

# 学位論文

## 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)

平成 20 年 6 月 博士（環境学）申請

東京大学大学院新領域創成科学研究科

環境システム学専攻

井上 靖雄

## 目次

第1章	序論	1
1.1.	アスベスト問題の背景	2
1.1.1.	アスベスト問題の社会的背景	2
1.1.2.	一般環境におけるアスベスト濃度	5
1.1.3.	環境問題におけるアスベスト問題の特徴	5
1.2.	計数手法	6
1.2.1.	位相差顕微鏡法 (PCM 法)	6
1.2.2.	電子顕微鏡法	8
1.2.3.	分散染色法	8
1.3.	PCM 法の問題点	12
1.3.1.	計数操作全体のばらつき	12
1.3.2.	計数におけるばらつき	12
1.3.3.	視野選択のばらつき	12
1.3.4.	トレーサビリティ	13
1.3.5.	熟練者の確保	13
1.3.6.	PCM 法の問題点の整理	13
1.4.	自動計数技術	13
1.4.1.	Magiscan	13
1.4.2.	AFACS	14
1.4.3.	画像処理を用いた自動計数技術の問題点	14
1.5.	本研究の目的	15
第2章	視野数と精度の関係	16
2.1.	緒言	17
2.2.	PCM 法の精度に関する表現	17
2.2.1.	統計学的な誤差表現	17
2.2.2.	検出限界と定量限界	18
2.3.	シミュレーション条件	19
2.3.1.	考慮するばらつきの要因	19
2.3.2.	観察視野数と試行回数	19
2.3.3.	濃度条件	19
2.3.4.	サンプリング条件	19
2.4.	手法	20
2.4.1.	使用したソフトウェア	20

2.4.2.	仮想視野への配分確率 .....	20
2.4.3.	仮想視野データの作成方法 .....	21
2.4.4.	選択視野データの作成方法 .....	21
2.5.	結果 .....	22
2.5.1.	総繊維数 $NF$ .....	22
2.5.2.	フィルタ上の繊維分布 .....	22
2.5.3.	視野数と繊維数の関係 .....	29
2.5.4.	視野数と繊維数の RSD の関係 .....	29
2.6.	考察 .....	33
2.6.1.	濃度と必要視野数の関係 .....	33
2.6.2.	少視野数かつ高濃度条件でのばらつき .....	33
2.6.3.	視野選択方法 .....	34
2.7.	結言 .....	34
第 3 章	自動標本観察システム .....	35
3.1.	緒言 .....	36
3.2.	システムの概略 .....	36
3.3.	システム構成要素の詳細 .....	40
3.3.1.	分解能（対物レンズと CCD カメラ） .....	40
3.3.2.	自動 XY ステージ .....	43
3.3.3.	オートフォーカスのアルゴリズム .....	44
3.3.4.	深度合成アルゴリズム .....	46
3.3.5.	オートローダ .....	46
3.3.6.	制御ソフトウェア .....	48
3.4.	システムの検証 .....	49
3.4.1.	オートフォーカスの精度検証—石綿クロスチェック試料の場合 .....	49
3.4.2.	オートフォーカスの精度検証—除去現場サンプルの場合 .....	51
3.4.3.	オートフォーカスとシステムの適用範囲との関係 .....	53
3.4.4.	速度性能 .....	55
3.5.	結言 .....	57
第 4 章	自動計数アルゴリズム .....	58
4.1.	緒言 .....	59
4.2.	アルゴリズムの概略と画像処理ライブラリの利用 .....	59
4.3.	前処理 .....	60
4.3.1.	PCM 法の前処理 .....	60
4.3.2.	分散染色法の前処理 .....	64
4.4.	オブジェクトの認識 .....	65

4.4.1.	従来の2値化手法.....	65
4.4.2.	エッジ認識による2値化手法.....	66
4.5.	オブジェクトの計数.....	70
4.6.	自動計数の実例.....	71
4.6.1.	アモサイトサンプルへの適用結果（多視野観察時の濃度比較）.....	71
4.6.2.	「石綿クロスチェック試料」サンプルへの適用結果（視野ごとの計数比較）.....	72
4.6.3.	除去現場サンプルの適用結果（実サンプルへの適用）.....	73
4.6.4.	本アルゴリズムの適用範囲.....	75
4.7.	自動計数アルゴリズムのまとめ.....	75
第5章	結論.....	76
5.1.	まとめ.....	77
5.2.	今後の展望.....	78
5.2.1.	分散染色法への応用.....	78
5.2.2.	実績の蓄積.....	78
5.2.3.	周辺技術および操作内容の標準化.....	78
謝辞	.....	79
参考文献	.....	80
Appendix	.....	84
A.1.	アスベストの定義と物性.....	85
A.1.1.	定義.....	85
A.1.2.	化学的・物理的特性.....	85
A.2.	オートローダの動作機構.....	87
A.2.1.	動作機構.....	87
A.2.2.	制御機構.....	91
A.2.3.	コントロールプログラム.....	92
A.3.	オートローダ仕様.....	93
A.3.1.	スライドガラス搬送装置 全体図.....	94
A.3.2.	スライドガラス搬送装置主要部品リスト.....	95
A.3.3.	スライドガラス搬送装置制御盤 回路図 1.....	96
A.3.4.	スライドガラス搬送装置制御盤 回路図 2.....	97
A.3.5.	スライドガラス搬送装置制御盤 回路図 3.....	98
A.3.6.	スライドガラス搬送装置制御盤 回路図 4.....	99
A.3.7.	スライドガラス搬送装置制御盤 回路図 5.....	100
A.3.8.	スライドガラス搬送装置制御盤 回路図 6.....	101
A.3.9.	スライドガラス搬送装置制御盤 外観図.....	102



A.3.10.	スライドガラス搬送装置制御盤 部品リスト .....	103
A.3.11.	ローダ／アンローダ制御モジュール仕様 .....	104
A.4.	分散染色法への対応 .....	105
A.4.1.	自動回転アナライザ .....	105
A.4.2.	分散染色画像の前処理 .....	111
A.5.	自動回転アナライザ仕様 .....	119
A.5.1.	仕様詳細 .....	119
A.5.2.	組図 .....	121
A.6.	PCM 法における低温灰化処理の有効性 .....	122
A.7.	シェーディング補正 .....	126
A.7.1.	はじめに .....	126
A.7.2.	ノイズ・シェーディング補正方法 .....	126

## 本文中の図表一覧

図 1.1	日本の石綿の輸入量の推移	3
図 1.2	石綿にさらされる業務による肺がん・中皮腫の労災認定者数	4
図 1.3	石綿含有建材の廃棄物予測	4
図 1.4	分散染色画像の実例	9
図 1.5	分散染色の光学系（左：Central Stop、右：Annular Stop）	10
図 1.6	液浸液物体における光の分散	11
図 1.7	浸液（L）と試料（S）の分散曲線	11
図 2.1	標準的な計数条件でのアスベスト濃度と統計学的な誤差の関係	18
図 2.2	フィルタ上の繊維分布（均一分布：10 f/L）	22
図 2.3	フィルタ上の繊維分布（均一分布：5 f/L）	23
図 2.4	フィルタ上の繊維分布（均一分布：1 f/L）	23
図 2.5	フィルタ上の繊維分布（均一分布：0.5 f/L）	24
図 2.6	フィルタ上の繊維分布（均一分布：0.1 f/L）	24
図 2.7	フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/2$ , 1 f/L）	25
図 2.8	フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/3$ , 1 f/L）	25
図 2.9	フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/4$ , 1 f/L）	26
図 2.10	フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/3$ , 10 f/L）	26
図 2.11	フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/3$ , 5 f/L）	27
図 2.12	フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/3$ , 1 f/L）（図 2.8 再掲）	27
図 2.13	フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/3$ , 0.5 f/L）	28
図 2.14	フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/3$ , 0.1 f/L）	28
図 2.15	繊維数と視野数の関係（均一分布）	30
図 2.16	繊維数と視野数の関係（中央分布： $\sigma = 1/3$ ）	30
図 2.17	繊維数の <i>RSD</i> と視野数の関係（2,000 視野：均一分布）	31
図 2.18	繊維数の <i>RSD</i> と視野数の関係（500 視野：均一分布）	31
図 2.19	繊維数の <i>RSD</i> と視野数の関係（2,000 視野：中央分布： $\sigma = 1/3$ ）	32
図 2.20	繊維数の <i>RSD</i> と視野数の関係（500 視野：中央分布： $\sigma = 1/3$ ）	32
図 2.21	仮想視野の繊維数密度の標準偏差	34
図 3.1	標本観察ユニットの概略図	37
図 3.2	自動標本観察システムの全体像（左：オートローダ、右：その他全体）	38
図 3.3	サンプルホルダ拡大図	38
図 3.4	対物レンズの比較（上：DM、下：DLL）	41
図 3.5	超高感度カメラによるサンプル画像（クリソタイル）	42
図 3.6	HSE/NPL スライドのグループ 6 の撮像例	43

図 3.7	コントラストカーブ .....	45
図 3.8	深度合成の実例 .....	47
図 3.9	制御用ソフトウェアのメインウィンドウ .....	48
図 3.10	クロスチェック試料の視野ガイド .....	50
図 3.11	除去現場でのサンプリング地点 .....	52
図 3.12	除去現場のセキュリティゾーン外部で得られたサンプルの視野画像例 .....	54
図 4.1	自動計数のフロー図 .....	59
図 4.2	前処理 (PCM 法) のフロー図 .....	61
図 4.3	PCM 画像の前処理の流れ .....	62
図 4.4	ピーク輝度の占める割合とサンプル濃度の関係 .....	64
図 4.5	オブジェクト認識のフロー図 .....	66
図 4.6	オブジェクト計数のフロー図 .....	70
図 4.7	アモサイト標準サンプルへの適用結果 .....	71
図 4.8	エッジ検出 1 段階目と 2 段階目の計数繊維構成 .....	72
表 1.1	アスベストの種類と鉱物 .....	2
表 1.2	一般環境のアスベスト繊維濃度 .....	5
表 1.3	気中のアスベスト濃度測定手法 .....	7
表 1.4	アスベスト繊維の屈折率と分散色 .....	9
表 2.1	サンプリング条件 .....	19
表 3.1	自動標本観察システムに用いた装置 .....	39
表 3.2	石綿クロスチェック試料によるオートフォーカスの検証結果 [視野数] .....	50
表 3.3	除去現場での捕集条件 .....	51
表 3.4	除去現場サンプルによるオートフォーカスの検証結果 .....	51
表 3.5	標本観察単位操作の所要時間 [s] .....	55
表 4.1	アモサイト標準サンプル .....	63
表 4.2	エッジ検出の設定条件 .....	68
表 4.3	エッジ連結の成立条件 .....	69
表 4.4	「石綿クロスチェック試料」の計数結果 (視野ごとの比較) .....	73
表 4.5	除去現場サンプルの計数結果 .....	74

## Appendix 中の図表一覧

Fig. 1	プレパラート支持体.....	87
Fig. 2	支持体のチャック、粗動ステージ、微動ステージ .....	87
Fig. 3	プレパラート支持体の顕微鏡のステージ.....	88
Fig. 4	プレパラート支持体を固定するためのステージ側の加工 .....	88
Fig. 5	プレパラート支持体の顕微鏡への導入（チャック離脱可能位置） .....	89
Fig. 6	プレパラート支持体の顕微鏡への導入（粗微動ステージの待機位置への後退） .....	89
Fig. 7	プレパラート支持体の顕微鏡への導入（ステージの観察距離までの上昇） .	90
Fig. 8	オートローダ制御ブロック図 .....	91
Fig. 9	自動回転アナライザ外観 .....	106
Fig. 10	自動回転アナライザボックス内部.....	106
Fig. 11	偏光板による光量減少 .....	107
Fig. 12	ロングシャッターによる撮影 .....	108
Fig. 13	シャッター時間を改良した自動回転アナライザを用いた標本観察フロー.	109
Fig. 14	自動回転アナライザによる分散色変化の例（アモサイト／ $n_D25^\circ\text{C} = 1.680$ ） .....	110
Fig. 15	前処理（分散染色法）のフロー図.....	111
Fig. 16	画像減算の例.....	112
Fig. 17	偏光板の回転角度と分散染色による発色.....	114
Fig. 18	偏光板の回転角度と分散染色による発色（続き） .....	115
Fig. 19	偏光板回転時の画像のずれ.....	117
Fig. 20	偏光板回転時の画像のずれの補正結果.....	118
Fig. 21	良好なコントラストが得られている画像.....	123
Fig. 22	背景の地模様が目立つ画像.....	123
Fig. 23	従来処理のサンプル.....	124
Fig. 24	低温灰化処理を行ったサンプル.....	124
Fig. 25	輝度分布 .....	125
Fig. 26	対象物を撮影した画像 .....	127
Fig. 27	対象物のない部分を撮影した画像.....	127
Fig. 28	中間値画像の諧調変換した画像.....	128
Fig. 29	ブランク画像のグレー画像.....	128
Fig. 30	グレー画像の諧調変換した画像.....	129
Fig. 31	グレー画像の諧調変換した画像から中間値の諧調変換画像を減算した画像 .....	129

Fig.32	減算した画像をフィルタ処理した画像.....	130
Fig.33	元画像のグレイ画像.....	130
Fig.34	元画像を補正処理した画像.....	131
Fig.35	3×3 の移動平均フィルタの加重マトリクス .....	131
Table 1 コントロールプログラムのライブラリ .....		92

# 第1章 序論

本章では、日本におけるアスベスト使用の歴史とアスベスト問題の特徴について述べる。また、既存のアスベスト繊維の計数方法を整理し、その問題点を指摘し、本研究の目的を導出する。

## 1.1. アスベスト問題の背景

日本におけるアスベスト問題の社会的な背景と、環境問題としての特徴について簡単に整理する。なお、本論文では特定の用語を除いて「石綿」とは表記せず、「アスベスト」と表記することとする。

### 1.1.1. アスベスト問題の社会的背景

アスベストとは、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（表 1.1）。古くは、古代エジプトではミイラを包む布として、中国・周の時代では火浣布（火で洗える布）として、また日本では「竹取物語」に登場する「火鼠の皮衣」はアスベストであったろうと考えられている（Wikipedia）。

現代においては、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（吹き付け剤、耐火被覆材、断熱材、床材、壁や天井の内装材、屋根材）、自動車の部品（ブレーキライニングやブレーキパッド、クラッチ関連部品）、電気製品、家庭用品など様々な形態で利用されてきた。詳細は Appendix に整理した。

2005 年のいわゆる「クボタショック」が記憶に新しいところであるが、それ以前にも、例えば阪神淡路大震災の折にも、倒壊した建築物の解体作業現場における曝露が問題になったことがあり、また、1980 年代には学校でのアスベスト使用が問題になっている。我々がアスベストに曝露する主要な経路としては経気曝露と経口曝露が存在しており、あまり知られていないが、飲料水中にも大量のアスベストが含まれている。しかし、健康への影響は少ないと考えられており、US EPA の飲料水の基準は 7 MFL (Million Fibers per Liter of water) と極めてゆるい基準値となっている (EPA, 2006)。

一方、アスベストの経気曝露による特有な疾患は、石綿肺、石綿肺がん、悪性中皮腫（胸膜、腹膜）などの存在が古くから知られており [厚生労働省, 2006]、1973 年には WHO の機関である国際がん研究機関 (IARC: International Agency for Research on Cancer) が、アスベストの発がん性を指摘している (IARC, 1973)。その後、WHO は 1989 年にクロシドライト（青石綿）とアモサイト（茶石綿）の使用禁止を勧告し、1980～90 年代にかけて、EU 諸国やアメリカではアスベストの使用が次々に禁止された [東敏昭, 2008]。日本では、2004 年に 1%以上含有する製品の製造などが禁止され [厚生労働省, 2003]、1986 年の ILO の石綿

表 1.1 アスベストの種類と鉱物

	アスベスト名	化学組成式
蛇紋石族	クリソタイル/Chrysotile (温石綿・白石綿)	$\text{Mg}_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$
	クロシドライト/Crocidolite (青石綿)	$\text{Na}_2(\text{Fe}^{2+}, \text{Mg})_3(\text{Fe}^{3+})_2\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH}, \text{F})_2$
	アモサイト/Amosite (茶石綿)	$(\text{Fe}, \text{Mg})_7\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$
角閃石族	アンソフィライト/Anthophyllite (直閃石綿)	$(\text{Mg}, \text{Fe})_7\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$
	トレモライト/Tremolite (透角閃石綿)	$\text{Ca}_2\text{Mg}_5\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$
	アクチノライト/Actinolite (陽起石綿)	$\text{Ca}_2(\text{Mg}, \text{Fe})_5\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$

条約を日本が批准したのは 2005 年 8 月であった [ILO, 2005]。同 2005 年には特定化学物質等障害予防規則より分離し、単独の規則である石綿障害予防規則（いわゆる石綿則）が制定され [厚生労働省, 2005]、また、労働災害認定基準も明確化されている [厚生労働省, 2006]。2006 年には、労働安全衛生法施行令が改正され全面禁止（石綿および石綿をその重量の 0.1% を超えて含有するすべての物の製造、輸入、譲渡、提供、使用が禁止）となった [厚生労働省, 2006]。

日本におけるアスベスト産出量はごくわずかであるので、輸入量はそのまま消費量と考えることができる。戦後 1949 年に輸入が再開されて以来、1970 年代に輸入のピークを迎え、全面禁止になった 2006 年に至るまでに累計の輸入量は 960 万トンあまりと見積もられている [日本石綿協会, 2007] (図 1.1)。国内においては、アスベストは全面禁止となっているため、製造にかかわる作業者の曝露、製造工場の近隣での曝露、作業者が衣類などに付着した状態で自宅に持ち帰ったアスベストによる家族の曝露という可能性は、現段階では解決されていると考えてもかまわない。現在は、

高度成長期に大量に使用されてきたアスベストの影響が、クボタの例のように長い潜伏期間を経て製造や取り扱いに携わってきた人への健康影響として現れており、特に中皮腫の認定件数が急増している [厚生労働省 労働基準局, 2005] [厚生労働省 労働基準局, 2008] (図 1.2)。また、アスベストの吹き付けや保温材を使用した建築物の老朽化が進むのに伴い、21 世紀中頃にかけて改修や解体が最盛期を迎えることは避けられない。今後 2020 年をピークとして、毎年 100 万トン以上のアスベスト含有建築材料が廃棄物として発生するとの予測 (図 1.3) がなされており [日本石綿協会, 2007]、解体作業時のアスベストが環境へ飛散する懸念が高まっている。このように、アスベスト問題は製造のフェーズの問題ではなく廃棄のフェーズの問題にシフトしている。いったん環境中に放出されたアスベストは通常的环境条件下で分解、変質しにくい性質を持ち、今後、中国などの途上国も日本と同じ歴史をたどることが予想されるため、大気中アスベスト濃度の測定を簡便にかつ精度よく実施する手法が求められている。

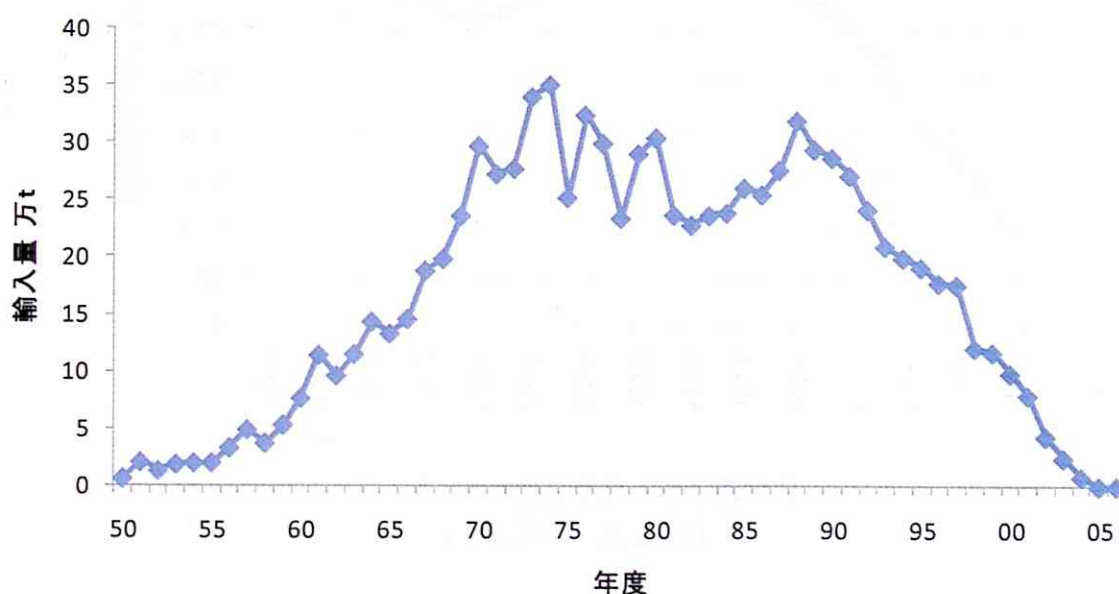


図 1.1 日本の石綿の輸入量の推移  
[日本石綿協会, 2007] より作成



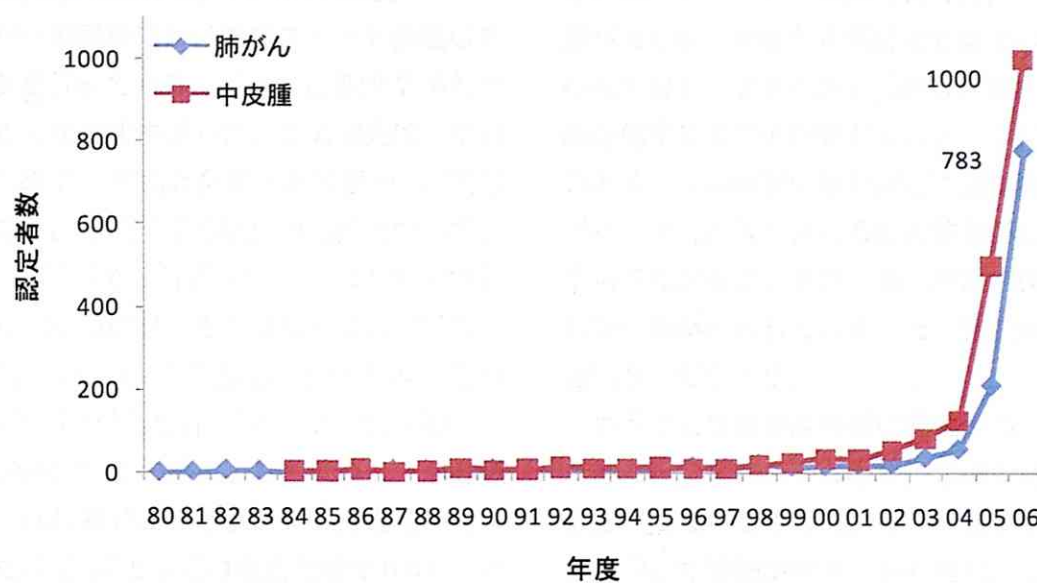


図 1.2 石綿にさらされる業務による肺がん・中皮腫の労災認定者数  
 [厚生労働省 労働基準局, 2005] および[厚生労働省 労働基準局, 2008]より作成

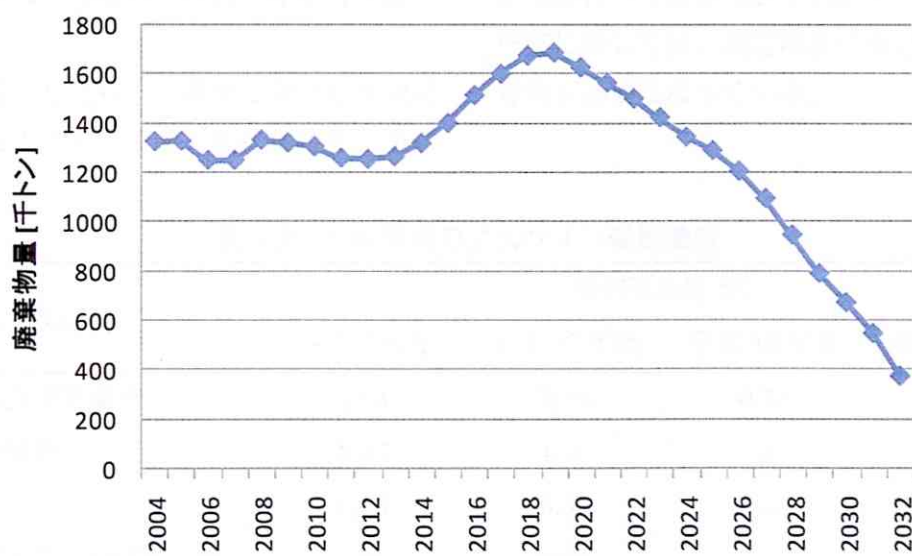


図 1.3 石綿含有建材の廃棄物予測  
 [日本石綿協会, 2007]

## 1.1.2. 一般環境におけるアスベスト濃度

環境省が一般環境におけるアスベスト濃度のモニタリングを行っている。表 1.2 に平成 7 年および 17～19 年の結果を示した。この調査は、平成元年 12 月 27 日付け環大企第 490 号通知「大気汚染防止法の一部を改正する法律の施行について」に基づき、各地点で 3 日間（4 時間×3 回）測定して得られた個々の測定値を地点ごとに幾何平均し、その値を当該地点の石綿濃度としたものである[環境省, 2008]。敷地境界基準が 10 f/L [環境庁, 1989]であるので、この濃度よりも低いことが必須であるが、1f/L を超える濃度を示した地域がわずかにあるだけで、ほとんどの観測地域で 0.5 f/L に満たない濃度となっており、一般環境の濃度は十分低いことがわかる。

## 1.1.3. 環境問題におけるアスベスト問題の特徴

アスベスト問題を時間という観点から考えると、曝露から症状発生までの顕在化時間と、発生源の継続時間という二つの特徴が存在することが分かる。

はじめに、我々をとりまく環境の変化が健康に具体的な影響を及ぼすまでの「顕在化時間」から

考える。アスベスト曝露に特有な症状として中皮腫があるが、曝露から発症までは 30～40 年といわれており、アスベスト問題は、曝露から影響が顕在化するまでの時間が長いという特徴があるといえる。この時間が長いほど、発生源への対策が遅れ、予防対策が遅れるため被害が広がってしまう可能性がある。また、長い時間が経過して過去の発生源が失われてしまうと、発生源の特定が困難になってしまう。

もうひとつ重要な時間は発生源の「継続時間」である。アスベストの場合、含有製品の製造工場は存在しないと考えるが、含有する建築資材を利用した建物が解体される度に、その解体工事現場が発生源となりうるため、アスベスト発生源の「継続時間」は、これから数十年という長さで継続すると考えられる。また、建物のような社会ストックが発生源となるため、根源的な対策は難しく、解体時に飛散防止を十分に行い、同時に作業従事者の安全を確保するという対処療法的な対策しか打つことができない。そのため、常に解体作業に際しては、周辺環境における濃度の測定・管理が必要になってくる。

表 1.2 一般環境のアスベスト繊維濃度

地域分類	幾何平均値 f/L			
	平成 7 年度	平成 17 年度	平成 18 年度	平成 19 年度
石綿製品製造事業場等	1.04	0.38	0.18	0.38
廃棄物処分場等	0.47	1.16	0.35	0.33
蛇紋岩地域	0.64	0.30	0.28	0.42
高速道路および幹線道路沿線	0.34	0.53	0.39	0.52
住宅地域	0.11	0.30	0.22	0.33
商工業地域	0.18	0.23	0.27	0.20
農業地域	0.47	0.13	0.40	0.40
内陸山間地域	0.24	0.20	0.36	0.42
離島地域	0.21	0.11	0.31	0.40

[環境省, 2008]

## 1.2. 計数手法

もうひとつ、アスベスト問題の特徴を挙げるとすれば、その計数手法が挙げられる。アスベストは鉱物繊維であり、特定の形態を持たないこともあって、これまで分析の自動化／機械化が進んでおらず、依然として人の手によって顕微鏡を用いた分析（繊維種の同定や繊維濃度の測定作業）が行われている現状にある。一方、社会的な分析の要請は高まるばかりで、2006年の労働安全衛生法施行令改正では、アスベスト含有製品の規制対象が、その重量の1%を含む製品から、0.1%を含む製品に変更され【厚生労働省、2006】、また、対象も主要3種類のアスベスト（アモサイト、クリソタイル、クロシドライト）だけでなく、トレモライト、アクチノライト及びアンソフィライトにまで対象が広げられており、これまでは使用が認められていた製品もその含有量を再調査しなければならないケースも生じている。

古くからこの作業に携わり、標準となるような分析技術を持つ技術者は高齢化しているため、今後同じ精度を保ちながら分析を続けるには、次の世代の分析技術者の養成が重要な課題となっている。しかしこれからの時代、アスベストの分析技術を身に着け、一生をその技術とともに生きて行くことを選択する若い技術者をどれだけ確保できるだろうか。測定者個人に依存するような分析技術ではなく、標準化された分析技術が必要であることは明らかであり、分析技術という観点からは、アスベスト問題は非常に重要な時期に差し掛かっていると考えるべきである。

本節では、アスベストの主要な計測手法について整理し、その問題点を抽出する。現在、アスベスト（繊維状物質）の主な計数方法として、位相差顕微鏡法(PCM法)、電子顕微鏡法(SEM/TEM法)、および、分散染色法(DS法)がある。

### 1.2.1. 位相差顕微鏡法(PCM法)

PCM(Phase Contrast Microscopy)法は、国内外の機関により測定法が規定されており、計数手法として最もよく用いられている手法である【環境庁、1989】【環境省、2007】【日本作業環境測定協会、2004】【日本作業環境測定協会、2005】【JIS、2006】【日本石綿協会、1988】(NIOSH, 1994)(WHO, 1997)。規定によって若干の相違があるものの(表 1.3)、原則として以下の手順で行われる。

1. メンブレンフィルタを用いて、試料空気を対象に応じて一定量吸引する。
2. このメンブレンフィルタをアセトン蒸気で透明化処理し、トリアセチンでスライドガラスに固定することで標本作製する。
3. 作製した標本を位相差顕微鏡の総合倍率400倍(接眼レンズ10倍、対物レンズ40倍)を用い観察し、視野内に描かれたアイピースグレイティクルの大円(直径300 $\mu$ m)に存在する粒子を観察する。
4. 長さ5 $\mu$ m以上、幅が3 $\mu$ m未満、アスペクト比3以上の条件を満たす繊維状物質について計数を行う。
5. それぞれの計数条件に従い、総計数繊維数もしくは観察した視野数が上限値に達するまで計数を行う。

PCM法は、一般環境大気中のアスベスト繊維濃度を求める手法として利用されているが、計数対象繊維がアスベストであるか否かの判断はできず、繊維濃度を知るための手法である。そのため、同定が必要な場合には他の分析手法を併用しなければならない。

表 1.3 気中のアスベスト濃度測定手法

出典	繊維状物質測定 マニュアル		室内環境等における 石綿粉塵濃度 測定方法	アスベストモニタリング マニュアル	空気中の 繊維状粒子 測定方法
規定機関	日本作業環境 測定協会		日本石綿協会	環境省	JIS
年次	2004 年		1988 年	2007 年	2006 年
対象	作業環境		室内環境	一般大気 (発生源周辺地域／ バックグラウンド地域)	(指定なし)
サンプリング フィルタ [mm]	25	47 (2 等分)	25	47 (4 等分)	(指定なし)
フィルタ有効径 [mm]	21～23	35	22	35	(指定なし)
フィルタ平均 孔径 [μm]	0.8				
捕集空気流速	フィルタ面速 4.0～5.0 cm/s		5 L/min	10 L/min	採塵量が 0.3 mg/cm <sup>2</sup> 以下 になるよう、 目的に応じて設定
サンプリング 時間	通常は 1 L/min で 15 分以上		2 時間	4 時間	
フィルタ 処理方法	アセトン・トリアセチン法 (フタル酸ジメチル／シュウ酸ジエチル法)				
顕微鏡 観察方法	対物レンズ倍率 40 倍、接眼レンズ倍率 10 倍、総合倍率 400 倍の光学顕微鏡 (位相差観察が可能なもの)				
	1 視野＝φ 300 μm				
計数方法	長さ 5 μm 以上、幅 3 μm 以下、アスペクト比 3 以上				
				生物顕微鏡と位相差顕微鏡を 切り替えた際の計数値の差を 求める	
	繊維数 200 本以上 あるいは 50 視野以上計数	50 視野になるまで 計数		繊維数 200 本以上あるいは 100 視野になるまで計数 (た だし、50 視野まで計数したと きにアスベストが 1 本以上計 数された場合は、50 視野まで としてよい。)	繊維数 100 本以上 あるいは 50 視野に なるまで計数

## 1.2.2. 電子顕微鏡法

開口数が0.65~0.75程度の光学顕微鏡では、観察可能な繊維幅(=水平方向の分解能)が0.3~0.4  $\mu\text{m}$  までに限られてしまうため、それより細い繊維の観察ができない<sup>1</sup>。一方、電子顕微鏡(SEM: 走査型電子顕微鏡/TEM: 透過型電子顕微鏡)を用いた場合は、これより細いアスベストも容易に観察できる。またEDX(エネルギー分散型X線分析器)を備えた電子顕微鏡では、アスベスト繊維ごとの化学組成を知ることができるので、種類の同定が可能である。

SEMでは画面上に見られる像から繊維形態を認識し、必要に応じてEDXスペクトルを調べて繊維の種類を同定しながら計数する。TEMでは蛍光板状に投影された像を見て、繊維の形態からアスベストか否かを判断する。その上で必要に応じてEDX分析で化学組成を、電子解析で繊維の結晶構造を調べ、アスベストの種類を判定しながら計数する。

SEM/TEM法では、微細な繊維の計数や種別同定が可能である一方で、分析装置が大規模でありサンプルの前処理も煩雑である。また、観察視野が狭くなるため、計数誤差大きくなる恐れもある。SEM/TEM法の詳細な手順も整理されている[日本石綿協会, 1988][日本作業環境測定協会, 2004]が、フィルタ上で観察される面積が非常に狭く、装置の普及に問題があり、電子顕微鏡法が一般的な手法として普及するとは考えにくい。

<sup>1</sup> 分解能  $R$  は、光学系で2点として認識できる最小の幅として定義することができ、開口数  $NA$ 、光の波長  $\lambda$  を用いて  $R = \frac{\lambda}{2NA}$  で表わされるものである。現在用いられている位相差顕微鏡の対物レンズの開口数  $NA$  は0.75程度で、光の波長  $\lambda$  を550 nm(基準波長)とすると、分解能  $R$  はおよそ0.32  $\mu\text{m}$  となり、このレベルの分解能が位相差顕微鏡を用いた観察の限界である。

## 1.2.3. 分散染色法

分散染色法(Dispersion Staining, DS法)[日本作業環境測定協会, 2004]は、位相差顕微鏡を用いて繊維種別の同定を可能にする手法である。分散染色法は測定対象の繊維状の物質の屈折率と浸液の屈折率を一致させ、屈折率が光の波長によって変化する性質(=分散)を利用して、サンプル中の測定対象繊維だけを光学的に着色して識別する方法である。繊維種ごとの屈折率と発色を表1.4に整理し、分散染色の実例を図1.4に示した。

分散染色法の発色原理は以下のようにになっている。コンデンサーレンズの前側焦点面に小さな円形状(Central Stop)または環状(Annular Stop)の光源絞りを置き、この面と共役な対物レンズの後側焦点面に光源絞りの像を遮断するように円形状または環状のマスク(遮蔽マスク)を置く。これによって、ステージに試料がないときは、光源絞りを通過した照明光は対物レンズを通っても遮蔽マスクによってすべてカットされるので、視野は暗黒になる暗視野照明となる(図1.5)。

図1.6は試料を示したもので、試料Sが適当な浸液Lに浸されている液浸物体を観察対象とする。波長による物体の屈折率の変化を分散と呼ぶが、一般的にアスベスト繊維などの試料の分散は、液体の分散より小さいと考えられる。試料Sと浸液Lが緑の波長( $\lambda = 550 \text{ nm}$ )での屈折率が等しく、それぞれの波長  $\lambda$  に対する屈折率  $n_D^{25^\circ}$  が、図1.7示したような曲線(分散曲線)を描くとする、図1.6の下側から白色の平行光線が入射した場合には、底辺と平行な表面を持っている中央部では各波長の光線はそのまま直進する。しかし、左右の斜めの境界部では、緑色の光(G)に対しては試料Sと浸液Lでの屈折率は等しいので直進するが、青色の光(B)に対しては

「試料Sの屈折率」 < 「浸液Lの屈折率」

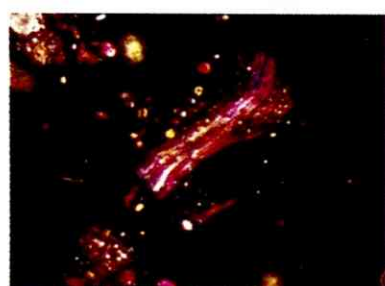
であり、赤色の光(R)に対しては

「試料Sの屈折率」 > 「浸液Lの屈折率」

表 1.4 アスベスト繊維の屈折率と分散色

繊維の種類／屈折率 ( $n_D^{25^\circ\text{C}}$ )	浸液の屈折率 ( $n_D^{25^\circ\text{C}}$ )	分散色
クリソタイル／1.532～1.549	1.550	赤紫～青
アモサイト／1.635～1.696	1.680	桃
	1.700	青
	1.680	橙色
クロシドライト／1.654～1.701	1.690	桃
	1.700	青
	1.605	橙色
アンソフィライト／1.596～1.694	1.640	青
アクチノライト／1.620～1.688	1.605	橙色
	1.640	青
	1.640	青

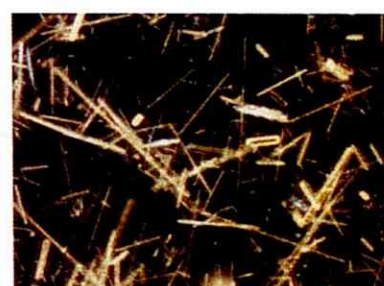
[日本作業環境測定協会, 2004]



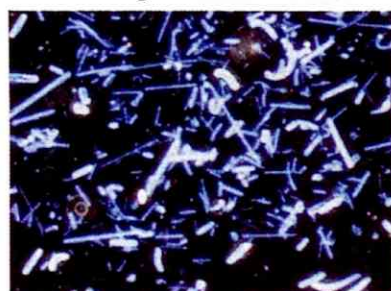
クリソタイル

 $n_D^{25^\circ\text{C}} = 1.550$ 

アモサイト

 $n_D^{25^\circ\text{C}} = 1.680$ 

アンソフィライト

 $n_D^{25^\circ\text{C}} = 1.605$ 

ロックウール

 $n_D^{25^\circ\text{C}} = 1.640$ 

トレモライト

 $n_D^{25^\circ\text{C}} = 1.640$ 

クロシドライト

 $n_D^{25^\circ\text{C}} = 1.700$ 

図 1.4 分散染色画像の実例

[日本作業環境測定協会, 2006]より抜粋



であり、B と R はそれぞれ図 1.6 に示したように屈折して進む。このようにして進んだ光のうち、直進光は先に述べた後側焦点面の遮蔽マスクでカットされて、中間像面に達しない。これに対して、屈折した光は遮蔽マスクを回避して、

「白色－緑色＝赤紫色」

の像を形成する。試料 S の屈折率＝浸液 L の屈折率の点の波長によって、像の色の違いとなる。このように固体と液浸物体の分散の違いを、像の色の違いとして観察する方法を利用したのが分散染

色法である。現在、分散染色法は、環境省のマニュアル [環境省, 2007] や JIS [JIS, 2006] に採用されている。

分散染色法は、従来の PCM 法で用いる位相差顕微鏡を用いて繊維種別同定が可能であるが、その前処理には、低温プラズマ灰化装置を用いて数時間から一晩程度の灰化処理が必要であるため、1 サンプルの処理にかなりの時間を要することが問題である。

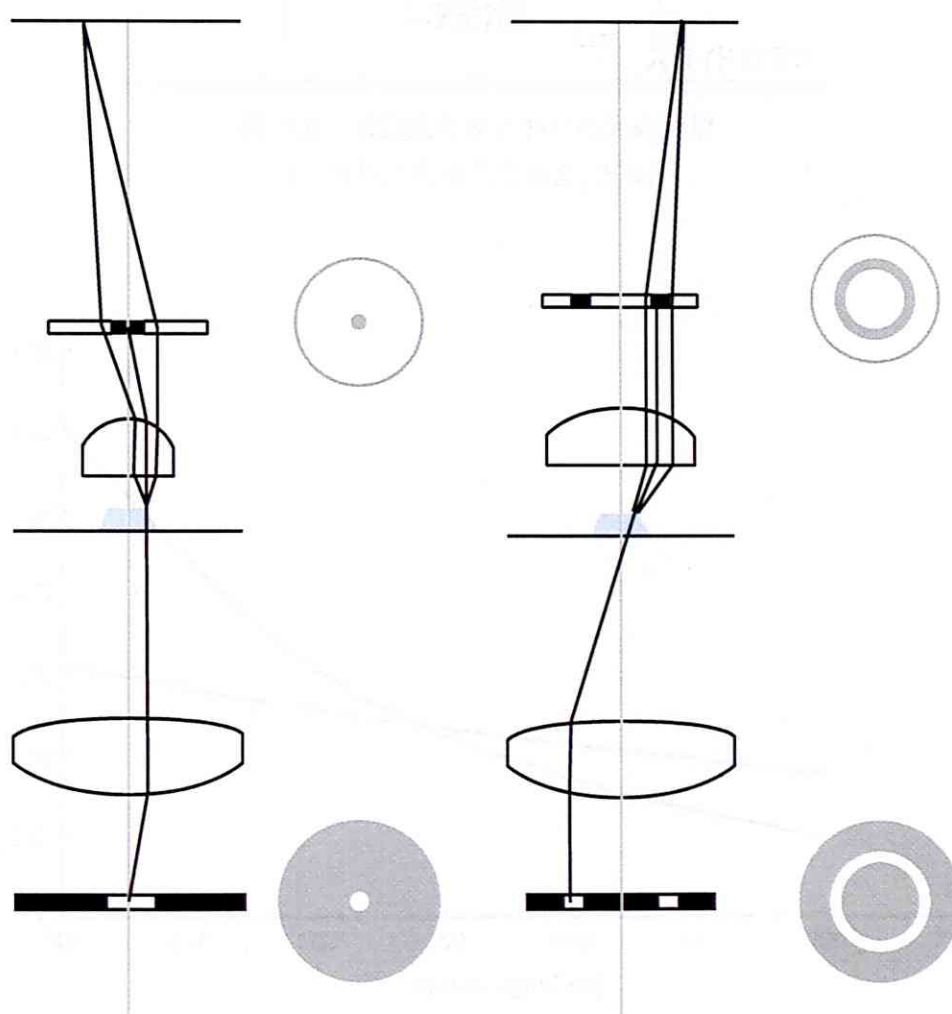


図 1.5 分散染色の光学系（左：Central Stop、右：Annular Stop）

[日本作業環境測定協会, 2004]より

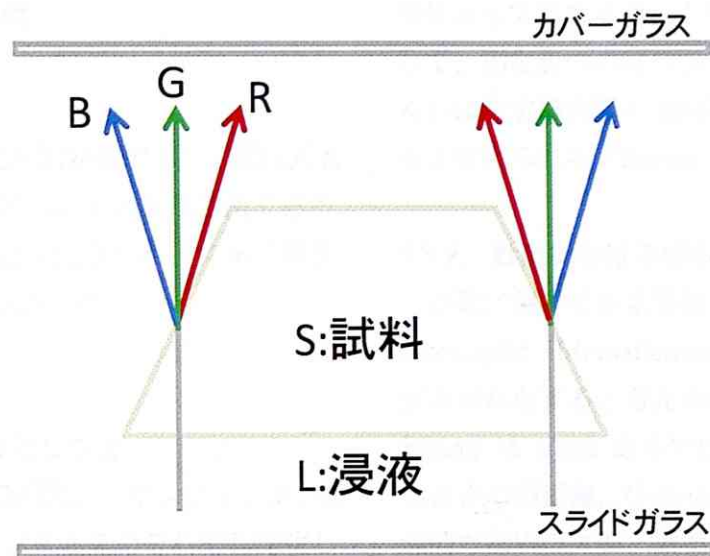


図 1.6 液浸液物体における光の分散  
[日本作業環境測定協会, 2004]

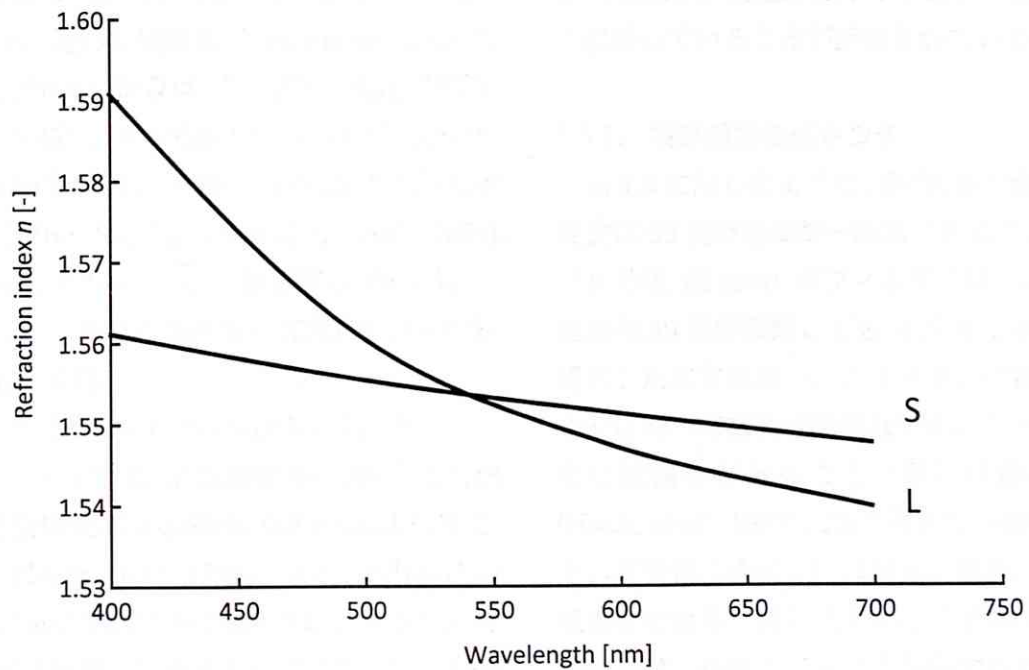


図 1.7 浸液 (L) と試料 (S) の分散曲線  
[日本作業環境測定協会, 2004]



### 1.3. PCM 法の問題点

PCM 法は、装置が比較的安価であり、現在元も広く用いられているアスベストの計数手法であるが、計数結果にばらつきが大きく、古くから精度管理に大きな問題を抱えている。

#### 1.3.1. 計数操作全体のばらつき

PCM 法による計数の誤差は、サンプリング、標本作製、計数の3つのプロセスでそれぞれ発生していると考えられる [本間, 1991]。これらのすべての要素を含んだ計数操作全体のばらつきを *RSD* (相対標準偏差)<sup>2</sup>で示した事例は多数存在しており、その値には非常に幅がある。

ある熟練者の *RSD* は 15.7% であった (Taylor, et al., 1984)。適切な捕集量 (100 f/mm<sup>2</sup> 以上) であれば測定者内の *RSD* は 10~17%。測定者間の *RSD* が 17~25%、測定機関間では 45% となった (NIOSH, 1994)。また、経験のない 20 人の計測者間の *RSD* が 46.9% に達した例もある [本間, 1991]。同様に、経験のない 7 名の計測者間の *RSD* は 17% で、この 7 名の計測者内の *RSD* は 14% であった [本間, 1991]。

NIOSH の Proficiency Analytical Testing (PAT) プログラムでは、計測機関内の *RSD* は 0.18~0.28、計測機関間の *RSD* は 0.33~0.44 程度であった (Schlecht, et al., 1986)。また、NIOSH の Manual of Analytical Methods では、サンプルあたり 80~100 繊維の計数を求めているので、*RSD* は 10~12% になると考えられている (NIOSH, 1994)。また、長さに関する計数基準は統一さ

れていても、計数基準の細部の解釈、理解が計測者によって異なることが多く、あるサンプルに対して、測定者内のばらつきに比べて、計測者間あるいは測定機関間の *RSD* はこれよりも大きくなると考えられる (Baron, et al., 1987)。

#### 1.3.2. 計数におけるばらつき

計数に関する誤差要因としては、Sizing、Oversight、Identification、Recording の 4 つの要素が存在すると考えられる (Pang, 2000)。Sizing は 5  $\mu\text{m}$  あるいは 3  $\mu\text{m}$  という基準となる長さの誤認識、Oversight は、視力や繊維の徹底的な探索の欠如、顕微鏡の調整不備などによる繊維の見逃しである。Identification は重なったり、束になったりしている繊維の誤計数であり、Recording は誤記録である。Pang らによれば、アモサイトでは Sizing、クリソタイルでは Oversight が支配的となっており、繊維種の違いも影響していることが指摘されている。

#### 1.3.3. 視野選択のばらつき

表 1.3 に示したように、PCM 法で観察される視野数は 50 視野程度が一般的であるが、 $\phi 25 \text{ mm}$  (有効径 22 mm) のフィルタでは、 $\phi 300 \mu\text{m}$  の視野を 50 視野観察しても、わずか 0.93% の面積を観察したにすぎない。フィルタ上の繊維の捕集が十分に均一であれば問題ないが、フィルタ上の捕集には偏りがあることは既に指摘されており (Hook, et al., 1983)、1% に満たない観察割合では、その妥当性、代表性には疑問が残る。とりわけ、低濃度となる一般環境空気中のアスベストの濃度測定では、視野の代表性を担保するためには、多視野観察が必要であると考えられる。しかしながら、現行の目視による観察では、多視野観察には限界がある。

<sup>2</sup> *RSD* (Relative Standard Deviation) は *SD* (Standard Deviation) を算術平均 *m* (mean) で割ることによって得られる ( $RSD = SD/m$ )。すなわち、変動係数 *CV* (Coefficient of Variation) と同義である。資料によっては *CV* で表現されているものも多数存在するが、本論文では *RSD* に表記を統一する。

### 1.3.4. トレーサビリティ

トレーサビリティの欠如も、現行の PCM 法の問題点として指摘できる。顕微鏡による目視観察であるため、測定者がどの視野を観察したのか、後に再現することは不可能である。そのため、どのように分析したのかではなく、誰が測定したのかという観点で分析全体が評価されている。計数操作を自動化し、観察した視野を画像として残すことができれば、トレーサビリティは大きく向上すると考えられる。

### 1.3.5. 熟練者の確保

現在、アスベスト計数に携わっている技術者は団塊の世代が中心であり、高齢化が進んでいることが強く懸念される。熟練者と経験のない計測者では大きく精度が異なることは上述の通りであるが、今後、彼ら熟練者の技術を引き継いで行くことは、社会にとっても大きな負担となっている。

### 1.3.6. PCM 法の問題点の整理

このように、PCM 法は精度管理に問題があるが、その根本的な原因は、計数作業が計数者個人に依存していることにある。そのためには、PCM 法の自動化、機械化を実現し、測定者によるバイアスを除去し、計数のばらつきの抑制を実現することが重要である。また自動化によって、多視野観察も可能になれば、視野選択によるばらつきも抑制することができる。

## 1.4. 自動計数技術

既存の自動計数技術について整理する。自動計数技術は前述の PCM 法の問題点を解決する重要な可能性を持っているが、これまでに検討された例は数えるほどしかない。

### 1.4.1. Magiscan

Magiscan は商用のハードウェアとして Joyce-Loebl 社によって販売されたものである。ソフトウェアは、Manchester 大学が ARC (Asbestosis Research Council) の援助のもとに、アスベスト計数に特化した Image Analyzer の開発プロジェクトを立ち上げたことに由来している。当初の装置のパフォーマンスは十分期待できるものであったので、HSE (Health and Safety Executive, U.K.) が採用し、引き続き開発がすすめられた。1982 年のバージョンが最終バージョンであり、その後開発は進められていない。(KENNY, 1984)

システムは、位相差顕微鏡にビデオカメラ (160 × 160mm) を接続し、512 × 512 pixel の画素の 64 階調 (6 bit) のグレースケール画像を取得して、自動計数を行う。最も暗い画素を画像から認識し、細線化処理によって骨格を抽出して認識する。視野の移動やフォーカスの調整は自動化されていない。分解能はおよそ 0.3 μm と考えられ、1 視野の観察に 10 秒程度要している (Baron, et al., 1987)。

当初、Magiscan は目視観察と良好な一致が確認された (KENNY, 1984) ため、参照分析者 (reference analyst) として Manchester Asbestos Program (PAT) や Regular Interlaboratory Counting Exchanges (RICE) (Brown, et al., 1994) (Crawford, et al., 1984)、Asbestos Fibre Regular Informal Counting

Arrangement (AFRICA) (Crawford, et al., 1992) といった精度管理プログラムで利用された実績がある。しかし、細い繊維の見逃しや、ひとつの繊維が複数の繊維として分割して認識されるなど問題点も指摘され、顕微鏡の数倍の価格も普及のネックとなった<sup>3</sup> (Baron, et al., 1987)。結局、Magiscan は参照分析者としては利用されなくなった (Baron, 2001)。

#### 1.4.2. AFACS

AFACS (Asbestos Fibers Automatic Counting System) は井上らが開発した自動計数システムである (Inoue, et al., 1998)。位相差顕微鏡に接続した CCD カメラで画像 (512×512 pixel, 256 階調グレースケール) を取得し、画像処理によって計数を行う点は前述の Magiscan と類似している。Magiscan との大きな違いは、アスベスト認識のための 2 値化の手法が工夫されている点である。画像処理において、2 値化は非常に重要な技術であり、井上らの手法では、背景の輝度の分布が正規分布に従うと仮定して、実際の輝度分布と正規分布との乖離が最小となるように thresholding value  $k_T$  を決定し、この  $k_T$  を上回る部分を繊維として認識するものである。

井上らはこのシステムの精度を 6 計測機関とクロスチェックし、計測機関の CV は 50% と大きかったが、AFACS の計数値は計数値全体の中央値となり、目視計数値の最大値と最小値を除いた 4 計測機関の平均値の約 ±8% に含まれ、妥当な値であったとしている [井上, ほか, 1999]。しかし、普及の実績はなく、今のところ AFACS が使用された事例は、井上らの研究例に限られている。

#### 1.4.3. 画像処理を用いた自動計数技術の問題点

画像処理を用いた自動計数技術 (Magiscan と AFACS) の問題点としては、

- ・ 画像輝度によって繊維を認識している点
- ・ 深度方向の繊維分布を考慮していない点
- ・ 顕微鏡作業が自動化されていない点

が挙げられる。

画像輝度は、サンプルの状況や光学系の調整によって大きく異なる可能性があるため、一定の基準として扱うことは難しいと考えられる。

Magiscan では最も暗い画素を繊維あるいは混在粒子の候補として抽出しているが、ダークコントラスト方式であってもラティテュードを超える位相差量がある場合には繊維は白く (明るく) 観察されることもあるため、位相差量の大きくなる太いアモサイト繊維は見逃す恐れがある。また、AFACS では輝度分布が正規分布に従うことを仮定し、高輝度側で正規分布から乖離した部分を繊維画素であると見なしているが、正規分布の仮定の妥当性については疑問が残る。また極めて浅い焦点深度に対して、繊維は深度方向にそれよりも広く分布、存在しているため、ある焦点深度で得られた画像だけでは、その視野の繊維を計数するには情報量が不十分であるといわざるを得ない。さらに、計数作業だけでなく顕微鏡操作も測定者間のばらつきの一因であり、作業負荷が大きな部分である。そのため、顕微鏡操作もある程度自動化されなければ、自動化された装置として市場に受け入れられるとは考えにくい。

これらの問題を解決することができれば、測定者の操作に依存していた計数のばらつきを抑制することが可能になると同時に、作業者の負荷軽減と作業員確保の負担を緩和することができる。また、多視野観察も可能になるため、視野選択による計数のばらつきも抑えることが可能になる。さらに、計測内容をすべて電子データで記録できるため、トレーサビリティの改善にも寄与すると考えられる。

<sup>3</sup> 当時、顕微鏡が \$18,000 のところ、ソフトウェアが \$106,000 と高価であった。 (Baron, et al., 1987)

---

## 1.5. 本研究の目的

---

これまでに述べたように、アスベストの問題はかつての製造や使用のフェーズから、廃棄のフェーズの問題となっている。今後顕在化する恐れがあるのは、アスベストを含有した建築資材を使った建築物が、解体される際に大気中への飛散する問題である。飛散対策を十分に行えば、周辺で極端な高濃度は出現しないため、対象となるのは比較的低い濃度領域となる。この低い濃度域を、計数者個人に依存することなく、ばらつきを抑制させながら、自動的に計数するシステムの開発が期待されているといえる。

このような背景を踏まえ、本研究では位相差顕微鏡を用いた PCM 法を自動化する、気中アスベスト繊維自動計数システムを開発することを目的とした。その実現のために、まず多視野観察によって抑制できる計数のばらつきを推計する。この結果から、一般環境レベルで必要となる観察視野数を明らかにする。

次に作製された標本を自動的にステージにセットし、視野を移動させ、フォーカスを合わせ、画像を取り込むという一連の自動化したシステムを開発する。さらに、得られた画像から画像処理によって繊維状物質を計数するアルゴリズムを構築する。

## 第2章 視野数と精度の関係

本章では、多視野観察による精度の改善の可能性について、モンテカルロシミュレーションによって計数結果のばらつきを推計し、その結果から様々な濃度において、妥当な精度を保証するために必要となる視野数を検討する。

## 2.1. 緒言

本章では、視野数が計数のばらつきに及ぼす影響を検証する。多視野観察をモンテカルロ法でシミュレーションし、一般環境レベルの濃度で捕集されたサンプルを精度よく観察するために必要となる視野数を推計することを目的とする。

## 2.2. PCM 法の精度に関する表現

### 2.2.1. 統計学的な誤差表現

PCM 法には誤差要素が多数存在するため、精度管理は極めて困難な課題であるが、計数操作一般に、次のような統計学的な誤差表現が可能である。

捕集されたアスベスト繊維が覆う面積は、フィルタ面積に比べてごく僅かで、フィルタ上にランダムに分布していると考え、繊維を数える操作はポアソン過程と考えることができる。そのため、計数における  $RSD$  は計数繊維数を  $N$  とすると、

$$RSD = 1/\sqrt{N} \quad (2.1)$$

で与えられる (IUPAC, 1995)。また、PCM 法では、単位面積あたりの繊維数は標本上でばらつきがあるものの、ばらつきの程度は標本上で偏りがないことを前提としており、すなわち、単位面積（観察視野）あたりの平均繊維数は（繊維密度  $d$ ）は一定とみなすことができるので、捕集繊維数  $N$  は式 2.2 で与えられる。

$$\begin{aligned} N &= dS \\ &= (CQ/A_E) \times an \\ &= anCVT/\pi D_E^2 \\ &\propto nVT \end{aligned} \quad (2.2)$$

ここで、繊維密度  $d$  f/mm<sup>2</sup>、濃度  $C$  f/L、有効フィルタ面積  $A_E$  mm<sup>2</sup>、フィルタ有効径  $D_E$  mm、サンプリング体積  $Q$  L、捕集流量  $V$  L/min、捕集時間  $T$  min、計数視野面積  $S$  mm<sup>2</sup>、視野数  $n$ 、1 視野あたりの面積  $a$  mm<sup>2</sup> である。さて式 2.1 より、計数繊維数を増やすことで精度が改善すると考えられ、さらに式 2.2 より、フィルタの面積や観察視野の面積は規定の情報であり、濃度は未知の情報であるとする、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のどちらかで  $RSD$  を抑制することができることがわかる [井上, ほか, 2007]。

前者は、捕集流量や捕集時間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の混入を助長するため、計数環境を悪化させる恐れがあり、また、どれだけ捕集量を増やすことが望ましいのか、事前に定量的に把握することは困難である。

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。しかし、計数プロセスを自動化することによって、計測者の負担を軽減することができれば、実現可能な選択肢となりえると考えられる。例えば、表 1.3 に示した標準的な条件（フィルタ径：φ47 mm、捕集速度：10 L/min、捕集時間：4 hr、観察条件：200 本以上あるいは 50 視野）で捕集を行った場合、異なる濃度条件下で式 2.1 と 2.2 から得られる計数に伴う  $RSD$  (■) を図 2.1 示した。比較的高濃度領域（繊維濃度 10 f/L 程度まで）では、約 10% の  $RSD$  で計数が可能であるが、それ以下の濃度領域では、従来の計数条件では大きなばらつきとなることがわかる。



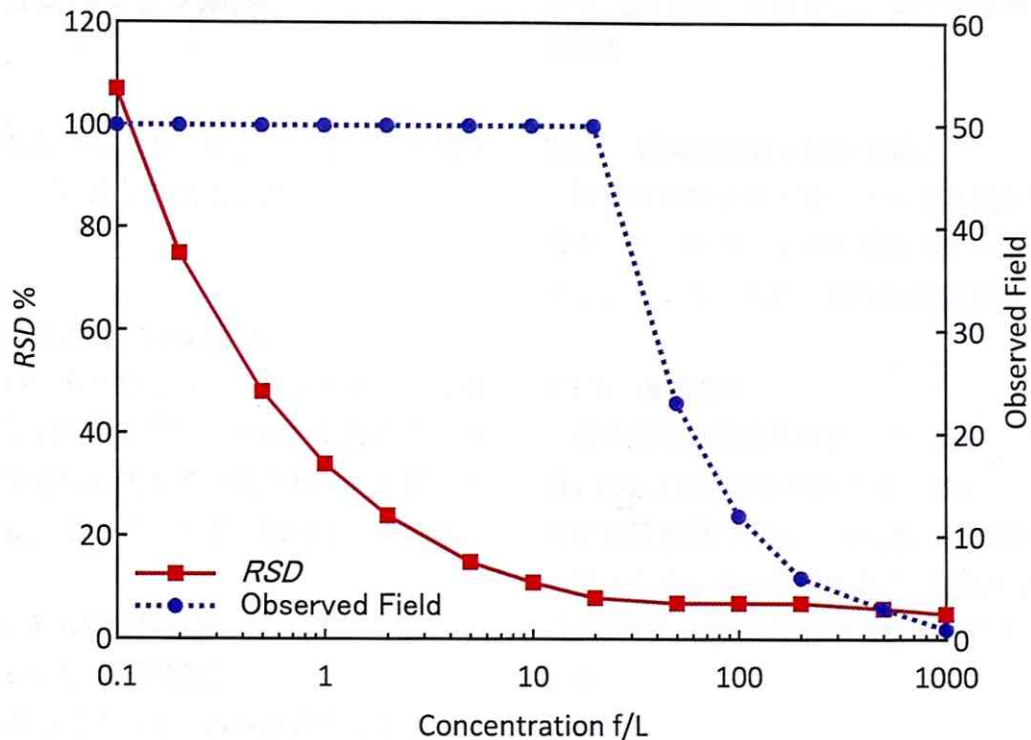


図 2.1 標準的な計数条件でのアスベスト濃度と統計学的な誤差の関係

標準的な条件として、フィルタサイズ：φ47 mm、捕集速度：10 L/min、捕集時間：4 hr、観察条件：200 本以上あるいは 50 視野を想定した。

図 2.1 (●) にはそれぞれの濃度における観察視野数も示している。視野数の上限を 50 視野と定めているため、濃度が低くなると、200 f を計数する前に視野上限に達していることがわかる。すなわち、この視野数の上限設定が計数される繊維数の増加を抑えてしまっているため、低濃度ほど RSD が大きくなっていると考えられる。濃度が低ければ低いほど、多視野観察が重要となることがわかる。

### 2.2.2. 検出限界と定量限界

PCM 法の検出限界 (Detection Limit) は、 $n$  視野 (通常 50 視野) 観察したときに 1 f だけ繊維が存在するときの濃度の 95% 信頼区間から次のよ

うに定められている (式 2.3) [JIS, 2006] [日本作業環境測定協会, 2004]。

$$\begin{aligned} \text{Detection Limit} \\ = (2.645 \times A_E) / (a \times n \times Q) \quad (2.3) \end{aligned}$$

しかし、定量限界 (Quantification Limit) に関しては、これまで十分に議論されておらず、むしろ検出限界と混同されている例すらみられる。50 視野観察してわずか 1 f しか存在しないような低濃度では、50 視野の選択方法によって結果が左右されてしまう可能性が高い。視野の選択方法によらず、精度が担保されるような定量限界を正しく定めることは重要である。

### 2.3. シミュレーション条件

多視野観察をシミュレーションによって再現するために、以下の条件を設定した。

#### 2.3.1. 考慮するばらつきの要因

本シミュレーションでは、多視野観察による観察繊維数の増加の影響だけを評価するために、「視野に存在する繊維は正しく計数される」と仮定することにした。これによって、試行ごとの計数のばらつきは、

- ・ フィルタ上の繊維分布
- ・ フィルタ上の視野選択

の二つの要素のばらつきにのみ依存することになる。しかし、同時に二つのランダムさを変化させることは合理的ではないので、視野選択のランダムさのみを変化させ、繊維分布のランダムさは固定することとした。つまり、仮想的に繊維を捕集した標本（以下、仮想標本）を2種類作成して、この標本に対してランダムに視野を選択するという試行を繰り返すこととした。なお、視野の選択

をランダムに行うことは、各種規定に記載されている〔環境省, 2007〕〔日本作業環境測定協会, 2004〕。

#### 2.3.2. 観察視野数と試行回数

観察視野数は現状最大でも100視野であるところを、その20倍の2,000視野までの観察を評価することにした。また、試行回数は200回とした。

#### 2.3.3. 濃度条件

現実的な低濃度条件として、10、5、1、0.5、0.1 f/L の5つの条件を検討することとした。10 f/L は敷地境界基準に相当し、0.1 f/L は実際の大気環境水準より少し低い濃度となる。作業環境を除いて、この濃度レンジを検討すれば十分であると考えられる。

#### 2.3.4. サンプルング条件

サンプルング操作は、環境省のアスベストモニタリングマニュアル〔環境省, 2007〕（以下、マニュアル）に従うこととした。概略は表2.1にまとめた。マニュアルでは、捕集に使用するメンブレンフィルタの直径 $D$ は47 mm（＝有効径 $D_E$ は35 mm）であり、その1/4片を観察すると定めら

表 2.1 サンプルング条件

項目	規定値
フィルタ直径 $D$	47 mm
フィルタ有効径 $D_E$	35 mm
フィルタの分割割合 $r$	1/4
フィルタ有効面積 $A_E$	240.5 mm <sup>2</sup>
捕集速度 $V$	10 L/min
捕集時間 $T$	4 hr
捕集体積 $Q$	2,400 L
観察視野径 $D_F$	300 $\mu$ m
視野面積 $a$	0.0707 mm <sup>2</sup>
最大視野数 $M$	3,400



れているため、観察できるフィルタの有効面積 $A_E$ は $240.5 \text{ mm}^2$ となる。また、観察視野径 $D_F$ は $300 \text{ }\mu\text{m}$ であるので、1視野の面積 $a$ は $0.0707 \text{ mm}^2$ であり、観察できる最大の視野数 $M$ は理論的にはおよそ3,400視野となる。しかし、観察視野が円形であるため3,400視野を観察することは不可能であり、また、シミュレーションの簡単のため、1視野相当面積を持つ正方形領域（以下、仮想視野）を視野として扱うこととした。この仮想視野の1辺のサイズは、 $266 \text{ }\mu\text{m}$ であり、1/4片のフィルタの半径上に66個並ぶサイズとなっている。

また、濃度 $C_i \text{ f/L}$ の空気を捕集したとき、観察対象となるフィルタ1/4片上に存在する総繊維数 $NF_i$ は式2.4で与えられる。

$$NF_i = r \times C_i \times Q \quad (2.4)$$

ここで、 $r$ はフィルタの分割割合（ $=1/4$ ）、 $Q$ は捕集体積（ $=2,400 \text{ L}$ ）であるので、総繊維数 $NF_i$ は濃度 $C_i$ の関数となる。

## 2.4. 手法

### 2.4.1. 使用したソフトウェア

乱数の生成から $RSD$ の計算まですべての作業はExcel 2007 (Microsoft 社)にて行った。シミュレーションの詳細は[岩崎, 2004]などを参考にした。

### 2.4.2. 仮想視野への配分確率

#### 2.4.2.1 均一分布

PCM法では、単位面積当たりに捕集された繊維および粒子は、標本上でばらつきがあるものの、ばらつきの程度には偏りが無いことを前提としている。この状況を以下では「均一分布」と呼び、この分布に従う仮想標本では、この前提を再現するために、すべての仮想視野に等しい確率で繊維が配分されることにした。この確率 $P_U$ は総仮想視野数 $M$ の逆数で与えられる（式2.5）。

$$P_U = 1/M = \text{const.} \quad (2.5)$$

#### 2.4.2.2 中央分布

一方、現実的には必ずしもフィルタ上の繊維の分布はランダムになるとは限らず、やや中央に集中した分布（以下、中央分布）になることが知られている (Lai, et al., 2006)。

単位面積あたりの繊維数のばらつき自体が標本上で偏りが生じ、中央付近に高密度に繊維が分布するため、ランダムに視野を選択すると、均一分布に比べて計数結果のばらつきが大きくなることが予想される。しかし、現実の捕集状態を理論的に再現することは困難であるため、ここでは、中央に集中した現実的な分布を与える確率分布の一例として、2次元の正規分布（式2.6）を用いることにした。

$$f(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp\left[-\frac{(x^2+y^2)}{2\sigma^2}\right] \quad (2.6)$$

$x, y$  はフィルタ中央を原点とする座標系 ( $x \geq 0$  および  $y \geq 0$ ) で、仮想視野の一辺の長さを単位長さとする。標準偏差  $\sigma$  は、中央への集積度合いを表すパラメータとなる。これを用いて、中央分布に従う配分確率  $P_C$  は式2.7で与えることとした。

$$P_C = P_U \times \gamma \times f(x, y) \quad (2.7)$$

すなわち、均一分布の確率 ( $P_U$ ) に視野の座標に依存する重み ( $\gamma \times f(x, y)$ ) を乗じるものである。なお、 $\gamma$  は確率の規格化パラメータであり、次式で与えられる。

$$\gamma = 1/\sum f(x, y) \quad (2.8)$$

#### 2.4.3. 仮想視野データの作成方法

次の手順で仮想視野データを作成した。

1. すべての仮想視野に 1~3,400 までの ID と座標( $x, y$ ) を与える。
2. ある濃度  $C_i$  における、フィルタの 1/4 片上に存在する総繊維数  $NF_i$  を計算する。
3. 以下の手順で、ランダムに仮想視野をひとつ選択する。
  - 3.1. 均一分布の場合は、1~3,400 の整数乱数をひとつ発生させ、その数字を ID に持つ仮想視野をひとつ選択する。
  - 3.2. 中央分布の場合は、1~3,400 の整数に、中央分布に従う重みを付けた整数乱数をひとつ発生させ、その数字を ID にも持つ仮想視野をひとつ選択する。
4. 選択された仮想視野に繊維を 1 本配分する。
5. 総繊維数  $NF_i$  がすべて仮想視野に配分されるまで 3 と 4 を繰り返す。

#### 2.4.4. 選択視野データの作成方法

マニュアルでは、視野選択はランダムに行うと記載されている。本シミュレーションでも、ランダムに視野を選択する方法をとった。ただし、選択された視野が重複しないように注意する必要がある。また、乱数で選択視野を都度選択すると、シミュレーションの記録を保持し、必要に応じて、再現することが困難になるため、あらかじめ 2,000 視野まで視野を選択する試行を 200 回分の視野選択データを作成しておくことにした。

各試行において、重複のない 2,000 視野を選択するデータは以下の手順で作成した。

1. すべての仮想視野に 1~3,400 の ID を与える。
2. 1~3,400 の整数乱数をひとつ発生させる。
3. 2 で発生させた乱数がこれまでに発生した乱数と重複していないか確認する。
4. 重複が確認されたら、2 に戻る。
5. 重複していなければ、選択する視野としてその ID を記録する。
6. 重複のない 2,000 視野が選ばれるまで、2~5 を繰り返す。
7. 2~6 を 200 回繰り返す。

## 2.5. 結果

### 2.5.1. 総繊維数 $NF$

各濃度（10、5、1、0.5、0.1 f/L）で 1/4 片のフィルタに捕集される総繊維数は式 2.3 より、6,000、3,000、600、300、60 f となった。それぞれ、1 仮想視野あたりの繊維密度は、1.8、0.88、0.18、0.088、0.018 f/仮想視野となる。濃度 0.1 f/L では、100 視野観察しても 2 本の繊維を観察できるかどうかという非常に低い捕集密度であることがわかる。

### 2.5.2. フィルタ上の繊維分布

繊維の捕集分布が均一分布に従う場合のフィルタ上の繊維分布を図 2.2～2.6 に示した。■で表現

された仮想視野に繊維が配分されており、その色が濃いほど仮想視野あたりの繊維本数が多いことを示している。

同様に、繊維の捕集分布が中央分布に従う場合、濃度 1 f/L で標準偏差  $\sigma$  をフィルタの有効半径の 1/2、1/3、1/4 とした場合の繊維分布を図 2.7～2.9 に示した。図 2.4 の均一分布の 1 f/L のケースと比べると、 $\sigma = 1/2$  は均一分布と類似しており、標準偏差  $\sigma$  が小さくなるにつれて中心部に集まる傾向が確認できた。標準偏差  $\sigma = 1/4$  では、ほとんど中心部に配分されてしまうため、以降の解析では正規分布を用いる場合、これら 3 つの中で、均一分布とは異なる現実的な分布の例として  $\sigma = 1/3$  を利用することとした。改めて、標準偏差  $\sigma = 1/3$  の場合の繊維分布を図 2.10～2.14 に示した。

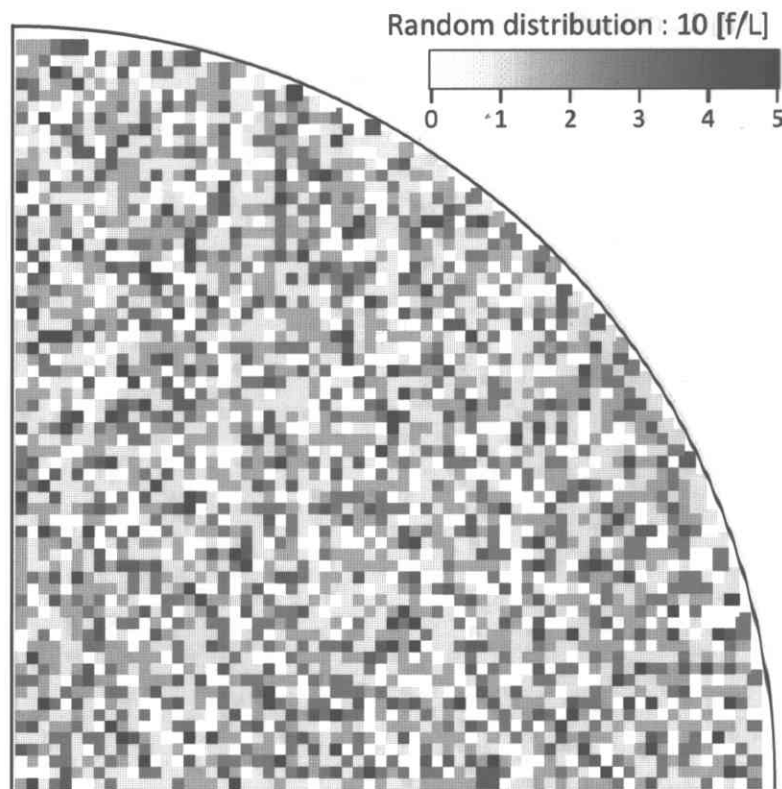


図 2.2 フィルタ上の繊維分布（均一分布：10 f/L）

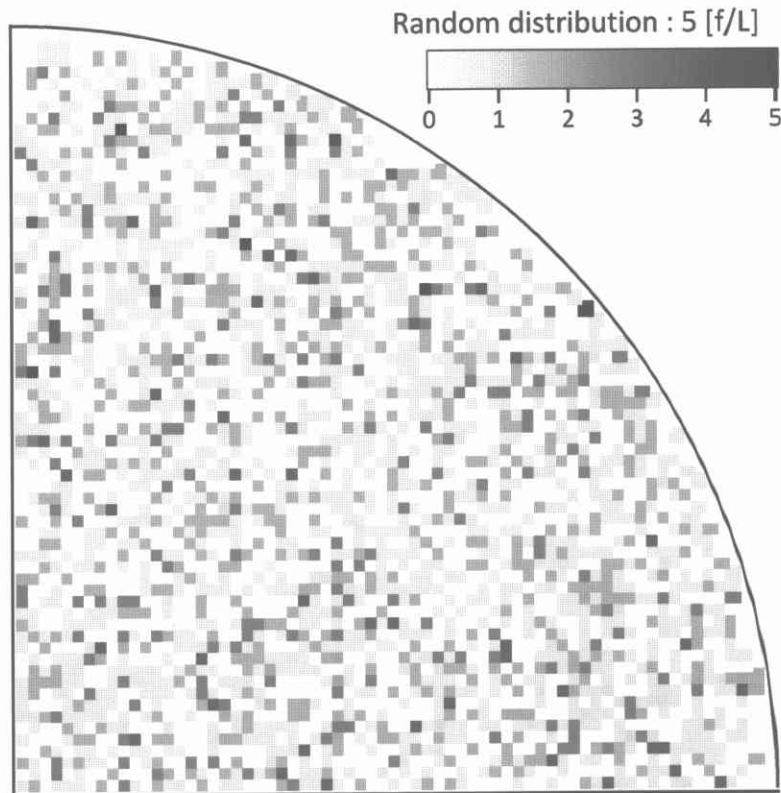


図 2.3 フィルタ上の繊維分布（均一分布： $5 \text{ f/L}$ ）

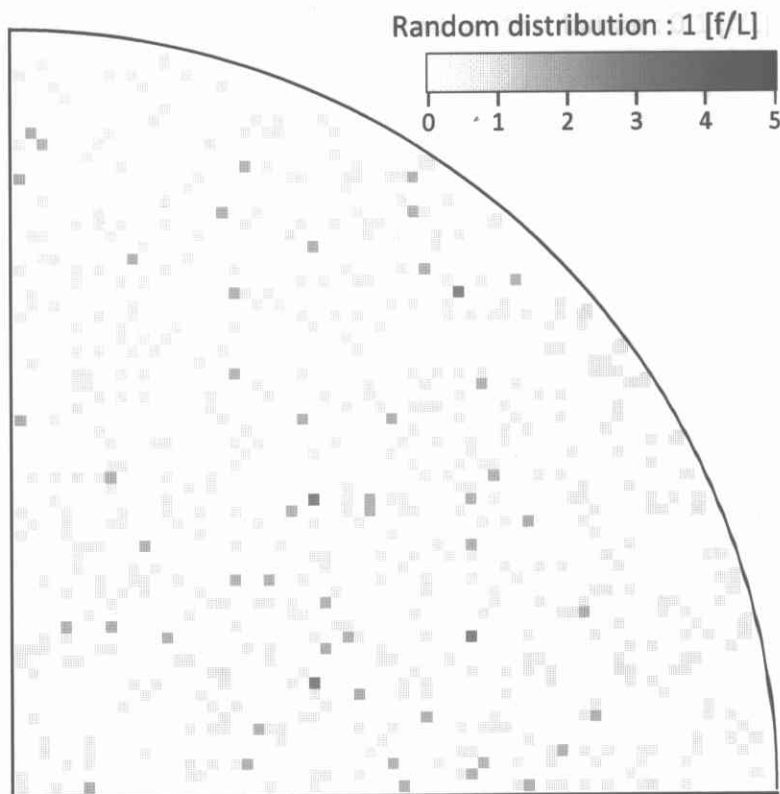


図 2.4 フィルタ上の繊維分布（均一分布： $1 \text{ f/L}$ ）

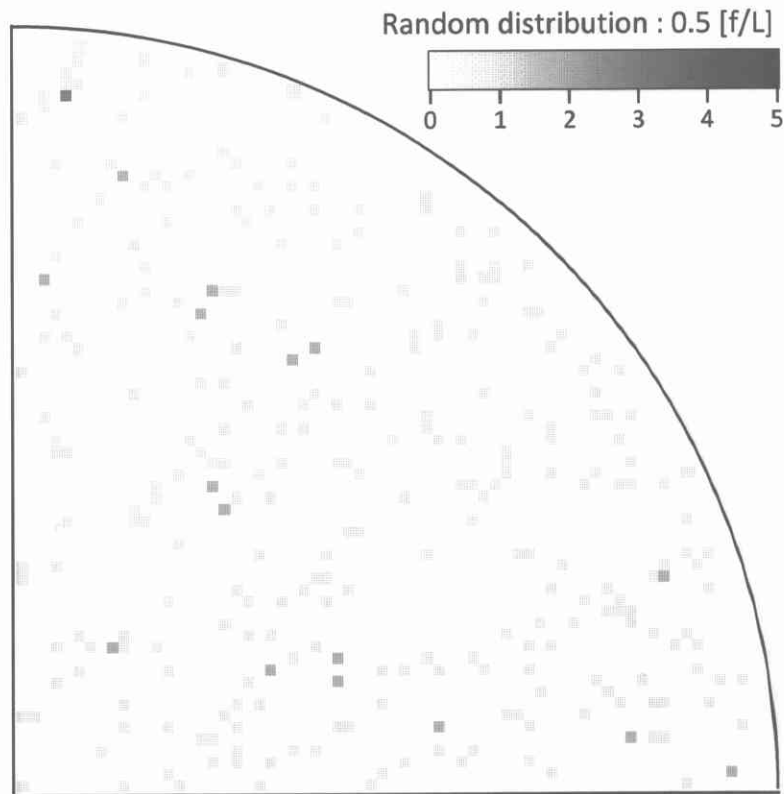


図 2.5 フィルタ上の繊維分布（均一分布 : 0.5  $f/L$ ）

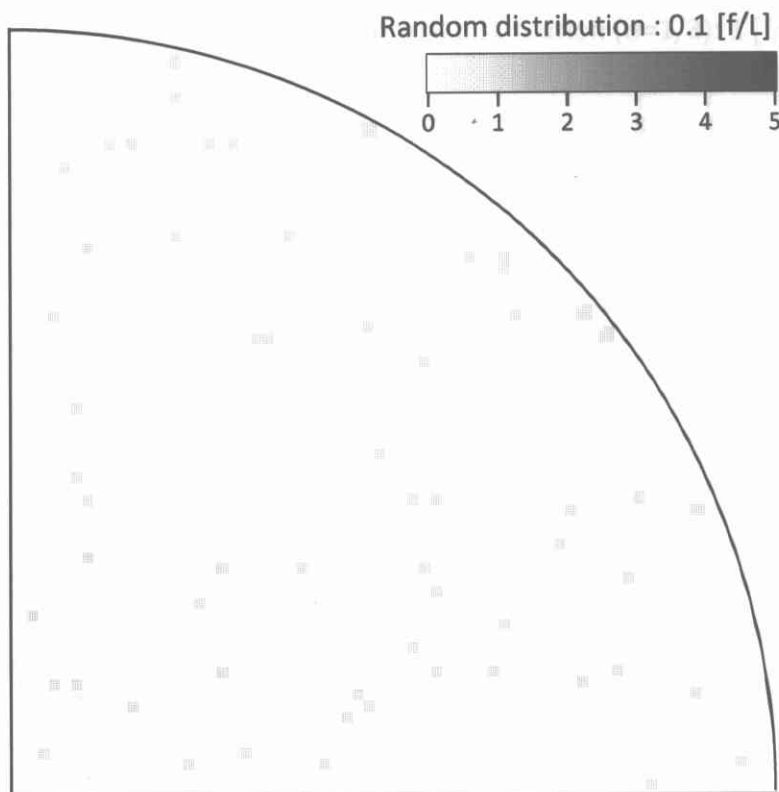


図 2.6 フィルタ上の繊維分布（均一分布 : 0.1  $f/L$ ）

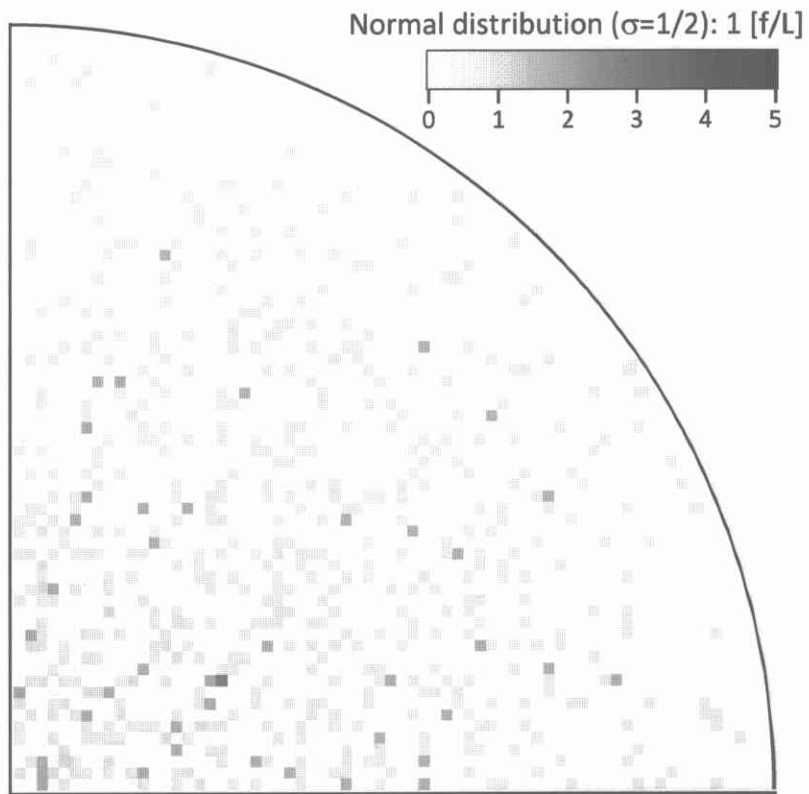


図 2.7 フィルタ上の繊維分布 (中央分布 :  $\sigma = 1/2, 1 \text{ f/L}$ )

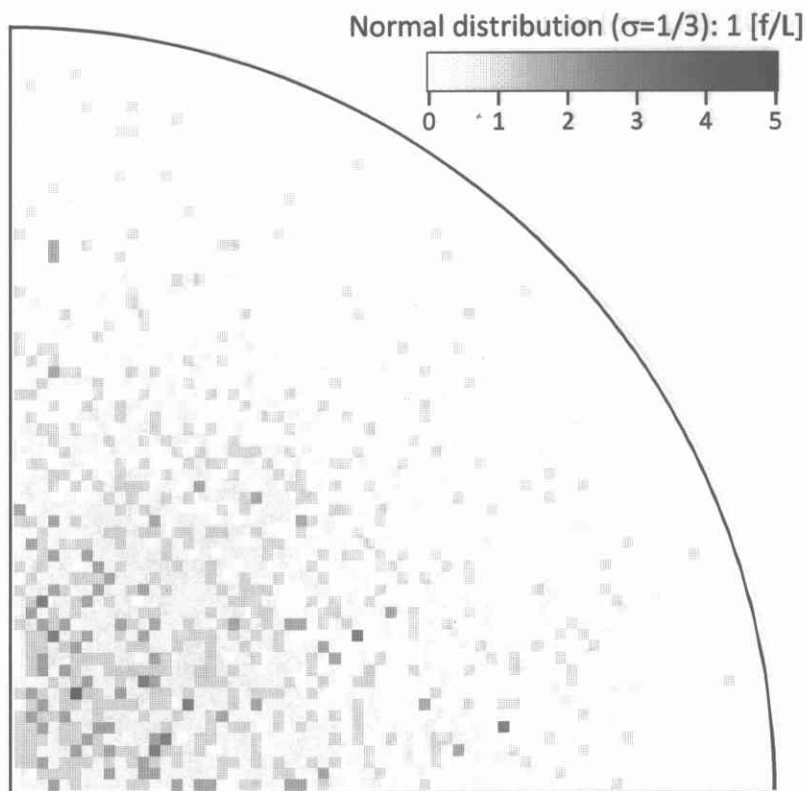


図 2.8 フィルタ上の繊維分布 (中央分布 :  $\sigma = 1/3, 1 \text{ f/L}$ )

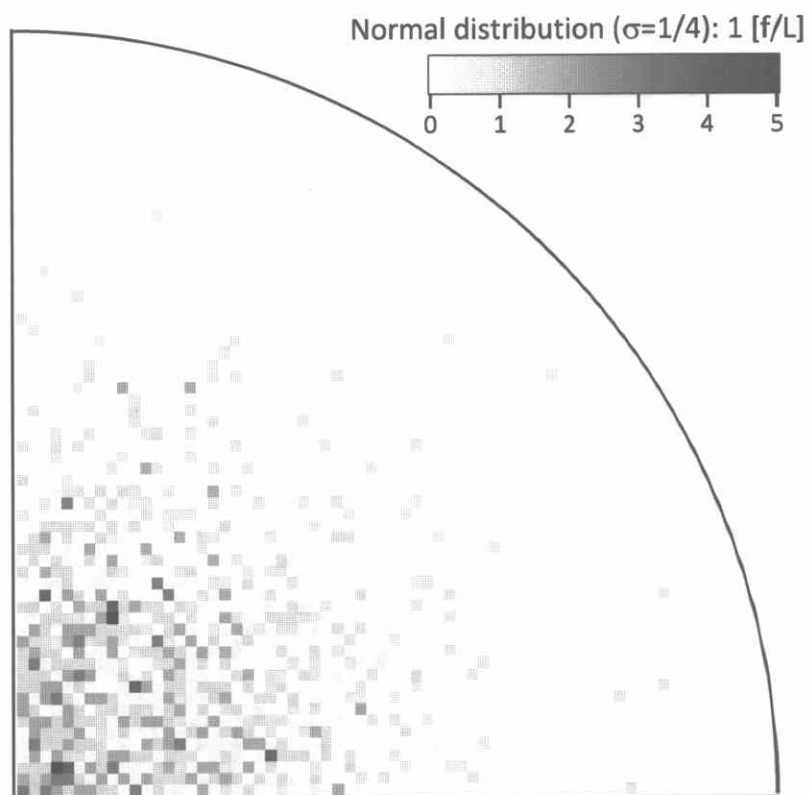


図 2.9 フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/4$ , 1 f/L）

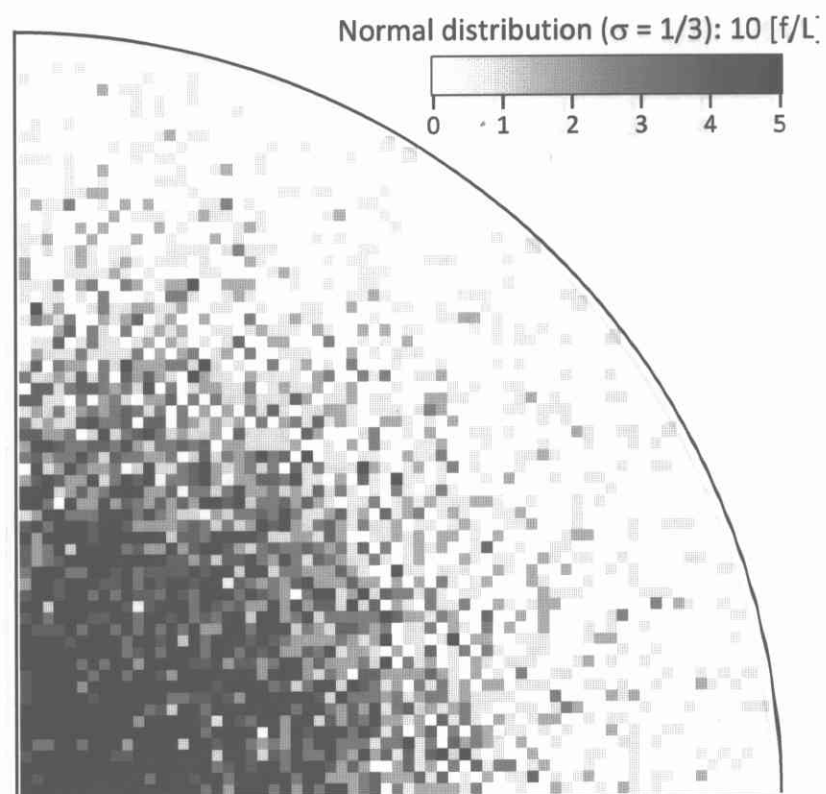


図 2.10 フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/3$ , 10 f/L）

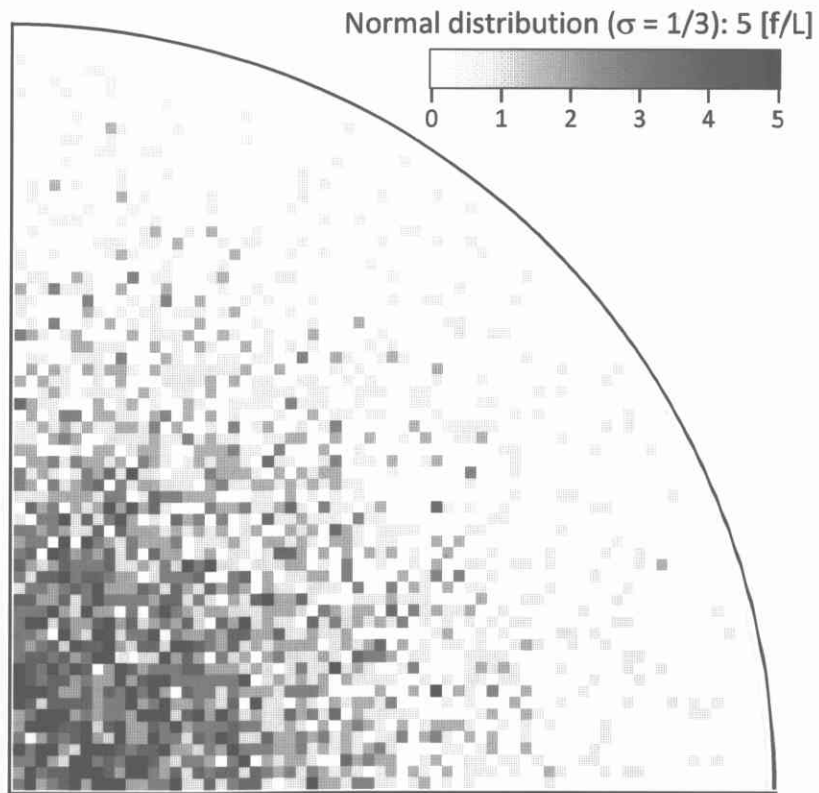


図 2.11 フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/3$ , 5 f/L）

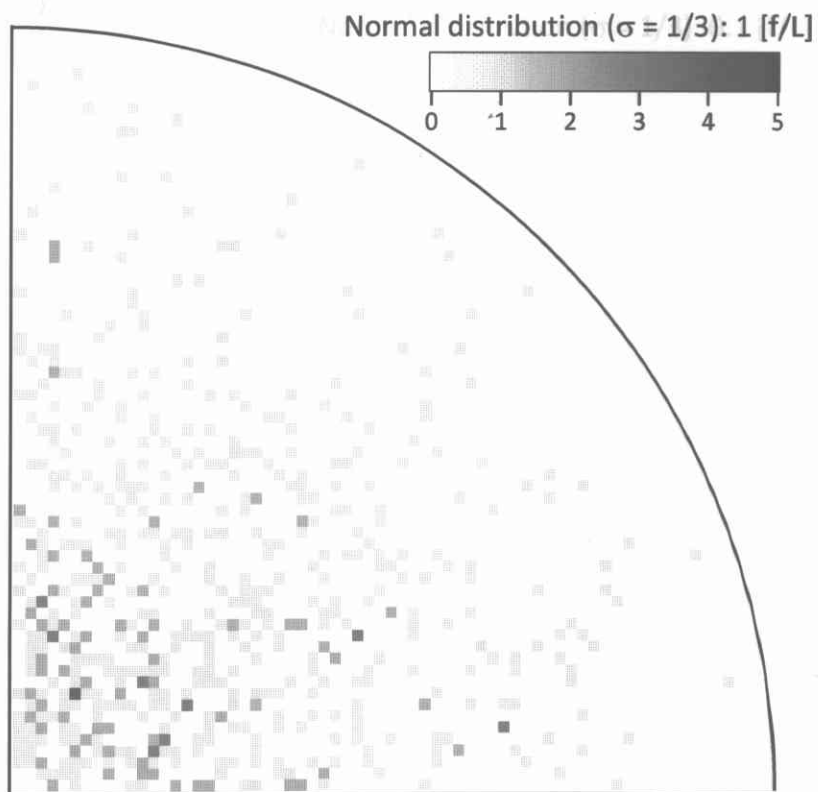


図 2.12 フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/3$ , 1 f/L）（図 2.8 再掲）



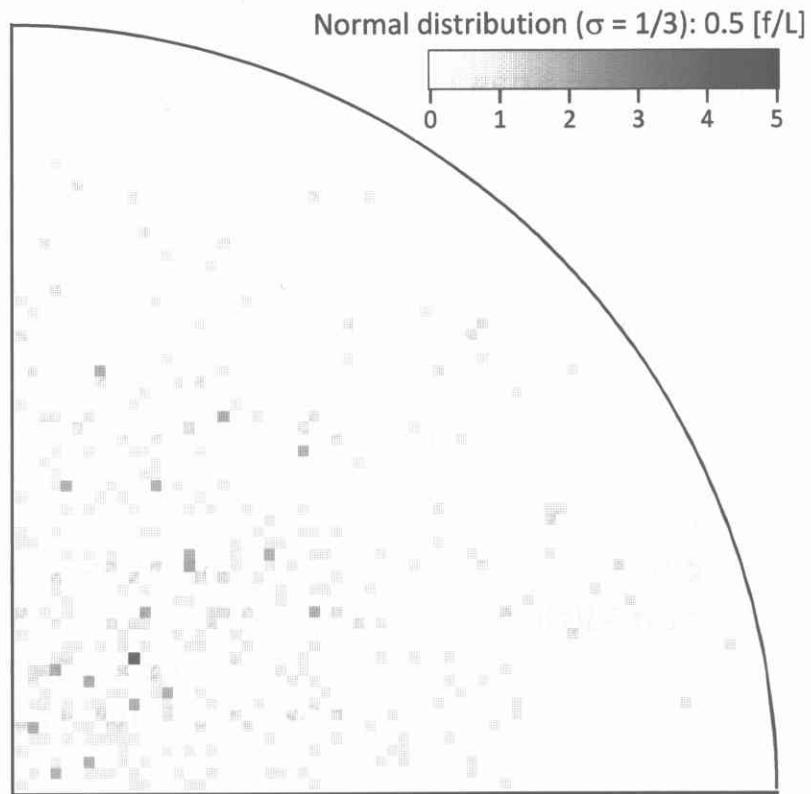


図 2.13 フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/3$ , 0.5 f/L）

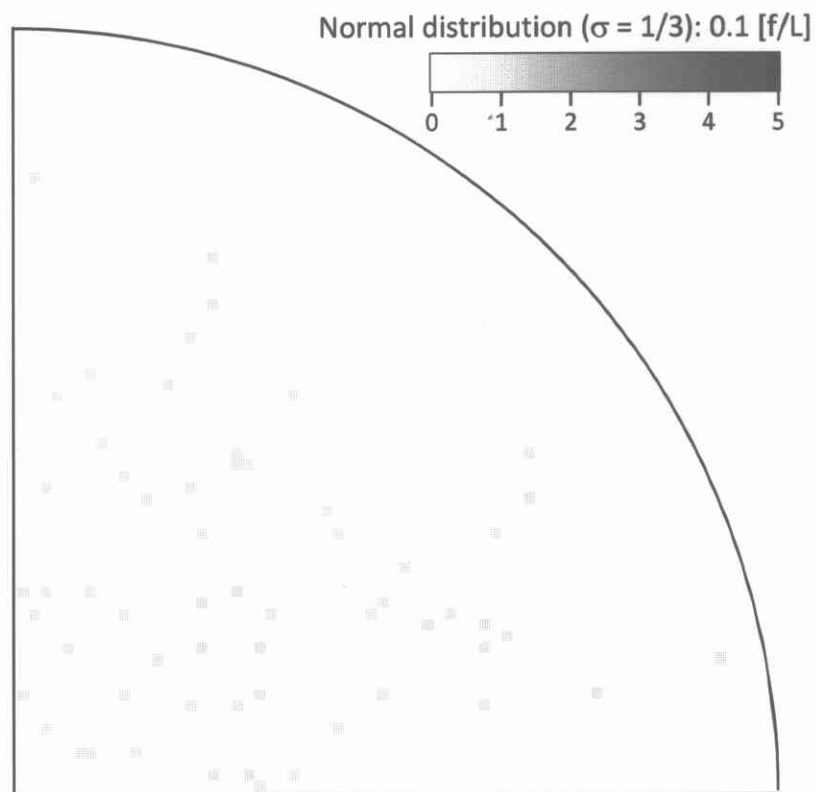


図 2.14 フィルタ上の繊維分布（中央分布： $\sigma = 1/3$ , 0.1 f/L）

### 2.5.3. 視野数と繊維数の関係

繊維の捕集分布が均一分布に従う場合の、視野数と繊維数（累積値）の関係を図 2.15 に、中央分布（ $\sigma = 1/3$ ）に従う場合を図 2.16 に示した。横軸に視野数、縦軸に繊維数を取り、200 回の試行すべてをプロットしてある。仮定した分布によらず、濃度が高いほど同じ観察視野数における観察繊維数のばらつきが大きくなっている。また、同一濃度、同一観察視野数で比べると、均一分布に比べて中央分布を仮定した方が、観察繊維数のばらつきが大きくなっている。

### 2.5.4. 視野数と繊維数の RSD の関係

繊維の捕集分布が均一分布に従う場合の、視野数と繊維数の *RSD* の関係を図 2.17~18 に、中央分布に従う場合を図 2.19~20 に示した。*RSD* は、

200 回の試行における繊維数の標準偏差を繊維数の平均で除したものである。横軸に視野数、縦軸に *RSD* をプロットしたが、仮定した分布によらず、低濃度ほど少視野数でのばらつきが多い結果となっている。また、300 視野程度までの少視野数の領域で、*RSD* は濃度と仮定した分布によらず急激に減少している。一方、300 視野を超えると、それほど大きな *RSD* の減少は見られなくなっている。

さらに、高濃度（5 あるいは 10 f/L）かつ 100 視野程度までに限ってみると、均一分布に比べて、中央分布を仮定した場合の方が、*RSD* が大きくなっている。一方、低濃度（1 f/L 以下）ではこのような傾向は見られなかった。

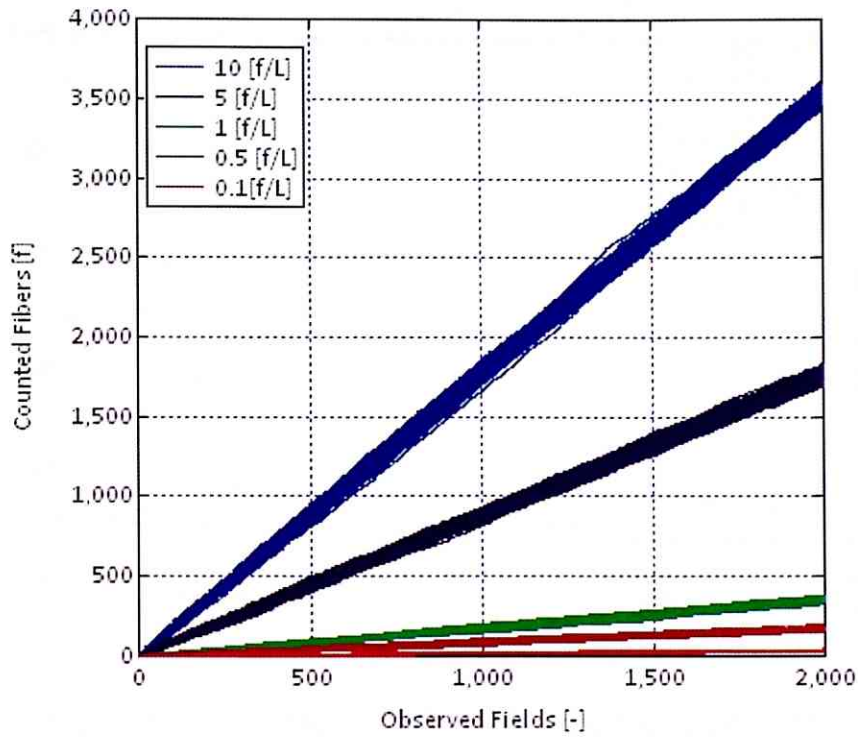


図 2.15 繊維数と視野数の関係（均一分布）

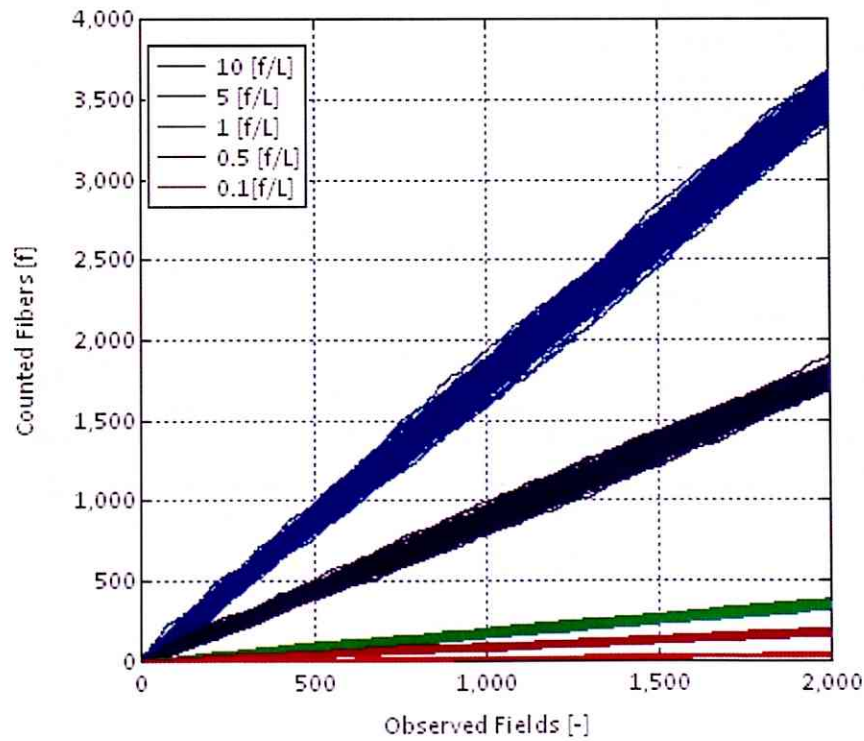


図 2.16 繊維数と視野数の関係（中央分布： $\sigma = 1/3$ ）

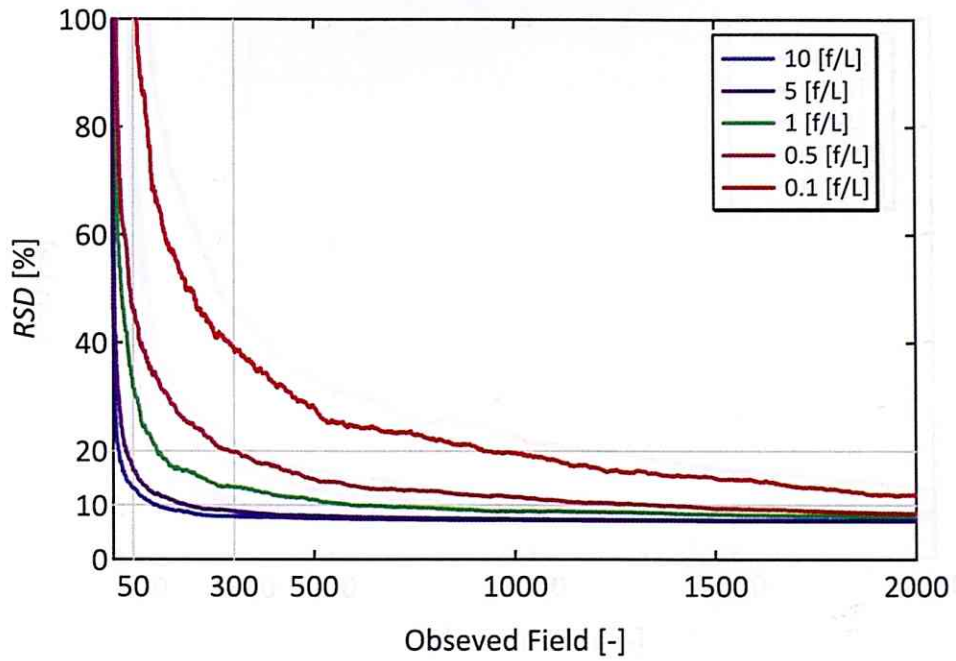


図 2.17 繊維数の  $RSD$  と視野数の関係 (2,000 視野：均一分布)

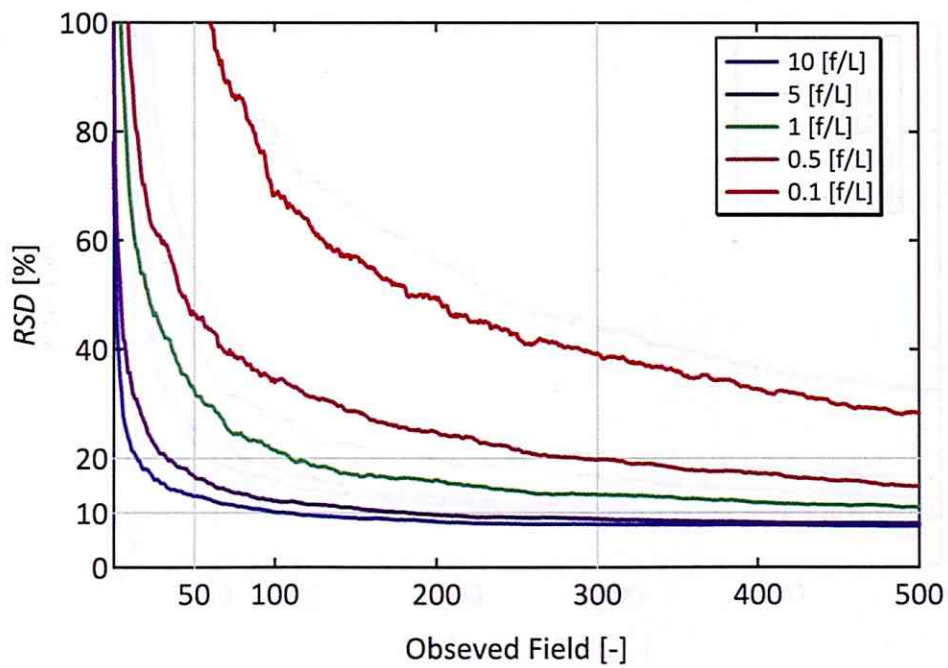


図 2.18 繊維数の  $RSD$  と視野数の関係 (500 視野：均一分布)

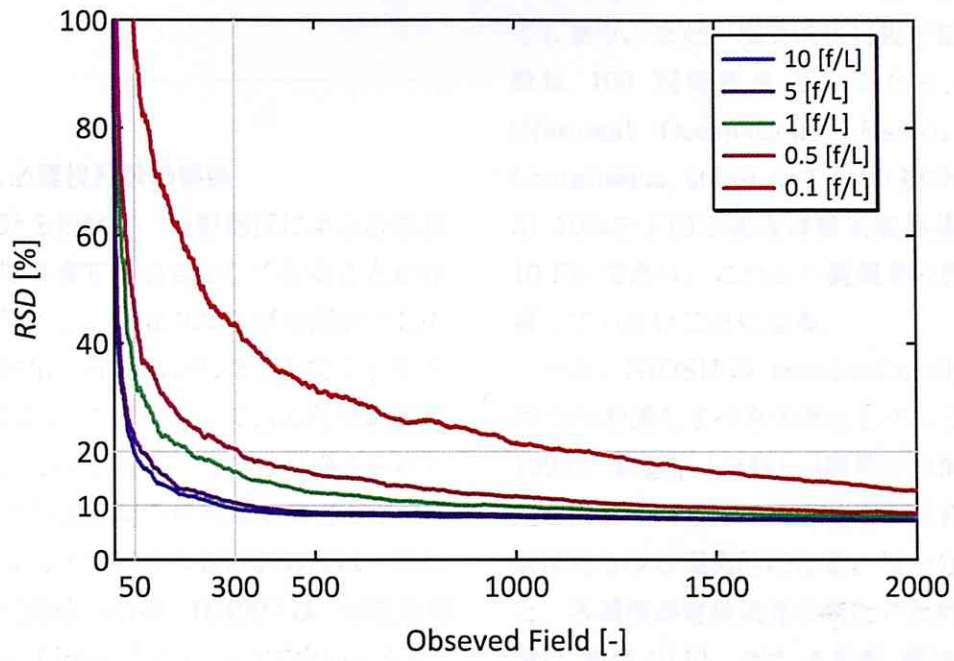


図 2.19 繊維数の  $RSD$  と視野数の関係 (2,000 視野 : 中央分布 :  $\sigma = 1/3$ )

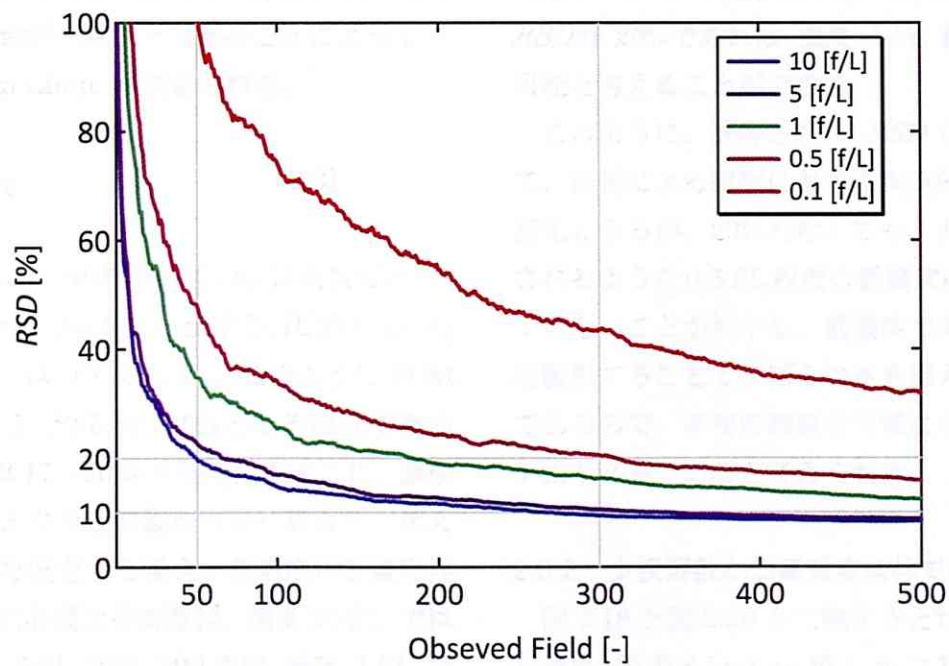


図 2.20 繊維数の  $RSD$  と視野数の関係 (500 視野 : 中央分布 :  $\sigma = 1/3$ )

## 2.6. 考察

### 2.6.1. 濃度と必要視野数の関係

すべての視野を観察し、視野選択による計数結果のばらつきは考慮する必要がなくなることが理想的である。しかし、全 3,400 視野を観察するのは、たとえ機械化・自動化されたとしても容易ではない。計数のばらつきに対してある程度の許容範囲を設けて、その範囲にばらつきが抑えられるような視野数と濃度の関係を検討する必要がある。

ある測定値に対するばらつきの許容度は一般に定量限界として議論される。IUPAC は、定量限界 (Quantification Limit,  $L_Q$ ) について次のように述べている (IUPAC, 1995)。「Quantification Limit は仮説検定ではなく、相対標準偏差 (RSD) で与えられる。つまり、あるレベル  $L$  における平均的なばらつきが一定以下であることによって Quantification Limit が決定される。

$$L_Q = k_Q \sigma_Q \quad (2.9)$$

$\sigma_Q$  はそのレベルでの標準偏差、 $k_Q$  は乗数であり、この乗数は RSD の逆数に一致する。IUPAC の  $k_Q$  に関する規定値は 10 である」。このように PCM 法の定量限界を RSD が 10% となる濃度である考えると、図 2.17~20 から明らかなように、濃度によって必要となる視野数が大きく異なる。例えば、均一分布を仮定する場合、各濃度が定量限界を満たすために必要な視野数は、濃度 10 f/L では 100 視野、濃度 5 f/L では 200 視野、濃度 1 f/L では 600 視野、濃度 0.5 f/L では 1,400 視野、濃度 0.1 f/L に至っては、2,000 視野観察しても RSD は 10% を下回ることはない。また忘れてならないのが、このシミュレーションでは存在する繊維はすべて正しく計数されると仮定していることである。実際の観察では、さらに計数結果はばらつ

くことになるので、さらに必要な視野数は増加してしまう。また、現実的に目視で観察可能な視野数は 100 視野程度であると考えられている (National Occupational Health and Safety Commission, 2005) ので、100 視野の観察で RSD が 10% を下回る濃度は敷地境界基準と同程度の 10 f/L であり、これより低濃度の環境の測定には適していないことになる。

一方、NIOSH の standard method では RSD は 20% を満たすべき水準としている (NIOSH, 1995)。環境庁 (当時) [環境庁, 1989] も同様な通達を出している。20% であれば、必要となる視野数はもう少し現実的になる。均一分布を仮定すると、各濃度が定量限界を満たすために必要な視野数は、濃度 10 f/L では 15 視野、濃度 5 f/L では 30 視野、濃度 1 f/L では 100 視野、濃度 0.5 f/L では 300 視野、濃度 0.1 f/L では 1,000 視野程度の観察がそれぞれ必要になる。つまり、許容される RSD が 20% であれば、濃度 1 f/L 程度までは定量可能と考えることができる。

このように、許容される RSD の与え方によって、目視による観察における現実的な定量限界は変化するが、20% と考えても、大気環境で観測されるような 0.5 f/L 程度の低濃度の計測には適していないことがわかる。低濃度であっても、多視野観察することで、ばらつきを抑えることが可能であるので、多視野観察を可能にする装置・システムが必要であると考えられる。

### 2.6.2. 少視野数かつ高濃度条件でのばらつき

図 2.18 と図 2.20 を比較するとわかるように、高濃度 (5 あるいは 10 f/L) かつ 100 視野程度までに限ってみると、均一分布に比べて、中央分布を仮定した場合の方が、RSD が大きくなっている。これは、仮想視野あたりの繊維数のばらつきによるものだと考えられる。図 2.21 に各濃度における仮想視野あたりの繊維数の標準偏差を示した。低濃度では、仮定する分布によらず標準偏差に大き



な違いは見られないが、高濃度では中央分布を仮定した方が、標準偏差が倍程度大きいことがわかる。少視野数ではこのばらつきが平準化されないため、中央分布を仮定した方が計数のばらつきが大きくなっている。逆に、低濃度ではどちらの分布を仮定しようとも、計数結果に違いはなく、繊維分布の形状には依存しないことがわかる。

### 2.6.3. 視野選択方法

本章では、視野の選択方法は PCM 法の規定に従いランダムに選択することとした。しかし、これまでに述べたように、フィルタ上の実際の分布が、中央ほど繊維密度が高くなるような分布であるならば、すなわち、「単位面積当たりに捕集された繊維および粒子は、標本上でばらつきがあるものの、ばらつきの程度には偏りが無いこと」という PCM 法の前提が成り立たないならば、視野選択方法も検討の必要がある。しかし、ここでは多視野観察時の統計学的な計数のばらつきのみを解析の対象としたため、視野選択方法については検討を行わなかった。今後の課題であるといえる。

## 2.7. 結言

本章では、多視野観察による精度の改善の可能性について検討した。モンテカルロシミュレーションによって計数結果のばらつきを推計し、さまざまな濃度において、視野数と計数のばらつきの指標となる *RSD* の関係を整理した。その結果、現行の最大観察視野数である 100 視野程度の観察を前提として、許容される *RSD* を IUPAC 同様 10% とすると、目視観察によって定量可能な濃度はおおむね 10 f/L 程度であった。また、もう少し緩やかな基準 (20%) を設けている NIOSH や環境庁に従うとしても、定量限界は 1 f/L 程度であることが明らかになった。実際の気象環境で観測されるような、低濃度サンプルの計測には 300 視野あまり多視野観察が必要であり、観察者の疲労の影響を受けない機械化・自動化が必要であると結論付けられた。

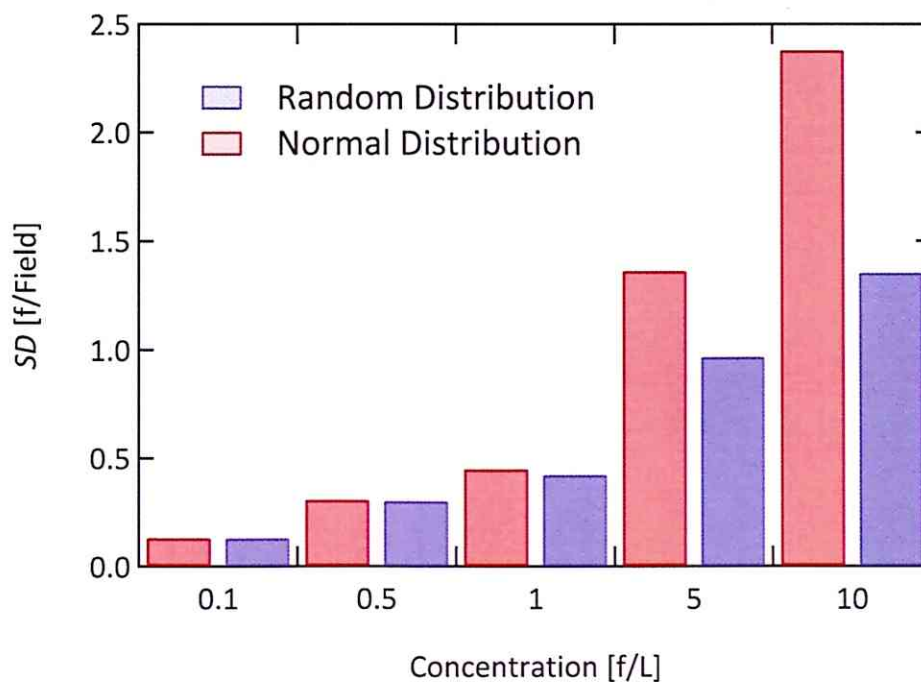


図 2.21 仮想視野の繊維数密度の標準偏差

## 第3章 自動標本観察システム

本章では、PCM 法における顕微鏡操作と撮像操作を自動化する、自動標本観察システムの開発を行った。



### 3.1. 緒言

これまでに、PCM 法を自動化する試みはいくつか存在しているが、いずれも顕微鏡に接続したビデオカメラや CCD 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ことを目的としたもの (Baron, et al., 1987) (Inoue, et al., 1998) 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ない。主要なアスベスト繊維であるクリソタイルを例にとると、PCM 法の主要な誤差要因は、繊維の見落とし (Oversight) であり、その寄与は 78.3% と非常に大きく (Pang, 2000)、視野内の繊維を正しく認識するための、正確な顕微鏡操作が重要であると考えられる。多視野観察を可能にするには、視野を適切に移動し、フォーカスを調整し、画像を撮像するという顕微鏡操作全体を自動化する必要がある。

本章では、PCM 法による多視野観察を可能にするために、顕微鏡操作を自動化した自動標本観察システムの開発を目的とした。この自動化によって、目視観察の計測者の負担を軽減し、多視野観察時にも顕微鏡操作の熟練度による計数のばらつきを抑制することが可能になると期待される。

なお、本章では PCM 法の自動化に係る部分についてのみ触れ、分散染色法に係る部分の詳細は Appendix にまとめた。また、サンプルの捕集およびスライドの作成手順は、本論文の目的とする自動化の対象からは外れるため詳述していない。

### 3.2. システムの概略

本システムのブロック図を図 3.1 に、全体図を図 3.2 に示した。また、採用したハードウェアは表 3.1 にまとめた。なお装置のアセンブルは、当該分野に実績のある企業に<sup>4</sup>依頼した。

本システムに用いた位相差顕微鏡は、ニコン製位相差顕微鏡 ECLIPSE 80i TP-DPH (以下、位相差顕微鏡) である。位相差観察用対物レンズには、ニコン製 CFI Plan Flour DM 40X および CFI Plan Flour DLL 40X (以下、対物レンズ) を用いた。位相差顕微鏡に接続した CCD カメラは、フローベール製 3CCD カメラ ADP-240 (1/3 型、有効画素 1024(H)×768(V) ×3、LVDS 接続、以下、CCD カメラ) である。

位相差顕微鏡のフォーカス制御にはフローベール製 AFコントローラ AF-σD (以下、AFコントローラ) を用いた。搭載した CCD カメラの映像信号は AFコントローラを経由して、画像取得のために Matrox 社製キャプチャーカード Meteor II Digital METEOR2DIG64L (以下、キャプチャーカード) に入力される。AFコントローラは入力された映像信号をもとに、合焦点位置を計算し、顕微鏡粗微動ダイヤルに装着されたモーターをコントロールし、合焦点位置へステージを移動させる。

合焦点位置が決定した後、この再びモーターを駆動し、焦点位置を挟む一定範囲をスキャンし、複数枚の画像を深度方向に一定間隔で取得し、深度合成画像 (後述 3.3.4 節) を作成する。

また、アスベスト標本を効率的に多数観察できるように、標準プレパラートが 2 枚装着可能な専用サンプルホルダ (図 3.3) を作製し、中央精機製 MSS-50A を位相差顕微鏡に装着できるように改

<sup>4</sup> 王子計測機器株式会社  
<http://www.oji-keisoku.co.jp/>

造したステージ（以下、自動 XY ステージ）を用いた。さらに、自動 XY ステージ上の標本を自動的に入れ替えるためのオートローダを開発した。

なおこれらのシステム全体は、開発した専用の制御ソフトウェアによってコントロールされる。

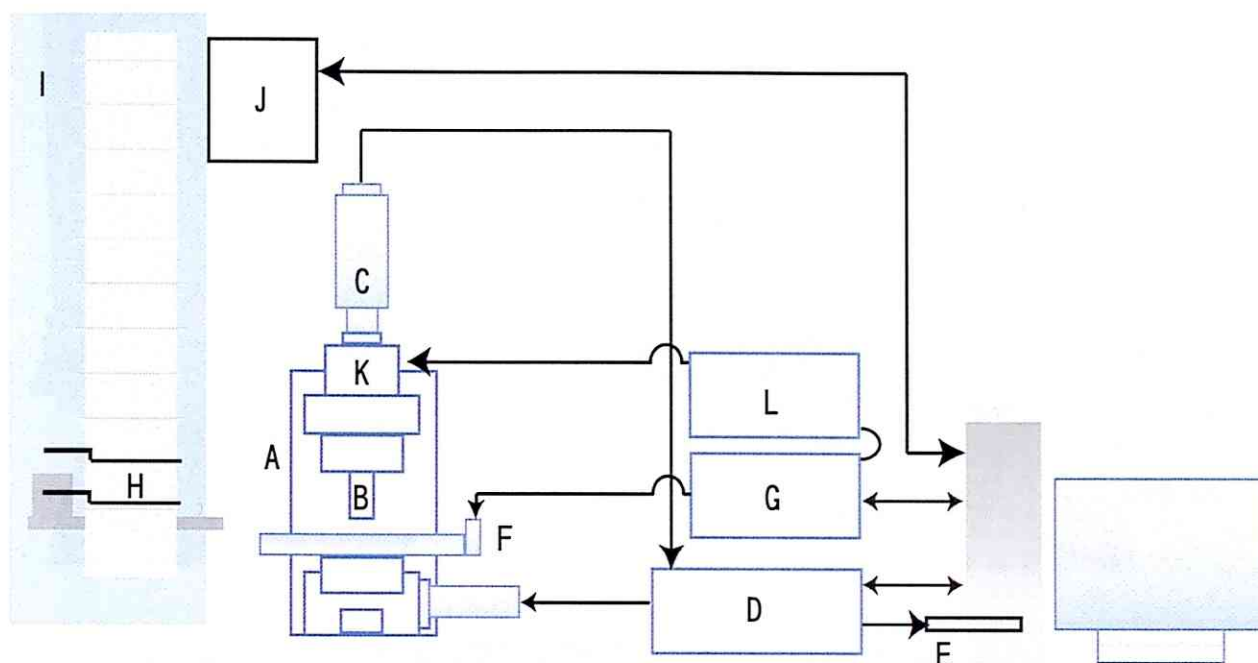


図 3.1 標本観察ユニットの概略図  
(A～Jは表 3.1 に対応)

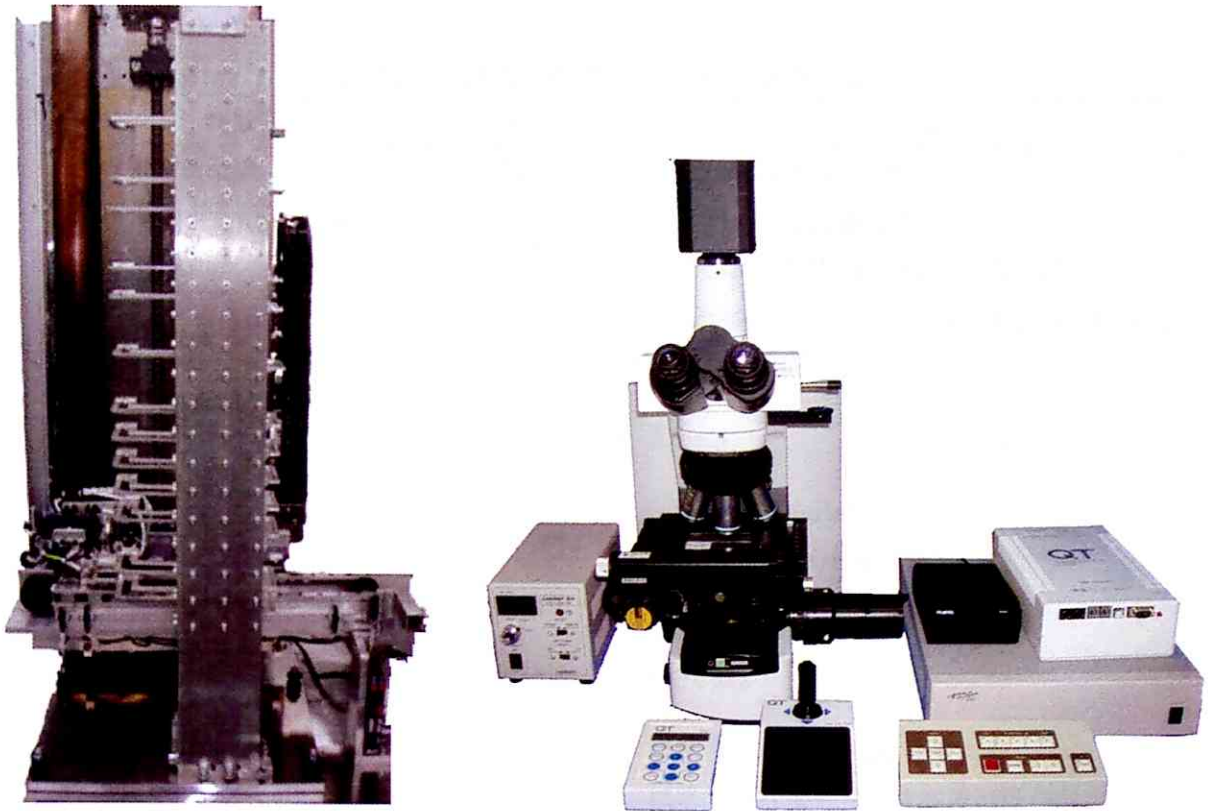


図 3.2 自動標本観察システムの全体像（左：オートローダ、右：その他全体）

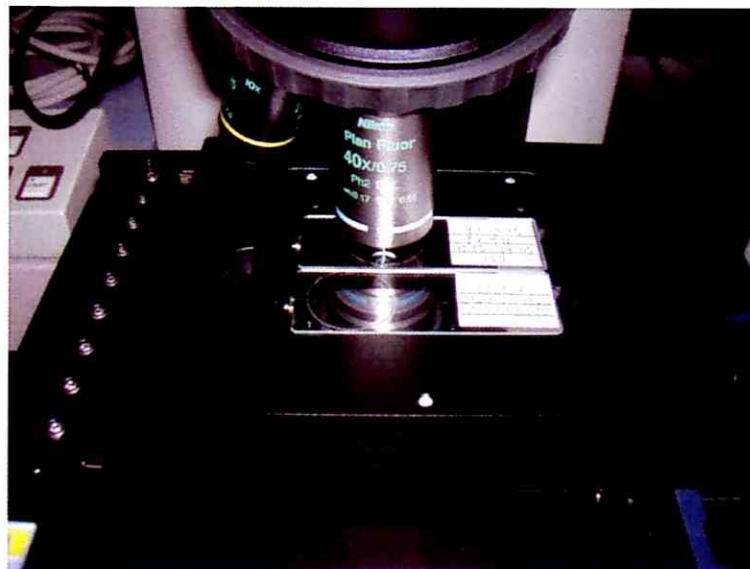


図 3.3 サンプルホルダ拡大図

スライドが2枚搭載可能になるように改造されている。

表 3.1 自動標本観察システムに用いた装置

装置名	メーカー	型番ほか
A 位相差顕微鏡	Nikon	ECLIPSE 80i TP-DPH
B 対物レンズ	Nikon	CFI Plan Flour DM 40X および、CFI Plan Flour DLL 40X
C 3CCDカメラ	フローベル	ADP-240 (1/3型、有効画素1024(H)×768(V) ×3、LVDS接続)
D オートフォーカス コントローラ	フローベル	AF-σD
E キャプチャーカード	Matrox	Meteor II Digital METEOR2DIG64L
F XY自動ステージ	中央精機	MSS-50A
G XY自動ステージ コントローラ	中央精機	QT-CM2
H サンプルホルダ	独自開発	標準プレパラート2枚装着可能
I オートローダ	独自開発	標準プレパラート40枚装着可能(サンプルホ ルダ20段)
J オートローダ コントローラ	独自開発	
K 自動回転アナライザ	独自開発	
L 自動回転アナライザ コントローラ	独自開発	

### 3.3. システム構成要素の詳細

#### 3.3.1. 分解能（対物レンズと CCD カメラ）

位相差画像を用いて自動計数するには、高コントラストな画像であることが求められるため、対物レンズには、標準搭載の目視観察に適した DLL レンズだけでなく、より高コントラストな観察が可能な DM レンズも搭載した。

位相差顕微鏡は、標本の位相差量を光の干渉を利用して明暗のコントラストに変換して観察できる顕微鏡である。位相差量に応じて物体を黒く（暗く）見せるダークコントラスト方式と、逆に物体を白く（明るく）見せるブライツコントラスト方式があるが、本システムではダークコントラスト方式を採用した。ダークコントラスト方式は、目視による観察では一般的に用いられている方式である。ダークコントラスト方式は、対物レンズにおける直接光の吸収量の違いで、DLL、DL、DM の 3 種類の対物レンズを選択できる。標本の位相差量が増加するに従い像の暗さも増すが、ある限度を越すと逆に像が明るくなるため、標本の位相差量に制約を受ける。この位相差の許容量はラティテュード (latitude) と呼ばれる。それぞれの位相差対物レンズは、一般的コントラストの DLL レンズ、中間的コントラストの DL レンズ、高コントラストの DM レンズというコントラスト特性を持つ。DLL レンズはコントラストとラティテュードがよくバランスしていて、ラティテュードは低域および中域の物体をカバーし、位相物体<sup>5</sup>だけでなく振幅物体<sup>6</sup>にもかなりの適応性があるため、一般的な位相差物体の観察に適している。DL レン

ズは DLL レンズに比べて少しコントラストを上げた性能になっていて、ラティテュードは中間的である。DM レンズはコントラストがやや硬調でラティテュードが狭くなっており、低位相差の観察に適している。具体的には、DM レンズでは 1/8 波長、DLL レンズでは 1/4 波長を超えると、コントラストが反転して、黒く見えていたものが白く飛んだようになって、観察を妨げる。

一般にアスベスト測定における位相差顕微鏡での観察は、サンプルにあわせて、位相差対物レンズのコントラストを選択することが重要である。図 3.4 上側が DM レンズ、下側が DLL レンズを用いたときの同一視野（クリソタイル）の画像を示した。とりわけ細い繊維において、DM レンズで取得した画像が高コントラストであることがわかる。空気中の浮遊繊維測定の場合、太く粗大な繊維は浮遊しにくいので、おのずと測定対象が微細繊維に絞られるため、DM レンズがもっとも適している。したがって、本システムでは既定の対物レンズとしては DM レンズを用いることとした。

さて、この対物レンズの理論分解能  $R$  は、開口数  $NA$  が 0.75 であり、光の波長を 550 nm（緑）とすると  $R = 0.37 \mu\text{m}$  である。これに遜色ない分解能を有する CCD カメラが必要であるが、本システムで採用した CCD カメラの分解能は  $0.116 \times 0.116 \mu\text{m}/\text{pixel}$ （正画素）となっており要件を満たしている。

なお、本システムで採用した 3CCD カメラ ADP-240 以外にも、フローベール製超高感度 EM-CCD カメラ ADT-100（以下、高感度 CCD）も検討した。高感度 CCD は 2/3 インチ正画素型フレームトランスファ型 CCD 固体撮像素子（TI 社インパクトロン CCD）を使用し、通常の撮影から最大 1600 倍の超高感度画像データを 10 bit デジタル出力することが可能である。また、ADP-240 に比べて視野が縦横それぞれ 2 倍、面積で 4 倍に拡大される。

図 3.5 に高感度 CCD によるサンプル画像（クリ

<sup>5</sup> 位相物体は、光が侵入すると、透過光の強度は変わらず、位相のみが変わる無色透明な物体。生細胞は位相物体の代表的な例。光学的等方体とも。

<sup>6</sup> 振幅物体は、光が侵入すると光が吸収されたりして光の振幅が変化する物体。不透明な物体や染色した標本が相当。振幅物体は明視野観察で観察可能。吸収物体あるいは光学的異方体とも。



図 3.4 対物レンズの比較（上：DM、下：DLL）



ソタイル)を示した。本研究開発において十分な仕様であり、視野も広がるメリットはあるが、モノクロであるため、分散染色への転用ができない。また、アスベスト認識に必要な輝度領域は現状のADPでも十分であるとの判断から採用にいたらなかった。今後システムをPCM法に限定し、さらに感度を高めるシステムを構築するときには候補の1つである。

さて、JIS [JIS, 2006]では、HSE/NPL検出限界試験用スライド (Guen, et al., 1984) のグループ5以上が観察できる者に行わせるとよい、とされているが、同スライドを本システムで実際に観察したところ、グループ6のラインまで観察可能であり、十分な分解能を有している (図3.6)。

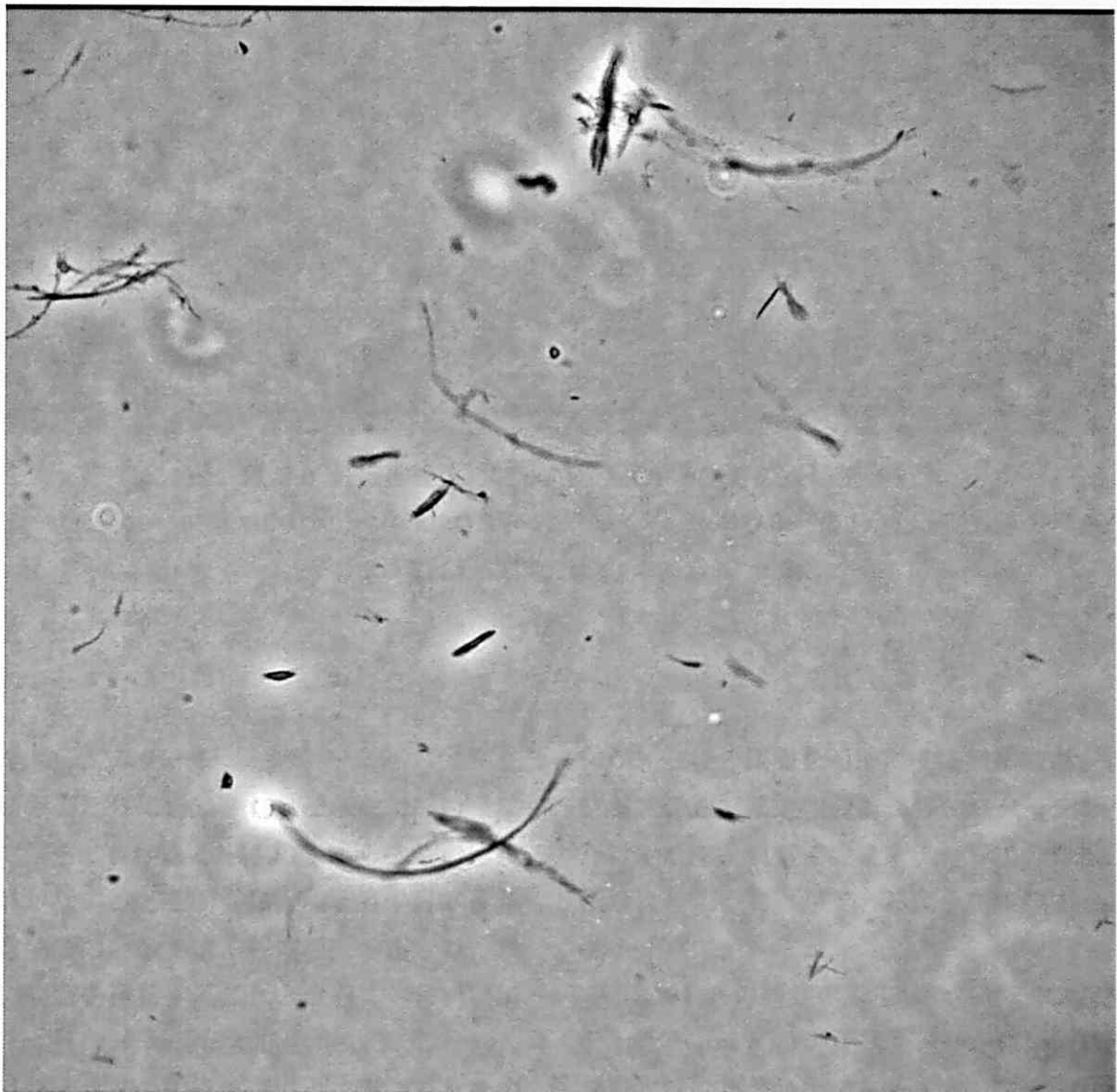


図 3.5 超高感度カメラによるサンプル画像 (クリソタイル)

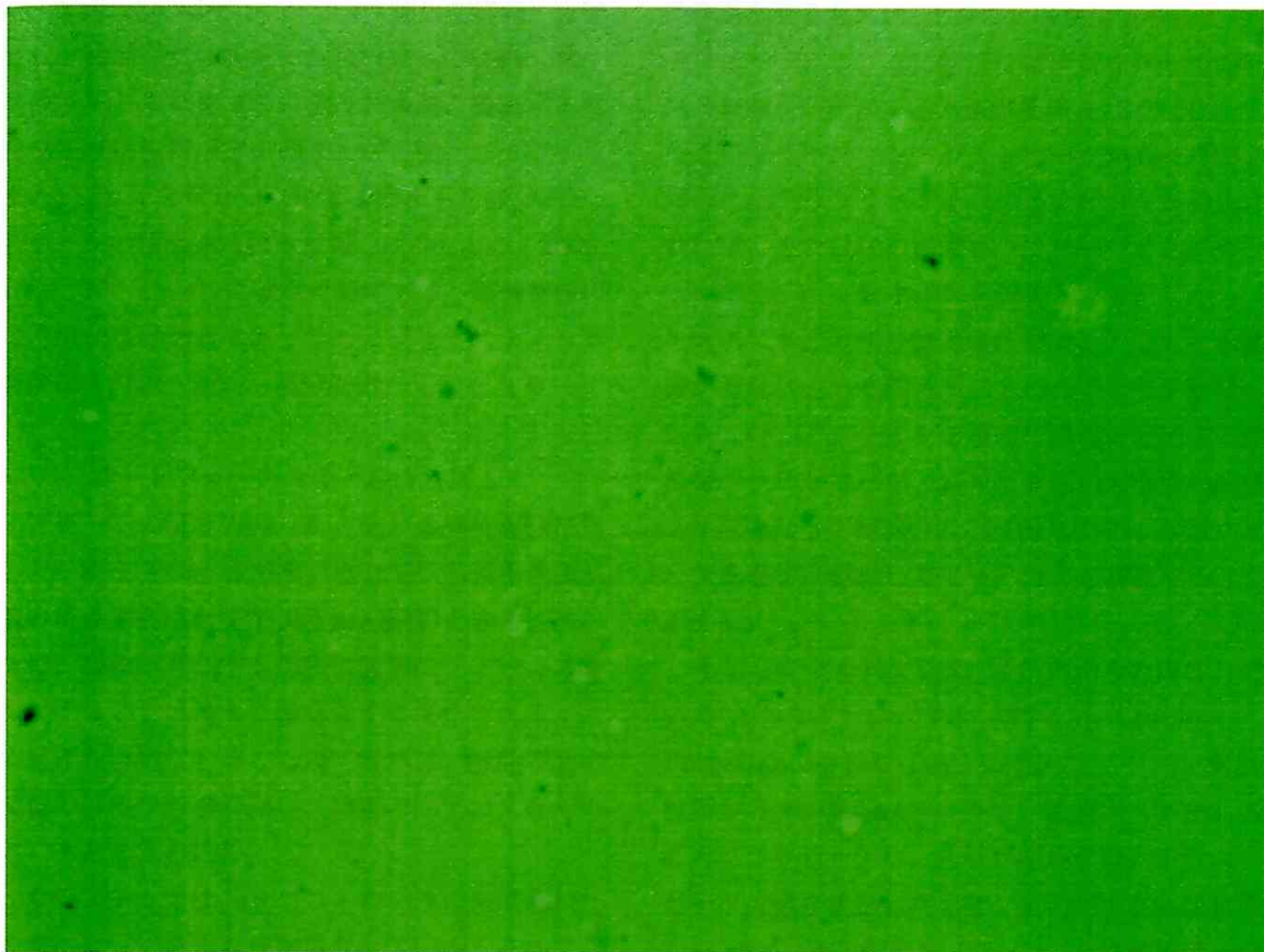


図 3.6 HSE/NPL スライドのグループ 6 の撮像例

対物 40 倍レンズ (DM レンズ) で HSE/NPL スライドの No.6 グループ (0.34  $\mu\text{m}$  間隔) を撮影したもの。粒子の重なりによって見えにくい部位もあるが総じて No.6 のラインが観察できている。

### 3.3.2. 自動 XY ステージ

単位面積あたりに捕集された繊維および粒子は、標本上でばらつきがあるものの、ばらつきの程度には偏りが無いことを前提に、環境省や日本作業環境測定協会の手順では、観察視野の選定は、ランダムに視野を選択することとされている【環境省, 2007】【日本作業環境測定協会, 2004】。一方、現実にはフィルタの辺縁部では単位面積当たりの繊維密度は減少してしまうことを考慮すべきだという指摘もある (Lai, et al., 2006)。本研究では既存の視野の移動方法や選択方法の是非は議論しな

いが、今後の議論を可能にするためにも、自動観察システムでは定型の視野移動パターンを与えるだけでなく、観察位置をステージ上の座標として任意に与えることができるように実装する必要がある。

$\phi 300 \mu\text{m}$  の観察視野を移動させるには、少なくとも数百  $\mu\text{m}$  程度の距離を速やかにかつ精度よく移動することが必要である。本システムに搭載した自動 XY ステージの最少移動距離は 1  $\mu\text{m}$ 、最大移動速度は 8,000  $\mu\text{m/s}$  であり、観察視野の移動には十分な精度・速度を持ち合わせている。ま



た、専用のソフトウェア(3.4.7節にて詳説)を開発し、論理原点の設定、論理原点への移動、マイクロメートル単位でのステップ移動、観察する視野を任意に座標指定することが可能となっている。また、ジョイスティックによる操作も可能であり、ステージの移動速度は5段階(8000, 4000, 2000, 1000, 500  $\mu\text{m/s}$ )に設定可能である。顕微鏡操作に不慣れな計数者であっても、ジョイスティックを使用すれば、適切な視野制御が可能となる。

### 3.3.3. オートフォーカスのアルゴリズム

ステージの深度方向(Z方向)の移動範囲に対して、現在PCM法で用いられている位相差顕微鏡の焦点深度はわずか0.5  $\mu\text{m}$ 程度<sup>7</sup>と非常に浅いため、繊維が存在する深度に適切にフォーカスを調整することは最も技量を要する操作である。この操作を自動化することができれば、計測者間の技量のばらつきを抑制し、精度の向上に大きく寄与すると考えられる。

本システムでは、AFコントローラに搭載された機能によって合焦点が実現されている。そのアルゴリズムは以下の通りである。通常、画像情報による合焦点位置は、各画面において画像コントラストを計算し、コントラストがピーク(極大)となる位置をサーチすることで算出されている。コントラストカーブの概念図を示した(図3.7上)。ここで、コントラストとは画像中の輝度の分散値に相当する。通常、コンパクトデジタルカメラなどでは、被写界深度が深いため、フォーカス領域のコントラストカーブは単峰性のプロファイルを持つことが多く、すべての領域を詳細にサーチすることは速度面において現実的ではない。高速に

動作をさせるために、ラフにピーク位置を検出(=ラフサーチ)し、次に検出位置周辺を詳しく検出(=詳細サーチ)する方法が使用されている。

このように、コントラストピークが高々1つの場合には、ラフサーチで一つ目のピークが検出されれば、それ以降の領域をラフサーチする必要がないため、高速動作が実現可能となる。しかし、アスベストの位相差顕微鏡画像では、そもそも繊維が視野に占める割合が小さいのでピークが低くなり、むしろフィルタの透明化処理に起因する地模様やハローなどが、無視できない大きさの画像ノイズとなって観察される(図3.7中)。複数のピークを適切に認識してフォーカスを調整する必要がある。

そこで本システムでは、メーカーから公開されているAFコントローラのAPI(Application Programming Interface)を用いて、サーチ開始位置から-20~10  $\mu\text{m}$ という広い範囲すべてを2  $\mu\text{m}$ ごとにラフサーチし、正しい繊維のコントラストピーク位置を検出した上で、そのピーク検出位置から-3~3  $\mu\text{m}$ の範囲を0.2  $\mu\text{m}$ ごとに詳細サーチするよう改良を行った(図3.7下)。また、ピークが検出されない場合には、3回までサーチを繰り返す設定になっている。ラフサーチを十分に行うため、フォーカス位置を検出する速度は犠牲になってしまうが、より確実に合焦点位置が検出するための対策となっている。

<sup>7</sup> 本システムの光学系の焦点深度(DoF: Depth of Focus)は次式で与えられる。

$$DoF = \frac{n\lambda}{2NA^2} + \frac{n}{7NA \times M}$$

$n$  は対物レンズと試料の間の媒体の屈折率(空気ならば=1)、 $\lambda$  は光源波長(通常 550 nm)、 $NA$  は開口数、 $M$  は対物レンズの倍率である。[野島, 2004]

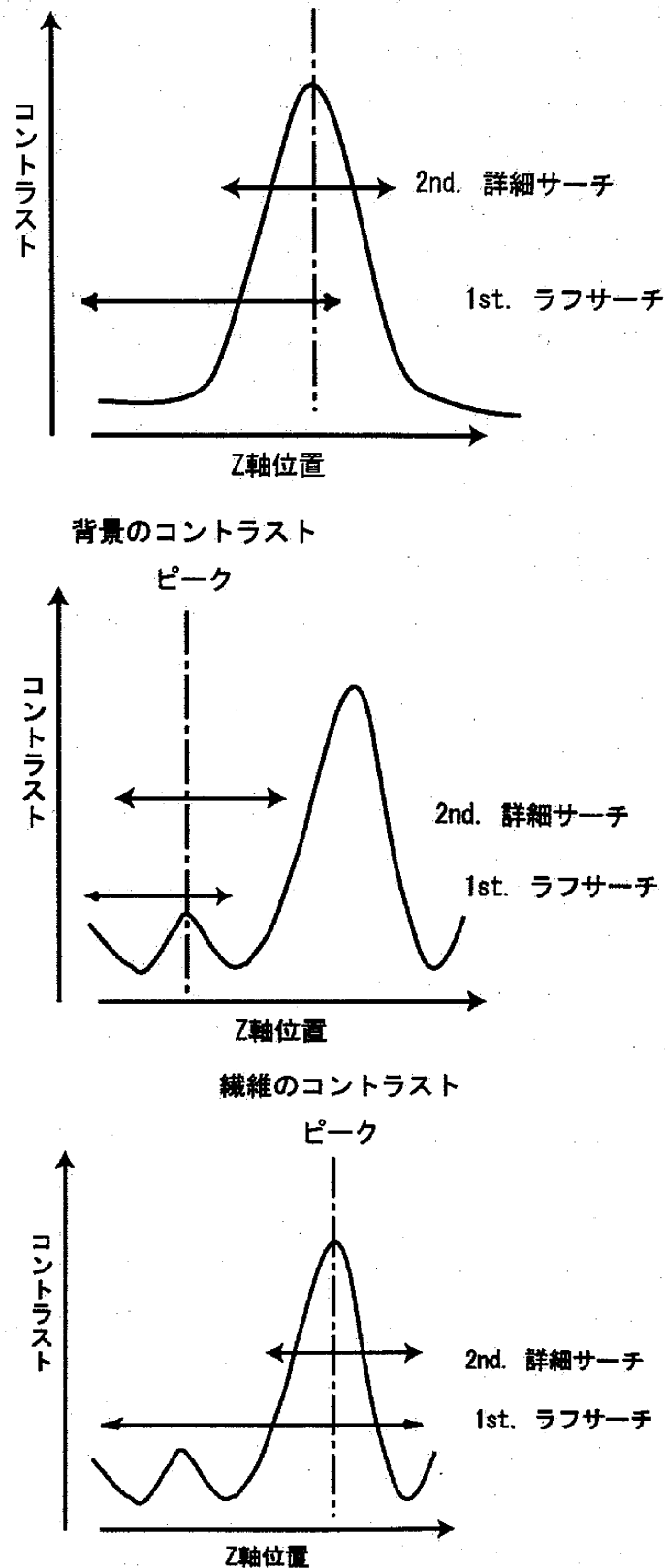


図 3.7 コントラストカーブ

上：通常の単峰型のコントラストピーク。中：アスベスト画像に特有なコントラストピーク。高い本来のコントラストピーク位置のほかに背景のコントラストピーク位置が存在する。下：改良したコントラストサーチアルゴリズム。できるだけ広い範囲をラフサーチすることで、繊維本来のコントラストピークを認識するよう工夫した。

### 3.3.4. 深度合成アルゴリズム

オートフォーカスではフォーカス領域全体の情報、すなわち、輝度の分散に基づいて画像全体の焦点が最適となるような合焦点位置を決定する。しかし、アスベスト測定用の対物レンズの焦点深度は  $0.5\ \mu\text{m}$  と非常に浅く、ある繊維をある焦点深度で観察したとき、焦点の合っている部分と合っていない部分が存在することになる。そのため実際の目視観察では、観察されるべき繊維の全体を把握するためにステージを常に上下させている。しかし、CCD から得られた単一焦点深度の画像には、焦点のずれによる画像の「ぼけ」を生じるため、アスベストのような極めて細い繊維の計数において、長さや幅の誤差要因となることが懸念される。つまり、画像処理によってアスベスト繊維を自動計数するためには、ある視野における合焦点位置の画像だけではなく、その上下の深度に存在する繊維も含めた画像（以下、深度合成画像）を合成する必要がある。

そこで本システムでは、以下に述べる手順で深度方向に複数の画像を合成することにした。まず、AF コントローラによる合焦点位置を中心に、深度方向に  $0.2\ \mu\text{m}$  間隔で XY ステージを移動させ、同一視野で焦点位置の異なる画像 30 枚を取り込む。画素ごとの 30 枚の画像における輝度変化は、合焦点位置画像が白点（明るい点）であれば極大値、合焦点位置画像が黒点（暗い点）であれば極小値となる。したがって、画素ごとに極致を抽出し、その部位から画像を新たに合成することにより、視野内すべての位置で合焦点が達成された画像が合成される。なお、30 枚の画像をコンピュータ側に取り込んだ後、深度合成処理は顕微鏡とは独立にコンピュータ側で実行される。

深度合成の一例（視野の抜粋）を図 3.8 に示した。画像(1)～(7)は深度合成のプロセスで得られた画像の抜粋である。画像(4)はオートフォーカスにて得られたフォーカス位置で得られた画像であり、画像(1)～(3)は合焦点位置の上側、画像(5)～(7)は

合焦点位置の下側、それぞれ  $0.8\ \mu\text{m}$  間隔の画像の抜粋となっている。画像(4)では中央の太い繊維にフォーカスが合っているが、その下にある細く小さい繊維には合っていないため、画像(4)からこの細い繊維を正しく計数することは困難である。一方、この細い繊維にフォーカスが合っているのは画像(2)であり、これらの画像を含めて深度合成で得られた画像が画像(8)である。中央の太い繊維だけでなく、細い繊維にもフォーカスが合っていることわかる。このように合成された画像を対象とすることで、単一画像で深度方向に繊維分布を持つ標本の自動観察が可能になる。この画像合成技術は、繊維の見落としを防ぐ上で、非常に有用である。

### 3.3.5. オートローダ

通常の顕微鏡のステージには 1 枚しか標本を装着できないため、連続して多数の標本を観察することができない。自動観察システムとしての利点を生かすためには、ステージに装着されている標本を自動的に交換する仕組みとして、オートローダの搭載が必要である。

オートローダは顕微鏡のステージ形態に依存する装置であるため、本システムでは、自動 XY ステージに装着できるオートローダユニットを独自開発した。オートローダユニットは、2 枚のプレパラート保持可能な支持体を 20 枚装着することができる。つまり全ての支持体にプレパラートをセットすることにより最大 40 枚の標本を自動的に交換、連続観察ができることとなる。

支持体を固定するチャックの開閉、ステージの移動などの基本動作はオートローダコントローラ内にある PLC (Programmable Logic Controller) にて制御を行っている。この PLC に PC 上で起動するコントロールプログラムが指令を与えることにより、決められた動作を行う。さらに、このコントロールプログラムを計測ソフトウェアから制御することにより、所定の支持板を XY ステージ

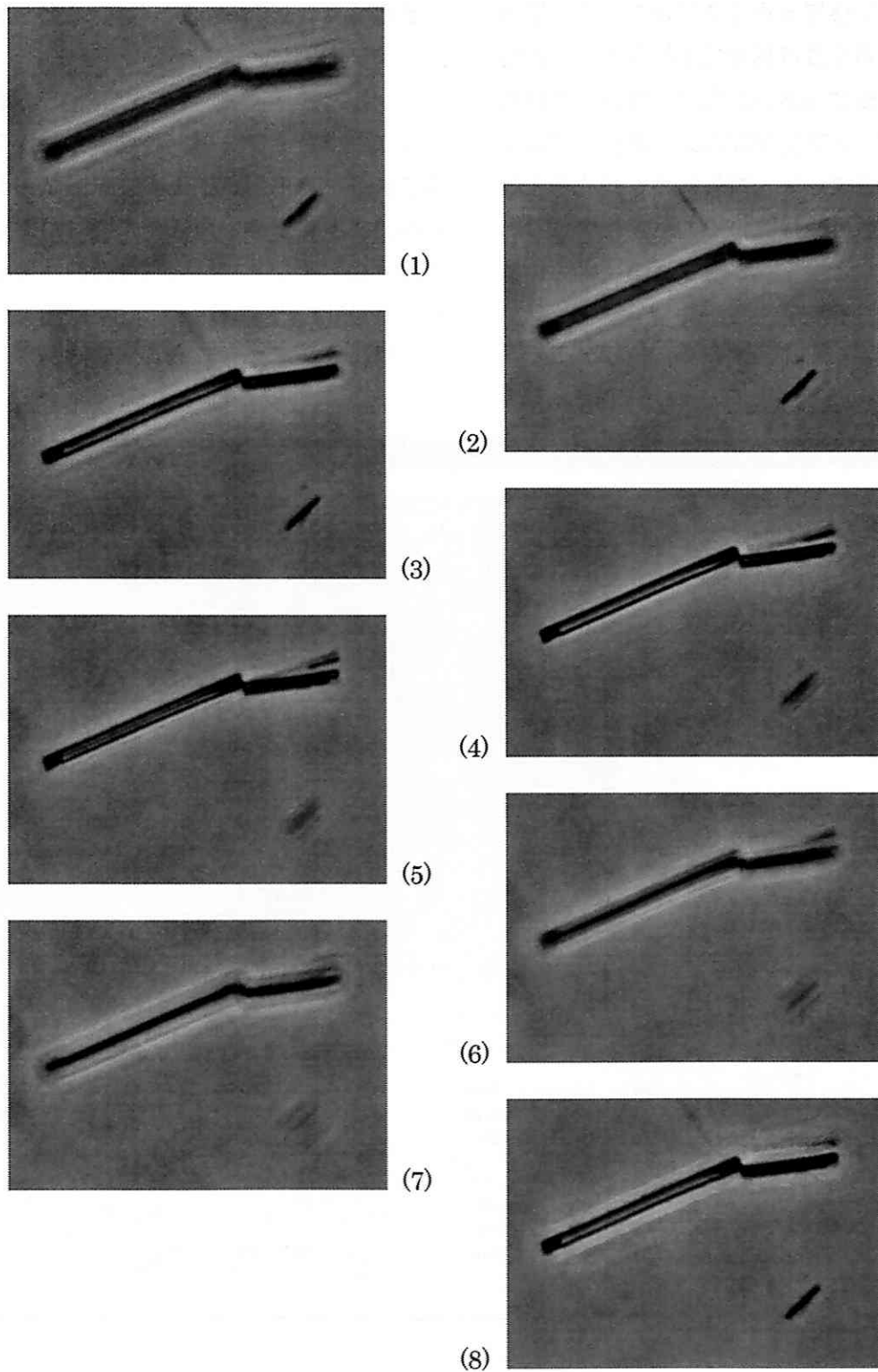


図 3.8 深度合成の実例

深度合成のプロセスで得られる画像のうち  $0.8\ \mu\text{m}$  ステップの画像と深度合成画像を示した。4はオートフォーカスによる合焦点位置の画像であり、1~3 はこれより浅い位置（上側）、5~7は これより深い位置（下側）で得られた撮影された画像である。また、8は深度合成によって得られた画像である。

上に装着することが可能となっている。オートローダの詳細な仕様・設計はAppendixにまとめた。

### 3.3.6. 制御ソフトウェア

本システムは、複数の装置を組み合わせているため、統合的な制御を実現する仕組みが必要である。本研究では、システム全体を制御するためのソフトウェアも開発した。ソフトウェアのメインウィンドウ（図 3.9）には、観察視野以外に、AF

コントローラの制御、自動 XY ステージの制御などがインタラクティブに実行できるように実装されている。このソフトウェアを使うことで、計測者は、一切顕微鏡に触れることなくリモートでアスベスト観察が可能となる。つまり、接眼レンズを覗いた姿勢を長時間継続する必要はなく、通常のデスクワーク同様に、マウスとキーボードの操作だけでアスベストの観察が可能であり、作業効率の改善が期待できる。

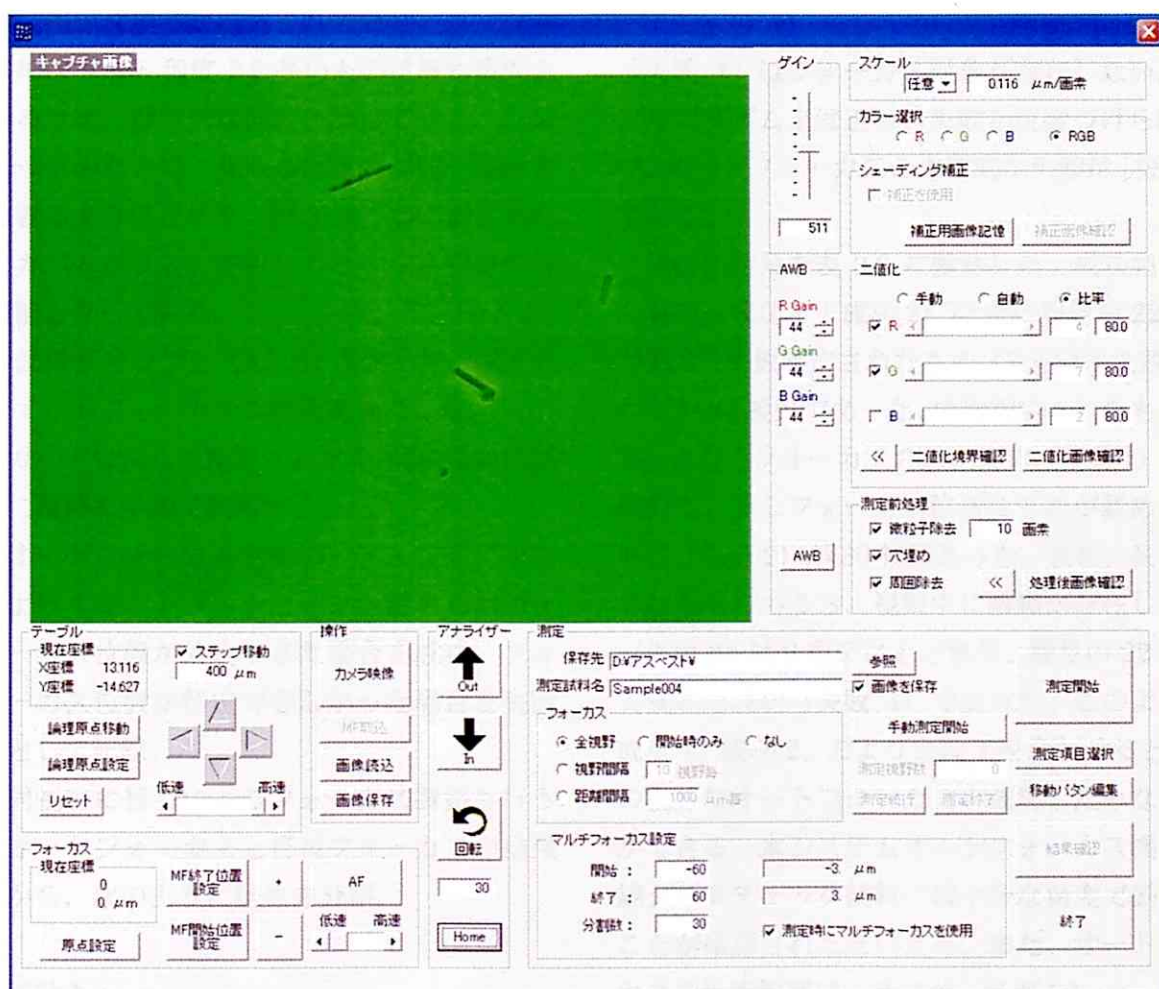


図 3.9 制御用ソフトウェアのメインウィンドウ

ハードウェアのパラメータ設定から、観察操作までをこのソフトウェアによって実行可能になっている。

### 3.4. システムの検証

#### 3.4.1. オートフォーカスの精度検証－石綿クロスチェック試料の場合

オートフォーカスの精度を検証するために、日本作業環境測定協会が行っているアスベスト計数の精度管理事業で用いられている試料（以下、石綿クロスチェック試料）を用いて、オートフォーカスの精度を検証した。この試料には、クリソタイルと模擬建材粒子が捕集されており、クリソタイル繊維は 5  $\mu\text{m}$  程度より長いものは概ね除外されているため、現実的な試料となっている。クロスチェックのために、異なる計数者が同一視野を観察できるようにガイド（図 3.10）が印刷された特殊なカバーガラスを使用しており、50 視野の特定が可能となっている。

この試料 5 サンプル（A～E）を用いて、以下の手順でオートフォーカスの精度を検証した。

- 1) ガイドによって指定された 50 個の視野に順に視野を手動で調整する。
- 2) オートフォーカスを行い、アルゴリズムによってコントラストピークが認められフォーカス位置が特定できた場合を成功、フォーカス位置が特定できなかった場合を失敗として記録。
- 3) 同視野に目視によるフォーカス調整も行う。
- 4) オートフォーカスと目視フォーカスの結果から、次のように結果を分類。

##### 成功 1：

オートフォーカスが成功判定され、実際に正しく繊維にフォーカスされているもの

##### 成功 2：

オートフォーカスは成功判定されたもの

のフォーカス領域内の粒子などにフォーカスが寄ってしまいフォーカスに少しずれが認められるもの。

##### 失敗 1：

オートフォーカスが失敗判定されたもののうち、目視でフォーカス調整した際に当該視野に繊維が存在しなかったもの。

##### 失敗 2：

オートフォーカスが失敗判定されたもののうち、目視でフォーカス調整した際に当該視野に繊維が存在したもの。

「失敗 1」はフォーカス対象が存在しないため、アルゴリズム上は正しい失敗と位置づけられるので、オートフォーカスの本質的な失敗は「失敗 2」である。

検証の結果を表 3.2 に整理した。成功判定されたもの（成功 1 + 成功 2）は 250 視野中 222 視野であり、失敗判定されたもの（失敗 1 + 失敗 2）はわずか 28 視野であった。成功判定されたもののうち、正しくフォーカスされたもの（成功 1）は 192 視野で、少しフォーカス位置にずれが認められたもの（成功 2）が 30 視野あった。また、失敗判定されたもののうち、視野中に繊維が存在したもの（失敗 2）は 6 視野にとどまり、残りの 22 視野は実質的な成功（失敗 1）であった。このように、成功 1、成功 2、および失敗 1 を合わせると、9 割の視野でオートフォーカスの成功したみなすことができる。本システムオートフォーカス機構は石綿クロスチェック試料には十分な精度で動作することが確認されたといえる。また、オートフォーカスの検索範囲は、ラフサーチが 30  $\mu\text{m}$ 、詳細サーチが 6  $\mu\text{m}$  としているが、この検証結果からは妥当な検索範囲設定であったとみなすことができる。

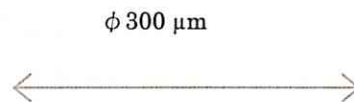


図 3.10 クロスチェック試料の視野ガイド

長方形の2隅を丸くカットしたものが複数並んでおり、カットされた部分で囲まれる点線の円内が $\phi 300 \mu\text{m}$ に相当し、観察位置を特定することが可能となっている。

表 3.2 石綿クロスチェック試料によるオートフォーカスの検証結果【視野数】

AF 成否	A	B	C	D	E	合計
AF 成功	49	38	42	45	48	222
成功 1	35	36	38	38	45	192
成功 2	14	2	4	7	3	30
AF 失敗	1	12	8	5	2	28
失敗 1	0	3	3	0	0	6
失敗 2	1	9	5	5	2	22

AF 成否は、アルゴリズムによる判定結果による。1と2の分類は次の通り。成功1は、目視によるフォーカスと一致するもの。成功2は、目視によるフォーカスとはずれが見られるもの。失敗1は、視野中に繊維が存在したもの。失敗2は、視野中にフォーカスの対象となる繊維が存在しないもの。



### 3.4.2. オートフォーカスの精度検証－除去現場サンプルの場合

吹き付けアスベストの除去現場でサンプリングされたサンプルに適用した。サンプリング場所は、a) 除去作業は終了しており隣接する部屋で除去作業が行われている地点、b) 除去作業中の部屋でセキュリティゾーンに近く、空気の取り込み側にあたり作業中であっても比較的濃度の低いと想像される地点、c) 除去作業前の部屋で除去作業中の部屋には隣接しているが、b) 同様にセキュリティゾーンに近く濃度は低いと想像される地点、d) セキュリティゾーンの外（建物内の廊下部）の4地点である（図 3.11）。除去作業中は液体が散布され、極度の濃度も高くなり捕集には適さないので、作業の休憩時間を選んでサンプリングを行った。それぞれのサンプリング地点での捕集条件は表 3.3

にまとめた。高濃度が予測されたため、あらかじめ捕集量は少なく設定した。また、石綿クロスチェック試料の場合とは異なり、視野ガイド付きのカバーガラスは用いず、標準的な手順でサンプルを作成した。

サンプルはそれぞれ 300 視野ずつ観察し、オートフォーカスの成否を記録した。除去現場でのサンプルで非常に高濃度であるため、「失敗 1」のように視野にターゲットが存在しないためにフォーカスに失敗してしまうという可能性は極めて低いので、失敗の分類は「失敗 1」と「失敗 2」を分けることはしなかった。同様に、成功視野も粒子が多いため、微妙なフォーカスのずれは考慮せず、「成功」とだけ記録した。

表 3.3 除去現場での捕集条件

サンプル	捕集速度	捕集時間	捕集体積	フィルタ径
	L/min	min	L	mm
A	2	5	10	φ 25
B	2	5	10	φ 25
C	2	30	60	φ 25
D	2	10	20	φ 25

表 3.4 除去現場サンプルによるオートフォーカスの検証結果

サンプル	オートフォーカス 成功視野数（成功率）
a	300 (99.7%)
b	297 (98.7%)
c	291 (96.7%)
d	7 (2.3%)

サンプル a~c は、除去現場内部でサンプリングしたもの。サンプル d はセキュリティゾーン外部（建物内廊下部）でサンプリングされたもの。



4 サンプルのオートフォーカスの成否を表 3.4 にまとめた。除去作業現場の負圧環境下でのサンプリングとなった a~c のサンプルでは、ほぼすべての視野でオートフォーカスが成功した（3 サンプルの平均成功率は 98.3%）。一方、セキュリティ

ゾーン外のサンプル d では、わずか 2.3%しかオートフォーカスが成功しなかった。この原因は次節で考察する。

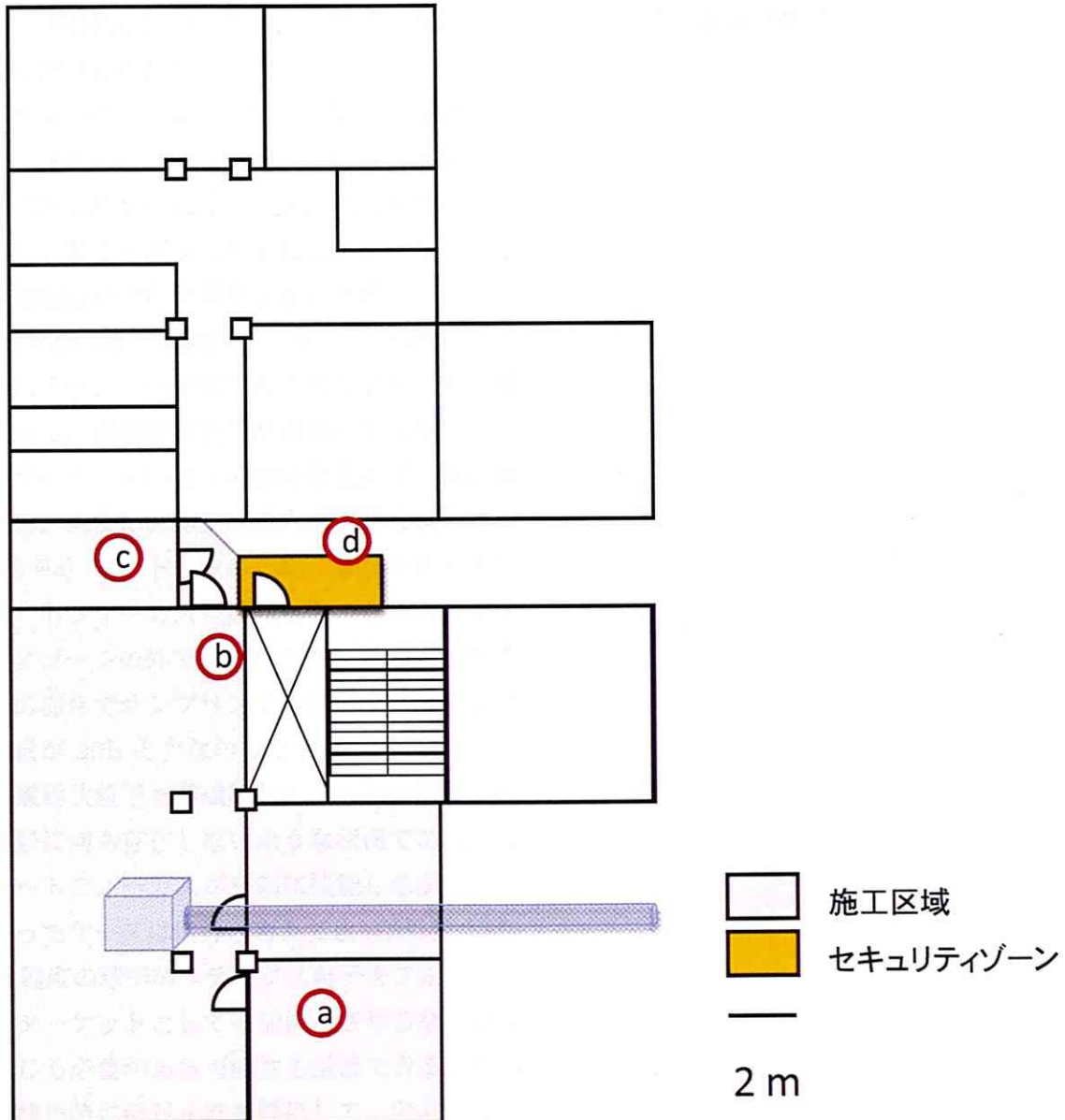


図 3.11 除去現場でのサンプリング地点

a~d は測定地点。a は除去作業が終了した部屋、b は除去作業中の部屋、c は除去作業をまだ行っていない部屋、d はセキュリティゾーン外部。また、b の部屋から負圧集塵機で屋外へ排気されている。

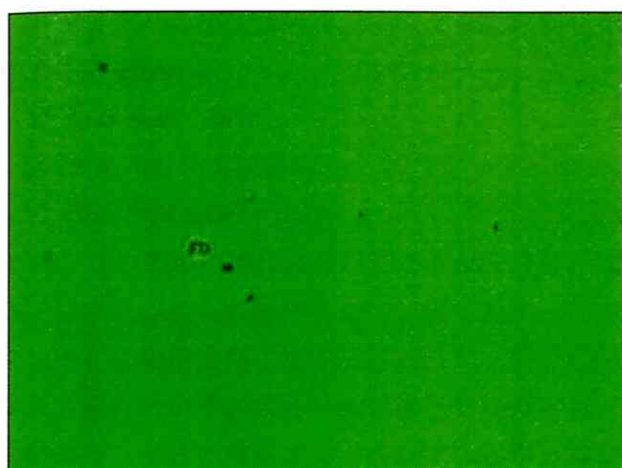
### 3.4.3. オートフォーカスとシステムの適用範囲との関係

正しくフォーカスが調整されない場合には、以降の操作を一切行うことができないためオートフォーカスによるフォーカス調整の可否が、システムの適用範囲を決定する最大の要素となる。そして、オートフォーカスの可否は、繊維状物質だけでなく、非繊維状物質も含めた全粒子の濃度が重要であると考えられる。

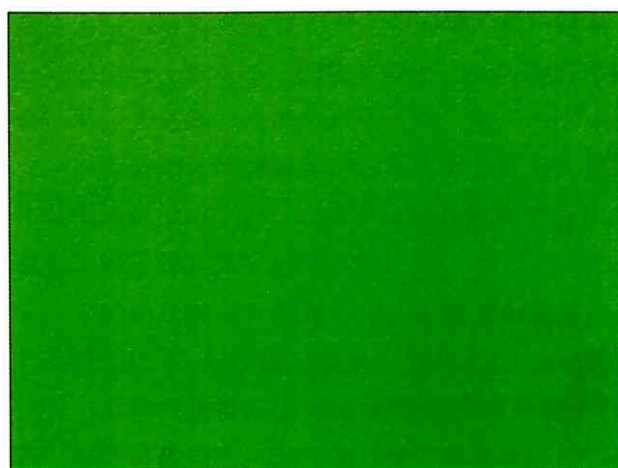
石綿クロスチェック試料では、1割の視野でオートフォーカスに失敗したが、失敗2（視野にフォーカス対象なし）に比べて失敗1（視野にフォーカス対象あり）が少なかったことから、共存する非繊維状粒子の影響が大きいと考えられる。実際、今回使用した石綿クロスチェック試料には、人工的にチャンバーで発じんされたアスベスト繊維のほかに、模擬建材粒子が含まれており、この存在がオートフォーカスの成功を支えていると推察される。同様に、作業現場内部で得られたサンプル(a~c)は、トータルの粒子濃度が高くもなくオートフォーカスに成功した。しかし、セキリティゾーンの外で得られたサンプルdは、作業現場の都合でサンプリング時間が10分、サンプリング量が20Lと少なかったため、図3.12示すように繊維状粒子も非繊維状粒子も捕集量が少なく、視野に何も存在しないような状況であったため、オートフォーカスが有効に機能しなかった。こういったケースは例外と考えてよいが、例えば、 $\phi 1\mu\text{m}$ 程度の球形のラテックス粒子をフォーカシングのターゲットとして追加捕集させるなどの対策を講じる必要がある可能性も指摘できる。あるいは、捕集時に粉じん計を併用して、おおよその捕集量を把握しながら捕集時間をフレキシブルに変更するという方法も考えられる。しかし、第1章で述べたように、本論文ではサンプルの調整技術は対象とはしていないため、詳細な議論は行っていない。なお、一般大気環境では、既定の捕集量(2,400L)を捕集すると、過剰捕集となって計

数を阻害する可能性はあるが、過少捕集となる可能性は低く[環境省, 2007]、一般大気環境レベルでのフォーカス調整は問題ないと想像される。

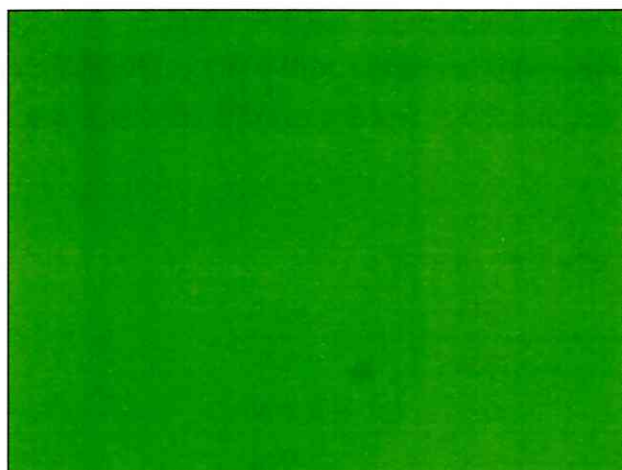
以上の事柄から、本システムの適用範囲としては、除去現場サンプル(a~c)の結果から相当高濃度な領域まで対応可能であり、低濃度側はフォーカスターゲットが存在する範囲であれば、対応可能であると結論できる。



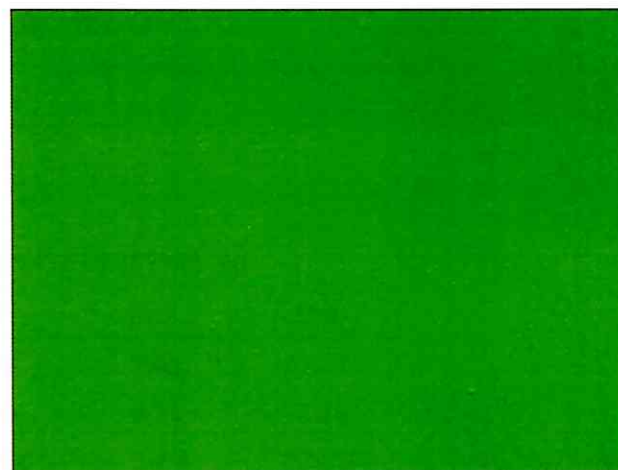
1 番目の視野



100 番目の視野



200 番目の視野



300 番目の視野

図 3.12 除去現場のセキュリティゾーン外部で得られたサンプルの視野画像例

セキュリティゾーン外部で得られたサンプルを 300 視野撮像し、そのうち 1,100,200,300 番目に観察された視野を抜粋掲載。1 番目の視野にはわずかに非繊維状の粒子が存在し、オートフォーカスが成功し得られた画像であるが、それ以外の視野は粒子が存在しないためオートフォーカスに失敗し、手動でフォーカスを調整して撮像した画像である。

## 3.4.4. 速度性能

本システムの速度性能を以下のように評価した。  
標本観察の操作は、

- 1) ある視野に移動し
- 2) フォーカスを調整し
- 3) 深度合成画像を作成する

という3つの単位操作に分けることができる。複数の標本にこれらの操作を続けて繰り返すことで、それぞれの単位操作に要する平均時間を計測した。なお、現行のいずれのルールに従った場合にも、視野はランダムに選択するとされているが、ランダムに視野選択した際の距離のばらつきによる速度のばらつきは、装置の速度性能とは無関係の要素である。そこで、フィルタ中心を通過する30°角度間隔の直径上を等間隔に移動して視野を選択することにした。CCDによる観察サイズがおおよそ

φ100 μmであるので、移動距離は200 μmとした。直径上に100視野観察ができるので、60°間隔の6本の直径上をすべて観察すると、600視野の観察が可能である。使用した標本は、前述のオートフォーカスの性能評価に用いたものと同じ、日本作業環境測定協会のクロスチェック試料であり、3標本に同じ時間測定を行った。

その結果を表3.5整理した。1視野の観察に要する時間は17秒前後であり、おおよその内訳は、フォーカスの調整に3秒、画像の深度合成に10秒、視野の移動に1秒であった。全体の時間には単位操作間の待ち時間などが含まれるため、単位操作の平均時間の和は全体の平均時間とは必ずしも一致しない。

表 3.5 標本観察単位操作の所要時間 [s]

Case 1	移動	AF	合成	全体
平均	0.87	3.09	9.63	17.47
標準偏差	0.02	1.66	0.21	2.15
<i>RSD</i>	2.9%	53.8%	2.2%	12.3%
Case 2	移動	AF	合成	全体
平均	0.87	2.44	9.62	16.73
標準偏差	0.03	1.00	0.10	1.09
<i>RSD</i>	3.0%	41.1%	1.0%	6.5%
Case 3	移動	AF	合成	全体
平均	0.86	3.06	9.58	17.48
標準偏差	0.02	1.72	0.16	2.22
<i>RSD</i>	2.3%	56.2%	1.6%	12.7%

移動は視野移動、AFはオートフォーカス、合成は深度合成画像の作成というそれぞれの標本観察の単位操作に対応している。3つの単位操作の平均時間の和と、全体の平均時間が一致しないのは、単位操作間の待ち時間などが全体には含まれるためである。

視野の移動に要する時間はよく安定しており、その *RSD* は 3% 以下となった。これは、使用している自動ステージの安定性を裏付けるものであるといえる。同様に、深度合成に要した時間も、単位操作としては最長の時間を必要としているが、よく安定していることが確認できた。深度合成は、30 枚の画像を次々にコンピュータ側に取り込んで、取り込みが完了するとコンピュータ側で合成画像を作成する流れになっており、この二つのプロセスが非常に安定していると考えられる。

一方、オートフォーカスに要した時間は、*RSD* が 50~60% と大きくばらついた。これは、既定のラフサーチで詳細サーチの対象とするコントラストピークが見つけれなかった際に、3 回まで繰り返してラフサーチを行うように設定されているためである。1 回のラフサーチでコントラストピークが発見されれば短くなるが、ラフサーチを 3 行い、結果としてコントラストピークを認識できず、オートフォーカスに失敗してしまうと、1 回で成功した場合の 3 倍程度時間を要することになり、これがばらつきを生んだ原因であると考えられる。

さて、得られた画像を用いて自動計数する場合、後述するアルゴリズムでは 1 視野に 1 秒を要さないため [井上, ほか, 2007]、1 視野の観察に必要な時間は 18 秒で十分であると考えられる。このサイズの視野であれば、50 視野の観察は 15 分程度で実現可能と計算できる。日本作業環境測定協会の実際の測定者数名にヒアリングを行ったところ、50 視野の観察に要する時間は 20~30 分との回答が得られた。また、かつて計測時間を調べた結果からも、同程度の面積の観察に要する時間は 30 分あまりと見積もられる (Crawford, et al., 1987)。視野面積を度外視すれば、50 視野の観察は目視観察と同程度の速度水準にあることが分かる。

しかし、実際の目視観察視野は  $\phi 300 \mu\text{m}$  であるので、現状のおよそ  $\phi 100 \mu\text{m}$  の視野の観察では、

面積にして 9 倍<sup>8</sup>の隔たりがあるため、速度としては視野当たり現状の 9 倍の性能が求められることになる。現在のシステムでは、機器動作の安定性を優先した実装となっているため、速度面での改良は今後の課題である。速度向上には、次のようなアプローチが考えられる。

#### 3.4.4.1 コマンド間の待ち時間の削減

制御プログラムから機器に向けて発信されるコマンドはシリアル通信であるため、安定性を考えると、コマンド間に 150 ms 程度の待ち時間 (Wait) をおく必要がある。深度合成で 30 枚の画像を取り込んでいるが、取り込みのコマンドを送信するたびに 150 ms の Wait が発生しているので、単純に  $150 \text{ ms} \times 30 \text{ 回} = 4.5 \text{ s}$  のロスが生じている。速度性能の評価とは別に行った検証で、深度合成のプロセスのうち、画像をコンピュータに取り込む処理に要している時間はおよそ 7 秒、取り込んだ画像からコンピュータで深度合成画像を合成する処理に要している時間がおよそ 3 秒と見積もられているため、取り込みの大半が待ち時間となっていることが分かる。安定稼働が確認できれば、こういった待ち時間を短縮することで速度向上に寄与することが期待できる。

#### 3.4.4.2 処理の並列化

深度合成に使用する画像を取り込んだ後の合成処理は、顕微鏡とは独立にコンピュータで行われるため、取り込みが完了すれば、次の視野に移すことができる。現状では、画像取り込みまでに要する時間と、画像合成以降に要する時間では前者の方が長いため、前者と後者を並列処理させることで、見掛け上、処理に必要となる時間を前者だけとみなすことも、理論的には可能である。

<sup>8</sup> 正確には、採用した CCD の視野サイズは縦  $89.08 \mu\text{m}$ 、横  $118.78 \mu\text{m}$  であり、 $\phi 300 \mu\text{m}$  の視野面積相当の観察には、6.7 視野の観察が必要である。

#### 3.4.4.3 観察視野の拡大 (CCD サイズの変更)

今回採用した 3CCD のサイズは 1/3 インチであるが、市場には今回の条件を満たすような解像度を有している 1 インチの 3CCD も存在している<sup>9</sup>。CCD の 1 辺の長さがおおよそ 3 倍になるので、面積が 9 倍になり、結果として相当の速度向上に寄与すると考えられる<sup>10</sup>。しかし、取り扱う情報量が増えるため、画像取り込みや合成にそれぞれ要する時間が増加する恐れも否定はできない。

#### 3.4.4.4 観察視野の拡大 (対物レンズの変更)

今回採用した対物レンズは、各種規定に基づいて 40 倍の倍率を有するものであるが、20 倍の対物レンズ<sup>11</sup>も市販されている。倍率が半分になるので、視野面積は 4 倍に広がることになり、CCD の変更と同様に速度向上に寄与すると考えられる。CCD 観察時の分解能が半分になるが、現状の CCD であれば約 0.23  $\mu\text{m}$ /正画面素と計算され大きな問題はない。また、光学分解能は開口数 (NA) に依存するが、NA = 0.75 であれば現在採用している対物レンズと同じで、光学分解能は 0.366  $\mu\text{m}$  となり HSE/NPL 検出限界試験用スライドでグループ 6 と同じになり十分であるといえる。一方、NA が 0.40 程度になると、光学分解能が 0.688  $\mu\text{m}$  まで低下するため、利用することは望ましくないと考えられる。また、倍率低下によって透過光量が増加するため、光を通しやすい(白く輝く)粒子のそばにある細い繊維はハレーションして見

えなくなる可能性があるなどのデメリットも想像される。

#### 3.4.4.5 速度性能のまとめ

上記以外にも、現在市販の汎用オートフォーカスコントローラで制御しているフォーカス調整を、専用のオートフォーカスコントローラを開発することができれば、さらに処理速度の向上が望めるなど、さまざまな処理時間削減の可能性が考えられる状況である。

本研究で到達した段階は、装置の安定動作を重視した速度性能までしか達成されておらず、目視観察に比べて数分の一程度の速度であるが、前述の処理時間削減の可能性や、精度や感度が衰えることなく 24 時間休みなく観察作業を行うことができること、今後、速度向上は十分期待できると考えられる。

### 3.5. 結言

位相差顕微鏡を用いた目視によるアスベスト繊維計数法を自動化するシステムを開発した。システムは、位相差顕微鏡、CCD カメラ、オートフォーカスコントローラ、自動 XY ステージなどから構成される。従来の自動化手法は顕微鏡画像から繊維を計数する処理に限られていたが、本システムは画像取得までの機械的な顕微鏡操作の自動化に着目した点で新規なものである。システムの性能はフォーカス調整に大きく依存するが、フォーカス調整はフォーカス対象領域にターゲットとなる物質が捕集されている限り十分な精度であることが確認された。速度性能は、現段階では装置がプロトタイプであり安定動作を優先したため最適化されていないが、改善の余地は多く存在し、今後の高速化は十分に期待できる。

<sup>9</sup> 例えば、ADH-200 (フローベール製) は 200 万画素、有効解像度は 1920 H  $\times$  1080 V、30 fps の 1 型 3CCD で、C マウント対応であるため、顕微鏡の接続も容易である。

<sup>10</sup> 正確には、1/3 インチの CCD のサイズは、対角が 16 mm、横 12.7 mm、縦 9.6 mm であるのに対して、1 インチの CCD のサイズは、対角が 6 mm、横 4.8 mm、縦 3.6 mm であり、厳密に 3 倍ではない。また、「インチ」と呼ばれるが、1 インチ = 25.4 mm とはなっていない。これは、CCD が使用される以前の 1 インチの撮像管の対角が 16 mm であったことに由来している。

<sup>11</sup> Nikon 製の位相差対応対物レンズとしては、CFI Plan Apo DM 20X (NA = 0.75)、CFI S Fluor DL 20X (NA = 0.75)、CFI Plan DL 20X (NA = 0.40) などがある。本文記載のとおり、NA が 0.75 程度であれば、理論上は選択肢となりうる。

## 第4章 自動計数アルゴリズム

本章では、自動標本観察システムによって得られる画像から、繊維状物質を計数するためのアルゴリズムの開発を行った。



#### 4.1. 緒言

本章では、標本観察システムで得られた画像を用いて、PCM 法および分散染色法において繊維状物質を自動計数可能なアルゴリズム [井上, ほか, 2007]を開発することを目的とした。ただし、分散染色法に係る内容の詳細はAppendixにまとめた。

#### 4.2. アルゴリズムの概略と画像処理ライブラリの利用

画像中の繊維状物質を計数するには、まず、

- ・ 計数対象となるオブジェクトの抽出（オブジェクトの認識）
- ・ 計数条件との適合を確認（オブジェクトの計数）

という2つのステップが必要となる。また、得られた画像が画像解析に耐えうる画質・条件を備えたものである保証はないため、必要に応じて画像の調整や、計数対象から除外するなどの前処理を行う必要もある。さらに、PCM 法で得られる画像には色彩情報は存在せず、輝度情報だけであるが、分散染色法で得られる画像には色彩情報も含まれる。色彩情報の有無によって異なる前処理を用意する必要があると考えられるので、

- ・ PCM 法の対象画像の調整（前処理 PCM 法）
- ・ 分散染色法の対象画像の調整（前処理 分散染色法）

の二つを用意する。図 4.1 にフロー図を示した。

なお本研究では、この3つのステップで必要となる画像処理技術を、実績のある Matrox 社製の汎用画像解析ライブラリである Matrox Imaging Library（以下、MIL）を利用して実現することとした。画像処理技術分野では、既に多くの知見の蓄積がなされており、必要な画像処理機能をオリジナルにスクラッチからコーディングする必然性はないと判断したためである。なお、アルゴリズムは Visual Basic 6（Microsoft 社）によってプログラムとして実装し、アルゴリズムの検証を行った。

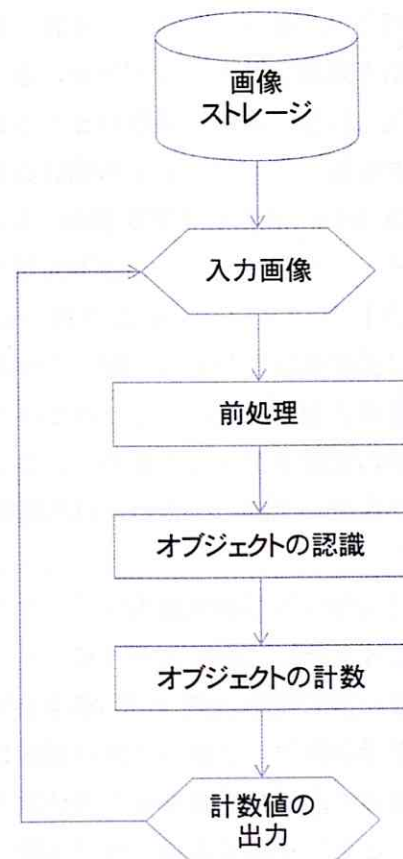


図 4.1 自動計数のフロー図



### 4.3. 前処理

PCM 法と分散染色法では得られる画像が大きく異なるため、前処理は PCM 法と分散染色法で異なる処理を開発した。

#### 4.3.1. PCM 法の前処理

PCM 法の前処理のフローを図 4.2 示した。PCM 法で扱う画像は、位相差情報に基づくグレースケールの輝度情報だけであるので、RGB カラーの 3 レイヤのうち G レイヤだけを扱えば十分である。これは、人が RGB 情報から輝度情報を得る際に、主として G レイヤを中心に認識しているためである<sup>12</sup>。

このステップでは、得られたグレースケールの画像に対して、PCM 法による入力画像が自動計数可能な画像であるかどうかを検討し、必要に応じて補正処理を行う。自動計数が困難となる画像には一般に以下の 3 点が考えられる。

- 1) 画像中に輝度の傾きがある場合
- 2) 対象物の背景に対するコントラストの弱い画像である場合
- 3) 混在する粒子等の異物が多く対象物の認識が困難な画像である場合（過剰捕集条件の除外）

また、繊維の認識の妨げとなるので、あらかじめ、

- 4) 繊維とは異なる画像情報は消去する（背景ピーク輝度による補正）

という操作もこのステップで行う。処理の例を図 4.3 に示した。

#### 4.3.1.1 画像中に輝度の傾きがある場合

顕微鏡で撮像された画像ではよく見られる問題であり、本研究開発では既存のシェーディング補正 [大山, ほか, 2006] を適用することとした。しかし、現在用いているシステム系では、ほとんどシェーディング補正を必要とするような画像は得られないため、本アルゴリズムの評価においては使用していない。採用したシェーディング補正の詳細は Appendix に記載した。

#### 4.3.1.2 対象物の背景に対するコントラストの弱い画像である場合

グレースケールの画像において、コントラストとは輝度の差と言い換えることができる。アスベスト繊維と背景との輝度との違いが明瞭であれば、4.4 節で述べるオブジェクトの認識手法によって認識させることは容易である。逆に、対象物と背景の輝度の分離が十分でないと、対象物の認識は困難となる。画像の輝度分布を、8 bit のグレイ空間全体に拡大することで、コントラストを増幅する手法は一般的に用いられている [高木, ほか, 2004]。しかし、通常的手法では線形的に増幅するだけであるため、アスベスト繊維と背景の輝度の比だけでなく、不要なノイズと背景の輝度の比も一様に増幅されてしまい、判別し易さの改善は保障されない。

ところで、位相差顕微鏡には対物レンズによって、ダークコントラスト法とブライツコントラスト法が存在する。前者では、繊維は暗い像として、後者では繊維は明るい像として得られる。また、画像の大部分を占める背景に対応する輝度は、その画像の輝度分布（輝度ヒストグラム）のピーク近傍に存在する。そのため、アスベスト繊維は低輝度あるいは高輝度のいずれかに存在することになり、背景輝度（以下、ピーク輝度）からアスベスト繊維が存在する輝度側にテールを引いた分布となることが多い。そのため、輝度レンジの増幅は、テールを引いた輝度側にのみ実施すれば十分

<sup>12</sup> RGB カラーの 3 レイヤの情報からグレースケールの輝度情報 Y を得るには、  

$$Y = 0.29891 \times R + 0.58661 \times G + 0.11448 \times B$$
 という換算式を用いることが多く、係数から G の寄与が大きいことがわかる。

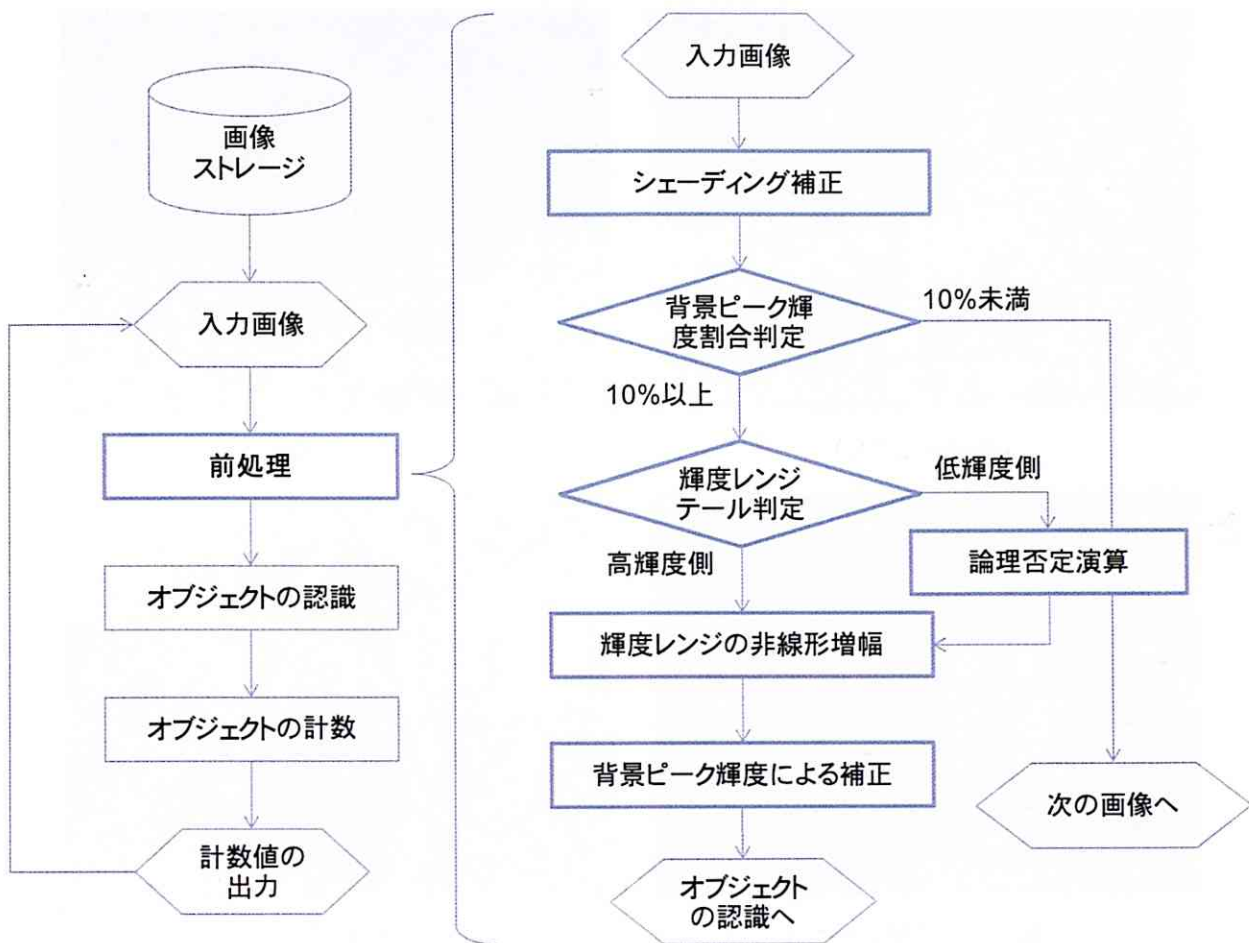
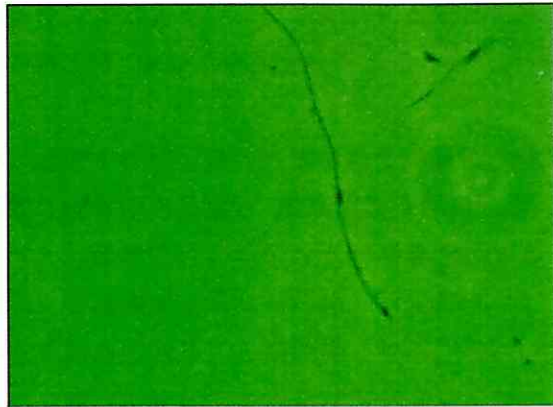
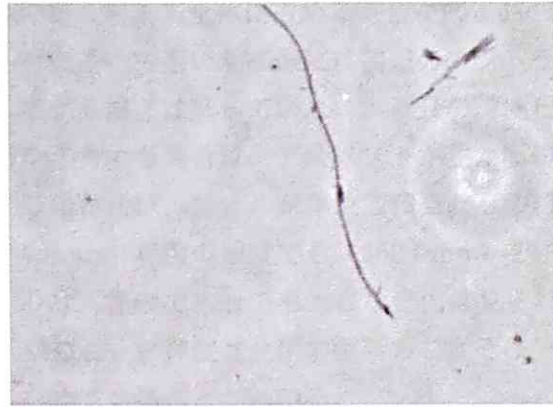


図 4.2 前処理 (PCM 法) のフロー図



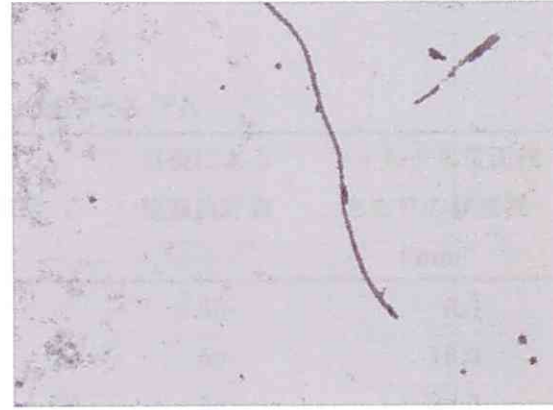
(a:元画像)



(b:グレイ画像)



(c:輝度増幅)



(d:ピーク輝度による補正)

図 4.3 PCM 画像の前処理の流れ

である。ここでは、MILで提供されている輝度増幅手法のうち、非線形関数を用いて選択的に輝度レンジの端の領域ほど大きく輝度レンジが増幅する手法を採用した。

$$g = g_{\min} - \frac{1}{\alpha} \ln[1 - p(g)] \quad (4.1)$$

$$p(g) = \sum_{j=g_{\min}}^g h(j) / \sum_{j=g_{\min}}^{255} h(j) \quad (4.2)$$

パラメータ  $g_{\min}$  は、輝度の連続性を保証するために、輝度ヒストグラムの 90% タイルを与える輝度、もう一つのパラメータ  $\alpha$  は増幅した輝度のレンジが 8bit を超えないように、画像ごとにそ

れぞれ定めることとした。ただし、式 4.1~4.2 で示した関数は、高輝度側にテールを持つ場合しか適用できないため、低輝度側にテールを持つ場合は画像の理論否定演算<sup>13</sup> (NOT) を行ってから輝度を増幅させ、再度、理論否定演算によって画像を復帰させる必要がある。

JIS の位相差顕微鏡法 [JIS, 2006]では、顕微鏡での観察はダークコントラスト法とブライトコントラスト法のいずれで行ってもよいとされているが、経験的には目視観察にはダークコントラスト法が適しているとされている。本研究で採用した

<sup>13</sup> 2進数で  $0 \rightarrow 1$ ,  $1 \rightarrow 0$  とする演算となり、いわば補集合を与える演算となる。画像においては、濃淡が逆転する処理になる。

対物レンズも、第3章で述べたとおりダークコントラストレンズであるため、本システムで得られた画像の処理は、論理否定演算を行うこととした。

#### 4.3.1.3 混在する粒子等の異物が多く対象物の認識が困難な画像である場合（過剰捕集条件の除外）

アスベスト繊維以外の粒子などが多数混在する画像では、被覆率が高くなるため、背景輝度のピークが低く抑えられることが想像される。その一例として、表4.1に示すような比較的高濃度でかつ広い濃度域のアモサイト標準サンプル ( $n=15$ )

の画像を200視野撮影し、その背景の輝度ピーク画素数が画素全体に占める割合を図4.4に示した。なおここで用いた画像には前述のコントラストに関する補正は施していない。背景の輝度ピーク画素が占める割合は、アスベストが主たる粒子である場合には、フィルタ単位面積当たりの繊維数が  $6 \text{ f/mm}^2$  程度の濃度でも、 $250 \text{ f/mm}^2$  を超えるような高濃度であっても大きな変化は見られず、背景のピーク輝度は全体の画素のおよそ20~25%を占めていることがわかる。

表 4.1 アモサイト標準サンプル

試料 No.	繊維数濃度 $\text{f/cm}^3$	目視による 計数繊維数 $f$	目視による 観察視野数	フィルタ単位面積 あたりの繊維数 $\text{f/mm}^2$
1	0.13	22	50	6.3
2	0.33	56	50	16.0
3	0.66	112	50	32.0
4	1.09	185	50	52.5
5	1.28	200	46	61.6
6	1.50	200	39	72.2
7	1.82	200	32	87.6
8	2.02	200	29	97.2
9	2.24	200	26	108
10	2.38	200	25	115
11	2.63	200	22	127
12	2.82	200	21	136
13	3.18	200	18	153
14	3.31	200	18	159
15	5.36	200	11	258

本サンプルは、チャンバー内で様々な濃度のアモサイト標準粒子を発生させて、有効ろ過径23 mm、直径25 mm メンブレンフィルタを使用し、流量  $2 \text{ L/min}$  で10分間サンプリングを行った上で、通常の手順で標本作製したものである。サンプルは、位相差顕微鏡に接続した、200万画素相当 ( $1728 \times 1152$  ピクセル) のデジタルカメラで撮影したものである。

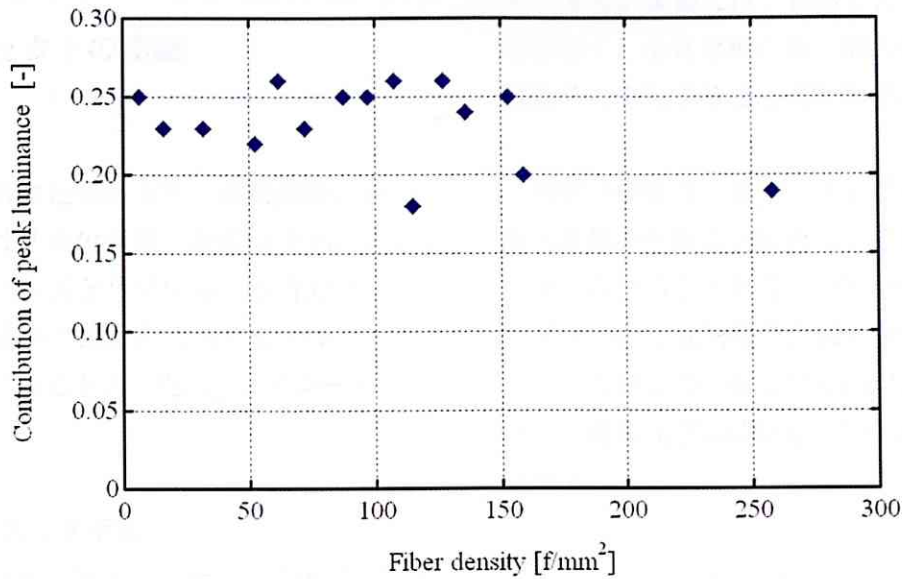


図 4.4 ピーク輝度の占める割合とサンプル濃度の関係

現実的な適用を考慮すると、この程度の背景割合が実現されるようにサンプリング時に捕集量をコントロールすることが望ましいと考えられる。本自動計数アルゴリズムでは他の粒子の存在も考慮して、ひとまず、背景輝度ピークが全体の 10%を下回るサンプルは捕集量過多と考えて除外することとした。

#### 4.3.2. 分散染色法の前処理

分散染色法で得られる画像はカラーであるので、PCM 法とは異なる前処理が必要となる。しかし、分散染色法に関する内容は本論文の主題からは外れるので、詳細は Appendix に記載した。

##### 4.3.1.4 繊維とは異なる画像情報の消去（背景ピーク輝度による補正）

前述のように、対物レンズの選択によって、ダークコントラストレンズであれば繊維は暗い像として、ブライต์コントラストレンズであれば繊維は明るい像として得られる。そのため、使用した対物レンズによって、背景のピーク輝度に対して繊維の存在しない輝度領域（高輝度側あるいは低輝度側）が決定され、その輝度領域の画像情報は重要ではない。そこで、不要な領域の輝度を持つ画素をすべて背景ピーク輝度で置換することとした。



#### 4.4. オブジェクトの認識

画像処理分野の技術のうち、形状認識にかかわる技術の多くは2値化画像（画素が1 bitで表現された画像）を対象としている。本研究においても、画像から繊維状物質を認識するプロセスは2値化画像を用いることとした。処理フローを図4.5に示した。

##### 4.4.1. 従来の2値化手法

グレースケール画像から何かしらのオブジェクトを認識することは、画像を一定の基準で2値化することと同義といっても過言ではない。画像中のオブジェクトすべてが必要な対象物であり、対象と背景のコントラストが十分である場合には2値化のクライテリアを決定することは容易であるが、実際には主として対象と背景の境界部分に微妙な輝度変化が存在するため、クライテリアの決定は容易な作業ではない【高木, ほか, 2004】。

対象画像の状態、撮影条件などの条件に変化がない場合には、固定のクライテリアを用いる方法（しきい値処理法）が用いられる。しかし、このようなケースはまれであり、通常は画像ごとにクライテリアを決定する必要がある。一般によく用いられる手法としては、p-タイル法、モード法、判別分析法がある【谷口, 1996】【村上, 2004】。

p-タイル法は、対象物が画像内で占めるおよその面積比率  $p$  が既知の場合は、2値化画像中の画素値1（1画素）の割合が  $p$  となるように閾値  $T$  を定める手法である。画像の中の対象図形のおおよその面積が分かっているときに有効な方法であるが、適用範囲は限られる。モード法は、双峰性の輝度分布（2つのピークを持つ輝度分布）を前提としており、対象とする図形と背景の濃度値の差が大きく、ヒストグラムにはっきりと谷が出来るときに有効な方法であり、谷間となる点を閾値

$T$  とする。実際には、濃度ヒストグラムは滑らかではなく、小さな極小値、極大値が存在するため自動的に決定することは容易ではない。

判別分析法は、濃度ヒストグラムにおける対象物と背景の分散比を最大にする閾値  $T$  を統計学的に決定しようとする手法であり、p-タイル法やモード法のような前提条件は不要である。濃度ヒストグラムを二つのクラス  $C_1$  と  $C_2$  に分割する場合、次の分離度  $\eta(T)$  が最大になるように閾値  $T$  を選定する。

$$\eta(T) = \text{Max} \left[ \frac{\sigma_B^2(T)}{\sigma_W^2(T)} \right] \quad (4.3)$$

$\sigma_B^2(T)$  はクラス間分散（Interclass Variance）、 $\sigma_W^2(T)$  はクラス内分散（Intraclass Variance）で、それぞれ、次の式で与えられる。

クラス内分散

$$\begin{aligned} \sigma_W^2 &= \omega_1 \sigma_1^2 + \omega_2 \sigma_2^2 \\ &= \frac{1}{N} \left[ \sum_{i \in C_1} (i - \mu_1)^2 n_i + \sum_{i \in C_2} (i - \mu_2)^2 n_i \right] \end{aligned} \quad (4.4)$$

クラス間分散

$$\begin{aligned} \sigma_B^2 &= \omega_1 (\mu_1 - \mu_T)^2 + \omega_2 (\mu_2 - \mu_T)^2 \\ &= \frac{1}{N} \left[ \sum_{i \in C_1} (\mu_T - \mu_1)^2 n_i + \sum_{i \in C_2} (\mu_2 - \mu_T)^2 n_i \right] \end{aligned} \quad (4.5)$$

ここで、 $\sigma_W^2 + \sigma_B^2 = \sigma_T^2$ （ $\sigma_T^2$ ：全分散）、 $\omega_1, \omega_2$  はクラス  $C_1, C_2$  の生起確率（正規化された画素数）、 $\mu_1, \mu_2$ 、および、 $\sigma_1^2, \sigma_2^2$  はそれぞれクラス  $C_1, C_2$  に属する画素の濃度の平均値および分散である。この手法は、2 つクラスの分布の割合が極端に異なる場合に、クライテリアの大きいほうのクラス

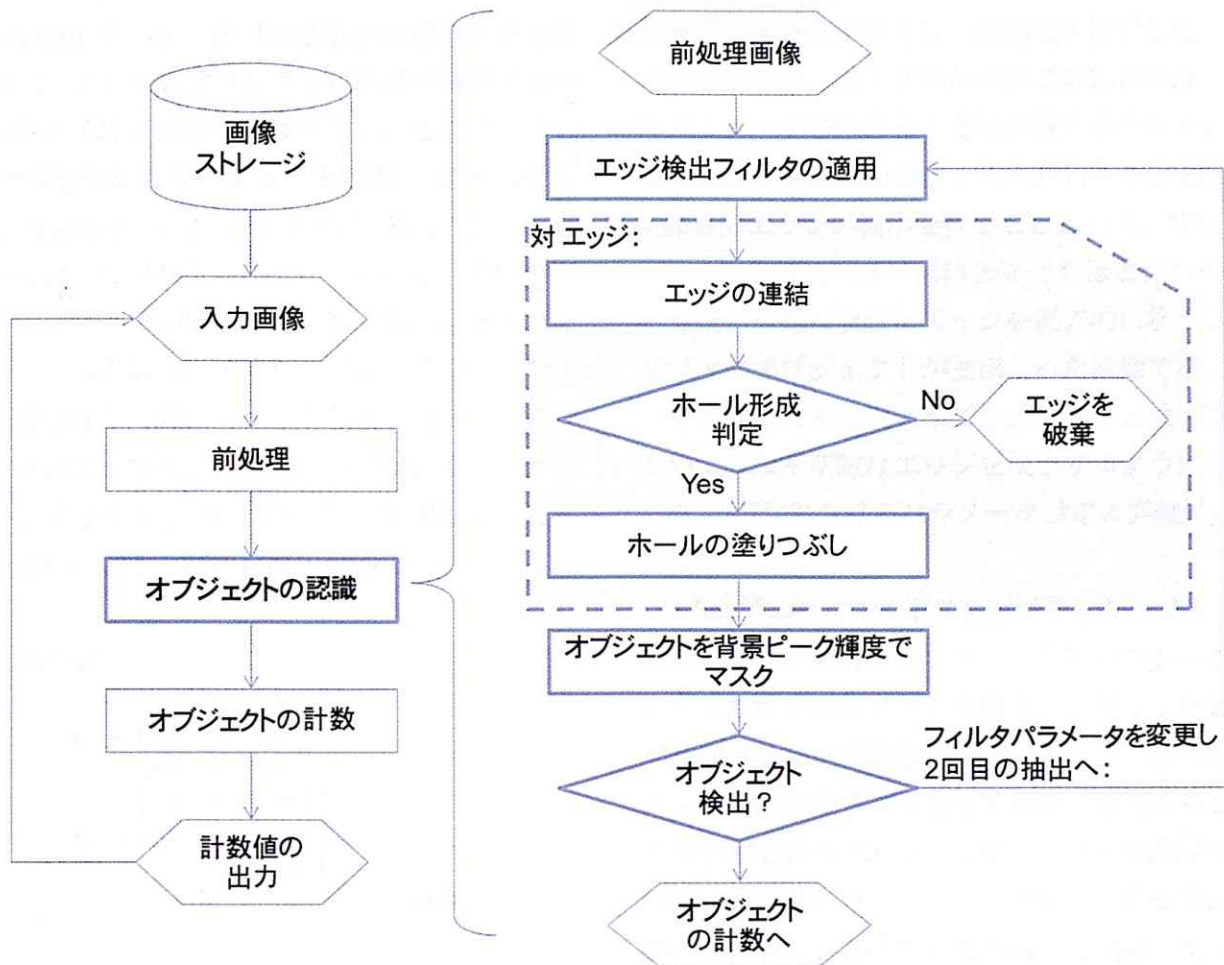


図 4.5 オブジェクト認識のフロー図

側に偏るという性質をもつ。例えば、背景に比べて対象物の面積が極端に小さい場合、対象物を大きめに抽出するクライテリアが選ばれてしまう[高木, ほか, 2004]。アスベスト繊維はまさにこのケースに相当するため、安定した2値化手法であるとは言い難い。

#### 4.4.2. エッジ認識による2値化手法

このように、一般的には有力な2値化手法であっても、必ずしもアスベスト繊維の認識は適していない。そこで、本研究では局所的な輝度の大小ではなく、2次元的な輝度の変化に着目して対象

物を認識する手法を考案した。すなわち、画像中の輝度のエッジに着目する手法である。エッジとは対象物と背景の境界を表す曲線群であり、画像における輝度の変化からエッジを定めることが可能である。定性的に表現するならば、明瞭なエッジはコントラストが十分な画像の輝度変化の大きな場所で得られ、逆に、弱いエッジは低コントラストで滑らかな画像中のゆるやかな輝度の変化から得られるものである。

エッジは、通常画像輝度の1次微分、2次微分に相当する局所オペレータによって抽出される。前者の典型例は *Sobel* や *Prewitt* のオペレータ



がある(式 4.6、4.7)。後者の典型例としては *Laplacian* オペレータ(4 連結と 8 連結)がある(式 4.8)。これらのオペレータは高速に演算可能であるがノイズの影響を受けやすい。そこでノイズ除去のためのスムージングも同時に適用可能な *Shen-Castan* フィルタを用いることとした(Shen, et al., 1992)。このフィルタは、MIL で利用可能な IIR (Infinite Impulse Response) フィルタの一つであり、式 4.9 に示すような関数で重みづけを行う。MIL のエッジ検出機能の既定のフィルタとなっており、近傍の影響が画素中央からの距離に応じて速やかに減衰する特徴があるため検出力が高いことが知られている。

*Sobel:*

$$\begin{aligned} f_x &= \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \\ f_y &= \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix} \end{aligned} \quad (4.6)$$

*Prewitt:*

$$\begin{aligned} f_x &= \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \\ f_y &= \begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \end{aligned} \quad (4.7)$$

*Laplacian:*

$$\begin{aligned} (4 \text{ 連結}) &= \begin{bmatrix} 0 & -1 & 0 \\ -1 & 4 & -1 \\ 0 & -1 & 0 \end{bmatrix} \\ (8 \text{ 連結}) &= \begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ -1 & 8 & -1 \\ -1 & -1 & -1 \end{bmatrix} \end{aligned} \quad (4.8)$$

*Shen-Castan:*

$$= Ke^{-\beta|n|} \quad (4.9)$$

なお、エッジ検出フィルタにはいくつかの設定すべきパラメータが存在し、最適化を検討したいところであるが、さまざまな画像に対応可能な一意なパラメータを定めることは困難であるので、ここではエッジ検出の精度よりも汎用性を重視して、2段階でエッジの検出を行うこととした。すなわち、1段階目にはノイズ除去をそれほど行わずとも検出可能な明瞭なエッジを優先的に検出し、1つ以上のオブジェクトが抽出された画像では、2段階目にはある程度ノイズ除去しないと検出されないような不明瞭なエッジを検出するように設定した。MIL におけるパラメータ設定の詳細は、表 4.2 整理した。

*Shen-Castan* フィルタを適用することによって、スムージングを行いつつエッジが抽出されるが、必ずしもオブジェクトの周囲すべてがエッジとして認識されない可能性が残る。そこで、断片的なエッジを一定の条件を満たす場合に結合するという後処理を行う(エッジの結合)。この処理の条件は表 4.3 にまとめた。エッジの結合によって、認識されたエッジがホールを形成した場合、その内部を 8 連結<sup>14</sup>でエッジの連続性を認識して、その内部塗りつぶし、オブジェクトとして抽出する。

<sup>14</sup> 連結とは対象画素とそれを取りかこむ周辺画素との連続性の定め方である。8 連結は、ある画素の周囲 8 画素すべてを接続の候補とする方法であり、一方 4 連結は、上下左右の 4 画素のみを接続の候補とする方法である。

表 4.2 エッジ検出の設定条件

設定項目 (プロパティ)	1 回目設定内容	2 回目設定内容
ExtractionFilter.FilterType プロパティ (エッジ検出フィルタの種類)	edgeShen (既定値)	edgeShen (既定値)
ExtractionFilter.Mode プロパティ (エッジの計算方法 (カーネル/再帰) の指定)	edgeRecursive (IIR フィルタの既定値)	edgeRecursive (IIR フィルタの既定値)
ExtractionFilter.Smoothness プロパティ (平滑化の強度の指定 0~100)	50 (既定値は 50)	80 (既定値は 50)
EdgeType プロパティ (エッジの種類の選択 稜線/輪郭)	edgeContour (FIR フィルタの既定値)	edgeContour (FIR フィルタの既定値)
Threshold.Mode プロパティ (エッジ判定基準)	edgeThresholdHigh (既定値)	edgeThresholdHigh (既定値)
Accuracy プロパティ (求める精度)	edgeAccuracyHigh (既定値)	edgeAccuracyHigh (既定値)

MIL の EdgeFinder オブジェクトの主要パラメータの設定内容。エッジ検出フィルタの種類 (ExtractionFilter.FilterType プロパティ) には、5 種類 (edgeDeriche, edgeFreichen, edgePrewitt, edgeShen, edgeSobel) あり、選択した edgeShen はその既定値。エッジの計算方法 (ExtractionFilter.Mode プロパティ) はカーネル計算 (edgeKernel) と再起計算 (edgeRecursive) から IIR フィルタの既定値である edgeRecursive を選択。平滑化の強度 (ExtractionFilter.Smoothness プロパティ) のみ 1 回目と 2 回目で異なる設定となっており、1 回目は既定値の 50 に設定し、2 回目は 80 に設定。エッジの種類 (EdgeType プロパティ) は edgeCrest (稜線) と edgeContour (輪郭) が選択できるが、極致ではなく変化の急激な部分が必要なので edgeContour を選択。エッジ判定基準 (Threshold.Mode プロパティ) は 6 種類 (edgeThresholdLow, edgeThresholdMedium, edgeThresholdHigh, edgeThresholdVeryHigh, edgeThresholdUserDefined, edgeThresholdDisable) あり、既定の edgeThresholdHigh を選択。エッジ検出の精度 (Accuracy プロパティ) は 3 種類 (edgeAccuracyDisable, edgeAccuracyHigh, edgeAccuracyVeryHigh) から edgeAccuracyHigh を採用。

表 4.3 エッジ連結の成立条件

設定項目 (プロパティ)	設定内容
FillGapParameters.Angle プロパティ (連結する二つエッジ端のなす角度 既定は 360°)	360 (全方向)
FillGapParameters.Candidate プロパティ (連結するエッジの候補の選択)	edgeCandidateAny (異なるエッジのエッジ端も結合する)
FillGapParameters.Continuity プロパティ (連結するエッジの連続性 0~100)	50 (距離と連続性ともに中程度)
FillGapParameters.Distance プロパティ (連結するエッジ端の最大距離)	10 (10 pixel 未満)
FillGapParameters.Polarity プロパティ (連結するエッジの傾斜条件 明→暗と暗→明の区別)	EdgePlarityConstants.edgePolarityAny (エッジの傾斜方向を考慮しない)

MIL の EdgeFinder オブジェクトのエッジ連結に関するパラメータの設定内容。エッジ端を中心として Angle プロパティと Distance プロパティで定義できる扇形の領域が重なるエッジの組が連結の候補となる。ここでは、Angle プロパティに 360、Distance プロパティに 10 としているので、エッジ端を中心とした半径 10 pixel の円形の領域となる。Candidate プロパティで、同一エッジのエッジ端のみ連結

(edgeCandidateSame) と異なるエッジ端も連結 (edgeCandidateAny) が選択できるが、ここでは異なるエッジを連結することが目的なので edgeCandidateAny を選択。連結できるエッジの候補が複数見つかった場合には、エッジ間の距離とエッジの連続性を考慮して決定する。この決定は Continuity プロパティに依存し、この値が 0 のときは距離を優先し、100 のときは連続性が優先される。ここでは 50 としてある。また、エッジには明→暗のエッジと暗→明のエッジが存在するが、Polarity プロパティで同一傾斜のエッジを接続する (edgePolaritySame) と異なる傾斜のエッジも接続する (edgePolarityAny) が設定でき、ここでは傾斜を区別はせずに連続するように Polarity プロパティには edgePolarityAny を設定した。

## 4.5. オブジェクトの計数

オブジェクトの計数のフローを図4.6に示した。  
抽出されたオブジェクトは、JISに従い、

- ・長さ  $5\mu\text{m}$  以上
- ・幅（直径） $3\mu\text{m}$  未満
- ・アスペクト比 3 以上

を計数基準とした [JIS, 2006]。本アルゴリズムで  
使用している MIL では、繊維状のオブジェクト  
の長さ、幅、アスペクト比の算出可能である。  
しかし、輝度むらやにじみ、ピントの合っていない箇  
所で見受けられるリング状のハレーションの一部を  
抽出してしまうケースを除外する必要がある。そ  
こで、オブジェクトの平均輝度  $q$  が画像の

背景ピーク輝度  $p$  と比較して十分な差  $\delta$  が認め  
られない場合には、この段階で計数対象から除外  
することとした。

$$|q - p| > \delta \quad (4.10)$$

ここで、 $\delta$  は20とすることにした。また、使用す  
る対物レンズがダークコントラストであるので、  
オブジェクトの平均輝度  $q$  に比べて、背景ピー  
ク輝度  $p$  は大きいので、実際には絶対値記号は外す  
ことができ、

$$p - q > \delta \quad (4.11)$$

と表現できる。

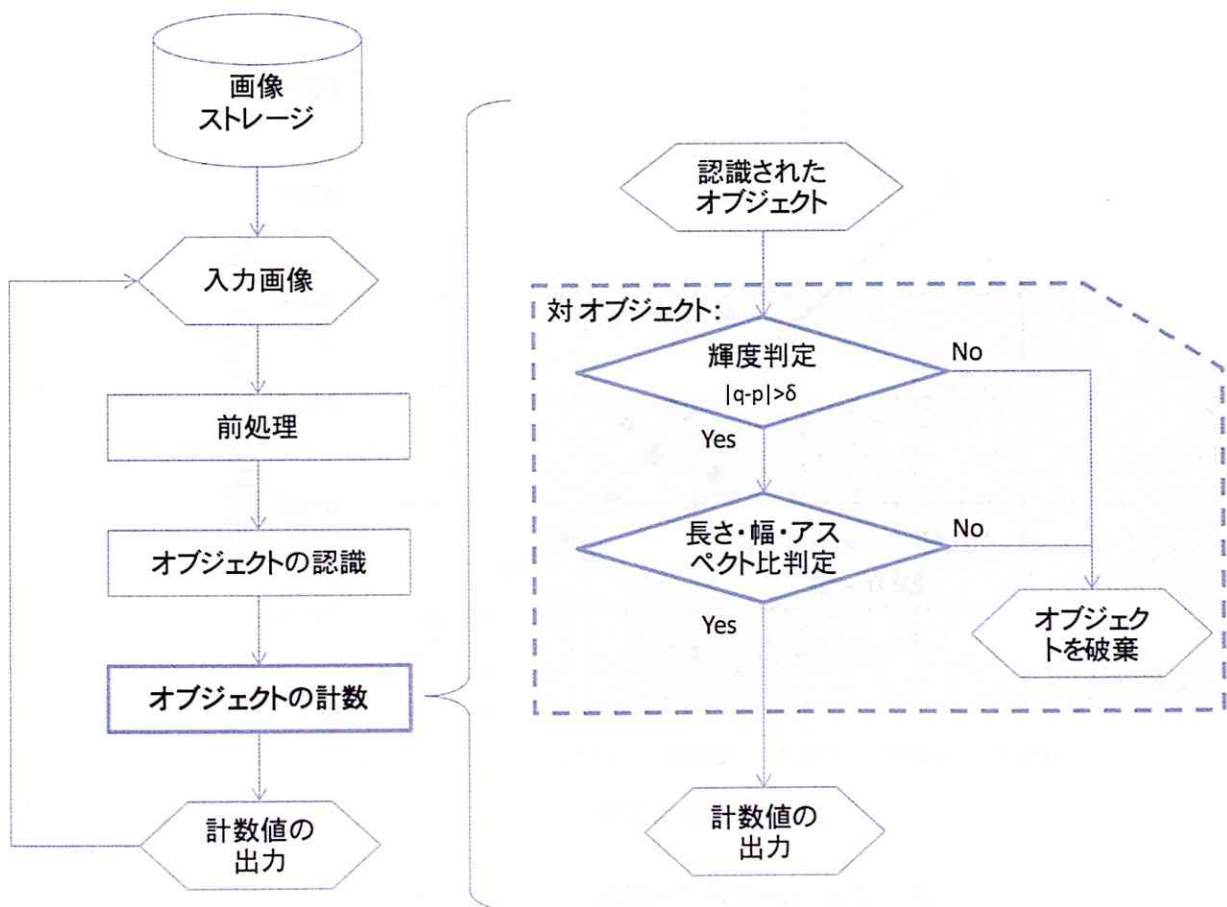


図 4.6 オブジェクト計数のフロー図

## 4.6. 自動計数の実例

本アルゴリズムの妥当性を検証するために3つのサンプルに適用した。1つ目は、実験室で発じんさせたアモサイトサンプル ( $n=15$ )、2つ目は第3章でも使用した「石綿クロスチェック試料」 ( $n=5$ )、3つ目は同様に第3章でも使用した除去現場サンプル ( $n=4$ ) である。1つ目のサンプルは表4.1に示した標準サンプルであり、比較的濃度が高く、従来のPCM法による計数情報が与えられている。2つ目のサンプルにはPCM法による濃度情報は与えられていないが、3つ目のサンプルには濃度情報が与えられている。また、1つ目と3つ目のサンプルでは濃度の比較を行い、2つ目の視野間の計数結果の比較を行った。

### 4.6.1. アモサイトサンプルへの適用結果 (多視野観察時の濃度比較)

本アルゴリズムによる各サンプル200画像当たりの計数結果と、目視による計数結果から推計した200視野総繊維数を比較した(図4.7)。両者の結果は良い一致を示しており、ばらつきが少なく良好な計数結果となっていることがわかる。

自動計数にも過少・過大評価につながる誤計数が存在するはずであるが、この濃度レンジでは計数される繊維が膨大で、個別の視野あるは繊維に対して自動計数の真偽を確認することは現実的ではないため行っていない。むしろ多視野を観測することで、そういった誤差が相殺されることが示唆されているといえるだろう。現実的には、1サンプルあたり200視野、4000本という計数は目視では困難であるが、自動計数では障害とはならな

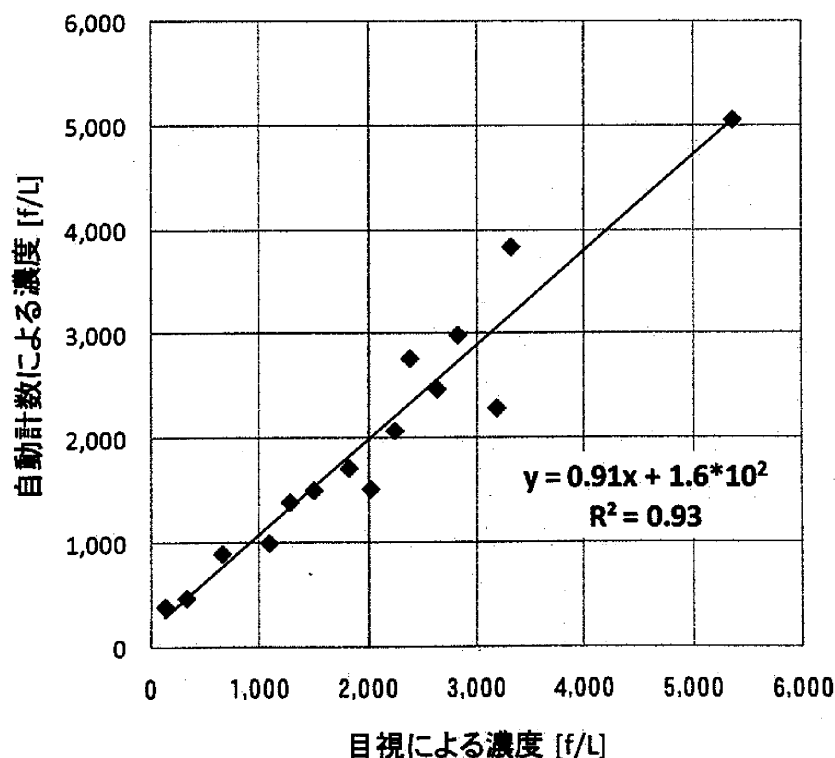


図 4.7 アモサイト標準サンプルへの適用結果

PCM法の規定に従って熟練者が計数した結果と自動計数結果の比較。自動計数では一律200視野を観察し、サンプル数は $n=15$ 。

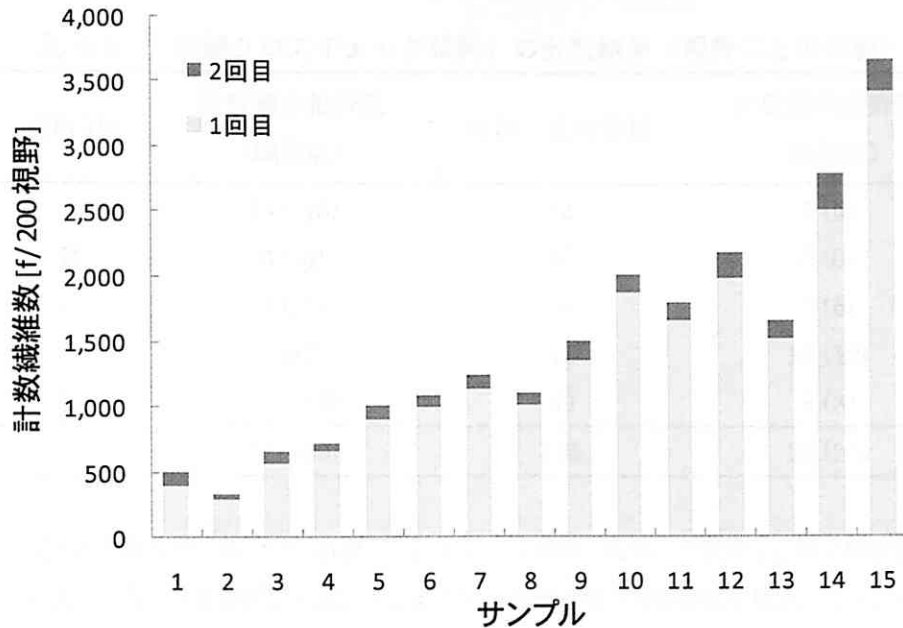


図 4.8 エッジ検出 1 段階目と 2 段階目の計数繊維構成

1 回目のエッジ検出で計数された繊維が大半であるが、2 回目のエッジ検出で計数された繊維も全体の 1 割程度存在しており、2 段階の繊維認識の有効性が確認された。

い。実際、今回の 15 サンプル、3000 視野、合計 22,000 本あまりの計数作業に要した時間は、一般的なノートパソコン<sup>15</sup>でおよそ 30 分程度に過ぎず、自動計数は圧倒的な速度と精度で計数可能であることが示された。

また、図 4.8 には、エッジ検出 1 段階目と 2 段階目で検出された繊維の構成を示した。サンプルによって若干の差はあるが、おおむね 9 割の繊維を 1 段階目のエッジ検出で計数し、2 段階目のエッジ検出で残りの 1 割程度が計数されていることがわかる。エッジ検出を 1 段階で最適化せず、2 段階に分けて検出することにした結果、1 割程度の計数漏れを防ぐことができたことがわかる。

#### 4.6.2. 「石綿クロスチェック試料」サンプルへの適用結果（視野ごとの計数比較）

「石綿クロスチェック試料」サンプル（ $n=5$ 、それぞれ 50 視野）に本アルゴリズムを適用し、自動計数と目視による計数の視野ごとの計数誤差を検討した。画像はオートフォーカスを用いず、手動でフォーカスを調整し撮像した。目視観察によって、視野あたりの繊維数は大半が 0 または 1 f であることが分かっているため、目視と自動計数の相関係数による議論ではなく、計数結果の一致度合いを評価した。

表 4.4 に目視計数と自動計数結果が一致した視野数、過少だった視野数、過剰となった視野数をサンプルごとに示した。また、過少あるいは過剰となった視野に関してはその視野での過少、過剰繊維数も併記した。計数の一致度合いは 60～90% 程度となり、平均するとおよそ 75% の視野（250

<sup>15</sup> Intel Core 2 Duo T7200 2.00GHz の CPU 搭載のノートパソコン。ただし、MIL8 と VB6 の環境ではシングルコアとして動作

表 4.4 「石綿クロスチェック試料」の計数結果（視野ごとの比較）

試料 ID	計数過少視野数 (繊維数)	計数一致視野数	計数過剰視野数 (繊維数)
A	13 (-15)	32	5 (5)
B	5 (-5)	45	0 (0)
C	7 (-8)	38	5 (5)
D	9 (-9)	31	10 (12)
E	8 (-12)	39	3 (3)
計	42 (-49)	185	23 (25)

日本作業環境測定協会の「石綿クロスチェック試料」を用いて視野ごとの自動計数結果が、目視計数結果が一致、過少あるいは過剰となった視野数を集計。カッコ内には、数え漏らしたあるいは数えすぎた繊維数を示した。

視野中 185 視野) で計数結果は一致した。また計数過剰となった視野 (23 視野) に比べて、計数過少となった視野 (42 視野) が多い結果となった。また 5 つのサンプルで、計数過少となった視野数において、数え漏れた繊維数は 49 f であるので、過少計数視野あたりの過少繊維数は 1.2 f/視野であった。同様に、計数過剰となった視野において、数え過ぎた繊維数は 25 f であるので、過剰視野視野あたりの過剰視野数は 1.1 f/視野であった。このように、過少計数あるいは過剰計数した視野においても、計数誤差は 1 f 程度であり、多視野観察を考えると、その影響はわずかなものと考えられ、妥当な結果となっていることがわかる。

#### 4.6.3. 除去現場サンプルの適用結果（実サンプルへの適用）

3.4 節でも使用した、吹き付けアスベストの除去現場でサンプリングされたサンプルに適用した。サンプリング場所は前述の通り、a) 除去作業は終了しており隣接する部屋で除去作業が行われている地点、b) 除去作業中の部屋でセキュリティゾーンに近く、空気の取り込み側にあたり作業中であ

っても比較的濃度の低いと想像される地点、c) 除去作業前の部屋で除去作業中の部屋には隣接しているが、b) 同様にセキュリティゾーンに近く濃度は低いと想像される地点、d) セキュリティゾーンの外の 4 地点である (図 3.11 参照)。

本アルゴリズムの計数結果と同地点での二名の目視計数者 (X と Y) の目視計測結果と比較し結果を表 4.5 に示した。計数者 X は日本作業環境測定協会のクロスチェック事業で B ランクの資格をもち、計数者 Y は同事業の C ランクの資格を有している経験者である。また、目視計数者 X は同一の標本を観察しているが、目視計数者 Y は同一地点でサンプリングされた異なる標本を観察した結果である。なお、本アルゴリズム (本システム) の観察視野は目視観察に比べると狭いため、計数繊維数及び観察視野数は比較できないが、濃度のみ対等に比較できる。

同一サンプルを観察した計測者 X と比較すると、作業環境における数千～数百 f/L の濃度レベルの実測サンプル (b と c) の計数結果はよく一致しているといえる。しかし、サンプル a では、本アルゴリズムが過剰計数となっている。この原因の



一つには、繊維濃度が高いことよりも混在する粒子濃度が高いことが原因であろうと推測される。大きな粒子が多くなると透過光量が多くなり「ハロー」と呼ばれる際立って明るい画像ノイズが増加する。その結果、エッジによる対象物認識には不利な条件となり、本来認識する必要のない巨大な粒子の一部を誤って繊維と認識してしまうケースが見られた。また、繊維に付着した微小粒子がエッジを変化させるため、繊維が切断されて認識されるケースも見られ、過剰計数につながっていると考えられた。

また、セキュリティゾーン外部のサンプル d は、前述の通りオートフォーカスでのフォーカス調整に多くの視野で失敗したので、失敗した視野は個別に目視でフォーカスを調整して撮像した画像を用いた。このサンプルは、数 f/L 程度の濃度が想

像され、計数者 X はそのレベルの結果となっているが、本アルゴリズムの結果はちょうどその 10 倍となっており、本アルゴリズムが過剰計数になっている恐れがある。この原因は、エッジとして抽出する対象がないために、微小な画像背景の輝度の変化をエッジととらえて、背景の地模様を繊維として認識していることが原因だろうと考えられる。

計数者 Y は計数者 X に比べると全般的に低く、特に、サンプル b では 10 分の 1 以下の結果となっている。いずれの計数結果も真の値はそもそも不明であるが、同一地点で捕集された異なる二つのサンプルが、それぞれ異なる計数者によって観察されると、このような違い、ばらつきを生むことがありうることを改めて示した結果であるといえる。

表 4.5 除去現場サンプルの計数結果

サンプル	本アルゴリズム	計数者 X	計数者 Y
a	計数繊維数 f	863	212.5
	観察視野数 -	300	16
	濃度 f/L	$1.0 \times 10^4$	$7.1 \times 10^3$
b	計数繊維数 f	520	200
	観察視野数 -	300	17
	濃度 f/L	$6.2 \times 10^3$	$6.3 \times 10^3$
c	計数繊維数 f	281	201
	観察視野数 -	300	29
	濃度 f/L	$5.6 \times 10^2$	$6.2 \times 10^2$
d	計数繊維数 f	10	6
	観察視野数 -	289	50
	濃度 f/L	$6.2 \times 10$	6

本アルゴリズムは観察視野数が目視に比べて狭いため、視野数および繊維数では直接比較できないが、濃度は比較可能である。

#### 4.6.4. 本アルゴリズムの適用範囲

以上の3種類のサンプルへのアルゴリズムの適用結果から、本アルゴリズムの適用が可能、あるいは望ましくない環境は以下のように考えることができる。

人工発じんしたサンプルへの適用結果から、混在する粒子がほとんど見られないようなサンプルであっても、100～数千 f/L といった高濃度であれば目視と極めてよい一致が見られ、スタンダードを用いたサンプルへの適用性は高いといえる。また石綿クロスチェック試料への適用結果も良好であり、現在試料の標準値は熟練者の目視観察によって得られているが、これを置き換えることができる可能性があるといえる。

しかし、作業現場（アスベスト除去作業）でのサンプルは、目視計測とばらつく結果も見られた。濃度が高くなると、過剰計数する傾向がみられた。そのため、混在する粒子の多い環境でサンプリングされた場合には、あまり適していないと考えることができ、アルゴリズムの改良あるいは捕集量を事前に制御するような機構の開発が今後の課題となる。また、極端に捕集量が少なく非繊維状の粒子すら存在しないようなサンプルでは、オートフォーカスもエッジ検出も正しく動作せず、本システムの運用には適していないことが明らかとなった。

#### 4.7. 自動計数アルゴリズムのまとめ

従来の画像の輝度に着目するのではなく、画像の背景と対象物の境界である「エッジ」に着目することで、位相差顕微鏡画像からアスベスト繊維を認識し計数するアルゴリズムを開発した。また、PCM 法だけでなく分散染色法にも対応できる画像前処理も開発した。

アルゴリズムを汎用の画像解析ライブラリを用いて Visual Basic で実装した自動計数プログラムを開発した。適切な前処理を行った後に、エッジを2段階で抽出することで、繊維を高い精度で認識し、かつ高速に計数することが可能となった。