論

 Δ

動的光散乱理論に基づく動画像処理によるブラウン粒子の粒径評価

毅† 三池 秀敏 准 冒 木村 TE 冒 英明 Æ 正広竹 IF. 員 山本 員 百田

Brownian Particle Sizing by Sequential Image Processing Based on the Theory of Dynamic Light Scattering

Takeshi KIMURA[†], Associate Member, Hidetoshi MIIKE[†], Hideaki YAMAMOTO[†] and Masahiro MOMOTA^{††}, Members

あらまし 微粒子のブラウン運動をとらえた顕微鏡動画像処理による新しい粒径評価法を提案する.通常の動 的光散乱法では,粒子からの散乱光を光検出器によりヘテロダイン検波し,信号の自己相関解析を行う.本研究 では,顕微鏡下でレーザ光散乱照明により可視化した微粒子のブラウン運動を対象とする.可視化された粒子の 見掛けのサイズは,散乱強度に依存して変化し真のサイズとは異なるが,粒子の運動性は変化しない.そこで本 手法では,顕微鏡下での微粒子のブラウン運動を動画像としてとらえ,ソフト的に正弦波空間フィルタ中の運動 に変換した後,得られる画像時系列信号のスペクトル解析により粒径の評価を可能にした.この際,統計平均を とり相関関数の信頼性を高めるために長時間の動画像データが連続入力可能な手法を実現した.動的光散乱理論 における自己相関関数の散乱角依存性をもとに,数種類の空間フィルタを用いて,得られた自己相関関数の波数 依存性や粒子サイズ依存性を調べることで提案した手法の有効性を確認した.

キーワード 動画像処理, ブラウン運動, 顕微鏡画像, 粒径評価

1. まえがき

局所的な速度を非接触で解析する方法としては、レー ザ・ドップラー法^{(1),(2)}や空間フィルタ法^{(3),(4)}が知られ ている.いずれの手法も観測対象とする小領域に格子 じま状の空間パターンを作り、この中を通過する運動 物体より放射される総光量の時間変化をとらえ、この 周波数スペクトルを解析することにより速度の検出を 行う.ここで、格子じまを光学的に作るか、メカニカ ルに作るかの違いはあるが、両者は原理的には同一な ものであると理解できる⁽⁵⁾.

近年,マイクロエレクトロニクスの発達を背景にディ ジタルビデオ信号処理による2次元速度計測の試みが 行われている.我々も,空間フィルタ法を基礎とした ディジタル動画像処理による速度計測法を提案してき た^{(5),(6)}. この手法は、従来ハードウェアによるアナログ 処理で実現されてきたシステムをほとんどソフトウェ アによるディジタル処理に置き換えたものである.こ れにより、ハードでは実現困難である正、負の値をも つ理想的な正弦波空間フィルタを実現できると共に、 測定対象の速度やサイズに応じてフィルタの波長、移 動速度を任意に変えることができ、高精度の速度解析 が可能になる.

本研究では、動画像処理による空間フィルタ法の一 つの可能性として、動的光散乱理論をもとに動画像処 理によるブラウン粒子の粒径評価を試みた.動的光散 乱法では、溶媒中での微粒子のブラウン運動に伴う散 乱光の揺らぎをスペクトル解析することにより、微粒 子の粒径の情報を得ることができる⁽⁷⁾.散乱光の揺らぎ の観測は通常へテロダイン、あるいはホモダイン検波 法等によりホトダイオードや光電子増倍管(ホトマル) 等を通して行われている.

ところで、運動する粒子により摂動を受けた散乱光

[†] 山口大学工学部電気電子工学科, 宇部市

Faculty of Engineering, Yamaguchi University, Ube-shi, 755 Japan †† 德山工業高等専門学校情報電子工学科,德山市

Tokuyama National College of Technology, Tokuyama-shi, 745 Japan

解釈できる.本研究ではこうした立場から,動画像処 理による空間フィルタ法と動的光散乱理論を用いて, 顕微鏡下でのサブミクロン粒子のブラウン運動を解析 し,粒径評価を試みる新しい手法を提案する.

2. 解析原理

2.1 動的光散乱法の原理

図1のように、レーザ光が局所的な誘電率変化をも つ媒質に入射したとき散乱が生じる.従って、散乱体 の運動に伴い、光検出器(ホトダイオードや光電子像倍 管)で観測される散乱光に揺らぎが生じ、その周波数ス ペクトルは粒子の運動状態を反映している.粒子の運 動がブラウン運動のように統計的に単純な場合、以下 のような考えで散乱体の粒径が評価できる.

図1において $\vec{k_i}$, $\vec{k_f}$ はそれぞれ入射光および散乱光 の波数ベクトルである。また、散乱波数ベクトル \vec{q} は 図中の各ベクトルの幾何学的関係より、その大きさと 方向が決定され、

$\overrightarrow{q} = \overrightarrow{k_i} - \overrightarrow{k_f}$	(1)
$q = \vec{q} = (4\pi n/\lambda) \cdot \sin(\theta/2)$	(2)
で与えられる ⁽⁷⁾ . ここで、 $ \overrightarrow{k_i} = \overrightarrow{k_f} = 2\pi n/$	えでえば
入射レーザ光の波長、 n は媒質の屈析率、 $ heta$ は	散乱角て

ところで、媒質の構成分子と媒質中の散乱微粒子の 質量が適当な関係にあるとき、微粒子はいわゆるブラ ウン運動をする。ヘテロダイン検波法を用いて、ブラ ウン運動粒子からの散乱光を計測すると時間変動する ランダムな信号が得られる。この信号はブラウン運動



Fig. 1 Geometry of the light scattering.

を反映しており,その自己相関関数はヘテロダイン相 関関数と呼ばれ,

 $F(q,t) = \exp(-q^2 D \cdot |t|)$

$$=\exp(-|t|/\tau) \tag{3}$$

で与えられる⁽⁷⁾. D は粒子の拡散定数と呼ばれ、半径 a の球形粒子の場合、アインシュタイン・ストークスの 関係式より、

$$D = k_B T / (6\pi \eta a) \tag{4}$$

で与えられる. k_B はボルツマン定数であり、 k_B =1.38 ×10⁻¹⁶erg/K である. T は絶対温度、 η は媒質の粘性 係数である.よって、散乱光の変動する輝度信号の自 己相関関数を求め、自己相関関数が 1/e に減衰する相 関時間 τ

$\tau=1/(q^2D)=6\pi\eta a/(k_BTq^2)$	(5)
を計算することにより, ブラウン粒子の粒径	(直径)は
$2a=2\times(k_BTq^2\tau/(6\pi\eta))$	(6)
の式で評価できる.	

2.2 実験環境について

今回は粒径1 µm 前後のポリスチレンラテックス粒子 (以下では粒子と呼ぶ)を解析対象としたが、この場合、 通常の透過照明では顕微鏡下(今回の倍率約400倍: 対物レンズ×20)でも対象とする粒子が小さいため、画 像中での対象粒子のサイズは1 pixel 程度となってしま い,2値化やエッジ処理等の従来の画像処理による粒 径評価は困難である (なお 1 画素は約 1.3 μm に相当す ることを標準スケールにより確認している). そこで, 実際の粒子像を観測するのではなく、高輝度のレーザ 光の散乱照明を用いて粒子からの散乱像を動画像とし てとらえる. 図2は、今回用いた顕微鏡動画像処理シ ステムを示したものであり、図3にこのシステムによ り得られた顕微鏡画像の一例を示す。図3は、1.09 µm の粒子からの散乱像をとらえたものであるが、各粒子 の散乱像の大きさはレーザ光の散乱照明により、実際 の大きさより大きく映像化されている。また照明が画 像視野内で不均一であるため,位置によって粒子散乱 像の大きさは異なって見える。このため、得られた画 像からの直接の粒径評価は意味をもたないが、粒子に よる散乱像の動きを解析することでブラウン運動の特 徴をとらえることは可能である。言い換えると、画面 内でブラウン運動する散乱粒子像による輝度の時系列 変動を空間フィルタを通してスペクトル解析すること により粒径評価が可能になる.

2.3 動画像処理による粒径評価

動的光散乱法におけるヘテロダイン検波法で散乱光

ある



図 2 顕微鏡動画像処理システム Fig. 2 Microscopic sequential image processing system.



図3 プラウン粒子の顕微鏡画像例 Fig. 3 An example of brownian particles image under microscope.

の揺らぎを観測することは、散乱体の運動により変調 を受けた散乱光と参照光を混合し、光強度の揺らぎを 観測していることである。このことは順序を変えて考 えれば、差動型レーザ・ドップラー計測法に見られる ように、散乱光と参照光を散乱角 θ で交差させたとき にできる干渉じま(波数ベクトル($\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_i$)中での散 乱光の揺らぎを観測していることと等価である。そこ で本研究では、空間フィルタ法とレーザ・ドップラー 法が原理的には同一であることから、動画像データに 干渉じまと等価な空間フィルタをソフト的に重畳し、 フィルタ中での散乱粒子像のプラウン運動に伴う輝度 信号の揺らぎをスペクトル解析することにより、粒径 評価を行う新しい手法を提案する。 2.3.1 動的光散乱法の空間フィルタ法への適用 まず,前述のようにヘテロダイン検波法とレーザ・ ドップラー法が等価であると考えることにより,レー ザ・ドップラー法における干渉じまの空間波数 K

 $K = (4\pi n/\lambda) \cdot \sin(\theta/2) = 2\pi/d$ (7) と式(2)の散乱波数 q が対応すると考え,散乱波数 q を

 $K=2\pi/d$ (8) のように置き換える. d はレーザ・ドップラー法にお ける干渉じまの波長である. 更に、レーザ・ドップラー 法と空間フィルタ法が同一原理に基づいており、干渉 じまの波長 d が空間フィルタの波長 λ' に相当すると考 えられることから、式(7)を

$$K = 2\pi/\lambda' \tag{9}$$

のように置き換える。従って,波長

$$\lambda' = \lambda/(2n \cdot \sin(\theta/2)) \tag{10}$$

をもつ空間フィルタ中でのブラウン粒子の運動に伴う 相関関数 F(K,t) として

$$F(K,t) = \exp(-K^2 D \cdot |t|)$$

= $\exp(-|t|/\tau)$ (11)
が得られる。ここで相関時間では

 $\tau = 1/(K^2D) = 6\pi\eta a/(k_BTK^2)$ (12) である。以上の考えに基づき、動画像処理による粒径 評価が可能である。

2.3.2 動画像データの統計的平均処理

次に,得られた動画像データからの粒径評価の基本 となる相関関数の決定方法について述べる.一般に, ブラウン運動のようにランダムな信号を扱う場合,短 い時系列データを用いて解析を行うと,得られた信号 の統計的平均操作が不十分であるため,正しい相関関 数を推定することは困難である.そこで,以下に述べ る方法で動画像データの長時間連続入力および輝度信 号の平均パワースペクトルの計測を行った.

まず、 $N \times N$ pixel, *L* frame の動画像を考える.通常,空間フィルタを重畳した動画像データから空間フィ ルタ法に基づき、フィルタ中での変動信号 A(t)を求め る場合、次式のように、2次元の動画像データ S(x,y,z)をいったんメモリに取り込み、その後、一方 向への積算処理、正弦波フィルタの重畳といった一連 の動画像処理を行う必要がある^{(5),(6)}.

 $A(t) = \sum_{n} \sum_{n} S(x, y, t) \cdot \sin\{\overrightarrow{K} \cdot (\overrightarrow{r} - \overrightarrow{v_s} \cdot t)\}$ (13)

ここで、 \vec{K} は空間フィルタの波数ベクトルである ($|\vec{K}| = 2\pi/\lambda'$).また \vec{K} の方向は空間フィルタの並進速





図4 投影動画像を用いた解析手順

Fig. 4 A procedure of analysis utilizing projection images.

度 $\vec{v_s}$ と平行な方向とする. \vec{r} は原点(0,0)から測った 観測画素(x,y)の位置ベクトルを表す.ここで、Xお よびY方向の速度成分を求める場合、各々 $\vec{K} =$ $(K_x,0), \vec{K} = (0,K_y)$ の波数ベクトルをもつ正弦波フィ ルタを重畳して解析を行えばよいことになる.但し、 この方法では2次元動画像データをそのまま取り込む ため、1フレームごとのデータ量が大きくなり、メモ リの制約から連続的に取り込めるフレーム枚数は限定 され、長時間データの連続入力は一般に困難となる.

そこで、前報(文献(8))で報告したように、X方向、 あるいはY方向への投影画像(1次元)処理と画像の連 続取込みを並行させて実行する(図4).例えば、Y方 向の速度成分を検出したい場合、式(13)は波数 \vec{K} = (0, K_y)、並進速度 \vec{v}_s =(0,0)の空間フィルタを用いて

$$Ay(t) = \sum_{x} \sum_{y} S(x, y, t) \cdot \sin(K_{y} \cdot y)$$
$$= \sum_{y} \left\{ \sum_{x} S(x, y, t) \right\} \cdot \sin(K_{y} \cdot y)$$
$$= \sum By(y, t) \cdot \sin(K_{y} \cdot y)$$
(14)

と変形できる. すなわち, X 方向にあらかじめ積算, 投影した信号 By(y,t)に,後で正弦波フィルタを重畳 すればよいことになる. By(y,t)が連続取込みを行う 1次元投影動画像データであり,パソコンを中心とす る我々のシステム (RAM,4 MByte)でも約18分間の連 続取込み (投影画像サイズ 128×1 pixel,サンプリング 周波数15 Hz でフレーム数 16384 枚)が可能である.

次に, ブラウン運動が定常的確率過程とみなせるこ



図 5 パワースペクトルの時系列平均を求める手順 Fig. 5 A procedure for obtaining the averaged power spectrum.

とから、図5に示すように、観測時間内のL点の時系 列データをオーバラップを許しながら1系列M点のN個の時系列に分割し、平均パワースペクトル $\overline{P}(K, \omega)$ を求める。更に、Wiener-Khinchineの定理から平均パ ワースペクトルのフーリエ変換を行うことにより、統 計平均された自己相関関数

$$\overline{F}(K,t) = \int_{-\infty}^{\infty} \overline{P}(K,\omega) e^{-j\omega t} d\omega$$
(15)

が求められる.この自己相関関数の相関時間を計算す ることにより粒径評価を行う.

以上,本節 (2.2) で述べてきた解析手順を, Ay(t)を 求める場合についてフローチャートで図6に示してい る.





3. 解析結果

解析に用いた 1 次元動画像データ By(y,t)は、128× 128 pixel の原動画像を X 方向に積算処理しながら 15 Hz で連続 16384 frame (約 18 分間) 取り込んだもので ある。前述のように (図 5 参照)、各区間のスペクトル 解析のサンプル点数は M=512 点とし、ブラウン運動 が定常過程とみなせることから、L=16384 点の時系列 データを 60 点ずつずらしながら N=260 個の平均パワー スペクトルを求め、更に、そのフーリエ逆変換により 平均の自己相関関数 F(K,t) が求まる。

ここで、求められた平均相関関数 $\overline{F}(K,t)$ が、動的 光散乱法におけるヘテロダイン相関関数 F(q,t) と等価 であるか否かをまず調べる必要がある。今、式(3)に注 目するとヘテロダイン相関関数は、次のような特徴を もつことがわかる。

(1) ヘテロダイン相関関数の波形は、粒径が一定の



- 図7 平均自己相関関数の空間フィルタ波長 λ 依存性 (粒径 0.48 μm):x=K²t のスケールでプロットした場合,ほ ぼ重なる
- Fig. 7 The averaged autocorrelation function $\overline{F}(K, t)$ for various wavelengths plotted as a function of $K^2 t$. Note that curves superpose (particle size = 0.48 μ m).

場合,観測時の散乱角によって定まる散乱波数ベクト ル \vec{q} が異なっても, X 軸を q^2t でスケールした場合同 一の曲線となる.

(2) 相関時間 r は粒径 a に比例する.

以上の2点に着目して,実際に粒径0.48,1.09 および 2.02 μ mの3種類の微粒子の顕微鏡動画像に対し,波 長の異なる4種類の空間フィルタ(波長5.24 (4.0 pixel), 8.38 (6.4 pixel),10.48 (8.0 pixel) および16.77 μ m (12.8 pixel))を重畳し,平均相関関数 $\overline{F}(K,t)$ がどの ような波数 ($K=2\pi/\lambda'$) 依存性をもつかを調べた.

図7は、粒径を一定 (0.48 μ m)にして空間フィルタの 波長 λ' を変化させたときの相関関数を、横軸を K^2t で スケールして表示したものである。前述のヘテロダイ ン相関関数 F(q,t)の特徴(1)で述べたように空間フィ ルタ法で得られた平均相関関数の波形はほぼ重なって おり、同じ特徴をもつことが確認できた。平均相関関 数の同様の振舞いは、粒径 1.09 μ m の粒子の場合でも 確認できたが、粒径 2.02 μ m の粒子の場合は、用いる 空間フィルタの波長が長くなるにつれ波形の重なりは 悪くなった。これは、粒径が大きくなるとブラウン粒 子の運動変位が小さくなるため、波長の長い空間フィ ルタでは感度が不足するためと考えられる。

図 8 は、フィルタの波長を一定 (8.38 μ m) にして、各 粒径ごとの平均相関関数 $\overline{F}(K,t)$ を示したものである. ヘテロダイン相関関数 F(q,t) の特徴(2)と同様に、与 えた粒子の粒径が、0.48、1.09、2.02 μ m とほぼ倍々で あるのに対して、平均相関関数 $\overline{F}(K,t)$ の得られた各 粒径ごとの相関時間もほぼ倍々となっている (各々、



図8 平均自己相関関数の粒径依存性 (波長 8.38 μ m) Fig. 8 The averaged autocorrelation function $\vec{F}(K,t)$ for various space-filters obtained by the image sequence processing (wavelength=8.38 μ m).

1.9 s, 3.4 s および 8.0 s). すなわち,動画像処理による空間フィルタ法で得られた平均相関関数 $\overline{F}(K,t)$ を用いて,その相関時間より粒径の評価が可能であることが確認できた.同様の結果は波長 5.24 μ mのフィルタの場合でも確認できた.しかし,粒径 2.02 μ mの場合,波長の長い 10.48, 16.77 μ mのフィルタでは,粒径と相関時間の比例関係は十分ではなく,粒径と用いる空間フィルタの波長を最適化することが必要であると言える.

以上,述べてきたように、与えた粒径およびフィル タの波長を変えて行った相関時間 τ と粒径 2a の処理結 果を表 1 にまとめて示す.このとき、実験時の室温 24.5°C (絶対温度 T=297.7 K)より,水の粘性係数を 0.0091 poise として、粒径を計算した.表中では、フィ ルタ波長 5.24 μ m および 8.38 μ m の空間フィルタを用 いた場合が、実際の粒径に最も近い値を示している. また、波長 5.24 μ m のフィルタに比べ、波長 8.38 μ m の フィルタを用いた場合の方がより正しい解析値が得ら れている.これは、波長 5.24 μ m の空間フィルタでは 1 波長をほぼ四つの離散点(画素)で代表していること から、ディジタル誤差が大きくなるためと思われる. この点に関しては、顕微鏡の分解能を上げれば(倍率の 大きな対物レンズを用いる)ある程度解決できるものと 考えられる.

表1の結果より、今回の計測システムでは1µm前後 のブラウン粒子の粒径評価には、5.24~8.38µm程度の 波長の空間フィルタが適していると考えられる.すな わち、顕微鏡の倍率や粒径に応じた最適な波長の空間 フィルタを選択することで、動画像処理によるブラウ

表1 粒径評価の結果

(与えた粒径:2a=0.48µm)

フィルタ波長 λ'[μm]	相関時間 τ[sec]	解析粒径 2a[µm]
5.24(4.0p)	0.85	0.58
8.38(6.4P)	1.89	0.51
10.48(8.0P)	3.31	0.57
16.77(12.8P)	6.34	0.42

(与えた粒径:2a=1.09µm)

フィルタ波長 λ'[μm]	相関時間 τ[sec]	解析粒径 2a[µm]
5.24(4.0p)	1.69	1.15
8.38(6.4P)	3.34	0.90
10.48(8.0P)	5.09	0.87
16.77(12.8P)	13.69	0.92

(与えた粒径:2a=2.02µm)

フィルタ波長 λ'[μm]	相関時間 τ[sec]	解析粒径 2a[µm]
5.24(4.0p)	3.46	2.37
8.38(6.4P)	8.00	2.14
10.48(8.0P)	8.62	1.48
16.77(12.8P)	7.92	0.53

ン粒子の粒径評価が可能であることが確認できた.

4. む す び

動画像中の粒子のランダム運動を空間フィルタ中で の運動にソフト的に変換すると共に,動的光散乱理論 を適用することで粒径評価が可能であることを示した. この方法は,通常の動的光散乱法による計測法と比べ て,光学系の調整等の煩わしさがなく,また空間フィ ルタをソフト的に重畳していることから,粒子の粒径, 運動速度に応じた最適な波長のフィルタが選択でき, 高精度の解析が可能である.

また、今回は顕微鏡の散乱照明用に波長 633 nm の

He-Ne レーザを用いたが,散乱光の強度は入射光の波 長を λ とすると λ⁻⁴ に比例することが知られており⁽⁷⁾, 波長の短い Ar レーザ (488 nm)等を光源として用いる ことや,倍率の高い顕微鏡対物レンズを用いることに より,更に粒径の小さいサブミクロン粒子に対しても 計測が可能と思われる.

今回提案した方法では、測定対象を直接目でとらえ ることができ、画像中の場所による運動状態の違いや 粒径分布の情報を得ることも可能であり、細胞内微粒 子や微生物の運動解析など生命科学への応用も含め適 用範囲は広いと考えられる.

謝辞 本研究を進める上で適切な助言を頂きました 古賀和利助教授(山口大学工学部知能情報システム工 学科)に謝意を表します.

文

献

- Cummins H. Z., Knable N. and Yeh Y.: "Observation of Diffusion Broadening of Rayleigh Scattered Light", Phys. Rev. Lett., 12, 6, pp. 150-153(1964).
- (2) Stevenson W. H. : "Laser Doppler Velocimetry : A status Report", Pro. IEEE, 70, 6, pp. 652-658 (1982).
- (3) Aizu Y. and Asakura T.: "Principles and Development of Spatial Filtering Velocimetry", Appl. Phys. B, 43, pp. 209-224 (1987).
- (4) 小林 彬: "計測用空間フィルタ法の進展",応用物理,52, 12, pp. 1007-1014 (1983).
- (5) Miike H., Koga K., Momota M. and Hashimoto H.: "Spatial Filtering Velocimetry by Dynamic Image Processing", Jpn. J. Appl. Phys., 26, 9, pp. L1431-L1434 (1987).
- (6) 三池秀敏,古賀和利,橋本 基,百田正広: "最大エント ロピー法による動画像のスペクトル解析 (イメージ・ドップ ラー計測)",信学技報, IE86-109 (1987).
- (7) Berne B. J. and Pecora R. : "Dynamic Light Scattering", Jhon Willey & Sons, New York (1976).
- (8) 山本英明,三池秀敏,古賀和利,百田正広: "ディジタル 動画像処理による空間フィルタ速度計測法",信学論(D-II), J75-D-II, 10, pp. 1682-1690 (1992-10).

(平成4年12月16日受付,5年4月5日再受付)



木村 毅

平4山口大・工・電気卒.現在,同大大学 院博士前期課程在学中.動画像処理による物 理計測,特にサブミクロン粒子の粒径計測, DNA分子の運動解析に関する研究に従事.



三池 秀敏

昭46九大・工・電子卒.昭51同大大学院 博士課程了.同年山口大・工・電気助手.現 在,同大学電気電子工学科教授.昭62年度 および昭63年7月~9月西独マックスプラン ク研究所(ドルトムント)招聘研究員,動画像 処理による物理計測,非平衡化学反応系の非

線形パターンダイナミックス,流体現象等に関する研究に従事. 工博.電気学会,情報処理学会,日本物理学会,形の科学会各 会員.



山本 英明

平3山口大・工・電気卒.同大大学院博士 前期課程在学中.動画像処理による物理計 測,非平衡化学反応系の流体現象に関する研 究に従事.



百田 正広

昭54山口大・工・電気卒、同年徳山工業高 等専門学校情報電子工学科助手,昭62講師, 平1助教授,現在に至る.この間,平3山口 大学工学部電気電子工学科に内地留学、生体 情報処理,画像計測に関する研究に従事、情 報処理学会,日本 ME 学会各会員、