



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

利用全域式光學同調斷層掃描術於角膜神經在疾病模  
式下的量化分析

Quantification of Corneal Nerve's Disease Model Images

Using Full-Field Optical Coherence Tomography

廖家沛

Chia-Pei Liao

指導教授：黃升龍 博士

Advisor: Sheng-Lung Huang, Ph.D.

共同指導教授：陳偉勵 醫師

Co-advisor: Wei-Li Chen, MD, Ph.D.

中華民國 111 年八月

August 2022





## 致謝

首先非常感謝指導教授黃升龍老師，在這三年提供豐富的實驗資源及指導，讓我們了解做研究的意義及精神，並在實驗陷入瓶頸時給予正確的方向引導以及訓練我們對於找到問題、解決問題並防止問題再次發生的能力。再來也特別感謝共同指導教授陳偉勵醫師抽空指導我關於角膜各層結構和亞基底神經的知識，並給予研究方向以及手術上的建議，在與陳醫師討論過程中也獲益良多。

另外要感謝陳林志傑學長帶領我熟悉 Ti:sapphire OCT 系統並在實驗上和 Matlab 軟體上都給了很多非常實用的建議，讓我加快對研究的進度。感謝陳柏穎學長幫助我熟悉 Ce<sup>3+</sup>:YAG FF OCT1 系統以及相關軟體並在我需要使用英文時幫我檢查語法。感謝林裕展學長和楊騰毅學長在修復光源時和我討論解決耦光和準值的問題，加快復原所需的時間。感謝千珍姐在 Labview 上的幫助，解決許多控制 OCT 系統所產生的問題。感謝群玲和雅婷姊幫我們處理實驗室的大小事讓我們能更專注在實驗研究上。感謝鄭婷幫忙取得檢體樣本並提供手術和神經判斷上的幫助，讓我在這三年能得到較好的角膜影像。

此外還要感謝安荷、柏彥和淑雯，因為有你們互相的討論提問與提醒，才能讓我在研究過程中少走一些彎路並開闊我的視野。其他還要感謝柏辰、惟茜、修羽、邵允、雅鈞、以佳、豫萱，非常感謝實驗室的大家在我身體不適的時候對我的諸多關照，讓我能度過最不舒服的時期。

最後感謝我的家人朋友在各個時候的支持鼓勵與陪伴，謝謝你們。



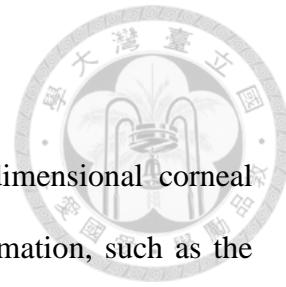
## 摘要

在角膜的研究與檢測中，建構高解析度的三維角膜影像有助於提供臨床醫生得到更多角膜診斷資訊，如在縱切面上得到各層厚度、在橫切面得到各層結構內部形貌以及角膜亞基底神經叢形貌變化。角膜是具有大量感覺神經的組織，目前許多文獻顯示許多的眼表面及系統性疾病皆與角膜亞基底神經叢形貌變化有關，例如：糖尿病I、II型與帕金森氏症。因此精確定量角膜亞基底神經形貌能為早期診斷提供幫助。

在本研究中，使用等向性之微米級空間解析度的可見光  $\text{Ce}^{3+}\text{:YAG}$  自發輻射與近紅外光  $\text{Ti:sapphire}$  自發輻射兩套光源之全域式光學同調斷層掃描術分別對檢體與活體來展示角膜各層結構之橫平面與縱平面以及三維立體影像。

藉由健康與受傷角膜模式之檢體小鼠實驗，證實本系統具有細胞等級的成像能力，並且與自行撰寫之曲面擬合與投影程式及前人的 TCCMetrics 結合能夠得到更完整的角膜亞基底神經影像並做精確的定量分析，各個健康與損傷角膜神經參數的差異以及復原趨勢大致符合生理學。具體而言，健康與受傷角膜模式之檢體小鼠結果對比為：健康的主幹神經密度為  $136.93 \pm 19.18 / \text{mm}^2$ ，損傷模式角膜之主幹神經密度在復原時間第 52 天為大約  $70 / \text{mm}^2$ ，是健康的神經的 50% 左右；健康的亞基底神經密度為  $61.46 \pm 1.78 \text{ mm} / \text{mm}^2$ ，損傷模式角膜為大約  $15 \text{ mm} / \text{mm}^2$ ，是健康神經的 24% 左右；健康分枝神經密度為  $731.00 \pm 186.19 / \text{mm}^2$ ，損傷模式角膜為大約  $40 / \text{mm}^2$ ，不到健康神經的 10%；分枝神經連接點密度為  $608.01 \pm 116.99 / \text{mm}^2$ ，損傷模式角膜為大約  $40 / \text{mm}^2$ ，不到健康神經的 10%；健康平均分枝點為  $4.57 \pm 1.41$ ，損傷模式角膜為大約 0.5，大約為健康神經的 10%；分枝主幹比為  $5.53 \pm 2.04$ ，損傷模式角膜為大約 0.5，大約為健康神經的 10%。

關鍵字：全域式光學同調斷層掃描、角膜、角膜亞基底神經、神經形貌量化



## Abstract

In corneal research and examination, high-resolution three-dimensional corneal images can help clinicians to obtain more corneal diagnostic information, such as the thickness and the internal morphology of each layer and the corneal sub-basal nerve. The cornea is a densely innervated tissue with sensory nerve fibers, and many literatures have shown that both ocular surface and systemic diseases are associated with corneal nerves, such as diabetes and Parkinson's disease. Therefore, accurate quantification of corneal nerve can provide help for early disease diagnosis.

Here we develop Ce<sup>3+</sup>:YAG and Ti:sapphire light source full-field optical coherence tomography (FF-OCT) systems with isotropic micron spatial resolution to get the en-face, cross sectional views and three-dimensional images from *ex vivo* and *in vivo* samples.

We validated the imaging ability with healthy and injured models of *ex vivo* mice, and get the accurate quantitative analysis from more complete corneal sub-basal nerve images using curve plane tracing and projection code and TCCMetrics. The comparison between quantitative results of *ex vivo* healthy and injured models mice are as follows: NFD, healthy:  $136.93 \pm 19.18 / \text{mm}^2$ , injured:  $70 / \text{mm}^2$ ; NFL, healthy:  $61.46 \pm 1.78 \text{ mm/mm}^2$ , injured:  $15 \text{ mm} / \text{mm}^2$ ; BND, healthy:  $731.00 \pm 186.19 / \text{mm}^2$ , injured:  $40 / \text{mm}^2$ ; BNCD, healthy:  $608.01 \pm 116.99 \text{ mm/mm}^2$ , injured:  $40 / \text{mm}^2$ ; BNCM,  $4.57 \pm 1.41$ , injured: 0.5; BMR, healthy:  $5.53 \pm 2.04$ , injured: 0.5; NFW, TC, K line, numbers of short nerve fiber, parallelism and standard deviation of single-image parallelism have no significant difference.

Keywords: Full-field optical coherent tomography, Cornea, Corneal sub-basal nerve, Quantitative of corneal sub-basal nerve

# 目錄

致謝 .....	I
摘要 .....	II
Abstract.....	III
目錄 .....	IV
圖目錄 .....	VI
表目錄 .....	XIV
第一章 緒論 .....	1
第二章 Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描術及眼睛結構 .....	3
2.1 光學同調斷層掃描術基本原理 .....	3
2.2 Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描系統 .....	11
2.2.1 系統簡介 .....	12
2.2.2 影像處理 .....	23
2.2.3 系統橫向與縱向解析度 .....	27
2.2.4 干涉效率與訊雜比 .....	31
2.2.5 Mirau 裝置內填充物測試.....	35
2.3 眼睛結構介紹 .....	39
第三章 角膜亞基底神經之影像處理與量化分析方法 .....	43
3.1 神經影像之處理方法 .....	43
3.2 神經影像之量化分析 .....	53
第四章 FVB 小鼠檢體角膜量測與分析結果 .....	59





4.1 Ex vivo 正常 FVB 小鼠角膜量測分析 .....	59
4.1.1 小鼠角膜樣本之製備與量測方法 .....	59
4.1.2 小鼠角膜量測結果與影像分析 .....	61
4.1.3 小鼠角膜神經影像量化分析 .....	67
4.2 Ex vivo 受傷模式 FVB 小鼠角膜量測分析 .....	72
4.2.1 小鼠角膜受傷模式之製備方法 .....	72
4.2.2 小鼠角膜量測結果與影像分析 .....	77
4.2.3 小鼠角膜神經影像量化分析 .....	81
4.3 正常與受傷模式小鼠角膜神經影像量化分析比較.....	91
第五章 結論與未來展望 .....	94
5.1 結論 .....	94
5.2 未來展望 .....	97
參考文獻 .....	98
附錄 .....	103



## 圖目錄

圖 2.1 麥克森干涉儀架構。 $E_i$ 為入射光電場； $E_R$ 為參考端反射電場； $E_S$ 為樣本端反射電場； $z_R$ 為分光鏡到參考端之長度； $z_S$ 為分光鏡到樣本端之長度。 ....	4
圖 2.2 低同調寬頻光源之 OCT 系統架構。樣品端具有多面不連續散射面， $Z_{S1} \sim Z_{Sn}$ 為分光鏡至樣品不同層介面之長度。 ....	7
圖 2.3 多散射面的 OCT 干涉訊號[11].....	10
圖 2.4 高斯函數的多頻光譜光源 $S(k)$ 與其同調函數 $\gamma(z)$ 及同調長度 $l_c$ 的關係[11]..	11
圖 2.5 簡易全域式光學同調斷層掃描系統架構 .....	12
圖 2.6 可見光源之 Mirau-based 全域式 OCT 系統架構圖。左邊方框內為光源模組，其中 445_nm LD 為波長 445 nm 的雷射二極體；Dichroic mirror 為分色鏡；Objective 1 為物鏡；Ce <sup>3+</sup> :YAG crystal fiber 為摻鈦鉻鋁石榴石晶體光纖；MMF(multi-mode fiber)為多模光纖。右邊方框內為干涉儀系統，其中 PBS (polarization beam splitter) 為極化分光鏡； $\frac{1}{4}$ wave plate 為四分之一玻片；PZT 為壓電致動器；Objective 2 為顯微物鏡(Olympus water immersion objective；20X；NA 0.5)；Mirau interferometer 為自製干涉儀組件；CCD (charge coupled device)為電荷耦合元件(IMPERX ICL-B0620)。 .....	13
圖 2.7 近紅外光源之 Mirau-based 全域式 OCT 系統架構圖。左邊方框內為光源模組，其中 520_nm LD 為波長 520 nm 的雷射二極體；PBS (polarization beam splitter) 為極化分光鏡；Dichroic mirror 為分色鏡；Objective 1 為物鏡(ZEISS；50X；NA 0.75)；Ti:sapphire crystal fiber 為摻鈦藍寶石晶體光纖；Long pass filter 為高通濾光片；MMF (multi-mode fiber)為多模光纖。右邊方框內為干涉儀模組，其中 $\frac{1}{4}$ wave plate 為四分之一玻片；PZT 為壓電致動器；Objective 2 為顯微物鏡(Olympus water immersion objective；20X；NA 0.5)；Mirau interferometer 為自製干涉儀組件；CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor)為互補式金氧半導體。 ....	14
圖 2.8 (a)可見光源 FF-OCT 光源架構圖，(b)近紅外光源 FF-OCT 光源架構圖 ....	15



圖 2.9 LHPG 系統架構圖 .....	16
圖 2.10 (a)晶體光纖生長示意圖；(b)融區圖[14] .....	17
圖 2.10 Ce <sup>3+</sup> :YAG 晶體光纖吸收頻譜[15].....	18
圖 2.11 445_nm LD 之 P-I 曲線圖 .....	18
圖 2.12 Ce <sup>3+</sup> :YAG 晶體光纖之輸出光頻譜[16].....	19
圖 2.13 445_nm LD 泵浦光源功率與Ce <sup>3+</sup> :YAG 晶體光纖 SE 功率之關係圖 .....	19
圖 2.14 Ti:sapphire 晶體光纖之吸收與放射頻譜[17].....	20
圖 2.15 Ti:sapphire 晶體光纖之輸出光頻譜[14].....	20
圖 2.16 520 nm LD 之 P-I 曲線圖 .....	21
圖 2.17 520_nm LD 泵浦光源功率與Ti:sapphire 晶體光纖 SE 功率之關係圖 .....	21
圖 2.18 (a) 可見光源 FF-OCT 干涉儀系統架構圖 、(b) 近紅外光源 FF-OCT 干涉儀 系統架構圖 .....	22
圖 2.19 極化方向示意圖 .....	23
圖 2.20 自製 Mirau 裝置架構圖與光路路徑 .....	24
圖 2.21 干涉訊號之載波訊號與包絡訊號關係圖。紅線為載波訊號；黑線為包絡訊 號。 .....	24
圖 2.22 四點運算法示意圖 .....	25
圖 2.23 圓孔繞射示意圖[18] .....	28
圖 2.24 Rayleigh criterion 示意圖[19] .....	28
圖 2.25 可見光 FF-OCT 之橫向解析度。(a)測試片量測影像；(b)訊號強度分布 ..	30
圖 2.26 近紅外光 FF-OCT 之橫向解析度。(a)測試片量測影像；(b)訊號強度分布 .....	30
圖 2.27 可見光 FF-OCT 之縱向解析度 .....	31
圖 2.28 近紅外光 FF-OCT 之縱向解析度 .....	32
圖 2.29 可見光 FF-OCT 干涉效率隨雜散光改變之理論值 .....	34

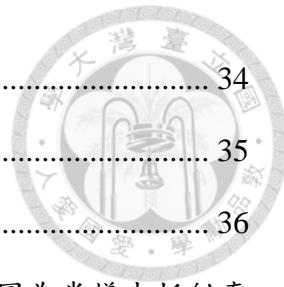


圖 2.30 可見光 FF-OCT 干涉效率測量結果 .....	34
圖 2.31 近紅外光 FF-OCT 干涉效率測量結果 .....	35
圖 2.32 SNR 計算方式示意圖 .....	36
圖 2.33 在填充物介質為空氣時的 walk-off effect 示意圖[20]。左圖為當樣本折射率為 n 且掃描深度為 d 時 confocal gate 因折射率差而偏移的距離；右圖為 coherent gate 因折射率差而偏移的距離。 .....	37
圖 2.34 填充物折射率測試圖。GP3 上放置一環狀玻璃上面再覆蓋一層玻璃，中間的空隙(箭頭處)以放置填充物，隨著掃描便可得到 GP3 上表面至上層玻璃下表面的光程。 .....	38
圖 2.35 (a)填充物為空氣時掃描得到之光程；(b)填充物為 KF-96-3000cs 時掃描得到之光程，接著除以空氣為填充物之光程即可得到 KF-96-3000cs 之折射率；(c) 填充物為 silicon oil 時掃描得到之光程，接著除以空氣為填充物之光程即可得到 silicon oil 之折射率。 .....	38
圖 2.36 橫向(a)測試片影像，(b)解析度；(c)縱向解析度與(d)干涉效率 .....	39
圖 2.37 眼球與角膜各層構造示意圖[21] .....	40
圖 2.38 角膜上皮細胞結構[22].....	41
圖 2.39 前彈力層之電子顯微鏡影像，左圖為縱切面影像，右圖為橫切面影像，Ep: epithelium ; B: Bowman's layer ; P: substantia propria ; K: keratocyte. [23] .....	41
圖 2.40 基質層膠原纖維結構示意圖[25] .....	42
圖 2.41 角膜神經分布[26].....	43
圖 3.1 亞基底神經與前彈力層示意圖。藍色箭頭所指白色區塊為前彈力層，紅色箭頭為亞基底神經。(比例尺：20 $\mu\text{m}$ ) .....	44
圖 3.2 全域式 OCT 系統的三維影像由多張平面影像組成，因此在掃描具曲率的組織樣本時，便會在單張影像觀察到多層結構。 .....	45
圖 3.3 單張影像觀察到多層結構。紅色箭頭為上皮細胞層；綠色箭頭為亞基底神經；	



藍色箭頭為前彈力層；黃色箭頭為基質層。[29] (image size : 615 μm * 615 μm)	45
圖 3.4 標定並選取位置示意圖。假設 1 為最亮點 0 為非最亮點，分次在每一行對比縱向上的點得到最亮值並記錄下其位置。	46
圖 3.5 (a)角膜 cross section 影像原圖；(b) cross section 加上標記點，藍點為選定範圍內的最亮點。(比例尺 : 20 μm)	47
圖 3.6 左圖為使用 15 次高階多項式擬合結果，右圖為使用低階多項式擬合結果。從圈出來放大的方框可以看出明顯對比，左圖明顯較完美的貼合在前彈力層上。(比例尺 : 20 μm)	48
圖 3.7 原圖至得到前彈力層擬合曲線之流程圖	48
圖 3.8 (a)原始標記點，具有誤差過大的深度資訊，(b) 經過閾值校正後誤差過大的點已被消除。(縱軸/橫軸單位 : voxel / pixel, 由於此圖為內插過因此單位換算為 0.06 μm / voxel、0.15 μm / pixel)	49
圖 3.9 藍點為原始深度資訊標記點。黃線為未經閾值校正的擬合曲線，紅線為經閾值校正的擬合曲線，可以清楚看到黃線因被極值影響的關係而偏離藍點密度最大的位置，反之紅線比黃線更精確的擬合出藍點的趨勢。(縱軸/橫軸單位 : voxel / pixel, 由於此圖為內插過因此單位換算為 0.06 μm / voxel、0.15 μm / pixel)	49
圖 3.10 多張 cross section 依次做曲線擬合並合併成三維曲面。下方圖的 scale bar 為深度資訊。(0.2 μm / voxel)	50
圖 3.11 前彈力層與亞基底神經叢三維地形圖。上方為亞基底神經叢地形圖，下方為前彈力層地形圖，兩者大約距離 1.6 μm。	51
圖 3.12 (a~d)經全域式 OCT 掃描後未經處理得到之不同深度影像。(e)經處理得到三維地形圖後投影至二維之前彈力層影像。(f) 經處理得到三維地形圖後投影至二維之亞基底神經叢影像。(比例尺 : 20 μm)	52
圖 3.13 內皮細胞層之三維地形圖。	53
圖 3.14 (a)未經程式處理得到之內皮細胞影像，因曲率關係無法看到完整的內皮細	



胞層。(b)由內皮細胞層之三維地形圖投影至二維之影像，與左圖對比可以得到更多內皮細胞層之資訊。(比例尺：20 μm) .....	53
圖 3.15 神經分類圖。左圖為亞基底神經影像原圖，右圖為經過類後的亞基底神經影像圖，紅線為主幹神經，藍線為分枝神經，綠線為短神經。 .....	54
圖 3.16 左圖為角膜亞基底神經影像，紅箭頭處為待測寬度之神經。右圖為左圖紅箭頭處亞基底神經之強度分布，右圖之紅箭頭為代測神經強度分布之半高全寬，即為其神經寬度。 .....	56
圖 3.17 K-line 各層級示意圖。紅色箭頭處之皺褶即為 K-line。[31] .....	57
圖 3.18 (a)主幹神經與分枝神經夾角示意圖，紅箭頭為主幹神經，藍箭頭為分枝神經。(b)平行性計算方式，將主幹與分枝神經的向量歸一化後做內積。 .....	59
圖 4.1 眼球放置方式示意圖 .....	61
圖 4.2 Ce <sup>3+</sup> :YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之 FVB 小鼠健康檢體角膜從上皮細胞層至前彈力層影像。(a)縱平面影像(含 4.5 μm 厚度之資訊)，(b)不同深度之橫平面影像(含 1 μm 厚度之資訊)。黃色箭頭為細胞核，紅色箭頭為亞基底神經叢，藍色箭頭為前彈力層之邊界，此組影像掃描速度為 1/8 倍速，(比例尺：20 μm) ....	64
圖 4.3 Ce <sup>3+</sup> :YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之 FVB 小鼠健康檢體角膜基質層影像。(a)基質神經影像，(b)膠原纖維束影像，(c)、(d)角膜基質細胞影像。紅色箭頭為基質神經，藍色箭頭為膠原纖維束，黃色箭頭為基質細胞。(比例尺：20 μm)	65
圖 4.4 Ce <sup>3+</sup> :YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之 FVB 小鼠健康檢體角膜基質層至內皮細胞層影像。(a)縱平面影像，(b)不同深度之橫平面影像。紅色箭頭為基質層與後彈力層邊界，黃色箭頭為後彈力層與內皮細胞層邊界，藍色箭頭為內皮細胞層。(比例尺：20 μm) .....	66
圖 4.5 (a) Ce <sup>3+</sup> :YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之 FVB 小鼠健康檢體角膜縱平面影像，(b)縱平面影像中黃線所標注位置之縱向強度分布大小。EP：epithelium；BL：Bowman's layer；ST：stroma；DM：Descemet's membrane；ED：endothelium。	

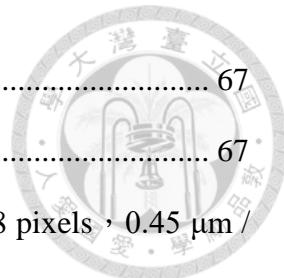


圖 4.6 角膜各層折射率[34].....	67
圖 4.7 前彈力層與亞基底神經之三維地形圖(視域大小為 648*488 pixels , 0.45 μm / pixel , 0.2 μm / voxel) 。 .....	68
圖 4.8 第一組(a)經過程式分離前之前彈力層與亞基底神經影像，(b)經過程式分離後之亞基底神經影像，(c)經過程式分離後之前彈力層影像。(比例尺：20 μm)...	68
圖 4.9 (a)第一組影像之 NeuronJ 神經追蹤圖，(b) TCCMetrics[31]量測出之數據。紅線為主幹神經，藍線為分枝神經。(比例尺：20 μm) .....	69
圖 4.10 前彈力層與亞基底神經之三維地形圖(視域大小為 648*488 pixels , 0.45 μm / pixel , 0.2 μm / voxel) .....	70
圖 4.11 第二組(a)經過程式分離前之前彈力層與亞基底神經影像，(b)經過程式分離後之亞基底神經影像，(c)經過程式分離後之前彈力層影像。(比例尺：20 μm)...	71
圖 4.12 (a)第二組影像之 NeuronJ 神經追蹤圖，(b) TCCMetrics[31]量測出之數據。紅線為主幹神經，藍線為分枝神經。(比例尺：20 μm) .....	72
圖 4.13 (a)手術用之立體顯微鏡，(b)手術實時影像，(c) FVB 小鼠環狀刮除手術示意圖，(d)直徑 3 mm 組織採樣器(編號:33-32)。 .....	75
圖 4.14 FVB 小鼠環狀刮除手術痕跡。 .....	75
圖 4.15 Ti:sapphire FF-OCT 系統所掃描之經環切刮除手術 FVB 小鼠活體右眼角膜橫切面大圖拼接影像，紅色箭頭為經 3 mm 組織採樣器環切過的痕跡。(比例尺：50 μm).....	76
圖 4.16 Ti:sapphire FF-OCT 系統所掃描之經環切刮除手術 FVB 小鼠活體右眼角膜橫切面影像，紅色箭頭為經 3 mm 組織採樣器環切過的縱向痕跡。(比例尺：20 μm)	77
圖 4.17 上圖為 FVB 小鼠活體掃描方式，下圖為環切痕跡與掃描平面形成夾角示意圖。	78



圖 4.18 Ce <sup>3+</sup> :YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之受傷角膜模式 FVB 小鼠檢體角膜從上皮細胞層至前彈力層影像。(a)縱平面影像，(b)不同深度之橫平面影像。紅色箭頭為亞基底神經叢，藍色箭頭為前彈力層之邊界。(比例尺：20 μm).....	80
圖 4.19 Ce <sup>3+</sup> :YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之受傷角膜模式 FVB 小鼠檢體角膜基質層影像。(a)膠原纖維束影像，(b)角膜基質細胞影像。藍色箭頭為膠原纖維束，黃色箭頭為基質細胞。(比例尺：20 μm).....	81
圖 4.20 Ce <sup>3+</sup> :YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之受傷角膜模式 FVB 小鼠檢體角膜基質層至內皮細胞層影像。(a)縱平面影像，(b)深度 100 μm，(c)深度 102 μm 之橫平面影像。紅色箭頭為基質層與後彈力層邊界，黃色箭頭為後彈力層與內皮細胞層邊界，藍色箭頭為內皮細胞層。(比例尺：20 μm)。 .....	82
圖 4.21 第一組受傷角膜模式之 FVB 小鼠(復原時間：14 天)檢體角膜影像之前彈力層與亞基底神經三維地形圖(視域大小為 648*488 pixels，0.45 μm / pixel，0.2 μm / voxel).....	83
圖 4.22 第一組受傷角膜模式之 FVB 小鼠(復原時間：14 天)檢體角膜影像。經過程式分離前深度為(a) 38 μm，(b) 39 μm 之神經影像。(c)經過程式分離後之亞基底神經影像，(d)經過程式分離後之前彈力層影像。紅色箭頭為亞基底神經。(比例尺：20 μm).....	84
圖 4.23 第一組受傷角膜模式之 FVB 小鼠檢體角膜影像(復原時間：14 天)之(a)NeuronJ 神經追蹤圖，(b) TCCMetrics[31]量測出之數據。紅線為主幹神經，藍線為分枝神經。(比例尺：20 μm) .....	84
圖 4.24 第二組受傷角膜模式之 FVB 小鼠(復原時間：21 天)檢體角膜影像之前彈力層與亞基底神經三維地形圖(視域大小為 648*488 pixels，0.45 μm / pixel，0.2 μm / voxel).....	85
圖 4.25 第二組受傷角膜模式之 FVB 小鼠(復原時間：21 天)檢體角膜影像。經過程式分離前深度為(a) 33 μm，(b) 34 μm 之神經影像。(c)經過程式分離後之亞基底神	



經影像，(d)經過程式分離後之前彈力層影像。紅色箭頭所指為亞基底神經。(比例尺：20 μm).....	86
圖 4.26 第二組受傷角膜模式之 FVB 小鼠檢體角膜影像(復原時間：21 天)之(a) NeuronJ 神經追蹤圖，(b) TCCMetrics 量測出之數據。紅線為主幹神經，藍線為分枝神經。(比例尺：20 μm) .....	86
圖 4.27 第三組受傷角膜模式之 FVB 小鼠(復原時間：53 天)檢體角膜影像之前彈力層與亞基底神經三維地形圖(視域大小為 648*488 pixels，0.45 μm / pixel，0.2 μm / voxel).....	87
圖 4.28 第三組受傷角膜模式之 FVB 小鼠(復原時間：53 天)檢體角膜影像。經過程式分離前深度為(a) 36 μm，(b) 37 μm 之神經影像。(c)經過程式分離後之亞基底神經影像，(d)經過程式分離後之前彈力層影像。紅色箭頭所指為亞基底神經。(比例尺：20 μm).....	88
圖 4.29 第三組受傷角膜模式之 FVB 小鼠檢體角膜影像(復原時間：53 天)之(a) NeuronJ 神經追蹤圖，(b) TCCMetrics 量測出之數據。紅線為主幹神經，藍線為分枝神經。(比例尺：20 μm) .....	88
圖 4.30 亞基底神經形貌參數對於復原天數對神經復原程度的影響與趨勢圖表。(a) NFD，(b) NFL，(c) BND，(d) BNCD，(e) BNCM，(f) BMR，(g) TC，(h) Parallelism，(i) Sigma P，(j) NFW。 .....	91
圖 4.31 健康亞基底神經形貌參數與角膜損傷之亞基底神經形貌參數對照趨勢圖表。(a) NFD，(b) NFL，(c) BND，(d) BNCD，(e) BNCM，(f) BMR，(g) TC，(h) Parallelism，(i) Sigma P，(j) NFW。——虛線為健康亞基底神經的平均值，---虛線為健康亞基底神經的標準差。 .....	94
圖 5.1 Straiko Modified Jones Tube 示意圖以及內皮細胞在裂隙燈下之影像。[41] 98	

## 表目錄



表 2.1 可見光系統之 PZT 掃描速度與四點運算張數對照表 .....	27
表 2.2 近紅外光系統之 PZT 掃描速度與四點運算張數對照表 .....	27
表 2.3 填充物黏滯性與折射率對比 .....	37
表 4.1 Ce <sup>3+</sup> :YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之 FVB 小鼠健康檢體角膜亞基底神 經量化參數統計表，(a)以前資料[31]，(b)本研究所掃描資料。 .....	73



# 第一章 緒論

角膜是光線進入眼球碰到的第一個組織，具有曲率且透明的特性。角膜結構共分為五層，從眼表至底層分別為上皮細胞層(epithelium)、前彈力層(Bowman's layer)、基質層(stroma)、後彈力層(Descemet's membrane)以及內皮細胞層(endothelium layer)。

角膜的神經分布非常密集，其具有大量的感覺神經，因此對於氣溫、壓力及疼痛非常敏感，並且角膜神經還具有供應角膜上皮養分的功能，對維持眼表健康如增生、傷口癒合等等有很大的影響[1]。由於角膜神經主要是由三叉神經(trigeminal nerve)的眼支經睫狀神經(ciliary nerve)延伸分布到角膜，因此部分由神經系統疾病造成的三叉神經損傷會反映至角膜神經[2]，因而角膜神經在科學與臨床研究上獲得高度重視。

近年來隨著對角膜亞基底神經叢(sub-basal nerve plexus)的定量分析研究，發現許多疾病與角膜亞基底神經叢的參數變化有相當大的關係。例如：一型糖尿病(type 1 diabetes mellitus) [3]、二型糖尿病(type 2 diabetes mellitus) [4]、乾眼症(dry eye disease) [5]、角膜炎(keratitis) [6]、圓錐角膜(keratoconus) [7]、帕金森氏症(Parkinson's disease) [8]、自閉症(autism)等，因此精準的角膜亞基底神經參數量化便可以做到疾病早期診斷的效果。為了能較精確且多樣的量化角膜亞基底神經，目前使用十二個參數來描述神經的樣貌，分別為：角膜亞基底神經密度(nerve fiber length density; NFL)、主幹神經密度(number of main nerve fiber density; NFD)、分枝神經密度(number of branch nerve fiber density; BND)、分枝神經點連接密度(branch nerve connected point density; BNCD)、扭曲度(tortuosity coefficient; TC)、分枝主幹比(branch main fiber ratio; BMR)、平均分枝點(branch nerve connection per main fiber; BNCM)、角膜神經寬度(corneal nerve fiber width; NFW)、角膜 K 結構(corneal K line)、短神經數(number of short nerves)、平行性(parallelism)、平行性標準差。

目前眾多角膜亞基底神經觀察研究所常用的儀器為活體共軛焦顯微鏡(in vivo confocal microscope; IVCM)，然而其橫向與縱向解析度分別為  $2\text{ }\mu\text{m}$  和  $4\text{ }\mu\text{m}$ 。在角



膜為曲率結構組織的影響下，時常無法在三維空間下詳細的描繪出神經形貌，更別說因為疾病而可能造成的前彈力層扭曲導致神經扭曲。而我們實驗室的全域式 OCT 因具有寬頻光源特性，在縱向解析度上具有微米等級的空間解析度，因此在三維的神經追蹤上是有很好的表現。

然而描述亞基底神經樣貌的各個參數是基於二維影像的量化分析，雖然全域式 OCT 具有細緻的光學切片效果，在三維上有很好的表現，但在投影至二維做量化分析時仍會因角膜曲率與前彈力層扭曲關係導致可能只有部分神經參與量化[9]，這就導致參數的不全面性。在本研究中使用具有高空間解析度的全域式 OCT，對健康與疾病的 FVB 小鼠(susceptibility to Friend leukemia virus B)分別進行檢體掃描，並藉由自行撰寫的 curve plane tracing and projection 程式，將因角膜曲率與前彈力層扭曲關係造成的神經樣貌描述不全做適當修正以得到完整十二個神經參數，得到健康與疾病的 FVB 小鼠角膜神經在量化上的差異，藉此確立我們之 Mirau-based 全域式 OCT 在經過程式修正後具有進行較精準的疾病早期診斷之能力[10]。

## 第二章 Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描

### 術與角膜結構介紹



本章將介紹全域式光學同調掃描術(Full-field optical coherence tomography; FF-OCT)的原理，2.1 節將會先介紹麥克森干涉儀的基本干涉原理，2.2 節接著延伸推導至本實驗室所使用的 Mirau-based FF-OCT 的實驗架構。最後 2.3 節介紹眼角膜分層結構與本實驗主要量測的亞基底神經叢(corneal sub-basal nerve plexus)。

### 2.1 光學同調斷層掃描術(OCT)原理

光學同調斷層掃描是利用低同調光源產生干涉的技術，而同調光干涉其最基本的架構為麥克森干涉儀(Michelson interferometer)，如圖 2.1 所示由高同調光源、參考端、樣本端、以及光偵測器所組成。此小節會先從較簡單的高同調性單頻光源進行干涉原理推導，接著推導至使用低同調寬頻光源之理論，最後說明全域式光學同調斷層掃描架構。

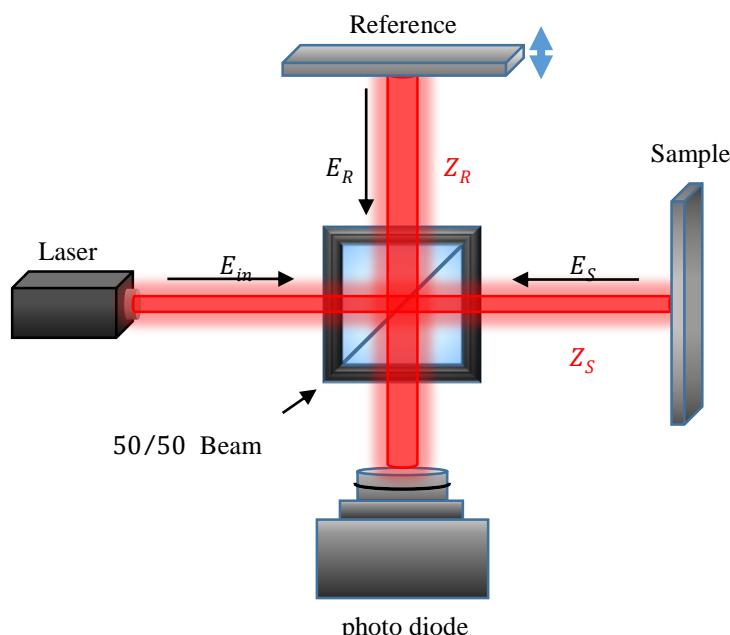


圖 2.1 麥克森干涉儀架構。 $E_{in}$ 為入射光電場； $E_R$ 、 $E_S$ 分別為參考端、樣本端反射光電場； $Z_R$ 、 $Z_S$ 分別為分光鏡至參考端、樣本端的距離。



圖 2.1 中由 laser 端發射至分光鏡之入射光電場為  $E_{in}$ 。其數學形式為 Eq. 2.1 所示：

$$E_{in} = E_0 e^{i(k_0 z - \omega_0 t)} \quad \text{Eq. 2.1}$$

在 Eq. 2.1 中， $E_0$ 為入射單頻光源之電場振幅； $k_0$ 為入射光波數，其與波長關係為  $k_0 = 2\pi/\lambda_0$ ； $\omega_0$ 為入射光角頻率，其與波長關係為  $\omega_0 = 2\pi c/\lambda_0$ ； $z$ 為光軸標，分光鏡所在設為  $z = 0$ ； $t$ 為時間。

當入射光經過分光鏡後會分為兩道強度相同的光，分別為打至參考端的參考光與打至樣本端的樣本光。參考光及樣本光在經過參考端與樣本端的反射面後會再次抵達分光鏡。此時的參考光及樣本光的電場定義為  $E_R$ 、 $E_S$ ，由於經過分光鏡後，兩道光的光強會是入射光的一半，而在此處我們是用電場表示，因此會是入射電場的  $1/\sqrt{2}$  倍，數學形式可分別由 Eq. 2.2、Eq. 2.3 表示：

$$E_R = \frac{1}{\sqrt{2}} E_{in} * r_R * e^{i2k_0 Z_R} \quad \text{Eq. 2.2}$$

$$E_S = \frac{1}{\sqrt{2}} E_{in} * r_S * e^{i2k_0 Z_S} \quad \text{Eq. 2.3}$$

在上述公式中， $E_{in}$ 為入射光電場； $r_R$ 、 $r_S$ 分別為參考端與樣本端的反射率； $Z_R$ 、 $Z_S$ 分別為分光鏡到參考端和樣本端的距離。

參考光與樣本光在經過分光鏡疊合後會因改變參考端的距離  $Z_R$  而得到不同光程差所產生的干涉訊號，最後由光偵測器接收轉換成光電流。此時的光電流  $I_D$  可由 Eq. 2.4 表示：

$$I_D = \frac{\rho}{2} \langle |E_R + E_S|^2 \rangle \quad \text{Eq. 2.4}$$

上述公式之所以要乘上  $1/2$  是因為在打入光偵測器前又再經過一次分光鏡，能量又衰減了一半，因此  $E_R$ 、 $E_S$  電場各需乘上  $1/\sqrt{2}$ 。Eq. 2.4 中  $\rho$  為光偵測器的光電轉換效率； $E_R$  為參考光的電場； $E_S$  為樣本光的電場。在得到光電流  $I_D$  後接著將 Eq. 2.2、Eq. 2.3 帶入 Eq. 2.4 便可得到 Eq. 2.5：



$$I_D = \frac{\rho}{2} * \langle |E_{in}|^2 \rangle * \left| \frac{r_R}{\sqrt{2}} e^{i2k_0 Z_R} + \frac{r_S}{\sqrt{2}} e^{i2k_0 Z_S} \right|^2 \\ = \frac{\rho}{4} * \langle |E_{in}|^2 \rangle * \left\{ r_R^2 + r_S^2 + r_R r_S [e^{i2k_0(Z_R - Z_S)} + e^{-i2k_0(Z_R - Z_S)}] \right\}^2 \quad \text{Eq. 2.5}$$

Eq. 2.5 可以將  $[e^{i2k_0(Z_R - Z_S)} + e^{-i2k_0(Z_R - Z_S)}]$  此項利用尤拉公式整理為  $2 \cos[2k_0(Z_R - Z_S)]$ ，得到 Eq. 2.6：

$$I_D = \frac{\rho}{4} * \langle |E_{in}|^2 \rangle * \{r_R^2 + r_S^2 + 2r_R r_S \cos[2k_0(Z_R - Z_S)]\} \quad \text{Eq. 2.6}$$

在 Eq. 2.6 中，由於電場的振幅頻率遠高於光偵測器的積分時間，因此第二項的  $\langle |E_{in}|^2 \rangle$  可視為常數，除此之外第一項的  $\rho$  與第三項的  $r_R, r_S$  皆為常數，由此可之整項式子可以視為一建立在偏壓上的餘弦波，經整理後可得到由直流  $i_{DC}$  與交流  $i_{AC}$  組合的公式 Eq. 2.7：

$$I_D = \{i_{DC} + i_{AC} \cos[2k_0(Z_R - Z_S)]\} \quad \text{Eq. 2.7}$$

對比 Eq. 2.6 和 Eq. 2.7 可知，直流項  $i_{DC}$  由  $\frac{\rho}{4} * \langle |E_{in}|^2 \rangle * (r_R^2 + r_S^2)$  組成，直接影響其大小的參數為  $(r_R^2 + r_S^2)$ ；交流項  $i_{AC}$  由  $\frac{\rho}{4} * \langle |E_{in}|^2 \rangle * 2r_R r_S \cos[2k_0(Z_R - Z_S)]$  組成，其振幅與  $(r_R r_S)$  有關，相位則由  $2k_0(Z_R - Z_S)$  決定，但在此處的推導皆假設光源為單頻光源，所以  $k_0$  為常數，因此唯一決定相位的是樣本端與參考端的光程差，即  $(Z_R - Z_S)$ 。隨著調整參考端的位置，使的參考端的距離趨近於樣本端即光程差為 0 時，交流項會得到最大值，也就是有最佳的干涉訊號。

到這裡都是用高同調單頻光源作為推導，根據公式顯示只要參考端與樣本端的光程差為入射光波長的二分之一倍的整數倍皆可產生最大值的干涉訊號，而這代表在空間上具有無限長的同調性。如果樣本端的待測物在深度上具有多個反射面，那麼在高同調單頻光源且符合條件的情況下，干涉訊號會因不同縱向深度反射面造成的干涉的疊加影響。

光學同調斷層掃描術需具有良好的光學切片 (Optical sectioning) 效果，也就是在縱向上有良好的解析度，如在光源的選擇上使用高同調單頻光源則無法達到要



的效果，因此在選擇上需使用寬頻光源。當光源的頻寬越寬，空間上的同調長度(Coherence length)越短，代表縱向解析度越好，更能深度方面接收到更細微的資訊，因此接下來需利用上述推導將光源從高同調單頻光源轉換成低同調寬頻光源進行寬頻光源的 OCT 理論分析。

在寬頻光源的 OCT 理論分析中，入射電場的公式須由 Eq. 2.1 更改成 Eq. 2.8 並假設樣品端的待測樣品為一在不同深度上具有不連續性散射面的物質，具體架構如圖 2.2 所示。

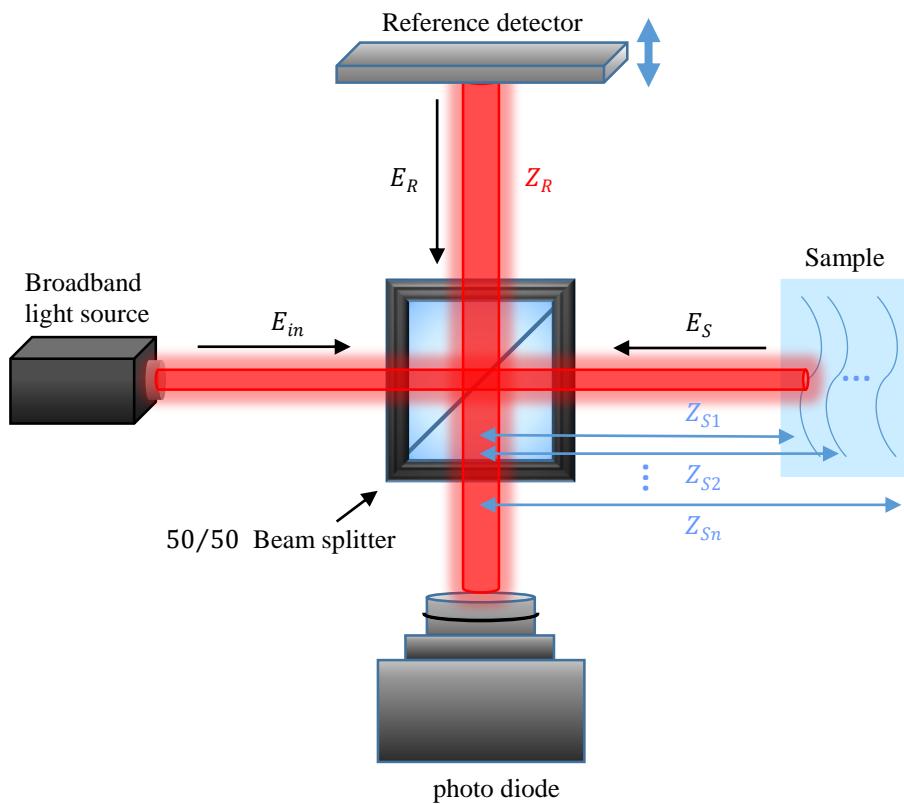


圖 2.2 低同調寬頻光源之 OCT 系統架構。樣品端具有多面不連續散射面， $Z_{S1} \sim Z_{Sn}$  為分光鏡至樣品不同層介面之長度。

$$E_{in} = S(k, \omega) e^{i(kz - \omega t)} \quad \text{Eq. 2.8}$$

上述 Eq. 2.8 中， $S(k, \omega)$  為寬頻光源中不同波長對應的電場強度， $k$  為波數，其與波長關係為  $k = 2\pi/\lambda$ ； $\omega$  為入射光角頻率，其與波長關係為  $\omega = c/2\pi\lambda$ 。

在圖 2.2 的參考端中，Eq. 2.2 需更改成 Eq. 2.9：



$$E_R = \frac{1}{\sqrt{2}} E_{in} * r_R * e^{i2kZ_R}$$

$$= \frac{1}{\sqrt{2}} * S(k, \omega) * r_R * e^{i[k(2Z_R+Z)-\omega t]} \quad \text{Eq. 2.9}$$

而在樣本端因為樣本具有多層不連續性散射面，不同層的反射率與距離皆不同，因此 Eq. 2.3 需改寫成 Eq. 2.10：

$$E_S = \frac{1}{\sqrt{2}} E_{in} * \sum_{n=1}^N r_{Sn} * e^{i2kZ_{Sn}}$$

$$= \frac{1}{\sqrt{2}} * S(k, \omega) * \sum_{n=1}^N r_{Sn} * e^{i[k(2Z_{Sn}+Z)-\omega t]} \quad \text{Eq. 2.10}$$

接下來與先前的推導一致，兩道光再次經過分光鏡疊合，將更改過後的參考光與樣本光 Eq. 2.9、Eq. 2.10 代入 Eq. 2.4，經整理後得光電流公式 Eq. 2.11：

$$I_D = \frac{\rho}{2} * \left\langle \left| \frac{S(k, \omega)}{\sqrt{2}} e^{i(kz-\omega t)} (r_R * e^{i2kZ_R} + \sum_{n=1}^N r_{Sn} * e^{i2kZ_{Sn}}) \right|^2 \right\rangle \quad \text{Eq. 2.11}$$

同理，因電場的振幅頻率遠高於光偵測器的積分時間，因此可去除與時間相關的參數並經由運算簡化至 Eq. 2.12：

$$I_D = \frac{\rho}{4} * S(k) \left\{ \begin{array}{l} (R_R + R_{S1} + R_{S2} + \dots + R_{Sn}) + \\ \left\{ \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{Sn}} [e^{i2k(Z_R-Z_{Sn})} + e^{-i2k(Z_R-Z_{Sn})}] \right\} + \\ \left\{ \sum_{n=1}^N \sum_{n \neq m=1}^N \sqrt{R_{Sn} R_{Sm}} [e^{i2k(Z_{Sn}-Z_{Sm})} + e^{-i2k(Z_{Sn}-Z_{Sm})}] \right\} \end{array} \right\}$$

$$\quad \text{Eq. 2.12}$$

上式中， $S(k) = \langle |S(k, \omega)|^2 \rangle$ ， $R_R = |r_R|^2$ 、 $R_{Sn} = |r_{Sn}|^2$ 、 $R_{Sm} = |r_{Sm}|^2$ 。

接著觀察 Eq. 2.12 中的三項中括號項，第一行的中括號項( $R_R + R_{S1} + R_{S2} + \dots + R_{Sn}$ )代表光偵測器偵測到的光電流直流項。

第二行的中括號項 $\left\{ \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{Sn}} [e^{i2k(Z_R-Z_{Sn})} + e^{-i2k(Z_R-Z_{Sn})}] \right\}$ 為參考光與樣本光的互相干涉項，此項對於還原樣本三維結構最具影響力。

第三行的中括號項 $\left\{ \sum_{n=1}^N \sum_{n \neq m=1}^N \sqrt{R_{Sn} R_{Sm}} [e^{i2k(Z_{Sn}-Z_{Sm})} + e^{-i2k(Z_{Sn}-Z_{Sm})}] \right\}$ 則是樣本中各個反射面產生的光的互相干涉項，為雜訊的來源，並且由於各個介面的反射率皆很小，基本上不影響  $I_D$ ，因此可忽略不計。



Eq. 2.12 經過整理與尤拉公式簡化後可得 Eq. 2.13：

$$I_D = \frac{\rho}{4} * S(k) \left\{ \begin{array}{l} (R_R + R_{S1} + R_{S2} + \dots + R_{Sn}) + \\ \left\{ \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{Sn}} \{ \cos[2k(Z_R - Z_{Sn})] \} \right\} \end{array} \right\} \quad \text{Eq. 2.13}$$

從每層介面分開來看可以得知 Eq. 2.13 與同調單頻光源最後推導出的公式 Eq. 2.6 類似，同樣是加載在偏壓上的餘弦波。兩者差異在於多頻光源  $S(k)$  對於干涉的影響，因此接下來將  $S(k)$  的理論數學式帶入。

假設多頻光源的頻譜在理想狀態下為高斯函數分布，則  $S(k)$  以 Eq. 2.14 表示：

$$S(k) = \frac{1}{\Delta k \sqrt{\pi}} e^{-\left(\frac{k-k_0}{\Delta k}\right)^2} \quad \text{Eq. 2.14}$$

其中  $k_0$  是多頻光源的中心波長之波數； $\Delta k$  是 k-domain 下的光源頻寬(full width at half maximum；FWHM)。將此式帶回 Eq. 2.13 且在  $\rho$ 、 $R_R$ 、 $R_S$  不受  $k$  變更而影響的情況下，可得到由不同振幅的光源頻譜相異連續波數組成的餘弦波疊加而成的光電流，此光電流可由 Eq. 2.15 所表示：

$$I_D = \frac{\rho}{4} * S_0 \left\{ \begin{array}{l} (R_R + R_{S1} + R_{S2} + \dots + R_{Sn}) + \\ \left\{ \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{Sn}} e^{-(Z_R - Z_{Sn})^2 \Delta k^2} \{ \cos[2k(Z_R - Z_{Sn})] \} \right\} \end{array} \right\} \quad \text{Eq. 2.15}$$

上式中  $S_0$  由 Eq. 2.16 所示：

$$S_0 = \int_0^\infty S(k) dk \quad \text{Eq. 2.16}$$

從 Eq. 2.15 公式中的第二項中括號可以看到不同的樣本光所對應的干涉訊號的中心位置也會不一樣，即以參考光臂長  $Z_R$  為變數來掃描，各個介面將產生分別在  $Z_{Sn}$  處出現且其半高全寬定義為  $l_c$  的干涉訊號，如此，將干涉訊號做處理，將振盪訊號的波包擷取出來即可得到各層介面的位置  $Z_{Sn}$  以及散射強度  $R_{Sn}$  的資訊從而達到光學切片的效果並得到完整的三維結構資訊，如圖 2.3 所示。

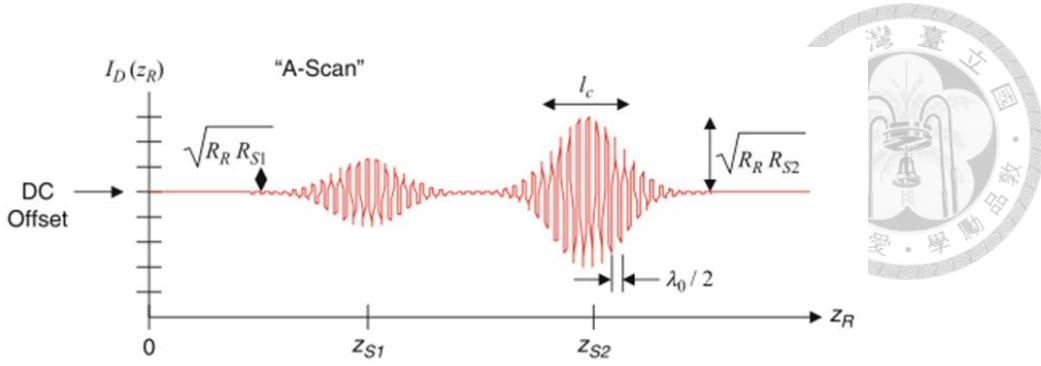


圖 2.3 多散射面的 OCT 干涉訊號[11]

此時已推導完關於寬頻光源對干涉訊號影響的理論，接下來會針對關於在寬頻光源下的干涉訊號的半高全寬  $l_c$  做推論。從 Eq. 2.15 可知，當參考光與樣本光的光程差也就是參考臂長與樣本臂長越相近時，將得到最大的干涉訊號，也可代表兩道光的同調性越高。此時假設兩道光臂長差為  $z$ ，亦兩道光的電場可設為  $E(Z_s)$  與  $E(Z_s + z)$ ，則可利用此定義同調度(Degree of coherence)  $\Gamma(z)$  與相干函數(Coherence function)  $\gamma(z)$  之間的關係，如 Eq. 2.17 所示：

$$\Gamma(z) = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} E(\alpha)^* E(\alpha+z) d\alpha}{\int_{-\infty}^{\infty} |E(\alpha)|^2 d\alpha} = \frac{\gamma(z)}{\int_{-\infty}^{\infty} |E(\alpha)|^2 d\alpha} \quad \text{Eq. 2.17}$$

其中  $\alpha$  為虛擬變項。

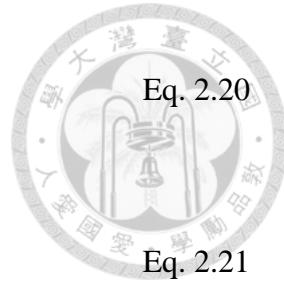
對比 Eq. 2.17 左右項可得知兩臂的電場與相干函數  $\gamma(z)$  之間的關係，即 Eq. 2.18：

$$\gamma(z) = \int_{-\infty}^{\infty} E(\alpha)^* E(\alpha + z) d\alpha \quad \text{Eq. 2.18}$$

此時根據 Wiener–Khinchin theorem[12]，可知一函數的自相關函數的傅立葉轉換對為功率普密度，即 Eq. 2.18 可表示為頻譜  $S(k)$  的傅立葉轉換，如 Eq. 2.19：

$$\gamma(z) = F\{S(k)\} = e^{-(z)^2 \Delta k^2} \quad \text{Eq. 2.19}$$

上式表示高斯函數的多頻光譜光源所產生的同調函數，其在空間上的分布也為高斯函數分布，而此分布也可稱之為 OCT 系統在縱向上的點擴散函數(point spread function；PSF)。我們定義此點擴散函數的半高全寬為此干涉儀的相干長度(coherence length)，即圖 2.3 中提及的  $l_c$ ，同時也是 OCT 系統的縱向解析度。其數學形式由 Eq. 2.20 所示：



Eq. 2.20

$$\gamma(z) = e^{-(z)^2 \Delta k^2} = \frac{1}{2}$$

從 Eq. 2.20 可繼續推導出同調長度與光源頻譜的關係 Eq. 2.21：

$$l_c = \frac{2\sqrt{\ln 2}}{\Delta k} = \frac{2\ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} \quad \text{Eq. 2.21}$$

從上式可觀察到，隨著光源頻譜越寬則同調長度越短，其表現形式如圖 2.4。

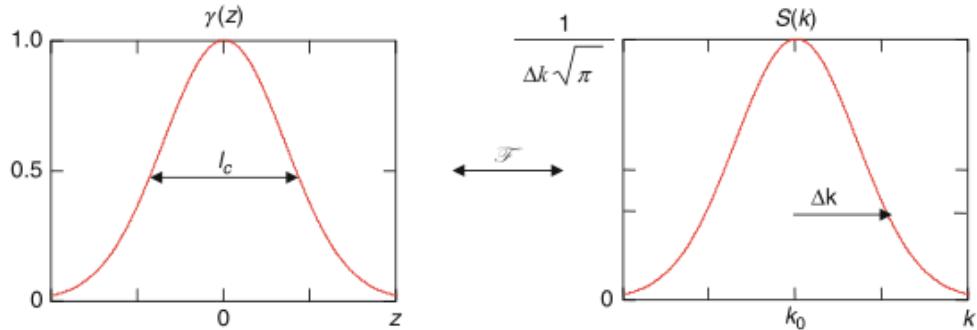


圖 2.4 高斯函數的多頻光譜光源  $S(k)$  與其同調函數  $\gamma(z)$  及同調長度  $l_c$  的關係[11]

本節至此，共說明了 OCT 之干涉原理並以此推導出多頻與單頻光源之差異，最後以多頻光源對同調長度的影響來證實 OCT 之光學切片能力。接下來的小節將會介紹本實驗室所使用的 Mirau-based 全域式 OCT 架構與其橫向、縱向解析度之理論推導及實驗值。



## 2.2 Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描系統

本研究所使用的系統為 Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描系統，全域式光學同調斷層掃描系統最簡單的架構如圖 2.5 所示。從圖 2.5 可以看到全域式 OCT 與圖 2.2 的差別在於全域式 OCT 的光偵測器改成相機及與之配套的成像透鏡，如此即可在橫向上提升掃描範圍及觀察能力，從而得到在縱向及橫向上都有極佳的資訊細節影像。

Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描系統便是由全域式 OCT 所衍伸，此節將介紹 Mirau-based 全域式 OCT 的架構並說明其影像處理方式，最後討論橫向與縱向的解析度理論值及實驗值以及訊雜比。

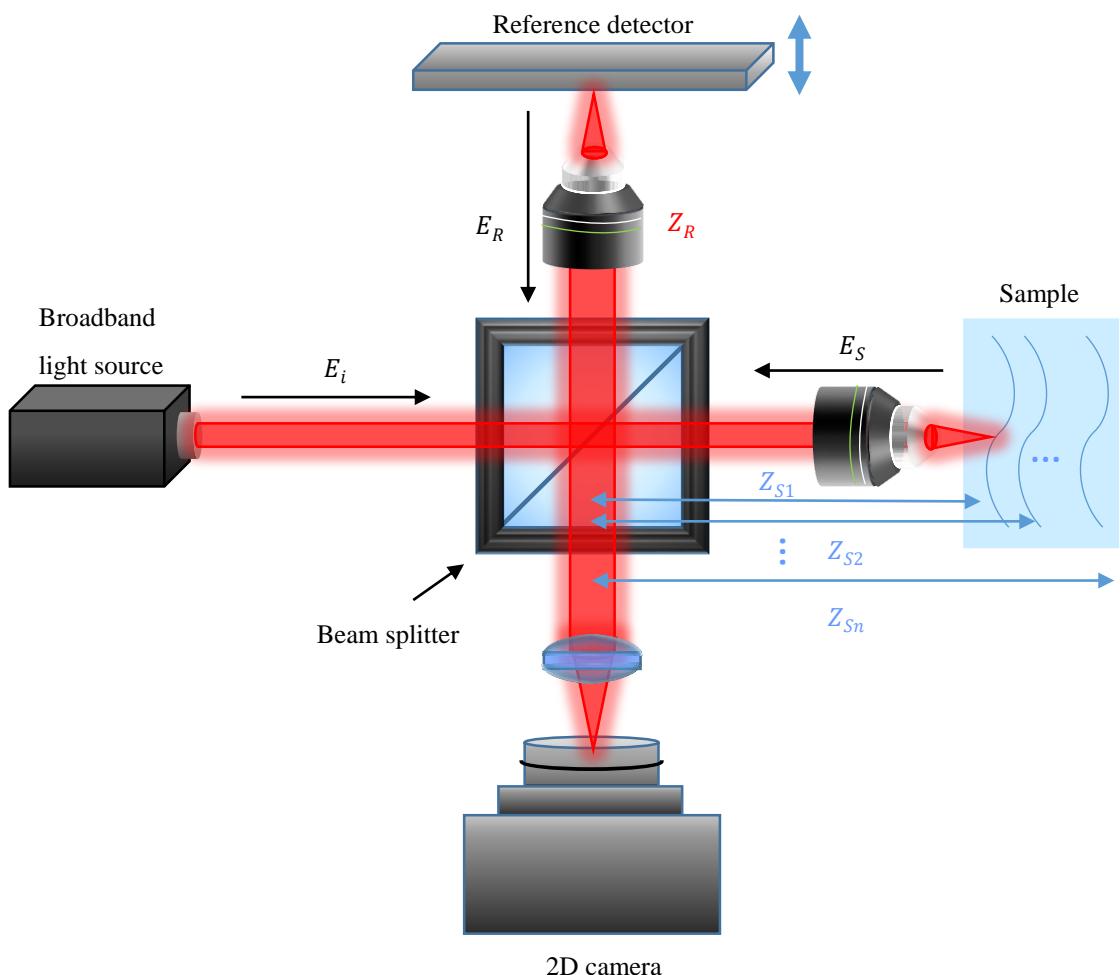


圖 2.5 簡易全域式光學同調斷層掃描系統架構



## 2.2.1 系統簡介

圖 2.6 與圖 2.7 分別為摻鈰鈦鋁石榴石( $\text{Ce}^{3+}\text{:YAG}$ )可見光源與摻鈦藍寶石(Ti:sapphire)近紅外光源的 Mirau-based 全域式 OCT 架構圖。這兩個架構皆是由兩部分組成，一是光源模組(light source module)，一是干涉儀模組(interferometer module)，兩者之間用多模光纖(multi-mode fiber; MMF)連接。接下來會針對圖 2.6 和圖 2.7 的架構作詳細說明。

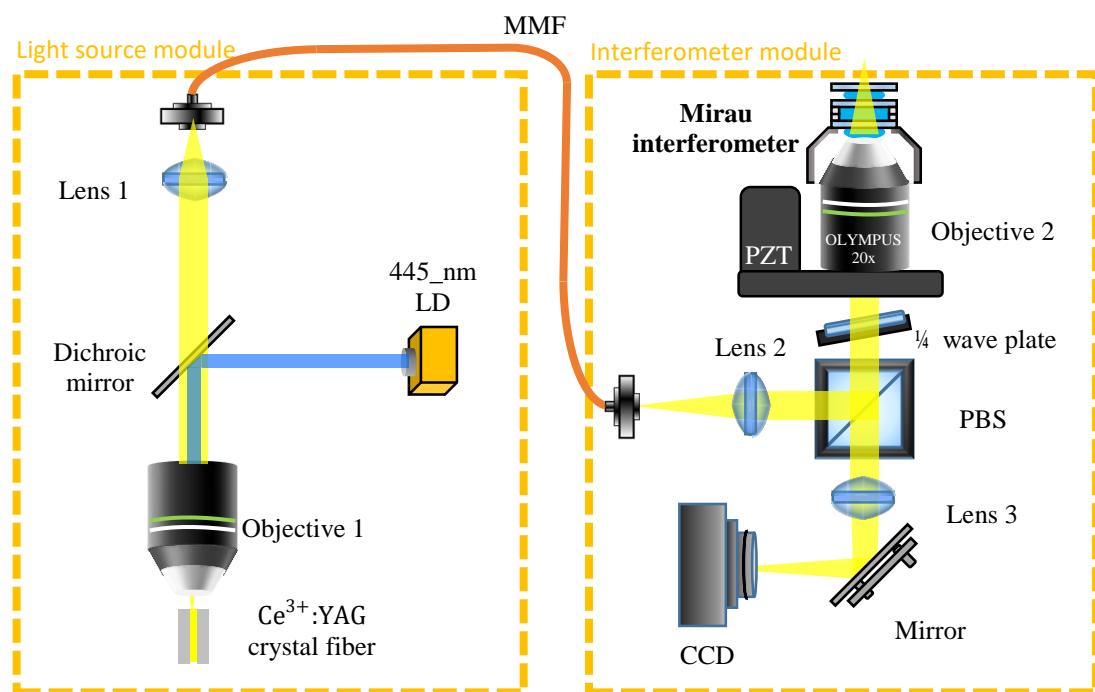


圖 2.6 可見光源之 Mirau-based 全域式 OCT 系統架構圖。左邊方框內為光源模組，其中 445 nm LD 為波長 445 nm 的雷射二極體；Dichroic mirror 為分色鏡；Objective 1 為物鏡；Ce<sup>3+</sup>:YAG crystal fiber 為摻鈰鈦鋁石榴石晶體光纖；MMF(multi-mode fiber)為多模光纖。右邊方框內為干涉儀系統，其中 PBS (polarization beam splitter)為極化分光鏡；¼ wave plate 為四分之一玻片；PZT 為壓電致動器；Objective 2 為顯微物鏡(Olympus water immersion objective；20X；NA 0.5)；Mirau interferometer 為自製干涉儀組件；CCD (charge coupled device)為電荷耦合元件(IMPERX ICL-B0620)。

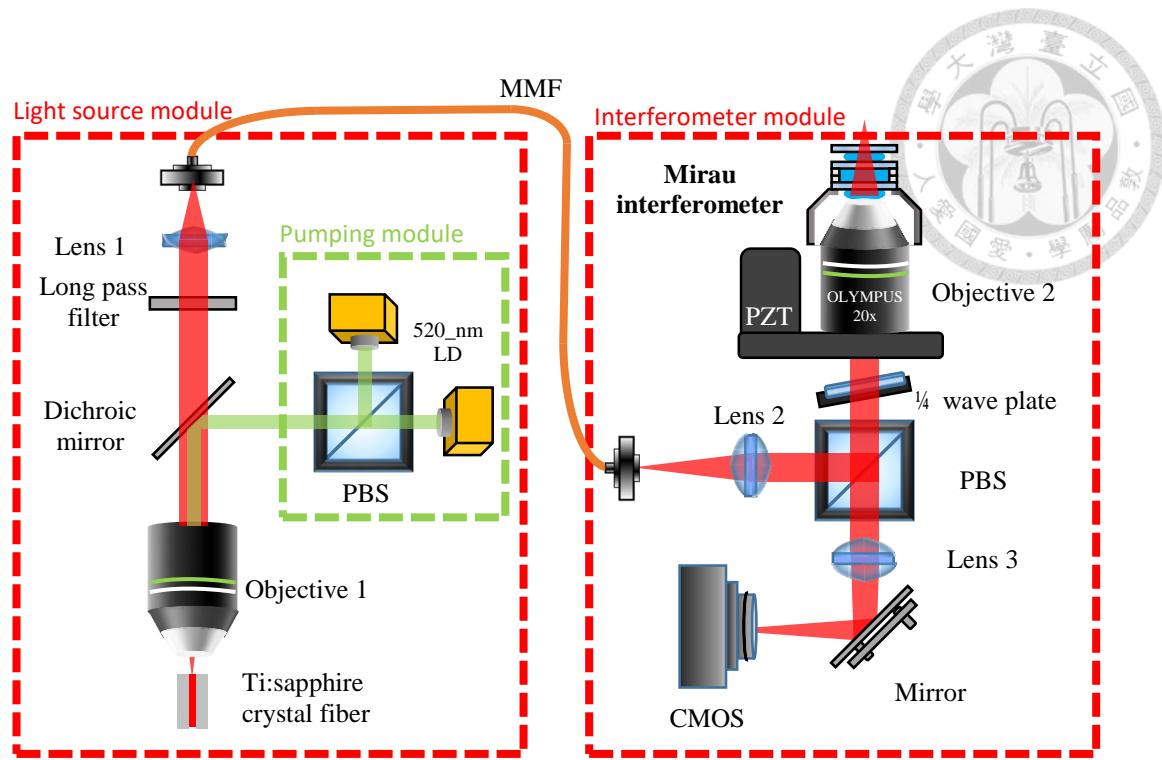


圖 2.7 近紅外光源之 Mirau-based 全域式 OCT 系統架構圖。左邊方框內為光源模組，其中 520\_nm LD 為波長 520 nm 的雷射二極體；PBS (polarization beam splitter)為極化分光鏡；Dichroic mirror 為分色鏡；Objective 1 為物鏡(ZEISS；50X；NA 0.75)；Ti:sapphire crystal fiber 為摻鈦藍寶石晶體光纖；Long pass filter 為高通濾光片；MMF (multi-mode fiber)為多模光纖。右邊方框內為干涉儀模組，其中 $\frac{1}{4}$  wave plate 為四分之一玻片；PZT 為壓電致動器；Objective 2 為顯微物鏡(Olympus water immersion objective；20X；NA 0.5)；Mirau interferometer 為自製干涉儀組件；CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor)為互補式金氧半導體。

首先介紹光源系統，圖 2.8、2.9 分別為可見光與近紅外光的光源部分架構圖

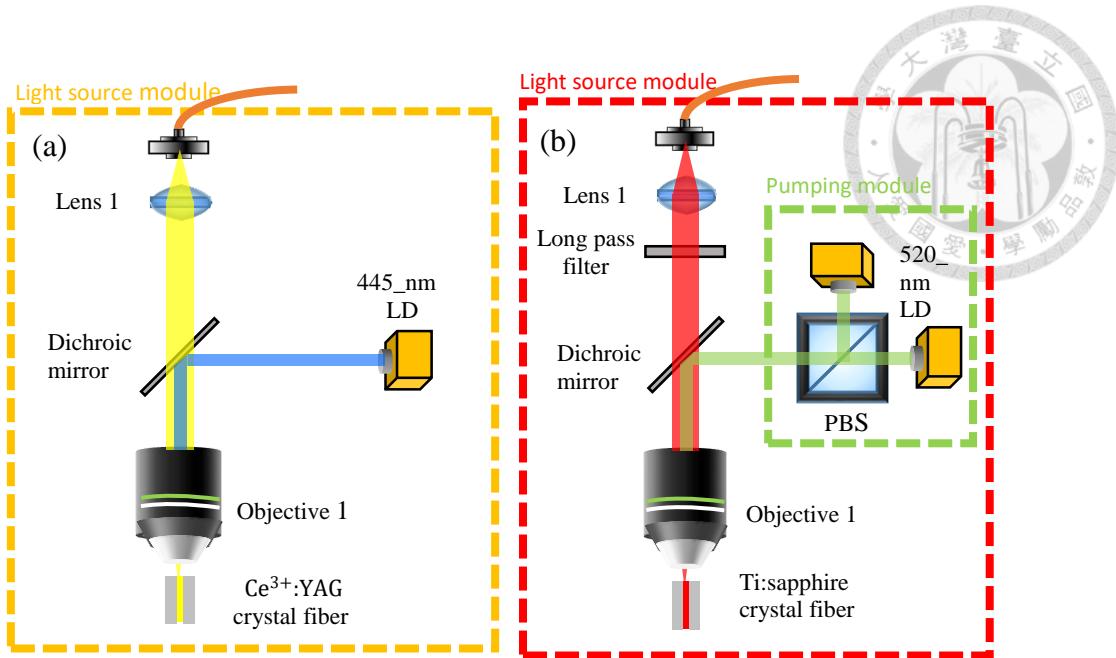


圖 2.8 (a)可見光源 FF-OCT 光源架構圖，(b)近紅外光源 FF-OCT 光源架構圖

圖 2.8 (a)中由 445\_nm LD 當作泵浦光源，經由分色鏡分光至物鏡並聚焦在實驗室自製的Ce<sup>3+</sup>:YAG晶體光纖中，晶體光纖經過 445 nm 藍光泵浦後會產生自發性輻射(spontaneous emission；SE)，SE 接著再次通過物鏡準直後經由 Lens 1 聚焦耦合進 MMF。

圖 2.8 (b)中則由兩顆 520\_nm LD 與 PBS 組成泵浦系統，透過 PBS 對於 P 極化光穿透及 S 極化光反射的特性將兩道光重合在一起當作泵浦光源，之後經由分色鏡分光至物鏡並聚焦在實驗室自製的Ti:sapphire晶體光纖中，晶體光纖受 520 nm 綠光泵浦後會產生自發性輻射(spontaneous emission；SE)，SE 接著再次通過物鏡準直後通過高通濾光片後經由 Lens 1 聚焦耦合進 MMF。

這兩套光源系統所使用的晶體光纖皆是實驗室自製，下面會先介紹晶體光纖的製備方法。晶體生長方法有多種，例如：浮動熔區法(floating zone method)、柴式法(Czochralski method)、區域熔煉法(zone melting method)、高溫熔液法(flux method)、伐諾伊焰熔法(Verneuil method)、布里奇曼-史托巴格法(Bridgman-Stockbarger method)等，其中最常見的為浮動融區法與柴式法。



本實驗是所使用的長晶方法為雷射加熱基底長晶法(laser-heated pedestal growth；LHPG)，此方法是屬於浮動融區法的一種，由 Haggerty 於 1975 年提出[13]。雷射加熱基底長晶法有幾個優點：

- (1) 具有高拉取速率晶體生長速度快，易於長出小半徑晶體。
- (2) 由雷射作為光源能較好的控制溫度，且溫度高易於生長高熔點晶體。
- (3) 為無坩堝技術，可以在高純度和低應力下生長晶體。

圖 2.9 為本實驗室所使用 LHPG 架構，使用波長為  $10.6 \mu\text{m}$ 、輸出功率為 50 W 的  $\text{CO}_2$  雷射作為熱源，在系統上將雷射擴束後打入腔體，經過內外圓錐反射鏡(reflaxicon)形成均勻的環狀光束，在光路上放置平面鏡將光打至拋物面鏡使其以軸對稱的方式聚焦在原始晶棒(source rod)上。

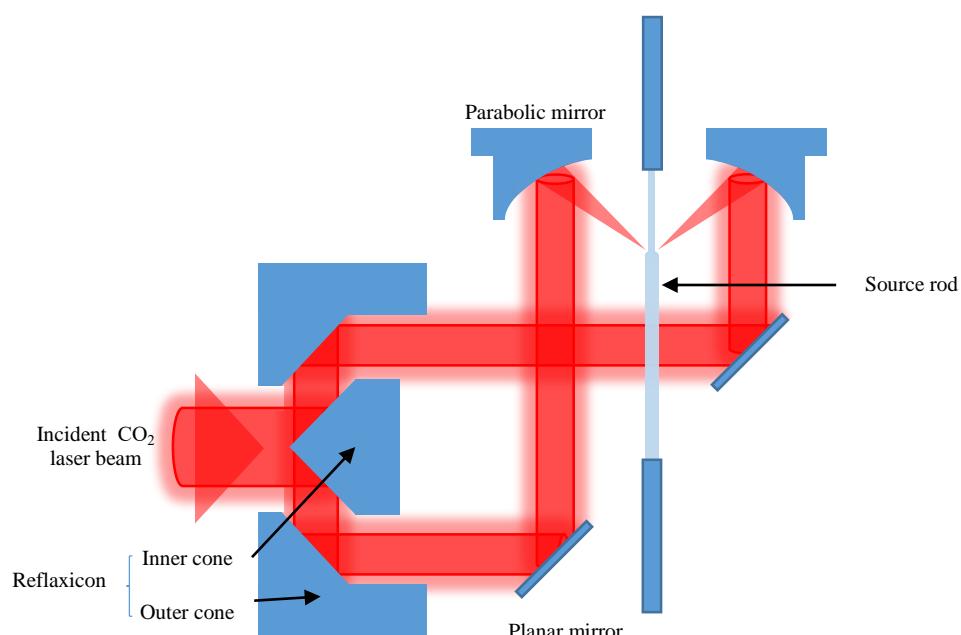


圖 2.9 LHPG 系統架構圖

圖 2.10 為晶體光纖生長示意圖，原始晶棒的頂端經由加熱後產生融區，子晶藉由步進馬達緩慢下降至觸碰到融區，融區的溶液由於溫度差會生長在子晶上，接著緩慢上拉即可形成晶體光纖。

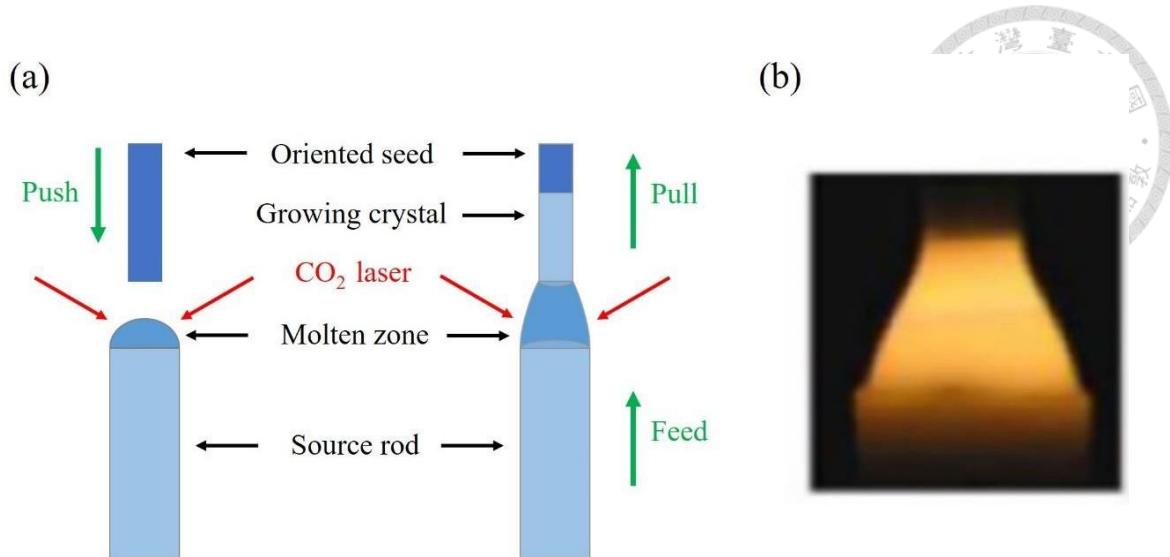


圖 2.10 (a)晶體光纖生長示意圖；(b)融區圖[14]

此過程中須遵守質量守恆，其關係式由 Eq. 2.22 所示：

$$M = \rho V = \rho_s (\pi r_s^2 v_s) = \rho_f (\pi r_f^2 v_f) \quad \text{Eq. 2.22}$$

上式中， $\rho_s$ 、 $\rho_f$ 分別為原始晶棒與晶體光纖的密度； $r_s$ 、 $r_f$ 分別為原始晶棒與晶體光纖的半徑； $v_s$ 、 $v_f$ 分別為原始晶棒推送與晶體光纖提拉的速度。

對 Eq. 2.22 稍做整理後可得到始晶棒與晶體光纖的速度比關係式 Eq. 2.23：

$$\frac{D_s}{D_f} = \sqrt{\frac{v_f}{v_s}} \quad \text{Eq. 2.23}$$

其中  $D_s$ 、 $D_f$  分別為原始晶棒與晶體光纖的直徑，因此藉由原始晶棒推送與晶體光纖提拉的速度以及已知原始晶棒的直徑即可控制晶體光纖的生長半徑。

接著討論圖 2.8、2.9 中的自製摻鈰鈦鋁石榴石( $\text{Ce}^{3+}\text{:YAG}$ )、摻鈸藍寶石(Ti:sapphire)晶體光纖之效能。圖 2.10 為  $\text{Ce}^{3+}\text{:YAG}$  之吸收頻譜，可以看到其吸收峰值的波長位於 458 nm，因此我們使用接近此波長的 445\_nm LD 當作泵浦光源。圖 2.11 為此 445\_nm LD 之 P-I 曲線。

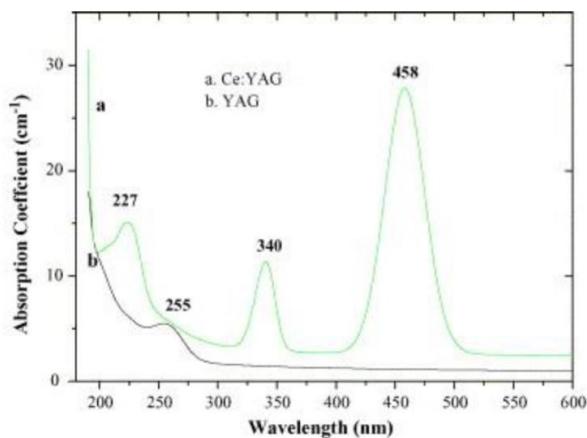


圖 2.10 Ce<sup>3+</sup>:YAG 晶體光纖吸收頻譜[15]

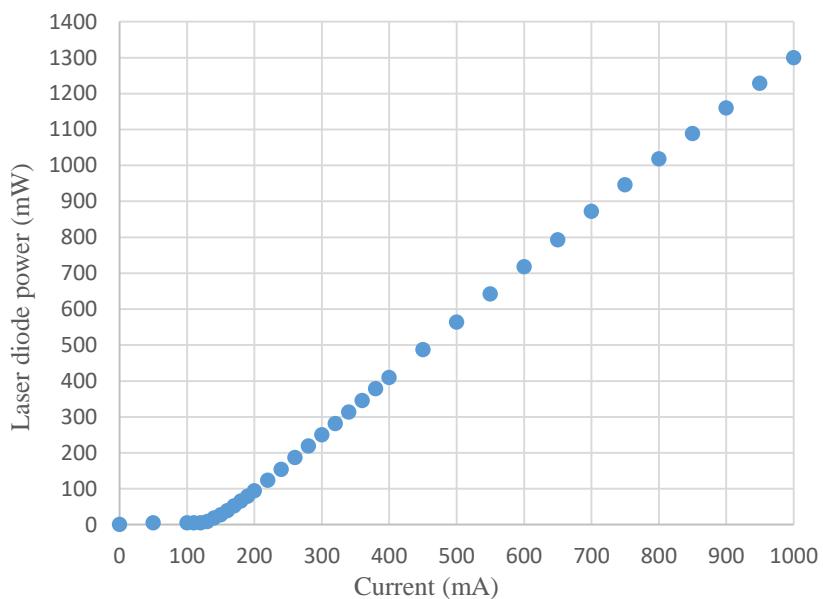


圖 2.11 445\_nm LD 之 P-I 曲線圖

Ce<sup>3+</sup>:YAG 晶體光纖在經過藍光 445 nm LD 泵浦後會產生高亮度與寬頻的 SE，極為適合 OCT 所使用，SE 的中心波長落在於 560 nm，且其頻譜之半高全寬為 95 nm，如圖 2.12 所示。而圖 2.13 為 445\_nm LD 泵浦光源功率對應到Ce<sup>3+</sup>:YAG 晶體光纖之 SE 功率的關係圖，由此圖可知，當 445\_nm LD 泵浦光源功率為 1228 mW 時，SE 功率為 35.3 mW。

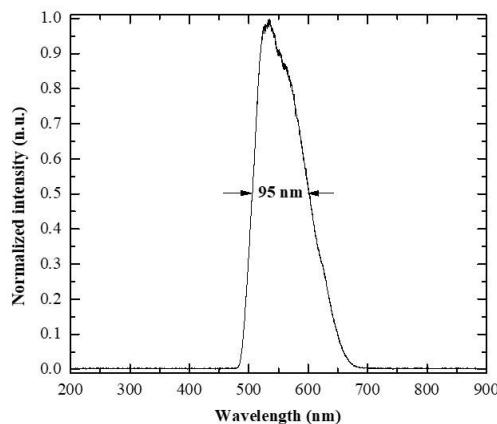


圖 2.12  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 晶體光纖之輸出光頻譜[16]

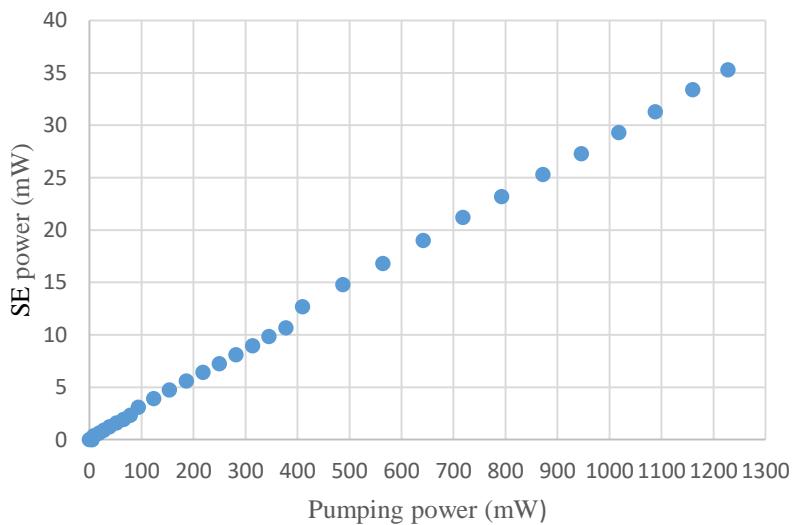


圖 2.13 445 nm LD 泵浦光源功率與  $\text{Ce}^{3+}$ :YAG 晶體光纖 SE 功率之關係圖

圖 2.14 為 Ti:sapphire 晶體光纖之吸收與放射頻譜，其吸收截面(absorption cross section)與極化方向有關， $\pi$  極化光和  $\sigma$  極化光代表入射光極化方向分別與晶體 c 軸平行或垂直。綠色線代表吸收頻譜，而觀察綠線可以發覺不管是  $\pi$  極化或是  $\sigma$  極化，吸收頻譜峰值皆在 500 nm 左右，因此我們使用兩顆接近此波長的綠光 520 nm LD 當作泵浦光源。

Ti:sapphire 晶體光纖在經過綠光 520 nm LD 泵浦後所產生之 SE 的中心波長落在於 780 nm，且其頻譜之半高全寬為 163.8 nm，如圖 2.15 所示。圖 2.16 為兩顆 520 nm LD 之 P-I 曲線，當兩顆 LD 都施加 1500 mA 的電流時，總輸出功率為 1818 mW。而圖 2.17 為 520 nm LD 泵浦光源功率對應到 Ti:sapphire 晶體光纖之 SE 功率



的關係圖，由此圖可知，當 520\_nm LD 泵浦光源總功率為 1818 mW 時，SE 功率為 36.4 mW。

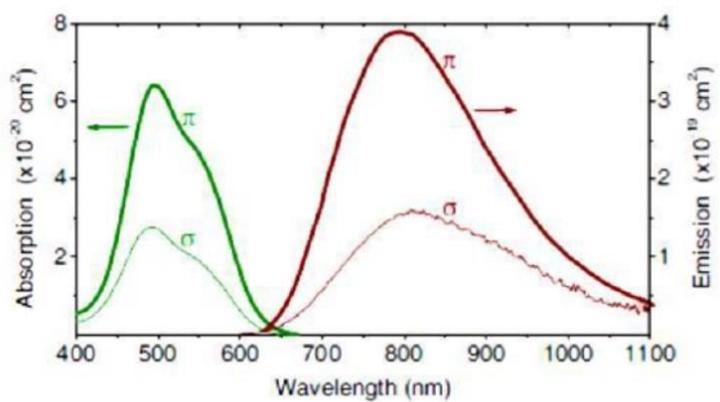


圖 2.14 Ti:sapphire 晶體光纖之吸收與放射頻譜[17]

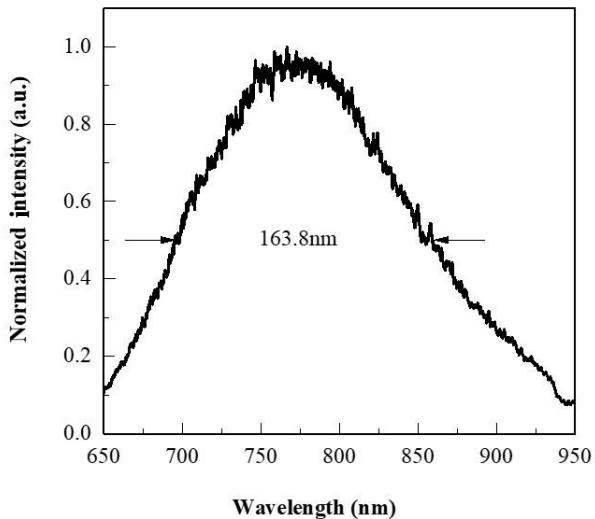


圖 2.15 Ti:sapphire 晶體光纖之輸出光頻譜[14]

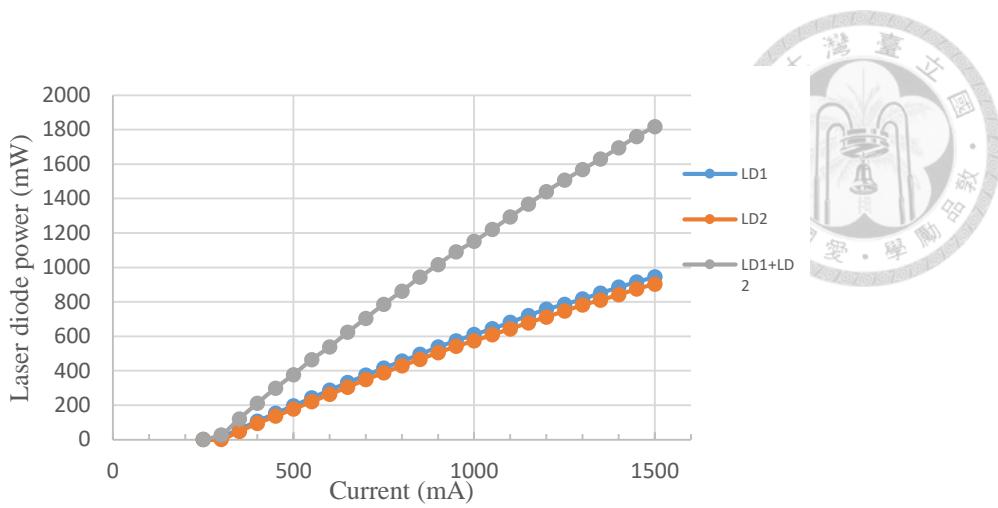


圖 2.16 520 nm LD 之 P-I 曲線圖

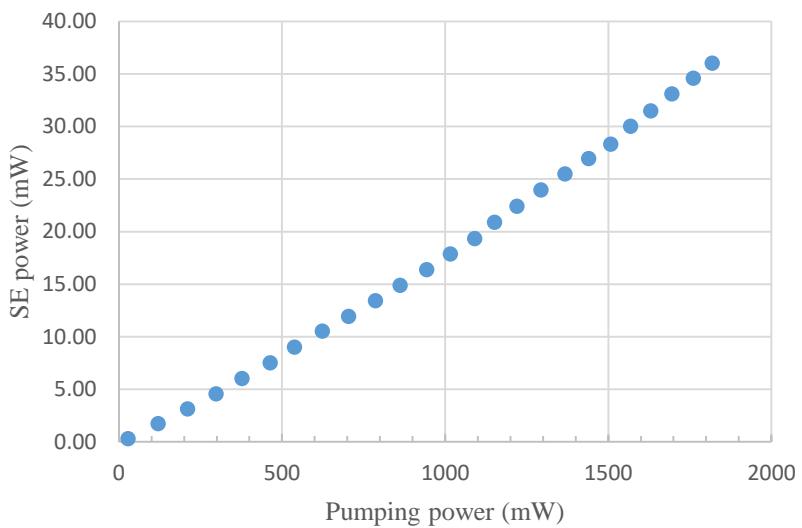


圖 2.17 520\_nm LD 泵浦光源功率與 Ti:sapphire 晶體光纖 SE 功率之關係圖

最後介紹干涉儀系統，圖 2.18 (a)、(b)分別為可見光與近紅外光的干涉儀部分架構圖。兩者在系統架構上的差異僅在最後收錄影像一個是 CCD 一個是 CMOS，因此放在一起統一介紹。耦合進 MMF 的 SE 寬頻光源經過 Lens 2 準值後打在 PBS 上，經 PBS 反射後穿過四分之一波片透過物鏡聚焦在樣本上，經樣本反射後沿原路返回再次通過 PBS 及 Lens 3 最後成像至相機。

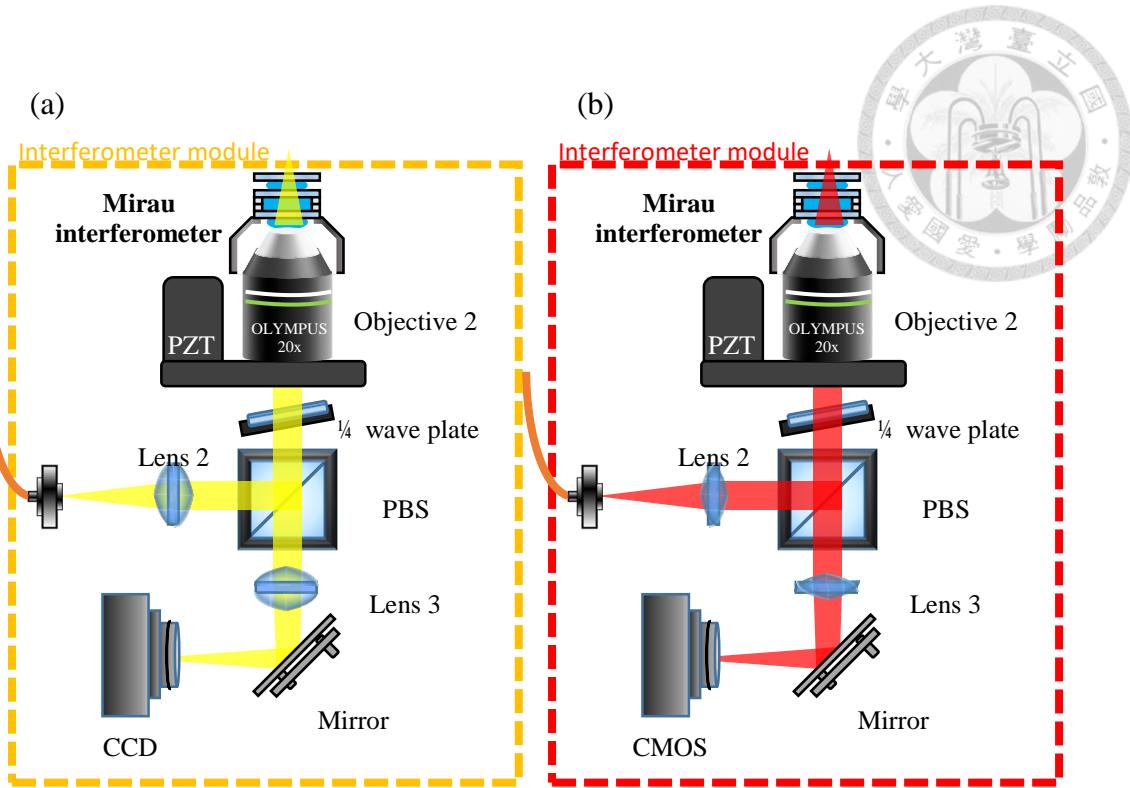


圖 2.18 (a) 可見光源 FF-OCT 干涉儀系統架構圖、(b) 近紅外光源 FF-OCT 干涉儀系統架構圖

在這過程中，寬頻光源的極化方向如圖 2.19 所示，由於 PBS 的特性，寬頻光源在經過 PBS 時會將 S 極化的光反射。接著在四分之一玻片的快軸與 x 軸為 45 度的情況下，通過四分之一玻片後的 S 極化光將會變為右旋偏振。右旋偏振光被樣本反射後反射光將會變為左旋偏振，再次通過四分之一玻片將轉為 P 極化光因此可穿透 PBS 最後打進相機裡。

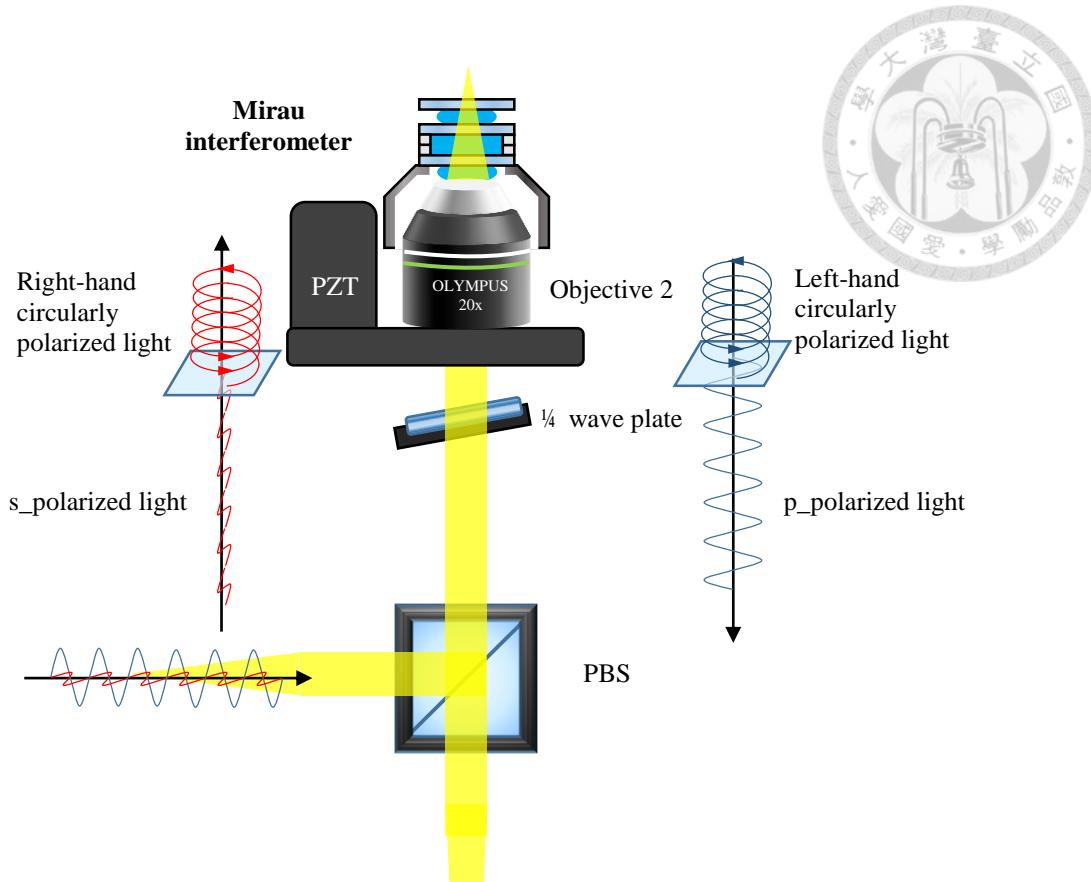


圖 2.19 極化方向示意圖

接著我們細看本實驗室自製的 Mirau 裝置，其架構示意圖如圖 2.20 所示。Mirau 由有鍍膜的兩片玻璃片(GP1、GP2)與中間的兩片塑膠環組成，中間則填充矽油 (silicon oil； $n = 1.406$  @ sodium D line)以達到折射率匹配的效果。GP1 為鍍有 5% 反射率膜層的玻璃片而 GP2 為鍍有 30% 反射率膜層的玻璃片。此時光在經過物鏡聚焦後在 Mirau 內的光路因 GP2 的關係可分為參考臂與樣本臂如下兩列和圖 2.20 內的箭頭所示，由此可使參考光路和樣本光路在同一軸上同時隨 PZT 移動從而得到樣本不同面的干涉影像。

參考臂光路：

GP1 上表面 → GP2 上表面 → GP1 上表面 → GP2 上表面 → GP1 上表面 → 相機



樣本臂光路：

GP1 上表面 → GP2 上表面 → GP3 上表面與樣本交接面 → GP2 上表面 →  
GP1 上表面 → 相機

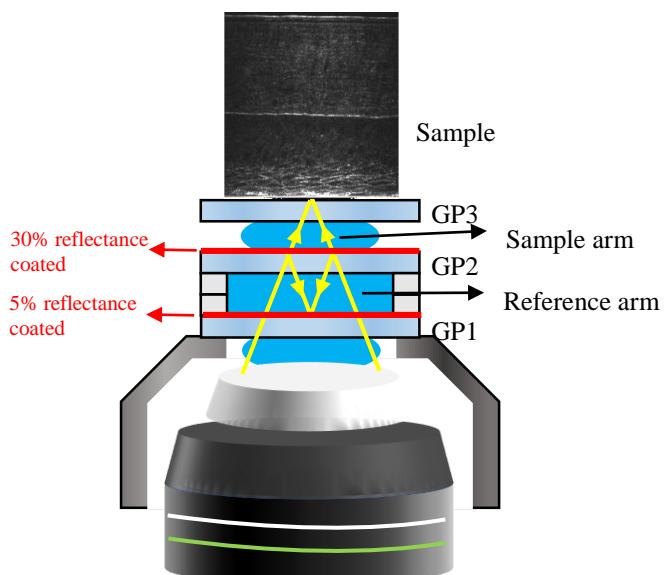


圖 2.20 自製 Mirau 裝置架構圖與光路路徑

## 2.2.2 影像處理

從 2.2.1 可以得知如何取得聚焦面上的 sample 干涉訊號影像，隨著 PZT 的移動便可以得到不同深度的二維影像從而重建出完整的三維影像。然而此時相機得到的干涉訊號是載波(carrier)形式並非樣本結構之散射訊號，因此需要利用四點運算法將不同深度產生的干涉從載波形式轉為包絡訊號(envelope)。圖 2.21 為干涉訊號之載波訊號與包絡訊號的關係圖。

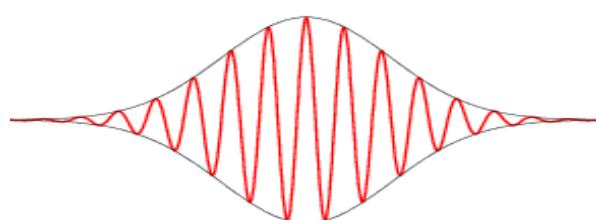


圖 2.21 干涉訊號之載波訊號與包絡訊號關係圖。紅線為載波訊號；黑線為包絡訊號。



本文用來得到包絡訊號的方法為四點運算法，此方法可得到週期正弦函數之振幅，其示意圖如圖 2.22 所示。

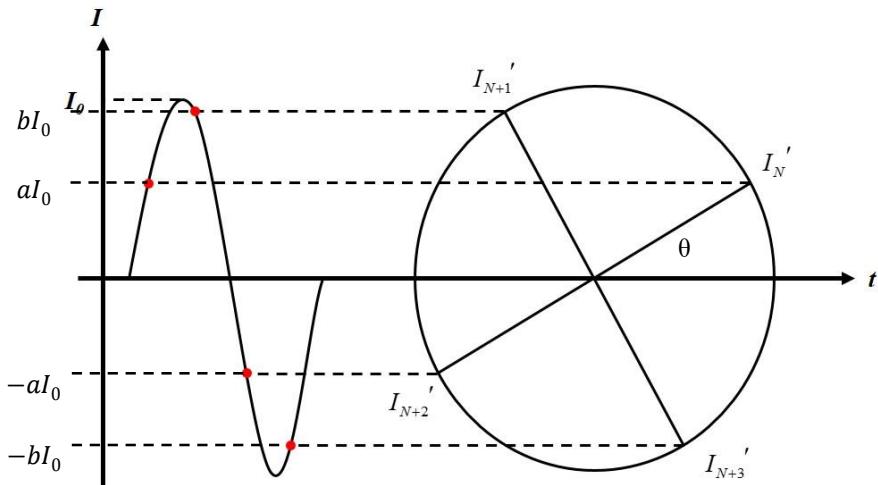


圖 2.22 四點運算法示意圖

我們將一週期正弦波在 x 軸上平均分為四等分，也就是每四分之一個週期取一個點，此時這四個點的振幅可以分別用  $aI_0$ 、 $bI_0$ 、 $-aI_0$ 、 $-bI_0$  表示並以  $I_N'$ 、 $I_{N+1}'$ 、 $I_{N+2}'$ 、 $I_{N+3}'$  定義，其關係式如 Eq. 2.24 到 Eq. 2.27 所示。

$$I_N' = I_0 \sin \theta = aI_0 \quad \text{Eq. 2.24}$$

$$I_{N+1}' = I_0 \cos \theta = bI_0 \quad \text{Eq. 2.25}$$

$$I_{N+2}' = -I_0 \sin \theta = -aI_0 \quad \text{Eq. 2.26}$$

$$I_{N+3}' = -I_0 \cos \theta = -bI_0 \quad \text{Eq. 2.27}$$

接著再將這四個式子帶入四點運算方程式 Eq. 2.28 中，即可得到此正弦波的振幅。而整個干涉訊號可看成是由多個正弦波所組成，因此隨著每個正弦波的振幅被求出來即可如圖 2.21 將載波訊號轉成包絡訊號。

$$\begin{aligned} & \frac{\sqrt{2}}{4} \left[ \sum_{i>j=1}^4 (I_i - I_j)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \\ &= \sqrt{\frac{(-b-a)^2 + (-b-b)^2 + (-b+a)^2 + (-a-a)^2 + (-a-b)^2 + (b-a)^2}{8}} \end{aligned}$$



Eq. 2.28

$$= \sqrt{\frac{8(a^2+b^2)}{8}} I_0 = I_0$$

四點運算法最主要的限制就是一個載波之間選取的四個點必須等間距，而跟這個條件有相關的參數有五個，分別為 PZT 的掃描速度(v)、相機的幀率(frame rate; F)、寬頻光源的中心波長( $\lambda_0$ )、正弦波一個週期內的選取張數(N)、樣本的折射率(n)。為了配合其條件，這五個參數的關係式如 Eq. 2.29。

$$v * \frac{N}{F} = \frac{\lambda_0}{2n} \quad \text{Eq. 2.29}$$

Eq. 2.29 的物理定義為 PZT 在一個載波週期的時間內所走的距離需要等於一個載波週期的光程距離，也就是包絡訊號上相鄰的兩點距離。以可見光系統舉例， $\lambda_0$ 為  $0.56\text{ }\mu\text{m}$ 、n 為 1.4，則兩個包絡之間的距離為  $0.2\text{ }\mu\text{m}$ ；近紅外光系統  $\lambda_0$ 為  $0.78\text{ }\mu\text{m}$ ，則兩個包絡之間的距離為  $0.278\text{ }\mu\text{m}$ 。右式需要除以 2 是因為 PZT 移動距離會是光程距離變化量的一半。這邊要注意的是由於使用的是四點運算法所以正弦波一個週期內的選取張數(N)需要是四的倍數，如此才能確保影像不失真。接著將 Eq. 2.29 整理一下便可得到最終我們需要的 PZT 移動速度公式 Eq. 2.30。

$$v = \frac{\lambda_0}{2n} * \frac{F}{N} \quad \text{Eq. 2.30}$$

從上式可以看到，當相機的幀率(F)、寬頻光源的中心波長( $\lambda_0$ )、樣本的折射率(n)為固定值時，正弦波一個週期內的選取張數(N)會與 PZT 移動速度成反比。移動速度越慢則一個載波週期內所擷取的張數越多，如此透過四點運算法得到的  $I_0$ 也就會越準包絡訊號資訊越詳細、訊雜比較佳，反之移動速度越快則一個載波週期內所擷取的張數越少，四點運算法得到的  $I_0$ 也就較不準，包絡訊號資訊可能會有些失真、訊雜比較差。因此在掃描時需依照掃描樣本是活體或檢體亦或是總掃描時間是否有限制去做選擇。表 2.1 與表 2.2 分別為本研究所使用可見光與近紅外光光源之 Mirau based FF-OCT 系統的 PZT 速度與四點運算張數對照表。



表 2.1 可見光系統之 PZT 掃描速度與四點運算張數對照表

	$\frac{1}{8}$ 倍速	$\frac{1}{4}$ 倍速	$\frac{1}{2}$ 倍速	1 倍速	2 倍速	4 倍速	8 倍速	16 倍速
PZT 速度(v) 單位: $\mu\text{m/s}$	0.1	0.20	0.41	0.81	1.62	3.24	6.48	12.96
單一載波內 計算張數(N)	512	256	128	64	32	16	8	4

表 2.2 近紅外光系統之 PZT 掃描速度與四點運算張數對照表

	$\frac{1}{8}$ 倍速	$\frac{1}{4}$ 倍速	$\frac{1}{2}$ 倍速	1 倍速	2 倍速	4 倍速	8 倍速	16 倍速
PZT 速度(v) 單位: $\mu\text{m/s}$	0.54	1.09	2.18	4.35	8.71	17.41	34.82	69.64
單一載波內 計算張數(N)	512	256	128	64	32	16	8	4



### 2.2.3 系統横向與縱向解析度

當使用透鏡成像時，透鏡的效果可以看成是圓孔的遠場繞射(Fraunhofer diffraction)從而在聚焦處形成艾瑞盤(Airy disk)如圖 2.23，此即為繞射極限，因為繞射極限的存在當兩個光點過於靠近時會使得儀器無法分辨。光學系統中解析度的定義為空間中兩個點可以分辨的最短距離，其可解析最短距離根據瑞利準則(Rayleigh criterion)定義為第一個艾瑞盤的中心位置坐落於第二個艾瑞盤的第一暗紋上，距離小於這個界限即無法分辨，如圖 2.24。

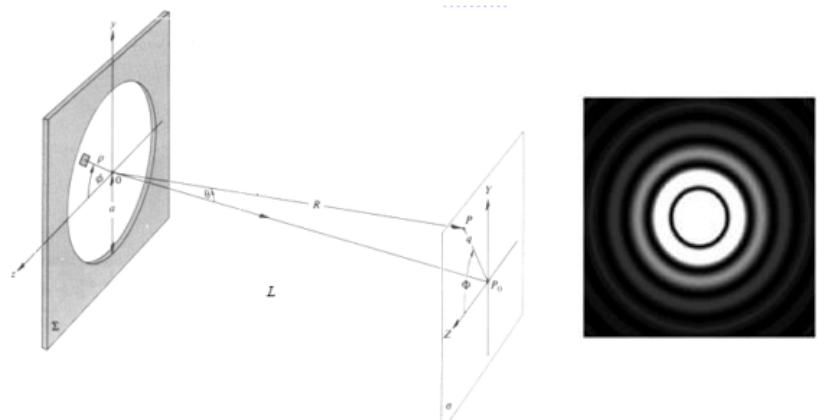


圖 2.23 圓孔繞射示意圖[18]

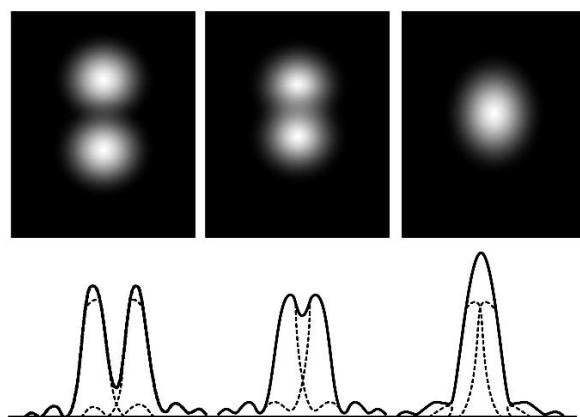


圖 2.24 Rayleigh criterion 示意圖[19]



## 横向解析度理論

上述之艾瑞盤的中心位置離第一暗紋位置距離可由第一類貝索函數決定 (Bessel function of the first kind)，當其為 0 時即可算出可解析距離 $q_1$ ，如 Eq. 2.31 所示。其中  $k$  為波數； $a$  為圓孔孔徑； $R$  為圓孔中心至第一暗紋的直線距離。

$$J_1\left(\frac{kaa_1}{R}\right) = 0 \quad \text{Eq. 2.31}$$

將 Eq. 2.31 整理並移項可得到 $q_1$  公式 Eq. 2.32。

$$\frac{kaa_1}{R} = 3.83 \Rightarrow q_1 = 1.22 \frac{R\lambda}{2a} \quad \text{Eq. 2.32}$$

對於透鏡來說，Eq. 2.32 中的  $R$  可等於透鏡焦距  $f$ ， $2a$  可等於透鏡孔徑  $D$ ，因此 Eq. 2.32 可改寫成 Eq. 2.33 也可轉為以數值孔徑為參數的關係式 Eq. 2.34。

$$q_1 = 1.22 \frac{f\lambda}{D} \quad \text{Eq. 2.33}$$

$$q_1 = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad \text{Eq. 2.34}$$

上述解析度分析皆是只考慮光學性質本身，對於整個 OCT 系統來說横向解析度還須考慮到相機本身二維陣列偵測器的影響。因此整個系統的横向解析度可以 Eq. 2.35 呈現。 $R_{OCT}$  為 OCT 系統的横向解析度， $R_{optical}$  為光學横向解析度也就是  $q_1$ ， $R_{camera}$  為相機本身取樣解析度 (sampling resolution)，其等於像素大小除以光學系統放大倍率。

$$R_{OCT} = \sqrt{R_{optical}^2 + R_{camera}^2} \quad \text{Eq. 2.35}$$

## 横向解析度測量結果

我們使用横向解析度測試片來測量系統横向寫析度，將測試片放置在 GP3 上方並將焦距調至紋路最清楚的地方，經可見光與近紅外光 FF-OCT 掃描即可得到圖 2.25 (a) 與圖 2.26 (a)。得到測試片圖後我們選取亮暗交界並畫出光強度訊號圖，對其做歸一化後可得圖 2.25 (b) 與圖 2.26 (b)，以此我們定義訊號強度 90% 與 10% 之間的寬度為横向解析度。



由圖 2.26 (b)可知可見光 FF-OCT 之橫向解析度大約等於  $0.8 \mu\text{m}$ ，而近紅外光 FF-OCT 之橫向解析度約等於  $1.26 \mu\text{m}$ 。

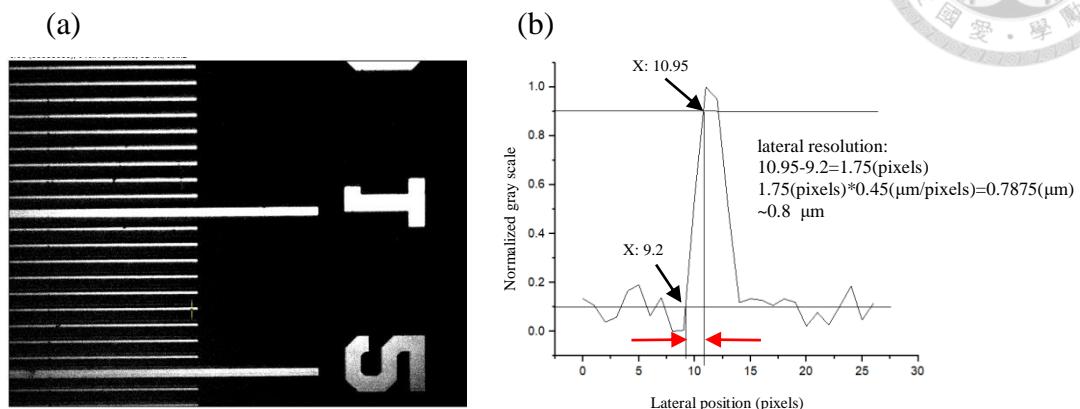


圖 2.25 可見光 FF-OCT 之橫向解析度。(a)測試片量測影像；(b)訊號強度分布

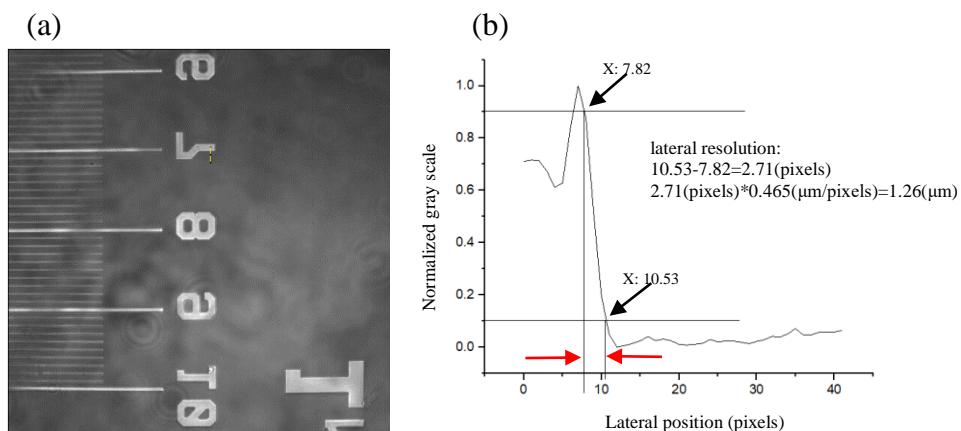


圖 2.26 近紅外光 FF-OCT 之橫向解析度。(a)測試片量測影像；(b)訊號強度分布

### 縱向解析度理論

在 2.1 小節中的 Eq. 2.21 有提到相干函數  $\gamma(z)$  為 OCT 系統的縱向點擴散函數 PSF，並且已知其半高全寬  $l_c$  即為縱向解析度。然而跟橫向解析度一樣，影響縱向解析度的除了半高全寬  $l_c$  之外還有物鏡的數值孔徑 NA 影響，因此 Eq. 2.21 需改寫成 Eq. 2.36。

$$\Delta z = \left[ \frac{n\pi}{2 \ln 2} \left( \frac{\Delta\lambda}{\lambda^2} \right) + \frac{2n(1-\cos\theta)}{\lambda} \right]^{-1} \quad \text{Eq. 2.36}$$



其中  $\frac{2n(1-\cos\theta)}{\lambda}$  項為物鏡共焦闊影響之參數；n 為折射率； $\theta$  與數值孔徑 NA 相關，其等於  $\sin^{-1}\left(\frac{NA}{n}\right)$ 。

### 縱向解析度測量結果

系統本身的縱向解析度定義為不受樣本干擾的情況下量測，因此我們使用 GP3 上表面與空氣的接觸面的干涉訊號作為量測標準，並計算其干涉訊號的半全寬以得到縱向解析度實驗值，圖 2.27 與圖 2.28 為可見光與近紅外光 FF-OCT 之縱向解析度，分別為  $0.93 \mu\text{m}$  以及  $1.36 \mu\text{m}$ 。

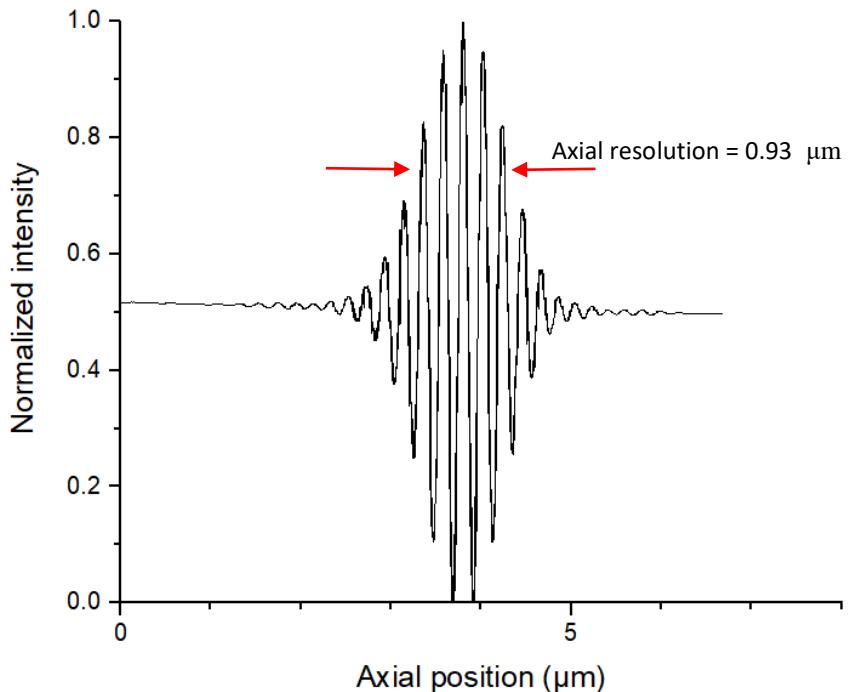


圖 2.27 可見光 FF-OCT 之縱向解析度

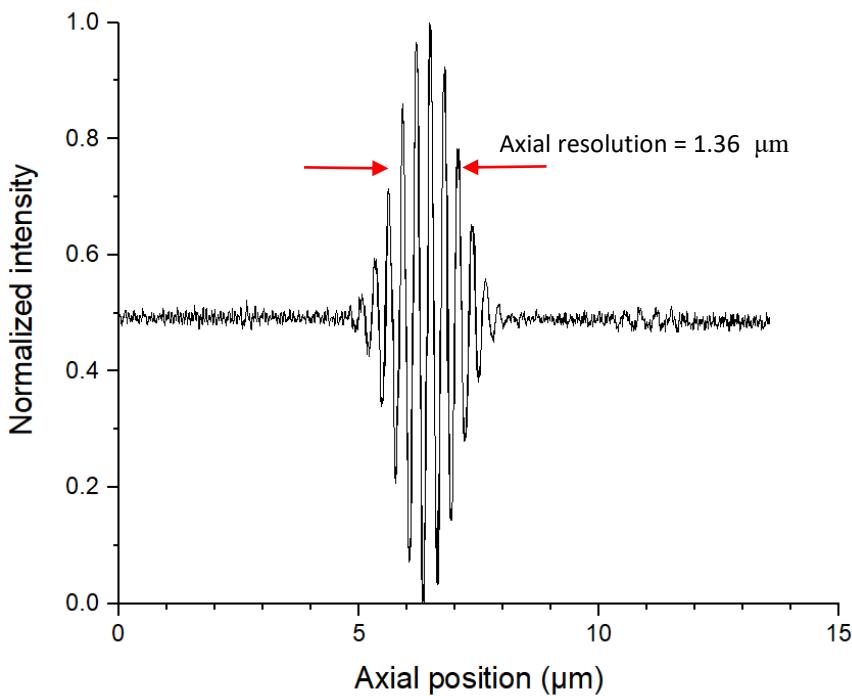


圖 2.28 近紅外光 FF-OCT 之縱向解析度

## 2.2.4 干涉效率與訊雜比

### 干涉效率

對於 Mirau based FF-OCT 系統中，影像訊號來源於參考光與樣本光的互相干涉，在 2.1 小節有推導過干涉訊號的理論公式即 Eq. 2.15，我們可以將 Eq. 2.15 稍微整理成以光強為單位，如 Eq. 2.37。其中  $I_R$  、  $I_S$  分別為打回相機之參考光光強以及樣本光光強。

$$I_D = I_R + I_S + 2\sqrt{I_R I_S} e^{-(Z_R - Z_{Sn})^2 \Delta k^2} \cos[2k(Z_R - Z_{Sn})] \quad \text{Eq. 2.37}$$

按照圖 2.20 的參考光及樣本光光路，我們可以將  $I_R$  、  $I_S$  以 Eq. 2.38、Eq. 2.39 呈現，以供我們之後計算理論值。

$$I_R = \{(1 - R_{GP1}) * R_{GP2}\}^2 * R_{GP1} * I_0 \quad \text{Eq. 2.38}$$

$$I_S = \{(1 - R_{GP1}) * (1 - R_{GP2})\}^2 * R_S * I_0 \quad \text{Eq. 2.39}$$

Eq. 2.39 中  $R_S$  為樣本的反射率，其反射率可由 Eq. 2.40 得知。其中  $n_{GP3} = 1.46$ 。

$$R_S = \frac{(n_{GP3} - n_{air})^2}{(n_{GP3} + n_{air})^2} \quad \text{Eq. 2.40}$$



以上述四個公式基本上便可計算出理論干涉訊號強度分布圖，然而現實中我們還需要考慮到雜散光(stray light)的影響，因此 Eq. 2.37 需變為 Eq. 2.41。主要雜散光的來源來自於參考光打至 GP1 後並沒有原路返回而是直接穿透打至相機上，因此雜散光光強 $I_{SL}$ 可由 Eq. 2.42 表示。

$$I_D = I_R + I_S + I_{SL} + 2\sqrt{I_R I_S} e^{-(Z_R - Z_{Sn})^2 \Delta k^2} \cos[2k(Z_R - Z_{Sn})] \quad \text{Eq. 2.41}$$

$$I_{SL} = (1 - R_{GP1})^2 * R_{GP2} * I_0 \quad \text{Eq. 2.42}$$

在可見光 FF-OCT 系統中，為了盡量避免雜散光的影響因此會在 GP1 的下表面點上高吸收率的黑點，假設其吸收率為 B，則 Eq. 2.41 可改寫成 Eq. 2.43。

$$I_D = I_R + I_S + (1 - B)I_{SL} + 2\sqrt{I_R I_S} e^{-(Z_R - Z_{Sn})^2 \Delta k^2} \cos[2k(Z_R - Z_{Sn})] \quad \text{Eq. 2.43}$$

干涉效率(interference efficiency；IE)的計算即為干涉訊號的交流振幅大小除以直流偏壓大小，如 Eq. 2.44 所示。

$$\text{IE} = \frac{2\sqrt{I_R I_S}}{I_R + I_S + (1 - B)I_{SL}} = \frac{\Delta I_{AC}}{I_{DC}} = \frac{I_{max} + I_{min}}{I_{max} - I_{min}} \quad \text{Eq. 2.44}$$

圖 2.29 為可見光 FF-OCT 干涉效率隨雜散光改變之理論值。套用 Eq. 2.38、Eq. 2.39、Eq. 2.40 以及 Eq. 2.43，可得知可見光理論最大干涉效率為 81.15% 並隨著黑點吸收率減少而下降。圖 2.30 為可見光 FF-OCT 干涉效率測量結果，藉由干涉訊號圖得知直流偏壓大小與交流振幅大小並以 Eq. 2.44 計算干涉效率，其實際量測值為 63%，與理論值對照可知黑點因吸收率並非 1 無法完全去掉雜散光，但有很好的提升干涉效率效果。

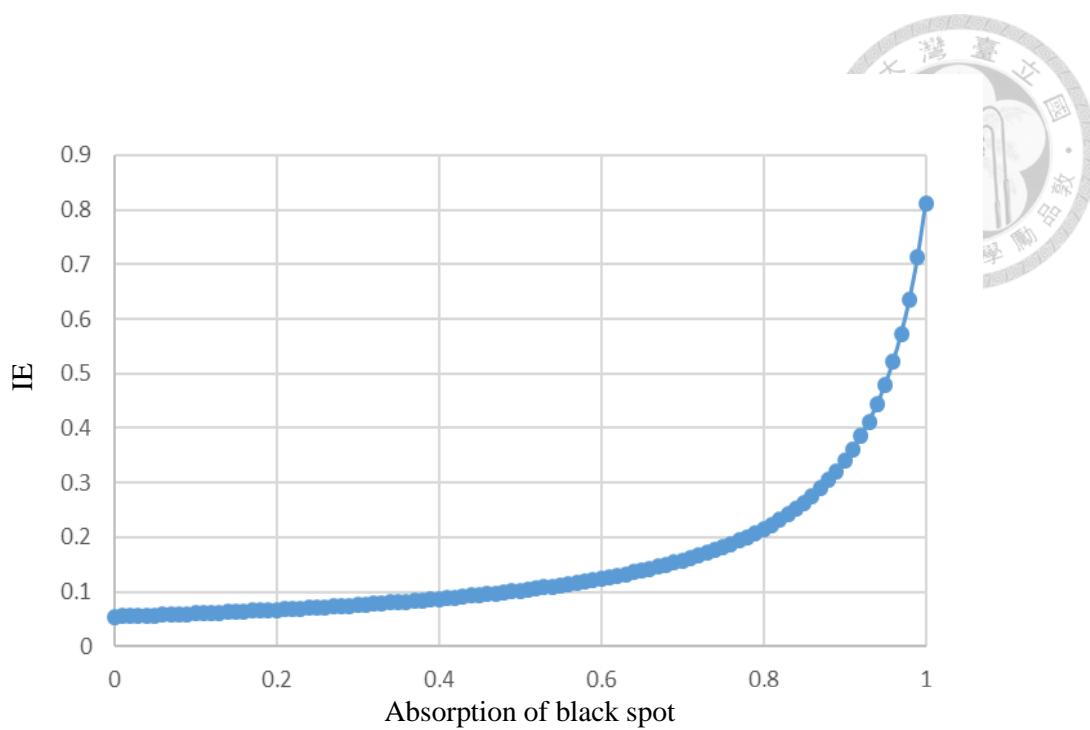


圖 2.29 可見光 FF-OCT 干涉效率隨雜散光改變之理論值

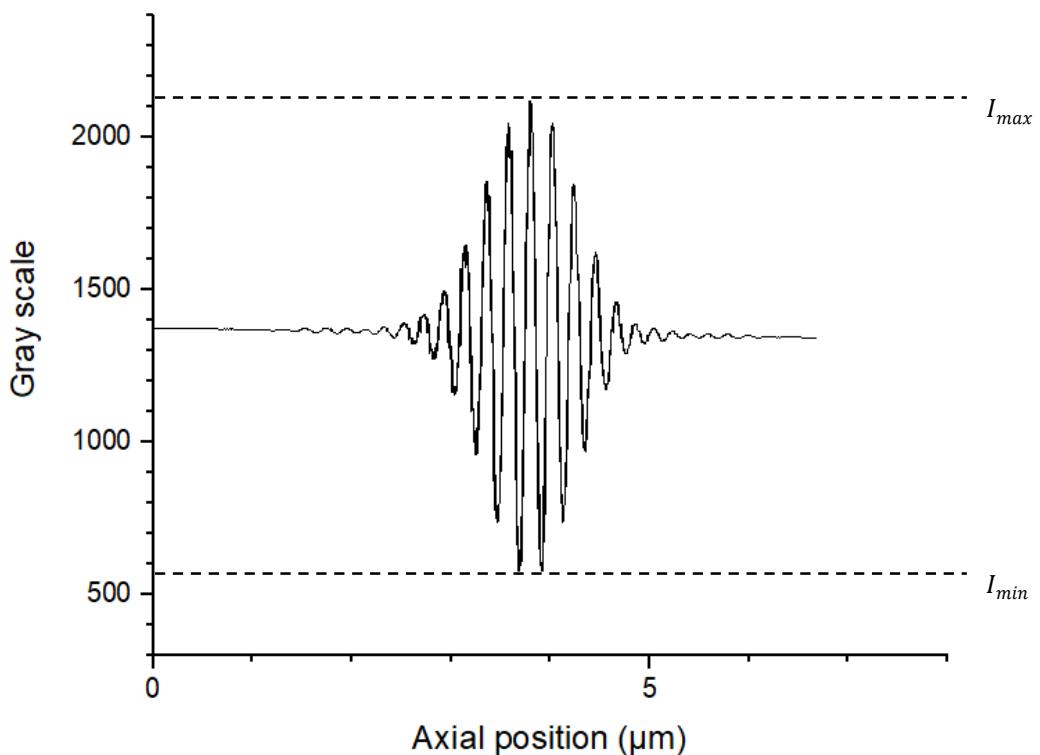


圖 2.30 可見光 FF-OCT 干涉效率測量結果

而近紅外光 FF-OCT 因為沒有點黑點吸收雜散光，因此(1-B)項等於 1，其理論干涉效率為 5.46%，圖 2.31 為近紅外光 FF-OCT 干涉效率測量結果實際量測值為



18%，會有這麼大差異是因為理論值會把雜散光當作全部被收進相機哩，然而實際情況會因為 Mirau 些許的傾角導致只有部分雜散光被收進相機，傾角造成的效果與黑點有些許相似但沒有如可見光系統的黑點效果這麼好，因此實際測量值才會與理論值有意。

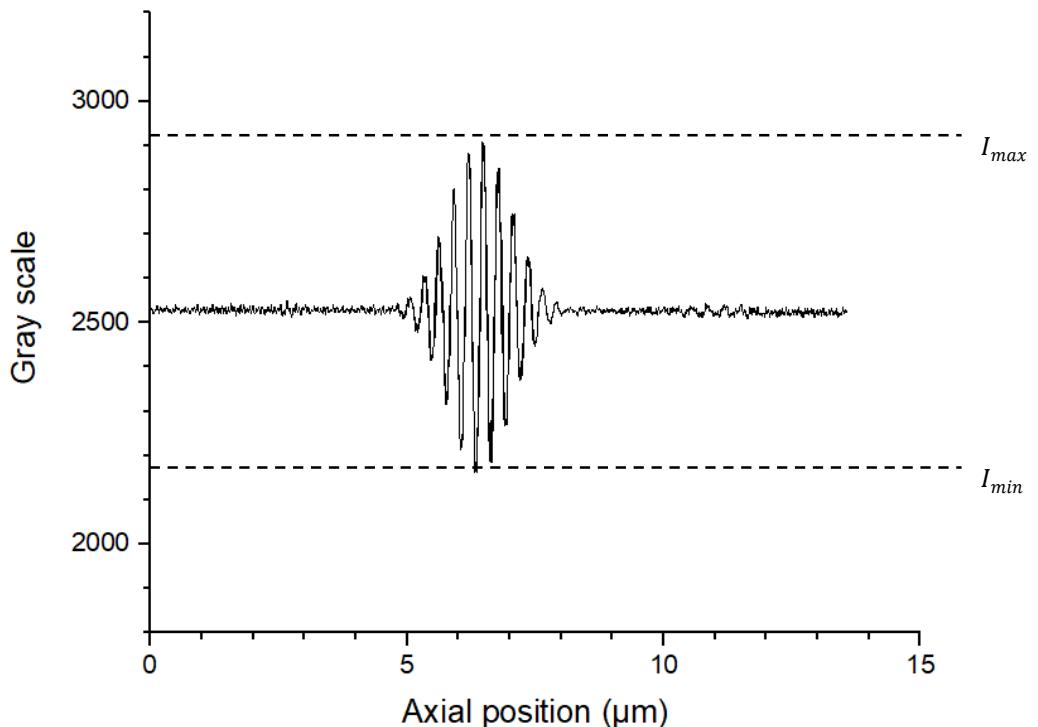


圖 2.31 近紅外光 FF-OCT 干涉效率測量結果

### 訊雜比

訊雜比(signal to noise ratio ; SNR)的定義為訊號與雜訊的比例，表示形式如 Eq. 2.45。其中 $\Delta I_{AC}$ 為干涉訊號強度， $\sigma$ 為雜訊強度。

$$SNR = \frac{\langle \Delta I_{AC}^2 \rangle}{\sigma^2} \quad Eq. 2.45$$

而訊雜比通常會以分貝(dB)的形式表現，因此將 Eq. 2.45 取 log 後得到 Eq. 2.46。

$$SNR = 10 \log_{10} \left( \frac{\langle \Delta I_{AC}^2 \rangle}{\sigma^2} \right) \quad Eq. 2.46$$

量測訊雜比的方式為使用干涉訊號的振幅強度做為 $\Delta I_{AC}$ ，沒有干涉的地方做標準差(standard deviation)做為  $\sigma$ ，如圖 2.32。可見光 FF-OCT 之 SNR 值為 34.89dB。近紅外光 FF-OCT 以同理計算，其 SNR 值為 30.8dB。

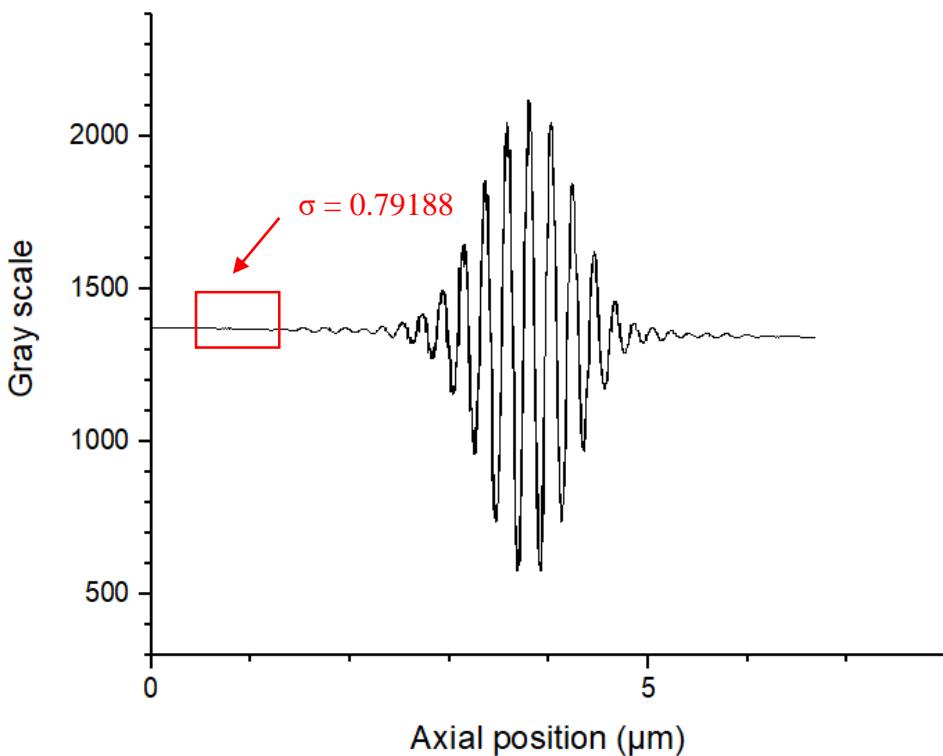


圖 2.32 SNR 計算方式示意圖

## 2.2.5 Mirau 裝置內填充物測試

為了使得 Mirau based FF-OCT 的共焦閘(confocal gate)與同調閘(coherent gate)在掃描樣本時能盡量減少 walk-off effect 的影響以增加掃描距離，如圖 2.33。透過 Eq. 2.47 可知當樣本折射率與 Mirau 內填充物折射率差小於 1 時可大大增加系統的掃描深度。因此經計算後我們使用矽油(silicon oil； $n = 1.406$  @ sodium D line)當作填充物。其中  $SD_{Mirau}$  為系統的最大掃描深度(maximum scanning depth);  $DOF_{objective}$  為物鏡的 depth of focus；n 為樣本折射率； $n_0$  為填充物折射率。

$$SD_{Mirau} = \frac{DOF_{objective}}{(n-n_0)+\left(\frac{1}{n_0}-\frac{1}{n}\right)} \quad \text{Eq. 2.47}$$

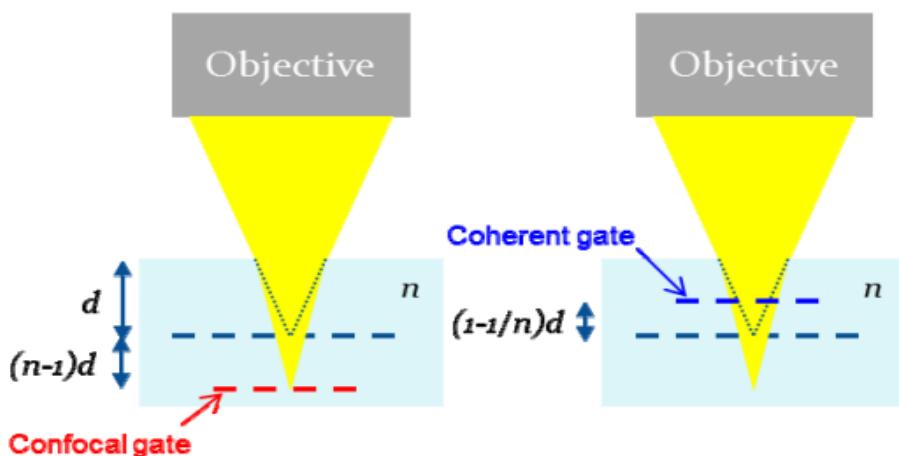


圖 2.33 在填充物介質為空氣時的 walk-off effect 示意圖[20]。左圖為當樣本折射率為  $n$  且掃描深度為  $d$  時 confocal gate 因折射率差而偏移的距離；右圖為 coherent gate 因折射率差而偏移的距離。

由於近紅外光 Mirau based FF-OCT 的光源波長與打在樣本上的光源功率大小皆在活體掃描的安全範圍內，因此近紅外光 Mirau based FF-OCT 可適用於活體角膜掃描中。然而因為系統架構限制，垂直向上的樣本載台如圖 2.6 對於活體角膜掃描會有些許困難，而如果將載台傾斜則 GP2 與 GP3 內的先前所選的矽油會因黏滯係數(viscosity)過低導致流失，因此另外選取了高黏滯性的填充物(KF-96-3000cs； $n = 1.403$ )作為測試，表 2.3 為兩者性能對比。接下來將對高黏滯性的填充物做測試與兩者影像解析度及干涉效率對比。

表 2.3 填充物黏滯性與折射率對比

	Viscosity (cs)	Refraction
KF-96-3000cs	3000	1.403 @ 25°C
Silicon oil	300	1.406 @ 23°C

首先是兩者於近紅外光波長(780 nm)下的折射率測試，測試方法為在 GP3 上放置一環狀玻璃，上層再蓋一層玻璃如圖 2.34。環狀內的空間依次以空氣、Silicon oil、KF-96-3000cs 當填充物並以系統掃描，此時我們可以依次得到掃描出來的 GP3 至上層玻璃的光程距離並按照光程與折射率的關係算出各個填充物的折射率，量



測出的結果 silicon oil 的折射率為 1.41 而 KF-96-3000cs 為 1.405，如圖 2.35，其與理論值的差異極小，細微差異應是溫度導致。

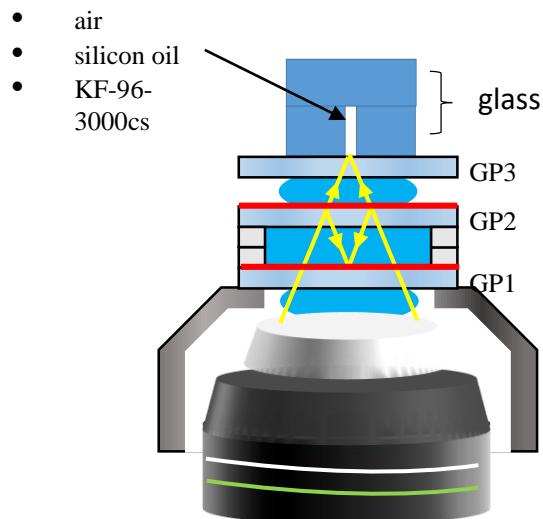


圖 2.34 填充物折射率測試圖。GP3 上放置一環狀玻璃上面再覆蓋一層玻璃，中間的空隙(箭頭處)以放置填充物，隨著掃描便可得到 GP3 上表面至上層玻璃下表面的光程。

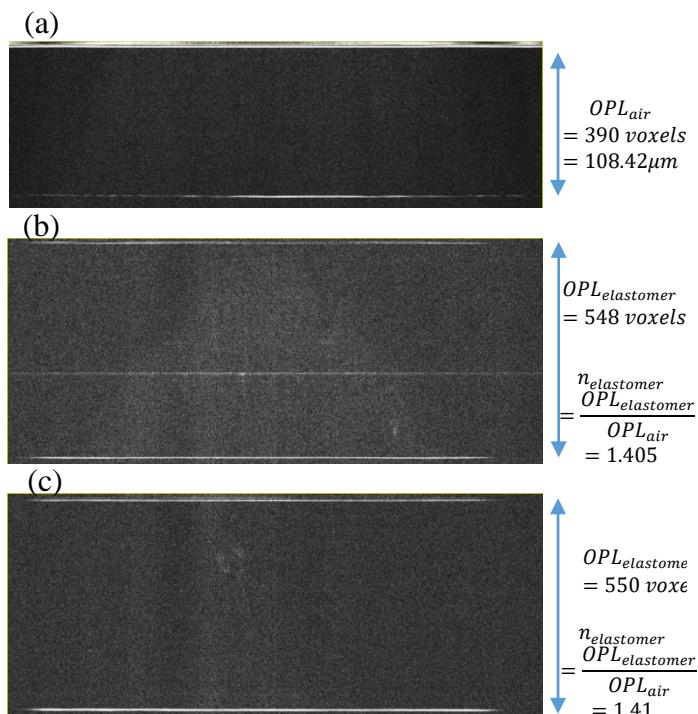


圖 2.35 (a)填充物為空氣時掃描得到之光程；(b)填充物為 KF-96-3000cs 時掃描得到之光程，接著除以空氣為填充物之光程即可得到 KF-96-3000cs 之折射率；(c) 填充物為 silicon oil 時掃描得到之光程，接著除以空氣為填充物之光程即可得到 silicon oil 之折射率。



接下來對使用 KF-96-3000cs 情況下測試橫/縱向解析度與干涉效率，如圖 2.36，測試方法皆與 2.2.3 小節一樣，橫/縱向解析度與干涉效率的測量結果分別為  $1.31\text{ }\mu\text{m}$ 、 $1.25\text{ }\mu\text{m}$  以及  $16\%$  與使用 silicon oil 時的數據  $1.26\text{ }\mu\text{m}$ 、 $1.36\text{ }\mu\text{m}$ 、 $18\%$  差不多。

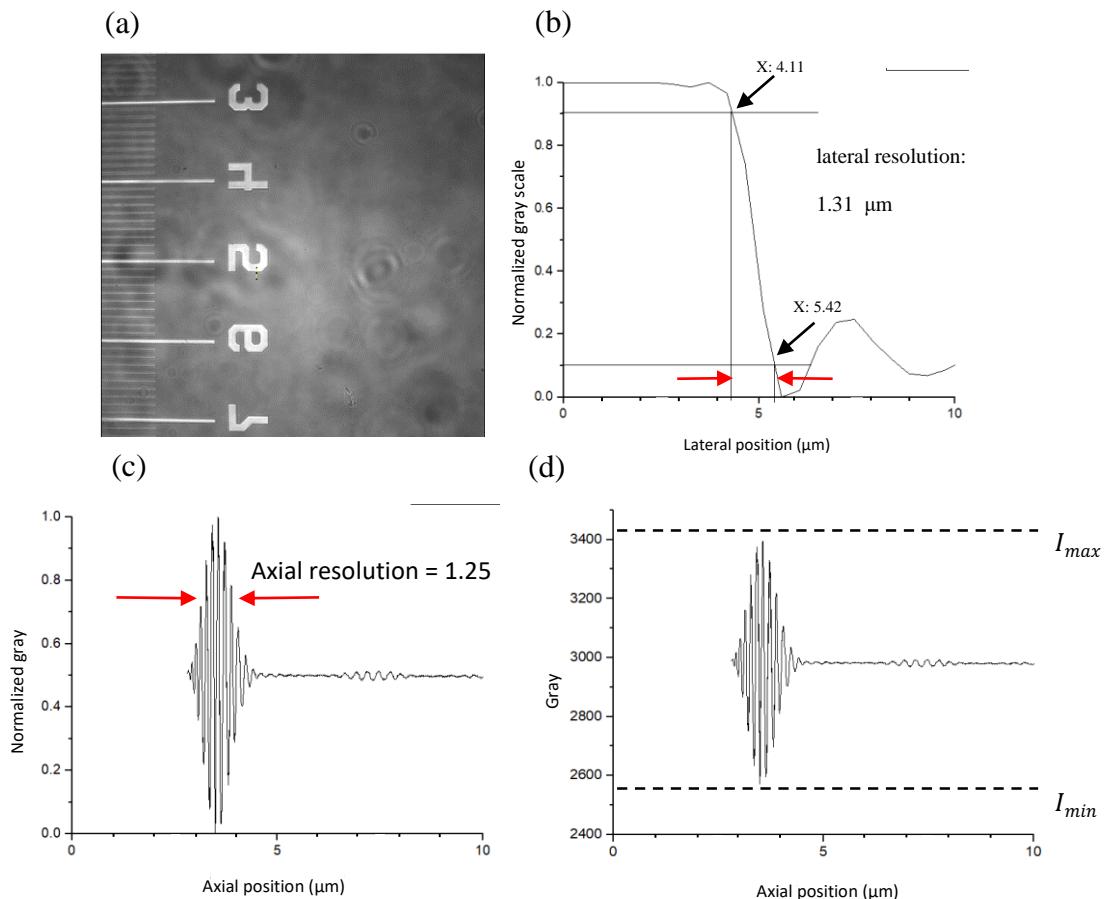


圖 2.36 橫向(a)測試片影像，(b)解析度；(c)縱向解析度與(d)干涉效率



## 2.3 角膜結構介紹

角膜是整個眼球最前端的組織，覆蓋瞳孔、虹膜和前房，其具有透明、無血管和感覺神經豐富的特點。角膜最主要的功用便是提供屈光作用使光線能順利經過水晶體到達視網膜以及保護眼睛避免外來物的侵害。角膜結構總共可分成五層，從外到內分別為上皮細胞層(epithelium)、前彈力層(Bowman's layer)、基質層(stroma)、後彈力層(lamina elastic posterior)、內皮細胞層(endothelium)，如圖 2.37 所示。

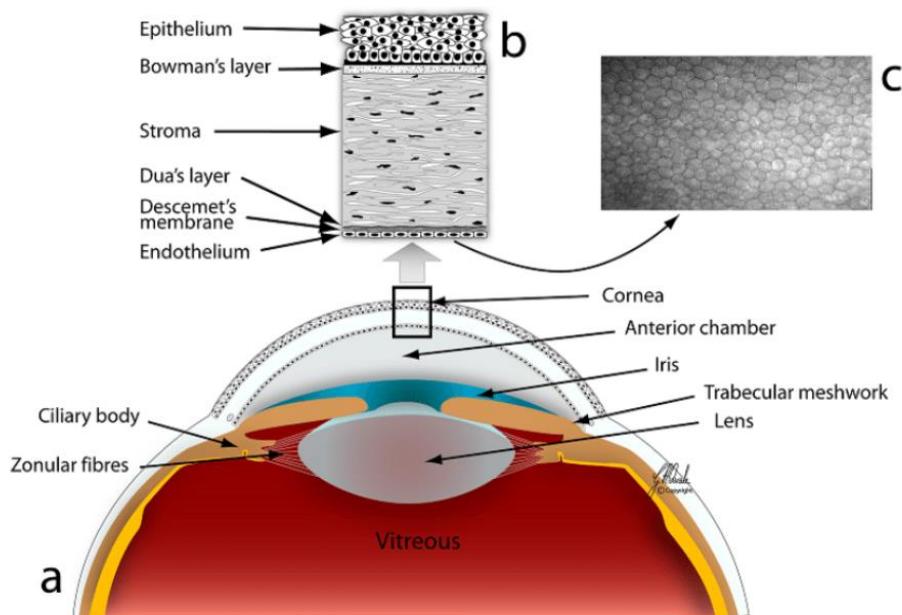


圖 2.37 眼球與角膜各層構造示意圖[21]

接著介紹角膜各層結構特徵與作用，首先是上皮細胞層，上皮細胞層再生能力強，損傷後再生較快，其又可細分為角膜表層上皮細胞(superficial epithelial cell)、角膜翼狀上皮細胞(wing epithelial cell)、角膜基底上皮細胞(basal epithelial cell)，如圖 2.38。角膜表層上皮細胞因為深層的細胞不斷推移擠壓，使的細胞型態由柱狀變為翼狀再變為扁平的鱗狀細胞，由兩到三層的鱗狀細胞組成，為眼睛主要反射介面。角膜翼狀上皮細胞也因深層的細胞推移擠壓，因此由形狀為多邊的翼狀組成，厚度大約兩到三層，細胞核呈長橢圓形，核質緻密。角膜基底上皮細胞由單層柱狀細胞構成，底部有一層基底膜，兩者由半橋粒(hemidesmosomes)連接並與前彈力層相接。

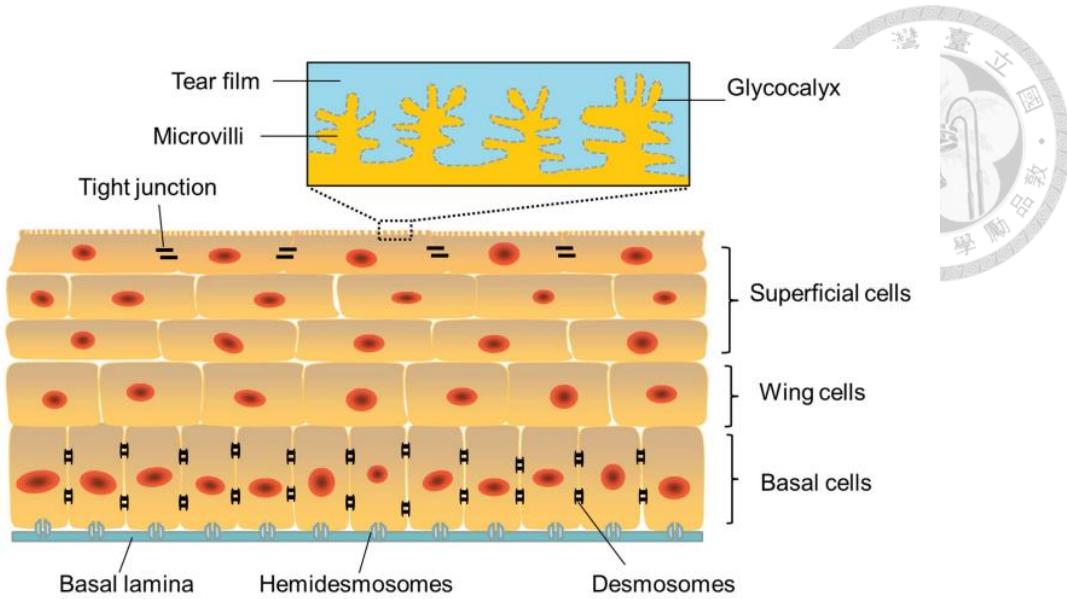


圖 2.38 角膜上皮細胞結構[22]

前彈力層，又稱鮑曼氏膜(Bowman's membrane)，此結構中並無細胞，主要是由膠原纖維組成的透明薄膜，如圖 2.39。此層受到傷害不會再生修復並且是角膜最晚生成的結構。

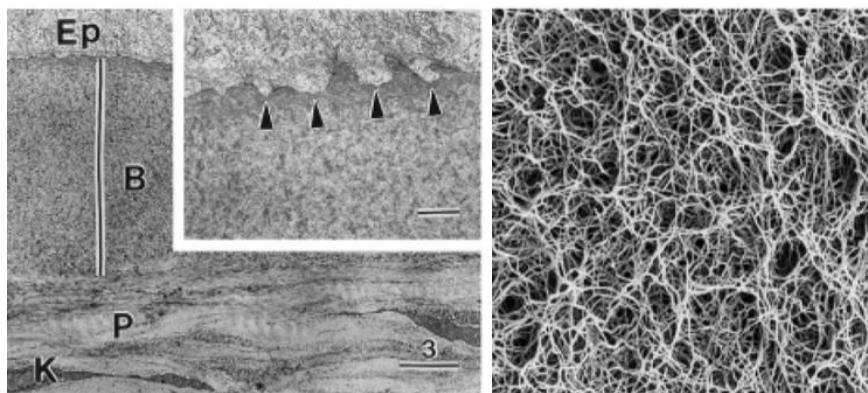


圖 2.39 前彈力層之電子顯微鏡影像，左圖為縱切面影像，右圖為橫切面影像，Ep: epithelium；B: Bowman's layer；P: substantia propria；K: keratocyte. [23]

基質層，為角膜中最厚的一層，主要成分為 I、IV 型膠原纖維。角膜具高透明度便是因為此層的纖維排列規整，各層互相成一定角度重疊，如圖 2.40，其間有固定的和游走的角膜基質細胞(keratocyte)及基質神經(stromal nerve)，並含有豐富的透明質酸(hyaluronic acid)和一定的粘多糖(mucopolysaccharide)。此層損傷後不能再生成，以瘢痕組織(cicatricial tissue)所代替[24]。

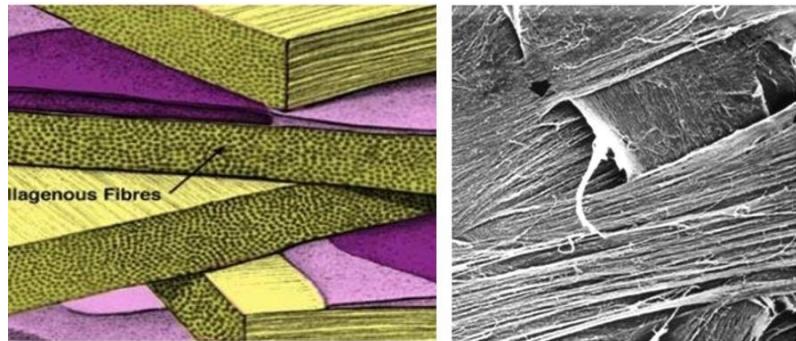


圖 2.40 基質層膠原纖維結構示意圖[25]

後彈力層，是由內皮細胞分泌產生的膠原蛋白組成的一層較堅硬透明的均質膜，富有彈性，抵抗力較強，損傷後可以再生，其會隨年齡增加而增厚。

內皮細胞層，為單層六角形扁平細胞構成，細胞密度會隨著年齡增加而減少。其具有角膜房水屏障的功能，正常情況下，房水不能透過此層滲入到角膜組織中。在嬰幼兒，內皮細胞進行有絲分裂，但成人以後內皮細胞損傷則不能再生，缺失的細胞只有依靠鄰近細胞擴張補缺損區。若角膜內皮細胞失去功能，則角膜可發生水腫和大泡性角膜病變[24]。

角膜神經是角膜組織重要的組成部分，正常的角膜神經功能不僅使角膜成為全身感覺最敏感的部位，對角膜的營養代謝也具有重要作用。另外許多研究也顯示角膜亞基底神經叢(corneal sub-basal nerve plexus)與許多系統性疾病相關，因此了解並量化角膜亞基底神經叢可以做到疾病早期診斷的效果。

角膜的神經主要是由三叉神經(trigeminal nerve)的眼支經睫狀神經(ciliary nerve)延伸分布到角膜。神經呈叢狀分佈於角膜各層，位於基質層的基質神經通常斜向生長，在前彈力層時發出垂直小支穿過前彈力層，在基底細胞的基底膜附近失去髓鞘進入上皮層，並與前彈力層呈平行生長形成亞基底神經叢，再由此分支且垂直延伸至淚膜(tear film)，最後稱此神經為表層神經末梢(superficial nerve terminal)，如圖 2.41。

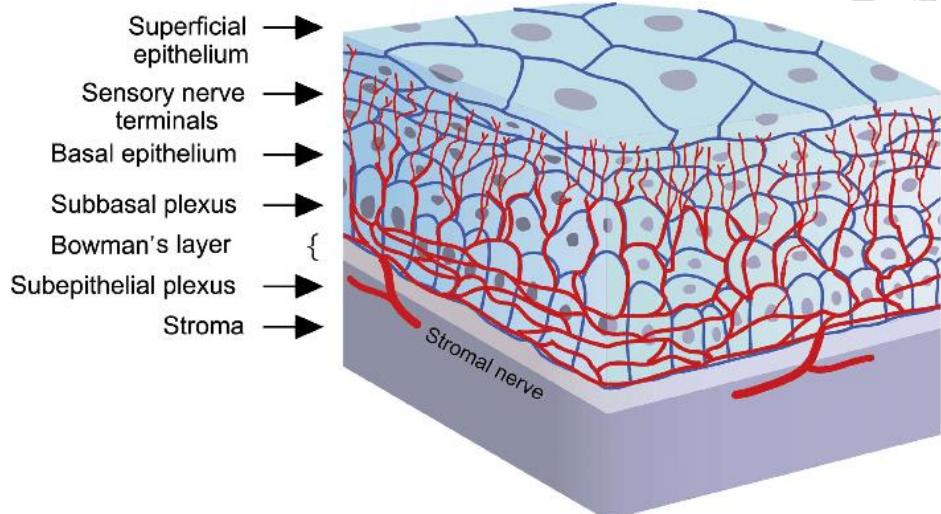
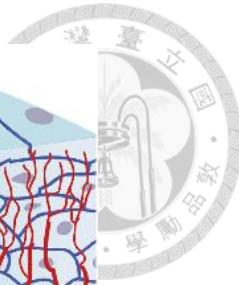


圖 2.41 角膜神經分布[26]



## 第三章 角膜亞基底神經之影像處理與量化分析 方法

目前有許多研究證實有部分疾病與角膜亞基底神經的形貌息息相關[27]，包括且不限於眼表面本身的疾病，因此有個精確的神經形貌描述量化方法可更可觀的做到早期診斷。在本章將會介紹角膜神經的量化分析方法，3.1 小節會說明角膜亞基底神經影像的處理方式，3.2 小節會介紹描述神經形貌的十二個參數，最後 3.3 小節會講解在本論文會使用到的角膜受傷模式小鼠的製備方法。

### 3.1 神經影像之處理方法

在 2.3 小節有提到本研究所探討的亞基底神經叢是由位於基質層(stroma)的基底層神經穿透前彈力層(Bowman's layer)後平行於此層的神經，此神經與前彈力層的距離非常小，另外由於上皮細胞層(epithelium)和前彈力層具有較強的折射率差異[28]，因此當我們使用全域式 OCT 系統掃描角膜樣本時，亞基底神經叢影像會被前彈力層所影響，如圖 3.1 所示。藍色箭頭所指白色區塊為前彈力層，紅色箭頭為亞基底神經，雖然在整個連續影像可以看到完整不間斷的神經，然而在單一影像中亞基底神經會因為前彈力層的干擾而變短或中斷導致後續的神經量化分析造成困難及不準確。

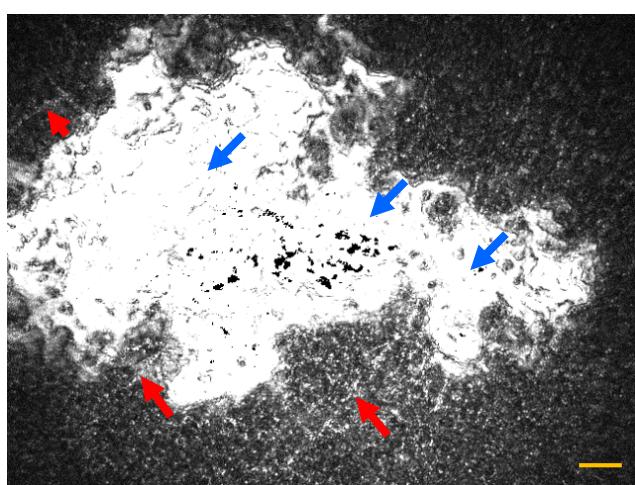


圖 3.1 亞基底神經與前彈力層示意圖。藍色箭頭所指白色區塊為前彈力層，紅色箭頭為亞基底神經。(比例尺：20  $\mu\text{m}$ )



會影響到神經量化分析的因素除了上述所說的前彈力層干擾之外，另外一個原因是角膜為一有曲率的組織而全域式 OCT 系統掃描的影像為由 confocal gate 和 coherent gate 所在之處作為掃描平面，如圖 3.2 所示。雖然經過一段時間的掃描後可得到完整的三維影像，然而在觀察單一影像時會因為曲率關係而在單張影像一次看到多層角膜結構[29]，如圖 3.3。

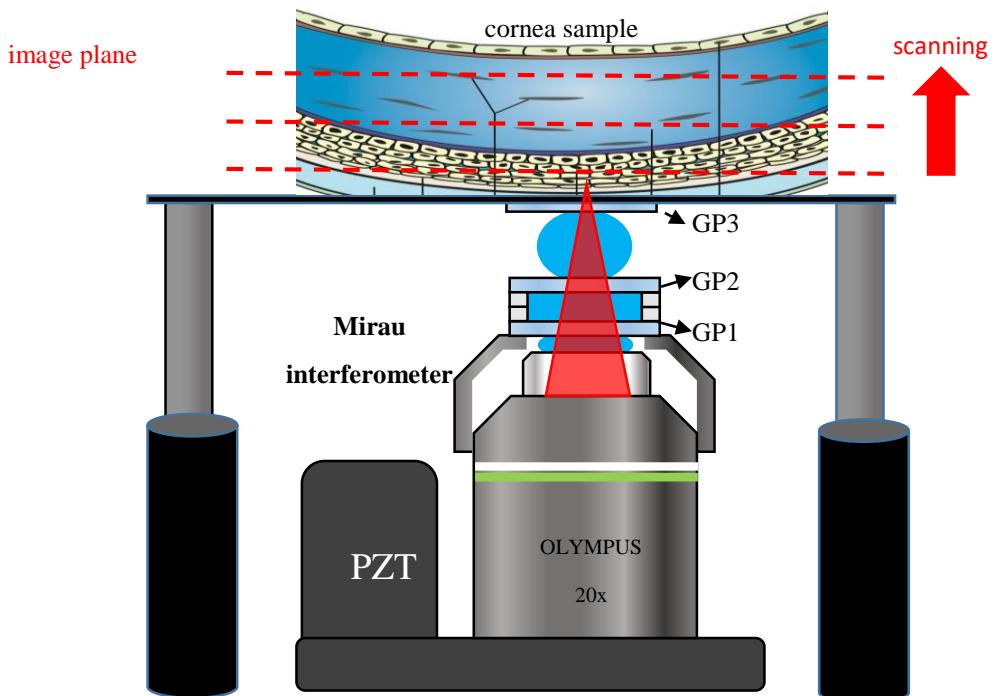


圖 3.2 全域式 OCT 系統的三維影像由多張平面影像組成，因此在掃描具曲率的組織樣本時，便會在單張影像觀察到多層結構。

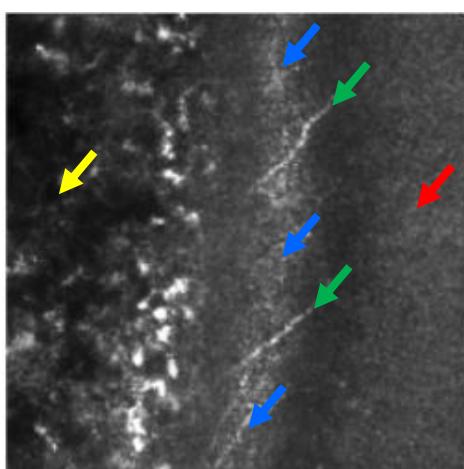


圖 3.3 單張影像觀察到多層結構。紅色箭頭為上皮細胞層；綠色箭頭為亞基底神經；藍色箭頭為前彈力層；黃色箭頭為基質層。[29] (image size : 615 μm \* 615 μm)



所幸基於全域式 OCT 系統的縱向解析度極佳以及在 2.2.2 小節提到的兩張影像之間的距離在可見光及近紅外光下為  $0.2 \mu\text{m}$  和  $0.278 \mu\text{m}$ ，在縱向上有極好的光學切片能力且不會漏掉過多資訊。因此雖然亞基底神經容易被前彈力層干擾，仍然能透過程式將前彈力層與亞基底神經分開，以下將會一一介紹分開前彈力層與亞基底神經的方法。

首先，前面有提到前彈力層因其他層的折射率差異而產生較強的干涉訊號，因此可以此當作標定。然而雖然前彈力層的干涉訊號在角膜基底上層細胞至基質層中算最強的，但在整張 cross section 影像中卻不一定，因此會利用掃描得到的 cross section 影像對每行在選定的範圍內(角膜基底上皮細胞層至基質層前段)由上至下尋找最亮值並標記下位置資訊，如圖 3.4 及圖 3.5。

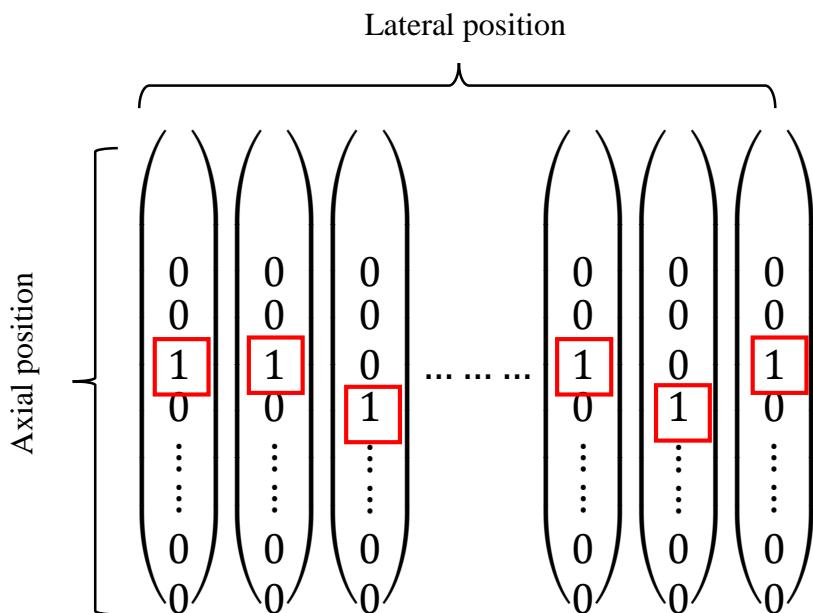


圖 3.4 標定並選取位置示意圖。假設 1 為最亮點 0 為非最亮點，分次在每一行對比縱向上的點得到最亮值並記錄下其位置。

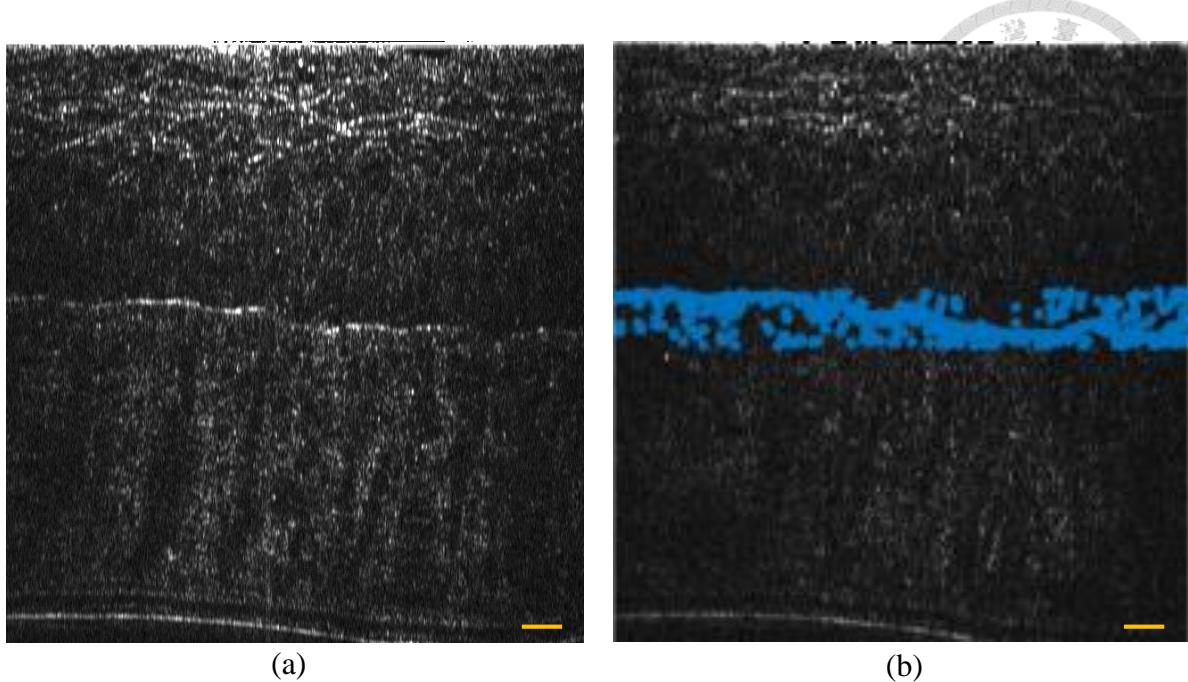


圖 3.5 (a) 角膜 cross section 影像原圖；(b) cross section 加上標記點，藍點為選定範圍內的最亮點。(比例尺：20  $\mu\text{m}$ )

在得到標記點深度位置資訊後無法直接使用，因為可以從圖 3.5 看到雖然大部分準確的標記在前彈力層，但也有少部分標記到其他地方，因此需要透過曲線擬合 (curve fitting) 得到最吻合前彈力層標記點的函數曲線，最後使用此曲線對應的 y 值作為深度資訊。

在這邊選擇使用 15 次方之高階多項式做為擬合之曲線，選擇 15 次方的原因為如果使用過低階作為擬合曲線會造成無法完美描述出前彈力層形貌的情況，如圖 2.46，而如果使用過高次之多項式在表現上也不會有更好的結果，只會增加對電腦的負荷導致運算時間增加。圖 3.6 中分別為用 15 次式與 2 次之差異，可以看到就算看起來很平滑的前彈力層也無法單純用二次式完美擬合。

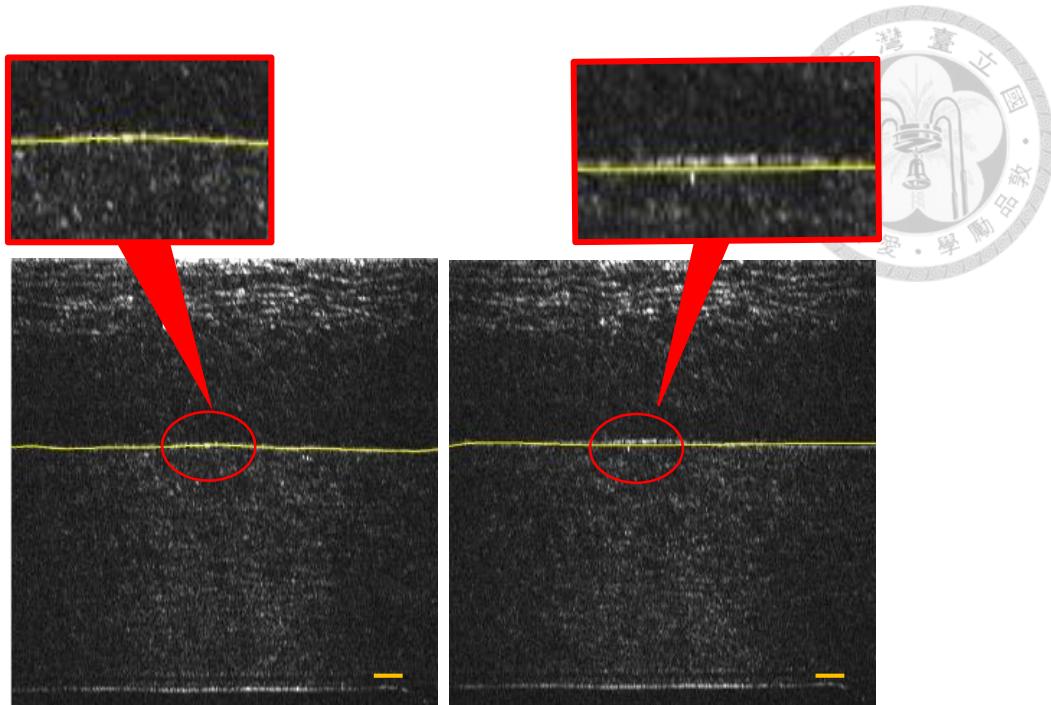


圖 3.6 左圖為使用 15 次高階多項式擬合結果，右圖為使用低階多項式擬合結果。從圈出來放大的方框可以看出明顯對比，左圖明顯較完美的貼合在前彈力層上。(比例尺：20 μm)

在使用曲線擬合時比較特別的是因為是由高階多項式當擬合函數，因此需要較多的横向點數才能得到較精確的結果，因此在擬合前需要先將整張影像做內插以得到足夠的横向點數，得到擬合函數後再以原圖大小的橫軸帶入得到相對應的縱軸座標，其過程大致如圖 3.7。

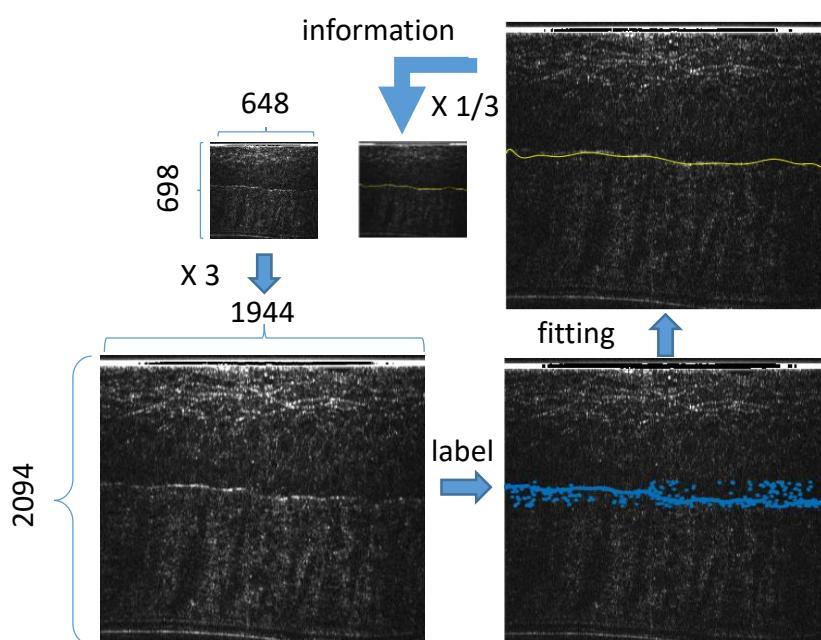


圖 3.7 原圖至得到前彈力層擬合曲線之流程圖



此時得到的擬合曲線仍需要經過最後的校正，其原因為前面提到的某些標記點不在前彈力層上，導致擬合曲線會有一點誤差，因此最後使用設定標準差 $\sigma$ 的1.5倍作為閥值(threshold)，如 Eq. 3.1 所述。 $y_i$ 為影像中每個標記點的深度資訊， $y_{fitting\ curve}$ 為擬合曲線得到的深度資訊。

$$\text{threshold} = 1.5\sigma = 1.5 \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - y_{fitting\ curve})^2} \quad \text{Eq. 3.1}$$

當有某個標記點的深度資訊扣除相對應的擬合曲線之深度資訊大於閥值時，代表其為過於極端之誤差，此標記點便不被使用，會將其更改為擬合曲線的深度資訊而非原始的，反之，則繼續使用原始的深度資訊，如圖 3.8 (a)，紅框為誤差過大之標記點。最後再用校正過的深度資訊再做一次曲線擬合，即可避免因誤差導致曲線擬合有問題，如圖 3.9。

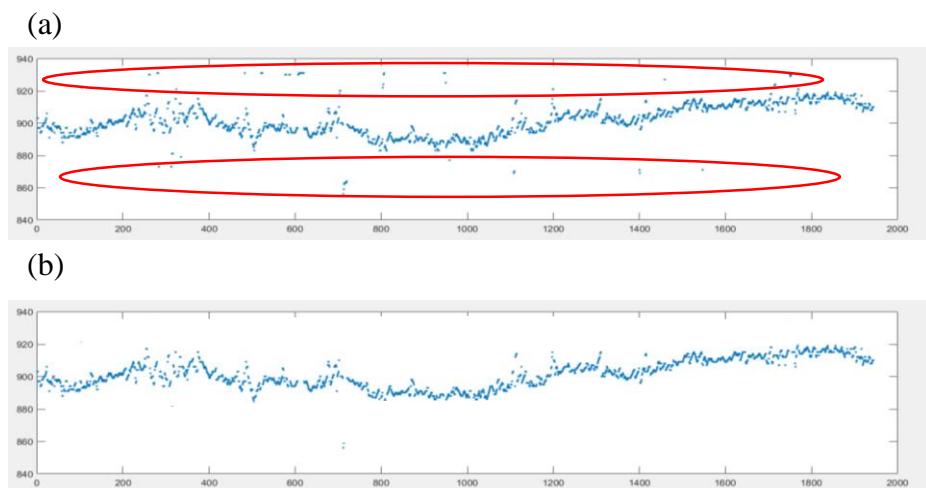


圖 3.8 (a)原始標記點，具有誤差過大的深度資訊，(b) 經過閥值校正後誤差過大的點已被消除。(縱軸/橫軸單位：voxel / pixel，由於此圖為內插過因此單位換算為  $0.06\ \mu\text{m} / \text{voxel}$ 、 $0.15\ \mu\text{m} / \text{pixel}$ )

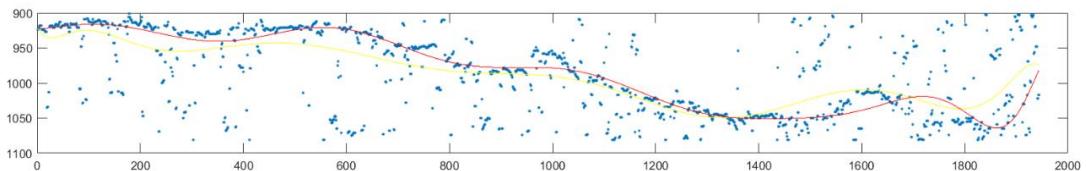


圖 3.9 藍點為原始深度資訊標記點。黃線為未經閥值校正的擬合曲線，紅線為經閥值校正的擬合曲線，可以清楚看到黃線因被極值影響的關係而偏離藍點密度最大的位置，反之紅線比黃線更精確的擬合出藍點的趨勢。(縱軸/橫軸單位：voxel / pixel，由於此圖為內插過因此單位換算為  $0.06\ \mu\text{m} / \text{voxel}$ 、 $0.15\ \mu\text{m} / \text{pixel}$ )



經過上述步驟即可得到單張 cross section 代表前彈力層形貌的擬合曲線，接著再同理對其餘 cross section 影像做相同步驟並合併即可得到三維曲面，如圖 3.10。

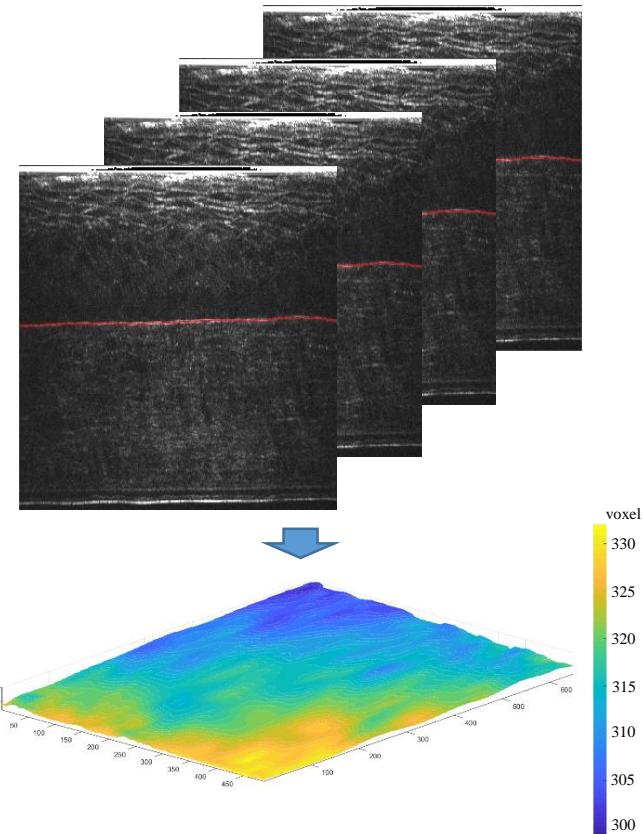


圖 3.10 多張 cross section 依次做曲線擬合並合併成三維曲面。下方圖的 scale bar 為深度資訊。 $(0.2 \mu\text{m} / \text{voxel})$

此時的三維曲面僅僅只是深度資訊，因此最後我們需要賦予曲面灰階值資訊。將曲面上每一個像素點(pixel)用原圖對應深度的灰階值資訊帶入，最終便可得到完整的前彈力層三維地形圖。

基於前面提到的亞基底神經叢平行生長於前彈力層上以及全域式 OCT 系統良好的光切片能力，在得到前彈力層的曲面後，將其向上位移即可得到亞基底神經叢之三維地形圖，最終達成分離前彈力層與亞基底神經叢的目標。從多個小鼠角膜樣本得知前彈力層與亞基底神經叢大約距離  $1\sim2 \mu\text{m}$ ，如圖 3.11。

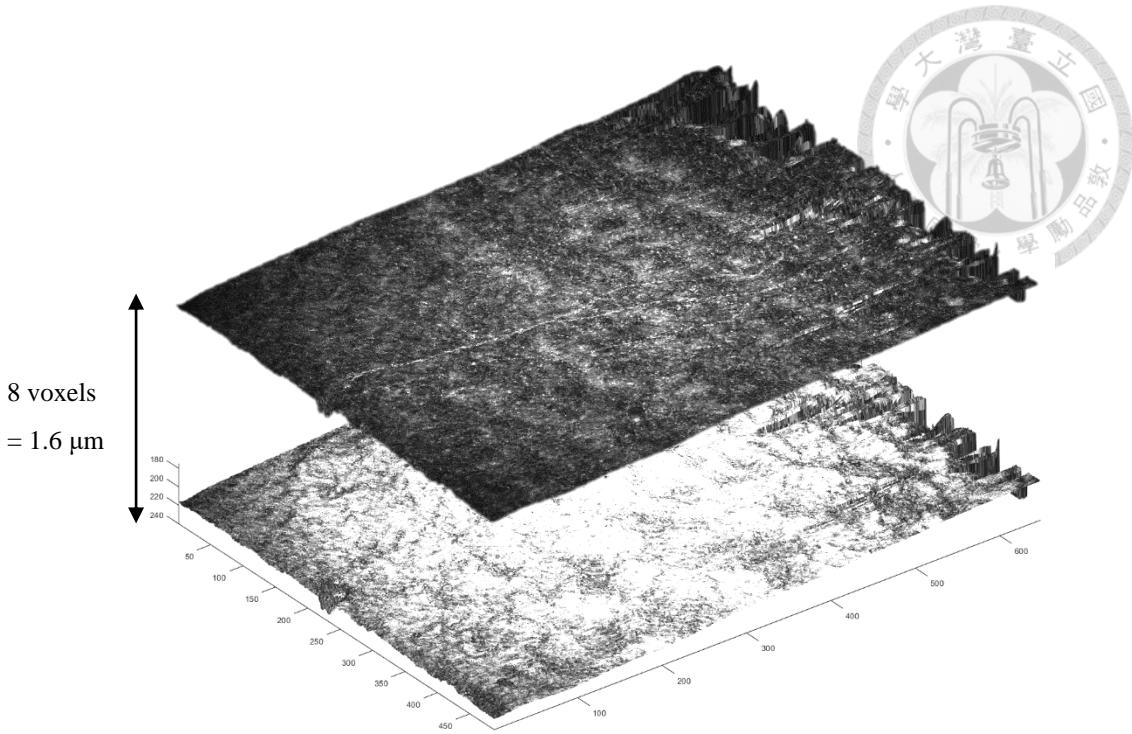


圖 3.11 前彈力層與亞基底神經叢三維地形圖。上方為亞基底神經叢地形圖，下方為前彈力層地形圖，兩者大約距離  $1.6 \mu\text{m}$ 。

由於此時三維地形圖的 image size 跟原圖一致，只是每個 pixel 多了深度資訊，因此只要最後將三維地形圖的深度資訊去掉即可得到投影至二維的分析量化神經所需的最終校正後影像，如圖 3.12，其中紅色箭頭為亞基底神經，藍色箭頭所指大塊白色區域為前彈力層。圖 3.12 (a ~ d)為正常掃描後未經處理得到之深度  $65 \sim 68 \mu\text{m}$  處影像，可以看到亞基底神經與前彈力層幾乎同時出現且前彈力層對亞基底神經的干擾極為嚴重。圖 3.12 (e)、(f)分別為前彈力層及亞基底神經經過上述步驟得到三維地形圖後對二維投影的影像，兩者之間很好的區分開來並且得到完整的前彈力層及亞基底神經叢之照片。

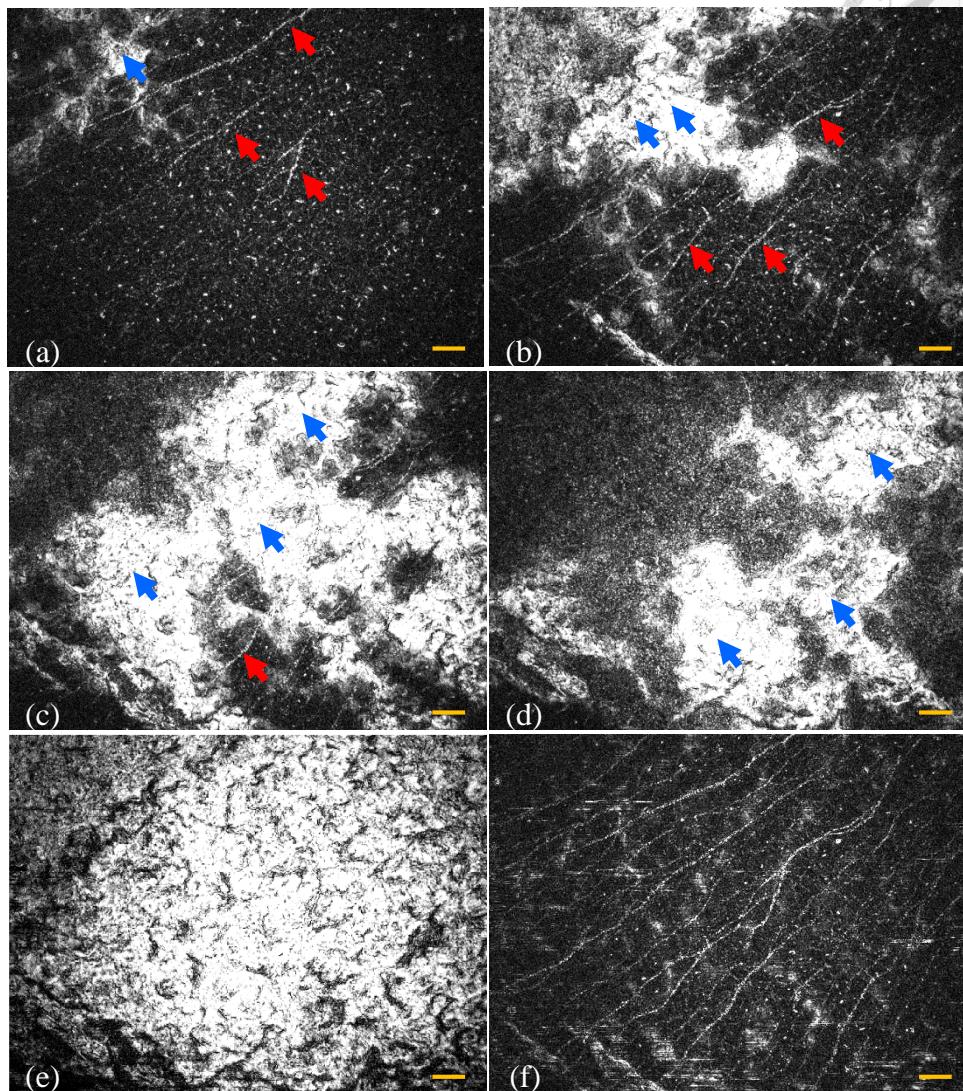


圖 3.12 (a~d)經全域式 OCT 掃描後未經處理得到之不同深度影像。(e)經處理得到三維地形圖後投影至二維之前彈力層影像。(f) 經處理得到三維地形圖後投影至二維之亞基底神經叢影像。(比例尺：20  $\mu\text{m}$ )

此程式除了可用在前彈力層與亞基底神經叢的分割外，亦可用在其他因曲率而無法完整呈現在單張影像的其他層，如內皮細胞層。將標記點所感興趣的範圍從前彈力層移至內皮細胞層附近，如圖 3.13，之後步驟與上述一致，即可得到完整的內皮細胞層影像，如圖 3.14，這對於調查內皮細胞層數量、密度等也有極大的幫助。

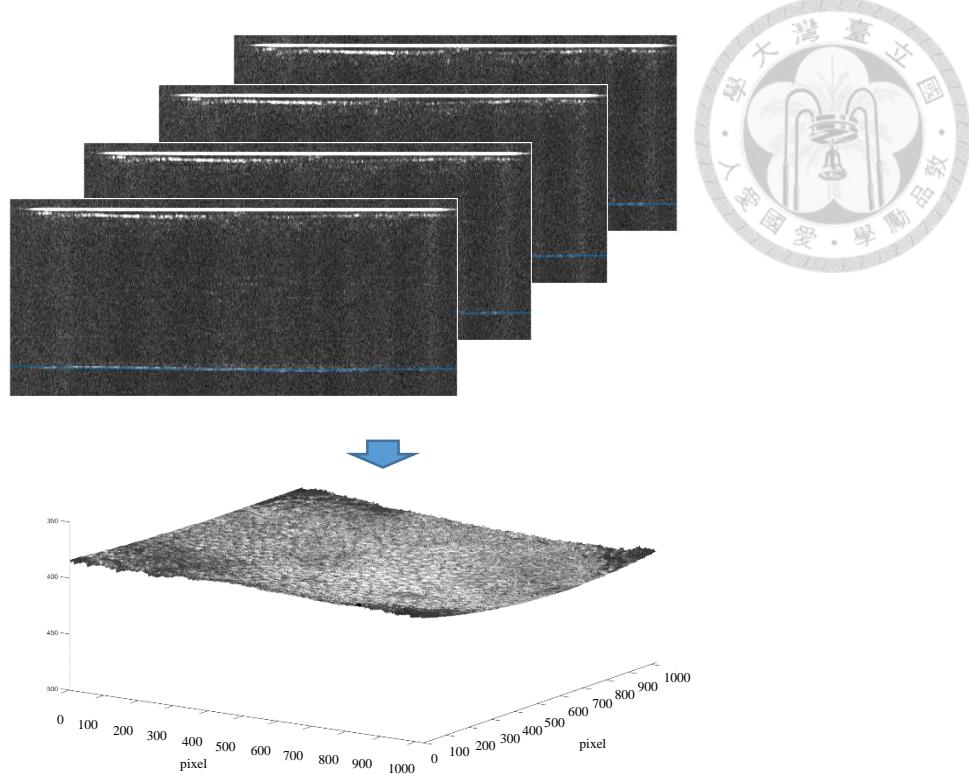


圖 3.13 內皮細胞層之三維地形圖。

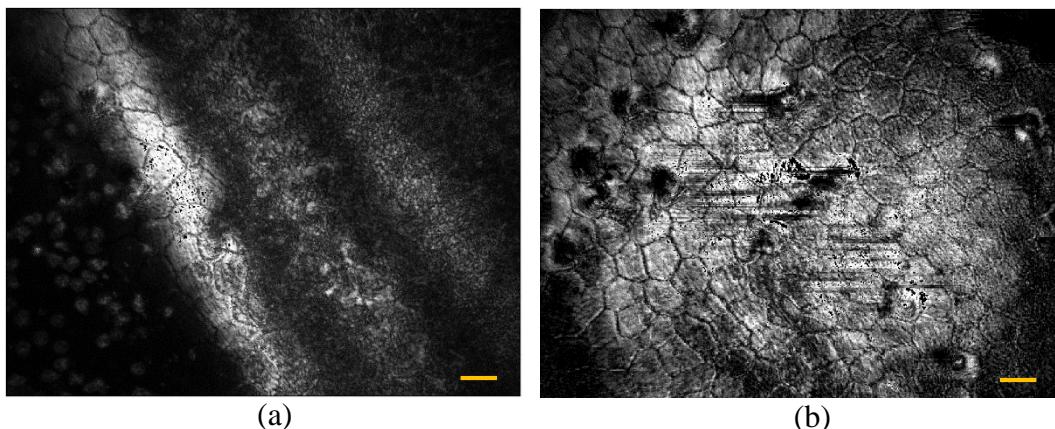


圖 3.14 (a)未經程式處理得到之內皮細胞影像，因曲率關係無法看到完整的內皮細胞層。  
 (b)由內皮細胞層之三維地形圖投影至二維之影像，與左圖對比可以得到更多內皮細胞層之資訊。(比例尺：20  $\mu\text{m}$ )



## 3.2 神經影像之量化分析

本文旨在探討健康與受傷過的角膜亞基底神經在形貌上的變化，因此在這一小節先介紹描述神經形貌的量化參數，在下一章介紹受傷角膜的製備方法與掃描流程。

在介紹神經量化參數前先介紹亞基底神經的分類，亞基底神經主要分為三類，分別為主幹神經(main fiber)、分枝神經(branch fiber)與短神經(short fiber)[29]，此三種神經分類如圖 3.15 所示，紅線為主幹神經，藍線為分枝神經，綠線為短神經。

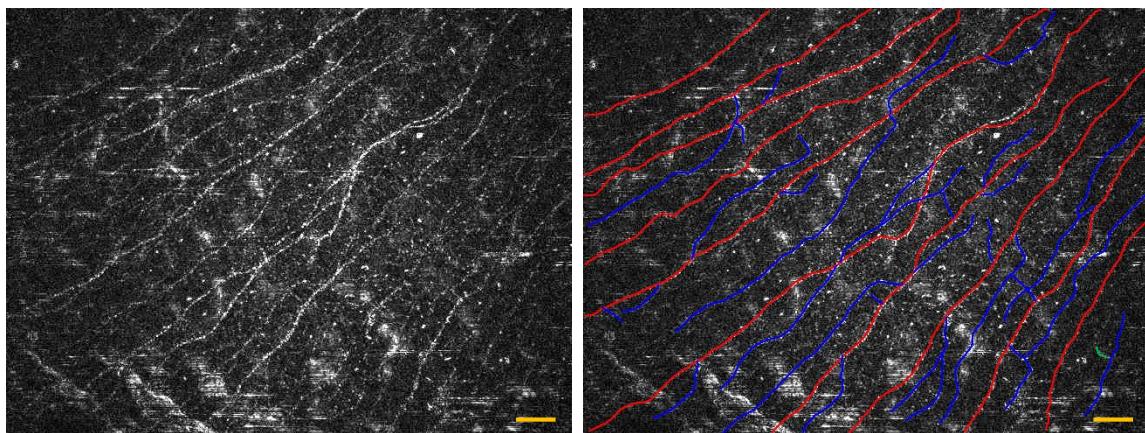
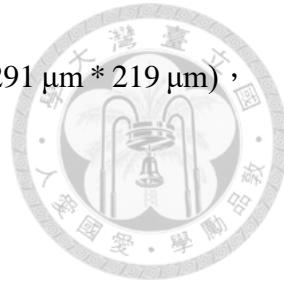


圖 3.15 神經分類圖。左圖為亞基底神經影像原圖，右圖為經過類後的亞基底神經影像圖，紅線為主幹神經，藍線為分枝神經，綠線為短神經。

接著介紹本文所使用之角膜神經量化的 12 個參數，此 12 個參數為前人所開發[31]，除了常見的亞基底神經密度、主幹神經密度之外還另新增了其他參數以期可以更加詳細的描述神經的形貌，分別為：角膜亞基底神經密度(nerve fiber length density; NFL)、主幹神經密度(number of main nerve fiber density; NFD)、分枝神經密度(number of branch nerve fiber density; BND)、分枝神經點連接密度(branch nerve connected point density; BNCD)、角膜神經扭曲度(tortuosity coefficient; TC)、分枝主幹比(branch main fiber ratio; BMR)、平均分枝點(branch nerve connection per main fiber; BNCM)、角膜神經寬度(corneal nerve fiber width; NFW)、角膜 K 結構(corneal K line)、短神經數(number of short nerves)、平行性(parallelism)、平行性標準差。下面分別介紹其定義與數學式，由於本研究之神經影像皆經過 3.1 小節的 curve plane



tracing and projection 程式，因此下述之面積皆為整張視域大小( $291\text{ }\mu\text{m} * 219\text{ }\mu\text{m}$ )，而不會只選取緊鄰神經的面積。

### 1. 角膜亞基底神經密度(NFL):

定義為神經總長度除以面積，其數學形式由 Eq. 3.2 所示。

$$\text{NFL} = \frac{\text{total nerve fiber length}}{\text{area}} \left( \frac{\text{mm}}{\text{mm}^2} \right) \quad \text{Eq. 3.2}$$

### 2. 主幹神經密度(NFD):

定義為主幹神經數量除以面積，其數學形式由 Eq. 3.3 所示。

$$\text{NFD} = \frac{\text{number of main nerve fibers}}{\text{area}} \left( \frac{1}{\text{mm}^2} \right) \quad \text{Eq. 3.3}$$

### 3. 分枝神經密度(BND):

定義為分枝神經數量除以面積，其數學形式由 Eq. 3.4 所示。

$$\text{BND} = \frac{\text{number of branch nerve fibers}}{\text{area}} \left( \frac{1}{\text{mm}^2} \right) \quad \text{Eq. 3.4}$$

### 4. 分枝神經點連接密度(BNCD):

定義為分枝神經與主幹神經交會點數量除以面積，其數學形式由 Eq. 3.5 所示。

$$\text{BNCD} = \frac{\text{number of connected point}}{\text{area}} \left( \frac{1}{\text{mm}^2} \right) \quad \text{Eq. 3.5}$$

### 5. 分枝主幹比(BMR):

定義為分枝神經數量除以主幹神經數量，其數學形式由 Eq. 3.6 所示。

$$\text{BMR} = \frac{\text{number of branch nerve fibers}}{\text{number of main nerve fibers}} \quad \text{Eq. 3.6}$$

### 6. 平均分枝點(BNCM):

定義為分枝神經與主幹神經交會點數量除以主幹神經數量，其數學形式由 Eq. 3.7 所示。

$$\text{BNCM} = \frac{\text{number of connected point}}{\text{number of main nerve fibers}} \quad \text{Eq. 3.7}$$

### 7. 角膜神經扭曲度(TC):



其分為單條角膜神經扭曲度  $\tau$  與平均扭曲度  $\bar{\tau}$ 。

定義為神經路徑長除以神經起終點位移距離後用 1 減去，此參考了 CCMetrics 之公式[31]，其數學形式由 Eq. 3.8 所示。其中  $\tau(n_i)$  為第  $i$  條角膜神經之扭曲度， $X_{si}$  為第  $i$  條角膜神經之起始點座標， $X_{ei}$  為第  $i$  條角膜神經之終點座標， $|X_{si} - X_{ei}|$  即為單條神經位移距離。 $d_i$  為神經路徑長。當角膜神經越扭曲，則此值越接近 1，反之則接近 0。

$$\tau(n_i) = 1 - \frac{|X_{si} - X_{ei}|}{d_i} \quad \text{Eq. 3.8}$$

平均扭曲度為整張影像多條神經扭曲度之平均值，其數學形式由 Eq. 3.9 所示。M 為整張影像中總神經數量。

$$\bar{\tau} = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \tau(n_i) = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \left( 1 - \frac{|X_{si} - X_{ei}|}{d_i} \right) \quad \text{Eq. 3.9}$$

#### 8. 角膜神經寬度(NFW):

定義為角膜神經強度分布圖的半高全寬，如圖 3.16。

由於人眼角膜亞基底神經直徑在  $1.51 \pm 0.74 \mu\text{m}$ [30]，而可見光與近紅外光 FF-OCT 系統之解析度分別為大約 0.9 與  $1.3 \mu\text{m}$ ，兩者之間的大小相當接近，因此量測到的半高全寬需要透過 Eq. 3.10 校正才會是真正的神經寬度。

$$\text{NFW} = \sqrt{d_{FWHM}^2 - d_{lateral resolution}^2} \quad \text{Eq. 3.10}$$

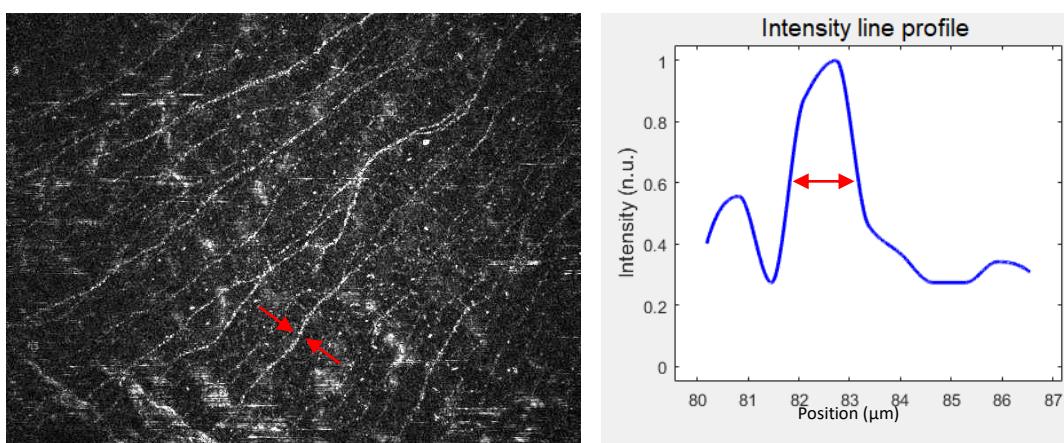


圖 3.16 左圖為角膜亞基底神經影像，紅箭頭處為待測寬度之神經。右圖為左圖紅箭頭處亞基底神經之強度分布，右圖之紅箭頭為代測神經強度分布之半高全寬，即為其神經寬度。



#### 9. 角膜 K 結構等級(K line grade):

以人工方式判讀，其區分為四個等級，每個等級定義如下。各層級示意圖如圖 3.17。

Grade 1：無 K-line，影像平滑且能清楚看見神經走向。

Grade 2：有 K-line，影像可看到明顯皺褶感但不影響神經走向。

Grade 3：有明顯 K-line，神經走向已被皺褶切斷但切斷處還無法看到基質層的 keratocytes。

Grade 4：有明顯 K-line，神經走向已被皺褶切斷且在切斷處可看到基質層的 keratocytes。

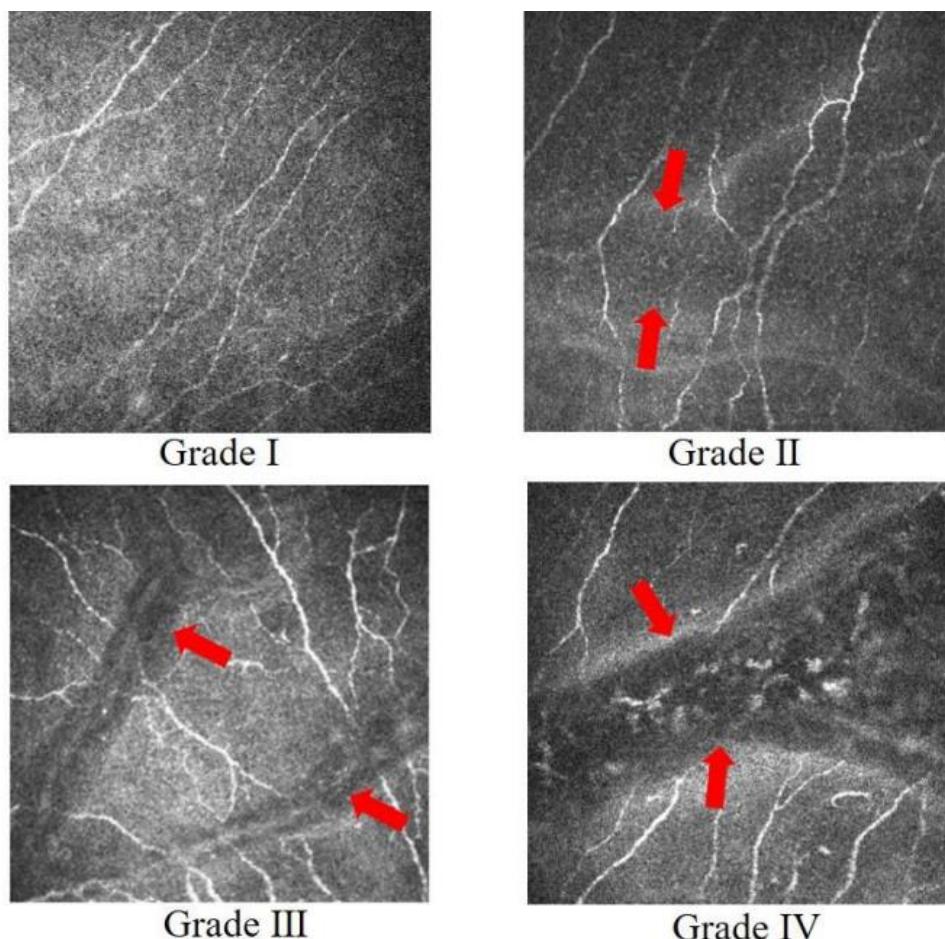


圖 3.17 K-line 各層級示意圖。紅色箭頭處之皺褶即為 K-line。[31]



#### 10. 短神經數(number of short nerves):

定義為影像中長度介於  $20 \sim 50 \mu\text{m}$  之神經。

#### 11. 平行性(parallelism):

定義為主幹神經與分枝神經的夾角，其示意圖如圖 3.18 (a)所示，紅箭頭為主幹神經，藍箭頭為分枝神經。在某些疾病中亞基底神經的平行性具有差異性，其計算方式如下。令主幹神經之起終點向量為  $\overrightarrow{R_m}$ ，分枝神經之起終點向量為  $\overrightarrow{R_b}$ ，將兩者歸一化後做內積即可得到平行性係數，其示意圖如圖 3.18 (b)，而數學式由 Eq. 3.11 所示。此時得到的為一條主幹神經和與其相交的單條分枝神經之平行性係數，而整張影像有不同的分枝神經，每個分枝神經與主幹神經皆有一個平行性係數，因此最後由每個得到的平行性係數做平均以及他們的標準差  $\sigma$  來描述整張影像的神經夾角程度，數學式由 Eq. 3.12 及 Eq. 3.13 所示。值越趨近於 0 即代表較不健康。

$$P(n_i) = |\overrightarrow{R_m} \cdot \overrightarrow{R_b}| \quad \text{Eq. 3.11}$$

$$P = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m P(n_i) = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m |\overrightarrow{R_m} \cdot \overrightarrow{R_b}| \quad \text{Eq. 3.12}$$

$$\sigma_P = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n [P(n_i) - \bar{P}(n)]^2} \quad \text{Eq. 3.13}$$

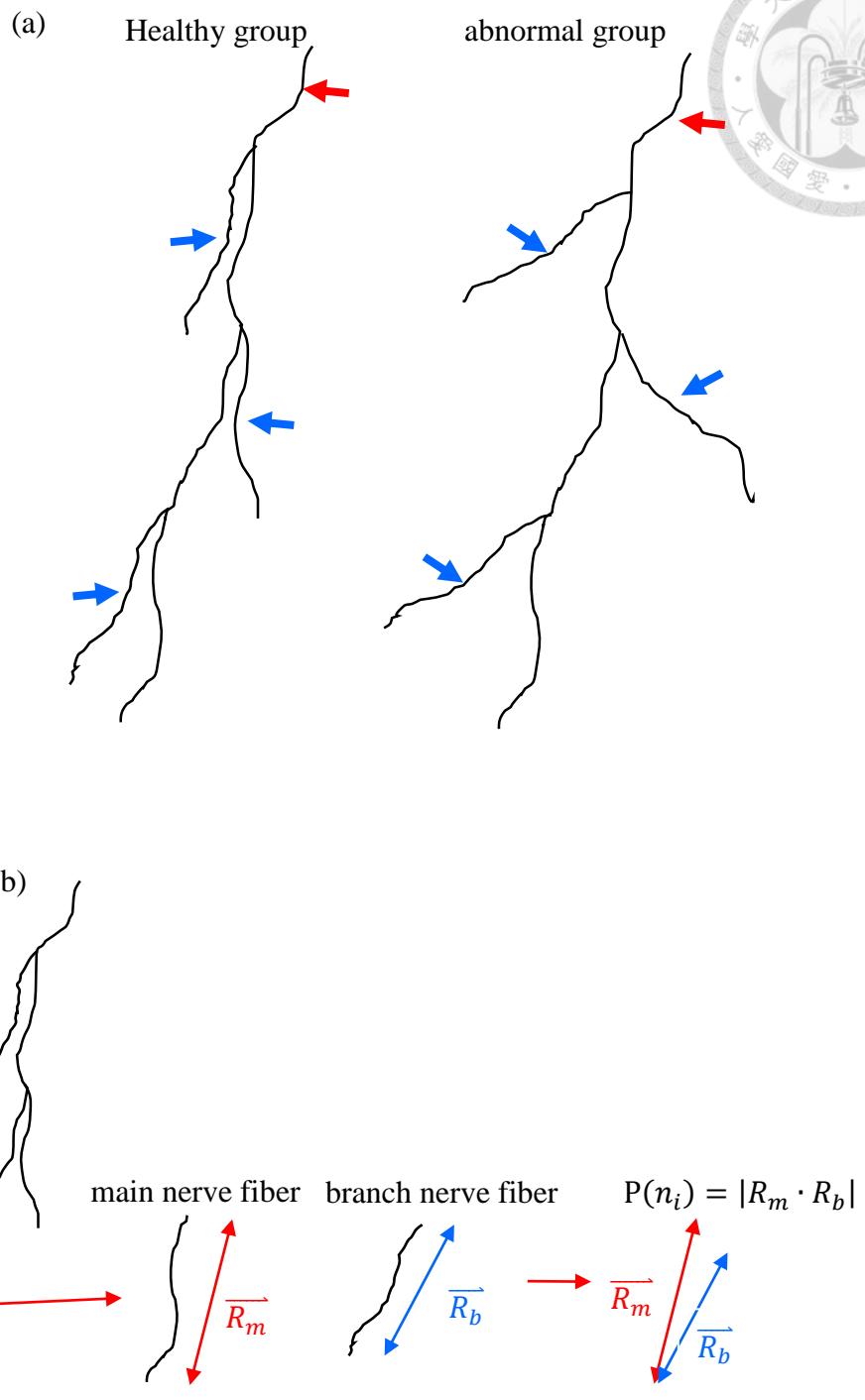


圖 3.18 (a)主幹神經與分枝神經夾角示意圖，紅箭頭為主幹神經，藍箭頭為分枝神經。(b)平行性計算方式，將主幹與分枝神經的向量歸一化後做內積。



## 第四章 FVB 小鼠檢體角膜量測與分析結果

本章將利用可見光 Ce<sup>3+</sup>:YAG 自發輻射之 Mirau-based FF-OCT 系統對分別為健康與受傷狀況的 FVB 小鼠進行掃描，並透過 curve plane tracing and projection 程式將亞基底神經影像製作成三維地形圖，最後再將其投影至二維得到 flattened image 從而得到完整的亞基底神經影像並做後續的量化分析，以得到較精確的關於健康與受傷角膜之亞基底神經形貌變化。4.1 小節會介紹健康的 FVB 小鼠角膜檢體掃描影像結果，接著 4.2 小節介紹受傷模式的 FVB 小鼠角膜檢體掃描影像結果，最後在 4.3 小節分析健康與受傷角膜之亞基底神經在量化上的差異。

### 4.1 *Ex vivo* 正常 FVB 小鼠角膜量測分析

4.1.1 小節會介紹健康的 FVB 小鼠角膜檢體製備方法，4.1.2 小節介紹角膜的掃描影像結果，4.1.3 介紹角膜亞基底神經之量化分析結果。

#### 4.1.1 小鼠角膜樣本之製備與量測方法

實驗所用之樣本為年齡十週至十四週之 FVB 小鼠，下面為製備檢體角膜程序。

步驟一：

使用 0.5 ml 的針筒抽取與小鼠體重相對應劑量之麻醉劑，使用的麻醉劑為舒泰 (Zoletil) 與若朋 (Rompun) 混和溶液，混和劑量分別為 0.25 ml/kg 和 0.2 ml/kg。

步驟二：

需帶麻布手套以防麻醉時遭到小鼠咬傷，帶好麻布手套後用食、拇指抓住小鼠的後頸，並用無名指小指夾住尾巴防止小鼠逃脫，以及避免在注射麻醉時小鼠回頭反咬，確保按在鐵籠上無法動彈後，將配製好的麻醉藥注入小鼠的後腿肌肉處。

步驟三：

等待舒泰與若朋混合之藥劑發作並確認小鼠已昏迷後，將 0.3 ml 氯化鉀 (KCL) 注射進心臟處對其進行安樂死。注射完後須按壓小鼠後腳掌，以確定小鼠已失去生命跡象，沒有反射反應才可進行下一步驟取下小鼠角膜。



步驟四：

取下眼球後將其放置在可見光 Mirau-based FF-OCT 系統的 GP3 上，並用 Kimtech 拭鏡紙所搓成的四條細條狀組成井字型以固定眼球，以免在掃描過程中滑掉，如圖 4.1。

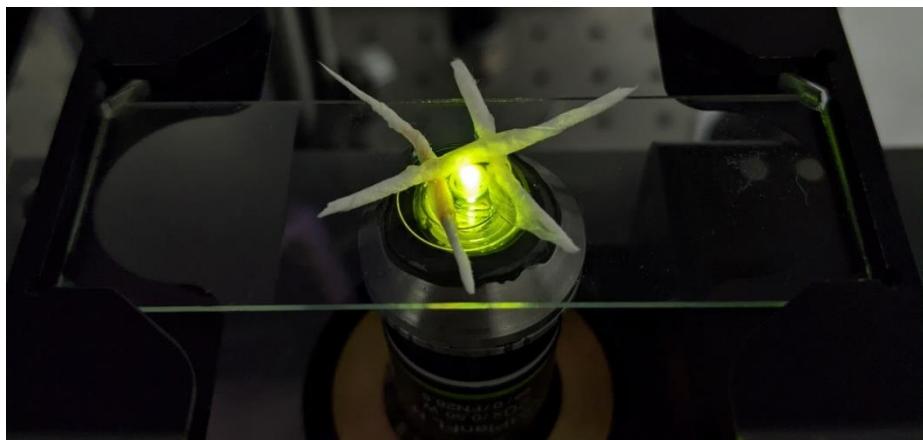


圖 4.1 眼球放置方式示意圖

步驟五：

使用 2% Methocel ( $n = 1.336$ )的溶液滴在眼球做為與 GP3 間的媒介，以此來降低 GP3 ( $n = 1.45$ )、空氣( $n = 1$ )及角膜( $n = 1.37$ )之間因折射率差異形成的強反射面，最後調整擺放角度，以便進行角膜影像掃描。



#### 4.1.2 小鼠角膜量測結果與影像分析

本小節為 Ce<sup>3+</sup>:YAG Mirau-based FF-OCT 系統所掃描之 FVB 小鼠健康角膜檢體影像。在 2.3 小節時有提到角膜的五層結構，分別為上皮細胞層(epithelium)、前彈力層(Bowman's layer)、基質層(stroma)、後彈力層(lamina elastic posterior)、內皮細胞層(endothelium)，接著會依序介紹各層所對應的掃描影像。

首先是從上皮細胞層至前彈力層，上皮細胞層可細分為角膜表層上皮細胞(superficial epithelial cell)、角膜翼狀上皮細胞(wing epithelial cell)、角膜基底上皮細胞(basal epithelial cell)，由於本實驗室所使用之 OCT 系統具有細胞等級的解析度及光學切片能力，因此對於細分的上皮細胞層依然能在影像上被區分出來。

圖 4.2 (a)為上皮細胞層至前彈力層的縱切面影像，其中紅色括號部分為角膜表層上皮細胞，角膜表層上皮細胞因為深層的細胞不斷推移擠壓，使得細胞型態最終變為扁平的鱗狀細胞，由兩到三層的鱗狀細胞組成，而從影像上可以很好的看出角膜表層上皮細胞扁平和多層的特性。角膜表皮上層細胞所對應的橫切面影像為圖 4.2 (b)中深度 0 μm 至 20 μm，在橫切面影像中可以看到表皮上層細胞很明顯的為鱗狀結構，並且在黃色箭頭處能清楚的觀察到細胞核。接著在圖 4.2 (a)藍色括號部分為角膜翼狀上皮細胞，從縱切面中可以看到細胞結構從非常扁平的上皮細胞逐漸過渡為橫躺的橢圓形狀，其對應的橫切面影像為圖 4.2 (b)中深度 20 μm 至 40 μm 處，可以很明顯的看到相比 0 μm 至 20 μm 的上皮細胞，翼狀細胞的面積相對較小，此極為符合角膜表層上皮細胞因為深層的細胞不斷推移擠壓，使得細胞型態由柱狀變為翼狀再變為扁平的鱗狀細胞的過程。最後圖 4.2 (a)綠色括號部分為角膜基底上皮細胞，從縱切面影像可以觀察到其為柱狀形並且細胞面積更小，對應的橫切面影像為圖 4.2 (b)中深度 40 μm 至 50 μm 處，能看到邊界變得更小，然而因為基底上皮細胞的細胞質較多折射率差異較小，因此導致基底上皮細胞雖也看的到邊界但相比前兩層則較為不清楚。[32]



圖 4.2 (a)藍色箭頭為前彈力層因與基底上皮細胞和基質層折射率差異較大而產生的強反射面，其對應到的橫切面影像為圖 4.2 (b) 深度  $52\text{ }\mu\text{m}$  和  $53\text{ }\mu\text{m}$  藍色箭頭處。在 2.3 小節時有提到亞基底神經叢為基質神經穿過前彈力層並與前彈力層呈平行生長，因此在影像上亞基底神經應該會出現在前彈力層之前。觀察圖 4.2 (b) 深度  $51\text{ }\mu\text{m}$  即可發現紅色箭頭所指之亞基底神經叢優先出現，隨後在圖 4.2 (b) 深度  $52\text{ }\mu\text{m}$  和  $53\text{ }\mu\text{m}$  處前彈力層緊跟著出現，此證明亞基底神經確實會出現在前彈力層之前並與前彈力層平行。基於本實驗室使用 OCT 系統之  $0.2\text{ }\mu\text{m}$  的光學切片能力及細胞級的縱向解析度，透過 3.1 小節所介紹的三維地形圖即可分離出完整的亞基底神經及前彈力層。

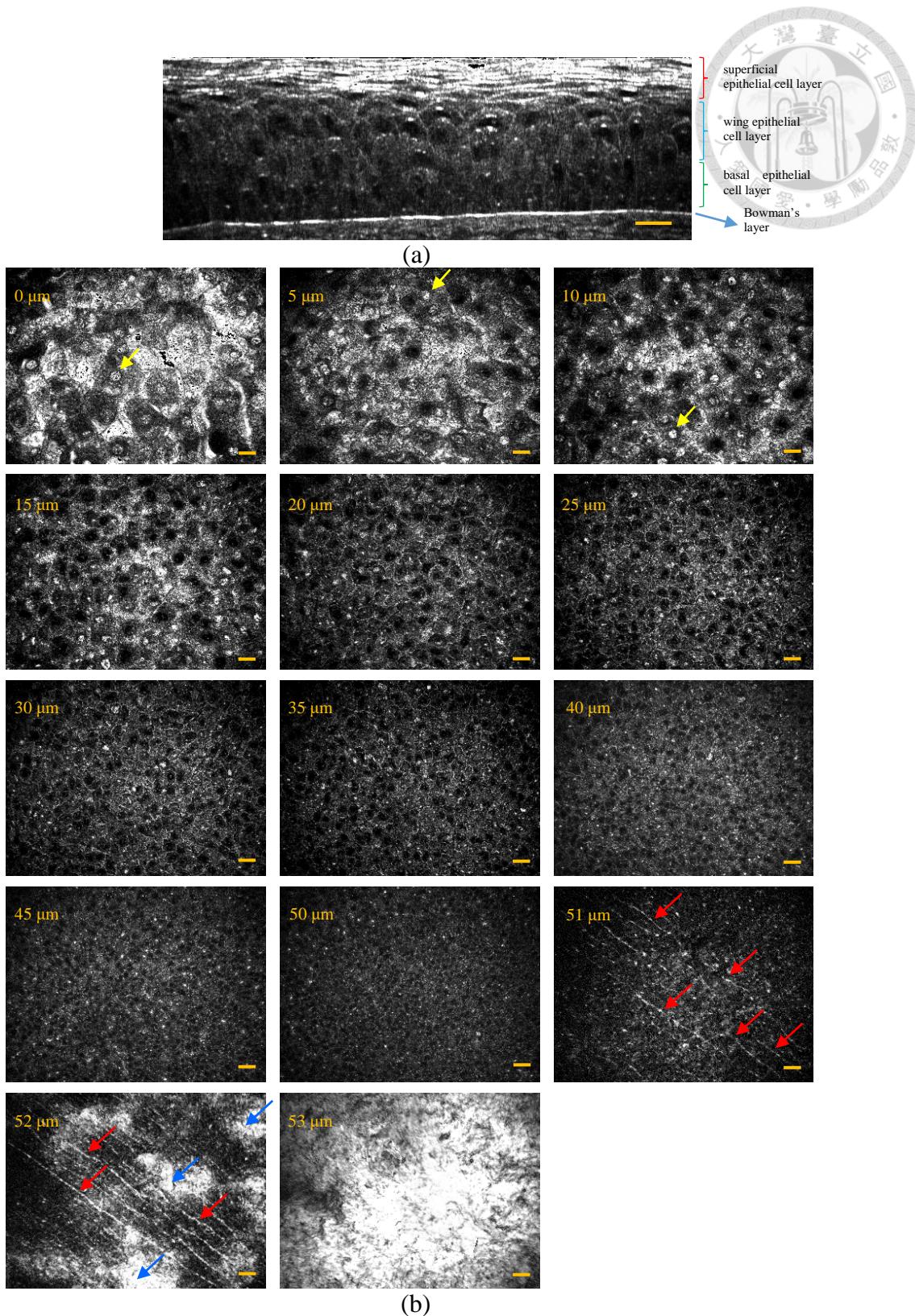


圖 4.2 Ce<sup>3+</sup>:YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之 FVB 小鼠健康檢體角膜從上皮細胞層至前彈力層影像。(a)縱平面影像(含 4.5 μm 厚度之資訊),(b)不同深度之橫平面影像(含 1 μm 厚度之資訊)。黃色箭頭為細胞核，紅色箭頭為亞基底神經叢，藍色箭頭為前彈力層之邊界，此組影像掃描速度為 1/8 倍速，(比例尺：20 μm)



掃描影像經過前彈力層後接著來到基質層，圖 4.3 (a)為橫切面深度 67  $\mu\text{m}$  的基質層影像，其中紅色箭頭處為角膜基質神經(stroma nerve)，角膜基質神經相較亞基底神經在橫平面上較寬。圖 4.3 (b)為橫切面深度 75  $\mu\text{m}$  的基質層影像，藍色箭頭所指細條狀線為膠原纖維束(collagen fiber)，這些膠原纖維束組成多層膠原纖維薄板並在各層呈一定角度重疊。在膠原纖維板中分布許多角膜基質細胞(corneal keratocytes)，這些基質細胞會以樹突互相連結組成二維網路，如圖 4.3 (c)、(d)橫切面深度 88、94  $\mu\text{m}$  的基質層影像中的黃色箭頭處。

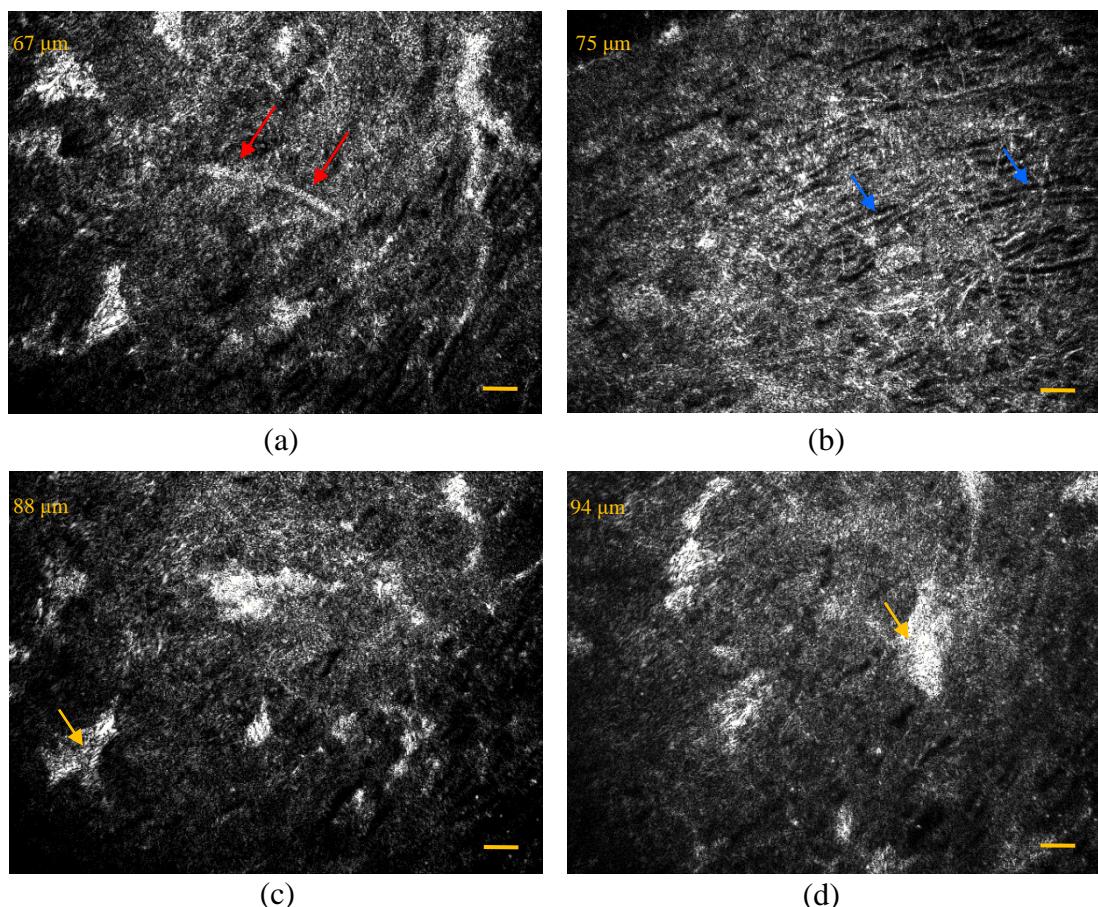


圖 4.3 Ce<sup>3+</sup>:YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之 FVB 小鼠健康檢體角膜基質層影像。(a)基質神經影像，(b)膠原纖維束影像，(c)、(d)角膜基質細胞影像。紅色箭頭為基質神經，藍色箭頭為膠原纖維束，黃色箭頭為基質細胞。(比例尺：20  $\mu\text{m}$ )

最後為基質層到內皮細胞層的影像，圖 4.4 (a)為縱切面影像而(b)~(d)為深度 124  $\mu\text{m}$  至 132  $\mu\text{m}$  的橫切面影像，以相同顏色的箭頭將同結構在縱切面和橫切面影像標示出來。經過基質層後下一層結構為後彈力層，圖 4.4 (a)中的紅色箭頭處即



為後彈力層與基質層折射率差異形成的較強反射面所在位置。圖 4.4 (b)為深度在 124  $\mu\text{m}$  的橫切面影像，紅色箭頭即後彈力層與基質層的邊界，右下方的區域為基質層。圖 4.4 (c)為深度在 127  $\mu\text{m}$  的橫切面影像，此時因為曲率關係可以看到四層結構，分別為右下區域的基質層、紅色箭頭所指的後彈力層邊界、黃色箭頭所指的後彈力層與內皮細胞層交界處，此交界處亦稱基底側面(basolateral surface)[33]以及最後藍色箭頭所指的內皮細胞層。在深度為 127  $\mu\text{m}$  和 132  $\mu\text{m}$  處的圖 4.4 (c)和(d)可以看到雖然因為曲率關係導致藍色箭頭所指的內皮細胞層在單一張影像只能看到一條極為明顯的亮帶，但在這亮帶中能很清楚的看到單層的六角形結構，此即為內皮細胞形貌。圖 4.4 (e)為圖 4.4 (d)經過程式校正後得到的完整內皮細胞層影像，可以看到整張影像都能觀察到非常清楚的六角型結構內皮細胞，數量與圖 4.4 (d)相比多非常多。

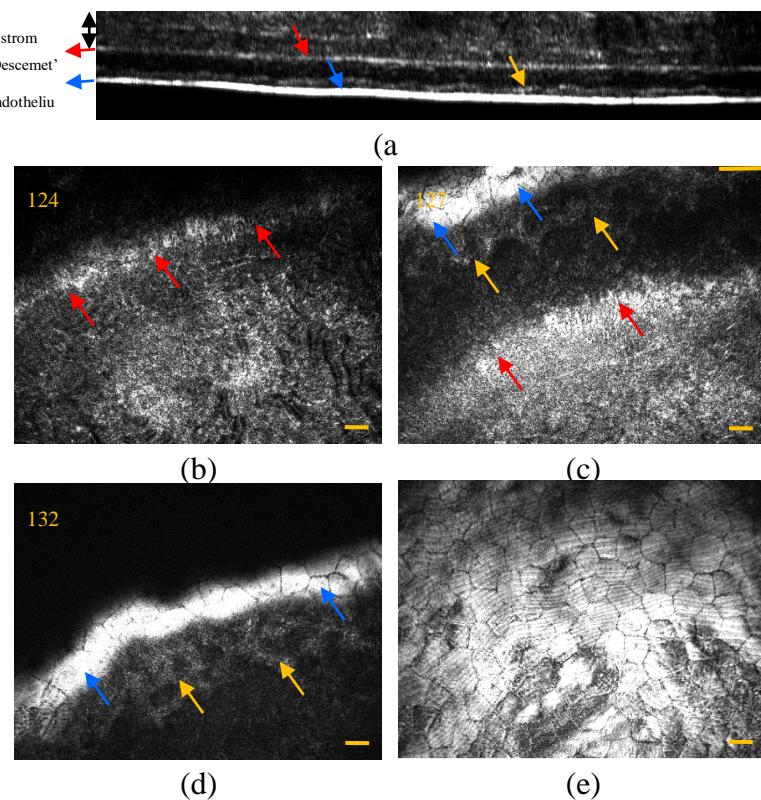


圖 4.4 Ce<sup>3+</sup>:YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之 FVB 小鼠健康檢體角膜基質層至內皮細胞層影像。(a)縱平面影像，(b)不同深度之橫平面影像。紅色箭頭為基質層與後彈力層邊界，黃色箭頭為後彈力層與內皮細胞層邊界，藍色箭頭為內皮細胞層。(比例尺：20  $\mu\text{m}$ )。



圖 4.5 (a)為完整的小鼠角膜縱平面影像，圖中清楚地呈現五層結構。圖 4.5 (b)為對應的強度分布圖，從強度分布圖可以看到在上皮細胞層、前彈力層以及內皮細胞層有很大的訊號強度，此與各層折射率差異相關且和各層折射率統計圖合理對應，如圖 4.6。

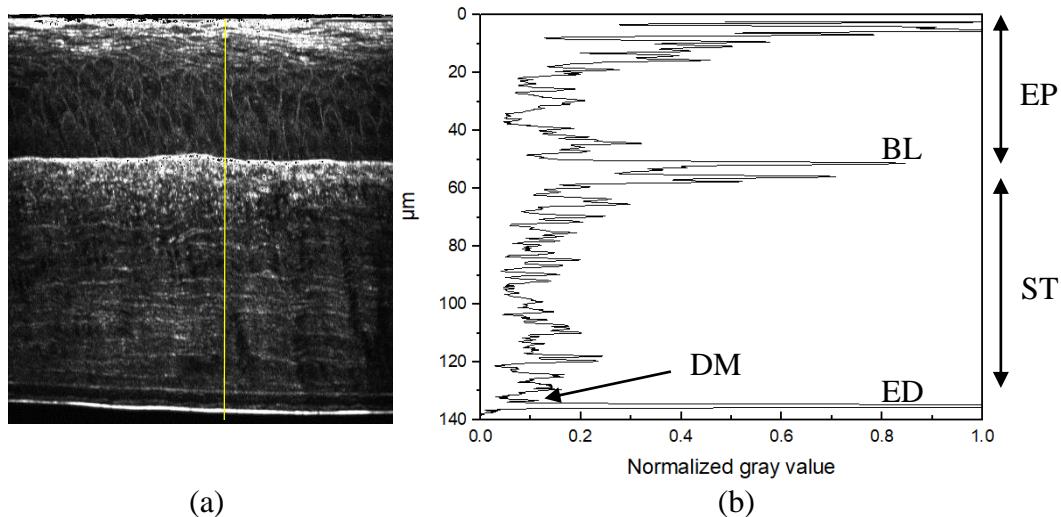


圖 4.5 (a) Ce<sup>3+</sup>:YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之 FVB 小鼠健康檢體角膜縱平面影像，(b)縱平面影像中黃線所標注位置之縱向強度分布大小。EP : epithelium ; BL : Bowman's layer ; ST : stroma ; DM : Descemet's membrane ; ED : endothelium 。

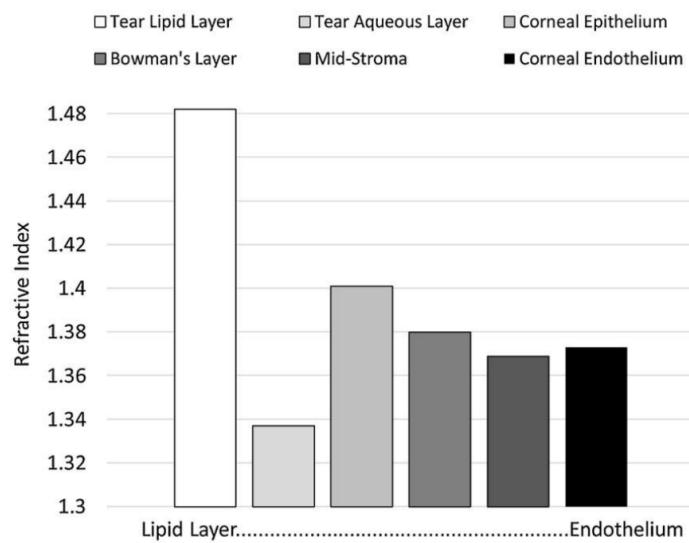


圖 4.6 角膜各層折射率[34]



### 4.1.3 小鼠角膜神經影像量化分析

在第三章時有提到由於前彈力層干擾以及角膜的曲率關係，在單張影像中亞基底神經常常會呈現斷斷續續的情況，因此認為在進行亞基底神經量化前需先經過第 3.1 小節所提到的 curve plane tracing and projection 程式進行校正。

以下介紹兩組 FVB 小鼠健康檢體角膜經過 curve plane tracing and projection 程式前後之影像，圖 4.7 為 Ce<sup>3+</sup>:YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之第一組 FVB 小鼠健康檢體角膜影像之前彈力層與亞基底神經的三維地形圖(視域大小為 648\*488 pixels，0.45 μm/pixel)，此兩個地形圖之間差了 6 voxels 也就是 1.2 μm，由此可知亞基底神經與前彈力層非常接近，如沒有非常的縱向解析度與極窄的 voxel depth 便無法完美分離此兩結構。

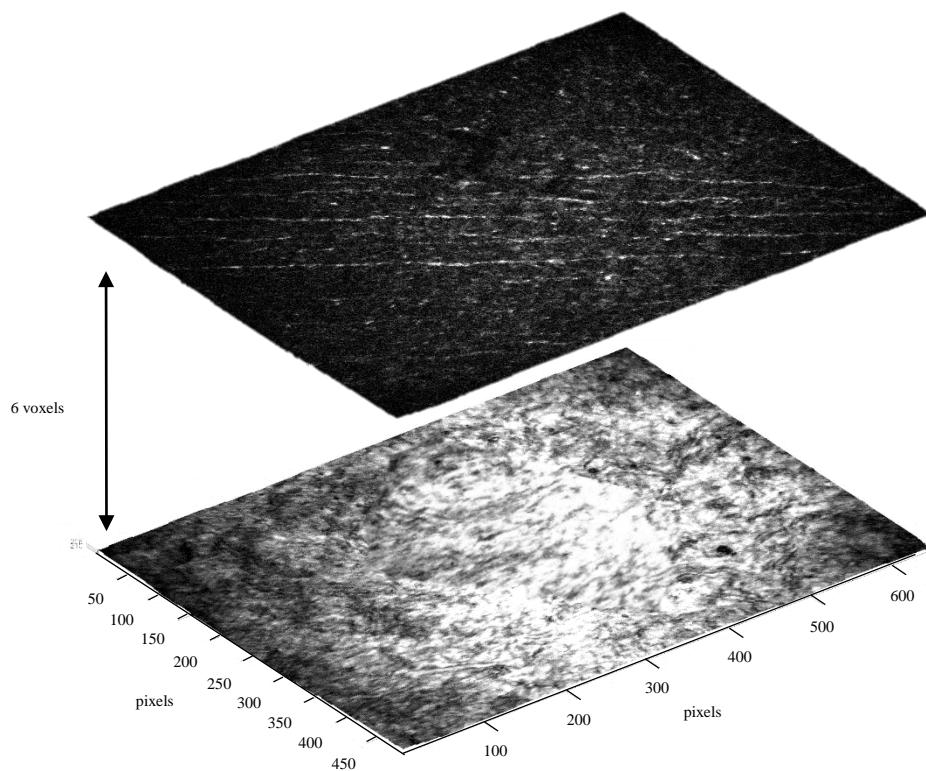


圖 4.7 前彈力層與亞基底神經之三維地形圖(視域大小為 648\*488 pixels，0.45 μm / pixel，0.2 μm / voxel)



圖 4.8 為 Ce<sup>3+</sup>:YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之第一組 FVB 小鼠健康檢體角膜前彈力層附近影像，圖 4.8 (a)為未經 curve plane tracing and projection 程式校正的影像，可以看到亞基底神經與前彈力層疊在一起導致亞基底神經在觀測上有斷開的趨勢。圖 4.8 (b)、(c)為經 curve plane tracing and projection 程式校正的影像，圖 4.8 (b)為兩者分離後亞基底神經三維地形圖投影至橫平面之影像，圖 4.8 (c)為前彈力層三維地形圖投影至橫平面之影像。

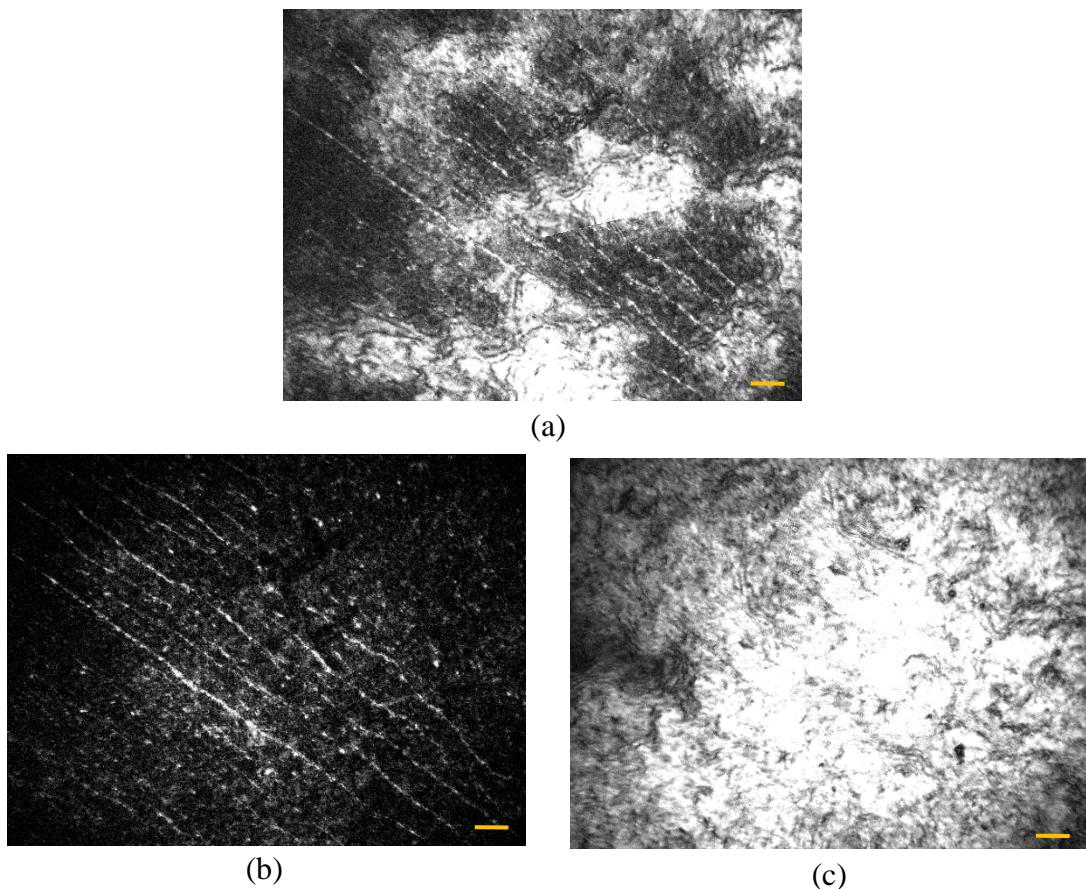


圖 4.8 第一組(a)經過程式分離前之前彈力層與亞基底神經影像，(b)經過程式分離後之亞基底神經影像，(c)經過程式分離後之前彈力層影像。(比例尺：20 μm)

得到校正後的亞基底神經後即可利用 NeuronJ 進行神經追蹤並利用 3.2 小節時提到的描述亞基底神經形貌之參數進行量化，圖 4.9 (a)為第一組影像之 NeuronJ 神經追蹤圖，圖 4.9 (b)為 TCCMetrics[31]量測出之數據。

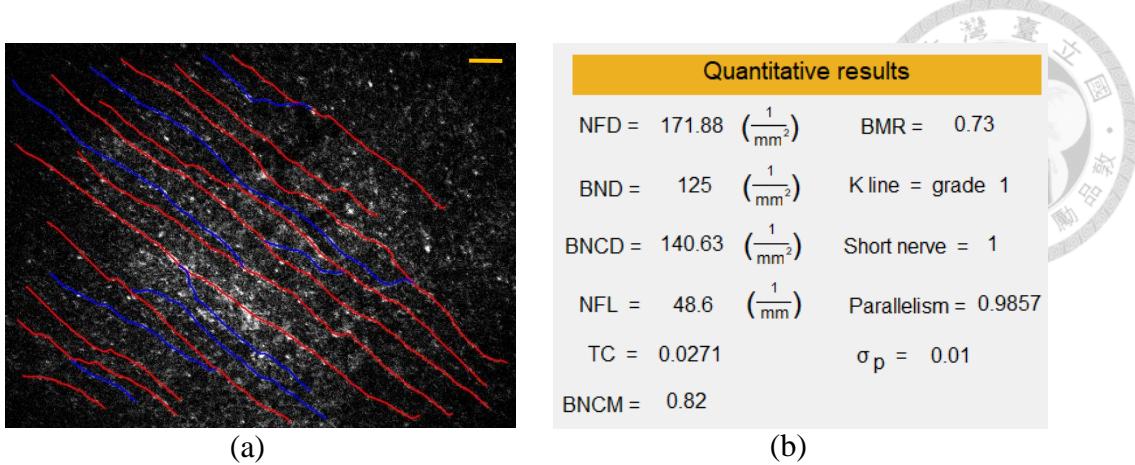


圖 4.9 (a)第一組影像之 NeuronJ 神經追蹤圖，(b) TCCMetrics[31]量測出之數據。紅線為主幹神經，藍線為分枝神經。(比例尺： $20 \mu\text{m}$ )

圖 4.10 為第二組 FVB 小鼠健康檢體角膜影像之前彈力層與亞基底神經的三維地形圖(視域大小為  $648*488$  pixels,  $0.45 \mu\text{m}/\text{pixel}$ )，此兩個地形圖之間差了 8 voxels 也就是  $1.6 \mu\text{m}$ ，大部分亞基底神經與前彈力層的距離大都落在  $1 \mu\text{m} \sim 2 \mu\text{m}$ 。

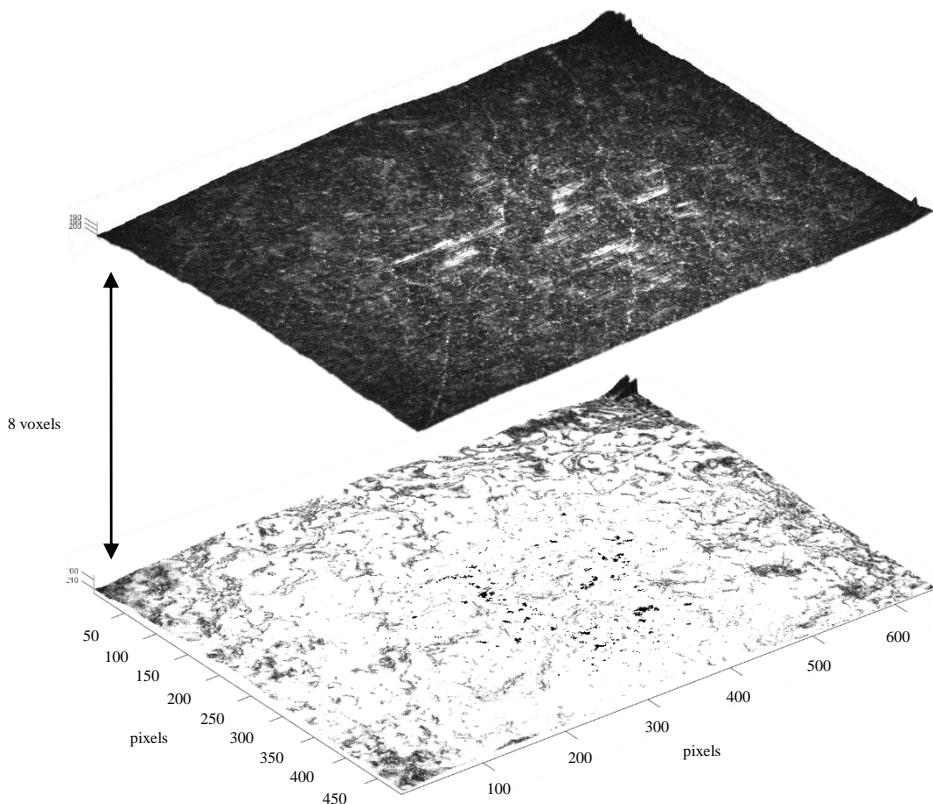


圖 4.10 前彈力層與亞基底神經之三維地形圖(視域大小為  $648*488$  pixels,  $0.45 \mu\text{m}/\text{pixel}$ ,  $0.2 \mu\text{m}/\text{voxel}$ )



圖 4.11 為 Ce<sup>3+</sup>:YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之第二組 FVB 小鼠健康檢體角膜前彈力層附近影像，圖 4.11 (a)為未經 curve plane tracing and projection 程式校正的影像。圖 4.11 (b)、(c)為經 curve plane tracing and projection 程式校正的影像，圖 4.11 (b)為兩者分離後亞基底神經三維地形圖投影至橫平面之影像，圖 4.11 (c)為前彈力層三維地形圖投影至橫平面之影像。圖 4.12 (a)為第一組影像之 NeuronJ 神經追蹤圖，圖 4.12 (b)為 TCCMetrics[31]量測出之數據。透過圖 4.11 與圖 4.12，可以看到相較於第一組此組神經較為稀少，原因為此組的小鼠從犧牲並取出檢體後到掃描時的時間較長，因此部分神經會消退斷裂或消失。[35]

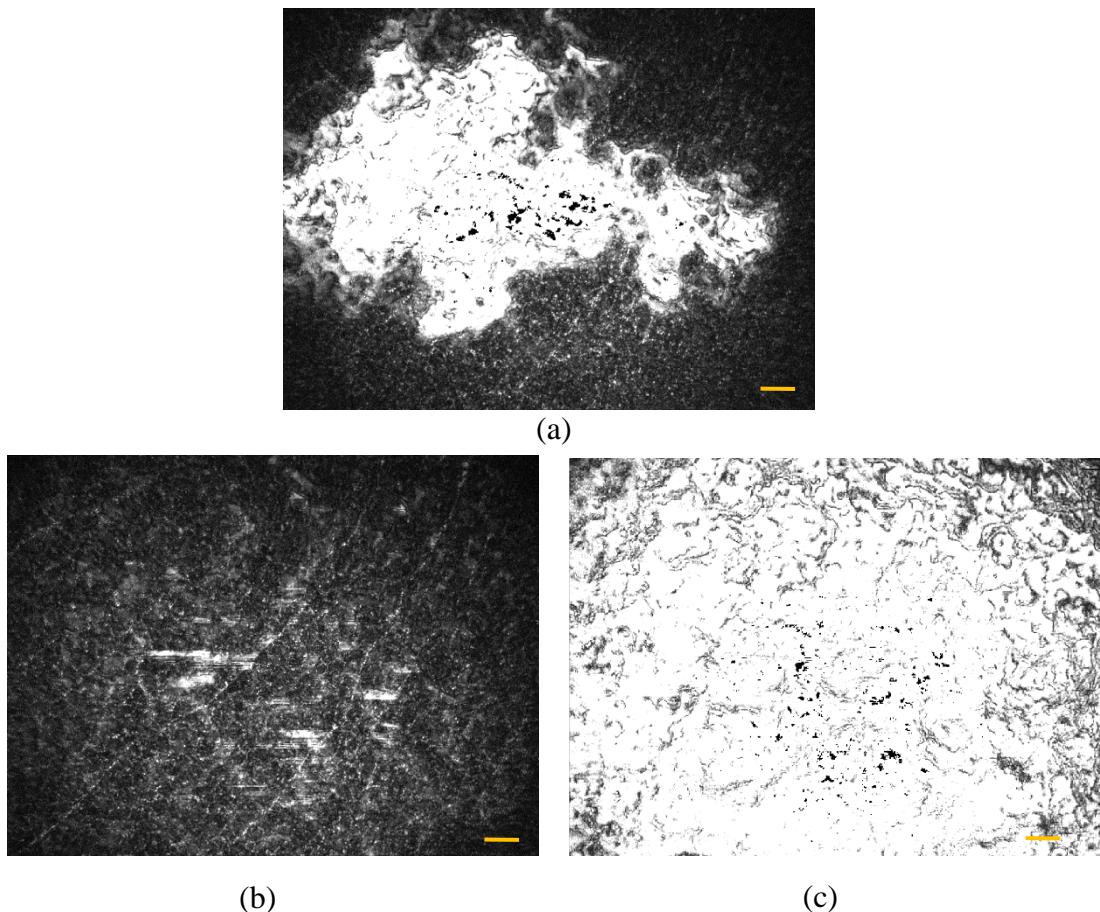


圖 4.11 第二組(a)經過程式分離前之前彈力層與亞基底神經影像，(b)經過程式分離後之亞基底神經影像，(c)經過程式分離後之前彈力層影像。(比例尺：20 μm)

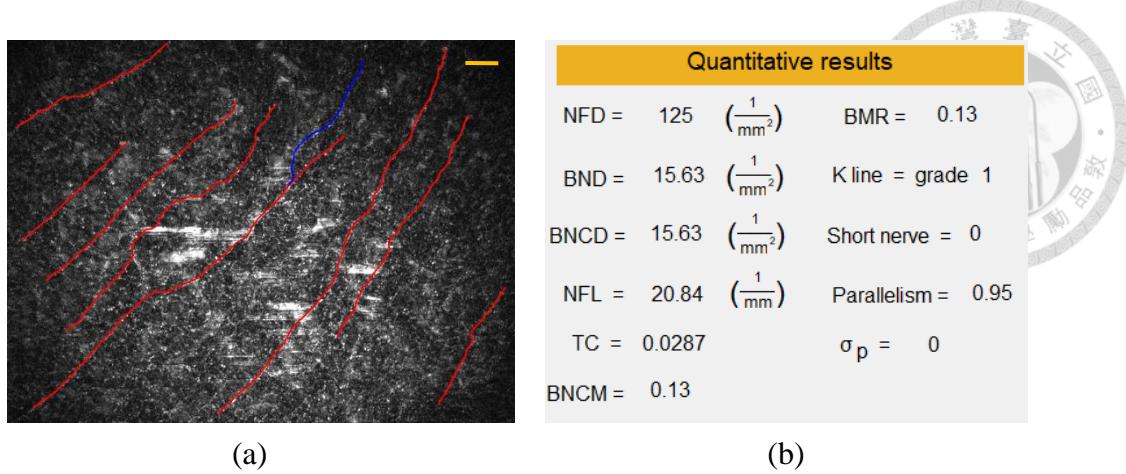


圖 4.12 (a)第二組影像之 NeuronJ 神經追蹤圖，(b) TCCMetrics[31]量測出之數據。紅線為主幹神經，藍線為分枝神經。(比例尺：20  $\mu\text{m}$ )

表 4.1 (a)為以前亞基底神經量化資料，其中 a1、a2、a3 為三隻健康小鼠掃描得到的三組影像，經過程式校正後由 TCCMetrics 得到之參數[31]。表 4.1 (b)為本次研究所掃描之兩隻健康小鼠的亞基底神經量化資料，其中 n1、n2 分別對應到圖 4.9 與圖 4.12 之亞基底神經量化資料。其結果為：n1、n2 的 NFD 分別為  $171.88 \text{ mm}^{-2}$ 、 $125 \text{ mm}^{-2}$ ，與以前的資料  $136.93 \pm 19.18 \text{ mm}^{-2}$  相比，有在其標準差範圍內；n1、n2 的 BND 分別為  $125 \text{ mm}^{-2}$ 、 $15.63 \text{ mm}^{-2}$ ，而以前的資料為  $731 \pm 186.19 \text{ mm}^{-2}$ ，n1、n2 的值明顯小於以前資料且 n2 小於 n1；n1、n2 的 BNCD 分別為 140.63、15.63，以前的資料為  $608.01 \pm 116.99$ ，結果同樣 n1、n2 的值較小；n1、n2 的 NFL 分別為 48.6 mm、20.84 mm，以前的資料為  $61.46 \pm 1.78 \text{ mm}$ ；n1、n2 的 NFW 分別為  $1.28 \mu\text{m}$ 、 $1.07 \mu\text{m}$ ，以前的資料為  $1.08 \pm 0.32 \mu\text{m}$ ，在其標準差範圍內；n1、n2 的 TC 分別為 0.0271、0.0287，以前的資料為  $0.0681 \pm 0.0132$ ；n1、n2 的 BNCM 分別為 0.82、0.13，以前的資料為  $4.57 \pm 1.41$ ；n1、n2 的 BMR 分別為 0.73、0.13，以前的資料為  $5.53 \pm 2.04$ ；n1、n2 的 parallelism 分別為 0.9657、0.95，以前的資料為  $0.75 \pm 0.0475$ ；n1、n2 的  $\sigma_p$  分別為 0.01、0，以前的資料為  $0.3 \pm 0.02$ ，n2 會是 0 是因為在圖 4.12 中只有一條分枝神經，因此只有一組主幹與分枝神經的平行性，所以  $\sigma_p$  會為 0。將表 4.1 (a)、(b)相比會發現表 4.1 (b)整體數據較表 4.1 (a)較小，且 n2 略小於 n1，尤其是與分枝神經相關之參數，我們認為原因為小鼠從犧牲並取出檢體後到掃描時



的時間有很大的關係，當死亡時間超過 13 小時大部分亞基底神經會消退斷裂或消失，分枝神經消退速度更略大於主幹神經[36]，而 n2 取出檢體後到掃描時的時間又大於 n1，所以這解釋為何表 4.1 (a)、(b) 以及 n1、n2 兩組數據有部分相異。雖然本組之 NFD 與以前資料相近，但其他參數有一定差距，因此在之後的章節將會使用以前資料作參考。

表 4.1 Ce<sup>3+</sup>:YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之 FVB 小鼠健康檢體角膜亞基底神經量化參數統計表，(a)以前資料[31]，(b)本研究所掃描資料。

	a1	a2	a3	Mean	S.D.
NFD ( $\frac{1}{mm^2}$ )	132.73	157.86	120.19	136.93	19.18
BND ( $\frac{1}{mm^2}$ )	796.36	520.94	875.69	731.00	186.19
BNCD	663.63	473.58	686.81	608.01	116.99
NFL ( $\frac{1}{mm}$ )	62.72	62.24	59.43	61.46	1.78
NFW (μm)	1.11	1.11	1.01	1.08	0.32
TC	0.0776	0.053	0.0737	0.0681	0.0132
BNCM	5.00	3.00	5.71	4.57	1.41
BMR	6.00	3.30	7.29	5.53	2.04
K line	Grade 1	Grade 1	Grade 1	Grade 1	X
Short nerve (根)	13	13	19	15	3.5
Parallelism	0.7138	0.8038	0.7325	0.7500	0.0475
$\sigma_p$	0.32	0.30	0.29	0.30	0.02

(a)

n1	n2
171.88	125
125	15.63
140.63	15.63
48.6	20.84
1.28	1.07
0.0271	0.0287
0.82	0.13
0.73	0.13
Grade 1	Grade 1
1	0
0.9657	0.95
0.01	0

(b)

## 4.2 *Ex vivo* 受傷模式 FVB 小鼠角膜量測分析小鼠角膜受傷模式之製備方法

4.2.1 小節會介紹受傷模式的 FVB 小鼠角膜檢體製備方法，4.2.2 小節介紹角膜的掃描影像結果，4.2.3 介紹角膜亞基底神經之量化分析結果。

### 4.2.1 小鼠角膜樣本之製備與量測方法

本實驗所用之角膜受傷樣本為年齡八週之 FVB 小鼠，下面介紹如何製備受傷之角膜。

步驟一：

使用 0.5 ml 的針筒抽取與小鼠體重相對應劑量之麻醉劑，使用的麻醉劑為舒泰



(Zoletil)與若朋(Rompun)混和溶液，混和劑量分別為 0.25 ml/kg 和 0.2 ml/kg。

#### 步驟二：

需帶麻布手套以防麻醉時遭到小鼠咬傷，帶好麻布手套後用食、拇指抓住小鼠的後頸，並用無名指小指夾住尾巴防止小鼠逃脫，以及避免在注射麻醉時小鼠回頭反咬，確保按在鐵籠上無法動彈後，將配製好的麻醉藥注入小鼠的後腿肌肉處。

#### 步驟三：

等待舒泰與若朋混合之藥劑發作後將麻醉藥劑，藥劑為 0.5% Alcaine，滴在待手術眼睛上防止眼動過於激烈影響手術精確度。

#### 步驟四：

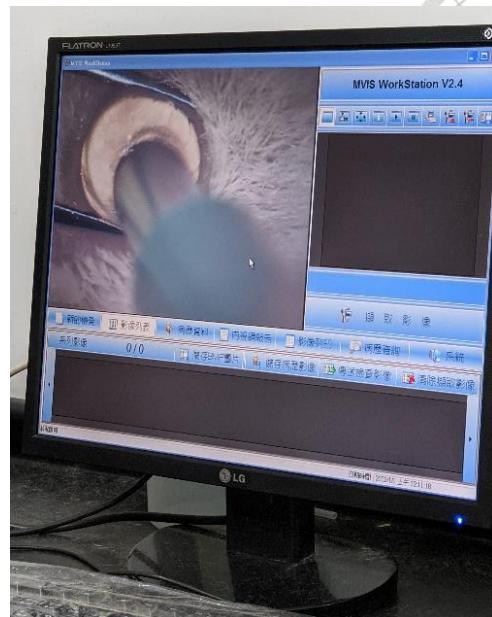
使用直徑為 3 mm 之組織採樣器(biopsy punch)在手術立體顯微鏡下對八週齡之 FVB 小鼠右眼進行環狀切割，手術示意如圖 4.13 所示，手術痕跡如圖 4.14。切割深度大約為從表面至 1/2 或 2/3 基質層以確保有較嚴重的阻斷亞基底神經以方便後續與健康亞基底神經的形貌對比。

#### 步驟五：

由於近紅外光 Ti:sapphire 自發輻射之光源對於活體眼睛的刺激較小，且 Ti:sapphire FF-OCT 系統的視域範圍較大( $476 \mu\text{m} * 476 \mu\text{m}$ )，在尋找傷痕痕跡可較為快速，因此手術過後在麻醉期間利用近紅外光 FF-OCT 系統而非 Ce<sup>3+</sup>:YAG FF-OCT 對小鼠進行活體掃描手術位置，最後並以 enface and cross section 影像確保環切深度有在預期之中，如圖 4.15 和圖 4.16。



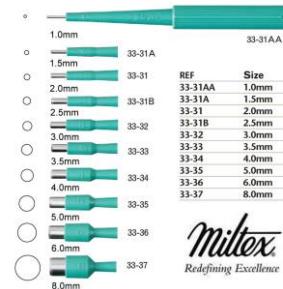
(a)



(b)



(c)



(d)

圖 4.13 (a)手術用之立體顯微鏡，(b)手術實時影像，(c) FVB 小鼠環狀刮除手術示意圖，(d)直徑 3 mm 組織採樣器(編號:33-32)。

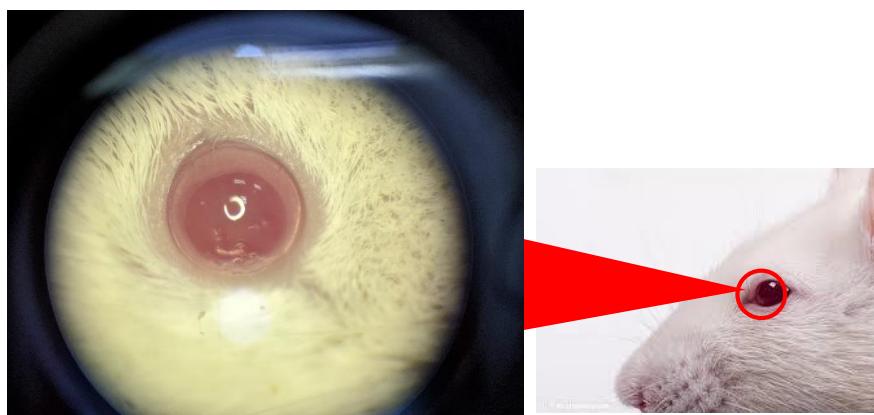


圖 4.14 FVB 小鼠環狀刮除手術痕跡。

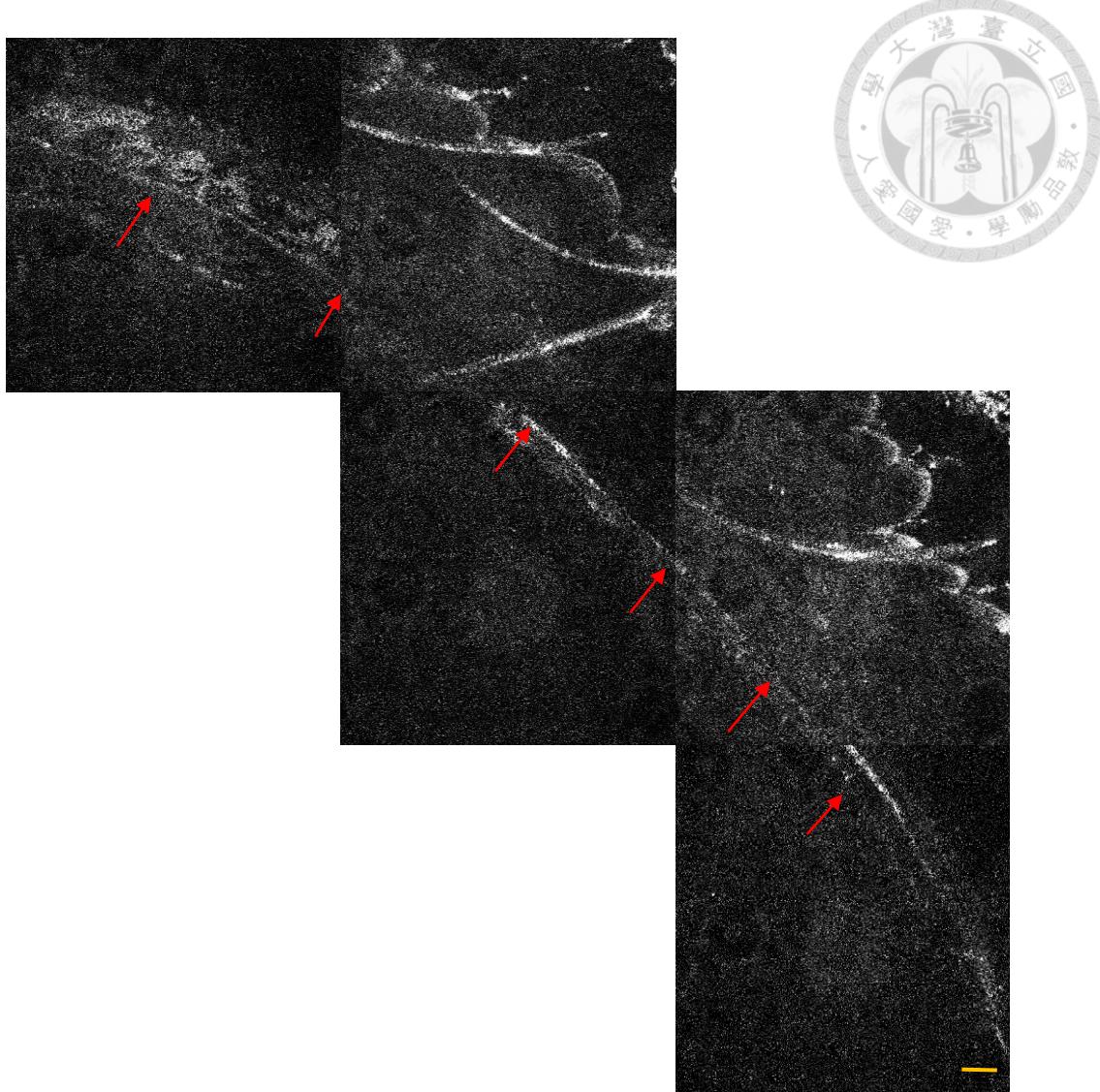


圖 4.15 Ti:sapphire FF-OCT 系統所掃描之經環切刮除手術 FVB 小鼠活體右眼角膜橫切面大圖拼接影像，紅色箭頭為經 3 mm 組織採樣器環切過的痕跡。(比例尺：50  $\mu\text{m}$ )

圖 4.15 為 Ti:sapphire FF-OCT 系統所掃描之經環切刮除手術 FVB 小鼠活體右眼角膜橫切面影像，此橫切面是由五個長寬為 476  $\mu\text{m}$  \*476  $\mu\text{m}$  大小的單一視域所組成的大圖拼接影像，而此影像之縱向深度大約在 30  $\mu\text{m}$ ，也就是上皮細胞層還未至前彈力層處。圖中的紅色箭頭所指圓弧為 FVB 小鼠右眼經過 3 mm 組織採樣器環切過的痕跡。此圓弧的半徑大約為 3 ~ 4 個視域，也就是 1.5 mm 左右，經掃描影像得到的數據與 3 mm 組織採樣器的直徑相符，因此能確認此為組織採樣器所造成之痕跡。

已知痕跡位置後便須由縱切面來查看環切深度是否達到 1/2 至 2/3 基質層的需

求，其縱切面如圖 4.16 所示。圖 3.22 為 Ti:sapphire FF-OCT 系統所掃描之經環切刮除手術 FVB 小鼠活體右眼角膜單一視域之縱切面影像。圖中紅色箭頭為 FVB 小鼠右眼經過 3 mm 組織採樣器環切過在縱向上的痕跡，可以看到環切造成的白色痕跡從表面延伸至差不多 1/2 基質層處，深度大約為  $75 \mu\text{m}$ ，從此圖來看我們有達到環切所需要的深度。

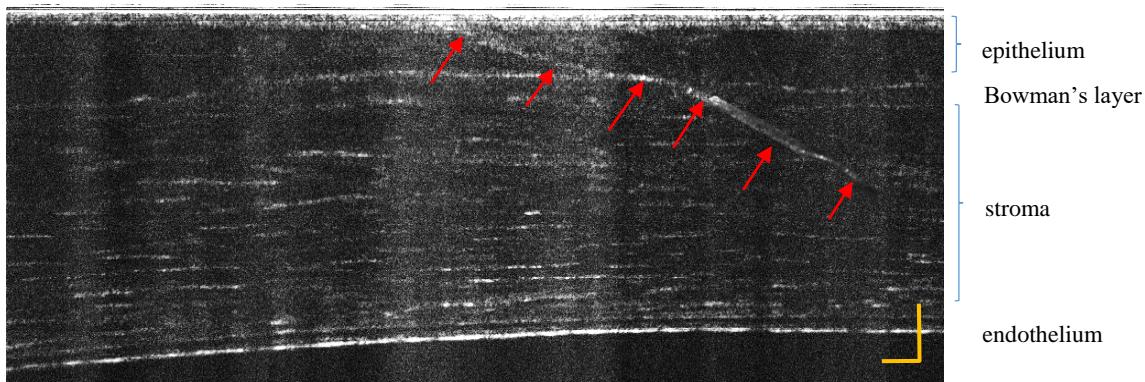


圖 4.16 Ti:sapphire FF-OCT 系統所掃描之經環切刮除手術 FVB 小鼠活體右眼角膜橫切面影像，紅色箭頭為經 3 mm 組織採樣器環切過的縱向痕跡。(比例尺： $20 \mu\text{m}$ )

另外還需針對圖 4.16 的斜向環切痕跡做出說明，上圖可以明顯看到環切痕跡是由左上到右下的斜向痕跡，而非想像中的垂直痕跡。環切痕跡會有這種傾斜走向是因為雖然在手術時組織採樣器確實是直上直下在角膜上留下痕跡，但因為掃描時需要將小鼠放在載台上，由於載台的形狀限制，此時貼在載台 GP3 上的小鼠眼睛位置不會是眼睛的曲面頂端，眼睛的對稱軸會與載台形成一個傾角，因此當眼睛以一個傾斜的角度貼在掃描載台上時，此時的環切痕跡便會與載台形成一個夾角，如圖 4.17。因此我們認為在掃描影像中，因環切在縱向上造成的痕跡具有傾斜角是合理的現象。至此，受傷角膜模式之 FVB 小鼠便製備完畢。

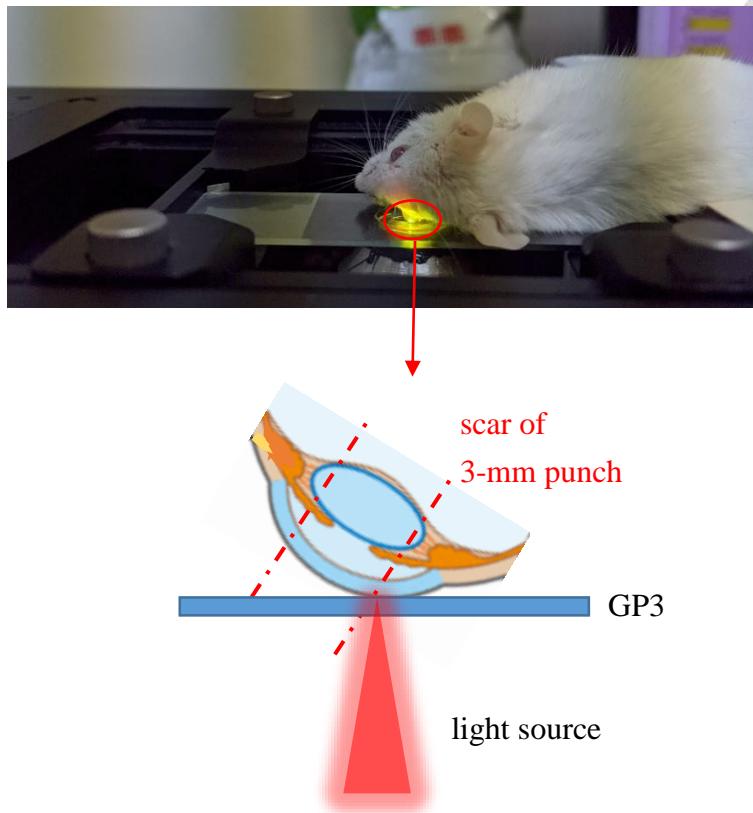


圖 4.17 上圖為 FVB 小鼠活體掃描方式，下圖為環切痕跡與掃描平面形成夾角示意圖。

## 4.2.2 小鼠角膜量測結果與影像分析

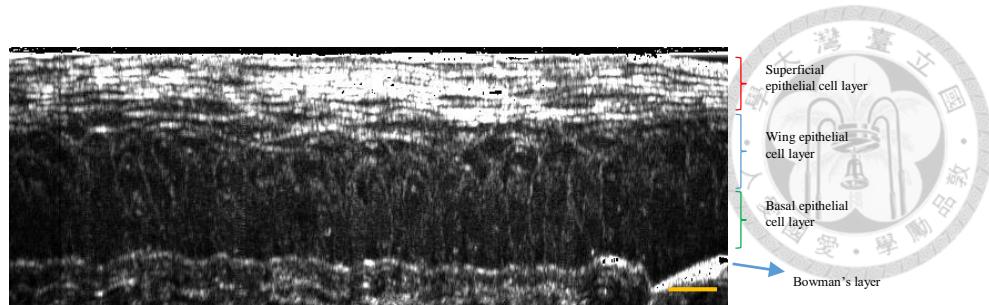
4.2.1 小節提到如何製備受傷角膜模式之 FVB 小鼠，受傷角膜模式之 FVB 小鼠數量總計有 15 隻並分成三組，每組五隻。在全部都經過手術後我們給予第一、二、三組小鼠分別為兩個禮拜、三個禮拜及六個禮拜的復原時間，第一組小鼠在手術過後兩個禮拜犧牲並進行檢體掃描，第二、三組以此類推。在本小節會呈現其中一組的可見光 Mirau-based FF-OCT 系統所掃描之受傷角膜模式 FVB 小鼠檢體影像。

圖 4.18 (a)為上皮細胞層至前彈力層的縱切面影像，其中紅色括號部分為角膜表層上皮細胞，從影像上可以很好的看出角膜表層上皮細胞扁平和多層的特性。角膜表皮上層細胞所對應的橫切面影像為圖 4.18 (b)中深度 0  $\mu\text{m}$  至 10  $\mu\text{m}$ ，在橫切面影像中可以看到表皮上層細胞很明顯的為鱗狀結構，並且能清楚的觀察到細胞核。接著在圖 4.18 (a)藍色括號部分為角膜翼狀上皮細胞，從縱切面中可以看到細

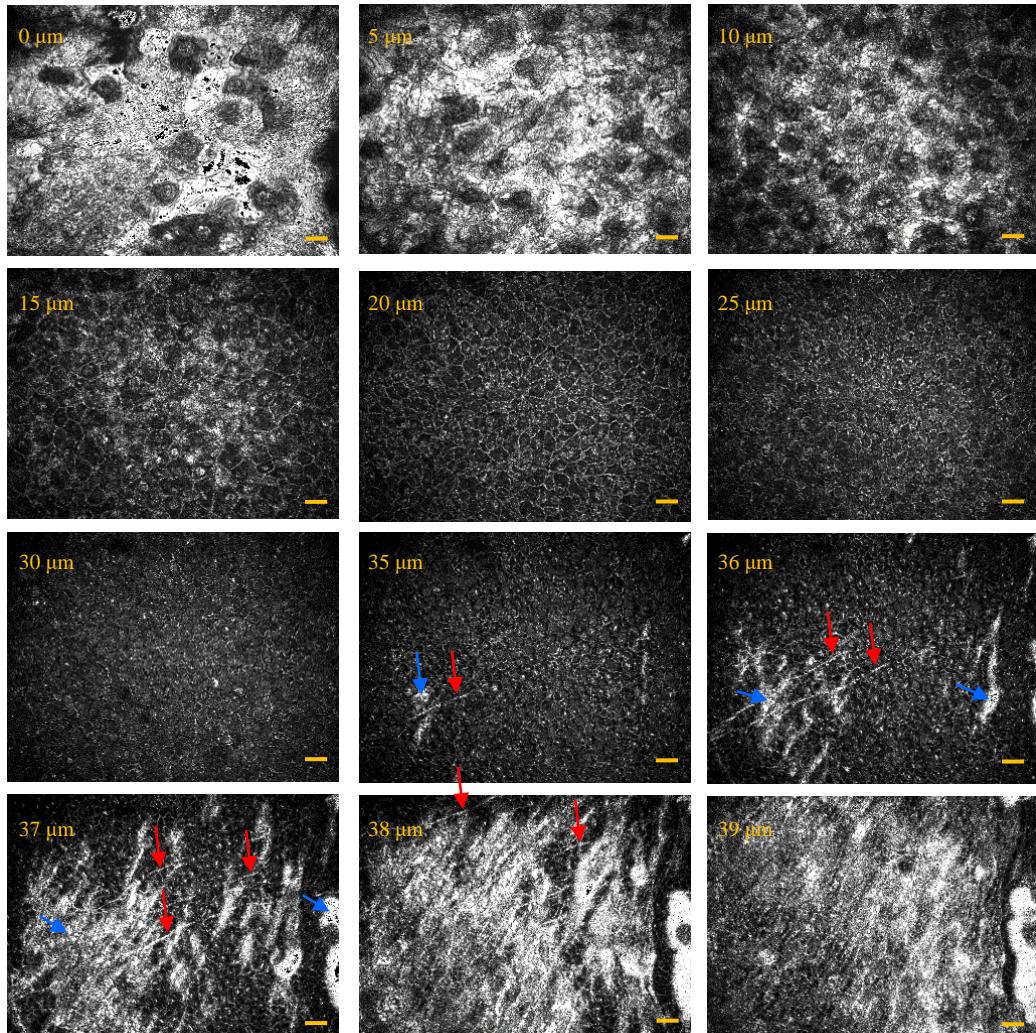


胞結構從非常扁平的上皮細胞逐漸過渡為橫躺的橢圓形狀，其對應的橫切面影像為圖 4.18 (b) 中深度 10  $\mu\text{m}$  至 20  $\mu\text{m}$  處，可以很明顯的看到相比 0  $\mu\text{m}$  至 10  $\mu\text{m}$  的上皮細胞，翼狀細胞的面積相對較小。最後圖 4.18 (a) 綠色括號部分為角膜基底上皮細胞，從縱切面影像可以觀察到其為柱狀形並且細胞面積更小，對應的橫切面影像為圖 4.18 (b) 中深度 20  $\mu\text{m}$  至 30  $\mu\text{m}$  處，能看到邊界變得更小且稍為的較不明顯。

圖 4.18 (a) 藍色箭頭為前彈力層因與基底上皮細胞和基質層折射率差異較大而產生的強反射面，與圖 4.2 (a) 相比，圖 4.18 (a) 的前彈力層顯得較為扭曲，猜測是因為經過手術所造成，前彈力層對應到的橫平面影像為圖 4.18 (b) 深度 35  $\mu\text{m}$  到 37  $\mu\text{m}$  處，在藍色箭頭可以看到前彈力層慢慢出現並且是長條狀的在不同區域出現，不像圖 4.2 (b) 之前彈力層是平滑的。與其一起出現的是亞基底神經，觀察圖 4.18 (b) 深度 35  $\mu\text{m}$ 、36  $\mu\text{m}$ 、37  $\mu\text{m}$  和 38  $\mu\text{m}$  即可發現紅色箭頭所指之亞基底神經叢先出現，隨後前彈力層緊跟著亞基底神經延伸的方向蔓延，此證明亞基底神經確實會出現在前彈力層之前，並且此圖神經與圖 4.2 (b) 52  $\mu\text{m}$  處的神經相比很明顯的較為稀少。最後神經與前彈力層漸漸消失並在 39  $\mu\text{m}$  處進入基質層。



(a)



(b)

圖 4.18 Ce<sup>3+</sup>:YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之受傷角膜模式 FVB 小鼠檢體角膜從上皮細胞層至前彈力層影像。(a)縱平面影像，(b)不同深度之橫平面影像。紅色箭頭為亞基底神經叢，藍色箭頭為前彈力層之邊界。(比例尺：20 μm)



接著掃描影像來到基質層，圖 4.19 (a)為橫切面深度  $53\text{ }\mu\text{m}$  的基質層影像，藍色箭頭所指細條狀線為膠原纖維束(collagen fiber)，當基質層受到損傷後並進入重建階段時，纖維組織會逐漸填滿缺損，新的膠原纖維排列很不規則，留下不同程度的瘢痕[37]。圖 4.19 (b)為橫切面深度  $69\text{ }\mu\text{m}$  的基質層影像，在膠原纖維板中分布許多角膜基質細胞(corneal keratocytes)，這些基質細胞會以樹突互相連結組成二維網路，如圖中的黃色箭頭處。

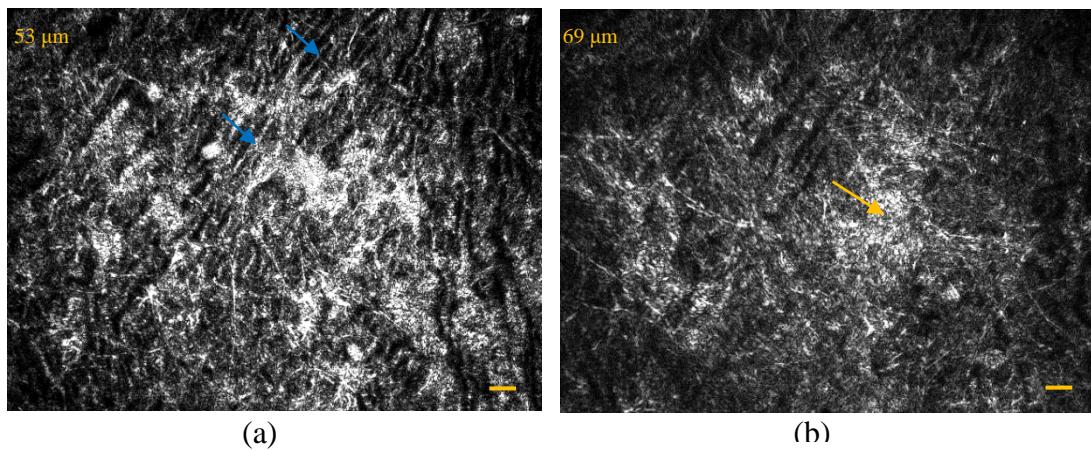


圖 4.19  $\text{Ce}^{3+}\text{:YAG}$  Mirau-based FF-OCT 系統掃描之受傷角膜模式 FVB 小鼠檢體角膜基質層影像。(a)膠原纖維束影像，(b)角膜基質細胞影像。藍色箭頭為膠原纖維束，黃色箭頭為基質細胞。(比例尺： $20\text{ }\mu\text{m}$ )

最後為基質層到內皮細胞層的影像，圖 4.20 (a)為縱切面影像而(b)、(c)為深度  $100\text{ }\mu\text{m}$  與  $102\text{ }\mu\text{m}$  的橫切面影像，以相同顏色的箭頭將同結構在縱切面和橫切面影像標示出來。經過基質層後下一層結構為後彈力層，圖 4.20 (a)中的紅色箭頭處即為後彈力層與基質層折射率差異形成的較強反射面所在位置。圖 4.20 (b)為深度在  $100\text{ }\mu\text{m}$  的橫切面影像，紅色箭頭即後彈力層與基質層的邊界，右邊區域為基質層。圖 4.20 (c)為深度在  $102\text{ }\mu\text{m}$  的橫切面影像，此時因為曲率關係可以看到四層結構，分別為右區域的基質層、紅色箭頭所指的後彈力層邊界、黃色箭頭所指的後彈力層與內皮細胞層交界處亦稱基底側面(basolateral surface)的晶格狀結構以及最後藍色箭頭所指的內皮細胞層。在藍色箭頭所指的內皮細胞層能很清楚的看到單層的六角形結構，此即為內皮細胞形貌。

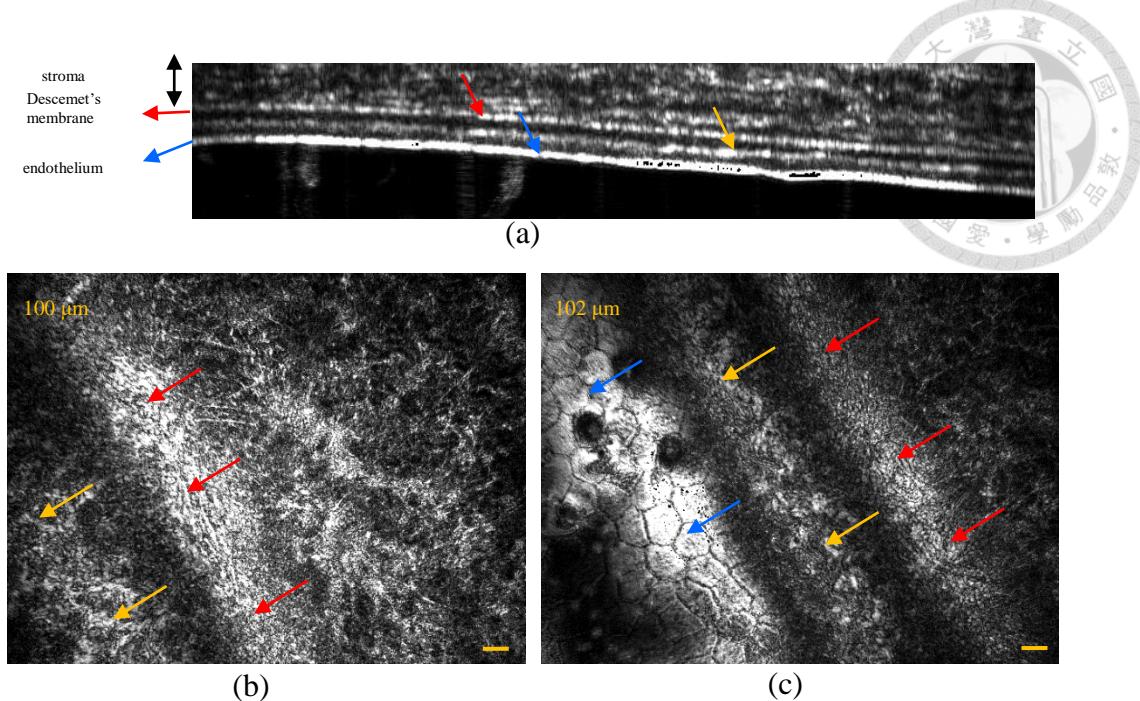


圖 4.20 Ce<sup>3+</sup>:YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描之受傷角膜模式 FVB 小鼠檢體角膜基質層至內皮細胞層影像。(a)縱平面影像，(b)深度 100  $\mu\text{m}$ ，(c)深度 102  $\mu\text{m}$  之橫平面影像。紅色箭頭為基質層與後彈力層邊界，黃色箭頭為後彈力層與內皮細胞層邊界，藍色箭頭為內皮細胞層。(比例尺：20  $\mu\text{m}$ )。

### 4.2.3 小鼠角膜神經影像量化分析

前面提到受傷角膜模式之 FVB 小鼠分成三組，每組五隻。並在手術過後兩個禮拜、三個禮拜及六個禮拜犧牲並進行檢體掃描，其中因為掃描需要時間的關係，因此會將復原時間的單位由週數細分為天數。下面會分別呈現復原時間為兩個禮拜、三個禮拜及六個禮拜經過 curve plane tracing and projection 程式校正的影像以及利用 TCCMetrics 神經量化後的資訊，最後以圖表的方式呈現各個神經量化參數對於不同復原天數對神經復原程度的影響與趨勢。

圖 4.21 為 Ce<sup>3+</sup>:YAG Mirau-based FF-OCT 系統掃描第一組受傷角膜模式之 FVB 小鼠檢體角膜影像之前彈力層與亞基底神經的三維地形圖(視域大小為 648\*488 pixels，0.45  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ )，此兩個地形圖之間差了 7 voxels 也就是 1.4  $\mu\text{m}$ 。此組小鼠的手術後至檢體掃描中間的復原時間為兩個禮拜，細分時間為第 14 天。

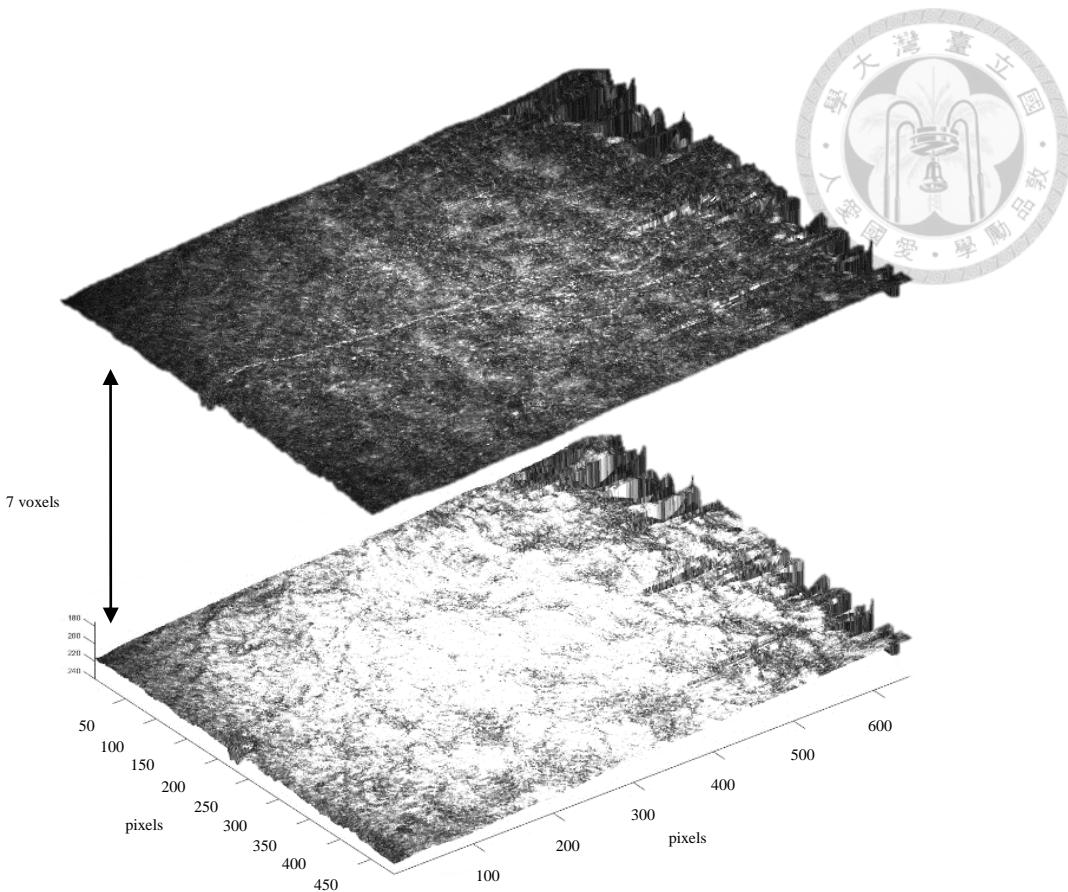
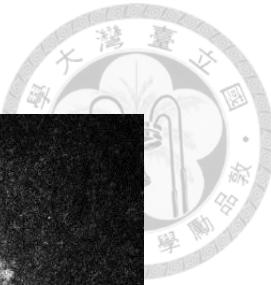


圖 4.21 第一組受傷角膜模式之 FVB 小鼠(復原時間：14 天)檢體角膜影像之前彈力層與亞基底神經三維地形圖(視域大小為 648\*488 pixels , 0.45  $\mu\text{m} / \text{pixel}$  , 0.2  $\mu\text{m} / \text{voxel}$ )

圖 4.22 為第一組受傷角膜模式之 FVB 小鼠檢體角膜前彈力層附近橫平面影像，圖 4.22 (a)、(b)為未經 curve plane tracing and projection 程式校正的影像，分別為深度  $38 \mu\text{m}$  與  $39 \mu\text{m}$  處，可以看到前一張與後一張亞基底神經(紅色箭頭)是接續的只不過前彈力層疊在一起導致亞基底神經在觀測上有斷開的趨勢。圖 4.22 (c)、(d)為經 curve plane tracing and projection 程式校正的影像，圖 4.22 (c)為兩者分離後亞基底神經三維地形圖投影至橫平面之影像，與圖 4.9 (a)中正常角膜亞基底神經相比可以明顯觀察到神經相較之下稀少許多，圖 4.22 (d)為前彈力層三維地形圖投影至橫平面之影像，在此圖會發現右上方處有一些橫條紋產生，這是因為在曲線擬合中雖然 15 次高階多項式可以擬合大部分曲線，但有部分仍會因為前彈力層過崎嶇或是在前彈力層上下方有其他很強反射面的干擾而讓某幾張縱平面的前彈力層擬合產生誤差從而產生類似橫條紋的現象出現，擬合失誤的狀況大都如第三章的圖



3.6 所示。

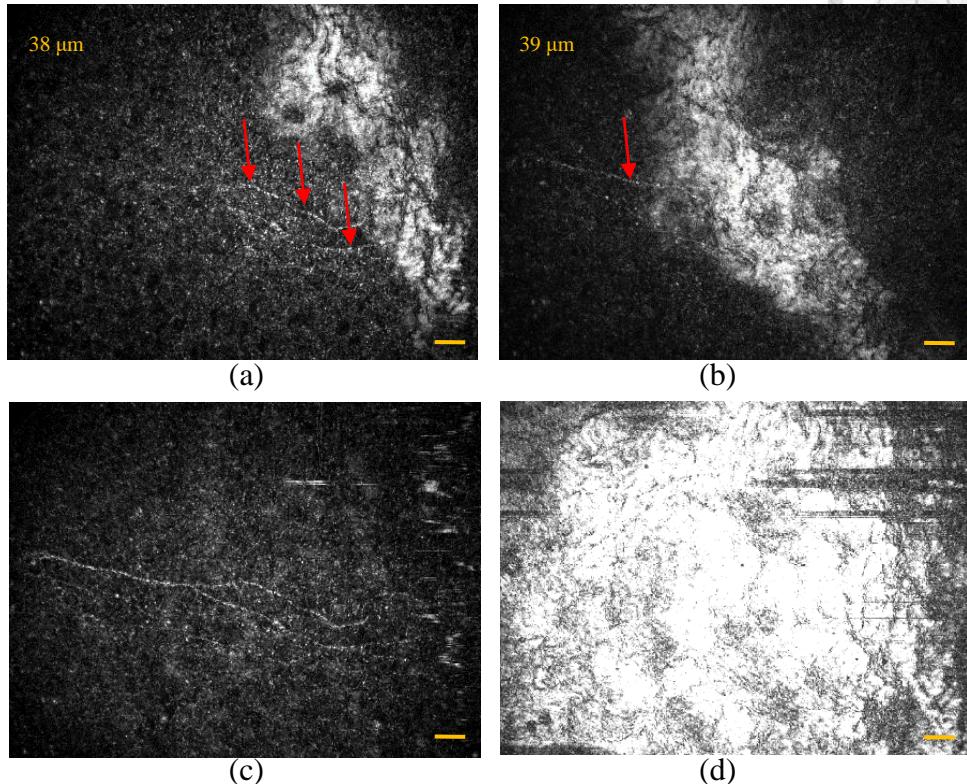


圖 4.22 第一組受傷角膜模式之 FVB 小鼠(復原時間：14 天)檢體角膜影像。經過程式分離前深度為(a)  $38 \mu\text{m}$ ，(b)  $39 \mu\text{m}$  之神經影像。(c)經過程式分離後之亞基底神經影像，(d)經過程式分離後之前彈力層影像。紅色箭頭為亞基底神經。(比例尺： $20 \mu\text{m}$ )

圖 4.23 (a)為第一組亞基底神經影像經程式校正後利用 NeuronJ 進行神經追蹤之 NeuronJ 神經追蹤圖，圖 4.9 (b)為 TCCMetrics 量測出之描述亞基底神經形貌之參數數據。

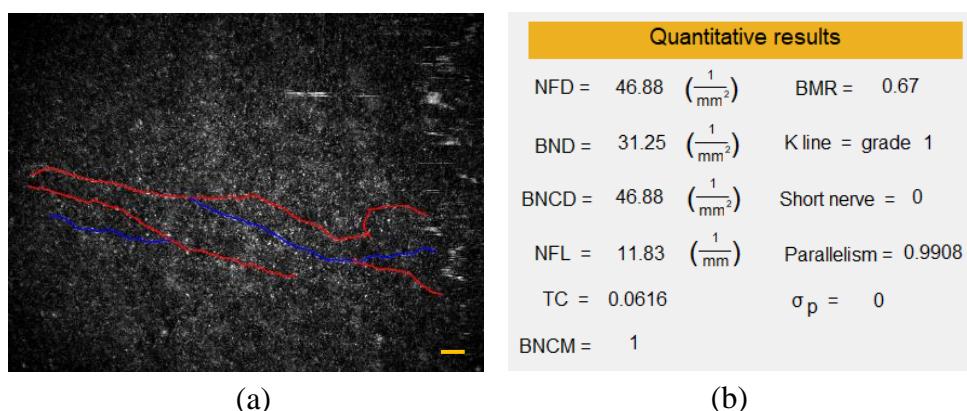


圖 4.23 第一組受傷角膜模式之 FVB 小鼠檢體角膜影像(復原時間：14 天)之(a) NeuronJ 神經追蹤圖，(b) TCCMetrics[31]量測出之數據。紅線為主幹神經，藍線為分枝神經。(比例尺： $20 \mu\text{m}$ )



圖 4.24 為第二組 FVB 小鼠健康檢體角膜影像之前彈力層與亞基底神經的三維地形圖(視域大小為 648\*488 pixels, 0.45  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ )，此兩個地形圖之間差了 10 voxels 也就是 2  $\mu\text{m}$ 。此組小鼠的手術後至檢體掃描中間的復原時間為三個禮拜，細分時間為第 21 天。

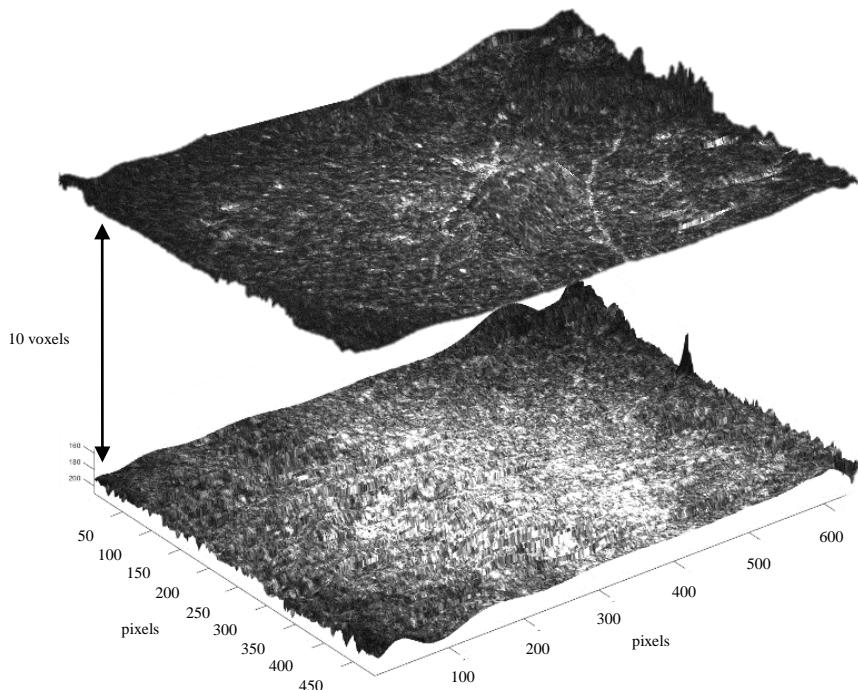


圖 4.24 第二組受傷角膜模式之 FVB 小鼠(復原時間：21 天)檢體角膜影像之前彈力層與亞基底神經三維地形圖(視域大小為 648\*488 pixels, 0.45  $\mu\text{m} / \text{pixel}$ , 0.2  $\mu\text{m} / \text{voxel}$ )

圖 4.25 (a)、(b)為未經 curve plane tracing and projection 程式校正的第二組亞基底神經橫平面影像，分別為深度 33  $\mu\text{m}$  與 34  $\mu\text{m}$ ，亞基底神經(紅色箭頭)被前彈力層嚴重干擾導致亞基底神經在觀測上有斷開的趨勢。圖 4.25 (c)、(d)為經 curve plane tracing and projection 程式校正後的影像，圖 4.25 (c)為兩者分離後亞基底神經三維地形圖投影至橫平面之影像，與圖 4.9 (a)中正常角膜亞基底神經相比可以明顯觀察到神經相較之下稀少許多並比圖 4.22 (c)稍微多一些，圖 4.25 (d)為前彈力層三維地形圖投影至橫平面之影像。

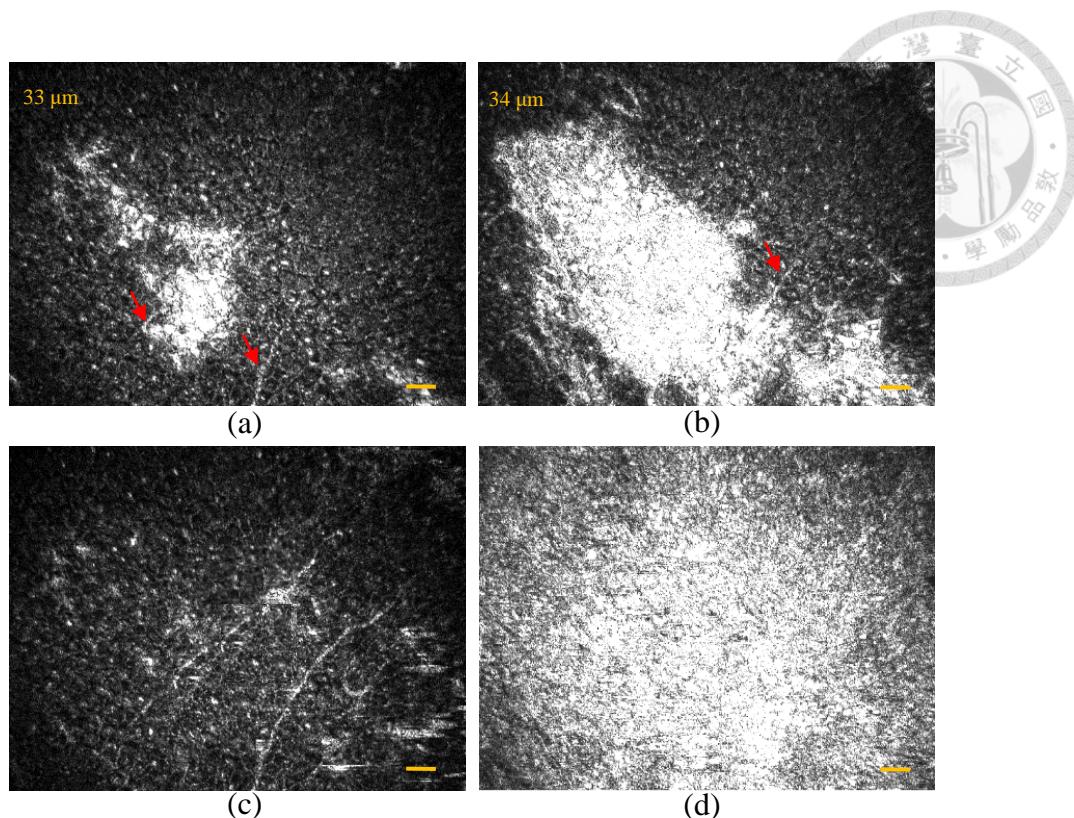


圖 4.25 第二組受傷角膜模式之 FVB 小鼠(復原時間：21 天)檢體角膜影像。經過程式分離前深度為(a) 33  $\mu\text{m}$ ，(b) 34  $\mu\text{m}$  之神經影像。(c)經過程式分離後之亞基底神經影像，(d)經過程式分離後之前彈力層影像。紅色箭頭所指為亞基底神經。(比例尺：20  $\mu\text{m}$ )

圖 4.26 (a)為第二組亞基底神經影像經程式校正後利用 NeuronJ 進行神經追蹤之 NeuronJ 神經追蹤圖，圖 4.26 (b)為 TCCMetrics 量測出之數據。

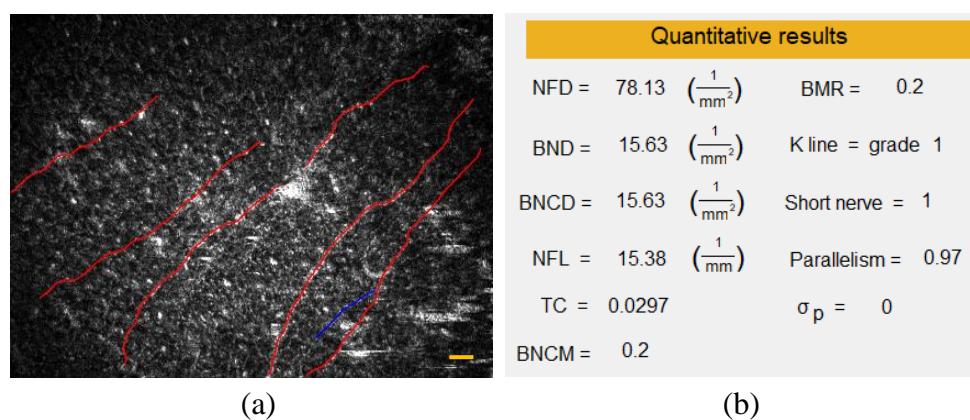


圖 4.26 第二組受傷角膜模式之 FVB 小鼠檢體角膜影像(復原時間：21 天)之(a)NeuronJ 神經追蹤圖，(b)TCCMetrics 量測出之數據。紅線為主幹神經，藍線為分枝神經。(比例尺：20  $\mu\text{m}$ )



圖 4.27 為第三組 FVB 小鼠健康檢體角膜影像之前彈力層與亞基底神經的三維地形圖(視域大小為  $648 \times 488$  pixels,  $0.45 \mu\text{m}/\text{pixel}$ )，此兩個地形圖之間差了 7 voxels 也就是  $1.4 \mu\text{m}$ 。此組小鼠的手術後至檢體掃描中間的復原時間為六個禮拜，細分時間為第 53 天。

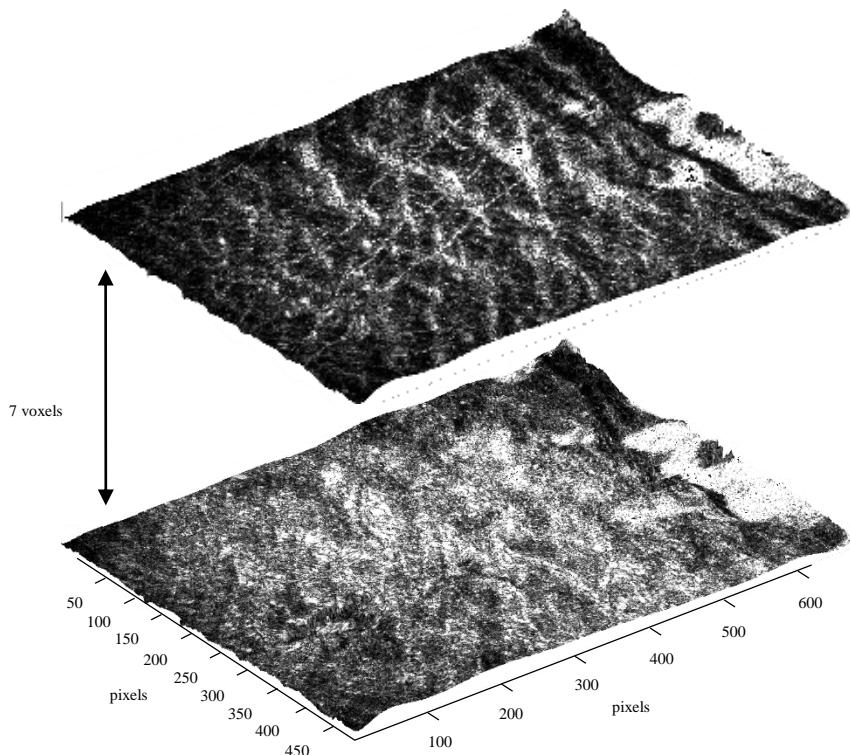


圖 4.27 第三組受傷角膜模式之 FVB 小鼠(復原時間：53 天)檢體角膜影像之前彈力層與亞基底神經三維地形圖(視域大小為  $648 \times 488$  pixels,  $0.45 \mu\text{m} / \text{pixel}$ ,  $0.2 \mu\text{m} / \text{voxel}$ )

圖 4.28 (a)、(b)為未經 curve plane tracing and projection 程式校正的第三組亞基底神經橫平面影像，分別為深度  $36 \mu\text{m}$  與  $37 \mu\text{m}$ ，亞基底神經(紅色箭頭)被前彈力層嚴重干擾導致亞基底神經在觀測上有斷開的趨勢。圖 4.28 (c)、(d)為經 curve plane tracing and projection 程式校正後的影像，圖 4.28 (c)為兩者分離後亞基底神經三維地形圖投影至橫平面之影像，與圖 4.9 (a)中正常角膜亞基底神經相比可以明顯觀察到神經相較之下稀少許多並與圖 4.26 (c)相差彷彿，圖 4.28 (d)為前彈力層三維地形圖投影至橫平面之影像。

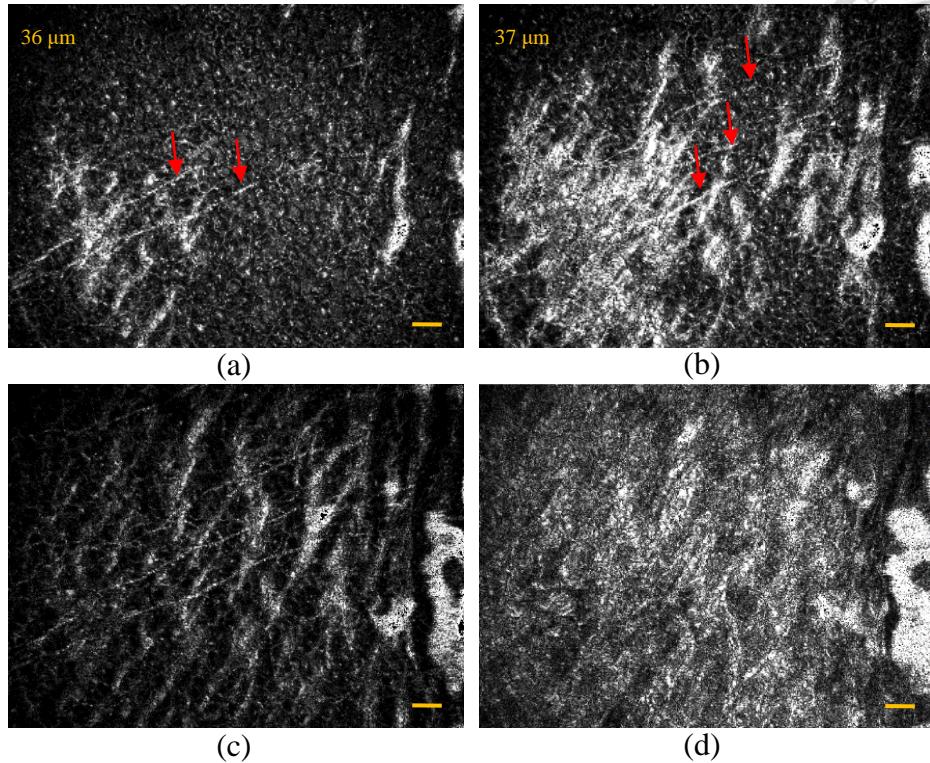
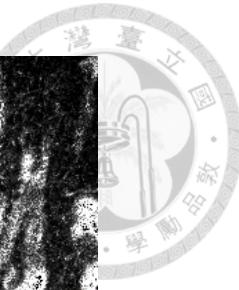


圖 4.28 第三組受傷角膜模式之 FVB 小鼠(復原時間：53 天)檢體角膜影像。經過程式分離前深度為(a) 36  $\mu\text{m}$ ，(b) 37  $\mu\text{m}$  之神經影像。(c)經過程式分離後之亞基底神經影像，(d)經過程式分離後之前彈力層影像。紅色箭頭所指為亞基底神經。(比例尺：20  $\mu\text{m}$ )

圖 4.29 (a)為第三組亞基底神經影像經程式校正後利用 NeuronJ 進行神經追蹤之 NeuronJ 神經追蹤圖，圖 4.29 (b)為 TCCMetrics 量測出之數據。

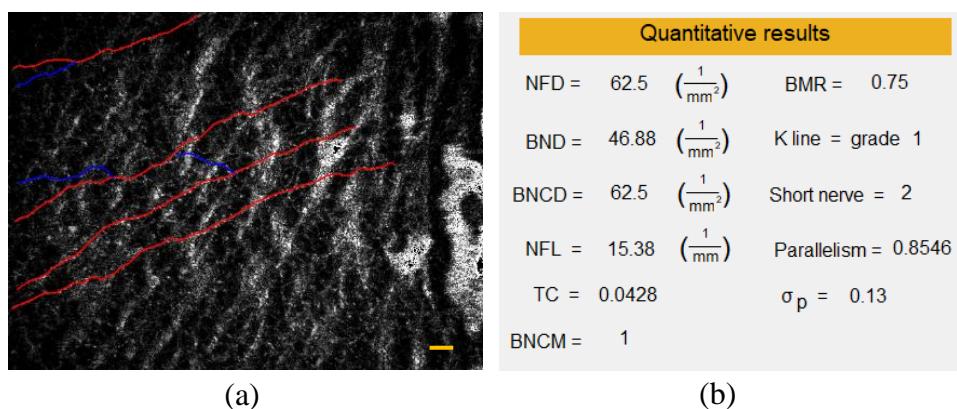


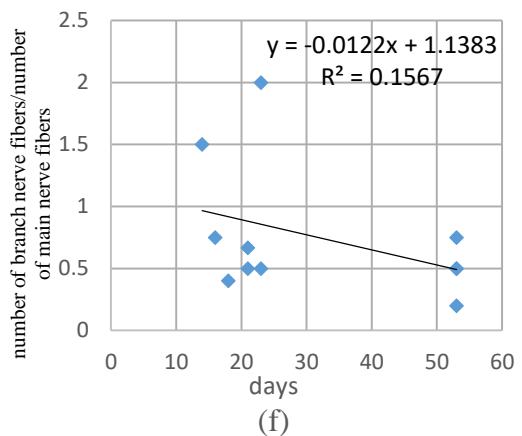
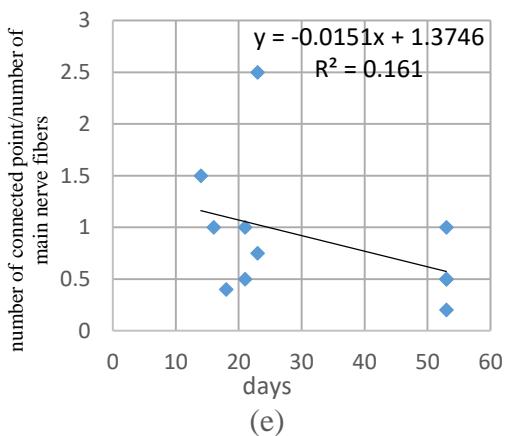
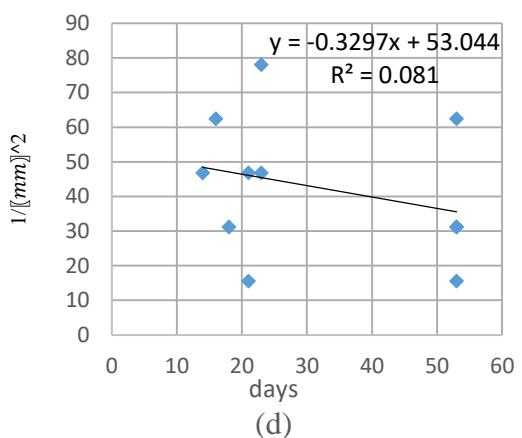
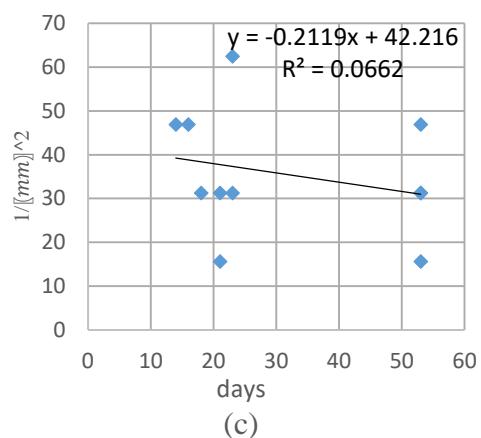
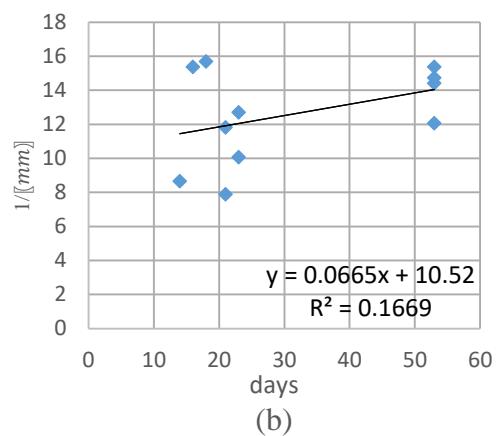
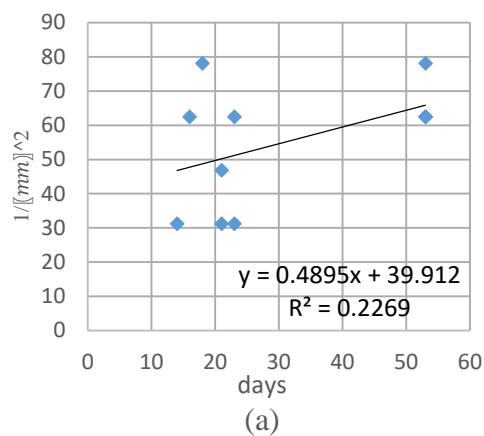
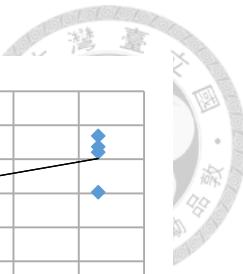
圖 4.29 第三組受傷角膜模式之 FVB 小鼠檢體角膜影像(復原時間：53 天)之(a)NeuronJ 神經追蹤圖，(b)TCCMetrics 量測出之數據。紅線為主幹神經，藍線為分枝神經。(比例尺：20  $\mu\text{m}$ )



最後以圖表的方式呈現各個神經量化參數對於不同復原天數對神經復原程度的影響與趨勢，圖表中的橫軸為復原天數，總計有第 14、16、18、21、23 以及 53 天，分別對應二、三及六個禮拜。圖 4.30 (a)、(b)為與主幹神經相關的參數 NFD (number of main nerve fiber density) 和 NFL (nerve fiber length density)，可以很清楚的看到這兩個參數隨著時間增加而有正增長的趨勢，這代表手術過後隨著復原時間的增加，主幹神經不管是數量或是長度皆有復原生長的情況，這與文獻顯示的情況極為符合[38]。

接著是與分枝神經相關之參數，分別為圖 4.30 (c)、(d)、(e)、(f) 的 BND (number of branch nerve fiber density)、BNCD (branch nerve connected point density)、BNCM (branch nerve connection per main fiber) 和 BMR (branch main fiber ratio)。在分枝神經相關參數的趨勢反而與主幹神經相反，隨著時間增加神經復原的趨勢為負增長，雖然下降趨勢並不大但還是與多數研究的正向復原趨勢[39]不相符。我們認為原因有兩個，一是犧牲到掃描檢體之間的時間，由於透過可見光 Mirau-based FF-OCT 系統掃描角膜需要先調整至最佳眼球角度，所以當掃到亞基底神經時需要花費一定時間，因此可能因為中間的時間過長導致部份分枝神經消退[36]；二是樣本數量不夠多以及復原時間不夠長，在多數神經再生的研究中復原時間多以月為單位，並且最後一次追蹤時間的神經規模無法回復至未受損前[40]，因此這邊認為 52 天的時間長度並不夠能觀察到分枝神經明顯的復原再生趨勢。基於以上兩個原因導致分枝神經相關參數的再生趨勢為負增長或幾乎持平。

最後是 4.30 (g)、(h)、(i)、(j) 的 TC (tortuosity coefficient)、parallelism 與其標準差以及 NFW (corneal nerve fiber width)，這四個參數在角膜受損前後並沒有過大的差異。扭曲度隨著復原時間增加而稍微變小代表神經變得較為平滑，但並沒有辦法佐證是否合理[39]，原因同上時間跨度不夠大。而平行度以及神經寬度則確實無太大差別，皆在合理範圍。



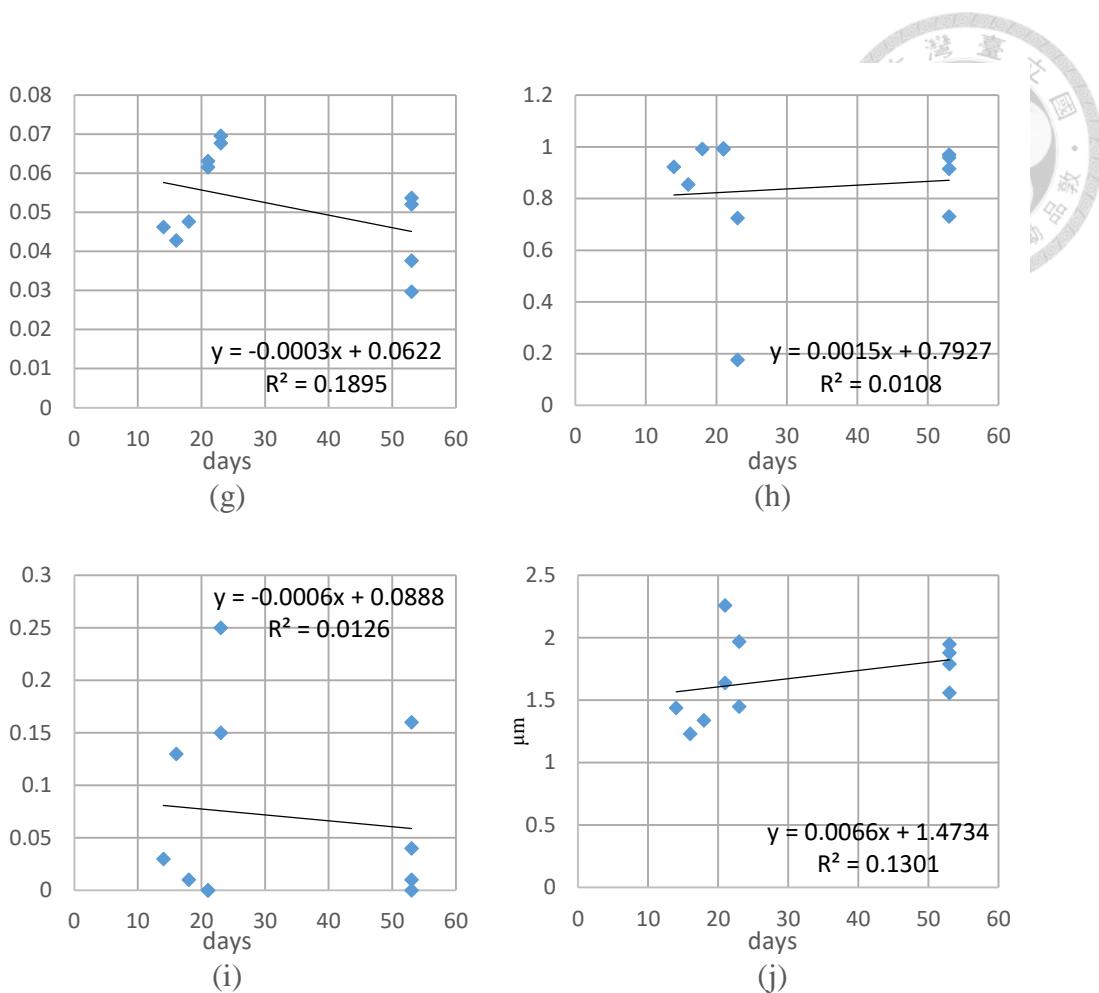


圖 4.30 亞基底神經形貌參數對於復原天數對神經復原程度的影響與趨勢圖表。(a) NFD , (b) NFL , (c) BND , (d) BNCD , (e) BNCM , (f) BMR , (g) TC , (h) Parallelism , (i) Sigma P , (j) NFW 。



## 4.3 正常與受傷模式小鼠角膜神經影像量化分析比較

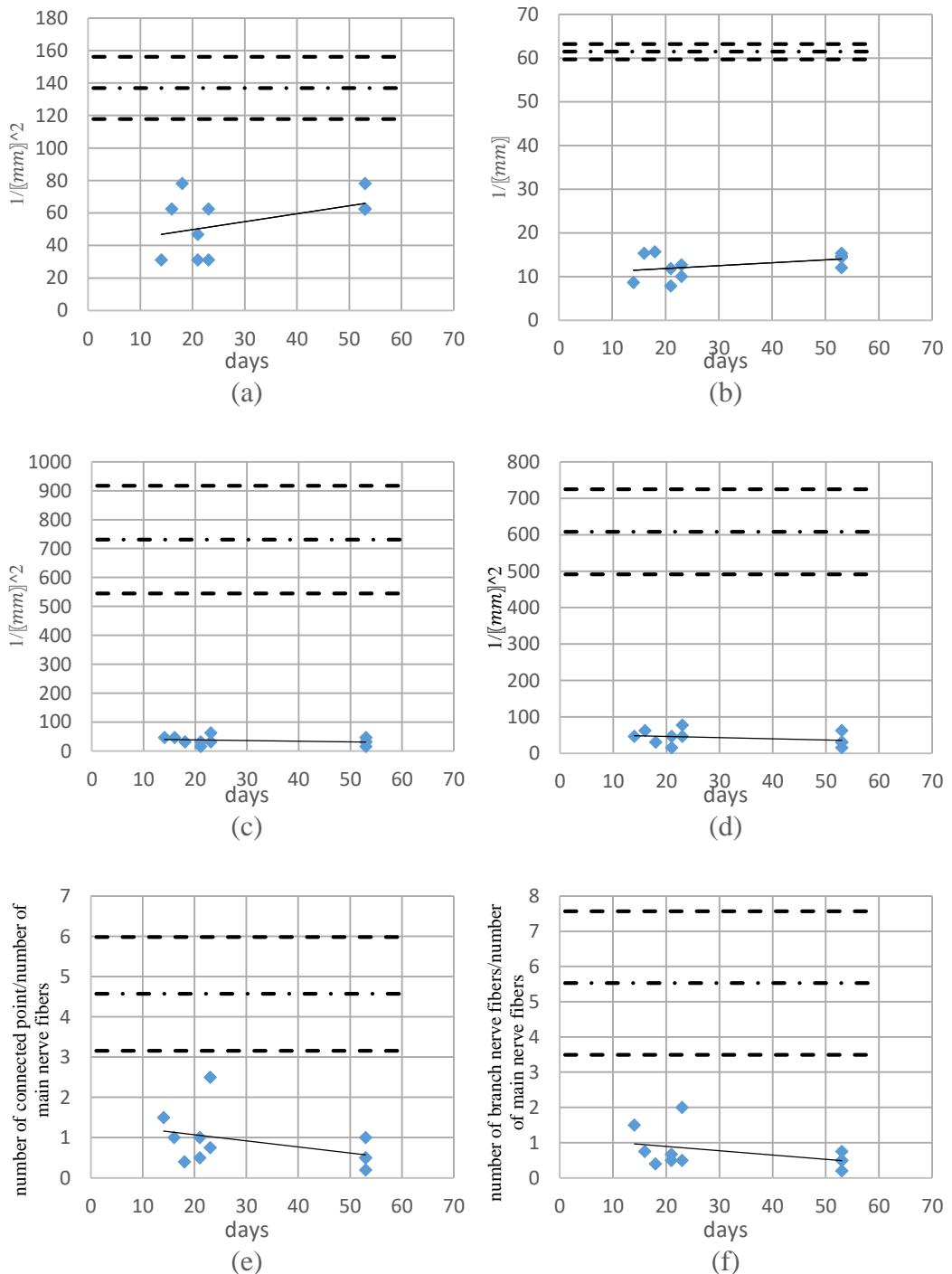
4.2.3 小節最後針對各個神經量化參數對於不同復原天數對神經復原程度的影響與趨勢做成圖表，在這一章會對健康亞基底神經形貌參數和角膜損傷之亞基底神經形貌參數做對照並做成圖表表示。

圖 4.31 和圖 4.30 相似，不過在圖 4.30 上新增了健康亞基底神經形貌參數的平均值與標準差，在圖 4.31 中----虛線為健康亞基底神經的平均值，-----虛線為健康亞基底神經的標準差。從圖 4.31 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 中可以很明顯觀察到對於主幹與分枝神經相關的參數中健康的亞基底神經與損傷過的亞基底神經有很大的差別，對於圖 4.31 (a) NFD，健康的主幹神經密度為  $136.93 \pm 19.18 / mm^2$ ，損傷模式角膜之主幹神經密度在復原時間第 52 天為大約  $70 / mm^2$ ，是健康的神經的 50% 左右；圖 4.31 (b) NFL，健康的亞基底神經密度為  $61.46 \pm 1.78 mm / mm^2$ ，損傷模式角膜為大約  $15 mm / mm^2$ ，是健康神經的 24% 左右；圖 4.31 (c) BND，健康分枝神經密度為  $731.00 \pm 186.19 / mm^2$ ，損傷模式角膜為大約  $40 / mm^2$ ，不到健康神經的 10%；圖 4.31 (d) BNCD，分枝神經連接點密度為  $608.01 \pm 116.99 / mm^2$ ，損傷模式角膜為大約  $40 / mm^2$ ，不到健康神經的 10%；圖 4.31 (e) BNCM 健康平均分枝點為  $4.57 \pm 1.41$ ，損傷模式角膜為大約 0.5，大約為健康神經的 10%；圖 4.31 (f) BMR 分枝主幹比為  $5.53 \pm 2.04$ ，損傷模式角膜為大約 0.5，大約為健康神經的 10%。各個健康與損傷角膜神經參數的差異以及復原趨勢大致符合生理學。最後對於(g) TC，(h) Parallelism，(i) Sigma P，(j) NFW 的參數來說則沒有差別。

從圖 4.31 中可以觀察到健康與損傷角膜的神經參數確實有巨大差異，但在損傷角膜模式中天數對於復原程度的趨勢並不是那麼理想，尤其是在分枝神經相關的參數中，在前面有提到我們猜測影響到分枝神經參數的原因很有可能是因為從小鼠犧牲到掃描檢體之間的時間。本次研究中，由於一開始執著於要在第二、三、六個禮拜犧牲，因此時間到時一次便會犧牲兩至三隻小鼠，但如上所述，掃描到一張完美的亞基底神經需花費一段時間，而雖然其他角膜有泡在角膜培養液並放在



冰箱保存，但直到掃描最後一隻眼睛時時間多半已超過一天。因此我認為如有後續實驗的話需要特別注意從犧牲到掃描檢體的時間，一次最好只犧牲一隻小鼠並立刻掃描以得到最佳影像，而這樣也可以順便將時間跨度拉長並得到更多組較完美的亞基底神經參數資訊。



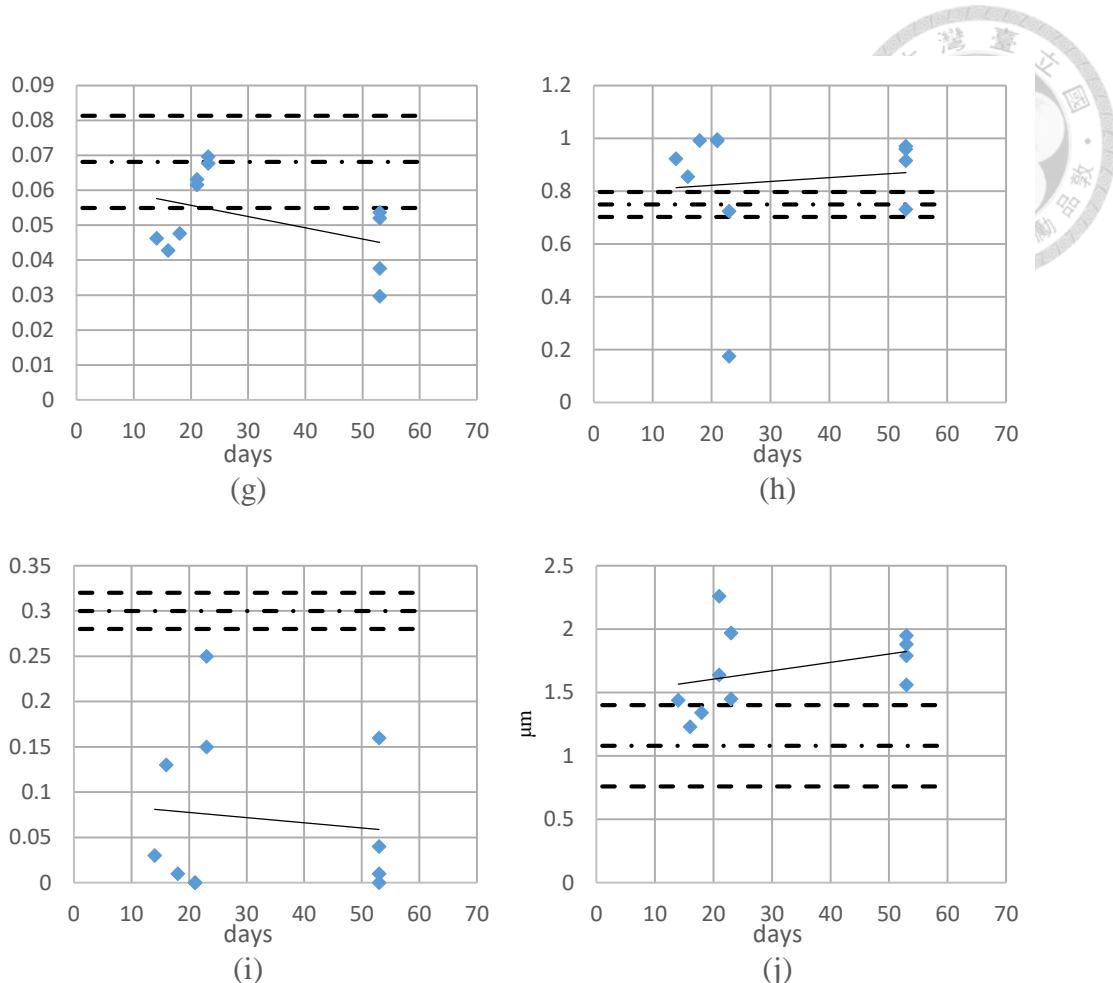


圖 4.31 健康亞基底神經形貌參數與角膜損傷之亞基底神經形貌參數對照趨勢圖表。(a) NFD，(b) NFL，(c) BND，(d) BNCD，(e) BNCM，(f) BMR，(g) TC，(h) Parallelism，(i) Sigma P，(j) NFW。- - -虛線為健康亞基底神經的平均值，- - -虛線為健康亞基底神經的標準差。



## 第五章 結論與未來展望

### 5.1 結論

本研究藉由 Mirau-based FF-OCT 系統得到健康與損傷過後的 *ex vivo* FVB 小鼠角膜影像，並對其亞基底神經的多個形貌描述之參數進行量化分析，以得到健康與損傷神經在形貌上之差異以及復原情形。本實驗所使用的兩套 OCT 系統分別為以可見光 Ce<sup>3+</sup>:YAG 晶體光纖所產生的自發性輻射作為光源的 Ce<sup>3+</sup>:YAG Mirau-based FF-OCT，其光源中心波長為 560-nm，頻譜半高全寬為 95 nm，此系統測得的橫向解析度為 0.8 μm、縱向解析度為 0.9 μm；以及以近紅外光 Ti:sapphire 晶體光纖所產生的放大自發性輻射作為光源的 Ti:sapphire Mirau-based FF-OCT，此光源中心波長為 780-nm，頻譜半高全寬為 163.8 nm，而測得的橫向解析度為 1.3 μm、縱向解析度為 1.3 μm。由於可見光光源波長較短，因此可見光系統在解析度上較近紅外光系統好，因此在需要高解析度的掃描檢體亞基底神經時多使用可見光系統，而近紅外光系統搭配高速 CMOS 相機，在掃描的速度上較具優勢，以及此光源對於眼睛刺激較小，因此多使用在檢查手術痕跡確認的活體掃描中。

本論文藉由自行撰寫的 curve plane tracing and projection 程式改善亞基底神經因各種原因而導致的神經不連續性。在一般的掃描影像中很常出現神經斷斷續續的情況但在生理學的角度來說神經不該出現斷開的情形，產生這種情況的原因有兩個，一是角膜為一有曲率的組織，在掃描的時候需要觀察的組織通常不會平行於掃描平面，因此在單張掃描影像中常常出現多層結構，亞基底神經也因此會斷開；二是由於上皮細胞層和前彈力層具有較強的折射率差異而導致 OCT 系統在掃描至前彈力層附近時會產生強反射面造成在影像中前彈力層會與亞基底神經重疊在一起，以上原因使得亞基底神經形貌的量化分析顯得較為困難。為解決以上問題，透過我們已知的前彈力層與亞基底神經為平行生長的結構以及系統極高的橫縱向解析度與光學切片能力，我們可以以強反射面的前彈力層為基準將前彈力層和亞基

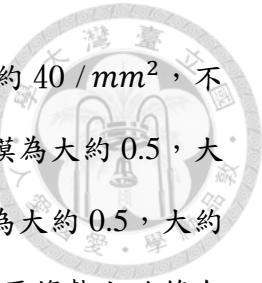


底神經精準的分離出來得到前彈力層與亞基底神經的三維地形圖，最後將此三維地形圖投影至橫平面即可得到不受前彈力層以及曲率干擾的完整亞基底神經，這對後續的神經量化分析可以起到較為精準的作用。

在健康的 *ex vivo* FVB 小鼠角膜掃描影像中，基於擁有細胞等級解析度的可見光 OCT 系統，我們可以在橫平面與縱平面上皆清楚的觀察到角膜的五層結構：上皮細胞層、前彈力層、基質層、後彈力層、內皮細胞層。除此之外，上皮細胞層內細分的三種細胞結構：表層上皮細胞層、翼狀上皮細胞層、基底上皮細胞以及基質層內的基質細胞、膠原纖維束皆可被解析出來。另外在健康的小鼠角膜亞基底神經的量化分析中，由於犧牲至掃描之間的時間間隔關係，導致量化後的神經參數與之前有些微差異，因此在之後的健康與損傷角膜亞基底神經的比對中取以前的健康亞基底神經參數作為標準。

在角膜損傷模式的 *ex vivo* FVB 小鼠角膜掃描影像中，我們將 15 隻八周齡的 FVB 小鼠分為三組並進行直徑 3 mm 的環切刮除手術，分別在手術過後的二、三及六個禮拜犧牲掃描並對亞基底神經進行量化分析，得到結果為，隨著復原時間增加，主幹神經密度(NFD)與亞基底神經密度(NFL)再生趨勢皆為正向增長，主幹神經密度在趨勢線上從復原時間兩個禮拜的大約  $45 / \text{mm}^2$  到復原時間六個禮拜的大約  $65 / \text{mm}^2$ ，亞基底神經密度則從大約  $11 \text{ mm} / \text{mm}^2$  至  $15 \text{ mm} / \text{mm}^2$ 。分枝神經相關的參數在趨勢上則為持平或負向增長，原因可能為犧牲到掃描檢體之間的時間過長以及復原時間跨度不夠大導致。剩餘參數如平行度、神經寬度及扭曲度則沒有太大差異。

最後將健康與損傷角膜的亞基底神經作比對，健康的主幹神經密度為  $136.93 \pm 19.18 / \text{mm}^2$ ，損傷模式角膜之主幹神經密度在復原時間第 52 天為大約  $70 / \text{mm}^2$ ，是健康的神經的 50% 左右；健康的亞基底神經密度為  $61.46 \pm 1.78 \text{ mm} / \text{mm}^2$ ，損傷模式角膜為大約  $15 \text{ mm} / \text{mm}^2$ ，是健康神經的 24% 左右；健康分枝神經密度為  $731.00 \pm 186.19 / \text{mm}^2$ ，損傷模式角膜為大約  $40 / \text{mm}^2$ ，不到健康神經的 10%；分



枝神經連接點密度為  $608.01 \pm 116.99 / mm^2$ ，損傷模式角膜為大約  $40 / mm^2$ ，不到健康神經的 10%；健康平均分枝點為  $4.57 \pm 1.41$ ，損傷模式角膜為大約 0.5，大約為健康神經的 10%；分枝主幹比為  $5.53 \pm 2.04$ ，損傷模式角膜為大約 0.5，大約為健康神經的 10%。各個健康與損傷角膜神經參數的差異以及復原趨勢大致符合生理學。

本次研究中，由於一開始執著於要在第二、三、六個禮拜犧牲，因此時間到時一次便會犧牲兩至三隻小鼠，但由於掃描到一張完美的亞基底神經需花費一段時間，而雖然其他角膜有泡在角膜培養液並放在冰箱保存，但直到掃描最後一隻眼睛時時間多半已超過一天。因此如有後續實驗的話需要特別注意從犧牲到掃描檢體的時間，一次最好只犧牲一隻小鼠並立刻掃描以得到最佳影像，以此最大程度的降低因死亡時間而有可能出現的實驗誤差，而這樣也可以順便將時間跨度拉長並得到更多組較完美的亞基底神經參數資訊，以便得到更具合理性之數據。

上述量測結果，證實了本研究所使用的 Mirau-based FF-OCT 能夠提供高空間解析度的三維影像，有能力辨識出角膜各層中不同的細胞型態並透過三維影像提供完整的角膜亞基底神經形貌。以臨床研究的價值而言，非侵入式、高解析度的掃描搭配神經分離程式，能夠協助較精準的亞基底神經量測量化，並對疾病進行早期的診斷，例如：自閉症(Autism)、帕金森氏症(Parkinson's disease)與糖尿病(Diabetes)等疾病。



## 5.2 未來展望

本研究證實了 Mirau-based 全域式 OCT，可以用於 FVB 小鼠的眼角膜掃描，並且可以利用 curve plane tracing and projection 程式擬合前彈力層地形來分離出亞基底神經使得針對角膜亞基底神經的量化計算能夠更為客觀準確。然而對於某些因為疾病或是物理損傷而導致結構複雜的前彈力層，目前的擬合程式依舊無法精確分離神經與前彈力層，亞基底神經影像中有可能還是會殘存一些前彈力層影像。未來可以結合機器學習，使用大量的縱平面影像訓練電腦找出前彈力層的地形分布，藉此精確分離複雜結構下的前彈力層與神經。

curve plane tracing and projection 程式除了用在分離亞基底神經與前彈力層之外亦可運用在其他結構，如內皮細胞層，應用在內皮細胞層可用做檢查眼庫角膜品質的程式。在進行後彈力層內皮角膜移植手術(DMEK)時，常使用 Straiko Modified Jones Tube 進行保存與運輸後彈力層至內皮細胞，而因為形狀限制後彈力層至內皮細胞層在 Straiko Modified Jones Tube 中是捲曲的，如圖 5.1[41]。如果此時只使用一般檢驗器具如裂隙燈，得到影像會因捲曲而只能檢查部分內皮細胞，而 OCT 系統掃描搭配程式即可得到完整的內皮細胞並在角膜移植手術前對內皮細胞密度做精確的檢驗。

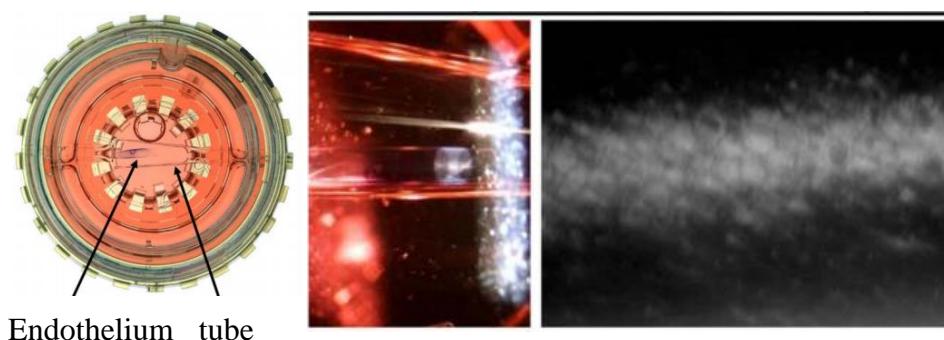


圖 5.1 Straiko Modified Jones Tube 示意圖以及內皮細胞在裂隙燈下之影像。[41]

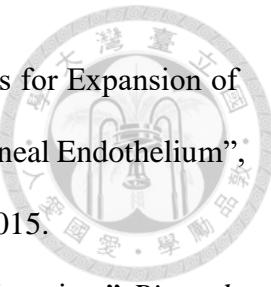


## 参考文献

- [1] H. Eguchi , A. Hiura , H. Nakagawa, *et al.*, “Corneal Nerve Fiber Structure, Its Role in Corneal Function, and Its Change in Corneal Diseases,” *BioMed Res. Int.*, 2017.
- [2] L. J. Müller, C. F. Marfurt, F. Kruse, *et al.*, “Corneal nerves: structure, contents and function,” *Experimental Eye Research*, vol. 76, no. 5, pp. 521-542, 2003.
- [3] M. Markoulli, J. Flanagan, S. S. Tummanapalli, *et al.*, “The impact of diabetes on corneal nerve morphology and ocular surface integrity,” *The Ocular Surface*, vol. 16, no. 1, pp. 45-57, 2018.
- [4] M. Ferdousi, A. Kalteniece, S. Azmi, *et al.*, “Diagnosis of Neuropathy and Risk Factors for Corneal Nerve Loss in Type 1 and Type 2 Diabetes: A Corneal Confocal Microscopy Study,” *Diabetes Care*, vol. 44, no. 1, pp. 150-156, 2021.
- [5] O. Levy et al., “Increased corneal sub-basal nerve density in patients with Sjögren syndrome treated with topical cyclosporine A,” *Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 45, no. 5, pp. 455–463, 2017.
- [6] A. Cruzat, D. Witkin, N. Baniasadi, *et al.*, “Inflammation and the Nervous System: The Connection in the Cornea in Patients with Infectious Keratitis,” *IOVS*, vol. 52, no. 8, pp. 5136-5143, 2011.
- [7] D. V. Patel and C. N. J. McGhee, “Mapping the Corneal Sub-basal Nerve Plexus in Keratoconus by In Vivo Laser Scanning Confocal Microscopy,” *IOVS*, vol. 47, no. 4, pp. 1348-1351, 2006.
- [8] S. L. Misra, H. M. Kersten, R. H. Roxburgh, *et al.*, “Corneal nerve microstructure in Parkinson's disease,” *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 39, pp. 53–58, 2017.
- [9] S. D. Cillà, S. Ranno, E. Carini, *et al.*, “Corneal Subbasal Nerves Changes in Patients with Diabetic Retinopathy: An In Vivo Confocal Study,” *IOVS*, vol. 50, no.11, pp. 5155-5158, 2009.



- [10] N. Papanas and D. Ziegler, “Corneal Confocal Microscopy: A New Technique for Early Detection of Diabetic Neuropathy,” *Current Diabetes Reports*, vol. 13, pp. 488–499, 2013.
- [11] 游鈴, “Analysis of Image and Spectrum Properties on Skin Cells by Mirau-based Full-field Optical Coherence Tomography Combined with Near-infrared Raman Spectroscopy,” 國立臺灣大學, 2019.
- [12] Wolfram MathWorld, “Wiener-Khinchin Theorem.” [Online]. Available: <https://mathworld.wolfram.com/Wiener-KhinchinTheorem.html>.
- [13] J. S. Haggerty, W. P. Menashi, and J. F. Wenekkus, “Method for forming refractory fibers by laser energy,” U.S. Patent 3,944,640, 1976.
- [14] 王世昌, “玻璃纖衣摻鈦藍寶石晶體光纖之發展與應用,” 國立臺灣大學, 2016.
- [15] Y. Dong, *et al.*, “Luminescence studies of Ce:YAG using vacuum ultraviolet synchrotron radiation,” *Mater. Res. Bull.*, vol. 41, no. 10, pp. 1959—1963, 2006.
- [16] 吳政育, “Full-field optical coherence tomography combined with raman spectroscopy for biological sample characterization,” 國立臺灣大學, 2017.
- [17] P. F. Moulton, “Spectroscopic and laser characteristics of Ti:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,” *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 3, no. 1, pp. 125-133, 1986.
- [18] E. Hecht, “Optics,” 5th Edition, Pearson Inc., 2016.
- [19] T. Dahmen, “Tomographic Reconstruction of Combined Tilt- and Focal Series in Scanning Transmission Electron Microscopy,” *Universität des Saarlandes*, 2015.
- [20] 何端書, “Functional Optical Coherence Tomography Based on Broadband Crystal Fiber Light Source,” 國立臺灣大學, 2015.

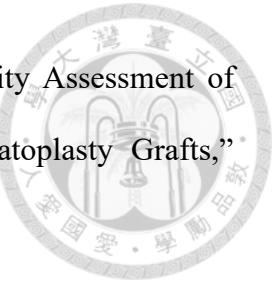


- [21] J. Navaratnam, T. P. Utheim, V. K. Rajasekhar, *et al.*, “Substrates for Expansion of Corneal Endothelial Cells towards Bioengineering of Human Corneal Endothelium”, *Journal of Functional Biomaterials*, vol. 6, no. 3, pp. 917-945, 2015.
- [22] Z. Chen, J. You, X. Liu, *et al.* “Biomaterials for corneal bioengineering,” *Biomed. Mater.*, vol. 13, no. 3, 2018.
- [23] H. Shuichiro, O. Tokaji, and T. Koujiro, “Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman’s layer and Descemet’s membrane in mammals and amphibians.” *J. Morphol.*, vol. 254, no. 3, pp. 247—258, 2002.
- [24] “準分子雷射屈光性角膜手術學.” [online]. Available: <http://nobelgroup.com.tw/lasikeye/excimer/112.htm>
- [25] “Anatomy and Physiology of cornea.” [Online]. Available: <https://www.slideshare.net/Lhacha/anatomy-and-physiology-of-cornea>
- [26] H. Sheha, S. Tighe, O. Hashem, *et al.* “Update On Cenegermin Eye Drops In The Treatment Of Neurotrophic Keratitis,” *Clin. Ophthalmol.*, vol. 13, pp. 1973-1980, 2019.
- [27] J. Kokot, A. Wylegała, B. Wowra, “Corneal confocal sub-basal nerve plexus evaluation: a review,” *Acta Ophthalmologica*, vol. 96, no. 3, pp. 232-242, 2018.
- [28] S. Patel, L. Tutchenko, “The refractive index of the human cornea: A review,” *Contact Lens and Anterior Eye*, vol. 42, no. 5, pp. 575-580, 2019.
- [29] E. Auksorius, D. Borycki, P. Stremplewski, *et al.* “In vivo imaging of the human cornea with high-speed and high-resolution Fourier-domain full-field optical coherence tomography,” *Biomedical Optics Express*, vol. 11, no. 5, pp. 2849-2865, 2020.
- [30] C. F. Marfurt, J. Cox, S. Deek, *et al.* “Anatomy of the human corneal innervation,” *Experimental Eye Research*, vol. 90, no. 4, pp. 478-492, 2010.



- [31] 陳林志傑, “Quantification of Corneal Nerve's Image Using TCCMetrics and Full-field Optical Coherence Tomography,” 國立臺灣大學, 2020.
- [32] 陳昱彤, “全域式光學同調斷層掃描術用於動物眼睛模型之特性分析,” 國立臺灣大學, 2018.
- [33] T. A. Harrison, Z. He, K. Boggs, *et al.* “Corneal endothelial cells possess an elaborate multipolar shape to maximize the basolateral to apical membrane area,” *Mol. Vis.*, vol. 22, pp. 31–39, 2016.
- [34] S. Patel and L. Tuchenco, “The refractive index of the human cornea: A review,” *Contact Lens Anterior Eye*, vol. 42, no. 5, pp. 575–580, 2019.
- [35] C. F. Marfurt, J. Cox, S. Deek, *et al.* “Anatomy of the human corneal innervation,” *Experimental Eye Research*, vol. 90, no. 4, pp. 478-492, 2010.
- [36] M. A. Al-Aqaba, T. Alomar, A. Miri, *et al.* “Ex vivo confocal microscopy of human corneal nerves,” *Br. J. Ophthalmology*, vol. 94, pp. 1251-1257, 2010.
- [37] “屈光手術學:供眼視光學專業用(第2版).” [online]. Available: [https://www.books.com.tw/web/sys\\_serialtext/?item=0010593426&page=5](https://www.books.com.tw/web/sys_serialtext/?item=0010593426&page=5)
- [38] C. S. Medeiros and M. R. Santhiago, “Corneal nerves anatomy, function, injury and regeneration,” *Experimental Eye Research*, vol. 200, 2020
- [39] T. Darwish, A. Brahma, C. O'Donnell, *et al.* “Subbasal nerve fiber regeneration after LASIK and LASEK assessed by noncontact esthesiometry and in vivo confocal microscopy: Prospective study,” *J. Cataract. Refract. Surg.*, vol. 33, no. 9, pp. 1515-1521, 2007.
- [40] F. Zhang, S. Deng, N. Guo, *et al.* ”Confocal Comparison of Corneal Nerve Regeneration and Keratocyte Reaction between FS-LASIK, OUP-SBK, and Conventional LASIK,” *Cornea*, vol. 31, no. 9, pp. 5536-5544, 2012.

- [41] K. D. Tran, P. K. Dye, K. Odell, *et al.* “Evaluation and Quality Assessment of Prestripped, Preloaded Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Grafts,” *Cornea*, vol. 36, no. 4, pp. 484-490, 2016.





## 附錄一： curve plane tracing and projection 程式

---

%----- parameter for higher-order function from XZ\_avg image

%-----選取路徑&設定影像資訊

file\_path = 'D:\ntu\Lab\scanning image\CeYAG

image\2019.02.11\_ex\_vivo\_FVB1\_2(CeYAG)\XZ\_11\_raw';

X\_pixel\_XZ = 648; %for FOV X-direction

Y\_pixel\_XZ = 478; %for FOV Y-direction

Z\_pixel\_XZ = 703;

resize = 3;

%

bowman\_top\_limit = 300; % Bowman's layer上界線

bowman\_bottom\_limit = 335; % Bowman's layer下界線

%

fitting\_order = 15;

above = 0; % Bowman's layer往上調幾個voxels

tolerance = 1.5; % 多少個標準差以外要被刪除

---

%-----收集並擬合Bowman's layer的曲線

cd(file\_path);

F = dir(fullfile(file\_path,'\*.raw'));

img\_num = length(F);

if img\_num > 0 % ????????

    x\_ex = 1:X\_pixel\_XZ;

    x\_ex2 = 1:X\_pixel\_XZ\*resize;

    yp3\_XZf = zeros(488,648);

    for j = 1:img\_num % ????????

        data\_name = F(j).name;% ???

        fid = fopen(data\_name,'r+');

        f = fread(fid,[X\_pixel\_XZ Z\_pixel\_XZ],'float32','ieee-be');

        f = f';

        f3 = imresize(f,resize);

        Ht = bowman\_top\_limit\*resize;

        Hb = bowman\_bottom\_limit\*resize;

        Htr = round(Ht);

        Hbr = round(Hb);



```
ff = f3(Htr:Hbr,:);
[max_f,index] = max(ff,[],1);
index_0 = index + Htr;
index_1 = index_0;
%----- fitting bowman's curve
p = polyfit(x_ex2,index_0,fitting_order);
y1 = polyval(p,x_ex2);
%-----把誤差太大的點扣掉
m = index_0 - y1;
STD = std(m)*tolerance;
index_1((m > STD | m < -STD) ==1) = 0;
if index_1(1) == 0
    a = 1;
    while index_1(a) == 0
        a = a+1;
    end
    index_1(1) = index_1(a);
end
if index_1(X_pixel_XZ*resize) == 0
    a = X_pixel_XZ*resize;
    while index_1(a) == 0
        a = a-1;
    end
    index_1(X_pixel_XZ*resize) = index_1(a);
end
for a = 2 : X_pixel_XZ*resize-1
    if index_1(a) == 0
        left_pixel = a;
        while index_1(left_pixel) == 0
            left_pixel = left_pixel-1;
        end
        left_value = index_1(left_pixel);
        right_pixel = a;
        while index_1(right_pixel) == 0
            right_pixel = right_pixel+1;
        end
        right_value = index_1(right_pixel);
        index_1(a) = (left_value+right_value)/2;
```



```
    end  
end  
  
%----- fitting bowman's curve  
p2 = polyfit(x_ex2,index_1,fitting_order);  
yp = polyval(p2,x_ex2);  
m2 = index_1 - yp;  
STD = std(m2)*tolerance;  
index_1((m2 > STD | m2 < -STD) ==1) = 0;  
  
%-----把誤差太大的點扣掉  
if index_1(1) == 0  
    a = 1;  
    while index_1(a) == 0  
        a = a+1;  
    end  
    index_1(1) = index_1(a);  
end  
if index_1(X_pixel_XZ*resize) == 0  
    a = X_pixel_XZ*resize;  
    while index_1(a) == 0  
        a = a-1;  
    end  
    index_1(X_pixel_XZ*resize) = index_1(a);  
end  
for a = 2 : X_pixel_XZ*resize-1  
    if index_1(a) == 0  
        left_pixel = a;  
        while index_1(left_pixel) == 0  
            left_pixel = left_pixel-1;  
        end  
        left_value = index_1(left_pixel);  
        right_pixel = a;  
        while index_1(right_pixel) == 0  
            right_pixel = right_pixel+1;  
        end  
        right_value = index_1(right_pixel);  
        index_1(a) = (left_value+right_value)/2;
```



```
    end  
end  
  
% fitting bowman's curve  
p3 = polyfit(x_ex2,index_1,fitting_order);  
yp2 = polyval(p3,x_ex2);  
m3 = index_1 - yp2;  
STD = std(m3)*tolerance;  
index_1((m3 > STD | m3 < -STD) ==1) = 0;  
%----把誤差太大的點扣掉  
if index_1(1) == 0  
    a = 1;  
    while index_1(a) == 0  
        a = a+1;  
    end  
    index_1(1) = index_1(a);  
end  
if index_1(X_pixel_XZ*resize) == 0  
    a = X_pixel_XZ*resize;  
    while index_1(a) == 0  
        a = a-1;  
    end  
    index_1(X_pixel_XZ*resize) = index_1(a);  
end  
for a = 2 : X_pixel_XZ*resize-1  
    if index_1(a) == 0  
        left_pixel = a;  
        while index_1(left_pixel) == 0  
            left_pixel = left_pixel-1;  
        end  
        left_value = index_1(left_pixel);  
        right_pixel = a;  
        while index_1(right_pixel) == 0  
            right_pixel = right_pixel+1;  
        end  
        right_value = index_1(right_pixel);  
        index_1(a) = (left_value+right_value)/2;  
    end
```



```
end

% fitting bowman's curve
p4 = polyfit(x_ex2,index_1,fitting_order);
yp3_XZ = polyval(p4,x_ex2);
yp3_XZ = imresize(yp3_XZ,1/resize) / resize;
yp3_XZf(j,:) = yp3_XZ;

fclose(fid);
end
for m = 478:488
    yp3_XZf(m,:) = yp3_XZf(478,:);
end
end


---


%----- parameter for enface_avg image
file_path3 = 'D:\ntu\Lab\scanning image\CeYAG
image\2019.02.11_ex_vivo_FVB1_2(CeYAG)\enface_5_reslice_raw';
X_pixel = 648; %for FOV X-direction
Y_pixel = 488; %for FOV Y-direction
Z_pixel = 699;


---


%-----畫出三維地形圖與投影至二維
cd(file_path3);
F = dir(fullfile(file_path3,'*.raw'));
img_num = length(F);
if img_num > 0
    intensity = zeros(1,X_pixel);
    zi = zeros(Y_pixel,X_pixel);
    z = zeros(Y_pixel,X_pixel);
    yp3_final = round(yp3_XZf)-above;
    for j = 1:488
        data_name = F(j).name;
        fid = fopen(data_name,'r+');

        f = fread(fid,[X_pixel Z_pixel],'float32','ieee-be');
        f = f';
        yp3 = yp3_final(j,:);

        %-----拿出Bowman's layer intensity
```



```
for k = 1:X_pixel
    i = f(yp3(k),k);
    intensity(k) = i;
end
zi(j,:)=intensity;
z(j,:)=yp3;
fclose(fid);

end
x = 1:X_pixel;
y = 1:Y_pixel;
figure(1)
warp(x,y,z,zi);
colormap('gray');
caxis([min(min(zi)),max(max(zi))]);
axis([0 X_pixel 0 Y_pixel 0 Z_pixel]);
axis equal;
set(gca,'ydir','reverse');
set(gca,'zdir','reverse');

end
figure(above),
imshow(zi,'border','tight');
colormap('gray');
caxis([min(min(zi)),max(max(zi))]);
%-----show the crossection picture to check whether the curve is fitting or not
cd(file_path);
F = dir(fullfile(file_path,'*.raw'));
img_num = length(F);
if img_num > 0
    x_ex = 1:X_pixel;
    x_ex2 = 1:X_pixel*resize;
    intensity = zeros(1,X_pixel);
    zi = zeros(Y_pixel,X_pixel);
    z = zeros(Y_pixel,X_pixel);
    for j = 60:65
        data_name = F(j).name;%  

        fid = fopen(data_name,'r+');
```



```
f = fread(fid,[X_pixel Z_pixel],'float32','ieee-be'); % [x slice, z slice]
f = f';
f3 = imresize(f,resize); % resize 大小
Ht = bowman_top_limit*resize;
Hb = bowman_bottom_limit*resize;
Htr = round(Ht);
Hbr = round(Hb);
ff = f3(Htr:Hbr,:);
[max_f,index] = max(ff,[],1);

index_0 = index + Htr;
index_1 = index_0;

p = polyfit(x_ex2,index_0,fitting_order);

y1 = polyval(p,x_ex2);

m = index_0 - y1;
STD = std(m)*tolerance;
index_1((m > STD | m < -STD) == 1) = 0;
if index_1(1) == 0
    a = 1;
    while index_1(a) == 0
        a = a+1;
    end
    index_1(1) = index_1(a);
end
if index_1(X_pixel*resize) == 0
    a = X_pixel*resize;
    while index_1(a) == 0
        a = a-1;
    end
    index_1(X_pixel*resize) = index_1(a);
end
for a = 2 : X_pixel*resize-1
    if index_1(a) == 0
        left_pixel = a;
```



```
        while index_1(left_pixel) == 0
            left_pixel = left_pixel-1;
        end
        left_value = index_1(left_pixel);
        right_pixel = a;
        while index_1(right_pixel) == 0
            right_pixel = right_pixel+1;
        end
        right_value = index_1(right_pixel);
        % 相加除以當作中間
        index_1(a) = (left_value+right_value)/2;
    end
    p2 = polyfit(x_ex2,index_1,fitting_order);
    yp = polyval(p2,x_ex2);
```

```
m2 = index_1 - yp;
STD = std(m2)*tolerance;
index_1((m2 > STD | m2 < -STD) ==1) = 0;
if index_1(1) == 0
    a = 1;
    while index_1(a) == 0
        a = a+1;
    end
    index_1(1) = index_1(a);
end
if index_1(X_pixel*resize) == 0
    a = X_pixel*resize;
    while index_1(a) == 0
        a = a-1;
    end
    index_1(X_pixel*resize) = index_1(a);
end
for a = 2 : X_pixel*resize-1
    if index_1(a) == 0
        left_pixel = a;
        while index_1(left_pixel) == 0
```



```
    left_pixel = left_pixel-1;
end
left_value = index_1(left_pixel);
right_pixel = a;
while index_1(right_pixel) == 0
    right_pixel = right_pixel+1;
end
right_value = index_1(right_pixel);
index_1(a) = (left_value+right_value)/2;
end

% fitting bowman's curve
p3 = polyfit(x_ex2,index_1,fitting_order);
yp2 = polyval(p3,x_ex2);

m3 = index_1 - yp2;
STD = std(m3)*tolerance;
index_1((m3 > STD | m3 < -STD) ==1) = 0;

if index_1(1) == 0
    a = 1;
    while index_1(a) == 0
        a = a+1;
    end
    index_1(1) = index_1(a);
end
if index_1(X_pixel*resize) == 0
    a = X_pixel*resize;
    while index_1(a) == 0
        a = a-1;
    end
    index_1(X_pixel*resize) = index_1(a);
end
for a = 2 : X_pixel*resize-1
    if index_1(a) == 0
        left_pixel = a;
```

```

        while index_1(left_pixel) == 0
            left_pixel = left_pixel-1;
        end
        left_value = index_1(left_pixel);
        right_pixel = a;
        while index_1(right_pixel) == 0
            right_pixel = right_pixel+1;
        end
        right_value = index_1(right_pixel)
        index_1(a) = (left_value+right_value)/2;
    end
end
p4 = polyfit(x_ex2,index_1,fitting_order);
yp3 = polyval(p4,x_ex2);
yp4 = imresize(yp3,1/resize) / resize;
yp4 = round(yp4) - above;
figure(j)
subplot(2,1,1)
imshow(f3)
caxis([2,10]);

subplot(2,1,2)
imshow(f3)
hold on
plot(x_ex2,index_1,'.');
hold on
plot(x_ex2,yp3,'r');
caxis([2,10]);
end
end

```

---





## 附錄二：Straiko Modified Jones Tube

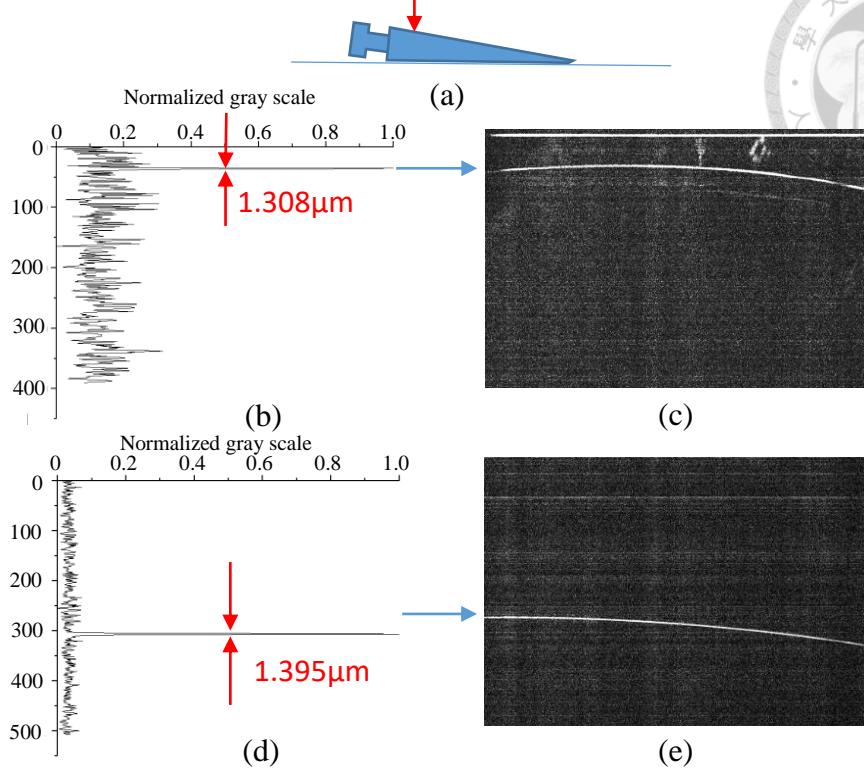
本研究所使用的 curve plane tracing and projection 程式除了可用在分離亞基底神經與前彈力層之外，亦可在所有因曲率關係導致無法觀察整體樣本上，而 Straiko Modified Jones Tube 是一個可以很好運用 curve plane tracing and projection 程式的樣本。

Straiko Modified Jones Tube 是一形狀類似錐狀的玻璃管，長度約為 32~37.6 mm，寬度約為 5.6~6 mm，常使用於後彈力層內皮角膜移植手術(DMEK)的保存與運輸後彈力層至內皮細胞層，如附圖 1.1，而因為形狀限制後彈力層至內皮細胞層在 Straiko Modified Jones Tube 中是捲曲的，如圖 5.1。如果此時只使用一般檢驗器具如裂隙燈，得到影像會因捲曲而只能檢查部分內皮細胞，而 OCT 系統掃描搭配程式即可得到完整的內皮細胞並在角膜移植手術前對內皮細胞密度做精確的檢驗。

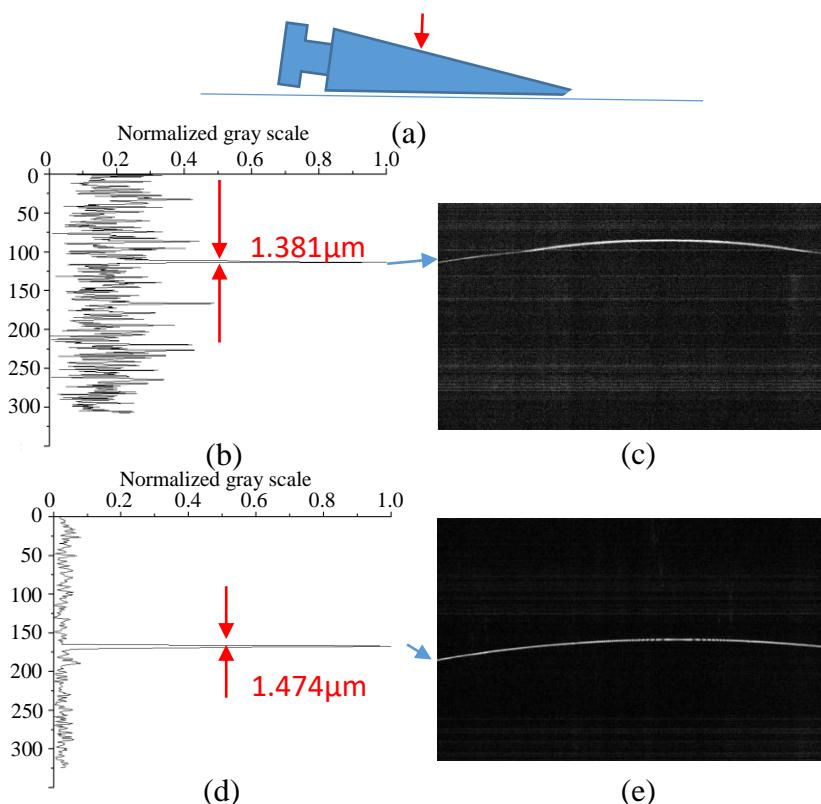


附圖 1.1 Straiko Modified Jones Tube 示意圖

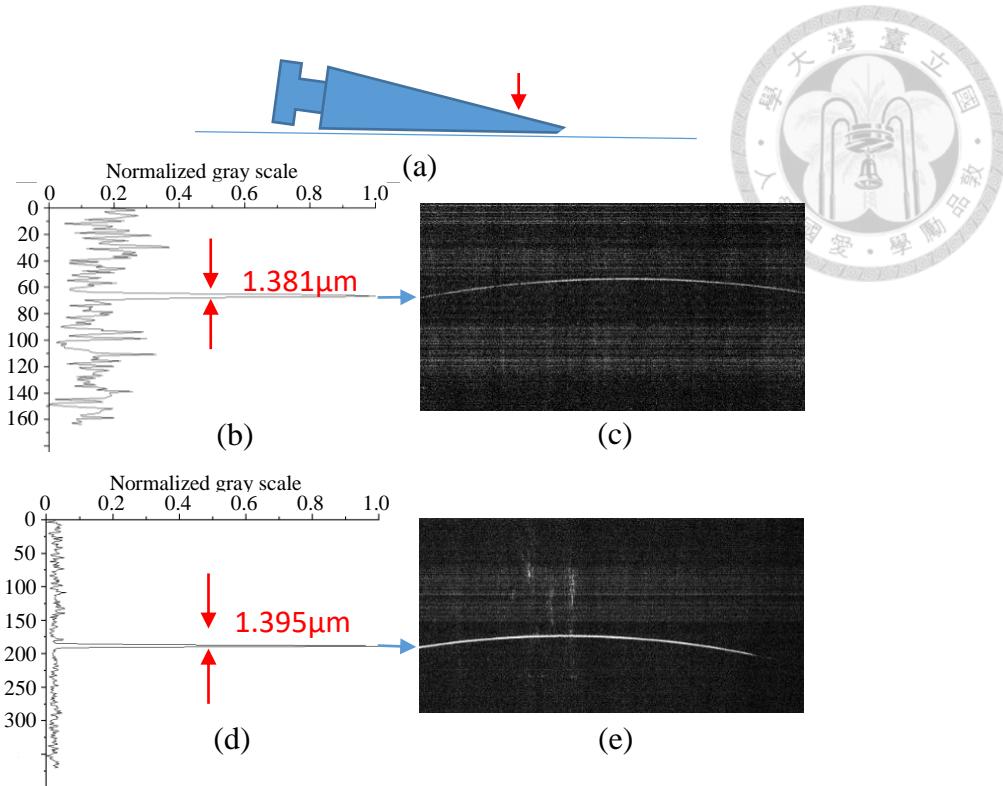
由於 Straiko Modified Jones Tube 在每個不同區域的曲率及管壁厚度都不太一樣，因此事先分別在 Straiko Modified Jones Tube 的前中後段掃描並觀察經過管壁後影像是否會改變，如附圖 1.2, 1.3 1.4 的(a)~(e)。下圖皆為由 Ti:sapphire FF-OCT 系統所掃描之影像，附圖 1.2 為前段的掃描結果，附圖 1.2 (a)為掃描大概位置，附圖 1.2 (b), (c)為外管壁的訊號強度分布圖以及縱平面影像，附圖 1.2 (d), (e)為內管壁的訊號強度分布圖(縱軸單位為 voxels, 0.278  $\mu\text{m}/\text{voxel}$ )以及縱平面影像，可以看到空氣與外管壁因折射率差而產生的干涉訊號之半高全寬差異不大。附圖 1.3 為中段的掃描結果，附圖 1.4 為後段的掃描結果，三個位置的內外管壁界面的訊號半高全寬皆差異不大。



附圖 1.2 (a) Straiko Modified Jones Tube 掃描位置，(b)外管壁之訊號強度分布圖，(c)外管壁縱平面影像，(d)內管壁之訊號強度分布圖，(e)內管壁縱平面影像。

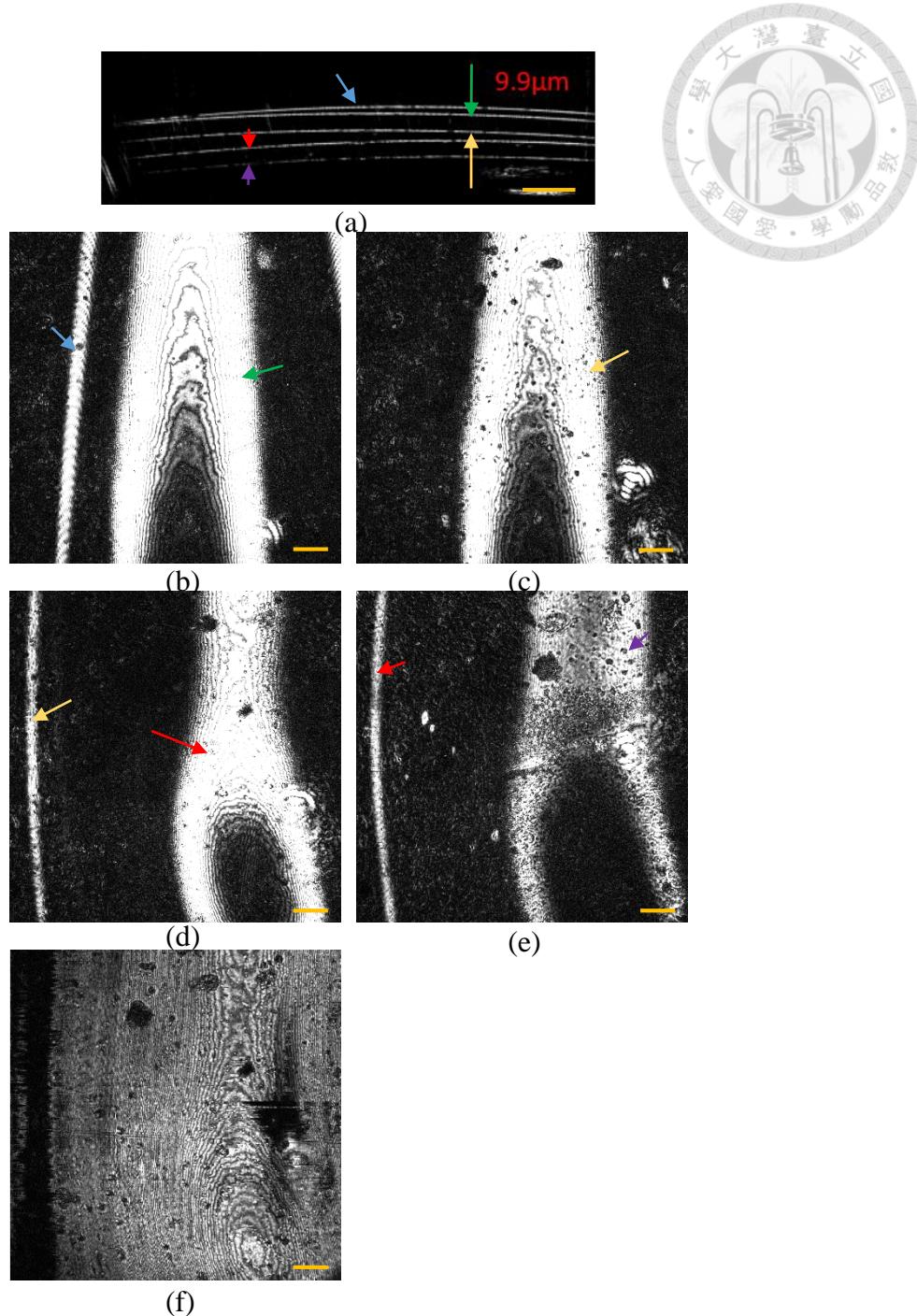


附圖 1.3 (a) Straiko Modified Jones Tube 掃描位置，(b)外管壁之訊號強度分布圖，(c)外管壁縱平面影像，(d)內管壁之訊號強度分布圖，(e)內管壁縱平面影像。



附圖 1.4 (a) Straiko Modified Jones Tube 掃描位置，(b)外管壁之訊號強度分布圖，(c)外管壁縱平面影像，(d)內管壁之訊號強度分布圖，(e)內管壁縱平面影像。

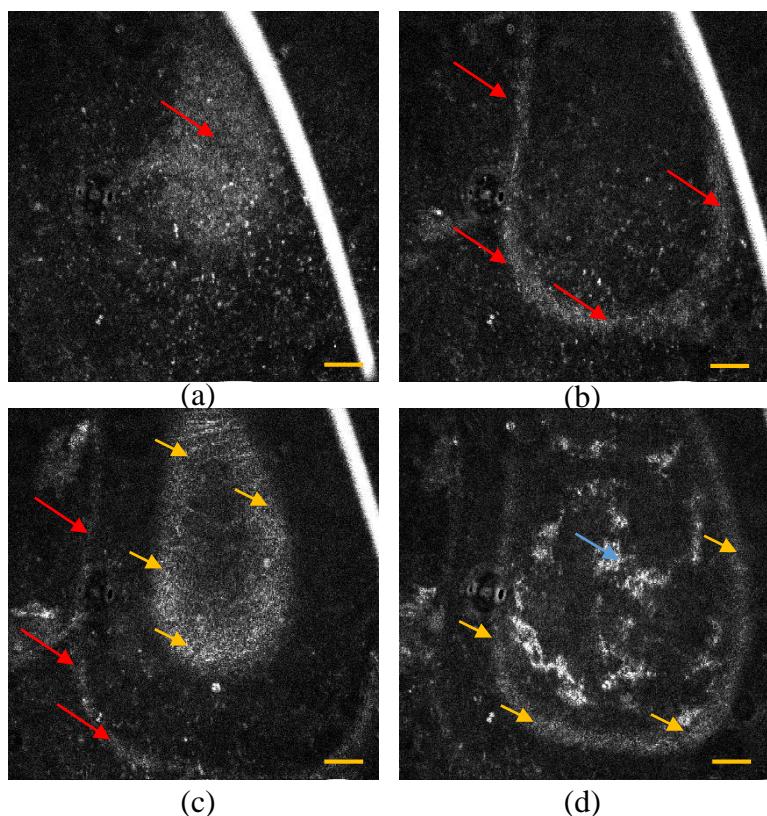
接著將塑膠片捲成桶狀以當作內皮細胞層的替代物進行測試，塑膠片的厚度經電子測微器測量為大約  $10 \mu\text{m}$ ，塑膠片在 Straiko Modified Jones Tube 中捲成兩層，其掃描結果如附圖 1.5。附圖 1.5 (a)為塑膠片在 Straiko Modified Jones Tube 中的縱平面影像，藍色箭頭為 Straiko Modified Jones Tube 的內管壁，綠色箭頭與黃色箭頭所指為第一層塑膠片的上界面和下界面，紅色箭頭與紫色箭頭所指為第二層塑膠片的上界面和下界面，可以看到這兩層的厚度(即綠色箭頭至黃色箭頭和紅色箭頭至紫色箭頭的距離)經測量皆為  $9.9 \mu\text{m}$  與電子測為器量測的厚度相同，因此可確認這兩層即為塑膠片。附圖 1.5 (b)~(e)為塑膠片不同界面的橫平面影像，橫平面影像中的箭頭顏色對應至縱平面上的箭頭顏色。附圖 1.5 (f)為附圖 1.5 (d)經過 curve plane tracing and projection 程式校正過後的影像。



附圖 1.5 (a)塑膠片在 Straiko Modified Jones Tube 中縱平面影像，(b)第一層塑膠片上界面  
(c)第一層塑膠片下界面(d)第二層塑膠片上界面，(e)第二層塑膠片下界面橫平面影像，(f)  
經過 curve plane tracing and projection 程式校正過後的影像。(比例尺: 50  $\mu\text{m}$ )



最後為兔子角膜作為樣品放入 Straiko Modified Jones Tube 中的掃描影像，為了與 DMEK 時所使用的樣本狀況類似，我們將兔子角膜捲成筒狀放入 Straiko Modified Jones Tube 中並使得其內皮細胞層向外對著內管壁。附圖 1.6 為兔子角膜各層橫平面影像。附圖 1.6 (a), (b)紅色箭頭處為內皮細胞層但並沒有觀察到明顯的內皮細胞六邊形結構，這是因為由於此次只是先行觀察掃描狀況，並沒有將兔子角膜的後彈力層至內皮細胞層單獨剝離，此樣本為完整的角膜而這對於 Straiko Modified Jones Tube 來說尺寸過大，因此在塞入 Straiko Modified Jones Tube 中時非常困難並可能在過程中將內皮細胞刮掉，這是認為沒有看到內皮細胞結構的原因。附圖 1.6 (c)的黃色箭頭處為後彈力層，隨著掃描深度增加便可看到基質層，如附圖 1.6 (d)之藍色箭頭處。到此為利用 Ti:sapphire FF-OCT 系統掃描 Straiko Modified Jones Tube 中樣本的測試，在未來便可將最後一步，單獨剝離的後彈力層至內皮細胞層放進管中進行掃描與程式校正以模擬得到 DMEK 時會看到的內皮細胞影像。



附圖 1.6 兔子角膜在 Straiko Modified Jones Tube 中橫平面影像(a), (b)紅色箭頭處為內皮細胞層(c)黃色箭頭處為後彈力層(d)藍色箭頭處為進入基質層。(比例尺: 50 μm)