

## 画像上の多粒子の自動追跡ソフトウェアの効率化

報告者 大学院総合理工学研究科 環境系工学専攻 准教授 竹原幸生  
共同研究者 総合理工学研究科 東大阪モノづくり専攻 教授 江藤剛治  
工学部社会環境工学科 講師 沖中知雄  
大学院総合理工学研究科 シニアサイエンティスト 田中厚夫  
関西電力株式会社 久末信幸

### 1. 背景

研究代表者は流れ場の画像計測のため、多数のトレーサー粒子(1000×1000 画素の画像で約 10,000 個)を自動的に追跡して流速場を計測できる粒子追跡速度計測法 (Particle Tracking Velocimetry; PTV) を開発した。自動粒子追跡アルゴリズムとして、カルマンフィルターによる次時刻の粒子情報の予測、 $\chi^2$ 乗検定による同一粒子の対応付け、の2つ要素からなり、統計・確率学的な基礎に基づいており、計測精度は現在提案されている方法の中でもトップクラスと世界的に評価されている。

最近、バイオイメージング分野においても、細胞等の試料に蛍光粒子等マーカー付着させ、その動きを顕微鏡下で画像計測し、様々な機能の解明する計測技術が進んでいる。しかし、画像計測における粒子の移動は現在人間の手で行っているのが現状である。本申請で提案する手法が開発されれば、人間の手で行って数日かかる作業が数十分程度と極端に短縮することができる。さらに近畿大学で開発された超高速ビデオカメラと組み合わせると、これまで知られていない様々現象を明らかにすることが出来き、この分野の研究に大きな影響を与えるものと思われる。

### 2. 目的

現状では、本研究室で開発したカルマンフィルターと $\chi^2$ 検定法を用いた自動粒子追跡プログラム (KC 法) は、いくつかのパラメータ設定が必要となり、一般の研究者には使用しづらいものとなっている。また、得られた結果から流体運動の特性量を抽出する効率的な方法がなかった。本研究では、近畿大学で開発した自動粒子追跡ソフトの効率化のために、以下のような事項に関して開発を行った。

1. 自動粒子追跡速度計測法の1つである KC 法におけるカルマンフィルターで用いられる誤差項の自動設定法の開発
2. 微分干渉顕微鏡により微小空間内の粒子の3次元位置計測法の検討

### 3. 研究組織

#### [近畿大学]

研究代表者	社会環境工学科・准教授・竹原幸生	研究総括
共同研究者	社会環境工学科・教授・江藤剛治	高速ビデオカメラの開発
共同研究者	電気電子工学科・講師・沖中知雄	固体材料への画像計測の適用
共同研究者	シニアサイエンティスト・田中厚夫	微分干渉顕微鏡による粒子画像のシミュレーション法の開発

#### [学外]

共同研究者	関西電力株式会社	・久末 信幸	可視化実験, 数値シミュレーション
-------	----------	--------	-------------------

### 4. 研究方法

#### 4.1 KC 法におけるカルマンフィルターで用いられる誤差項の自動設定法の開発

カルマンフィルターにおける状態方程式および観測方程式の誤差項を評価する必要がある。現時点では、予想される誤差量を一定値として予測を行っているが、この誤差項を時々刻々と計測値から評価できればより高精度に粒子情報をカルマンフィルターにより予測できる。最適な誤差項の評価のために、計測結果をある領域ごとに分割して、統計量を求める方法を考える。領域を分割する際、計測値の個数により誤差の推定精度が変化する。分割領域内の粒子数が少なすぎるとデータ数が少ないため、誤差成分の影響を強く受ける。逆に分割領域を大きく取りすぎると、誤差分布が均一化され、局所的な誤差分布がわからなくなる。いかに分割領域を決定すれば、より最適な誤差分布を推定できるかの判定基準をシミュレーションにより求めた。

以下にシミュレーション手順を示す。

- ① 第 1 時刻の粒子位置を定める。1000×1000pixel 四方の範囲の中に粒子が均一に分布するように一様乱数で粒子位置を決定する。今回、粒子数を 1000, 5000, 10000 個の 3 パターン作成する。
- ② 各粒子の移動量を定める。それぞれの粒子は 1 時刻に x 方向に 10pixel, y 方向に 0pixel 移動することとする。
- ③ 移動量の x 成分, y 成分に標準偏差 1.0pixel の正規乱数を発生させ、誤差として加える。
- ④ 第 1 時刻の粒子位置から、③の移動量分進んだ粒子位置を第 2 時刻の粒子位置とする。第 2 時刻での移動量も②, ③と同様にして与える。
- ⑤ 第 20 時刻まで同様にして作成する。

画像中の誤差の統計を取るために、画像を 2×2, 3×3, 4×4, 5×5 に分割し、その領域

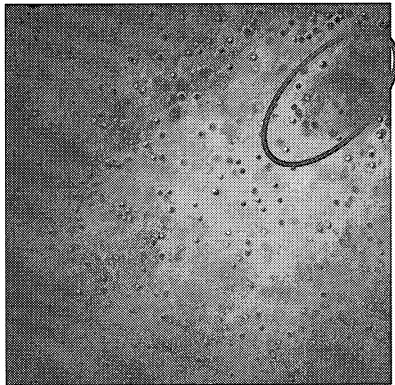


図-2 クリプトモナスの遊泳の高速撮影

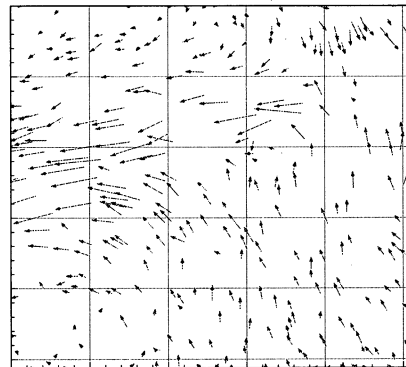


図-3 PTV結果

内の粒子情報に対して統計量をとる．分割したそれぞれの区域における予測値と実測値の誤差の標準偏差と区域内の粒子数を求めた．

#### 4.2 微分干渉顕微鏡により微小空間内の粒子の3次元位置計測法の検討

微小領域下での流れ場の三次元計測を，微分干渉顕微鏡下での画像のピント変化を利用して，三次元計測をする手法について検討した．まず理化学研究所の河野氏が撮影した微生物クリプトモナスの運動を，高速撮影した例を図-2 に示す．楕円中の部分がクリプトモナスである．クリプトモナスが水を噴出し，移動している様子を 2000 コマ/秒で高速撮影している．水中には直径  $0.356\mu\text{m}$  のポリスチレンビーズをトレーサー粒子として入れ込んである．

本研究室で開発された KC を用いて，流れ場を計測した結果の例を図-3 に示す．二次元平面での流速分布が明瞭に計測出来ているのが分かる．微分干渉顕微鏡のピントが合う面は非常に薄いため，ピント面から観察する標本が数  $\mu\text{m}$  移動するだけで見え方が異なる．この特徴を利用して三次元計測の可能性を検討する．

標本の輝度変化を利用し，微分干渉顕微鏡のピント面に対して，粒子が奥行き方向のどの位置にあるか把握することを目的として実験を行った．実験には河野氏が使用した顕微鏡システムと同様のものを用いて，CCD カメラ (Kodak Professional DCS760) で撮影した．撮影した画像の輝度分布を分類し，標本の三次元位置の推定法を検討する．河野氏の撮影環境と同様にするため顕微鏡に 60 倍の対物レンズを装着し，直径  $0.356\mu\text{m}$  の粒子を使用した．

実験では粒子を水で薄めガラスプレパラート上で観察した．計測にはガラス面に固定した粒子を撮影した．ピントを変化させ，再度ピントを元の位置に戻した際，元の粒子画像が得られることを確認した．撮影は  $2\mu\text{m}$  ごとにレンズを粒子に近づけながら合計 26 枚撮影した．26 枚目に撮影した画像を  $0\mu\text{m}$  として，基準とした．最大  $50\mu\text{m}$  のレンズ光軸方向のデータを取ることが出来た．

また，シミュレーションにより微分干渉顕微鏡により得られる画像の輝度分布を求める

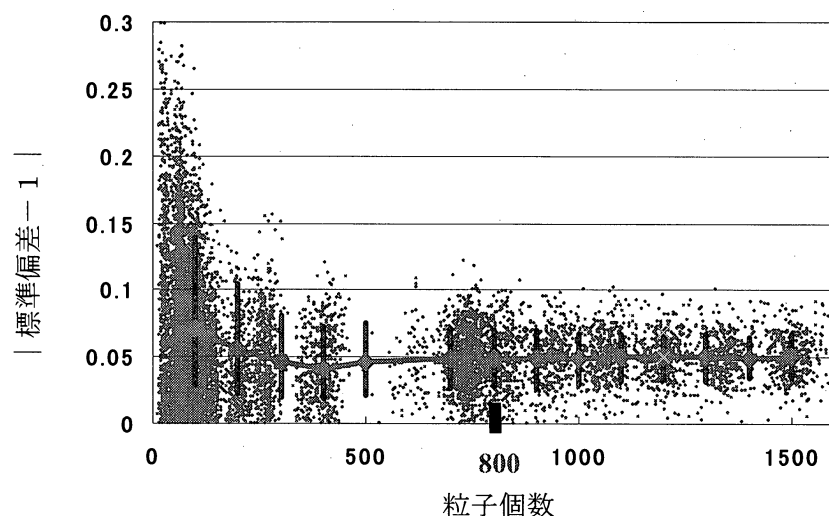


図-4 領域内の粒子数と誤差の分状態

ことにより、実測値との比較により 3 次元位置を正確計測することができる。今回は微分干渉顕微鏡により得られる画像の輝度分布をシミュレーションにより求める方法を開発した。

## 5. 研究成果

### 5.1 KC 法におけるカルマンフィルターで用いられる誤差項の評価

領域内の粒子数と予測誤差の標準偏差の関係を図-4 に示す。図より粒子数が増えるにつれ標準偏差のばらつきは小さくなっている。粒子数 600~1000 辺りから標準偏差のばらつきは一定となっている。

標準偏差のばらつきがほぼ一定となる最小の粒子数が最適の分割領域とする。粒子数を 100 毎で区切り、それぞれの区間に含まれるデータを平均した結果を図中に曲線で示す。最初右下がりに変化していた点が、800 を超えた辺りで一定の値を保つようになっている。このことから、一つの領域内に 800 個程度の粒子が含まれるように設定すれば最適な誤差分布を推定できると考えられる。

### 5.2 微分干渉顕微鏡におけるピントの変化による撮影画像の分類

撮影画像の例を図-5 に示す。撮影した画像の中で粒子外周部分の輝度が高く、はっきり見える画像をピントが合っている画像として選び、基準とした。基準とした粒子を図-5 (A) に示す。図-5 (A) より粒子の三次元方向位置を画像の特徴から分類する。

(ピント面より上方にある場合) 図-5 (B) にピント面から 6 $\mu\text{m}$  上方にある粒子画像を示す。図-5 (A) と比較すると二つの異なる特徴が分かった。①粒子外周部分の輝度が低く、粒子の輪郭を明確に見ることができない点。②図-5 (A) では一重の黒い輪が、図-5 (B)

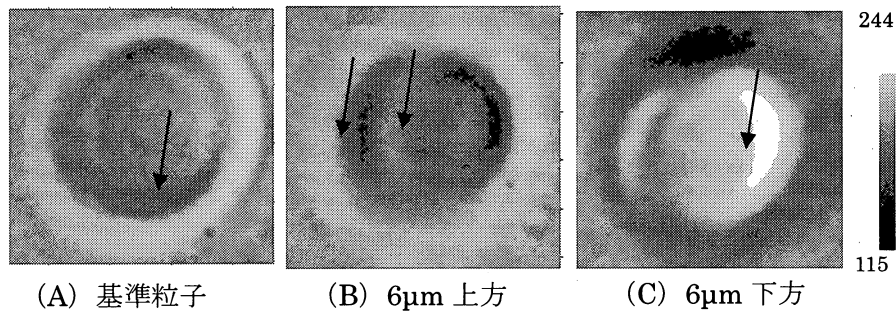


図-5 微分干渉顕微鏡の撮影粒子画像

では輪が二重に見える点である（図-5 (B) 内の矢印で示す）。また上方からピント面に近づくとつれて、粒子の輪郭がはっきりと表れ、粒子の中心付近にある黒い曲線が外側の黒い曲線に近づく様子が分かった。

（ピント面より下方にある場合）図-5 (C) にピント面から  $6\mu\text{m}$  下方にある粒子画像を示す。図-5 (A) と比較すると、輝度の低い部分が高い部分を取り囲んでいる。ピント面から下方に離れるにつれて、輝度の高い部分、低い部分が逆転し、粒子中心の輝度が高くなっていくことが分かった。（図-5 (C) 内の矢印で示す）

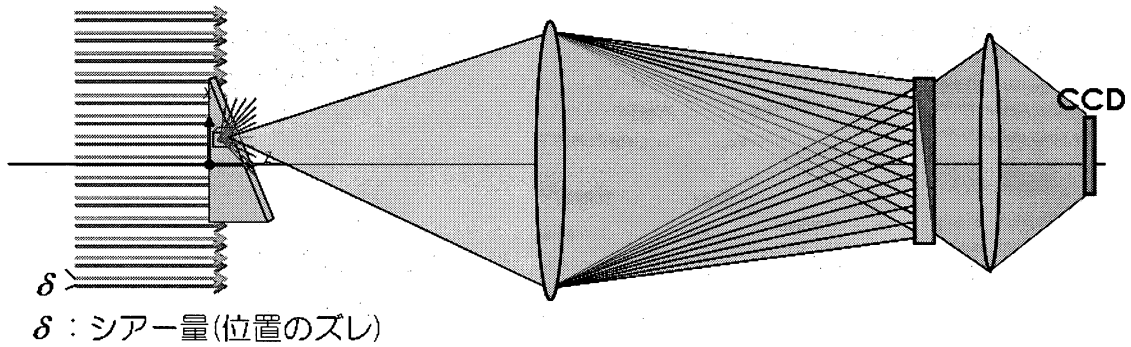
これらの特徴からピント面に対して、粒子が上下どちらにあるか区別できる点と奥行きによって輝度に変化していくことから指標を作成できる点分かった。よって粒子の三次元位置を把握できる可能性がある。

また同時に、微分干渉顕微鏡下での粒子画像のシミュレーション法の開発を行った。図-6 に今回行ったシミュレーションの概念図を示す。シミュレーション法は以下のとおりである。

- 1) 屈折率分布を関数分解（Wavelet 関数等の活用）して近似。  
関数の重み係数をパラメータとして与えて屈折率分布を仮説
- 2) 測定対象(仮説)の各点からのレイトレースで結像シミュレート
- 3) シミュレート像と現実の DICM 画像との誤差がより小さくなるようなパラメータを次々に探していく（階層的な探索）。

今回は簡単な試料のモデルとして、屈折率 1.4 の三角形（2 次元モデル）を用いて、開発言語 LabVIEW によるシミュレーションの枠組み・方式を構築した。

得られた結果を図-7 に示す。微分干渉顕微鏡では透明三角形体が存在する場所で輝度変化が生じる。図-7 中の輝度が高くなっているところが三角形の透明体が存在するところである。2 次元モデルでは様々な形状のものを計測対象領域にセットすれば微分干渉顕微鏡によって得られる画像をシミュレートできる。



**伝達関数**

$$K_{z_{i1}}(x_{img}, y_{img}; x, y, z) = \frac{1}{i\lambda} \int \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{r_o z_i} \exp(ik[n_{obj}r_o - \frac{1}{2f}(\xi^2 + \zeta^2) + \frac{1}{2z_i}((x_{img} - \xi)^2 + (y_{img} - \zeta)^2)]) d\xi d\zeta$$

exp ik [ ]

- 第1項) 試料媒体内の点源から表面での屈折を経てレンズに至る  
光学的距離に相当する位相差
- 第2項) レンズを通過する際に生じる位相差
- 第3項) レンズから像点までの距離に相当する位相差

図-6 微分干渉顕微鏡下での画像シミュレーション法の概念図

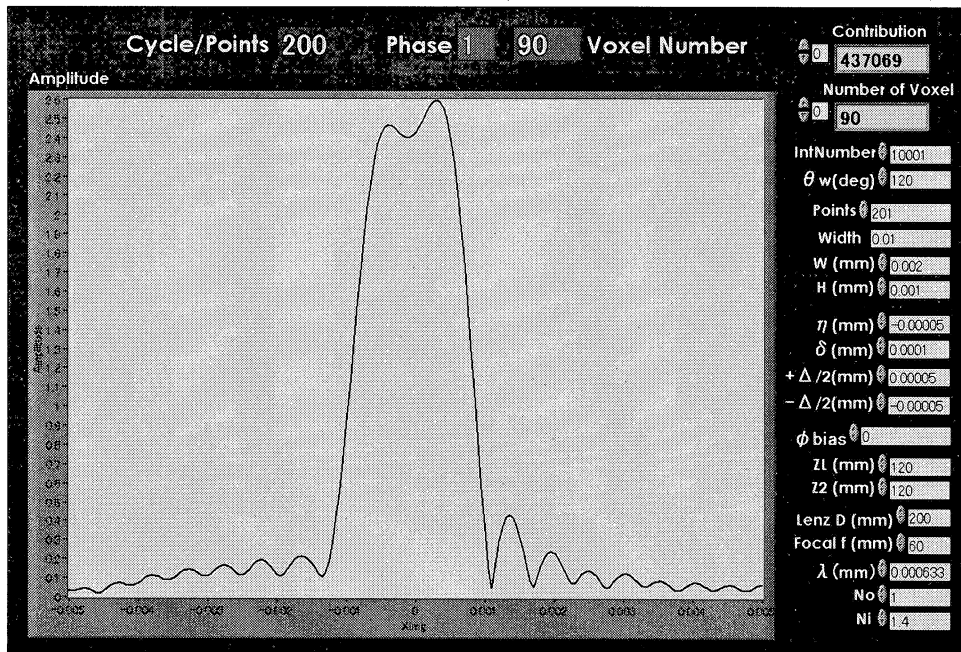


図-8 シミュレーションにより得られた微分干渉顕微鏡により得られる  
画像の輝度分布

## 6. 今後の展開

本研究室で開発したカルマンフィルターと $\chi^2$  検定法を用いた自動粒子追跡プログラム (KC 法) は, いくつかのパラメータ設定が必要となり, 一般の研究者には使用しづらいものとなっている. また, 得られた結果から流体運動の特性量を抽出する効率的な方法がなかった. 本研究では, 近畿大学で開発した自動粒子追跡ソフトの効率化のために開発を行った. 得られた結果と今後の展開を以下に示す.

1. 自動粒子追跡速度計測法の 1 つである KC 法におけるカルマンフィルターで用いられる誤差項の評価法について検討を行った. 粒子数が 800 個以上になるように領域を設定して誤差項を評価すればよいことが分かった. 今後, 時々刻々の誤差を評価するプログラムを KC 法に組み込み, より高精度な粒子追跡ができる
2. 微分干渉顕微鏡により微小空間内の粒子の 3 次元位置計測法の検討を行い, ボケによる 3 次元計測の可能性を示した. また, シミュレーションに微分干渉顕微鏡下での画像を作成するプログラムを作成した. 今後, シミュレーションと組み合わせて, 高精度に粒子位置を計測できる手法を開発する.