

皮肤反射式共聚焦显微成像扫描畸变校正

刘 创^{1,2}, 张运海¹, 黄 维^{1,2}, 唐玉国¹

- (1. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所 江苏省医用光学重点实验室, 江苏 苏州 215163;
2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要: 皮肤反射式共聚焦显微镜是一种重要的皮肤影像学诊断工具, 其采用共振型振镜扫描成像会带来非线性畸变, 为校正这种畸变, 提出一种像素值反正弦过采样信号重建的 RCM 图像畸变校正方法, 对间距为 20 μm 的矩形光栅扫描成像实验表明, 在校正畸变前光栅图像间距的标准差为 7.78 μm , 图像的畸变率达到 38.9%, 经过像素值反正弦过采样信号重建后, 光栅图像间距的标准差缩小为 0.85 μm , 畸变率缩小到 4.2%。结合分辨率板和实际人皮肤成像情况, 表明文中提出的畸变校正方法能够较好地校正共振型振镜引起的图像畸变, 满足人皮肤实时无创影像学诊断要求。

关键词: 共聚焦显微镜; 共振型振镜; 非线性畸变

中图分类号: TP391.4 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201847.1041003

Correction of reflectance confocal microscopy for skin imaging distortion due to scan

Liu Chuang^{1,2}, Zhang Yunhai¹, Huang Wei^{1,2}, Tang Yuguo¹

- (1. Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Reflectance Confocal Microscopy for skin (RCM) is an important skin imaging diagnostic tool, which uses resonant galvanometer that will result in nonlinear distortion at image. In order to correct the distortion, a method of anti-sine signal oversampling based pixel using isochronous sampling system to correct the distorted RCM image caused by resonant galvanometer was presented. The results of experiments on the rectangular grating with a pitch of 20 μm indicate that, the standard deviation of the grating spacing is 7.78 μm . The distortion rate of image before being corrected is 38.9%. The standard deviation of the image corrected by the anti-sine signal over-sampling based pixel method is 0.85 μm , so the distortion rate is reduced to 4.2%. According to the results of a resolution plate and the actual human skin imaging, the distortion correction method proposed in this paper can correct the image distortion caused by resonant galvanometer and meet the human skin real-time non-invasive imaging diagnostic requirements.

Key words: confocal microscopy; resonant galvanometer; nonlinear distortion

收稿日期: 2018-05-05; 修订日期: 2018-06-03

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC0110303); 国家重大科研装备研制项目(ZDYZ2013-1); 江苏省基础研究计划青年基金(BK20160363); 苏州应用基础研究计划(SYG201510); 苏州市民生科技项目(SS201643)

作者简介: 刘创(1992-), 男, 硕士生, 主要从事显微光学仪器设计方面的研究。Email: patersonliu@foxmail.com

导师简介: 张运海(1975-), 男, 研究员, 博士, 主要从事激光扫描共聚焦显微成像技术、超分辨受激辐射损耗(STED)显微光学成像技术、自适应光学技术等方面的研究。Email: zhangyh@sibet.ac.cn

0 引言

皮肤病是皮肤受到内外因素的影响后,其形态、结构和功能发生变化,产生病理过程,并相应地产生各种临床表现,恶性皮肤疾病如黑色素瘤、基底细胞癌等甚至危及生命,严重影响人们的生活质量。皮肤病患者通常可占到综合医院门诊量的 10% 左右^[1],针对皮肤疾病的早期准确诊断有着重要意义。面向皮肤病诊断的皮肤组织病理学成为许多皮肤疾病诊断的金标准,但是需要活检取材,这种有创的方式,易导致患者疼痛、留下瘢痕;同时病理切片的制作费时费力且仅能提供活检部位的信息;此外,制成切片后,细胞已经失去了生理状态信息。特别是当监测疾病变化、评价疗效、确定皮损边界等情况下,常常需要反复活检,这一切都大大降低了患者的依从性。

皮肤科临床的发展需要无创、原位、实时、动态的检测方法,对可疑皮损进行重复检查,提供客观量化的评价指标。临床的需求促进了皮肤影像学的产生和发展。皮肤影像学是利用现代超声、光学、磁共振等手段对皮肤病进行无创、原位、动态、实时诊断的一门新型技术学科。过去十几年作为医学影像学分支的皮肤影像学取得了长足的进步,包括皮肤镜^[2]、皮肤共聚焦技术、多光子成像^[3]、光学相干层析成像^[4]和光声成像等多种成像技术用于临床疾病诊断已成为可能。皮肤镜使用可见光成像,穿透能力不深只能对皮肤表皮组织成像,满足不了皮肤深层疾病的诊断。OCT 成像的横向分辨率较低,一般只能达到 10 μm 左右。多光子成像需要昂贵的飞秒激光作为成像光源,成像系统较昂贵,难以在医院中普及。基于反射式共聚焦成像的皮肤原位、在体、实时、动态三维成像技术实现了皮肤计算机断层扫描成像(Skin Computed Tomography),也称为皮肤 CT,它克服了皮肤镜检查的局限性,是具有广阔发展前景的无创性皮肤影像学方法。

共聚焦成像是激光点扫描成像技术,需要采用扫描机构将激光点相对于样本进行逐点逐行的扫描移动。在对人体皮肤进行在体成像观察时,由于人体的生理颤振,需要成像速度足够快才能避免由于皮肤颤振引起的图像模糊,一般需要成像速度达到 9 f/s。为实现快速共聚焦成像,出现了采用多面体转

镜的扫描驱动方式^[5];另一种方式是采用共振型振镜进行快速行扫描。共振型振镜运动为非线性的简谐运动,扫描成像时会带来较严重的图像畸变,对于这种畸变,出现了采用非线性时间间隔采样的畸变校正方法^[6],然而非线性时间间隔采样方法对硬件的实时同步控制要求很高,系统容易受到外界的干扰发生扰动,稳定性较差。国内也有利用正弦校正和曲线拟合方法的校正方法^[8],其方法简单有效,但校正效果还有提高空间。

文中采用共振型振镜实现皮肤在体、实时共聚焦成像,针对共振型振镜扫描时引起的图像畸变,提出样本等时间间隔采样结合像素值反正弦过采样信号值重建的图像畸变校正方法,不但实现了图像畸变校正,而且充分利用了数据采集系统的采样能力,从而实现了图像信噪比的提高。

1 皮肤共聚焦成像系统的畸变产生与仿真

皮肤共聚焦成像技术是基于反射式共聚焦原理的成像技术。共聚焦原理采用共轭焦点技术,使光源针孔、样品及探测器针孔处于彼此对应的共轭位置。从光源发射出的光经过物镜准确地照明物镜焦平面上的样品,在针孔滤波的作用下,只有样品观察面扫描点发出的光才能通过,从而显著提高了系统信噪比和成像清晰度。同时,非焦面光被针孔滤去,因此共聚焦系统成像景深近似为零,沿 Z 轴方向的扫描可以实现光学层析扫描从而实现样品的三维成像^[7]。

激光扫描共聚焦成像与普通宽场显微成像的成像方式有很大不同,激光扫描共聚焦显微成像采用的是点扫描成像;其扫描方式有多种,文中采用的是最常见的二维振镜组扫描,如图 1 所示。

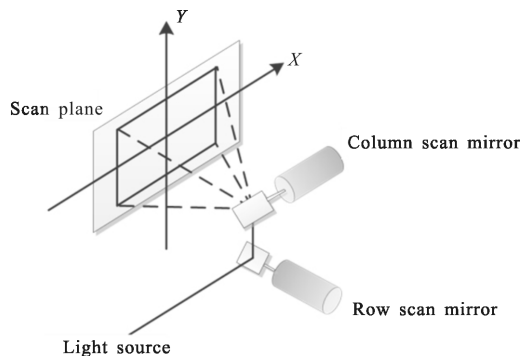


图 1 二维振镜组扫描示意图

Fig.1 Two-dimensional galvanometer group scanning diagram

在常规的共聚焦扫描系统中采用双检流计式振镜作为扫描方式^[8],由于检流计式振镜振动频率一般不超过 2 kHz,扫描速度不能满足实时成像需要。该系统采用的共振型振镜进行行扫描,其再与一个进行列扫描的检流计式振镜配合完成对样本的高速二维扫描而实现实时成像。

1.1 扫描畸变的产生

由于共振型振镜不能由外界直接控制其运动位置,但其控制器能产生一个共振型振镜运动位置的参考信号;且共振型振镜每往返运动一次,即扫描视场中的一行,故将该参考信号作为整个振镜组控制的行参考信号。如图 2 所示,当共振型振镜在最左端时发出行参考信号,由 FPGA 接收共振型振镜控制器发出的行参考信号作为源信号后产生列扫描信号驱动检流式振镜做列扫描,同时产生行采样信号给数据采集系统;数据采集系统在接收到行采样信号后以一定采样频率连续采样一行的信号。每帧采样的开始检流计式振镜都指向视场的顶端行,每完成一行的扫描后检流计式振镜都向下扫描一个单位(即指向下一行),由此直到检流计式振镜扫描到视场的末端行为止;如此采样后经过上位机重建得到一帧完整视场的图像。

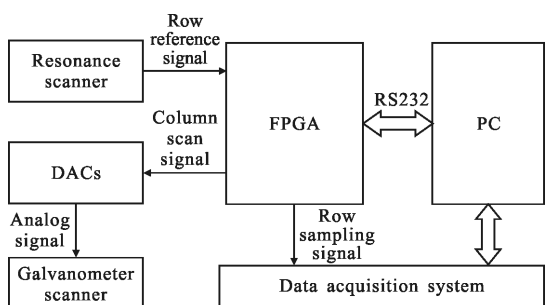


图 2 振镜组与数据采集控制关系图

Fig.2 Relationship between galvanometer and data acquisition

行参考信号、行采样信号与列扫描信号之间的时序关系如图 3 所示,其中 φ 为行参考信号与行采

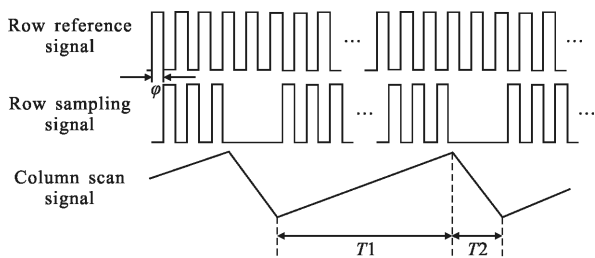


图 3 信号时序图

Fig.3 Signal timing diagram

样信号之间的相位差,该相位差可由 FPGA 控制调节使最终采样获得重建图像与扫描视场对应。其中 $T1$ 为列扫描振镜扫描行程的时间, $T2$ 为列扫描振镜回程的时间。

共振型振镜工作于稳态时,振镜运动为简谐运动。假定当共振型振镜扫描到视场 X 方向的左端时共振型振镜的振动角度为 0,那么它振动的角度与扫描时间的关系应该满足下式:

$$\theta(t) = \frac{\theta_{\max,r}(1 - \cos(2\pi t/T_r))}{2} \quad (1)$$

式中: $\theta_{\max,r}$ 为共振型振镜的最大扫描角度; T_r 为一次简谐运动的周期; t 为扫描的时间。

文中采用的共振型振镜的行方向扫描系统原理如图 4 所示,由于采用特殊的 $f-\theta$ 透镜,故振镜转角 θ 与扫描行方向位移量 Δx 符合如下关系:

$$\Delta x = f \cdot 2\theta \quad (2)$$

式中: f 为 $f-\theta$ 物镜的焦距。

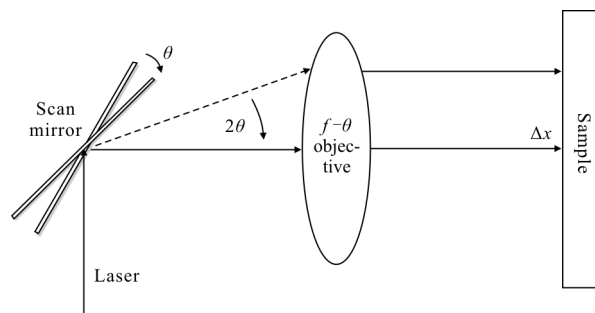


图 4 共振型振镜行方向扫描方式

Fig.4 Resonant galvanometer scanning way at row direction

将公式(2)代入到公式(1)中得到行方向位移量与时间的关系:

$$\Delta x(t) = \theta_{\max,r} \cdot f \cdot \left(1 - \cos\left(\frac{2\pi t}{T_r}\right)\right) \quad (3)$$

由于文中的采样系统使用的等时采样方式:在接收到一个行采样信号后,每经过 $\Delta t = \frac{1}{f_{\text{sample}}}$ (f_{sample} 为采样系统的采样频率) 的时间就采样一次得到序号为 n 的一个采样值 S_n ,共采样 N 次。可知,时间与采样点序号成线性关系,故采样点序号与行方向位移量的关系如图 5 所示。

将样本的二维扫描区域等分成 $m \times m$ 个像元,每个像元大小为 $\nabla x \times \nabla y$ 。由图 5 可知,在位于行扫描方向的中间区域的单位像元所含的采样点少,而在

行扫描方向的两端区域的单位像元所含采样点更多。如果简单的将每个采样点转换为图像的像素点,就会出现图像行方向两端出现拉伸、中间区域则被压缩,从而形成非线性的图像畸变。

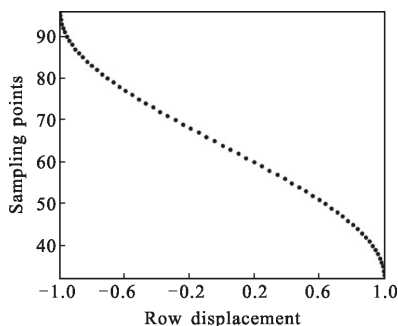


图 5 采样点序号与行方向位移量的关系

Fig.5 Relationship between the number of sampling points and the displacement of the row direction

由于检流计式振镜的转角与输入电压成线性关系;从公式(2)可知振镜的转角与扫描的位移量成线性关系,且如图 3 所示,输入的列扫描信号在扫描行程时间内为线性变化,故列方向的扫描为线性扫描,不会导致图像畸变。

1.2 对扫描畸变的仿真

对共振型振镜运动方式进行仿真,如图 6(a)为原始间距为 \bar{d} 的仿真光栅,设每条光栅之间的间距为 d_i 。图 6(b)为在行采样信号相位与振镜振动相位一致的情况下,模拟共振型振镜对图 6(a)进行扫描且采用等时采样系统对其采样重建后所得的畸变图像。

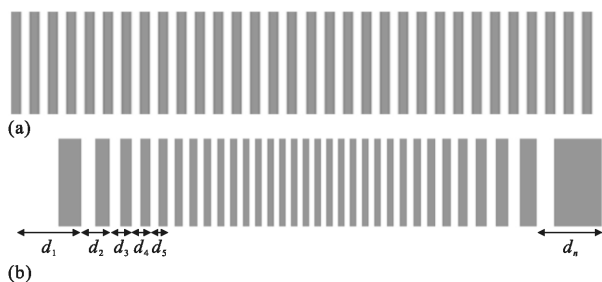


图 6 光栅仿真图

Fig.6 Grating simulation

设:

$$\text{间距标准差} = \sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{n}} \quad (4)$$

$$\text{畸变} = \frac{\text{间距标准差}}{\text{原始间距}} \times 100\% \quad (5)$$

由公式(4)、(5)可得,畸变图像图 6(b)的间距标准差为 4.31,畸变为 26.9%。

2 像素值反正弦过采样信号值重建方法对图像畸变矫正

像素值反正弦过采样信号值重建方法的基本思想为:对样本扫描视场中的每个像元都进行多次采样。在共振型振镜振动到视场两端时,由于振动速度慢在相同长度的一个像元内停留时间长故其采样点就更多,就应该将更多的采样点合并为一个像元;而在振镜振动到视场的中点时,由此此时振动速度快在相同长度的一个像元内停留时间短故其采样点就更少,此时应该将更少的采样点合并为一个像元。

实际图像重建时,在一行的采样中,如图 7 所示,图中黑色曲线 Y 轴为时间,当触发一个行采样信号时,在行扫描的前半个周期 $(0-T_r/2)$ 时间内采样 N 个采样点;由于采用的共振型振镜的频率为 8 kHz (即 $T_r=125 \mu\text{s}$, $T_r/2=62.5 \mu\text{s}$),采用采样系统采样频率为 60 MSPS (即 $\Delta t = \frac{1}{60 \times 10^6} \text{s}$)。故最终采样点数 N 取 3 750 个。其中 X 轴为还原图像所对应的像元位置。根据图 7 黑色曲线中每个像元位置所停留的时间,计算得到每个像元内包含采样点的个数如图 7 中灰色曲线所示,将每个像元内的采样点的采样值求均值后映射为一个像素值。将原始采样到的 3 750 个采样点依图 7 所示关系合并后映射为 512 个像素值,由此获得一行矫正后的像素数据,经过 512 行的扫描后获取一幅完整的矫正畸变后的图像。

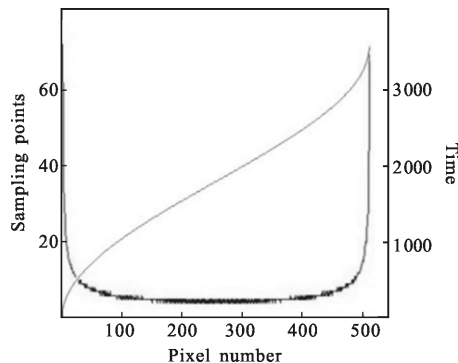


图 7 每行像素与采样点关系

Fig.7 Relationship between each pixel and the sampling point for each row

3 实验与结果

皮肤共聚焦扫描成像系统光路如图 8(a)所示,组成如下:偏振片、偏振分光棱镜 PBS、二维扫描振镜组、扫描透镜、筒镜、四分之一波片、显微物镜、针孔透镜和针孔。皮肤共聚焦扫描成像系统工作原理如下:首先由激光器发出激光,激光经偏振分光棱镜 PBS 反射经过扫描振镜组、扫描透镜、筒镜和物镜到达样本;物面将激光反射,反射的激光沿原照明光路返回,经偏振分光棱镜 PBS 透射,再经针孔透镜在针孔位置成像。图 8(b)所示为皮肤共聚焦扫描成像系统实物。

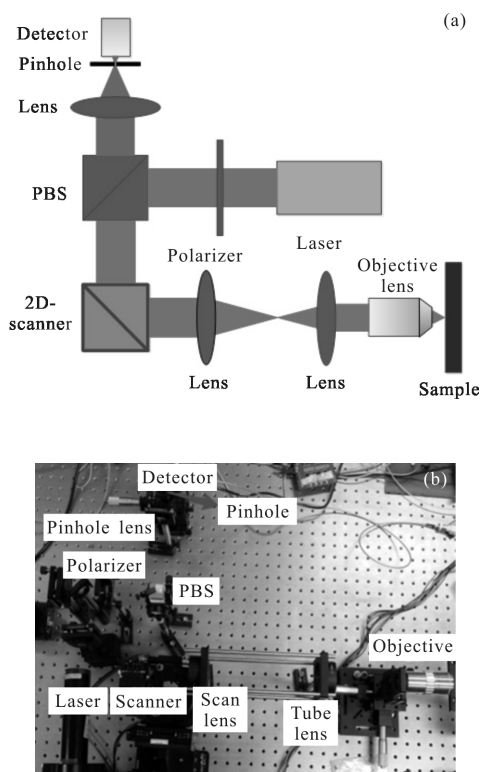


图 8 (a) 系统光路图, (b) 系统实物图

Fig.8 (a) Optical path diagram, (b) realistic system photo

实验系统使用激光波长为 830 nm, 系统扫描视场范围为 $665 \mu\text{m} \times 665 \mu\text{m}$ 。矫正畸变前对条纹间距为 $20 \mu\text{m}$ 的光栅进行扫描, 通过 FPGA 校准共振型振镜运动与数据采集时钟的相位, 之后经过数据采集及图像重建后得到原始数据, 横向等比例压缩后得到分辨率为 512×512 的图 9, 每个像素点对应 $1.3 \mu\text{m} \times 1.3 \mu\text{m}$ 大小。该图光栅条纹之间的间隔如

图 10 中方形数据标记曲线所示, 其间隔距离标准差为 $(5.99 \mu\text{m} \times 1.3 \mu\text{m}) 7.78 \mu\text{m}$, 畸变达到 38.9%。

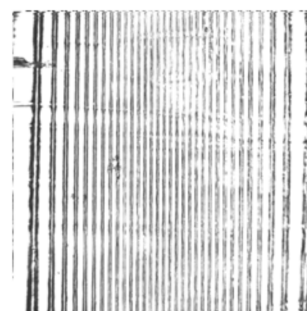


图 9 矫正畸变前 $20 \mu\text{m}$ 光栅成像

Fig.9 Image of $20 \mu\text{m}$ grating before correction

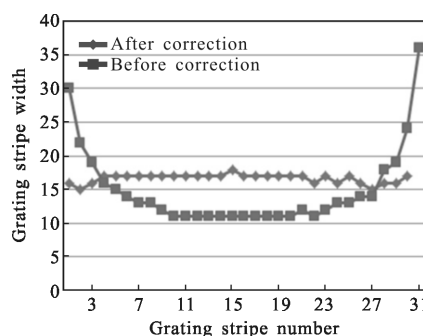


图 10 矫正畸变前后光栅间隔分布

Fig.10 Distribution of the grating interval before and after correction

对图 9 相同位置扫描成像并通过像素值反正弦过采样信号值重建方法处理后得到矫正后的图像, 如图 11 所示; 该矫正后图像中的光栅间距如图 10 中圆形数据标记曲线所示, 间距标准差为 $(0.66 \mu\text{m} \times 1.3 \mu\text{m}) 0.85 \mu\text{m}$, 畸变为 4.2%。光栅间距基本保持一致说明矫正效果良好。

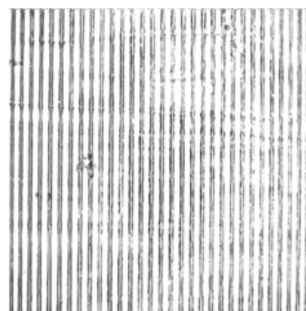


图 11 矫正畸变后 $20 \mu\text{m}$ 光栅成像

Fig.11 Image of $20 \mu\text{m}$ grating after correction

原始图像的畸变程度和不同方法的校正效果如表 1 所示。

表 1 校正效果比较

Tab.1 Comparison of correction results

Method	Before	Sine ^[8]	Curve fitting ^[8]	Arcsine over sampling
Distortion	38.9%	10.7%	7.9%	4.2%

对 USAF1951 分辨率板进行扫描测试得到图 11。

如图 12 所示,在视场范围内分辨率板内的规则线条表现出了很好的分布,在视场的中心和边缘都表现出了很好的校正效果。



图 12 扫描 USAF1951 分辨率板所成图像

Fig.12 Image of the USAF1951 resolution board scanned

图 13 为该系统对正常手掌背部皮肤基底层成像。图中箭头指向为高折光的基底细胞,圆形圈内部为呈高折光的基底细胞包绕较低折光的真皮乳头,A 区域为皮肤褶皱。

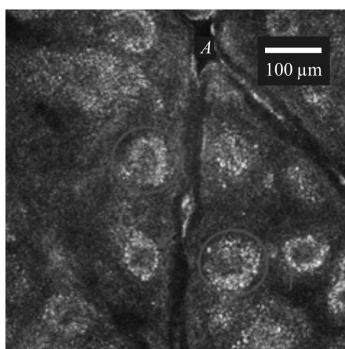


图 13 该系统所成皮肤图像

Fig.13 Skin image from this system

从图 13 中可以明显观测到基底细胞与真皮乳头结构,由高折光的基底细胞包绕真皮乳头所形成的环状结构为色素环,色素环的缺失是白癜风疾病的显著特征^[9]。对色素痣细胞的形态观测可用于诊断黑色素瘤、色素痣、基底细胞癌等疾病。

4 结 论

文中根据共振型振镜和检流计式振镜的工作特性,设计一种操作方法对其二者进行准确的控制,使其能配合数据采集系统重建出扫描图像;并使用像元信号过采样方法对共振型振镜的非线性运动所造成的畸变(畸变率达 38.9%)进行校正,该方法对每个像元中的信号都进行过采样,再根据共振型振镜在每个像元里停留的时间推算出采样点的个数,将每个像元中的采样点合并为一个像素值后重建出扫描图像;结果获得畸变率仅为 4.2%的图像,满足诊断观测所需。

参考文献:

- [1] Rajadhyaksha Milind, Marghoob Ashfaq, Rossi Anthony. Reflectance confocal microscopy of skin in vivo: from bench to bedside [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2017, 49 (1): 7-19.
- [2] Argenziano G, Soyer H P. Dermoscopy of pigmented skin lesions—a valuable tool for early diagnosis of melanoma[J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(7): 443-449.
- [3] Koehler M, Konig K, Elsner P, et al. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography [J]. *Optic Letters*, 2006, 31(19): 2879-2881.
- [4] Gambichler T, Moussa G, Sand M, et al. Applications of optical coherence tomography in dermatology [J]. *J Dermatological Science*, 2005, 40(2): 85-94.
- [5] Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, et al. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology [J]. *J Invest Dermatol*, 1999, 113(3): 293-303.
- [6] Leybaert L, De Meyer, Mabilde C, et al. A simple and practical method to acquire geometrically correct images with resonant scanning-based line scanning in a custom-built video-rate laser scanning microscope [J]. *Journal of Microscopy-Oxford*, 2005, 219: 133-140.
- [7] Zhang Yunhai, Yang Haomin, Kong Chenghui. Spectral imaging system on laser scanning confocal microscopy [J]. *Optics and Precision Engineering*, 2014, 22(6): 1446-1453. (in Chinese)
- [8] Xiong Daxi, Liu Yun, Liang Yong, et al. Correction of distortion in microscopic imaging with resonant scanning[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2015, 23 (10): 2971 - 2979. (in Chinese)
- [9] Liu Huaxu. Atlas of Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013. (in Chinese)