

國立臺灣大學醫學院暨工學院醫學工程學研究所

碩士論文

Graduate of Institute of Biomedical Engineering

College of Medicine and Engineering

National Taiwan University

Master Thesis



以倍頻顯微術自動搜尋皮下微血管的方法

Auto-searching Erythrocytes Harmonic Generation

Microscopy Method

謝佳宏

Chia-Hung Hsieh

指導教授：劉子銘 博士

Advisor : Tzu-Ming Liu, Ph.D.

中華民國 102 年 12 月

December, 2013

誌 謝



兩年前，我生日當天，恰好是台大研究所入學考試放榜之日，我很幸運地錄取台灣大學，此後，我的人生展開一段華麗的冒險。這些日子，歷經太多事情了，有甜美的回憶也有苦澀的眼淚，一言難盡。

感謝劉子銘老師的指導，也感謝台北科大的張陽郎老師與方志鵬老師的諄諄教誨，使我在學術與人生上有不同的體認。徹重、仕泓、倫彰，謝謝你們陪我走過人生的低潮，瞎狼幫不會解散的，對吧？徹重，如果我下次又失戀，手機再借我打一次。慶祐，下次回台北時記得找大家聚聚。仕泓，我們最麻吉了，一切盡在不言中。倫彰，有好對象要說喔！育芳學姊，謝謝妳的協助讓我的實驗可以順利進行。佩純，感謝妳每年都邀請我去聖誕趴還介紹教會的朋友給我認識。政翰，感謝你 Hold 住雷射和承接實驗室行政業務。感謝建國的雷射與明蓉學姊的物鏡，讓我順利完成實驗。敬宇、郁涵、小家宏、治宇，很高興認識你們，雖然只有短暫的相處，但覺得實驗室有你們真好。雅菁，謝謝妳的「一臂之力」，實驗成功那晚，妳是第一個見證人。感謝宥妊和團團的熱情相助，你們真是很棒的受試者。

感謝協助我處理行政業務的醫學院會計組鄭育杰先生、蕭慧芬小姐、總務分處購運股陳斐雯股長、出納股周麗珠股長、醫工所辦的琪美、郁智、宇寧、分子生醫影像中心的仁勇哥與瑋含。

謝謝這一路上肯定我、幫助我、愛護我和關心我的人，因為你(妳)們，我的人生才會如此溫暖、感動與精彩。這一路上曾經傷害過我的人，感謝妳們磨練我的心志，讓我在逆境中成長。我雖然沒有台大人的聰明與自信，卻有台大人不屈不撓的骨氣，我不會認輸的，而且會讓自己過得更好。

最後，感謝我最親愛的父母親及家人，感謝你們無怨無悔的支持、鼓勵與付出，使我從一個職業學校的學生一路爬到台灣最高學府，取得碩士學位，心中除了感激還是感激。這份榮耀是屬於你們的，謹以此文獻給最摯愛的你們。

2013/12/20 于台北

中文摘要



血液查常規檢查是重要的醫療篩檢項目，透過血液抹片的顯微影像來了解血球的狀態，如紅血球數、白血球數、血小板數、血紅素含量、血球容積比等，醫師再根據這些檢驗數據做為臨床診斷的依據。目前，醫院多以侵入式的抽血檢查為主，送驗過程耗時且檢體在活體外可能受到環境因子影響導致變質進而影響檢查之正確性。

隨著科技的進步，非侵入式的醫學影像檢驗技術不斷推陳出新，在非線性光學顯微術中，倍頻式光學虛擬活體切片術不但有細胞等級的三維空間解析能力而且具有能量守恆的性質，不會對生物體造成傷害，檢測時亦無需使用染劑，因此，本研究團隊以人體手臂做為觀測點，透過手動方式調整物鏡及載物平移台形成三維控制，使雷射聚焦至皮下微血管進而觀測血球。由於微血管距離表皮僅 $200\mu\text{m}$ ，檢測人員調整粗、細調節輪與載物平移台的力道過大或過小都容易使微血管被忽略，此外，微血管呈三維分布，很容易發生重複搜尋的情況導致效率變差，經驗不足的操作人員亦難上手，有鑒於此，本研究論文提出「自動搜尋皮下微血管演算法」輔助檢測人員找到微血管，如此不但能提升搜尋效率、減輕操作人員負擔更可避免與病患近距離接觸。

Abstract

Blood routine examination is important to check the health screening program, through the image of blood smear microscopy about the state of blood, such as red blood cells (RBCs), the white blood cells (WBCs), platelet count, hematocrit (Hct) are common examination in laboratory medicines, it requires a draw of blood, which is an invasive method to patients. It cost patients' time to wait for results and may be the subject of environmental factors on in vitro led to deterioration in turn affect the accuracy check.

With the advancement of technology, non-invasive medical imaging inspection technology innovation, because of the nonlinear optical microscopy has sub-micron level tomography three-dimensional image resolution, has been widely used in biological observation and research. In the current nonlinear optical microscopy, harmonics-based in vivo optical virtual biopsy has three-dimensional cellular-level image, the system will not cause harm to the organism, but also without the use of stain. Therefore, the research team use this system for real-time observation and analysis of in vivo human blood cells, shape, flow and shape. We use arm as observation point, laser focus to subcutaneous capillaries. Before experiment, the participant loads his arm on the translation stage, operator adjusts the altitude of object and translation stage by manual, With three dimensional searching, program controls the laser focus to further observation of subcutaneous blood capillaries. As the capillaries from the epidermis only 200 μ m, operator adjustments coarse or fine adjustment knob of objective and controls translation stage powerfully, the capillary could be ignored, in addition, due to the capillary was three-dimensional distribution, the situation is prone to repeat the search resulted in poor efficiency, therefore, this thesis published "Algorithm of auto-searching subcutaneous capillaries", not only can improve search efficiency, but also reduce the burden on the operator can be avoided to contact with patients.

目 錄



致謝	I
中文摘要	III
Abstract	IV
目錄	V
第一章 緒論	1
1.1 背景	1
1.2 斷層掃描技術	2
1.2.1 光學同調斷層掃描	5
1.2.2 共軛焦顯微術	9
1.2.3 倍頻式光學虛擬活體切片術	12
1.3 研究動機	14
第二章 基礎理論.....	16
2.1 光學倍頻顯微術	16
2.1.1 二倍頻	16
2.1.2 三倍頻	21
2.2 流式細胞術	22
2.3 皮膚系統	25
2.4 數位影像處理	30



2.4.1 空間濾波器	30
2.4.2 平滑濾波器	32
2.4.3 排序濾波器	33
2.4.4 影像二值化	36
2.4.5 直方圖	37
2.4.6 直方圖拓寬	39
第三章 研究方法	41
3.1 光學系統	41
3.2 自動搜尋皮下微血管演算法	43
3.2.1 流程圖	45
3.2.2 搜尋步驟	46
第四章 實驗結果與討論	59
4.1 倍頻影像剖面圖	60
4.2 電腦搜尋結果	62
4.3 人工搜尋結果	67
4.4 搜尋時間之比較	74
第五章 結論與未來展望	76
參考文獻	77

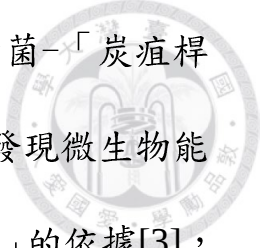
第一章 緒論



1.1 背景

醫學檢測技術是現代醫學不可或缺的重要工具，而光學顯微術在生命科學發展史上更是扮演非常關鍵的角色。顯微鏡問世後，人類開始透過顯微鏡觀測肉眼看不到的細微物體。自十七世紀顯微鏡被用於生物觀察以來，至今許多研究領域依然借鑒光學顯微術。166 年，英國科學家羅伯特·虎克（Robert Hooke）透過顯微鏡觀察軟木塞組織，發現組織呈格子狀排列，成為史上第一次成功觀察「細胞」的人並將其命名為「cell」。此外亦發表「顯微術」（Micrographia）一書，書中記載了透過顯微鏡觀察所收集的生物顯微圖片[1]。1684 年，荷蘭科學家安東尼·凡·列文虎克（Thonius Philips van Leeuwenhoek）使用自製的改良顯微鏡，首度用肉眼觀察到「細菌」等單細胞生物[2]，從此奠定了微生物學的基礎。

十九世紀的歐洲，隨著工業革命後都市化的急劇發展，土地開發及工業汙染造成居住環境的改變與破壞，新興傳染病也陸續出現。由於當時人們缺乏公共衛生觀念，導致許多人因感染症致死，如：1854 年英國倫敦因公共水井遭汙染導致霍亂大流行。之後人們開始意識到公共衛生的重要性，研究人員紛紛投入感染症的研究，進而發展出流行病學。1875 年，德國科學家羅伯·柯霍（Heinrich Hermann Robert



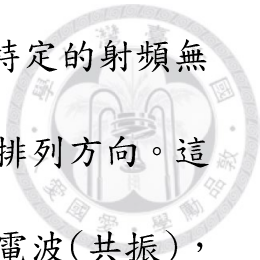
Koch) 首次使用光學顯微鏡發現具有感染性的病原體細菌-「炭疽桿菌」，爾後相繼發現結核桿菌和霍亂弧菌，為人類首次發現微生物能夠致病的事實，並提出「柯霍氏法則」作為判定「病原體」的依據[3]，成為傳染症狀研究的先驅。顯微術的問世對傳染症的研究功不可沒，隨著公共衛生的改善與醫學的進步，感染症逐漸消失匿跡。二次大戰後，全球面臨前所未有的社會變遷，新興文明世界改變了人類的生活型態及飲食習慣，罹患癌症的人口比例不斷攀升，癌症儼然成為現今社會非常重要的課題。

1.2 斷層掃描技術

病理組織切片一直被視為是許多疾病確定診斷的最終標準。對臨床醫師而言，如何根據病灶外觀選擇正確的區位進行切片以避免遺漏最重要、最嚴重的部位導致誤診是醫療上共同的難題。癌症前期所隱藏的病變往往無法用肉眼區別，有些部位亦無法切片送驗（如：黏膜組織），此外，醫護人員對病患進行血液、體液及組織等侵入式檢體採集，可能增加病患感染或癌細胞擴散的風險。因此，發展不動刀就能透視整個病灶區域且能看到致病關鍵分子的檢驗技術是臨床醫學上需要克服的問題。隨著科技的進步，非侵入式的醫學影像檢驗技術不斷推陳出新，電腦斷層掃描(Computer Tomography, CT)、磁共振



影(Magnetic Resonance Imaging, MRI)、正子斷層造影(Positron Emission Tomography, PET)等斷層掃描技術不僅發展成熟且為目前醫療診斷主力，穿透深度均可達 10 公分以上且影像解析度為毫米等級。而在諸多光學斷層掃描技術中，最早發展的是運用 X 光來進行的電腦斷層掃描，它是一種利用數位幾何處理後重建的三維放射線醫學影像，屬於中、高度輻射劑量的診斷技術。利用單一軸面的 X 射線旋轉照射人體，由於人體不同組織對 X 射線的吸收能力不同，藉由成像儀測量 X 射線從不同入射角度入射通過人體後的衰減信號，經由電腦運算處理得到組織的斷層影像[4]，再將各層的斷層影像層層堆疊，即可重建出組織的三維影像。相較於傳統 X 光影像，電腦斷層掃描能提供高解析度的三維資訊，藉由人體不同組織經阻射後得到的放射強度，即使是微小的差異也能區分出來。其影像空間解析度可達 0.5 毫米。由於電腦斷層掃描的軟組織對比度較差，因此須配合靜脈注射低劑量顯影劑以增強組織影像之對比，雖危險度低，但對於體質敏感者、腎功能衰竭或糖尿病的病患仍有副作用。此外，電腦斷層掃描有輻射劑量偏高的問題，正常人每年平均從自然環境裡接收 3 至 5 毫西弗的輻射量，照一張胸部 X 光攝影約為 0.3 毫西弗，而一次全身電腦斷層掃描檢吸收的輻射量約 10 至 15 毫西弗，對人體仍有一定程度的傷害。磁共振造影是一種沒有使用 X-ray 和輻射線的非侵入式醫學影像



診斷技術，它是將人體置入一個大型的強烈磁場，利用特定的射頻無線電波脈衝激發人體內水分子的氫原子核，改變其旋轉排列方向。這期間，原子核會吸收與原子核轉動頻率相同的射頻無線電波(共振)，一但關掉激發電波，原子核就會釋放吸收的能量信號，藉由電腦計算後組合成影像。由於身體不同器官和組織的含水量不同，因此在水分子重新排列時，其所釋放出來的能量訊號也不同，故而在影像上呈現不同的色調，其影像穿透深度亦大於 10 公分、解析度為毫米等級[5]，由於軟組織(肌肉、肌腱、神經系統...等)的含水量較豐富，因此，核磁共振造影經常被用於軟組織的病症檢查。正子斷層造影是具有輻射量的一種分子醫學影像技術，利用 FDG(氟-18 去氧葡萄糖)模擬葡萄糖進入細胞，進行初步的糖代謝，觀察癌細胞攝取、消耗額外葡萄糖的現象來診斷癌症。雖然細胞增加葡萄糖代謝的現象也見諸少數良性組織，但是最常出現的還是惡性腫瘤組織，所以，正子造影普遍應用於各種癌症的診斷、分期與追蹤。正子斷層攝影是一種功能性的影像，主要觀察代謝信號，影像解析度是毫米等級。

隨著預防醫學概念的興起，人們都希望藉由預防性檢測發現病徵，但現行醫學影像診斷是以生物組織病變的解剖變化為主，無法得知生物組織的細胞變化資訊，由於細胞間的訊息傳遞及現象需要以細胞等級解析度的影像才能觀察，以現有之斷層影像技術是無法達成

的，再者，電腦斷層掃描和正子斷層掃描均使用高量輻射線，對人體仍有影響，嚴格來說算不上真正的非侵入式系統。隨著光學技術的進步，人們利用光學成像技術發展出光學斷層掃描術，它擁有即時性、非侵入性且可獲得高解析度的斷面影像，無論在空間解析度或分子生物學資訊的提供都有突破性發展，以下針對幾種光學斷層掃描術做介紹。

1.2.1 光學同調斷層掃描術

光學同調斷層掃描術（Optical Coherence Tomography，OCT）為斷層影像技術的一種，近年來廣泛應用在生物、材料科學與醫學領域。其中以眼科臨床上的應用最為成熟，也是現代眼科醫師不可或缺的診斷工具，對於視網膜病變、視神經、角膜檢測及青光眼診斷有相當貢獻。其工作原理與超音波(Ultrasound)類似，相較於超音波利用聲波傳遞的時間差推算測試樣本內的相對空間位置；光學同調斷層掃描術使用光波作為信號源，利用光的干涉原理對測試樣本反射回來的光信號進行高解析度之橫切面斷層成像，其解析度比超音波高，可提供微米等級解析度之二維活體組織斷層影像，此斷層影很像是切片下的組織結構，被視為活體光學切片(In vivo optical biopsy) [6]。一般而言，光進入生物組織時，除了小部分會被反射，大部分的光會因組織特性差異而被吸收(Absorption)或散射(Scattering)，由於散射光散射

位置不同造成光路長度差異，使得散射光失去同調性(Coherence)。光學同調斷層掃描術利用干涉原理，將多次散射光從反射光中濾除以收集組織的反射與逆向散射光進行成像。如圖 2.3 所示，系統包括一個寬頻低同調性光源(Low coherence light source)及麥克森干涉儀(Michelson interferometer)，光源發出的光通過分光鏡後分成兩束光，一束射入反射鏡 M_R ，稱為參考光；另一束打入測試樣本，稱為測試光。參考光經由反射鏡 M_R 反射後穿透分光鏡，另一方面，測試光打入樣本後產生的背向散射光(Backscattering) 由分光鏡反射，最後，兩道光重合進入屏幕。光束重合時會因光程差的不同使兩道光

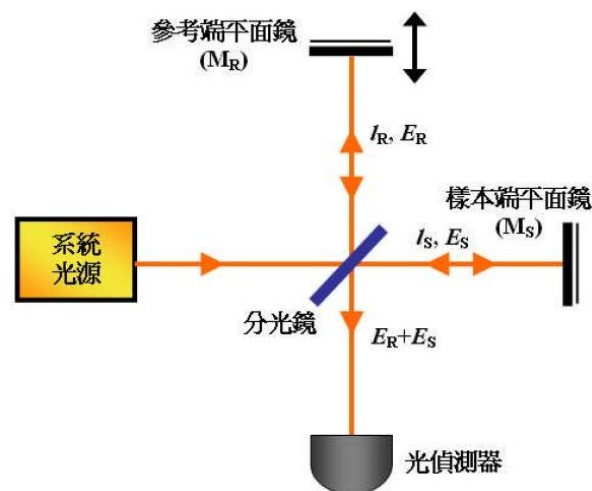


圖 1.1 麥克森干涉儀。利用各種組織對光的反射、吸收及散射能力的不同，收集背向散射的光子來進行成像。

的相位出現變化而在屏幕上產生干涉現象。當光程差大於某個距離時，干涉現象消失，此距離稱同調長度 (Coherence length)。高同調

性光源(High coherence light source)具有近單一波長及單一相位特性且為窄頻光譜，其同調長度較長，意即，在光程差很大的情況下依然能產生干涉現象；低同調性光源則是由不同波長組合而成，為寬頻光譜，其同調長度較短，換言之，只有在兩道光束幾乎沒光程差的情況下才會形成干涉，光學同調斷層掃描術利用此特性，透過連續移動反光鏡 M_R 造成參考光與測試光的光程差改變，使得干涉條紋隨著反光鏡移動的距離而有相關性的位移，如此，光偵測器便可量測到一連串的干涉波包，這些波包代表樣本在不同深度介面之背向散射光的干涉結果，將這些不同深度的樣本信號經過電腦處理後便可得到樣本的斷層影像資訊。若系統使用寬頻光作為系統光源，參考光與測試光的光場分別為 E_r 、 E_s ，光電流可表示為 i_D [7]

$$\begin{aligned} i_D &\propto \langle |E_s + E_r|^2 \rangle \\ &= [I_R + I_S + 2\sqrt{I_R I_S} \operatorname{Re}\{\gamma_{12}(\tau)\}] \end{aligned} \quad (1.15)$$

其中

$$\gamma_{12}(\tau) = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} E_R(t) E_s^*(t - \tau) dt}{\sqrt{\int_{-\infty}^{\infty} E_R(t) E_R^*(t) dt \int_{-\infty}^{\infty} E_s(t) E_s^*(t) dt}} = \frac{\Gamma_{12}(\tau)}{\sqrt{I_R I_S}} \quad (1.16)$$

τ 為光程差、 $\gamma_{12}(\tau)$ 為相干度、 $\Gamma_{12}(\tau)$ 為相干函數。當兩道光的光程差

為零時，相干程度最大，此時干涉信號最大；而隨著光程差變大，兩道光的相干程度變小，干涉信號亦隨之變小。由 Wiener-Khintchine 定理可知，相干函數與光源功率密度頻譜互為傅立葉轉換對，經由推導可得到[7]

$$I_c = \frac{2\ln 2}{\pi} \cdot \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (1.17)$$

其中， I_c 為光源的同調長度(Coherence length)， λ_0 為光源中心頻率， $\Delta\lambda$ 為光源頻寬，由上式可知，光源的頻寬越寬，同調長度就會越短。系統的縱向掃描即是應用此原理，利用同調長度的區間掃出干涉信號，故光源的同調長度決定了縱向解析度。目前光學同調斷層掃描術之橫向與縱向解析度可達微米(μm)等級，於對非侵入性光學切片有強烈需求的皮膚科，是個不錯的選擇。

1.2.2 共軛焦顯微術

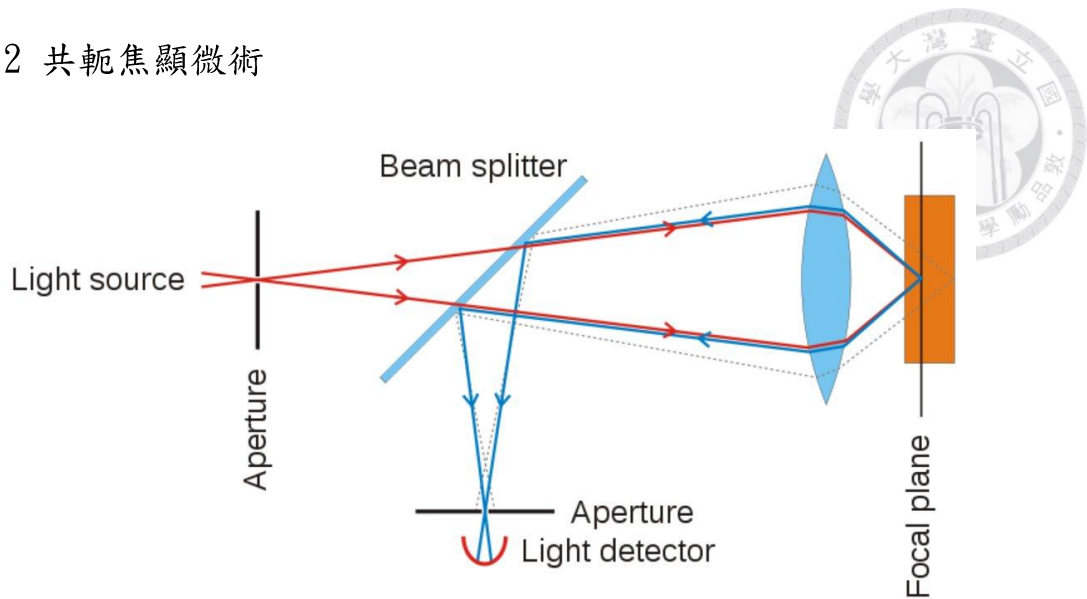


圖 1.2 共軛焦顯微術

共軛焦顯微術(Confocal microscopy)理論於 1957 年由美國學者 Marvin Minsky 提出；1969 年由 P.Davidovits 與 M.D.Egger 利用雷射當作光源，正式發展出共軛焦掃描顯微鏡[8]；1987 年，第一套商用共軛焦顯微鏡問世。圖 1.2，共軛焦(Confocal)是指從一個點光源發射的探測光通過透鏡(Lens)聚焦到樣本上，樣本的反射光再通過原透鏡匯聚回到光源。光聚焦的斷層面稱為聚焦面 (Focus plane)，以外稱之非聚焦面(Out-of focus plane)；傳統顯微鏡下所觀察的影像有來自樣本聚焦面及非聚焦面的反射光，其影像模糊、解析度較差且無法一層一層地深入樣品做觀察。共軛焦顯微鏡在反射光的光路上增加一個半反半透鏡 (Dichroic mirror)，將通過透鏡的反射光折向其它方向，並在其焦點處設置一個光學針孔 (Pinhole)，只有來自樣品聚焦面的反射光或是輻射螢光會進入光學針孔，其餘非聚焦面的反射

光或螢光則被阻擋在外。最後，反射光進入光電倍增管（Photomultiplier tube, PMT），經由光束掃描形成的影像稱為共軛焦影像(Confocal Image)[9]。

共軛焦顯微系統由倒立或正立顯微鏡、照明針孔、探測針孔、共軛焦 XY 掃描鏡、光電倍增管和電腦所組成；相較於傳統顯微鏡所看到的二維空間影像，共軛焦顯微鏡產生的只是一個極小的亮點；共軛焦顯微系統將雷射光平行導入分光鏡（Beam splitter），分光鏡再將特定波長的光反射至共軛焦 XY 掃描鏡，通過掃描鏡的光經由透鏡（Lens）及物鏡（Objectives）聚焦至樣品，在樣品的焦平面上做二維掃描。最後經由電腦運算，將點組成線，線組成面，呈現出高解析度的二維斷層影像，此影像亦稱為光切片（Optical sections）。

傳統顯微鏡的平面解析度理論極限早在 1884 年由 Ernest Abbe 提出：顯微鏡最大可能之平面解析度取決於光繞射極限[10]。根據 Rayleigh criterion，可解析的距離由光斑（Airy disc）決定，傳統顯微鏡之橫向解析度 r_{airy} 為[11]

$$r_{airy} = \frac{0.61\lambda_0}{n \cdot \sin\alpha} = \frac{0.61\lambda_0}{NA_{obj}} \quad (2.14)$$

其中 λ_0 為光的波長、 n 為折射率、 α 為光入射物體最大角度之半、 NA_{obj} 為鏡頭的數值孔徑。而共焦顯微鏡透過光學針孔作用，其橫向鑑別率比傳統顯微鏡佳，約為[12-13]

$$r_{airy} = \frac{0.4\lambda_0}{NA_{obj}} \quad (2.13)$$

共軛焦顯微鏡三維空間解析度主要來自光束在 Z 軸景深的限縮， Z 軸解析度可表示為[14]

$$Z_{min} = \frac{2\lambda_0\eta}{NA_{obj}^2} \quad (2.14)$$

上式的 η 為聚焦面介質之折射係數，軸向的解析度與光學針孔大小有關。以單一透鏡觀測，當樣品偏離焦平面時，會產生散焦的情況，中心強度也隨之降低。單一物鏡平面聚焦之 Z 軸強度變化關係可表示為[14]

$$I(u, v=0) \propto \left[\frac{\sin \frac{u}{4}}{\frac{u}{4}} \right]^2 \quad (2.15)$$

$$u = \frac{2\pi a^2(\Delta z)}{\lambda f^2} \quad (2.16)$$

其中， Δz 為距離焦平面的高度， a 是透鏡光瞳的半徑， f 是透鏡焦距，

$v=0$ 表示成像於光軸上。而共軛焦顯微鏡成像的強度隨散焦距離的變化較單一透鏡快，為單一物鏡強度變化的平方，可表示為[14]

$$I(u, v = 0) \propto \left[\frac{\sin \frac{u}{4}}{\frac{u}{4}} \right]^4 \quad (2.17)$$

共軛焦顯微鏡在焦平面上能產生較傳統顯微鏡更為清晰的影像，再配合 Z 軸的深淺移動，將一系列不同斷層面的二維影像組合成三維空間的立體影像；再加入時間軸，可創造出動態的四維影像。是一項高解析度的光學切片術，很適合用於活體生物的顯微觀測研究。

1.2.3 倍頻式光學虛擬活體切片術

儘管光學同調斷層掃描術(OCT)能提供微米等級的影像解析度，但仍無法達到細胞或次細胞等級的解析能力。利用最先進的「倍頻式光學虛擬活體切片術」(Harmonics-based in vivo optical virtual biopsy)，可以成功在活體倉鼠的口腔黏膜組織下看到癌細胞與微血管中流動的紅血球[15]，研究成果不僅登上國際知名期刊 Optical Express，也發表在頂尖期刊 Advanced Materials，未來將朝向臨床人體實驗以達到「切片免動刀」的目標。

倍頻式光學虛擬活體切片術利用生物分子與細胞結構本身既有的非線性光學特性，發展出無須外加染色的非侵入式活體超高解析度



斷層掃描光學[16]，足以作為虛擬病理切片用途；倍頻造影的三個重要特性-「非侵入性」、「即時性」以及「次微米等級的高空間解析度之斷層造影能力」[17-19]，此為傳統顯影技術無法達成的重要突破，不但能即時觀察組織中的動態變化，更提能供高解析度之組織結構資訊，在疾病診斷與細胞研究領域都具有極高的發展潛力。倍頻顯微術使用的信號來自生物體或材料本身發出的二倍頻和三倍頻，無須外加任何染劑或額外處理。同時由於倍頻產生時的能量守恆特性，不會有多餘能量累積在樣本中，因此不會對樣本造成傷害。結合上述兩個特性，倍頻顯微影像術提供了一個真正的非侵入式顯微檢測系統。二倍頻強度和入射光強度平方成正比，三倍頻強度則和入射光強度三次方成正比，此非線性效應提供倍頻顯微術非常好的光學切片能力，配合鉻貴橄欖石雷射，使得取像深度可超過一毫米，還可以有次微米的解析度，不會像一般光學顯微鏡在組織深處的影像模糊不清。此外，倍頻顯微影像術具有非常高的對比，二倍頻信號主要是在生物體內整齊排列的奈米級構造產生，稱之為生物光子晶體效應。三倍頻則是在介面不連續處產生，可提供一個完整的細胞型態資訊，兩者結合就能對生物體中複雜的結構提供進一步的資訊。除了在立體斷層造影上的病理診斷之外，倍頻影像技術亦能進行活體組織中病灶區域變化的長時間觀測。

1.3 研究動機

目前檢測人體疾病多以侵入式的抽血檢查為主，並透過血液抹片的顯微影像來了解血球的狀態，由於倍頻式光學虛擬活體切片術有次微米等級的解析度、非侵入式以及無需使用染劑等特性，因此，我們嘗試應用此系統對活體紅血球的數量、形狀、流速與運動等進行即時觀測和分析以取代傳統的抽血檢查。未來，醫師可藉由即時的倍頻影像資訊作為診斷依據，不但可以降低檢體在活體外受到環境因子影響而變質的風險，亦可免去檢體送驗的過程，大幅縮短檢驗時間。

觀測前，受試者將手臂平放在系統的載物平移台(Stage)上，檢測人員以手動方式轉動 Z 調節輪 (Z-motor) 控制物鏡(Objective)高度，再藉由調整載物移動平台之平面移動，以三維移動的方式讓雷射光聚焦至皮下微血管進而觀測紅血球。由於微血管距離表皮下僅 200 μ m，檢測人員調整粗、細調節輪與載物平移台時，轉動力道過大或過小都容易使待測目標(微血管)被忽略，再者，搜尋範圍呈三維分布，很容易發生重複搜尋的狀況而導致搜尋時間增加、效率變差，經驗不足的檢測人員亦難上手。因此，本研究論文提出「自動搜尋皮下微血管演算法」，以電腦自動搜尋的方式，從皮膚淺層往深處尋找微血管，以皮下組織橫切面，依序搜尋、辨識 25 個觀測點，如此可避免重複找尋以提升效率，不僅減輕檢測人員負擔、亦可避免與病患近

距離接觸。現行的磁共振造影(MRI)、電腦斷層掃描(CT)等均以自動掃描的方式對人體進行檢測，自動化檢驗儼然成為必然趨勢。



第二章 基礎理論



2.1 光學倍頻顯微術

倍頻顯微術(Harmonic generation microscopy)發展自非線性光學，倍頻現象主要由光與物質交互作用所產生的非線性極化所致，且無涉及電子能階躍遷，所使用的信號來自生物體或材料本身的二倍頻和三倍頻，無須外加任何染劑處理。由於倍頻產生時的能量守恆特性，不會有多餘能量累積在樣本中，亦不會對樣本造成傷害。結合上述特性，倍頻顯微術提供了一個非侵入式的檢測方法，對於活體生物觀察上有研究及發展的價值[20]，以下對二倍頻與三倍頻做介紹。

2.1.1 二倍頻

二倍頻(Second-harmonic generation, SHG)在非線性光學上是個重要的物理現象。1961 年，P.A.Franken 等人於美國密西根大學(University of Michigan)實驗時發現，利用波長為 694.3 nm 的紅寶石脈衝雷射通過石英晶體後，再經由稜鏡分光，除了原先 694.3 nm 的光，還發現一道波長為 347.15 nm 的紫外光，此光正是 694.3 nm 的倍頻光(圖 2.1)[21]。透過電場與二階項極化作用後產生倍頻光，其頻率為原頻率的兩倍，「二倍頻」遂而得名。

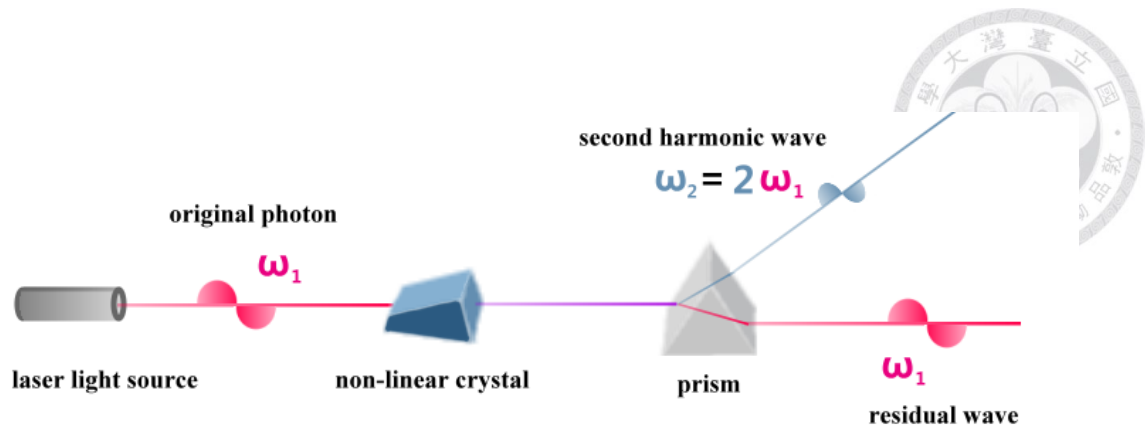


圖 2.1 二倍頻的產生過程

當光與介質交互作用時，在介質中所產生之極化向量(Polarization)

與所加電場強度成正比，此極化強度可表示為

$$P = \epsilon_0 \chi E \quad (2.1)$$

其中， ϵ_0 是真空介電常數(Vacuum permittivity)、 E 為電場、 χ 為介質

之極化率(Susceptibility)，可以多項式展開

$$\chi = \chi^{(1)} + \chi^{(2)}E + \chi^{(3)}E^2 + \dots + \chi^{(n)}E^{n-1} \quad (2.2)$$

將其帶入 2.1 式，可得

$$\begin{aligned} P &= \epsilon_0 (\chi^{(1)} + \chi^{(2)}E + \chi^{(3)}E^2 + \dots + \chi^{(n)}E^{n-1})E \\ &= \epsilon_0 \chi^{(1)}E + \epsilon_0 \chi^{(2)}E^2 + \epsilon_0 \chi^{(3)}E^3 + \dots + \epsilon_0 \chi^{(n)}E^n \\ &= P_1 + P_2 + P_3 + \dots + P_n \end{aligned} \quad (2.3)$$

其中，

$$P_1 = \varepsilon_0 \chi^{(1)} E^1 \quad (2.4)$$

$$P_2 = \varepsilon_0 \chi^{(2)} E^2 \quad (2.5)$$

$$P_3 = \varepsilon_0 \chi^{(3)} E^3 \quad (2.6)$$

$\chi^{(1)}$ 為線性極化率， $\chi^{(2)}$ 、 $\chi^{(3)}$ 至 $\chi^{(n)}$ 分別為二階、三階與n階非線性極化率。由於線性極化率 $\chi^{(1)}$ 遠大於其它非線性極化率，當電場強度較弱時，二階項以上可以忽略不計僅剩 P_1 線性項。此時，極化向量與電場呈線性關係，滿足傳統光學理論的反射(Reflection)、折射(Refraction)及重疊定理(Superposition principle)。當介質受大電場作用時，電場強度較強，高階項不可忽略， P_2 、 P_3 至 P_n 被視為非線性項，此時極化向量與電場呈非線性關係。由於高階非線性極化率極小，因此電場強度要夠強、能量密度超過 10^{11} W/cm^2 時才會發生非線性光學現象。超快雷射可產生極高的瞬時輸出功率以提供非線性光學所需之強大電場，非常適合作為激發光源。而倍頻信號產生的原理可由 2.3 式中的二次項 $P_2 = \varepsilon_0 \chi^{(2)} E^2$ 說明。當入射光頻率為 ω ，電場可表示為[22,23]:

$$E_{(t)} = \text{Re}\{E_0 e^{-i\omega t}\} = E_0 \cos\omega t \quad (2.7)$$





再將 2.7 式帶入 P_2 ，可得

$$\begin{aligned}
 P_2(t) &= \varepsilon_0 \chi^{(2)} E_0^2 \cos^2 \omega t \\
 &= \varepsilon_0 \chi^{(2)} E_0^2 \left[\frac{1}{2} (1 + \cos 2\omega t) \right] \\
 &= \frac{1}{2} \varepsilon_0 \chi^{(2)} E_0^2 + \frac{1}{2} \varepsilon_0 \chi^{(2)} E_0^2 \cos 2\omega t
 \end{aligned} \tag{2.8}$$

其中， $\frac{1}{2} \varepsilon_0 \chi^{(2)} E_0^2 \cos 2\omega t$ 為二倍頻項，其頻率為入射光頻率的兩倍。由於光入射介質時引起的分子偶極震盪 (Dipole oscillation)，這些分子的行為如同非諧振子 (Anharmonic oscillator) 可激發出頻率 2ω 、 3ω ... 之電磁輻射。二倍頻的產生可想像成兩個頻率相同 (ω) 的光子同時與物質分子中的電子發生極化作用，藉由虛能階交換產生一個頻率為原本激發光兩倍 (2ω) 的光子，如圖 2.2 所示。

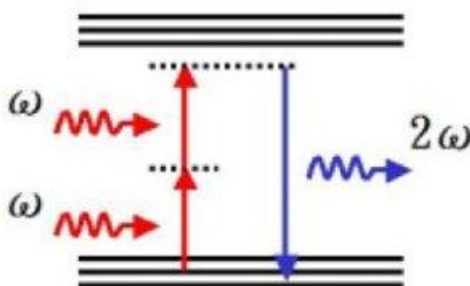


圖 2.2 二倍頻產生能階示意圖。實線為原子能階，虛線為虛能階。

兩個頻率為 ω 的光子被吸收，同時產生一個頻率為 2ω 的光子。這些虛能階代表原子本徵態與光子輻射場的能量組合。

二倍頻效應無涉及電子能階躍遷，遵守動量能量守恆，因此不會有能量消耗在樣品中而造成破壞。近年來，二倍頻不僅用來研究材料科學，更被廣泛應用在觀察生物體。由於二倍頻信號只發生在非對稱的材料，可利用此特性對一些特定的生物組織做觀察，以下對二倍頻與材料特性的關聯做說明。

當光子入射的材料具反對稱性(Inversion Symmetry)，其極化強度為 $-P$ 、電場強度為 $-E$ ，帶入 2.5 式後可得

$$\begin{aligned} -P_2(t) &= \epsilon_0 \chi^{(2)}(-E)^2 \\ &= \epsilon_0 \chi^{(2)}E^2 \\ &= P_2(t) \end{aligned} \tag{2.9}$$

欲使 2.9 式成立， $P_2(t)$ 等於零是唯一解。由於 ϵ_0 和 E 不為零，可求得

$$\chi^{(2)} = 0 \tag{2.10}$$

由此可知，介質結構若具有中心對稱(Centrosymmetry)特性，則無法產生二倍頻。換言之，欲產生二倍頻效應，材料必須具是非中心對稱的結構。例如：存在於生物組織內的膠原蛋白纖維、骨骼肌肉等。



2.1.2 三倍頻

三倍頻 (Third harmonic generation, THG) 一般發生於介質界面處 (interface)，亦可產生自小於波長的微粒。

$$E_{(t)} = \varepsilon \cos \omega t \quad (2.11)$$

將其帶入 2.6 式，可得

$$\begin{aligned} P_3(t) &= \varepsilon_0 \chi^{(3)} E^3(t) \\ &= \frac{1}{4} \varepsilon_0 \chi^{(3)} \varepsilon^3 \cos 3\omega + \frac{3}{4} \varepsilon_0 \chi^{(3)} \varepsilon^3 \cos \omega t \end{aligned} \quad (2.13)$$

其中，2.13 式中的 $\frac{1}{4} \varepsilon_0 \chi^{(3)} \varepsilon^3 \cos 3\omega$ 為三倍頻項。其頻率為入射光頻率的三倍。三倍頻的產生與前述二倍頻的原理相似，可想像成三個頻率相同(ω)的光子同時與物質分子中的電子發生極化作用，藉由虛能階交換產生一個頻率為原本激發光三倍(3ω)的光子，如圖 2.3 所示。三倍頻效應同樣無涉及電子能階躍遷，遵守動量能量守恆，不會有能量消耗在樣品中而造成破壞。不同於二倍頻，無論材料是否為中心對稱皆有非零的三階極化率 $\chi^{(3)}$ ，意即，任何物質都能產生三倍頻信號[24]。在生醫影像上的應用，三倍頻可提供細胞形態學 (Morphology) 資訊。例如，生物體中的細胞壁、細胞膜、乳突細胞、

紅血球等。

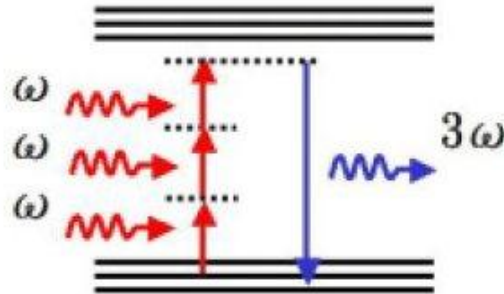


圖 2.3 三倍頻產生能階示意圖。實線為原子能階，虛線為虛能階。

三個頻率為 ω 的光子被吸收，同時產生一個頻率為 3ω 的光子。這些虛能階代表原子本徵態與光子輻射場的能量組合。

2.2 流式細胞術

流式細胞術（Flow cytometry）是指細胞於流體狀態下移動時，能夠觀測及記錄細胞狀態的一種生物學技術，能對懸浮於流體中的單細胞或微小粒子逐一進行計數及分選，具有快速偵測、定量分析以及分離特定細胞等優點。1969 年，美國洛斯阿拉莫國家實驗室(Los Alamos National Laboratory, LANL)的 Marvin Van Dilla 利用氬離子雷射取代傳統的顯微鏡光源激發螢光物質，並結合流體動力聚焦（Hydrodynamic focusing）及分選器(Sorter)等技術發展出第一部可偵測螢光的細胞儀(Cytometer)[25]，此為流式細胞儀（Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS）的前身。1972 年，史丹福大學(Stanford

University) 的研究團隊結合了多參數螢光(Multiple parameter fluorescence)、散射光(Scatter light)、庫爾特顆粒計數器(Coulter counter)及細胞分選(Cell sorting)等技術，研發出螢光活化細胞分選的原型機，確立了今日的FACS架構，從此，細胞測量技術進入新的紀元。流式細胞術目前被廣泛應用在基礎研究和臨床實驗，舉凡分子生物學、病理學、腫瘤學、血液學、免疫學、藥理學、遺傳學及臨床醫學均屬其應用範疇。

流式細胞儀由液體、光學顯微鏡系統以及電子偵測系統所組成。能快速偵測一顆接著一顆流動於液體中的顆粒或細胞。當雷射激發光聚焦至流體時，每一個通過光束的懸浮顆粒會產生前散射(Forward scatter)、旁散射(Side scatter)信號，同時，細胞本身所攜帶的螢光物質會被激發並產生頻率低於激發光的螢光信號，之後由光電倍增管(Photo-multiple Tube, PMT)接收，將其轉換成電子脈衝信號，再經放大處理後轉換成數位訊號，最後利用電腦將大量數據進行分析及統計，以螢光定量代表細胞的數量。藉由前散射信號可以測得細胞的尺寸與體積，透過旁散射信號可以得到細胞粒度(Granularity)，根據這些散射光和螢光的組合數據就能推算出每個顆粒的物理和化學性質，如此，便可區分液體中不同的細胞。儘管流式細胞儀能夠分析流



體中的細胞資訊，但在分析人體血液細胞前，還是需要透過侵入式的抽血採樣，將樣本送進流式細胞儀做檢測。目前，許多先進的非侵入式光學虛擬活體切片術(Virtual optical biopsy)被發展出來且應用在生理學、病理學與臨床診斷上，如眼科常使用的光學同調斷層掃描(OCT)。近年來，仰賴共軛焦顯微術以及粒子追蹤速度場(Particle Tracking Velocimetry, PTV)量測技術的進步，相較於傳統共軛焦顯微術，微粒子追蹤速度場共軛焦顯微術(Confocal micro-PTV)可以提供更細部的細胞移動資訊，很適合用於血液動力學的研究[26]。儘管如此，共軛焦顯微術的對比主要還是來於自螢光標定細胞(Fluorescent labeling cells)，此外，在熱轉換過程中會使鬆弛的受激電子(Relaxation of excited electrons)釋放到活體組織中導致光毒性(phototoxic)、光過敏(photoallergic)等現象，對於人體仍有一定程度的傷害。有鑒於此，光學倍頻顯微術(Harmonic-generation microscopy)提供一個更佳的非侵入式檢測方法，相較於其他共軛焦顯微術，它具有能量守恆特性且無需使用顯影劑，故不會對生物體造成傷害，此外，倍頻顯微術擁有較高的影像對比度及細胞等級的空間解析能力，很適合應用在活體細胞上的觀察與研究，如脂質(Lipid)、黑色素(Melanin)和血紅素(Hemoglobin)等。目前，本研究團隊利用三倍頻顯微術對人體活體血球做即時觀測，藉由高解析度的即時影像分析紅血

球與白血球的資訊，不僅能縮短傳統抽血檢查的時間，更能做為醫師臨床診斷的依據。



2.3 皮膚系統

皮膚系統(Integumentary system) 為人體與外界區隔之最外層結構，涵蓋人體的範圍最廣，佔人體比重 15%。皮膚的厚度會隨部位而有所差異，如眼皮的厚度最薄，約 0.5 毫米，手掌及腳掌的皮膚最厚，約 4 毫米。皮膚由表皮(Epidermis)、真皮(Dermis)和皮下組織(Hypodermis)所組成(圖 2.4)，是人體最大的器官，可抵禦外來有害物質進入人體，具有調節體溫、保濕、排除部分代謝物、產生維生素 D 以及感覺認知等功能[27,28]。

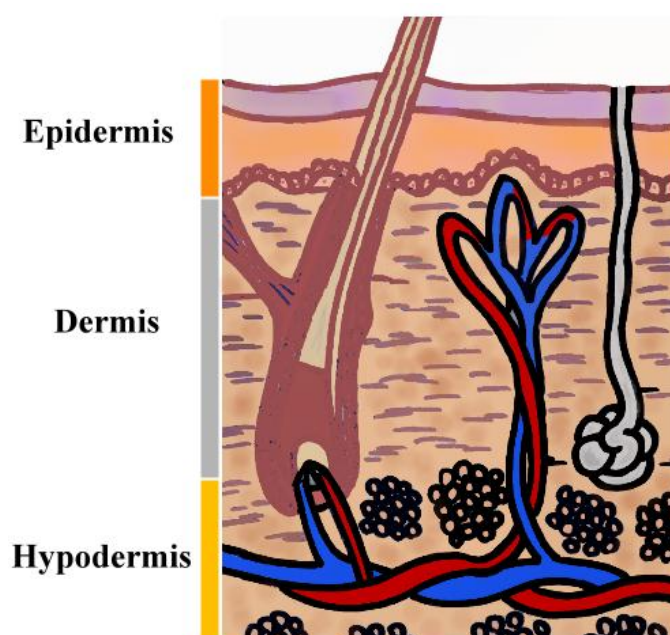


圖 2.4 皮膚解剖圖



表皮為皮膚的最上層，厚度從眼皮的 0.04 釐米至足底的 1.4 釐米不等，由淺至深分別為角質層(Stratum corneum)、透明層(Stratum lucidum)、顆粒層(Stratum granulosum)、棘狀層(Stratum spinosum)與基底層(Stratum basale)，如圖 2.5 示。

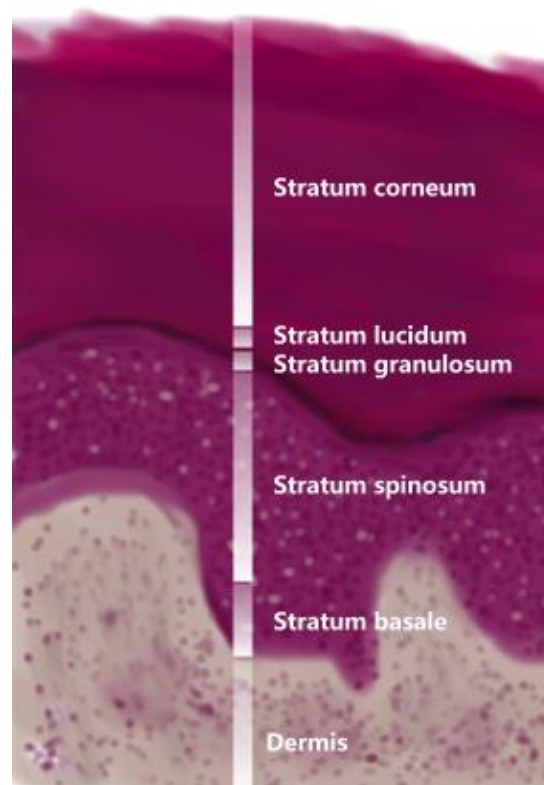


圖 2.5 表皮解剖圖

角質層由死亡的無核細胞堆積與纖維化的角質素(Keratin)組成，角質層內的部分胺基酸及其代謝產物形成天然保濕因子，使角質層得以維持緊實並且保持皮膚的柔軟性。最外層的陳舊角質形成皮垢而脫離，而角質細胞接續不斷形成，使角質層維持一定厚度，這種自基底層到



角質層的經常性變化，稱為皮膚的更新。更新的速度因個人體質、部位和年齡而有所不同。一般而言，自基底層到角質層的形成約為兩週，而角質層形成皮垢，進而脫離皮膚，也需要兩週的時間。透明層位於角質層下方，由多層扁平、透明的細胞緊密排列而成，且只存在於手掌和腳掌。顆粒層位於角質層(或透明層)下方，內含透明角質(Keratohyaline)顆粒，與膚彈力有關，若含水量足夠則皮膚看起來較光滑，若水份不足，皮膚則容易老化。棘狀層位於顆粒層下方，為表皮中最厚的一層，在光學顯微鏡下觀測，細胞呈棘狀突出，稱為棘細胞。棘細胞與棘細胞間由胞橋小體(Desmosomes)緊密相連，可抵抗外力摩擦，細胞間的隙縫有淋巴管通過，能供給皮膚營養。此外，棘狀層中有許多感覺神經末梢，可以感知外界各種刺激。基底層位於表皮最下層，與真皮層以波浪式相接。基底細胞層是表皮的生長來源，其中的細胞不斷分裂，逐漸向外移行並產生變化，最後形成角質層。基底細胞由真皮層中的微血管供給養分，具有細胞分裂能力，正常狀態下，更新週期為 15 至 30 天。此外，基底層內的黑色素細胞(Melanocyte)所分泌的黑色素(Melanin)，可形成天然保護層，能抵抗紫外線的侵害。

真皮位於表皮下方，主要由結締組織(Connective tissue)構成，內含膠原纖維、彈性纖維與基質，能維持皮膚彈性[27]。此外，真皮

層中含有微血管、神經、汗腺、皮脂腺、毛囊和淋巴管等附屬器官，對於感覺、免疫系統及體溫調控扮演著重要角色。真皮層的上層稱為乳突層(Papillary layer)，由緊鄰表皮的薄層結締組織構成。乳突層的結締組織向表皮底部突出，形成波浪狀的真皮乳突細胞(Dermal papillae，能使表皮與真皮緊密連結。由於表皮有許多向下凸起的表皮脊(Epidermal ridge)往下陷入真皮，而真皮也有許多指狀的乳突細胞嵌插於其間，所以表皮與真皮之界面是凹凸不平的(圖 2.6)。乳突層微血管豐富，能使表皮從真皮的微血管獲得營養。由於表皮沒有血液循環組織，其營養供給及廢物排泄完全依賴真皮層中的微血管與淋巴管來輸送。一般而言，真皮乳突細胞內會有微血管通過。

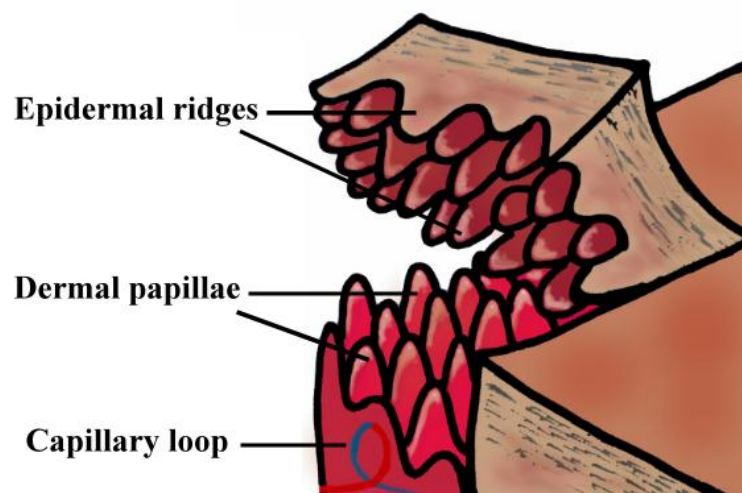


圖 2.6 真皮乳突細胞解剖圖

網狀層 (Reticular layer) 位於乳突層下方，較厚，由緻密的結締組織 (Connective tissue)、基質及少許細胞構成。結締組織可分為膠



原纖維(Collagen fiber)、彈性纖維(Elastic fiber)與網狀纖維(Reticular fiber)。其中，以膠原纖維最多，其強韌的纖維性蛋白佔結締組織的90%，為皮膚主要的支撐結構，彈性纖維佔比其次，負責皮膚的彈性，而網狀纖維佔比最少。基質是填充在纖維及細胞間的膠狀物質，主要成份為葡萄糖胺聚糖 (Glucosaminoglycan)及膠原蛋白(Collagens)，這些多糖與蛋白互相結合，以多糖蛋白(Proteoglycan)形式存在，可保持結締組織水分。網狀層內不僅有許多微血管、淋巴管和神經，毛囊、皮脂腺和汗腺等附屬器官也多存在於網狀層。

皮下組織(Hypodermis) 即為脂肪層，位於真皮層之下，可減緩外界來的撞擊力以保護體內器官。此層含有大量的疏鬆性結締組織及脂肪組織，疏鬆性結締組織中特定的脂肪細胞以脂肪油滴的形式貯存脂肪於細胞質中，當它們逐漸累積脂肪時，就開始變得膨脹，細胞核就被推擠到一邊，當這些細胞數目太多時，其他種類的細胞就被擠出，這些細胞就形成脂肪組織。脂肪組織存在於皮膚下方及肌肉間的空隙，也出現在各臟器及關節周圍保護器官。

2.4 數位影像處理

一張影像可被定義成一個二維函數 $f(x, y)$ ，其中 x 和 y 是空間 (Spatial) 座標， f 的值為影像在該點的強度 (Intensity) 或灰階 (Graylevel)。當 x 、 y 與 f 的強度值為有限離散量時，則稱這張影像是數位影像 (Digital image)，組成單位為像素 (Pixel) [29]。數位影像處理 (Digital image processing) 是藉由電腦處理數位影像以提升視覺品質，使人易於觀察與理解影像中的資訊。不僅如此，影像處理與電腦視覺的認知功能更是密不可分。電腦視覺技術是以電腦取代人腦對目標進行辨識、搜尋、追蹤和分析等工作 [30]。如今，數位影像處理技術被廣泛應用在生物學、醫學、氣象學、地質學、考古學、天文學、生態學、航太、軍事及工業... 等各種領域。本研究即為電腦視覺於醫學上的應用，透過電腦對擷取到的醫學影像做計算，再根據計算結果來控制儀器做三維移動，以達到自動化搜尋皮下微血管的功能。以下小節即針對數位影像處理常使用影像處理技巧做介紹。

2.4.1 空間濾波器

空間 (Spatial domain) 是指影像的二維平面，濾波器 (Filter) 是指作用於像素與其鄰域像素 (Neighborhood pixels) 之特定運算。圖 2.7， $f(x, y)$ 為影像中某個座標的像素值， W 矩陣為 3×3 濾波遮罩 (Mask)，

$g(x, y)$ 為像素及其鄰域像素經遮罩運算後的結果：



$$g(x, y) = w(-1, -1)f(x - 1, y - 1) + w(-1, 0)f(x - 1, y) + \dots + w(0, 0)f(x, y) + \dots + w(1, 1)f(x + 1, y + 1) \quad (2.14)$$

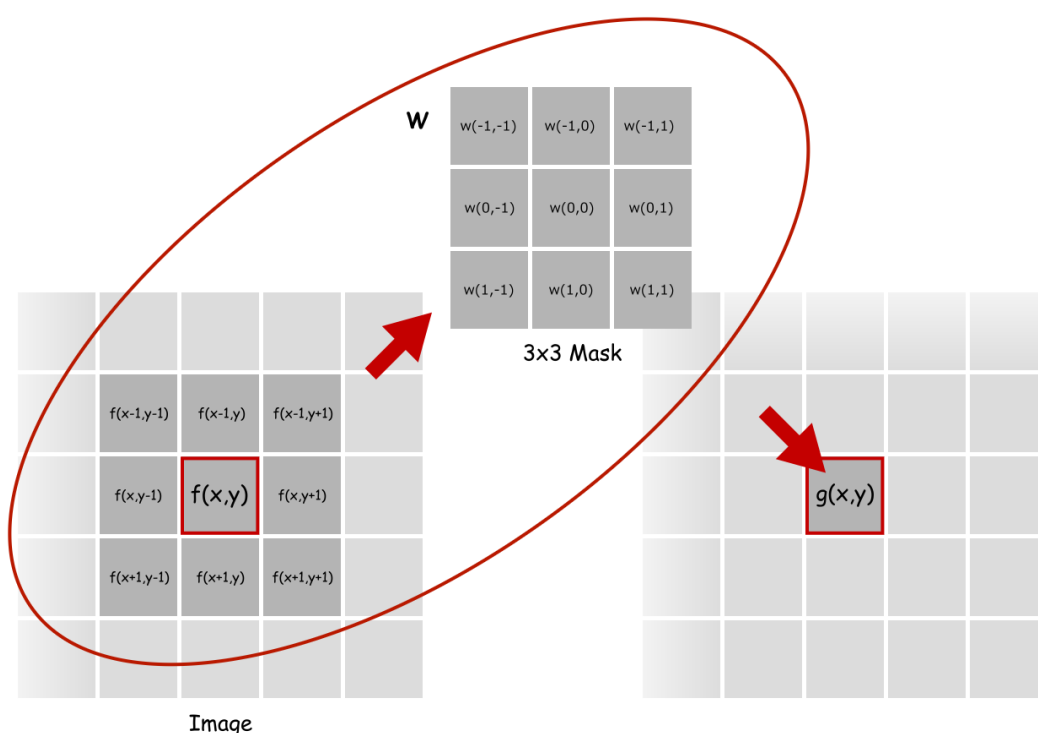


圖 2.7 空間濾波器之運作原理

像素經濾波運算後得到一個新的值 $g(x, y)$ ，以此取代原有的 $f(x, y)$ 成為新的像素值。由於一張數位影像是由多個像素組成，對其做濾波處理即是對影像中的每個像素做濾波遮罩運算，再將運算結果取代原有的像素值，如此便完成影像濾波。

2.4.2 平滑濾波器

平滑濾波器(Smooth filter)是空間濾波器的一種，又稱均值濾波器 (Average filter)，顧名思義就是將像素和鄰域像素的灰階值加總後取平均值並以此取代原像素的灰階值。平滑濾波器可將影像模糊化以降低影像中各像素值的差異，使影像更為柔和。平滑罩有兩種模式，圖 2.8 為一般型 3×3 平滑濾波遮罩，遮罩矩陣中所有係數均為 1，其濾波結果可由下式表示：

$$f'(x,y) = \frac{1}{9} \sum_{s=-1}^1 \sum_{t=-1}^1 f(x-s, y-t) \quad (2.15)$$

其中， $f(x,y)$ 為原像素值， $f'(x,y)$ 為平滑濾波處理後之像素值。

$\frac{1}{9} \times$	1	1	1
	1	1	1
	1	1	1

圖 2.8 一般型 3×3 平滑濾波遮罩

圖 2.9 為權重型平滑空間濾波器，其遮罩採用權重平均 (Weighted average)，將鄰域各個像素分別乘以不同係數，遮罩中心的像素乘以最大權重值，距離中心點越遠的像素則乘以較低的權重值。以 3x3 遮罩為例，中心像素給予最高權重值 4，而上、下、左、右四個像素距離中心像素距離為 1 單位，給予較中心點次高的權重值 2，而對角的四個像素距離中心像素的距離為 $\sqrt{2}$ ，給予最低的權重值 1。

$$\frac{1}{12} \times$$

1	2	1
2	4	2
1	2	1

圖 2.9 權重型 3x3 平滑濾波遮罩

2.4.3 排序濾波器

排序濾波器(Rank filter)是非線性空間濾波器，其濾波響應建立在像素與其鄰域像素的灰階值大小排序，藉由排序後所決定的值來取

代原本的像素值。中值濾波器(Median filter)為排序濾波器的一種，被廣泛運用在數位影像處理，對於濾除影像中的胡椒鹽雜訊(Salt and pepper noise)非常有效(圖 2.10)[31]。



(a)含有雜訊之灰階影像

(b)經中值濾波處理後的影像

圖 2.10 中值濾波

中值濾波器是對中心像素與其鄰域像素之灰階值做排序，再取出排序居中的值取代原本的像素值。圖 2.11，中心像素值為 230，其鄰域像素值分別為 111、23、30、16、30、29、26 和 60。將灰階值由小至大排序，其結果為 16、23、26、29、30、60、90、111、230，排序居中的灰階值為 30，以此值取代原有的 230。

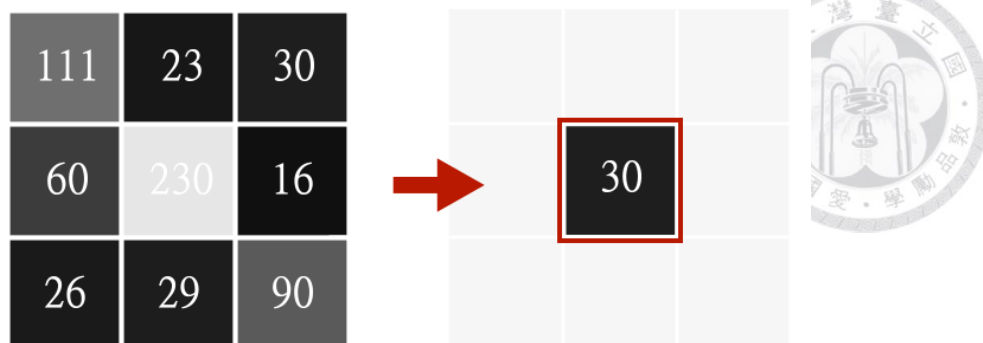


圖 2.11 中值濾波原理

最小值濾波器(Minimum filter)則是對中心像素與其鄰域像素之灰階值做排序，再取出排序最小的值取代原本的像素值。圖 2.12，中心像素值為 230，其鄰域像素值分別為 111、23、30、16、30、29、26 和 60。將灰階值由小至大排序後，排序最小的灰階值為 16，以此值取代原有的 230。

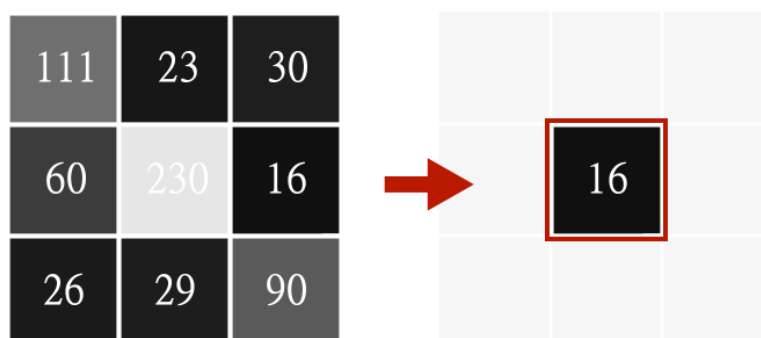


圖 2.12 最小值濾波原理

最大值濾波器(Maximum filter)則是對中心像素與其鄰域像素之灰階值做排序，再取出排序最大的值取代原本的像素值。圖 2.13，中心像素值為 230，其鄰域像素值分別為 111、23、30、16、30、29、26 和 60。將灰階值由小至大排序後，排序最大的灰階值為 230，以此值

當做新的像素灰階值。

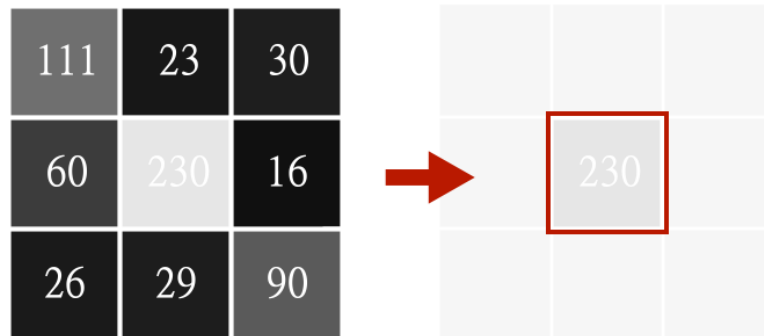


圖 2.13 最小值濾波原理

2.4.4 影像二值化

影像二值化(Binary)是將影像中所有像素透過閾值(Threshold)轉換成黑、白兩色，像素值大於閾值者，其像素值以 255(白色)取代，反之，像素值設為 0(黑色)，如此，可得到一個非黑即白的二元影像(圖 2.14)。二值化處理對於文字識別、條紋辨認、物體追蹤、偵測及定位而言，是常見的前置處理程序，可將我們感興趣的目標保留在影像中，其餘不相關的資訊則清除為背景。



圖 2.14 影像二值化

2.4.5 直方圖

在統計學中，直方圖（Histogram）是一種對數據分布情況的圖形表示，是一種二維統計圖表，它的兩個坐標分別是統計樣本和該樣本對應的某個屬性的度量。灰階影像的直方圖由其灰階值統計量所構成，用以表示數位影像中像素值的分布情況，換言之，直方圖的縱軸座標為每個灰階值在影像中出現次數(頻率)[32]，而橫坐標則為影像強度(Intensity)，左側灰階值最低，其值為 0（純黑），橫坐標越往右側則灰階值越高，接近純白(圖 2.15)。

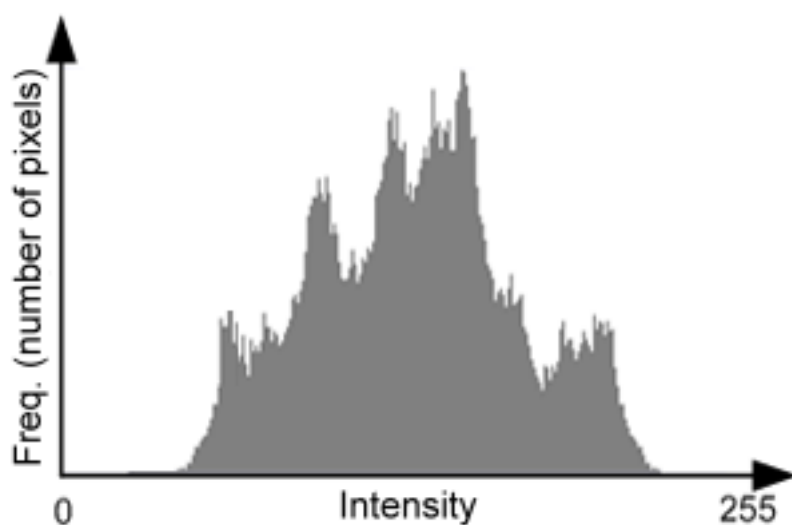


圖 2.15 直方圖

一張 8 位元灰階影像之中值(Mean value)以下式表示：

$$Mean = \frac{1}{total\ pixel\ counts} \sum_{i=0}^{255} i \cdot (pixel\ counts\ of\ i) \quad (2.16)$$

其中，total pixel counts 為整張影像的像素總數， i 為像灰階值 0 到 255，pixel counts of i 為影像中灰階值等於 i 的像素數量。圖 2.16 的灰階影像，其直方圖分布較為平均。圖 2.17 為較明亮的灰階影像，其直方圖灰階值分布多集中於右側；圖 2.18 為較暗的灰階影像，其直方圖灰階值分布多集中於左側。

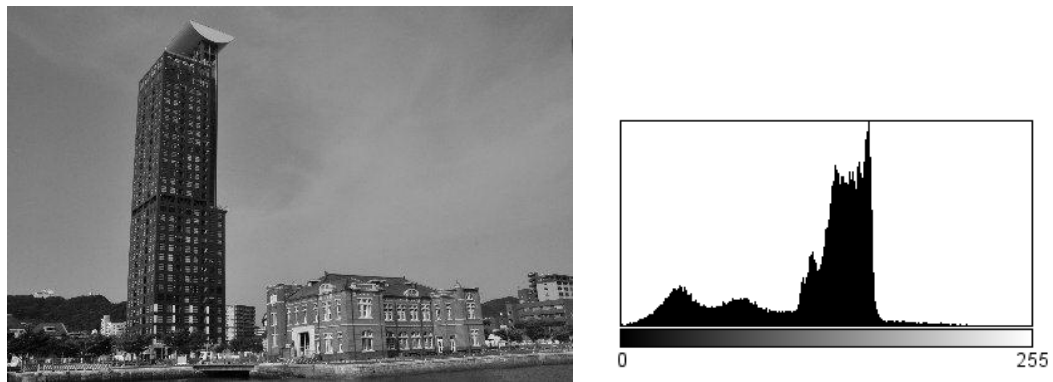


圖 2.16 (a)原始灰階影像圖(b)直方圖

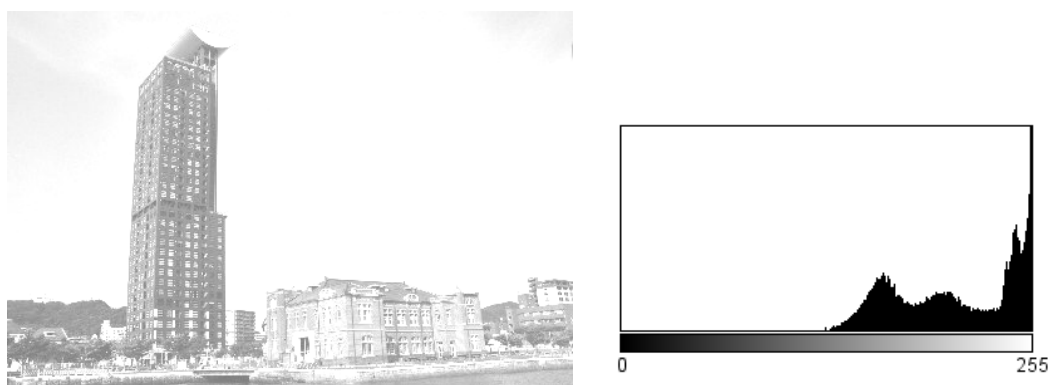


圖 2.17 (a)明亮的灰階影像 (b)直方圖

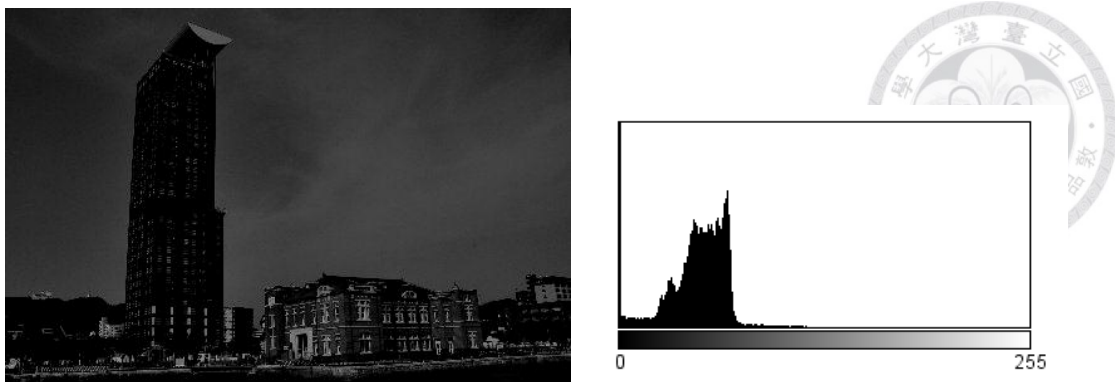


圖 2.18 (a)暗沉灰階影像 (b)直方圖

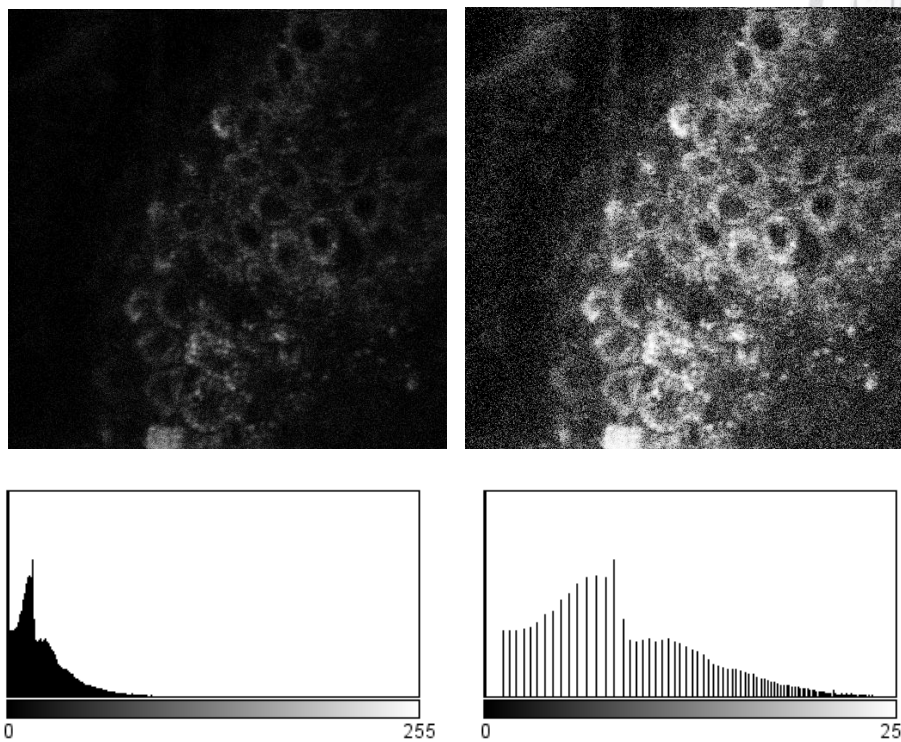
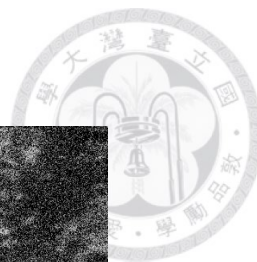
2.4.6 直方圖拓寬

從影像的直方圖(Histogram)分布可以發現，當一張 n 位元之數位影像的灰階值集中分布於某個範圍而沒有拓展至最低(0)和最高灰階值時($2^n - 1$)，影像對比度就會顯得比較差，此時藉由直方圖拓寬(Histogram Stretching)後，即可增強影像對比[33]，下式為直方圖拓寬之運算：

$$I_{NEW} = Stretch(I) = \left[\frac{I - I_{MIN}}{I_{MAX} - I_{MIN}} \right] (MAX - MIN) + MIN \quad (2.17)$$

I_{NEW} 為經拓展後新灰階值， I_{MIN} 和 I_{MAX} 分別為原始影像的灰階分布之最小及最大值， I 則為分布於 I_{MIN} 及 I_{MAX} 範圍內的灰階值， MAX 與 MIN 分別為 n 位元數位影像之最大與最小灰階值，以 8 位元的灰階影像為例， MAX 與 MIN 分別是 0 和 255。圖 2.19(a)(b)分別

為真皮乳突細胞灰階影像和經方圖拓展後的結果。



(a)對比度較低的灰階影像

(b)經直方圖拓展後的影像

(c)影像之直方圖

(d)經直方圖拓展後的直方圖

圖 2.19 直方圖拓展

第三章 研究方法



3.1 光學系統

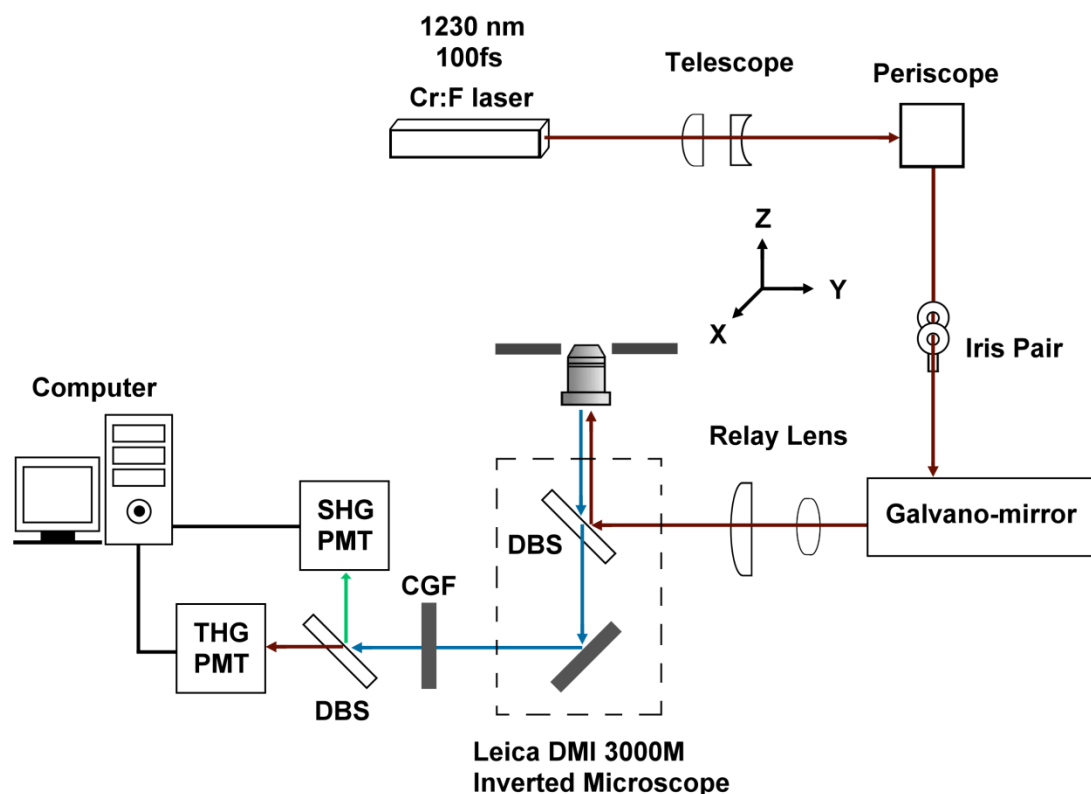


圖 3.1 非線性倍頻顯微系統系

本實驗採用萊卡(Leica DMI 3000M)的掃描倒立顯微鏡系統，以鉻貴橄欖石飛秒雷射為光源，工作波長為 1230nm，脈衝重複率為 90MHz，脈衝寬度為 100fs，平均輸出功率為 400mW。為避免功率損耗和光束擴大，激發光經過凸透鏡和凹透鏡組成的擴束望遠鏡 (Telescope)，再經由潛望鏡(Periscope)將光束拉高，之後進入掃描系統，藉由一組高速振鏡 (XY resonant scanner + galvanomirror) 對樣本做二維快速掃描，每秒產生 30 張 512×512 像素的二維影像。

之後，來自樣本聚焦面的反射信號會進入分光鏡(Dichroic Beam Splitter, DBS)，波長長於 490nm 的二倍頻信號會通過分光鏡進入其中一個光電倍增管，波長短於 490nm 的三倍頻信號則被反射進入到另一個光電倍增管，經由光電倍增管將光信號轉為電信號，最後進入影像擷取卡。為了濾除其他波長所造成的雜訊，分別在兩個光電倍增管前各放置一個帶通濾波器(Band-pass filter)。影像擷取卡(Frame grabber)為加拿大 Matrox 公司所生產，型號為 Matrox Odyssey Xpro。影像重組軟體為自行開發的視窗軟體-「NTU-BME」，如圖所 3.2 所示。以 Microsoft Visual Studio 的 MFC(Microsoft Foundation Classes) 為開發平台，搭配 Matrox 公司的影像處理函式庫 MIL9.0 (Matrox Imaging Library 9.0) 開發而成。

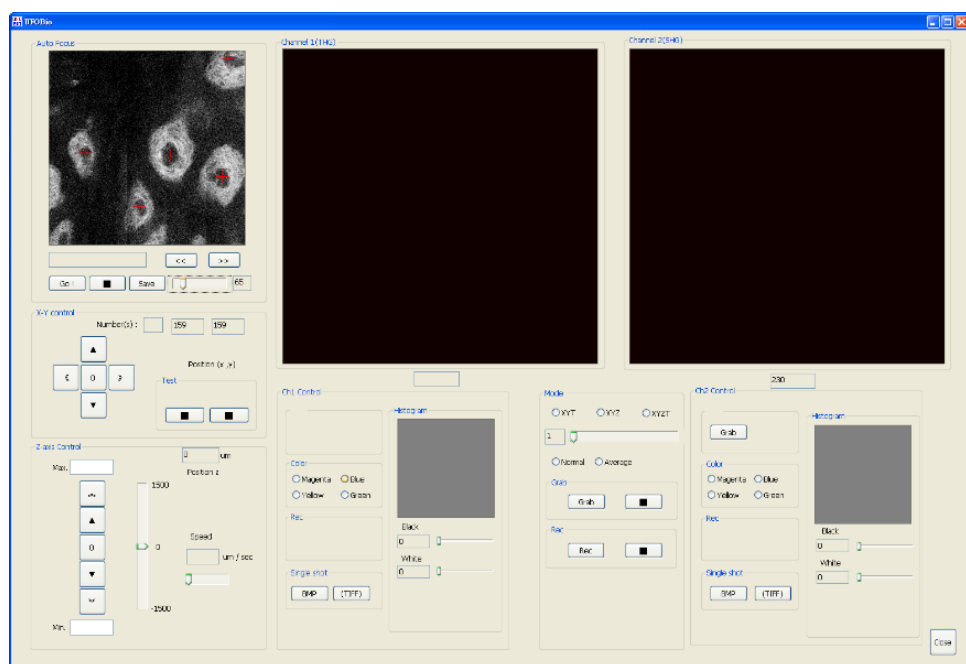


圖 3.2 視窗軟體 NTU-BME

3.2 自動搜尋皮下微血管演算法

人體表皮到微血管的平均距離為 250-350 μm ，其中，手臂的微血管至表皮之平均距離為 150-200 μm ，此深度很適合我們的系統，故本實驗以手臂做為觀測點，對皮下微血管中的紅血球做即時取像。由於微血管以三維分布的方式穿梭在表皮下的膠原蛋白層，且會通過膠原蛋白纖維中空處，如圖 3.1(a)(b)所示。因此，只須讓雷射光直接聚焦至膠原蛋白層，再搭配載物平移台的二維移動找到原蛋白，如此即可找到微血管。

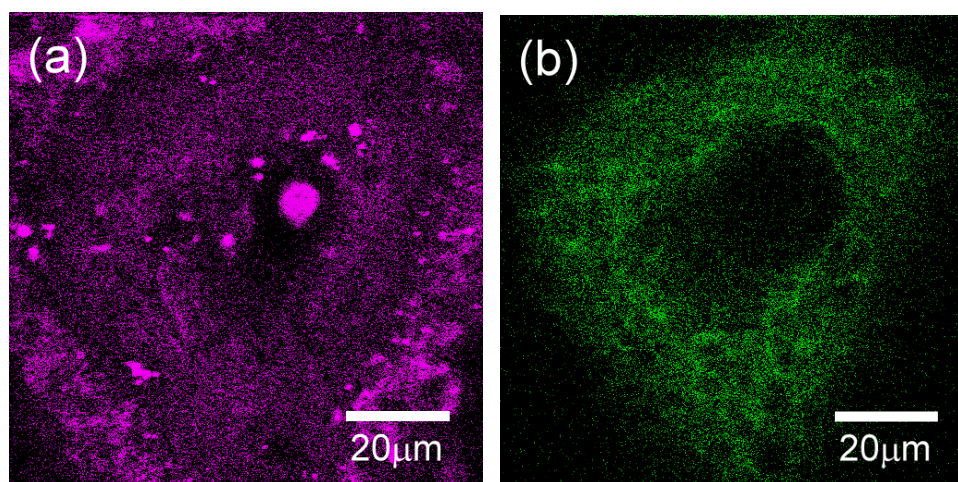


圖 3.3 (a)三倍頻血球影像 (b)二倍頻膠原蛋白影像

然而，膠原蛋白分布並不集中且在不同焦平面下的形狀及大小都不盡相同，此外，受限於觀測視野大小(80 $\times$ 80 μm^2)，在搜尋過程中所擷取到的二倍頻影像有很高的機率只有局部畫面(圖 3.4)。很難以此判斷

雷射聚焦的位置，如此在三維空間內搜尋，猶如大海撈針非常沒有效率，有鑑於此，本文提出一套演算法，以電腦自動搜尋的方式輔助檢測人員找到微血管，同時對於搜尋範圍內所有可能出現微血管的地方做標記，檢測人員倘若對其它觀測點有興趣，只需點選面版上的按鈕，載物平移台就會自動移動到另一個微血管的位置，操作上非常方便。

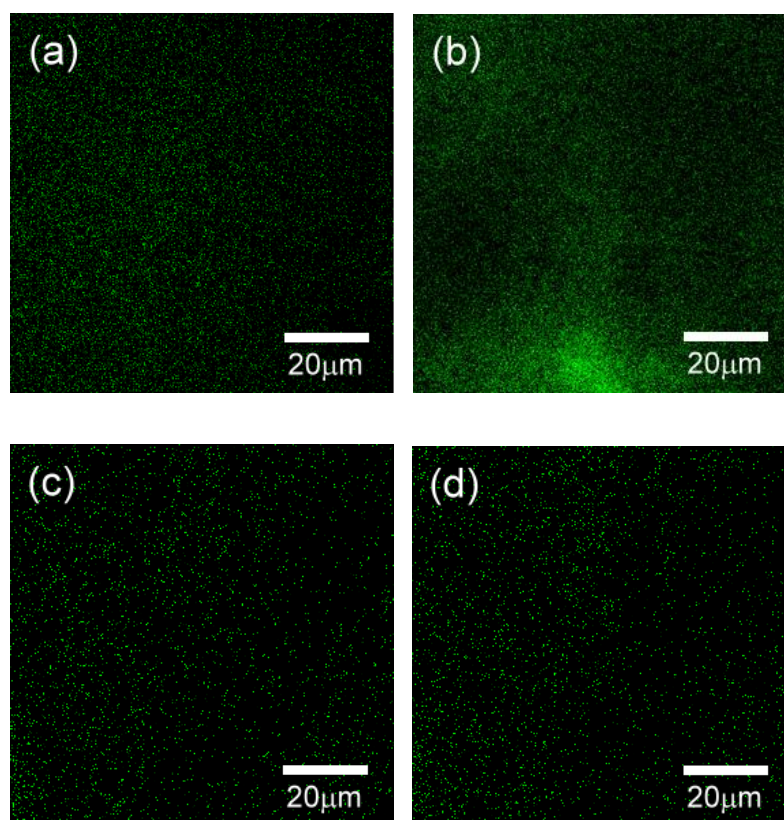
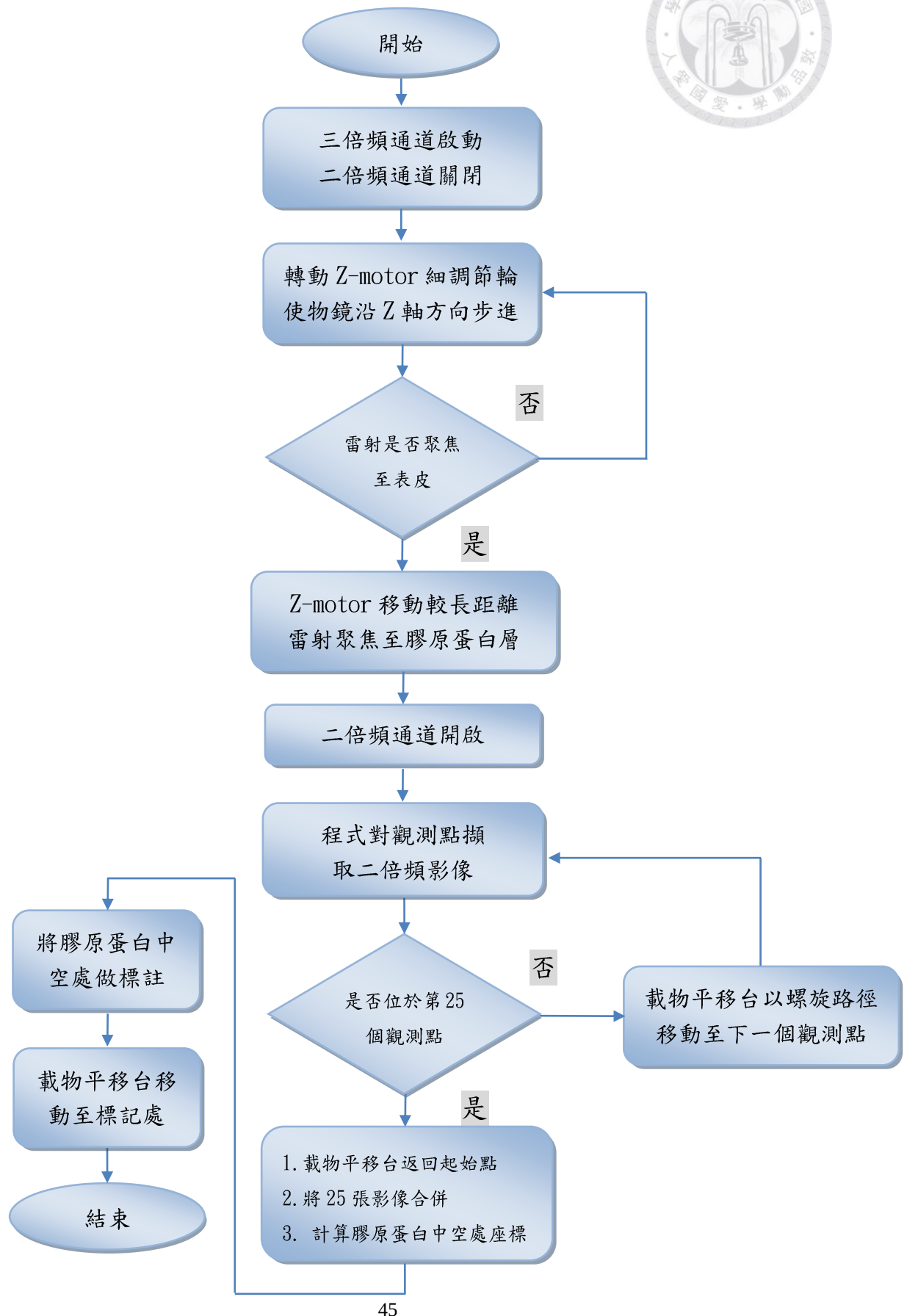


圖 3.4 不同觀測點的局部二倍頻信號

3.3.1 流程圖



3.3.2 搜尋步驟



現行的檢測方式是以人工調整物鏡高度和載物平移台形成三維控制，讓雷射聚焦至皮下微血管以觀測紅血球。實驗前，檢測人員調整物鏡高度，使物鏡上的水珠微微碰觸蓋玻片，此時，物鏡與蓋玻片的距離僅只數釐米，檢測人員要以手動方式在這數釐米的範圍內找到一個適合的深度讓雷射聚焦至皮下微血管並不是件容易的事，轉動調節輪的手勁稍大，待測目標就會被略過。再者，當雷射聚焦至皮下組織時，礙於觀測視野只有 $80 \times 80 \mu m^2$ ，無法做大範圍的觀測，尚須搭配手動方式控制載物平移台做二維搜尋，當載物台來回移動時，很容易發生同一個觀測點被重複尋找以致效率降低。有鑑於此，本研究論文提出以電腦控制物鏡與載物平移台移動，先控制物鏡移動到適合的深度，讓雷射直接聚焦至膠原蛋白層，之後再控制載物平移台對焦平面上的特定區域做有系統的二維搜尋，類似軍事衛星的原理，對某一區域做高空偵察，將其分割成數個區塊並分別取像，最後再將所有區塊的衛星圖拼起來，呈現一幅大範圍的地圖，如此，不僅可以減少重複搜尋的問題且精準、有效率，一切資訊更是盡收眼底。

步驟一：

實驗前，檢測人員將水滴在水鏡上。從側面看去，物鏡上的水珠微微

凸出載物平移台，此為物鏡最佳起始位置。將圓形蓋玻片放上後，受試者將手臂平放於載物平移台上，一切準備就緒，即可開始實驗。

步驟二：

程式執行後，二倍頻通道(SHG channel)暫時關閉。程式先對三倍頻通道(THG channel)做即時取像，每秒 30 張，每張影像(Frame)為 512 x 512 像素之灰階影像(Grayscale image)，實際視野為 $80 \times 80 \mu\text{m}^2$ 。程式每 0.3 秒對影像做一次最小值濾波 (Minimum filter)處理並計算其影像平均值(Mean value)，當影像平均值小於 1，則判斷雷射尚未聚焦至表皮，此時程式控制物鏡沿 Z 軸方向步進以擷取下一個深度之焦平面影像，重複上述步驟，直到影像平均值大於 1，程式判定雷射聚焦至表皮時，物鏡會沿 Z 軸方向步進一個較長的距離，使雷射直接聚焦至膠原蛋白層(圖 3.5)。

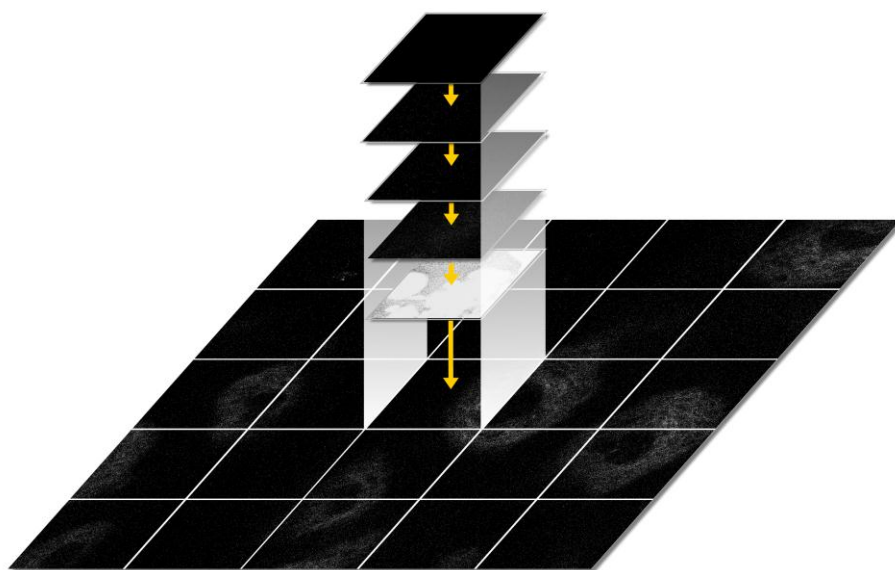


圖 3.5 搜尋示意圖。雷射尚未聚焦至表皮前，程式不斷調整物鏡高度，使雷射聚焦至下一個焦平面。

一開始，雷射聚焦在蓋玻片外，三倍頻灰階影像呈現近乎全黑狀態，僅有些微白色訊號(圖 3.6(a))，經最小值濾波處理(圖 3.6(b))，其影像平均值為 0(圖 3.6(c))。此時程式判定「雷射尚未聚焦至表皮」，遂以控制物鏡沿 Z 軸方向步進以擷取下一個深度的焦平面影像。

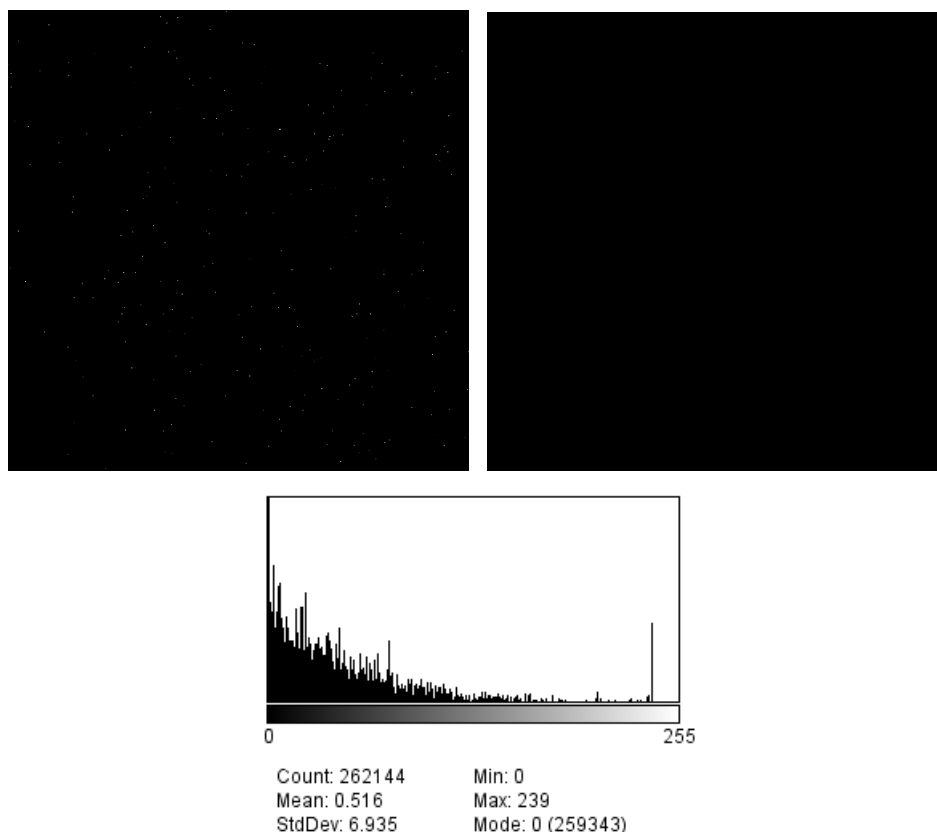


圖 3.6

(a)雷射聚焦於空氣之三倍頻影像 (b)經最小值濾波處理的影像
(c) 經最小值濾波處理之後的直方圖統計

重複上述步驟，物鏡持續沿著軸向步進。當雷射聚焦至玻片介面時，三倍頻影像信號逐漸增強且密集(圖 3.7(a))，但經最小值濾波處理後(圖 3.7(b))，信號幾乎被濾除，影像平均值仍小於 1(圖 3.7(c))。

程式判定雷射尚未聚焦至表皮，物鏡繼續沿 Z 軸方向步進。

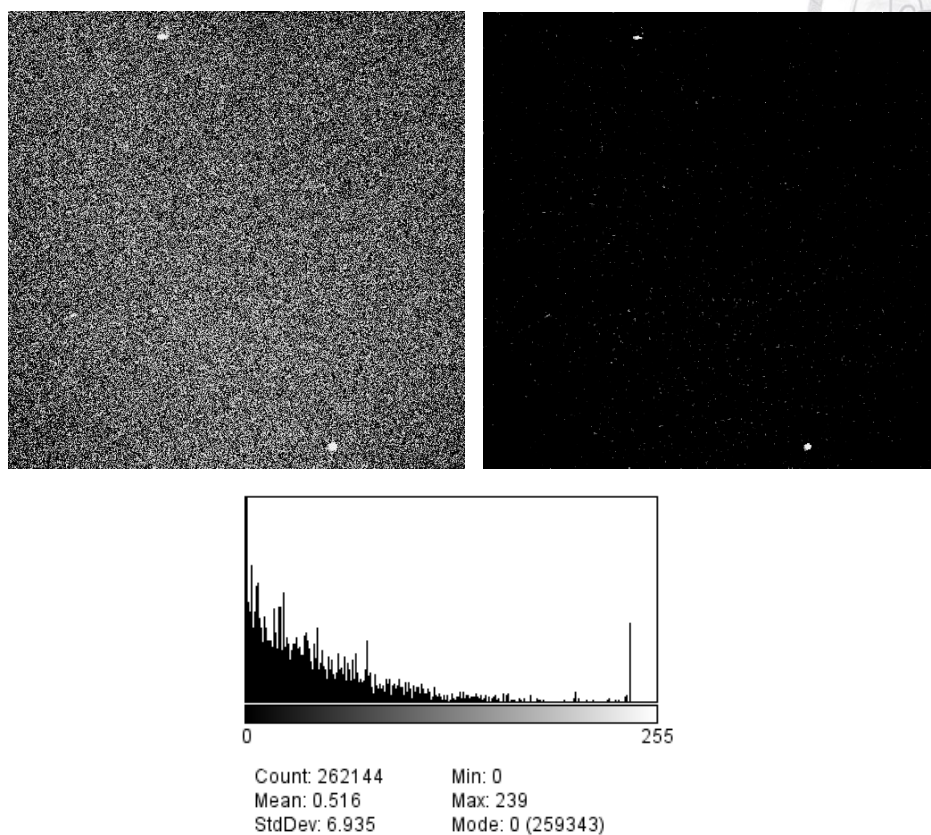


圖 3.7

(a)雷射聚焦於玻片介面之三倍頻灰階影像 (b)經最小值濾波處理的影像
(c) 經最小值濾波處理之後的直方圖統計

當雷射聚焦至表皮時，影像信號明顯增強且畫面呈現近乎全白狀態 (圖 3.8(a))，經濾波處理後(圖 3.8(b))，白色信號保留下來，其影像平均值遠大於 1(圖 3.8(c))。

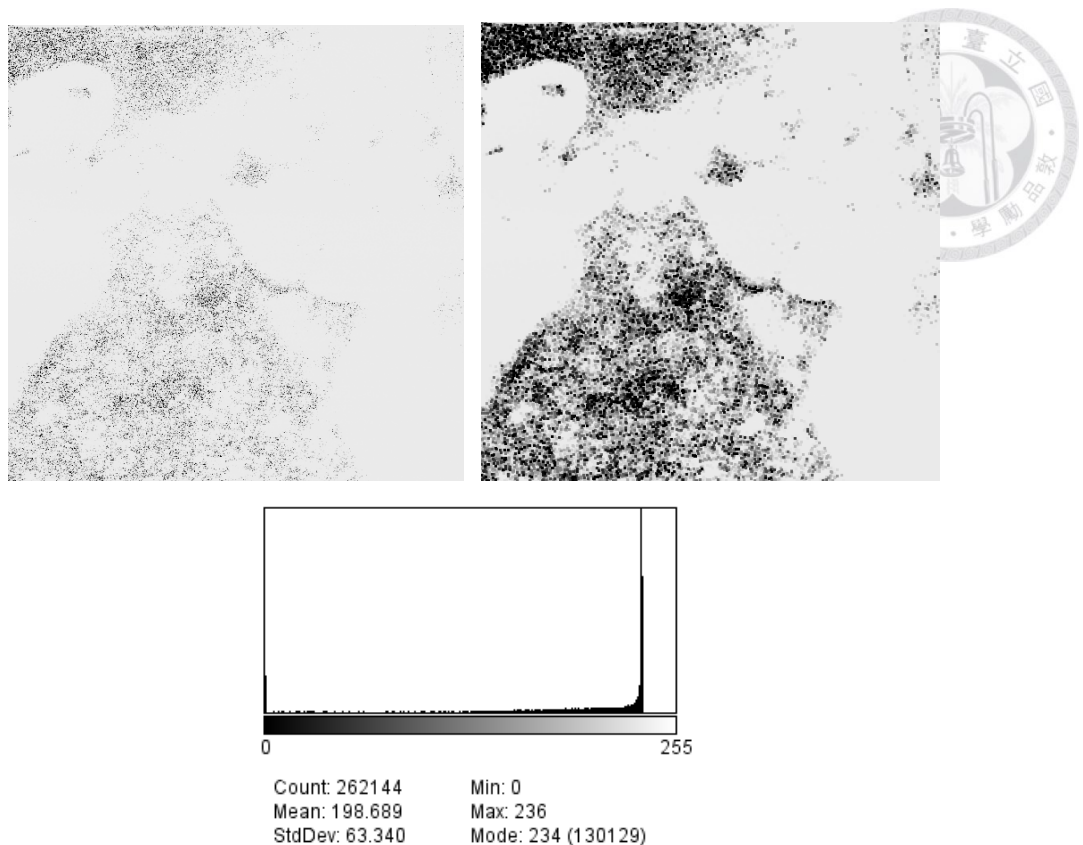


圖 3.8

- (a) 雷射聚焦於表皮之三倍頻灰階影像 (b) 經最小值濾波處理的影像
(c) 經最小值濾波處理之後的直方圖統計

此時，程式判定「雷射聚焦至表皮」並以物鏡目前的高度當作軸向基準點($Z=0$)，控制物鏡沿 Z 軸方向推進 $125\mu\text{m}$ 使雷射直接聚焦至膠原蛋白層，最後，物鏡停止移動。由於微血管至表皮的深度相當薄且因人而異，即使是同一隻手臂的不同部位，微血管深度也有些微差異，因此，雷射聚焦的深度即為關鍵。為了得到人體表皮至微血管的平均深度，我們對三位受試者進行人體實驗，在每位受試者的手臂中間區域隨機選擇五個測試點，每個測試點的取像範圍為 $400\times 400\mu\text{m}^2$ ，經

實驗後得到一個平均深度 124.6 μm (表 3.1)，取整數後為 125 μm 。由於受試者的個體差異以及微血管是以三維分布的方式穿梭於膠原蛋白層，我們取樣的焦平面不可能剛好切到每條微血管，但是觀測範圍內所有可能出現微血管的區域都會被程式標註，在此焦平面上，多數的膠原蛋白中空處可以看到血球流動微，但有些則否，倘若標記點上沒有出現微血管，只需上下微調物鏡高度(莫約 5 μm)就能看到。

表 3.1 不同受試者之表皮至微血管的深度

次\受試者	A	B	C
1	122	120	124
2	125	128	117
3	126	126	128
4	120	130	126
5	128	125	125
平均	124.2	125.8	124.0
總平均:124.7			單位: μm

步驟三：

當雷射聚焦至膠原蛋白層後，二倍頻通道啟動，程式以第一個聚焦點為起始點，控制載物平移台依螺旋路徑移動並循序對焦平面上的 25 個觀測點取二倍頻影像(圖 3.9)，載物平移台每秒鐘移動一次，每次移動 80 μm ，取像範圍 400 $\times$ 400 μm^2 ，圖 3.10 為實際取到之灰階影像。

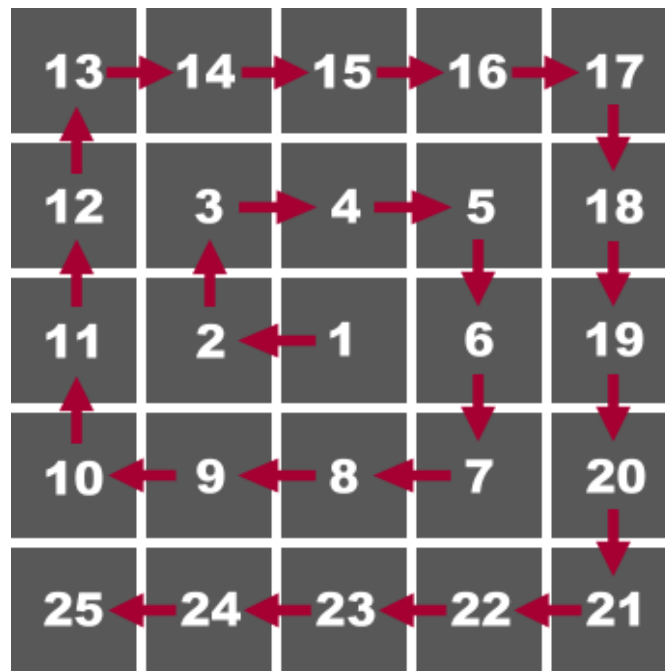


圖 3.9 載物平移台之螺旋移動路徑

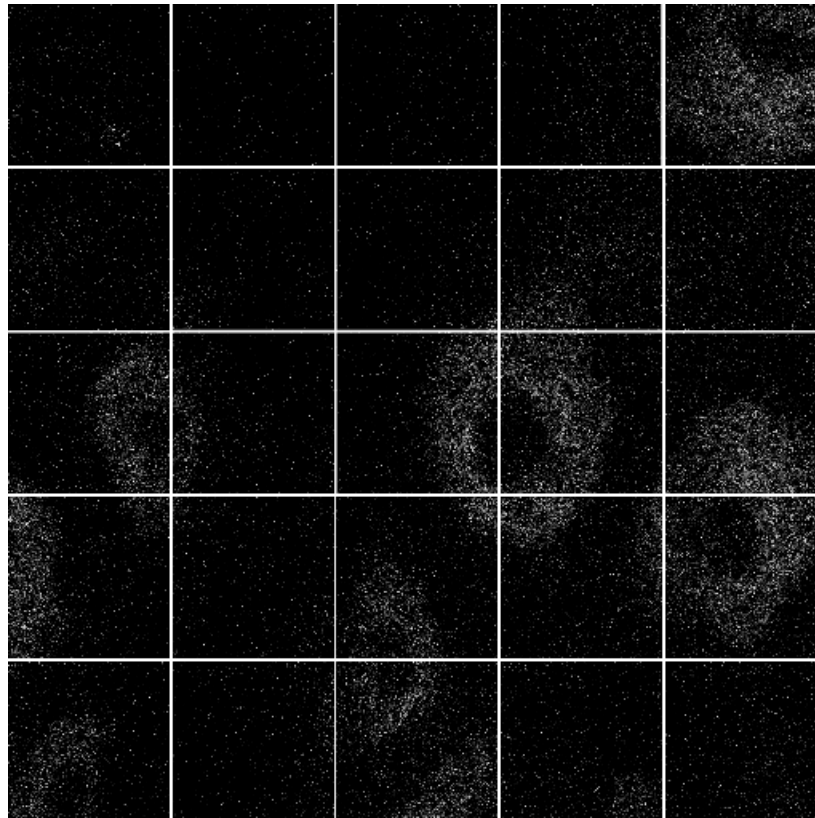


圖 3.10 膠原蛋白層的二倍頻影像，取像範圍為 $400 \times 400 \mu m^2$ 。

為了提升影像品質，程式每三張影像會做一次平均，之後再對平均後的影像做處理，以下針對影像處理部分做說明。不同於一般影像，倍頻影像接收來自樣品反射的信號，電腦再根據信號之強弱逐點計算出對應的像素值，最後組成一張「離散點狀圖」(圖 3.11)。

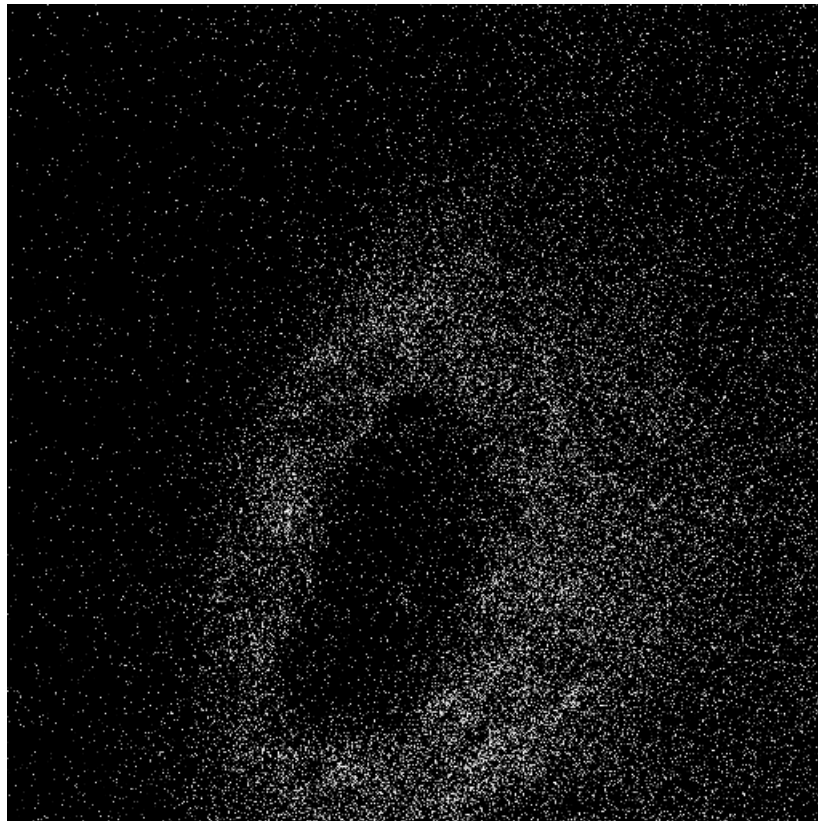


圖 3.11 灰階二倍頻影像(512x512 像素)

儘管人眼可以區分出倍頻影像中的目標與雜訊，實際上，將影像放大後可明顯看出，目標物與背景雜訊均由許多像素值大於 0 的離散點所構成(圖 3.12)，電腦無法判斷哪些像素是資訊、哪些像素是背景雜訊。因此，需透過影像處理濾除雜訊，將目標從背景中分離出來，

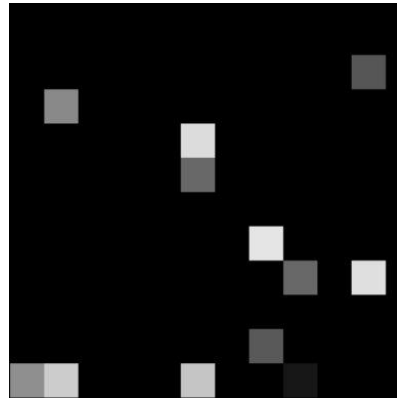
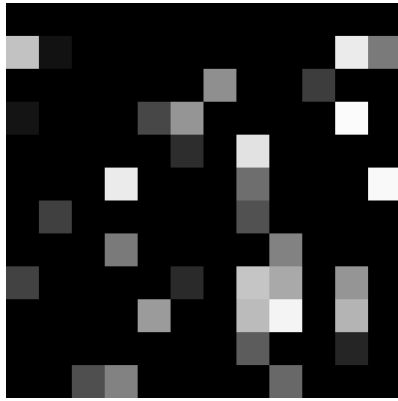


圖 3.12 (a)目標物的局部放大影像 (b)背景雜訊的局部放大影像

以利後續的目標定位。於是，我們嘗試以一般影像處理中常用的中值濾波器(Median filter)濾除「胡椒鹽雜訊」，經處理後發現整張圖幾乎都被濾掉(圖 3.13)。

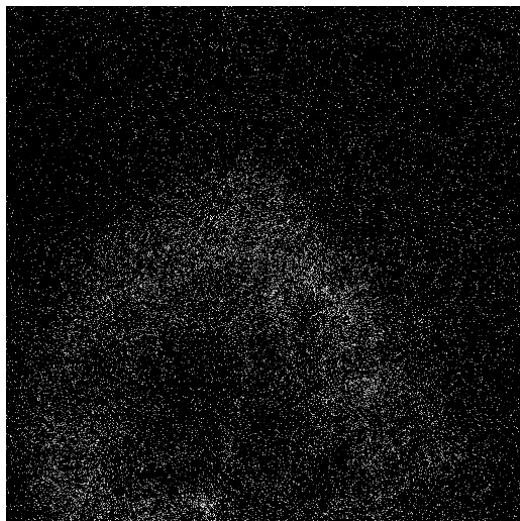


圖 3.13 (a)原始灰階二倍頻影像 (b)中值濾波器處理後的結果

會產生這樣的結果其實不難理解，由於像素與像素之間並非緊密連結，經由中值濾波處理後，除了像素緊密相連的區域會被保留下來

外，其他區域的資訊均會被濾除。由此可知，中值濾波器對於倍頻影像可謂失效。退一步思考，人眼之所以能夠辨識出目標，關鍵在於像素間的「密集程度」。對於像素較密集的区域，我們認定為目標物，對於像素較不密集的区域，我們將其視為背景。藉由此概念，本研究論文提出一套針對倍頻影像的影像處理方法，能夠將目標物從背景分離出來。首先，程式先對每張影像做直方圖拓展(Histogram Stretching)以提升影像對比度，在雷射狀況不穩定、輸出功率較低的狀況下，仍可不受影響繼續實驗。緊接著，程式對影像做最大值濾波(Maximum filter)處理，如此，分開的像素就會連結在一起(圖 3.14)。

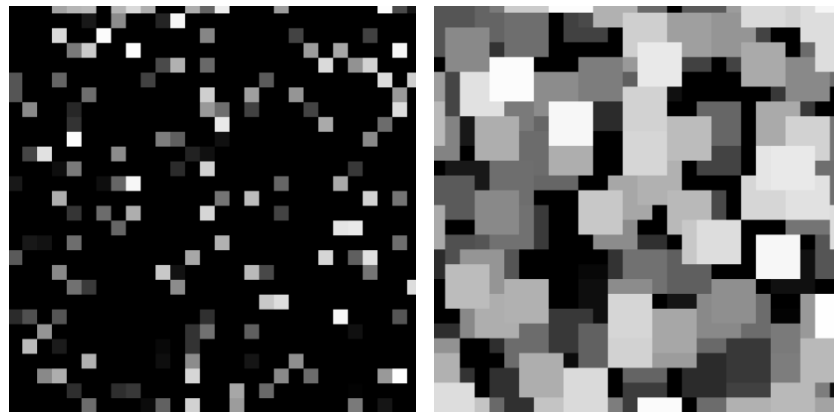


圖 3.14 (a)原始離散點圖 (b)經最大值濾波器運算後的影像

之後，再將影像做平均縮小(Average scale down)，由原本的 512x 512 像素影像縮小至 64x64 像素，此時，鄰近的像素會平均成一個值，

並以此做為縮小後的代表像素，如此，離散的點狀圖就會聚合成一個塊狀物體(圖 3.15)。

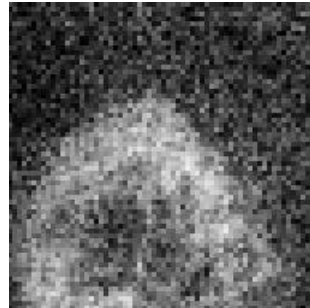


圖 3.15 經縮小處理的灰階影像，大小為 64×64 像素

當 25 個觀測點取像完畢，載物平移台則停止移動，此時程式將 25 張 64×64 像素的影像拼成一幅 320×320 像素之灰階影像(圖 3.16)，其視野為 $400 \times 400 \mu m^2$ 。之後，程式將其輸出至視窗程式的工作面板上，以利操作人員觀測。

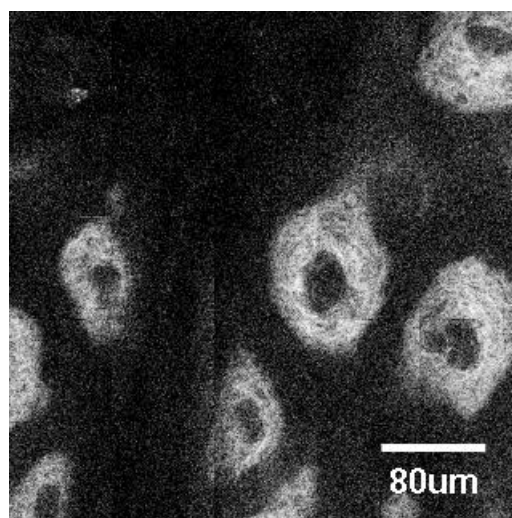


圖 3.16 大視野的二倍頻灰階影像

步驟四

程式將步驟三所輸出的大視野二倍頻影像以預設的閾值(Threshold)對影像做二值化(Binary)處理，將膠原蛋白信號留下來，其餘變成黑色的背景(圖 3.17(a))，同時，程式再對二值化的影像做中值濾波(Median filter)處理，將殘餘雜訊濾除，使目標物變得更清楚(圖 3.17 (b))。

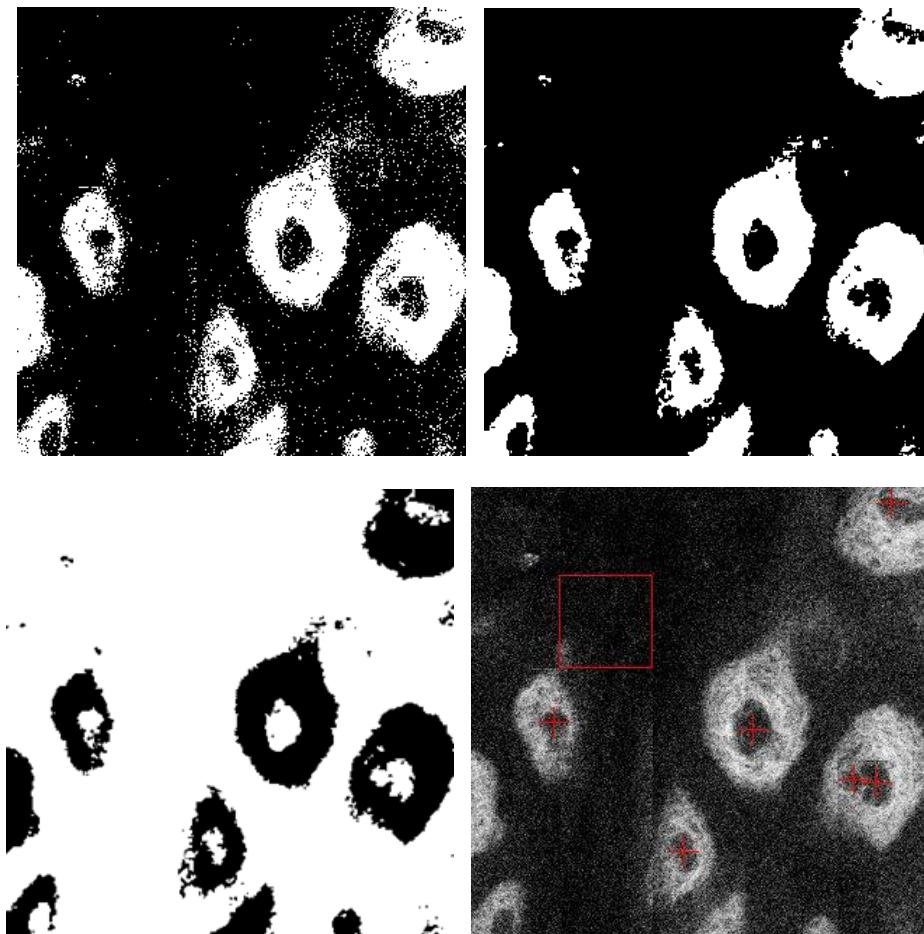


圖 3.17

- (a)經二值化處理後的影像 (b)經中值濾波處理的影像
(c)將二值化影像做反向運算 (d)將空洞處座標示於原始像中

接著，程式將二值化影像取反向運算(圖 3.17(c))，如此，膠原蛋白就會變成背景(像素值為 0)，而膠原蛋白中空處就會變成物體(像素值為 1)，最後，程式會計算出觀測視野內所物體(膠原蛋白中空處)的質心座標並將其標註在原始影像中(圖 3.17 (d))以提供檢測人員觀測。如此，所有微血管可能通過之處便一目了然。搜尋演算法執行到此，會暫時停止所有搜尋步驟，切換到「校正模式」，此時操作人員得以手動方式微調二值化的閾值(Threshold)使二值化影像達到最佳化，或是維持程式預設的閾值不做更動。

步驟五

手動校正完畢後，操作人員將程式切回「搜尋模式」，程式則會根據膠原蛋白中空處質心座標自動將載物平移台移動到標註的地方，此時，操作面板上就立即顯示紅血球流動的畫面。一般而言，微血管會通過膠原蛋白中空處，意即，被標註的地方都有可能出現微血管。倘若檢測人員想看其它觀測點，只需按下按鈕，載物台就會自動且精準地移動下一個觀測點，以達到自動化搜尋微血管的功能。

第四章 實驗結果與討論



本實驗使用萊卡(Leica DMI 3000M)倒立顯微鏡系統與奧林帕斯40倍水鏡(40×/NA=1.15, Olympus)，以鉻貴橄欖石飛秒雷射為光源，工作波長為1230nm，脈衝重複率為90MHz，脈衝寬度為100fs，平均輸出功率為400mW，對人體做二維快速掃描，每秒產生30張512×512像素的倍頻影像，影像為512×512像素，影像視野為 $80 \times 80 \mu m^2$ ，再搭配本研究論文提出之「自動搜尋皮下微血管演算法」控制物鏡與載物平移台形成三維移動以搜尋人體皮下微血管(圖4.1)。

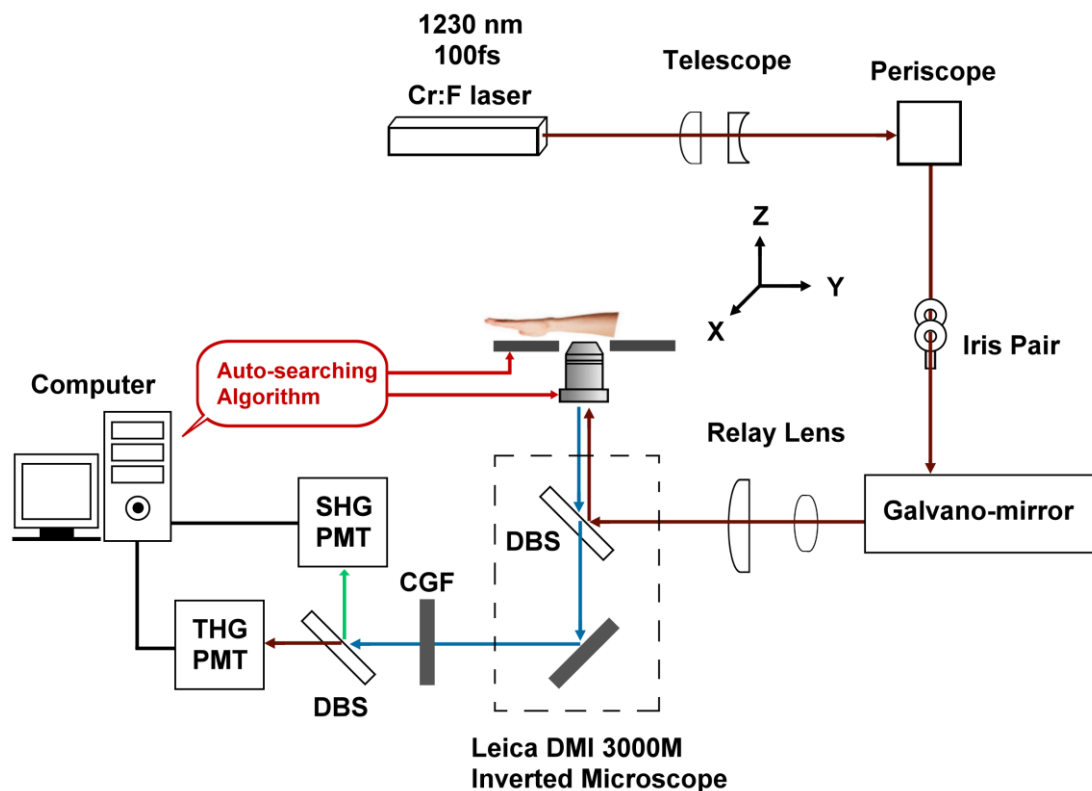
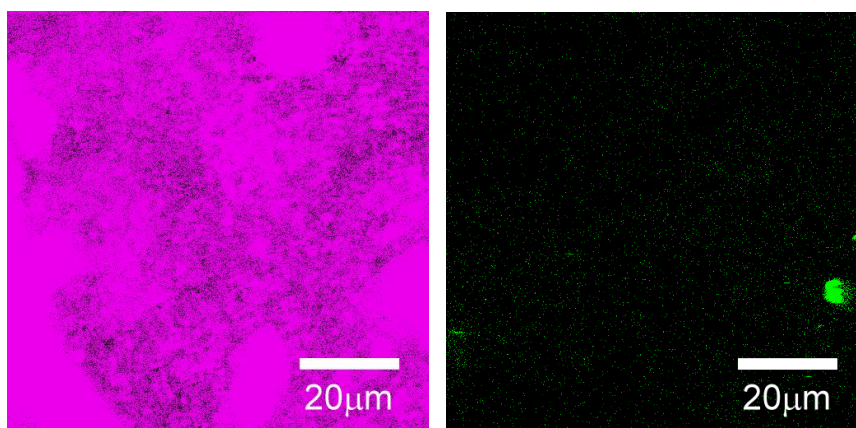


圖 4.1 實驗系統架構

為了比較人工尋找和電腦自動搜尋的效能，我們先以「電腦搜尋」的方式對兩位受試者進行試驗，並記錄找到微血管(血球)所花費的時間。之後將控制儀器(Z-motor controller)卸下，改以手動方式操控物鏡與物載物平移台尋找皮下微血管並記錄找到微血管的時間。本試驗經衛生福利部與台大醫院研究倫理委員會(National Taiwan University Hospital, Institutional Review Board, IRB)核准，公開徵求兩名 20 到 90 歲無糖尿病及皮膚傳染疾病之健康受試者進行人體試驗。本試驗以一位 25 歲女性及 23 歲男性為受試者，試驗過程中，受試者的手臂自然平放於載物平移台上，以雷射光源照射在手臂內側的皮膚上，照射時間總長不超過 30 分鐘。

4.1 倍頻影像剖面圖

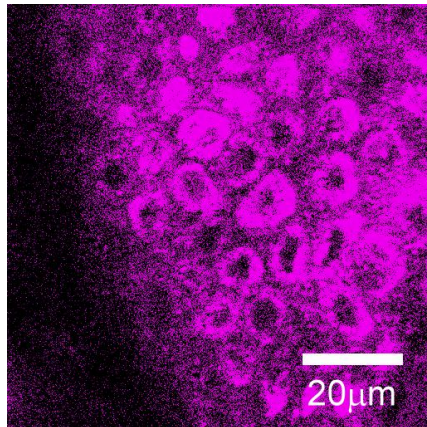
在不同深度下的三倍頻影像，由表皮層至真皮層，由淺至深，對每個斷層面做雙通道取像。圖 4.2(a)(b)為雷射聚焦至表皮的影像。



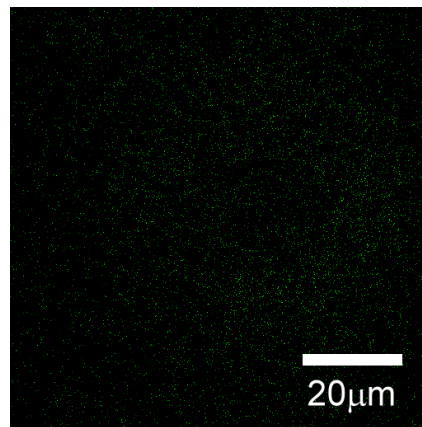
(a)表皮層之三倍頻影像

(b)表皮層之二倍頻影像

圖 4.2(c)(d)為真皮層的三倍頻真皮乳突細胞以及二倍頻影像，由於雷射還沒有聚焦至真皮層的淺層，因此二倍頻畫面尚未出現膠原蛋白影像。

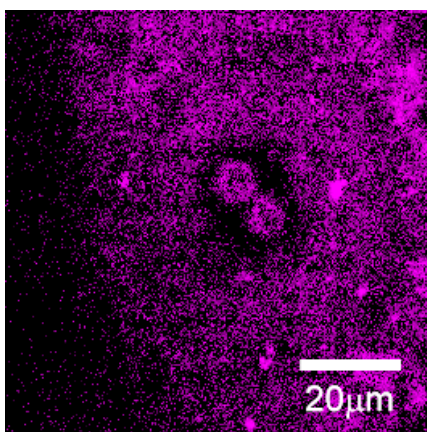


(c)真皮層三倍頻影像

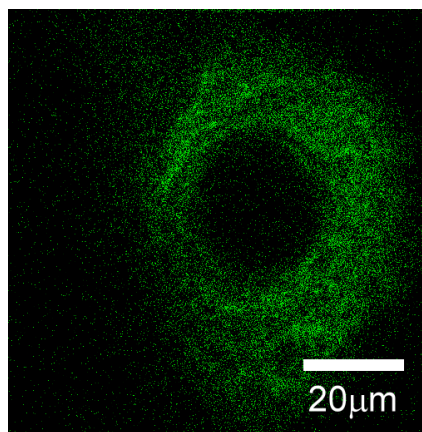


(d)真皮層二倍頻影像

圖 4.2(e)(f)為真皮層的三倍頻血球影像以及二倍頻膠原蛋白影像。此時，雷射還聚焦至真皮層的深層，從二倍頻畫面可以清楚地看到膠原蛋白影像。



(e)真皮層深處之三倍頻影像



(f)真皮層之二倍頻影像

圖 4.2 各深度的三倍頻與二倍頻影像

4.2 電腦搜尋結果

試驗前，檢測人員將水滴在物鏡上。從側面看去，水珠微微凸出載物平移台，之後將圓形蓋玻片放上、受試者的手臂自然平放於載物平移台上，一切準備就緒，實驗開始。首先，程式對三倍頻通道(THG channel)取像，判斷雷射是否聚焦至表皮，此時，二倍頻通道暫時關閉不取像。

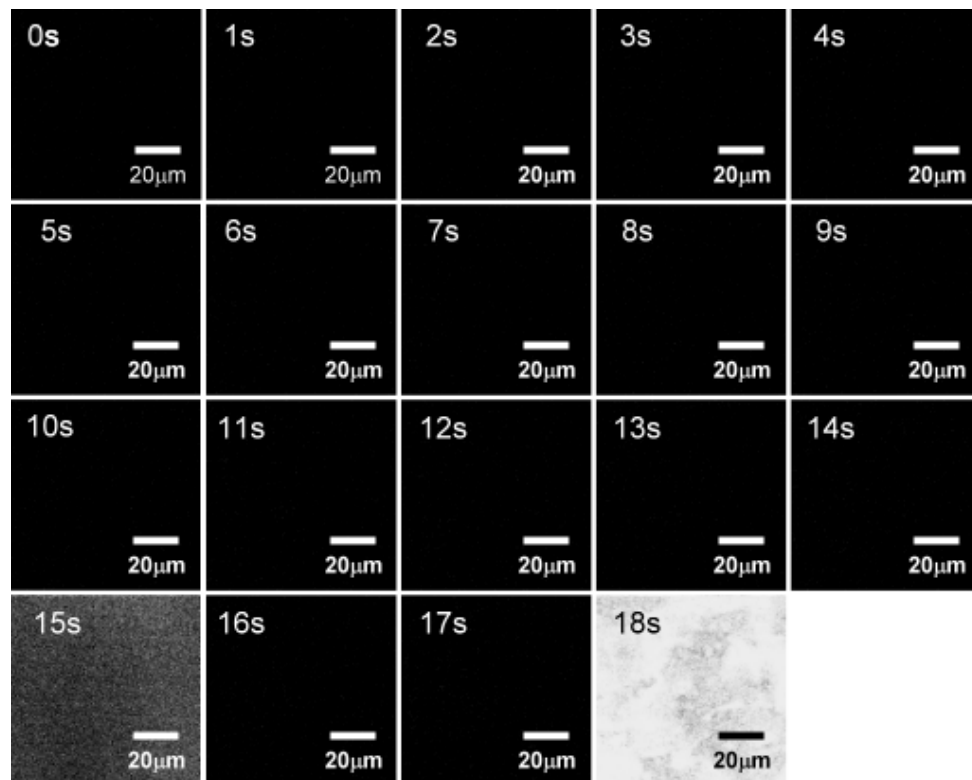


圖 4.3 物鏡沿 Z 軸方向步進時所擷取到的三倍頻影像

圖 4.3，一開始，雷射聚焦於玻片之外的空氣，畫面幾乎呈現全黑狀態。第 15 秒的畫面為雷射聚焦至玻片介面的三倍頻影像。第 18 秒的畫面則是雷射聚焦至人體表皮之三倍頻影像，此時，程式控制物

鏡推進 150 μm 的距離使雷射直接聚焦至膠原蛋白層，同時，二倍頻通道(SHG channel)啟動。圖 4.4，程式以螺旋狀路徑於焦平面上 25 個觀測點擷取二倍頻影像，取像範圍為 400 $\times$ 400 μm^2 ，於第 19 秒開始，第 43 秒結束。由於程式對每個觀測點取像、存圖以及擷取完畢後控制載物平移台移動至下一個觀測點需耗費 1 秒鐘，故程式控制載物平移台走完 25 個觀測點會花費 25 秒。

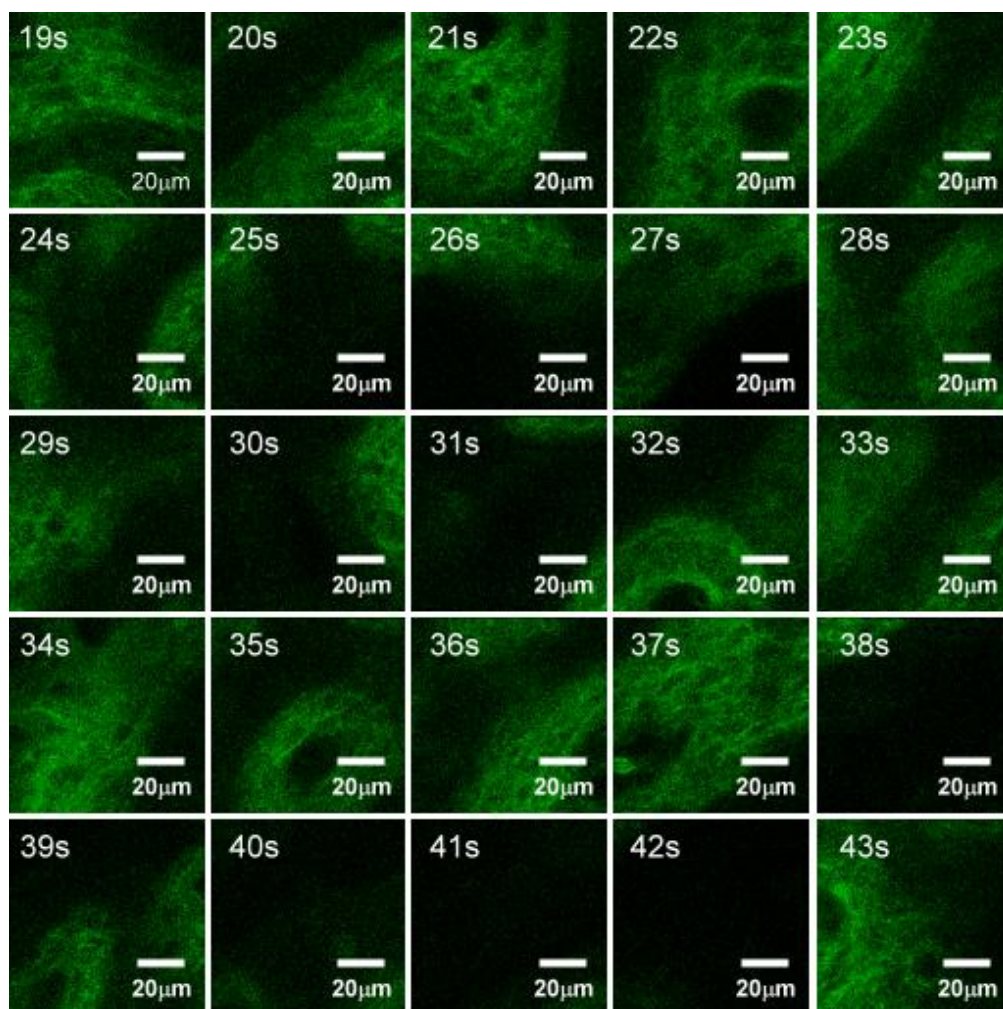


圖 4.4 載物平移台以螺旋狀路徑移動時所擷取到的二倍頻影像

當 25 個觀測點取像完畢後，程式將擷取到的 25 張二倍頻影像拼成一幅 320×320 像素之大視野影像，圖 4.5。最後，影像會顯示在視窗介面的左上方供檢測人員參考，圖 4.6。

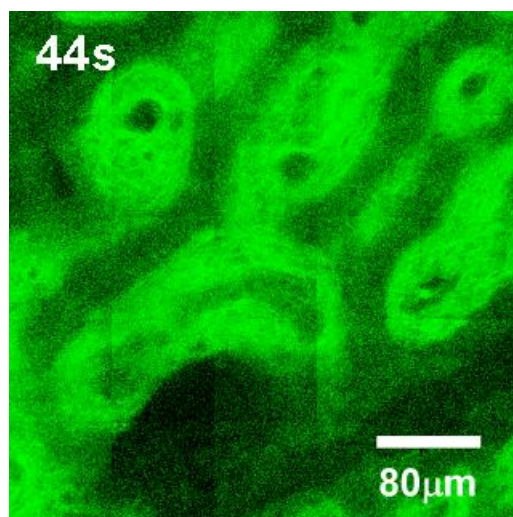


圖 4.5 大視野之二倍頻膠原蛋白拼圖影像(320×320 像素)

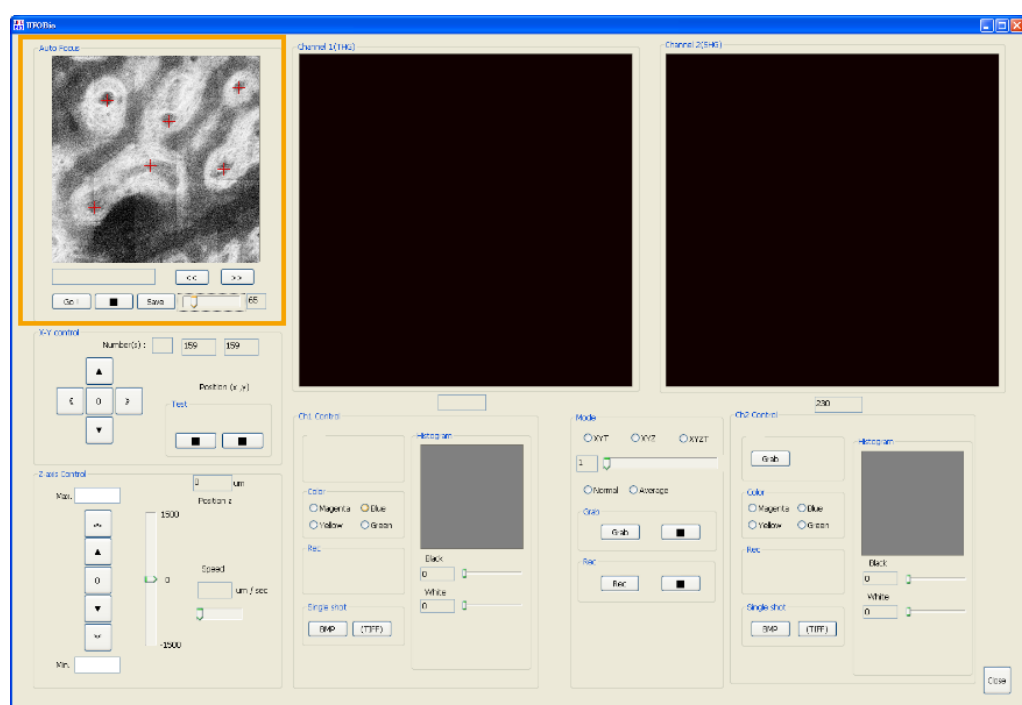


圖 4.6 膠原蛋白影像顯示於視窗介面

圖 4.7，程式自動切換至「校正模式」，操作人員以手動方式校正閾值使膠原蛋白空心處被定位，校正過程花費 6 秒鐘。

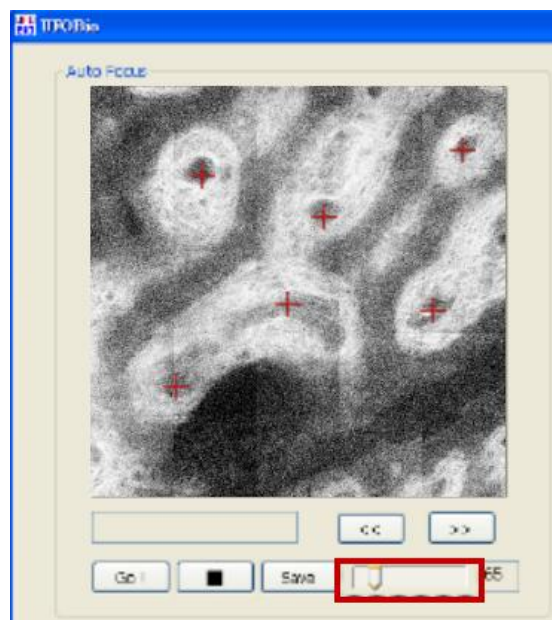


圖 4.7 校正模式，調整閾值，將膠原蛋白空洞定位

校正結束後，按下「>>」鍵，程式將校正模式切換回自動搜尋模式並且控制載物平移台移動到紅色十字標記的位置(移動過程不到 1 秒鐘)，三倍頻畫面出現血球影像(圖 4.8)，搜尋過程共耗時 51 秒。

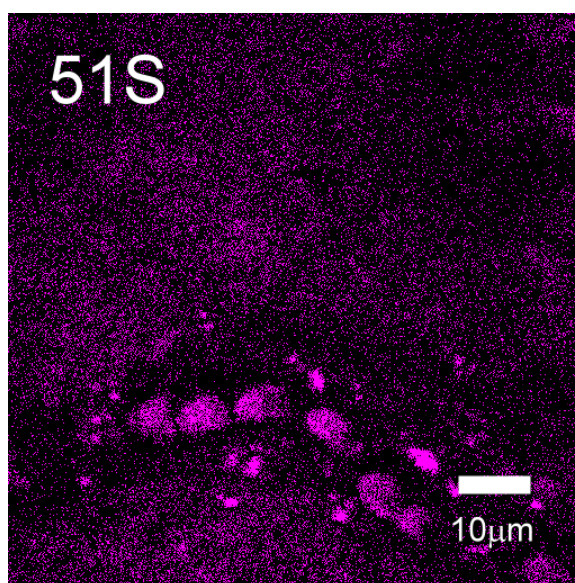


圖 4.8 以電腦演算法找到皮下微血管

圖 4.9 為第一個觀測點的血球影像，從圖中可以清楚地看到一顆顆流動中的血球。

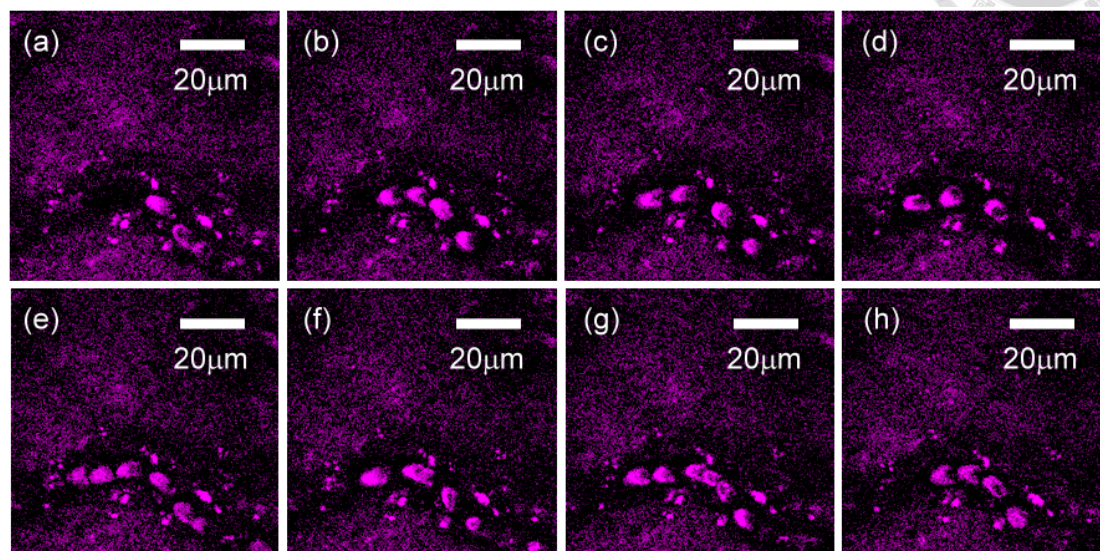


圖 4.9 第一個觀測點之三倍頻血球影像

欲觀測其他觀測點的血球影像，只需再按下「>>」鍵，載物平移台就會自動移至該觀測點，移動過程只需 1 秒鐘，如圖 4.10。

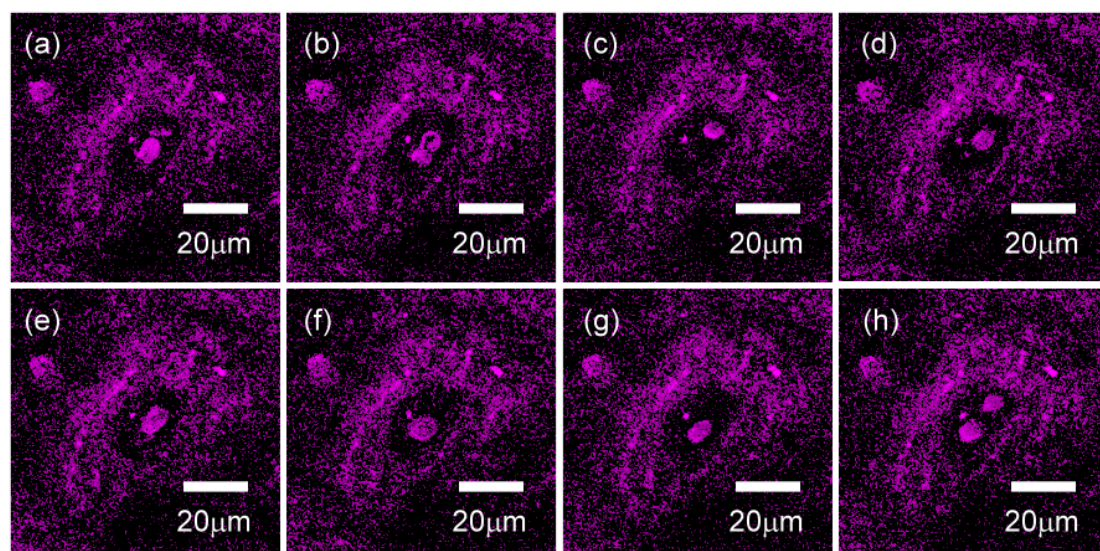


圖 4.10 第二個觀測點之三倍頻血球影像

4.3 人工搜尋結果

不同於電腦自動搜尋，人工搜尋策略以三倍頻信號為主，先找到三倍頻真皮乳突細胞，再調整物鏡高度，使雷射聚焦至真皮乳突細胞較深的斷層面以尋找血球。一開始，雷射聚焦至空氣，三倍頻畫面呈現全黑狀態(圖 4.11(0s)-(8s))，操作人員以手動方式調整物鏡高度，設法使雷射聚焦至皮下組織，此時，載物平移台靜止不動。調整過程中，我們一邊轉動粗調節輪，一邊觀測三倍頻畫面，當三倍頻畫面出現強烈信號時(圖 4.11-(9s))，表示雷射已聚焦至皮下。

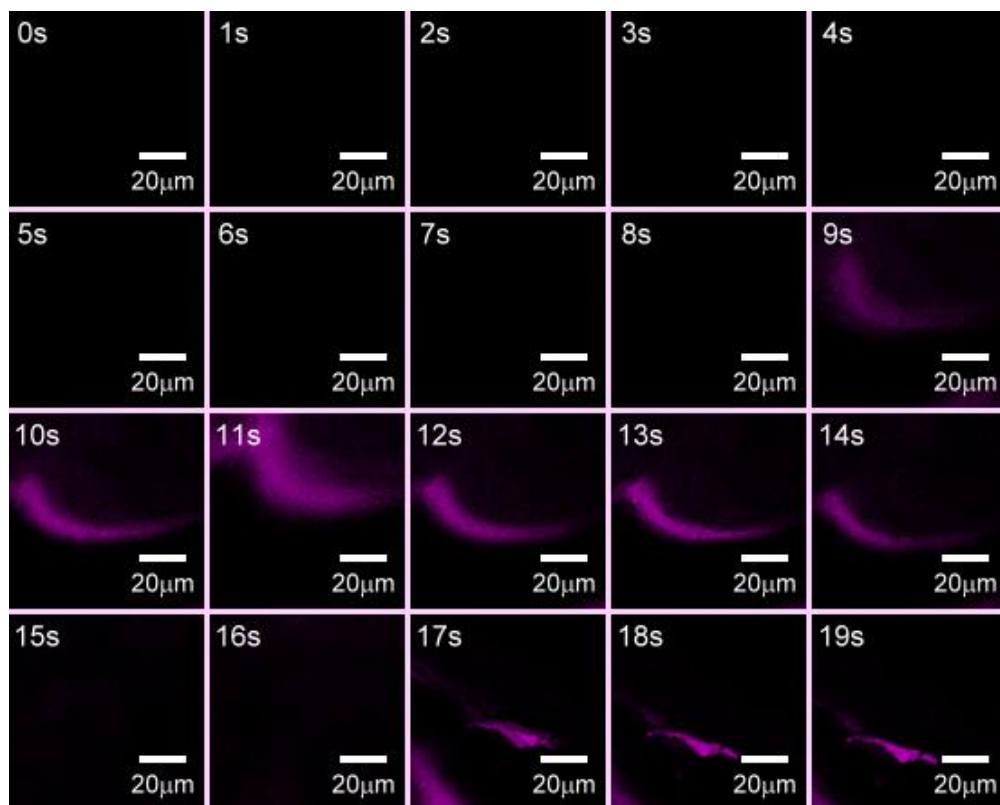


圖 4.11 人工搜尋血球之過程，第 0 秒至第 19 秒

此時，物鏡停止軸向移動，操作者以手動方式控制載物平移台於焦平面上做二維移動以尋找真皮乳突細胞，一般而言，我們只能以隨機移動的方式做搜尋(圖 4.12 至圖 4.14)。

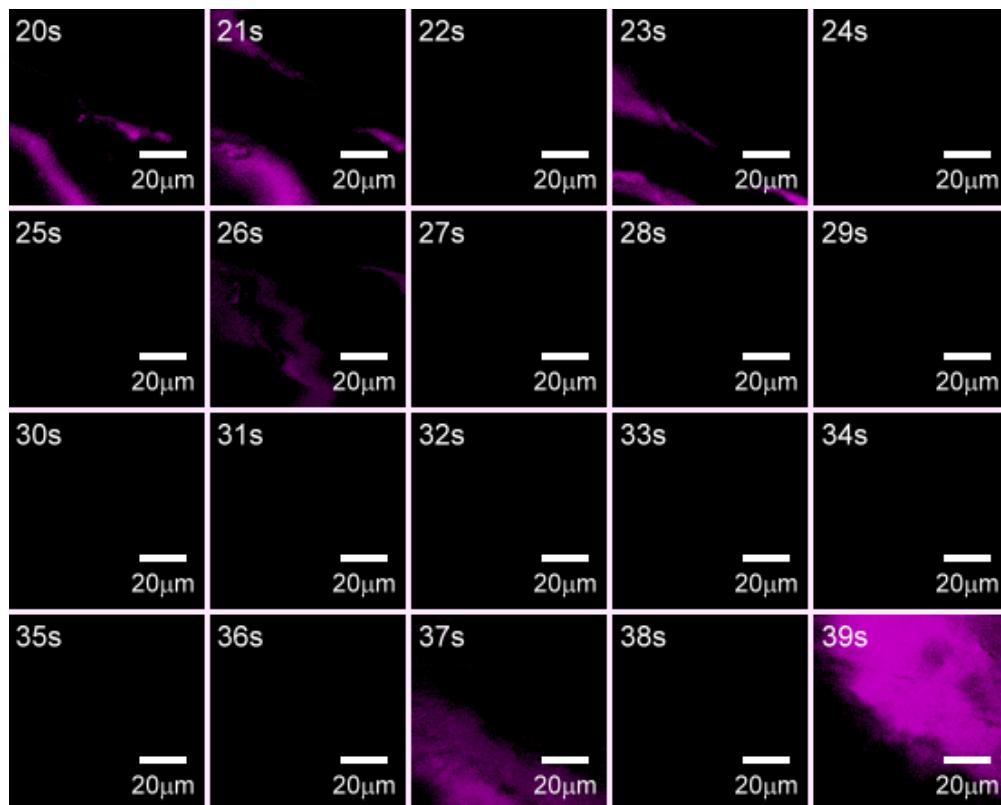


圖 4.12 人工搜尋血球之過程，第 20 秒至第 39 秒

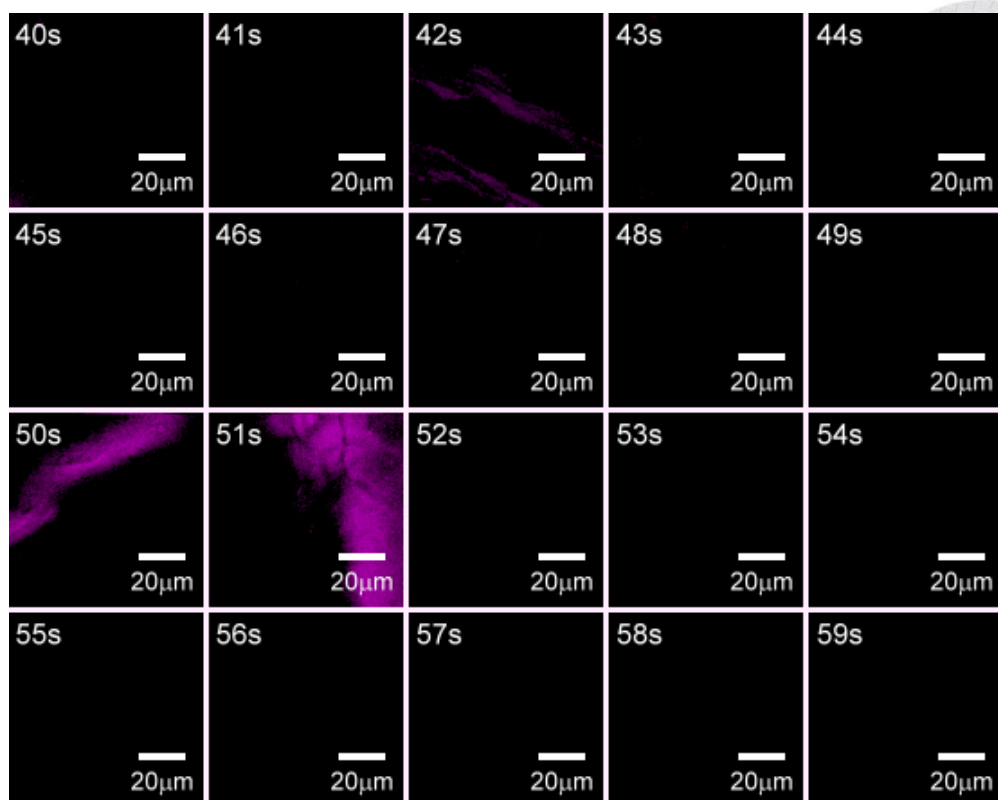


圖 4.13 人工搜尋血球之過程，第 40 秒至第 59 秒

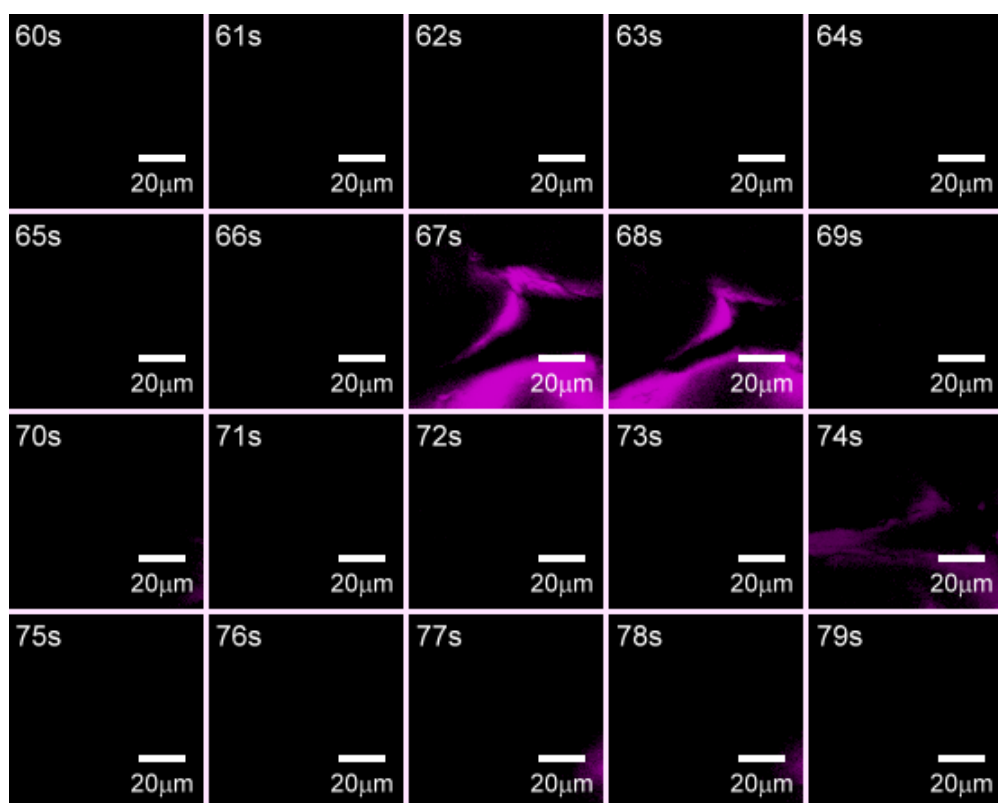


圖 4.14 人工搜尋血球之過程，第 60 秒至第 79 秒

圖 4.15(81s)至(99s)，此範圍的三倍頻信號較強，附近很有可能出現真皮乳突細胞，於是先將搜尋範圍縮小，在附近做微幅前移動。

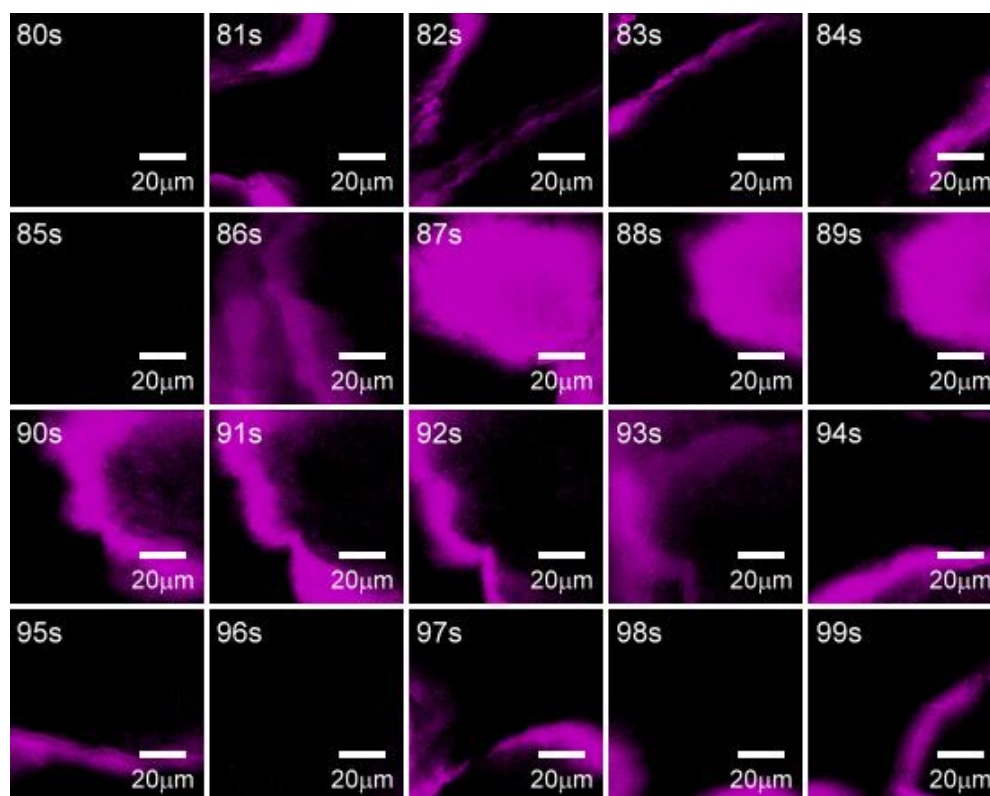


圖 4.15 人工搜尋血球之過程，第 80 秒至第 99 秒

由於載物平移台的操作搖桿非常靈敏，操作力道的拿捏非常重要。手勁稍大，畫面很快就被掠過(圖 4.15(81s)-(84s))，操作力道過小，則畫面又停滯不動(圖 4.15(90s)-(92s))。

操作人員持續在附近做二維搜尋，當第 111 秒時，三倍頻畫面出現很強的真皮乳突細胞信號(圖 4.16(111s))，此時，載物平移台停止移動，操作人員調整物鏡的細調節輪，讓雷射聚焦到更深的斷層面以找出血球(圖 4.16(115s)-(119s))。

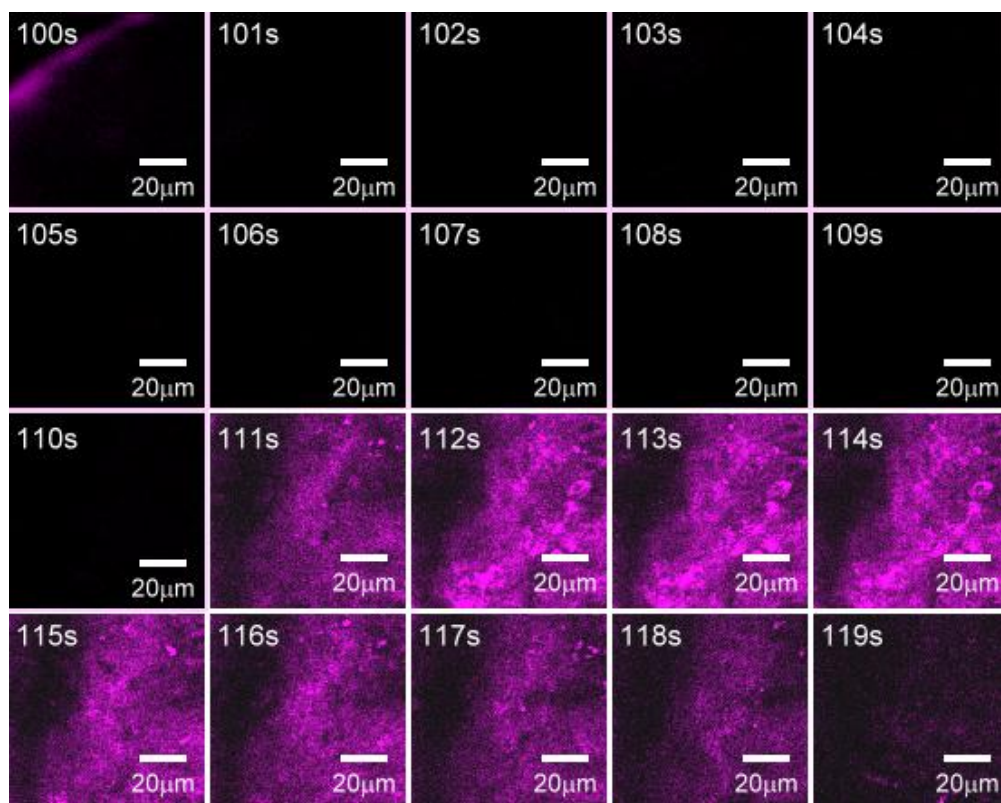


圖 4.16 人工搜尋血球之過程，第 100 秒至第 119 秒

從圖 4.17(122s)-(123s)可以發現，真皮乳突細胞的中心處沒有血球的蹤跡，於是，我們來回轉動物鏡的細調節輪，使雷射聚焦至真皮乳突細胞的各個斷層面(圖 4.17(125s)-(134s))再次確認是否有血球通過。

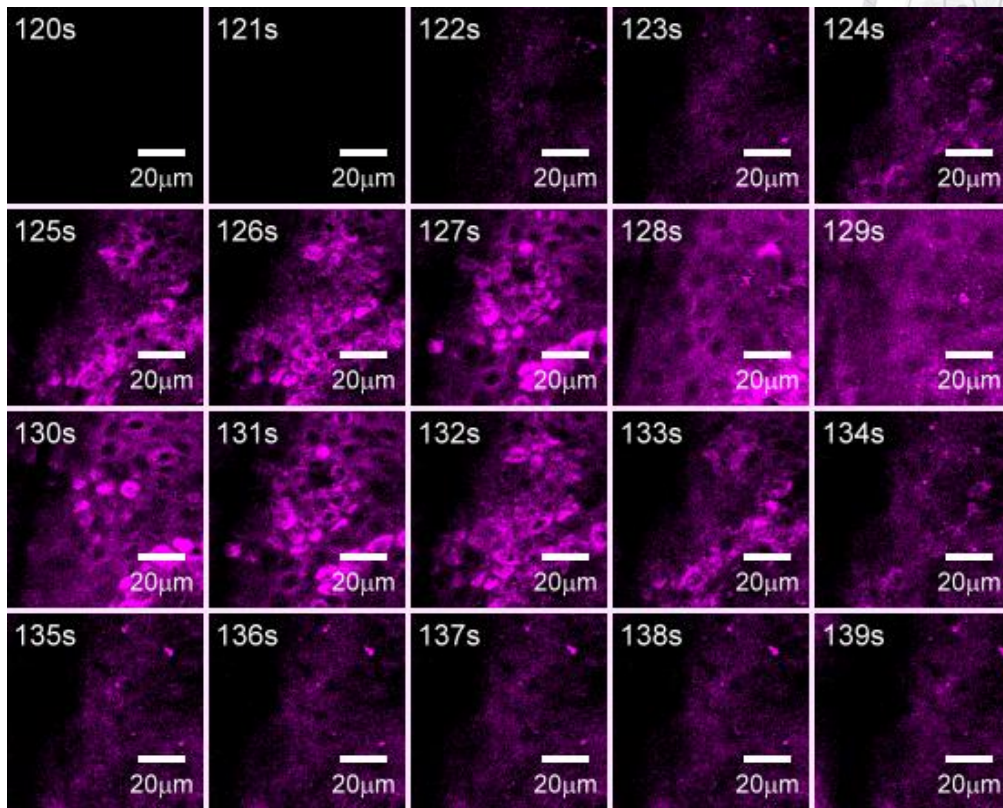


圖 4.17 人工搜尋血球之過程，第 120 秒至第 139 秒

由於一直沒有血球的影像，所以決定尋找下一個觀測點。由於此區的真皮乳突細胞很豐富，微血管通過的機率非常高，於我們控制載物平移台往左邊做移動(圖 4.18(140s)-(145s))，之後，載物平移台再朝前方移動(圖 4.18(146s)-(148s))，此時，載物平移台停止移動，重複之前的步驟，調整物鏡細調節輪以觀測此區域較深的斷層面影像(圖 4.18(155s)-(158s))。

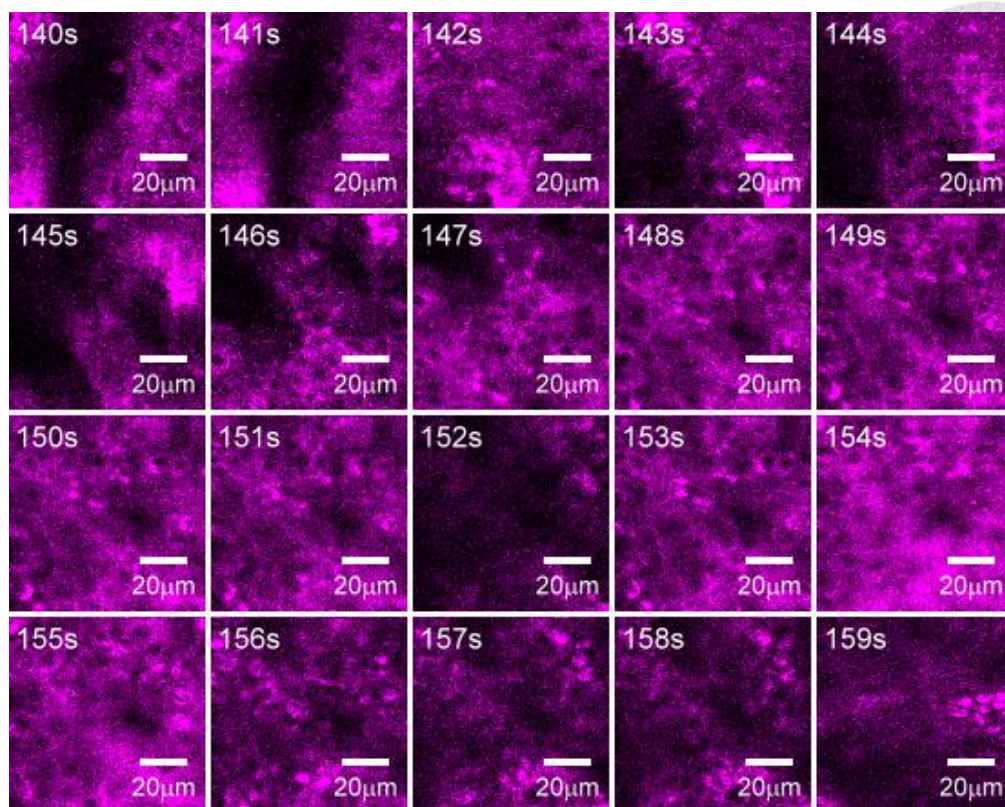


圖 4.18 人工搜尋血球之過程，第 140 秒至第 159 秒

當雷射聚焦至較深的斷層面後，物鏡停止微調，改以手動操作載物平移台在附近做搜尋。終於，我們在三倍頻影像中發現血球的蹤跡(圖 4.19(162s)左上方)，操作人員控制載物平移台往右邊移動，讓血球置於畫面中央(圖 4.19(168s))，搜尋結束。整個搜尋過程共花費 2 分 48 秒。

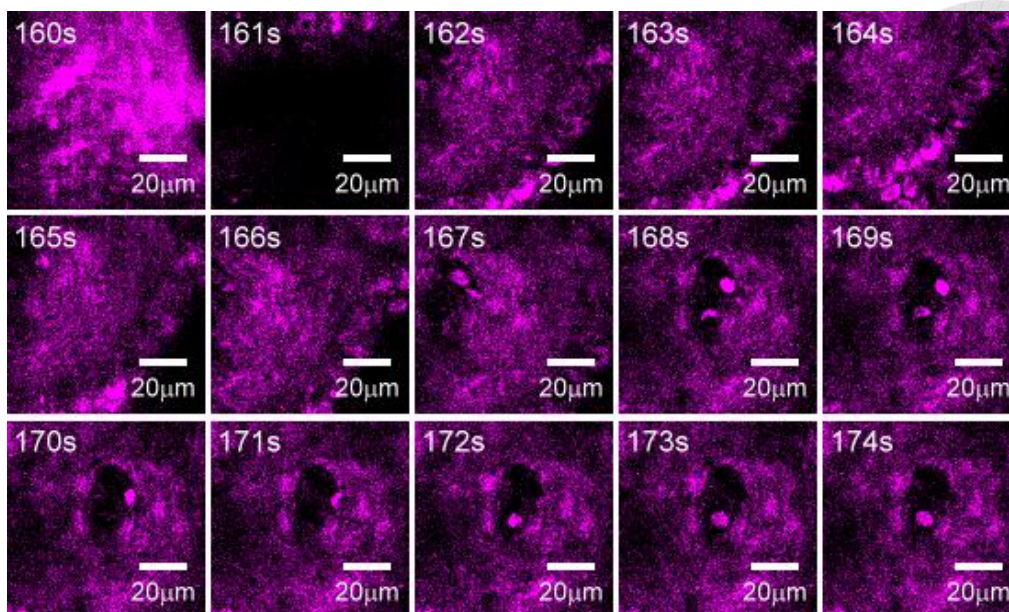
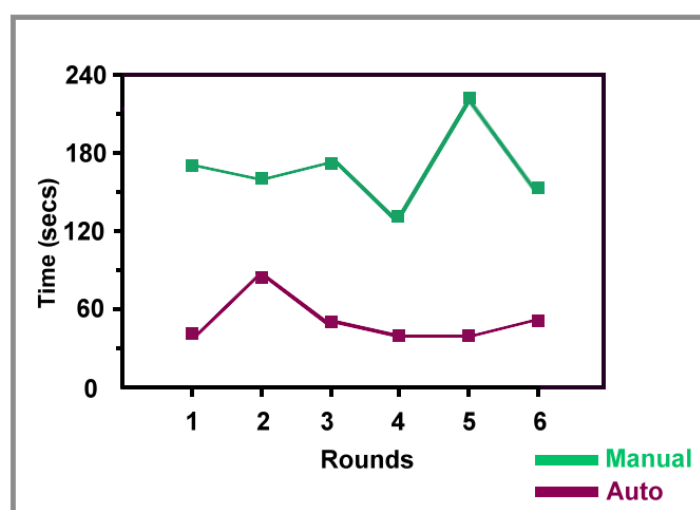


圖 4.19 人工搜尋血球之過程，第 160 秒至第 174 秒

4.4 搜尋時間之比較

我們對兩位受試者分別進行三次電腦搜尋及三次人工搜尋，並記錄找到微血管所花費的時間。表 4.1，橫軸為實驗的回合數，縱軸為尋找時間。綠色曲線為手動尋找微血管所花費的時間，平均為 165 秒，紅色曲線為電腦演算法搜尋的時間，平均花費 52 秒。

表 4.1 時間比較





由於第二次實驗(Round=2)的物鏡初始高度設置較低以致物鏡與蓋玻片距離較遠，故尋找表皮的時間較長。從實驗結果可以知道，電腦自動化搜尋較人工搜尋有效率且精準，能對大區域範圍進行快速掃描，一次將多個微血管可能通過的區域做定位，操作人員若想觀測其他觀測點，只需按下按鈕即可換到其他觀測點。相較於電腦搜尋，人工搜尋的策略主要以真皮乳突細胞為目標，找到真皮乳突細胞後，再讓雷射聚焦到深處以尋找微血管，除此之外，並沒有一個比較明確的搜尋法則。由於觀測視野較小，操作人員無法對大視野的範圍做觀測，只能靠隨機移動的方式於焦平面上做搜尋，因此常常會發生相同的區域重複搜尋以致效率變低的情況，更甚者，還可能有迷失方位以致無法判定目前位於表皮下的哪個斷層面。目前人工搜尋還是以隨機搜尋的方式進行，運氣好可以很快找到目標，但是，雷射剛好聚焦至真皮乳突細胞的機率很低，此外，不是每個真皮乳突細胞的深層都有血管通過，如果沒有找到，還是需要重新搜尋。此外，物鏡的軸向控制也是一個常見的問題，在人工搜尋過程中，操控者調整粗、細調節輪的力道以及熟練度都會直接影響搜尋的效率，由於是手動關係，載物平移台無法以等速運動，有時控制搖桿的力道太大，一些有用的資訊容易被掠過，而電腦可以很穩定地控制物鏡軸向移動，且能夠自動判斷雷射是否已經聚焦至表皮下，對操作者而言，非常地方便。

第五章 結論與未來展望



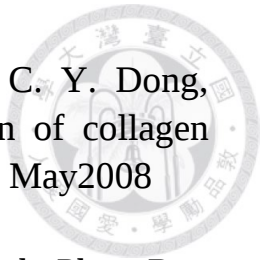
目前，我們使用倍頻式光學虛擬活體切片術對受試者皮下微血管內的血球進行觀測，由於臺大醫院核准的觀測時間是十五分鐘，故尋找皮下微血管的時間不宜太長。經實驗證明，利用自動化搜尋血球演算法能夠縮短搜尋時間以解決人工搜尋導致效率較差的問題。未來，系統商業運轉後，醫師或醫檢人員無需接受訓練即可有效率地利用電腦自動化搜尋功能找到皮下微血管內的血球，當門診量較大時，不僅可以減輕醫檢師操作儀器上的負擔，更可以避免與病患長時間近距離接觸，這對醫檢人員和病患都是有益的。

現今許多醫學斷層掃描儀器多採用自動掃描的方式對人體進行檢測，再由電腦將擷取到的影像重組以產生完整的醫學影像。電腦自動化不僅精準且有效率，未來，我們希望利用倍頻式光學虛擬活體切片術搭配電腦演算法對微血管內的血球進行即時分選和流速分析，此外，研究團隊亦可利用自動化演算法的概念，針對皮下組織發展一套演算法，以即時、自動化的方式輔助醫師對病患的皮下組織(黑色素、真皮乳突細胞以及膠原蛋白等)做分析，透過非侵入式的即時影像觀測，讓醫師在最短的時間內掌握相關資訊以做為診斷依據，病患亦可第一時間獲知身體狀況進而省去來回門診的時間，不但能節省醫療資源，更能提升醫療品質。

參考文獻

- 
- [1] Drake, Ellen Tan(1996). Restless Genius: Robert Hooke and His Earthly Thoughts. Oxford University Press. ISBN978-0-19-506695-1
- [2] Frank N. Egerton (2006). "A History of the Ecological Sciences, Part 19: Leeuwenhoek's Microscopic Natural History". Bulletin of the Ecological Society of America 87: 47
- [3] Koch R. (1884) Mitt Kaiser Gesundh 2, 1-88; Koch R. (1893) J. Hyg. Inf. 14, 319-333
- [4] Herman, G. T., Fundamentals of computerized tomography: Image reconstruction from projection, 2nd edition, Springer, 2009
- [5] Kyle Alan Bernheim , "Functional And Structural Magnetic Resonance Imaging Humans And Macaques,"Ph.D Thesis California Institute Of Technology, 2004
- [6] J. G. Fujimoto,C. Pitris , S. A. Boppart , M. E. Brezinski , “Optical Coherence Tomography: An Emerging Technology for Biomedical Imaging and Optical Biopsy., ” Neoplasia 2(1):1-17, 2000
- [7] A. F. Fercher, K. Mengedocht, and W. Werner, “Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light,” Opt. Lett.13, 186-188 ,1988
- [8] P. Davidovits and M. D. Egger, “Scanning Laser Microscope,” Nature London 223, 831,1969
- [9] Pawley JB, Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3rd ed. 2006, New York: Springer Science + Business Media LLC.
- [10] M. Born and E. Wolf, Principles of Optics . Pergamon Press, Oxford,1980
- [11] M. Born, E.Wolf, Principles of Optics,Cambridge University Press , England,1999

- 
- [12] E.H.K. Stelzer, Practical Limits to Resolution in Fluorescence Light Microscopy, in R. Yuste, E. Lanni, and A. Konnerth, Imaging Neurons: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, America, 12.1-12.9, 2000
- [13] J. Murray, Confocal Microscopy, Deconvolution, and Structured Illumination Methods, in R.D. Goldman and D.L. Spector, Live Cell Imaging: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, America, pp.239-280, 2005
- [14] C.J.R. Sheppard, M. Gu, Optics 86, 104, 1990
- [15] M.R. Tsai, S.Y. Chen, D.B. Hsieh, P.J. Lou, and C.K. Sun, "In vivo optical virtual biopsy of human oral mucosa with harmonic generation microscopy," Biomed. Opt. Express 2(8), 2317–2328, 2011
- [16] J.G. Fujimoto, M. E. Brezinski, G. J. Tearney, S. A. Boppart, B. Bouma, M. R. Hee, J. F. Southern, and E. A. Swanson, "Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography," Nat. Med. 1(9), 970–972, 1995
- [17] S.Y. Chen, S.U. Chen, H.-Y. Wu, W.J. Lee, Y.H. Liao, and C.K. Sun, "In vivo virtual biopsy of human skin by using noninvasive higher harmonic generation microscopy," IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. 16(3), 478–492, 2010
- [18] S.Y. Chen, H.Y. Wu, and C.-K. Sun, "In vivo harmonic generation biopsy of human skin," J. Biomed. Opt. 14(6), 060505, 2009
- [19] S.H. Chia, C.H. Yu, C.H. Lin, N.C. Cheng, T.M. Liu, M.C. Chan, I.H. Chen and C.K. Sun, "Miniaturized video-rate epi-third-harmonic-generation fiber-microscope," Opt. Express 18(16), 17382–17391, 2010

- 
- [20] V. Hovhannisyan, W. Lo, C. Hu, S. J. Chen, and C. Y. Dong, “Dynamics of femtosecond laser photo-modification of collagen fibers,” *Optics Express*, Vol.16,No.11, pp.7958-7968, May2008
- [21] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, and G. Weinreich, *Phys. Rev. Letters* 7, 118 ,1961
- [22] R.Boyd,Nonlinear Optics. Academic Press,third ed.,2003
- [23] Ho-Che Kuo,“Monitoring Thermally Induced Alteration of Collagen by SHG”,National Sun Yat-Sen University ,2005
- [24] Chi-Kuang Sun “Higher harmonic generation microscopy” *Adv Biochem English/Biotechnology*;95:17-56 ,2005
- [25] M.A.Van Dilla, T.T.Truiullo,P.F.Mullaney,and J.R.Coultex.,“Cell Microfluorometry: A Method for Rapid Fluorescence Measurement, ” *Science*,Vol.163,No.3872,pp.1213-1214,1969
- [26] R. LIMA, S. WADA, M. TAKEDA, K. TSUBOTA, T. YAMAGUCHI., “In vitroconfocal micro-PIV measurements of blood flow in a square micro channel: The effect of the haematocrit on instantaneous velocity profiles”*J.Biomech.*,Vol.40,No.12,pp.2752-2757, 2007
- [27] Carlson BM. Integumentary, skeletal, and muscular systems. In: *Human Embryology and Developmental Biology*. St. Louis, Mo: Mosby; 1994:153-81.
- [28] Moore KL, Persuad TVN. The integumentary system. In: *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects*. 5th ed. Philadelphia, Pa: Saunders; 1998:481-96.
- [29] Foley, J.D. and Van Dam, A., *Fundamentals of Interactive Computer Graphics*, Reading, Mass., Addison-Wesley Publishing Company, 1982, second edition,1990

- 
- [30] Azriel Rosenfeld, Picture Processing by Computer, New York: Academic Press, 1969
- [31] T. Huang, G. Yang, and G. Tang, "A fast two-dimensional median filtering algorithm", IEEE Trans. Acoust., Speech, Signal Processing, vol. 27, no. 1, pp. 13–18, 1979
- [32] Pearson, K. (1895). "Contributions to the Mathematical Theory of Evolution. II. Skew Variation in Homogeneous Material". Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 186: 343–414
- [33] Rafael C. González, Richard Eugene Woods (2007). Digital Image Processing. Prentice Hall. p.85