

光動力診斷及相關技術於疾病診斷之應用

王智昱/義守大學 生物醫學工程系教授

陳進庭/台灣大學醫學院光電生物醫學研究中心暨生命科學院微生物生化研究所副教授

前言

「光」是一種電磁波；由於可見光人眼可見，是人類最早也最熟悉的能量來源之一。雖然在兩三百年前，便有人提出以光作為診斷工具的想法，但是受限於科技能力，並未發展成為有用的診斷技術。近年來，由於光電技術的突飛猛進，利用光來進行非破壞性檢測的技術蓬勃發展；而許多原本使用於其它工程領域的光電技術，都被應用到醫學工程的領域之中，至此「光」才開始大量且有系統地被使用來進行醫療診斷。與現行醫療系統中許多檢測方法相較，低能量的「光」具有低侵入性、價格低廉、對人體無傷害等優點，頗具發展之價值與潛力，也因此吸引眾多研究者在生醫光電領域上投注心力[1-9]，更創造了許多新的診斷技術，為疾病診斷開啓了一扇機會之窗。

光有四種主要之物理參數——「波長」、「強度」、「相位」以及「偏極性」，其個別或組合應用可提供十分豐富的資訊；因此其應用面向非常廣泛。然而其於醫療診斷上之應用可概分為兩個主要分支，即「光譜量測」及「光學造影」。就光譜量測技術而言，可量測組織之生物物理或生物化學特性所反映出來的光譜型態，如散射、反射與吸收係數之值（散射光譜、反射光譜）、光的非彈性散射（拉曼散射）、折射率之改變（表面電漿共振技術）、電子之躍遷與能量轉換（螢光及磷光光譜）、分子之振動及轉動（紅外光譜）等。當組織發生病變時，其物理或化學特性發生變化，因而造成光譜型態的變化。比較正常與病變組織的光譜型態，即可診斷出病變組織[10]。而光學造影技術則量測前述參數之二維或三維變化，反映出組織整體結構特性，包含電子之躍遷與能量轉換之幾何分布情形（穩態與時間解析螢光影像、奈米量子點螢光影像）、界面反射結合光學干涉現象造影（光學同調斷層掃描）、量測組織的光學特性，如吸收係數、散射係數，以及折射

率之改變（超快造影、功能性紅外線造影技術）等。由於個別型態之組織（如癌症組織與正常組織）其生物物理與生物化學特性各異，光學特性亦皆不同。量測不同組織與間的光學特性差異，便能進行病變診斷[11,12]。

一般而言，生物組織對可見光與近紅外光波長的光子有極強的散射作用，使得此類波長的光不易深入組織[13]；此一重要特性也對其應用造成了限制，因此一般的光譜量測多應用於表面病變組織的診斷。然而實際應用上，許多疾病發生於較深處，因此「量測深度」也是工具好壞之重要指標。而為了量取較深層的組織影像，研究者提出多種造影的方法，包括光學同調造影技術（optical coherence tomography）、擴散光子密度波（diffuse photon density wave）及超快造影（ultrafast imaging）等，加強了光學造影技術的可行性。

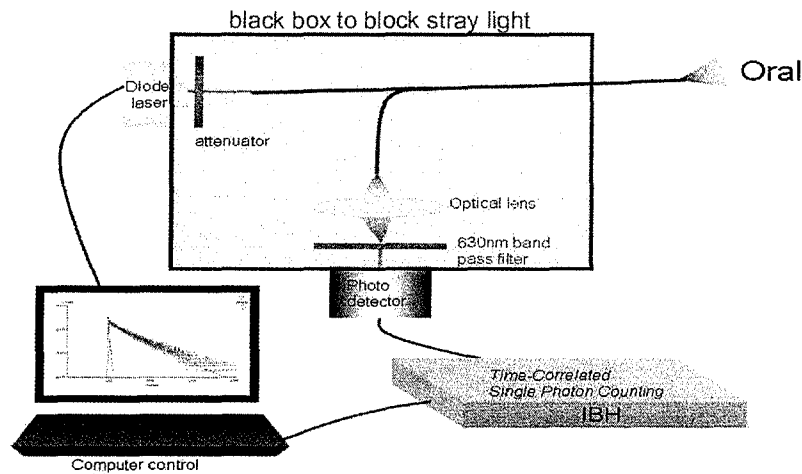
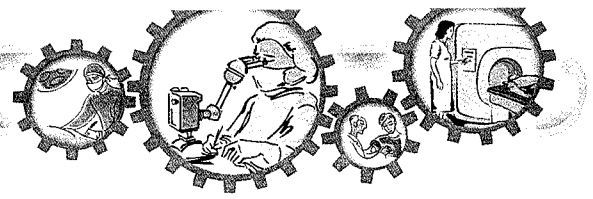
為使讀者對於生醫光電於醫療診斷之應用上有較為清楚的了解，筆者依「表淺病灶診斷」以及「深入病灶造影」兩類應用，挑選了幾種「光譜診斷」與「光學造影」相關的技術，包括時間解析螢光光譜在癌症診斷之應用、螢光影像應用於口腔癌診斷、光學同調斷層掃描之發展，以及超快造影技術等，說明其原理與應用領域。

一、表淺病灶診斷

某些疾病發生的位置比較表淺，因此其診斷重點在於疾病之分類（如癌症之分級）與範圍之大小。單光子螢光光譜法已實現於光譜量測以及螢光影像擷取，在口腔癌組織診斷上有不錯的成果。以下將簡介單光子螢光光譜法在口腔癌診斷上之應用。

1. 時間解析螢光光譜應用於活體口腔癌檢測

利用組織自體螢光來進行癌症診斷，具有價低廉、準確性高、即時診斷等優點。穩態螢光在目前已有的發展，癌症鑑識度也高，但其卻也存在著個別成分鑑

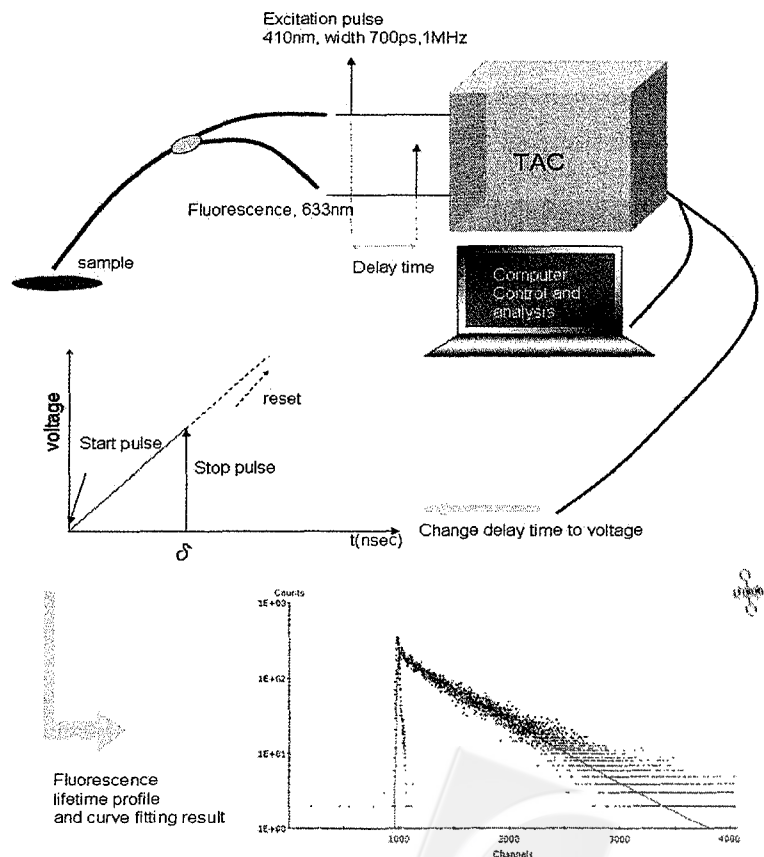


圖一 口腔活體時間解析螢光量測系統

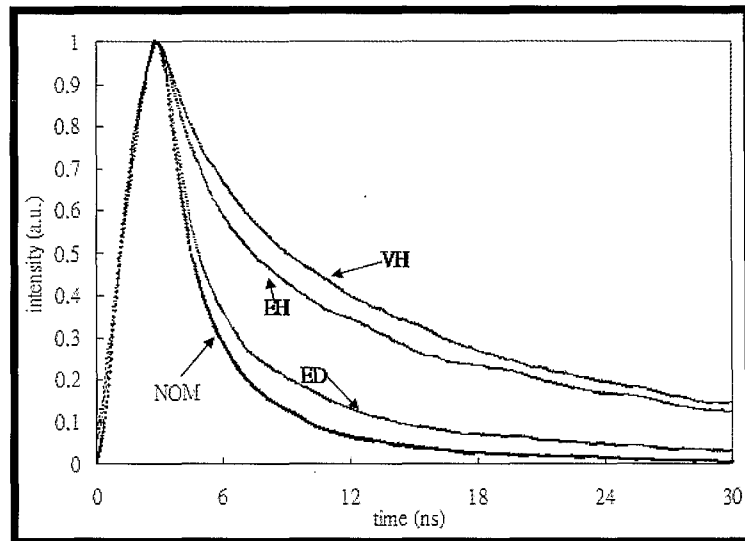
別度低、訊號干擾較大、激發光強度及照射角度影響螢光強度等缺點[14]。而利用時間解析螢光生命週期之方法，能改善穩態螢光所存在的缺點，檢測到極弱的螢光，提高鑑識的靈敏度。人體組織含有不同的螢光物質，其分布受組織異常增生變化影響；利用人體本身自體螢光protoporphyrin IX的特殊性質，經由特定波長的雷射激發後，量測螢光的生命週期，其螢光生命週期會因為其組織型態而產生差異。由分析、辨別不同之螢光生命週期，即可鑑視出正常、增生、及癌症病變組織結構的改變[15]。因此，我們期望藉由自體螢光結合時間解析，判讀螢光生命週期，發展出即時、準確度及鑑識度高之癌症檢測系統。

時間解析螢光光譜之量測，需高感度光學偵檢器方能竟功，而「時間相關單光子計數(time-correlated single photon counting)」裝置是常用儀器之一。在Wang et al等人[ref]以時間解析螢光量測建立活體口腔癌診斷技術；其量測系統包含紫光短脈衝雷射(pulse width=700ps, 410nm)、單光子計數裝置(IBH, UK)、特用型Y-形光纖等(圖一)。「單光子計數」之主要原理，是利用一台TAC裝置(time-to-amplitude converter)，將所耗費之時間長短，轉換成電壓大小，藉以快速且準確地決定事件發生之開始與結束時間。量測時，採用能量極弱的短脈衝激發光，使得受激組織一次只能發出單個光子。該光子到達偵測器時間的機率，與螢光對時間之分布形態(profile)成正相關。因此，計數各不同時間到達偵測器的光子數目，即可得到螢光對時間之分布形態(圖二)。

圖三顯示了四類口腔組織(正常--NOM, 表皮增厚--EH, 乳突狀增生變異--VH與表皮增生變異--ED)的典型衰減曲線。圖中可以看出，EH與VH的衰減時間最長，ED次之，NOM則很明顯是最短的。由此判斷以時間解析螢光量測判別不同口腔組織應為可行。



圖二 光子計數裝置量測原理示意圖



圖三 四種口腔組織

verrucous hyperplasia (VH), epithelial hyperplasia (EH), epithelial dysplasia (ED), 與 normal oral mucosa (NOM) 樣本的典型時間衰減曲線。

2.5- 氨基酮戊酸(5-ALA)引致 PpIX 之螢光影像應用於口腔癌診斷

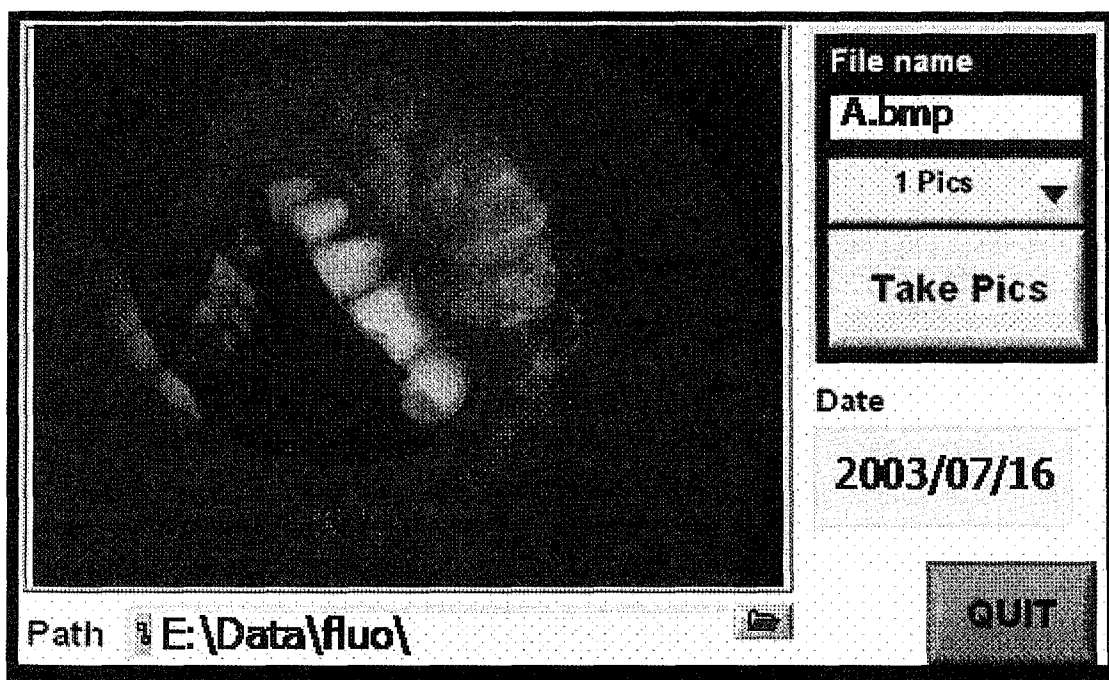
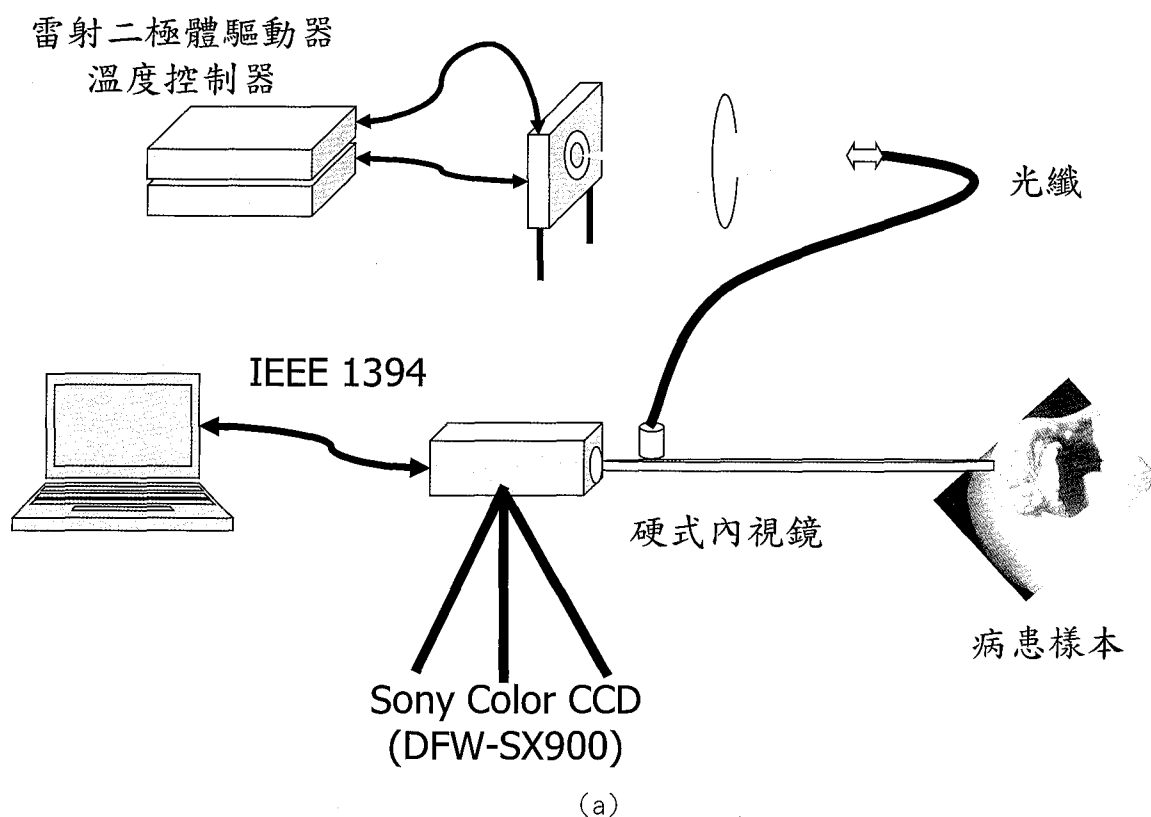
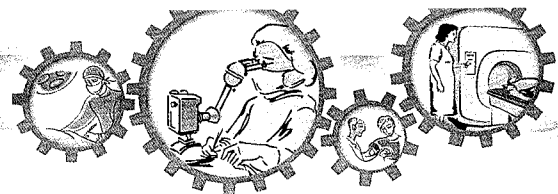
前述之自體螢光光譜的癌症診斷法，可以檢測出癌前及癌症組織[16,17]。然而，由於台灣的口腔癌患者多為教食檳榔所造成(比例高於88%)，因此有許多病患也伴隨口腔黏膜下層纖維化，造成自體螢光測量的誤差[14]。藉由量取ALA被代謝後產生的螢光物質即可克服這個困難。ALA塗於口腔黏膜組織，可被細胞代謝成PpIX，造成該物質的聚集。經由雷射光(波長410nm)激發後，此螢光物質可放射出紅光(波長630nm)，此現象在病變組織特別的顯著，而在其他正常組織較無明顯的變化。由於ALA代謝所產生的螢光物質PpIX是細胞中原本就具有的，並不會有外加毒性的疑慮，因此有許多研究者致力於此螢光染劑的研究。國內相關之研究，結合了台大光電生物醫學研究中心、牙醫系、北醫大生醫材料系、義守大學生物醫學工程系等相關實驗室，整合了生物、藥劑、醫工以及臨床等領域，已有初步之成果[18]。量測進行前，先於病患的口腔組織塗抹內含ALA的液狀賦形劑，該賦形劑於口腔內遇熱即凝成膠狀。藥品於塗抹患處後，需經一定時間後，ALA方能經黏膜吸收進入組織。為了解螢光影像隨著時間的變化，該研究於不同的時間點(塗抹後30分鐘、1小時、1.5小時以及2小時)擷取白光影像及螢光影像，並加以分析。

該研究採用紫光雷射二極體(NDHV310ACA, Nichia, 30mW, 405nm)作為激發光源。激發光經由透鏡聚焦後打入導光光纖。光纖將激發光導引至硬式內視鏡(Stoke GmbH)前端後均勻打到待測組織，並激發出螢光。螢光影像經內視鏡送至高解析度彩色CCD(Sony)，經由IEEE 1394介面成像在電腦螢幕上，供醫師進行判定，並可儲存影像(圖四)。

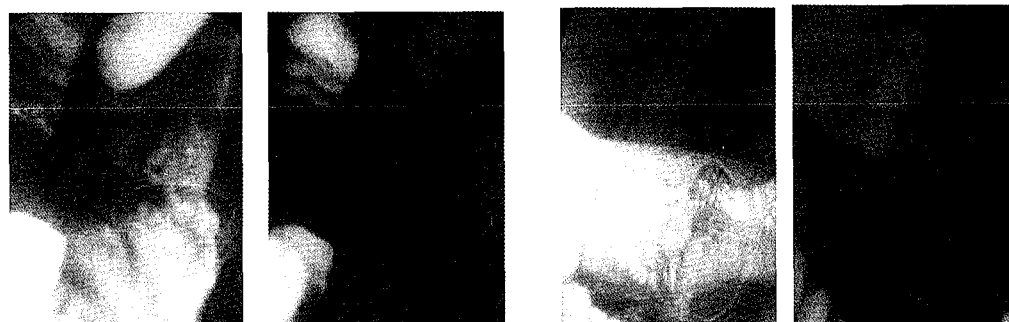
圖五為某位病患(經切片檢驗為medium dysplasia)之白光影像及螢光影像。其中(1)為塗抹ALA30分鐘後，病變之處尚未明顯出現紅光反應。(2)則為給予ALA1小時之後，病變處的紅光反應漸趨明顯，顯示出PpIX漸漸聚集當中。(3)為給予ALA2小時後，病變處的螢光已經呈現很顯著的紅光反應，顯示出已經聚集了大量的PpIX。配合影像處理方法，可以依病變程度將病灶位置圈出，在協助臨床醫師進行診斷時將十分有用。

二、深入病灶造影

欲利用光學方法，達成深入人體組織之醫用光學造影，其主要挑戰是光的散射問題。光子一旦進入人體組織，散射便十分嚴重。由於散射光所具有的影像資訊很少，且會掩蓋具有影像資訊的少量光子，使影像模糊完全無法解析；因此光學造影如要成功，首先必須克服光子散射的問題。為達此目的，一般「光子閘截技術」，即利用特殊之光學方法將具有影像資訊之少量



圖四 (a) 螢光影像量測系統示意圖。(b) 自行開發之螢光影像擷取介面



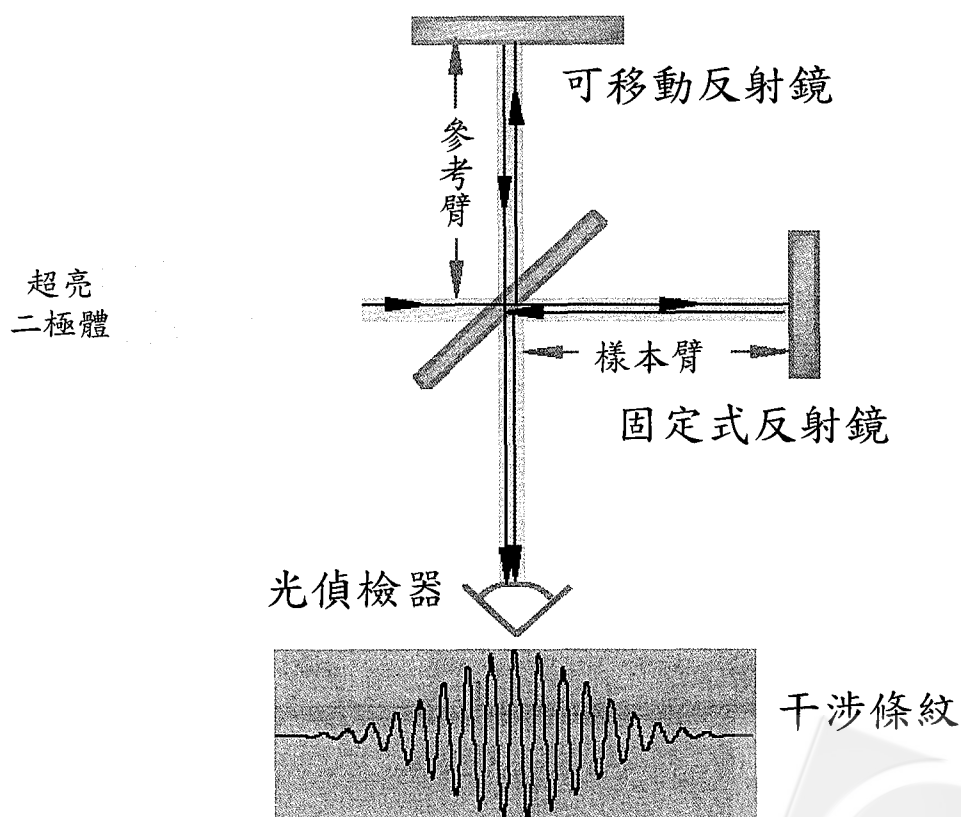
(a) 塗抹 ALA 30 分鐘後

(b) 塗抹 ALA 1 小時後

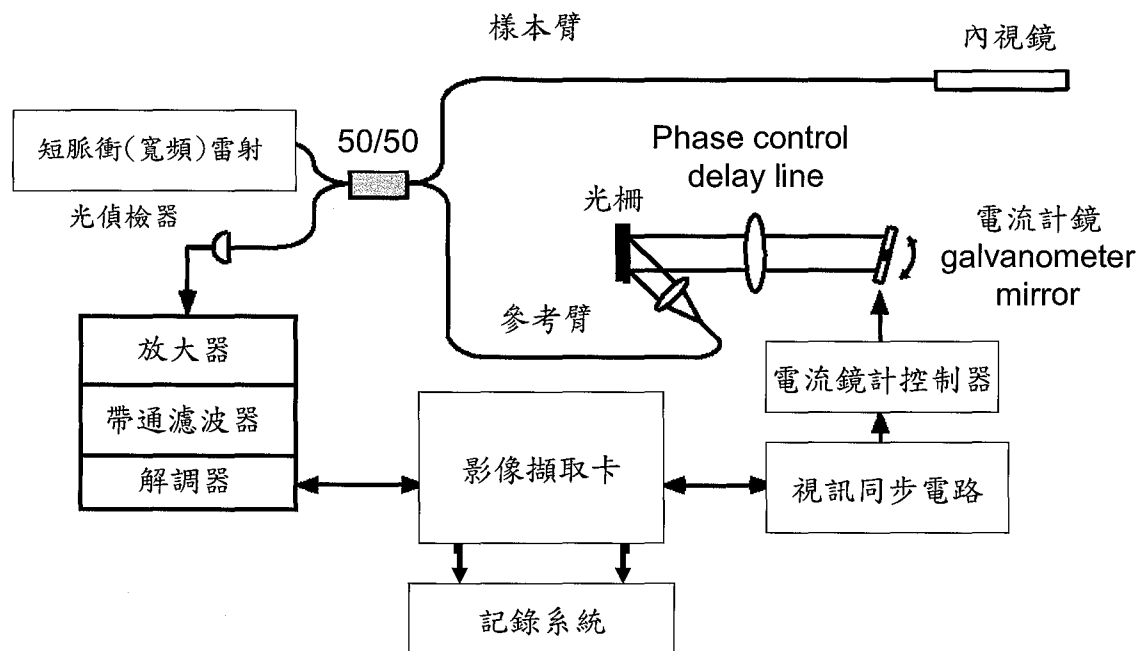
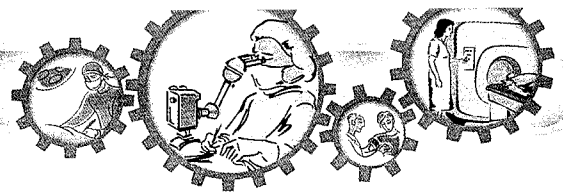


(c) 塗抹 ALA 2 小時後

圖五 中度組織分化不良的白光影像（左）與螢光影像（右）



圖六 光學同調斷層掃描架構示意圖



圖七 光纖內視鏡式光學同調斷層掃描系統架構示意圖

光子擷取出來，作為造影之用。研究者發展了數種方案解決此一問題，筆者就其中較為典型的兩種方法，即「光學同調斷層掃描」與「光學超快造影術」加以說明。

1. 光學同調斷層掃描

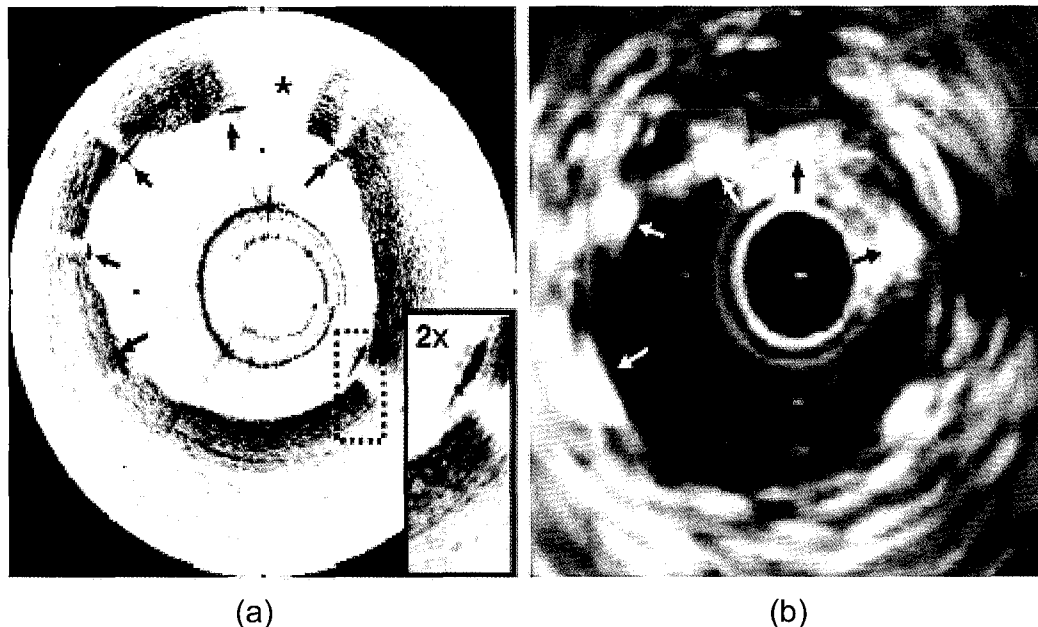
光學同調斷層掃描之基本原理，係利用光的干涉原理來達成，其架構類似於麥克爾遜干涉儀，如圖六所示。本法使用之光源為短光同調長度(coherence length)之超亮二極體(super luminance diode)，因此只會在極短的距離內發生干涉(約數個 μm)。入射光由分光鏡分光之後，經參考臂(reference arm)與樣本臂(sample arm)反射，再經分光鏡後進入光偵檢器。若兩臂距離相當，則可測得干涉訊號；距離不同則不發生干涉。因此若量測其干涉訊號，則可以顯示高軸向解析度的影像。早期發展時，係利用一定之速率移動待測物，當發生干涉時將有固定頻率之明暗變化；藉由鎖相濾波器可測得這些變化(亦即有訊號)，並進行造影。

光學同調斷層掃描若使用自由空間(free space)之架構，將無法應用於內視鏡，對於觀察人體內部器官是一大阻礙。此外，傳統方法造影速度過慢，超亮二極體之光強度有其極限，而且亦無法滿足高解析度之需求。圖七顯示了改良後之光學同調斷層掃描架構示意圖。利用

光纖導光方式，已使該方法得以應用於內視鏡，觀察人體內部重要器官[19]。而利用電流計鏡(galvanometer mirror)、透鏡與光柵做成之phase control delay line，取代了原先機械式掃描的量測方法，在掃描速度上做了大幅度改進，也使造影達到“video rate”之能力，使得「即時顯像」成為可能。而解析度方面，一般紅外光雷射雖然是很強的照射光源，但其光同調長度過長，無法進行光學同調斷層掃描之造影。然而，近年來由於短脈衝雷射的進一步發展，使得雷射之頻寬增加。由於光源之頻寬愈寬，光同調長度便愈短；而光源之脈衝長度愈短，便會造成愈大的頻寬。因此，短脈衝及寬頻光源之發展，以提高解析度，亦為本方法中一項研究之重點。

圖八顯示了 Fujimoto 等人利用光纖內視鏡架構之光學同調斷層掃描系統，量測動脈粥狀硬化斑之造影成果。其中左圖為 OCT 所造之影像，右圖則為血管內超音波所得到之影像。另人驚異的是，OCT 所得影像之解析度，較超音波影高出許多；其中有許多細節的部份(圖中箭頭所指之處)，超音波造影並無法清楚解析。而 OCT 技術更可克服一般光學造影無法深入組織內部等困難，在醫學檢測應用上確實具有極佳得前景與潛力。

2. 超快造影技術



圖八 動脈粥狀硬化斑之造影：(a)光學同調斷層掃描造影。(b)血管內超音波造影

人體組織對光而言，可視為非均質的混濁介質，其中佈滿大小與形狀都不相同的粒子(particles)；光子進入人體組織之後，與這些粒子碰撞，即會遭遇不同程度的散射與吸收。光子與組織發生交互作用之後，會發生「直行光子(ballistic photons)」、「蛇行光子(snake photons)」以及「擴散光子(diffuse photons)」等三種不同狀況[20]。其中直行光子與蛇形光子因在組織中僅受到少量的散射，具有較為豐富之影像資訊，且較散射光子更早到達光偵檢器，因此可用來作為造影之用。圖九顯示了光子與組織交互作用結果示意圖。

為實現直行光子與蛇形光子之閘截，可利用短脈衝雷射光源照射人體組織，光脈衝在組織中進行並穿出後將被拉長。利用高速之光偵檢器閘截早期到達偵測器之光子，便可進行造影。若依人體組織之一般厚度與光學特性計算，以一道數百 fs 至數個 ps 的短脈衝照射後，在數百 ps 內到達偵測器的光子可視為直行與蛇行光子。因此，若能閘截到這些光子，將可得到高解析度之影像。

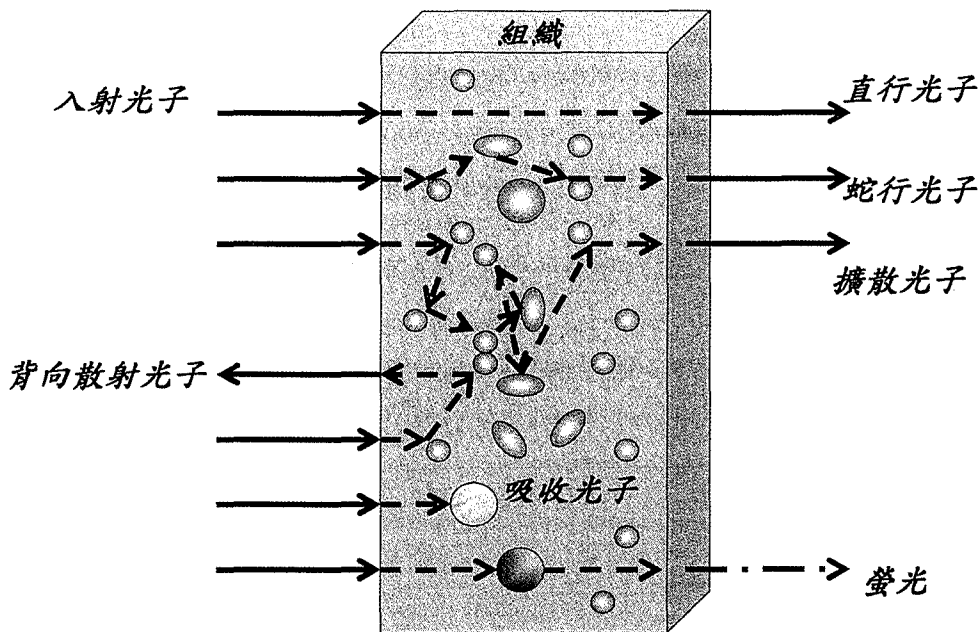
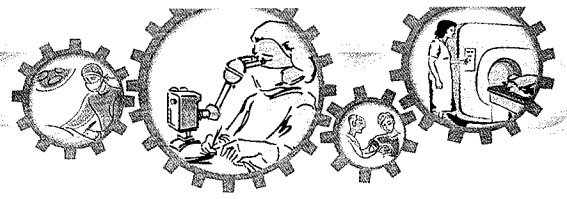
閘截早期到達偵測器之光子，方法各殊；一般可分為時間解析(time-resolved)，頻率解析(frequency-resolved)與極化閘定(polarization gating)等方法。由於時間解析是最直接與最容易瞭解的方法，因此我們將介紹這個方法。在較早期的研究中，有許多研究者利用超快光學的非線性現象來閘截光子，如 Kerr gate、Raman

amplification、femtosecond parametric amplification、Fourier spectrum imaging、four-wave-mixing等方法。這些方法需要較進階的光電技術，所需費用亦較高。此外，若欲量測時間波形，前述方法則顯得較為麻煩。近年來有許多的研究者採用條紋照相機(streak camera)來量測這些超快現象。條紋照相機的原理如下：當入射光打在光電管上，便會激發出電子。若再電子到達螢光屏的途中，加上偏向電壓，並快速地掃描，不同時間到達的光訊號便會依序顯現在螢光屏上。利用此法來量測超快現象，其時間解析度最高可以到達2ps。研究顯示，利用條紋照相機，配合二維掃描平台量測混濁溶液內之物體，並閘截時間波形中較為前緣的光訊號，可以得到清晰的影像[21,22]；這驗證了本方法的確是可行的。

雖然利用條紋照相機來量測可以得到高時間解析度的訊號，但在形成二維影像時，則須利用二維掃描平台進行掃描，此舉會花費許多的時間。近年來由於具有高速快門的加強形電子耦合裝置照相機(Intensified CCD camera)的快速發展，其快門最快可達到80ps，因此可以閘截到極短時間內的光訊號。由於此類照相機可以直接取得影像，因此更適合作為組織造影之用。亦有研究者以利用這類相機得到不錯的研究成果[23]。

結 論

由於光對組織而言，基本上並不會造成傷害。因



圖九 光子與組織交互作用示意圖

此，利用光電科技來進行癌症診斷，最重要的便是希望達到「非侵入式診斷」的目標。而光電科技依其量測方式，可概分為光譜量測與光學造影二類；而其於在醫療上的應用，在「表淺病灶」與「深入病灶」二種不同的需求上，皆各有其可資運用之方法。由於光電技術的日新月異，其於醫療相關領域之應用日廣，因此其前景是十分看好的。

參考文獻

- [1] C. Y. Wang, C. T. Chen, C. P. Chiang, S. T. Young, S. N. Chow, and H. K. Chiang (1999) A probability-based multivariate statistical algorithm for the autofluorescence spectroscopic identification of oral carcinogenesis. *Photochem Photobiol*, 69(4): 471-477.
- [2] C. Y. Wang, C. T. Chen, C. P. Chiang, S. T. Young, S. N. Chow, and H. K. Chiang (1998) Partial least-squares discriminant analysis on autofluorescence spectra of oral carcinogenesis. *Appl Spectrosc*, 52(9): 1190-1195.
- [3] V.V. Lazarev, R.A. Roth, Y. Kazakevich, and J. Hang (1999) Detection of premalignant oral lesions in hamsters with an endoscopic fluorescence imaging system. *Cancer*, 85 (7): 1421-1429.
- [4] L. Wang, P. P. Ho, C. Liu, and R. R. Alfano (1993) Ballistic 2-D imaging through scattering walls using an ultrafast optical Kerr gate. *Science*, 253: 769-771.
- [5] E. Abraham, E. Bordenave, N. Tsurumachi, G. Jonusauskas, J. Oberle, and C. Rulliere (2000) Real-time two-dimensional imaging in scattering media by use of a femtosecond Cr⁴⁺:forsterite laser. *Opt. Lett.* 25: 929-931.
- [6] C. Doule, T. Lepine, P. Georges, and A. Brun, "Video rate depth-resolved two-dimensional imaging through turbid media by femtosecond parametric amplification (2000) *Opt. Lett.* 25: 353-355.
- [7] S. P. Morgan, M. P. Khong, and M. G. Somekh (1997) Effects of polarization state and scatterer concentration on optical imaging through scattering media. *Appl. Opt.* 36: 1560-1565.
- [8] C. W. Sun, C. Y. Wang, C. C. Yang, Y. W. Kiang, I. J. Hsu, and C. W. Lin (2001) Polarization gating in ultrafast-optics imaging of skeletal muscle tissues. *Opt. Lett.* 26(7): 432-434.
- [9] J.G. Fujimoto, S.A. Boppart, G.J. Tearney, B.E. Bouma, C. Pitris, and M.E. Brezinski (1999) High resolution in vivo intra-arterial imaging with optical coherence tomography.

Heart. 82(2):128-133.

[10] A. Mahadevan (1996) Fluorescence and Raman spectroscopy for diagnosis of cervical precancers. Ph.D. dissertation. The University of Texas at Austin.

[11] G. Marquez, L. V. Wang, S. P. Lin, J. A. Schwartz, and S. L. Thomsen (1998) Anisotropy in the absorption and scattering spectra of chicken breast tissue. *Appl. Opt.* 37: 798-804.

[12] S.A. Walker, S. Fantini, and E. Gratton (1997) Image reconstruction by backprojection from frequency-domain optical measurements in highly scattering media. *Appl. Opt.* 36(1): 170-179.

[13] R.R. Anderson and J.A. Parrish (1981) The optics of skin. *J. Invest. Dermatol.* 77: 13-19.

[14] T.M. Tsai, H.M. Chen, C.Y. Wang, J.C. Tsai, C.T. Chen, and C.P. Chiang (2003) In vivo autofluorescence spectroscopy of oral premalignant and malignant lesions: distortion of fluorescence intensity by submucous fibrosis. *Lasers Surg. Med.* 33(1), 40-47.

[15] H.M. Chen, C.P. Chiang, C. You, T.C. Hsiao, C.Y. Wang (2005) Time-resolved autofluorescence spectroscopy for classifying normal and premalignant oral tissues. *Lasers Surg. Med.* 37: 37-45.

[16] C.Y. Wang, T.M. Tsai, H.M. Chen, C.T. Chen, and C.P. Chiang (2003) A PLS-ANN Based Classification Model for Oral Submucous Fibrosis and Oral Carcinogenesis. *Lasers Surg. Med.* 32(4): 318-326.

[17] H.M. Chen, C.Y. Wang, C.T. Chen, H. Yang, Y.S. Kuo, W.H. Lan, M.Y.P. Kuo, and C.P. Chiang (2003) Autofluorescence spectra of oral submucous fibrosis. *J. Oral Pathol. & Med.* 32(6): 337-343.

[18] C.L. Chang, T.M. Tsai, C.T. Chen, C.P. Chiang, H.M. Chen, C.Y. Wang (2003) A Fluorescence Imaging System for in vivo Oral Precancer Detection. *Biomedical Engineering Society 2003 Annual Symposium*. Taipei, Taiwan, December 12-13.

[19] E. Abraham, E. Bordenave, N. Tsurumachi, G.

Jonusauskas, J. Oberle, and C. Rulliere (2000) Real-time two-dimensional imaging in scattering media by use of a femtosecond Cr⁴⁺:forsterite laser. *Opt. Lett.* 25: 929-931.

[20] L. Wang, P.P. Ho, C. Liu, G. Zhang, and R.R. Alfano (1991) Ballistic 2-D imaging through scattering walls using an ultrafast optical Kerr gate. *Science*. 253: 769-771.

[21] C. W. Sun, C. Y. Wang, C. C. Yang, Y. W. Kiang, I. J. Hsu, and C. W. Lin (2001) Polarization gating in ultrafast-optics imaging of skeletal muscle tissues. *Opt. Lett.* 26(7): 432-434.

[22] C. W. Sun, C. Y. Wang, C. C. Yang, Y. W. Kiang, Chih-Wei Lu, I. J. Hsu, and C. W. Lin (2001) Polarization dependent characteristics and polarization gating in time-resolved optical imaging of skeletal muscle tissues. *IEEE Journal on Selected Topics of Quantum Electronics*. 7(6): 924 - 930.

[23] M.E. Zevallos, S.K. Gayen, B.B. Das, M. Alrubaiee, and R.R. Alfano (1999) Picosecond electronic time-gated imaging of bones in tissues. *IEEE J. Selected Topics in Quantum Electronics* 5(4): 916-922.

