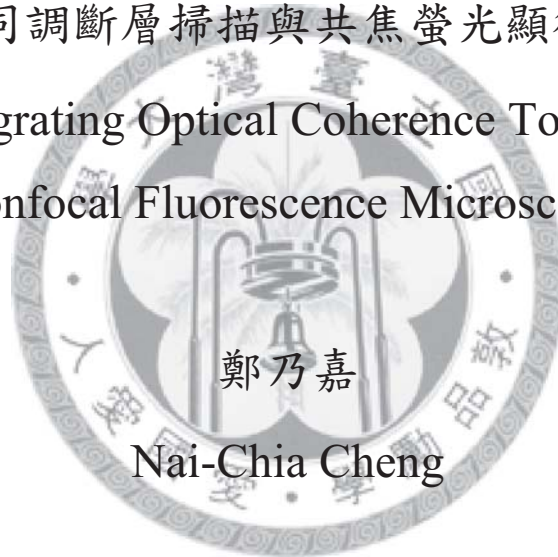


國立臺灣大學電機資訊學院光電工程學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Photonics and Optoelectronics  
College of Electrical Engineering and Computer Science  
National Taiwan University  
Master Thesis

結合光學同調斷層掃描與共焦螢光顯微術之研究  
Study of Integrating Optical Coherence Tomography and  
Confocal Fluorescence Microscopy



指導教授：黃升龍 博士

Advisor: Sheng-Lung Huang, Ph.D.

中華民國 99 年 7 月

July 2010

## 摘要

光學同調斷層掃描與共焦螢光顯微術為目前兩種最主要的非侵入式光學診斷技術。光學同調斷層掃描，是利用光子在組織內散射特性的變化，提供組織內部之結構性資訊；而共焦螢光顯微術，則藉由量測出之點對點螢光訊號在空間中的分佈情形，達到高解析度功能性造影之目的。由於此兩種技術能提供互補性的影像資訊，並且皆具有微米等級的空間解析度，因此將兩者整合為一具有兩種工作模態之光學影像系統一直是十分熱門且重要的研究主題。

本論文中，我們自製了雙纖衣結構的摻鈷釷鋁石榴石晶體光纖，當此光纖以波長 445 nm 的藍光雷射二極體作為幫浦光時，可產生中心波長 560 nm、頻寬 98 nm 之放大自發輻射，將其作為光學同調斷層掃描的光源，在空氣中可達到 1.52  $\mu\text{m}$  的縱向解析度；同時又以藍光半導體雷射作為共焦螢光顯微術的激發光源，成功建立了一套具有三維空間解析能力之雙模態光學影像系統。我們並利用摻鈷釷鋁石榴石晶體粉末作為樣本，驗證了此系統對樣本同一空間的影像整合與疊合能力，縱向疊合範圍達 107  $\mu\text{m}$ 。此初期研究成果展現了本系統對於生命科學或是醫學的研究上都極具應用潛力。

我們另外也使用光學同調斷層掃描對培養皿中的肺癌細胞與人體間葉幹細胞進行三維造影。在自製的細胞模型中，我們發現癌細胞與幹細胞在空間中互相接近時，癌細胞有移向幹細胞的現象，顯示出我們所建立的光學同調斷層掃描系統具有檢測非活體細胞模型中之細胞化學趨向性的能力，未來更可結合共焦螢光顯微術對此模型提供更為精確的三維影像與定量分析。

## Abstract

Optical coherence tomography (OCT) and confocal fluorescence microscopy (CFM) are the two most important noninvasive optical diagnosis techniques nowadays. OCT provides structural information in tissue by detecting variation of scattering property of living sample, where CFM measures the intensity of fluorescence signals point-to-point in three-dimensional (3D) space, and achieves high resolution functional imaging. The two techniques provide not only spatial resolution with micrometer scale but also complementary image information. Therefore, it is an very important research object to integrate the two techniques into a two modal optical imaging system up to now.

In this thesis, we use a 445 nm laser diode as excitation light of CFM and pumping source of broadband amplified spontaneous emission (ASE) generated by  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG double-cladding crystal fiber, successfully construct a two modal imaging system with 3D resolving power. By using  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG particle as sample, we verify the ability of two modal image integration, and this preliminary result demotrate the application potential of our system on medical and life science.

We also perform 3D imaging on cultured human pulmonary adenocarcinoma cells and mesenchymal stem cells. In a homemade cellular structure, we find that cancer cells have the tendency of approaching stem cells when they get closer. By using fluorescence protein transfected cells as sample, we can make a much more quantitative analysis of this phenomenon with the help of CFM in our system in the future.

# 目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	V
第一章 緒論與研究動機.....	1
第二章 基礎理論介紹.....	5
2.1 解析度的概念.....	5
2.2 共焦螢光顯微術.....	7
2.2.1 基本架構及原理.....	7
2.2.2 成像理論與系統解析度.....	9
2.2.3 針孔大小對共焦顯微系統的影響.....	17
2.2.4 螢光特性與螢光物質.....	19
2.3 光學同調斷層掃描術.....	22
2.3.1 干涉.....	22
2.3.2 低同調干涉術.....	25
2.3.3 系統解析度.....	29
第三章 系統架構與設計.....	31
3.1 系統光源.....	31
3.2 光學系統架構.....	36
3.3 掃描系統.....	39
第四章 實驗結果與分析.....	43
4.1 系統測試.....	43
4.1.1 光學同調斷層掃描.....	43
4.1.2 共焦螢光顯微術.....	46

4.2	摻鈰釷鋁石榴石晶體粉末.....	50
4.3	癌細胞與幹細胞模型.....	56
4.3.1	細胞培養.....	56
4.3.2	樣本架構.....	57
4.3.3	實驗結果.....	59
第五章	結論與未來工作.....	66
參考文獻	.....	68



## 圖目錄

圖 2-1 (a)兩點可分辨 (b)兩點不可分辨.....	6
圖 2-2 (a)傳統光學顯微術 full-field illumination , (b)共焦顯微術 point scanning illumination.....	7
圖 2-3 共焦螢光顯微術原理示意圖.....	9
圖 2-4 單一透鏡可視為兩個球面組合而成.....	10
圖 2-5 繞射平面與觀測平面座標圖.....	12
圖 2-6 艾瑞盤.....	14
圖 2-7 物鏡與集光鏡共焦成像.....	16
圖 2-8 針孔半徑對(a)橫向解析度與(b)縱向解析度的影響.....	18
圖 2-9 螢光激發原理示意圖.....	19
圖 2-10 eGFP 螢光光譜.....	20
圖 2-11 邁克森干涉儀示意圖.....	24
圖 2-12 同調長度與頻寬的關係.....	28
圖 2-13 OCT 縱向掃描機制.....	29
圖 3-1 LHPG 的生長法示意圖.....	32
圖 3-2 LHPG 生長雙纖衣晶體光纖及熔區橫截面示意圖.....	33
圖 3-3 雙纖衣晶體光纖的成長過程.....	34
圖 3-4 $Ce^{3+}$ :YAG 晶體光纖 ASE 光譜及端面影像.....	34
圖 3-5 系統架構示意圖.....	37
圖 3-6 開迴路 PZT 位移量與驅動電壓關係.....	40
圖 3-7 二維掃描.....	41
圖 3-8 三維掃描.....	41
圖 3-9 共焦螢光顯微系統之縱向掃描.....	42

圖 4-1 以平面鏡做為樣本的干涉訊號.....	43
圖 4-2 使用光源頻譜直接模擬的干涉訊號.....	44
圖 4-3 光柵的顯微鏡影像(100x) .....	45
圖 4-4 OCT 橫向解析度測試 .....	45
圖 4-5 光柵邊界反射訊號強度 .....	46
圖 4-6 共焦螢光顯微系統 (a)橫向點擴散函數 (b)縱向點擴散函數..	47
圖 4-7 螢光小球樣本製作 .....	48
圖 4-8 螢光小球之顯微鏡影像(100x) .....	48
圖 4-9 螢光小球之平面影像 .....	49
圖 4-10 $Ce^{3+}$ :YAG 晶體粉末之顯微鏡影像(100x) .....	50
圖 4-11 $Ce^{3+}$ :YAG 晶體顆粒二維掃描 .....	51
圖 4-12 $Ce^{3+}$ :YAG 顆粒以 OCT 取得之三維影像 .....	52
圖 4-13 $Ce^{3+}$ :YAG 顆粒以 CFM 取得之三維影像 .....	52
圖 4-14 $Ce^{3+}$ :YAG 顆粒之雙模態三維影像 .....	53
圖 4-15 $Ce^{3+}$ :YAG 顆粒不同縱深的影像 .....	54
圖 4-16 細胞培養皿示意圖 .....	57
圖 4-17 培養皿細胞樣本架構示意圖 .....	58
圖 4-18 蓋玻片細胞樣本架構處理示意圖 .....	58
圖 4-19 (a)癌細胞與(b)幹細胞之顯微鏡影像.....	59
圖 4-20 癌細胞二維掃描影像 .....	60
圖 4-21 單層癌細胞掃描訊號 .....	61
圖 4-22 癌細胞之平面影像 .....	61
圖 4-23 幹細胞與癌細胞三維結構 .....	62
圖 4-24 癌細胞與幹細胞二維掃描影像 .....	63
圖 4-25 癌細胞尺寸 .....	64

圖 4-26 幹細胞與癌細胞三維結構之 OCT 影像-1.....64

圖 4-27 幹細胞與癌細胞三維結構之 OCT 影像-2.....65





# 第一章 緒論與研究動機

在臨床醫學診斷及生命科學的研究上，非侵入式影像技術的蓬勃發展無疑提供了巨大且深入的影響力。隨著微電子學、電腦科學及生物技術的迅速發展，影像設備得以不斷改進，檢測技術也越來越精確。較常見非侵入式醫學影像技術像是 X 光電腦斷層掃描(X-ray computed tomography; CT)、核磁共振造影(magnetic resonance imaging; MRI)、超音波造影(ultrasound imaging)等都已發展地十分成熟，不論在臨床診斷或是基礎醫學的研究上都提供了相當大的幫助。然而上述這些技術的空間解析極限通常僅達數十微米，若是要檢測出一些疾病(例如癌症)初期在細胞組織上的病變，或者想要在微觀尺度上觀察生物組織對於外在刺激的反應，這樣的空間解析度是遠遠不夠的。光學影像技術如傳統光學顯微術、共焦顯微術、光學同調斷層掃描與非線性光學顯微術等，不但具有非侵入性的優點，同時能提供微米等級的空間解析度，因此廣泛地被應用在生物醫學的研究中。其中又以共焦顯微術[1]及光學同調斷層掃描[2]為當今發展最為成熟且兼具臨床應用價值的兩種技術。

共焦顯微術相較於傳統光學顯微術，具有較高的空間解析度，並且由於偵測器只接收到來自物鏡焦平面附近的訊號光，能對薄樣本的不同深度進行掃描獲得一系列的光學切片。將這些不同深度的光學切片影像透過軟體重建，我們能獲得樣本的三維立體資訊，不用像傳統光學顯微術一樣必須將樣本做切片處理後才能觀察樣本的內部結構。除了空間解析度的提升，共焦顯微術還可以進一步透過對樣本特定部位使用螢光染劑加以標定，或是直接觀察樣本產生的

螢光訊號，大幅提升影像訊號與背景的對比，此技術稱為共焦螢光顯微術(confocal fluorescence microscopy, CFM)。共焦螢光顯微術除了大幅提升影像品質之外，還能藉由觀察螢光訊號的強度變化，對生物樣本內的生理變化進行造影，也就是說，共焦螢光顯微術是一種能提供功能性造影(functional imaging)的顯影技術。由於生物組織內由於病變所導致的功能變化通常早於結構變化，因此不論對於實驗室中非活體的研究，或是透過內視鏡(endoscope)系統進行臨床上的病理診斷，共焦螢光顯微術都極具應用價值。

共焦顯微術的概念最初在 1957 年時由 Marvin Minsky 提出，當時的動機是希望不經由染色就能清楚觀察到腦組織內神經網路的結構。但由於缺乏適當的光源與大量處理數據的能力，使得這一原理在當時並沒有受到太多重視，一直停留在純理論的階段。共焦掃描顯微技術真正成為一個實用的顯微技術則是等到雷射與個人電腦發明以後。1969 年時，Mojmir Petran 與 M. David Egger 利用雷射作為系統光源發展了第一台共焦掃描顯微鏡並觀測腦中的未經染色的神經節細胞；運用共焦顯微術來觀察具有螢光的生物樣本的觀念則是 1980 年代後期由 Tony Wilson、Brad Amos 和 John White 等人提出。第一台商業化的共焦掃描顯微鏡則是到 1987 年才由 G. Q. Xiao 和 G. S. Kino 所建構完成。1990 年之後，由於更高功率與更穩定的雷射光源的發明、濾光片鍍膜技術的進展、掃描鏡速率的提升，以及越來越多樣化的螢光染劑的合成，現今的商業化共焦螢光顯微鏡已經發展地十分成熟，可視為一個以光學顯微鏡為核心的光電系統。藉由改變系統內的雷射波長以及對應的螢光染劑和濾光片，幾乎已可滿足不同樣本不同應用上的任何需求。

光學同調斷層掃描(optical coherence tomography; OCT)近年來已發展成為一種相當具有臨床應用價值的光學診斷技術。光學同調斷層掃描是由低同調干涉術(low coherence interferometry; LCI)發展而來，此技術原本是用於光纖斷面的檢測[3-4]，然而也有人將此技術應用於人眼或其他生物組織厚度的檢測[5-7]。1991年時 J. G. Fujimoto 將用於深度掃描的低同調干涉術配合樣本橫向維度的移動，首次呈現了生物組織的二維光學切片影像[2]，並且很快地於 1993 年就完成了將光學同調斷層掃描應用於活體(in vivo)造影的實驗[8]。光學同調斷層掃描發展至今，已發展出許許多多的變形與不同的應用，與其他光學影像技術相比，光學同調斷層掃描不但同樣具有非侵入性與高空間解析度的優點，並且在生物組織內探測的深度也較其他技術深入許多。例如在人眼這種透明介質中，光學同調斷層掃描能量到眼睛內部 2 cm 深的視網膜影像[9]；而在皮膚類的高散射介質中，光學同調斷層掃描也能取得 1~2 mm 的深度影像[10]。除此之外，由於光學同調斷層掃描在掃描時不需要改變物鏡與樣本間的距離即能獲得深度的結構資訊，因此相對於其他光學影像技術，其架構更適合應用於內視鏡的開發，這也是為何光學同調斷層掃描能在很短時間內即迅速發展成為能夠大量運用於臨床病理診斷的技術的原因。

共焦螢光顯微術與光學同調斷層掃描皆能提供非侵入式的高解析度三維影像，共焦螢光顯微術所能提供的功能性影像與光學同調斷層掃描提供的結構性影像又恰好能夠互相彌補影像資訊的不足，因此希望能將此兩種技術整合在同一光學架構之中，並且同時取得兩種影像模態的努力一直未曾停歇[11-12]。然而由於此兩種技術中的光學系統對物鏡的需求互相衝突，因此文獻中的整合式系統通常

會犧牲掉共焦螢光顯微術的縱向解析能力，無法對同一位置取到的兩種影像互相疊合為一個能夠同時提供兩種資訊的三維影像。

為了解決此問題，我們使用雷射加熱基座生長法(laser-heated pedestal growth method; LHPG)生長出的雙纖衣結構的摻鈰鈮鋁石榴石晶體光纖(double-clad  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG fiber)，將其自發放大輻射寬頻光源(amplified spontaneous emissions; ASE)應用於光學同調斷層掃描，並改變傳統上共焦螢光顯微系統聚焦激發光與接收訊號光使用同一物鏡的架構，將收光物鏡置於樣本的另一側以避免共焦螢光顯微系統縱向解析度不足的問題。在此架構之下，我們成功使用此系統取得  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 粉末同一位置的兩種工作模態的三維影像並加以疊合，顯示出此系統未來在生物醫學的研究上能比傳統光學同調斷層掃描系統提供更為充足的資訊。

在此論文中，第一章為緒論與研究動機；第二章會對共焦螢光顯微術與光學同調斷層掃描的理論基礎作一詳細的介紹；第三章將簡述我們實驗室中用來生長  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 雙纖衣晶體光纖的 LHPG 架構，並詳細解釋此雙模態系統的架構與設計，除此之外我們也會說明在軟體上如何結合兩種工作模態的三維影像。第四章中我們會先檢驗系統的空間解析度，接著使用  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 晶體顆粒驗證此系統的效能，並以光學同調斷層掃描系統檢測肺癌細胞與幹細胞的培養皿模型描述此系統未來的應用方向；第五章則為結論與未來工作。

## 第二章 基礎理論介紹

在本章中，我們將先介紹顯微鏡系統中解析度的概念與定義，接著再分別介紹共焦螢光顯微術與光學同調斷層掃描的基本系統架構與原理。

### 2.1 解析度的概念

影像系統中，解析度代表的是一個系統能夠將待測物中的細微結構清楚分辨出來的能力。解析度通常由影像系統的点擴散函數(point spread function; PSF)來定義，所謂點擴散函數，指的是一個無限小的光點被影像系統成像後影像的強度分佈，若是用訊號與系統的術語來說，點擴散函數就是一個光學成像系統的脈衝響應(impulse response)。

解析度最常見的定義是以點擴散函數的半高全寬值(full-width of half maximum; FWHM)來代表系統可解析出空間中兩點的最短距離，這是由於實務上點擴散函數的半高全寬值可以很容易地被量測出來。假設一影像系統的点擴散函數為高斯分佈，而今空間中有距離為  $d$  的兩個點被影像系統所成像，若  $d$  的等於此高斯函數之半高全寬，如圖 2-1(a)所示，則我們認為此兩點在空間中恰好可被系統所分辨；若  $d$  比此高斯函數之半高全寬小很多，如圖 2-1(b)所示，由於兩個高斯函數過於接近，量到的訊號無法清楚地顯現出兩個峰值，我們認為此兩點無法被系統所鑑別出來。

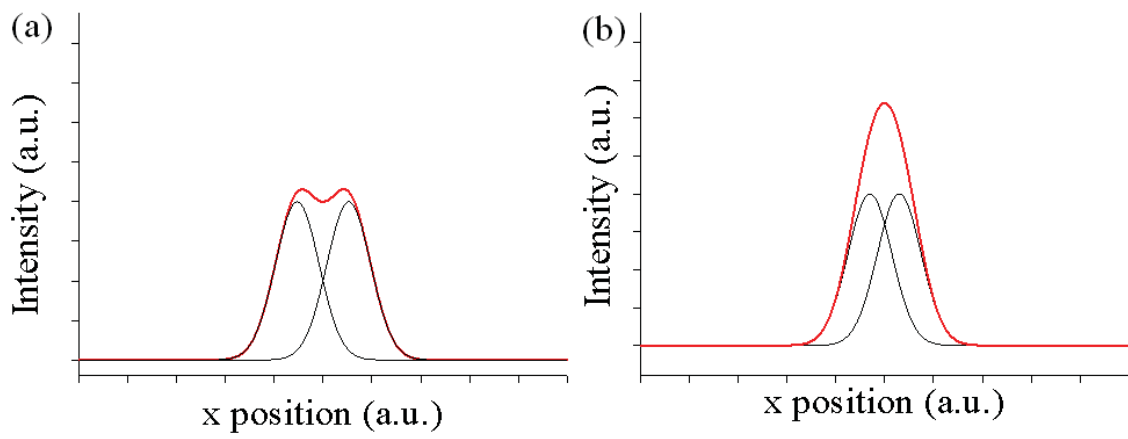


圖 2-1 (a)兩點可分辨 (b)兩點不可分辨



## 2.2 共焦螢光顯微術

### 2.2.1 基本架構及原理

在傳統的光學顯微術中，系統的光源會對樣本在物鏡下的整個視野進行激發(full-field illumination)，如圖 2-2(a)，樣本中只要激發光經過的地方都會有反射光或是螢光的訊號產生。來自物鏡焦平面的訊號光由集光鏡收集後在後端成像，但來自物鏡焦平面前後區域的雜散光也同樣會被集光鏡收集進入系統，導致影像模糊化(blur)，對比度嚴重地的下降，使得影像的品質低落。這解釋了為什麼用在傳統光學顯微鏡上的生物樣本需要做切片處理，而一般處理過的厚度均小於  $10\ \mu\text{m}$ 。

然而若是採取一個簡單卻聰明的辦法：對樣本做單點的激發並取樣，見圖 2-2(b)，透過掃描的動作，可以把這些點重組為一張二維甚至三維的影像(point scanning illumination)；並且藉由在集光鏡後端成像處放置一個針孔(pinhole)，僅有來自焦平面的訊號光能通過此針孔被光偵測器所蒐集，其他來自非焦平面之訊號光會被濾除而不會影響最後影像的成像品質，使得系統的縱向解析能力大為提升，具有傳統光學顯微術所沒有的光學切片(optical biopsy)能力，此即為共焦顯微術的基本概念。

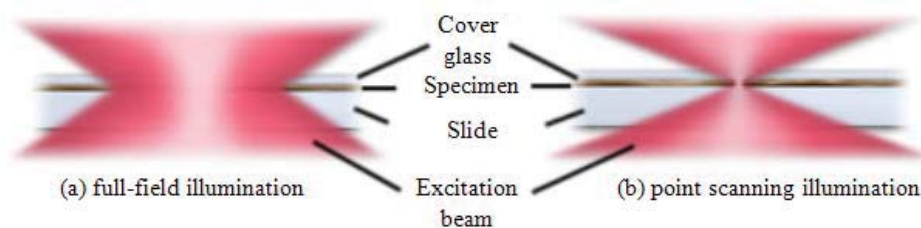


圖 2-2 (a)傳統光學顯微術 full-field illumination，(b)共焦顯微術 point scanning illumination

圖 2-3 為一反射式共焦螢光顯微術之示意圖。激發光(excitation light)通過分光鏡(beam splitter)後由物鏡聚焦到樣本中的焦平面(focal plane)，樣品受到此激發光束的影響，不管是否位於焦平面，只要激發光通過之處皆產生反射、散射或螢光等各類光子，這些光子再經由分光鏡以及濾鏡的搭配加以篩選訊號光的波段，由聚焦透鏡(focusing lens)聚焦，通過針孔後被光偵測器蒐集並紀錄樣本聚焦點處之訊號光強度。要注意的是，僅有來自焦平面之訊號光被聚焦透鏡聚焦後，還能通過位於聚焦透鏡焦平面處之針孔被光偵測器所收集，來自焦平面以上或以下之區域的訊號光被聚焦透鏡聚焦後則會被針孔所阻擋而無法進入光偵測器，此即為共焦一詞的來源。這種特性使共焦螢光顯微術所獲得的樣本中不同深度的影像有很好的對比，因此毋須將樣本切開就能偵測到樣本中不同深度的影像。

共焦螢光顯微術雖然具有傳統光學顯微鏡所沒有的光學切片能力，但是其代價是一次僅能擷取樣本中一個點的訊號光，無法像傳統光學顯微術一樣一次對整個視野成像，必須透過二維掃描的方式來掃描整個視野的位置以得到完整的影像。



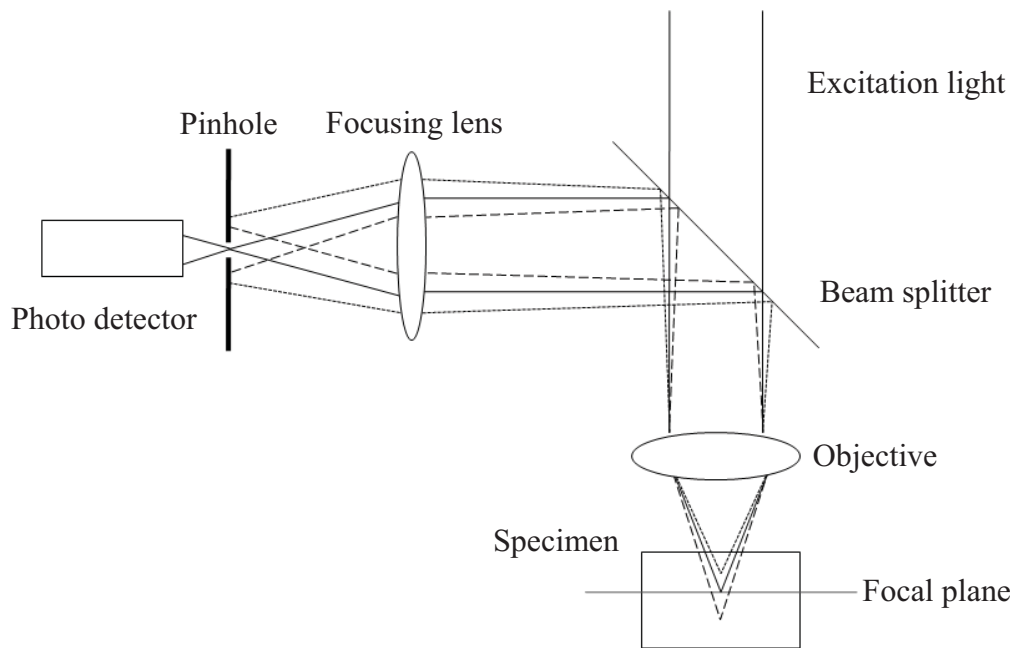


圖 2-3 共焦螢光顯微術原理示意圖

## 2.2.2 成像理論與系統解析度[13]

在本小節中，我們使用傅立葉光學(Fourier optics)對薄透鏡之繞射成像原理做一詳細說明，並以此為基礎，考慮共焦螢光顯微術的架構，進而推導出系統之橫向與縱向解析度。

共焦螢光顯微系統，如前一節所描述，通常包含物鏡(objective)與集光鏡(collector)，它們的功能是將光源的光聚焦到待測物上以及收集訊號光(反射光或螢光)。在此我們都將兩者視為完美無像差的薄透鏡，以方便進行分析。當一波長為 $\lambda$ 之光波通過上述之薄透鏡，相位和振幅會隨著不同的空間位置而改變，若是將透鏡視為一繞射屏幕(diffraction screen)，其穿透率可以用一個複數函數 $t(x,y)$ 表示：

$$t(x,y) = P(x,y)e^{-j\phi(x,y)} \quad (2-1)$$

其中 $P(x,y)$ 和 $e^{-j\phi(x,y)}$ 為相對於入射光之振幅變化與相位變化。假設

透鏡很薄且折射率為  $n$ ，入射至透鏡前後之光場分別為  $U_1(x_1, y_1)$  及  $U_2(x_2, y_2)$ ，如圖 2-4 所示。對一薄透鏡而言，我們忽略光線在透鏡內的平移，同時採用近軸近似(paraxial approximation)可大大地簡化厚度函數為：

$$D(x, y) = D_0 - \frac{x^2 - y^2}{2} \left( \frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) \quad (2-2)$$

因此薄透鏡造成的相位延遲可表示為：

$$\phi(x, y) = knD(x, y) + k[D_0 - D(x, y)] \quad (2-3)$$

其中  $k = 2\pi / \lambda$  為入射光的波數(wave number)。

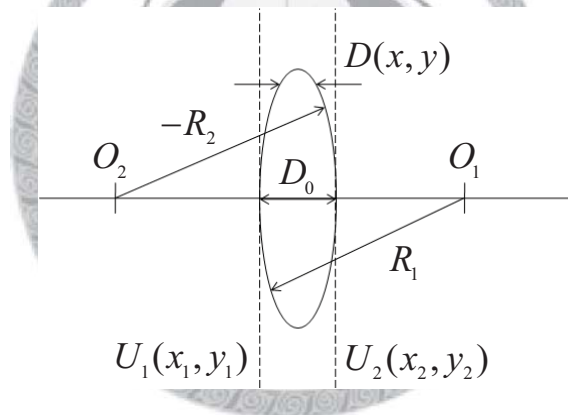


圖 2-4 單一透鏡可視為曲率半徑分別為  $R_1$  及  $-R_2$  的兩個球面組合而成，

圓心為  $O_1$  與  $O_2$ ， $D_0$  為透鏡在光軸上的厚度

經由式(2-1)我可以得知經過透鏡後的光場可表示為：

$$U_2(x, y) = U_1(x, y)P(x, y)e^{-j\phi(x, y)} \quad (2-4)$$

其中  $P(x, y)$  稱為透鏡之光瞳函數(pupil function)。

最後可推得薄透鏡之穿透率：

$$t(x, y) = \frac{U_2(x, y)}{U_1(x, y)} = P(x, y) e^{\frac{jk(x^2+y^2)}{2f}} \quad (2-5)$$

其中  $\frac{1}{f} = (n-1) \left( \frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right)$  且忽略一常數項相位項  $e^{-jknD_0}$ ，而  $e^{\frac{jk(x^2+y^2)}{2f}}$  可

看作對一球面波的二次曲面近似。當焦距  $f > 0$  時，透鏡將會造成收斂波(convergent wave)，稱為正透鏡。一平面波通過正透鏡時，則會在透鏡後距離為  $f$  的一點上會聚，稱為焦點。但是受限於光波的繞射現象使其無法會聚於一點，而是一個聚焦範圍，其由以下之繞射公式來推導。

在此我們考慮無窮大的不透明屏幕上的一個有限孔徑對單色光的繞射情形，並且利用惠更斯－菲涅耳原理(Huygens-Fresnel principle)的數學表達式，來做相關的近似，因此在圖 2-5 中點之場的振幅很容易寫成[14]：

$$U_3(x_3, y_3) = \frac{1}{\lambda} \iint_{-\infty}^{\infty} U_2(x_2, y_2) \frac{e^{-jkr}}{r} \cos(n, r) dx_2 dy_2 \quad (2-6)$$

其中  $U_2(x_2, y_2)$  為繞射平面  $(x_2 - y_2)$  上  $Q$  點之光場，而  $U_3(x_3, y_3)$  為觀測平面  $(x_3 - y_3)$  上  $P$  點之光場，兩平面相距  $z$ ， $Q$  和  $P$  距離為  $r$ ， $\frac{e^{-jkr}}{r}$  表示在  $P$  點所觀測到由  $Q$  點產生之球面波， $\cos(n, r)$  為定義  $U_2(x_2, y_2)$  之波向量  $\vec{n}$  與觀測方向  $\vec{r}$  之間的方向餘弦。

若  $(x_3 - x_2)^2 + (y_3 - y_2)^2 \ll z^2$ ，即觀測平面與繞射平面之間的距離遠大於觀測點至光軸的距離，則  $r$  可用以下關係近似：

$$r \approx z \left[ 1 + \frac{(x_3 - x_2)^2 + (y_3 - y_2)^2}{2z^2} \right] \quad (2-7)$$

又由於觀測點很靠近光軸，因此  $\cos(n, r) \approx 1$ ，所以式(2-6)可改寫為：

$$U_3(x_3, y_3) = \frac{je^{-jkz}}{\lambda z} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} U_2(x_2, y_2) e^{-j\frac{k}{2z}[(x_3-x_2)^2 + (y_3-y_2)^2]} dx_2 dy_2 \quad (2-8)$$

此即為繞射公式中的菲涅耳近似(Fresnel approximation)，我們將使用此式來計算平面波通過薄透鏡後在焦平面附近的繞射圖形。

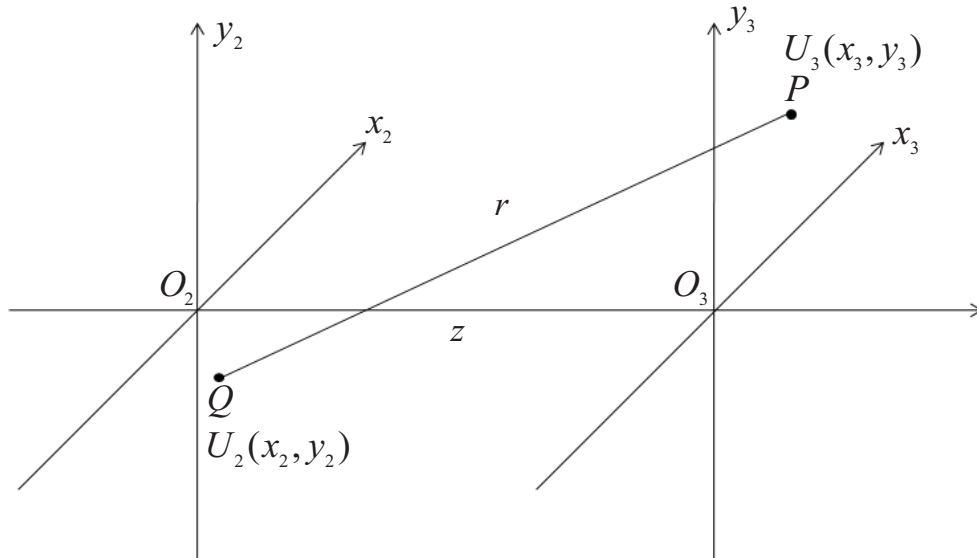


圖 2-5 繞射平面與觀測平面座標圖

今假設一平面波入射至透鏡上，於透鏡前之光場  $U_1(x_1, y_1) = U_0$ ，帶入(2-5)式，則穿過透鏡後瞬間的光場為：

$$U_2(x, y) = U_0 P(x, y) e^{j\frac{k}{2f}(x^2 + y^2)} \quad (2-9)$$

利用式(2-8)，則焦平面上 ( $z = f$ ) 的光場表示為：

$$U_3(x_3, y_3) = \frac{jU_0}{\lambda f} e^{-jkf} e^{-j\frac{jk}{2f}(x_3^2 + y_3^2)} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} P(x, y) e^{j\frac{k}{f}(x_3x + y_3y)} dx dy \quad (2-10)$$

假設透鏡是圓對稱，其光瞳函數只與半徑有關， $P(x, y)$ 可寫成 $P(r)$ ， $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ ，利用漢克變換(Hankel transform)並忽略 $U_0$ ，可將式(2-10)改寫為：

$$U_3(r_3) = \frac{j}{\lambda f} e^{-jkf} e^{-\frac{j\pi r_3^2}{\lambda f}} \int_0^\infty P(r) J_0\left(\frac{2\pi r r_3}{\lambda f}\right) 2\pi r dr \quad (2-11)$$

其中 $J_0$ 代表零階第一類貝索函數(Bessel function)。若透鏡為半徑為 $a$ ，其光瞳函數可表示為：

$$P(r) = \begin{cases} 1, & r \leq a \\ 0, & r > a \end{cases} \quad (2-12)$$

將式(2-12)帶入式(2-11)，則式(2-11)可化為：

$$U_3(r_3) = \frac{j\pi a^2}{\lambda f} e^{-jkf} e^{-\frac{j\pi r_3^2}{\lambda f}} \left[ \frac{2J_1\left(\frac{2\pi r_3^2}{\lambda f}\right)}{\left(\frac{2\pi r_3 a}{\lambda f}\right)} \right] \quad (2-13)$$

其中 $J_1$ 為一階第一類貝索函數。上式已經可以精確地描述焦平面的光場分佈，然而為了實際上應用的方便我們將引進下列參數[15]：

透鏡的數值孔徑(numerical aperture; NA)：

$$NA = \sin \alpha \approx \frac{a}{f}$$

徑向(radial)的光學座標 $\nu$ ：

$$\nu = \frac{2\pi a}{\lambda f} r_3 \approx \frac{2\pi}{\lambda} r_3 \sin \alpha$$

菲涅耳數(Fresnel number)：

$$N = \frac{a^2}{\lambda f}$$

將上面這些參數引入式(2-13)，則式(2-13)最終可寫成：

$$U_3(\nu) = j\pi N e^{-jkf} e^{\frac{j\nu^2}{4N\pi}} \left[ \frac{2J_1(\nu)}{\nu} \right] \quad (2-14)$$

此為焦平面光場的分佈函數，而光強度的分佈函數則為上式的絕對值平方：

$$I(\nu) = (\pi N)^2 \left[ \frac{2J_1(\nu)}{\nu} \right]^2 \propto \left[ \frac{2J_1(\nu)}{\nu} \right]^2 \quad (2-15)$$

此強度分佈就是我們所熟知的艾瑞盤(Airy disk)，如圖 2-6 所示，它代表的是一個完美透鏡聚焦能力的理論極限，或稱為繞射極限(diffraction-limited)。若將此強度分佈沿著一維徑向作圖，其半高全寬為  $\frac{\lambda}{NA}$ ，我們可用此式計算單一薄透鏡之橫向解析度。

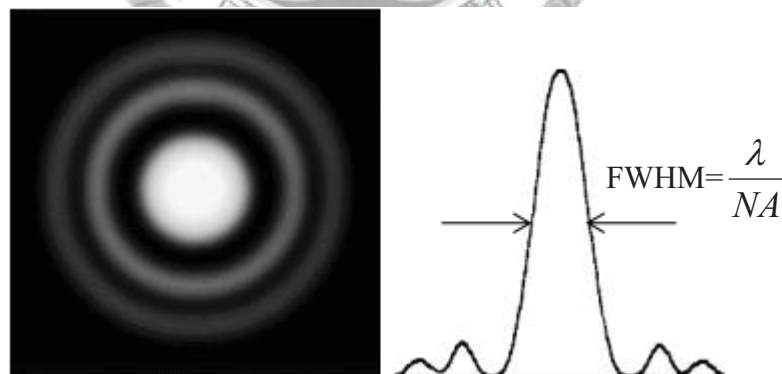


圖 2-6 艾瑞盤

由以上的推導我們已經可知平面波經透鏡聚焦後在焦點處橫向的強度變化，然而在軸向上由於聚焦的效果同樣會有光強度的變化。假設今觀測面距離焦平面  $\Delta z$ ，所以觀測面與透鏡之距離為  $f + \Delta z$ ，

經由相同的推導過程，最後可得到：

$$U_3(v, u) = 2\pi j N e^{-jkf} e^{\frac{ju^2}{4N\pi}} \int_0^1 P(\rho) e^{\frac{jv\rho^2}{2}} J_0(v\rho) \rho d\rho \quad (2-16)$$

上式即為焦點附近繞射圖形的三维分布，並不限於焦平面，其中  $\rho = r/a$  為歸一化後之徑向座標光學座標， $u$  為軸向(axial)之光學座標：

$$u = \frac{2\pi}{\lambda} a^2 \left( \frac{1}{f} - \frac{1}{z} \right) = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta z \frac{a^2}{f^2} \approx \frac{2\pi}{\lambda} \Delta z \sin^2 \alpha$$

在式(2-16)中，若  $u = 0$ ，即觀測面位於焦平面上，則可化為式(2-14)的形式，光強度的分佈即由式(2-15)所描述；若  $v = 0$ ，則式(2-16)描述的是光強度沿著軸向的變化，可用下式表示：

$$I(u) = |U_3(v=0, u)|^2 = (\pi N)^2 \left[ \frac{\sin\left(\frac{u}{4}\right)}{\frac{u}{4}} \right]^2 \propto \left[ \frac{\sin\left(\frac{u}{4}\right)}{\frac{u}{4}} \right]^2 \quad (2-17)$$

其半高全寬為  $\frac{1.75\lambda}{(NA)^2}$ ，此即為單一薄透鏡之縱向解析度。然而要注意的是，在傳統光學顯微鏡系統中，對於厚樣品在不同深度之二維影像，容易受到非焦平面之雜光干擾，因此無法完全表現出此式所代表之縱向解析能力。

我們已討論過單一薄透鏡之繞射成像現象，就是當我們以一“點”光源作為物體，會由一物鏡將其成像在像平面，因此我們可以得到在像平面附近的強度分布，此即為 2.1 節中描述的系統點擴散函數。而在共焦成像的情形下，除了物鏡外，會有另一集光鏡將訊號光收集並匯聚到“點”偵測器來成像，如圖 2-7 所示。

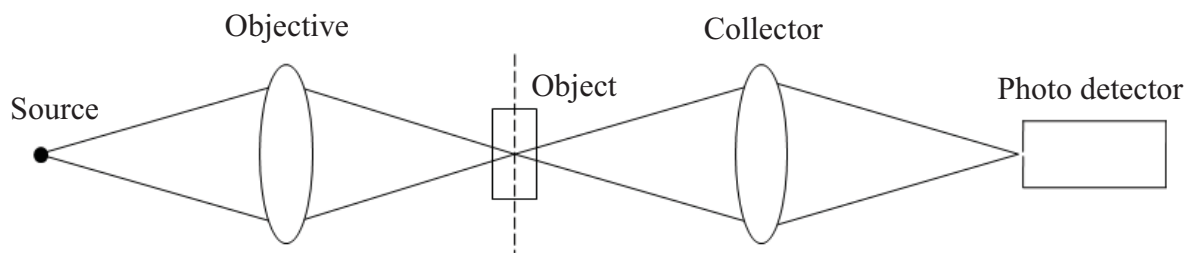


圖 2-7 物鏡與集光鏡共焦成像

共焦成像對於偵測反射光或是收集螢光有不同的成像公式。如果訊號光是反射光，由於雷射光與反射光皆為同調光(coherent light)，適用於相干成像(coherent imaging)公式，其影像的光強度可表示為：

$$I = |h_1 h_2 \otimes f_{refl}|^2 \quad (2-18)$$

其  $h_1$ 、 $h_2$  分別是物鏡與集光鏡的振幅點擴散函數， $f_{refl}$  為物體反射係數的空間分布函數， $\otimes$  符號代表卷積(convolution)。在螢光成像的部分，由於螢光訊號是非同調光，因此需考慮非同調成像條件，其影像的光強度則為

$$I = (h_1)^2 (h_2)^2 \otimes f_{flu} \quad (2-19)$$

其中  $f_{flu}$  為螢光物質之空間分布函數。假設樣本為一理想“點”物體，則  $f_{refl} = f_{flu} = 1$ ，因此共焦顯微系統的点擴散函數均可簡化為兩者的相乘積：

$$PSF_{Conf} = (h_1)^2 \times (h_2)^2 = PSF_{Obj} \times PSF_{Col} \quad (2-20)$$

由此式可看出，若激發光波長和螢光訊號波長相近，且使用物鏡做為集光鏡(背向收光，如圖 2-3 所示)，則  $h_1 \approx h_2$ ，系統的橫向解析度

根據式(2-15)可推出  $I(v) \propto \left[ \frac{2J_1(v)}{v} \right]^4$ ，其半高全寬為  $\frac{0.37\lambda}{NA}$ ；同樣地，



根據式(2-17)可推出  $I(u) \propto \left[ \frac{\sin\left(\frac{u}{4}\right)}{\frac{u}{4}} \right]^4$ ，其半高全寬為  $\frac{1.27\lambda}{(NA)^2}$ 。跟單一

薄透鏡的解析度相比，共焦顯微系統具有較好的空間解析度。在第三章中，我們將針對本身系統的架構計算理論上系統的空間解析度。

### 2.2.3 針孔大小對共焦顯微系統的影響

由上節推導可知，共焦螢光顯微術相較於傳統光學顯微術具有較好的空間解析度。但是要注意的是，上節的討論中，是假設光偵測器為一理想的“點”偵測器，然而現實中的光偵測器其收光面積通常遠大於成像的光點大小。為了在真實情況中模擬“點”偵測器，常用的作法是在偵測器前放置一個針孔，以達到共焦成像的空間選擇性。由此可知，針孔的大小也是影響共焦螢光顯微術空間解析能力的重要因素。

理想上，共焦螢光顯微術具有近似  $\left[ \frac{\sin\left(\frac{u}{4}\right)}{\frac{u}{4}} \right]^4$  的縱向反應曲線。

但是若偵測器不是一個點，而是一個半徑為  $r_p$  的圓盤，則接收到的光強度必須對整個偵測器的面積作積分：

$$I(u) = \int_0^{r_p} |h(2u, v)|^2 v dv \quad (2-21)$$

其中  $h$  為物鏡與集光鏡的點擴散函數，在此假設物鏡與集光鏡相同，並且使用一完美平面反射鏡做為樣本； $v_p$  表示歸一化的針孔半徑，

與真實針孔半徑的關係為：

$$v_p = \frac{2\pi}{\lambda} r_p \sin \alpha \quad (2-22)$$

由式(2-21)即可算出有限大的針孔半徑所造成的縱向反應曲線，文獻[16]中將 $v_p$ 的大小對系統解析能力的影響做了詳盡的探討，其計算結果如圖 2-8 所示：

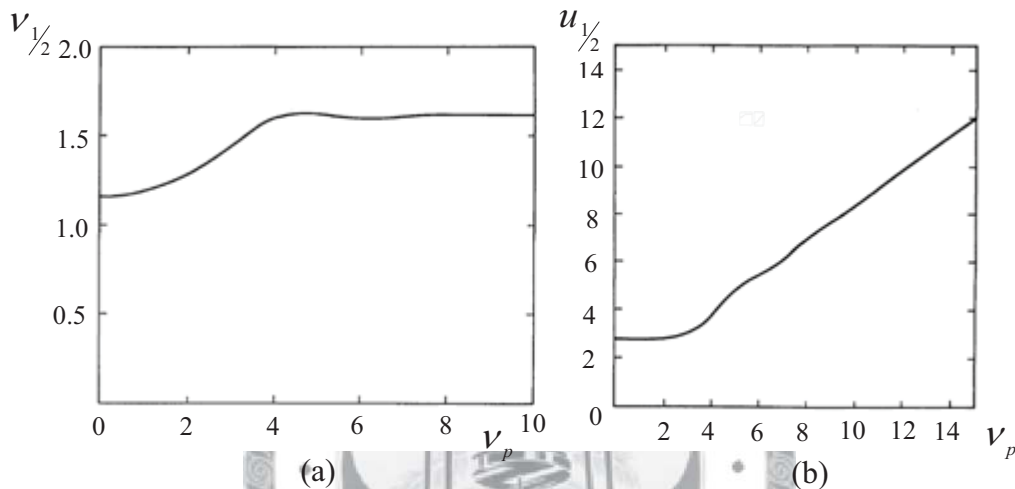


圖 2-8 針孔半徑對(a)橫向解析度與(b)縱向解析度的影響[16]

由圖 2-8 可看出， $v_p < 0.5$  時，橫向解析度  $v_{1/2}$  幾乎不受  $v_p$  影響， $0.5 \leq v_p < 4$  時  $v_{1/2}$  開始顯著上升；而  $v_p \leq 2.5$  的情況下，縱向解析度  $u_{1/2}$  幾乎與  $v_p$  無關。因此若是想要保持共焦顯微系統的光學切片能力並希望能偵測到足夠的訊號光， $v_p = 2.5$  是一個合理的選擇，此時對應的針孔半徑：

$$r_p = \frac{2.5\lambda}{2\pi} \frac{m}{\sin \alpha} \quad (2-23)$$

其中  $m$  代表實際光路中將訊號光聚焦到針孔上的透鏡與集光鏡的焦距比例，代表樣本上的光點到針孔前被放大的比例，在基本的光路架設中， $m \approx 10$ ，其對應的針孔大小約為  $10 \mu\text{m}$ 。

## 2.2.4 螢光特性與螢光物質

螢光在生命科學、分析化學、醫學等研究上，已經是一種廣泛且十分重要的研究工具。其特點在於螢光物質靈敏度高，相對於放射性物質其危險性也較小，並且由於螢光物質具有特定的光譜分佈，僅透過光譜分析就能得知螢光物質的種類，若是將螢光訊號通過顯微系統造影，則能獲得對比度十分良好的螢光影像。

螢光的產生，是由波長短能量較高的激發光源與螢光分子反應，使螢光分子中位於基態(ground state)的電子吸收一個波長為 $\lambda_{ex}$ 的光子後，躍遷至激發態(excited state)，之後由於分子的振動，能量會以熱的形式產生部份散逸，於是電子便掉到激發態中的最低簡併態，但由於電子處於激發態較不穩定，所以經過一段時間後電子就會掉回基態，並發出一個波長為 $\lambda_{em}$ 的螢光光子，而這個波長較長的放射光便是我們所要觀測的螢光訊號，如圖 2-9 所示。由於螢光通常由最低激發態的最低振動能階所放射出來，所以一般而言 $\lambda_{em} > \lambda_{ex}$ ，這個現象稱為斯托克斯位移(Stokes shift)。

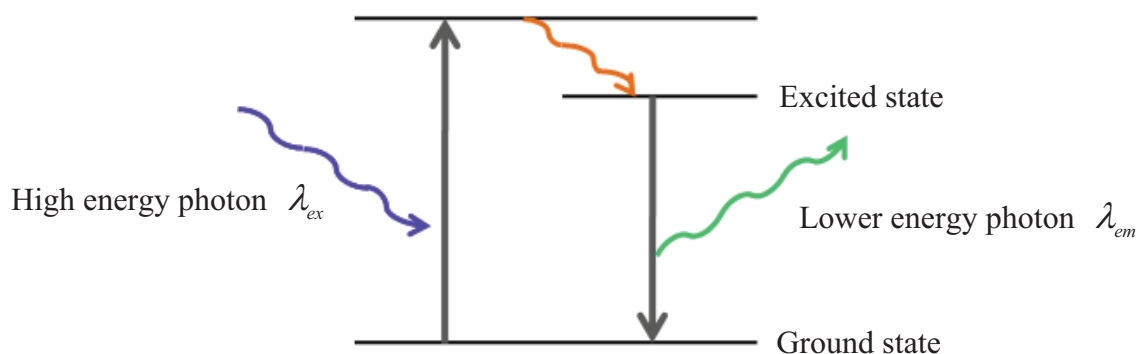


圖 2-9 螢光激發原理示意圖

螢光放射光譜是以某一特定波長激發螢光分子，記錄不同波長所得到的相對強度，再以波長為橫座標、螢光強度為縱座標畫出曲線。吸收光譜則是改變激發光波長，記錄每一波長所對應的吸收比例來作圖，如圖 2-10 所示，此圖是 Invitrogen 公司出產的 eGFP (enhanced green fluorescence protein) 頻譜，圖中的藍色曲線代表吸收頻譜，綠色曲線代表放光頻譜，中心波長為 509 nm。每一種螢光分子都有其固定的光譜，使用不同的激發光波長只會改變激發效率而不會改變光譜形狀，因此在選擇激發光波長時，應該要盡量接近螢光分子的吸收峰值以獲得較好的發光效率。

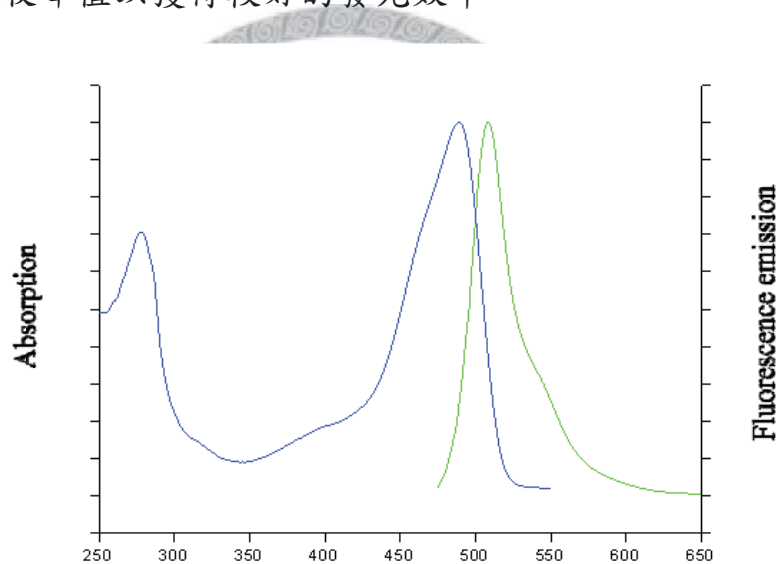


圖 2-10 eGFP 螢光光譜

在螢光顯影技術中，螢光訊號的來源可分為兩類：自體螢光 (auto-fluorescence) 與次級螢光 (secondary fluorescence)。一般外加於樣本中，使得特定部位訊號強度增強的螢光染劑，其所發出的螢光即為所謂的次級螢光，具有特定的光譜形狀，因此透過選擇適當的濾光片將其波段擷取出來，可使影像對比大大地提升。自體螢光指的是螢光物質本身在沒有外加螢光染劑的情況下，由激發光所激發出

來的螢光訊號，其光譜形狀是由樣本中許多種同時被激發光激發的螢光分子光譜疊合而成。自體螢光在樣本有外加染劑的情況下，會構成影像中的背景訊號，使影像對比下降。然而在進行活體實驗時，由於無法外加染劑，自體螢光反而會成為影像主要的訊號來源。



## 2.3 光學同調斷層掃描術[17]

### 2.3.1 干涉

干涉(inteference)為光的特性之一，可用光的波動性來解釋其現象。定性上來說，由於光在空間中是以弦波的形式傳播，假設今有兩頻率相同的光波往同一方向前進，考慮一極端情況：當兩道光波的相位完全相同時，根據波動的疊加原理，可視為一道新的光波，其振幅(amplitude)為原兩道光波的振幅直接相加，若在光的行進方向上放一道屏幕，會發現光的強度(intensity)比原本兩道光個別照射在屏幕上的時候還要強得多，稱為完全建設性干涉；若考慮另一極端情況：兩道光波的相位相差  $180^\circ$ ，則新的光波振幅為原本兩道光波振幅相減，因此會發現屏幕上的光強度比原本兩道光單獨照射時還要弱得多，稱為完全破壞性干涉；若兩道光波的相位差介於以上兩種極端狀況之間，則屏幕上的光強度也會介於兩者之間，強度的變化取決於相位差的大小。以上即為干涉最基本的概念，並可以此為基礎進一步解釋不同頻率、不同方向甚至多道光之間的互相干涉。

干涉的現象早在虎克(Robert Hooke)和牛頓(Isaac Newton)所進行的一些的薄膜實驗中就已經被觀察到，但由於牛頓想以光的粒子說來分析這個現象，因此未能給出完備的解釋。直到 1801 年楊(Thomas Young)引用海更斯(Christiaan Huygens)的提出的波動理論，並以水波干涉實驗為模板設計了著名的雙狹縫實驗證明了理論的預測，光的波動性與干涉的概念才廣為世人所接受。在楊的雙狹縫干涉實驗中，光源與屏幕分別位於雙狹縫平面的兩側，使光通過雙狹縫後在屏幕上成像。實驗結果顯示，屏幕上的圖像是由建設性干涉

所形成的亮帶與破壞性干涉所形成的暗帶所組成，而亮帶與暗帶得形成則取決於屏幕上一點到兩個狹縫的距離所對應的光程差(optical path difference)。這個實驗結果證明了光的確如水波一樣會產生干涉的現象。

干涉儀(interferometer)即為利用干涉原理，在儀器中使兩道或多道光波結合在一起並產生干涉的量測技術，發展至今已經有許許多多的變形，應用的領域也十分廣泛。邁克森干涉儀(Michelson interferometer)為眾多干涉儀中最基本的架構之一，光學同調斷層掃描即為一種將邁克森干涉儀的架構應用於生物樣本上的掃描技術。

圖 2-11 為一個邁克森干涉儀的架構示意圖。由光源(light source)發出的光，經過分光鏡時一部分被分光鏡反射形成參考光(reference arm)，一部分穿過分光鏡形成測試光(sample arm)。參考光被平面鏡  $M_R$  反射後循原路折回，部分光再穿透分光鏡到達光偵測器(photo detector)；同樣地，測試光被平面鏡  $M_S$  反射後循原路折回，部分光再被分光鏡反射後和參考光一起到達光偵測器(photo detector)。通過改變平面鏡  $M_R$  的前後位置，我們可以改變參考光和測試光到達光偵測器前的光程差，使兩道光產生干涉。藉由電腦記錄光偵測器中光電流隨著改變平面鏡  $M_R$  的位置所產生的變化，我們可以進一步分析光源或待測物的特性。

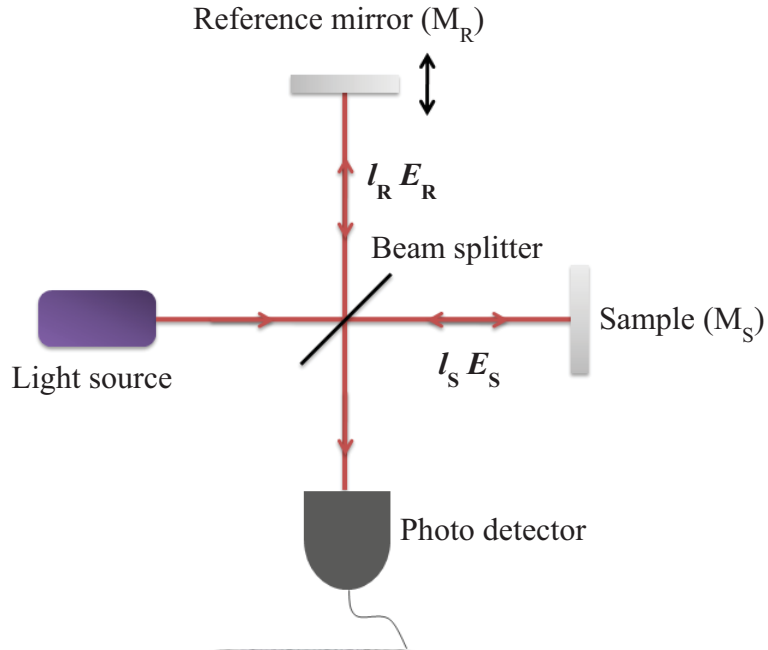


圖 2-11 邁克森干涉儀示意圖

假設光源為一完美的單頻光，則參考光和測試光的光場函數可寫成：

$$\begin{aligned} E_R &= A_R e^{-j(2\beta_R l_R - \omega t)} \\ E_S &= A_S e^{-j(2\beta_S l_S - \omega t)} \end{aligned} \quad (2-24)$$

其中  $\beta_R$  和  $\beta_S$  分別代表參考光和測試光的光傳播常數(propagation constant)， $l_R$  和  $l_S$  則代表分光鏡到  $M_R$  和  $M_S$  的距離。請注意，由於參考光和測試光會來回經過上述路徑兩次，因此上式中的長度係數為 2。

而光偵測器中的光電流  $i_D$  大小正比於入射光的強度，即：

$$\begin{aligned} i_D &\propto |E_R + E_S|^2 \\ &= |A_R|^2 + |A_S|^2 + 2\text{Re}\{E_S E_R^*\} \end{aligned} \quad (2-25)$$

上式中等號右邊的前兩項代表參考光和測試光本身光強度所造成直流電流，不會隨平面鏡  $M_R$  的前後移動而改變，可視為背景訊號；最



後一項代表的是兩道光干涉所引起的光電流變化，會隨著  $l_R$  和  $l_S$  的相對距離改變而改變，通常我們感興趣的資訊是由這種交流電流的變化所以提供。在自由空間(free space)中， $\beta_R$  和  $\beta_S$  的值均為  $2\pi/\lambda_0$ ， $\lambda_0$  為真空中單頻光的波長，上式中最後一項可改寫為：

$$\begin{aligned}\operatorname{Re}\{E_S E_R^*\} &= A_R A_S \cos(\beta_R l_R - \beta_S l_S) \\ &= A_R A_S \cos\left(\frac{2\pi\Delta l}{\lambda_0/2}\right)\end{aligned}\quad (2-26)$$

其中  $\Delta l = l_S - l_R$ ，代表兩道光走的路徑長度的差異。由上式可知，光電流中交流的成分會隨著兩道光的光程差改變而呈現週期性變化，其變化的週期為  $\lambda_0/2$ 。

### 2.3.2 低同調干涉術

OCT 基本上的架構其實就如同一個邁克森干涉儀，然而其縱向掃描所依據的掃描技術-低同調干涉術，是使用一低時間同調性的寬頻光源如鹵素燈(halogen lamp)、超高亮度發光二極體(super luminescent diode; SLD)或飛秒雷射(femto-second laser)作為系統光源，而非如前一節所假設的單頻光。

同樣假設參考光與測試光的光場分別為  $E_R$ 、 $E_S$ ，將測量時間考慮進來後，光電流可表示為：

$$\begin{aligned}I_d \propto \langle |E|^2 \rangle &= \frac{1}{T} \int_{t_0 - \frac{T}{2}}^{t_0 + \frac{T}{2}} [E_R(t) + E_S(t - \tau)] \cdot [E_R(t) + E_S(t - \tau)]^* dt \\ &= \left[ \frac{1}{T} \int_{t_0 - \frac{T}{2}}^{t_0 + \frac{T}{2}} E_R(t) \cdot E_R^*(t) dt \right] + \left[ \frac{1}{T} \int_{t_0 - \frac{T}{2}}^{t_0 + \frac{T}{2}} E_S(t - \tau) \cdot E_S^*(t - \tau) dt \right] \\ &\quad + \left[ \frac{1}{T} \int_{t_0 - \frac{T}{2}}^{t_0 + \frac{T}{2}} (E_R(t) \cdot E_S^*(t - \tau) + E_R^*(t) \cdot E_S(t - \tau)) dt \right]\end{aligned}\quad (2-27)$$

其中  $T$  為測量時間，而前兩項分別代表來自參考光與測試光單獨的光強度。假設光場是穩定的，即  $T \rightarrow \infty$ ，則上式可化為：

$$I_d = I_R + I_S + 2\sqrt{I_R I_S} \operatorname{Re}\{\gamma_{12}(\tau)\} \quad (2-28)$$

其中：

$$\gamma_{12}(\tau) = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} E_R(t) \cdot E_S^*(t-\tau) dt}{\sqrt{\int_{-\infty}^{\infty} E_R(t) \cdot E_R^*(t) dt} \sqrt{\int_{-\infty}^{\infty} E_S(t) \cdot E_S^*(t) dt}} = \frac{\Gamma_{12}(\tau)}{\sqrt{I_R I_S}} \quad (2-29)$$

$\gamma_{12}(\tau)$  稱為相干度 (degree of coherence)， $\Gamma_{12}(\tau)$  稱為相干函數 (coherence function)。當兩道光的光程差  $\tau = 0$  時，代表相干程度最大，干涉訊號最大；隨著光程差的加大，兩道光的相干程度會變小，干涉訊號也隨之變小。我們可以定義同調時間  $\tau_c$  (coherence time) 為相干度與相干函數的半高全寬值，亦即：

$$\frac{\gamma\left(\frac{\tau_c}{2}\right)}{\gamma(0)} = \frac{\Gamma\left(\frac{\tau_c}{2}\right)}{\Gamma(0)} = \frac{1}{2} \quad (2-30)$$

表示兩道光的光程差  $\tau \gg \tau_c$  時就看不到干涉訊號。

又 Wiener-Khintchine 定理告訴我們，相干函數  $\Gamma(\tau)$  與光源的功率頻譜互為傅立葉轉換對 (Fourier transform pair)：

$$\begin{aligned} \Gamma(\tau) &= \int_{-\infty}^{\infty} E(t) \cdot E^*(t-\tau) dt = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} P(\omega) \cdot e^{j\omega\tau} d\omega \\ P(\omega) &= \int_{-\infty}^{\infty} \Gamma(\tau) \cdot e^{-j\omega\tau} d\tau \end{aligned} \quad (2-31)$$

若光源的功率頻譜為高斯分布 (Gaussian distribution)，即：

$$P(\omega) \propto e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{\omega-\omega_0}{\Delta\omega}\right)^2} \quad (2-32)$$

其中  $\omega_0$  為中心頻率， $\Delta\omega$  代表光源的頻譜分佈的標準差，頻譜的半高全寬值和  $\Delta\omega$  的關係為  $\omega_{FWHM} = 2\sqrt{2\ln 2} \cdot \Delta\omega$ 。利用傅立葉轉換對中，時域訊號與頻域訊號半高全寬值的乘積為定值： $\omega_{FWHM} \cdot \tau_c = 8\ln 2$ ，以及頻譜與波長間的轉換關係： $\omega_{FWHM} = 2\pi f_{FWHM} = 2\pi c \frac{\Delta\lambda}{\lambda_0^2}$ ，可得到同調

時間與波長間的關係為：

$$\tau_c = \frac{4\ln 2}{c \cdot \pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (2-33)$$

其所對應的同調長度：

$$l_c = \frac{4\ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (2-34)$$

由上式可以看出，當光源的頻寬越寬，同調長度就會越短。如果光源為完美單頻光，則  $\Delta\lambda = 0$  而同調長度趨近於無窮長，代表無論光程差相差多遠，都有干涉訊號，而干涉訊號以週期形式作起伏，此即為前小節所討論的情況，如圖 2-12 左所示；如果光源為寬頻光，則同調長度是一個有限的值，如圖 2-12 右所示，參考光與測試光之間的光程差需小於同調長度才會發生干涉。

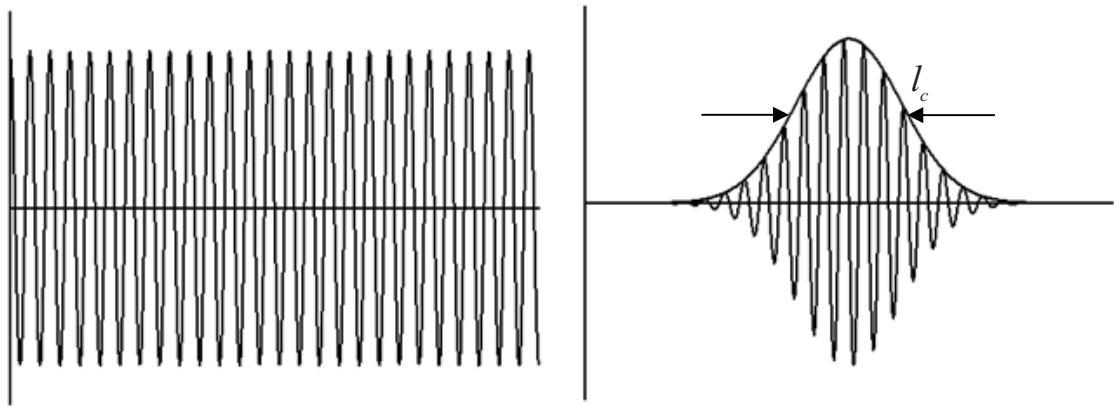


圖 2-12 同調長度與頻寬的關係

OCT 就是以低同調干涉術原理為基礎進行縱向掃描，橫向掃描則是和共焦顯微術一樣，透過掃描鏡(scanning mirror)直接改變測試光的方向，或是讓測試光不動、移動載物台改變測試光聚焦到樣本的位置，達成完整的三維掃描。

我們以圖 2-13 描述縱向掃描機制：假設今有一待測物具有平坦的多層反射結構，當測試光進入這個待測物時，在每一層的界面都有部分的光被反射回來，透過移動圖中的  $M_R$ ，改變在待測物中的可能產生干涉的界面的深度，當此深度剛好對應到某一層的界面時，反射回來的測試光會和參考光發生干涉。藉由同步記錄  $M_R$  移動的距離和干涉訊號的強度，我們可以毋須破壞待測物就可得到待測物深度結構的資訊。

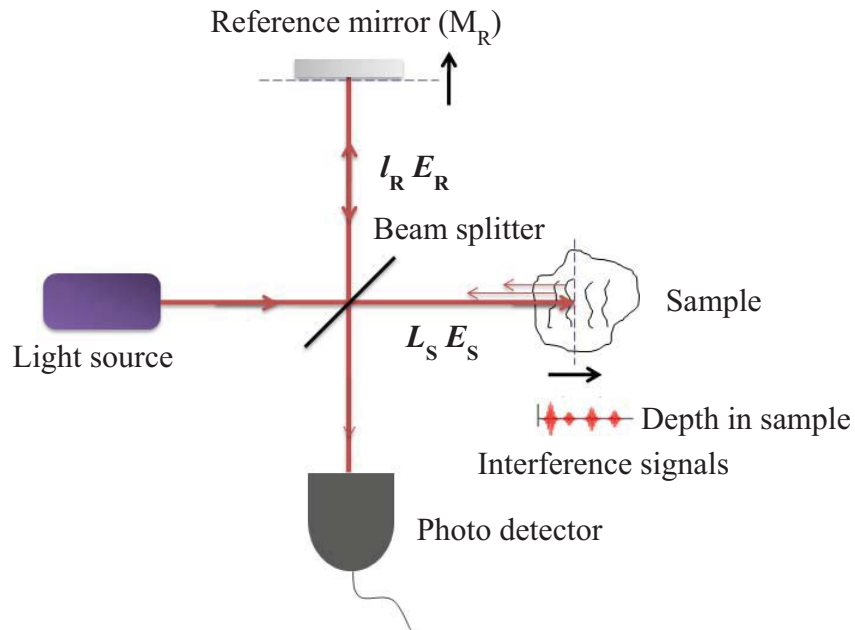


圖 2-13 OCT 縱向掃描機制

### 2.3.3 系統解析度

前一節已經介紹過了 OCT 的縱向掃描機制。假設光源的頻譜是高斯分佈，則系統所量到的訊號也是高斯分佈，由上一節所推導的公式可知，同調長度即是系統所量到訊號的半高全寬值。在邁克森干涉儀的架構下，由於光路折返的特性，參考光上的平面鏡移動一段距離，會使得實際光程差是該距離的兩倍，因此光程差換算到真實的移動距離時需要除以 2，所以系統的縱向解析度為：

$$\frac{l_c}{2} = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} \approx 0.44 \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} \quad (2-35)$$

由上式可知，光源中心波長越短，或是光源的頻寬越寬，OCT 系統的縱向解析度會越高。

為了使橫向解析度跟縱向解析度一樣具有微米等級的空間解析度，通常會使用一個物鏡將待測物端的光束聚焦，因此橫向解析度的大小可用 2.2.2 節中艾瑞盤的大小去做估算。然而實際上光束被物

鏡聚焦後的光點大小還會受到光源的場形分佈以及物鏡像差的影響，使得橫向解析度略為下降。儘管如此，繞射極限仍是評價一個光學系統橫向解析能力很重要的指標。

假設今有一近似平行光的基本高斯光束經過焦距為  $f$  的物鏡聚焦後，成為新的一道高斯光束，最小光點大小的位置落在物鏡焦點處。經過物鏡聚焦後的高斯光束，其發散角比聚焦前的高斯光束大許多，使得光點大小隨著遠離物鏡焦點而快速變大，因此 OCT 在進行縱向掃描時掃描區間只限於物鏡焦點附近才擁有較清晰的橫向解析能力。一般文獻中，定義光束大小變成光腰的  $\sqrt{2}$  倍時失去橫向解析能力，亦即 OCT 的縱向可掃描範圍為物鏡的景深(depth of focus)，所以選用焦距較短的物鏡可提升系統的橫向解析能力，然而焦距較短的物鏡代表系統的景深也較短，也就是縮短了系統的縱向掃描範圍，所以在 OCT 中橫向解析度與景深為兩個相互折衷系統參數，在設計系統時，需要因應實際應用需求而選用適當焦距的物鏡。儘管如此，由於 OCT 縱向解析度只與光源的功率頻譜有關，更換聚焦物鏡並不會影響系統的縱向解析度，因此 OCT 的縱向與橫向解析度互相獨立，在應用上比共焦顯微術更有彈性。

## 第三章 系統架構與設計

上一章中，我們已經對光學同調斷層掃描及共焦螢光顯微系統的成像理論分別做了詳細的介紹。在本章中，我們將描述在實務上如何建構並且結合這兩種系統，使之成為能對樣本的另一位置同時提供結構性與功能性資訊之三維顯影系統。

### 3.1 系統光源

由 2.3.2 節及 2.3.3 節的討論可知，光源的頻寬越寬，或是光源的中心波長越短，光學同調斷層掃描的縱向解析度越高。我們實驗室所自行生長之  $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  晶體光纖所產生的放大自發輻射 (amplified spontaneous emission; ASE) 寬頻光源正符合這樣的需求，並且用來幫浦  $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  晶體光纖的藍光雷射二極體 (laser diode; LD) 波長也很適合用來激發生物體內之螢光。以下我們將針對  $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  晶體光纖的生長及製備做詳盡之介紹。

常見的晶體生長方法有 Bridgman-Stockbarger 法、Czochralski 法、Verneuil 法、浮動熔區法 (floating zone; FZ) 與高溫溶液法，其中只有浮動熔區法適合用來生長晶體光纖[18]。我們實驗室所使用的雷射加熱基座生長法 (laser-heated pedestal growth method; LHPG) 屬於熔區法的一種，於 1972 年由 Haggerty 所提出，一開始用來生長紅寶石 (ruby) 晶體[19]，後來陸續應用於其他晶體或晶體光纖的生長。

LHPG 具有生長時不需使用容器盛載晶體，無坩堝污染的問題，並且使用 LHPG 生長晶體光纖還具有高生長速度以及容易長出直徑很小之晶體光纖的優點，因此使用 LHPG 來生長我們所需的

Ce<sup>3+</sup>:YAG 晶體光纖是非常適合的。

圖 3-1 為 LHPG 之示意圖。左邊的圖表示 50-W 的 CO<sub>2</sub> 雷射經擴束後的光束進入生長腔，經過內、外錐狀面鏡的反射後成為均勻的環形光束，接著經由平面鏡使光軸調整為向上，最後經由拋物面鏡使光以軸對稱的形式聚焦於原始晶棒(source rod)上，使原始晶棒頂端熔融產生熔區。右邊的圖表示原始晶棒經過熔區使材料熔化後，緩慢的使子晶下移與熔區接觸，接著一面將原始晶棒往上送，一面將子晶以較快速度上拉拉成所需的晶體光纖。提拉子晶與推送原始晶棒的速度比與生長晶體的直徑比的關係如下：

$$\frac{D_f}{D_p} = \sqrt{\frac{v_p}{v_f}} \quad (3-1)$$

其中  $D_f$  和  $D_p$  分別代表原始晶棒和晶體光纖的直徑； $v_f$  及  $v_p$  則代表原始晶體推送和晶體光纖往上提拉的速度。由上式可看出，藉由調整兩者的速度比即可生長出不同直徑的晶體光纖。

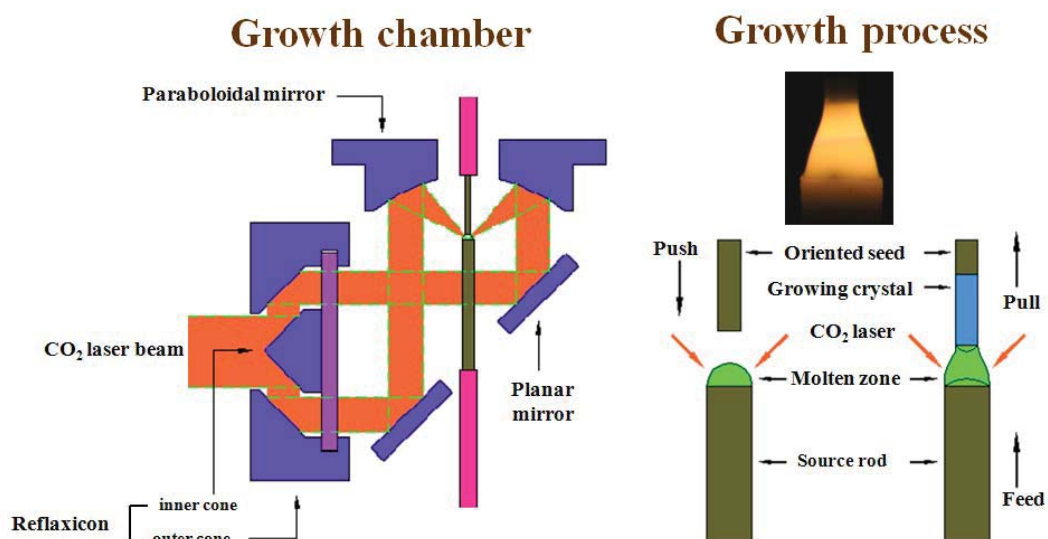


圖 3-1 LHPG 的生長法示意圖



透過以上過程，我們實驗室可生長的單晶光纖最小直徑為 23  $\mu\text{m}$ 。但若利用玻璃毛細管(silica capillary) 包覆  $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  單晶光纖，並且以藍寶石管(sapphire tube)穩定熔區的溫度，以 LHPG 方法再成長一次，利用  $\text{SiO}_2$  滲透到 YAG 的特性，我們可以生長雙層纖衣的晶體光纖，其晶纖核心(core)直徑可小於 23  $\mu\text{m}$  以下。其熔區橫截面如圖 3-2 所示：

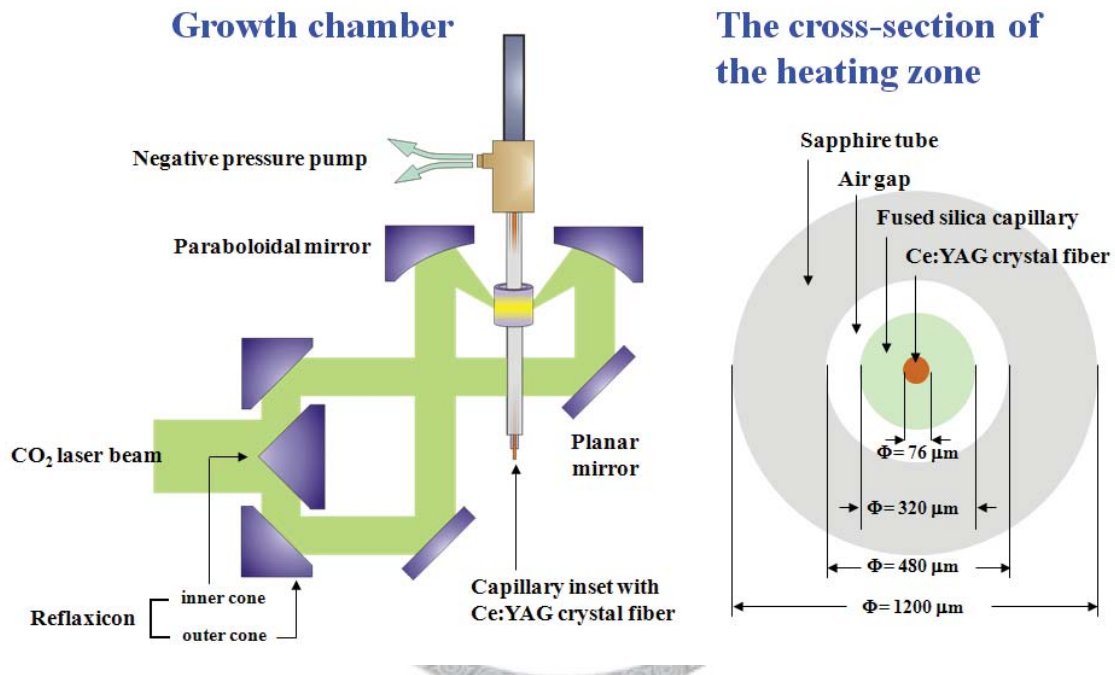


圖 3-2 LHPG 生長雙纖衣晶體光纖及熔區橫截面示意圖

圖 3-3 為雙纖衣晶體光纖的成長過程。要注意的是由於避免新長出的光纖受到重力影響而曲折，所以此時抽拉的方向是向下，經過熔區後  $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  晶體和玻璃毛細管互相融化混合成內層纖衣(inner-clad)。從圖 3-3 中右下方晶纖的側面圖(side view)可清楚看出纖心-內層纖衣-外層纖衣之三層結構。

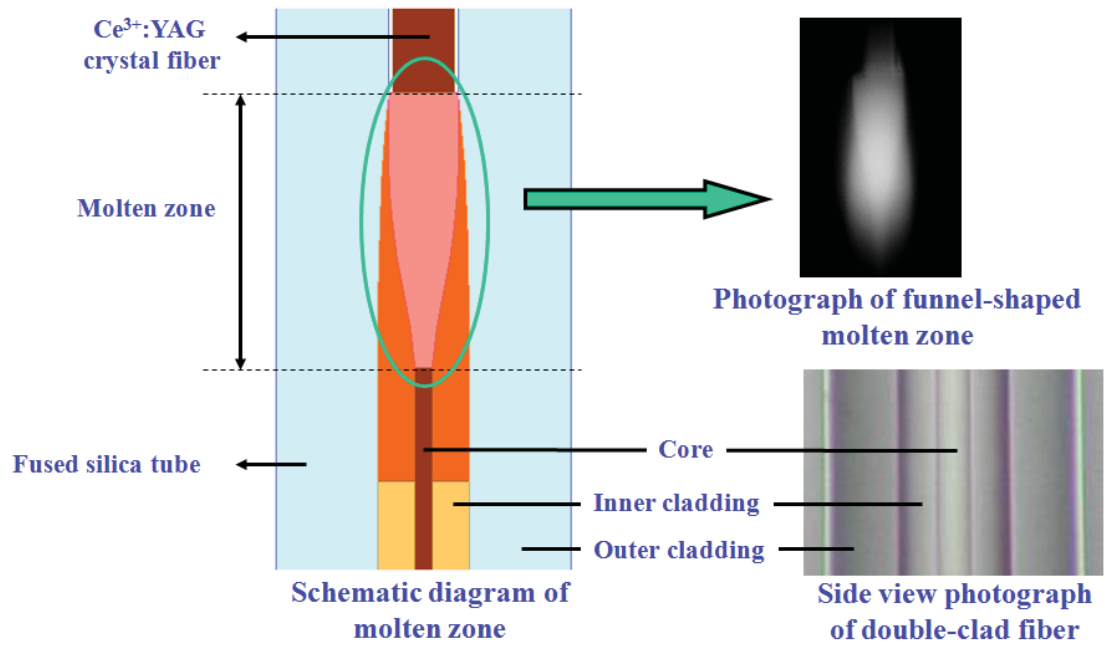


圖 3-3 雙纖衣晶體光纖的成長過程

經以上描述的方法所成長出來的 Ce<sup>3+</sup>:YAG 晶體光纖，經過包覆及端面研磨拋光後，使用波長為 445 nm 的雷射二極體做為幫補光源，其 ASE 光譜及端面影像如下圖所示：

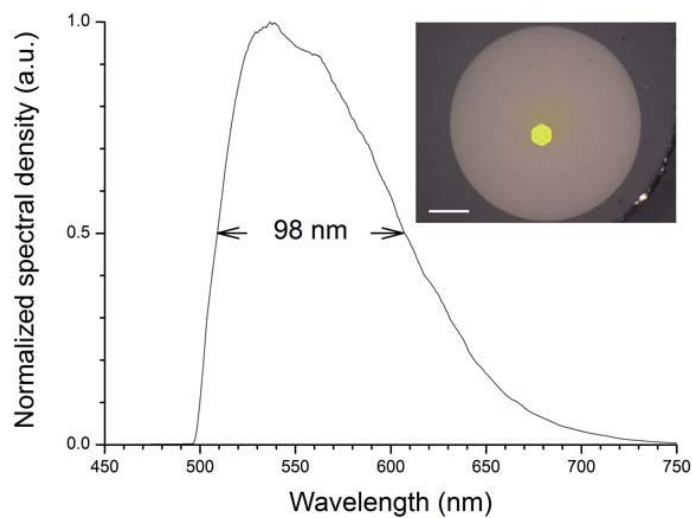


圖 3-4 Ce<sup>3+</sup>:YAG 晶體光纖 ASE 光譜及端面影像

圖 3-4 中右上方的端面影像中，比例尺代表的長度為 20 μm，中間黃

色部分為纖心，直徑約為 10  $\mu\text{m}$ 。對於應用於光學同調斷層掃描系統的光源，若是光源頻譜越不接近於高斯頻譜，其干涉訊號的旁瓣(side lobe)會越明顯，容易造成錯誤的訊號解讀。由圖 3-4 可看出， $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  晶體光纖所產生的 ASE 光譜，其半高全寬達 98 nm 並且十分接近高斯分佈，為一十分理想的高斯頻譜光源。

為了有效率地激發螢光物質，共焦螢光顯微系統通常使用一波長落在紫外光或藍光波段的單頻光做為激發光源。因此我們用來激發  $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  晶體光纖的藍光雷射二極體剛好也能作為共焦螢光顯微系統的激發光源。然而由雷射二極體放射出的雷射光場形分佈通常包含許多高階模態(high-order mode)，而非一場形為高斯分佈的基本模態。由於高階模態無法由物鏡聚焦成一個具繞射極限大小的光點，若是直接將此具有許多高階模態的雷射光聚焦到樣本上，將無法獲得良好的空間解析能力。為了解決這個問題，實務上通常會將使用一空間濾波器(spatial filter)，或是將雷射光耦合(couple)進一單模光纖(single mode fiber)中以濾除不需要的高階模態。而我們建立的共焦螢光顯微系統就是使用一適用於藍光波段的單模光纖進行空間濾波的動作，詳細架構將於下節加以說明。

## 3.2 光學系統架構

圖 3-5 為系統架構示意圖。我們使用最高輸出功率為 500 mW、波長 445 nm 的藍光雷射二極體(Nichia, #NDB7112E)做為幫浦光源，其發散光由  $L_1$  (Newfocus, #5720-A) 準直(collimate)後，以  $L_2$  (Newfocus, #5720-A) 聚焦到纖心直徑約為 6.5  $\mu\text{m}$  的  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 晶體光纖的纖心上。集中於纖心的  $\text{Ce}^{3+}$  經由幫浦光的激發後產生 ASE 光源並透過光纖傳播，於光纖出光口使用 10X 的顯微物鏡(Olympus, RMS10X)收集並成像於  $P_1$  的位置。 $LF_1$  (Semrock, #BLP01-488R-25) 位於  $L_3$  與  $P_1$  中間以濾除殘存的幫浦光。 $P_1$  (Edmund Optics, #NT56-283) 的大小為 100  $\mu\text{m}$ ，其作用在於濾除纖心以外的 ASE 光以留下較好的模態並降低雜訊。通過  $P_1$  的 ASE 光由  $L_4$  (Thorlabs #LSB08-A) 再度準直，並由 BS (Thorlabs, #BS-013) 分為參考光與測試光。由於我們的 ASE 光源頻寬達 98 nm，為使兩道光路的光程差保持相同，避免 OCT 系統的縱向解析度由於色散效應(dispersion effect) 而降低，參考光和測試光分別使用兩個倍率同樣為 10X、數值孔徑為 0.28 的長工作距離(long working distance)物鏡  $L_5$  和  $L_6$  (Edmund Optics, #NT59-877) 聚焦到  $M_2$  和 S 上，完成對稱的麥克森干涉儀架構。我們將  $M_2$  固定在壓電致動器  $PZT_1$  (Physik Instrumente, P-601.3S) 上，由外加的三角波驅動  $PZT_1$  使之來回震動，以實現 2.3.2 節中所描述的縱向掃描。橫向掃描則是透過將樣本 S 放置於一組可二維移動的線性平移台 LS (Thorlabs, #MTS25-Z8E) 上，使測試光聚焦到樣本的不同位置。掃描過程中產生的干涉訊號由  $L_{11}$  (Thorlabs, #LSB08-A) 聚焦到光偵測器 PD (Thorlabs, #PDA36A) 上，並由資料擷取卡 (National Instrument, #PCI-4461) 讀取並儲存到電腦中。

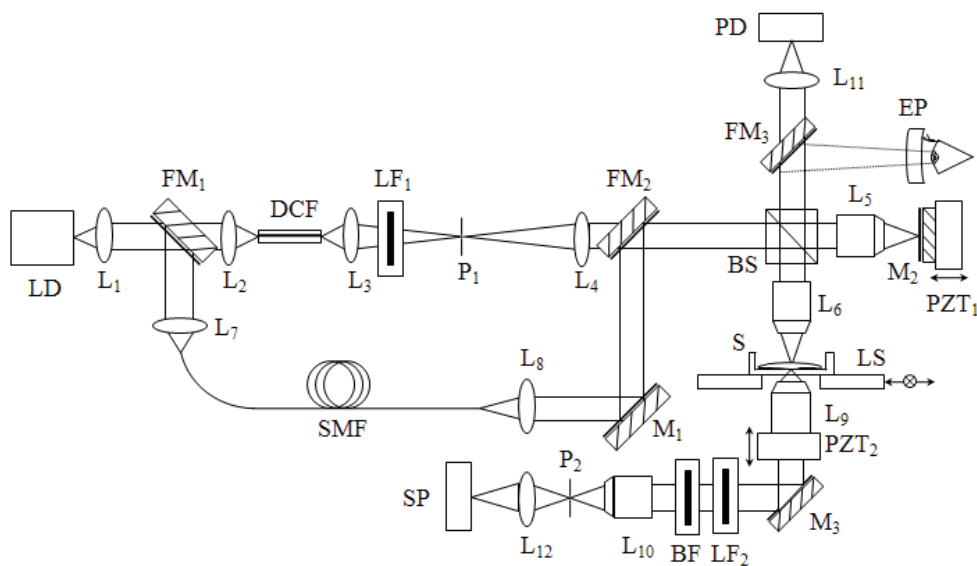


圖 3-5 系統架構示意圖。LD, 雷射二極體;  $L_1$ 、 $L_2$ 、 $L_7$ 、 $L_8$ , 40X、60X、20X、10X 非球面透鏡;  $L_3$ 、 $L_9$ 、 $L_{10}$ , 10X、40X、10X 物鏡;  $L_5$ 、 $L_6$ , 10X 長工作距離物鏡;  $L_4$ 、 $L_{11}$ 、 $L_{12}$ , 消色差雙合透鏡;  $FM_1$ 、 $FM_2$ 、 $FM_3$ , 翻轉面鏡; DCF, 雙纖衣晶體光纖; SMF, 單模光纖;  $P_1$ 、 $P_2$ , 100  $\mu\text{m}$ 、10  $\mu\text{m}$  針孔;  $LF_1$ 、 $LF_2$ , 長通濾波片; BF, 帶通濾波片; BS, 非極化寬頻分光鏡;  $M_1$ 、 $M_2$ 、 $M_3$  反射鏡;  $PZT_1$ 、 $PZT_2$ , 壓電致動器; S, 樣本; LS, 線性平移台; PD, 光偵測器; SP, 矽光電倍增管; EP, 目鏡

由於 OCT 系統一次能掃描的縱向深度受限於測試光聚焦物鏡的景深，若掃描的範圍超出景深太多，橫向解析度會由於光束的發散而快速下降，因此實務上 OCT 系統通常會使用較低倍率的物鏡以換取較長的縱向掃描範圍。然而由 2.2.2 的推導結果可知，共焦顯微系統通常需要一數值孔徑較大(通常倍率也較高)的物鏡和集光鏡以獲得較好的空間解析度，因此其實這兩種系統對物鏡的需求是互相衝突的，這也是為什麼一般在結合 OCT 與共焦顯微術的文獻中，無法對樣本的同位置分別取得兩種工作模態之三維影像的原因。

為了解決此矛盾，我們在設計共焦螢光顯微系統時，用來聚焦

激發光的物鏡仍選擇使用 OCT 系統測試光端的  $L_6$ ，但用來收集螢光的集光鏡則獨立使用另一個數值孔徑為 0.6 的物鏡  $L_9$  (Olympus, LUCPLFLN40X)，並且將  $L_9$  固定在另一個壓電致動器  $PZT_2$  (Physik Instrumente, P721.0LQ) 上，透過  $PZT_2$  的上下震動實現以縱向掃描。

為了將波長為 445 nm 的雷射光引入系統，我們在  $L_1$ 、 $L_2$  及  $L_4$ 、BS 間各安裝一個翻轉面鏡(flipper mirror) $FM_1$ 、 $FM_2$ ，雷射光被  $FM_1$  轉折後由  $L_7$  耦入 SMF (THORLABS, #SM450) 內，SMF 的後端再使用  $L_8$  準直化後由  $M_1$  和  $FM_2$  轉折進入系統由  $L_6$  聚焦到樣本上。樣本被激發的螢光，被  $L_9$  收集後，先後通過  $LF_2$  及 BF 以濾掉殘餘的雷射光並擷取適當的訊號波段，再以一個 10X 物鏡  $L_{10}$  聚焦到 10  $\mu\text{m}$  針孔  $P_2$  上進行空間濾波。最後，通過  $P_2$  的光訊號以  $L_{12}$  收集並聚焦進入矽光電倍增管(silicon photomultiplier)SP (Newport, #SPM1D-T) 轉換成電訊號，同樣由資料擷取卡擷取並傳送到電腦內儲存。

由於我們所使用的 OCT 與 CFM 系統光源皆為人眼可接收的可見光波段，因此可以在  $L_{11}$  前另外安置一個翻轉面鏡  $FM_3$ ，將反射回來的訊號光轉折進入目鏡內，如此即可直接用人眼觀察光聚焦處樣本的形態，對取得影像的效率與校正兩種系統影像的相對位置都有很大的幫助。

### 3.3 掃描系統

由於共焦螢光顯微術與光學同調斷層掃描都只能一次擷取空間中一個點的訊號，因此若想取得一張二維甚至三維的影像必須就透過掃描系統進行掃描與取樣。我們的系統在橫向上是使用一組具有兩個維度的線性平移台改變樣本的位置，使 ASE 或藍光雷射聚焦在樣本的不同位置上，這樣做的好處是在軸向上的光源激發強度可以維持定值，因此在整個掃描區域下是受到相同強度的光源激發，不會有影像強度不均的問題。除此之外，使用線性平移台可以允許我們做不同大小範圍的影像掃描，若是使用掃描鏡改變光束位置進行橫向掃描，則影像掃描的範圍會受到掃描鏡轉折角度與物鏡倍率的限制。並且藉由更換不同數值孔鏡的物鏡，可以針對同一樣品區域重覆掃描得出範圍相同但解析度不同的影像。

在我們的系統中 OCT 與 CFM 的縱向掃描都是透過 PZT 的來回振動實現。OCT 的縱向掃描機制在 2.3.2 節中已有詳細的說明，我們用來搭載參考面鏡的 PZT 為 PI 公司生產的 P-601.3S，其開迴路 (open-loop) 最大移動範圍為 250  $\mu\text{m}$ ，已足夠涵蓋我們系統中使用的 10X 物鏡的景深。振動頻率一般由 20 Hz 的三角波來驅動，然而可以視情況以 2 Hz 驅動以降低振動雜訊，兩種振動頻率所對應之干涉訊號的載波中心頻率  $f_0$  分別為 2.5 與 25 kHz， $f_0$  之計算方式如下：

$$f_0 = \frac{2V}{\lambda_0} \quad (3-2)$$

其中  $V$  為 PZT 的移動速率。並可由式(3-2)進一步計算載波頻率之頻寬  $\Delta f$ ：

$$\Delta f = \frac{2V\Delta\lambda}{\lambda_0^2} \quad (3-3)$$

由式(3-3)可得兩種訊號頻率之半高全寬為 0.45 與 4.5 kHz，但是實際上在擷取 OCT 的資料時，電腦內部所設定的帶通濾波器頻寬分別為 2.4 與 24 kHz，這是為了能讓所有訊號都能被充分地擷取與呈現。

在進行一次二維掃描時，以固定取樣頻率取樣，PZT 每次振動可取得一個的縱深(軸)的資訊，但是我們只取來回一半路程的資料，這是由於 Hysteresis 效應，使得 PZT 的來回路徑並不完全相同，如圖 3-6 所示：

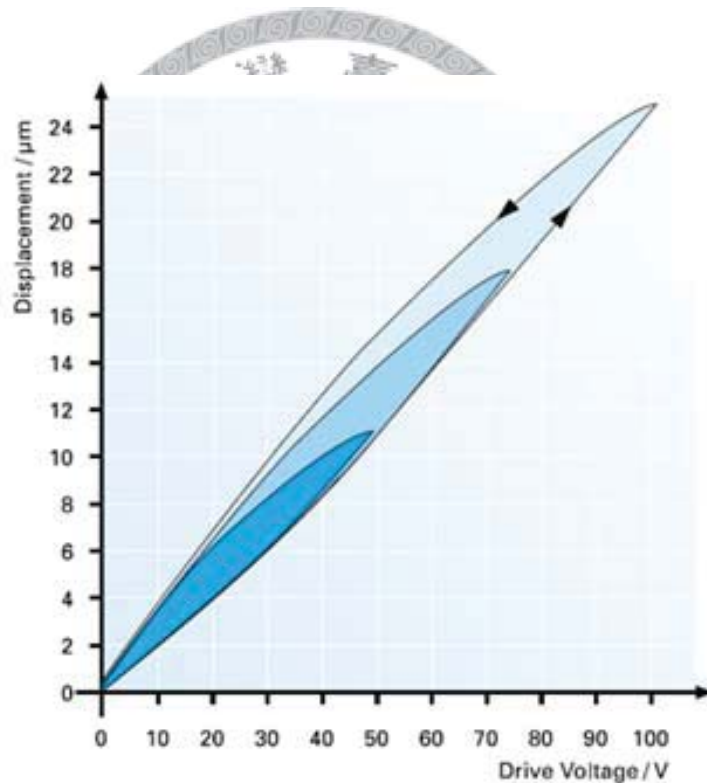


圖 3-6 開迴路 PZT 位移量與驅動電壓關係

在 PZT 振動的同時，使用電腦控制等速移動線性平移台的其中一個維度(x軸)，移動範圍就是橫向的掃描範圍，在此範圍內 PZT 來回振動的次數代表橫向上的像素個數，像素的大小  $\Delta x$  與 PZT 振動頻



率、掃描範圍，以及線性平移台移動速率有關。舉例來說：假設 PZT 的振動頻率為 20 Hz， $x$  軸掃描範圍 200  $\mu\text{m}$ ，橫向移動速率為 40  $\mu\text{m/s}$ ，則一張二維掃描的時間為 5 秒，PZT 來回振動了 100 次，因此  $\Delta x$  的大小為 2  $\mu\text{m}$ 。二維掃描的示意圖如圖 3-7 所示：

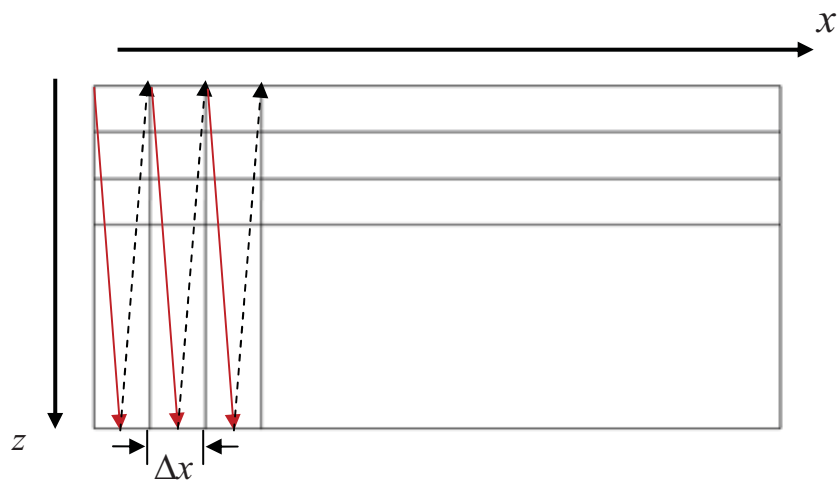


圖 3-7 二維掃描

若是想取得一個三維的影像，則必須將橫向上另一維度( $y$  軸)上不同位置取到的許多二維影像資料使用影像處理軟體加以重組。其方法是在取完一張二維影像後， $y$  軸每隔一小段距離再取一次二維影像，此段距離必須與原本二維影像  $x$  軸的像素大小相同，以保持橫向上兩個維度的像素大小相同。三維掃描的示意圖如圖 3-8 所示：

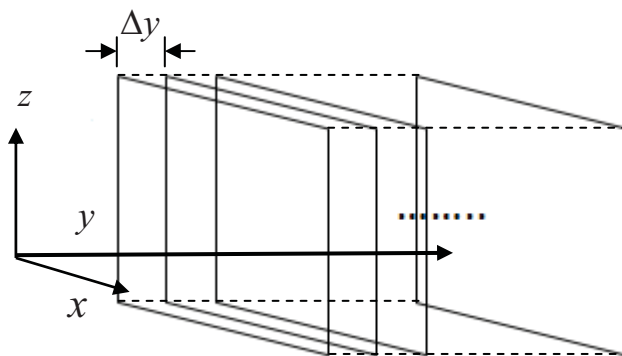


圖 3-8 三維掃描

共焦螢光顯微系統的掃描方式基本上和光學同調斷層掃描類似，不同的是共焦螢光顯微系統中的縱向掃描是將物鏡裝載在另一個 PI 公司生產的 PZT 上下振動來回掃描，如圖 3-9 所示。此 PZT 型號為 P721.0LQ，縱向最大掃描範圍為 140  $\mu\text{m}$ ，和光學同調斷層掃描相比，共焦螢光掃描顯微系統的縱向掃描範圍會少一些。因此若是想要將同一位置的兩種影像資料整合在一起，必須在軟體上另行處理。

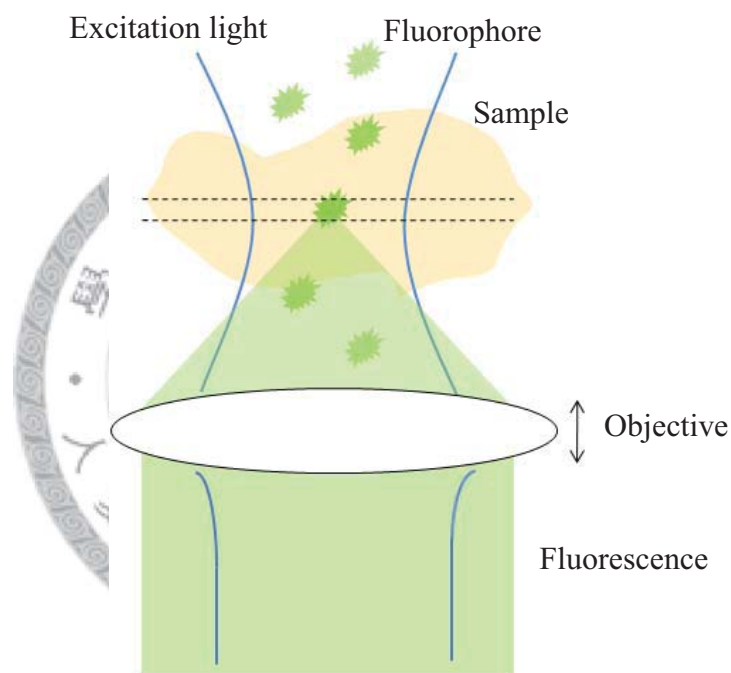


圖 3-9 共焦螢光顯微系統之縱向掃描

## 第四章 實驗結果與分析

在本章中，我們先對建立好的雙模態影像系統進行解析度與影像品質之初步測試。接著使用摻鉍鈮鋁石榴石晶體粉末作為一個能同時被光學同調斷層掃描與共焦螢光顯微術取得立體影像之理想樣本，展示系統的影像結合能力。最後使用光學同調斷層掃描系統對癌細胞與幹細胞的樣本架構取得三維影像。

### 4.1 系統測試

#### 4.1.1 光學同調斷層掃描

由 2.3.3 節可知，OCT 的縱向解析度即為干涉訊號的同調長度。因此我們使用一個平面鏡做為樣本，並且用目鏡確認光點確實聚焦到平面鏡上，紀錄一維掃描時，光偵測器中光電流隨著參考面鏡移動時上下震盪的交流訊號。其結果如下圖所示：

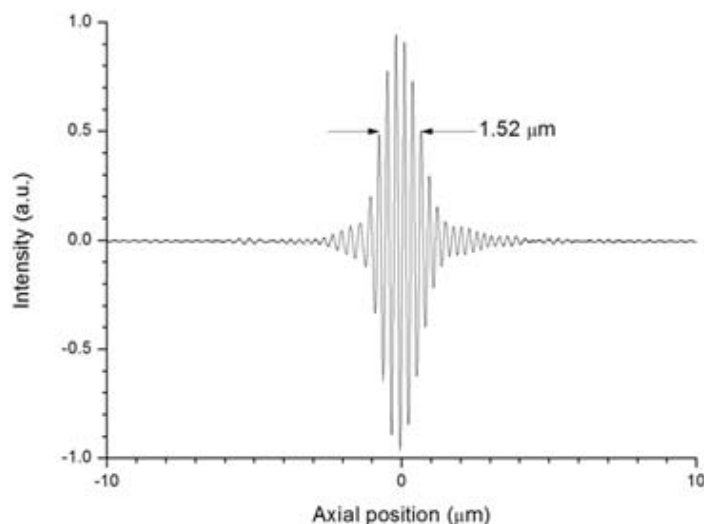


圖 4-1 以平面鏡做為樣本的干涉訊號

如圖中所示，以平面鏡為測試樣本量測到的干涉訊號之半高全寬為  $1.52 \mu\text{m}$ 。而若是將圖 3-4 中的光源頻譜直接使用 MATLAB 撰寫程式去計算系統的干涉訊號，其半高全寬為  $1.45 \mu\text{m}$ ，如下圖所示：

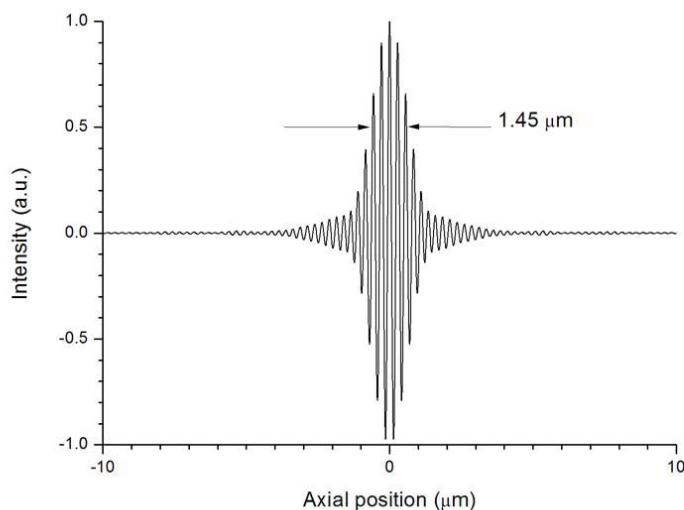


圖 4-2 使用光源頻譜直接模擬的干涉訊號

比較模擬與實際量測的結果，我們所架設的 OCT 系統的縱向解析度略大於直接使用光源頻譜計算的結果，表示我們架設的 OCT 系統在測試端光路與參考端光路兩端的色散有些微差異。儘管如此，我們的實驗結果仍然和模擬結果十分接近，因此我們都將在此縱向解析度的條件下進行所有的實驗。

至於橫向解析度的部分，由於我們的 ASE 寬頻光源具有許多橫向模態，即使使用完美的物鏡也無法將光束聚焦到繞射極限的大小。為了評估我們 OCT 系統的橫向解析能力，我們使用一個光柵(grating)作為測試樣本進行二維掃描。光柵的顯微鏡影像及其週期大小如圖 4-3 所示：

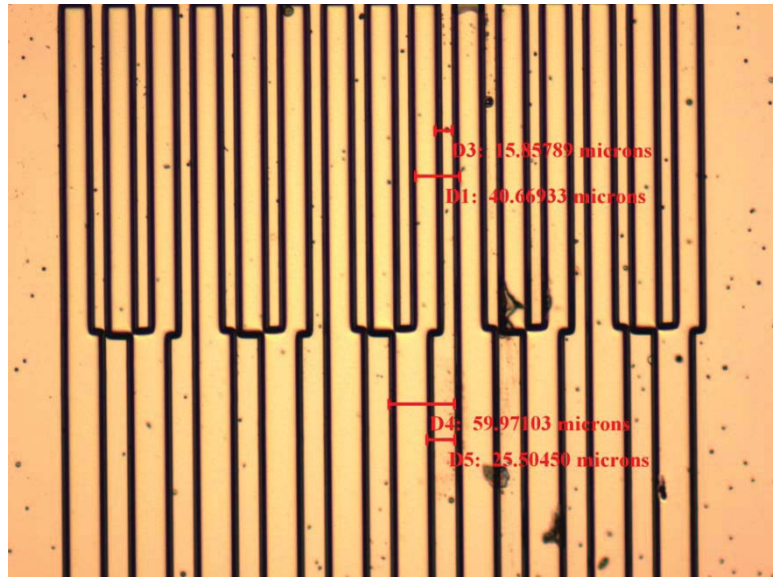


圖 4-3 光柵的顯微鏡影像(100x)

由於聚焦光點大小不是一個無窮小的點，所以當光點橫向移動經過光柵每一個週期的上下邊界時，邊界的影像會有拓寬的現象，而上下交疊的區域即為聚焦光點的大小。實驗結果如圖 4-4 所示：

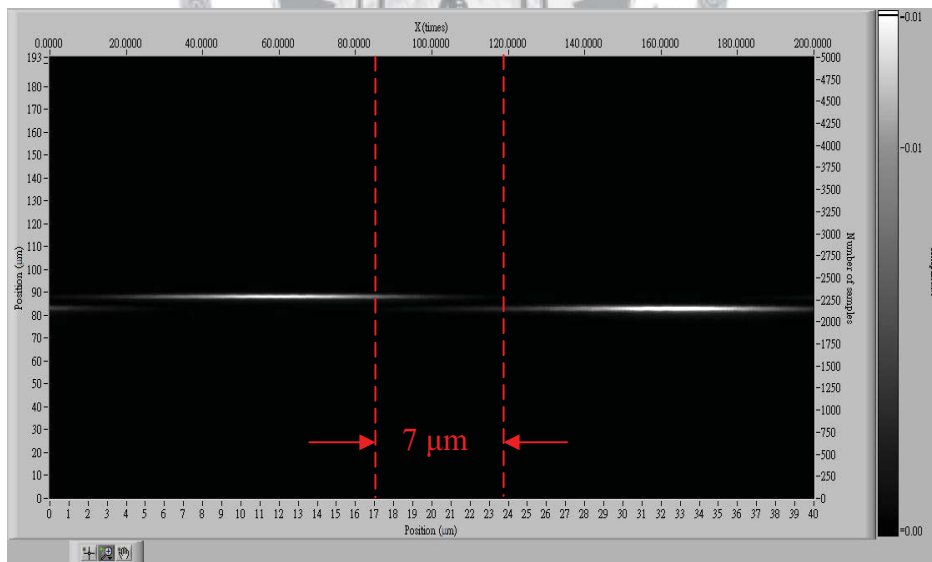


圖 4-4 OCT 橫向解析度測試

由上圖可看出，我們的 OCT 系統將測試光聚焦到樣本上的光點大小約為  $7\ \mu\text{m}$ ，其大小是由邊界的反射訊號強度由 90% 掉到 10% 的

寬度所定義，如圖 4-5 所示：

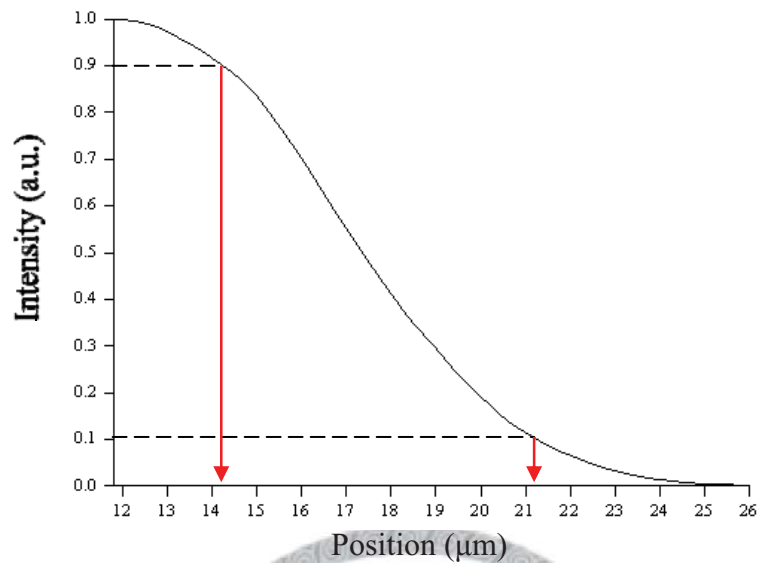


圖 4-5 光柵邊界反射訊號強度

若是希望提升系統的橫向解析度，我們可以藉由更換針孔的大小或是使用較高倍的聚焦物鏡，但是代價是訊號強度變弱或是景深變短。

#### 4.1.2 共焦螢光顯微術

在我們的架構中，共焦螢光顯微系統中的聚焦鏡與集光鏡並非使用同一個物鏡，因此我們先使用式(2-17)與式(2-20)，並帶入實驗架構的系統參數以計算理論上最佳的橫向與縱向解析度。在本研究的共焦螢光顯微系統中，聚焦物鏡的數值孔徑為 0.28、集光物鏡的數值孔徑為 0.6、激發光為 445 nm 並假設訊號光中心波長為 600 nm，其橫向上與縱向上的點擴散函數模擬結果如圖 4-6 所示：

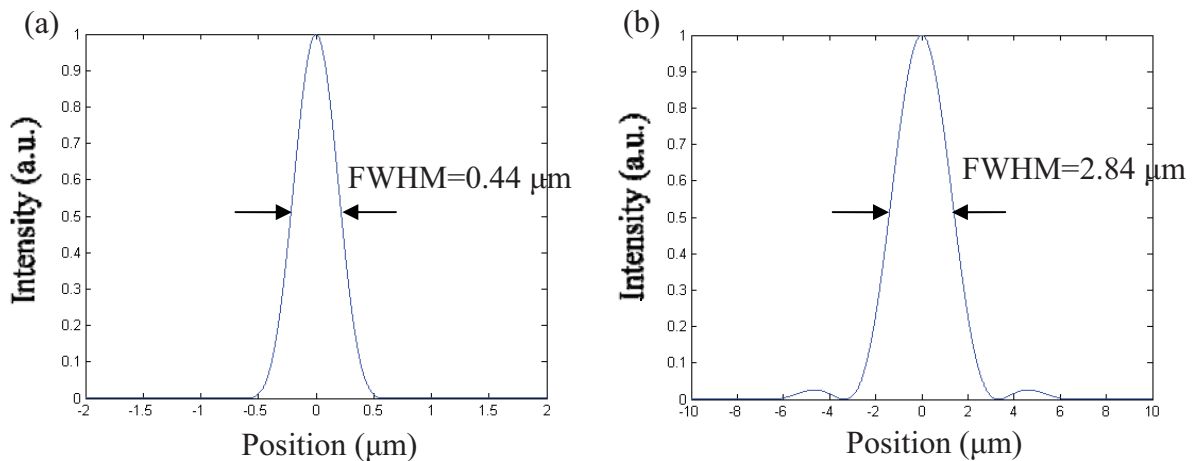


圖 4-6 共焦螢光顯微系統 (a)橫向點擴散函數 (b)縱向點擴散函數

從圖 4-6 可看出，我們架設的共焦螢光顯微系統理論上的橫向與縱向解析度分別為  $0.44 \mu\text{m}$  與  $2.84 \mu\text{m}$ ，然而此模擬結果尚未考慮將訊號光聚焦到針孔之透鏡與針孔大小的影響。與光學同調斷層掃描系統相比，共焦螢光顯微術具有較高的橫向解析度，然而其縱向解析能力不如光學同調斷層掃描，若是希望更加提升共焦螢光顯微術的縱向解析能力，可以使用數值孔徑更高的物鏡做為集光鏡，但是如此一來物鏡的工作距離(working distance)將大幅縮短。以 Olympus 出產的 UPLSAPO 40X 空氣鏡為例，其數值孔徑高達 0.9，可提供小於  $1 \mu\text{m}$  的縱向解析度，然而其工作距離僅為  $180 \mu\text{m}$ ，在這麼短的工作距離下，系統架設的困難度將大為提高，不符合實際應用的需求。

為了確定我們架設的共焦螢光顯微系統是否完善，我們使用直徑為  $15 \mu\text{m}$  螢光小球(Invitrogen, #F-21011)作為樣本進行掃描，這是由於螢光小球的形狀固定，並且能有效率地被藍光激發，提供良好的影像對比度。螢光小球的樣本製作方式如圖 4-7 所示：

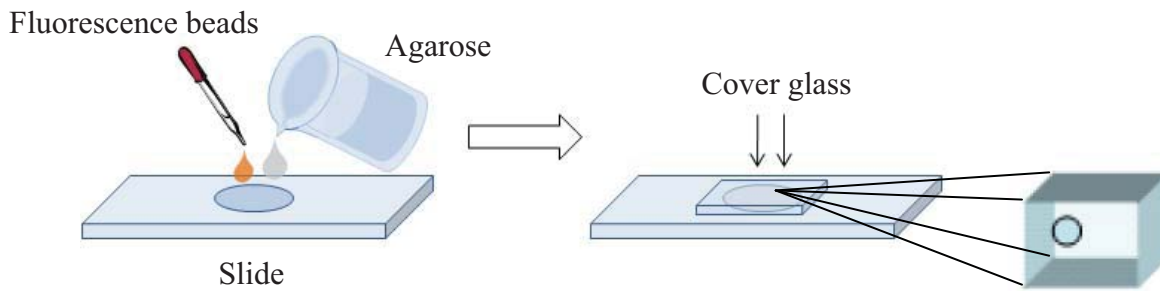


圖 4-7 螢光小球樣本製作

首先我們將 1 g 之洋菜膠粉末(agarose)加入 50 mL 的純水中，用加熱盤加熱並攪拌使洋菜膠粉末溶解成為一透明無色之洋菜膠溶液。趁洋菜膠溶液尚未冷卻固化前，將螢光小球溶液與洋菜膠溶液以體積比 1:10 的比例均勻混合，再用滴管取一小部分滴於有凹槽的載玻片中，最後將蓋玻片蓋上待其冷卻，冷卻後可在蓋玻片周圍塗上透明指甲油防止水分蒸發。完成後之螢光小球顯微鏡影像如下：

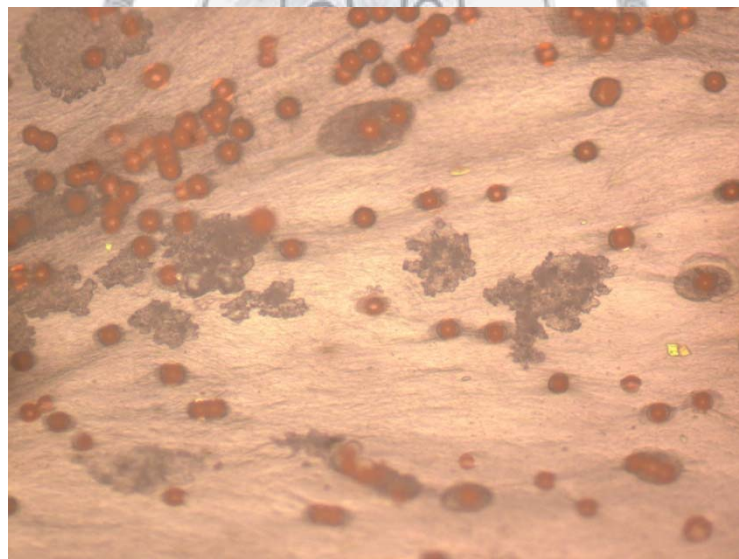


圖 4-8 螢光小球之顯微鏡影像(100x)

掃描結果經由影像處理軟體的重建後之二維平面影像如圖 4-9 所示：



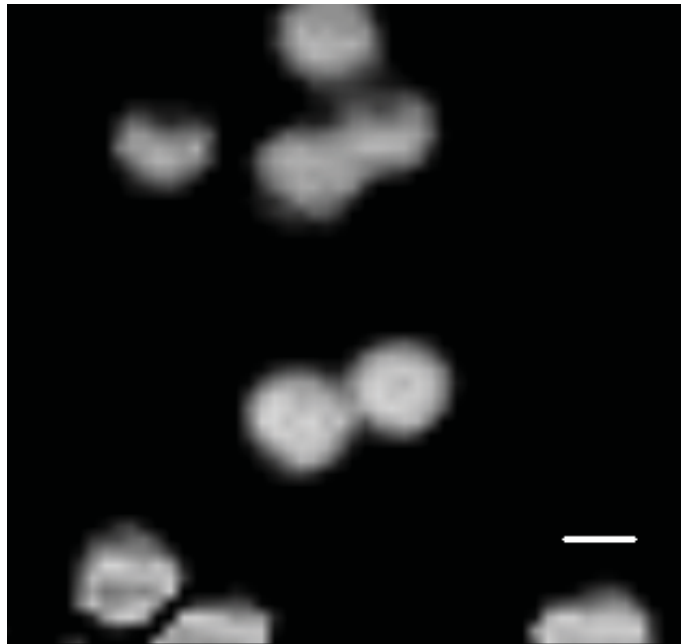


圖 4-9 螢光小球之平面影像，影像範圍  $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ ，比例尺的長度代表  $10\ \mu\text{m}$

由圖 4-9 可看出我們所架設的共焦螢光顯微系統可清楚地將螢光小球的形狀與空間分佈顯現出來，並且由影像得知的螢光小球大小與實際大小十分符合，因此我們認為當樣本中訊號源的大小接近這樣的尺寸時我們的系統都能忠實地呈現其原本的樣貌。

## 4.2 摻鈰釷鋁石榴石晶體粉末

在 4.1 節中，我們已初步測試過系統兩種工作模態之造影能力，但是在上節中我們所用來測試系統之樣本皆無法同時取得兩種工作模態之影像。為了證明我們所架設之系統具有對同一樣本之同一位置取得兩種工作模態之三維影像的能力，我們將  $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  晶體以研鉢搗碎後鋪灑於載玻片上，其顯微鏡影像如下圖所示：

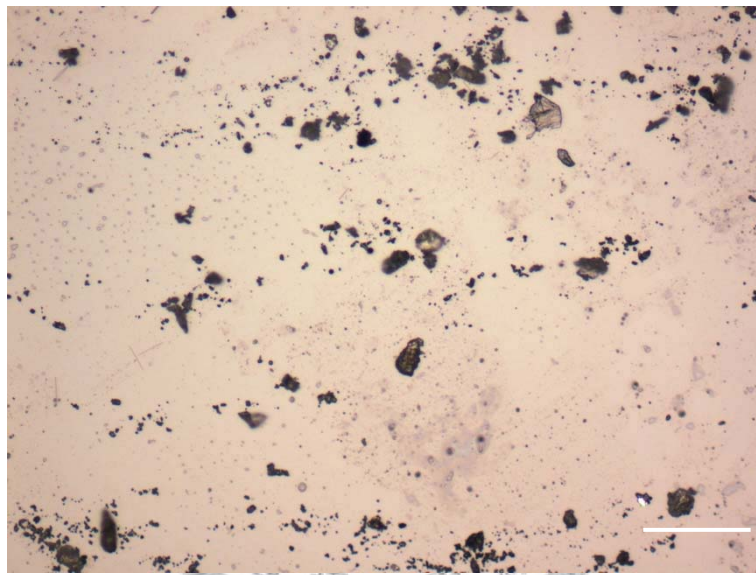


圖 4-10  $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  晶體粉末之顯微鏡影像(100x)，比例尺大小 100  $\mu\text{m}$

圖 4-10 中，圖中顏色較暗之不規則小區塊即為  $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  晶體粉末。進行實驗時，我們先以 OCT 進行二維掃描以確認  $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  晶體顆粒之大小與空間分佈。掃描結果如下圖所示：

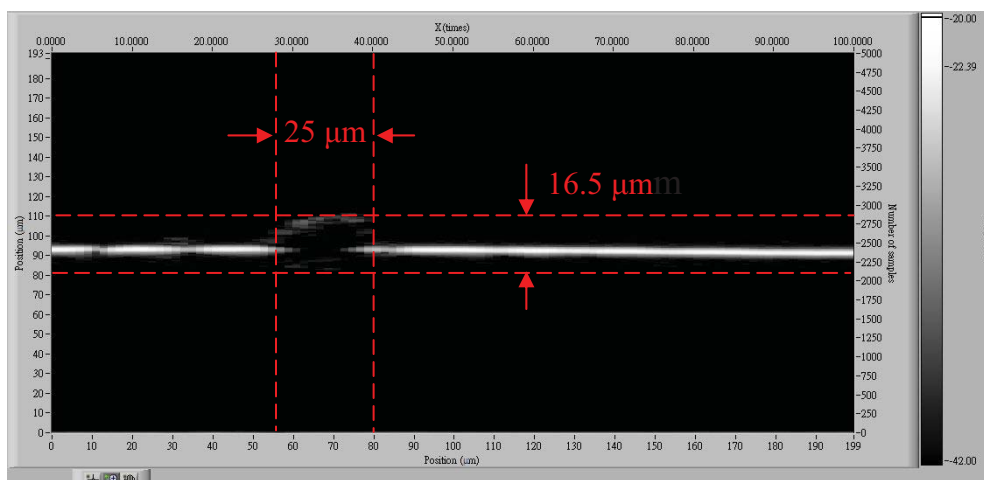


圖 4-11  $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  晶體顆粒二維掃描

圖 4-11 中影像中央白線代表載玻片表面之強烈反射訊號。由圖中左方之空間座標可看出這個晶體顆粒的厚度約為  $30\ \mu\text{m}$ ，然而此空間座標代表的是光程長度  $L'$ ，與實際空間長度  $L$  之關係為  $L' = nL$ ， $n$  為物質折射率，而  $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  之折射率為 1.82，因此其實際厚度應約為  $16.5\ \mu\text{m}$ ，並且在這個縱切位置上晶體顆粒橫向大小約為  $25\ \mu\text{m}$ 。

我們接著以 OCT 與 CFM 分別對載玻片上的同一區域進行三維影像掃描，掃描結果以影像處理軟體重建後之三維影像分別為圖 4-12 與圖 4-13：

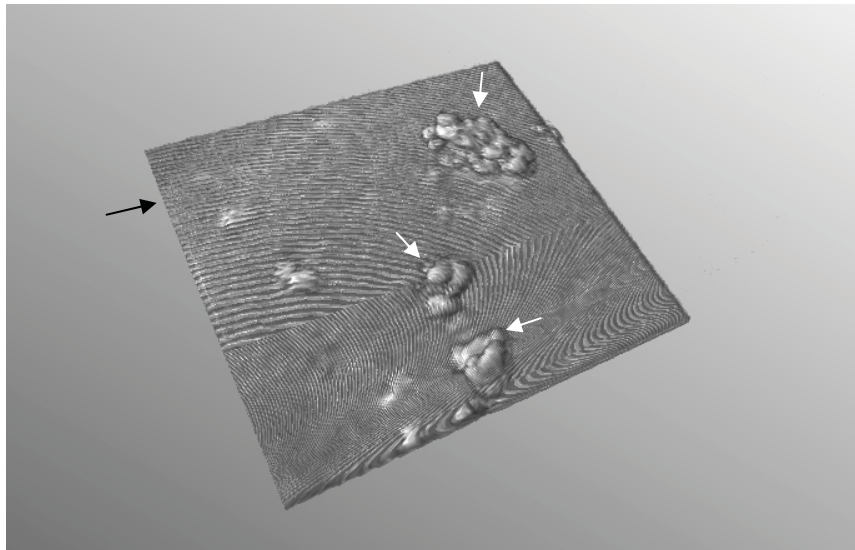


圖 4-12  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 顆粒以 OCT 取得之三維影像，影像範圍  $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m} \times 107\ \mu\text{m}$

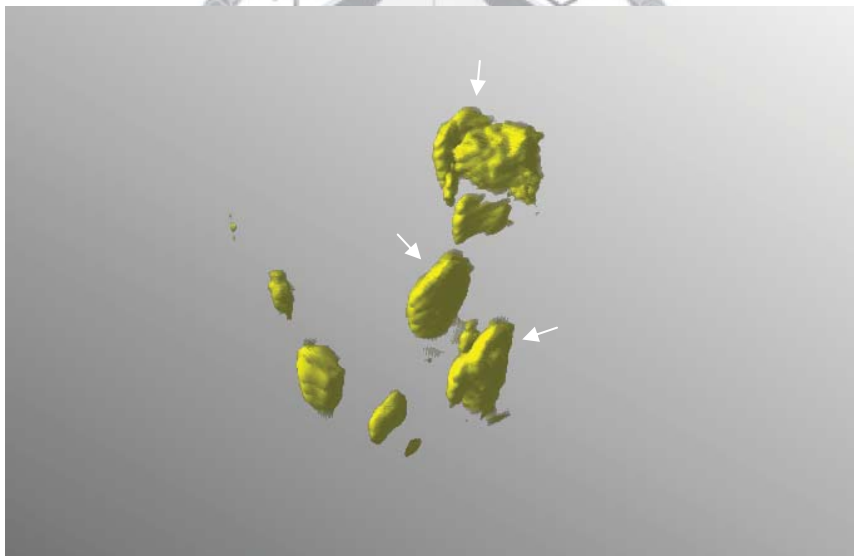


圖 4-13  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 顆粒以 CFM 取得之三維影像，影像範圍  $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m} \times 107\ \mu\text{m}$

圖 4-12 中，黑色箭號指向之均勻方形區域即為載玻片表面的反射訊號，由於載玻片並不會被激發產生螢光，因此圖 4-13 中並不會顯現出載玻片的存在。圖 4-12 中載玻片上以白色箭號指向之三個凸起區域即為  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 粉末表面的散射訊號，可與圖 4-13 中白色箭

號指向之三個螢光訊號區塊互相對應。與圖 4-13 相比較，這些散射訊號區域的邊界不如螢光訊號那麼明顯，這是因為使用 OCT 進行影像掃描時，邊界上的背向散射訊號會比表面的反射訊號微弱許多。

我們將兩組三維影像互相結合後之影像如圖 4-14 所示：

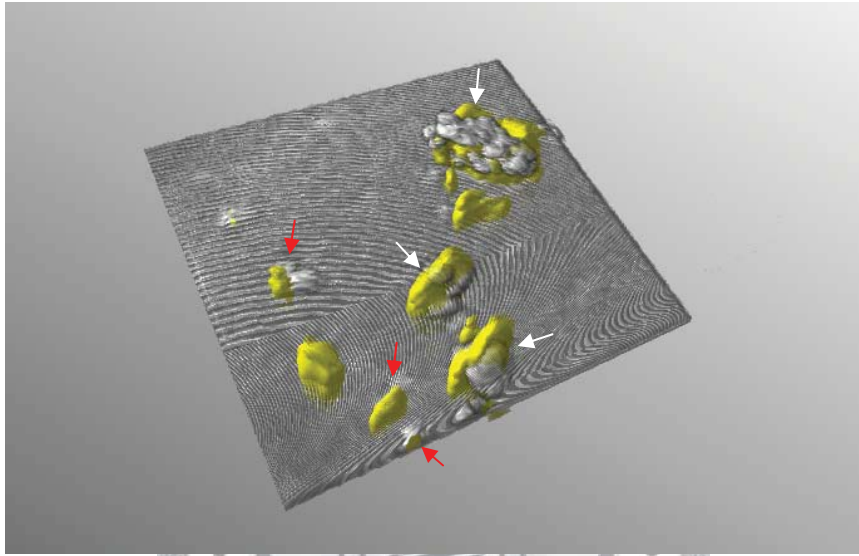


圖 4-14  $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$  顆粒之雙模態三維影像，影像範圍  $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m} \times 107\ \mu\text{m}$

由圖 4-14 可明顯看出，白色箭號所指向的區域在橫向上所呈現的兩種工作模態之影像形狀大致符合，而縱向上螢光訊號的分佈則有超出 OCT 散射訊號的情形，這是由於 CFM 的縱向解析度不及 OCT 所致。紅色箭號所指向之區域則可看到螢光訊號與散射訊號在橫向上有輕微的偏移，這是因為載物台在空間中的傾斜角度對 OCT 與共焦螢光顯微系統來說並不完全相同。儘管如此，圖 4-14 已充分地展現了我們系統整合同一樣本兩種影像模態的能力。

最後我們將圖 4-14 不同縱深的影像由上而下依序顯示，如圖 4-15 所示。其中(a)、(c)、(e)、(g)為 OCT 不同深度的切面影像，而

(b)、(d)、(f)、(h)則為 CFM 不同深度的切面影像。(a)-(b)、(c)-(d)、(e)-(f)、(g)-(h)互相對應相同的縱向深度。

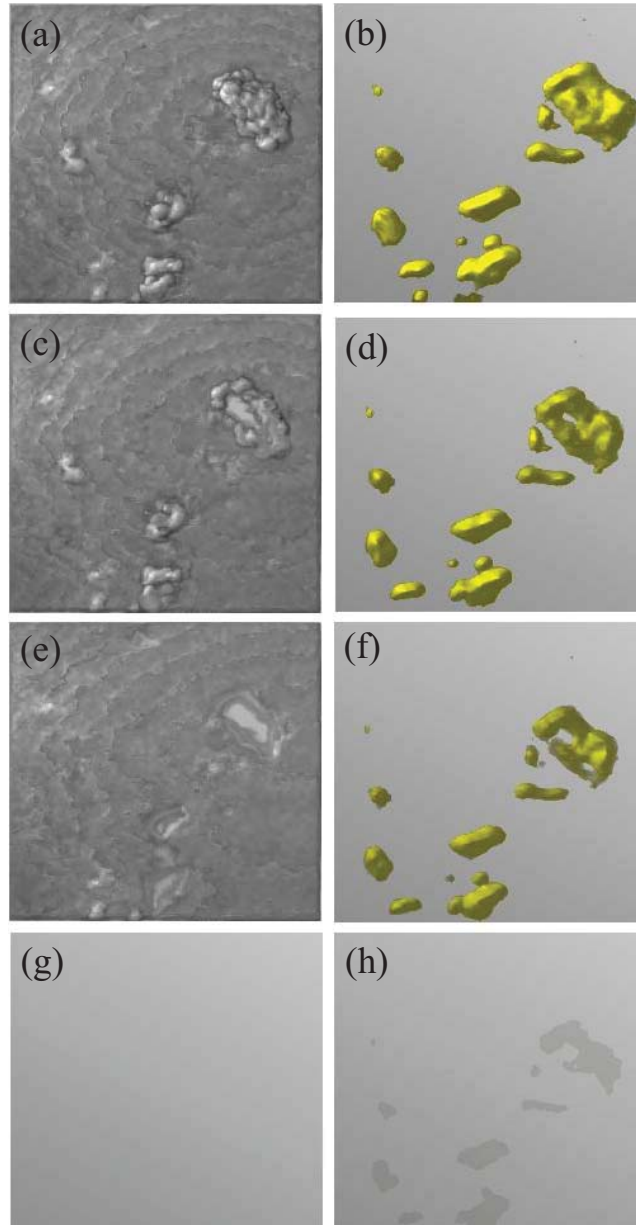


圖 4-15  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 顆粒不同縱深的影像，

由(a)、(c)、(e)、(g)可看出 OCT 只在  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 顆粒的表面有散射訊號，這是因為  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 產生的 ASE 波段在  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 顆粒中也會再次被吸收，造成如(e)中玻片表面的空洞。而(b)、(d)、(f)、(h)可看出  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 顆粒的 CFM 影像訊號強度在縱向上確實會隨著深

度增加而逐漸衰減，若是比較(g)和(h)，由於 CFM 的縱向解析能力不及 OCT，因此在玻片表面以下的區域仍有微弱的訊號存在。



### 4.3 癌細胞與幹細胞模型

以上所進行之實驗中，無論是光柵、螢光小球或是摻銻釷鋁石榴石晶體粉末皆屬於無生命現象之無機樣本。為了評估我們所架設的系統應用在生物樣本上之潛力，我們進一步使用 OCT 系統對培養於培養皿 (culture dish) 中之單層肺癌細胞 (human pulmonary adenocarcinoma cell; H441GL) 與人類間葉幹細胞 (mesenchymal stem cell; Kp-hMSCs) 進行二維或三維造影，希望能單純透過 OCT 影像資訊達到對單一細胞顯影之目的。

#### 4.3.1 細胞培養

我們所使用的 H441 細胞株屬於非小細胞性肺癌 (Non-small-cell lung cancer; NSCLC)，是在 1982 年由 A. F. Gazdar、M. Brower 和 D. Carney 從患有肺臟乳頭狀腺癌 (papillary adenocarcinoma) 的心胞膜液 (pericardial fluid) 中培養出，再利用攜帶有綠色螢光蛋白基因 (green fluorescent protein; GFP) 的反轉錄病毒載體進行感染，而選殖出帶有此段報導基因的 H441GL 細胞。H441GL 細胞培養於含有 10% FBS、100 U/ml penicillin、10 µg/ml streptomycin、0.25 µg/ml amphotericin B、1% NEAA 的 RPMI1640 培養液，置於含 5% CO<sub>2</sub>、溫度 37 °C 的潮濕培養箱中培養。

至於間葉幹細胞之細胞株則是由一位捐贈者的骨髓中分離出，利用攜帶有 16 型人類乳突瘤病毒 E6/E7 基因 (Human papillomaviruses-16 E6/E7; HPV16 E6/E7) 的反轉錄病毒載體進行感染，所選殖出不朽化 (immortalize) 的人類間葉幹細胞。Kp-hMSCs 細胞培養於含有 10% FBS、100 U/ml penicillin、10 µg/ml streptomycin、



0.25  $\mu\text{g/ml}$  amphotericin B 的 DMEM-LG 培養液，置於含 5%  $\text{CO}_2$ 、溫度 37  $^\circ\text{C}$  的潮濕培養箱中培養。

上述之細胞子代在培養時，必須先吸掉培養液，以 8 ml PBS (phosphate-buffered saline; 137-mM NaCl, 2.7-mM KCl, 10-mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2-mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , PH=7.4) 清洗二次，再吸掉 PBS。然後加入預先於 37  $^\circ\text{C}$  回溫的 0.05% trypsin-EDTA 1ml，置於培養箱中作用 5~10 分鐘。可輕拍培養皿使細胞容易脫落，並置於顯微鏡底下觀察。待細胞皆被切下後，加入適量培養液終止 trypsin-EDTA 的作用，以無菌滴管抽吸細胞懸浮液數次，將細胞充分打散後，而細胞數目計算則以粒子計數器(Z1 coulter counter®, Beckman Coulter)進行。

#### 4.3.2 樣本架構

我們實驗使用之單層的癌細胞與幹細胞都是所謂的貼附型細胞，必須附著於帶適量正電之固體或半固體上生長，在實驗室中則通常將其種於培養皿或是蓋玻片的表面使其順利生長，如下圖所示：

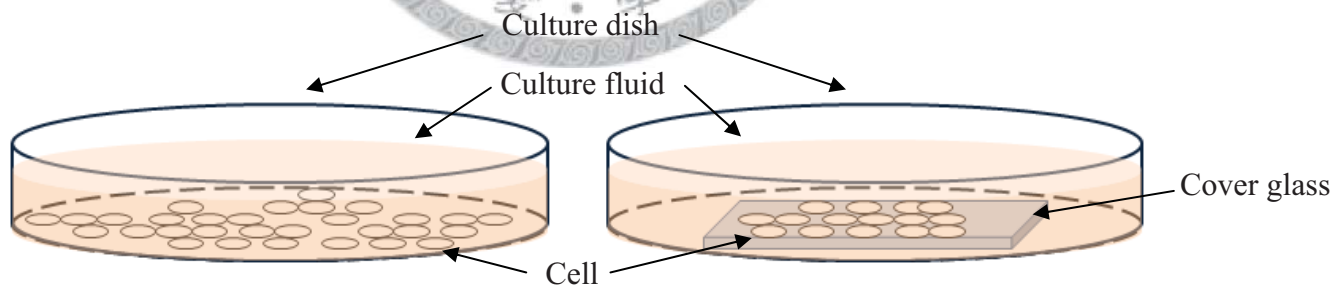


圖 4-16 細胞培養皿示意圖

開始進行實驗前，必須將細胞培養皿從細胞培養室中取出，然而若是直接將培養皿置於系統載物台上進行掃描，則用來維持細胞存活之培養液將導致 OCT 系統嚴重的色散效應使干涉訊號拓寬，而且難以在參考端光路使用色散補償片進行色散補償。除此之外，培

養液也會隨時間快速蒸發，影響影像之判讀。為了解決此問題，對直接培養於培養皿底部的細胞樣本，可以在其上覆蓋一片蓋玻片再將培養液吸至幾乎全乾，只在載玻片與培養皿之間留有一層培養液，並在玻片與培養皿間用塑膠墊片(spacer)加以支撐，如圖 4-17 所示；對於培養於蓋玻片上之細胞樣本，則可將玻片從原本之培養皿撈起並迅速將附有細胞的表面向下置於另一有注入少許培養液的培養皿之上，其他處理流程與培養於培養皿底部的細胞樣本相同，如圖 4-18 所示：

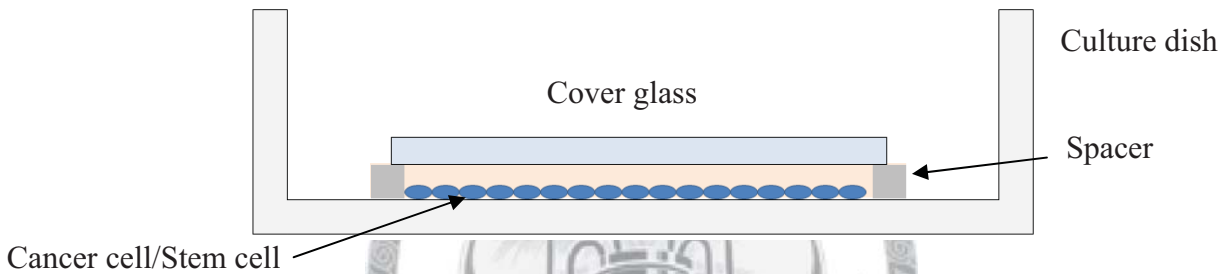


圖 4-17 培養皿細胞樣本架構示意圖

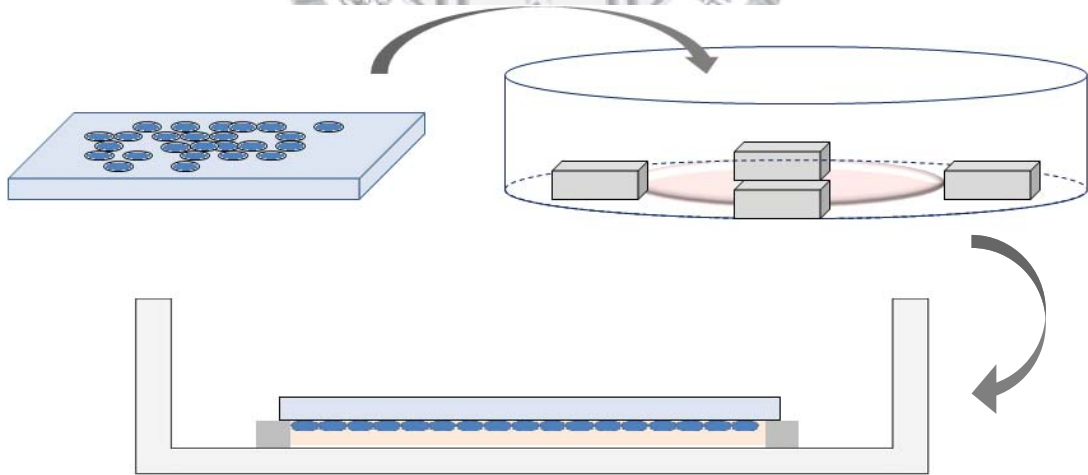


圖 4-18 蓋玻片細胞樣本架構處理示意圖

使用圖 4-17 與圖 4-18 之樣本架構，除了可使培養液與空氣之接觸面積減少，減緩培養液之蒸發速率外，也能輕易地在 OCT 系統的

參考端光路間架設一片蓋玻片進行色散補償，確保 OCT 系統的縱向解析度不會因為色散效應而嚴重下降。

### 4.3.3 實驗結果

經過培養後之癌細胞與幹細胞的相位差顯微鏡(phase contrast microscope)影像如圖所示：

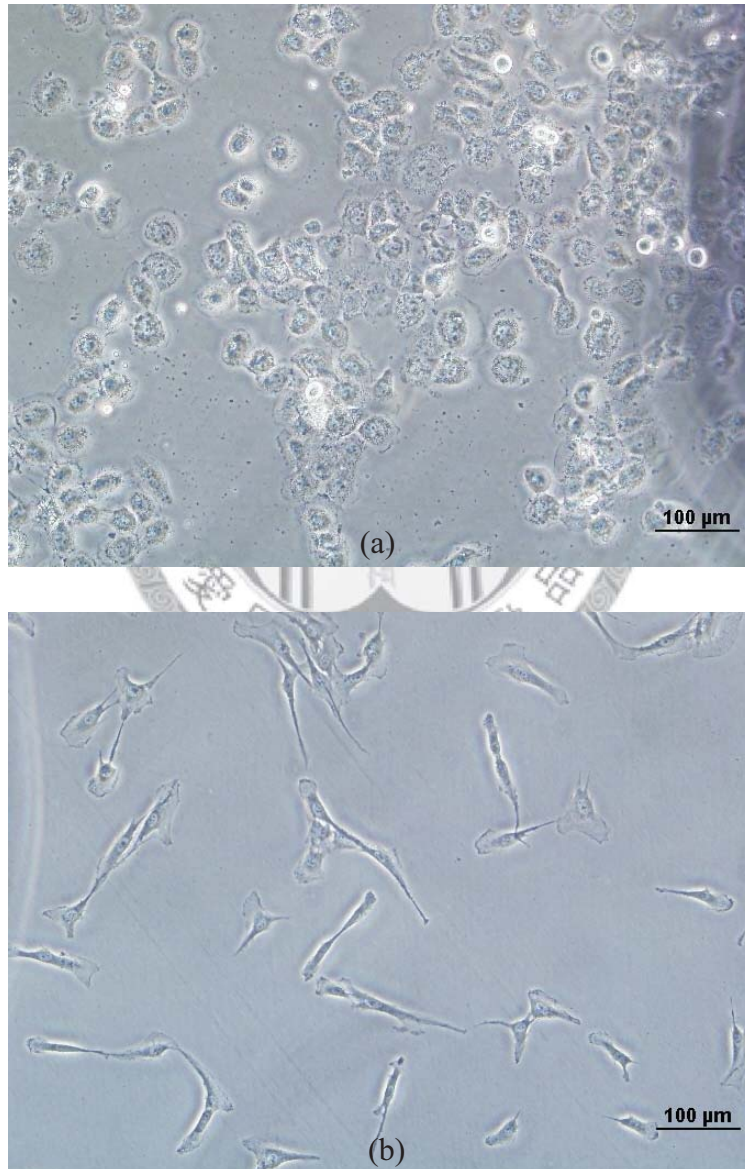


圖 4-19 (a)癌細胞與(b)幹細胞之顯微鏡影像

由圖 4-19 可看出，癌細胞的形狀大致接近圓形，並且直徑分佈

約在 20  $\mu\text{m}$ ~50  $\mu\text{m}$  之間，而幹細胞則大部分為細長條狀並且長度往往超過 100  $\mu\text{m}$ 。圖 4-19 中之細胞並未被培養至全滿的狀態，然而為了能使細胞樣本能在細胞培養箱以外的環境長時間存活以方便進行影像掃描，通常會使細胞不斷生長增殖直到充滿整個培養皿或蓋玻片為止。

首先我們先使用圖 4-18 之架構對癌細胞進行二維掃描。由於我們 OCT 系統之縱向掃描範圍受限於 PZT 振動之振幅，無法對圖 4-18 架構中一整個縱深進行掃描，因此進行實驗時，我們只對有癌細胞訊號之區域進行掃描。掃描結果如圖 4-20 所示：

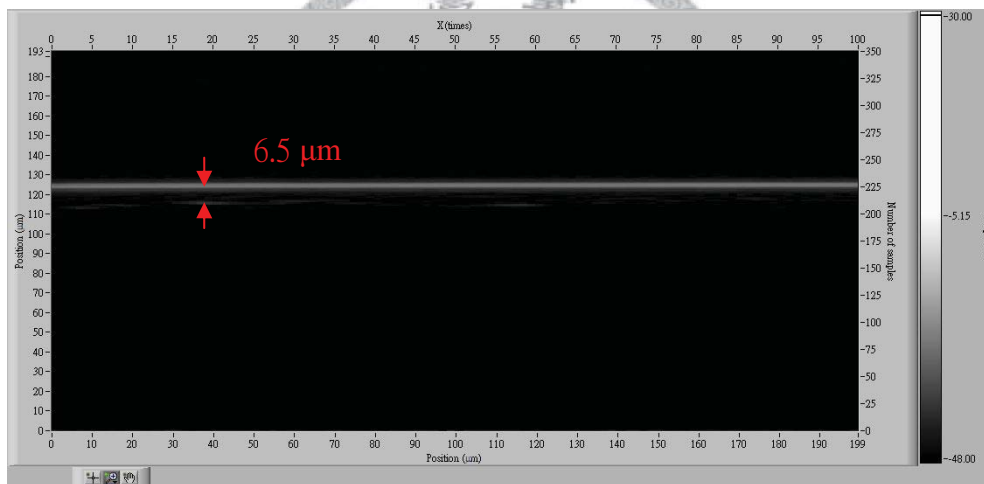


圖 4-20 癌細胞二維掃描影像

圖 4-20 中，最上方的白色直線代表圖 4-18 中蓋玻片下表面之反射訊號，下方較弱且不連續之訊號則是來自癌細胞細胞膜之背向散射(back scattering)，因此兩訊號之間距即代表癌細胞之厚度。我們擷取圖中標示之一維縱向訊號並去掉載波頻率作圖，其結果如下圖所示：

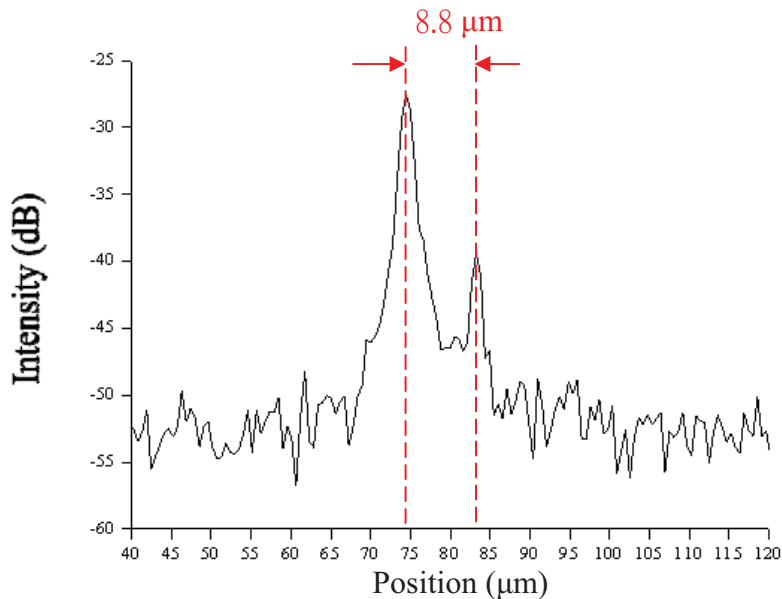


圖 4-21 單層癌細胞掃描訊號

由圖 4-21 中可得知玻片下表面與癌細胞膜之間距為  $8.8 \mu\text{m}$ ，由於細胞質之折射率約為 1.35，因此從圖 4-20 可測得癌細胞之厚度約為  $6.5 \mu\text{m}$ ，而實際上之癌細胞厚度符合，表示我們所架設之 OCT 系統的確有能力檢測出單層癌細胞之厚度。

接著我們對圖 4-18 之架構進行三維掃描，掃描之後的資料經由影像處理軟體重組之後之平面影像如下圖所示：

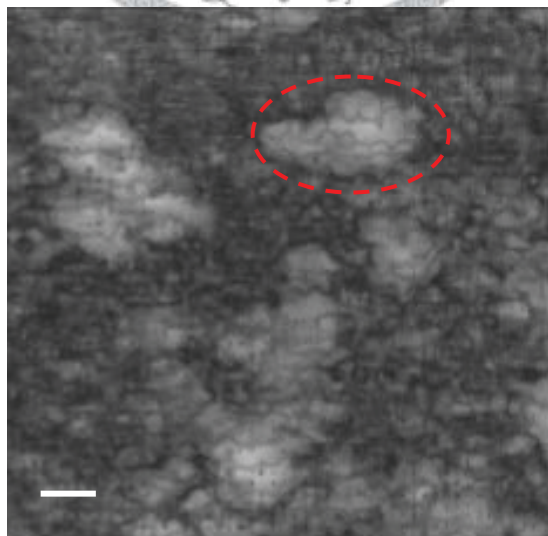


圖 4-22 癌細胞之平面影像。影像範圍  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ ，比例尺長度代表  $10 \mu\text{m}$

由圖 4-22 可約略看出單一癌細胞之輪廓，但與圖 4-19(a)之顯微鏡影像相比較，細胞邊界與周圍背景之對比並沒有十分明顯，代表我們所架設之 OCT 系統的橫向解析度尚不足以清楚地表現出單一細胞之型態。

比較圖 4-19 的(a)與(b)，兩種細胞的型態差異非常大，因此我們也嘗試使用 OCT 系統同時取得兩種細胞之影像，希望能比較兩者影像上的差異。然而在培養細胞時一個培養皿或蓋玻片表面只能培養一種細胞，為了能同時對兩種細胞進行影像掃描，我們進一步設計了如圖 4-23 之樣本架構：

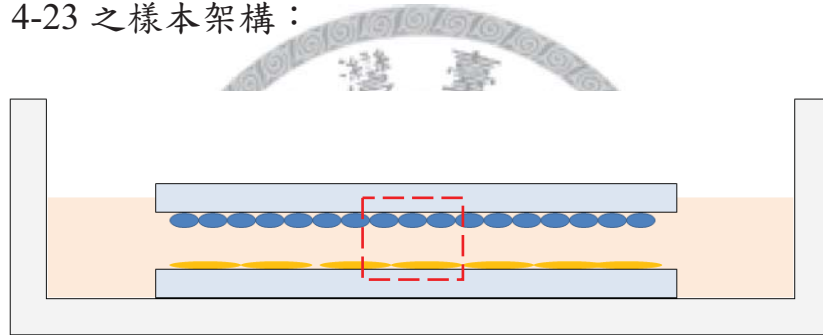


圖 4-23 幹細胞與癌細胞三維結構

圖 4-23 中，我們將兩片分別培養癌細胞與幹細胞之蓋玻片面對面疊合置於培養皿中，圖中紅色方框圈選之區域代表我們選取之掃描範圍。二維掃描之結果如下圖所示：

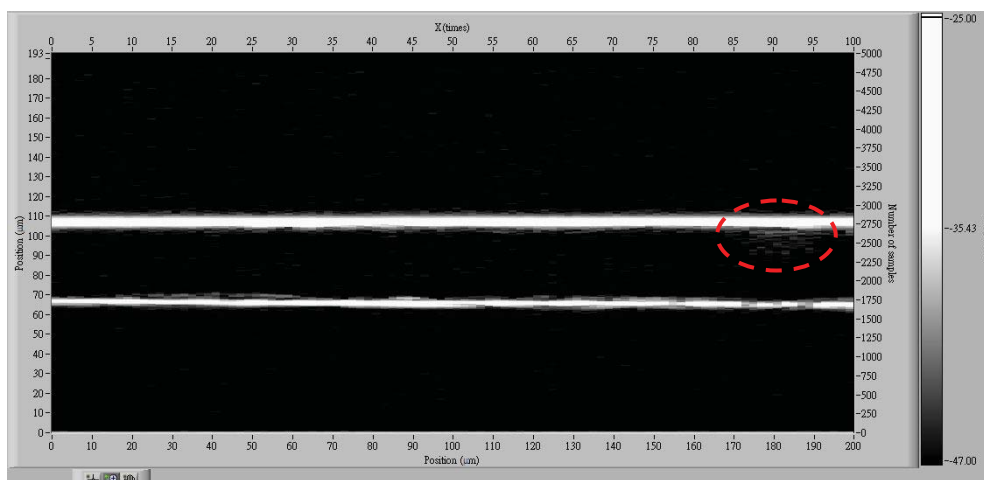


圖 4-24 癌細胞與幹細胞二維掃描影像

圖 4-24 中，兩條白線分別代表上玻片的下表面與下玻片的上表面。假設培養液之折射率與水相同皆為 1.33，則由左側的空間座標可換算得兩片玻片的間距約為 35  $\mu\text{m}$ 。圖 4-24 中以紅色虛線圈選的部分若與周圍癌細胞的散射訊號比較，可明顯看出在縱向上有向下延伸的現象。量測此區域散射訊號在橫向與縱向上的分佈範圍，如圖 4-25 所示，則可看出在橫向與縱向上的實際尺寸分別約為 24  $\mu\text{m}$  與 15  $\mu\text{m}$ 。若以底面直徑 24  $\mu\text{m}$ 、高度 15  $\mu\text{m}$  的圓錐去近似此訊號區塊，則此圓錐之體積約為 2262  $\mu\text{m}^3$ ；而我們若將單顆癌細胞以直徑 27  $\mu\text{m}$ 、高度 4  $\mu\text{m}$  的圓柱體去近似，則兩者之體積約略相同，因此我們認為此區域的散射訊號應為單顆癌細胞之散射訊號。而與圖 4-20 比較，圖 4-20 中癌細胞並沒有如圖 4-24 中向下延伸之現象，兩者實驗架構的差異僅在於下方有無幹細胞的存在，因此我們也認為癌細胞向下趨近之關鍵在於幹細胞的牽引。

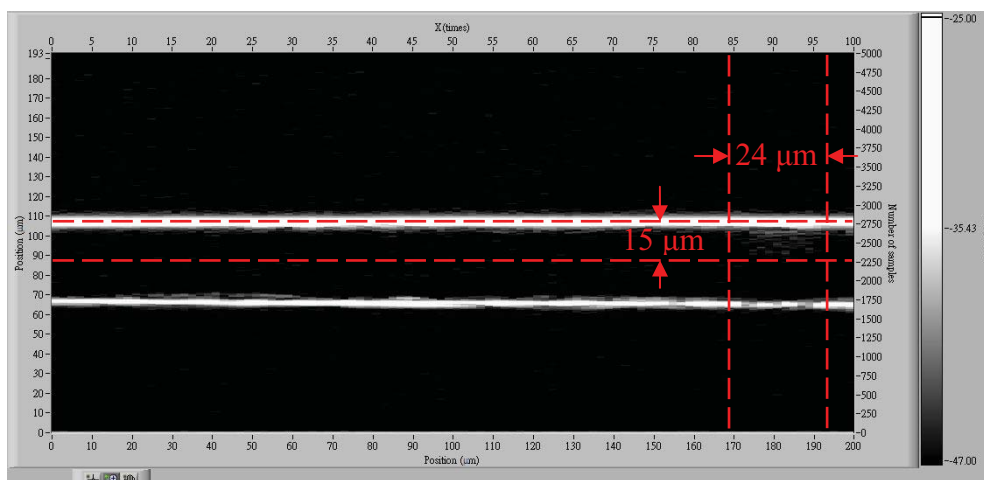


圖 4-25 癌細胞尺寸

最後我們對圖 4-23 之樣本架構進行三維掃描，並使用影像處理軟體將資料加以重建後之三維影像如圖 4-26 與圖 4-27 所示：

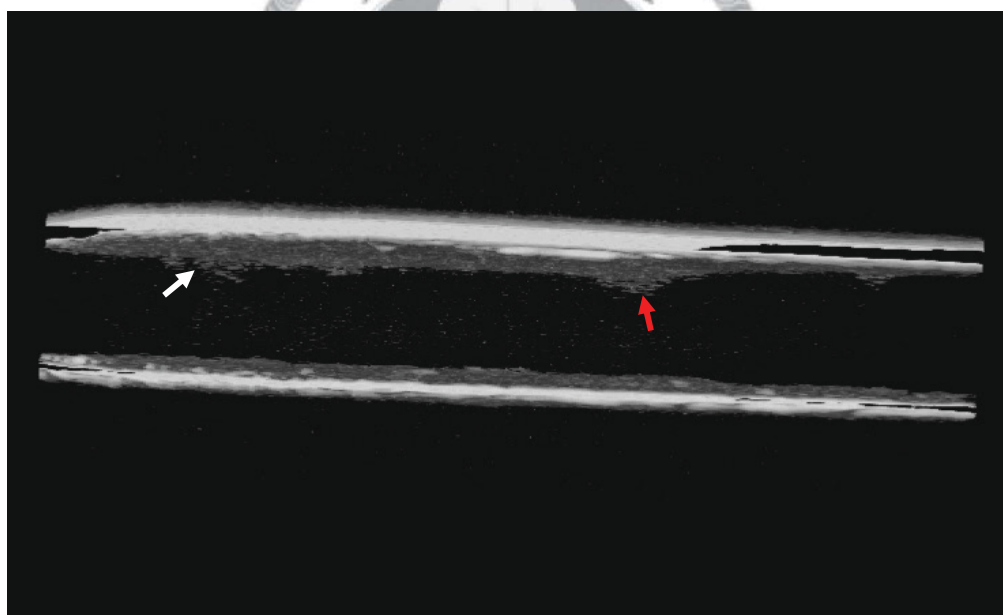


圖 4-26 幹細胞與癌細胞三維結構之 OCT 影像-1



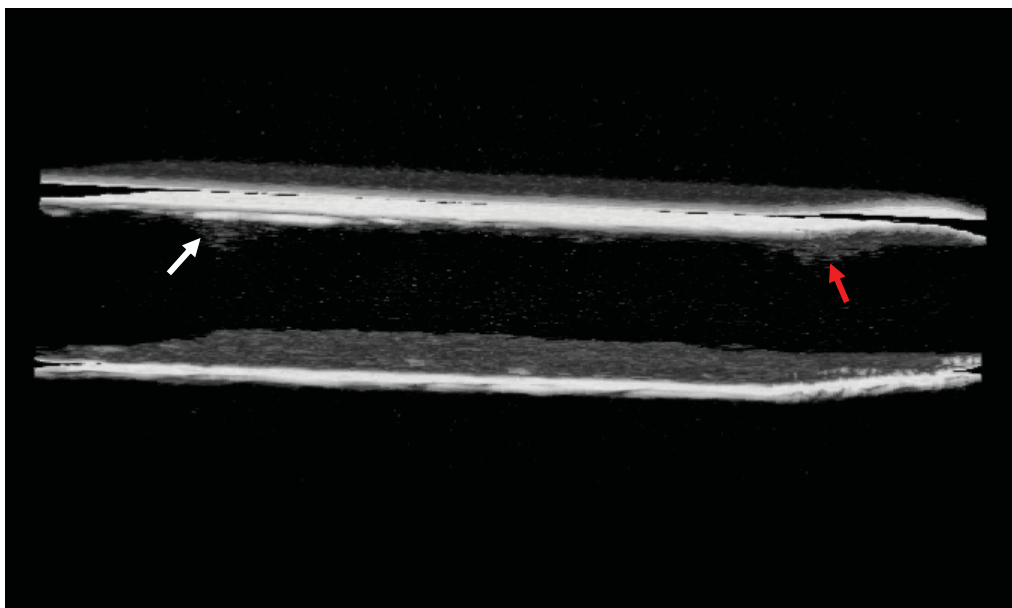


圖 4-27 幹細胞與癌細胞三維結構之 OCT 影像-2

圖 4-26 與圖 4-27 中，橫向上之掃描範圍為  $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ 。圖 4-26 與圖 4-27 為同一三維影像由不同旋轉視角拍攝而得，為了增強散射訊號之影像對比度，我們在進行影像處理時將圖 4-24 與圖 4-25 中玻片表面的過強的反射訊號設為黑色，因此圖 4-26 與圖 4-27 中上下各有一段黑色間隙，而兩張圖中相同顏色的箭頭指向相同區域的散射訊號。透過三維影像重建，單一癌細胞向幹細胞趨近之現象與空間分佈可更為清楚地顯露出來。

## 第五章 結論與未來工作

我們已成功使用  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 晶體光纖所產生的 ASE 與激發  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 晶體光纖之藍光雷射作為系統光源，建構了一套具有光學同調斷層掃描與共焦螢光顯微系統兩種工作模態之三維造影系統，並且使用  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 晶體粉末作為樣本，證明了此系統具有對樣本的同位置提供兩種影像模態的能力。此系統能提供比單一影像系統更為豐富的影像資訊，在生命科學與醫學應用上極具潛力。

我們也以培養皿中之肺癌細胞作為樣本，使用光學同調斷層掃描檢測出單層細胞表面之干涉訊號，由量測得知細胞厚度為  $6.5 \mu\text{m}$ ，與實際細胞厚度十分符合，表示我們的光學同調斷層掃描系統在縱向上確實具有細胞等級的解析能力。我們並以肺癌細胞與人體間葉幹細胞之三維架構作為樣本，觀察到此兩種細胞在空間中互相接近時，癌細胞有明顯趨向幹細胞移動之現象。

基於上述成果，此系統未來之改進與應用方向，我認為有以下幾點：

1. 改善 OCT 之橫向解析度與 CFM 之縱向解析度，使兩系統之立體解析體積尺寸更為接近，以充分展現樣本之三維立體結構。
2. 針對目前癌細胞與幹細胞間互相趨近之現象，設計更精確的樣本模型與架構，希望能定量觀測並探討此現象之成因。
3. 在  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 晶體光纖激發光入射之端面鍍上針對 ASE 波段的高反射率鍍膜，希望能增加輸出端 ASE 光源之功率，進一步提升干涉訊號強度。

4. 此系統現階段由於 ASE 光源之波段與大部分生物螢光訊號之波段互相重疊，因此無法同時使用兩種工作模態擷取影像。未來若是開發出具實用性的 Ti:Sapphire 晶體光纖作為 OCT 系統光源，則光源波段就能避開大部分生物螢光波段，達到同步掃描的目的。



## 參考文獻

- [1] Pawley, J., "Handbook of biological confocal microscopy". Springer Verlag.(2006)
- [2] Huang, D., E. Swanson, C. Lin, J. Schuman, W. Stinson, W. Chang, M. Hee, T. Flotte, K. Gregory, and C. Puliafito, "Optical Coherence Tomography," *Science*. **254**, 1178-1181 (1991)
- [3] Takada, K., I. Yokohama, K. Chida, and J. Noda, "New measurement system for fault location in optical waveguide devices based on an interferometric technique," *Applied optics*. **26**(9), 1603-1606 (1987)
- [4] Youngquist, R., S. Carr, and D. Davies, "Optical coherence-domain reflectometry: a new optical evaluation technique," *Optics letters*. **12**(3), 158-160 (1987)
- [5] Clivaz, X., F. Marquis-Weible, R. Salathe, R. Novak, and H. Gilgen, "High-resolution reflectometry in biological tissues," *Optics letters*. **17**(1), 4-6 (1992)
- [6] Fercher, A., K. Mengedocht, and W. Werner, "Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light," *Optics letters*. **13**(3), 186-188 (1988)
- [7] Schmitt, J., A. Knüttel, and R. Bonner, "Measurement of optical properties of biological tissues by low-coherence reflectometry," *Appl. Opt.* **32**, 6032-6042 (1993)
- [8] Swanson, E., J. Izatt, M. Hee, D. Huang, C. Lin, J. Schuman, C. Puliafito, and J. Fujimoto, "In vivo retinal imaging by optical coherence tomography," *Optics letters*. **18**(21), 1864-1866 (1993)
- [9] Hee, M., J. Izatt, E. Swanson, D. Huang, J. Schuman, C. Lin, C. Puliafito, and J. Fujimoto, "Optical coherence tomography of the

- human retina," Archives of Ophthalmology. **113**(3), 325 (1995)
- [10] Welzel, J., E. Lanckenau, R. Birngruber, and R. Engelhardt, "Optical coherence tomography of the human skin," Journal of the American Academy of Dermatology. **37**(6), 958-963 (1997)
- [11] Pan, Y., T. Xie, C. Du, S. Bastacky, S. Meyers, and M. Zeidel, "Enhancing early bladder cancer detection with fluorescence-guided endoscopic optical coherent tomography," Optics letters. **28**(24), 2485-2487 (2003)
- [12] Yuan, S., Q. Li, J. Jiang, A. Cable, and Y. Chen, "Three-dimensional coregistered optical coherence tomography and line-scanning fluorescence laminar optical tomography," Optics letters. **34**(11), 1615-1617 (2009)
- [13] 蕭志遠, 共焦螢光顯微系統之設計與應用. 2004.
- [14] Goodman, J., "Introduction to Fourier optics". Roberts & Company Publishers.(2005)
- [15] Born, M. and E. Wolf, "Principles of optics".
- [16] Wilson, T. and A. Carlini, "Size of the detector in confocal imaging systems," Optics letters. **12**(4), 227-229 (1987)
- [17] 廖柏睿, 摻鉻鈮鋁石榴石光源應用於光學低同調掃描中解析度與訊雜比之研究. 2008.
- [18] Boulon, G., L. Laversenne, C. Goutaudier, Y. Guyot, and M. Cohen-Adad, "Radiative and non-radiative energy transfers in Yb-doped sesquioxide and garnet laser crystals from a combinatorial approach based on gradient concentration fibers," Journal of Luminescence. **102**, 417-425 (2003)
- [19] Burrus, C. and J. Stone, "Single- crystal fiber optical devices: A Nd: YAG fiber laser," Applied Physics Letters. **26**, 318 (1975)