

論文内容の要旨

論文題目: 位相差顕微鏡を用いた気中アスベスト繊維自動計数システムの開発

(Development of a System to Automatically Count Airborne Asbestos Fibers by Using Phase Contrast Microscopy)

氏名 井上 靖雄

第1章 序論

アスベストは、天然に産する鉱物繊維で、蛇紋石族のクリソタイル（白石綿）と角閃石族のクロシドライト（青石綿）やアモサイト（茶石綿）などが知られている。耐熱性、耐薬品性、絶縁性など工業上の諸特性に優れているため、建築資材、自動車の部品、電気製品、家庭用品など様々な形態で利用されてきた。近年、アスベストの危険性が国内で広く認識されるようになり、濃度計測の需要が増加している。一方アスベストの濃度計測は、これまで、メンブレンフィルタに吸引捕集されたアスベスト繊維を、位相差顕微鏡を用いて目視観察する方法（以下、PCM法）で行われているが、得られる結果にばらつきが大きいことがかねてから問題視されている¹⁾。

フィルタ上の繊維の分布がランダムであると考え、計数された繊維数 N を用いて計数値の相対標準偏差 RSD は

$$RSD = 1/\sqrt{N} \quad (1)$$

で与えられる。つまり計数のばらつきは、式1より、計数される繊維数を増やすことで抑制することができる。そのためには、視野あたりの繊維数を増加させる方法、あるいは、

観察視野数を増加させる方法が考えられる。前者は、捕集空気量を増やすことで実現可能であるが、同時に空気中の他の粒子、繊維の混入を助長するため、計数環境を悪化させる恐れがある。一方後者は、多視野観察時の計測者の疲労とそれに伴う精度低下が懸念されるが、計数プロセスを自動化することによって計測者の負荷を軽減することができれば実現可能な選択肢となり得る。

これまでに、PCM法を自動化する試みはあるが^{2,3)}、いずれも顕微鏡に接続したカメラで撮影し、得られた画像をコンピュータで自動計数するものであって、画像を得るまでの顕微鏡操作を自動化した事例は見当たらず、自動計数技術としても十分なものではなかった。

本研究は、PCM法における多視野観察を可能にするために、顕微鏡操作および計数操作を自動化した自動計数システムを開発することを目的とした。また、位相差顕微鏡を用いた繊維種同定法である分散染色法にも対応可能なシステムとすることも目的とした。本システムは、計測者に由来する計数のばらつきを抑制するだけでなく、画像として標本を保存できるため、トレーサビリティの向上に寄与するものである。

第2章 視野数と精度の関係

2.1 目的

多視野観察によって、計数繊維数を増加させることで計数のばらつきを低減できることをモンテカルロシミュレーションで検証し、濃度によって必要な観察視野数を導くことを目的とした。

2.2 手法

現行の環境省のマニュアル⁴⁾に従って標本を作成し、 $\phi 47\text{mm}$ のフィルタの1/4片を、JIS⁵⁾の計数基準に従って観察することを想定する。5つの濃度(10, 5, 1, 0.5, 0.1 f/L)の大気を捕集することを仮定し、それぞれのフィルタ上に捕集される総繊維数 NF を計算する。この繊維数 NF をフィルタ上に確保可能な全3,400個の実視野相当面積の矩形領域(以下、仮想視野)に配分する。このときフィルタ上の繊維の分布として均一な分布と中央に集中するような分布を仮定し、仮想的な標本データを作成する。図1には、濃度1 f/Lの標本上の均一に分布する繊維の様子を示した。

また、計数に際しては、仮想視野中に存在する繊維は正しく計数されると仮定して、ランダムに仮想視野を2,000視野まで選択し、その視野に配分されている繊維数を積算する試行を200回実施し、計数繊維数の相対標準偏差 RSD を推計した。

2.3 結果および考察

フィルタ上に均一に繊維が分布している場合の、視野数(500視野まで)に対する RSD の変化を図2に示した。環境省のマニュアルに従って50視野まで観察した場合、比較的高濃度(10および5 f/L)では RSD は20%以下となるが、一般環境で見られるような低濃度0.5 f/Lでは、50視野の観察では RSD は40%を超え、非常にばらつきの大きい計数結果となることがわかる。逆に、 RSD を20%に抑えるためには、0.5 f/Lでは300視野程度の観察が必要であることがわかった。また、捕集された繊維の分布が均一ではなく、中央に集中する分布に従うと考えた場合、低視野数でさらにばらつきが大きくなる傾向も確認できた。300視野を超えるような目視観察は現実的ではなく、自動化が必要になると考えられる。

第3章 自動標本観察システム

3.1 目的

これまで手動で行われていた顕微鏡観察操作を自動化するシステムを開発することを目

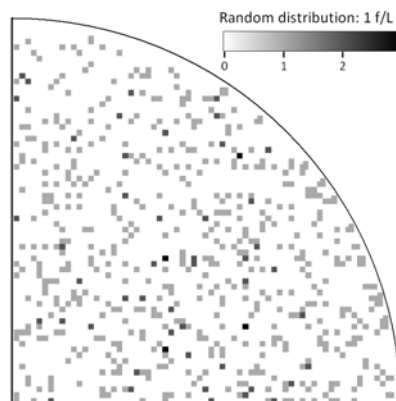


図1 フィルタ上の均一な繊維分布例
(濃度1 f/Lの場合)

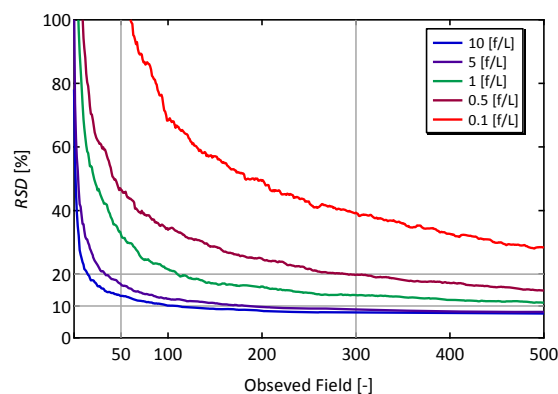


図2 視野数に対する RSD の変化



図3 自動標本観察システムの概観
(オートローダは除く)

的とした。

3.2 システム概略

図3に開発したシステムの概観を示した。位相差顕微鏡に3CCDカメラを装着し、その信号はオートフォーカスコントローラとコン

コンピュータのキャプチャーボードに送られる。顕微鏡操作の最大の課題であるフォーカスの調整は、独自に改良したアルゴリズムによってフォーカス位置を判定し、オートフォーカスコントローラによってステージのZ方向の移動を0.2 μm単位で適切に制御した。

深度方向に分布する繊維を正しく画像に取得するために、画像の深度合成技術を利用した。合焦点位置の上下0.2 μm間隔の画像を30枚取得し、画素ごとに極値を与える情報を選択的に取得し、画像を合成するものである。

また、観察作業の効率化のため、スライドを2枚装着できるようなステージを作製し、XY方向の移動操作を自動化するために市販の自動XYステージを改造して装着した。さらに、スライドの自動交換を可能にするオートローダも開発した。

さらに、PCM法だけでなく分散染色法への対応を可能にするため、アナライザーを任意の角度に自動的に回転させる自動回転アナライザーも独自開発した。なお、これらの装置全体は制御ソフトウェアより統一的に制御可能となっている。

3.3 オートフォーカスの検証

観察視野を特定できる特殊な試料（以下、クロスチェック試料）を5枚用いてオートフォーカスと観察速度の検証を行った。クロスチェック試料はそれぞれ50視野観察し、同一視野のオートフォーカスと目視によるフォーカス調整とを比較した。その結果、全250視野中222視野でフォーカス位置は一致した。また、一致しなかった28視野のうち22視野にはフォーカスのターゲットが存在しなかったため、実質的には成功とみなすことができた。改良したオートフォーカス機能は、目視と同程度の水準であることが確認できた。

第4章 自動計数アルゴリズム

4.1 目的

画像処理によって繊維を自動計数するアルゴリズムを開発することを目的とした。

4.2 手法

開発したアルゴリズムは「前処理」「対象物認識」「対象物計数」の3つのステップから構成される。前処理では繊維の認識を容易にするための処理を行う。PCM法と分散染色法で詳細が異なり、PCM法では、輝度の偏りや輝度分布を補正する。分散染色法では、アナライザーを回転することで同じ視野に対し

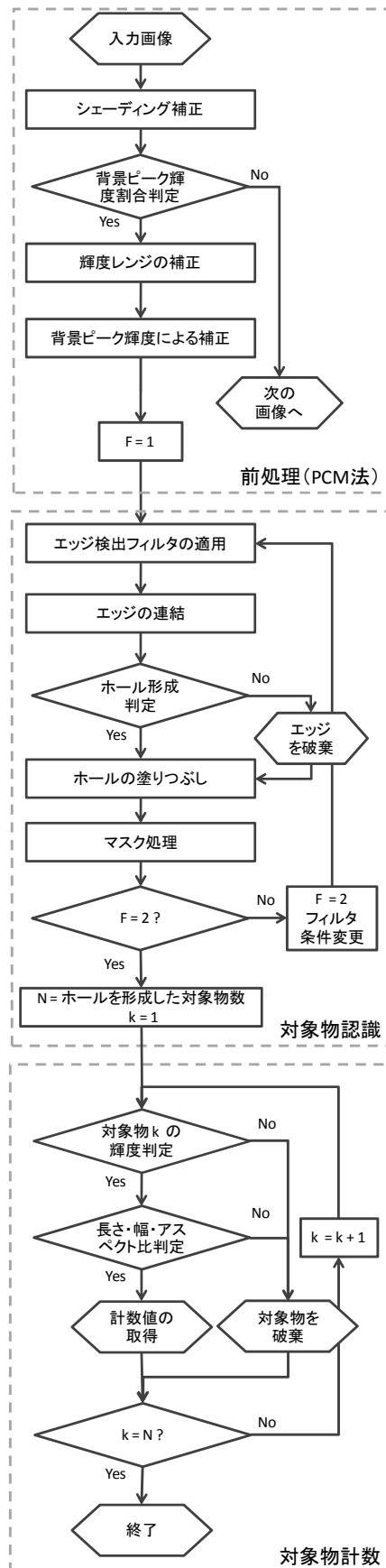


図4 PCM法の計数アルゴリズムフロー

て複数の画像が得られることを利用して、発色が変化する部分だけを抽出した画像を合成する。

対象物認識では、画像中の背景と繊維の境界画素、すなわち「エッジ」を抽出する。得られたエッジを適切に連結・補正することで繊維を認識する。対象物計数では、認識された繊維の長さ情報を計測し、繊維数を計測する。また、精度を向上させるため、エッジ検出のパラメータセットを変更して、対象物認識と対象物計数の処理を2回実施することにした。図4にはPCM法の計数アルゴリズムフローを示した。これらの画像処理は汎用画像処理ライブラリ MIL 8 (Matrox 社) を利用し、Visual Basic 6 (Microsoft 社) によってアプリケーションとして実装した。

4.3 アルゴリズムの検証

チャンバーで人工発塵させたアモサイト (n=15) に本アルゴリズムを適用した。繊維状物質の判定基準は JIS (長さ 5 μm 以上、幅が 3 μm 未満、アスペクト比 3 以上) になった。自動計数では、通常の見視観察の4倍の200視野の観察を行った。自動計数と見視計数それぞれから得られた濃度を図5に示した。多視野の計測によって、自動計数と見視の濃度の関係は、傾きが0.93、 R^2 が0.91となり、ばらつきが少なく、互いによく一致する結果となった。図6には、アモサイトの計数における対象物認識1回目と2回目の計数繊維数を示した。いずれのケースでも約1割程度の繊維が、2回目の対象物認識で計数されており、エッジ検出を2回に分けることで、計数精度が改善されることが確認できた。

また、「石綿クロスチェック試料」5標本、それぞれ50視野について、視野ごとに自動計数結果と見視計数結果を比較した。その結果、およそ75%の視野で計数結果が一致し、視野レベルでも見視とよく一致することが確認できた。

第5章 結言

位相差顕微鏡を用いたアスベスト計数を自動化するシステムとして、自動観察システムと、自動計数アルゴリズムの開発と検証を行った。本システムによって、計測者に由来する計数のばらつきを抑制するだけでなく、多視野観察による計数繊維の増加に伴う誤差の

抑制が可能になると考えられる。同時に、標本のトレーサビリティの確保にも貢献する期待される。

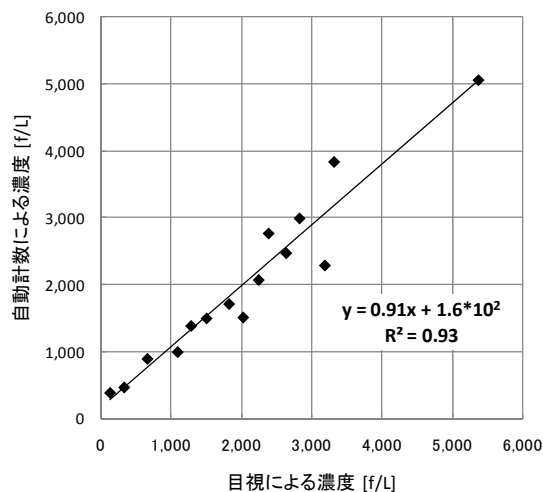


図5 自動計数と目視計数の比較

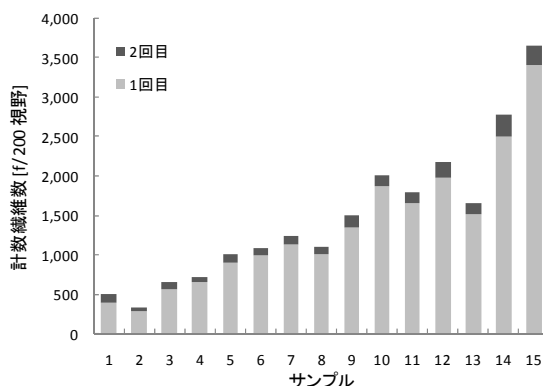


図6 各ステップの計数繊維数(アモサイト)

参考文献

- 1) NIOSH (1984) ASBESTOS and OTHER FIBERS by PCM 7400, NIOSH Manual of Analytical Methods 4th Edition
- 2) Inoue Y et al. (1998) Development of an automatic system for counting asbestos fibers using image processing. *Part Sci Technol* 16, 263-279
- 3) Baron PA, Shulman SA (1987) Evaluation of the Magiscan image analyzer for asbestos fiber counting. *Am Ind Hyg Assoc J* 48, 39-46
- 4) 環境省 (2007) アスベストモニタリングマニュアル 第3版
- 5) JIS (2006) K38501-1 空気中の繊維状粒子測定法 第1部