

國立台灣大學工學院機械工程學研究所



碩士論文

Department of Mechanical Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

可配合機器人培養操作之大範圍幹細胞辨識技術

Large Area Cell Identification for Robotic Stem Cell

Culture

林昱萱

Yu-Hsuan Lin

指導教授：顏家鈺 博士

Advisor: Jia-Yush Yen, Ph.D.

中華民國 110 年 7 月

July 2021

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書



可配合機器人培養操作之大範圍幹細胞辨識技術

Large Area Cell Identification for Robotic Stem Cell Culture

本論文係 林昱萱 君(R08522803)在國立臺灣大學工學院機械工程學研究所完成之碩士學位論文，於民國 110 年 07 月 15 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： 顏景鈺
(指導教授)

陳岳琪 陳佑宗

劉書宏 _____

系主任 林布群 (簽名)


序言

本論文屬「科技部再生醫學科技發展計畫-幹細胞組織工程於氣管再生醫學之應用」中子計畫一之部分成果，該計畫之宗旨為：透過結合各領域解決胸腔醫學中的大範圍氣管損傷難題，其目標為：給予幹細胞刺激使其分化成軟骨組織，並配合人工支氣管架使用，最後再將其移植於人體內，修復臨床上氣管損傷之困擾。

子計畫一之計畫名稱為「幹細胞組織工程」，期望建置「利用機器人模擬培養幹細胞系統」以達到幹細胞培養之自動化工程。進行本論文研究前，已於實驗室架設一座六軸機械手臂，並且也已完成該手臂進行幹細胞培養時所需基本動作之控制程式撰寫，如：利用電磁鐵作為機械手臂之抓取物品方式、培養皿或移液器拿取動作、培養液更換…等一系列步驟，故本研究將搭配前述已建置完成之系統使用，接續進行該自動化系統工程之建置。

文末，特別感謝總計畫主持人陳晉興教授給予本研究之支持與鼓勵，以及子計畫四主持人陳佑宗副教授給予許多幹細胞之專業知識指導及經驗分享，並由其實驗室提供本論文所需幹細胞及相關細胞之培養知識。

摘要



隨著科技的發展，自動化細胞培養系統已逐漸取代傳統的人工細胞養殖方法，利用機器不間斷進行重複動作的特性，提升細胞養殖效率，不但可以降低專業人員因重複動作所造成之職業傷害以及高工時問題，還可使研究人員進行其他機器無法取代之工作。然而，目前市面上自動化細胞養殖系統尚未達到完全的自動化，仍有些許動作需要人工進行輔助判斷。幹細胞又屬一種具有潛能的細胞，經由特殊刺激可使其分化成各種特定組織，可幫助器官組織上之修復。

綜合以上，本論文欲提升幹細胞培養系統之自動化程度，將原需由人工進行輔助判斷之工作利用數位運算方式取代，藉由機器視覺搭配影像處理中特徵處理方式針對幹細胞分化與否進行辨識，並將眾辨識結果縫合成一大範圍之影像，最後搭配機器人將欲移除幹細胞進行移除。

關鍵字：自動化幹細胞培養系統(Automatic stem cell culture system)、機器視覺(Machine vision)、幹細胞辨識(Stem cell identification)、圖像分割(Segmentation)、影像縫合(Image stitching)、全域細胞(Whole well)、路徑規劃(Trajectory planning)

ABSTRACT



Nowadays, automatic cell culture system is more common. It can increase efficiency of cell culture due to extending working time. Moreover, the system can still reduce the occupational injury due to repetitive work for researcher and solve the problem of excessive working hours. However, there are still some works that need to be finished by human in the system. Hence, the system hasn't been fully automatic. Also, stem cell is one kind of cell which can differentiate into various type of cells. Therefore, there are more and more stem cell treatments showing up. It indicates the importance of stem cell in 21st century.

Above all, the thesis plans to improve the automation of automatic stem cell culture system. To construct a fully automatic stem cell culture system, I use image processing to do the identification instead of artificial way. After stem cells are identified, image stitching is used to show the distribution of large area cell. Last but not least, I use a robot with machine vision to remove those cells which have already recognized.

Keywords : Automatic stem cell culture system, Machine vision, Stem cell identification, Segmentation, Image stitching, Whole well, Trajectory planning

目錄



口試委員會審定書	i
序言	ii
摘要	iii
ABSTRACT	iv
目錄	v
圖目錄	viii
表目錄	xi
第一章 緒論	1
1.1 研究動機	1
1.2 文獻回顧	2
1.3 研究目的	3
1.4 論文架構	4
第二章 影像處理	6
2.1 影像基本介紹	6
2.1.1 像素 <i>Pixel</i>	6
2.1.2 三原色光模式 <i>RGB Color Model</i> ^[14]	6
2.1.3 灰階影像 <i>Gray Scale</i>	7
2.2 影像形態學 <i>MATHEMATICAL MORPHOLOGY</i> ^[15]	8
2.2.1 侵蝕 <i>Dilation</i>	8
2.2.2 膨脹 <i>Erosion</i>	11
2.3 圖像二值化 <i>THRESHOLD</i>	14



2.3.1 平均值法.....	14
2.3.2 雙峰法.....	15
2.3.3 大津演算法 Otsu's Method ^[6]	16
2.3.4 最小誤差法 ^[16]	17
2.3.5 自適應閾值法 Adaptive Threshold ^[17]	18
第三章 實驗內容	19
3.1 實驗設備.....	19
3.1.1 實驗設備介紹.....	19
3.1.2 培養箱設計.....	19
3.1.3 培養箱控制.....	20
3.2 實驗一、分化與未分化細胞辨識.....	22
3.2.1 幹細胞培養方式之選擇.....	22
3.2.2 實驗流程.....	22
3.2.3 閾值選擇.....	23
3.2.4 實驗結果.....	25
3.2.5 與人工標記結果比較.....	27
3.2.6 與人工智能結果比較.....	30
3.3 實驗二、全域圖分析.....	35
3.3.1 實驗流程.....	35
3.3.2 照片取得及編碼.....	37
3.3.3 第一次圖片切割.....	38
3.3.4 圖片分析.....	40
3.3.5 圖像近似.....	41
3.3.6 圖像分割 Segmentation ^[18]	41
3.3.7 全域圖縫合.....	42

3.3.8 中間點定位.....	46
3.3.9 路徑規劃 ^[19]	49
3.3.10 實驗結果.....	50
3.4 實驗三、細胞辨識搭配全域圖分析.....	52
3.4.1 實驗流程.....	52
3.4.2 細胞介紹.....	53
3.4.3 細胞辨識.....	54
3.4.4 實驗結果.....	56
3.4.5 與人工智能結果比較.....	60
第四章 結論與未來展望.....	62
4.1 結論.....	62
4.2 未來展望.....	62
參考文獻.....	65



圖目錄



Figure 1 Cytogrations 系統 (左) Compact Select SC 系統 (右)	1
Figure 2.1 RGB 三原色顏色空間	7
Figure 2.2 原圖(上) 灰階圖(下)	7
Figure 2.3 輸入影像(左)與結構元素(右)	9
Figure 2.4 原點疊加圖	9
Figure 2.5 侵蝕運算結果	9
Figure 2.6 輸入影像(左)與結構元素(右)	12
Figure 2.7 原點疊加圖	12
Figure 2.8 膨脹運算結果	12
Figure 2.9 平均值法運算過程	15
Figure 2.10 平均值法結果圖	15
Figure 2.11 大津演算法運算過程	16
Figure 2.12 大津演算法結果圖	17
Figure 3.1 設計之齒輪	20
Figure 3.2 設計之步進馬達支具(左)及與步進馬達組合圖(右)	21
Figure 3.3 步進馬達與支具實際安裝情形	21
Figure 3.4 實驗一之實驗流程圖	23
Figure 3.5 實驗二之實驗流程圖	36
Figure 3.6 照片拍攝順序以及編碼	37
Figure 3.7 影像編碼	37
Figure 3.8 影像組合圖	38
Figure 3.9 影像重疊圖	39

Figure 3.10 英文代碼規則.....	39
Figure 3.11 分割後圖片標籤示意圖.....	39
Figure 3.12 降噪前圖片.....	40
Figure 3.13 降噪後圖片.....	40
Figure 3.14 影像類別圖.....	42
Figure 3.15 影像類別分類圖.....	42
Figure 3.16 縫合對應編號圖.....	46
Figure 3.17 原始全域圖.....	47
Figure 3.18 忽略較小區塊的全域圖.....	47
Figure 3.19 計數規則.....	48
Figure 3.20 中間點標示.....	48
Figure 3.21 中間點運算邏輯圖.....	48
Figure 3.22 中間點尋找結果圖.....	48
Figure 3.23 各點距離的計算順序.....	50
Figure 3.24 單一區塊路徑規劃.....	50
Figure 3.25 真實縫合圖.....	51
Figure 3.26 全域圖-無圖像分割.....	51
Figure 3.27 全域圖-圖像分割(3×3) Figure 3.28 全域圖-圖像分割(5×5).....	51
Figure 3.29 實驗二之實驗路徑規劃圖.....	52
Figure 3.30 實驗三之實驗流程圖.....	53
Figure 3.31 H9 細胞及 HEK293T 細胞於同一培養皿影像.....	54
Figure 3.32 細胞原圖.....	55
Figure 3.33 初步細胞辨識結果.....	55
Figure 3.34 修正後之細胞辨識結果圖.....	56
Figure 3.35 低倍率縫合圖 Figure 3.36 高倍率縫合圖.....	58



Figure 3.37 全域圖-圖像分割(3×3)	59
FIGURE 3.38 全域圖-圖像分割(5×5).....	59
FIGURE 3.39 欲移除幹細胞之路徑圖	59



表目錄



Table 2.1 侵蝕運算表	10
Table 2.2 膨脹運算表	13
Table 3.1 閾值選擇	24
Table 3.2 實驗一結果表	26
Table 3.3 與人工標記結果比較表	29
Table 3.4 與人工智能結果比較表	34
Table 3.5 與人工智能結果比較之顏色比對表	34
Table 3.6 細胞辨識結果表	57
Table 3.7 電腦影像辨識結果與人工智能辨識結果比較表	61

第一章 緒論



1.1 研究動機

幹細胞為一種具有多向分化能力之細胞，若於未分化形態時給予適當的刺激，可能使其分化成所需目標功能之細胞，因此深受醫學領域人員喜愛。然而，幹細胞培養過程繁瑣且重複性高，生長情形屬連續性進程，需要許多細胞培養研究人員不分日夜的照顧，故需耗費大量人力資源。

細胞培養過程中有許多步驟屬於高重複性動作，例如：培養皿的拿取、培養液的更換……等，此時，若利用機器取代人工操作這些步驟，不但可以改善細胞培養人員因高工時加上不斷進行重複連續性動作所產生的疲乏及錯誤，也可利用機器24小時運轉提升效率，因此目前市面上有許多公司已開發出自動化細胞培養系統，例如：由美國 Brandel Inc.開發之 Cytogrator 系統^[1]，該系統可利用一隻機器手臂進行眾多細胞培養時所需之動作—培養皿提取、種植細胞於培養皿中、培養液的更換……等；由英國公司 SelectScience 開發之 Compact Select SC 系統^[2]，也是利用一隻機械手臂進行所有細胞培養時所需之動作，而此系統之特色為可針對幹細胞進行特殊處理—繼代(sub culturing)、細胞數量計數……等。

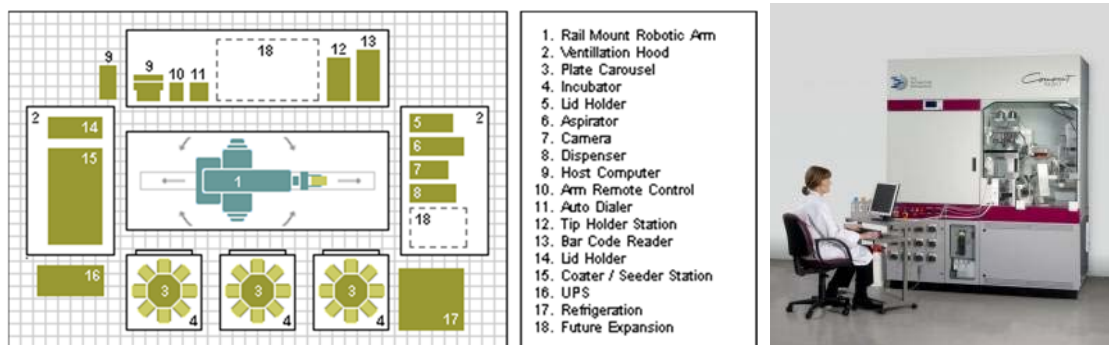



Figure 1 Cytogrator 系統 (左) Compact Select SC 系統 (右)



儘管目前已開發出多種不同的自動化細胞培養設備，但使用這些培養設備時尚存在些許特定動作須由人工進行操作，例如：細胞辨識之處理以及藉由辨識結果判斷後續步驟，故並非達到完全的自動化。鑒於以上情形，為使幹細胞培養設備達到完整的自動化，讓相關研究人員可以進行其他非機械可取代之動作及研究，遂成本論文之研究動機。

1.2 文獻回顧

西元 1760 年代工業革命發生，人類的生產模式逐漸機械化，開始利用大量的機器取代動物以及人力，大規模的機械工廠也隨之出現，隨著時間演進，各類型的需求逐漸浮現，於是機械發明以及對應之應用也開始於日常生活中出現。21 世紀，電腦的出現帶給了人類生活新的視野，其所具備的運算能力隨著處理器不斷的強化而增強，可進行的動作也不僅侷限於單純的計算，因此科學家開始針對影像進行分析與研究，影像處理學門也於此時出現。該學門主要分為兩大處理基礎：模板基礎(Template-based)^[3]以及特徵基礎(Feature-based)^[4]。模板基礎是指進行影像處理時，利用原始影像中的光線變化、灰度值……等影像基本因子進行分析；而特徵基礎則是針對原始圖像中特定目標進行分析，藉由對該目標特徵值提取，如：輪廓、形狀……等特質而進行影像處理。隨著影像處理技術逐漸成熟，應用範圍也逐漸廣泛。西元 2002 年 Wei He 與 Joseph Wilder 將影像處理技術應用於醫學生物領域中，他們利用對白血球形狀的提取與分析，進一步檢測病患是否罹患白血病，Fabio Scotti 也接續前者研究，利用影像處理中圖像分割方式精準地計算出影像中白血球數目^{[5][6]}，至今，影像處理技術已廣泛使用於醫學生物領域中。

1986 年 Berthold K.P.Horn 嘗試將影像處理與機械進行結合，並利用攝影機取得的影像作為回饋，使機械與回饋之影像進行搭配，也是從此時「機器視覺」(Robot vision)一詞開始出現。^[7] 2017 年 Zhijie Nan 與 Qingsong Xu 使用了機械手臂搭

配機械視覺，利用影像處理方式偵測出細胞分佈位置，並利用機器手臂的路徑規劃完成細胞之顯微注射^[8]。




幹細胞是一種具有多向分化能力的細胞，可分化成特定的組織以進行組織修復等非傳統治療，解決醫學上許多難題，因此近年來幹細胞的需求量逐漸上升，也催化了自動化幹細胞培養系統的發展速度。^{[9][10]}幹細胞的培養過程中，除了一般培養皿提取以及更換培養液動作外，尚需針對幹細胞生長情形進行即時的偵測並判斷是否需要進行幹細胞移除動作，綜合以上，一個自動化幹細胞培養系統除了機械等硬體上的使用，也需要軟體上辨識與判斷系統的配合。Ulrich Marx 等人於西元 2013 年提出可以藉由幹細胞的形態學(morphology)作為辨識幹細胞的依據^[11]，而 Risako Nagasaka 研究團隊也指出：幹細胞的生長型態大部分會有明顯趨勢，故確實可利用幹細胞之型態學作為辨識依據^[12]。

本研究欲創建一自動化幹細胞培養系統，將採取機械手臂搭配機器視覺的方式作為該系統之模型，並搭配影像處理的方式針對幹細胞的形態學進行辨識，然而，要如何有效地將影像處理結果與機器手臂進行連結，創建一完全自動化幹細胞培養系統，則為本研究之探討內容。

1.3 研究目的

現階段市面上已開發出取多的自動化細胞培養設備^[13]，但尚無任何設備達到完全的自動化，仍須利用人工進行特定步驟，例如：幹細胞分化與否之判斷。為使此部分達到自動化，欲使用機器視覺取代人類眼睛，並利用影像處理模擬人類頭腦針對幹細胞進行判斷。

此論文將搭配本實驗室已架設之「利用機器人模擬培養幹細胞系統」使用，該系統包含一隻六軸機械手臂及其針對幹細胞培養基礎動作之控制程式撰寫，因此



本實驗將設計一系列之影像處理步驟以達成「幹細胞分化與否之辨別」，最後再利用前述辨別結果將欲移除之幹細胞使用機械手臂抓取移液器從培養皿中去除。此外，為使該系統可以達到更佳的表现，也針對已架設完成之系統進行硬體上的些微改善。

1.4 論文架構

本論文共分為四個章節。由第一章的緒論作為前言，說明本論文之研究動機、目的，以及整體論文之架構規劃。第二章屬於相關理論之介紹，主要說明與本論文中影像處理之相關基礎理論及方法。第三章則為實驗內容之方法設計及結果分析，將針對實際操作情形進行解釋及討論。最後，第四章則作為本論文之結尾，針對前述所有內容進行統整並探討本系統未來發展方向。

第一章：

此章為緒論，作為本論文之開端，首先，將闡述研究動機，並藉由文獻回顧及探討進一步訂定研究目的，最後再依照研究目的規劃完整的研究方法及實驗流程。

第二章：

此章將介紹影像處理方法之相關基礎理論，理解其原理後，於後續實驗進行時便可選擇最合適之方法，提升實驗效率。

第三章：

此章將根據本論文之研究目的設計並進行三項實驗，藉由三項實驗依序進行，逐步針對欲分析之影像進行處理，以達成目標。

實驗一為針對幹細胞之影像進行細胞辨識動作，此實驗之設計目的為藉由影像處理方式辨識未分化幹細胞以及已分化幹細胞，了解培養皿中各種類的幹細胞分佈，以利後續將已分化幹細胞移除時使用。



實驗二為將多張影像經由分析再縫合成全域圖之實驗，重點為全域圖縫合時之步驟設計，由於輸入影像皆呈現放大數倍後之細胞，實際上利用移液器將細胞移除時無法達到如此精密之動作，故需將多張影像進行縫合處理成大範圍之影像，輸出一張可搭配移液器使用之全域圖。

實驗三為將實驗一及實驗二聯合應用於實際情況之實驗，並於全域圖輸出後再加入移液器的路徑規劃，完整地模擬「機器人培養操作之大範圍幹細胞辨識技術系統」。

第四章：

此章節將總結本論文之實驗結果，進行整體研究成效的總分析，並根據其結果討論未來改進方向以及展望。

第二章 影像處理



2.1 影像基本介紹

2.1.1 像素 Pixel

像素 (Pixel) 為影像顯示的基本單位，可將每一個像素視為影像顯示的單位方塊，而此單位方塊只能顯示一個顏色。每一張照片都是由多個像素所組成，當單位面積內的像素越多，代表一張照片被切成的單位方塊越多，即可以用更小的單位方塊去描寫每一個邊界以及特徵，所顯示的照片就會越逼近真實的物體。通常像素的表示方法為：(橫向的像素數目) × (縱向的像素數目) 或直接使用像素總數，例如：本實驗中所使用的照片像素為 5184×3456 或 1791.5904 萬像素 (5481×3456=17915904)。

2.1.2 三原色光模式 RGB Color Model^[14]

三原色光模式是採用「加法混色法」，描述利用三種原色光：紅光 (Red)、綠光 (Green)、藍光 (Blue) 不同的比例相疊加而產生顏色，通常於電子系統中應用。目前三種原色光會使用 8 位元所表達，也就是每一種原色光會依照 2^8 個值表達，所以會有整數 0 至 255 表示，而通常會依照紅色、綠色以及藍色的順序(R,G,B) 加以描述。常見的顏色表示有：紅色 (255,0,0)、藍色 (0,0,255)、綠色 (0,255,0)、黃色 (255,255,0)，而當三者的數值為最大時 (255,255,255) 會呈現白色；反之，當三者的數值為最小時 (0,0,0)，則會呈現黑色。

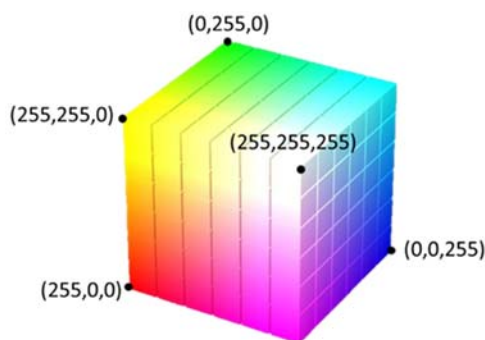


Figure 2. 1 RGB 三原色顏色空間

2. 1. 3 灰階影像 Gray Scale

灰階影像是由最暗的黑色至最亮的白色所組成的影像，通常每個像素會採取 8 的位元 (8 bits) 所表達，因此會有 256 (2^8) 個分階，並由 0 至 255 所表達。此灰階影像因有 256 種分階，因此會比僅由黑白兩色所組成的黑白照片更清楚且保留更多的特徵點；此外，因灰階影像只有一個通道，對比三原色光模式的照片有三個通道，可以降低許多複雜的運算，簡化計算過程，但又可保留部分特徵點。



Figure 2. 2 原圖(上) 灰階圖(下)



2.2 影像形態學 Mathematical Morphology ^[15]

侵蝕 (Erosion) 以及膨脹 (Dilation) 是影像形態學常見的處理方法，可以用特殊的運算方法，於保留影像中的特徵值為前提條件下，達到去除影像中雜訊的目的。通常會搭配圖像二值化所運用。

2.2.1 侵蝕 Dilation

侵蝕的運算定義為

$$A \ominus B = \{z \mid (\hat{B})_z \subseteq A\}$$

其中 A 為目標對象；B 為結構元素 (Structuring element)

當目標像素 A 為已經過二值化處理後的影像，因此 A 的灰度值只含 0 或 255，而結構元素 B 通常為含有中心點的單位圓形或是單位正方形。進行侵蝕運算時，我們會使用集合的原理，針對輸入影像的每一像素原點 A 與結構元素 B 的原點相疊圖。此時，若結構元素 B 內所含的灰度值皆相同，則此像素點 A 維持原色；反之，若結構元素 B 內所含的灰度值不同 (同時含有 0 以及 255)，則重新將此像素點 A 設為背景色。故經由上述運算，經過侵蝕後的影像會有收縮變小的現象。

以下舉一例說明：

假設輸入影像，如 Figure 2.3，結構元素為圓形，如 Figure 2.3。將輸入影像以及結構元素的原點進行疊圖後，如 Figure 2.4，即可開始進行運算。侵蝕運算遵循上述原理，表格中以右下角的像素 (黃色星星的那格像素作為目標像素 A)，如 Table 2.1。最後經由一系列的侵蝕運算後，輸出結果呈現如 Figure 2.5，其中灰色部分為經由侵蝕運算後由黑色區塊 (灰度值 0) 變為白色區塊 (灰度值 255) 的部分。

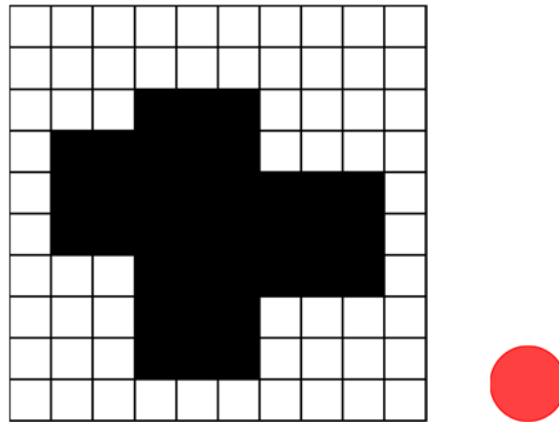


Figure 2.3 輸入影像(左)與結構元素(右)

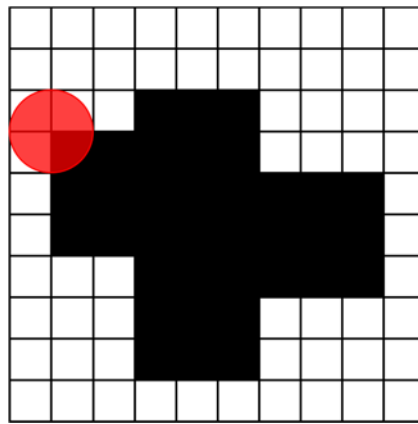


Figure 2.4 原點疊加圖

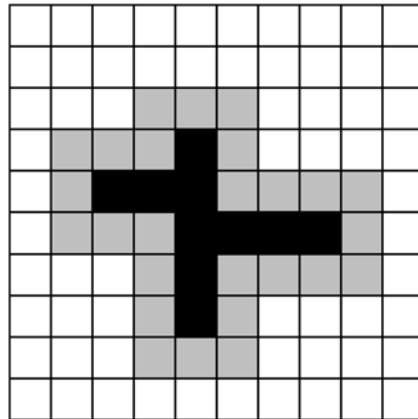


Figure 2.5 侵蝕運算結果



Table 2.1 侵蝕運算表

原圖	侵蝕運算結果圖	說明
		<p>從原圖中可以發現，結構元素 B 內所含的皆為黑色（灰度值 0）的像素，故目標像素 A 的輸出值為黑色（灰度值 0）</p>
		<p>從原圖中可以發現，結構元素 B 內所含 1 格黑色（灰度值 0）以及 3 格白色（灰度值 255），並非所有值皆為黑色（灰度值 0），故目標像素 A 的輸出值為白色（灰度值 255）</p>
		<p>從原圖中可以發現，結構元素 B 內所含 2 格黑色（灰度值 0）以及 2 格白色（灰度值 255），並非所有值皆為黑色（灰度值 0），故目標像素 A 的輸出值為白色（灰度值 255）</p>
		<p>從原圖中可以發現，結構元素 B 內所含皆為白色（灰度值 255），並非所有值皆為黑色（灰度值 0），故目標像素 A 的輸出值為白色（灰度值 255）</p>
		<p>從原圖中可以發現，結構元素 B 內所含 2 格黑色（灰度值 0）以及 2 格白色（灰度值 255），並非所有值皆為黑色（灰度值 0），故目標像素 A 的輸出值為白色（灰度值 255）</p>
		<p>從原圖中可以發現，結構元素 B 內所含 3 格黑色（灰度值 0）以及 1 格白色（灰度值 255），並非所有值皆為黑色（灰度值 0），故目標像素 A 的輸出值為白色（灰度值 255）</p>



2.2.2. 膨脹 Erosion

膨脹的運算定義為

$$A \oplus B = \{z \mid (\hat{B})_z \cap A \neq \emptyset\}$$

其中 A 為目標對象；B 為結構元素 (Structuring element)

當目標像素 A 為已經過二值化處理後的影像，因此 A 的灰度值只含 0 或 255，而結構元素 B 通常為含有中心點的單位圓形或是單位正方形。進行膨脹運算時，我們會使用集合的原理，針對輸入影像的每一像素原點 A 與結構元素 B 的原點相疊圖。此時，若結構元素 B 內所含的灰度值只要有任一黑色（灰度值 0）出現，則此像素點 A 會輸出黑色；反之，若結構元素 B 內所含的灰度值皆為白色（灰度值 255），則重新將此像素點 A 設為背景色（白色）。故經由上述運算，經過侵蝕後的影像會有膨脹擴大的現象。

以下舉一例說明：

假設輸入影像，如 Figure 2.6，結構元素為圓形，如 Figure 2.6。將輸入影像以及結構元素的原點進行疊圖後，如 Figure 2.7，即可開始進行運算。侵蝕運算遵循上述原理，表格中以右下角的像素（黃色星星的那格像素作為目標像素 A），如 Table 2.2。最後經由一系列的侵蝕運算後，輸出結果呈現如 Figure 2.8，其中灰色部分為經由膨脹運算後由白色區塊（灰度值 255）變為黑色區塊（灰度值 0）的部分。

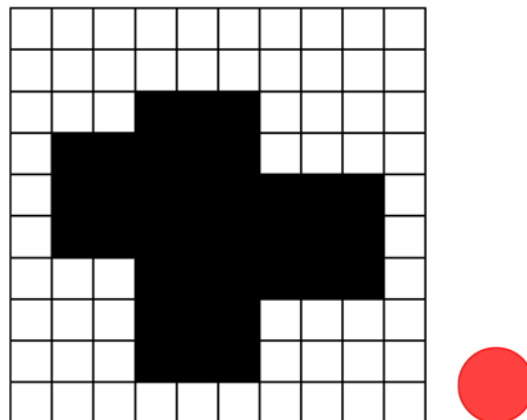


Figure 2.6 輸入影像(左)與結構元素(右)

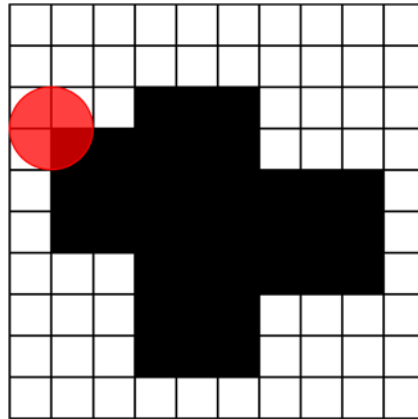


Figure 2.7 原點疊加圖

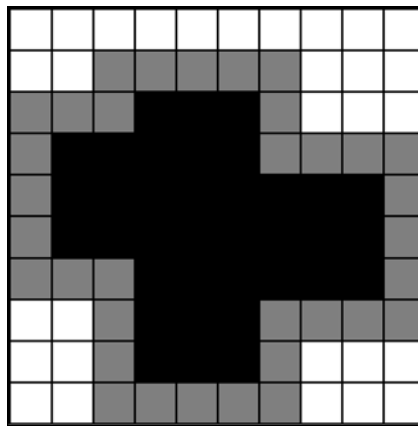

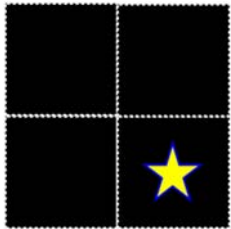
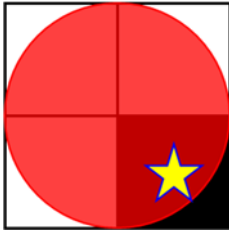
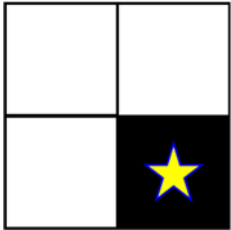
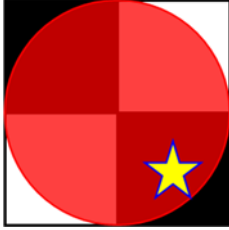
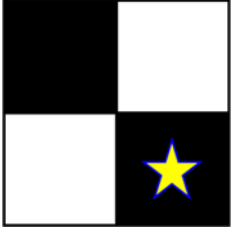
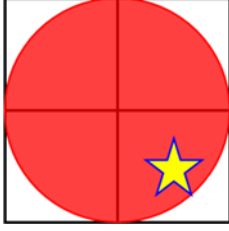
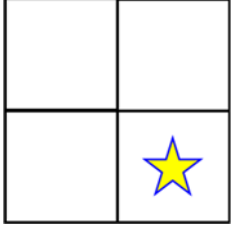

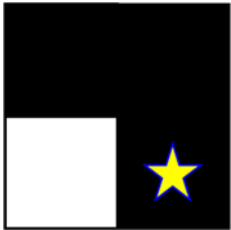

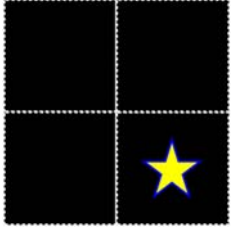


Figure 2.8 膨脹運算結果



Table 2.2 膨脹運算表

原圖	膨脹運算結果圖	說明
		<p>從原圖中可以發現，結構元素 B 內所含的皆為黑色（灰度值 0）的像素，滿足任一像素為黑色（灰度值 0），故目標像素 A 的輸出值為黑色（灰度值 0）</p>
		<p>從原圖中可以發現，結構元素 B 內所含 1 格黑色（灰度值 0）以及 3 格白色（灰度值 255），滿足任一像素為黑色（灰度值 0），故目標像素 A 的輸出值為黑色（灰度值 0）</p>
		<p>從原圖中可以發現，結構元素 B 內所含 2 格黑色（灰度值 0）以及 2 格白色（灰度值 255），滿足任一像素為黑色（灰度值 0），故目標像素 A 的輸出值為黑色（灰度值 0）</p>
		<p>從原圖中可以發現，結構元素 B 內所含皆為白色（灰度值 255），並不滿足任一像素為黑色（灰度值 0），故目標像素 A 的輸出值為白色（灰度值 255）</p>
		<p>從原圖中可以發現，結構元素 B 內所含 2 格黑色（灰度值 0）以及 2 格白色（灰度值 255），滿足任一像素為黑色（灰度值 0），故目標像素 A 的輸出值為黑色（灰度值 0）</p>
		<p>從原圖中可以發現，結構元素 B 內所含 3 格黑色（灰度值 0）以及 1 格白色（灰度值 255），滿足任一像素為黑色（灰度值 0），故目標像素 A 的輸出值為黑色（灰度值 0）</p>



2.3 圖像二值化 Threshold

二值化又稱為灰度分割，是一種影像處理的方式，主要功能為將一張普通影像的灰度劃分成只有兩種灰度，分別為亮點（灰度值為 255）及暗點（灰度值為 0），最終得到一個二元的輸出影像。其運作方式為設定一個閾值（thresholding value），當影像中的灰度值大於此一閾值，則令該點為亮點；反之，當影像中的灰度值低於此一閾值，則令該點為暗點，如此一來即可將一含有 256 個亮度等級（灰度值 0-255）的灰度影像圖輸出成一張只有兩個亮度等級（灰度值 0 以及灰度值 255）的二元圖。此外，若閾值設定得適當，我們便可以利用此一影像處理的方式進行條紋或邊界的辨認，使經過二值化後的圖像仍可保有整體或局部特徵值的效果。

由上述可知，圖像二值化處理的重點因素為閾值的設定，實際上閾值選取的方法有很多種，以下將說明較常見的五種方法。

2.3.1 平均值法

直接設定灰度平均值（灰度值 127）為閾值，以 Figure 2.9 為例。此方法為最基礎的方法，但因為其視每一畫素為等權，故可能導致部分物件的特徵值丟失，而無法反映真實的影像資訊。

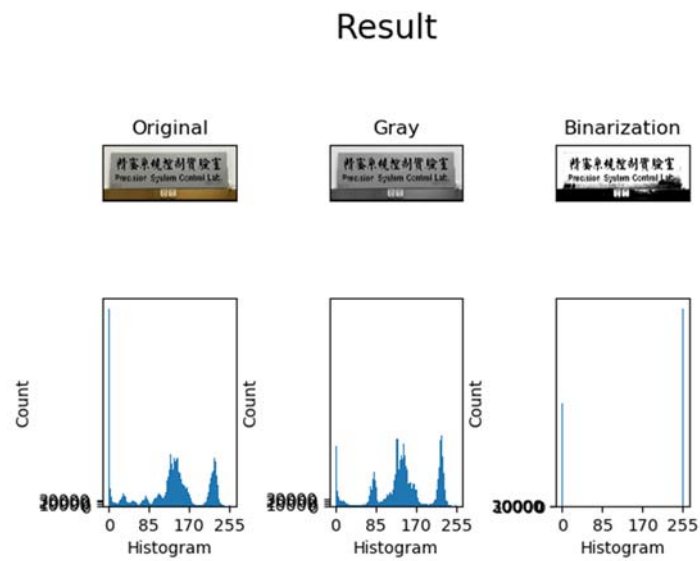


Figure 2.9 平均值法運算過程



Figure 2.10 平均值法結果圖

2.3.2 雙峰法

若原始圖像的灰度值含有雙峰的特性，也就是說此一原始圖像有明顯的兩個群集的灰度分佈，則我們即可利用此一灰度分佈圖找出雙峰間的谷點（臨界值），而此谷點便是閾值。



2.3.3 大津演算法 Otsu's Method ^[6]

大津演算法是由一位日本數學家大津展之 Otsu Nobuyuki 所提出，其將影像假設為兩類，也就是圖像中僅分為前景以及背景，並計算此二類中的灰度值變異數，再經由窮舉法找出一個權重值 (Weight) 可以使兩類中灰度值變異數之加權和最大，此時即可利用該權重值找出所對應的閾值。由於變異數加權和的值最大，代表經由此假定閾值所分類的前景以及後景會有最大的差別，因此可以準確地區分前後景，而達到圖像二值化之目的。

此演算法實際演算方法如下：

首先，任意假設一個閾值 t ，並利用此閾值將圖像分為兩個類別，分別計算此二類別中灰度值的標準差 $\sigma_1(t)$ 及 $\sigma_2(t)$ ，再計算此分法所對應的權重值 $\omega_1(t)$ 及 $\omega_2(t)$ ，其中權重值 ω_1 和 ω_2 為被此閾值分開成此二類別的對應機率。接著，計算變異數加權和 $g(t) = \omega_1(t)\sigma_1^2(t) + \omega_2(t)\sigma_2^2(t)$ 。最後，利用窮舉法找出 $g(t)$ 的最大值，而其所對應的 t 值即為最佳閾值。經由大津演算法進行二值化處理的過程如 Figure 2.11。

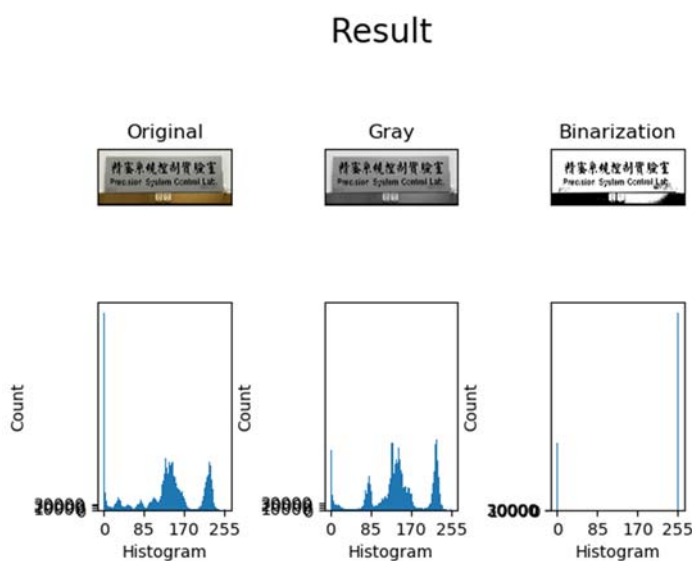


Figure 2.11 大津演算法運算過程



Figure 2. 12 大津演算法結果圖

2. 3. 4 最小誤差法 [16]

J. Kittler 於 1986 年發表 Minimum Error Thresholding，論文中以 Bayes 的 minimum error threshold 為原型，經由數學運算將原本複雜的計算式簡化成較易運算且單未知數的方程式 $J(T)$ ，最後再利用窮舉法繪出平滑的方程式 $J(T)$ 曲線，並經由此曲線找出最小值，此時所對應的 T 值即是最佳的閾值。

$$J(T) = 1 + 2[P_1(T) \log \sigma_1(T) + P_2(T) \log \sigma_2(T)] \\ - 2[P_1(T) \log P_1(T) + P_2(T) \log P_2(T)]$$

其中

$$P_i(T) = \sum_{g=a}^b h(g) \\ \mu_i(T) = \left[\sum_{g=a}^b g \cdot h(g) \right] / P_i(T) \\ \sigma_i^2(T) = \left[\sum_{g=a}^b h(g) \cdot \{g - \mu_i(T)\}^2 \right] / P_i(T)$$

上述式中， $h(g)$ 為每一畫素的灰度值

$$a = \begin{cases} 0, & i = 1 \\ T + 1, & i = 2 \end{cases}, \quad b = \begin{cases} T, & i = 1 \\ n + 1, & i = 2 \end{cases}$$



2.3.5 自適應閾值法 Adaptive Threshold ^[17]

2.3.1 項至 2.3.4 項所介紹之尋找閾值的方法皆是針對整張完整影像進行單一閾值的定義，此時閾值的適當與否會直接影響二值化之結果，有時甚至會因為閾值選擇有誤，使得影像經二值化後失去其原有之特徵值。

本項說明之閾值選擇法則是針對影像局部進行閾值的選擇，可於特定情況中修正影像經二值化後遺失特徵點的缺陷。

自適應閾值法會先將影像切割成若干區塊加以編號，並單獨針對這些微小區塊進行閾值運算，最常使用之運算法為：均值法以及高斯加權平均法。均值法是將此微小區塊中所有像素之灰度平均值作為閾值；高斯加權平均法則是利用高斯分佈尋找微小區塊中各像素灰度值之均值定義閾值。定義各區塊之閾值後，即可針對該閾值所對應之區塊進行二值化處理。

當影像中發生亮度分布不均時，例如：某一區塊呈現特別亮（灰度值較高），這些局部偏高的灰度值會影響 2.3.1 至 2.3.4 項中閾值運算，導致最終定義之閾值偏高，若經此偏高之閾值進行二值化處理後，可能造成因偏高的閾值而將圖像之特徵值濾掉，產生經二值化後圖像遺失的後果。由於自適應閾值法為針對影像中「局部」面積進行閾值運算，換言之，可單獨處理較亮區塊或較暗區塊之閾值定義，改善亮度分布不均對閾值運算之影響，最終達到避免因閾值選擇錯誤而產生特徵值遺失之情形。

第三章 實驗內容



幹細胞之細胞大小維度屬於微米等級，必須藉顯微鏡觀察及辨別細胞之型態，因此數位相機經由目鏡及物鏡放大效果後取得的影像實際上為局部且微小之面積，當然這些局部微小之區域是無法直接透過肉眼觀察。為達成本研究之目的—「辨別分化之幹細胞並移除」，必須滿足以下兩條件，一為「辨別幹細胞分化與否」；二為「移除分化之幹細胞」，故分別設計進行以下三項不同的實驗。

3.1 實驗設備

3.1.1 實驗設備介紹

本實驗中，使用的顯微鏡款式為 Leica DMIL Type 090-135.002，所搭配的數位相機為 Canon EOS 550D，其輸出的照片為 5184 像素×3456 像素。機械手臂則是使用 JR6G-08N 之六軸機械手臂，並以寶元數控 R8800 控制器操控。

3.1.2 培養箱設計

幹細胞培養時，為了使細胞可以於生物體外進行正常分化，必須將培養箱中的環境模擬成生物體內的環境，因此往往需要於培養箱中調控溫度、濕度、氣體濃度（二氧化碳或氧氣濃度），甚至是酸鹼值的高低，故培養箱通常為一密閉環境，為避免培養箱中環境遭外界環境汙染，於拿取培養皿之動作時盡量越快越好。

由於機械手臂之動作範圍及體積相當大，因此一般市售之培養箱較不適合，故於設計培養箱時，為配合機械手臂之動作，使用橫拉式作為培養箱門開關的方式。選擇此種方式之原因為：相較於上開式，拂塵的情況較不明顯；而當門開關時所使用的面積也相較於掀翻開式的門少，故當門開關時，機械手臂不需要為了避免被門撞到而進行回退動作。



本設計中，利用齒輪以及齒條作為動力傳遞桿件，將馬達的角度輸出轉變成位移輸出量。此外，也可以利用適當的齒輪比之設計，將馬達傳輸至齒條上的扭力提高，可以提高輸出效率。

齒輪模數比設計方法如下：首先，齒輪與齒輪必須達到密合，方可達到滾動的條件，因此兩個齒輪的法線節距需相同，此為必要之設計條件。當固定齒輪之直徑以及齒數時，即可經計算出齒輪節距。為符合必要條件（兩相密合之齒輪法線節距需相等），可訂定出齒條的法線節距，再經由節圓直徑以及齒數的計算而得出模數比。



Figure 3.1 設計之齒輪

3.1.3 培養箱控制

開關培養箱門的動力來源為步進馬達，之所以選其作為動力來源之原因為：其可控制輸出之角度（最小精度為 1.8 度），且具有鎖住（Break）之功能，能避免馬達於靜止時發生反轉的情況。為搭配步進馬達的使用，本設計使用馬達控制板 A4988 及 Arduino MEGA 2560 作為控制馬達的介面。首先，將控制程式寫入 Arduino MEGA 2560，再利用其控制板上的腳位作為 pwm 輸出，藉以控制馬達之轉動角度以及方向。

培養箱開關門控制方式之設計想法為：利用 Arduino MEGA 2560 作為時間計算器，自開門時間起算，30 秒後門會自動關閉。因此程式撰寫概念為：當 Arduino MEGA 2560 收到由外部傳進來的訊號時，會傳新的訊號給馬達控制板，使馬達控制板可以依照控制程式的撰寫條件進一步驅動馬達運轉。待馬達運轉完指定動作後，Arduino MEGA 2560 便會開始計算時間，等時間結束後則會再傳新的訊號給馬達控制板，使馬達進行關門的動作。

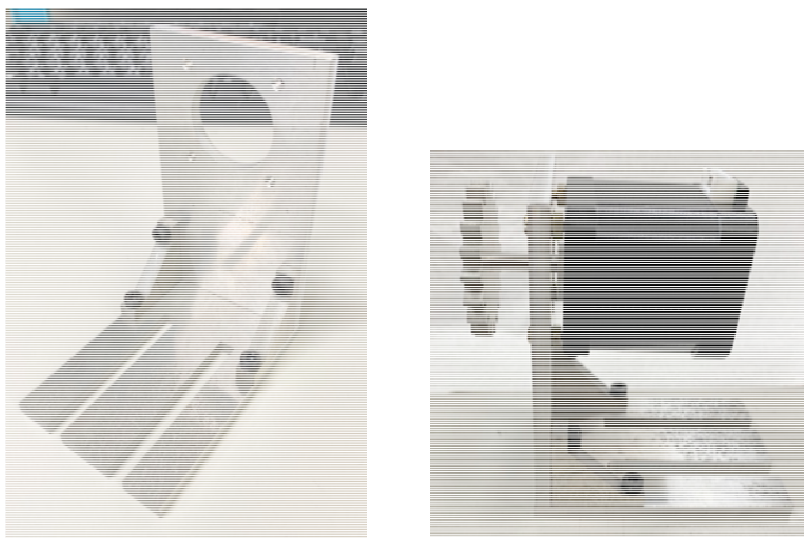


Figure 3.2 設計之步進馬達支具(左)及與步進馬達組合圖(右)

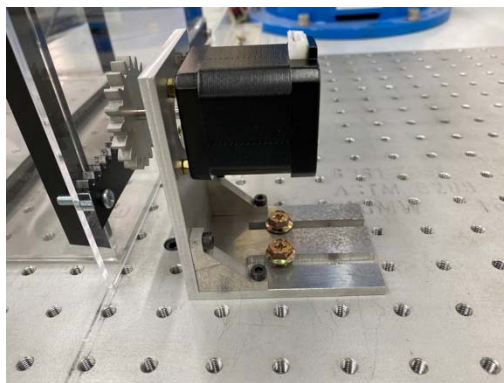


Figure 3.3 步進馬達與支具實際安裝情形



3.2 實驗一、分化與未分化細胞辨識

未分化之幹細胞具有多向分化能力，因此為研究人員研究之重點項目。然而，細胞培養過程繁瑣，幹細胞分化時機未知且已分化幹細胞會加速影響未分化之幹細胞，因此當培養皿中出現已分化幹細胞時需盡快將其移除。本實驗則是利用影像處理方式模擬研究人員人工辨識幹細胞分化與否之動作，針對取得之幹細胞影像進行運算處理，最終標示出該影像中未分化幹細胞區域、已分化幹細胞區域以及背景區域，降低耗費於人工細胞辨識之時間，提高幹細胞培養整體效能。

3.2.1 幹細胞培養方式之選擇

細胞培養方式依據培養時細胞的生長方式不同而分為兩種：貼壁培養 (adherent culture) 及懸浮培養 (suspension culture)。利用貼壁培養方式所培養出的細胞，於生長時會吸附在人工基質上 (本實驗之人工基質為培養皿)，而利用懸浮培養方式之細胞則會漂浮於培養液中。兩者最大的差別為使用顯微鏡觀察並移動培養皿時，細胞是否可以達到固定於絕對位置的效果，也就是移動培養皿時，細胞之間的相對位置以及於培養皿上的絕對位置是否改變。

由於此實驗之目的為辨別幹細胞之分化與否，再經由辨別結果利用移液器移除已分化之幹細胞。因此實驗中，為了使幹細胞的絕對位置於視覺影像觀察時固定，又可提供移除幹細胞之確切之座標，因此細胞之位置資訊甚為重要，綜合以上，最終幹細胞培養方式採取貼壁培養方式進行。

3.2.2 實驗流程

首先，針對輸入影像進行預處理動作，此步驟包含：將 RGB 影像轉為灰階影像，再將此灰階影像藉由定義適當的閾值以進行二值化，接著即可利用輪廓的抓取

找出影像中各細胞分佈位置。定位出各細胞位置後，便可使用細胞型態以及生長方式作為細胞辨識之篩選條件。本實驗設定的篩選條件為：細胞周長、細胞面積以及細胞間相對密度，完成上述眾步驟後，即可輸出經細胞辨識之結果圖。然而，單一幹細胞非常微小，與移液器的尺度大小相差甚遠，因此即便知道每一顆已分化幹細胞位置，也無法一一將其移除，故最終僅需提供未分化以及已分化幹細胞之分布區域，綜合以上，最後的步驟則是利用前述之細胞辨識結果圖，找出同類型幹細胞之分佈並以區塊方式呈現。

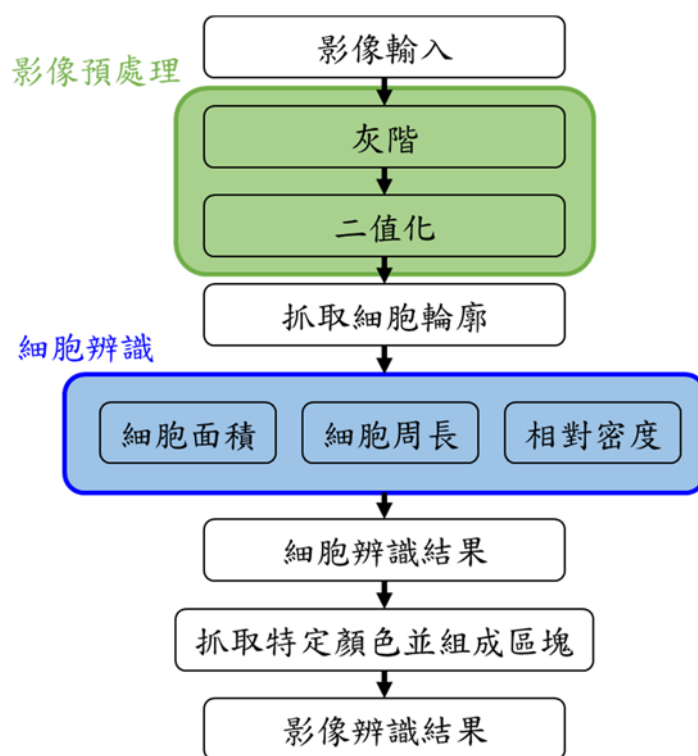



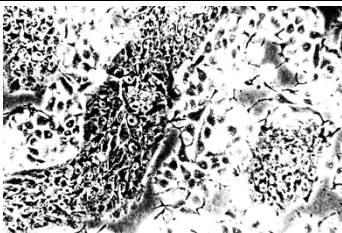
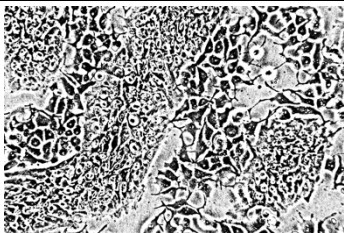
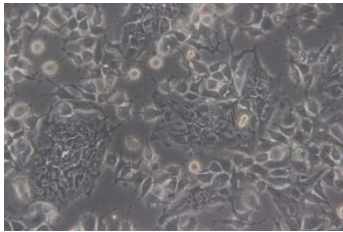
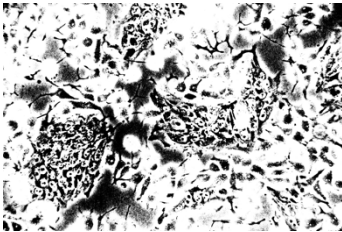
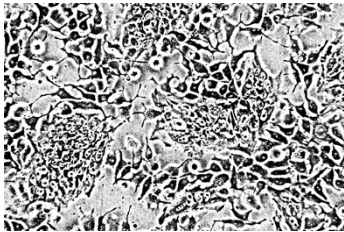
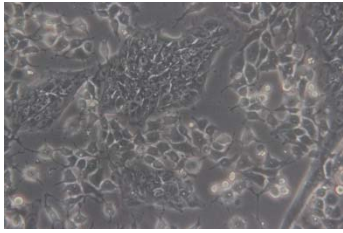
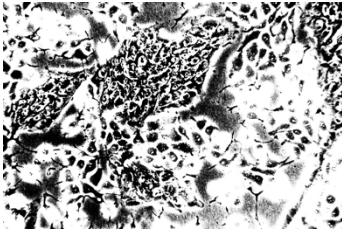
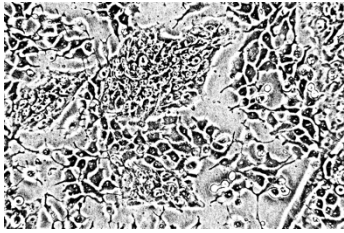

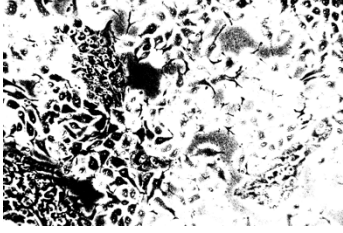
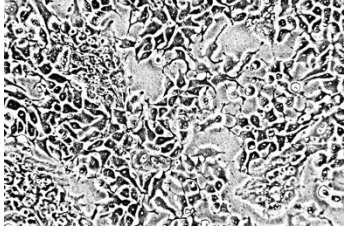
Figure 3.4 實驗一之實驗流程圖

3.2.3 閾值選擇

本實驗使用倒立式顯微鏡作為觀測幹細胞之器材，當物鏡放大倍率越大，物鏡會越接近工作台，照射至培養皿的光線越少，所觀察影像會越暗，故需使用額外的光源作為輔助。大部分顯微鏡所搭配之光源皆屬點光源，根據光學原理，亮度會與距光源距離成反比，距離越短亮度越亮，同理，經顯微鏡放大後取得的細胞照片也

會有此現象，當放大倍率越大受其影響會越低。由於人體眼睛觀察能力有限，無法辨別過於細微之光線變化，但此現象依然存在，因此若是使用上述說明的雙峰值法或大津演算法等，仍然無法消除因影像亮度不均（右下角亮度較亮；左下角亮度較暗）所造成之影響，如 Table 3.1 第二行所示。為改善或避開此因素，必須採取「自適應閾值法」，藉由將影像切割成若干區域，針對各區域分別計算其閾值，再進行二值化，如此一來，亮度較亮之區域即可有較高的閾值，較低區域可有較低之閾值，便可消除二值化受影像亮度不均造成之影響，如 Table 3.1 第三行所示。

Table 3.1 閾值選擇

原圖	全域閾值法	自適應閾值法
		
		
		
		



3.2.4 實驗結果

由於幹細胞之變化錯綜複雜，加上經分化後幹細胞型態並非固定，即便經由人工辨識，依舊存在不確定性。於此將模擬人工辨識之過程，將辨識結果分為三種可能，分別為「未分化幹細胞」、「已分化幹細胞」以及「不確定分化與否之幹細胞」。由於有三種辨識結果，本實驗運用三種不同的顏色進行標註，藍色部分為「未分化幹細胞」；紅色部分為「已分化幹細胞」；黃色部份則為「不確定分化與否之幹細胞」。

本實驗之目的為將已分化幹細胞移除並保留未分化幹細胞於培養皿中，由於細胞生長時已分化幹細胞會影像未分化幹細胞甚至加速其分化，因此細胞移除判別將以從嚴的方式進行，直接將非未分化幹細胞部分全部視為待移除區域（此區域中包含已分化幹細胞、不確定分化與否之幹細胞以及背景區域），故最終將輸出只含未分化幹細胞之區塊圖。

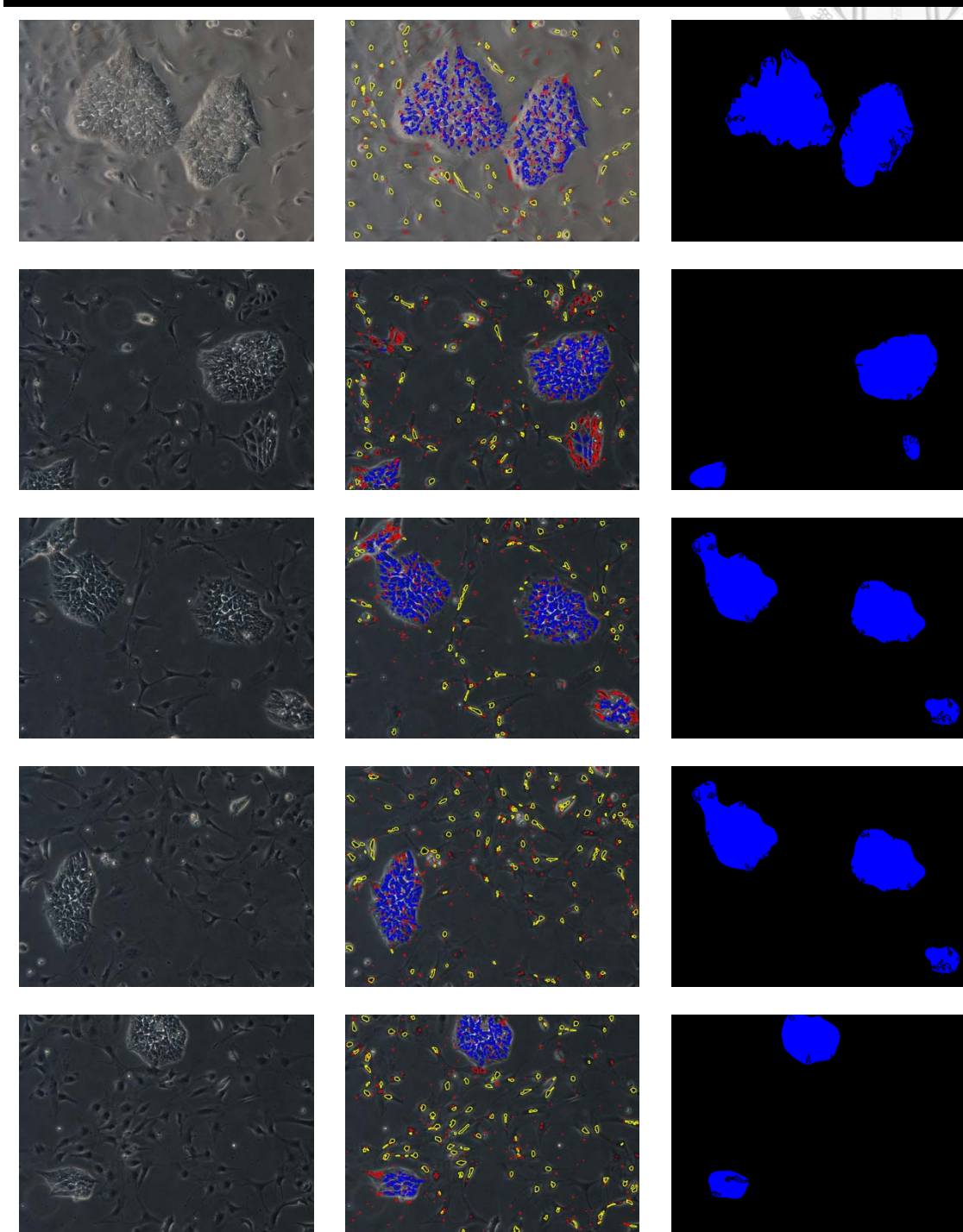
下表中將展示本實驗結果，如。第一列為由數位相機所拍攝之原始細胞圖，第二列為細胞辨識結果圖，第三列為將未分化幹細胞抓取後組成之區塊圖。下表中，可初步用肉眼判定辨識結果大致上正確，實際準確率將於 3.2.5 項中探討。

Table 3.2 實驗一結果表

原始細胞圖

細胞辨識結果圖

未分化幹細胞區塊圖





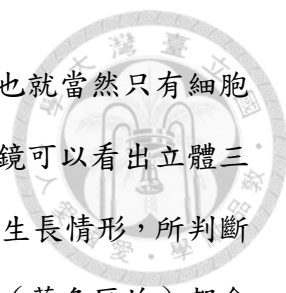
3.2.5 與人工標記結果比較

為了驗證影像辨識結果的正確率，我們請陳老師的實驗室人員根據細胞學以及自身的經驗，以人工方法辨識細胞，並利用四個顏色區別不同型態的細胞，分別為藍色（未分化細胞區域）、紅色（已分化細胞區域）、黃色（不確定細胞種類區域）以及黑色（背景區域），最後再將此電腦影像辨識結果與人工標記影像結果進行比較，並觀察及探討兩者差別。

由於幹細胞的生長型態多變，若只依據當下照片的細胞型態進行判斷，仍會對少數細胞持有疑慮，因此才會有不確定細胞分化狀況（黃色區塊）的出現。若須解除此疑慮，則必須加入時間因素做為考量，藉由該黃色區塊細胞生長的先後情況作為輔助判斷。然而，此實驗並不考慮時間因素，因此無法解決黃色區塊的問題，故我們採取從嚴處理，直接將黃色區塊視為待移除細胞（非良好細胞），寧可移除少部分良好（未分化細胞），也不要遺留不良細胞（已分化細胞）於培養皿中，進一步影響盤中良好的細胞。

綜合以上，實際將電腦影像辨識結果的未分化細胞區域（藍色區塊）與人工標記影像結果的未分化細胞區域（藍色區塊）進行比較，若兩張 (x, y) 座標的像素皆為藍色或皆為非藍色，則比較結果圖為綠色；若兩張 (x, y) 座標的像素分別為一藍一黑，則比較結果圖為紅色。下表中，第一列為電腦影像辨識結果圖，第二列為人工標記影像圖，第三列為比較結果圖。

由比較結果圖中，可以發現電腦辨識與人工辨識兩者的差異多發生在邊界，且皆為電腦辨識良好細胞（藍色區塊）的結果較人工辨識良好細胞（藍色區塊）的結果小。可以推估發生此現象之原因為：細胞生長現象屬於立體三維模型，當利用數位相機進行拍照時，會將三維模型轉換成二維模型，故細胞生長高低情況會藉由影像的亮暗呈現，然而電腦辨識是將影像進行二值化、輪廓抓取再由特徵值辨別，所



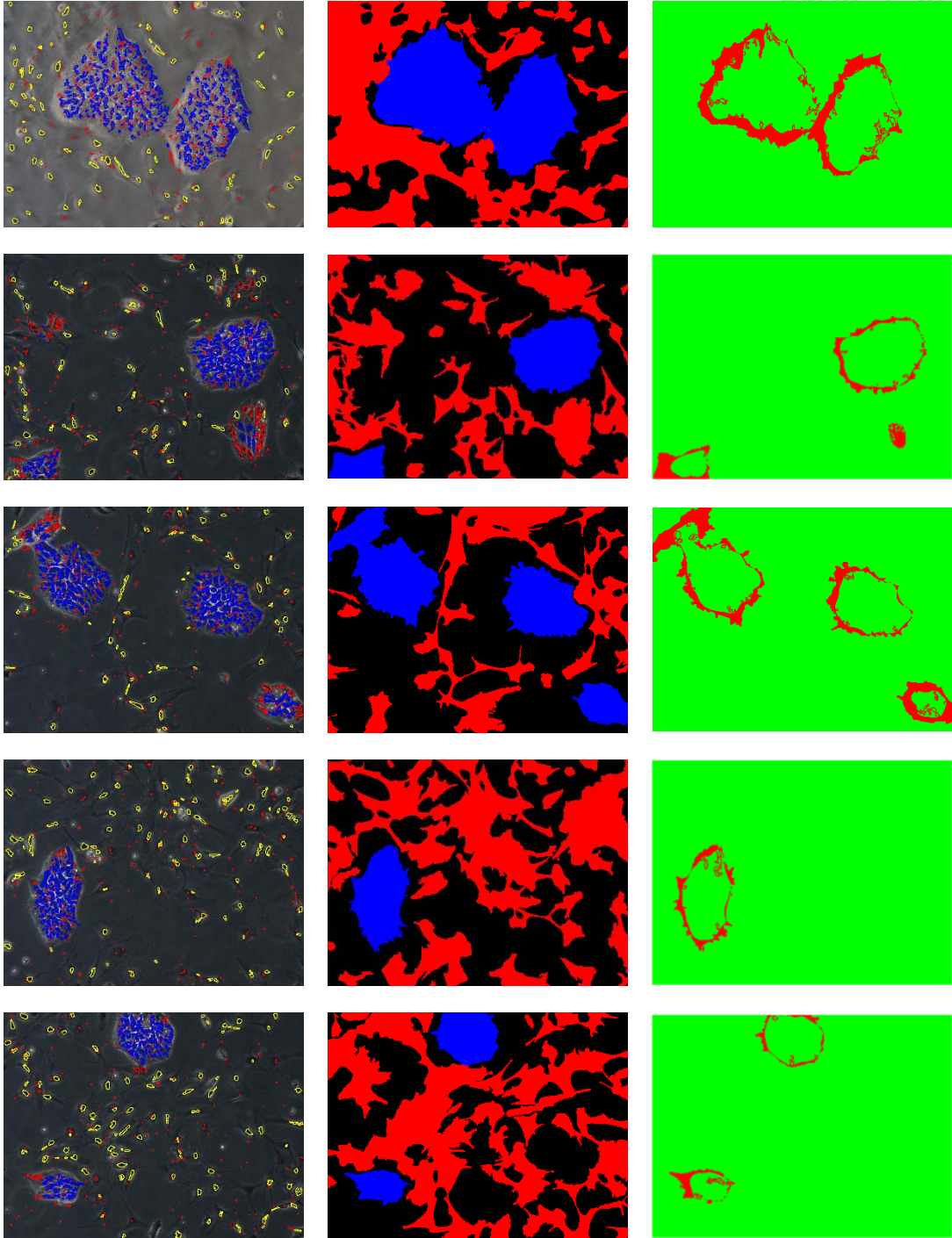
有的影像分析皆屬於二維分析，並無加入三維分析，所得的結果也就當然只有細胞最上層平面的生長情形。但人工方法辨識時，由於眼睛藉由顯微鏡可以看出立體三維的模型，加上個人自身經驗，最後即可推論細胞於Z軸方向的生長情形，所判斷出的結果則會考量第三軸（Z軸），因此所標記未分化細胞區域（藍色區塊）都會較電腦辨識結果大。

Table 3.3 與人工標記結果比較表

電腦影像辨識結果圖

人工標記影像圖

比較結果圖





3.2.6 與人工智能結果比較

除了利用電腦影像處理的方式進行細胞分化的判斷與否外，同時也於其他計畫中使用人工智能(Artificial Intelligence)進行分析。該計畫使用由 Ronneberger 所提出的 U-Net 架構透過人工標記的辨識結果進行學習，並根據學習結果進一步針對輸入影像進行判斷。

由於 U-Net 既定架構的因素，其只會分析輸入影像的中間部分，換言之，輸入影像外圍會有一小部分將被捨棄。為了誤差分析時的公平性，本項僅會依照人工智能辨識結果圖的輸出大小作為比較時之模板，並同時將電腦影像處理之結果與其進行對比。

首先，先說明電腦影像辨識結果圖，如 Table 3.4 中第一行，與人工智能辨識結果圖，如 Table 3.4 中第二行，中各顏色所代表之涵義。電腦影像辨識結果圖中呈現四種顏色，分別為藍色、紅色、黃色以及黑色，藍色區塊所代表為電腦辨識結果為「未分化之幹細胞區域」屬於不需移除之區塊；紅色區塊則代表電腦辨識結果為「已分化之幹細胞區域」；黃色區塊則代表電腦辨識結果為「不確定分化與否之幹細胞區域」；黑色區塊則代表無電腦辨識結果，也就是「背景區塊」。然而，進行電腦影像辨識結果圖與人工智能辨識結果圖比較時，為簡化對比時之結果，僅將電腦影像辨識結果圖視為兩輸出結果-不需移除區塊以及需移除區塊，其中不需移除區塊為電腦影像辨識結果圖中藍色區塊，而需移除區塊便是電腦影像辨識結果圖中非藍色區塊，也就是紅色、黃色和黑色區塊。

人工智能辨識結果圖中呈現三種顏色，分別為藍色、紅色及黑色，藍色區塊所代表為人工智能辨識結果為「未分化之幹細胞區域」，屬於不需移除之區塊，紅色區塊所代表為人工智能辨識結果為「已分化之幹細胞區域」，屬於需移除之區塊，

而黑色區塊則代表人工智能辨識結果為「背景區域」，此區塊由於無任何細胞生長，因此是否進行移除動作並不影響培養結果。




第二，將定義比較結果圖中各顏色(如 Table 3.5)所代表之涵義，並進一步針對此涵義分析。

一、深綠色為「辨識正確之安全區域」：該區塊代表電腦影像辨識之結果與人工智能辨識的結果皆為不須移除之區塊，發生可能僅為電腦影像辨識以及人工智能辨識皆同時出現未分化細胞區塊(藍色區域)；

二、紅色為「辨識錯誤之危險區域」：該區塊為電腦影像辨識與人工智能辨識結果完全不相同，且因電腦影像辨識錯誤會造成整體危害之區域。也就是說電腦影像辨識結果為不須移除區塊(藍色區塊)，但人工智能辨識結果卻為已分化幹細胞(紅色區塊)，換言之為需移除區塊，而如此的辨識錯誤，會造成將已分化幹細胞誤留於培養皿中，使其加速影響未分化幹細胞，而造成不良效果；

三、螢光綠色為「辨識錯誤之安全區域」：該區塊發生情形為電腦影像辨識結果為不須移除區域(藍色區塊)，而人工智能辨識結果為背景區域(黑色區塊)，同為不需移除區域，因此雖產生辨識錯誤，但此錯誤並不會影響幹細胞於培養皿中後續生長情形，固屬安全區域；

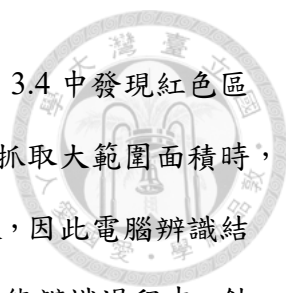
四、黃色為「辨識錯誤之幹細胞浪費區域」：該區塊發生情況為當電腦影像辨識結果為需移除區塊(非藍色區塊)，但人工智能辨識結果為未分化幹細胞(藍色區塊)，也就是不需移除區域。因此若按電腦影像辨識結果而將此區塊之幹細胞進行移除，會誤將未分化幹細胞去除，雖對培養皿中幹細胞生長情形不會造成影響，但可能造成幹細胞的浪費；



五、灰色為「辨識可能正確之安全區域」：該區域發生狀況為電腦影像辨識結果為需移除區域(非藍色區塊)，而人工智能辨識結果則為已分化幹細胞(紅色區塊)，而此區塊屬需進行移除的區域。由於經電腦影像辨識結果得為非藍色區塊，代表該區域有可能為已分化幹細胞或無幹細胞區域(背景區塊)，因此若此區塊為已分化幹細胞則說明辨識正確，若此區塊為無幹細胞區域則說明辨識錯誤，故此狀況屬辨識可能正確區域。然而，不論辨識結果正確與否，此範圍於電腦影像辨識結果及人工智能辨識結果中皆屬需移除區域，因此可將此歸類於安全區域；

六、紫色為「辨識可能正確之降低效率區域」：該區域發生情景為電腦影像辨識結果為需移除區域(非藍色區塊)，而人工智能辨識結果則為無幹細胞區塊(黑色區塊)。；由於經電腦影像辨識結果得為非藍色區塊，代表該區域有可能為已分化幹細胞或無幹細胞區域(背景區塊)，而人工智能辨識結果屬無幹細胞區域，因此若此區塊為已分化幹細胞則說明辨識錯誤，若此區塊為無幹細胞區域則說明辨識正確，故此狀況屬辨識可能正確之區域。然而，不論辨識結果正確與否，此範圍於電腦影像辨識結果中屬需移除區域，而人工智能辨識結果中屬可不移除區域，因此若按電腦影像辨識結果針對此區塊進行移除動作，雖對幹細胞培養情形不會造成影響，但因進行移除動作需耗時，產生將時間耗費於不必要之行為上，故屬降低效率區域；

第三，則根據比較結果圖之結果進行分析。根據上述說明，可以得知於比較結果圖中，對電腦影像辨識結果以及細胞培養結果影響最不良處為紅色區塊；電腦影像辨識結果有錯誤但對細胞培養結果無影響的區域則為螢光綠色與黃色區塊，而電腦影像辨識結果有疑慮處則為灰色與紫色，最後電腦影像辨識結果以及細胞培養結果皆為良好處則以深綠色表示。



綜合以上，於比較結果圖中需注意處為紅色區塊，由 Table 3.4 中發現紅色區塊多出現於細胞的邊界處，初步推斷原因可能為：利用顏色輪廓抓取大範圍面積時，為使該大範圍面積呈現圓滑平整狀，會向外推進而產生圓滑曲線，因此電腦辨識結果之未分化幹細胞(藍色區域)會較實際情況大，再加上因人工智能辨識過程中，針對影像進行較多的「侵蝕」處理，因此人工智能辨識結果中的未分化幹細胞(藍色區塊)又會再向內部縮小，故方於邊界處產生較多「辨識錯誤之危險區域」(紅色結果)。此外，於 Table 3.4 中可以發現大量的「辨識可能正確之降低效率區域」(紫色區塊)出現，根據該區域之定義將會造成此全自動化幹細胞培養系統之效率降低，因此未來若需提升此系統之運作效率，可以針對此區域進行修正。

整理而言，於比較結果圖中可以觀察出「辨識錯誤之幹細胞浪費區域」(紅色區塊)所占比例不高，加上「辨識正確之安全區域」(深綠色區塊)、「辨識錯誤之安全區域」(螢光綠色區塊)以及「辨識可能正確之安全區域」(灰色區塊)此三種區域佔比較結果圖相當大的占比，說明經此電腦影像辨識方法作為全自動幹細胞培養系統之辨識方法為可行。其中，「辨識錯誤之幹細胞浪費區域」(黃色區塊)出現的比例相當的少，說明了利用此電腦影像辨識作為幹細胞之辨識系統，可以有效地降低浪費幹細胞的情況產生，提升幹細胞培養效能。最後，若需提升此自動化系統運行效率，則可以針對「辨識可能正確之降低效率區域」(紫色區塊)進行優化。



Table 3.4 與人工智能結果比較表

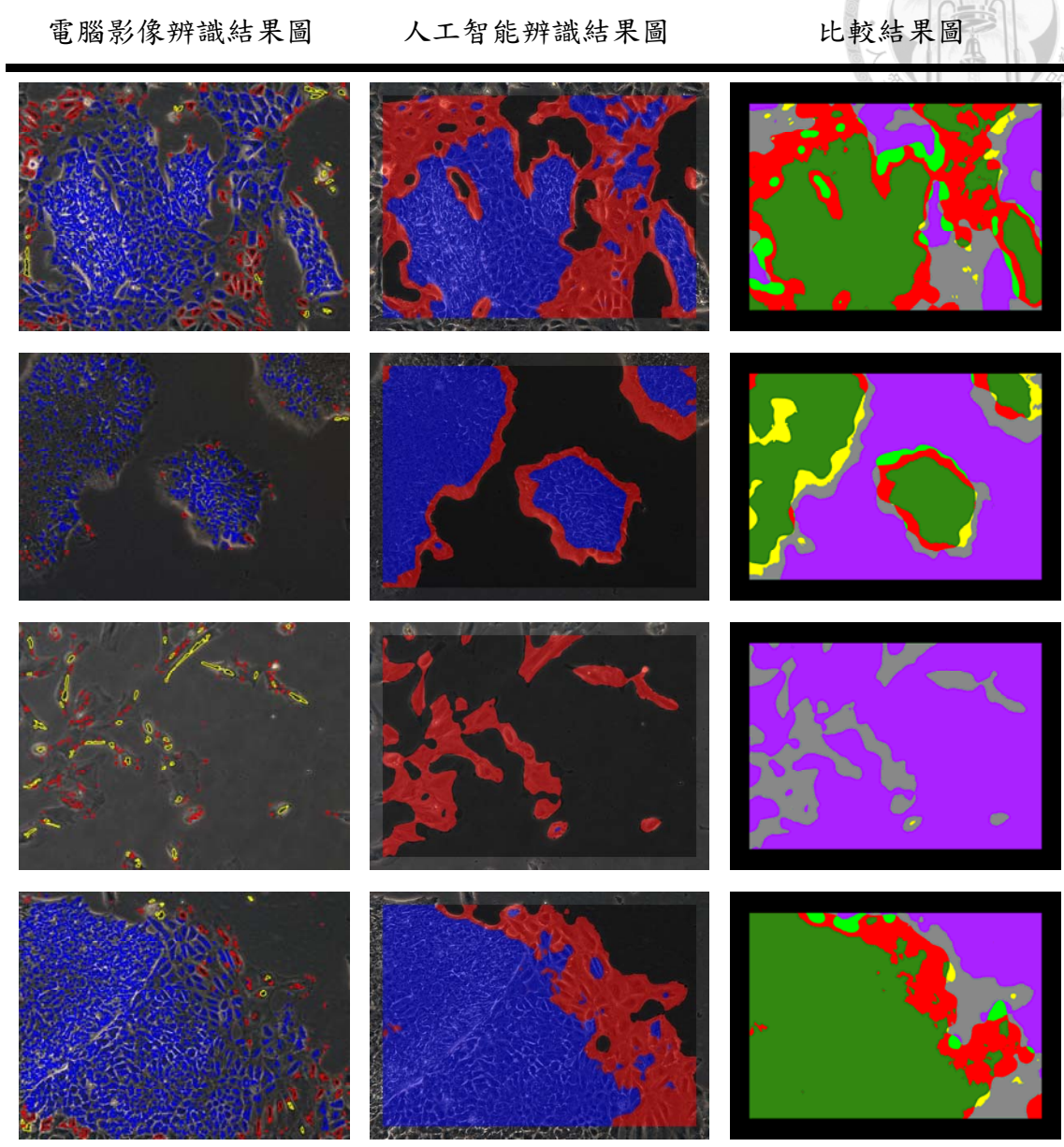


Table 3.5 與人工智能結果比較之顏色比對表

		人工智能辨識結果圖		
		藍色	紅色	黑色
電腦影像辨識 結果圖	藍色			
	非藍色			



3.3 實驗二、全域圖分析

此實驗之設計宗旨為滿足本研究之第二條件「移除分化之幹細胞」。將使用六軸機械手臂提取移液器或吸引器並將分化之幹細胞自培養盤中吸除，僅保留未分化之幹細胞於培養皿中。其中，移液器的吸頭大小相較於幹細胞都大上許多，進行一次吸取動作都將牽涉到較大區域面積的幹細胞，因此我們必須具備全域的細胞分佈圖進行分析，最終方可利用此全域圖之細胞辨識結果規劃移液器或吸引器的移除路徑。

3.3.1 實驗流程

本實驗所使用之細胞皆為未分化之幹細胞，目的為辨別幹細胞區域以及背景區域（無幹細胞區域），最終輸出一張大範圍之全域圖。

為得到培養皿中幹細胞分佈的全域圖，必須取得連續多張的幹細胞影像，並進行縫合。進行影像縫合時，相鄰影像需具備足夠數目的相同特徵點，方可藉由這些特徵點進行接合，故於影像取得時，需特別將相鄰影像中採取小部分面積重疊，因此一張影像中可以被分為「重疊部分」以及「非重疊部分」，並針對這兩部分進行不同之後續影像處理。

圖像分割（Segmentation）為將原圖像切割成許多子區域，並針對這些子區域進行細部分析，最後再將這些子區域之結果結合。由於此動作將原圖進行子區域的細部分析再結合，故其所得之結果可以更加的精確，同理，當原圖所切割的子區域數目越多，其結果也會更加的精確。因此與本實驗中，我們也嘗試運用此技巧藉以提高結果之精確度。

由於所見之影像是經顯微鏡放大許多而得，實際上肉眼無法看見，即便我們得以辨識每一顆欲移除幹細胞之位置，也無法將特定細胞移除，故可運用此特點，採



取近似的作法，將每一張切割後照片內目標像素占整張照片比例大小作為判斷依據，若目標像素佔比大於50%，則可直接將該張切割後照片視為全部皆為目標像素；反之，則全部皆為非目標像素。

由於切割後照片分為「重疊區域」以及「非重疊區域」，其中，重疊區域部分必須特別注意，需額外進行處理。重疊區域代表該區域有不只一組的採樣照片，由於這些區域的採樣條件都相同（相同的顯微鏡、相機、影像處理過程……等），因此這些採樣數據的權重也皆相等，故最終採等權平均法處理之。而非重疊區域因無上述之問題，故僅需依照正常流程進行處理即可。最後，將這些經由近似法以及等權平均法處理後的結果進行縫合動作，即可得到一張完整的全域圖。

由於本研究最終目標為「保留未分化幹細胞並移除已分化幹細胞」，因此得到幹細胞生長情況後，即可利用此全域圖中待移除幹細胞分佈面積進行軌跡分析，最終即可得出移液器預經之座標點位以及軌跡。本實驗之完整步驟流程圖如下表。

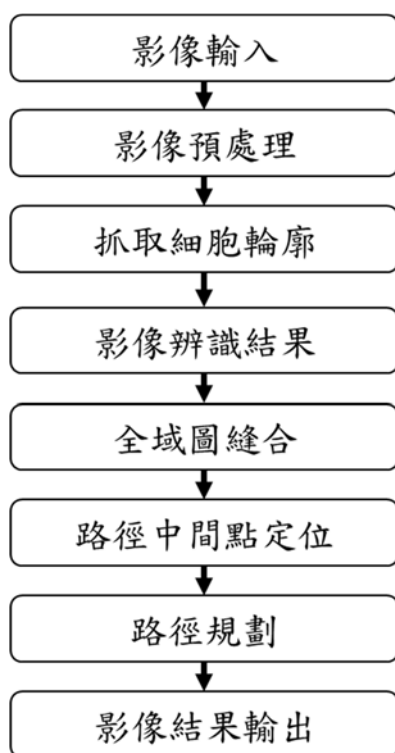


Figure 3.5 實驗二之實驗流程圖



3.3.2 照片取得及編碼

拍攝照片時，相鄰兩張圖片的重疊面積若不足，再加上細胞圖片的色調較單調且特徵點不如一般圖片的明顯，會造成相鄰圖片後續接合辨別時產生困難，縫合軟體無法順利縫合，又重疊部分若過多，則會降低全域圖分析之效率，因此最終方才決定相鄰照片採取 $\frac{1}{3}$ 作為重疊面積。

由於此實驗中，採取「手動」拍攝方式進行細胞照片的取得，顯微鏡具有放大數倍的功能，為了可以清楚觀察細胞的形態，一般多選擇最小的比例尺，故只要稍微移動培養皿，原本照片中的細胞經過顯微鏡放大再經由數位相機中成像後，很有可能會超出追蹤的範圍。因此為了使拍攝過程可以順利完成，照片取得的順序以及對應編號採用如 Figure 3.6 方式。

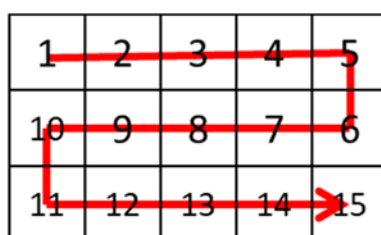


Figure 3.6 照片拍攝順序以及編碼

然而，上述照片編碼順序並非直觀，為了降低後續作業時編碼轉換問題所耗費之時間，以及方便未來找尋特定照片，將依照行(column)列(row)的方式重新將照片進行編碼動作，而編碼之順序如 Figure 3.7。

1-1	1-2	1-3	1-4	1-5
2-1	2-2	2-3	2-4	2-5
3-1	3-2	3-3	3-4	3-5

Figure 3.7 影像編碼



3.3.3 第一次圖片切割

如 3.3.2 中所述，由於培養皿中細胞的手動拍攝過程中，重疊面積達 $\frac{1}{3}$ ，因此每一張照片會與其前後左右皆有重疊部分，如 Figure 3.8。

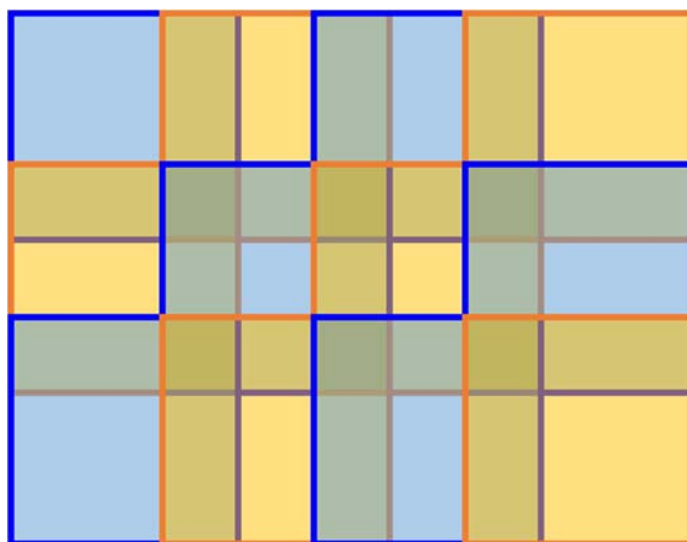


Figure 3.8 影像組合圖

由於相鄰圖片有重疊面積區域，無法直接將照片進行接合，為順利後續影像分析以及接合處理，將一張圖片切割成「重疊區塊」和「非重疊區塊」，再分別對這兩種區塊進行不同的處理，最終再將其進行縫合。

由 Figure 3.8 可以發現，不同排列位置的圖片其重疊以及非重疊區塊的位置不同：位於角落的圖片僅會與左方或右方的照片（其一）以及上方或下方的照片（其一）有重疊，如 Figure 3.9(左)；位於第一列以及最後一列（非角落）的圖片會與左方及右方的照片和上方或下方的照片（其一）有重疊，如 Figure 3.9(中)；位於第一行以及最後一行（非角落）的圖片會與左方或右方的照片（其一）和上方及下方的照片有重疊，如 Figure 3.9(中)；位於中間的圖片則會同時與左方、右方、上方以及下方的照片重疊，如 Figure 3.9(右)。

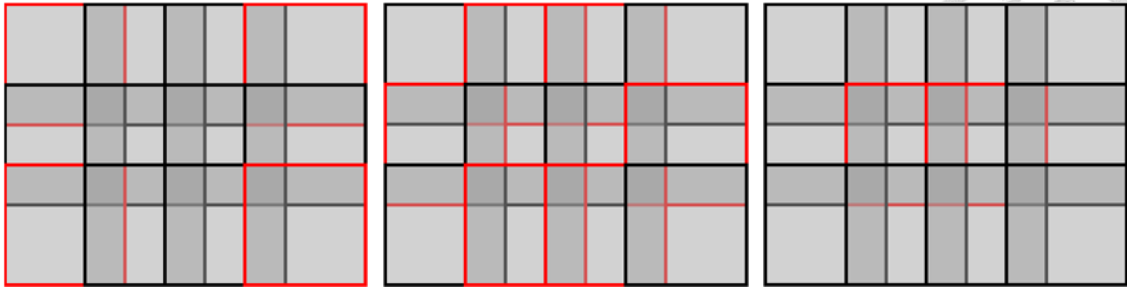


Figure 3.9 影像重疊圖

此外，為了方便照片切割後，可明確地得知切割後的照片原本位於何處及其相對位置，將針對每一片切割後的照片給予標籤，標籤原則為：（行數）-（列數）-（英文代碼）。其中，英文代碼的規則為：非重疊區塊為 M(Middle)、位於非重疊區塊 M 右側之重疊區塊為 R(Right)、位於非重疊區塊 M 左側之重疊區塊為 L(Left)、位於非重疊區塊 M 上方之重疊區塊為 U(Up)、位於非重疊區塊 M 下方之重疊區塊為 D(Down)，而其他角落之重疊區塊則是左(L)右(R)優先於上(U)下(D)，換言之，左(L)右(R)排在前；上(U)下(D)排在後。英文代碼規則如 Figure 3.10 所示。

LU	U	RU
L	M	R
LD	D	RD

Figure 3.10 英文代碼規則

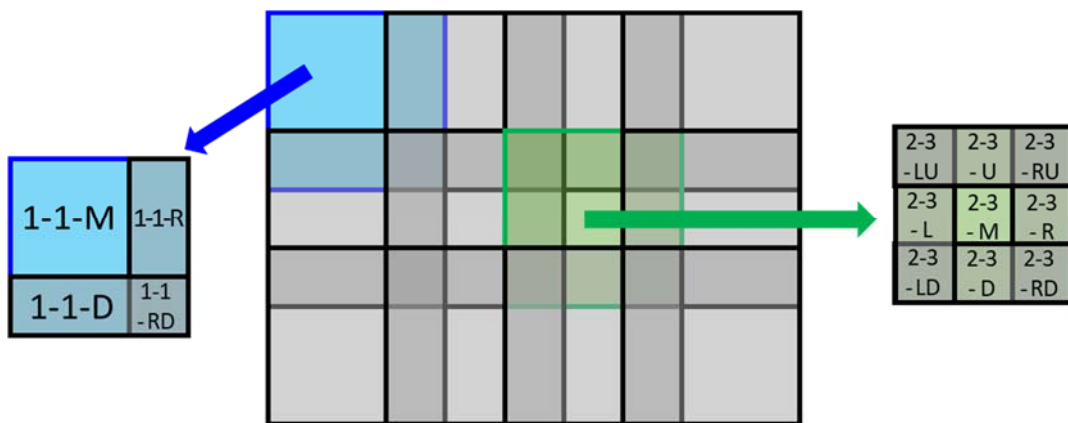


Figure 3.11 分割後圖片標籤示意圖



3.3.4 圖片分析

使用數位相機拍攝時，會因傳感器、電路以及膠片顆粒等因素而產生圖像雜訊 (image noise)，亦或因為培養液上的懸浮物造成拍攝的相片上產生非細胞之黑點，無論是何者皆會使我們於影響處理中產生雜訊誤差，如 Figure 3.12 當我們無法以物理方法消除此項誤差，只好使用手動補償的方式將其去除。

本實驗目的為區隔「存在細胞區域」以及「背景區域」，僅需將含有細胞區塊與背景進行分離，相較於實驗一的細胞辨識簡單許多，因此於本步驟中只需利用基本的輪廓提取方法進行圖片分析，即可將兩者區塊完成區分，最後再依據面積大小作為條件，將分散且面積較小區塊視為雜訊(noise)，直接將其去除，如 Figure 3.13。

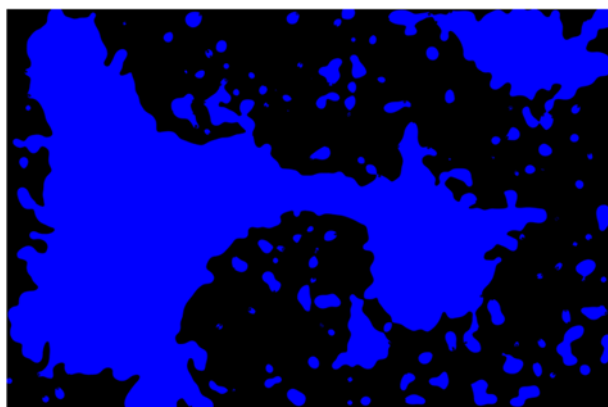


Figure 3.12 降噪前圖片

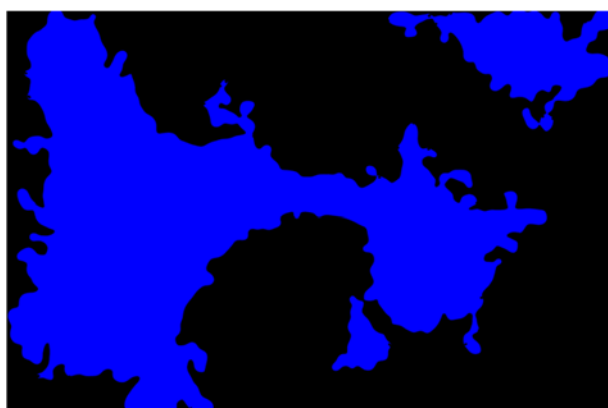


Figure 3.13 降噪後圖片



3.3.5 圖像近似

由於每張圖片都是同時經目鏡以及物鏡放大所得，故圖片中所顯示的細胞分佈是肉眼無法直接看見的，更不用說要使用移液器將特定細胞移除，因此單張照片中細胞的分佈並非如此重要。故可採取「近似法」進行處理，簡化步驟如下：利用目標細胞占整體圖片面積比例進行近似處理，若欲目標細胞占整體圖片面積比例大於百分之五十，則將此圖片整體視為目標細胞區塊；反之，若欲移除細胞占整體圖片面積比例小於百分之五十，則將此圖片整體視為非目標細胞區塊。

此外，由 3.3.2 可知，一張圖片會被切割成「重疊區塊」以及「非重疊區塊」。由於本試驗是採取手動拍攝，因此相鄰圖片之重疊區塊無法達到精確 $\frac{1}{3}$ 重疊，因此針對重疊區塊圖片分析的結果採用均值定理，如此一來，可以兼顧多張圖片資訊的保留以及提升判斷結果的準確值；而非重疊區塊則可直接對其進行圖片分析。

3.3.6 圖像分割 Segmentation ^[18]

圖像分割是一種將原始影像分割成數個區域影像的方法，藉由將母影像切割成眾多子影像的過程，可將母影像原本所含的大量資訊內容分散至子影像中，再針對已標籤的子影像進行分析，最終將各子影像分析結果依照標籤次序組合至母影像中。

由於 3.3.5 項步驟中採取近似法，以「張」作為近似單位，不論影像所含像素多寡，於計算該張影像中目標像素所佔比例後，即利用近似法將該張影像視為單一結果。如此一來，影像中所含的特徵值（如：影像邊緣）可能因近似處理而遺失，導致最終結果失真。因此，本實驗嘗試引入圖像分割方法，將母影像分割成眾多子影像，再針對子影像進行近似處理，由於子影像所含實際區塊較少，因此經由近似



處理後所遺失的特徵值相對也較少，期望可藉由圖像分割動作，提升影像邊緣檢測之精確度。

3.3.7 全域圖縫合

於圖片分析時，依照「重疊」、「無重疊」、「寬」及「高」分為十一個類別，以下將針對各類別進行說明。

Type 8	Type 1	Type 10	Type 1	Type 10	Type 1	Type 8
Type 2	Type 7	Type 5	Type 7	Type 5	Type 7	Type 4
Type 9	Type 6	Type 11	Type 6	Type 11	Type 6	Type 9
Type 2	Type 7	Type 5	Type 7	Type 5	Type 7	Type 4
Type 8	Type 3	Type 10	Type 3	Type 10	Type 3	Type 8

Figure 3.14 影像類別圖

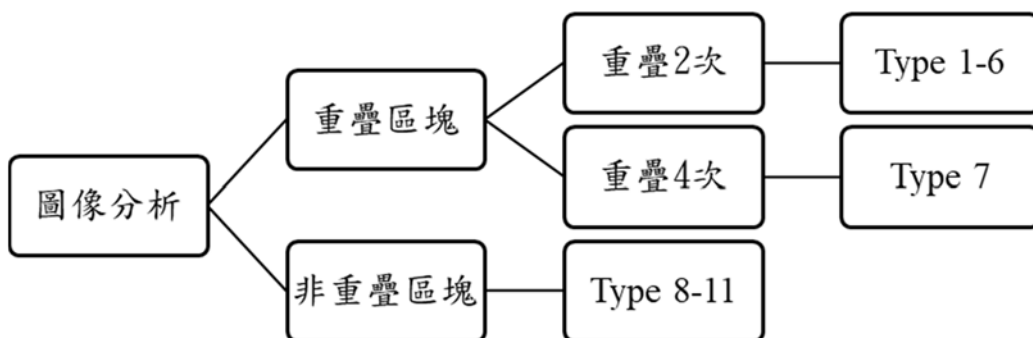


Figure 3.15 影像類別分類圖



類別一、此類別屬於重疊次數為二之「重疊區塊」，並根據上述重疊原理中可得知此類別：寬 = $\frac{1}{3} \times$ 輸入圖片之寬；高 = $\frac{2}{3} \times$ 輸入圖片之高。同時，此類別中進行圖片分析所相對應的影像編碼皆為 1-(N)-R 以及 1-(N+1)-L，其中 $N=1,2,\dots(\text{column number}-1)$ 。待圖片分析後之結果，將遵循上述原理，並依序（左到右）命名為 1-(2K)，其中 $K=1,2,\dots(\text{column number}-1)$ 。

類別二、此類別屬於重疊次數為二之「重疊區塊」，並根據上述重疊原理中可得知此類別：寬 = $\frac{2}{3} \times$ 輸入圖片之寬；高 = $\frac{1}{3} \times$ 輸入圖片之高。同時，此類別中進行圖片分析所相對應的影像編碼皆為(N)-1-D 以及(N+1)-1-U，其中 $N=1,2,\dots(\text{row number}-1)$ 。待圖片分析後之結果，將遵循上述原理，並依序（上到下）命名為(2K)-1，其中 $K=1,2,\dots(\text{row number}-1)$ 。

類別三、此類別屬於重疊次數為二之「重疊區塊」，並根據上述重疊原理中可得知此類別：寬 = $\frac{1}{3} \times$ 輸入圖片之寬；高 = $\frac{2}{3} \times$ 輸入圖片之高。同時，此類別中進行圖片分析所相對應的影像編碼皆為(row number)-(N)-R 以及(row number)-(N+1)-L，其中 $N=1,2,\dots(\text{column number}-1)$ 。待圖片分析後之結果，將遵循上述原理，並依序（左到右）命名為(2×row number-1)-(2K)，其中 $K=1,2,\dots(\text{column number}-1)$ 。

類別四、此類別屬於重疊次數為二之「重疊區塊」，並根據上述重疊原理中可得知此類別：寬 = $\frac{2}{3} \times$ 輸入圖片之寬；高 = $\frac{1}{3} \times$ 輸入圖片之高。同時，此類別中進行圖片分析所相對應的影像編碼皆為(N)-(column number)-D 以及(N+1)-(column number)-U，其中 $N=1,2,\dots(\text{row number}-1)$ 。待圖片分析後之結果，將遵循上述原理，並依序（上到下）命名為(2K)-(2×column number-1)，其中 $K=1,2,\dots(\text{row number}-1)$ 。

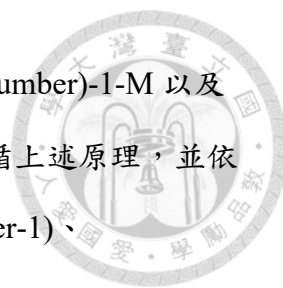


類別五、此類別屬於重疊次數為二之「重疊區塊」，並根據上述重疊原理中可得知此類別：寬 = $\frac{1}{3} \times$ 輸入圖片之寬；高 = $\frac{1}{3} \times$ 輸入圖片之高。同時，此類別中進行圖片分析所相對應的影像編碼皆為(N)-(M+1)-D 以及(N+1)-(M+1)-U，其中 $N=1,2,\dots(\text{row number}-1)$, $M=1,2,\dots(\text{column number}-2)$ 。待圖片分析後之結果，將遵循上述原理，並依序（上到下，左至右）命名為(2K)-(2J+1)，其中 $K=1,2,\dots(\text{row number}-1)$, $J=1,2,\dots(\text{column number}-2)$ 。

類別六、此類別屬於重疊次數為二之「重疊區塊」，並根據上述重疊原理中可得知此類別：寬 = $\frac{1}{3} \times$ 輸入圖片之寬；高 = $\frac{1}{3} \times$ 輸入圖片之高。同時，此類別中進行圖片分析所相對應的影像編碼皆為(M)-(N)-RD、(M)-(N+1)-LD、(M+1)-(N)-RU 以及(M+1)-(N+1)-LU，其中 $N=1,2,\dots(\text{column number}-1)$, $M=1,2,\dots(\text{row number}-1)$ 。待圖片分析後之結果，將遵循上述原理，並依序（上到下，左至右）命名為(2K+1)-(2J)，其中 $K=1,2,\dots(\text{row number}-2)$, $J=1,2,\dots(\text{column number}-1)$ 。

類別七、此類別屬於重疊次數為四之「重疊區塊」，並根據上述重疊原理中可得知此類別：寬 = $\frac{1}{3} \times$ 輸入圖片之寬；高 = $\frac{1}{3} \times$ 輸入圖片之高。同時，此類別中進行圖片分析所相對應的影像編碼皆為(M+1)-(N)-R 以及(M+1)-(N+1)-L，其中 $N=1,2,\dots(\text{column number}-1)$, $M=1,2,\dots(\text{row number}-2)$ 。待圖片分析後之結果，將遵循上述原理，並依序（上到下，左至右）命名為(2K)-(2J)，其中 $K=1,2,\dots(\text{row number}-1)$, $J=1,2,\dots(\text{column number}-1)$ 。

類別八、此類別屬於「非重疊區塊」，並根據上述重疊原理中可得知此類別：寬 = $\frac{2}{3} \times$ 輸入圖片之寬；高 = $\frac{2}{3} \times$ 輸入圖片之高。同時，此類別中進行圖片分析

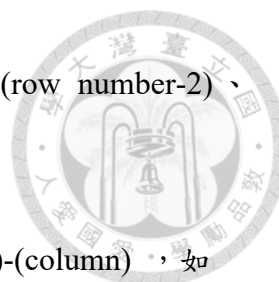


所相對應的影像編碼皆為 1-1-M、1-(column number)-M、(row number)-1-M 以及 (row number)-(column number)-M。待圖片分析後之結果，將遵循上述原理，並依序（左上、右上、左下、右下）命名為 1-1、1-(2×column number-1)、(2×row number-1)-1、(2×row number-1)-(2×column number-1)。

類別九、此類別屬於「非重疊區塊」，並根據上述重疊原理中可得知此類別：寬 = $\frac{2}{3}$ × 輸入圖片之寬；高 = $\frac{1}{3}$ × 輸入圖片之高。同時，此類別中進行圖片分析所相對應的影像編碼皆為(N+1)-1-M 以及(N+1)-(column number)-M，其中 N=1,2...(row number-2)。待圖片分析後之結果，將遵循上述原理，並依序（第一行由上而下、最末行由上而下）命名為(2K+1)-1 以及 (2K+1)-(2×column number-1)，其中 K=1,2...(row number-2)。

類別十、此類別屬於「非重疊區塊」，並根據上述重疊原理中可得知此類別：寬 = $\frac{1}{3}$ × 輸入圖片之寬；高 = $\frac{2}{3}$ × 輸入圖片之高。同時，此類別中進行圖片分析所相對應的影像編碼皆為 1-(N+1)-M 以及(row number)-(N+1)-M，其中 N=1,2...(column number-2)。待圖片分析後之結果，將遵循上述原理，並依序（第一列由左而右、最末列由左而右）命名為 1-(2K+1)以及 (2×row number-1)-(2K+1)，其中 K=1,2...(column number-2)。

類別十一、此類別屬於「非重疊區塊」，並根據上述重疊原理中可得知此類別：寬 = $\frac{1}{3}$ × 輸入圖片之寬；高 = $\frac{1}{3}$ × 輸入圖片之高。同時，此類別中進行圖片分析所相對應的影像編碼皆為 (P+1)-(N+1)-M，其中 P=1,2...(row number-2)、N=1,2...(column number-2)。待圖片分析後之結果，將遵循上述原理，並依序（由



左而右、由上而下) 命名為(2K+1)-(2J+1)，其中 $K=1,2,\dots(\text{row number}-2)$ 、 $J=1,2,\dots(\text{column number}-2)$ 。

最後即可依照圖片分析的結果以及其對應的輸出編號 (row)-(column)，如 Figure 3.16，直接將照片進行縫合，即可完成全域圖之分析。

1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	
2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	...
3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	
		⋮			

Figure 3.16 縫合對應編號圖

3.3.8 中間點定位

我們可以藉由上述步驟得出一張待移除細胞的全域圖(whole well)，如 Figure 3.17。現實生活中，我們必須使用移液器針對細胞進行抽取而使已分化的細胞不會繼續影響健康的細胞，而移液器吸頭大小與細胞大小有很大的差異，移液器吸頭依舊無法移除每一格輸出的小方格，亦或小區塊的已分化細胞對健康細胞影響的程度有限，因此，為配合實際應用情形，將忽略全域圖中較小的區塊，如 Figure 3.18，僅針對較大連續面積的區塊進行路徑的規劃及模擬。

其中，排除較小區塊的方式為，利用圖中的畫素數量的多寡作為面積區塊大小的數量依據。首先，我將每一個「連續」且「同色」的區塊視為一完整區塊，再針對這些完整區塊進行畫素數量的計數，若這些像素區塊的總數比設定值低則可忽略此一完整區塊；反之，若這些像素區塊的總數比設定值高則保留。

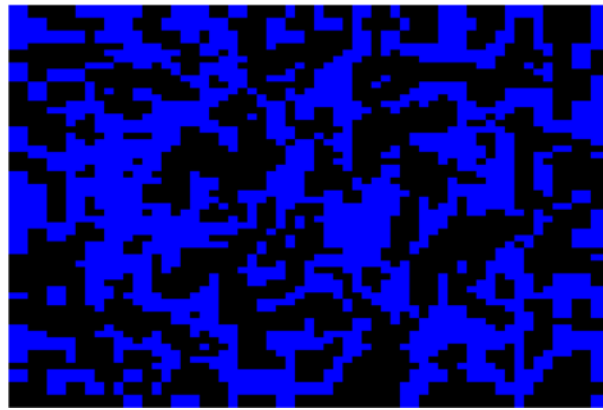


Figure 3.17 原始全域圖

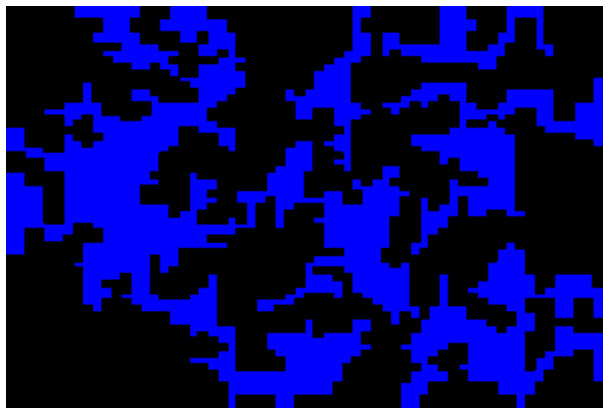


Figure 3.18 忽略較小區塊的全域圖

接著，為了可以精準的移除已分化細胞，必須規劃一路徑，使機械手臂可以準確地操控移液器至目標位置，達到吸引之目的，本實驗直接利用上述的結果圖進行分析。首先，從第一列向右對每一個畫素顏色進行偵測，當偵測到指定顏色時，並開始計數，直到該指定顏色結束，第二，利用此計數值與設定值進行對比，若此計數值大於設定值，則可針對此一連續指定顏色區塊的中點進行標點，並將該計數值歸零，反覆上述步驟；反之，若此計數值小於設定值，則可直接將該計數值歸零，如 Figure 3.21。其中，利用設定值作為計數值的限制條件原因為：有可能此整體區塊包含了眾多列與行（二維），而中間點的尋找只針對每一「列」的「連續」區塊（一維），因此若此一連續區塊太小（短），吸引器的尺寸維度依舊太大，無法到達，但若直接將此一連續區塊忽略，則會造成二維面積的喪失，故於此步驟中，依舊將原面積保留，僅不針對其作中間點尋找的動作。

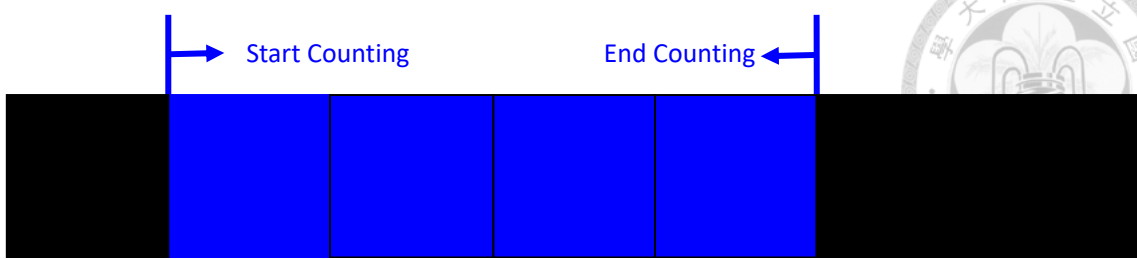


Figure 3.19 計數規則

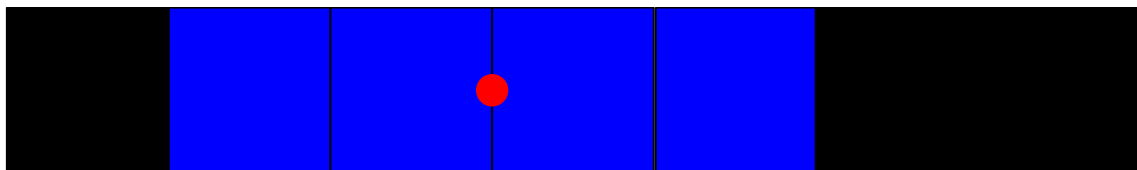


Figure 3.20 中間點標示

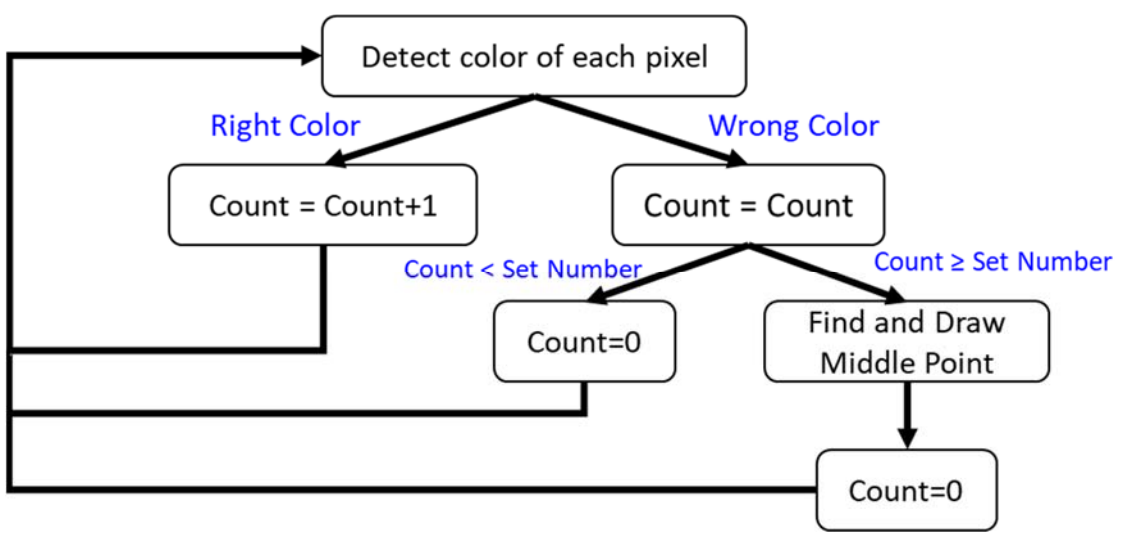


Figure 3.21 中間點運算邏輯圖

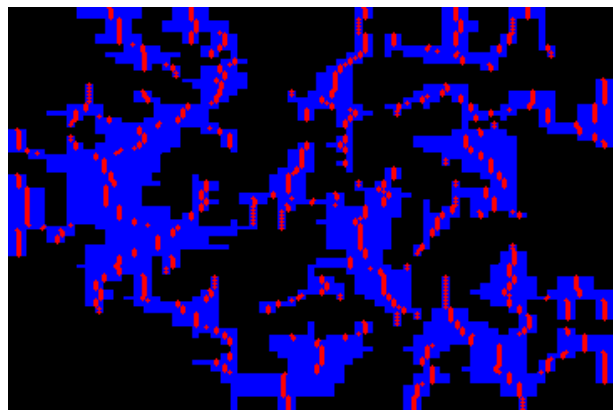


Figure 3.22 中間點尋找結果圖



3.3.9 路徑規劃 [19]

經由 3.3.7 項中所定位出的中間點皆為路徑上的必要點，也就是說，這些必要點位置為未來移液器進行細胞移除動作時一定會到達的點位。然而，由上項中所計算出的中間點資訊僅有點位的座標並無先後順序，因此必須針對這些座標進行路徑的規劃，使得移液器可以依照所規劃的路徑移動，提升細胞移除之效率。

平面座標系中，已知兩點可連為一線，而路徑規劃則是利用許多已知點，進一步推估出理想曲線或折線，並以此線作為路徑。此外，全域圖中並非所有待移除細胞區塊皆為連續區塊，可能分散分佈於圖中，故會預先將各區塊拆開分別進行路徑分析，最終再將所有區塊之結果疊加，則可完成全域圖的路徑規劃。

本實驗中將「最短距離之兩點進行連接」作為路徑之規劃原則，運算邏輯如 Figure 3.23，因此首先針對最上層之中間點（下圖中點編號 1）與剩餘其他中間點進行距離運算，再從其中找出最短距離（下圖中點編號 2）並利用此二點連為一線，為避免某中間點重複運算以及保持路徑之連續性，因此直接繼續利用此第二點（下圖中點編號 2）重複上述之運算找出第三點（下圖中點編號 3）並連接，以此類推，結果如 Figure 3.24 所示。此外，由於此路徑並非封閉或單一終點之曲線，可能呈現具有多分支之路徑，因此額外利用兩點間距離之最大值作為邊界條件，當某一中間點與其他點之距離大於設定值，則可將此點視為路徑之終點，結束距離運算。最終再將所有區塊之路徑圖進行疊加，完成全域圖路徑規劃。

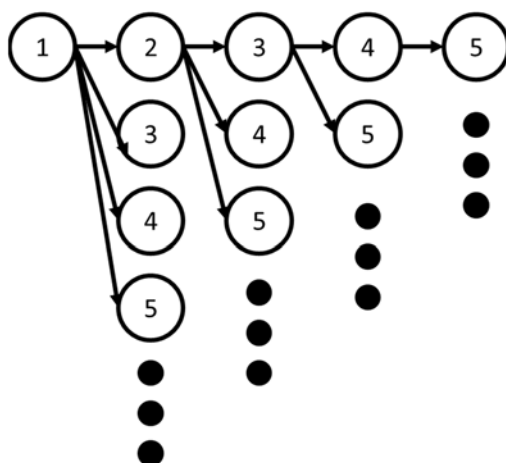


Figure 3.23 各點距離的計算順序

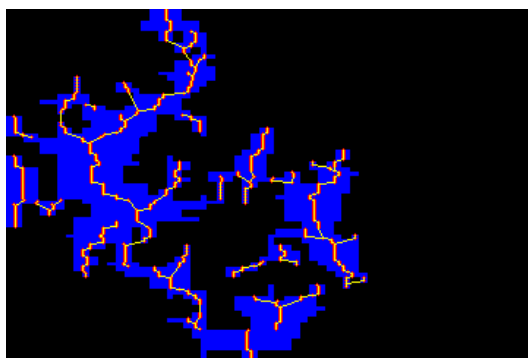


Figure 3.24 單一區塊路徑規劃

3.3.10 實驗結果

為了可以清楚地將實驗結果與實際情形進行比對，因此搭配由 Pablo d'Angelo 為主開發商所開發之全景影像拼接軟體 Hugin 使用。此程序使用相鄰照片互有重疊部分作為尋找控制點之範圍，並於該區域中利用影像處理方式從中找出影像中相同點作為控制點，並利用這些控制點對影像進行拼接處理，最後於拼接處進行亮度及模糊化等步驟，即可完成一張由多張子影像組成之全景圖。

本實驗中，總共拍攝 10 行 10 列共 100 張細胞影像，經 Hugin 進行影像拼接後所得之全景影像如 Figure 3.25。由於本實驗中 3.3.4 項「圖像分割」步驟之目的為提高輪廓提取時之精確度，理論上分割區塊的數量會與精確度成正比，分割區塊越多精準度則會越高，為驗證此理論，本實驗同時進行三種不同分割區塊數量之圖



像分割：無圖像分割步驟（分割區塊數量為 1）以及其他兩種分割區塊數量，分別切割成 3 行 3 列共 9 塊以及 5 行 5 列共 25 塊，實驗結果依序為 Figure 3.26、Figure 3.27、Figure 3.28。



Figure 3.25 真實縫合圖

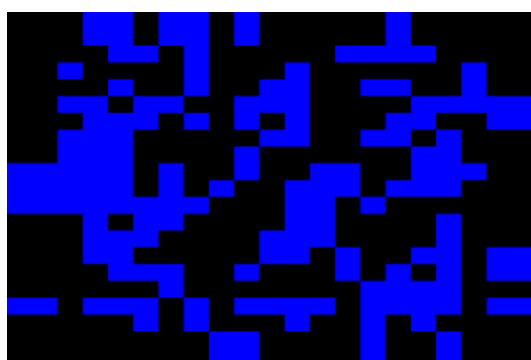


Figure 3.26 全域圖-無圖像分割

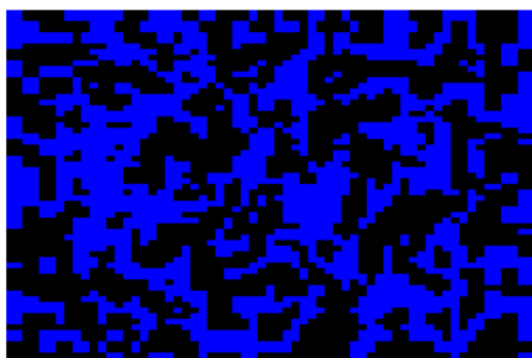


Figure 3.27 全域圖-圖像分割(3×3)

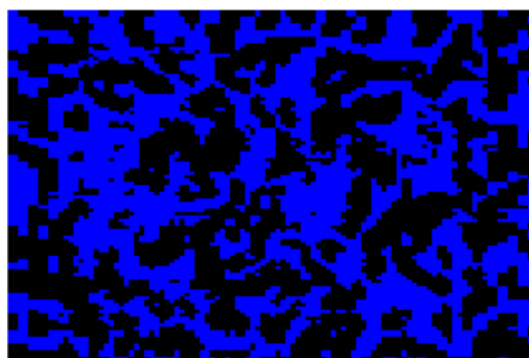


Figure 3.28 全域圖-圖像分割(5×5)

由上述實驗結果中可以總結兩結論。第一、經本實驗設計之實驗步驟可有效區隔含有細胞區域以及背景區域，且經縫合動作後呈現之全域圖確實可表達實際細胞分佈情況；第二、當圖像分割所使用的分割區塊數越多，確實可提升影像輪廓提取之精確度，因此可以發現上述三種實驗結果中，取 25 塊分割數目之圖像分割步驟所得出之全域圖 (Figure 3.28) 與實際情況 (Figure 3.25) 相比具有最佳之精確度。最後即可針對全域圖進行整體的路徑規劃，結果如 Figure 3.29。

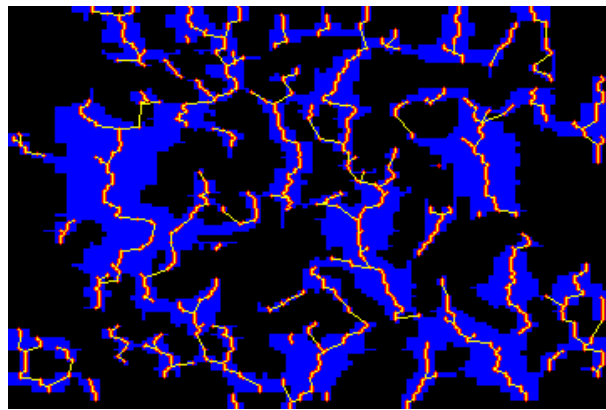


Figure 3.29 實驗二之實驗路徑規劃圖

3.4 實驗三、細胞辨識搭配全域圖分析

本實驗將綜合實驗一及實驗二運用於實際情況中，最終探討整體成效。為了模擬幹細胞同時有分化以及未分化的情況，使用特殊手法將兩種不同細胞，分別為 WA09 以及 HEK293T 細胞，培養於同一盤培養皿上，其中，WA09 為一種人類幹細胞，而 HEK293T 則屬於一種人類癌症細胞，本實驗中將 WA09 視為「未分化之幹細胞」、HEK293T 視為「已分化之幹細胞」。

3.4.1 實驗流程

本實驗所使用之幹細胞與 3.2 節實驗一不同，因此需調整細胞辨識之篩選條件，此外，也多加入「亮度分析」作為新增之篩選條件，如 Figure 3.30 中使用紅色字體標示之，接著便接續將新的影像辨識結果進行全域圖縫合，輸出一含有「未分

化幹細胞」以及「已分化幹細胞」結果之全域圖。由於本計畫最終目標為「保留未分化幹細胞並移除已分化幹細胞」，因此得到幹細胞生長情況後，即可利用此全域圖中待移除幹細胞分佈面積進行軌跡分析，最終即可得出移液器預經之座標點位以及軌跡。本實驗之完整步驟流程圖如 Figure 3.30。

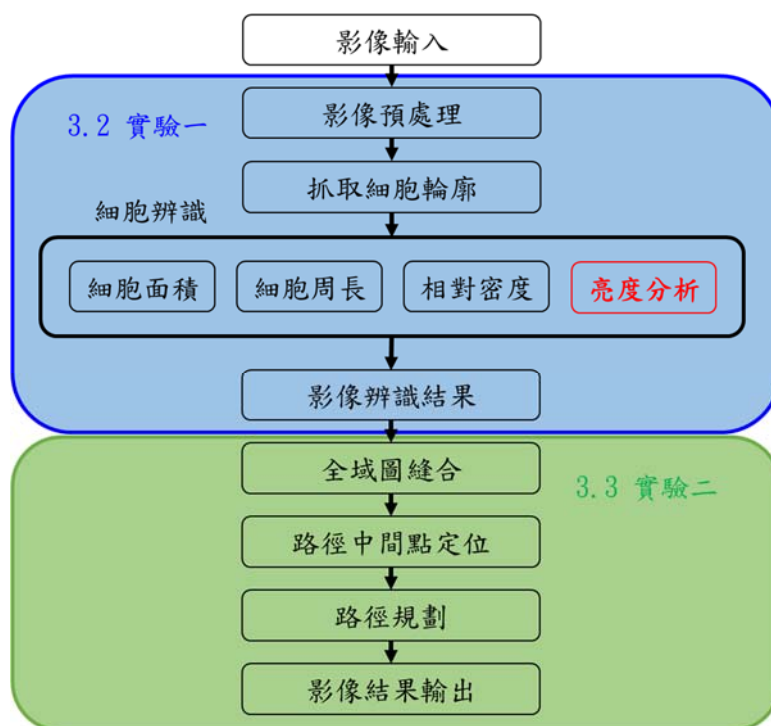


Figure 3.30 實驗三之實驗流程圖

3.4.2 細胞介紹

本實驗使用了兩種不同的細胞，分別為 WA09 及 HEK293T 細胞。WA09 是一種具有良好分化能力的人類胚胎幹細胞，通常稱之為 H9（以下將以此稱之），當 H9 尚未分化時，其細胞的型態較其他細胞「小」且生長模式較為「密集聚集」，而當其分化後細胞形態便會轉變成較大的細胞且逐漸分散，不再呈現聚集樣。HEK293 為人類胚胎腎細胞的細胞系之一，其培養容易且轉載效率高，因此其深受研究學者喜愛。而本實驗中所使用之 HEK293T 細胞屬於由 HEK293 細胞系衍生的一種細胞，由於其具備之特質，常用於表達生物蛋白之功用或作為轉載病毒之載體，該細胞型態與 H9 相比較「大」且生長模式較「分散」。

本實驗使用未分化的 H9 細胞模擬「未分化之幹細胞」作為不需移除的細胞，而 HEK293T 細胞則模擬「已分化的幹細胞」，也就是待移除細胞。之所以使用 HEK293T 細胞作為分化細胞之模擬原因，是因為幹細胞的培養過程複雜且困難，很難同時於一盤培養皿中同時養出未分化以及已分化的幹細胞，經過多次試驗，結果只有兩種：分別為全部都是未分化的幹細胞或全部都是已分化的幹細胞。因此，本實驗利用人工將兩種不同的細胞培養於同一培養皿上，進一步模擬待移除細胞（HEK293T 細胞），以及存留培養皿細胞（H9 細胞）。Figure 3.31 為藉由顯微鏡觀察同時養殖兩種不同細胞的情形，大致上我們可以很清楚地看出 H9 細胞區塊與 HEK293T 細胞區塊的不同。Figure 3.31 中細胞邊界較明顯且細胞較大的為 HEK293T 細胞，而細胞生長情況較緊密且小的細胞為 H9。

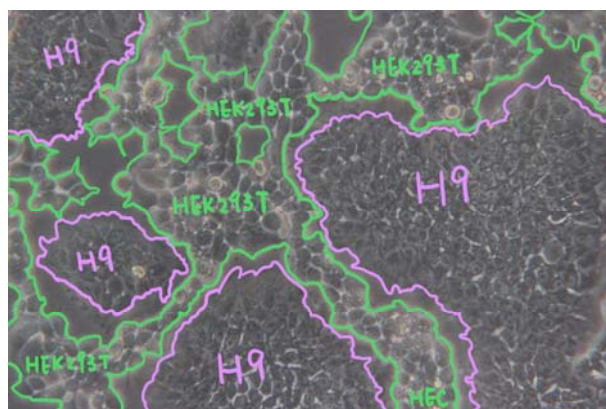


Figure 3.31 H9 細胞及 HEK293T 細胞於同一培養皿影像

3.4.3 細胞辨識

本實驗使用 H9 與 HEK293T 細胞模擬幹細胞分化及未分化與前述 3.2 節實驗一所使用真實未分化及分化之幹細胞不同，因此進行細胞辨識的條件當然也不同。由 3.3.2 項中可知 HEK293T 細胞與 H9 細胞有許多形態上的不同。儘管如此，某些特定情況下，兩者細胞型態卻非常相似，若僅使用周長、面積以及相對密度作為辨識條件不足矣，故於本實驗中會再多加入一項篩選辨識條件，提升辨識準確度。

由於 HEK293T 細胞生長較為立體，因此該細胞團與培養液或 H9 細胞的接觸邊界會有較亮且明顯的輪廓，本實驗中則運用此特性作為新增之篩選條件。首先，先藉由各細胞之輪廓周長、面積以及相對密度先進行第一步的篩選，同時，也可於此步驟中，發現 H9 細胞中有少數情況(多位於細胞團正中央)會被判定為 HEK293T 細胞，如 Figure 3.33，仔細觀察，則可發現此區塊的細胞型態確實與 HEK293T 細胞非常相似，故特增一篩選條件修正此區塊的錯誤辨識。

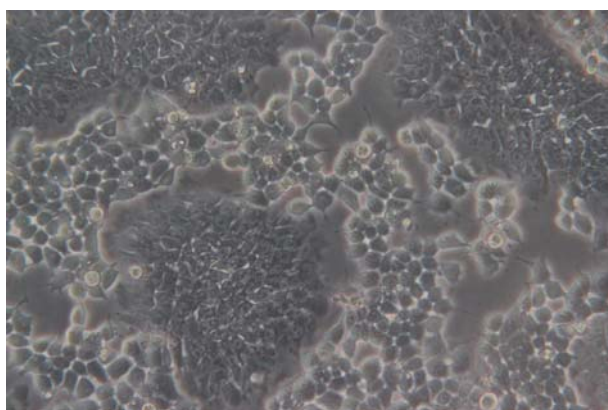


Figure 3.32 細胞原圖

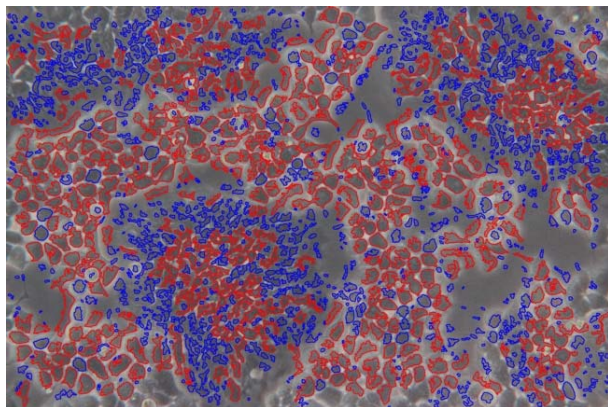


Figure 3.33 初步細胞辨識結果

根據細胞學可知，細胞多由細胞團之外圍細胞開始分化，僅極少數情況會呈現「自細胞團中央之細胞開始分化」情形，因此可以假定於 H9 細胞中央被判定為 HEK293T 細胞的區域實屬 H9 細胞。為驗證此假設，可利用上述 HEK293T 細胞團

具有較亮且明顯的輪廓特性進行檢核，若假設區域外圍有此輪廓存在（實屬 HEK293T 細胞團），則為錯誤假設，該區塊辨識結果仍應標示為 HEK293T 細胞；反之，若假設區域外圍無此輪廓存在（實屬非 HEK293T 細胞團），則為正確假設，該區塊辨識結果需改為 H9 細胞，Figure 3.34 中黃色標示區塊則屬之。最後即可發現：經由上述多架設一層篩選條件後，細胞辨識結果的正確率確實改善許多。

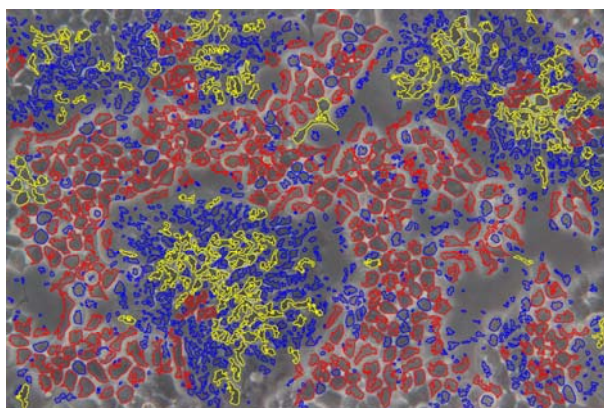


Figure 3.34 修正後之細胞辨識結果圖


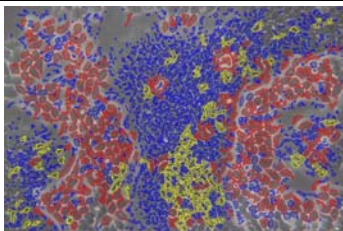

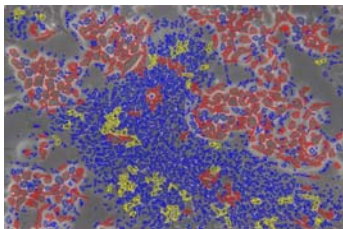

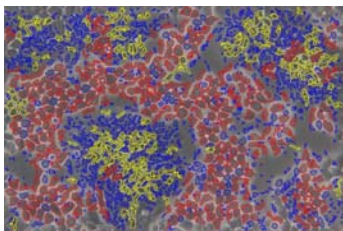

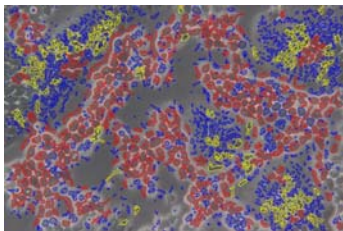

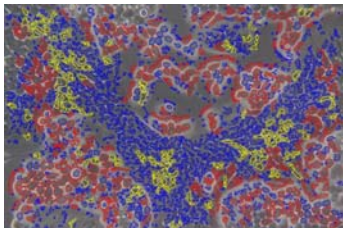
3.4.4 實驗結果

由於本實驗有針對細胞辨識步驟進行修正，與 3.2 實驗一不同，因此本項將針對實驗結果分成兩部分進行探討，第一單就細胞辨識結果進行分析，第二為整體結果分析。

Table 3.1 中，第一列為細胞原圖及第二列為經細胞辨識後之結果。本實驗由於沒有如 3.2 實驗一中具有經人工標籤之準確結果進行準確率之計算，因此只能藉由整體趨勢初步判別結果之正確與否。細胞辨識結果中，標示為紅色者為 HEK293T 細胞；標示為藍色者為 H9 細胞；標示為黃色者則為經特殊判別處理之細胞，這些細胞經型態篩選後原為 HEK293T 細胞，然而因細胞生長要件（一團 H9 細胞中較不會長出 HEK293T 細胞）原因，因此這些細胞實際上為 H9 細胞的機率極大，故將這些細胞以黃色作為特殊標示。Table 3.6 中可發現以整體趨勢來看，辨識結果大

致正確，但其中含有三項缺失，第一項缺失為：影像四周接近邊緣處會發生輪廓抓取遺失的狀況，導致該區域的細胞無法經過辨識過程，因而無法輸出辨識結果；第二項缺失為：由於細胞辨識的篩選條件是藉由細胞型態進行辨別，因此當兩者的細胞型態相似時，則會發生辨識結果錯誤；第三項缺失則是影像雜訊的處理並非完全，導致辨識結果中仍有許多雜訊被辨識為 H9 細胞。

Table 3.6 細胞辨識結果表

細胞原圖	細胞辨識結果
	
	
	
	
	

首先，為確保縫合軟體 Hugin 進行縫合時無失真情形，於細胞影像拍攝時，本實驗除了使用一貫物鏡外，額外使用再低一倍率的物鏡並拍攝，再將兩者縫合後的影像進行對比，Figure 3.35 為利用低倍率物鏡共 20 張（5 行 4 列）影像縫合後之結果，圖 Figure 3.36 為利用高倍率物鏡共 100 張（10 行 10 列）影像縫合後之結果，可以發現經不同倍率物鏡所拍攝出不同影像所縫合出的結果相同，因此可證實縫合軟體 Hugin 並無失真情形。



Figure 3.35 低倍率縫合圖



Figure 3.36 高倍率縫合圖

接著，將細胞辨識結果經圖像分割，圖像分割的數量為將圖片分析後影像分割成 3 行 3 列共 9 張子影像、接著進行圖像近似處理最後再做縫合動作，輸出一大範圍全域圖，結果如 Figure 3.37。由結果中，可以發現藍色區塊確實有良好地表現出原始圖中 H9 細胞的分佈，然而紅色區塊於表達 HEK293T 細胞時卻有明顯的錯誤。可能的原因有二：第一、因圖像分割所分割的數量過少，使得於圖像近似處理時，導致特徵點遺失；第二、可能因進行近似處理時採用 50% 作為近似條件，當藍色區塊所佔面積大於 50% 則可將整體影像視為藍色，同理，若紅色區塊所佔面積大於 50% 則可將整體影像視為紅色，而當紅色區塊以及藍色區塊都不及 50% 實則將整體影像視為黑色。然而如此的近似法會於特定情況中產生錯誤：當一張影像中藍色及紅色所佔百分比皆接近 50%，但卻都無超過 50% 的情況下，按照所設計的近似邏輯，該影像會被視為黑色，但實際情況（紅色及藍色皆接近 50%）卻與輸出結果（黑色）相差甚遠。於是，本實驗又再進一步進行圖像分割的數量為將圖片分

析後影像分割成 5 行 5 列共 25 張子影像的處理，所得到的輸出結果如 Figure 3.38，由結果中可以發現提高圖像分割數量確實可以改善此錯誤，但仍有些許缺失存在。

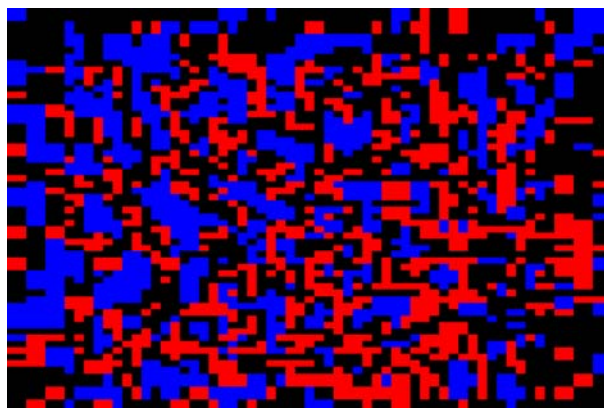


Figure 3.37 全域圖-圖像分割(3×3)

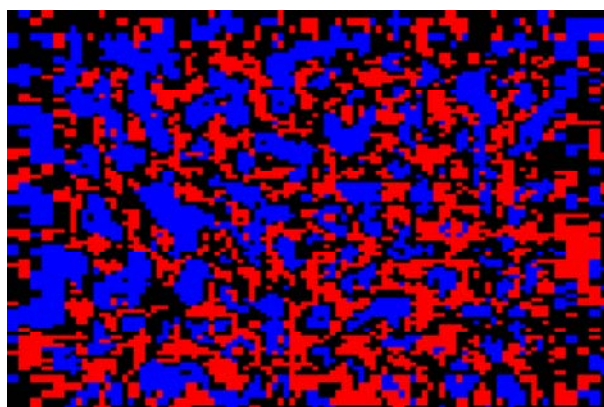


Figure 3.38 全域圖-圖像分割(5×5)

最後，藉由上述全域圖縫合後之結果，進行路徑的規劃，如 Figure 3.39。

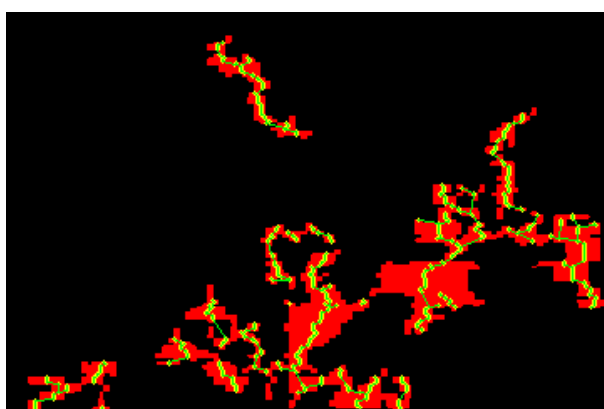


Figure 3.39 欲移除幹細胞之路徑圖



3.4.5 與人工智能結果比較

同 3.2.6 項，一樣將利用電腦影像處理方式進行幹細胞辨識結果與利用人工智能進行幹細胞辨識的結果做探討。Table 3.7 中，第一行為幹細胞原圖；第二行為本實驗之電腦辨識結果；第三列為人工智能辨識結果。

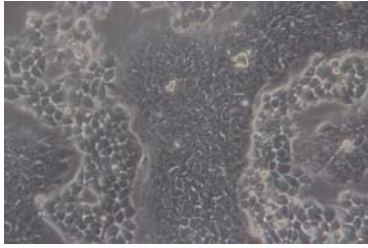
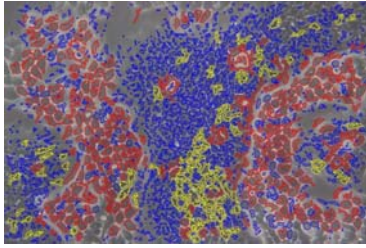
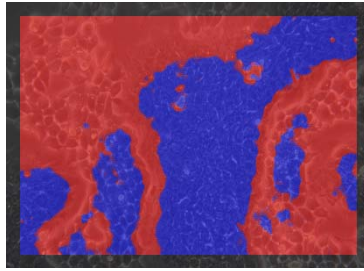
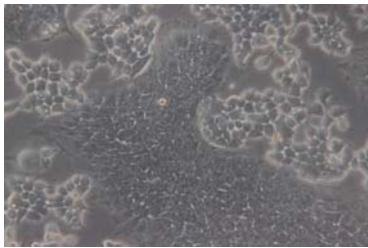
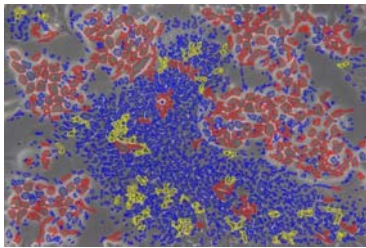
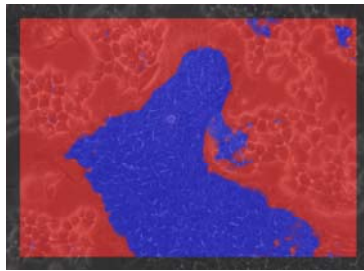

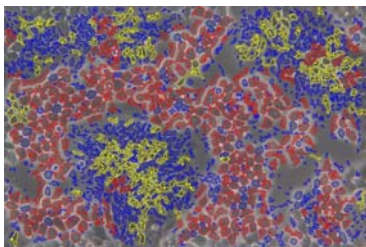
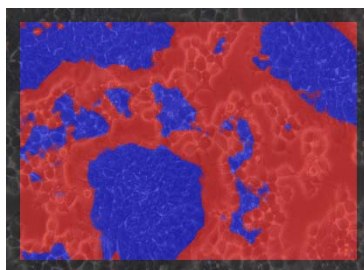

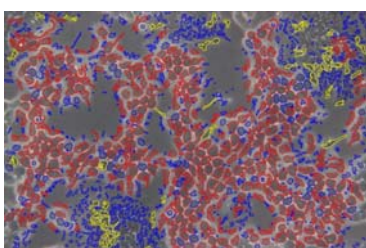
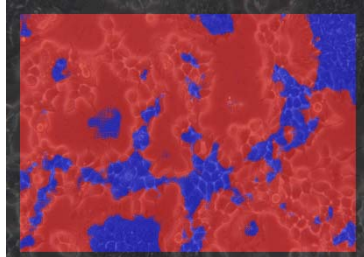
由 Table 3.7 可觀察出，不論是本實驗之幹細胞辨識結果，亦或是他項研究中利用人工智能之 U-Net 架構進行幹細胞辨識的結果中，皆可有良好之辨識結果，兩者所辨識出的結果也近乎相似，因此雖無由人工標記之正確結果進行比較分析，仍可推判本實驗之幹細胞辨識結果無誤，精確度相當高。

雖為如此，由 Table 3.7 仍可發現，如 3.4.4 項中所分析，若僅利用細胞形態學進行辨識時，會有錯誤產生。由於幹細胞原圖中有少數 H9 細胞與 HEK293T 細胞的細胞型態非常相似，因此若單就型態學分析，經本實驗電腦影像辨識後初步會將型態相似的細胞視為 HEK293T 細胞，如 Table 3.7 中第二行黃色標註區塊，但若加入幹細胞生長條件（H9 細胞團中很少會有 HEK293T 細胞存在）進入判斷時，則可將其視為 H9 細胞。同理，利用人工智能進行幹細胞辨識時，由於幹細胞原圖相同，型態相似的 H9 細胞與 HEK293T 細胞依舊存在，因此也會發生上述之問題，只是人工智能會將型態相似的細胞視為 H9 細胞，因此由 Table 3.7 中第三行可以看出該類型的細胞會呈現藍色，恰好與本實驗相反。

此外，由 Table 3.7 中也可發現本實驗之幹細胞辨識結果圖中，除了未分化幹細胞區域（藍色區域以及黃色區域）以及已分化幹細胞區域（紅色區域）外，尚存在背景區域（黑色區域）。然而，經人工智能 U-Net 架構運算後而得之辨識結果則僅剩未分化幹細胞區域（藍色區域）以及已分化幹細胞區域（紅色區域），並無背景區域存在，且背景區塊也並無辨識為特定幹細胞之趨勢。初步推估會產生此情況之原因有二，分別為：一、因 U-Net 運算中，侵蝕以及膨脹運算較深，因此背景會

被侵蝕至消失；二、因利用 U-Net 學習訓練時是利用真實未分化以及已分化幹細胞，而本實驗中，則是利用人工手法將 H9 細胞及 HEK293T 細胞培養於同一培養皿中，並利用 HEK293T 細胞模擬已分化幹細胞，因此與最初 U-Net 學習訓練時之情況不同，固然辨識結果之精確度會下降。

Table 3.7 電腦影像辨識結果與人工智能辨識結果比較表

幹細胞原圖	電腦影像辨識結果圖	人工智能辨識結果圖
		
		
		
		

第四章 結論與未來展望



4.1 結論

綜合本論文內容，本研究針對「利用機器人模擬培養幹細胞系統」同時進行硬體及軟體的設計。

硬體方面，由於本實驗室並非專業細胞培養實驗室，因此原系統利用單一開放開口之壓克力箱模擬培養箱以放置培養皿，然而，實際上細胞培養箱必須為一封閉環境才可針對內部進行溫度、濕度、二氧化碳濃度……等因素調控。為使系統更貼近實際情況，且可搭配機械手臂運行之動作，於本研究中設計一可配合原壓克力箱大小之側開式自動門，使該壓克力箱成為如真實培養箱一般之封閉系統，並將自動門與機器人兩者之控制程式相互搭配，達最佳效益。


軟體方面，則是利用機器視覺模擬細胞培養人員眼睛及大腦判斷，故針對機器視覺設計一系列之影響處理步驟。首先，利用影像預處理搭配輪廓抓取以及利用細胞面積、周長、相對密度等篩選條件進行幹細胞分化與否之辨別，接著將前述結果藉由圖片分析及近似法並搭配圖像分割等處理，最終利用多張影像縫合成一大範圍之幹細胞辨別結果。進行幹細胞培養時，為避免已分化幹細胞催化未分化幹細胞並加速其分化速率，實際會使用移液器將已分化幹細胞進行移除動作，故本論文也利用前述大範圍之幹細胞辨別結果針對辨別為已分化幹細胞區塊，進行移液器之路徑規劃，完整模擬真實幹細胞培養時之所有步驟。

4.2 未來展望

「機器人模擬培養幹細胞系統」的創建主要分為兩大部分，分別為「利用機械手臂模擬培養人員雙手之動作」以及「利用機器視覺模擬培養人員眼睛以及大腦運作」，本實驗則是針對後者進行研究。

由於受限於實驗室環境設備因素，因此並無於本實驗室進行幹細胞的培養，本論文中影像數據的拍攝皆於國立台灣大學基因蛋白研究所實驗室完成，再將這些影像數據帶回本實驗室進行後續影像分析。若欲延伸本論文之內容以完善該系統實際使用，可以考慮做以下改進：

1. 將本實驗所使用之機器手臂移至基因蛋白研究所之細胞培養實驗室，使機械手臂可搭配培養箱及顯微鏡等實際幹細胞培養所需設備使用，並將顯微鏡上搭配之數位相機連接至電腦，使幹細胞影像提取後可直接傳輸至電腦馬上進行細胞辨識、全域圖縫合及移液器軌跡規劃等影像處理步驟，再將軌跡規劃之點位馬上回授至機械手臂，直接進行細胞移除動作，即可確實進行「機器人模擬培養幹細胞系統」。
2. 由於目前幹細胞拍攝時是利用手動移動培養皿方式進行拍攝，導致取得之相鄰影像重疊面積並非準確 $\frac{1}{3}$ ，造成相鄰重疊區塊並非相同，進一步於影像分析時發生誤差。因此，若於顯微鏡之載物平台上裝設一「可控制之自動 XY 位移平台」即可修正此誤差：利用控制程式撰寫操作該平台，便可使培養皿於影像拍攝時每一次移動皆為準確數值。此外，由於該平台是經由控制程式所操控，同時也可大幅提升系統之自動化程度。
3. 本論文中「影像近似法」的使用是以 50%作為近似條件。然而此近似條件，會於特定狀況（藍色或紅色所佔百分比皆接近 50%，但都未超過 50%）發生錯誤，於上述情況中，系統會將其近似於無幹細胞區塊（黑色），但實際情形卻相差甚遠。為修正此錯誤，應增加近似篩選條件，使採取影像近似法後結果與實際幹細胞生長情況相符。



4. 3.4 節實驗三所使用之細胞是利用人工特殊培養技術將兩種不同的細胞於同一培養皿中培養，分別將 H9 及 HEK293T 模擬未分化幹細胞及已分化幹細胞，非實際幹細胞自行分化之結果，因此無法驗證本辨識系統、全域圖縫合及移液器之軌跡規劃於實際應用情形是否適當。因此，若未來欲優化此系統，可以嘗試培養真實幹細胞，使其自然分化，並利用本系統進行一系列之影像處理及細胞移除動作，即可於其中再針對誤差發生處進行修正。

參考文獻



- [1] Brandel. , “Cytogration System”
<http://www.brandel.com/integrationinvitro.html>

- [2] SelectScience, “CompacT SelecT SC Automatic stem cell culture system”
<https://www.selectscience.net/products/compact-select-sc-automated-stem-cell-culture-system/?prodID=13635>

- [3] B. Horn, B. Klaus, Robot Vision, MIT Press, 1986.

- [4] P. Gehler, S. Nowozin, On feature combination for multiclass object classification,
IEEE 12th International Conference on Computer Vision, 2009

- [5] F. Scotti, Robust segmentation and measurements techniques of white cells in
blood microscope image, IMTC Instrumentation and Measurement, 2006.

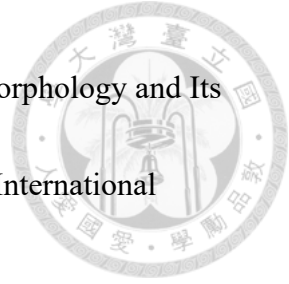
- [6] N. Otsu, A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms, in Systems,
Man, and Cybernetics. IEEE trans., 1979.

- [7] S. Belongie, J. Malik, and J. Puzicha. Shape matching and object recognition using
shape contexts. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence,
2002

- [8] Z. Nan, Q. Xu, Multiple-cell recognition and path planning for robotic
microinjection system. Chinese Control Conference, 2017



- [9] D. Kami et al., "Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine," *BMC biotechnology*, vol. 13, no. 1, 2013.
- [10] S. Konagaya, T. Ando, T. Yamauchi, H. Suemori, and H. Iwata, "Long-term maintenance of human induced pluripotent stem cells by automated cell culture system," *Scientific reports*, vol. 5, no. 1, 2015.
- [11] U. Marx et al., "Automatic production of induced pluripotent stem cells," *Procedia CIRP*, vol. 5, 2013.
- [12] R. Nagasaka et al., "Visualization of morphological categories of colonies for monitoring of effect on induced pluripotent stem cell culture status," *Regenerative Therapy*, vol. 6, 2017.
- [13] M. E. Kempner and R. A. Felder, "A review of cell culture automation," *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation*, vol. 7, no. 2, pp. 56-62, 2002.
- [14] M. F. Cowlshaw, "Fundamental requirements for picture presentation," *Society For Information Display*, vol. 26, no. 2, 1985



[15] J. Angulo, S. Velasco-Forero, F. Meyer, 2017, Mathematical Morphology and Its

Applications to Signal and Image Processing, France, Springer International

Publishing

[16] J. Kittler, J. Illingworth, Minimum Error Thresholding, Pattern Recognition,

vol.19, no.1, p.41-47, 1986

[17] Pierre D. Wellner, Adaptive Thresholding for the DigitalDesk, EuroPARC

Technical Report EPC-93-110

[18] L. G. Shapiro, G. C. Stockman, Computer Vision, United States, Pearson

Publishing

[19] X. Jiang, E. Barnett, C. Gosselin, Dynamic Point-to-Point Trajectory Planning

Beyond the Static Workspace for Six-DOF Cable-Suspended Parallel Robot, IEEE

Transactions on Robotics, vol.34, no.3, June 2018

[20] T. Piotrowski, O. Rippel, A. Elanzew, B. Nießing, S. Stucken, S. Jung, N. König,

S. Haupt, L. Stappert, O. Brüstle, R. Schmitt, S. Jonas, Deep-learning-based multi-

class segmentation for automated non-invasive routine assessment of human

pluripotent stem cell culture status, Computers in Biology and Medicine 129-

104172, 2021

- [21] T. Leemhuis, D. Padley, C. Keever-Taylor, D. Niederwieser, T. Teshima, F. Lanza, C. Chabannon, P. Szabolcs, A. Bazarbachi, MBC Koh, Essential requirements for setting up a stem cell processing laboratory, Bone Marrow Transplantation, 2014

