

國立台灣大學電機資訊學院生醫電子與資訊學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biomedical Electronics and Bioinformatics

College of Electrical Engineering and Computer Science

National Taiwan University

Master Thesis

使用單發雷射之雙模態光聲/超音波顯微系統

Cost-effective Design of a Photoacoustic-Ultrasound

Microscope Using Single Laser Pulses

吳文邵

Wen-Shao Wu

指導教授：李百祺 博士

Adviser : Pai-Chi Li, Ph.D.

中華民國 105 年 7 月

July, 2016



## 謝誌

碩士生活很快地在忙碌中過去，首先必須感謝父母對我的支持，鼓勵我來到台大鑽研自己的興趣，包容沒辦法和我相處的時間，父親則積極給我正面的榜樣也進入博士班深造，因此更感謝母親努力在工作之餘還要照顧家裡和妹妹。

感謝李百祺教授，記得剛推甄完來學校找指導教授，老師的實驗室就同時散發專業與和樂的氣氛，進研究所後，養成了每週規劃和完成進度的習慣，在李老師固定每個禮拜的會議督促和耐心指導下，最後得到了不錯的實驗成果，每當研究上遇到無法解釋的困難，老師總在會議上點破我的問題。也很感謝老師在這段期間提供我投稿和出國參與會議的機會，讓我的專業知識又更上一層。


感謝劉建宏博士和佳倫學長，因為實驗室很大而且分工很複雜，剛進實驗室在摸索的時候，都是透過兩位資深的大學長的詳細介紹，才漸漸了解整個實驗室的運作，是實驗室的大家長。實驗時儀器的操作，儘管手邊的事情再忙，學長們都會細心且一再叮嚀我該注意的細節。

感謝所有給予我協助的學長姐們，士堯學長一步步介紹他的研究給我，並帶我認識實驗室。瑋文學姐在研究上幫助我非常多，因為是生物領域的專業，如果沒有學姐給予研究靈感、提供細胞技術和不斷幫老鼠打針麻醉，實驗就沒辦法完整，就算平常需要顧及多個研究，每當我有疑問或是實驗需求，學姐總是願意給予專業的幫助。裕威、境嚴、珮妤、上景都是實驗室的明燈，在我實驗遇到瓶頸的時候指引我方向，尤其裕威不只能在研究上給予專業的引導，同時還是我們的康樂股長，常常督導要按時運動，是位文武雙全的奇才；當然還需要感謝三位戰友凱文、何偉、柏逸的一同奮鬥，不管是一起擠在 731 或奈米認真，或是休息的時候組隊發洩紓壓，都還是歷歷在目，希望畢業之後凱文和何偉在業界而柏逸在學術生涯都能順利。

吳文邵 謹誌

2016.08.16

## 摘要



本研究致力於開發一套光聲/超音波雙模態顯微系統，以建立腫瘤血管新生三維模型之影像為目標。本研究開發之系統具有微米等級解析度與高影像深度，且不同於傳統光聲影像系統與超音波影像系統，僅使用單一雷射二極體即能產生出共模態影像。系統概念採用雷射誘發式超音波(Laser induced ultrasound)，以 PDMS 混和物之多層膜結構取代傳統超音波探頭作為超音波激發源，能夠產生高頻、窄頻超音波訊號，藉由頻譜分離法將兩種模態影像分離與分別成像，多層膜所產生之超音波訊號頻譜可創造於 12 MHz 以下與光聲訊號 10 dB 影像對比。線與腫囊複合仿體的影像建立，驗證系統具備血管及腫瘤三維影像之潛力，透過標定金奈米粒子於觀測細胞上，近紅外光雷射二極體能夠激發光聲訊號，觀測血管內皮細胞，以利進一步建立新生血管影像。

**關鍵字：**光聲顯微術、雙模態影像系統、雷射誘發式超音波、三維影像系統

## Abstract



A dual-modality photoacoustic-ultrasound system was developed for mapping three-dimensional models of tumor angiogenesis. The system features micron scale spatial resolution in photoacoustic imaging, high resolution in ultrasound imaging and high imaging depth. With a single pulsed laser diode, the system is able to make dual-modality images by laser induced ultrasound without an additional ultrasonic pulser. A multilayer film made by PDMS and graphite powder was used to generate high frequency and narrow band ultrasound. Accordingly, photoacoustic and ultrasound signals can be separated with simple filtering and the photoacoustic image and the ultrasound image can be generated concurrently. The scheme creates 10 dB signal contrast and was tested with a fiber and cyst phantom. Gold nanorods with the absorption peak in near infrared range were used to generate the photoacoustic signal. By targeting gold nanorods on the vessels, the system has the potential to investigate neovascularization and establish 3D tumor angiogenesis models.

**Keyword: photoacoustic microscopy, dual-modality imaging, laser induced ultrasound, 3D imaging system**

# 目錄



口試委員審定書 .....	I
謝誌 .....	II
摘要 .....	III
Abstract.....	IV
圖目錄 .....	VIII
表目錄 .....	X
第一章 緒論 .....	1
1.1 研究動機 .....	1
1.2 腫瘤血管新生 .....	2
1.2 光聲顯微術 .....	2
1.2.1 光聲效應原理 .....	2
1.2.2 光聲顯微術 .....	3
1.2.3 雷射二極體光聲顯微鏡 .....	4
1.3 雷射誘發式超音波 .....	5
1.4 光聲/超音波雙模態影像 .....	5
1.4.1 雙模態系統文獻探討 .....	6
1.5 基於單發雷射光聲/超音波影像系統 .....	7
1.5.1 雷射誘發窄頻超音波 .....	7
1.5.2 光聲/雷射誘發窄頻超音波系統架構 .....	9
1.6 論文架構 .....	9
第二章 雷射二極體光聲顯微系統 .....	11
2.1 光聲訊號理論模型 .....	11
2.2.1 雷射脈衝寬對光聲能量影響 .....	12
2.2.2 雷射脈衝寬對光聲頻譜影響 .....	13



2.2	高能量雷射二極體 .....	14
2.3	雷射二極體產生誘發式超音波 .....	16
2.3.1	雷射誘發窄頻超音波 .....	18
2.4	雷射二極體光聲顯微影像訊雜比 .....	18
2.5	光聲穿透深度 .....	18
第三章	雷射誘發窄頻超音波系統 .....	20
3.1	多層膜製作 .....	20
3.2	薄膜產生超音波系統架構 .....	20
3.3	窄頻超音波頻率響應 .....	22
3.4	雷射誘發超音波訊號強度 .....	23
3.5	合成孔徑法 .....	26
第四章	光聲/超音波顯微使用單發雷射成像系統 .....	27
4.1	雷射二極體光聲/超音波顯微系統架設 .....	27
4.2	頻帶分離法 .....	29
4.3	系統影像分析 .....	30
4.3.1	影像深度判別 .....	30
4.3.2	超音波強度補償 .....	31
4.4	系統光聲影像解析度量測 .....	31
4.5	系統超音波影像解析度量測 .....	32
4.5.1	薄膜產生超音波影像解析度 .....	32
4.5.2	合成孔徑法對影像解析度及品質提升 .....	33
4.5.3	薄膜產生超音波聲場分析 .....	34
4.7	線仿體光聲/超音波雙模態影像 .....	36
4.7.1	薄膜式架構雙模態影像 .....	36
4.8	系統對奈米金桿光聲影像靈敏度 .....	37

4.8.1 奈米金桿濃度與仿體製作 .....	37
第五章 光聲/超音波雙模態系統於腫瘤細胞血管增生應用 .....	39
5.1 三維線/腫囊仿體影像 .....	39
5.1.1 影像掃描及掃描速度 .....	39
5.1.2 三維影像建立 .....	40
5.2 奈米金粒子標定血管內皮細胞影像 .....	41
第六章 問題與討論 .....	43
6.1 光聲/超音波雙模態系統優勢與限制 .....	43
6.2 雷射二極體對系統所帶來之限制 .....	43
6.3 影像系統解析度 .....	44
6.4 仿體影像 .....	44
6.5 影像空間解析度改善 .....	44
6.5.1 結合聲透鏡與超音波薄膜系統 .....	44
6.5.2 結合聲透鏡式系統分析 .....	45
6.5.3 聲透鏡製作 .....	46
6.5.4 結合聲透鏡與薄膜之系統架構 .....	47
6.5.5 結合聲透鏡與薄膜之超音波影像解析度 .....	47
第七章 結論與未來工作 .....	49
7.1 結論 .....	49
7.2 未來工作 .....	49
7.2.1 光聲超音波雙模態系統應用 .....	49
7.2.2 雙波長雷射二極體光聲顯微系統 .....	51
參考文獻 .....	53



## 圖目錄



圖 1-1 傳統 OR-PAM 架構.....	4
圖 1-2 光聲單層模與多層膜結構.....	8
圖 1-3 光聲單層模與多層膜頻譜[19].....	9
圖 1-4 使用窄頻雷射誘發超音波架構[19].....	9
圖 2-1 雷射脈衝寬與產生光聲訊號示意圖.....	12
圖 2-2 壓力傳遞限制係數與脈衝寬比率關係.....	13
圖 2-3 單層模結構下雷射光表面入射與反射示意圖.....	14
圖 2-4 光聲訊號在不同雷射脈衝寬下波形與頻譜模擬.....	14
圖 2-5 脈衝雷射二極體脈衝調控示意圖.....	15
圖 2-6 雷射驅動電路圖.....	16
圖 2-7 雷射輸出波型及輸入短脈衝訊號與產聲雷射脈衝寬關係.....	16
圖 2-8 PDMS 混和物單層膜產生光聲訊號中心頻率及雷射脈衝寬在不同雷射二極體能量、脈衝寬、聚焦光斑影響.....	17
圖 3-1 多層膜製作流程.....	20
圖 3-2 背向散射式多層膜光聲/超音波系統架構.....	21
圖 3-3 吸收係數與振幅頻寬模擬圖.....	22
圖 3-4 單層與多層膜於雷射二極體激發下產生超音波波形與頻譜.....	23
圖 3-5 雷射誘發超音波聲壓量測架構.....	24
圖 3-6 雷射輸入電壓與接收光聲訊號強度.....	24
圖 3-7 散射仿體厚度對光聲與超音波線仿體影像訊雜比與橫向解析度之影響.....	25
圖 3-8 合成孔徑法.....	26
圖 4-1 雷射二極體光聲/超音波顯微系統示意圖.....	28
圖 4-2 雷射二極體光聲/超音波顯微系統運作步驟.....	28





圖 4-3 雷射二極體光聲/超音波顯微系統光學模組.....	29
圖 4-4 雷射二極體光聲/超音波顯微系統.....	29
圖 4-5 頻帶分離法.....	30
圖 4-6 影像深度資訊.....	30
圖 4-7 薄膜產生超音波訊號強度因物體吸收造成之強度變化.....	31
圖 4-8 銅網光學影像、光聲影像.....	32
圖 4-9 金屬線仿體光學影像、探頭回聲影像、雷射誘發超音波影像.....	33
圖 4-10 線仿體探頭回聲及薄膜產生超音波架構影像及橫向、軸向投影.....	33
圖 4-11 線仿體超音波影像使用合成孔徑法前後比較.....	34
圖 4-12 薄膜非聚焦超音波聲圖像.....	35
圖 4-13 無薄膜下使用探頭之線仿體光聲 B-scan 影像、探頭回聲線仿體超音波影 像及合成影像與薄膜式光聲/超音波架構經頻譜分離後光聲 B-scan 影像、超音波 影像、合成影像.....	36
圖 4-14 奈米金桿吸收光譜.....	37
圖 4-15 系統接收奈米金桿之光聲訊號靈敏度.....	38
圖 5-1 線/腫囊仿體光聲三維掃描影像、超音波三維影像、光聲/超音波三維影像 模型.....	41
圖 5-2 血管內皮細胞(A)光學影像 (B)光聲影像.....	42
圖 6-1 多層膜結合聲透鏡之光聲/超音波系統架構、聚焦深度 3 毫米 F 數值 1 之聲 透鏡計算.....	46
圖 6-2 結合聲透鏡與多層膜製作流程.....	47
圖 6-3 結合聲透鏡實驗架構.....	47
圖 6-4 結合薄膜與聲透鏡之線仿體超音波 B-scan 投影影像及解析度.....	48
圖 7-1 老鼠耳部血管/腫瘤光學影像、光聲三維影像切面、窄頻超音波三維影像切 面、探頭收發超音波三維影像切面.....	51



## 表目錄

表 1-1 目前現有光聲顯微影像系統.....	7
-------------------------	---

# 第一章 緒論



## 1.1 研究動機

本研究著力於開發單發雷射之雙模態光聲/超音波顯微系統，應用在腫瘤血管新生於三維模型影像建立。三維環境影像相較於二維平面影像需要更深的影像深度，而傳統光學顯微影像基於光學散射的方式觀測影像，僅能穿透表層細胞，因此難以用來建立三維影像。光聲顯微術藉由光聲效應的特性達到較佳的影像深度，且透過光聚焦的方式達到光學解析度，能夠讓我們觀察微米等級之物體，如新生血管。然而光聲顯微術影像對比建立在光吸收強度，對於光吸收能力薄弱的組織，就無法建立影像；而另一方面，超音波影像對比建立在物體散射能力之差異，藉此我們可以建構出結構性的影像。光聲/超音波雙模態影像的結合可以幫助我們了解新生血管與腫瘤細胞之間的作用關係。

由於光聲系統激發源為雷射，而傳統超音波系統使用壓電材料在電訊號觸發下產生震動，產生機械波，因此兩系統結合時需仰賴脈衝雷射與超音波收發器獨立觸發的方式建立影像，方法簡易但需要額外加入收發系統才能達到，增加系統的複雜度。因此本研究提出一結合了雷射誘發式超音波與光學解析度光聲顯微技術，僅需在光聲顯微系統中加入薄膜狀結構之超音波激發源，即成為共模態光聲/超音波顯微系統。此系統量測目標影像時，在雷射觸發下同時由物體產生光聲及由薄膜狀超音波激發源產生高頻且窄頻超音波，經目標物散射後，最後由超音波探頭接收，因此不需要外加電子設備，因此系統複雜度低，接收的訊號經過頻譜分離後，即能得到光聲/超音波影像，誘發式超音波薄膜同時具備製作容易及低成本，能夠符合開發高成本效益光聲顯微系統之目的。

此外光聲效應需要透過脈衝雷射產生，光聲顯微系統通常使用 Q 開關雷射，此類雷射具有短脈衝、高能量之特性，能夠產生寬頻率、高訊雜比之光聲訊號，然而價格高昂且設備龐大，因此光聲顯微系統仍難以推廣到一般研究甚至臨床前

研究上，以雷射二極體作為光聲激發源，能讓光聲系統具備小體積、高成本效益的優勢，拓展此系統在臨床前上的應用。



## 1.2 腫瘤血管新生

腫瘤生長為造成癌症之原因，而腫瘤生長之因素已在近年來被提出[1]，因腫瘤生長時會分泌缺氧因子，讓血管不斷向腫瘤所在位置生長，以提供腫瘤所需養分，形成腫瘤血管新生。血管新生初期僅有少量血管為腫瘤細胞提供生長所需因素，然而當血管新生到後期，腫瘤周圍將形成血管網路，此時腫瘤生長速率以倍數成長，治療上也變得困難，因此目前許多研究以抑制腫瘤血管新生，達到限制腫瘤獲得生長因素為治療方式[2]。然而觀察腫瘤造成血管生成的行為，需在三維的生物模型中進行，因此必須透過建立三維生長環境來培養腫瘤細胞[2-5]，而觀察上由於傳統光學顯微鏡觀測深度因受光學散射的影響，觀測深度僅限於表層約200微米內[6]，無法較完整的觀察腫瘤血管新生在培養環境中與腫瘤的作用關係，因此必須藉由新的工具輔助來幫助更進一步的觀測。

## 1.2 光聲顯微術

光聲效應是光聲顯微術的基本應用原理，當光打在特定物體上，會產生數千赫茲的機械波，而自從1960年高功率雷射發明後，光聲效應被應用於氣體偵測、非破壞性檢測等應用，1990年代中後，光聲效應開始被應用在生物醫學影像、分子影像、功能性影像等應用。

### 1.2.1 光聲效應原理

光聲效應利用物體或組織吸收電磁波能量後，產生局部瞬間熱膨脹現象(thermal expansion)，而轉換為機械波震動，此震動發出的機械波正好位在超音波頻段範圍，因此可藉由超音波探頭接收。

光聲影像之影像對比建立在組織對特定波長電磁波段的吸收程度，依照組織的吸收係數，使得光聲影像具備光學吸收的對比，相較於超音波而言，光聲影像提供了更多功能性的對比。另一方面，組織吸收電磁波能量後轉換為聲波傳遞，

由於聲波散射比光學散射小約 2~3 次方，因此光聲影像相較於光學影像能夠偵測到於組織更深層的位置。特定波長以及短波寬雷射使得物體在雷射激發下能夠產生百萬赫茲的訊號，需藉由高頻超音波探頭接收，由於高頻的特性，光聲影像能夠創造良好的空間解析度。

光場穿透物體所需時間遠小於熱傳導時間，也就是符合熱傳遞限制(thermal confinement)，使得只有被光照到的地方產生熱膨脹，其產生聲壓強度可由下式表示：

$$p(z) = \left( \frac{\beta C_s^2}{C_p} \right) \mu_a F_0(z) e^{-\mu_{eff} z} \quad \text{式 1.1}$$

其中 $\beta$ 代表組織熱膨脹係數， $C_s$ 代表聲速， $C_p$ 為組織熱容量， $\mu_a$ 為組織光學吸收係， $F_0$ 為光場強度分布， $\mu_{eff}$ 表示光衰減係數。光聲訊號與光場能量及熱膨脹係數成正比關係，而光場在組織內傳遞則依據衰減係數及深度成指數衰減，而衰減係數與組織散射和吸收有關，當散射與吸收能力越強，穿透深度下降，相對的，當組織吸收能力越強，產生的光聲訊號強度也增加，因此吸收係數是光聲影像對比的來源。然而光聲訊號以聲波形式傳遞，遇到聲阻抗差異大的組織，如脂肪、氣泡等，容易產生強反射造成訊號嚴重衰減，影響聲波傳遞強度，但其在皮膚表層檢測及血管導管影像的應用仍然有不錯的成效。

### 1.2.2 光聲顯微術

光聲顯微術(photoacoustic microscopy, PAM)結合光學吸收對比及超音波穿透深度的優勢，能夠較傳統光學影像有較高的影像穿深，在解析度上依照聲學聚焦與光學聚焦方式分為聲學解析度光聲顯微術(acoustic resolution photoacoustic microscopy, AR-PAM)與光學解析度光聲顯微術(optical resolution photoacoustic microscopy, OR-PAM)。前者以發散的雷射光束激發大範圍組織產生光聲訊號，利用探頭聚焦的方式得到影像，因此影像解析度決定於接收探頭中心頻率，解析度範圍大約在數百微米；而後者解析度則取決於物鏡和探頭聚焦能力，兩者點擴散函數的捲積決定整體影像的點擴散函數[7]，由於光學聚焦能力遠高於聲學，物鏡

數值孔徑(numerical aperture, NA)主要決定雷射聚焦點的大小以及解析度，橫向解析度可以下式表示：

$$\text{Lateral resolution} = \frac{0.61\lambda}{\text{NA}} \quad \text{式 1.2}$$

其中 $\lambda$ 為入射雷射光之波長，由式 1.2 可知，要得到越好的橫向解析度，則需要越大的數值孔徑，此類顯微鏡在繞射極限下可以創造出微米等級影像解析度，目前有研究使用數值孔徑高達 1.23 的物鏡，創造出下微米級的解析度[8]，已接近光學顯微術的解析度，但卻保有高影像穿深的優勢。透過聚焦一次激發組織一處，並視為可解析的最小單位點，結合掃描技術建構出二維或三維影像。

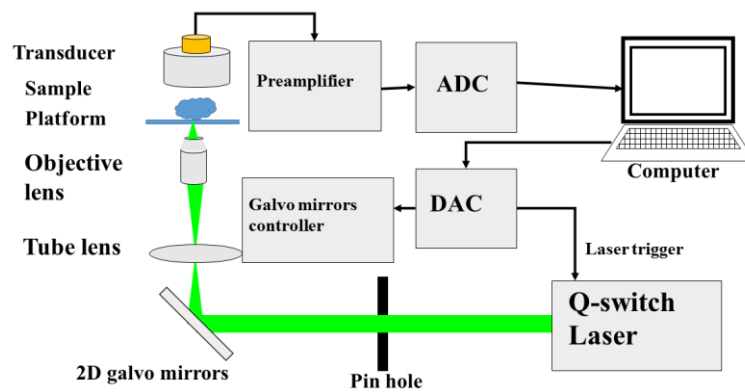


圖 1-1 傳統 OR-PAM 架構

### 1.2.3 雷射二極體光聲顯微鏡

光聲顯微術雖同時具有高解析度和影像穿深，儘管有一些實驗室以此系統提出傑出的研究，但從 1990 年代發展至今仍然未被廣泛用在臨床前研究，因為光聲訊號需要透過短脈衝雷射激發，才能夠產生高強度訊號[7]，而脈衝寬通常被設定為 10 奈秒以下，因此 Q 開關雷射為最常用於光聲顯微系統的激發源，但此類雷射系統體積大且價格高昂，使得光聲顯微系統應用受限。在 OR-PAM 系統中，由於使用光聚焦的方式激發目標物產生訊號，因此在此脈衝寬下總能量僅需數奈焦耳即足夠，在此條件下，高能量雷射二極體(Pulsed Laser diode, PLD)非常適合作為替代。作為 OR-PAM 的激發源，因為雷射二極體具有體積小、輸出能量穩定、脈衝重複頻率(PRF)、價格低等優點；但此類雷射脈衝寬因採用電容充放電

的方式，上升時間通常需要 10~20 奈秒方能達到最大能量輸出，使得脈衝寬被限制在約 100 奈秒的寬度，影響到產生之光聲訊號的強度與中心頻率，這方面的測試會在第二章做進一步討論。

雷射二極體光聲顯微系統已在幾篇研究中被提出，使用高能量、長脈衝寬的雷射二極體作為激發源以增加光聲訊號之訊雜比，但由於二極體仍較 Q 開關雷射能量低，因此皆須透過高平均數來增加訊雜比，且接近 100 奈秒的脈衝寬增加了單發雷射總能量，對於生物影像應用，可能會面臨總能量的限制，而直接限制脈衝重複頻率，因此希望藉由使用充能時間更短的雷射二極體，以較小的單發雷射能量達到相近的光聲訊號強度。

### 1.3 雷射誘發式超音波

雷射誘發式超音波(laser induced ultrasound)同樣應用光聲效應的原理，利用具有高熱彈性係數的吸收體作為超音波發射源，以高能量短脈衝雷射激發吸收體，在吸收電磁波能量後產生高強度聲波，在一定能量限制下，吸收體不會被雷射破壞，因此能夠作為發射源不斷產生超音波，最後再由超音波探頭接收建立出影像。由於透過光聲效應作為超音波源，吸收體材料的熱彈性係數影響到產生超音波訊號的強度，聚二甲基矽氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)具有非常高的熱彈性係數，是金屬材料的五倍以上[11]，不過此種聚合物本身為透明，對於可見光和近紅外光波頻段吸收能力較低，而由於脈衝雷射波段通常在可見光和近紅外光範圍內，因此需混和吸收材料如鍍鉻、鍍金或混和石墨粉(carbon powder)提高吸收係數。在高能量短脈衝雷射觸發下，可以產生高頻且寬頻的超音波[12]，研究顯示此材料只有接收雷射的表面一微米以下會吸收並產生超音波，超過此範圍的聚合物只會造成訊號衰減，而 PDMS 衰減係數高，因此製程上的厚度被盡量減少。

### 1.4 光聲/超音波雙模態影像

光聲影像對比取決於組織吸收係數，因此所建立之影像僅能讓實驗者觀察到能夠吸收此波段光波並產生光聲效應的功能性影像，而超音波則根據組織內聲阻

抗不同產生的反射訊號形成影像對比，可提供組織內結構性影像，兩者互補的關係有助於研究者同時建立功能性或結構性影像，進一步了解組織間或是分子在組織中作用的影像。

光聲/超音波因皆藉由聲波方式傳遞訊號，兩者皆具有高影像穿深的優點，同時因使用設備多有相似之處，如探頭、掃描系統等，系統結合上，OR-PAM 與超音波顯微系統比其他雙模態系統，如光聲/螢光顯微系統[13]、超音波/計算斷層掃描系統[14]等，由於複雜度相對較低，系統合成的可行性高。

#### 1.4.1 雙模態系統文獻探討

目前現有雙模態系統如表 1 所示[15, 16, 17, 18]，依照影像解析度主要可分成三種，使用陣列探頭、單一高頻超音波探頭、單一超高頻超音波探頭架構。透過在陣列系統上由光纖導入雷射光，直接利用陣列超音波探頭接收物體光聲訊號，系統複雜度低、可靠性高，目前已有多篇文獻使用雙模態系統應用在血管與組織影像[15]、幹細胞生長影像[16]。然而由於陣列探頭空間解析度受限於頻率低，因此有使用高頻單探頭的架構，並與雷射共焦的方式，提高空間解析度[17]，但這樣的架構需透過特殊設計的聚焦設備，讓探頭與雷射光源共路，這類型的雙模態系統仍採用聲學解析度光聲顯微術，穿透深度高但解析度約在數十微米，較適合觀察位於深層組織的結構，細胞觀測也僅以群集的變化追蹤。作為觀測新生血管影像之系統，因新生血管大小僅數微米至數十微米，需要光學解析度系統。另外也有研究提出使用超高頻超音波探頭接收，以達到光聲及超音波微米以下的空間解析度，但影像穿深同時因為高頻在組織中衰減的特性而僅能觀察數層細胞，系統應用因此以單層細胞影像為主[18]。為達到建立三維影像，必須兼顧空間解析度與影像深度。

除影像解析度上的差異，三種系統共同特徵為採用光聲、超音波獨立成像的方式，也就是以分別或是交錯切換光聲與超音波模式建立影像，因光聲與超音波激發源不相同，且為避免訊號會在時間上重疊。而由於激發源相異，系統必須同時具備雷射與超音波收發器 (Pulser/receiver)，和驅動探頭的高壓放大器



(Amplifier)，這些元件的加入增加雙模態系統的複雜性。三種系統另一點共同特徵為使用 Q 開關雷射，其目的是為產生高能量短脈衝以激發光聲訊號，但採用這種雷射的系統具有不少限制，例如雷射體積龐大、重複頻率低、價格高昂等，加上雙模態系統須加上超音波驅動元件，這些原因使得雙模態系統更昂貴，應用價值也較低。

表 1-1 目前現有光聲顯微影像系統

PA/US system	Array transducer based	Single probe based	Ultra high single probe
Frequency	Low (<10 MHz)	High (10~40 MHz)	High (1 GHz)
Spatial resolution	~200 $\mu\text{m}$ (PA) ~200 $\mu\text{m}$ (US)	~40 $\mu\text{m}$ (PA) ~40 $\mu\text{m}$ (US)	<1 $\mu\text{m}$ (PA) ~1 $\mu\text{m}$ (US)
PA/US integration	Independent system	Independent system	Independent system
Laser source	Q-switch laser	Q-switch laser	Q-switch laser

## 1.5 基於單發雷射光聲/超音波影像系統

雷射誘發式超音波由於同樣使用雷射作為激發源，若與光聲系統共同使用激發源便能夠免去外加超音波發射器。然而在同時產生光聲和超音波的架構之下，兩訊號在時間上因部分重疊無法分離，為了解決重疊的問題，先前研究以頻譜分離的方式，利用多層堆疊的膜狀結構，在雷射觸發下產生高頻且窄頻的超音波訊號，在 20 MHz 以下相較低頻的部分，能夠產生約 20 dB 訊號對比，由於研究顯示組織光聲訊號中心頻率出現在 10 MHz 附近，透過濾波器可將光聲及窄頻超音波分離，個別產生出影像。

### 1.5.1 雷射誘發窄頻超音波

PDMS 混和物所製做出的單一層膜狀結構材料在短脈衝雷射激發下，能夠吸收電磁波能量，並轉換為高強度、寬頻率超音波，在先前研究中[19]，多層膜狀

結構是結合光吸收層與光穿透層堆疊的方式，在雷射觸發下能夠產生數個脈波，而形成窄頻的效果。光吸收層即為 PDMS 與石墨粉混和所製作，目的是讓混和物能夠吸收雷射能量；穿透層為 PDMS，由於純 PDMS 不吸收紅外線波長以下的光，因此不產生超音波，目的是讓吸收層間有時間延遲，達到建設性與破壞性干涉的效果，便能夠達成控制所需的頻譜，而由於 PDMS 與 PDMS 混和物的聲阻抗相近，因此聲波在多層膜中傳遞不會嚴重反射。多層膜所產生出的超音波訊號可視為單層膜與轉移函數的捲積，以下式表示：

$$S_m(t) = S_s(t) * h_m(t) = S_m(t) * \sum_{i=1}^N \alpha_i \delta(t - t_i) \quad \text{式 1.3}$$

其中  $S_m$  代表多層膜產生之訊號， $S_s$  代表單層膜產生之訊號， $h_m$  為轉移函數，由產生的訊號強度  $\alpha_i$  和穿透層所造成各層的延遲  $t_i$  而組成。

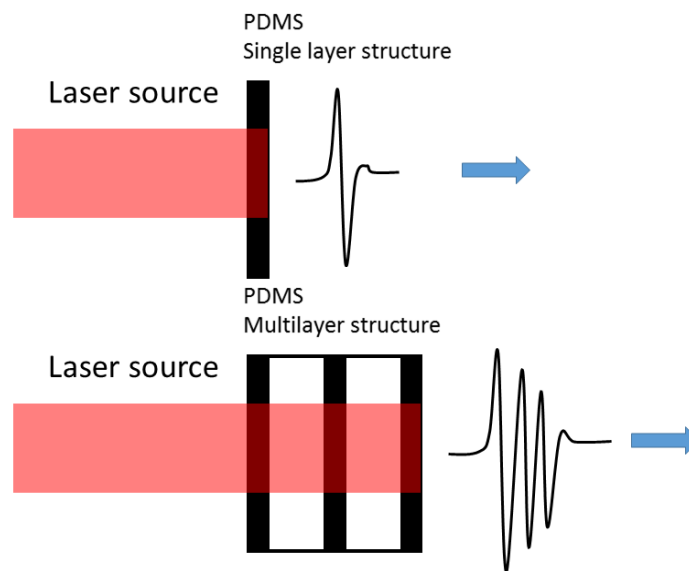


圖 1-2 光聲單層模與多層膜結構

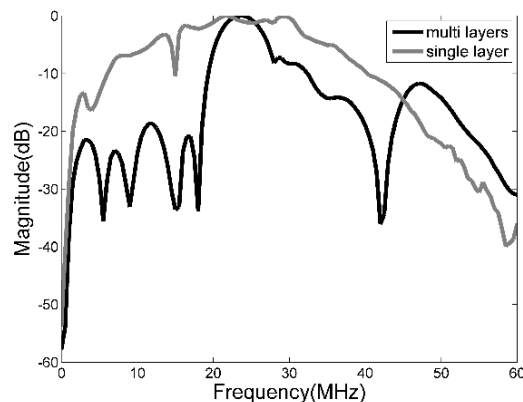


圖 1-3 光聲單層模與多層膜頻譜[19]



### 1.5.2 光聲/雷射誘發窄頻超音波系統架構

在先前的系統架構中，多層膜製作於基底上，雷射首先激發超音波，因多層膜對 523 nm 雷射光穿透率為 25%，因此部分雷射能量穿過膜後激發目標物產生光聲訊號，但礙於超音波探頭與雷射光源位置相衝，此架構無法使用背向散射的方式建立目標物體超音波影像，因此採用側向接收，但側向接收下聲波傳遞路徑並不像回聲方式單純，聲波因不同路徑在複雜的組織結構內散射程度皆不相同，而無法正確顯示待測目標物的深度資訊，為了能夠建構三維影像模型，必須更改此架構，以包含深度資訊建立三維結構。

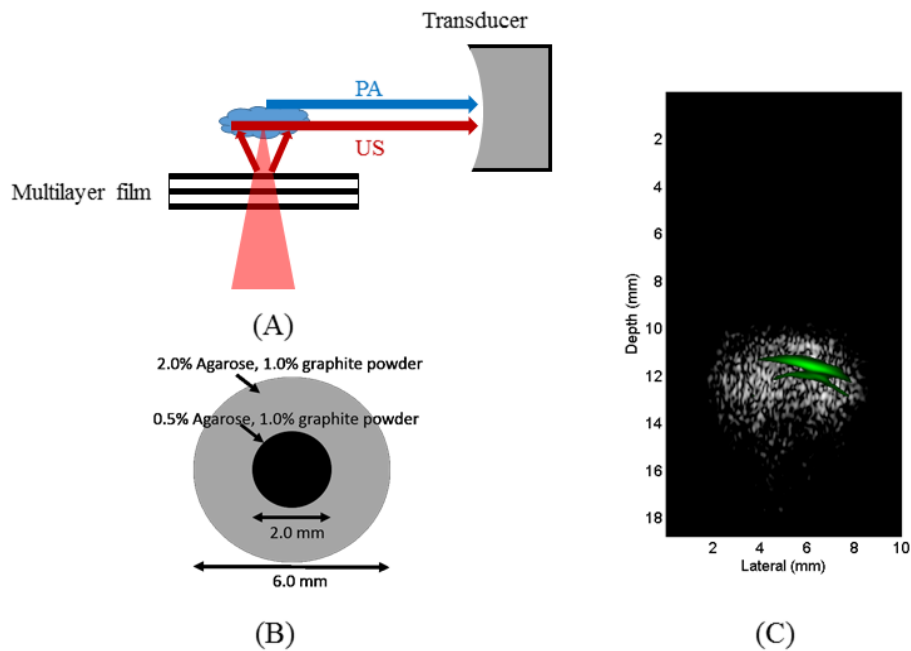


圖 1-4 使用窄頻雷射誘發超音波架構[19]

## 1.6 論文架構

本論文探討利用雷射誘發式窄頻超音波材料所架設的雙模態光聲/超音波顯微系統，目標為使用單一雷射源同時產生光聲與超音波影像，並量測系統光聲與超音波影像對比及可達解析度，最後以此系統建立三維腫瘤血管模型影像。第一章介紹光聲顯微術與窄頻超音波原理，第二章評估雷射二極體系統對光聲及雷射

誘發式超音波之影響，第三章說明改良後的窄頻式超音波多層膜製作與訊號頻譜，第四章說明以雷射二極體完成架設的光聲/超音波雙模態系統，並量測實際達成之光聲及超音波影像解析度，第五章以此系統建立三維仿體影像、細胞影像，並展示雙模態系統應用之初步結果，第六章討論目前完成結果，第七章做總結及說明未來系統改進方向。

## 第二章 雷射二極體光聲顯微系統



雷射作為光聲訊號激發源，脈衝寬為重要參數，對光聲訊號來說，脈衝寬與應力傳遞限制(stress confinement)和熱傳遞限制(thermal confinement)有直接關係，滿足此兩限制才能確保產生的光聲訊號能達到最大振幅。為滿足應力與熱傳遞限制，光聲系統的雷射需使用數奈秒的短脈衝，因此通常使用 Q 開關雷射，但雷射二極體受到物理上的限制無法達到如此短脈衝寬，對光聲訊號振幅會造成影響。另一方面，雷射脈衝寬亦決定激發的超音波訊號頻譜，因此必須透過光聲的數學模型了解脈衝寬對光聲訊號振幅以及頻率的影響，決定可選擇的雷射二極體。

### 2.1 光聲訊號理論模型

應力傳遞限制由物質熱傳遞係數和受熱區域決定，而壓力傳遞限制與物質聲速及受熱區域決定，受熱區域與觀測物體的大小和光吸收係數相關[20]，而熱傳遞限制可被表示為：

$$t_{thermal} = L_p^2/4D \quad \text{式 2.1}$$

其中 D 為目標物體的熱擴散係數，組織的熱擴散係數大約為  $1.4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ ，而雷射脈衝寬必須滿足  $t_p < t_{thermal}$  才能有效產生光聲訊號， $L_p$  為物體受熱區間，同時和吸收係數以及物體的大小相關，以光聲顯微鏡觀察的物體大小  $L_p = 10 \text{ }\mu\text{m}$  來看， $t_{thermal} = 179 \text{ }\mu\text{s}$  遠大於脈衝時間，因此脈衝雷射二極體一般都符合熱傳導限制。

另一方面，應力傳遞限制與受熱區域和物體聲速相關，可表示為：

$$t_{stress} = L_p/c \quad \text{式 2.2}$$

$c$  為目標物體聲速，此以組織內傳遞速度為主，與水相近，約為  $1500 \text{ m/s}$ ，則此時  $t_{stress} = 6.7 \text{ ns}$ ，當雷射脈衝寬高過於這個數值，產生的光聲訊號振幅便會遞減。由於脈衝雷射二極體難以達到如此短脈衝寬，此時必須考慮應力傳遞限制對振幅衰減的影響。



### 2.2.1 雷射脈衝寬對光聲能量影響

光聲訊號產生可由下列模型表示[21]：

$$p_0(z) = \left(\frac{\beta c^2}{C_p}\right) \mu_a F e^{-\mu_a z} = \Gamma A e^{-\mu_a z} \quad \text{式 2.3}$$

其中 $\beta$ 為等壓體積膨脹係數(isobaric volume expansion coefficient)， $C_p$ 為物體熱容量， $F$ 為區域螢光強度， $\mu_a$ 為吸收係數， $\Gamma = \beta c^2 / C_p$ 為格呂奈森常數(Grüneisen coefficient)， $A = \mu_a F$ ，光傳遞過程中因吸收係數和傳遞距離衰減，在均勻物質中，可以將距離 $z$ 以物體內聲速 $c$ 與時間 $t$ 代換得到：

$$P(t) = p_0(z = ct) = \Gamma A e^{-\mu_a ct} \quad \text{式 2.4}$$

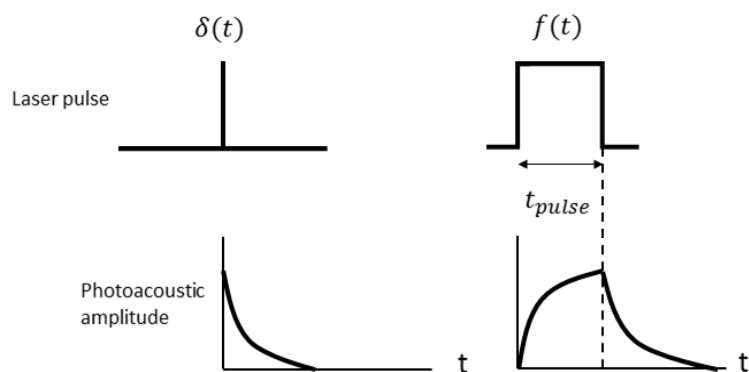


圖 2-1 雷射脈衝寬與產生光聲訊號示意圖

在相同單發雷射能量假設之下，當脈衝寬極短時雷射符合應力傳遞限制之假設，此時可以將輸入雷射當作脈衝訊號，即 $f(t) = \delta(t)$ ，當輸入脈衝寬超過限制時，便需考慮其有限脈衝寬 $t_{pulse}$ ：

$$P(t) = f(t) * p_0(z = ct) \quad \text{式 2.5}$$

$$f(t) = \begin{cases} 1/t_{pulse} & \text{for } 0 < t < t_{pulse} \\ 0 & \text{elsewhere} \end{cases} \quad \text{式 2.6}$$

在 $0 < t < t_{pulse}$ 內：

$$P(t) = \Gamma A \frac{(1 - e^{-\mu_a ct})}{\mu_a ct_{pulse}} \quad \text{式 2.7}$$

在 $t > t_{pulse}$

$$P(t) = \Gamma A \frac{(1 - e^{-\mu_a c t_{pulse}})}{\mu_a c t_{pulse}} e^{-\mu_a c t} \quad \text{式 2.8}$$

光聲訊號在  $t = t_p$  時達到最大振幅  $P_{peak} = P(t = t_{pulse}) = \Gamma A \frac{(1 - e^{-\mu_a c t_{pulse}})}{\mu_a c t_{pulse}}$ ，其中

應力傳遞限制係數  $S$ ：

$$S = \frac{1 - e^{-\mu_a c t_{pulse}}}{\mu_a c t_{pulse}} = \frac{1 - e^{-\tau}}{\tau} \quad \text{式 2.9}$$

當假設物體吸收係數大或是物體大小超過  $1/\mu_a$  時，此時：

$$\tau = \mu_a c t_{pulse} = \frac{t_{pulse}}{(L_p/c)} = \frac{t_{pulse}}{t_{stress}} \quad \text{式 2.10}$$

要符合應力傳遞限制則需  $t_{pulse} \ll t_{stress}$ ，此時  $\tau \rightarrow 0$ ， $S$  會出現最大值 1， $\tau$  值增加會使得  $S$  減少。

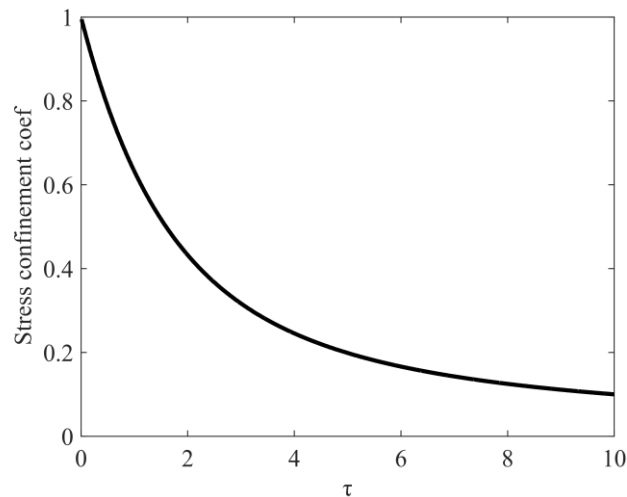


圖 2-2 壓力傳遞限制係數與脈衝寬比率關係

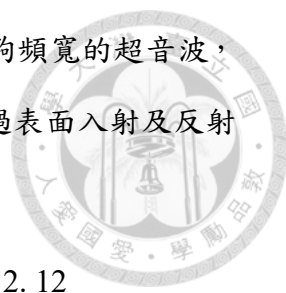
然而可調脈衝寬雷射，如雷射二極體，可透過輸入電訊號調整脈衝寬，但最大能量(peak power)輸出為定值，因此在單發能量最大值固定時：

$$P_{peak} = \Gamma A \frac{(1 - e^{-\mu_a c t_{pulse}})}{\mu_a c} \quad \text{式 2.11}$$

在固定最大能量之下，脈衝寬越寬可得到更強的光聲訊號，因此對於可調脈衝寬式的雷射，應使用寬脈衝。

### 2.2.2 雷射脈衝寬對光聲頻譜影響

由於雷射脈衝寬影響光聲訊號波寬，因此頻譜也受雷射脈衝調控，在光聲模型中，光聲頻譜同時受到物體吸收係數和聲速影響，在雷射誘發式超音波條件中，



為產生高頻超音波，產生雷射誘發超音波之單層膜必須產生足夠頻寬的超音波，吸收材料之吸收係數可由已知吸收度和吸收層厚度決定，並透過表面入射及反射係數推算其吸收係數[22]：

$$\mu_a = -\ln\left(\frac{-T^2 + \sqrt{T^4 + 4T'R^2}}{2T'R^2}\right)/d \quad \text{式 2.12}$$

$R$ 為單層膜表面光反射率， $T$ 為表面穿透率， $T'$ 為單層膜光總穿透率， $d$ 為吸收層厚度，作為實驗模擬之單層膜吸收層穿透率為 75%，厚度為 10 微米。

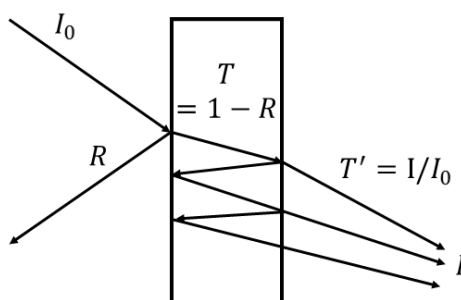


圖 2-3 單層模結構下雷射光表面入射與反射示意圖

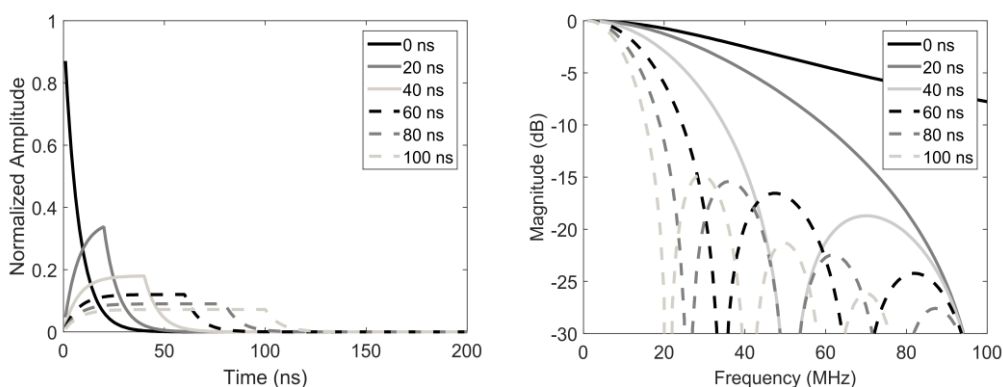


圖 2-4 光聲訊號在不同雷射脈衝寬下波形與頻譜模擬

圖 2.4 中可以看出當穿透率為 75%時，雷射脈衝寬需短於 60 奈秒，產生之光聲訊號在 20 MHz 時約為 -6 dB，當脈衝寬高於 80 奈秒時，訊號在 20 MHz 已小於 -10 dB，為產生出高頻超音波訊號，應使用脈衝寬小於 60 奈秒的雷射源。

## 2.2 高能量雷射二極體

為了得到較好的光聲訊號強度和寬頻的誘發式超音波，必須使用短脈衝寬雷



射二極體。不同於 Q 開關雷射使用 Q 值調變方式產生瞬間高強度脈衝能量，雷射二極體以 pn 接面能帶變化，在順向偏壓驅使下，能帶產生居量反轉造成受激發射，雷射二極體在固定偏壓下能夠產生穩定的激發光，但從無偏壓到給予穩定順向偏壓時會產生延遲，使得雷射二極體有一段相較於 Q 開關雷射較長的能量上升區間，而高能脈衝雷射二極體則是在瞬間給予高電流脈衝，減少時間延遲，產生及短波寬的脈衝光，然而通常充能時間約需 10~20 奈秒，且總脈衝波寬有 100 奈秒[10]，在光斑非常小的情況下此數值超過應力張弛時間，造成產生的光聲訊號振幅下降，因此需要更短脈衝寬的雷射二極體。為達到更短脈衝，選用 SPL\_LL90-3 脈衝雷射二極體(905-nm wavelength, 70W, 20-80ns pulse width, OSRAM, Germany)，這種高能量雷射二極體利用閘啟閉的方式，控制雷射脈衝寬，一端則使用固定電壓源提供穩定電壓，在控制閘關閉時對電容充電，當閘被開啟時，電容能瞬間放電以減少充電所需的時間，且由於閘啟閉時間可以更好被控制，此種雷射能夠產生約 20 奈秒的短脈衝，較符合光聲系統需求。閘之驅動方式以 5 伏特短脈波控制脈衝寬，雷射二極體閘值為 10 伏特，因此需以高速放大電路將電壓提升到 10 伏特，EL7104C 可提供瞬間大電流將輸入電壓放大，開啟雷射。

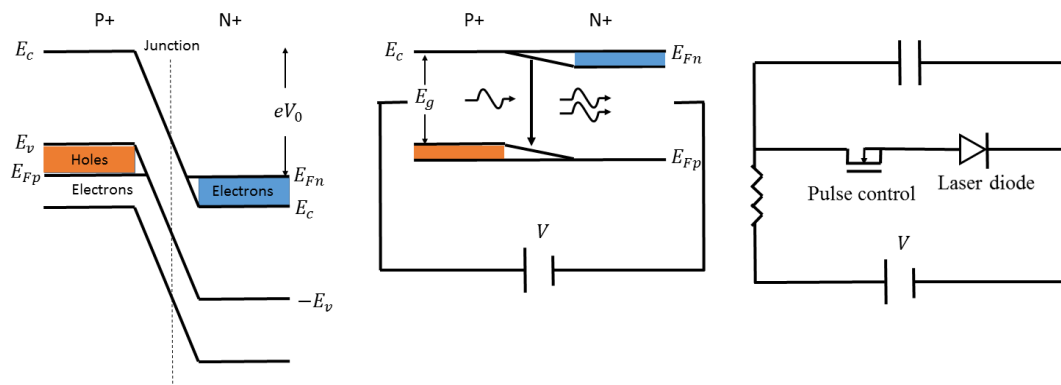


圖 2-5 脈衝雷射二極體脈衝調控示意圖

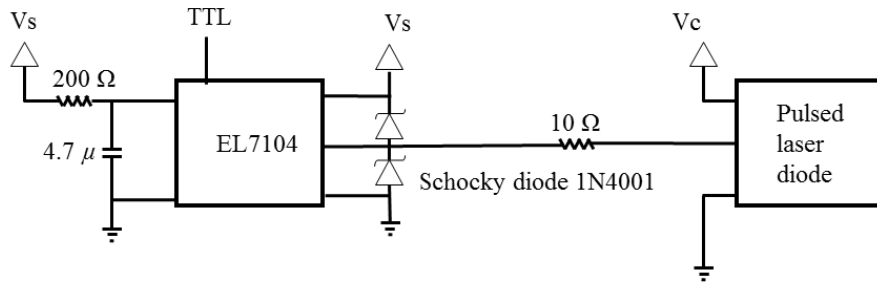


圖 2-6 雷射驅動電路圖

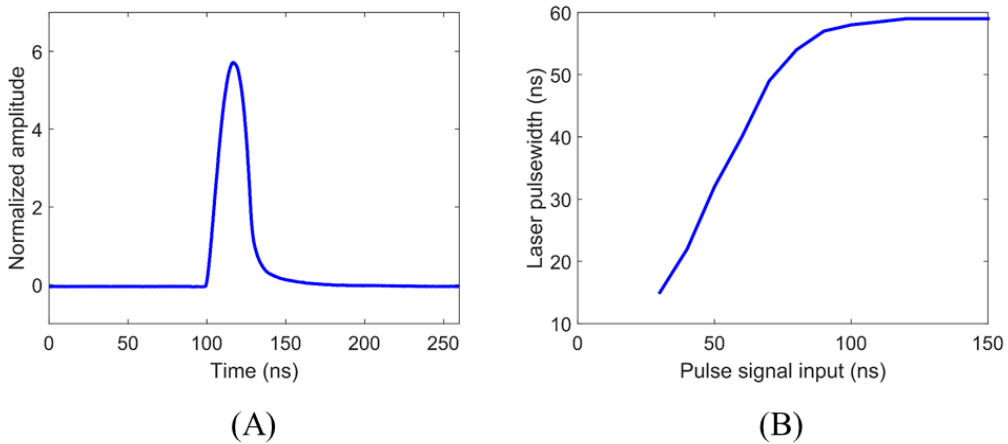
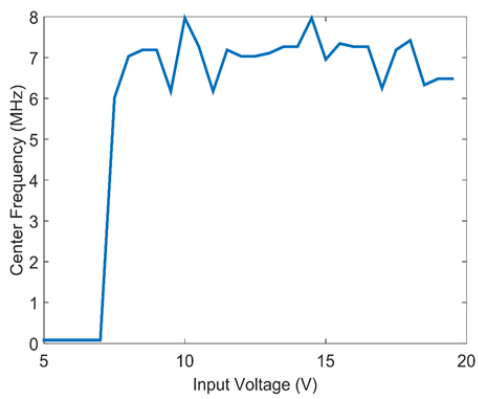


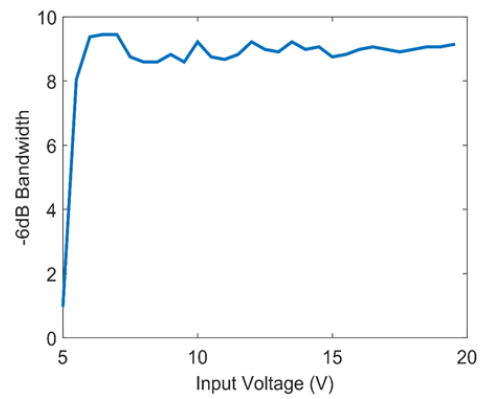
圖 2-7 (A)雷射輸出波型 (B)輸入短脈衝訊號與產聲雷射脈衝寬關係

### 2.3 雷射二極體產生誘發式超音波

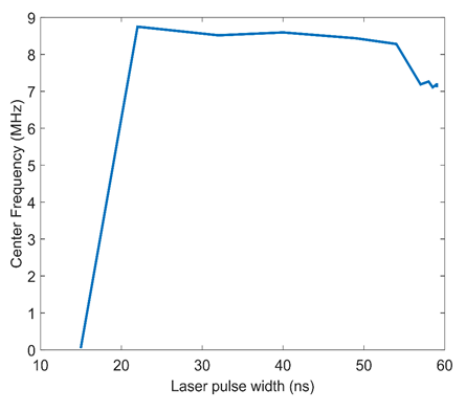
為創造高解析度超音波影像，PDMS 混和物吸收雷射能量後產生超音波頻寬，受雷射誘發式超音波中心頻率受激發源參數所影響，除了在上述光聲理論模型中，短脈衝雷射能激發較寬頻的訊號，其他雷射參數如雷射能量和聚焦光斑大小也影響到產生超音波訊號的特性。透過可調脈衝雷射二極體，調整不同雷射能量、脈衝寬度、聚焦光斑大小，以實驗了解這些參數對於雷射頻率之影響。實驗以石墨與 PDMS 以 1:22 混和作為雷射激發源；雷射以物鏡(NA=0.6)聚焦，產生超音波訊號以 20 MHz 超音波探頭接收，經放大器提升 80 dB 訊號後以取樣率 80 MHz 擷取超音波訊號，雷射能量可藉由調控輸入之定電壓控制，而雷射脈衝寬則藉由輸入脈衝訊號寬調控，聚焦光斑以聚焦中心之距離為參考，以分析頻譜變化之趨勢。



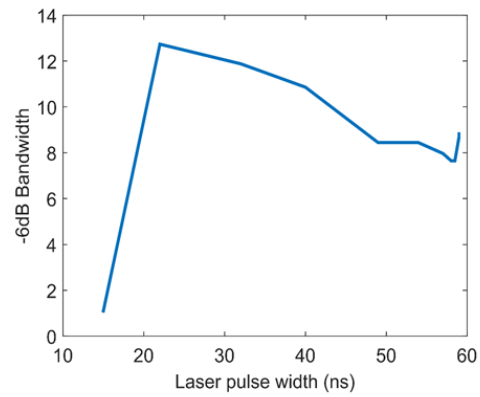
(A)



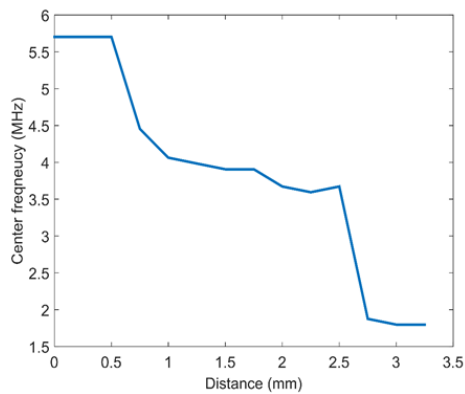
(D)



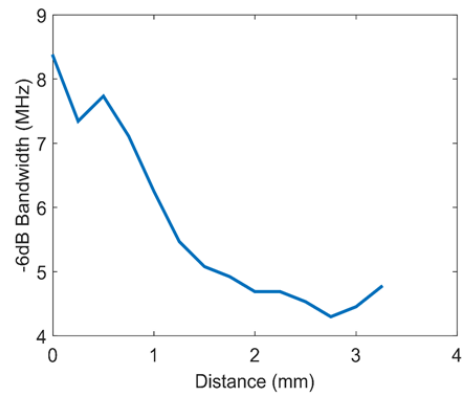
(B)



(E)



(C)



(F)

圖 2-8 PDMS 混和物單層膜產生光聲訊號中心頻率在不同雷射二極體(A)能量、(B)脈衝寬、(C)聚焦光斑(與聚焦中心之距離)影響以及雷射脈衝寬在不同(D)能量、(E)脈衝寬、(F)聚焦光斑下的影響

圖 2.8 說明了雷射雷射誘發超音波的中心頻率主要受到聚焦光斑大小和脈衝

頻率影響，且雷射能量不是影響光聲頻譜的主要因素。因此為產生高頻超音波訊號，亦須控制聚焦光斑之大小，必須讓 PDMS 混和吸收層盡量接近雷射聚焦中心。



### 2.3.1 雷射誘發窄頻超音波

在式 中，多層膜下激發的訊號可視為單層膜產生的訊號與轉移函數捲積，轉移函數 $h_m(t)$ 為脈衝函數組成， $\alpha_i$ 表示各脈衝函數振幅，與光吸收層吸收係數相關，其中 $a_i$ 為第  $i$  層吸收係數。

$$\alpha_i = a_N \prod_{i=1}^N (1 - a_{i-1}) \quad \text{式 2.13}$$

脈衝函數延遲 $t_i$ 可由光穿透層厚度決定，由於 PDMS 聲速已知為 1000 m/s，可推得延遲時間根據欲產生的窄頻訊號中心頻率調整穿透層厚度，轉移函數頻譜亦受到多層膜層數  $N$  影響，當層數越多訊號越窄頻，並根據式 1.3 可推得產生超音波訊號之頻譜。

## 2.4 雷射二極體光聲顯微影像訊雜比

雷射二極體由於無法產生極短脈衝寬的光波訊號，因此必須透過訊號平均提高訊雜比，由於雷射二極體具有相當高的佔空比(duty cycle)，SPL\_LL90-3 脈衝雷射二極體佔空比為 0.1%，以 40 奈秒脈衝寬為例，可達脈衝重複頻率 25 千赫茲，在採用每點 100 次平均，提高訊雜比 10 dB 的條件下，可達到每秒 250 點的掃描速率。然而整體系統掃描速度仍需同時考慮掃描器定位和訊號擷取器傳輸所花費的時間。

## 2.5 光聲穿透深度

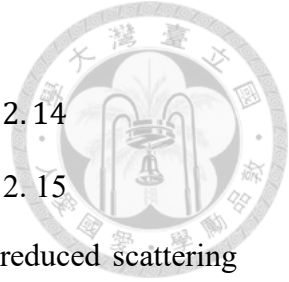
系統所能達到的影像穿透深度取決於雷射、待測目標物性質和接收端靈敏度。雷射的影響如 2.2 所提到，雷射能量、脈衝寬，和待測目標所具有的吸收係數決定所激發之光聲訊號強度，接收探頭靈敏度、接收器抗雜訊能力、接收器訊號放大倍率及訊號平均數決定系統所能辨析最小強度的訊號，式 2.11 說明產生最小可辨析強度的光聲訊號所需的雷射能量，而待測目標的散射係數決定入射光在物

體中的衰減程度，如式 2.14 所示：

$$I = I_0 e^{-\mu_{eff} d_{sample}} \quad \text{式 2.14}$$

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)} \quad \text{式 2.15}$$

其中 $\mu_a$ 和 $\mu'_s$ 分別為吸收係數(absorption coefficient)與散射係數(reduced scattering coefficient)， $\mu_{eff}$ 為兩者綜合的有效光衰減係數(effective attenuation coefficient)， $I_0$ 為光進入目標物前能量， $I$ 為光穿透物體後達到深度 $d_{sample}$ 時之光強，而藉由式 2.11 已說明雷射二極體能激發之目標物光聲訊號強度，透過此方式量測系統所能感測到最小的光聲訊號強度，可推算出目標測量物體的厚度限制。



### 第三章 雷射誘發窄頻超音波系統



#### 3.1 多層膜製作

多層膜製作材料使用 PDMS，將主劑與固化劑 10:1 混和，並分為吸收層與穿透層。吸收層製作時加入石墨粉，以調整石墨粉與 PDMS 的重量比控制吸收層吸收係數，將混和物吸取 0.1 毫克置於基底平台上，並使用高速旋轉台以 6000 rpm 旋轉，形成約 10 微米的厚度，並用烘箱以攝氏 70 度烤乾；穿透層為 PDMS，以旋轉轉速控制穿透層厚度，以達到是當的時間延遲。

為將烤乾後薄膜與旋轉台基底分離，在基底上貼上隱形膠帶(3M, Japan)，由於隱形膠帶非黏著面表面與 PDMS 及 PDMS 混和物附著率低，待烘烤乾後可使用膠帶黏著面將多層膜撕起，並以夾具固定。

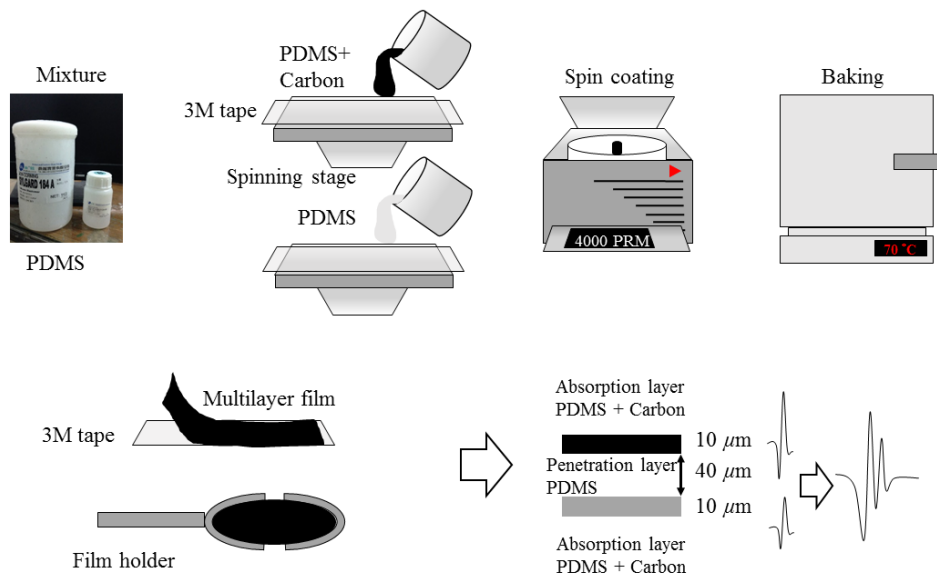


圖 3-1 多層膜製作流程

#### 3.2 薄膜產生超音波系統架構

在超音波影像系統中，背向散射提供目標物體深度資訊，為以背向散射方式取得目標物體深度資訊，雷射首先聚焦在目標物體上，部分能量被物體吸收轉換為光聲訊號，而部分穿透被薄膜吸收產生超音波訊號，超音波訊號為雙向產生，

一部分直接傳向探頭，作為超音波生成位置參考，而另一部分遠離探頭，受到物體散射回傳訊號，並經過薄膜後傳回到探頭，然而此架構之下薄膜會造成訊號衰減，因此必須減少薄膜厚度。以目標中心頻率 20 MHz，聲波波長於組織中為 75 微米、於 PDMS 中為 50 微米，多層膜結構中吸收層約為 10 微米，而穿透層為 40 微米，多層膜厚度已超過聲波波長，因此多層膜對於回傳訊號的衰減不可忽略。

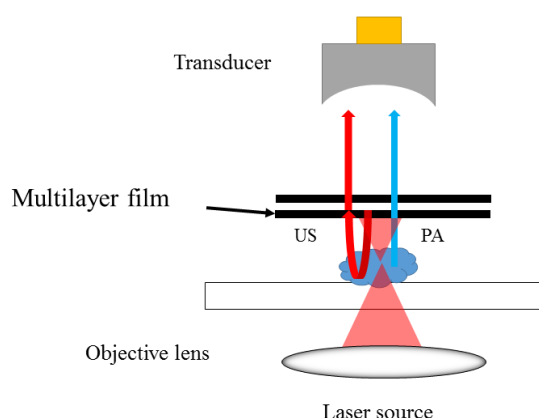


圖 3-2 背向散射式多層膜光聲/超音波系統架構

訊號衰減主要受到 PDMS 與水的聲阻抗不同和 PDMS 本身對聲波的衰減影響，PDMS 聲阻抗依照主劑與固化劑混和比而異，製作薄膜上使用重量 10:1 混和，此混和比例下 PDMS 聲阻抗為 1.1 MRayl[23]，而水的聲阻抗為 1.5 MRayl，聲穿透率為 0.98，因此訊號幾乎完全穿透。

$$Reflection = \left( \frac{Z_{water} - Z_{PDMS}}{Z_{water} + Z_{PDMS}} \right)^2 \quad \text{式 3.1}$$

$$Transmission = \frac{4Z_{water}Z_{PDMS}}{(Z_{water} + Z_{PDMS})^2} \quad \text{式 3.2}$$

衰減係數在此混和比下為 3.3 dB/MHz/cm，在薄膜厚度小於 100 微米的條件下，PDMS 對於訊號衰減小於 1 dB，因此可以確保此實驗架構中，薄膜對訊號衰減在可接受範圍。

薄膜厚度因 PDMS 聲速與水的差異會對訊號相位造成影響，當薄膜厚度太大時，造成光聲與超音波訊號在探頭表面相位不同，產生破壞性干涉，既降低光

聲訊號振幅，同時也降低解析度，因此多層膜層數應受限制。



### 3.3 窄頻超音波頻率響應

在新架構中，需考慮於雷射二極體脈衝寬與雷射能量對於產生光聲訊號振幅與雷射誘發超音波頻率的限制，由於較長的雷射脈衝，降低所產生光聲訊號的頻寬。在光聲模型中，影響訊號的因素還有吸收係數，當吸收係數增加時，光聲訊號振幅與頻寬皆上升。在先前架構中，雷射是首先通過多層膜產生超音波後再達到物體上，因此必須控制多層膜光穿透率，採用低吸收係數的多層膜；而新架構中，雷射首先通過物體產生光聲訊號再由多層膜吸收，薄膜吸收度並不影響光聲訊號強度，因此用於新架構的多層膜應增加各吸收層吸收係數，以提高誘發式超音波頻寬。

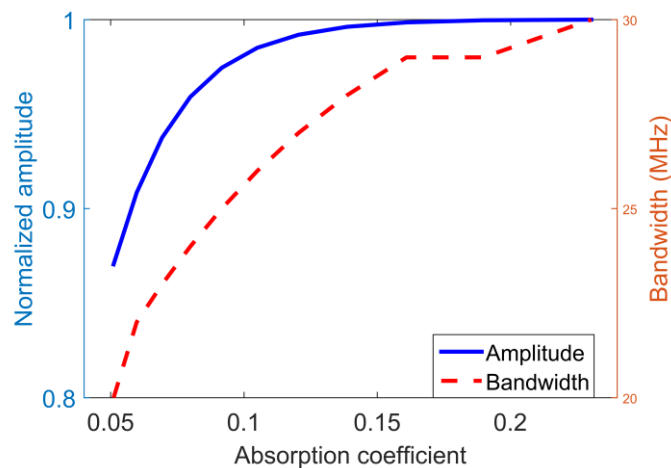


圖 3-3 吸收係數與振幅頻寬模擬圖

不同於先前研究使用的短脈衝雷射，在較寬脈衝的雷射二極體的架構下，首先必須量測單層膜所能產生超音波的頻寬範圍，實驗上以 20 MHz 探頭接收下，薄膜所產生雷射誘發超音波高頻截止頻率約在 14 MHz，而非過去實驗上能夠達到 20 MHz 以上，因此必須調整薄膜結構。根據過去實驗結果，可透過調整多層膜穿透層厚度以和期望中心頻率做匹配，使用雷射二極體下因截止頻率約在 14 MHz，因此調整目標中心頻率為 14 MHz，對應層間距離應調整為 70 微米。

多層膜產生窄頻超音波經強反射金屬回傳的波形進行測試，其頻譜如圖 3.



4，中心頻率位於 17 MHz，部分帶寬 47%，頻率 12 MHz 以下之頻率和光聲訊號產生 10 dB 的訊號對比，而 15 MHz 以上兩者也有 10 dB 以上的對比。

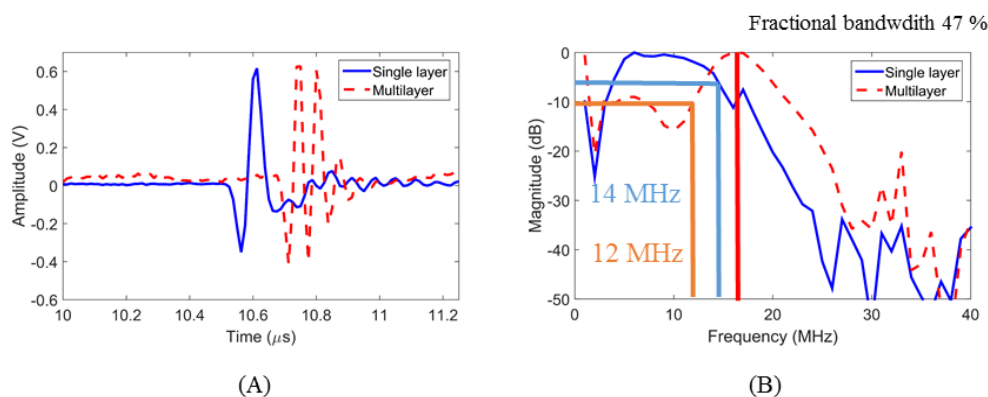


圖 3-4 單層與多層膜於雷射二極體激發下產生超音波(A)波形與(B)頻譜

多層膜在新架構中，於雷射觸發下會向兩側同時產生窄頻超音波訊號，一邊直指探頭，另一邊則傳向物體，產生回聲訊號，傳向物體的訊號為超音波源，因此以此訊號的頻譜為主，直指探頭的訊號可讓我們辨識薄膜與物體間的相對位置，以幫助推算物體所在深度。

### 3.4 雷射誘發超音波訊號強度

#### 3.4.1 雷射誘發式超音波聲壓

PDMS 混和物在雷射激發下產生的超音波，即使 PDMS 具有高彈性係數，能夠誘發出高強度超音波訊號，但雷射二極體能量較低，量測方式如圖 3.5 所示，以水聽筒量(hydrophone, MHA9-150, Force Technology, Denmark)測其聲壓，二極體使用其最大輸出能量，脈衝寬 20 奈秒，量測之單層膜吸收層為 1:22 石墨與 PDMS 混和物，此條件下所測得聲壓強度為 400 帕斯卡。對於作為建立影像的超音波源來說，這樣的訊號強度相對於一般超音波探頭所能產生的訊號強度明顯低上許多，因此需透過超音波聚焦探頭、低噪放大器及 100 次訊號平均的幫助，提升超音波訊雜比。

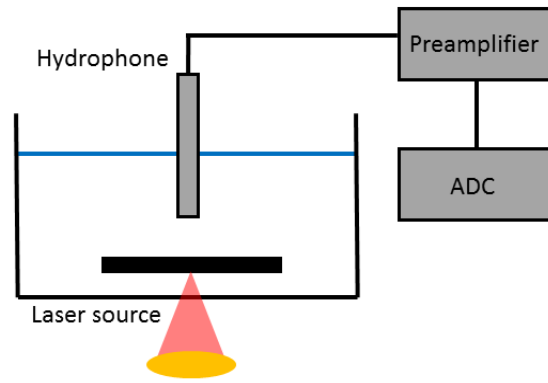


圖 3-5 雷射誘發超音波聲壓量測架構

### 3.4.2 超音波系統影像深度

靈敏度測量目的為了解薄膜所激發的超音波在經過衰減後，仍然能被系統辨析的最小強度。實驗設計上如同聲壓量測，但使用 20 MHz 聚焦式超音波探頭接收，前置放大器將訊號放大 80 dB，並將訊號做 100 次平均，量測使用單層膜吸收層為 1:22 石墨與 PDMS 混和物，當雷射以最大電壓輸入時，聲壓為 399 帕，逐漸調降輸入強度直到無法接收到光聲訊號。

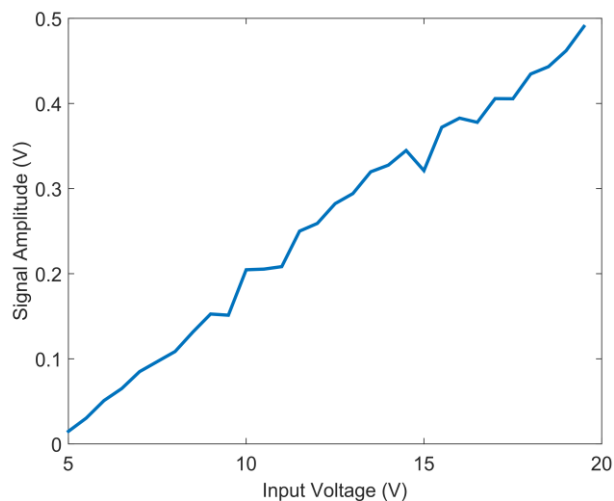


圖 3-6 雷射輸入電壓與接收光聲訊號強度

實驗發現系統能夠辨別最小超音波訊號強度為最大強度的 1/25，約為訊號最強時的 -14 dB，換算成聲壓約 16 帕的訊號強度。同時也說明系統超音波影像的動態範圍也被限制在 14 dB 以下，必須透過增加吸收層濃度提高超音波訊號強度來增加動態範圍。

在 3.2 章所提出的架構中，影響到超音波訊號的不僅以雷射和 PDMS 吸收層有關，並受到待測目標物的散射性質所影響，由於雷射首先穿過待測目標才經由薄膜所吸收轉換為超音波，觀測目標為血管與腫瘤模型，生長於模擬軟組織的環境中，而組織在波長 905 奈米下的散射係數為  $10 \text{ cm}^{-1}$  以下，而吸收係數約為  $0.1 \text{ cm}^{-1}$ ，則以式 2.14 與式 2.15 可推算其有效光衰減係數約在  $1.74 \text{ cm}^{-1}$  以內，因此雷射強度衰減 3 dB 下的光穿透組織深度可達 3.98 毫米，已適合用於此模型觀察。若觀測模型為老鼠耳部血管影像，則受到皮膚表面散射影響較嚴重，由於皮膚吸收及散射係數分別約在  $0.3 \text{ cm}^{-1}$  與  $25 \text{ cm}^{-1}$ ，有效光衰減係數  $4.77 \text{ cm}^{-1}$ ，雷射強度衰減 3 dB 下的光穿透組織深度為 1.45 毫米，不過由於老鼠耳的厚度通常在 1 毫米下，因此理論上仍不會造成超音波訊號強度不足的問題，但影像動態範圍也會因組織散射而減少。

實驗上我們利用 0.5% 二氧化矽粉末(silica)作為光散射質與 1% 洋菜膠 (Seakem LE Agarose, Lonza Rockland, USA)混合，模仿組織造成光散射，測量不同厚度下系統能接收到的像仿體超音波影像，作為超音波系統影像深度依據。線仿體以兩種不同材料呈現，一種以生物毛髮，另一種以細金屬線，生物毛髮較粗，直徑約為 150~200 微米，光吸收率較高，細金屬線線寬 20 微米，但光吸收度較低，由於光聲與超音波同時產生，因此兩種不同材料可比較光吸收率造成超音波穿透深度的影響。

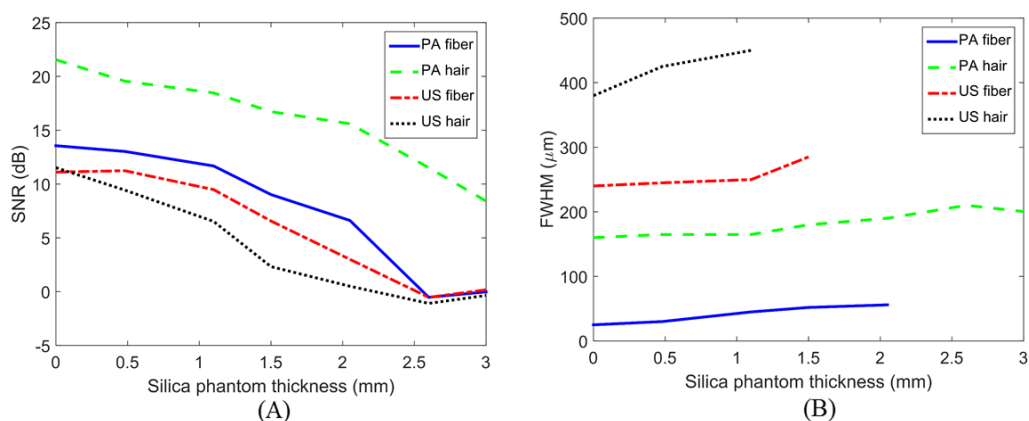


圖 3-7 散射仿體厚度對光聲與超音波線仿體影像(A)訊雜比與(B)橫向解析度之

## 影響

以兩種線仿體仿體影像中訊號最強訊雜比做比較，如圖 3.7(A)，以其-6 dB 強度來看，光聲影像深度可達 2 毫米以上，但會因吸收度不同而異，毛髮仿體因吸收度高而具有較深的影像深度；超音波的影像深度隨仿體後度增加而減少，且受到物體吸收度與散射能力影響，生物毛髮由於吸收度高能產生較高光聲訊號，但也使得穿透光能量較低，誘發超音波訊號減弱，圖 3.7 中可見，毛髮線仿體的超音波訊號穿透度僅 1 毫米，但金屬線仿體可達 1.5 毫米。解析度亦受到散射物體厚度影響，當厚度增加，線仿體半高全寬也增加。

### 3.5 合成孔徑法

由於薄膜架構下雷射誘發式超音波並無聚焦，僅依靠探頭接收聚焦，超音波源可被視為一平面波，利用合成孔徑法提高解析度以及訊雜比。合成孔徑法適用於單元式探頭掃描，藉由同一目標在數個不同位置獲取的回傳訊號，以計算各路徑延遲調整訊號之相位差再加總起來，訊號因相位不同產生建設性與破壞性干涉，達到提升訊雜比以及聚焦效果。

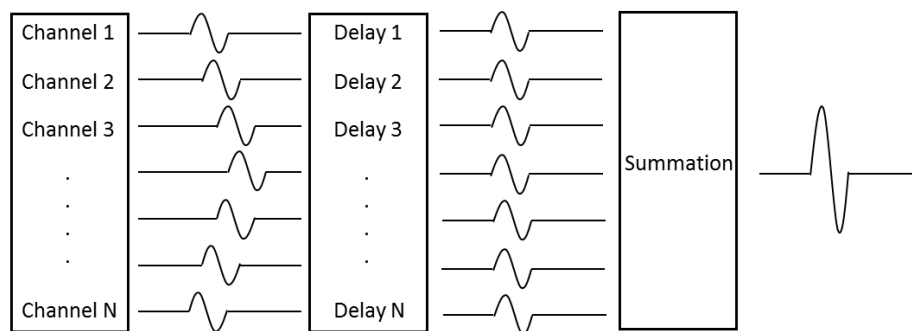


圖 3-8 合成孔徑法

## 第四章 光聲/超音波顯微使用單發雷射成像系統



### 4.1 雷射二極體光聲/超音波顯微系統架設

SPL\_LL90-3 雷射二極體為高能量雷射二極體，最大輸出功率為 80 瓦，具有可調式脈衝寬之特性，可透過電訊號控制其輸出，雷射控制電路以短脈衝寬訊號經大電流高速放大器 EL7104 放大電壓至 15 伏特，控制雷射閥啟閉，以達成短脈衝輸出。此雷射二極體具有 0.1% 之佔空比，在 40 奈秒脈衝寬下可創造脈衝重複頻率達 25 kHz，在此條件下輸出單發脈衝能量可達 420 nJ。雷射輸出波長為 905 nm，光頻譜半高寬為 7 nm，光束發散角平行 pn 結為 15 度及垂直 pn 結為 30 度，因此需透過準直鏡調整光束，將能量完全導入聚焦物鏡，物鏡數值孔徑為 0.6，可創造解析度達 0.9 微米。另一方面，光束經由分光鏡另一端由相機接收，可偵測光學影像，目的為幫助影像對焦以及提供光學影像比對，鏡組皆由 DVD 光學讀寫頭內取得(hop1000, China)。雷射產生之光聲及超音波訊號經由 20 MHz 超音波探頭(National Taiwan University ultrasound imaging lab, Taiwan)接收後，由訊號放大器/資料擷取器(US-KEY, sampling rate 80 MHz, signal amplification 80 dB, Lecoeur Electronique, French)擷取並傳回電腦。控制流程為觸發器啟動資料擷取器，而由於啟動和開始擷取資料間有延遲，以延遲電路將雷射與訊號擷取同步，當每筆 A-scan 完成後，電腦判斷影像掃描是否結束，決定平台移動與是否進行下一筆資料擷取，以完成 B-scan 或 C-scan 掃描。

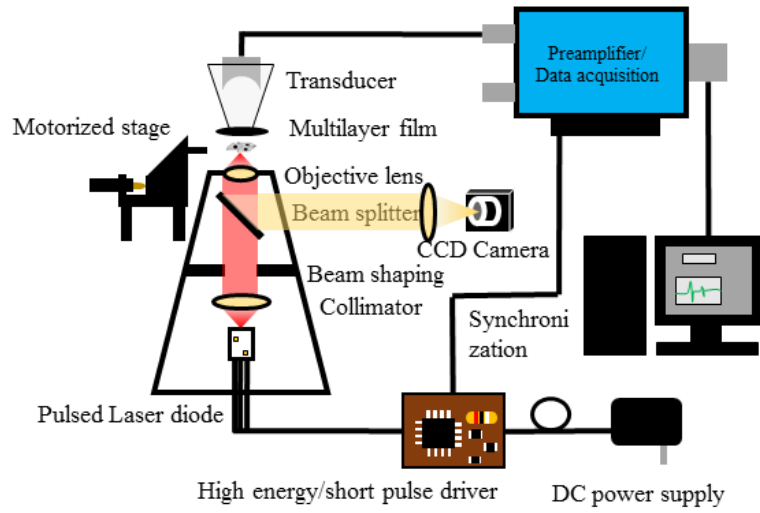


圖 4-1 雷射二極體光聲/超音波顯微系統示意圖

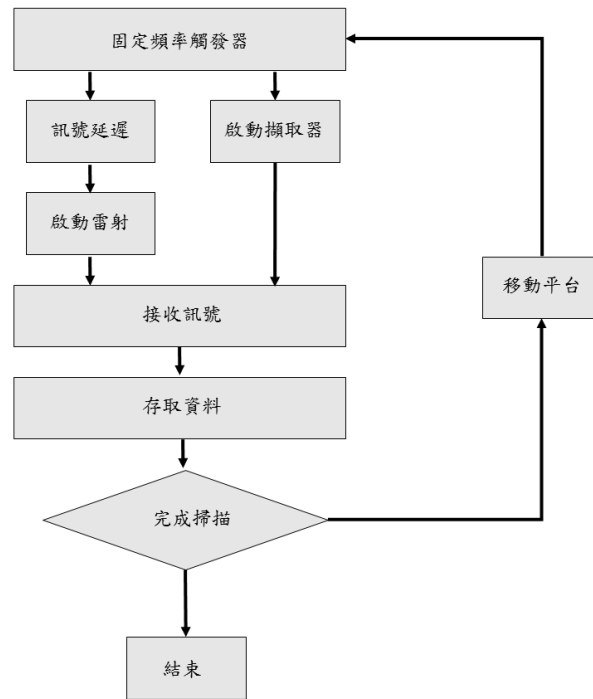


圖 4-2 雷射二極體光聲/超音波顯微系統運作步驟

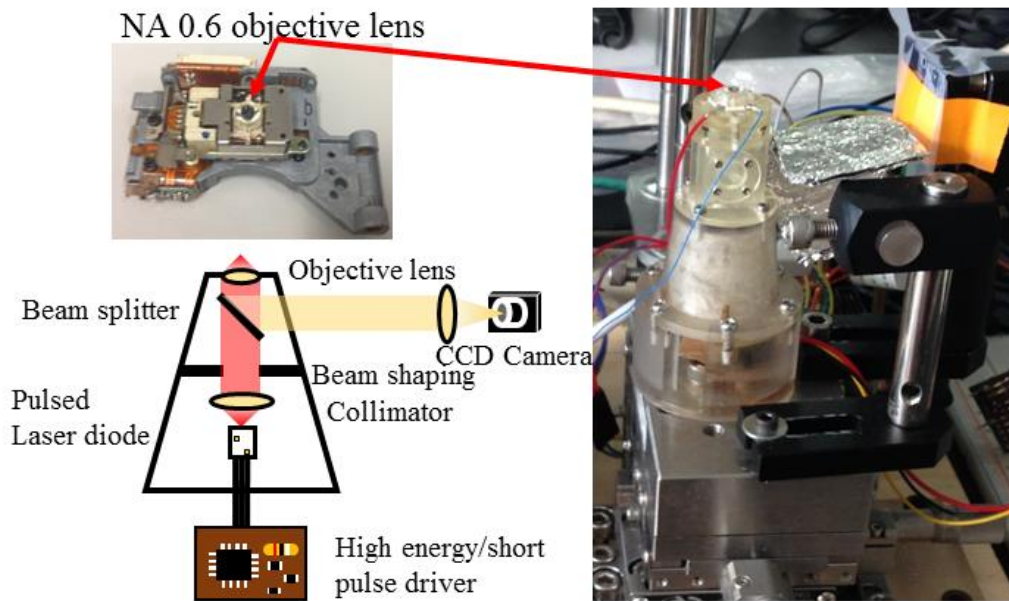


圖 4-3 雷射二極體光聲/超音波顯微系統光學模組

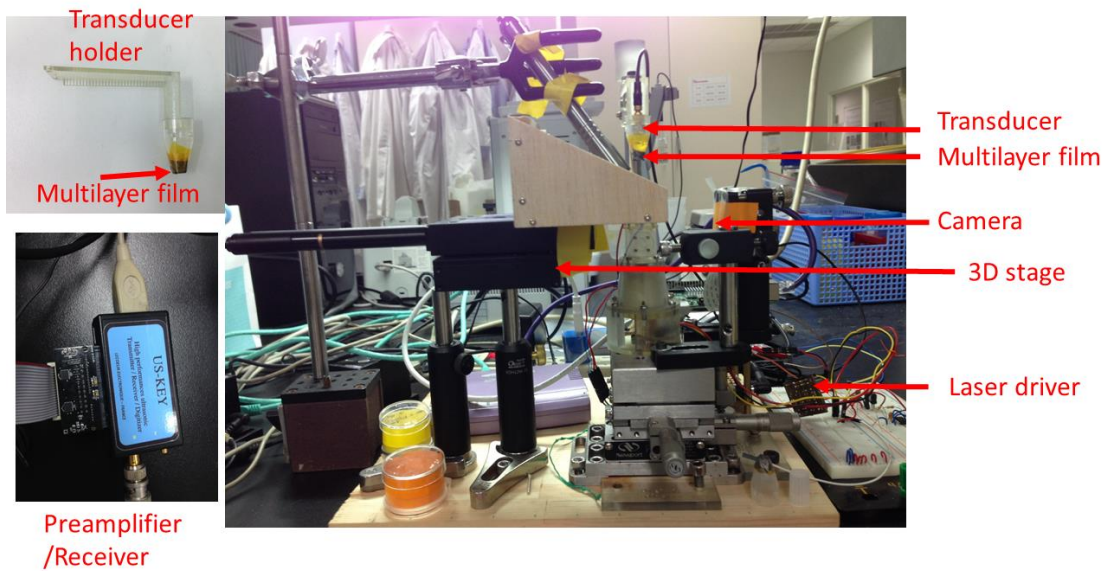


圖 4-4 雷射二極體光聲/超音波顯微系統

## 4.2 頻帶分離法

雷射同時觸發產生光聲與超音波訊號，並解同時被探頭接收，多層膜產生之窄頻超音波可藉由不同解調頻率與低通濾波將兩訊號分離，以帶寬 10 MHz 低通

濾波將光聲訊號分離，以 15 MHz 頻率解調及 10 MHz 低通濾波分離超音波訊號。

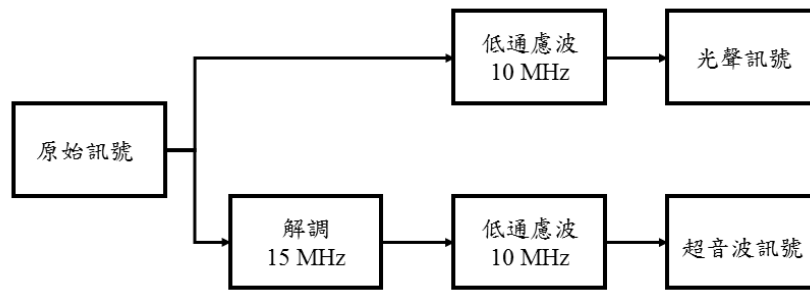


圖 4-5 頻帶分離法

### 4.3 系統影像分析

#### 4.3.1 影像深度判別

和探頭收發接收物體回聲訊號不同的地方在於，探頭收發下聲波來回的路程相同，因此物體所在深度為聲速和回聲時間乘積的一半  $ct_{pulse-echo}/2$ ，在使用薄膜產生雷射誘發超音波之系統當中，訊號接收起始時間與薄膜產生超音波同時，薄膜會產生雙向生波訊號，直接傳遞到探頭的訊號為判斷薄膜所在深度的資訊，時間為  $t_{film}$ ，而後會收到光聲及超音波回聲訊號，接收到光聲訊號時間為  $t_{PA}$ ，超音波回聲為  $t_{US}$ ，光聲訊號為單向傳遞，因此深度為  $t_{PA}$  與聲速的乘積  $ct_{PA}$ ，超音波在薄膜與物體間為雙向，通過薄膜後直達探頭，因此薄膜到探頭間為單向，因此深度計算為  $c(t_{film} + t_{US}/2)$ 。

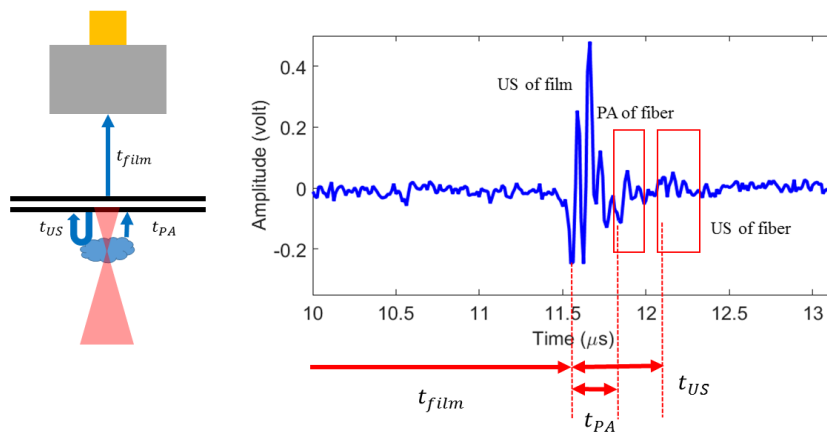


圖 4-6 影像深度資訊



圖 4.5 以線仿體為例，系統會先後接收到薄膜的聲波訊號、物體光聲及超音波訊號，線仿體由於訊息單一，因此可看到線仿體的 $t_{US}$ 即為 $t_{PA}$ 的二倍。

### 4.3.2 超音波強度補償

由於雷射能量首先被物體吸收產生超音波，而部分能量穿透物體才被薄膜吸收誘發超音波，因此超音波強度會受到雷射穿透度的影響而變化，為使得超音波強度參照相同標準，薄膜吸收雷射能量後，直達探頭的訊號未經過任何物體，其強度直接和吸收能量成正比，可作為誘發超音波訊號的強度參考，物體回聲訊號需根據薄膜傳遞到探頭的強度常態化，補償因物體吸收造成超音波強度的變化。

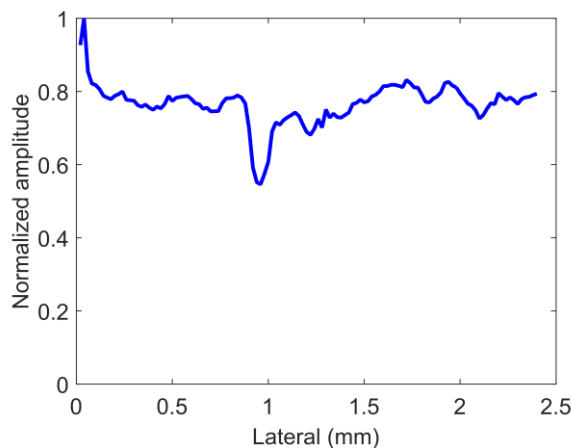


圖 4-7 薄膜產生超音波訊號強度因物體吸收造成之強度變化，此圖為線仿體在 1 毫米位置時產生超音波的訊號振幅

## 4.4 系統光聲影像解析度量測

系統影像光聲解析度以銅網進行測量，銅網線寬 8 微米，尺寸間格 52 微米。系統以步距 1 微米掃描物體，取得之光聲訊號以最大值投影(maximum projection)建立投影，銅網光聲影像與投影如圖 4.8 所示，並取其切面計算半高全寬，投影線寬平均為 9.6 微米。

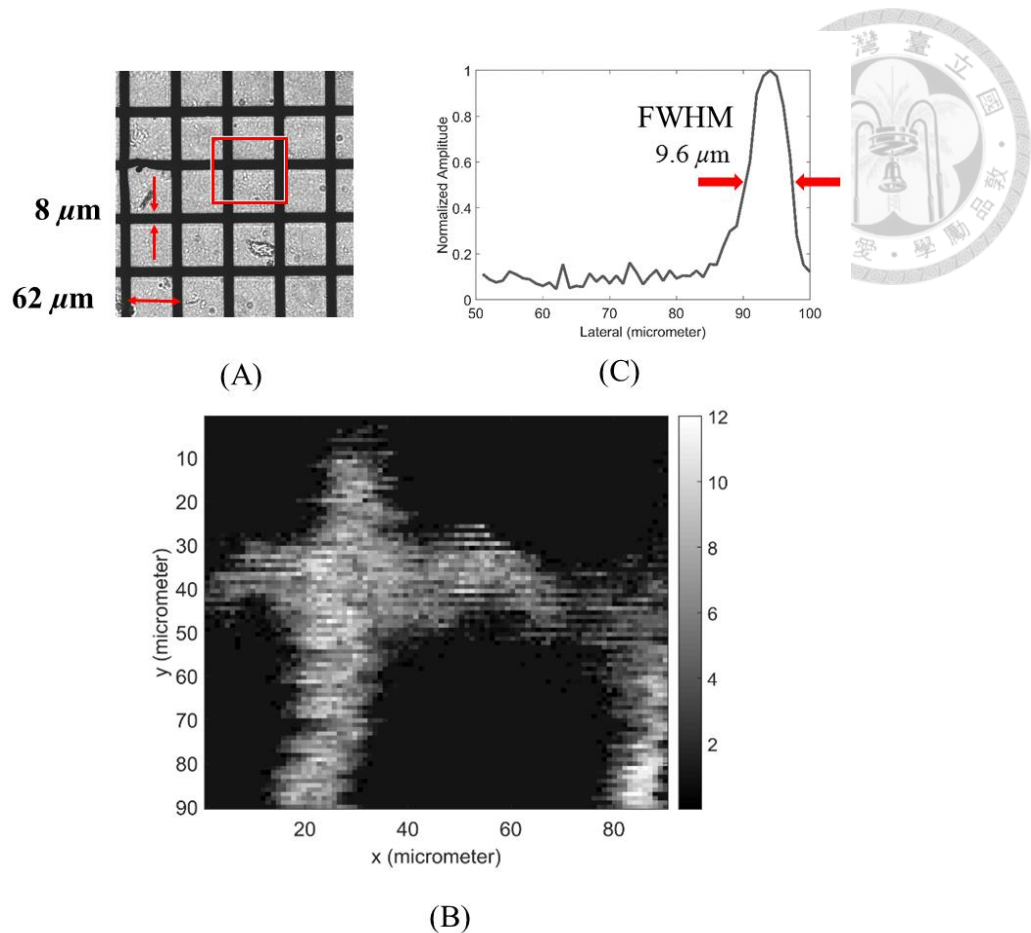


圖 4-8 (A)銅網光學影像 (B)光聲影像 C-scan 最大值投影 (C)切面平均線寬

## 4.5 系統超音波影像解析度量測

### 4.5.1 薄膜產生超音波影像解析度

以 20 微米金屬線仿體進行量測，由於系統採用背向接收方式，接收探頭為 20 MHz、F 數值為 2，影像經解調及合成孔徑法處理後，得到的 B-scan 超音波影像。圖 4.10 中顯示探頭收發影像與使用薄膜作為超音波源下影像差異，而此雷射誘發超音波在此系統下 B-scan 的橫向投影半高全寬為 240 微米，同樣探頭收進行發回聲影像則為 155 微米，造成兩者間差異來自於薄膜發射無聚焦；軸向投影在此系統下為 169 微米，而使用探頭收發為 106 微米，兩者差異源自於中心頻率之差異，雷射誘發超音波在此系統下線仿體回波之中心頻率在 15 MHz 附近，探頭收發中心頻率則在 20 MHz。

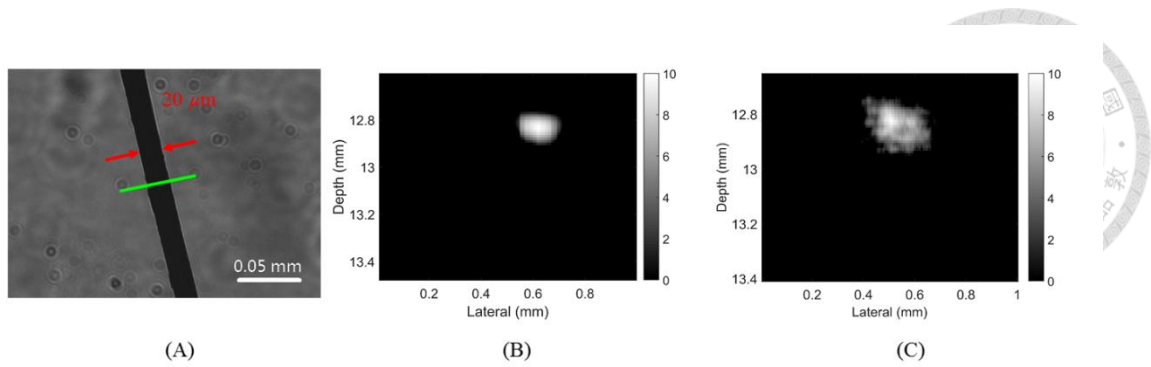


圖 4-9 (A)金屬線仿體光學影像 (B)探頭收發回聲 B-scan 影像 (C)雷射誘發超音波 B-scan 影像

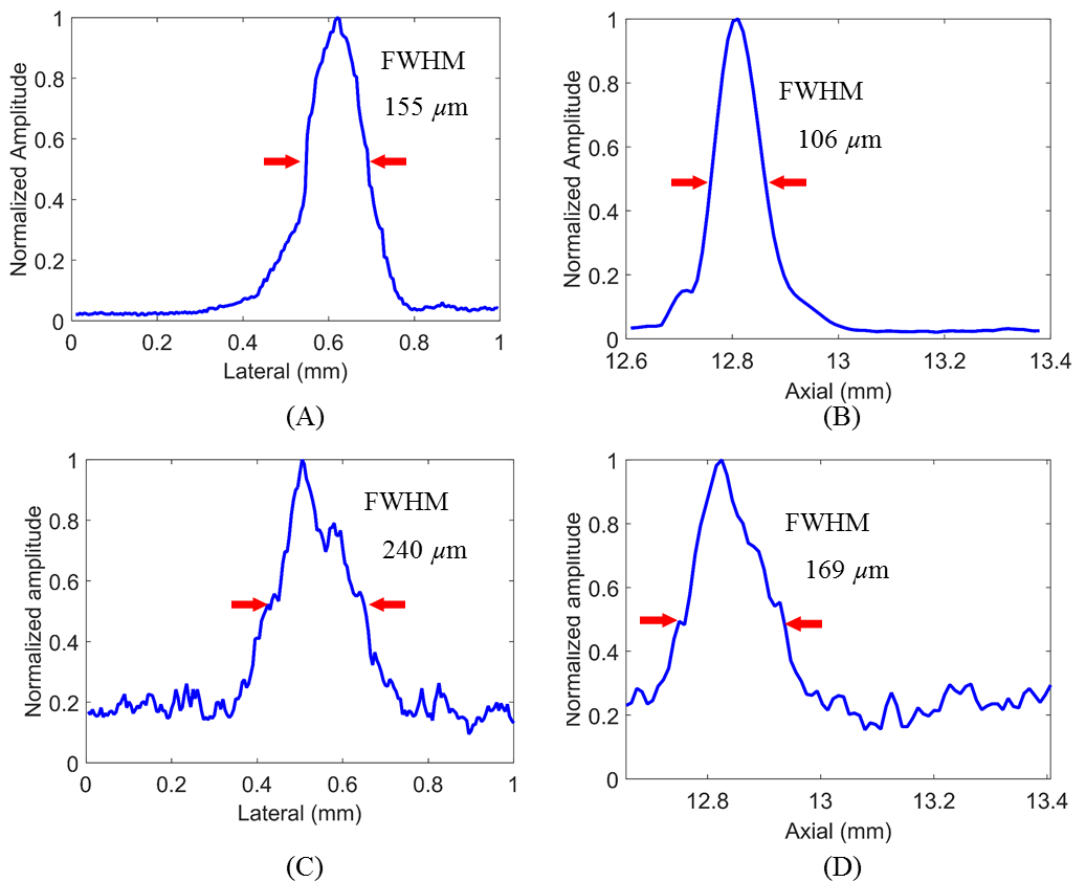


圖 4-10 (A)探頭收發線仿體影像橫向投影 (B)軸向投影 (C)薄膜產生超音波架構線仿體影像橫向投影 (D)軸向投影

#### 4.5.2 合成孔徑法對影像解析度及品質提升

薄膜架構必須使用合成孔徑法以提升訊雜比及解析度，圖 4.11 中顯示使用

合成孔徑法前後影像差異，使用後訊雜比增加，不論在橫向及軸向上，影像邊緣也較平緩，但解析度提升幅度有限。

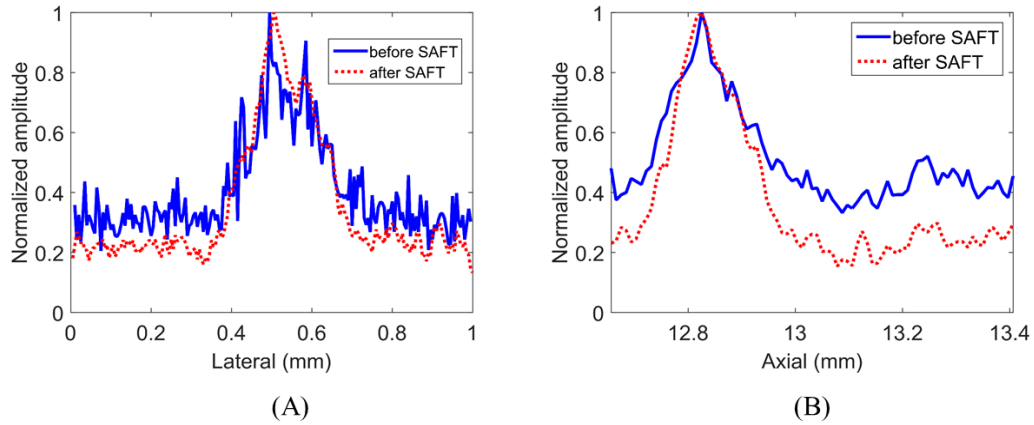


圖 4-11 線仿體超音波影像使用合成孔徑法前後比較

#### 4.5.3 薄膜產生超音波聲場分析

由於超音波解析度與超音波源所產生聲波波束寬高度相關，為了進一步了解薄膜產生超音波對解析度造成之影響，量測其聲圖像與波束寬，如圖 4.12 所示，薄膜產生的超音波訊號強度在空間中分布接近高斯分布，從薄膜開始強度依距離遞減，波束寬皆維持在約 1 毫米，並無任何聚焦情形發生，且遠超過接收探頭的聚焦波束寬，系統影像解析度由發射與接收共同影響，因此此系統影像解析度主要由受探頭決定。

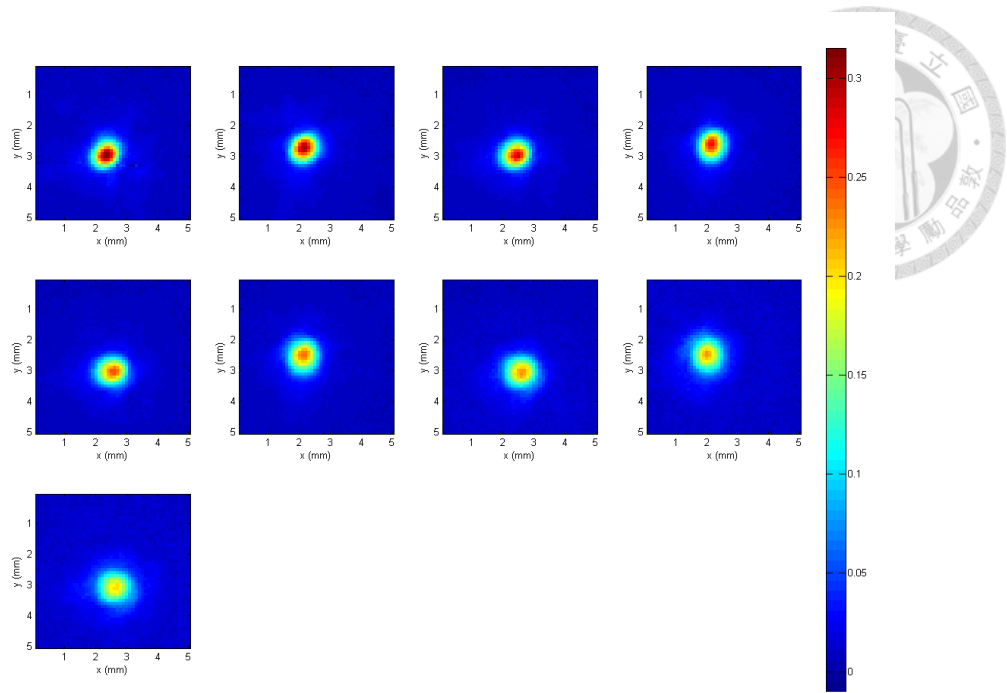


圖 4-12 薄膜非聚焦超音波聲圖像



## 4.7 線仿體光聲/超音波雙模態影像

### 4.7.1 薄膜式架構雙模態影像

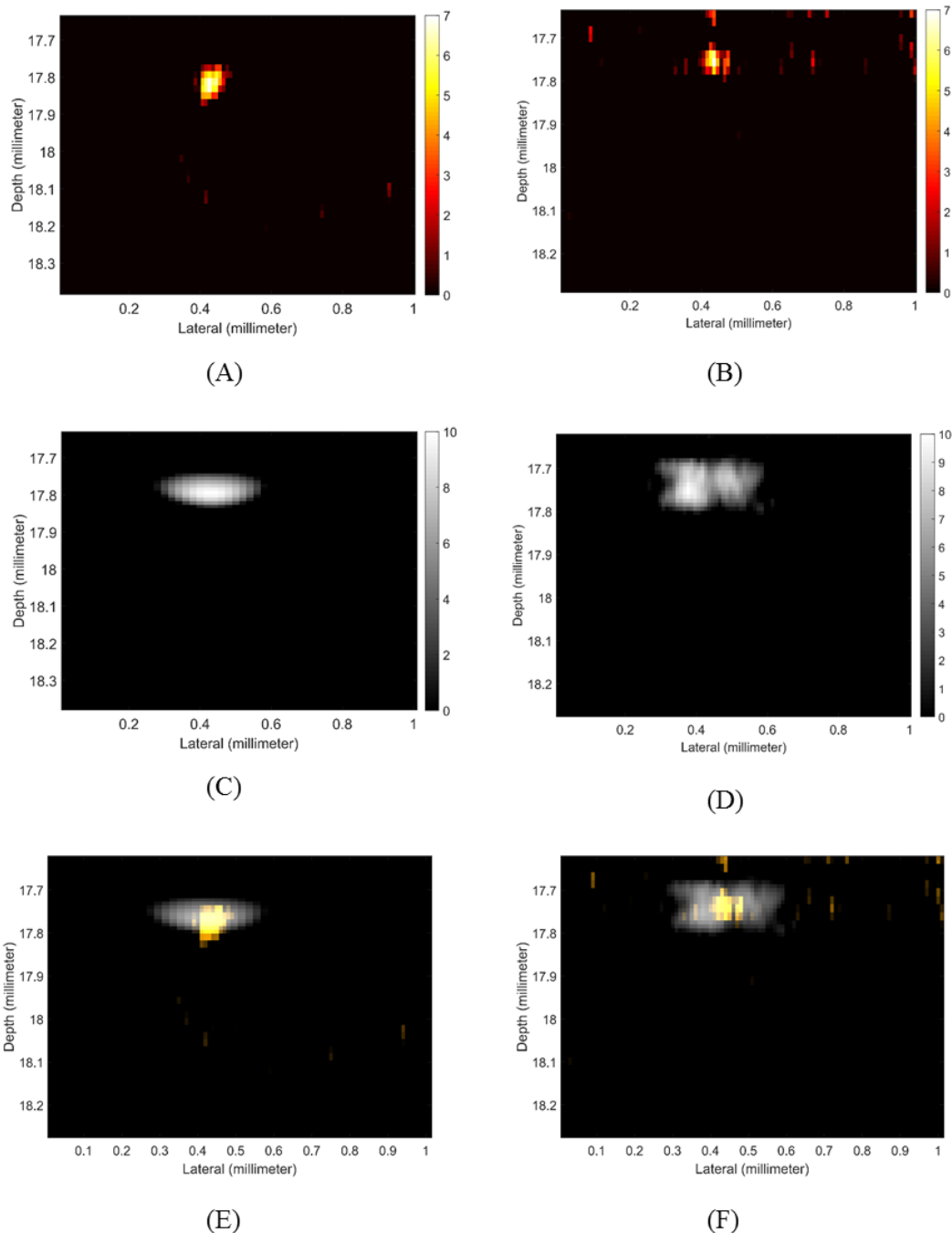


圖 4-13 (A)無使用薄膜下探頭單獨接收線仿體光聲 B-scan 影像 (C)探頭收發線仿體超音波影像 (E)合成影像 (B)薄膜式光聲/超音波架構經頻譜分離後光聲 B-scan 影像 (D)超音波影像 (F)合成影像

測試仿體為塗佈上吸收染料的 20 微米金屬線仿體，接收訊號經頻帶分離後

分為光聲/超音波影像，接著根據計算的深度位置重新建立合成影像。圖 4.13 (B)(D)(F)為薄膜架構下光聲、超音波及合成影像，並與探頭收發比較，圖 4.13 (A)(C)(E)為使用探頭以切換的方式分別接收光聲與超音波訊號結果。

#### 4.8 系統對奈米金桿光聲影像靈敏度

由於系統使用雷射波長為 905 奈米，為了觀察血管影像，必須標定吸收物質以提高影像對比，使用奈米金桿標定。奈米金桿具有可藉由改變奈米粒子長寬比例，調整吸收波長的特性，並且不具毒性、沒有激發疲乏(photon bleaching)的問題，非常適合用於需重複觀察生長情況的血管影像。然而金粒子濃度影響到系統能產生之光聲訊號強度，為測試雷射二極體光聲系統對金粒子偵測之靈敏度，使用不同濃度的金粒子進行光聲訊號強度測量，以 100 次訊號平均為基準，測試金粒子產生之光聲訊號訊雜比。

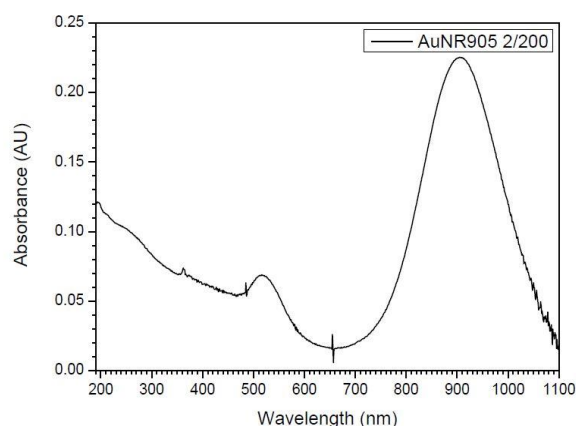


圖 4-14 奈米金桿吸收光譜

##### 4.8.1 奈米金桿濃度與仿體製作

金粒子濃度為 26 nM/L，莫爾吸收係數為  $\epsilon = 4.27 \times 10^9$ ，仿體製作方式將不同稀釋濃度之金奈米粒子與洋菜膠混和，製作於玻片上，稀釋濃度為 9/10 至 1/10 倍。經測量後發現，系統能在 100 次訊號平均下可偵測到最小濃度為 5.2 nM，訊雜比為 4.9 dB，從系統測得光聲訊號強度來看，能夠辨析的金奈米粒子濃度訊號強度為最強時的 0.6 倍，也就是 -2.2 dB。

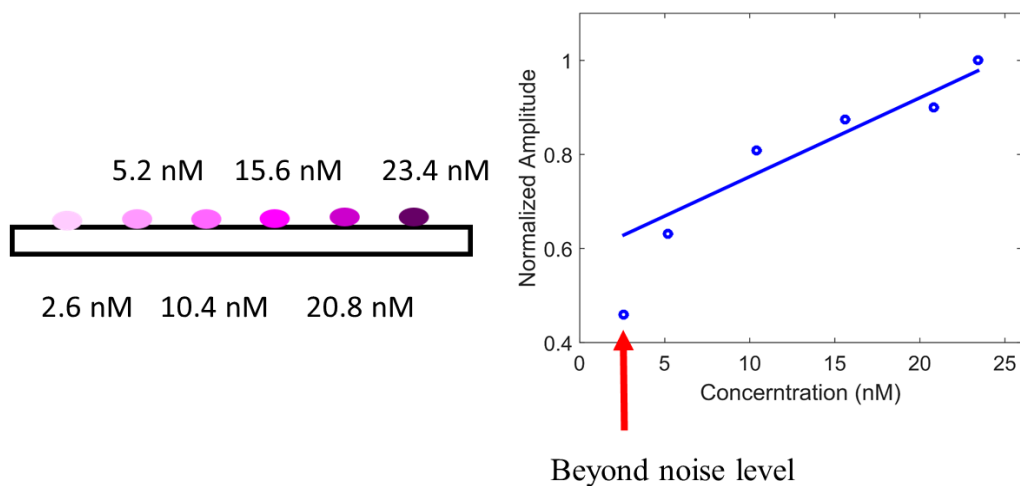


圖 4-15 系統接收奈米金桿之光聲訊號靈敏度

稀釋 1/10 倍的金粒子的吸收係數約為  $10.4 \text{ cm}^{-1}$ ，光吸收能力仍遠高於一般組織和 PDMS 混和物吸收層，因此當待測目標物內標定的區域內有較大量的金粒子，會大大降低雷射穿透能量，造成激發的超音波訊號強度明顯下降，在此條件下光聲和超音波訊號很容易因為穿透能量低而無法顯現超音波影像，因光聲與超音波在頻譜上對比僅 10 dB，當光聲強度與超音波對比超過 10 dB 範圍，超音波影像會被光聲影像蓋過，導致無法分辨兩種影像。



## 第五章 光聲/超音波雙模態系統於腫瘤細胞血管增生應

### 用

本章以雷射二極體光聲/超音波顯微系統建構三維線/腫囊仿體，以及建立標定金奈米粒子之血管細胞影像。前者以驗證此雙模態系統足以建立三維光聲、超音波影像，後者以驗證系統能夠建立標定金粒子之細胞影像，血管模型中將以金奈米粒子標定於血管內皮細胞上，若能夠建立細胞影像，則可以證明此系統能夠用以觀測血管模型。

#### 5.1 三維線/腫囊仿體影像

線仿體以生物毛髮作為光吸收質，建立光聲影像，線仿體線寬大約 70 微米，以三條線相互交錯，位於兩線交錯點上放置一直徑約 1 毫米之洋菜膠球狀腫囊仿體，腫囊仿體以 1% 洋菜膠(Agarose)混和 0.5% 超音波散射質(Silica)。

##### 5.1.1 影像掃描及掃描速度

由於在高數值孔徑聚焦物鏡下，光學聚焦能夠達到比超音波不論是橫向或是軸向更好的解析度，透過軸向掃描，光聲影像可以創造更佳解析度，透過掃描平台進行三維度掃描，在系統中，考慮雙軸載物台負荷，第三軸掃描採用移動雷射模組的方式，改變雷射聚焦深度，由於掃描深度範圍遠小於探頭景深，系統仍可視為共焦。掃描範圍為水平方向 3.2 x 3.2 毫米，以及軸向 0.5 毫米，步距為 50 微米，也就是總共 64 x 64 x 11 個點，每點平均 100 次以提高訊雜比。雖然雷射二極體能達到非常高的脈衝重複頻率，但整體系統掃描速度仍需考慮訊號擷取速度、馬達定位速度等，而目前所使用的擷取器最快擷取速度被限制在每秒接收 200 條 A-line 以下(4096 點)，由於訊號必須平均 100 次，使得掃描速度僅為每秒 2 點，一個平面的掃描時間耗時約 40 分鐘，整體三維掃描時間耗時超過 400 分鐘。

### 5.1.2 三維影像建立

探頭所接收到之訊號經過低通濾波後分離出光聲訊號，依軸像掃描對應之深度資訊得到三維光聲影像之切面圖如圖 5.1(B)，並依照三維影像中訊號最強點之一半(-3 dB)強度作為線仿體影像之邊界，建立三維光聲影像模型如圖 5.1(E)。超音波影像則經 15 MHz 解調後經低通濾波分離出，再以合成孔徑法處理，而由於超音波 B-mode 影像本身即可透過回聲計算深度資訊，因此取 11 次掃描中單次的 C-scan 掃描影像即建立三維超音波影像切面；然而仿體影像中，由於腫囊超音波訊號弱，在單次的三維影像中除訊雜比低，難以和周圍雜訊分離，而因實驗為建立三維光聲訊號進行 11 次不同雷射聚焦深度的掃描，但其中雷射誘發超音波在激發源遠離焦點時，產生的訊號頻譜差異已小，而物體與薄膜相對位置並無移動，因此 11 次 C-scan 下超音波的相位皆相同，在此考量下透過平均，可提升超音波訊雜比，而另一方面由於光聲在不同聚焦面下訊號相位不盡相同，可降低光聲訊號強度，增加光聲與超音波間的對比。圖 5.1(D)即為經過平均後的三維超音波切面圖，可以看到經過訊雜比提升後的超音波訊號較能顯現，但由於經提升後的超音波訊號強度最強處仍然小於經頻譜分離法後的光聲訊號將近 3 dB，因此能圖上仍然能看到明顯的光聲訊號。

並將光聲及超音波三維影像訊號以訊號最強的-3 dB 強度作為建立三維影像模型的邊界，得到圖 5.1(E)(F)的三維影像模型。光聲模型中可以清楚分辨兩條線仿體的影像，但第三條線仿體由於吸收頻率異於其他兩條，因此光聲訊號和其他兩者差異較大，已低於 3 dB 強度以下，因此無法建構模型出來，但在圖中仍然可以看到另外兩條線仿體因光能量在第三條線仿體阻隔下，因接收到較低光能量而產生較弱的光聲訊號；同樣的，在腫囊仿體所在之處，線仿體也因腫囊對光的散射下產生較弱的光聲訊號，而可見模型有一處缺塊。超音波三維模型中，可清楚見腫囊仿體模型，但同時亦可見無法透過濾波消除的光聲影像。

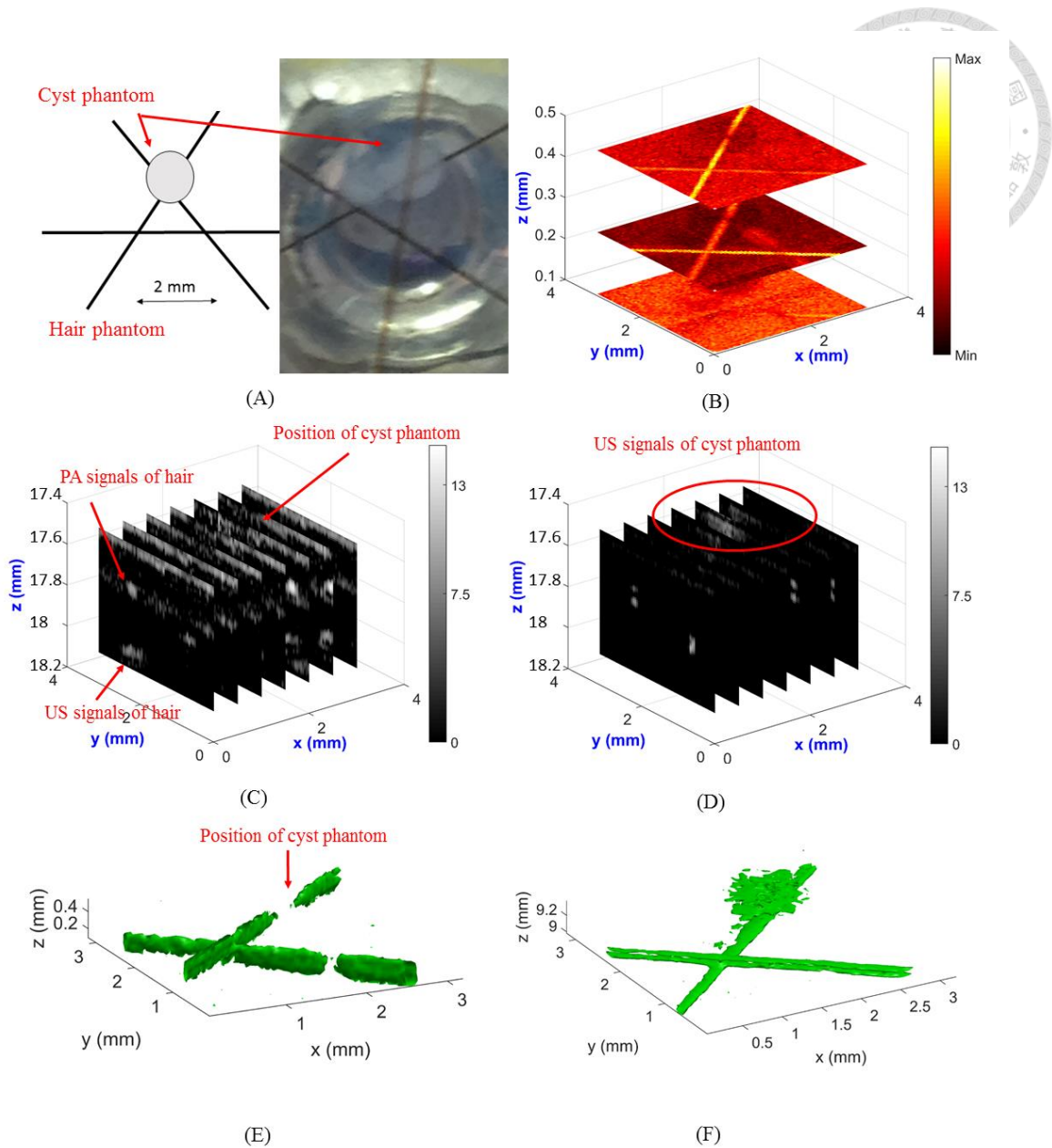


圖 5-1 (A)線/腫囊仿體(B)光聲三維掃描影像(C)以單次 C-scan 掃描下超音波三維影像 (D)以 11 次 C-scan 掃描平均後之超音波三維影像(E)以 -3 dB 強度為邊界所連結之三維光聲影像(F) 以 -3 dB 強度為邊界所連結之三維超音波影像

## 5.2 奈米金粒子標定血管內皮細胞影像

為測試系統足夠建立新生血管影像，以人類血管內皮細胞(human endothelial cell)作為仿體測量光聲影像，標定金粒子以濃度 26 nM 讓細胞進行吞噬，並以系統進行掃描，掃描步距以 3 微米為單位，並掃取 300 x 300 微米平方之範圍。量

測方式首先利用光學影像做軸向上對位，將細胞調整到光學聚焦平面。

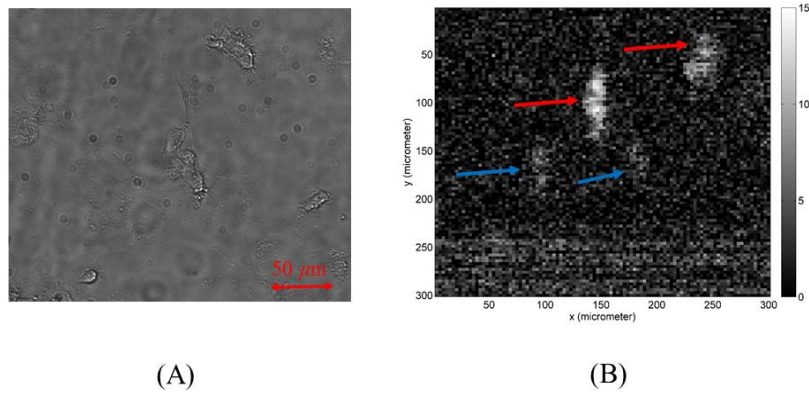


圖 5-2 血管內皮細胞(A)光學影像 (B)光聲影像

量測結果確實可以看到細胞輪廓，由於細胞厚度非常薄，圖 5.2(B)中可以發現不同深度(藍色箭頭)上亦有細胞光聲影像，由於所在平面與目標細胞不同，因此影像也較模糊，與光學影像比較，位於光學聚焦平面上的細胞影像才會顯現，但在光聲影像中仍有部分訊號，這會影響到光聲在軸向上的解析度。

## 第六章 問題與討論



### 6.1 光聲/超音波雙模態系統優勢與限制

本研究中架設之雙模態顯微系統利用雷射誘發式超音波，利用雷射和 PDMS 多層膜作為超音波激發源，能夠免去使用額外超音波收發儀器或電路，且材料製作容易，而接收端使用壓電式超音波探頭單純接收超音波訊號，因此不受限於傳統超音波影像系統必須使用收發式超音波探頭，可透過任何高靈敏度的接收探頭如水聽筒提高接收光聲/超音波訊號強度。

雷射誘發式超音波在使用雷射二極體觸發下影像深度，由於 PDMS 薄膜受雷射激發所產生的超音波聲壓經量測下不足 1 千帕，且高度受到雷射能量影響，和傳統收發式探頭聲壓能夠達到數百千帕相比，較容易受到觀測物體厚度限制，在超音波靈敏度量測實驗中，系統所能量測到最小超音波訊號與激發的超音波源訊號強度僅相差 14 dB，建立影像過程中，會因為待測目標本身散射性質，造成雷射能量衰減使產生的超音波訊號更小，以及因聲阻抗等造成訊號上的衰減讓實際能觀測的影像動態範圍更小。

在仿體實驗中也看到，超音波強度在目標物體吸收產生光聲訊號的部分又有衰減，為了讓超音波發射強度一致，會依照未通過物體的超音波訊號作為強度依據做訊號補償，將因部分吸收光能量的地方提升超音波訊號強度，但目的僅為讓整體超音波影像一致。

### 6.2 雷射二極體對系統所帶來之限制

雷射二極體相較於 Q 開關雷射具有更小體積、相對低價的優勢，且高脈衝重複頻率的特性使得此種雷射具有快速成像之潛力，然而光聲訊號受到熱傳遞限制和壓力傳遞限制，必須仰賴高能、短脈衝電磁波激發源，雷射二極體由於無法產生足夠短脈衝的高能量電磁波，造成產生的光聲訊號強度低，必須透過高訊號平均數以提升訊雜比，因此影像建立速度和 Q 開關雷射相比提升效果有限，而

由於系統擷取訊號的速度亦受到資料擷取器限制，掃描式顯微系統必須透過三維 XYZ 各點進行掃描重建，因此建構三維影像模型需耗費數小時的時間，對於相對緩慢生長的腫瘤血管模型建立，還可以接受，但對於相對變化速度快如細胞追蹤觀測之應用，便需要更進一步改進掃描速度。

光聲影像深度受到雷射能量限制，即使可透過訊號平均提升訊雜比，但系統仍有最小可辨析訊號強度，在系統對金奈米粒子靈敏度的實驗中，當金粒子濃度低於 5.2 nM 時，光聲訊號即不可辨析，此時光聲訊號強度為 26 nM 時產生之光聲訊號強度的 -2.2 dB，考慮到組織散射能力，雷射穿過軟組織在 3.98 毫米下衰減 3 dB，對於觀測三維影像模型厚度約 1 毫米並不受到限制。

### 6.3 影像系統解析度

薄膜式架構因僅有單向聚焦，因此解析度不如探頭單獨收發之效果，在合成孔徑法的幫助下仍然可以創造橫向 240 微米的空間解析度，並同時提升訊雜比，光聲影像解析度因沒有足夠細的線仿體進行測量，但在銅網影像上量測的線寬 (9.6 微米) 與實際線寬 (8 微米) 誤差在 20% 內，表示系統仍具備微米等級解析度。

### 6.4 仿體影像

從光聲與超音波兩者訊號的分離，以頻譜濾波的方式減弱其中一種訊號，使其與另一種訊號產生對比，是必須在兩種訊號強度相當的條件下建立，雖然組織光聲訊號中心頻率在 10 MHz 以下，但若超音波訊號強度不足，仍然會和光聲訊號的高頻成分重疊而難以分離。在此仿體實驗中，光聲訊號經濾波後仍然大於超音波訊號 3 dB 的強度，顯然無法產生足夠對比，必須透過減弱光聲訊號強度，或是透過調整薄膜對光的吸收係數增加超音波訊號強度，來提升超音波的對比。

### 6.5 影像空間解析度改善

#### 6.5.1 結合聲透鏡與超音波薄膜系統

聲透鏡為單元探頭另一種聚焦方式，利用聲透鏡聲速與水差異，藉由計算物體到達探頭表面之相位調整聲透鏡厚度，使得訊號從目標聚焦點回傳到探頭為相

同相位，達到建設性干涉及聚焦效果。由於聲透鏡塑型相較於壓製探頭表面能夠達到更大的 F 數值(F-number)，而創造更高的空間解析度。

另一方面，在薄膜架構中，雷射必須聚焦於待測目標物上，由於焦點景深非常短僅有數微米，而薄膜因物體本身厚度，必須與物體有段距離，但薄膜受雷射激發產生之超音波除了訊號強度取決於雷射照射單位面積下強度外，產生之超音波頻寬及中心頻率亦受到與光聚焦點之距離影響，因此與物體之距離也不能太遠，實驗設定上以貼近物體表面約 1 毫米至 2 毫米內，以維持訊號強度與高頻率。聲透鏡系統由於具有發射聚焦之效果，產生超音波訊號強度透過焦點上建設性干涉提升，因此探頭與待測目標之距離由聲透鏡聚焦深度決定，而非以貼近物體的方式提升訊號強度，可以增加觀測目標大小的彈性。

### 6.5.2 結合聲透鏡式系統分析

聲透鏡與多層膜結合，提供另一種發射聚焦的方式，以達到提升解析度效果，在以知聲透鏡材料聲速，以及設定目標 F 數值之情況下，可透過計算訊號於探頭表面上同相位推得聲透鏡幾何形狀。

$$\left(\frac{c}{v} - 1\right)d(x) = f \sqrt{\frac{f^2(1-1/4F^2)}{x^2+f^2(1-1/4F^2)}} - f\sqrt{1-1/4F^2} \quad \text{式 3.3}$$

其中 c 為水中聲速，v 為聲透鏡聲速，聚焦深度為 f，由式 3.3 便可得到聲透鏡各點之厚度。

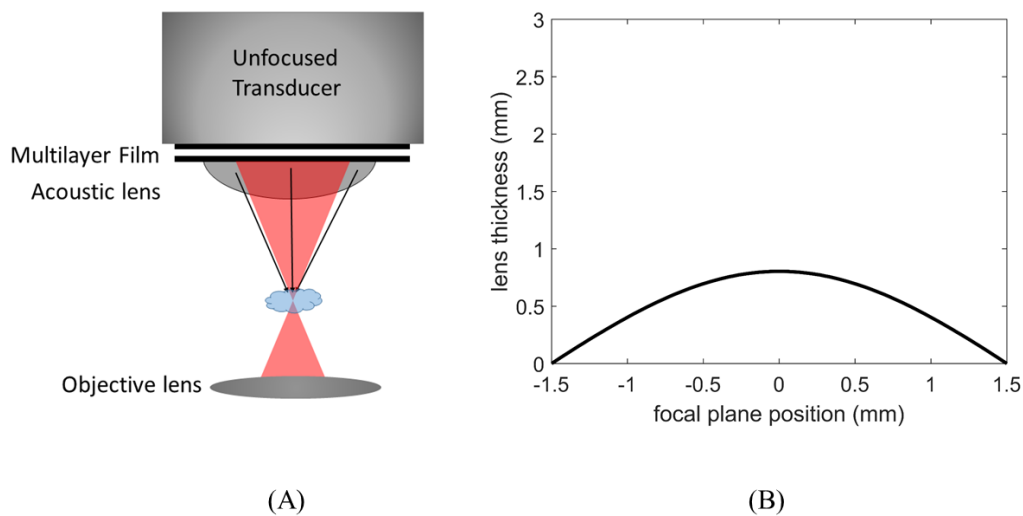


圖 6-1 (A)多層膜結合聲透鏡之光聲/超音波系統架構 (B)聚焦深度 3 毫米 F 數值 1 之聲透鏡計算

### 6.5.3 聲透鏡製作

結合聲透鏡創造高解析度，由於使用較小 F 數值，聲透鏡厚度對於聲波訊號衰減不可忽略，若使用 PDMS 作為聲透鏡材料，厚度最大之處為 0.8 毫米，考慮衰減係數為 4 dB/cm/MHz，則對於 20 MHz 訊號衰減達到 6.4 dB，因此必須選擇衰減係數更低之材料。RTV 矽膠(room temperature vulcanization silicone)是一種聲阻抗與水接近且衰減係數低的材料，已被廣泛用於聲透鏡材料上，其衰減係數約為 1 dB/cm/MHz，對於高頻聲波頻率 20 MHz 之訊號衰減僅 1.6 dB。

結合聲透鏡與多層膜製作上，首先需以非聚焦式探頭為基底，將多層膜製作於非聚焦式探頭上，再將 RTV 矽膠倒置於多層膜上，並以 3D 列印技術根據計算表面曲度製作的模具置於探頭上，於室溫下待矽膠固化，便完成結合聲透鏡的多層膜超音波探頭。



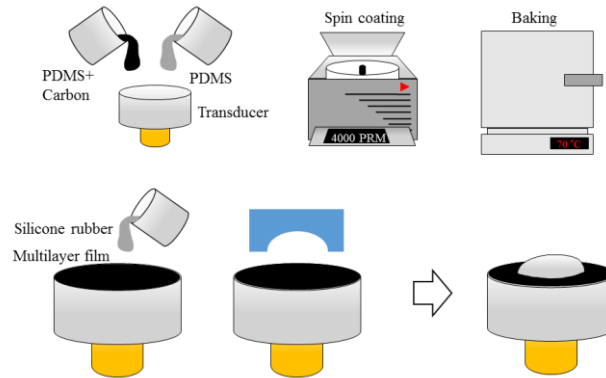


圖 6-2 結合聲透鏡與多層膜製作流程

#### 6.5.4 結合聲透鏡與薄膜之系統架構

以 RTV 矽膠製作於非聚焦探頭上、F 數值為 1 的聲透鏡，探頭中心頻率 20 MHz，在雷射觸發下能夠聚焦發射訊號，因具較小的 F 數值可因此提升解析度。由於聲透鏡使用雷射二極體下所產生訊號強度不足，仿體的背散射訊號皆無法辨析，因此必須採用較高電磁波強度的 Nd:YLF 雷射(523 ns wavelength, 10 ns pulsewidth, Edgewave, Germany)作為其超音波激發源進行測試，雷射能量經儀器測量為  $2 \mu\text{J}$ 。

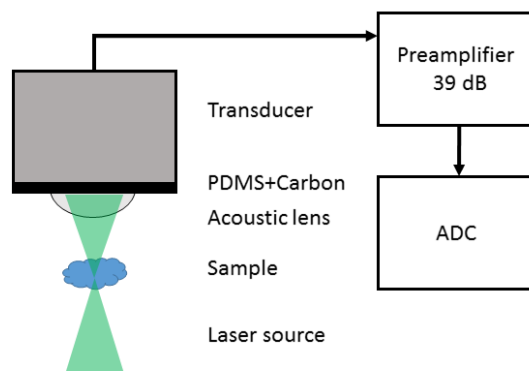


圖 6-3 結合聲透鏡實驗架構

#### 6.5.5 結合聲透鏡與薄膜之超音波影像解析度

量測上使用相同金屬線仿體，而在此架構中，薄膜被製作於探頭表面，接收回聲訊號和使用探頭收發相同，因此物體深度資訊計算方式相同。圖 6.4 所示，系統橫向解析度及軸向分別可達 150 微米與 178 微米，橫向上比薄膜式架構提升

37.5%，並與 F 數值為 2 的探頭收發影像之解析度相近，軸向上並未有太大差異，因為軸向解析度與中心頻率關係較大，而使用聲透鏡並未提高超音波中心頻率，因此未有提升。

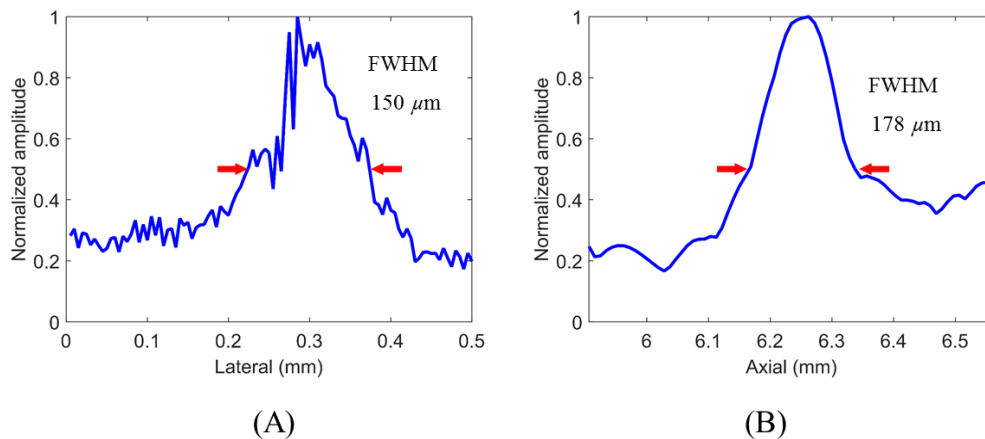


圖 6-4 結合薄膜與聲透鏡之線仿體超音波 B-scan 投影影像及解析度

結合聲透鏡與薄膜的系統架構，目的是為改善薄膜架構的超音波解析度，以及訊號強度的問題，實驗結果顯示，聲透鏡架構雖提升解析度但並未改善超音波訊號強度，反而必須使用高能量雷射激發。

由於在聲透鏡製作上，僅討論聲速由水進入 RTV 後的相位變化，然而在結合薄膜後，探頭表面、薄膜、聲透鏡接觸面間存在多種邊界效應，才因此造成訊號衰減嚴重，訊號強度低，且各材料間聲速與聲阻抗的差異對於訊號相位亦有影響，若無完全匹配，易使得訊號無法產生建設性干涉，也是影響訊號強度之原因，認為可從此處深入研究，以提升此架構應用於雷射二極體系統之可能性。

## 第七章 結論與未來工作



### 7.1 結論

本研究完成架設光聲/超音波雙模態顯微系統，系統基於單一雷射二極體產生共模態影像，以 PDMS 混和物之多層膜結構取代傳統超音波探頭作為超音波發射源，能夠產生窄頻超音波訊號，並可藉由頻譜分離法將兩種模態影像分離。為激發 20 MHz 以上高頻超音波訊號，使用 20 奈秒短脈衝雷射二極體作為激發源。雷射誘發超音波頻譜上，多層膜所產生之超音波訊號頻譜可創造於 12 MHz 以下 10 dB 影像對比，讓光聲與超音波訊號能夠產生影像差異。系統可達解析度在光聲/超音波影像分別為 2 微米、240 微米，而使用聲透鏡之下影像進步達 150 微米，但由於產生超音波訊號太小，不適用於雷射二極體光聲超音波系統中。系統雙模態影像透過頻帶分離法，依照不同子頻帶解調並使用 10 MHz 濾波後得到，線與腫囊複合仿體的影像建立，則驗證系統能夠建立血管及腫瘤三維影像之潛力。透過標定金奈米粒子於觀測細胞上，905 奈米雷射二極體能夠激發光聲訊號，觀測血管內皮細胞，以利進一步建立新生血管影像。

### 7.2 未來工作

#### 7.2.1 光聲超音波雙模態系統應用

目的為以此雷射二極體光聲/超音波雙模態系統建立血管與腫瘤影像，首先利用老鼠耳部血管進行觀測，由於老鼠耳朵本身佈滿血管，在植入腫瘤培養後，即能誘發腫瘤血管新生，且因老鼠耳朵厚度約 1 毫米，適合作為腫瘤新生初期的三維模型。

實驗方式首先在老鼠耳朵內植入腫瘤細胞培養，經過一週時間生長後，於血管內部注入金奈米粒子，並以本研究所架設之系統進行三維影像掃描。目前實驗完成初步影像分析，光聲影像透過三軸掃描建立三維影像，超音波則利用二軸掃描建立三維影像，但利用光聲第三軸掃描所得到的多個三維影像訊號做平均，以提高

超音波訊雜比。

實驗結果中，血管由標定金的方式產生光聲訊號，與腫瘤超音波訊號在頻譜分離方式下能產生足夠的影像對比，但相較於仿體光聲影像，老鼠血管標定金下產生的光聲訊號顯得稍弱，僅能偵測到血管分支前較粗的部分，此處血管寬約有200~300微米寬。無法偵測到較細血管之原因可能因金粒子從注入之血管流向分支部位時，濃度已下降，吸收度由血管底部向分支遞減，光聲訊號也越來越弱，另一方面由於老鼠皮膚對於光為強散射物質，因此能夠進入到組織內被轉換為光聲訊號的能量相較於仿體也較弱。同樣的由薄膜誘發之超音波也較弱，不過由於腫瘤細胞為超音波的強散射物質，加上訊號強度遠大於光聲高頻成分，因此在濾波後能夠清楚看到腫瘤超音波影像。為驗證腫瘤超音波影像之正確性，也利用探頭連接收發器，得到超音波影像作為比對，位置大致符合。

影像掃描時間是建立老鼠耳部血管三維影像面臨最大問題，因掃描速度在每點100次平均下限制在2點/秒造成三維掃描需耗費一小時以上，要建立完整的老鼠腫瘤血管三維影像，掃描範圍必須包括整個腫瘤(腫瘤大小約數百微米到數毫米)，但一方面必須滿足光聲解析度，因此掃描步距必須足夠小(微米)，在必須使用高頻均數的條件下，掃描時間會耗費數小時，因此必須改善訊號擷取時間才能適用於老鼠血管影像建立。

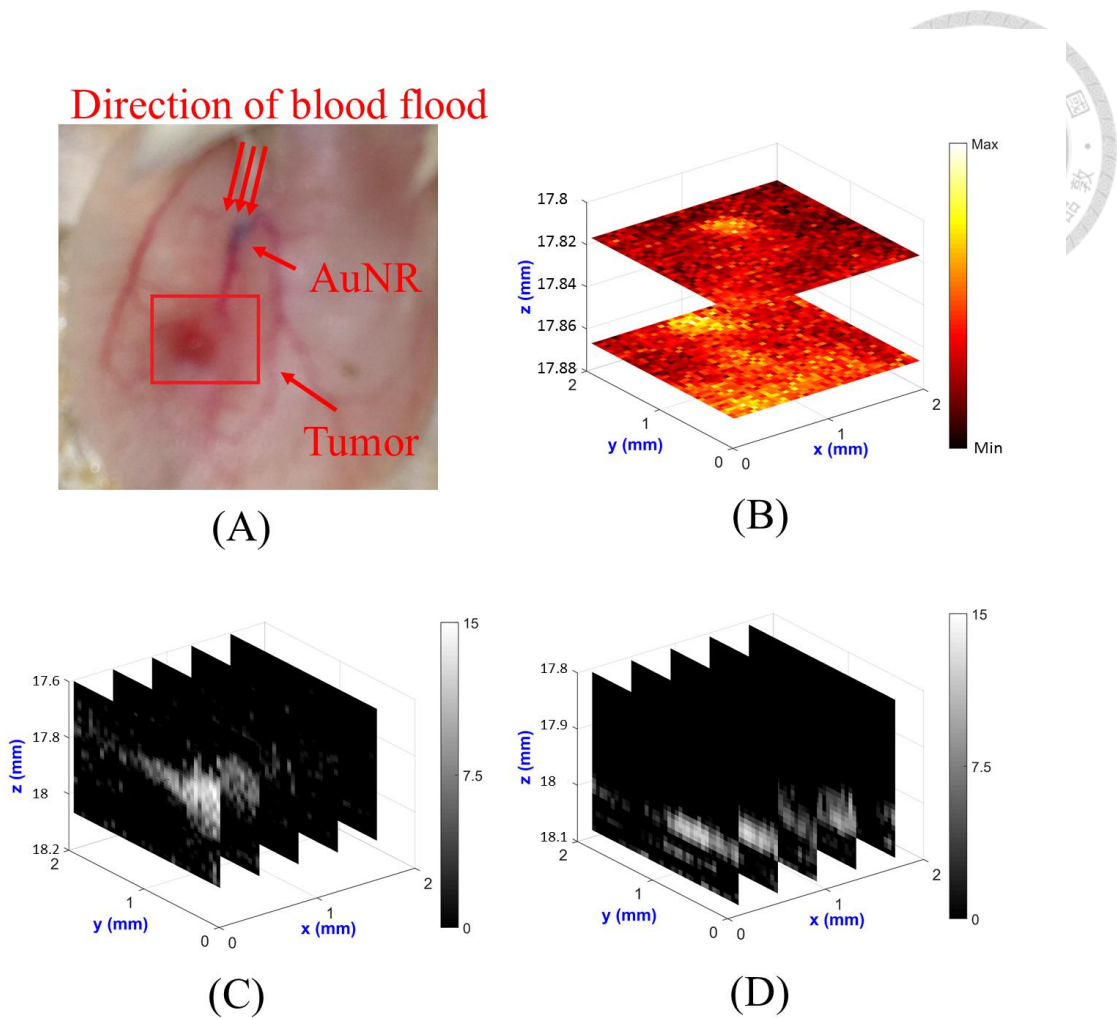


圖 7-1 老鼠耳部血管/腫瘤(A)光學影像 (B)光聲三維影像切面 (C)窄頻超音波三維影像切面 (D)探頭收發超音波三維影像切面

### 7.2.2 雙波長雷射二極體光聲顯微系統

利用物體吸收波長範圍的差異，雙波長光聲顯微系統能夠建立兩種功能性影像。由於光聲比超音波影像具有更好的解析度，雙波長系統在解析度方面比雙模態系統更具優勢，但必須考慮觀測物體的吸收波長。雙波長系統之研究已被提出 [24-26]，但目前也都僅限於 Q 開關雷射與可調式雷射系統(Tunable laser)上，脈衝可調式雷射和 Q 開關雷射同樣有體積大、價格昂貴之問題，因脈衝雷射波長選擇範圍小，可調式雷射通常透過一脈衝雷射激發螢光之方式產生不同波長範圍之雷射，因此更限制了多波長光聲系統的應用性。相對的，雷射二極體具有較多

的波長選擇性，利用雷射二極體光聲顯微系統之優勢，希望引入雙波長雷射系統，提升目前系統的應用價值。



## 參考文獻



- [1] S. M. Weis and D. A. Cheresh, "Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets", *Nature Medicine*, 17.11 (2011): 1359-1370.
- [2] D. Fukumura and R. K. Jain, "Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization", *Microvascular Research*, 74.2 (2007): 72-84.
- [3] K. M. Yamada and E. Cukierman, "Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D", *Cell*, 130.4 (2007): 601-610.
- [4] C. Fischbach, et al., "Cancer cell angiogenic capability is regulated by 3D culture and integrin engagement", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106.2 (2009): 399-404.
- [5] Y. Zheng, et al., "In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109.24 (2012): 9342-9347.
- [6] M. Balu, et al., "Effect of excitation wavelength on penetration depth in nonlinear optical microscopy of turbid media", *Journal of Biomedical Optics*, 14.1 (2009): 010508-010508.
- [7] J. Yao and L. V. Wang, "Sensitivity of photoacoustic microscopy", *Photoacoustics*, 2.2 (2014): 87-101.
- [8] L. V. Wang and S. Hu, "Photoacoustic tomography: in vivo imaging from organelles to organs", *Science*, 335.6075 (2012): 1458-1462.
- [9] L. Zeng, et al., "Portable optical-resolution photoacoustic microscopy with a pulsed laser diode excitation", *Applied Physics Letters*, 102.5 (2013): 053704.
- [10] T. Wang, et al., "A low-cost photoacoustic microscopy system with a laser diode excitation", *Biomedical Optics Express*, 5.9 (2014): 3053-3058.
- [11] T. Buma, M. Spisar and M. O'Donnell, "High-frequency ultrasound array element

using thermoelastic expansion in an elastomeric film", *Applied Physics Letters*, 79.4 (2001): 548-550.

[12] Y. Hou, et al., "Broadband all-optical ultrasound transducers", *Applied Physics Letters*, 91.7 (2007): 073507.

[13] Y. Wang, et al., "Integrated photoacoustic and fluorescence confocal microscopy", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 57.10 (2010): 2576-2578.

[14] N. F. Schwenzer, et al., "Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance", *Journal of Hepatology*, 51.3 (2009): 433-445.

[15] G. Xu, et al., "Photoacoustic and ultrasound dual-modality imaging of human peripheral joints", *Journal of Biomedical Optics*, 18.1 (2013): 010502-010502.

[16] S. Y. Nam, et al., "In vivo ultrasound and photoacoustic monitoring of mesenchymal stem cells labeled with gold nanotracers", *PLoS One*, 7.5 (2012): e37267.

[17] T. Harrison, et al., "Combined photoacoustic and ultrasound biomicroscopy", *Optics Express*, 17.24 (2009): 22041-22046.

[18] E. M. Strohm, M. J. Moore and M. C. Kolios, "High resolution ultrasound and photoacoustic imaging of single cells", *Photoacoustics*, 4.1 (2016): 36-42.

[19] S. Y. Hung, et al., "Concurrent photoacoustic-ultrasound imaging using single-laser pulses", *Journal of Biomedical Optics*, 20.8 (2015): 086004-086004.

[20] T. Liu, et al., "Photoacoustic generation by multiple picosecond pulse excitation", *Medical Physics*, 37.4 (2010): 1518-1521.

[21] T. J. Allen, B. T. Cox and P. C. Beard, "Generating photoacoustic signals using high-peak power pulsed laser diodes", *Biomedical Optics 2005*, International Society for Optics and Photonics, 2005.

[22] Huang, C. H., et al. "Calculation of the absorption coefficients of optical materials by measuring the transmissivities and refractive indices." *Optics and Laser Technology*



34.3 (2002): 209-211.

[23] D. S. Lin, et al., "Encapsulation of capacitive micromachined ultrasonic transducers using viscoelastic polymer", *Journal of Microelectromechanical Systems*, 19.6 (2010): 1341-1351.

[24] J. T. Oh, et al., "Three-dimensional imaging of skin melanoma in vivo by dual-wavelength photoacoustic microscopy", *Journal of Biomedical Optics*, 11.3 (2006): 034032-034032.

[25] M. Liu, et al., "In vivo three dimensional dual wavelength photoacoustic tomography imaging of the far red fluorescent protein E2-Crimson expressed in adult zebrafish", *Biomedical Optics Express*, 4.10 (2013): 1846-1855.

[26] H. Dortay, et al., "Dual-wavelength photoacoustic imaging of a photoswitchable reporter protein", *SPIE BiOS.*, International Society for Optics and Photonics, 2016.

