

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與自編程式
進行影像判讀輔助及樣本動態分析

Image Interpretation Assistance and Sample Dynamic
Analysis Using Full-Field Optical Coherence Tomography
and Customized Program

劉柏辰

Bo-Chen Liu

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, M.D., Ph.D.

中華民國 112 年 8 月

August 2023



致謝



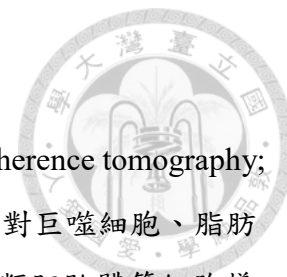
首先要感謝指導教授黃升龍老師，提供豐富的研究資源以及舒適的實驗室空間，讓我得以安心地進行碩士班的研究。在每周的進度報告中，老師總是對我在實驗中遇到的難題給予非常切中要點的建議，以循循善誘的方式引導我從重重迷霧中摸索出前進的道路，不僅使研究進度順利推進，更訓練了我獨立思考和解決問題的能力，深感受益良多。

接著要特別感謝共同指導教授陳偉勵醫師，在百忙之中抽空指導並分享對細胞樣本的寶貴知識，深化了我的研究。每次討論中，陳醫師總是充滿活力且樂於鼓勵，為我的研究注入了更多的希望與動力。另外，我也要感謝上知、許寧、美雲和鄭婷學長姐，他們悉心培養並協助處理各種實驗樣本，使我得以研究分析高品質的樣本。

感謝雅婷姐幫忙處理實驗室大大小小的事情。感謝千珍姐幫忙維護和修改 LabVIEW 程式。感謝裕展、騰毅學長，在 FF-OCT 的光路架設上給予非常多協助。感謝柏彥、淑雯學長姐在新生訓練時的細心指導。感謝家沛、安荷學長姐，教導我 FF-OCT 系統的相關知識和影像處理的技巧，並與我討論如何撰寫分析程式。感謝惟茜、修羽、劭允、雅鈞、群玲、豫萱、以佳、智皓，與大家一起聊天、討論並相互督促，為我的實驗室生活增添了許多色彩。

最後，感謝我的家人，爸、媽、芷瑜、芷瑄、睦淳，有你們一直以來的支持和陪伴，我才能順利完成這個人生中的重要里程碑，謝謝你們。

中文摘要



本研究利用全域式光學同調斷層掃描術(Full-field optical coherence tomography; FF-OCT)，配合 Ce^{3+} :YAG 晶體光纖之自發輻射作為系統光源，對巨噬細胞、脂肪間質幹細胞生成之神經球細胞以及誘導型多功能幹細胞生成之類胚胎體等細胞樣本進行掃描和影像建構。透過此系統，我們能夠獲得橫向解析度為 $0.8 \mu m$ ，縱向解析度為 $0.97 \mu m$ 的橫平面、縱平面以及三維立體影像。

以 Ce^{3+} :YAG FF-OCT 為基礎，本研究進一步開發動態光學同調斷層掃描術(Dynamic full-field optical coherence tomography; D-FF-OCT)。在 D-FF-OCT 的掃描過程中，我們將影像擷取平面停留固定於樣本任意深度，並記錄該固定深度下背向散射光訊號隨時間之變化。藉由 D-FF-OCT，我們能夠獲得以長度-長度-時間所組成的三維影像，其空間解析度與 FF-OCT 相同，而時間解析度為 $7.7 ms$ 。

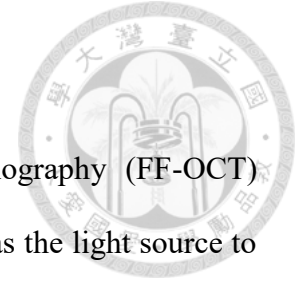
此外，我們自行撰寫了分析程式，將 D-FF-OCT 所採集之時域資訊以像素為單位，轉換為頻譜圖，並進行特徵頻率的分析。為了降低影像中的雜訊干擾以提升整體訊噪比，我們在程式中採用縱向一維高斯及橫向二維高斯之卷積平均法對訊號進行預處理。在橫向進行 $5*5$ 個像素的高斯卷積平均後，系統之橫向解析度變為 $1.82 \mu m$ ，而在縱向進行 11 點高斯卷積平均後，時間解析度則為 $9.35 ms$ 。

在巨噬細胞的實驗中，透過上色動態影像可有效增強細胞核的對比度，未來可應用於影像判讀的輔助工具。而在神經球細胞和類胚胎體的實驗中，利用上色動態影像，我們能夠針對細胞的動態特性進行分析，並從頻譜圖中區分環境雜訊與動態訊號之差異。

在上色動態影像中，我們設定了低頻閾值與中頻閾值，將所有頻譜圖分為低頻區段、中頻區段及高頻區段。透過閾值的設定，確保三區段之曲線下總面積相等。其中，巨噬細胞的低頻閾值為 $4.94 \pm 0.3 Hz$ ，中頻閾值為 $12.86 \pm 0.53 Hz$ ；神經球細胞的低頻閾值為 $6.67 \pm 0.43 Hz$ ，中頻閾值為 $14.34 \pm 0.24 Hz$ ；類胚胎體的低頻閾值為 $5.94 \pm 0.46 Hz$ ，中頻閾值為 $14.39 \pm 0.37 Hz$ 。透過三種樣本的閾值比較，我們可以推論出相較於巨噬細胞，神經球細胞與類胚胎體具有更多高頻峰值訊號。這些由 D-FF-OCT 所測得之具空間解析度的動態資訊，未來有機會與細胞生理指標進行比對，以更進一步地揭開細胞的生理運作機制。

關鍵字：全域式光學同調斷層掃描、動態特性分析、影像判讀輔助、上色動態影像

Abstract



In this study, we utilized full-field optical coherence tomography (FF-OCT) combined with spontaneous emission from Ce^{3+} :YAG crystal fiber as the light source to perform scanning and image reconstruction of macrophages, ADMSC-derived neurospheres, and iPSC-derived embryoid bodies. The system achieved high-resolution en face, cross-sectional, and three-dimensional volumetric images with lateral resolution of $0.8 \mu\text{m}$ and axial resolution of $0.97 \mu\text{m}$.

Based on Ce^{3+} :YAG FF-OCT, we developed dynamic full-field optical coherence tomography (D-FF-OCT). D-FF-OCT involved fixing the image acquisition plane at a specific depth within the sample and capturing the temporal variation of backscattered light signals. With D-FF-OCT, we obtained three-dimensional images composed of length-length-time dimensions, maintaining the spatial resolution of FF-OCT and achieving a temporal resolution of 7.7 ms .

To analyze the D-FF-OCT data, we developed a analysis program that transformed the acquired temporal information into spectrograms on a per-pixel basis. The program included signal pre-processing techniques such as axial one-dimensional Gaussian convolution average and lateral two-dimensional Gaussian convolution average to reduce noise and enhance the signal-to-noise ratio. The temporal resolution resulted in 9.35 ms after applying an 11-point Gaussian convolution average, while the lateral resolution became $1.82 \mu\text{m}$ through a 5×5 -pixel Gaussian convolution average.

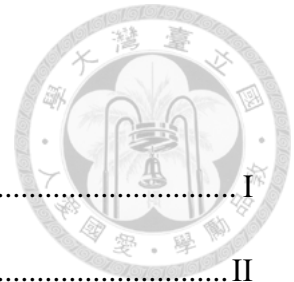
In the experiments with macrophages, color-coded D-FF-OCT imaging effectively enhanced the contrast of the cell nucleus, providing a potential auxiliary tool for image interpretation. In the experiments with neurospheres and embryoid bodies, color-coded D-FF-OCT imaging allows us to analyze the dynamic characteristics of the cells and

differentiate between environmental noise and dynamic signals in the spectrogram.

In the color-coded dynamic imaging, we set low-frequency and mid-frequency thresholds to divide all spectrograms into low-frequency, mid-frequency, and high-frequency segments. These thresholds were adjusted to ensure equal total areas under the curve for each segment. Specifically, for macrophages, the low-frequency threshold is 4.94 ± 0.3 Hz, and the mid-frequency threshold is 12.86 ± 0.53 Hz. For neurospheres, the low-frequency threshold is 6.67 ± 0.43 Hz, and the mid-frequency threshold is 14.34 ± 0.24 Hz. For embryoid bodies, the low-frequency threshold is 5.94 ± 0.46 Hz, and the mid-frequency threshold is 14.39 ± 0.37 Hz. By comparing the thresholds among the three samples, we can infer that neurospheres and embryoid bodies exhibit more high-frequency peak signals compared to macrophages. The spatially resolved dynamic information obtained by D-FF-OCT has the potential to be compared with cellular physiological markers in the future, allowing for a deeper understanding of the cellular physiological mechanisms.

Keywords: full-field optical coherence tomography, dynamic characteristic analysis, image interpretation aid, color-coded D-FF-OCT image

目錄



致謝	I
中文摘要	II
Abstract	III
目錄	V
圖目錄	VII
表目錄	XVI
Chapter 1 緒論	1
Chapter 2 Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描術介紹	2
2.1 光學同調斷層掃描術(OCT)原理	2
2.2 Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描系統	10
2.2.1 系統簡介	10
2.2.2 影像處理	20
2.2.3 系統橫向解析度及縱向解析度	23
2.2.4 系統影像訊噪比	26
Chapter 3 動態全域式光學同調斷層掃描術介紹及分析程式介紹	31
3.1 動態全域式光學同調斷層掃描術(D-FF-OCT)	31
3.2 D-FF-OCT 分析上色程式之介紹	38
Chapter 4 <i>In vitro</i> 巨噬細胞影像量測與分析結果	52
4.1 樣本製備方法	52
4.2 巨噬細胞之 FF-OCT 影像量測結果	56
4.3 以巨噬細胞之動態影像強化細胞核之對比度	63

Chapter 5	脂肪間質幹細胞生成之神經球細胞團塊與誘導型多功能幹細胞生成之類胚胎體影像量測與分析結果.....	68
5.1	樣本製備方法與量測方法	68
5.1.1	間質幹細胞生成之神經球細胞培養過程.....	68
5.1.2	誘導型多功能幹細胞生成之類胚胎體培養過程.....	72
5.1.3	樣本量測方法.....	73
5.2	FF-OCT 影像量測結果	75
5.2.1	間質幹細胞生成之神經球細胞 FF-OCT 影像.....	75
5.2.2	誘導型多功能幹細胞生成之類胚胎體 FF-OCT 影像.....	79
5.2.3	樣本掃描深度受限之原因探討.....	83
5.3	以 D-FF-OCT 量測細胞動態特性之結果	87
5.3.1	間質幹細胞生成之神經球細胞 D-FF-OCT 影像結果與分析.....	87
5.3.2	誘導型多功能幹細胞生成之類胚胎體 D-FF-OCT 影像結果與分析.....	95
Chapter 6	結論與未來展望.....	101
6.1	結論	101
6.2	未來展望	104
Reference	105

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 50/50 分光鏡到樣本端之長度。2
- 圖 2.2 使用寬頻光源之麥克森干涉儀。 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_{S1} 為 50/50 分光鏡到樣本第一層界面之長度； Z_{S2} 為 50/50 分光鏡到樣本第二層界面之長度。5
- 圖 2.3 縱向掃描單一反射面干涉訊號。7
- 圖 2.4 OCT 系統縱向上的點擴散函數示意圖。8
- 圖 2.5 最簡易之全域式 OCT 系統架構圖。9
- 圖 2.6 Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描系統架構圖。445-nm LD 是波長為 445 nm 之雷射二極體；Dichroic mirror 為分色鏡；OBL (Objective lens) 為物鏡； Ce^{3+} :YAG crystal fiber 為摻鈰鈮鋁石榴石晶體光纖；MMF (Multi-mode fiber) 是多模光纖；PBS (Polarization beam splitter) 為極化分光鏡；QWP (Quarter-wave plate) 為四分之一波片；PZT 為壓電致動器；Mirau device 是自製干涉儀之組件；CCD (Charge-coupled device) 為感光耦合元件 (IMPERX ICL-B0620)。10
- 圖 2.7 Ce^{3+} :YAG FF-OCT 光源系統架構圖。11
- 圖 2.8 LHPG 生長法之系統架構[11]。12
- 圖 2.9 LHPG 法之晶體生長示意圖[11]。13

圖 2.10	(a)單纖衣包覆法示意圖[12]；(b)單纖衣包覆法實際包覆過程影像。...	14
圖 2.11	Ce ³⁺ :YAG 晶體之吸收頻譜[13]。.....	15
圖 2.12	445-nm 藍光 LD 之 P-I 曲線。.....	15
圖 2.13	Ce ³⁺ :YAG 晶纖之輸出光頻譜[11]。.....	16
圖 2.14	Ce ³⁺ :YAG 晶纖之輸出功率。.....	16
圖 2.15	可見光之 Mirrau-based FF-OCT 干涉儀系統。.....	17
圖 2.16	光極化方向示意圖。藍色箭頭為寬頻黃綠光之行進方向；紅色箭頭圖式為黃綠光極化方向經元件後之轉變。.....	18
圖 2.17	Mirrau 架構圖及其干涉路徑示意圖。.....	19
圖 2.18	干涉載波(Carrier)訊號與包絡(Envelope)訊號示意圖。.....	20
圖 2.19	四點運算法示意圖[14]。.....	21
圖 2.20	瑞利準則示意圖[15]。.....	23
圖 2.21	橫向解析度量測結果(a)解析度測試片量測影像 (b)橫向訊號強度分布。.....	24
圖 2.22	系統縱向解析度量測結果。.....	25
圖 2.23	沿 XY 法向量做移動平均處理及橫平面移動平均處理示意圖。.....	27
圖 2.24	沿 XZ 法向量做移動平均處理及縱平面移動平均處理示意圖。.....	27
圖 2.25	不同平均張數之縱平面影像比較圖，(a) 1 張；(b) 3 張；(c) 9 張。.....	29
圖 3.1	FF-OCT 模式中，PZT 推進 Mirrau device 過程示意圖，圖中紅色虛線為系統之影像擷取平面。(a) PZT 開始推動 Mirrau objective device；(b) PZT 推動過程；(c) PZT 推動影像擷取平面至 404 μm 行程極限。.....	32
圖 3.2	D-FF-OCT 模式中，將 PZT 固定於任意指定深度，搭載於上的 Mirrau 物	

	鏡組(如黃色框線處)也隨之固定，使得影像擷取平面也固定在相對應的樣本深度。.....	33
圖 3.3	FF-OCT 模式與 D-FF-OCT 模式分別得到之三維影像示意圖。.....	33
圖 3.4	由 CCD sensor 的單一 pixel 所記錄。圖中縱軸為樣本背向散射光之強度，橫軸為抓取影像的張數，可經由張數和 CCD 設定之 frame rate 換算出掃描此原始資料所經之時間。.....	34
圖 3.5	系統接收樣本光訊號之相機(CCD sensor)像素(Pixel)規格，CCD sensor 由 648 pixels*488 pixels 組成，一個 pixel 之面積大小為 0.45 μm *0.45 μm ，可由此換算出系統視域(Field of view ; FOV)大小為 291.6 μm *219.6 μm 。.....	36
圖 3.6	D-FF-OCT 模式下得到與時相關之 X-Y 平面影像。.....	37
圖 3.7	D-FF-OCT 之時域資訊圖經過快速傅立葉轉換後，轉為頻域資訊圖。.....	38
圖 3.8	從 D-F-OCT 原始數據中擷取感興趣之時間區間(TOI)。.....	39
圖 3.9	(a)以矩陣形式呈現 X-Y 平面影像，其矩陣大小為 $m*n$ ；(b)矩陣形式之卷積核，其矩陣大小為 $a*b$ 。.....	40
圖 3.10	MATLAB 中不同的二維卷積模式。(a) Valid 模式；(b) Same 模式；(c) Full 模式。.....	41
圖 3.11	二維影像矩陣補零示意圖。.....	41
圖 3.12	卷積核矩陣翻轉過程。.....	42
圖 3.13	(a) 根據卷積核大小選取小範圍之二維影像矩陣 c ；(b)影像二維卷積平均過程示意圖， c 為選取出來的小範圍影像矩陣(藍色和黃色方框)； v 為	

	卷積核(灰色方框)； u' 則是二維卷積平均後的結果(綠色方框) [20]。 ..42
圖 3.14	5*5 個像素平均後之等效橫向解析度計算示意圖。43
圖 3.15	縱向時間上卷積平均示意圖。44
圖 3.16	以類方波形式之權重進行移動加權平均，導致於頻譜圖中後段出現如 Sinc 函數之強度遞減波包(紅色方框)。45
圖 3.17	在卷積平均中改為加入高斯窗函數做加權平均後，解決圖 3.16 中後段之波包假訊號。45
圖 3.18	縱向高斯窗函數卷積平均示意圖。以 11 點平均為例，上圖左邊以紅框標示之未平均 X-Y 平面為目標平面(D_i)，綠框標示平面為進行 11 點平均時欲使用之平面。經過高斯窗函數(W_i)加權卷積平均後，獲得以藍框標示的平均後新 X-Y 平面(D_i')。46
圖 3.19	11 張平面進行高斯窗函數平均後之等效時間解析度計算示意圖。47
圖 3.20	頻率取樣上限示意圖。以上圖為例，圖中可以看出在 40 Hz 後幾乎沒有峰值存在，因此將 f_{max} 設在 40 Hz，超過 f_{max} 之頻率皆不列入程式中計算，減少程式之運算量。48
圖 3.21	使用 F1 與 F2 將頻譜圖平均劃分為三區段。49
圖 3.22	像素依面積佔比上色示意圖。50
圖 3.23	飽和度與明度數值重新縮放示意圖。51
圖 4.1	巨噬細胞之培養流程圖。(PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate ; LPS: Lipopolysaccharides from Escherichia coli O55:B5)。52
圖 4.2	FF-OCT 之縱平面影像，影像下方的帶狀構造為乘載細胞之熔融石英片 (Fused silica, GP3)。(a) U937 單核細胞；(b)巨噬細胞，黃色箭頭指出巨

	噬細胞貼附於熔融石英片之處。圖中比例尺皆為 20 μm 。.....	52
圖 4.3	FF-OCT 之橫平面影像。(a)U937 單核細胞 (b)巨噬細胞。圖中比例尺皆為 20 μm 。.....	53
圖 4.4	巨噬細胞顯微鏡影像 (a)未活化之巨噬細胞；(b)活化之巨噬細胞。圖中比例尺為 100 μm 。.....	53
圖 4.5	巨噬細胞培養於熔融石英片之示意圖。.....	54
圖 4.6	將附有巨噬細胞之熔融石英(紅框處)取出，黏貼到鑽孔玻片下方。....	54
圖 4.7	培養基添加量示意圖。.....	55
圖 4.8	巨噬細胞 FF-OCT 影像圖 (a)縱平面切片影像圖；(b)橫平面各深度切片圖。圖中比例尺皆為 20 μm 。.....	57
圖 4.9	巨噬細胞 FF-OCT 影像圖 (a)不同深度之縱平面影像；(b)深度 4 μm ~10 μm 之橫平面影像。藍色、紅色和黃色箭頭分別標示出相對應巨噬細胞之細胞核中，白點出現的位置。圖中比例尺皆為 20 μm 。.....	58
圖 4.10	巨噬細胞之絲狀構造 FF-OCT 影像圖 (a)不同深度之縱平面影像，最上方圖為 YZ 方向，影像大小為 219.6 μm *48.6 μm ，中下兩張圖則是 XZ 方向，影像大小為 291.6 μm *48.6 μm ；(b)橫平面各深度切片圖，圖(b)中藍、黃、紅三種顏色箭頭分別對應到圖(a)中相同顏色箭頭標示之絲狀構造。圖中比例尺皆為 20 μm 。.....	60
圖 4.11	絲狀構造橫平面影像圖，藍色箭頭標示出絲狀構造開始出現的位置。圖中比例尺為 20 μm 。.....	61
圖 4.12	含絲狀構造之巨噬細胞橫平面大圖拼接，圖中比例尺為 20 μm 。.....	62
圖 4.13	(a)巨噬細胞 FF-OCT 影像；(b)巨噬細胞黑白動態影像。圖中比例尺為	

	20 μm 。	63
圖 4.14	巨噬細胞上色動態影像，右側頻率色彩尺為顏色對應之頻率表現，巨噬細胞之低頻閾值為 4.89 Hz，中頻閾值為 12.7 Hz。圖中比例尺為 20 μm 。	64
圖 4.15	(a)以白色方框標示上色動態影像中不同顏色表現之像素；(b)描繪(a)中標示像素的頻譜圖，由上而下分別為位在細胞膜之像素、位在細胞核之像素以及表現高頻之像素。	65
圖 4.16	相同深度之巨噬細胞上色動態影像與 FF-OCT 影像比較圖，橘色箭頭指出高頻訊號表現之細胞。圖中比例尺為 20 μm 。	66
圖 4.17	(a)上色動態影像與(b)黑白動態影像比較圖。圖中比例尺為 20 μm 。	67
圖 5.1	神經球細胞相關培養流程簡圖。(NFM: Neurosphere formation medium ; FBS: Fetal bovine serum)。	68
圖 5.2	神經球細胞之顯微鏡影像，圖中比例尺為 100 μm 。(影像由陳偉勵醫師研究團隊提供)。	69
圖 5.3	神經幹細胞顯微鏡影像，圖中比例尺為 100 μm 。(影像由陳偉勵醫師研究團隊提供)。	70
圖 5.4	神經幹細胞 FF-OCT 影像圖。(a)縱平面影像圖(含 1.35 μm 厚度之資訊)；(b)橫平面影像圖(含 1 μm 厚度之資訊)，圖中比例尺為 20 μm 。	71
圖 5.5	2*2 個 FOV 之神經幹細胞 FF-OCT 橫平面影像圖(含 1 μm 厚度之資訊)，圖中比例尺為 20 μm 。	72
圖 5.6	類胚胎體相關培養流程簡圖。(RDM : Retinal differentiation medium ; BDNF : Brain-derived neurotrophic factor ; RPE : Retinal pigment epithelium)。	

	72
圖 5.7	iPSC 類胚胎體之顯微鏡影像，圖中比例尺為 100 μm 。(由陳偉勵醫師研究團隊提供)。	73
圖 5.8	將懸浮型細胞取出並放至 GP3 玻片容器之示意圖。	74
圖 5.9	連續兩次掃描 iPSC-derived EB 之 FF-OCT 橫平面影像 (a)開始掃描時間點：16:45；(b)開始掃描時間點：17:12。	74
圖 5.10	神經球細胞之 FF-OCT 影像圖，圖中比例尺皆為 20 μm 。(a)縱平面影像；(b)橫平面影像。黃色箭頭標示出神經球中突然出現的強反射橢圓構造，圖(a)則呈現此構造開始出現及消失之深度的縱平面影像。	76
圖 5.11	橢圓構造 FF-OCT 影像切片圖，圖中比例尺皆為 20 μm 。	77
圖 5.12	神經球細胞落於 GP3 上之示意圖。	78
圖 5.13	(a)神經球細胞橫平面影像，下方為樣本三維示意圖；(b)神經球細胞縱平面影像，圖中比例尺皆為 20 μm 。	78
圖 5.14	類胚胎體之 FF-OCT 影像，比例尺為 20 μm 。(a)縱平面影像；(b)橫平面影像。黃色箭頭指出類胚胎體中的特殊構造於縱平面影像和橫平面影像的位置。	80
圖 5.15	類胚胎體 H&E 染色影像，比例尺為 50 μm 。(由陳偉勵醫師研究團隊提供)。	81
圖 5.16	類胚胎體細胞凋亡區域之 FF-OCT 影像，圖中比例尺為 20 μm 。(a)縱平面影像，呈現了空腔構造出現和消失的深度；(b)橫平面影像。圖中紅色圓圈為細胞凋亡區域。	82
圖 5.17	神經球細胞團塊之 FF-OCT 橫平面影像，掃描深度約 70 μm 。圖中比例	

	尺為 20 μm 。.....	83
圖 5.18	(a)神經球細胞團塊之 FF-OCT 縱平面影像，圖中比例尺為 20 μm ，圖中黃線標示出觀察標的之位置；(b)神經球細胞隨深度逐漸衰減之灰階值強度圖。.....	84
圖 5.19	(a)皮膚之 FF-OCT 縱平面影像[31]，圖中比例尺為 20 μm ；(b)皮膚樣本中，光強度隨掃描深度衰減圖。.....	85
圖 5.20	光束經過球狀透鏡後之示意圖。.....	86
圖 5.21	(a)神經球細胞團塊 FF-OCT 影像；(b)以像素為單位，在時間軸上進行標準差運算後，得到神經球細胞團塊之黑白動態影像，其亮度代表標準差之大小。圖中比例尺為 20 μm 。.....	87
圖 5.22	神經球細胞團塊之上色動態影像，右側頻率色彩尺為顏色對應之頻率表現。圖中比例尺為 20 μm 。.....	88
圖 5.23	抓取不同頻率顏色表現之像素示意圖，比例尺為 20 μm 。.....	89
圖 5.24	神經球細胞單一像素之完整頻譜圖。.....	90
圖 5.25	以不同顏色之像素所描繪的頻譜圖。.....	91
圖 5.26	受環境雜訊影響的 D-FF-OCT 資料所描繪的頻譜圖，黑色圓圈標示出雜訊頻率峰值。.....	92
圖 5.27	透過移動 MAXIMUM 的位置(橘色實線)，過濾圖 5.26 中的高頻雜訊峰值干擾。橘色斜線區域為移動 MAXIMUM 後，新增的不加入程式分析之區域。.....	93
圖 5.28	移動 MAXIMUM 過濾高頻雜訊峰值前後的上色動態影像，調整後影像較能看出高頻訊號區域。比例尺為 20 μm 。.....	94

圖 5.29	小鼠之視網膜類器官培養過程[29]，圖 A 比例尺為 200 μm ，圖 B 比例尺為 50 μm 。.....	95
圖 5.30	培養經七天之類胚胎體 (a) FF-OCT 橫平面影像；(b)黑白動態影像。圖中比例尺為 20 μm 。.....	96
圖 5.31	類胚胎體之上色動態影像，圖中比例尺為 20 μm 。從中挑選三個不同頻率表現之像素，並繪製其頻譜圖。右側為對應之頻率色彩尺。.....	97
圖 5.32	描繪圖 5.31 中白色方框標示之像素的頻譜圖。.....	98
圖 5.33	同個類胚胎體隨時間經過之上色動態影像比較。第 0 分鐘時，低頻閾值為 5.08 Hz，中頻閾值為 13.71 Hz。第 30 分鐘時和第 60 分鐘時，低頻閾值皆為 5.97 Hz，中頻閾值皆為 14.6 Hz。圖中比例尺為 20 μm 。....	99

表目錄



表 2.1	Mirau-based FF-OCT 之 PZT 掃描速度與週期內影像張數對照表	22
表 2.2	平均張數與等效疊加厚度關係表	28
表 2.3	縱向上不同平均張數與訊噪比關係表	30
表 5.1	巨噬細胞上色動態影像之低頻閾值與中頻閾值。	100
表 5.2	神經球細胞上色動態影像之低頻閾值與中頻閾值。	100
表 5.3	類胚胎體上色動態影像之低頻閾值與中頻閾值。	100

Chapter 1 緒論



近年來，光學同調斷層掃描術(Optical coherence tomography；OCT)以其無須標定(Label-free)、非侵入性(Non-invasive)與微米級高空間解析度等優勢，在生物醫學領域中廣泛應用，成為生醫影像技術的重要工具。OCT 基於光學干涉原理[1]，主要分為時域式(Time-domain) OCT 與頻域式(Frequency-domain) OCT 兩種類型。在本研究中，我們採用了全域式 OCT (Full-field OCT；FF-OCT)系統，屬於時域式 OCT 的一種，與傳統 OCT 不同之處在於，FF-OCT 以二維感光耦合元件(CCD sensor)接收干涉訊號，以提升系統的掃描速率。

FF-OCT 系統在進行深度掃描時，透過接收到的背向散射訊號建立了樣本的三維立體影像。然而，儘管 FF-OCT 系統具有微米級解析度，能夠清晰呈現大部分生物樣本的細節，但其主要展現的是靜態結構，如細胞和神經束等。若欲觀察樣本的動態變化過程，我們只能透過長時間且多次的掃描，以比較不同時間點的樣本形貌差異。在此情境下，我們無法直接觀察和追蹤樣本的動態變化，因此，為了進一步探索和研究動態特性，我們以 FF-OCT 系統為基礎，開發全域式動態光學同調斷層掃描模式(Dynamic FF-OCT；D-FF-OCT)，旨在實現對細胞動態變化的即時觀察和評估[2], [3]。

在本研究中，我們運用 FF-OCT 掃描模式和 D-FF-OCT 掃描模式量測體外培養(In vitro)細胞樣本，包含巨噬細胞(Macrophage) [4]、脂肪間質幹細胞生成之神經球細胞(ADMSC-derived neurosphere) [5]以及誘導型多功能幹細胞生成之類胚胎體(iPSC-derived embryoid body) [6]。除了研究高解析度的 FF-OCT 三維立體影像外，我們還利用 D-FF-OCT 模式獲取樣本動態訊號的時域數據。隨後，藉由自行撰寫的 D-FF-OCT 分析程式，對動態訊號進行數據處理和頻率分析，將其分為高頻、中頻、低頻區域，並以對應不同頻率的顏色通道進行分析上色[7]，得到可用來判斷樣本頻率分布的上色動態影像(Color-coded D-FF-OCT image)。此外，藉由 D-FF-OCT 分析程式的運算，我們能夠區分出特徵頻率是來自樣本動態訊號還是環境雜訊[8]。

本研究利用 FF-OCT 掃描模式對樣本進行細胞級解析度的三維影像建構，並進一步應用 D-FF-OCT 掃描模式，實現細胞動態特徵頻率的可視化和分析，透過該研究結果，將有助於我們更了解細胞或組織的動態行為。未來將著重於 D-FF-OCT 掃描模式的優化，以及數據分析演算法的開發，以獲取更精確的成像與分析結果。

Chapter 2 Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描術

介紹

本章節將會說明光學同調斷層掃描術(Optical coherence tomography; OCT)之基本原理。本章之 2.1 節將以麥克森式干涉儀(Michelson interferometer)的架構進行 OCT 干涉理論之推導。接著於 2.2 節推廣至 Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描術(Full-field optical coherence tomography; FF-OCT)系統架構說明。

2.1 光學同調斷層掃描術(OCT)原理

OCT 是一種採用低同調性光源的干涉技術，在本小節中，會先以高同調性光源進行時域式 OCT 理論上的推導，接著轉換至使用低同調性光源理論推導，並說明全域式光學同調斷層掃描系統。圖 2.1 為使用高同調單頻光源、樣本端、可移動式參考端和光偵測器所組成的麥克森干涉儀(Michelson interferometer)架構圖。

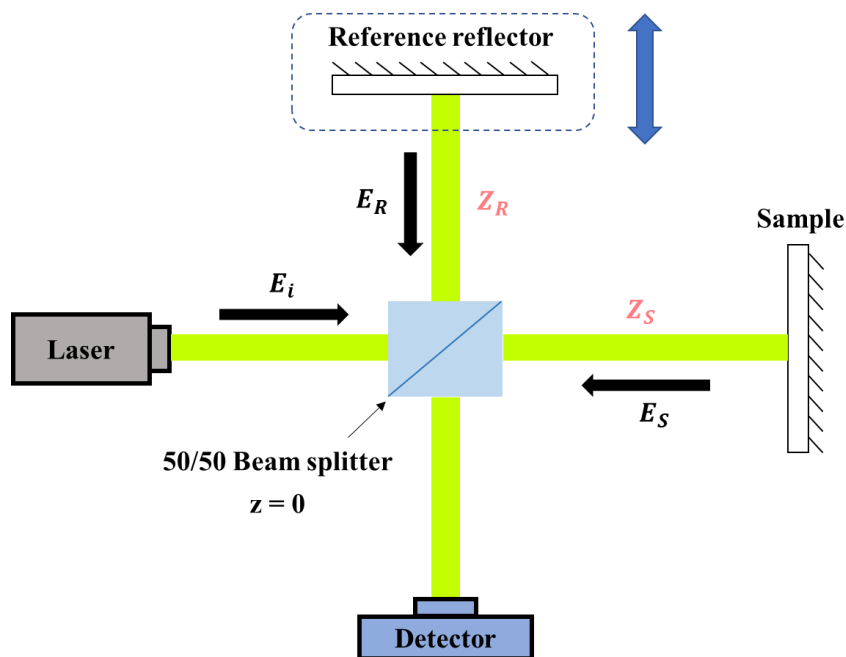


圖 2.1 麥克森干涉儀架構。 E_i 為入射光電場； E_R 為參考端反射電場； E_S 為樣本端反射電場； z_R 為分光鏡到參考端之長度； z_S 為 50/50 分光鏡到樣本端之長度。



首先假設光源由圖 2.1 之 Laser 端出發，此單頻光源之入射電場可以寫成 E_i ，其數學形式如 Eq. 2.1 所示：

$$E_i = E_0 * e^{i(k_0 Z - \omega_0 t)} \quad (2.1)$$

在 Eq. 2.1 中，我們將入射光以電場形式表示， E_0 為高同調單頻光源之電場振幅、 k_0 為光源之波數、 Z 為光路中的位置(假設 50/50 BS 位置所在位置為 0)、 ω_0 為單頻光源的角頻率、 t 為時間。

在光源進入分光鏡(50/50 BS)後，會被分成兩道強度相同的樣本光及參考光，而被分光鏡分開的兩道光之電場振幅會變為初始電場 E_i 的 $\frac{1}{\sqrt{2}}$ 倍，這兩道光會分別打到參考端之反射鏡以及樣本端之散射面，再返回至 BS。經過參考端及樣本端反射後回到 BS 之電場，我們分別定義為 E_R 與 E_S ，其數學形式由 Eq. 2.2 與 Eq. 2.3 所示：

參考端：

$$E_R = \frac{1}{\sqrt{2}} E_i * r_R * e^{i(2k_0 Z_R)} \quad (2.2)$$

樣本端：

$$E_S = \frac{1}{\sqrt{2}} E_i * r_S * e^{i(2k_0 Z_S)} \quad (2.3)$$

其中， E_i 為入射光之電場、 r_R 為參考端之反射係數、 r_S 為樣本端的反射係數、 Z_R 為參考端到分光鏡的距離、 Z_S 為樣本端到分光鏡的距離。

藉由移動參考端的位置來改變兩臂之間的光程差，使得樣本光與參考光通過分光鏡後，在光偵測器端重合，可以接收到不同深度之干涉訊號。由於兩道光到達光偵測器時又經過一次分光鏡，因此能量再度衰減為一半，因此光偵測器所量測到的光電流 I_D 可以表示為 Eq. 2.4：

$$I_D = \rho \left\langle \left| \frac{E_R}{\sqrt{2}} + \frac{E_S}{\sqrt{2}} \right|^2 \right\rangle = \frac{\rho}{\sqrt{2}} \langle |E_R + E_S|^2 \rangle \quad (2.4)$$

在 Eq. 2.4 中， ρ 為光偵測器之光電轉換效率、 E_R 為參考光之電場、 E_S 為樣本光之電場，接著將 Eq. 2.2 及 Eq. 2.3 代入 Eq. 2.4 並整理可得 Eq. 2.5：

$$I_D = \frac{\rho}{4} * \langle E_i^2 \rangle * [r_R^2 + r_S^2 + r_R r_S (e^{i(2k_0)(Z_R - Z_S)} + e^{-i(2k_0)(Z_R - Z_S)})] \quad (2.5)$$

由於我們使用之光偵測器，其積分時間遠大於電場振幅變化週期，因此 Eq. 2.5 中 $\langle E_i^2 \rangle$ 項為電場對時間的平均值，並視為常數； ρ 、 r_R 、 r_S 也皆為常數。我們針對 Eq. 2.5 之第三項使用尤拉公式(Euler's formula)將指數項轉換，取其實數項化簡為 $2 \cos[(2k_0)(Z_R - Z_S)]$ ，再代回寫成如 Eq. 2.6 所示：

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

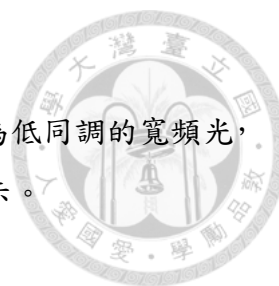
在 Eq. 2.6 中，我們可以把光電流整理成與兩臂距離有關的交流項 i_{AC} ，與兩臂距離無關的直流項 i_{DC} ，最後改寫為 Eq. 2.7：

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

由 Eq. 2.7 看出，可將光偵測器所得到的光電流 I_D 視為一直流偏壓上的餘弦波。且由 Eq. 2.6 與 Eq. 2.7 兩式相互對照，可發現直流偏壓大小由 i_{DC} 表示，與 $(r_R^2 + r_S^2)$ 有關；交流項振幅則是由 i_{AC} 所表示，與兩臂之反射係數 $(r_R r_S)$ 有關。而在交流項中的 $(Z_R - Z_S)$ ，則是表示參考端及樣本端之間的光程差，此光程差會隨著 OCT 在縱向上進行掃描時改變，且從 $\cos[(2k_0)(Z_R - Z_S)]$ 可以知道，掃描單一散射面時，當 Z_S 越接近 Z_R ， $\cos[(2k_0)(Z_R - Z_S)]$ 的值就會隨之變大，而在兩臂之間光程差為 0 時，此值會達到最大值 1，這也表示當兩臂長度相等時，會有最佳的干涉訊號和最大的光電流 I_D 。

以上推導建立在使用高同調單頻光源的情況，但是在光學同調斷層掃描術的光源挑選上，以單頻雷射作為光源並不是最佳解。因為單頻雷射的波長為一狄拉克 δ 函數(Dirac delta function)，當參考端及樣本端之光程差恰為入射光波長一半之整數倍時，干涉訊號便會產生最大值，意謂它在縱向上有接近無限長的同調長度，因此若以單頻雷射作為光學同調斷層掃描術的光源來量測一反射界面時，將會在縱向上接收到多個干涉極值訊號，這些重複出現的干涉極值訊號會對縱向上其他像素點(Pixel)造成串擾(Crosstalk)，影響我們判斷待測樣本的縱向位置。

若我們將上述單頻光源改為一寬頻光源，便能降低縱向上像素點間的串擾，使 OCT 在縱向上有更好的解析度，並提供優秀的光學切片(Optical sectioning)能力。當系統所使用的低同調光源頻寬越寬，縱向上同調長度(Coherence length)就越短，縱向上便能接收到更系範圍的掃描資訊，即縱向解析度越佳，而縱向上可被觀察的



範圍稱作同調閘(Coherence gate)。

以下將推導使用寬頻光源之 OCT 系統理論，我們將光源改為低同調的寬頻光，並假設樣本中有數個縱向上不連續的散射面，架構如圖 2.2 所示。

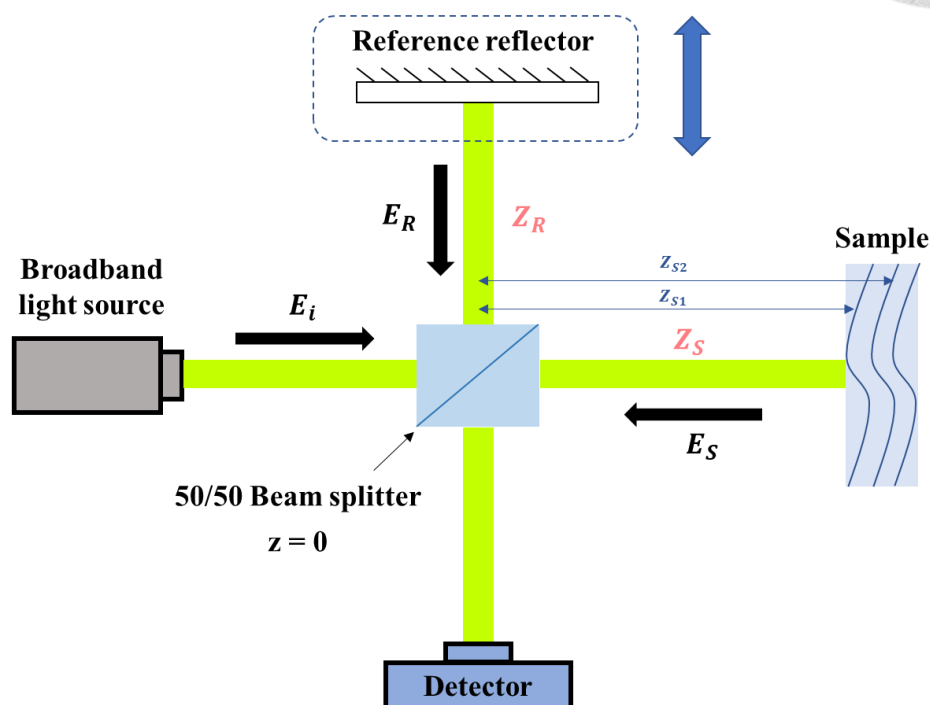


圖 2.2 使用寬頻光源之麥克森干涉儀。 E_i 為入射光電場； E_R 為參考端反射電場； E_S 為樣本端反射電場； Z_R 為分光鏡到參考端之長度； Z_{S1} 為 50/50 分光鏡到樣本第一層界面之長度； Z_{S2} 為 50/50 分光鏡到樣本第二層界面之長度。

在寬頻光源之 OCT 系統理論推導中，我們必須將入射光電場 Eq. 2.1 修正為 Eq. 2.8，如下式所示：

$$E_i = s(k, \omega)e^{i(kz - \omega t)} \quad (2.8)$$

在 Eq. 2.8 中， k 為波數($k = \lambda/2\pi$)， ω 為角頻率($2\pi\nu$)，分別表示空間及時間上的頻率， $s(k, \omega)$ 為不同光波長 λ 對寬頻光源電場強度的函數。

在圖 2.2 中，由於樣本是由多層的界面所組成，整體的背向散射訊號是由樣本內不同界面的背向散射率(r_{Sn})以及不同距離(Z_{Sn})疊加後的結果，因此參考端與樣本端反射回到 BS 的電場 Eq. 2.2 和 Eq. 2.3 要改寫為 Eq. 2.9 和 Eq. 2.10。



參考端：

$$E_R = \frac{1}{\sqrt{2}} E_i * r_R * e^{i(2kZ_R)} \quad (2.9)$$

樣本端：

$$E_S = \frac{1}{\sqrt{2}} E_i * \sum_{n=1}^N r_{Sn} * e^{i(2kZ_{Sn})} \quad (2.10)$$

與前面單頻光源 OCT 的推導相同，兩臂的光經過 BS 之後重合，因此我們將 Eq. 2.9 和 Eq. 2.10 代入 Eq. 2.4 中，可得在光偵測器端接收到的光電流：

$$I_D(k, \omega) = \frac{\rho}{2} \left\langle \left| \frac{s(k, \omega)}{\sqrt{2}} r_R e^{i(2kZ_R - \omega t)} + \frac{s(k, \omega)}{\sqrt{2}} \sum_{n=1}^N r_{Sn} * e^{i(2kZ_{Sn} - \omega t)} \right|^2 \right\rangle \quad (2.11)$$

由於光電場振幅變化的週期相較於光偵測器之積分時間快很多，因此可以將 Eq. 2.11 中與時間有關的項(ωt)去除，之後對 Eq. 2.11 展開整理，可得 Eq. 2.12。

$$I_D(k) = \frac{\rho}{4} \left\{ \begin{array}{l} [S(k) * (R_R + R_{S1} + R_{S2} + \dots)] \\ + \\ [S(k) * \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{Sn}} (e^{i2k(Z_R - Z_{Sn})} + e^{-i2k(Z_R - Z_{Sn})})] \\ + \\ [S(k) * \sum_{n=1}^N \sum_{m=1, m \neq n}^N \sqrt{R_{Sn} R_{Sm}} (e^{i2k(Z_{Sn} - Z_{Sm})} + e^{-i2k(Z_{Sn} - Z_{Sm})})] \end{array} \right\} \quad (2.12)$$

其中由於系統光源頻譜為高斯分布(Gaussian distribution)，我們將光源頻譜 $S(k)$ 寫為高斯分布形式，如下式 Eq. 2.13 所示。並假設 Eq. 2.12 中， $R_R = |r_R|^2$ 及 $R_{Sn} = |r_{Sn}|^2$ 。

$$S(k) \equiv |s(k, \omega)|^2 = \frac{1}{\Delta k \sqrt{\pi}} e^{-\left(\frac{k-k_0}{\Delta k}\right)^2} \quad (2.13)$$

其中 k_0 是光源頻譜的中心波數； Δk 是在 k 空間中的半高全寬(Full width at half maximum; FWHM)。在 Eq. 2.12 中， $S(k) * (R_R + R_{S1} + R_{S2} + \dots)$ 是光偵測器所接收到的直流項； $S(k) * \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{Sn}} (e^{i2k(Z_R - Z_{Sn})} + e^{-i2k(Z_R - Z_{Sn})})$ 是樣本的背向散射光和參考臂的光相互干涉的項； $S(k) * \sum_{n=1}^N \sum_{m=1, m \neq n}^N \sqrt{R_{Sn} R_{Sm}} (e^{i2k(Z_{Sn} - Z_{Sm})} + e^{-i2k(Z_{Sn} - Z_{Sm})})$ 是樣本中各個界面的背向散射光相互干涉項。我們將 Eq. 2.12 進行尤拉公式轉換並簡化，得到 Eq. 2.14。



$$I_D(k) = \frac{\rho}{4} \left\{ \begin{aligned} & [S(k) * (R_R + R_{S1} + R_{S2} + \dots)] \\ & + [S(k) * \sum_{n=1}^N 2\sqrt{R_R R_{Sn}} \cos(2k(Z_R - Z_{Sn}))] \\ & + [S(k) * \sum_{m \neq n=1}^N \sqrt{R_{Sn} R_{Sm}} \cos(2k(Z_{Sn} - Z_{Sm}))] \end{aligned} \right\} \quad (2.14)$$

若考慮樣本內僅有一個界面產生背向散射，此時 Eq. 2.14 將不會有第三項，並且光偵測器所接收到的光電流將只會包含 R_R 和 R_{S1} ，這邊我們將 R_{S1} 用 R_S 替換掉，則光電流方程式可改寫為 Eq. 2.15：

$$I_D(k) = \frac{\rho}{4} * S(k) * \{R_R + R_S + 2\sqrt{R_R R_S} \cos[2k(Z_R - Z_S)]\} \quad (2.15)$$

以下推導中不考慮樣本的色散現象，因此假設光電轉換效率 ρ 、參考端反射率 R_R 以及樣本端反射率 R_S 不隨波數 k 改變而改變。光偵測器接收到的光電流為光源頻譜中不同的 k 所對應到不同 $I_D(k)$ 的疊加結果，得到結果如 Eq. 2.16：

$$I_D(k) = \frac{\rho}{4} * S_0 * \{R_R + R_S + 2\sqrt{R_R R_S} e^{-(Z_R - Z_S)^2 \Delta k^2} \cos[2k(Z_R - Z_S)]\} \quad (2.16)$$

在 Eq. 2.16 中， $S_0 = \int_0^\infty S(k) dk$ ，干涉訊號則與 $e^{-(Z_R - Z_S)^2 \Delta k^2} \cos[2k(Z_R - Z_S)]$ 有關，當 OCT 在單一散射面上進行縱向掃描時， $(Z_R - Z_S)$ 決定了干涉訊號與光電流大小的變化，參考臂長度與樣本臂長度越接近，得到的干涉訊號之值越大；當兩臂長度相等，即光程差 (ΔZ) 等於 0 時，可得干涉訊號之峰值，此時參考端反射光與樣本端反射光是最吻合之相位關係。當樣本在縱向上進行掃描時，光偵測器得到的干涉訊號如圖 2.3 所示。

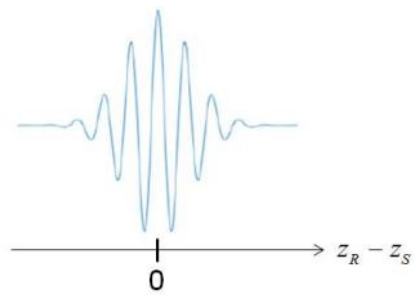


圖 2.3 縱向掃描單一反射面干涉訊號。

為了量化光的同調度，我們定義空間上相干程度(Degree of coherence) $\Gamma(z)$ 和相干函數(Coherence function) $\gamma(z)$ 之關係如 Eq. 2.17 所示



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

在 Eq. 2.17 中， α 為虛擬變數(Dummy variable)。當參考端移動，造成參考臂長度改變時，OCT 便能進行縱向上的掃描，如圖 2.2 所示。定義 z 為參考端長度(Z_R)和樣本端長度(Z_S)之差，則參考光及樣本光的電場可分別表示為 $E(Z_S)$ 與 $E(Z_S + z)$ 。藉由觀察 Eq. 2.17 可以得到相干函數 $\gamma(z)$ 和兩臂電場之關係，如 Eq. 2.19 所示：

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

根據 Wiener-Khinchin theorem [9]，Eq. 2.18 之積分可以表示為頻譜的傅立葉轉換(Fourier transform)，如 Eq. 2.19 所示：

$$\int_{-\infty}^{\infty} E(\alpha)^* \cdot E(\alpha + z) d\alpha = FT_k[|E(k)|^2](z) = FT_k[S(k)](z) \quad (2.19)$$

將 Eq. 2.18 和 Eq. 2.19 進行比較後，可得到相干函數 $\gamma(z)$ 與光源頻譜 $S(k)$ 之關係如下：

$$\gamma(z) = FT_k[S(k)](z) = e^{-(z)^2 \Delta k^2} \quad (2.20)$$

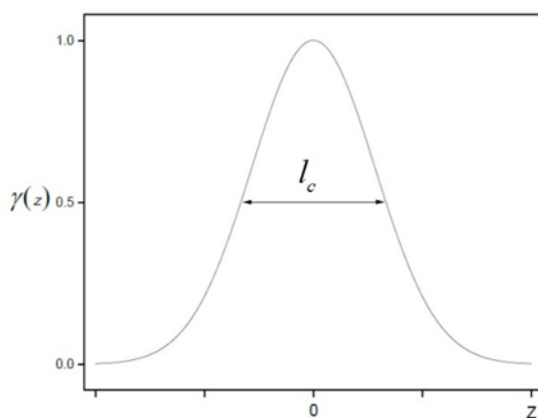


圖 2.4 OCT 系統縱向上的點擴散函數示意圖。

相干函數 $\gamma(z)$ 同時也是 OCT 系統中縱向上的點擴散函數(Point square function; PSF)。圖 2.4 為 OCT 系統縱向上的點擴散函數和縱向位置的關係，而 PSF 中的半高全寬可定義為相干長度(Coherence length; l_c)，也是 OCT 系統之縱向解析度。PSF 的半高全寬滿足 Eq. 2.21，並可以由此推導出 l_c 與光源頻譜之間的關係如 Eq. 2.22

所示：

$$\gamma(z) = e^{-(z)^2 \Delta k^2} = \frac{1}{2} \quad (2.21)$$

$$l_c = \frac{2\sqrt{\ln 2}}{\Delta k} = \frac{2 \ln 2 \lambda_0^2}{n\pi \Delta \lambda} \quad (2.22)$$



本研究中所使用的全域式光學同調斷層掃描術，最簡單的架構如圖 2.5 所示。全域式光學同調斷層掃描術不同於先前的時域式 OCT 架構，全域式 OCT 在架構上的參考端和樣本端各加上了一顆顯微物鏡，並且把光偵測器的部分換成收取二維干涉影像的相機，利用樣本端的一維移動平台，即可收取樣本中不同深度的平面影像。前面說明使用低同調光源的優勢中有提到，低同調光源之光學同調斷層掃描術可以在縱向上接收到較細範圍的掃描資訊，而全域式 OCT 系統藉由結合顯微物鏡把光束聚焦的效果，使得橫向上觀察樣本平面資訊的能力再往上提升。且相較於共軛焦顯微鏡，OCT 也提供較佳的縱向上觀察範圍(同調間較佳)，使得全域式 OCT 成為一項極具潛力的診斷儀器。

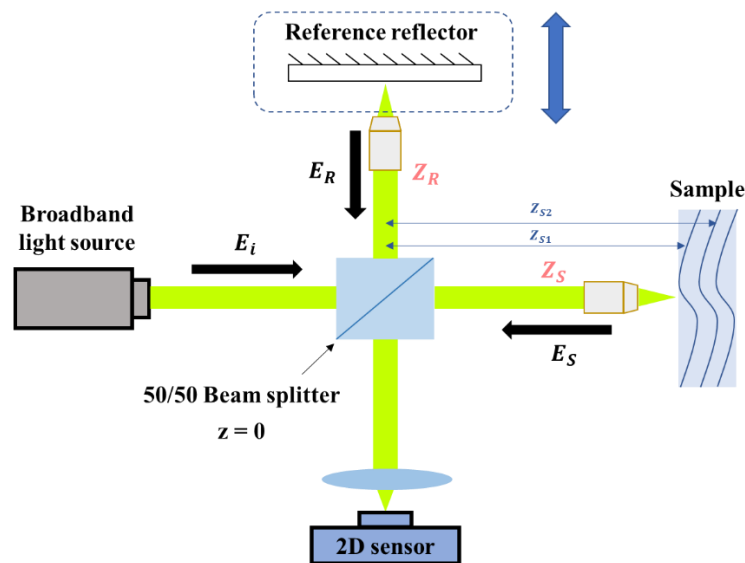


圖 2.5 最簡易之全域式 OCT 系統架構圖。

此小節說明了 OCT 的原理，推導低同調光源作為系統光源的好處，並從時域式 OCT 推廣至全域式 OCT。在接下來的 2.2 節中，我將會說明本研究中使用的 Mirau-based 全域式 OCT 架構，並推導其橫向及縱向之解析度，再與實驗所得之結果做比較。

2.2 Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描系統

此節將會介紹 Mirau-based 全域式 OCT(Mirau-based FF-OCT)之系統架構，說明 OCT 影像之擷取及處理方式，並進行系統在橫向(Lateral resolution)與縱向解析度(Axial resolution)的理論值與實驗結果的比較，最後探討系統干涉效率(Interference efficiency; IE)和訊噪比(Signal-to-noise ratio; SNR)理論與實際之差異。

2.2.1 系統簡介

圖 2.6 為本實驗使用之 Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描系統架構圖，其架構由兩部分所組成，分別為右側的光源系統與左側的干涉儀系統，兩獨立系統之間會以一條多模光纖(Multi-mode fiber; MMF; core=300 μm)相連接，以下會針對光源系統與干涉儀系統做更詳盡的介紹。

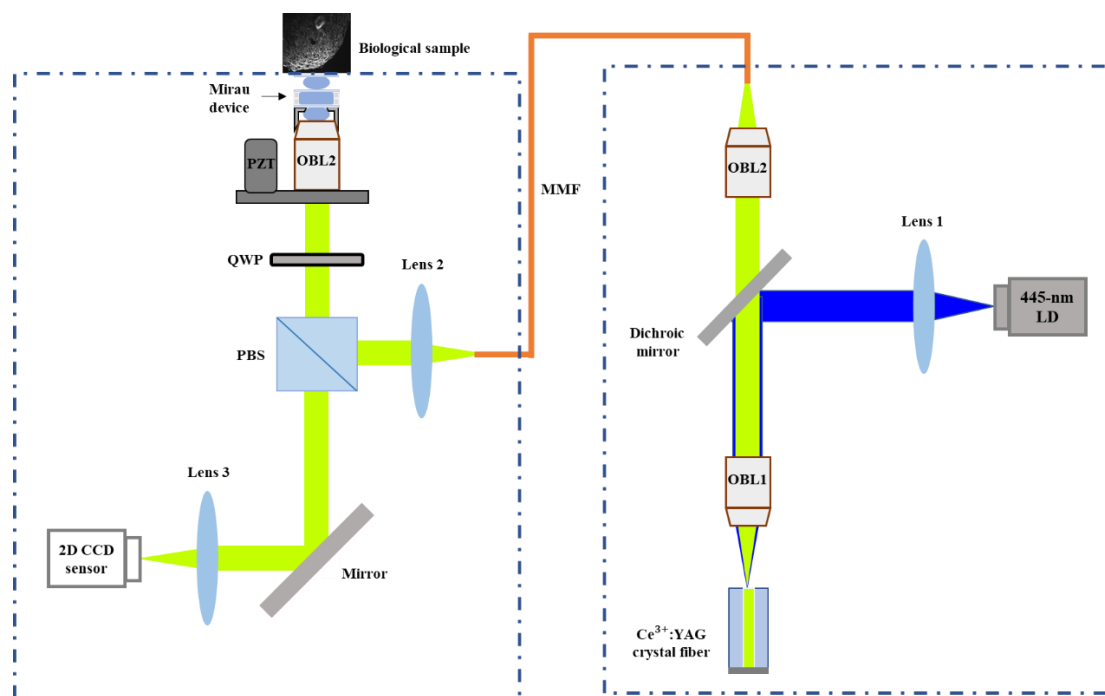


圖 2.6 Mirau-based 全域式光學同調斷層掃描系統架構圖。445-nm LD 是波長為 445 nm 之雷射二極體；Dichroic mirror 為分色鏡；OBL (Objective lens)為物鏡； Ce^{3+} :YAG crystal fiber 為摻鈰鈮鋁石榴石晶體光纖；MMF (Multi-mode fiber)是多模光纖；PBS (Polarization beam splitter)為極化分光鏡；QWP (Quarter-wave plate)為四分之一波片；PZT 為壓電致動器；Mirau device 是自製干涉儀之組件；CCD (Charge-coupled device)為感光耦合元件(IMPERX ICL-B0620)。

首先介紹 Mirau-based Ce^{3+} :YAG FF-OCT 之光源系統：

圖 2.7 為本研究所使用 Ce^{3+} :YAG FF-OCT 之光源系統架構圖，我們使用單顆波長為 445 nm 之藍光雷射二極體作為系統泵浦光源，藍光經過焦距為 f 的非球面透鏡 Lens 1，由於 Lens 1 距離雷射二極體出光位置恰為 f ，使得經過 Lens 1 之藍光形成平行光。打在與光路呈 45 度夾角的分色鏡(Dichroic mirror)，反射後進入物鏡(OBL 1)，透過物鏡將平行藍光聚焦並耦合至實驗室自行生產之 Ce^{3+} :YAG 單纖衣晶體光纖之中，激發出寬頻光源，再利用分色鏡將殘存之 445 nm 雷射光濾除，並耦合至多模光纖(MMF)之中。

本研究使用之 Ce^{3+} :YAG 晶體光纖，經 445 nm 藍光泵浦後，會產生自發性輻射(spontaneous emission; SE)，中心波長為 560 nm 之寬頻黃綠光源。此外，我們在晶體光纖上使用了雙向 (Double pass) 架構，於晶體光纖一端鍍銀(鍍銀面外再鍍上一層鋁層作為保護層並增加散熱效果)，利用銀的高反射率，使得產生反方向之 SE 光打到鍍銀端後反射，統一由未鍍銀端射出，有效運用其生成之 SE 光並增加輸出光功率。

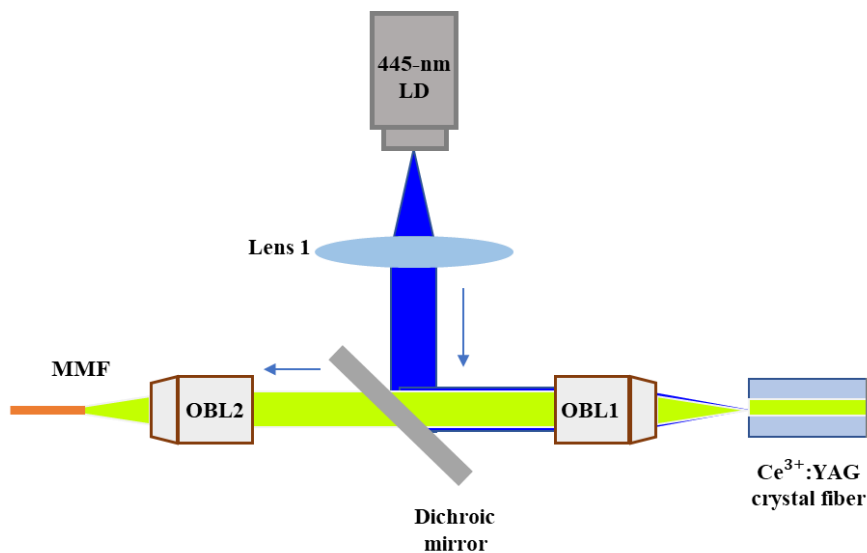


圖 2.7 Ce^{3+} :YAG FF-OCT 光源系統架構圖。

本研究中所使用的摻鈰鈮鋁石榴石(Ce^{3+} :YAG)晶體光纖，為實驗室所製備之晶體光纖。其使用的長晶方法為雷射加熱基座生長法(Laser-heated pedestal growth; LHPG)，此法屬於浮動熔區法的一種，於 1972 年由 Haggerty 提出[10]，起初是用

於生長紅寶石晶體，後續才被用來生長其他晶體和晶體光纖。

使用 LHPG 法來生長晶體光纖，有以下三個優點：第一，LHPG 法不需額外使用容器，如坩鍋等，盛裝晶體原料，因此可以避免原料受容器污染的問題；其二，LHPG 法以雷射作為加熱源，強度及溫度較容易控制；第三，在生長晶體時，LHPG 法具有高生長速度的特性，可以更容易長出小直徑的晶體。這三個優點是我們實驗室選用此法進行晶體光纖生長的主因。

本實驗室之 LHPG 法所使用之系統架構如圖 2.8 所示，我們使用輸出功率 50 W，波長 10.6 μm 之二氧化碳雷射(CO_2 laser)作為加熱源，由於許多高熔點的氧化物晶體對於 10.6 μm 波長具有很高的吸收率，因此採用此波長來熔化晶體。在 CO_2 雷射進入到生長腔之前，會先將光束擴束，再經過內外圓錐反射鏡(Reflexicon)形成均勻的環狀光束，並利用平面鏡使光束向上反射至拋物面鏡，讓光以軸對稱之方式聚焦於原始晶棒(Source rod)。

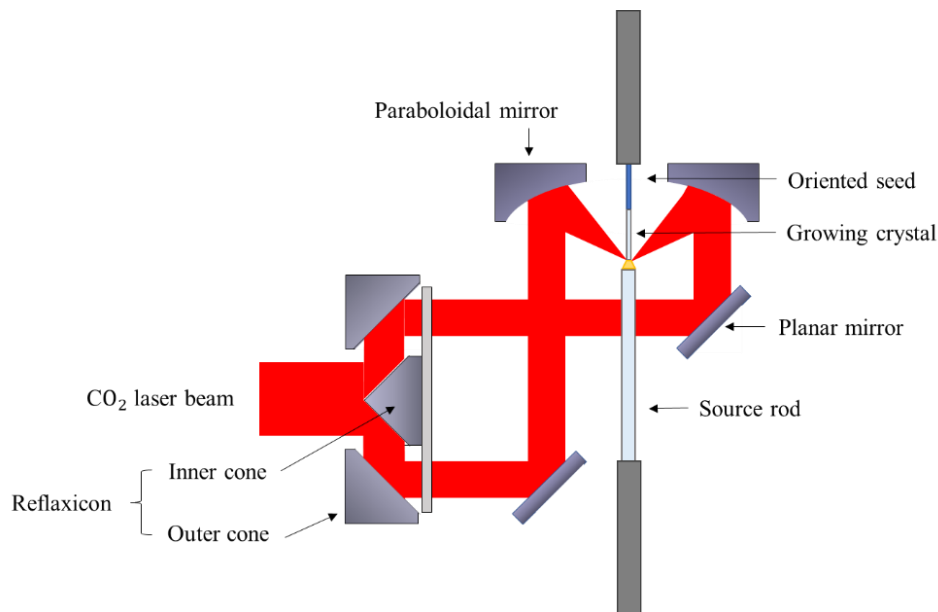


圖 2.8 LHPG 生長法之系統架構[11]。

在原始晶棒頂端因受熱而產生熔區時，使用步進馬達緩慢將子晶(Seed)向下移動至與熔區相接，接著再將子晶向上提拉。由於子晶和熔融態晶體之交界面溫度相對較低，因此冷卻凝固的熔融態晶體將會附著於向上提拉之子晶上。

圖 2.9 為晶體成長過程之示意圖：

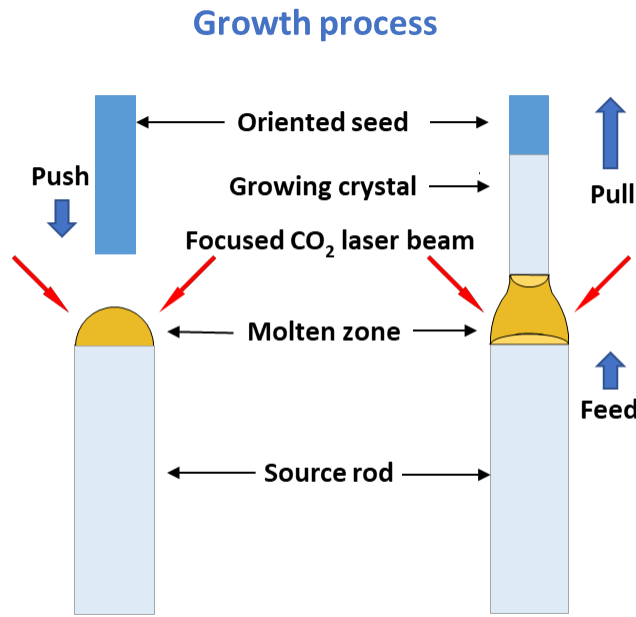


圖 2.9 LHPG 法之晶體生長示意圖[11]。

原始晶棒的頂端經過聚焦的二氧化碳雷射加熱之後形成熔區，此時利用步進馬達慢慢將子晶下降，直到接觸到熔區之熔融態晶體後，一邊將原始晶體以 v_s 的速度往上推，一邊將子晶以 v_f 的速度向上提拉，且 v_f 必須要大於 v_s ，使晶體原料可以照著子晶之排列方向生長出晶體光纖，由於生長的晶體光纖與減少之原始晶棒必須遵守質量守恆，其關係式如 Eq. 2.23 所示：

$$M = \rho V = \rho_s(\pi r_s^2 v_s) = \rho_f(\pi r_f^2 v_f) \quad (2.23)$$

其中， M 為質量； ρ 為密度； V 為體積； ρ_s 、 ρ_f 分別是原始晶棒和生成之晶體光纖的晶體密度； r_s 和 r_f 分別為原始晶棒和生成之晶體光纖的半徑； v_s 與 v_f 分是原始晶棒推送和生成之晶體光纖提拉的速度。整理 Eq. 2.23 後可以得到如 Eq. 2.24 之關係式：

$$\frac{D_s}{D_f} = \sqrt{\frac{v_f}{v_s}} \quad (2.24)$$

D_s 、 D_f 分別為原始晶棒和生成之晶體光纖的直徑，由上式可知，只要適當地控制晶棒推送和子晶提拉之速度，即可長出所需直徑大小之晶體光纖。

生長完之晶體光纖，需要用纖衣將其包覆，常見的方法有兩種，一種是使用低溫玻璃包覆製程進行單纖衣包覆法；另一種是使用高溫玻璃包覆製程進行雙纖衣包覆法。本研究使用的晶體光纖為摻鈰釷鋁石榴石($\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$)單纖衣晶體光纖，其單纖衣包覆法如圖 2.10 所示。

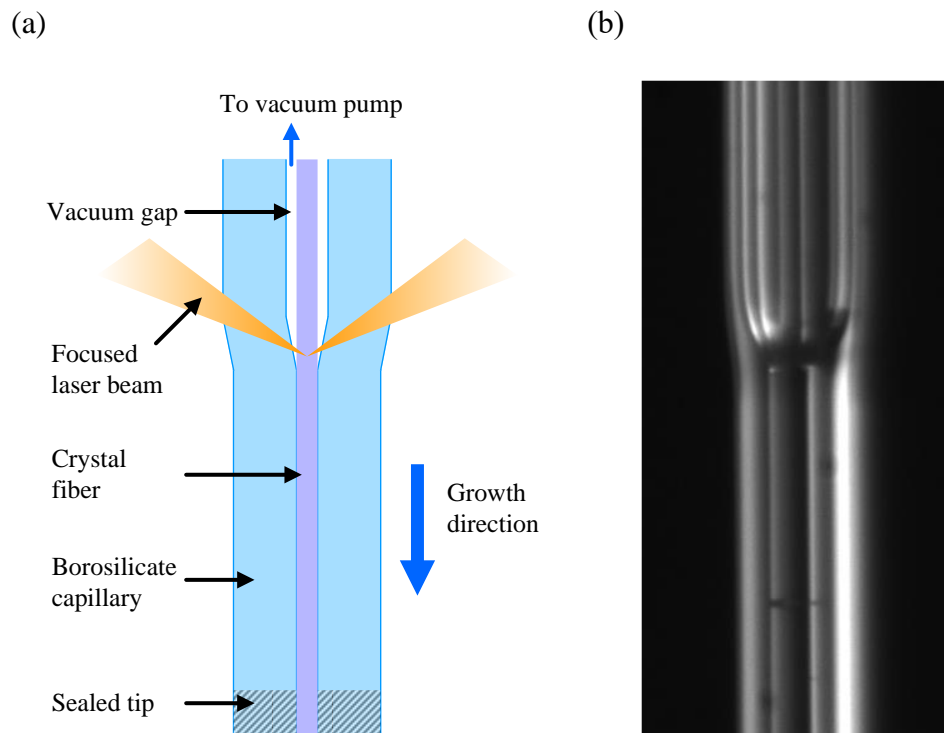


圖 2.10 (a)單纖衣包覆法示意圖[12]；(b)單纖衣包覆法實際包覆過程影像。

首先將晶體光纖放入材質為硼玻璃(Borosilicate)之毛細管，使用 CO_2 雷射對其中一端加熱封口，再由另一端開口持續抽氣，讓晶體光纖與毛細管之間呈現負壓的狀態，並持續以可讓毛細管軟化的溫度加熱，由於硼玻璃軟化的溫度($821\text{ }^\circ\text{C}$)比起 $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$ 之熔點($1965\text{ }^\circ\text{C}$) 低了不少，因此兩者之間幾乎不會產生互熔區，即可使硼玻璃直接貼附在晶體光纖上，生成單纖衣晶體光纖。

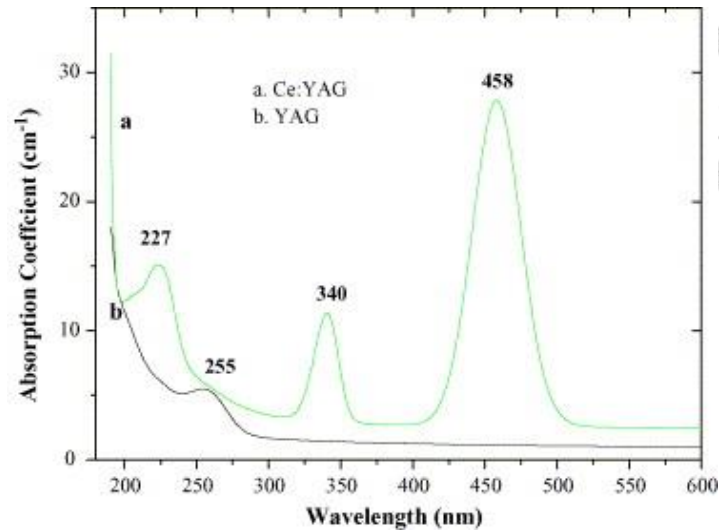


圖 2.11 Ce³⁺:YAG 晶體之吸收頻譜[13]。

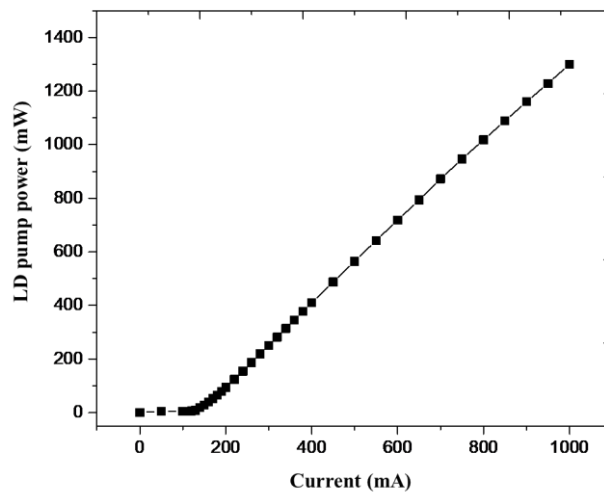


圖 2.12 445-nm 藍光 LD 之 P-I 曲線。

圖 2.11 為 Ce³⁺:YAG 晶體之吸收頻譜，從頻譜圖中可以看出，Ce³⁺:YAG 晶體之吸收峰值約為 458 nm，因此我們於 Mirau-based OCT 之光源系統中選用波長為 445 nm 的藍光雷射二極體(Laser diode；LD)作為激發光源。圖 2.12 為該藍光 LD 的 P-I 曲線，於 LD 上施加 1000 mA 之電流時，藍光 LD 輸出之功率約為 1300 mW。使用此藍光 LD 泵浦 Ce³⁺:YAG 晶體光纖所產生之 SE 寬頻黃綠光，其輸出頻譜中心波長為 560 nm，半高全寬為 95 nm，如下圖 2.13 所示。圖 2.14 為 445 nm 之藍光 LD 的激發功率對 Ce³⁺:YAG 晶體光纖產生之寬頻黃綠光源輸出功率，由此圖可知，在藍光 LD 輸出功率達 1300 mW 時，Ce³⁺:YAG 晶體光纖可產生約 35 mW 之 SE 光。

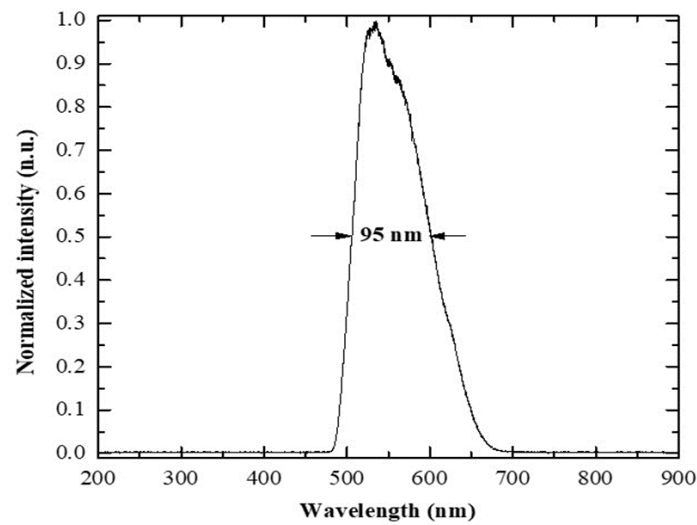


圖 2.13 Ce^{3+} :YAG 晶纖之輸出光頻譜[11]。

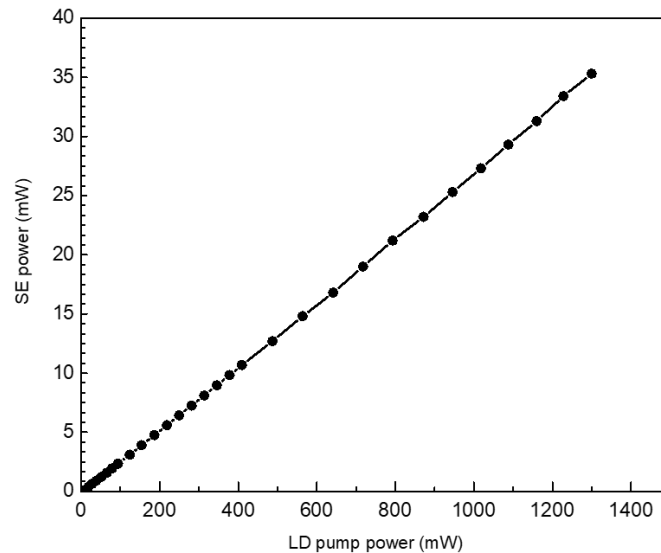


圖 2.14 Ce^{3+} :YAG 晶纖之輸出功率。

從圖 2.13 可以看出， Ce^{3+} :YAG 晶體光纖所產生 SE 光之頻譜形狀相當接近高斯分布，當光源頻譜越接近高斯分布，其生成之干涉訊號越不會出現旁瓣(Side lobe)現象造成的串擾(Crosstalk)。由於 OCT 系統之影像即是透過干涉訊號建構生成，因此 Ce^{3+} :YAG 晶體光纖十分適合作為 OCT 的光源使用。

接著介紹 Mirau-based Ce^{3+} :YAG FF-OCT 中的干涉儀系統，如圖 2.15 所示：

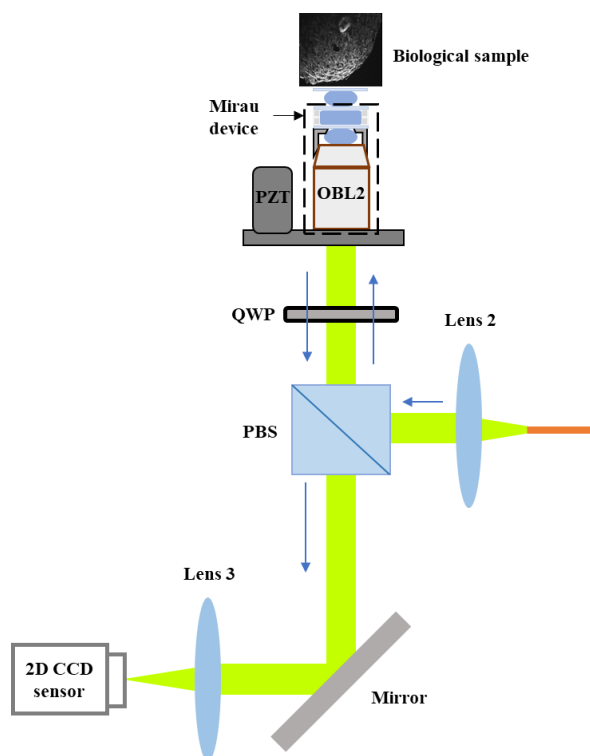


圖 2.15 可見光之 Mirau-based FF-OCT 干涉儀系統。

在干涉儀系統中，我們利用 Lens 2 將來自光源端之 560 nm 黃綠寬頻光準直後，其線性極化光經 PBS (Polarization beam splitter) 反射 S 極化光打至 QWP (Quarter-wave plate) 上，藉由 QWP 將 S 極化光轉化成圓極化光，經過物鏡後均勻入射至樣本，而經樣本反射之圓極化光會循原路回到 QWP，打過 QWP 變成 P 極化光，並穿透 PBS 進入相機 (CCD sensor)。詳細的極化光轉化情況可見圖 2.16。

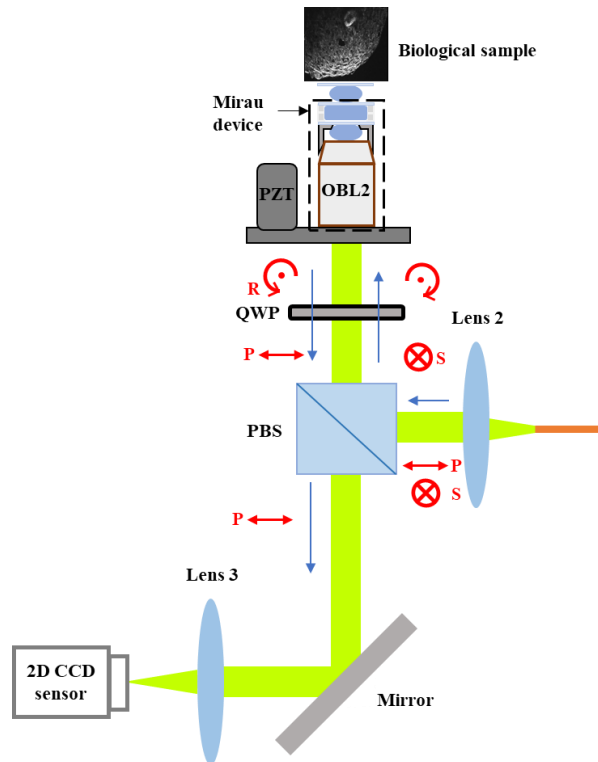


圖 2.16 光極化方向示意圖。藍色箭頭為寬頻黃綠光之行進方向；紅色箭頭圖式為黃綠光極化方向經元件後之轉變。

在干涉儀系統中，干涉訊號的形成來自本實驗室自製之 Mirau 組件，其架構圖如圖 2.17 所示。將兩片厚度為 $150\ \mu\text{m}$ 之 fused silica 玻璃片(GP1、GP2)以 UV 膠黏貼於環形墊片組之上下，並於玻璃片和環形墊片組形成之空腔中填入矽油 (Silicone oil; $n = 1.406$ @sodium D line)，即完成 Mirau 組件，其中 GP1 和 GP2 分別鍍有反射率為 5% 及 30% 之反射鍍膜層。Mirau 製作完成後，會安裝於 Objective lens 2(OBL2)前端，我們稱之為 Mirau 物鏡組，最後於 Mirau 物鏡組上方之量測平台架設 GP3，其厚度、材質皆與 GP1、GP2 相同，唯一差別在於 GP3 沒有鍍反射膜層。加上這片 GP3 是為了在對樣本進行深度掃描時補償樣本臂的光程差，讓樣本臂長度(GP2→GP3→GP2)與參考臂長度(GP2→GP1→GP2)相等。而 Mirau 與 OBL2 間的空隙以及 Mirau 與 GP3 間的空隙，同樣也會使用矽油填滿，減少界面之間由於 Fresnel's law 產生的強反射，以避免在影像上造成干擾或產生假訊號。

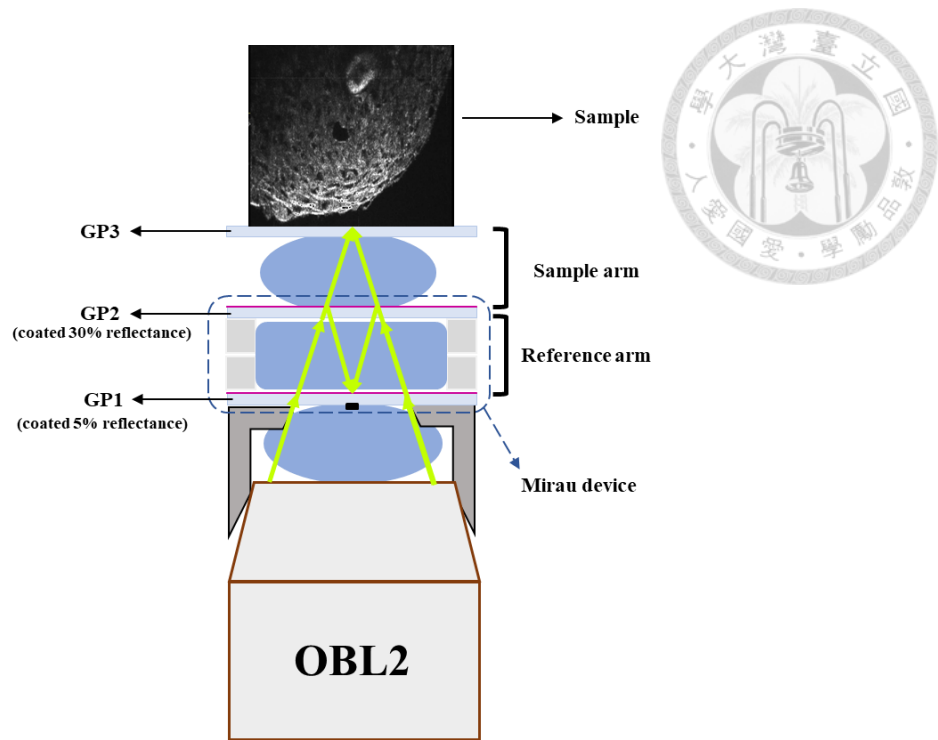


圖 2.17 Mirau 架構圖及其干涉路徑示意圖。

在使用系統進行成像時，參考光與樣本光之干涉路徑如圖 2.17，其詳細路徑描述如下：

參考光路徑：GP1 上表面→GP2 上表面→GP1 上表面→GP2 上表面
→GP1 上表面→CCD sensor

樣本光路徑：GP1 上表面→GP2 上表面→GP3 上表面→樣本→GP3 上表面
→GP2 上表面→G12 上表面→CCD sensor

最終參考光與樣本光會於 CCD sensor 重合，產生干涉訊號，便可得到掃描樣本中一個干涉平面的資訊。在進行掃描時，利用壓電致動器(PZT)將 Mirau 物鏡組向上推動，縮短 GP2 和 GP3 間距離，使得樣本端生成之干涉平面往樣本內部移動，藉此達到軸向深度掃描之三維成像。



2.2.2 影像處理

當 FF-OCT 系統進行深度掃描時，樣本造成之背向散射光會與參考光產生干涉訊號，並成像至 CCD 相機。而相機上各個像素點會接收到成像系統相對應之成像平面的訊號。但是相機接收到的訊號為樣本光及參考光干涉後之載波(Carrier)相位訊號，因此要透過四點運算法去除載波的相位資訊，以還原成樣本中不同深度之散射訊號，而此散射訊號之大小即代表樣本中各層界面的反射率大小，我們稱為包絡(Envelope)訊號，圖 2.18 為干涉形成之載波訊號與包絡訊號間的關係。

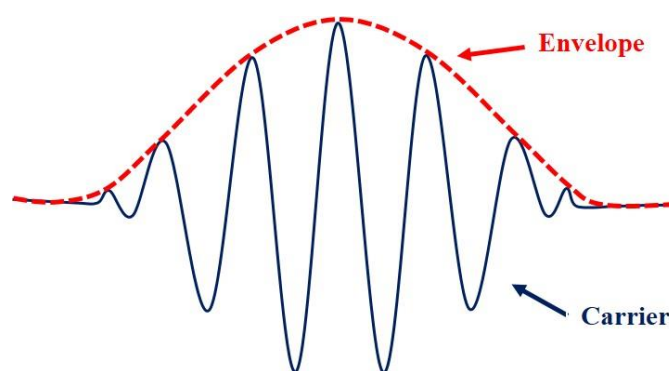


圖 2.18 干涉載波(Carrier)訊號與包絡(Envelope)訊號示意圖。

要將帶有相位資訊之載波訊號轉換為包絡訊號，除了上述的四點運算法，也常見文獻中使用希爾伯特轉換(Hilbert transform)，將相機得到的載波訊號轉換為解析訊號(Aalytic signal)後取其絕對值，即為包絡訊號。但此法必須在接收所有載波訊號後，才能進行上述的訊號間轉換，會犧牲 OCT 可即時顯示影像(Real time image)的優點，因此於本研究中，我們使用與希爾伯特轉換等效之四點運算法[14]來將載波訊號還原為包絡訊號。

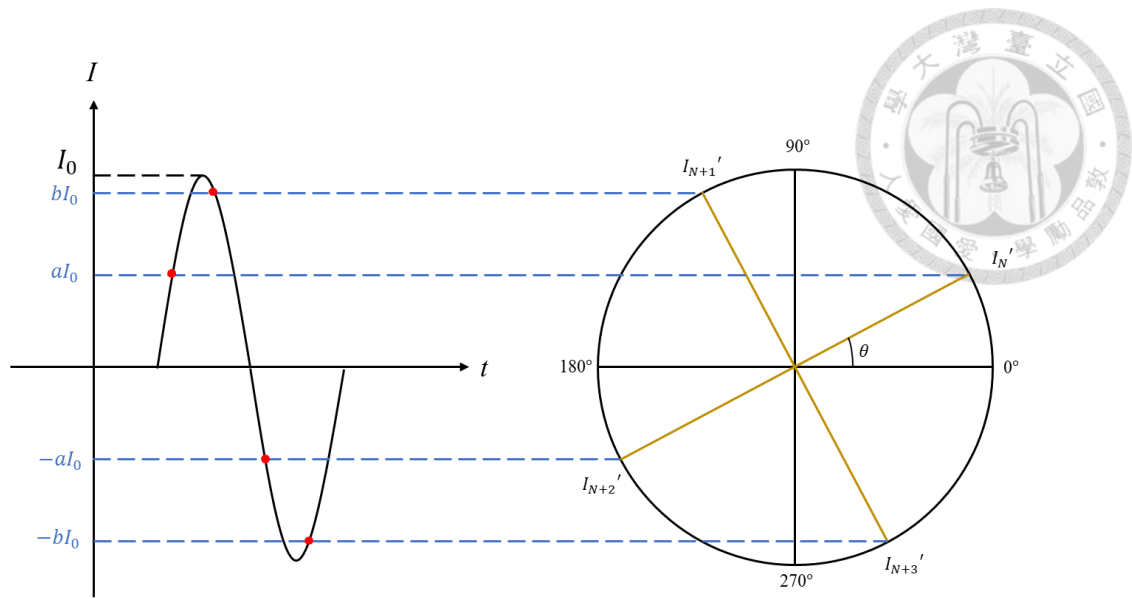


圖 2.19 四點運算法示意圖[14]。

我們利用四點運算法計算單一週期正弦波之振幅，圖 2.19 為四點運算法之示意圖，在圖中左側的正弦波上，取點間距為四分之一週期的四個點，四點振幅分別為 aI_0 、 bI_0 、 $-aI_0$ 、 $-bI_0$ ，並相對應至 I'_N 、 I'_{N+1} 、 I'_{N+2} 、 I'_{N+3} 表示此四點振幅之大小，其關係式如 Eq. 2.25 至 Eq. 2.28 所示：

$$I'_N = I_0 \sin \theta = aI_0 \quad (2.25)$$

$$I'_{N+1} = I_0 \cos \theta = bI_0 \quad (2.26)$$

$$I'_{N+2} = -I_0 \sin \theta = -aI_0 \quad (2.27)$$

$$I'_{N+3} = -I_0 \cos \theta = -bI_0 \quad (2.28)$$

接著將上述四條關係式代入四點運算法之方程式中，表示如 Eq. 2.29，即可將載波訊號還原為包絡訊號。

$$\begin{aligned} & \frac{\sqrt{2}}{4} \left[\sum_{i>j=1}^4 (I_i - I_j)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \\ &= \sqrt{\frac{(-b-a)^2 + (-b-b)^2 + (-b+a)^2 + (-a-a)^2 + (-a-b)^2 + (b-a)^2}{8}} = \sqrt{\frac{8(a^2+b^2)}{8}} I_0 = I_0 \quad (2.29) \end{aligned}$$

根據上述推導之條件，為了換算出正確的正弦波振幅，我們取的四點其間距必須相同，因此 PZT 掃描速度和相機的畫面更新率(Frame rate；F)要相互配合，而 PZT 掃描時的移動速度 v 與相機的畫面更新率 F 須滿足的關係式如 Eq. 2.30：

$$v * \frac{N}{F} = \frac{\lambda_0}{2*n} \quad (2.10)$$

其中 λ_0 為寬頻光源之中心波長； N 為一個週期之正弦波內的影像張數； n 為樣本折射率。將 Eq. 2.30 改寫後變為 Eq. 2.31：

$$v = \frac{\lambda_0}{2*n} * \frac{F}{N} \quad (2.11)$$

需要注意的是，一週期正弦波內的影像張數 N 必須為4的倍數；而右式中的 $\frac{\lambda_0}{2*n}$ ，其物理意義為包絡訊號上相鄰兩點的距離，分母的係數2則代表 PZT 掃描深度的兩倍與樣本端之光程變化有關。

在 Eq. 2.32 中可以看出，當 F 與 $\frac{\lambda_0}{2*n}$ 維持定值時，一週期正弦波內之影像張數會和 PZT 移動速度呈現反比關係，即表示當 PZT 移動速度越快時，週期內影像張數會越少，因此四點運算法可平均的張數也越少，如此一來我們便會得到較低訊噪比的 FF-OCT 影像；反之，若我們使用較慢的 PZT 移動速度掃描樣本，會因為週期內張數較多，在四點運算過後得到較高訊噪比的影像，但相對容易受到樣本晃動、漂浮或振動等等原因影響。因此量測樣本時，須根據樣本的狀態、狀況選擇最適合的掃描速度，表 2.1 為本實驗所使用之 Mirau-based FF-OCT 之 PZT 掃描速度與週期內影像張數對照表。

表 2.1 Mirau-based FF-OCT 之 PZT 掃描速度與週期內影像張數對照表。

	1/16 倍速	1/8倍速	1/4倍速	1/2倍速	1倍速	2倍速	4倍速	8倍速	16倍速
PZT 移動速度 (v) ($\mu\text{m/s}$)	0.05	0.1	0.2	0.41	0.81	1.62	3.25	6.48	12.96
週期內張數(N)	1024	512	256	128	64	32	16	8	4



2.2.3 系統橫向解析度及縱向解析度

此小節將對 Mirau-based FF-OCT 系統的橫向解析度(Lateral resolution)與縱向解析度(Axial resolution)進行理論值的推導以及實驗值的量測。

橫向解析度理論

在全域式 OCT 中，系統之橫向解析度會受光學成像系統與相機像素取樣兩因素影響。在光學成像系統中，橫向解析度的定義為平面上可被分辨的兩點之間的最小距離，常依據瑞利準則(Rayleigh criterion)的定義來判斷。當點光源打過透鏡後會產生艾瑞盤(Airy disk)，相鄰兩點光源之艾瑞盤重疊時，根據瑞利準則，若其中一個的艾瑞盤中心位置落在另一艾瑞盤之第一零點，也就是第一暗環上時，則兩點光源恰可被解析，如圖 2.20 所示，而點光源艾瑞盤之半徑即為其解析度。

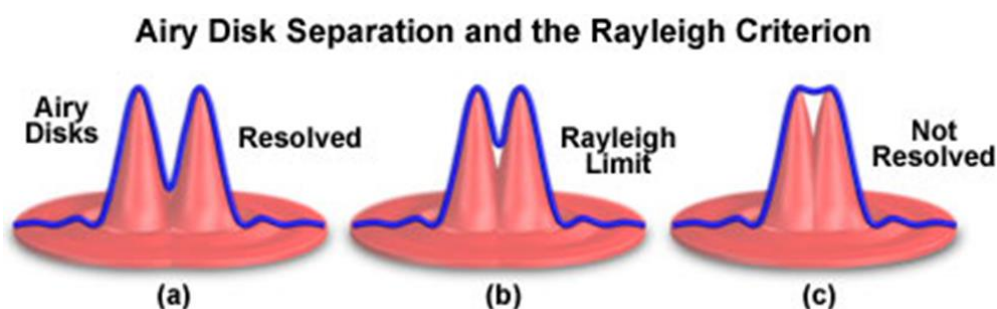


圖 2.20 瑞利準則示意圖[15]。

由此，定義其角分辨率(Angular resolution； θ)如 Eq. 2.32 所示。

$$\theta = 1.22 \frac{\lambda}{D} \quad (2.12)$$

其中， λ 為寬頻光源中心波長； D 為透鏡孔徑大小。由於樣本成像於透鏡之焦平面上，透鏡與成像位置之間距恰為透鏡焦距 f ，在角分辨率極小的情況下，可推導出橫向解析度 Δr 如 Eq. 2.33：

$$\Delta r = 1.22 \frac{\lambda f}{D} = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.13)$$

其中 f 為透鏡焦距； NA 為透鏡數值孔徑。以上為光學成像系統之橫向解析度推導。



除了光學成像系統之外，相機像素取樣是另一主要影響橫向解析度之因素，在使用相機接收訊號時，會因為相機像素橫向上的取樣使得橫向解析度變寬。而全域式 OCT 之橫向解析度最終會如 Eq. 2.34 所示：

$$R_{lateral} = \sqrt{R_{optical}^2 + R_{camera}^2} \quad (2.34)$$

$$R_{camera} = \frac{\text{像素大小}}{\text{光學系統放大倍率}} \quad (2.35)$$

其中， $R_{optical}$ 為光學成像系統之橫向解析度； R_{camera} 為相機像素取樣解析度。

橫向解析度量測結果

量測 Mirau-based FF-OCT 系統之橫向解析度時，我們會將解析度測試片放置於 GP3 上方，經系統掃描後得到如圖 2.21(a)和(b)。本研究中，我們量測 90%訊號強度至 10%訊號強度之寬度做為系統橫向解析度，圖 2.21(a)中的方框位置為我們得到圖 2.21(b)訊號強度變化曲線之區域，經量測之後得本研究所使用之 Mirau-based FF-OCT 系統橫向解析度為 0.8 μm 。

(a)



(b)

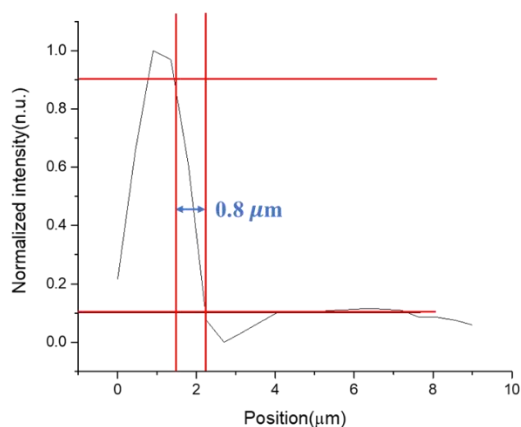


圖 2.21 橫向解析度量測結果(a)解析度測試片量測影像 (b)橫向訊號強度分布。

縱向解析度理論

光學成像系統中，縱向上可分辨出兩反射面之最小距離即為縱向解析度。於先前 2.1 節推導過的相干函數 $\gamma(z)$ ，即時域式 OCT 系統之縱向點擴散函數(Point spread

function ; PSF), 每一反射面可對應至一 PSF, 當兩 PSF 可被解析時, 其半高全寬的點剛好相互重疊, 因此我們定義 PSF 之半高全寬為時域式 OCT 系統縱向解析度 $\Delta z_{coherence}$, 如 Eq. 2.36 所示, 其中 λ 為光源中心波長, $\Delta\lambda$ 為光源頻寬(FWHM)。

$$\Delta z_{coherence} = \frac{2 \ln 2}{n\pi} \left(\frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} \right) \quad (2.36)$$

而本實驗所使用之全域式 OCT, 除了相干長度會影響縱向解析度, 在縱向上也會由於物鏡聚焦的效果, 使可觀察的範圍更精細, 而物鏡之縱向解析度可寫為如 Eq. 2.37 所示:

$$\Delta z_{objective} = \frac{\lambda}{2n(1-\cos\theta)} \quad (2.37)$$

其中 n 為介質折射率; θ 為角度, 與使用物鏡之 NA 值有關。因此全域式 OCT 之系統縱向解析度 Δz , 須結合相干長度及物鏡的影響, 修正成 Eq. 2.38:

$$\Delta z = \left[\frac{1}{\Delta z_{coherence}} + \frac{1}{\Delta z_{objective}} \right]^{-1} = \left[\frac{n\pi}{2 \ln 2} \left(\frac{\Delta\lambda}{\lambda^2} \right) + \frac{2n(1-\cos\theta)}{\lambda} \right]^{-1} \quad (2.38)$$

縱向解析度量測結果

量測 Mirau-based FF-OCT 系統之縱向解析度時, 我們利用掃描 GP3 上表面和空氣之交界面的干涉訊號, 量測其半高全寬作為系統的縱向解析度。掃描得到的干涉載波訊號如圖 2.22 所示, 經量測之後得本研究所使用之 Mirau-based FF-OCT 系統縱向解析度約為 $0.97 \mu\text{m}$ 。

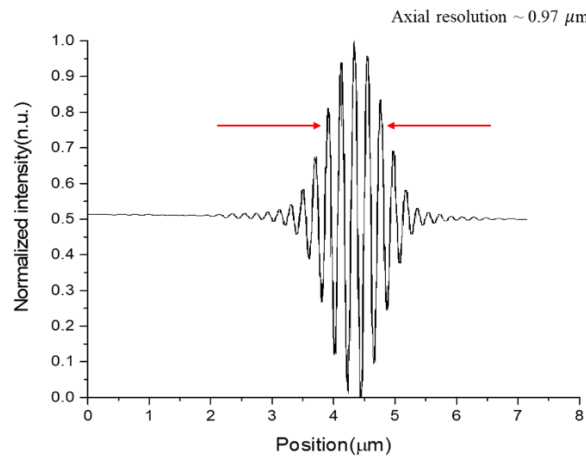


圖 2.22 系統縱向解析度量測結果。



2.2.4 系統影像訊噪比

訊噪比(Signal to noise ratio; SNR)為訊號強度與雜訊強度的比例，訊噪比越高，影像對比度越佳，更容易分辨出不同訊號之特徵，可以用 Eq. 2.39 表示：

$$SNR = \frac{\text{Power of signal}}{\text{Power of noise}} \quad (2.39)$$

而在 OCT 系統中，我們將 SNR 定義為訊號光強度 I_{signal} 平方後之平均與雜訊光強度取標準差 σ_{noise} 後平方的比值，如 Eq. 2.40 所示：

$$SNR = \frac{\langle I_{signal}^2 \rangle}{(\sigma_{noise})^2} \quad (2.40)$$

通常訊噪比會以分貝(dB)為單位呈現，將 Eq. 2.40 取對數之後，再乘以十倍，得到以分貝形式表示的訊噪比，如 Eq. 2.41 所示。

$$SNR_{(dB)} = 10 \log_{10} \left(\frac{\langle I_{signal}^2 \rangle}{(\sigma_{noise})^2} \right) = 20 \log_{10} \left(\frac{\langle I_{signal} \rangle}{\sigma_{noise}} \right) \quad (2.41)$$

為增加影像訊噪比，我們常利用移動平均處理程式(Running average processing)對 OCT 影像作後處理(Post-processing)，以下將介紹移動平均處理程式，並以免子視網膜之 OCT 影像呈現程式處理前後之影像訊噪比差異。在 OCT 影像中，因樣本內結構複雜，形成不同折射率分布影響，干涉訊號會隨不同深度或不同組織有強弱變化，因此於接下來的討論，我們定義整個 OCT 三維影像中，干涉訊號最強的為 $I_{peak\ signal}$ ，並定義掃描至 GP3 前之訊號強度標準差，或是掃過兔子視網膜色素上皮後折射率相對較均勻分布處的訊號強度標準差為雜訊 σ ，因此系統訊噪比可以用 Eq. 2.42 表示：

$$SNR = 20 \log_{10} \left(\frac{I_{peak\ signal}}{\sigma} \right) \quad (2.42)$$

移動平均處理(Running average processing)

在進行 FF-OCT 之影像呈現時，為了使影像有更好的訊噪比，我們會將三維的 OCT 影像分別沿著 XY、XZ、YZ 等三個法向量，以橫平面(XY)或是縱平面(XZ、YZ)的形式，對相鄰平面的像素做平均處理，如圖 2.23 及圖 2.24 所示。

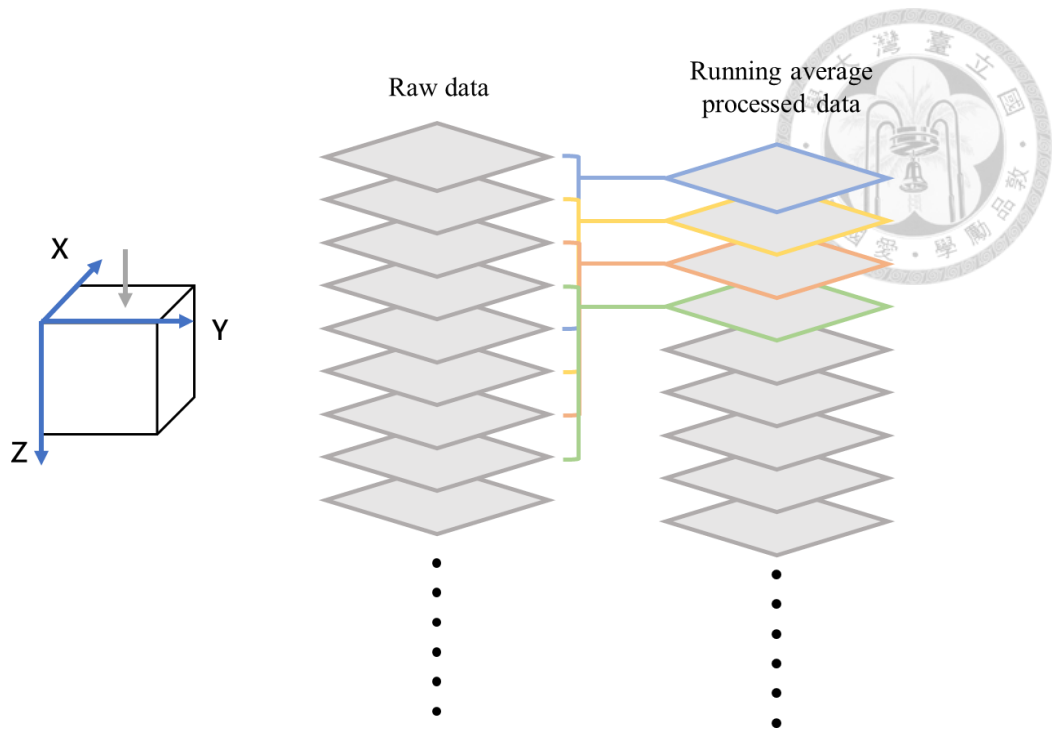


圖 2.23 沿 XY 法向量做移動平均處理及橫平面移動平均處理示意圖。

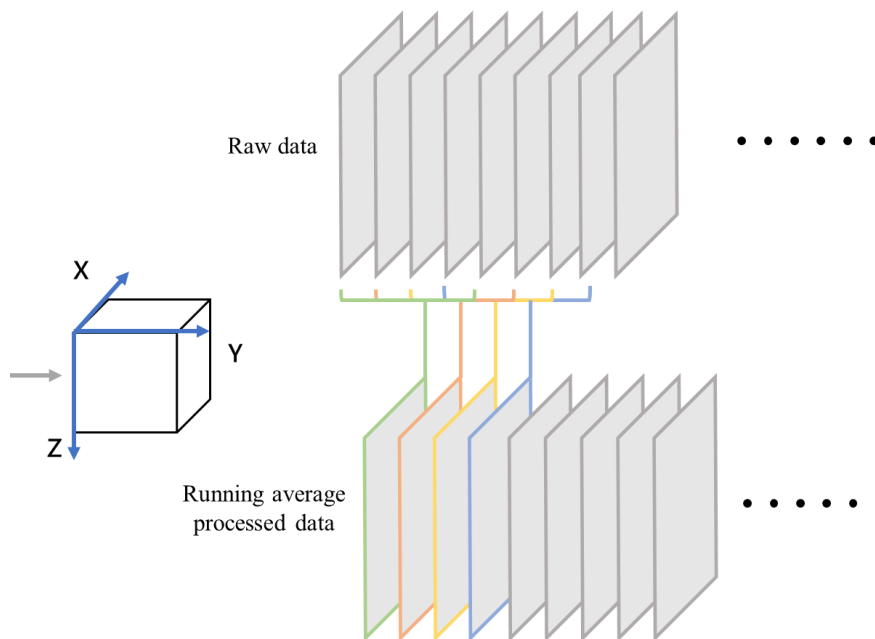
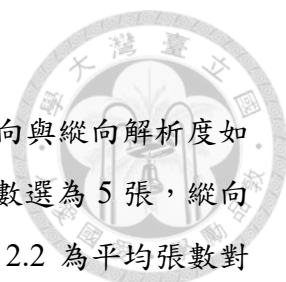


圖 2.24 沿 XZ 法向量做移動平均處理及縱平面移動平均處理示意圖。

在移動平均處理的程式中，我們可以選擇以多少個原始資料(Raw data)平面為一疊加厚度(Stacking thickness)之單位，相互平均後生成一個新的平面(Running average processed data)。使用程式做平均時，使用的原始資料平面數越多，即代表疊加厚度越厚，程式處理後得到的 OCT 影像雜訊強度越低，其訊噪比越佳，但也



會因此使影像變得越模糊，解析度越差。

本研究使用之 Mirau-based Ce^{3+} :YAG FF-OCT 系統，其橫向與縱向解析度如 2.2.3 小節所提及，皆為 1 個微米左右，因此在橫向上的平均張數選為 5 張，縱向上平均張數選為 3 張，最能展現系統微米級解析度的優勢，表 2.2 為平均張數對應等效疊加厚度之關係。但除了考慮系統解析度，掃描樣本尺寸大小也是選擇平均張數的重要依據，選擇接近樣本尺寸的等效平均厚度做移動平均處理，將能在不過多影響到影像解析度的情況下，以最佳的訊噪比獲得樣本清晰影像。

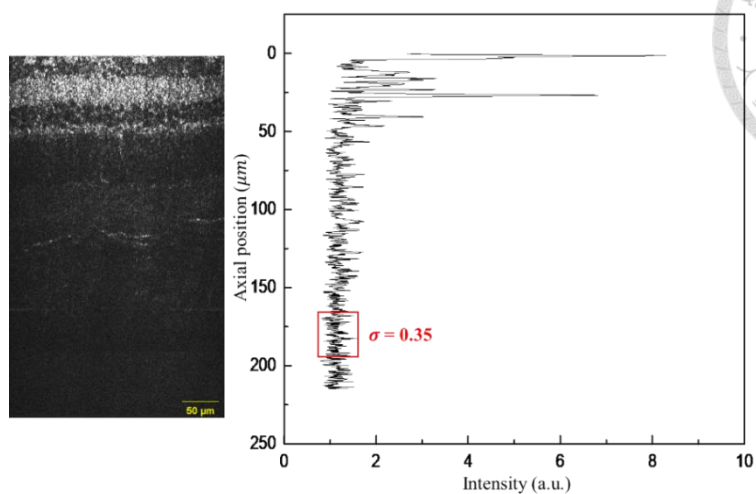
表 2.2 平均張數與等效疊加厚度關係表。

橫向		縱向	
平均張數	等效疊加厚度(μm)	平均張數	等效疊加厚度(μm)
1	~ 0.2	1	~ 0.45
5	~ 1	3	~ 1.35
15	~ 3	9	~ 4.05

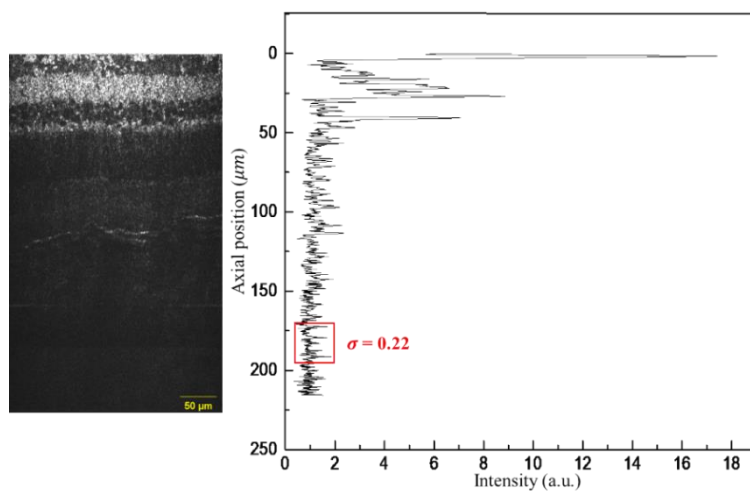
在縱向平均上，我們嘗試比較：沒有平均、平均 3 張、平均 9 張等三種不同的平均張數之結果，觀察平均張數越多，是否使影像訊噪比有所提升，圖 2.25 為三種不同平均張數之縱平面影像(Cross section)，也同時展示其 A-scan profile。當影像經過越多張平均後，影像雜訊明顯下降，表 2.3 比較縱向上不同平均張數之訊噪比量測值差異。由表 2.3 可以看出，當 OCT 三維影像經過 n 張平均時，雜訊將變為原始三維影像雜訊的 $\frac{1}{\sqrt{n}}$ 倍。



(a)



(b)



(c)

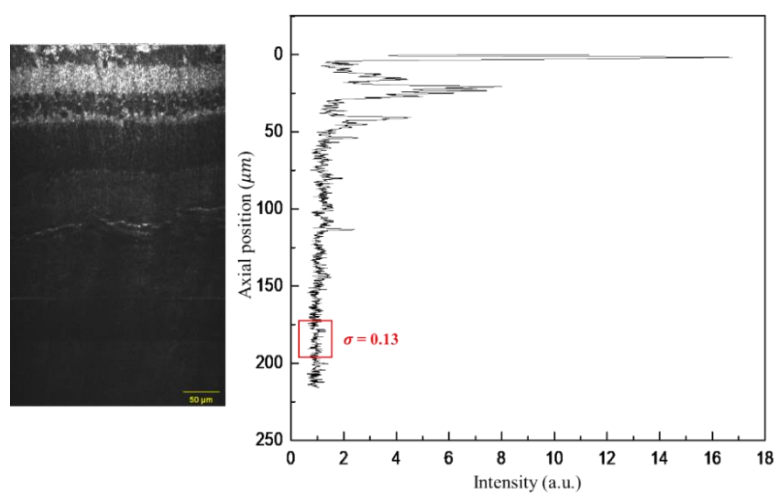
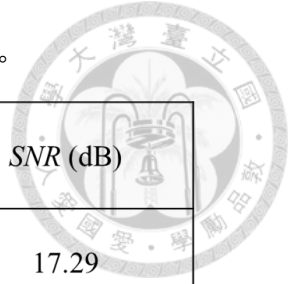


圖 2.25 不同平均張數之縱平面影像比較圖，(a) 1 張；(b) 3 張；(c) 9 張。

表 2.3 縱向上不同平均張數與訊噪比關係表。

平均張數	等效疊加厚度(μm)	雜訊 σ (a.u.)	SNR (dB)
1	~ 0.45	0.35	17.29
3	~ 1.35	0.22	18.93
9	~ 4.05	0.13	21.03



Chapter 3 動態全域式光學同調斷層掃描術介紹及分析程式介紹



本章將介紹動態全域式光學同調斷層掃描術(Dynamic FF-OCT；D-FF-OCT)之工作原理及最基本的標準差(Standard deviation；STD)形式之 D-FF-OCT 影像。接著詳細介紹以 MATLAB 自行撰寫之 D-FF-OCT 分析程式，對原始數據(Raw data)進行分析，並根據分析結果上色，得到三原色(RGB)形式之 D-FF-OCT 影像。

3.1 動態全域式光學同調斷層掃描術(D-FF-OCT)

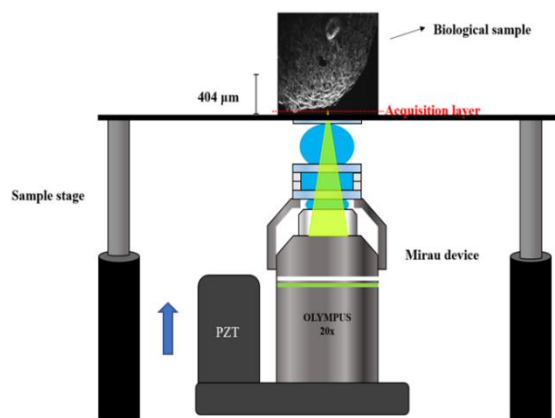
使用全域式光學同調斷層掃描術(FF-OCT)對生物樣本進行掃描時，藉由 FF-OCT 的微米級解析度，以非侵入式的方式掃描記錄待測物的各層組織結構、神經突觸或是細胞樣貌等。而我們可以根據掃描影像的量化分析，針對形態上的改變，如神經密度降低、細胞外觀變形等，辨別出個體位在健康、亞健康或患病哪個階段，對早期疾病的診斷起了重要效益。

動態全域式光學同調斷層掃描術(D-FF-OCT)則是 FF-OCT 的進階應用，被視為可以提升 FF-OCT 臨床診斷能力的利器。利用 D-FF-OCT 記錄生物樣本的修復、代謝或是分化等等的動態行為過程[3],[7]，經自撰程式分析後，便能以細胞級解析度評斷待測物當下的狀態。若能將 D-FF-OCT 的分析結果結合 FF-OCT 的結構影像，可使 FF-OCT 應用於醫學臨床診斷時更全面、完善。

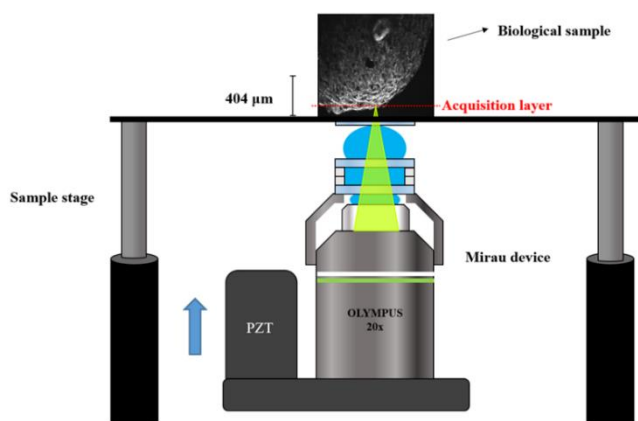
本研究中使用之 OCT 系統在其 LabVIEW 操作程式中，有兩種掃描模式可以做切換，第一種為 FF-OCT 模式，如本論文中第二章所呈現。使用 FF-OCT 模式進行三維成像掃描時，利用樣本中各層折射率差異造成不同強度之背向散射光，與參考光產生干涉後，使其干涉訊號成像於 CCD 相機上。在此掃描模式下，透過 PZT 的線性深度推進，使干涉儀系統中的樣本臂深入待測樣本中，以獲取樣本各層之干涉訊號。而由於 PZT 行進路程長度上的規格限制，我們使用之 Ce^{3+} :YAG Mirau-based FF-OCT，其掃描深度最深可達到 404 μm ，PZT 推進 Mirau objective device 的過程則如圖 3.1 所示。



(a)



(b)



(c)

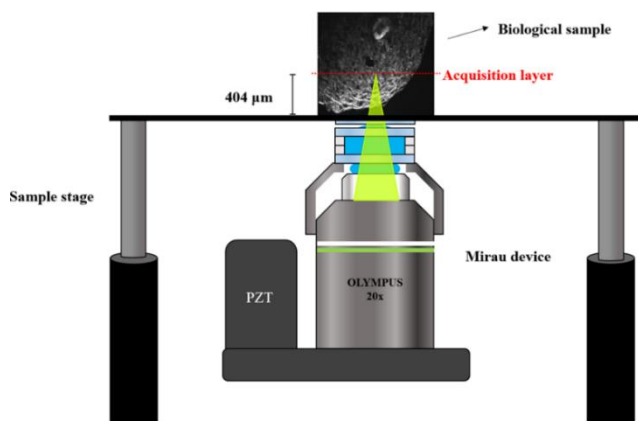


圖 3.1 FF-OCT 模式中，PZT 推進 Mirau device 過程示意圖，圖中紅色虛線為系統之影像擷取平面。(a) PZT 開始推動 Mirau objective device；(b) PZT 推動過程；(c) PZT 推動影像擷取平面至 404 μm 行程極限。

第二種模式則是動態全域式光學同調斷層掃描術模式。本研究中所使用之動態全域式光學同調斷層掃描術，以第二章介紹之 Ce^{3+} :YAG Mirau-based FF-OCT 架構為基礎，將其掃描方式由原本的線性深度推進 PZT 達到三維掃描效果，改為可將 PZT 停留於任意指定深度(但仍需在 $404\ \mu\text{m}$ 之 PZT 行程極限範圍內)，即表示影像擷取平面將固定於該指定深度，如圖 3.2 所示。

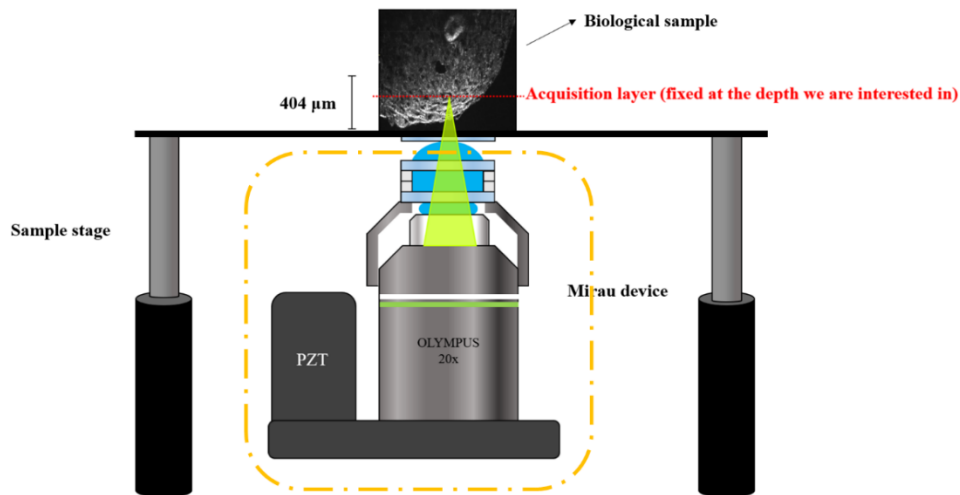


圖 3.2 D-FF-OCT 模式中，將 PZT 固定於任意指定深度，搭載於上的 Mirau 物鏡組(如黃色框線處)也隨之固定，使得影像擷取平面也固定在相對應的樣本深度。

當我們將影像擷取平面停留於感興趣之樣本深度位置並開始抓取影像後，由於 Mirau 物鏡組不會有 Z 方向上的位移，系統相機得到之影像將由 FF-OCT 模式的 X-Y-Z 三維影像轉變為 X-Y-T 影像，原本表示樣本深度的 Z 軸變成表示抓取樣本 D-FF-OCT 資訊所經過之時間，如圖 3.3 所示。而影像擷取平面於該固定深度將持續接收並記錄平面上來自樣本移動、物質流動，甚至是細胞代謝等會造成散射光強度變化之資訊，以達成動態全域式光學同調斷層掃描術之訊號抓取。

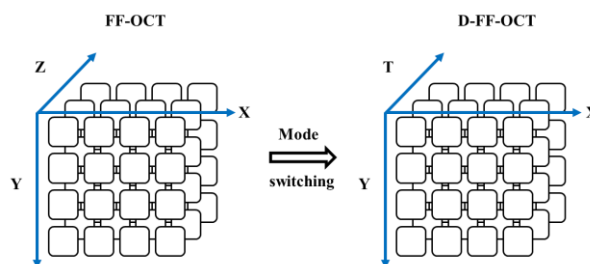


圖 3.3 FF-OCT 模式與 D-FF-OCT 模式分別得到之三維影像示意圖。

使用 D-FF-OCT 模式進行特定深度之訊號抓取時，CCD sensor 中每一個像素記錄到的光散射訊號 I 皆為靜態散射光訊號(Stationary signal) I_0 以及與時間相關之背向散射光訊號的總和，如 Eq. 3.1 所示：

$$I(x, y, z, t) = I_0(x, y, z) + \alpha(x, y, z, t) * \cos(\varphi(x, y, z, t)) \quad (3.1)$$

其中， I_0 的產生來自參考光與同調閘內外之靜態散射光訊號； α 為與時間相關之振幅； φ 為與參考光發生干涉之背向散射光訊號之相位。當影像擷取平面在一固定深度抓取訊號時，該深度之靜態散射光訊號 I_0 為一不隨時間改變強度的訊號，因此可視為定值。而 α 的大小通常與擷取平面之樣本折射率(Refractive index)，以及平面上之散射物體(Scatterer)數量有關； φ 則會因為散射物體的軸向運動，產生相位上的變化[16]。

於本研究中，我們將 D-FF-OCT 模式量測到與時間相關之背向散射光訊號定義為 I_t ，其散射光強度隨時間變化如圖 3.4 所示。在這一連串的背向散射光訊號中，我們只關心其隨時間變化的部分，因此需要透過時域上的分析處理，除去靜態散射光訊號的干擾，提取出隨時間變化之部分，並稱此部分為動態散射光訊號(Dynamic signal)。

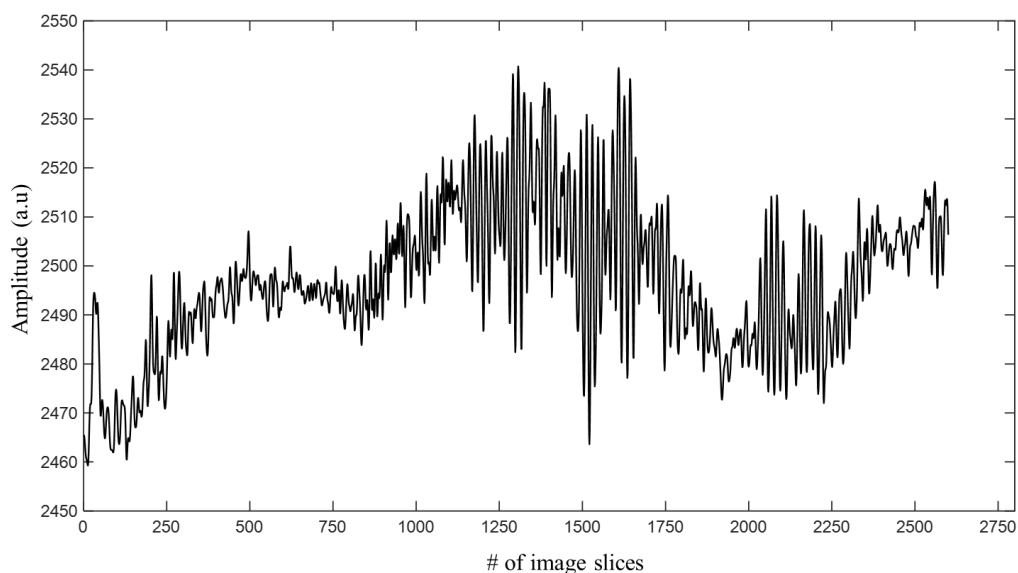


圖 3.4 由 CCD sensor 的單一 pixel 所記錄。圖中縱軸為樣本背向散射光之強度，橫軸為抓取影像的張數，可經由張數和 CCD 設定之 frame rate 換算出掃描此原始資料所經之時間。

然而，來自生物樣本之強散射結構(如膠原蛋白、纖維等)所產生的靜態散射光訊號，其訊號強度動輒比動態散射光訊號之強度大上一百倍不止，使得較弱的動態散射光訊號常被掩埋於靜態散射光訊號之下。因此我們需要對一連串背向光散射訊號 I_t 取其標準差(Standard deviation ; STD)，以降低光強度大但是幾乎不太變動之靜態散射光訊號所帶來的影響，並突顯光強度較小但是不斷改變之動態散射光訊號。

使用 2.2.2 節提及之四點運算法，可以從一連串背向光散射訊號 I_t 中提取標準差。四點運算法為 N 點運算推廣出來的訊號提取方法[17]，Eq. 3.2 和 Eq. 3.3 分別為由 N 點運算和由四點運算得到的訊號振幅強度：

$$I_{N-point} = \frac{\sqrt{2}}{N} \left[\sum_{i>j=1}^N (I_i - I_j)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.2)$$

$$I_{4-point} = \frac{\sqrt{2}}{4} \left[\sum_{i>j=1}^4 (I_i - I_j)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.3)$$

$$= \sqrt{\frac{\sum_{i>j=1}^4 (I_i - I_j)^2}{8}} \quad (3.4)$$

而 Eq. 3.3 可以再整理成 Eq. 3.4，等效於標準差的計算方式。但是於 D-FF-OCT 程式分析中，我們並非以四點運算法進行標準差的提取，而是選擇使用下述較簡單且可根據設備參數不同進行調整之運算方式，進行訊號標準差的處理。

取動態散射光訊號之標準差時，我們需針對各像素所測量到的光強度變化進行標準差處理。可以將每一個像素想像成一個小相機，其工作便是記錄各自面積範圍內的光強度變化過程，且像素皆為獨立個體，不相互影響，本研究系統中使用之 CCD sensor 規格，如圖 3.5 所示。

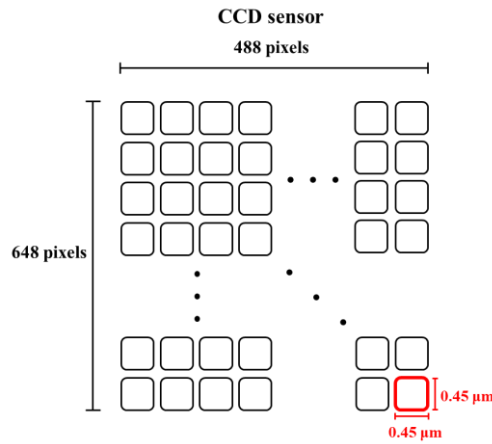


圖 3.5 系統接收樣本光訊號之相機(CCD sensor)像素(Pixel)規格，CCD sensor 由 648 pixels*488 pixels 組成，一個 pixel 之面積大小為 0.45 μm *0.45 μm ，可由此換算出系統視域(Field of view；FOV)大小為 291.6 μm *219.6 μm 。

而光強度變化過程將以灰階值的形式記錄，我們使用之 CCD sensor 可以檢測到共 4096 種灰階值(0~4095；0 為黑色，4095 為白色)。單一像素記錄總時長 t 後，得到 N_{slice} 個灰階值，如 Eq. 3.5 所示：

$$N_{slice} = \frac{t}{Unit\ of\ time} \quad (3.5)$$

$$frame\ interval\ time = \frac{1}{frame\ rate} \quad (3.6)$$

其中，*frame interval time* 為記錄一張影像所需之單位時間，與 CCD sensor 設定之影格速率(Frame rate)有關，其關係式如 Eq. 3.6 所示，使用越高的影格速率抓取動態訊號，可觀察到越細微的時間間隔內變化。本研究中所使用之 CCD，其最高影格速率可達 260 Hz，我們將系統 CCD 的影格速率固定為 260 Hz，即代表張與張之間的時間間隔為 $\frac{1}{260}$ 秒，如圖 3.6 所示。

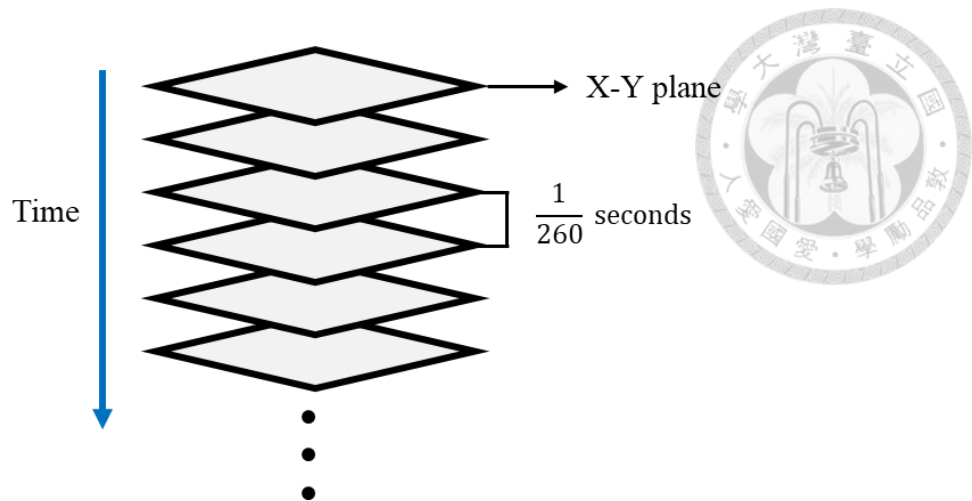


圖 3.6 D-FF-OCT 模式下得到與時相關之 X-Y 平面影像。

影格速率同時也決定了 D-FF-OCT 系統能分辨的最大頻率，想要觀測出固定位置之像素是否有散射光強度的改變，根據奈奎斯特定理(Nyquist theorem)，取樣率至少需要大於訊號頻率的兩倍，取得之訊號才不會失真，由此可以推得，D-FF-OCT 系統所使用之 CCD 相機可以量測到的最大頻率 F_{Max} ，如 Eq. 3.7 所示：

$$F_{Max} = \text{frame rate}/2 \quad (3.7)$$

由上式可以計算得到，本研究使用之 D-FF-OCT 系統，可以量測到的最大頻率 F_{Max} 為 130 Hz，換算得到系統之時間解析度為 7.6 ms。

接著對 N_{slice} 個灰階值取標準差，其值即為此單一像素面積內光強度變化的幅度大小，最後把 648 pixels*488 pixels 各自的光強度變化幅度大小計算出來，並對所有標準差的值做歸一化處理，數值 0 設為黑色(暗)，數值 1 設為白色(亮)，介於 0 至 1 之間則使用漸層灰階呈現，由此建構出一個完整視域的黑白 D-FF-OCT 影像，如此便得到最基本的，以標準差形式呈現之動態全域式光學同調斷層掃描術影像。



3.2 D-FF-OCT 分析上色程式之介紹

在 3.1 節提及的標準差形式之 D-FF-OCT 影像中，我們僅能以影像中之亮暗程度大致判斷待測物當下的狀態：較亮的部份表示該處正在大幅度變動，較暗的部份表示該處結構相對穩定。於其他文獻曾經提及，在較複雜的生物樣本中，如癌組織或視網膜等，可以於標準差形式的 D-FF-OCT 影像中辨別出被其他強散射結構掩蓋住的細胞[3],[7]，透過標準差之差異，分辨出不同的細胞個體。然而，在標準差 D-FF-OCT 影像中，僅能表現出樣本各處之散射光強度隨時間變化的波動幅度，為了進一步對 D-FF-OCT 所量測到的動態訊號作更詳細的分析，我們將透過 MATLAB 程式中快速傅立葉轉換(Fast Fourier transform; FFT)的運算，將原本為時域資訊 (Time-domain; 時間-強度圖) 的動態訊號轉為頻域資訊(Frequency-domain; 頻率-強度圖)，如圖 3.7 所示，並針對得到的頻譜圖進行分析上色。

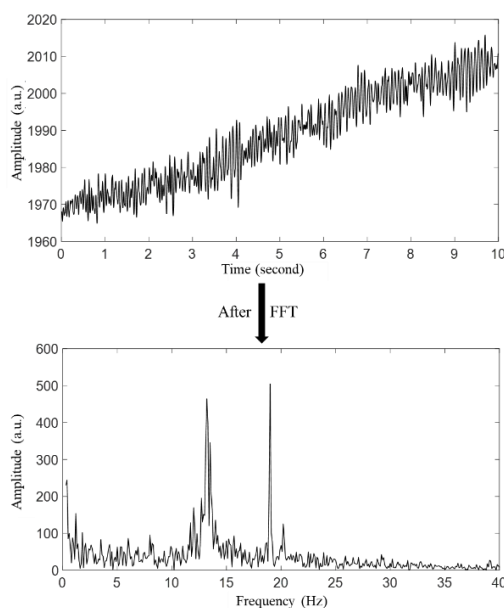


圖 3.7 D-FF-OCT 之時域資訊圖經過快速傅立葉轉換後，轉為頻域資訊圖。

透過頻域上的分析，將 D-FF-OCT 影像由標準差形式之黑白影像轉換為彩色的紅綠藍(RGB)三原色影像，R、G、B 分別代表了細胞或組織中的高頻率行為、中頻率行為以及低頻率行為，我們稱之為彩色 D-FF-OCT 影像(Color-coded D-FF-OCT image)。當彩色 D-FF-OCT 影像應用於臨床醫學時，其優勢在於，可以根據影像上的顏色所代表之頻率高低，對待測物的動態行為做更快速的分析判斷[7]。



以下將詳細介紹我們的 color-coded D-FF-OCT 程式之分析過程：

步驟一，從原始數據中提取我們感興趣的時間區間(Time of interest; TOI)。

在引入 D-FF-OCT 原始數據後，我們可以根據需求，從原始數據中挑選出接下來要進行分析的時間區間，如圖 3.8 所示。

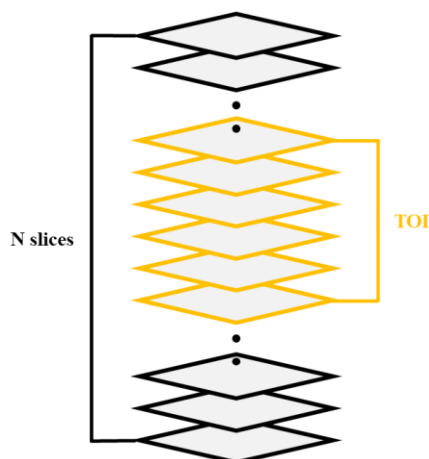


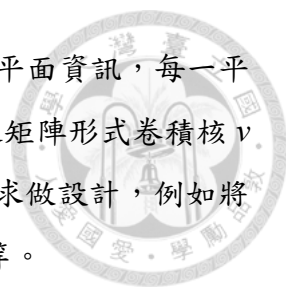
圖 3.8 從 D-F-OCT 原始數據中擷取感興趣之時間區間(TOI)。

由於細胞或組織的動態行為有可能是間歇性的，於此步驟中，我們可以去除動態行為的時間區間，只針對存在動態訊號的時間區間進行分析，以降低電腦的運算負擔，縮短分析所需時間；另一方面，若掃描動態行為較為頻繁的樣本，如血球流動過程等，即可於此步驟中，將一份記錄時長為 t 之 D-FF-OCT 原始數據分割成多份進行分析，再將多份分析完的彩色 D-FF-OCT 影像展開，得到一系列動態過程圖。

步驟二，對擷取出來的時間區間做橫向平面上的二維卷積(2-D convolution)平均。

由步驟一擷取出的時間區間之數據，未經處理前必定摻雜了不少環境或是系統造成之雜訊，為了將 D-FF-OCT 影像中雜訊的影響降到最低，我們會針對 X-Y 平面及 T 方向分別做影像平滑處理，以增加 D-FF-OCT 影像之訊噪比。於步驟二，我們對每一個 X-Y 平面執行二維卷積平均。

MATLAB 程式中的二維卷積流程[18], [19]，主要可以分為三個部分，影像矩陣補零、卷積核翻轉及兩矩陣相對應元素乘積後相加。



首先是矩陣補零(Zero padding)的部分，輸入之 D-FF-OCT 平面資訊，每一平面皆能以矩陣形式表示，如圖 3.9(a)所示；而欲對影像所使用之矩陣形式卷積核 v (Kernel)，則如圖 3.9(b)所示，卷積核矩陣可以依照使用者的需求做設計，例如將平面資訊變得更平滑，或是突顯平面資訊中變化明顯的像素等等。

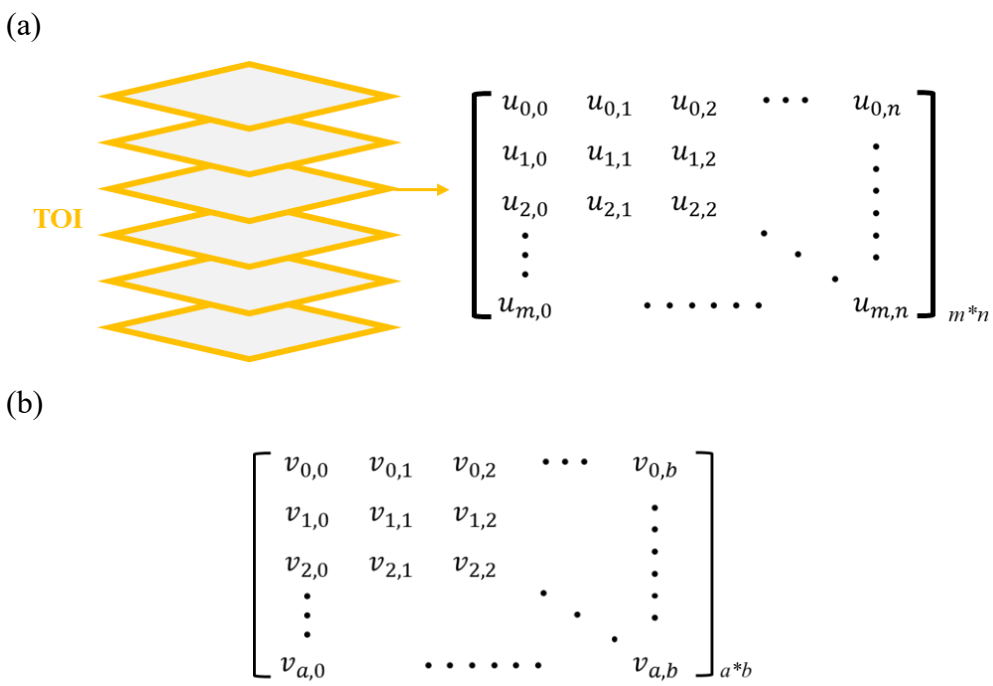


圖 3.9 (a)以矩陣形式呈現 X-Y 平面影像，其矩陣大小為 $m \times n$ ；(b)矩陣形式之卷積核，其矩陣大小為 $a \times b$ 。

MATLAB 中的二維卷積運算，分別有 Valid、Same 和 Full 三種模式，如圖 3.10 所示，其差別在於有無對影像矩陣補零，補了幾行零，並且會因為使用不同的二維卷積模式，輸出得到不同大小之影像矩陣。

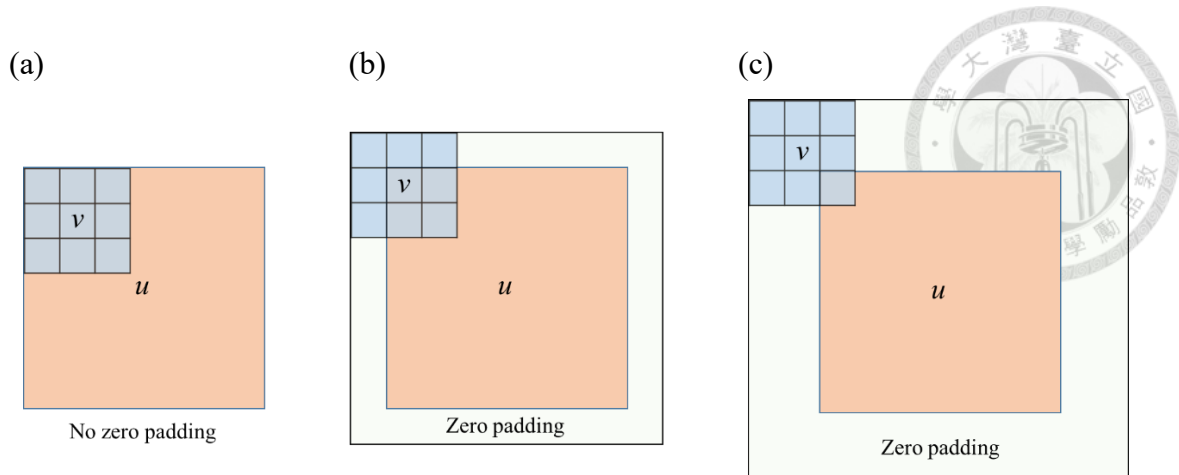


圖 3.10 MATLAB 中不同的二維卷積模式。(a) Valid 模式；(b) Same 模式；(c) Full 模式。

而程式中的二維卷積，是以卷積核(v)左上角與被卷積影像矩陣(u)左上角對齊後開始運算。若以 Valid 模式進行運算，程式會輸入原影像矩陣進行二維卷積，輸出之處理後矩陣會小於原影像矩陣；若選擇使用 Same 模式，原影像矩陣周圍會補上 $(\text{Kernel size}-1)/2$ 行的零元素，再進行二維卷積運算，並輸出與原影像矩陣相同大小之處理後矩陣；以 Full 模式進行運算，原影像矩陣則會補上 $(\text{Kernel size}-1)$ 行的零元素，輸出得到 $(\text{Image size} + \text{Kernel size} - 1)$ 行的處理後矩陣，為了使輸入和輸出的影像矩陣維度保持一致，我們選用 Same 模式進行二維卷積運算。以下假設影像矩陣和卷積核皆為 3×3 的矩陣，圖 3.11 為二維影像矩陣在 Same 模式下進行補零之示意圖：



圖 3.11 二維影像矩陣補零示意圖。

在做平面影像矩陣與卷積核的同位置元素乘積相加之之前，還需要對卷積核翻轉，其翻轉方式為先沿著 X 軸翻轉，再沿著 Y 軸翻轉，最後得到如圖 3.12 右邊的翻轉後矩陣 v' 。卷積核矩陣之大小會影響平均後的結果，使用行列數越多的卷積核

矩陣，卷積平均後的影像會更模糊。

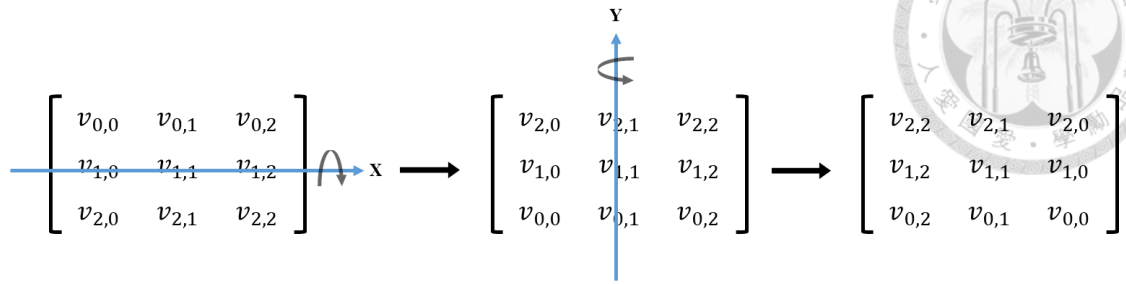


圖 3.12 卷積核矩陣翻轉過程。

將翻轉過後的卷積核 v' 在補零的二維影像矩陣上移動，當遇到欲進行卷積處理之像素時，如圖 3.13(a) 中的 $u_{0,0}$ ，程式將以該像素 ($u_{0,0}$) 為中心，取出周圍的像素點，組成行列大小與卷積核相同的矩陣 c ，如圖 3.13(a) 中的藍色、黃色方框所示，接著將矩陣 c 和卷積核 v' 相對應位置之元素相乘，最後相加，得到 $u_{0,0}'$ ，為像素 $u_{0,0}$ 二維卷積平均後之結果 (圖 3.13(b))。

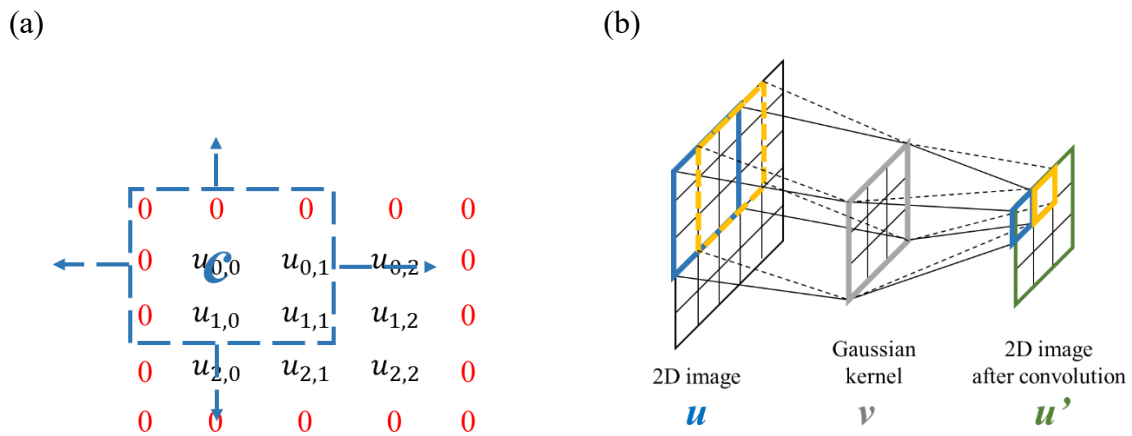


圖 3.13 (a) 根據卷積核大小選取小範圍之二維影像矩陣 c ；(b) 影像二維卷積平均過程示意圖， c 為選取出來的小範圍影像矩陣 (藍色和黃色方框)； v 為卷積核 (灰色方框)； u' 則是二維卷積平均後的結果 (綠色方框) [20]。

利用此方式，將每個像素做完處理後，得到一 X-Y 平面的二維卷積平均結果，再由此推廣至其餘匯入的 D-FF-OCT 數據，完成所有 D-FF-OCT 數據橫向平面上的二維卷積平均處理。

而在本研究中，我們設定卷積核為 5×5 個像素，進行二維橫向卷積平均，平均

後之等效橫向解析度(Equivalent lateral resolution),其計算過程如圖 3.14 所示和 Eq. 3.8, 得到等效橫向解析度為 1.82 μm 。

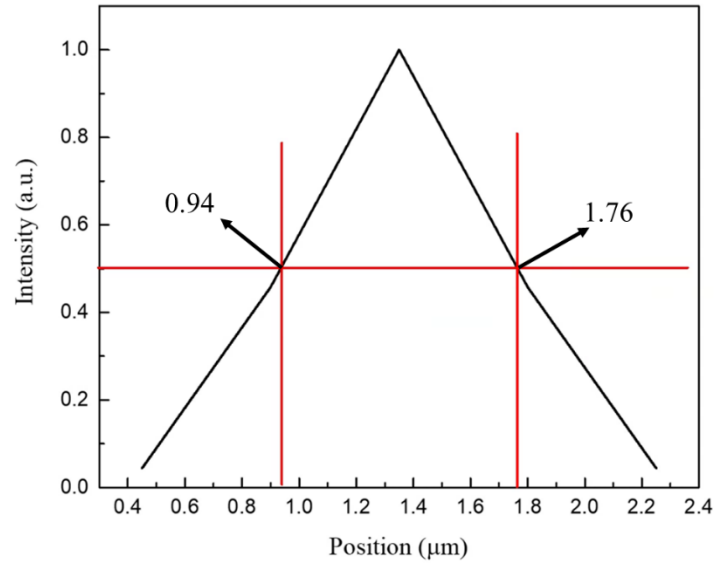


圖 3.14 5*5 個像素平均後之等效橫向解析度計算示意圖。

$$\begin{aligned}
 \text{Equivalent lateral resolution} &= \frac{FWHM}{\text{Distance interval between two pixels}} \\
 &= \frac{1.76 - 0.94}{0.45} = 1.82 \quad (3.8)
 \end{aligned}$$

步驟三，對擷取之時間區間做縱向高斯窗函數卷積平均(Gaussian window function convolution average)。

除了步驟二中的對橫向平面上做二維卷積平均，縱向時間上也可以利用卷積平均的方式，減少來自系統或是樣本震動造成的影響。在縱向時間平均時，我們可以根據掃描樣本的動態行為，決定要以幾張 X-Y 平面為單位進行一次平均計算，生成處理後的 X-Y 平面，如圖 3.15 所示。

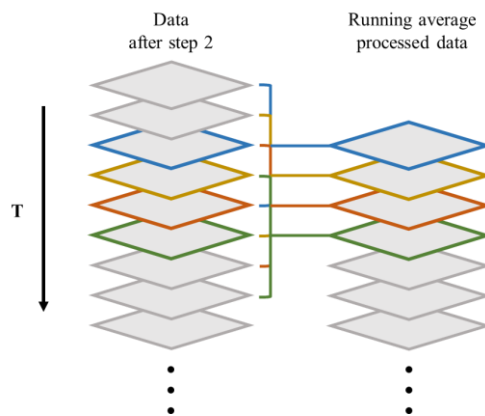


圖 3.15 縱向時間上卷積平均示意圖。

然而，直接以多張 X-Y 平面做卷積平均計算，如同以方波形式的權重對各平面進行加權平均，在後續使用 FFT 將 D-FF-OCT 資訊由時域轉為頻域時，頻譜圖會呈現類似 Sinc 函數的波包樣貌，在中後段尤其明顯，如圖 3.16 所示，將造成分析上的誤差。因此我們在縱向上進行卷積平均時，需要加入高斯窗函數形式權重分配，解決頻譜圖中後段形成波包假訊號的問題，解決後之頻譜圖如圖 3.17 所示。

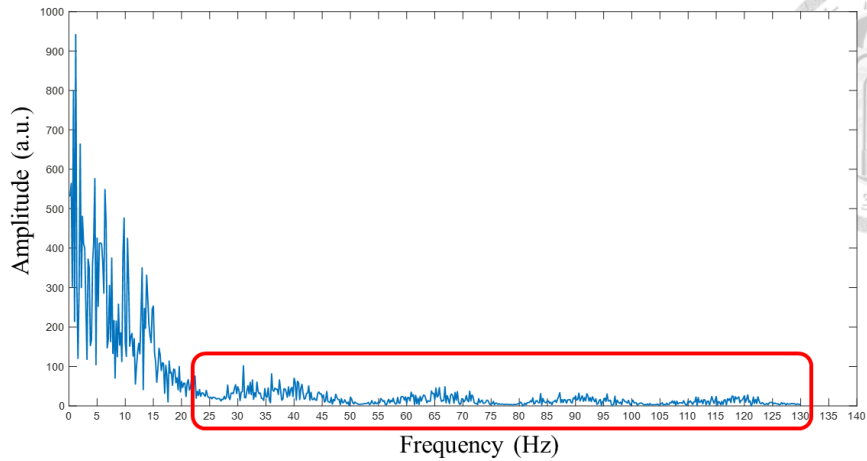


圖 3.16 以類方波形式之權重進行移動加權平均，導致於頻譜圖中後段出現如 Sinc 函數之強度遞減波包(紅色方框)。

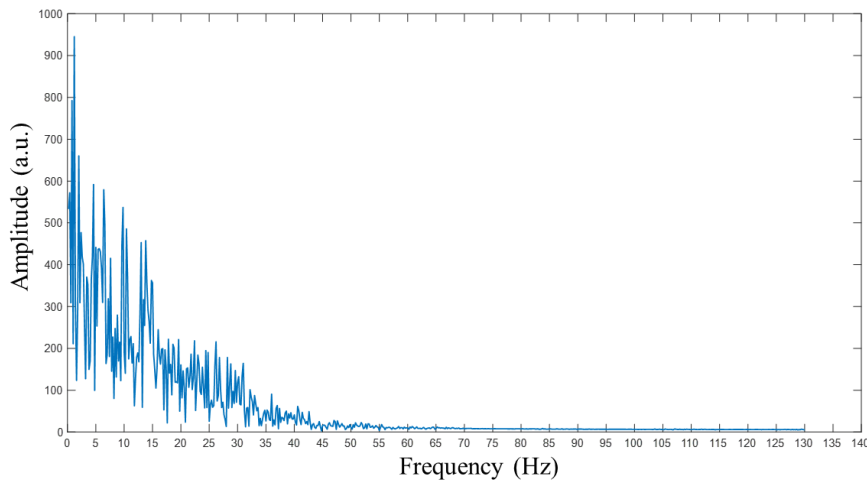


圖 3.17 在卷積平均中改為加入高斯窗函數做加權平均後，解決圖 3.16 中後段之波包假訊號。

使用高斯窗函數作權重加成時，我們會將欲平均之目標 X-Y 平面對應至高斯函數之峰值，目標平面前後之 X-Y 平面則對應到高斯峰值兩側遞減的權重數值，將平面之數值乘上對應到的高斯函數數值，並加權平均，生成處理過後之目標平面，其運算示意如圖 3.18。

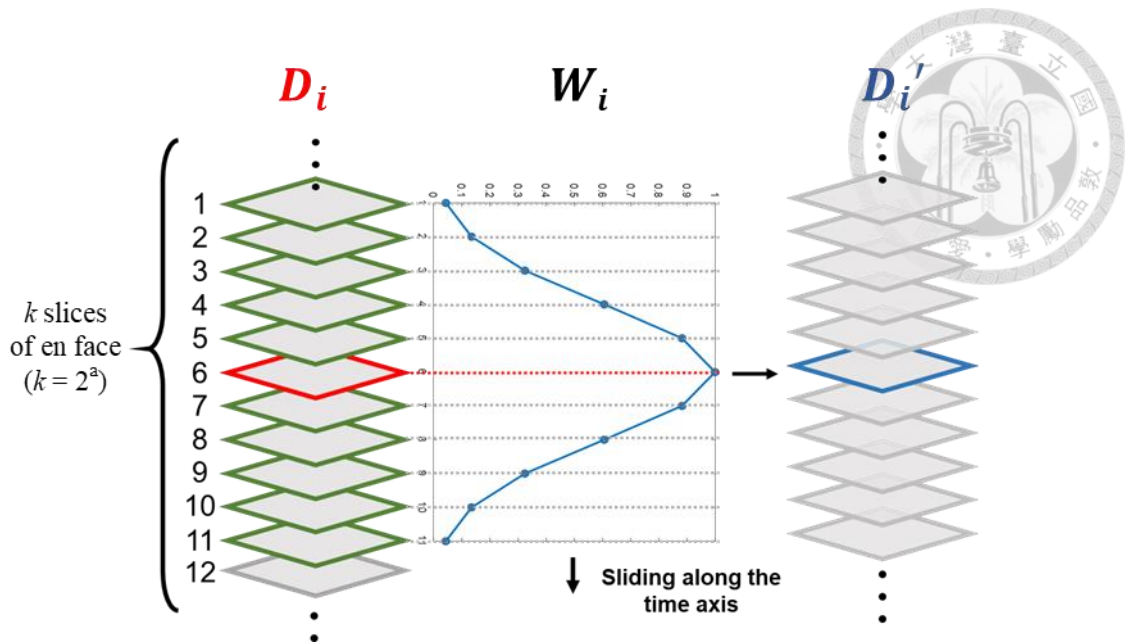


圖 3.18 縱向高斯窗函數卷積平均示意圖。以 11 點平均為例，上圖左邊以紅框標示之未平均 X-Y 平面為目標平面(D_i)，綠框標示平面為進行 11 點平均時欲使用之平面。經過高斯窗函數(W_i)加權卷積平均後，獲得以藍框標示的平均後新 X-Y 平面(D_i')。

做縱向高斯窗函數卷積平均時，可以依據掃描樣本的動態行為，決定使用高斯函數之點數個數。樣本動態行為越慢，則可選用越多的點數做縱向平均，即代表使用越多的 X-Y 平面加入一個目標平面的加權卷積平均，以此增加 D-FF-OCT 影像的整體訊噪比。

未經過縱向卷積平均前，系統 CCD 相機的時間解析度為 7.6 ms。在本研究中，我們使用縱向 11 張高斯窗函數進行卷積平均，其等效時間解析度(Equivalent temporal resolution)之計算過程與結果如圖 3.19 和 Eq. 3.9 所示，得到平均後等效時間解析度為 9.35 ms。

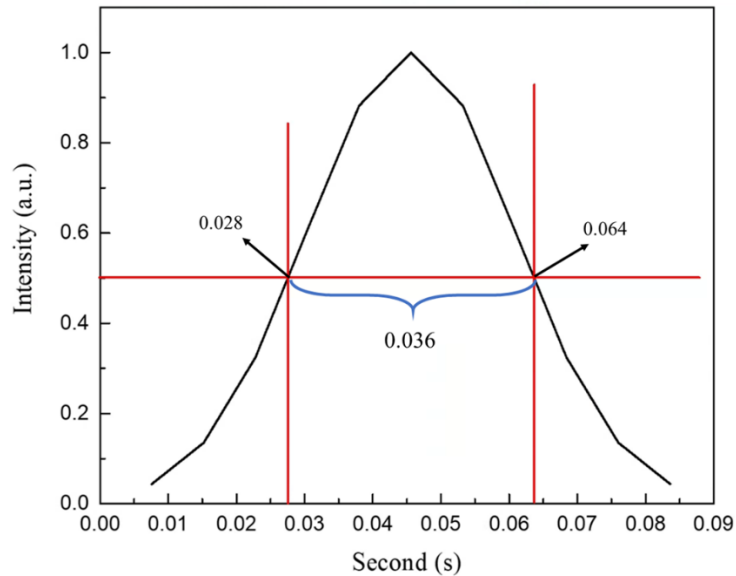


圖 3.19 11 張平面進行高斯窗函數平均後之等效時間解析度計算示意圖。

$$\begin{aligned}
 \text{Equivalent temporal resolution} &= \frac{FWHM}{\text{Time interval between two layers}} \\
 &= \frac{64-28}{3.85} = 9.35 \quad (3.9)
 \end{aligned}$$

步驟四，對處理完成之 D-FF-OCT 資訊取標準差。

對 D-FF-OCT 之原始資訊做完橫向及縱向的平均處理後，我們會針對資訊中每個獨立像素所記錄的一系列背向散射光訊號之數值，取其標準差，其過程如 3.1 節後半段所述，得到標準差形式呈現之 D-FF-OCT 影像，可作為後續上色分析的比較參考。

步驟五，將所有獨立像素所得頻譜圖之曲線下面積平均分配至三個顏色通道[7]。

對 D-FF-OCT 之原始資訊做完橫向及縱向的平均處理後，我們將每個獨立像素所記錄的與時相關之背向散射光訊號，利用快速傅立葉轉換，由時域資訊轉換至頻域資訊，得到其頻譜圖，由於一個 D-FF-OCT 視域是由 648 個像素乘以 488 個像素所組成，因此我們總共可以得到 648 * 488 個頻譜圖。

獲得所有頻譜圖後，先將頻譜圖之曲線下面積進行加總，並從中挑選出閾值 (Threshold) 以平均劃分出低頻區段、中頻區段以及高頻區段。在頻譜圖中，使用 N 個閾值，可以劃分出 $(N+1)$ 個區段，由於我們需要劃分出低、中、高頻，因此只需

要挑選兩個閾值即可，分別將其命名為低頻閾值(Low frequency threshold ; F1)及中頻閾值(Middle frequency threshold ; F2)。而閾值挑選的條件關係式，如 Eq. 3.10 和 Eq. 3.11 所示：

$$\int_0^{F1} \iint_{x,y \min}^{x,y \max} FFT[I(x,y,t)] dx dy df = \frac{1}{3} \iiint_{x,y,f \min}^{x,y,f \max} FFT[I(x,y,t)] dx dy df \quad (3.10)$$

$$\int_{F2}^{f \max} \iint_{x,y \min}^{x,y \max} FFT[I(x,y,t)] dx dy df = \frac{1}{3} \iiint_{x,y,f \min}^{x,y,f \max} FFT[I(x,y,t)] dx dy df \quad (3.11)$$

其中， x,y 為像素位置座標， f 為頻率， t 為原始資料掃描所經時長， f_{max} 為頻譜圖之頻率取樣上限，大於 f_{max} 之頻率點不列入程式分析。比較 D-FF-OCT 影像中不同像素位置的頻譜圖後，確定各頻譜圖中，頻率較大之區域皆沒有峰值存在，即可適當降低頻率取樣上限，以減少程式運算所耗費之時間，如圖 3.20 所示。

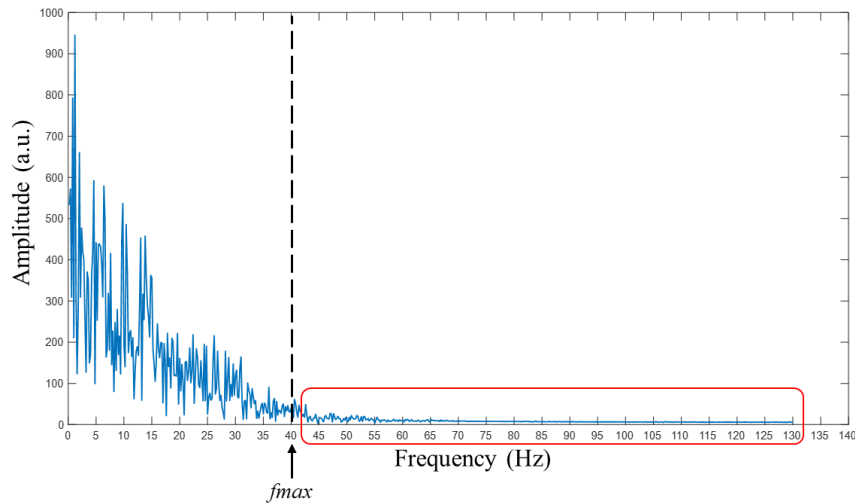


圖 3.20 頻率取樣上限示意圖。以上圖為例，圖中可以看出在 40 Hz 後幾乎沒有峰值存在，因此將 f_{max} 設在 40 Hz，超過 f_{max} 之頻率皆不列入程式中計算，減少程式之運算量。

利用 F1、F2 將所有像素之頻譜圖皆劃分為三個區段：低頻區段、中頻區段及高頻區段，圖 3.21 中，紅色虛線為 F1、F2，黑色虛線為 f_{max} ，我們會將所有頻譜圖中，低頻、中頻、高頻區段曲線下面積分別加總並比較，若三者無法相等，則對閾值進行前後微調，直到三者數值一致為止。

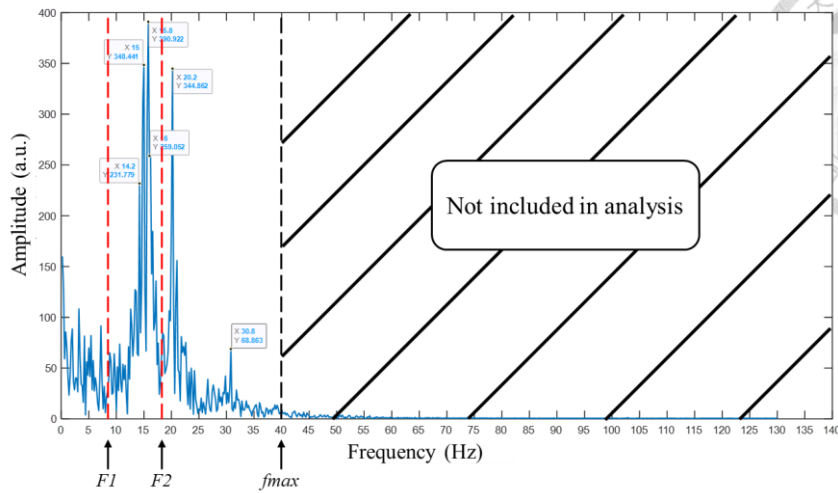
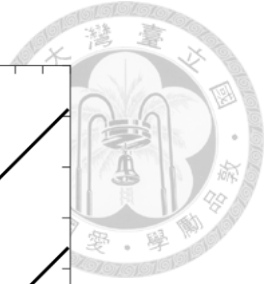


圖 3.21 使用 F1 與 F2 將頻譜圖平均劃分為三區段。

每個獨立像素產生出來的頻譜圖，皆由相同的 F1 和 F2 劃分。從 0 Hz 到 F1，此頻率範圍為低於低頻閾值之頻率區段，我們視為低頻訊號，上色時將以藍色呈現；F1 到 F2 為介於低頻閾值與中頻閾值之頻率區段，我們視為中頻訊號，上色時將以綠色呈現；F2 到 f_{max} 為高於中頻閾值，直到頻率取樣上限之頻率區段，我們視為高頻訊號，上色時將以紅色呈現，其關係式如 Eq. 3.12、Eq. 3.13 和 Eq. 3.14 所示：

$$B(x, y) = \int_0^{F1} FFT[I(x, y, t)] df \quad (3.12)$$

$$G(x, y) = \int_{F1}^{F2} FFT[I(x, y, t)] df \quad (3.13)$$

$$R(x, y) = \int_{F2}^{f_{max}} FFT[I(x, y, t)] df \quad (3.14)$$

上述三式得到的是各區段之曲線下面積，因每個像素記錄到不同的動態行為，其對應之頻譜圖會有不同的峰值分布，使得各像素在後續 RGB 上色階段，於相同的 F1 和 F2 劃分之下，會因為各區段頻率曲線下面積佔比之差異，呈現出不同顏色。

步驟六，以低、中、高頻曲線下面積之佔比對各像素疊加上色。

於單一像素中，根據其頻譜圖峰值分布，由比例之關係式得到三色各自面積佔比 (B' , G' , R')，如 Eq. 3.15、Eq. 3.16 和 Eq. 3.17 所示：

$$B' = \frac{B(x, y)}{\sqrt{R^2(x, y) + G^2(x, y) + B^2(x, y)}} \quad (3.15)$$

$$G' = \frac{G(x, y)}{\sqrt{R^2(x, y) + G^2(x, y) + B^2(x, y)}} \quad (3.16)$$



$$R' = \frac{R(x,y)}{\sqrt{R^2(x,y)+G^2(x,y)+B^2(x,y)}} \quad (3.17)$$

將三色乘以各自面積佔比，算出該像素中，每個顏色應以多少比例相互疊加，混合得到該像素之顏色呈現，流程如圖 3.22。

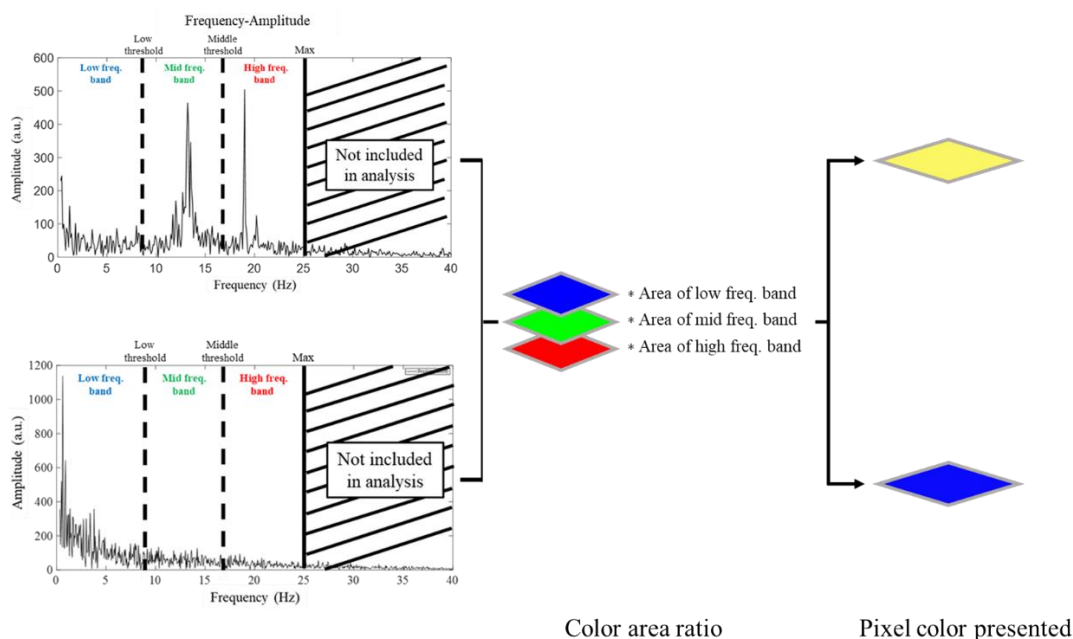


圖 3.22 像素依面積佔比上色示意圖。

RGB 形式之 D-FF-OCT 影像為使用顏色相互疊加而成的彩色 D-FF-OCT 影像，整體色彩效果容易因為顏色過於相近而模糊成一團，影響影像判讀。因此我們會將輸出之 RGB 形式影像，再輸入到色相、飽和度、明度 (Hue, saturation, value ; HSV) 色彩空間(Color space)進行微調[21]。

由於彩色 D-FF-OCT 影像圖是以 RGB 作為顏色組成的基礎，因此引入 HSV 色彩空間後，色相的部分將不再做調整，我們主要會針對影像飽和度矩陣以及影像明度矩陣內的數值進行重新縮放(Rescale)。HSV 色彩空間中，飽和度和明度最小值為 0，最大值可以到 1，然而，初從 RGB 色彩空間轉入 HSV 色彩空間時，處理前的影像飽和度數值與明度數值往往被限縮在較窄的可用範圍，透過 MATLAB 中的重新縮放，我們將數值分布擴大至飽和度和明度的可用範圍極限，如圖 3.23 所示。

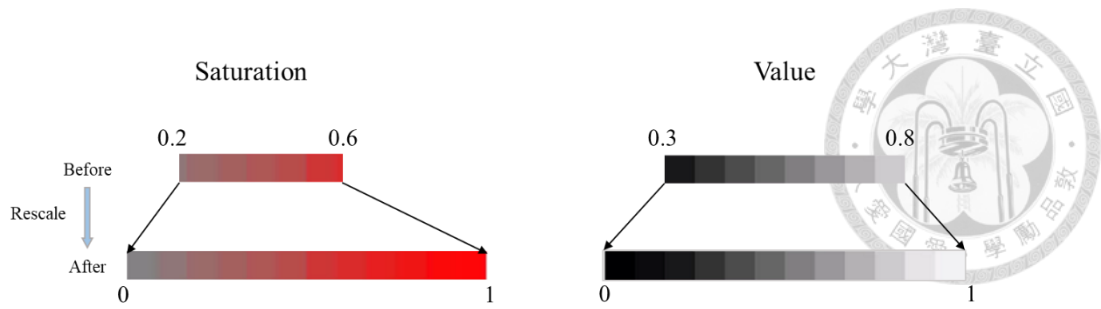


圖 3.23 飽和度與明度數值重新縮放示意圖。

增加飽和度，可使彩色 D-FF-OCT 影像呈現上更為鮮明；而擴張明度的分布範圍，則讓彩色 D-FF-OCT 影像之對比度提升，影像將更清晰。調整完的影像，我們會由 HSV 色彩空間再次轉回 RGB 色彩空間，並輸出得到處理後之彩色 D-FF-OCT 影像。

Chapter 4 *In vitro* 巨噬細胞影像量測與分析結果

在第四章中，我們運用先前所介紹的 Ce^{3+} :YAG Mirau-based FF-OCT 以及 Dynamic FF-OCT，對 *in vitro* 之巨噬細胞樣本進行量測和分析。我們嘗試透過 D-FF-OCT 程式對影像上色，達到凸顯細胞核的效果。

4.1 樣本製備方法

本節量測的樣本為使用 U937 細胞株(Cell-line)進行培養之活化巨噬細胞，圖 4.1 為培養流程圖，細胞的培養過程皆由台大醫學院陳偉勵醫師研究團隊協助完成。

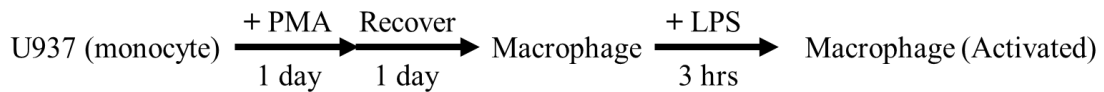


圖 4.1 巨噬細胞之培養流程圖。(PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate ; LPS: Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O55:B5)。

以下簡單敘述培養流程：

在培養流程中，懸浮型單核細胞 U937 會先在培養箱(Incubator)中養兩至三天，再從中取出要使用的細胞量，加入能使 U937 單核細胞分化為貼附型巨噬細胞之 PMA 藥物(#Sigma P8139)，放進培養箱中培養一天，並於隔天換回原本使用之培養基(Medium: RPMI+FBS; RPMI: Roswell Park Memorial Institute; FBS: Fetal Bovine Serum)，再培養一天，即得到貼附型的未活化巨噬細胞。以下我們以圖 4.2、圖 4.3 比較 U937 單核細胞與貼附型巨噬細胞於形態上的差異。

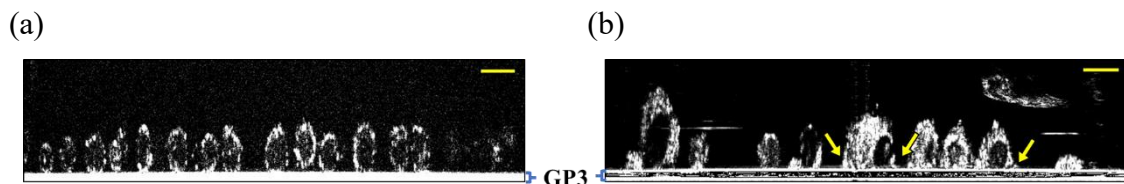


圖 4.2 FF-OCT 之縱平面影像，影像下方的帶狀構造為乘載細胞之熔融石英片(Fused silica, GP3)。(a) U937 單核細胞；(b) 巨噬細胞，黃色箭頭指出巨噬細胞貼附於熔融石英片之處。圖中比例尺皆為 20 μm 。

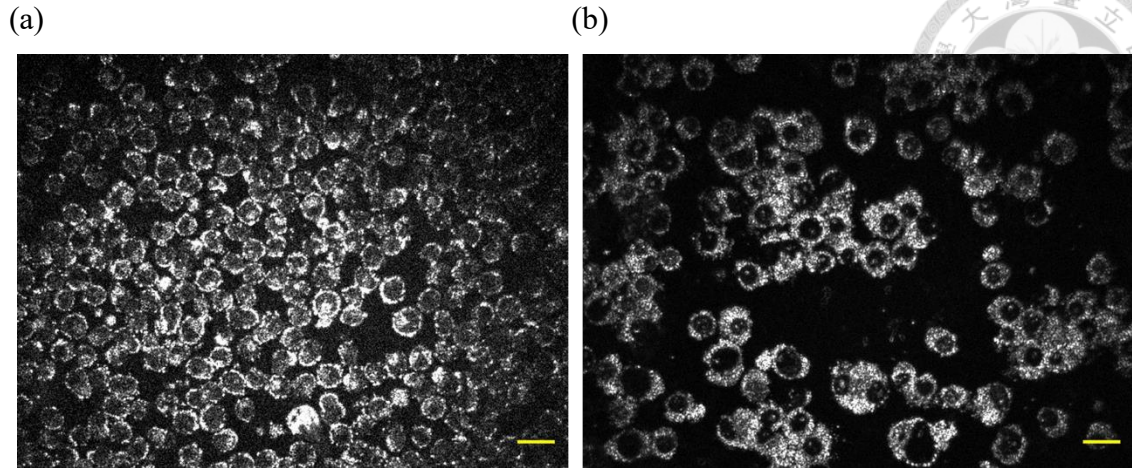
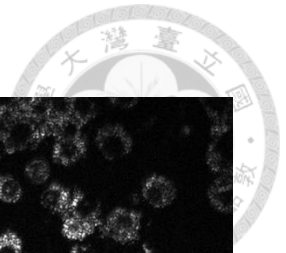


圖 4.3 FF-OCT 之橫平面影像。(a) U937 單核細胞 (b)巨噬細胞。圖中比例尺皆為 20 μm 。

在 FF-OCT 縱平面影像中，我們能夠觀察細胞是否貼附於玻片上。如圖 4.2(a) 所示，懸浮型的 U937 單核細胞呈現圓球狀並停留在玻片上，與玻片接觸的面積相當小。相比之下，圖 4.2(b)顯示出巨噬細胞為貼附於玻片所延伸出來的構造(由黃色箭頭所指)，並明顯看出巨噬細胞與玻片的接觸面積大於 U937 單核細胞。此外，在圖 4.3 的橫平面影像中，可以發現 U937 單核細胞尺寸較為一致，而巨噬細胞則是有較明顯的大小差異，且整體尺寸稍大於 U937 單核細胞。

而若要獲得活化的巨噬細胞，需要先除去未活化巨噬細胞中的舊培養基，再加入 LPS (#Sigma L6529-1MG)，並放置三小時，即可得到活化之巨噬細胞。未活化與活化之巨噬細胞在顯微鏡下的樣貌，如圖 4.4 所示，較難看出彼此間的差異：

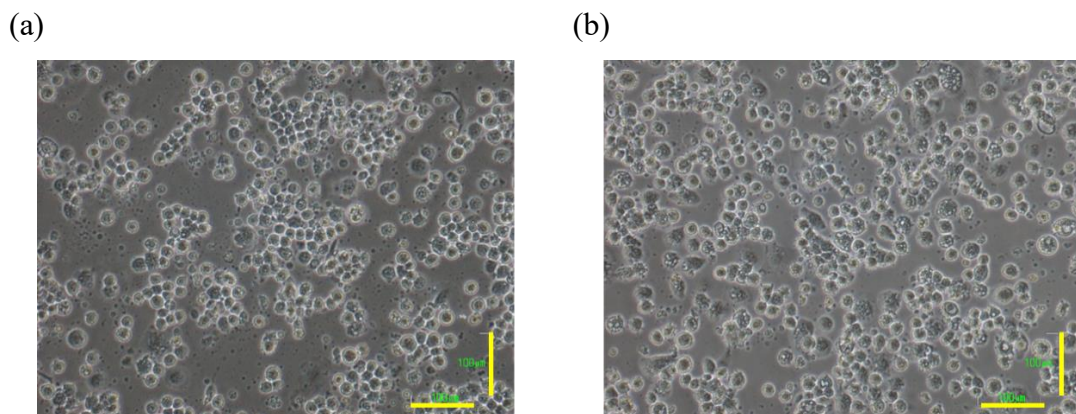


圖 4.4 巨噬細胞顯微鏡影像 (a)未活化之巨噬細胞；(b)活化之巨噬細胞。圖中比例尺為 100 μm 。

本實驗使用 6 孔細胞組織培養盤(6-well cell culture plate)進行巨噬細胞的培養，由於此培養盤大於 FF-OCT 之二維移動平台(XY scanning stage, MLS203, THORLABS)放置樣本的固定架，且其底部的厚度也遠超系統 PZT 所能行走之 404 μm 最遠行程，影像擷取平面無法進到培養盤內部進行三維深度掃描。為此，我們改以實驗室特別訂製之熔融石英片(Fused silica)放置於 6 孔盤中，進行細胞培養時，原本培養在 6 孔盤底部的巨噬細胞則直接培養在熔融石英片上，如圖 4.5 所示。

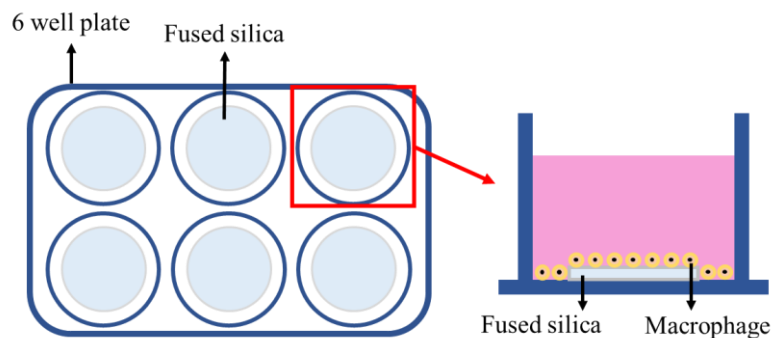


圖 4.5 巨噬細胞培養於熔融石英片之示意圖。

在製備掃描樣本時，我們會將附有巨噬細胞之熔融石英片取出，使用指甲油將其黏貼於鑽孔長型玻片下方，如圖 4.6 所示，等待指甲油乾後，即可使用二維移動平台夾住鑽孔玻片，固定掃描樣本。其中，熔融石英片與系統 Mirau 干涉儀之 GP1、GP2，厚度皆為 150 μm ，可以在進行三維深度掃描時，由熔融石英片補償來自樣本臂的光程差，以得到最大的干涉訊號和品質較佳的 FF-OCT 影像。

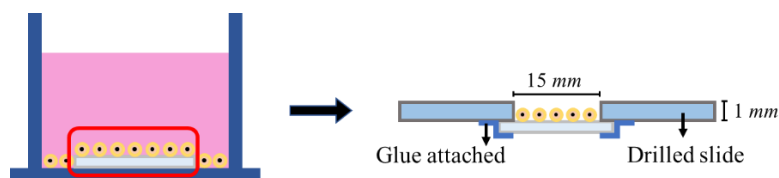


圖 4.6 將附有巨噬細胞之熔融石英(紅框處)取出，黏貼到鑽孔玻片下方。

另外，進行三維深度掃描時，培養基液體的添加量是影響 FF-OCT 成像品質的重要因素之一。在掃描時，為避免樣本的健康程度隨著離開培養盤急轉直下，我們會讓樣本浸泡於培養基之中，然而，由於培養基與液面上方空氣折射率差異過大，在此交界處會形成一強反射面。若添加的培養基過少，導致此反射面與細胞樣本過



於接近，系統光源照射到強反射面後的反射光會循光路進入 CCD 相機，對 FF-OCT 細胞影像造成嚴重的雜訊干擾，並且會降低整體的訊噪比。因此，在進行三維深度掃描時，需要精確調節培養基的添加量，以獲得高品質的 FF-OCT 影像。

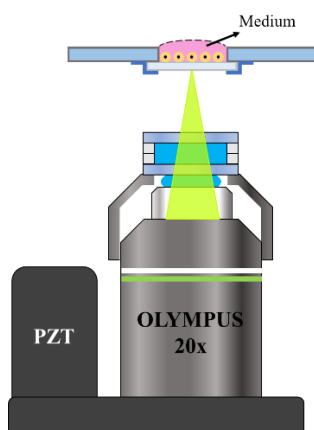


圖 4.7 培養基添加量示意圖。

在進行掃描之前，我們會添加培養基至能以表面張力維持液面微微隆起的狀態，如圖 4.7 之虛線位置所示，如此一來，培養基與空氣的交界面已盡可能遠離樣本，即可將系統光源反射光的影響降至最低。本實驗所用之鑽孔玻片，其規格為孔洞直徑 15 mm，厚度 1 mm，與附著細胞的熔融石英片組合之後，可以形成一個容量約為 176 mm³的空間，如圖 4.6 所示，使用吸取量為 200 μL 的定量吸管(Pipette)，吸滿培養基再加入此空間中，可以恰好達到如圖 4.7 的液面狀態。

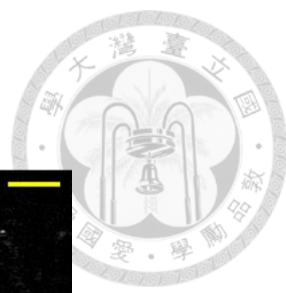
4.2 巨噬細胞之 FF-OCT 影像量測結果

在本節中，我們使用具有高空間解析度之 Ce^{3+} :YAG Mirau-based FF-OCT 系統，對巨噬細胞進行非侵入式的掃描觀察，並建構具細胞級解析度之 FF-OCT 三維立體影像。

圖 4.8 為 FF-OCT 系統掃描培養於熔融石英片之巨噬細胞影像，以下我們採用縱平面影像圖與橫平面影像圖的兩種方式來展示影像，以便進行互相對照。在圖 4.8(a)之縱平面(Cross section)影像中，可以看出巨噬細胞呈圓球狀單層結構，周遭亮白色的環狀構造為細胞膜，屬於會造成較強背向散射光訊號的構造；而細胞中心顏色偏黑色的部分則為細胞核，由於細胞核內部物質分布較均勻，折射率差異較小，相對不會造成太多的背向散射訊號，因此在 FF-OCT 影像呈現上較為暗淡。

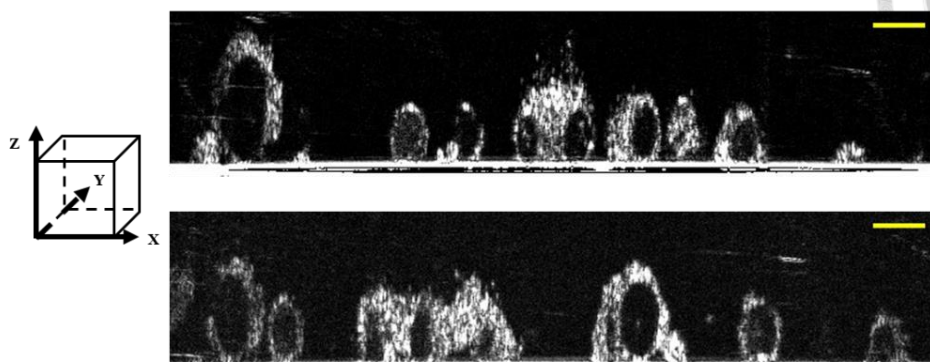
在體外培養的條件下，巨噬細胞會群聚生長，這是由於巨噬細胞具有良好的細胞-細胞間相互作用能力，並通過細胞-組織間相互作用，與其他細胞產生聯繫，這些聯繫將促進巨噬細胞的群聚生長和分化，在圖 4.8(b)的橫平面(En face)影像中，可以觀察到巨噬細胞形成密集的細胞群。

此外，利用 FF-OCT 優異的光學切片能力，可以呈現出巨噬細胞位於不同深度的樣貌。以乘載細胞的 GP3 上表面作為起始點($0\ \mu\text{m}$)，由於介質從熔融石英進入到培養基($n=1.337$) [22]，兩者之間折射率(n)差異大，在橫平面影像上形成強背向散射訊號，使得 CCD 相機接收到過曝訊號，造成影像呈現全白現象。隨著掃描深度的增加，巨噬細胞影像以同心圓的方式放大，接著漸漸縮小，直到掃描深度超過細胞直徑大小，影像擷取平面進入細胞上方之培養基，整體影像因折射率幾乎無差異而變暗，即得到完整的細胞三維立體影像。使用圖像處理軟體 ImageJ 做簡易的影像分析，可以量測出巨噬細胞的平均直徑約在 $15\ \mu\text{m}$ 至 $20\ \mu\text{m}$ 左右。



(a)

Cross section (X-Z)



(b)

En face (X-Y)

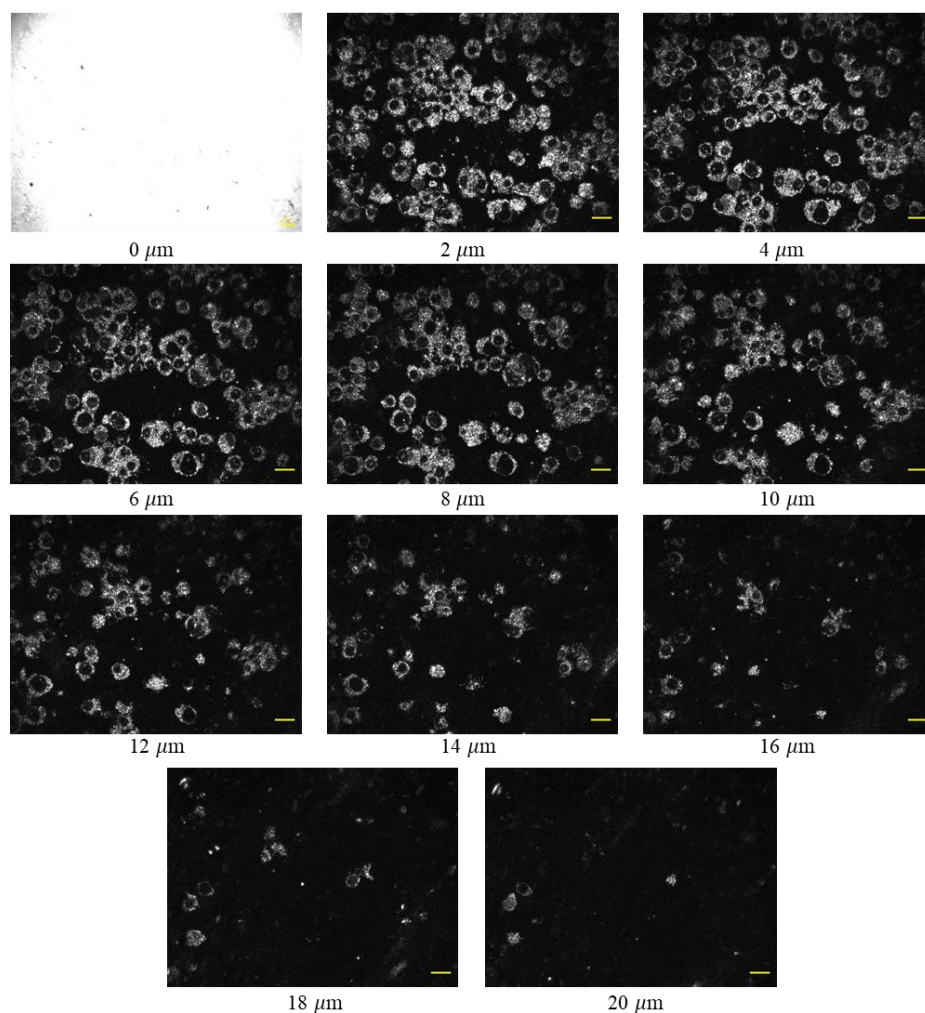


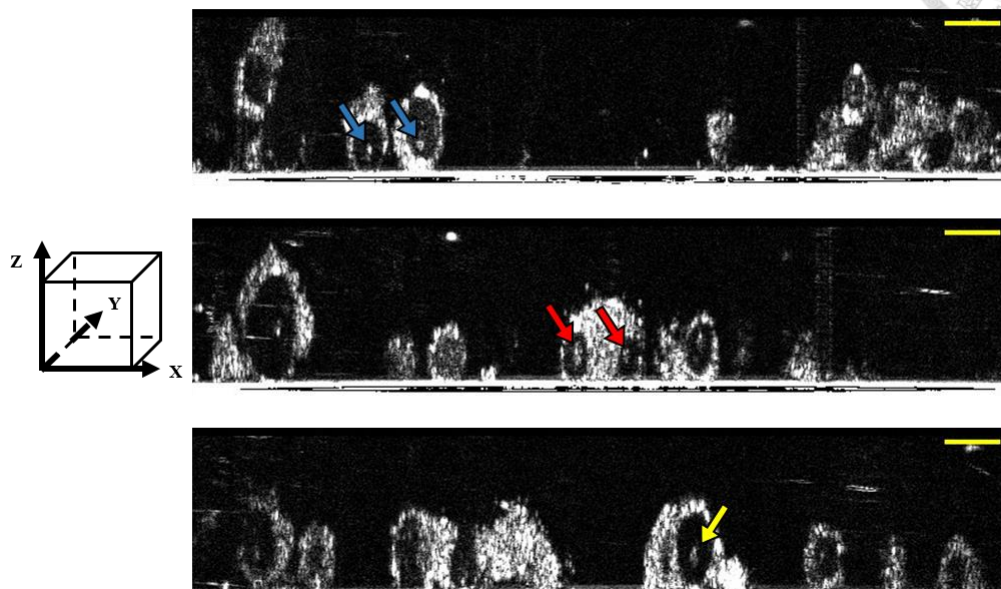
圖 4.8 巨噬細胞 FF-OCT 影像圖 (a)縱平面切片影像圖；(b)橫平面各深度切片圖。圖中比例尺皆為 $20\ \mu\text{m}$ 。



以下將對巨噬細胞之 FF-OCT 影像做進一步的觀察與分析：

(a)

Cross section (X-Z)



(b)

En face (X-Y)

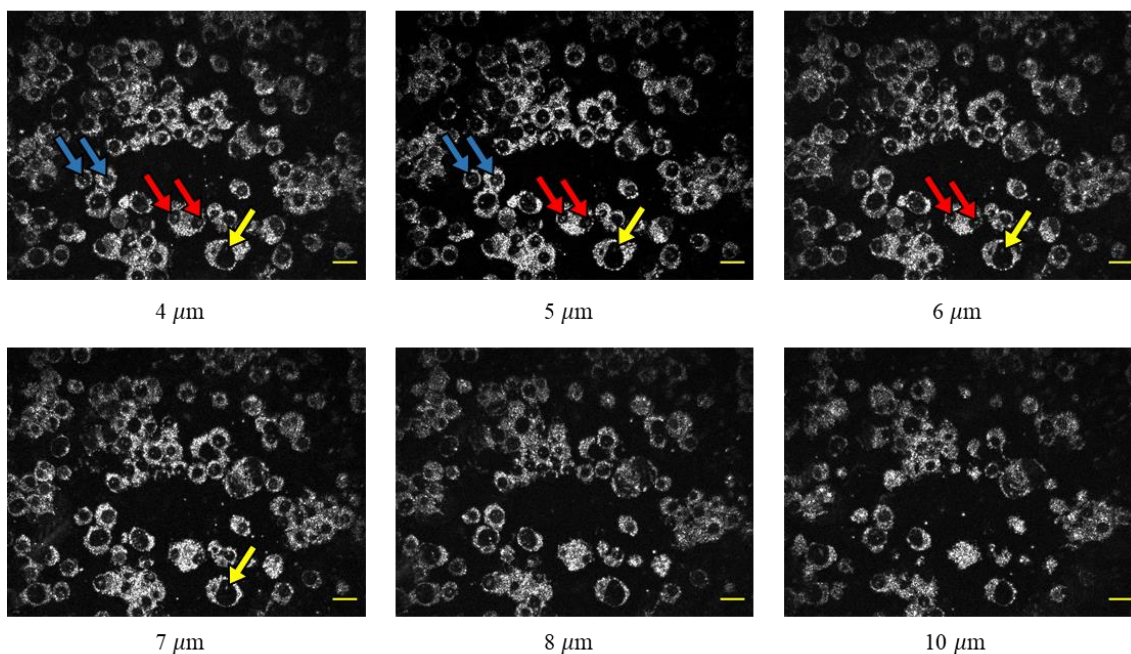
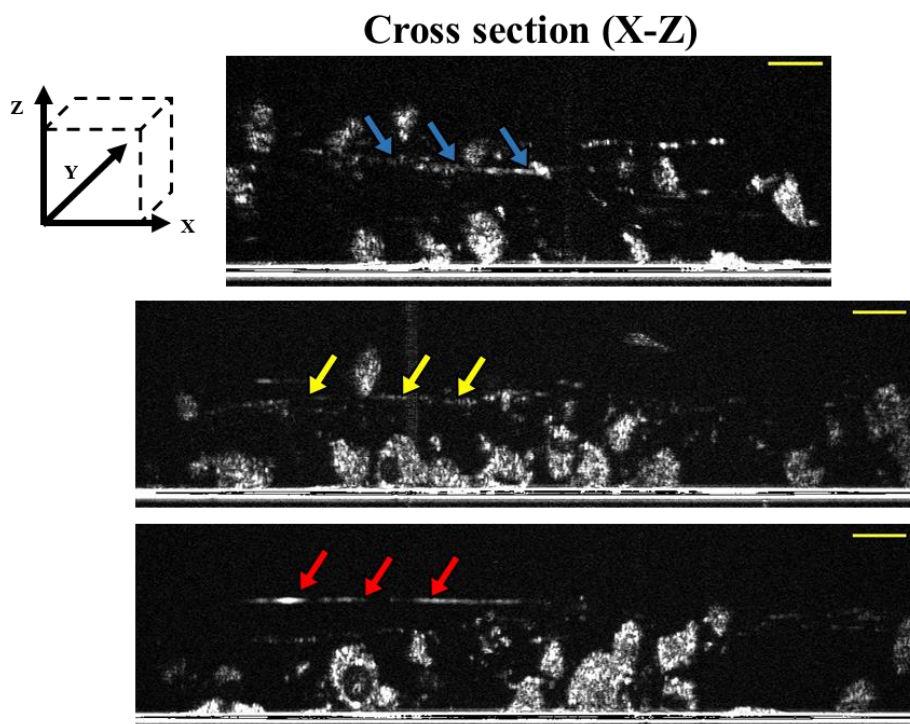


圖 4.9 巨噬細胞 FF-OCT 影像圖 (a)不同深度之縱平面影像;(b)深度 4 μm ~10 μm 之橫平面影像。藍色、紅色和黃色箭頭分別標示出相對應巨噬細胞之細胞核中，白點出現的位置。圖中比例尺皆為 20 μm 。

在圖 4.9 的縱平面影像與橫平面影像中，各個細胞的細胞核偏中心的位置，幾乎都有白點存在，代表此處有一構造與細胞核內部有著較大的折射率差異，造成較強之背向散射訊號。圖 4.9(a)中，我們以箭頭標示出縱平面影像的細胞內白點，並在橫平面影像中，標示出相對應的白點位置，如圖 4.9(b)所示。經觀察發現，這些白點大多分布在巨噬細胞 4 μm 至 8 μm 左右的深度，使用 ImageJ 量測過後，得到白點大小約在 1 μm ~3 μm 左右，推斷此構造應為細胞核中的核仁。

此外，在巨噬細胞的 FF-OCT 影像中，偶爾會看到細絲狀的物體出現於細胞之間，如圖 4.10 所示，我們稱之為絲狀構造(Filamentous structure)。由圖 4.10(a)之縱平面影像可以看到，這些構造遍布於巨噬細胞樣本各個深度，或粗或細，且由於此構造建立在細胞與細胞之間，其走向並不具備固定的指向性，因此在影像上較難找到與縱平面完全平行的絲狀構造，導致縱平面影像呈現出來之絲狀構造比較不連續。而圖 4.10(b)之橫平面影像則可以較清楚看出絲狀構造的整體分布與走勢，可能是因為樣本中各類細胞所處高度差不多，且絲狀構造連接點之高度位置也相去不遠，因此絲狀構造與橫平面較為平行，才能得到較連續絲狀構造的 FF-OCT 影像結果。

(a)



(b)

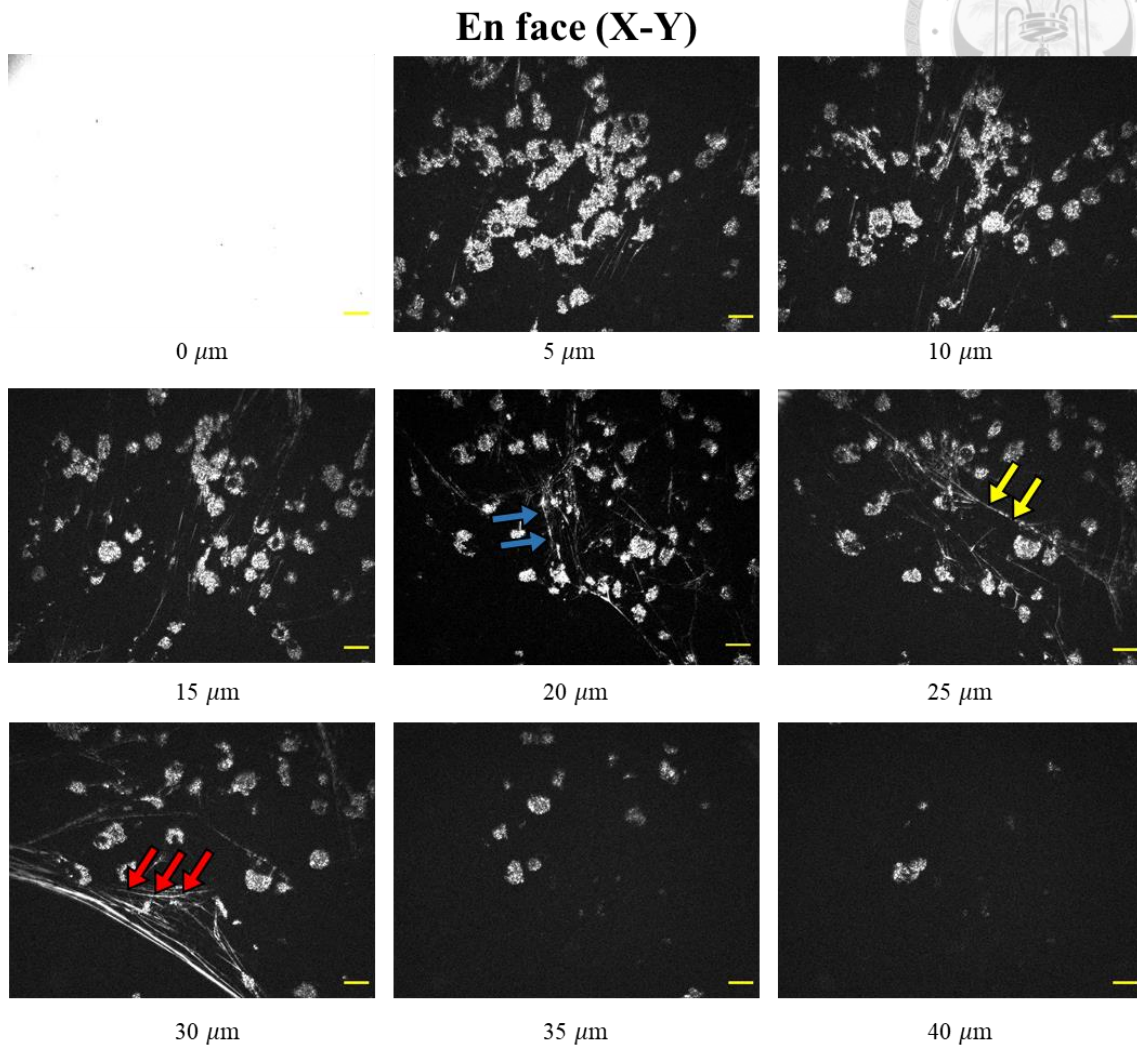


圖 4.10 巨噬細胞之絲狀構造 FF-OCT 影像圖 (a)不同深度之縱平面影像，最上方圖為 YZ 方向，影像大小為 $219.6 \mu\text{m} \times 48.6 \mu\text{m}$ ，中下兩張圖則是 XZ 方向，影像大小為 $291.6 \mu\text{m} \times 48.6 \mu\text{m}$ ；(b)橫平面各深度切片圖，圖(b)中藍、黃、紅三種顏色箭頭分別對應到圖(a)中相同顏色箭頭標示之絲狀構造。圖中比例尺皆為 $20 \mu\text{m}$ 。

而出現在細胞周邊的絲狀構造主要有兩種，一種是細胞骨架(Cytoskeleton) [23]，另一種是細胞膜奈米通道(Tunneling nanotube；TNT)。其中，細胞骨架主要功能在於細胞形狀結構的維持與穩定，且常常是多根細胞骨架結合成一大束，單根細胞骨架之直徑約為幾十奈米不等；TNT 則是細胞間信號與物質傳遞的通道，其直徑從奈米等級到微米等級都有，較細的通道只能傳輸一些零碎的物質、信號，而微米等級的通道則可以傳遞粒線體等體積較大的胞器。根據相關文獻顯示[24],[25]，TNT



與細胞骨架存在些許差異：

- (1) TNT 必定連接著至少兩個細胞以上。
- (2) 細胞培養時產生的 TNT，通常都懸浮於 medium 之中，幾乎不會貼附在培養皿上表面。
- (3) 使用免疫螢光染色做標記時，TNT 會顯現出纖維肌動蛋白(Filamentous actin ; F-actin)陽性反應，以及微管蛋白(Tubulin)陰性反應，而細胞骨架免疫染色後，則是兩者都呈現陽性反應。

在 FF-OCT 影像上，樣貌型態的差異，如上述 (1)和(2) ，是我們觀察與判斷的主要重點，為了探究絲狀構造的特徵，我們以 $1\ \mu\text{m}$ 為單位，由 GP3 上表面開始，捕捉到絲狀構造之影像出現為止，將巨噬細胞影像分切成多張橫平面影像，如圖 4.11 所示。我們發現，在這些影像中，絲狀構造並非一開始就出現的，這代表其未附著於 GP3 玻片上，而是當 FF-OCT 之影像擷取平面掃描到 $5\ \mu\text{m}$ 之深度後才出現，此外，由於這些絲狀構造大多連接於兩顆或多顆細胞之間，因此我們判斷影像中的絲狀構造大多為細胞膜奈米通道。

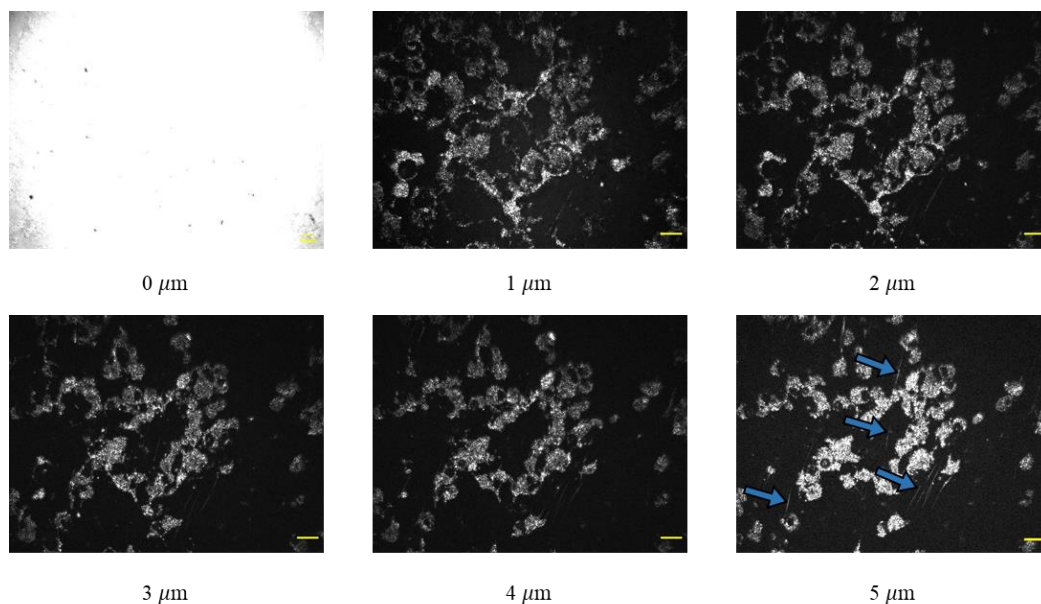


圖 4.11 絲狀構造橫平面影像圖，藍色箭頭標示出絲狀構造開始出現的位置。圖中比例尺為 $20\ \mu\text{m}$ 。

另外，我們也嘗試透過大圖拼接的方式，以呈現更廣範圍的絲狀構造 FF-OCT 影像資訊。我們以 2*2 個視野(Field of view ; FOV)進行拼接，得到一張視域大小為 439.2 μm *583.2 μm 之橫平面影像，如圖 4.12 所示。

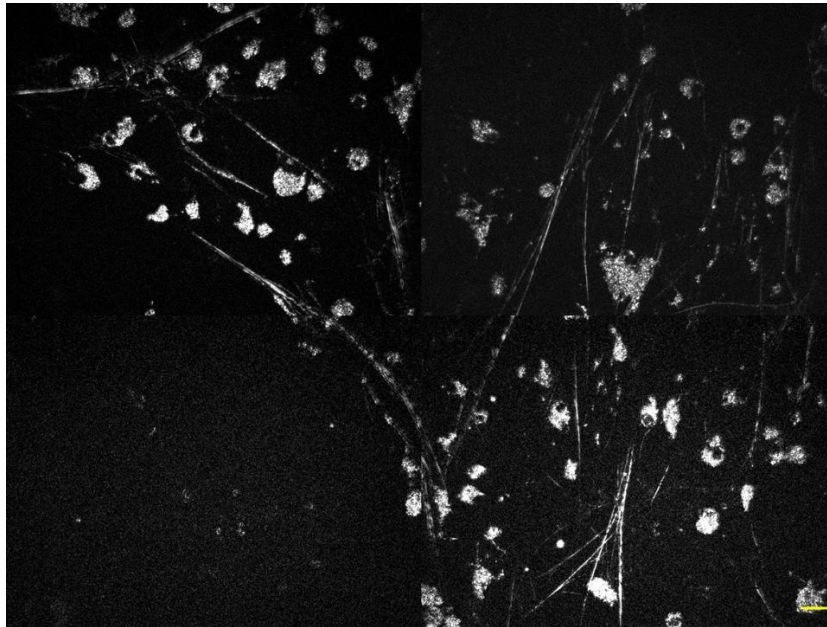


圖 4.12 含絲狀構造之巨噬細胞橫平面大圖拼接，圖中比例尺為 20 μm 。

4.3 以巨噬細胞之動態影像強化細胞核之對比度

本節使用 Ce^{3+} :YAG Mirau-based FF-OCT 系統中的 D-FF-OCT 模式，對培養之巨噬細胞進行掃描，再以 MATLAB 撰寫之 D-FF-OCT 分析程式進行分析並輸出處理後影像。

由程式分析得到的影像，可依運算方式的不同為其命名，在本研究中，於 3.1 節提及，以標準差形式分析得到的黑白影像，我們稱之為動態光學同調斷層掃描影像(D-FF-OCT image)，以下簡稱為黑白動態影像；而於 3.2 節後半部所提及之 RGB 三色疊圖輸出之影像，則稱為上色動態光學同調斷層掃描影像(Color-coded D-FF-OCT image)，以下將簡稱為上色動態影像。

以 CCD 相機的單一像素為單位，對一段時間內獲得的背向散射光訊號取了標準差後，得到如圖 4.13(b)的結果，為一個視域範圍內的巨噬細胞黑白動態影像，並將其與相同深度之 FF-OCT 影像對比，如圖 4.13(a)所示。

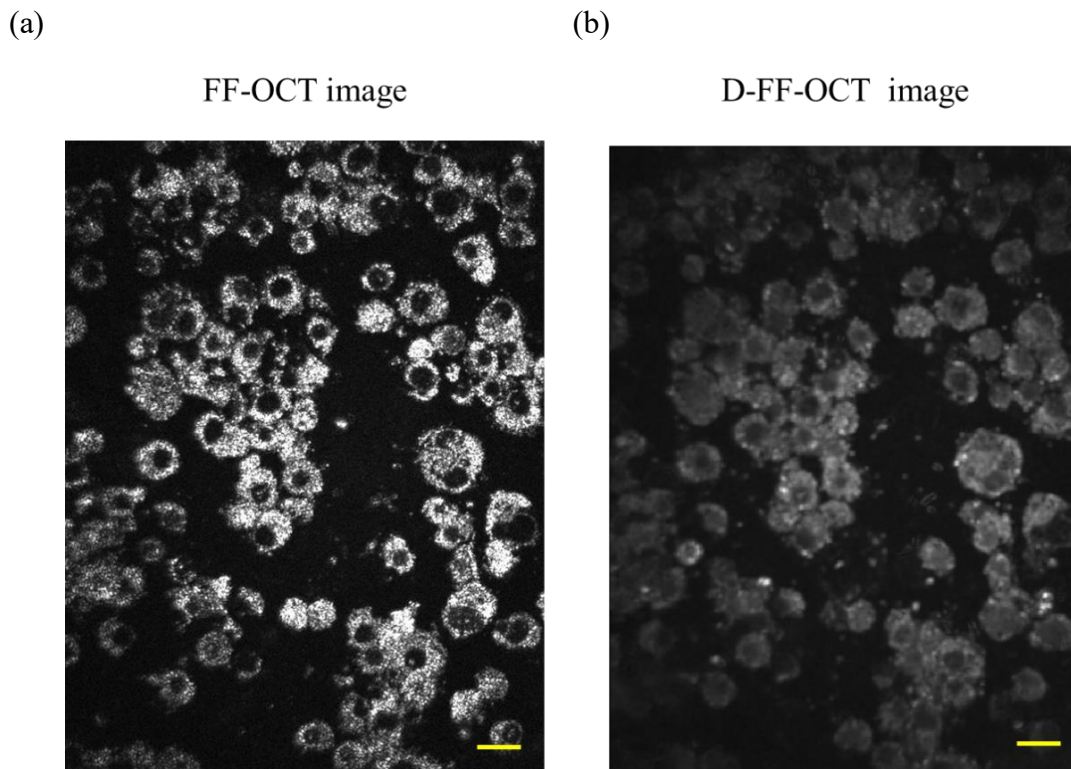


圖 4.13 (a)巨噬細胞 FF-OCT 影像；(b)巨噬細胞黑白動態影像。圖中比例尺為 $20\ \mu\text{m}$ 。

在 FF-OCT 影像中，由於細胞膜與外界培養基兩介質的折射率差異較大，因此在掃描時，會因為兩者間存在的強反射面，形成強背向散射光並由 CCD 相機接收，得到清楚的細胞膜構造影像。然而，進入到細胞核後，由於其內部物質較為均勻，因此較難形成強背向散射光，使得細胞核在影像中呈現較為暗淡，難以觀察其內部構造。

在圖 4.13(b)，我們設定 CCD 相機以每秒 260 張的影格速率(Frame rate)，於固定深度下連續擷取影像約 15 秒，再透過標準差運算處理後，以單一像素之標準差越大，像素越亮為依據，生成 648 像素*488 像素之巨噬細胞黑白動態影像。在黑白動態影像中，大多數細胞核的位置皆有標準差，表示核內的背向散射光訊號值隨時間改變，顯示細胞核中存在一定的動態特性，透過 D-FF-OCT 的掃描與分析，我們可以將其更加清晰地呈現。

除了黑白動態影像，我們也利用巨噬細胞的背向散射光訊號的變化作進一步應用，將其經快速傅立葉轉換，得出各個像素的頻率-強度圖，我們稱之為頻譜圖，並利用 3.2 節的 RGB 上色方法，將頻譜圖分出高、中、低頻，生成如圖 4.14 的上色動態影像。

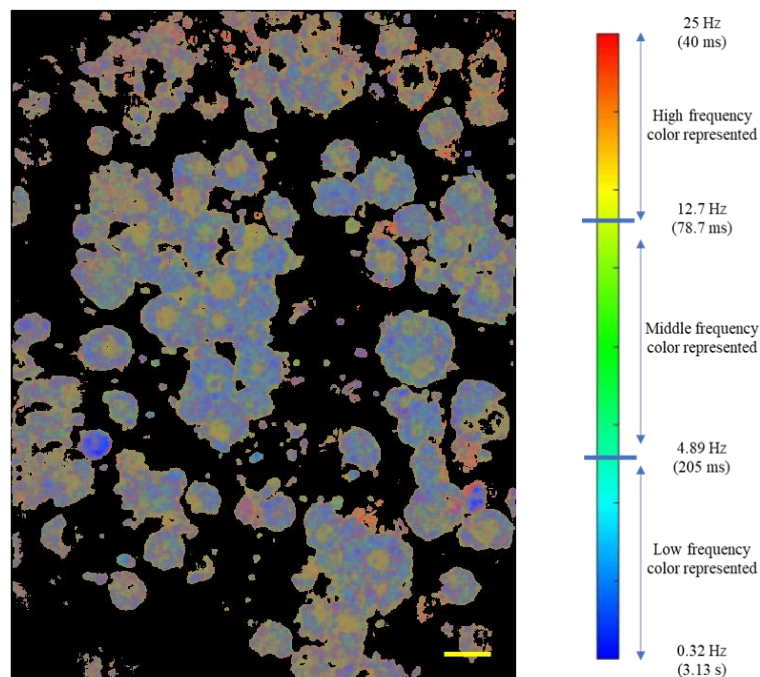
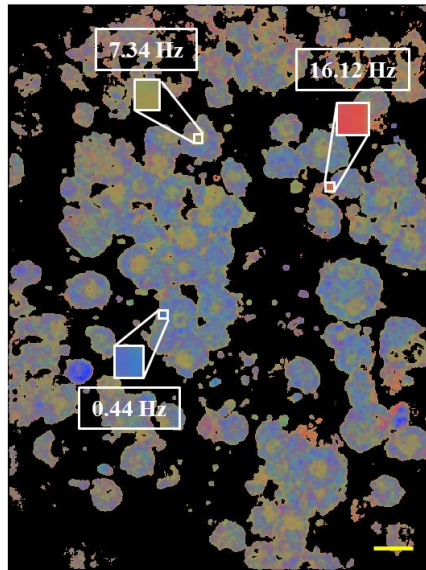


圖 4.14 巨噬細胞上色動態影像，右側頻率色彩尺為顏色對應之頻率表現，巨噬細胞之低頻閾值為 4.89 Hz，中頻閾值為 12.7 Hz。圖中比例尺為 20 μm 。

在圖 4.14 中，一個完整的巨噬細胞影像是由藍色的細胞膜和黃綠色的細胞核組成，而顏色則對應到圖 4.14 的頻率色彩尺。由於細胞膜是相對穩定的結構，因此在影像中呈現屬於低頻的藍色，而細胞核的部分，則呈現出相對偏中高頻的黃綠色，代表細胞核中可能有一些相對快速的動態行為。

(a)



(b)

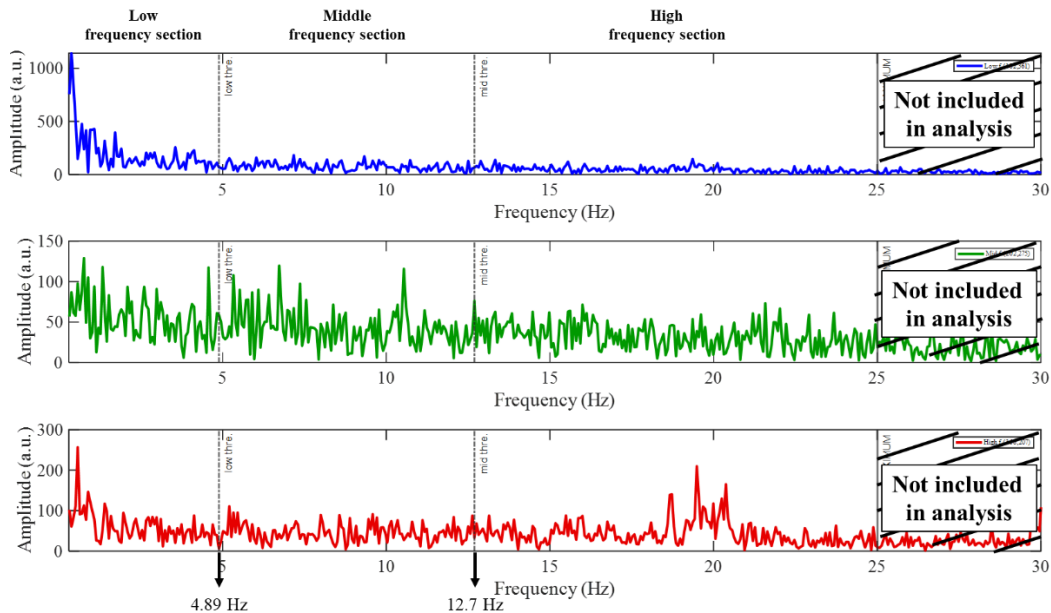


圖 4.15 (a)以白色方框標示上色動態影像中不同顏色表現之像素；(b)描繪(a)中標示像素的頻譜圖，由上而下分別為位在細胞膜之像素、位在細胞核之像素以及表現高頻之像素。

從圖 4.14 的上色動態影像中，我們挑選了呈現低頻的細胞膜、中高頻的細胞核，以及表現相對高頻的像素(如圖 4.15(a)中白色方框所標示)，並描繪其頻譜圖，如圖 4.15(b)所示。圖 4.15(b)上方為細胞膜的頻譜圖，圖中可以很清楚的看到僅有低頻區段存在峰值訊號，中後段的部分幾乎沒有出現任何峰值。而中間則是細胞核的頻譜圖，圖中較難觀察到顯著的峰值訊號，推測可能是因為核內存在多種胞器，其動態變化的幅度較小且特性相對複雜，導致頻譜圖中的訊號較不明顯。圖 4.15(b)最下方則是上色動態影像中表現高頻之像素所描繪出來的頻譜圖，該圖中在高頻區段出現幾個峰值訊號，我們將上色動態影像與相同深度之 FF-OCT 影像作比較，如圖 4.16 所示，圖中橘色箭頭分別在兩張影像中指出相同位置之細胞。根據 S. Park *et al.*以 D-FF-OCT 進行海拉細胞(HeLa cell)凋亡研究的文獻[26]，海拉細胞在凋亡過程中，其特徵頻率落在約 15 Hz 至 20 Hz 左右。此外，根據本實驗室先前的研究[27]，凋亡過程中的細胞，其細胞核在 FF-OCT 影像中會隨時間呈現從弱反射訊號到強反射訊號再到整體破碎的變化。其中，強反射訊號的產生主要源於細胞本體失去均質性，導致形成較強的背向散射光訊號。基於上述兩點，我們推測橘色箭頭所指之細胞可能正處於凋亡過程中，這解釋了為何在頻譜圖中出現 20 Hz 附近的峰值訊號，且同時在對應的 FF-OCT 影像中呈現強反射訊號。

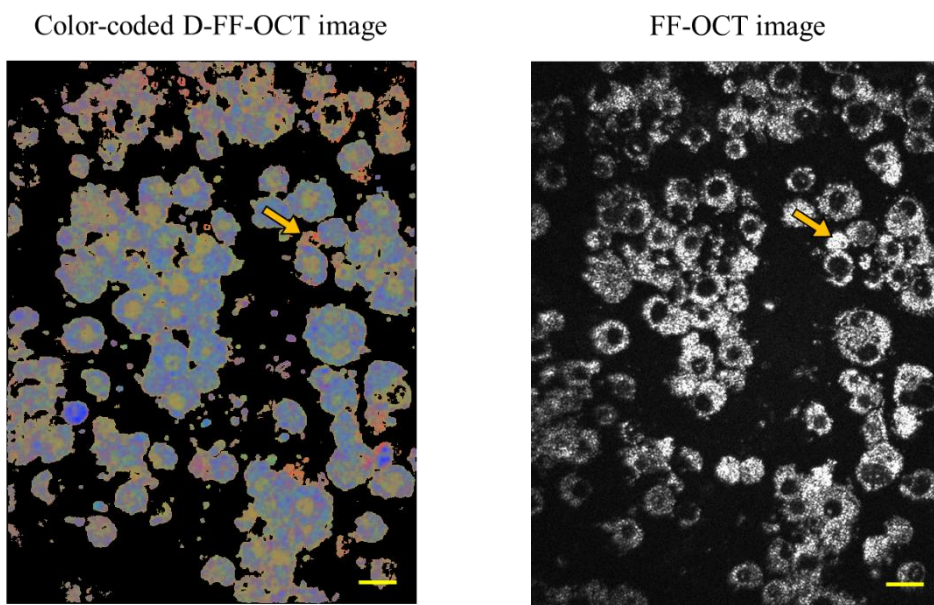
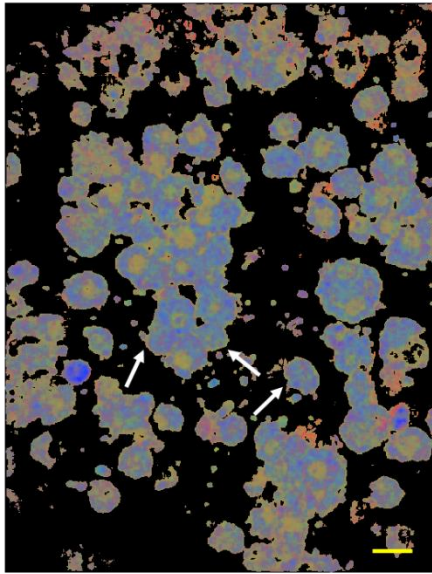


圖 4.16 相同深度之巨噬細胞上色動態影像與 FF-OCT 影像比較圖，橘色箭頭指出高頻訊號表現之細胞。圖中比例尺為 20 μm 。

(a)

Color-coded D-FF-OCT image



(b)

D-FF-OCT image

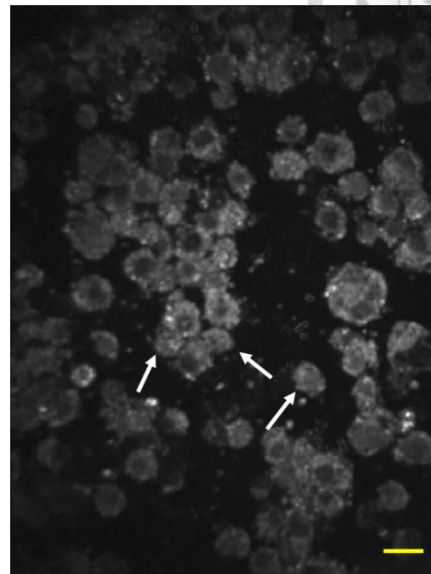


圖 4.17 (a)上色動態影像與(b)黑白動態影像比較圖。圖中比例尺為 20 μm 。

此外，在上色動態影像中，部分細胞呈現出一整團藍色的樣貌，而非低頻藍色細胞膜加上中高頻黃色細胞核之組成，如圖 4.17(a)中白色箭頭所標示。透過在黑白動態影像中比較相同的細胞，如圖 4.17(b)所標記，可以發現該細胞在黑白動態影像中以白色團塊的形式存在，表示影像擷取平面並未完全捕捉到細胞核的深度，導致後續上色分析成果不佳，且目前系統 LabVIEW 的 D-FF-OCT 掃描模式，每次僅能於固定深度進行影像採集，難以確保該深度下每個細胞核的所在都能被準確捕捉到。未來，我們將嘗試開發三維的 D-FF-OCT 掃描模式，對待測物進行完整的動態影像採集，以解決上述問題。

使用 FF-OCT 模式進行影像掃描時，由於細胞核內的背向散射光強度較弱，相較於細胞膜所引起的強烈背向散射光強度，細胞核內的變動資訊較難以觀察。因此，透過 D-FF-OCT 分析程式對影像進行分析上色，可凸顯影像中細胞核的特徵，進而輔助 FF-OCT 影像的判讀。未來，若應用深度學習(Deep learning)進行影像判讀時，可以利用此方法提供基準真相(Ground truth)作為參考，進一步提升深度學習的準確度。

Chapter 5 脂肪間質幹細胞生成之神經球細胞團塊與誘導型多功能幹細胞生成之類胚胎體影像量測與分析結果



第五章同樣使用第三章介紹之 Ce^{3+} :YAG Mirau-based FF-OCT 以及 Dynamic FF-OCT，量測並分析體外培養的脂肪間質幹細胞生成之神經球細胞(ADMSC-derived neurosphere)與誘導型多功能幹細胞生成之類胚胎體(iPSC-derived embryoid body)，對影像進行上色，並從中獲得細胞團塊的動態特性。

5.1 樣本製備方法與量測方法

本節中進行量測分析的細胞為神經球細胞與類胚胎體，兩者皆屬於懸浮型細胞團塊，其懸浮型態為細胞生長提供更具生理相關性的環境，貼切地模擬體內組織和器官的三維結構，相比於傳統的二維培養系統，可以為藥物開發、組織研究等領域帶來更準確的結果。本實驗中所有細胞樣本的培養皆由台大醫學院陳偉勵醫師研究團隊協助完成，以下將簡要介紹各細胞的培養流程，以及使用 FF-OCT 時的量測方法。

5.1.1 間質幹細胞生成之神經球細胞培養過程

此小節將介紹神經球細胞的相關製備過程，神經球細胞是使用兔子之脂肪間質幹細胞生成神經幹細胞(Neural stem cell)的中間產物，圖 5.1 為其培養流程[28]：

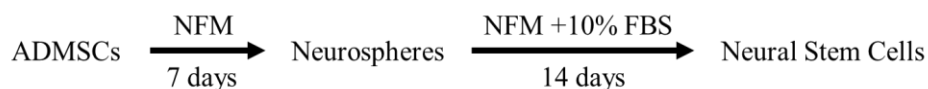


圖 5.1 神經球細胞相關培養流程簡圖。(NFM: Neurosphere formation medium; FBS: Fetal bovine serum)。

以下簡單介紹培養流程：

取得兔子之間質幹細胞之後，我們將幹細胞培養在 10 公分培養皿，直到培養皿底部的細胞長至 7~8 成滿時，加入 1 毫升的胰蛋白酶(Trypsin)分解使細胞貼附培

養皿之附著蛋白(Adhesion protein→vessel-adhering proteins)，以方便後續收集細胞，此過程維持約 3 分鐘，接著加入含有 FBS 的培養基以終止胰蛋白酶反應並進行離心處理。接下來，使用能促使脂肪間質幹細胞形成神經球細胞的培養基 (Neurosphere formation medium；NFM)進行回溶，後續以每平方公分 4×10^4 個細胞的數量，加入特別設計用於低貼附性細胞的 6 孔細胞組織培養盤中，維持懸浮狀態並連續培養 7 天，每 2 天更換一次 NFM。在此過程中，細胞會慢慢聚集成球狀，即得到懸浮的神經球細胞，圖 5.2 顯示了懸浮狀態的神經球細胞在培養過程中，第一和與第七天的顯微鏡影像比較。

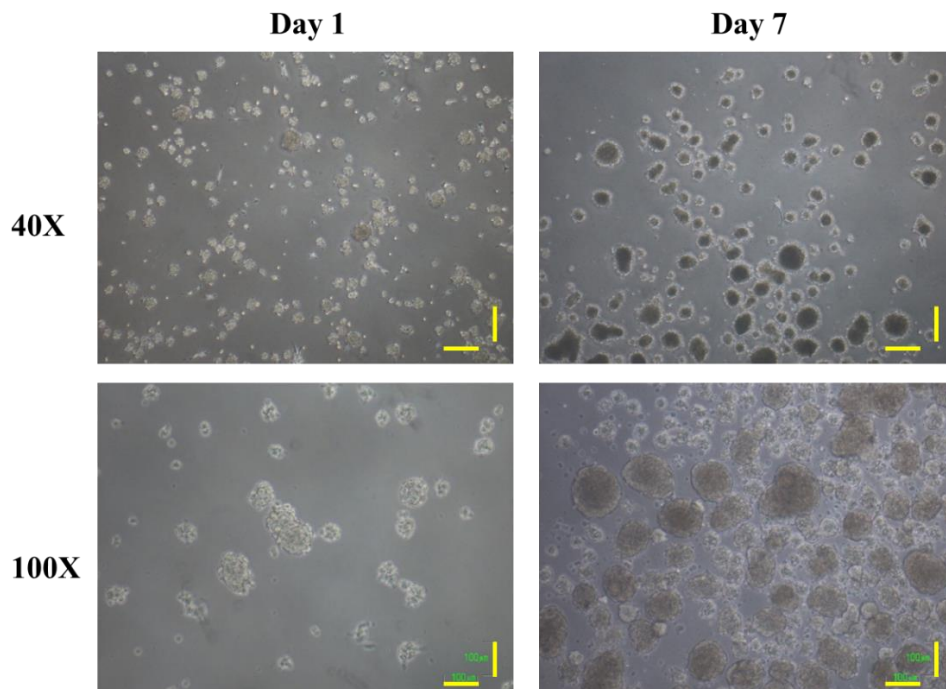


圖 5.2 神經球細胞之顯微鏡影像，圖中比例尺為 $100 \mu\text{m}$ 。(影像由陳偉勵醫師研究團隊提供)。

經過七天的懸浮培養後，我們將再次使用胰蛋白酶，將神經球細胞轉化為單細胞形態，接著以含有 FBS 的培養基終止胰蛋白酶反應，經離心後再用 NFM 與 10% 的 FBS 回溶，放入培養皿內培養 14 天，並以兩天一次的頻率更換容器中的培養基 (NFM+10% FBS)，即可得到貼附型態的神經幹細胞。我們在圖 5.3 和圖 5.4 分別呈現了神經幹細胞的顯微鏡影像圖以及 FF-OCT 影像圖，從中可以看出神經幹細胞為梭狀形態，並在玻片上呈現非常緊密的排列。

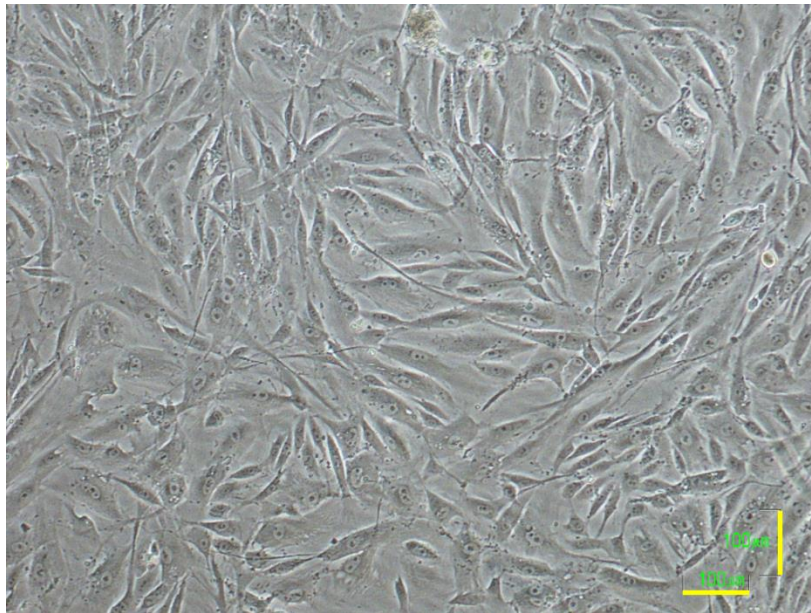


圖 5.3 神經幹細胞顯微鏡影像，圖中比例尺為 100 μm 。(影像由陳偉勵醫師研究團隊提供)。

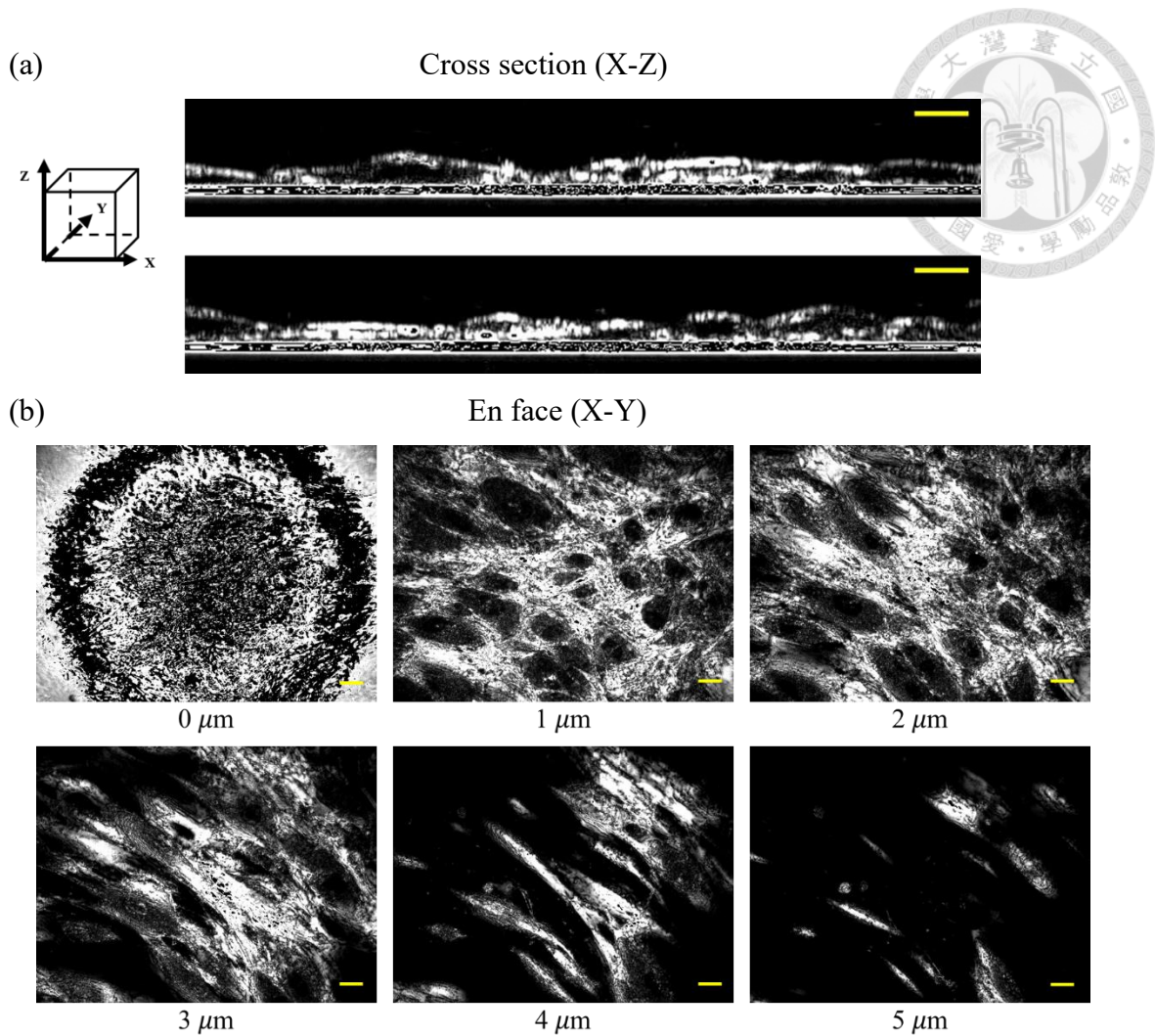


圖 5.4 神經幹細胞 FF-OCT 影像圖。(a)縱平面影像圖(含 1.35 μm 厚度之資訊)；(b)橫平面影像圖(含 1 μm 厚度之資訊)，圖中比例尺為 20 μm 。

而圖 5.4 的 FF-OCT 影像，除了可以觀察到細胞分布狀況之外，還可以看出神經幹細胞為扁平狀的細胞。由縱平面影像可以看出，神經幹細胞幾乎完全貼附並爬行於我們的 GP3 玻片上，很難由縱平面影像觀察細胞核的存在，因此我們利用 FF-OCT 的光學切片能力，透過橫平面影像，計算得到神經幹細胞的縱向大小約為 5~6 μm 。此外，我們也嘗試以多個相鄰視域拼接的方式，呈現如圖 5.5 的大視域神經幹細胞 FF-OCT 影像圖，圖中可以看到，神經幹細胞雖然扁平，但其細胞偽足卻可以觸及相當遠的區域。

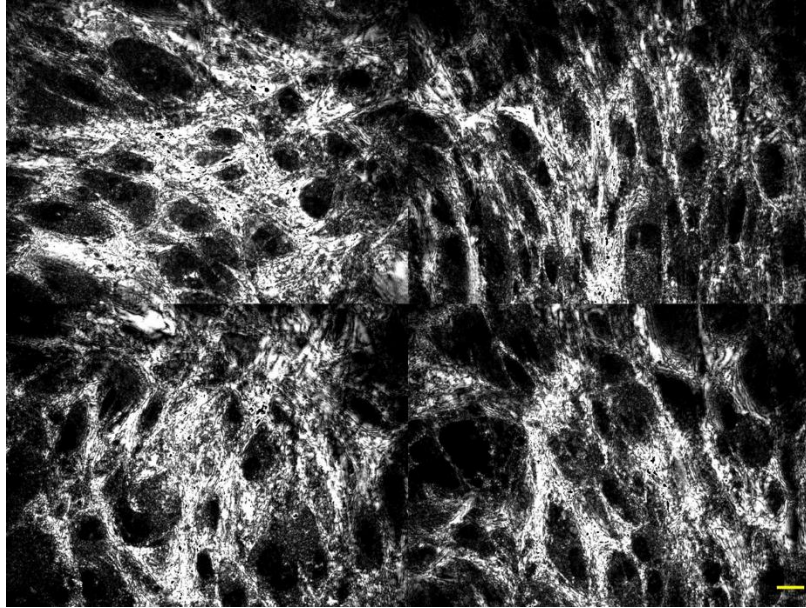


圖 5.5 2*2 個 FOV 之神經幹細胞 FF-OCT 橫平面影像圖(含 1 μm 厚度之資訊)，圖中比例尺為 20 μm 。

5.1.2 誘導型多功能幹細胞生成之類胚胎體培養過程

本小節將簡要描述誘導型多功能幹細胞(iPSC)的培養過程[6], [29]，在本研究中，我們選用類胚胎體作為樣本，該樣本是由 iPSC 分化而成，是成為視網膜神經節細胞(Retinal ganglion cell)前的中間產物，其分化流程如圖 5.6：

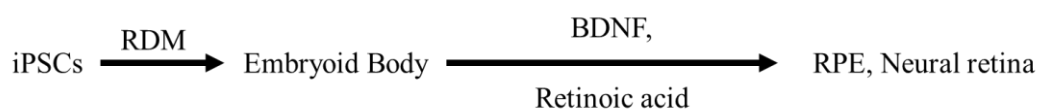


圖 5.6 類胚胎體相關培養流程簡圖。(RDM：Retinal differentiation medium；BDNF：Brain-derived neurotrophic factor；RPE：Retinal pigment epithelium)。

實驗使用之 iPSC 細胞株(NTUH-iPSC-01-02-feeder-free iPSC)購買自生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center)，並在無餵養細胞(Feeder cell)的條件下培養。我們使用 Stemflex 培養基進行 iPSC 細胞培養，以每天更換培養基的方式，讓 iPSC 細胞株維持在未分化的狀態。

若要將 iPSC 細胞株作進一步的分化，首先利用細胞分離試劑(Accutase cell detachment solution)，將 iPSC 溫和且快速的分離後，以離心的方式收集起來，並利

用視網膜分化培養液(Retinal differentiation medium ; RDM)使其形成 iPSC 細胞團塊。在分化成類胚胎體的過程中，會以每孔 9000 顆的細胞濃度，培養於 96 孔低附著細胞培養盤上，經過培養後，每孔內將形成一個至數個懸浮型的類胚胎體。圖 5.7 為經不同天數培養之類胚胎體。

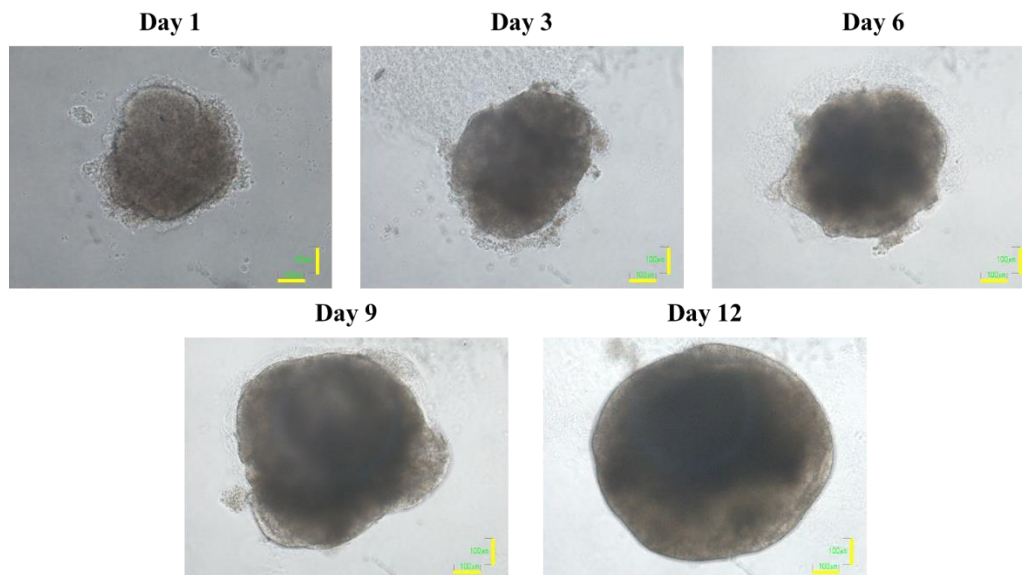


圖 5.7 iPSC 類胚胎體之顯微鏡影像，圖中比例尺為 100 μm 。(由陳偉勵醫師研究團隊提供)。

影像中可以看到，類胚胎體的外觀較為圓潤，甚至會出現接近圓球形貌的細胞團塊，如圖 5.7 上排中間影像所示。在類胚胎體的內部，可觀察到顆粒狀結構，凸顯出類胚胎體是以多顆 iPSC 細胞集結匯聚而成。而影像中，類胚胎體有的區域呈現亮白色，有的卻是深灰色，其成因將在 FF-OCT 影像呈現後，詳加探討。

5.1.3 樣本量測方法

第四章所量測的細胞為巨噬細胞，是一種在培養過程中，需要貼附於培養皿或玻片表面的細胞，因此量測用樣本在製備過程中，必須用指甲油將貼附著細胞的 GP3 貼在鑽洞玻片下，方便後續使用系統二維移動平台固定並觀察之。

而本節所量測的為懸浮型細胞，由於這些細胞團塊並未貼附在玻片或培養皿表面，可以使用乾淨的滴管或是定量吸管(Pipette)將細胞與培養基同時吸取收集，並移動至 OCT 系統的 GP3 玻片容器中，如圖 5.8 所示。

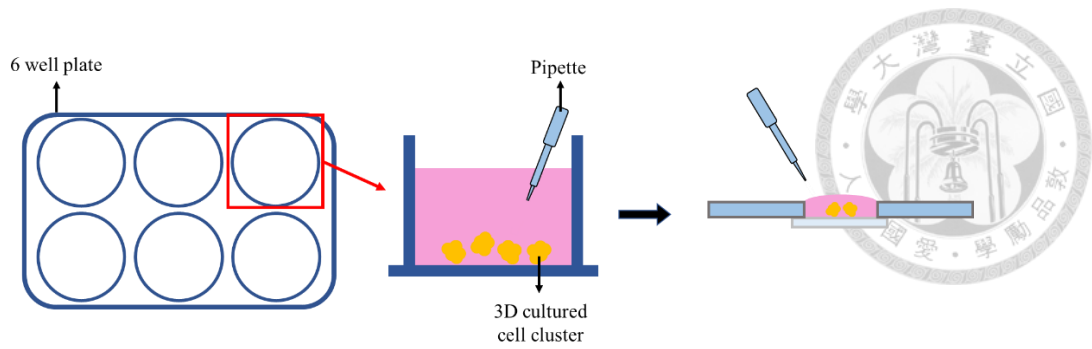


圖 5.8 將懸浮型細胞取出並放至 GP3 玻片容器之示意圖。

另外，在進行 FF-OCT 或 D-FF-OCT 量測時，滴入培養基會使 GP3 玻片容器中的液體產生流動，以及移動二維平台時造成整體樣本的晃動，這些人為外在因素都可能導致懸浮型細胞呈現不穩定的狀態，例如在培養基中漂動或是旋轉等等，這些因素都會影響成像品質，造成影像中出現雜訊。

因此，在進行掃描之前，我們會讓樣本靜置約 10 至 15 分鐘，以減少上述會造成懸浮型細胞非自發性流動或晃動的影響。為了驗證靜置可以使懸浮型細胞更穩定，我們對靜置過的同類細胞連續進行兩次 FF-OCT 三維深度掃描，並比較兩次的影像。由於我們使用相對緩慢的掃描速度，兩次掃描至相同深度之時間差距約為 30 分鐘，其橫平面影像如圖 5.9 所示。

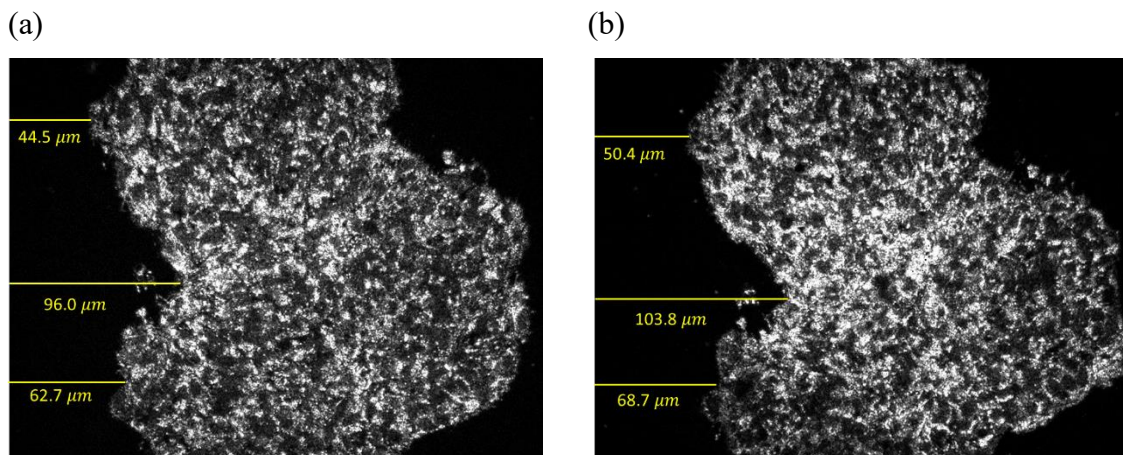


圖 5.9 連續兩次掃描 iPSC-derived EB 之 FF-OCT 橫平面影像 (a)開始掃描時間點：16:45；(b)開始掃描時間點：17:12。

我們擷取了相同深度的橫平面影像作比較，影像中可以看出，儘管已透過靜置減緩細胞團塊的漂動，圖 5.9 (a)和(b)仍存在微小位移。利用 ImageJ 對兩個影像進

行從視域邊緣至細胞邊緣的距離量測，得到此細胞在 30 分鐘內往右移動約 $6\ \mu\text{m}$ ，平均每分鐘僅移動 $0.2\ \mu\text{m}$ ，比起剛加入玻片容器時，以肉眼可見之速度在容器中漂動的狀況截然不同，由此證明，靜置樣本對於減少懸浮型細胞因人為因素造成的環境雜訊，有一定程度的幫助。



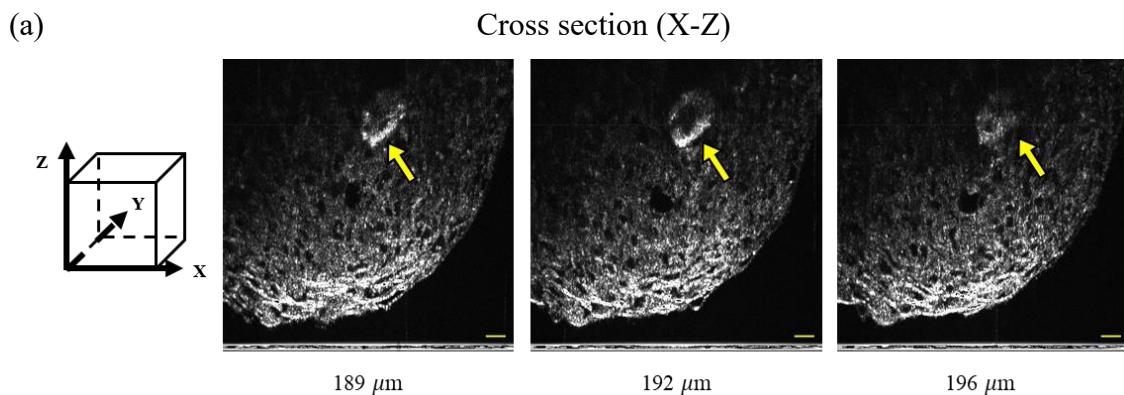
5.2 FF-OCT 影像量測結果

此小節同樣使用第二章介紹之高空間解析度 $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$ Mirau-based FF-OCT 系統，對神經球細胞以及類胚胎體等兩種懸浮型細胞進行非侵入式觀察，並呈現其三維立體影像。

5.2.1 間質幹細胞生成之神經球細胞 FF-OCT 影像

5.1.1 小節中所呈現的神經球細胞顯微鏡影像(見圖 5.2)，經圖中比例尺比對得知，培養 7 天的細胞，其直徑大小約為 $200\ \mu\text{m}$ 左右，接近本實驗所採用之 FF-OCT 系統的視域大小($291\ \mu\text{m} \times 219\ \mu\text{m}$)，此外，神經球細胞往往會形成更大的個體，因此 FF-OCT 的單一視域通常無法完整呈現整個神經球細胞。

圖 5.10 為神經球細胞之 FF-OCT 影像圖，與 5.1.1 節中的神經球細胞顯微鏡影像相比，FF-OCT 掃描得到的影像更能將其內部構造詳細展示，以下我們分別以縱平面影像和橫平面影像呈現，兩組相互對照，凸顯出 FF-OCT 系統在縱向上與橫向上皆有良好的解析度。



(b)

En face (X-Y)

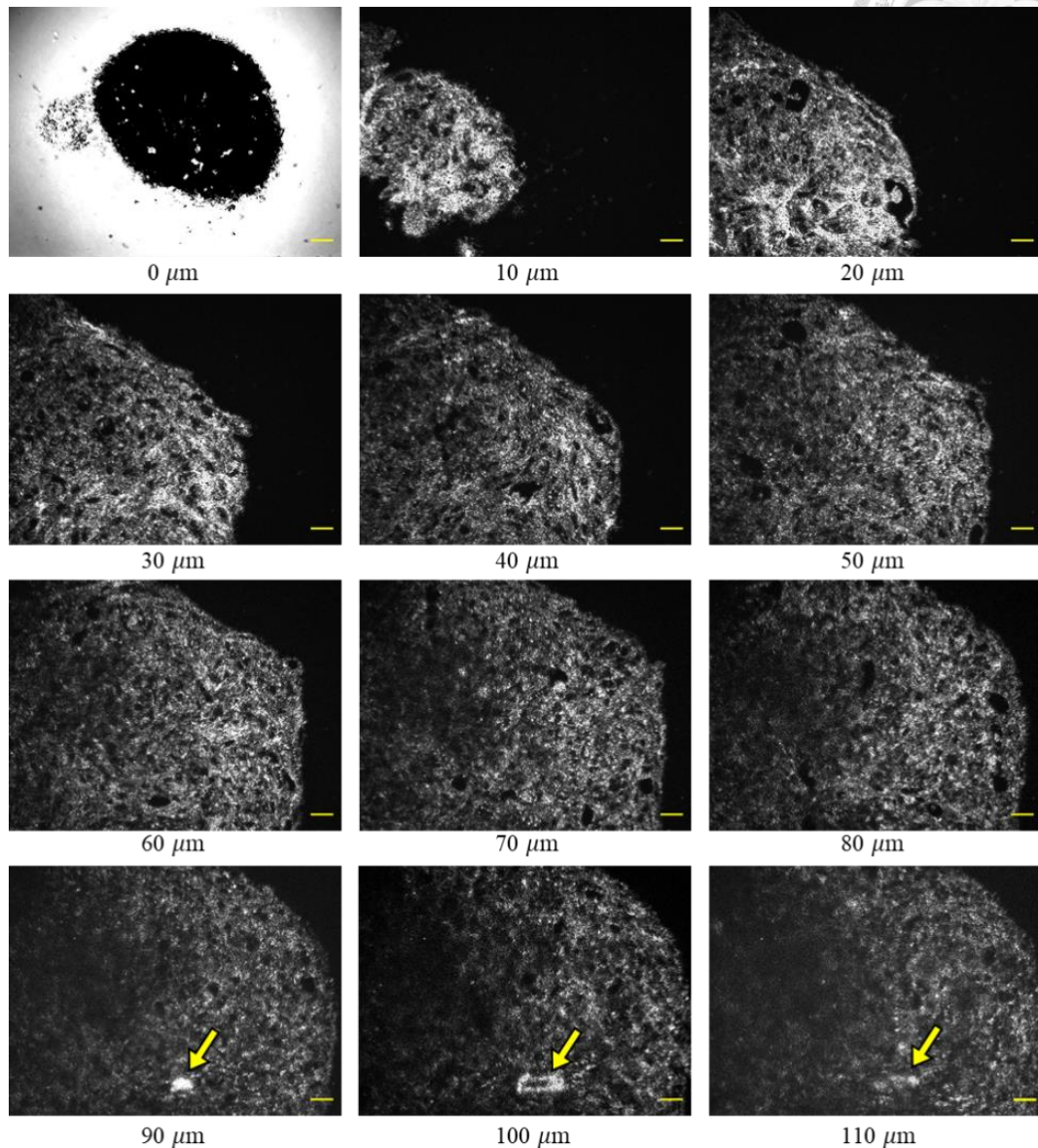


圖 5.10 神經球細胞之 FF-OCT 影像圖，圖中比例尺皆為 20 μm。 (a)縱平面影像； (b)橫平面影像。黃色箭頭標示出神經球中突然出現的強反射橢圓構造，圖(a)則呈現此構造開始出現及消失之深度的縱平面影像。

圖 5.10(a)中，三張 FF-OCT 影像最下方的位置都有一條橫跨整個視域的黑白摻雜之帶狀構造，為 Ce^{3+} :YAG 光源由 GP3 玻片進入到培養基時，兩相異介質交界處形成強反射面，干涉條紋於此反覆閃爍形成，該帶狀構造可視為 GP3 玻片上表面之位置，而此帶狀構造也可以對應到圖 5.10(b)的橫平面影像中，標示為 0 μm 之影像。

另外，縱平面影像中可以看到，在神經球細胞較深處的位置，有一顆突然出現的強反射橢圓構造(以黃色箭頭標示)，與周遭明顯不同，對應至橫平面影像也看到相同的構造出現。我們將有橢圓構造的橫平面與縱平面影像以更小的尺度呈現，並嘗試計算該構造的尺寸大小，如圖 5.11 所示。

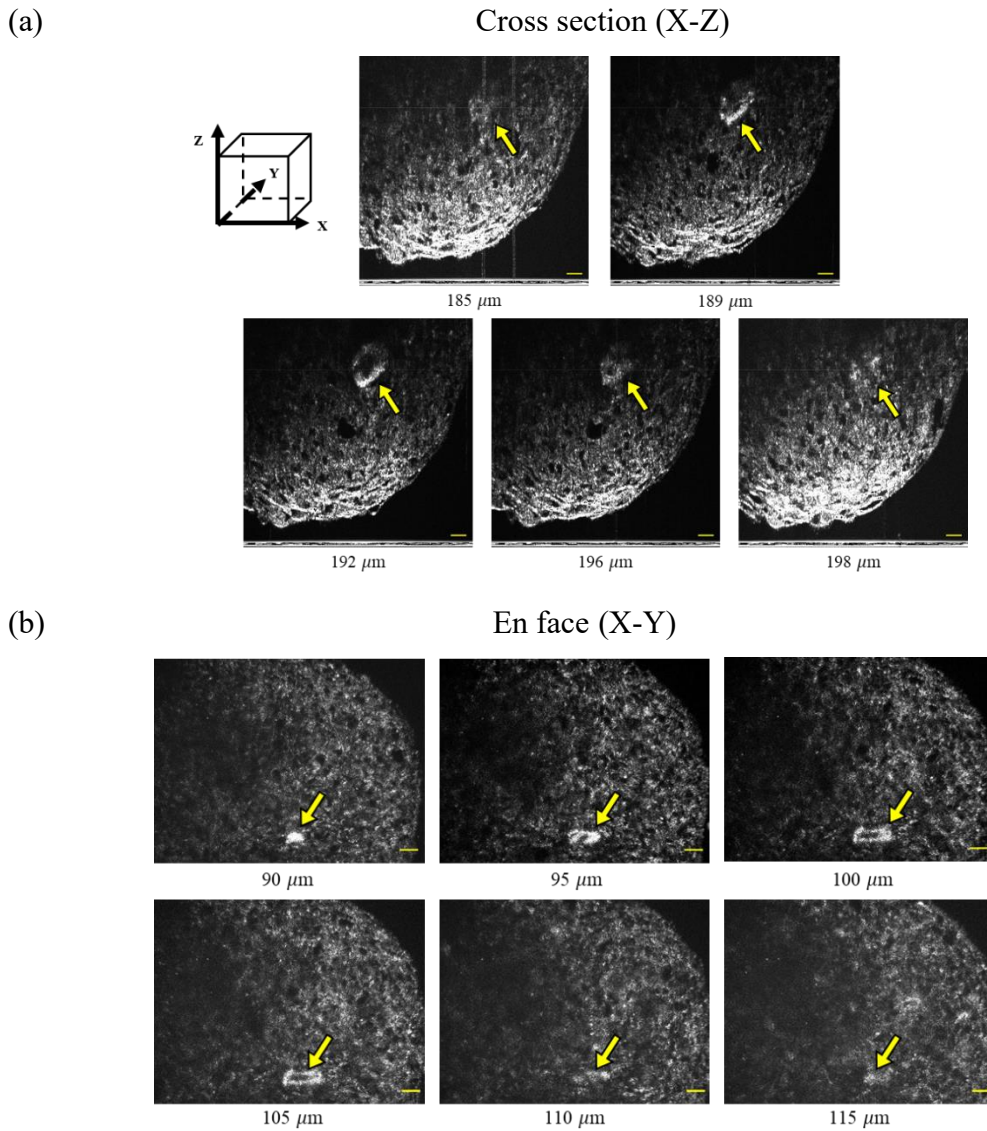


圖 5.11 橢圓構造 FF-OCT 影像切片圖，圖中比例尺皆為 20 μm 。

圖 5.11 (a)展示了縱平面(X-Z direction)影像切片，可以看到橢圓構造於深度 185 μm 首次出現，直到 198 μm 為止，其橫向上的大小約為 13 μm 。另一方面，在圖 5.11 (b)的橫平面(X-Y direction)影像中，橢圓構造從 90 μm 左右的深度出現，直到 115 μm 才幾乎消失，其縱向上的大小為 25 μm ，是一個稍微扁平的橢圓形構造。

然而，僅憑 FF-OCT 影像圖較難辨識出這些結構的類型或來源，目前的推測是這些結構可能是神經球細胞在生長過程中因細胞凋亡(Apoptosis)或不規則相疊而形成的囊泡。

另外，神經球細胞是以三維立體的方式進行培養，當加入 GP3 玻片容器並經過靜置後，由於重力作用，部分細胞會平壓於 GP3 玻片上，並產生些微形變。然而，這些細胞並不完全貼附在玻片上，而是與其表面產生接觸，如圖 5.12 所示，其中藍色箭頭標示了神經球細胞底部與玻片表面之間的接觸面。

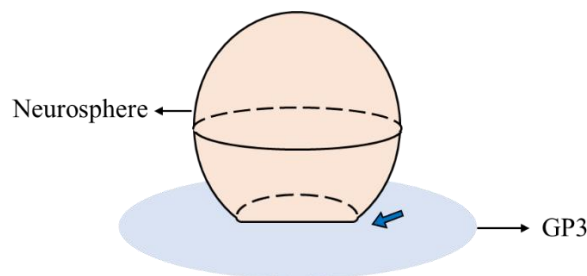


圖 5.12 神經球細胞落於 GP3 上之示意圖。

圖 5.13 則展示神經球細胞與 GP3 貼附的橫平面影像與縱平面影像。圖 5.13 (a)為影像擷取平面經過 GP3 和培養基的交界面後，得到的第一張橫平面影像，即為貼附於 GP3 上的神經球細胞影像，利用圖像處理軟體 ImageJ，對影像中與 GP3 玻片接觸的細胞團塊進行量測，得到其直徑約為 $65.25\ \mu\text{m}$ 。

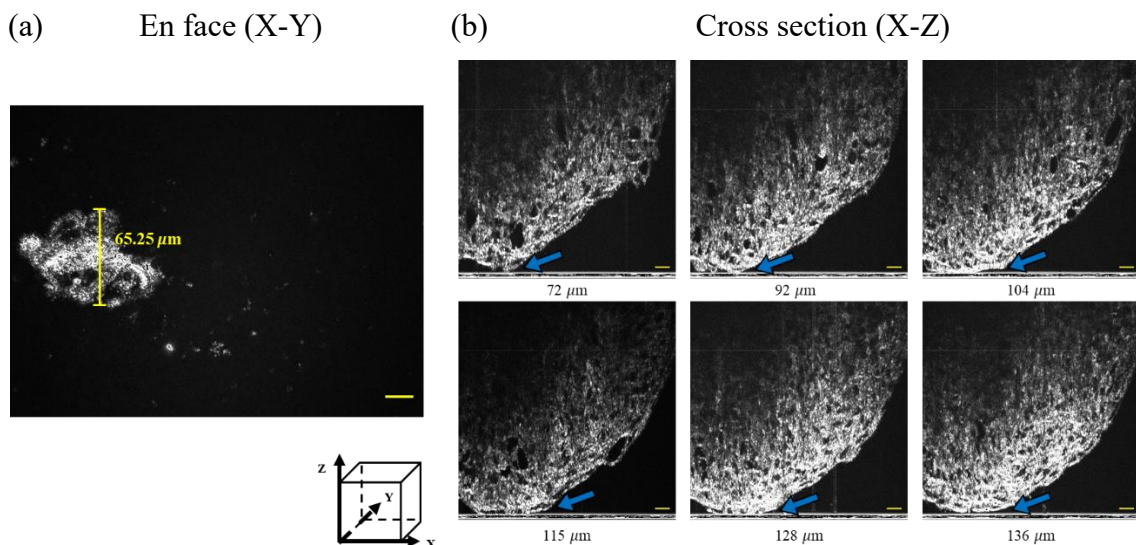


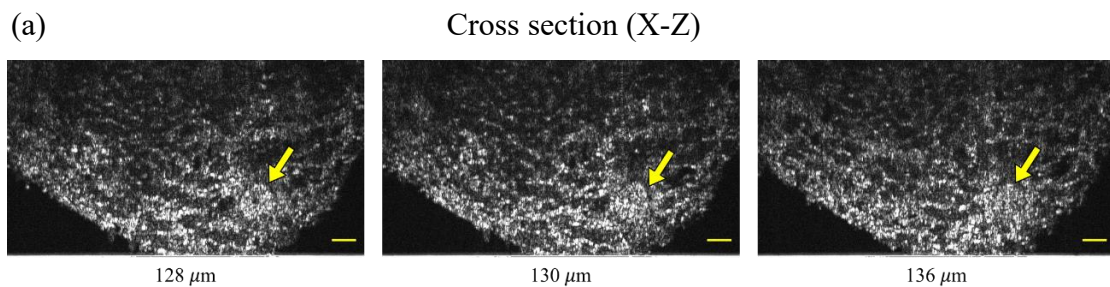
圖 5.13 (a)神經球細胞橫平面影像，下方為樣本三維示意圖；(b)神經球細胞縱平

面影像，圖中比例尺皆為 20 μm 。

對比其縱平面影像，如圖 5.13 (b)所示，當深度為 72 μm 時，進入到神經球細胞團塊開始與玻片貼合之處，隨著深度沿著 XZ 方向推進，可以看到接觸面積逐漸增加，如圖中藍色箭頭標示的位置，在大約 104 μm 時，接觸面積達到最大。接著，深度再繼續推進，接觸面積又漸漸變小，直到 XZ 方向上的深度到 136 μm 時，神經球細胞完全脫離 GP3 玻片。根據縱平面影像，可計算出整個接觸面的直徑約為 64 μm (136 μm - 72 μm = 64 μm)。然而，使用 ImageJ 分析時所得到的結果與橫平面影像稍有差異，可能是由於操作 ImageJ 量測橫平面影像時的人為誤差所致。

5.2.2 誘導型多功能幹細胞生成之類胚胎體 FF-OCT 影像

類胚胎體是由多個 iPSC 細胞聚集而成的細胞團塊，與前一節提及的神經球細胞類似。由於聚集了多個細胞，其細胞體積也很容易超過我們 FF-OCT 視域大小。本實驗中量測的類胚胎體，大多都是 300 μm 起跳，甚至有達到 4、500 μm 的巨大細胞團塊，因此量測時，我們只能量到單一個體的部分位置，或是以多個視域拼接的方式，組合出完整的類胚胎體 FF-OCT 影像。圖 5.14 為類胚胎體的 FF-OCT 縱平面影像以及橫平面影像：



(b)

En face (X-Y)

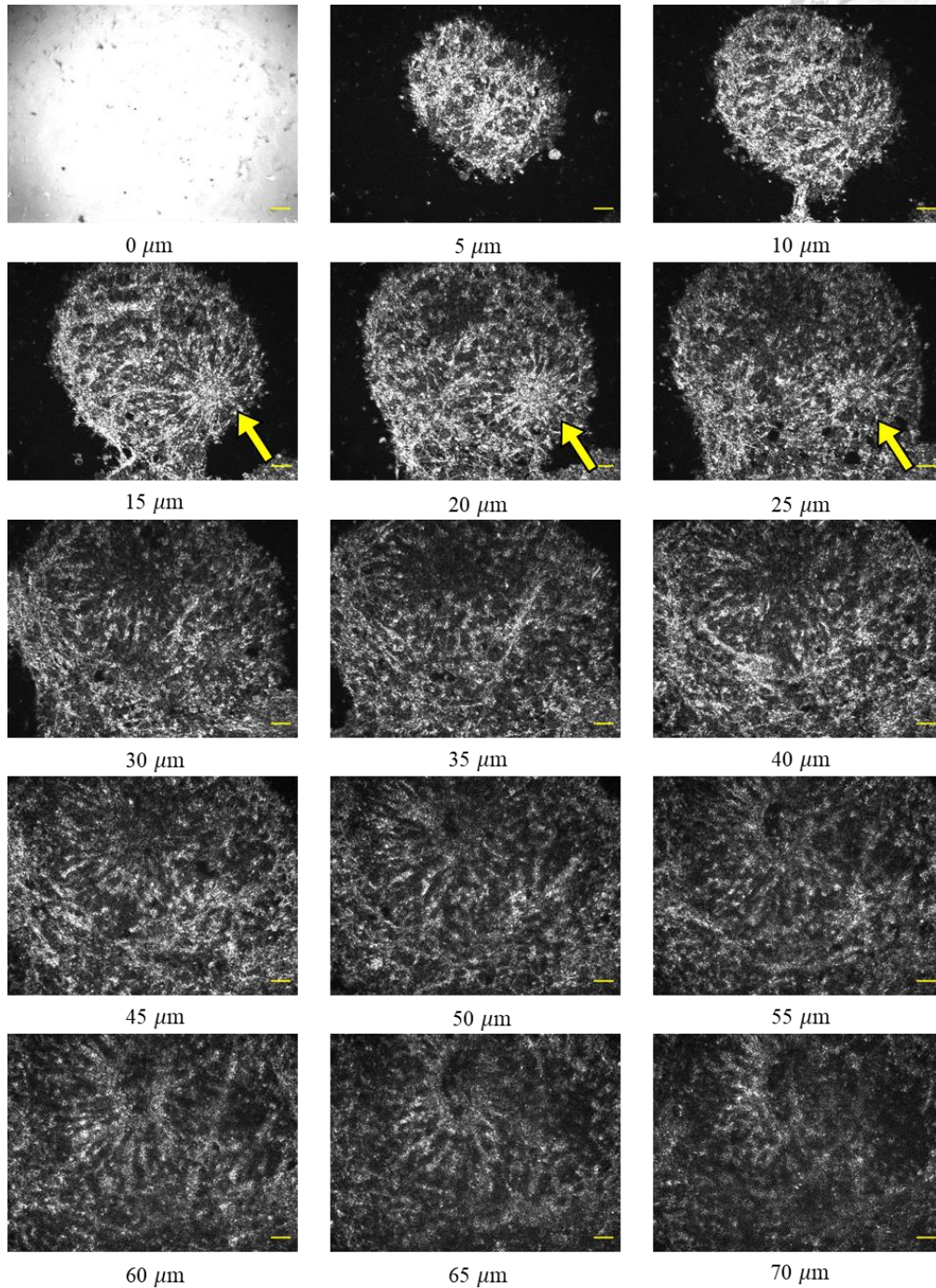


圖 5.14 類胚胎體之 FF-OCT 影像，比例尺為 20 μm 。(a)縱平面影像；(b)橫平面影像。黃色箭頭指出類胚胎體中的特殊構造於縱平面影像和橫平面影像的位置。

在圖 5.14 (b)中，黃色箭頭指出了類胚胎體中如蜘蛛網般放射狀的特殊構造，並且在圖 5.14(a)的縱平面影像中呈現蛛網狀構造出現和消失的深度。然而，由於類胚胎體並非真正的胚胎發育，僅從其構造難以判斷其所屬的細胞種類。若要確定

該特殊構造的組成，需採用切片染色技術，並根據不同的培養條件推測其分化過程中可能的表現傾向，接著，可運用對應的標的蛋白抗體(Markers)進行染色，以獲得對該特殊構造的更具體且明確的認識。

圖 5.15 為使用鹼性的蘇木精(Hematoxylin)和酸性的伊紅(Eosin)染色法對類胚胎體進行染色觀察，此方法簡稱 H&E 染色法。H&E 染色為組織學標本及病理切片標本常使用之染色法，蘇木精可以將嗜鹼性的結構，如細胞核、核糖體等等含有核糖核酸(RNA)的區域染成紫藍色；而細胞質與非細胞等由蛋白質組成的嗜酸性結構，則會被伊紅染成粉紅色[30]。

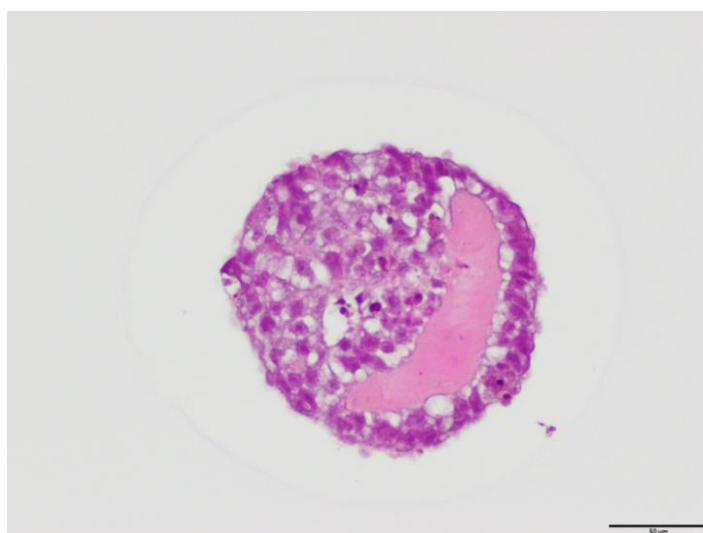


圖 5.15 類胚胎體 H&E 染色影像，比例尺為 50 μm 。(由陳偉勵醫師研究團隊提供)。

在類胚胎體之 H&E 染色影像中，深紫色且呈現圓形的部分多為細胞核，如圖 5.15 中心位置所示，而影像右側有一大塊呈現粉紅色的半月型區域，根據協助切片的人員判斷，此處為進行細胞凋亡(Apoptosis)的區域，當中沒有任何細胞存在，可視作細胞團塊中的囊腔。

在 FF-OCT 掃描過程中，也有發現相對應細胞凋亡之空腔影像，圖 5.16 為圖 5.14 中擷取出來的部分 FF-OCT 影像。圖 5.16(a)中，以紅色圓圈標示之位置可能為類胚胎體細胞凋亡區域，而此結構在圖 5.16(b)的橫平面影像中更為明顯，以 XY 方向做推進掃描，從深度 20 μm 開始，可以看到靠近上方有一塊呈現空洞樣貌的黑色區域，如影像中紅色圓圈所標示，直至深度 40 μm 左右才漸漸縮小。

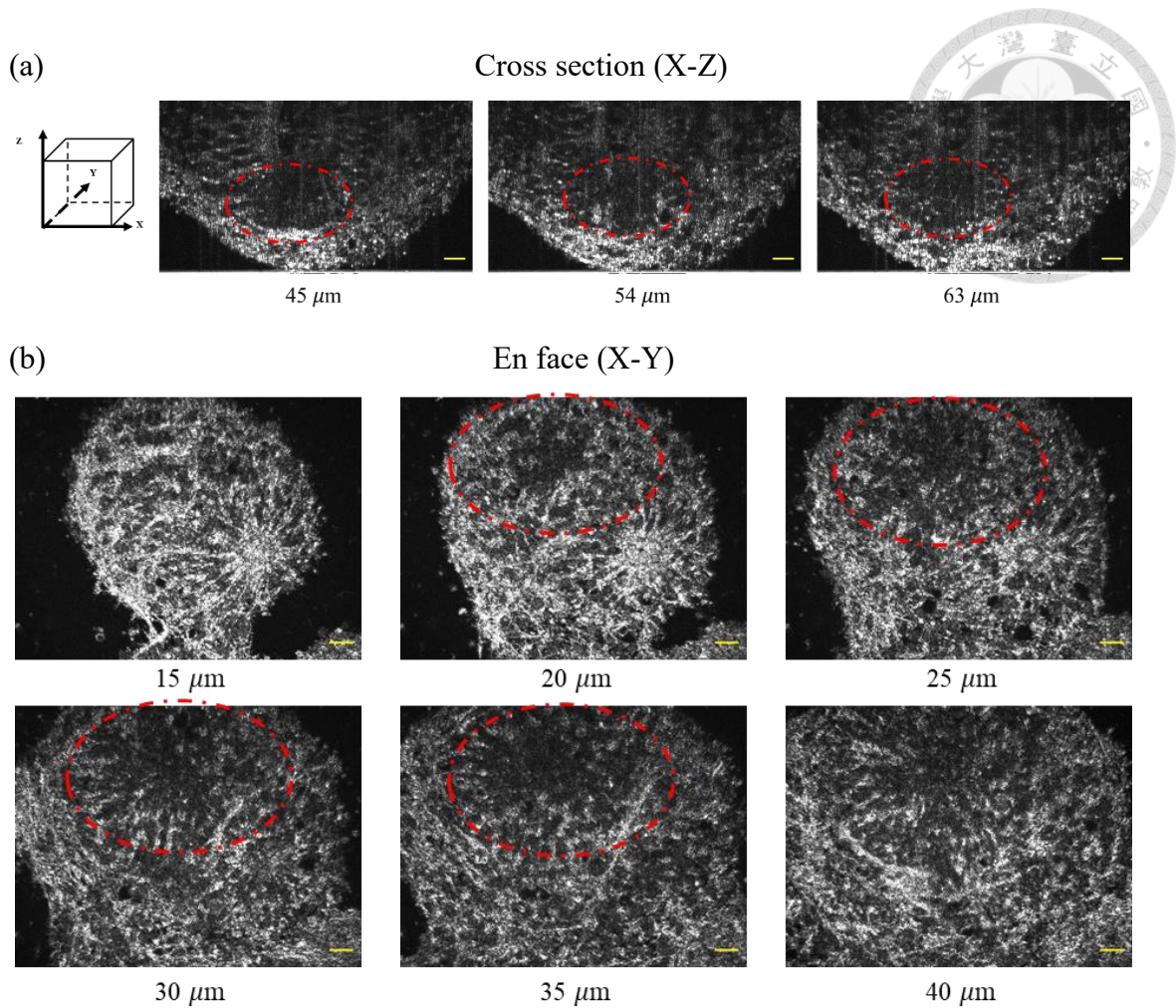


圖 5.16 類胚胎體細胞凋亡區域之 FF-OCT 影像，圖中比例尺為 $20\ \mu\text{m}$ 。(a)縱平面影像，呈現了空腔構造出現和消失的深度；(b)橫平面影像。圖中紅色圓圈為細胞凋亡區域。

在類胚胎體 FF-OCT 影像中，細胞凋亡區域呈現黑色的原因是，凋亡後的細胞消失並被培養基取代，形成一個充滿培養基的空腔。當空腔內部的折射率分布均勻時，背向散射光不易形成，使得該區域呈現出整體暗淡的影像。



5.2.3 樣本掃描深度受限之原因探討

對神經球細胞團塊或是類胚胎體進行 FF-OCT 三維掃描時，常發現當掃描到達一定深度時，樣本造成的背向散射訊號之光強度會急遽下滑，導致影像畫面相當黯淡，幾乎看不出任何的細胞相關特徵，如圖 5.17 所示。

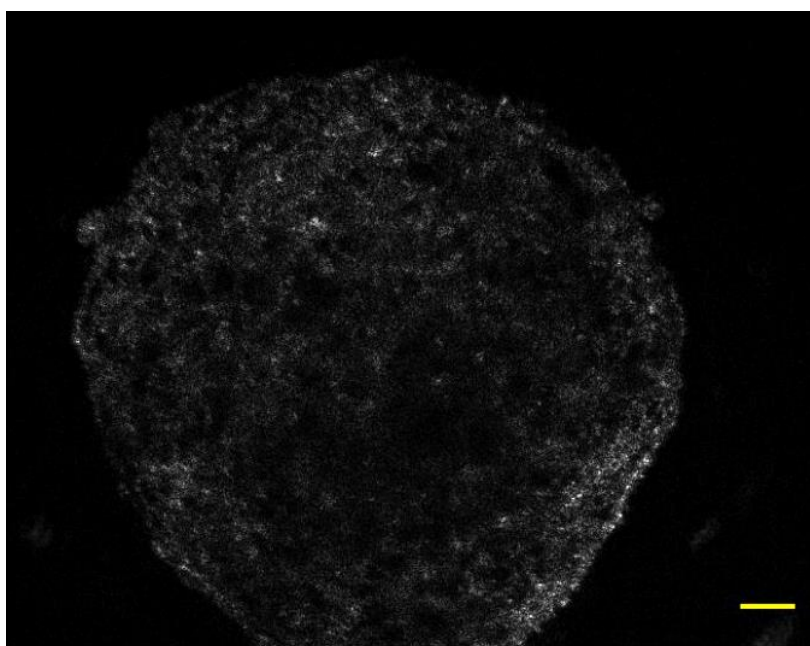
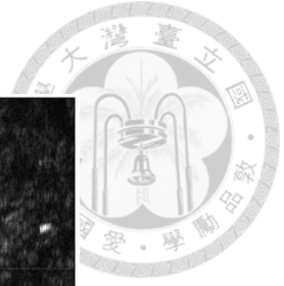
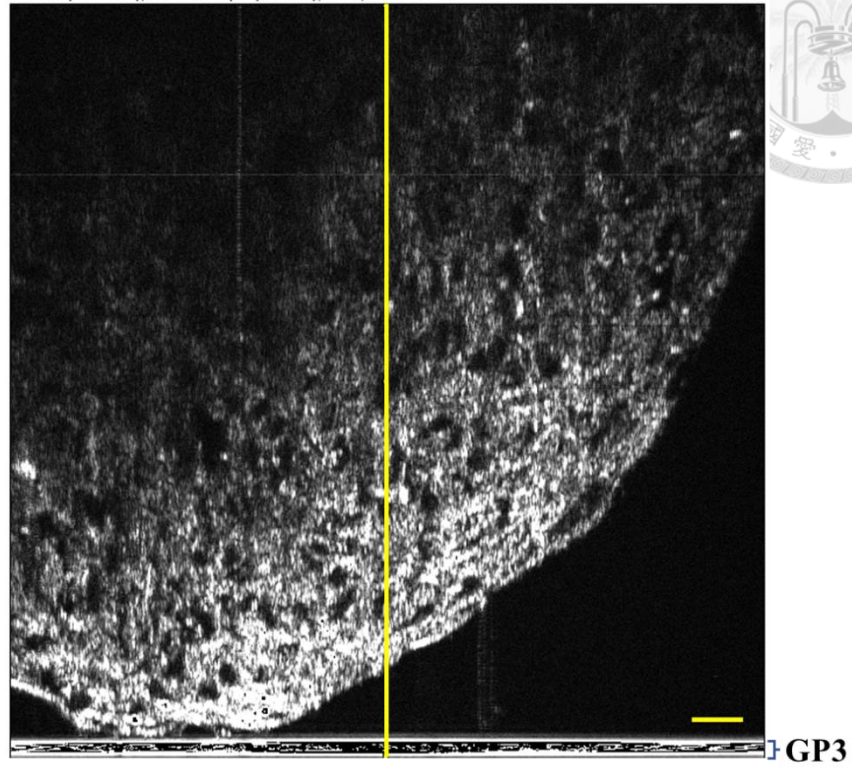


圖 5.17 神經球細胞團塊之 FF-OCT 橫平面影像，掃描深度約 70 μm 。圖中比例尺為 20 μm 。

為了探究背向散射光強度衰減趨勢，我們利用圖像處理軟體 ImageJ，對 FF-OCT 之縱平面影像進行灰階值強度的分析。圖 5.18(a) 展示了神經球細胞團塊的 FF-OCT 縱平面影像，影像最下方橫跨整張影像的帶狀構造為 GP3 玻片的位置，而黃色實線標示了沿深度方向的掃描軌跡。為了呈現隨深度變化的光強度，我們繪製了對應的灰階值強度圖，如圖 5.18(b)所示：



(a)



(b)

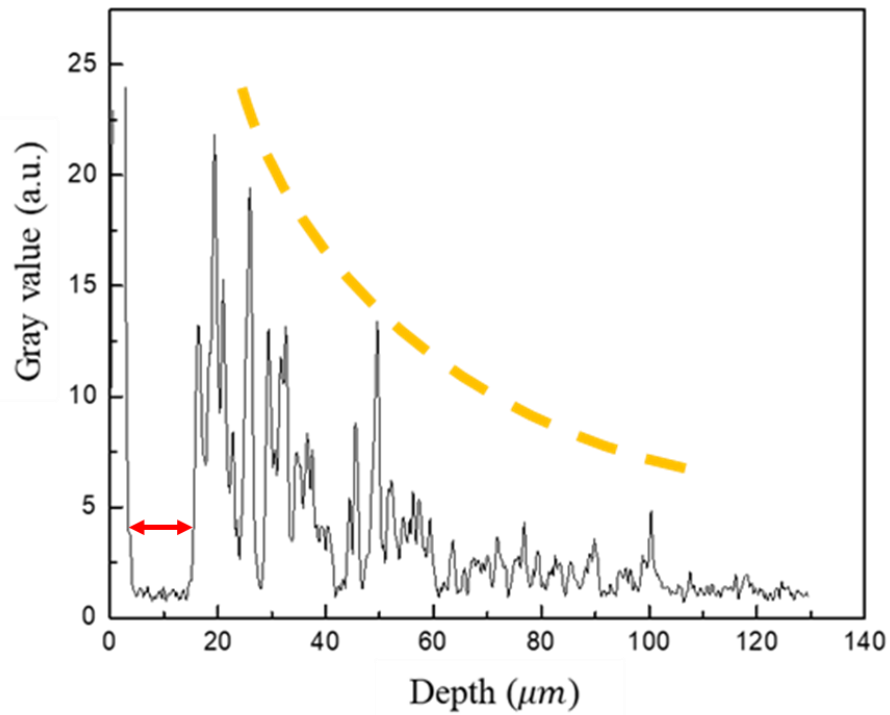


圖 5.18 (a)神經球細胞團塊之 FF-OCT 縱平面影像，圖中比例尺為 $20\ \mu\text{m}$ ，圖中黃線標示出觀察標的之位置；(b)神經球細胞隨深度逐漸衰減之灰階值強度圖。

圖 5.18(b)中，一開始的最大峰值訊號，為光源由 GP3 玻片進入到培養基時形成的強反射所造成，緊接著一段深度約 10 μm 的平緩極小值，如紅色箭頭標示處，與圖 5.18(a)對照，可以看出該段深度主要是培養基，其中並不存在易形成背向散射光之物體，因此不會出現顯著的峰值訊號，而此處微小的光強度變化則可視為系統之雜訊。而後隨著深度增加，灰階值漸漸下降，直到 90 μm 左右的深度時，背向散射光之光強度已經十分接近系統雜訊的大小。

在實驗室曾經掃描的各種樣本中，皮膚樣本是背向散射光強度隨掃描深度增加而衰減最劇烈的樣本之一，因此我們在將皮膚樣本與神經球細胞團塊樣本的掃描深度-光強度圖相互比較。

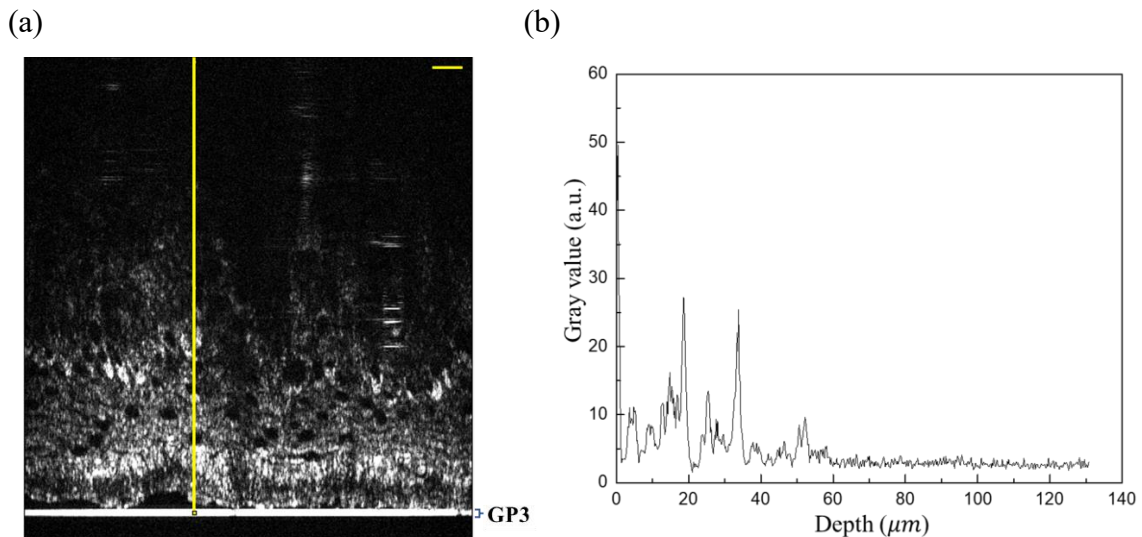


圖 5.19 (a)皮膚之 FF-OCT 縱平面影像[31]，圖中比例尺為 20 μm ；(b)皮膚樣本中，光強度隨掃描深度衰減圖。

沿著圖 5.19(a)的黃線描繪灰階值強度圖，如圖 5.19(b)所示，皮膚樣本在 60 μm 左右的深度即衰減至看不到甚麼背向散射訊號，其光強度衰減幅度略快於神經球細胞團塊，而皮膚樣本之所以光強度衰減幅度大，是因為皮膚組成相當緻密，且其組織的折射率與散射能力都較強，因此光源的穿透深度較淺。

針對神經球細胞的光強度衰減結果，我們推測，由於細胞團塊是以多顆小細胞聚集而成，而這些小細胞相當於球狀透鏡堆疊，因此當光源經過時，小細胞會將光束強力聚焦，接著以更大的角度發散出去，如圖 5.20 所示。隨著 FF-OCT 深度掃

描，經過的小細胞數目越多，光源強度衰減的幅度也隨之增大，這限制了光源的穿透深度，因此，我們只能於樣本的淺層範圍內可以獲得良好信噪比的影像。

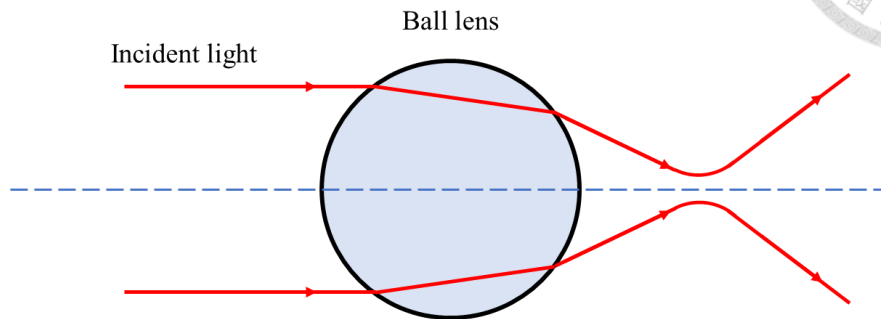


圖 5.20 光束經過球狀透鏡後之示意圖。

此種背向散射光強度大幅衰減的現象屬於樣本的特性之一，目前較合宜的解決方法是調整輸入光源的強度。正如 2.2.1 節所述，我們的 $\text{Ce}^{3+}:\text{YAG}$ 光源系統可提供最高至 35 mW 的 SE 光輸出功率。在不使前段影像於 CCD 相機上過曝的條件下，適度提高光源系統的輸出功率，增加光源強度，有助於光源穿透深度更深入至樣本中。

5.3 以 D-FF-OCT 量測細胞動態特性之結果

利用 Ce^{3+} :YAG Mirau-based FF-OCT 之 D-FF-OCT 模式擷取細胞影像，並使用 D-FF-OCT 分析程式進行上色分析，觀察並分析約 15 秒的時間範圍內神經球細胞團塊與類胚胎體的動態特性變化。儘管兩種細胞團塊皆是由多個細胞堆疊而成，然而我們觀察到，於此節的上色動態影像中，更多的是各個區域因應不同頻率的動態特性而呈現出不同顏色，與第四章中所描述的細胞膜和細胞核之影像型態略有不同。以下將分別呈現神經球細胞與類胚胎體的 D-FF-OCT 分析結果。

5.3.1 間質幹細胞生成之神經球細胞 D-FF-OCT 影像結果與分析

本研究以分析固定深度之二維 D-FF-OCT 影像為主，使用 D-FF-OCT 分析程式對神經球細胞團塊進行分析後，分別可以得到黑白動態影像與上色動態影像。圖 5.21 分別為神經球細胞團塊之 FF-OCT 影像與 D-FF-OCT 黑白動態影像：

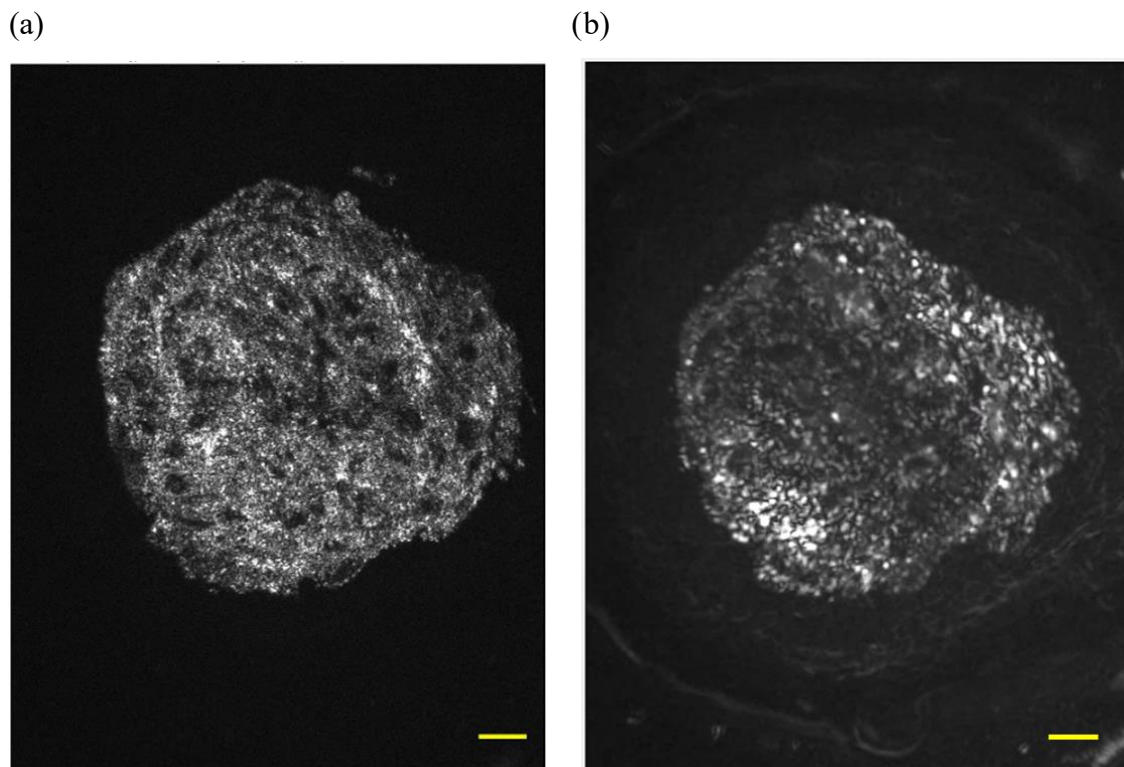


圖 5.21 (a)神經球細胞團塊 FF-OCT 影像；(b)以像素為單位，在時間軸上進行標準差運算後，得到神經球細胞團塊之黑白動態影像，其亮度代表標準差之大小。圖中比例尺為 $20\ \mu\text{m}$ 。

圖 5.21(a)、(b)兩圖雖然皆以黑白影像呈現，但兩者的生成方式大為不同。圖 5.21(a)利用 FF-OCT 優異的光學切片能力，從三維影像中擷取出與黑白動態影像相同深度的橫平面影像，以供相互參照和分析。圖 5.21(b)則是以 D-FF-OCT 模式量測固定的樣本深度，記錄一連串背向散射訊號，透過標準差運算的處理後，所得到的黑白動態影像。在影像中，亮度較高，呈現白色的像素，代表該像素記錄到的背向散射光強度隨時間改變的幅度較大，因此運算後獲得之標準差較大；亮度較小，較接近灰黑色的像素，則代表該像素記錄到的背向散射光強度隨時間變化的幅度較小，運算後獲得的標準差較小。然而，標準差的大小僅能反映光強度隨時間變化的幅度，無法充分代表頻率的高低。在樣本中，可能會出現光強度變化幅度較大但變化頻率較慢的區域，也可能出現時間範圍內光強度變化小但變化頻率快的區域。因此，為與黑白動態影像相互比較，以下我們將呈現基於分析頻譜圖的頻率分布所得到的上色動態影像：

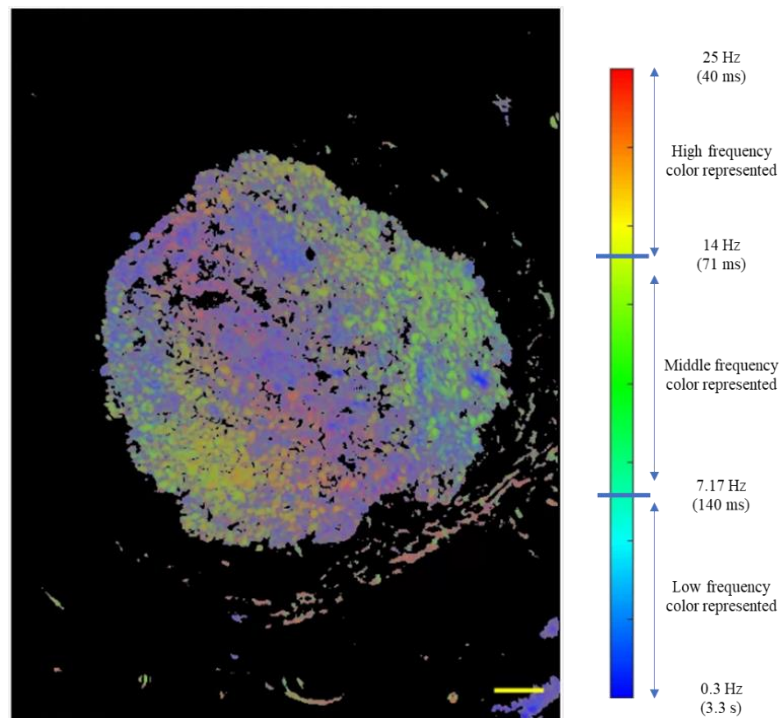


圖 5.22 神經球細胞團塊之上色動態影像，右側頻率色彩尺為顏色對應之頻率表現。圖中比例尺為 20 μm 。

以相同的 D-FF-OCT 資料，利用 D-FF-OCT 分析程式進行上色，得到如圖 5.22 的結果。不同於前一章巨噬細胞的結果，在神經球細胞團塊的上色動態影像中，我們不易看出細胞膜加上細胞核的影像組成，而是看到細胞團塊的各區域呈現不同的顏色，代表各處皆有特殊的動態特性表現。由於我們採用的上色分析方式屬於平均 FF-OCT 視野(Field of view)內量測到的動態訊號，因此呈現出來的顏色是樣本個體的相對高頻、中頻以及低頻。

在動態上色影像中，可以觀察到細胞的左右區域有相對偏中高頻率的黃綠色，而中間的區域則主要呈現代表低頻的藍色，此外，也能發現其中夾雜著一些代表高頻的紅色，這些顏色的分布情況反映細胞不同區域的動態特性差異。以下我們將以像素為單位，如圖 5.23 所示，描繪高、中、低頻等各區域像素的頻譜圖，頻譜圖是以橫軸為頻率，縱軸為強度所繪製的二維圖，我們能觀察各張頻譜圖的形狀分布，對其動態特性進行分析比較。另外，透過頻譜圖，我們也能判斷上色動態影像呈現的結果，是來自細胞的真實訊號，或是由環境雜訊所引起的干擾。

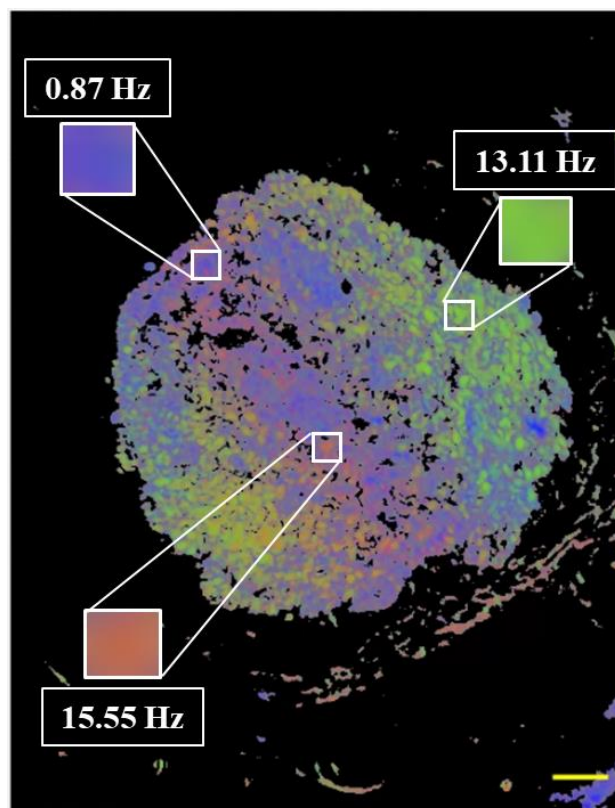


圖 5.23 抓取不同頻率顏色表現之像素示意圖，比例尺為 20 μm 。

環境雜訊是指外在因素在掃描過程中造成的干擾，例如系統本身的振動或是人走動造成的振動等，由於環境雜訊會直接影響整個樣本，在 D-FF-OCT 原始資料抓取過程中若受到干擾，後續呈現的頻譜圖中將會出現相同頻率的雜訊峰值，且有時透過自編程式中的平均處理無法將雜訊完全消除，進而導致上色動態影像出現錯誤的結果。

圖 5.24 為此組神經球細胞中單一像素的完整頻譜圖，可以看到在頻譜圖的後半部分幾乎沒有任何頻率峰值存在，考慮到程式分析的效率，我們會在分析過程中將這些後半段的頻譜圖排除，以降低運算負荷量。

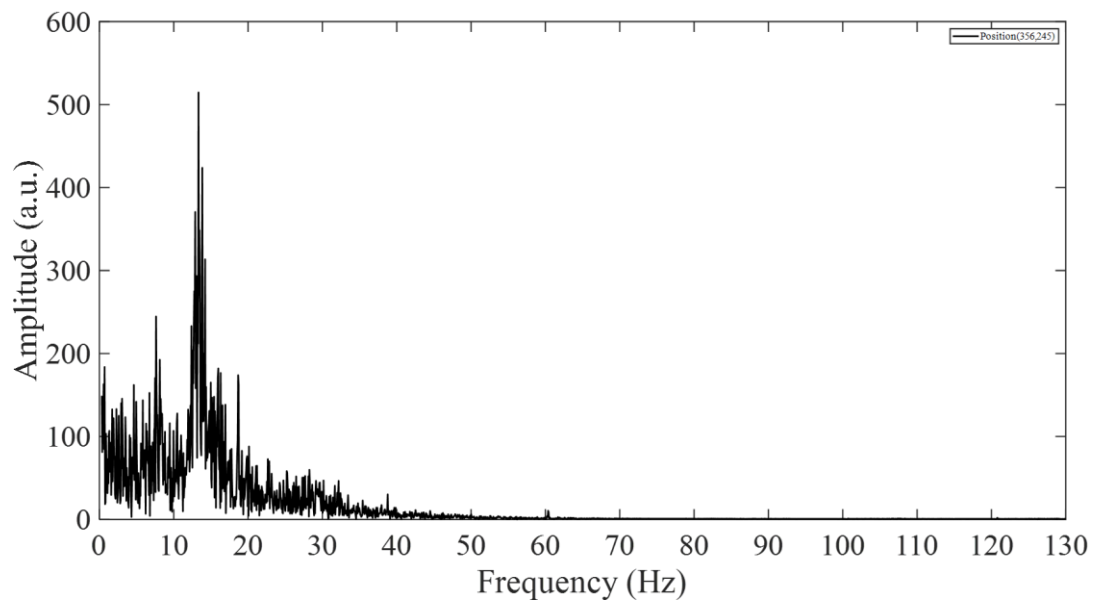


圖 5.24 神經球細胞單一像素之完整頻譜圖。

圖 5.25 則顯示圖 5.23 白色方框標示像素之頻譜圖，由上到下分別為低頻頻譜圖、中頻頻譜圖、高頻頻譜圖。

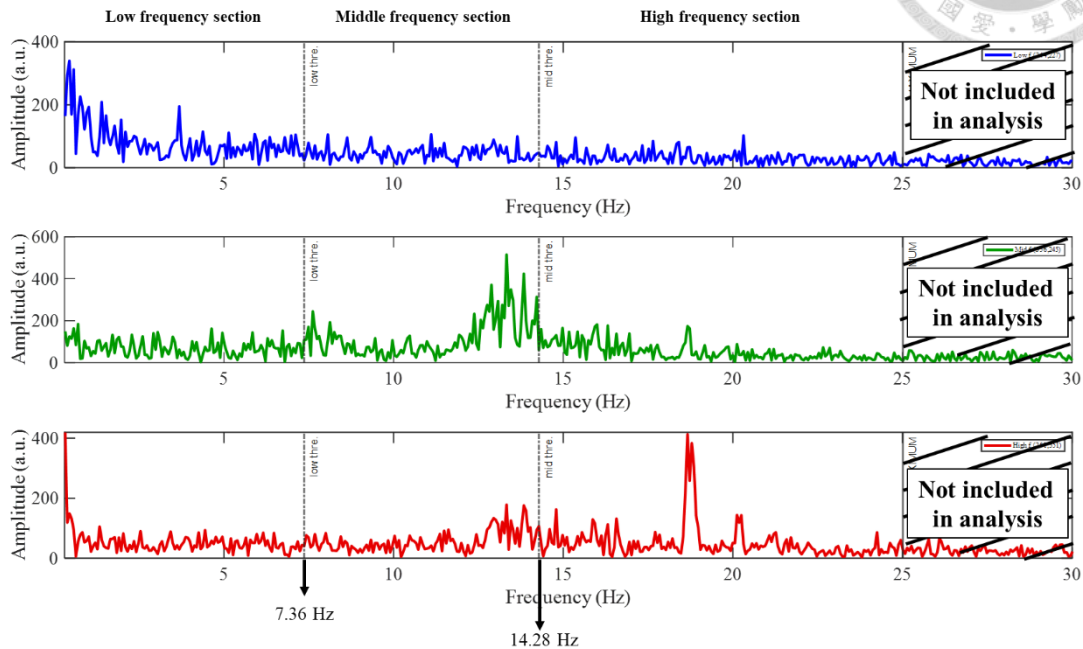


圖 5.25 以不同顏色之像素所描繪的頻譜圖。

三張頻譜圖中，最右邊皆標示著 MAXIMUM 的實線，表示程式在運算分析時，只取資訊至該頻率，而大於該頻率的頻譜資訊，在經過一維及二維的高斯平均後，已不存在任何峰值，因此可以將其排除在分析之外，增加程式的運算效率。而 MAXIMUM 左邊的兩條虛線，分別為低頻閾值和中頻閾值，閾值將頻譜圖劃分成三個區段，由左至右為低頻區段、中頻區段、高頻區段。

經觀察可以發現，不同顏色像素之頻譜圖，其呈現的特徵頻率峰值存在差異性。在低頻頻譜圖中，只有低頻區段呈現較為明顯的峰值，而中頻區段與高頻區段則呈現相對平緩的波型。在中頻頻譜圖中，頻率峰值普遍發生於中頻區段，高頻區段內偶有少數強度稍低的峰值存在，但低頻區段則幾乎沒有任何突出峰值。而在高頻頻譜圖中，只有高頻區段才有顯著的峰值出現。

此外，我們針對其他受環境雜訊干擾之 D-FF-OCT 資料，進行頻譜圖的呈現，如圖 5.26 所示。觀察圖中黑色圓圈所標示的峰值，在各像素生成的頻譜圖中均反覆出現，由此推斷該峰值為雜訊峰值。另外，圖 5.26 最下方的高頻頻譜圖顯示，

此像素在上色動態影像中呈現偏向紅色的高頻表現，而此現象是由雜訊峰值所貢獻，這亦印證前述所提及之環境雜訊可能影響上色動態影像結果之推論。

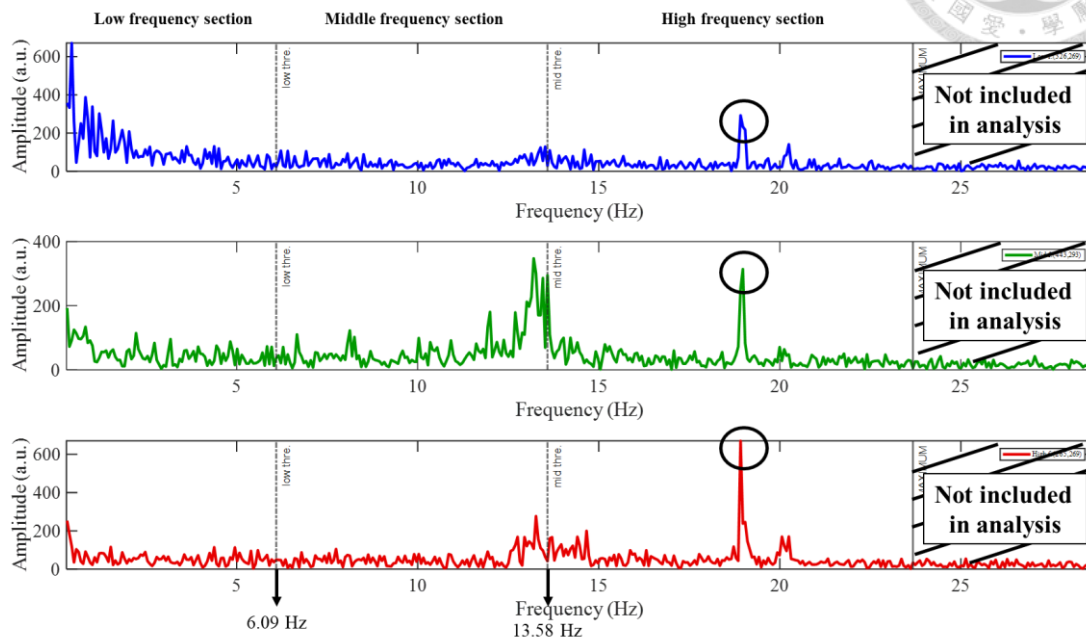


圖 5.26 受環境雜訊影響的 D-FF-OCT 資料所描繪的頻譜圖，黑色圓圈標示出雜訊頻率峰值。

若遇到高頻雜訊峰值，我們可以藉由移動 MAXIMUM 的位置，將之排除在分析範圍之外，而 MAXIMUM 的移動也會造成低頻閾值與中頻閾值往較低頻率的方向移動，如圖 5.27 所示。圖中黑色虛線代表原本的 MAXIMUM 位置，黑色斜線則是排除在分析範圍外的部分，而橘色實線為調整後的 MAXIMUM，新增了被排除在分析範圍外之區域，以橘色斜線標示。透過此方法，將有助於減少高頻雜訊峰值對影像分析的干擾，獲得更貼近細胞真實動態特性的結果。

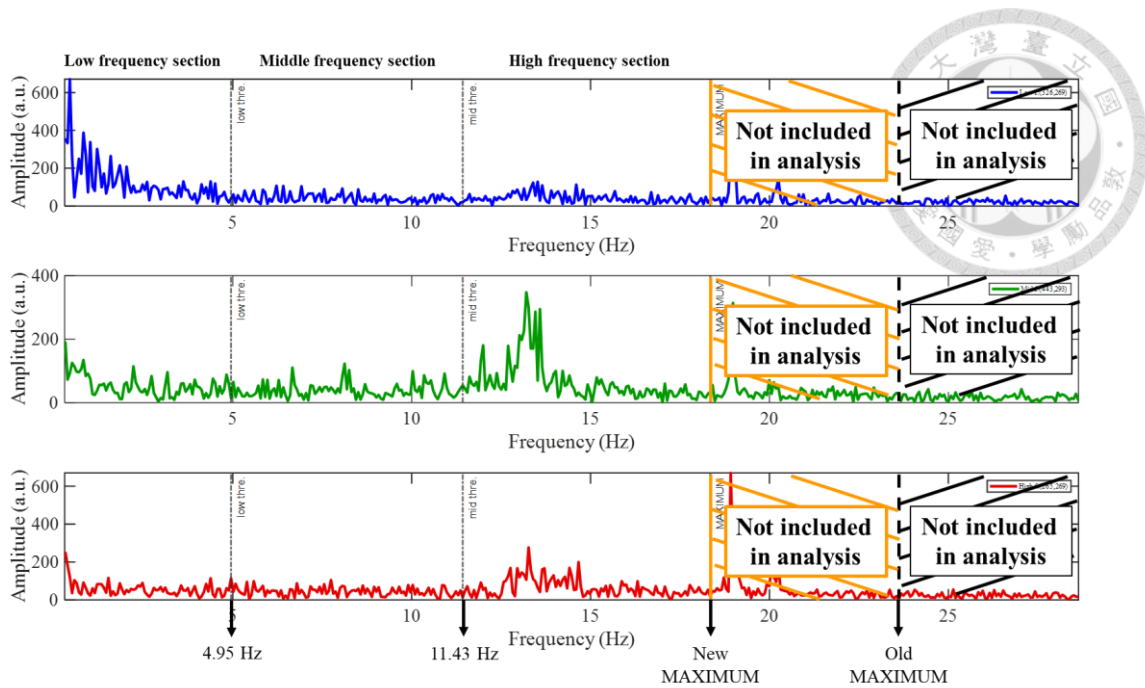


圖 5.27 透過移動 MAXIMUM 的位置(橘色實線)，過濾圖 5.26 中的高頻雜訊峰值干擾。橘色斜線區域為移動 MAXIMUM 後，新增的不加入程式分析之區域。

圖 5.28 展示此組受環境雜訊干擾之 D-FF-OCT 資料所生成的上色動態影像，左側和右側分別為移動 MAXIMUM 前後的影像。在左側影像中，我們可以看到細胞中間區域呈現高頻(紅色)與低頻(藍色)混雜的現象，此時呈現的高頻結果大多來自環境雜訊的干擾，在影像中並無法清楚地觀察到明顯的高頻區域。透過調整 MAXIMUM，將高頻雜訊峰值剔除後，得到圖 5.28 右側影像。在右側影像中，細胞的外圍區域出現較顯著的高頻特徵表現，也更接近如圖 5.23 中，細胞外圍偏向中高頻表現，內部呈現較低頻表現的上色動態影像分布。

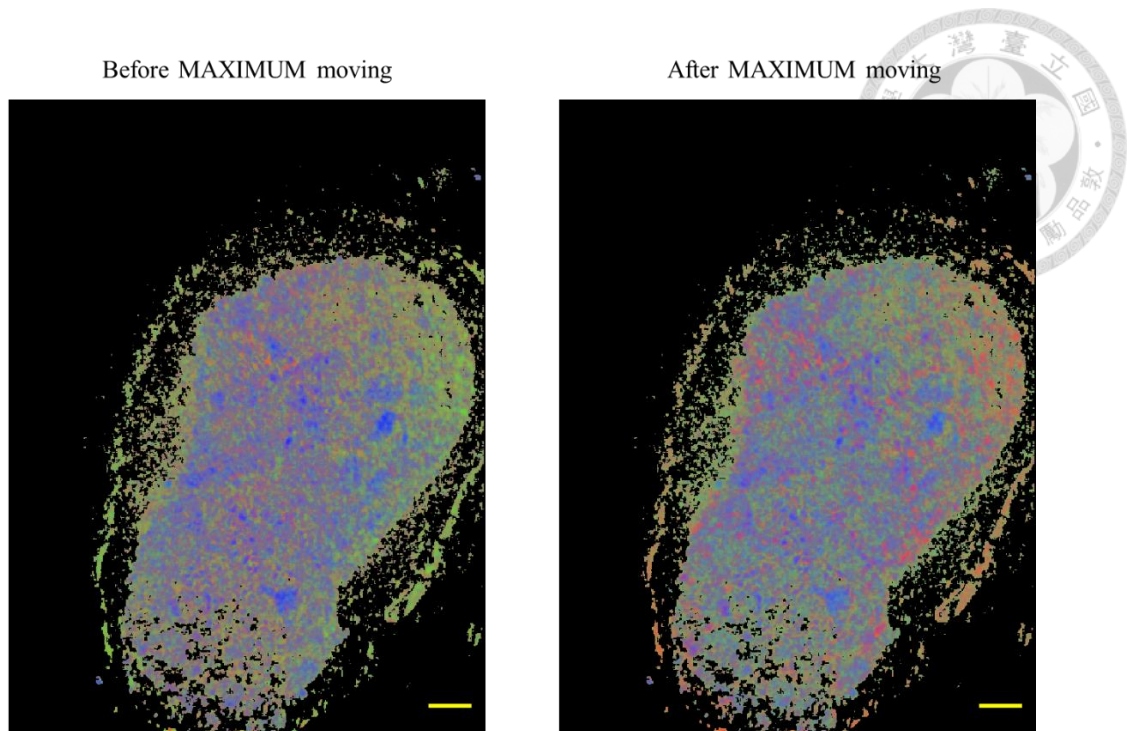


圖 5.28 移動 MAXIMUM 過濾高頻雜訊峰值前後的上色動態影像，調整後影像較能看出高頻訊號區域。比例尺為 20 μm 。

回顧圖 5.25，並且檢查了同批掃描資料中其他像素生成的頻譜圖，我們觀察到頻譜圖中均未出現重複的峰值，因此，我們可以推論該次 D-FF-OCT 掃描過程未受到嚴重的環境雜訊影響，同時也證明了我們抓取到的特徵頻率為細胞自身所產生的訊號。

遺憾的是，目前我們的細胞樣本資料數量仍然不足，尚無法從動態特性中取得與細胞直接相關的詳盡資訊。未來的研究需要累積更多的 D-FF-OCT 樣本數據，並且透過染色影像圖的輔助，如 H&E 染色或免疫組織化學染色等方法，以增加對於細胞的辨識度與詳盡程度。同時，結合人工智慧技術如機器學習或深度學習等方法，也能夠應用於分析和處理這些龐大的數據集，期望從特殊頻率峰值或是上色動態影像的結果中成功地進行部分細胞的區分和辨識。

5.3.2 誘導型多功能幹細胞生成之類胚胎體 D-FF-OCT 影像結果與分析

類胚胎體與 5.3.1 節的神經球細胞皆屬於懸浮型細胞團塊，我們同樣利用 Ce^{3+} :YAG Mirau-based FF-OCT 的 D-FF-OCT 掃描模式與 D-FF-OCT 分析程式對其進行影像擷取與動態分析，並呈現類胚胎體的黑白動態影像、上色動態影像以及頻譜圖。

圖 5.29 引用自 Stem Cell Report 的論文(M. Voelkner *et al.*, 2016) [29]，該論文使用小鼠之誘導型多功能幹細胞培養視網膜類器官(Retinal organoid)，並有記錄培養過程中細胞大小的變化。我們將其作為培養天數對應到類胚胎體團塊大小的參考，可以看到在第七天時，團塊大約是 600 μm ，而培養至第十天時，細胞已超過 1 mm。

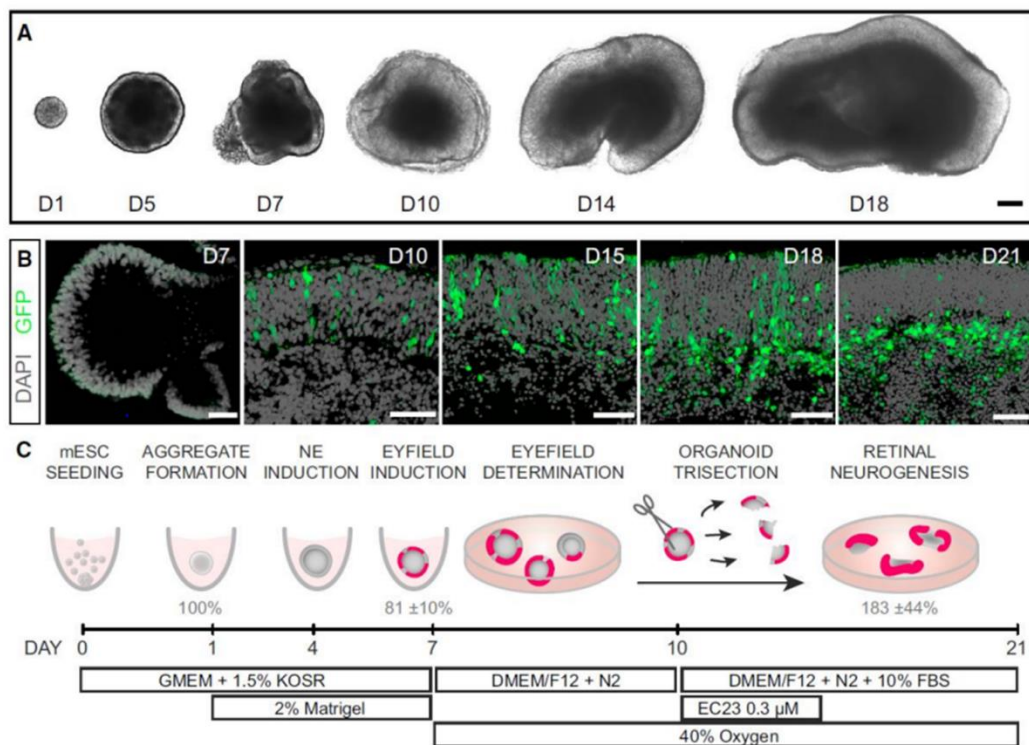


圖 5.29 小鼠之視網膜類器官培養過程[29]，圖 A 比例尺為 200 μm ，圖 B 比例尺為 50 μm 。

在本實驗中，我們以培養七天的類胚胎體樣本進行掃描分析，是因為隨著培養天數增加，類胚胎體的體積也會相應增加。然而，為了能在本研究使用的系統視域

(219 μm *291 μm)內觀察到較完整的類胚胎體形貌，我們選擇了這個培養天數，但過短的培養天數，也導致類胚胎體仍處於較為初期的分化階段。未來可以採用拼接的方式，將多個相鄰視域拼在一起，以對培養天數更長且分化更完整的細胞團塊進行 D-FF-OCT 掃描和分析。此外，也可以對團塊中的不同細胞進行分析，觀察它們在上色動態影像中是否呈現出不同的動態特徵頻率，以進一步探索細胞之間的相互作用和發育過程。

圖 5.30 (a)和(b)分別為培養七天的類胚胎體之 FF-OCT 影像與黑白動態影像。利用 FF-OCT 系統的光學切片能力，我們從三維影像中挑選出與 D-FF-OCT 位於相同深度的 FF-OCT 影像，並將其相互比較。

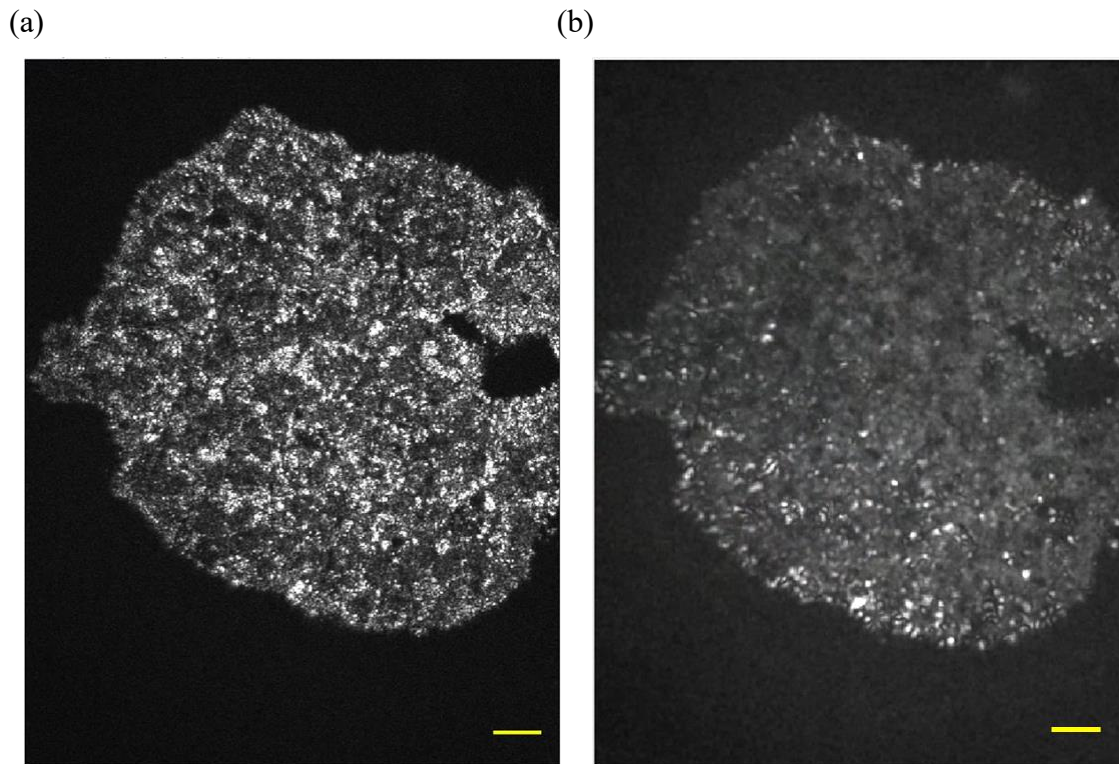


圖 5.30 培養經七天之類胚胎體 (a)FF-OCT 橫平面影像；(b)黑白動態影像。圖中比例尺為 20 μm 。

根據本章 5.2.2 節中的 H&E 染色影像和 FF-OCT 影像，我們推測圖 5.30(a)中的黑色空洞可能為細胞凋亡後所形成的囊腔構造。由於該區域沒有任何細胞存在，因此在做 D-FF-OCT 分析時，不會產生任何動態訊號。因此，該處經標準差計算得到的數值與系統雜訊的強度相近，導致如圖 5.30(b)所示，呈現出空洞狀態。而在

圖 5.30(b)的黑白動態影像中，只有細胞的下半部分出現零星區域呈現明亮的特徵，這代表僅有少數區域的背向散射光強度在時間上有著顯著的變化幅度，而其他區域的背向散射光強度則是以相對較小的幅度隨時間變化。

圖 5.31 則是以同樣的D-FF-OCT 資料進行上色分析後，得到之上色動態影像。影像中，以類胚胎體樣本的下方以及團塊外圍出現較多的高頻表現，我們根據上色動態影像，挑選出表現高頻、中頻和低頻的像素並描繪其頻譜圖，並將頻譜圖進行比較，以確定影像中的顏色形成並非來自環境雜訊的影響。

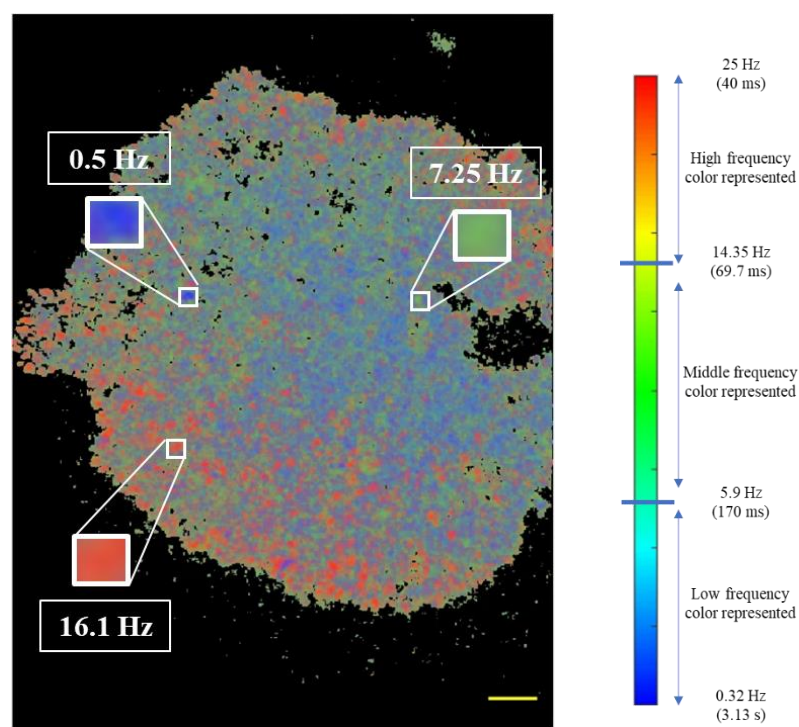


圖 5.31 類胚胎體之上色動態影像，圖中比例尺為 20 μm 。從中挑選三個不同頻率表現之像素，並繪製其頻譜圖。右側為對應之頻率色彩尺。

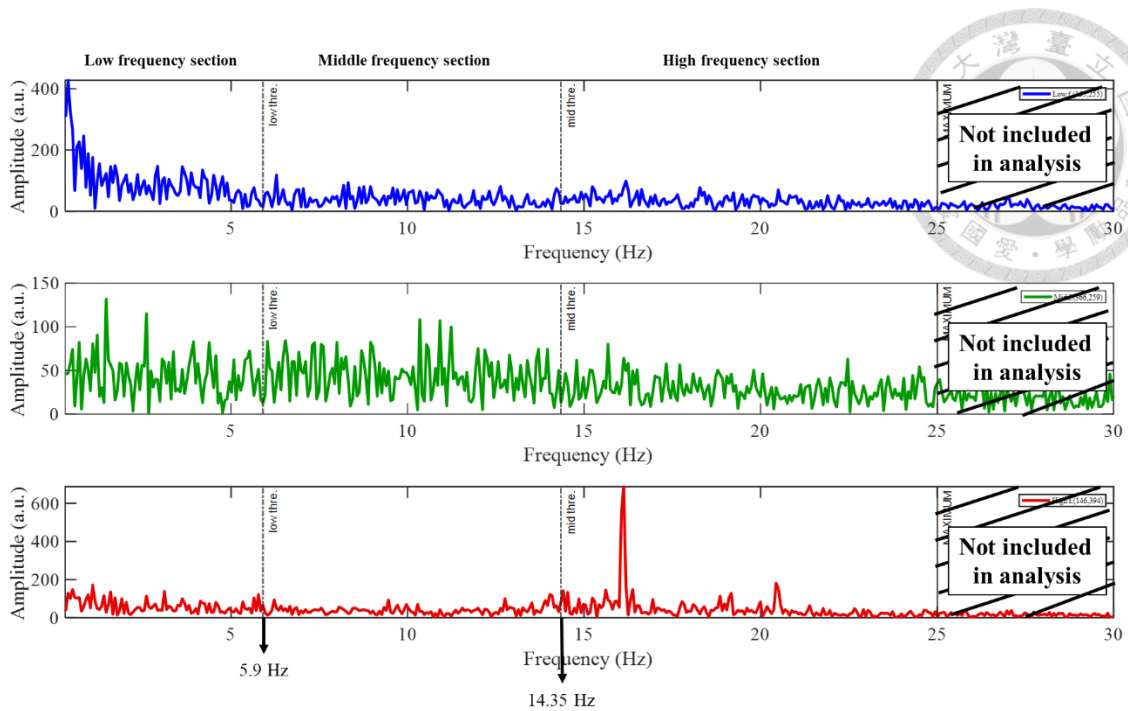


圖 5.32 描繪圖 5.31 中白色方框標示之像素的頻譜圖。

圖 5.31 中挑選不同顏色的像素(白色方框)，並分別繪製其頻譜圖，如圖 5.32 所示，自上而下呈現了類胚胎體的低頻、中頻和高頻頻譜圖。與 5.3.1 的分析方法一致，我們在程式分析中剔除了不含峰值的高頻部分，以降低運算負荷量並加快分析速度。除了中頻頻譜圖在對應的中頻區段較不容易觀察到顯著的特徵頻率外，其餘兩個頻譜圖對應的區段均顯示其特徵頻率。此外，這三張頻譜圖中不存在重複出現的頻率峰值，也證明此組 D-FF-OCT 資料在擷取時未受到雜訊頻率影響。

在類胚胎體的樣本掃描中，我們也嘗試持續觀察同一個細胞團塊，以探討其動態特徵分布在時間上的變化。然而，由於我們乘載樣本的載台為開放式容器，內部的培養基會隨時間逐漸蒸發，且類胚胎體樣本屬於懸浮型細胞，加入新的培養基會將我們觀察的細胞團塊沖離系統視域，即使重新找回也難以再次觀察相同的深度平面。因此，在這些條件限制之下，目前我們只能在約一小時的時間範圍持續進行觀察。

圖 5.33 呈現了針對同一個類胚胎體，選取三個時間點，分別為第零分鐘、第三十分鐘以及第六十分鐘，進行 D-FF-OCT 模式掃描，並以程式分析，得到上色動態影像。

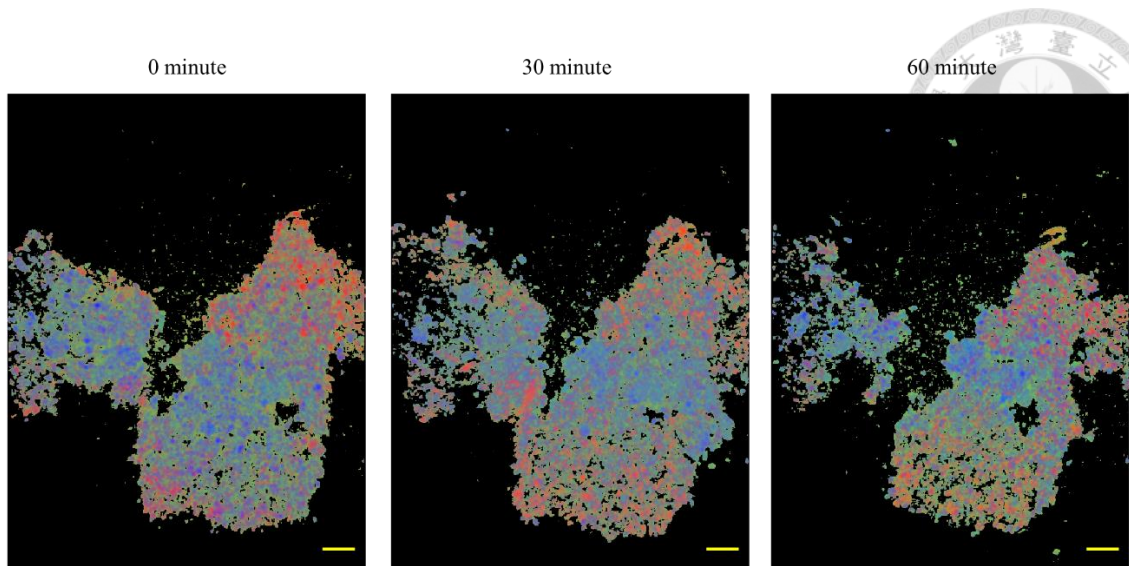


圖 5.33 同個類胚胎體隨時間經過之上色動態影像比較。第 0 分鐘時，低頻閾值為 5.08 Hz，中頻閾值為 13.71 Hz。第 30 分鐘時和第 60 分鐘時，低頻閾值皆為 5.97 Hz，中頻閾值皆為 14.6 Hz。圖中比例尺為 20 μm 。

然而，在 D-FF-OCT 模式掃描時，系統使用的壓電致動器無法每次都精確地停留在相同的深度平面，因此我們只能盡可能尋找相近深度進行 D-FF-OCT 訊號採集，這造成在後續分析這三張上色動態影像時出現微小形態上的差異，特別是在第六十分鐘的上色動態影像，其形態與另外兩張有最明顯的落差。此外，由於類胚胎體在短時間內的變化相對微小，因此單一小時的觀察可能難以觀察到顯著的動態變化趨勢。未來可考慮將開放式的樣本載臺更新為簡易的培育器(Incubator)，以便對相同的類胚胎體進行長時間的 D-FF-OCT 掃描，監測其動態變化趨勢，且可以搭配高空間解析度的 FF-OCT 影像進行觀察，以更全面地揭示類胚胎體的動態變化過程。

目前，許多研究團隊正積極致力於發展和應用 D-FF-OCT 技術。Leung *et al.* 利用動態微光學同調斷層掃描術(Dynamic micro-optical coherence tomography)對人類食管與子宮頸活檢樣本進行分析應用，其測得的細胞動態頻率範圍落在 0 Hz – 20 Hz 內[32]。Münter *et al.* 則使用基於顯微光學同調斷層掃描術(Microscopic OCT)所開發的掃描式頻域 OCT (Scanning frequency-domain OCT)，對肝臟細胞(Hepatocytes)進行動態特性分析，其上色結果能夠凸顯細胞核的存在，並且細胞動態頻率分析之範圍為 0 Hz – 25 Hz [33]。另外，Thouvenin *et al.* 則利用 D-FF-OCT 對老鼠肝臟組

織進行量測，細胞動態頻率的分析範圍則是介於 0.2 Hz – 40 Hz 之間[34]。

根據細胞組織樣本的不同或數據分析演算法的差異，文獻中所使用的低頻閾值和中頻閾值可能存在一定的變異性。然而，大多數細胞樣本的動態頻率通常在 40 Hz 的範圍內，而我們所研究的三種樣本的動態頻率則皆分布在 25 Hz 以下的範圍內。此外，在表 5.1、表 5.2 和表 5.3 中，我們分別呈現本研究在巨噬細胞、神經球細胞和類胚胎體之上色動態影像分析時所使用的低頻閾值與中頻閾值，以及其閾值的平均數±標準差之結果。

表 5.1 巨噬細胞上色動態影像之低頻閾值與中頻閾值。

Macrophage	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
Low threshold (Hz)	4.89	4.82	5.46	4.7	4.82
Mid threshold (Hz)	12.7	12.57	13.77	12.44	12.82
	Averaged low threshold (Hz)	4.94±0.3		Averaged mid threshold (Hz)	12.86±0.53

表 5.2 神經球細胞上色動態影像之低頻閾值與中頻閾值。

Neurosphere	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Low threshold (Hz)	7.36	6.35	6.98	6.54	6.54	6.22
Mid threshold (Hz)	14.28	13.97	14.22	14.41	14.47	14.66
	Averaged low threshold (Hz)	6.67±0.43		Averaged mid threshold (Hz)	14.34±0.24	

表 5.3 類胚胎體上色動態影像之低頻閾值與中頻閾值。

Embryoid body	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Low threshold (Hz)	5.96	6.41	5.08	5.97	5.97	6.22
Mid threshold (Hz)	14.35	14.47	13.71	14.6	14.6	14.73
	Averaged low threshold (Hz)	5.94±0.46		Averaged mid threshold (Hz)	14.39±0.37	

比較這三種細胞樣本的閾值，我們觀察到巨噬細胞的低頻閾值和中頻閾值均較其他兩種樣本為低。而在我們的 D-FF-OCT 分析程式中，上色的計算方式是通過調整閾值，使頻譜圖在界定的低頻、中頻和高頻區段之間實現總面積的平均分配。在三種樣本中使用相同最大頻率(MAXIMUM)的設定下，我們可以推斷相較於神經球細胞和類胚胎體，巨噬細胞在高頻區段較少出現峰值訊號，因此需要將閾值調整至較低的頻率，以滿足總面積均等分配的條件。也由此可知，神經球細胞與類胚胎體在高頻區段表現出更多的動態特性。

Chapter 6 結論與未來展望




6.1 結論

本研究使用 Mirau-based FF-OCT 系統的 FF-OCT 掃描模式，對體外培養的細胞樣本進行影像量測。此外，我們亦使用相同系統的 D-FF-OCT 掃描模式，量測細胞樣本的動態特性。使用的細胞樣本包括巨噬細胞、間質幹細胞生成之神經球細胞，以及誘導型多功能幹細胞生成之類胚胎體。本研究所使用的 OCT 系統，以 Ce^{3+} :YAG 晶體光纖產生的自發性輻射作為光源，其中心波長為 560 nm，頻譜之半高全寬為 95 nm。以寬頻光源搭配顯微物鏡，使我們的 OCT 系統能夠同時呈現高解析度的縱平面影像和橫平面影像。經實驗量測，此系統之橫向解析度約為 0.8 μm ，系統之縱向解析度約為 0.97 μm ，而 D-FF-OCT 的時間解析度為 7.7 ms。

本論文除了利用 FF-OCT 掃描模式呈現細胞樣本三維立體影像之外，亦採用 D-FF-OCT 掃描模式對細胞樣本進行量測。在 D-FF-OCT 掃描模式下，我們定位影像擷取平面於特定樣本深度，並持續收集該平面上的背向散射光訊號變化，得到長度-長度-時間的三維影像，再以自行撰寫之 D-FF-OCT 分析程式進行影像分析。為確保取得真實訊號，在程式中，我們透過縱向一維高斯平均及橫向二維卷積高斯平均等處理方式，減少外在因素對樣本產生的動態影響。不過此類平均處理方式會降低系統的空間解析度及時間解析度，經過橫向 5*5 個像素平均之後，系統之橫向解析度變為 1.82 μm ，而在 11 點高斯縱向平均後，時間解析度變為 9.35 ms。然而，這些解析度仍小於細胞樣本的尺寸及其特徵頻率，因此可以在平滑雜訊的同時保留一定量的影像資訊。我們最終獲得兩種影像，一是以標準差大小呈現的黑白動態影像，另一則是利用頻譜圖之頻率峰值進行 RGB 色彩通道平均分配後所呈現的上色動態影像。

在 *in vitro* 巨噬細胞的量測實驗中，我們以 FF-OCT 掃描模式獲得培養於 GP3 玻片上的巨噬細胞影像，透過影像可以清楚地觀察到巨噬細胞的細胞膜與細胞核之形貌。在 FF-OCT 影像中，細胞周圍呈亮白色環狀的結構是細胞膜，其介質折射率與周遭差異較大，造成較強的背向散射光訊號；而內部呈黑色球狀的部分則是細胞核，由於核內材質分布較均勻，折射率差異較小，故不易形成背向散射光訊號，在 FF-OCT 影像上表現較為黯淡。



此外，我們也使用 D-FF-OCT 掃描模式量測固定深度的 *in vitro* 巨噬細胞，並透過自行編寫之 D-FF-OCT 分析程式，獲得黑白動態影像和上色動態影像。在黑白動態影像中，我們觀察到多數細胞核存在標準差，其數值小於周圍細胞膜的標準差，但仍大於背景雜訊，這表示核內的背向散射光訊號隨時間變化，具有一定的動態特性。在分析程式中，我們進一步運用背向散射光訊號，利用快速傅立葉轉換計算得到各個像素的頻譜圖，再將所有頻譜圖進行 RGB 色彩通道平均分配，得到巨噬細胞的上色動態影像。在上色動態影像中，細胞膜呈現代表低頻的藍色，而細胞核則呈現代表中高頻的黃色，透過 D-FF-OCT 程式分析，能夠有效凸顯細胞核的特徵，並可用來輔助判讀 FF-OCT 影像。此外，在未來的影像分析中，若採用深度學習進行自動化判讀，可利用細胞的上色動態影像作為基準真相(Ground truth)，以進一步提升深度學習模型的準確度。

在 *in vitro* 間質幹細胞生成之神經球細胞團塊及 *in vitro* 誘導型多功能幹細胞生成之類胚胎體的實驗中，我們同樣以 FF-OCT 模式與 D-FF-OCT 模式進行掃描，並進程式分析。在 FF-OCT 影像中，我們觀察到兩種樣本都是以多顆小細胞聚集而成，且細胞團塊內偶爾會出現外型特殊的構造，但目前仍需要累積一定數量的 FF-OCT 影像，並與 H&E 和 IHC 等等相關染色影像比對，才有機會辨識出這些構造屬於何種細胞。

我們發現，在顯微鏡影像中，神經球細胞和類胚胎體的中央區域會呈現深灰色，無法清晰辨識細胞形貌。而在 FF-OCT 模式下，雖然可以獲得清楚的小細胞群體影像，但掃描深度也僅能到達 90 μm 左右，超過此深度後，即使影像擷取平面繼續深入樣本，CCD 相機所接收到的背向散射訊號也非常微弱。透過圖像處理軟體 ImageJ，我們對 FF-OCT 縱平面影像進行訊號之灰階值強度衰減進行分析，結果顯示隨著掃描深度增加，背向散射訊號強度急遽下滑，根據此結果我們推測，由於這兩種樣本皆是以多顆小細胞聚集而成，而成堆的小細胞相當於將球狀透鏡堆疊，因此當光束經過時，會先被聚焦，接著以更大的角度發散，導致光強度急遽衰減，同時也限制了 FF-OCT 的掃描深度。由於這種現象屬於樣本的特性，我們只能在不使前段影像過曝的條件下，適度提升光源輸出功率及相機積分時間，以增加掃描深度。

量測神經球細胞與類胚胎體等懸浮型細胞的 D-FF-OCT 影像時，移動觀測載臺或是添加培養基等人為外在因素，都會使樣本產生非自發性的動態行為，如漂動

或是轉動等，類似布朗運動，造成上色動態影像整體出現雜訊，我們稱之為環境雜訊，因此在進行掃描之前，我們會將載臺上的樣本靜置約 15 分鐘，以減少環境雜訊的影響。

在神經球細胞與類胚胎體的 D-FF-OCT 影像分析中，特別是在上色動態影像方面，觀察到的現象與巨噬細胞凸顯細胞核的結果略有不同。在影像中，我們觀察到細胞團塊各個區域呈現出不同顏色，反映其對應不同頻率的動態特性。為了證明抓取到的特徵頻率源於細胞本身的動態行為，我們以像素為單位，在同一細胞樣本中描繪其高頻、中頻、低頻等各區域的頻譜圖。通過比較頻譜圖，我們可以觀察峰值出現的頻率位置是否相同，用來判斷我們量測到的屬於真實訊號或是雜訊峰值。經過比較，我們確定神經球細胞及類胚胎體的 D-FF-OCT 資料中抓取到的特徵頻率為細胞本身所生成的訊號。

此外，我們將三種樣本在 D-FF-OCT 分析時所使用的低頻閾值與中頻閾值進行整理和比較，並列於表格中。巨噬細胞的低頻閾值為 4.94 ± 0.3 Hz，中頻閾值為 12.86 ± 0.53 Hz；神經球細胞的低頻閾值為 6.67 ± 0.43 Hz，中頻閾值為 14.34 ± 0.24 Hz；類胚胎體的低頻閾值為 5.94 ± 0.46 Hz，中頻閾值為 14.39 ± 0.37 Hz。在相同的最大頻率上限(MAXIMUM)的設定下，巨噬細胞的低頻與中頻閾值明顯較另外兩種樣本低，由此可以推論神經球細胞與類胚胎體具有更多的高頻動態特性。觀察神經球細胞與類胚胎體樣本中偏向中頻(綠色)或高頻(紅色)表現的像素，我們發現其頻譜圖多在 13 Hz 至 20 Hz 之間出現數個頻率峰值，然而遺憾的是，目前我們的樣本資料數量尚不足以從分析所得到的動態特性中獲取與細胞直接相關的資訊。

我們也嘗試對同一類胚胎體持續觀察，以探討上色動態影像中的動態特徵分布如何隨時間變化，但受限於培養基的蒸發速度以及添加培養基可能導致原細胞被沖離視域，我們僅能進行約一小時的持續觀察。然而，類胚胎體在短時間內的變化微小，僅一小時的時間差異較難觀察到顯著的動態變化趨勢，為了更全面且精確地了解樣本的動態特性，未來可以考慮將樣本載臺更新為簡易培育器裝置，以實現更長時間的動態觀察，從而更好地了解動態變化趨勢。

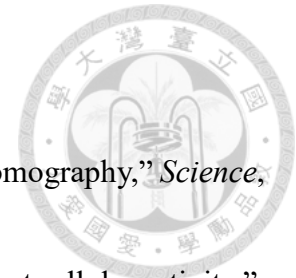


6.2 未來展望

本研究證實了使用 Mirau-based 全域式 OCT 的 D-FF-OCT 掃描模式，可以從神經球細胞和類胚胎體等樣本中擷取到具有動態特徵的訊號，再透過 D-FF-OCT 分析程式，將訊號轉為動態特徵頻率，並根據頻率進行影像上色，獲得上色動態影像。然而，由於目前 D-FF-OCT 樣本數據量不足，我們尚無法建立不同特徵頻率與細胞之間的直接關聯性。在未來，隨著 D-FF-OCT 樣本數據的累積，我們希望可以透過 H&E 染色或 IHC 染色等組織染色影像圖的輔助，並結合機器學習或深度學習等方法，從動態特徵頻率或上色動態影像中成功地區分和辨識不同細胞類型，從而更深入理解組織和細胞的動態行為。

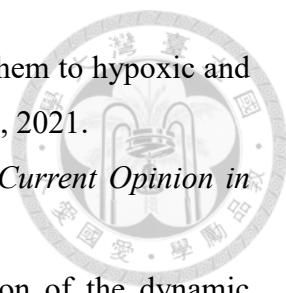
使用 Mirau-based 全域式 OCT 的 D-FF-OCT 掃描模式抓取影像資訊時，我們的影像擷取平面會固定於特定深度，因此，在後續進行 D-FF-OCT 分析時，只能產生該特定深度的單一橫平面上色動態影像，對於具備生成三維立體影像能力的 OCT 系統而言，這樣的限制稍顯遺憾。為克服這一限制，未來可以開發三維 D-FF-OCT 掃描模式，透過極慢的影像擷取平面推進速率，進行三維深度掃描，並配合 CCD 相機的影格速率設定，使每個 OCT 系統之縱向解析度的深度內能夠抓取足夠數量的原始資料。在進行 D-FF-OCT 分析程式的修改時，我們可以以縱向解析度為單位，生成每個單位深度內的單一橫平面上色動態影像，進而得到多個不同深度的上色動態影像。藉此方式，將有助於建立更完整的三維上色動態影像模型，使我們能夠更全面、更精確地觀察並分析組織和細胞間的動態特性，以提供更詳細的資訊。未來希望能透過與細胞生理指標的比對，解釋這些特徵頻率所代表的生物信息，進一步揭開細胞的生理運作機制。

Reference



- [1] D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin *et al.*, “Optical coherence tomography,” *Science*, vol. 254, pp. 1178—1181, 1991.
- [2] V. Gorti, R. Malpani, E. Blick *et al.*, “D-FFOCT as a tool to detect cellular activity,” *Biophotonics Congress: Biomedical Optics (Translational, Microscopy, OCT, OTS, BRAIN)*, W1E –W5E Optical Society of America, Washington, DC, 2020.
- [3] O. Thouvenin, C. Boccara, M. Fink *et al.*, “Cell motility as contrast agent in retinal explant imaging with full-field optical coherence tomography,” *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 58, pp. 4605—4615, 2017.
- [4] Y. S. Baek, S. Haas, H. Hackstein *et al.*, “Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells,” *BMC Immunology*, vol. 10, pp. 18—32, 2009.
- [5] E. Monni, T. Congiu, D. Massa *et al.*, “Human neurospheres: from stained sections to three-dimensional assembly,” *Translational Neuroscience*, vol. 2, pp. 43—48, 2011.
- [6] T. A. V. Afanasyeva, J. C. Corral-Serrano, A. Garanto *et al.*, “A look into retinal organoids: methods, analytical techniques, and applications,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 78, pp. 6505—6532, 2021
- [7] C. Apelian, C. Gastaud, A. C. Boccara, “Extracting relevant information for cancer diagnosis from dynamic full field OCT through image processing and learning,” *Proceeding of SPIE*, vol. 10053, 100531H, 2017.
- [8] J. Scholler, “Motion artifact removal and signal enhancement to achieve in vivo dynamic full field OCT,” *Optics Express*, vol. 27, pp. 19562—19572, 2019.
- [9] Wolfram MathWorld, “Wiener-Khinchin Theorem,” [Online]. Available: <https://mathworld.wolfram.com/Wiener-KhinchinTheorem.html>.
- [10] J. Haggerty, “Production of fibers by a floating zone fiber drawing technique,” *NASA Contract Report*, NASA-CR-120948, 1972.
- [11] 吳政育, “Full-field optical coherence tomography combined with raman spectroscopy for biological sample characterization,” *國立臺灣大學碩士論文*, 2017.
- [12] 王政凱, “摻鈦藍寶石寬頻晶體光纖光源之製備與檢測,” *國立臺灣大學碩士*

- 論文, 2011.
- [13] Y. Dong, G. Zhou, J. Xu *et al.*, “Luminescence studies of Ce³⁺:YAG using vacuum ultraviolet synchrotron radiation,” *Materials Research Bulletin*, vol. 41, pp. 1959—1963, 2006.
- [14] 施承宏, “全域式光學同調斷層掃描術用於角膜神經影像分析,” 國立臺灣大學碩士論文, 2019.
- [15] Olympus, “Resolution Criteria and Performance Issues” [Online]. Available: <https://www.olympus-lifescience.com/zh/microscope-resource/primer/digitalimaging/deconvolution/deconresolution/>
- [16] C. Apelian, F. Harms, O. Thouvenin *et al.*, “Dynamic full field optical coherence tomography: subcellular metabolic contrast revealed in tissues by temporal analysis of interferometric signals,” *Biomedical Optics Express*, vol. 7, Issue 4, pp. 1511—1524, 2016.
- [17] C. C. Tsai, C. K. Chang, K. Y. Hsu *et al.*, “Full-depth epidermis tomography using a mirau-based full-field optical coherence tomography,” *Biomedical Optics Express*, vol. 5, Issue 9, pp. 3001—3010, 2014.
- [18] MATLAB MathWorks, “2-D convolution” [Online]. Available: <https://www.mathworks.com/help/matlab/ref/conv2.html>.
- [19] CSDN, “二維卷積詳解，zero padding 和 shape=full, same, valid 詳解” [Online]. Available: https://blog.csdn.net/weixin_42150026/article/details/104554895.
- [20] 知乎, “如何通俗易懂地解釋卷積” [Online]. Available: <https://www.zhihu.com/question/22298352>.
- [21] J. Scholler, K. Groux, O. Goureau *et al.*, “Dynamic full-field optical coherence tomography: 3d live-imaging of retinal organoids,” *Light: Science & Applications*, vol. 9, 140, 2020.
- [22] R. A. Khanbeigi, A. Kumar, F. Sadouki *et al.*, “The delivered dose: Applying particokinetics to in vitro investigations of nanoparticle internalization by macrophages,” *Journal of Controlled Release*, vol. 162, pp. 259—266, 2012.
- [23] D. A. Fletcher, R. D. Mullins, “Cell mechanics and the cytoskeleton,” *Nature*, vol. 463, pp. 485—492, 2010.
- [24] S. Valdebenito, S. Malik, R. Luu *et al.*, “Tunneling nanotubes, TNT, communicate

- 
- glioblastoma with surrounding non-tumor astrocytes to adapt them to hypoxic and metabolic tumor conditions,” *Scientific Reports*, vol. 11, 14556, 2021.
- [25] C. Zurzolo, “Tunneling nanotubes: Reshaping connectivity,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 71, pp. 139—147, 2021.
- [26] S. Park, T. Nguyen, E. Benoit *et al.*, “Quantitative evaluation of the dynamic activity of HeLa cells in different viability states using dynamic full-field optical coherence microscopy,” *Biomedical Optics Express*, vol. 12, pp. 6431—6441, 2021.
- [27] 陳柏穎, “全域式光學同調斷層掃描術於三維黑色素瘤細胞株之細胞凋亡研究,” 國立臺灣大學碩士論文, 2021.
- [28] W. Khalil, T. Tiraihi, M. Soleimani *et al.*, “Conversion of neural stem cells into functional neuron-like cells by microrna-218: differential expression of functionality genes,” *Neurotoxicity Research*, vol. 38, pp. 707—722, 2020.
- [29] M. Völkner, M. Zschätzsch, M. Rostovskaya *et al.*, “Retinal organoids from pluripotent stem cells efficiently recapitulate retinogenesis,” *Stem Cell Reports*, vol. 6, pp. 525—538, 2016.
- [30] A. T. Feldman, D. Wolfe, “Tissue processing and hematoxylin and eosin staining,” *Histopathology*, vol. 1180, pp. 31—43, 2014.
- [31] 游鈞, “Mirau 全域式光學同調斷層掃描術結合近紅外光拉曼光譜用於皮膚細胞之影像與頻譜特性分析,” 國立臺灣大學碩士論文, 2018.
- [32] H. M. Leung, M. L. Wang, H. Osman *et al.*, “Imaging intracellular motion with dynamic micro-optical coherence tomography,” *Biomedical Optics Express*, vol. 11, pp. 2768—2778, 2020.
- [33] M. Münter, M. vom Endt, M. Pieper *et al.*, “Dynamic contrast in scanning microscopic OCT,” *Optics Letters*, vol. 45, pp. 4766—4769, 2020.
- [34] O. Thouvenin, C. Apelian, A. Nahas *et al.*, “Full-field optical coherence tomography as a diagnosis tool: Recent progress with multimodal imaging,” *Applied Sciences*, vol. 7, 236, 2017.