

國立臺灣大學電機資訊學院生醫電子與資訊學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biomedical Electronics and Bioinformatics

College of Electrical Engineering & Computer Science

National Taiwan University

Master Thesis

靶向超音波於血栓溶解之研究

A Study on Targeted-Ultrasound Assisted Thrombolysis



Szu-Chia Chen

指導教授：李百祺 博士

Advisor: Pai-Chi Li, Ph.D.

中華民國 98 年 6 月

June, 2009

摘要

缺血性中風、心肌梗塞與深層靜脈栓塞等常見疾病與血栓的形成息息相關，臨床上注射血栓溶解劑所伴隨的內出血等副作用，使得發展安全以及更有效率的血栓溶解治療方式成為目前重要的研究課題。直至今日，歷經約 30 年的研究，超音波應用於血栓溶解治療為目前極具潛力的治療模式。許多研究團隊利用低頻超音波 (20 kHz~2 MHz) 與超音波對比劑所誘發的穴蝕效應，幫助血栓溶解劑更深入血栓內部進而增加血栓溶解的治療成效。也有研究指出，即使無血栓溶解劑的存在，超音波與對比劑的作用機制亦可造成血栓的溶解破壞。也因此，本研究的主要目的為嘗試提升超音波應用於血栓溶解治療的效能以及安全性，分別從超音波的使用頻率與靶向性超音波對比劑兩方面著手：(1) 靶向性超音波對比劑：超音波對比劑的加入可以降低誘發穴蝕效應所需要的能量，此外隨著新興生物科技的發展，藉由超音波對比劑的表面修飾，可以達到專一性辨認血栓、增加血栓局部對比劑濃度的效果。在靶向誘發穴蝕效應的作用下，希望可藉此提升體外低頻超音波輔助血栓溶解治療的安全性以及效能。(2) 超音波的使用頻率：不同於先前的研究，本研究配合臨床上的需求，嘗試發展結合觀測血栓生成以及即時溶解治療的高頻超音波系統(> 20 MHz)，並使用雙頻激發方式企圖使高頻超音波成功誘發穴蝕效應，以期將具有高空間解析度的血管內超音波應用於臨床上的血栓溶解治療，達到診治合一的目的。本研究的實驗結果顯示：1. 實驗室自製靶向性超音波對比劑的確具有標靶能力，並且具有增強血塊局部區域穴蝕效應的潛能，在未來的臨床應用上，可望在避免血管損傷的安全操作下提升血栓溶解效能。2. 聲場強度大小是影響高頻超音波能否誘發穴蝕效應的主因。因此，高頻超音波系統礙於探頭孔徑大小的限制而無法提供足夠能量誘發穴蝕效應，將造成血管內超音波應用於血栓溶解作用上的困難，也因此未來仍會以體外低頻超音波做為血栓溶解治療的

研究主軸。

關鍵詞：血栓溶解劑、超音波對比劑、穴蝕效應、雙頻激發、血管內超音波、靶向性超音波對比劑



Abstract

Ischemic stroke, myocardial infarction and deep vein thrombosis are common diseases which are related to thrombosis. Systemic thrombolytic therapy is one of the most widely used treatments for recanalization of the occluded vessel. However, the administration of thrombolytic agents has a major disadvantage of inducing comprehensive hemorrhage and may cause death. Therefore, there is a clinical need for treatment methods to increase the effectiveness of complete reperfusion without increasing the probability of bleeding. Several studies have shown that low-frequency ultrasound (20 kHz~2 MHz) enhances enzymatic thrombolysis by increasing the transport of thrombolytic agents into clots through cavitation-related mechanisms. Besides, there were some studies shown a thrombolytic potential of ultrasound in combination with ultrasound contrast agent even without the presence of thrombolytic agents. Thus, the use of ultrasound to enhance and accelerate the thrombolysis of occluded vessels is an area of active investigation. The purpose of this study was to develop two approaches for improving the efficiency and safety of ultrasound-assisted thrombolysis which were base upon the therapeutic frequency we chosen and the use of targeted contrast agents : (1). Targeted ultrasound contrast agent : Ultrasound contrast agents, mainly microbubbles, are good nuclei for reducing the threshold for cavitation induction. By the virtue of the rapid discovery of novel biomarkers and affinity ligands, targeted ultrasound contrast agents are developed to recognize thrombi and thereby increasing the local concentration of microbubbles. One hypothesis of the present study was that a targeted ultrasound contrast agent can enhance both the thrombolytic efficacy and safety in transcutaneous (noninvasive) ultrasound for the same reason. (2). The ultrasound frequency : For clinical need, we were trying to develop a high-frequency

ultrasound system with high-resolution for imaging and a possible combined diagnostic and therapeutic in vivo application using the same transducer. Thus, one component of this study is the investigation of the feasibility of sonothrombolysis by using intravascular ultrasound (IVUS, > 20 MHz). Here we used the dual high-frequency method to induce cavitation and estimate its intensity by measuring differential ICD, acoustic intensity of the low frequency component. According to the experimental results, we conclude that : 1. Our thrombus-targeted ultrasound contrast agent was capable of targeting specific sites and has the potential for inducing localized cavitation thus avoiding the possible endothelial damage in the clinical application. 2. The magnitude of acoustic intensity plays a major rule in the cavitation induction using high-frequency ultrasound. Besides, due to the limitation of high-frequency ultrasound aperture size, sonothrombolysis using intravascular ultrasound may not be feasible.

Keywords: Thrombolytic agent, Ultrasound contrast agent, Cavitation, Dual high-frequency method, Intravascular ultrasound, Thrombus-targeted ultrasound contrast agent.

目錄

口試委員會審定書.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iv
第 1 章 緒論.....	1
1.1 血栓症.....	1
1.2 血栓溶解劑.....	2
1.3 醫用超音波.....	4
1.4 超音波對比劑.....	6
1.5 穴蝕效應.....	9
1.6 超音波在血栓溶解治療的應用.....	12
1.7 研究動機與目標.....	17
1.8 論文架構.....	19
第 2 章 低頻超音波輔助血栓溶解實驗.....	20
2.1 實驗材料與方法.....	20
2.1.1 超音波對比劑.....	20
2.1.2 血塊製備.....	21
2.1.3 實驗系統架構.....	21
2.1.4 血栓溶解作用成效評估.....	22
2.2 實驗結果討論.....	24
第 3 章 靶向性對比劑輔助低頻超音波血栓溶解實驗.....	30
3.1 實驗材料與方法.....	30
3.1.1 靶向性超音波對比劑.....	30
3.1.2 血塊製備.....	32
3.1.3 靜態與流動實驗系統架構.....	32
3.1.4 血栓溶解作用成效評估.....	34
3.2 結果與討論.....	35
第 4 章 高頻超音波誘發穴蝕效應實驗.....	41
4.1 實驗材料與方法.....	41
4.1.1 超音波對比劑.....	41
4.1.2 穴蝕效應之偵測.....	41
4.1.2.1 B-mode 影像亮度觀察法.....	41
4.1.2.2 定量穴蝕效應—Inertial Cavitation Dose.....	41

4.2 血管內超音波誘發穴蝕效應	43
4.2.1 實驗系統架構	43
4.2.2 初步實驗結果與討論	44
4.3 雙頻激發方法誘發穴蝕效應	45
4.3.1 實驗架構驗證	46
4.3.2 高頻探頭誘發穴蝕效應	48
4.4 實驗結果討論	51
第 5 章 結論與未來工作	54
第 6 章 參考文獻	61



圖目錄

圖 1：血栓溶解劑 (tPA) 的作用機制[3]。.....	2
圖 2：以聲穿孔 (sonoporation) 的方式進行基因轉殖[8]。.....	5
圖 3：超音波輔助血栓溶解治療。.....	5
圖 4：超音波對比劑 (微氣泡，左) 與一般氣泡 (右) 的示意圖[11]。.....	6
圖 5：靶向性超音波對比劑的組成與標靶機制[14]。(A)標靶細胞與微氣泡的非專一性結合；(B)在微氣泡表面嵌合配位體的主動性標靶。.....	8
圖 6：穴蝕效應示意圖[20]。.....	10
圖 7：微氣泡在超音波聲場下造成的分裂現象 (fragmentation) [21]。.....	10
圖 8：穴蝕效應信號頻譜，超音波發射頻率為 1.7 MHz。(a) 未發生穴蝕效應的信號 (baseline signal)；(b)同時有穩態穴蝕效應 (subharmonic peak) 以及慣性穴蝕效應 (broadband noise) 的信號[19]。.....	10
圖 9：微氣泡半徑-時間關係圖[22]。超音波發射中心頻率，實線：15 MHz；虛線：5 MHz。圖中顯示微氣泡在較低發射中心頻率有較大幅度的半徑變化 (虛線部分)。.....	11
圖 10：心導管式血管內超音波示意圖。.....	14
圖 11：血管內超音波的血管內壁影像 (from Wikipedia)。.....	15
圖 12：超音波輔助靶向性超音波對比劑的標靶作用[34]。(A)無超音波照射下，大部分的靶向性對比劑隨著流體流動，與血管壁的接觸機會較少；(B)開啟超音波施以輻射力後，可推動靶向性對比劑移向目標物以增加與血管內壁的作用機會。.....	16
圖 13：實驗動機與流程圖.....	18
圖 14：使用 Coulter MultiSizer III 量測實驗室自製對比劑的濃度與粒徑分佈圖。平均粒徑大小為 1.5 μ m，濃度為 485 顆/50 μ L (原液濃度：9.7*10 ⁷ 顆/mL)。.....	20
圖 15：低頻超音波輔助血栓溶解實驗架構圖。.....	22
圖 16：低頻超音波輔助血栓溶解作用。橫軸為實驗變因；縱軸為 weight loss (%)。.....	24
圖 17：控制組血塊切片 (Control)。.....	25
圖 18：只有超音波照射情形下的血塊切片 (US only)。.....	26
圖 19：超音波與對比劑共同作用(穴蝕效應)後的血塊切片 (US+CA)。.....	27
圖 20：與血栓溶解劑 Streptokinase 作用 30 分鐘後的血塊切片 (SK only)。.....	28
圖 21： 血栓溶解劑與穴蝕效應共同作用後的血塊切片。(US+CA+SK)。.....	28
圖 22：使用 Coulter MultiSizer III 量測實驗室自製靶向性超音波對比劑的濃度與粒徑分佈圖。平均粒徑大小為 1.5 μ m，濃度為 332 顆/50 μ L (原液濃度：6.6*10 ⁷ 顆/mL)。.....	31
圖 23：血栓浸泡於不同溶液後的高頻超音波影像[11]。(a).生理食鹽水 (b).非	

靶向性微氣泡 (c). 靶向性微氣泡。	32
圖 24：(a). 系統架構實景 (b). 流動與靜態系統示意圖。	33
圖 25：靜態系統血栓溶解實驗結果。	36
圖 26：流動系統血栓溶解實驗結果。	37
圖 27：流動系統中，控制組血塊切片影像。	38
圖 28：流動系統中，非靶向性對比劑與超音波共同作用下的血塊切片影像。	39
圖 29：流動系統中，靶向性對比劑與超音波共同作用下的血塊切片影像。 ..	40
圖 30：ICD 原理。	42
圖 31：血管內超音波誘發穴蝕效應實驗架構圖。	44
圖 32：25 MHz 高頻超音波照射微氣泡的影像亮度變化。	45
圖 33：雙頻激發法原理示意圖。(a). 兩種不同頻率弦波相加後的發射波形 (綠色波形)。紅色：19 MHz；藍色：20 MHz。(b). 綠色波形直接作傅立葉轉換後的頻譜圖。(c). 此發射波形經過組織或微氣泡的非線性震盪後，信號經傅立葉轉換後的頻譜圖 (擷取 2 MHz 以下的部分)。	46
圖 34：雙頻激發法誘發穴蝕效應實驗架構。雙頻: 9.5 MHz+10.5 MHz, envelope frequency 為 1 (10.5-9.5) MHz，發射聲壓在 1.5 與 2 MPa 之間。	47
圖 35：雙頻激發法誘發穴蝕效應的影像亮度變化。	48
圖 36：雙高頻超音波誘發穴蝕效應實驗架構圖。	49
圖 37：雙高頻超音波誘發穴蝕效應實驗實景。	49
圖 38：雙高頻超音波經對比劑震盪後的信號頻譜 (取 2 MHz 以下)。	50
圖 39：雙高頻超音波照射對比劑前後的平均亮度差異。左：超音波照射前，平均亮度為 15.5 dB；右：超音波照射 2 分鐘後，平均亮度為 14.7 dB。	51
圖 40：ICD 曲線比較圖。	51
圖 41：低頻聲場強度比較。	52
圖 42：實驗流程及結果	54
圖 43：輻射力 (Radiation force) 造成對比劑的位移及聚積現象[50]。(a)血管、對比劑與超音波探頭的相對位置示意圖。(b)標誌上螢光的微氣泡於老鼠小動脈中的流動情形，流速為 7.5 mm/s。(c) 發射超音波後微氣泡移動至血管右方 (遠離探頭方向)，並產生微氣泡聚積的情形，此時的流速為 1 mm/s。	57
圖 44：輻射力的產生與驗證。(a) 實驗架構示意圖；(b) 實驗架構實景；(c) 影像的相對位置及分區觀測示意圖。	59
圖 45：輻射力輔助靶向性超音波對比劑血栓溶解實驗架構示意圖。(a)實驗架構圖，探頭的超音波發射方向垂直於微氣泡溶液的流動方向；(b) 架構俯視圖。	60

表目錄

表 1：血栓溶解劑的種類及性質[2]。.....	3
表 2：常見超音波對比劑的組成成分[11]。.....	7
表 3：超音波輔助血栓溶解治療的相關研究。.....	13
表 4：雙頻激發法誘發穴蝕效應的實驗條件比較。.....	52



第1章 緒論

1.1 血栓症

血栓症 (thrombosis) 為血液凝固於血管內的疾病[1]。血栓的形成與缺血性中風、肺栓塞、心肌梗塞等常見疾病息息相關，並且在各國死亡率的排名地位居高不下。血栓症的形成原因非常多而複雜，依凝血作用機轉，可分為兩種：(1)凝固系統 (如纖維蛋白原、第八因子、凝血原) 過剩，來自於遺傳性及後天性疾病導致的高凝固能力 (hypercoagulability)；(2)纖溶系統缺乏，包括抗血栓蛋白質、C 蛋白、S 蛋白等天然抗凝血蛋白質的不足。這兩種凝血機轉都會使得血液濃度提高，造成纖維蛋白溶解不正常或血管壁內組織不正常的改變並引起不正常的凝血。血栓形成的基本因素為血管損傷、血流緩慢、血小板堆積和血液高凝固。若依發生血栓 (thrombi) 的部位，則可分動脈、靜脈、及微血管[1]。

1. 動脈血栓症 (arterial thrombosis)：由於血小板在損傷血管之反應和纖維蛋白堆積，大多形成白色血栓 (white thrombus)。動脈發生血栓則造成器官缺氧，如心肌梗塞、腦血栓等。其中，80% 的腦中風 (stroke) 為腦血栓引起的缺血性腦中風。
2. 靜脈血栓症 (vein thrombosis)：為血流緩慢產生鬱血之疾病，活化凝血酶而引起，大多含紅血球而成紅色血栓 (red thrombus)。
3. 微血管性血栓症 (microcirculation thrombosis)：為大量纖維單體組成的複合物，如泛發性血管內血液凝固症 (Disseminated Intravascular Coagulation, DIC) 所引發的血栓症。

1.2 血栓溶解劑

一旦血栓形成之後，以抗凝劑治療僅能消極性地防止進一步的凝血，並無法使血栓溶解，而正常組織在養分與氧氣供應不足的情況下，將會造成永久的傷害。臨床上普遍採用血栓溶解劑 (thrombolytic agent) 作為治療方式，而血栓溶解劑即為外源性纖溶酶原活化劑 (plasminogen activator)，有組織型纖溶酶原活化劑 (tissue Type plasminogen activator, t-PA)、尿激酶 (urokinase, UK)、鏈球菌激酶 (streptokinase, SK)等[2]。其治療機制為活化纖溶酶原 (plasminogen) 轉變成纖溶酶素 (plasmin)，以溶解血塊、降低血漿之黏度[3] (圖 1)。血栓溶解劑之種類及性質列於表 1。

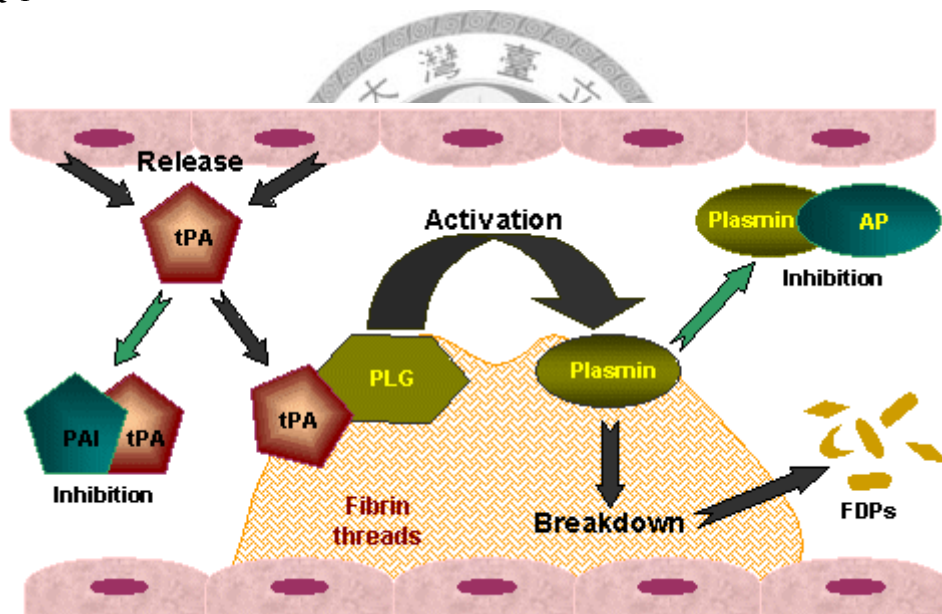


圖 1：血栓溶解劑 (tPA) 的作用機制[3]。

目前臨床上使用的血栓溶解治療方式 (thrombolytic therapy) 為症狀發生後數小時內，以靜脈注射的方式注入血栓溶解劑。但血栓溶解劑的使用有諸多限制如：

1. 內出血副作用：由於病人體質的不同，以體重換算注射血栓溶解劑的劑量有其危險性，當藥量過度時，會造成廣泛性的血管出血併發症；
2. 時間限制：時間是決定是否使用血栓溶解劑最重要的因素，以中風患者為例，文獻指出[4, 5]，若使

用 t-PA 於發病超過 3 小時的患者，則病人產生腦出血的機率大增（3 小時以內增加 6%，6 小時以內增加 14%），然而發生腦中風以及心肌梗塞後，往往需預留 1 小時的確定診斷及準備時間，以至於能夠得到此種治療的患者有限。由於注射血栓溶解劑的諸多限制，使得發展安全以及更有效的血栓溶解治療方式成為目前重要的研究課題。

表 1：血栓溶解劑的種類及性質[2]。

血栓溶解劑 種類	分子量 (Daltons : D)	半衰期 (分鐘)	來源	對纖維蛋白的 親和性及特性
Tissue plasminogen activator (t-PA)	低分子 28126 高分子 30882	60 分(體外) 2 分(體內)	黑色素 細胞瘤	最強，故產生的出血等副作用較 SK、UK 為少
Urokinase (UK) 單鏈 (pro-UK) 雙鏈	低分子 S1 31500 高分子 S2 54700	48.5±32 分 (體外) 14±6 分 (體內)	腎臟組織 培養	強。 弱。進入血中後，除了將血栓溶解外，也將正常的纖維蛋白原溶解掉的副作用，對血栓治療的效果不佳
Streptokinase (SK)	48000	18 分 (速相) 83 分 (遲相)	β 鏈球菌 之培養液	弱。其作用不具選擇性，故有出血之疑慮。

1.3 醫用超音波

人耳所能聽見的音波頻率約在 20-20000 Hz，大於 20000 Hz 的頻率範圍稱作超音波。超音波的研究和發展從第二次世界大戰期間，隨著聲納 (Sonar) 的發明，被應用在偵測敵艇的方位及距離，直至 1950 年代後期才開始真正應用到醫學診斷上。一般醫用超音波的頻率範圍約在 0.1-50 MHz，可依醫學需求的不同而採用不同的頻率，可以分為診斷用超音波以及治療用超音波。

(1) 診斷用超音波：臨床上普遍使用的超音波頻率範圍落在 2-15 MHz 之間，具有 1 mm 以下的空間解析度，可獲得組織結構影像及血流速度資訊。而普遍在心導管手術中使用的血管內超音波 (Intravascular Ultrasound, IVUS)，中心頻率在 20 MHz 以上，由於具有更高的空間解析度 ($< 100 \mu\text{m}$)，因此可以精確觀測血管內壁的組織形態。除此之外，由於超音波為一非游離輻射的醫學影像系統，並且具有即時觀測的優勢，也因此高頻超音波 (20-100 MHz) 在新興的分子影像領域中亦扮演著極為重要的角色。

(2) 低頻的超音波波束具有較好的穿透深度可以作深處聚焦，能量在組織內的分佈也可以達到良好的規範。超音波的治療效應主要可以分為兩種：熱效應以及機械效應。前者以非侵入的方式將體內深部聚焦處的組織加以燒灼，其原理為組織吸收超音波能量後溫度上升，使目標組織的蛋白質變性壞死以達到治療功效，如癌症治療[6-8]。而在機械效應方面，由於超音波為一隨時間改變強度的機械波 (疏密波)，一疏一密的交替下，可以使超音波對比劑產生震盪，進而應用在治療領域上。目前重要的治療發展如聲穿孔 (sonoporation) 基因轉殖治療[9] (圖 2)、超音波輔助血栓溶解治療等 (圖 3)。

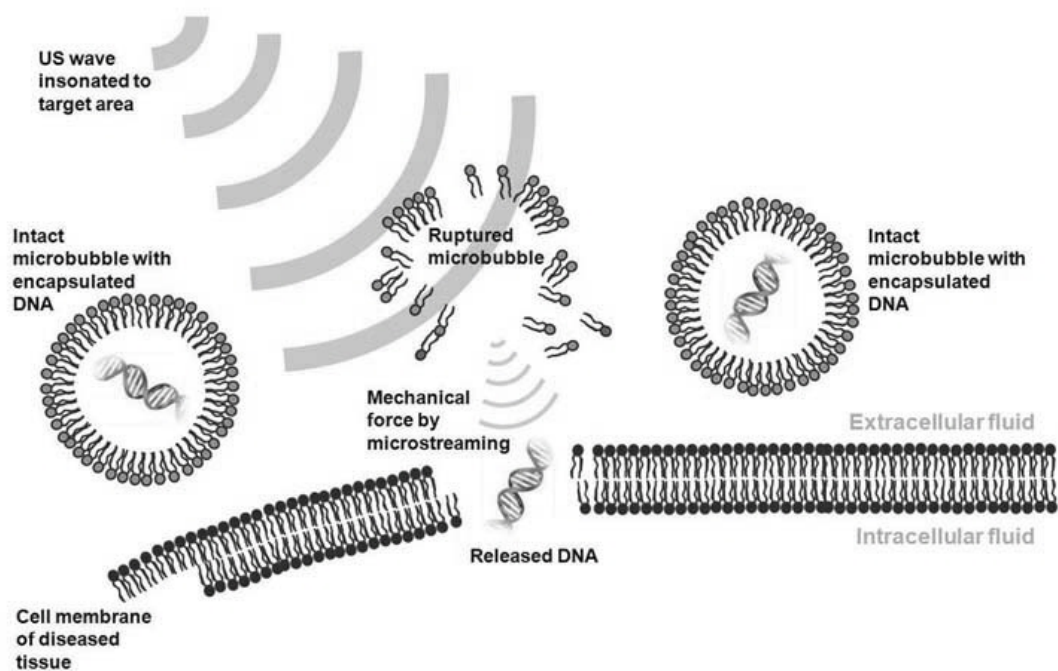
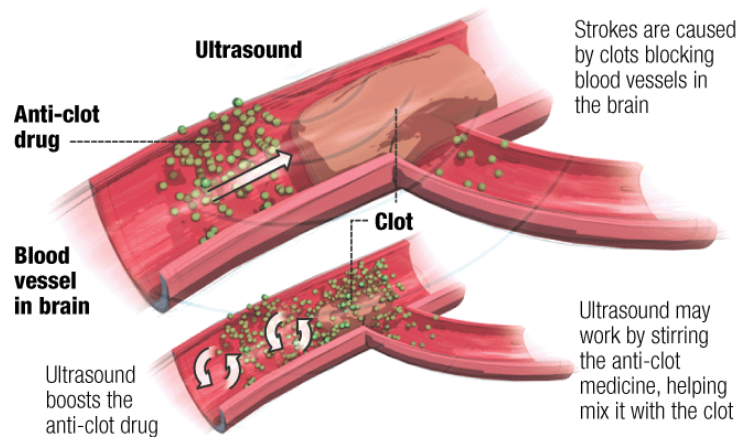


圖 2：以聲穿孔 (sonoporation) 的方式進行基因轉殖[8]。

HEALTH: ULTRASOUND FIGHTS CLOTS DURING STROKES

A new study found that ultrasound energy used with the anti-clot drug tissue plasminogen activator restored blood flow in almost half of patients tested within two hours. Nearly 163,000 deaths were from strokes in 2002, the No. 3 cause of death in the United States.



Sources: Centers for Disease Control and Prevention;
New England Journal of Medicine

Associated Press

圖 3：超音波輔助血栓溶解治療。

1.4 超音波對比劑

常見的超音波對比劑以微氣泡 (microbubble) 的形態為主，可以經由靜脈注射的方式加強血液的散射信號或增加正常組織與不正常組織之間的影像對比度，一個理想的超音波對比劑需要以下特點[10]：(1) 無生物毒性，並且可以被生物體代謝排除；(2) 製作方法簡易並且可經由靜脈注射；(3) 可以通過肺循環及微循環；(4) 具有相當的穩定性。

微氣泡的組成 (圖 4 左) 包括(1) 外殼:厚度約為數百奈米,以白蛋白 (albumin) 或脂質 (lipid) 為主要構成,比一般氣泡 (圖 4 右) 更具穩定性,並且具有生物相容性;(2) 包覆氣體:以難溶性氣體為主,如全氟化丙烷 (perfluoropropane)、 SF_6 等,可增加對比劑的生物半衰期及穩定性。微氣泡的大小範圍約在 $1\text{-}5\text{ }\mu\text{m}$ 之間,足以通過肺循環以及微循環,達到增強對比的功能。常見的超音波對比劑組成示於表 2。

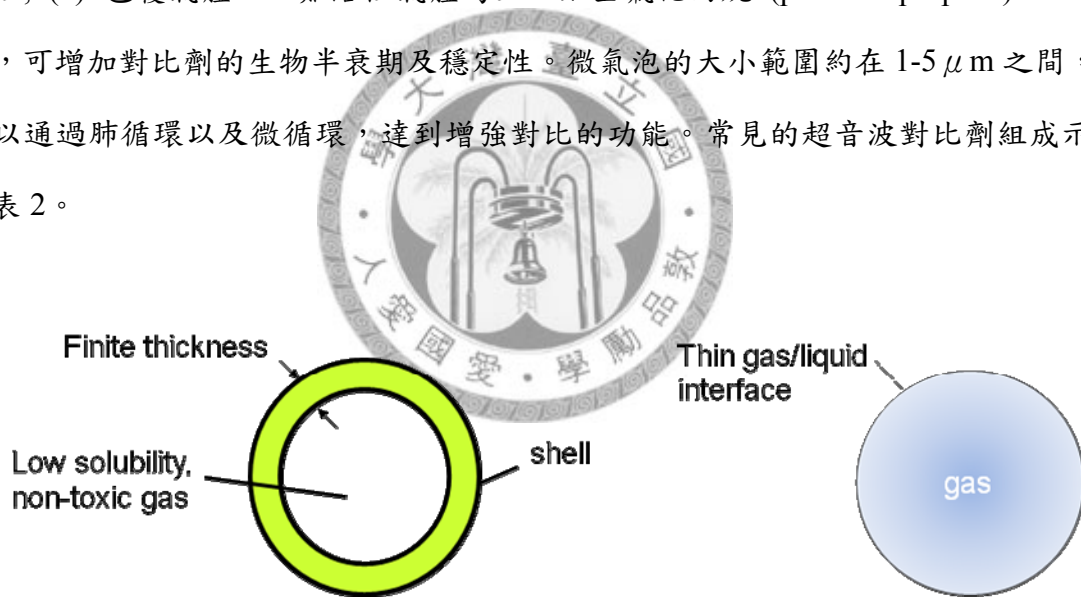


圖 4：超音波對比劑 (微氣泡，左) 與一般氣泡 (右) 的示意圖[11]。

表 2：常見超音波對比劑的組成成分[11]。

Contrast agent	Filling gas	Encapsulating shell material
Albunex®	air	sonicated serum albumin
Optison™	octafluoropropane	cross-linked serum albumin
Quantison™	air	spray-dried serum albumin
MP1950	decafluorobutane	phospholipid
Aerosomes™	perfluorocarbon gas	phospholipid
Filmix™	air	phospholipid
Bisphere™	air	polymer
Sonazoid™	perfluorocarbon gas	phospholipid

近年來，隨著生物技術的進步，靶向性超音波對比劑 (targeted ultrasound contrast agents) 正蓬勃發展中，如 $\alpha_v\beta_3$ -targeted microbubbles，可以偵測與癌症發展相關的血管新生 (angiogenesis) 現象[12]、具有辨認糖蛋白 GP IIb/IIIa 受體的血栓標靶微氣泡 (thrombus-targeted microbubbles) 等[13]，對於早期診斷治療及藥物的靶向給予開啟了新的契機。

靶向性超音波對比劑 (主要形態為微氣泡) 的組成與機制如圖 5，簡述如下：靶向性超音波對比劑的發展過程中通常需要選取適當的生物標記 (biomarker)，其與疾病的形成息息相關，通常為抗原 (antigen) 或胜肽 (peptide)。而與此 biomarker 有高親和性的抗體或胜肽，稱作配位體 (ligand)，可以專一辨認並結合 biomarker。藉由生物技術的發展，此配位體可以與微氣泡作化學性或生物性的嵌合 (conjugation)，當以靜脈注射的方式注入靶向性微氣泡時，藉由專一性的結合，可增強 biomarker 過分表現區域 (與疾病相關性高) 的信號強度[14]，進而增進病灶區的影像對比度並且增加超音波的治療潛能。

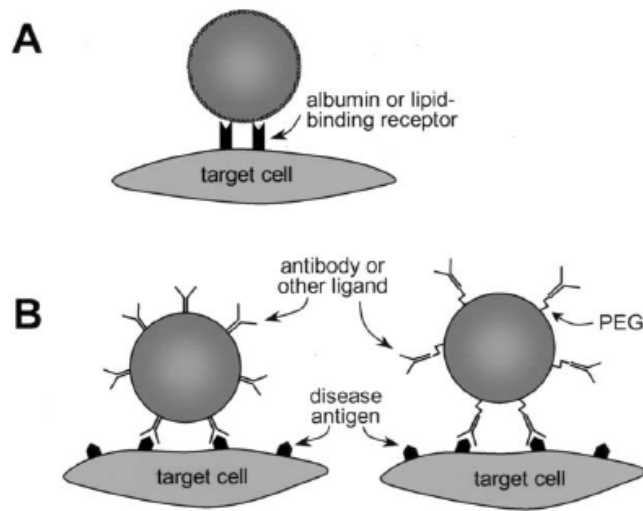


圖 5：靶向性超音波對比劑的組成與標靶機制[14]。(A)標靶細胞與微氣泡的非專一性結合；(B)在微氣泡表面嵌合配位體的主動性標靶。

在血栓靶向微氣泡的發展方面，目前已有許多應用於分子影像的研究：如 Lanza 等人，為第一位嘗試發展具有專一性結合能力的超音波對比劑，可增加超音波偵測體內血栓的靈敏度與專一性[13]；Martin 的研究團隊認為利用靶向超音波對比劑可以幫助穿顱都卜勒超音波 (transcranial Doppler ultrasound) 對於血流中血栓的偵測，並且有助於辨別新生與舊有的血栓，以得知疾病（如中風）的發展[15]；另外 Schumann 等人藉由在脂質微氣泡上鑲嵌配位體以辨認活化後血小板上的 GP IIb/IIIa，並在 *in vitro* 及 *in vivo* 實驗中驗證此靶向對比劑與血栓的專一性結合能力，並認為此血栓靶向對比劑可增強超音波對於血管中血栓偵測的靈敏度等[16]。但直至目前為止，血栓靶向超音波對比劑於血栓溶解的治療應用並不多，因此本研究將藉由靶向超音波對比劑辨認血栓的專一性能力，應用於增加血塊附近的微氣泡濃度，並施以適當的超音波能量以誘發穴蝕效應，相信在增強血塊局部區域穴蝕效應的作用後，可以提升超音波的血栓溶解效能。

1.5 穴蝕效應

在 1.3 節中曾提及利用微氣泡在超音波聲場下的震盪效應，可做治療上的應用，而此震盪效應即為穴蝕效應 (cavitation)。其定義為在超音波聲場下，液體中微氣泡生成、脹縮甚至破裂的一連串過程[17]。由於超音波為一隨時間改變強度的縱波（疏密波），當交替的正壓與負壓作用於微氣泡時，微氣泡即會發生震盪 (oscillation)，正壓使微氣泡縮小，負壓使微氣泡脹大，最後甚至可能造成微氣泡的破裂（如圖 6 與圖 7），此過程稱為穴蝕效應。大致上可以分為兩種形式：1. 穩態穴蝕效應 (stable cavitation)，發生於較低的超音波聲場強度，會造成液體在微氣泡內流動 (micro-streaming) 的現象以及增加微氣泡殼層的壓力 (shell stress) [18]。2. 慣性穴蝕效應 (inertial cavitation)：當微氣泡殼層脹縮的速度，與超音波的壓縮舒張速度不同步時，經數個循環後造成微氣泡的破裂，稱為慣性穴蝕效應或瞬變穴蝕 (transient cavitation)。兩種穴蝕效應信號經傅立葉轉換後的頻譜分布如圖 8 所示，stable cavitation 的頻譜特性為在超音波發射頻率的一半 (subharmonic frequency) 有峰值；而 inertial cavitation 的頻譜特徵為一寬頻雜訊[19]。

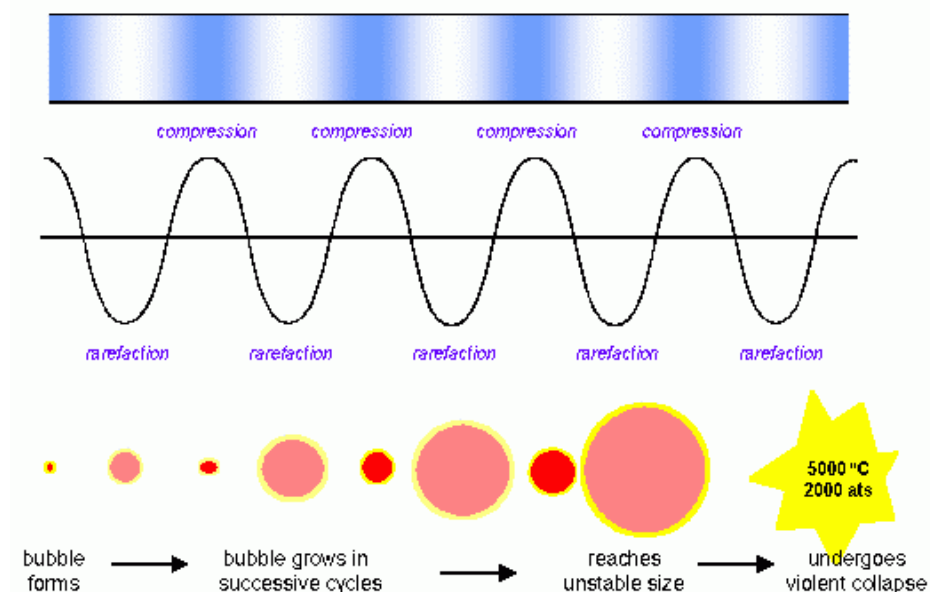


圖 6：穴蝕效應示意圖[20]。

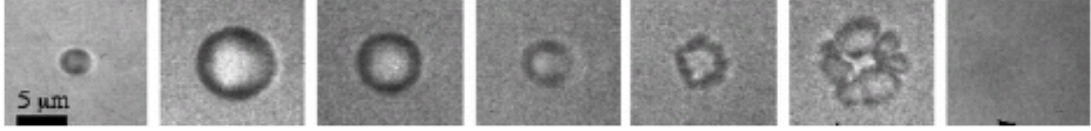


圖 7：微氣泡在超音波聲場下造成的分裂現象 (fragmentation) [21]。

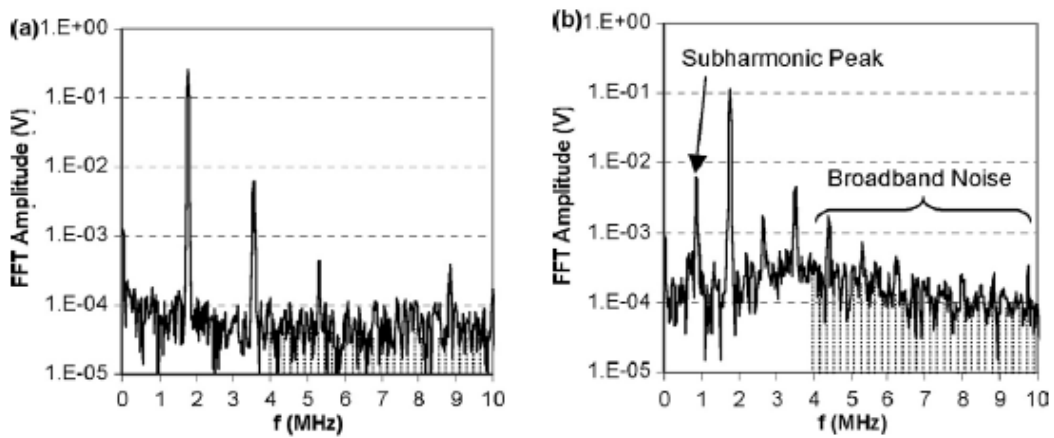


圖 8：穴蝕效應信號頻譜，超音波發射頻率為 1.7 MHz。(a) 未發生穴蝕效應的信號 (baseline signal)；(b)同時有穩態穴蝕效應 (subharmonic peak) 以及慣性穴蝕效應 (broadband noise) 的信號[19]。

基於安全考量，在醫學診斷影像系統中，穴蝕效應為應避免之現象，也因此定義和聲壓 (P) 以及發射中心頻率 (f_c) 有關的機械指標 (Mechanical Index) 作為規範，以避免發生不良的生物效應：

$$MI \equiv \frac{P_{0.3}}{\sqrt{f_c}}$$

式中，MI 值與超音波發射中心頻率的根號值成反比，原因在於微氣泡分裂情況的發生取決於微氣泡受到負聲壓時的脹大程度，也因此當超音波發射的中心頻率越高，微氣泡就越無足夠的時間脹大並震盪 (圖 9)，因而越不易發生穴蝕效應[22]。

然而在治療領域的觀點，若能在目標區域給予適當且足夠強的超音波聲壓，可使微氣泡產生強烈的破裂現象，並且可利用此現象所釋放的能量應用於：1.腫瘤治療；2.基因轉殖；3.藥物傳遞；4.加速血栓溶解速率等[23-25]。由於超音波對比劑的加入可以提供額外的穴蝕核，並降低誘發穴蝕效應所需的超音波能量，也因此本研究將會加入微氣泡作為超音波對比劑，並且對於穴蝕效應的誘發都以不超過安全規範為準則 ($MI < 1.9$)。

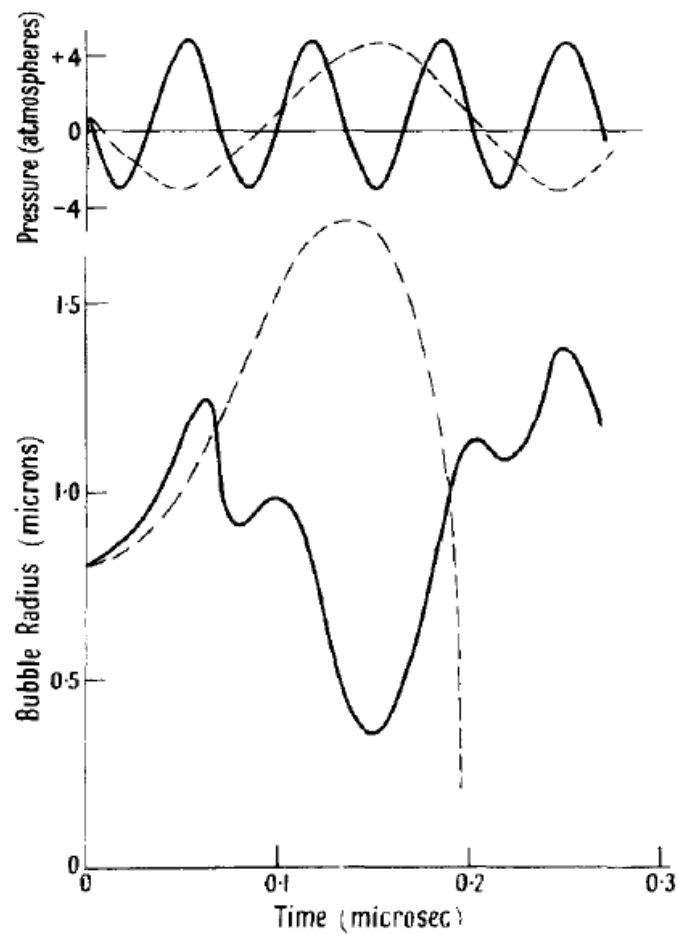


圖 9：微氣泡半徑-時間關係圖[22]。超音波發射中心頻率，實線：15 MHz；虛線：5 MHz。圖中顯示微氣泡在較低發射中心頻率有較大幅度的半徑變化（虛線部分）。

1.6 超音波在血栓溶解治療的應用

在 1.2 節中提到，臨床上治療血栓相關疾病，如缺血性中風、心肌梗塞、深層靜脈栓塞等，以靜脈注射血栓溶解劑為主要的治療方式，但是此種方式為全身性的溶解治療，容易有出血的副作用以及劑量控制不易等問題，因此若能利用超音波誘發穴蝕效應所產生的能量輔助血栓溶解治療，將可望有效降低血栓溶解劑的治療劑量，意即在提高安全性的前提下提高治療效能。

直至今日，已經有許多超音波輔助血栓溶解治療的研究：如 Francis 等人，藉由在血栓溶解劑 (t-PA) 上標定放射性元素，指出在超音波的作用下，可以使血栓溶解劑在血塊中有更深入的分佈[24]；Everbach EC 等人的實驗結果認為對比劑（微氣泡）的加入，可以比單純只有超音波照射有更好的血栓溶解成效[25]，並可以將血栓溶解劑的治療成效提高約 20 % [26-29]。Suchkova 等人的實驗結果指出，隨著超音波發射功率的增加，血栓溶解的成效越好[30]：在功率分別為 0.25 W/cm^2 、 0.75 W/cm^2 、 1 W/cm^2 、 1.5 W/cm^2 的情況下的重量減輕百分比依序為 $35 \pm 6\%$ 、 $58 \pm 6\%$ 、 $75 \pm 6\%$ 、 $77 \pm 8\%$ (平均值 $\pm$ 標準偏差)。除此之外，更有研究指出，即使在沒有血栓溶解劑的存在下，超音波與超音波對比劑所引發的機械效應亦可以造成血栓的溶解作用[19, 31]。其中機制雖然尚未完全了解，但普遍認為與超音波的穴蝕效應息息相關[19, 27-29, 31-33]。

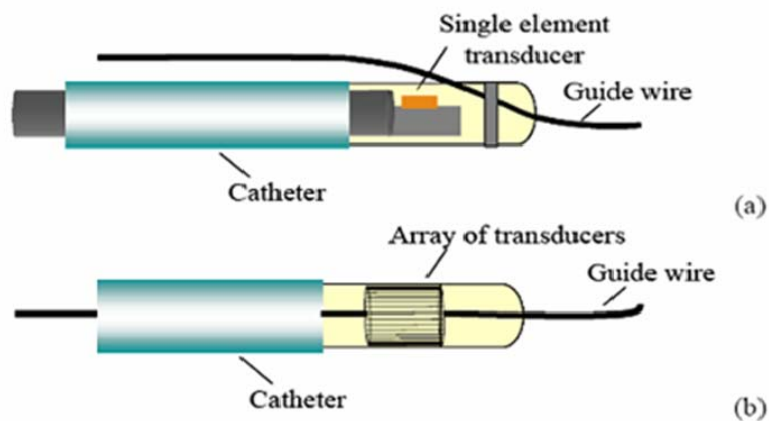
超音波輔助血栓溶解治療的相關研究整理如表 3，可以發現使用的超音波頻率範圍皆落在 20 kHz 到 2 MHz 之間，為治療用超音波的使用頻段。但以臨床的需求上來看，發展結合診斷以及治療的高頻系統有其必要性：臨床上普遍使用血管內超音波 (Intravascular Ultrasound, IVUS)，係一特殊心導管的頂端置放極細小的超音波探頭 (圖 10)，發射中心頻率在 20 MHz 以上，由於具有高解析度，可顯示血管內壁的組織形態如粥狀斑塊或血栓等病灶，並可精確地量測血管內徑大小及截面積 (圖 11)，倘若可以將此高頻超音波系統以及超音波對比劑應用於血管內血栓溶

解治療，將可在血管傷害最低的情況下提升血栓溶解效率，以達診治合一的目的。

表 3: 超音波輔助血栓溶解治療的相關研究。

References	Protocol	Freq.	Thrombolytic agents	Duration	Results /conclusions
Tachibana et al.	<i>In vitro</i>	170 kHz	UK	60 sec	The presence of the echo-contrast agent induced further acceleration of thrombolysis by US energy.
William et al.	<i>In vitro</i>	1MHz	no	60 min	Greater percentage weight loss with US + μ bubble than ultrasound alone.
Cintas et al.	<i>In vitro</i>	2MHz	rt-PA	30 min	The percent weight loss US alone: $6.1 \pm 1.9\%$ US + Levovist: $10.9 \pm 3.6\%$ US + rt-PA: $13.1 \pm 2.6\%$ US + Levovist + rt-PA: $30.7 \pm 9.5\%$
Francis et al.	<i>In vitro</i>	1MHz	rt-PA	120 min	Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) into clots .
Molina et al.	<i>In vivo</i>	2MHz (TCD)	t-PA	120 min	The administration of MBs further enhances US-augmented systemic thrombolysis in acute ischemic stroke, leading to a more complete arterial recanalization.
Birnbaum Yet al.	<i>In vivo</i>	37kHz	no	Up to a total of 4 periods of 15 min	In vivo arterial clot dissolution can be achieved with intravenous microbubbles and transcutaneous ultrasound delivery alone.
Xie et al.	<i>In vivo</i>	1MHz	no	30 min	Therapeutic ultrasound was applied during an intravenous infusion of MRX-815

					microbubbles (ImaRx). Restoration of rapid flow within the graft was seen.
Tiukinhoy-Laing et al.	<i>In vitro</i>	1MHz	rt-PA	2 min	Ultrasound exposure of tPA-loaded echogenic liposomes resulted in enhanced thrombolysis (49.5% relative improvement vs. no ultrasound).
Suchkova et al.	<i>In vitro</i>	40 kHz	t-PA	60 min	No US & t-PA only : 20±5% No t-PA & US only : 10% US+t-PA 0.25 W/cm ² : 35±6% 0.75 W/cm ² : 58±6% 1 W/cm ² : 75±6% 1.5 W/cm ² : 77±8%
Soltani and Soliday	<i>In vitro</i>	1 MHz	UK SK t-PA rt-PA	60 min	Ultrasound with a frequency of 1 MHz and intensities of 2.5-3.1W/cm ² had no statistically significant impact on biological activity of selected plasminogen activators.



Ref: Proc. of SPIE, 2006, 6086, 60860F

圖 10：心導管式血管內超音波示意圖。

(a) single element ; (b) array of transducer 。

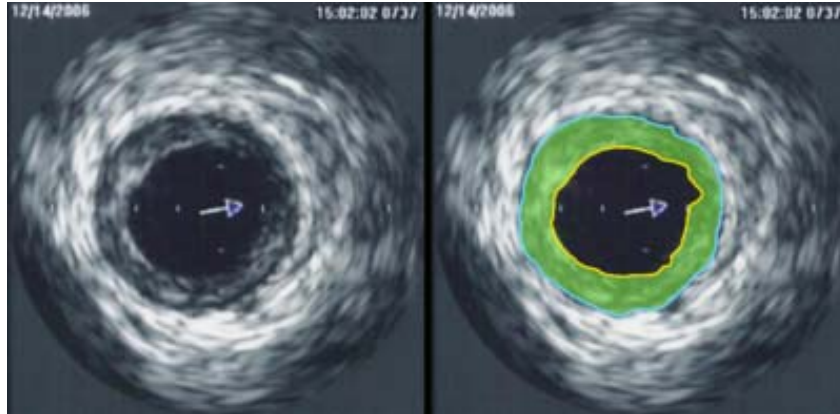


圖 11：血管內超音波的血管內壁影像 (from Wikipedia)。

另一方面，由於理論上高頻超音波於治療應用上有其相當的困難度（如：難以誘發穴蝕效應），在此限制之下，非侵入性的體外低頻超音波仍是目前超音波輔助血栓溶解治療的研究主軸，但如何達到更精確的血栓溶解治療並避免不必要的生物效應，新興靶向性超音波對比劑的發展給了一道曙光：增加血塊局部區域的對比劑濃度，並與血塊做專一性結合，將穴蝕效應的破壞能量集中於血栓形成處。除此之外，先前亦有研究利用超音波所產生的推力（輻射力）增加靶向性超音波對比劑與標靶物的作用機會（圖 12）、增強超音波分子影像的偵測效能[34]，以助於疾病狀態的分析、後續相關治療規畫，此部分將於第五章做更詳盡的討論。

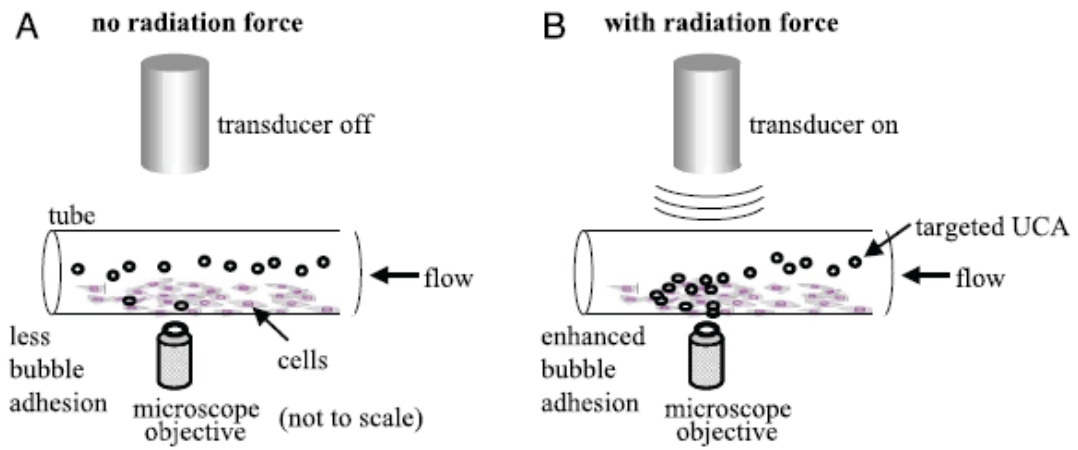


圖 12：超音波輔助靶向性超音波對比劑的標靶作用[34]。(A)無超音波照射下，大部分的靶向性對比劑隨著流體流動，與血管壁的接觸機會較少；(B)開啟超音波施以輻射力後，可推動靶向性對比劑移向目標物以增加與血管內壁的作用機會。



1.7 研究動機與目標

根據 WHO 世界衛生組織統計，腦血管疾病（如中風）以及心臟疾病（如急性心肌梗塞）在世界十大死因中，位居第二。這些疾病的發生與血栓的形成息息相關，然而注射血栓溶解劑等臨床治療方式可能引發內出血或因血管疏通時間過長造成組織缺氧壞死等副作用，使得發展安全以及更有效的血栓溶解治療方式成為重要的研究課題。直至今日為止，已有許多研究團隊利用低頻超音波（20 kHz~2 MHz）與超音波對比劑作用產生的穴蝕效應（cavitation），幫助血栓溶解劑更深入血栓內部作用以增加血栓溶解成效。

低頻超音波較易產生穴蝕效應，並且可以以非侵入的方式做體外輔助治療，但是低頻超音波應用於血栓溶解治療有其優缺點。優點為與微氣泡的共振頻率相近（1-5MHz），易於利用微氣泡的震盪效應達到治療功效，但礙於空間解析度的限制，較不易達到精確的局部治療以及可能會有不必要的生物效應（adverse bio-effect）[35]。但以臨床的需求上來看，高頻超音波（> 20 MHz），雖不易誘發穴蝕效應，但由於具有良好的空間解析度，可精確的觀測病灶所在，若能搭配即時的治療，將可以微侵入的方式達到診治合一的目的。因此本研究的主要目的為嘗試提升超音波應用於血栓溶解治療的安全性以及效能，本實驗流程與動機彙整於圖 13：

1. 首先以實驗室自身架構證實超音波應用於血栓溶解治療的可行性，並探討相關機制。
2. 體外低頻超音波靶向性血栓溶解治療：以模擬 *in vivo* 的流動架構以及實驗室自製的血栓靶向對比劑，藉由增加對比劑與血栓的作用機會以提升低頻超音波輔助血栓溶解治療的安全性以及效能。
3. 嘗試使用高頻超音波誘發穴蝕效應，利用文獻中的雙頻激發方法[35]，企圖突破高頻超音波不易誘發穴蝕效應的限制，評估將血管內超音波

(IVUS) 應用於臨床上血栓溶解治療的可行性。

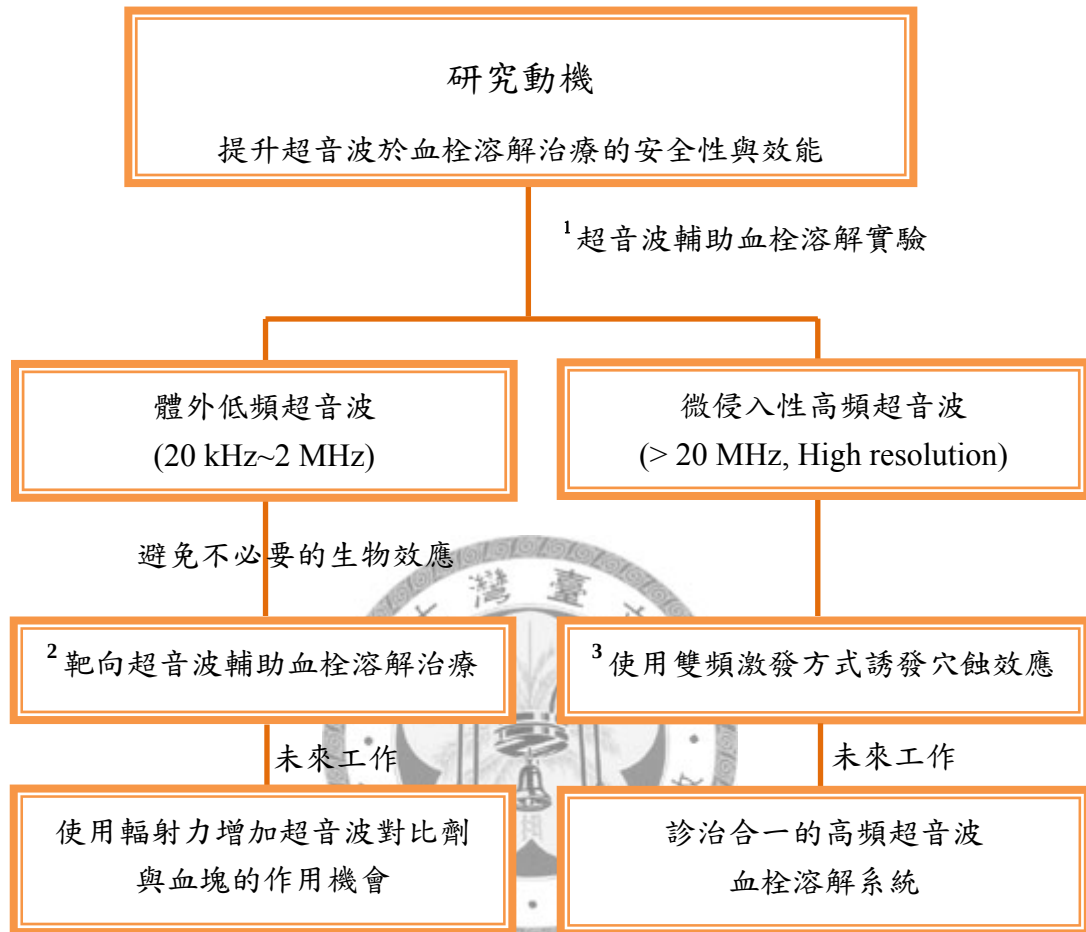


圖 13：實驗動機與流程圖

1.8 論文架構

第一章概述血栓相關疾病與臨床上的治療方式、醫用超音波與穴蝕效應的治療應用，並簡介過去文獻中超音波輔助血栓溶解治療的研究。第二章描述超音波輔助血栓溶解治療架構的建立、驗證文獻中以低頻超音波輔助血栓溶解劑的治療成效，並探討其中機制。第三章建立模擬 *in vivo* 的流動系統，探討靶向超音波對比劑能否增加體外低頻超音波的血栓溶解效能以驗證靶向性對比劑的標靶成效。第四章嘗試發展高頻超音波誘發穴蝕效應系統，試圖以雙高頻激發的方式克服高頻超音波不易誘發穴蝕效應的限制，以評估血管內超音波等高頻超音波 (>20 MHz) 應用於治療血栓相關疾病的可行性。第五章為結論與未來工作。



第2章 低頻超音波輔助血栓溶解實驗

2.1 實驗材料與方法

2.1.1 超音波對比劑

以實驗室自製的白蛋白微氣泡 (albumin-based microbubbles) 做為低頻超音波輔助血栓溶解實驗的對比劑，製作流程如下：將商用血清白蛋白 (Octapharma AG, Lachen, Switzerland) 和 PBS 或生理食鹽水以體積比例 1：14 混合後，利用超音波粉碎儀 (Branson, Danbury, USA) 在通入 C_3F_8 氣體的情況下震盪 2 分鐘，製備完畢的對比劑存放於 4°C 冰箱，使用前必需先搖勻後再依實驗需求調整稀釋倍數 [36]。實驗室自製對比劑的粒徑分佈範圍在 0.5-3 μm (平均粒徑為 1.5 μm)，原液濃度為 9.7×10^7 顆/mL，如圖14。

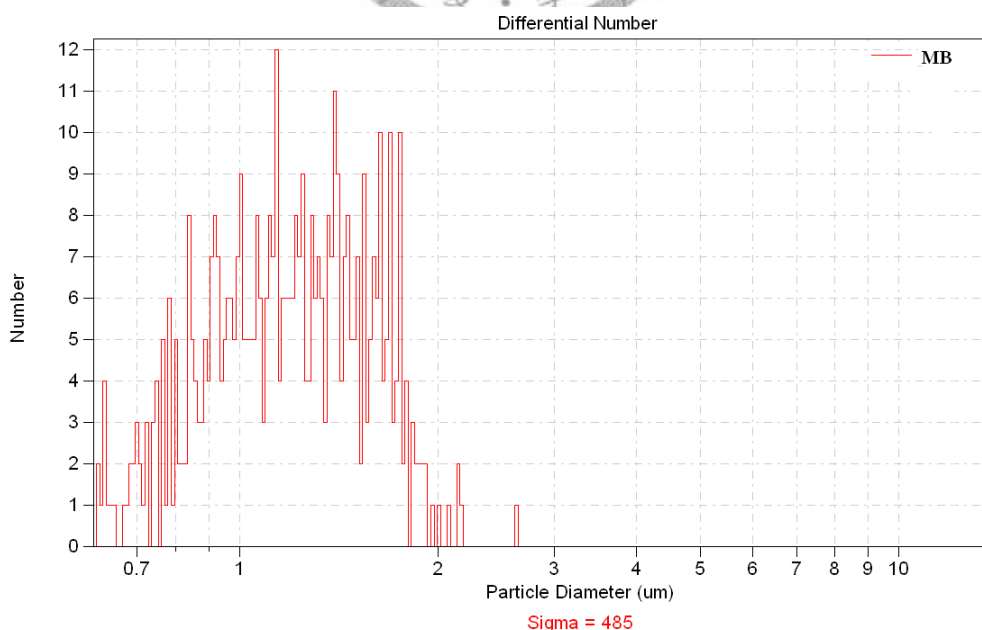


圖 14：使用 Coulter MultiSizer III 量測實驗室自製對比劑的濃度與粒徑分佈圖。平

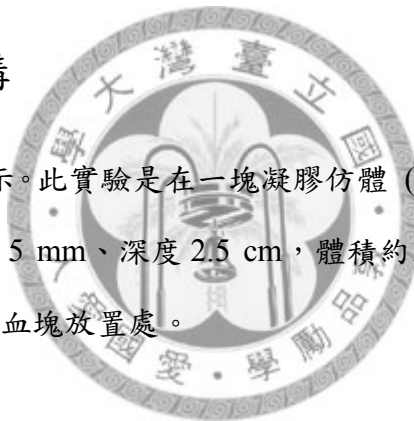
均粒徑大小為 $1.5\ \mu\text{m}$ ，濃度為 485 顆/ $50\ \mu\text{L}$ （原液濃度： 9.7×10^7 顆/mL）。

2.1.2 血塊製備

使用真空採血管 (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) 採集狗血後分裝至 $200\ \mu\text{L}$ 的 PCR 離心管 (Scientific Specialties, Lodi, CA, USA)。每個離心管中裝有 $125\ \mu\text{L}$ 的全血以及 $8\ \mu\text{L}$ 濃度為 0.46M 的 calcium chloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) 以進行復凝化作用，接著放入 4°C 的冰箱靜置 2 天，以形成穩定並具再現性的血塊。(直徑約為 3mm ，重量為 $101.4 \pm 10.1\ \text{mg}$)。

2.1.3 實驗系統架構

實驗架構如圖 15 所示。此實驗是在一塊凝膠仿體 (2 % agarose phantom) 中進行，仿體中央挖一個直徑 $5\ \text{mm}$ 、深度 $2.5\ \text{cm}$ ，體積約為 $0.5\ \text{cm}^3$ 的圓柱型空腔，為實驗室自製對比劑以及血塊放置處。



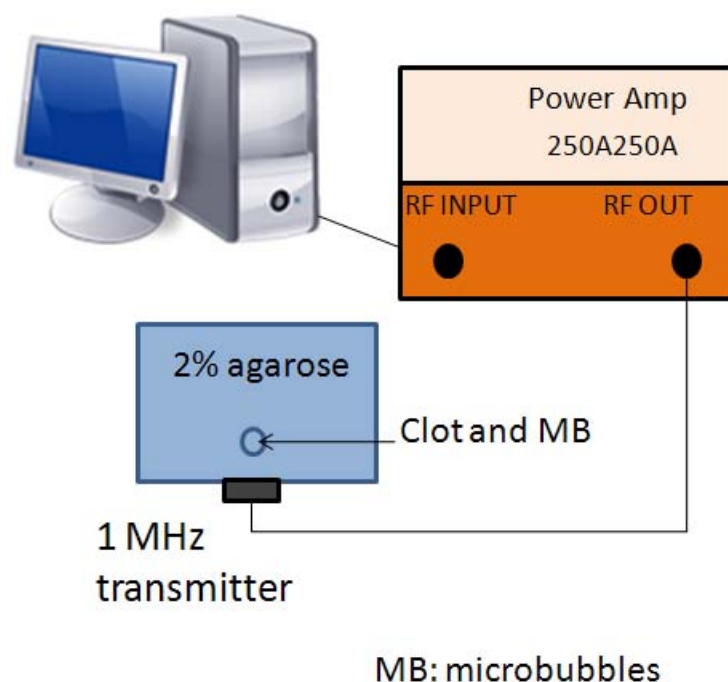


圖 15：低頻超音波輔助血栓溶解實驗架構圖。

血栓溶解實驗的發射探頭中心頻率為 1MHz (V302, Panametrics-NDT, Waltham, MA, USA)，直徑為1 吋，聚焦深度為3 吋。信號源來自電腦內的數位類比轉換卡 (digital-to-analog converter, CompuGen 1100, GaGe Applied Technologies, Lachine, QC, Canada)，控制使用的脈衝重覆頻率 (pulse repetition frequency, PRF) 為100 Hz，duty cycle為0.1%。完成的波形輸出至功率放大器 (RF power amplifier, 250A250A, Amplifier Research, Souderton, PA, USA)，將電壓放大後再驅動探頭發射。

2.1.4 血栓溶解作用成效評估

血栓溶解作用的成效以重量減輕百分比 ($L_i(\%)$) 作為評估方式。公式如下：

$$L_i(\%) = \frac{W_i - W_c}{W_i} \times 100$$

其中， W_i 、 W_c 分別為實驗前與實驗後的血塊重量。為了分別比較超音波、超音波對比劑以及血栓溶解劑對於血栓溶解成效的貢獻，將形成的血塊分成5組：1.控制組 (Control)：評估實驗操作上對血塊的影響；2.只照射超音波 (US only)：仿體洞中裝入生理食鹽水以及血塊，以超音波照射；3.超音波搭配自製對比劑 (US+CA)：觀測穴蝕效應對血塊的影響；4.與濃度為1000 U/ml的 Streptokinase (Sigma, USA) 作用30分鐘 (SK only)；5.與 Streptokinase 作用 30分鐘後再加入自製對比劑以超音波照射 (US+CA+SK)。超音波照射時間均為 30秒。每組血塊在實驗完畢後，均泡入 10% 的福馬林固定並切片染色，再以光學顯微鏡 (CKX41, Olympus, Japan) 做血栓溶解作用微觀的成效評估。



2.2 實驗結果討論

低頻超音波輔助血栓溶解實驗結果如圖 16，橫軸為各組實驗變因，縱軸為重量減輕百分比 (weight loss (%))。結果顯示低頻超音波與超音波對比劑對於血栓溶解劑 (Streptokinase) 有相當的輔助作用，可達到最佳的治療成效，比控制組多了約 26% 的 weight loss。除此之外，超音波與對比劑引發的穴蝕效應，對於血塊的溶解也有相當的助益 (與控制組比較，重量減輕百分比增加約 7%)。

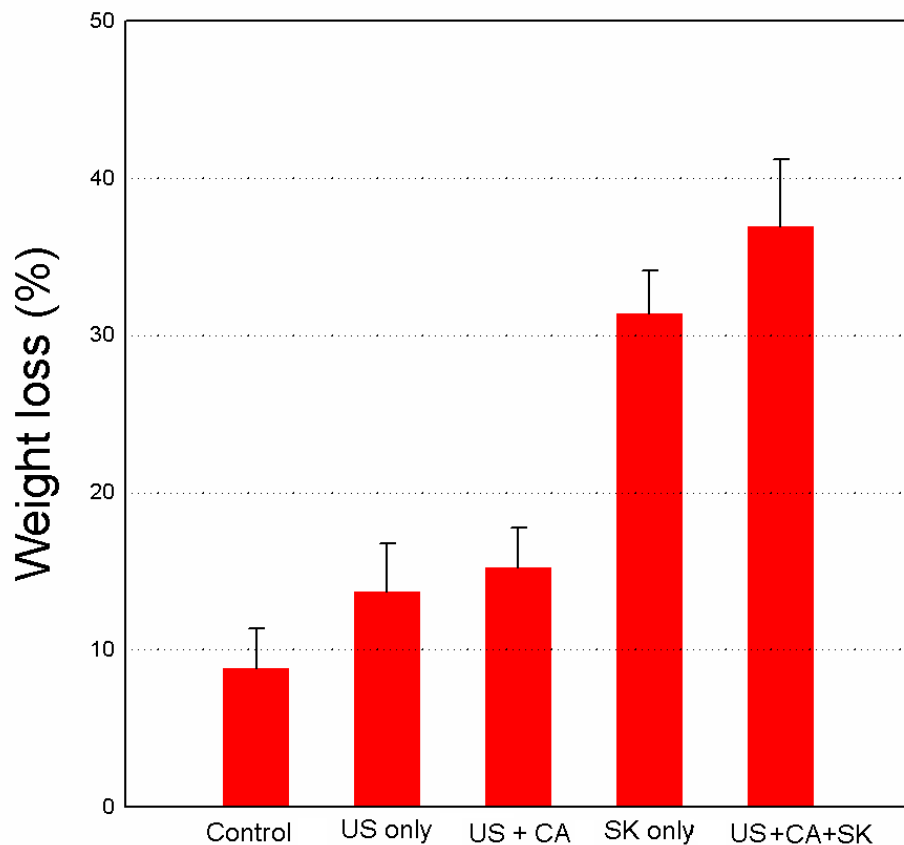


圖 16：低頻超音波輔助血栓溶解作用。橫軸為實驗變因；縱軸為 weight loss (%)。

血塊的切片結果如圖 17 到圖 21 所示，控制組的血塊呈現平滑完整的外觀，進一步的放大倍率更顯示完整顆顆分明的紅血球 (圖 17)，說明本實驗的操作流程 (血塊的轉移置放) 並不會造成血塊的嚴重損傷；而在單純只有超音波照射的情況

下 (圖 18)，血塊較為鬆散，並且有部分紅血球剝落的情形，顯示超音波的機械效應會影響血塊表面的平整度；而在低頻超音波誘發對比劑的穴蝕效應作用之下 (圖 19)，可見血塊內部產生空腔，結構也更為鬆散。

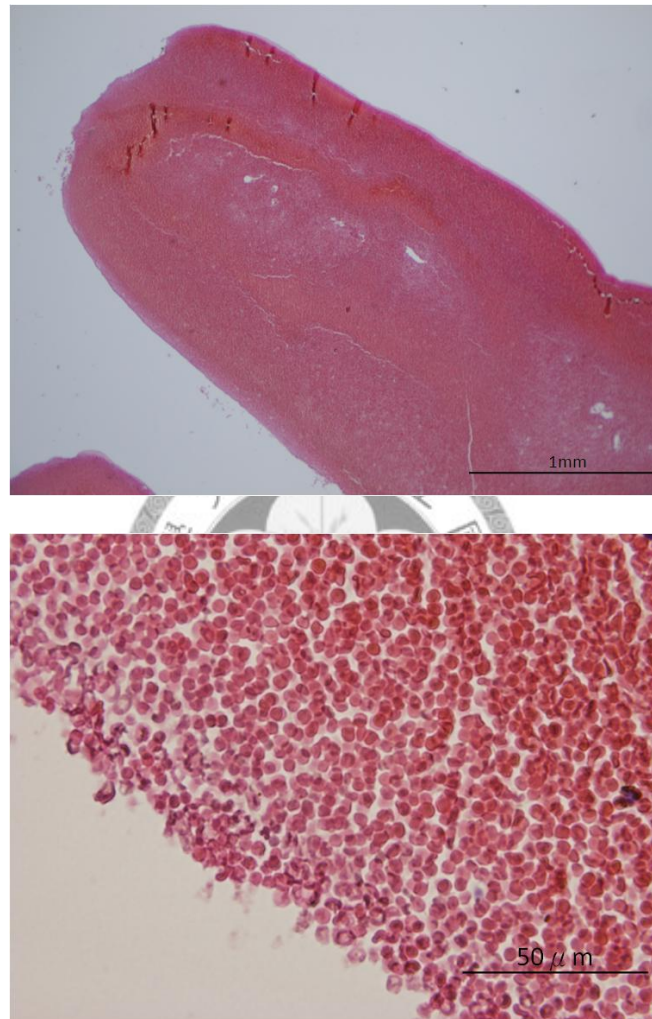


圖 17：控制組血塊切片 (Control)。

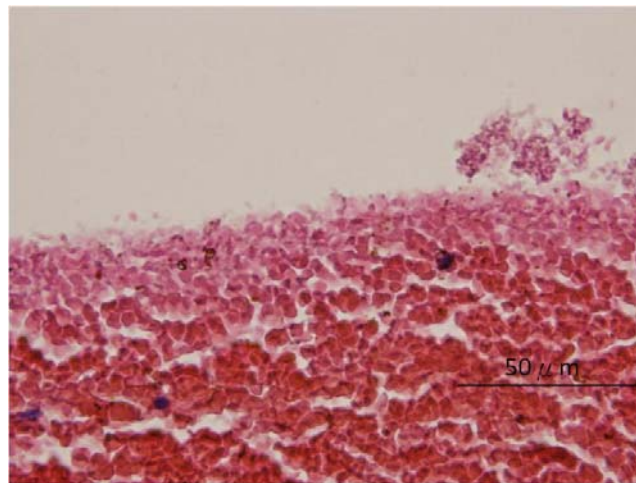
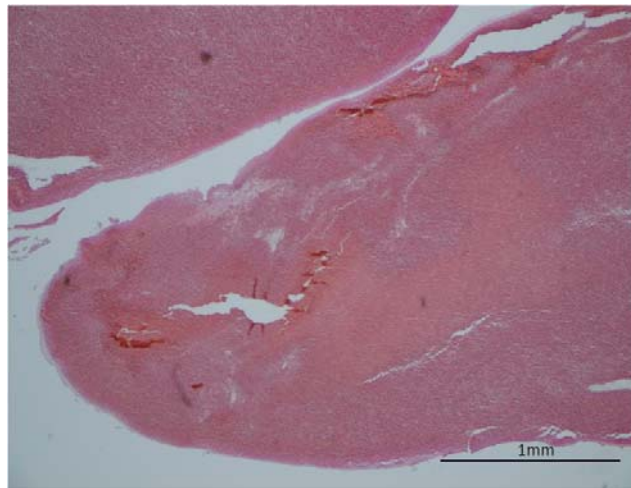


圖 18：只有超音波照射情形下的血塊切片 (US only)。



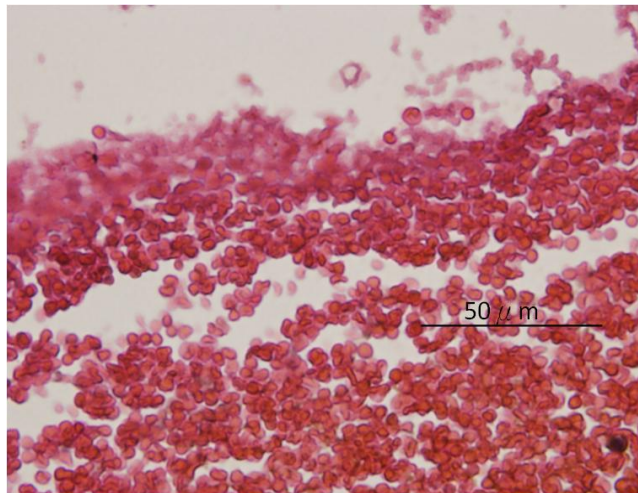
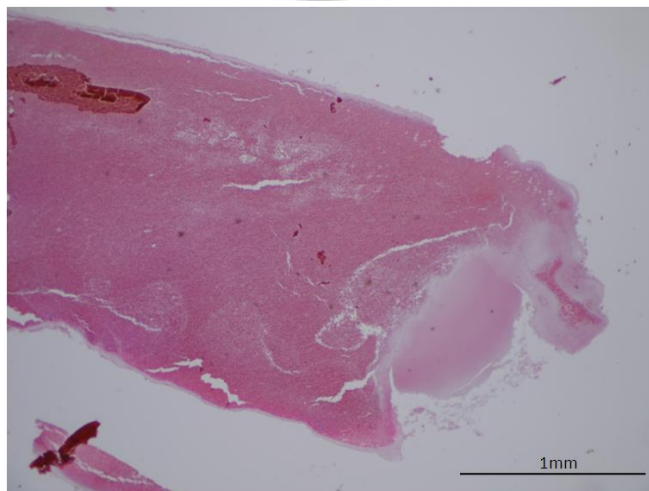


圖 19：超音波與對比劑共同作用(穴蝕效應)後的血塊切片 (US+CA)。

在只有加入血栓溶解劑的情況下，血塊明顯的縮小許多，並可見溶解扁塌、不再完整的紅血球 (圖 20)，且對於血塊的作用範圍僅侷限於表面；而在超音波誘發穴蝕效應的輔助下，可以將血栓溶解劑的作用更深入血塊內部 (圖 21)，達到最佳的血塊溶解效果。也因此，不論從巨觀的重量減輕百分比或是微觀上檢視血塊切片的结果都呈現相當的一致性。



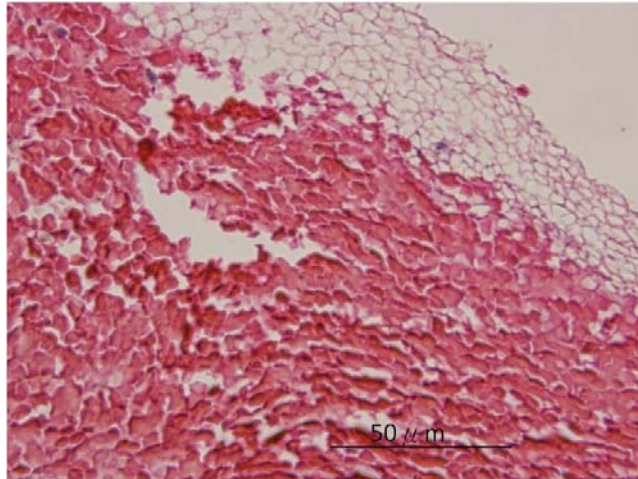


圖 20：與血栓溶解劑 Streptokinase 作用 30 分鐘後的血塊切片 (SK only)。

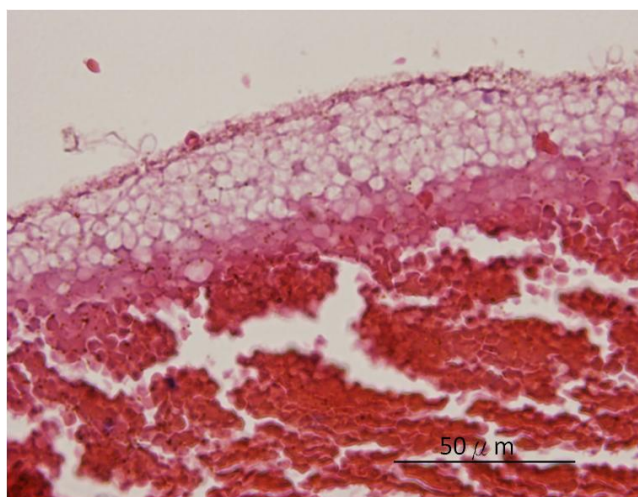
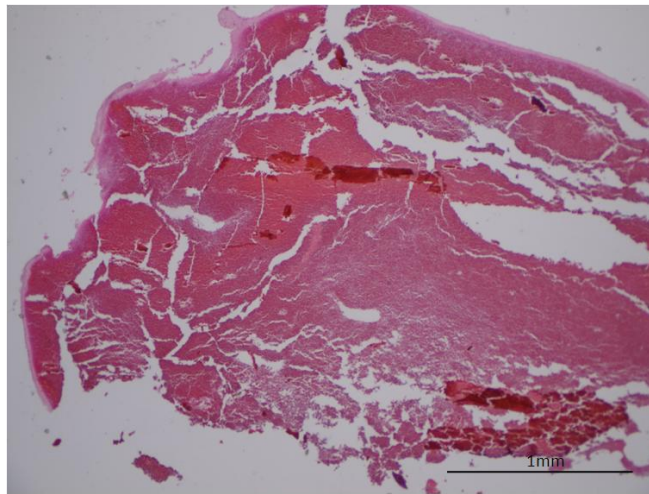


圖 21：血栓溶解劑與穴蝕效應共同作用後的血塊切片。(US+CA+SK)。

從實驗結果上來看，結合低頻超音波 (1MHz)、超音波對比劑以及血栓溶解劑，對於提升血栓溶解作用有相當的助益，可能的機制為：穴蝕效應使得血塊結構鬆散並產生空腔 (cavities)，血栓溶解劑再更進一步深入血塊內部，溶解其中的纖維連結及紅血球，達到最佳的血栓溶解成效。除此之外，本實驗的超音波照射時間均僅有 30 秒，顯示超音波所引發的穴蝕效應絕對具有增加血栓溶解效率的潛能。

也因此證實低頻超音波對於輔助血栓溶解作用的效益後，本研究為了降低體外低頻超音波所可能產生的不良生物效應，將評估使用血栓靶向性超音波對比劑並利用其對於血塊的親和性，做專一性的血栓標靶溶解治療。



第3章 靶向性對比劑輔助低頻超音波血栓溶解實驗

在 1.4 節中，已概述靶向性超音波對比劑的基本組成與機制，包含選取與疾病形成相關的 biomarker，以及在微氣泡表面鑲嵌與此 biomarker 專一結合的配位體 (ligand)。本實驗室於先前已發展出標靶血栓的超音波對比劑 (thrombus-targeted ultrasound contrast agent)，使用的靶向 ligand 為 Aggrastat (或稱 tirofiban)，可專一性辨認血栓中活化後的血小板表面上的糖蛋白 (GP IIb/IIIa)，而 GP IIb/IIIa 在血小板的凝集以及血栓的形成過程中扮演著重要的角色，因而在形成血栓的區域，會有 GP IIb/IIIa 的大量表現[11]，並在注射靶向性超音波對比劑後，將會造成血栓局部的信號增強[9-11]。也因此我們認為此靶向性對比劑也會在血栓溶解治療上有所助益，將會在以下的實驗中驗證討論。

3.1 實驗材料與方法

3.1.1 靶向性超音波對比劑

根據先前實驗室所建立的製備方式[11]，將人類血清白蛋白與 Aggrastat 以 1:1 的比例混和後，再加入生理食鹽水配成體積百分濃度為 12.4% 的水溶液，並利用超音波粉碎儀 (Branson, USA) 在通入 C_3F_8 氣體的情況下震盪 2 分鐘。製備完畢的對比劑存放於 4°C 冰箱，使用前必需先搖勻後再依實驗需求調整稀釋倍數 (本實驗稀釋倍數為 100 倍)。除此之外，將未加入 ligand 所製成的白蛋白微氣泡作為控制組的對比劑。

實驗室自製的血栓-靶向超音波對比劑的粒徑分佈範圍在 0.5-3 μm (平均粒徑為 1.5 μm)，原液濃度為 6.6×10^7 顆/mL，如圖 22。

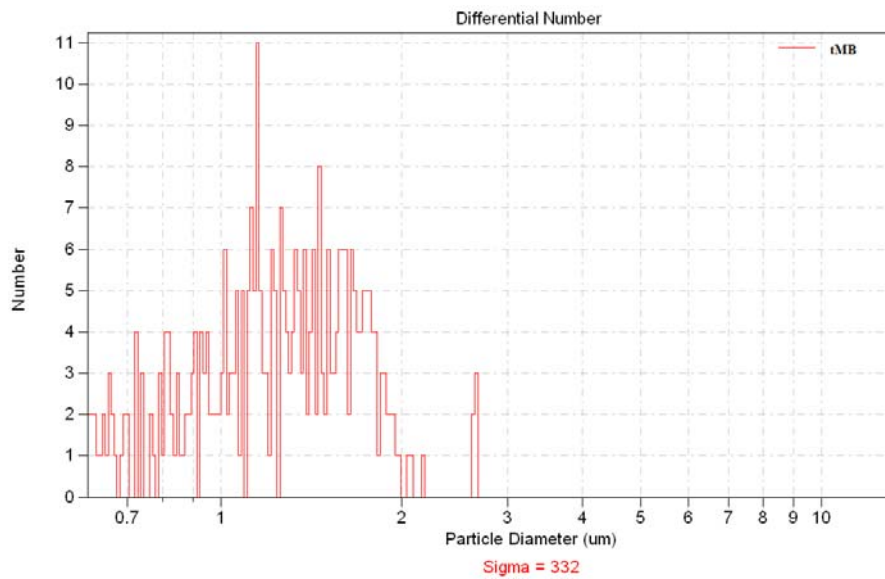


圖 22：使用 Coulter MultiSizer III 量測實驗室自製靶向性超音波對比劑的濃度與粒徑分佈圖。平均粒徑大小為 $1.5 \mu\text{m}$ ，濃度為 332 顆/ $50 \mu\text{L}$ （原液濃度： 6.6×10^7 顆/mL）。

實驗室自製的血栓靶向超音波對比劑 (thrombus-targeted microbubbles, tMB)，在先前已經利用高頻超音波影像證實其對於血塊的標靶能力[11]，如圖 23。在改善其實驗架構後，將以靜態與流動系統驗證此靶向性微氣泡對於超音波血栓溶解治療的助益。

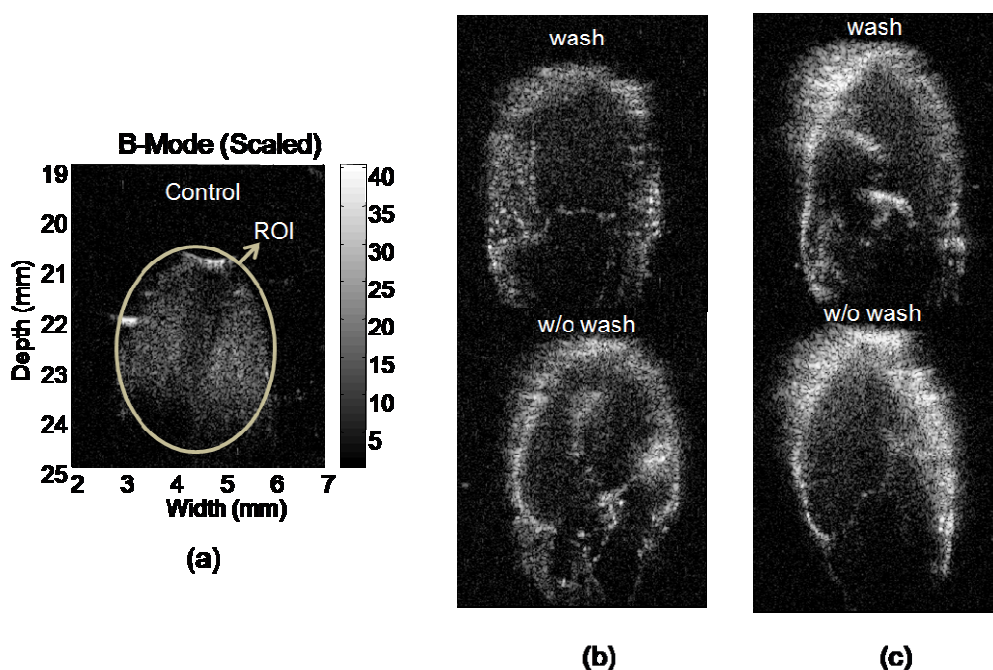


圖 23：血栓浸泡於不同溶液後的高頻超音波影像[11]。(a).生理食鹽水 (b).非靶向性微氣泡 (c).靶向性微氣泡。

3.1.2 血塊製備

與先前的血塊製備方式相同，如 2.1.2 節。

3.1.3 靜態與流動實驗系統架構

在靶向性對比劑輔助低頻超音波血栓溶解實驗中設計了兩種系統架構，分別為靜態與流動式血栓溶解系統，如圖 24。靜態實驗架構的目的為證實靶向性對比劑在微氣泡表面嵌入標靶物質後亦可成功被誘發穴蝕效應、釋放與控制組對比劑相當的破壞能量，並比較在沒有使用生理實驗水沖洗步驟下，靶向性與非靶向性超音波對比劑對於血栓溶解作用的差異。

實驗架構如圖 24(a) 所示，發射探頭中心頻率為 1MHz (V302, Panametrics-NDT)，信號源來自電腦內的數位類比轉換卡 (CompuGen 1100, GaGe Applied Technologies) 控制使用的脈衝重覆頻率 (pulse repetition frequency, PRF)

為 100 Hz，duty cycle 為 0.1%。完成的波形發出至功率放大器(RF power amplifier, 250A250A, Amplifier Research)，將電壓放大後再驅動探頭髮射。仿體內的超音波散射訊號經由 10 MHz 探頭 (V312, Panametrics-NDT) 接收後，經 5072PR 前置放大器放大 (5072PR, Panametrics-NDT)，再由類比數位轉換卡 (CompuScope 12100, GaGe Applied Technologies) 接收，最後由 MatLab 計算穴蝕效應的程度。

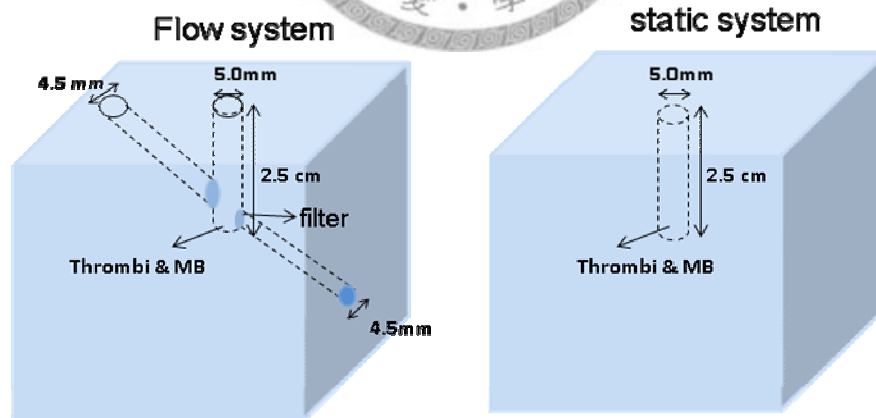
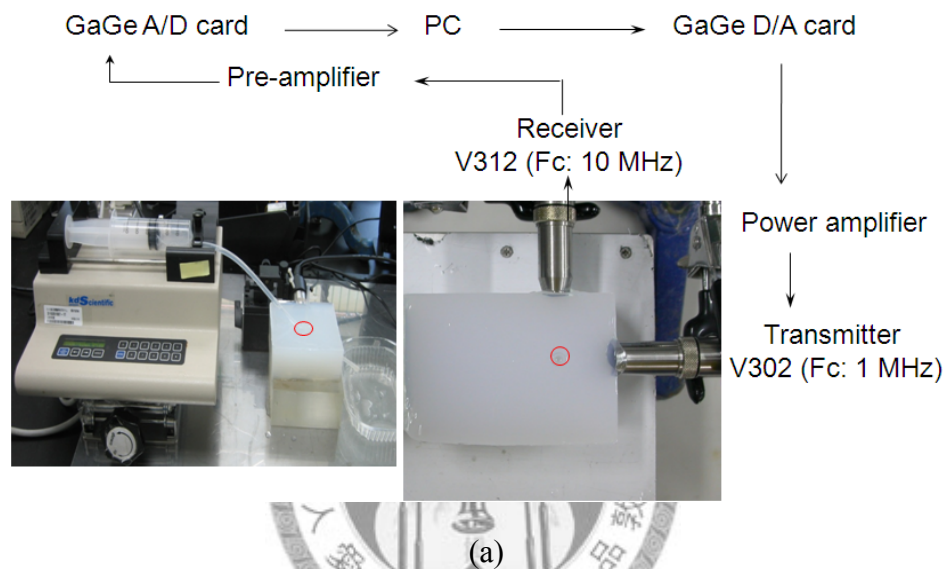


圖 24：(a). 系統架構實景 (b). 流動與靜態系統示意圖。

靜態與流動式血栓溶解實驗都是在凝膠仿體中進行，中間亦有圓柱形空

腔，為對比劑與血塊放置處，體積約為 0.5cm^3 (圖24 (b))。流動式系統使用注射幫浦 (Infusion pump, KDS Model 200, Holliston, MA, USA) 將流速控制為 1 mL/sec ，雖然此流速小於頸動脈的流速 (12.5 mL/sec)，但考量被血栓堵住的血管流速較慢的情況下，此流速的設定為合理的範圍。除此之外，為鑑別靶向性與非靶向性對比劑對於血栓溶解作用的能力並模擬靜脈注射微氣泡後，未與血栓結合的微氣泡被血液帶走的情形。流動式血栓溶解系統在微氣泡流過血塊後，將以 5 c.c 的生理實驗水沖洗，以帶走未附著於血塊的對比劑，驗證靶向性超音波對比劑的標靶能力。

3.1.4 血栓溶解作用成效評估

在靜態系統中，分別將對比劑溶液 (靶向與非靶向性微氣泡) 裝入仿體空腔後，再放入血塊，並於開啟超音波、誘發穴蝕效應後，將血塊取出，量測實驗後的血塊重量。而在流動式系統，於開啟超音波前，靶向或非靶向性微氣泡溶液 (tMB/MB)，利用注射幫浦以固定流速流經血塊 30 秒後以生理食鹽水沖洗，並於誘發穴蝕效應後量測血塊重量。

血栓溶解作用成效評估方式與第二章相同，除了以巨觀的方式計算血塊的重量減輕百分比之外，亦將所有實驗後的血塊浸泡於 10% 的福馬林固定並作染色切片，以光學顯微鏡觀測血塊作用前後的微觀變化。

3.2 結果與討論

實驗結果顯示，在沒有使用生理食鹽水沖洗的步驟下，靜態系統中靶向性與非靶向性超音波對比劑對於血栓溶解作用，反應在重量減輕百分比 (weight loss (%)) 的成效差異並不大 (如圖 25)。除此之外，穴蝕效應的量化值 (dICD) 亦無顯著差異，表示在微氣泡的表面上嵌合 ligand 並不會影響穴蝕效應所釋放出來的能量與成效。

縱然理論上，即使是靜態系統，靶向性超音波對比劑黏附在血塊上的數量應該要比非靶向性超音波對比劑來的多，但在靶向性微氣泡與非靶向性微氣泡的使用濃度無特別稀釋的情況下，(靶向性微氣泡的濃度為： 6.6×10^5 顆/ml，而非靶向性微氣泡的濃度為： 9.7×10^5 顆/ml)，彼此與血塊的作用機率理論上會相近，所以反應在重量減輕百分比上並無顯著的差異，誠如圖 25 所示。



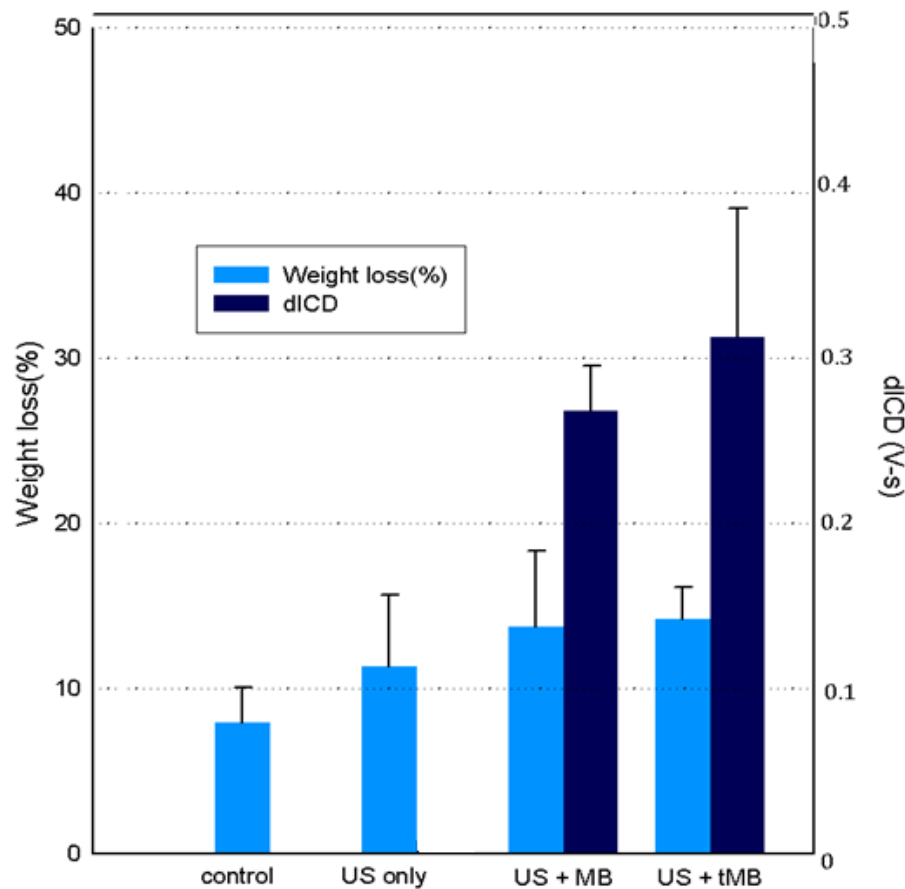


圖 25：靜態系統血栓溶解實驗結果。

US：超音波； MB：非靶向性微氣泡； tMB：血栓-靶向微氣泡。

然而在流動系統中，由於多了以生理食鹽水沖洗的步驟，可將未附著於血塊表面的微氣泡帶走，也因此與非靶向組比較後，靶向性超音波對比劑的標靶能力可造成 10 % 額外的重量損失，如圖 26。

在圖 26 中，超音波與靶向性微氣泡組 (US+tMB) 的重量減輕百分比為 23.0%，而靜態系統中同樣是 US + tMB 組 (圖 25) 的重量減輕百分比為 13.5%，此差異主要是來自於實驗中靶向性微氣泡溶液使用的體積的不同，由於靜態實驗中，血塊處於一密閉空間，與之作用的微氣泡溶液體積為仿體內空腔體積： 0.5cm^3 ，而流動系統中與血塊作用的微氣泡溶液總體積為 30cm^3 ，雖然後續有生理食鹽水沖洗的步驟，但與靜態系統比較後仍然有較多的作用機會，因此反應在重量減輕百

百分比上有較大的差異。

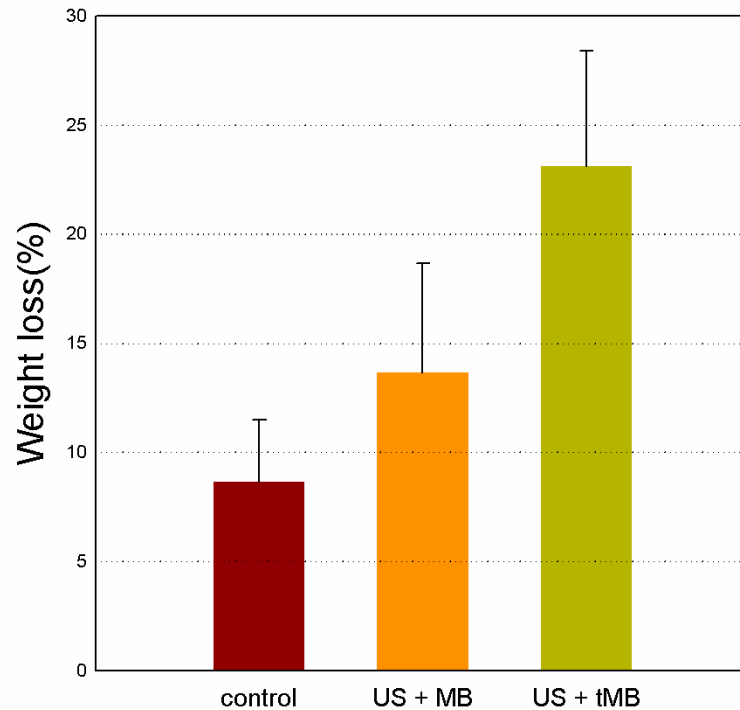
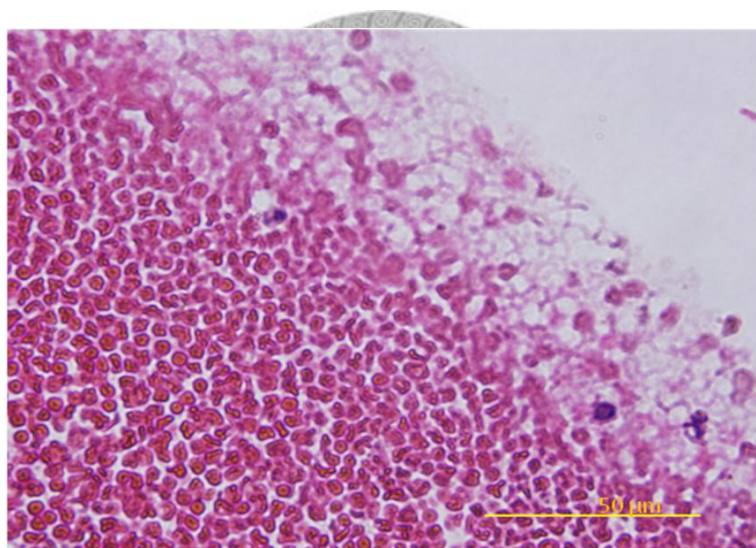


圖 26：流動系統血栓溶解實驗結果。

除了以重量減輕百分比評估靶向性超音波對比劑對於血栓溶解的成效助益外，以光學顯微鏡觀測血塊切片提供另一種更具可信度的評估方式：控制組的血塊切片結果，如圖 27 (a)，可看見完整平滑的血塊輪廓，更進一步的放大倍率，可見完整顆顆分明的紅血球 (圖 27(b))。此結果顯示，在實驗室自製靶向性微氣泡溶液流過血塊，並經生理食鹽水沖洗、取出後不會造成血塊的嚴重損傷，並仍保有血塊的完整性。



(a)



(b)

圖 27：流動系統中，控制組血塊切片影像。

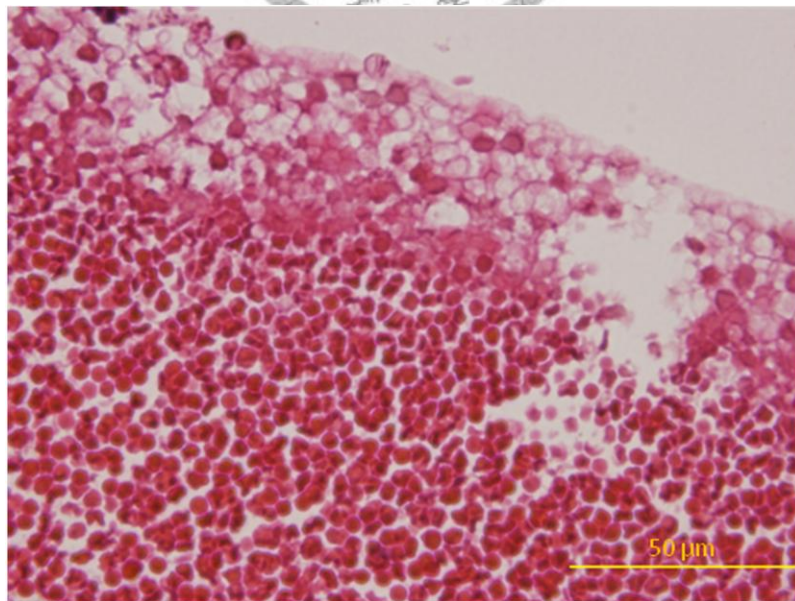
圖 28、29 為非靶向性與靶向性微氣泡分別與超音波共同作用後的血塊切片，可以明顯看到靶向對比劑組比非靶向對比劑組的孔洞來的多，也因此印證了先前以重量減輕百分比的評估模式 (圖 26)。

除此之外，從圖 28 (a) 與圖 29 (a) 的孔洞形態顯示，超音波誘發對比劑所產生的穴蝕效應在血栓溶解作用上，扮演著重要的角色。但因靶向性對比劑的專一

附著能力，使得靶向對比劑組的孔洞比非靶向對比劑組來的多且大，血塊結構也更為疏鬆。此結果指出實驗室自製的血栓靶向對比劑的確具有標靶能力，並且具有局部誘發穴蝕效應的潛能，在未來臨床應用上，不但可以增加血栓溶解效能，亦有機會避免不必要的血管損傷。

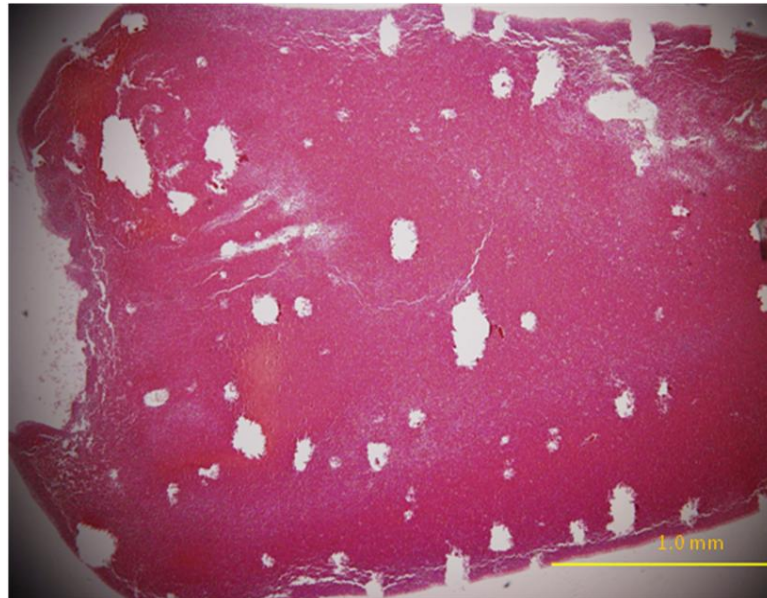


(a)

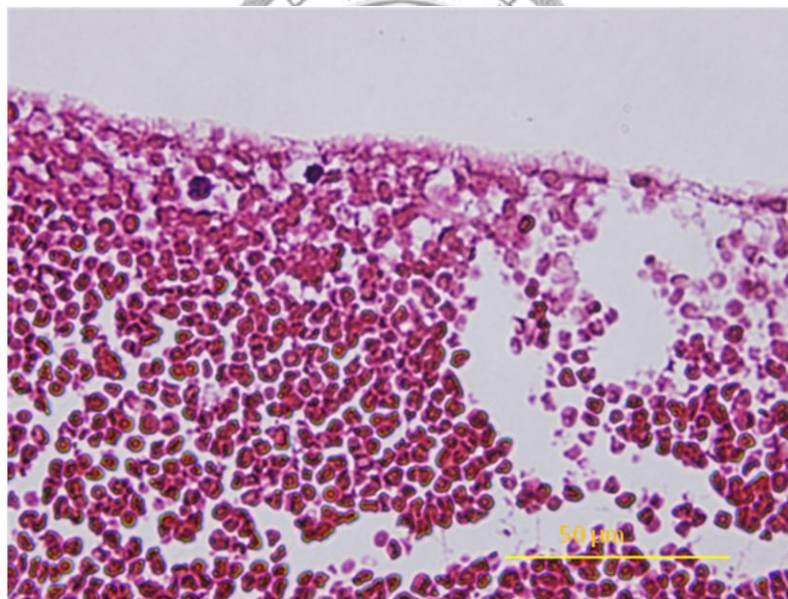


(b)

圖 28：流動系統中，非靶向性對比劑與超音波共同作用下的血塊切片影像。



(a)



(b)

圖 29：流動系統中，靶向性對比劑與超音波共同作用下的血塊切片影像。

第4章 高頻超音波誘發穴蝕效應實驗

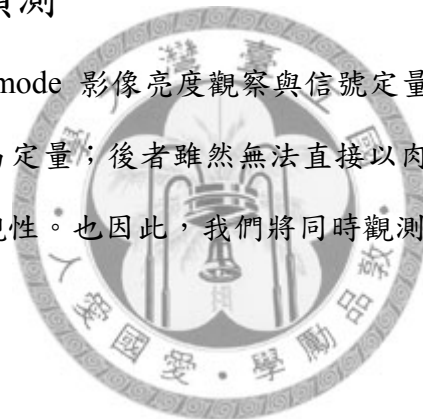
4.1 實驗材料與方法

4.1.1 超音波對比劑

採用實驗室自製的白蛋白微氣泡 (albumin-based microbubbles) 做為高頻超音波誘發穴蝕效應實驗的對比劑。

4.1.2 穴蝕效應之偵測

偵測穴蝕效應有 B-mode 影像亮度觀察與信號定量分析兩種方式。前者可以直接觀測影像，但是不易定量；後者雖然無法直接以肉眼觀測，但以量化後的數值作為評估方式較具客觀性。也因此，我們將同時觀測 B-mode 影像以及定量的分析穴蝕效應。



4.1.2.1 B-mode 影像亮度觀察法

為了避免商用超音波探頭產生穴蝕效應而干擾實驗結果，實驗時會將商用探頭的輸出功率調至最低，以準確觀測穴蝕效應的時態變化。除此之外，為了得到較適當的影像對比度，動態範圍 (dynamic range) 設為 60 dB。

4.1.2.2 定量穴蝕效應—Inertial Cavitation Dose

穴蝕效應的定量，在先前已有許多研究加以討論[23, 37-39]。我們將穴蝕效應的劑量稱為 Inertial Cavitation Dose (ICD)。在同一個實驗架構下的穴蝕效應相對量是可以互相比較的，當 ICD 值升高時，表示微氣泡的破裂數或是破裂趨勢變多。

而考慮 ICD 值時，通常會取沒有對比劑下的信號作為基準值 (即取樣體積內只裝水)，並將有加入超音波對比劑 (微氣泡) 的 ICD 值減去此基準值作為完全由微氣泡提供的破裂效應，稱作 differential ICD[38]。

ICD 的原理如圖 30：微氣泡破裂為一激突訊號 (spike)，在時域上非常短暫 [38] (數百奈秒，圖 30(a))，頻譜分析後為一寬頻訊號 (圖 30(b))，其頻寬可到達 30~40 MHz[40]。因此必須選取適當頻率範圍的探頭，擷取微氣泡破裂釋放的寬頻信號，並避免由水的非線性特性產生的低頻諧波的成分。將選取頻率範圍的方均根值 (Root Mean Square, RMS) 作為信號的寬頻上升量，並依時間畫出，如圖 30(d) 所示。將曲線下的面積積分，便是某一段時間內微氣泡破裂的整體效應，即 ICD。將此 ICD 值再扣除水在同樣時間內積分得到的 ICD 值，可得到 differential ICD。此為真正用以量化穴蝕效應的指標。

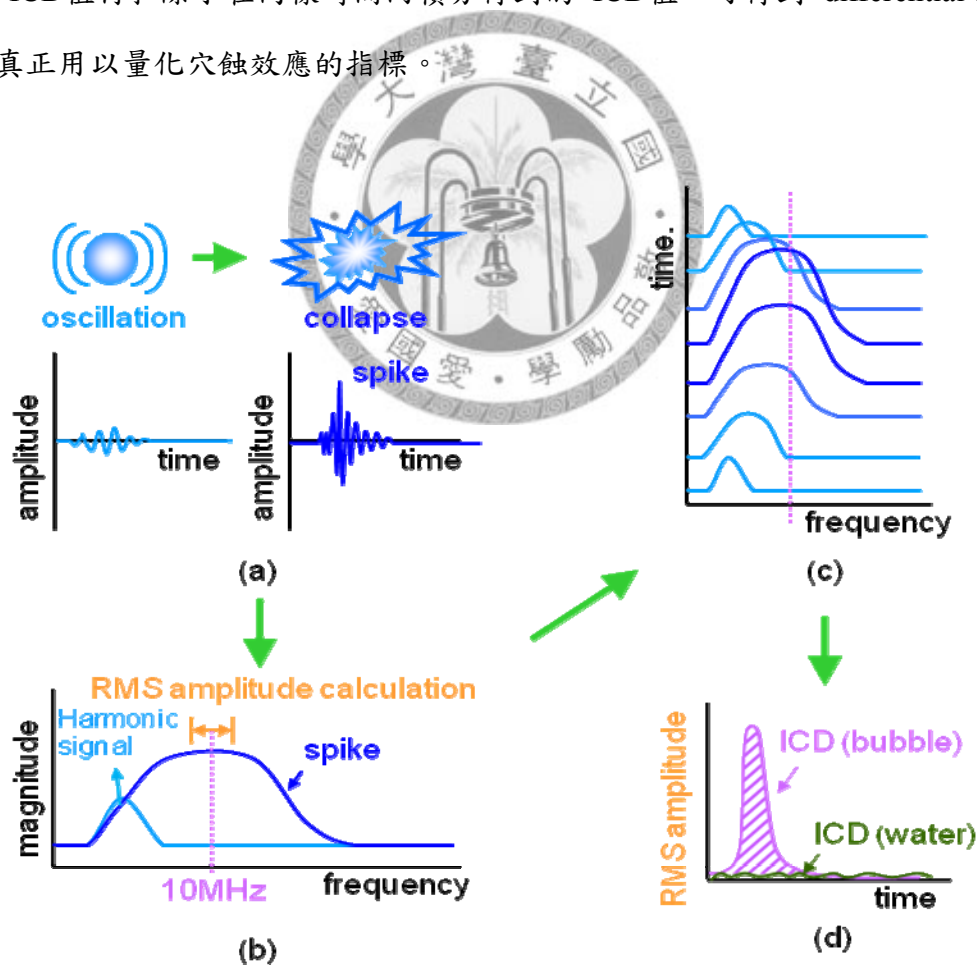


圖 30：ICD 原理。

4.2 血管內超音波誘發穴蝕效應

如 1.6 節中提到，由於血管內超音波具有高解析度，可精確顯示血管內壁的組織形態，若能將此系統應用於血管內血栓溶解治療，將可在血管傷害最低的情況下提升血栓溶解效率，以達診治合一的目的。本實驗藉由評估高頻超音波 (> 20 MHz) 誘發對比劑穴蝕效應的效能，探討血管內超音波應用於血栓溶解治療的可行性。

4.2.1 實驗系統架構

血管內超音波誘發穴蝕效應實驗如圖 31。此實驗是在一塊凝膠仿體中進行，仿體中央挖一個直徑 5mm、深度 2.5cm，體積約為 0.5cm^3 的圓柱型空腔，為實驗室自製對比劑放置處，並在與此空腔相距不到 1mm 處另挖直徑為 1mm 的圓柱小空腔，為導管式血管內超音波探頭 (Single element, center frequency: 40MHz, diameter: 0.83mm, Boston Scientific, Massachusetts, USA) 的放置處。發射信號來自電腦內的數位類比轉換卡 (CompuGen 1100, GaGe Applied Technologies)，完成的波形輸出至功率放大器 (25A250A, Amplifier Research)，將電壓放大後再驅動探頭發射。除此之外，在垂直於血管內超音波發射方向的位置，使用商用超音波探頭 (10 L and LOGIQ 500, GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin, USA) 以影像觀測的方式直接了解微氣泡破裂的時變過程。

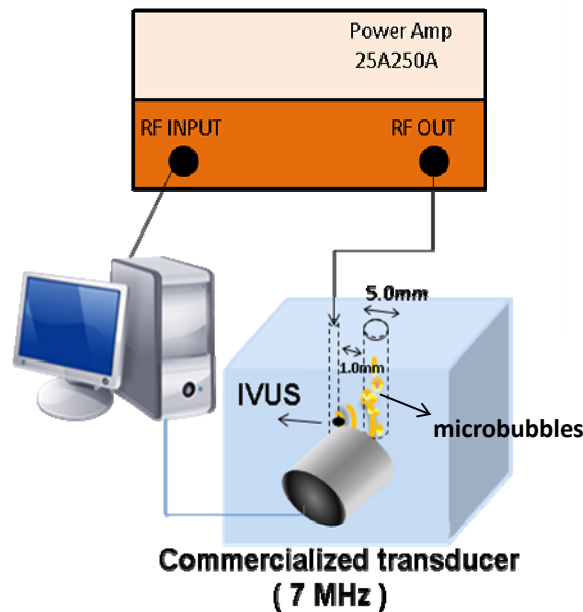


圖 31：血管內超音波誘發穴蝕效應實驗架構圖。

4.2.2 初步實驗結果與討論

初步實驗結果顯示，微氣泡在血管內超音波照射前後的影像亮度變化小於 1 dB，幾近於無變化。然而高頻超音波 (>20 MHz) 要能有效誘發穴蝕效應，需要比低頻超音波發射更大的聲壓[41]，但經調整電壓以提高聲壓後，血管內超音波會因為不堪負荷而損壞。

有鑑於血管內超音波探頭無法承受較高的聲壓，因此將探頭換成孔徑較大 (diameter: 0.25") 的 25 MHz探頭 (V324, Panametrics-NDT)，發射頻率為 25 MHz 的超音波，檢視高頻超音波能否在提高聲壓後產生穴蝕效應。但從影像亮度的結果上來看，似乎仍無法將微氣泡打破 (如圖32)，此結果與先前的研究理論相符 [42]：在與微氣泡共振頻率相距甚遠的情況下，高頻超音波確實無法有效誘發穴蝕效應，也因此認為，若欲有效誘發穴蝕效應，仍須仰賴超音波的低頻成分 (< 5 MHz)，因此本實驗將參考先前的研究[35]，使用雙頻激發的方式，試圖產生低頻成分以誘發穴蝕效應，於下節中介紹。

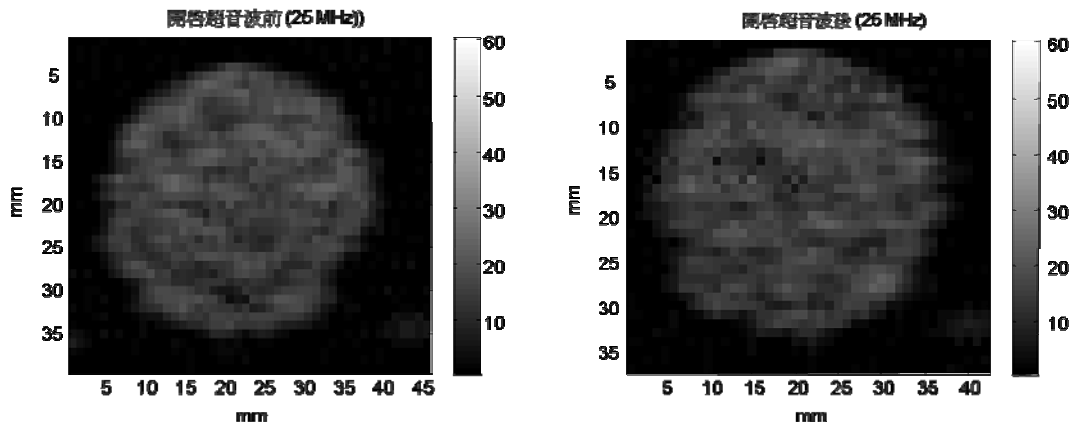


圖 32：25 MHz 高頻超音波照射微氣泡的影像亮度變化。

4.3 雙頻激發方法誘發穴蝕效應

雙頻激發 (dual frequency excitation) 法，其基本原理簡述如下[35]：超音波發射波形 $x(t)$ 為兩個不同頻率的弦波相加，經過微氣泡的非線性震盪後[43-45]，將產生低頻的成分。

發射波形如下式：

$$x(t) = \cos(\omega_1 t) + \cos(\omega_2 t)$$

根據和差化積公式，上式可改寫成：

$$x(t) = 2 \cos\left(\left(\frac{\omega_1 - \omega_2}{2}\right)t\right) \cdot \cos\left(\left(\frac{\omega_1 + \omega_2}{2}\right)t\right)$$

其中， $\omega_1 = 2\pi f_1$ ， $\omega_2 = 2\pi f_2$ 。以圖 33(a) 為例，假設紅色線段為中心頻率 19 MHz (f_1) 的弦波，藍色線段為中心頻率 20 MHz (f_2) 的弦波，則兩者頻率不同的弦波相加後，可得為綠色線段 $x(t)$ 的發射波形。若將此發射波形直接作傅立葉轉換可以得到如圖 33(b) 的頻譜：在 19 與 20 MHz 處各有一峰值。但若將此超音波發射波形 $x(t)$ 經由組織或超音波對比劑的非線性震盪後，收到的信號作頻譜分析可得如圖 33(c) 的低頻 (1MHz) 信號，如圖(a)中顯示的包封成分 (envelope component)。

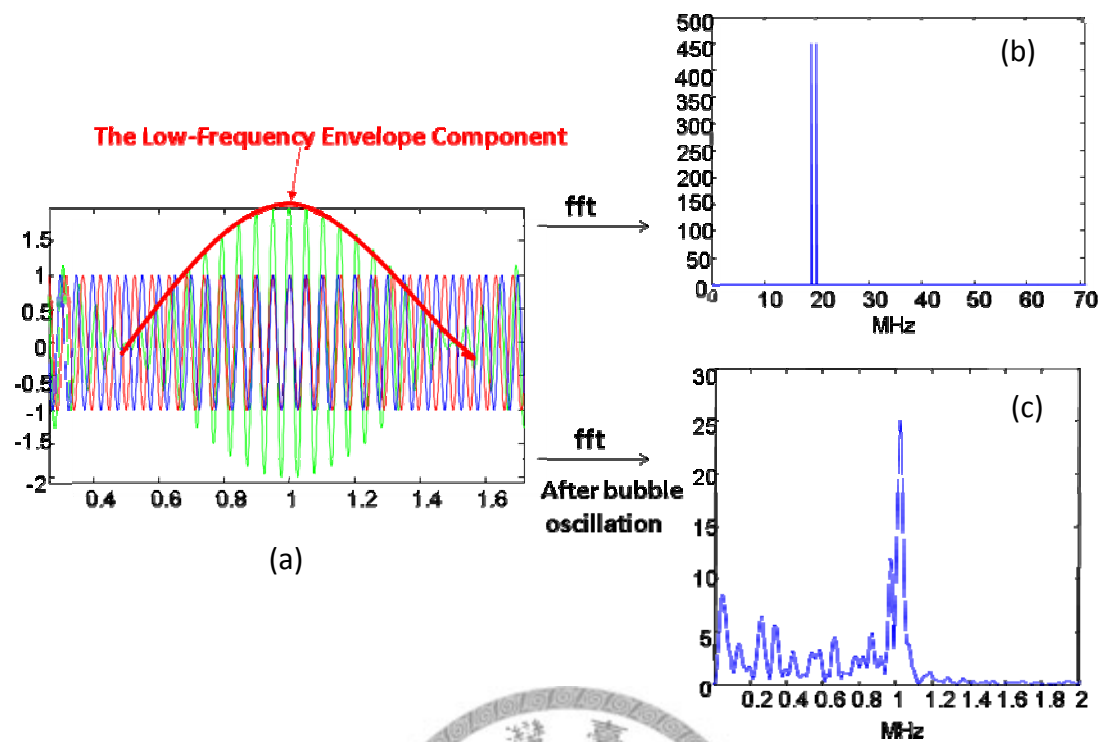


圖 33：雙頻激發法原理示意圖。(a). 兩種不同頻率弦波相加後的發射波形（綠色波形）。紅色：19 MHz；藍色：20 MHz。(b). 綠色波形直接作傅立葉轉換後的頻譜圖。(c). 此發射波形經過組織或微氣泡的非線性震盪後，信號經傅立葉轉換後的頻譜圖（擷取 2 MHz 以下的部分）。

雙頻激發法的優點，在於既保有高頻 (carrier frequency) 超音波的良好解析度，可準確控制超音波傳遞的空間位置，並可利用對比劑的非線性特性產生低頻成分 (envelope frequency)，提升高頻超音波誘發穴蝕效應的潛能。

4.3.1 實驗架構驗證

在直接使用 20 MHz 以上的高頻超音波以前，先參照文獻[42]中的實驗條件，驗證在我們的實驗架構下雙頻激發法的可行性。實驗架構如圖 34 所示，電腦的數位類比轉換卡 (CompuGen 1100, GaGe Applied Technologies) 驅動波形產生器 (AWG420, Tektronix, Beaverton, Oregon, USA) 所產生的雙頻波形 (9.5+10.5 MHz)，發出至功率放大器 (250A250A, Amplifier Research) 將電壓放大後再驅動與文獻相同的 10MHz 探頭 (diameter: 1", model V322, Panametrics-NDT)。在雙頻超

音波與對比劑作用後，為檢視其低頻聲場強度，另放置 1MHz 的接收探頭 (V302, Panametrics-NDT) 經 5073 PR 放大器 (Panametrics-NDT) 後，將訊號傳至示波器 (MSO 4104, Tektronix, USA) 中存取，並搭配商用超音波探頭與超音波儀作 B-mode 影像亮度觀測，以證實此方法是否能誘發穴蝕效應。

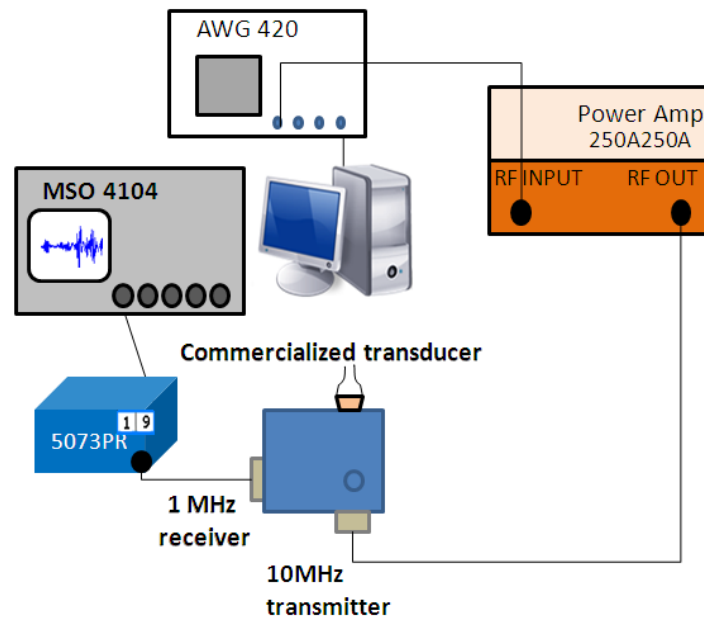


圖 34：雙頻激發法誘發穴蝕效應實驗架構。雙頻: 9.5 MHz+10.5 MHz, envelope frequency 為 1 (10.5-9.5) MHz，發射聲壓在 1.5 與 2 MPa 之間。

雙頻超音波誘發穴蝕效應的實驗結果如圖 35 所示：上圖為剛注入微氣泡、尚未開啟超音波的情形，可看到微氣泡均勻的分布於仿體空腔中。下圖為開啟超音波後，聚焦平面上微氣泡減少、影像亮度變暗的情形。結果顯示在我們的實驗架構下雙頻激發方式確實可以有效造成微氣泡的震盪與破裂。接下來要以“雙高頻”的方式誘發穴蝕效應。

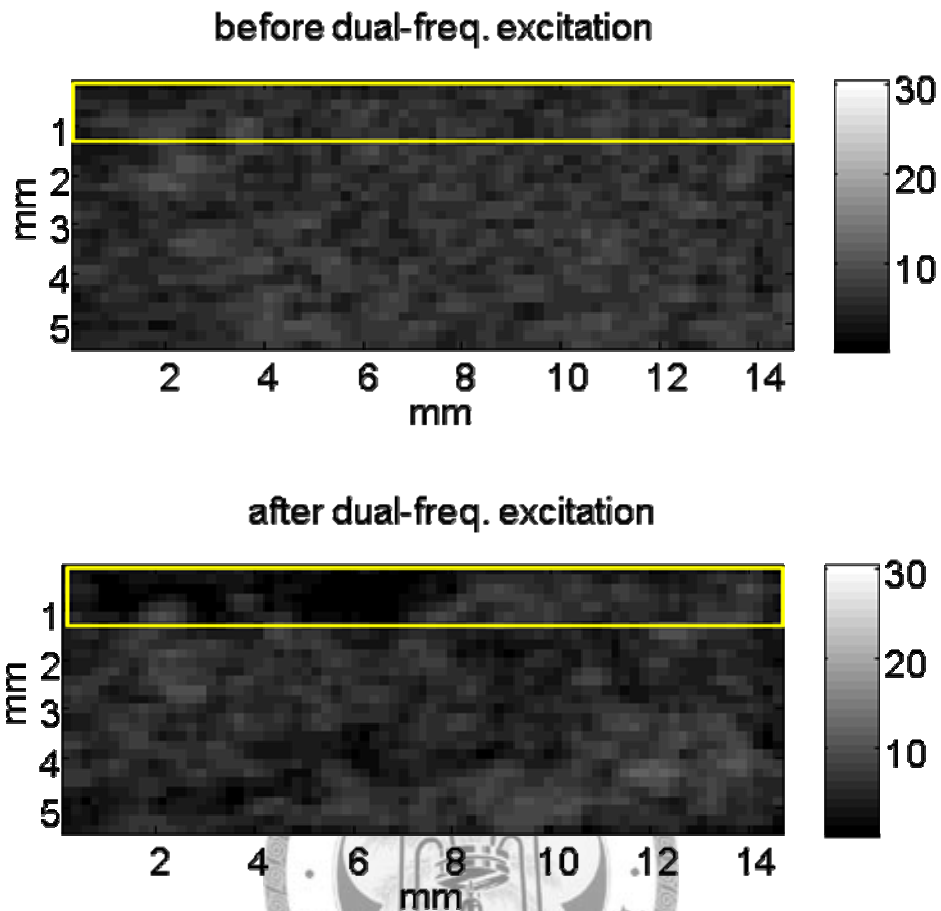


圖 35：雙頻激發法誘發穴蝕效應的影像亮度變化。
上：超音波照射前；下：超音波照射後。黃色方框為探頭聚焦面。

4.3.2 高頻探頭誘發穴蝕效應

在確定雙頻超音波激發穴蝕效應的可行性後，本實驗將使用 25 MHz 的探頭 (diameter : 0.25", model : V324, Panametrics-NDT)，發射 19+20 MHz 的雙高頻超音波，架構如圖 36、37。與上節的架構相似，亦使用商用超音波儀觀測亮度變化以及 1MHz 探頭量測低頻聲場強度，另外加上一個 10 MHz 的超音波探頭 (V312, Panametrics-NDT) 接收穴蝕效應產生的寬頻信號，經 5072 PR 放大器 (Panametrics-NDT) 後，再將此信號經由 MatLab 分析計算穴蝕效應劑量 (ICD)。

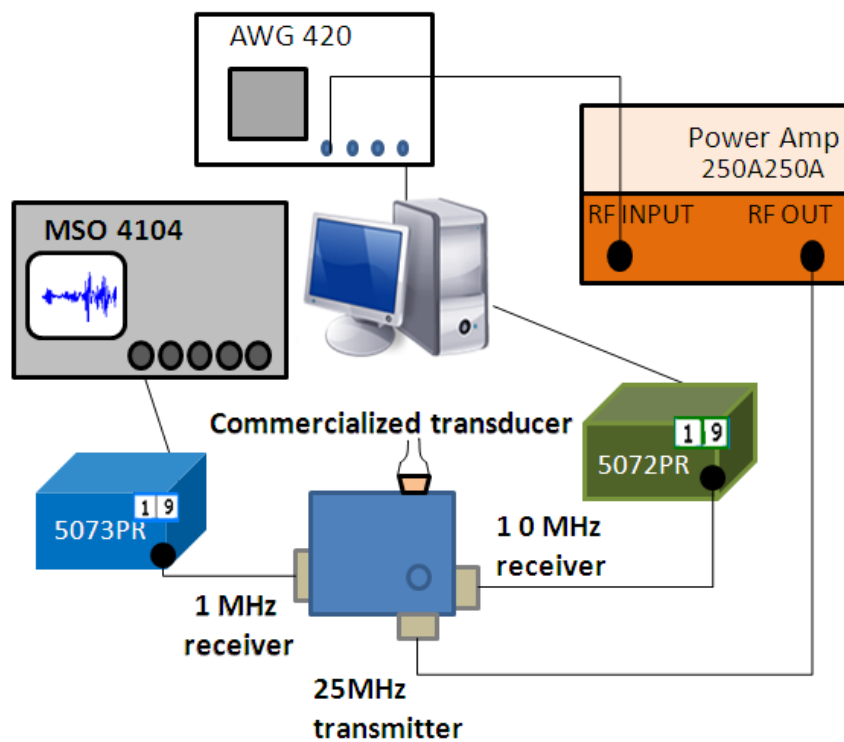


圖 36：雙高頻超音波誘發穴蝕效應實驗架構圖。

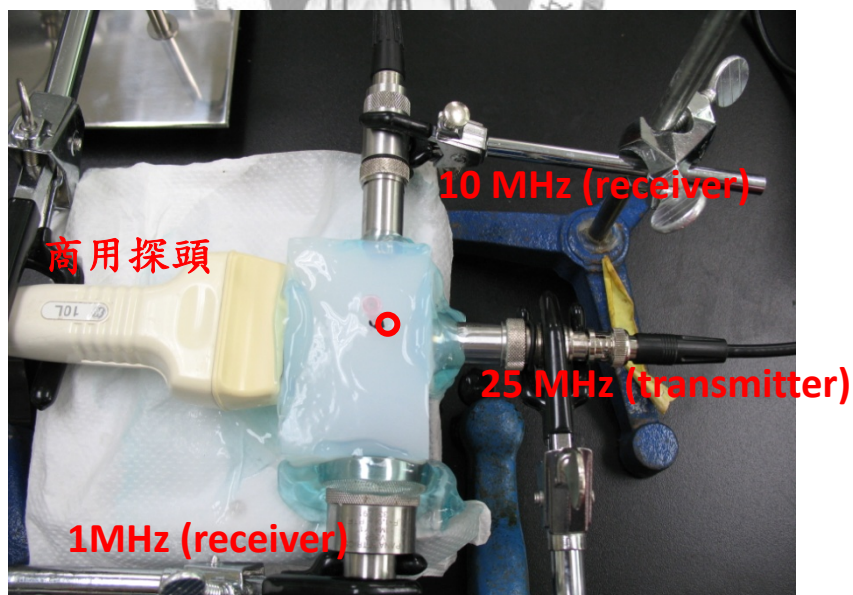


圖 37：雙高頻超音波誘發穴蝕效應實驗實景。

仿體中央的紅色圈為裝填微氣泡的空腔位置。

在仿體空腔裝入對比劑後，發射雙高頻超音波 (19+20 MHz)。微氣泡散射信

號經低頻探頭接收後，分析結果顯示此激發方式確實可以產生低頻的成分 (圖 38)。在確定有低頻成份之後，利用商用超音波儀評估雙高頻激發方式是否能造成微氣泡的破裂，以克服高頻不易誘發穴蝕效應的限制。但是從 B-mode 影像結果顯示 (圖 39)，超音波照射微氣泡前後的亮度差異僅約為 1 dB，在照射過程中亦無觀察到亮度變暗的情形。為更進一步以客觀的方式評估微氣泡的破裂與否，藉由與低頻實驗中 (第 2 章) 確定可以打破微氣泡條件下的 ICD 值作比較，如圖 40。黑色曲線下的面積為背景值，紅色與藍色曲線分別為 19+20 MHz 與 1 MHz 的超音波照射微氣泡後，寬頻訊號上昇量隨時間畫出的結果。將曲線下的面積與背景值相扣除即為各自的 differential ICD 值，結果指出實驗使用的雙高頻超音波並無明顯的穴蝕效應現象。

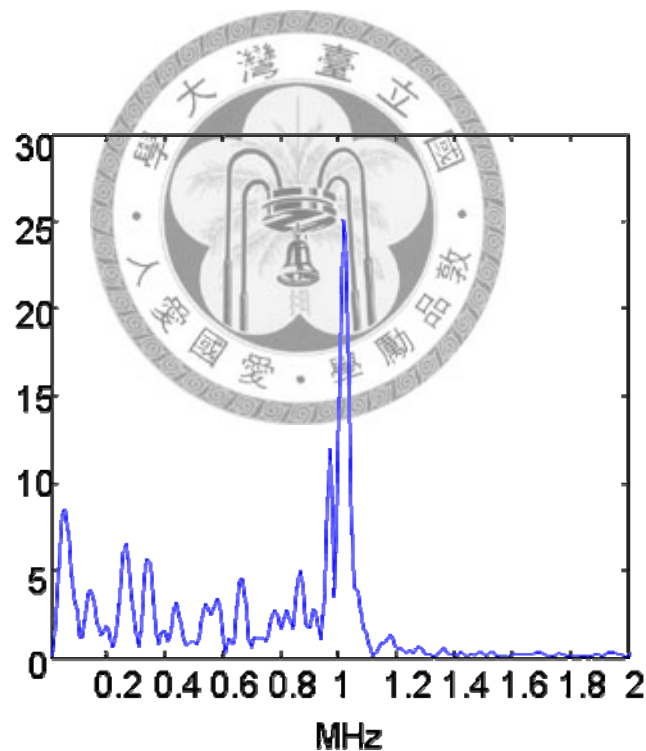


圖 38：雙高頻超音波經對比劑震盪後的信號頻譜 (取 2 MHz 以下)。

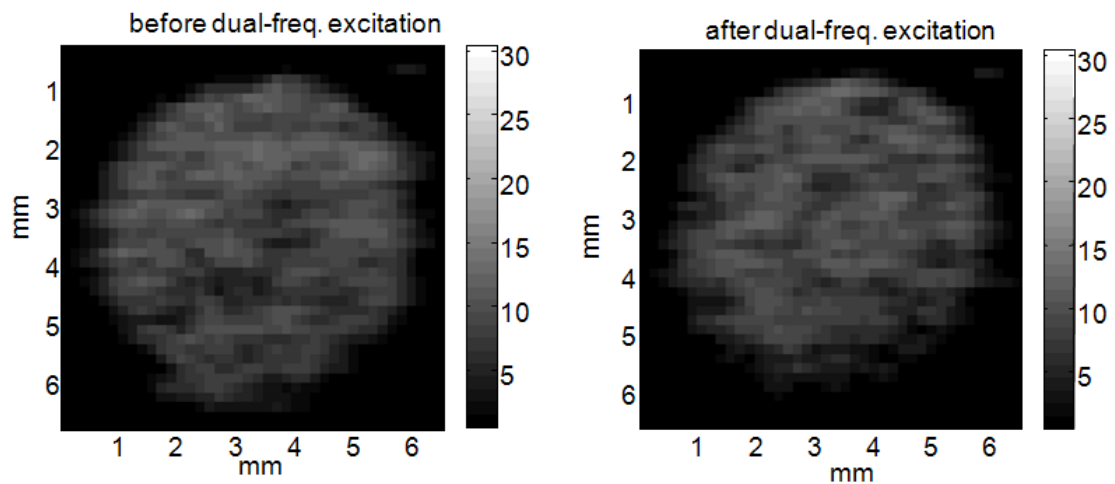


圖 39：雙高頻超音波照射對比劑前後的平均亮度差異。左：超音波照射前，平均亮度為 15.5 dB；右：超音波照射 2 分鐘後，平均亮度為 14.7 dB。

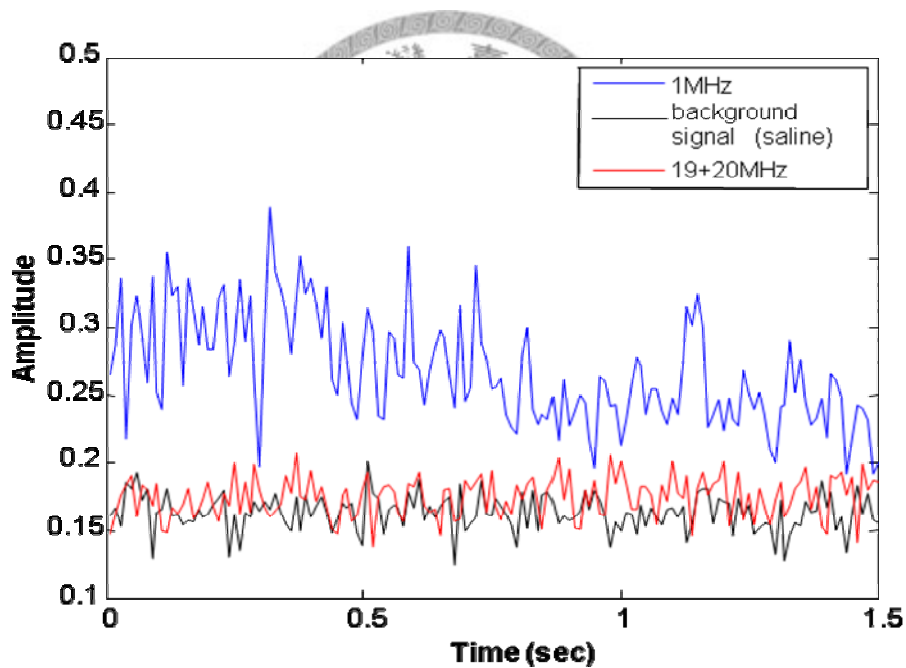


圖 40：ICD 曲線比較圖。

4.4 實驗結果討論

根據過去的研究，頻率的選擇與聲壓的調控為能否有效誘發穴蝕效應的主要影響因素[46, 47]：超音波發射頻率要與微氣泡的共振頻率相近 ($< 5 \text{ MHz}$)，並在足夠的超音波聲壓下，以引起微氣泡的破裂效應 (慣性穴蝕效應)。本實驗嘗試使

用雙頻激發的方式以期能突破高頻超音波不易誘發穴蝕效應的限制，但實驗結果顯示，25 MHz 的高頻探頭髮射19+20 MHz的雙高頻超音波並無法如同 10 MHz 探頭髮射 9.5+10.5 MHz 的雙頻超音波有效產生穴蝕效應，為得知其原因，將比較兩者的實驗條件，如表4。

表 4：雙頻激發法誘發穴蝕效應的實驗條件比較。

Bubble destruction	Transducer	The envelope frequency	Pulse length
Yes	10MHz (diameter: 1")	1MHz	10 μ s
No	25MHz (diameter: 0.25")	1MHz	10 μ s

表4中，兩種激發方式所採用的低頻成分都是 1MHz，但是此低頻成分的多寡實為能否成功產生穴蝕效應的關鍵，也因此比較這兩種發射情況經過微氣泡的非線性效應後，所產生的低頻聲場強度（圖 41）。

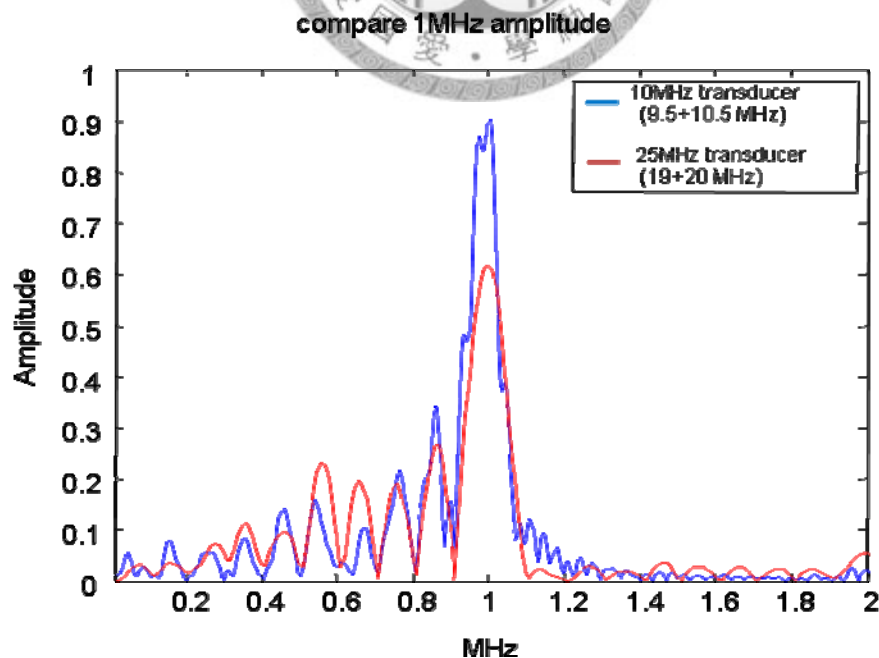


圖 41：低頻聲場強度比較。

上圖中，兩者於 1MHz 的振幅大小並無顯著差異，但是 25MHz 探頭髮射雙高頻超音波時，卻無法將微氣泡打破，經評估後的可能原因如下：1.脈衝長度不足：雙高頻超音波 (19+20 MHz) 的發射頻率為 9.5+10.5 MHz 的兩倍，或許應使用更長的脈衝長度才足夠引起微氣泡的振盪；2.微氣泡種類：本實驗室自製的微氣泡為白蛋白微氣泡，而常見的商用超音波對比劑如 SonoVue (Bracco, Amsterdam, Netherlands) 其以磷脂質作為包覆氣體的殼層。為考量殼層種類不同造成如引起穴蝕效應的閾值差異，本研究使用圖 36 的架構，在仿體洞中充填 Sonovue 後，發射19+20 MHz的雙頻超音波，亦無見微氣泡的破裂，也因此可以排除本實驗室自製對比劑所造成的差異；3.探頭面積差異太大：10 MHz 探頭的面積約為 25 MHz 探頭的 16 倍 (diameter: 1" v.s 0.25")，意即發射能量亦有相當大的差距，也因此發射聲壓不足的情況下，無法有效產生穴蝕效應。

總的來說，以雙頻激發的方式確實可以誘發穴蝕效應，但鑑於高頻超音波的探頭面積受限，以至於發射的聲壓不足以使微氣泡產生破裂，也因此認為孔徑更小 (diameter: < 1mm) 的血管內超音波 (IVUS) 可能無法應用於血栓溶解的作用，應以體外低頻超音波的方式才能有效誘發穴蝕效應並輔助治療血栓相關疾病。

第5章 結論與未來工作

本研究致力於提升超音波在血栓溶解治療的效率以及安全性，以期發展更安全、更有效的血栓溶解治療方式，實驗流程與結果彙整如圖 42：

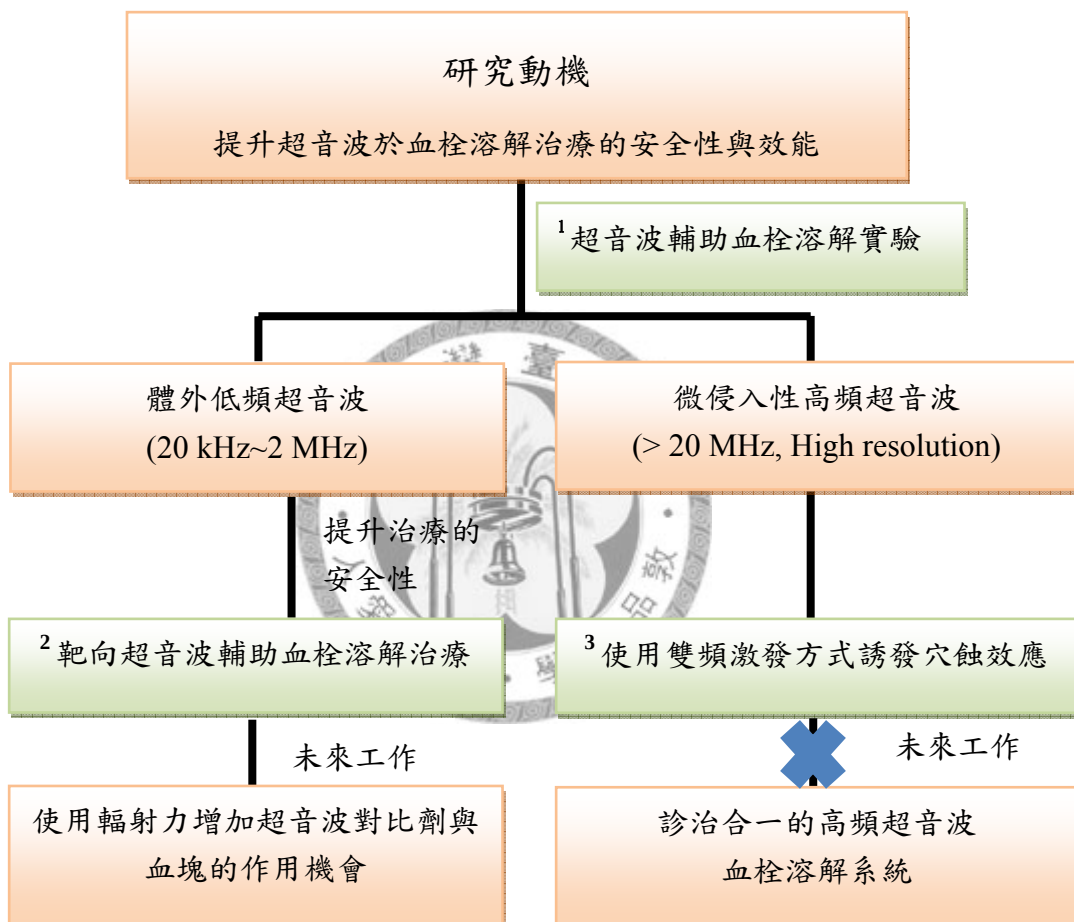


圖 42：實驗流程及結果

本研究先使用自身實驗架構證實低頻超音波誘發對比劑所產生的穴蝕效應，確實可以有效輔助血栓溶解劑的治療成效，並可達到最大的重量減輕百分比（比控制組多約 30%），其中可能的作用機制為穴蝕效應所釋放出來的能量使得血塊結構鬆散並產生空腔，也因此血栓溶解劑能更進一步深入血塊內部，溶解其中的纖維連結及紅血球，因而達到最佳的血栓溶解成效。除此之外，從切片的結果上來看，

本實驗對於血塊轉移置放等操作流程並不會造成嚴重的血塊損傷 (如圖 17 與圖 27)，也因此更證實了穴蝕效應對於血栓溶解作用的重要性。

為了避免或減少體外低頻超音波血栓溶解治療所可能帶來的不良生物效應 (如血管內皮的損傷)，本研究使用實驗室自製血栓靶向超音波對比劑，藉由標靶的專一性辨認作用增加血栓局部區域對比劑的濃度，以達到更專一性的偵測與治療。從靜態與流動式架構的實驗結果顯示，實驗室自製的血栓靶向對比劑的確具有標靶能力，並且具有局部誘發穴蝕效應的潛能，在未來臨床應用上，可望在避免血管損傷的安全操作下提升血栓溶解效能。

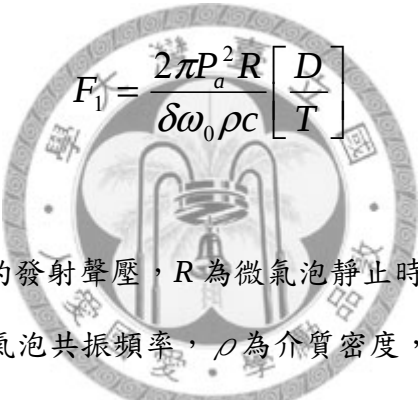
在探討並研究體外低頻超音波對血栓溶解作用的效能及機制外，本研究亦嘗試使用高頻超音波誘發穴蝕效應，希望能達到診治合一的目的，初步結果指出要能有效誘發穴蝕效應，仍需仰賴超音波的低頻成分 ($< 5 \text{ MHz}$)，也因此本實驗使用雙頻激發方法，利用微氣泡的非線性特性，試圖產生低頻成分 (envelope frequency)，以成功誘發穴蝕效應。經過實驗參數的比較評估後認為，以雙頻激發的方式確實可以誘發穴蝕效應，但鑑於高頻超音波的探頭面積受限，以至於發射的聲壓不足以使微氣泡產生破裂，也因此認為孔徑更小 (diameter: $< 1 \text{ mm}$) 的血管內超音波 (IVUS) 可能無法應用於血栓溶解的作用，應以體外低頻超音波的方式才能有效誘發穴蝕效應並輔助治療血栓相關疾病。

未來工作方面，雖然已於實驗中證實自製靶向性超音波對比劑的標靶能力以及對血栓溶解作用的助益，但於臨床應用上，靜脈注射對比劑後，將會面臨稀釋倍數變大以及與血塊作用機會降低的問題。除此之外，由於對比劑隨著血液流動，也因此其移動方向與管壁平行，對比劑的分布為均勻分布或是集中於血流中軸的分布狀況，若欲增加超音波對比劑與“血管壁”上血栓的作用機會，需要其他輔助的力量將微氣泡推向管壁，以達更專一性的標靶偵測與治療，也因此未來將使用“輻射力”作為此推動機制，增加血栓局部靶向性超音波對比劑的濃度，並再施以適當能量的超音波，誘發穴蝕效應，於提高專一性的情況下達到最佳的血栓溶解

成效。

輻射力的概念在 1906 年 V.F.K Bjerknes 於觀察氣泡在超音波聲場下彼此吸引、排斥等行為後，率先提出，接著引起許多研究團隊將此概念應用於微氣泡中：超音波的能量被介質中的粒子吸收後，周遭環境與粒子間的壓力梯度將會產生同超音波前進方向的移動力量，稱作輻射力 (Radiation force)，或稱作 Bjerkness force [34, 48-51]，主要由兩種力量組成：

1. 主級輻射力 (primary force)：為直接從超音波射源發射出來並遠離探頭方向的力量，使可壓縮的物體 (如氣泡) 產生位移，在發射週數夠長的情況下，此位移可達數個毫米；此力量的大小可以使用下列式子作理論的計算[51]：


$$F_1 = \frac{2\pi P_a^2 R}{\delta \omega_0 \rho c} \left[\frac{D}{T} \right]$$

其中， P_a 為超音波的發射聲壓， R 為微氣泡靜止時的半徑大小， δ 為總阻尼 (damping) 係數， ω_0 為微氣泡共振頻率， ρ 為介質密度， c 為超音波於介質中的聲速。另外，隨著脈衝長度 D 以及脈衝重複頻率 $1/T$ 的不同也會影響主級輻射力 F_1 的大小。

2. 次級輻射力 (secondary force)：為超音波對比劑之間的吸引力，當主級輻射力將微氣泡推向血管壁上的目標物後，微氣泡之間的次級輻射力，將會使標靶處累積更大的微氣泡濃度；兩個相同微氣泡之間彼此吸引的次級輻射力大小理論值如下式[51]：

$$F_2 = -\frac{2}{9} \left[\frac{\pi \rho (\omega P_a \kappa)^2 R^6}{d^2} \right] \left[\frac{D}{T} \right]$$

其中， R 為微氣泡半徑， κ 為微氣泡的壓縮性， ω 為其頻率， d 為兩個微氣泡中心之間的距離。

先前提到，靶向性超音波對比劑的發展，對觀測特定病理組織以及標靶治療有極大的幫助，藉由嵌合不同的配位體 (ligand) 於微氣泡表面，即可選擇性的標靶目標物，如血管新生、發炎或血栓等。但此靶向性對比劑能否有效到達目標位置，將會對“標靶”的效果產生重大的影響，而輻射力即可應用於此，並在先前已有許多研究：Dayton 與 Fowlkes 等人於先前已假設自由流動的微氣泡可以藉由超音波輻射力的推力，增加微氣泡黏合於血管內皮的作用機會[50, 52]；接著 Dayton 在流動的仿體實驗中藉由光學顯微鏡的觀察，證實主級輻射力 (primary radiation force) 的確可以推動超音波對比劑遠離血管中軸移動至血管壁 (圖 43)，並且在老鼠微循環的實驗架構中量測輻射力造成微氣泡溶液流速改變的數值變化(從 7.5 mm/s 降低至 1 mm/s)，實驗發現微氣泡的位移隨著超音波的脈衝重複頻率以及溶液流速的增加而增加，而發射聲壓與次級輻射力造成微氣泡的濃度聚積有正相關；Rychak 及 Zhao 等人更進一步證實，輻射力的作用可造成目標物區域 80 倍以上的對比劑滯留，另外亦有研究認為輻射力可作為增進治療藥物專一性給予的機制[34, 48, 53]。

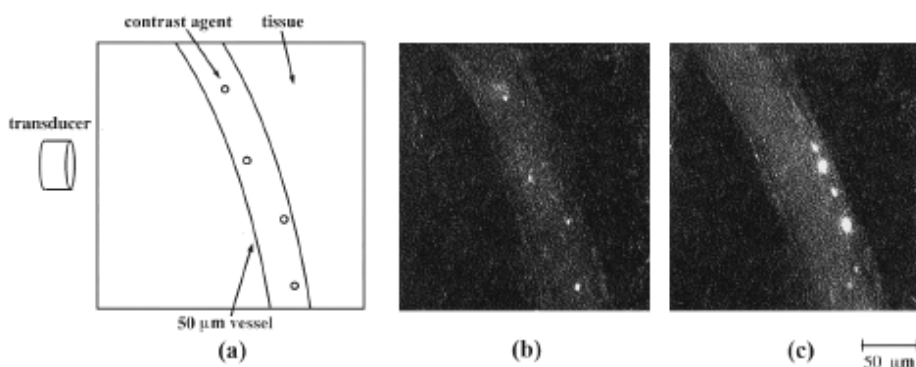
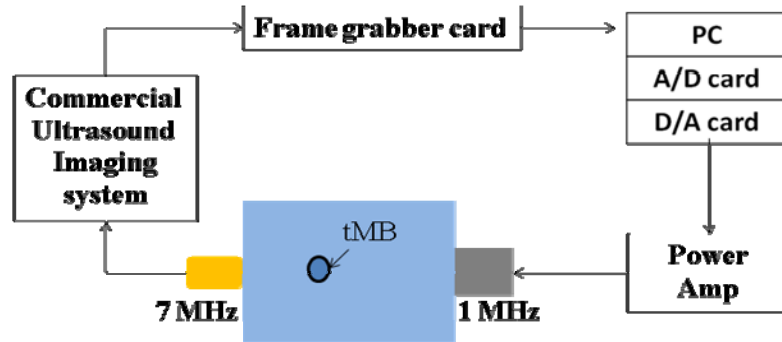


圖 43：輻射力 (Radiation force) 造成對比劑的位移及聚積現象[50]。(a)血管、對比劑與超音波探頭的相對位置示意圖。(b)標誌上螢光的微氣泡於老鼠小動脈中的流動情形，流速為 7.5 mm/s。(c) 發射超音波後微氣泡移動至血管右方 (遠離探頭方向)，並產生微氣泡聚積的情形，此時的流速為 1 mm/s。

總的來說，主級輻射力可以使流動中的微氣泡產生位移，使之朝向對側管壁移動，同時降低微氣泡的流動速度，並增加微氣泡之間次級輻射力的作用機會，藉由彼此的吸引、推擠，將造成管壁上更大的微氣泡濃度累積，但直至今日，輻射力的相關研究主要著重於生醫分子影像與藥物傳遞等偵測治療應用[34, 51, 53-56]，但與血栓溶解作用的相關研究與探討卻少之又少，也因此未來研究將利用輻射力作為增加與血栓的作用機會的機制，以期將穴蝕效應所釋放的能量集中於血塊局部，達到最佳的治療成效。實驗將採取三步驟進行輻射力輔助靶向超音波血栓溶解研究：

1. 輻射力的產生與驗證：為驗證本實驗所使用的參數條件可以有效產生輻射力，將採用兩種方式驗證：1. 使用輻射力微量天平 (radiation force balance, National Physical Laboratory, UK) 量測輻射力的大小。2. 使用商用超音波探頭以及超音波儀觀測微氣泡是否會因為輻射力的推動產生位移，初步架構如圖：實驗是在一塊凝膠仿體中進行，仿體中央挖一個直徑 5 mm、深度 2.5 cm，體積約為 0.5 cm^3 的圓柱型空腔，為靶向性對比劑 (tMB) 放置處。仿體右側放置 1 MHz 的發射探頭 (V302, Panametrics-NDT)，信號源來自電腦內的數位類比轉換卡 (CompuGen 1100, GaGe Applied Technologies)，控制發射中心頻率為 1.5 MHz、40 個發射週期、脈衝重複頻率 (pulse repetition frequency, PRF) 為 1000 Hz 的弦波 [49, 50, 52, 55, 56]。完成的波形發出至功率放大器 (RF power amplifier, 250A250A, Amplifier Research)，將電壓放大後再驅動探頭髮射。仿體左側為商用超音波探頭直接從影像觀測微氣泡的時變過程，影像由影像擷取卡 (frame grabber, UPG 410 B, UPMOST Corp.) 完成與分析。擷取的影像相對位置如圖 44 (c)，將分為三部分觀測輻射力的作用，其中 part 1 為遠離發射探頭的位置，part 2 為探頭聚焦面，part 3 為接近發射探頭的位置。也因此若 part 1 的區域變亮，part 2、part 3 的區域亮度變暗且總亮度 (part 1+part 2+part 3) 不變時，即可驗證輻射力的產生，除此之外，亦會使用商

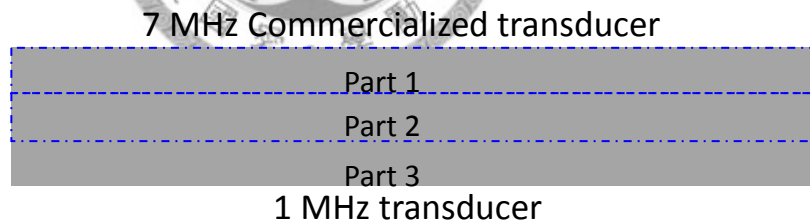
用探頭即時觀測微氣泡因受到輻射力所產生的位移。



(a)



(b)



(c)

圖 44：輻射力的產生與驗證。(a) 實驗架構示意圖；(b) 實驗架構實景；(c) 影像的相對位置及分區觀測示意圖。

2. 在驗證輻射力推動微氣泡的可行性後，再進行輻射力輔助靶向性超音波對比劑血栓溶解實驗，實驗架構與第四章中靶向超音波輔助血栓溶解實驗相似，如圖 45(a)：使用注射幫浦控制靶向性微氣泡溶液的流速為 1 ml/sec、

探頭的超音波發射方向正對血塊並垂直於微氣泡溶液的流動方向，先發射低強度 (low intensity) 、長脈衝周期 (long pulse duration) 的超音波，利用輻射力推動靶向性微氣泡以增加與血塊的作用機會 (圖 45(b))。

3. 接著使用高強度 (high intensity) 的超音波誘發穴蝕效應，並檢視輻射力與靶向性超音波對比劑的共同作用下，對於血栓溶解作用的助益。

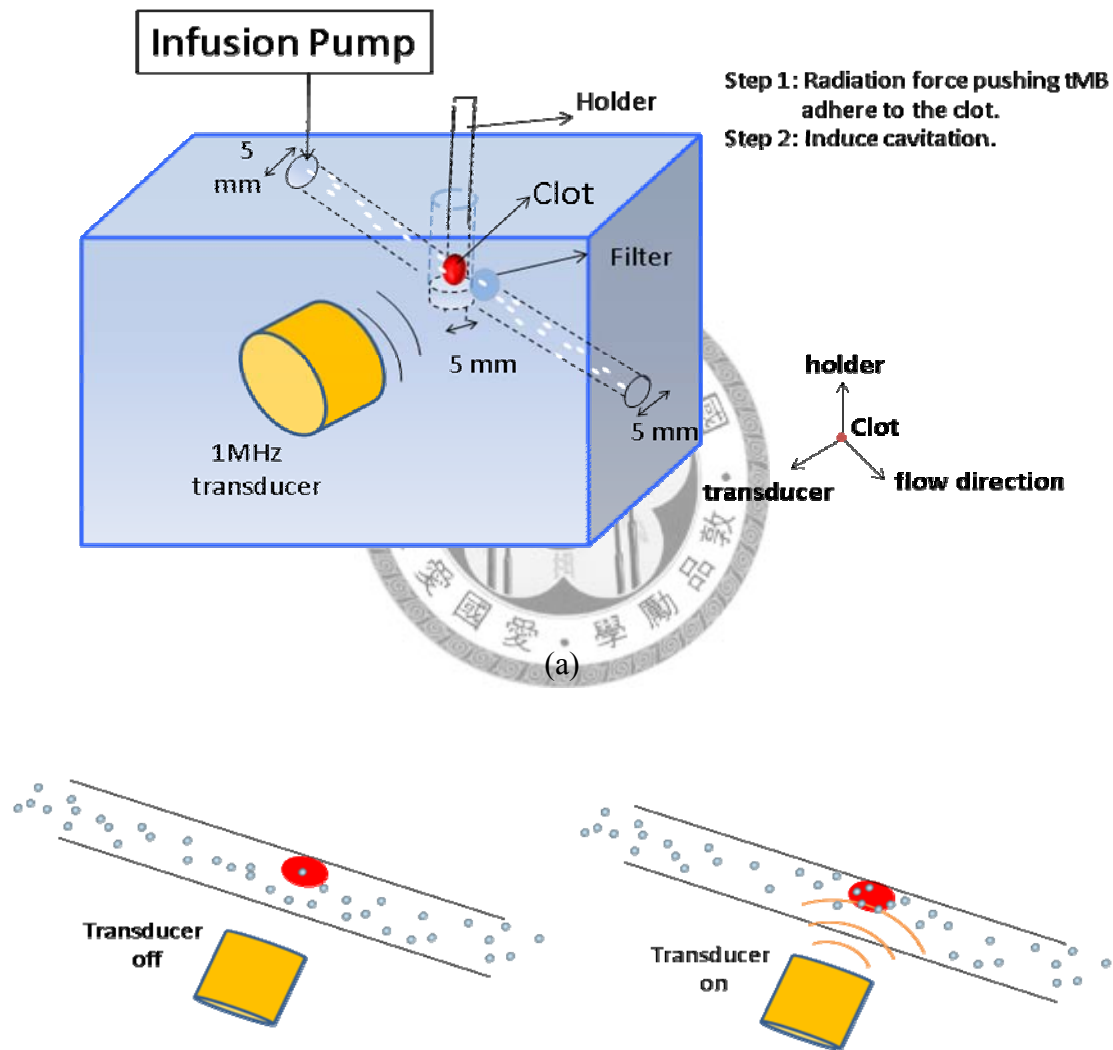


圖 45：輻射力輔助靶向性超音波對比劑血栓溶解實驗架構示意圖。(a)實驗架構圖，探頭的超音波發射方向垂直於微氣泡溶液的流動方向；(b) 架構俯視圖。

第6章 參考文獻

- [1] Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. N Engl J Med, 2008. **359**(9): p. 938-49.
- [2] 何敏夫, *血液學*. 2005, 台北: 合記. 第三版, p. 555-6.
- [3] <http://diaglab.vet.cornell.edu/clinpath/modules/>, Cornell University.
- [4] Hacke, W., et al., *Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS)*. JAMA, 1995. **274**(13): p. 1017-25.
- [5] Hacke, W., et al., *Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators*. Lancet, 1998. **352**(9136): p. 1245-51.
- [6] Datta, N.R., et al., *Head and Neck Cancers - Results of Thermoradiotherapy Versus Radiotherapy*. International Journal of Hyperthermia, 1990. **6**(3): p. 479-86.
- [7] Overgaard, J., et al., *Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology*. International Journal of Hyperthermia, 1996. **12**(1): p. 3-20.
- [8] Datta, N.R., et al., *Head and neck cancers: results of thermoradiotherapy versus radiotherapy*. International Journal of Hyperthermia, 1990. **6**(3): p. 479-86.
- [9] Kim, Y.S., et al., *High-intensity focused ultrasound therapy: An overview for radiologists*. Korean Journal of Radiology, 2008. **9**(4): p. 291-302.
- [10] Goldberg, B.B., J.B. Liu, and F. Forsberg, *Ultrasound contrast agents: a review*. Ultrasound Med Biol, 1994. **20**(4): p. 319-33.
- [11] Ruan, J.L., *Preparation and Applications of Targeted Ultrasonic Contrast Agents*. 2008, National Taiwan University.
- [12] Ellegala, D.B., et al., *Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)beta3*. Circulation, 2003. **108**(3): p. 336-41.
- [13] Lanza, G.M. and S.A. Wickline, *Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy*. Curr Probl Cardiol, 2003. **28**(12): p. 625-53.
- [14] Lindner, J.R., *Molecular imaging with contrast ultrasound and targeted microbubbles*. J Nucl Cardiol, 2004. **11**(2): p. 215-21.
- [15] Martin, M.J., et al., *Enhanced detection of thromboemboli with the use of targeted microbubbles*. Stroke, 2007. **38**(10): p. 2726-32.
- [16] Schumann, P.A., et al., *Targeted-microbubble binding selectively to GPIIb IIIa*

- receptors of platelet thrombi*. Invest Radiol, 2002. **37**(11): p. 587-93.
- [17] Lauterborn, W., et al., *Acoustic cavitation, bubble dynamics and sonoluminescence*. Ultrason Sonochem, 2007. **14**(4): p. 484-91.
- [18] Morgan, K.E., et al., *Experimental and theoretical evaluation of microbubble behavior: effect of transmitted phase and bubble size*. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 2000. **47**(6): p. 1494-509.
- [19] Prokop, A.F., A. Soltani, and R.A. Roy, *Cavitation mechanisms in ultrasound-accelerated fibrinolysis*. Ultrasound Med Biol, 2007. **33**(6): p. 924-33.
- [20] <http://www.sonochemistry.info/>, Sonochemistry centre of Coventry University.
- [21] Burns, P.N. and S.R. Wilson, *Microbubble contrast for radiological imaging: 1. Principles*. Ultrasound Q, 2006. **22**(1): p. 5-13.
- [22] Neppiras E.A., *Acoustic cavitation*. Physics Reports. 1980. **61**(3): p. 159-251.
- [23] Chen, W.S., et al., *The effect of surface agitation on ultrasound-mediated gene transfer in vitro*. J Acoust Soc Am, 2004. **116**(4 Pt 1): p. 2440-50.
- [24] Francis, C.W., et al., *Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots*. Ultrasound Med Biol, 1995. **21**(3): p. 419-24.
- [25] Everbach, E.C. and C.W. Francis, *Cavitation mechanisms in ultrasound-accelerated thrombolysis at 1 MHz*. Ultrasound Med Biol, 2000. **26**(7): p. 1153-60.
- [26] Hajri, Z., et al., *An investigation of the physical forces leading to thrombosis disruption by cavitation*. J Thromb Thrombolysis, 2005. **20**(1): p. 27-32.
- [27] Molina, C.A., et al., *Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator*. Stroke, 2006. **37**(2): p. 425-9.
- [28] Datta, S., et al., *Correlation of cavitation with ultrasound enhancement of thrombolysis*. Ultrasound Med Biol, 2006. **32**(8): p. 1257-67.
- [29] Cintas, P., et al., *Enhancement of enzymatic fibrinolysis with 2-MHz ultrasound and microbubbles*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(7): p. 1163-6.
- [30] Suchkova, V., et al., *Enhancement of fibrinolysis with 40-kHz ultrasound*. Circulation, 1998. **98**(10): p. 1030-5.
- [31] Birnbaum, Y., et al., *Noninvasive in vivo clot dissolution without a thrombolytic drug: recanalization of thrombosed iliofemoral arteries by transcutaneous ultrasound combined with intravenous infusion of microbubbles*. Circulation, 1998. **97**: p. 130-4.
- [32] Wu, Y., et al., *Binding and lysing of blood clots using MRX-408*. Invest Radiol, 1998. **33**(12): p. 880-5.
- [33] Xie, F., et al., *Effectiveness of lipid microbubbles and ultrasound in declotting*

- thrombosis. *Ultrasound Med Biol*, 2005. **31**(7): p. 979-85.
- [34] Zhao, S., et al., *Radiation-force assisted targeting facilitates ultrasonic molecular imaging*. *Mol Imaging*, 2004. **3**(3): p. 135-48.
- [35] Yeh, C.K., et al., *Dual high-frequency difference excitation for contrast detection*. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2008. **55**(10): p. 2164-76.
- [36] Cheng, Y.J., *Preparation and Biomedical Applications of Ultrasonic Microbubbles*. 2007, National Taiwan University.
- [37] Oberle, V., et al., *Efficient transfer of chromosome-based DNA constructs into mammalian cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1676**(3): p. 223-30.
- [38] Lai, C.Y., et al., *Quantitative relations of acoustic inertial cavitation with sonoporation and cell viability*. *Ultrasound Med Biol*, 2006. **32**(12): p. 1931-41.
- [39] Datta, S., et al., *Ultrasound-enhanced thrombolysis using Definity as a cavitation nucleation agent*. *Ultrasound Med Biol*, 2008. **34**(9): p. 1421-33.
- [40] Kruse, D.E., C.K. Yeh, and K.W. Ferrara, *A new imaging strategy utilizing wideband transient response of ultrasound contrast agents*, in *IEEE International Ultrasonics Symposium*, 2003. p. 424-8.
- [41] Chérin, E., et al., *Microbubble contrast agent destruction using 20-25 MHz ultrasound*, in *IEEE International Ultrasonics Symposium*, 2005. p. 751-4.
- [42] Yeh, C.K., S.Y. Su, and C.C. Shen, *Microbubble destruction by dual-high-frequency ultrasound excitation*. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2009. **56**(5): p. 1113-8.
- [43] Shi, W.T. and F. Forsberg, *Ultrasonic characterization of the nonlinear properties of contrast microbubbles*. *Ultrasound Med Biol*, 2000. **26**(1): p. 93-104.
- [44] Tang, M.X. and R.J. Eckersley, *Nonlinear propagation of ultrasound through microbubble contrast agents and implications for imaging*. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2006. **53**(12): p. 2406-15.
- [45] Khokhlova, V.A., et al., *Effects of nonlinear propagation, cavitation, and boiling in lesion formation by high intensity focused ultrasound in a gel phantom*. *J Acoust Soc Am*, 2006. **119**(3): p. 1834-48.
- [46] Chomas, J.E., et al., *Mechanisms of contrast agent destruction*. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2001. **48**(1): p. 232-48.
- [47] Klibanov, A.L., et al., *Destruction of contrast agent microbubbles in the ultrasound field: the fate of the microbubble shell and the importance of the bubble gas content*. *Acad Radiol*, 2002. **9 Suppl 1**: p. S41-5.
- [48] Rychak, J.J., et al., *Enhanced targeting of ultrasound contrast agents using acoustic radiation force*. *Ultrasound Med Biol*, 2007. **33**(7): p. 1132-9.
- [49] Dayton, P., et al., *Acoustic radiation force in vivo: a mechanism to assist*

- targeting of microbubbles*. Ultrasound Med Biol, 1999. **25**(8): p. 1195-201.
- [50] Dayton, P.A., J.S. Allen, and K.W. Ferrara, *The magnitude of radiation force on ultrasound contrast agents*. J Acoust Soc Am, 2002. **112**(5 Pt 1): p. 2183-92.
- [51] Dayton, P.A., et al., *A preliminary evaluation of the effects of primary and secondary radiation forces on acoustic contrast agents*. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 1997. p. 1264 -77.
- [52] Fowlkes, J.B., et al., *The role of acoustic radiation force in contrast enhancement techniques using bubble-based ultrasound contrast agents*. J Acoust Soc Am, 1993. **93**: p. 2348.
- [53] Rychak, J.J., A.L. Klibanov, and J.A. Hossack, *Acoustic radiation force enhances targeted delivery of ultrasound contrast microbubbles: In vitro verification*. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 2005. **52**(3): p. 421-33.
- [54] Rychak, J.J., et al., *Acoustic radiation force enhances ultrasound contrast agent retention to P-selectin in vivo*. in *IEEE International Ultrasonics Symposium*, 2005: p. 1703-7
- [55] Lum, A.F., et al., *Ultrasound radiation force enables targeted deposition of model drug carriers loaded on microbubbles*. J Control Release, 2006. **111**(1-2): p. 128-34.
- [56] Shortencarier, M.J., et al., *A method for radiation-force localized drug delivery using gas-filled lipospheres*. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 2004. **51**(7): p. 822-31.

