

画素時系列の相関解析を利用した
動画処理による微粒子集団の速度分布計測

非会員 落合 浩治[†] 正員 三池 秀敏[†]
正員 橋本 基[†] 正員 蛭名 良雄[†]

Speed-Distribution Measurement of Crowded Particles by Dynamic Image Processing Utilizing Pixel-Based Temporal-Correlation Analysis

Kouji OCHIAI[†], Nonmember, Hidetoshi MIIKE[†], Hajime HASHIMOTO[†] and Yoshio EBINA[†], Members

[†] 山口大学工学部電気工学科, 宇部市
Faculty of Engineering, Yamaguchi University, Ube-shi,
755 Japan

あらまし バクテリアのように寸法がほぼ一定で、ランダムな方向に運動する微粒子集団の速度分布を、画素時系列の相関解析を利用した新しい動画処理法により計測できることを示す。

1. まえがき

種々の環境下における微生物の運動性を正確に計測する技術は、生物学や医学をはじめ広い分野の注目を集めている。多くの場合、レーザー光を利用した動的光散乱法が微生物の運動性や寸法の解析に用いられている^{(1),(2)}。しかし、培養液中の運動を解析する場合、微生物の自力運動とブラウン運動を分離するのが困難で⁽³⁾、自力運動する微生物のみの正確な速度分布を決定する方法はまだ十分には確立されていない。別のアプローチとして、顕微鏡下の微生物の運動を直接動画として捉え、その運動性を解析する方法が試みられている⁽⁴⁾。従来提案されている多くの動画処理では、運動物体の画面内の位置座標の時間変化を追跡する方法がとられている^{(5),(6)}。しかし、対象とする粒子数が多くなるにつれて、軌跡の交差等により、各粒子を区別して追跡することが困難になり、運動ベクトル解析のアルゴリズムはかなり複雑になることが予想される。

我々は、こうした問題点にある程度対処できる方法を模索する過程で、個々の運動物体の座標を追跡することをやめ、固定した画素点における粒子の通過による輝度変化が粒子の速度の情報を持つことを示してきた⁽⁷⁾⁻⁽⁹⁾。ここでは、動画中の各画素の輝度信号の時間変化に着目し、その時系列の自己相関関数を解析することで、運動粒子群の速度分布を得る新しい動画処理法を提案する。

2. 計測原理

まず最も簡単な場合を考えよう。周囲より明るい一

定の輝度を持つ運動粒子が、その輝度分布を保ったままある画素 (i, j) を通過する時間を D 、進行方向の長さを L とすると、図1に示すように L が画素サイズより大きければ、粒子の通過速度 v は、

$$v = L/D \tag{1}$$

により得られる。ここでもし全ての運動粒子に対して L が一定であれば $1/D$ は相対的な速度となる。 D は輝度変化の波形の細かい形を反映するので雑音の影響を受け易い。本研究では D を直接測定するかわりに、比較的雑音の影響を受けない量として、その波形の全体形で決まる相関関数を導入する。すなわち、画素 (i, j) の輝度信号の時間変化 $S_{ij}(t)$ より自己相関関数 $C_{ij}(\tau)$ を求め、その相関時間 τ^c よりその画素における通過速度 v_{ij} を評価する。このとき $C_{ij}(\tau)$ は次のように定義される。

$$C_{ij}(\tau) = \frac{1}{T} \int_{-\frac{T}{2}}^{\frac{T}{2}} (S_{ij}(t) - B_{ij})(S_{ij}(t+\tau) - B_{ij}) dt \tag{2}$$

ここで B_{ij} は粒子の通過しない時点での画素 (i, j) における輝度の値を示す(図1)。この関数が最大値 $C_{ij}(0)$ の1/2に減衰する時間を相関時間 τ^c とする。通過波形が矩形波に近いものであれば τ^c は D に比例することがすぐ確かめられる。また、対象粒子が中心に最大輝度を持つ対称な任意の輝度分布を持つ場合も、その分布が各粒子について一定であれば、 $1/\tau^c$ は粒子の相対的な速度 v を示すことを確認している。全画素につい

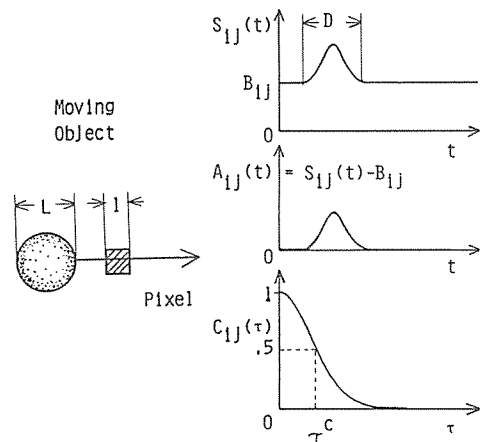


図1 粒子の通過による画素 (i, j) の輝度信号の時間変化 $S_{ij}(t)$ およびその自己相関解析法
Fig.1 An autocorrelation analysis of temporal brightness changes $S_{ij}(t)$ at each pixel caused by passing of moving particles.

て τ_{ij} を求めることで画面内を運動する全ての粒子の速度の情報を得ることができるが、観測時間 T 中に同一の粒子が通過した全ての画素にその粒子の速度の情報が残されることになる。その粒子の速度が一定であれば、通過した全ての画素で等しい速度となる。すなわち、 $1/\tau_{ij}$ から求められる速度分布は見かけ上通過した画素数倍になっている。以下正味の粒子の速度分布をこの通過画素数で割って(あるいは等価的に τ_{ij} を乗じて)求める。

基本的に一個の粒子のみが時間 T の間に観測画素を完全に通過する場合には(図 2(a)) 相関時間の逆数 $1/\tau_{ij}$ はその粒子の速度を反映する。しかし、図 2 に示すようないくつかの場合には相関時間は速度の正しい情報を与えなくなる。すなわち、

- (i) 粒子の端の部分が通過する場合(図 2(b))
- (ii) 観測時間 T 内に粒子が画素を完全に通過しない場合(図 2(c))
- (iii) 通過粒子が 2 個以上の場合(図 2(e))
- (iv) 通過粒子の波形に重なりが生ずる場合(図 2(d))

などが考えられる。(i)については一定の輝度レベルをいき値として定め、画素の中心付近を通過したもののみを解析するようにした。(ii)については解析の対象から除外した。また(iii)、(iv)は画面内に存在する粒子数が多くなると粒子の軌跡に重なりが生じ、必然的に起きる現象である。(iii)については図 2(f)に示すような波形分離が可能であるので、本研究では分離した各々の自己相関解析を行って各々の粒子の速度を区別して求めた。

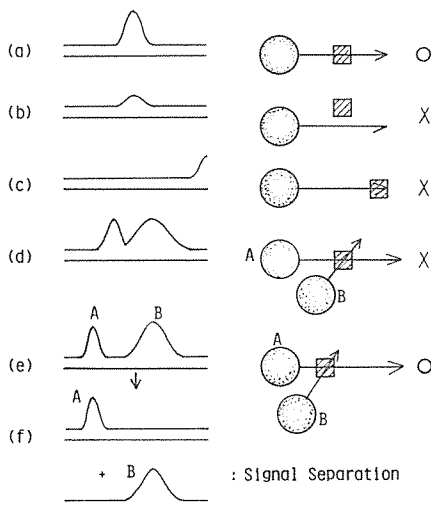


図 2 粒子の各画素に対する通過形態と輝度変化
Fig.2 Various passing-forms of particles.

(ii)の場合は、分離が不可能で今回の解析においては誤差要因となる。この生起確率は、粒子数が数百個以下の範囲では相対的に小さく、また、たとえ発生したとしても観測時間 T 内に粒子が通過する画素数 n_T と重なりを生じた画素数 n_0 の比 (n_0/n_T) の割合でしか誤差として効いてこないことになる。すなわち我々の提案している方法では粒子の運動軌跡に重なりがあっても、その影響による誤差をかなり小さくできることが期待され、結果的にかなりの高密度の粒子群の速度計測が可能と考えられる。

以下バクテリア(腸内細菌: E. coli)の運動を模擬した計算機シミュレーションにより、この方法の有効性を確認する。

3. 計算機シミュレーションによる検討

3.1 シミュレーション方法

400倍の位相差顕微鏡下(暗視野)のバクテリアを、我々の開発した画像処理システム⁽⁷⁾(最大10Hzのサンプリングスピードで 64×64 画素の画面を連続的に128枚取り込める)で捉えたとき直径が3~4画素のほぼ円形の粒子とみなせる。また、その輝度分布は中心部に最大輝度を持つガウス分布に類似している。そこで、粒子内の輝度分布 $B(r)$ を次のように仮定した。

$$B(r) = \begin{cases} 160 \exp(-r^2/1.1); & 0 \leq r \leq 1.6 \text{ (pixel)} \\ 16 & ; r > 1.6 \text{ (pixel)} \end{cases} \quad (3)$$

ここで16は背景画面の輝度レベルを示す。また、距離 r の単位は画素の寸法を1として表現している。このような粒子が 64×64 画素の画面内をそれぞれランダムな方向に直線運動するものとして、128枚の連続画像を発生させた。粒子が重なった場合は、輝度の高い方の値をその画素の輝度の値とし、画面から粒子が外れると、すぐ同一の速度と方向を持つ粒子が画面内のどこかに出現するようなプログラムとしている。画面内の粒子数、粒子の速度分布形等をパラメータとして数種のシミュレーション画像を作った。なお、これらの粒子の実際の速度は $10 \mu\text{m/s}$ が約 0.35 pixel/frame に相当する。

3.2 ランダムな方向に同一速度で動く場合

まず、簡単な場合として、全ての粒子が同一の速度で動く(方向はランダム)場合の解析結果を図3に示す。図中の分布は粒子数が100で速度が 0.35 pixel/frame の場合の結果で、相関時間の逆数は約 0.325 1/frame に鋭いピークを持つ、ほぼ左右対称の分布となっている。この分布が δ 関数となれば理想的であるが、分布

形が左右対称形に近く鋭いことから粒子の速度の情報
がほぼ正確に反映されていることがわかる。一方、シ
ミュレーションで与えた速度と、得られた相関時間の
逆数の分布のピーク値との関係を図3にあわせて示し
ている。ほぼ直線関係が得られており $1/\tau^c$ が相対的
な速度を示すことがわかる。なお、この方法で計測で
きる運動速度の上限は約 0.84 pixel/frame であるこ
とを確認している。下限については時系列を長くとれ
ばかなり低速度まで計測できるが、128 個の時系列の
場合約 0.07 pixel/frame となり、他の方法に比べ計
測できる速度のダイナミックレンジがかなり広く、速
度分布を解析するのに適した方法といえる。

3.3 粒子が Saclay 分布に従い運動する場合

次に各粒子が分布した種々の速度で運動する場合を
取り上げた、活性度の高いバクテリアの運動が Saclay⁽²⁾
分布に従うことから、各粒子の速度分布 $P(v)$ を

$$P(v) = \frac{v}{v_c^2} \exp(-v/v_c) \tag{4}$$

と仮定した。ここで v_c は分布の最頻値を示し、特性速
度と呼ばれる。図4は特性速度 v_c を 0.175 pixel/

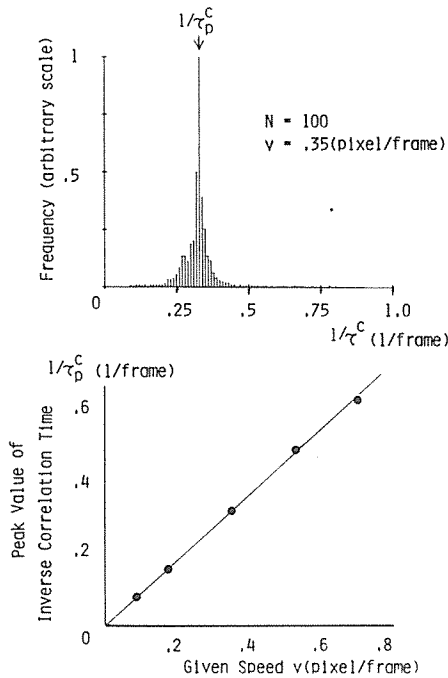


図3 一定速度でランダム方向に運動する粒子のシミュレーションによる解析例

Fig.3 Computer simulation and the correlation analysis of moving particles with constant speed and random direction

frame に固定し、粒子数 N を変化させた時に得られ
た速度分布を示している。各図中実線は式(4)より計算
された理論曲線を示す。また、図中のパラメータ G は
測定値と理論値の誤差の目安を与えるもので、それぞ
れの分布の面積比として表した。この結果より、我々
がここで提案した方法は $v_c = 0.175$ pixel/frame の
特性速度に対しては誤差の許容範囲を 10% とすれば
約 200 個の粒子数が上限であることがわかる。この
上限の数 N_u は特性速度 v_c によって変化するが、 N_u と
 v_c の積はほぼ一定となった。このことは観測時間内に
粒子が運動することにより通過していく画素の数が全
画素数に達するところが上限を与えると考えると理解
できる。実際に $v_c = 0.175$ pixel/frame, $N_u = 200$
とすると 128 frame 中に通過する全画素数 N_0 は $N_0 =$
 $v_c \times N_u \times 128 = 4480$ となり画面中の全画素数 (64
 $\times 64 = 4096$ 画素) とほぼ一致した値となる。

4. バクテリアの速度分布の計測

ここでは、我々が提案した方法を現実の画像処理に
適用した一例を示す。対象としたのは腸内細菌 E.coli
の顕微鏡画像である。図5は画面内に約 25 匹のバク
テリアが存在している場合を解析した結果の一例であ
る。図5(a)は遠心分離により運動性の高いバクテリア
を取り出したサンプルの結果で、このとき試料は 10
 μm のスペースを持つサンドイッチ型セル中に BHI
培養液とともに封入され、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ の条件下におかれ
ている。速度分布は Saclay に近いとはいえないが、
その平均速度を図3の結果を用いて換算すると約 1.11

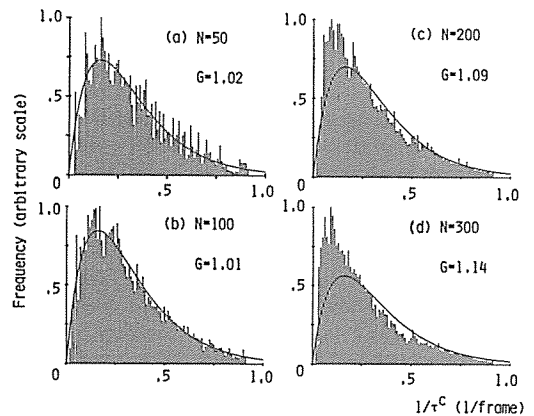


図4 Saclay 速度分布を持ちランダム方向に運動する粒子のシミュレーションによる解析例

Fig.4 Computer simulation and correlation analysis of moving particles with Saclay speed-distribution and random direction.

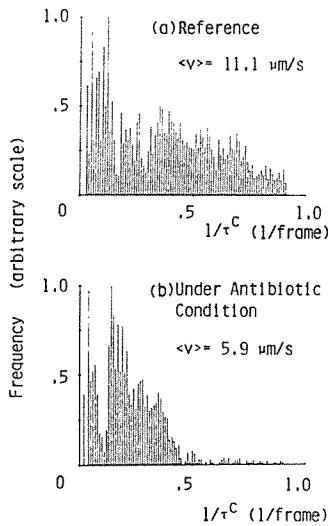


図5 バクテリアの速度分布の解析例
Fig.5 Example of actual scene analysis.

$\mu\text{m/s}$ となり、同一条件下で動的光散乱法により得られる値(約 $12 \mu\text{m/s}$)とほぼ一致した結果となった。このことは我々が提案したシミュレーションモデルがほぼ妥当であることを示している。一方、図5(b)は抗生物質($1000 \mu\text{g/ml}$, クロラムフェニコール)を投与した場合の結果で、明らかに高速で運動する菌の割合が大幅に減少しているのがわかる。このときの平均速度は $5.9 \mu\text{m/s}$ であった。すなわち提案した動画処理法により薬剤の効果(薬剤の存在による運動性の低下)が実際に捉えられ、実験的にも可能な方法であることが確認できた。

5. むすび

画素を通過する粒子の輝度の時間変化より自己相関関数を用いて速度の情報を計測する新しい方法を提案した。この画像計測法は粒子の径や輝度分布が未知の粒子群に対しては今後の検討を待つことが多いが、今回得られた結果よりその特徴を列記すると次のとおりである。

1. 個々の粒子を追跡せず、各画素点に固定した座標系で観測し、同一の処理を実行しているので多粒子系を取扱う場合には比較的解析アルゴリズムが簡単である。
2. 64×64 画素 128 frame の動画像として解析した場合の計測可能な速度の範囲は $0.07 \leq v \leq 0.84$ (pixel/frame) となり、比較的ダイナミックレンジ

が広く速度分布の解析に適している。

3. 計測可能な粒子数の上限は、粒子の速度、観測時間などで決まるが、今回の条件では $v_c = 0.175$ pixel/frame (Saclay 分布) で約 200 個となり、従来法に比べかなりの高密度の粒子集団まで計測可能である。

以上のような特徴は多粒子群の統計的性質を評価するのに有効と考えられ、速度分布変化で評価したバクテリアの薬剤感受性検査などへの応用の可能性を示唆しているといえよう。

文 献

- (1) B.J.Berne and R.Pecora, ed.: "Dynamic Light Scattering", John Wiley & Sons, Inc., New York (1976).
- (2) H.Z.Cummins: "Intensity Fluctuation Spectroscopy of Motile Organisms", in Photon Correlation Spectroscopy and Velocimetry, ed, E.R.Pike and H.Z.Cummins, pp.200-225, Plenum Press (1977).
- (3) J.C.Earnshaw, G.Munroe, W.Thompson and A.I.Traub: "Automated laser light scattering system for assessment of sperm motility", Med. & Biol. Eng. & Comput., 23, 5, pp.263-268 (1985).
- (4) J.O.B.Greaves: "The bugsystem: The software structure for the reduction of quantized video data of moving organisms", Proc. IEEE, 63, 10, pp.1415-1425 (1975).
- (5) H.H.Nagel: "Overview on image sequence analysis", in Image Sequence Processing and Dynamic Scene Analysis, ed.T.S.Huang, pp.2-39, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1983).
- (6) M.Yachida, M.Asada and S.Tsuji: "Automatic analysis of moving images", IEEE Trans. PAMI-3, 1, pp.12-19 (1981).
- (7) H.Miike, K.Shimada, K.Ochiai and H.Hashimoto: "Measurement of particle movement using time correlation analysis of dynamic image", Jpn. J. Appl. Phys., 25, 4, pp.634-639 (1986).
- (8) H.Miike, Y.Kurihara, H.Hashimoto and K.Koga: "Velocity-field measurement by pixel-based temporal mutual-correlation analysis of dynamic image", Trans. IECE Japan (Section E), E69, 8, pp.877-882 (1986).
- (9) H.Miike, Y.Kurihara, K.Koga and H.Hashimoto: "Velocity-field measurement of a vortex by dynamic image processing", Jpn. J. Appl. Phys., 25, 5, pp.L409-L412 (1986).
(昭和61年4月28日受付)