

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 26 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23656308

研究課題名（和文）微分干渉顕微鏡を用いた微生物周りの3次元流れ場計測法の開発

研究課題名（英文）Development of measurement techniques of three dimensional velocity around a microbe by using a differential interference contrast microscope

研究代表者 竹原幸生（TAKEHARA KOHSEI）

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：50216933

研究成果の概要（和文）： 微生物回りの流れ場計測のために微分干渉顕微鏡を用いた3次元PTV計測法の開発を行った。3次元PTV計測法の原理として、焦点面からのズレによる粒子画像の変化の特徴を計測し、奥行き方向の位置を計測する方法を提案した。ピンボケにより粒子画像にリング状の干渉縞が生じ、それがピント面からのズレに応じて線形的に変化すること明らかとなった。提案した計測手法を用いて、粒径 $0.983\mu\text{m}$ のポリスチレン粒子を用いて水中でのブラウン運動を計測し、理論値と比較した。

研究成果の概要（英文）： To measure velocity distributions around a microbe, the three dimensional Particle Tracking Velocimetry (3D PTV) with a Differential interference contrast (DIC) microscope has been developed. In this method, the properties of out-of-focus image of particle are used for estimation of distance from particle to focal plane. In the out-of-focus image of particle, a ring like image is generated around the center of the particle image and the diameter of the ring like image increases with the distance from the particle to focus plane. Experimental results show that the diameter of the ring like image is proportional to the distance from a particle to the focal plane.

The proposed method has been applied to measurements of the Brownian motion of a particle in water. The Results show a good agreement with the theoretical prediction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・水工学

キーワード：微分干渉顕微鏡，粒子画像速度計測法，3次元計測

1. 研究開始当初の背景

水域の環境を考える上では、プランクトン等の水中微生物の挙動が重要な因子となる。そのため、これまで現地観測により微生物の分布やその経時変化等が計測されてきた。微

生物の挙動を理解する上では、そのようなマクロの特性を理解すると同時に個々の微生物の挙動の理解も必要となってくる。流れによる移流のみではなく、微生物自身も自らの運動により移動することができ、群衆を形成

したりする。そのような微生物個体の運動に関しては未だ不明な点が多く、解明が強く望まれている。

微生物の挙動を観察するのに最も適しているのは顕微鏡である。特に微生物は透明な体をしたものが多く、通常の見視野顕微鏡では微生物を明確に観察するのは困難である。その問題を解決するものとして微分干渉顕微鏡がある。微分干渉顕微鏡では、透明な物体でも輪郭を明瞭に観察することがきる。

また、顕微鏡下での運動を画像により計測する場合、拡大して撮影しているため、ゆっくりした運動でも画像上では高速な運動になってしまい、通常のビデオカメラでは計測が困難である。申請者はこれまで高速ビデオカメラの開発に加わり、既に100万枚/秒の高速カメラを開発している。さらに、高速ビデオカメラを用いる際に問題となる光量不足を解決した微分干渉顕微鏡も既に開発している。

微分干渉顕微鏡画像の例として写真-1(研究



写真-1 原画像

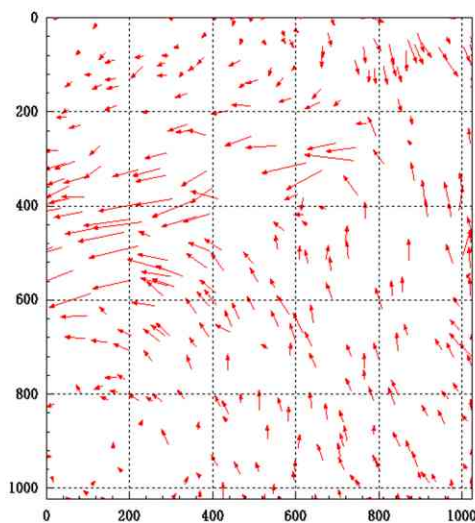


図-1 PTV結果

代表者所有の微分干渉顕微鏡と同型のもを使用して理化学研究所の河野弘幸氏が撮影)にクリプトモナスの微分干渉画像を示す。クリプトモナス自身は焦点面から少しずれた位置にいるため、ボケた画像となっているが、形状は明確に認識できる。画像中に写っている多数の点はトレーサー粒子である。図-1は申請者が開発したPTVによりクリプトモナスが噴流を出して移動する瞬間をトレーサー粒子の動きから2次元流れ場を計測したものである。クリプトモナスの噴流による周囲の流れ場が計測できているが、実際は3次元の流れ場であり、挙動の詳細な理解には流れ場の3次元計測が必要となる。

2. 研究の目的

本研究では、微生物周辺流体の3次元の動きの計測から微生物の運動を把握することを目的とする。流れ場の計測として粒子追跡流速測定法(PTV)を用いることを想定している。そこで微分干渉顕微鏡下でのピンぼけによる粒子画像変化を利用した粒子3次元位置計測法を開発することを目的としている。

微生物の運動により周辺に流れが生じトレーサー粒子が3次元的に移動する。トレーサー粒子の奥行き方向の移動によって粒子画像に輝度分布の変化、つまりピンボケが生じる。この粒子画像の輝度分布の変化を利用して粒子の3次元位置を推定する。微分干渉顕微鏡下の粒子画像はピンぼけにより粒子の外縁部分で円形の輝度が高い部分が現れ、リングのように見える(エアリ回折パターン)。焦点面からの粒子位置のズレが大きくなると、円形リングが広がっていくという特徴が見られた。ピンぼけの影響によるリングサイズの変化に規則性があれば、3次元位置計測に関する奥行き方向の指標になる可能性がある。

3. 研究の方法

(1)微分顕微鏡下の粒子画像の特徴抽出

実験で用いる微分干渉顕微鏡は、光路上に2つのノマルスキープリズムと呼ばれる特殊な光学素子と偏光板(アナライザー、ポラライザー)を組み込んだ顕微鏡である。微分干渉顕微鏡ではノマルスキープリズムにより、1本の光をわずかに離れた平行な2つの光とし、無色透明な物体に通過させ、その後2つの光を干渉させ、無色透明な物体に明暗のコントラストをつけて観察をすることができる。透明に近い微生物の挙動を把握することを想定して本研究では微分干渉顕微鏡を使用する。

実験においては微分干渉顕微鏡下で水中での粒子の奥行き方向の位置を正確に制御するのは困難であるため、プレパラートガラス

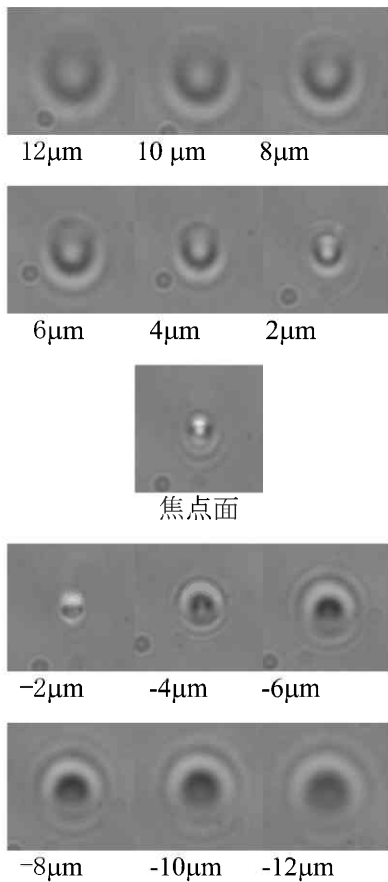


写真-2 焦点面からズレによる
粒子画像の変化

面に付着した静止している粒子に対して対物レンズの位置を移動させることにより焦点面からの位置を変化させた。

まず、蒸留水 25ml を入れたビーカーに直径 $0.983 \mu\text{m}$ の粒子群を一滴分散させる。その粒子を分散させた水を少量プレパラート上に乗せ、静止した粒子を撮影するため、30分ほど放置し、粒子撮影を行った。目視により微分干渉顕微鏡を用いて、粒子の縁がはっきりと観察できる位置を焦点位置 ($z=0 \mu\text{m}$) と決める。焦点面に対して対物レンズを $2 \mu\text{m}$ 間隔で上下方向に移動させ、粒子画像を撮影した。 $z=-12\mu\text{m} \sim 12\mu\text{m}$ の範囲の全 13 枚の粒子画像から微分干渉顕微鏡下における 3 次元位置の推定する方法を検討する。撮影した粒子画像の例を写真-2 に示す。

写真-2 中の数字は焦点面から粒子位置までの距離であり、+が上側、-が下側を意味している。写真-2 より分かるように粒子画像の周辺には光学的干渉によりリング状の画像が生じているのがわかる。また、焦点面から距離が大きくなるにつれて、そのリングの大きさ(半径)は大きくなっていることがわかる。

リング状画像の大きさから焦点面から粒子までの距離は求めることができるが、粒子

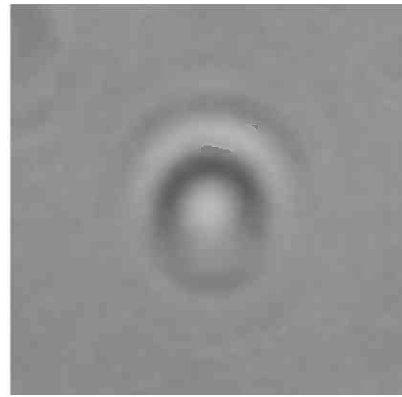


図-2 元画像

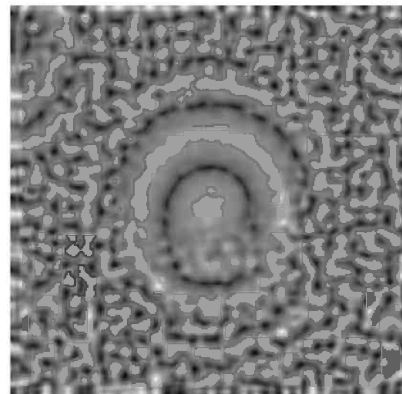


図-3 相関画像

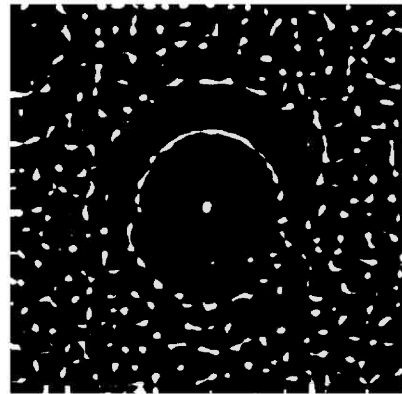


図-4 2階調化画像

が焦点面より上にあるか、下にあるかは判断できない。写真-2 より焦点面より粒子が上方にあるとき、粒子画像の中心輝度は高く(周囲に比べて明るい)、焦点面より粒子が下方にある場合は粒子画像の中心輝度が低い(周囲に比べて暗い)ことがわかる。

以上の結果により、粒子画像のリング形状の大きさと焦点面からの距離の関係を明らかにし、さらに中心の輝度と粒子位置と焦点面の位置関係を明らかにできれば、粒子の奥行き方向の位置を求めることができる。

(3) 画像処理による特徴量の抽出法

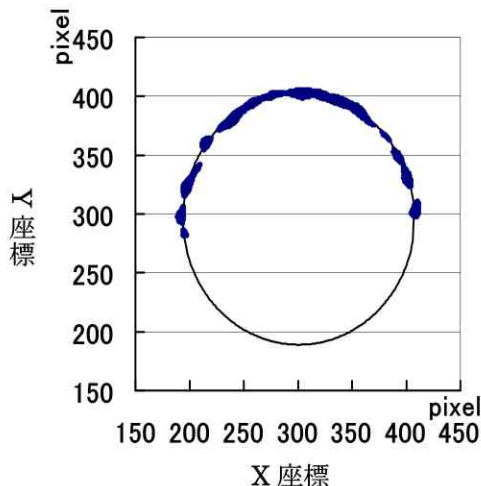


図-5 最小自乗法によるリング形状への円のフィッティング

元画像におけるリング形状をより明確にするため、研究代表者が開発した粒子マスク法を用いた。粒子マスクとは、粒子画像の中心輝度が大きく周辺が暗い山の形をした輝度分布をしており、これを二次元正規分布で近似した輝度パターンの中で、PTV用の粒子画像抽出のために研究代表者が開発した手法である。この方法により求めた相関画像からリング形状を計測することとした。粒子マスク法による一連の画像処理の例を図-2から図-4に示す。

図-2には微分干渉顕微鏡を用いた1つの粒子画像を取り上げたものを示している。図-2より分かるようにリング状画像を認識すること出来るが形状を計測するにはより明瞭かする必要がある。図-3は図-2の元画像に粒子マスク相関を適用した画像（相関画像）を示す。元画像（図-2）に比べ、マスク相関画像の方がより明確にリング形状を認識できることがわかる。今回はリングの輪郭が最も明瞭になったのは、粒子マスク法におけるマスクサイズが10pixelのときであった。

リング部分の画像のみを抽出するため、マスク相関画像を2階調化した。図-4は相関係数の閾値を0.4とした画像である。この得られた2値化画像から図-4のようにリングの一部を取り出すことが可能になった。図-4より分かるように、リング形状の上半分と下半分では連続性がないように見られる。よって、本研究ではリング形状が明瞭な上半分の情報を用いてリングサイズを計測することとした。

図-5に図-4より求めた2階調化した画像からリング画像の部分だけを取り出した図を示している。リング画像の上半分の情報からリングのサイズおよび中心位置を計測する。具体的には図-4のように抽出したリング上半分のみデータに対して最小自乗法によ

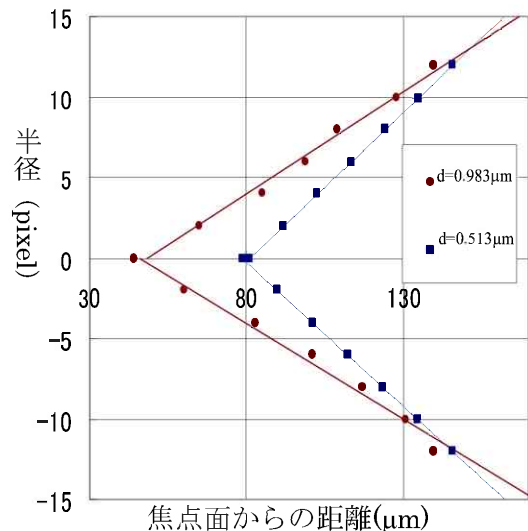


図-6 画像処理により求めたリング半径と粒子位置の焦点面からの距離

り円の方程式を当てはめ、リングの半径・中心位置を求めた。最小自乗法としてはPowell法を用いた。図-5中に実線で示した曲線が当てはめた円の結果である。

4. 研究成果

(1) リングサイズと粒子位置の関係

図-6に粒子のリングサイズの半径 (pixel) とピント位置から粒子位置のズレ (μm) の関係を示す。実験には直径 $0.983\mu\text{m}$ と $0.513\mu\text{m}$ の2種類の粒子を用いた。図-5より、いずれの粒子に対しても焦点面から距離に比例してリングサイズが大きくなるのがわかる。リングサイズを測定することで、焦点面からの粒子位置の距離を計測することができることがわかった。リングの半径を $r(\text{pixel})$ 、焦点面から粒子位置までの距離 $z(\mu\text{m})$ とすると実験により求められた関係式は以下ようになった。

(粒子径 $0.983\mu\text{m}$ の場合)

$$z = 0.127r - 6.110 \quad (\text{焦点面より上方})$$

$$z = -0.119r + 5.499 \quad (\text{焦点面より下方})$$

(粒子径 $0.513\mu\text{m}$ の場合)

$$z = 0.185r - 14.96 \quad (\text{焦点面より上方})$$

$$z = -0.180r + 14.17 \quad (\text{焦点面より下方})$$

上式より、いずれの粒子径に対しても焦点面の上下におけるリングサイズの増加に対する焦点面から距離の増加率はほぼ同程度であることがわかった。また、粒子径が小さくなればその増加率が大きくなり、計測精度がよくなることがわかる。しかし、写真-2からも分かるように、リングサイズが大きくなる

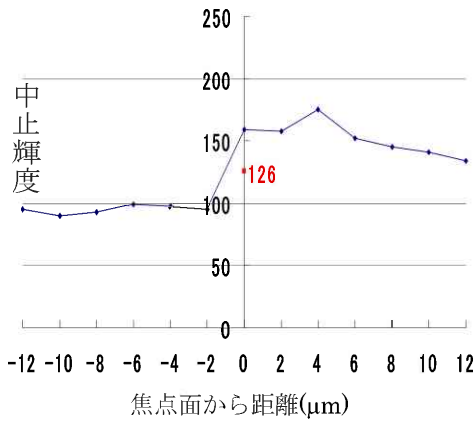


図-7 粒子位置と中心輝度の関係

とリング画像が徐々に不明瞭になり、計測が困難となる。つまり、奥行き方向の計測範囲が狭くなる。

粒子径 $0.983\mu\text{m}$ の場合について、求めたリング半径と焦点面からの距離の関係式と実測値との誤差の自乗平均平方根値を求めた。得られた結果は焦点面からの距離がマイナス方向(上方)で $0.44\mu\text{m}$ 、プラス方向(下方)で $0.37\mu\text{m}$ であった。

(2) 粒子位置の焦点面に対する上下関係

図-6より、粒子が焦点面からどの程度離れているかは計測できるが、粒子位置が焦点面より上か下かは判断できない。写真-2の観察の結果より、粒子が焦点面より上方に位置するとき、粒子画像の中心が明るくなり、焦点面より下方ならば中心が暗くなるという特徴が観察された。

画像処理により求めた中心位置を用いて、輝度を求めた。図-7に結果を示す。粒子が存在しない領域、つまり背景の平均輝度は126であった。焦点面より粒子が下方にあるとき、中心輝度は背景輝度126より小さく、90から100付近となる。それに対して、焦点面より粒子が上方にあるとき、中心輝度は背景輝度126より大きく、 $z=4\mu\text{m}$ で最大値をとり、徐々に減少していく。

以上の結果より、背景輝度を境にしてピント面より上方か下方を判断できる。

(3) 適用例

リングサイズ(半径)と中心輝度を計測することに粒子の奥行き方向の位置を計測できることが分かった。平面方向の位置は円の中心位置により求めることができ、粒子の3次元位置を求めることができる。開発した手法をブラウン運動の計測に適用した。微小な粒子は、水中でブラウン運動によって不規則に動いている。粒子のブラウン運動を3秒毎に5分間撮影して粒子3次元位置計測を行うことにした。

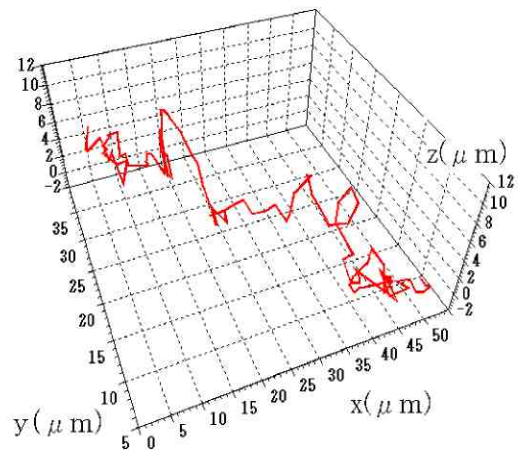


図-8 粒子の移動経路

図-8に、提案した手法を用いて求めた3秒毎の粒子の3次元位置を線で結んだ粒子の移動経路を示している。粒子の挙動には規則性がみられず、ブラウン運動の特徴と合致している。

ブラウン運動は温度、水の粘性、粒子径、時間によって決まる。時間 $t(\text{sec})$ の間に微小粒子の移動距離 x の自乗平均値は以下の式で表される。

$$\overline{x^2} = \frac{kTt}{3\pi\eta a}$$

ここで、 k はボルツマン係数、 T は絶対温度(K)、 t は時間間隔(sec)、 η は水の粘性係数(Pa/sec)、 a は粒子の直径である。今回の実験では粒子径 $0.983\mu\text{m}$ の粒子を用いており、水温は 18°C であり、時間間隔は 3.0 sec であった。この条件から上式を用いて求めた移動距離の自乗平均値は $\overline{x^2}=0.90(\mu\text{m}^2)$ となった。

実験では3秒間隔で5分間の計測で得られた100個のデータを用いて、3秒間の移動距離の自乗平均値を求めた。画像平面方向の x 方向、および y 方向の移動平均距離はそれぞれ、 $0.965\mu\text{m}$ 、 $1.03\mu\text{m}$ となり、理論値とほぼ同程度となった。それに対して、奥行き方向である z 方向に関しては $1.99\mu\text{m}$ となり、約2倍程度となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計2件)

- ① Kohsei Takehara, Recent developments of PTV techniques(Invited lecture), King Abdullah University of Science and

Technology, Mechanical Engineering
Seminars, 2013.3.27(サウジアラビア)

- ② 竹原幸生, 西田学, 仲井孝史, 微分干渉
顕微鏡を用いた顕微鏡下の3次元粒子位
置の計測法, 平成24年度土木学会関西支
部年次学術講演会, 平成24年6月9日
(神戸市)

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹原幸生 (TAKEHARA KOHSEI)
近畿大学・理工学部・教授
研究者番号: 50216933

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし