

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

子計畫一：超音波微脂體偵測及穴蝕化控制機制研究

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2218-E-002-044-

執行期間：92年11月01日至93年09月30日

執行單位：國立臺灣大學電機工程學系暨研究所

計畫主持人：李百祺

計畫參與人員：賴寬裕，賴俊延

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 12 月 13 日

總計畫：超音波釋控微脂體科技於腫瘤預防診斷治療之研究

子計畫一：超音波微脂體偵測及穴蝕化控制機制研究

(Detection and Control of Ultrasonic Cavitation with Liposome)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 92 - 2218 - E - 002 - 044 -

執行期間： 92 年 11 月 01 日至 93 年 7 月 31 日

計畫主持人：李百祺教授

共同主持人：

計畫參與人員： 賴寬裕、賴俊延

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：台灣大學電機工程學系

中 華 民 國 93 年 9 月 30 日

中文摘要：

以穴蝕效應為主之超音波治療法近年來在惡性腫瘤治療上受到越來越多的重視。利用超音波聚焦的能力，可針對深度患部組織做非侵入式之治療。在超音波所有非加熱性的治療方式中，利用穴蝕效應的治療方法，具有很高之潛力。穴蝕效應為液體中氣泡形成或脹大的過程。為探討穴蝕效應治療法，本研究分為穴蝕之誘發及偵測兩方面來討論。首先就誘發條件來說，由於產生穴蝕所需之穴蝕核在人體中濃度過低且分布不均，造成誘發穴蝕效應的條件相當難以控制及預測。解決的方法之一為主動注射超音波微氣泡對比劑至人體中，以提供大量之穴蝕核，且亦有助於影像偵測。本研究採用之穴蝕核以 Levovist® 及自製之微脂體為主。除加入微氣泡以作為穴蝕核之外，本計畫並設計特殊發射波形以有效誘發穴蝕效應之產生。而在偵測穴蝕效應方面，本研究採用二種量化分析方法。第一種為使用診斷用超音波儀器做影像擷取，進而利用影像亮度來定量分析治療前後之微氣泡數量，計算穴蝕效應的程度。第二種則為利用慣性穴蝕劑量來偵測穴蝕效應。本計畫先期研究部分主要成果包括成功建立一套實驗系統，探討誘發超音波穴蝕效應的條件，並能定量偵測穴蝕效果。目前已完成與發射訊號長度及工作周期等相關實驗，及有關頻率、相位以及掃描方式等各種不同誘發條件的討論。此外，亦以 Rayleigh-Plesset 方程式及 Runge-Kutta 法為基礎，發展一模擬工具，以觀察氣泡在不可壓縮液體中受聲波驅動時其半徑變化，並進一步將模擬結果與前述之穴蝕效應實驗做比較與討論。此一先期之成果，驗證了超音波穴蝕效應有效誘發及偵測之可行性，並為後續計畫之良好基礎。

關鍵字：超音波、微氣泡對比劑、微脂體，穴蝕化、癌症治療

英文摘要：

Cavitation based ultrasonic therapy has received considerable research attention for noninvasive cancer treatment. The ultrasound's low attenuation and focusing capabilities also provide opportunities for site-specific treatment of deep-seated tumors. Cavitation is the formation and activities of bubbles (or cavities) in a liquid. In order to make such a therapeutic technique feasible, efficient induction and detection of cavitation is necessary, and these are also the two main research goals of this project. Generally, acoustic cavitation is difficult to control due to the inhomogeneous concentration distribution of cavitation nuclei in blood. On the other hand, injection of microbubble based ultrasound contrast agent can provide a more uniform distribution of cavitation nuclei. The strong scattering associated with contrast microbubbles can also benefit detection of cavitation. In this project, we use Levovist® and liposome bubbles (produced in house) as our cavitation nuclei. Special transmit waveforms are also designed for effective induction of cavitation. For detection, the intensity change in B-mode and the inertial cavitation dose are used. We have successfully built an experimental system and studied the effects of pulse duration, duty cycle, frequency, phase and scanning sequence on cavitation induction. In addition, a simulator based on the Rayleigh-Plesset equation and the Runge-Kutta method has also been developed. The success of this preliminary project has built a solid foundation for on-going and future research in cavitation based ultrasonic cancer therapy.

Keywords: ultrasound, contrast microbubbles, liposome, cavitation, cancer treatment

I. 研究動機與計畫目標

根據行政院衛生署統計，在台灣地區近十年來，惡性腫瘤(癌症)死亡人數高居不下。因此，惡性腫瘤的相關治療，在近年來也越來越受重視。目前臨床上對於癌症的治療方法，主要有藥物、手術開刀及放射線療法。然而直接口服藥物，會產生很大的副作用；手術開刀為一侵入式治療法，麻醉以及出血等情況皆對病人身體造成很大的負擔；放射性治療除殺死癌細胞外，亦會損害健康細胞。因此，尋求其他方式之癌症治療法，根據病人情況做最適當之選擇，為癌症治療中相當重要的研究議題。以穴蝕效應(cavitation)為主之超音波治療法，有潛力成為治療癌症的創新技術。近年來，超音波技術在醫學診斷與治療已有廣泛之應用。相較於其他醫學影像技術，超音波具有安全性較高、可攜式、即時顯像以及良好的解析度等優點。另一方面，使用超音波熱效應[1]及穴蝕效應 [2]以治療惡性腫瘤，甚至更進一步搭配微脂體藥物輸送技術或結合基因療法之相關研究，也已逐漸受到重視。

以穴蝕效應為主，搭配以微脂體為穴蝕核之超音波治療法，具有非侵入式、易於評估及可針對深度患部做長時間治療等優點[3]-[6]，但目前在以穴蝕效應為主做超音波治療的研究上，少有以微脂體為主之研究。然而微脂體對腫瘤細胞的積聚效應，可使微脂體對腫瘤細胞具有很強的靶向特性。因此，綜合微脂體與穴蝕效應之超音波治療法，在腫瘤治療有相當大的潛力。穴蝕效應超音波治療法，是以穴蝕效應及微氣泡破壞(microbubble destruction)等兩種物理現象為主軸。穴蝕效應在物理學上的定義，指當液體中『形成』氣泡(或泛指非液體之密閉空腔)的過程。由無到有產生的氣泡，或是由小氣泡漲大到較大氣泡的過程，皆為『形成』之範疇。造成穴蝕效應的機制可以分為三種：分裂(fragmentation)，整流擴散(rectified diffusion)，穩定擴散(static diffusion)。其中，分裂又稱為瞬變穴蝕(transient cavitation)或慣性穴蝕(inertial cavitation)，指的是當微氣泡在幾微秒時間內劇烈的漲大而破壞成兩個以上的子微氣泡，其能量大量釋放的結果會產生聲壓，並造成溫度急速上升(1000K 以上)，以及自由基(free radical)之釋放。相對來說，整流擴散則是較慢的機制。整流擴散又稱非慣性穴蝕(noninertial cavitation)，其主要的成因是由於微氣泡中氣體的濃度與外界液體中氣體的濃度不一致，造成氣液交界面的擴散運動，氣體向內之擴散速度大於向外之擴散速率，而使氣泡逐漸漲大而破裂。其能量之釋放亦較前述之分裂緩和。穩定擴散則是指氣泡在一平衡狀態下漲縮的作用，其微氣泡破裂之現象並不明顯，能量釋放的程度亦遠小於前兩種穴蝕現象。

為有效利用及控制穴蝕效應，本研究分為誘發及偵測兩方面來探討。誘發條件可分為兩大類，其一為調整入射聲壓之物理參數，另一類誘發條件為微氣泡之選擇。在穴蝕效應偵測方面，目前的研究可分為活體實驗及非活體實驗兩方面。於活體實驗研究中，大多直接評估穴蝕效應治療法之結果，而較少對穴蝕效應之物理現象本身做定量偵測。非活體實驗的偵測法則有顯微鏡觀測法、光學法、以及聲學法。本研究亦利用微氣泡在液體中受到聲壓時所應遵守之物理準則，建立一套模擬工具，計算氣泡之半徑變化，以利穴蝕效應實驗之進行。綜合而言，本研究的目標在於設計一套能有效誘發及偵測穴蝕效應的系統；此外，本研究亦將結合微脂體之靶向特性，搭配微脂體之藥物輸送技術，開發穴蝕效應結合微脂體之惡性腫瘤治療法。長期目標為提升超音波惡性腫瘤治療之技術，在未來對於惡性腫瘤治療等重要的研究課題中做出貢獻。

II. 模擬方法與結果

在建立穴蝕效應實驗系統前，為瞭解不同入射波形及微氣泡等物理參數的差異對於穴蝕之影響，本研究先建立模擬工具，探討微氣泡穴蝕及破裂之程度，以供實驗設計之參考。

II. 1: Rayleigh-Plesset 方程式

分析聲波和氣泡之間的交互作用，最被廣泛使用的模型就是 Rayleigh-Plesset 方程式，它描述氣泡在液體中，受到聲波驅動時的半徑變化所應遵守的規則[7]。參考下圖 1，一微氣泡位於液體中。 a 代表微氣泡之外徑， d_s 為殼層的厚度，假設 $d_s \ll a$ ，並令殼層的剪切黏滯係數(shear viscosity)和剪切模數(shear modulus)分別為 η_s 和 G_s 。其中，剪切係數表示材料對於扭動、剪切應力與剪切應變之比值，單位為帕(Pa)。而剪切黏滯係數可視為液體流動阻力的指標，單位為泊(poise, Pa · s)，黏滯性越大的材料，其分子間吸引力越大，流動趨於緩慢，反之，黏滯性越小的物體，越容易造成擾動。 p_∞ 為離微氣泡極遠處的聲壓，等於靜水壓 p_0 加上外加的時變入射聲壓 $p_i(t)$ ， $p_L(t)$ 為微氣泡表面的聲壓， p_g 為微氣泡內的氣壓， T_1 和 T_2 分別為殼層的內表面和外表面的徑向應力(radial stress)， η_L 代表液體的剪切黏滯係數。

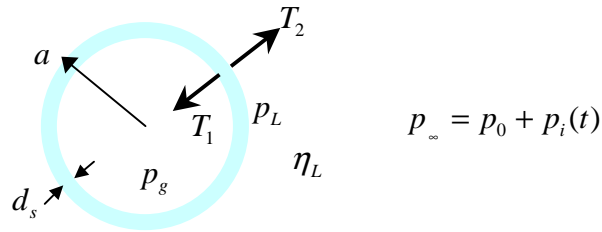


圖 1：微氣泡於液體中之示意圖

將球面座標系 (r, θ, ϕ) 的原點定在氣泡的球心。假設當氣泡受到時變的聲壓驅動時，只有半徑上的變化，並令其半徑為 $a(t)$ 。令液體中座標為 (r, θ, ϕ) 的點在時間為 t 的速度為 \mathbf{u} ，則由於整個系統為球對稱， \mathbf{u} 的 θ 分量和 ϕ 分量將為零，只剩下 r 分量，即 $\mathbf{u} = (u_r, u_\theta, u_\phi) = (u(r, t), 0, 0)$ ，其中 $u = u_r$ 。假設液體為不可壓縮(incompressible)，則其密度將為一常數，令為 ρ ，且由 equation of conservation of mass：

$$\rho \nabla \cdot \mathbf{u} + \frac{D\rho}{Dt} = 0, \quad (1)$$

可得

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (r^2 u) = 0, \quad (2)$$

進一步假設此液體之應力(stress)正比於應變的變化率(strain rate)，且具有等向性(isotropic)(即假設液體為 Newtonian)，則由 Navier-Stokes equation：

$$\rho \left[\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + (\nabla \mathbf{u}) \mathbf{u} \right] = -\nabla p + \mu \nabla \cdot (\nabla \mathbf{u}), \quad (3)$$

其中 μ 為液體的黏滯係數， p 為聲壓，可推得

$$\rho \left[\frac{\partial u}{\partial t} + u \frac{\partial u}{\partial r} \right] = -\frac{\partial p}{\partial r} + \mu \left[\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial u}{\partial r} \right) - \frac{2u}{r^2} \right]. \quad (4)$$

最後，給定半徑及半徑對時間微分的初始值，便可使用 Runge-Kutta method 來解不同入射聲壓下微氣泡半徑對時間的變化。

II.2 微氣泡半徑對聲壓之響應

有關微氣泡的參數，主要有厚度，剪切係數，剪切黏滯係數，以及半徑。厚度、剪切係數、黏滯性三者為氣泡殼層之相關參數，與氣泡破裂之難易度有密切的關係。給定誘發的聲壓以及氣泡相關物理參數，算出半徑後便可進一步判定氣泡破裂之程度。有關氣泡破裂之判定標準，前人的研究指出，當微氣泡受負壓作用後漲大到原本半徑的 2 倍，隨即受正壓作用而縮小到之前半徑的 0.1 倍時，便發生微氣泡破壞。本研究參考此種判定方法，訂定一標準來判斷氣泡破裂的程度，參考下圖 2：

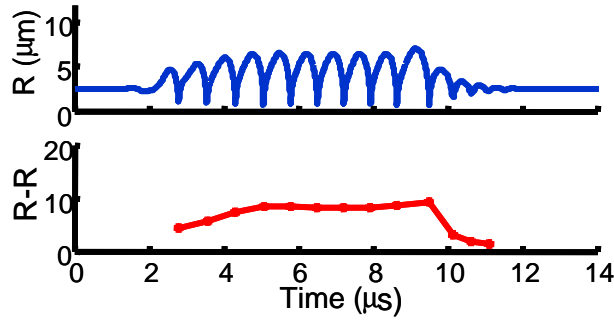


圖 2：微氣泡震盪半徑圖

圖 2 中，上圖為氣泡半徑隨時間的變化，縱軸為半徑，橫軸為時間；而下圖則為氣泡半徑每震盪一次，其半徑的極大值與極小值之比值。當氣泡半徑漲縮一次，氣泡破裂的機會就增加一次，而發生的機率又與其半徑震盪的比值有關，震盪的程度越大，越容易發生氣泡破裂的現象。考慮以上兩點，給定誘發條件後，氣泡破壞的機率之指標可以下式表示：

$$P_{destructin} = \sum \frac{R_{max.}}{R_{min.}}. \quad (5)$$

然而如前述所示，由於超音波其他效應對組織的影響，使我們亦需考量誘發穴蝕效應之聲壓。因此，以能量的觀點來看，我們訂立以下之參數 E 來衡量微氣泡破壞之效率：

$$E = \frac{P_{destruction}}{Energy_{total}}, \quad (6)$$

也就是將微氣泡破裂指標除上超音波入射能量，便得到此次誘發穴蝕之效率。由於實際實驗所誘發穴蝕及破裂之微氣泡有一定總數，而非單一顆，相較於探討單一微氣泡是否破裂，訂定 2 倍及 0.1 倍閾值之判斷標準，本研究將震盪半徑比相加以計算微氣泡破裂機率的作法，較符合實際實驗中之需求。也就是給定誘發的兩類物理參數（微氣泡及入射波形），經

過模擬工具計算後，便可得到微氣泡半徑響應，從而推算微氣泡破壞之效率。

III. 實驗方法與結果

III.1 對比劑

本研究使用之對比劑以 Levovist®(Schering AG, Berlin, Germany)及自製之微脂體為主。Levovist®注射劑為目前在台灣唯一臨床上核准可使用的超音波對比劑，為一用於靜脈注射之超音波顯影劑，其主要的成分為半乳糖(galactose)及少許的棕櫚酸(palmitic acid)，將其注入液體中會產生高濃度的微小氣泡，微氣泡平均半徑約為 2~3 μm ，對於超音波有極強的散射能力，氣泡表面由一層棕櫚酸薄殼所包圍，可以使氣泡穩定存在於液體中。微脂體亦可做為超音波對比劑及穴蝕效應中所需之穴蝕核。其化學組成主要是脂質微粒子，為許多磷脂質(phospholipids)構成，其分子形狀為親水性之圓形體(頭)及兩疏水性之長條體(尾)所組成。經過特定之製程，可將大量磷脂質分子聚合，呈現尾對尾的結構。因其尾端會聚合在一起，因此疏水層會形成雙層分布，使得整個微脂體呈現雙層球狀結構，其大小約為數百奈米(100 nm)至數微米(μm)等級，可以通過肺循環而不被排出體外。

III.2 穴蝕效應偵測

我們將超音波實驗用仿體挖一空腔以做為微氣泡放置處，在仿體旁以一診斷用超音波探頭取影像，實驗擷取到的灰階影像資料經由影像擷取卡傳回電腦，然後找到對比劑空腔位置，也就是我們有興趣的區域(Region of Interest, ROI)，再把此區域內每個相素的強度加起來，以代表該時間下的對比劑回音散射信號強度。藉由此強度的大小，可偵測該時間點下微氣泡數量。由超音波照射前後之微氣泡數量差，便可定量偵測穴蝕效應。因此，由影像亮度差便可直接定量推算穴蝕效應。下面兩圖皆為仿體之超音波影像，圖 3(a)為穴蝕效應治療前之影像，圖 3(b)則為經過長時間超音波治療後之影像，兩影像之方框區域為微氣泡放置處，也就是 ROI。

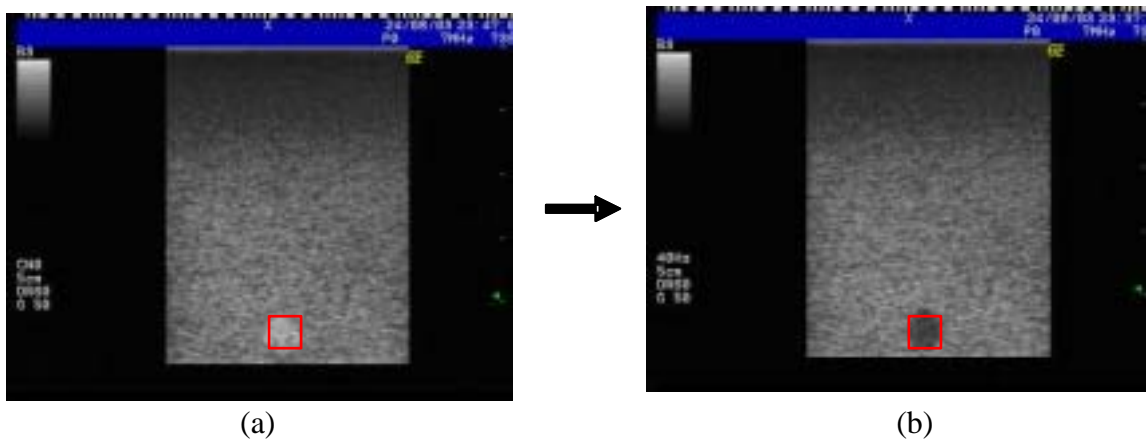


圖 3：超音波仿體影像

以 I 代表影像亮度，ROI 代表微氣泡處，可定義 ROI 之整體影像亮度如下：

$$Intensity = 10 \log \sum_{ROI} I, \quad (7)$$

藉由計算(a)與(b)之影像亮度差(Intensity)，在線性之假設下，便可反映出治療前後 ROI 之微氣泡數差異，進一步達到定量偵測穴蝕效應之目的。

當我們以超音波誘發微氣泡破裂，並量測其逆散射回音信號時，由於微氣泡破裂時間極為短促(<10 ns)，故此時產生之散射信號為一相當寬頻之信號，此寬頻信號之能量與被破壞之微氣泡數成正向關係。若我們誘發穴蝕效應之發射信號頻率為 1 MHz，並量取微氣泡區域回音信號，將信號做頻譜分析可得如類似下圖 4 上曲線，而無穴蝕發生之訊號作頻譜分析則會得到下曲線。選取一較高之頻率(10 MHz)以避開基頻(1 MHz)、二倍頻(2 MHz)以及三倍頻(3 MHz)之干擾，並在該頻率附近取出一小段頻譜(9.5 to 10.5 MHz)，則該段上曲線頻譜之振幅對頻率積分的結果，可代表寬頻信號產生量，此即為 inertial cavitation dose (ICD)。

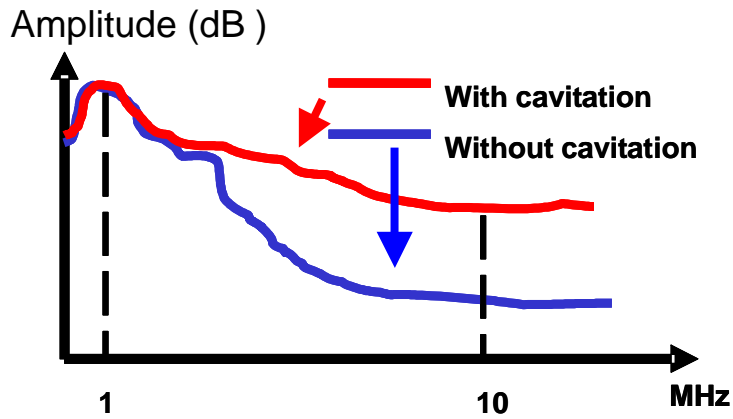


圖 4 ICD 法示意圖

實際實驗進行時，考慮對照組，令發生穴蝕所量取之訊號為 $S_c(t)$ ，而放置純水(無發生穴蝕)所量取之訊號為 $S_w(t)$ ，則可求得該次誘發條件之 ICD 值：

$$ICD = \int_{9.5MHz}^{10.5MHz} F\{S_c(t) - S_w(t)\}. \quad (8)$$

也就是將某條件下誘發穴蝕所偵測之訊號 $S_c(t)$ ，減掉同樣入射波形但將微氣泡換為水所偵測之訊號 $S_w(t)$ ，做傅立葉轉換後，在頻譜上選取對 9.5 MHz 至 10.5 MHz 做積分，便可得到該次誘發條件下之 ICD 值。ICD 可反映微氣泡破壞的程度，為一有效偵測穴蝕效應大小之參數。

III.3 實驗系統架構

首先，在穴蝕效應的誘發部分，我們設計好發射波形後，經過高速的數位類比轉換器(DAC200, Signatec, Corona, California, USA)轉換成類比信號，經由功率放大器(250A250A, Amplifier Research, Souderton, Pennsylvania, USA)放大為高電壓信號，進而激發實驗用低頻

探頭髮射信號。實驗探頭(V302, Panametrics, Waltham, MA, USA)中心頻率為 1 MHz，焦距為 6.1 cm，探頭直徑為 2.54 cm，本實驗系統聲場大小在聚焦區域最大約為 1.6 MPa。在偵測端影像亮度法的部分，我們採用一診斷用的超音波診斷儀(LOGIQ 500 System, GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin, USA)搭配一陣列探頭(10L, GE Medical Systems)以偵測穴蝕效應，此陣列探頭之中心頻率設定為 7 MHz，在實驗中並將功率調到較低值(MI<0.4)，以避免偵測同時打破對比劑微氣泡。同時為了增加影像之可讀性，將超音波儀器上之增益值亦做適當之調整。以影像擷取卡(UPG401B, UPMOST Corp., Taipei, R.O.C.)於超音波治療前後各擷取一張 B-mode 灰階影像，將資料傳回個人電腦分析。而 ICD 值部分，我們採用中心頻率為 10 MHz 之探頭(V312, Panametrics)接收訊號，探頭焦距為 4cm，直徑為 1.27 cm，而後訊號經由 5800 pulser/receiver(5800PR, Panametrics)做初步濾波及放大之處理，再送至一高速的類比數位轉換器(PDA500, Signatec, Corona, California, USA)，將資料傳回個人電腦分析。

III.4 實驗設計及結果

為驗證實驗系統之可行性，我們使用 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 MPa 等四種不同的聲壓之 5 週弦波訊號，來觀察 ICD 值與影像亮度法及聲壓之關係。其中，ICD 值之接收取樣頻率為 100 MHz，接收時間為 20 μ s；同時取擷取 B-mode 影像之 GE 診斷儀亦做以下之調整：其 power 旋鈕調降到最低，也就是將偵測探頭之入射能量降到最小，且將其 TGC(time gain compensation)鈕固定，避免因改變不同聲壓時的接收 gain 值而改變其影像亮度，B-mode 之動態範圍取 60 dB，B-mode gain 調整為 50dB，發射時間為 3 分鐘。實驗結果如下圖 5 所示：

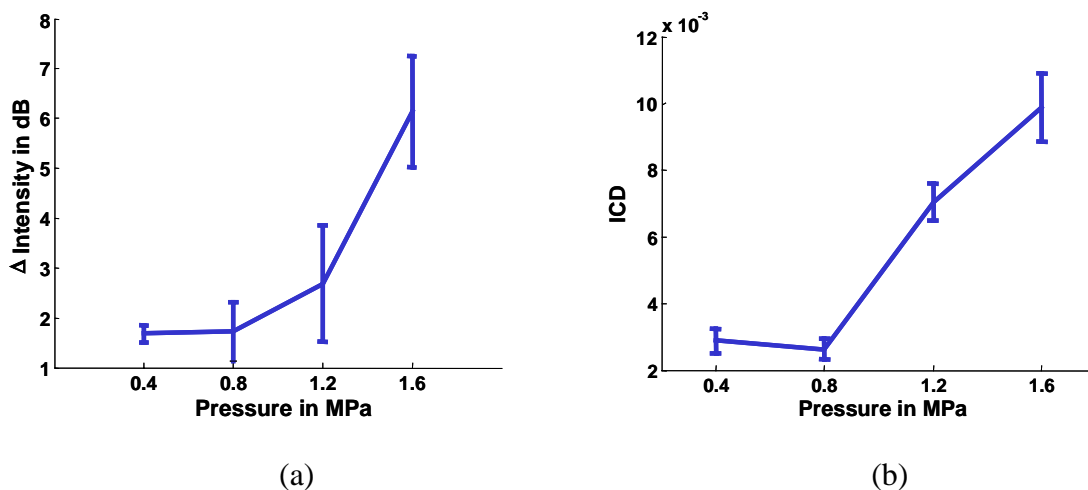


圖 5 聲壓 vs. 穴蝕效應實驗結果

上圖(a)與圖(b)兩者皆可觀察聲壓越大，ICD 值及影像亮度改變越大的現象。

除聲壓外，本研究亦探討週期數及穴蝕之關係，以瞭解超音波劑量對穴蝕之影響。我們使用週期數為 1、2、5、10、20 及 50 之聲波訊號誘發穴蝕，發射聲壓為 1.6 MPa，結果如下：

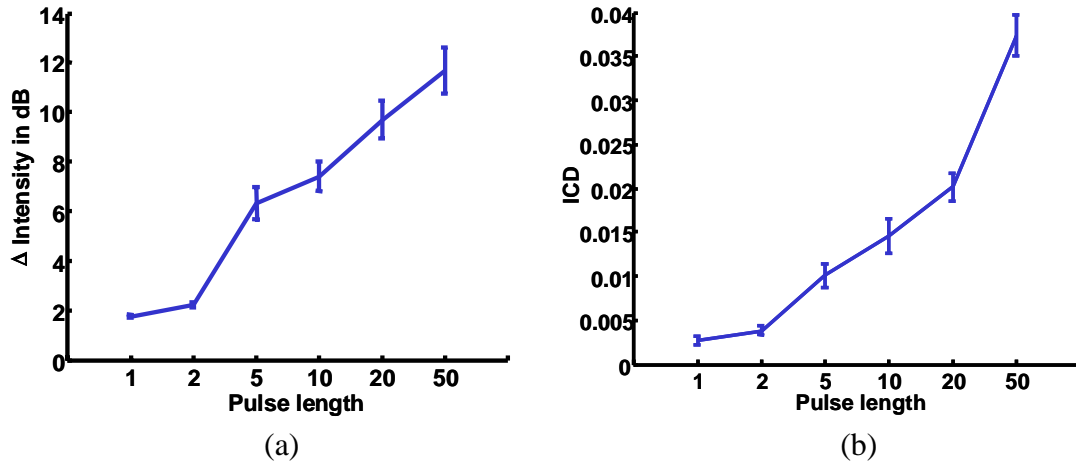


圖 6 週期數 vs. 穴蝕效應實驗結果

上圖 6(a)為影像亮度法之結果，圖(b)則為 ICD 法之結果，其 errorbar 為五次實驗之標準差。圖(a)與圖(b)兩者皆可觀察週期數越長，ICD 值及影像亮度改變越大的現象。

IV. 討論

由圖 5 之聲壓與影像亮度變化關係圖及聲壓與 ICD 值關係圖，可觀察到兩者皆有隨聲壓值加大而上升之趨勢，顯示當聲壓增加時，對比劑破裂的程度較大，且可接收到較大之 ICD 值。而 0.8 MPa 及 0.4 MPa 之 ICD 值及影像亮度變化之程度差不多，故我們可以推論，在聲壓小於 0.8 MPa 以下時，實驗系統難以比較誘發狀況之不同。而在週期數與穴蝕效應之關係實驗中，同樣可以觀察到影像亮度變化與 ICD 值隨週期數增加而上升的現象。上兩實驗皆可觀察到影像亮度變化及 ICD 值隨超音波劑量增加而上升的現象。

此外，由實驗結果可知，ICD 值及影像亮度變化有很高之相關性，將兩者做相關性比較如下圖 7 (相關係數為 0.88)。若將左下角低聲壓受到較大雜訊影響之情形去除，可以得到更高之相關性。

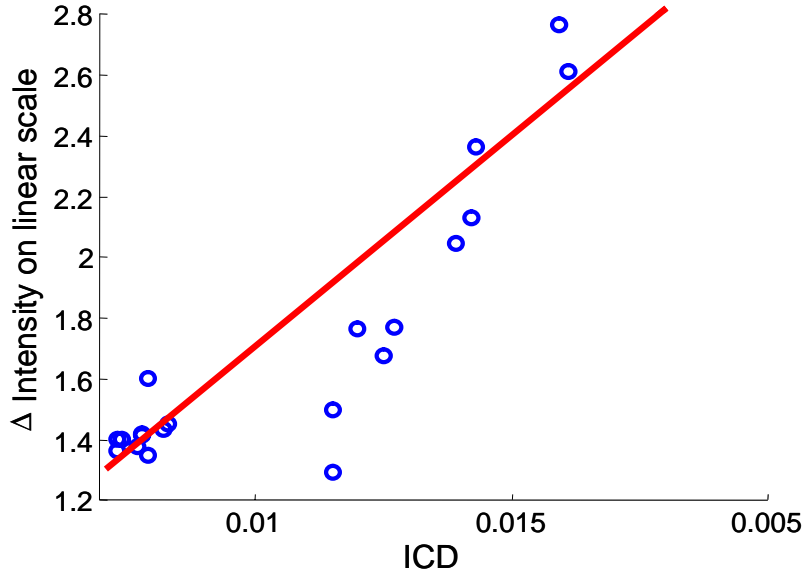


圖 7 ICD 與影像亮度變化之相

V. 結論

為研究以穴蝕效應為主之超音波治療法，本研究建立一套有效誘發及偵測穴蝕效應之系統，在誘發端設計入射波形，並於偵測端量測其穴蝕效應及微氣泡破壞之程度。此外，本研究亦利用 Rayleigh-Plesset 方程式及 Runge-Kutta 法模擬微氣泡受聲壓作用時半徑之響應，進一步訂定微氣泡破裂之效率參數，可於實際實驗前作為參考之用。在有效偵測部分，本研究利用微氣泡破裂之特性，以 ICD 法定量偵測穴蝕發生之程度，並輔以影像亮度法來觀察微氣泡消失之程度。實驗證明誘發穴蝕之超音波劑量、ICD 值、以及影像亮度變化，三者間具高度正相關性，故可利用微氣泡破裂產生之寬頻效應，推算其 ICD 值，以有效偵測穴蝕程度。在未來工作方面，我們將以自製之微脂體為主，結合靶向功能，探討不同材料組成對於穴蝕效應之影響，並進行 *in vitro* 及 *in vivo* 實驗。

參考文獻

- [1] A. V. Zaitsev, N. T. Sanghvi, S. Ikenberry, J. F. Worzalla, R. M. Schultz, and T. D. Self, "High intensity focused ultrasound (HIFU) treatment of human pancreatic cancer," *1996 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp.1295-1298.
- [2] S. Umemura, K. Kawabata, K. Sasaki, N. Yumita, K. Umemura, and R. Nishigaki, "Recent advances in sonodynamic approach to cancer therapy," *Ultrasonics*, Vol. 3, No. 3, pp. 187-191, 1996.
- [3] F. Pavanetto, P. Perugini, I. Genta, C. Minoia, A. Ronchi, U. Prati, L. Roveda, and R. Nano, "Boron-loaded liposomes in the treatment of hepatic metastases: preliminary investigation by autoradiography analysis," *Drug Delivery*. Vol. 7, No. 2, pp: 97-103, 2000.

- [4] A. Hayat, “**Development of inherently echogenic liposomes as an ultrasonic contrast agent**” *Journal of Pharmaceutical Science*, Vol. 85, No. 5, 1996.
- [5] V. V. Valentini, S. E. Murer, B. J. Kane, M. J. Vonesh, and H. A. Onyuksel, “**Antibody conjugation of acoustically reflective liposomes for tissue targeting,**” *J. Acoust. Soc. Am.*, Vol. 25, No. 9, pp. 16, 1995.
- [6] S. M. Demos, H. A. Onyuksel, B. J. Kane, K. Ramani, A. Nagaraj, and R. Greene, “**In vivo targeting of acoustically reflective liposomes for intravascular and transvascular ultrasonic enhancement,**” *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 33, No. 3, pp. 867-875, 1999.
- [7] L. Hoff, *Acoustic Characterization of Contrast Agent for Medical Ultrasound Imaging*. Trondheim, Norway, 2001.