

近畿大学理工学部 正会員 ○竹原 幸生
近畿大学理工学部 西田 学
近畿大学理工学部 仲井 孝史

1. はじめに

水環境を考える上で水中での微生物の挙動を把握することは重要である。赤潮、アオコなどの微生物が起因となる現象の解明につながる可能性がある。また、微生物の挙動がどのようにして流れ場から効率的に駆動力を得ているか等の知見は水環境だけでなく様々な工学分野で活用される可能性がある。しかし、微生物の挙動は高速で三次元運動をしているため、その微生物の運動を正確に計測することは困難である。

本研究では、微生物周辺流体の三次元的な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三次元位置計測法を開発することを目的としている。

2. 微分干渉顕微鏡下の3次元粒子計測法の概要

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三次元的に移動する。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三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）。ピント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。ピンボケの影響によるリングサイズの変化に規則性があれば、三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. 粒子の三次元位置による画像変化の実験

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、静止した粒子に対して対物レンズの位置を移動させることにした。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、粒子撮影を行う。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ピント位置 ($z=0 \mu\text{m}$) と決める。ピント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。全 13 枚の元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図-1 に示す。

元画像におけるリング形状をより明確にするため、粒子マスクとの関連画像からリング形状を計測することとした。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ことで、PTV 用の粒子画像抽出のために本研究室で開発された手法である。図-2 は図-1 の元画像に粒子マスク相関を適用した画像を示す。元画像（図-1）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マスクサイズは 10pixel であった。

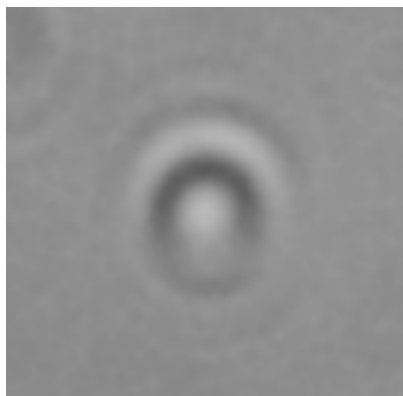


図-1 元画像

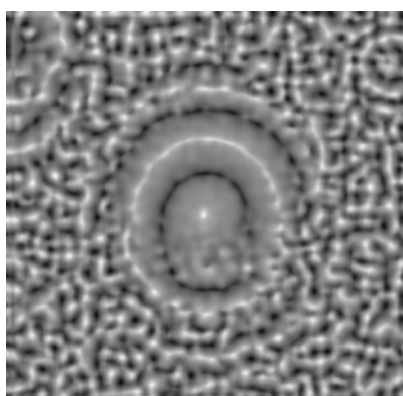


図-2 相関画像

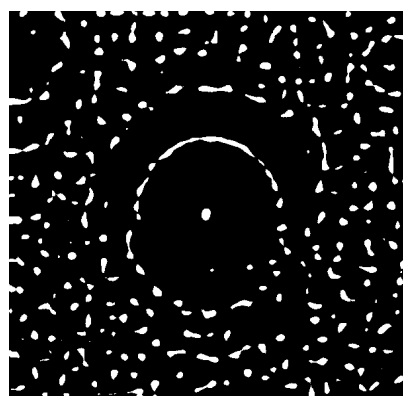


図-3 2階調化画像

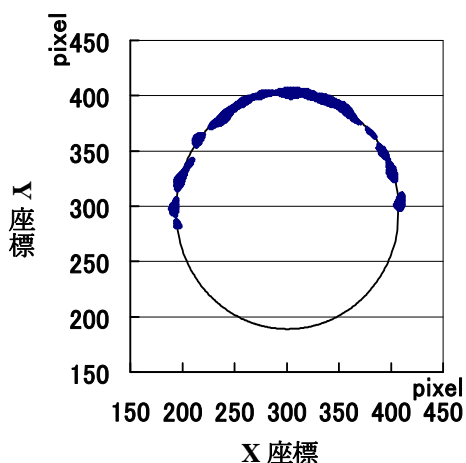


図-4 最小自乗法によるリングフィッティング

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-3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。

2階調化した画像から規則的に広がっているリング部分のみを抽出し、リング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部分のみデータに対して最小自乗法により円を当てはめ、リングの半径・中心位置を求めた。

4. 実験結果と考察

図-5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。図-5よりピント面から距離に比例してリングサイズが大きく広がるのがわかる。リングサイズを測定することで、ピント面からの粒子位置のズレを計測することができることがわかった。計測精度はピント面からの距離がマイナス方向で $0.44 \mu\text{m}$ 、プラス方向で $0.37 \mu\text{m}$ であった。

図-5の結果から粒子がピント面からどの程度離れているかは計測できるが、粒子位置がピント面より上か下かは判断できない。観察の結果、粒子がピント面より下側に位置するとき、粒子画像の中心が明るくなり、ピント面より上側ならば中心が暗くなるという特徴が観察された。図-6に画像処理により求めた中心位置を用いて、輝度を求めた結果を示している。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。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。

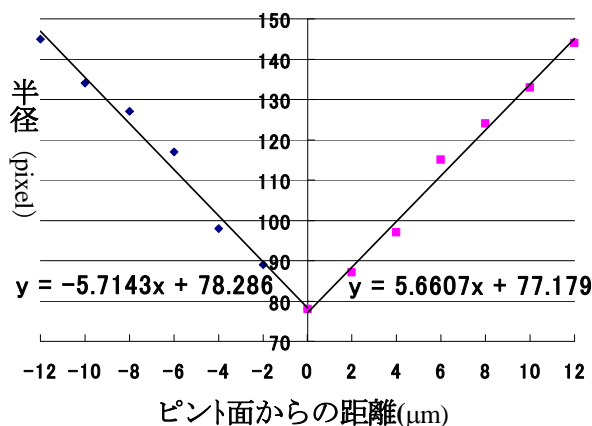


図-5 画像処理により求めたリング半径

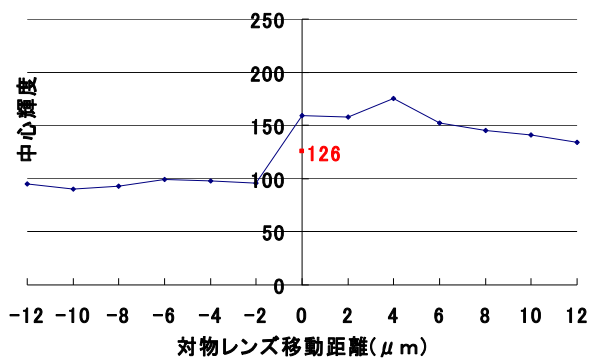


図-6 中心輝度