

# 微生物観測のための ヴィジュアルフィードバックシステムの開発

本田 匠\* 高氏 秀則\*\* 金子 俊一\*\*\*

## Visual Feedback System for Tracking of Microorganisms

Takumi HONDA Hidenori TAKAUJI Shun'ichi KANEKO

**Abstract** — In the field of nanotechnology, tracking freely swimming microorganisms under a microscope is difficult. An image of the target often rotates and changes shape as it moves. Further, the difficulty increases with background changes and fluctuations of colors and the brightness because of differences in the surrounding environment. To address these problems, we propose a tracking method combined with robust image processing of the data obtained by the tracking system. Our system feeds image processing data back, and obtains accurate positions of swimming microorganisms in real-time.

**Key words** : Template Matching, Micro Sensing, Visual Feedback

### 1. はじめに

地球環境および生態系を考える上で、個体群、生態群の構造及び挙動を解析することは大変重要である。また生態系の中で最も基本的な生態群としては微生物が挙げられる。近年、微生物の研究方法が多く開発され、それらの観察をする技術の需要が高まっている。ストレス環境、例えばある種の薬品を加えた時の個体の挙動、集団の挙動を解析することは薬学での効果の評価の一手法となり、また一方では微生物の挙動を理解することで地球環境の変化に対する生体の反応の基礎を学ぶ一つの指針となる。

本研究は微生物の個別の挙動、及び集団での挙動を画像照合の技術にて工学的に観察するシステムを構築する。画像処理の研究は、近年注目を集めるナノテクノロジーやバイオテクノロジーの分野において、位置推定や計測[1]、検査[2]などに使用されており、その技術に対する要求は高まっている。中でも視覚フィー

ドバック制御は、医療分野の腹腔鏡制御や、生命科学分野の細胞注入に応用されており、マイクロマニピュレーションやマイクロセンシングなどでの操作を行うことを考えた場合、任意の位置に精密に移動させることのできる位置決めシステムが求められる。細胞や微生物のように対象物そのものが運動する場合、安定した観察は容易ではなく、これは生物学における課題となっている。対象を撮像し、画像処理結果をフィードバックする技術は、ナノテクノロジーの分野に有効な手法であるが、従来の研究では澄んだ水の中、目的の対象物だけを入れトラッキングするものが主となっており、泥などの背景や照明のゆらぎによる外乱を含んだ環境下での微生物の検出の研究は、生物学において必要とされているがいまだ多くはない。そこで本研究では、顕微鏡より得られた視覚画像から、色や証明の変化にロバストなテンプレートマッチングであるカラーOCM [5] を用いトラッキングを行う方法を提案する。本システムではイメージセンサ、対物レンズおよびXYステージは共に平行に配置されているものとし、それらが一体となったCNC 画像測定システム(ニコン社製:iNEXIV VMA-2520)をベースに位置決めシステムを

\* 釧路工業高等専門学校

\*\* 室蘭工業大学

\*\*\* 北海道大学

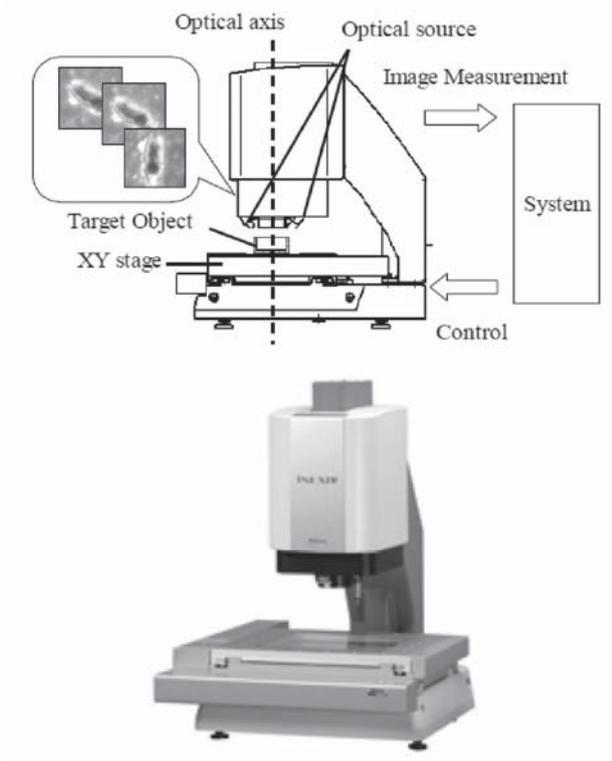


Figure 1: System configuration.

考えた (fig. 1)。

最終目的として、個別と集団での挙動と関連性を情報学的な分野で解析及び評価を行うことだが、本稿ではその第一歩として個体での追跡実験を行い評価したので、その結果について報告する。

## 2. 概要

ここではトラッキングする際に対し、一般的な問題点とそれに対応するための処理と実験について述べる。水中の物体を照合する際に、光の減衰、屈折により色の变化や、明度の変化が考えられる。この問題に対応するため、照明の変化や色の变化にロバスト性を示したカラーOCM [5] を使用し照合を行った。

## 3. カラーOCMを用いた移動体追跡

### 3. 1 方向符号照合法 (OCM)

方向符号照合法[4] の基礎について述べる。これは画素の明度を類似度評価のために直接に用いるのではなく、画素近傍の明度変化が最大となる勾配方向を量子化した値を符号として用いるため、画像ごとの固有性が高く、また照明変動による明度変化に対して強いロバスト性をもつ。この符号を方向符号(OC) とする。以下に照合度である類似度の導出手順を中心に要点を述べる。初めに、対象画像および参照画像の方向符号化を行う。画素位置  $(p, q)$  における明度を  $I(p, q)$  とし、

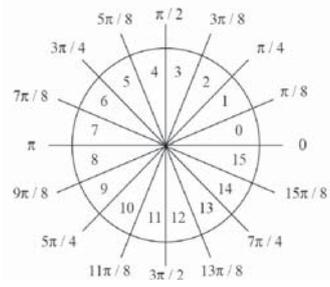


Figure 2: Orientation Code.

$$\text{水平方向勾配を } I_p = \frac{\partial I}{\partial p}, \text{ 垂直方向勾配を } I_q = \frac{\partial I}{\partial q}$$

とすると、勾配方向は  $I_{pq} = \frac{I_p}{I_q}$  以上のように示すこ

とができる。本研究では、勾配演算としてSobel演算子を使用する。

$$\theta_{pq} = \tan^{-1}(I_{pq})$$

$$c_{pq} = \begin{cases} \text{int}\left[\frac{\theta_{pq}}{\Delta\theta}\right] & \text{if } |I_p| + |I_q| > \Gamma \\ N = \frac{2\pi}{\Delta\theta} & \text{その他} \end{cases} \quad (1)$$

$$\ast \Delta\theta = \frac{\pi}{2} \quad N = 16$$

ここで  $\Gamma$  はノイズ、勾配が小さい画素を除去するための閾値である。水平、垂直各方向の絶対値の和が閾値  $\Gamma$  より大きい場合のみ、0~Nに符号化し、これを有効符号とする (Fig. 2)。

次に、参照画像と対象画像の照合を行う。参照画像  $f$  のテンプレートサイズを  $M \times M$ 、対象画像を  $g$  とすると、各画素の方向符号  $c_f, c_g$  を比較、方向符号が巡回的であることを考慮し、残差絶対値  $D$  を得る。画素数で割り正規化を行い、この値  $\bar{D}$  を平均残差絶対値としこの値の最小位置を照合位置とする。

$$\bar{D} = \frac{1}{M^2} \sum_{M \times M} D(c_f, c_g) \quad (2)$$

$$D(m, n) = \begin{cases} \min\{|m-n|\} & \text{if } m \neq N \cap n \neq N \\ \frac{N}{4} & \text{その他} \end{cases} \quad (3)$$

### 3. 2 カラーOCM

カラーOCM [5] は前述したOCM に色情報を使用した手法である。本手法はXYZ 表色系を使用し、各値についてOC化を行い、各値の類似度及びその信頼度を重みとしてそれぞれ算出しこれらに基づいて評価を行う。

Table 1:本システムの仕様

視野範囲	4. 7x3. 5mm
フレームレート	最大500fps
解像度	640x480画素
倍率	40倍
画素サイズ	7.3( $\mu$ m/pic)

Table 2:実験パラメータ

Refサイズ	150x150画素
方向符号しきい値 $\Gamma$	20
サンプリングレート	20fps
シャーレ	$\phi$ 90x15mm
映像サイズ	320x240画素

本来、明度値だけに用いていたOCに色情報を用い、また各値について重みを設定することによって、色に起因する検出の精度や再現性がロバストに確保されるものと期待される。まず $X$  値について考える。水平方向勾配を

$$X_p = \frac{\partial X}{\partial p}, \text{水平方向勾配を } X_q = \frac{\partial X}{\partial q},$$

勾配方向  $\theta_{Xpq} = \tan^{-1} \frac{X_p}{X_q}$  を算出することができる。

$\theta_{Xpq}$  から、式(1)(3)を用いて残差値Dxが導かれる。同様

にY, Z 値についてもDy,Dzと定義し、これらに基づいて次式のDxyzで評価を行う。今回重みは画素ごとに計算し、より信頼性を上げた。

$$Dxyz(m, n) = \frac{WxDx + WyDy + WzDz}{Wx + Wy + Wz}$$

Wx,Wy,Wzは重みであり、各値の信頼度を示したもので、文献[5]に定義したものを使用している。

#### 4. 実験方法

上述したテンプレートマッチングを基にトラッキング性能を確認する。本研究ではトラッキング対象に、微小な生物の一例としてミジンコを使用する。今回使用したミジンコはカイミジンコと呼ばれ、fig. 3(a)に示すような形状であり、体長約50~200  $\mu$  mほどの大きさをしている。口近傍、頭部近傍に生えた触覚を動かして水を押し、その反作用で水中を遊泳する[8]。以降、対象物とはミジンコのことを指し、対象物、対象部分を含むテンプレート画像をReference (以下Ref) とする。光軸方向の移動は微小とし、影響のないものとし

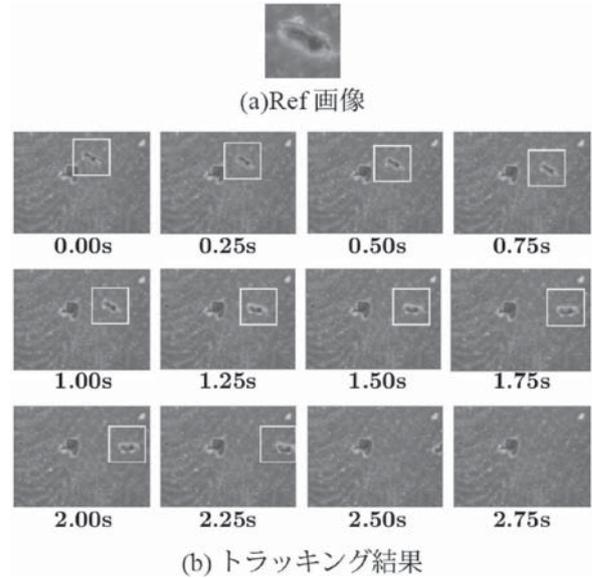


Figure 3:検出結果

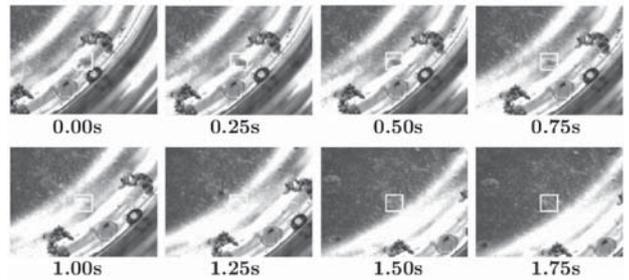


Figure 4: 反射の激しい面でのトラッキング

てXY 方向のトラッキングを行った。ビジョンシステムの概要をtable1 に示す。ビジジュアルフィードバックを用いた位置決めにおいて、画像処理による対象物の位置測定分解能は位置決めの最小分解能の下限となり、位置測定分解能よりも細かく位置決めすることはできない。このため、位置測定分解能は十分小さいことが望まれる。画像計測器が撮像した画像は、設定したフレームごとに画像処理用PC (Windows XP, Xeon 2.50 GHz) に取り込み、ビジジュアルフィードバックを行う。まず対象画像から OC画像へ計算をする。得られた画像より Ref画像とマッチングを行い、対象物の位置を検出する。

#### 5. 実験結果

本研究のトラッキング性能を確認するため、前述したシステムで実験を行った。対象物は浅型シャーレに蒸留水を入れ用いた。各実験パラメータをtable2に示す。Fig. 3は検出結果の一例として視野内の対象物をトラッキングした。0.25secごとの連続写真を示す。視野外に出るまで対象物を捕らえマーキングしていることが

分かる。検出位置から対象の絶対座標に変換し、同時に対象位置と画像中心からの差分をもとにステージの目標位置を計算する。速度指令をコントローラに送ることで、ステージを目標位置に制御する。これにより、対象を常に視野中心に保持をする。ステージは各軸の精度 5  $\mu\text{m}$ を備えており、ストロークはX軸が650mm, Y軸が550mmである。ステージ制御のデータ取得は、最大50msecで実行される。検出した対象物は次のフレームへのRefへと更新され、次のフレームで同様の処理を行う。Refを更新する際に、Refが元の対象物をとらえているか否かということは現時点では考えておらず、自律的な評価をアルゴリズムに組み込むことがこれからの課題である。これには、対象物に対して複数のテンプレートを用いて照合しつつ蓄積していく手法が考えられる。しかし、毎フレーム複数のテンプレートで照合するのは計算コストが掛かり、また、Refのバックアップを考慮しなくてはならないため、複数の手法の組み合わせを必要とする。シャーレの縁や水の振動により、明度情報や色の変化が激しく変化した場合に、従来のOCMや明度を主とした他の手法では検出し続けることができない。そのような場合においてもカラーOCMはトラッキングし続けることができ、その有効性の一例をfig. 4に示す。

## 6. まとめ

提案手法のトラッキング性能を検証するため、ミジンコを用いた実験を行った。提案手法により画像計測器から得られたデータで視覚フィードバックをすることで、微生物の2次元運動計測及び、位置制御が可能であるという結果を得た。今回はミジンコを用いたが、ミジンコに限らず他の微生物であっても適用できる可能性がある。またその場合、各微生物の持つ遊泳特性、運動軌跡などから分類ができると考えられる。今後の課題として、高フレームレートに対応するための高速化や、マッチングミスによるトラッキング不能状態に対策をした手法を組み合わせる必要がある。

## 参考文献

- [1] 大塚二郎：“ナノテクノロジーと超精密位置決め技術”，工業調査会，Feb, 2005.
- [2] N. Ogawa, H. Oku, K. Hashimoto, and M. Ishikawa：“Microrobotic visual control of motile cells using high-speed tracking system,” IEEE Trans. Robotics, vol. 21, no. 4, pp. 704-712, 2005.
- [3] K. Takahashi, N. Ogawa, H. Oku and K. Hashimoto:

- “Organized Motion Control of a Lot of Microorganisms Using Visual Feedback,” Proc. 2006 IEEE Int. Conf. Robotics & Automation (ICRA 2006), pp. 1408-1413, 2006.
- [4] A. Davies, N. Ogawa, H. Oku, K. Hashimoto and M. Ishikawa: “Visualization and estimation of contact stimuli using living microorganisms,” Proc. 2006 IEEE Int. Conf. Robotics & Biomimetics (ROBIO 2006), pp. 445-450, 2006.
- [5] F. Ullah, S. Kaneko, and S. Igarashi: Orientation Code Matching for Robust Object Search, IEICE Trans. On Inf. & Sys, E48-D, no. 8, pp. 999-1006, 2001.
- [6] F. Ullah and S. Kaneko: Using orientation codes for rotation-invariant template matching, Pattern Recognition, 37, no. 2, pp. 201-209, 2004.
- [7] 本田匠, 高氏秀則, 金子俊一: “照明スペクトル変動に対してロバストな重み付きカラー方向符号照合法”, 精密工学会誌, Vol. 75 No. 2, pp.313-320, 2009.
- [8] 大塚攻, 駒井智幸: 節足動物の多様性と系統, 裳華房, pp. 172-268, 2008.