

# 速時新鮮數位病理術

## Rapid Fresh Digital-pathology

孫啟光、巴卡地、曾耀燦、王國川、王奐之、黃馨儀、張克平、  
廖怡華

Chi-Kuang Sun, Bhaskar Jyoti Borah, Yao-Chen Tseng, Kuo-Chuan Wang, Huan-Chih Wang,  
Hsin-Yi Huang, Koping Chang, Yi-Hua Liao

當今腦瘤手術中的冷凍病理需耗時 25–30 分鐘，而為了達成更有效率且不造成假影的檢體處理，並同時以極高解析度之數位影像，本技術涵蓋了 H&E 整體組織快速染色法，和以非線性光學為基礎所建構的具十億像素之介觀顯微鏡，並將之應用於手術檢體的病理鑑定。透過將經 H&E 快速染色後的樣品以亞微米的高解析度拍攝大面積的實時非線性拼接影像，且不須後處理，即可提供公分級的大視野病理影像給病理科醫師進行判讀，且經臨床試驗後得到了 100% 的準確率。

Currently, frozen section (FS) pathology, the global standard for intraoperative tumor assessment (ITA), that involves cryosectioning, susceptible to artifacts, consumes up to 30 minutes per round, and eventually limits number of ITAs in a critical surgery. In order to reach more efficient and artifact-free tissue processing and obtain digital images with ultra-high resolution, the technology implements true-H&E rapid whole-mount tissue staining (the-RTS) method, conducts optical imaging via mesoscale nonlinear optical gigascope (mNLOG), and help solve this urgent problem. Acquiring real-time centimeter-scale large-area-stitching H&E images with sub-micron resolution, our technology can preserve the true surgical margin and histological details without causing any artifact. Remarkably, with the speed that at least 4 times faster than frozen-biopsy, rapid fresh *digital*-pathology secures an excellent accuracy of 100%, that is indeed comparable to the ultimate solution of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) biopsy in the clinical trial for brain tumor assessment by pathologists.

### 一、前言

腦瘤泛指長在顱骨腔內的瘤，其生成可能來自為大腦組織、腦膜或其他顱內組織的原生，也可能從腦以外的如乳癌、肺癌、胃腸癌等轉移來的惡性腫瘤。最常見的原發性腦瘤，為從神經膠質細胞突變的神經膠質細胞瘤，又稱為膠質瘤 (glioma)，占所有腦瘤的一半以上，其次為腦膜長出的腦膜瘤、由腦下腺發生的腦下腺瘤、由神經膜長出的神經鞘瘤等。而膠質瘤其浸潤性的生長模式導致正常腦組織邊緣模糊，並不易觀察到其腫瘤的邊界。而根據 WHO 多年的統計數據，高階膠質瘤如 glioblastoma 的復發率幾乎維持在 90% 左右，5 年生

存率在 10% 左右。<sup>(1-2)</sup>。其預後顯示了該類腫瘤的高度危險性，也正迫切地需要發展出以病理學角度切入的有效治療策略，才能有效地挽救患者的生命。

而病理學為研究疾病發展狀態及疾病本質的一門醫學基礎學科，其透過結合形態學、組織學，探討疾病的成因，發生的致病機制及病情的演變，從而為疾病的診斷、治療、預防提供必要的理論基礎和實踐依據。而在 19 世紀末，因當時的醫療資源匱乏，外科醫師鮮少利用活體組織檢驗在手術過程中做出明確診斷。病理學成為一種純粹的學術追求，在大多數情況下，以屍檢或最終手術的檢體，使用顯微鏡將肉眼和顯微鏡下的發現與臨床病史聯繫起來，並對疾病進行分類。而對於許多臨床手術病例，臨床病理學之評估由外科醫生進行，通常僅通過肉眼檢查。在 1876 年蘇木精-伊紅 (hematoxylin & eosin, H&E) 染色法首次被測試、發表後，病理科醫師有了一方便取得且有效能觀測細胞核到細胞質結構、形狀和顏色等資訊的染色方式；1893 年福馬林的組織固定效果也首次被介紹，並在短短幾年內成為當時組織保存的主流方式，因而演變出了經福馬林固定之石蠟 (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) 切片的病理黃金標準流程。但考量其經過固定、脫水、石蠟包埋等流程需花費至少 1 天以上的時間，應用於手術過程中仍不適合，故使得將組織快速冷凍使其硬化，再進行切片、染色的冷凍病理 (frozen-section pathology, FS-pathology) 成為了一突破的可能，而 1905 年於美國 Mayo 醫院的初步測試也被廣泛認為是冷凍切片的首個成功案例，能使得樣品處理時間控制在約 1 小時完成。而在這樣的時間條件下，使手術中進行檢體判讀及診斷變得可行，也開啟了醫療型態的重大變革。

而在癌症的眾多治療方法中，手術無疑是最能完整切除癌化組織、延長患者生存期的方式，但在有功能保留或美觀考量的組織器官，術中能依著專業病理觀點精確並有效率的分辨腫瘤及正常組織，進而去分辨其邊界的準確位置，以達到腫瘤完整切除及組織功能保留的雙重目的，便顯得相當重要。當今腫瘤切除手術的術中黃金標準流程即為冷凍病理，其中樣品的製備過程如冷凍手術檢體、切片等需花費相當長的處理時間，才能將其放置在顯微鏡上進行觀察。然而，其缺點除了時間外，更有可能將真實的手術邊界於切片流程中切除，也可能因冷凍過程造成假影<sup>(3)</sup>，提升病理科醫師判讀的不確定性。故目前國際多方倡議使用光學新鮮組織切片術來取代冷凍病理，透過直接對切除之手術檢體進行全組織的光學影像擷取，以避免造成人為假影。而如何在有限的時間內，能迅速地獲得大面積且高品質的病理影像，更成為了發展相關顯微平台的關鍵議題。

在現代病理學的演化中，數位病理 (digital pathology) 為不可或缺的一環，其中全玻片成像 (whole slide imaging, WSI) 正在迅速發展，這有助於以數位形式儲存數十億張冷凍/石蠟病理組織切片之影像，並進一步使病理科醫師能夠從任何位置遠程存取全玻片掃描之影像來執行快速的病理評估。然而，為了能在數位取樣的基礎上，保持良好的診斷可靠性，至關重要的是在從檢體拍攝到數位顯示系統的像素路徑中沒有解析度上的損失。根據數位病理學協會的實用指引<sup>(4)</sup>，需有典型 20 倍放大倍率的 WSI 以進行觀察和分析，而在 40 倍放大倍率時具有  $0.5 \mu\text{m}$  之數位解析度、滿足奈奎斯特定理 (Nyquist theorem) 的  $0.25 \mu\text{m}$  像素大小<sup>(5-6)</sup> 且保持 24-bit 顏色深度，方能達到數位病理的基本標準。而其代表  $1 \times 1 \text{ mm}^2$  的區域須至少包含 384 Mbits，即  $1 \text{ cm}^2$  的區域至少 38.4 Gbits 或 1.6 Gigapixels。對於這種具有高數值孔徑 (numerical aperture, NA) 的物鏡，其視野範圍 (field of view, FOV) 通常會低於  $1 \text{ mm}^2$ ，需要進行拼接才能組合出較大面積的影像，而相關的影像處理必須是無偽影的，才不會影響診斷的可靠性，也才能將病理資訊鉅細靡遺地以數位方式儲存。然而，儘管使用了高速明場 CCD/

CMOS 傳感器，但現今主流的 WSI 技術<sup>(6-9)</sup> 在考慮高倍率高 NA 物鏡時，普遍需要長達一分鐘或更長時間以掃描、計算，以實現公分級取像、拼接和顯示操作。

該類發表之相關技術<sup>(10-23)</sup> 利用數位成像的方式及光學的虛擬切片，以實現更快的評估速度。對於新鮮未固定且未切片的組織，預計在術中病理鑑定 (intraoperative pathological assessment) 的期間將盡可能的病理資訊進行數位化，以確保診斷的可靠性。然而其參數與結果如表 1，不僅未能符合國際上對於數位病理影像保存與取樣之大面積高解析度規範 (無法達到滿足奈奎斯特取樣定理的十億像素採樣存取量、半微米之解析度)，且眾多技術或耗時比目前冷凍病理久，亦因未能使用標準的病理染劑，而降低了其病理判讀上的準確度。而在數位影像的取樣方面，目前已發表的相關技術亦無法實現即時的大視場無偽影拼接／賽克功能，或者在亞分鐘內實現十億像素的採集和數位顯示能力。此外，因病理科醫師一般以辨識典型 H&E 染色下的組織學特徵和外觀進行判定，故在使用替代染劑取代 H&E 染劑時，需要特定的機器學習演算法<sup>(20, 21, 23)</sup> 或對病理科醫師進行額外的解釋訓練<sup>(10-16, 19, 23)</sup>，方能使其判讀。更甚者，在使用其他種類的細胞核染劑<sup>(15, 24-26)</sup> 代替蘇木精 (hematoxylin) 時，其對比度與染色效果是否能與標準 H&E 染色完全匹配，需要進行一套完整的染色結果驗證確認，且對於不同的器官，染色結果亦可能有所不同。因此，相關技術之於蘇木精染劑的相容性對於不需要培訓且可靠的 FS/FFPE 替代技術至關重要，而由於蘇木精染料不具備螢光特性，故許多以螢光成像為基礎的影像技術並無法進行測試。

表 1. 嘗試解決術中病理之相關技術。CM: confocal microscopy, OCT: optical coherence tomography, MUSE: microscopy with ultraviolet surface excitation, MPM: multiphoton optical microscopy, SIM: structured illumination microscopy, LSM: light sheet microscopy, SRS: stimulated Raman scattering, UV-PAM: ultraviolet photoacoustic microscopy

| Tech.  | Ref.          | FOV (mm × mm)  | Pixel number or pixel size | Accuracy   | Sensitivity | Specificity | H&E compatibility | Additional training | Real-time a) Stitching & half-a-micron resolution display | Subminute Gigapixel acquisition & digital display | Tissue       |
|--------|---------------|----------------|----------------------------|------------|-------------|-------------|-------------------|---------------------|---|---|--------------|
| CM     | <sup>10</sup> | 0.37 × 0.37    | —                          | —          | 95%         | 100%        | No                | Yes                 | No  | No  | Brain        |
|        | <sup>11</sup> | —              | 1024 × 1024                | 94.4%      | 89.7%       | 95.3%       | No                | Yes                 | No  | No  | Skin         |
|        | <sup>12</sup> | —              | 1024 × 1024                | —          | 76–90%      | 85–98%      | No                | Yes                 | No  | No  | Prostate     |
| OCT    | <sup>13</sup> | 5.0 (diameter) | —                          | —          | 88.9–92.6%  | 96.8–98.4%  | No                | Yes                 | No  | No  | Skin         |
| MUSE   | <sup>14</sup> | 4.0 (diameter) | 2728 × 2200                | 96.03%     | 97.62%      | 92.86%      | No                | Yes                 | No  | No  | Breast       |
| MPM    | <sup>15</sup> | 0.48 × 0.48    | 1024 × 1024                | 94.1%      | 95.4%       | 93.3%       | No                | Yes                 | No  | No  | Breast       |
|        | <sup>16</sup> | 1.0 × 1.0      | 2048 × 2048                | 98.3%      | 97.3%       | 100%        | No                | Yes                 | No  | No  | Prostate     |
| SIM    | <sup>17</sup> | —              | —                          | 89.2%      | 79.2%       | 95.1%       | No                | Yes                 | No  | No  | Prostate     |
|        | <sup>18</sup> | 1.3 × 1.3      | 2048 × 2048                | 76.5–82.4% | 62.5–87.5%  | 77.8–88.9%  | No                | Yes                 | No  | No  | Kidney       |
| LSM    | <sup>19</sup> | 0.9 (width)    | 0.9 μm/pixel               | 93%        | 90%         | 94%         | No                | Yes                 | No  | No  | Prostate     |
| SRS    | <sup>20</sup> | 0.4 × 0.4      | 1024 × 1024                | > 92%      | 94.5%       | 94.1%–      | No                | Yes                 | No  | No  | Brain        |
|        | <sup>21</sup> | 0.4 × 0.4      | —                          | 92–96%     | —           | —           | No                | Yes                 | No  | No  | Brain        |
|        | <sup>22</sup> | 0.4 × 0.4      | —                          | 87%        | —           | —           | No                | Yes                 | No  | No  | Skull        |
| UV-PAM | <sup>23</sup> | 0.5 × 0.5      | 700 × 500                  | 91.7–96.9% | 91.3–96.5%  | 91.5–96.9%  | No                | Yes                 | No  | No  | Colon, Liver |

## 二、速時新鮮數位病理術

故在這裡，我們想介紹一種能有機會取代當今冷凍病理之術中病理技術，稱為速時新鮮數位病理術 (Rapid Fresh Digital-Pathology) 如圖 1，本平台能測試無物理切片、經標準 H&E 染劑快速染色的全組織，而其取像是由具有高奈奎斯特品質因數 (nyquist-figure-of-merit, NFOM)、十億像素之非線性光學介觀顯微鏡 (mesoscale Nonlinear Optical Gigascope, mNLOG) 進行測試。在數位病理學領域，此 mNLOG 影像系統首度提供了真正符合 WSI 標準的全標本表面成像 (whole specimen superficial imaging, WSSI) 技術，能夠在不到 120 秒內對  $1\text{ cm}^2$  的區域進行多色成像，其數據大小總共 86 G 位或 3.6 Gigapixels (24 位)，不僅保持了亞微米的數位解析度，並能在半秒的多重計算下，實時運行大視場高像素率吞吐量、失真補償、去除高頻雜訊。此外，其技術使用了以 CUDA 加速的快速假影補償二維大視野馬賽克拼接 (rac2D-LMS) 之方法，以實現大視野範圍 ( $\geq 1\text{ mm}^2$ )、高 NFOM ( $> 1$ ) 之多頻道非線性光學雷射掃描系統。rac2D-LMS 能運行基於簡化的 FOV 失真模型的即時徑向失真補償，在 60 秒內完成  $> 12 \times 12\text{ mm}^2$  區域的馬賽克拼接，將範圍內的影像資訊完整地紀錄。

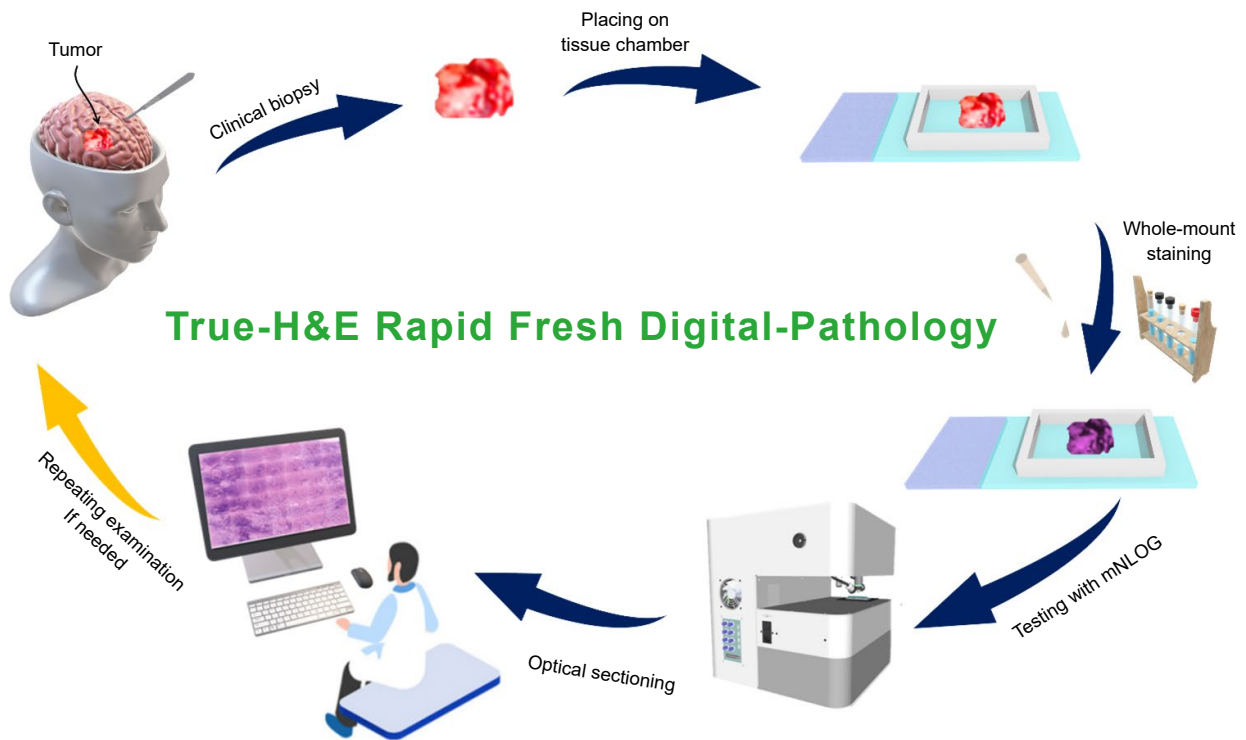


圖 1. 速時新鮮數位病理術。

本文於以下介紹各項應用於此平台之技術：

### 1. 快速組織染色

在速時組織病理術中，快速組織染色 (rapid tissue staining, RTS) 流程屬於相當重要的一個環節，其透過將手術切除下來未固定、切片之檢體放入組織室或組織容器中，使用標準的 H&E 染劑及溶液，進行快速的全組織染色 (whole-mount staining) 如圖 2，整體流程所花費

的染色時間少於 6 分鐘。其流程如下：

- (1) 用固定液進行固定過程。
- (2) 使用 Gill 蘇木精溶液和／或 Mayer 蘇木精溶液進行 H 染色過程。
- (3) 用蒸餾水進行清洗過程。
- (4) 用氨溶液進行藍化處理。
- (5) 用伊紅溶液進行 E 染色過程。
- (6) 用酒精溶液進行清洗過程。
- (7) 用蓋玻片對切除的未固定生物檢體進行加蓋處理。

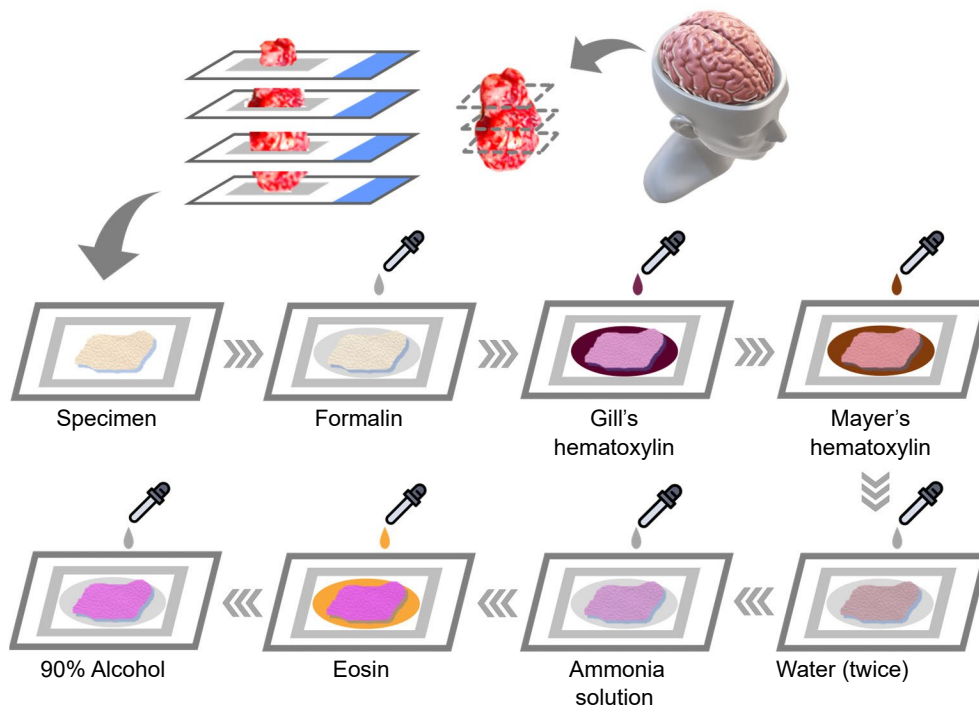


圖 2. RTS 染色法之流程。其中所使用之化學染劑皆為臨床病理使用的標準染劑。

## 2. 共振振鏡大角度光柵掃描系統

本平台使用的 mNLOG 平台為大角度光學光柵式掃描 (large angle optical raster scanning, LAORS) 系統。雷射光源我們採用中心波長為 1070 nm 的 70 MHz 的摻鎳脈衝光纖雷射 (Fidelity-2, Yb-doped fiber laser, COHERENT)，其雷射脈衝之高重複率將有助於確保高 NFOM，從而實現無光學變焦的高數位解析度。而該研究結合了三倍頻 (third-harmonic generation, THG) 和雙光子激發螢光 (two-photon excited fluorescence, TPEF) 分別用於檢測蘇木精和伊紅信號。而掃描鏡組的快軸由 4 kHz 共振掃描鏡 (CRS 4 kHz, Cambridge, USA) 用於快速水平 (X) 軸掃描，而慢軸由 Galvo 掃描鏡 (8320K, Cambridge, USA) 沿垂直 (Y) 軸掃描，完成高速共振振鏡光柵掃描。而光學中繼系統有效焦距 (EFL) 為 167 mm 的管透鏡 (tube lens)，以及 EFL 為 110 mm 的 scan lens 組合而成。為了將掃描光束聚焦在組織樣本上，使用了高數值孔径 (NA = 0.95) 之 20×物鏡 (XLUMPlanFl, 20×/ 0.95W, Olympus)。為了有效地收集染色檢體之信號，透過添加適當的分光鏡，帶通濾波片，構成不同頻道分別檢測 H

和 E 兩種染劑之訊號。而本研究中所進行之取像，每一成像塊為視野範圍  $1 \text{ mm}^2$  的影像，其影像由  $6000 \times 6000$  個像素組成，即每一像素大小為  $167 \text{ nm}$ 。而對於每個檢體，將會使用 mNLOG 影像平台獲取多個圖塊，以提供較大的累積查看區域，且在每種情況下，都確保了  $> 700 \text{ M 位/秒}$  的有效資料存取量。

### 3. 多頻道數據採集

使用資料擷取卡 ATS9440 (Alazar Technologies Inc., Canada) 可支持多達 4 個同時可類比轉數位訊號之頻道，而每個頻道之取樣率 (sampling rate) 高達  $125 \text{ MSps}$ 。受限於  $70 \text{ MHz}$  的雷射重複率，我們透過將雷射脈衝同步信號輸出被饋送到 ATS9440 使每個取樣與每個雷射脈衝同步，從而實現  $70 \text{ M/s}$  的採樣率。每個成像圖塊都包含沿每條快軸線的  $6000$  個像素，故能確保每個像素有 1–2 個有效光脈衝。而橫向移動公分級檢體以取得其二維影像，我們沿水平軸和垂直軸使用了兩個電動線性平台 (TSDM40-15X, Sigma Koki, 日本)，其平台能達成約  $5.6 \text{ 毫米/秒}$  的最大橫向移動速度。而在收集多個圖塊時，確保了約 9% 的 FOV 長度或寬度的重疊。

### 4. rac2D-LMS 中的瞬時畸變補償模型

假設輸入圖像 ID  $(x, y)$  具有  $C \times R$  像素，我們首先定義兩個二維陣列如下

$$F_x(x, y) = \begin{pmatrix} 0 & \cdots & C=1 \\ & \ddots & \vdots \\ 0 & \cdots & C=1 \end{pmatrix}_{C \times R} \quad \text{and} \quad (1)$$

$$F_y(x, y) = \begin{pmatrix} 0 & \cdots & 0 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ R-1 & \cdots & R-1 \end{pmatrix}_{C \times R} \quad (2)$$

定義兩個空間縮放參數  $S_x$  及  $S_y$ ，且參考 FOV 失真模型<sup>(27)</sup>，得出

$$r_d(x, y) = \frac{360}{A\pi} \tan^{-1} \left[ 2r_u(x, y) \tan \frac{A\pi}{720} \right] \quad (3)$$

Where  $r_u(x, y) = \sqrt{r_x(x, y)^2 + r_y(x, y)^2}$  and

$$r_x(x, y) = \frac{1}{c_1} (F_x(x, y) - c_1), \quad r_y(x, y) = \frac{1}{c_2} (F_y(x, y) - c_2)$$

$$c_1 = 0.5C(1.0 + X_{off}/S_x), \quad c_2 = 0.5R(1.0 + Y_{off}/S_y)$$

在枕形失真或桶形失真的情況下獲得乘法因子，並分別獲得水平和垂直軸的兩個像素坐標圖

$$M_x(x, y) = c_1 [1 + r_x(x, y)f(x, y)] \quad (4)$$

$$M_y(x, y) = c_2 [1 + r_y(x, y)f(x, y)] \quad (5)$$

對 T1 和 T2 執行上述映射的像素映射操作，得到的圖像分別為  $T1^U$  和  $T2^U$ 。對於估計的感

興趣重疊區域 (ROI)  $R_{12}$ ， $d_k$  的評估如下，其中  $k$  表示每個單獨的情況。在最小  $d_k$  情況下，獲得畸變參數  $A$ 、 $X_{\text{off}}$  和  $Y_{\text{off}}$ ，並為後續的像素映射操作設置固定值。

$$d_k = \frac{\sum_{\text{All } R_{12} \text{ pixels}} |T_1^U - T_2^U|}{\text{Area}(R_{12})} \quad (6)$$

為了評估上述模型，我們以網格圖像進行模擬並引入了不對稱徑向畸變<sup>(28)</sup>。圖 3(a) 為兩個同樣扭曲的圖塊，而圖 3(b) 中展示了一個簡單的馬賽克拼接，其中以紅色標記的 ROI 可見嚴重的結構不連續性。而圖 3(a) 之失真圖塊在經過上述提出的方法處理，失真參數  $A$ 、 $X_{\text{off}}$  和  $Y_{\text{off}}$  分別估計為  $51^\circ$ 、 $-49$  和  $-47$ ，負號表示基礎翻轉操作。為了將失真效果應用於圖塊的所有 4 個象限，故沿 X 軸、Y 軸以及 X 和 Y 軸翻轉輸入，並根據所描繪的相同地圖重複像素重新映射操作在公式 (4) 和 (5) 中。並在整個分析過程中設置為 60.0。圖 3(c) 中描繪了失真補償的圖塊，曲線在建議的修正後變得筆直。而圖 3(d) 為帶有失真補償圖塊的馬賽克拼接結果，其中紅色標記的 ROI 顯示出近乎無偽影的性質。

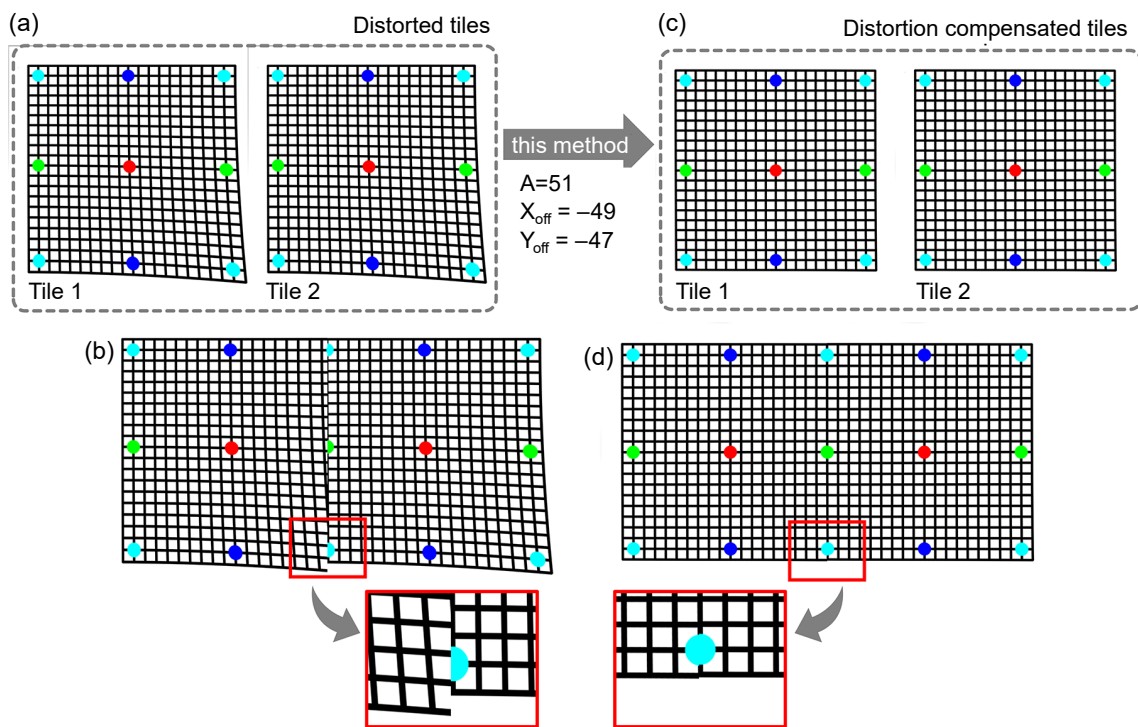


圖 3. 模擬網格圖像進行失真補償之範例。(a) 兩個不對稱扭曲的相同圖塊 (b) 扭曲圖塊的馬賽克拼接圖像 (c) 使用失真補償方法所獲得之圖塊，其中失真參數  $A$ 、 $X_{\text{off}}$  和  $Y_{\text{off}}$  分別為  $51^\circ$ 、 $-49$  和  $-47$ 。(d) 未扭曲圖塊的馬賽克拼接圖像。(b) 和 (d) 中放大的紅色標記區域揭示了此失真補償方法的有效性。<sup>(28)</sup>

## 5. 實時顏色重新映射以協助傳統的組織病理學可視化

對於協助病理科醫師進行快速評估來說，如何將取得之影像透過顏色映射轉換為其熟

悉的病理影像色彩是一項相當重要的議題。因此，我們嘗試對 mNLOG 圖像進行傳統的組織病理學可視化。一項相關的先前研究<sup>(29)</sup> 揭露了一概念，能利用 Beer-Lambert 定律為基本基礎將螢光顯微鏡的影像映射為虛擬 H&E 影像。故在 mNLOG 平台中應用相同的理論，我們定義了兩表 (LUT) 用於 THG 和 TPEF 頻道的顏色重新映射，以轉換成典型的 H&E 特定圖像。首先將蘇木精和伊紅染料所需的藍色、綠色和紅色成分分別定義為 ( $B_H$ 、 $G_H$ 、 $R_H$ ) 和 ( $B_E$ 、 $G_E$ 、 $R_E$ )。並設定其圖像為 8-bit 圖像，對於  $i: 0-255$  的強度範圍，將 LUT 計算為：

$$LUT_H \rightarrow \begin{cases} Blue \rightarrow e^{-(255-B_H)ik/255} \\ Green \rightarrow e^{-(255-G_H)ik/255} \\ Red \rightarrow e^{-(255-R_H)ik/255} \end{cases} \quad \text{and} \quad LUT_E \rightarrow \begin{cases} Blue \rightarrow e^{-(255-B_E)ik/255} \\ Green \rightarrow e^{-(255-G_E)ik/255} \\ Red \rightarrow e^{-(255-R_E)ik/255} \end{cases} \quad (7)$$

其中  $LUT_H$  和  $LUT_E$  分別用於蘇木精和伊紅頻道，並且可優化參數  $k$  以調整所需的對比度水平。而定義並建構 LUT 將有助於簡化每個像素的操作，並幫助我們進行近乎瞬時的 CUDA 加速圖像色彩轉換，可表示為：

$$mNLOG_{THG}(r,c) \xrightarrow{\text{color mapping } LUT_H} H_{remap}(r,c) \quad (8)$$

$$mNLOG_{TPEF}(r,c) \xrightarrow{\text{color mapping } LUT_E} E_{remap}(r,c) \quad (9)$$

其中， $mNLOG_{THG}(r,c)$  和  $mNLOG_{TPEF}(r,c)$  分別表示 THG 和 TPEF 頻道圖像， $H_{remap}(r,c)$  和  $E_{remap}(r,c)$  分別是蘇木精和伊紅特定的重映射圖像， $r$  和  $c$  分別表示垂直和水平像素坐標。隨後，公式 (8) 和 (9) 中的重映射圖像按如下組合以獲得最終的 H&E 重映射輸出為：

$$HE_{remap}(r,c) = HE_{remap}(r,c) \times E_{remap}(r,c) / 255.0 \quad (10)$$

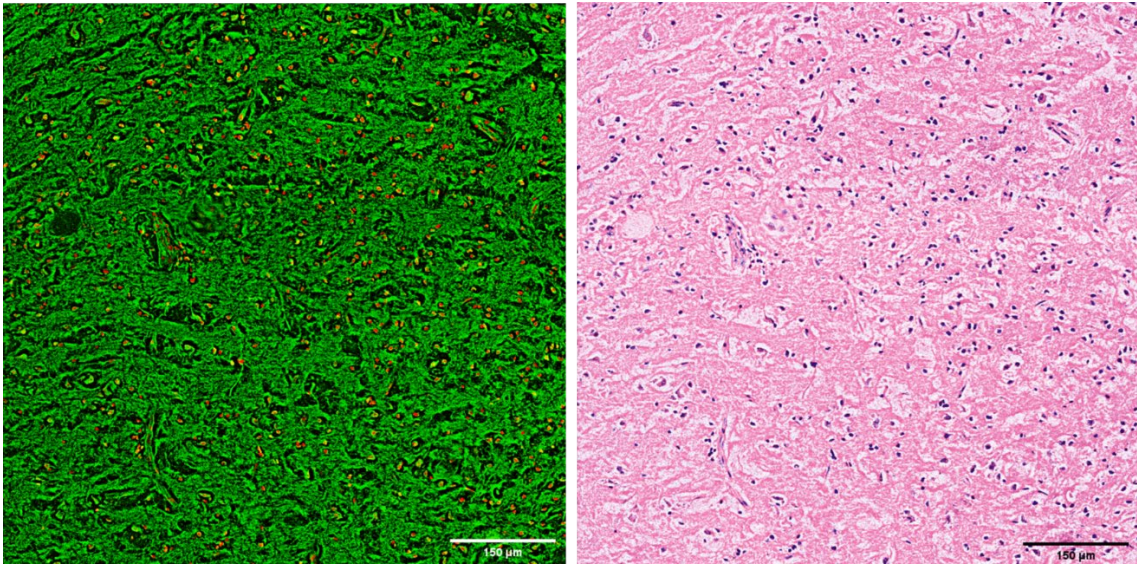


圖 4. 人類正常腦部皮質組織切片影像的顏色映射。



## 6. 通過降噪對比度增強 (DCE) 實現數字提升

為理解降噪的重要性，我們導入一例如圖 5(a) 為人腦標本的原始無裁剪 mNLOG 影像。<sup>(28)</sup> 組織在成像前經過了上述提及之 RTS 染色法，圖 5(b)、(c) 中的紅色和綠色通道分別源自蘇木精和伊紅染料的 THG 和 TPEF 信號。經上述顏色重新映射算法直接應用於補充圖 5(a) 中的圖像，即為圖 5(d)，清晰可觀察到強烈的背景信號。其原因為由於未固定的腦組織特別柔軟，並且其技術重點落於較短的染色時間，故要徹底清除組織上多餘或殘留的染色是不可行的。然而 THG 和 TPEF 頻道皆因此降低了顏色重新映射後細胞形態的可見性。為了解決這個問題，此平台採用了一稱為去噪對比度增強 (denoising contrast enhancement, DCE)<sup>(30)</sup>，與對比度受限的自適應直方圖均衡化等其他技術不同，DCE 能先抑制背景訊號，然後再選擇地優化結構細節的對比度，結果如圖 5(e)、(f)、(g)，而經過顏色映射後為圖 5(h)。另外，其利用 CUDA 加速，處理一張  $6000 \times 6000$  像素的圖片只需幾十毫秒，故可以實時進行。

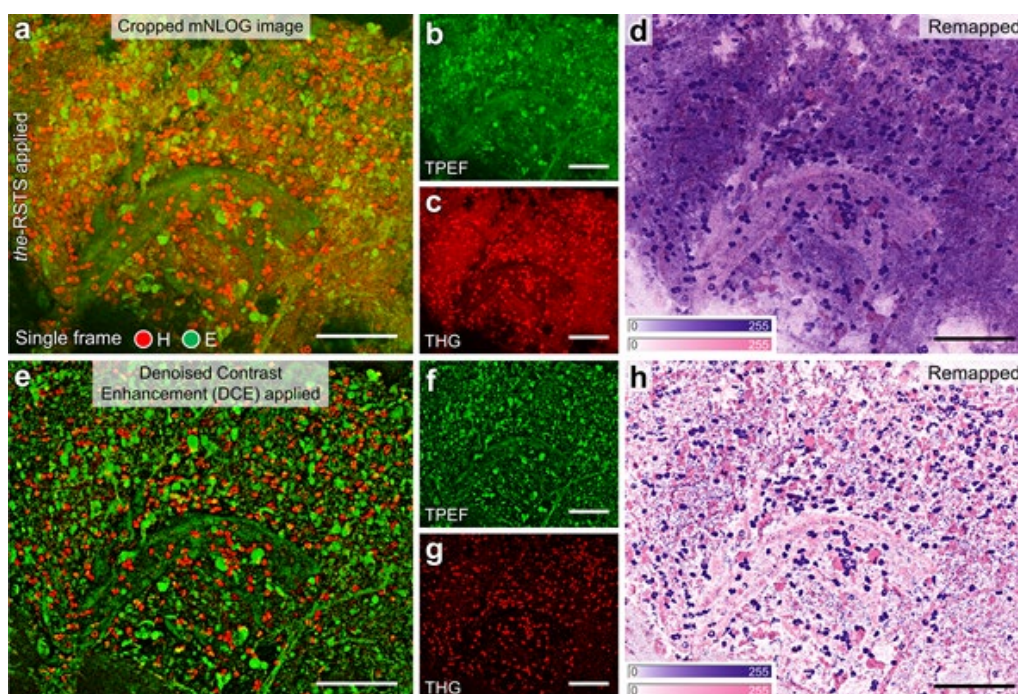


圖 5. 去雜訊、對比度增強 (DCE) 輔助並進行顏色映射之展示。(a)-(c) 經快速全組織染色膠質瘤檢體的原始無處理 mNLOG 圖像。紅色和綠色通道分別表達源自蘇木精 (H) 和伊紅 (E) 染劑的三倍頻 (THG) 和雙光子激發螢光 (TPEF) 信號。(d) (a) 經顏色映射之影像，顯示出阻礙結構可見性的強烈紫色背景。(e)-(g) (a)-(c) 應用 DCE 後之影像，每個通道中的背景均受到抑制。(h) (e) 經顏色映射之影像，顯示細胞核和其他相關形態的可視性有顯著提高。<sup>(28)</sup>

## 7. 超大十億像素數據集的自定義位圖

在大視野的條件下時，若要維持高解析度，便需要大量像素來確保高 NFOM。如此平台以 167 nm 的超精細像素尺寸 (即每個 1 平方毫米的圖塊具有  $6000 \times 6000$  像素) 對 1 平方公分的區域進行成像，則在此過程中將總共獲得 3.6 Gbits。此外，考慮 RGB 三色之紀錄，每個像素將佔用 24-Bit，從而導致磁盤上有 10 GB 的數據。而常見的 TIFF 和 PNG 格式雖然

支持壓縮，其緩慢的運行速度並不太適合存儲和顯示如此龐大的數據集。故此平台將馬賽克拼接圖像存儲為自定義位圖，只要有足夠的系統內存可用，它就可以以最小的時間複雜度支持超大型數據集。位圖文件以一組特定的標頭開頭，其中包含採集信息，例如圖像尺寸、分塊數量等，然後是超大圖像的 10 倍縮小版本，以實現快速的低解析度預覽。在自定義位圖中，數據按 B、G 和 R 序列組織，即每個像素對應三個 8 位值，依次描述藍色、綠色和紅色頻道。

為證實本技術是否能提供真實 H&E、超高解析度、無任何假影且記錄各種組織上的病理特徵之新鮮病理影像，在臺大醫院的腦癌手術臨床試驗中，此研究測試了 50 個人腦檢體，其中包含了 25 個經 4 個患者的腫瘤移除手術而切下的膠質瘤檢體，以及 25 個經冷凍儲存的正常人腦檢體，並將測試之影像與對應標準病理切片影像提供給臺大醫院的病理科醫師進行無訓練的盲測判讀。而欲測試的腦部檢體於 6 分鐘內利用標準的組織染劑完成樣品的所有處理，2 分鐘內使用以非線性光學為基礎製作的介觀顯微鏡進行高速的取樣掃描與實時影像拼接，如圖 6。而病理科醫師不僅能在本項新鮮病理影像技術的影像上快速且準確解讀各種組織病理學上的典型特徵，更在 50 個檢體的病理判讀上達到了 100% 的準確率。圖 7 為一例，展示了病理科醫師在觀察此技術之高解析度病理影像時，所記錄下的病理特徵及判讀內容。此項結果驗證了本技術能夠於現今腫瘤手術的術中鑑定過程能提供所急需之快速且準確的病理診斷。

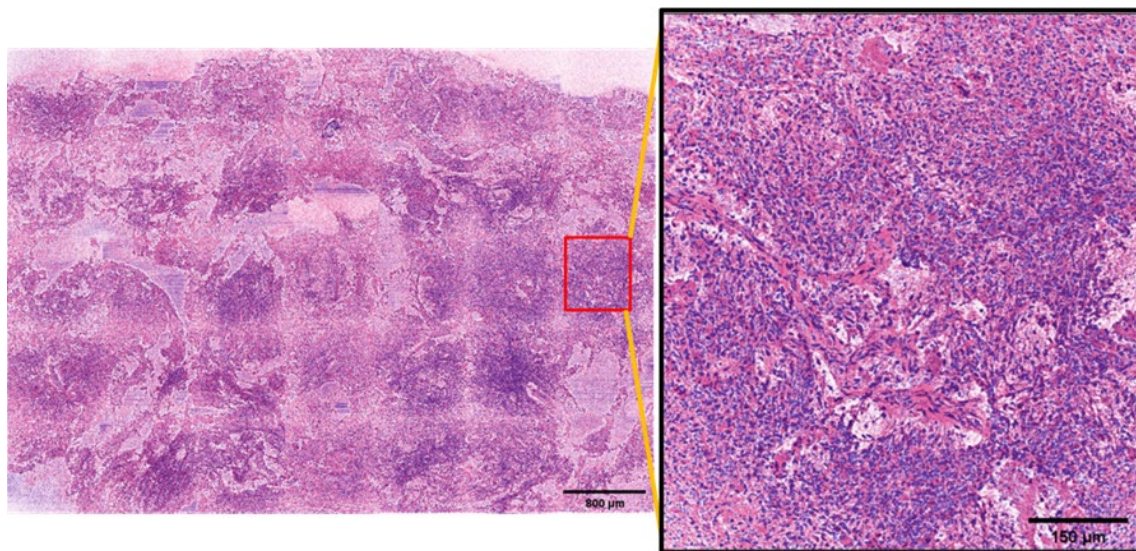


圖 6. 人腦膠質瘤檢體使用 mNLOG 平台拍攝之染色病理影像。異常多的細胞數量、型態及微血管增殖皆被展示於放大之 ROI 中。

### 三、結論

此項技術不僅避免了冷凍切片的複雜時間、人力花費及手術樣品邊界的遺失，更在影像的解析度上領先了當今的各項顯微技術，成為首個有符合數位病理影像保存與取樣之大面積高解析度規範的病理影像技術。綜觀整體的實驗成果，不僅在流程上節省了將近三分之二的時間，更是在影像解析度上有重大性的突破，使得無須任何後處理且具十億畫素的公分級影像，以數位化影像的形式，保存下該塊組織的病理資訊。更在台大醫院的臨床試驗中，病理

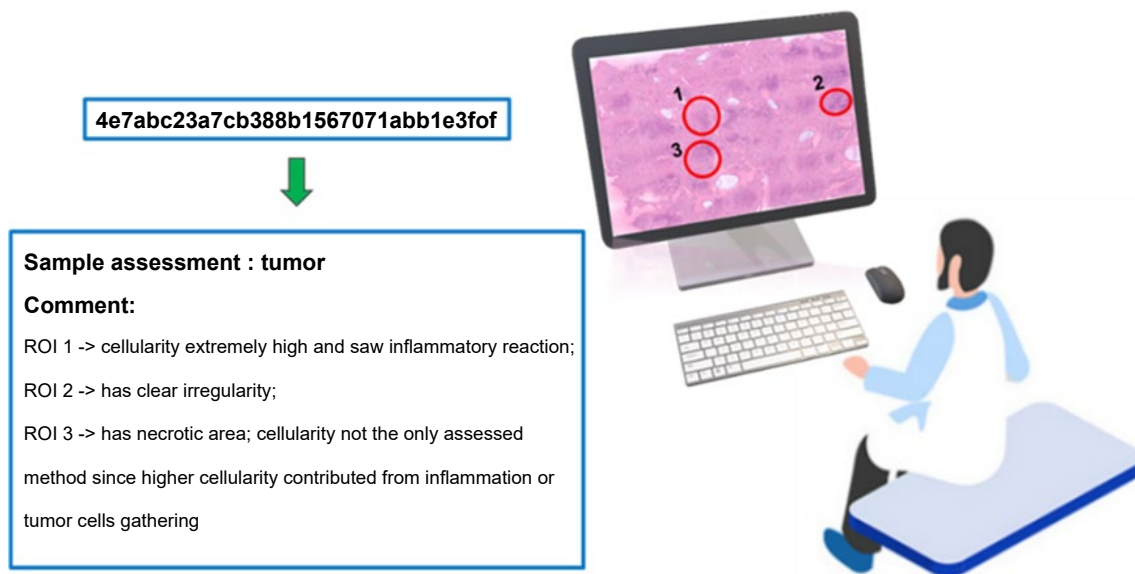


圖 7. 病理科醫師進行 mNLOG 的病理影像判讀範例。其中 32 位亂碼用以隱藏檢體相關資訊，而診斷結果顯示病理科醫師能由其影像觀察到腫瘤的典型病徵。

科醫師進行 50 個檢體的判讀準確率測試上達到了驚人的可靠性，驗證了本技術能夠於現今腫瘤手術的術中鑑定過程提供快速且準確的病理診斷，除可大幅降低手術時間，提高手術之精準度，更能有效挽救生命，並提高醫院手術室之效率。

(此篇文章所使用之相關實驗結果已於 2023 年 5 月 30 日刊登於 communication medicine 期刊，且其關鍵技術亦已進行各國專利申請)

## 參考文獻

1. Quinn T Ostrom, Gino Cioffi, Kristin Waite, Carol Kruchko, Jill S Barnholtz-Sloan, *Neuro-Oncology*, **23**, iii1(2021).
2. Michael Weller et al., *Nature Reviews Clinical Oncology*, **18** (3), 170 (2020).
3. Ballester L, Fuller G., *Intraoperative Consultation and Optimal Processing. Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach* (2th edition).
4. Zarella MD et al., *Arch Pathol Lab Med.*, **143** (2), 222 (2019).
5. Nyquist, H., *Transactions of the American Institute of Electrical Engineers*, **47**, 617 (1928).
6. Shannon, C. E., *Proceedings of the IRE.*, **37**, 10 (1949).
7. Patel, A. et al., *J Pathol Inform.*, **12**, 50 (2021).
8. Deshpande, S., Minhas, F., Graham, S. & Rajpoot, N., *Med Image Anal.*, **77**, 102337 (2022).
9. Seo, J.-H. et al., *Micron.*, **126**, 102718 (2019).
10. Snuderl, M. et al., *Brain Pathology*, **23**, 73 (2013).
11. Longo, C. et al., *British Journal of Dermatology*, **180**, 1473 (2019).
12. Bertonni, L. et al., *Virchows Archiv.*, **476**, 511 (2020).
13. Jerjes, W., Hamdoon, Z., Al-Rawi, N. & Hopper, C., *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, **29**, 101616 (2020).
14. Lu, T. et al., *J Biomed Opt.*, **25** (12), 126501 (2020).
15. Tao, Y. K. et al., *Proc Natl Acad Sci., USA* **111**, 15304 (2014).
16. Cahill, L. C. et al., *Modern Pathology*, **33**, 916 (2020).
17. Wang, M. et al., *Cancer Res.*, **75**, 4032 (2015).
18. Liu, J. et al., *Urology*, **98**, 195 (2016).
19. Xie, W. et al., *J Biomed Opt.*, **25**, (2020).

20. Orringer, D. A. et al., *Nat Biomed Eng.*, **1**, 0027 (2017).
21. Hollon, T. C. et al., *Cancer Res.*, **78**, 278 (2018).
22. Shin, K. S. et al., *Sci Rep.*, **9**, 20392 (2019).
23. Baik, J. W. et al., *Laser Photon Rev.*, **15**, 2100124 (2021).
24. Chazotte, B., *Cold Spring Harb Protoc*, **2011** (1), pdb.prot5556 (2011).
25. Karg, T. J. & Golic, K. G., *Chromosoma*, **127**, 235 (2018).
26. Mari, P. O. et al., *DNA Repair*, **9**, 848 (2010).
27. Devernay, F. & Faugeras, O., *Mach Vis Appl.*, **13**, 14 (2001).
28. Borah, B.J., Tseng, YC., Wang, KC. et al., *Commun Med.*, **3**, 77 (2023).
29. Giacomelli, M. G. et al., *PLoS One*, **11**, e0159337 (2016).
30. Borah, B. J. & Sun, C.-K., *iScience*, **25**, 103773 (2022).

## 誌謝

本研究獲得了中華民國國家科學及技術委員會、中華民國經濟部、國立臺灣大學醫學院附設醫院及其尖端醫學中心的支持與補助，計畫編號為國科會：MOST 111-2321-B-002-015-、MOST 110-2221-E-002-048-MY3；經濟部：111-EC-17-A-19-S6-009；尖端醫學中心：111F-004。並由衷感謝國立臺灣大學生命科學系陳示國教授和單禹堯同學為我們提供用於測試和優化快速組織染色法的小鼠大腦檢體。

## 作者簡介

孫啟光先生為美國哈佛大學應用物理所博士，現為國立臺灣大學光電工程學所特聘教授。

Chi-Kuang Sun received his Ph.D. in Applied Physics from Harvard University. He is currently a Distinguished Professor in the Graduate Institute of Photonics and Optoelectronics at National Taiwan University.

巴卡地先生為國立臺灣大學光電工程學所博士，現為介觀生醫股份有限公司技術長。

Bhaskar Jyoti Borah received his Ph.D. in the Graduate Institute of Photonics and Optoelectronics from National Taiwan University. He is currently a Chief Technology Officer, mesoView CO., LTD.

曾耀琛先生為國立臺灣大學光電工程學所碩士，現為國立臺灣大學光電工程學所專任研究助理。

Yao-Chen Tseng received his M.S. in the Graduate Institute of Photonics and Optoelectronics from National Taiwan University. He is currently a Research Assistant in the Graduate Institute of Photonics and Optoelectronics at National Taiwan University.

王國川先生為國立臺灣大學醫學系學士，現為國立臺灣大學醫學院附設醫院外科部主治醫師。

Kuo-Chuan Wang received his B.S. in the School of Medicine from National Taiwan University. He is currently an Attending Physician in the Department of Surgery at National Taiwan University Hospital.

王奐之先生為國立臺灣大學醫學系學士，現為國立臺灣大學醫學院附設醫院外科部主治醫師。

Huan-Chih Wang received his B.S. in the School of Medicine from National Taiwan University. He is currently an Attending Physician in the Department of Surgery at National Taiwan University Hospital.

黃馨儀小姐為國立臺灣大學病理學研究所博士，現為國立臺灣大學醫學院附設醫院 病理部主治醫師。

Hsin-Yi Huang received her Ph.D. in the Department of Pathology and Graduate Institute of Pathology from National Taiwan University. She is currently an Attending Physician in the Department of Pathology at National Taiwan University Hospital.

張克平先生為國立臺灣大學醫學系學士，現為國立臺灣大學醫學院附設醫院病理部主治醫師。

Koping Chang received his B.S. in the School of Medicine from National Taiwan University. He is currently an Attending Physician in the Department of Pathology at National Taiwan University Hospital.

廖怡華小姐為國立臺灣大學病理學研究所博士，現為國立臺灣大學醫學院附設醫院皮膚部主治醫師。

Yi-Hua Liao received her Ph.D. in the Department of Pathology and Graduate Institute of Pathology from National Taiwan University. She is currently an Attending Physician in the Department of dermatology at National Taiwan University Hospital.