

國立臺灣大學電機資訊學院生醫電子與資訊學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biomedical Electronics and Bioinformatics

College of Electrical Engineering and Computer Science

National Taiwan University

Master Thesis

高通量免標定光學繞射斷層掃描術於紅血球三維型態之  
分析

Label-free Characterization of Red Blood Cell 3D  
Morphology with High-Throughput Optical Diffraction  
Tomography

張祐祥

Yu-Hsiang Chang

指導教授：宋孔彬 博士

Advisor: Kung-Bin Sung, Ph.D.

中華民國 110 年 9 月

September, 2021

國立臺灣大學碩士學位論文口試委員會審  
定書



高通量免標定光學繞射斷層掃描術於紅血球三維型  
態之分析

Label-free Characterization of Red Blood Cell 3D  
Morphology with High-Throughput Optical Diffraction  
Tomography

本論文係張祐祥君(R08945011)在國立臺灣大學生醫電子與  
資訊學研究所完成之碩士學位論文，於民國 110 年 9 月 10 日承下  
列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

朱孔祥 (指導教授)

黃念祖 駱遠

所長：

林致廷

## 致謝



感謝我的指導老師，宋孔彬老師。感謝您開明的讓我決定研究方向，同時又能多方面給予協助，每次開會的建議也讓我學習到從不同面向思考問題的重要性，同時促使我學習更多技術與知識。感謝黃念祖老師及駱遠老師在口試時給的建議及肯定。

感謝柏廷、仰賢兩位遙不可及的目標，因為有你們的協助這份研究才得以步入軌道。感謝淮清布置活絡了狹小的實驗室，及扛下了後續的計畫，祝你研究順利。感謝子佳在3D列印的幫助，並讓我見證了強者的邏輯是多麼縝密且清晰。感謝文偉、胤甫在光學儀器的協助以及提升實驗室優良氣氛的努力。感謝韋翰提供寶貴的血液樣本豐富我的實驗內容。感謝逸翔在我低潮時成為心靈上的支助以及建立認識美好事物的途徑。感謝昕原在影像算法上的建議以及拯救我的腳踏車。感謝瑩儒在訊號處裡作業的幫助。感謝撐起90公斤槓鈴及實驗室的國聖成為我重訓的好夥伴。感謝千容、育汶平衡了實驗室異常的性別比例，以及提升實驗室多數人的運動頻率。感謝所有在碩士生涯中給予我協助的夥伴。

最後感謝父母的完全支持，讓我在沒有金錢壓力的環境下完成學業。

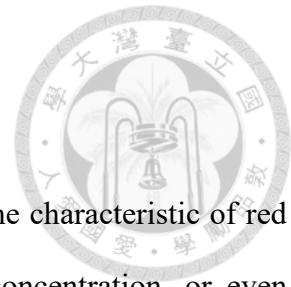
## 中文摘要

作為人體氣體與調控循環系統的核心，紅血球的三維圓盤形狀、兩側表面凹陷程度、血紅素狀態甚至細胞膜表面的黏彈性，都與其物質攜帶交換的能力息息相關。因此可以推論出當其中出現變化勢必會伴隨著相關疾病的存，在像是貧血、糖尿病等患者都有異常血球的出現。臨牀上針對紅血球的型態檢驗方式主要是血液抹片，但此方式在判定上較為緩慢且主觀，而在黏彈性等資訊上則需利用滲透壓梯度細胞計數儀等專業器材獲得。因此需多相關研究都提出不同的三維血球分析方式，包含在更高通量下獲取資訊，或是以旋轉樣本或旋轉光源方式拍攝紅血球三維資訊。本文整合並提升這些方式中的技術，達到高通量又能定量分析的三維紅血球量測技術。

定量相位顯微術作為一種免標記技術，可以動態的將樣本厚度及內部物質折射率資訊定量的記錄在干涉影像中，而這樣的技術去除了人為觀察，並可將其中所有參數以數值方式定量記錄。在先前文獻中即提出利用此技術結合微流道建立出高通量斷層繞射顯微系統以提升拍攝通量，並實現三維影像的擷取。建立在此技術之上，本研究將其最佳化並建立高通量斷層繞射顯微系統。在拍攝通量上可達到每分鐘 43 顆紅血球的拍攝速度，而為使處理速度同樣提升，利用深度學習模型進行影像分割並以圖形處理器進行後續運算上的加速。在三維重建流程中，本實驗提升澤爾尼克多項式擬合角度的正確性，並修正三維重建中資訊缺失的問題。文中將此技術應用在加入不同濃度戊二醛，來模擬血球型態異常之紅血球與一般情況之對比分析。在結果上平均物質質量、光學體積、細胞膜表面黏彈性、大小、體積、血球表面凹陷程度、球型率等變化，皆符合假設與文獻結果且都具有顯著差異。由此可以預期此技術在紅血球相關疾病或是觀察藥物影響的應用上，能以定量且快速的優勢輔助臨床檢驗。

關鍵字：紅血球、高通量、免標記、斷層繞射顯微鏡、澤爾尼克多項式擬合、三維重建

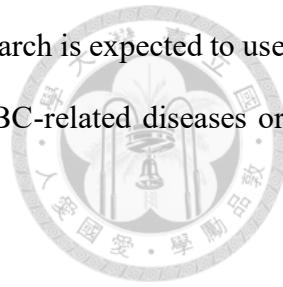
## Abstract



As the central cell of the gas and circulatory system regulation, the characteristic of red blood cells includes disk shape, biconcave geometry, hemoglobin concentration, or even membrane fluctuation all related to the ability to carry and exchange. Therefore, we can speculate that the variation of that property will accompany the disease. For instance, in anemia, diabetes patients have been found to have abnormal RBCs. In clinical, the analysis of RBCs 3D features mainly uses blood smear, but the process is slow and subjective and the viscoelasticity of red blood cells requires professional equipment to measure, such as osmotic gradient ektacytometry. Hence, many studies have proposed different methods to analyze RBC, including higher throughput or captured 3D information by rotating incident light or sample. In this article, we have incorporated some of these techniques to achieve higher throughput while quantitatively measuring RBC.

Digital holographic microscopy is a label-free method that can dynamically and quantitatively encode sample thickness and inner substance into an interferogram. This method records all parameters in numerical values to eliminate subjective judgments. In this study, we combined a digital holographic microscope with a microfluidic device to construct optical diffraction tomography to improve capture throughput. The results show that with this setting, 43 RBCs can be captured per minute. As throughput increases, this article uses deep learning and GPU to accelerate processing. For 3D RBC reconstruction, this research optimizes the Zernike polynomial angle estimation algorithm and minimizes the problems caused by the missing angle problem. Finally, this setting was applied to observe red blood cells induced by different amounts of glutaraldehyde to simulate the comparison between abnormal red blood cells and normal red blood cells. The result shows that mean mass density, optical volume, membrane fluctuation, size, volume, sphericity, and concavity are all in agreement with the

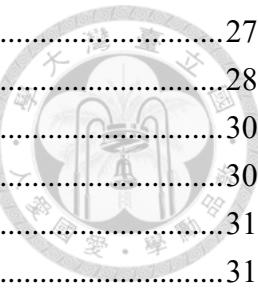
hypothesis and previous research significantly. From the result, this research is expected to use quantitative and rapid advantages to assist clinical testing on other RBC-related diseases or measure the impact of drugs.



Keywords: Red blood cell, high throughput, label-free, optical diffraction tomography, Zernike polynomial fitting, 3D reconstruction

## 目錄

國立臺灣大學碩士學位論文口試委員會審定書.....	i
致謝.....	ii
中文摘要.....	iii
Abstract.....	iv
目錄.....	vi
圖目錄.....	ix
表目錄.....	xii
第一章：導論.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 研究動機及目標.....	2
第二章：文獻回顧.....	5
2.1 紅血球與其疾病成因.....	5
2.2 紅血球關聯疾病.....	6
2.2.1 心血管疾病與紅血球關聯性.....	6
2.2.2 貧血.....	6
2.2.3 糖尿病與紅血球關聯.....	8
2.3 血球分析技術.....	8
2.3.1 全血形態分析技術.....	8
2.3.2 單顆血球形態分析技術.....	10
2.3.3 臨床紅血球檢測方式與相關參數.....	12
2.4 定量相位顯微術.....	13
2.4.1 全像素顯微鏡(digital holographic microscopy, DMH).....	13
2.4.2 原理及回顧.....	14
2.4.3 光學繞射斷層顯微鏡.....	16
2.5 以定量相位顯微術分析紅血球.....	18
第三章：方法與結果.....	23
3.1 光學架構與驗證.....	23
3.1.1 光學架構.....	23
3.1.2 系統放大率.....	25
3.1.3 視野大小.....	26
3.1.4 系統側向解析度.....	26



3.1.5 干涉條紋對比度.....	27
3.1.6 時間與空間相位雜訊.....	28
3.2 微流道裝置.....	30
3.2.1 流體內的血球運動.....	30
3.2.2 流體動力聚焦(hydrodynamic focusing) .....	31
3.2.3 微流道晶片製備.....	31
3.2.4 流體注射幫補.....	33
3.2.5 微流道裝置設置流程.....	34
3.3 相位回復與驗證.....	34
3.3.1 相位回復.....	34
3.3.1.1 相位回復方法.....	34
3.3.1.2 相位回復結果.....	37
3.3.2 相位值驗證.....	38
3.3.2.1 光學架構驗證樣本製備.....	38
3.3.2.2 相位值驗證.....	39
3.3.2.3 微流道內樣本相位值驗證.....	39
3.3.3 相位值雜訊探討.....	40
3.3.3.1 消除光斑.....	40
3.3.3.2 相機比較.....	41
3.4 相位影像分割與追蹤.....	43
3.5 數值方法重新對焦.....	46
3.5.1 重新對焦原理與方法.....	46
3.5.2 重新對焦結果.....	48
3.6 轉動與滾動角度估算.....	48
3.6.1 角度估算方法.....	48
3.6.1.1 Z 軸轉動角度校正 .....	49
3.6.1.2 Zernike fitting .....	50
3.6.1.3 角度對應.....	52
3.6.2 角度估算結果.....	53
3.6.2.1 轉動角度.....	53
3.6.2.2 滾動角度.....	54
3.7 三維重建與角度缺失問題修正.....	56
3.7.1 原理與方法.....	56
3.7.1.1 傅立葉繞射理論.....	56
3.7.1.2 角度缺失問題(missing cone problem).....	58
3.7.2 計算結果.....	60
3.7.2.1 三維重建結果.....	60
3.7.2.2 Missing cone problem 平滑結果.....	61



3.8 影像二值化與形態處理.....	62
3.9 誤差分析.....	63
3.9.1 角度估算誤差.....	63
3.9.2 三維重建誤差.....	67
第四章：應用 .....	69
4.1 驗證及實驗樣本製備.....	69
4.1.1 正常與疾病血球樣本製備.....	69
4.1.2 戊二醛處裡樣本製備.....	69
4.2 參數分析.....	70
4.3 紅血球結果分析.....	74
4.3.1 戊二醛作用結果比較.....	74
4.3.2 疾病血球比較.....	77
第五章：結論與未來展望.....	79
5.1 結論與討論.....	79
5.2 未來展望.....	81
參考文獻.....	83

## 圖目錄

圖 1 異常紅血球可能對應之型態變化.....	6
圖 2 不同貧血症狀對應血球形態變化式意圖 .....	8
圖 3 (A)樣本流經光源時示意圖。(B)正常紅血球細胞前向與側向散射數值與數量。(C)加入戊二醛後紅血球細胞分析結果.....	9
圖 4 滲透壓梯度細胞計數儀量測時的記錄曲線與對應參數 .....	10
圖 5 多種細胞分析方法。(A)毛細管拉伸血球表面。(B)以定量相位顯微術拍攝結果。(C)以原子力顯微鏡拍攝。(D)以超聲波進行聲速分析。(E)以光鉗拉伸。(F)以微流道分析型態。.....	11
圖 6 不同架構下 ACTs 與 CCTs 頻率分布情形。(A) OFF-AXIS 架構。(B) SLIGHTLY-OFF-AXIS 架構。(C) ON-AXIS 架構。 .....	14
圖 7 POPESCU 等人所提出之 DPM 架構。 .....	15
圖 8 調變光柵位置以分離樣本與參考光資訊。(A)架構示意圖。(B)(C)在不同 Z 下的干涉影像。(D)(E)B, C 所對應頻域，可見在改變 Z 時頻域不會改變。 .....	16
圖 9 FIELD 團隊所提出的結合掃描鏡之三微折射率顯微鏡架構.....	17
圖 10 本實驗室於先前研究中所建立之三維折射率顯微鏡架。[4] .....	18
圖 11 (A)正常血球三維重建結果。(B)糖尿病患者血球三維重建結果。(C)CDOT 拍攝二維及三維影像流程。 .....	19
圖 12 在小鼠心臟驟停前後紅血球三維形態表現 .....	20
圖 13 利用微流道拍攝捐贈血液紅血球在不同存放時間下變化。(A)微流道設計。(B)光架構設計。(C)血球存放時間(橫軸)與受機械力擠壓時之光學體積分布(縱軸) .....	21
圖 14 (A)定量相位顯微術結合微流道架構。(B)以此架構所重建之不同型態血球。 .....	22
圖 15 系統架構圖。Po1、Po2：偏振片(POLARIZER); QP：四分之一波片(QUARTER WAVEPLATE); OL1、OL2：物鏡(OBJECTIVE LENS); M1、M2：反光鏡(MIRROR); L1~L5：透鏡(LENS).....	24
圖 16 (A)以顯微系統拍攝 RESOLUTION TARGET 影像。 (B)圖(A)紅線區間作圖結果 .....	26
圖 17 左圖為白光拍攝 RESOLUTION TARGET 影像，右圖為紅色虛線強度分度情形，並當作此系統之邊緣擴散函數.....	27
圖 18 (A)干涉影像條文對比情形與強度分佈。(B)所有縱軸條文對比，左圖為沿橫向計算每一像素縱軸對比情形，右圖為 3072 條縱軸對比分布結果。 .....	28
圖 19 左圖為無樣本的視野下相位分佈情形，右圖各點為 300 張影像中整體相位值標準差分佈.....	29
圖 20 左圖為視野中各像素再 300 張的標準差分佈，右圖為直方圖表示結果 .....	29
圖 21 血管中血液剪切力與流速分佈示意圖。 .....	30
圖 22 (A)實驗中流道流速分佈示意圖，以及軸向分佈。(B)縱向與(C)側向之流體動力聚焦示意圖其中藍線為鞘流液流，紅線為樣本流。 .....	31
圖 23 (A) 微流道設計圖。(B) 流體動力聚焦實際結果，右圖為縱向聚焦結果 .....	33



圖 24 自製針筒幫浦架構.....	34
圖 25 FAST TWO DIMENSIONAL PHASE-UNWRAPPING 演算法流程圖 .....	36
圖 26 相位校正示意圖 .....	37
圖 27 相位回復流程與各階段影像結果 .....	38
圖 28 光學架構驗證樣本製備縱向及側向示意圖 .....	38
圖 29 以已知折射率塑膠小球驗證相位值結果，左圖為相位分佈，右圖為白色虛線相位值與理論相位值比較結果.....	39
圖 30 已知折射率樣本於微流道中相位分佈情形.....	40
圖 31 (A)消除光斑裝置示意圖。(B)去除光斑前後相位影樣與背景比較。(C)去除光斑前後要本相位值比較。.....	41
圖 32 相機響應參數比較 .....	42
圖 33 比較相機對於相同樣本時擷取影像後雜訊情形 .....	43
圖 34 ICNET 模型架構 .....	44
圖 35 利用 ICNET 分割影像中細胞區域的結果 .....	45
圖 36 細胞追蹤流程圖 .....	46
圖 37 左圖為數值對焦前後影像結果，右圖為連續區間 TAMURA 級數分佈情形.....	48
圖 38 血球投影影像在橢圓擬合後的角度修正示意圖 .....	50
圖 39 澤爾尼克多項式描述情形，紅線為理想平面波前每條代表再細分的波前投影方向，藍色為細分的波前經像差改變後的投影位置.....	51
圖 40 紅血球水平與垂直狀態 .....	51
圖 41 不同項多項式之個別像差分佈情形，由左至右為第四、第五、第十二、第十三項.....	52
圖 42 滾動理想雙凹圓盤並以多項式第四項擬合結果標準化後與 $\cos 2\theta$ 曲線之作圖結果 .....	53
圖 43 以橢圓擬合進行角度校正示意圖，左邊為原始影像，右邊為角度轉動後結果 ...	54
圖 44 (A)判定 90 度依據，紅點為區域最大值該影像標記為 90 度。(B)判定為 0 度，橘點為區域最大值該影像標記為 0 度。(C)作為判定角度的依據，並依圖(A)紅點與圖(B)橘點作為頭尾拆分出四個 90 度分佈區間。(D)由 C 所拆分結果，圖中黑點因 $C_4+C_5$ 值不在頭尾區間中視為刪除項.....	55
圖 45 左圖為上圖所對應角度結果，右圖為隨機挑選的相位影像與其所估算出的角度 .....	56
圖 46 傅立葉切片理論與傅立葉繞射理論三維分佈差異。(A)傅立葉切片理論。(B)傅立葉繞射理論[65].....	57
圖 47 (A)MISSING CONE PROBLEM 產生示意圖。(B)理想三維空間頻率分佈[66]。(C)實際三維重建空間頻率分佈情形，其中 U, V, W 為此三維空間座標軸[66]。 .....	59
圖 48 (A)重建影像三維頻域不同切面的分佈。(B)(C)重建出的三維影像左邊為延一軸項的不同切面，右邊為三維型態。 .....	61
圖 49 去除角度缺失算法前後的重建切面結果，上圖為直接進行反傅立葉計算結果，	

下圖為修正後結果。.....	62
圖 50 相位投影影像與角度對應結果。上方序列為利用文獻方法之 C <sub>4</sub> 擬合結果，下方序列為利用本實驗方法所得之結果。.....	64
圖 51 誤差計算時所用(A)三維模型及(B)投影影像扭曲示意圖.....	66
圖 52 15 組模擬影像所有投影的角度估算誤差統計結果.....	67
圖 53 (A)上圖為 500 張已知角度投影影像重建結果，下圖為 200 張隨機旋轉影像重建結果 (B)實際拍攝之二維相位影像與其重建結果之相同角度投影比較.....	68
圖 54 (A)不同濃度之戊二醛及其對應被稀釋血液之裂解比例。(B)不同濃度之戊二醛及其對應延展指數，此參數對應血球形變能力。.....	70
圖 55 (A)計算厚度比值前使項位影像均勻分布的流程。(B)紅血球大小、厚度所表示區域。.....	71
圖 56 對相位影像(黑線區域)進行弧度擬合.....	72
圖 57 0.05%、0.01%戊二醛誘導血球與正常血球參數比較。(A)平均質量密度(B)光學體積(C)細胞膜表面波動性(D)平均直徑(E)厚度比值(F)體積(G)表面積(H)球形度(I)紅血球表面弧度.....	75
圖 58 糖尿病血球與一般血球內部物質分布比較.....	78
圖 59 糖尿病血球與一般血球內部物質二維及三維型態比較.....	78
圖 60 糖尿病血球與一般血球內部物質去除體積差異之型態參數比較.....	79

## 表目錄

表 1 所用次項分佈公式 .....	52
表 2 不同方法模擬血球角度之誤差 .....	67
表 3 不同角度估算方式在重建結果上的誤差比較 .....	68





# 第一章：導論

## 1.1 研究背景

紅血球是體內重要的物質交換細胞，尤其在氧氣運輸上扮演者至關重要的角色。在人體內紅血球利用其高度彈性的細胞膜，通過體內不同管徑的血管，並調控著不同區域的血液流速。而在過程中除了與細胞交換氧氣離子等物質之外，也同時調控著血管內壁的彈性與性質[1]。由此可知當紅血球出現異常，許多與之相關的疾病將會出現，同理，諸多影響體內循環的疾病亦會調變的血球的行為與特性。

貧血就與紅血球的特性有著密切的關聯，可能由於骨髓造血功能異常、腸胃道吸收特定物質功能缺失，或是體內特定維生素不足等先天或後天的影響，導致紅血球體型異常、內部血紅素不足、分化不完全、形狀怪異等情形發生，而這些結果都會因為缺乏健康的紅血球能夠攜帶氧氣至身體各個器官而造成貧血症狀的產生。因此在臨床上為了能夠定義這些疾病的差異會將檢查結果與正常血球所對應的檢驗數值進行比較。

糖尿病主要發生原因為體內胰島素生產機制異常，因此無法在血糖較高的情況下將多餘糖份轉化的肝醣儲存，使得高糖濃度的體液在人體循環的過程中會損傷或破壞組織及器官，而此過程亦會影響到在體內數量龐大的紅血球。在正常的血球中血紅蛋白組成分為 HbA、HbA<sub>2</sub>、HbF，而 HbA 又可以分為 HbA<sub>1A</sub>、HbA<sub>1B</sub>、HbA<sub>1C</sub> 三種子型，在正常情況下不需額外催化 HbA 的氨基機會與醣類進行醣基化反應產生鍵結，此過程也稱為梅納反應，然而此反應在糖尿病患者中更加顯著，在臨牀上發現糖尿病患者的 HbA<sub>1C</sub> 濃度會是正常人的兩倍，此結果是因為 HbA<sub>1C</sub> 是 HbA 在β鏈上有己醣修飾的型態。此外 HbA<sub>1C</sub> 在產生後直到紅血球衰老凋亡時才會消失，並且在紅血球 3 個月的平均壽命中會不斷累積，因此相較於直接計量血糖濃度，量測 HbA<sub>1C</sub> 可以取得一較為穩定的血糖變化。在此結果下 HbA<sub>1C</sub> 被視為監控糖尿病的重要因素之一[2]。

血栓(Thrombosis)作為主要心血管疾病的觸發要素，主要是由於動、靜脈系統中有血塊生成。這類的血管疾病主要起因於內皮細胞損傷，因此釋出化學信號誘使炎症細胞活性增加，導致血管平滑細胞增生。而這些活化之內皮細胞便會促使血小板及凝血纖維

蛋白分解(coagulation-fibrinolysis)，同時這些活化因子也會產生過量活性氧物質(Reactive oxygen species, ROS)，對血管內皮細胞進一步傷害，在如此循環下血塊便逐漸生成[3]。然而除血小板外，紅血球作為血液中主要細胞，與血栓的產生也有著重要的關聯。正常情況下紅血球細胞會利用其雙凹圓盤狀之特徵，攜帶氧氣等物質並利用對其中物質如三磷酸腺苷(ATP)與一氧化氮等的調控，來維持心血管的穩定性。然而當其出現異常並導致物質釋放量改變下，便會導致高血壓、動脈粥狀硬化等病徵產生。

在觀測紅血球這類體內細胞，最普遍之方法便是利用光學顯微鏡進行分析，在基礎明視野顯微架構下，由 Zernike 所提出的相位差顯微鏡(Phase contrast microscope)建立了利用相位變化達到不須額外標定物質(label-free)便能清楚觀測細胞樣本的先驅。而隨後定量相位顯微術(Quantitative phase microscopy, QPM)，如相位繞射顯微鏡(Diffraction Phase Microscopy)、數位全像術顯微鏡(Digital holographic microscopy, DHM)的出現，更可利用光源經過樣本內不同物質所造成的相位延遲，達到定量分析的特性。而這類二維相位影像系統也已經在先前文獻中實現對於紅血球細胞的造影，包含觀察其二維細胞結構，及細胞膜動態變化並分析其內部反應機制等。而本實驗室亦建立三維折射率顯微架構[4]對地中海貧血病患之紅血球進行分析。而為更精確區分其與正常細胞之差異，各種計算參數與分析方式也被提出，向是利用相位值推算紅血球容積、平均血紅素等，或是利用其生物透鏡(Bio-lens)特性以 Zernike 多項式分析型態學特徵等 [5-7]。

## 1.2 研究動機及目標

1.1 小節中提到部分與紅血球直接或間接相關的疾病，而這些相關疾病皆在人類主要死因中列居前位。儘管在臨床上有許多相應的診斷方式，像是血液檢測中的流式細胞儀、血栓診斷上的血管成像技術等，然而相關檢驗上因為需要大型儀器或是專業操作人員，加上發病前期不易感知所以常常被忽視，且可能由於病患自身的誤判而加劇治療的難度。

在臨牀上常使用全血分析儀或是血液抹片等方式，來判斷血球內部物質組成大小等，其中較為直觀的血球型態則大多需要人工判定，使得在判斷依據上較難定量。雖

然常規的診斷方法可以得到諸多資訊，但是在許多病症上類似的變異可能都會出現，像是多種型態的紅血球病變就導致了貧血症狀十分複雜，而相似的變異讓部分病徵甚至難以診斷，例如地中海貧血與缺鐵性貧血皆是紅血球體型過小，然而兩種的治療方式不盡相同，若誤判則可能加劇病徵。另外在監控糖尿病患者的血糖數值的常規方法中，儘管商用血糖儀十分普及且可由病患自行操作，然而其結果容易受活動及時間影響需要時常採血監控。更加穩定的方法如上述可以利用分析 HbA<sub>1c</sub> 糖化血色素取得較為有效且定量的數值，但是分離蛋白質的過程，除了需要操作訓練外更要有完善的環境及分析設備。

由此可見建立快速簡易的篩檢方式便十分重要。除去上述所提及需特殊設備及特定醫療人員主觀判定的診斷方式。本研究希望能透過操作上較為容易且定量的系統來對於紅血球進行判讀分析，期望未來能應用於相關疾病上的分析與診斷。在此動機下，本研究希望能透過操作上較為容易且定量的系統，對於相關症狀進行診斷。文獻中提到，疾病與血球外觀型態像是體積大小、球形率、表面積等，或是內部物質組成的改變皆有些許相關。此外正常情況與病變血球的形變能力也會有所不同，紅血球形變能力會直接影響血液整體黏度(viscosity)，在人體中利用三維型態的變化，紅血球可以在動、靜脈不同剪率(shear rate)的情況下調整血流黏度。然而異常紅血球無法依照剪率變化隨之形變，導致無法適當調控血液流速，進而引起相關疾病[8]。又因疾病皆會對各種因素有著不同差異的影響，因此系統有必要能同時描述多種細胞型態的參數以減少操作上的差異性。

數位全像術顯微鏡架構的出現，使我們可以從細胞的面向進行分析患者血球與正常血球差異，並能針對此特徵進行深入分析與判定以建立不同的診斷方式。除不需標定及獲取定量資訊之特性外，亦可透過數值計算，將拍攝到的影像進行重新對焦(Numerical refocus)、三維重建等，並可依此回推出平均紅血球容積(Mean Corpuscular Volume, MCV)、平均紅血球血紅素(Mean Corpuscular Hemoglobin, MCH)等紅血球臨床指數。此外紅血球內部可視為均質，且形狀呈圓盤對稱，因此可利用其生物透鏡的特性，以 Zernike 多項式等計算像差之公式推估實驗過程中的型態學參數。但傳統顯微鏡拍攝方式需要預先製作樣本進行替換，且拍攝期間還須不斷切換視野來增加樣本數量，進而導致拍攝速度

下降。因此部分文獻曾提出結合微流道的特性 [5, 7, 9, 10]，除了可以調控血球在流道內部的運動模式，更可達到高通量檢測。



結合上述資訊與技術本研究期望能達到以下目標：

- 光學系統架設及建立影像重建演算法

架設高通量斷層繞射顯微系統，並利用均勻折射率之樣本驗證其正確性，使該架構得以正確的拍攝樣本干涉影像，同時建立相位回復、數值對焦之演算法，還原出包含樣本相位與震幅資訊的複數場(complex field)。此外亦會結合微流道流體特性及高通量的優點，將紅血球樣本通入流道後連續拍攝並重建出三維影像。使用實驗室先前提出之三維折射率顯微術(Three-dimensional refractive-index microscope)及其相應的三維傅立葉繞射理論(Fourier Diffraction Theorem)，建立本實驗之紅血球三維折射率重建流程與技術。最後將結果相互比對以計算血球形態學變化之參數。

- 比較不同情況之紅血球與正常狀況之差異探討系統應用

利用上述架構與演算法，對正常樣本與藥物引導或是相關血液疾病樣本進行拍攝比較，包含物質組成如光學體積、平均質量密度，型態相位分布如體積、表面積、球形率、血球弧度等，以及細胞膜表面波動性等可以描述細胞黏彈性的相關參數。並參照先前文獻結果，以確立此技術在紅血球分析上的有效性。



## 第二章：文獻回顧

### 2.1 紅血球與其疾病成因

紅血球作為人體血液中數量最多的血球細胞，是氧氣傳遞的最重要媒介。正常的紅血球為一個雙凹圓盤狀，且內部填滿血紅素之均質細胞，而支撑其雙凹圓盤特性之結構則是紅血球之細胞膜。細胞膜由兩層結構建立以包裹細胞，最外層是一可流動且其中夾有蛋白通道或受體的脂質層，而下方則是細胞骨架，這層骨架的節點會以一通道蛋白，又稱血影蛋白(spectrin)連接上層細胞膜。在紅血球處於穩定之雙凹圓盤狀時，血影蛋白會稍微收縮並將其收縮力施加於上層脂質層中以維持形狀恆定。

除氧氣運送外紅血球亦會通過其自身氧化還原系統，調控 ATP 與一氧化氮之釋放來調節心血管功能，許多研究也表明一氧化氮的生成，對於血球整體黏彈性的維持有一定程度的影響，由此可知當血球調控機制不再健全時便會導致相關心血管疾病的產生。其中可能出現之表現為細胞活性氧物質上升、內部蛋白與酶數量及活性改變、血球與血管壁附著情形增加等，而這些內部物質穩定性的改變，便會導致血影蛋白糖基化(glycosylation)，最終導致細胞骨架功能異常。而骨架功能異常最明顯表現便是，細胞整體硬度上升、半徑縮小、雙凹圓盤狀不再清晰、以及整體黏彈性降低等特徵。當紅血球出現這些型態表現後也將導致其平時灌流過之組織包含血管內壁等區域，氧化壓力上升且攜帶得氧氣量也會跟隨下降，並影響整體血液黏滯度以增加心血管區域損傷風險。[1]

因此針對上述型態的出現與疾病的對應，本研究期望能以一種方式快速簡易的判斷紅血球形態特徵與黏彈性之表現，其中根據會影像血球形變能力之因素，可以歸納出三種目標進行分析。1. 正常紅血球透過較大的表面積與體積比來完成氧氣輸送功能，因此可以根據其三維型態，包含體積與表面積等進行分析。2. 血球內部物質及血紅素(hemoglobin)之定量分析。3. 紅血球細胞膜之黏彈性分析。[11, 12]



## 2.2 紅血球關聯疾病

### 2.2.1 心血管疾病與紅血球關聯性

諸多心血管疾病皆發現與紅血球之型態與特徵變異有所關連。在動靜脈血栓之疾病患者中皆發現，不正常之大小、形狀、黏彈性係數等皆與血栓的出現相關。像是帶有鐮刀型貧血、地中海平血等型態異常之血球患者其出現血栓之比例皆高於一般人二到四倍。血液整體黏滯性上升對於血栓形成風險也有極大影響，紅血球因其形狀、血紅素濃度、形變能力等，可以調變血液在不同管徑壓力下流速，因此是控制全血整體黏滯度最主要因素[8]。

而對於血球大小分布異常之患者，也發現與缺血性中風(ischemic stroke)、血栓、急性冠心症(Acute coronary syndrome)、心肌梗死(Acute myocardial infarction) 高血壓等心血管疾病相關聯[13]。正常血球之容積約為 80~100 fL，然而許多血球增生異常或是貧血之疾病會造成血球增生異常而出現紅血球大小不一致的異胞作用(anisocytosis)之現象。因此利用全血計數方式來量測並計算其標準差與平均之比例的紅血球寬度分布(red blood cell distribution width, RDW)，變成為判斷血球異常與疾病關聯之指標。在先前推論中，此現象產生可能是由於控制骨髓造血之促紅細胞生成素受體(erythropoietin receptor)的表達異常、慢性發炎抑致衰老萎縮血球清除異常、或是氧化壓力上升導致血球凋亡速度增加(圖 1)，使得整體大小不一致。[13, 14]

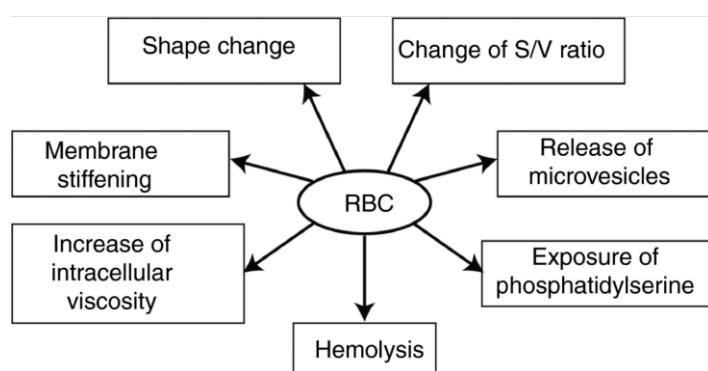


圖 1 異常紅血球可能對應之型態變化[15]

### 2.2.2 貧血

貧血作為常見的隱性遺傳疾病之一，發生原因是紅血球中血紅素含量過低，以致攜



帶氧氣量不足，其中貧血的種類多達 400 種，並主要可以分為缺血、紅血球生成量不足、紅血球有所缺陷導致。以下簡述幾種常見的貧血種類，包含海洋性貧血(thalassemia)、鐮刀型貧血(sickle cell anemia)、遺傳性球形紅細胞增多症(hereditary spherocytosis, HS)、惡性貧血(pernicious anemia)等(圖 2)。

海洋性貧血患者由於基因遺傳缺陷，使其無法產生足量的血紅蛋白，進而影響紅血球功能及運輸氧氣效率，在血液檢查上 MCV 及 MCH 會較一般細胞低，在血液抹片中以伊紅(eosin)染色會發現，中央顏色較淺區域(central pallor)大於細胞整體直徑的三分之一，且其中央可能會有一小塊顏色較深區域出現(Target cell)[16]，此外患者血球會有異胞作用且紅血球形狀差異程度(poikilocytosis)顯著[17]。

鐮刀型貧血如其名所述，患者血球會夾雜著鐮刀形狀的異常血球，而這些鐮刀狀血球凋亡速度非常快，因此會導致紅血球量不足，此外由於形態特殊在經過微血管等狹小管徑時，容易阻塞進而導致其他感染症狀或是肺栓塞血等病徵。

遺傳性球形紅細胞增多症為發生於紅血球細胞膜病變的疾病，患者血球細胞缺乏數種蛋白來維持細胞骨架與細胞膜的貼合，並會導致紅血球成球狀而非雙凹圓盤，同時這類的血球形變能力也較弱，由於細胞膜穩定性降低，使其在體內循環中細胞膜脂質組成逐漸損失，這樣的結果便會導致血液檢查中 MCV 下降及 MCHC 上升，而這些形狀異常疾病血球在經過脾臟時便會被破壞清除，導致體內血球含量不足及黃疸病徵出現[18]。

惡性貧血發生原因是因為消化道內特定蛋白質缺乏，無法吸收維生素 B12，而導致在生產紅血球的過程出現異常，而患者的紅血球數量或是血紅蛋白的含量會較正常人低但體積會較大，而這是因為患者血液中會包含尚未完全分化成紅血球的有核巨成紅血細胞(megaloblasts)，而且此類細胞並不具有紅血球的功能。

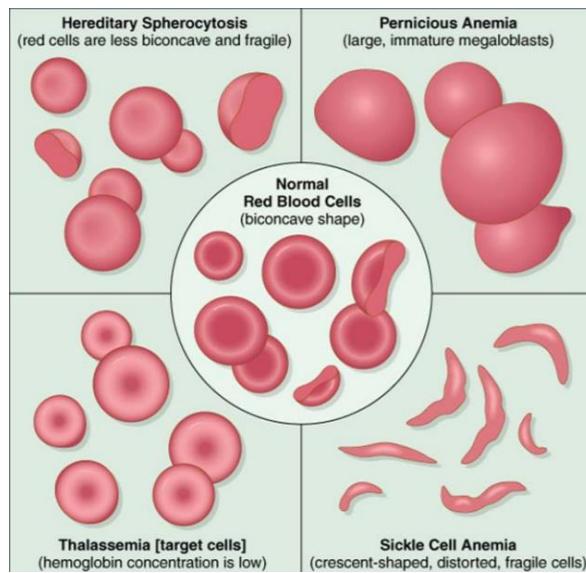


圖 2 不同貧血症狀對應血球形態變化式意圖 [19]

### 2.2.3 糖尿病與紅血球關聯

糖尿病的患者中因為胰島素無法作用，因此血液內包含大量血糖，而血液系統常須處於高葡萄糖濃度的環境下，便會變異且容易引發心血管疾病等問題。在之前研究中發現糖尿病患者的紅血球，因內部血紅素濃度較低，因此患者血球顏色會比正常紅血球來的淡，而且血球的形狀變異性極高，在患者中可能達到三分之一的血球大小皆不相同，遠大於正常情況下只有 2% 的變異量[20]。除此之外患者的紅血球幾何型態也會跟著改變，血球會被自發形成的纖維蛋白(fibrin fiber)拉長並纏繞，結果會加厚及促使纖維蛋白生成，並可能導致血栓的出現，另外患者的紅血球細胞膜也被發現出現嚴重的糖基化(glycosylated)，破壞細胞膜與骨架間的連結降低整體的堅固性，而血液中高醣濃度也會促使紅血球聚集在一起，進而演變成血塊[21]。

## 2.3 血球分析技術

### 2.3.1 全血形態分析技術

對於血液之易取得性與診斷可靠度佳，許多全血分析儀器也已經商用並被臨床採納。於此分別針對紅血球形態與黏彈性之全血分析儀器進行簡介。在細胞大小之分析上最常用為流式細胞儀，其原理為利用流體焦距(hydrodynamic focusing)確保每次通過一顆血

球，並在特定位置以雷射照射，並取得樣本在接收雷射後之折射或放光結果，以分析其參數或是螢光表現等。其中散射光可以分為兩個方向，分別為分析原先光路在經過樣本後繞射打至前方接收器之前向散射(Forward scatter, FSC)，與量測折射與反射光的側向散射(Side Scatter, SSC)(圖 3(a))，而兩者分別與樣本大小體積以及內部物質複雜度相關[22]。因此透過流式細胞儀便可分析血球細胞大小分布與血紅素密度等性質表現[23, 24]。在 Marczak 等人所提出之研究中，及利用流式細胞儀表明紅血球在加入 0.005% 之戊二醛後，其體積相對正常紅血球小，投影在接收器上內部物質分布總和如同圖 3 (b, c) SSC-A(area) 的差異有著顯著變化。

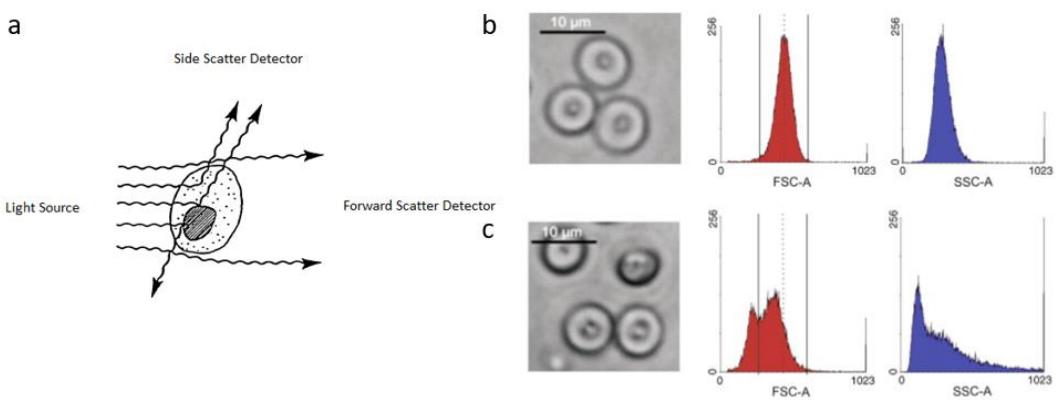


圖 3 (a)樣本流經光源時示意圖。(b)正常紅血球細胞前向與側向散射數值與數量。(c)加入戊二醛後紅血球細胞分析結果

在分析血球細胞形變能力之標準方法上主要利用滲透壓梯度細胞計數儀(Osmotic gradient ektacytometry)，其也被應用於臨床上部分病症診斷，像是遺傳性球形紅血球症(hereditary spherocytosis)、遺傳性口型球症(hereditary stomatocytosis)等。在量測上血球會先懸浮於剪應力為 30 Pa 之溶液中，並逐漸增加滲透壓並記錄其伸長係數的曲線(圖 4)以從中獲得幾項參數。其中曲線最小值( $O_{min}$ )為紅血球脆性與表面積體積比，而最大形變值( $EI_{max}$ )為細胞膜形變能力，另外最大值之一半( $O_{hyper}$ )則描述平均紅血球血紅素濃度與細胞體積[12]。

儘管上述方法便可針對紅血球形態、黏彈性等性質進行分析，但其結果都須由大量

血球細胞進行統計以獲取資訊，其中的參數也大多都是間接推估，並無法針對單一血球形態進行說明。因此許多針對單顆血球定量定性的分析也被相繼提出，並能根據目標參數進行分析。

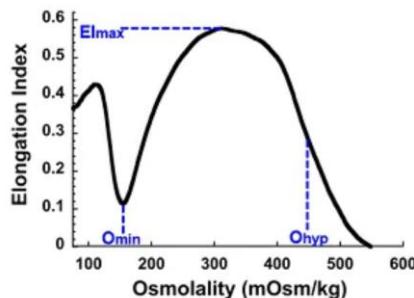


圖 4 滲透壓梯度細胞計數儀量測時的記錄曲線與對應參數

### 2.3.2 單顆血球形態分析技術

在單顆細胞型態分析中可分為多種研究方式(圖 5)，包含單顆細胞逐一拍攝分析其二維與三維型態學資訊及細胞黏彈性，以及利用微流道高通量分析紅血球形變能力與二維形態資訊。第一種方式較為廣泛應用之作法為利用定量相位顯微術進行分析，由於細胞之定量資訊可以被擷取，因此透過旋轉入射光之角度便可將其資訊進行三維形態重建以獲得體積表面機等資訊。此外也可透過高速拍攝細胞並由相位影像的變化推算細胞膜表面變化，作為細胞膜黏彈性之直接證據[25-28]。除此之外以光鉗(optical tweezers)、原子力顯微鏡(AFM)等方式以被用於分析血球楊氏模數(Young's modulus)，來描述血球只在一個方向上受到張力或壓縮時的彈性。[11]

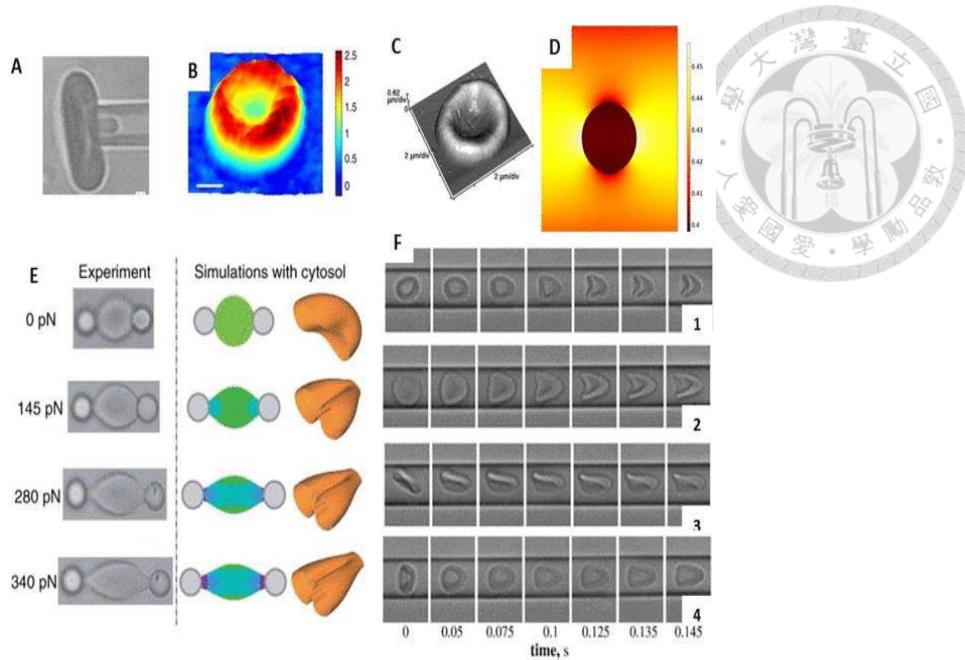


圖 5 多種細胞分析方法。(A)毛細管拉伸血球表面。(B)以定量相位顯微術拍攝結果。(C)以原子力顯微鏡拍攝。(D)以超聲波進行聲速分析。(E)以光鉗拉伸。(F)以微流道分析型態。[11]

儘管上述方式確實可以獲得前述中所有描述細胞形變能力之參數，然而其通量太低，在部分操作較為複雜之裝置上如光鉗、AFM 等，更是難以進行大量數據的統計，如此一來便會難以判斷取得之參數是否為疾病誘發或是血球間變化範圍。因此以微流道進行研究之高通量方式也被提出，在分析上如同流式細胞儀並透過改變流體速度、流道管徑來使血球細胞形變以記錄形變能力、恢復係數等與彈性相關之分析，同時也可由影像上對二維影像進行外觀型態分析。以微流道方式確實達到對於黏彈性質高通量之分析，但是對於形態學之描述僅能針對二維影像，且無法定量分析該細胞內之物質組成與分布。

為達到高通量定量分析 Merola 等人提出由微流道結合定量相位顯微術開發之高通量顯微系統，在其研究中透過將血球假設為生物透鏡，以分析其滾動角度並進行三維重建[7]，然而其並未詳細解釋各步驟詳細作法，此系統也未經驗證與應用演示。因此本研究將以此方式為基礎，結合微流道與相位顯微鏡來建立一高通量斷層繞射顯微系統，並依此建立的系統同時對血球三維型態與黏彈性進行分析。



### 2.3.3 臨床紅血球檢測方式與相關參數

在臨牀上血液相關疾病皆會經過全血細胞計數(complete blood count)來做初步分析，在分析上會計量包含血球的體積、數量以及血紅蛋白水平(Hemoglobin level, g/dL)，此外在計算總體血球體積時會利用離心後沉澱的血球占全血比例之血比容(Hematocrit, Hct)進行描述。在體積測量上，現今分析多為利用直流電抗法，其方法在血球通過感應區域時，感測器會根據其體積而有不同的阻抗變化，再透過紀錄這些變化所產生的脈衝，來計算出所有通過的血球個數以及個別大小。而血紅蛋白水平則是先利用溶解劑把樣本中的紅血球外膜溶解，稀釋出內部的血紅蛋白後在以 Sodium Lauryl Sulphate、Potassium Cyanide 等化學物質穩定其結構及顏色[29]，最後利用吸收光譜儀計量吸光度來推算出病人的血紅蛋白水平。由上述方式後幾項相關指數可以被提取並定義。

- 平均紅血球容積(Mean Corpuscular Volume, MCV)用以描述平均一個紅血球的容積。

$$MCV(\text{fl}) = \frac{\text{Hct}(\%)}{RBC \text{ count}(10^6/\mu\text{l})} \times 10 \quad (\text{式 } 1)$$

- 平均紅血球血紅素(Mean Corpuscular Hemoglobin, MCH)來表示平均一顆細胞內的血紅素值。

$$MCH(\text{pg}) = \frac{\text{Hemoglobin level}(\frac{\text{g}}{\text{dl}})}{RBC \text{ count}(10^6/\mu\text{l})} \times 10 \quad (\text{式 } 2)$$

- 平均紅血球血紅素濃度(Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, MCHC)用來表示整體紅血球中血紅素濃度的平均值

$$MCHC = \frac{MCH}{MCV} \text{ OR } \frac{Hb(\frac{\text{g}}{\text{dl}})}{Hct(\%)} \times 100 \left( \frac{\text{g}}{\text{dl}} \right) \quad (\text{式 } 3)$$

- 紅血球細胞大小分佈(Red Blood Cell Distribution Width, RDW)用來描述細胞大小差異的分佈情形。

$$RDW = \frac{\text{STD of MCV}}{\text{Mean MCV}} \times 100 \quad (\text{式 } 4)$$

在臨牀上計量這些參數是否落在正常範圍之中，可以用來判斷血球的健康程度，訂做出初步的疾病篩選，然而許多疾病都與上述參數改變有關。例如在鐮刀性貧血及糖尿病患者中 MCV、MCH、MCHC 皆有上升的趨勢[27, 30]，因此需要採用更進一步的分析還準



確判斷所屬病症。例如在糖尿病患者中，血紅蛋白其中一種種類的分支 HbA<sub>1c</sub> 會與醣類產生糖基化反應，且含量會增加因此可以做為判定糖尿病的檢驗目標之一。在量測上主要是利用離子交換色譜、電泳、結構差異等化學方法將糖基化的血紅素中分離並定量其所佔的比例[2]。

## 2.4 定量相位顯微術

### 2.4.1 全像素顯微鏡(digital holographic microscopy, DHM)

傳統利用明視野(brightfield)的光學顯微鏡，透過光源被樣本吸收導致與介質的強度差異來使樣本影像顯現，然而生物樣本多為低吸收弱散射的透明物體，在影像中無法呈現清晰的對比，細胞內透明的結構也因此難以取得[31]。因此螢光顯微鏡等技術也被開發，來增強對比以更好的去觀察目標位置。但螢光染劑具有專一性因此若需要觀測完整細胞，則需要多種螢光染劑相互疊加，其結果可能對細胞造成影響。因此免標記(label-free)的顯微成像方式在對整體細胞的觀測上會是更理想的技術，像是細胞與生理食鹽水的折射率在波長 532 奈米時大約分別為 1.387 與 1.337[32]，因此之間的差異便可以用來作為辨識樣本的要素。

全像術顯微鏡作為一種定量相位顯微術，建立在干涉儀的基礎上並利用其中的樣本與介質的折射率差異，使光束產生相位延遲來記錄影像。與相位差(phase contrast)顯微鏡或是微分干涉相位差(differential interference contrast)顯微鏡等直提升影像對比度的定性技術不同的是，DHM 相機平面接收兩道不同相位的光源在干涉後的強度影像，並由干涉結果經過轉換後推導並定量相位變化，此變化主要受兩個因素影響，包含樣本厚度以及折射率(refractive index)[33]。其結果可用公式 5 描述，其中包含沿著垂直於樣本平面的光軸(z 軸)所計算的樣本厚度(R)、樣本折射率(n<sub>c</sub>)、介質折射率(n<sub>m</sub>)以及波長(λ)，而樣本與參考光之間的相位延遲(Δϕ)單位為 radian。

$$\Delta\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \int_R [n_c - n_m] dz \quad (\text{式 5})$$

## 2.4.2 原理及回顧

建立在相位延遲的特性上，許多相位顯微鏡也被開發出來，如 Mach-Zehnder[34]、Michelson[35]、common-path[36]等架構。在上述三種架構中為了得到樣本的二維相位影像，顯微架構中需要兩道光來進行干涉。產生干涉的方式可以分為共光路(common path)與分離光路兩種方式，而共光路的特點在於樣本光源與參考光源在成像後產生，並經過相同的光學元件，使得所經過的光程幾乎相同，同時也可以大幅的減少因環境震動對於兩道不同光源的影響。而在共光路的架構上產生樣本光與參考光又可以分為兩種方法，包含離軸式(off-axis)與共軸式(on-axis)[37]，兩種方式都可以藉由擺放光柵來分光產生。在干涉平面，會由樣本光的頻率成分 ACTs(auto-correlation terms)與中心頻率為干涉頻率的 CCTs (cross-correlation terms)所組成，其中因為理想參考光為空間頻率為零的平面波，因此 ACT 主要由樣本光頻率成分決定。共軸式系統由於 ACTs 與 CCTs 重疊，因此需要透過相位調變器些微改變參考光與樣本光之間的相位偏移量，並連續紀錄多張影像以移除 ATCs 及其中一個 CCTs(圖 6(c))，而雖然拍攝過程較為複雜，但影像所涵蓋空間頻率頻寬較窄，因此可以在相機的取樣限制下記錄更多資訊。而離軸式系統是通過傾斜參考光的入射方向，使之與樣本光在相機平面干涉時呈現一個夾角，這樣的目的在為了產生高頻干涉，其結果在影像上便會呈現出單一頻率的強度變化條紋，而此方式便可以在單張影像上將 ATCs 與 CCTs 分離(圖 6(a, b))，此結果所帶來的優點是離軸式架構可以透過單張干涉影像，來回復樣本相位資訊，使其可以連續拍攝動態樣本，且不易受環境擾動影像。但因為 ACTs 及 CCTs 得分離，離軸式系統影像所有空間頻率涵蓋頻寬較廣(圖 6(a))，因此將高頻區域分離進行相位回復時，可能會造成部分資訊丟失[38]。

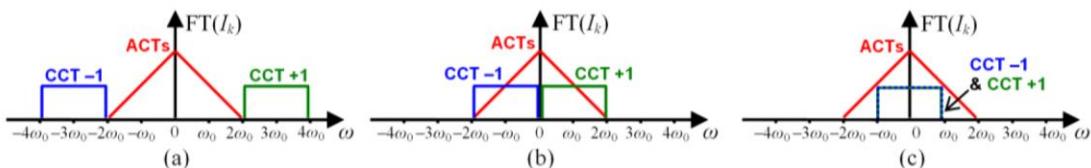


圖 6 不同架構下 ACTs 與 CCTs 頻率分布情形。(a) off-axis 架構。(b) slightly-off-axis 架構。(c) on-axis 架構。[38]



2006 年 Popescu 等人[39]提出可利用單張高頻干涉影像進行相位拍攝的繞射相位顯微術(diffraction phase microscopy, DPM) (圖 7)，其架構將與樣本進行干涉的獨立參考光路移除，改以穿透式光柵(transmission grating)取代，並將其置於光路中物鏡後的中繼鏡之焦平面處如圖 5 中 G 元件所示。實際操作下先前經過樣本的平面波在樣本與介質的差異下出現延遲，並會在經過光柵後進行分散光束並產生多階光路。在 Popescu 等人提出的架構中他們將一組空間濾波器(spatial filter)放置於圖 7 中 L1 的傅立葉平面，將 0 階光源的高頻區域過濾掉只保留低頻資訊，如此便可建立一道具有均勻波前的參考光束。

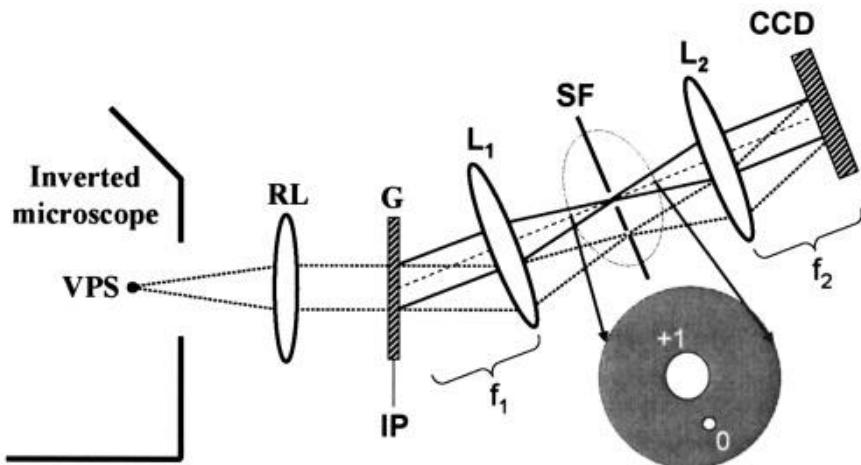


圖 7 Popescu 等人所提出之 DPM 架構。[39]

然而這種方式會需要高精度的針孔，且容易受環境影響而需要時常調整，此外被過濾後的光源也可能因為與樣本光的強度差異而降低干涉對比度。因此圖 8 展現出更簡易的方式，以一空間濾波器(window) B 保留原光路的 0 階與 1 階的所有光源，並透過調整光柵 G 在光軸上與影像平面 IP 的距離 z 便可在維持兩道光源夾角相同的情況下改變剪切距離(shearing distance)由 A1 變為 A2，使得參考光中包含的樣本資訊不會與樣本光中的資訊重疊[40]，但此方法需要樣本周圍帶有有足夠大的空白區域，使得在改變剪切距離後參考光束在樣本處能提供均勻波前進行干涉。

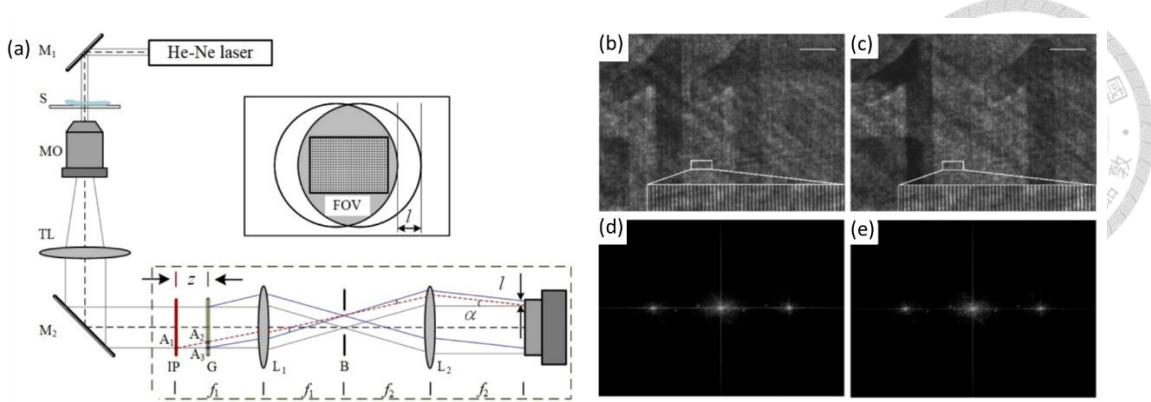


圖 8 調變光柵位置以分離樣本與參考光資訊。(a)架構示意圖。(b)(c)在不同 z 下的干涉圖影像。(d)(e)b, c 所對應頻域，可見在改變 z 時頻域不會改變。 [40]

如此一來在相機平面參考光波前(R)與樣本光波前(O)便會進行干涉，並將相位資訊記錄在干涉影像上，而此時的干涉影像便可以下式進行描述

$$I = |R^2| + |O^2| + R^*O + O^*R \quad (\text{式 } 6)$$

其中  $R^*$ 、 $O^*$  是兩者分別的波前共軛複數。前兩項為兩道光源的強度資訊，後兩項則是彼此干涉的結果，其中包含著樣本光與參考光的相位及強度資訊[41]。如上所述，在 off-axis 架構中帶有相位資訊的條紋頻率(CCTs)，會與頻率空間原點分離，而式 6 前兩項會在原點上，因此可以經過對強度影像傅立葉轉換後，濾波並保留其中一個 CCT，再將其移動至頻率空間中心後進行反傅立葉計算出複數場(F)，最後以下式回推出相位資訊( $\Delta\phi$ )，其推導可參照[38]。而實際計算流程則會於 3.3.1 呈現。

$$\Delta\phi = \arctan\left(\frac{\text{Im}(F)}{\text{Re}(F)}\right) \quad (\text{式 } 7)$$

其中  $\text{Im}$  與  $\text{Re}$  分別代表複數場的虛部與實部。而在濾波過程時，濾波器的大小則會影響到計算結果，若範圍太大可能會被 ACTs 影像，範圍太小則會丟失部分有用的高頻資訊。

### 2.4.3 光學繞射斷層顯微鏡

三維影像對於樣本的觀察是一項重要的技術發展，不同於二維投影，三維資訊可以更確切的了解樣本在實真實環境中的物質分佈以及型態。如同電腦斷層與 X 光等技術，

透過定量資訊的投影便可一次進行重建還原出三維特徵。而定量相位顯微術，因為其拍攝到的影像皆為定量資訊，因此也可以利用相同的演算技術重建出三維影像。2007 年 Field 團隊開發利用掃描鏡掃描樣本的顯微鏡(圖 9)，而掃描角度受限於聚光鏡與物鏡因此設定為 $\pm 60$  度，並利用濾波反投影(Filter back projection)演算法重建出 Hela 細胞三維折射率影像[42]。與二維顯微架構不同的是，常見的三維架構會加入掃描鏡來改變入射光的角度，進而收取不同投影角度的相位影像，但是角度會受限於聚光鏡及物鏡的數值孔徑，使結果有所缺失。此外在重建過程中亦要考慮樣本大小與波長較為接近，若投影結果內包含繞射資訊的因素直接被忽略，樣本的的解析度會被大幅影響[43]，因此許多傅立葉繞射理論對影像進行重建的技術也被提出。

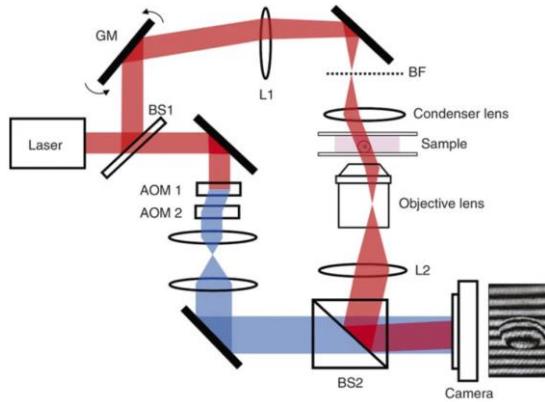


圖 9 Field 團隊所提出的結合掃描鏡之三微折射率顯微鏡架構[42]

本實驗室先前即利用 Mach-Zehnder 架構建立出基礎的倒立式三維折射率顯微鏡(Digital holographic microtomography, DH $\mu$ T)[43]，其架構建立在 Phase-shifting interferometry (PSI) 方法上，於參考光路中放置壓電感應器(PZT)產生相對於樣本光束的多種相位偏移，並利用 advanced iterative algorithm (AIA)從多張相偏移影像中計算出相位資訊，最後再結合掃描鏡(galvanometer mirror, GM)的轉動取得不同角度相位影像。然而此方式在拍攝時容易受環境震動影像，因此在二維相位影像上改進為利用共光路的 DPM 架構[39]進行單張拍攝來獲取相位影像，並保留如圖 10 中綠色虛線光路的 Mach-Zehnder 架構的設計來獲取掃描鏡旋轉時的角度情形[4]。在圖 10 的本實驗室架構中，光源會先經過分光鏡(BS)將光源區分為拍攝樣本的實線與紀錄角度的虛線兩道光，其中實線在進入樣本前

會先經過拍攝角度為 $\pm 60^\circ$ 之掃描鏡(GM)，由物鏡(OL)接收後經過光柵(G)與空間濾波器(Window)後於相機平面產生干涉。角度紀錄則是利用經過掃描鏡的光源與原始光源經過干涉後，干涉條紋會傾斜而推算出來。

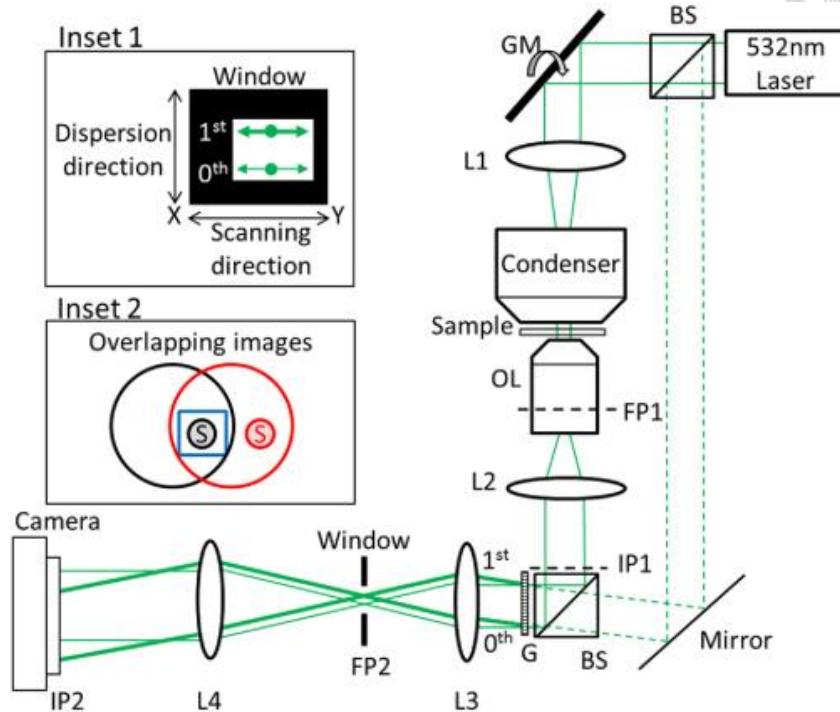


圖 10 本實驗室於先前研究中所建立之三維折射率顯微鏡架。[4]

## 2.5 以定量相位顯微術分析紅血球

作為取得容易且環境需求較低的生物樣本定量相位顯微術，被大量應用在紅血球分析以及其相關疾病的驗證上。1957 年 Barer 提出細胞內折射率與蛋白質濃度呈線性關係，並以公式  $n_c = n_m + \alpha \times C$  描述，物質折射率  $n_c$  可經過折射率增益常數  $\alpha$  與血紅素濃度  $C$  (g/L) 推算出 [44]。例如在計算紅血球血紅素折射率時  $\alpha$  在文獻中會設定為 0.193 mL/g [44]。以此公式結合相位差( $\Delta\phi$ )與投影面積的總和，便可以定量出單一紅血球去除介質或是水分的重量，也稱之為乾重(dry mass)。而在臨牀上用來描述多顆紅血球平均重量的 MCH，便是計算血球乾重的參數。

$$\text{dry mass} = \frac{\text{wavelength} \sum_x \sum_y \Delta\phi(x,y) dy dx}{2\pi \alpha} \quad (\text{式 8})$$

Y.K. Park 團隊及利用折射率斷層顯微鏡觀察糖尿病者紅血球 (圖 11)[27]。為了完整記錄紅血球特徵，他們結合了三維折射率以及二維相位影像一起拍攝形態上包含體積、表面積、球形率等資訊，此外亦紀錄血紅素濃度、含量，以及細胞膜表面波動性等參數。在系統架構中他們利用共光路繞射光學斷層掃描顯微鏡(common-path diffraction optical tomography, cDOT)來拍攝。而為更好觀察紅血球的變化與糖尿病的相關性，他們將所量測到的個體資訊進行相關分析，以便於瞭解參數與疾病間的連結性，但除了細胞膜表面波動性，其他參數在正常與糖尿病間皆無顯著差異。其餘在糖尿病的研究上 G. Mazarevica 等人的結果中呈現，在固著的紅血球上，糖尿病患者血紅素折射率會比正常來的低，而在直接稀釋的血球細胞上則會根據酸鹼度有所變化[45]，因此可以作為後續利用 cDOT 等相關技術研究時的一項指標參照。除了已知的疾病外，Y.K. Park 團隊也將技術應用在外源性感染可能造成血球改變的觀察。透過在紅血球樣本中加入蜂毒 (Melittin)使細胞膜表面被打孔。利用定量相位顯微術，相比於先前的研究更好的定量毒素與細胞的交互作用。在拍攝上他們同樣使用 cDOT 進行，並獲取不同藥物濃度的二維、三維與相位參數，來即時了解蜂毒對紅血球的影響。

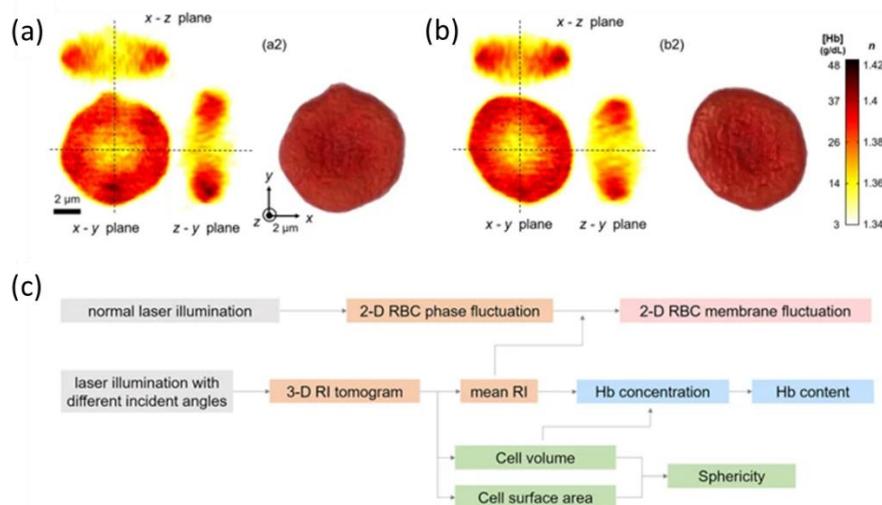


圖 11 (a)正常血球三維重建結果。(b)糖尿病患者血球三維重建結果。(c)cDOT 拍攝二維及三維影像流程。[27]

同樣作為常見血液疾病貧血症狀的紅血球也被應用作為觀測樣本，在 Martina Mugnano 等人提出的研究中[6]，他們直接以二維投影作為分析目標，並從相位影像推斷出表面積、血紅素含量、球形率等資訊，其中球形率計算方式為中央相位值除以四分之一直徑位置的相位值得結果。除此之外他們也利用 Zernike 多項式中 piston、defocus、third-order spherical aberration 進行擬合以比較貧血紅血球與正常的擬合數值差異，結果上他們也展現出在結合這三項的擬合結果後，對特定疾病的分辨情形可以相當於臨床診斷上的準確率。在心血管相關疾病上，心臟驟停作為重大死因之一，在被急救復甦後的血球也被用來觀測以了解發病前後的差異。H.J. LEE 等人比較了老鼠在窒息性心臟驟停(asphyxial cardiac arrest)時與急救復甦之後 60 分鐘的血液型態的改變(圖 12)[46]，在顯微架構上他們同樣使用了三維折射率顯微術來進行拍攝。經過三維形態以及全血分析的對比在結果上 CPR 期間與復甦後血球並無顯著差異。

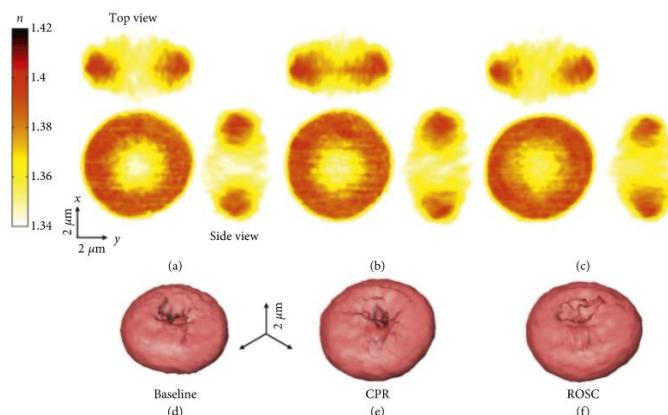


圖 12 在小鼠心臟驟停前後紅血球三維形態表現[46]

此外，為更進一步了解紅血球的機械性質以及增加拍攝時的通量，許多研究結合了定量相位顯微術以及微流道，以對紅血球進行更深入的實驗。在 H.S Park 等人的實驗中[47]，由於血球的黏彈性降低會與水分的通透力下降相關，因此他們以血球受機械外力時水分流動情形，來了解捐贈後的血液在存放期間，對於血球的形變能力等機械力是否有影響。在架構上他們設計了一個具有比血球更狹窄區間的微流道，並在內部通入折射率為 1.372 的高折射率介質，以清楚記錄紅血球在被擠壓前後水分通透的情形，並以 off-

axis Mach-Zehnder 架構連續拍攝拍攝血球在通過狹窄區間的時候，以及通過前後的光學體積變化，並比較隨著血液存放時間的差異對於光學體積的影響(圖 13)。在結果上他們發現隨著存放時間越久，血球整體光學體積會上升(圖 13)，此結果是由於長時間存放的血球受機械力後排出的水分增加，導致血球內部在總血紅素含量不變的情況下，血紅素濃度相對擠壓前上升。,

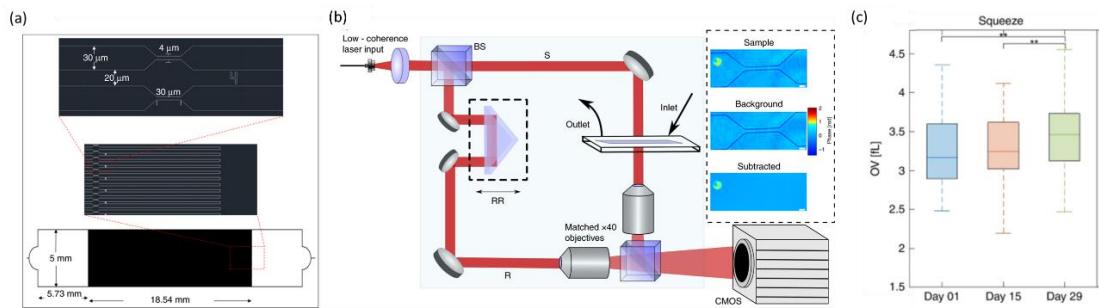


圖 13 利用微流道拍攝捐贈血液紅血球在不同存放時間下變化。(a)微流道設計。(b)光架構設計。(c)血球存放時間(橫軸)與受機械力擠壓時之光學體積分布(縱軸)[47]

D. Dannhauser 等人利用定量相位顯微術無需額外標記的特性，以及微流道高通量的優點，進行外周血單個核細胞 (peripheral blood mononuclear cell) 的分析，在流道中他們加入稀釋後的高黏彈性係數的聚合物，迫使細胞維持在流道中央。在實際拍攝時他們結合相位影像以及白光影像，以快速判斷通過的細胞種類為何。在這樣的架構上，他們能夠達到每秒有 1.2 顆細胞的通量[48]。

大多結合微流道拍攝的系統，皆是以二維影像作為分析資訊，然而在流體中行進的過程如同在體內真實情況，是屬於一個三維的運動情形。因此 F. Merola 等人就利用血球在流道內會有多種運動型態的方式，控制其在不形變的情況下滾動並快速擷取這個過程(圖 14(a))[7]。如同電腦斷層原理當有多個角度的正向投影，影像便可以此進行三維重建。在拍攝上他們利用單一直線流道導入血球，在推估紅血球滾動角度上他們利用第四項 Zernike 多項式估算，最後再將角度與資訊影像利用 filtered back projection 進行重建。而拍攝樣本除一般紅血球外，也利用缺鐵性貧血、地中海貧血等血球疾病進行拍攝(圖 14(b))。而本論文也針對其影像處理方法在 3.4.8 節進行比較分析。

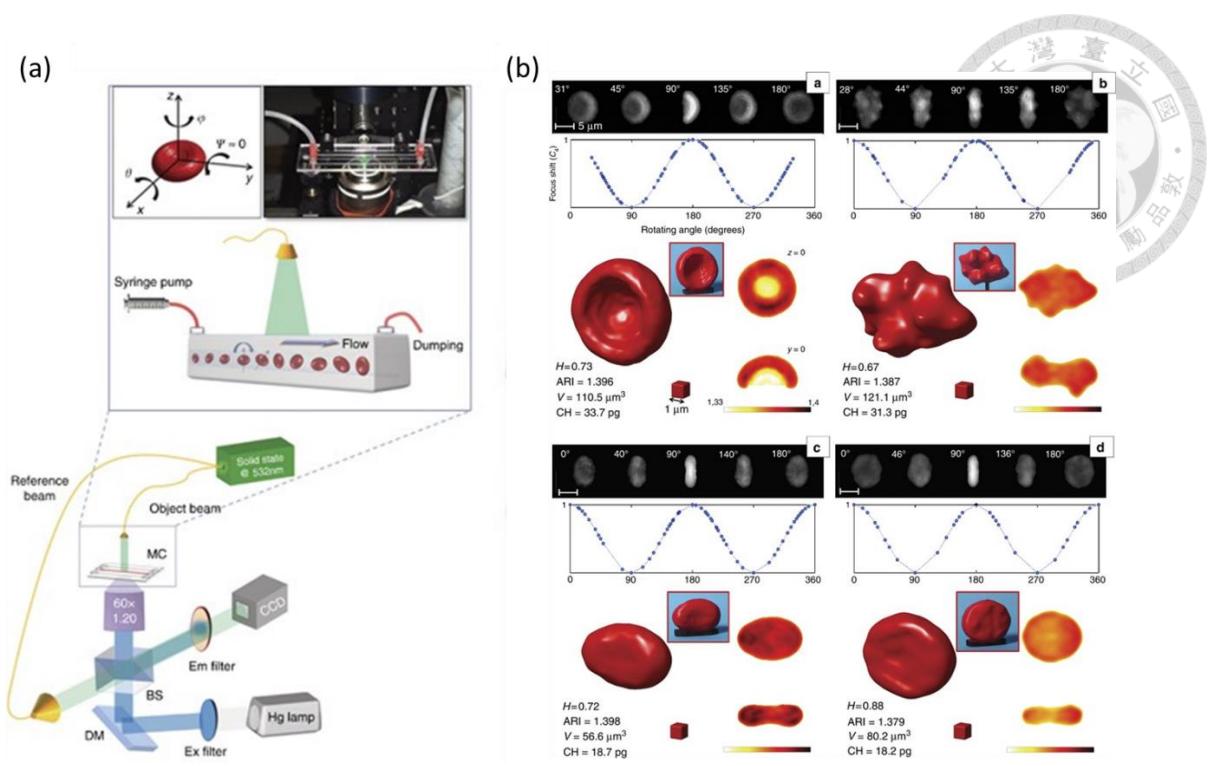


圖 14 (a)定量相位顯微術結合微流道架構。(b)以此架構所重建之不同型態血球。[7]

## 第三章：方法與結果

### 3.1 光學架構與驗證

#### 3.1.1 光學架構

本實驗光學架構如圖 15 所示。光源波長為 532 奈米雷射光源，並先將其以物鏡 (OL1) 焦距後以針孔(pinhole)去除雜光，之後以偏振片使光束偏振方向相同，使其得以產生干涉。在光束經過樣本平面前透過聚光鏡縮小光束同時保持接近準直，讓光束在通過樣本時呈平面波前，並以 60 倍水鏡接收及放大。在本實驗架構中是利用光源相互干涉結果來記錄樣本相位資訊，因此實驗利用光通過光柵時會出現繞射之現象進行分光，將光束進行複製建立共光路系統，並參照[4]所述方式調整光柵位置以避免干涉時兩道光束中的樣本相互重疊干擾，以此方式建立之共光路系統(common-path)可以大幅降低拍攝連續影像時受到環境與機械震動的影響[4]。在後方透鏡組成之 4f 系統的傅立葉平面上，放置空間濾波器保留零階與一階出射光，分別做為樣本光與參考光並在相機平面進行干涉，而本實驗的架構相較於[39]利用針孔的方式，可以免去調整光路對齊針孔的步驟，且因為兩道光束皆未被過多阻擋因此也能達到較佳的干涉結果，並最後由 CMOS 相機擷取影像。



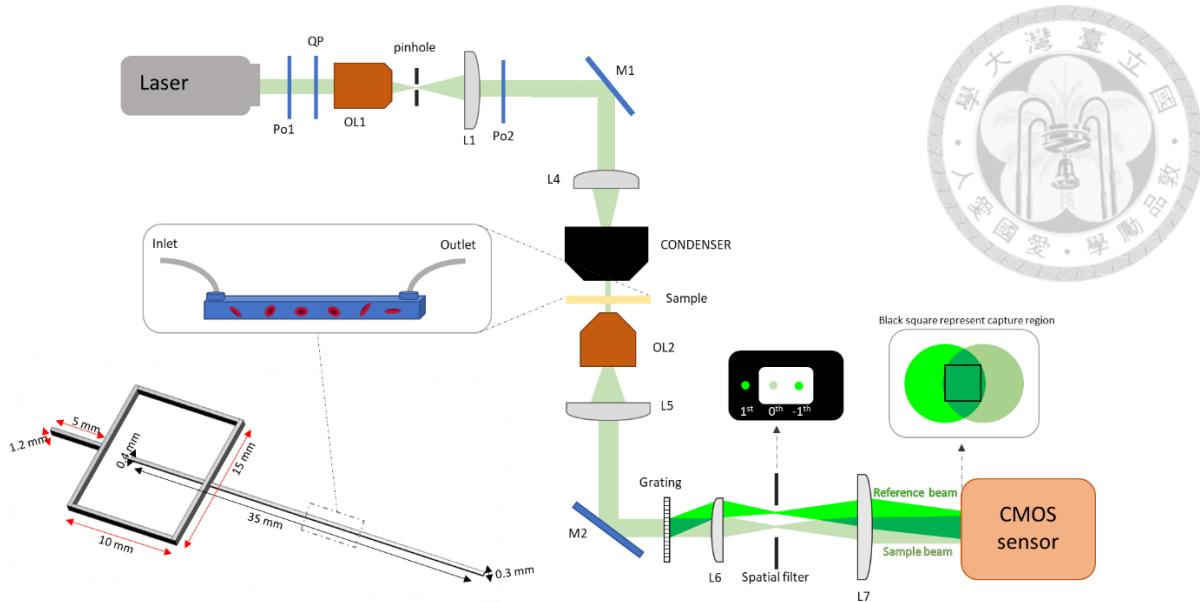


圖 15 系統架構圖。Po1、Po2：偏振片(Polarizer); QP：四分之一波片(Quarter Waveplate); OL1、OL2：物鏡(Objective Lens); M1、M2：反光鏡(Mirror); L1~L5：透鏡(Lens)

上述系統使用元件說明與參數如下：

1. 雷射光源(Laser)：波長為 532 nm 之固態雷射(CNI MLL-U-532-200mW)
2. 偏振片(Po1, Po2)、四分之一波片(QP)：Po1 作用為確保雷射光源偏振方向單一，並與後方 QP 在旋轉方向上呈 45 度角差異將光源轉換為圓偏振，避免光源受元件反射後進入雷射造成損壞。在濾波後以 Po2 在將光源轉換為單一偏振方向確保干涉得以產生。
3. 物鏡(OL1, OL2)：OL1 為一空氣鏡(Edmund, 20X DIN, NA=0.4)，目的為擴束及焦距雷射光束。OL2 為 60 倍水鏡(Olympus, LUMFLN 60X, NA = 1.10)，用於接收通過樣本之光源並進行放大。
4. 針孔(pinhole)：作為空間濾波器(10um 圓形孔徑)，放置於 OL1 之焦平面上，擋去光源空間頻率的高頻成分，使通過針孔的光可以近似為點光源。
5. 聚光鏡(Condenser, U-ACC oil immersion, NA = 1.4)：將光束縮小，且其出射光由多個點光源組成，確保照射平面亮度均勻。
6. 光柵(grating, Dynasil, 300 Groove, UV Transmission Grating)：透過繞射原理將光源依



波長分開，而在單一波長光源下會將該光源往不同方向進行出射，但在設計上對應波長之光柵會以一階為主要出射路徑，並向兩側衰減。而在本系統中為確保干涉時分出的樣本光與參考光兩道強度相當，因此選用紫外光波段適用的光柵，因其在 532 奈米區間零階與一階強度相近。

7. 空間濾波器(spatial filter)：在光柵分光後因理論上會分出無限多道光束，因此為了避免重複干涉，在光柵後第一個傅立葉平面放置 3D 列印之空間濾波器，讓零階樣本光束所有頻率成分與一階參考光束的低頻成分，並濾除其他階光束及部分一階參考光束高頻區域。
8. 透鏡(L1 ~ L5)：L1 ( $f = 50\text{ mm}$ ) 與 OL1 成對，將光束準直與擴束。L2 ( $f = 50\text{ mm}$ ) 與聚光鏡組合使其輸出光為準直狀態。L3 ( $f = 50\text{ mm}$ ) 作為 OL2 之後端管鏡(tube lens)。L4 ( $f = 50\text{ mm}$ ) 與 L5 ( $f = 250\text{ mm}$ ) 組成 4f 系統，可作為濾波、放大之功能並使光柵滿足相機取樣定理
9. 影像擷取裝置(高速 CMOS 相機, VC-12MX-M/C 180)：像素大小為 5.5  $\mu\text{m}$ ，感光元件大小為 3072x4096，且最高擷取速度可達每秒 180 幀。

### 3.1.2 系統放大率

本系統所使用之六十倍物鏡為無窮遠物鏡(infinity objective lens)，然而其生產商(Olympus)所設定之後方鏡筒透鏡焦距長為 180 毫米，但在本架構上所使用之鏡筒透鏡焦距長為 50 毫米，因此計算出此物鏡在本系統之放大率僅為  $60 * (50/180) = 16.67$  倍。除物鏡放大外，需另外再加上後方 4F 系統，其放大率為 5 倍，因此可求得系統整體理論放大率約為 83.33 倍。

由於人為誤差，顯微鏡系統實際放大率可能與理論有所差距。因此利用 resolution target (USAF 19511X)，放置於樣本平面進行拍攝來量測系統正確放大率。因 resolution target 已給定每一毫米黑白條紋之頻率，所以可直接計算出每一黑白週期之寬度。在拍攝影像後取一組連續黑白條紋區域進行分析，其結果如圖 16 所示，其中為降低人為量測誤差，過程取每個光強度週期之峰值強度的一半，作為明暗的交界點及其長度量測的

位置，並計算兩組明暗紋週期的寬度進行平均。Resolution target 在此區域為每毫米 64 個週期，因此每組明暗紋週期約等於 15.625 微米。計算實際拍攝結果圖 16(b)時，取灰度最大與最小值平均作為明暗交界，並平均兩次明暗變化寬度得到量測結果為 1309.0 微米，可求出實際放大率為 83.77 倍與理論放大率 83.33 倍相近。

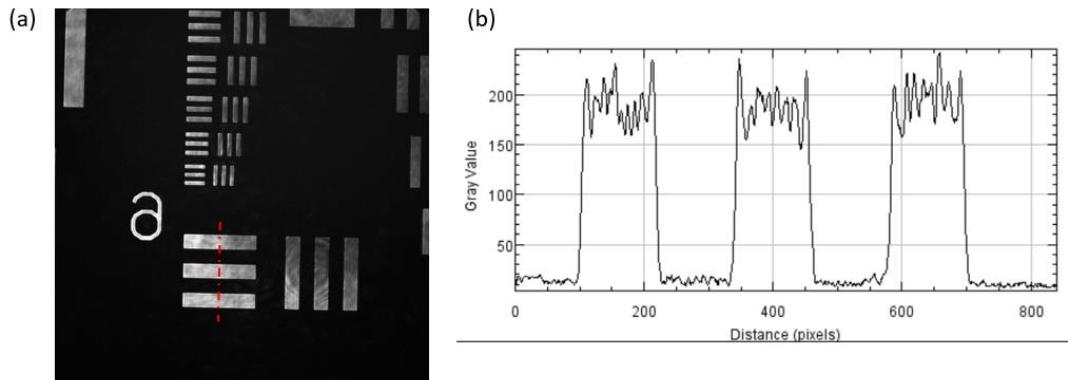


圖 16 (a)以顯微系統拍攝 resolution target 影像。 (b)圖(a)紅線區間作圖結果

### 3.1.3 視野大小

此高通量系統其通量與視野大小相關，隨視野越大其通量亦能相對應跟隨提升。然而視野可能受限於物鏡本身之視野大小、光束大小、光學元件大小、相機感測晶片大小。

在本系統中相機感測晶片之邊長為 3072 像素，可拍攝大小約為 16896 微米，由此除以系統放大倍率後在樣本處約可拍攝邊長為 202 微米之方形物體。因此流道設計之寬度需大於 200 微米，以完全利用晶片接收區域，並考慮流道邊緣不連續面可能造成相位變化過大，且加工過程無法確保邊緣平整，因此實際實驗後最終設定流道寬度為 300 微米。

### 3.1.4 系統側向解析度

為驗證顯微架構系統架設時，光學元件擺放位置是否正確，為此利用寬頻白光光源，來拍攝經樣本在經過系統後成像的邊緣擴散函數(edge spread function, ESF) (圖 17)，來估算系統側向解析度(lateral resolution)是否與理論值相符。在樣本處放置 USAF

resolution target 並拍攝其圖形明暗邊緣，在取其灰階值快速變化的距離計算出實際解析度。由灰階值最低點自其後第一個區域最大值為總變化量，在取其中 20% 到 80% 的強度區間計算側向解析度。在影像上獲得這個區間約為 4 像素，而對應回樣本平面距離為  $4 \times 5.5 / 83.33 = 0.26 \mu\text{m}$ 。而在本系統所使用的物鏡之繞射極限 ( $\frac{\lambda}{2NA_{Obj}}$ ) 為 0.24 與量測值相近，其數值大小也主要由物鏡影響。<sup>[49]</sup>。

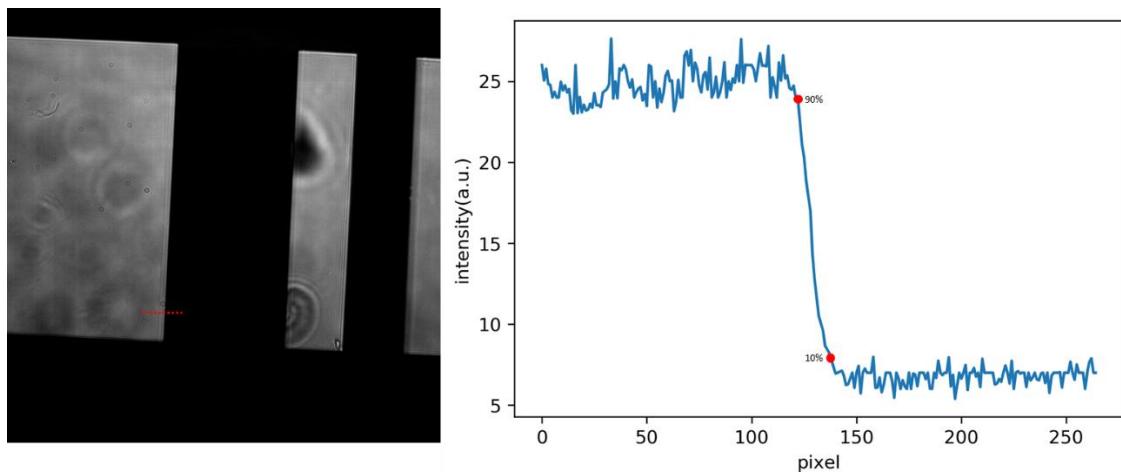


圖 17 左圖為白光拍攝 resolution target 影像，右圖為紅色虛線強度分度情形，並當作此系統之邊緣擴散函數

### 3.1.5 干涉條紋對比度

在系統中干涉條紋清晰度及干涉條紋的頻率決定所得影像之正確性，其中條紋對比度越高在傅立葉轉換後，越能完整地從高頻區域回推出樣本相位資訊。而干涉條紋之對比度  $I_{FC}$  可以由

$$I_{FC} = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (\text{式 } 9)$$

進行定量。對比度的分佈會在零到一之間，當數值越接近一表示干涉對比度越高，其中  $I_{max}$  為干涉條紋強度最大值而  $I_{min}$  則為區域最低值。在計算上將單邊總像素共 3072 條縱軸分別計算，記錄其干涉條文對比分布(圖 18(b))，在調整干涉影像上，實驗時會讓中央干涉結果處於較佳，並盡可能降低整體干涉對比度差異。在本架構中計算出所有縱軸的干涉條紋強度平均為 0.647。而此結果略優於 M. Bedrossian 等人[50]所提出之架構，干

涉對比為 0.6 之結果。

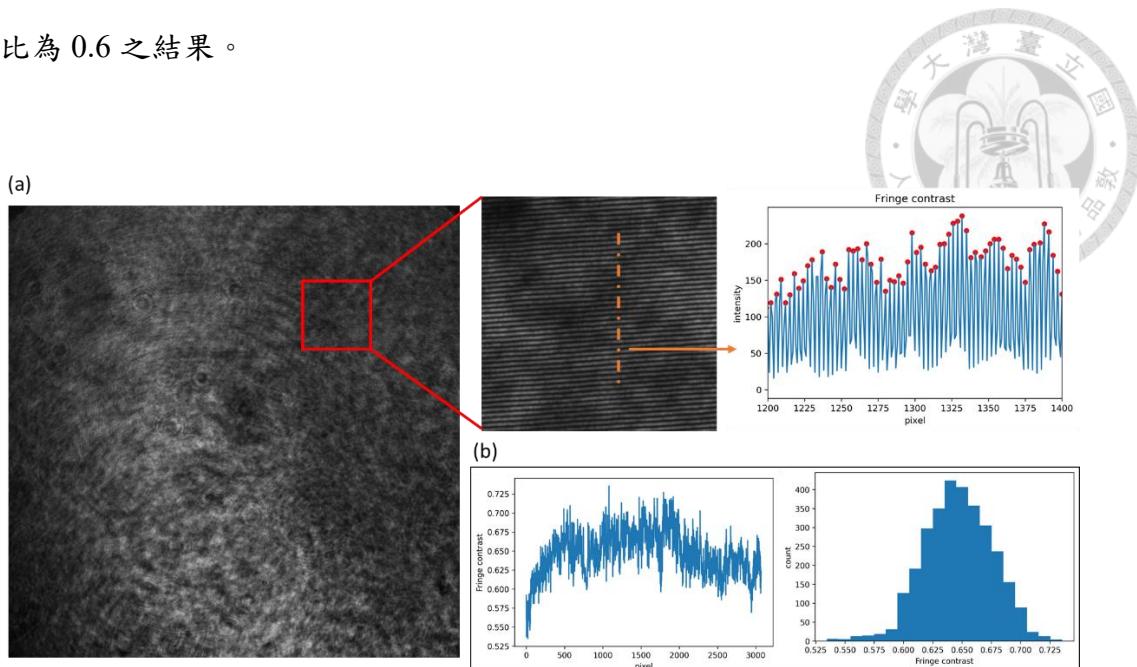


圖 18 (a)干擾影像條文對比情形與強度分佈。(b)所有縱軸條文對比，左圖為沿橫向計算每一像素縱軸對比情形，右圖為 3072 條縱軸對比分布結果。

### 3.1.6 時間與空間相位雜訊

在由干擾影像回推相位時，由於受到多種雜訊影響，例如環境震動、光斑(speckle)、相機響應條件等因素影響，使的干涉結果無法達到完美條件，因此在相位恢復後便會產生特定雜訊，而此雜訊主要可以分為單一影像中不同區域的差異，以及隨時間變化各張影像間的差異。在量測上以 180 幀連續拍攝 300 張無樣本的玻片影像，並分別計算時間與空間雜訊。

空間雜訊計算之方法，是藉由計算單張相位影像標準差再計算出全部影像之平均及標準差。在本架構上空間雜訊平均為  $0.0651 \pm 0.0038$  rad ( $5.512 \pm 0.322$  nm)，而此結果優於 A. Ahmad 團隊[51]與 D.G. Abdelsalam 等人[52]所提出架構之  $9.5208 \pm 4.7001$  nm 及 10 nm 誤差結果。

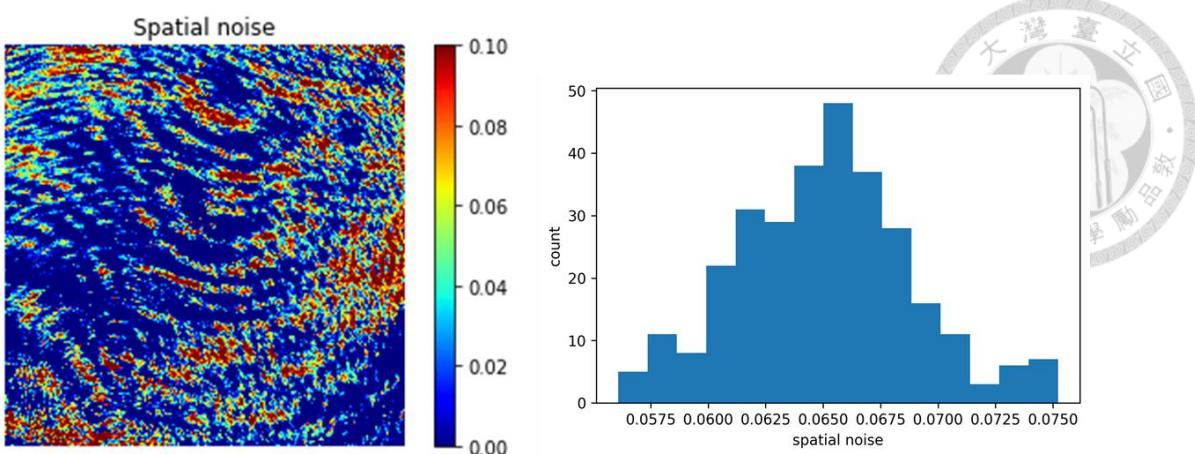


圖 19 左圖為無樣本的視野下相位分佈情形，右圖各點為 300 張影像中整體相位值標準差分佈

時間雜訊主要受環境震動導致，而在本實驗中因為需要拍攝連續影像，因此時間雜訊對於獲取結果會有所影響。在計算上同樣連續拍攝 300 張並取得單一像素在連續影像中標準差，最後將所有像素標準差計算平均及整體標準差。在本架構中時序誤差為  $0.034 \pm 0.0184$  rad ( $2.879 \pm 1.556$  nm)，此結果與 C. Zheng 等人[53]所得出  $2 \pm 0.4$  nm 系統時序雜訊結果相近。而在圖中可以看到除邊緣與角落的雜訊較高外影像中也有部分區域雜訊較大，其結果可能與視野邊緣部分光源強度較低或是髒污、光斑等因素，使得干涉對比度較差造成在計算上相位雜訊較大。有較大的標準差也可能由於雷射、相機散熱風扇、針筒幫浦運作震動所導致。

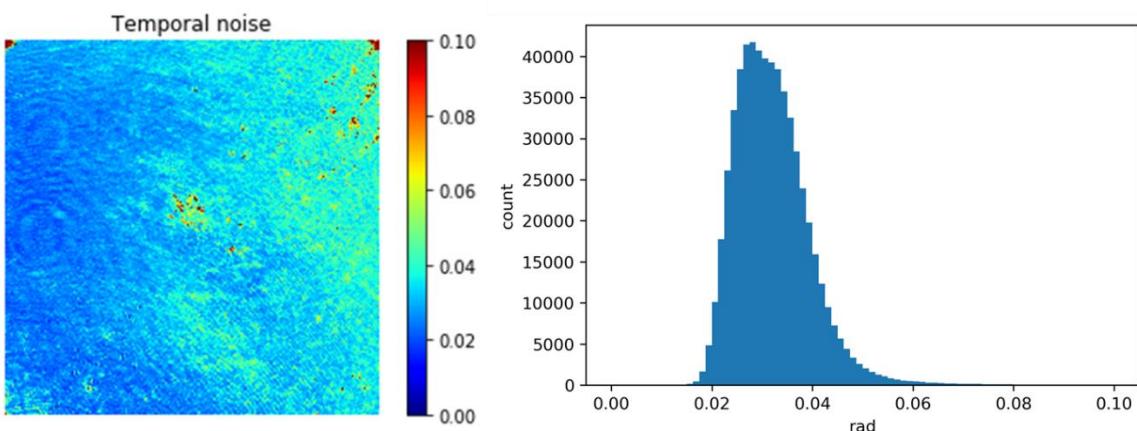


圖 20 左圖為視野中各像素再 300 張的標準差分佈，右圖為直方圖表示結果



## 3.2 微流道裝置

### 3.2.1 流體內的血球運動

在人體中紅血球會透過運動、形變等方式流經血管，而先前研究透過微流道模擬血球在血管內運動型態，發現在不同流速與管徑下紅血球會出現不同型態。其中隨著流速降低，當其壓力小於紅血球膜骨架支撐力時，血球便會呈現滾動(tumbling)或是水平運動狀態[10]。為提升通量並完整擷取樣本三維資訊，本實驗亦利用微流道裝置來輸入樣本並以 3.1.1 的定量顯微系統進行擷取。而樣本三維資訊來源為促使樣本在流道中滾動並拍攝各個旋轉方向的投影結果進行重建。其方法為控制流道內流體為層流狀態，於此狀態下由於流體在流道內速度會受流體與管壁的黏性力作用的影響，使靠近管壁的流速愈慢，而中心處的速度( $u_{center}$ )最大，在半徑為  $R$  的流道，其距離中心的不同位置  $r$  之速度  $u_r$  分布可描述為

$$u_r = u_{center} \left[ \left( 1 - \left( \frac{r}{R} \right)^{1/2} \right) \right] \quad (\text{式 10})$$

，並呈現拋物線分布(圖 21)，因此當流體速度控制在不會造成血球細胞形變的情形下，便可因重力而沉降在流道下半部，此時血球上下受到不同流速便可使其滾動，而此現象亦與血液在血管中流速分布相似(圖 21)[54]。

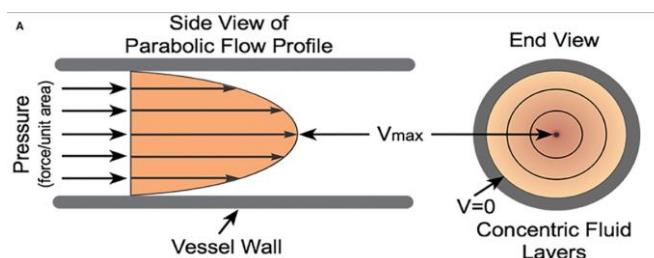


圖 21 血管中血液剪切力與流速分佈示意圖[2]。

在本系統上定義光路為  $Z$  軸，沿流體流動方向為  $X$  軸。而在恆定流速下，血球在通過流道的過程中會受到  $xz$  方向與  $xy$  方向之拋物線流速影響，而有兩種推動其運動之流體作用力(圖 22)，因此除滾動外血球也會同時進行水平狀態轉動，使其投影影像呈 360 度角度連續但變化隨機的分布。

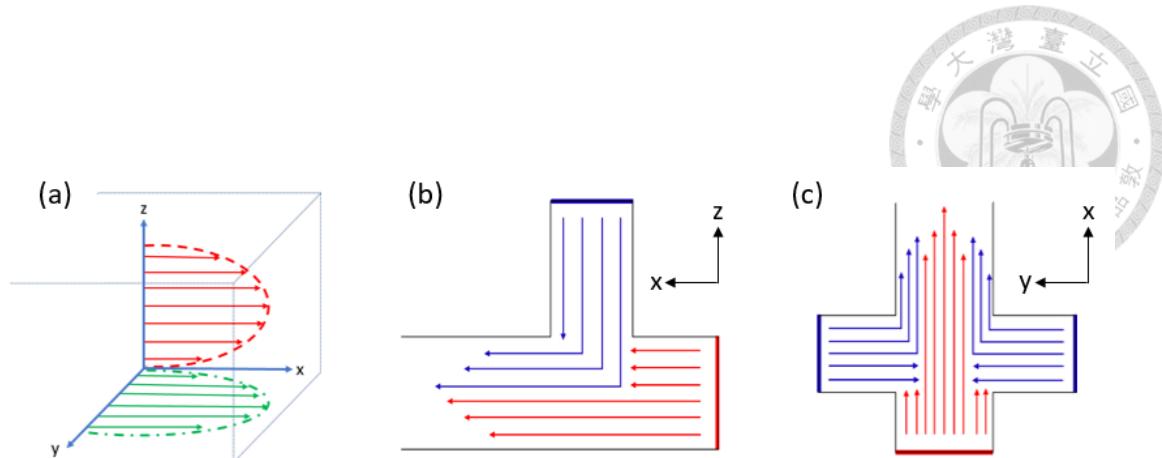


圖 22 (a) 實驗中流道流速分佈示意圖，以及軸向分佈。 (b) 縱向與(c)側向之流體動力聚焦示意圖其中藍線為鞘流液流，紅線為樣本流。

### 3.2.2 流體動力聚焦(hydrodynamic focusing)

儘管利用重力沉降及可讓血球不同區域承受不同流速而滾動，但若要將該血球進行重建會需要其呈現 360 度滾動之投影影像，也就是在視野範圍中必須出現兩次完整翻動，然而受限於光束大小與相機擷取範圍，僅依靠重力沉降較難保證在視野中的血球能達到滾動次數的要求。因此利用流體動力聚焦原理，額外加上一道速度較快的鞘流液 (sheath flow)限縮原本樣本液的範圍。其原理為當兩道相同密度、黏滯力流體呈層流形態往同方向流動時，若兩流體速度不同，其在流道內所占截面積便會與流速呈正比，並擠壓低速流的分布區域，促使低速流流量改變如圖 22 (b, c) 紅色流體分布情形。根據此原理若於兩側同時給定相同流速且流速皆快於中央流體之鞘流液，便能控制樣本流體在流道中央位置。在本實驗中採用圖 22 (b)方法迫使血球細胞分布在拋物線下半部，以提升其滾動次數，圖中也以紅色線段示意樣本流體在流道內分布情形。並且該施加於上方的鞘流液同樣可以分佈在樣本液兩側，避免因為兩側流速較慢血球往兩邊聚集之現象 (圖 22 (c))。

### 3.2.3 微流道晶片製備

在微流道晶片設計上，包含單一組輸入輸出端的基本線性流道，與加入流體動力聚

焦之流道設計，為減少輸入端的數量本研究參考 Y.M. Patel 等人所提出之方法[55]來加入並分出不同方向之鞘流液，他們將水平方向與垂直方向流體聚焦合併設計成一與主要流道垂直但具有不同高度之流道，以促使通入樣本盡可能處於主流道中央並緊貼底部，最後透過對模板加工形成流道。

而本實驗中之流道模板是於工業設計軟體繪製後，利用 CNC 銑床進行加工切割(委託台大實驗工廠進行製作)，製作之鋁合金基板之流道模板，後以 9:1 混合 A、B 劑之聚二甲基矽氧烷 (Polydimethylsiloxane, PDMS) 透過軟蝕刻方式進行翻模製作。方法為倒入 PDMS 抽真空去除氣泡後放置於 60 度烘箱加熱使其固化，再切割取下後利用一毫米口徑切片刀(biopsy punch)切出液體進出口，並透過氧電漿機(Oxygen Plasma)使 PDMS 與欲貼合之蓋玻片表面物理或化學性質改變，透過在表面產生自由基使兩者得以緊密貼合產生封閉流道[56]。

流道設計如圖 23(a) 所示，其以 PDMS 進行翻模製作。加入流體動力聚焦之流道其設計為，在原先線性流道加上一道不同高度但與之垂直的流道，與[55]不同處，為了減少輸入端，將原先由兩側通入鞘流液之設計連接在一起，使其成為單一輸入，以達到一個輸入端同時提供上方及兩側流體動力聚焦之結果，在設計上流道高度與比例，為透過實際通入血球後測試在不同情況下其滾動與相機擷取情形進行篩選。並利用不同顏色之流體做為流體動力聚焦之效用測試，其中圖 23 (b)藍色液體為流速較快之鞘流液，紅色為樣本液。左圖可見其水平方向上之聚焦情形，而右圖則為輸出端之流體分布，可見其在垂直方向上之聚焦能力。

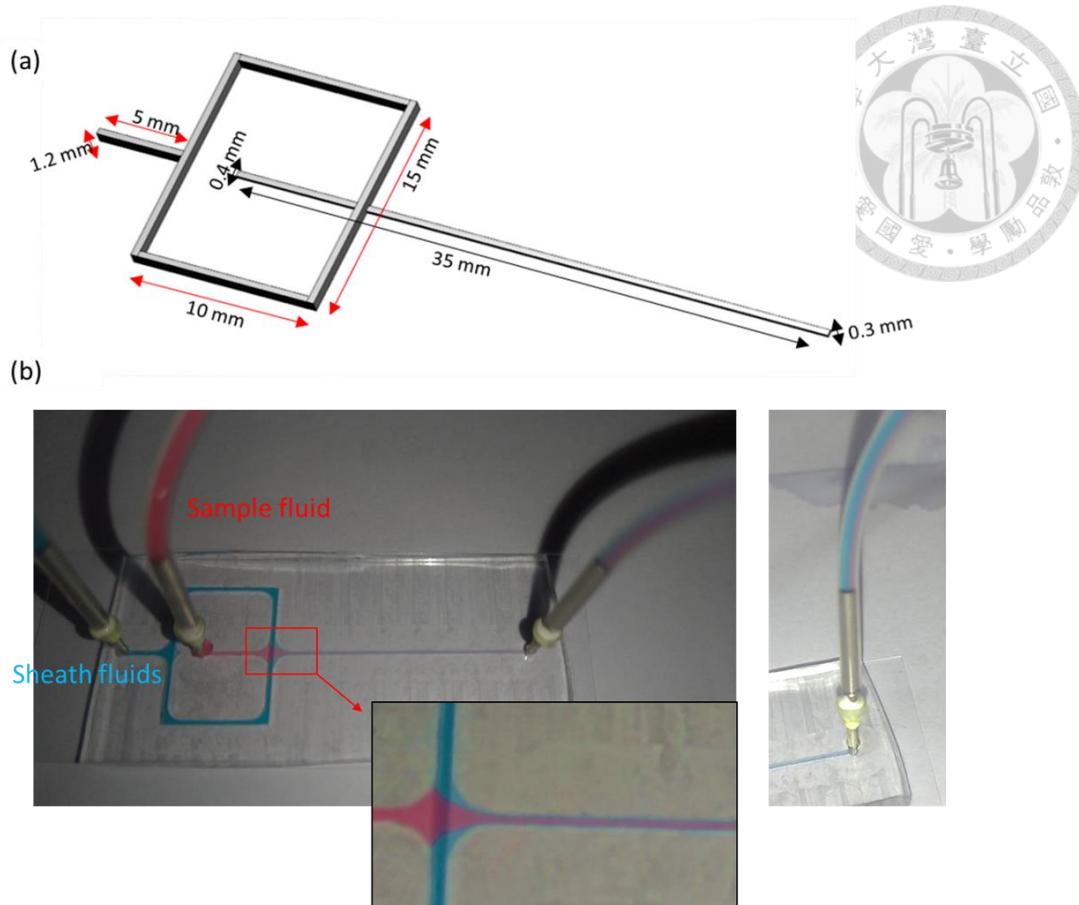


圖 23 (a) 微流道設計圖。(b) 流體動力聚焦實際結果，右圖為縱向聚焦結果

### 3.2.4 流體注射幫補

除流道本身外，流體速度壓力的控制也是維持血球旋轉要素之一，在流體控制上分為帶有血球之稀釋液的樣本液以及作為流體聚焦之鞘流液，兩者利用不同針筒幫補(syringe pumps)進行流速控制與進液。在樣本液控制上為求精確，實驗上使用商用針筒幫補(CHEMYX FUSION 200)以  $5 \mu\text{l}/\text{min}$  進行推動，而在鞘流液上則利用 Arduino 與drv8825 馬達驅動模組控制步進馬達(42BYGH47;0.55 Nm)，使其以  $10 \sim 20 \mu\text{l}/\text{min}$  間流速推動鞘流液。自製針筒幫補設計如下，其固定針筒與螺桿區域利用 3D 列印制備後固定於木板上(圖 24)。



圖 24 自製針筒幫浦架構

### 3.2.5 微流道裝置設置流程

在拍攝前流道需放置於水中並以真空幫浦抽除流道內部空氣使水進入，之後以內徑 0.91 mm 之 45 度點膠針頭及太空透明管(TYGON)連接流道及置於針筒幫浦上之針筒，並將流道晶片放置於系統載物台上。初始先以 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  及 100  $\mu\text{l}/\text{min}$  之流速分別推動樣本液與鞘流液，待樣本液與鞘流液皆經過流道並輸出後，後將兩個幫浦調整回 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ，並讓其穩定後開始拍攝。

## 3.3 相位回復與驗證

### 3.3.1 相位回復

#### 3.3.1.1 相位回復方法

本實驗所用之定量像位顯微術利用干涉來記錄樣本所造成的延遲，因此需要額外以影像處理方式回復原始相位資訊。計算上利用傅立葉轉換可以分離出干涉條紋之高頻資訊，經過濾波後將高頻資訊單獨進行反傅立葉計算，並將求得之虛數與實數進行反正切運算得到相位包裹影像(wrapped)。而在系統架構上，因元件擺放、髒汙等可能造成人為

誤差，在經過物鏡等透鏡後便會產生多種像差疊加在正確影像上的結果，所以為去除這些誤差影響，在計算上需透過與不含樣本之背景影像相位進行相減將其去除。由於在拍攝樣本與背景間的時間差可能存在些微的環境震動，所以為確保上述誤差能夠被完整扣除，因此在計算上會將濾波後所得的背景與樣本之高頻區域之強度最大值皆移到各自二維空間頻率的中心，再進行後續反傅立葉計算並相減。

但經過反正切計算後所得影像為數值分布在 $\pm\pi$ 之間的相位包裹影像，因為是為不連續影像，因此用 Fast two dimensional phase-unwrapping 演算法計算出相位解包裹影像(unwrap)。其方法先利用二階微分方式計算出不同像素計算先後順序 R 並組成不同組別，由 R 值較大的像素優先計算，在計算排序的依據 R 的方法如以下公式所示：

$$R = \frac{1}{D} \quad \text{式 11}$$

其中

$$\begin{aligned} D(i,j) &= [H^2(i,j) + V^2(i,j) + D_1^2(i,j) + D_2^2(i,j)]^{\frac{1}{2}} \\ H(i,j) &= \gamma[\Phi(i-1,j) - \Phi(i,j)] - \gamma[\Phi(i,j) - \Phi(i+1,j)] \\ V(i,j) &= \gamma[\Phi(i,j-1) - \Phi(i,j)] - \gamma[\Phi(i,j) - \Phi(i,j+1)] \\ D_1(i,j) &= \gamma[\Phi(i-1,j-1) - \Phi(i,j)] - \gamma[\Phi(i,j) - \Phi(i+1,j+1)] \\ D_2(i,j) &= \gamma[\Phi(i-1,j+1) - \Phi(i,j)] - \gamma[\Phi(i,j) - \Phi(i+1,j-1)] \end{aligned}$$

$\gamma$ 用來計算給定數值與 $\pi$ 相除後的餘數， $\Phi$ 則代表輸入的相位包裹影像並以 i,j 表示其像素座標，而在計算後每個像素與其他像素接觸的邊都會有一個 R，如圖 25 所示，透過排序後由 R 最大值開始迭代計算兩相鄰像素 pixel<sub>1</sub>, pixel<sub>2</sub> 是否需加上或扣除  $2\pi$ ，其加減依據為

$$\text{floor}((pixel_1 - pixel_2 + \pi)/2\pi) * 2\pi$$

如圖 25(c)初始會把像素兩兩一組，並在計算過程中把單一像素併入組別中，如圖(d)的 e 會被併入紫色組別，而之後若計算到的邊緣兩邊都有組別則會將數量較少的組別經過加減  $2\pi$ 倍數來併入另一組別，如圖 25(e)黃色組會被併入紫色組，至整體影像剩單一組

別為止，其流程如下[57]。

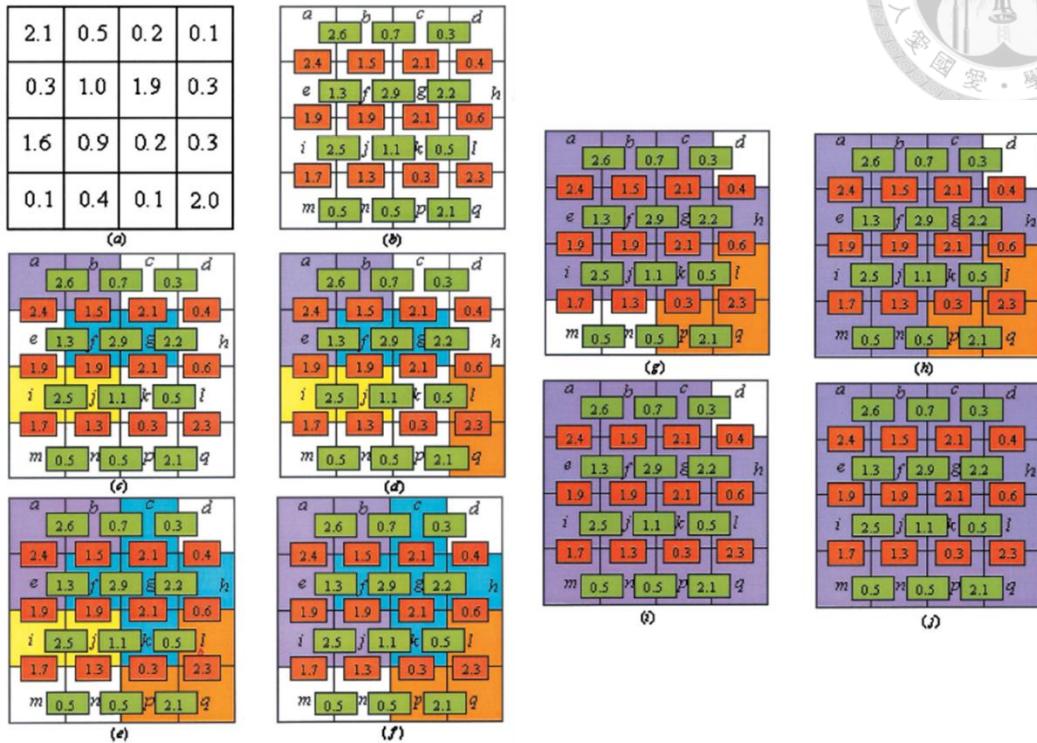


圖 25 Fast two dimensional phase-unwrapping 演算法流程圖[57]

然而在血球滾動中可能造成像位變化大於  $2\pi$ 的情形，此時期包裹影像便會進入下一個反正切週期，使得相位影像被限制在 0 到  $2\pi$ 之間。不過這些區域與周圍像素便會產生較大的梯度變化，如圖 26 中紅色虛線對應的剖面線所示，因此透過迭代可以不斷去找出這些區域，並加上或減去  $2\pi$ 進行修正。

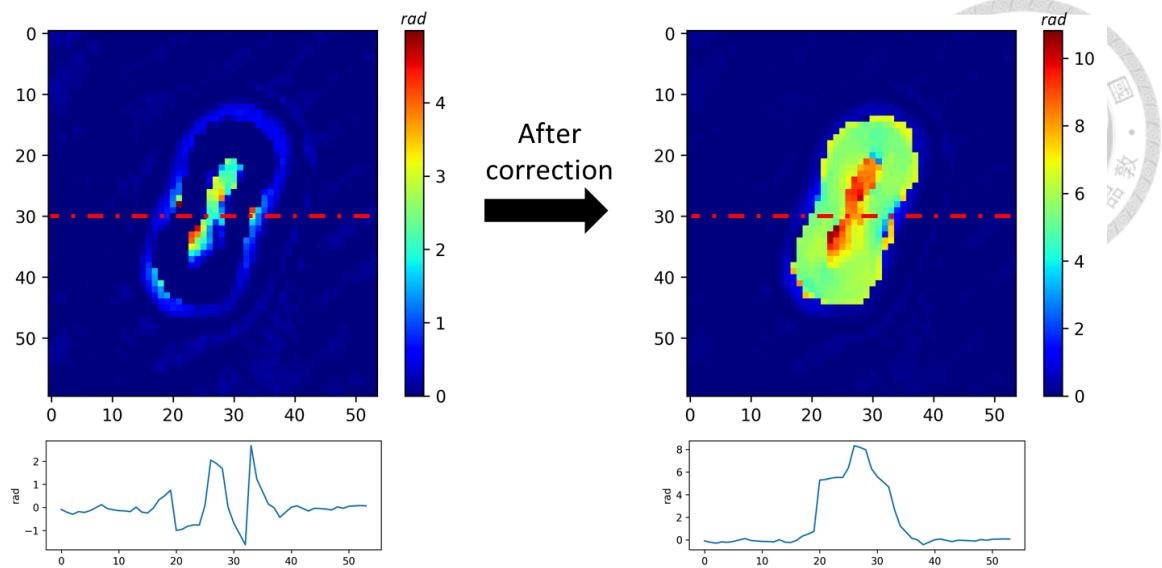


圖 26 相位校正示意圖

### 3.3.1.2 相位回復結果

樣本相會資訊在拍攝時被記錄在干涉條紋中，因此干涉效果的好壞決定了相位影像的資訊清晰與否。在實際計算上如圖 27 所示，過程包含傅立葉轉換、高頻區域擷取、反傅立葉計算、相位影像解包裹、背景扣除等步驟。其中在經過傅立葉轉換後可以看到頻域中，包含了中央低頻區域以及上下兩相互對稱之高頻干涉條紋，此兩者距離是由參考光與樣本光干涉時夾角決定，而在圖 27 影像中也展現出高頻區與低頻區域彼此相互分離。在本實驗中為了在計算時分離兩種頻率，以高頻區域為中心取樣除以四分之一邊長之方形，來避免兩個頻率相互混疊而無法獲取正確相位資訊，同時擷取干涉條文所有頻率資訊。

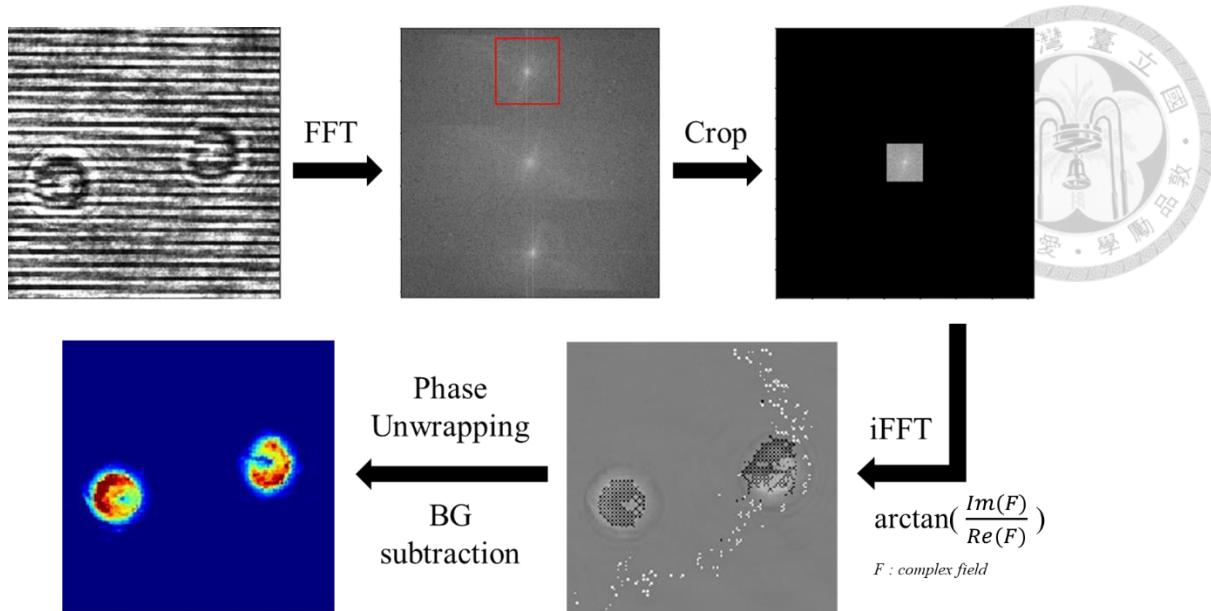


圖 27 相位回復流程與各階段影像結果

### 3.3.2 相位值驗證

#### 3.3.2.1 光學架構驗證樣本製備

為驗證架構所擷取之相位影像的正確性，實驗中利用已知折射率且大小為  $10\text{ }\mu\text{m}$  的均勻塑膠小球( $10\text{ }\mu\text{m}$  Polystyrene Bead, Polysciences Inc.,  $n = 1.5983$  ( $532\text{ nm}$ ))進行驗證。透過已知介質、樣本的折射率，可以對干涉影像進行影像處理後比對拍攝與實際值，作為該光學系統之驗證。在樣本製作上，先取  $3\text{ }\mu\text{l}$  原液並稀釋 1000 倍，後均勻滴在玻片上自然乾燥。為避免小球與其周圍介質折射率差異太大，所以用已知折射率液體(Cargille Labs, Series A,  $n=1.566$ )作為其介質，覆蓋於玻片上後進行拍攝。

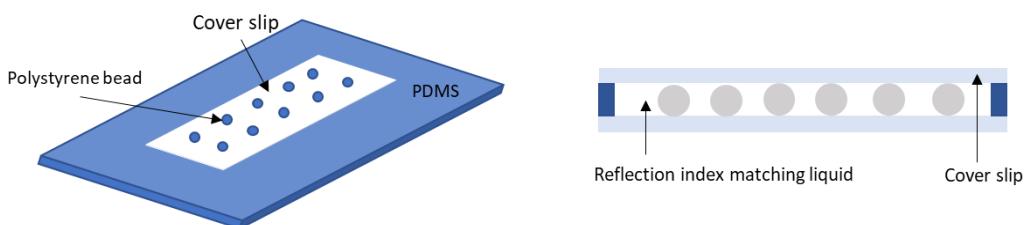


圖 28 光學架構驗證樣本製備縱向及側向示意圖



### 3.3.2.2 相位值驗證

為驗證此顯微架構拍攝之樣本相位值正確性，會先以 3.3.2.1 方式製備塑膠小球作為樣本，由於該小球三維資訊以及在波長 532 nm 時之折射率為已知數值，因此可以計算出該小球在樣本時所會造成的理論相位延遲，並將其與系統實際拍攝到的相位延遲進行比較。在樣本製作上將此折射率為 1.5986 的小球，放置在波長 532 nm 時折射率為 1.566 的油性介質，以避免與塑膠小球折射率差距過大。根據公式可以計算出下圖橘線模擬圖形，並將其與量測到的藍線進行比較，然而可以看到雖然相位值分佈及最大值大致相同，但兩條線無法完全重合，其中量測值表面波動較大。而此結果可能因為拍攝到是樣本與系統之點擴散函數(Point spread function)進行卷積後的結果，除此之外相位影像也可能受到小球製作使表面即不平整、雷射光斑、環境或是相機響應等因素影響。而為了解該雜訊的出現原因，3.3.3 分別對光斑、相機等因素進行分析比較。

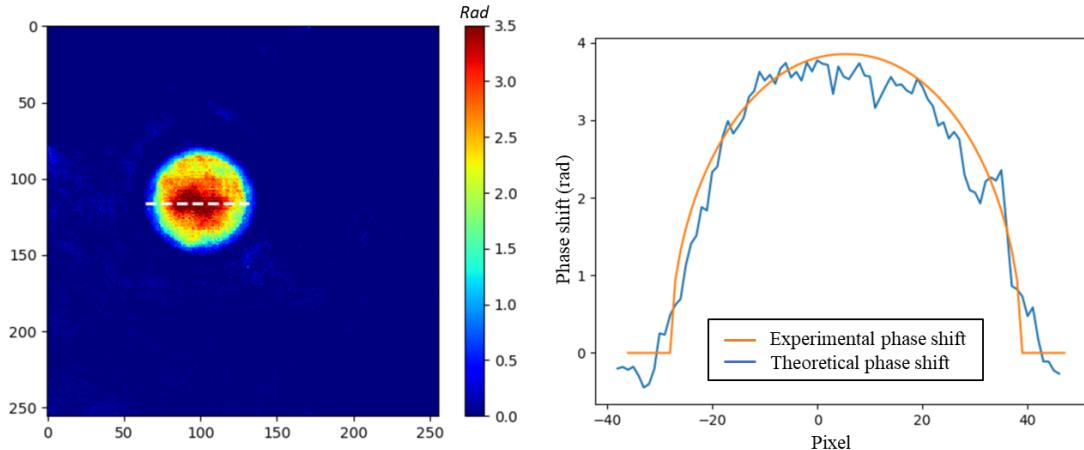


圖 29 以已知折射率塑膠小球驗證相位值結果，左圖為相位分佈，右圖為白色虛線相位值與理論相位值比較結果

### 3.3.2.3 微流道內樣本相位值驗證

由於本實驗需藉助微流道來進行樣本拍攝，因此也驗證樣本在微流道內時其資訊不會受其影響。在拍攝方法上先將塑膠小球稀釋液浸泡在介質油中，並待稀釋液中水分蒸發後將其通入流道，靜置等小球沉澱後進行拍攝。其結果如下，可見在扣除背景影像後，

微流道架構對於相位資訊並不會有所影響。

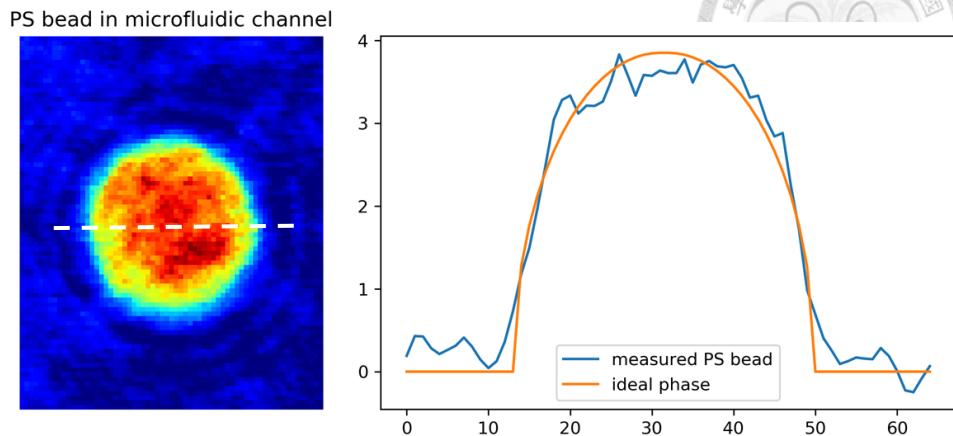


圖 30 已知折射率樣本於微流道中相位分佈情形

### 3.3.3 相位值雜訊探討

#### 3.3.3.1 消除光斑

由於窄頻雷射具有高度同調性(coherence)，因此在成像上便會受到光源自身干涉而形成之光斑(speckle)，進而導致系統解析能力降低。因此許多方式也被開發來克服此問題，例如使用低同調性的寬頻光源、額外加上移動擴散片(Diffuser)的方式等[58]，而本研究即是利用擴散片特性來達到消除光斑的目的。當光源通過擴散片時，因為其粗糙的表面結構，光源便會因繞射特性，使得出射光可視為由無數點光源所構成的光束，而隨著擴散片移動便可使的單一時間點下通過樣本並進入相機的光線強度及相位皆不同，因此只要光束角度變化的速度遠大於相機曝光的時間，便可在影像中達到平均的效果，使得雷射光源在保持高度時間同調性時，得以降低其空間同調性及光斑的產生。[59]

而為實現動態擴散片的裝置，本實驗利用步進馬達，並以 Arduino 及控制模組控制轉速再將擴散片黏上馬達後，置於前方透鏡焦點上，而因為光束打在擴散片後會快速發散，因此在其後方加上一光圈限縮光束大小，同時避免雜光進入顯微架構，最後再放上一透鏡維持光束大小(圖 31(a))，並將此裝置置於圖 15 的 Po2 與 L4 之間。而在馬達轉速設定上，為了避免進到該馬達共振區間，同時又到達到相機曝光時間內最佳結果，因此設定每分鐘轉速為 326 轉，並在此轉速下紀錄干涉影像，比較前後影像之光斑影響，與對應相位影像變化。

其結果如圖所示，從加入擴散片前後的影像取圖中紅框處進行比較，確實可以看到背景雜訊明顯降低(圖 31 (b))，但是當取出樣本相位資訊進行比較後(圖(c))發現，使用擴散片前後樣本的相位值可能受相機響應結果、環境等因素而仍有波動雜訊存在(圖 31 (c))。在此結果上可以認定光斑對於樣本相位值所造成的雜訊並沒有太大的影響。

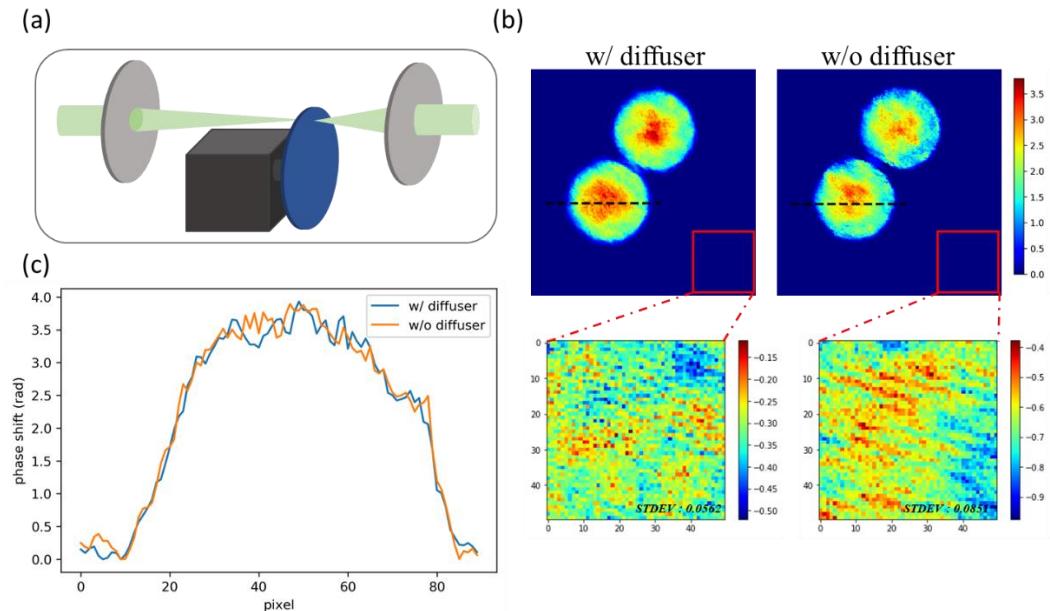


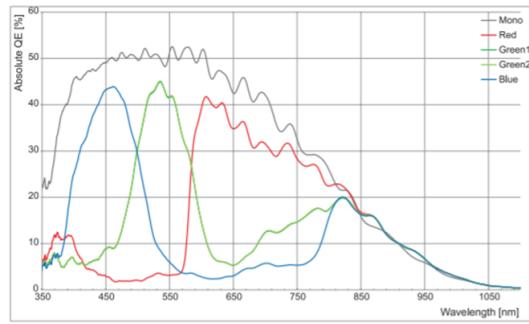
圖 31 (a)消除光斑裝置示意圖。(b)去除光斑前後相位影樣與背景比較。(c)去除光斑前後樣本相位值比較。

### 3.3.3.2 相機比較

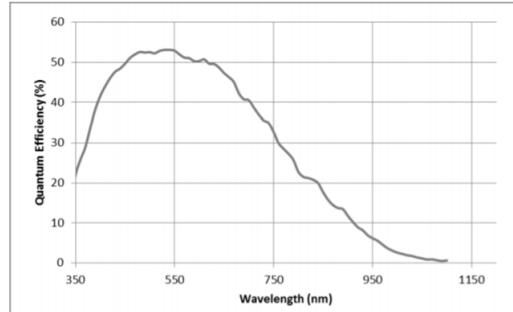
除干涉影像要清晰外擷取裝置亦要能達到良好的響應，才能完整的接收影像資訊。在感光元件中經由光電轉換給與相機信號進而成像，而在這過程中電子亦可能受到溫度影響自發響應而出現熱雜訊，此外相機在輸出相同訊號時所讀取到的電子數也會受讀取雜訊(Read noise)影響有所改變，而這些雜訊會影響相機區分最亮與最暗的差距又稱動態範圍(Dynamic range)，由此可見光電轉換效率、雜訊強度、動態範圍等都會決定相機對於擷取影像的表現。因此比較兩台不同 CMOS 相機，來分析樣本相位影像中起伏的雜訊是否由相機所造成。兩台相機分別為 VIEWORKS VC-12MX-M180 以及 POINTGREY

GZL-CL-41C6M-C，兩台相機之像素寬度皆為  $5.5\text{ }\mu\text{m}$  CMOS 工業級相機，其餘響應資訊如圖 32 所示。在拍攝相同樣本後對樣本相位進行分析，由結果可以看到不同的相機，對於相同的樣本在獲取相位後，會有不同的雜訊情形，而其中 POINTGREY 相機之相位分佈比 VIEWORKS 來的平滑。由此可以驗證出擷取裝置對於樣本相位資訊有著較高的影響。然而受限於視野大小以及擷取速度本實驗仍使用 VIEWORKS 相機進行拍攝。

	VIEWORKS VC-12MX-M180	POINTGREY GZL-CL-41C6M-C
Dynamic range	54 dB	56 dB
Read noise	x	18.8e- at zero gain



VC-12MX-M180 Quantum Efficiency



GZL-CL-41C6 Quantum Efficiency

圖 32 相機響應參數比較

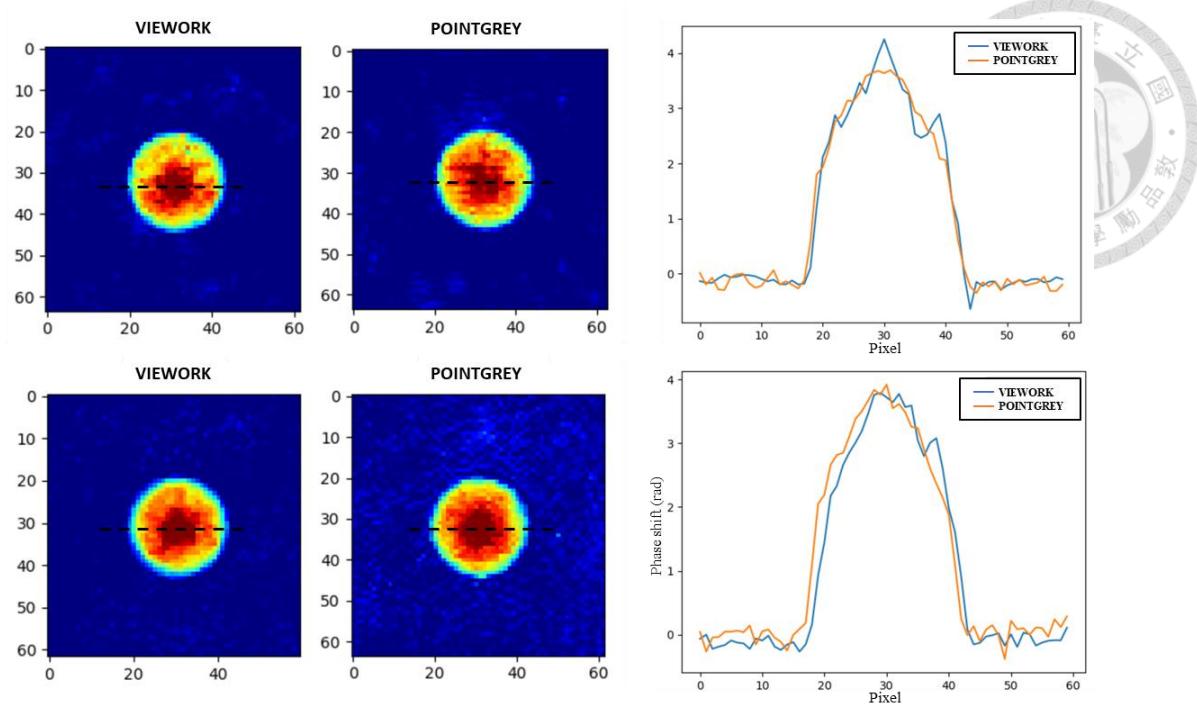


圖 33 比較相機對於相同樣本時擷取影像後雜訊情形

### 3.4 相位影像分割與追蹤

拍攝過程以每秒 180 帖連續拍攝，而在這之後便須將此連續影像中各顆血球分離進行排列以便於分析。然而擷取到之影像為干涉圖，其中樣本與背景強度差異不大，此外受環境與光學元件影響，影像中包含許雜訊及干涉條紋影響，因此傳統影像分割方式難以將特定區域取出分類。類神經網路的出現大幅提升影像處理的精確度與效率，隨著多層卷積網路(convolutional neuro network)所建立之深度學習技術的提出，使得影像中目標區域之影像特徵能夠被記憶與學習。在此基礎下不同的類神經網路也被開發於不同實用目的。在影像分割中，透過事先將不同區域進行標記之影像輸入至網路中，使其回傳單一像素對於不同標記可能的機率，在其與輸入影像之正確標記之差異，來決定網路中各個參數更新方向與數值。而在本實驗中因取得影像大小及張數較為龐大，因此為降低所需的運算速度，採用 H. Zhao 等人所提出之 image cascade network (ICNet) 來提升其各個像素所屬類別之預測速度，同時保有一定之預測正確性。與一般 Fully convolution network 將所有特徵進行同樣運算方式不同，ICNet 先將輸入影像分為低、中、高解析度，並隨著解析度降低分別改變其經過的運算層數量，在解析度較低時經過的卷積層數

量提升。如圖 34 所示其概念為，中高解析度在經過少量特徵提取後便能大致區分出分割區域位置，而最後再讓低解析度影像經過較多卷積層進行特徵提取得到較完整邊緣特徵來完善分割結果。在結合不同解析度之預測結果上，他們透過先將低解析度影像內插來進行上採樣，並進行卷積計算以合併內插像素與原始像素之特徵，最後與高解析度影像合併。而在訓練過程中不同解析度在結合時，亦會同時計算不同解析度影像與其對應解析度的標記影像之誤差，分別加上權重後合併所有誤差來進行參數更新。[60]

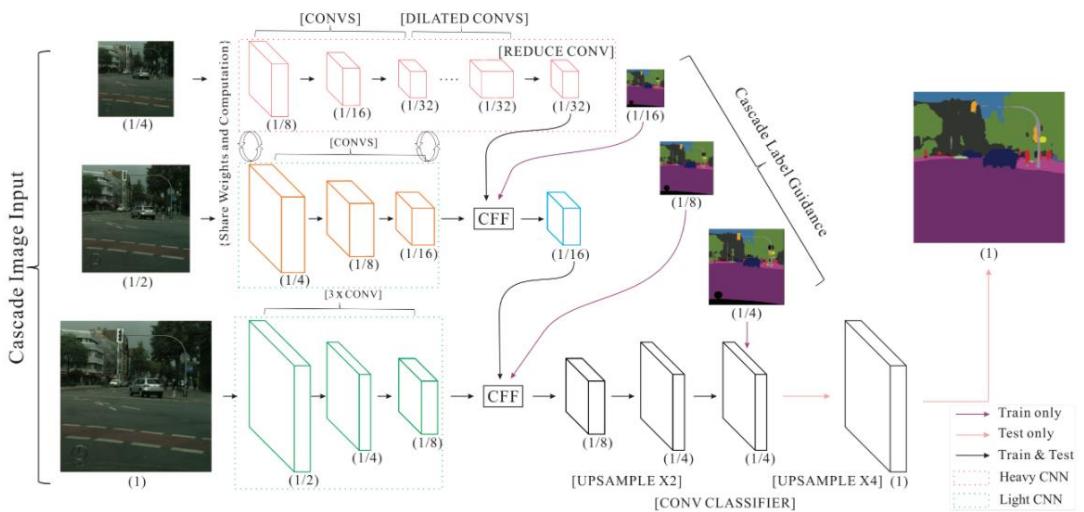


圖 34 ICnet 模型架構[60]

在本實驗中，利用此方式來進行細胞位置預測，而為提升預測能力，輸入影像會先扣除整體 2500 張影像的平均值，再利用限制對比度自適應直方圖均衡(Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization)來平衡每一區塊之強度，同時避免單一區域強度過高之方式，使細胞影像之邊緣能更加清晰。此訓練資料為事先透過人工進行整顆紅血球位置標定並標記出約 2200 張訓練影像，而每張影像僅包含兩種類別，分別為紅血球與背景區域，標記結果會在訓練前將其打散後以 9:1 分為訓練集(training set)與驗證集(validation set)，訓練過程中每次迭代隨機抽取三張進行訓練，並在調整不同解析度之損失函數權重後，以 Adam 進行梯度更新。在訓練過程中以 Mean Intersection over Union (MeanIOU) 計算模型預測能力，其計算方式為預測範圍與正確範圍之交集(area of overlap)除上聯集(area of union)。在經過約 50 個 epoch 迭代計算後，模型對於驗證集預測之 MeanIOU 達

到 0.822。而之後拍攝之結果皆以此訓練結果進行分割。在測試上此模型可達到對 1024\*1024 之輸入影像每秒 17 帧之預測能力，相比一般 Resnet18 之 Fully convolution network (FCN)僅為 5 帧的速度有顯著提升，同時保有高度預測能力。單張預測影像如附圖所示。接下來細胞追蹤的步驟，即是以右圖預測結果的二值化影像，經由 OpenCV 進行物件偵測後轉換出座標，來進行不同血球的歸類運算。

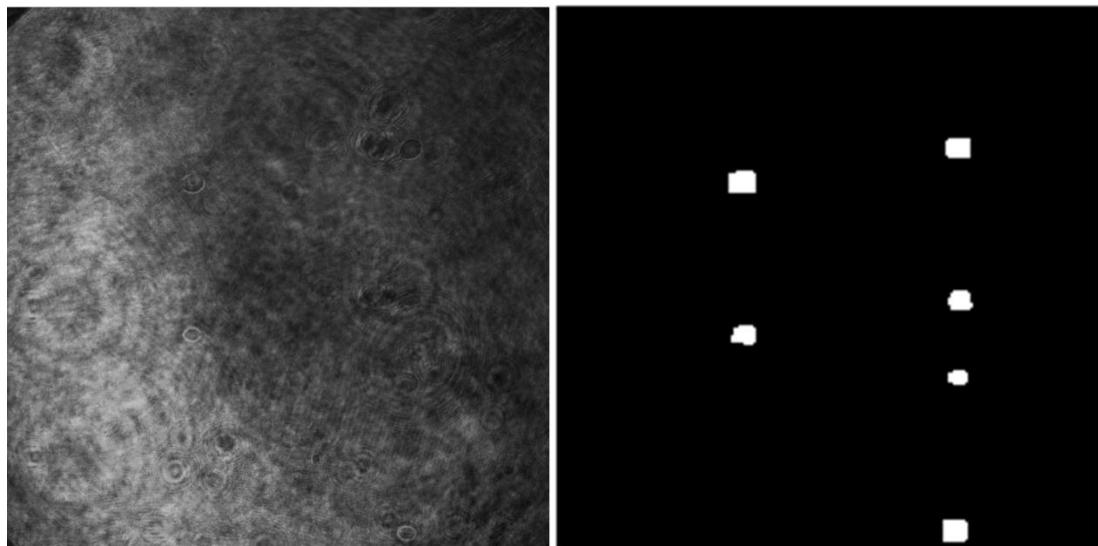


圖 35 利用 ICNet 分割影像中細胞區域的結果

在分割出各張影像中細胞位置後，利用 OpenCV 套件將模型預測出之 Binary mask 之細胞區域之中心位置，轉換為座標資訊後進行整理，來判斷每張影像中不同區域所屬之血球細胞以進行追蹤，其流程如圖 36。最後將各顆細胞在每張影像中對應位置與大小整合輸出進行下一步分析。在判斷過程中，也利用相位值與座標計算出各張影像質心，再將同顆紅血球的連續影像一一對齊便於之後計算。

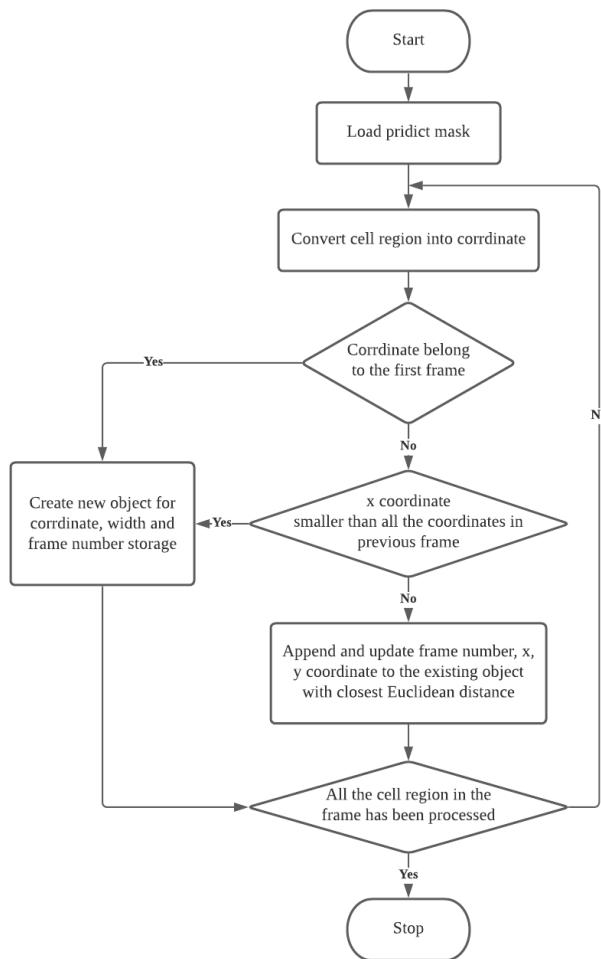


圖 36 細胞追蹤流程圖

### 3.5 數值方法重新對焦

#### 3.5.1 重新對焦原理與方法

在紅血球滾動過程中，其沿著光路的位置( $z$  軸)可能會有所差異，造成焦平面位置改變，而因定量相位顯微術利用紀錄平面波前變化方式來記錄影像，因此得以利用獲取影像回推不同平面的資訊，也就是數值重新對焦演算法。其流程與其他成像方式中自動對焦方法不同的是，並非採用機械方法進行調整，而是以數值推算一連續區間中每張影像的焦距情形，再找出其中銳利性最高之影像。

在定量相位顯微術中一般拍攝情況下，相機接收平面位置( $z_0$ )之干涉影像可由樣本

光( $I_O$ )與參考光( $I_R$ )之強度進行推算。由公式 12 可見，可以透過推算得出不同  $z$  位置的干涉影像強度( $I_H$ )並以  $x, y$  描述影像中像素位置。同公式 6 的  $O$  與  $R$  分別代表樣本光與參考光波前，且強度分別為  $I_O$  及  $I_R$ ，而  $\Delta\phi_O$  是樣本造成的相位差，加上  $\phi_O$  後代表樣本光有通過樣本之相位資訊， $\phi_R$  為參考光相位資訊[61]。

$$I_H(x, y, z_0) = I_O(x, y, z_0) + I_R(x, y, z_0) + \\ 2\sqrt{I_O(x, y, z_0)I_R(x, y, z_0)} \cos(\phi_O(x, y, z_0) + \Delta\phi_O(x, y, z_0) - \phi_R(x, y, z_0)) = \\ |O(x, y, z_0) + R(x, y, z_0)|^2 \quad (\text{式 12})$$

而不同成像位置之樣本複合波前(complex object wave)  $O(x, y, z_B)$ ，可基於 Huygens–Fresnel 原理由相機平面的複合波前，與點擴散函數(point spread function, PSF)  $g(x, y; z_B)$  經由卷積計算出[62, 63]

$$O(x, y, z_B) = O(x, y, z_0) * g(x, y, z_B) \quad (\text{式 13})$$

並將 PSF 定義為

$$g(x, y, z_B) = \frac{z_B}{i\lambda(x^2+y^2+z_B^2)} \exp\left(\frac{i2\pi}{\lambda}\sqrt{x^2+y^2+z_B^2}\right) \quad (\text{式 14})$$

並令  $\lambda$  為波長，因此在經過二維傅立葉轉換後，距離相機平面  $z_B$  的複合波前  $O(x, y; z_B)$  就可經由原始波前乘上一個轉移函數  $G(x, y; z_B)$  求得。

$$O(x, y, z_B) = \text{FT}^{-1}[\text{FT}[O(x, y, z_0)]G(x, y, z_B)] \quad (\text{式 15})$$

$$G(x, y, z_B) = \exp(i2\pi z_B \sqrt{(1/\lambda)^2 - u^2 - v^2}) \quad (\text{式 16})$$

上式為利用 Fresnel 假設中的 angular spectrum method 推導而得，其中  $u, v$  為經由二維傅立葉轉換後空間頻率的座標，而函數  $G$  可以在給定不同數值( $z_B$ )，來求得距離相機平面不同位置的相應波前資訊。而在推算空間頻率座標時，將該影像之取樣頻率定為一像素，以計算出對應大小之空間座標系。

與機械方法相似，在數值方法上仍須透過給定一區間，並一一計算後比較的方式，來找出最佳焦聚位置。在本實驗中使用 Tamura 係數，根據影像對比程度計算影像紋理資訊的方式，進行判斷何者為最佳焦距距離。方式為計算上述推算出的波前相位影像  $O(x, y, z_B)$  的灰度值  $|O|^2$  的標準差( $\sigma(|O|^2)$ )及其平均值( $\langle |O|^2 \rangle$ )，由此方式計算出最大值



則判斷為最佳焦距位置。

$$\text{Tamura Coefficient} = \sqrt{\frac{\sigma(0_\phi)}{\langle 0_\phi \rangle}} \quad (\text{式 17})$$

### 3.5.2 重新對焦結果

圖 37 即為數值對焦計算過程，圖中橫軸 0 的位置為拍攝到的原始影像，並以其為中心計算出前後連續區間的 Tamura 係數後，取出最大值並將其視為最佳焦距位置，如圖 37 中紅點所示。比較右圖與左圖，可以看到原始影像在計算之後，影像邊緣銳利度提升整體也較為清晰。

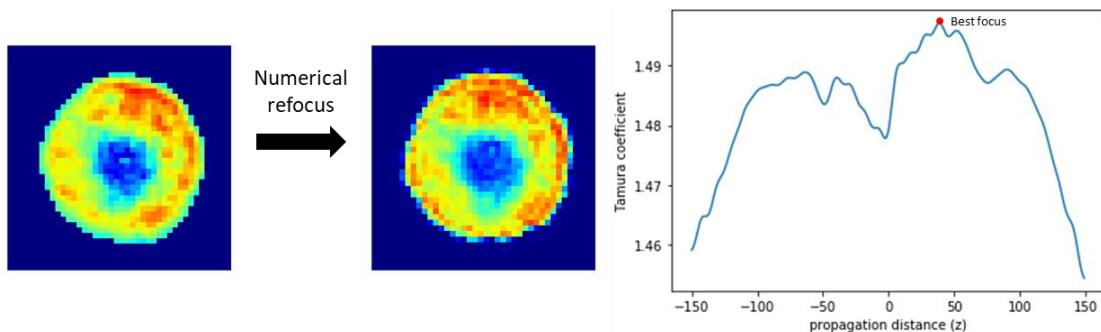


圖 37 左圖為數值對焦前後影像結果，右圖為連續區間 Tamura 係數分佈情形

## 3.6 轉動與滾動角度估算

### 3.6.1 角度估算方法

透過擷取血球在流道內滾動過程，便可將其進行三維重建，但在重建過程中需加入角度資訊，以正確對應出該投影的三維空間位置。3.2.1 章中提到血球在流道內運動時，除滾動外亦會受到 xy 平面流速梯度影響隨之轉動。然而在其轉動過程之中，血球內部物質也在進行流動，因此僅能以形狀估計當下轉動角度，無法提供正確內部物質分布資訊。由此，在後續重建過程中，便將此以 Z 軸為軸轉動時血球內部變化直接忽略，僅計算血球輪廓轉動角度，並假定重建之結果為一平均分布後之狀態。

在滾動角度計算上紅血球作為內部無胞器且由血紅素組成的幾乎均質之細胞，折射率比血球外的介質折射率高，所以可以將其視為一生物透鏡(biolens)。因此便可套用

計算光學透鏡造成像差之相同方式，來描述滾動中的紅血球其投影角度對應的參數，進而回推出紅血球的滾動角度。

因此在流程上，所有擷取影像皆會先利用橢圓擬合判定轉動角度，並統一連續影像長軸方向，由此減少所需多項式，並增加後續擬合正確性。之後利用澤爾尼克多項式進行滾動角度計算。3.6.1.1 與 3.6.1.2 節分別對這兩種角度計算過程進行描述。

### 3.6.1.1 Z 軸轉動角度校正

在處理上會利用橢圓擬合先計算出每張投影在投影平面之轉動角度。橢圓擬合計算過程會隨機從邊緣取點並做切線，之後找出其中兩個切線的交點，再找出通過兩交點之切線的角平分線，而兩條角平分線相交之處即為估算之橢圓圓心，並推算出一組橢圓公式。之後不斷重複該隨機找點過程直到相同的橢圓出現次數達到閾值。而由最終橢圓便可估算血球長短軸以及轉動角度 $\gamma$ 。

在對每張投影影像進行橢圓擬合後，將其統一轉動至與投影平面的 y 軸平行之狀態(圖 38)，再進行後續計算。在決定各張影像的轉動角度 $\gamma$ 時，為確保橢圓擬合結果之可信度，優先計算橢圓擬合影像中，長短軸差異大於五像素之影像的橢圓轉動角度，再以此去平滑其餘投影影像擬合出的角度，在這裡所指的長短軸差異較大之影像會對應到滾動角度較大之影像。因為血球在流動過程中，雖然轉動方向及大小為隨機，但變化必為平滑有序狀態，因此同樣須確定擬合出來的角度隨時間為一平滑結果。最後再根據此角度將所有紅血球投影影像轉動至同一方向(圖 38)。

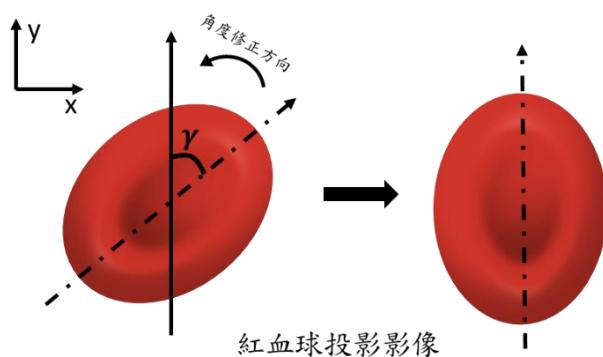


圖 38 血球投影影像在橢圓擬合後的角度修正示意圖

### 3.6.1.2 Zernike fitting

澤爾尼克多項式作為一無限多項的多項式集合，可以用來描述一單位圓中的原始影像，在經過光學系統後的強度與性質表現。其中的每一項(mode)，都可以用來表示一個理想的平面波前，在經過系統後產生之相差表現(圖 39)。此外，每個特定的 mode 都有其單位相量，且於其他 mode 相互正交，因此便可透過相加來描述不同相差在系統中相互疊加之情形，而每個 mode ( $Z_k$ )的權重或稱作係數( $C_k$ )便可表示該像差占整體波前( $O$ )的比例，並以此將目標波前進行拆解。其公式

$$O(\rho, \theta) = \sum_{k=0} C_k Z_k(\rho, \theta) \quad (\text{式 18})$$

表示在以  $\rho, \theta$  描述的極座標單位圓中，不同波前可以用一系列不同之多項式乘上個別係數來加總組合進行描述。因此由此式便可推算出不同波前對應的係數組合

$$C_k = \iint O(\rho, \theta) Z_k(\rho, \theta) \rho d\rho d\theta \quad (\text{式 19})$$

並依此區分比較擬合之結果，其中  $O$  為量測到之未知波前，並在計算前將笛卡爾坐標系轉換為極座標表示，轉換上以影像左上角為極點分別由座標計算出距離  $\rho$  及利用反正切計算出夾角  $\theta$ 。

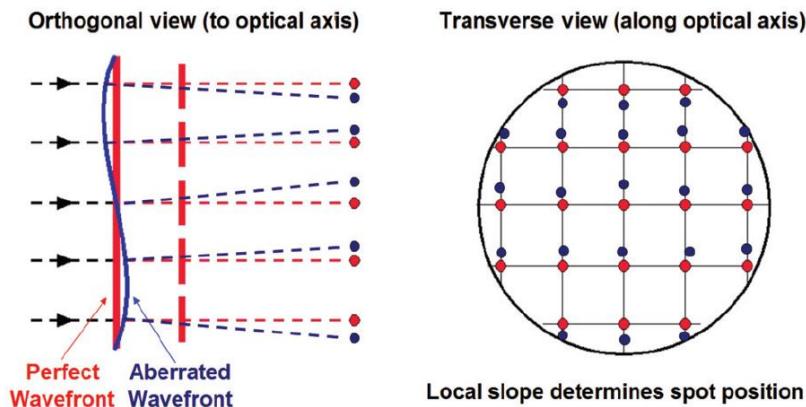


圖 39 澤爾尼克多項式描述情形，紅線為理想平面波前每條代表再細分的波前投影方向，藍色為細分的波前經像差改變後的投影位置

在多個澤爾尼克多項式中選用其中數種與血球投影分布相似之 mode，來共同描述一擷取影像之角度，其極座標表示如表 1。多項式描述為一方形內切圓的數值分佈，因此在計算上要先將上一步所求出的相位影像，經過邊緣偵測後去除背景，使細胞遮罩的邊緣盡可能與相位影像邊緣重合。在這之後將 90 度分布定為一區間，因此第一步先分別定義出平行與垂直於投影平面之投影影像編號，其中利用第五(Defocus)與第十三項(Primary Spherical Aberration)多項式來描述水平狀態，而第十二項(Horizontal Secondary Astigmatism)則用來描述垂直狀態(圖 40)。以上述計算方式分別找出兩者局部最大值之影像後，亦即這些影像分別對應水平狀態(0 度)與垂直狀態(90 度)，便可將每個紅血球的所有連續影像劃分為多個 0 到 90 度區間，在各區內之影像則利用第四項(Horizontal Primary Astigmatism)及第五項之係數相加進行比較與排序。

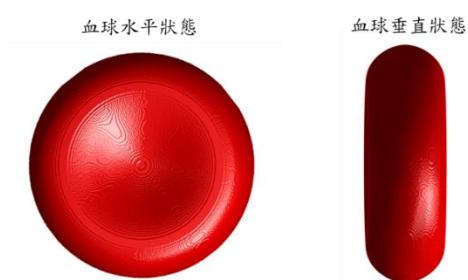


圖 40 紅血球水平與垂直狀態

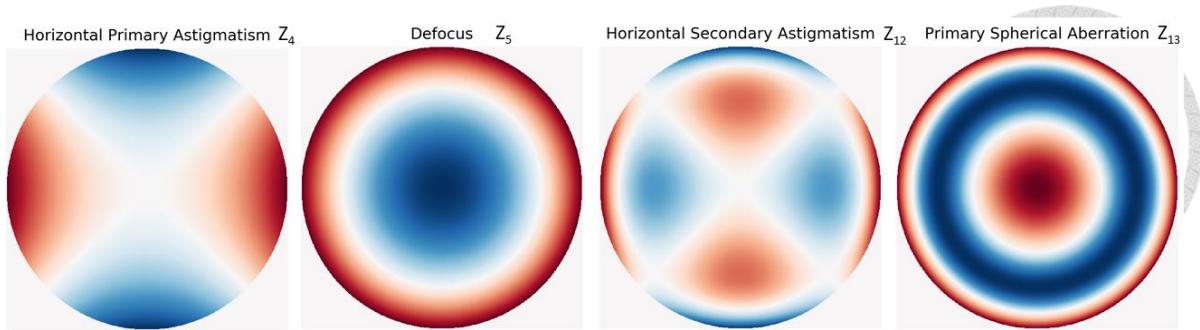


圖 41 不同項多項式之個別像差分佈情形，由左至右為第四、第五、第十二、第十三項

表 1 所用次項分佈公式[64]

Z <sub>n</sub> (ρ, θ)	
Z <sub>4</sub>	$\sqrt{6}\rho^2 \cos(2\theta)$
Z <sub>5</sub>	$\sqrt{3}(2\rho^2 - 1)$
Z <sub>12</sub>	$\sqrt{10}(4\rho^4 - 3\rho^2)\cos(2\theta)$
Z <sub>13</sub>	$\sqrt{5}(6\rho^4 - 6\rho^2 + 1)$

### 3.6.1.3 角度對應

在 3.6.1.2 經過擬合計算出不同組合之多項式係數後，便可將其轉換為角度資訊。藉由形態上的性質，因為與血球垂直型態分布相似因此再將其組合並實驗後，將第十二項(C<sub>12</sub>)係數之局部最大值取出定義為 90 度，而與水平型態相似的第五(C<sub>5</sub>)及第十三項之倒數(1/C<sub>13</sub>)總和的局部最大值定義為 0 度(圖 40、圖 41)。從先前文獻中[7]發現，在模擬之三維雙凹圓盤狀圖形滾動及投影下，分別以第四或第五項澤爾尼克多項試計算後之係數，經由標準化後會與  $\cos^2\theta$  之連續曲線呈正比(圖 42)，而為提升精確度因此實驗中兩個多項式計算結果皆採納，然而在實際計算上因為紅血球並非完美雙凹圓盤狀且在流道運動過程中也被非連續滾動狀態，因此需額外判斷各幀所對應的角度。由此實驗時假定標準化後的係數與  $\cos^2\theta$  曲線相等，因此在計算出各區間之單張影像 C<sub>4</sub> 及 C<sub>5</sub> 總和後，並去除區間內 C<sub>4</sub> 加 C<sub>5</sub> 值大於區間尾端影像其對應 C<sub>4</sub> 加 C<sub>5</sub> 值，以及小於區間頭端 C<sub>4</sub> 加 C<sub>5</sub> 值之影像，經過標準化便可依  $\cos^{-1}(\sqrt{C_4 + C_5})$  回推出其對應角度。在計算出

各區間角度後，便建立在紅血球為連續向前滾動之條件下，將各區間連接為 0~360 分布並不斷重複至所有區間分配完，實際計算過程如 3.6.2.2 所呈現。

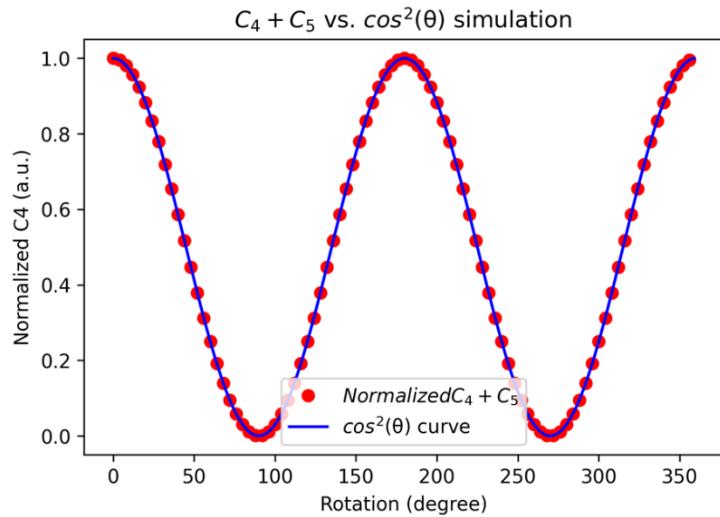
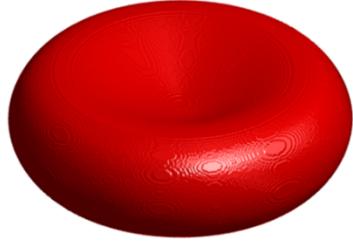


圖 42 滾動理想雙凹圓盤並以多項式第四項擬合結果標準化後與  $\cos^2 \theta$  曲線之作圖結果

### 3.6.2 角度估算結果

本節利用上述方式在影像分析的過程中利用了模擬以及校正的方式，來盡可能的還原影像旋轉前後的情形及其所對應的旋轉的角度，流程先計算 z 軸為中心轉動時的角度再進行 y 軸為中心的滾動角度。

#### 3.6.2.1 轉動角度

紅血球僅以 z 軸為中心轉動時其投影面積並不會改變，因此利用橢圓擬合的方式取得投影影像的角度，並將其進行回復以便於後續的擬合計算。其結果如下圖所示。左邊圖片為回復之原始影像，經過擬合取得角度後可將其轉動為右圖，便可使所有影像皆與投影影像 y 軸平行便於計算。

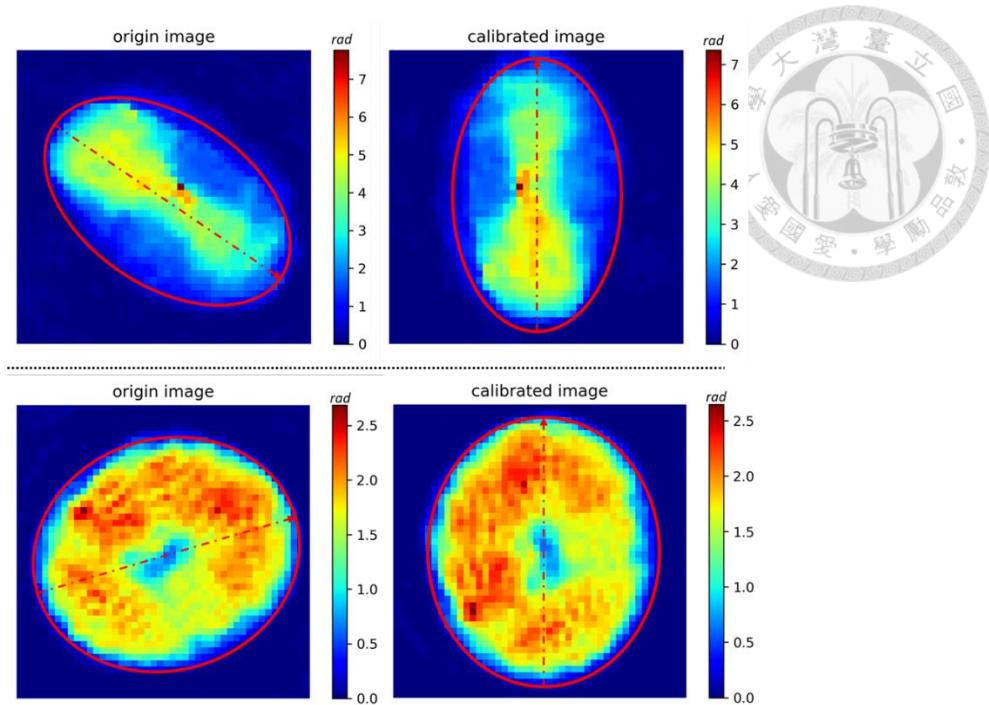


圖 43 以橢圓擬合進行角度校正示意圖，左邊為原始影像，右邊為角度轉動後結果

### 3.6.2.2 滾動角度

而以 y 軸為中心進行滾動的情形就會產生投影形狀的改變，因此在本實驗中利用模擬的方式來大致推論出，被視為生物透鏡的紅血球在當下的滾動角度。在 3.6.1.3 提到，計算方式為將一連續影像進行分段再分別對應回角度，其流程如下圖所示，利用  $C_{12}$  可以計算出呈九十度之影像(圖 44 (a))，並以紅點表示，再利用  $C_5$  及  $1/C_{13}$  可以計算出呈現 0 度的影像並以橘點表示(圖 44 (b))。之後計算第四及第五項(圖 44 (c))，並根據剛剛所得的 90 度及 0 度位置，將連續影像拆分為不同區間(圖 44(d))，並刪除各區間中  $C_4$  加  $C_5$  值超出標記位置之影像，如圖 44 (d)中黑點所示。最後將各區間係數合分別標準化至 0 到 1 分佈後，相對應到  $\cos^2 \theta$  曲線上以回推出角度。其結果與對應角度之影像如圖 45 所示。

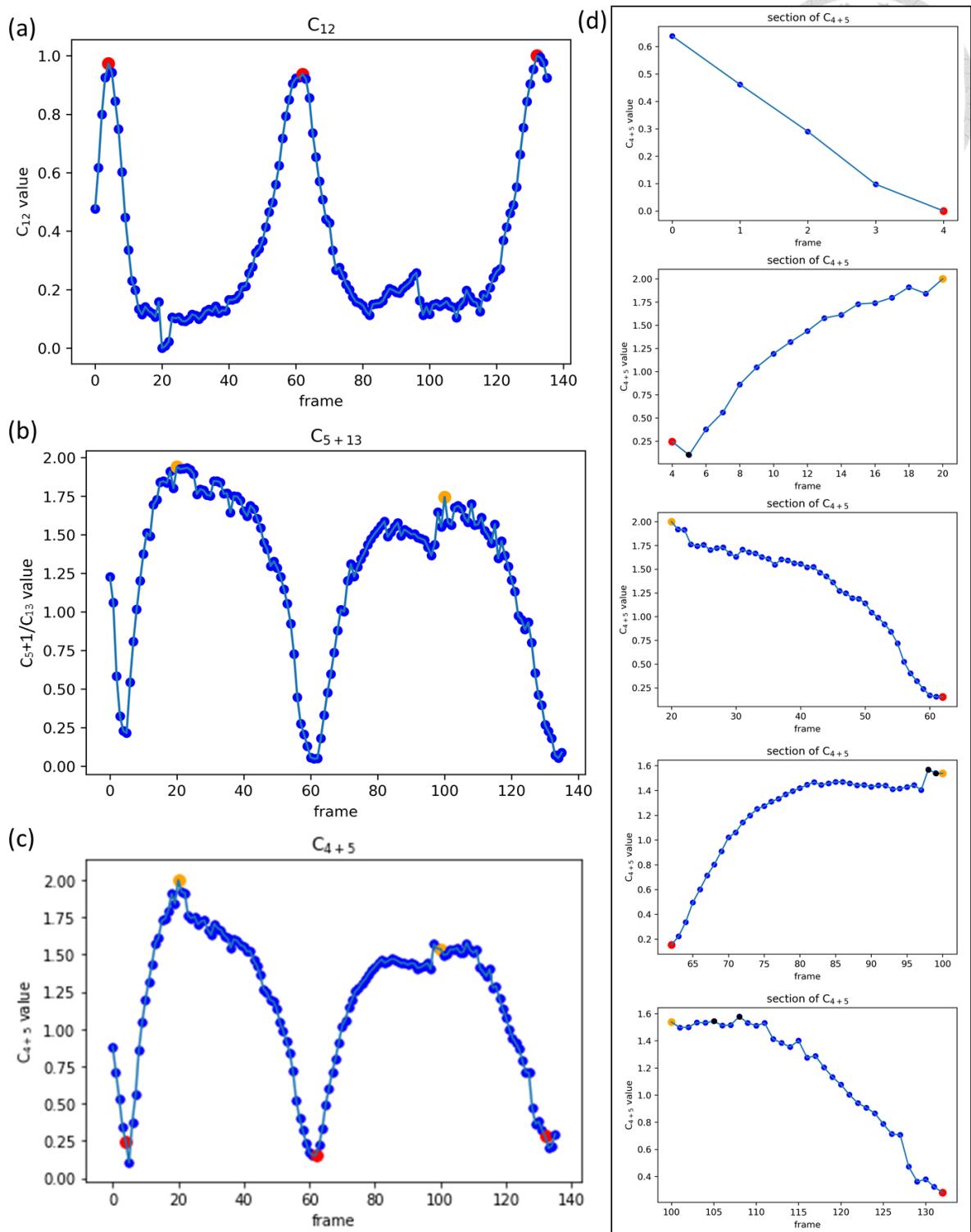


圖 44 (a)判定 90 度依據，紅點為區域最大值該影像標記為 90 度。(b)判定為 0 度，橘點為區域最大值該影像標記為 0 度。(c)作為判定角度的依據，並依圖(a)紅點與圖(b)橘點作為頭尾拆分出四個 90 度分佈區間。(d)由 c 所拆分結果，圖中黑點因  $C_{4+5}$  值不在頭尾區間中視為刪除項

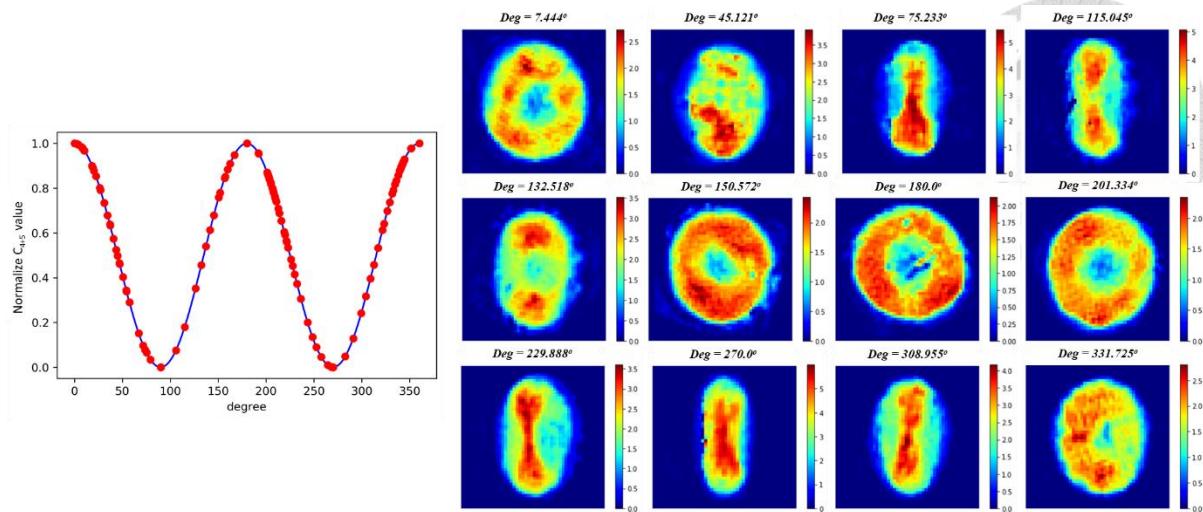


圖 45 左圖為上圖所對應角度結果，右圖為隨機挑選的相位影像與其所估算出的角度

### 3.7 三維重建與角度缺失問題修正

#### 3.7.1 原理與方法

##### 3.7.1.1 傅立葉繞射理論

在 X 光、電腦斷層等技術中，透過拍攝不同角度之影像可以建立出拍攝樣本之三維資訊，而此技術亦稱為斷層掃描(Tomography)。而在計算上多使用 Filter Back Projection 進行重建。然而在拍攝細胞等級之影像時，因樣本較小所以當平行光束通過樣本的時候，些微的折射率改變便會導致光源產生繞射，因此在重建過程中需要考慮光源經過樣本所產生之繞射資訊來還原正確的三維形態。為解決此問題，在本實驗中利用傅立葉繞射理論(Diffraction Fourier Theorem)結合 Rytov 假設來進行重建。傅立葉繞射理論基於傅立葉切片理論(Fourier Slice Theorem)基礎，可將投影資訊經傅立葉轉換後，與原始影像之傅立葉空間進行連結[65]。

在拍攝時光經過樣本產生之繞射結果，會以一複數波來進行描述，而此複數波，實部( $\Phi(r)$ )為折射率用以表示光的折射，虛部( $a(r)$ )則為衰減的情形。不過為簡化計算，根據傅立葉繞射理論可先假設樣本為弱散射體，且其散射場強度遠小於入射場。在 Rytov 假設中將經過樣本後的複數場，描述為入射光  $u_0(r)$  與散射光  $u_s(r)$  的疊加，在實際拍攝上這兩組光源之疊加與否，也分別可對應為樣本光( $u_0(r) + u_s(r)$ )與參考光( $u_0(r)$ )，而其以



complex phases ( $\varphi$ )之描述關係如下式。

$$u(r) = \exp(\varphi(r)) = \exp(i\Phi(r) + \ln(a(r))) \quad (\text{式 20})$$

$$u_0(r) = \exp(\varphi_0(r)) = \exp(i\Phi_0(r) + \ln(a_0(r))) \quad (\text{式 21})$$

其中  $u(r), \varphi(r), \Phi(r), a(r)$  為樣本光資訊， $u_0(r), \varphi_0(r), \Phi_0(r), a_0(r)$  為參考光資訊，由上式可回推 Rylov 假設中之樣本散射場複數形態( $\varphi_R(r)$ )如下式所述

$$\varphi_R(r) = \ln(\exp(\varphi(r) - \varphi_0(r))) = \ln\left(\frac{a(r)}{a_0(r)}\right) + i(\Phi(r) - \Phi_0(r)) \quad (\text{式 22})$$

傅立葉繞射理論中三維影像之頻域，為不同角度之二維投影影像之頻域的組合。與傅立葉切片理論不同的是，在本實驗中因樣本內折射率變化的尺度較小，此時若忽略散射場資訊將會影響重建之解析度。細胞投影影像之頻域應視為一球形，然而受限於物鏡數值孔徑(Numerical aperture)物鏡之收光角度有限，因此接收區域近似於半球形，此時在不同投影角度組合下，原始物體之三維頻域會呈現球形分布又稱為 Ewald Sphere。在二維呈現上便如圖 46 所示，當二維影像投影時，考慮繞射的前提下每個投影頻域會是弧形範圍(圖(b))，與圖(a)切片理論中投影仍是線段的結果不同。而當樣本或是光源在轉動時，投影線段的一維頻率也會一起轉動，所以當樣本轉動一圈，在二維頻率空間也會被轉動一圈的一維頻率填滿，此過程在三維空間的示意圖可見圖 47(a)。

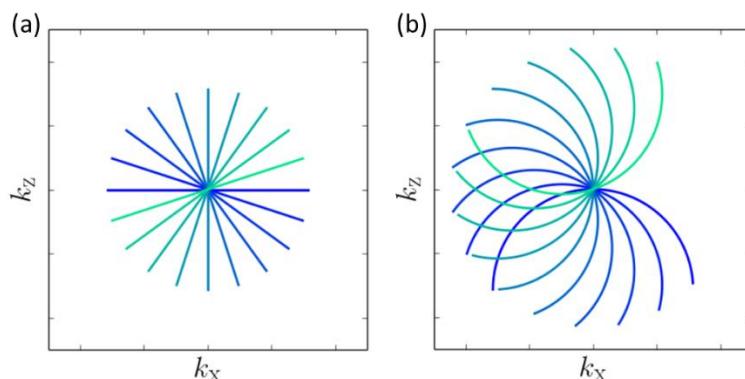


圖 46 傅立葉切片理論與傅立葉繞射理論三維分佈差異。(a)傅立葉切片理論。(b)傅立葉繞射理論[65]

在上述假設與理論中，Rylov 將三維樣本之頻域空間  $O$  與其假設之複數場相對應。描述式為

$$O(F_x \cdot \cos\theta - F_z \cdot \sin\theta, F_y, F_x \cdot \sin\theta + F_z \cdot \cos\theta) = -f_z * 2\pi * \varphi_R(f_x, f_y) \quad (\text{式 23})$$

其中座標對應如下：

$$\begin{cases} f_x = F_x; f_y = F_y \\ f_z = \sqrt{\left(\frac{n_{medium}}{\lambda}\right)^2 - f_x^2 - f_y^2} \\ F_z = f_z - \frac{n_{medium}}{\lambda} \end{cases} \quad (\text{式 24})$$

上式中  $f_x, f_y, f_z$  為二維投影影像空間頻率座標， $n_{medium}/\lambda$  為 Ewald Sphere 之半徑， $f_z$  的計算目的為將投影影像之頻域轉換為三維分布並限制在 Ewald Sphere 空間中， $F_x, F_y, F_z$  則是樣本三維空間頻率座標。在此式計算前由於相位回復之過程已扣除背景資訊，因此  $\varphi_R$  可直接由相位回復所得之複數影像進行運算。

在將投影影像轉換為實際接收的半球形頻域分佈後，最後則是將投影影像與樣本空間頻率座標相對應。上述提及在傅立葉投影理論中，二維投影可以對應到三維空間中的一個平面或區域，因此可以利用每張影像所求得之角度資訊，來將半球狀頻率分布旋轉後對應。而由於以 Z 軸為中心之旋轉可以事先利用橢圓擬合將所有影像轉動之角度統一，因此在重建時僅需考慮血球以 y 軸為中心進行滾動時之角度對應。由此便可將上述所求得之投影頻域  $F_x, F_y, F_z$  經三維旋轉矩陣運算後，對應到三維空間中之特定位置 X、Y、Z，並將最後重建之三維結果以 MATLAB isosurface 函數進行繪製。

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos\theta & 0 & -\sin\theta \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin\theta & 0 & \cos\theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} F_x \\ F_y \\ F_z \end{bmatrix} \quad (\text{式 25})$$

### 3.7.1.2 角度缺失問題(missing cone problem)

在 3.4.5 重建過程中，提到可以透過二維投影像重建出樣本三維資訊。然而在此實驗中由於血球在流道內滾動時，角度分佈無法均勻，因此在重建計算上那些缺失的角度會在傅立葉轉換的過程中被內插。除此之外物鏡在接受散射光時，會受限於其數值孔徑大小而無法接受完整的散射資訊(圖 47 (a))，以至於最後對應到 Ewald sphere 上後，並非一個完整的球形(圖 47 (b))，而是呈現一去除蘋果果核之形狀(missing apple core) (圖

47 (c))[66]。而在此狀態下進行反傳立葉計算後所得之三維結果便會包含許多誤差及雜訊，因此便須透過影像處理方式來盡可能地消除這些雜訊將三維影像分佈盡可能平滑

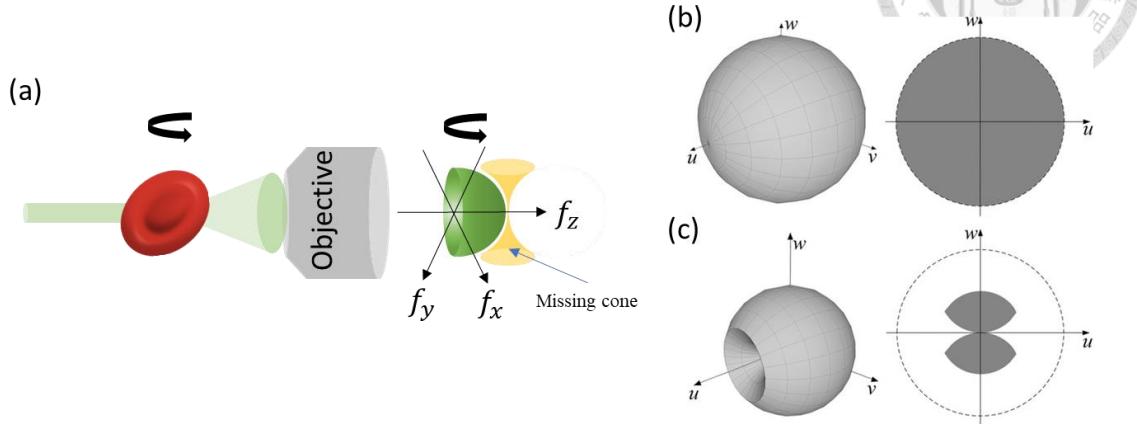


圖 47 (a)Missing cone problem 產生示意圖。 (b)理想三維空間頻率分佈[66]。 (c)實際三維重建空間頻率分佈情形，其中  $u, v, w$  為此三維空間座標軸[66]。

利用數值方法消去 Missing angle 問題上共使用三種方式，分別為 Total Variation minimization (TVmin)、正則限制條件(positive constraint)以及空間限制條件(spatial constraint)。在計算上先利用 TVmin 對三維影像進行初步平滑，再利用大津(Otsu)閾值將三維影像轉換為二值化分佈，並通過形態學膨脹(morphological dilation)計算以確保血球之三維資訊皆分佈在此區域內，之後便在此三維遮罩內，進行正則限制條件以及 TVmin 的疊代運算，最終輸出平滑之三維影像。

總變差(Total Variation)是用來描述影像在強度改變上是否平滑，當影像中包含許多雜訊與誤差時其總變差值會上升，因此 TVmin 便是利用迭代方式，使前後兩次總變差的差異( $\nabla TV$ )收斂至最小值，而這樣的計算方式可以讓影像在保留邊緣資訊下，降低其內部雜訊影響。總變差計算  $l_1$ -norm 的數值，在二維上計算方式為

$$TV(f) := \sqrt{|f(m+1, n) - f(m, n)|^2 + |f(m, n+1) - f(m, n)|^2} \quad (\text{式 26})$$

其中  $f$  為輸入影像並以  $m, n$  表示像素座標，由此便可進行迭代以達到設定之最小總變差變化閾值，其流程為[67]：

1. 計算當前影像( $f_k$ )之總變差值，並計算其與上一次( $f_{k-1}$ )迭代之差異( $\nabla TV$ )



2. 以一給定常數 $\lambda$ 更新當前影像每個像素值。

$$f_{k+1}(m, n) = f_k(m, n) - \lambda \nabla TV|_{f_k}(m, n) \quad (\text{式 27})$$

3. 將超出 Mask 之像素移除

4. 進行正則限制條件。其中 $n^*(x, y, z)$ 為每次迭代後結果，並取其實部。

$$\operatorname{Re}\{n^*(x, y, z)\} \geq n_{medium} \quad (\text{式 28})$$

5. 重複上述步驟至 $\nabla TV < \epsilon$

為降低運算量本實驗設定總迭代次數為 60 次，前 10 次迭代用以計算二值化遮罩，剩下 50 次則用以降低三維影像之雜訊。由於不同的 $\lambda$ 會決定其收斂速度。而當 $\lambda$ 上升收斂速度會加快，因此在計算中前十次 $\lambda$ 為 0.1，剩餘則設定 $\lambda$ 為 0.008。並以 GPU 加速運算。

### 3.7.2 計算結果

#### 3.7.2.1 三維重建結果

結合 3.6.2 結果可以將計算出的各角度投影影像進行三維重建，在計算之前為避免背景及影像中的雜訊在經過傅立葉轉換後因為頻率較高，對於重建結果影響較大，因此所有影像都會先經過中值濾波，並將背景數值統一。在此決定背景區域的方式亦是利用大津閾值進行計算。圖 48(b)為經影像處理後的重建結果，從三維頻率空間切面(圖 48(a))，可以看到三維空間並非完整球型，而是受限於物鏡數值孔徑大小有所缺失，另外中間不連續區域則為角度缺失的影像此分布與理論型態相近(圖 47(c))，在重建後的紅血球影像如圖 48(b)分為由上至下的切面影像以及利三維型模型行表示。

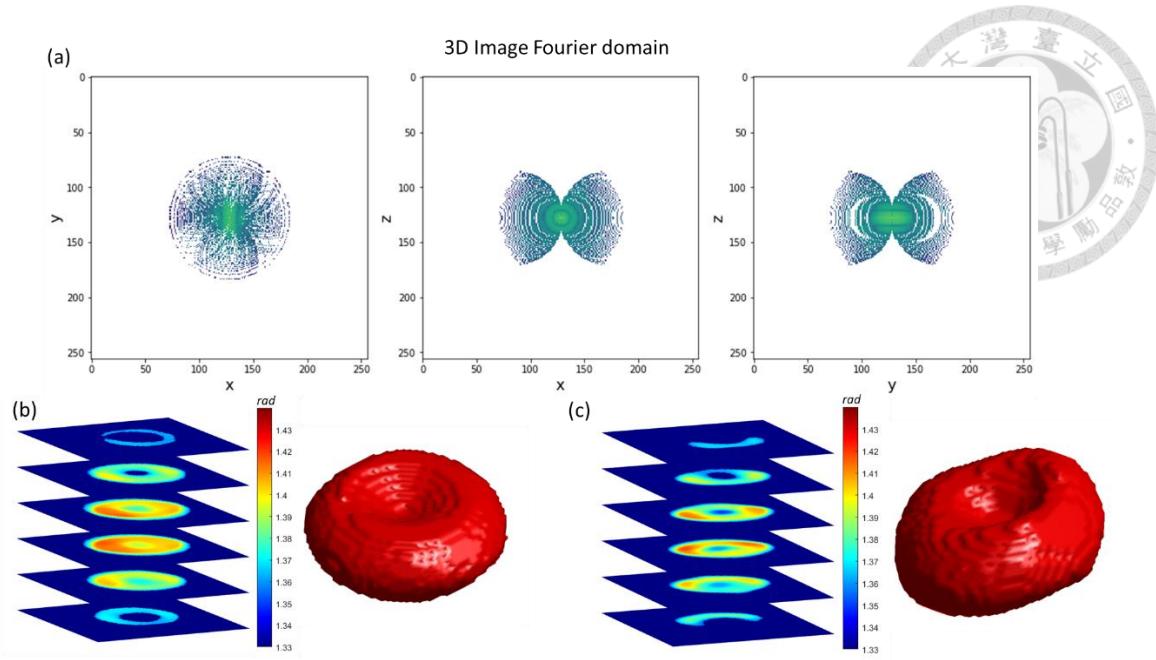


圖 48 (a)重建影像三維頻域不同切面的分佈。(b)(c)重建出的三維影像左邊為延一軸項的不同切面，右邊為三維型態。

### 3.7.2.2 Missing cone problem 平滑結果

由圖 48(a)可以看到，Ewald Sphere 中間有一果核狀缺失，因此利用平滑化算法及限制條件的方式，來去除在反傳立葉計算時，因為這些區域的缺失而造成之誤差與雜訊。圖 49 中上方即為直接將三維頻率反傳立葉計算後三維影像不同切面的結果，下方則是加上 TVmin 及正則限制條件以及空間限制條件等方法後的修正結果之切面。可以看到將三維頻率直接進行運算後，背景出現許多雜訊且樣本內部明顯分佈不連續，而在經過 TVmin 及不同限制條件計算後，血球內分佈變得相對平滑且雙凹圓盤輪廓也較為清晰。

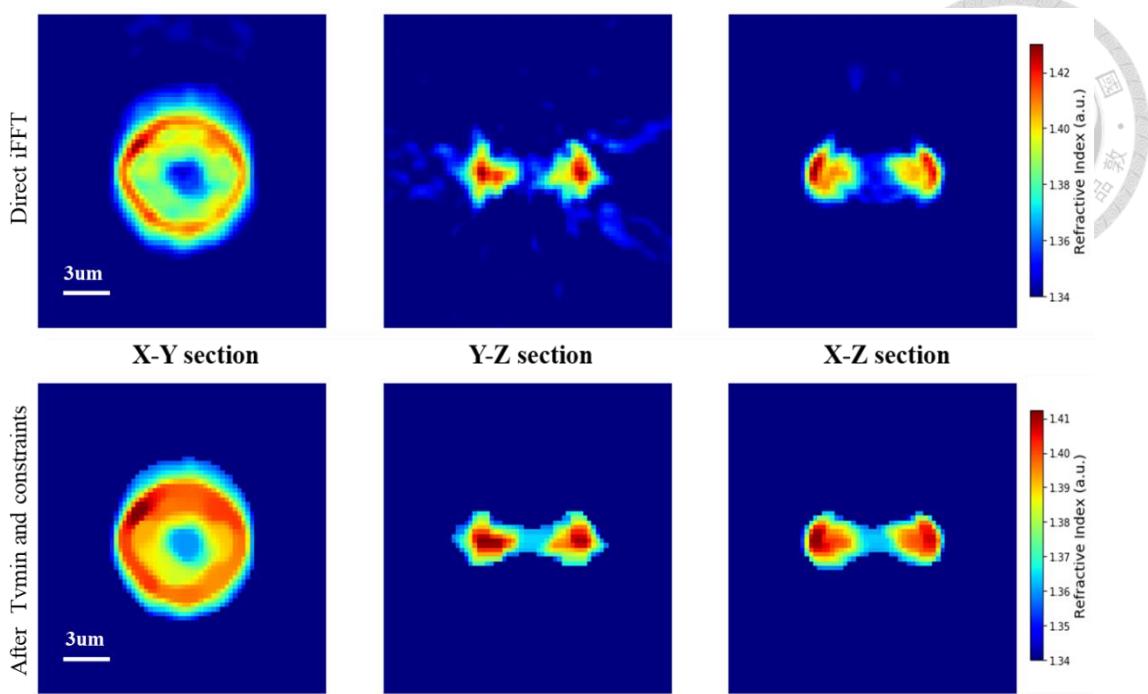


圖 49 去除角度缺失算法前後的重建切面結果，上圖為直接進行反傳立葉計算結果，下圖為修正後結果。

### 3.8 影像二值化與形態處理

在第三章的諸多分析過程中，由於背景雜訊的存在會影響結果的計算，例如在數值重新對焦上，雜訊會在計算後被放大影響整體銳利度，或是在重建過程中背景雜訊會影響樣本本身的重建結果。因此在這些步驟前，會先將影像轉變為二值化，經形態處理後僅保留原先影像中樣本區域。

二值化的計算方法即找出影像中的一個閾值，並將大於閾值的灰階值標記為 1 作為前景其餘為 0 並視為背景，在本實驗中皆利用大津閾值方法來計算，其透過遍歷的方式得出一灰階分佈中，每個灰階值所對應到的類間變異數，再由此判斷出最佳閾值，而在實際情況下因為焦距無法完美，使邊緣失焦區域較為模糊可能會被排除在閾值之外，因此還會額外乘上一權重來降低計算出的閾值，在本實驗中在權重設定為 0.3。

在經過二值化後的影像仍然可能包含數值較大的雜訊，此時便可利用型態處理將雜

訊移除或填補二值化影像的噪點或空缺。在計算上會利用膨脹(dilation)及侵蝕(erosion)的先後組合形成閉運算或開運算，來分別移除前景與背景的雜訊，此外透過改變 kernel 大小即可決定消去和填補的程度。



### 3.9 誤差分析

#### 3.9.1 角度估算誤差

不同於其他架構利用掃描鏡來拍攝三維影像的方法，本系統利用紅血球滾動時的投影影像來估算角度。與前述相比，實驗所得的角度分布會相對較不均勻且估算的角度也會與實際有些許誤差，但此方法可以大幅減少操作過程，以及增加用掃描方法所無法取得的角度資訊。而為了解在本實驗中角度估計上的誤差是否會影響到最後重建的結果，本實驗與先前文獻所提到的角度估算方法相互比較，來了解當前角度估算方式是否能有較可信的結果。在文獻[7]中將 Zernike 多項式擬合後第四項係數( $C_4$ )的結果集合，進行標準化後直接對應到數值同樣分布在 0 到 1 間的  $\cos^2 \theta$  曲線來判斷各幀影像的角度，但在實際情況下所擷取到的影像會受流體、焦距位置、紅血球內物質分布流動所影響，使得最後得到  $C_4$  值在相同角度時有可能會不一樣，因此若直接將所有影像的擬合值進行標準化便會造成誤判，圖 50 即呈現了此結果與角度對應時所造成的問題。在該序列中出現兩次水平狀態紅血球，但以文獻方法標準化後僅有一張影像數值為 1，而在本研究的方法因為先取出水平狀態影像，再將角度分成不同區間進行運算，確保不同區間的最大與最小值皆能對應到相同角度，因此得以達到更精確的標準化結果。此外相比於兩種方法所判定之垂直與水平狀態，如圖 50 的兩個序列中以特定顏色所標註的點，可以看到文獻方法所判定之影像在肉眼上也不如本研究方法來的接近目標。

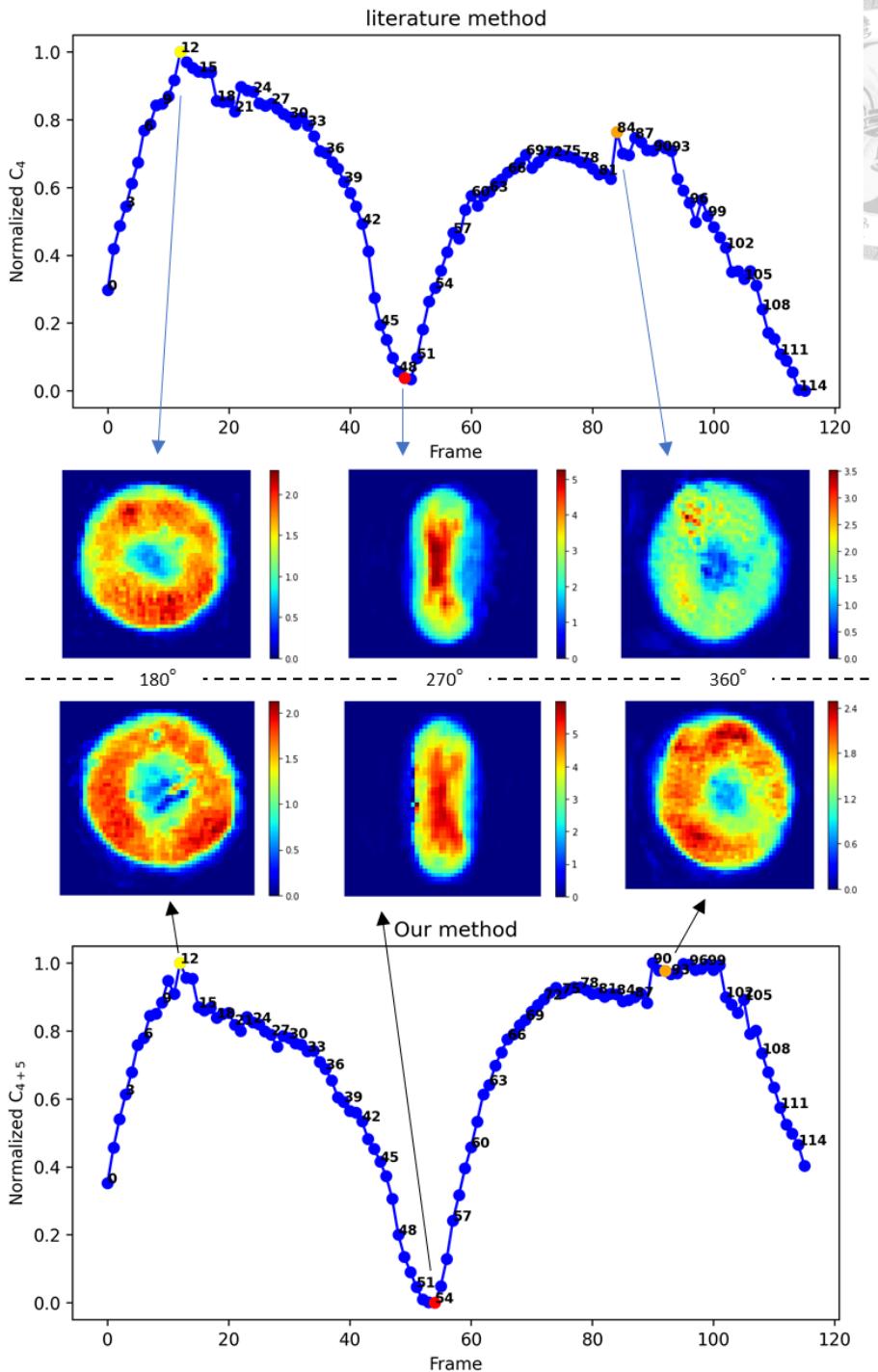


圖 50 相位投影影像與角度對應結果。上方序列為利用文獻方法之  $C_4$  擬合結果，下方序列為利用本實驗方法所得之結果。

實驗上利用模擬的方式來比較這兩種方法對角度判斷上的誤差。真實情況下紅血球物質分部並非均勻，因此本實驗利用兩組先前重建的三維結果來做為模擬影像的樣本（圖 51(a))，並加入不同的雜訊使其接近真實情況，最後投影出 200 張影像進行運算。

首先在投影角度上，隨機給定角度進行旋轉，隨機計算的結果又分為以 Z 軸為中心的轉動角度，以及以 y 軸為中心的滾動角度。轉動角度為每張影像隨機增加或減少 0 至 5 度，而滾動角度在 $\pm 30^\circ$  區間隨機增加或減少 0 至 5 度，其餘區域則隨機增加 3 至 8 度，此隨機方法主要是觀察實際拍攝時血球變化的行為來模擬。另外，不同角度的投影影像其總相位值在實際情況亦會有所變化，根據先前拍攝結果可以計算出所有投影影像標準差約為平均值的 0.09，因此在模擬上便以上述條件計算出呈高斯分佈的相位總和，並隨機分配給 200 張影像。建立在上述兩種雜訊的條件下，也額外的測試了對比度的增強以及投影影像的扭曲(warping)是否會對角度估算有所影響，在對比度改變的方法為將三維模型的個別體素值平方後再進行投影，以增強投影後的對比，此目的在於所用的三維模型在重建時有經過總變差、中值濾波等平滑過程，因此透過對比度的增強來模擬實際拍攝時，看到血球內部區域間變化較大的情形。而在影像扭曲上本實驗將每一項數的 x 座標經由

$$x' = C \cdot \sin\left(\frac{2\pi x}{columns}\right) + x \quad (\text{式 29})$$

轉換為 $x'$ ，其中係數(C)設定為 8 及針對每張影像總行數(columns)來計算(圖 51(b))，最後再將其結果放置於影像中心進行角度估算，而在扭曲過程中該張影像面積與總相位值皆會保持恆定。影像扭曲與對比度的調整目的皆是觀察在影像出現較為極端變化時，對於角度估算是否會有較大影響。

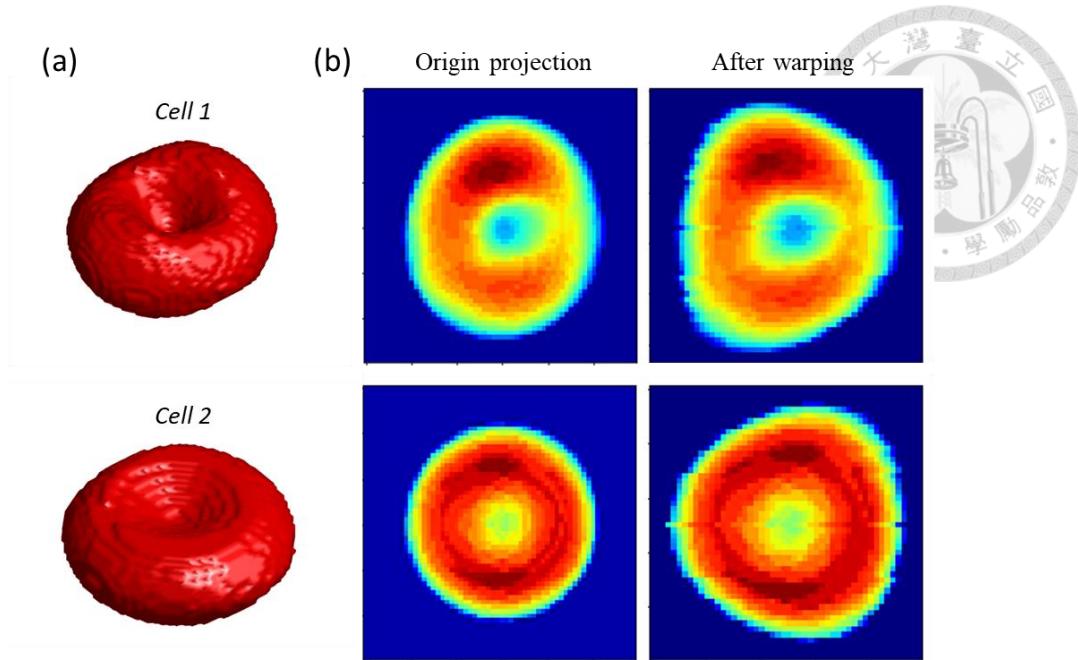


圖 51 誤差計算時所用(a)三維模型及(b)投影影像扭曲示意圖

在比較上將相同的 200 張影像分別經由本實驗估算及篩選的方式，以及只利用第四項係數( $C_4$ )的方式分別計算出角度，後者方法先計算 200 張影像分別對應的係數，再將其依序對應到  $\cos^2 \theta$  曲線 0 至 360 度。在計算角度估計的誤差上，先將正確以及估算的角度序列轉換為 0 到 90 度的分佈，例如 100 度的會對應為 80 度；200 度會對應到 20 度，以此類推以便於後續計算。之後利用估算角度以及正確角度相減的方均根結果計算平均值標準差，其結果如下表所示，表中列出十五個三維樣本，在加入不同型態的雜訊與轉換後，分別以兩種方法估算角度，並取得其與實際角度的平均差異。從表二可以看到本實驗所用的方法皆能取得較相近的角度估算結果。此外在統計結果上也可以看到，本實驗的方法在角度估算上相較於文獻方法有顯著的提升，將 15 顆血球模型的所有投影進行角度誤差的分佈觀察上，也呈現出在本實驗方法中也有明顯較低的結果(圖 52)。

表 2 不同方法模擬血球角度之誤差

	Random rotation + Total phase variation		Random rotation + Total phase variation + Image warping		Random rotation + Total phase variation + contrast enhancement		3D RBC Model
	Error (deg)	P value	Error (deg)	P value	Error (deg)	P value	
<i>Cell 1</i>							
Our Method	10.5 ± 7.0	p<0.001	12.8 ± 8.4	0.629	11.3 ± 7.4	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	21.1 ± 12.6		13.5 ± 5.6		16.0 ± 8.8		
<i>Cell 2</i>							
Our Method	10.6 ± 7.9	p<0.001	9.1 ± 6.9	0.307	9.4 ± 6.5	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	17.7 ± 8.1		10.0 ± 5.2		14.2 ± 8.4		
<i>Cell 3</i>							
Our Method	13.7 ± 11.2	0.319	12.4 ± 7.7	p<0.001	9.0 ± 6.5	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	15.0 ± 6.8		15.7 ± 8.4		15.7 ± 6.7		
<i>Cell 4</i>							
Our Method	10.8 ± 7.7	p<0.001	13.4 ± 7.7	0.142	12.2 ± 7.7	0.641	
C <sub>4</sub> estimated result	15.2 ± 8.3		14.7 ± 7.3		13.0 ± 7.4		
<i>Cell 5</i>							
Our Method	7.2 ± 6.6	p<0.001	8.9 ± 6.1	0.017	6.7 ± 4.9	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	11.0 ± 7.4		10.5 ± 5.3		11.9 ± 6.3		
<i>Cell 6</i>							
Our Method	10.0 ± 6.5	p<0.001	10.7 ± 8.9	0.031	9.2 ± 6.2	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	12.8 ± 5.0		12.7 ± 6.4		12.8 ± 6.4		
<i>Cell 7</i>							
Our Method	6.5 ± 4.8	p<0.001	5.5 ± 5.0	p<0.001	6.4 ± 5.1	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	9.0 ± 7.0		8.4 ± 5.3		9.8 ± 7.1		
<i>Cell 8</i>							
Our Method	9.9 ± 8.6		9.5 ± 6.6	0.678	9.8 ± 6.7	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	13.8 ± 7.6		10.2 ± 6.7		16.0 ± 7.2		
<i>Cell 9</i>							
Our Method	10.7 ± 6.4	p<0.01	10.7 ± 6.1		10.8 ± 6.9	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	12.6 ± 7.3		13.0 ± 7.4		13.6 ± 7.8		
<i>Cell 10</i>							
Our Method	6.4 ± 5.8	p<0.001	6.2 ± 4.7	p<0.001	6.6 ± 5.0	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	8.6 ± 6.0		10.4 ± 5.1		9.3 ± 4.7		
<i>Cell 11</i>							
Our Method	7.9 ± 5.6	p<0.001	7.0 ± 6.0	p<0.001	7.9 ± 5.6	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	11.6 ± 7.5		9.9 ± 7.2		11.6 ± 7.5		
<i>Cell 12</i>							
Our Method	9.4 ± 6.6	p<0.001	8.6 ± 6.5	p<0.001	8.9 ± 6.2	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	13.9 ± 7.3		11.7 ± 6.5		11.9 ± 6.6		
<i>Cell 13</i>							
Our Method	11.1 ± 8.3	p<0.001	13.2 ± 7.9	0.211	12.9 ± 7.6	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	18.5 ± 10.9		14.5 ± 7.8		16.1 ± 7.5		
<i>Cell 14</i>							
Our Method	7.9 ± 5.7	p<0.001	9.5 ± 12.6	0.96	7.9 ± 5.7	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	14.9 ± 6.4		9.5 ± 5.8		14.9 ± 6.4		
<i>Cell 15</i>							
Our Method	8.1 ± 6.5	p<0.001	8.0 ± 6.4	p<0.001	7.9 ± 6.1	p<0.001	
C <sub>4</sub> estimated result	12.0 ± 7.6		11.7 ± 6.8		13.0 ± 7.0		

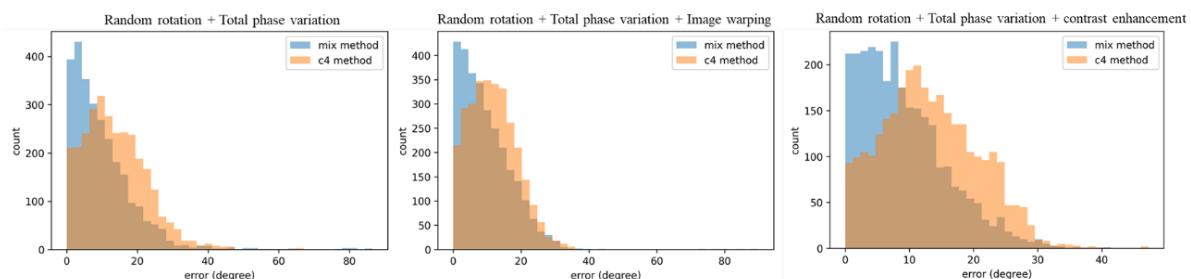


圖 52 15 組模擬影像所有投影的角度估算誤差統計結果

### 3.9.2 三維重建誤差

在重建過程中投影影像之角度估算，與重建之過程皆存在一定的雜訊與人為誤差，因此需計算影像重建流程之整體誤差。在本實驗結果分析上三維資訊僅用來作為形態上參考，相位資訊主要由二維投影影像進行分析，因此三維重建誤差計算在本實驗中也只考慮三維體積之誤差。流程上先計算了重建影像與原始二維投影影像之面積差異，然而因為在角度估算上可能存在誤差，因此僅比較 0 度及 90 度之相位影像與重建結果之投影影像的誤差。另外在模擬方法上，先對三維模型進行 500 張連續角度投影同時記錄對應角度，再將其透過 3.7 方法進行重建建立出正確結果。而估算結果則是經過對隨機投影影像進行橢圓擬合、角度估算等與實際相同的重建流程建立。最後比較正確結果與利

用不同角度估算方式以及加入不同雜訊之影像重建結果的差異。在誤差計算方法如下。

$$\frac{|已知角度重建結果 - 估算角度重建結果|}{|已知角度重建結果|} \times 100 \quad (\text{式 30})$$

在計算與原始相位影像比較結果上發現，重建影像與角度判定為 90 度及 0 度之原始相位影像，在面積上的誤差約為 7% (圖 53 (b))。除此之外下表 3 也呈現了在角度誤差估算時所討論的方法以及雜訊的種類，在經過相同程序的三維重建後與已知角度的重建型態比較結果。從表 3 可以看到本實驗所用的角度估算方法由於誤差較文獻方法小，所以在重建後的結果與已知角度相比較的誤差，也比先前文獻所用方法來得更佳。

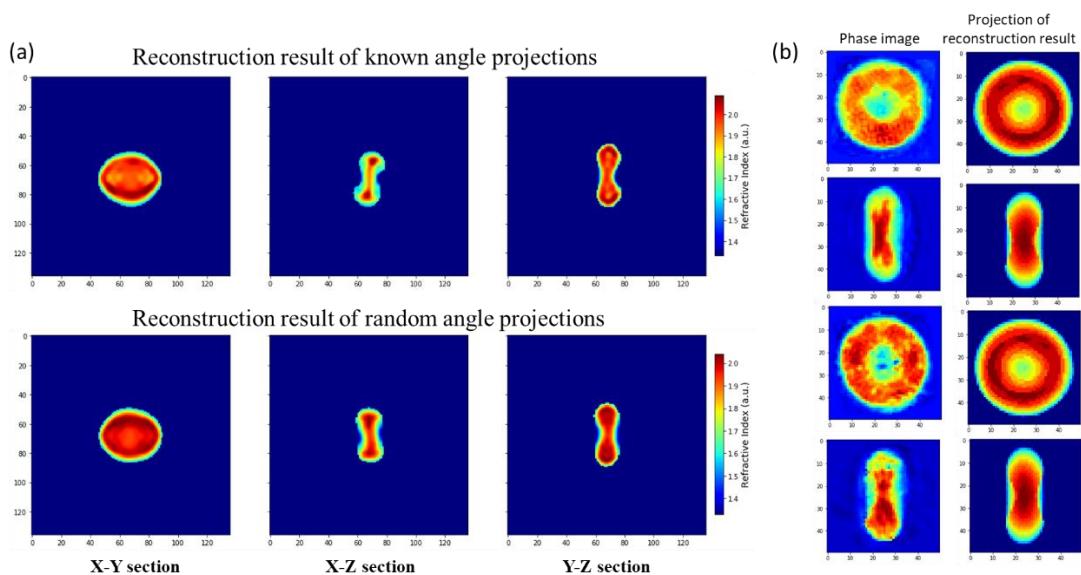


圖 53 (a)上圖為 500 張已知角度投影影像重建結果，下圖為 200 張隨機旋轉影像重建結果 (b)實際拍攝之二維相位影像與其重建結果之相同角度投影比較

表 3 不同角度估算方式在重建結果上的誤差比較

	Random rotation + Total phase variation		Random rotation + Total phase variation + Image warping		Random rotation + Total phase variation + contrast enhancement	
	Volume	Surface area	Volume	Surface area	Volume	Surface area
Our Method (N = 15)	$3.54 \pm 3.26\%$	$3.05 \pm 1.88\%$	$6.63 \pm 3.34\%$	$3.85 \pm 2.83\%$	$2.85 \pm 2.23\%$	$2.45 \pm 2.12\%$
C <sub>4</sub> estimated result (N = 15)	$10.82 \pm 4.18\%$	$5.44 \pm 4.54\%$	$10.19 \pm 3.72\%$	$6.06 \pm 3.32\%$	$10.05 \pm 6.65\%$	$4.93 \pm 3.78\%$

(% error)



## 第四章：應用

### 4.1 驗證及實驗樣本製備

本章為利用第三章方法與架構，將藥物誘導的紅血球或是疾病患者血球之型態等參數，與正常未經處裡的紅血球比較的應用，目的在於探討本系統之應用性，以及評估結果是否符合預期或是與先前文獻描述相似。

#### 4.1.1 正常與疾病血球樣本製備

正常血球樣本透過採血針(28G Acti-lance, ApexBio)進行取樣，在指尖扎針後抽取 2  $\mu\text{l}$  血液以 0.85% 生理食鹽水進行 18000 倍稀釋，並輕微搖晃置稀釋液呈均勻淡粉紅色後置於 5 毫升截面半徑 6 毫米之針筒內。並在針筒內置入攪拌磁石，避免因拍攝過程中血球沉降而降低注入流道之血球密度。

#### 4.1.2 戊二醛處裡樣本製備

製備此樣本的目的為探討系統在對於紅血球受藥物影響前後所量測的變化是否會與文獻相似。在先前研究中發現，當戊二醛(Glutaraldehyde)濃度大於等於 0.01% 時，便可對血球細胞進行固定使其不再發生裂解(Lysis)或是形變(圖 54)。因此亦稀釋液中分別加入 0.05%、0.01% 之戊二醛降低細胞整體流動性。戊二醛常用作細胞固定溶劑，其易與蛋白質等帶氨基及疏基(sulphydryl groups)物質形成鍵結，如此細胞整體硬度便會提升且形變能力降低。然而在加入戊二醛同時溶液滲透壓會隨之上升，每增加 1% 之戊二醛大約會對溶液提升 100 mOsm/kg [68]，因此在配置時亦會隨之調整至相同滲透壓條件。

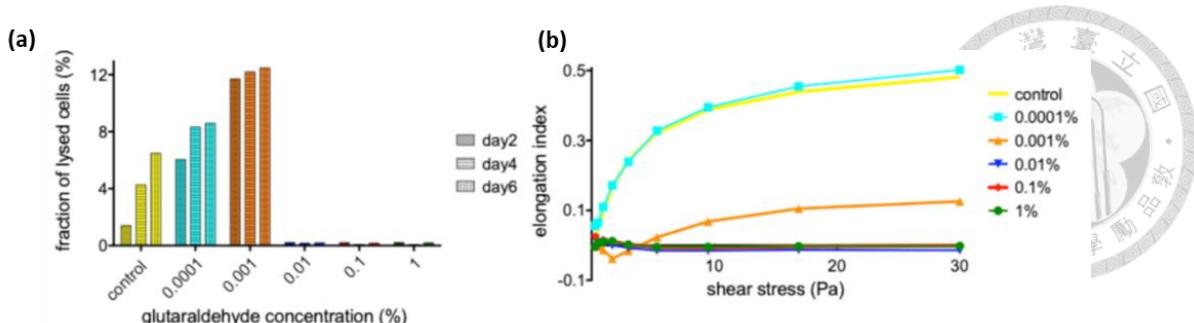


圖 54 (a)不同濃度之戊二醛及其對應被稀釋血液之裂解比例。 (b)不同濃度之戊二醛及其對應延展指數，此參數對應血球形變能力。[68]

先前文獻提及戊二醛作用於固定細胞的過程進需一秒[69]，而為確保反應適當進行，因此在二十分鐘的反應後才將稀釋液離心並移除上清液後，以生理食鹽水清洗回溶，再以生理食鹽水稀釋後注入流道中，以此確保模擬樣本與其他實驗樣本之介質折射率恆定。

## 4.2 參數分析

在分析各顆血球參數上計算了其定量資訊以及血球幾何型態，由於顯微系統擷取之影像皆為定量資訊，因此透過重建結果或是直接對投影影像計算，不同血球之外觀或是分布差異便可進行比較。在文獻回顧中提到影響血球形變能力，可以歸納為三種方向，包含其三維型態的表面積與體積等幾何參數，血球內部物質組成以及其細胞膜表面黏彈性。本研究針對這三項特性，來分別進行與之相關的參數分析。

- 幾何特性

1. 體積與表面積

透過三維重建結果可以計算出三維影像的體積與表面積數值。在體積計算上會加總所有立體像素(voxel)，在臨床上會利用平均紅血球體積(mcv) 來表示此項係數。表面積計算上則是加總所有立體像素表面積，並扣除像素間重疊區域的面積再將其總和。



## 2. 球形度(sphericity)

球形度用來描述三維物體與與其相同半徑之完美球體的相似程度，當球形度數值越高表示該三維物體越接近球形。其數值需透過體積(volume)與表面積(surface area)來進行運算。

$$\text{Sphericity} = \frac{\pi^{\frac{1}{3}}(6 \cdot \text{volume})^{\frac{2}{3}}}{\text{surface area}} \quad (\text{式 31})$$

## 3. 紅血球厚度比值

正常紅血球透過形成雙凹圓盤狀來提升整體表面積以增加物質傳遞效率，因此理想上正常血球中間凹陷區域厚度與最厚的區域厚度之比值數值應較小為佳。在計算上取出判定為水平之血球影像，而為了使分布較平均，每張影像會經過 90、180、270 度轉動後相加(圖 55(a))，再取出此相加結果中血球範圍內最大與最小的各 200 個像素值分別平均後，再將兩者形成比值來比較不同個體間的差異。

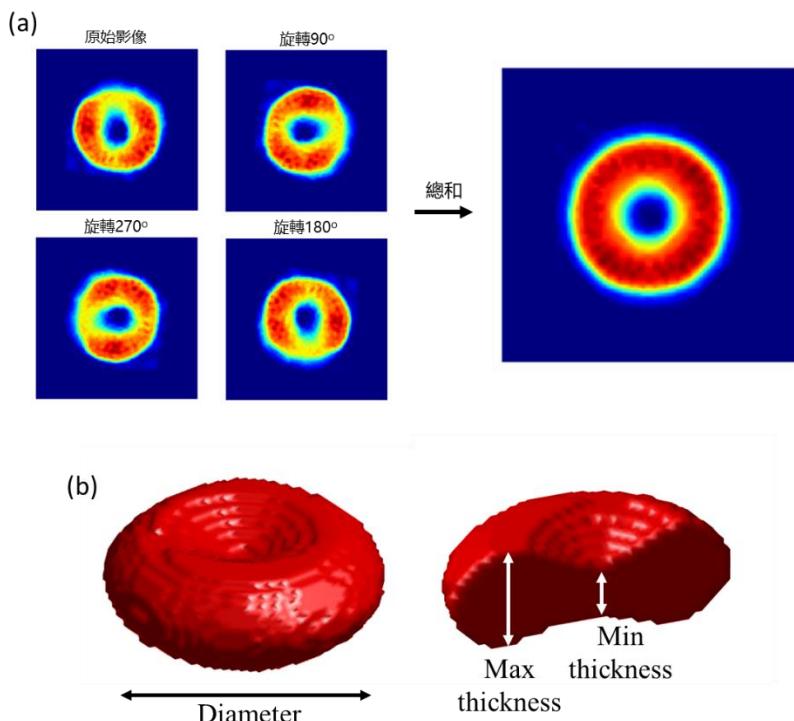


圖 55 (a)計算厚度比值前使頂位影像均勻分布的流程。(b)紅血球大小、厚度所表示區域。

## 4. 二維幾何參數

血球的大小分佈與許多疾病皆有相關，因此也透過橢圓擬合來計算出二維相位影像



的平均大小。

## 5. 紅血球表面弧度參數

除厚度之比值亦直接對血球雙凹型態的表面弧度進行計算分析。由 H. J. Deuling 等人所提出之模擬方法中，血球可以用下式對雙凹圓盤狀投影進行描述

$$\left(1 - \left(\frac{x}{R}\right)^2\right)^{\frac{1}{2}} \cdot \left(C_0 + C_2 \left(\frac{x}{R}\right)^2 + C_4 \left(\frac{x}{R}\right)^4\right) \quad (\text{式 32})$$

其中 R 為血球半徑、x 為過血球中心的一維截線上不同位置、C<sub>0</sub> 為血球中心厚度 C<sub>2</sub> 與 C<sub>4</sub> 為描述其弧度之係數[70]。在計算上會從角度估算為 0 度或 180 度的二維投影影像，取過中心的橫豎及對角線截線，共 16 筆血球中心到邊緣的結果進行計算並將其平均，避免血球分布不均勻導致計算結果誤差，其過程透過 Python scipy leastsq 函數進行擬合，並以方均根總和作為損失函數，便可以求出每顆細胞兩項係數(圖 56(a))，其中兩項係數上升皆表示弧度增加(圖 56 (b))，因此在後續分析上會將這兩項參數加總來進行後續比較。模擬結果除描述幾何型態外，由於血球之形變能力受細胞膜上骨架影響，因此不同表面弧度及球形度也以可用來描述紅血球之彈性。

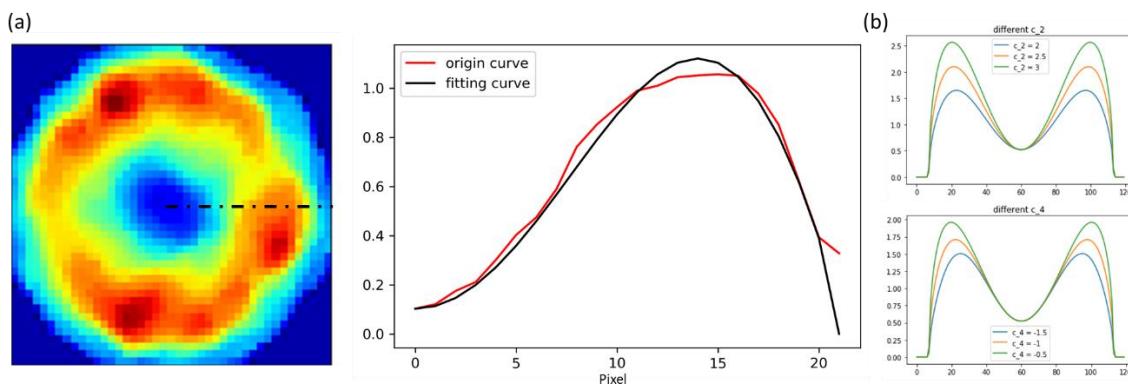


圖 56 對相位影像(黑線區域)進行弧度擬合

然而上述計算方式在部分血球中無法進行運算，例如重建資訊不足或是血球長短軸差異过大等，皆會影像該血球細胞所能取得之資訊。



## ● 內部物質組成

### 1. 光學體積

在本實驗架構透過樣本( $n_c$ )與介質( $n_m$ )折射率差異，可以取得樣本的定量資訊，由二維相位差影像( $\Delta \phi$ )可以計算出光學體積(Optical volume, OV)

$$\Delta \phi = \int (n_c - n_m) d\vec{R} \times \frac{2\pi}{\lambda} \quad (\text{式 33})$$

$$OV = \frac{\lambda}{2\pi} \iint \Delta \phi(x, y) dx dy \quad (\text{式 34})$$

單位為 femtoliter，而為提升每顆細胞定量資訊之正確性，光學體積的計算為所有投影影像之平均。在臨床上光學體積也可對應為平均血球血紅素量(MCH)如 dry mass =  $\frac{wavelength}{2\pi} \frac{\sum_x \sum_y \Delta \phi(x, y) dy dx}{\alpha}$  (式 8)，彼此可由線性方程式進行轉換。

### 2. 平均質量密度(average mass density)

為了去除個體間血球體積差異，可能導致光學體積隨之改變。實驗也將所求得到的光學體積除上三維重建後的總體積，以計算出平均質量密度，其單位為 picogram/voxel。在臨牀上可以對應為平均血球血紅素濃度(MCHC)。

## ● 細胞膜表面黏彈性

細胞膜及其細胞骨架為控制紅血球整體粘彈性(viscoelasticity)之重要因素，而健康之紅血球其整體應會不斷震動並達到動態平衡，因此可以透過量測細胞膜表面波動性(membrane fluctuations)來表示其黏彈性質。實驗過程利用微流道之高通量特性，量測不同情況下之紅血球細胞膜表面變化情形，作為描述細胞整體粘彈性之指標。其步驟為，現將血球稀釋液以 1000  $\mu\text{l}/\text{min}$  流速注入微流道後停止，並靜止 10 分鐘待血球沉降並貼附於玻片上，以每秒 180 帖連續拍攝 300 張後，再將紅血球以相同流速沖離玻片並拍攝背景影像，後重複拍攝下一輪影像。

在分析上，先平均 300 張照片並劃分出每顆影像區域，後分別計算每顆細胞單一像素與 300 張影像平均後的相同像素之差異絕對值，再分別讓每個像素對總張數 N 來平

均，最後將所有像素的差異加總後( $\sigma_\phi(x, y)$ )作為定量分析結果。

$$\sigma_\phi(x, y) = \sum_{x,y} ((\sum_n |\Delta\phi(x, y)_n - \Delta\phi(x, y)_{average}|)/N) \quad (式 35)$$

而最後所有分析資料，利用 MySQL 資料庫整理存儲以利後續比較及檢閱。



### 4.3 紅血球結果分析

#### 4.3.1 戊二醛作用結果比較

戊二醛作為細胞固定用的常用藥劑，在與細胞反應後會與內部蛋白質形成鍵結，使得細胞內部物質性質改變，出現硬化、流動性降低等特性達到細胞固著的目的。而此現象在紅血球中常在相關血液疾病中被發現，因此便利用此方法來模擬系統對於變異的紅血球與正常血球是否具有分辨能力，同時探討描述紅血球的多種參數中，何者在其性質改變後會有明顯的變化。在實驗中利用 0.05%、0.01% 兩種不同濃度與血球在生理食鹽水環境進行比較，並以控制組作為表示。在此組樣本中共考慮了體積、表面積、球形度、紅血球厚度比值、二維幾何參數、紅血球表面弧度參數、光學體積、平均質量密度、細胞膜表面黏彈性等。在拍攝的結果中由於並非所有血球皆能完美重建，因此部分需要依靠三維資訊的參數，在該血球中則不列入計算。而判斷重建結果好壞的方法，主要由人為判定角度資訊是否完整，以及重建結果是否在視覺上符合圓盤狀等因素。各參數比較結果如下並以 T test 來說明，不同物二醛濃度下血球特徵變化是否有顯著差異。

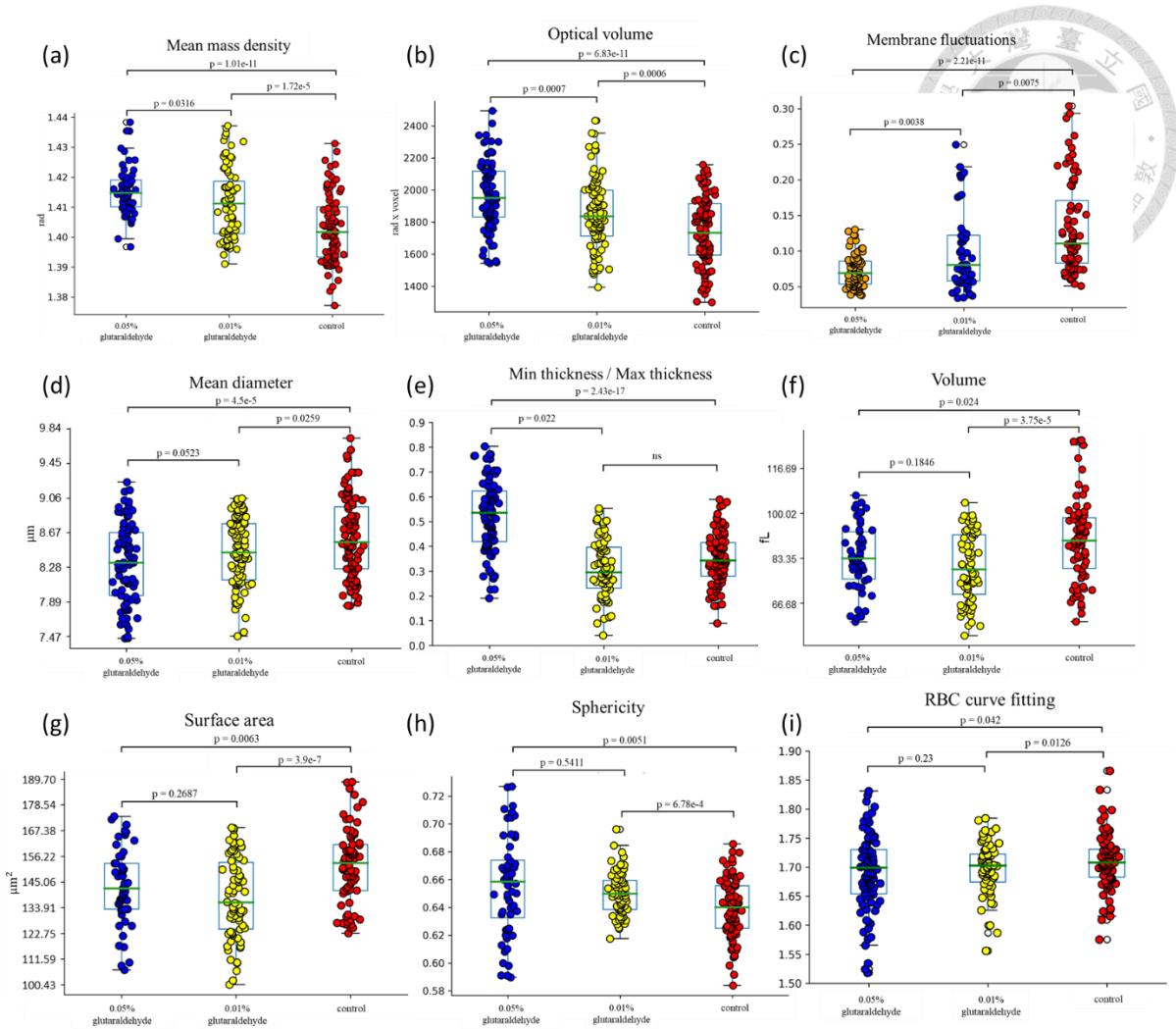


圖 57 0.05%、0.01% 戊二醛誘導血球與正常血球參數比較。(a)平均質量密度(b)光學體積(c)細胞膜表面  
波動性(d)平均直徑(e)厚度比值(f)體積(g)表面積(h)球形度(i)紅血球表面弧度

### ● 內部物質組成

相位值與樣本物質組成相關，當內部物質濃度上升或性質改變，所得相位值便會隨之提升。在加入戊二醛後因為其會與血紅素等蛋白產生鍵結，因此可以預期內部物質濃度以及乾重會上升[47]。光學體積只是用來描述細胞整體相位值總和，在計算上會將單顆血球個別投影影像的相位值總合進行平均，以提升計算準確性，最後在乘上波函數倒數  $2\pi/\lambda$ 。而平均質量密度則是將光學體積除上三維重建後的總體積像素，以求得單一像素的相位值，其結果能去除細胞體積差異所帶來的影響，平均質量密度也可以透過計算單一體積像素厚度取得細胞內物質平均折射率。

結果中可以看到光學體積以及平均質量密度，皆隨著戊二醛的濃度提升而上升，且彼此間都存在著顯著差異( $p < 0.05$ )(圖 57 (a, b))，而兩者不同濃度的結果差異並不如與控制組的差異表現，可能是由於反應以達飽和或是濃度差距不足等因素。



### ● 細胞膜表面黏彈性

細胞在活體內及物質與細胞膜等，會處於一動態平衡狀態，此外細胞膜的流動性也可以用以證明細胞的健康程度，在紅血球中細胞膜的形變能力決定了其在血管內運動的情形，高度的形變能力可以使血球通過狹窄的微血管，或是藉由改變個體形狀來影響血液的黏滯力。因此利用量測血球細胞膜在靜止的環境下震動情形，以此來進行判斷血球是否健康。從結果中可以看到隨著戊二醛濃度上升細胞膜表面變化逐漸下降並有顯著差異，且濃度越高其變化的分佈也變小(圖 57 (c))，因為戊二醛作為固著細胞的藥劑，在與細胞反應後勢必會影響其活動性，因此此結果符合假設[28]。

### ● 二維影像形態變化

由二維影像可以計算出血球大小差異、最厚區域最薄區域的比值，以及透過擬合計算出的血球表面弧度。而上述結果的數值主要會受系統擷取相位值的誤差影響，因此在計算上每顆血球都會取多個數值來進行平均以達到較高精度。像是在計算最厚區域時，會將所有估算為 90 度的影像寬度進行平均。而在弧度擬合時，則會取多個軸與方向的擬合結果來平均，以去除血球物質分佈不均勻的情形。在大小分析的結果中可以看到加入藥物後血球大小變小且其結果與控制組有明顯差異(圖 57 (d))，而此結果與利用流式細胞儀所拍攝的結果相符[23, 24]。

在厚度比值上，當血球細胞最厚區域最薄區域差異越大，其數值會越低(圖 57 (e))。此參數主要是在描述血球在相同半徑下與圓球相比有較高的表面積，即是透過雙凹特性來達成，而凹陷程度也與物運送物質能力相關。從結果上可以看到隨著濃度增加兩者比值也隨之增加。

在血球表面弧度擬合的計算上目的與厚度比值相似，主要是藉由血球凹陷型態的特

徵來進行比較，在計算上擬合結果會有兩項係數，其共同組成之方程式可以描述血球的弧度，當兩者上升表示弧度越明顯，因此在結果上會將兩者相加一起判斷。從結果上可以看到隨著藥物濃度上升數值都下降，並分別與控制組呈顯著差異(圖 57 (i))。

### ● 三維影像形態變化

透過三維重建可以更好地了解樣本實際型態，此外本實驗拍攝血球在流道內運動情形除了結果能更貼近血球實際在體內運動狀況，與其他利用掃描鏡拍攝三維結構的技術相比，更能完整的擷取到血球的正反面資訊，而不只是侷限於貼附於玻片該面的形態表現。然而受限於角度難以控制以及流道內流體的影響，三維資訊仍然有部分誤差存在。

血球的體積在臨牀上也被採納作為疾病判定標準之一，且因為紅血球為近乎均值的細胞，因此取得體積等同於取得內部血紅素濃度的資訊，此外正常人的血球大小近乎相當，不均勻的大小分布可能與分化或凋亡機制異常有關。在本實驗中三維結果只考慮其形態特徵，而相位資訊則是由投影影像來取得運算。在結果上可以看到體積與直徑變化相似，並且加入藥物的血球與控制組一樣有顯著差異(圖 57 (f))，而此結果也可以由先前研究進行論證。

血球具有較高的表面積體積比，因此表面積也是一項重要的參考要素，但在分析上因為受限於相機像素大小，因此果與實際會有一定的誤差。在結果上可以看到控制組的紅血球表面積較大，並與加入藥物後有顯著差異(圖 57 (g))。

球形度用以描述一個三維物體與圓球相似程度，越接近圓球的血球也代表其細胞黏彈性降低無法維持雙凹圓盤的形狀，其球形度會較高。而計算球形度之特點為其數值可以去除個體間血球大小的差異，使結果較易進行比較。在結果上也可以看到，隨著濃度提升球形度也隨之上升(圖 57 (h))。

#### 4.3.2 疾病血球比較

本實驗也進一步探討應用於血液相關病時是否也能觀察出相關趨勢，在實驗上共採用 4 位無相關疾病的受試者並以 N 表示，以及一位第一型糖尿病患者血球並以 T1D 表

示後進行同樣參數比較。此外因為部分參數是由三維重建結果進行推算，因此不同參數的樣本數量會有所不同，其數量亦標註於圖中。在參數分析上先對內部物質組成進行分析，包含光學體積以及平均物質密度，而平均物質密度去除了紅血球在不同個體間的體積資訊，因此在個體樣本數量較少的情況下較有參考依據。在圖 58 中可以看到 T1D 患者的紅血球其平均質量密度皆小於其他且都具有顯著差異( $P < 0.001$ )，而在光學體積上因為個體間血球體積有一定差異，因此較無法看出明顯趨勢。而細胞膜表面得黏彈性量測中，T1D 患者與 N1 到 N3 間存在顯著差異，並可看出健康者的血球表面黏彈性相對較高，而在 T1D 的分布中也可以看出其分布區域較小，較集中在黏彈性較低的區域。

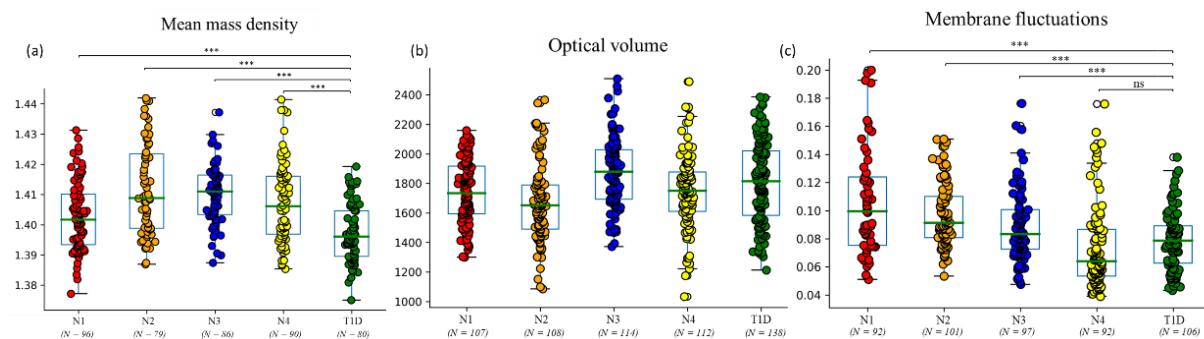


圖 58 糖尿病血球與一般血球內部物質分布比較

在型態參數便可看到，由於本實驗受試者數量較少且受試者間存在明顯個體差異，因此較難斷定一般血球與疾病血球間是否存在顯著差異。在下圖 59 可以看到實驗中所取得的 T1D 血球其大小比其他一般血球大，除此之外正常血球樣本間的差異亦相當明顯，因此若要利用體積等參數型態進行比較，還需要更多個體樣本參與。

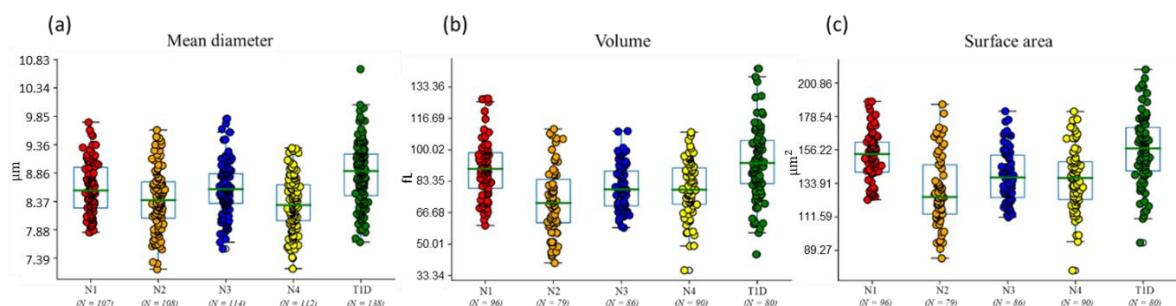


圖 59 糖尿病血球與一般血球內部物質二維及三維型態比較

而型態的分析上除上述參數外，實驗中亦計算幾種去除型態差異的參數，在二維投影影像上包含最薄與最厚區域的比值，以及對血球表面弧度進行擬合的結果，而三維上則是以球形率進行計算。上述參數在疾病血球比較上的結果如圖 60 所示，在先前文獻中提到[21]糖尿病患者血球厚度、中央凹顯深度在糖尿病患者血球上皆比正常血球顯著低下，而在本實驗的結果中血球厚度比值、球形率在疾病樣本上與一般血球較無顯著差異，而在血球表面弧度擬合中則可以看到糖尿病血球數值顯著低落( $P<0.001$ )，而此結果也代表該血球凹陷程度較不明顯，與文獻所提及結果相同但仍需更多樣本來進行驗證。

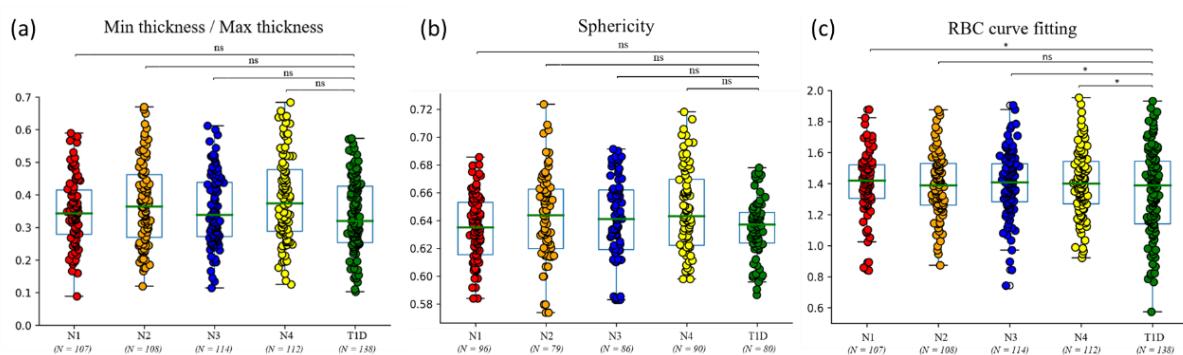


圖 60 糖尿病血球與一般血球內部物質去除體積差異之型態參數比較

## 第五章：結論與未來展望

### 5.1 結論與討論

本實驗結合了高通量裝置與免標記的顯微系統，達到快速獲取定向資訊的效用，在已知折射率大小的驗證下，證明了系統的大致正確性，再以去除光斑、相機比較的方式，進一步確認系統誤差由相機影響較大。而這些步驟的目的，除了能定量的與先前文獻所提出架構進行比較，更提供後續對實驗系統進行優化及影像品質提升的方向。

在先前文獻中提及，具有黏彈性等特徵異常的紅血球有三種目標可進行分析。1. 正常紅血球透過較大的表面積與體積比來完成氧氣輸送功能，因此可以根據其三維型態，包含體積與表面積等進行分析。2. 血球內部物質及血紅素之定量分析。3. 紅血球細胞膜之黏彈性分析[11, 12]。而方法與結果中，本實驗也呈現出利用高通量光學斷層顯微

術，定量的量測樣本資訊，除物質分布外也依此分析了型態資訊，達成可以在相同架構下同時擷取所有描述紅血球性質參數的結果。而此技術相較於現今臨床方法，省去了血液抹片人工判讀型態的步驟以及主觀的因素，同時因為是建立在定量相位顯微術上因此也不須額外標記來進行分辨。相較於其他定量相位顯微架構上則是提升了通量，或是計算方法的優化。但雖然通量提升對於需要統計分析的生物樣本有著極大的幫助，但由於計算過程中包含了估算與平均的過程，像是旋轉角度的估算、紅血球內部物質在滾動時也會隨之流動的特性，在本實驗中皆會對最後分析與重建結果有所影響。因此相較於掃描鏡等已知確切角度的方式，其再需要三維結果的參數分析上會存在較大的誤差。

利用微流道做為樣本載體的原因是為了提升通量，同時為了提升影像分析正確性及降低人為篩選的過程，在對連續影像中本實驗使用高通量深度學習模型來對血球影像作初步分割，在目前實驗拍攝上約為每分鐘 43 顆細胞，相較於以掃描鏡拍攝三維方式有明顯通量提升，但其中仍包含部分問題。像是流道厚度遠大於紅血球厚度，此結果便會導致拍攝時血球在部分影像上會受上層通過的血球影響，同時在追蹤連續影像中的相同細胞也會有所阻礙，導致分割後的追蹤過程仍需部分人為修正拉長分析所需時間。另外雖然實驗上盡可能降低流體對血球造成形變的影響，但血球在運動過程中內部物質仍然會不斷流動變化以維持自身形態，使的拍攝結果並非穩定，而受這樣的因素影響最大的參數便會是三維重建後的相關結果。因此本研究只對三維重建結果進行形態上的分析，其餘內部物質分布二維外觀等則是以連續影像分析。

為了盡可能地克服本實驗架構在還原三維樣本精確性上的缺點，本實驗中呈現了透過修改文獻中角度估算的方式，顯著提升正確率的計算流程，以及結合傅立葉繞射原理將相機擷取的二維投影影像進行重建，並加上平滑計算降低拍攝時所造成的誤差及雜訊，儘管由從三維結果所提取的資訊可能存在一定誤差，但其餘從二維影像提取的參數中皆是利用高通量的特性，計算單一血球所有投影影像進行平均，因此相較於貼附在玻片上單張拍攝的方式，有著更高的正確性。依此方式來分析不同情況下的紅血球，其中包含加入戊二醛或是疾病血球等之後，在結果上可以看出被改變的血球是可以透過此光學架構拍攝結果，依相位資訊、二維三維型態、細胞黏彈性等進行區分。像是在加入戊二醛

的實驗中透過改變濃度促使紅血球達到不同程度的固化效果，並以實驗架構進行多個參數分析後加入藥物前後都呈現統計上的顯著差異，另外變化結果也與先前文獻利用商用儀器量測的變化趨勢相當。但在疾病血球與正常血球的分析上，因為樣本數量缺乏僅能做為簡單比較及參考，尚無法定論結果中的差異是因為疾病導致或是本身個體差異，所以目前結果也與先前文獻有所不同，因此仍須未來更多相同病症之血球樣本作為驗證。然而從對疾病血球的比較實驗中也可看到，關係到個體差異的參數如體積、表面積、大小等，相較於其他去除個體差異的參數，如細胞膜表面黏彈性、表面弧度等，在變化上來的較無規律，因此在後續增加個體的實驗中，可以著重於這些去除個體差異之參數的比較。

總結來說本實驗利用免標記之高通量光學斷層掃描術達成了現今臨牀上需要多項儀器、專業人力才能取得的分析結果，也對相似技術進行通量提升與計算上的誤差降低，在將結果與文獻的比對中也間接探討了研究的可行性與應用，但可看出仍需更多樣本與實驗結果，來對其進行更深入的分析與驗證。

## 5.2 未來展望

在本架構上仍有諸多系統與分析流程需要提升及優化。

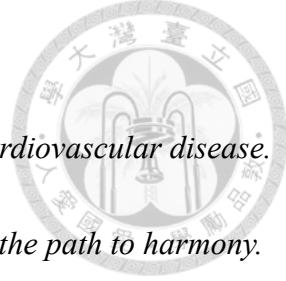
1. 在微流道的架構設計上，若能將流道高度控制在與兩顆血球細胞大小相當的情況下，便可在確保血球沉降並翻滾的前提下，也不會受其他紅血球干擾。然而要達到這樣精細的尺寸，在微流道的製作上，就必須以矽晶圓為基板使用黃光蝕刻方式進行製作出模板。如此一來可以大幅提升相位影像品質及細胞追蹤的正確性，但製作過程會需要較高花費。
2. 微流道寬度應同樣限制在只能單顆細胞通過，由於本實驗架構參考光中仍包含部分樣本資訊，因此當流道寬度太寬，便會難以與樣本光中實際樣本完全錯開，進而影響相位影像。但若要使參考光與樣本光樣本資訊完全會造成相機視野部分區域的浪費。
3. 在分析流程上由於包含多個步驟，像是數值對焦、橢圓擬合、角度估算等流程，因

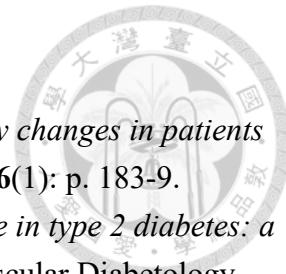


此在運算上仍需花費一定時間，而此過程可以透過 GPU 進行加速，或是演算法的改進來提升，使整體通量及分析速度可以達到接近即時分析的能力。

4. 在本實驗中不同投影所對應角度仍是以估算為主，雖相比文獻有所提升但仍有一定誤差，因此須建立更好的角度計算方式，以提升三維重建結果的可靠性與應用性。其中能夠取得已知角度對應的實際投影影像最為重要。在本實驗中僅能以模擬方式來估算，若是能以光鉗、毛細管等方式拍攝出正確的角度與影像間對應，對於後續算法修正與改進會有極大的幫助。
5. 在細胞滾動時由於其過程難以預測因此取得角度也不一定均勻分布，若結合對抗生成網路也許可以補足角度缺失問題，並提升影像品質。
6. 目前的分析參數的決定是建立在先前文獻所提到血球黏彈性異常的變化方向，但許多血液疾病都會有相似的變化傾向，因此找出更多可以描述紅血球的參數，像是調整微流道寬度以機械力改變血球再進行量測；以不同波長光源進行照射與拍攝；以不同滲透壓液體作為介質等，將可能提升診斷血液疾病得可靠性。
7. 在實驗上目前是以細胞固著的藥物誘導紅血球形態變化，與真實情況可能仍有差異，因此可利用阿斯匹靈等實際臨床會使用的藥物進行分析。
8. 在疾病樣本中，因為血球基本型態在個體間存在差異，因此需要更多不同疾病個體之樣本進行分析統計，才能作為本架構對於該疾病之應用能力的確認。

## 參考文獻

- 
1. Pernow, J., et al., *Red blood cell dysfunction: a new player in cardiovascular disease*. *Cardiovascular Research*, 2019. **115**(11): p. 1596-1605.
  2. Sacks, D.B., *Measurement of hemoglobin A(1c): a new twist on the path to harmony*. *Diabetes Care*, 2012. **35**(12): p. 2674-80.
  3. Satoh, K., et al., *Recent Advances in the Understanding of Thrombosis*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2019. **39**(6): p. E159-E165.
  4. Hsu, W.C., et al., *Tomographic diffractive microscopy of living cells based on a common-path configuration*. *Optics Letters*, 2014. **39**(7): p. 2210-2213.
  5. Memmolo, P., et al., *Hydrodynamic Red Blood Cells Deformation by Quantitative Phase Microscopy and Zernike Polynomials*. *Frontiers in Physics*, 2019. **7**.
  6. Mugnano, M., et al., *Label-Free Optical Marker for Red-Blood-Cell Phenotyping of Inherited Anemias*. *Analytical Chemistry*, 2018. **90**(12): p. 7495-7501.
  7. Merola, F., et al., *Tomographic flow cytometry by digital holography*. *Light-Science & Applications*, 2017. **6**.
  8. Byrnes, J.R. and A.S. Wolberg, *Red blood cells in thrombosis*. *Blood*, 2017. **130**(16): p. 1795-1799.
  9. Park, H.S., et al., *Invited Article: Digital refocusing in quantitative phase imaging for flowing red blood cells*. *Apl Photonics*, 2018. **3**(11).
  10. Reichel, F., et al., *High-Throughput Microfluidic Characterization of Erythrocyte Shapes and Mechanical Variability*. *Biophysical Journal*, 2019. **117**(1): p. 14-24.
  11. Tomaiuolo, G., *Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics*. *Biomicrofluidics*, 2014. **8**(5).
  12. Renoux, C., et al., *Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell deformability measured in isotonic condition*. *Scientific Reports*, 2019. **9**.
  13. Ates, A.H., et al., *Association of red Cell Distribution width with Characteristics of Coronary Atherosclerotic Plaques as Detected by Computed Tomography Angiography*. *European Journal of Therapeutics*, 2019. **25**(1): p. 58-63.
  14. Danese, E., G. Lippi, and M. Montagnana, *Red blood cell distribution width and cardiovascular diseases*. *Journal of Thoracic Disease*, 2015. **7**(10): p. E402-E411.
  15. Weisel, J.W. and R.I. Litvinov, *Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis*. *J Thromb Haemost*, 2019. **17**(2): p. 271-282.
  16. Ford, J., *Red blood cell morphology*. *Int J Lab Hematol*, 2013. **35**(3): p. 351-7.
  17. Korber, C., et al., *Red blood cell morphology in patients with beta-thalassemia minor*. *Laboratoriumsmedizin-Journal of Laboratory Medicine*, 2017. **41**(1): p. 49-52.
  18. Zamora, E.A. and C.A. Schaefer, *Hereditary Spherocytosis*, in *StatPearls*. 2021:



- Treasure Island (FL).
19. Chabner, D.-E., *The language of medicine*. 2017.
  20. NeamTu, M.C., et al., *The prevalence of the red cell morphology changes in patients with type 2 diabetes mellitus*. Rom J Morphol Embryol, 2015. **56**(1): p. 183-9.
  21. Buys, A.V., et al., *Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study*. Cardiovascular Diabetology, 2013. **12**.
  22. Rowley, T., *Flow Cytometry - A Survey and the Basics*. Materials and Methods, 2012.
  23. Marczak, A. and Z. Jozwiak, *The interaction of DNR and glutaraldehyde with cell membrane proteins leads to morphological changes in erythrocytes*. Cancer Letters, 2008. **260**(1-2): p. 118-126.
  24. Marczak, A., M. Walczak, and Z. Jozwiak, *The combined effect of IDA and glutaraldehyde on the erythrocyte membrane proteins*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **335**(1-2): p. 154-162.
  25. Park, Y.K., et al., *Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(4): p. 1289-1294.
  26. Hur, J., et al., *Melittin-induced alterations in morphology and deformability of human red blood cells using quantitative phase imaging techniques*. Scientific Reports, 2017. **7**.
  27. Lee, S., et al., *Refractive index tomograms and dynamic membrane fluctuations of red blood cells from patients with diabetes mellitus*. Scientific Reports, 2017. **7**.
  28. Paul, R., et al., *Quantitative absorption imaging of red blood cells to determine physical and mechanical properties*. Rsc Advances, 2020. **10**(64): p. 38923-38936.
  29. Oshiro, I., T. Takenaka, and J. Maeda, *New Method for Hemoglobin Determination by Using Sodium Lauryl Sulfate (Sls)*. Clinical Biochemistry, 1982. **15**(2): p. 83-88.
  30. Valavi, E., M.J.A. Ansari, and K. Zandian, *How to Reach Rapid Diagnosis in Sickle Cell Disease?* Iranian Journal of Pediatrics, 2010. **20**(1): p. 69-74.
  31. Yashunsky, V., et al., *Surface plasmon-based infrared spectroscopy for cell biosensing*. Journal of Biomedical Optics, 2012. **17**(8).
  32. Jin, Y.L., et al., *Refractive index measurement for biomaterial samples by total internal reflection*. Physics in Medicine and Biology, 2006. **51**(20): p. N371-N379.
  33. Mirjam Schürmann, J.S., Paul Müller, Chii J. Chan, Andrew E. Ekpenyong, Kevin J. Chalut, Jochen Guck,, *Chapter 9 - Refractive index measurements of single, spherical cells using digital holographic microscopy*. Methods in Cell Biology, 2015. **125**: p. 143-159.
  34. Charriere, F., et al., *Characterization of microlenses by digital holographic microscopy*. Applied Optics, 2006. **45**(5): p. 829-835.

35. Iwai, H., et al., *Quantitative phase imaging using actively stabilized phase-shifting low-coherence interferometry*. Optics Letters, 2004. **29**(20): p. 2399-2401.
36. Popescu, G., et al., *Imaging red blood cell dynamics by quantitative phase microscopy*. Blood Cells Molecules and Diseases, 2008. **41**(1): p. 10-16.
37. Micó, V., J. Garcia-Monreal, and Z. Zalevsky, *Quantitative phase imaging by common-path interferometric microscopy: application to super-resolved imaging and nanophotonics*. Journal of Nanophotonics, 2009. **3**(1): p. 031780.
38. Shaked, N.T., et al., *Two-step-only phase-shifting interferometry with optimized detector bandwidth for microscopy of live cells*. Optics Express, 2009. **17**(18): p. 15585-15591.
39. Popescu, G., et al., *Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics*. Optics Letters, 2006. **31**(6): p. 775-777.
40. Guo, R.L., et al., *Quantitative phase imaging by wide-field interferometry with variable shearing distance uncoupled from the off-axis angle*. Optics Express, 2020. **28**(4): p. 5617-5628.
41. Deng, D.N., et al., *Off-axis tilt compensation in common-path digital holographic microscopy based on hologram rotation*. Optics Letters, 2017. **42**(24): p. 5282-5285.
42. Choi, W., et al., *Tomographic phase microscopy*. Nature Methods, 2007. **4**(9): p. 717-719.
43. Su, J.W., et al., *Digital holographic microtomography for high-resolution refractive index mapping of live cells*. Journal of Biophotonics, 2013. **6**(5): p. 416-424.
44. Barer, R., *Refractometry and Interferometry of Living Cells*. Journal of the Optical Society of America, 1957. **47**(6): p. 545-556.
45. Mazarevica, G., T. Freivalds, and A. Jurka, *Properties of erythrocyte light refraction in diabetic patients*. Journal of Biomedical Optics, 2002. **7**(2): p. 244-247.
46. Lee, H.J., et al., *Three-Dimensional Shapes and Cell Deformability of Rat Red Blood Cells during and after Asphyxial Cardiac Arrest*. Emerg Med Int, 2019. **2019**: p. 6027236.
47. Park, H.S., et al., *Quantitative phase imaging of erythrocytes under microfluidic constriction in a high refractive index medium reveals water content changes*. Microsystems & Nanoengineering, 2019. **5**.
48. Dannhauser, D., et al., *Label-free analysis of mononuclear human blood cells in microfluidic flow by coherent imaging tools*. Journal of Biophotonics, 2017. **10**(5): p. 683-689.
49. Liu, C.G., S. Marchesini, and M.K. Kim, *Quantitative phase-contrast confocal microscope*. Optics Express, 2014. **22**(15): p. 17830-17839.
50. Bedrossian, M., et al., *Enhancing final image contrast in off-axis digital holography using residual fringes*. Optics Express, 2020. **28**(11): p. 16764-16771.

51. Ahmad, A., et al. *Reduction of spatial phase noise in the laser based digital holographic microscopy for the quantitative phase measurement of biological cells*. in *Advances in Microscopic Imaging*. 2017. Munich: Optical Society of America.
52. Abdelsalam, D.G. and T. Yasui, *High brightness, low coherence, digital holographic microscopy for 3D visualization of an in-vitro sandwiched biological sample*. Applied Optics, 2017. **56**(13): p. F1-F6.
53. Zheng, C., et al., *Diffraction phase microscopy realized with an automatic digital pinhole*. Optics Communications, 2017. **404**: p. 5-10.
54. Gillespie, A.H. and A. Doctor, *Red Blood Cell Contribution to Hemostasis*. Frontiers in Pediatrics, 2021. **9**.
55. Patel, Y.M., et al., *An inexpensive microfluidic device for three-dimensional hydrodynamic focusing in imaging flow cytometry*. Biomicrofluidics, 2020. **14**(6).
56. Bhattacharya, S., et al., *Studies on surface wettability of poly(dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength*. Journal of Microelectromechanical Systems, 2005. **14**(3): p. 590-597.
57. Herraez, M.A., et al., *Fast two-dimensional phase-unwrapping algorithm based on sorting by reliability following a noncontinuous path*. Applied Optics, 2002. **41**(35): p. 7437-7444.
58. Tayal, S., et al., *Speckle-free quantitative phase and amplitude imaging using common-path lateral shearing interference microscope with pseudo-thermal light source illumination*. Optik, 2019. **180**: p. 991-996.
59. Farrokhi, H., et al., *Speckle reduction in quantitative phase imaging by generating spatially incoherent laser field at electroactive optical diffusers*. Optics Express, 2017. **25**(10): p. 10791-10800.
60. Zhao, H., et al., *ICNet for Real-Time Semantic Segmentation on High-Resolution Images*. European Conference on Computer Vision (ECCV), 2018.
61. P. Langehanenberg, B.K., G. von Bally,, *Autofocus algorithms for digital-holographic microscopy*. Optics in Life Science, 2007. **Vol. 6633**.
62. Fonseca, E.S.R., et al., *Comparative analysis of autofocus functions in digital in-line phase-shifting holography*. Applied Optics, 2016. **55**(27): p. 7663-7674.
63. Mohammed, S.K., et al., *Quality assessment of refocus criteria for particle imaging in digital off-axis holography*. Applied Optics, 2017. **56**(13): p. F158-F166.
64. Kaye, E.A., et al., *Application of Zernike polynomials towards accelerated adaptive focusing of transcranial high intensity focused ultrasound*. Medical Physics, 2012. **39**(10): p. 6254-6263.
65. P. Müller, M.S., J. Guck,, *The theory of diffraction tomography*. arXiv : 1507.00466, 2015.
66. Ding, C. and Z. Tan, *Improved longitudinal resolution in tomographic diffractive*

- microscopy with an ellipsoidal mirror.* Journal of Microscopy, 2016. **262**(1): p. 33-39.
67. Velikina, J., S. Leng, and G.-H. Chen, *Limited view angle tomographic image reconstruction via total variation minimization.* Medical Imaging. Vol. 6510. 2007: SPIE.
68. Abay, A., et al., *Glutaraldehyde - A Subtle Tool in the Investigation of Healthy and Pathologic Red Blood Cells.* Frontiers in Physiology, 2019. **10**.
69. Sutera, S.P. and M.H. Mehrjardi, *Deformation and Fragmentation of Human Red Blood-Cells in Turbulent Shear-Flow.* Biophysical Journal, 1975. **15**(1): p. 1-10.
70. Deuling, H.J. and W. Helfrich, *Red Blood-Cell Shapes as Explained on Basis of Curvature Elasticity.* Biophysical Journal, 1976. **16**(8): p. 861-868.