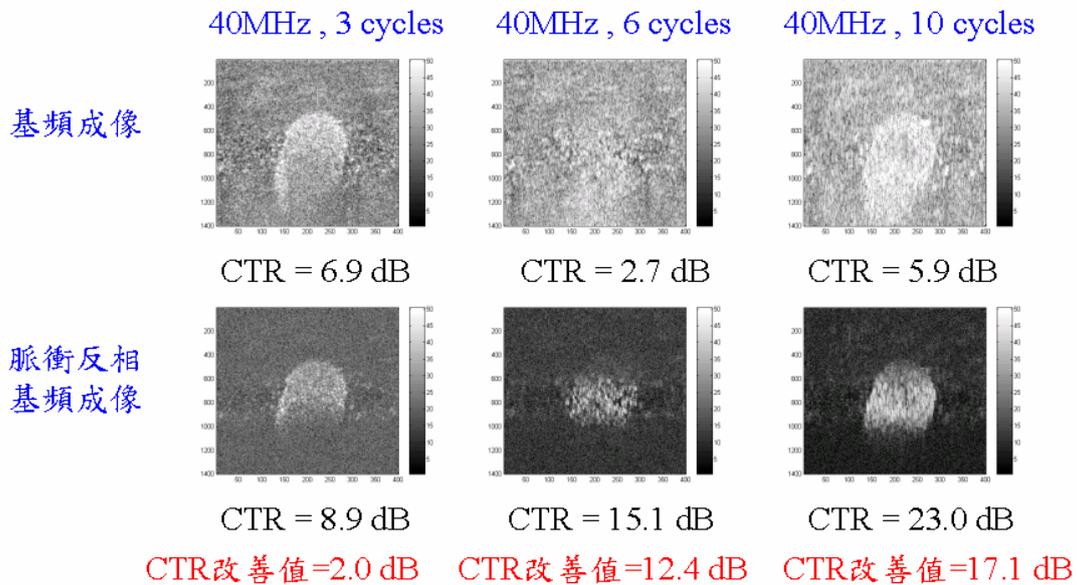


圖 4-9：當發射頻率為 40MHz 時，發射週期分別為 3、6、10 時的脈衝反相基頻成像，以上影像的動態範圍皆為 50 dB。

在脈衝反相基頻成像時，組織信號會被壓制到雜訊等級以下，因此在計算 CTR 時，主要的影響是疊加後的微氣泡信號的強度。當發射週期數增加時，雜訊等級不會有變化，而發射信號能量增加了 $10 \cdot \log(N/N_0)$ 倍，其中 N 為發射週期數，而 N_0 為參考波型的週期數，所以微氣泡的散射信號強度與 CTR 值也隨之增加了 $10 \cdot \log(N/N_0)$ 倍，因此發射信號的週期數增加，會使得脈衝反相基頻影像的訊雜比

(SNR) 也隨之增加。

如果我們要討論發射信號週期數與微氣泡非線性響應的關係，則必須將發射週期數所造成的訊雜比上升的因素移除掉，若以發射週期為 3 週期的情況當作參考，則 6 週期的訊雜比會高 $10 \cdot \log(6/3) = 3$ dB，而 10 週期的訊雜比會高 5.2dB。此外，在各種不同的頻率下，由於探頭頻率響應的差異，其訊雜比也會有所不同。我們根據探頭的頻率響應與發射週期所造成的訊雜比差異，將兩者所造成的影響補償回來以後，可以得到在各種頻率與各種發射週期下，使用脈衝反相基頻成像得到的 CTR 改善值如圖 4-10 所示。從圖 4-10 中，我們可以觀察到，仍然是發射週期數越多時 CTR 改善值越佳，代表發射週期數越多時微氣泡對於正、負聲壓的非線性響應越大。

參考文獻，一些有球殼的商用對比劑在低頻下 (2.25MHz)，對於正聲壓與負聲壓的非線性響應，會隨著發射週期數的增加而遞減 [35],[38]，這是因為當發射週期數增加時，微氣泡逐漸接近穩態震盪，其正回波信號的會越近似於反相後的負回波信號 [38]。此外，還可以觀察到當發射週期數越少時，正回波信號與負回波信號的中心頻率偏移會越大 [38]，所以理論上脈衝反相疊加後 CTR 改善度會越佳。然而，本實驗中使用的對比劑是自製的微脂體微氣泡，無論其共振頻率、球殼特性與微氣泡大小都與前述文獻中的情況不同，我們所探討的頻率是高頻下 (20~50MHz) 的非線性響應，因此微氣泡對於正聲壓與負聲壓的非線性響應特性可能會有所差異。在本研究中，當發射頻率 40MHz 時不同的發射週期下，正回波信號與負回波信號的頻譜如圖 4-11 所示，並沒有觀察到發射週期數越短時，兩者中心頻率偏移越大的情況發生。

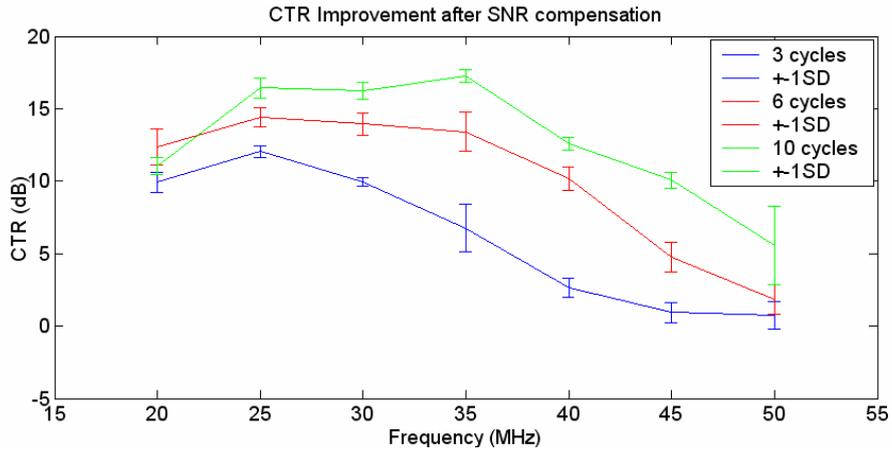


圖 4-10：經過訊雜比差異補償後，在各種發射頻率及發射週期下，使用脈衝反相基頻成像技術所得到的 CTR 改善值。

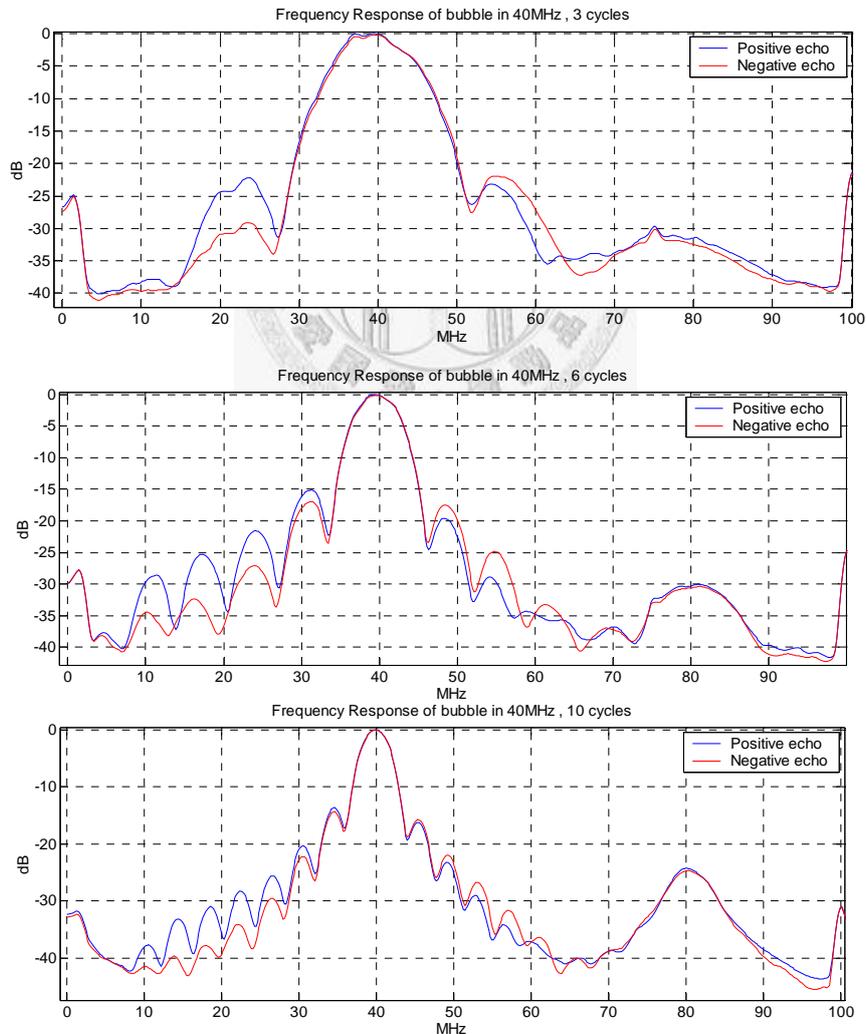


圖 4-11：當發射頻率為 40MHz 時，不同的發射週期數下，正回波信號與負回波信號的頻譜。

發射頻率與 CTR 改善值的關係

經過探頭頻率響應的訊雜比補償以後，從圖 4-10 中可以觀察到發射頻率在 25~35MHz 頻率之間時 CTR 改善值較佳，因此可以推斷微脂體微氣泡在 25~35MHz 下對於正、負聲壓的非線性響應最強。

4.3.2 微氣泡的頻率響應

以下我們觀察在脈衝反相疊加前後，組織信號頻譜與微氣泡信號頻譜的變化情形。我們在對比劑仿體影像上各圈選一塊組織區域以及對比劑灌注區域，將此區域的射頻資料沿 fast time 方向做傅立葉轉換後，取其功率頻譜的平均，即可得組織信號頻譜以及微氣泡信號頻譜。圖 4-12 即為每個發射頻率下，發射週期為 10 週期時，脈衝反相疊加前後的頻譜變化情況。由於 10 個週期的發射信號頻寬較窄，讓我們可較容易觀察是否有產生二次諧波成份或是次諧波成份。

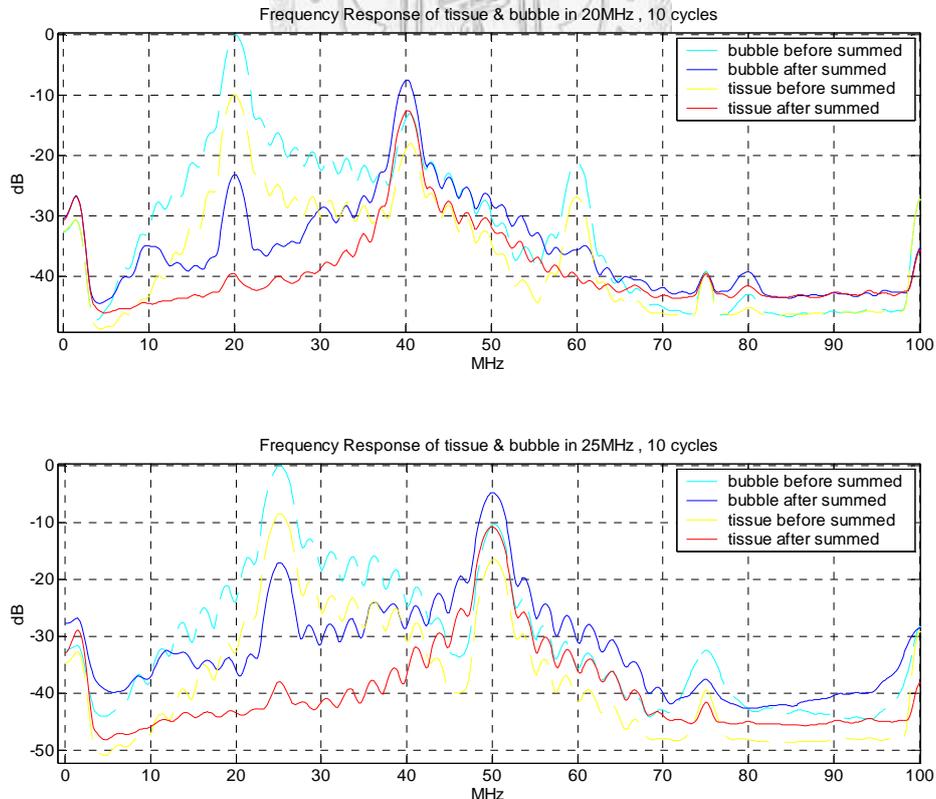
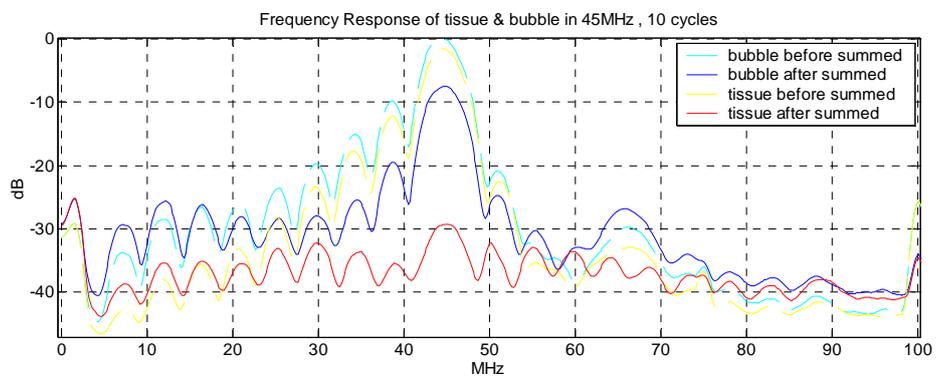
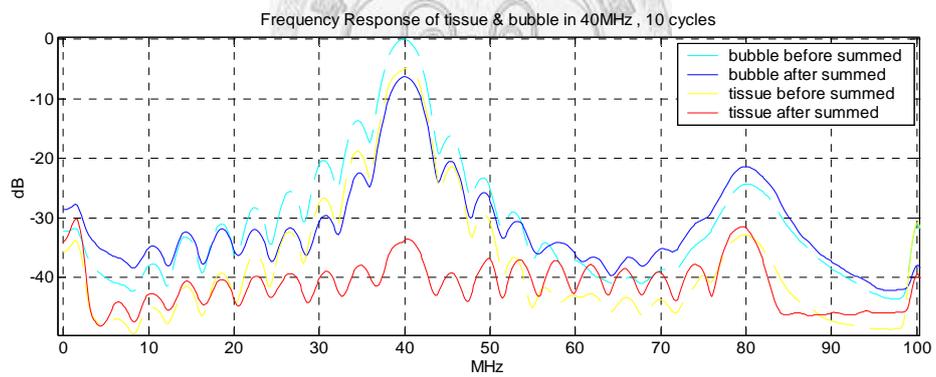
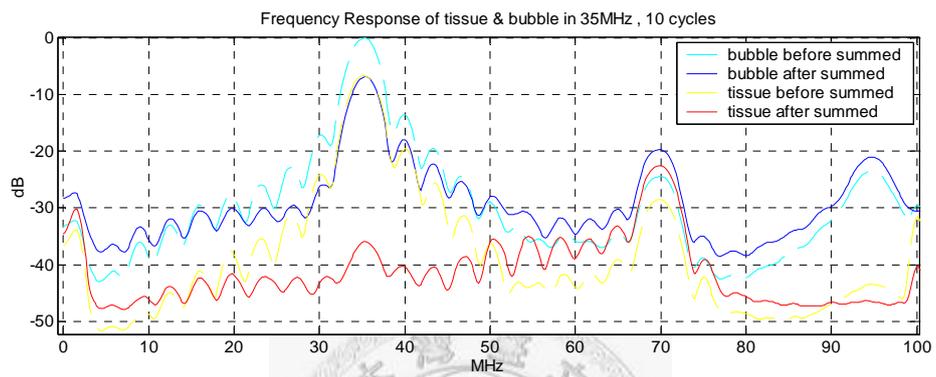
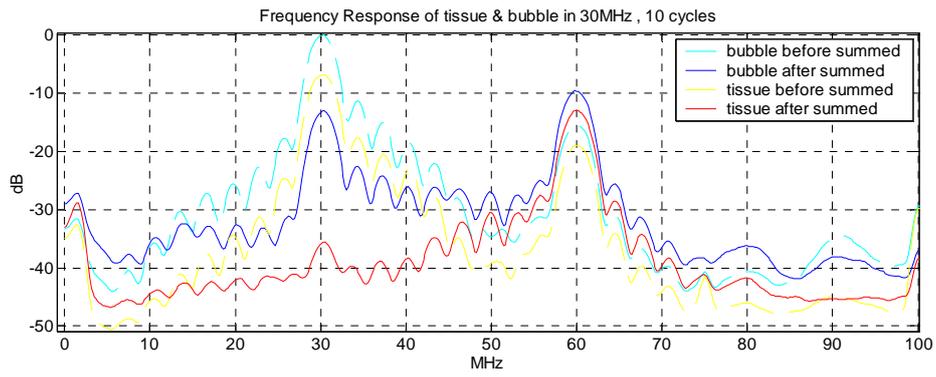


圖 4-12 (上)



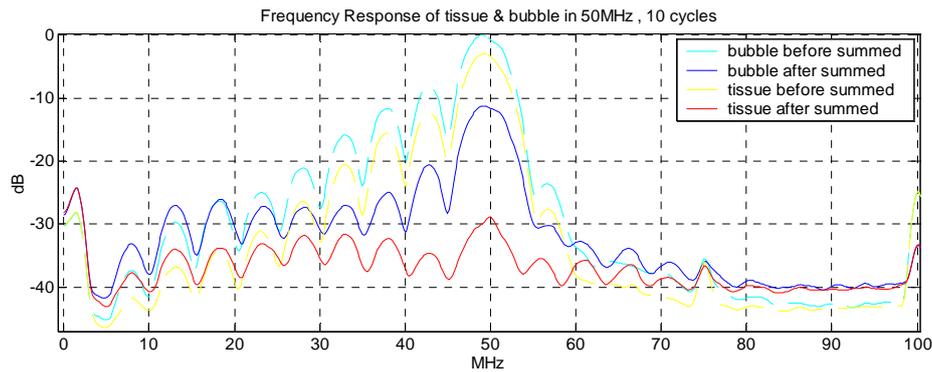


圖 4-12：各種發射頻率下（20~50MHz），組織信號頻譜與微氣泡信號頻譜在脈衝反相疊加前後的變化。

首先我們觀察每個發射頻率下其頻譜的基頻成分，可以觀察到組織信號在脈衝反相疊加以後，能量降至接近雜訊等級，而微氣泡信號在脈衝反相疊加以後，能量稍為衰減，但仍比組織信號能量高 15~25dB，因此在基頻上可以拉大組織信號與微氣泡信號能量的差距。當發射頻率為 20MHz 與 25MHz 時，從頻譜上可以明顯的觀察到二次諧波成份，無論在脈衝反相疊加前或是疊加後，組織信號與微氣泡信號的諧波能量差距皆為約 5 dB，因此無法提升組織信號與微氣泡信號的對比度。當發射頻率為 40MHz、45MHz 與 50MHz 時，在頻譜上無法觀察到明顯的次諧波頻率成分，在此發射頻率範圍我們使用高頻水聽筒（80MHz ultrasonic hydrophone, FORCE technology）所量測到超音波波束其聚焦點的聲壓強度約為 1.1 MPa，可能是發射聲壓不夠大，或是發射頻率沒有落在微氣泡共振頻率的兩倍附近，因此無法誘發微氣泡的次諧波響應[27]。

4.3.3 與諧波成像的比較

當發射頻率為 20MHz 與 25MHz 時，從頻譜上可以明顯的觀察到二次諧波成份，因此接下來我們將脈衝反相基頻成像與二次諧波成像來做一個比較。為了有較好的訊雜比，在二次諧波成像上我們採用脈衝反相疊加後的諧波成分來成像。

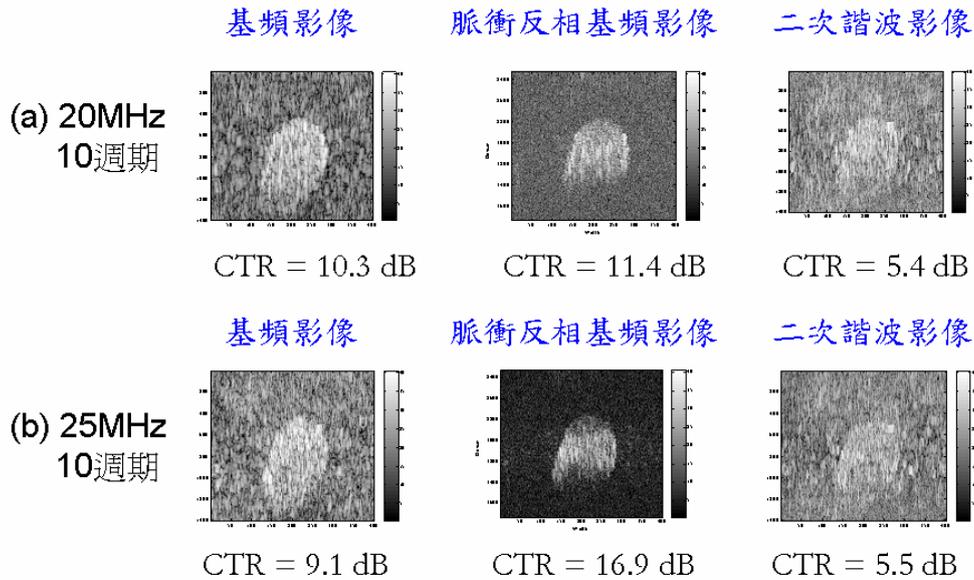


圖 4-13：當發射頻率為 20MHz 與 25MHz 時，基頻影像、脈衝反相基頻影像與二次諧波影像的比較。

從圖 4-13 可以觀察到三種成像方式中，由於脈衝反相基頻成像可以壓制組織信號，因此可以得到最佳的 CTR 值，而二次諧波成像的 CTR 值比基頻成像還低。通常由於微氣泡所產生的諧波信號可比組織諧波信號強，因此諧波成像可提升組織與血流的對比度，但必須在發射頻率接近微氣泡的共振頻率時才能有此表現。此外，微氣泡產生的諧波信號與基頻信號的強度比值，會隨著氣泡直徑縮小而減小 [40],[42]。這些都是在本研究中二次諧波成像無法改善 CTR 的原因。

4.3.4 組織移動的影響

當我們使用脈衝反相技術時，在同一個位置連續發射正脈衝波與負脈衝波，取兩次發射波型的回波信號來做加總。在實際的活體掃描時，小動物會因為心跳或是呼吸而造成組織移動現象，由於正脈衝波與負脈衝波在發射時有一個短暫的時間差距，如果在此時間差距內有組織移動現象，則會造成正與負的回波信號之間有時間偏移或是波型失真的現象，如此一來組織回波信號的基頻成分在脈衝反相疊加以後就無法消除，無法壓制組織信號就會使得脈衝反相基頻成像的 CTR

改善程度下降，因此我們必須探討組織移動對於脈衝反相基頻成像的影響。在本研究中使用脈衝反相技術進行掃描時，同一個位置上正與負脈衝波的發射時間差約為 $20\ \mu\text{s}$ ，接下來我們將組織移動方向分為軸向移動與橫向移動以分別探討其影響。

組織軸向移動的影響：

如圖 4-14 所示，如果在正與負脈衝波發射的時間差 ($20\ \mu\text{s}$) 之內組織有軸向移動，則會造成正與負回波信號之間有時間偏移的現象，使得疊加後組織信號的基頻成份無法消除。圖 4-15 為文獻上的模擬結果[45]，圖中的橫軸為正、負脈衝波發射的時間差內組織的軸向位移，位移量已除以基頻的波長來正規化，而縱軸為疊加後的回波信號強度，可以觀察到當軸向位移量越大時，疊加後所組織信號的基頻成分強度越大，組織信號無法消除會使得脈衝反相基頻成像的 CTR 下降。當軸向移動距離達到發射信號波長的百分之一時，脈衝反相基頻成像的 CTR 改善值會下降 13 dB 左右[35]，如圖 4-16 所示，因此當發射波長越短或是移動距離越大時，CTR 改善值下降程度就會越嚴重。我們探討實際應用的情況，當發射頻率為 50MHz 時波長為 $30.8\ \mu\text{m}$ ，因此如果組織軸向移動速度 $15.4\ \text{mm/s}$ ，則會造成軸向移動距離達到波長的百分之一，使得脈衝反相基頻成像的 CTR 改善值下降 13 dB 左右。參照圖 4-8 的實驗結果可知，此情況下在 50MHz 時即使使用 10 個發射週期數，也無法有效提升 CTR。

組織橫向移動的影響：

如果在正與負脈衝波發射的時間差 ($20\ \mu\text{s}$) 之內組織有橫向移動，除了兩者的回波信號有時間偏移的現象外，因為橫向波束強度的變化，也會使得兩者的回波信號的振幅變化不同，因此脈衝反相疊加後組織信號的基頻成分就會無法消除。圖 4-15 為文獻上的模擬結果[45]，圖中的橫軸為正、負脈衝波發射的時間差內組織的橫向位移，位移量已除以基頻的橫向波束寬度來正規化，而縱軸為疊加後的回波

信號強度，可以觀察到當橫向位移量越大時，疊加後所組織信號的基頻成分強度越大。

因此當組織的軸向位移或是橫向位移越大時，會使得脈衝反相基頻成像中壓制組織信號的效果越差，由此可知脈衝反相基頻成像技術容易因為組織軸向移動而影響 CTR 的提升效果，必須在組織軸向移動速度較小的情況下，才可有效提升 CTR。

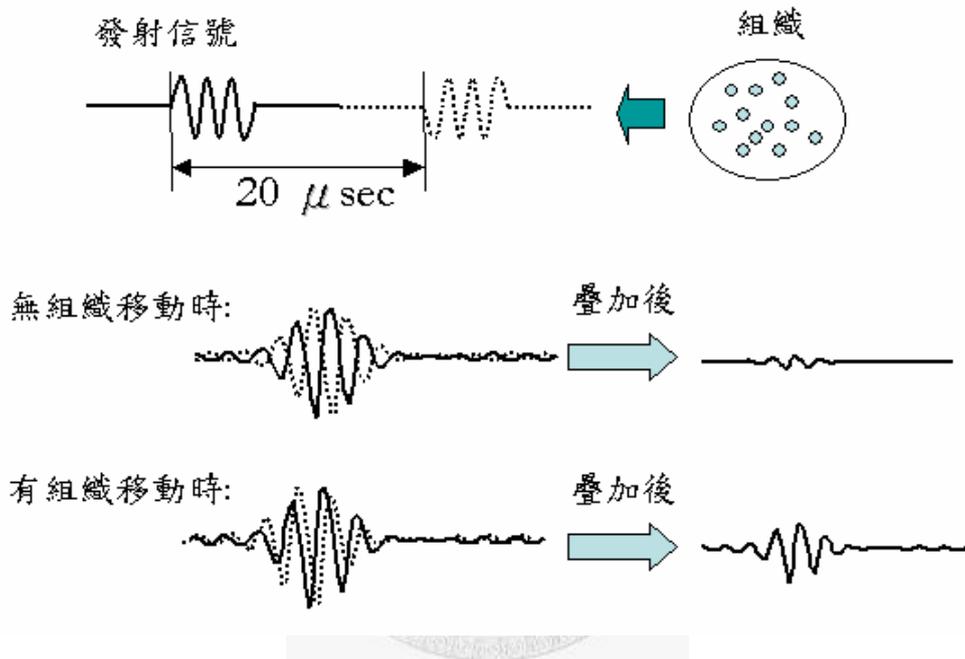


圖 4-14：組織軸向移動對於脈衝反相基頻成像的影響

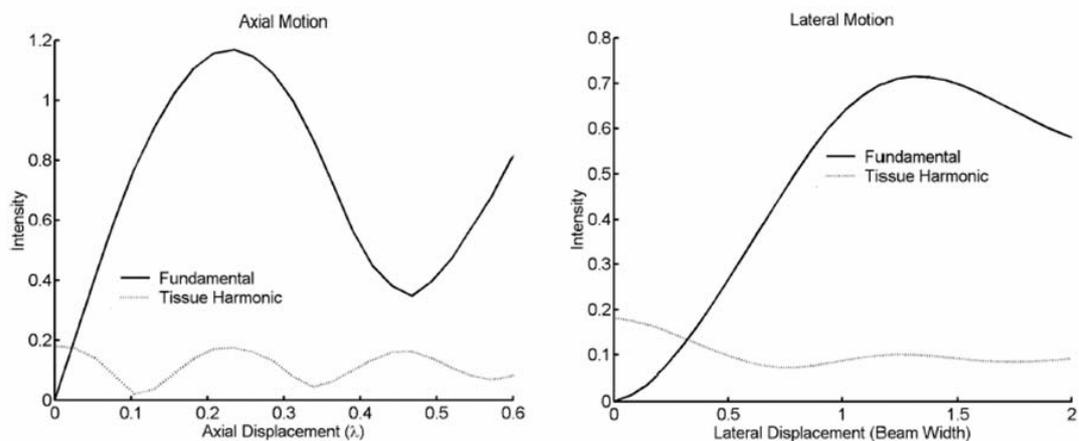


圖 4-15：當組織在正、負脈衝波發射期間有軸向與橫向位移時，經過脈衝反相疊加後，回波信號的基頻成分強度變化。[45]

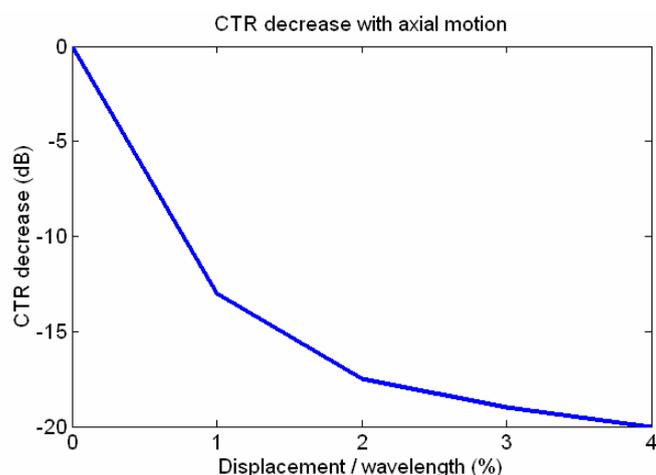


圖 4-16：組織軸向移動對於脈衝反相基頻成像的影響[35]

4.4 活體實驗

在前述的仿體實驗中我們證實了微脂體對比劑可有效增強流體信號，脈衝反相基頻成像的結果也可以成功提升組織與流體的對比度，接著我們將微脂體對比劑注射入小動物的血管內，期望在活體內也可以得到相同的效果。本研究中所使用的實驗鼠為 ICR 小鼠（圖 4-17），平均重量在 20 克左右，由台灣大學醫學院實驗動物中心所提供，所有處理程序皆符合相關的動物實驗規定。



圖 4-17：ICR 小鼠

首先我們檢測自製的微脂體對比劑與老鼠生理的相容性，微脂體球殼材料為磷脂質雙層膜，與生物體內的細胞膜相同，因此理論上微

脂體與生物體應有的高相容性，然而當我們將微脂體微氣泡注射入老鼠體內時，如果微氣泡濃度過高，仍有可能造成微氣泡在器官或是血管部位的栓塞現象，而微氣泡濃度過低又沒有明顯的顯影效果。所以我們必須測試出一個最佳的注射濃度範圍，能有足夠的微氣泡濃度增強血流信號又不會造成老鼠死亡。我們經由老鼠尾巴的靜脈注射方式將對比劑注射入老鼠體內，從低濃度開始測試，倘若老鼠注射後幾小時內無異狀可正常存活，則提升注射濃度。為了避免對比劑在老鼠體內堆積，每次注射必須使用不同老鼠或是讓同一隻老鼠間隔一天的時間再進行實驗。我們從 1mg/c.c 的注射濃度逐漸提升至 8mg/c.c，注射量為 0.1c.c，老鼠在注射後皆無異狀可正常存活。接著我們大略估算微氣泡在老鼠體內的濃度，當使用沒有靶向性功能的對比劑時，假設微氣泡在老鼠體內經過血液循環後濃度可均勻稀釋。體重 20 克的老鼠總血量約為 1.5c.c (佔體重的 1/13)，則將濃度 8mg/c.c 的微脂體對比劑注射 0.1cc 的量進入老鼠體內後，經過血液循環的對比劑濃度約為 0.5mg/c.c。參照 4.2.2 節的仿體實驗測試可知，0.5mg/c.c 的微氣泡濃度可有效增強流體信號，因此接下來的活體實驗中，對比劑的注射量皆為 0.1c.c，注射濃度 8mg/c.c。

首先我們觀察老鼠尾巴在注射前後的 B-mode 影像變化，圖 4-18 即為 40MHz 下的 B-mode 影像，可以清楚的觀察到靜脈血管內的情形。在注射對比劑之後，除了紅圈處有少許的微氣泡信號外，大部分靜脈血液的散射信號並沒有明顯增強。接著我們使用商用的高頻診斷超音波系統 (Capistrano Labs, Incorporated) 來觀察注射時靜脈血管的即時影像，如圖 4-19 所示，紅箭頭處即為針頭所在位置，當針筒開始將對比劑注射入靜脈時，可以觀察到靜脈血管的管徑被注射液體撐開的現象。理論上當靜脈內有微氣泡流過時，在影像上應可觀察到一團較亮的信號在血液中流動，然而我們在即時影像上並沒有觀察到此現象。

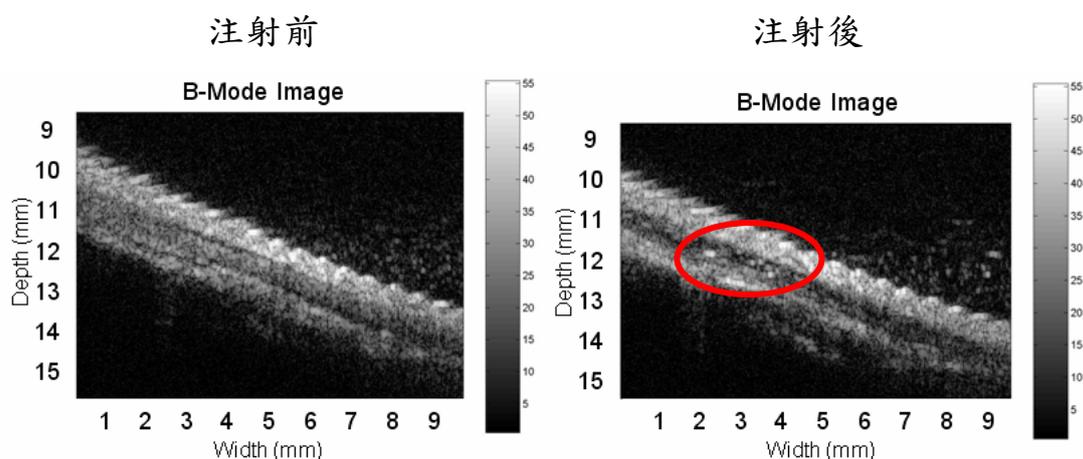


圖 4-18：老鼠尾巴靜脈在注射前後的 B-mode 影像。

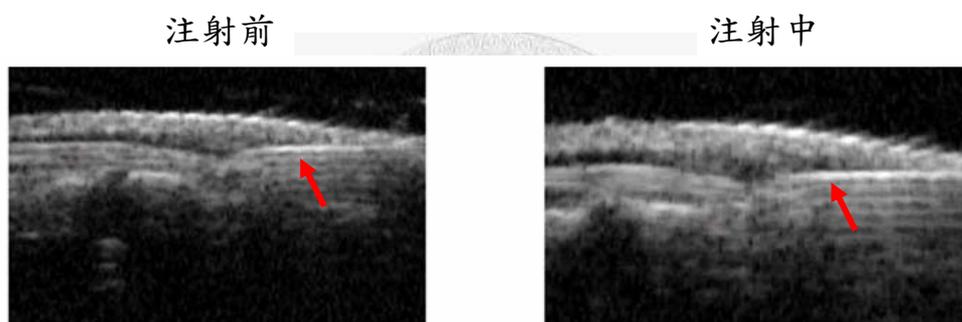


圖 4-19：使用商用的高頻超音波系統觀察靜脈注射時的即時影像，箭頭所指為針頭所在位置。

從上述的實驗結果可知，雖然微脂體微氣泡在仿體實驗可有效增強流體信號，但在小動物血管內卻沒有同樣的效果，因此接下來我們做了一個使用血液的仿體實驗，來測試對比劑在血液中是否會產生不一樣的變化，而造成活體血流實驗的失效。實驗架構仍如圖 4-1 所示，我們將配置好的微脂體對比劑以一比一的體積比與血液混合後，置入組織仿體的洞內並掃描 B-mode 影像，血液是在實驗時抽取大鼠的血液後馬上使用。發射信號為六個週期的 40MHz 正弦波，基頻成像與脈衝反相基頻成像的結果如圖 4-20 所示，左排為不同對比劑濃度下的仿體影像，而右排為不同對比劑濃度加入血液以後的仿體影像，我

們也掃描了純血液的仿體影像作為參考。

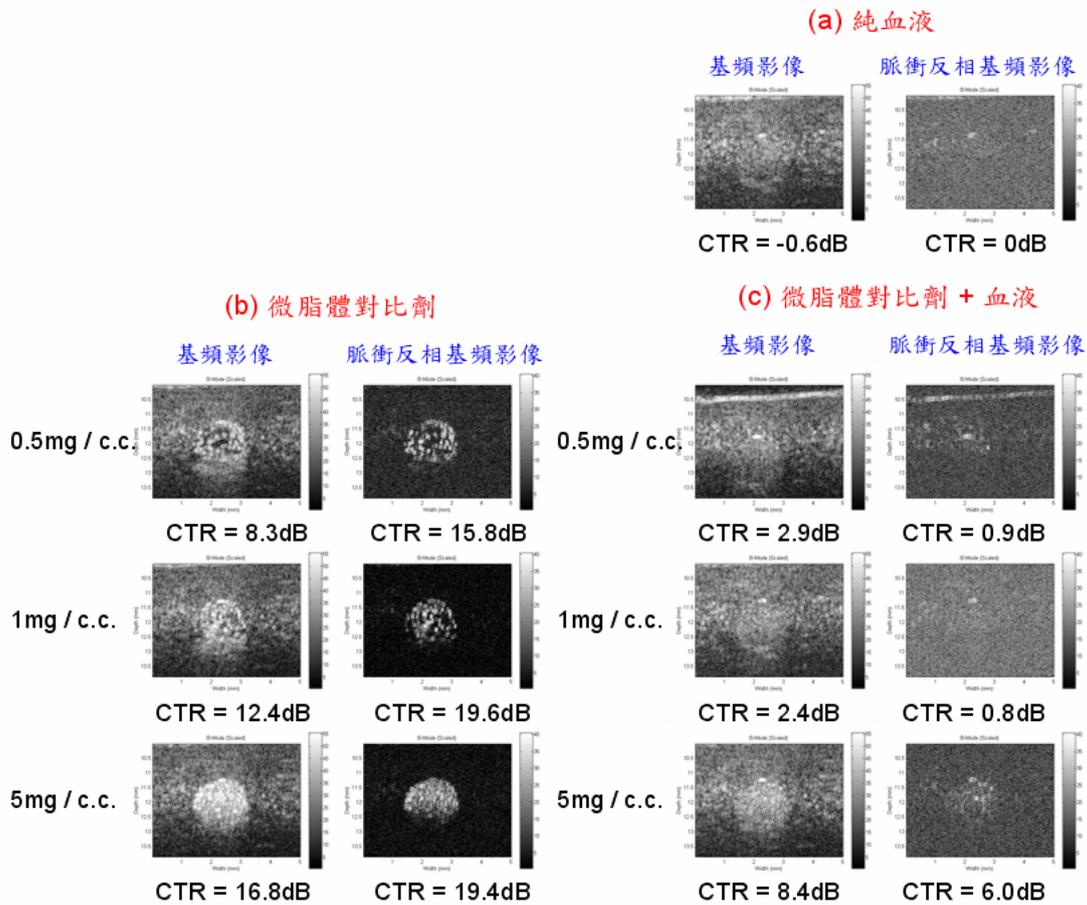


圖 4-20：各種不同對比劑濃度下，微脂體對比劑與其加入血液後的成像比較。

圖 4-20 中，首先比較純血液與血液加入對比劑後的基頻影像，可以觀察到血液散射強度的增加不大，必須要到 5mg/c.c. 的高對比劑濃度血液散射強度才有較明顯增加。接著比較在相同的對比劑濃下，微脂體對比劑與其在血液中的基頻影像，可以觀察到在血液中對比劑區域的散射強度變弱了，使得 CTR 下降了 5~10 dB。比較兩者的脈衝反相基頻影像，在微脂體對比劑影像中仍有明顯的微氣泡信號，然而在對比劑加入血液後的影像卻幾乎沒有微氣泡信號。因此從上述的實驗結果中，可以推測微脂體微氣泡在進入血液之後可能發生破裂的情況，而使得對比劑的顯影功能不佳。

微脂體微氣泡在血液中發生破裂的原因，我們推測有以下兩種可能因素，第一個是血液中的酵素或是其他蛋白質成分使微脂體的脂質球殼產生溶解而破裂，然而我們將有加入抗凝血劑的血液置放兩星期後重複此實驗，仍然得到相同的結果，由於置放兩星期的血液其中酵素與蛋白質應該已壞死，但仍使得微氣泡發生破裂的情況，因此此項因素應可排除。第二個原因可能是微氣泡在血液中內外的滲透壓不等所致，當微氣泡外部的滲透壓高於或是低於微氣泡內部的滲透壓時，微氣泡就會發生收縮或是脹大的情形而造成破裂，針對此點我們必須經過進一步的實驗加以確認，調整微脂體的內部滲透壓以及外部滲透壓，以判斷是否為此項因素所造成。期望對比劑在活體實驗中也能有良好的成像效果。



第五章 結論與未來工作

5.1 結論

在高頻超音波血流成像上，關於都卜勒血流成像方面，我們希望能提升系統偵測緩慢微細血流的能力，以提升流速解析度。高頻超音波在緩慢血流的速度估計上容易遭遇到一些問題，首先是掃掠式掃描方式會造成組織頻譜增寬效應，使得都卜勒頻譜上流速緩慢的血流信號與組織信號容易發生混疊情況，限制了系統可偵測的最小流速。此外，由於組織信號與血流信號在都卜勒頻譜的位置近似，用來濾除組織信號的 wall filter 其濾波效果更顯的重要。在都卜勒掃描上，我們為了壓制組織頻譜增寬效應，並使得 wall filter 能有效濾除組織信號，選擇了低掃描速度的連續掃掠式掃描方式，如此可壓制組織頻譜增寬效應，以降低系統的可偵測最小流速，並使得 wall filter 有足夠長度的都卜勒信號可以濾波，以有效發揮 wall filter 壓制組織信號的效用。實驗結果顯示，在都卜勒血流成像上，我們使用低掃描速度的連續掃掠式掃描方式，可以成功偵測到老鼠腫瘤內部管徑為 100 ~ 200 μm ，而流速在 5 mm/sec 以下的微細血管，成功提升了高頻系統偵測緩慢微細血流的能力。

然而高頻超音波系統在都卜勒血流成像上仍然有所限制，例如在偵測微血管時，當血流速度極為緩慢時，不明顯的都卜勒效應容易使得系統偵測血流的靈敏度不夠高，而高頻超音波由於聲波頻率較高，傳遞的衰減效應也會較嚴重，因此在血流成像上難以獲得較高的訊雜比，所以我們希望能使用對比劑來改善影像品質，利用對比劑成像來進一步提升系統偵測血流的靈敏度。在本研究中，我們使用自製的微脂體微氣泡來當作高頻對比劑。仿體實驗結果顯示，直徑大小 1 μm 的微脂體微氣泡可以有效增強流體的散射信號。在對比劑的非線性成像方面，我們使用脈衝反相基頻成像技術，在 B-mode 影像上可以成

功壓制組織信號，而留下微氣泡信號，提升了流體信號與組織信號的對比度，因此使用脈衝反相基頻成像技術可以提升 CTR，使我們能有效偵測微氣泡灌注區域。在定量的討論方面，我們探討了在不同發射週期與不同的發射頻率下，CTR 改善程度的變化。實驗結果顯示使用越多的發射週期可以得到越佳的 CTR 提升效果，在 20~50MHz 的頻率範圍中，以 35MHz 的 CTR 提升效果最佳。相較於對比劑的二次諧波成像，脈衝反相基頻成像的 CTR 值也較佳。然而脈衝反相基頻成像容易受到組織移動而影響 CTR 的提升效果，必須在組織軸向移動速度較小的情況下，才可有效提升 CTR。

5.2 未來工作

在本論文中探討了都卜勒血流成像的掃描方式，我們使用低掃描速度的連續掃掠式掃描方式，可提升系統偵測緩慢血流的能力。然而低掃描速度也會造成掃描影像時間增長的問題，倘若掃描一張影像的時間內小動物有明顯的組織移動時，就會造成影像上的變形失真，因此我們必須針對組織移動的問題做出進一步的改善。此外，在高頻探頭與系統硬體架構方面，我們也提出在未來可以改進的地方。

在對比劑成像方面，體外的仿體實驗中，已證實微脂體微氣泡在高頻超音波下可有效增強流體的散射信號，並可藉由微氣泡對於正、負聲壓的非線性響應，使用脈衝反相基頻成像技術進一步提升組織與微氣泡信號的對比度，以有效偵測微氣泡灌注區。然而在活體實驗中微脂體對比劑並沒有明顯的增強血流信號，我們必須針對微脂體對比劑做出一些改進，以期望對比劑在小動物血流成像上也有如同體外的仿體實驗有一樣好的效果，達到小動物分子影像的目標。以下我們針對都卜勒血流成像以及對比劑成像兩方面，來進一步說明相關的未來後續工作：

5.2.1 都卜勒血流成像

消除組織移動的干擾

在彩色都卜勒掃描上，我們使用橫向掃描速度 2 mm/sec 的連續掃掠式掃描方式，掃描一張橫向範圍 4 mm 的彩色都卜勒影像需要 2 秒的掃瞄時間，因此在這 2 秒的掃瞄時間內，如果小動物因為呼吸而造成組織移動現象，則會使得 B-mode 影像中的組織輪廓變形，以及彩色都卜勒影像中有整體的一致性組織移動速度，如圖 4-17 所示，因此容易影響欲觀察的血流區域。如果要消除組織移動的干擾，我們可以在掃描方式上做一些變化，在進行都卜勒掃描之前，先使用 B-mode 影像掃描愈觀察的組織區域，從影像上組織邊界的跳動的情況，可讓我們估計小動物的組織跳動頻率，得到此項資訊後，在接下來的都卜勒掃描上即可避開組織跳動的時間，也就是當組織靜止時，探頭橫向掃描一段距離，待組織跳動之前停止掃描，等到組織跳動結束後繼續進行掃描。此種走走停停的連續掃掠式掃描方式即可避開組織移動所造成的影響。

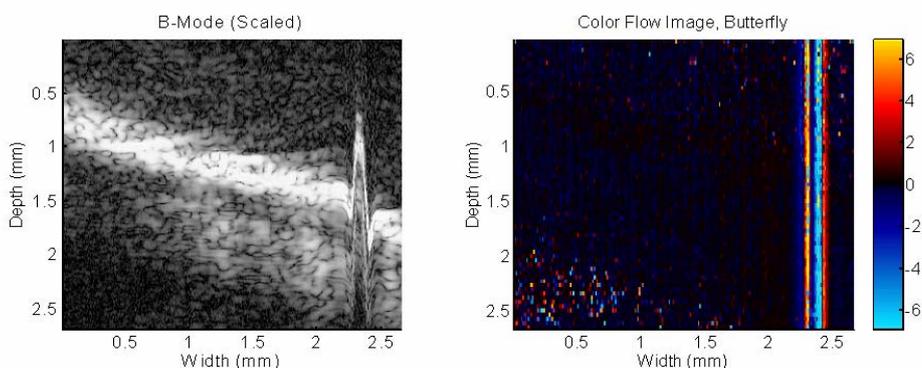


圖 5-1：有組織移動的情況下進行都卜勒掃描，在影像上所造成的影響。

使用高頻陣列探頭

在未來我們期望探頭的製作技術進步以後，能使用高頻陣列探頭來進行電子式掃描以及動態聚焦。如此可改善高頻系統成像速度較慢

的問題，達到即時顯像的成像效果，讓生物組織特性立即成像。在都卜勒血流掃描上，如果使用電子式掃瞄就可去除組織頻譜增寬效應，在血流速度估計上即可降低最小估計流速值，並有機會達成即時的彩色都卜勒成像，使我們能即時觀察血流變化。

改進系統硬體架構

目前高頻超音波系統的硬體架構上，仍有地方可加以改進來提升血流成像品質。在接收端的類比數位轉換器上，目前是使用 8 bits 振幅解析度的高速取樣電路 (PDA500)，我們期望能提升到 12 bits 或是更高的振幅解析度，如此不但可降低量化雜訊，在血流流速的估計上也能更加準確。此外，在接收信號進入類比數位轉換器之前，如果能經過時間增益補償 (time gain compensation) 的類比放大器，則可補償超音波在組織中的傳遞衰減效應，提升影像較深區域的成像品質。在提升顯像速率方面，在機械式掃描的限制下可以使用較高速的馬達帶動高頻探頭來進行掃描，並將後續的運算工作交給專門的數位信號處理晶片 (digital signal processor, DSP) 來處理，可縮短掃描與訊號處理的時間，有效的提升顯像速度。

5.2.2 對比劑成像

改進微脂體對比劑

從 4.4 節的實驗結果中，我們推測微脂體微氣泡在血液中發生破裂的情況，因此無法有效增強血液的散射信號，其可能原因之一為微氣泡內外部滲透壓不一致，使得微氣泡發生收縮或是脹大的情況而破裂，針對此點我們必須經過進一步的實驗加以確認，如果是此項原因所致，則必須在微脂體的製程中改變微氣泡內部的滲透壓，使其與血液的滲透壓一致。我們期望改進後的微脂體微氣泡在血液中不會發生破裂的情況，可有效增強血流散射信號並使用脈衝反向成像技術，以成功用在小動物血流成像上。

製作靶向性對比劑

微脂體對比劑為脂質所包覆的空氣泡，在脂質外殼上我們可以透過共價鍵結的方式將配位體 (ligand) 附加在微氣泡表面，配位體可視為一種抗體 (antibody)，而腫瘤細胞膜上有特殊的抗原 (antigen)，抗體與抗原之間的親和力會將兩者互相結合，因此外殼附加配位體的微氣泡可以聚集在腫瘤組織區域，達成靶向性功能的目的。我們必須針對不同腫瘤細胞的抗原，來選擇使用不同的配位體。使用靶向性對比劑可讓欲觀察特定組織區域的血流顯影效果更加明顯，並使我們有潛力發展具有分子探測功能的小動物分子影像。

血流密度指數的計算

在癌症的研究中，目前已知血管新生 (angiogenesis) 在癌症的發展中扮演重要的角色，我們希望能觀察腫瘤內部血管新生的情況，以了解腫瘤生長與轉移的情形。如果我們能將有效的高頻對比劑注射入小動物體內，並結合都卜勒血流成像，即可提升腫瘤內部微血管的散射信號，增加偵測血流的靈敏度與解析度。如此可讓我們使用血流密度指數 (Vascularity index) 來量化評估血管新生的情況，血流密度指數即腫瘤內的彩色都卜勒畫素 (pixel) 數與腫瘤的總畫素數之比，可讓我們在癌症研究上提供一項重要的研究資訊。

第六章 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 Medical & Biology*, Vol. 26, No. 1, pp. 1-27, Jan. 2000.
- [2] D. A. Knapik, B. Starkoski, C. J. Palvin, and F. S. Foster, “**A 100-200 MHz Ultrasound Biomicroscope**”, *IEEE Trans. on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 47, No. 6, pp.1540-1549, Nov. 2000.
- [3] J. Folkman, “**Angiogenesis: Initiation and Control**”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 401, No 1, pp. 212-227, 1982.
- [4] 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*, Vol. 93, pp. 761-765, 1999.
- [5] 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*, Vol. 74, No. 2, pp. 235-240, 1999.
- [6] T. Nakamura, Y. Mochizuki, H. Kanetake, and S. Kanda, “**Signals via FGF Receptor 2 Regulate Migration of Endothelial Cells**”, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 289, No.4, pp. 801-806, 2001.
- [7] 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*, Vol.4, No.1, pp. 11-20, 2001.
- [8] VisualSonics Inc., <http://www.visualsonics.com/>.
- [9] 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 Medical & Biology*, Vol. 26, No. 8, pp. 1275-1283, Oct. 2000.
- [10] 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 Medical & Biology*, Vol. 28, No. 9, pp. 1156-1172, Sep. 2002.
- [11] 李百祺, “都卜勒影像,” 醫用超音波原理及技術, pp. 42-64, 2000.
- [12] 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, 2001.
- [13] 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 Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 43, No. 1, pp. 149-157, Jan. 1996.
- [14] J. A. Jensen, ”**Estimation of Blood Velocity Using Ultrasound**”, *Cambridge University Press*, 1996.
- [15] Siemens Medical, <http://www.siemensmedical.com/>.
- [16] 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 Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 45, No. 6, pp. 1437-1440, Nov. 1998.
- [17] Dustin Kruse, Ronail Silverman, Steven Erickson, D. J. Coleman, and K. W. Ferrara, “**Optimization of Real-time High Frequency Ultrasound for Blood Flow Imaging in the Microcirculation**”, *2000 IEEE Ultrasonics Symposium*.
- [18] 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 Medical & Biology*, Vol. 29, No. 1, pp. 39-51, Jan. 2003.
- [19] Steinar Bjaerum, Hans Torp, and Kjell Kristoffersen "**Clutter Filter Design for Ultrasound Color Flow Imaging**", *IEEE Trans. on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 49, No. 2, pp.204-216, Feb. 2002.
- [20] N. de Jong, "**Improvements in Ultrasound Contrast Agents**", *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, Vol. 15, No. 6, pp. 71-80, 1996.
- [21] F. N. Burns, "**Harmonic Imaging with Ultrasound Contrast Agents**", *Clin. Radiol*, Vol. 51, No. 1, pp. 50-54, 1996.
- [22] K. Wei, A. Jayaweera, S. Firoozan, A. Linka, D. M. Skyba, and S. Kaul, "**Quantification of Myocardial Blood Flow with Ultrasound-Induced Destruction of Microbubbles Administered as A Constant Venous Infusion**", *Circulation*, Vol. 97, pp. 473-483, 1998.
- [23] D. L. Miller, "**Ultrasonic Detection of Bubbles by Their Second Harmonic Emissions**", *Ultrasonics*, Vol. 19, pp. 217-224, Sep. 1981.
- [24] B. C. Eatock, and R. Y. Nishi, "**Numerical Studies of the Spectrum of Low Intensity Ultrasound Scattered by Bubbles**", *The Journal of the Acoustical Society of America*, Vol. 77, pp. 1692-1701, 1985.
- [25] A. Prosperetti, "**Nonlinear Oscillations of Gas Bubbles in Liquids: Cavitation**", *JASA*, Vol. 57, pp. 810-821, 1975.
- [26]W. Lauterborn, "**Numerical Investigation of Nonlinear Oscillations of Gas Bubbles in Liquids**", *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 59, pp. 283-293, 1976.
- [27]David E. Goertz, Emmanuel Cherin, Andrew Needles, Raffi Karshafian, Allison S. Brown, Peter N. Burns, and F. Stuart Foster,

- “High Frequency Nonlinear B-Scan Imaging of Microbubble Contrast Agents”**, *IEEE Trans. on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 52, No. 1, pp.65-79, Jan. 2005
- [28] J. E. Powers, P. N. Burns, and J. Souquet , **“Imaging Instrumentation for Ultrasound Contrast Agents”**, *Advances in Echo Imaging Using Contrast Enhancement*, N. C. Nanda, S. Reinhard, and B. B. Goldberg, Eds., Kluwer Acad. Press, 1997.
- [29] F. Forsberg, W. T. Shi, and B. B. Goldberg, **“Subharmonic Imaging of Contrast Agents”**, *Ultrasonics*, Vol. 38 (1-8), pp. 93-98, Mar. 2000.
- [30] J. Chomas, P. Dayton, D. May, and K. Ferrara, **“Nondestructive Subharmonic Imaging”**, *IEEE Trans. on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 49, No.7 , pp. 883-892, Jul. 2002.
- [31] W. T. Shi, F. Forsberg, and B. B. Goldberg, **“Subharmonic Imaging with Gas-filled Microbubbles”**, *The Journal of the Acoustical Society of America*, Vol. 101, pp. 3139, 1996.
- [32] W. T. Shi and F. Forsberg, **“Ultrasonic Characterization of the Nonlinear Properties of Contrast Microbubbles”**, *Ultrasound in Medical & Biology*, Vol. 26, No.1, pp. 93-104, Jan. 2000.
- [33] E. Cherin, J.K. Poulsen, A.F.W. Van der Steen and F.S. Foster, **“Comparison of Nonlinear and Linear Imaging Technique at High Frequency”**, *2000 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1639-1643.
- [34] Yadong Li and James A. Zagzebski, **“Computer Model for Harmonic Imaging”**, *IEEE Trans. on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 47, No. 4, pp. 1000-1013, July 2000.
- [35] C.-C. Shen and P.-C. Li, **“ Pulse-Inversion-Based Fundamental Imaging for Contrast Detection: An Experimental Study”**, *IEEE*

- Trans. on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 50, No. 9, pp. 1124–1133, Sep. 2003.
- [36] Wei-Jung Guan , “ **Sub-micro Contrast Agent for High Frequency Ultrasound Imaging System**”, 2002.
- [37] L. Hoff, “**Nonlinear Response of Sonazoid, Numerical Simulation About Pulse-Inversion and Subharmonic**”, 2000 *IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1885-1888.
- [38] K. Morgan, M. Averkiou, and K. Ferrara, “**The Effect of the Phase of Transmission on Contrast Agent Echoes**”, *IEEE Trans. on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 45, No. 4 pp. 872-875, July 1998.
- [39] Evan C. Ungera,b, Thomas Porterc, William Culpd, Rachel Labella, Terry Matsunagaa, Reena Zutshia, “**Therapeutic Applications of Lipid-coated Microbubbles**“, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 56, No. 9, pp. 1291-1314, May. 2004.
- [40] D. E. Goertz, “**High Frequency Ultrasound Imaging of the Microcirculation**”, *PhD Thesis*, University of Toronto, 2002.
- [41] N. de Jong, L. Hoff, T. Skotland, and N. Bom, “**Absorption and Scatter of Encapsulated Gas Filled Microspheres: Theoretical Considerations and Some Measurements**”, *Ultrasonics*, Vol. 30, No. 2, pp. 95-103, Mar. 1992.
- [42] C. C. Church, “**The Effects of an Elastic Solid Surface Layer on the Radial Pulsations of Gas Bubbles**”, *The Journal of the Acoustical Society of America*, Vol. 97, No. 3, pp. 1510-1521, Mar. 1995.
- [43] 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, 2002.
- [44] Shao-Ling Huang, Andrew J. Hamilton, Ashwin Nagaraj, Susan D. Tiukinhoy, Melvin E. Klegerman, David D. Mcpherson, Robert C.

Macdonald, “**Improving Ultrasound Reflectivity and Stability of Echogenic Liposomal Dispersions for Use as Targeted Ultrasound Contrast Agents**”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 90, No. 12, pp. 1917-1926, Dec. 2001.

[45] Che-Chou Shen and Pai-Chi Li, “**Motion Artifacts of Pulse Inversion-Based Tissue Harmonic Imaging**”, *IEEE Trans. on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 49, No. 9, pp. 1203-1211, Sep. 2002.

[46] 吳金洌, “**斑馬魚之動物模式研究人類疾病之基因體功能**”, 中央研究院學術諮詢總會通訊, 第十三卷, 第一期, pp. 39~43, 民國九十三年八月.





附錄 微脂體對比劑製作方法

步驟一：

將下列藥物 (DOPE, DSPC, PG, CH) 依照下表 1 的比例配方注入圓底燒瓶後均勻混合，加入少許氯仿 (chloroform) 充分混合及溶解。

表 1：微脂體配方表[44]

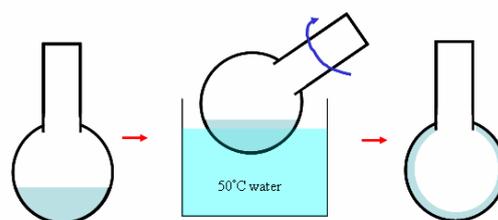
名稱	分子量	百分比 (%)	濃度 10mg/ml，總體積 5 c.c 的微脂體溶液，含有各種藥品的莫耳數
PE ^[a]	748.07	8	5.57 μ mols
PC ^[b]	790.15	69	48.00 μ mols
PG ^[c]	688.85	8	5.57 μ mols
CH ^[d]	386.65	15	10.44 μ mols

步驟二：

將混合溶液在 50°C 的水浴下以旋轉蒸發儀 (rotary evaporator) (圖一) 抽真空後，溶液會形成薄膜 (圖二)。



圖一：旋轉蒸發儀



圖二：旋轉蒸發示意圖

步驟三：

將樣品置於真空儀 (dessicator) 中，在真空狀態下持續 24 小時，確保其完全乾燥。

步驟四：

將在圓底燒瓶內的樣品加入去離子水 (deionized water) 共 2.5 c.c.，搖晃燒瓶使附著在瓶壁的薄膜溶解後，以超音波震碎機 (sonicator) 加以震盪，將微脂體粒子震碎至想要的尺寸 (直徑 1 μm)，量測粒徑大小的方式是使用粒徑分析儀 (Coulter N4 Particle Sizer) (圖三)。如果粒徑尺寸過大，則使用超音波震碎機再次震盪並量測。



圖三：粒徑分析儀 (Coulter N4 Particle Sizer)

步驟五：

得到想要的粒徑大小後，將溶液樣品加入 2.5 c.c.之 D-Mannitol (0.2 M)，再置於 -70°C 冷凍櫃使樣品凍結為固態。

步驟六：

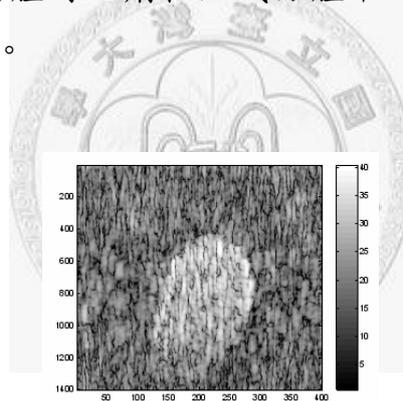
將結凍的樣品置於冷凍乾燥儀 (lyophilizer, Labconco, KansasCity,MO) (圖四) 中真空乾燥 24 小時，即可得粉末狀的微脂體對比劑共 50mg。



圖四：冷凍乾燥儀 (lyophilizer, Labconco, KansasCity, MO)

步驟七：

使用前再以生理食鹽水(NaCl:0.9g/100ml)將粉末狀微脂體對比劑配製成溶液，高頻超音波成像的最佳對比劑濃度範圍為 1~2 mg/cc，圖五即為微脂體對比劑在組織仿體中的 B-mode 影像，中間區域為對比劑灌注區。



圖五：對比劑仿體影像

Reference :

[a] PE : 1,2, Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine ($C_{41}H_{82}NO_8P$, FW=748.065441)

[b] PC : L- α -phosphatidylcholine, distearoyl, C18 : 0 ($C_{44}H_{88}NO_8P$, FW=790.1451261)

[c] PG : L- α -phosphatidyl-DL-glycerol ($C_{34}H_{66}NaO_{10}P$, FW=688.845371)

[d] CH : cholesterol ($C_{27}H_{46}O$, FW=386.65354)