



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I817063 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：109140962

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 11 月 23 日

(51)Int. Cl. : G02B7/36 (2021.01)

G02B21/24 (2006.01)

G02B21/36 (2006.01)

H04N5/232 (2006.01)

(30)優先權：2019/11/25 美國

62/940,163

(71)申請人：美商好樂杰公司 (美國) HOLOGIC, INC. (US)

美國

(72)發明人：杭特 貝里 F HUNT, BARRY F. (US)；史處芬 傑佛瑞 D STRUVEN,
JEFFREY D. (US)；梅爾 西德尼 H MAYER, SIDNEY H. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 201830086A

US 2015/0309299A1

US 2018/0295254A1

US 2019/0101739A1

審查人員：黃同慶

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：10 共 39 頁

(54)名稱

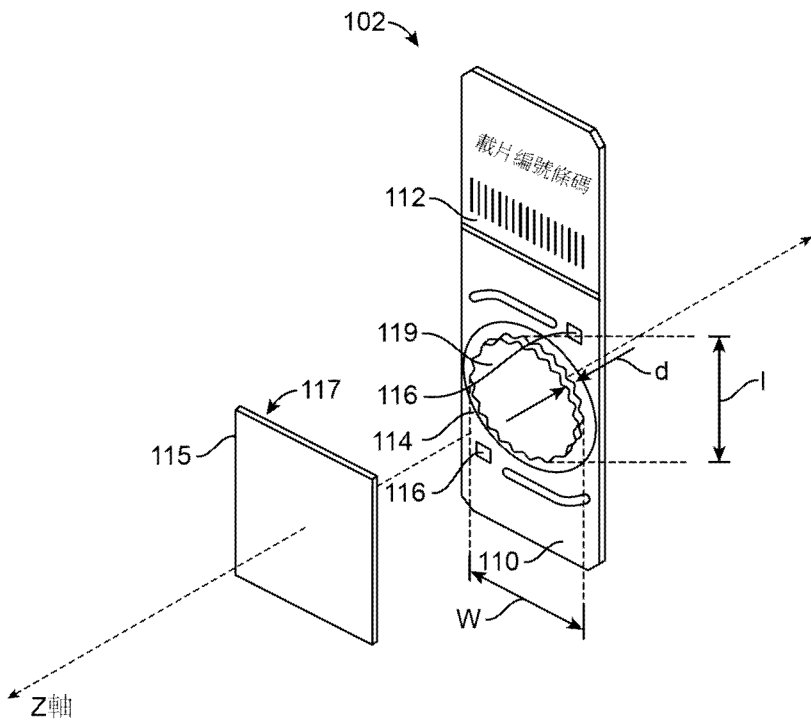
數位影像系統及方法

(57)摘要

本發明提供一種用於使用具有物鏡之相機獲取分佈在附加至載片之表面之試樣內之物件之影像之系統及方法，該試樣具有相對於該載片表面之不均勻高度，該物鏡具有與該載片之該表面形成非正交角之光軸，該方法包含：獲取該試樣之第一線性部分之第一複數個影像；評估在該第一複數個影像中擷取之該試樣之該線性部分內之物件之焦點；及獲取該第一線性部分或該試樣之不同於該第一線性部分之第二線性部分之第二複數個影像，其中在該第二複數個影像之獲取期間，該物鏡相對於該載片表面之高度基於在該第一複數個影像中擷取之該等物件之該所評估焦點而變化。

A system and method for acquiring images of objects distributed within a specimen affixed to a surface of a slide, the specimen having an uneven height relative to the slide surface using a camera having an objective lens with an optical axis that forms a non-orthogonal angle with the surface of the slide, the method including acquiring a first plurality of images of a first linear portion of the specimen; evaluating a focus of objects within the linear portion of the specimen captured in the first plurality of images; and acquiring a second plurality of images of the first linear portion or of a second linear portion of the specimen different from the first, wherein a height of the objective lens relative to the slide surface is varied during acquisition of the second plurality of images based on the evaluated focus of the objects captured in the first plurality of images.

指定代表圖：



【圖1】

符號簡單說明：

- 102:顯微鏡載片/載玻片/載片
- 110:矩形玻璃板/載玻片/載片/玻璃/玻璃基板
- 112:載片識別區/載片識別部分
- 114:試樣區
- 115:蓋玻片
- 116:框標
- 117:厚度
- 119:試樣
- d:厚度或深度
- l:長度
- W:寬度



I817063

【發明摘要】

【中文發明名稱】

數位影像系統及方法

【英文發明名稱】

DIGITAL IMAGING SYSTEM AND METHOD

【中文】

本發明提供一種用於使用具有物鏡之相機獲取分佈在附加至載片之表面之試樣內之物件之影像之系統及方法，該試樣具有相對於該載片表面之不均勻高度，該物鏡具有與該載片之該表面形成非正交角之光軸，該方法包含：獲取該試樣之第一線性部分之第一複數個影像；評估在該第一複數個影像中擷取之該試樣之該線性部分內之物件之焦點；及獲取該第一線性部分或該試樣之不同於該第一線性部分之第二線性部分之第二複數個影像，其中在該第二複數個影像之獲取期間，該物鏡相對於該載片表面之高度基於在該第一複數個影像中擷取之該等物件之該所評估焦點而變化。

【英文】

A system and method for acquiring images of objects distributed within a specimen affixed to a surface of a slide, the specimen having an uneven height relative to the slide surface using a camera having an objective lens with an optical axis that forms a non-orthogonal angle with the surface of the slide, the method including acquiring a first plurality of images of a first linear portion of the specimen; evaluating a focus of objects within the linear portion of the specimen captured in the first plurality of images; and acquiring a second plurality of images of

the first linear portion or of a second linear portion of the specimen different from the first, wherein a height of the objective lens relative to the slide surface is varied during acquisition of the second plurality of images based on the evaluated focus of the objects captured in the first plurality of images.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

102: 顯微鏡載片/載玻片/載片

110: 矩形玻璃板/載玻片/載片/玻璃/玻璃基板

112: 載片識別區/載片識別部分

114: 試樣區

115: 蓋玻片

116: 框標

117: 厚度

119: 試樣

d: 厚度或深度

l: 長度

W: 寬度

【發明說明書】

【中文發明名稱】

數位影像系統及方法

【英文發明名稱】

DIGITAL IMAGING SYSTEM AND METHOD

【技術領域】

【0001】本發明大體上係關於獲取附加至載片之表面之試樣，諸如具有超過成像器之景深之厚度之細胞學(細胞)試樣之數位影像之系統及方法。

【先前技術】

【0002】細胞學係生物學之分支，涉及對細胞之形成、結構及功能之研究。當應用於實驗室環境中時，細胞學家、細胞學者及其他醫學專業人員基於對患者之細胞之樣本之視覺檢驗做出患者之健康狀況之醫學診斷，此樣本在本文中稱為「細胞學」試樣。典型細胞學技術係「抹片檢查」測試，其中細胞自婦女之子宮頸刮取且經分析以便偵測異常細胞之存在，該異常細胞為宮頸癌發病之前兆。細胞學技術亦用於偵測人類身體之其他部位中之異常細胞及疾病。

【0003】廣泛採用細胞學技術，此乃因收集用於分析之細胞樣本較之傳統手術病理學程序(諸如生檢)通常具有較小侵入性，藉此使用具有彈簧加壓的可平移探針之專門生檢針、固定插管等等自患者切除固體組織樣本，本文中稱為「病理」試樣。可藉由各種技術，包含舉例而言藉由刮取或擦拭一區，或藉由使用針自胸腔、膀胱、椎管或其他適合區抽吸身體液體來自患者獲得細胞樣本。所獲取細胞樣本通常放置在防腐溶液中且隨後

自該溶液提取並轉移至載玻片。將固定劑施加至細胞樣本以確保細胞在載玻片上保持就位，以促進後續染色及檢驗。

【0004】通常，可期望載片上之細胞具有適當空間分佈，使得可檢驗個別細胞。單個細胞層通常係較佳的。因此，自含有諸多細胞(例如，數萬個)之液體樣本製備細胞學試樣通常需要首先藉由機械分散、液體剪切或其他技術來將細胞彼此分離，使得薄的細胞單層可經收集且沈積在載片上。以此方式，細胞學者可更輕而易舉地覺察出患者樣本中任何異常細胞之存在。亦能夠計數細胞以確保已評估充分數目之細胞。

【0005】美國專利第5,143,627號、第5,240,606號、第5,269,918號、第5,282,978號、第6,562,299號、第6,572,824號及第7,579,190號中揭示用於自液體樣本容器產生薄的細胞單層且接著將此薄層轉移至有利於視覺檢驗之「試樣載片」之某些方法及設備。根據此等專利中揭示之一種方法，使用插入至容器中之旋轉樣本收集器來分散懸浮在防腐液體中且儲存於樣本容器中之患者之細胞。將受控真空施加至樣本收集器以透過其篩濾器吸出液體，直至抵靠過濾收集所期望數量及空間分佈之細胞。此後，自樣本容器移除樣本收集器，並將過濾器部分壓在載玻片上以與所收集的實質上相同之空間分佈將所收集細胞轉移至載片。根據此等專利中之一或多者之教示製造之設備已在商業上獲得成功，諸如ThinPrep® 2000處理器(自患者樣本一次處理一個試樣載片)及ThinPrep® 5000處理器(自患者樣本批量處理試樣載片)，該等設備由位於馬薩諸塞州馬爾伯勒的Hologic, Inc.製造及銷售。進一步參考美國專利第7,556,777號及第7,771,662號。

【0006】一旦已製備試樣載片，便可由細胞學者，通常在放大情況

下，且使用或不使用各種照射源，在視覺上檢驗試樣。另外或另一選擇係，使用自動載片成像系統來輔助細胞學檢驗程序。舉例而言，自動載片成像系統可擷取固定至載片之細胞學試樣內之所有或實質上所有個別細胞之影像，並使用影像處理技術來執行細胞之初步評估，以便指導細胞學者對載片上之潛在地最相關的細胞進行仔細檢驗。此等成像系統之實例揭示於美國專利第 7,587,078 號、第 6,665,060 號、第 7,006,674 號、第 7,369,304 號及第 7,590,492 號中。無論是藉由在放大情況下檢驗實際試樣載片還是檢驗試樣之經放大影像，試樣通常由細胞學者分類為「正常」或「異常」，其中異常樣本通常歸屬於由貝塞斯達(Bethesda)子宮頸/陰道細胞學診斷報告系統所界定之主要類別中之一者中。

【0007】然而，存在與用於獲取生物學試樣之數位影像之先前系統及方法相關聯之若干個缺點。舉個例說，先前系統及方法由於在掃描整個試樣時停止及聚焦所需之時間而經歷緩慢獲取時間。此外，並不停下來聚焦之彼等先前系統及方法通常提供跨越試樣之僅單個聚焦平面。包含細胞學及病理學試樣兩者之生物學試樣實際係三維的(亦即，具有一深度)。因此，歸因於獲得生物學試樣之數位影像所需之高放大率及焦點孔徑，影像之景深係極其有限的。因此，焦平面中景深外部之試樣之部分將係離焦的或在影像中係不可見的。為了在試樣之多個不同深度處獲得焦點對準數位影像，必須諸如藉由移動試樣或相機，或藉由調整聚焦透鏡來調整聚焦平面。然而，此需要對每一聚焦平面之試樣進行額外掃描，或需要週期性地停下來重新聚焦，此進一步減慢獲取時間。

【0008】先前技術成像系統之諸多前述問題由揭示並闡述於PCT申請公開案 WO 2020/091965A2 (2019 年 10 月 9 日提出申請之

PCT/US19/55458) 中之成像系統及方法處理及解決。揭示於 WO 2020/091965A2中之成像系統及方法之關鍵態樣在下文闡述並論述，且包含用以擷取試樣內不同深度處之細胞之影像之能力，該試樣與具有透鏡物鏡之相機之單個掃描行程焦點對準，該透鏡物鏡相對於載片表面傾斜以擷取焦點範圍內包含試樣之整個厚度之影像。然而，與某些試樣載片一起出現且未在WO 2020/091965A2中處理之特定問題係，當試樣之厚度，亦即，試樣相對於載片表面之高度，歸因於舉例而言非均勻蓋玻片或原始載片製備之其他態樣而不均勻時。當此發生時，試樣中細胞中之某些細胞—可能地大量細胞—將在焦點範圍外部。因此，對揭示於 WO 2020/091965A2中之成像系統及技術之進一步改良對於解決離焦細胞之此問題將係有用的。

【發明內容】

【0009】根據所揭示發明之第一態樣，揭示一種用於使用具有物鏡之相機獲取分佈在附加至載片之表面之試樣內之物件之影像之方法，該物鏡具有與該載片之該表面形成非正交角之光軸，該試樣具有相對於該載片表面之不均勻高度，其中該方法包含：(i) 獲取該試樣之第一線性部分之第一複數個影像；(ii) 評估在該第一複數個影像中擷取之該試樣之該線性部分內之物件之焦點；及(iii) 獲取該第一線性部分或該試樣之不同於該第一線性部分之第二線性部分之第二複數個影像，其中在該第二複數個影像之獲取期間，該物鏡相對於該載片表面之高度基於在該第一複數個影像中擷取之該等物件之該所評估焦點而變化。視情況，該物鏡相對於該載片表面之高度在該第一複數個影像之獲取期間可係實質上恆定的。視情況，該第二線性部分直接毗鄰於該第一線性部分。

【0010】在各種實施例中，評估在該第一複數個影像中擷取之該等物件之該焦點包含：判定離焦物件之總數目是否超過臨限值數目，且接著：(i)若該第一複數個影像中之離焦物件之該總數目超過該臨限值數目，則自該第一線性部分獲取該第二複數個影像，或(ii)若該第一複數個影像中之離焦物件之該總數目不超過該臨限值數目，則自該第二線性部分獲取該第二複數個影像。

【0011】在各種實施例中，評估在該第一複數個影像中擷取之該等物件之該焦點包含：判定該等離焦物件相對於該載片表面之各別高度，及該等各別離焦物件在該第一複數個影像之獲取期間是否相對於該載片表面位於該物鏡之對焦範圍外部之高度處。較佳地，評估該第一複數個影像中之該等物件之該焦點包含：判定該等各別離焦物件在該第一複數個影像之獲取期間是否相對於該載片表面位於分別高於該物鏡之對焦範圍之最大高度或低於該物鏡之對焦範圍之最小高度之高度處。

【0012】在各種實施例中，評估該第一複數個影像中之該等物件之該焦點包含：判定該第一線性部分內之離焦物件之各別位置。

【0013】在各種實施例中，在該等影像之獲取期間，使相機及載片中之一者或兩者相對於另一者移動，其中藉由依據該相機相對於該各別第一或第二線性部分之縱向位置之線性位置增加及/或減少該相機相對於該載片表面之高度而使該物鏡相對於該載片表面之該高度變化。顯而易見地，可在該等影像之獲取期間，藉由相對於該相機垂直地移動該載片，或相對於該載片垂直地移動該相機，或兩者而使該物鏡相對於該載片表面之該高度變化。

【0014】在各種實施例中，當獲取該第一線性部分之第二複數個影

像時，該方法進一步包含：評估在該第二複數個影像中擷取之該等物件之焦點，及獲取該第二線性部分之第三複數個影像，其中在該第三複數個影像之獲取期間，該物鏡相對於該載片表面之該高度基於在該第二複數個影像中擷取之該等物件之該所評估焦點而變化。

【0015】 根據本文中所揭示之發明之另一態樣，一種用於使用具有物鏡之相機獲取分佈在附加至載片之表面之試樣內之物件之影像之方法，該物鏡具有與該載片之該表面形成非正交角之光軸，該試樣具有相對於該載片表面之不均勻高度，該方法包含：(a) 獲取該試樣之線性部分之第一複數個影像；(b) 評估在該第一複數個影像中擷取之該等物件之焦點；(c) 獲取該試樣之該相同或不同線性部分之第二複數個影像，其中在該第二複數個影像之獲取期間，該物鏡相對於該載片表面之高度基於在該第一複數個影像中擷取之該等物件之該所評估焦點而變化；及(d) 重複(a)至(c)直至已獲取實質上整個試樣之影像。當自該試樣之該不同線性部分獲得該第二複數個影像時，此不同線性部分可直接毗鄰於獲取該第一複數個影像之該線性部分。

【0016】 在各種實施例中，評估在該第一複數個影像中擷取之該等物件之該焦點可包含：判定離焦物件之總數目是否超過臨限值數目。

【0017】 在較佳實施例中，評估該第一複數個影像中之該等物件之該焦點包含：判定該等各別離焦物件在該第一複數個影像之獲取期間是否相對於該載片表面位於分別高於該物鏡之對焦範圍之最大高度或低於該物鏡之對焦範圍之最小高度之高度處，以及判定該各別線性部分內之該等離焦物件之各別位置。

【0018】 在較佳實施例中，在該等各別第一及第二複數個影像之獲

取期間，使該相機及載片中之一者或兩者相對於另一者橫向移動，其中藉由依據該相機相對於該各別線性部分之縱向位置之線性位置增加及/或減少該相機相對於該載片表面之高度而使該物鏡相對於該載片表面之該高度變化。再次，可在該等影像之獲取期間藉由相對於該相機垂直地移動該載片，或相對於該載片垂直地移動該相機，或兩者而使該物鏡相對於該載片表面之該高度變化。

【0019】根據所揭示發明之其他態樣，提供一種用於獲取分佈在附加至載片之表面之試樣內之物件之影像之系統，該試樣具有相對於該載片表面之不均勻高度，該系統包含具有物鏡之相機，該物鏡具有一光軸，其中該相機經定位使得該光軸與該載片之該表面形成非正交角。該系統進一步包含影像處理器，其與該相機可操作地耦合，其中該影像處理器經組態以接收由該相機獲取之該試樣之第一線性部分之第一複數個影像；評估在該第一複數個影像中擷取之該試樣之該線性部分內之物件之焦點；及致使該相機獲取該第一線性部分或該試樣之不同於該第一線性部分之第二線性部分之第二複數個影像，其中在該第二複數個影像之獲取期間，該物鏡相對於該載片表面之高度基於在該第一複數個影像中擷取之該等物件之該所評估焦點而變化。

【0020】在一項實施例中，在該第一複數個影像之獲取期間，該物鏡相對於該載片表面之高度係實質上恆定的。

【0021】在一項實施例中，該影像處理器至少部分地藉由判定離焦物件之總數目是否超過臨限值數目來評估在該第一複數個影像中擷取之該等物件之該焦點。

【0022】在一項實施例中，該影像處理器至少部分地藉由判定該等

離焦物件相對於該載片表面之各別高度來評估在該第一複數個影像中擷取之該等物件之該焦點。

【0023】在一項實施例中，該影像處理器至少部分地藉由判定該等各別離焦物件在該第一複數個影像之獲取期間是否相對於該載片表面位於該物鏡之對焦範圍外部之高度處來評估該第一複數個影像中之該等物件之該焦點。

【0024】在一項實施例中，該影像處理器至少部分地藉由判定該等各別離焦物件在該第一複數個影像之獲取期間是否相對於該載片表面位於分別高於該物鏡之對焦範圍之最大高度或低於該物鏡之對焦範圍之最小高度之高度處來評估該第一複數個影像中之該等物件之該焦點。

【0025】在一項實施例中，該影像處理器至少部分地藉由判定該第一線性部分內之離焦物件之各別位置來評估該第一複數個影像中之該等物件之該焦點。

【0026】在各種實施例中，該相機及載片中的一者或兩者較佳地經組態以在該等影像之獲取期間相對於另一者橫向移動。

【0027】不限制地，在一項實施例中，藉由依據該相機相對於該各別線性部分之縱向位置之線性位置增加及/或減少該載片表面相對於該相機之高度而使該物鏡相對於該載片表面之該高度變化。在同一或另一實施例中，藉由依據該相機相對於該各別第一或第二線性部分之縱向位置之線性位置增加及/或減少該相機相對於該載片表面之高度而使該物鏡相對於該載片表面之該高度變化。

【0028】可獲取該等第一或第二線性部分之該第二複數個影像。在一項實施例中，獲取該第一線性部分之該第二複數個影像，該影像處理器

進一步經組態以評估在該第二複數個影像中擷取之該等物件之焦點；及致使該相機自該第二線性部分獲取第三複數個影像，其中在該第三複數個影像之獲取期間，該物鏡相對於該載片表面之該高度基於在該第二複數個影像中擷取之該等物件之該所評估焦點而變化。不限制地，該第二線性部分可直接毗鄰於該第一線性部分。

【0029】鑒於附圖，所揭示實施例之其他及進一步態樣及特徵將自隨後的詳細說明而變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0030】參考附圖更詳細闡述實施例之前述內容及其他態樣，其中相似參考編號係指相似元件，且只要相關，相似元件之說明應可適用於所有經闡述實施例，且其中：

【0031】圖1展示供在自動數位影像系統中使用之試樣載片；

【0032】圖2係圖1之載片之試樣區之剖面；

【0033】圖3係細胞內含物之相對高度之研究之結果之表；

【0034】圖4A及圖4B分別係跨越試樣繪示細胞內含物之相對高度之3D聚焦圖及熱圖；

【0035】圖5係根據一項實施例圖解說明由數位成像器用於掃描試樣載片之蛇形掃描圖案之示意圖。

【0036】圖6係圖解說明成像器相對於載片之傾斜角之示意圖；

【0037】圖7係繪示聚焦合併操作之圖表；

【0038】圖8A至圖8C係試樣區之剖視圖，繪示細胞路徑，由體積掃描覆蓋之區，及由具有Z曲線跟隨之體積掃描覆蓋之區；

【0039】圖9A及圖9B係分別在不具有Z曲線跟隨及具有Z曲線跟隨

之情形下獲取之試樣之影像；及

【0040】圖10係用於使用Z曲線跟隨獲取試樣之影像之方法之流程圖。

【實施方式】

【0041】數位全載片成像(WSI)系統之出現被設定為徹底改變病理學及細胞學領域。快速獲得高品質全載片影像之能力將係成功臨床工作流程中之至關重要的步驟，尤其對於如巴氏(Pap)測試之高體積篩查應用而言。液基細胞載片在視覺上向檢視者呈現近乎單層，但細胞本質上係3維的。歸因於緊密排列之材料之焦深可較高倍顯微鏡物鏡之景深(DOF)高一個數量級，此等載片對於WSI可係具有挑戰性的。出於此原因，較之組織病理的組織載片，對細胞載片進行成像係更具挑戰性的。歸因於跨越載片細胞光斑區域之曲率，具有膜蓋玻片之載片亦可添加至掃描深度要求。如此，細胞學試樣中之所關注物件與試樣所附加至之載玻片之間的距離可相對於顯微鏡物鏡之DOF極大地變化。大多數當前WSI系統需要重複掃描以覆蓋多個焦平面，以便獲取品質影像，從而極大地增加成像時間。如此，有效地獲得細胞載片之高聚焦品質影像係具有挑戰性的。本文中揭示用於有效地掃描此等載片以獲得高品質、焦點對準影像之系統及方法。

【0042】參考圖1，展示顯微鏡載片102之例示性實施例。顯微鏡載片102係具有載片識別區112、試樣區114及框標116之矩形玻璃板110 (或其他適合材料)。顯微鏡載片102可係約75 mm乘25 mm或其他適合大小之標準大小顯微鏡載片。顯微鏡載片102可具有用以促進載片102之處置及定位之斜角。試樣區114可係具有最多大約22 mm之直徑之圓。可對顯微鏡載片102上之整個試樣區114進行成像。載片識別區112在長度上可係最

多大約25 mm至28 mm。載片識別部分112可印刷有條碼、ID號碼及/或其他資訊。試樣區114被保留為載玻片102之通透區。成像器可將框標116用作載片102上之參考點以判定載片102之位置及/或定向及其相對於成像器之特徵。包含分佈在三維體積內之複數個物件之試樣119附加至載片102，通常附加至試樣區114內，但在某些情形中，試樣可延伸於試樣區114外部。試樣119之三維體積具有長度(l)、寬度(w)及厚度或深度(d)。厚度(d)相對於載片102之表面界定z軸。試樣119可係任何適合試樣，諸如物件係細胞之細胞學試樣，物件係組織結構之固體組織樣本等。

【0043】如圖1中所繪示，蓋玻片115可用於覆蓋試樣區114中之試樣119。試樣蓋玻片115係足夠透明的以透過蓋玻片115獲取試樣119之影像。換言之，蓋玻片115不阻礙成像器透過蓋玻片115獲取影像。蓋玻片115起到如下作用：保存試樣119並保護其不被污染及污染其他物件，且亦將試樣119固持為扁平的且固持就位。蓋玻片115具有厚度117。

【0044】如圖2中所展示，安置於載玻片110與蓋玻片115之間的試樣119具有厚度120。細胞122以各種深度或z軸位置分散於整個試樣層。試樣可具有在整個試樣內超過用於獲取試樣中之物件(諸如細胞122)之影像之光學器件之景深之厚度。此可尤其發生在其中收集個別細胞之液基細胞學試樣中。放置於試樣119之頂部上方之蓋玻片115可由玻璃或塑膠製成，且使用薄黏合劑層黏著至載片110。已觀察到，細胞傾向於漂浮在黏合劑中，此致使該等細胞上升到玻璃110上面。此外，蓋玻片115並非始終完全扁平的且通常展現起伏、小丘及凹處。此致使黏合劑之厚度不一致，此繼而致使細胞距玻璃基板110且因此距物鏡之距離變化得有時大於景深可適應的。本文中揭示用於有效地掃描細胞載片，解決數位化既定視

場中較物鏡之景深厚之試樣之問題之數位成像方法及系統。

【0045】由於細胞可懸浮在安裝媒體中且亦可堆積，因此細胞載片固有地係3維的。由於顯微鏡物鏡具有此小景深(DOF)，因此在單個影像中可無法焦點對準地擷取所有細胞。實際上，個別細胞可較單個DOF厚。具有NA 0.75之40X顯微鏡物鏡具有小於2微米之景深。歸因於跨越細胞光斑區域之曲率，具有撓性膜(塑膠)蓋玻片之細胞載片可需要甚至更多掃描(亦即，影像獲取)深度。為了擷取細胞載片(諸如ThinPrep載片)上之所有細胞之品質影像，需要寬得多的聚焦範圍。

【0046】在一項實例中，在具有數位相機(豪洛捷ThinPrep整合式成像器)之電腦控制之顯微鏡上掃描23個ThinPrep Pap載片以採集細胞製備深度資料。首先，使用電腦驅動之XY載台掃描細胞光斑區。在每一位置處，擷取Z高度之寬範圍(> 40微米)處之影像堆疊。將每一影像細分成小區域(35微米正方形)且針對Z堆疊中之每一層級評估Brenner焦點分數度量。判定彼圖塊之最佳焦點。藉由聚焦於載片上印刷之框標，整個載玻片平面經判定且自焦點資料減去整個載玻片平面以判定細胞內含物之相對高度。

【0047】圖3中之表呈現自此23個載片獲得之資料之總結。該表展示，對於具有玻璃蓋玻片之載片，ThinPrep載片之平均細胞深度係11.09微米，且對於具有膜蓋玻片之載片，ThinPrep載片之平均細胞深度係23.6微米。在某些情形中，細胞深度可大於40微米。應注意，即使使用玻璃蓋玻片，但載片內之細胞高度之局部變化達到顯微鏡物鏡之景深之7倍。形成並再檢測針對每一載片之曲面聚焦圖。圖4A及圖4B中展示針對膜蓋玻片載片之實例，其展示在細胞光斑區域之廣度內之曲率效應。特定而言，

對於圖4A及圖4B中所展示之實例，試樣之中間部分之細胞較接近於載玻片，而圍繞試樣之邊緣之細胞較接近於蓋玻片。

【0048】如圖5中所繪示，在成像期間，藉由XY載片載台來移動載片102，以在整個試樣區114內(或，例如若實際試樣119覆蓋與試樣區114不同的區且先前判定了實際試樣119之邊界，則在整個實際試樣119之預定區內)掃描相機之視場。XY載片載台在來回蛇形路徑中移動載片102以在每一行程上擷取試樣119之掃描帶、列或線性部分之微影像。為了擷取掃描帶，XY載片載台連續移動載片102，且相機由XY載片載台觸發以當根據載台編碼器位置到達每一觸發點時擷取影像。使用極高速度相機使得載片與相機之間的相對移動係連續的。在此等高速處，沿著載片之線性部分獲取影像可稱為「掃描」列。蛇形路徑(使得每一後繼掃描帶之開始接近先前掃描帶之結尾)用於最小化掃描整個試樣119所需之時間。當沿著掃描帶移動載片102時，相機擷取試樣119之微影像。亦即，成像器根據掃描圖案擷取覆蓋整個試樣區之複數個影像，諸如圖5中所繪示之一個影像。掃描圖案包含由圖5中之水平箭頭130表示之複數個線性部分。試樣被細分成由圖5中之正方形表示之複數個聚焦區帶132。如此，沿著其獲取影像之每一線性部分130包含複數個聚焦區帶132。每一線性部分130可包含30至70個聚焦區帶。在另一實例中，當載片102保持靜止時，沿著掃描圖案移動相機，而非移動載片102。不管移動載片102還是移動相機，載片102相對於相機移動。

【0049】大多數當前WSI系統一次掃描一單個焦平面。典型掃描器在1分鐘內完成15 x 15 mm掃描。以此速率，掃描一圓形ThinPrep細胞光斑區域至14個焦平面之深度將花費至少26分鐘。為了大幅增加載片數位

化器之輸送量，某些系統被設計為在物鏡與載玻片之間具有傾斜角。使用此方法，景深可用於同時數位化各自位於略微不同深度處之相異層。接著，該等層可在稱為焦點合併之操作中疊並成單個複合聚焦層，該操作涉及選擇展現最佳聚焦之層(或層之部分)並將彼等聚焦良好之區域壓合在一起。使用此方法，載片可在物鏡下連續移動，而不停下來聚焦。各種層經數位化且經合併，且可構造本質上執行獲取後聚焦之系統。此系統之唯一限制係物鏡之景深，此繼而轉變為可成像之試樣之最大厚度。此系統之明顯優點係，無需停止及聚焦。

【0050】使用傾斜平面體積掃描方法顯著減少用於掃描全部細胞內含物區之獲取時間。ThinPrep Pap載片可在大約2.5分鐘內完成。如圖6中所展示，成像光學器件及相機202相對於載片102傾斜。相機框架之一個邊緣處之影像區域較相機框架之另一邊緣處之區域獲取更接近於載玻片之影像。在一項實例中，48毫弧度之傾斜角及0.5 mm之載片處之影像框架寬度提供 $0.5 \times \sin(0.048)$ 之掃描深度，即24微米。

【0051】如圖6中最佳地展示，物鏡之光軸204在掃描方向上(參見圖5)相對於載片102之平面之正交直線以傾斜角206傾斜。換言之，在載片之表面處之相機及光學器件之所得光軸204並不正交於載片102之平面。如WO 2020/091965A2中更詳細闡述，傾斜角206允許成像器獲得載片102上之試樣119之體積影像(亦即，延伸至試樣119之深度中之影像)。換言之，微影像包含載片102上之不同試樣119深度處之特徵之焦點對準影像，而非在以試樣119之正交角拍攝之影像之情形中之僅單個焦平面。成像站可經組態以獲取微影像，其中微影像中之每一者包含下伏於載片102之表面之載片102之深度之至少一部分。若蓋玻片115用於載片102上，則成像站

可經組態以獲取微影像，其中微影像中之每一者包含蓋玻片 115 之深度之至少一部分。

【0052】當相機連續移動時，其經觸發以每當已移動其自身寬度之 1/14 時獲得新影像。使用極高速度(>100 fps)相機。此等重疊影像可經分割且重新組裝以獲得 14 個焦平面影像，如圖 7 中所展示且如 WO 2020/091965 中更詳細闡述。為了最佳化儲存空間，藉由自各種平面選擇焦點對準像素來將焦平面組合成單個經延伸景深影像。使用 GPU 硬體加速即時進行影像處理。

【0053】雖然蓋玻片並非完全扁平的，但其扁平性之變化本質上係逐步的。此意指蓋玻片可在載片之中心中形成隆起，或者可能由跨越載片表面之多個波形成，但蓋玻片與下伏玻璃之間的距離中不存在突然改變。舉例而言，圖 8A 中展示完全扁平蓋玻片 115，而圖 8B 及圖 8C 中展示具有波形或不平表面之蓋玻片。

【0054】此緩慢改變之間隙允許獲取後聚焦之成像系統具有較由光學器件單獨提供之有效景深大得多的有效景深。基本上，當掃描載片時，通常在每一行程結束時(在反轉掃描之方向以詢問下一列或掃描帶之前)使用光柵來回圖案(如圖 5 中所展示)，在焦點合併操作期間分析所收集層並判定最佳焦點。隨著生物學材料跟隨起伏蓋玻片向上漂移時，在先前掃描帶中找到最佳焦點之層可用於預測用於待被掃描之下一掃描帶之最佳焦點圖案。在焦點合併期間找到所關注個別物件且說明其深度。接著使用每一列來預測用於下一列之最佳焦點。

【0055】在掃描帶之結尾處偵測到離焦區域之後，可以彼等離焦區域現在係焦點對準之不同高度重新掃描該掃描帶。可接著使用所得聚焦高

度來通知下一掃描帶，其繼而最小化重新掃描掃描帶所需之次數。

【0056】憑藉不必停止及聚焦；通常亦不必返回並重新掃描離焦區域之事實，此系統之優點係可達成高得多的輸送量(較低掃描時間)。相反，該系統僅來回掃描，直至其已數位化(及焦點合併)整個試樣。穿梭時，物鏡根據自先前掃描帶所給出之聚焦圖上下驅動，所有設計皆為使所關注物件保持在景深內，使得儘管其距載玻片表面之距離係變化的，但皆係焦點對準的。

【0057】為了處置在具有膜蓋玻片之載片上發現之較大總細胞深度範圍，可在Z軸上驅動成像光學器件以跟隨曲率，如圖8A至圖8C中所展示。細胞路徑802起伏且通常傾斜。使用如上文所闡述之傾斜相機之體積掃描提供較在單個焦深處進行的掃描更厚之掃描區域804，但無法提供細胞路徑802之底部部分806及頂部部分808之焦點對準影像。具有Z曲線跟隨810之體積掃描擷取試樣之整個細胞路徑802。相機視場之大小之區中之局部細胞深度係在傾斜平面掃描深度內，但在較長距離內，焦深之較大變化可係必要的。

【0058】曲線跟隨掃描方法最小化局部聚焦誤差，從而提供較高品質WSI影像。用於形成圖9A及圖9B中之影像之載片具有40微米以上之Z聚焦深度。圖9A中展示不具有Z曲線跟隨之體積掃描。圖9B中展示具有Z曲線跟隨之體積掃描。圖9B中之影像較圖9A中之影像更清晰且更焦點對準。

【0059】現參考圖10，將闡述用於獲取分佈在附加至載片之表面之試樣內之物件之影像之方法500。特定而言，對於具有相對於載片表面之不均勻高度且具有超過光學器件之景深之厚度之試樣，使用具有Z曲線跟

隨之體積掃描來獲取影像。在方法500之第一步驟502中，對試樣載片上之離散位置進行取樣以判定最初聚焦高度(Z)。接下來，在步驟504中，使用在步驟502中針對第一線性部分中之每一聚焦區帶判定之最初聚焦高度，沿著試樣之第一線性部分獲取數個影像。最初聚焦高度沿著第一線性部分保持恆定，此意指在步驟504中，物鏡相對於載片表面之高度在試樣之第一線性部分中之影像之獲取期間係實質上恆定的。試樣之每一列或線性部分包含複數個聚焦區帶。

【0060】舉例而言，參考圖5，沿著線性部分之每一正方形可係一聚焦區帶。待由成像器掃描之每一線性部分可包含舉例而言30至70個聚焦區帶。另一選擇係，可使用在步驟502中取樣之離散位置，而非使用步驟504中之實質上恆定聚焦高度來判定用於第一線性部分之 z 曲線，且可藉由跟隨彼 z 曲線來獲取沿著第一線性部分之影像。如此，在沿著第一線性部分獲取影像期間，物鏡沿著 z 軸根據 z 曲線相對於載片上下移動。

【0061】接下來，在步驟506中，對於剛被掃描過之線性部分中之每一聚焦區帶，藉由評估影像中擷取之物件是否係焦點對準的來判定最佳焦點。該評估包含：判定試樣中之離焦物件是否相對於載片表面位於物鏡之對焦範圍外部之高度處。該評估亦可包含：基於其沿著試樣之線性部分之相對位置識別離焦物件。亦即，對於沿著線性部分之每一聚焦區帶，評估影像以判定哪個焦平面具有最佳焦點。如圖7中所繪示，使用傾斜角影像獲取，一次在12個焦平面中擷取影像。舉例而言，若發現最佳焦點在最上或最下焦平面(焦平面1或12)中，則可需要分別上下移動物鏡相對於載片之 z 軸位置，以便獲得具有更好焦點之影像。另外，若最佳焦點發現於最上或最下焦平面中，則可需要在試樣之下一毗鄰線性部分之影像獲取期間

分別上下移動物鏡相對於載片之 z 軸位置。

【0062】若太多物件係離焦的(亦即，離焦物件之數目超過預定臨限值數目)，則在步驟508中調整離焦物件中之每一者之聚焦高度(Z)，且根據新的聚焦高度曲線重新掃描線性部分。當相機跟隨聚焦高度曲線時，藉由依據相機沿著試樣之線性部分之相對位置增加及/或減少相機相對於載片表面之高度而使物鏡相對於載片表面之 z 軸位置變化。物鏡相對於載片之 z 軸位置可沿著試樣之線性部分自一個聚焦區帶改變至下一聚焦區帶。在一項實施例中，載片110上下移動，而物鏡之 z 軸位置保持靜止。在替代實施例中，物鏡上下移動，而載片之 z 軸位置保持恆定。

【0063】若大多數，或所有聚焦區帶係焦點對準的，則在步驟510中，基於當前列中之每一聚焦區帶之最佳焦點，計算每一聚焦區帶之下一值。用於下一列之聚焦區帶中之某些聚焦區帶可向上移動(亦即，使得 z 位置較接近於蓋玻片且較遠離載玻片)，以追蹤較接近於蓋玻片之所關注物件，而聚焦區帶中之某些聚焦區帶可針對下一列向下移動以追蹤較接近於載玻片之所關注物件。接下來，在步驟512中，使用在步驟510中計算之聚焦曲線來掃描下一線性部分。針對試樣中之每一線性部分重複步驟506至512，直至獲得整個試樣之影像。亦即，在獲取針對試樣之每一線性部分之影像之後，評估彼等影像中之物件之焦點(步驟506)。基於該評估，判定用於試樣之下一線性部分之聚焦曲線(步驟510)且將其用於獲取直接毗鄰於剛被掃描過之線性部分之下一線性部分中之物件之影像(步驟512)。另一選擇係，若焦點評估顯示，太多物件係離焦的，則調整聚焦曲線並使用經調整之聚焦曲線再次掃描同一線性部分(步驟508)。

【符號說明】

【0064】

- 102: 顯微鏡載片/載玻片/載片
- 110: 矩形玻璃板/載玻片/載片/玻璃/玻璃基板
- 112: 載片識別區/載片識別部分
- 114: 試樣區
- 115: 蓋玻片
- 116: 框標
- 117: 厚度
- 119: 試樣
- 120: 厚度
- 122: 細胞
- 130: 水平箭頭/線性部分
- 202: 成像光學器件及相機
- 204: 光軸
- 206: 傾斜角
- 500: 方法
- 502: 第一步驟/步驟
- 504: 步驟
- 506: 步驟
- 508: 步驟
- 510: 步驟
- 512: 步驟
- 802: 細胞路徑

804: 掃描區域

806: 底部部分

808: 頂部部分

810: Z曲線跟隨

d: 厚度或深度

l: 長度

W: 寬度

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種用於使用具有物鏡之相機獲取分佈在附加至載片之表面之試樣內之物件之影像之方法，該物鏡具有與該載片之該表面形成非正交角之光軸，該試樣具有相對於該載片表面之不均勻高度，該方法包括：

獲取該試樣之第一線性部分之第一複數個影像；

評估在該第一複數個影像中擷取之該試樣之該第一線性部分內之物件之焦點，包括判定離焦物件之總數目是否超過臨限值數目及沿著該第一線性部分判定該試樣之最佳聚焦高度；

沿著該第一線性部分計算該試樣之最佳聚焦高度之Z聚焦高度曲線；

若該第一複數個影像中之離焦物件之該總數目超過該臨限值數目，則對該試樣之該第一線性部分再次成像以獲取第二複數個影像，其中該物鏡相對於該載片表面之高度在基於該Z聚焦高度曲線獲取該第二複數個影像之期間而變化；及

若該第一複數個影像中之離焦物件之該總數目未超過該臨限值數目，則獲取直接毗鄰於該第一線性部分之該試樣之第二線性部分之第二複數個影像，其中該物鏡相對於該載片表面之高度在基於該Z聚焦高度曲線獲取該第二複數個影像之期間而變化。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中該物鏡相對於該載片表面之高度在該第一複數個影像之獲取期間係實質上恆定的。

【請求項3】

如請求項1或2之方法，其中評估在該第一複數個影像中擷取之該等

物件之該焦點包括：判定該等離焦物件相對於該載片表面之各別高度。

【請求項4】

如請求項3之方法，其中評估該第一複數個影像中之該等物件之該焦點包括：判定該等各別離焦物件在該第一複數個影像之獲取期間是否相對於該載片表面位於該物鏡之對焦範圍外部之高度處。

【請求項5】

如請求項3之方法，其中評估該第一複數個影像中之該等物件之該焦點包括：判定該等各別離焦物件在該第一複數個影像之獲取期間是否相對於該載片表面位於分別高於該物鏡之對焦範圍之最大高度或低於該物鏡之對焦範圍之最小高度之高度處。

【請求項6】

如請求項1或2之方法，其中評估該第一複數個影像中之該等物件之該焦點包含：判定該第一線性部分內之離焦物件之各別位置。

【請求項7】

如請求項1或2之方法，其中使該相機及載片中之一者或兩者在該等影像之獲取期間相對於另一者橫向移動。

【請求項8】

如請求項7之方法，其中藉由依據該相機相對於該各別線性部分之縱向位置之線性位置增加及/或減少該載片表面相對於該相機之高度而使該物鏡相對於該載片表面之該高度變化。

【請求項9】

如請求項7之方法，其中藉由依據該相機相對於該各別第一或第二線性部分之縱向位置之線性位置增加及/或減少該相機相對於該載片表面之

高度而使該物鏡相對於該載片表面之該高度變化。

【請求項10】

如請求項1之方法，其中獲取該第一線性部分之該第二複數個影像，該方法進一步包括：

評估在該第二複數個影像中擷取之該等物件之焦點，包括判定離焦物件之總數目是否超過臨限值數目及沿著下一線性部分判定該試樣之最佳聚焦高度；

沿著該第二線性部分計算該試樣之該最佳聚焦高度之第二Z聚焦高度曲線；及

獲取第三線性部分之第三複數個影像，該第三線性部分直接毗鄰於該第二線性部分，其中該物鏡相對於該載片表面之高度在基於該第二Z聚焦高度曲線獲取該第三複數個影像之期間而變化。

【請求項11】

一種用於使用具有物鏡之相機獲取分佈在附加至載片之表面之試樣內之物件之影像之方法，該物鏡具有與該載片之該表面形成非正交角之光軸，該試樣具有相對於該載片表面之不均勻高度，該方法包括：

(a) 獲取該試樣之第一線性部分之第一複數個影像；

(b) 評估在該第一複數個影像中擷取之該等物件之焦點，包括判定離焦物件之總數目是否超過臨限值數目及沿著該第一線性部分判定該試樣之最佳聚焦高度；

(c) 沿著該第一線性部分計算該試樣之該最佳聚焦高度之Z聚焦高度曲線；

(d) 若該第一複數個影像中之離焦物件之該總數目超過該臨限值數

目，則對該試樣之該第一線性部分再次成像以獲取第二複數個影像，其中該物鏡相對於該載片表面之高度在基於該Z聚焦高度曲線獲取該第二複數個影像之期間而變化；若該第一複數個影像中之離焦物件之該總數目未超過該臨限值數目，則獲取直接毗鄰於該第一線性部分之該試樣之第二線性部分之第二複數個影像，其中該物鏡相對於該載片表面之高度在基於該Z聚焦高度曲線獲取該第二複數個影像之期間而變化；及

(e) 重複(a)至(d)直至已獲取實質上整個試樣之影像。

【請求項12】

如請求項11之方法，其中評估該第一複數個影像中之該等物件之該焦點包括：判定該等各別離焦物件在該第一複數個影像之獲取期間是否相對於該載片表面位於分別高於該物鏡之對焦範圍之最大高度或低於該物鏡之對焦範圍之最小高度之高度處。

【請求項13】

如請求項11之方法，其中評估該第一複數個影像中之該等物件之該焦點包含：判定該各別第一線性部分內之離焦物件之各別位置。

【請求項14】

如請求項11之方法，其中使該相機及載片其中之一者在該等各別第一及第二複數個影像之獲取期間相對於另一者橫向移動。

【請求項15】

如請求項14之方法，其中藉由依據該相機相對於該各別線性部分之縱向位置之線性位置增加及/或減少該載片表面相對於該相機之高度而使該物鏡相對於該載片表面之該高度變化。

【請求項16】

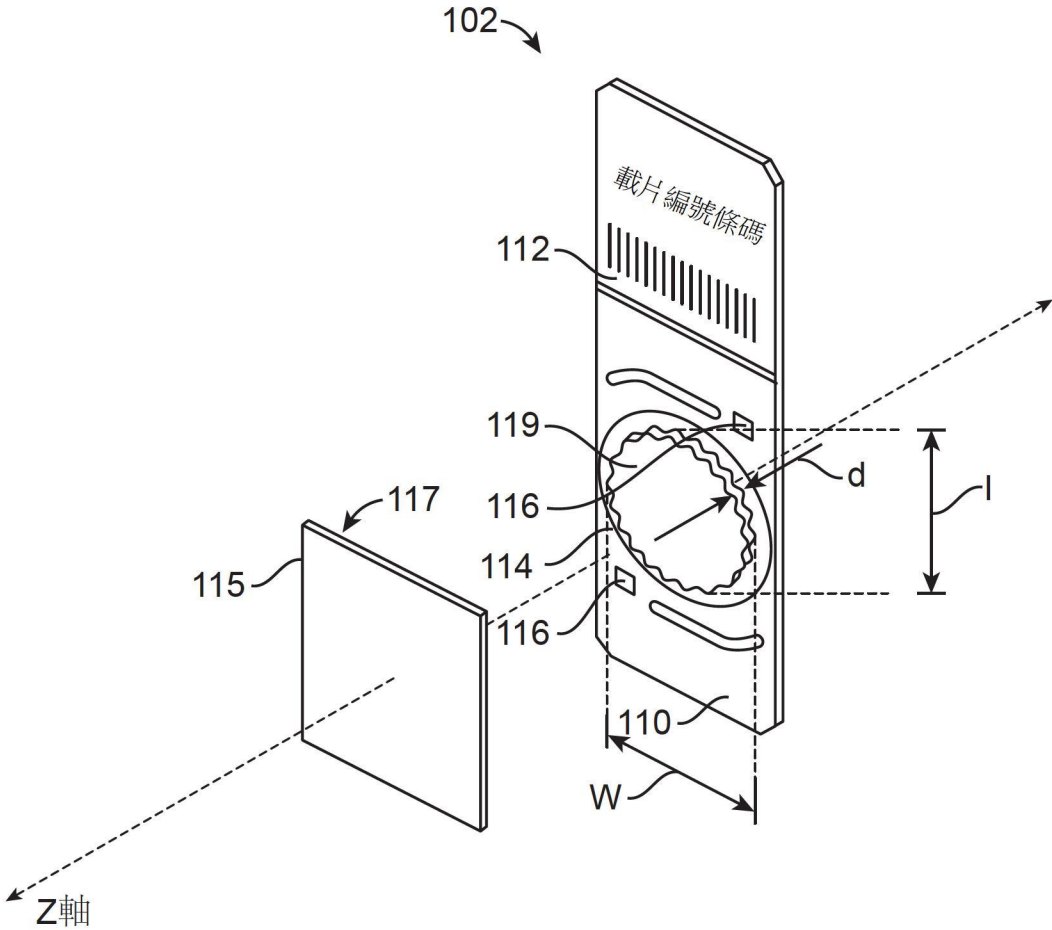
一種用於獲取分佈在附加至載片之表面之試樣內之物件之影像之系統，該試樣具有相對於該載片表面之不均勻高度，該系統包括：

相機，其具有物鏡，該物鏡具有光軸，其中該相機經定位使得該光軸與該載片之該表面形成非正交角；及

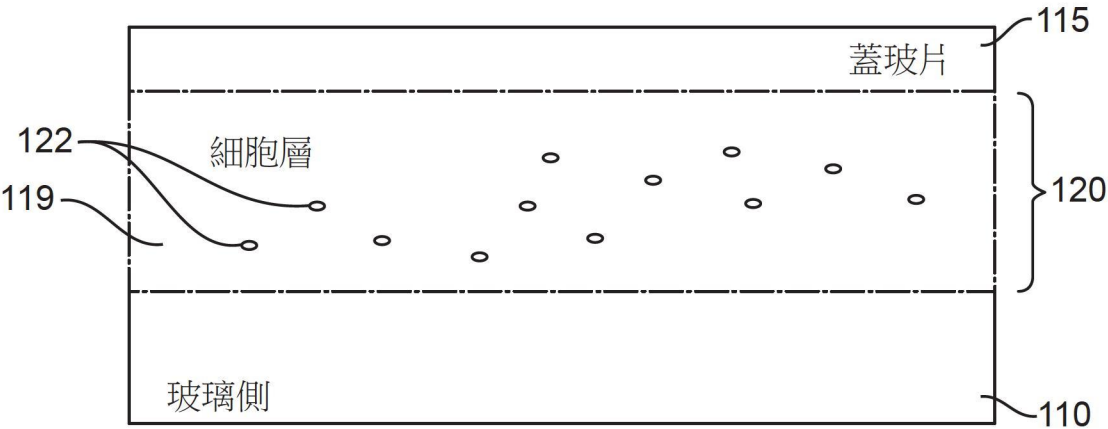
影像處理器，其與該相機可操作地耦合，

其中該系統經組態以實施如請求項1至10中任一項之方法。

【發明圖式】



【圖1】



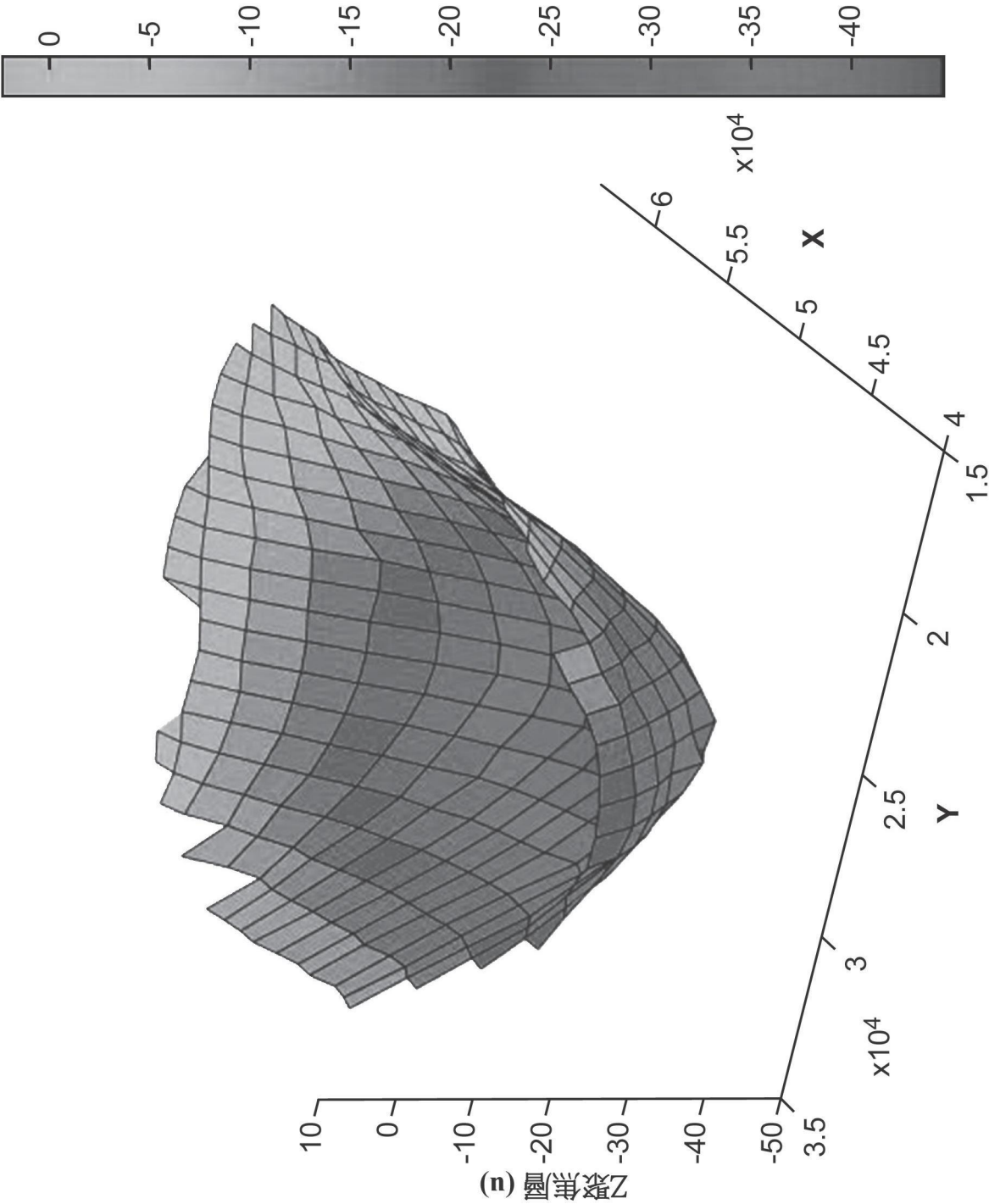
【圖2】

載片編號 玻璃蓋玻片	ΔZ 焦深 (單位：μ)
1	8.4
2	11.3
3	11
4	13.7
5	9
6	8.8
7	13.2
8	11.85
9	12.6
平均值± STD	11.09 ± 1.969

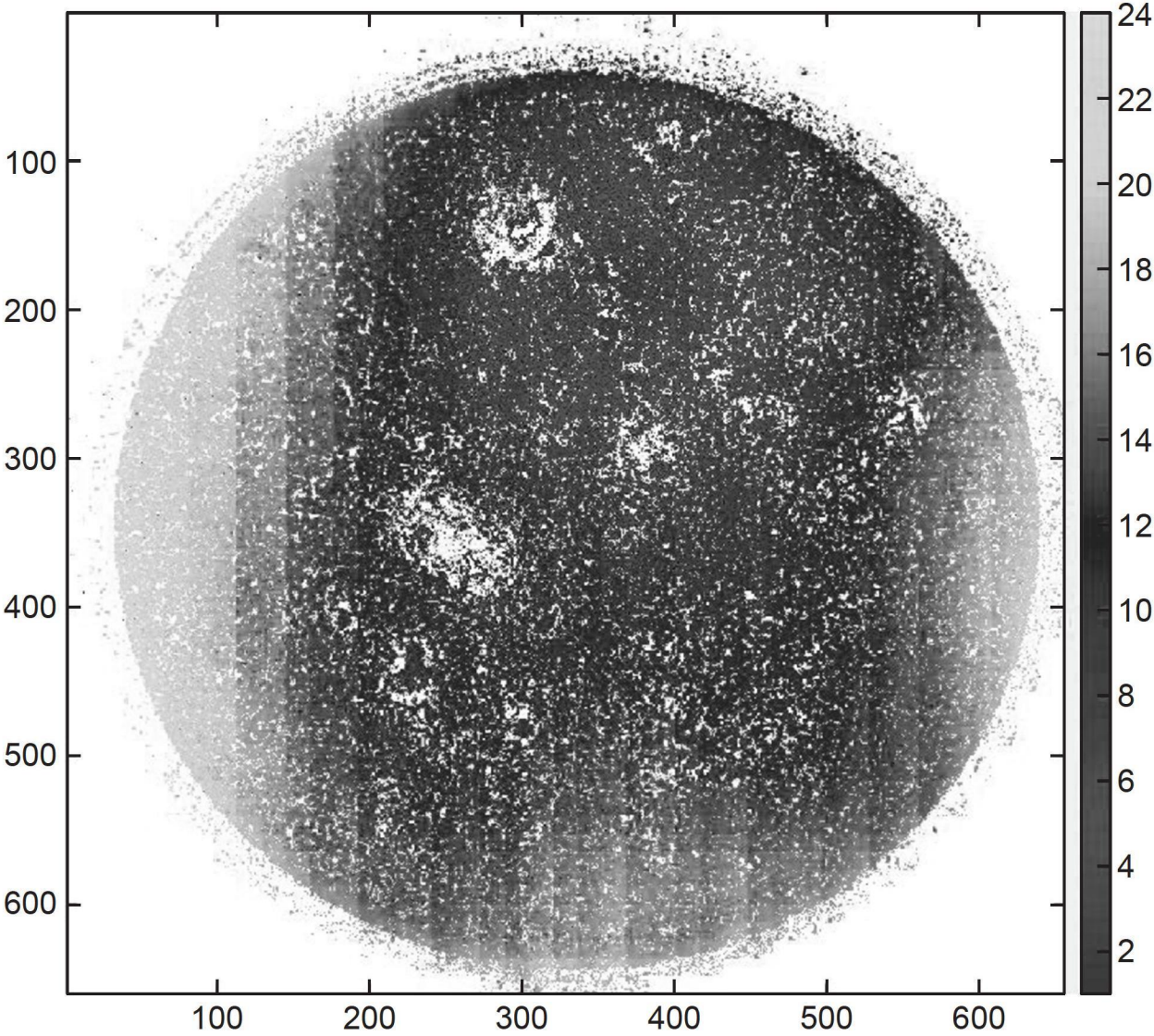
載片編號 塑膠蓋玻片	ΔZ 焦深 (單位：μ)
1	11.8
2	22
3	14.38
4	24.2
5	15
6	22.86
7	47
8	28
9	15.7
10	27
11	24.48
12	23.68
13	19.9
14	29.6
平均值± STD	23.6 ± 8.96

【圖3】

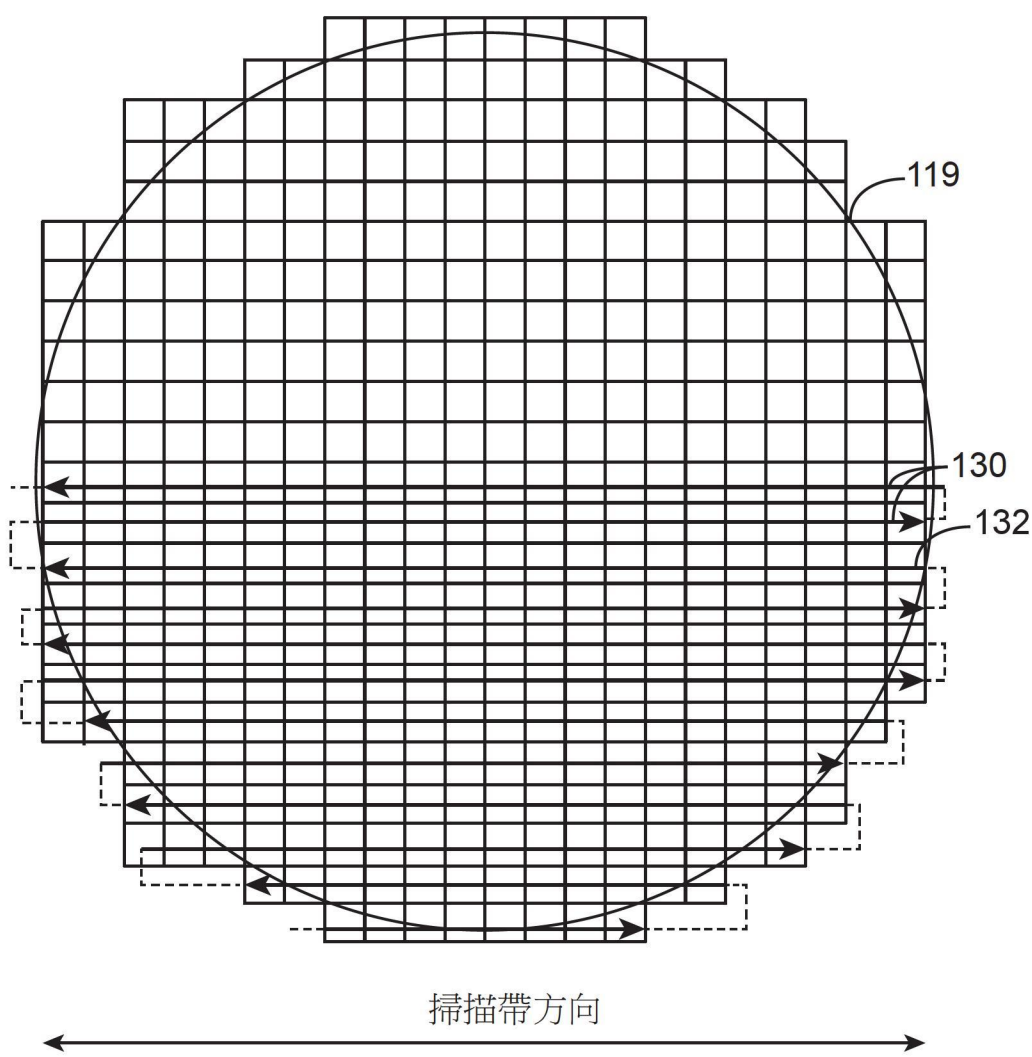
患者全載片聚焦圖



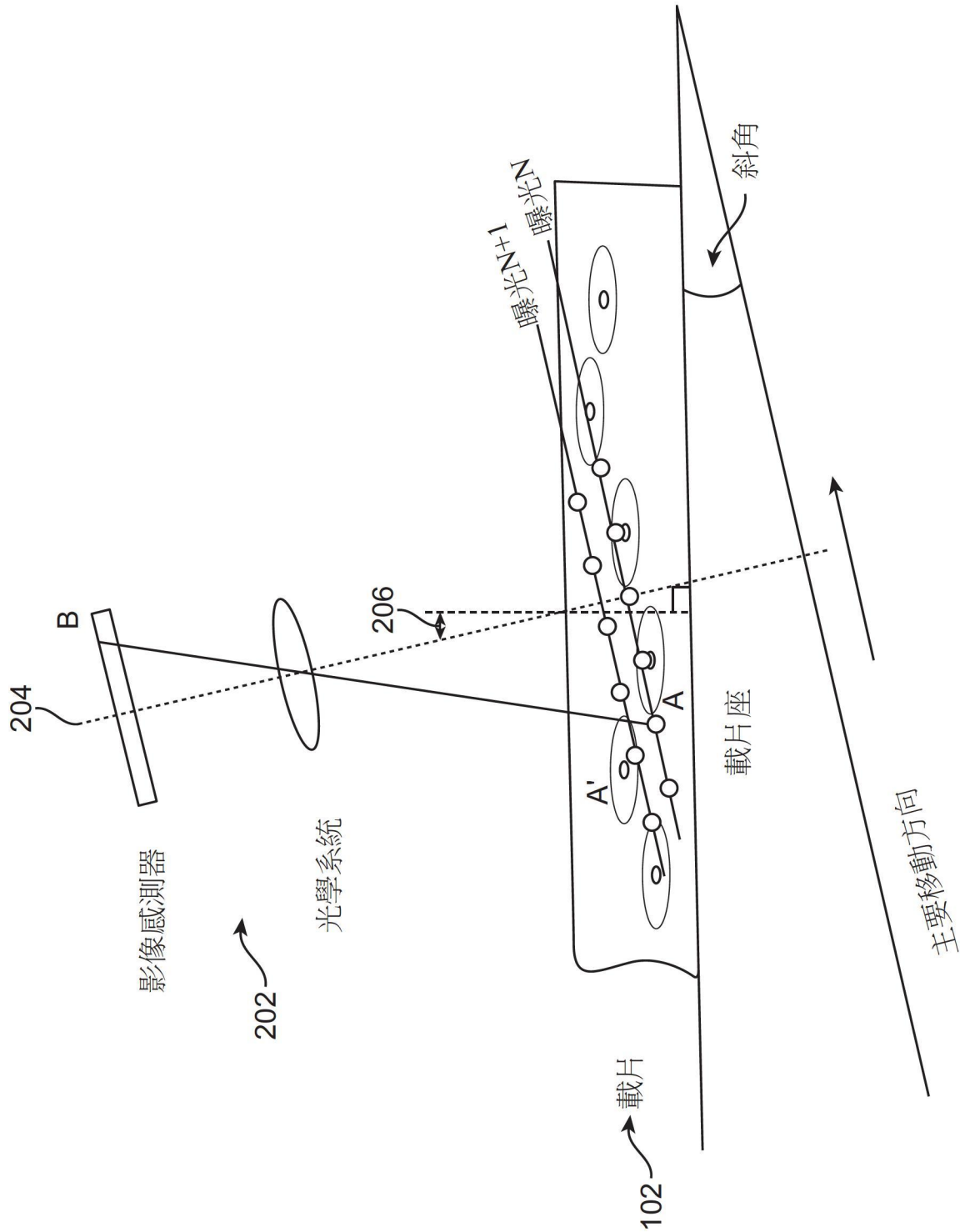
【圖4A】



【圖4B】

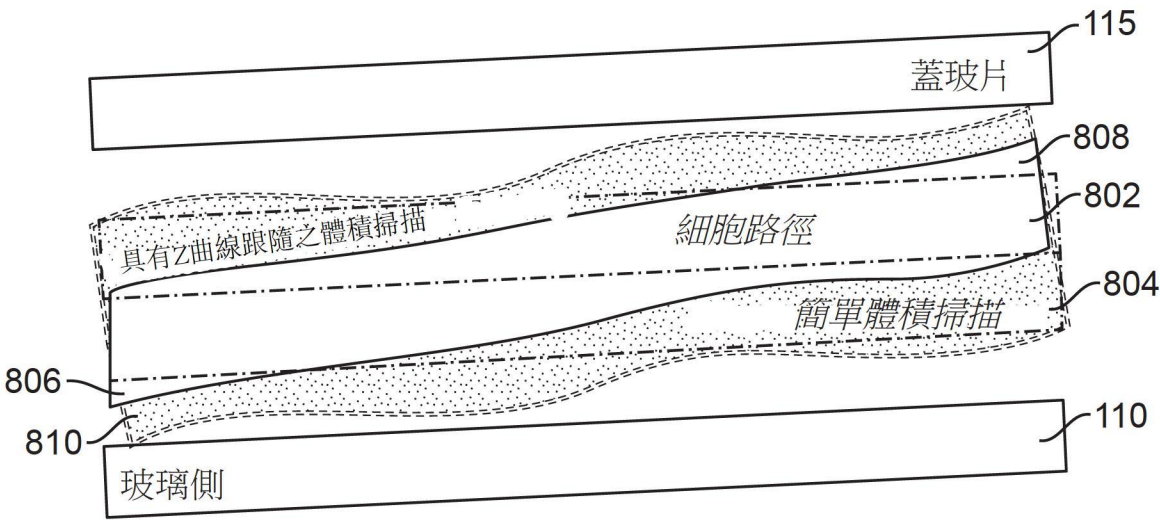


【圖5】

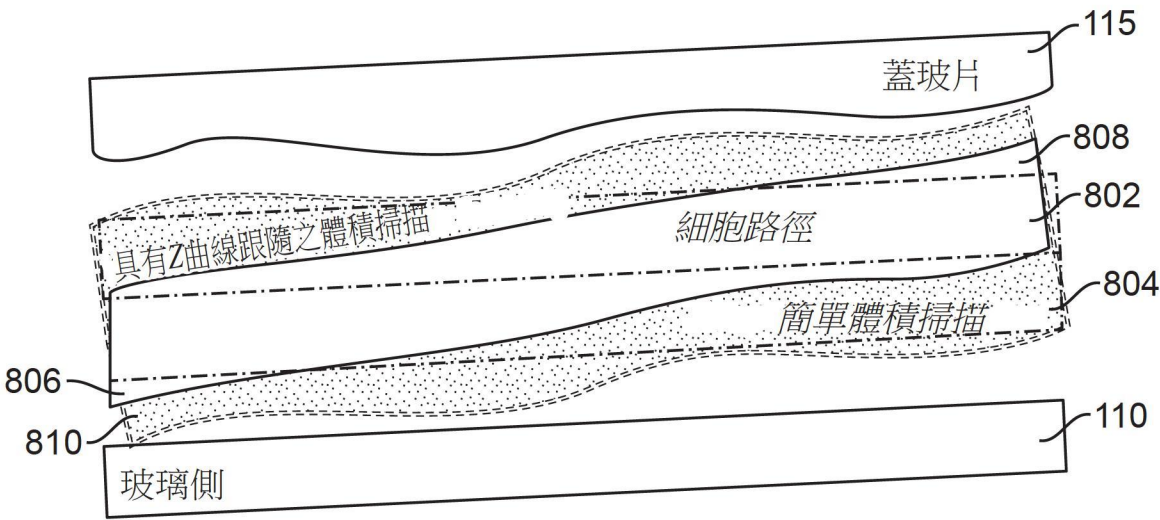


【圖6】

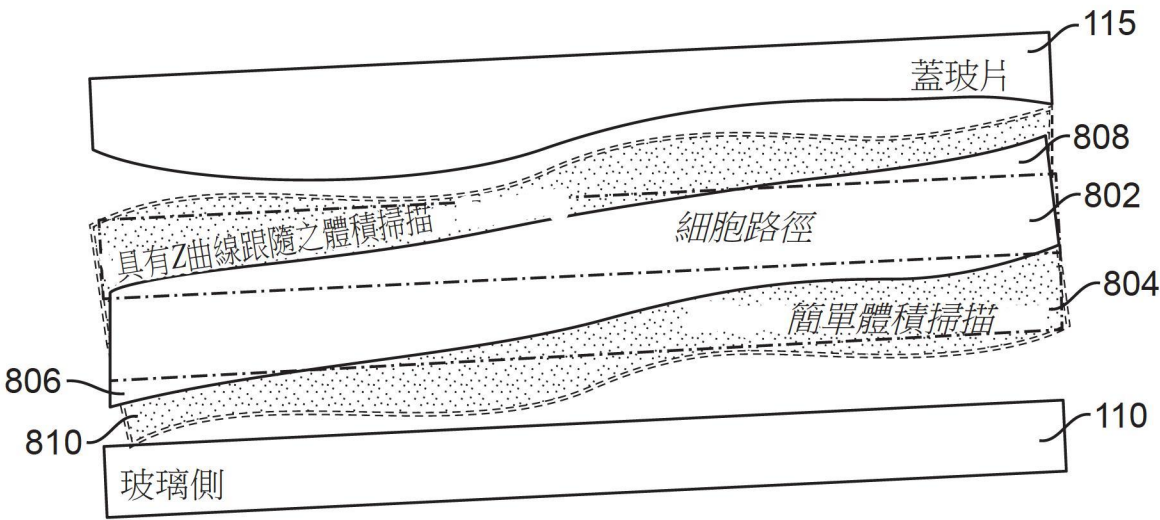
【7回】



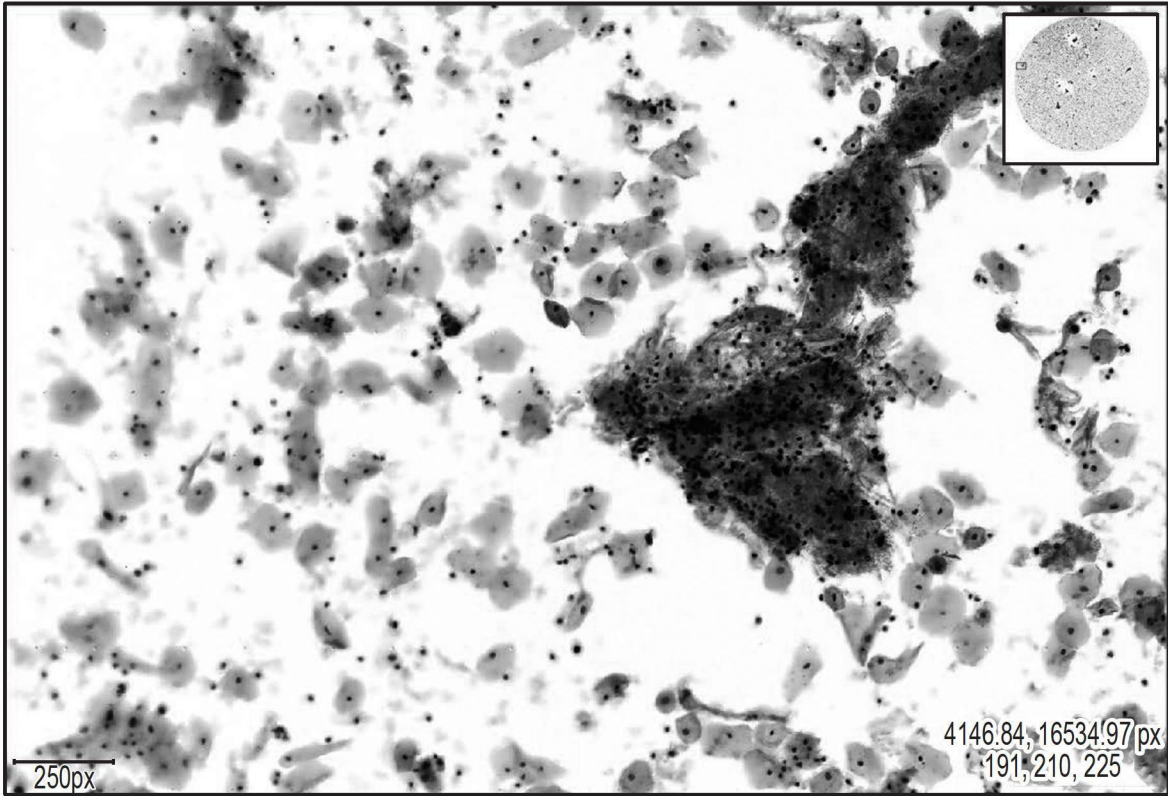
【圖8A】



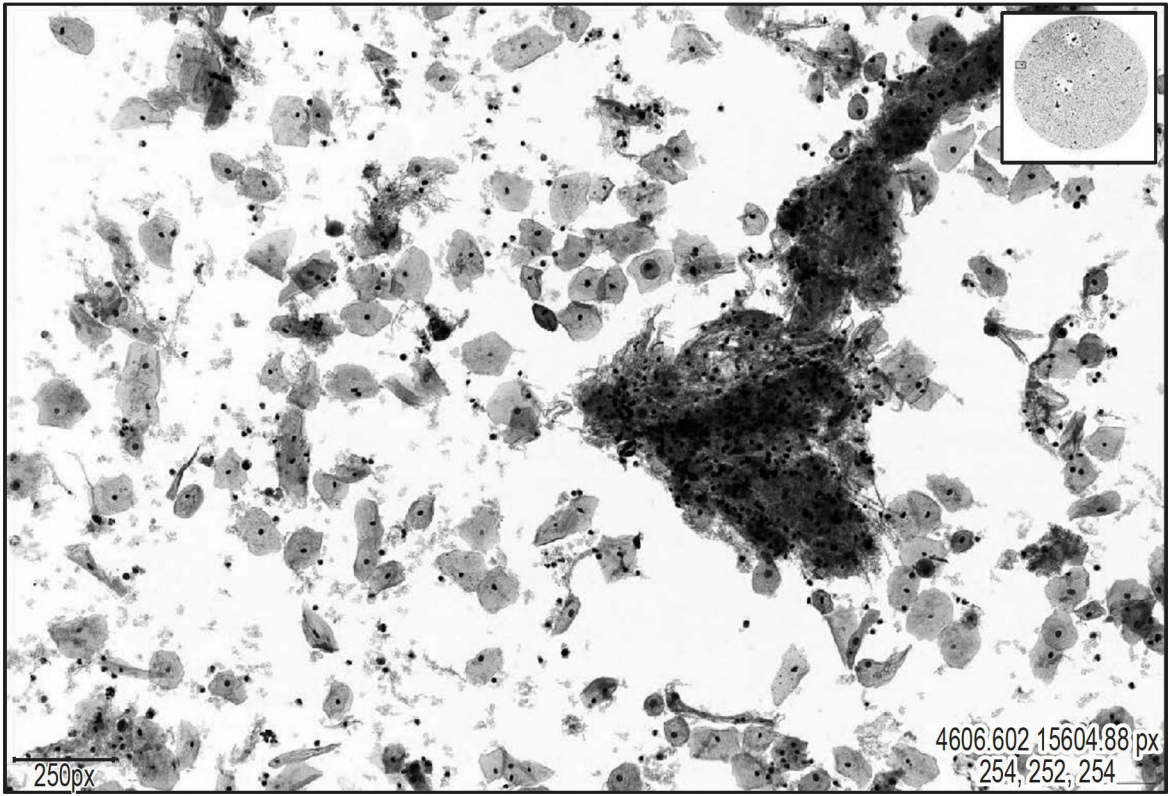
【圖8B】



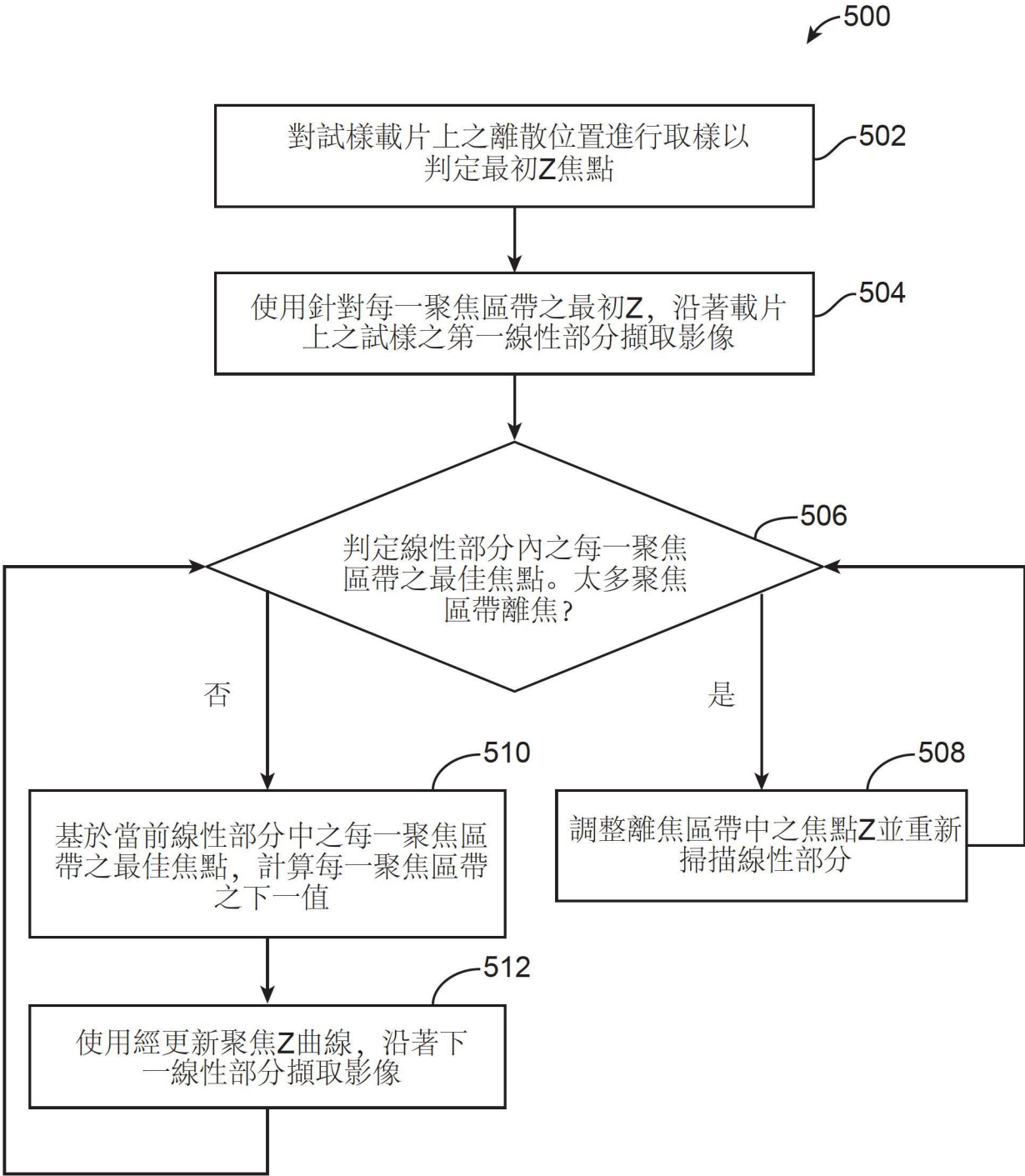
【圖8C】



【圖9A】



【圖9B】



【圖10】