

運用光鉗系統於神經元刺激與分化之研究

子計畫二：基於光鉗系統之顯微影像觀測系統之設計與研發(I) (期末報告)

A Study of Microscopy Image Observation System Based on Optical Tweezers

計畫編號：NSC-96-2221-E-009-238

執行期限：96年8月1日至97年7月31日

主持人：林昇甫職稱：教授

執行機構：國立交通大學

中文摘要：

顯微影像近年來在臨床疾病診斷或是神經細胞刺激上有著快速而卓越的發展，由於顯微影像技術可將細胞生長、突變、移動等等的複雜過程變成視覺可辨識之影像，使研究人員能早期發現其變化，可及早處理。因此在本研究計畫中，我們針對光鉗系統所作用的細胞，做一個顯微影像系統的觀測，其中包括顯微影像中細胞的分割與定位，細胞數量的估測，以及細胞的追蹤。由於其他的細胞相關的子計畫未過，因此本論文採用微粒子做實驗來模仿細胞的情況，而追蹤的部份則採用神經細胞。

神經細胞間傳遞訊息的方式，是藉由樹突(dendrite)與軸突(axon)連結並透過電位差傳遞來完成，因此在神經關聯研究中，觀察神經元間關連性與連結性變得異常重要，而經由神經傳遞的訊息，可能會是一個化學上或是物理上的變化，因此如何觀測到這個現象，將對於了解神經細胞間的溝通有相當大的幫助。本計畫中提出了利用數位影像技術，長期追蹤與紀錄神經元樹突生長與變化方法，有效的解決人為觀測的缺點。本計畫的成果不僅可以應用在長時間神經元細胞成長觀察與紀錄，並可以使用在其他神經原細胞研究中，例如：神經元細胞接受物理刺激的反應觀察等。

關鍵詞：顯微影像，細胞定位，細胞追蹤，神經元細胞。

Abstract

The microscopy image is greatly developed recently on disease diagnosis and neuron cells stimulation. Because the process of growth, mutation, and movement of cells can be transformed to a recognizable image, a microscopy image observation system is organized in this study. This system includes cells segmentation, locating, amount estimation, and tracking. Owing to that the other projects related to cells are not passed, the particle is used as cells for further experiments and neuron cells are used for tracking.

The message delivery between neuron cells are done by the connectivity and potential difference of dendrite and axon. The observation of connectivity between neuron cells is quite important because the message delivered from neuron cells may be a physical or chemical change. The observation of this phenomenon is important information of realizing the negotiation between neuron cells. In this study, digital image process is proposed for tracking and recording the growth and changes of neuron dendrite. The results of this study can be applied to long-term tracking and recording the growth of

neuron cells, such like the response observation of neuron cells when physical stimulations are received.

Keywords: microscopy image, cells locating, cells tracking, neuron cells.

一、本階段研究計畫之目的及成果

本計畫目標為完成自動化生物細胞觀測記錄系統之研發與神經細胞生長與行為的觀測。在自動化生物細胞觀測記錄系統之研發中，因為無法提供活體細胞長期保存與恆溫觀察平台，因此本計畫採用塑膠粒子代替活體細胞進行長時間顯微觀測，運用影像前處理可以消除影像雜訊與光源所產生不均勻背景的現象，並利用辨識及分割技術可以計算粒子數量與特定粒子移動軌跡之追蹤。在神經樹突觀察與記錄系統中，透影像處理與改良式細線化法偵測神經樹突，並經過追蹤搜尋可以獲得樹突數量與位置。經過塑膠粒子實驗得到的結果與數據後，就可將本研究計畫的方法應用在真實的細胞上，用同樣的方式去獲得細胞的分割計數、生長追蹤、移動軌跡偵測等等，使本計畫能在顯微影像上能達到不錯的應用。

二、研究發展及進行步驟

本子計畫的目的是在於提供一個自動化的顯微影像觀測與記錄系統。我們是利用CCD鏡頭配合光學顯微鏡進行微影像的觀測。透過高解析度CCD鏡頭，我們可以觀測到微米級(μm)的影像尺寸的物體，經由影像處理分析觀測物體的生理與物理特性。第一年計畫的目標，在生物細胞的分割定位與數量估計，運用影像處理中的背景分離與影像分割技術，我們將可以將目標細胞分割出來，並利用特徵抽取與特徵辨識技術來辨別目標細胞，並針對所辨識出來的目標細胞進行定位與記數。本計畫的成果不僅可以應用在長時間神經元細胞成長觀察與紀錄[1]，並可以使用在其他神經原細胞研究中，例如：神經元細胞接受物理刺激的反應觀察[2,3]...等。整個系統主要可分為生物細胞影像定位與細胞移動軌跡追蹤，以及神經樹突生長觀測兩大部分。依照各部分所處理的內容，又可以再細分為幾個子部分：

- (a) 生物細胞影像定位與細胞移動軌跡追蹤
 - (a-1) 顯微影像前處理與顯微影像品質分析
 - (a-2) 細胞影像分割定位與數量估計
 - (a-3) 特定細胞移動軌跡之追蹤

- (b) 神經原細胞樹突生長觀測與紀錄
 - (b-1) 影像強化
 - (b-2) 二值化
 - (b-3) 去除雜訊
 - (b-4) 改良式細線化
 - (b-5) 二維樹狀搜尋

(a) 生物細胞影像定位與細胞移動軌跡追蹤

在生物細胞影像定位與細胞移動軌跡追蹤這部份，主要包含前述的四項重要工作：(a-1)顯微影像前處理與顯微影像品質分析。(a-2) 細胞影像分割。(a-3) 細胞影像定位與數量估測。(a-4) 特定細胞移動軌跡之追蹤。以下針對這四項工作做進一步的介紹。

(a-1) 顯微影像前處理與顯微影像品質分析

一般數位影像的取得，往往會受到來自環境與攝影機本身的雜訊影響，例如光線、CCD 雜訊或傳輸過程造成影像品質不佳的情況。在顯微影像的取得過程中，造成影像品質不佳的情況主要有兩項：背景光源是否充足與成像是否準焦。前者主要發生在顯微鏡的背光調整不正確，或是 CCD 攝影機曝光不正確所造成，使得影像的對比度較低，物體不容易識別；後者則是因為顯微影像的景深非常淺，只要不在焦平面(focal plane)上的物體均模糊。當焦距調整不正確時，會使物體影像模糊而不易辨識。因此，針對這兩個現象，在實際處理顯微影像之前，必須進行影像的品質分析與影像前處理。

影像品質分析的主要目的，是在分析影像的成品質相對於人眼的認知，是否達到足夠的標準，例如清晰程度、影像對比度等等。但是，人眼評斷影像品質是相當主觀的，對於要進行自動分析的處理過程，不容易量化與實現。一個好的客觀影像品質量測(image quality measure)法，可以反映不同情況的失真程度，如模糊、有雜訊等等。Avcibas 等人[4]將 26 種影像品質計算的方法分成六大類，有許多廣為人知的量測方法，像是平均平方誤差(mean square error)與峰值信噪比(peak signal-to-noise ratio)等，最常被用在影像壓縮的品質比較上。但是，這些評斷標準並不適用在影像的清晰程度。更重要的，這類量測方法須要有基準影像來做比較。對於持續拍攝的連續顯微影像來說，要取得一張基準影像並不容易。Nill 與 Bouzas[5]提出一個基於影像功率頻譜(power spectrum)的影像品質量測方法。這個方法主要用來計算單張影像的品質，不需要其他的參考影像。因此，本計畫採用以影像內容為主的品質量測法，作為分析顯微影像品質的依據，並提供兩個客觀的指標決定取得的顯微影像是否符合所需要的品質。

第一個指標是影像銳利程度(sharpness index, SI)，用來表示顯微影像的成像是否準焦。影像的銳利度越高，表示高頻成份較多；反之，影像模糊的時候，高頻成份較少。對一張品質良好的顯微影像來說，影像內容通常是單純背景，且物體在影像中以明顯的輪廓邊緣呈現，因此影像中高頻成份的比例可以判斷顯微影像的銳利度。首先，將輸入的影像經過快速傅立葉轉換(fast Fourier transform, FFT)轉為頻率域，計算其頻域強度並取對數值，如下式：

$$M(u, v) = \log \|\mathbb{F}I(x, y)\|, \quad (1)$$

其中 \mathbb{F} 表示 FFT 轉換， $I(x, y)$ 為輸入的灰階影像 I 在 (x, y) 的灰階值， $M(u, v)$ 為對應的對數頻域強度值，如圖 1.(a) 所示。將整個頻率域 F 分為 b 個頻帶，

$$F = \{f_1, \dots, f_b\} \quad (2)$$

頻帶的劃分如圖 1.(b)所示。接著，統計各頻帶的強度平均值，

$$m_i = \frac{1}{N_i} \sum_{(u,v) \in f_i} M(u, v), i = 1, \dots, b \quad (3)$$

式中 N_i 為第 i 個頻帶的強度值數量， m_i 表示第 i 個頻帶的強度平均值。圖 2 是同一顯微影像在不同清晰程度下，經由(1)~(3)式所得到的影像頻率分佈。實線是對焦正確的頻域分佈；虛線是影像稍微模糊的頻域分佈。可以清楚的看出來，在低頻部份兩張影像相差不大，但是中高頻部份卻能清楚的分辨出準焦與對焦不正確的情形。依照頻帶強度曲線分佈的情形，在中高頻帶的曲線斜率變化會因為影像的清晰度而有所不同，因此可將影像銳利程度指標(SI)定義為：

$$SI = -\sum_i slope(m_i) \quad (4)$$

其中 $slope(\cdot)$ 表示取斜率的函數。根據顯微影像的特性與實驗結果， i 的選擇範圍由 $b/8$ 到 $3b/4$ 為最佳。當 $b=32$ ，SI 的值小於 1.5 時，就判定該顯微影像的銳利程度符合需求，否則就需要重新調整對焦。

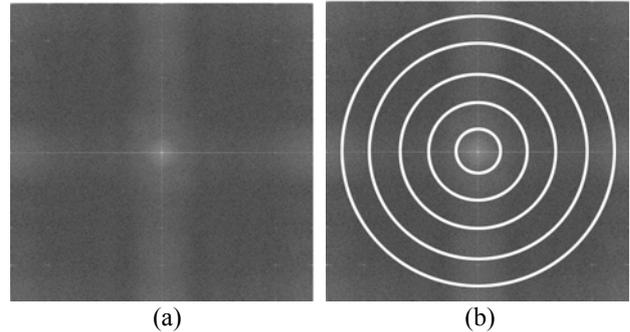


圖 1. 顯微影像轉換為對數頻域強度值的結果。(a) 對數頻域強度值影像，(b)圖(a)經過劃分頻帶的示意圖，圓形的帶狀區域表示同一個頻率值。

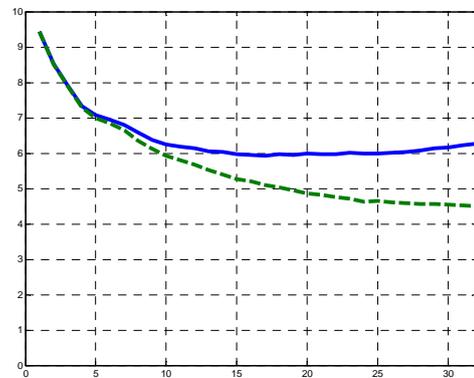


圖 2. 同一顯微影像在不同清晰程度下的頻域分佈圖。

第二個指標是影像曝光程度(exposure index, EI),用來表示顯微影像在亮度分佈與對比度上的表現。以灰階影像來說,最好的亮度分佈是能均勻的分佈在每個灰階值上,以保留最多的細節。而顯微影像受限於視野範圍非常小,如果不仰賴背景光源就會看不到物體。因此,背景光源主導了影像的亮度值。而顯微影像中的物體又大多以邊緣輪廓的型態顯現,屬於較暗的區域。在理想情況下,希望顯微影像的平均亮度在灰階分佈的中間值,也就是灰階值為128的時候,因此可以定義像曝光程度指標(EI)為

$$EI = \exp\left(\frac{-(\bar{I} - 128)}{2\sigma^2}\right) \quad (5)$$

其中 \bar{I} 表示輸入影像的平均亮度, σ 為亮度分佈標準差,在實驗中選20作為分佈標準差。當EI小於0.4時,就判定顯微影像的曝光程度不正確,將重新調整曝光。

在顯微影像的取得過程中,最需要人為介入調整的兩個情況就是影像對焦與背景光線的調整。由這兩個品質分析指標,可以將輸入的顯微影像進行是否準焦與曝光狀況的品質分析。當影像品質符合設定的標準,則繼續進行下一步的影像處理,否則將不合格的影像剔除。在未來也可以配合自動調整機制,如控制Z軸平台對焦等,達成自動品質調整的需求。

(a-2)細胞影像分割定位與數量估測

生物細胞辨識的目的是要能夠正確的辨識出目標細胞,進而將目標細胞刮出或定位,在細胞辨識之前,目標物的特徵抽取相當重要,好的特徵抽取可以提高之後的辨識成功率,反的,如果特徵抽取的不好,這樣會直接影響到後面的辨識率。物件之位置(邊界座標)、計算物件尺寸、分析物件形狀等都是比較常見的特徵種類。

在第一年計畫執行過程中,負責培養細胞的子計畫並未獲得通過,導致活體生物細胞無法取得。這對本計畫細胞影像分割這個部份,造成相當嚴重的影響,也非常的可惜。為了完成細胞影像分割的任務,本計畫採用與細胞尺度相同的塑膠微粒子作為活體細胞的替代品。若在未來能夠取得活體細胞,則可將目前發展的細胞影像分割技術稍做修改,應用在生物細胞的影像分割上。

外面所在賣的塑膠微粒子,可分為圓柱型與球型兩種,而我們所用的塑膠微粒子,則採用球型,也比較接近大部分細胞的形狀,尺寸有直徑2.47um跟1.86um兩種。

在細胞影像分割這個部份,通常最常在使用的是以動態輪廓模型(active contour model, ACM)來去逼近細胞的邊緣,動態輪廓模型最初是由Kass[6]所提出,主要應用於截取物件的輪廓,概念為一影像上的動態曲線,當受到曲線本身的內部能量以及影像本身外部能量影響時,會隨著能量的變動去改變原始曲線的形狀位置,依據所定義的能量函數,動態模型將會移動至內部能量及外部能量和最小的地方。

動態輪廓模型是一個半自動的演算法,首先需要定義初始輪廓,此輪廓線將會根據內外能量來移動。內部能量(internal energy)是由各控制點的相對位置資訊所決定,其目的是在維持動態輪廓線在移動時的平滑。而外部能量(external energy)則是影像的特徵,如影像的邊緣、尖端、

線段、或是物體輪廓等等。因此一個動態輪廓模型的能量函數可表為:

$$E_{total} = \int (E_{int}(V(s)) + E_{ext}(V(s))) ds \quad (6)$$

其中 E_{total} 代表整個輪廓的能量, E_{int} 和 E_{ext} 分別代表內部能量和外部能量, $V(s) = (x(s), y(s))$ 表曲線上的輪廓點位置, $x(s)$ 和 $y(s)$ 分別代表x-y座標。而內部和外部的能量式分別表示如下:

$$E_{int} = \alpha V'(s) + \beta V''(s) \quad (7)$$

$$E_{ext} = E_{image} = -|\nabla I(x, y)| \quad (8)$$

在內部能量中, $V'(s)$ 和 $V''(s)$ 分別代表某一控制點 $s(x, y)$ 的一階和二階微分,而 α 和 β 分別為其係數,當控制點間的斷裂分開程度較大時,第一項 $V'(s)$ 的數值就會增大,而當動態輪廓模型彎曲程度較大時,第二項 $V''(s)$ 就會較大,因此,當動態輪廓線要尋找最小能量總和時,曲線本身也會去符合連續且彎曲程度不大的條件。

而在外部能量中, $\nabla I(x, y)$ 為梯度影像,因此,當動態輪廓線越靠近影像邊緣時, $|\nabla I(x, y)|$ 會越大,取負值後則越小,故動態輪廓線模型將會由於影像的能量靠近邊緣處。

動態輪廓線在型變的過程中,計算每一個控制點的內部和外部能量,並在範圍內尋找能使內外部能量和最小的控制點,當所有控制點都完成最小化後,動態輪廓線選取邊界的方式也就完成了。

由於活體生物細胞無法取得,因此本計畫並沒有辦法使用細胞作為觀測,採用的是2.47um的球型塑膠微粒子,放在顯微鏡下的影像如下圖3所示:



圖3. 球型微粒子在顯微鏡下的影像。

在球型微粒子的分割中,我們利用校正尺去得到影像中像素(pixel)換算成實際距離,得到每1個像素為實際距離的0.25um,因此一個球型塑膠微粒子2.47um在影像中的直徑約為10個pixel,利用此已知的資訊,設計一個圓形的遮罩(mask)來尋找影像中微粒子的中心位置,此圓形遮罩矩陣設計如下:

$$F_{mask} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & -1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & -1 & 0 & 1 & 0 & -1 & -1 & 0 \\ -1 & -1 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & -1 & -1 \\ -1 & 0 & 1 & 1 & 2 & 1 & 1 & 0 & -1 \\ -1 & 1 & 1 & 2 & 2 & 2 & 1 & 1 & -1 \\ -1 & 0 & 1 & 1 & 2 & 1 & 1 & 0 & -1 \\ -1 & -1 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & -1 & -1 \\ 0 & -1 & -1 & 0 & 1 & 0 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (9)$$

因此，一張原始球型微粒子在顯微鏡下的影像，經過圓形遮罩的處理後，在中心位置會獲得較高的值，再設一定一個閾值(threshold)，將超過閾值的設為 1，也就是代表圓型微粒子的中心，低於閾值得設為 0，則可得到圓形微粒子中心的二值化圖，如圖 4 所示。

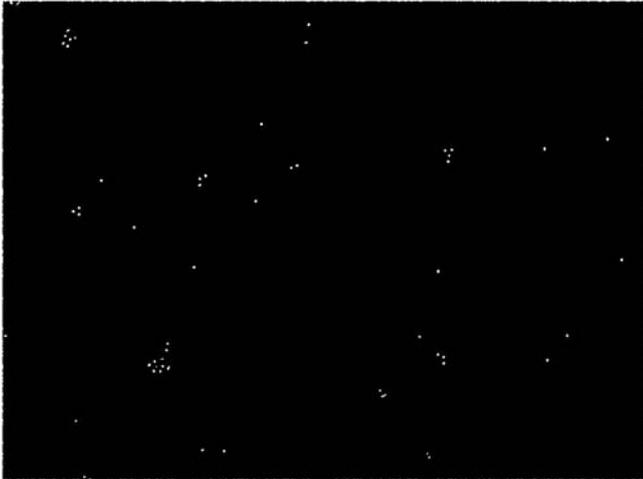


圖 4. 球型微粒子在顯微鏡下經過圓形遮罩處理過後的二值化影像。

由於球型微粒子在培養皿中是在一個三微的空間，且會根據一些震動、凡得瓦力(Van der Waals force)或是水面介面液體的流動等，造成此微粒子可能會些微移動震動，或是不在顯微鏡的焦平面(focal plane)上，導致球型微粒子影像邊緣會模糊化，此外，也由於次像素(sub-pixel)的影響，球型微粒子的邊緣或中心不一定都剛好落在像素上，因此一個球型微粒子經過遮罩處理後，可能會造成多個中心點，再經由種子區域成長法(SRG: Seed Region Growing)將相連的中心點集合，取平均後獲得最後的中心點位置。將原圖處理過後，以中心位置畫半徑為 5 pixel 的圓形結果如下圖 5 所示：

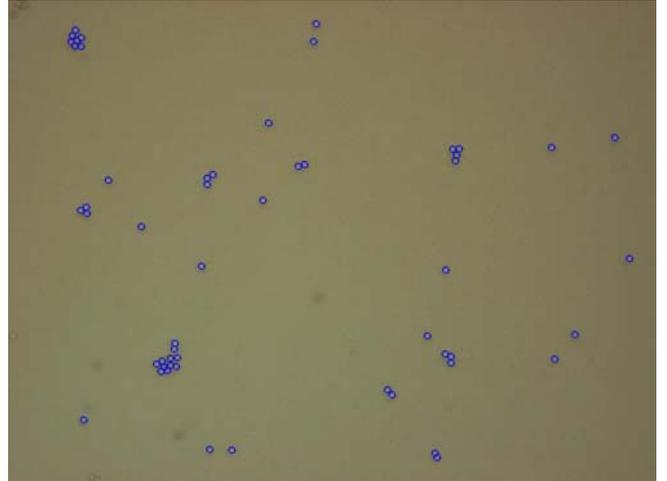


圖 5. 球型微粒子偵測結果。

以圓形遮罩作為偵測球型微粒子，再加上種子區域成長法，可將不必要的雜訊去除，此外，利用已知的資訊，微粒子的直徑約在 10 個像素左右，因此我們可以將微粒子精確的抓出來，而一些模糊的雜訊，如培養皿或是顯微鏡上的鏡片髒痕，都可藉由遮罩的方式加以去除。而當微粒子不在焦平面上時，其呈現的方式為一模糊圓球狀，因為不在焦平面上，因此我們也不將其列入考慮。

在將球型微粒子的分割出來後，我們就可以獲得每一個球型微粒子的中心座標，也可以獲得這張影像中微粒子總數，座標的資訊將可以提供移動軌跡追蹤作為使用，而微粒子的數量則可提供作為總數量的一個比例參考。當考慮是活體細胞均勻分散在培養皿中時，我們就可以將數個小畫面所獲得的數量，去推測在整個培養皿中，所有細胞的數量，許多疾病的判定都是借由某些特殊細胞的數量決定的，因此位置的資訊和數量的資訊在活體細胞的觀測實驗中是必要的。

(a-3) 特定細胞移動軌跡之追蹤

特定細胞移動軌跡追蹤的目標，在於追蹤顯微影像中的特定細胞，並紀錄其移動軌跡。其目的有兩個：第一，細胞在顯微視野中的活動情況，若要以人眼觀測，有時候會受到周遭其他細胞的影響而不易觀測。若能利用影像處理的技術，追蹤特定細胞並標示，可以大幅降低觀測的困難。第二，受到追蹤的細胞，可以紀錄其運動軌跡，一方面能實現自動顯微影像觀測系統的開發，另一方面運動軌跡可以提供為預測的資料，作為以影像進行奈米壓電平台回授控制、以及發展光鉗系統的先期準備。

利用視覺影像追蹤物體，在影像處理與電腦視覺的領域一直是相當熱門的問題。過去十幾年來，有許多追蹤物體的方法被提出。但在顯微影像的物體追蹤上，仍有許多問題與困難的地方。最主要的原因是，顯微影像的本質與其他視覺追蹤技術使用的影像，有相當大的差異與限制。顯微影像本身不具彩度，換言之，是僅有亮度的灰階影像。其次，顯微影像有效的成像，僅止於正確對焦的焦平面，一旦超出焦平面，物體便會模糊。而顯微影像也無法做到像一般攝影機拍攝，允許有不同的角度與方向。再來是物體在影像中的呈現，通常只具有邊緣，物體中間的部

份則會因為光線穿透的關係，呈現透明狀。以上這些，都說明了顯微影像中的物體與一般視覺影像中物體的不同，也說明利用顯微影像進行物體追蹤的困難點。

本計畫在顯微影像物體的追蹤研究，分為兩個層面。第一個是關於要追蹤物體的特徵選取，第二是追蹤的方法。在特徵抽取的部份，有小波轉換(wavelet transform)[7][8]、餘弦轉換(discrete cosine transform, DCT)[9][10]等等方法。小波轉換近年來常用在影像壓縮、邊緣抽取、特徵檢測及紋理(texture)分析等問題上，小波轉換會將資訊依其重要性的不同而保留在不同的頻帶中，低頻部份可以保留大部分人所能觀察到的資訊，而高頻部份則是儲存細微的變化。整體來說，利用 Gabor wavelet 除了可以同時提供一維或二維空間及頻域的資訊之外，它可以提供物體邊緣與內部紋理的抽取。尤其是利用 2D Gabor wavelet 進行特徵抽取，其最大的特性就是可獲得不同的縮放比率(scale)和旋轉角度(orientation)的資訊，因此許多研究中都採用賈柏小波函數(Gabor wavelet)作為一個抽取邊緣紋理特徵的工具。

一個二維的賈柏小波函數可以看成是具有特殊頻率與方向的正弦函數和高斯函數所構成，而賈柏小波函數的公式如下：

$$\psi_{\kappa}(z) = \frac{\kappa^T \kappa}{\sigma^2} \exp\left(-\frac{\kappa^T \kappa}{2\sigma^2} z^T z\right) \left(e^{ik^T z} - e^{-\frac{\sigma^2}{2}} \right)$$

$$z = (x, y)$$

$$\kappa = (k_v \cos \varphi_{\mu}, k_v \sin \varphi_{\mu})^T$$

$$k_v = 2^{\frac{v+2}{2}}, \varphi_{\mu} = \mu \frac{\pi}{8}, v = 0, 1, 2, 3, \mu = 0, 1, 2, 3$$
(10)

其中 $z = (x, y)$ 為影像座標，參數 v 和 μ 分別代表空間縮放及旋轉角度，在不同的 v 和 μ 中的賈柏濾波器(Gabor filter)會有所不同。經過(10)式抽取出的邊緣紋理，將作為接下來物體追蹤的特徵。

在追蹤階段，這裡提出一個基於卡曼濾波器(Kalman filter)的追蹤方法。在連續的顯微影像序列中，利用卡曼濾波器預測細胞微粒的運動狀態。在運動模型假設中，這裡假設以行進速度為等速的情況為最有可能發生的情況，給予最高的期望值，並經由其他狀態輸入來預估下一個時刻的狀態與相關位置，在完成下一時刻的評估預測後，先由最有可能的評估位置進行檢查，直到找到下一時刻的位置為止。特徵向量的相似度計算，這裡使用相關係數(correlation coefficient)來定義相似程度 r ：

$$r = \frac{n \sum ST - \sum S \sum T}{\sqrt{n \sum S^2 - (\sum T)^2} \sqrt{n \sum T^2 - (\sum S)^2}}$$
(11)

其中 S 為搜尋區域的影像特徵向量， T 表示目標物體的特徵向量。相似程度最高的位置，就會作為物體在顯微影像中的位置。圖 6 是特定微粒在顯微影像中被追蹤的情形。圖 7 則是追蹤 20 張連續顯微影像，期間該微粒的運動軌跡圖。

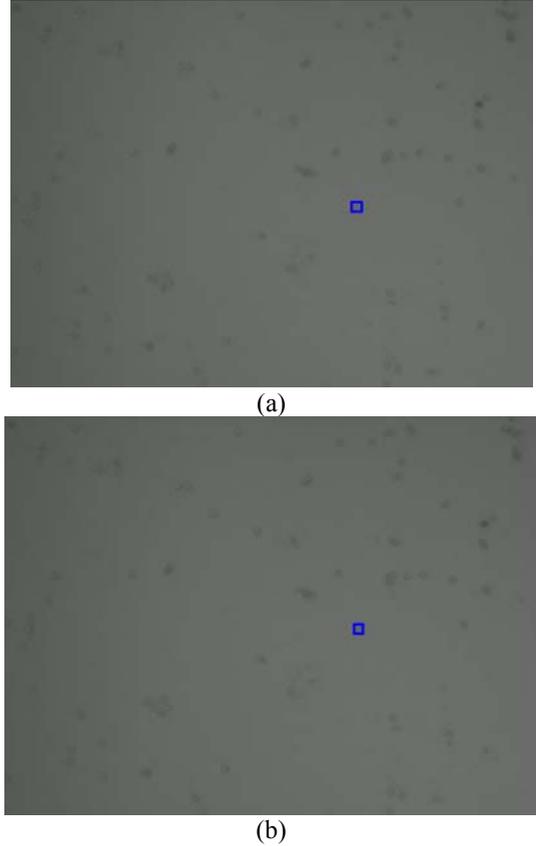


圖 6. 追蹤特定微粒的顯微影像。(a)第 10 幀，(b) 第 25 幀。

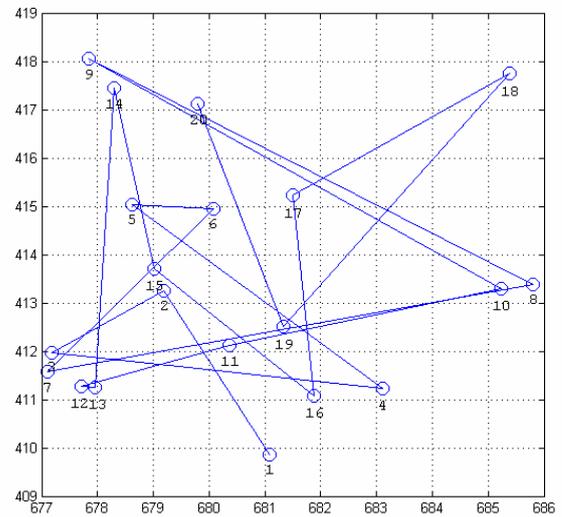


圖 7. 特定微粒的運動軌跡追蹤，圖上各點(1-20)依序代表不同時間點(frame)特定微粒所在的空間位置，單位是像素(pixel)。

(b)神經原細胞樹突生長觀測與紀錄

近年來，許多神經科學研究的方向都是在培育神經細胞與神經細胞刺激作用反應觀察，此相關的研究都需要

長時間的對神經細胞觀察與紀錄，一個全自動化的觀察與紀錄系統，可以減少人為的疏失，與降低誤差。在自動化的觀察系統中，建立一個可靠的影像處理系統來作分析是相當重要的，所以本計畫提出一個可靠度高的影像處理系統，來提供後從事神經細胞長期觀察者使用，本研究系統針對神經細胞的樹突生長觀察與紀錄，設計了一個自動化觀察與紀錄的系統，針對觀察神經細胞的顯微影像，我們進行了影像強化、二值化與去除雜訊，並再利用了改良式的細線化法來找出樹突，並使用二維樹狀(2D tree)[11]搜尋找出各個樹突的端點位置，如此一來就可以觀察與紀錄到每一個時間點的樹突狀況。

(b-1) 影像強化法

在一般的顯微影像中，因為取樣樣本的透光度與光源亮度的影響，會造成相當程度的有效影像遭到隱藏，所以在處理前必須先將神經原細胞影像強化，其目的是將影像取樣時被隱藏有效資訊給找出來。在本計畫中我們採用了直方圖等化(histogram equalization)的方法，來調整暗部的隱藏部份並獲得更多的有效資訊。

(b-2) 二值化

在影像強化後，首先要做的就是事先將所獲得的神經細胞影像二值化，二值化的目的在於將影像分割成兩個不同的屬性，因此閾值的決定會影響分割結果的好壞，二值化處理決定了影像中神經細胞邊界分割能否成功。閾值的選取方法有很多種，本研究採用 Nobuyuki Otsu [12]於 1979 年所提出的全域閾值法。

(b-3) 去除雜訊

因細胞顯微影像在經二值化處理後，有許多不必要之雜訊，除大部分為背景雜訊外，還包括細胞內部之雜訊，在此我們針對二值化後影像，利用形態學的集合論所發展出能自動將細胞內部及背景雜訊去除的方法。形態學主要用途是在於獲取物體拓撲和結果資訊，它在影像處理中的應用主要是：

1. 利用形態學的基本運算，對影像進行處理，從而達到改善影像的目的；
2. 描述和定義影像的各種幾何參數和特徵，如面積，周長，連通度，顆粒度，骨架和方向性。

通常形態學影像處理為一種鄰域運算形式，在每個像素位置上它與二值影像對應的區域進行特定的邏輯運算，邏輯運算的結果為輸出影像的相應像素。形態學運算的效果取決於結構元素(structure element)的大小、內容以及邏輯運算的性質。本文在去除雜訊的方法上，就是利用形態學運算中的侵蝕(erosion)與膨脹(dilation)，將背景及細胞內部一些不必要的圖點資訊濾除。

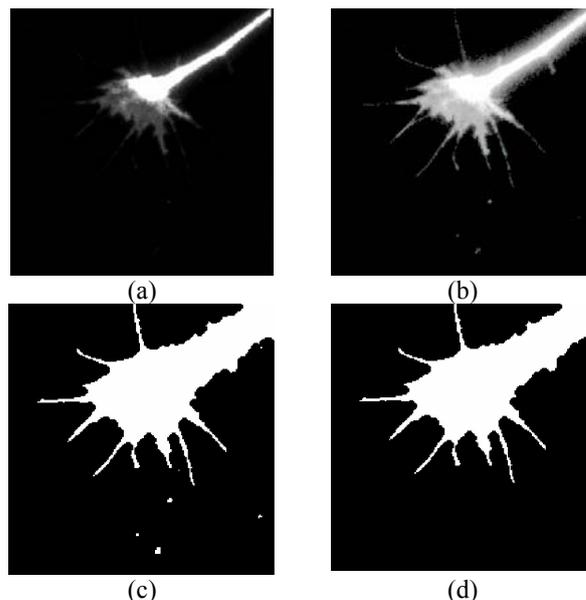


圖 8. 神經細胞影像處理。(a)灰階原始影像，(b)影像強化，(c)二值化影像，(d)去除雜訊。

(b-4) 改良式細線化法

使用細線化法的目的是要得到樹突的分布狀態，因此可以觀察與記錄樹突的生長狀態。細線化法是以迭代方式一層一層刪除物件邊界的像素，根據其與鄰近像素的關係，並利用演算法計算每一個像素是否去除或保留，經過多次的迭代後，最後所保留的就是中心的骨架(skeleton)。

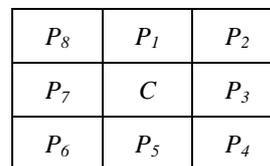


圖 9. 細線化法中相鄰八個像素點的示意圖。

細線化法中相鄰八個像素點的位置，如圖 9， C 是為待處理之像素，而 P_1 至 P_8 為其相鄰像素。物件像素值為 1，背景像素值為 0。

任何一個迭代刪除方式的細線化演算法必須滿足以下需求：

- (a) 刪除的點不會消去端點；
- (b) 刪除的點不會中斷連結；
- (c) 不會引起區域的過度浸蝕。

細線化法相關的研究有很多，其中 Zhang[13]提出一個平行偵測刪除邊緣的細線化方法，利用相鄰的八個像素點的關係，活化點(active point)數與反向(inverse)次數，並利用演算法規則判斷該點是否為邊際點，如果為邊際點則將該點反向為非活化點(inactive)，反之，該點保留為活化點。但是大部分的細線化演算法都會將大區域的部份保留過多的細線情形出現，本研究提出了改良 Zhang 的演算法，算法如下：

步驟(一)

沿左上右下順序對所有值為 1 的像素點 C 進行偵測，假設點 C 的位置為 (i,j) ，計算該點相鄰的八個像素點的關係，相鄰八個像素點的表示如圖，活化點(active point)數與反向(inverse)次數，NOO 代表為相鄰八點的活化點數，INC 代表為相鄰八點的反向數，即： $NOO(C)=P_1+P_2+\dots+P_8$ ，INC(C)則是依序從 $P_1 \rightarrow P_3 \rightarrow P_4 \dots \rightarrow P_8$ 當中，像素值從 0 變為 1 或像素值從 1 變為 0 的次數。例子如下：

1	0	0
0	1	1
0	1	1

圖 10. 細線化相鄰八像素點關連計算舉例。

可求出 $NOO(C)=4$ ， $INC(C)=4$ 。

步驟(二)

條件(a)中，當 $INC(C)=0$ ，代表周圍八點並沒有反向的情況，如果 $NOO(C)=0$ 表示 C 為一孤立點，周圍八點皆為 0 值的像素點，所以必需將該點刪除，如果 $NOO(C) \neq 0$ ，則 C 點週圍皆為 1 值的像素點，因此 C 點為內部一點，所以該點暫時保留。

條件(b)中，當 $INC(C)=2$ ，代表周圍八點僅有一次的反向的情況，如果 $NOO(C) \leq 2$ 或 $NOO(C) \geq 6$ 則定義為內部點，需要保留下來，如果 $NOO(C)=5$ 且 $P_3 \cdot P_5=1$ 且 $\text{sum}(i-1: i+1, j+2)=0$ 且 $\text{sum}(i+2, j-1: j+1)=0$ ，則該點為有效的邊界點，需要保留，其他的情形則為無效邊界，需要刪除。

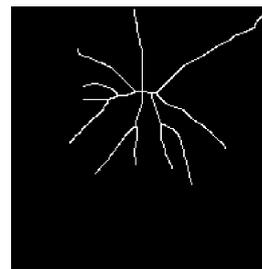
條件(c)中，當 $INC(C) > 2$ ，代表周圍八點有超過一次的反向的情況， C 點的狀況可能是轉折點或是交點，所以該點的資訊需要被保留。

步驟(三)

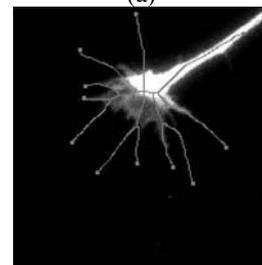
檢查是否有更改，如有更改則重複步驟一，若無更改則停止。

(b-5) 二維樹狀搜尋

本研究修改了 Freedman[12]在 2003 年所提出的二維空間搜尋樹方法，一般搜尋樹的結構都是由父代、子代、節點與端點所組成，最常見的搜尋樹就是二元樹(Binary tree)，它的節點與子代都有限制，所以使用上就不方便，因此日後才會有其他的二元樹延伸搜尋樹，KD tree 是眾多二元樹延伸應用的一種，它是將二元樹的空間延伸至 K 維空間中(K-Dimension)，但是他還是保有二元樹中的單節點與二子代的限制，因此我們將此限制修改，不限制單一節點的子代數限制，其目的是因為我們所觀察的神經細胞樹突的分支並沒有規則性，單一節點可能出現一個或多個分支的狀態，使用了可包含多子代的方法，我們可以更正確的獲得神經細胞樹突的分布狀態，在每張序列影像搜尋神經細胞樹突末端位置後，樹突末端位置都將記錄起來以便之後的分析。



(a)



(b)

圖 11. 神經細胞樹突。(a)細線化，(b)端點。

三、系統架設與實驗結果

本章節將對於本計畫所研發的顯微影像觀測系統架設與實驗結果，做一個詳盡的說明。整個實驗的結果包含說明實驗設備與系統的架設規劃，在實驗數據與結果討論中，將分為兩個部份來做說明，第一部分為粒子影像定位與移動軌跡追蹤，第二部份為神經細胞樹突生長偵測與紀錄。

3.1 顯微影像觀察與記錄系統的架設環境

本計畫所研發的顯微影像觀測系統包含了硬體與軟體兩個部分。在硬體方面，主要有 MICROTECH PMM-834 數位式顯微鏡，其放大倍率為 50~1000，影像擷取器為 Sony 1394 界面 CCD，影像解析度為 1024*768 像素，每秒可擷取 30 張影像，軟體操作介面為 MICROTECH 所提供的數位影像擷取量測系統，此介面提供了光學校正與幾何量測的功能，讓使用者能更方便的使用，顯微影像擷取與處理平台為一般桌上型電腦，處理器規格為 Intel Pentium®-IV 3.0GHz，圖 12 為本計畫顯微影像觀測系統硬體架構圖。



圖 12. 顯微影像觀測系統硬體架構圖。

3.2 實驗結果

實驗結果的部份，我們將分以下三點來討論，分別是影像分割定位與數量估測、特定細胞移動軌跡之追蹤和神經細胞樹突觀察與紀錄。在第一個部份，我們將針對分割定位的中心點和整體數量的估測，討論其誤差及發生原因。第二部份則著重是細胞追蹤的正確度，最後是神經細胞數量及生長的追蹤。

3.2.1 細胞影像分割定位與數量估測

在細胞影像分割定位與數量估測這一個部份，由於我們沒有活體細胞可供觀測，因此我們使用 2.47um 球型塑膠微粒子作為代替。我們針對一段影像中，任意取出總共 1000 張的圖片作為分割定位和數量估測的實驗。

在定位方面，由於塑膠微粒子並無法被控制在空間的某一處，因此只能用眼睛和圓型逼近的方式去判定其精確度，對於數張影像共 100 個塑膠微粒子，已知 2.47um 球型塑膠微粒子在影像中之直徑約佔 10 像素的情況下，經過圓形遮罩和種子區域成長法所獲得的中心，與用眼睛和圓形逼近的方式所獲得的中心，平均誤差約為 0.92 個 pixel，標準差為 0.9713 個 pixel，而誤差的發生，通常在於影像品質，由於我們並沒有光學桌，因此並沒有辦法維持影像不要晃動，些微的振動都會造成影像的模糊化，因此在微粒子的邊緣就會有模糊的情況。此外，也由於塑膠微粒子在培養皿中是在三維空間中，不一定完全落在顯微鏡的焦平面上，因此其邊緣也會有模糊化的情況，最後就是雜訊，也就是鏡頭或是培養皿的汙垢影響。這些影響都會造成在邊緣上判斷的一些誤差，而導致最後中心點的誤差。

另外，在數量估測的部份，所取出來的 1000 張影像，球型微粒子的數量都約在 100 個上下，由實驗結果所得的數據和人眼去觀察粒子的數量做比較，平均誤差約為 2.837 個，標準差為 2.132 個，也就是在一張影像中，數量的誤差約在 2% 左右。

3.2.2 特定細胞移動軌跡之追蹤

在特定細胞移動軌跡追蹤的實驗項目中，針對取得的顯微影像序列，進行特定微粒子的追蹤。首先由細胞定位的方法，分割出在顯微影像中的微粒子。接下來由人工指定某個粒子開始進行移動軌跡的追蹤。

實驗使用三段顯微影片來做追蹤，實驗結果如表 1 所示。在一般影片清晰度足夠的情況下，追蹤的正確率可以達到九成以上。由於沒有光學桌設備，因此粒子在影像中會有較不規則的振動，影響追蹤的效果。圖 7 就是一個典型因為外在振動，導致顯微影像振動後影響追蹤的情形。該為例子就算靜止不動，也會受到影像振動的影響。另一個造成追蹤率不高的情況，是微粒子的移動離開焦平面，導致影像特徵消失而追蹤失敗，如編號 3 的影片，微粒子稍微離開焦平面而導致追蹤失敗。

3.2.3 神經細胞樹突觀察與紀錄

在神經細胞觀察與紀錄實驗裡，我們著重於神經細胞樹突數目與位置的精確度，測試影片長度為 1 分 20 秒，取樣頻率為每秒 20 張，測試影像一共 1600 張，每張影像

平均處理時間 1'15"，本實驗準確率量測分為兩個，一個是樹突數量正確率(R_{cn})，另一個是樹突位置正確率(R_{cp})。正確率定義為：

$$R_{cn} = \frac{\mathcal{E}_{EN_Dendrite}}{\mathcal{E}_{TN_Dendrite}} \quad (12)$$

$$R_{cp} = \frac{\mathcal{E}_{CPN_Dendrite}}{\mathcal{E}_{TN_Dendrite}} \quad (13)$$

$\mathcal{E}_{EN_Dendrite}$ 為經過本系統所偵測出來的神經細胞樹突總數， $\mathcal{E}_{TN_Dendrite}$ 為手動計算出來的神經細胞樹突總數，

$\mathcal{E}_{CPN_Dendrite}$ 為經過本系統所偵測出來位置正確的神經細胞樹突總數。錯誤率的計算也是分為兩個部份，一個是樹突數量估測的錯誤率(R_{en})，另一個是樹突位置偵測的錯誤率(R_{ep})，相關定義為：

$$R_{en} = \frac{\mathcal{E}_{Err_EN_Dendrite}}{\mathcal{E}_{TN_Dendrite}} \quad (14)$$

$$R_{ep} = \frac{\mathcal{E}_{Err_CPN_Dendrite}}{\mathcal{E}_{TN_Dendrite}} \quad (15)$$

$\mathcal{E}_{Err_EN_Dendrite}$ 為經過本系統所未偵測出來或偵測錯誤的神經細胞樹突總數， $\mathcal{E}_{Err_CPN_Dendrite}$ 為經過本系統所偵測出來位置不正確位置的神經細胞樹突總數。

表 1. 特定細胞移動軌跡追蹤的結果。

影片編號	影像張數	追蹤正確張數	正確率
1	756	716	94.7%
2	733	663	90.4%
3	548	421	76.8%

表 2. 神經細胞樹突偵測準確率與錯誤率。

樹突數量 正確率	樹突位置 正確率	樹突數量 錯誤率	樹突位置 錯誤率
95.26%	93.18%	7.11%	8.54%

3.3 實驗結果討論

在神經細胞觀察與紀錄實驗裡，證明了我們所提出來的系統，能正確的計算出神經細胞樹突數量與位置，如圖 13(a)~(d)，分析錯誤判斷的影像，我們可以發現大部分誤差的都是出現在樹突末端的突觸，因為這些容易造成誤判的突觸都是在細胞核附近剛形成的突觸芽，這些突觸芽由於是屬於初生的突觸，透光度相當高，又因其與核本身距離並不遠所以容易造成系統的誤判，如圖 13(e)白色圈圈處，又一個容易造成錯誤的原因在於本身細線化的演算法中，由於演算法無法絕對正確的判斷邊緣保留點與側芽凸點所造成地不正確保留，因此產生錯誤的樹突判斷，如圖 13(f) 白色圈圈處。

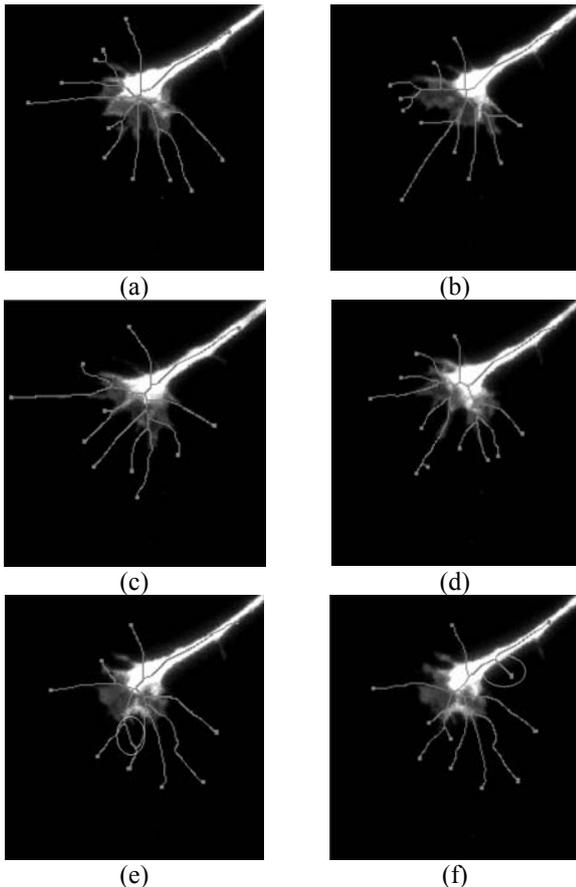


圖 13.神經細胞樹突偵測實驗結果。(a)~(d)為正確結果的例子，(e)與(f)為錯誤的例子。

四、結論與未來展望

本研究計畫提出一個基於光鉗系統之顯微影像觀測系統，其主要目的有兩個，一個是細胞的靜態分割、定位、跟計量，另一個則是細胞動態的移動偵測和生長追蹤紀錄。經由不斷的研究與改進，不論是系統的架構或是執行能力，均可以達成計畫所要求的目標。對於整個光鉗系統來說，有顯微影像觀測系統的輔助，可使整個光鉗系統增加穩健性和實用性。

在本研究計畫中，我們能針對顯微影像中的細胞，做出分割、定位、計數、追蹤等等的功能，也從實驗結果數據上得知能達到不錯的成果，對於顯微影像中小粒子的分割定位計數能達到相當高的正確率，而在追蹤上，也能將個別的粒子追蹤出來，並且根據不同的時間描繪出其空間座標。此外，在神經細胞的生長追蹤上，我們也以自己的方法將神經樹突的生長確實的追蹤到，因此，本計畫對顯微影像有著相當的研究成果。

對於未來，我們希望能針對特定的細胞，做進一步的觀察偵測，不管是生長或是追蹤等等，由於現在的神經細胞的取樣頻率(sampling rate)過低，導致在追蹤部分效果並不好，這點希望再將來能夠改進。此外，細胞在三維空間中的情況，目前我們只能利用顯微鏡對焦平面上的細胞做二維的定位，將來或許可以考慮兩隻顯微鏡做三維空間的重建，以達到對於細胞在三維空間的定位。而在光鉗系

統的部份，我們希望未來能與真實的三維控制平台做結合，提供一個位置控制訊號的回饋，並且能以影像作為一個空間位置資訊的取得，以增加整個光鉗系統的實用性。

參考文獻

- [1] A. Ehrlicher, T. Betz, B. Stuhmann, D. Koch, V. Milner, M. G. Raizen, and J. Käs, "Guiding neuronal growth with light," *Proceeding of National Academy of Sciences of The Unite States of America*, Nov. 2002.
- [2] D. Koch, T. Betz, A. Ehrlicher, M. Gogler, B. Stuhmann, and J. Kas, "Optical control of neuronal growth," *Proc. SPIE*, Vol. 5514, Aug. 2004.
- [3] D. J. Stevenson, T. K. Lake, B. Agate, V. Gárcés-Chávez, K. Dholakia, and F. Gunn-Moore, "Optically guided neuronal growth at near infrared wavelengths," *Optics Express*, Vol. 14, Issue 21, pp. 9786-9793, 2005.
- [4] I. Avcibas, B. Sankur, and K. Sayood, "Statistical Evaluation of Image Quality Measure," *Journal of Electronic Imaging*, vol. 11, no. 2, pp. 206-223, April 2002.
- [5] N.B. Nill and B.H. Bouzas, "Objective Image Quality Measure Derived from Digital Image Power Spectra," *Optical Engineering*, vol.31, pp. 813-825, April 1992.
- [6] M. Kass, A. Witkin, and D. Terzopoulos, "Snakes: Active contour model," *International Journal of Computer Vision*, pp.321-331, 1988.
- [7] R. M. Mutelo, W. L. Woo, and S.S. Dlay, "Two Dimensional Orthogonal Wavelet Features for Image Representation and Recognition," *Int. Conf. on Digital Signal Processing*, pp. 256-259, 1-4 July 2007.
- [8] G. Shalini, M.P. Sampat, M.K. Markey, A.C. Bovik, and W. Zhou, "Facial Range Image Matching Using the ComplexWavelet Structural Similarity Metric," *IEEE Workshop on Applications of Computer Vision*, pp. 4-4, Feb. 2007.
- [9] G. Gunlu and H. S. Bilge, "Driver Face Recognition by Using 3D Discrete Cosine Transform," *IEEE Intelligent Vehicles Symposium*, pp. 680-685, 13-15 June 2007.
- [10] W. Chen, E. M. Joo, and S. Wu, "Illumination compensation and normalization for robust face recognition using discrete cosine transform in logarithm domain," *IEEE Trans. on Systems, Man and Cybernetics, Part B*, vol. 36, no. 2, pp. 458-466, April 2006.
- [11] N. Otsu, "A Threshold Selection Method from Gray-level Histogram," *IEEE Trans. on System, Man, and Cybernetics*, Vol. 9, No.1, pp.62-66, 1979.
- [12] D. Freedman, "Effective tracking through tree-search," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Vol. 25, Issue 5, pp. 604- 615, May 2003.
- [13] T.Y. Zhang and C.Y. Suen, "A fast parallel algorithm for thinning digital pattern," *Communications of the ACM*, Vol. 27, No. 3, pp. 236-239, 1984.