

國立臺灣大學電機資訊學院生醫電子與資訊學院研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biomedical Electronics and Bioinformatics

College of Electrical Engineering and Computer Science

National Taiwan University

Master Thesis

用於提升光熱治療效果之奈米金液滴與相關技術

Enhanced Photothermal Therapy Using Gold Nanodroplets

劉恕維

Shu-Wei Liu

指導教授：李百祺 博士

Advisor: Pai-Chi Li, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書



用於提升光熱治療效果之奈米金液滴與相關技術
Enhanced Photothermal Therapy Using Gold Nanodroplets

本論文係劉恕維君 (R01945013) 在國立臺灣大學生醫電子與資訊學研究所完成之碩士學位論文，於民國 103 年 06 月 25 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

李百祺

(指導教授)

蔡秩光

張煥正

沈聖升

賴俊延

所長：

莊曜宇



致謝

兩年的時間轉眼之間就過去了，當初因為喜歡超音波進入實驗室，進來以後才知道指導教授非常厲害，覺得自己運氣很好有吃素有保佑。然而，當看到同屆的同學跟老師討論研究內容時，嚇了一跳「大家都開始了嗎！？自己是不是進度太慢。」於是就根據幾次 GROUP MEETING 的內容，踏上了與奈米金泡泡玩耍的旅程.....如果再給我一次機會.....我會更認真地與泡泡玩耍。泡泡是小時候熟悉的玩伴，感覺駕馭起來應該非常容易，然而事實並不如團團黑白腦袋認為的簡單，看起來很容易的實驗每次都做出不同結果，感覺起來很單純的架構，細節多的像論文初稿中的錯字.....必須花很多時間一個一個挑出修正才能完成實驗。

在跌跌撞撞的過程中，很感恩老師給予許多意見及協助，每次在修正完我邏輯上的問題後總是默默一聲長嘆.....總讓我覺得很不好意思，感謝您不厭其煩地修改實驗及文章上各式各樣的錯誤，讓我腦袋皺褶的深度可以和身體的厚度一同成長。還有在基因體的昱欣學姊、莊醫師學長、毛毛學姊、令儀學姊、詩萍學姊、冠良學長和曾經在基因體的俊延學長，大家總是很熱心地與我討論實驗設計及研究方向，並在我有困難的時候神救援！！讓膽大心粗的團團可以順利做出一些結果。還要感謝耿璽學長、建宏學長、佳倫學長、概瀚學長、裕威學長、境嚴學長和珮好學姊，教導我許多超音波的原理及實驗上的注意事項，讓儀器從一開始的.....還是不要說出來，綠色乖乖還是放在上面比較好。除此之外，還要感謝沈哲州老師、葉秩光老師及其實驗室的學長姐們給予我很多的資訊和建議，也要感謝凱恆的共焦架構和中正的奈米金，讓我有好的材料與工具進行實驗。最後謝謝同屆的大家、上屆的學長姐及下屆的學弟妹，讓我的碩班生活不只有實驗和資料，還有充滿了許多令人驚豔的回憶。

最後，還要感謝許多名字無法放上來的人，讓我研究所的日子充滿色彩，讓團團的黑白世界有機會抹上一些顏色，雖然最終也是以灰階影像收場，但是有許多很棒的回憶。

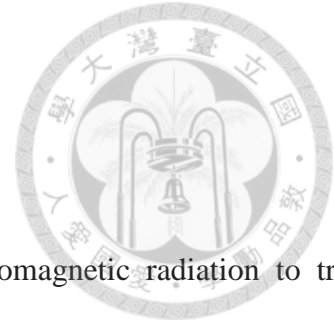
謝謝，所有曾經給我幫助及相遇的人。



中文摘要

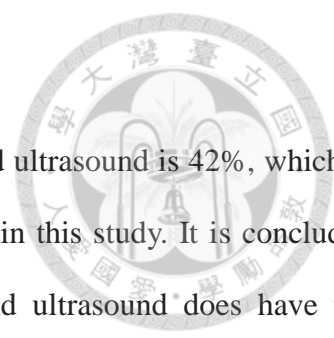
光熱治療是一種將電磁波轉換成熱能的癌症治療方式，研究人員以帶有腫瘤標靶的奈米金粒子當作媒介，待奈米金粒子結合到腫瘤組織後，再利用近紅外光照射使組織溫度上升，進一步造成腫瘤細胞壞死。與其他治療方式相比，光熱治療有高效率及低副作用的特性，然而奈米金粒子在腫瘤組織的濃度會嚴重影響治療效率，因此如何增加奈米金粒子的釋放效率是重要的研究課題。過去有人利用微氣泡當作載體進行運輸，然而微氣泡的穩定性不足，因此本研究以液滴取代氣泡，我們假設若能增強載體的穩定度，就有機會提升釋放效率。除此之外，本研究也利用雷射與超音波共同作用載體，希望藉著此方式增強穴蝕效應強度，並提升釋放效率。本研究利用實驗室自製的載體進行實驗，首先進行奈米金液滴的性質評估，了解其在超音波、雷射及雷射輔助超音波下的特性；接著，利用穴蝕效應劑量評估不同狀況下，奈米金液滴的穴蝕效應強度差異；接續是比較奈米金氣泡與奈米金液滴，在雷射輔助超音波作用下奈米金粒子的釋放效率差異；最後進行細胞及小動物實驗，藉由體外及體內實驗評估此方法在光熱治療上的效果。結果顯示雷射輔助超音波技術可以產生更強的穴蝕效應並有相輔相成的現象，奈米金液滴在雷射輔助超音波下破裂比例約 45%、吸光值約 0.027 均高於奈米金氣泡的結果。除此之外，細胞在雷射輔助超音波作用奈米金液滴下的存活率剩下 42%，也是全部實驗條件中最低的結果。總而言之，用雷射及超音波同時作用奈米金液滴的確有增強光熱治療的潛力。

關鍵字：光熱治療、奈米金液滴、雷射輔助超音波



Abstract

Photothermal therapy refers to the use of heating from electromagnetic radiation to treat various medical conditions, including cancer. For example, researchers have been using targeting gold nanoparticles to specific tumor sites as a therapeutic agent with the application of near infrared laser irradiation to induce heating and concomitant tumor cell necrosis. Comparing to other technologies, photothermal therapy can be highly effective with low side effects. It becomes clear that the quantity of gold nanoparticles that can be delivered and accumulated in the tumor is a key factor determining the therapeutic efficacy as well as an important research subject. One of the common approaches to enhancing delivery of the therapeutic agent is to employ micro bubbles as a carrier. Nonetheless, these microbubbles are generally not stable. Therefore, the hypothesis of this study is that by using nanodroplets as the carrier, the stability can be improved and thus the delivery can be enhanced. Moreover, we further hypothesize that by combining laser and ultrasound, liquid-to-gas phase change can be effectively induced and the subsequent bubble destruction can improve the cavitation effects and thus the delivery of therapeutic agent. To test these hypotheses, *in vitro* and *in vivo* experiments were conducted in this study. First, the *in house* therapeutic agents were characterized. Second, the inertial cavitation does was measured under various conditions to quantitatively represent the amount of the cavitation effects. Third, the delivery efficiency of gold nanoparticles between microbubbles and nanodroplets was compared. Finally, cell toxicity tests and animal experiments were conducted to evaluate photothermal therapeutic effects. Results show that the combination of laser with ultrasound provides stronger cavitation effects and synergistic treatment efficacy. Specifically, the destruction ratio of gold nanodroplets using both laser and ultrasound is approximately 45% and the optical density value representing the amount of gold delivered into the cells is 0.027, both are higher than those from



gold microbubbles. Furthermore, the cell viability under both laser and ultrasound is 42%, which is also the lowest among all the treatment strategies that were included in this study. It is concluded that the use of gold nanodroplets and the combination of laser and ultrasound does have the potential to be an effective technology for plasmonic photothermal therapy.

Key words: photothermal therapy, gold nanodroplets, laser and ultrasound



目錄

口試委員審定書.....	I
致謝.....	II
中文摘要.....	III
Abstract.....	IV
目錄.....	VI
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XI
第一章 緒論.....	1
1.1 癌症與光熱治療.....	1
1.2 超音波對比劑.....	4
1.3 穴蝕效應及其治療上的應用.....	7
1.4 研究動機與目標.....	9
1.5 論文架構.....	11
第二章 實驗材料與方法.....	12
2.1 對比劑製作.....	12
2.1.1 實驗架構及流程.....	12
2.1.2 氣化現象偵測.....	13
2.1.3 離心篩選測試.....	14
2.1.4 升溫現象偵測.....	14
2.2 氣化與穴蝕效應實驗.....	14
2.2.1 實驗架構及流程.....	14



2.2.2	氣化效應之誘發與偵測.....	17
2.2.3	穴蝕效應之誘發與偵測.....	17
2.3	奈米粒子釋放效率實驗.....	21
2.3.1	對比劑配置.....	21
2.3.2	實驗架構及流程.....	21
2.3.3	破裂比例評估法.....	22
2.3.4	吸光值評估法.....	23
2.4	光熱治療實驗.....	23
2.4.1	細胞實驗.....	23
2.4.2	小動物實驗.....	26
第三章	實驗結果.....	28
3.1	奈米金液滴製作及特性評估.....	28
3.1.1	粒徑及濃度.....	28
3.1.2	氣化能力.....	29
3.1.3	離心分析.....	30
3.1.4	升溫效率評估.....	32
3.2	雷射輔助奈米金液滴氣化與穴蝕效應.....	33
3.2.1	B-mode 影像觀察.....	33
3.2.2	粒徑濃度分析.....	35
3.2.3	聲壓 vs dICD.....	37
3.2.5	雷射強度 vs dICD.....	39
3.2.6	濃度 vs dICD.....	40
3.3	奈米金粒子釋放效率實驗.....	41



3.3.1 破裂比例評估法.....	41
3.3.2 吸光值評估法.....	43
3.4 光熱治療實驗.....	45
3.4.1 細胞毒性實驗.....	45
3.4.2 小動物治療實驗.....	46
第四章 分析與討論.....	48
4.1 雷射輔助超音波奈米金液滴穴蝕效應之特性探討.....	48
4.2 奈米金粒子釋放效率之結果探討.....	50
4.3 光熱治療效果探討.....	52
第五章 結論與未來工作.....	56
第六章 參考文獻.....	59



圖目錄

圖 1：光熱治療的作用機制。.....	3
圖 2：基本的微氣泡架構。.....	4
圖 3：液滴直徑與沸點的關係。 [29].....	7
圖 4：穴蝕效應的過程。 [33].....	8
圖 5：雷射與超音波作用機制圖。.....	10
圖 6：研究目標及流程。.....	11
圖 7：此圖為奈米金液滴製作架構之實景。.....	12
圖 8：此圖為氣化現象偵測之實景。.....	13
圖 9：此為氣化與穴蝕效應實驗之架構及實景。.....	16
圖 10：定量穴蝕效應原理示意圖。.....	19
圖 11：奈米金氣泡與奈米金液滴之粒徑濃度分布圖。.....	21
圖 12：比較實驗架構之實景。.....	22
圖 13：血球計數器分格子圖片。.....	25
圖 14：超音波雷射共焦架構圖。.....	27
圖 15：奈米金液滴粒徑濃度測量結果。.....	28
圖 16：奈米金液滴及其氣化後的顯微鏡影像。.....	29
圖 17：懸浮之奈米金液滴粒徑濃度圖。.....	30
圖 18：沉澱之奈金液滴粒徑分布圖。.....	31
圖 19：升溫變化圖。.....	32
圖 20：吸光值升溫變化圖。.....	33
圖 21：觀察不同作用狀況下奈米金液滴的反應。.....	34
圖 22：不同作用之奈米金液滴濃度破裂比例圖。.....	35
圖 23：不同作用之奈米金液滴粒徑破裂比例圖。.....	36
圖 24：聲壓與 dICD 之關係。.....	37
圖 25：發射週數與 dICD 之關係。.....	38
圖 26：雷射強度與 dICD 之關係。.....	39
圖 27：濃度與 dICD 之關係。.....	40
圖 28：破裂比例圖。.....	41
圖 29：粒徑破裂比例圖。.....	43
圖 30：吸光值差異圖。.....	44
圖 31：細胞存活率。.....	45



圖 32：腫瘤治療前後的外觀。.....	46
圖 33：治療前後的超音波影像差異。.....	47
圖 34：穴蝕效應劑量時間變化圖。.....	49
圖 35：不同雷射強度下之穴蝕效應劑量時間變化圖。.....	49
圖 36：對比劑在雷射與超音波同時作用下的破裂比例與粒徑差異。.....	52
圖 37：治療前後之腫瘤組織切片。.....	54
圖 38：抗原抗體標誌法。.....	58



表目錄

表 1：商用超音波對比劑的組成及名稱。.....	5
表 2：細胞實驗組別及作用方式.....	26

第一章 緒論



1.1 癌症與光熱治療

癌症(cancer)是目前全球人類十大死因之首，根據統計 2008 年全世界有 1270 萬人罹患癌症並且有 760 萬人因為癌症死亡[1]。癌細胞(tumor cell)是從正常的細胞分裂而成[2]，不良的環境因子會使正常細胞基因損傷，導致其分裂出病變的細胞，這些不正常的細胞就稱為癌細胞，癌細胞不但缺乏正常功能還會不停分裂增生，最終形成腫瘤組織對身體造成危害。癌症帶來的傷害很大，但是治癒卻非常困難，因此如何有效的治療癌症是現代最重要的課題。

目前臨床上最常見的癌症治療方式有三種，包括手術摘除[3]、化學治療(chemotherapy) [4]和放射治療(radiation therapy)[5]。手術摘除腫瘤治療對第一期癌症效果顯著，然而若是不能清楚判定腫瘤界線或者腫瘤位置在難以進行手術之處，會導致腫瘤組織無法完全移除，如此將造成癒後不佳及復發機率上升的問題。化學治療是利用藥物殺死癌細胞，通常在癌症擴散後使用，將化療藥物從血管中注入人體內，帶有腫瘤標靶的藥物會隨著血液流到腫瘤組織並殺死癌細胞，但是此方法有嚴重副作用，因為化療藥物也會傷害部分的正常細胞，此外若長期進行化學治療，癌細胞可能會產生抗藥性使治療效果下降[6]。放射治療是利用高能粒子(電子、質子或重粒子)照射腫瘤組織[7]從分子層次破壞癌細胞，此方法常與手術治療合併進行，殺死手術後未被清除的癌細胞，然而此治療方式對正常組織也會造成傷害，尤其是輻射照射路徑上的組織，其受傷程度不亞於腫瘤組織本身。上述三種治療方法是現在臨床上最常見的癌症治療技術，然而還有許多治療方式正在發展，而本研究探討的是利用熱能進行癌症治療。

癌症熱治療(hyperthermia therapy)的概念，在 1860 年代由 William Coley 醫師提出[8]並被應用在臨床癌症治療上。他的癌症病人在感冒高燒後，癌細胞竟然意

外消失，於是開始研究熱能在癌症治療上的應用，經過實驗後發展出 Coley's toxins 治療法[9]，利用細菌發炎時產生的熱能進行癌症治療，然而此技術現今並未得到美國食品衛生管理局(Food and Drug Administration, FDA)認可，所以已經不付存在。於是科學家們開始找尋其他加熱方式，射頻(Radiofrequency)、微波(microwave)、超音波(ultrasound)及雷射(laser)，是目前最廣泛應用的熱源。

射頻治療(radiofrequency tumor ablation, RFTA)是將治療探針伸到腫瘤組織處並通入高頻率的交流電，利用交流電使組織中的電子快速變換方向而摩擦生熱，然而若溫度過高會造成組織碳化降低治療效果。而微波治療(microwave ablation)時，一樣會先將探針伸到腫瘤組織附近，利用電磁波促使腫瘤組織內的水分子產生震盪，進而提高腫瘤組織溫度進行治療，此方法可以應用在大體積的腫瘤治療，但是必須準確控制治療區域，否則會造成正常組織的傷害。高強度聚焦式超音波(high-intensity focus ultrasound, HIFU)加熱治療的技術已經廣泛被應用在腫瘤上，將超音波的焦點置於腫瘤組織處，可以使該區域的組織溫度提高殺死癌細胞，除此之外，也可以協助進行藥物傳遞治療。雷射治療是利用紅外光照射，提高腫瘤組織的溫度[10]，然而人體組織的光熱轉換效率不佳，於是有人加入螢光物質輔助藉此提高光熱轉換效率[11]，但是螢光物質容易產生光分解(bleach)，所以無法應用在臨床治療，近年來奈米金粒子(gold nanoparticles)的發展逐漸成熟，由於其光熱轉換效率高且吸光值可以調控，使得光熱治療(photothermal therapy)成為現在最熱門的研究主題。

光熱治療是一種低侵入性、低副作用且高效率的癌症治療技術[12]，West 和 Lin 的團隊[13, 14]在 2003 年成功的利用近紅外光加熱奈米金粒子進行治療，他們將帶有腫瘤標靶的奈米金粒子(圖 1)，利用靜脈注射的方式送入體循環，等到奈米金粒子累積在腫瘤組織後，再利用近紅外光照射腫瘤組織，由於奈米金粒子表面會產生局部表面電漿共振效應(local surface plasma resonance, LSPR)使其溫度快速

升高，藉此提升腫瘤組織的溫度，當組織溫度高於 42°C 會導致細胞產生凝固性壞死(necrosis)。2006 年 El-Sayed 的團隊[15]成功地在把光熱治療應用在小老鼠身上，他們分別用尾靜脈注射及皮下腫瘤注射兩種方式將帶有標靶的奈米金粒子注入小鼠體內，再利用近紅外光照射腫瘤組織，成功的讓腫瘤組織消失。奈米金粒子是光熱治療的重要媒介，因此腫瘤組織中的奈米金粒子濃度會嚴重影響治療效果，所以如何使奈米金粒子有效的累積在腫瘤組織，便成為重要的課題。

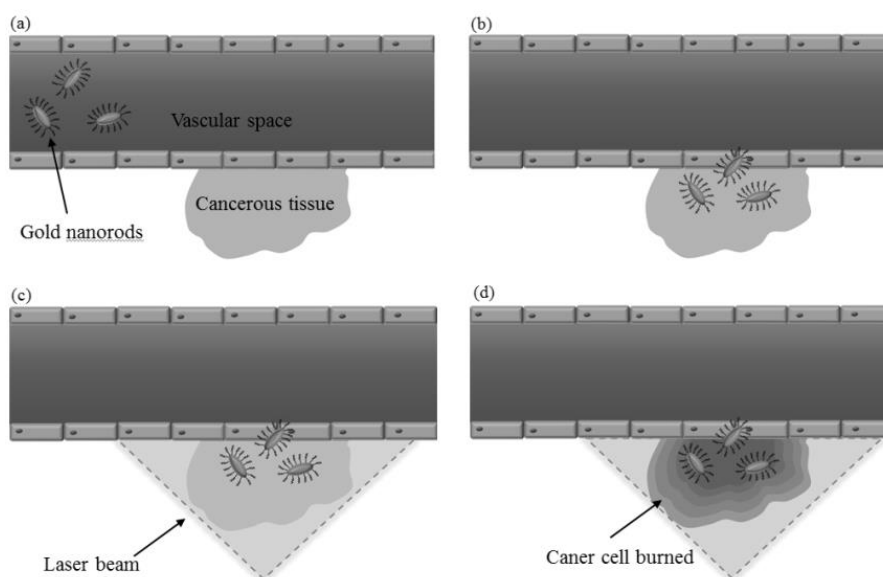


圖 1：光熱治療的作用機制。(a)首先將帶有腫瘤標記的奈米金桿(Gold nanorods, AuNR)注入血管內，(b)等到 AuNR 在腫瘤中聚集後，(c)用近紅外光照射加熱 AuNR，使腫瘤組織溫度上升，(d)由於溫度過高造成癌細胞產生凝固性壞死。

利用超音波對比劑(ultrasound contrast agents)當作載體[16]，將奈米金粒子包覆在超音波對比劑中，除了可以追蹤奈米金粒子的位置，還能夠藉由超音波穴蝕效應(ultrasound cavitation)引發的聲波輻射力(radiation force)提升奈米金粒子的釋放效率，下一章節將針對超音波對比劑及其在治療上的應用加以介紹。



1.2 超音波對比劑

超音波對比劑在 1960 年代第一次應用在臨床心臟診斷上[17]，其形態以微氣泡為主。超音波影像的對比度與聲阻抗(acoustic impedance)有關，組織間聲阻抗差異越大則對比度越強，聲阻抗公式如下：

$$Z = \rho D \quad (1)$$

Z 是聲阻抗值， ρ 是組織密度(density)，D 是聲速(sound velocity)，由於微氣泡內的氣體與血液的聲阻抗差異很大，因此能夠當作超音波對比劑協助臨床診斷疾病。

理想超音波對比劑必須滿足四個條件[18]：無生物毒性、可靜脈注射、不會阻塞血管及循環中穩定，由於微氣泡完全符合這些要求，因此更凸顯了其在超音波對比劑的地位。微氣泡的組成[19]可分為外殼(shell)與內部氣體(gas)兩個部分(圖 2)，外殼可以使用蛋白質(albumin)、脂質(lipid)和聚合物(polymers)三種成分，而氣體則有空氣(air)、全氟烷類(perfluorocarbon)及六氟化硫(sulfur hexafluoride)三種。

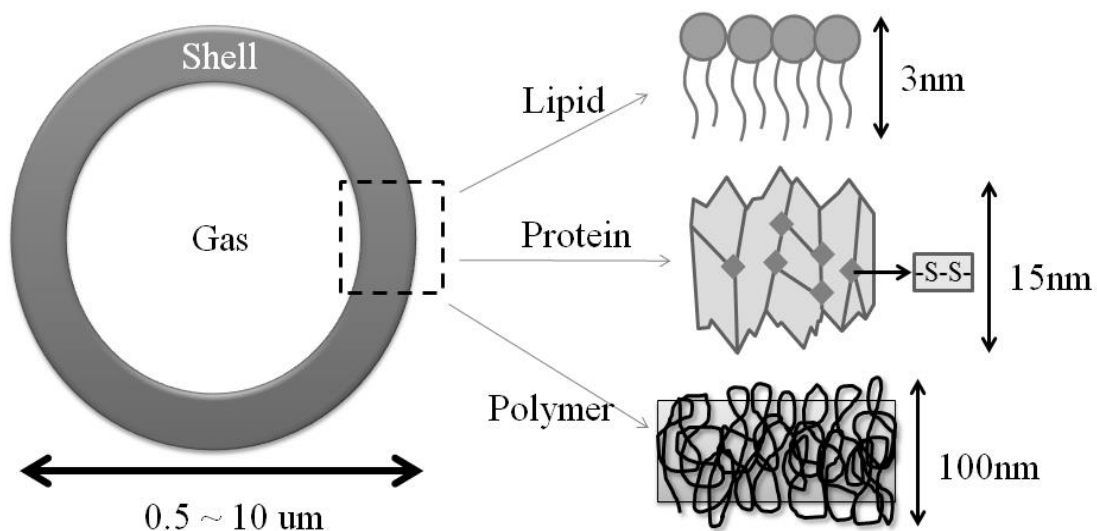



圖 2：基本的微氣泡架構。微氣泡的大小介於 0.5 到 10um 之間，但是體積越小的微氣泡穩定性越差，因此大部分微氣泡都在微米等級。脂質微氣泡的厚度約為 3nm 以凡得瓦力結合；蛋白質微氣泡的厚度約 15 到 20nm 以雙硫鍵結的方式結合；聚合物的微氣泡厚度約 100 到 200nm 以分子聚合的方式結合。



Albunex (GE healthcare)是最早通過美國 FDA 認證的蛋白質微氣泡，其外殼是人類血清白蛋白(human serum albumin, HSA)而裡面包覆的是空氣，體積介於 1 到 15um 之間。然而空氣會微溶於水，因此當微氣泡在體血液中流動時，空氣與血液中的氣體會發生擴散現象造成微氣泡不穩定，所以後來改用 C_3F_8 取代空氣[20]， C_3F_8 的穩定性高、難溶於水且生物相容，因此可以提升微氣泡在體循環的時間。除了應用在診斷上，蛋白質微氣泡也常被用來當作載體協助治療，由於蛋白質本身有雙硫鍵容易與抗原抗體結合，因此容易進行標記適合運送藥物或基因協助治療。脂質微氣泡是利用脂質疏水端(hydrophobic)與親水端(hydrophilic)的特性製作出的對比劑，其外殼是藉由分子間的凡得瓦力(van der waals' force)結合而成，因此脂質微氣泡的彈性較高容易與超音波共振，提供較好的顯影效果，然而其穩定性較差，在體循環內的存在時間最短。聚合物微氣泡是利用單體本身的聚合特性(cross-link)製作而成，由於其外殼結構相對複雜因此穩定性最高，2005 年 Cui 的團隊利用聚合物外殼包覆 C_3F_8 製作出體積 1 到 2um 間的微氣泡[21]，此種微氣泡在兔子血管中可以存在 7 到 8 分鐘。表 1 是現在商用微氣泡的組成及名稱[22]，現代普遍使用脂質包覆全氟碳化合物，原因是此種對比劑的顯影效果較好。

表 1：商用超音波對比劑的組成及名稱。

名稱	上市年份	外殼	氣體
Albunex	1994	蛋白質	空氣
Levovist	1996	脂質	空氣
Optison	1997	蛋白質	C_3F_8
Definity	2001	脂質	C_3F_8
SonoVue	2001	脂質	SF_6
Sonazoid	2006	脂質	C_4F_{10}

治療是微氣泡的另一個重要功能，將其當作載體[23]運輸藥物、基因或奈米金粒子進行治療。奈米金氣泡(gold microbubbles, AuMBs)[24]是將奈米金粒子包覆在蛋白質外殼中，如此不但能夠提供超音波及光聲(photoacoustic, PA)兩種影像，還能夠增強奈米金粒子的釋放效率，進一步應用在光熱治療上。然而微氣泡體積大且穩定度不足，因此在當作載體時無法進行滲出(extravasation)也不能用在長時間治療上，因此研究人員[25]將氣體換成液體製作出穩定度更高且體積更小的液滴(droplet)。

液滴在 1970 年由 Apfel 提出[26]，他利用線圈加熱的方式觀察液滴的氣化現象，但是由於其特性理解有限而且無法控制氣化的狀況因此發展趨緩。近年來 Krifgans 的團隊[27]利用超音波作用液滴藉此控制其氣化行為，其實驗證明當超音波頻率提升被氣化的液滴數目也會增加，除此之外有研究人員混合 C_3F_8 與 C_4F_{10} 做出可以調整氣化閾值的液滴[28]，藉著調整兩種化合物的混合比例達成升降氣化閾值的效果。目前液滴內最常用的物質是 C_5F_{12} ，此化合物常溫常壓下的沸點為 $29^\circ C$ ，但是當 C_5F_{12} 被包覆後，外殼與液體間的表面張力使 Laplace pressure 上升，因此其沸點升高到約 $50^\circ C$ 。Laplace pressure 的公式如下：

$$\Delta P = P_{inside} - P_{outside} = \frac{2\sigma}{r}$$

P_{inside} 是液滴裡的壓力， $P_{outside}$ 是外在環境的壓力， σ 是表面張力， r 代表液滴的直徑。從上述公式可知直徑越小液滴壓力越大(圖 3)沸點也越高[29]。Dayton[30] 和 Fabiilli[31] 等人均成功利用奈米液滴進行藥物釋放治療，由於奈米液滴氣化及破

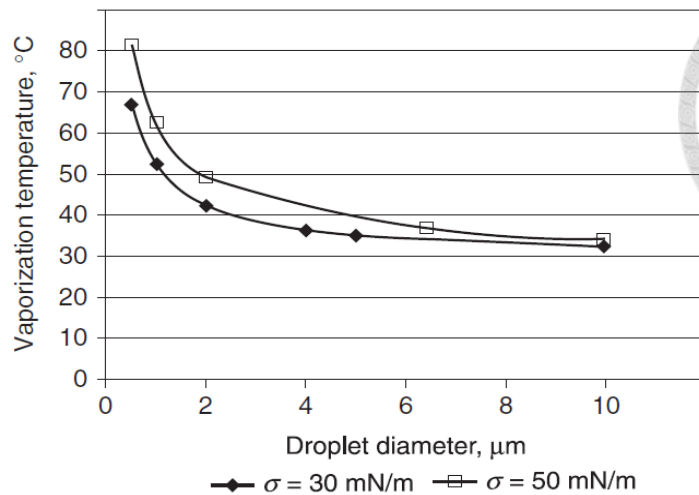


圖 3：液滴直徑與沸點的關係。當液滴直徑越小，液體受的壓力越大，因此沸點也越高。當表面張力是 50mN/m 時，直徑 2 μm 的液滴沸點約 50 $^{\circ}\text{C}$ 。[29]

裂時產生的聲波輻射力比氣泡更強，因此能夠更有效率的釋放藥物。除此之外 Emelianov 的團隊[32]在 2012 年製作出奈米金液滴，利用脈衝雷射(pulse laser)氣化奈米金液滴，可以得到比奈米金粒子高 100 倍的光聲訊號。

超音波對比劑兼具診斷及治療的特性，在利用對比劑進行治療的同時也能夠追蹤其位置，配合超音波穴蝕效應可以提高藥物、基因及奈米金粒子在治療位置的濃度，進而提升治療效果。下一章節將針對穴蝕效應及其在治療上的應用加以介紹。

1.3 穴蝕效應及其治療上的應用

超音波是一種會隨時間變化的機械波(mechanical wave)並以縱波的方式在液體中傳遞，由於正負壓力變化造成微氣泡在液體中生成、脹縮甚至於破裂的過程(圖 4)稱為穴蝕效應[33]。根據微氣泡的變化現象可以將穴蝕效應分成兩類[34]，第一類稱為穩定穴蝕效應(stable cavitation)[35]，意指微氣泡在此聲壓強度下不會破裂，只發生膨脹與收縮的現象，此種效應主要在低聲壓的狀況下發生。第二類稱為慣性穴蝕效應(Inertial cavitation)，當微氣泡膨脹縮小的速度與正負壓力變化無法



同步會引發破裂現象，這種狀況通常在聲壓較高時產生。為了瞭解微氣泡的體積與穩定性的關係 Plesset 和 Mitchel[36]定義了微氣泡的不穩定閾值 $R_{threshold}$ ：

$$R_{threshold} \cong \frac{R_{max}}{10}$$

R_{max} 是微氣泡的最大半徑，由上述公式可知，若微氣泡的脹縮半徑相差 10 倍，就會產生破裂的狀況。

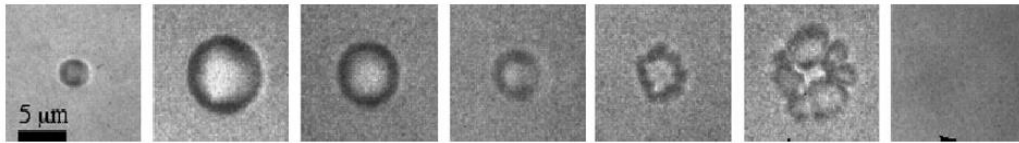



圖 4：穴蝕效應的過程。一開始氣泡進行穩定穴蝕效應，一段時間後由於氣泡體積達不穩定閾值，因此分裂(Fragmentation)。[33]

穴蝕效應在臨床診斷上是一種必須避免的現象，穴蝕效應發生時其強大的聲波輻射力(radiation force)可能會在身體組織中引起生物反應，因此临床上規定醫用超音波之 MI(mechanical index)值須低於 1.9，且必須符合合理抑低原則(as low as reasonably achievable, ALARA)避免穴蝕效應及不良生物效應產生[37]然而從治療的觀點來看，穴蝕效應是一種強而有力的工具，利用此效應進行基因治療[38]、藥物治療及腫瘤治療[39]，可以提高乘載物的運送效率增進治療效果。

近年來科學家利用高強度式聚焦超音波配合液滴增強化學治療的效果[40]，將速溶艾黴素(doxorubicin)包進液滴中，當液滴到達腫瘤時再施以超音波誘發液滴產生穴蝕效應，此時藥物就會被釋放到腫瘤組織中進行治療，此方法可以提升癌細胞 56%的死亡率。然而有研究指出不只有超音波會誘發穴蝕效應，雷射也可以產生光聲穴蝕效應(photo acoustic cavitation)[41]。當雷射照射奈米金粒子時會在周邊的液體中誘發微氣泡，持續提供能量後會使微氣泡破裂，此現象稱為光聲穴蝕效應。2006 年 Murray 的團隊發現[42]，利用雷射加熱奈米金粒子產生氣泡時，若結合超音波輔助可以誘發更多的穴蝕效應產生。



由過去的研究可以了解，超音波合併雷射能夠提升穴蝕效應發生的機會，而液滴相對於氣泡穩定度更高。因此本研究結合雷射、超音波及奈米金液滴，應用到光熱治療上，希望藉由此方法提高奈米金粒子在腫瘤組織的釋放效率，達到提升光熱治療效果的目的。

1.4 研究動機與目標

光熱治療在臨床上有低副作用、高局部傷害及高治療效率的優勢[43]，雖然有人成功利用氣泡當作載體增加奈米金粒子的釋放效率，但是氣泡的穩定性不足使其應用受限，因此我們嘗試利用奈米金液滴取代氣泡進行光熱治療，評估此方法是否會帶來較好的效果。除此之外本研究也合併超音波與雷射共同作用奈米金液滴，希望藉由雷射輔助超音波技術氣化更多的奈米金液滴誘發更強的穴蝕效應，達成提升奈米金粒子釋放效率並增強光熱治療效果之目的。

本研究有兩點假設：第一點是雷射輔助超音波技術可以提升奈米金液滴的氣化能力及穴蝕效應強度。；第二點是奈米金液滴有較高的奈米金粒子釋放效率。過去有研究指出[42]雷射與超音波共同作用奈米金粒子可以誘發更多穴蝕效應，因此我們將此技術應用到奈米金液滴上，希望能夠使奈米金液滴更容易被氣化並誘發更強的穴蝕效應。當奈米金液滴被雷射照射會升溫氣化，而超音波提供的負聲壓能夠降低奈米金液滴內的壓力降低氣化閾值氣化更多奈米金液滴；當奈米金液滴氣化後可以用超音波誘發穴蝕效應，而雷射會讓對比劑產生結構不穩定使穴蝕效應更容易產生，因此我們猜測在雷射輔助超音波作用中(圖 5)雷射負責氣化奈米金液滴並降低穴蝕效應閾值，而超音波負責誘發穴蝕效應並降低奈米金液滴氣化閾值。另外，過去有研究指顯示[25]液滴的穩定度高於氣泡，因此推測將奈米金粒子包進對比劑後也會有相同狀況，而且奈米金液滴有氣化現象，因此其破裂時能合併氣化現象產生更強的穴蝕效應，提升血管及細胞通透性使更多奈米金粒子進

入腫瘤組織。若上述兩個假設均成立，則使用雷射輔助超音波作用奈米金液滴，就能夠釋放出更多的奈米金粒子，提高光熱治療效果。

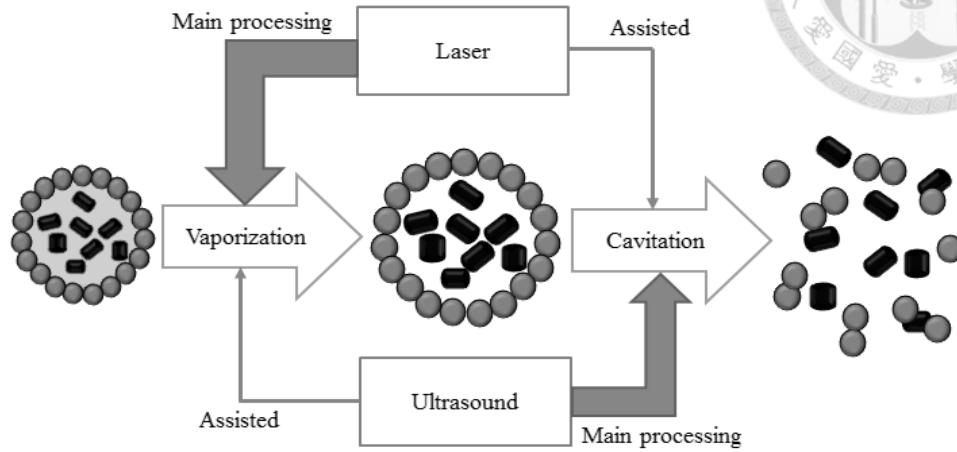


圖 5：雷射與超音波作用機制圖。雷射主要引起氣化效應輔助穴蝕效應，超音波主要引發穴蝕效應輔助氣化效應。

本研究的流程圖如下(圖 6)：首先觀察奈米金液滴在超音波、雷射及雷射輔助超音波下的反應，評估其穩定性及不同作用下的變化；接著量化穴蝕效應強度比較超音波、雷射與雷射輔助超音波三種作用方式對奈米金液滴穴蝕效應強度造成的差異，評估雷射輔助超音波是否能增強奈米金液滴之穴蝕效應；然後比較奈米金液滴與奈米金氣泡在不同作用方式下的破裂比例及吸光值差異，評估奈米金粒子釋放效率之優劣；最後進行細胞毒性測試及小動物實驗確認此方法在光熱治療的效果。

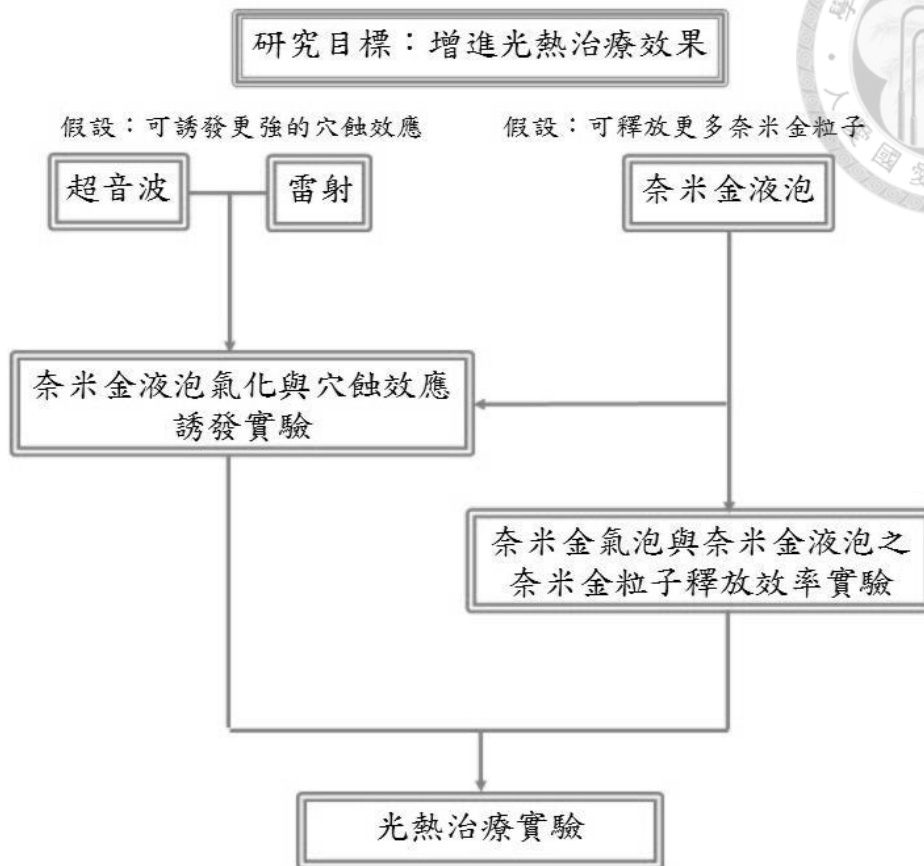


圖 6：研究目標及流程。

1.5 論文架構

本論文第一章概述癌症、光熱治療及超音波對比劑的概念，並簡述超音波穴蝕效應的優缺點及治療上的應用狀況。第二章將介紹各項實驗的流程與方法，包括對比劑的製作過程及特性測試、奈米金液滴氣化及穴蝕效應的誘發與偵測、奈米金粒子釋放效率評估及光熱治療效果評估。第三章將敘述並分析實驗結果。第四章會針對結果進行探討，評估是否達成研究的預期目標。第五章為結論與未來工作。

第二章 實驗材料與方法



2.1 對比劑製作

2.1.1 實驗架構及流程

本研究利用實驗室自製的奈米金液滴(gold nanodroplets, AuND)作為氯化與穴蝕效應的對比劑。製作架構(圖 7)及流程如下：將 20% 的人類血清白蛋白(Octapharma AG, Lachen, Switzerland)與吸收峰值在 808nm 的奈米金桿(gold nanorod, AuNR)以 1:3 的體積比例在放入 2ml 離心管中混合，放在室溫下反應 2 小時並用鋁箔紙避光，再將奈米金-白蛋白混合液用 1:10 的體積比例與磷酸鹽緩衝液(phosphate buffered saline, PBS)、二次水(ddH₂O)或生理食鹽水混合裝入 50ml 離心管中，在冰浴且通入 C₅F₁₂ 氣體的狀況下用超音波粉碎儀(Branson, Danbury, USA)震盪 1 分半鐘，最後把製備完畢的對比劑存放於 4°C 冰箱中冷凝(condensation)，靜置 8 個小時後取出即可得到奈米金液滴。

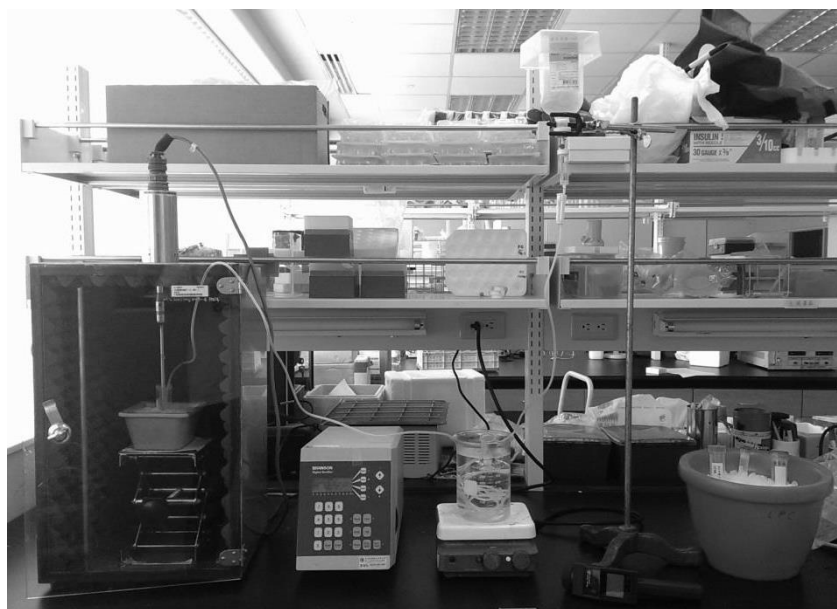


圖 7：此圖為奈米金液滴製作架構之實景。C₅F₁₂ 液體從點滴瓶倒入，經過熱水時氣化，再灌入圖片左方的離心管中。在冰浴且通入 C₅F₁₂ 氣體的狀況下，用超音波粉碎儀震盪後，即可得到奈米金液滴。

C_5F_{12} 在常溫常壓下的沸點為 $29^{\circ}C$ ，為了使其從液體變成氣體，因此使用點滴瓶及加熱盤，將 C_5F_{12} 液體從點滴瓶中倒入，利用高度造成的壓力差使液體往離心管方向流動，當 C_5F_{12} 液體經過 $50^{\circ}C$ 熱水時會快速氣化，如此便能將氣態的 C_5F_{12} 灌入離心管中製作出奈米金液滴。

奈米金液滴製作完成後，接著進行氣化現象偵測確定製作出的對比劑是液滴，並用離心分析法觀察不同離心條件下液滴的粒徑變化，最後用升溫評估法確定奈米金粒子的包覆狀況及光熱治療的潛力。

2.1.2 氣化現象偵測

氣化是液滴獨有的過程，當液滴中的液體吸收了足夠的熱能溫度會上升，當升高的溫度達到沸點且克服 Laplace pressure，液滴會瞬間變為氣泡。將製作完成的奈米金液滴置於血球計數器上(圖 8)，並利用烤燈提高環境溫度，從顯微鏡上觀察其形態變化。

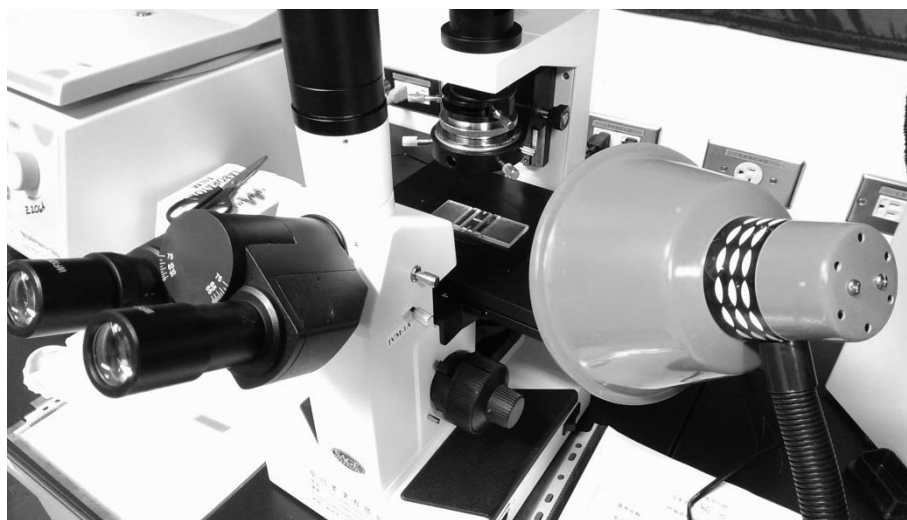


圖 8：此圖為氣化現象偵測之實景。利用烤燈提高環境溫度，觀察奈米金液滴的氣化現象。使用血球計數計的優點是，可以快速評估奈米金液滴大小及數量變化。



2.1.3 離心篩選測試

在不同的實驗架構下必須使用不同粒徑大小的奈米金液滴，然而並沒有相關的文獻做此分析，因此利用離心機分別以 600、900、1200 及 1500rpm 四種不同轉速離心 3 分鐘，再將沉澱物與懸浮物分開，沉澱物以 1ml ddH₂O 回溶後再以相同速度離心三分鐘，接著一樣取沉澱的部分以 1ml ddH₂O 回溶，最後用 Coulter MultiSizer III (Beckman-Coulter, Hamburg, Germany) 評估粒徑濃度變化；而懸浮物的部分，在離心後直接利用 Coulter MultiSizer III 觀察其粒徑濃度變化。

2.1.4 升溫現象偵測

奈米金液滴的製程是參考本實驗室過去的奈米金氣泡(nanogold microbubble, AuMB)製作程序，為了確定奈米金粒子有被包進液滴中，因此利用雷射加熱奈米金液滴觀察對比劑的溫度上升變化，藉此確定奈米金粒子的包覆狀況。將奈米金液滴以 1500 rpm 離心三分鐘，接著取沉澱物以 500ul 的二次水回溶，去除沒有被包覆的奈米金粒子，然後利用連續雷射加熱 3 分鐘並觀察奈米金液滴、液滴及水的升溫變化差異；接著用孔徑 300nm 大小的濾紙過濾離心後的奈米金液滴懸浮液、奈米金液滴沉澱液及被超音波作用後的蛋白質碎片，測量濾液的吸光值評估沒有被包進奈米金液滴的奈米金粒子在升溫上造成的影響。

2.2 氣化與穴蝕效應實驗

2.2.1 實驗架構及流程

氣化與穴蝕效應實驗是在塑膠仿體中進行。塑膠仿體在超音波下無散射訊號，因此適合用來當作仿體進行超音波體外試驗。仿體製作過程如下：先取等體積的塑膠硬化劑(Plastic Hardener, M-F Manufacturing Co., Inc.)和塑膠軟化劑(Plastic

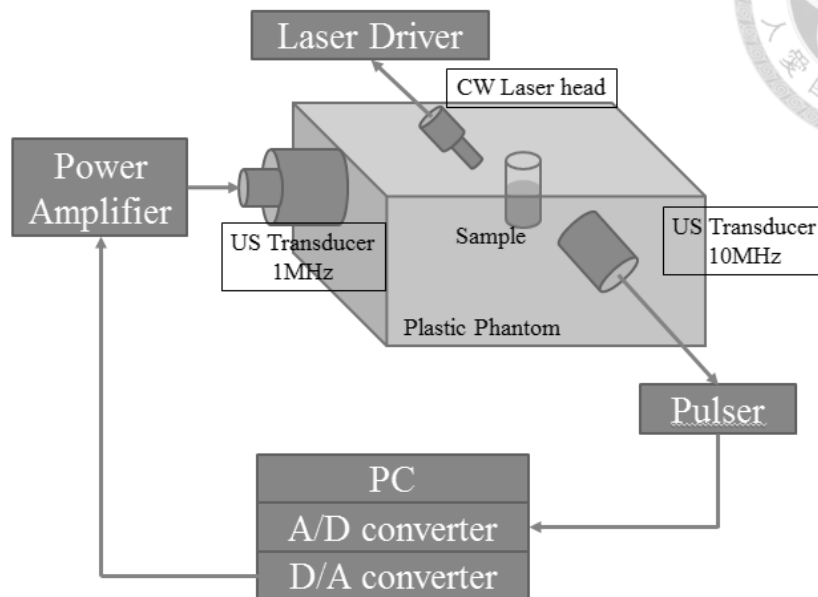
Softner, M-F Manufacturing Co., Inc.) 均勻混合，接著將混合物放到加熱盤上以 300 °C 加熱到澄清透明狀再倒入模具中，等待其冷卻凝固後即製作完成。

實驗架構及實景如下頁圖 9。仿體中央有一個直徑約 4mm，深度約 20mm，體積約 250ul 的小洞用來裝填對比劑。仿體左方為 1MHz 的超音波線聚焦探頭(V302, Panametrics-NDT, Waltham, MA, USA)，其聚焦範圍涵蓋小洞中段。仿體下方為超音波接收探頭，其頻率為 10MHz (V312, Panametrics-NDT, Waltham, MA, USA) 為了避免直接收到發射探頭的超音波訊號，因此兩探頭間以 90 度相交於對比劑裝填處。對比劑裝填處的左上方有波長 808nm 的連續雷射用來加熱對比劑，其照野範圍與超音波聚焦範圍相同。

超音波訊號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)，可藉由軟體 (LabVIEW5.1, National Instruments, Austin, TX, USA) 控制其超音波中心頻率、脈衝波長、發射週期及脈衝重複頻率。波形從數位類比轉換卡輸出後經過功率放大器 (RF power amplifier, 250A250A, Amplifier Research, Souderton, Pennsylvania, USA) 放大，接著驅動 1MHz 探頭髮射訊號。在接收訊號時是利用 10MHz 探頭，訊號被接收以後，再經過前置放大器 (Pulser/Receiver 5072PR, Panametrics-NDT, Waltham, MA, USA) 放大，最後由類比數位轉換卡 (analog-to-digital converter, CompuScope 12100, GaGe Applied Technologies, Lachine, QC, Canada) 接收存取，並利用 Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA) 計算穴蝕效應劑量的強度。



(a)



(b)

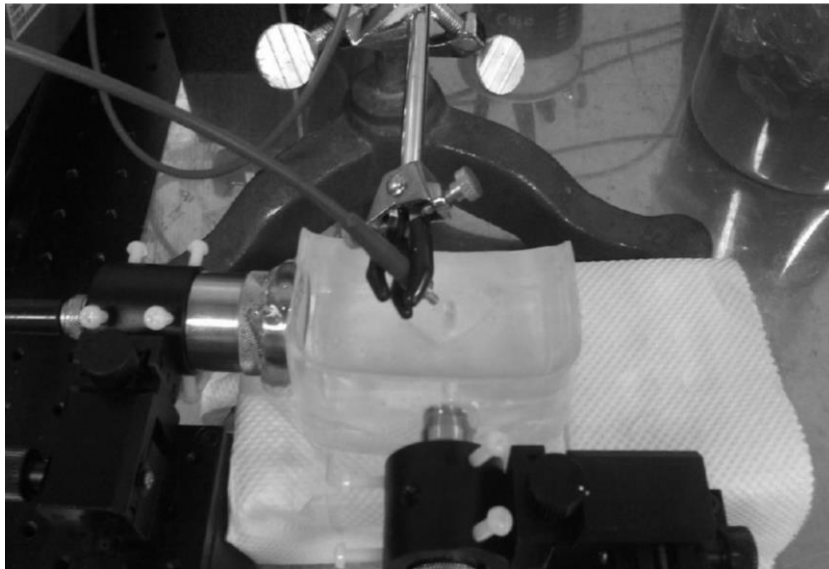


圖 9：此為氣化與穴蝕效應實驗之架構及實景。(a)利用 D/A 卡控制超音波輸出合併連續雷射作用對比劑，再將收到的訊號以 A/D 卡接收進一步處理。(b)塑膠仿體有透光性，因此可以將雷射架在對比劑裝填處左上方作用，使其作用方向與超音波相同。

當進行 B-mode 影像觀察實驗時，會把下方的接收探頭換成商用超音波探頭 (10L and LOGIQ 500, GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin, USA) 直接從影



像上觀察奈米金液滴的氣化與破裂現象。

2.2.2 氣化效應之誘發與偵測

2.2.2.1 B-mode 影像觀察法

藉由超音波 B-mode 影像可以直接觀察奈米金液滴在雷射、超音波及雷射輔助超音波下的氣化狀況。將對比劑裝填在仿體中間的小洞，再利用超音波或雷射作用 5 分鐘，在作用的過程中同時藉由商用超音波探頭觀察影像變化。如此便能直接觀測到奈米金液滴的氣化現象，然而在影像上難以進行定量，所以進一步採用粒徑測定法做分析。

2.2.2.2 粒徑測定法

利用 MultiSizer 直接測量奈米金液滴在雷射、超音波及雷射輔助超音波作用後的粒徑變化狀況，評估其不同作用下的氣化現象差異。先取奈米金液滴原液以 900rpm 離心 3 分鐘，並取沉澱物以 1ml ddH₂O 回溶，藉此篩選出粒徑大於 1 μ m 的奈米金液滴進行實驗。接著使用 MultiSizer 測量未作用前奈米金液滴的粒徑大小，再分別用超音波、雷射及雷射輔助超音波作用三分鐘，最後用 MultiSizer 再次測量粒徑濃度變化，評估奈米金液滴粒因氣化產生的徑濃度差異。

2.2.3 穴蝕效應之誘發與偵測

2.2.3.1 B-mode 影像觀察法

B-mode 影像可以直接觀察奈米金液滴受超音波、雷射及雷射輔助超音波作用下的反應，從影像上評估是否有穴蝕效應產生。將奈米金液滴放進仿體中並分別使用超音波、雷射及雷射輔助超音波作用三分鐘，同時藉由商用超音波探頭觀察



影像變化狀況，評估穴蝕效應是否發生。然而此方法無法定量穴蝕效應，因此進一步利用粒徑濃度測定法及穴蝕效應劑量分析法評估。

2.2.3.2 粒徑濃度測定法

利用 MultiSizer 直接測量奈米金液滴在雷射、超音波及雷射輔助超音波作用前後的濃度變化，藉此評估穴蝕效應的狀況。將奈米金液滴以 900rpm 離心 3 分鐘，取沉澱物回溶至 1ml ddH₂O，篩選出平均粒徑大於 1 μ m 的奈米金液滴進行實驗，如此能降低儀器最低測量下限(700nm)造成的誤差。粒徑大小濃度測定法可以定量評估穴蝕效應，利用此方法能夠了解破裂數量的差異但是無法確定破裂強度，因此進一步使用定量穴蝕效應劑量評估穴蝕效應強度。

2.2.3.3 定量穴蝕效應劑量分析法

藉由計算穴蝕效應劑量，可以定量分析穴蝕效應強度變化，將超音波的時域信號轉換成頻域信號，再取出含有穴蝕效應的成分進一步分析計算，即可得到穴蝕效應劑量(Inertial cavitation dose, ICD)。定量穴蝕效應的實驗方式有兩種，第一種是主動評估：利用同一顆探頭收發超音波訊號再計算穴蝕效應劑量，雖然這種實驗方式操作簡便，但是有高強度的原訊號干擾；另一種方法是被動評估：利用兩顆不同頻率的探頭分別收發超音波訊號，由於少了原訊號的干擾，因此可以得到更精確的結果，本研究即是利用被動評估法進行量測。

穴蝕效應發生的時間非常短暫(圖 10)，當對比劑破裂時會產生一個激突訊號(spike)(圖 10-a)，將其進行傅立葉轉換可得到一段寬頻訊號(圖 10-b)，使用適當頻率範圍的探頭擷取出訊號，並將範圍內的數值取方均根(Root Mean Square, RMS)，再依時間繪圖(圖 10-c)，最後取面積的積分(圖 10-d)即可得到一段時間內的穴蝕效應劑量(Inertail cavitation dose, ICD)，將此數值減掉水在相同實驗狀況下的 ICD

值，即可得到 differential ICD(dICD)，本研究採用此數值作為穴蝕效應的量化指標。

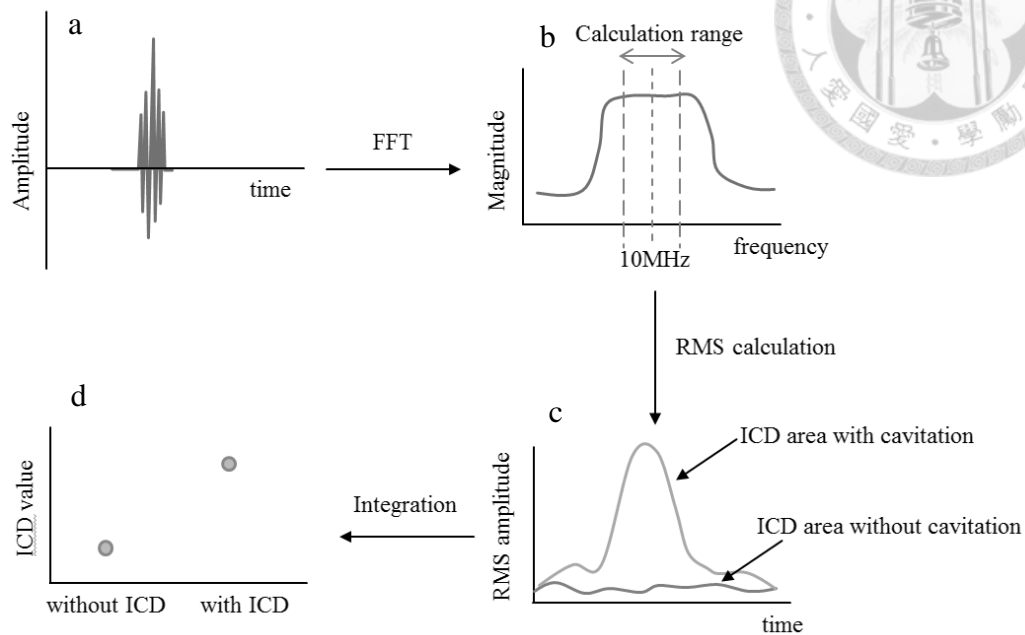


圖 10：定量穴蝕效應原理示意圖。(a) 穴蝕效應在頻域上是激突訊號，(b)經過傅立葉轉換可得到寬頻訊號，(c)取寬頻訊號的均方根值，並根據時間做圖，(d)取方均根-時間圖的面積積分，即可得到 ICD

奈米金液滴穴蝕效應會隨著超音波的發射參數，雷射強度及奈米金液滴大小等因素而變化。本研究針對實驗室自製的奈米金液滴與聲場強度、發射週數、雷射強度及奈米金液滴濃度四種變因進行探討，以降低實驗的複雜度，並且利用離心法篩選出 1 μ m 以下的奈米金液滴進行實驗，使結果可用於細胞及小動物實驗參考。

2.2.3.3.1 聲場強度

藉由調整數位類比轉換卡的輸出電壓及放大器的輸出功率改變聲場大小，觀察穴蝕效應的強度差異。有研究指出[44]當聲場強度提高時穴蝕效應的強度也會隨之上升，本實驗中分別使用 0.6, 1.4, 3.1 及 5.1 MPa 的聲壓強度，量測雷射輔助奈米金液滴穴蝕效應劑量在不同聲壓強度下的變化，其中超音波中心頻率為



1.023MHz 連續雷射強度為 2.6W，超音波的脈衝重複頻率為 100Hz，。

2.2.3.3.2 發射週數

利用 LabVIEW 調整超音波的發射週數觀察穴蝕效應的強度變化。發射週數是影響穴蝕效應的重要參數之一，當發射週數越高穴蝕效應強度應該也越強[45]。本實驗分別用 5, 10, 15, 及 20 個發射週數評估穴蝕效應強度差異，所使用的聲壓強度為 3.1MPa，中心頻率 1.023MHz，脈衝重複頻率為 100Hz，連續雷射強度 2.6W。

2.2.3.3.3 雷射強度

本研究使用的連續雷射波長為 808nm，一般組織在此波長下的吸收效率不高且雷射穿透深度較好[46]，因此選擇 808nm 進行實驗輔助穴蝕效應並同時進行光熱治療。過去研究發現超音波和脈衝雷射合併作用奈米金粒子會增加穴蝕效應發生的機會[47]，因此我們想要了解連續雷射是否也有這樣的現象，希望能藉此增強穴蝕效應強度。

調整雷射強度在 0, 1.6, 2.6 和 3.7W 下測量其穴蝕效應劑量，所使用的聲壓強度為 3.1 MPa，中心頻率 1.023MHz，脈衝重複頻率為 100Hz，發射週數 20。

2.2.3.3.4 對比劑濃度

過去研究顯示對比劑濃度越高穴蝕效應越強，但是當對比劑濃度超過一定程度後穴蝕效應強度會開始下降[48]。本實驗用 10^8 、 2.5×10^8 、 5×10^8 及 10^9 顆/毫升，四種濃度觀察奈米金液滴在雷射輔助超音波下的穴蝕效應強度變化差異，實驗中使用的聲壓為 3.1MPa，中心頻率 1.023MHz，脈衝重複頻率為 100Hz，發射週數 20。



2.3 奈米粒子釋放效率實驗

2.3.1 對比劑配置

利用離心法篩選出粒徑介於 1~2 μm 間的奈米金液滴及奈米金氣泡，並用稀釋法使其濃度相近。奈米金氣泡的製程與液滴相同，差別在於氣泡內的液體為 C_3F_8 且震盪時間為 2 分鐘。取冷凝後的奈米金液滴用 900rpm 離心 3 分鐘，吸走液體部分留下沉澱物，再用 1ml 的 ddH₂O 回溶，接著以 900rpm 離心 3 分鐘，吸走液體留下沉澱，再用 1ml 的 ddH₂O 回溶，即可得到粒徑大小約為 1.6 μm 的奈米金液滴。奈米金氣泡則是用 900rpm 離心 3 分鐘，留下上部懸浮層(cake)並加入 1ml 的 ddH₂O 回溶，接著再用 900rpm 離心 3 分鐘，一樣取上部懸浮層並加入 1ml 的 ddH₂O 回溶，即可篩選出粒徑大小約為 1.8 μm 的奈米金氣泡。完成粒徑調整後，接著根據當下的對比劑濃度加入適當體積的 ddH₂O 進行稀釋，即可得到濃度及大小相近的奈米金氣泡與奈米金液滴進行比較實驗(圖 11)。

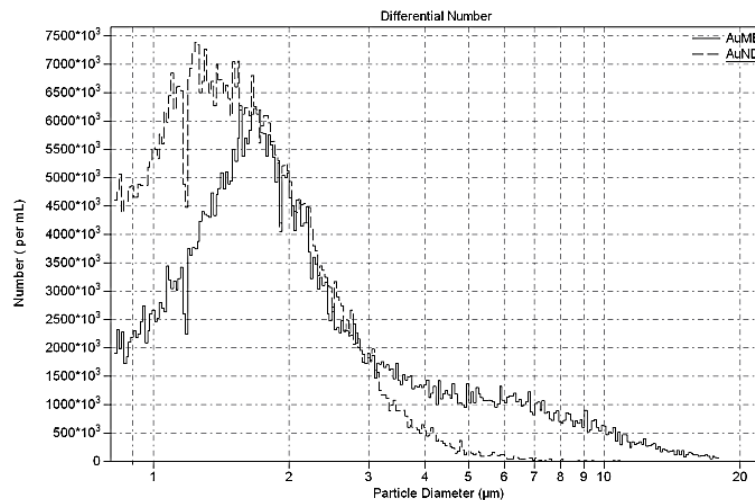


圖 11：奈米金氣泡與奈米金液滴之粒徑濃度分布圖。利用離心法及稀釋法篩選出粒徑濃度相近的奈米金液滴及奈米金氣泡，進行比較實驗。

2.3.2 實驗架構及流程

本實驗是在一塊凝膠仿體中進行，凝膠仿體的性質及聲速與水相近，因此沒有散射信號且適合用來模擬人體組織進行超音波體外試驗。仿體的製作方法如下：

取適當體積的二次水，以 2% 的重量百分比秤取瓊脂粉末，兩者混合攪拌後加熱至澄清透明狀接著倒入模具中，等到冷卻後再依據實驗需要做切割修整即可完成。

實驗架構如(圖 12)。仿體中央有一個可放入 2ml 離心管的小洞，連續雷射從仿體右上方射入，照野範圍涵蓋離心管中段。1MHz 線聚焦探頭至於仿體左側，聚焦處與雷射照野範圍重疊，超音波發射的過程與 2.2.1 節敘述相同。由於凝膠仿體透光性不如塑膠仿體，因此調整照射的位置以減少光能衰減。



圖 12：此為比較實驗架構之實景，為了降低雷射在仿體中的衰減，因此將其位置調整到仿體右上方。

2.3.3 破裂比例評估法

藉由離心及稀釋篩選出相同大小濃度的奈米金液滴及奈米金氣泡，再使用 Coulter MultiSizer III 測量奈米金液滴及奈米金氣泡的初始大小濃度，接著分別使用超音波、雷射及雷射輔助超音波作用奈米金液滴及奈米金氣泡，作用結束後再次使用 MultiSizer 測量對比劑濃度變化，藉此評估破裂比例差異，進一步推測奈米金粒子釋放效率差別。此方法是以間接的方式評估奈米金粒子釋放效率，優點是快速且直觀，缺點是每一顆對比劑內的奈米金粒子數量未必相同，可能會產生誤差，因此進一步利用吸光值評估法進行測定。



2.3.4 吸光值評估法

將奈米金液滴及奈米金氣泡的大小濃度調整相近以後，接著用超音波、雷射及雷射輔助超音波三種方法對奈米金液滴及奈米金氣泡作用，將作用後的對比劑以孔徑 300nm 大小的玻璃纖維濾紙(GF-75, Advantec, Japan)過濾，由於奈米金粒子的大小約 40nm，而奈米金液滴及奈米金氣泡的大小約 1.7 μ m，因此當對比劑破裂後，就可以用從濾液中取得奈米金粒子與部分對比劑碎片，接著利用 MultilabelReader(PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA)測量濾液在 808nm 下的吸光值，評估不同作用下奈米金氣泡與奈米金液滴的奈米金粒子釋放效率差異。

2.4 光熱治療實驗

2.4.1 體外細胞實驗

2.4.1.1 實驗架構及流程

細胞實驗是動物實驗的前測，因此實驗條件會盡量與動物實驗相同，為了避免奈米金液滴體積過大使小動物產生氣栓塞，因此本實驗使用體積較小的奈米金液滴。將奈米金液滴以 1500rpm 離心 3 分鐘，接著將懸浮液吸起放到新的離心管中，即可得到平均粒徑小於 1 μ m 的奈米金液滴，而此實驗之架構與 2.3.2 相同。將細胞及奈米金液滴放到離心管中，再以超音波、雷射及雷射輔助超音波作用觀察細胞存活率差異。

2.4.1.2 細胞培養及細胞數計算方式

本實驗所使用的細胞是 BNL 1ME A.7R.1 肝癌細胞，由於其生長快速且容易培養，因此選擇此種細胞進行實驗。將細胞置於細胞培養角瓶(flask)中培養，培養液



成分為 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium GIBCO, Grand Island, NY, USA)、10%的胎牛血清 (fetal bovine serum, GIBCO) 與 1%的抗生素 (penicillin)。實驗前先用胰蛋白酶切下細胞，離心後利用血球計數器計算細胞數量[49]，接著平均分裝到 2ml 離心管中，每個離心管內約有 10^6 顆細胞。

血球計數器上有一個邊長為 3mm 的正方形大格子(圖 13)，大格子內再平均分成 9 個中格子。計數方式有三種，第一種是只計算最中間格子內的細胞數；第二種是計算四個角落的總細胞數再除以四；第三種是計算全部格子內的細胞數再除以九。本實驗採用的是第二種方式，因為第一種方式誤差太大，第三種方式太耗費時間。細胞計算公式如下：

$$\frac{\frac{\text{數到的細胞數目}}{\text{格子數}} \times 2}{10^{-4}} = \text{細胞總濃度(顆/毫升)}$$

因為計算細胞時會用等體積的台盼藍(trypan blue)染色，因此得到平均每個中格的細胞數後要乘上兩倍，又由於每個中格的體積是 10^{-4} 毫升所以在經由單位換算後就能得到每毫升有多少顆細胞，每一個離心管都會重複計算四次取平均值，降低人為誤差。

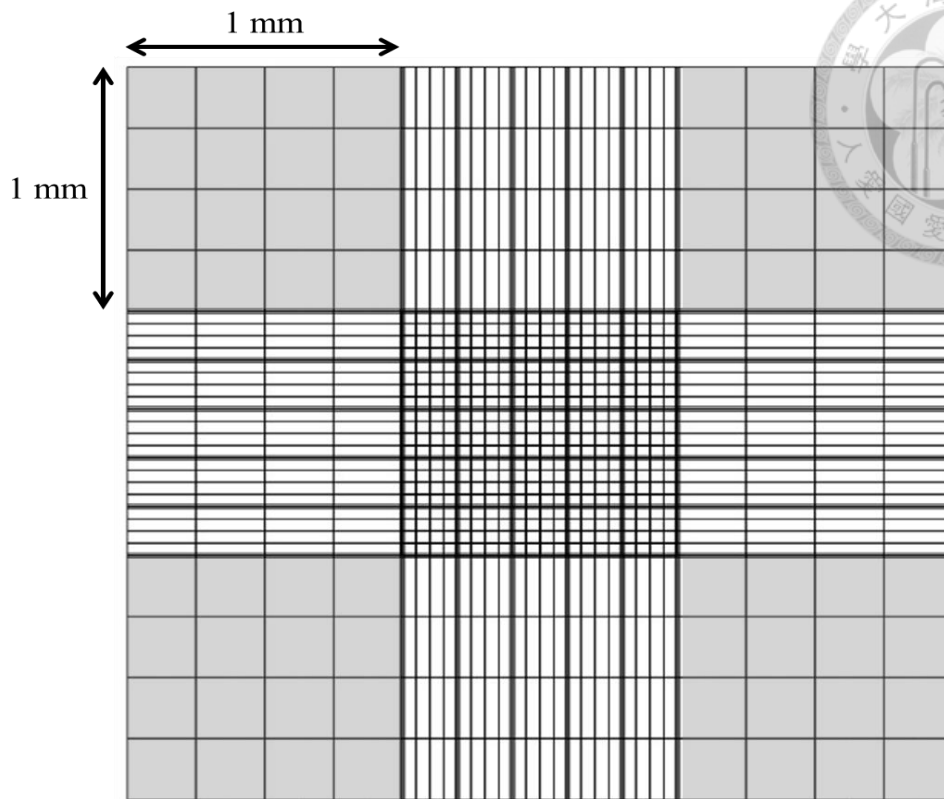


圖 13：血球計數器分格子圖片。從顯微鏡下可以看到血球計數器上的方格，本實驗所採用的方式為計算淺色區域內的細胞總數再除以四，接著帶入公式計算出細胞總濃度。

2.4.1.3 體外細胞實驗

先將細胞分成有對比劑與無對比劑兩組，有對比劑組的離心管中包含奈米金液滴及細胞，而無對比劑組的離心管只包含細胞。接著再把每一組分成 4 組(表 2)：控制組、超音波組、雷射組、雷射輔助超音波組，每一組有 10^6 顆細胞，而奈米金液滴與細胞的數量比是 1:200。實驗前用血球計數器確認每一組的細胞初始數量，接著用超音波或雷射作用。超音波組施予 3.1MPa 的超音波作用三分鐘，雷射組施予 2.6W 的連續雷射作用三分鐘，雷射輔助超音波組施予 3.1MPa 的超音波及 2.6W 的連續雷射同時作用三分鐘，完成作用後再使用血球計數器計算剩下的細胞數量並計算細胞存活率，藉此評估雷射與超音波對細胞的傷害性及奈米金液滴加入後對是否會有治療效果。

表 2：細胞實驗組別及作用方式

細胞實驗組別	有對比劑		無對比劑	
	內容物	作用方式	內容物	作用方式
控制組	細胞+ AuND	無作用	細胞	無作用
超音波組	細胞+ AuND	打超音波	細胞	打超音波
雷射組	細胞+ AuND	打雷射	細胞	打雷射
雷射輔助 超音波組	細胞+ AuND	同時打雷射 及超音波	細胞	同時打雷射 及超音波

2.4.2 小動物體內實驗

2.4.2.1 實驗架構及流程

本實驗使用的是 BALB/c 品種的小白鼠，先在小鼠背部注射約 10^6 顆 BNL 1ME A.7R.1 腫瘤細胞，在種入腫瘤三周後再進行光熱治療實驗。

為了使超音波及雷射可以聚焦在相同位置，因此利用快速成形系統 (Rapid prototyping system, EDEN350™, Objet Geometries, Rehovot, Israel) 製作出超音波雷射共焦架構(圖 14)，架構高度為 5 公分與超音波聚焦深度相同，超音波與雷射呈約 50 度角相交於架構底部藉此達成共焦。1MHz 超音波探頭置於架構上方，雷射頭置於架構右側邊，架構底部用保鮮膜封緊且裡面裝滿 ddH₂O 讓超音波可以順利傳導，除此之外架構下部有三個開口用來確認治療位置，超音波與雷射的發射來源皆與 2.1.2 相同。

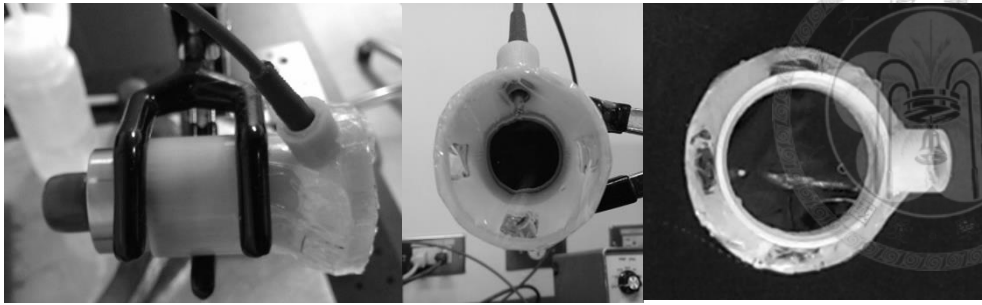


圖 14：超音波雷射共焦架構圖，從左到右分別是側面、下往上，上往下三種觀測方向。

2.4.2.2 雷射輔助超音波光熱治療體內實驗

實驗前將老鼠腫瘤附近的毛剃除以便利利用超音波觀察及進行治療，接著使用高頻超音波系統掃描腫瘤影像，接著將 10^8 顆奈米金液滴以皮下注射的方式打入腫瘤組織，接著使用雷射輔助超音波技術進行治療，最後再掃一次腫瘤影像，觀察治療前後的影像變化。實驗時使用的超音波中心頻率在 1MHz，發射週數 20，聲壓強度 3.1MPa，而連續雷射的強度為 2.6W，作用時間為 3 分鐘。

第三章 實驗結果



3.1 奈米金液滴製作及特性評估

3.1.1 粒徑及濃度

利用 Zetasizer 及 Multisizer 合併評估奈米金液滴的濃度及平均粒徑大小。Zetasizer 雖然能夠量測到粒徑小於 1 μ m 的對比劑，但是只能得到粒徑分布比例，而 Multisizer 雖然能精確測量對比劑的數量，但是最小測量下限是 700nm，因此結合兩者結果即可評估出奈米金液滴的粒徑大小濃度。

從 Zetasizer 的粒徑比例圖可知(圖 15)，700nm 以上的液滴大約占全部的 15%，而 Multisizer 測得此範圍內的液滴數量約是 2×10^9 顆/毫升，因此奈米金液滴濃度大約有 10^{10} 顆/毫升。

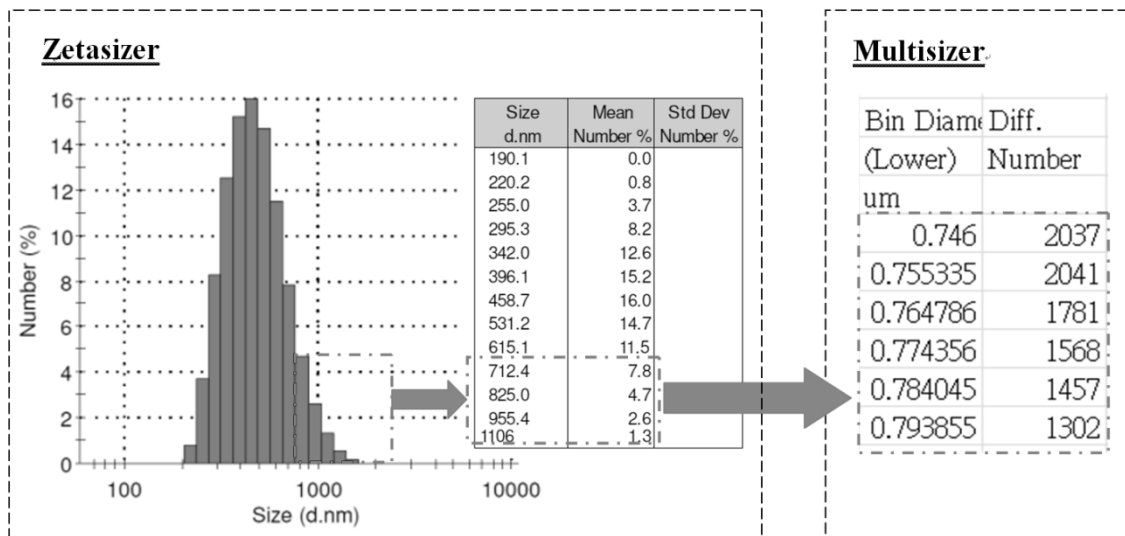


圖 15: 奈米金液滴粒徑濃度測量結果。左邊是 Zetasizer 的粒徑分布圖，可以得到粒徑大於 700nm 的比例，接著比對 Multisizer 在此區域的數量，就可以推得原本的奈米金液滴濃度。



3.1.2 氣化能力

氣化是奈米金液滴的重要特性之一，因此完成奈米金液滴製備後立即使用顯微鏡觀察其是否有氣化現象，藉此確定製備出液滴。從顯微鏡的影像上可以觀察到許多外殼明顯的圓形物體(圖 16-a)，這些圓球形的東西就是奈米金液滴。利用血球計數器的邊框當作標準，一個小格的長度是 50 μm ，因此視野內較清楚的奈米金液滴大約是 5 μm 左右，由於尚未離心處理，因此視野下的液滴體積較大。接著使用烤燈提升血球計數器周邊溫度，當溫度上升至 50 $^{\circ}\text{C}$ 時可以看到對比劑氣化(圖 16-b)甚至破裂，當液滴氣化變成氣泡後，在顯微鏡下有類似同心圓的影像且其體積可達 15 μm 。再與過去文獻資料中的影像比較[50]，可以確認我們做出的對比劑是液滴。

過去文獻指出液滴氣化後體積會快速膨脹至原本的 2 到 5 倍[51]，此特性的優點是可以得到很好的超音波顯影效果，缺點是過大的氣泡會引發血管氣栓塞，所以如何控制液滴氣化後的粒徑變成實驗時必須重視的問題，雖然液滴氣化後的體積無法控制，但是我們能藉由調整液滴的初始粒徑，避免其氣化後產生過大的氣泡。因此接下來我們使用離心分析法，找出不同粒徑大小的奈米金液滴。

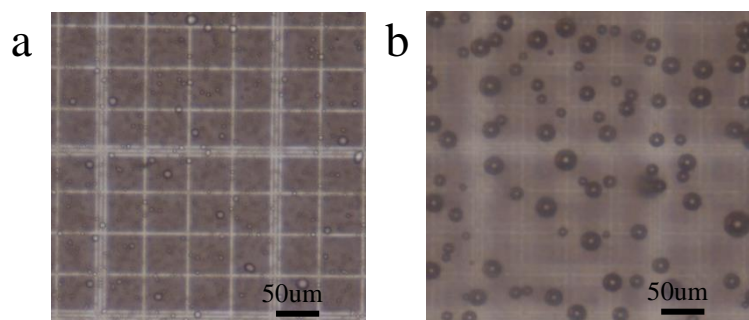


圖 16：此圖是奈米金液滴及其氣化後的顯微鏡影像。(a)尚未氣化前的液滴邊緣清晰內部乾淨；(b)變成氣泡後邊緣明顯感覺較立體，內部有同心圓的影像產生。



3.1.3 離心分析

為了降低氣栓塞的機會且不同實驗架構所需的奈米金液滴大小不同，因此必須篩選出需要的粒徑進行實驗。 C_5F_{12} 的密度比水高，離心後奈米金液滴會沉澱在離心管底部，因此只要調整轉速就能得到不同體積的液滴。

將奈米金液滴以不同離心速度處理，再將沉澱物與懸浮物分開測量，可以得到兩個結果。觀察不同離心速度下的懸浮液(圖 17)，當重複使用同一組奈米金液滴從低轉速到高轉速進行離心後，可以發現後一次的濃度都比前一次減少約 20%，因此若用體積較小的奈米金液滴可使用的濃度較低，除此之外，利用 1500rpm 離心後，可以使體積大於 1 μm 的奈米金液滴少於 10%，如此便能有效降低氣化後產生栓塞的機會。

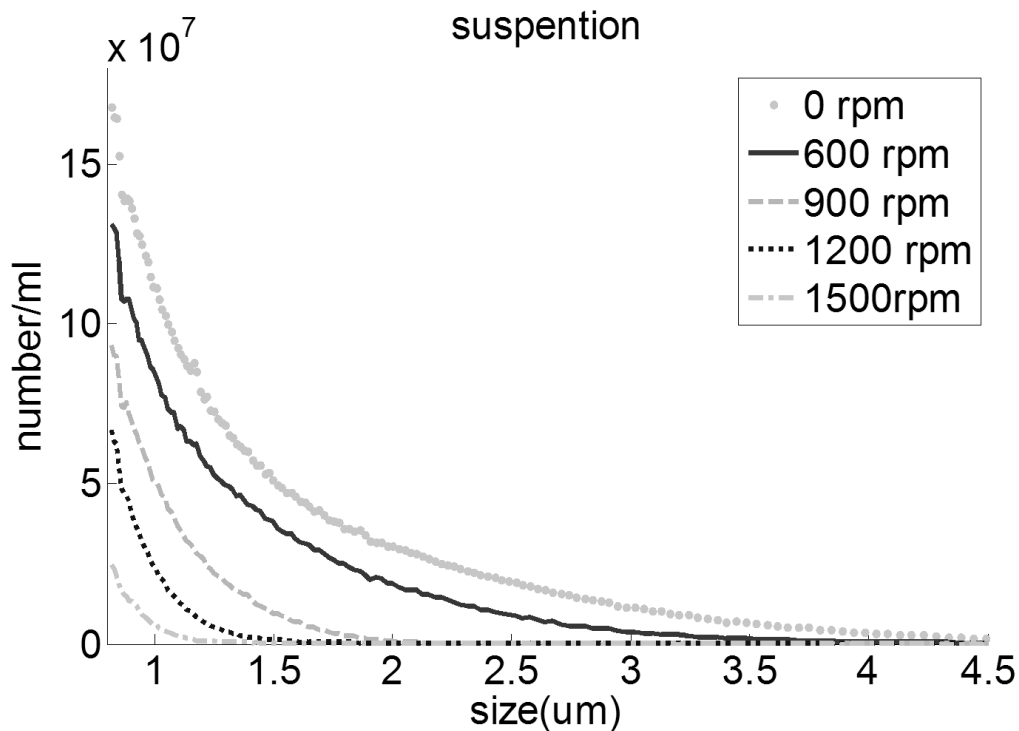


圖 17：懸浮之奈米金液滴粒徑濃度圖。每一次離心後的濃度，都比前一次減少 20%；當離心速度達到 1500rpm 時可以使粒徑小於 1 μm 的奈米金液滴占總量的 90% 以上，藉此降低氣栓塞產生的機會。



接著觀察沉澱的部分(圖 18)，每一組結果都用同樣的條件離心兩次，再測量粒徑分布狀況，從結果可以觀察到離心速度越快，得到的液滴粒徑越小，此數據可以當作後續實驗的離心條件參考。

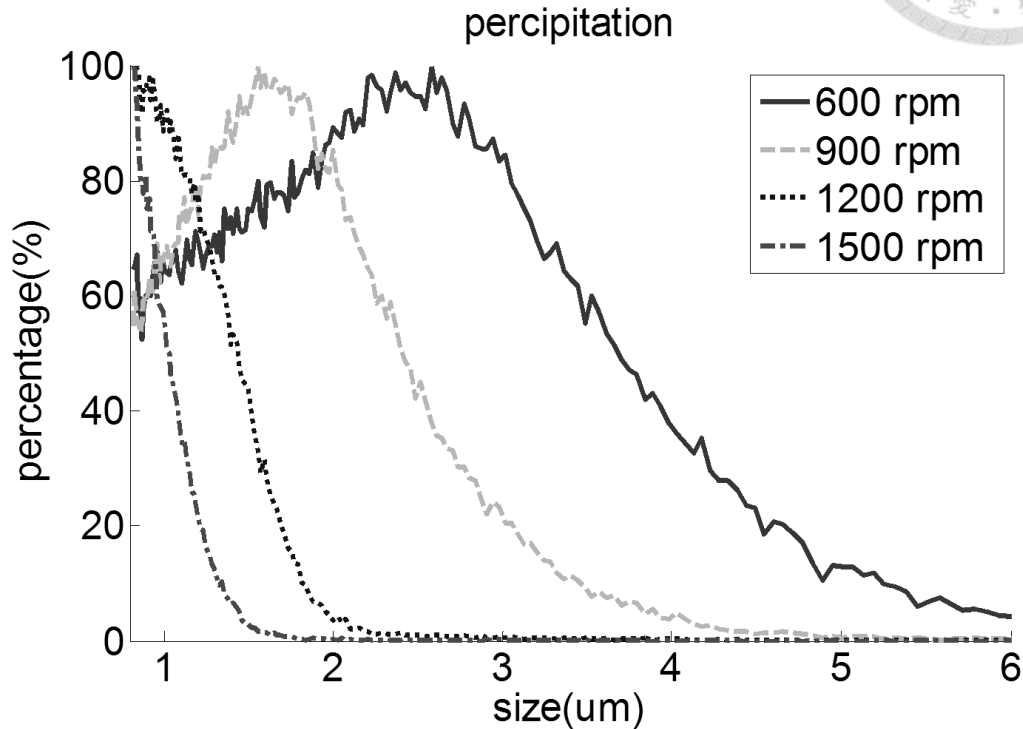


圖 18：沉澱之奈米金液滴粒徑分布圖。用 600rpm 離心，平均粒徑約 2.8um；用 900rpm 離心，平均粒徑約 1.8um；用 1200rpm，平均粒徑約 1um；用 1500rpm 平均粒徑小於 1um。

離心不只能分離出不同粒徑的奈米金液滴，也可以減少自由奈米金粒子在溶液中的濃度，由於奈米金液滴製備時未必能將所有的奈米金粒子全部包覆，因此會有一些自由的奈米金粒子在溶液中，雖然這些奈米金粒子可以促進溫度上升，但是如此一來便會造成實驗上的誤差，導致我們無法確定升溫是奈米金液滴造成，還是自由的奈米金粒子造成。因此接下來進一步分析奈米金液滴是否有包裹奈米金粒子，及自由奈米金粒子對升溫造成的影響。



3.1.4 升溫效率評估

為了確認液滴是否有包覆奈米金粒子，因此利用雷射加熱奈米金液滴觀察其升溫狀況並比較奈米金液滴、一般液滴及水三種樣本的升溫變化差異。從結果(圖 19)可以發現奈米金液滴的升溫效果明顯，在 2 分半鐘內即升高約 20°C，相較於奈米金液滴，一般液滴及水在雷射的照射下並沒有明顯的升溫變化。從此結果可以確定本實驗室的液滴中確實有奈米金粒子，然而在當進行細胞及動物實驗時無法去除奈米金液滴內沒有被包覆的奈米金粒子，因此必須進一步考慮這些自由的奈米金粒子對升溫造成的影響，於是進一步使用吸光值配合升溫變化評估進行觀測。

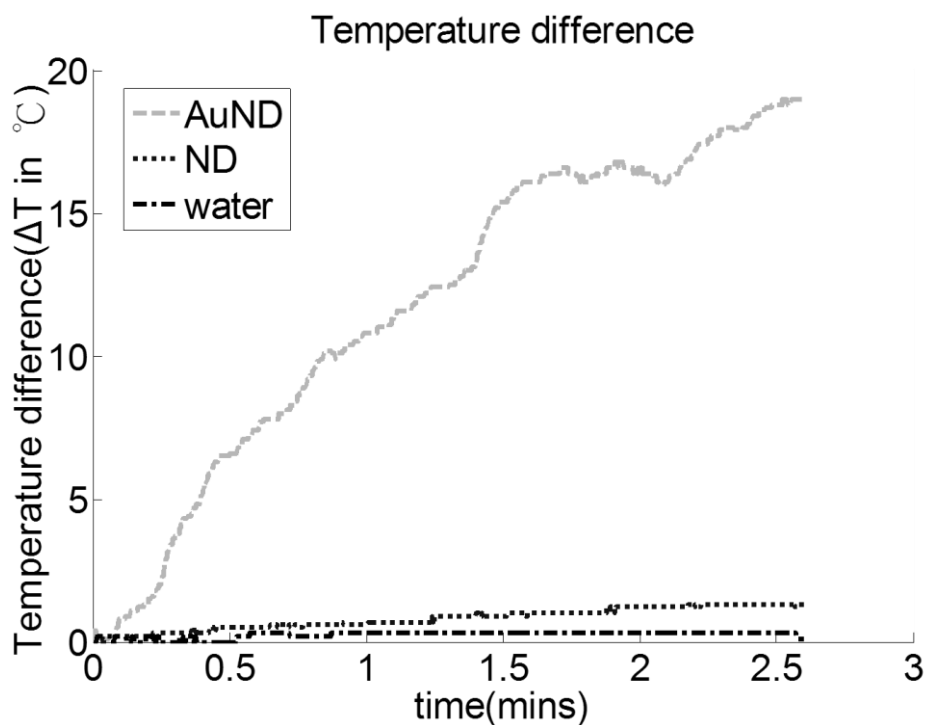


圖 19：升溫變化圖。水與沒有包覆奈米金的液滴升溫變化都非常小，而包覆奈米金的液滴則有非常好的升溫效果。

為了瞭解沒有被包覆的奈米金粒子對升溫變化造成的影響，因此將懸浮液濾液、沉澱液濾液與碎片的吸光值和奈米金粒子的濃度標準曲線比較(圖 20)，可以觀察到蛋白質碎片的吸光值(0.038)接近背景值(0.03)，因此蛋白質碎片造成的誤差可



忽略，而離心後沉澱物及懸浮液中沒有被包覆的奈米金粒子濃度約為10%及15%，然而其升溫變化高於標準曲線的結果，這表示奈米金粒子的包覆效率很高，且加熱後的升溫變化主要是被包覆的奈米金粒子造成。

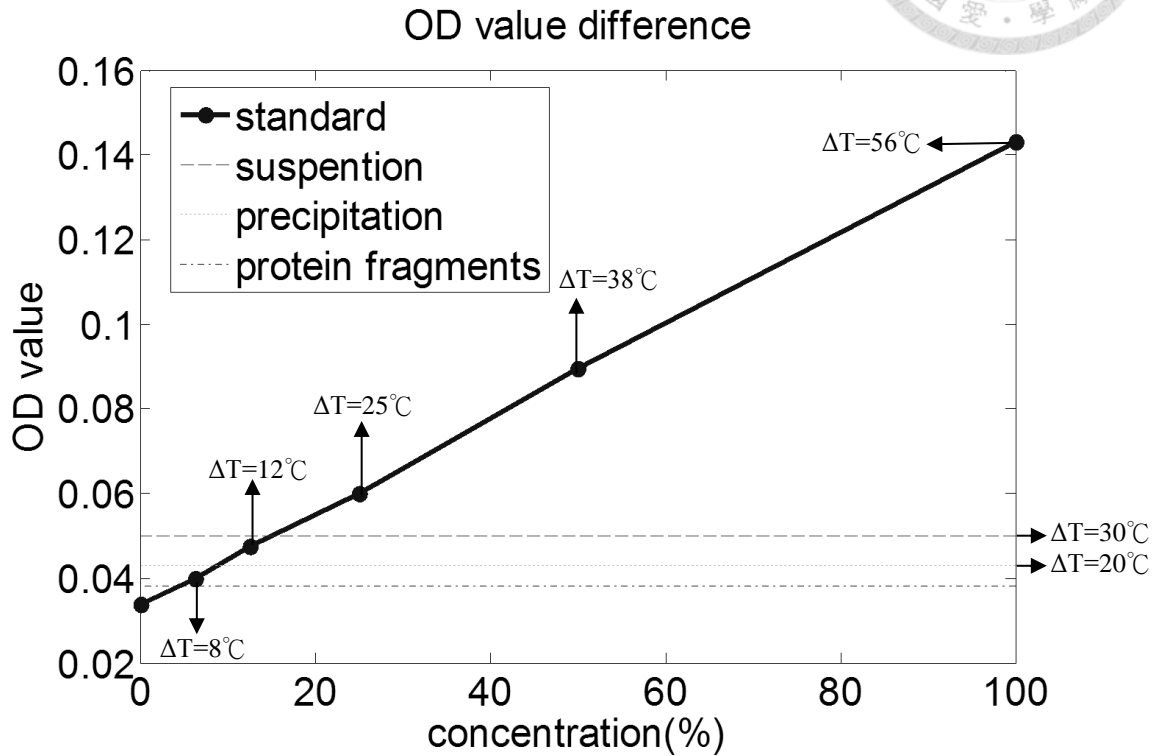


圖 20：吸光值升溫變化圖。從此圖可以觀察到沒有被包覆的奈米金粒子對升溫的影響很低，代表奈米金粒子的包覆效率很高且加熱後的升溫變化主要是被包覆的奈米金粒子造成。

3.2 雷射輔助奈米金液滴氣化與穴蝕效應

3.2.1 B-mode 影像觀察

本研究第一步先利用超音波 B-mode 影像觀察奈米金液滴在超音波、雷射及雷射輔助超音波下的變化。從結果可以發現，在沒有超音波或雷射作用時(圖 21-a)，影像中沒有明顯的對比產生，代表體積小於 1 μ m 的奈米金液滴在此狀況下的顯影效果不佳。當利用超音波作用 5 分鐘(圖 21-b)，可以看到一團白色霧狀的影像且其

從作用後 1 分鐘開始重複出現及消失直到關閉超音波，由於氣泡在超音波影像會顯示為白色對比，因此推測奈米金液滴被超音波作用後發生氣化現象，接著又因為穴蝕效應破裂，這代表單獨使用 3.1MPa 的超音波作用，可以氣化並擊破奈米金液滴；接著單獨使用雷射作用奈米金液滴 3 分鐘(圖 21-c)，可以發現仿體上方產生很明顯的影像對比變化，代表有大量的液滴變成氣泡，因此 2.6W 的雷射可以有效的氣化液滴；當合併超音波及雷射同時作用(圖 21-d)，可以發現其影像對比度高於只打超音波低於只打雷射，因此推測大量地奈米金液滴被雷射氣化後，接著又被超音波誘發穴蝕效應而擊破，因此顯影效果明顯低於單獨用雷射但是高於單獨用超音波。

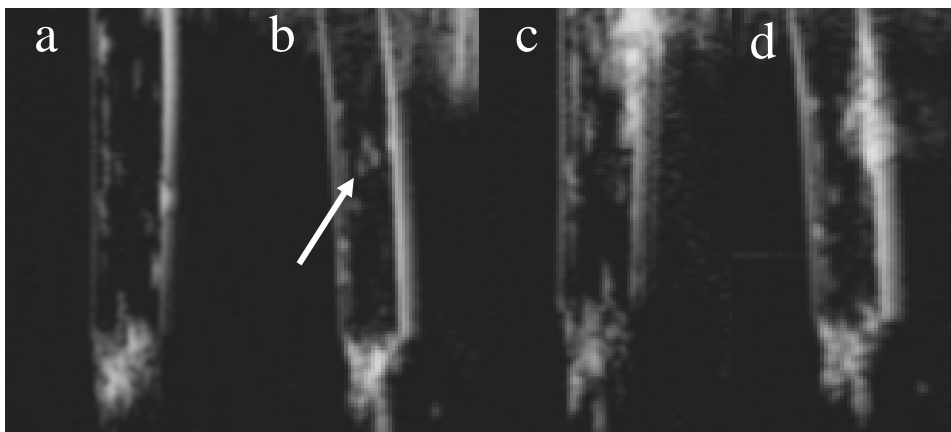


圖 21：觀察不同作用狀況下奈米金液滴的反應。(a)當沒有任何作用時，無法觀察到奈米金液滴，(b)當使用雷射作用 3 分鐘後可以看到些微的氣化與穴蝕效應現象(箭頭處)，(c)利用雷射作用 3 分鐘，會有明顯的氣化效應產生，(d)當合併超音波及雷射，確實可以有效的氣化並擊破奈米金液滴

從 B-mode 影像上可以確認雷射的氣化能力比超音波高很多，而超音波能夠有效的誘發氣化後的奈米金液滴產生穴蝕效應。然而從影像上只能觀察到變化的現象，不能定量氣化造成的粒徑差異及穴蝕效應強度變化，因此接續利用粒徑濃度分析及定量穴蝕效應劑量分析法評估。



3.2.2 粒徑濃度分析

經過 Multisizer 量測後可以發現(圖 22)奈米金液滴在超音波作用下的破裂比例約 15%，在雷射作用下的破裂比例為 20%，而合併超音波及雷射作用後，破裂比例可以提升到 40%，這代表結合雷射輔助超音波技術確實可以明顯提高奈米金液滴的破裂數量，除此之外，奈米金液滴單獨被雷射作用比單獨被超音波作用破裂比例更高，為了瞭解雷射作用較有效率的原因進一步分析不同粒徑下的破裂比例。

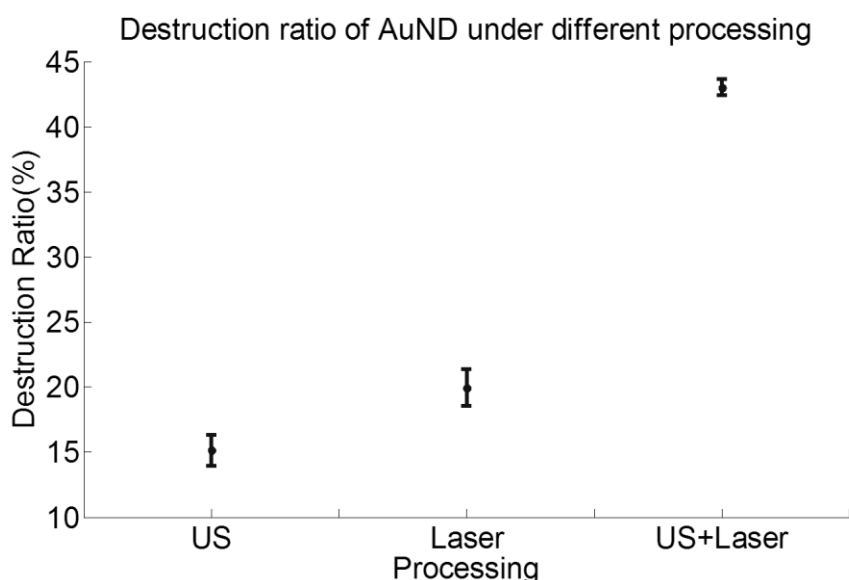


圖 22：不同作用之奈米金液滴濃度破裂比例圖。利用雷射輔助超音波技術，可以使最多的奈米金液滴破裂，而單獨用雷射作用比單獨用超音波作用，誘發更多的奈米金粒子穴蝕效

將奈米金液滴以粒徑及破裂比例作圖(圖 23)，發現單獨使用超音波作用時，3 μ m 以上的奈米金液滴破裂比例較高，這代表奈米金液滴的體積越小，越難利用超音波誘發穴蝕效應；而單獨使用雷射作用時，雖然大於 3 μ m 的奈米金液滴破裂比例與超音波類似，然而小於 3 μ m 的破裂比例卻比較高，可能是因為大體積的奈米金液滴破裂後，奈米金粒子被釋放出來，促使原本體積小的液滴膨脹並氣化，使得原本不會破裂的奈米金液滴也跟著破裂，因此總破裂比例較只用超音波作用高。當使用雷射輔助超音波作用後，可以很明顯看到綜效的現象，不管在何種粒

徑下破裂比例都很高。

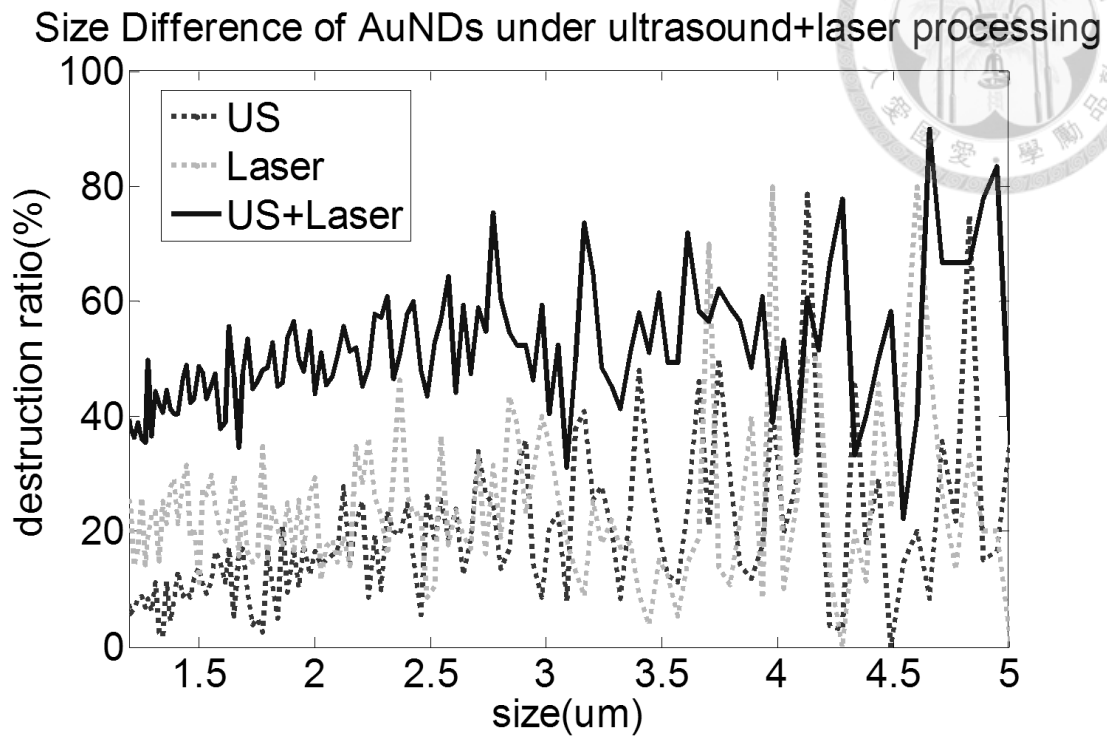


圖 23：不同作用之奈米金液滴粒徑破裂比例圖。分析粒徑變化，可以觀察到超音波只對體積大的奈米金液滴有作用，雷射在體積小的奈米金液滴也有作用，當合併兩者後有明顯的綜合效果。

使用粒徑濃度分析法進行評估可以了解奈米金液滴氣化前後的體積變化及穴蝕效應造成的濃度差異，但是無法定量評估穴蝕效應強度，因此進一步使用 dICD 評估不同參數下的穴蝕效應強度。



3.2.3 聲壓 vs dICD

將奈米金液滴以 1500rpm 離心三分鐘，取懸浮液進行穴蝕效應劑量實驗。觀察不同聲壓下奈米金液滴的 dICD 值差異(圖 24)。藉由調整數位類比轉換卡的輸出能量及放大器的功率，改變探頭的聲壓強度，可以觀察到聲壓上升時奈米金液滴的 dICD 也跟著上升。

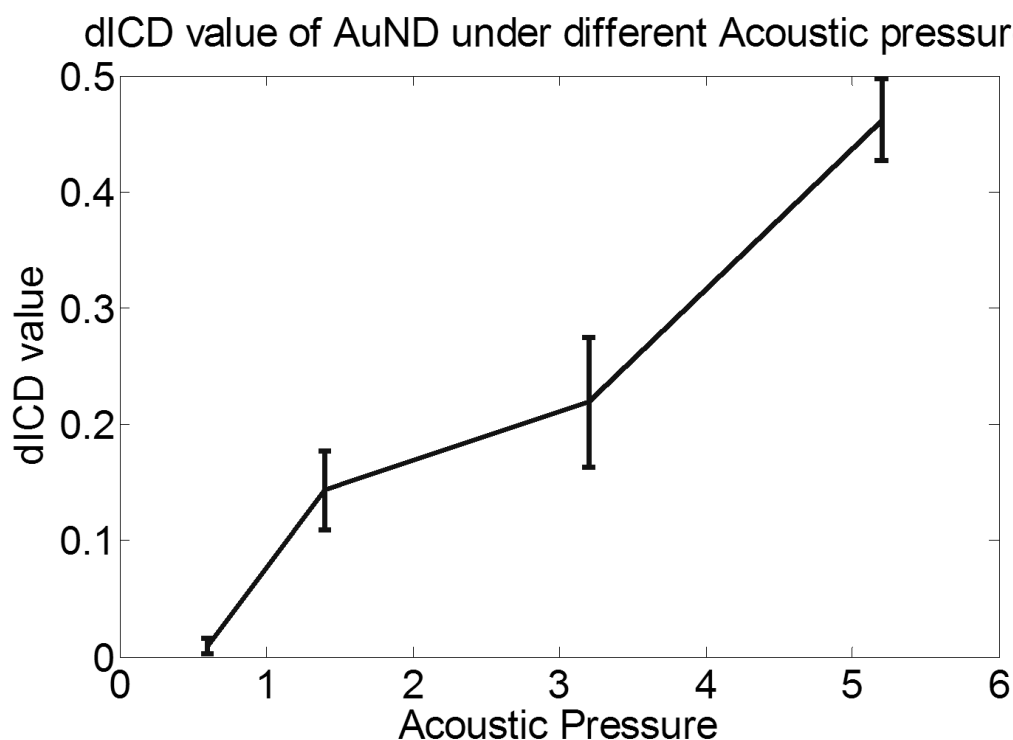


圖 24：聲壓與 dICD 之關係。調整聲壓強度觀察 dICD 質的變化，可以觀察到聲壓強度越高，所引起的 dICD 強度也越高。



3.2.4 發射週數 vs dICD

發射週數是影響穴蝕效應的重要因素，從實驗結果(圖 25)可以觀察到發射週數上升誘發dICD值也越強。當增加發射週數時，超音波作用奈米金液滴的時間也會增加，使奈米金液滴的膨脹收縮次數提高，造成其更不穩定引起更強的穴蝕效應。由於電腦的接收限制，因此將最高的發射週數定為20個，根據此實驗結果我們將後續實驗的發射週數定為20個，確保實驗可以得到最強的穴蝕效應，以產生最佳的釋放效率。

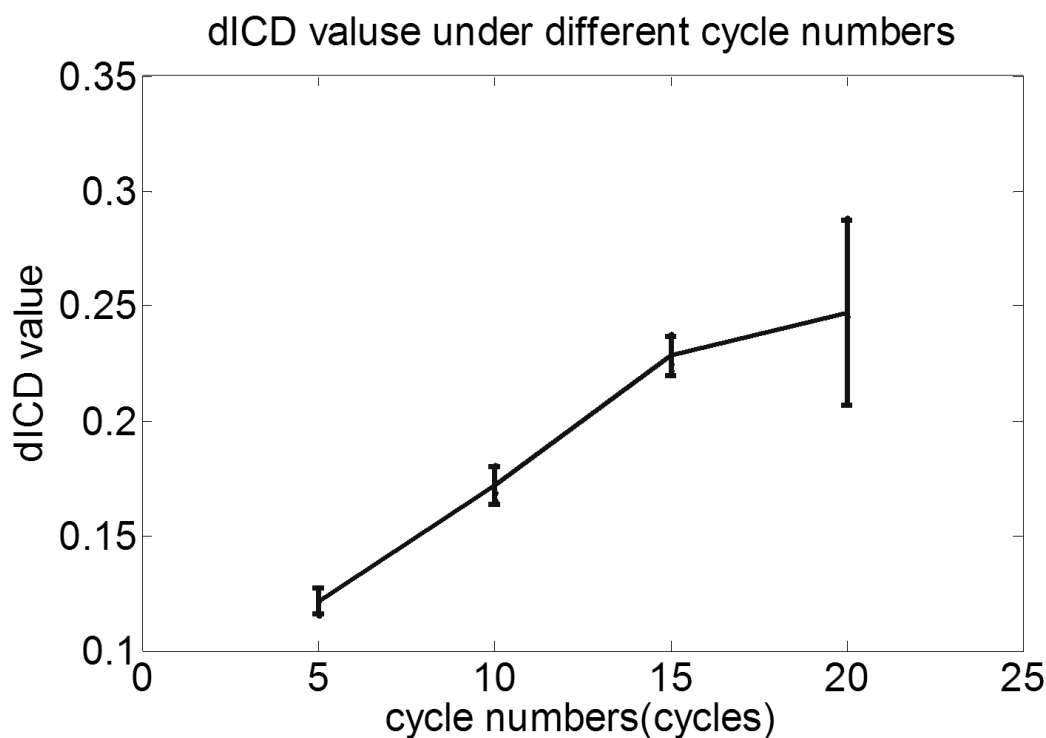


圖 25：發射週數與 dICD 之關係。調整發射週數觀察 dICD 質的變化，可以觀察到發射週數越多，dICD 強度也越高。



3.2.5 雷射強度 vs dICD

藉由調整不同雷射輸出強度，觀察dICD與雷射能量的關係。從結果(圖 26)可以發現雷射能量上升穴蝕效應強度也跟著上升，但是相較於不同聲壓或發射週數造成的差異，改變雷射強度對dICD造成的變化較不明顯。除此之外，比較沒有雷射(0W)與有雷射作用下的dICD值差異，可以發現有雷射時穴蝕效應強度明顯增強，可見合併超音波及雷射確實能誘發奈米金液滴產生更強的穴蝕效應。由於雷射強度超過2W以後，穴蝕效應的上升幅度不明顯，因此我們將後續實驗的雷射條件定為2.6W。

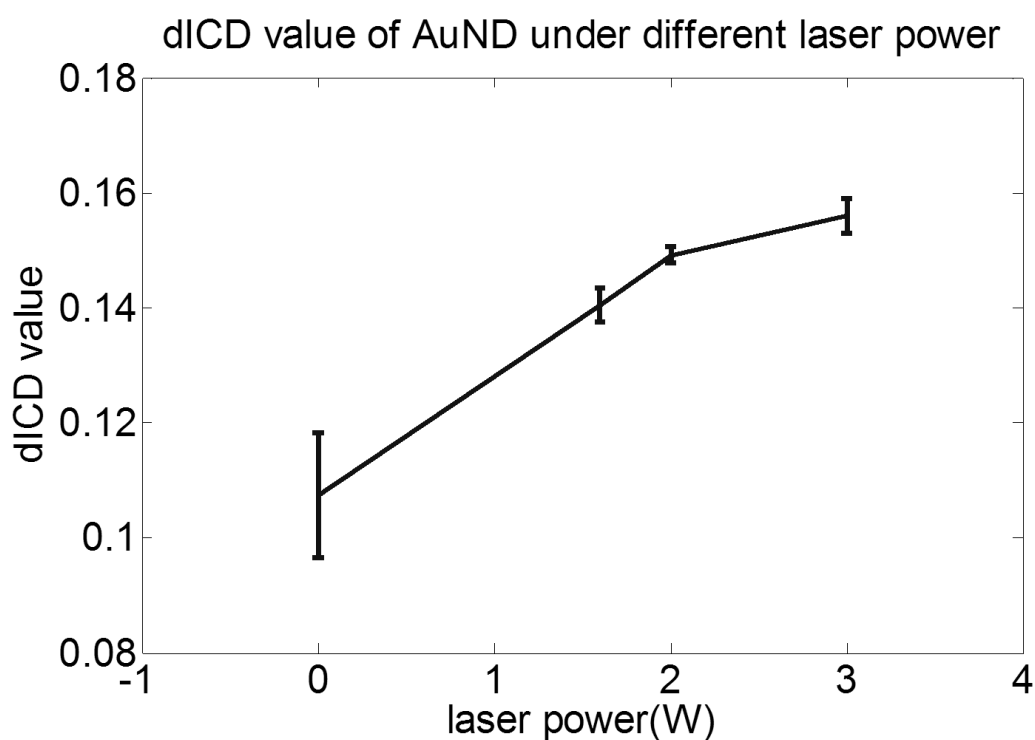


圖 26：雷射強度與 dICD 之關係。雷射強度越強 dICD 值也越高，比較有無雷射的 dICD 值，可以明顯看到雷射合併超音波的穴蝕效應強度差異。



3.2.6 濃度 vs dICD

最後藉由調整奈米金液滴濃度觀察 dICD 的變化，過去研究指出對比劑濃度越高穴蝕效應強度也會越強，但是由於屏蔽效應的影響，當對比劑濃度上升到一定程度時，其穴蝕效應強度會開始下降。然而從我們的結果中(圖 27)並沒有觀察到屏蔽效應，可能原因有兩個，第一個是濃度不夠高，另一個是雷射輔助超音波進行奈米金液滴穴蝕效應可以有效地把液滴擊破，因此沒有明顯的屏蔽效應。

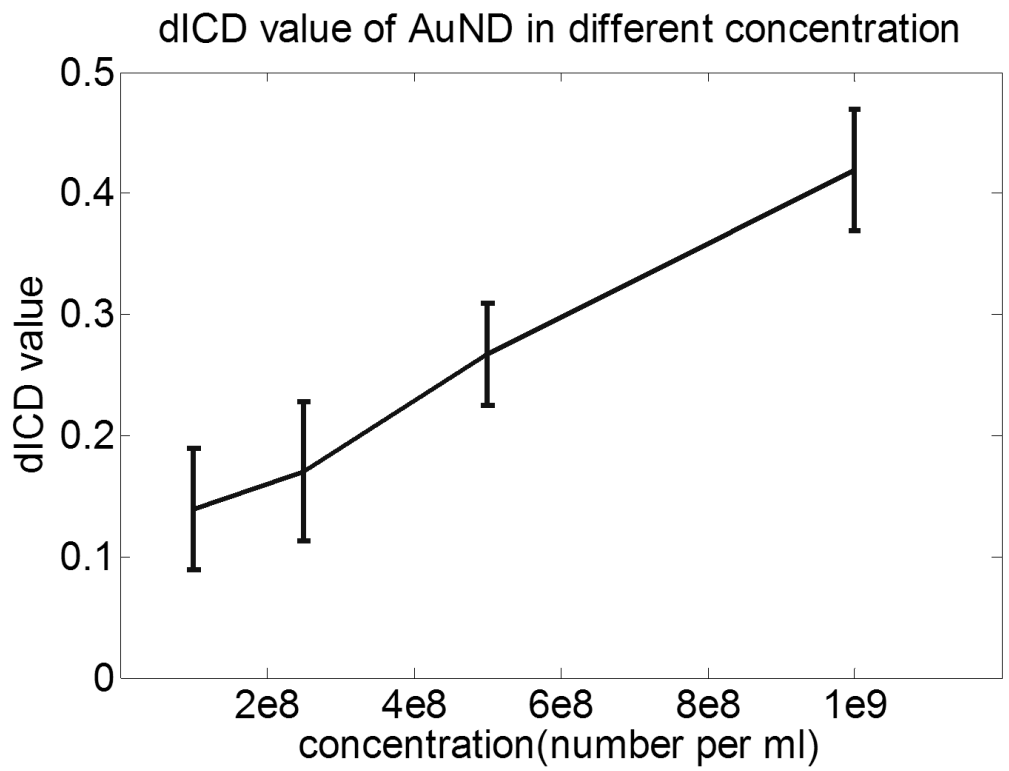


圖 27：濃度與 dICD 之關係。在雷射輔助超音波作用下，奈米金液滴的濃度越高穴蝕效應也越強。



3.3 奈米金粒子釋放效率實驗

3.3.1 破裂比例評估法

從3.2節中確定了適當的雷射及超音波作用參數，接下來進行奈米金液滴與奈米金氣泡的比較，觀察超音波、雷射及雷射輔助超音波三種方式作用下的奈米金粒子釋放效率。

當只有超音波作用時，奈米金氣泡的破裂比例高於奈米金液滴(圖28)，這也證實了奈米金液滴的穩定性較高。而只利用雷射作用時，奈米金液滴的破裂比例高於奈米金氣泡，但是兩者結果在統計上並無顯著性差異，這代表雷射對兩種對比劑的作用效果差不多。最後同時利用超音波及雷射作用對比劑，可以觀察到奈米金液滴的破裂比例較奈米金氣泡高10%，也是全部作用方式中最高的結果，這證實了雷射輔助超音波作用可以使更多的奈米金液滴破裂。

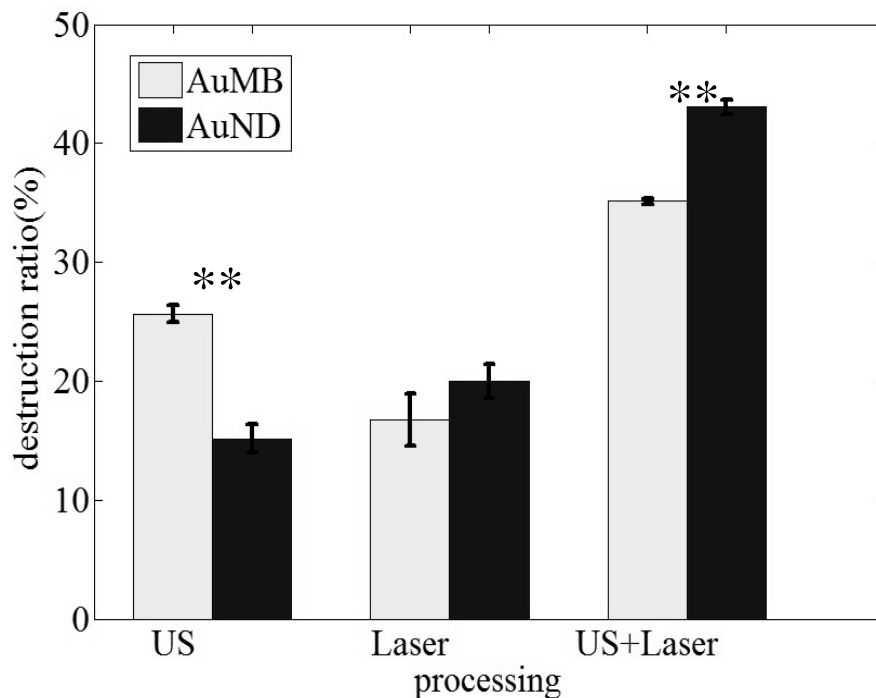

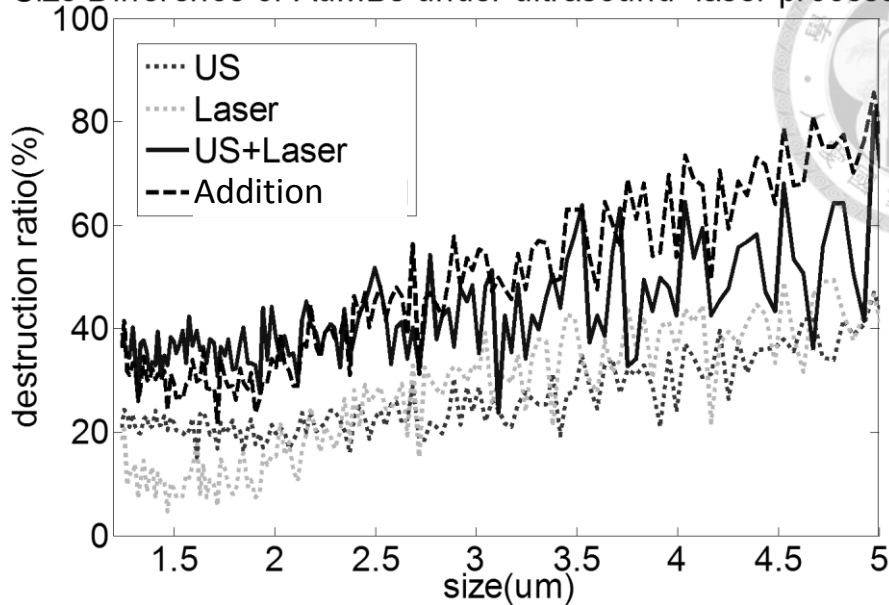


圖 28：利用不同作用方式，比較不同對比劑的破裂比例。可以觀察到雷射輔助超音波作用奈米金液滴，能夠使最多的對比劑破裂。**:p-value<0.01



接著畫出不同粒徑下的破裂比例圖(圖 29)，並比較奈米金液滴和奈米金氣泡在不同作用下粒徑的破裂狀況。在超音波作用下奈米金氣泡不論粒徑差異破裂比例相近，而在奈米金液滴中體積大的破裂比例較高，可能是因為大體積的對比劑本身就不穩定且容易與超音波產生共振，因此不管是氣泡或是液滴都是粒徑偏大的容易破裂，而小體積的氣泡雖然不易共振，但是因為氣泡穩定性比液滴低，所以受到大體積氣泡產生的穴蝕效應刺激後可能會破裂；當雷射作用時奈米金氣泡在大體積的部分破裂比例較高，然而奈米金液滴在不同體積下並沒有明顯差異，可能是因為雷射作用奈米金氣泡時奈米金粒子溫度上升造成氣泡結構不穩定而破裂，而越大的氣泡越容易受影響，然而用雷射作用奈米金液滴時，會產生氣化效應且大液滴釋出的奈米金粒子會使液體整體溫度上升，使小液滴變大進而破裂，因此奈米金液滴在不同粒徑下的破裂比例都差不多，但是根據濃度結果評估奈米金液滴與奈米金氣泡在破裂比例上並無顯著性差異。同時使用超音波和雷射作用的結果與圖中的黑線做比較可以發現，合併作用下對比劑的破裂比例都有上升，然而奈米金氣泡的綜合效果不如奈米金液滴，這是因為雷射與超音波作用奈米金氣泡時，兩者引發的破裂原因沒有關聯，然而在奈米金液滴下有液體膨脹與氣化這一層關係，因此綜合效應較明顯。

Size Difference of AuMBs under ultrasound+laser processing



Size Difference of AuNDs under ultrasound+laser processing

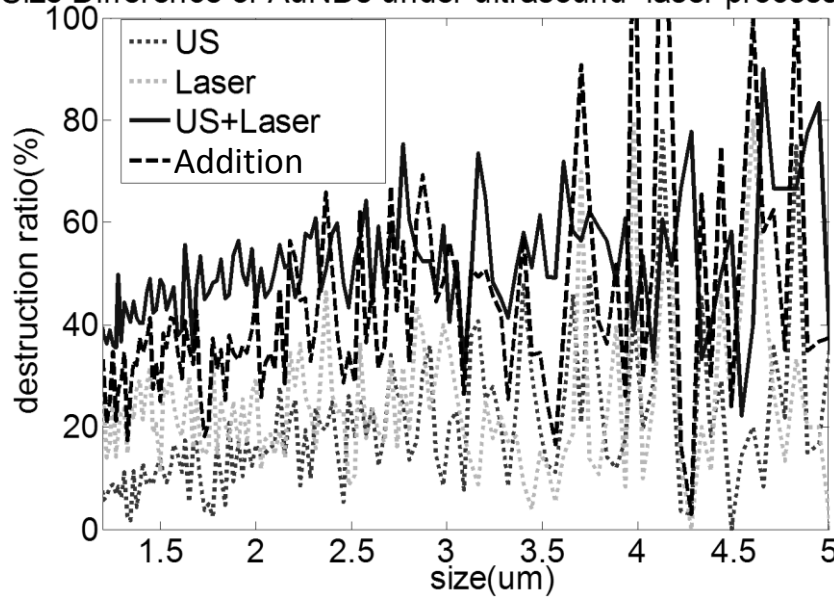


圖 29：奈米金液滴及奈米金泡的粒徑破裂比例圖。上圖是奈米金氣泡在不同粒徑下的破裂狀況，下圖是奈米金液滴在不同粒徑下的破裂狀況。

3.3.2 吸光值評估法

根據破裂比例評估法，確認了奈米金液滴破裂比例高於奈米金氣泡，但是破裂比例高不能完全代表釋放出較多的奈米金粒子，因此進一步利用吸光值評估。但是進行結果比較前必須先測量控制組和參考組的吸光值，以降低實驗誤差。將

尚未作用過的對比劑直接過濾，測量濾液的吸光值當作背景值，藉由減去背景值的動作可以去除沒有被包覆的奈米金粒子產生的誤差。而將一般的蛋白質液滴以雷射及超音波同時作用擊破後過濾，從濾液中可以取得蛋白質碎片的吸光值，將此數值當作參考值，實驗後發現所有的數值都大於參考值，代表蛋白質碎片對吸光值造成的影響可以忽略。

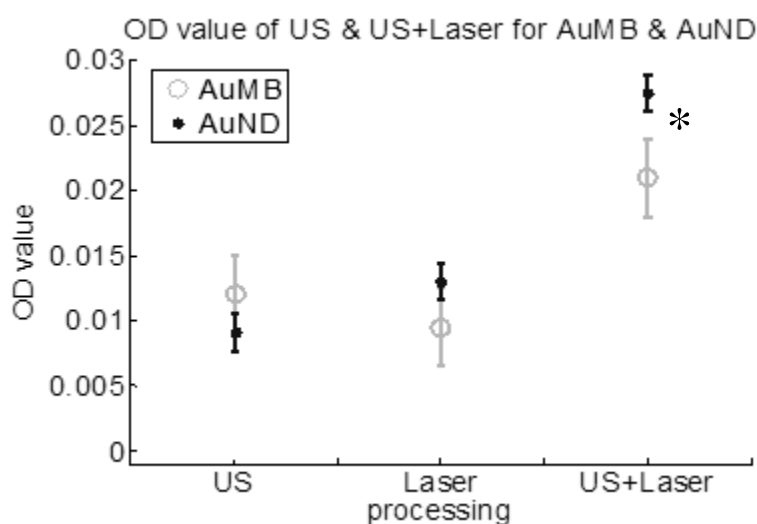


圖 30：奈米金液滴與奈米金氣泡在不同作用下的吸光值差異。利用不同方式作用，比較不同對比劑的吸光值差異，可以觀察到雷射輔助超音波作用奈米金液滴有最高的吸光值。

* :p-value<0.05

從結果可以觀察到(圖 30)，只有超音波作用時奈米金氣泡得到的吸光值較高，再次證實了奈米金液滴比奈米金氣泡穩定；而單獨雷射作用可以發現奈米金液滴的吸光值高於奈米金氣泡，但是在統計上也無顯著差異；當合併雷射與超音波作用後可以觀察到奈米金液滴的吸光值比奈米金氣泡高，這代表奈米金液滴釋放出較多的奈米金粒子。合併 3.3.1 及 3.3.2 節的結果，證實雷射輔助超音波作用奈米金液滴的確能夠更有效地釋放出奈米金粒子。



3.4 光熱治療實驗

3.4.1 體外細胞實驗

從 3.3 節的結果可以觀察到奈米金液滴在雷射輔助超音波作用下有較高的奈米金粒子釋放效率，但是仍必須確認此技術在光熱治療上的效果，因此細胞體外實驗及小動物體內實驗。

首先觀察在沒有奈米金液滴的狀況下(圖 31)，細胞在不同技術作用下的存活率差異，可以很明顯發現不論是雷射或超音波，作用前後細胞的存活率差異都沒有太大的變化，這代表實驗所使用的雷射與超音波參數對組織不會造成嚴重傷害；接著觀察有奈米金液滴的狀況，可以發現有雷射作用時細胞的存活率會降低，當合併超音波及雷射同時作用細胞存活率更降低到 45%，這代表雷射合併超音波可以有光熱治療效果。此實驗證明了雷射輔助超音波技術對一般細胞的安全性及此技術合併奈米金液滴可以提高光熱治療效果，接下去進一步做小動物實驗驗證。

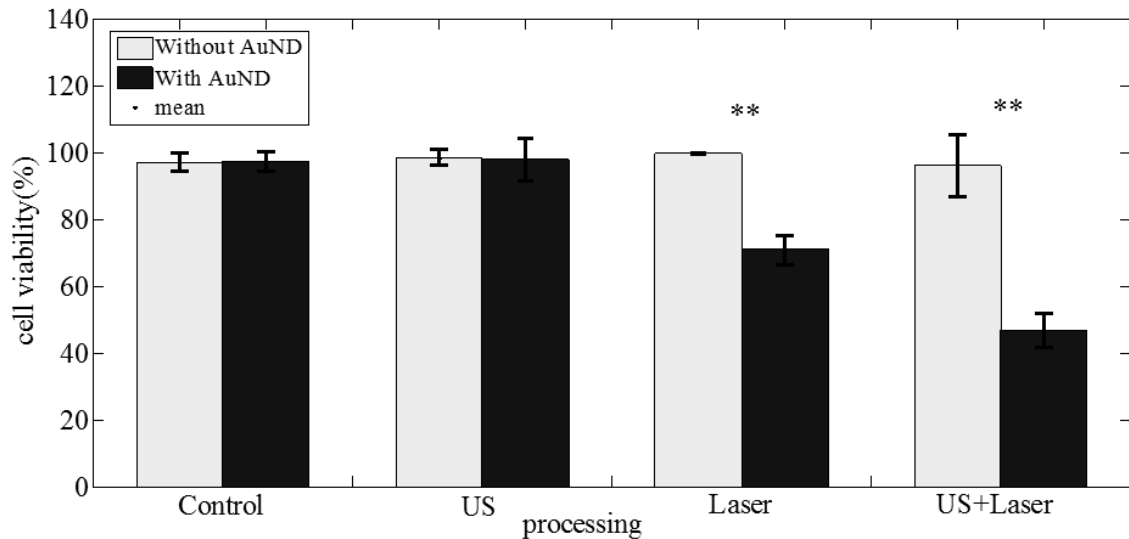


圖 31：不同作用下的細胞存活率。在有雷射及奈米金液滴的狀況下，細胞存活率下降，當合併雷射與超音波，更降低了細胞的存活率。



3.4.2 小動物體內實驗

根據細胞實驗可以了解雷射輔助奈米金液滴穴蝕效應在光熱治療上確實有效，接著進行體內實驗觀察。利用皮下注射將奈米金液滴打入腫瘤組織附近，接著使用共焦架構進行治療，比較治療前後的腫瘤超音波影像及外觀上的變化。

從腫瘤外觀上(圖 32)可以明顯看到，腫瘤治療前後的外觀差異及效果，治療前(圖 32-a)腫瘤大小約 1cm x 0.5mm，治療結束後當下(圖 32-b)可以看見一個很小疤痕及水泡，兩天後(圖 32-c)疤痕變得清晰且組織液大量產生，一周後(圖 32-d)可以看到腫瘤的位置變成一個痂，代表雷射輔助超音波奈米金液滴光熱治療有效。除從外觀上的進程可以了解到腫瘤治療前後的變化，利用超音波影像也可以觀察到組織的變化狀況。

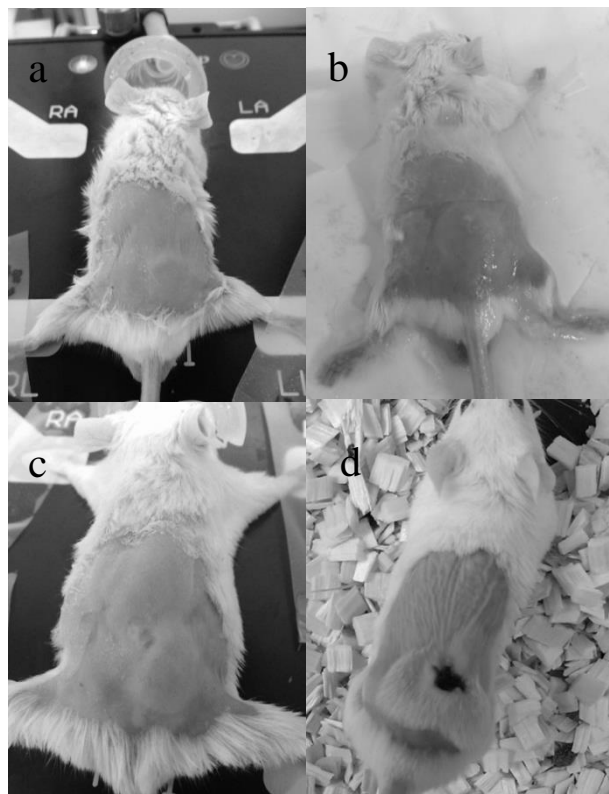


圖 32：腫瘤治療前後的外觀。可以很明顯看到治療前後的差別(a) 治療前(b)治療當天(c)治療後兩天(d)治療後一周

觀察超音波影像(圖 33)，也可以很清楚的看到一開始腫瘤組織內部訊號均勻，

治療當天可以看到組織對比增強，代表組織受到燒灼後硬化，兩天後可以看到很明顯的反射假影，是因為組織液大量產生在皮下與腫瘤之間，因此產生這樣的現象，由於一周後腫瘤位置是傷口，所以沒有利用超音波觀察其影像變化，但是從前面的影像可以很清楚觀察到雷射輔助超音波奈米金液滴穴蝕效應對腫瘤的光熱治療效果。

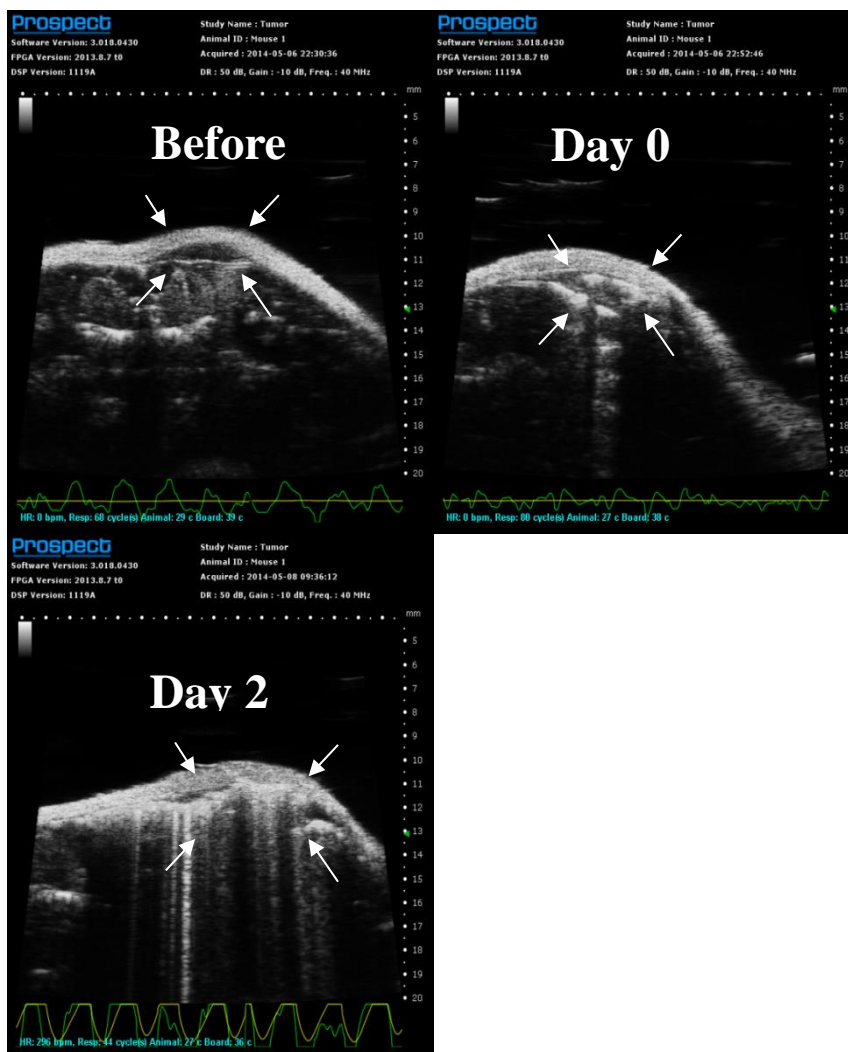
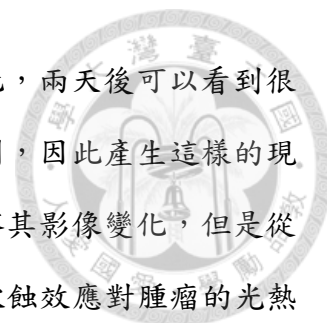


圖 33：治療前後的超音波影像差異。白色箭頭是腫瘤位置，可以觀察到治療前後組織的變化及進程。

第四章 分析與討論



4.1 雷射輔助超音波奈米金液滴穴蝕效應之特性探討

本研究的第一個假設是雷射輔助超音波作用奈米金液滴時，雷射負責氣化奈米金液滴並輔助穴蝕效應，而超音波則相反。根據 B-mode 影像結果可以觀察到雷射可以有效的氣化奈米金液滴，從粒徑濃度分析的結果可以發現雷射會造成奈米金液滴破裂，而藉由調整雷射強度觀察 dICD 變化可以發現其變化幅度差異小於調整超音波參數造成的變化，由此證實雷射確實能夠有效的氣化奈米金液滴，但是在穴蝕效應的部分影響不大；而超音波在 B-mode 影像下可以觀察到其氣化能力明顯低於雷射作用，但是能夠很有效的誘發穴蝕效應使氣化後的奈米金液滴破裂，而在粒徑濃度分析的結果中，其破裂比例低於雷射是因為氣化能力不佳，無法有效誘發穴蝕效應造成，而藉由調整不同超音波參數觀察 dICD 的實驗中，可以發現超音波參數造成的變化幅度都很高，從上述結果可以證實超音波能夠有效的誘發氣化後奈米金液滴的穴蝕效應，但是其氣化能力遠低於雷射作用。結合上述兩個論述驗證了雷射輔助超音波作用下，雷射主要負責氣化輔助穴蝕效應，超音波負責穴蝕效應輔助氣化現象的假設。

另外，若將穴蝕效應劑量的結果以時間與 dICD 數值作圖(圖 34)，可以觀察到單獨使用超音波作用奈米金液滴時穴蝕效應強度隨時間遞減，然而若雷射與超音波共同作用時穴蝕效應會隨時間增加而增強。若只有超音波單獨作用時，只有特定粒徑大小以上的奈米金液滴會被誘發穴蝕效應，當那些奈米金液滴破裂以後，就很難再誘發穴蝕效應，因此穴蝕效應的強度會隨著時間下降。當雷射與超音波同時作用時，雷射會使奈米金液滴氣化，使超音波能夠持續誘發穴蝕效應，由於雷射加熱需要時間，因此隨著時間上升被氣化的奈米金液滴越多，因此穴蝕效應劑量會隨時間增加而上升。除此之外，比較不同雷射強度下的 dICD 與時間變化狀

況(圖 35)，可以發現當雷射強度較強時，穴蝕效應的數值很快就上升，這代表很奈米金液滴更有效的被雷射氣化並被超音波誘發穴蝕效應。根據這些結果，更進一步驗證了雷射與超音波在奈米金液滴穴蝕效應上的影響。

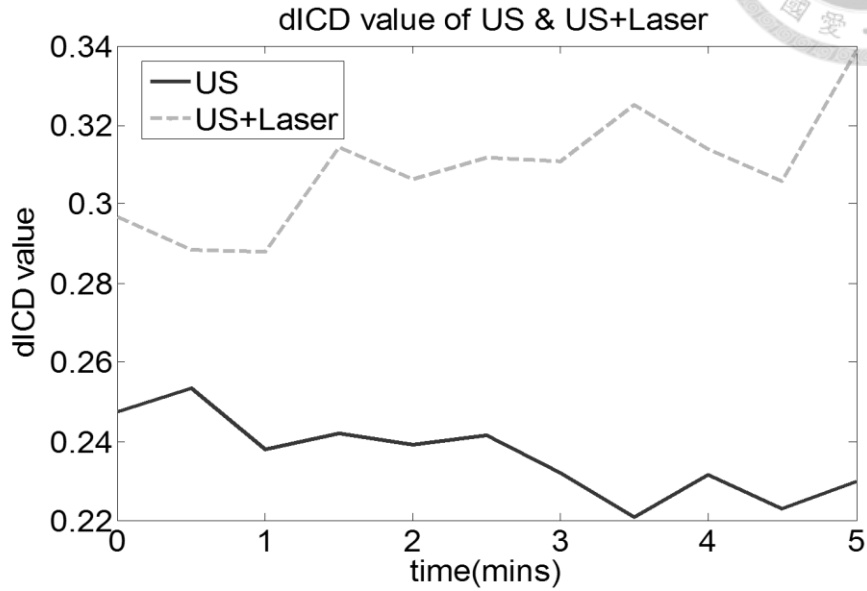
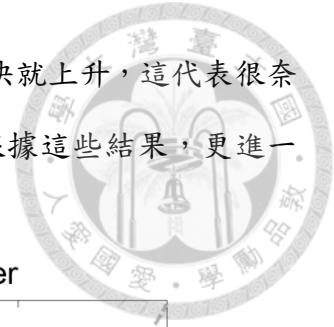


圖 34：超音波誘發的奈米金液滴穴蝕效應劑量隨時間增加而下降，而雷射與超音波共同作用時，穴蝕效應劑量隨時間增加而上升。

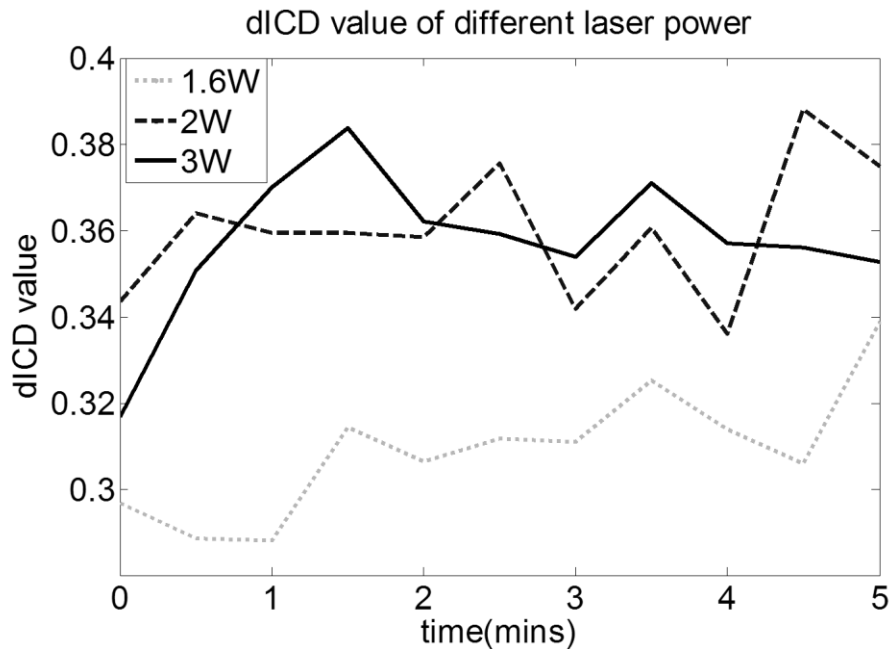


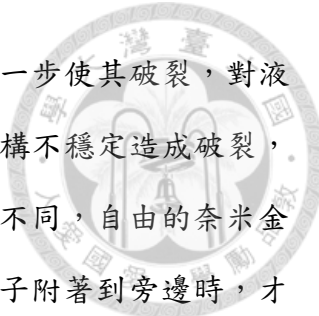
圖 35：雷射強度越強，穴蝕效應劑量上升的速度越快且越強，但是當雷射強度超過 2W 後差異並不明顯。

過去有研究利用超音波誘發穴蝕效應進行熱治療[52]，其優點是使用工具單一，穿透深度佳且穴蝕效應可以提高熱能的產生，然而此方法進行熱治療有兩個缺點，第一個是缺乏效率，第二個是需要很強的超音波能量。另外也有相關的研究[53]單獨使用雷射做光熱治療，然而受限於奈米金粒子在腫瘤組織的濃度、雷射的穿透深度及路徑上正常組織的傷害性，因此治療效果有限。雷射輔助超音波的方式雖然是一個耗能的技術，但是其帶來的效益大於各自相加，因此選擇使用這個方法誘發奈米金液滴的穴蝕效應。

4.2 奈米金粒子釋放效率之結果探討

本研究的第二個假設為奈米金液滴在雷射輔助超音波作用下能夠提高奈米金粒子的釋放效率。過去研究發現[42]奈米金粒子在超音波與雷射同時作用後會有更高的機率產生穴蝕效應，他們推測是因為雷射降低了穴蝕效應的閾值使更多穴蝕效應產生，然而在他們的實驗中並沒有直接作用液滴，而是利用奈米金粒子產生的氣泡觀察此現象。另外，也有相關的研究利用超音波對比劑的穴蝕效應進行治療[54]，然而由於氣泡的顯影效果很好且容易誘發穴蝕效應，所以大家都著重於此發展，但是微氣泡在體內的存在時間不足以協助熱治療，因此本研究犧牲超音波的顯影效果，利用液滴取代氣泡提高穩定性，以達成提高奈米金粒子釋放效率增強光熱治療之目的。

根據破裂比例及吸光值的實驗結果可以觀察到此現象，當只有超音波作用時奈米金液滴在大體積的部分破裂比例較高，然而奈米金液滴沒有這種現象；相反的當只有雷射作用時，奈米金氣泡大體積的部分破裂比例較高，然而奈米金液滴卻沒有這種現象。從超音波的角度來看，奈米金氣泡是一種相對不穩定的對比劑[55]，因此在超音波作用下很容易產生穴蝕效應，然而奈米金液滴必須要先氣化才會進一步破裂[50]，所以前者在超音波下的破裂狀況優於後者，從這個部分得到一個結論：體積大的對比劑容易被超音波誘發穴蝕效應。接著從雷射的角度分析，



當奈米金粒子吸熱升溫後，對氣泡而言會造成結構不穩定進一步使其破裂，對液滴而言是氣化造成體積膨脹因而破裂，雖然最終都是因為結構不穩定造成破裂，但是對比劑破裂後釋放出的奈米金粒子引發的連鎖反應效果不同，自由的奈米金粒子會吸熱升溫，對奈米金氣泡而言，只有自由的奈米金粒子附著到旁邊時，才會發生結構不穩定引起破裂，但是對奈米金液滴而言，當溫度升高時會引起氣化進一步破裂，不需要奈米金與液滴接觸就會產生連鎖效應，因此奈米金液滴破裂後產生的連鎖反應比氣泡高。

綜合超音波的大體積容易破裂及雷射的高連鎖效應兩個觀點，就能了解為何同時作用超音波與雷射在奈米金液滴上有很好的奈米金粒子釋放效率，當雷射作用奈米金液滴後會使其氣化且體積快速膨脹，當其膨脹後的體積超過超音波的穴蝕效應閾值就會破裂。為了避免氣栓塞，治療時我們會使用小於 1 μ m 的奈米金液滴，此體積下的奈米金液滴不容易被超音波氣化及引發穴蝕效應，但是當合併雷射後，原本小體積的奈米金液滴瞬間膨脹，體積膨脹到足以被超音波誘發穴蝕效應的程度，因此有更多的奈米金液滴破裂(圖 36-a)。反觀此效應發生在奈米金氣泡上，由於氣泡不會有體積膨脹的現象，因此其總破裂比例就是超音波引發的穴蝕效應加上雷射引起的氣泡破裂兩者合併的結果(圖 36-b)，所以奈米金液滴在雷射輔助超音波下能釋放出更多的奈米金粒子。

除了破裂比例的比較，本研究也利用吸光值評估法觀察奈米金粒子的釋放效率，由於奈米金粒子體積太小難以定量測量，而且又必須比較奈米金氣泡與奈米金液滴兩種對比劑的差異，因此利用吸光值的差別進行評估。吸光值評估法的優點在於可以直接比較奈米金粒子的濃度，缺點在於實驗程序較為複雜容易產生誤差。在吸光值實驗時要先建立參考值，由於過濾液中不只有奈米金粒子還有少許的對比劑碎片，在測量吸光值時對比劑碎片可能會使光線反射或折射造成誤差，因此將氣泡用超音波作用並測量其濾液在 808nm 下的吸光值做為參考值。將所有

的數據都與參考值比較，發現其他狀況下的實驗結果都高於參考值，因此可以忽略對比劑碎片對吸光值實驗造成的影響。綜合破裂比例與吸光的結果證實了奈米金液滴在雷射輔助超音波下的確有較好的奈米金粒子釋放效率。

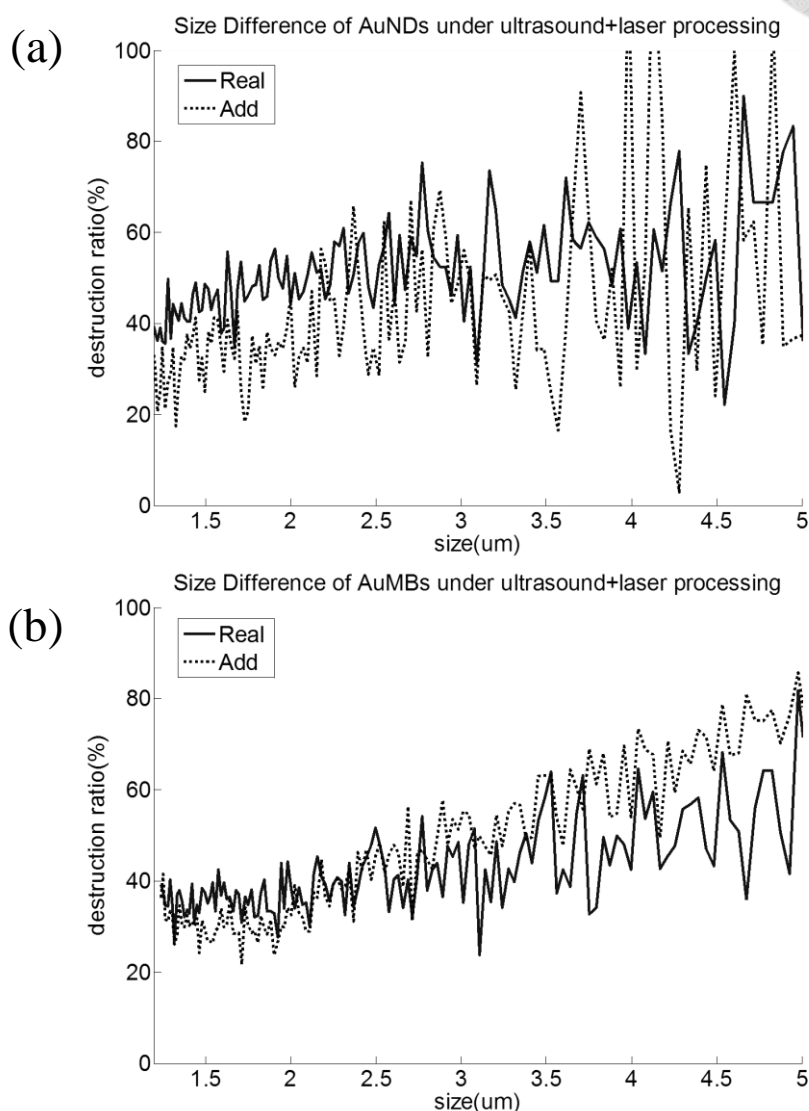
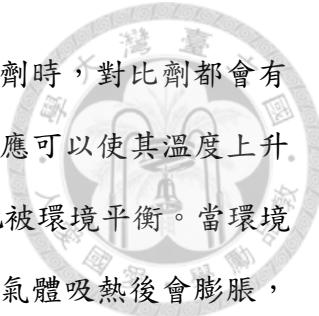


圖 36：對比劑在雷射與超音波同時作用下的破裂比例與粒徑差異。(a)奈米金液滴的結果(b)奈米金氣泡的結果。

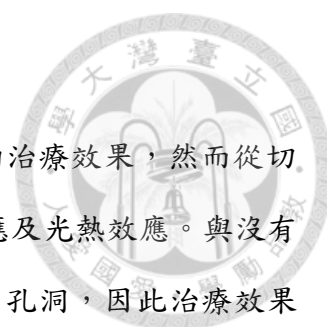
4.3 光熱治療效果探討

根據細胞實驗的結果可以很明顯發現，只要有雷射和奈米金液滴的存在，就可以有效地殺死細胞，與過去奈米金氣泡的實驗結果顯示若不將奈米金氣泡擊破雷射便無法有效的進行升溫治療[56]。雖然上述兩個實驗的架構不同，但是原理可



以提出來進一步比較，當雷射照射到包覆奈米金粒子的對比劑時，對比劑都會有溫度上升的狀況，有研究指出奈米金粒子的表面電漿共振效應可以使其溫度上升至幾千度 K[57]，然而奈米金粒子體積很小，因此熱能很快地被環境平衡。當環境吸收了熱能後，奈米金液滴與奈米金氣泡會有不同的反應，氣體吸熱後會膨脹，根據理想氣體方程式可知體積與溫度成正比，但是由於奈米金氣泡體積很小氣體分子的數量少，因此溫度變化加成造成的體積變化小，然而奈米金液滴是完全不同的狀況，奈米金液滴內的物質是液體，當雷射加熱時奈米金粒子會使液體氣化，一旦液體氣化其體積變化會以倍數成長[58]，除了造成體積快速膨脹外，穩定度也大幅降低，此時若持續施予相同能量就會馬上破裂。對奈米金氣泡而言破裂主因是奈米金粒子造成的結構不穩定，但是對奈米金液滴而言破裂主因是急速膨脹造成過大的瞬間壓力。當對比劑破裂後奈米金粒子會在溶液中流動，這些奈米金粒子會繼續提高環境溫度並引起微量的穴蝕效應[59]，這些現象對奈米金氣泡的穩定性影響有限，但是環境溫度對奈米金液滴的影響很大，因此會產生較明顯的連鎖反應。

在小動物光熱治療實驗的過程中，發現了此技術在治療上最大的限制：腫瘤體積大小，當腫瘤體積過大時會引發許多問題。首先是雷射與超音波聚焦範圍的問題，當腫瘤組織過大，兩者共聚焦的區域無法覆蓋整個腫瘤，因此只有部分的腫瘤組織能夠有效被治療，然而如此一來癒後便會成為很大的問題，即使治療區域內的腫瘤細胞都已經死亡，然而產生的空洞會被沒有治療到的腫瘤快速填滿，結果就是治療失敗，若要解決此問題則必須拉長總治療時間，分區照射治療，優點是可以有效的治療，缺點是效率變差且增加了對正常組織的傷害。另外一個限制是雷射穿透深度，當腫瘤體積過大時雷射無法完整照射到整顆腫瘤，即使分區緩慢治療，在深處的腫瘤組織治療效果就是比較差，若遇到此狀況必須改採侵入式治療方式，將光纖深入腫瘤組織，藉此克服雷射穿透深度的問題，然而如此一



來便失去了原本非侵入式治療的優勢。

從小動物的光熱治療實驗中可以很清楚的看到此技術的治療效果，然而從切片結果可以發現(圖 37:)，治療效果包含兩個部分：穴蝕效應及光熱效應。與沒有治療的腫瘤組織切片比較，治療後的腫瘤組織切片上有許多孔洞，因此治療效果可能有一部分是來自於穴蝕效應，另外在治療後的腫瘤組織切片上也可以看到細胞因受熱壞死的狀況，因此治療的效果也有一部分是來自於光熱現象，但是這兩種效應在治療中造成的影響差異，尚未有很好的方式評估。

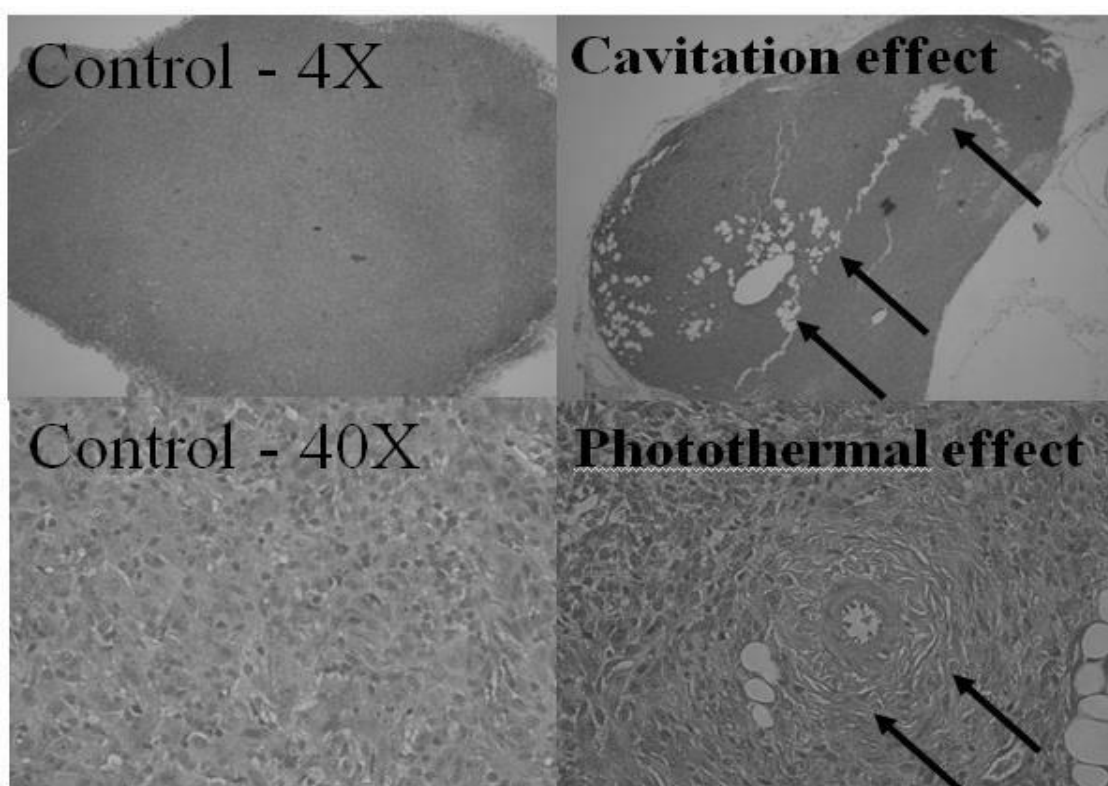


圖 37：與沒有治療的腫瘤組織切片相比較，可以看到有治療後的組織切片上有需多孔洞，並且有細胞壞死的狀況。

合併雷射、超音波及奈米金液滴確實能夠提升光熱治療的效果，此方法有幾個優點：第一個是提高奈米金粒子在腫瘤細胞的濃度，由於奈米金液滴非常穩定，因此可以有很高的運輸效率，除此之外奈米金液滴的穴蝕效應強度比氣泡強，因此可以使更多的奈米金粒子進入腫瘤細胞。第二個優點是高度的專一特性，當奈米金液滴在血液中流動時並不會有太大的變化，然而當遇到超音波及雷射共同作

用的地區，就會氣化破裂釋放出奈米金粒子，如果只有超音波或只有雷射作用，奈米金液滴的釋放效率有限甚至無法釋放出奈米金粒子。

然而此技術有一些限制與缺點：第一個是奈米金液滴的體積限制，由於奈米金液滴的體積是奈米等級，因此能攜帶的奈米金粒子數量有限[32]，若要讓更多的奈米金粒子進入腫瘤細胞，就必須提高奈米金液滴濃度，然而過多的奈米金液滴注入小動物體內，會引發高血壓導致小動物血管破裂死亡，因此如何在此限制下運輸最多的奈金粒子，是未來可以繼續討論的問題之一。第二個是高穴蝕效應強度，由於奈米金液滴穴蝕效應很強，因此可能會造成血管破損，然而只要讓雷射與超音波作用在腫瘤組織處，即使造成腫瘤血管破損對正常細胞也不會造成負擔。

第五章 結論與未來工作



為了增進光熱治療效果提升其在臨床上的應用價值，本研究結合雷射、超音波與奈米金液滴進行實驗，利用雷射輔助超音波技術誘發奈米金液滴穴蝕效應提高奈米金粒子的釋放效率，促使更多奈米金粒子能夠聚積到腫瘤組織中提升光熱治療效果。

在對比劑製作與特性評估實驗方面，本研究利用氣化、離心及升溫三種方式分析，觀察奈米金液滴是否具備該有的特性及如何取得適當粒徑大小的對比劑進行後續實驗。實驗結果顯示本實驗室自製的奈米金液滴可以藉由升高環境溫度使之氣化並且在雷射加熱後產生明顯的升溫變化，另外使用不同離心速度處理奈米金液滴，可以分離出小於 1 μ m、1.8 μ m、2 μ m 及 2.8 μ m 之奈米金液滴，這代表研究中成功製備出奈米金液滴並能控制其粒徑分布狀況。

在氣化現象與穴蝕效應實驗方面，本研究利用超音波 B-mode 影像及穴蝕效應劑量評估奈米金液滴在超音波、雷射與雷射輔助超音波作用下的變化狀況。實驗結果顯示雷射單獨作用時可以有效且大量的氣化奈米金液滴並使其破裂，而超音波單獨作用時雖然只會夠誘發少量液滴氣化，但是能有效的誘發穴蝕效應使奈米金液滴破裂；當提升超音波聲壓、發射週數、奈米金液滴濃度及雷射強度時，都會造成奈米金液滴的穴蝕效應強度增加，其中提升雷射強度產生的 dICD 變化幅度小於調整超音波參數產生的 dICD 變化，這代表超音波參數對穴蝕效應的影像較雷射高。因此結論在雷射輔助超音波技術中，雷射負責奈米金液滴之氣化效應輔助穴蝕效應，而超音波負責誘發穴蝕效應輔助氣化現象。

在奈米金粒子釋放效率實驗方面，本研究利用破裂比例法與吸光值評估法比較奈米金氣泡與奈米金液滴在超音波、雷射與雷射輔助超音波三種不同作用下的奈米金粒子釋放效率差異。實驗結果顯示雷射輔助超音波技術作用奈米金液滴時，其破裂比例較同作用下的奈米金氣泡高 10%，而吸光值較同方法下的奈米金氣泡

高 1.5 倍，代表雷射輔助超音波奈米金液滴穴蝕效應有較高的奈米金粒子釋放效率。

在光熱治療實驗方面，利用細胞毒殺性實驗及小動物實驗驗證此技術在治療上的可行性。實驗結果顯示細胞在沒有奈米金液滴的狀況下被超音波、雷射及雷射輔助超音波作用後的存活率都接近 100%，但若加入奈米金液滴，雷射輔助超音波下的細胞存活率剩下 42%，代表此技術對正常細胞沒有傷害，並且在有奈米金液滴的狀況下可以有效殺死癌細胞。而在小動物的實驗中，從外觀及超音波影像上觀察到腫瘤因為光熱治療而縮小及其癒後過程中的變化狀況，因此雷射輔助超音波奈米金液滴穴蝕效應確實具有光熱治療之效果。

未來工作方面，首先將在奈米金液滴表面標誌抗體進行實驗，使奈米金液滴可以利用靜脈注射的方式進行治療。腫瘤組織在快速分裂增生的同時，也會有許多新生血管形成，此時腫瘤組織處的血管內皮生長因子(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, VEGFR)濃度會大量上升，因此若將抗血管內皮生長因子(anti-VEGFR)標誌在奈米金液滴上，就能夠使奈米金液滴與腫瘤組織結合，如此就能將雷射輔助超音波奈米金液滴光熱治療應用在靜脈注射上。另外本研究所觀察的「雷射輔助超音波作用下奈米金液滴能釋放出更多奈米金粒子」的現象僅止於體外比較，對小動物體內的奈米金粒子釋放差異並不瞭解，因此未來工作也包括將使用標有螢光的奈米金粒子製作出奈米金液滴，並利用小動物螢光偵測技術觀察奈米金粒子進入腫瘤組織的濃度狀況。

未來工作還有設計出帶具有高濃度奈米金粒子的奈米金液滴(圖 38)，由於奈米金液滴的體積是奈米等級，因此其能夠包覆的奈米金粒子數量有限，若能進一步將奈米金粒子標誌在液滴外面使內外皆有奈米金粒子，便能提升奈米金液滴本身的金粒子數目提升釋放效率。目前的概念是將標誌抗原抗體的方法用來標誌奈米金粒子，將奈米金粒子與生物素(biotine)結合，並在原本的奈米金液滴外圍標上抗生

物素(avidin)，接著將兩者混合反應後再洗掉沒有結合上奈米金液滴的奈米金粒子，即可得到內外皆有奈米金粒子的奈米金液滴，然而此種奈米金液滴外面的標誌位置被奈米金粒子佔據，所以會使抗血管內皮生長因子的濃度降低使降低其與腫瘤組織結合的效率，因此如何在提高奈米金濃度的狀況下又有良好的腫瘤標誌效率是此種奈米金液滴必需要面對的課題。

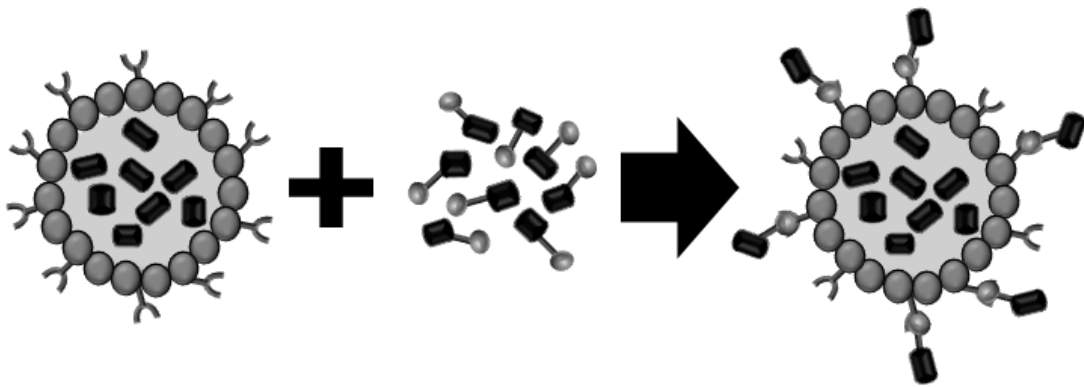
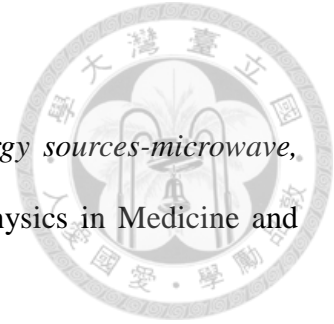


圖 38：利用抗原抗體標誌法，提高奈米金粒子的濃度。

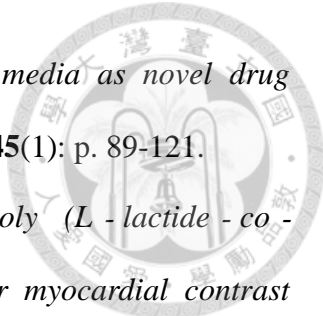
第六章 參考文獻




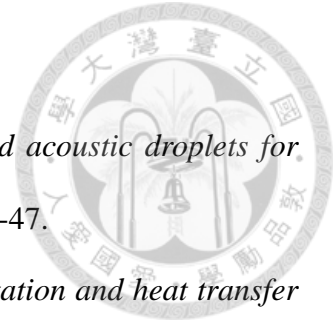
1. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
2. Knudson, A.G., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1971. **68**(4): p. 820-823.
3. Fisher, B., et al., *Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer*. New England Journal of Medicine, 2002. **347**(16): p. 1233-1241.
4. Sekine, I., et al., *A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with breast cancer*. Int J Clin Oncol, 2009. **14**(2): p. 112-9.
5. Zelefsky, M.J., et al., *High-dose intensity modulated radiation therapy for prostate cancer: early toxicity and biochemical outcome in 772 patients*. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 2002. **53**(5): p. 1111-1116.
6. Eramo, A., et al., *Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells*. Cell Death Differ, 2006. **13**(7): p. 1238-41.
7. Schulz-Ertner, D. and H. Tsujii, *Particle radiation therapy using proton and heavier ion beams*. J Clin Oncol, 2007. **25**(8): p. 953-64.
8. COLEY, W.B., *The Classic: The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Inoculations of Erysipelas: With a Report of Ten Original Cases*. Clinical orthopaedics and related research, 1991. **262**: p. 3-11.
9. Bickels, J., et al., *Coley's toxin: historical perspective*. Isr Med Assoc J, 2002.




- 4(6): p. 471-2.
10. Skinner, M.G., et al., *A theoretical comparison of energy sources-microwave, ultrasound and laser-for interstitial thermal therapy*. *Physics in Medicine and Biology*, 1998. **43**(12): p. 3535.
 11. Han, B., et al., *Development of quantum dot-mediated fluorescence thermometry for thermal therapies*. *Ann Biomed Eng*, 2009. **37**(6): p. 1230-9.
 12. Brunetaud, J., et al., *Non-PDT uses of lasers in oncology*. *Lasers in medical science*, 1995. **10**(1): p. 3-8.
 13. Oldenburg, S., et al., *Nanoengineering of optical resonances*. *Chemical Physics Letters*, 1998. **288**(2): p. 243-247.
 14. Pitsillides, C.M., et al., *Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles*. *Biophysical journal*, 2003. **84**(6): p. 4023-4032.
 15. Huang, X., et al., *Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods*. *Journal of the American Chemical Society*, 2006. **128**(6): p. 2115-2120.
 16. Ghosh, P., et al., *Gold nanoparticles in delivery applications*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. **60**(11): p. 1307-15.
 17. Gramiak, R. and P.M. Shah, *Echocardiography of the aortic root*. *Investigative radiology*, 1968. **3**(5): p. 356-366.
 18. Goldberg, B.B., J.-B. Liu, and F. Forsberg, *Ultrasound contrast agents: a review*. *Ultrasound in medicine & biology*, 1994. **20**(4): p. 319-333.
 19. Sirsi, S. and M. Borden, *Microbubble Compositions, Properties and Biomedical Applications*. *Bubble Sci Eng Technol*, 2009. **1**(1-2): p. 3-17.

- 
20. Lawrence, M.J. and G.D. Rees, *Microemulsion-based media as novel drug delivery systems*. *Advanced drug delivery reviews*, 2000. **45**(1): p. 89-121.
21. Cui, W., et al., *Preparation and evaluation of poly (L - lactide - co - glycolide)(PLGA) microbubbles as a contrast agent for myocardial contrast echocardiography*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2005. **73**(1): p. 171-178.
22. Faez, T., et al., *20 years of ultrasound contrast agent modeling*. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2013. **60**(1): p. 7-20.
23. 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.
24. Wang, Y.H., et al., *Photoacoustic/ultrasound dual-modality contrast agent and its application to thermotherapy*. *J Biomed Opt*, 2012. **17**(4): p. 045001.
25. Sheeran, P.S., et al., *Toward ultrasound molecular imaging with phase-change contrast agents: an in vitro proof of principle*. *Ultrasound Med Biol*, 2013. **39**(5): p. 893-902.
26. Apfel, R.E., *Tensile strength of superheated n-hexane droplets*. *Nature*, 1971. **233**(41): p. 119-121.
27. Kripfgans, O.D., et al., *Acoustic droplet vaporization for therapeutic and diagnostic applications*. *Ultrasound in medicine & biology*, 2000. **26**(7): p. 1177-1189.
28. Sheeran, P.S., et al., *Design of ultrasonically-activatable nanoparticles using low boiling point perfluorocarbons*. *Biomaterials*, 2012. **33**(11): p. 3262-9.
29. Rapoport, N.Y., et al., *Microbubble generation in phase-shift nanoemulsions*

- 
- used as anticancer drug carriers. Bubble Science, Engineering & Technology, 2009. 1(1-2): p. 31-39.*
30. Kheirrolomoom, A., et al., *Acoustically-active microbubbles conjugated to liposomes: characterization of a proposed drug delivery vehicle. Journal of Controlled Release, 2007. 118(3): p. 275-284.*
 31. Fabiilli, M.L., et al., *Delivery of water-soluble drugs using acoustically triggered perfluorocarbon double emulsions. Pharmaceutical research, 2010. 27(12): p. 2753-2765.*
 32. Wilson, K., K. Homan, and S. Emelianov, *Biomedical photoacoustics beyond thermal expansion using triggered nanodroplet vaporization for contrast-enhanced imaging. Nat Commun, 2012. 3: p. 618.*
 33. Burns, P.N. and S.R. Wilson, *Microbubble contrast for radiological imaging: 1. Principles. Ultrasound quarterly, 2006. 22(1): p. 5-13.*
 34. Leighton, T., *The acoustic bubble. 1994: Academic press.*
 35. Xu, S., et al. *Cavitation enhanced ultrasound thrombolysis. in Ultrasonics Symposium, 2008. IUS 2008. IEEE. 2008. IEEE.*
 36. Plesset, M. and T. Mitchell, *On the stability of the spherical shape of a vapor cavity in a liquid. Quarterly of Applied Mathematics, 1956. 13: p. 419-430.*
 37. FDA, *Information for Manufacturers Seeking Marketing Clearance of Diagnostic Ultrasound Systems and Transducers. 2008: p. 10-21.*
 38. Newman, C.M., et al., *Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality. Echocardiography, 2001. 18(4): p. 339-347.*
 39. Mitragotri, S., *Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. Nature Reviews Drug Discovery, 2005. 4(3): p.*



- 255-260.
40. Wang, C.H., et al., *Aptamer-conjugated and drug-loaded acoustic droplets for ultrasound theranosis*. *Biomaterials*, 2012. **33**(6): p. 1939-47.
 41. Wray, W.O., T. Aida, and R.B. Dyer, *Photoacoustic cavitation and heat transfer effects in the laser-induced temperature jump in water*. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 2002. **74**(1): p. 57-66.
 42. Ju, H., R.A. Roy, and T.W. Murray, *Gold nanoparticle targeted photoacoustic cavitation for potential deep tissue imaging and therapy*. *Biomedical optics express*, 2013. **4**(1): p. 66-76.
 43. Moon, H.K., S.H. Lee, and H.C. Choi, *In vivo near-infrared mediated tumor destruction by photothermal effect of carbon nanotubes*. *Acs Nano*, 2009. **3**(11): p. 3707-3713.
 44. Brayman, A.A., et al., *Hemolysis of 40% hematocrit, Alunex[®]-supplemented human erythrocytes by pulsed ultrasound: Frequency, acoustic pressure and pulse length dependence*. *Ultrasound in medicine & biology*, 1997. **23**(8): p. 1237-1250.
 45. Chen, W.-S., et al., *The pulse length-dependence of inertial cavitation dose and hemolysis*. *Ultrasound in medicine & biology*, 2003. **29**(5): p. 739-748.
 46. Scholle, K., et al., *2 μ m laser sources and their possible applications*. 2010.
 47. Farny, C.H., et al., *Nucleating cavitation from laser-illuminated nano-particles*. *Acoustics Research Letters Online*, 2005. **6**(3): p. 138-143.
 48. Rigopoulos, A.G., et al., *Echocardiography-guided percutaneous septal ablation in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy: one year follow-up*. *Hellenic J cardiol*, 2003. **44**: p. 171-179.

- 
49. Dein, F.J., et al., *Avian leucocyte counting using the hemocytometer*. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 1994: p. 432-437.
50. Giesecke, T. and K. Hynynen, *Ultrasound-mediated cavitation thresholds of liquid perfluorocarbon droplets in vitro*. Ultrasound in Medicine & Biology, 2003. **29**(9): p. 1359-1365.
51. Matsunaga, T.O., et al., *Phase-change nanoparticles using highly volatile perfluorocarbons: toward a platform for extravascular ultrasound imaging*. Theranostics, 2012. **2**(12): p. 1185-98.
52. Zhang, P. and T. Porter, *An in vitro study of a phase-shift nanoemulsion: a potential nucleation agent for bubble-enhanced HIFU tumor ablation*. Ultrasound Med Biol, 2010. **36**(11): p. 1856-66.
53. Atri, M., et al., *Contrast-enhanced ultrasonography for real-time monitoring of interstitial laser thermal therapy in the focal treatment of prostate cancer*. Canadian Urological Association Journal, 2009. **3**(2): p. 125.
54. Zhang, M., et al., *Initial investigation of acoustic droplet vaporization for occlusion in canine kidney*. Ultrasound Med Biol, 2010. **36**(10): p. 1691-703.
55. Hall, C.S., et al., *Experimental determination of phase velocity of perfluorocarbons: applications to targeted contrast agents*. Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on, 2000. **47**(1): p. 75-84.
56. Oraevsky, A.A., et al., *Enhanced delivery of gold nanoparticles by acoustic cavitation for photoacoustic imaging and photothermal therapy*. 2013. **8581**: p. 858123.
57. Huang, X. and M.A. El-Sayed, *Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT)*.

- Alexandria Journal of Medicine, 2011. **47**(1): p. 1-9.
58. Sheeran, P.S., et al., *Formulation and acoustic studies of a new phase-shift agent for diagnostic and therapeutic ultrasound*. Langmuir, 2011. **27**(17): p. 10412-20.
59. McLaughlan, J.R., et al., *Ultrasonic enhancement of photoacoustic emissions by nanoparticle-targeted cavitation*. Optics letters, 2010. **35**(13): p. 2127-2129.

