arXiv:2305.05156v1 [physics.optics] 9 May 2023

泽尼克相衬显微镜的定量相位恢复

Rikimaru Kurata[1],* Keiichiro Toda[2, 3],* Genki Ishigane[2],Makoto Naruse[1], Ryoichi Horisaki[1],† 和 Takuro Ideguchi[2, 3‡]

[1] *Department of Information Physics and Computing, Graduate School of Information Science and Technology,The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan*[2] *Department of Physics, Graduate School of Science, The University of Tokyo,7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan and*[3] *Institute for Photon Science and Technology, The University of Tokyo,7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan*(日期: 2023年5月10日)

我们提出了一种适用于泽尼克相衬显微镜（ZPM）的单图像数值相位恢复方法，可在无需硬件改造的情况下消除光晕和阴影消退伪影，并解决弱相位条件的限制。通过采用严格的 ZPM 物理模型及用于模型逆向求解的梯度下降算法，我们实现了定量 ZPM 成像。我们使用生物细胞对该方法进行了实验验证，并通过与数字全息术观测结果的比较，证实了其定量特性。

相衬显微镜由 Frits Zernike 发明，凭借其简单的实现方式，数十年来一直广泛应用于生物医学领域；其实现方式由标准明场显微镜、聚光器环形光阑和安装在其上的相位环组成 [1]。尽管相衬显微镜能够对细胞和组织等未经染色的透明样本提供高对比度图像，但泽尼克相衬显微镜（ZPM）不可避免地会受到由相位环有限径向宽度引起的光晕和阴影消退伪影影响，导致其本质上不具备定量性 [2]。此外，尽管人们已经认识到，对于径向宽度无限窄的聚光器环形光阑和相位环，ZPM 在弱相位范围内几乎具有定量性 [3], ，但如图 1 所示，大多数生物样本都超出了这一范围，因为单个细胞就会产生数弧度的相位延迟。因此，ZPM 不适用于各种依赖定量相位图像的生物医学分析，例如细胞干重或生长速率分析。近年来，这些分析已在定量相位成像（QPI）的研究中得到广泛探索，其中包括数字全息术（DH）等干涉测量技术 [4, 5]。

为解决上述问题，已有研究提出一种用于抑制 ZPM 伪影的数值方法 [6]。然而，该方法仅适用于弱相位范围，而对较大相位进行定量相位恢复的能力仍未得到探索。其他方法则通过改造 ZPM 装置的硬件，实现弱相位范围以外的定量相位恢复。例如，空间光干涉显微术（SLIM）是实现定量相位成像（QPI）的代表性技术之一 [7]。不过，该技术需要额外的光学单元，其中包含空间光调制器，并且依赖多次

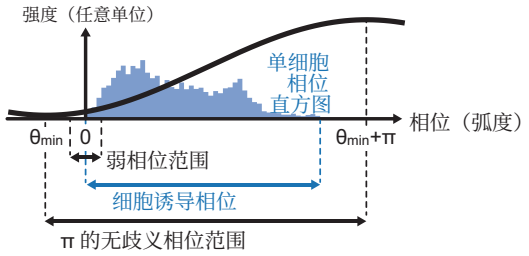

图 1. ZPM 中 π 的无歧义相位范围以及 0 rad 附近的弱相位范围。实线正弦曲线表示负相位衬度的衬度映射。蓝色柱条显示了典型单细胞相位图像的直方图。

移相测量来进行相位恢复，这损害了 ZPM 的简便性和稳健性。

在本研究中，我们提出了一种无需硬件改造、即可从单幅 ZPM 图像中进行定量相位恢复的数值方法。我们重新审视了 ZPM 的物理模型，并开发出一种高效的相位恢复算法，能够稳健地处理单个贴壁细胞图像。由于该技术不需要进行任何硬件改造，因此可应用于任何商用 ZPM 系统，从而轻松实现定量相位成像（QPI）。该方法还可能适用于其他相衬成像模态，例如 X 射线或电子束成像 [8, 9]。

为确定无歧义相位恢复的可用范围，必须重新审视 ZPM 的物理模型。使用正、负对比 ZPM 成像时，图像的强度 $I^{\pm}$ 可表示为物体引起的相位延迟 $I^{\pm}$ 的函数；其中，ZPM 由聚光器环形光阑和径向宽度无限窄的相位环组成，

* 作者对本研究贡献相同。
† horisaki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp
‡ ideguchi@ipst.s.u-tokyo.ac.jp

有限径向宽度，可表示为物体引起的相位延迟 θ 的函数，即

$$\begin{aligned} I^{\pm} &= |\mp j\alpha + (\exp(j\theta) - 1)|^2 \\ &\propto I_0 + \sin(\theta - \pi/2 - \theta^{\pm}_{\min}), \end{aligned} \tag{1}$$

其中，j 是虚数单位，α^2 是相位环的透射率。$I_0 = (2+\alpha^2)/2\sqrt{1+\alpha^2}$ 和 $\theta^{\pm}{}_{\min}$ 满足 $\sin\theta^{\pm}{}_{\min} = \pm\alpha/\sqrt{1+\alpha^2}$ 和 $\cos\theta^{\pm}{}_{\min} = 1/\sqrt{1+\alpha^2}$，它们是由光学系统决定的常数值，如图 1 中的曲线所示。该方程仅表示衍射光与非衍射光之间的干涉，其中相位环引入了相位延迟，最终形成正弦映射，其无歧义相位范围为 π。这意味着，只要物体引起的相位延迟处于无歧义相位范围内，即使不满足弱相位条件，也可以通过单幅图像进行相位恢复。对于正、负相位衬度，最小相位 $\theta^{\pm}{}_{\min}$ 分别取值于 $0 \le \theta^{+}{}_{\min} \le \pi/4$ 和 $-\pi/4 \le \theta^{-}{}_{\min} \le 0$ 范围内。对于满足 $\theta \ll 1$ rad 的弱相位物体，式（1）可近似为

$$\begin{aligned} I^{\pm} &\simeq |\mp j\alpha + j\theta|^2 \\ &\propto \alpha(\alpha \mp 2\theta), \end{aligned} \tag{2}$$

其中，ZPM 的对比度相对于 θ 呈线性关系。然而，需要注意的是，大多数样本都不满足这一要求，因此必须考虑式（1）中的非线性关系。

尽管我们展示了无需修改硬件即可突破 ZPM 弱相位范围的可能性，但由于实际中的聚光器环形光阑和相位环并非无限窄，光晕和阴影消退伪影的问题仍然存在。要解决这一问题，需要建立能够严格描述来自聚光器环形光阑的空间部分相干光的数值传播模型，这将带来巨大的计算开销。我们采用一种称为压缩传播（CP）的随机梯度下降方法来解决这一问题，该方法在我们近期的工作 [10] 中提出。

为简单起见，我们假设相位物体向量为一维 $\boldsymbol{f} \in \mathbb{C}^{N\times 1}$，其中 N 是物体的像素数，表示为

$$\boldsymbol{f} = \exp(j\boldsymbol{\theta}), \tag{3}$$

其中 $\boldsymbol{\theta} \in \mathbb{R}^{N\times 1}$ 是相位向量。如图 2 所示，基于 CP 的 ZPM 前向模型表示为

$$\boldsymbol{i} = \frac{1}{M}\sum_{m=1}^{M} |\boldsymbol{F}^{-1}\mathtt{diag}(\boldsymbol{p})\boldsymbol{F}\mathtt{diag}(\boldsymbol{f})\boldsymbol{F}^{-1}\mathtt{diag}(\boldsymbol{c})\boldsymbol{w}_m|^2, \tag{4}$$

其中，$\boldsymbol{i} \in \mathbb{R}^{N\times 1}$ 分别为采集的强度图像的向量，$\boldsymbol{p} \in \mathbb{C}^{N\times 1}$ 为相位环的向量，$\boldsymbol{c} \in \mathbb{R}^{N\times 1}$ 为聚光器环形光阑的向量。$\boldsymbol{w}_m \in \mathbb{C}^{N\times 1}$ 为 M 个随机波前中第 m 个波前的向量。$\boldsymbol{F} \in \mathbb{C}^{N\times N}$ 和 $\boldsymbol{F}^{-1} \in \mathbb{C}^{N\times N}$

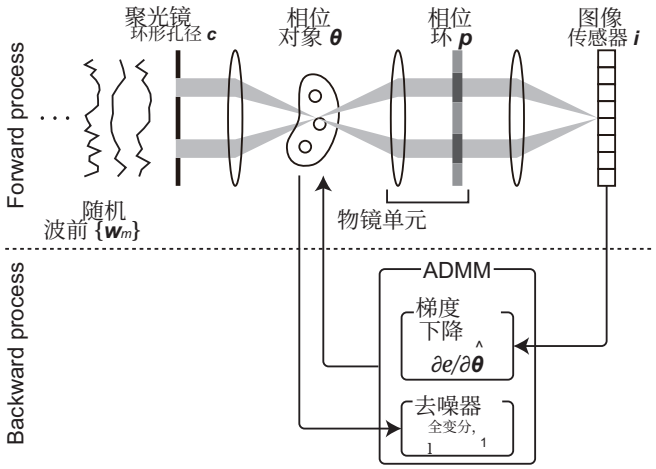

图 2. ZPM 中相位恢复前向和反向过程的示意图。

分别表示傅里叶变换及其逆变换的矩阵。“diag”是用于生成对角矩阵的算子，其对角元素为括号中的向量。如式（4）所示的前向模型所示，来自聚光镜环形孔径 $\boldsymbol{c}$ 的空间部分相干光表示为基于 CP 的随机波前 $\boldsymbol{w}_m$ 的系综平均，以降低下文所述梯度下降过程中的计算成本。

为按照图 2 所示在 ZPM 中进行相位恢复的梯度下降，我们将误差函数定义为 e

$$e = \|\widehat{\boldsymbol{i}} - \boldsymbol{i}\|_2^2, \tag{5}$$

其中，$\widehat{\bullet}$ 上的重音符号表示梯度下降过程中估计的变量，而 $\|\bullet\|_2$ 分别表示 ℓ_2 范数。根据链式法则，式 (5) 中误差 $\widehat{e}$ 对估计相位向量 $\boldsymbol{\theta}$ 的偏导数可写为

$$\frac{\partial e}{\partial \widehat{\boldsymbol{\theta}}} = \frac{\partial \widehat{\boldsymbol{f}}}{\partial \widehat{\boldsymbol{\theta}}} \cdot \frac{\partial e}{\partial \widehat{\boldsymbol{f}}}. \tag{6}$$

式 (6) 右侧的第二项计算如下

$$\begin{aligned} \frac{\partial e}{\partial \widehat{\boldsymbol{f}}} = &\frac{4}{M}\sum_{m=1}^{M} \mathtt{diag}(F^{-1}\mathtt{diag}(\boldsymbol{c})\boldsymbol{w}_m)^H \boldsymbol{F}^{-1}\mathtt{diag}(\boldsymbol{p})^H \boldsymbol{F} \\ &\mathtt{diag}(\boldsymbol{F}^{-1}\mathtt{diag}(\boldsymbol{p})\boldsymbol{F}\mathtt{diag}(\widehat{\boldsymbol{f}})\boldsymbol{F}^{-1}\mathtt{diag}(\boldsymbol{c})w_m)(\widehat{\boldsymbol{i}} - \boldsymbol{i}), \end{aligned} \tag{7}$$

其中，上标 H 表示矩阵的厄米共轭。然后，式（6）的左侧计算为

$$\frac{\partial e}{\partial \widehat{\boldsymbol{\theta}}} = \mathtt{real}\left[-j\mathtt{diag}(\widehat{\boldsymbol{f}})^H \frac{\partial e}{\partial \widehat{\boldsymbol{f}}}\right], \tag{8}$$

其中，“real”表示复振幅的实部。我们基于 Adam 优化器，采用梯度下降法，在第 k 次迭代中更新估计相位向量 $\widehat{\boldsymbol{\theta}}^{(k)}$，具体如下。

$$\widehat{\boldsymbol{\theta}}^{(k+1)} = \widehat{\boldsymbol{\theta}}^{(k)} - \texttt{Adam}\left[\frac{\partial e}{\partial \widehat{\boldsymbol{\theta}}^{(k)}}\right], \tag{9}$$

其中，“Adam”是 Adam 优化器中的一个算子，用于根据公式 (8) 中的偏导数计算更新步长 [11]。在 CP 中，我们基于随机梯度下降 [10]，在每次迭代时随机改变公式 (7) 中的波前 $\boldsymbol{w}_m$。随机波前的数量 M 可以保持较少，以降低与空间部分相干光传播相关的计算成本，同时不会引入任何近似。

此外，如图 2 [12] 所示，我们引入了一种基于交替方向乘子法（ADMM）的正则化过程。在这种情况下，式 (9) 中的更新步骤在第 k 次迭代时，利用两个辅助向量 $\boldsymbol{v}^{(k)} \in \mathbb{R}^{N\times 1}$ 和 $\boldsymbol{u}^{(k)} \in \mathbb{R}^{N\times 1}$ 重写为

$$\widehat{\boldsymbol{\theta}}^{(k+1)} = \widehat{\boldsymbol{\theta}}^{(k)} - \texttt{Adam}\left[\frac{\partial e}{\partial \widehat{\boldsymbol{\theta}}^{(k)}} + \rho(\widehat{\boldsymbol{\theta}}^{(k)} - (\boldsymbol{v}^{(k)} - \boldsymbol{u}^{(k)}))\right], \tag{10}$$

$$\boldsymbol{v}^{(k+1)} = \texttt{denoiser}\left[\widehat{\boldsymbol{\theta}}^{(k+1)} + \boldsymbol{u}^{(k)}\right], \tag{11}$$

$$\boldsymbol{u}^{(k+1)} = \boldsymbol{u}^{(k)} + (\widehat{\boldsymbol{\theta}}^{(k+1)} - \boldsymbol{v}^{(k+1)}), \tag{12}$$

其中，ρ 是一个调节参数。这里，“去噪器”是一种去噪算子，由全变分（TV）组成，用于在保留边缘的同时保证对象的平滑性，并通过 ℓ_1 范数抑制本研究中的背景噪声 [13]。全变分和 ℓ_1 范数均采用重加权方法实现，以自适应地增强正则化域上的稀疏性 [14]。

为通过实验验证我们的相位恢复方法，我们使用一台商用显微镜（Olympus IX73）搭建了用于单细胞成像的 ZPM 系统。该显微镜配备了 525 nm LED（Thorlabs SOLIS-525C）、聚光器环形光阑（Ph2）、负相位衬度物镜（UPlanFLN 40x/0.75NHPh2）和 CMOS 图像传感器（Basler acA2440-75um）。为了构建能够准确描述所搭建 ZPM 系统的数值物理模型，必须仔细设定模型参数，例如聚光器环形光阑和相位环的半径及径向宽度，以及后者的透射率。在我们的实验中，我们按照以下流程对这些参数进行了测量（更多详情见 [7] ）。我们将物镜的后孔径成像到相机平面，分别在有无聚光器环形光阑的情况下进行成像。在前一种情况下，测定了聚光器环形光阑的尺寸；在后一种情况下，则可根据相位环的衰减区域表征相位环的半径和透射率 $\alpha = 0.26$。聚光器环形光阑和相位环的内外

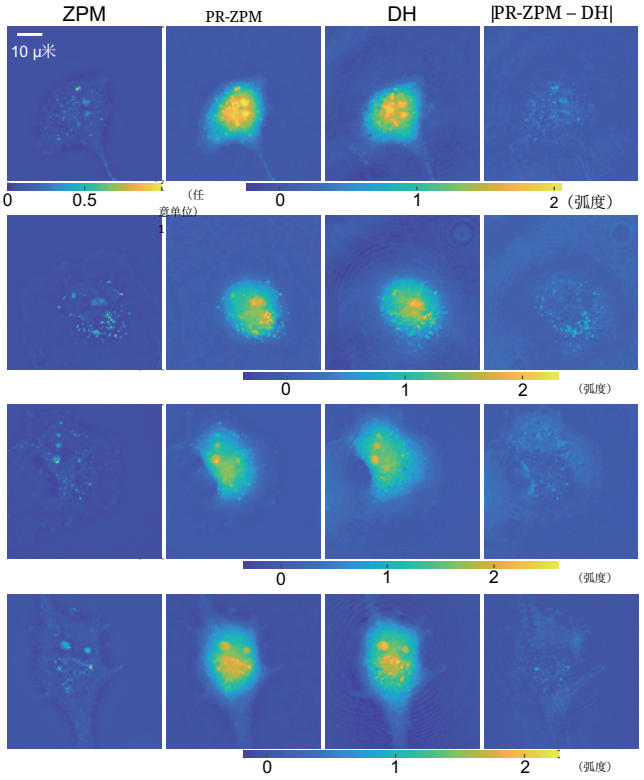

图3. 使用 ZPM 拍摄的 COS-7 细胞图像的相位恢复。左侧第一列和第二列分别显示 ZPM 图像及其相位恢复图像（PR-ZPM）。第三列和第四列分别显示使用 DH 独立拍摄的定量相位图像，以及 PR-ZPM 与 DH 图像之间的绝对差。DH图像的相位值是相对于其背景图像确定的。

半径以物镜的数值孔径为基准计算，分别为 0.31 和 0.40，以及 0.33 和 0.38。

在相位恢复过程中，随机波前的数量 M 设为 10。通过检测和膨胀边缘，从 ZPM 图像中分割出细胞轮廓 [15] ，并将其用作相位恢复的初始猜测。在 Adam 优化器中，我们将学习率设为 0.016，其他参数与原始研究 [11]中的相同。在交替方向乘子法中，调节参数 ρ 设为 20。

图3左侧第一列和第二列分别展示了固定COS-7细胞的ZPM图像及其相位恢复ZPM（PR-ZPM）图像，前者由我们的ZPM系统采集。ZPM图像的半间距空间分辨率为260 nm。正如图1所示，我们选择负相差，确保利用无歧义相位范围完整覆盖所关注的范围（0至数弧度）。如图所示，相位恢复结果中的残余光晕和阴影消退伪影极少。值得注意的是，该模型和

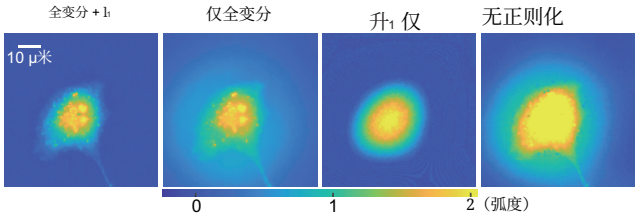

图4. 不同正则化条件下PR-ZPM图像的比较。最左侧第一幅图像是同时采用全变分和 ℓ_1 范数得到的结果，如图3第一行所示。第二幅和第三幅图像分别是仅采用全变分和仅采用 ℓ_1 范数得到的结果。第四幅图像是不采用全变分或 ℓ_1 范数得到的结果。

算法参数对于所有细胞图像的相位恢复均保持不变。

我们将PR-ZPM图像与使用自制DH系统独立采集的定量相位图像进行了比较。该DH系统基于共光路宽带衍射相位显微技术 [16]，，配备用于照明的532纳米激光器、物镜（LUC-PLFLN40X，40×/0.6），以及与ZPM系统中所用相同的图像传感器。DH图像的半节距空间分辨率为440纳米。关于DH系统的详情见我们近期的研究 [17]。如图3所示，所有DH图像的相位值均介于0至约2弧度之间，远超弱相位范围。图3最右侧一列显示了PR-ZPM图像与DH图像之间的绝对差。相位恢复中用于初始猜测的细胞轮廓所界定的细胞内区域内，差值图像的标准差从上至下分别为0.18、0.25、0.25和0.16弧度。这些较小的残差验证了我们基于无近似模型的单图像相位恢复算法具有定量性。

为评估正则化的效果，我们比较了采用不同正则化方法获得的相位恢复结果。图4展示了以下结果：分别采用全变分和 ℓ_1 范数、仅采用全变分、仅采用ℓ_1范数，以及两者均未采用。结果表明，全变分有助于重建细胞的形态结构，而ℓ_1 范数能够抑制背景噪声。全变分和ℓ_1 范数在相位恢复过程中发挥了协同作用。与图3中的DH图像相比，细胞内区域绝对差值的标准差分别为0.18、0.47、0.43和1.11 rad。

最后，我们讨论图3中PR-ZPM与DH图像之间残余相位差异的可能原因。尽管我们已调整PR-ZPM图像的像素间距，使其与DH图像的像素间距一致，但两个系统之间空间分辨率的不匹配仍可能在一定程度上导致残余差异。另一个影响因素可能是DH测量中的空间相位噪声，其主要来源于激光照明引起的相干噪声。我们评估了DH图像中不存在样品区域的空间相位噪声标准差，发现其数值范围为0.02至0.04 rad，低于实际观测到的残余相位差异。因此，我们认为残余差异的主要原因是模型误差，而通过更加精确地确定系统参数，有望减小这一误差。

总之，我们开发了一种数值相位恢复方法，可在 π 的无歧义相位范围内实现定量 ZPM，并成功将该方法应用于单细胞成像。通过进一步降低模型误差，有望实现更精确的相位恢复。由于我们的方法无需进行硬件改造即可应用于任何现有的 ZPM 系统，因此有望为 QPI 的广泛应用开辟道路。

本研究得到日本学术振兴会（JP20H02657、JP20K05361、JP20H05890、JP20H00125、JP23H01874、JP23H00273）、旭硝子财团、光科学与技术研究财团、中谷财团、UTEC-UTokyo FSI Research Grant 以及 UTokyo IXT Project Support Program 的资助。

[1] F. Zernike，《我如何发现相位衬度》，Science 121，345（1955）。[2] S. A. Johnson，《相位衬度显微镜》，载于 *Biomedi-cal Optical Phase Microscopy and Nanoscopy*（Elsevier，牛津，2013），第 3–18 页。[3] J. W. Goodman，《 *Introduction to Fourier Optics* 》（McGraw-Hill，1996）。[4] Y. Park、C. Depeursinge 和 G. Popescu，《生物医学中的定量相位成像》，Nature Photonics 12，578（2018）。[5] T. L. Nguyen、S. Pradeep、R. L. Judson-Torres、J. Reed、M. A. Teitell 和 T. A. Zangle，《定量相位成像：生物医学领域的最新进展与不断扩大的潜力》，ACS Nano 16，11516（2022）。

[6]Z. Yin、T. Kanade 和 M. Chen，《理解相位衬度光学以复原无伪影的显微图像用于分割》，《医学图像分析》16，1047，2012。[7] T. H. Nguyen、M. Kandel、H. M. Shakir、C. Best-Popescu、J. Arikkath、M. N. Do 和 G. Popescu，《无光晕相位衬度显微术》，《科学报告》7，44034，2017。[8] C. Holzner、M. Feser、S. Vogt、B. Hornberger、S. B. Baines 和 C. Jacobsen，《X射线扫描显微术中的泽尼克相位衬度》，《自然物理学》6，883（2010）。[9] R. Danev 和 K. Nagayama，《使用泽尼克相位板的透射电子显微术》，《超显微术》88，

243（2001）。[10] R. Horisaki、T. Aoki、Y. Nishizaki、A. R¨ohm、N. Chauvet、J. Tanida 和 M. Naruse，《相干压缩传播》，《光学快报》47，613（2022）。[11] D. P. Kingma 和 J. Ba，《Adam：一种随机优化方法》，国际学习表征会议（ICLR）（2015）。[12] S. H. Chan、X. Wang 和 O. A. Elgendy，《用于图像复原的即插即用交替方向乘子法：不动点收敛及其应用》，IEEE计算成像汇刊3，84（2017）。[13] L. I. Rudin、S. Osher 和 E. Fatemi，《基于非线性全变分的去噪算法》，《物理学D辑》60，259，1992。

[14] E. J. Candes、M. B. Wakin 和 S. P. Boyd，《通过重新加权 ℓ_1 最小化增强稀疏性》，《傅里叶分析与应用杂志》14，877（2007）。[15] R. C. Gonzalez 和 R. E. Woods，《形态学图像处理》，载于 *Digital Image Processing*（培生，2018），第 635–698 页。[16] B. Bhaduri、H. Pham、M. Mir 和 G. Popescu，《白光衍射相位显微术》，《光学快报》37，1094（2012）。[17] G. Ishigane、K. Toda、M. Tamamitsu、H. Shimada、V. R. Badarla 和 T. Ideguchi，《超越视频速率的中红外光热活体单细胞成像》，arXiv 预印本，2208.11969（2022），arXiv:2208.11969。