

アスベスト大気検査のための蛍光顕微鏡画像の解析

市田 越子[†] 河崎 哲男[†] 青木 功介[†] 松田 俊寛[†] 河尻 寛之[†]

関口 潔^{††} 西村 智基^{†††} 石田 丈典^{†††} Alexandrov Maxym^{†††} 黒田 章夫^{†††}

[†]株式会社インテック 先端技術研究所 〒930-0804 富山市下新町5番33号

^{††}有限会社シリコンバイオ 〒739-0046 東広島市鏡山3-10-31

^{†††}広島大学大学院 先端物質科学研究科 〒739-8530 広島県東広島市鏡山1-3-1

E-mail: fichida_etsuko@intec.co.jp

あらまし 現状の環境大気中に浮遊するアスベスト（石綿）の検査方法には検出感度や検出スピードの課題がある。筆者らは大気中のアスベストの検査を高速、簡易に行う事を目的として、蛍光顕微鏡画像からアスベストを自動計測できるソフトウェアを開発してきた。しかしながら、測定環境が変わった場合やサンプル毎の性質の違い等に起因してソフトウェアの認識の精度が低くなる事が分かった。そこで、本研究では、測定環境に依らずアスベストの計測精度を高めるように多段階で蛍光顕微鏡画像の輝度補正を行った。また、これらの輝度補正手法による認識精度の改善効果を検証した。

キーワード 顕微鏡画像, 蛍光画像, バイオイメージング, 輝度補正, アスベスト

1. はじめに

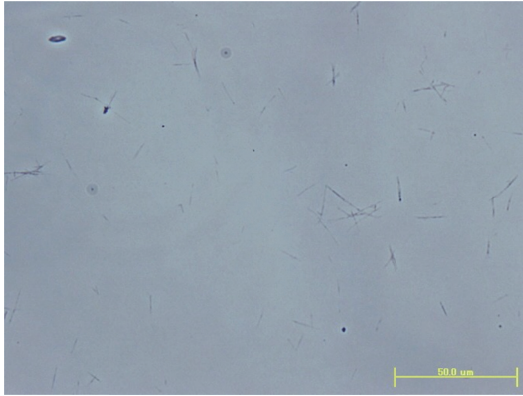
アスベストは長期にわたって大量に吸い込むことで、肺線維症（じん肺）、悪性中皮腫の原因になると言われており、肺がんを起こす可能性もあることが知られている。日本においては、「労働安全衛生法施行令」の改正により、昭和50年に吹き付けアスベストの使用が禁止され、平成7年にはアモサイト及びクロシドライトの製造、輸入、使用の禁止、平成16年にはアスベストを含む建材、摩擦材等の製造、輸入、使用の禁止、さらに平成18年9月にはアスベスト含有製品の製造、使用が全面禁止され、石綿ばく露防止対策の徹底、届け出が義務付けられている。また、関係省庁や地方自治体を中心に、現在も継続的にアスベストの使用実態調査と除去作業が続けられている。しかしながら、民間等を含む既設建築物には4,000万トン以上のアスベスト含有建材(1wt%以上含有アスベスト建材)が使用されているとも言われており、その解体による排出量が2014年から2024年頃にピークを迎えると予測されている[1]。その際、アスベストの飛散がないかどうかを現場で調べなければ、再び大きなアスベスト問題を引き起こすと考えられる（解体現場でのアスベストリスク）。

現状の環境大気中に浮遊するアスベスト検査の方法としては、フィルターを通してポンプで吸引し、フィルターを透明化した後、位相差顕微鏡で観察する方法（位相差顕微鏡法）が最も使用されている。しかしアスベストと非アスベスト繊維の判定が難しく、検査に熟練が必要、検査者による結果のばらつきが大きいという問題がある。また、位相差顕微鏡では光学的な限界により幅0.25 μm以下の超微細アスベストは検出できない問題がある。

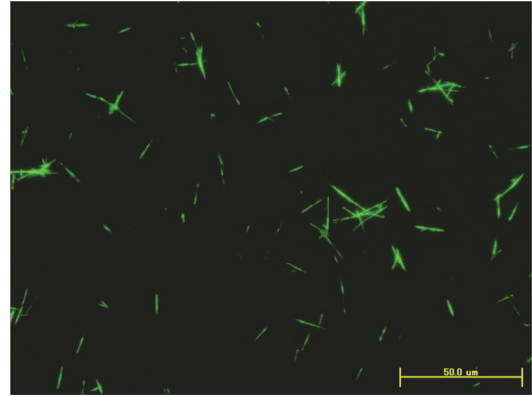
大気中の総繊維濃度が1本/ℓ以上の場合、電子顕微鏡によって観察する方法（電子顕微鏡法）も実施されている。電子顕微鏡法では微細なアスベストを検出可能であり、また、エネルギー分散型X線解析装置によりアスベスト種類の同定が可能である。しかしながら、電子顕微鏡による分析は熟練が必要な上、高倍率での観察が必要であり、検査に非常に時間がかかる。その為、解体現場の迅速な分析には不向きである。

一方、広島大学ではアスベスト特異的結合タンパク質を発見し、このタンパク質を蛍光物質で修飾することにより、フィルター上のアスベストを蛍光顕微鏡でとらえる方法（バイオ蛍光法）を開発した（JST 先端計測機器開発事業、要素技術開発平成19年-22年度）[2]。バイオ蛍光法では繊維が蛍光色を発しているため、位相差顕微鏡法と比較して、アスベストを容易に観察できる。同じ視野の顕微鏡画像で比較した場合、その差は顕著である（図1）。また、バイオ蛍光法は、低倍率で約80nm幅の微細なアスベストを観察でき、蛍光画像内に見られる繊維の殆どがアスベストであるため、建物解体現場や作業現場等でアスベストを迅速かつ簡易に検出する手法として有望視されており、環境省発行のアスベストモニタリングマニュアル第4.0版[3]にこの手法が紹介されている。このように、バイオ蛍光法は高感度にアスベストを検出できる方法であるが、筆者らは更に、バイオ蛍光法におけるアスベスト検査において、熟練の計測者以外でも簡単に計測を実施し、かつ計測時間の高速化を実現するため、アスベストの計測を自動化するソフトウェアの開発を行った[4],[5]。

本稿では、アスベストの自動計測を可能にするソフトウェアの概要及び、現状のソフトウェアの計測精度の問



位相差顕微鏡



蛍光顕微鏡

図1 位相差顕微鏡法と蛍光顕微鏡法(バイオ蛍光法)との比較

題点について説明し、精度改善のために考案した3通りの輝度補正アルゴリズムとその検証結果について述べる。

2. 自動計測ソフトウェア

2.1. ソフトウェア概要

アスベスト自動計測ソフトウェアは、従来のアスベスト検査方法より高速、簡易にアスベスト検査を可能にすることを目的として開発した。本ソフトウェアでは、蛍光顕微鏡画像から繊維状の物質であるアスベストを瞬時に自動計測するものであり、バイオ蛍光法による蛍光試薬と蛍光顕微鏡と小型 PC とで構成されるプロトタイプシステム(図2)を導入して動作させる。



図2 プロトタイプシステム

現在までのところ、以下の機能を有したソフトウェアを開発している。

- 1 画像あたり数秒で自動計測(検査に必要な 50 視野の画像を 5 分以内)
- アスベスト繊維数、長さ、幅、アスペクト比の自動計測
- 交差しているアスベストの自動識別

アスベストモニタリングマニュアルによれば、アスベストが単繊維(他との重なりのない1本の繊維)の場合は「長さ 5 μm 以上、幅(直径) 3 μm 未満で、かつ長

さと幅の比が 3 : 1 以上の繊維状物質を 1 本と数える」というルールがあり、この基準のもと顕微鏡画像を解析している。具体的には、蛍光の輝度の高い部分を自動で抽出し(図3)、抽出領域を囲った矩形の長辺の長さを L、輝度部分の面積を A とした場合、繊維の幅 W は式(1)より求める。

$$W=A/L \quad (1)$$

また、L と W よりアスペクト比 P を算出する。

$$P=L/W \quad (2)$$

算出したアスペクト比 P が 3 以上のものをアスベストとすることができる(図4)。

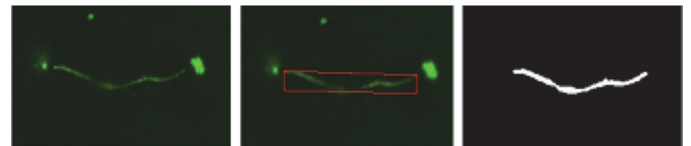


図3 アスベスト形状の算出

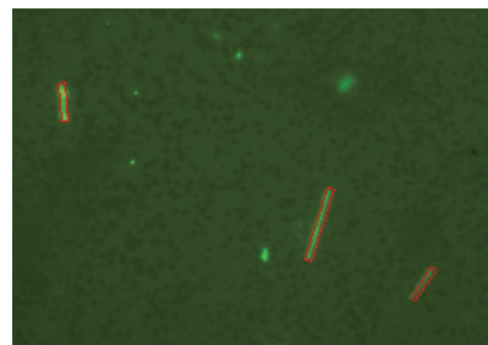


図4 認識したアスベストの例

2.2. ソフトウェアの課題

自動計測ソフトウェアでは、強く光るアスベストや単純な形状のアスベストを正確に認識可能である。しかし、蛍光顕微鏡・CCDカメラ等の測定機器が変わった場合や、サンプル毎の性質の違い等に起因して、様々な蛍光

画像が取得され、上記アスベスト認識の精度が低くなる。解体現場等で誰もが簡単に自動計測を実施するためには、このような測定環境やサンプル毎の状態の依存が少なく、高精度なアスベストの認識を行える必要がある。

撮影した蛍光顕微鏡画像を分析した結果、特に以下のような問題がみられた。

- 外部照明や顕微鏡の光源の影響により、蛍光画像の輝度が不均一になっている箇所やムラがあるため、画像の一部の領域でアスベストを認識できない
- 蛍光顕微鏡やCCDカメラの種類、機器の設定値の影響により、輝度が低い画像が撮影され、アスベストの視認性が悪くなる
- 測定環境の影響により、蛍光強度が強い場合は、アスベストの発する蛍光強度が強くなり、繊維が実際より太く検出される
- 蛍光試薬とアスベスト繊維の結合状態の違いや顕微鏡の焦点距離により、同一画面内でアスベストの輝度に違いが生じる

上記のソフトウェアの問題点を改善する為、実サンプルでの計測をベースに、新たに段階的に顕微鏡画像を輝度補正する手法について考案した。

次章では、輝度補正を含むソフトウェアの処理手順について説明する。

3. 改良手法

認識精度の課題を解決するため、アスベスト認識処理の前段階において、蛍光顕微鏡画像の輝度を補正する手法を検討した。新たにソフトウェアの処理手順に組み込んだのは、次に示す輝度補正手法である。

- ① 輝度ムラ補正
- ② ヒストグラム分布正規化
- ③ 適応型コントラスト調整

これらの三段階の輝度補正処理は、取得した顕微鏡画像から順次実施し、最終的に、これら輝度補正後の画像について従来のアスベスト認識処理にかけ、認識精度の向上を図る(図5)。

輝度ムラ補正では、蛍光画像の輝度が不均一になっている箇所やムラを修正することを目的としている。ヒストグラム分布正規化処理では、バックグラウンドの輝度が低くアスベストの視認性が低い蛍光画像に対してバックグラウンドの輝度を高くするとともに、蛍光の強度が強い画像に対して蛍光画像の輝度を調整する。また、適応型コントラスト調整では、サンプルの状態の差異を吸収するための輝度補正として、画像の部分的な輝度調整を目的とする。

次章からは、それぞれの輝度補正アルゴリズムについて説明する。

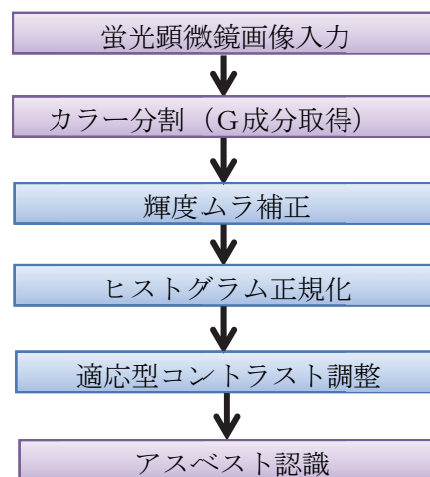


図5 改良手法

4. 輝度ムラ補正

顕微鏡像を撮影する際の照明の条件や顕微鏡の光源の影響により、画像には領域によって輝度のムラが生じる。特に画像の中央部分の輝度が高くなり、辺縁部の輝度が低くなる傾向がみられる(図6)。

そこで、入力画像のバックグラウンド領域の輝度分布から照明の条件によって生じる輝度ムラを予測し、自動的に画像を補正する方法を検討した。

輝度ムラ補正のアルゴリズムでは、まず、撮影画像MのヒストグラムHを作成し、その下限0~70%の範囲の輝度と座標を取得した(図7)。

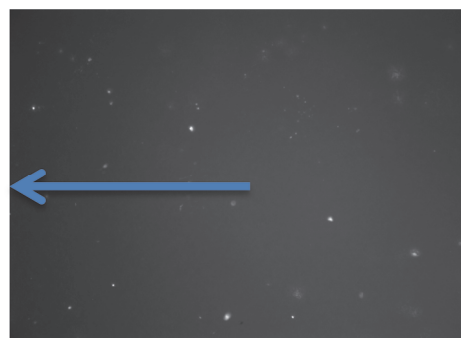


図6 撮影画像Mの輝度ムラの様子



図7 ヒストグラムH

次に、取得した輝度分布から輝度の最高値と最低値を求め、これらの値を含む座標から高輝度領域と低輝度領域を推定した。さらに、この高輝度領域と低輝度領域を基準とし、画像全体にわたって輝度の高低を表す輝度推定マップX(図8)を作成した。続いて、輝度推定マッ

プ X の輝度値を反転し、もとの撮影画像の輝度値に加算した補正画像 N を生成した。

$$N_{(i,j)} = M_{(i,j)} + \neg X_{(i,j)} \quad (3)$$

($M_{(i,j)}$ は画像 M の座標(i, j)における輝度値)

補正画像 N では、画像内のバックグラウンドが明るい領域は変化せず、暗い領域ではバックグラウンドの輝度を高くなる。その結果、画像全体のムラが改善され、バックグラウンドの輝度が均一になる (図 8)。

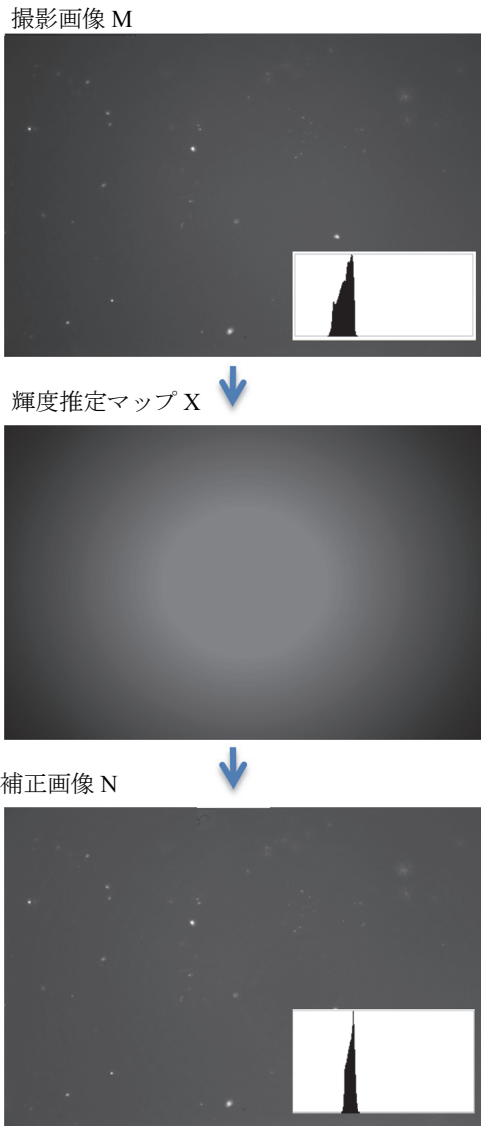


図 8 輝度ムラ補正

5. ヒストグラム正規化処理

顕微鏡やカメラなどのハードウェアの違いや同じハードウェアでも露光時間などの設定の違いにより、撮影画像の輝度の高さやコントラストには違いが生じる。図 9 は視野が同じであり、使用する顕微鏡とカメラは同一であるが CCD カメラの露光時間は 500msec, 1000msec と異なる。この 2 枚の画像はバックグラウンドの輝度分布

に違いがあり、露光時間の長い撮影画像 2 では 2 本のアスベストを確認できるが、撮影画像 1 ではそれらを視認するのが難しい。

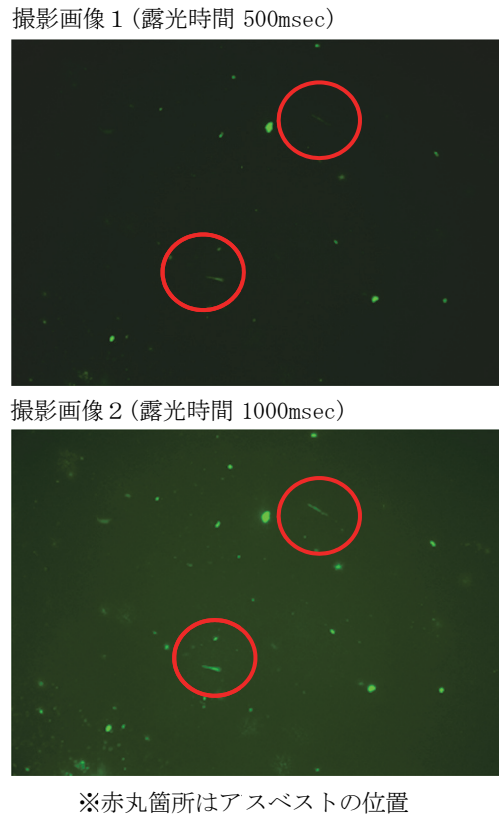


図 9 同視野で露光時間の異なる撮影画像

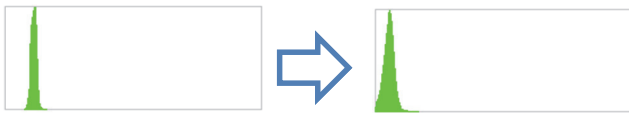
このような使用する顕微鏡やカメラに起因する測定環境の差異を吸収し、撮影画像の輝度のバラつきを補正する方法として、画像ヒストグラムを正規化する手法を検討した。ヒストグラムの正規化とは、蛍光画像の輝度分布を解析し、同様の背景色や前景色となるようにヒストグラムを最適化するものである。まずは、顕微鏡画像 P のヒストグラム下限 20% を画像の輝度下限値 P_{low} として算出する。また、ヒストグラム上限 1% を画像の輝度上限値 P_{high} として算出する。さらに、式(4)により、補正画像 Q の輝度下限値が 0、輝度上限値が 255 となるように画像のヒストグラムを線形的に変換し、正規化した補正画像 Q を得る。

$$Q_{(i,j)} = \frac{255-0}{P_{high}-P_{low}}(P_{(i,j)} - P_{low}) \quad (4)$$

(ただし、 $P_{(i,j)} < P_{low}$ の場合は $Q_{(i,j)}=0$
 $P_{(i,j)} > P_{high}$ の場合は $Q_{(i,j)}=255$)

ヒストグラム正規化の結果 (図 10)、同一視野で露出時間の異なる撮影画像 1 と撮影画像 2 において、ほぼ同一の輝度分布の画像が得られる (図 11)。また、撮影画像 1、撮影画像 2 共にアスベストを 2 本視認することができる。

撮影画像1のヒストグラム正規化:



撮影画像2のヒストグラム正規化:

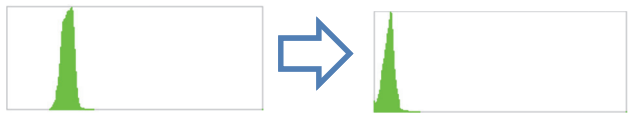
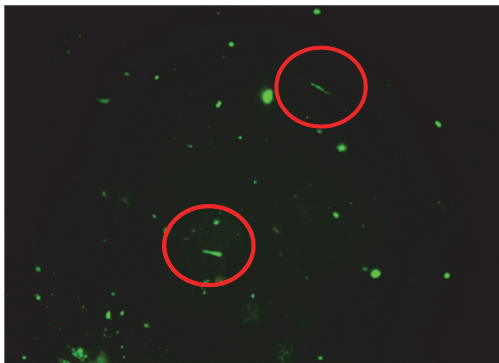
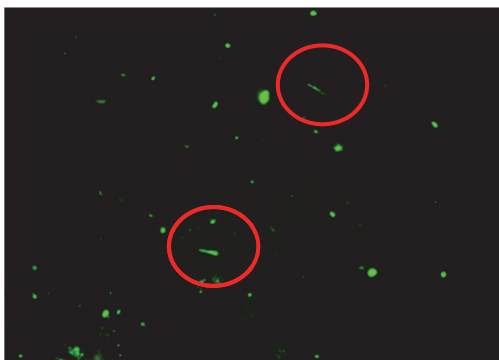


図10 ヒストグラム正規化

撮影画像1の補正画像



撮影画像2の補正画像



※赤丸箇所はアスベストの位置

図11 ヒストグラム正規化後の補正画像

6. 適応型コントラスト調整

試薬の反応性の影響やピントの状態によって生じる撮影画像のアスベストの輝度の違いの問題、また、1本のアスベストでも蛍光色の強い部分と弱い部分がある問題によって、自動認識が難しい場合がある(図12)。そこで、画像内の局所領域で輝度の低い部分を調整する、適応型コントラスト調整を検討した。

手法としては、まず、撮影画像Pについて縦と横の長さが等しくなるように柵目状に分割し、複数の小領域画像 $P_1 \sim P_N$ (N は小領域の数)を生成する。次に、小領域画像 P_T ($1 \leq T \leq N$)において、前章で述べたヒストグラム正規化処理を施し、補正画像 Q_T を生成する。同様に、全ての小領域画像 $P_1 \sim P_N$ において補正画像 $Q_1 \sim Q_N$ を生成する。最終的には補正画像 $Q_1 \sim Q_N$ を結合して、1枚の

補正画像Qを得る(図13)。

図14は輝度値の高さを3次元座標に置き換えて表示した画像である。撮影画像においては、輝度の高いアスベストは殆ど見られないが、適応型コントラスト調整による補正画像では、多くのアスベスト領域で輝度が高くなる。このように、適応型コントラスト調整では、アスベストを含む局所領域において正規化を行うことにより、部分的に輝度が低く、バックグラウンドに埋もれて見えないアスベストを強調し、補正した画像を生成する。

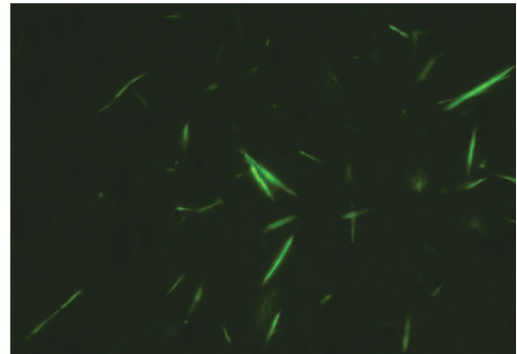
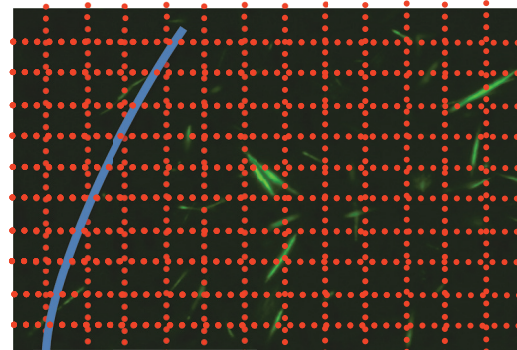


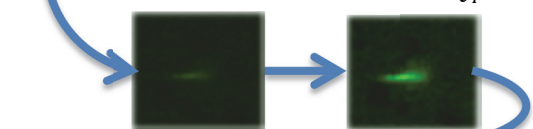
図12 輝度にバラツキのある撮影画像

撮影画像Pを小領域分割



小領域画像 P_T

補正画像 Q_T



補正画像Q

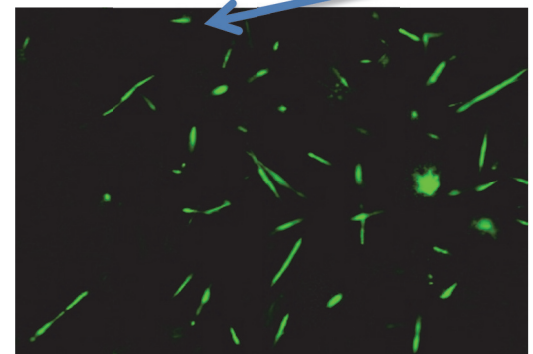
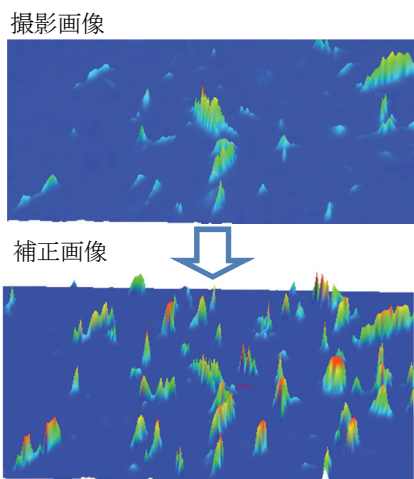


図13 適応型コントラスト調整



(輝度の高い順に赤，黄，緑，青で表示される)

図 14 輝度の 3 次元表示

7. 輝度補正の結果

「輝度ムラ補正」，「ヒストグラム正規化」，「適応型コントラスト調整」の輝度補正の効果を検証する為，以下の 4 パターンでアスベストの認識精度を比較した。

- 補正なし
- 補正 1(輝度ムラ補正)
- 補正 2(輝度ムラ補正，ヒストグラム正規化)
- 補正 3(輝度ムラ補正，ヒストグラム正規化，適応型コントラスト調整)

344 枚の蛍光顕微鏡画像（うちアスベスト本数 296 本）についてアスベストの自動認識を行った。その結果，補正なしの場合は認識精度 81.8%（242 本/296 本）であったが，輝度ムラ補正，ヒストグラム正規化，適応型コントラスト調整を実施した場合はそれぞれ認識精度が 85.1%，91.1%，93.2%と段階的に向上した（図 15）。各々の手法によってアスベスト認識精度の改善を確認できた。

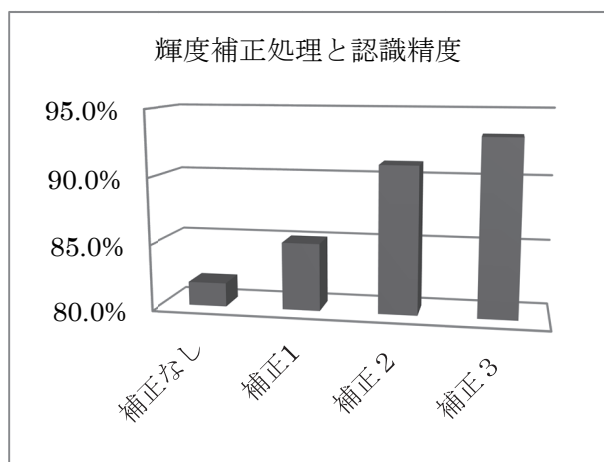


図 15 輝度補正処理と認識精度

8. 結論

筆者らは大気中のアスベストの検査を高速，簡易に行う事を目的として，蛍光顕微鏡画像からアスベストを自動計測できるソフトウェアを開発してきたが，測定環境が変わった場合やサンプル毎の性質の違い等に起因してソフトウェアの認識の精度が低くなる事が分かった。そこで，本稿では計測精度の改良を行うため，測定環境に依らずアスベストの計測精度を高めるように多段階で蛍光顕微鏡画像の輝度補正を行った。実施したこれらの輝度補正の効果について検証した結果，各々の手法を組み合わせる事によってアスベスト認識の精度が改善されることが分かった。

引き続き，様々な試料での計測を重ね，更にアスベストモニタリングマニュアルに正式に準じる形での計測を行い，高速，簡易にアスベスト検査が可能なソフトウェアを完成させたい。

また，1995 年 1 月の阪神・淡路大震災や 2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災では多くの建物が倒壊したが，震災後の建物の撤去作業中にはアスベストなど有毒物質の飛沫を吸ってしまう危険性がある[6]。今後は更に，このような震災の現場において，迅速なアスベスト検査が可能であるか，ソフトウェアの有効性を検証したいと考えている。

尚，現在，本研究は独立行政法人科学技術振興機構による産学イノベーション加速事業【先端計測分析技術・機器開発】の開発課題「バイオ蛍光法によるアスベスト自動計測ソフトウェアの開発」に採択され，研究を行っている。

文 献

- [1] “石綿含有窯業系建築建材の石綿無害化及び健康影響に係る安全性の調査”，日本石綿協会， pp.1, 2005.3.
- [2] T. Ishida, M. Alexandrov, T. Nishimura, K. Minakawa, R. Hirota, K. Sekiguchi, N. Kohyama, A. Kuroda, “Selective detection of airborne asbestos fibers using protein-based fluorescent probes,” , Environ. Sci. Technol. 44, pp755-759, 2010 .
- [3] ”アスベストモニタリングマニュアル（第 4.0 版）”，環境省，2010.6.
- [4] 黒田章夫，西村智基，Maxym Alexandrov，石田丈典，関口潔，河崎哲夫，青木功介，”バイオによるアスベスト簡易検出技術”，産業と環境，no.11, pp29-32, 2008.
- [5] 市田越子，青木功介，河崎哲夫，”アスベスト検出装置”，特願 2008-254674, 2008.
- [6] 宮本憲一 他，”終わりになきアスベスト被害”，岩波ブックレット， ISBN 978-4-00-270801-0, 2011.1.