

多層全像非軸向掃描狹縫共軛焦 螢光顯微鏡

Multiplexed Holographic Slit Confocal Microscopy for Multiplane Imaging

吳祚華、王鴻鈞、賈澤民、駱遠

Tso-Hua Wu, Hung-Chun Wang, Chou-Min Chia, Yuan Luo

本研究提出了一種非軸向掃描多焦平面共軛焦顯微鏡系統，結合了多層體積全像光柵和狹縫陣列檢測，可同時擷取不同深度的光學切片影像。顯微鏡系統中配置多層體積全像光柵，於樣本內的兩個或多個焦平面中選擇性地產生軸向焦點，然後使用共焦狹縫孔徑同時將多個平面成像到 CCD 的感測區域。本文說明了系統設計、實施方法和實驗數據，證明了這種顯微鏡系統不需利用任何軸向掃描裝置即能夠獲得螢光標記的標準微球和組織樣本的光學切片多焦平面影像。

Here, we proposed a non-axial-scanning confocal microscopy. The system is equipped with multiplexed volume holographic gratings for illumination and slit apertures for detection. The multiplexed volume holographic gratings produce multiple axial focal points, and the slit apertures image corresponding axial focal points, which display onto different sensing areas of a CCD. The system design, development and experimental measurements using biological samples are described thoroughly. The proposed system provides optical sectioning using fluorescently labeled standard micro-spheres as well as tissue samples without axial scanning.

一、前言

光學切片技術通過去除離焦背景雜訊，從各種樣本獲取三維信息的能力，最常用並具有良好背景雜訊抑制的光學切片成像方法就是基於共軛焦方法⁽¹⁻⁷⁾。雖然共焦成像提供了精確的光學切片能力來阻擋離焦背景，但是為改善影像品質而付出的代價通常是逐點掃描的時間。有許多研究正在努力開發高速橫向掃描機制或增加檢測和焦點數量⁽⁸⁻¹²⁾來提高掃描效率。為了減少掃描的需要，通過利用線型孔徑而不是單點針孔開發了狹縫共軛焦技術，用於各種生物成像應用^(6, 7, 13-17)。

通常在狹縫共軛焦顯微鏡中，需要利用多個感測器擷取訊號，因此一維或二維相機較適用於高速操作^(18,19)。為了進一步提高擷取速度，在狹縫共軛焦顯微鏡中使用單個振鏡⁽¹⁴⁾或雙面鏡⁽¹⁵⁾進行成像應用。近期研究中，聲光偏轉器⁽²⁰⁾亦用於在狹縫共軛焦上的組織樣本

進行線掃描，但這種方法必須進行深度掃描。基於傾斜照射的角度－狹縫共軛焦 (theta slit confocal) 被開發用於簡化橫向掃描的系統配置。角度－狹縫共軛焦系統將物鏡之入射孔徑分為兩個部分：照明區與收光區。入射光進入照明區，經由物鏡聚焦於觀察物上後漫射，再經由物鏡接收並於收光區將觀察物資訊回傳。掃描式角度－狹縫共軛焦系統⁽²⁶⁾ 利用移動照明區之入射光達到橫向掃描的效果。基於色散的光譜編碼狹縫共軛焦 (spectrally encoded slit confocal)⁽¹⁸⁾ 能夠獲得無標記樣品的影像，但不能解析厚螢光樣品。雙狹縫配置亦被提出，使兩道聚焦光束沿相反方向掃描物體，並且與感光耦合元件 (CCD) 相機上的相應像素 (視作數位狹縫) 同步。目前狹縫共軛焦技術已有許多研究致力於開發高速橫向掃描機制，然而現有的狹縫共軛焦系統仍需要沿軸向掃描。

平行共焦方法 (parallel confocal approach)⁽⁸⁾ 通過在空間光調製器 (spatial light modulator, SLM) 上使用電腦生成的雙扭曲光柵加速多面影像形成，使用一個波長激發及一個扭曲光柵產生兩個軸向焦點，並觀察在不同發射波長、光柵下的發射光。然而兩個平面之間的分離非常有限，它仍然需要在兩個方向上掃描。另外，由於偏振選擇性，使用 SLM 觀察微弱螢光影像是非常困難的。

本文我們提出了一種新的非軸向掃描狹縫共軛焦成像，結合了多層體積全像光柵 (multiplexed volume holographic gratings, MVHGs)，在樣品內的兩個或多個平面上產生焦線，然後使用狹縫孔徑同時成像多個深度，橫向投射到 CCD 上。與先前描述的狹縫共軛焦系統相比，我們的方法具備同時從多個深度獲取厚組織樣本的光學切片影像而無需軸向掃描。與 (8) 中描述的系統在 SLM 上使用電腦生成的光柵不同，我們的方法不依賴於探測影像的偏振選擇性，並且可以使用適當的 MVHGs 實現任意佈置縱向焦線的位置。與 (18) 中通過色散技術描述的系統相比，我們的方法能同時擷取無標記樣品以及螢光標記的組織樣品的影像。在本文中，實驗證明了多平面非軸向掃描狹縫共軛焦系統的性能，可以在多個深度成像標準微球和離體生物組織樣本。

二、實驗方法

圖 1 顯示了所提出的狹縫共軛焦顯微鏡的示意圖。架構配置成使 MVHGs 符合布拉格匹配條件而在樣本內的不同深度產生兩條焦線，並且還用作隨後的狹縫孔徑的輸入焦線。因此，使用 CCD 同時獲得不同深度內的樣本的光學截面影像，而無須軸向掃描。

多層體積全像光柵基於通過多次曝光菲醌 (phenanthrenequinone) 摻雜的聚甲基丙烯酸甲酯 (PQ-PMMA) 材料並配合多路曝光角度切換 (shift-angular multiplexing)⁽²³⁾ 而形成。可以使用圖 2 中的 k -球圖來說明。圖 2(a) 為記錄全像光柵的過程， $k_{s,i}$ 和 $k_{r,i}$ 分別表示訊號和參考光向量。第 i 個 MVHGs 的光柵向量由 (23) 給出。

$$k_{s,i} - k_{r,i} = K_i, \text{ and } i = 1, 2, \dots, M \quad (1)$$

其中 $|k_{s,i}| = |k_{r,i}| = 2\pi n / \lambda_{r,i}$ ， $\lambda_{r,i}$ 在空間中是記錄波長， K_i 是第 i 個全像圖的光柵向量， n 是記錄材料的折射率， M 是多層光柵的數量， Δz 為 i 個光柵向量間的深度差距，本研究的預設值為 10 微米。移動透鏡 L1 即能更改訊號光之波前，並且與透鏡 L1 之對焦深度相關。圖 2(b) 為重建過程，基於布拉格條件⁽²⁴⁾，探測器和繞射光束的傳播向量可表示為：

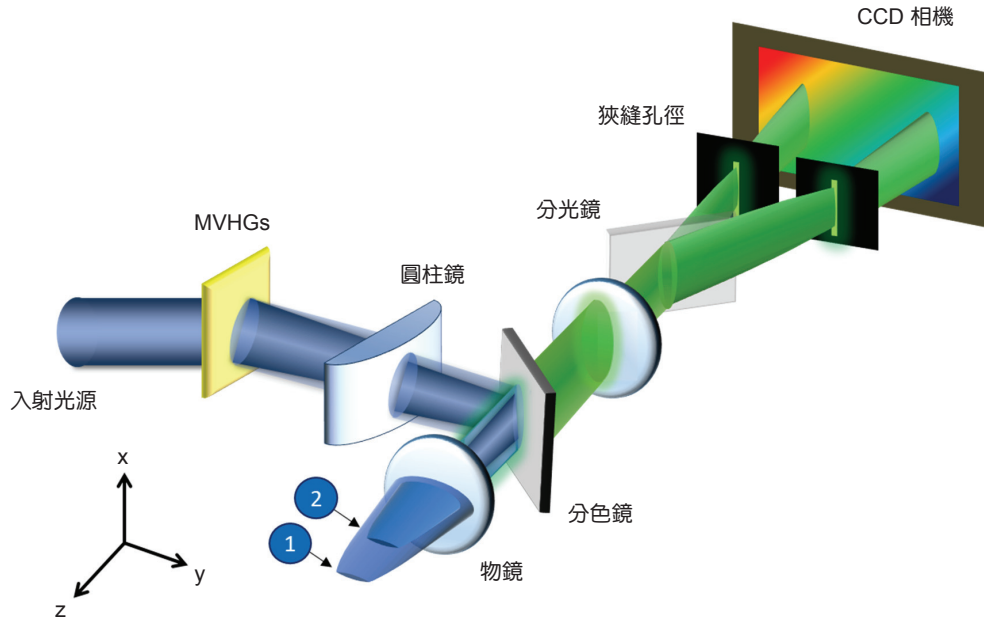


圖 1. 多平面狹縫共軛焦方法的示意圖。通過布拉格匹配的 MVHG 的繞射同時產生兩個不同深度的焦線，並通過相應的共軛焦縫隙孔徑探測，在沒有軸向掃描的情況下使用 CCD 檢測在多個深度處的光學切片螢光圖像。其中藍色光路為照明光路徑，綠色光路為接收光路徑，若觀察螢光樣本則兩路徑的光波長將不同，如同圖 1 中兩光路的顏色差異性。[Adapted] with permission from [ref 27] © The Optical Society.

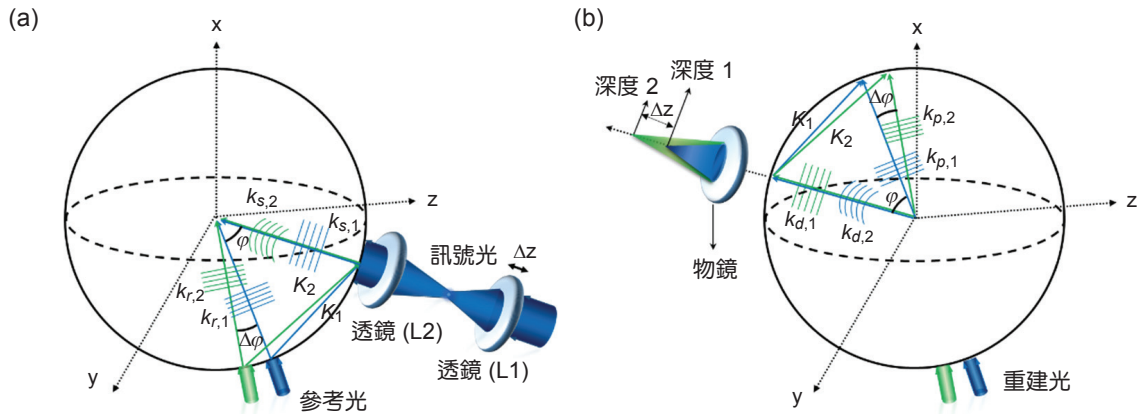


圖 2. (a) 基於 K 球面圖的記錄設計。 $k_{s,i=1,2}$ 和 $k_{r,i=1,2}$ 是形成 MVHG 的相應信號和參考光束。(b) 在布拉格匹配條件下重建。滿足 K 球面圖的探測光同時產生兩個繞射光束 $k_{d,1}$ 和 $k_{d,2}$ ，它們通過物鏡在樣品空間的不同平面上產生不同的焦點。[Adapted] with permission from [ref 27] © The Optical Society.

$$k_{d,i} - k_{p,i} = K_i, \text{ and } |k_{d,i}| = |k_{p,i}| = \frac{2\pi n}{\lambda_{p,i}} \quad (2)$$

λ_p 是空間中的探測波長，因為布拉格選擇性，以特定生成波長 λ_r 形成的 MVHG 可以在不同的探測波長 λ_p 下產生繞射。在圖 2 中， $M = 2$ ，L1 和 L2 的數值孔徑分別為 0.65 和

0.55。繞射和重建光束之間的角度稱光束間角 (φ) 是 68° ，重建光束之間的多層角度 ($\Delta\varphi$) 是 14.5° ， Δz 是 10 微米。因此利用重建光之不同入射角度，即可選擇體積全像的繞射光；由於不同角度的繞射光之波前訊號不同且與聚焦深度相關，即能利用物鏡將繞射光對焦於不同深度。

三、實驗結果與討論

在我們的實驗架構中，兩個 MVHG 在波長 488 奈米處的平均繞射效率為 $\sim 35\%$ ，在成像架構同時使用兩個瞳孔尺寸為 5 微米的狹縫孔徑來抑制離焦光。使用焦距為 200 毫米奧林巴斯物鏡 (ULWD MPlan 50X)，搭配 CCD (iXon897, Andor) 構建所提出的 MVHG 多平面狹縫共軛焦顯微鏡，通過對解析度圖表進行成像來評估所提出的共軛焦系統的橫向解析度。圖 3(a) 顯示當圖表在不同深度聚焦時，寬度為 0.78 微米的最小線條時有很好的解析度。值得一提的是，垂直方向上最小線對的對比度略高於沿水平方向的對比度，因為非對稱的狹縫孔徑形狀會引起非等向的共焦效應 (anisotropic confocal effect)⁽²⁴⁾。此外，通過以 0.1 微米的步進長掃描螢光標記的微球 (直徑 1 微米, Polyscience) 進行實驗評估系統軸向解析度。圖 3(b) 顯示了使用 488 奈米的激發波長沿軸向 (Z -PSF) 的點擴散函數的實驗結果，並且半高寬 (full width at half maximum, FWHM) 在深度 1 為 3 微米、深度 2 為 3.5 微米， Z -PSF 測量與

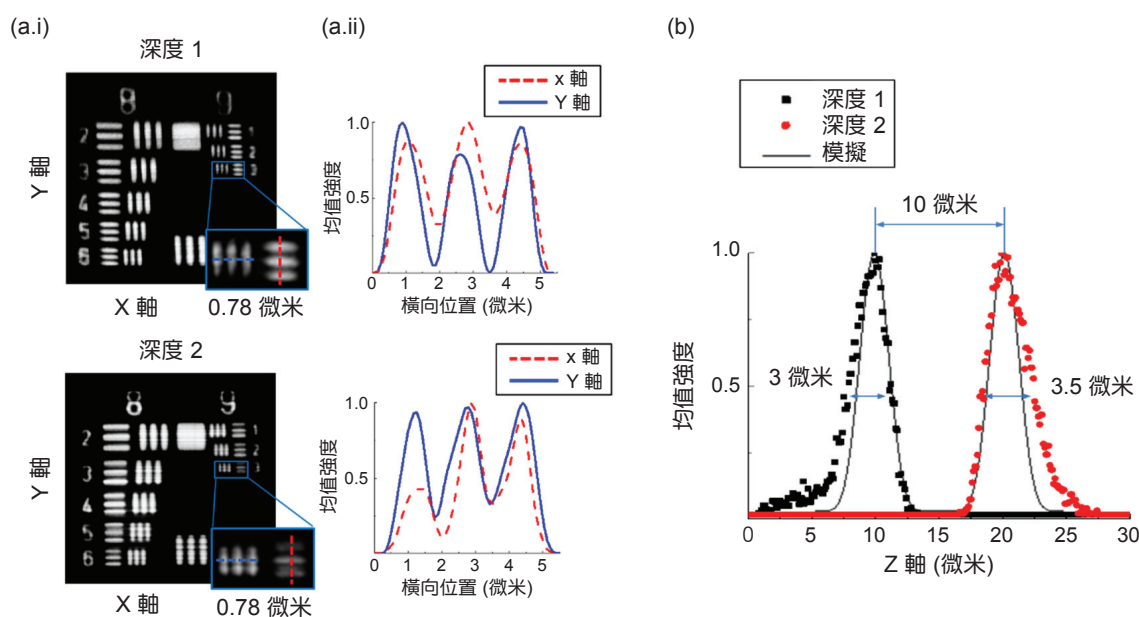


圖 3. (a.i) 通過該系統的 1951 年美國空軍條形圖的標準卡影像。第 9 組中的最小元素的線寬為 0.78 微米；(a.ii) 垂直和水平方向上的最小線對 (a.i) 的輪廓圖。由於所使用的為狹縫式共軛焦顯微鏡，因此橫向掃描時其中一個維度的對比度將會較差，如圖 (a.ii) 所示。(b) 通過掃描測量 1 微米螢光微球，基於 MVHG 的多平面狹縫共軛焦系統的歸一化軸向解析度。不同深度的半高寬 (FWHM) 分別為約 3 微米 (深度 1) 和 3.5 微米 (深度 2)，兩個深度之間的距離約為 10 微米。[Adapted] with permission from [ref 27] © The Optical Society.

非同調條件下的模擬結果一致⁽²⁴⁾，其半高寬為 3 微米。

$$Z-PSF(v_x, v_y, u) = \left| \int_{-1}^1 dk_y \exp \left\{ -j \frac{u}{2} \left(k_y + \frac{v_y}{u} \right)^2 \right\} \right|^2 \times \int_{-s}^s dv_y \left| h_{obj}(v_x, v'_y - v_y, u) \right|^2 \quad (3)$$

其中 x 、 y 和 z 表示物體坐標， $v_{x,y} = \frac{2\pi}{\lambda} \sin \alpha \times (x, y)$ ， $u = \frac{8\pi}{\lambda} \sin^2 \alpha \times z$ ， k_y 屬於傅里葉坐標， h_{obj} 是為物鏡的 $Z-PSF$ 振幅且可以得到圓柱坐標下 $h_{obj}(v, u) = \int_0^1 dk_r J_0(k_r v) \exp \left\{ -j \frac{u}{2} k_r^2 \right\} k_r$ 。

為了驗證提出的多平面狹縫共軛焦系統的能力，使用備具螢光標記稀疏分佈之厚的綠色微球樣品 (直徑 5 微米，Polyscience) 並嵌入 1 毫米厚的瓊脂糖平板 (Invitrogen) 中以成像。並使用藍色可調變雷射光源 (Innova 304C, Coherent Inc.) 在 $\lambda = 488$ 奈米處激發稀疏分佈的微球。在不進行軸向掃描情況下，圖 4(a) 為焦平面上螢光微球之 CCD 成像，並且顯著抑制了第二層深度的離焦光。在圖 4(b) 中，相同微球的光學切片影像在不同層深度處聚焦，而離焦背景也被明顯阻擋。此外，更密集分佈的螢光標記綠色微球 (Polyscience，直徑為 25 微米) 亦被使用於檢測系統成像能力。

圖 5 比較了標準全域影像和光學切片影像由所提出的 MVHG 多平面狹縫共軛焦方法擷取。在圖 5(a) 為標準全域影像，同時從 CCD 以均勻照明擷取具有對焦和離焦的螢光微球影像；圖 5(b) 顯示了使用基於 MVHG 的多平面狹縫共軛焦系統，在兩個深度同時獲得螢光標記的微球影像，沿 x 軸的橫向掃描步進長為 0.1 微米，並且不需要沿軸向掃描；圖 5(c) 通過強度分佈圖來比較局部對比度和離焦背景抑制，顯示了當在焦平面成像時，MVHG 多平面狹縫共軛焦系統明顯的抑制了來自離焦背景之雜訊。

為了證明 MVHG 多平面狹縫共軛焦顯微鏡對高度散射的組織樣本成像的能力，我們對兔子角膜上皮進行了體外 (*in vitro*) 成像實驗。圖 6 顯示了用 MVHG 多平面狹縫共軛焦顯微鏡拍攝的螢光標記之兔子角膜樣品的影像，在樣品的細胞膜上用螢光染料 (PKH67) 染色，並用相同的激發雷射光 (488 奈米) 照射。與前面描述的微球實驗一樣，MVHG 多平面狹縫共軛焦顯微鏡成功地去除了高度散射的組織樣本中多個螢光平面的背景雜訊。

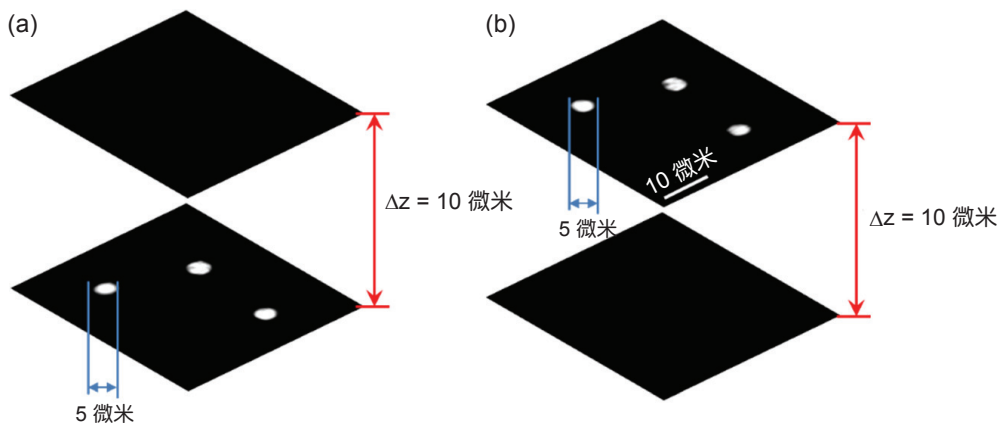


圖 4. (a)、(b) 從軸向分開 10 微米的兩個平面同時獲得的稀疏分佈的 5 微米螢光微球的光學截面影像：(a) 位於深度 1 的螢光微球影像，和 (b) 位於深度 2 的微球影像。[Adapted] with permission from [ref 27] © The Optical Society.

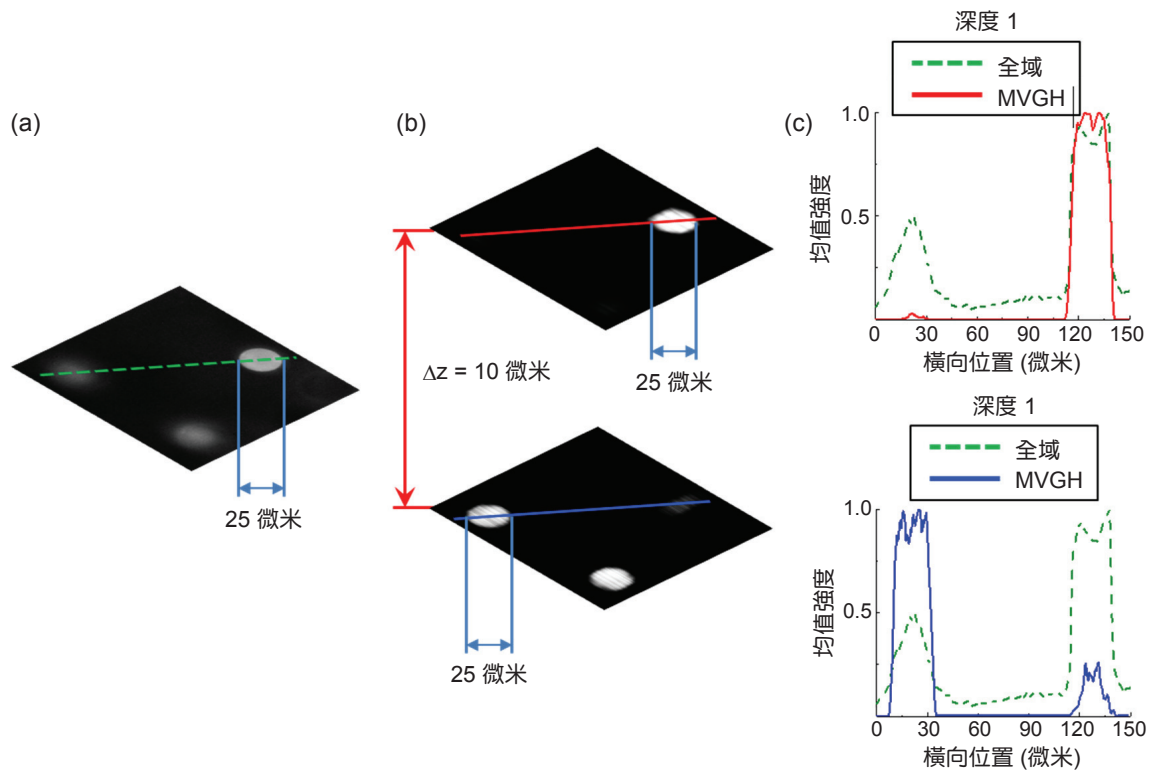


圖 5. 嵌入瓊脂糖凝膠中的密集分佈的 25 微米微球的影像。(a) 使用標準的全域拍攝微球的影像。(b) 使用 MVGHs 多平面狹縫共軛焦系統，從軸向間隔 10 微米的兩個平面同時獲取光學截面影像。(c) 使用不同的成像技術比較 (a) 和 (b) 之間的信號 (對焦微球) 和背景 (離焦微球) 的強度分佈。[Adapted] with permission from [ref 27] © The Optical Society.

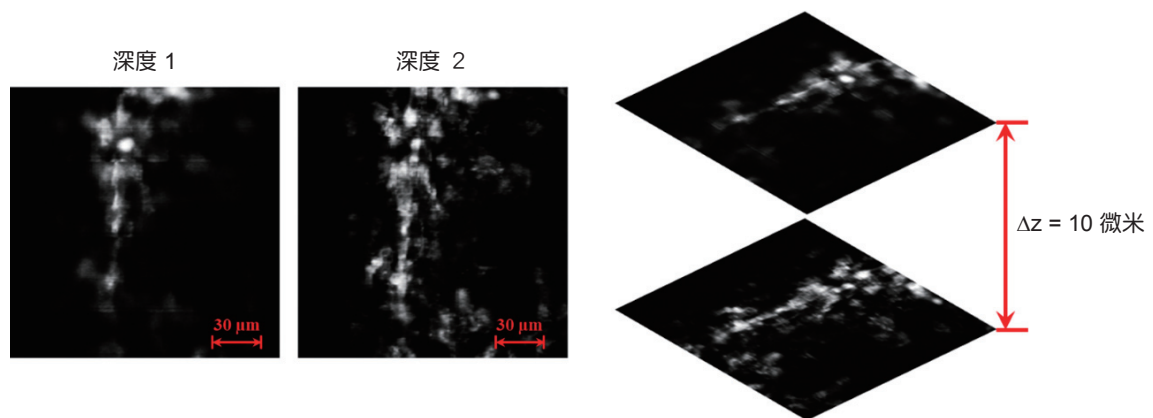


圖 6. 使用基於 MVGHs 的多平面狹縫共軛焦成像從兩個軸向分離的平面 (深度 1 和 2) 獲得螢光標記的兔子角膜樣品的合成影像。[Adapted] with permission from [ref 27] © The Optical Society.

四、結論

本研究開發了 MVHG 多平面狹縫共軛焦顯微鏡，以同時觀察來自不同深度的體外 (in vitro) 光學切片 3D 影像。在本方法中，藉由利用 MVHG 於照明與狹縫共軛焦檢測原理的應用，在厚的組織樣本內成像多層深度的應用上，能更有效率且高速的替代軸向掃描機制，並且同時有效地阻擋離焦背景。

該系統簡易而適應性強，並且能顯著的加快掃描成像的速度，因為它可以同時捕獲多層深度影像；雖然本研究僅呈現兩層深度的掃描，但若配合更多層的 MVGHs 以擴展系統，即可同時獲得更多的成像平面⁽²⁵⁾，同時也是本研究後續的發展方向。目前的狹縫共軛焦顯微系統是利用橫向一維線掃描，雖說掃描速度較優於點掃描系統，但仍有許多改善空間。利用二維掃描振鏡 (Galvo-Mirror) 即可以進一步提高共軛焦顯微系統的採集速度；除此之外更快的計算設備及更多的 MVGHs 於體內 3D 影像狹縫共軛焦顯微鏡，能完善系統以全自動方式重建整個三維影像。本研究於 2018 年 5 月發表於 Optics Express (Vol. 26 Issue 11 pp. 14288-14294)。

參考文獻

1. J. Pawley and B.R. Masters, *Optical Engineering*, **35** (9), 2765 (1996).
2. M. Tavakoli, P. Hossain and R.A. Malik, *Clinical ophthalmology*, **2** (2), 435 (2008).
3. Y.S. Sabharwal et al., *Applied optics*, **38** (34), 7133 (1999).
4. M. Minsky, Microscopy apparatus US patent 3013467. USP Office, Ed. US (1961).
5. C. Sheppard and A. Choudhury, *Journal of Modern Optics*, **24** (10), 1051 (1977).
6. J.-A. Conchello and J.W. Lichtman, *Nature methods*, **2** (12), (2005).
7. C. Sheppard and X. Mao, *Journal of Modern Optics*, **35** (7), 1169 (1988).
8. A. Jesacher, S. Bernet and M. Ritsch-Marte, *Optics express*, **24** (24), 27395 (2016).
9. P.-H. Wang, V.R. Singh, J.-M. Wong, K.-B. Sung and Y. Luo, *Optics letters*, **42** (2), 346 (2017).
10. A. Nakano, *Cell structure and function*, **27** (5), 349 (2002).
11. F.P. Martial and N.A. Hartell, *Plos one*, **7** (8), e43942 (2012).
12. A.A. Tanbakuchi, et al., *American journal of obstetrics and gynecology*, **202** (1), 90. e1 (2010).
13. C.-C. Wang, D.-j. Tang and T. Hefner, *Theory and Applications*, InTech (2011).
14. C.J. Koester, *Applied Optics*, **19** (11), 1749 (1980).
15. B.R. Masters and A.A. Thae, *Applied optics*, **33** (4), 695 (1994).
16. D.M. Maurice, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **13** (12), 1033 (1974).
17. H. Cang, C.S. Xu, D. Montiel and H. Yang, *Optics letters*, **32** (18), 2729 (2007).
18. J. Kim, D. Kang and D. Gweon, *Optics letters*, **31** (11), 1687 (2006).
19. M. Hughes and G.-Z. Yang, *Biomedical optics express*, **6** (4), 1241 (2015).
20. K.-B. Im, et al., *Optics express*, **13** (13), 5151 (2005).
21. P.J. Dwyer, C.A. DiMarzio and M. Rajadhyaksha, *Applied optics*, **46** (10), 1843 (2007).
22. Z. Yang, L. Mei, F. Xia, Q. Luo, L. Fu and H. Gong, *Biomedical optics express*, **6** (5), 1797 (2015).
23. J.W. Goodman, *Introduction to Fourier optics*, Roberts and Company Publishers, (2005).
24. Y. Luo, et al., *Optics letters*, **33** (6), 566 (2008).
25. Y.H. Chia, H.C. Wang and Y. Luo, "Incoherent holographic imaging of subsurface structures with volume holographic gratings", *Biomedical Imaging and Sensing Conference*, Proc. SPIE 10711 (2018).
26. Peter J. Dwyer, Charles A. DiMarzio, James M. Zavislan, William J. Fox, and Milind Rajadhyaksha, *Optics letters*, **31** (7), 942 (2006).
27. C.M. Chia, H.C. Wang, J. Andrew Yeh, Dipanjan Bhattacharya, and Y. Luo, *Optics Express*, **26**, 14288 (2018).

作者簡介

吳祚華先生現為國立清華大學奈微所碩士生。

Tso-Hua Wu is currently a M.S. student in the Institute of NanoEngineering and MicroSystems at National Tsing Hua University.

王鴻鈞先生為國立清華大學動機所碩士，現為新代科技股份有限公司工程師。

Hung-Chun Wang received his M.S. in Power Mechanical Engineering from National Tsing Hua University. He is currently an engineer in Syntec Technology Co., Ltd..

賈澤民先生為國立台灣大學機械所博士，現為國立台灣大學醫材影像所研究助理。

Chou-Min Chia received his Ph.D. in Mechanical Engineering from National Taiwan University. He is currently a research assistant in the Institute of Medical Devices and Imaging at National Taiwan University.

駱遠先生為亞歷桑那大學光學學院博士，現為國立台灣大學醫材影像所副教授。

Yuan Luo received his Ph.D. in College of Optical Sciences from University of Arizona, USA. He is currently an associate professor in the Institute of Medical Devices and Imaging at National Taiwan University.