

中華民國第 56 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 工程學科(一)科

第二名

052308

自製影像立體化的光切片手機顯微鏡

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 梁靖妮	指導老師： 邱莉華 陳正源
---------------	---------------------

關鍵詞：光切片、立體化、手機顯微鏡

摘要

本作品首先證明了 HiLo 應用在散射光影像的可行性。目前看到有關 HiLo 的論文都只有提及收集螢光訊號，沒有看到有用在散射光訊號的收集上。本實驗透過架設自製原型機，證明 HiLo 的原理也能夠應用在散射光上，大幅提升 HiLo 光切片的深度與廣度。再者，本作品將自行撰寫之 App 結合雲端運算。再經過驗證後確認處理出來的影像是正確的影像。不僅加速影像處理流程，而且使用者只需攜帶手機便可立即看到處理出來的成果。接著，利用 3D 列表機自製具有光切片功能的手機顯微鏡實體。將原型機微小化並與日常生活常見的手機結合，讓使用者方便使用的同時也實現經濟便利性。最後，實現影像立體化，利用光切片的影像能使得原本平面的 2D 影像，可以呈現 3D 的立體化影像。

壹、 研究動機

在科學 Maker 的 fb 社團當中，台大的江宏仁教授設計及推廣了手機顯微鏡。在現在這個手機普及的時代裡，這種微型可攜帶式的顯微鏡，可以讓我們隨時觀察並記錄微小尺度的物體，非常方便。但是手機顯微鏡得到的影像含有很多離焦訊號的困擾，這些離焦訊號不僅讓影像的對比變差，也很容易掩蓋焦平面的訊號使我們無法看清楚要觀察的物體。一般實驗室所購買的光學切片共軛焦顯微鏡可以處理這個問題，可惜要價昂貴，自行組裝大約要花費四十萬，而且體積約是 $1m \times 1m \times 1m$ ，十分龐大。因此我在思考，有沒有甚麼辦法能夠增加手機顯微鏡的影像對比，是否可利用光學切片去除離焦雜訊而留下焦平面的訊號讓影像更清楚？所以展開對這項研究的探索過程。

貳、 研究目的

- 一、 了解光學切片原理
- 二、 設計並測試適合光切片的原型機
- 三、 設計適合手機操作的影像處理系統流程 App
- 四、 設計並列印出 3D 實體手機顯微鏡模型

參、 研究設備及器材

一、 實驗儀器

		
光源(手機的 LED 燈)	透鏡組的透鏡	物鏡(10 倍)
		
CCD	CCD 架台	分光片
		
散光器	樣本(衛生紙)	樣本台
		
CCD 成像透鏡	三 D 列印機	

肆、 研究過程及方法

一、 光學切片顯微鏡的文獻探討

光學切片顯微鏡主要是指針對物鏡焦平面上的樣品所成的像，藉由微調可得到樣品在不同深度的薄層所呈現的結構影像。搜尋文獻可發現，有許多方法可以做到光學切片，有共軛焦顯微鏡[1]、light sheet 顯微鏡[2]、HiLo 顯微鏡[3]。共軛焦顯微鏡的成像方式是利用逐步點激發產生訊號，將訊號送到電腦後做後處理組成影像，因此它與手機不相容。Light Sheet 顯微鏡雖然成像方式與手機相容，但由於其主要應用範圍以螢光為主，樣本需具有螢光分子其訊號才足夠強，影像才會清楚，因此應用的範圍會被侷限。HiLo 顯微鏡由於其成像方法與手機相容、訊號來源不侷限於螢光、架構相對前兩者也相對簡單。

綜合上述，為了要找到最佳的方法，我們列了三個條件來篩選我們想要使用的技術；(1) 成像方法要與手機相容，(2) 影像的訊號來源不要侷限於特定的訊號，這樣使用範圍才會比較廣泛，(3) 我們希望架構能夠愈簡單愈好以降低製作的難度。呼應前述三項條件，整理如下：因此經過篩選後，我們決定使用 HiLo 顯微鏡做為達到光學切片能力的方法。

	共軛焦顯微鏡	Light sheet 顯微鏡	HiLo 顯微鏡
手機的成像方法	不相容	相容	相容
光源	均可	螢光樣本較適用	均可
架構	複雜	複雜	簡單

二、 HiLo 顯微鏡原理

HiLo 顯微鏡的基本原理是利用空間頻率的概念，經由訊號處理(傅立葉及反傅立葉轉換原理)的方式而達到光學切片的作用。在一張影像中，可以約略分成大尺度邊緣模糊的結構與小尺度邊緣銳利結構如圖 1。大尺度結構在空間頻率上屬於低頻的部分，小尺度結構則屬於高頻部分。



圖 1: 空間頻率的概念。左: 全頻的影像，中: 高頻的影像，右: 低頻的影像。

在顯微鏡的影像下，高頻訊號由於邊緣銳利清楚因此只會出現在焦平面，因此得到焦平面高頻的訊號只需把影像做高通濾波即可；而低頻訊號則有可能會同時出現在離焦及焦平面的地方，HiLo 顯微鏡能夠濾出焦平面的低頻訊號，並與高頻結合形成焦平面全頻的影像，進而實現光學切片。要達到這個目的，需要兩張影像來處理，一張是利用均勻光斑照明(I_{uniform})，另一張是用非均勻的光斑照明(I_{speckle})。根圖 2 所示，置於激發光路上的散射器(不一定要週期性結構，任一形狀能造成光斑雜亂的結構即可，如毛玻璃)，其位置與物鏡後焦平面互為共軛焦平面，所以散射器的形狀就會投影到焦平面上形成非均勻照明，置入或移除散射器，就可以得到 $I_{\text{speckle}}/I_{\text{uniform}}$ 如圖 3。

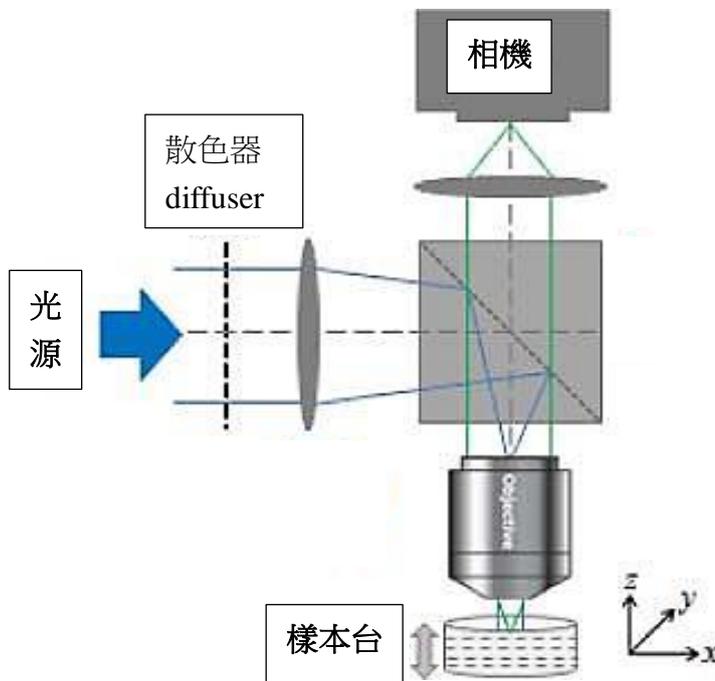


圖 2: HiLo 顯微鏡的架構。

來源: <https://www.osapublishing.org/boe/fulltext.cfm?uri=boe-3-1-206&id=226098>

由於散光器位於樣本焦平面的共軛焦平面，因此 speckle 的 pattern 在焦平面是最清楚的，離焦後就會變模糊。所以它在軸向上的對比可視作一加權函數，焦平面的加權最大，離焦的加權很小，藉此濾出焦平面的訊號。但是由於散射器的 pattern 並不是樣本本身的結構，因此濾出的焦平面訊號需做低通濾波去除空間頻率比散射器 pattern 更高頻的訊號以得到低頻影像；而因為高頻訊號只會出現在焦平面，故高頻影像只需將 Iuniform 做高通濾波即可。最後要形成焦平面的全頻影像需把高頻和低頻影像做線性疊加，讓兩者在頻率軸上的截止頻率是平滑連接的。

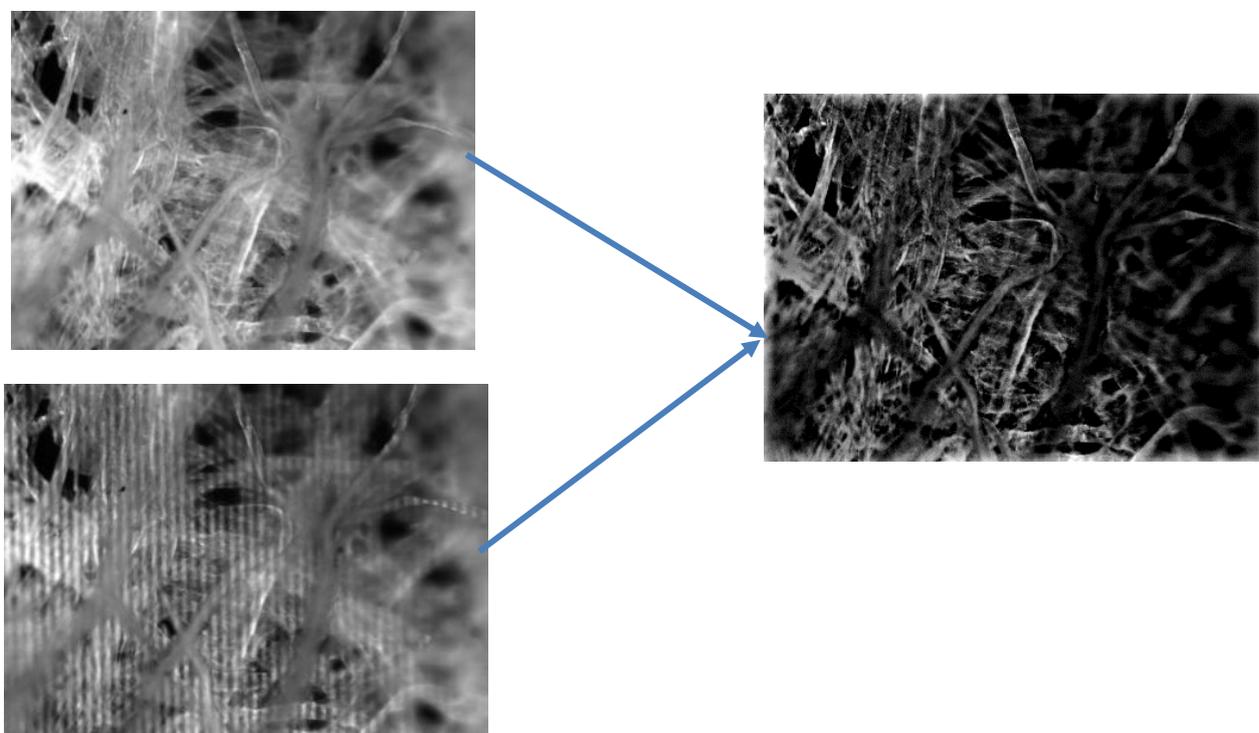


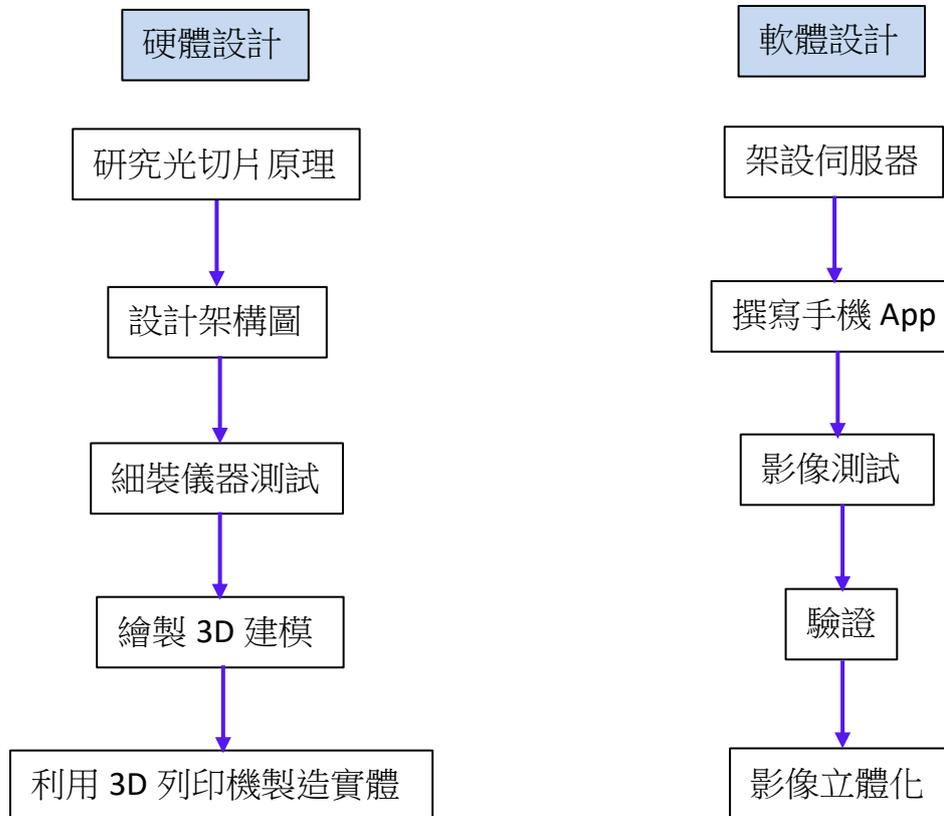
圖 3: 左上為 $I_{uniform}$ ，左下為 $I_{speckle}$ ，右為處理過後的光學切片影像。

來源: <http://biomicroscopy.bu.edu/research/hilo-microscopy>

目前 HiLo 顯微鏡在研究單位的實驗室中，由於穩定性以及解析度的要求高，因此機身大又笨重，拍攝的影像也因未即時呈現的要求必須傳到高速電腦做處理，這讓我覺得自製具有光切片功能的手機顯微鏡，在對解析度以及穩定性的要求不高的情形下，使其微小化，經濟化、便利化，而具有實用價值。

三、 研究與設計流程圖

由於本實驗需要把 HiLo 顯微鏡的技術應用到手機顯微鏡上，因此實作上要分成硬體與軟體來進行。



四、硬體設計過程

(一)、HiLo 顯微鏡的架構圖

請參照圖 4，光路的设计讓光源發光通過透鏡組後，經過分光片反射並聚焦在物鏡的前焦平面，通過物鏡後會變成平行光打在樣本上，這樣的照明方式是參考 Kohler illumination 的设计，是一種對樣本非常均匀的照明方式。而樣本內焦平面的點光源發出的光在反射透過物鏡、分光片及成像透鏡之後，會聚焦於 CCD 上並成像。而散光器要置於 L_2 透鏡的前焦點上，激發光才會把散光器的 pattern 投影到焦平面上，散光器的位置、樣本的焦平面、CCD 三者互為共軛焦平面*，散光器的 pattern 會同時出現在這三個位置上。

*共軛焦平面：實際顯微鏡中，由於光線被多次發散聚焦，每一次聚焦產生的焦點都是共軛焦平面。

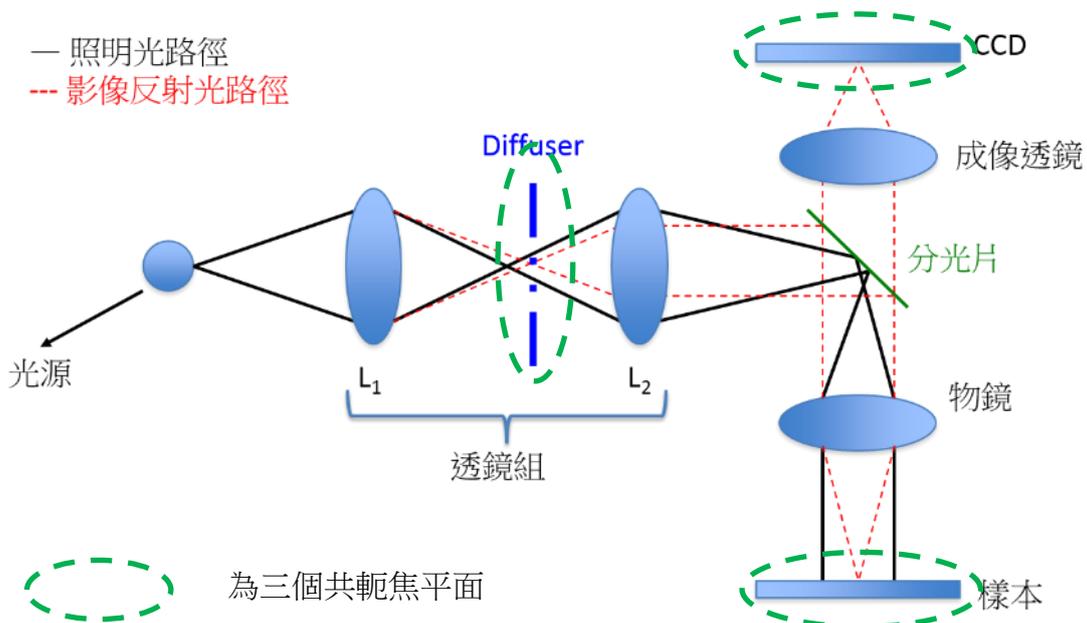


圖 4: HiLo 顯微鏡的架構圖

(二)、利用原型機模型測試影像

1. 將激發光前進方向通過之光學元件依次(除散光器外)架在光學桌上並鎖緊固定。
2. 利用一面鏡子/玻璃放在物鏡焦平面處使激發光可以被反射回來通過分光片。
3. 利用步驟 2 的反射光對正 tube lens 以及 CCD。
4. 將樣本固定在載玻片上，用夾子將載玻片夾緊並在樣本台上鎖緊以免樣本移動。
5. 連接好 CCD 與電腦後微調樣本與物鏡的距離(旋轉樣本台的轉軸)，直到螢幕上出現清楚的影像。
6. 將散光器於圖 5 的夾子上壓緊並置於透鏡組的第二個透鏡前焦距處(如圖 4)，並前後微調其位置，直到可看見清楚的散光器影像，這個位置即為共軛焦平面。
7. 移除夾子上的散光器(鬆開螺絲)，此時照到樣本上為均勻光斑。
8. 將影像存檔，為 I_{uniform} 。
9. 插入散光器，再將影像存檔，為 I_{speckle} 。
10. 旋轉樣本台之轉軸刻度移到下一層(刻度為 $10\ \mu\text{m}$)並重複步驟 3 至 9，得到一系列的 Z 軸影像(I_{uniform} 以及 I_{speckle})。

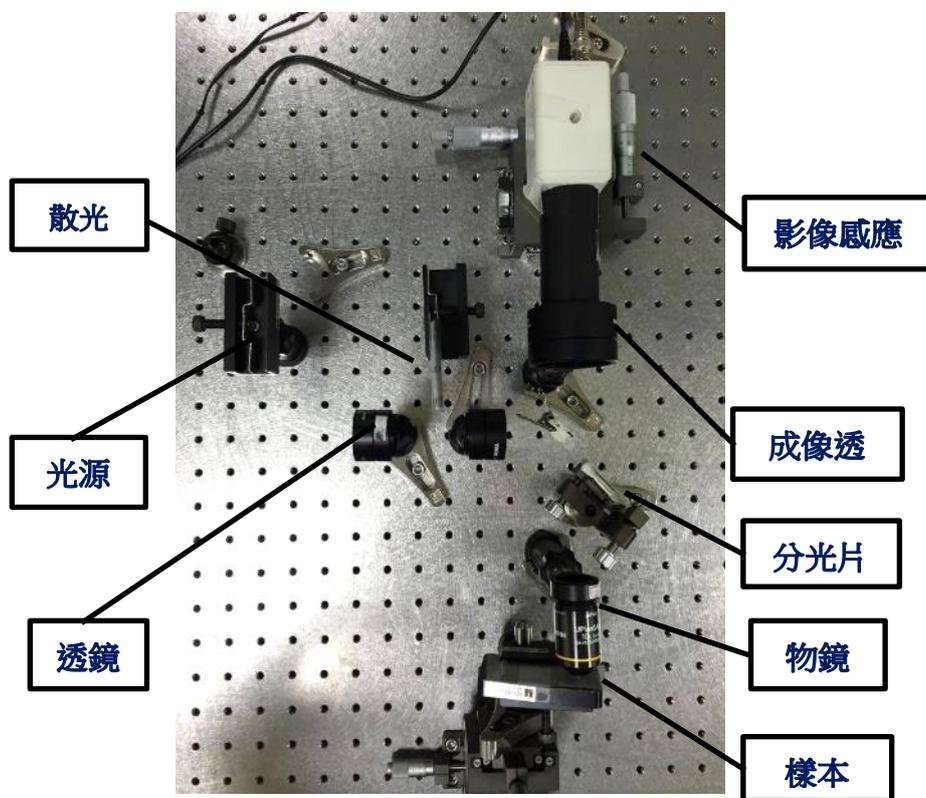


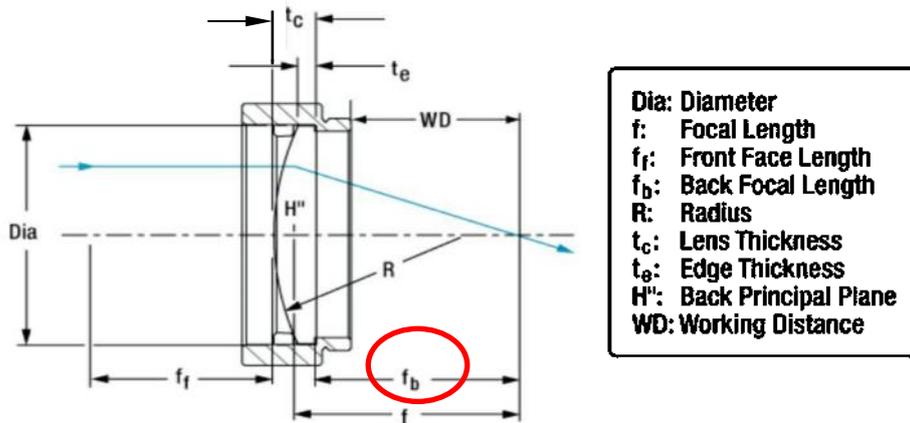
圖 5: 原型機實際架設圖

(三)、手機顯微鏡實體設計之初步構想

1. 設計理念：將原型機的光路微小化，並實際的做出一個實體顯微鏡，希望能結合手機拍攝使用。採購可行的光學元件，根據光學元件的大小繪製 3D 設計圖。使 Google 公司 Sketch up 的軟體繪製此 3D 圖，非常易於操作。

2. 光學透鏡的規格：

(1)透鏡組的焦距(Focal Length)為 15.0mm，考慮設計圖，可採用廠商所給的數據，從透鏡邊緣到焦點的距離(Back Focal Length)為 11.6mm。



Item #	Optic Diameter	Focal Length ^a	Diopter ^b	Radius of Curvature	Center Thickness	Edge Thickness	Back Focal Length ^{a,c}	Working Distance ^a
LA1540-A-ML ^d	Ø1/2"	15.0 mm	+66.6	7.7 mm	5.1 mm	1.8 mm	11.6 mm	8.8 mm

圖 6：透鏡組示意圖

(2) 物鏡的焦距(micro video imaging lenses)為 1.68mm，主要是應用在 CCD 照相用的物鏡。但若按照原來正常的方式使用，樣本台在左側(透鏡口徑較大)，當光線由右側(透鏡口徑較小)進入，投射到樣本上再反射光就會非常微弱，因此在設計上反過來使用。

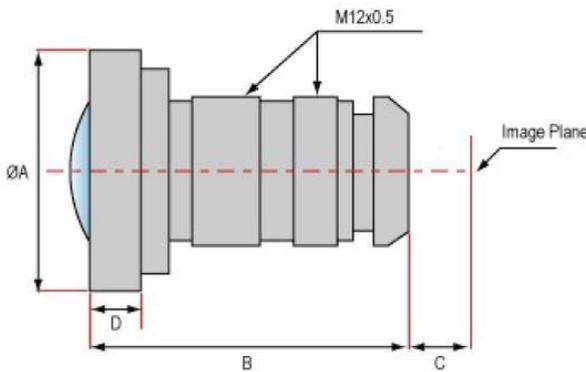


圖 7：物鏡示意圖

Stock #	No-IR Cut Filter	IR Cut Filter @650nm	Focal Length (mm)	Aperture (f/#)	A (mm)	B (mm)	C (mm)	D (mm)
#59-776		#66-880	1.68	2.5	15.0	13.2	3.3	2.8

3. 其他結構設計說明：

(1)光源：設計成可拆卸式，以方便更換電池。

(2)Diffuser(散光器)：由於軟體處理需要均勻光斑照射的影像(uniform 影像)與非均勻光斑照射的影像(speckle 影像)，因此需設計出在兩個透鏡之間可移動的 diffuser，讓使用者方便使用。

(3)若要調整物體的焦平面，必須設計出可轉動的物鏡調節輪，由於使用 M12 的螺紋，每旋轉一圈的螺距為 0.5mm，故每轉五度，樣本台將會上升台會上升 7 微米，確實達成光切片效果。計算如下：

$$0.5 \text{ mm} \times \frac{5^\circ}{360^\circ} \approx 0.0069 \mu\text{m}$$

(四)、 手機顯微鏡微小化之最短距離的估計

1. 嘗試將光學路徑放在同一光軸上，利用數學上的柯西不等式及光學上的透鏡成像公式，即可初步估計出手機顯微鏡可行之最小距離。

一 激發光路徑

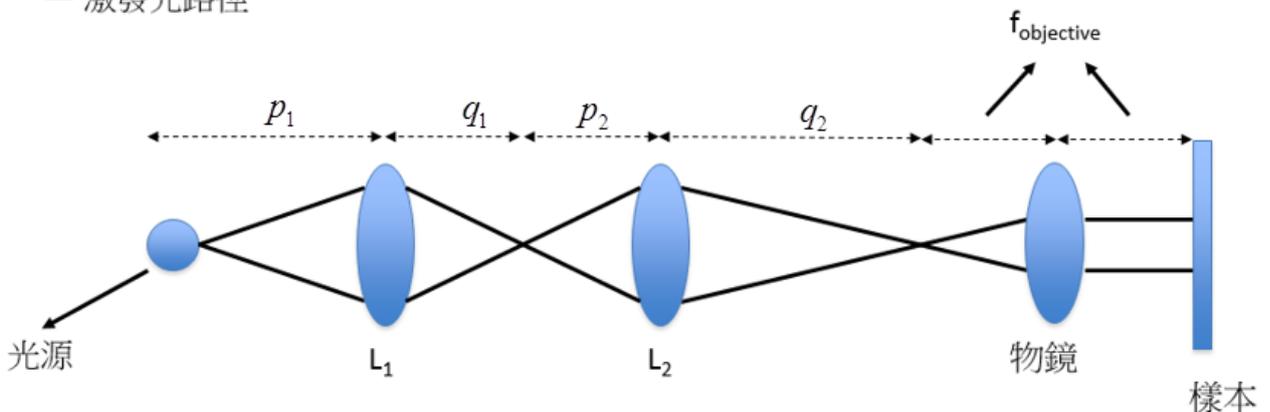


圖 8：簡要光路圖

假設 L_1 的焦距是 f_1 ， L_2 的焦距是 f_2 ，

根據薄透鏡公式 $\frac{1}{p_1} + \frac{1}{q_1} = \frac{1}{f_1}$ (1) 、 $\frac{1}{p_2} + \frac{1}{q_2} = \frac{1}{f_2}$ (2)

已知柯西不等式 $(a^2 + b^2)(c^2 + d^2) \geq (ab + cd)^2$ (3)

利用(3)，則 $(p_1 + q_1) \left(\frac{1}{p_1} + \frac{1}{q_1} \right) \geq \sqrt{\left(p_1 \times \frac{1}{p_1} \right)} \sqrt{\left(q_1 \times \frac{1}{q_1} \right)} = 4 \dots\dots$

將(1)代入(4)，可得 $p_1 + q_1 \geq 4f$ ，同理(2)代入(4)，可得 $p_2 + q_2 \geq 4f$

所以 $p_1 + q_1 + p_2 + q_2 \geq 4f + 4f$

- 我們將買來的透鏡計算其可行的最段距離後，在光學平台上微調出最佳距離後，並實際確認以手機拍攝成功，可達成光切片的效果，再實際測量每個光學元件的相對距離，最後設計並繪製出整個設計圖。本設計的透鏡焦距 $f_1 = f_2 = 15 \text{ mm}$ ，故光源到分光鏡的距離可估計最小為 $15\text{mm} \times 8 = 120\text{mm} = 12\text{cm}$ 。

五、軟體設計過程

(一)、資料探討與語言選擇

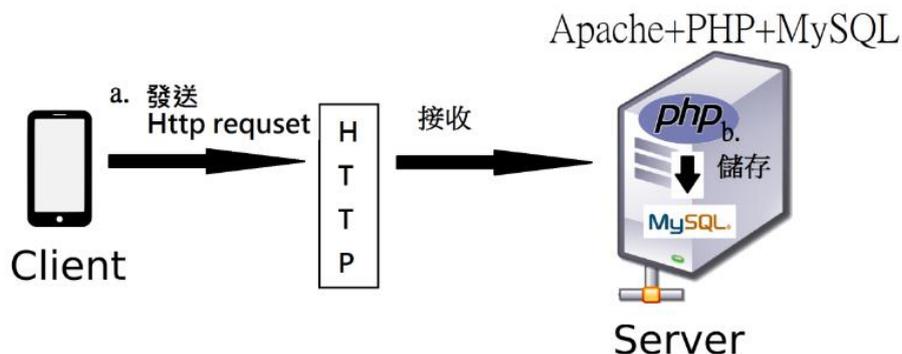
- 為什麼要在 server 上進行影像處理？

隨著智慧型手機的蓬勃發展，手機內的處理器和記憶體等級越來越好，使手機的處理速度和效能更高。儘管如此，光是實作圖片高通濾波的手機程式要在手機上進行處理，就已需要花到約 6 分鐘的時間。為了改善影像處理在手機上時間過長的情況，我們希望利用電腦來進行影像的處理。因為電腦的處理速度依然是比手機快速。

- 操作主要分成二個部份：

(1)、手機透過網路傳送圖片到 server

- 手機透過 http post 網路協定傳送圖片到 php 網頁。
- 透過 php 網頁將圖片傳到資料庫中。

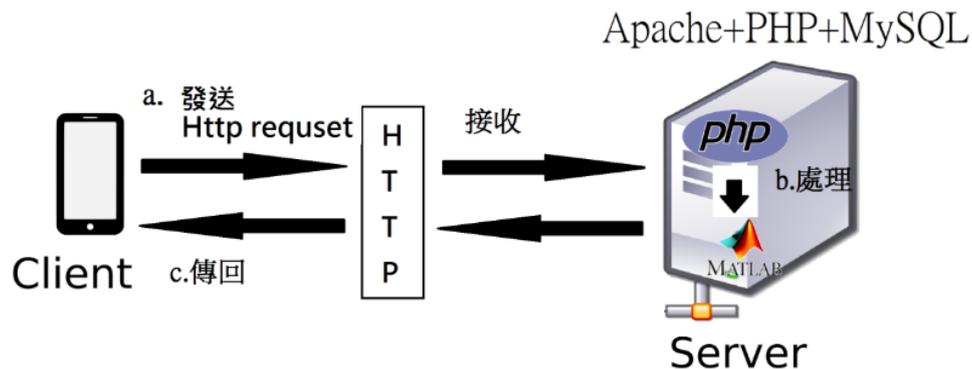


(2)、手機要求 server 進行 HiLo 影像處理並將圖片送到手機

(a)從手機透過 http post 網路協定發送一個執行的請求到 php 網頁

(b)php 網頁自動去呼叫 matlab 的程式執行影像處理並將完成的圖片儲存到資料庫

(c)資料庫透過 php 網頁將圖片送到手機上顯示



(二)、 HiLo 影像運算流程

1. 手機App撰寫的依據：本人透過 java 程式撰寫適用於 android 手機的App，主要參考 Ricky Wai Suen 的碩士論文[4]附錄所寫的HiLo運算程式碼，參照論文[4]的作法，經由一張Uniform和Speckle的影像進行相關的影像處理，產生一張Hi的影像與Lo的影像，最後結合成一張HiLo的影像。

2. 程式運算主要分成三個部份：

I. 產生 Hi 的影像 (對 Uniform 的影像進行高通濾波)

- A. 將 Uniform 的影像灰階化，得到 GrayUniform。
- B. GrayUniform 的影像做傅立葉轉換，得到 FFTUniform。
- C. FFTUniform 的影像進行傅立葉的低通濾波，得到 LowUniform。
- D. GrayUniform 減去 LowUniform 的影像得到 Hi 的影像。

II. 產生 Lo 的影像

- A. 將 Uniform 與 Speckle 的影像灰階化，得到 GrayUniform 和 GraySpeckle。
- B. 灰階化 Uniform 和 Speckle 的影像做傅立葉轉換，得到 FFTUniform 和 FFTSpeckle。

- C. FFTUniform 和 FFTSpeckle 的影像進行傅立葉的低通濾波，得到 LowUniform 和 LowSpeckle。
- D. 將 GrayUniform 除以 LowUniform，得到 impUniform。
- E. 將 GraySpeckle 除以 LowSpeckle，得到 impSpeckle。
- F. impUniform 減去 impSpeckle 得到 imp 的影像。
- G. imp 影像做傅立葉轉換，得到 FFTimp。
- H. FFTimp 的影像進行傅立葉的帶通濾波，得到 imLo1。
- I. 將 imLo1 進行反傅立葉轉換。
- J. FFTimp 的影像進行傅立葉的帶通濾波(值不同)，得到 imLo2。
- K. 將 imLo2 進行反傅立葉轉換。
- L. imLo1 減去 imLo2 的絕對值，得到 imLo3
- M. imLo3 乘上 GrayUniform，得到 imLo4
- N. 將 imLo4 進行低通濾波，得到 imLo5
- O. 將 imLo5 乘上 Eta 值，最後得到 imLo 的影像

III. 產生 HiLo 的影像

- A. 將 Hi 的影像與 Lo 的影像相加，即可得到產生 Lo 的影像。

(三)、 軟體架構

1. Android App

外觀設計：四個按鈕，一個視窗畫面顯示影像。

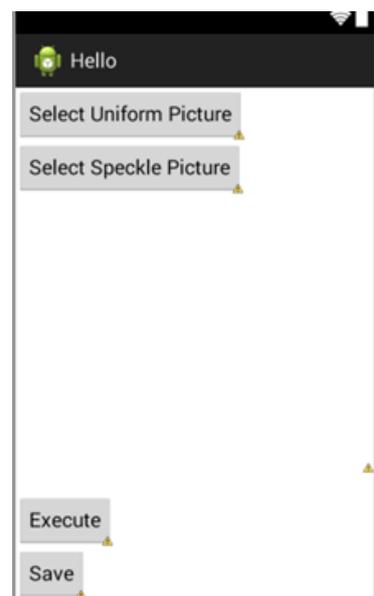


圖 10: App 使用介面圖

(1). **Select Uniform Picture**: 從手機的相簿中選一張 Uniform 的圖片，將圖片傳到 php 網頁。

(2). **Select Speckle Picture**: 從手機的相簿中選一張 Speckle 的圖片，將圖片傳到 php 網頁。

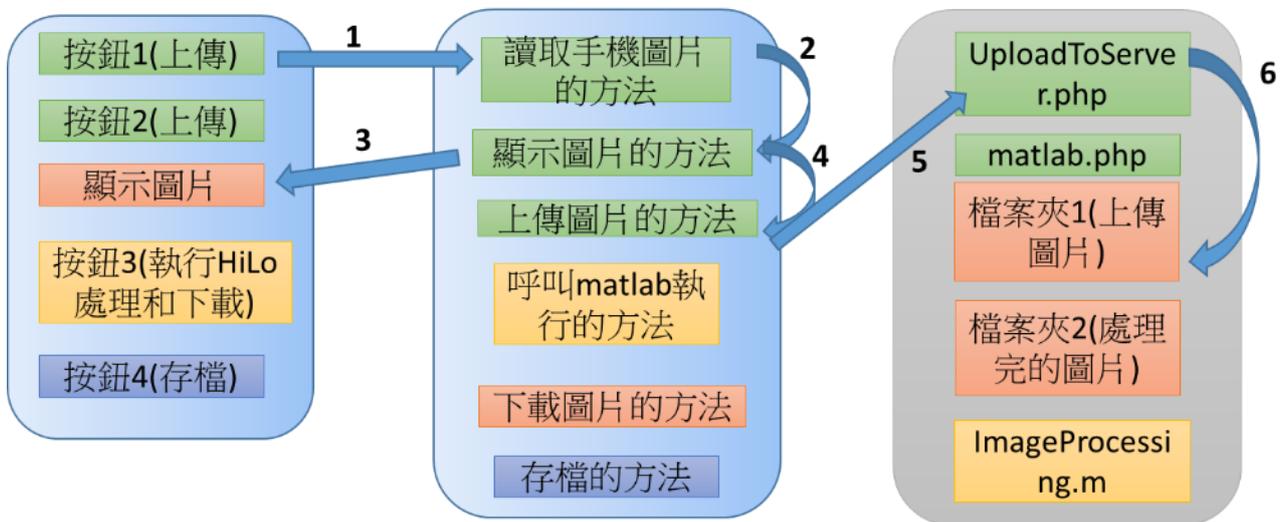


圖 11：上傳圖片的詳細流程圖

按下按鈕 1(Select Uniform Picture)->呼叫”讀取手機圖片的方法”來執行->選擇 uniform 圖片
->呼叫”顯示圖片的方法”來執行->顯示圖在螢幕上->呼叫“上傳圖片的方法”來執行
->上傳圖片到 Server 並呼叫 UploadToServer.php 執行->將 uniform 圖片放到檔案夾 1 內
->手機螢幕上會顯示” File Upload Completed”

(按鈕 2(Select Speckle Picture)同上)

(3). **Execute**：要求 php 網頁自動呼叫 matlab 程式執行影像處理，然後將影像處理完的圖顯示在視窗畫面上。

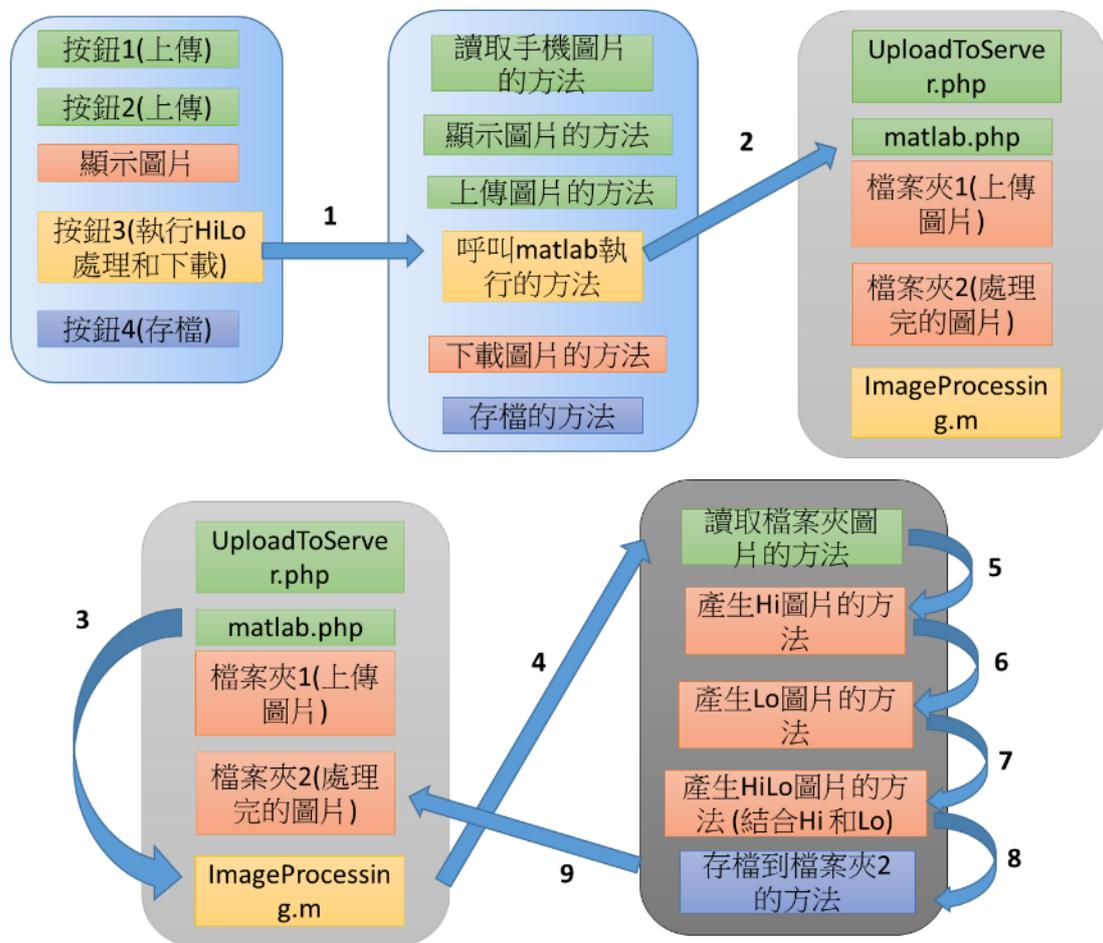


圖 12：處理及回傳圖片的詳細流程圖

按下按鈕 3(Execute)->呼叫”呼叫 matlab 執行的方法”來執行->呼叫 matlab.php 執行->自動呼叫 matlab 程式開始執行->呼叫”讀取檔案夾圖片的方法”->從檔案夾 1 讀取 uniform 和 speckle 圖片->呼叫”產生 Hi 圖片的方法”->呼叫”產生 Lo 圖片的方法”->呼叫”產生 HiLo 圖片的方法 (結合 Hi 和 Lo)”->呼叫”存檔到檔案夾 2 的方法”->返回到按鈕 3->呼叫”下載圖片的方法”來執行->取得檔案夾 2 內的 HiLo 圖片->手機螢幕上會顯示” Execute Completed”

(4). Save：將影像處理完的圖儲存在手機的記憶體內

2. PHP 網頁架設:

PHP 網頁分成二個部分，一部分負責去接收 android 傳送過來的圖片且放置資料庫中；另一部分為自動呼叫 matlab 程式執行影像處理，然後將影像處理的圖傳回到手機。

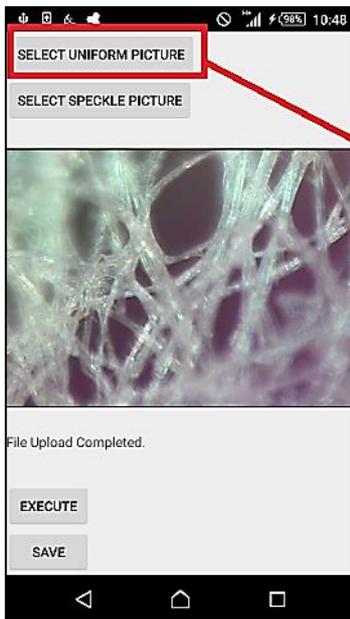
伍、 研究結果

一、成功合成 HiLo 光學切片照片

(一) 自行設計 App 將手機上的照片處理成 HiLo 影像

先拍攝好兩張樣品(衛生紙)影像一張是直接對齊拍攝($I_{uniform}$)，另一張是加了條狀的散射器拍攝($I_{speckle}$)。接著利用自行設計的 App 進行 HiLo 影像處理，步驟如下：

步驟 1：上傳 $I_{uniform}$ 的照片



點選”SELECT UNIFORM PICTURE”

→呼叫”讀取手機圖片的方法”來執行

→選擇 $I_{uniform}$ 圖片

→呼叫”顯示圖片的方法”來執行

→顯示圖在螢幕上

→呼叫”上傳圖片的方法”來執行

→上傳圖片到 Server 並呼叫 UploadToServer.php 執行

→將 uniform 圖片放到檔案夾 1 內

→手機螢幕上會顯示”File Upload Completed”

步驟 2：上傳 $I_{speckle}$



點選”SELECT SPECKLE PICTURE”

→呼叫”讀取手機圖片的方法”來執行

→選擇 $I_{speckle}$ 圖片

→呼叫”顯示圖片的方法”來執行

→顯示圖在螢幕上

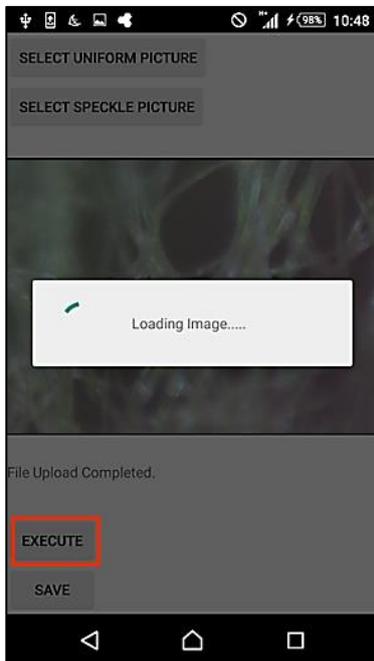
→呼叫”上傳圖片的方法”來執行

→上傳圖片到 Server 並呼叫 UploadToServer.php 執行

→將 speckle 圖片放到檔案夾 1 內

→手機螢幕上會顯示”File Upload Completed”

步驟 3：完成 1 和 2 已將 $I_{uniform}$ 和 $I_{speckle}$ 圖片上傳至 server，3 是對圖片進行處理產生 HiLo 的圖片和下載 HiLo 的圖片



點選"EXECUTE"

→呼叫"呼叫 matlab 執行的方法"來執行

→呼叫 matlb.php 執行

→自動呼叫 matlab 程式開始執行

→呼叫"讀取檔案夾圖片的方法"

→從檔案夾 1 讀取 uniform 和 speckle 圖片

→呼叫"產生 Hi 圖片的方法"

→呼叫"產生 Lo 圖片的方法"

→呼叫"產生 HiLo 圖片的方法 (結合 Hi 和 Lo)"

→呼叫"存檔到檔案夾 2 的方法"

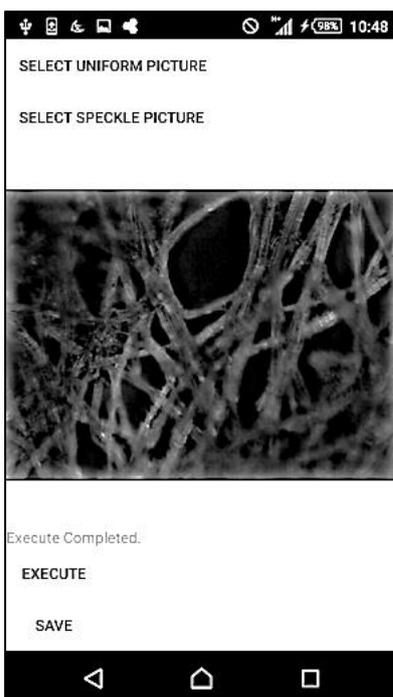
→返回到"EXECUTE"

→呼叫"下載圖片的方法"來執行

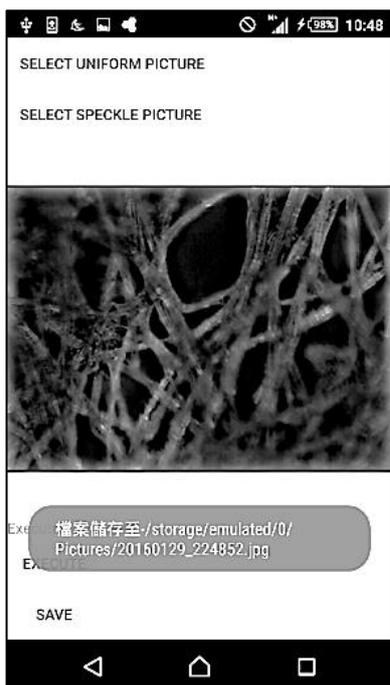
→取得檔案夾 2 內的 HiLo 圖片

→手機螢幕上會顯示"Execute Completed"

結果：



步驟 4：將結果影像存檔



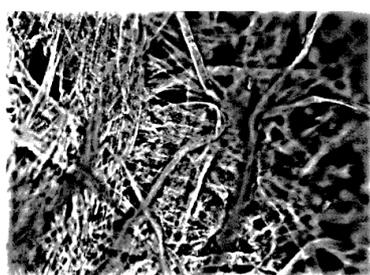
點選”SAVE”

→呼叫”存檔的方法”來執行

→圖片存到手機的相簿裡

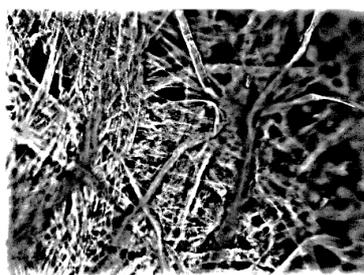
(二) 驗證正確影像

由於 HiLo 顯微鏡的演算法已經被提出並驗證可以正確得到光學切片影像了，而且其發明人 Jerome Mertz 教授也寫了一個外掛程式供大家使用，因此一開始先使用免費的影像處理軟體 imageJ 來做 HiLo 的影像處理，再使用自行設計的 App 處理並確認其結果的正確性。



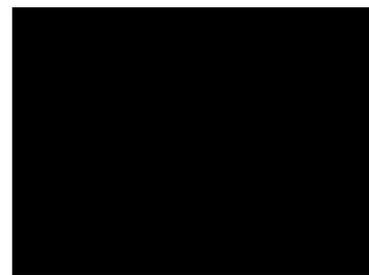
imageJ處理的HiLo影像

—



自製手機app處理的HiLo影像

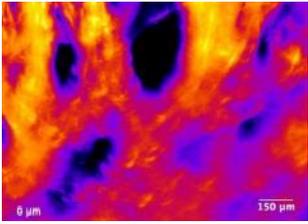
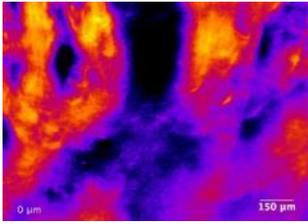
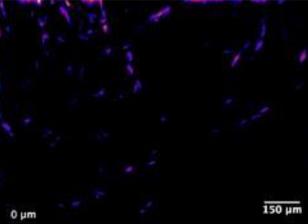
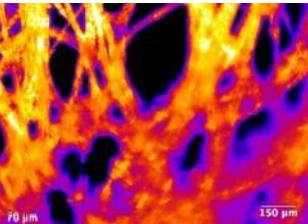
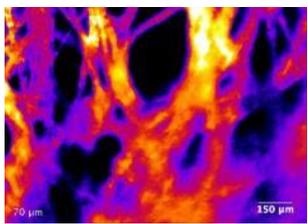
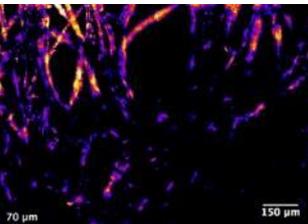
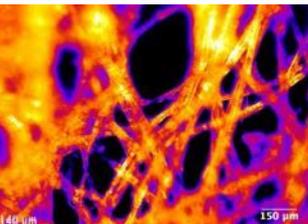
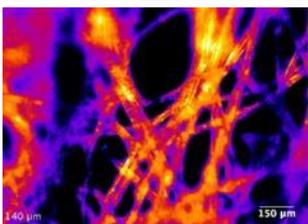
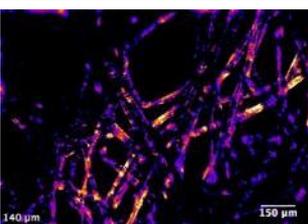
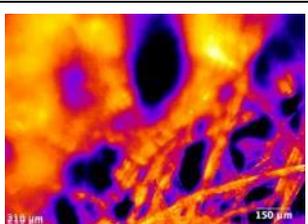
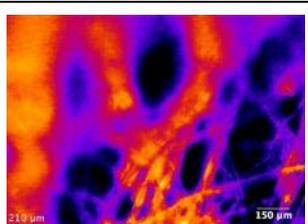
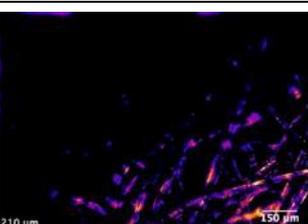
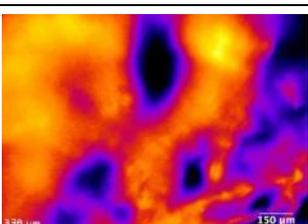
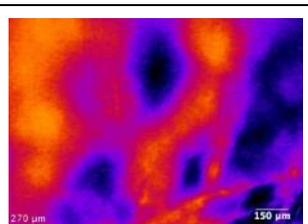
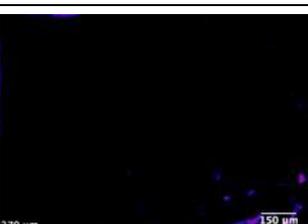
=



將 imageJ 處理過後的 HiLo 影像與自行撰寫的 App 所處理的 HiLo 影像利用 imageJ 將兩圖線性相減，得出結果為全黑影像，代表兩張影像是完全相同的，因此可證明手機 App 處理的影像是正確的。

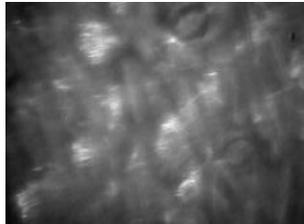
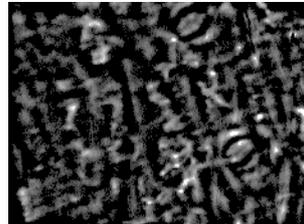
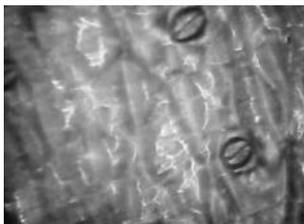
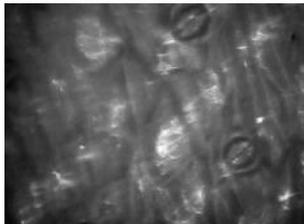
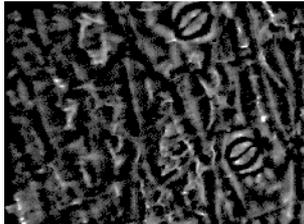
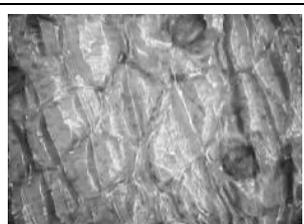
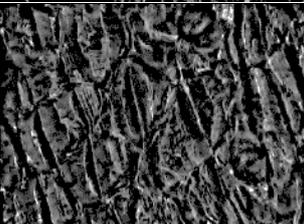
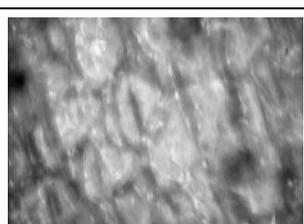
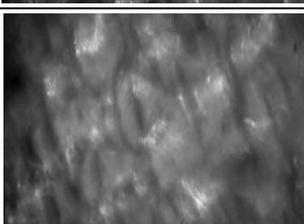
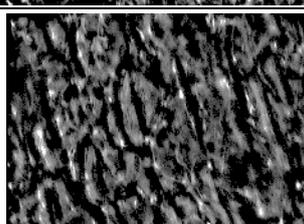
二、 拍攝並處理樣本在不同深度的影像

(一) 拍攝並處理樣本一(衛生紙)在不同深度的影像

影像名稱 影像深度	均勻光拍照 I_{uniform}	加散射器拍照 I_{speckle}	處理後的 HiLo mage
0 μm			
70 μm			
140 μm			
210 μm			
280 μm			

從 I_{uniform} 的一系列影像可以看出，在深度 0 μm 以及 280 μm 的地方，大多數的物體都是模糊離焦的，在 HiLo 系列影像可以看出這些離焦的物體幾乎都被剔除了。深度 70 μm 的影像是左上角在焦平面，而右下角離焦，210 μm 的地方則相反。而在深度 140 μm 則是影像中央為焦平面的部份。

(二)拍攝並處理樣本二(車前草下表皮)在不同深度的影像

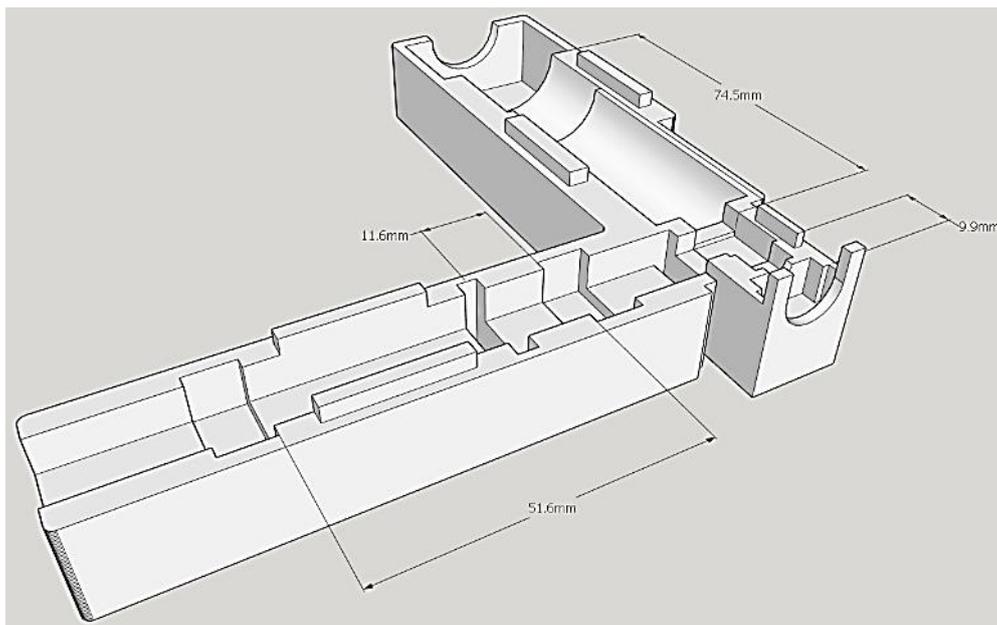
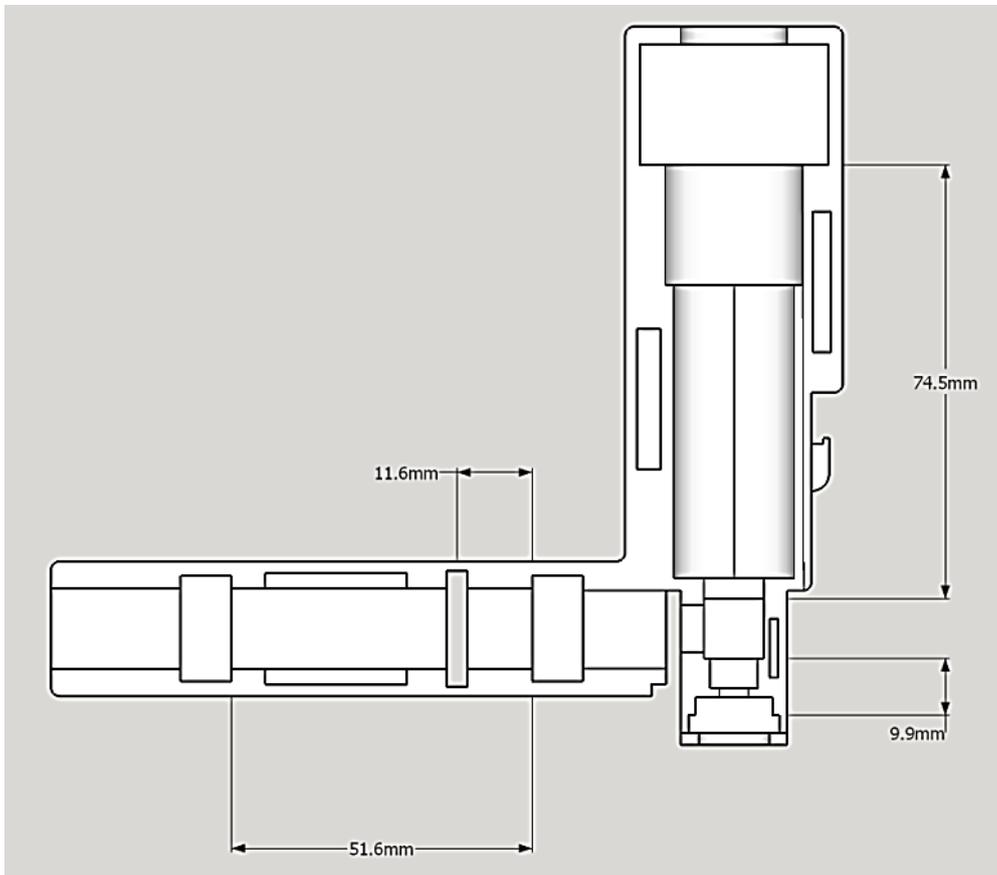
影像名稱 影像深度	均勻光拍照 I_{uniform}	加散射器拍照 I_{speckle}	處理後的 HiLo image
0 μm			
20 μm			
40 μm			
60 μm			
80 μm			

此為車前草下表皮，我們能看到非常明顯的保衛細胞由離焦到焦平面再到離焦的樣貌。

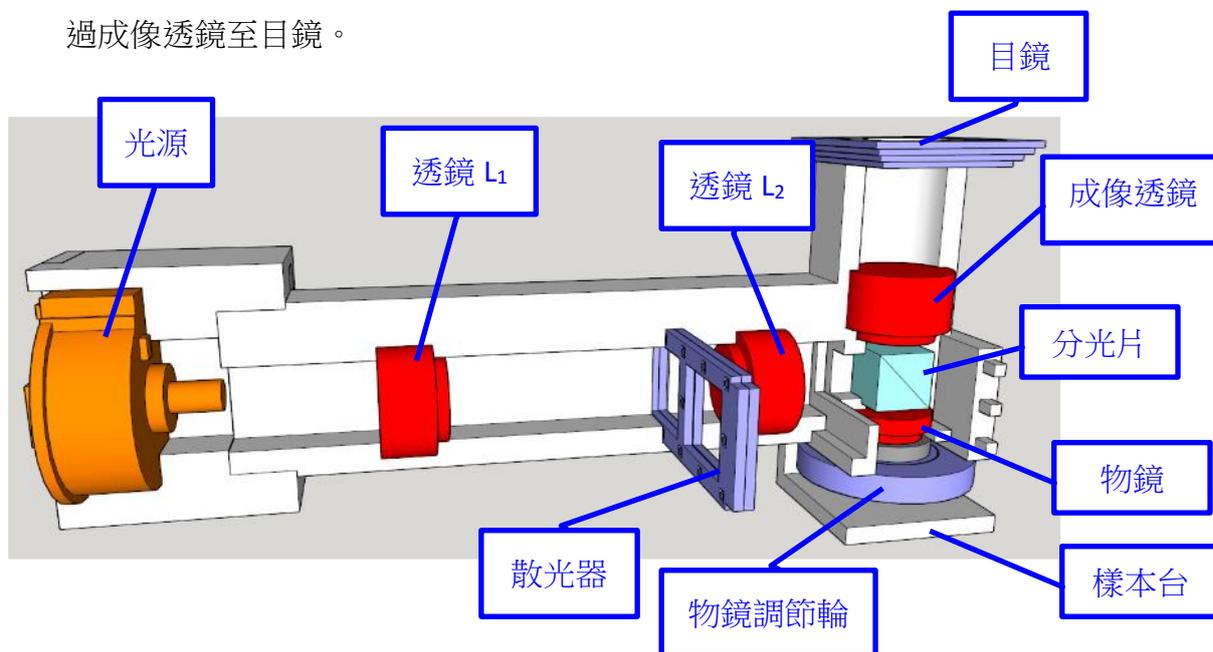
三、完成手機顯微鏡實體模型

(一) 手機顯微鏡微的設計圖

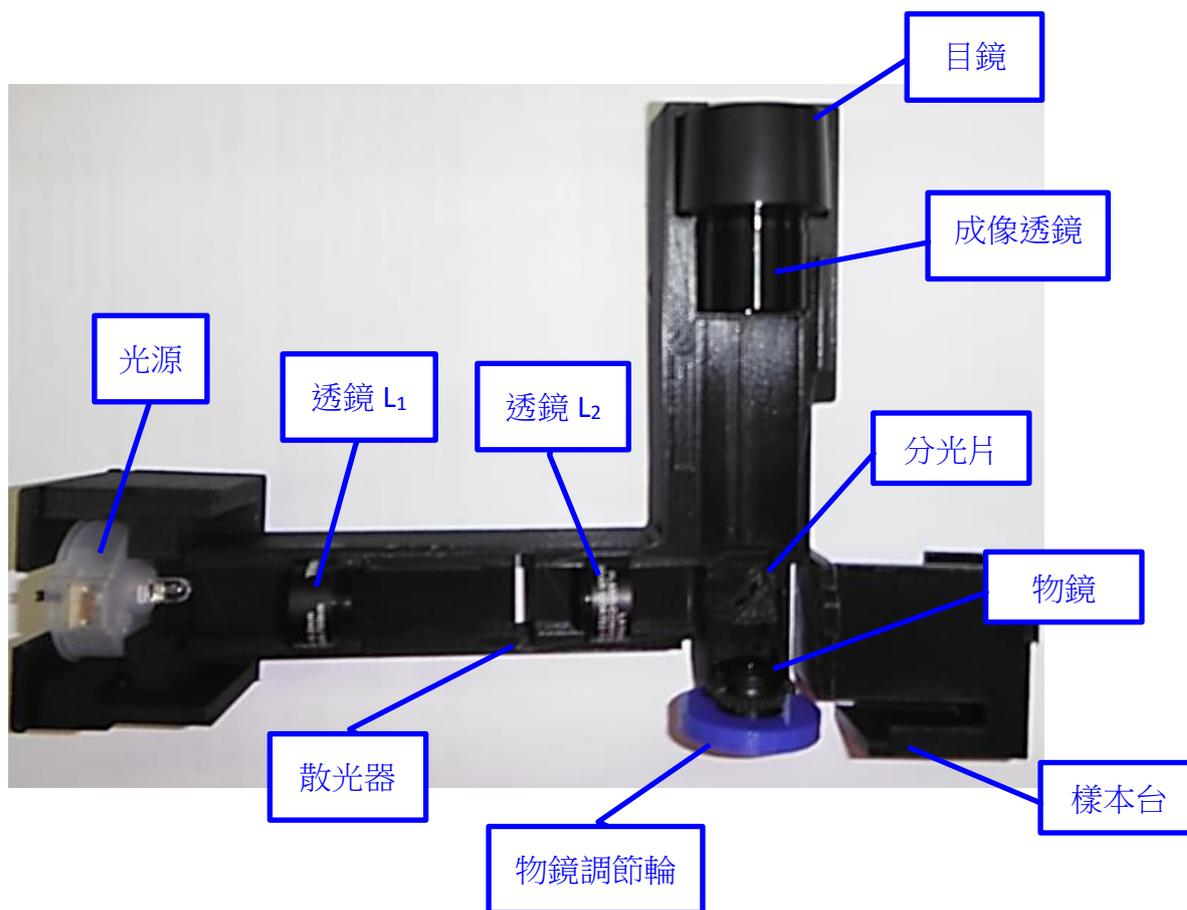
1. 以下為自製手機顯微鏡中，各光學元件之間的相對距離示意圖：



2. 使用 Google 公司 Sketch up 的軟體繪製此 3D 圖，整個構圖可看見左側的光源通過透鏡組後，在方形分光片上反射通過物鏡後，照射在樣本台上的標本，再反射經過成像透鏡至目鏡。



(二) 使用 3D 列表機列印出的實體模型



陸、 討論

一、討論球面像差對光切片顯微鏡的影響程度

球面像差為目前我們已知可以討論的成像系統缺陷，參考上圖，上面為完美透鏡的聚焦，所有光線匯聚到焦點上。而下面則為有球面像差的聚焦，通過透鏡邊緣和透鏡中央的光線匯聚到軸向上不同點。所以球面像差在軸向上會拉長焦點的範圍，而在橫向上焦點的最小值會因此變大，進而降低影像的解析度。

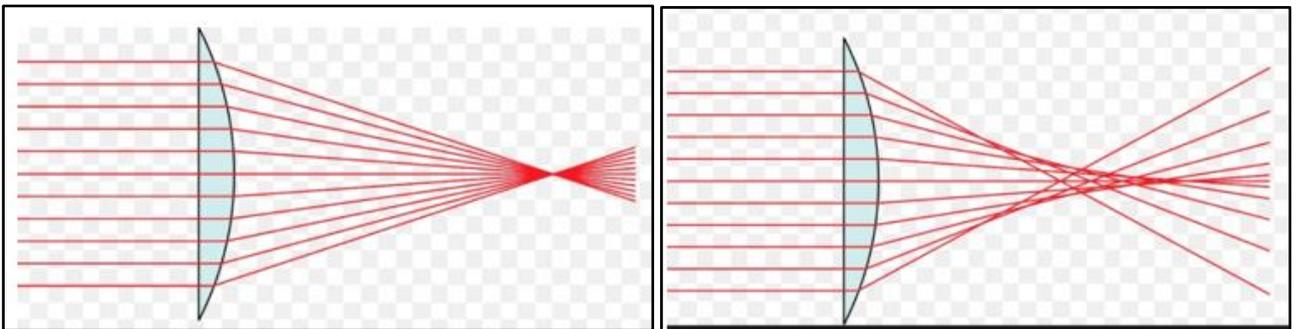


圖 10 完美透鏡及有球面像差的聚焦，圖片來源：

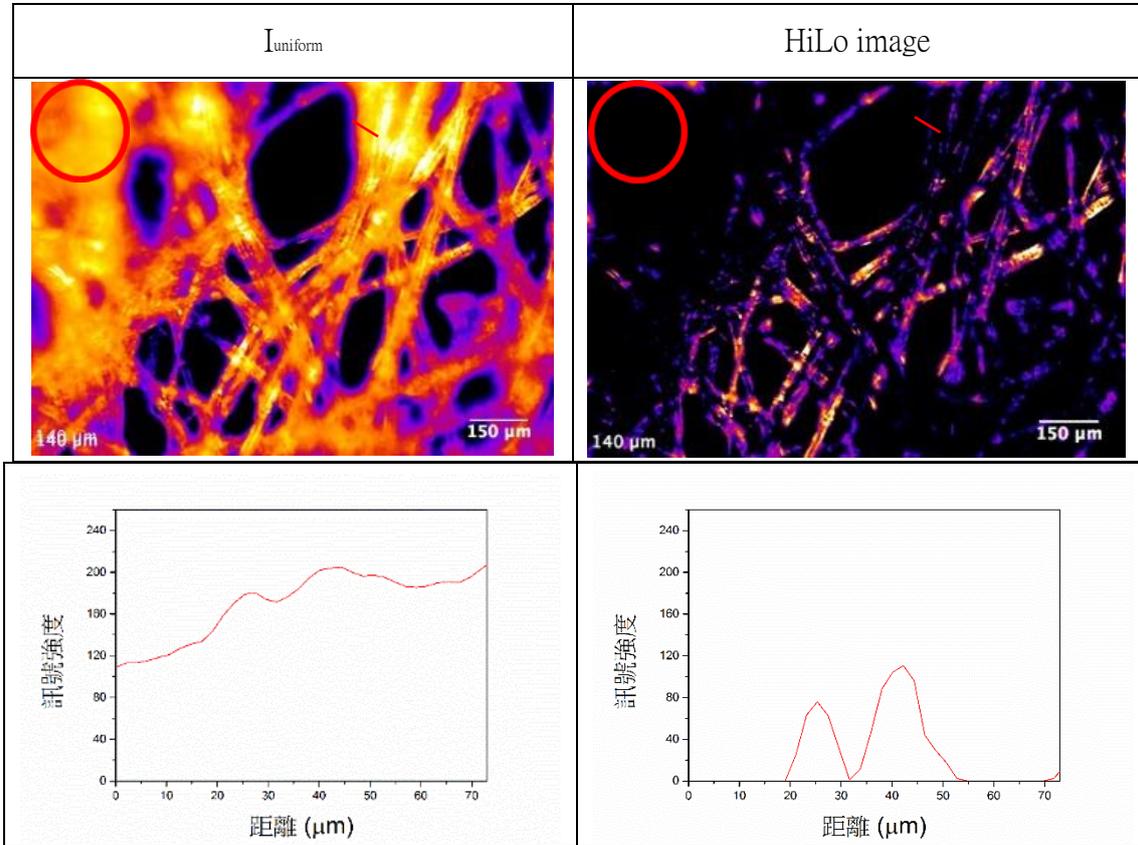
https://zh.wikipedia.org/wiki/%E7%90%83%E9%9D%A2%E5%83%8F%E5%B7%AE#/media/File:Spherical_aberration_2.svg

在我們的設計中，球面像差的影響可以分成激發光路與成像光路來討論。

- (一) 在激發光路上，由於激發光最後在樣本上照明時是非聚焦的狀態以形成均勻的照明，因此球面像差造成最主要的影響是放入散光器後，投影在樣本上的結構性光斑其邊緣是否清楚，定量上分析結構性光斑清晰與否請參考[5]。
- (二) 而收光光路系統則相對激發光路較容易會受到球面像差的影響，因為成像的方式是全視野(wide-field)成像，根據海更斯原理(Huygens principle)，樣本上的每一點可視為新的點光源，通過物鏡、成像透鏡及手機鏡頭投影到最後的影像感測器上，其中物鏡及手機鏡頭均為複合式透鏡，已校正球面像差，因此主要會造成球面像差的來源為成像透鏡。目前由於使用的是短焦距(5 cm)的透鏡，透鏡中央與邊緣的厚度有明顯的改變，因此成像多少還是會有球面像差的影響，但是在目前的設計我們已經將這樣的影響盡可能地降低了，若要進一步提升影像品質則需要特別設計的成像透鏡，校正球面像差。

二、一般均勻光照與 HiLo 影像的分析

在前述的結果可看出，影像幾乎都是離焦的時候，HiLo 顯示離焦雜訊都被剔除了，因此利用深度 140 μm 的影像，部分離焦部分在焦平面來做分析。



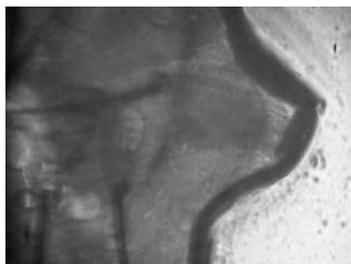
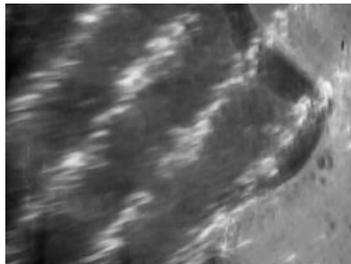
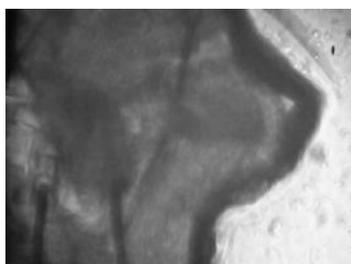
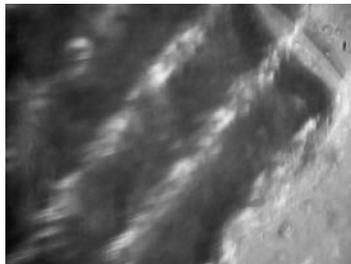
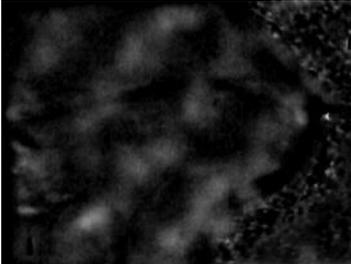
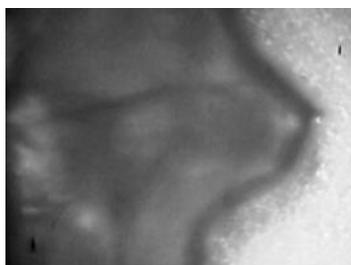
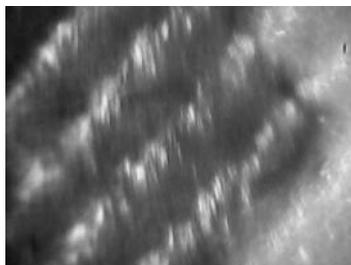
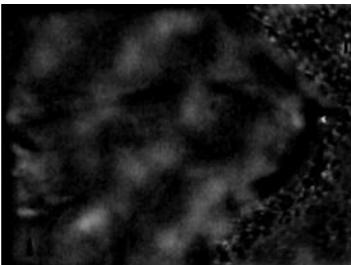
比較：

- (一) 上圖中紅色圓圈標示的地方，在 I_{uniform} 可以很明顯的看出被離焦雜訊所干擾，而在 HiLo 影像由於剔除這些離焦雜訊就能明顯的看出改善。
- (二) 比較上圖中紅線標示的地方，表格下列是紅線經過訊號強度的分布，兩個峰值就是在焦面的物體，在 I_{uniform} 中由於離焦干擾過大導致不容易看出這兩個峰值，而在 HiLo 影像中則可以明顯看到這兩個峰值，因此可說明 HiLo 的影像在剔除了離交雜訊後確實增加了影像的對比。

三、散光器是否在物鏡的共軛焦平面上所造成之影響

要產生光切片的影像，必須要加入散光器(diffuser)，而散光器的位置要擺放在透鏡組的共軛焦平面上，若散光器不在物鏡的共軛焦平面上，那會造成甚麼狀況呢？

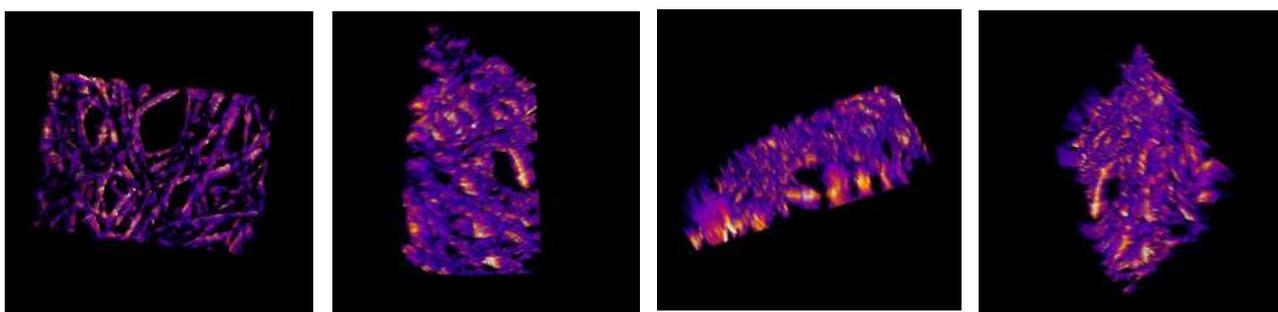
以下以果蠅頭殼樣本所拍攝出的結果來說明：

	Iuniform	Ispeckle	HiLo image
0 μm			
20 μm			
40 μm			

由上圖的影像可看出，uniform 影像幾乎都為離焦部分，但卻能在最後的 HiLo 影像看到清楚的 diffuser (散光器)所造成的 pattern，由此推斷，這時候 diffuser 所放的位置不是在透鏡的共軛焦平面上，所以在最後呈現 HiLo 影像時才能看到，這會影響對真實影像的判讀。另外，在[6]中也有提到，結構性光斑可能會出現在最後的 HiLo 影像上，只要再做適當的影像濾波即可剔除。在較厚的樣本上若取像深度太深，會因為結構性光斑在經過樣本上層不均勻的組織折射、散射後變形變模糊，而降低 I_{speckle} 得結構對比，進而影響 HiLo 光學切片的解析度。在上面果蠅頭殼的影像中，由於果蠅頭殼是浸泡在生理食鹽水中，有許多雜質摻雜其中(脂肪等)，因此相對衛生紙而言會對結構性光斑造成相對嚴重的變形，進而降低其光學切片能力，以導致計算出錯誤的 HiLo 影像。

四、呈現樣本立體相貌

將樣本之一的衛生紙，由表面開始每增加深度 $10\ \mu\text{m}$ 拍攝一張 HiLo 影像，共 30 張，可使用軟體 imageJ 的外掛程式 3D viewer 將 30 張 HiLo 影像依照深度的先後順序疊合在一起做出立體影像，用 imageJ 開啟後再輸入到再使用 3D viewer 進行 3D 建模，不但能看到完整且真實的物體相貌，更能清楚看出物體在空間的立體結構。下圖為各種不同視角所見樣本(衛生紙)的立體影像。



五、未來展望

- (一) 現行的架構必須是手機要利用網路連到 server 才可行，而有許多地區是沒有網路連線的，必須倚賴手機本身的運算資源。目前想到的方法是：利用藍芽將手機所拍攝的兩張影像傳到附近的電腦上，利用電腦中所搭配的影像處理系統完成 HiLo 影像，再傳回手機。
- (二) 提升輔助手機軟體的功能，使之有疊圖並轉化為 3D 立體影像的效果，讓使用者更方便使用並且更加實踐立體化。
- (三) 製作成自動化的機器人，使之能藉光切片自動分析樣本組成，使之能夠探索無人的未知區域，並且分析其中的物品，再自動傳回，有利於未知區域的開發工作。

柒、 結論

一、證明 HiLo 於散射光影像的可行性

目前有關 HiLo 的論文都只有提及收集螢光訊號，沒有看到有用在散射光訊號的收集上。本實驗透過架設自製原型機，證明 HiLo 的原理也能夠應用在散射光上，大幅提升 HiLo 光切片的深度與廣度

二、結合雲端運算加速影像處理流程

- (一)、研發出手機端與伺服器端的連結分析軟體。
- (二)、拍攝的影像能成功的使用軟體計算出運算結果，並與 imageJ 的外掛程式得到的影像吻合，經過 HiLo 的影像處理後，離焦雜訊的剔除確實提升了影像的對比。

三、利用 3D 列表機自製具有光切片功能的手機顯微鏡模型

- (一)、購買微小透鏡，經過理論計算出最小機身長度後，再於光學平台上微調，成功的拍攝並錄影，也順利完成具有光切片的 HiLo 影像。
- (二)、利用 3D 列表機以 1：1 的比例製作出可拆卸式的手機顯微鏡，目前正進行到最後的測試階段。

四、預期實現影像立體化的光切片手機顯微鏡

已在電腦中利用 imageJ 將每增加深度 10 μm 所拍攝的 30 張 HiLo 影像疊加，可看到不同角度的立體樣本影像，希望能進一步完成在手機上就能實現影像立體化。

捌、 參考文獻

- [1]J. B. Pawley, "Handbook of biological confocal microscopy", Springer, 3rd edition, 2006.
- [2]M. B. Ahrens, M. B. Orger, D. N. Robson, J. M. Li and P. J. Keller, "Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy", Nature Methods, 2013
- [3]D. Lim, T. N. Ford, K. K. Chu and J. Mertz, "Optically sectioned in vivo imaging with speckle illumination HiLo microscopy", Journal of Biomedical Optics, 2011
- [4] Optically Sectioned Imaging of Microvasculature of In-Vivo and Ex-Vivo Thick Tissue Models with Speckle-illumination HiLo Microscopy and HiLo Image Processing Implementation in MATLAB Architecture , 2013
- [5] Analyzing speckle contrast for HiLo microscopy optimization,2011

【評語】 052308

1. 本案設計一與手機結合的光學系統，獲取可用於光學切片的 HiLo 顯微影像。此系統還包括連結至雲端主機的影像處理程式，將處理完的影像傳回手機顯示。
2. 作者已經可以用手機及結合的系統獲得品質不錯的單一 HiLo 影像。除了光學設計，作者並用 3D 列印方式製作所需的配件，以及撰寫 APP 及雲端程式。