

## 画像処理エキスパートシステムによるマイクロ・キャリア上 動物細胞の視覚認識・計測法\*

(第2報, ファジィ推論による認識精度向上と  
輪郭線追跡ビーズ認識による処理の高速化)

福田敏男<sup>\*1</sup>, 塩谷成敏<sup>\*2</sup>, 新井史人<sup>\*1</sup>  
浅間 一<sup>\*3</sup>, 長棟輝行<sup>\*3</sup>, 遠藤 勲<sup>\*3</sup>

### Recognition and Counting Method of Animal Cells on Microcarrier Using Image Processing Based on Expert System (2nd Report, Improvement of the Recognition with the Fuzzy Inference and the Speed-Up of the Fast Image Processing with Bead-Recognition by Bead-Contour-Tracking)

Toshio FUKUDA, Shigetoshi SHIOTANI, Fumihito ARAI,  
Hajime ASAMA, Teruyuki NAGAMUNE and Isao ENDO

This paper deals with the recognition of the small animal cells by using image processing based on the expert system for the application of the micromanipulator system. These cells are cultured on microcarriers, which are beads. Previously we studied on the recognition of these cells and the counting of the number of these cells by the expert system with the segmentation method. However this method has some problems, such as that it takes much time for image processing and it is difficult to recognize cells with complicated shapes. Thus, this study proposes a method for the recognition of cells with fuzzy inference and the method of recognition of beads by tracking bead-contours. It is shown by these methods that it is possible to recognize these cells more speedily than before and to do them more accurately than before.

**Key Words:** Measurement, Fuzzy Set Theory, Digital Image Processing, Creature Recognition, Expert System

#### 1. はじめに

近年, 多くの所で多くのバイオプロセスの計測と制御に関する研究<sup>(1)(2)</sup>が行われている。そして, これらの生物の培養に最も適した環境を探そうと研究が続けられている。そこでは, 各々の条件下で生物を培養し生物の数を数えて, それがいちばん大きくなる環境を探している。これには生物の数を数える必要があり, 顕微鏡を通して人の目視によって行われている。しかし, このような仕事は将来, 自動化されることが望ましいと考えられる。そのため, 本研究では, 前報<sup>(1)</sup>同様, 球状をしたビーズの表面上で培養された細胞(インタフェロンβ形)<sup>(3)</sup>を画像認識の対象物とし, 人間の目視により近い判断能力をもつシステムを開発し, 培養状況監視の自動化と高速化を目的としている。培養液の中には無数のビーズがあり, これらの個々のビーズの表面にくっついた細胞の数は同じ培養日数の物でも異なる。そこで, 細胞がたくさん乗ったビーズだけを選び抽出するために, 個々のビーズの表面に乗った細胞

の数を数える必要がある。

前報<sup>(1)</sup>では, 画像セグメント法によるビーズ内の生物の認識と同定について報告した。しかし, この方法では, ビーズ1個当たりの細胞の数の認識時間が平均5分かかり, 処理時間の短縮が問題となっていた。また, 面積などのパラメータ<sup>(4)</sup>を用いたデータベースとの比較だけでは, 複雑な形状をした細胞を正確にカウントするのは困難であった。本報では, (1)ファジィ推論による認識を行うことによってゴミと細胞との区別をより正確に行い, (2)ビーズ認識では輪郭線追跡を用いて, 複数個のビーズが接触した場合における個々のビーズの認識を可能とし, (3)全処理の高速性を追求する研究を行って良好な結果が得られたので, 報告する。

#### 2. 細胞認識の流れ

2.1 フローチャート 本処理は, 大きく分けて, (1)ビーズの認識, (2)ビーズ中央部にある細胞の認識, (3)ビーズの周辺部にある細胞の認識の三つで構成されている。フローチャートを図1に示す。まず, カメラで画像を撮り, 画像処理によって, ビーズの位置検出をした後, ビーズの中央部・周辺部の二つに分けて細胞を抽出し, 本エキスパートシステムを用いて細

\* 原稿受付 平成2年3月30日。

<sup>\*1</sup> 正員, 名古屋大学工学部(〒464-01 名古屋市千種区不老町1)。

<sup>\*2</sup> 名古屋大学工学部。

<sup>\*3</sup> 理化学研究所(〒351-01 和光市項広沢2-1)。

胞の認識判定をする。二つの領域でのオーバカウント数を考慮にいれて、ビーズ内の細胞の数を求める。

**2.2 各処理を行うための濃淡処理** 顕微鏡から撮る画像は、照明の明るさや顕微鏡のフィルタに大きく依存してしまうため以下の処理を行うためには、どのような条件下でもビーズが浮き出てくるようにしなければならない。ここでは原画像(図2)から、原画像と同じ環境のもとで撮った対象物(ビーズ)を乗せなかった画像を差し引いて以下の処理に用いる。このようにして作られる画像を補正画像と呼ぶことにする。

**2.3 ビーズの認識** 試験管から抽出したビーズは、1個ではなく複数個である。そこで、個々のビーズ上の細胞数をカウントするには、個々のビーズの位置を検出する必要がある。また、ビーズは各々の単体に分かれているわけではなく、複数個のビーズが隣接していて、ラベリングによる分離ができない。そこで、以下の処理を用いる。まず、補正画像を自動設定しきい値を用いて二値化する。輪郭線を円滑化するために膨張処理<sup>(5)</sup>を施し(図3)、輪郭線処理を行う。

次に、輪郭線追跡により、ビーズ円の位置を求める。ある適当な円弧始点から追跡を始める。この時、この円弧始点が円の中心を原点として周囲を四分割した場合、第何象限にある点かを判別し、円の輪郭線が円弧始点の左右どちらかの近傍で途切れていても認識できるように左、右両回転方向に追跡する。この各回転方向の各象限についての追跡方向を示したのが図4である。この図4で得られた候補方向の中から接線傾きを

パラメータとして、次の円弧点を選ぶ。これらの処理を、輪郭線が途切れるか接線傾きが急変するまで同ラベルを付けながら、輪郭線を追跡する。次に、同ラベルが付けられた中から代表点を三つ抽出し円の中心と半径を出す。そして、本研究では、ビーズの基本半径(130画素)と求めた円の半径との誤差が15%以内ならば、ビーズと判断する(図5)。

**2.4 ビーズ内の細胞の抽出** ビーズは中央部では明るく周辺部では暗い。そこで、細胞認識も中央部と周辺部の二つの領域に分けて行う必要がある。

(1) ビーズの中央部 中央部とは、本研究ではビーズ円の85%の大きさに縮小した領域とする。補正画像を、しきい値を変えて二値化する(図6)。次に、面積の小さいものはノイズとみて除去する(図7)。残ったものが細胞の候補となる。

(2) ビーズの周辺部 周辺部とは、本研究ではビーズ円からビーズ円を50%の大きさに縮小した領

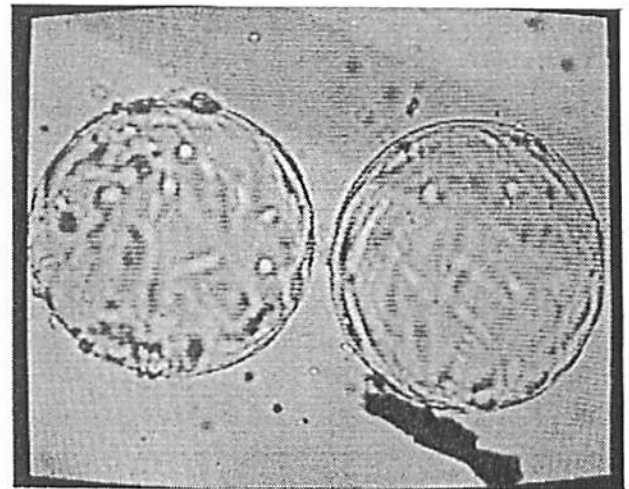


図2 原画像

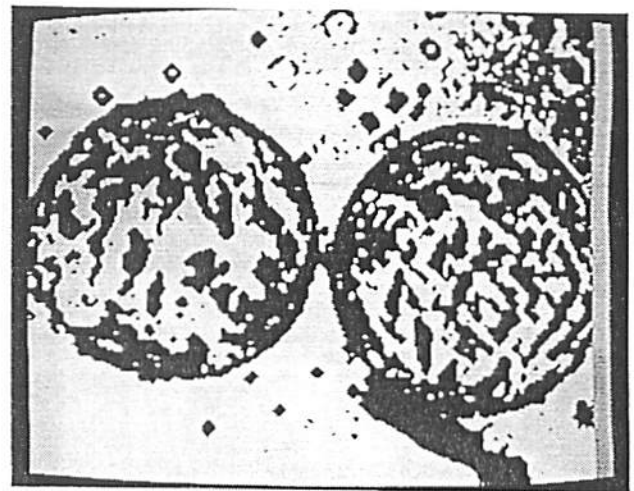


図3 補正画像(膨張処理後)

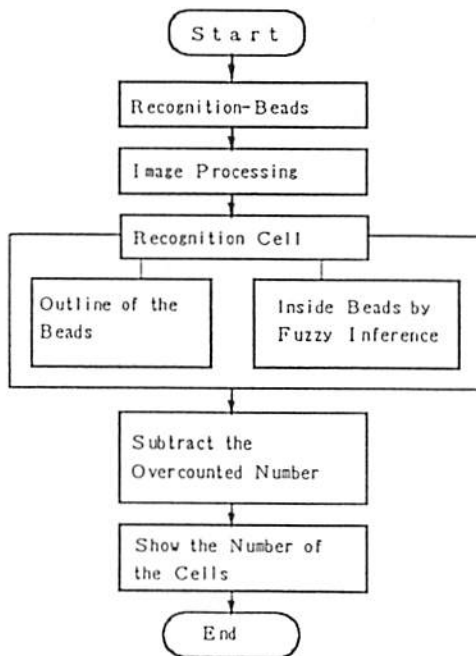


図1 フローチャート

域を差し引いた領域とする。ここで用いる画像は原画像を微分処理した後、反転処理をして二値化したものを用いる。次に、面積の小さいものはノイズとみて除去する。残ったものに結合処理を行い、分離されているものでもそれらの距離が三画素以下であれば結合する(図8)。これを再ラベリングする。細胞である場合、中心部に空白部分ができる。この空白部分の大きさが大きな特徴量となる。ビーズの中央部と周辺部間の二重カウント問題については、3・6節で述べる。

### 3. 認 識 部

#### 3・1 細胞の基本形状 対象とする細胞は、中央

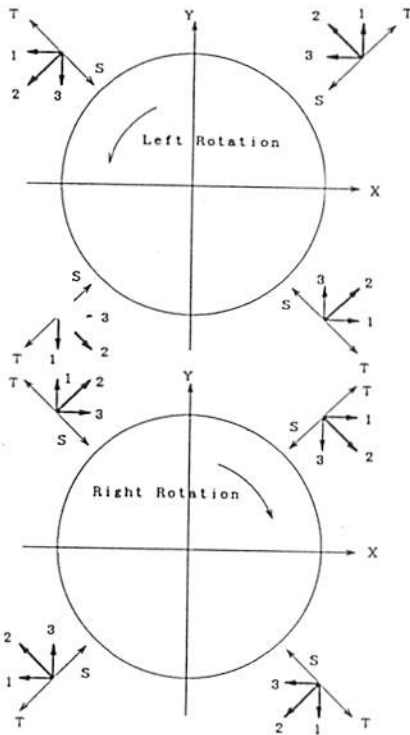


図4 円弧追跡方向

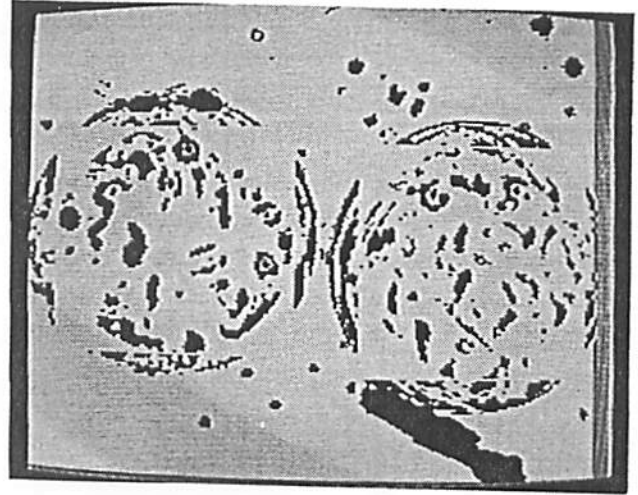


図6 ビーズ内部補正画像(ノイズ除去前)

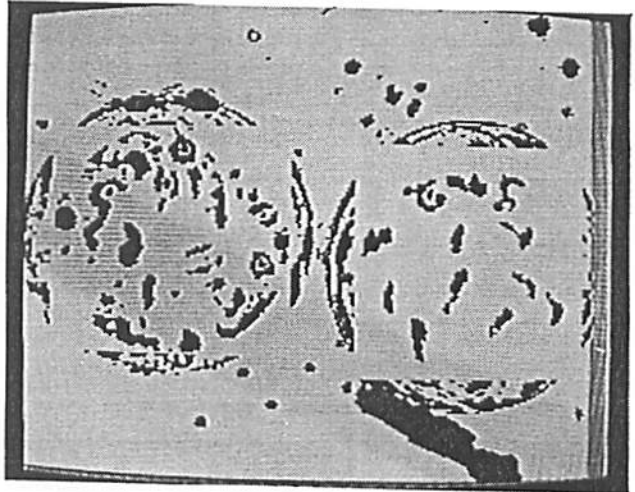


図7 ビーズ内部補正画像(ノイズ除去後)

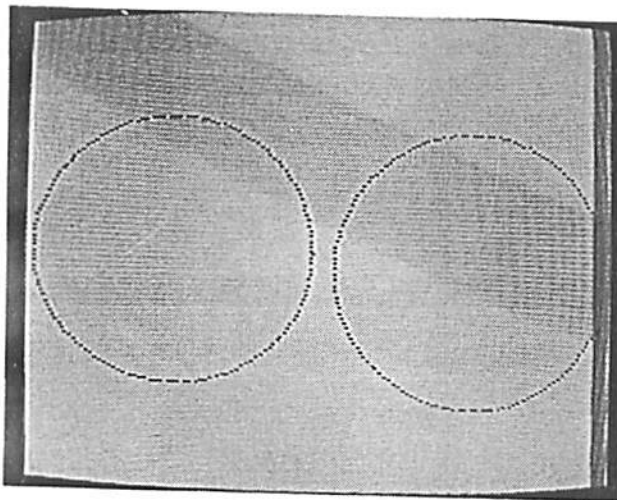


図5 ビーズを認識した画像

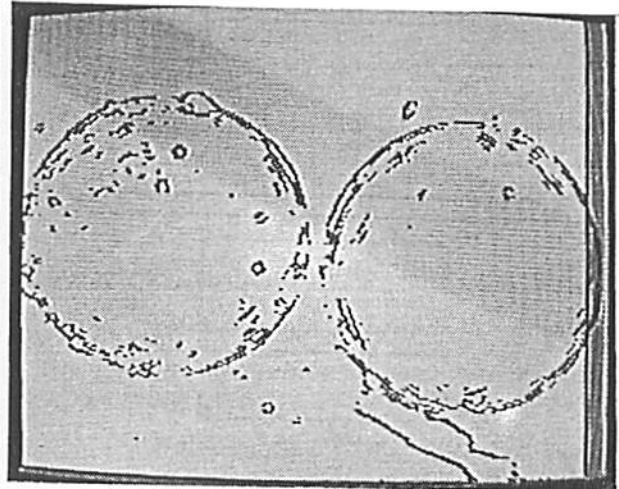


図8 ビーズ周辺部微分処理

部が膨らんだ三日月の形をしている。これを図9に示す。

3.2 細胞認識用パラメータ ビーズ中央部, 周辺部で抽出される物体の形状は, 図10, 11に示すような形状である。これらの抽出された物体の中から細胞を抽出するために, 細胞の基本形状を目安に細胞であるかどうかの判定に必要な認識用パラメータを設定する。以下に, ビーズ中央部, 周辺部での認識用パラメータについて述べる。

ビーズ中央部で抽出される細胞の形状は, 図10に示すように, 六つの形状(基本形状, 円形形状, 長手長と幅長の比が1に近い形状, 輪郭線が入り組んだ複雑な形状, 幅長が短い形状, 面積が小さい形状)に分類される。本研究では, 基本形状だけを細胞と決める。そこで, 細胞を認識するために次のパラメータを設定する。

- ①幅の長さ
- ②図形の形状の複雑さを計るための複雑度  
(複雑度=周囲長\*周囲長/面積)
- ③長手方向の長ささと幅方向の長さの比
- ④面積

ビーズの周辺部で抽出される細胞の認識の形状は, 図11に示すように五つの形状(基本形状, 物体の中心部の空白面積が小さい形状, 面積が小さい形状, 幅長が短い形状, 長手長が短い形状)に分類される。本研究では, 基本形状だけを細胞と決める。そこで, 細胞を認



図9 細胞の基本形状

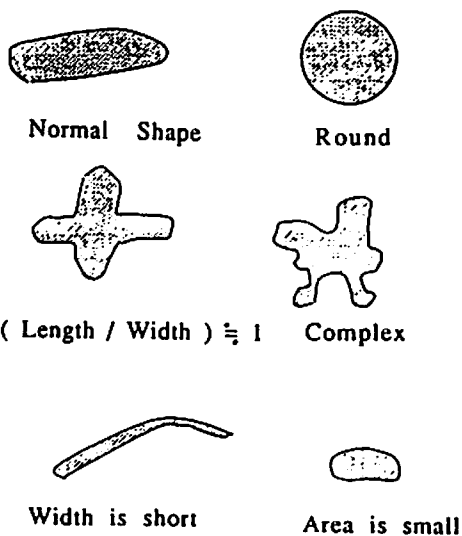


図10 ビーズ内部で抽出した細胞

識するために次のパラメータを設定する。

- ①幅の長さ
- ②細胞の中心付近の空白部分の大きさ  
(空白部分の大きさ=長手方向の空白部分の長さ+幅方向の空白部分の長さ)
- ③長手方向の長さ
- ④面積

3.3 細胞認識法 ビーズの中央部で抽出される細胞は, 形状が複雑で, ある程度幅をもたせた値域で記述されたデータベースとの比較では認識できずに見落としている細胞がある。そこで, 本研究では, ファジィ推論を用いた認識を行う。また, ビーズの周辺部で抽出される細胞は, その形状判断が比較的簡単に行いやすく, 曖昧の要素が少ない。そこで, 本処理では, データベースを用いた認識を行う。

3.4 細胞認識の知識表現方式 ビーズの内部で抽出される物体の細胞である確率をZとする。このZを求める因子は, 幅長・複雑度・(長手長/幅長)の三つで, ファジィ推論によって求められる。これを, バッカス記法で表現すると,

$\langle Z \rangle ::= \langle \text{Width, Grade of Complexity, Length Width} | \langle \text{Fuzzy Inference} \rangle \rangle$   
 $\langle \text{Grade of Complexity} \rangle ::= \langle \text{Area, Perimeter} | \langle \text{Perimeter} * \text{Perimeter} / \text{Area} \rangle \rangle$   
 $\langle \text{Area} \rangle ::= \langle \text{The Area of the Cell} \rangle$   
 $\langle \text{Perimeter} \rangle ::= \langle \text{The Perimeter of the Cell} \rangle$   
 $\langle \text{Short Width} \rangle ::= \langle \text{The Width of the Cell} \rangle$   
 $\langle \text{Long Width} \rangle ::= \langle \text{The Length of the Cell} \rangle$

ビーズの周辺部で抽出される物体の認識には, 幅長・中心部空白部分の大きさ・長手長の三つの認識用パラメータのデータベースとの比較認識を用いる。この決定条件をPとすると

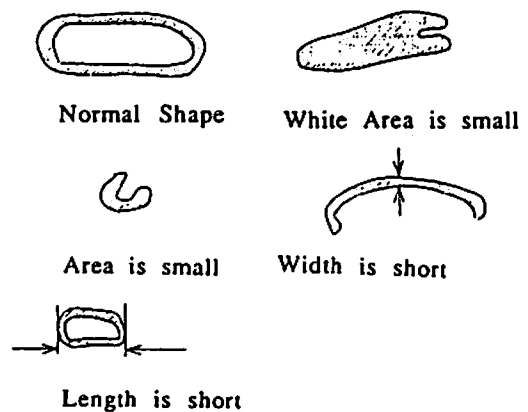


図11 ビーズの周辺部分で抽出した細胞

$\langle P \rangle ::= \langle \text{Width, White Area, Length} \mid$   
 $\langle \text{Width} \geq a \rangle, \langle \text{White Area} \geq b \rangle,$   
 $\langle \text{Length} \geq c \rangle \rangle$   
 $\langle a \rangle ::= \langle \text{The Threshold of the Area Gained by}$   
 $\text{this Experiment} \rangle$   
 $\langle b \rangle ::= \langle \text{The Threshold of the White Area}$   
 $\text{Gained by this Experiment} \rangle$   
 $\langle c \rangle ::= \langle \text{The Threshold of the Length Gained}$   
 $\text{by this Experiment} \rangle$   
 $\langle \text{White Area} \rangle ::= \langle d, e \mid \langle \text{White Area}$   
 $= d + e \rangle \rangle$

$\langle d \rangle ::= \langle \text{The Length of the White Part of the}$   
 $\text{Direction of the Length in the Cell} \rangle$   
 $\langle e \rangle ::= \langle \text{The Length of the White Part of the}$   
 $\text{Direction of the Width in the Cell} \rangle$

3.5 ファジィ推論による認識

**3.5.1 メンバシップ関数について** 図12に示すメンバシップ関数を四つ設定した。これらは、3.2節で述べた認識用パラメータ[幅長, 複雑度, (長手長/幅長)]の三つのメンバシップ関数と細胞確率のメンバシップ関数である。ただし、面積はノイズ除去の段階で既に考慮されている。人間の細胞判断に基づいて、幅長, 複雑度に関しては三つの山, (長手長/幅長), 細胞確率の山は二つにわける。AZ, BZは実験から求めた標準的な細胞の値域であり, AN, BNは標準より小さい値域の山, AP, BPは標準より大きい値域の山である。また, CPが実験から求めた標準的な細胞の値域であり, CNが標準より小さい値域の山である。細胞確率のメンバシップ関数において, D(Dust)はゴミの山で, C(Cell)は細胞の山で, 横軸に細胞である確率をとる。

**3.5.2 三次元ルールマップについて** 三つのメンバシップ関数[幅長・複雑度・(長手長/幅長)]の各山における18個の複数の組合せに対して, ゴミか細胞のどちらであるかを記述したものが図13に示すルールマップである。Dがゴミ, Cが細胞である。例えば, 「AN, BZ, CNの組合せなら, おそらくゴミであろう」, のように記述したものである。

**3.5.3 ファジィ演算について** 本処理では, max-min演算による推論を行い, 重心を取る方法を用いる。n番目のルール・マップに記されている幅の長

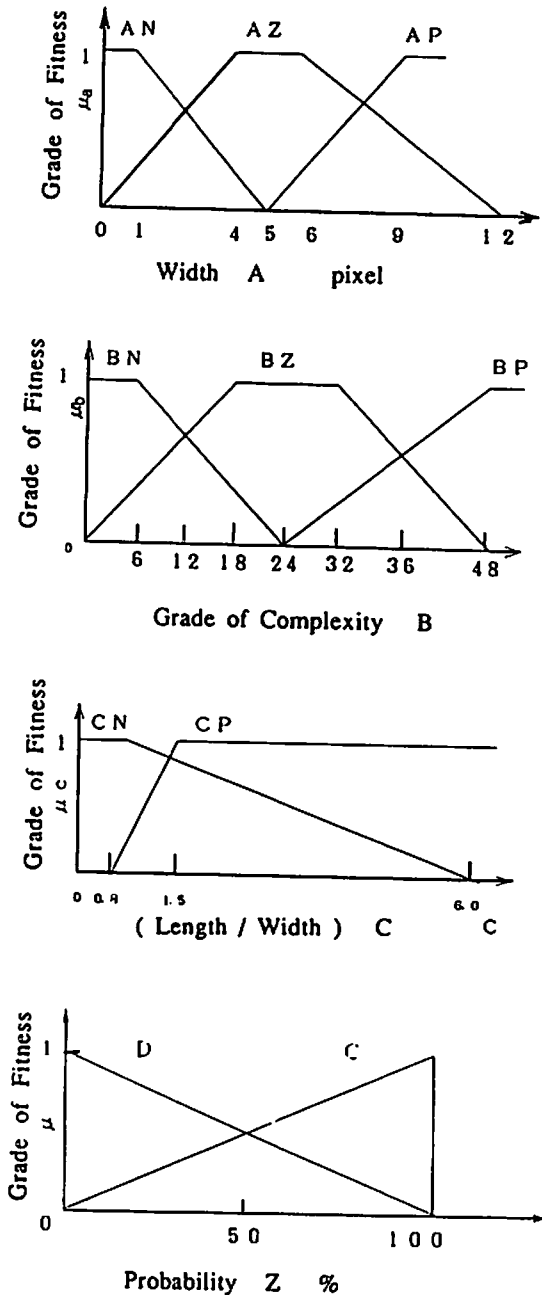


図12 メンバシップ関数

	AN	AZ	AP
B N	CN D	CN D	CN D
B Z	CN D	CN C	CN D
B P	CN D	CN D	CN D
	CP C	CP C	CP D
	CP C	CP C	CP D
	CP D	CP D	CP D

図13 ルールマップ

さ  $A$ , 複雑度  $B$ , 長手方向の長さ と幅方向の長さの比  $C$  とすれば, これらそれぞれの山に対する適合度を  $\mu_a, \mu_b, \mu_c$  とすると, 細胞確率のメンバシップ関数に使用する最終適合度  $\mu$  は, max-min 演算で求められる.

$$\mu = \min(\mu_a, \mu_b, \mu_c)$$

さて, 領域は全部で 18 個あるから, これらについて上記の計算を繰返していく. 図 14 を参照して  $n$  番目について考えると,

上記の面積:  $S_n$

重心:  $Zg = G_n/S_n$

とすれば,  $S_n, G_n$  は以下ようになる.

①  $n$  番目のルール・マップが  $D$  の時

$$S_n = \int \mu(z) dz = 50(2 - \mu)\mu$$

$$G_n = \int z * \mu(z) dz = 5000/3 * [-(1 - \mu)^3 + 1]$$

②  $n$  番目のルール・マップが  $C$  の時

$$S_n = \int \mu(z) dz = 50(2 - \mu)\mu$$

$$G_n = \int z * \mu(z) dz = 10000 * [-\mu^3/6 + 1/2]$$

最終結果として出す細胞である確率  $\psi$  は, これら 18 個の領域すべての平均と考えればよいから,

$$\psi = \frac{\sum_{n=1}^{18} \left( \frac{G_n}{S_n} \right)}{18}$$

$\psi$  の値域は,  $[33.3 \leq \psi \leq 66.6]$  であり,  $\psi = 50$  がちょうど中心となる. そこで, 本研究では,  $\psi \geq 50$  を満たす場合を細胞であると決める.

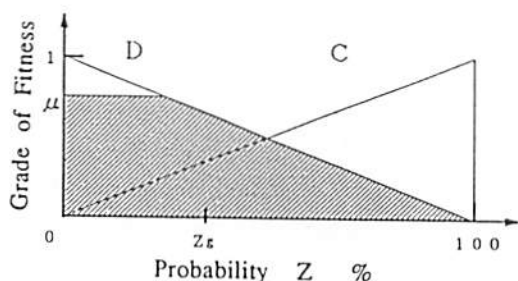


図 14 ファジィ重心計算

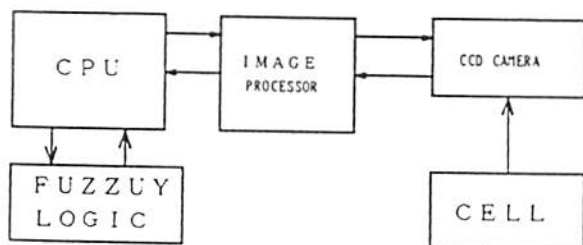


図 15 実験装置システムの概略図

3.6 ビーズの中央部と周辺部間の二重カウント問題 ビーズの中央部と周辺部との間には, 重複した領域が存在しているため, 二重カウントされる物体が存在する可能性がある. ビーズの中央部, 周辺部で細胞と判断されたものは, 物体の中心位置が記憶されており, 両領域において認識した細胞の中心間の距離が  $L$  以内であれば, 二重カウントされたものと判断する. 各ビーズについて, 二重カウントされた物体の数を数える. 本処理では,  $L=3$  画素とした.

#### 4. 実験方法および結果

ビーズの入っている液体を一滴スポイトで取り, ガラス板上に乗せ 200 倍に拡大して, ビーズ上の細胞がよく見え, またビーズの輪郭線もよく見えるようにピントと明るさを調整する. そして, 画像を取り込み画像データをディスク上にセーブする. また, ステージを動かしてビーズ細胞がない所を見つけ, この画像(減算画像)も撮っておく. 後は, 本システムで画像認識をさせ, ビーズに乗った細胞の数をカウントする. これと人間が目視で数えた細胞数を比較して, その精度を求める. 実験システムの概略図を図 15 に示す.

人間とコンピュータが認識した細胞の数を比較したものを図 16 に示す. 本実験では, 平均認識誤差率は 5% である. 本実験で, 誤差が生じた場合があるが, これはビーズの周辺部にある細胞のカウントが不正確であったためである. 認識では, ビーズの中央部において, ファジィ推論を採用したことにより人間とほぼ同じ判断を下すことができた. また, 実行時間に関しては, ビーズ 1 個当たり平均 24 秒であり, 従来の処理<sup>(1)</sup>の 15 倍となったので十分な成果を得られた.

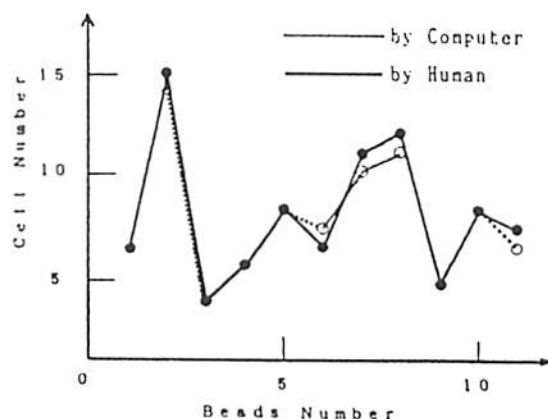


図 16 人間とコンピュータとの認識比較

## 5. 結 論

本研究では、バイオプロセスにおけるビーズ上の動物細胞の繁殖の度を自動的に画像計測することを目的とし、ファジィ推論認識法と輪郭線追跡によるビーズの認識法を用いて、

- (1) 認識率向上,
- (2) 処理時間の高速化

に対し、本手法の有効性を示した。

本認識システムは、ビーズが接し合っている場合か、または接していない時にのみ有効であり、ビーズの重なりが大きくなると適用できない。これは今後の課題

である。

## 文 献

- (1) 福田・長谷川, 機論, 画像処理エキスパートシステムによるマイクロ・キャリア上動物細胞の視覚認識・計測法, 投稿中(1990).
- (2) 福田・長谷川, 機論, 55-512, C(1989), 959.
- (3) 小林, ヒト繊維芽細胞による $\beta$ 型インターフェロンの生産(4), 4-6(1987), 473, BIO INDUSTRY.
- (4) 尾崎・谷口, 画像処理—その基礎から応用まで第2版, (1983), 153-174, 207-260, 共立出版.
- (5) 長谷川・興水・中山・横井, 画像処理の基本技法, (1986), 56, 技術評論社.