

博士論文（要約）

自律振動ポリマーの三次元マイクロ挙動計測の
ためのデジタルホログラフィック顕微鏡の開発

森田 佳士之

目次

第1章	序論.....	5
1.1	マイクロロボット	5
1.2	ソフトマテリアルと高分子ゲルの刺激応答による駆動.....	5
1.3	自律振動ゲル	6
1.4	三次元マイクロ形状, 変位計測	9
1.5	粒子追跡による変形計測とマイクロ三次元変形計測手法.....	12
1.5.1	粒子追跡手法	12
1.5.2	粒子追跡による計測の特徴	12
1.5.3	画像解析法	13
1.5.4	粒子追跡によるマイクロ三次元計測手法.....	14
1.6	研究意義・目的	18
1.7	本研究の構成	19
第2章	デジタルホログラフィック顕微鏡と粒子検出.....	20
2.1	ホログラフィとデジタルホログラフィック顕微鏡.....	20
2.1.1	ホログラフィの原理	20
2.1.2	デジタルホログラフィ	21
2.1.3	デジタルホログラフィック顕微鏡.....	22
2.1.4	光学系概要	23
2.1.5	DHM 解像度.....	24
2.1.6	ホログラム再生手法	25
2.2	先行研究 : DHM による粒子検出・追跡.....	26
2.2.1	強度最大・最小値を用いた粒子位置検出.....	27
2.2.2	複素振幅を用いた粒子検出	27
2.2.3	focusing function による粒子検出.....	27
2.2.4	相互相関法による粒子検出	28
2.3	DHM 粒子検出・追跡アルゴリズム.....	30
2.3.1	位相像.....	30
2.3.2	二次元位相理論波面による粒子検出アルゴリズム.....	31
2.3.3	理論波面歪みの導出	32

2.3.4	パターンマッチング関数	33
2.3.5	サブピクセル解析	35
第3章	粒子検出・追跡精度検証	37
3.1	トレーサ粒子の位置検出と類似度計算関数の選定	37
3.1.1	計測条件	37
3.1.2	ブラウン運動	37
3.1.3	撮影・再生結果	38
3.1.4	背景ノイズ影響調査	40
3.1.5	マッチング関数比較結果	42
3.1.6	静止トレーサ粒子検出率	48
3.1.7	空気中粒子位置検出	49
3.1.8	静止トレーサ粒子計測結果考察	52
3.2	二次元テンプレートによる粒子追跡	54
3.2.1	粒子追跡手順	55
3.2.2	粒子追跡精度評価	56
3.2.3	計測条件	58
3.2.4	矩形管内流れ理論式	59
3.2.5	流れ場計測結果	59
3.2.6	誤ベクトル除去処理結果	61
3.2.7	粒子変位三次元計測結果	67
3.2.8	二次元テンプレート計測結果まとめ	74
3.3	三次元テンプレートによる粒子追跡精度	75
3.3.1	粒子追跡アルゴリズム	75
3.3.2	粒子追跡計測条件	76
3.3.3	粒子追跡結果	76
3.4	DHMによる粒子検出・追跡手法まとめ	78
第4章	自律振動ゲルの蠕動運動計測	80
4.1	Belousov-Zhabotinsky (BZ) 反応	80
4.2	反応原理	80
4.3	BZ反応による自律振動ゲルの構成, 先行研究	81
4.4	本計測の目的	83

4.5	自律振動ゲル作成手順	83
第5章	結論.....	86
第6章	謝辞.....	88
第7章	参考文献	90

第1章 序論

1.1 マイクロロボット

サブミクロンからサブミリメートルスケールの微視的機械はマイクロロボットとよばれ、実現すれば、省スペース、省資源、省エネルギーで移動でき、様々な分野の応用が見込まれる。例えば、医療分野では生体内で稼働させることで発症部位への輸送や精密な手術、環境のセンシングや薬剤投与など、様々な役割が実現できる可能性を秘めている。しかしながら、従来のセンチメートルスケール以上のロボットでは生じない問題が微小スケールのアクチュエータでは生じてくるため、多くの課題解決が必要である。例えば、微小スケールでは体積に対して表面積比が増加することで、界面付近の張力や抵抗、粘着力がバルクの影響に比べて支配的になる。そのためレイノルズ数が低い粘性支配な環境では、進退の形状が同じ往復運動の変形では流体中で移動することができない (Purcell, 1977)。したがって自然界の微生物は鞭毛を一方方向へ回転させたり、繊毛を非対称で異時的に運動させたりすることで、環境中を推進することに成功している。

マイクロロボットを駆動させる手法にはセンサ、アクチュエータ、制御といったユニットを格納し、自己で駆動するオンボード型と、外部からの作用により駆動、誘導されるオフボード型に大きく分けられる。研究されているマイクロロボットにおいてオンボード型では化学反応によるもの (Li et al., 2016)、オフボード型では磁場や超音波、光等を用いて駆動させるもの (Lum et al., 2016; Villangca et al., 2016)の開発が進められている。マイクロロボットの実現のためには様々なユニットを一体化し自律分散制御させる必要がある。これらの手法では粘性支配な環境下で独立した駆動機能を持たせるためにマイクロスケールで複雑な機構が必要となる上、剛構造なため受動自由度が少なくなるといった問題があり、解決が望まれる。

1.2 ソフトマテリアルと高分子ゲルの刺激応答による駆動

自由度が高く柔軟な動作を実現するためにソフトマテリアルが注目されている。ソフトマテリアルは、例えば高分子化合物や液晶、界面活性剤などの柔軟性や変形性を有する材料の総称であり、日常生活でごく一般に使用されている。その生体に類似した柔軟性を生かして、軟体動物のような小空間での移動が可能なアクチュエータ (Seok et al., 2013) や様々な形状の物体を掴む機構 (Kofod & Wirges, 2007) など、剛性をもった素材では再現できない挙

動を示すことが可能である。

ソフトマテリアルの一つである高分子ゲルは三次元な架橋により網目状の構造をつくり、多量の溶媒を保持できる性質を持つ。溶媒を保持する貯蔵性や、溶媒の吸収・排出による膨潤・収縮性を有しつつも、流動性が低く形状を維持することができるという他のソフトマテリアルとは異なる性質を備えている。天然高分子ゲルとしてゼラチン、ナタデココ、こんにゃくなどが身近に存在する。高分子ゲルは金属と比べて軽く、柔軟性を有する。また、含水高分子ゲルは生体への適合性を持ち、コンタクトレンズ等に製品化されている他、外部刺激に対する応答性から人工筋肉素材への応用も期待されている。さらに、刺激に対する応答性を持つ性質からマイクロアクチュエータとしての研究が進められている。

田中 (1978) は高分子ゲルが温度や溶媒の構成の変化により、可逆的・不連続的に膨潤・収縮する体積相転移現象を見出した。それ以来、刺激に対して応答を示す応答性ゲルの研究が数多くなされてきた。電場や pH, イオン濃度, 温度, 光, 化学物質など様々な外部刺激による応答が発見された。こうした性質から高分子ゲルはスマートゲルとも呼ばれ、多種多様な研究, 開発が進められてきた (Hines et al., 2017)。例えば, N-イソプロピルアクリルアミドゲル (NIPAAm) は温度変化により応答する (Hirokawa & Tanaka, 1984)。N-イソプロピルアクリルアミドゲルは相転移温度以上では疎水性相互作用により収縮し, それ以下の温度では水和が生じて膨潤する。pH などの化学応答する高分子ゲルにはアクリルアミド-アクリル酸共重合ゲルなどが知られている。こうしたゲルは pH によりゲル内外のイオンの流入により浸透圧が変化し体積が変化する。

電流, 電圧による応答を活用した高分子ゲルはシステムの簡潔性と優れた制御性から多くの研究・開発がおこなわれている。2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸ゲルやビニルアルコール-アクリル酸ゲルなどの高分子電解質ゲルは電圧付加による電気浸透現象や電解質濃度変化, あるいは浸透圧変化により変形が生じる。例えば, 不揮発性のイオン液体を含んだフッ素系高分子ゲルをイオン液体とカーボンナノチューブからなる電極ゲルで挟むことで屈曲振動する電流駆動型の変形機構が研究されている (Fukushima, 2005)。一方, こうした応答性を持つ高分子ゲルを駆動装置として活用するためには外部刺激を周期的に与え続ける必要があるため, 制御部を含めた装置全体としてはマイクロスケールを超える規模になり, マイクロロボットとしての機能を果たせない欠点がある。

1.3 自律振動ゲル

応答性を示す多くのゲルは継続的に運動を持続させるためには外部刺激により運動を制

御する必要がある。本研究では外部刺激による制御無しに、Belousov-Zhabotinsky (BZ) 反応とよばれる化学反応によって自律的に振動するゲルに着目する。BZ 反応は反応系内の物質濃度が周期的に振動する反応である。酸化剤、還元剤、金属触媒により反応が進行する。BZ 反応による酸化還元反応と温度応答性を示す NIPAAm ゲルとをカップリングすることで外部刺激に頼ることなく自律的に振動するゲルが発見された(Yoshida et al., 1996)。自律振動ゲルは酸化還元振動に応じてゲルの親疎水性が変化し、膨潤・収縮を示す。さらに反応波長以上の長さを持つば図 1.1, 図 1.2 のように化学反応が伝播し色変化と共に膨潤収縮が生じて蠕動運動することが知られている。BZ 反応による自律振動ゲルは制御装置なしに膨潤・収縮を繰り返す。この恒常的な条件での変化は前節の刺激応答性ゲルにはみられない性質であり、化学反応を含めて生体システムと似ている点が極めて特徴的である。自律振動ゲルは成形に柔軟性を持ち、ゲル自身がさらに駆動装置等が不要なことから、micro-TAS やドラッグデリバリー、物質輸送等への応用が期待されている。この化学反応に対する膨潤収縮を利用してゲル自身が自律的に移動する系が実現されている(Maeda et al., 2007)。より複雑な変形や移動を実現させるためには化学反応による濃度変化と運動との関係をより明確にする必要があり、そのためにはゲルの運動を三次元で精密に計測する必要がある。

本研究で対象としているゲルの大きさは数百マイクロメートルからセンチメートルの範囲で、膨潤・収縮の周期は 1 分～10 分程度、膨潤による変位は数マイクロメートルから数十マイクロメートルである(Yoshida et al., 2003)。表 1.1 に自律振動ゲルの運動スケールをまとめる。これまで、この自律振動ゲルに対する挙動の観察では顕微鏡による境界面の移動や、化学反応に伴う色変化の観察(Yoshida et al., 2000, Maeda et al., 2008)、あるいはピラー状ゲルによる間接的な蠕動運動の計測(Tabata et al., 2002)にとどまっていた。そのため、マイクロで自律的な蠕動運動における変位や膨潤・収縮量に関して、三次元で定量的には計測されてこなかった。また、化学反応による錯体の酸化還元状態の変化と、三次元動態の関連性についても詳細な計測がされていない。柔軟な蠕動運動の理解のためには、三次元でマイクロスケールにおける、変形と色変化情報との同時計測が必要である。

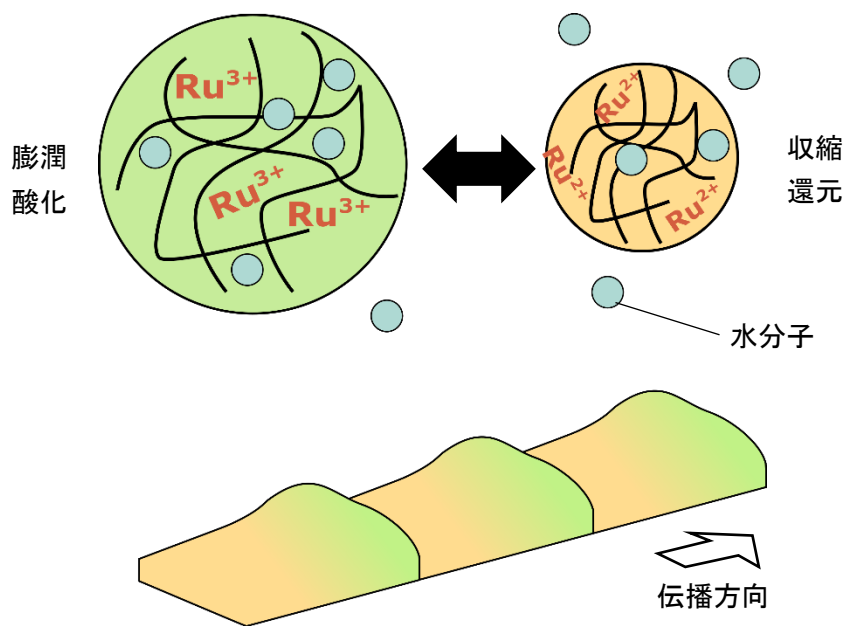


図 1.1 自律振動ゲルの膨潤収縮(上)と蠕動運動(下)

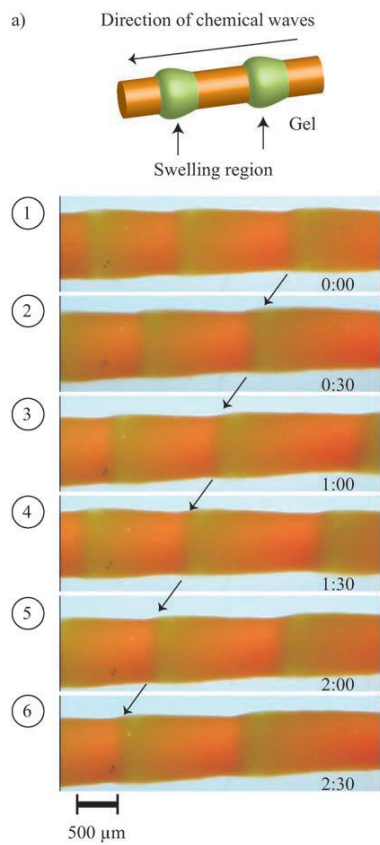


図 1.2 円柱自律振動ゲルの蠕動運動 (Maeda et al., 2008)

表 1.1 自律振動ゲルの運動特性

大きさ	数百 μm ～
膨潤変位	数 μm ～数十 μm
振動周期	数十秒～十数分

1.4 三次元マイクロ形状，変位計測

自律振動ゲルの運動を詳細に理解するためには表 1.1 のマイクロスケールにおける膨潤収縮による蠕動運動を三次元で計測する必要がある。マイクロスケールにおける三次元計測手法は、様々な手法が開発されてきた。本節では三次元マイクロ形状，変位計測装置の技術を複数紹介し，マイクロ高分子ゲルの動的な変形計測への有効性を議論する。

1: CMM (Coordinate Measuring Machine)

CMM は座標測定器とも呼ばれ，プローブを用いて物体を三次元計測する装置である。測定的方式により，接触型と非接触型に分けられる。

1) 接触型：マイクロプローブ先端の球を測定対象に接触させ，加わる力を電気信号に変換して検出する手法。繰り返し精度は数 nm 程度あるが，プロービング時のステージ位置読み取り値からの補正量の不確かさが大きい。不確かさは 100nm 程度である (Sato, 2008)。

2) 非接触型：接触式プローブを用いず，レーザや光を用いる方式。短時間で多数の座標値を測定でき，対象物に接触しないため傷を付けずに計測可能である。

1), 2)の方式を組み合わせたマルチセンサ式の CMM も市販されている。計測に数秒と時間を要し，動的な変位の測定には不向きである。この手法では表面形状の計測には有効であるが，内部の構造は明らかにできない。

2: 電子顕微鏡

電子顕微鏡は加速した電子を対象に反射あるいは透過させて形状を計測する顕微鏡である。可視光よりも非常に短い波長を持つため非常に高い解像度を持つ。反射する電子を結像する走査型顕微鏡 (SEM) と薄い計測対象を透過した電子線を結像させる透過型電子顕微鏡 (TEM) に大きく分類できる。

1) SEM: 電子線を走査し，計測対象から反射した電子線を検知，結像することで表面状態を観察することができる。電子線を照射するため，試料中の水分を取り除く。反射しない透

過物には金属を蒸着させる必要がある。計測における空間分解能は最高 0.5nm 程度である。

2) TEM: 薄い切片上の計測対象を透過した電子を計測することで対象内部の構造をより高い分解能で計測することができる。断面形状を測定することはできるが、計測対象の凹凸を検知することは困難である。空間分解能は最高 0.1nm と SEM よりも高い。

これらの手法は基本的に二次元計測で奥行方向に定量的な計測ができないが、物体を様々な角度で照射することで三次元構造を構成する TEM トモグラフィや、光軸周りに二次電子検出器を配置することにより、三次元で表面形状を算出する三次元 SEM も開発されている。TEM や SEM は高分子ゲルの構造解析のために以前から使用されてきた (Attwood et al., 1988; Griess et al., 1993)。しかしながら計測対象を加工する必要がある上、これらの手法は表面の形状・構造のみの計測である。三次元 SEM は計測に時間を要し、ダイナミックな運動や変位を計測することは難しい。

3: レーザ顕微鏡

レーザー顕微鏡は、透過光非接触で表面形状を計測できる計測装置であり、高分解能、高速度で三次元情報を記録できる。ここでは多く用いられている共焦点光学系によるレーザー顕微鏡について紹介する。共焦点光学系は Minsky により開発された (Minsky, 1988)。通常の顕微鏡の光学系と異なり、対象物の 1 点に照射するように光源を出射し、焦点が合った位置と共役な位置にピンホールを配置することで、焦点以外からの光を排除し、光軸方向に分解能をもつ。したがって、得られた像を積み上げることで三次元像を形成することができる。計測対象の 1 点以外の光をカットすることでコントラストを上げた像を得ることができるという特長を持つ。また、集光度が高く、高輝度なレーザーを用いることで、解像度がより高い像を得ることができる。共焦点光学系を蛍光顕微鏡に応用することで、細胞等の生体組織の観察・計測への応用 (Lawson & Weinstein, 2002) もなされている。

共焦点光学系では光軸方向の情報しか得ることができないため、三次元像を構築するためには、二次元面内方向に走査する必要がある。走査方式として、計測対象を走査する試料走査方式、レーザービームを走査するレーザー走査方式の 2 つの方式に分類できる。試料走査方式ではステージを動かすことで三次元計測ができるため、光学系に工夫が不要である。しかしスキャンに長時間要してしまう。レーザー走査方式は試料走査方式と比べて高速に高精度な計測が可能であるが、高速走査のためには光学系に工夫が必要になる。高速化の光学系手法として、ライン照明、ニポウディスク、非走査マルチビーム共焦点法などが知られている。これらの手法により、平面方向の計測が格段に速くなった。

レーザー顕微鏡はゲルの内部構造をマイクロスケールに三次元で計測できる有効な手法である (Hirokawa et al., 1999). しかしレーザー顕微鏡は, 奥行方向のスキャンが必要であり, 一辺, 数百マイクロメートルの立方体の三次元計測の時間分解能は 1fps 程度が現状限界である. 数秒スケールで変化するような本研究対象のゲルの膨潤・収縮の伝播を詳細に捉えることは難しい.

4: デジタルホログラフィック顕微鏡 (DHM)

デジタルホログラフィック顕微鏡は物体を直接計測せず, 物体からの三次元的波面を干渉縞として二次元で記録し, 再度三次元で再生する技術である. 透明体の計測や鏡面な物体でもナノスケールオーダーで形状を計測できる. 一台のカメラで走査なしに計測が可能のため, 高速度カメラと組み合わせることで数万 fps と非常に高速な計測 (Suzuki et al., 1997) が可能である. 赤血球の形状計測による分類 (Liu et al., 2011) などソフトマテリアルへの適用もなされている. しかしながら対象物と周囲の屈折率差によって形状の厚みを測定するため, 屈折率が変化するゲルの膨潤収縮の直接測定には工夫が必要である.

5: マイクロ粒子追跡法

粒子追跡による変位や速度を測定する方法は従来から主に流体を対象として多く用いられてきた. マイクロトレーサ粒子を空間あるいは対象物に配置, 混入させて位置を計測することで変位や速度を算出する. マイクロ粒子を計測するために顕微鏡を始めとして多くの計測方法が提案されてきた. 粒子追跡法は主に流体の流れ場の計測に活用されてきたが, ゲルを始めとするソフトマターの計測にも応用されている. Schmitt ら (1998) は生体組織の中に粒子を拡散させ, 圧力下での変位を光干渉断層撮影法 (OCT) により評価した. さらに, 少量の粒子を付着させることで, 細胞骨格のダイナミックな計測にも活用されている. Patel ら (2018) は, がん細胞の変形による力学的な変化を細胞下のゲル中に埋め込まれた粒子を追跡し評価した.

表 1.2 にこれらの計測手法をまとめて示す. 自律振動ゲルの詳細解析のためには, 内部の変形計測が必要になる. 紹介したこれらの手法では三次元対象物をマイクロスケールで形状を計測することが可能であるが, 高速で内部の変形を計測できる手法は限られる. 本研究では自律振動ゲル内部の運動を高速に計測するために, マイクロ粒子追跡法を適用する.

表 1.2 三次元マイクロ形状・変形計測手法

形状計測手法		空間測定分解能	計測時間	備考
CMM (micro-scale)		1nm～	数秒～	表面形状のみ
電子顕微鏡	TEM	0.1nm～	～数十 fps	面計測のみ
	SEM	0.5nm～	～数十 fps	面計測のみ
レーザ顕微鏡		100nm～	1fps～	
デジタルホログラフィック顕微鏡 (DHM)		100nm～	～数万 fps	屈折率変化に影響
マイクロ粒子追跡法		粒子濃度依存	～数万 fps	内部も計測可

1.5 粒子追跡による変形計測とマイクロ三次元変形計測手法

本章では粒子追跡による変形計測手法の特徴や原理を詳細に説明する。三次元の粒子位置の検出手法は様々な方法が提案されており、いくつかを紹介する。

1.5.1 粒子追跡手法

トレーサ粒子を計測対象内に付着あるいは埋め込み、追跡することで変位や動作を観察・計測する手法は「粒子画像流速測定法」として、主に流体の測定手法として大きく発達してきた。粒子を流体中に混入させることで流れ場を測定する手法は 1980 年代より開発が進み、マクロスケールで二次元な計測は 2000 年代にほぼ確立された (可視化情報学会, 2002)。分散させた流体にレーザ等の照明を照射し、画像を連続的に記録する。連続的に記録された画像の変化を解析することで流れ場全体の流速分布を求めることができる。粒子追跡による変位や速度を測定する方法は従来から主に流体を対象として多く用いられ、固体への計測例はさほど多くはない。計測対象の運動に粒子自身が影響する可能性はあるが、非接触・低侵襲で計測できる。

1.5.2 粒子追跡による計測の特徴

(1) 計測次元

画像全体の場を計測することができるため、面あるいは空間 (二, 三次元) の変位情報を一度に得ることができる。他の手法では点計測のものが多く、面で高速に計測できる点が優れているといえる。

(2)時間分解能

時間分解能はカメラの周波数，露光時間，照明の時間間隔によって決定されるため，任意の時間間隔の連続画像を取得できる．瞬時の流速分布を計測できるため，乱流等のダイナミックかつランダムな非定常流れの計測にも有効である．

(3)空間解像度

空間解像度は記録する撮像素子の解像度に左右されるものの他の計測手法と比べて，高い空間解像度を得ることができる．100万画素程度の画像取得が可能なカメラが多く使用される．数百万画素の CCD カメラがあれば実用上充分である．

(4)間接計測

本手法は計測対象そのものを観察しているわけではなく，対象中あるいは表面上のトレーサ粒子を追跡することで物体の変位・速度を導出する間接計測である．そのため，測定対象に粒子を混入させる必要がある．また，トレーサ粒子の追従性という「運動特性」や照明に対する粒子の散乱特性といった「光学的特性」が計測エラーに大きく依存する．カメラで撮影した画像から変位を求めるため，計測対象物にプローブで触れたり，内部を破壊したりする必要なく非侵襲で計測できる．

(5)データの再利用

粒子追跡法では撮影した粒子の連続画像から変位や速度を算出する．すなわち一度データ画像を記録できれば再計測することなく様々な解析を試行することができる．

1.5.3 画像解析法

得られた粒子の時系列連続データからトレーサ粒子の移動を抽出することで速度・変位場を得ることができる．画像解析・処理は複数提案されているが，図 1.3 に示すように大きく二つに分けられる．本節ではこの二つの手法について解説する．

(1)画像相関法

画像相関法では二時刻の輝度関数から画像上のパターンの変位を解析する．一般的には画像を小領域に分割して，領域内の輝度値パターンから類似している領域を探索することで領域平均移動量を算出する手法である．画像領域の輝度情報を参考にするため，画像上の個々の粒子像を識別する必要はない．測定点を任意の位置に設定できるという利点がある．

(2)粒子追跡法

可視化画像から個々の粒子座標を検出して取得する．複数時刻にわたり同一粒子像を追跡することで，変位ベクトルを導出できる．画像相関法よりも変位を高空間解像度で正確に

測定することができる，粒子が存在する位置の変位ベクトルしか得ることができない。

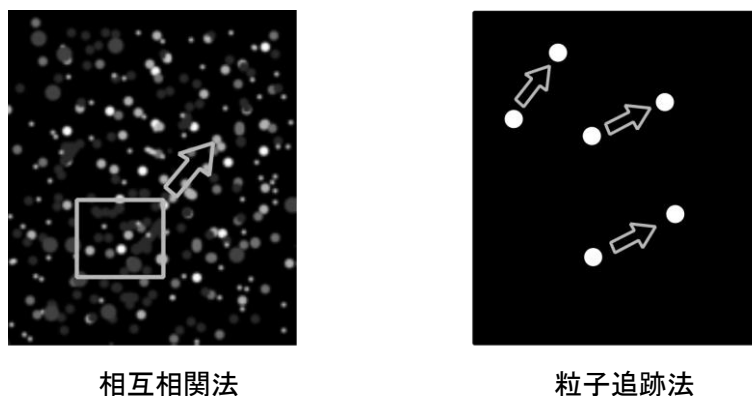


図 1.3 粒子運動変位抽出手法

1.5.4 粒子追跡によるマイクロ三次元計測手法

粒子追跡による三次元マイクロ計測手法には，ステレオ法やデフォーカス法，DHM 等，非常に多くの手法が提案・開発されている．粒子を追跡するためには，三次元で粒子位置を検出する必要がある．ここでは主要な三次元マイクロ粒子検出手法を記し，比較する．

1: デフォーカス法（3点ピンホール法）

デフォーカス法は粒子のボケを定量的に測定することで奥行き方向の粒子位置を検出する手法である (Yoon & Kim, 2006)．光学顕微鏡に対し，対物レンズのすぐ後に3点ピンホールのアパーチャマスクを付けている．このマスクを通った粒子の像は，焦点面上にある場合は一点の像に，焦点から離れると図 1.4 のように3点像になる．この3点像の中心の位置が面内粒子位置であり，3点像の大きさから焦点面からの奥行き方向の距離を算出することができる．また，焦点の手前にあるか，奥にあるかで粒子像の位置関係が逆転する．これらの情報から三次元位置計測が可能になる．

この手法の特長は，光学系にレンズや回折格子等の要素を加えることなく3D3C計測ができるという点である．しかし，3点像が重なると粒子検出が出来ないため粒子密度を上げることができないといった問題がある．3点像が重なる問題については，アパーチャマスクの工夫やカラーフィルタを用いる (Tien et al., 2008) 解決策が提案されている．また，マスクで大部分を覆うため照明強度が小さくなり SNR が小さくなる．

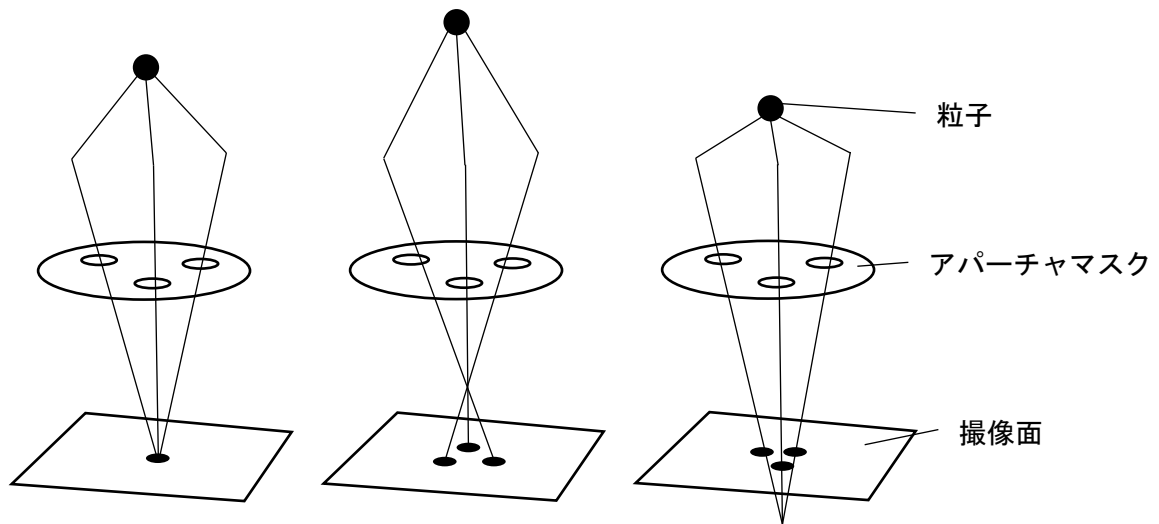


図 1.4 デフォーカス法による粒子像

2: ステレオマイクロ法

ステレオマイクロ法は撮影に二つのカメラを使用することで面内だけでなく奥行き方向の速度を計測する 2D3C 手法である (Cierpka & Kahler, 2012). 一般的に使われているステレオマイクロ法の二つの手法の概略図を図 1.5 に示す. よく用いられる型が右の CMO type である. CMO type の利点は, 左の Greenough type よりも視野が被る領域が大きい事である. 二つの視点の角度はキャリブレーション時に決まっており, 面内方向の速度分布から, 両側の視点がかぶった領域の奥行き方向の速度を算出することができる. ステレオマイクロ方式の問題点は, レンズの収差や歪みの影響を受けて画像の不確かさが増大する点, 角度を調整する際のキャリブレーションが複雑である点, チャンネル内の水とガラスのような屈折率の差が結果に影響しやすい点, 平面計測であるため三次元空間を計測するには走査が必要な点などが挙げられる.

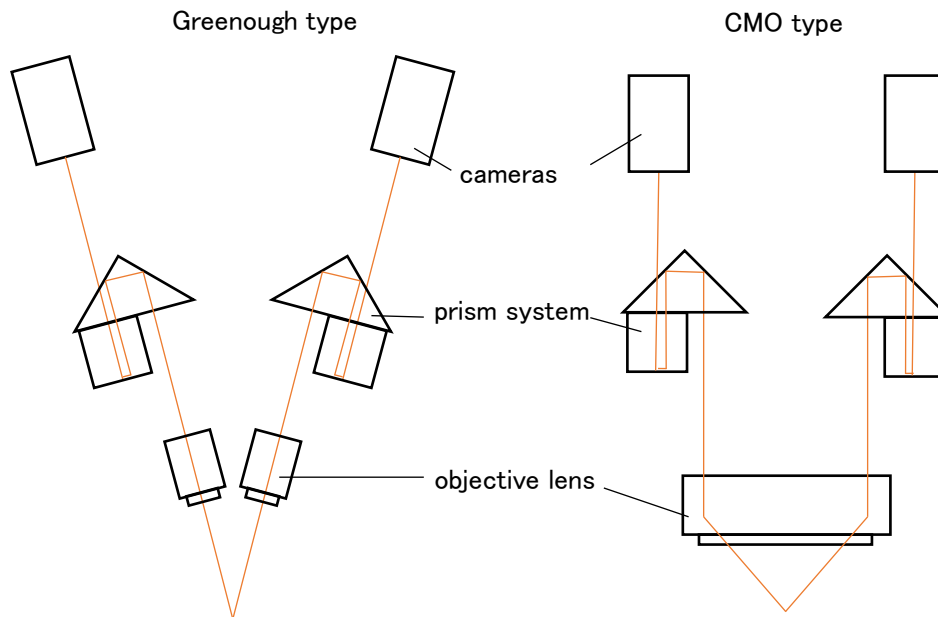


図 1.5 ステレオマイクロ法における光学系構成例

3: トモグラフィック法

トモグラフィック方式では、3 台以上のカメラを用いてボリューム中の粒子を撮影し、三次元粒子位置の測定を行う手法である。ステレオマイクロ方式と異なり、体積相互相関あるいは体積追跡アルゴリズムから粒子位置および変位・速度場を算出する。カメラの台数が多いほど精度があがるが、その分計算コストも増大するため、通常は 4~6 台程度のカメラで撮影される。

トモグラフィックの再生の際に問題となるのが、ghost 粒子の存在である (Elsinga et al., 2011)。複数のカメラで撮影した際に、粒子が被ることによって実際は粒子がない位置に粒子があるように再生されてしまう。この ghost 粒子は計測場のトレーサ粒子が多くなるほど増大するため、トモグラフィック方式の粒子濃度は 1px あたり 0.05 粒子程度に制限されている。三次元流れ場測定手法としては有効であるが、複数のカメラで精細なキャリブレーションが必要となり、マイクロスケールでの計測はカメラ配置や対物レンズ作動距離などの制限も有り極めて困難である。

4: 共焦点レーザー顕微鏡

従来の光学顕微鏡では被写界深度が大きく焦点面外のトレーサ粒子の影響を受けてしま

う問題点があった。共焦点レーザ顕微鏡は被写界深度を従来の顕微鏡よりも大幅に狭く計測できることで、物体内の光軸方向に空間解像度を持つ。これにより構造の計測ができることは前章で紹介したが、三次元粒子位置検出にも応用されている。ここでは計測時間精度を向上させたニポウディスク方式の原理について説明する。レーザ光はマイクロレンズが多数配置されたニポウディスクを通過し、ピンホール面で焦点を結ぶ。ピンホールにより焦点面付近以外の光を遮断することで、被写界深度を従来の光学顕微鏡よりも大幅に減らす事ができる。これにより焦点外の粒子の影響を減らすことで SN 比を大幅に上げることが可能となった。このニポウディスクは回転することによって二次元平面上の画像を得ることができる (Lima et al., 2006;)。共焦点レーザ顕微鏡の欠点はディスクの走査速度で時間分解能が決まるということである。三次元計測を行うためには、二次元走査に加えて奥行方向に走査も必要となるため、現状では形状計測と同様に、非定常な粒子の動きを高速に三次元で測定することは難しい。

5: デジタルホログラフィック顕微鏡 (DHM)

前節で紹介したように DHM は三次元光場を記録することで対象物の形状を計測できる。しかし、DHM だけでは外部の表面形状あるいは厚みしか計測できない。そこで、これを粒子検出・追跡に応用することで、変位を三次元で計測する研究が多く行われている。粒子像を二次元の干渉縞、ホログラムとして記録した後、計算機内で三次元の粒子像を再生する。ホログラムを撮影すれば三次元情報を記録することができるため、走査が必要なく、一台のカメラで計測できる。したがって、高速かつ広領域で変形や流れ場を、粒子の追跡により三次元で計測することが可能である (Satake et al., 2005)。

以上に記したマイクロ三次元計測手法を以下の表にまとめる。自律振動ゲルの計測のためにはマイクロスケールでかつ計測時間分解能が高い三次元変位計測装置が必要である。自律振動ゲルの振動周期は分スケールであるが、伝播速度は $10 \sim$ 数 $10 \mu\text{m/s}$ であり (Maeda et al., 2008) 少なくとも 1fps 以上の分解能が必要である。粒子追跡法の中でマイクロスケールの三次元空間を高速に計測できるのはデフォーカス法と DHM 法である。これら二つの計測時間は撮像素子に依存するため撮像系次第では高速な撮影が可能である。これら両者を比較したとき、奥行方向の計測範囲において DHM が優れる。例えば倍率 20 倍の対物レンズを使用したときデフォーカス法では奥行方向の計測範囲は約 $200 \mu\text{m}$ なのに対し (Yoon et al., 2006), DHM では約 $600 \mu\text{m}$ の領域で計測可能である。そこで本研究では DHM と粒子追

跡法を組み合わせることで高分子ゲルの内部の形状変化や局所領域の膨潤収縮をマイクロスケールかつ三次元で計測を実現する。

表 1.3 三次元粒子検出手法一覧

粒子追跡手法	計測次元	粒子濃度	計測速度	備考
ステレオマイクロ法	2D3C	高	高	
共焦点レーザー顕微鏡	2D3C	高	低	
デフォーカス法	3D3C	低	高	
トモグラフィック法	3D3C	高	高	マイクロスケールは困難
デジタルホログラフィック顕微鏡 (DHM)	3D3C	低	高	奥行方向計測領域広

1.6 研究意義・目的

高分子ゲルの様々な外部刺激による応答は機能的かつ生体的な要素を有し、近年ますます注目されている物質である。機能性の向上や応用・実用化の研究が多くなされる一方、さらなる発展のためには実現象を正確に把握する必要がある。しかしながら実計測、特に三次元かつマイクロスケールでの計測は、スケールの小ささや形状変化の速さから困難を伴い実施されてこなかった。本研究の目的は以下の二つである。

第一の目的として、高分子ゲルを始めとするマイクロマテリアルの形状や変動を、三次元でマイクロスケールかつ高時間分解能で計測できるシステムを開発する。具体的にはホログラフィの技術を応用した DHM と粒子検出・追跡手法を組み合わせた計測システムを開発する。DHM により再生された位相像から形状の変化を、トレーサ粒子の検出・追跡から、高速に三次元で計測することが可能である。DHM による粒子検出・追跡システムは特に流れ場の計測や微生物のトラッキングなど多くの応用がなされてきたが、後述するように計測領域奥行方向の精度の低さが課題であった。本研究ではテンプレートマッチングを用いた粒子検出・追跡手法を開発、精度検証し、性能を評価する。本計測システムは高分子ゲルの計測だけではなく、生体組織や流体、他のソフトマテリアルなどのマイクロ三次元計測へ応用することで、生体的な現象の理解、マイクロ流体デバイスへのフィードバックなど様々な応用への可能性が考えられる。

第二の目的として、開発した DHM 計測システムにより、自律振動ポリマーである BZ 反応によって膨潤収縮するゲルの三次元形状変化と、化学反応に伴う色変化の同時計測を実施し、マイクロスケールにおける動態を明らかにする。BZ 反応による自律振動ゲルは駆動装置や制御システムなしに化学エネルギーを運動エネルギーへ変換することができる。生体システムと類似する特異的な性質を有する高分子ゲルである。しかしながら三次元かつ、マイクロスケールで定量的な形状計測、そして化学反応との同時計測は行われてこなかった。本研究では第一目的として開発した DHM 計測システムに加えて、カラーカメラを用いて色情報との同時計測を実施する。具体的には、粒子追跡によりゲルの表面および内部の形状変形を三次元で計測し、蠕動運動の詳細を明らかにする。さらに色情報を同時に計測することで、化学反応波の伝播とそれに伴う力学応答による膨潤収縮運動の関連性を明らかにする。自律振動ゲルに関する詳細な計測ができれば、振動化学反応による濃度変化と膨潤収縮運動をより複雑に制御させるための基礎的な指針となりうる。

1.7 本研究の構成

本章では研究背景として自律振動ゲルや三次元マイクロ計測機器について述べ、本研究の意義そして目的を記した。

第 2 章では計測で用いる DHM の、三次元計測原理および DHM による粒子検出の先行研究について詳細に述べる。

第 3 章では DHM による粒子検出・追跡アルゴリズムの開発、精度検証を目的とする。粒子検出・追跡システムの詳細を述べ、従来の DHM による粒子検出手法との比較をする。アルゴリズムの検出・追跡精度を流体中の粒子計測により測定し、本手法が自律振動ゲルの計測に十分な精度を有しているかを検証する。

第 4 章では BZ 反応の詳細、自律振動ゲルの動作原理と先行研究、作成手法を述べ、第 3 章で開発した DHM による三次元挙動計測を実施する。本研究では三種類の拘束条件に対してゲルを計測して挙動を三次元で可視化計測し、微小な膨潤・収縮を定量的に評価する。

最後に第 5 章で、本研究の結論を述べる。

第2章 デジタルホログラフィック顕微鏡と粒子検出

本研究ではデジタルホログラフィック顕微鏡 (DHM) による粒子検出・追跡から、マイクロ高分子ゲルの挙動を三次元で計測する。本章では使用する DHM の原理および光学系を解説する。そして DHM による粒子検出の先行研究を紹介し、本研究で新たに開発した粒子検出アルゴリズムの詳細を説明する。

2.1 ホログラフィとデジタルホログラフィック顕微鏡

2.1.1 ホログラフィの原理

ホログラフィは光の波動性を利用して 2 次元記録媒体に物体の三次元情報を記録、再生する技術で, Gabor (1948) によって発見された。ホログラフィの語源はギリシャ語で「全て」を意味する holos-と「記録する」の意を持つ grapein-から来ている。

図 2.1 に従来の一般的なホログラフィの原理コンセプトを示す。物体を通過した、あるいは物体から反射した光を物体光、別の既知の光波面を参照光とする。この二つの波面を干渉させることにより、縞模様のフリンジパターンを得る事ができる。このパターンを記録した二次元媒体がホログラムである。このホログラムに対して記録の際に用いた既知の波面、参照光をホログラムに再び照射することで、物体光と同等の回折光が進行する。そのため、ホログラムを覗くとあたかも三次元の物体がそこにあるかのように見える。ホログラフィでは一般的な撮像素子では記録することができない振幅と位相の両方の情報を読み取り、三次元で再生が可能である。

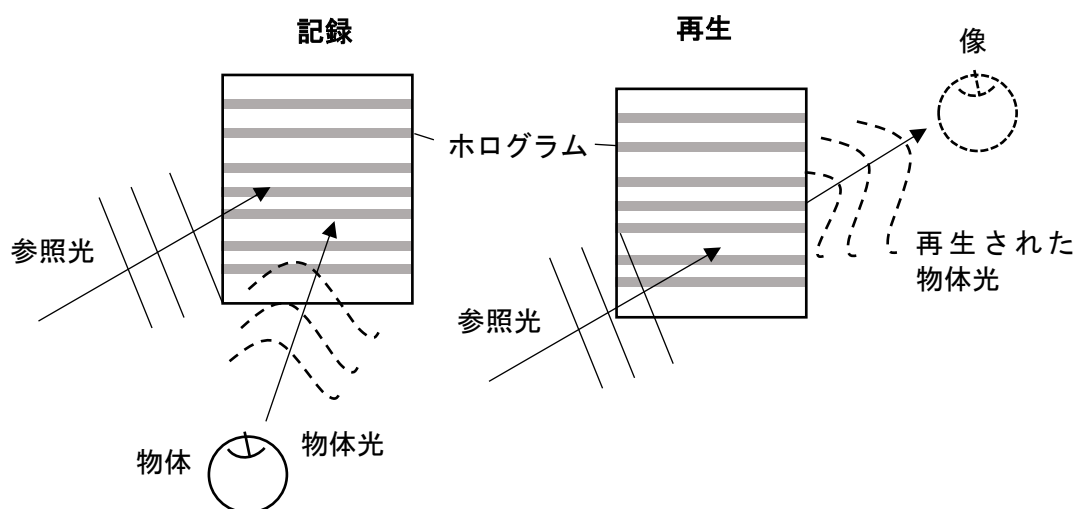


図 2.1 ホログラフィの記録・再生原理

ホログラフィの原理についてより詳細に説明する．いまホログラム面が物体光 E_0 と参照光 E_r で照射されるとき，干渉縞 I は以下のように表現できる．

$$I = |E_r + E_0|^2 = |E_r|^2 + |E_0|^2 + E_r^* E_0 + E_r E_0^* \quad (2.1)$$

E_0^*, E_r^* はそれぞれ E_0, E_r の複素共役である．

さらに再生の際は参照光 E_r' を照射すると，透過光 E は

$$\begin{aligned} E &= E_r' I = E_r' |E_r + E_0|^2 \\ &= E_r' |E_r|^2 + E_r' |E_0|^2 + E_r' E_r^* E_0 + E_r' E_0^* E_r \end{aligned} \quad (2.2)$$

と表せる．最初の二項は 0 次光でホログラムを直進する光で干渉していない物体光と参照光の強度パターンである．第三，四項は 1 次共役像と呼ばれる．第三項は振幅 E_0 でホログラム後方に虚像が見られる．一方第四項は振幅が E_0^* 比例するため像はホログラム面の前方に，虚像と比べて前後が反対になって実像が結ばれる (Asundi, 2011)．

2.1.2 デジタルホログラフィ

旧来のホログラム記録媒体にはハロゲン化銀乳剤を基礎とする写真乾板が広く用いられてきた．光の伝播や回折は，電磁気回折理論により非常に正確に再現することが可能である．デジタルホログラフィ (DH) は写真乾板にではなく CCD や CMOS 等の電子撮像素子を用いて干渉縞を記録し，計算機内の数値計算により像を再生する．

デジタルホログラフィは従来のホログラフィに比べて利点がいくつかある．1 つは写真乾板より記録再生を高速に行え，コストが安く済むという点である．乾板を使用する従来の方法では撮影のたびに物理的に乾板を取り替える必要があり，連続撮影は困難であった．また，従来のホログラフィは再生の際に，現像後のホログラムを位置あわせする必要があった．デジタルホログラフィではこのような操作は不必要である．さらに位相場を再生しても，人間の眼には直接見えないため，光場の位相情報を得るためには別の手段で再計測する必要があった．これに対しデジタルホログラフィでは位相情報を計算により簡単に可視化する事が可能な点である．

一方で，デジタルホログラフィでは従来のホログラフィより空間解像度は落ちる．解像度は CCD や CMOS の離散化された素子に依存しており，現状では数ミクロン程度である．この値は従来のホログラフィより一桁低い値である (Kim, 2011)．

2.1.3 デジタルホログラフィック顕微鏡

デジタルホログラフィを顕微鏡に応用し、マイクロ場の三次元情報を記録・再生する技術がデジタルホログラフィック顕微鏡（以下 DHM）である。DHM の基本的な構成は光源、干渉計，対物レンズ，CCD 等撮像素子，計算機から成る。DHM はインライン型，位相シフト型，オフアキス型の 3 つ光学構成が主に使用されている。DHM の特徴と光学構成について説明する。

DHM 特徴

・三次元（ボリューム）計測

DHM は一枚のホログラム画像から三次元像を再生することが可能な 3D3C 計測手法である。ステレオマイクロ法のような 2D3C 計測法とは異なり，即時の三次元像の記録が可能である。これにより，粒子の三次元座標を瞬時に記録することで非定常あるいはランダムな三次元変位を測ることも可能である。

・撮影系

DHM ではカメラ（撮像素子）1 つで三次元を記録可能である。よって複数のカメラを用いるステレオマイクロ法のような精密なキャリブレーションが必要ない。また時間分解能はカメラのフレームレートに依存し，高速度カメラを利用すれば非常に短時間の現象の測定が可能である。

・ノイズ，外乱の影響

DHM の欠点としてノイズ，外乱の影響を受けやすいことがある。空気のゆらぎや，流路，レーザの変動，振動，温度変化に敏感であるため，測定の際は細心の注意が必要である。

DHM 光学構成

1) インライン DHM

図 2.2 にインライン DHM の概要図を示す。単レーザ光を物体に当て，物体から拡散される物体光と物体周りを通る参照光を対物レンズを通して干渉縞として撮像素子に記録する。インライン型では撮像面に参照光を垂直に当ててホログラムを作成する。この方式では 0 次項と共役像が重なり再生像が劣化する。

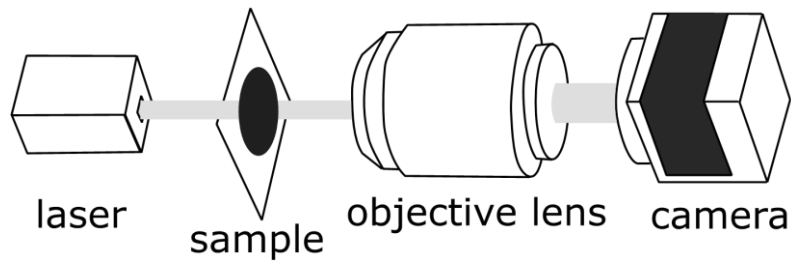


図 2.2 インライン DHM の光学系構成例

2) オフアクシス DHM

オフアクシス型はレーザ光を物体光と参照光に分け、参照光を物体光に対して角度をずらして干渉させる手法である (Cucho et al., 1999). 0 次の回折像と±1 次の回折像を重ねないようにして再生像の劣化を防ぐ. オフアクシス型では強度と位相の両方の情報を定量的算出することができる. しかし像素子の空間周波数帯域のうち再生像に使用できる域が限られており, 計測領域が狭くなる.

3) 位相シフト DHM

位相シフト型ではオフアクシス型では計測領域が狭くなる問題を解決するために, 参照光の位相をピエゾ素子や波長板で変え, 3 枚以上のホログラムを取り込む. 取り込んだホログラムの再生像を足し合わせるにより, 実像を含む項だけ抽出することができる. これにより解像度向上した像を得ることができる. しかしながら, 像を一つ取得するために複数回の撮影が必要なため時間分解能は低くなる.

各 DHM の特徴を以下の表にまとめる.

表 2.1 DHM の光学型

	インライン型	位相シフト型	オフアクシス型
概要	物体光路を計測	参照光を数回シフト	参照光を傾けて計測
位相計測	可能 (繰返し計算要)	可能	可能
空間分解能	低	高	低
時間分解能	高	低	高

2.1.4 光学系概要

本研究で用いる DHM 装置 (UDHM-01, ウシオ電機株式会社) の概略図を図 2.3 に示す. 本 DHM 装置はオフアクシス型を採用している. 本研究での計測対象である自律振動ゲルの

振動周期は数分と比較的長い。しかし化学波の伝播速度は数十 $\mu\text{m/s}$ であり, 少なくとも 1fps 以上の計測速度が必要である。オフアクシス型は, 高速な撮影が可能で, 位相・強度の両方の定量的な情報を容易に記録・再生可能である。装置の基本的な要素は光源, 撮像素子, 対物レンズとフィルタから成る。

レーザから照射された光はビームスプリッタにより, 二つに分けられる。スペーシャルフィルタでノイズを取り除いた後, 一方は観察対象物を通る物体光, 他方は参照光として両方を干渉させた干渉縞を撮像素子に記録する。記録されたホログラム画像は計算機により三次元像を再生する。この DHM を用いて計測場中のトレーサ粒子の座標を三次元で検出し, マイクロスケールにおいて三次元変位計測を実現する。

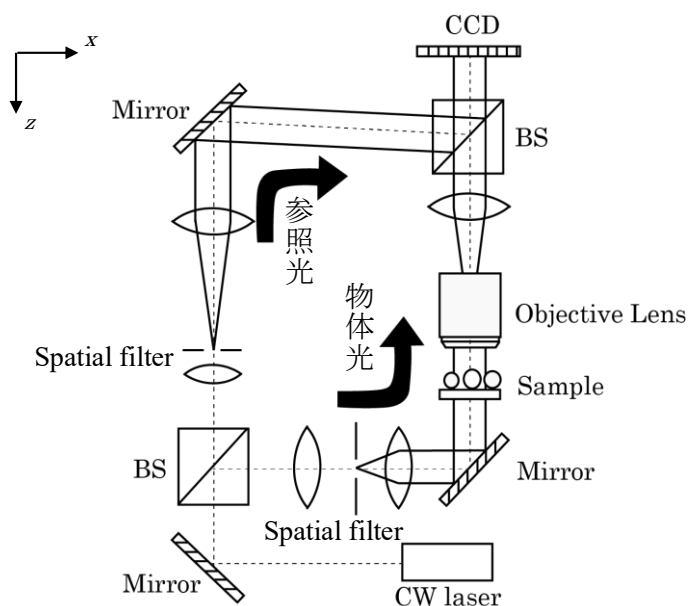


図 2.3 DHM 光学系概要

2.1.5 DHM 解像度

DHM では対物レンズにより拡大することにより, 微小領域の光場を記録できる。DHM の拡大率, 解像度について考察する。平面方向の空間解像度は対物レンズの開口数 (NA: Numerical Aperture) によって決定される。NA は光学系の明るさや解像力を示す値で, 以下で定義される。

$$NA = n \sin \theta \quad (2.3)$$

n は対象物と対物レンズの間の屈折率を示し, θ は対象物からレンズへと入射する光軸に対する最大角度である。平面方向の空間解像度 δx はレーリーの解像限界より,

$$\delta x = \kappa \frac{\lambda}{NA} \quad (2.4)$$

で表現される。λは波長で、円形レンズの強度分布より、κ = 0.61 である。光軸方向の空間解像度 δz は以下の式で示される (Kim, 2011)。

$$\delta z = \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (2.5)$$

2.1.6 ホログラム再生手法

記録されたホログラムの干渉縞画像から、数値計算により、位相・強度三次元像を再生する手法を説明する。まずフーリエ変換法により (Takeda et al., 1982) 0 次光や共役像の影響を取り除き複素振幅分布を得て、伝播式より任意の再生面Γ(ξ, η)上の像を得る。再構成における座標系を図 2.4 に示す。フレネル・キルヒホッフの解析理論よりホログラムに垂直に入射してきたとき、回折光は、

$$\Gamma(\xi', \eta') = \frac{i}{\lambda} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h(x, y) E_R(x, y) \frac{\exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda} \rho'\right)}{\rho'} dx dy \quad (2.6)$$

ここで、ρ' はホログラム上の点から再生像の距離であり、

$$\rho' = \sqrt{(x - \xi')^2 + (y - \eta')^2 + d^2} \quad (2.7)$$

と表される。h(x, y) はホログラムパターン、E_R(x, y) は参照光、λは波長を表す。上式で得られる実像は歪められるため (Schnars & Jueptner, 2005) 実際の再生には参照光の共役波 E_R^{*}を用い、次式のようになる。

$$\Gamma(\xi, \eta) = \frac{i}{\lambda} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h(x, y) E_R^*(x, y) \frac{\exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda} \rho\right)}{\rho} dx dy \quad (2.8)$$

$$\rho = \sqrt{(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2 + d^2} \quad (2.9)$$

ここで、

$$g(\xi, \eta, x, y) = \frac{i}{\lambda} \frac{\exp\left[-i \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{d^2 + (x - \xi)^2 + (y - \eta)^2}\right]}{\sqrt{d^2 + (x - \xi)^2 + (y - \eta)^2}} \quad (2.10)$$

とすると,

$$\Gamma(\xi, \eta) = \frac{i}{\lambda} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h(x, y) E_R^*(x, y) g(\xi, \eta, x, y) dx dy \quad (2.11)$$

であり,

$$g(\xi, \eta, x, y) = g(\xi - x, \eta - y) \quad (2.12)$$

とおいても空間不変である。ここで、フレネル回折積分をホログラムのデータとフレネル回折の自由空間伝播カーネルとの畳み込み積分とみることができ、さらに、convolution theorem から,

$$\Gamma(\xi, \eta) = F^{-1}\left(F\left(h(x, y) \cdot E_R^*(x, y)\right)F\left(g(\xi, \eta, x, y)\right)\right) \quad (2.13)$$

を得ることができる。Fはフーリエ変換を表す。すなわち数値的には、フーリエ変換を二回試行することで再生像を算出することができる。得られた光場から位相、強度を計算する。高速化のため再生計算にはGPU (Graphic Processing Unit, Quadro k5200, NVIDIA)を用いた。

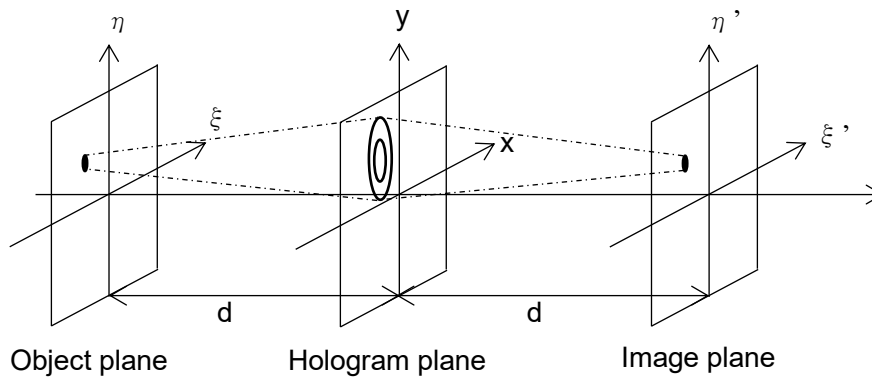


図 2.4 ホログラフィ再生における座標構成

2.2 先行研究 : DHM による粒子検出・追跡

本研究では DHM により粒子位置を三次元で検出・追跡することで、物体の形状変化・変

位を計測する。したがって粒子の位置を三次元で精度よく検出できることが、変位の計測精度に大きく関与してくる。デジタルホログラフィ (DH) による粒子検出の先行研究を紹介する。

2.2.1 強度最大・最小値を用いた粒子位置検出

DHM による粒子の三次元位置検出の研究は多く行われている。その中でも再生強度画像を利用する手法が一般的に多く用いられてきた。これは構成の簡便さから、よく使われているインライン型の DHM では、再生強度像を取得するのが容易であり、位相像を定量的に再生するためには手間がかかるためである。

まずは、強度の最大・最小値を計算することで粒子を検出する手法の先行研究を紹介する。Murata ら (2000) は数値計算から強度情報により粒子位置検出ができる可能性を示した。Yang ら (2005) はデジタルフィルタを適用しより精度が高い粒子検出法を提案した。Xu ら (2002) は lensless カメラを用い、レーザを絞ることで直径 $5.13\mu\text{m}$ 粒子の鮮明な強度画像を背景画像の抜き出し等を駆使して撮影した。Satake ら (2005) は強度の最大値から粒子を検出し、検出・追跡することで流れの速度を計測した。Verpillat ら (2011) は径 100nm のアガロースゲル内に埋め込まれた金粒子を撮影し強度画像分布からピーク値から粒子位置を検出した。しかしながら、デジタルホログラフィでは再生像が奥行方向に伸びるため、強度値の最大・最小値による検出のみでは十分な精度を得ることができない。

2.2.2 複素振幅を用いた粒子検出

Pan ら (2003) は再生された複素振幅を基に粒子検出を行った。実像の波面は焦点面で実数になるため複素部の分散は 0 になる。一方焦点面から離れると実像波面の複素部が現れるため、分散は 0 でなくなる。これを利用して分散の最小値を粒子位置とする。この手法を用い $10\mu\text{m}$ の粒子を撮影し、奥行方向の精度が強度像を用いた粒子検出手法よりも改善することを示した。

2.2.3 focusing function による粒子検出

粒子の検出において平面方向には強度の最大値等で十分な精度を実現できるが、奥行方向の精度に難があった。そこで、単純な最大・最小値ではなく、鮮鋭度など様々な function が提案されてきた。Langehanenberg ら (2008) は gradient, laplacian, variance, spec を focus function として強度像だけでなく位相像に採用し、細胞を検出した。Choi ら (2009) は同様の

関数を用いて円管中の赤血球の速度を測定した．Toy (2012) らは細胞の検出のために *focusing function* を位相に対して適用した．*gradient, laplacian, variance, spec* は以下の式で示される．

$$\text{GRA}(x,y) = \sum_i^m \sum_j^n \sqrt{(I(i,j) - I(i-1,j))^2 + (I(i,j) - I(i,j-1))^2} \quad (2.14)$$

$$\text{LAP}(x,y) = \sum_i^m \sum_j^n (I(i+1,j) + I(i-1,j) + I(i,j+1) + I(i,j-1) - 4I(i,j))^2 \quad (2.15)$$

$$\text{VAR}(x,y) = \frac{1}{mn} \sum_i^m \sum_j^n (I(i,j) - \bar{I})^2 \quad (2.16)$$

$$\text{SPEC}(x,y) = \sum_i^m \sum_j^n \log(1 + F(I(i,j))) \quad (2.17)$$

I は画素の位相あるいは強度値， \bar{I} は $m \times n$ ピクセル領域における，位相あるいは強度値の平均値である． F はフーリエ変換によるバンドパスフィルタを示す．

これらの関数に加えて，Chen ら (2009) は *self-entropy* を算出することで粒子位置を検出し，Ren ら (2016) は粒子だけではなく，様々な三次元物体の深度マッピングができるアルゴリズムを開発した．また，Pitkäaho (2014) らは部分的コヒーレントな LED (*light-emitting diodes*) を光源に使用した上 *Tamura-coefficient* を *focus function* として径 $4 \mu\text{m}$ の latex ビーズの位置推定をした．*self-entropy* (ENTR), *Tamura-coefficient* (TC) は以下の式で表される．

$$\text{ENTR} = -\sum_k p_k \log(p_k) \quad (2.18)$$

$$\text{TC} = \sqrt{\frac{\sqrt{\text{VAR}}}{\bar{I}}} \quad (2.19)$$

P_k はデータ値の確率密度関数である．Mohammed (2017) らはこれらの手法に加えて，全部で 13 種の *focus function* による粒子からの距離による値を比較し，位相・強度それぞれで検証した．また，*focus function* と別の手法とを組み合わせたアルゴリズムも開発されている (Guildenbecher et al., 2013)．

2.2.4 相互相関法による粒子検出

相互相関は二つの信号の類似性を示す手法である．ホログラフィにおける粒子検出では，粒子像の伝播の性質を生かした相互相関，シミュレーションによる粒子像を基にした相互

相関が知られている。

前者では Yang ら (2011) が、粒子の波動は再生時に粒子位置を中心に対称になることを利用して、ある位置の粒子像ともっとも類似している点までの距離の半分を粒子位置として検出する手法を開発した。水中の流れ場の径 $50\ \mu\text{m}$ の粒子を計測して、精度を検証した。

後者では Ooms ら (2006) は参照像として、数値計算で得られた三次元強度像を用い、類似度ピーク位置を検出することで粒子位置を三次元で特定する手法を開発した。彼らは光学系にも工夫を加え、光学フィルタを挿入することで粒子の像が伸びる原因となる開口数 (Numerical Aperture: NA) の更なる低下を防ぐシステムの検証を行った。Hesseling (2018) らは相互相関の参照ボリュームに改良を加えた。デジタルホログラフィでは記録像の端付近は再生のための情報が少なくなるため、粒子像が歪むことが知られている (Gire et al., 2008)。Hesseling らは粒子の平面位置により参照ボリュームを変えた相互相関を試み、さらに粒子検出・追跡のために複数時刻の実ボリュームデータを参照するアルゴリズムを開発した。しかし、彼らの施行した DHM インライン光学系では画質が悪く十分な粒子検出の精度検証ができていなかった。

以上の DHM による粒子検出手法に関する研究を表 2.2 にまとめる。

表 2.2 デジタルホログラフィック顕微鏡による粒子検出手法先行研究

	粒子径	粒子素材	光学形式	周囲流体	検出手法
Xu et al.	$5.13\ \mu\text{m}$	latex	in-line	air	強度最大値
Verpillat et al.	100nm	gold	off-axis	water, gel	強度最大値
Pan et al.	$10\ \mu\text{m}$	polymer	in-line	air	複素振幅 強度
Sheng et al.	3.189, 0.75 μm	polystyrene	in-line	蒸留水	(segmentation method)
Choi et al.	$8\ \mu\text{m}$	RBC	in-line	liquid	focus function
Lee et al.	1, 30 μm	polystyrene	in-line	air	focus function
Guildenbecher et al.	$465\ \mu\text{m}$	polystyrene	in-line	silicon oil	強度最小値と最大エッジ鮮鋭度
Seo et al.	$15\ \mu\text{m}$	polystyrene	in-line		強度最大値と focus function の相関値
Mohammed et al.	$150\ \mu\text{m}$		off-axis		focus function 13 種

Yang et al.	50 μ m	polymer	in-line	water	Correlation coefficient
Ooms et al.	40–63 μ m		in-line	water	Correlation coefficient
Hesseling et al.	8.7 μ m	polystyrene	in-line	water	Correlation coefficient

2.3 DHM 粒子検出・追跡アルゴリズム

本研究では粒子の三次元位置検出・追跡精度向上のために、理論から算出した粒子波動の二次元テンプレートマッチングと実再生像を利用した三次元テンプレートマッチングを組み合わせたアルゴリズムを使用する。図 2.5 に粒子検出・追跡手順の概要チャート図を示す。最初に透過率が高い粒子にコヒーレントなレーザを照射し、物体光と参照光とを干渉させた干渉波を撮像素子にホログラム画像として記録する。記録したホログラムから前節での再生式により、回折計算等で三次元光場、ここでは位相場を再生する。

まずは粒子位置を検出するための参照二次元データを算出する。再生三次元像から参照データと類似している箇所を検出し、粒子の初期位置とする。続いて、粒子追跡のために初期位置の実再生像データを参照ボリュームとして設定しなおし、次時刻の粒子位置を追跡する。本節では三次元位相像から粒子位置を検出するアルゴリズムの詳細を説明する。

2.3.1 位相像

前節で紹介したように、従来の DHM による粒子検出では強度画像が多く使われてきた。これは DHM でよく使われるインライン型では直接には強度情報しか得ることが出来ず、位相情報を得るためには、繰り返し計算が必要なことが要因のひとつとして挙げられる。今回使用する DHM はオフアクシス型であり、強度だけでなく位相の情報を容易に取得することができる。位相情報が強度情報より優れている点が大きく二つある。1つはレーザ光の変動に強いことである。すなわちレーザ光の強度が低くても位相場に影響は与えないということである。高速度での粒子追跡では高出力照明が必要で、高エネルギーの照明が物性や流れ場の変化を引き起こしてしまう可能性があった。位相を用いる手法ではより低い照度での実験が可能である。もう1つは、情報量が強度より多いことである。粒子の強度分布と異なり、位相分布では粒子の形状に応じて各画素の位相値が決まる。そのため、細かい再生像の変動を粒子検出において評価できるという利点がある。

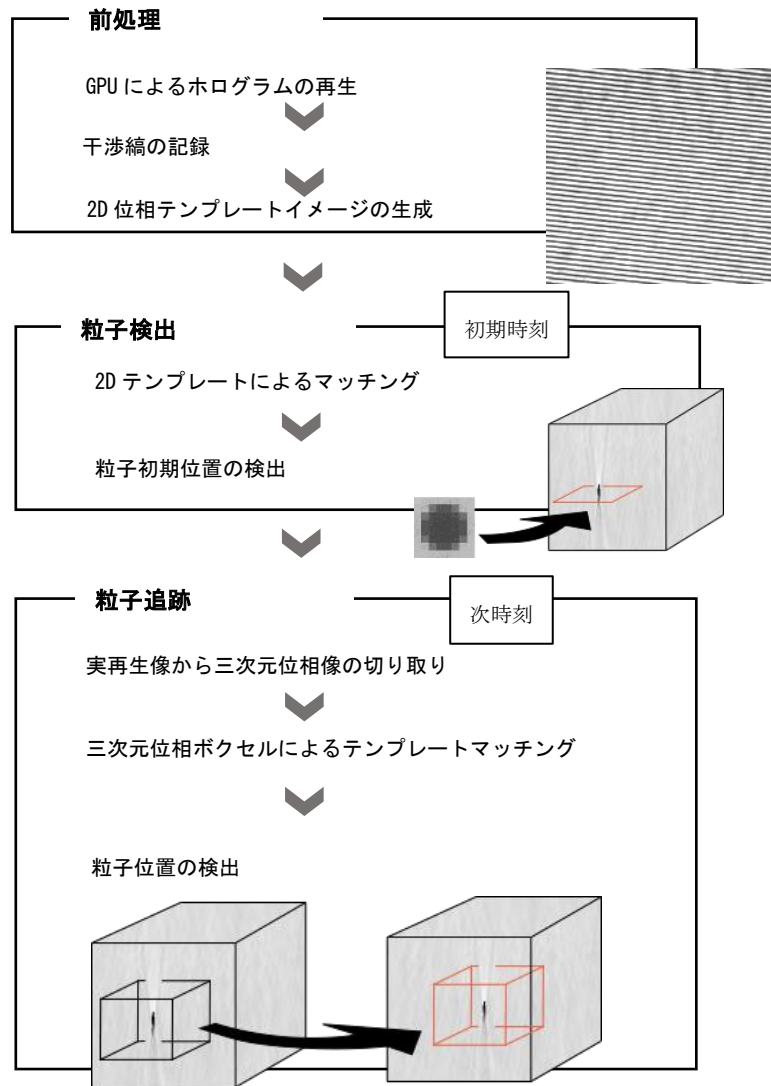


図 2.5 再生像による粒子検出・追跡アルゴリズム

2.3.2 二次元位相理論波面による粒子検出アルゴリズム

図 2.6 に理論的に算出された波面データから三次元像中の粒子位置を検出するアルゴリズムの詳細を示す。検出の手法としてテンプレートマッチング法を利用する。テンプレートマッチング法はあらかじめ準備した形状および画像と、対応する画像との画素間を評価することで、形状がどこにあるか目的の位置を検出する手法である。粒子の初期位置の検出のために粒子の位相波面パターンをテンプレートとして使用する。レーザからの光は位相がそろった波面である。しかし、粒子をレーザ光が通過した際、粒子内と粒子外では屈折率が異なるため、伝播速度の差から、位相波面は図 2.6 (a)のようにゆがめられて伝播し

ていく。この歪められた粒子直上の波面を検出することで粒子位置を三次元で特定する。粒子直上の波面は粒子径と屈折率差が既知の場合算出が可能である。算出した xy 平面内の位相波面を二次元テンプレートとする。そしてパターンマッチングにより再生位相画像との類似度をボクセル各点で計算し、ピーク値となる位置を粒子位置座標とする。

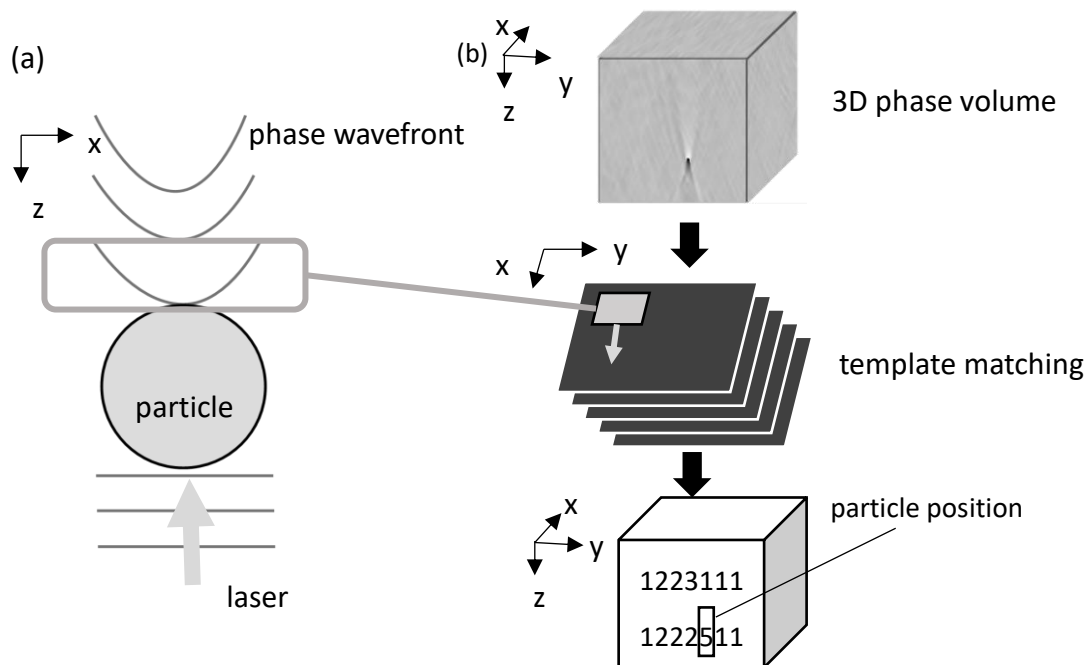


図 2.6 (a)粒子を通過する位相波面の伝播イメージ, (b)理論テンプレートによる粒子検出手順

2.3.3 理論波面歪みの導出

パターンマッチングを行う際、テンプレート波面が必要になる。粒子直上の xy 二次元テンプレート波面を算出する。粒子と周囲場の屈折率が違うため理論値では図 2.7(a)のように半球状に歪む。この球面を屈折率差とトレーサ粒子径から計算すると、波面の分布 $R(x, y)$ は $R(x, y) = P(x, y)\Delta n$ で表される。ここで、 $P(x, y)$ は粒子の形状、 Δn は粒子と周囲場の屈折率差である。今回の粒子検出では図 2.7(b)をテンプレートとして類似度の計算を行う。

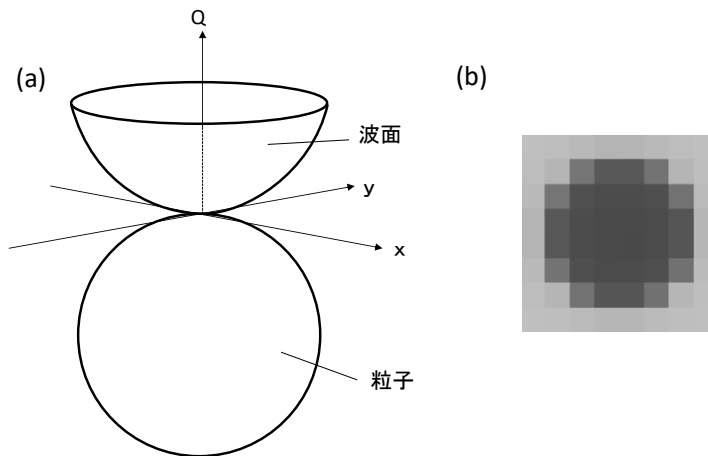


図 2.7 (a)粒子通過による位相波面の変化, (b)理論テンプレート

2.3.4 パターンマッチング関数

テンプレートマッチング法を用いる際のテンプレートと位相画像との類似度, 相関値を計算する関数は複数提案されており, 用途に応じて使い分けるのが望ましい. 図 2.8 に被探索画像とテンプレート画像との関係イメージを示す. T はテンプレート画像, P は被探索画像である再生位相像, m はテンプレート画像サイズを示す. 本節では相関値を求める関数として CC, NCC, ZNCC, SAD, ZSAD の 5 つについて式を交えて説明する.

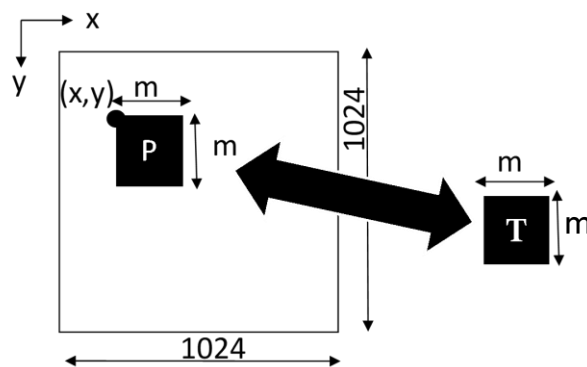


図 2.8 テンプレートマッチング概略図

マッチング関数の概説

・ CC (Cross Correlation)法

CC 法は相互相関マッチングと呼ばれ,

$$CC(x, y) = \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{m-1} P(x+i, y+j)T(i, j) \quad (2.20)$$

と表すことができる. m はテンプレート画像のサイズ, P は再生位相像, T はテンプレート

波面画像を表す。簡便で高速フーリエ変換で計算が可能のため、計算時間が短くできるという利点がある。輝度値が高いと相関値が高くなる傾向があるため通常では使用は難しいが、エッジの検出などでは有効である。

• **NCC (Normalized Cross Correlation) 法 (正規化相互相関マッチング)**

NCC マッチングは

$$NCC(x, y) = \frac{\sum_i^{m-1} \sum_j^{m-1} P(x+i, y+j)T(i, j)}{\sqrt{\sum_i^{m-1} \sum_j^{m-1} P(x+i, y+j)^2 \sum_i^{m-1} \sum_j^{m-1} T(i, j)^2}} \quad (2.21)$$

と表すことができる。それぞれの変数は CC 法と同じである。正規化されているため、相関値が-1 から 1 の間に収まる。入力画像輝度値の定数倍変動に対して不変といった特徴を持つ。

• **ZNCC (Zero-mean Normalized Cross-Correlation) 法**

ZNCC は CC に対して正規化し、ゼロ平均化した相関関数である。テンプレートの輝度平均値を引いて計算することで、画像輝度値の定数倍やオフセット変動に不変な類似度計算が可能である。すなわち入力画像輝度値の一次変換に不変な相関関数である。ZNCC は

$$ZNCC(x, y) = \frac{\sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{m-1} (P(x+i, y+j) - \bar{P})(T(i, j) - \bar{T})}{\sqrt{\sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{m-1} (P(x+i, y+j) - \bar{P})^2} \sqrt{\sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{m-1} (T(x+i, y+j) - \bar{T})^2}} \quad (2.22)$$

と表すことができる。 \bar{P} は類似度を計算する範囲内の再生画像の位相平均、 \bar{T} はテンプレート波面画像の位相平均を表す。計算量が多くなる欠点があるが、高速フーリエ変換を用いることで高速化が可能である。

• **SAD (Sum of Absolute Difference) 法**

SAD 法は同じ位置の画素の輝度値の差の絶対値の合計を表し

$$sad(x, y) = \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{m-1} |P(x+i, y+j) - T(i, j)| \quad (2.23)$$

で表すことができる。これまでの相関値関数と異なり相違度を表すため、似ているほど値は

小さくなり、完全に一意している場合は0になる。比較的計算量が少なくすむという利点がある。

• **ZSAD (Zero-mean Sum of Absolute Difference) 法**

ZSAD 法は

$$zsad(x, y) = \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{m-1} |(P(x+i, y+j) - \bar{P}) - (T(i, j) - \bar{T})| \quad (2.24)$$

表すことができる。ZSAD 法は SAD 法に対してゼロ平均化した関数で、入力画像輝度値のオフセット変化に不変という特徴を持つ。SAD 法と同じく相違度を表す。

以上の5つの手法を用いて三次元粒子位置検出を行い、DHMによる粒子検出に最も適切なものを選定する。5つの関数式及び特徴を表 2.3 にまとめる。

表 2.3 パターンマッチング関数まとめ

CC	SAD	特徴
$cc = \sum PT$	$sad = \sum P - T $	定数倍変動に不変
$ncc = \frac{\sum PT}{\sqrt{\sum P^2 \sum T^2}}$	$zsad = \sum (P - \bar{P}) - (T - \bar{T}) $	オフセット変動に不変
$zncc = \frac{\sum (P - \bar{P})(T - \bar{T})}{\sqrt{\sum P^2 \sum T^2}}$		定数倍変動に不変 オフセット変化不変

2.3.5 サブピクセル解析

デジタル画像上で輝度値のパターンを走査する際、標本化のため画素単位でしか粒子位置を決定することができない。サブピクセル処理は画素サイズよりも1桁小さな値の精度で粒子位置を検出する解析手法である。

図 2.9 のように相関値のピーク値の両側の値が異なる場合、本来のピーク値は2番目に高い箇所 (x=i+1) 寄りになるはずだが、標本化のため実際のピークとずれた位置がピーク値となる。これを修正するために、ピーク値を含めた3点に、ガウス分布や二次曲線を当てはめ、重心を計算することでより小さな桁でのピーク位置を算出する。ガウス分布、二次曲

線, 重心によるサブピクセル移動量 P は相関値 R を用いて次のように表すことができる.

$$\text{ガウス分布 } P = i - \frac{1}{2} \frac{\ln R_{i+1} - \ln R_{i-1}}{\ln R_{i+1} - 2 \ln R_i + \ln R_{i-1}} \quad (2.25)$$

$$\text{二次曲線 } P = i - \frac{1}{2} \frac{R_{i+1} - R_{i-1}}{R_{i+1} - 2R_i + R_{i-1}} \quad (2.26)$$

$$\text{重心 } P = \frac{(i+1)R_{i+1} + iR_i + (i-1)R_{i-1}}{R_{i+1} + R_i + R_{i-1}} \quad (2.27)$$

i は一次元座標を示す. 上述の式のうち本研究ではガウス分布によるフィッティングを用いて x, y, z それぞれの座標を求め, 0.1pixel の精度で粒子位置を検出する.

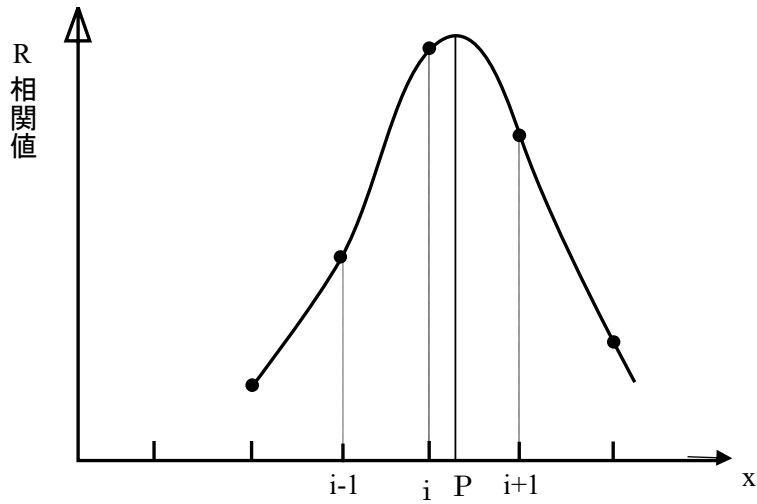


図 2.9 サブピクセル解析

第3章 粒子検出・追跡精度検証

3.1 トレーサ粒子の位置検出と類似度計算関数の選定

本粒子検出・追跡手法では「二次元理論テンプレートマッチングによる粒子検出」と「三次元実テンプレートによる粒子追跡」からなる。まずは、粒子検出において類似度算出指標として最適な関数を選定する。流体中のトレーサ粒子を撮影し、前節で紹介した複数のマッチング関数で位置検出を試行し精度を評価した。

3.1.1 計測条件

評価の指標としてグリセリン水中の静止トレーサ粒子を撮影した。図 3.1 に示されるように、断面 $100 \times 2000 \mu\text{m}$ の矩形流路に径 $2 \mu\text{m}$ のトレーサ粒子 (R0200, Thermo Fischer Scientific) を静止状態にあるグリセリン水に混入した。粒子が浮遊した状態で安定するのを待ち、計測領域中の 58 個の粒子を 290fps で 50 フレーム撮影した。光源には波長 632.8nm の He-Ne レーザを使用し、画素数 $1024 \times 1024 \text{px}$ の CMOS で撮影した。対物レンズの倍率は 20 倍、NA は 0.42 (MITUTOYO) である。グリセリン水の濃度は 20.6% で屈折率は 1.36 である。グリセリン水の濃度は粒子の沈降・上昇を防ぐため、トレーサ粒子の密度 1.05g/cm^3 に合わせるように調整した。トレーサ粒子の屈折率は 1.59 である。また、計測面積は $171.6 \times 171.6 \mu\text{m}$ である。

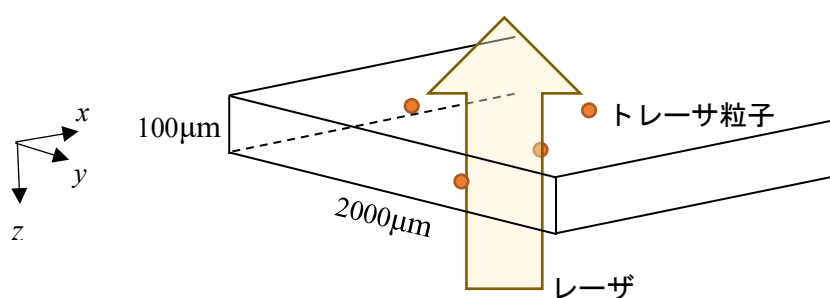


図 3.1 水中粒子計測条件図

3.1.2 ブラウン運動

計測領域がマイクロサイズであるため、場の測定のためには、さらに小さな、数マイクロサイズのトレーサ粒子を使用することになる。本節では流体中の粒子検出により精度検証を行うが、この時、粒子が不規則に運動するブラウン運動が粒子検出に与える影響を考慮する必要がある。

ブラウン運動は1827年にBrownが花粉から水中に流出した微粒子を顕微鏡で観察した際に発見された。ブラウン運動の原理はEinstein (1905)により分子運動論と結びつけて説明された。微粒子が水中あるいは空気中にある時、微粒子は周囲の媒質である水や空気の分子運動に影響されてブラウン運動を起こす。これは媒質の分子が微粒子に向かって衝突し衝撃を与えるためである。衝撃の大きさ、方向は衝突の仕方に影響される。微粒子が分子よりもずっと大きい場合、粒子は動かないが、粒子が十分小さければある瞬間では各方向からの衝撃は一樣ではないため、合力として一方向に衝撃を受けることになり、粒子はその方向に動く。次の瞬間では別の方向に動くことになるため、粒子は不規則な経路を描いて運動する。

個々の粒子から流体速度を計算する粒子追跡法ではトレーサ粒子の位置が直接速度場の精度に影響するため、粒子径によってはブラウン運動が大きな誤差要因になる。ストークス・アインシュタインの式では半径 r の粒子が時間 t の間に任意の方向へ移動する平均移動距離 X の二乗平均は

$$X^2 = 2Dt = \frac{k_B T t}{3\pi\mu r} \quad (3.1)$$

と表すことができる。ここで D は拡散係数で、

$$D = \beta k_B T = \frac{k_B T}{6\pi\mu r} \quad (3.2)$$

と示される。 $k_B (=1.380658 \times 10^{-23} [\text{J/K}])$ はボルツマン係数、 T は温度、 μ は粘性係数を示す。本研究では径 $2\mu\text{m}$ のトレーサ粒子を用いて最大 $1/100\text{s}$ 間で粒子追跡の精度検証を行う。式より径 $2\mu\text{m}$ のブラウン運動の移動距離は $0.073\mu\text{m}$ となり速度換算で $7.3\mu\text{m/s}$ である。この値は xy 面内方向では 0.3px 程度に相当し、サブピクセル処理の精度と合わせても影響は小さいが、無視できる大きさではないため考慮が必要である。

3.1.3 撮影・再生結果

撮影したホログラム画像を図3.2(a)に示す。物体光と参照光の干渉による干渉縞が縦方向に入っている様子が見てとれる。また図3.2(b), (c)にこのホログラム画像の再生三次元像の xy 断面図を強度、位相それぞれについて表した。 xy 方向の解像度は $0.275\mu\text{m}/\text{pix}$ であり、 z 方向のピッチサイズを $0.6875\mu\text{m}$ として290スライス再生した。円形の波形が粒子を表している。画像の輝度が高いほど強度や位相は大きくなることを示す。波面は粒子を通過すると伝播して大きくなり、ピント位置付近で小さくなる。

本節での精度検証では図3.2(c)の位相画像を用いる。粒子位相再生像における断面図の

奥行き方向変化を図 3.3 に載せる. $z=0$ の画像が粒子直上波面と考えられる. 各画像は $z = 6.875\mu\text{m}$ ずつずらしたときの xy 断面像である. レーザは z 方向正から負へと伝播する. さらに図 3.3(右) に粒子位相波面の xz 断面図を示す. 位相波面が黒から白へと変化するの波面が伝播により下に凸から上に凸の波面へと変化するためである. また, 本来粒子より下には位相差がないのにも関わらず, 再生波面が粒子焦点位置を中心に対称になっているのは, 再生計算の際は粒子の存在を考慮していないためである.

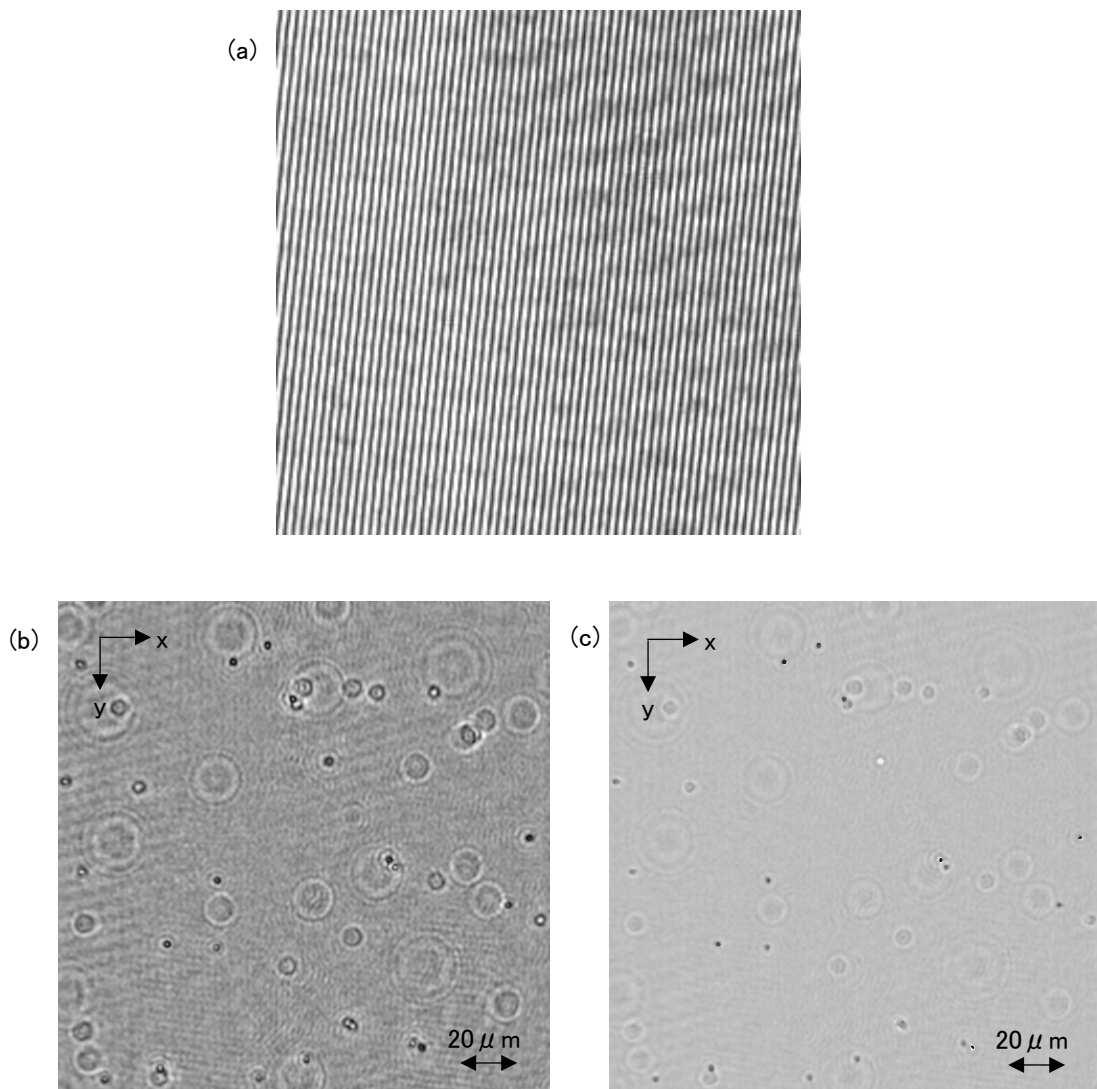


図 3.2 (a): 記録ホログラム. (b): 再生粒子強度像. (c): 再生粒子位相像

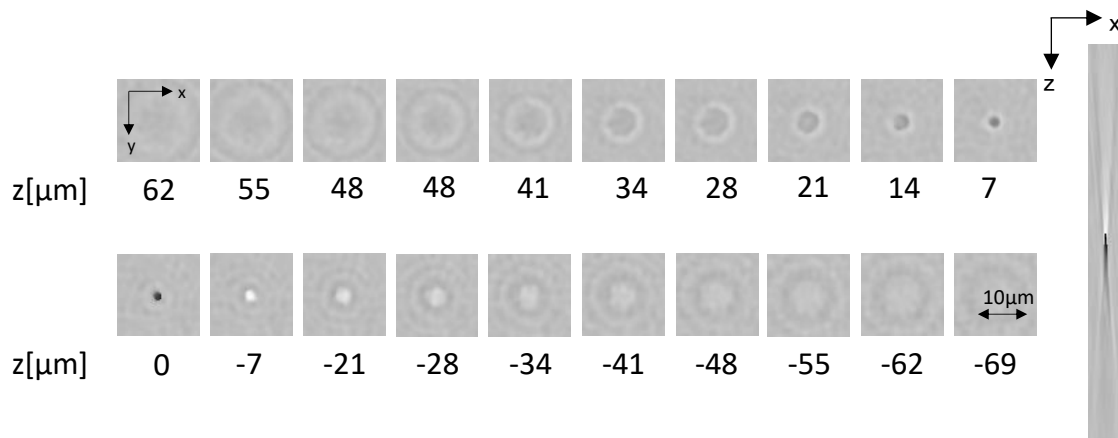


図 3.3 再生粒子位相像の伝播と x-z 断面図

3.1.4 背景ノイズ影響調査

静止した流体中の粒子でも時系列で検出位置が変化する。検出位置が変化する理由にはブラウン運動等の振動に加え背景ノイズの影響が考えられる。背景ノイズの原因としてレーザーがコヒーレントであることからコントラストの違いが生じるスペックルノイズ等が考えられる。

背景ノイズの影響を調査するため、粒子がない強度、位相の領域を 100 px 四方で切り取った。それぞれの値の 10frame での時間変動を比較した。図 3.4 に各画素値の時系列のばらつきを標準偏差 (standard deviation, SD) でプロットした。

強度、位相値は 0-255 で正規化している。図に示されるように、強度のばらつき、すなわち、時間変動が位相より大きい。領域内平均標準偏差は強度 : 0.99, 位相 : 0.34 と強度象が位相の約 3 倍である。この理由として、強度はレーザー強度の変動に大きく影響されるためと考えられる。すなわち位相像のほうが背景像のノイズが少ないことが分かった。

さらに今度は粒子波面の変動を詳しく調べる。図 3.5 にグリセリン水中の静止している同じ粒子像のある断面の位相、強度値の 10frame での SD 値をプロットした。位相、強度像ともに粒子の縁付近で SD 値が大きく、変動している様子が見られる。粒子の像は半球形状で、縁付近では形状の変化が大きい。しかしながら径 $2\mu\text{m}$ の粒子の場合、傾斜部は 1-2px の解像度しかなく少量の粒子の動きが位相値の変化に大きく影響すると考えられる。強度では全体的にばらつきが大きい位相の場合はばらつきが特段大きい箇所が、粒子縁付近に集中している。

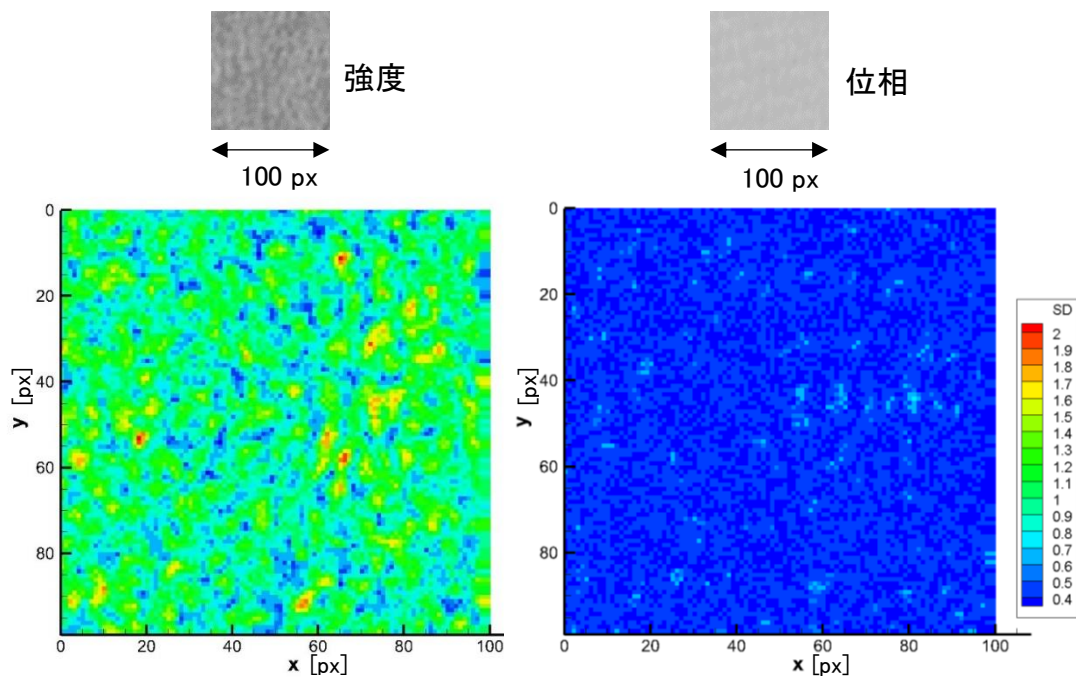


図 3.4 位相・強度像の背景ノイズのばらつきの大きさ

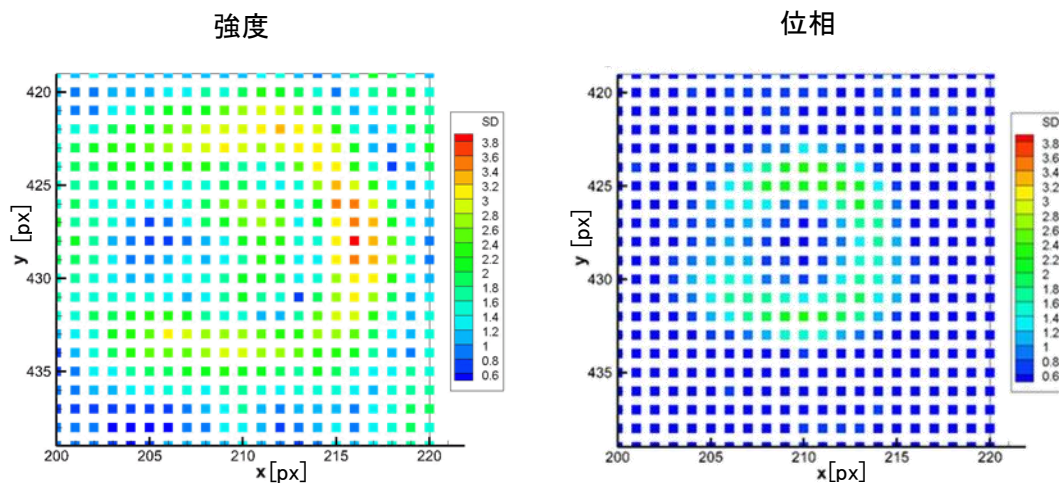


図 3.5 粒子像における位相・強度値の時間変化におけるばらつきの大きさ

図 3.6 は各断面強度および位相の SD 値を箱ひげ図で示したものである。箱ひげ図は図 3.6(右上)で示すように、最小値、第 1 四分位数、中央値、第 3 四分位数、最大値をボックスと線によって示す。各断面のばらつきにおいて、位相においては強度と比べて第 1 四分位数、中央値、第 3 四分位数は低い、最大値は極端に高く、中央値の 200 倍以上にも達す

る. 位相の SD 値の最大値が大きくなった原因は位相飛びであると考えられる. 位相は $0-2\pi$ の範囲でしか表せず, 2π を超えた場合 0 に再帰する. いわゆる位相飛びが発生したため, 縁付近で大きな位相変化になったと考えられる.

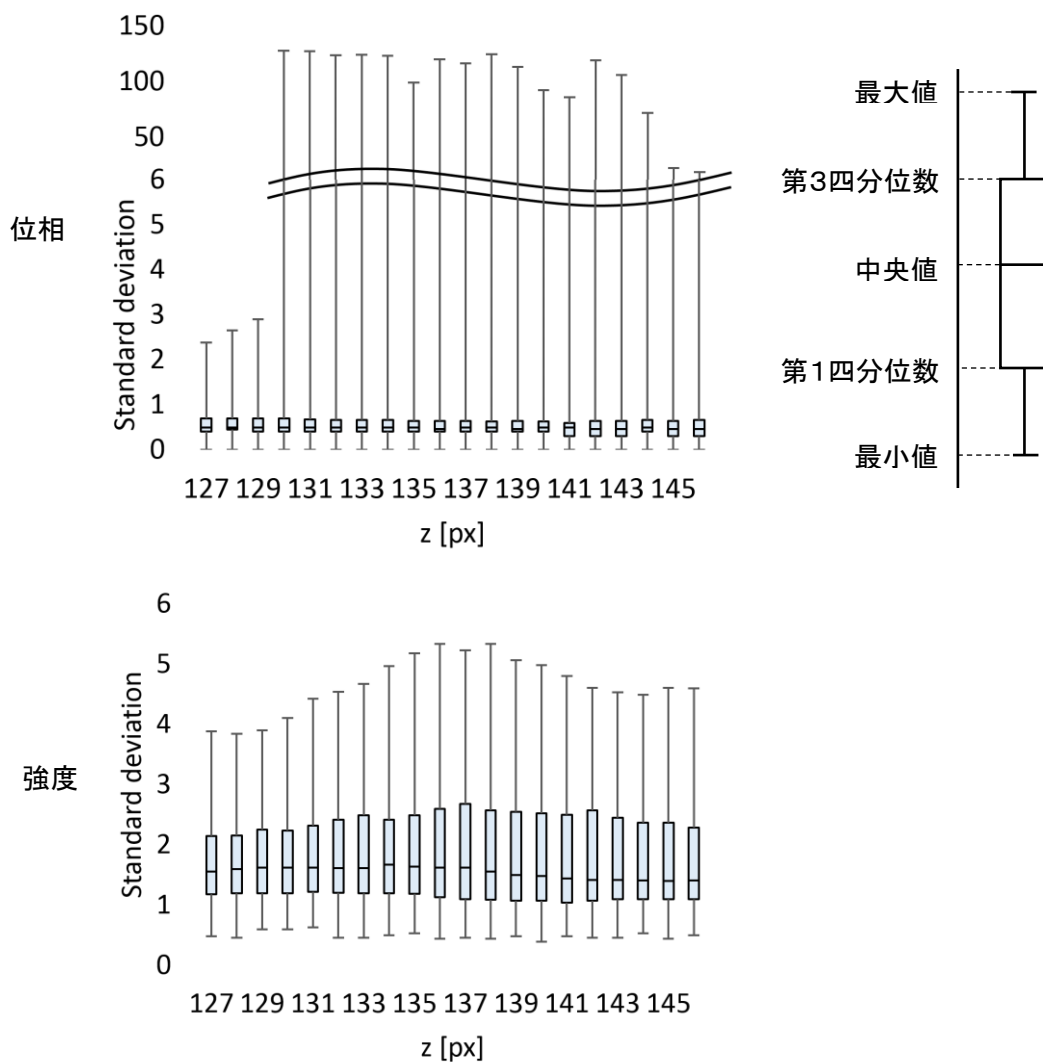


図 3.6 z 断面における粒子像のばらつき変化

3.1.5 マッチング関数比較結果

粒子検出精度検証のために, 静止した粒子の三次元像から粒子位置検出を行い, 偶然誤差を評価する. テンプレートマッチング関数として, 上節で紹介した CC, NCC, ZNCC, SAD, ZSAD でそれぞれ位置検出, 比較し, DHM による粒子検出において適切な関数を選出する. テンプレートサイズは 8×8 px である. 粒子位置の偶然誤差 S は標準偏差,

$$S^2 = \sum_{j=1}^T \frac{(x_j - \bar{x})^2}{T} \quad (3.3)$$

で表す. x_j はある時刻での粒子位置, \bar{x} は 50 フレームでの粒子位置平均, T はフレーム数 50 を示す. 1frame は 1/290s に値する.

本節では粒子検出の精度検証のため, 二次元理論テンプレートでの粒子検出を繰り返して評価する. 各粒子で 50 フレーム分粒子検出を行い, 粒子位置の偶然誤差を計算し, 平均を取った. 各関数における偶然誤差, 及び検出粒子個数を表 3.1 にまとめる. S_x , S_y , S_z はそれぞれ x , y , z 方向の偶然誤差を示す. S_x , S_y については小数点第四桁, S_z は小数点第三桁を四捨五入した.

表 3.1 各マッチング関数による粒子検出結果

	Averaged S_x [μm]	Averaged S_y [μm]	Averaged S_z [μm]	Particle number
CC	0.072	0.072	0.81	60
NCC	0.065	0.073	0.35	58
ZNCC	0.064	0.069	2.06	58
SAD	0.066	0.072	0.25	58
ZSAD	0.065	0.071	0.28	58

全体の傾向として面内 x , y 方向と比べ面外 z 方向の偶然誤差が少なくとも 4 倍以上と大きくなった. この原因として粒子の波面パターンの単純性が考えられる. 粒子によって歪められ伝搬していく波面は単純な凹形であり, 再生される位相場は図 3.7 のように似た凹形波面が連なった形である. パターンマッチングではこの凹形波面群の中から最もテンプレートと類似した波面を検出する. しかし, 奥行方向に似た波面が続き違いが少ない. そのため, ノイズ等の外乱による位相変化に比べて伝播による位相変化が小さく, z 方向の誤差が大きくなったと考えられる. これはグリセリン水中の粒子類似度分布, 図 3.8 にも表れている.

図 3.8 は粒子付近の類似度の分布を x 軸, z 軸方向にそれぞれプロットしたグラフであり, 原点が粒子直上を示す. 類似度分布導出には ZSAD 関数を用いた. 図の分布を見てわかるように x 方向において粒子付近の類似度分布は非常に急峻で, ピークがはっきりと捉え

られる。一方で、奥行き z 方向の類似度の傾きは平面 x 方向と比べて緩やかピークも x 方向と比べてはつきりしない。 z 方向の検出には粒子像の外乱が影響しやすく、 z 方向の精度が x, y 方向と比べて低くなる。

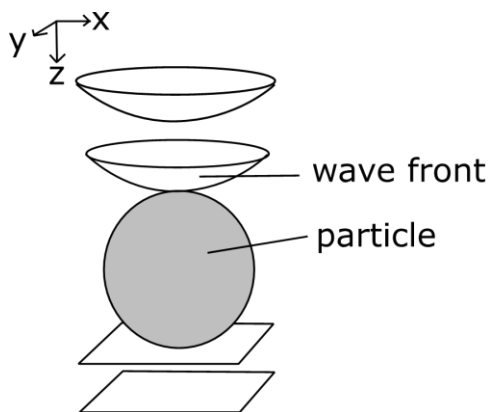


図 3.7 物体光波面伝播イメージ

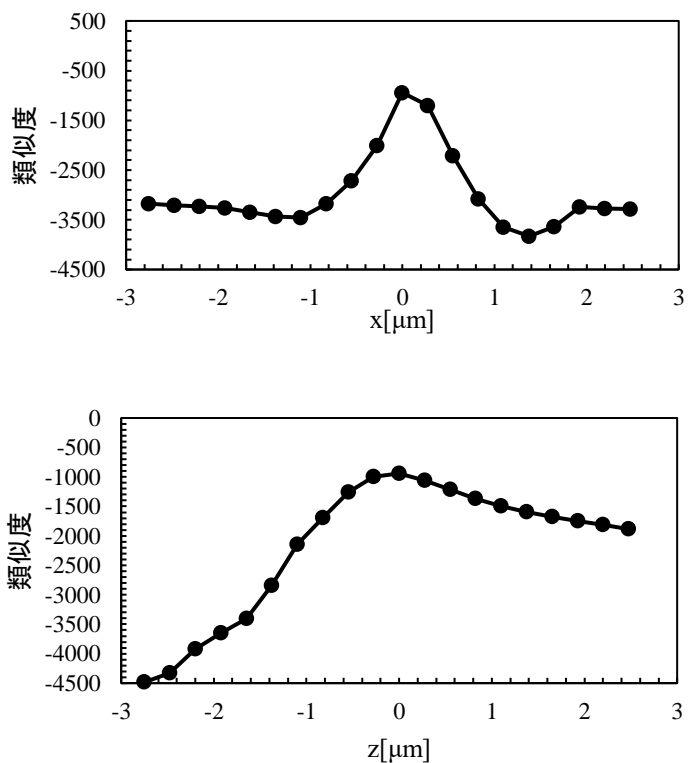
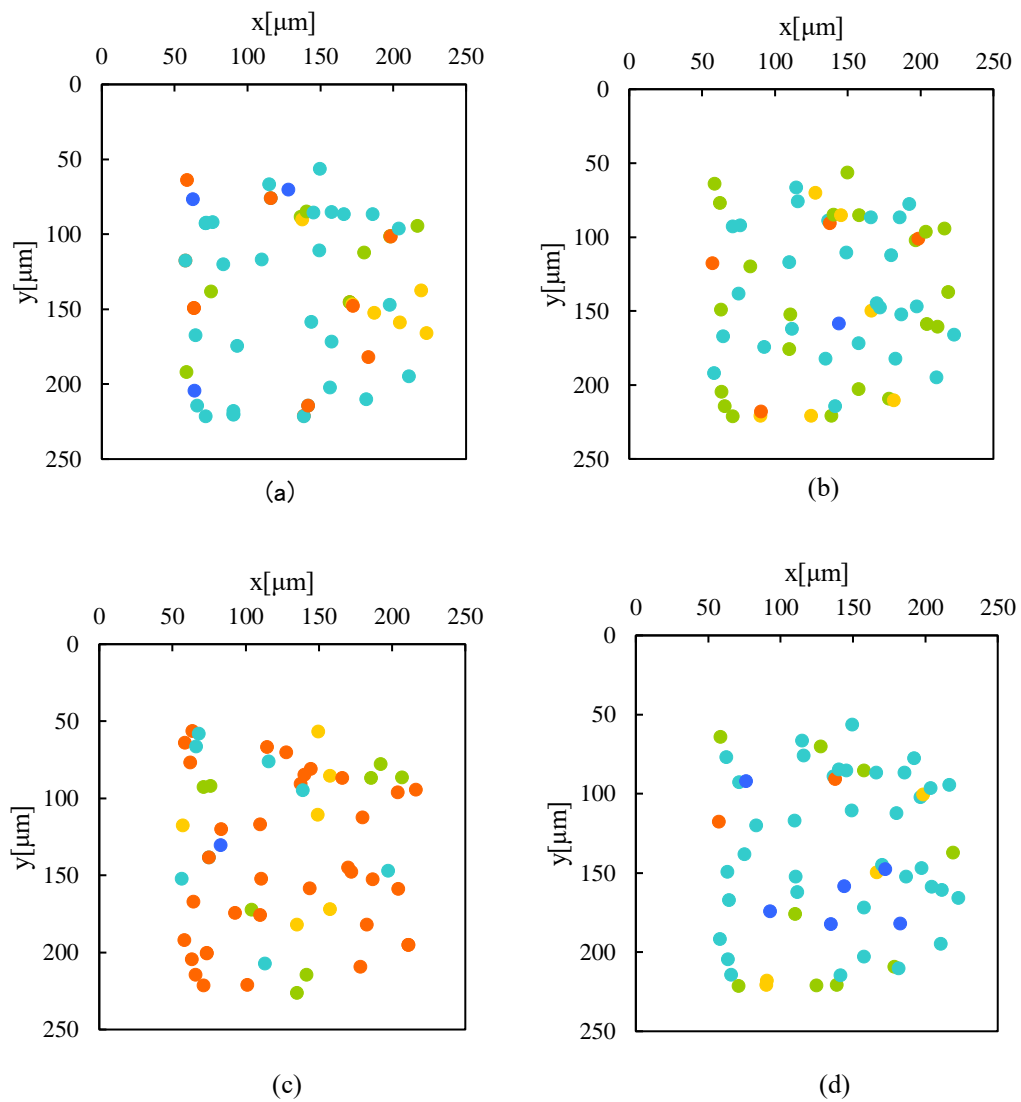


図 3.8 平面，奥行方向における ZSAD 関数による類似度分布の違い

各マッチング関数の比較を行う。表 3.1 に示すように、 x, y の平面方向の偶然誤差には大

きな差はなかったが、奥行き方向の検出に相違が見て取れる。詳細に検証するため、図 3.9 に検出された粒子を x, y 平面でプロットし、奥行き方向の位置の偶然誤差の値をカラーで示した。



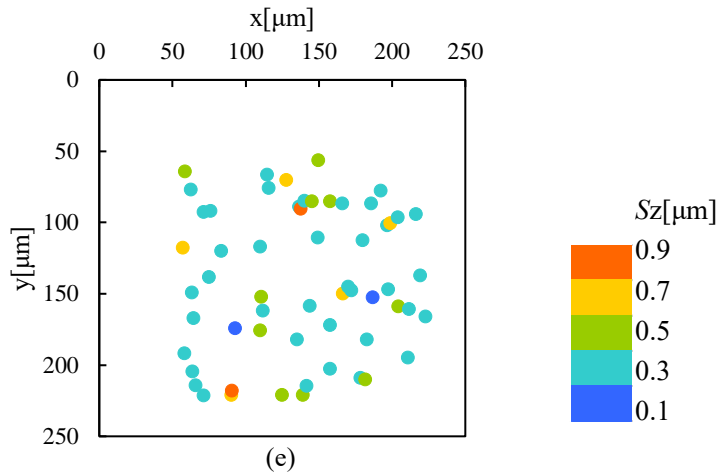


図 3.9 各マッチング関数 (a) CC, (b) NCC, (c) ZNCC, (d) SAD, (e) ZSAD による静止粒子検出結果. x, y 平面に検出された粒子をプロットし, 色は z 方向の偶然誤差を示す.

CC 法

CC 法では各粒子の S_x , S_y , S_z の平均値がそれぞれ 0.072 , 0.072 , $0.81\mu\text{m}$ と S_z の値が他の手法と比べて大きくなった. 図 3.9(a)に示すように, 粒子個数が一見他の手法と比べて少なく見えるのにもかかわらず実際の個数は 60 個とむしろ他の関数よりも多い. これは 1 つの粒子に対して複数の地点で類似度のピークが出てしまったためである. CC の特徴として輝度値が高い箇所の相関が高くなる点があり, 輝度の高い, すなわち白い部位の相関値が高くなり, 1 つの粒子付近で複数の箇所でも相関値が高くなった. そのため実際の波面とは全く関係ない位置で複数マッチングし, 精度が低くなったと考えられる.

図 3.10 はある 1 つの粒子の z 座標を 50 フレーム分プロットしたものである. グラフが示すように 1 フレーム毎に粒子の z 位置が $6\mu\text{m}$ 移動している箇所もある. 1 フレームの間隔は $1/290$ 秒であり実際の粒子がこの速さで移動することは考えにくく, 粒子を誤検出していると考えられる. 以上より CC 法を本再生像に対して粒子パターンマッチングとして使用するの適切ではない.

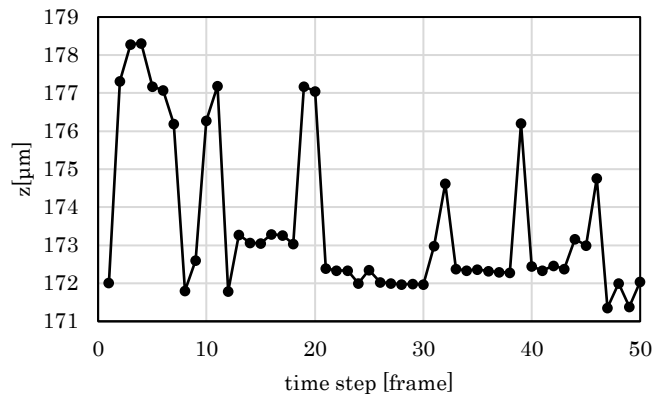


図 3.10 CC 法による粒子検出奥行位置の時系列変化

NCC 法

S_x , S_y , S_z の平均値がそれぞれ 0.065, 0.073, 0.35 μm と S_z の値が CC と比べて小さくなった。CC を正規化した効果で、輝度の高い箇所につきずられなくなったため粒子の波面を安定して検出できたためと考えられる。図 3.11 に奥行き z 座標と相関値の関係を示す。横軸は z 座標の再生ピッチごとにプロットしている。1pitch = 1.375 μm である。この時、図の丸で囲んだあたりがピーク値で粒子位置になるが、粒子でない箇所とピーク値との相関値の差が出ないという問題がある。さらに、検出の際には位相の折り返しを考慮する必要がある。NCC ではオフセット変動で相関値が変わるため注意が必要であるが、有効な手段の一つといえる。

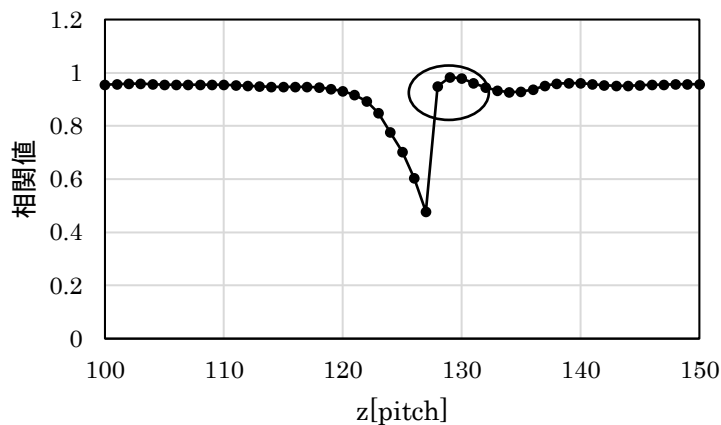


図 3.11 NCC 法による粒子検出時の z 方向相関値分布

ZNCC 法

ZNCC 法では S_x , S_y , S_z の平均値がそれぞれ 0.064, 0.069, 2.06 μm と、 S_z 平均値が CC 法や NCC 法に比べて大きくなり、精度が悪化した。図 3.9(c)をみても分かるように全体的に

偶然誤差が大きくなってしまっている上、粒子がない位置が粒子と判定されてしまった箇所が多数ある。ZNCC 法は一般的に CC や NCC に比べて安定した手法であるにも関わらず精度が悪化した理由として、ZNCC は画像を一次変換しても相関値が変化しないことが挙げられる。

粒子検出を行った際の相関値と奥行き座標の関係を図 3.12 に示す。粒子がある箇所は丸で囲んだ付近であるが、粒子が全くない位置にもピークが複数できてしまっており、正確な粒子検出が出来なかった。相関値のピークが粒子のない位置にも多く出てしまった理由として、粒子の位相変化が単純な凹波面であることが考えられる。ZNCC は高いロバスト性があるためこの単純な凹波面を一次変換した波面、ノイズによる小さな凹みでさえ一次変換して粒子凹型波面に近いと相関値が高くなってしまう。したがって ZNCC はこのパターンマッチングには適切ではないといえる。

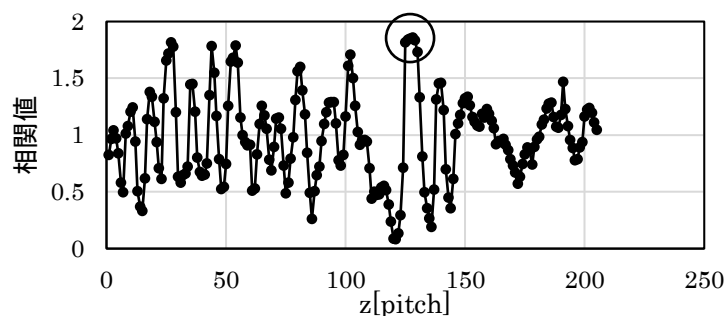


図 3.12 ZNCC 法による粒子検出時の z 方向相関値分布

SAD 法, ZSAD 法

SAD 法, ZSAD 法それぞれ Sz の値が 0.25, 0.28 μm と他の手法と比べて小さくなった。図 3.9 (d), (e)をみても分かるようにほとんどの粒子の誤差が 0.3 μm 以下と安定している。この二つの手法も有効な関数といえる。

以上 5 種類の関数によるマッチング結果を見てきたが、NCC, SAD, ZSAD 関数が安定した粒子検出結果を得ることができた。これら 3 つは z 方向の偶然誤差をサブピクセルオーダーに抑えることができています。本研究では位相画像を用いて検出を行っていくことを考慮し、オフセット変化に強い ZSAD 法を使用していくこととする。

3.1.6 静止トレーサ粒子検出率

前節では液中で検出された粒子がどの程度の精度で位置検出できているかを調査した。

続いて、粒子をどの程度の割合で検出できているかを調査する。グリセリン水中の径 $2\mu\text{m}$ の粒子を複数の粒子濃度環境で粒子位置検出し、二次元理論テンプレートマッチングによって検出できているかを検証した。矩形ガラス管中の粒子を 250fps、露光時間 $100\mu\text{s}$ で撮影した。解像度は平面方向に $0.25\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、奥行き方向に $0.5\mu\text{m}/\text{pitch}$ である。マッチング関数として ZSAD を用いた。

図 3.13 に結果を示す。粒子濃度は 0.007- 0.04vol% の五段階で調査し、粒子が正確に検出できているかどうかは位相再生画像と粒子検出位置を目視で確認した。グラフにおいて、true detection は正常に検出された粒子、missing は検出されなかった粒子、false detection は粒子ではないノイズを粒子として検出した数をそれぞれ割合で示した。検証した粒子濃度の範囲では、おおよそ 80% 程度の粒子を正常に検出できていることが分かった。検出できなかった粒子は 20% 近く存在しているが、位置検出されない粒子は空間解像度を減少させるものの誤差を増幅させるわけではないので大きな影響を与えない。しかし、誤検出された粒子は追跡の際の誤差要因となるため、注意が必要である。グラフを見てみると、粒子濃度が 0.02vol% 以上になると、誤検出率が 14% 以上と大きな値になっている。誤検出が少ない粒子検出を実施するためには、0.01vol% 以下の粒子濃度が適しているといえる。

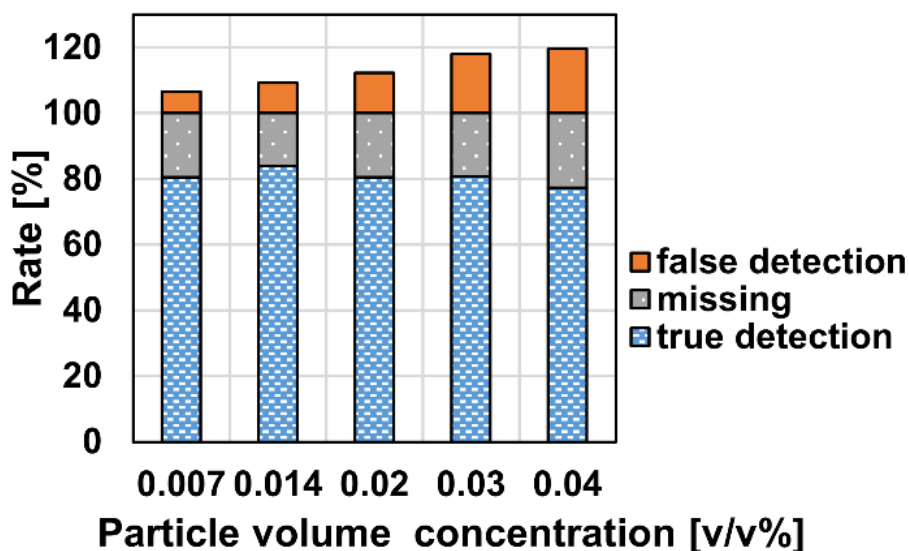


図 3.13 粒子濃度による粒子検出率の変化

3.1.7 空気中粒子位置検出

粒子の位相像は周囲の流体と、粒子の屈折率差によって決まるため、周囲場の屈折率は粒子検出に影響を与える。これまでの検証ではグリセリン水中で粒子検出を行ってきたが、本

節ではより屈折率差の大きい空気中での粒子検出を試行し、粒子検出への影響を調査する。さらに、ピエゾ素子で規定量面外方向に移動させることで、偶然誤差だけでなく、偏り誤差を調査した。

計測条件

スライドガラス上に直径 $2\mu\text{m}$ のトレーサ粒子 (R0200, Thermo Fischer Scientific) を付着させ、DHM で撮影した。光源に波長 632.8nm の He-Ne レーザを使用した。20 倍、 $\text{NA}=0.42$ の対物レンズを用い、解像度 1024×1024 の CMOS により 290fps で 50 フレーム連続撮影した。トレーサ粒子を分散して配置するため図 3.14 ように、エタノール中に粒子を混入し、カバーガラス上に乗せて、エタノールを蒸発させた。

計測結果

記録した再生三次元位相ボクセル面内方向断面図を図 3.15 に示す。解像度は面内が $0.275\mu\text{m}/\text{pitch}$ 、奥行き方向のピッチサイズは $0.6875\mu\text{m}$ とした。

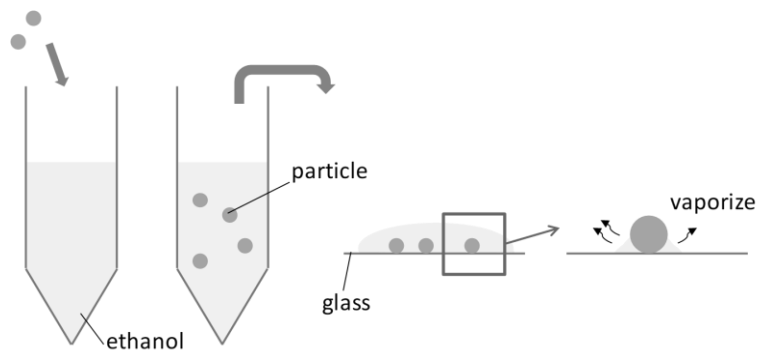


図 3.14 計測粒子準備手順

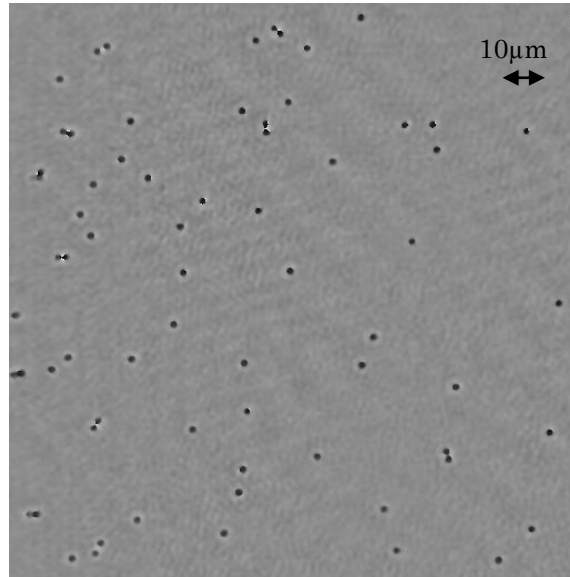


図 3.15 空気中粒子位相再生像

再生された粒子位相画像の ZSAD 法によるパターンマッチングの結果、45 個の粒子が検出された。このうち 30 個の粒子に対し 50 フレームでの x, y, z 方向の偶然誤差 S を計算し検出された粒子で平均をとった。その結果偶然誤差 S の平均は x, y, z 方向でそれぞれ $0.039, 0.035, 0.64\mu\text{m}$ となり、 x, y に比べて奥行き方向 z 方向の誤差が 13 倍以上大きくなった。

続いて、ピエゾステージ(PI 社 P-724.CD)を用いて粒子を奥行き z 方向に $25\mu\text{m}$ ずつ移動させて粒子位置検出を行い、偶然誤差を求めた。その結果を表 3.2 にまとめた。偶然誤差は平面方向には $0.03\text{-}0.05\mu\text{m}$ 、奥行方向には $0.5\text{-}0.7\mu\text{m}$ であった。

表 3.2 空気中粒子計測結果

	Average $S_x[\mu\text{m}]$	Average $S_y[\mu\text{m}]$	Average $S_z[\mu\text{m}]$
$z=0$	0.039	0.035	0.64
$z=25$	0.033	0.032	0.52
$z=50$	0.035	0.037	0.57
$z=75$	0.042	0.033	0.64
$z=100$	0.046	0.042	0.71

また各粒子の z 位置から移動量平均との z 方向の偏り誤差 B を求めた。偏り誤差 B は

$$B = \sum_{j=1}^M \frac{(\overline{X_j} - X_t)}{M} \quad (3.4)$$

と計算する．ここで $\overline{X_j}$ はある粒子の z 移動量の平均， X_t は真値すなわちピエゾでの z 奥行き方向移動量を示す．また M は粒子個数である．以上の結果から

$$E^2 = B^2 + (tS)^2 \quad (3.5)$$

で表される誤差 E を算出した． t はスチューデント t 値である．各座標での偏り誤差 B および誤差 E を表 3.3 にまとめる．

表 3.3 静止粒子検出における奥行き方向偏り・偶然誤差

z-position [μm]	z=25	z=50	z=75	z=100
z-Bias error [μm]	-0.15	-0.40	-0.87	-0.30
z-random error [μm]	0.52	0.57	0.64	0.71
Number of particles	23	30	29	32
Student-t value	2.07	2.04	2.05	2.04
Error [μm]	1.09	1.22	1.58	1.47

3.1.8 静止トレーサ粒子計測結果考察

グリセリン水中のトレーサ粒子はブラウン運動の影響を受けるため，偶然誤差が空気中のトレーサ粒子よりも大きくなることが予想された．しかし，奥行き方向に関しては，空気中の偶然誤差がグリセリン水中の二倍程度大きくなった．空気中およびグリセリン水中での奥行き方向類似度分布を図 3.16 に示す．グリセリン水中の類似度ピークが明確に出ているが，空気中の類似度分布にはピークが二か所生じた．このため奥行き座標が正しく検出されず，偶然誤差が大きくなったと考えられる．

二つピークが生じた原因は図 3.17 に示すように位相飛びが生じたためである．図 3.17(a) は粒子断面での各 z 座標における位相波面分布を示したものである．本来ならば，図 3.17(c) のように下に凸波面から上に凸波面へと変化し，伝播していく．しかし，図 3.17(b) のように上に凸の波面に位相飛びが生じてしまい，凹波面と似てしまったため類似度が高くなってしまった．位相場では $0-2\pi$ の幅しかなく， 2π を越えると 0 に再帰する位相飛びが生じてしまう．グリセリン水と粒子との屈折率差が 0.23 なのに対し，空気中では 0.59 と 2.5 倍以上屈折率差が大きくなり，位相波面が深くなる．空気中で類似度ピークが二か所生じたの

は、グリセリン水中と比べて粒子との屈折率差が大きいため波面のゆがみが大きくなり、位相の上に凸部が 2π を越えてしまい位相飛びが生じたためと考えられる。しかしながら、本計測では溶液と近い屈折率を持つ高分子ゲルを対象としているため本粒子検出アルゴリズムはゲル中の粒子検出へと充分適用可能といえる。

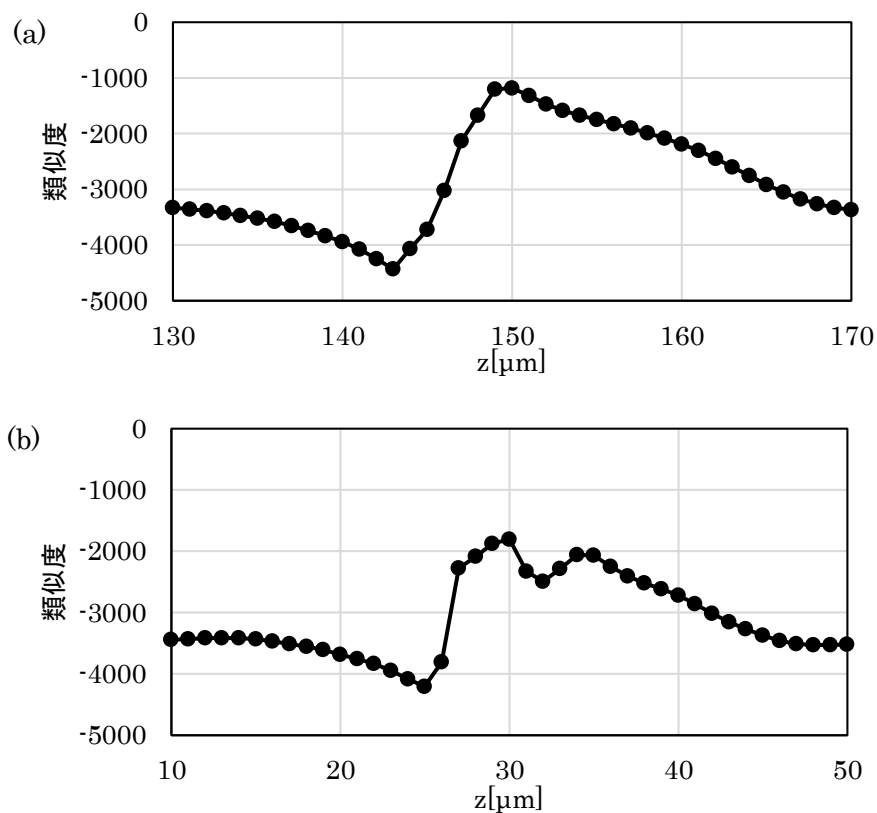
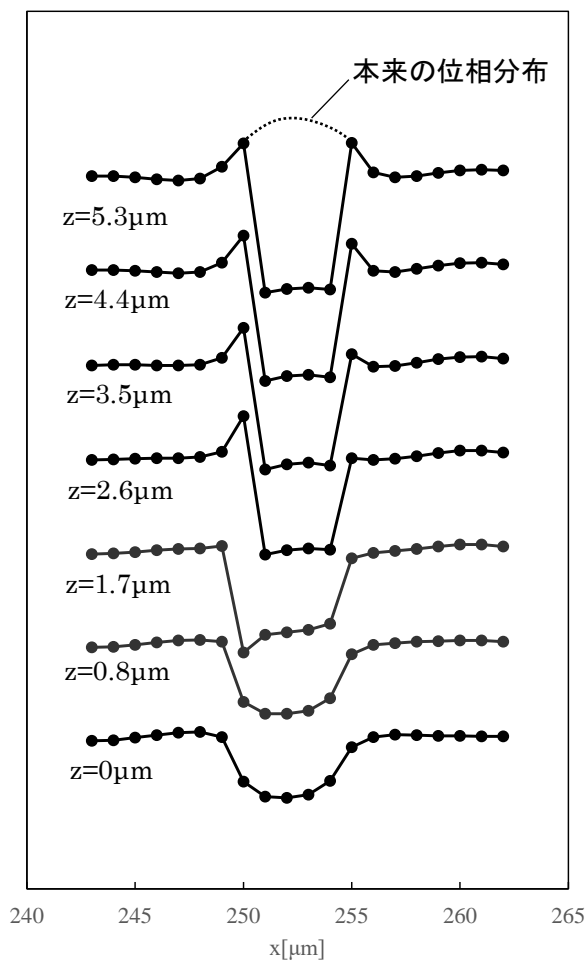
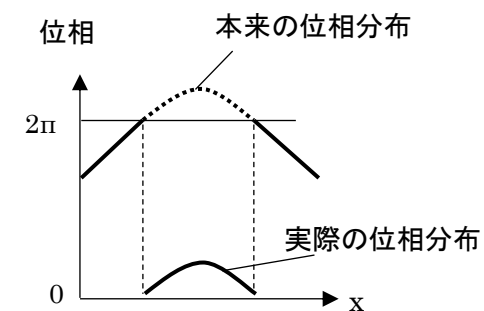


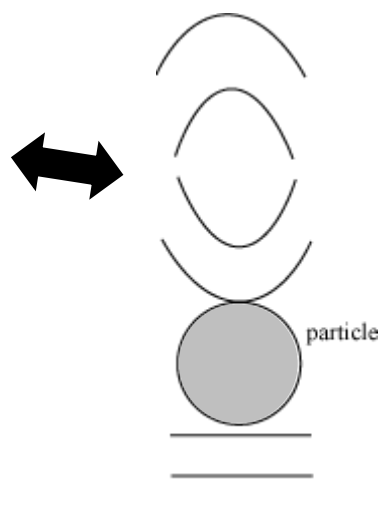
図 3.16 (a)グリセリン水中および、(b)空気中におけるZ軸方向の類似度分布



(a) 空気中での位相波面断面変化



(b) 位相飛び



(c) 位相飛びのない粒子位相波面変化

イメージ図

図 3.17 xz 断面位相分布と位相飛び

3.2 二次元テンプレートによる粒子追跡

前節の粒子検出から、二次元理論テンプレートのみによる粒子追跡を実施し、矩形管中の流れの計測から追跡精度を測定し、十分な精度が得られるかを検証する。二次元テンプレートのみで高精度な粒子追跡を実現ができれば、計算コストの点で三次元テンプレートより優れる。

3.2.1 粒子追跡手順

図 3.18 に二次元テンプレートによる粒子追跡手順を示す。2 時刻分の再生された位相像に対してそれぞれ理論的に算出されたテンプレートを用い、粒子位置を検出する。両時刻の検出座標を比較し、1 時刻目の粒子から最も近い粒子を粒子の移動先とする「最近法」を使用する。しかしながらこの単純なアルゴリズムでは重なった粒子や領域外へ移動する粒子では、実際とは異なる粒子の対応付けが起こり、誤った変位ベクトルが生じる可能性がある。このベクトルを「誤ベクトル」と呼ぶ。最近法では二時刻の比較で単純に最も近い距離の粒子を選ぶため誤ベクトルが多く発生する可能性がある。したがって誤ベクトルを除去する操作が必要となる。

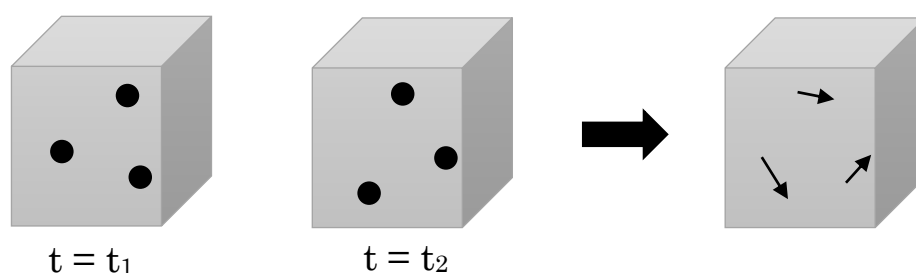


図 3.18 粒子追跡手順

誤ベクトル除去

粒子追跡における誤ベクトルは粒子の時間対応付けにおける誤対応によって生じる。誤対応が生じる要因として以下のものが挙げられる。

- 1) 粒子数密度の過多による粒子追跡候補数の増加
- 2) 流れの空間変動波長が短い、あるいは変形速度が大きい

本アルゴリズムでは周囲の速度ベクトルとの比較により誤ベクトルを除去する。ベクトル除去の手順を図 3.19 にまとめる。

画面外へ消える粒子は誤ベクトルになる可能性が高いため画面端の粒子は追跡候補から省く。その後、残ったベクトルから誤ベクトルを除去するために、周囲のベクトルと比較する。まず判定対象ベクトルに注目し、他の全てのベクトルとの始点間の距離を計算し、近い距離のベクトルを一定数集める。集めたベクトルの中からそれぞれについてベクトル間距離にしたがって重みを計算する。重みは $\text{weight} = a / \text{length}$ とする。ここで length は注目のベクトルと相手のベクトルとの始点間の距離を示す。 a は定数ではここでは 200 とする。この重みから各速度成分で周囲ベクトル集団から速度の重みつき中央値 M を算出する。

標準偏差を σ とする時、

$$M - \sigma p < velocity < M + \sigma p \quad (3.6)$$

を満たさない場合、判定対象ベクトルを誤ベクトルと判定し除去する。 p は定数である。この操作を数回繰り返す。以上の方法を用いて誤ベクトル除去を行った。

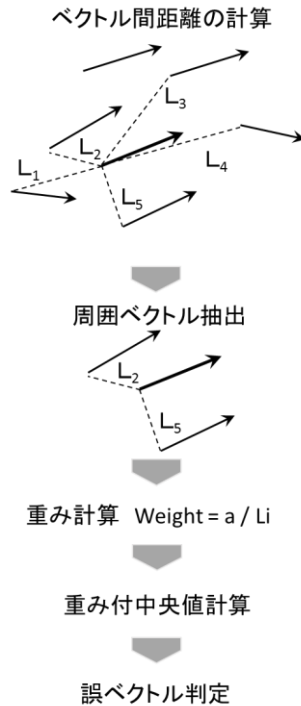


図 3.19 誤ベクトル除去手順

3.2.2 粒子追跡精度評価

粒子追跡精度を評価するためにマイクロチャンネル内の層流を測定する。

シリンジポンプ精度評価

計測の前に流れの駆動に使用するシリンジポンプ (MFS-SP3 株式会社マイクロ流体システム工房) の評価を行う。流路に接続していない状態で $1.0\mu\text{l}/\text{min}$ の設定で $250\mu\text{l}$ のシリンジ (1725RN, HAMILTON 社) を駆動させた。図 3.20 に示すような接続方法で流量計 (LG16-0025A, SENSIRION 社) で流量を計測した。流量計の写真を図 3.21 に示す。

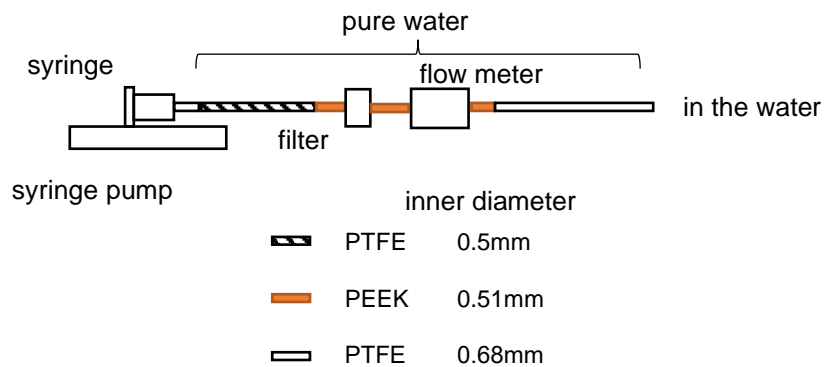


図 3.20 シリンジポンプ流量計測図

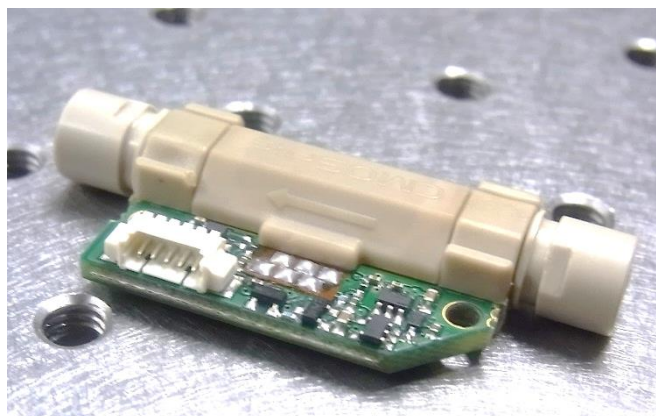


図 3.21 流量計 (LG16-0025A, SENSIRION 社)

流量計による計測結果を図 3.22 に示す。計測周期は 100ms である。1000 秒間計測での平均は $0.995\mu\text{l}/\text{min}$ 標準偏差は $0.0033\mu\text{l}/\text{min}$ になった。流量計の精度は測定値に対して $\pm 10\%$ である。測定値のばらつきは小さく、計測に十分な精度といえる。

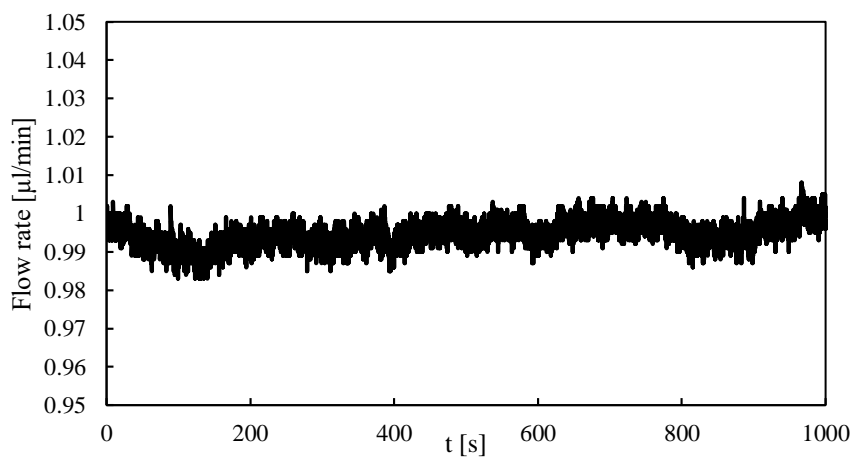


図 3.22 時系列流量測定結果

3.2.3 計測条件

図 3.23 のように $200 \times 140 \mu\text{m}$ の矩形断面の直線流路を用いる。流路厚さ $140 \mu\text{m}$ のシリコンウェハを二枚のガラスで挟み込んだ構造をしており、変形はないとする。この流路に直径 $2 \mu\text{m}$ のトレーサ粒子 (R0200, Thermo Fisher Scientific) を粒子濃度 $0.005 \text{ vol}\%$ で混入させたグリセリン水溶液をシリンジポンプで $1.0 \mu\text{l}/\text{min}$ の流量で駆動させた。シリンジには $250 \mu\text{l}$ (1725RN, HAMILTON 社) を用いる。実験装置の概略図を図 3.24 に示す。グリセリン水溶液の屈折率は 1.3615 で、比重が粒子と同じになるようにあわせてある。この流れ場を高速カメラ (Fastcam SA-Z Photron 社) で露光時間 $1/6061$ 秒で撮影し、 10 ms 間隔、 2 時刻 1 ペアで 400 ペア分の粒子位置を比較しベクトルを導出する。光源には 532.3 nm の緑色レーザー (J150GS JUNO 532nm・SOC 社) を用いた。流量を測定するために流量計を直列に接続してある。流量計内に粒子が詰まることを防ぐために流量計手前には蒸留水を、流量計後にはトレーサ粒子が分散したグリセリン水を流した。

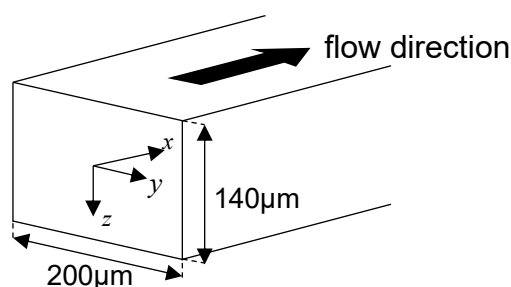
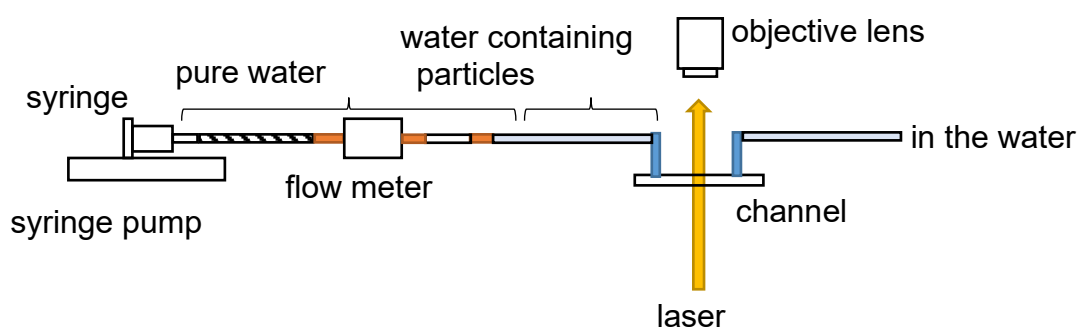


図 3.23 マイクロ流路概観図 (左), 写真 (右)



	PTFE	内径 0.5mm		PTFE	内径 0.68mm
	PEEK	0.51mm		FEP	0.79mm

図 3.24 計測概要図

3.2.4 矩形管内流れ理論式

図 3.25 に示すような矩形流路を考える. Navier-Stokes 方程式より

$$-\frac{\partial p}{\partial x} + \mu \left[\frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \right] = 0 \quad -\frac{1}{2}w < y < \frac{1}{2}w, 0 < z < h \quad (3.7)$$

$$u = 0 \quad y = \pm \frac{1}{2}w, z = 0, z = h$$

式(4.1)を解くことにより

$$u = \frac{4h^2 \Delta p}{\pi^3 \mu L} \sum_{n, \text{odd}} \frac{1}{n^3} \left[1 - \frac{\cosh\left(n\pi \frac{y}{h}\right)}{\cosh\left(n\pi \frac{w}{2h}\right)} \right] \sin\left(n\pi \frac{z}{h}\right) \quad (3.8)$$

と導くことができる. 式(4.2)から積分をとることで, 流量は

$$Q = \frac{h^3 w \Delta p}{12 \mu L} \left[1 - \sum_{n, \text{odd}} \frac{192h}{n^5 \pi^5 w} \tanh\left(n\pi \frac{w}{2h}\right) \right] \quad (3.9)$$

と表すことができる.

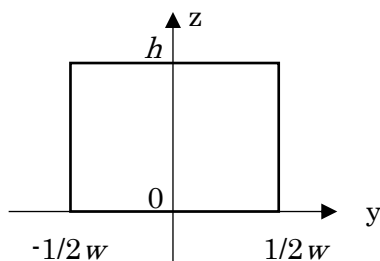


図 3.25 矩形流路断面図

3.2.5 流れ場計測結果

DHM で撮影した結果 400 ペア, 800 枚のホログラムを撮影し 3 次元位相場を得た. 図 3.26 にホログラム画像と位相三次元場の xy 平面断面画像を示す. 端のモザイク部は流路外側部分の壁である.

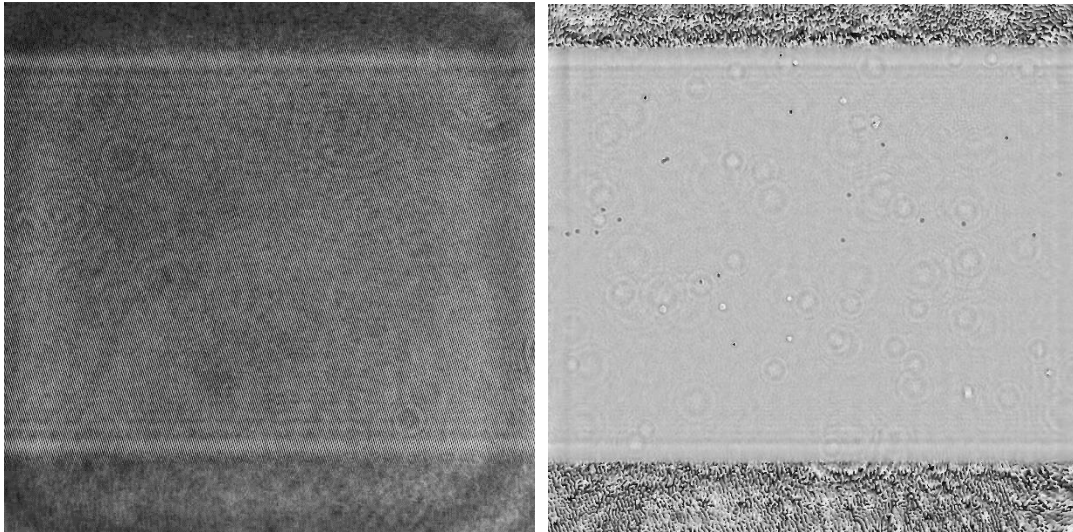


図 3.26 流路中の粒子；(左)ホログラム，(右)再生位相像

得られた三次元位相場から粒子を検出し，二時刻比較から変位ベクトルを得る．図 3.27 に実際に得られた粒子とベクトル出力結果の一例を示す．左図に，二時刻分の粒子を時刻で色を分けてプロットした．黒点が始点時刻，橙色が終点を示す．右図に左図の粒子分布から得られた誤ベクトル除去後のベクトル分布を示す．

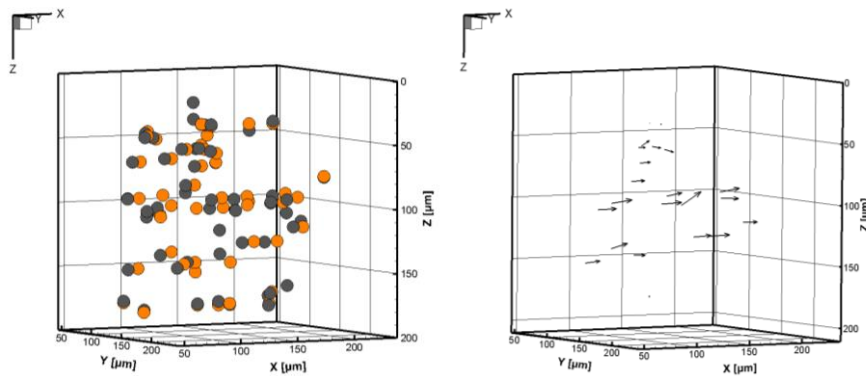


図 3.27 二時刻粒子検出結果；(左)検出粒子位置，(右)算出ベクトル分布

三次元位相場 800 枚から，400 組の粒子位置座標データを，前節で説明した ZSAD 法を用いて導出した．粒子検出の際はチャンネル壁の影響が出ないように $50\mu\text{m}$ ずつ壁部分は削っており解析領域は $171 \times 171 \times 200\mu\text{m}$ である．その結果，800 枚の位相 3 次元画像から 39300 個の粒子が検出された．1 時刻あたり平均 49 個の粒子が検出されたことになり，平均粒子間距離は約 $43\mu\text{m}$ である．この 400 組の粒子位置座標データからベクトル場を得る際の誤ベクトル処理精度を検証する．

3.2.6 誤ベクトル除去処理結果

誤ベクトル処理と無処理の結果を比較し、アルゴリズムの有効性を評価する。

誤ベクトル除去なし

最初に、誤ベクトル除去処理をしなかった場合のベクトル場の検証を行う。800組の粒子から得られた19654個のベクトルの中から図3.28に示すように流路中央高さ断面から $z = \pm 10\mu\text{m}$ の範囲内を通過するベクトルを抽出した。通過したベクトルのx方向速度を全てプロットしたのが図3.29である。点線が矩形流路でのポアズイユ流れの理論値である。理論値に近い値が多くみられる。しかし、大きく理論値から外れたベクトルも多くあり、負の速度を示すものもみられた。こうしたベクトルは粒子の対応付け誤りによる誤ベクトルと考えられる。

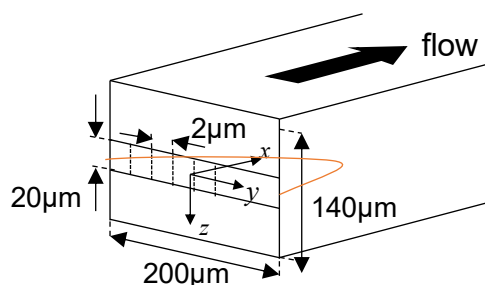


図 3.28 流路内変位ベクトルの解析領域

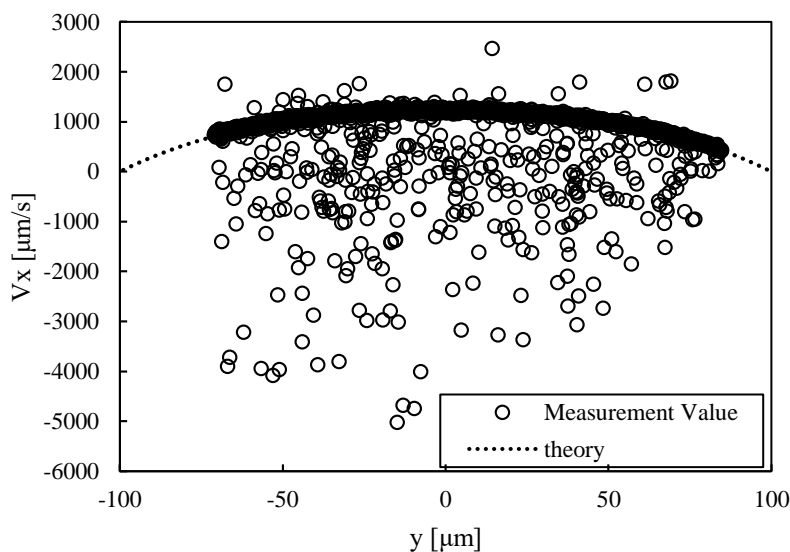


図 3.29 誤ベクトル無処理時の xy 平面 x 方向速度プロット

理論値と計測値がどの程度乖離しているか調べるために、図 3.29 の分布をさらに y 方向に 2 μm 毎に収集して平均をとり RMSE 値を計算した。図 3.30 に平均値、ポアズイユ流れ理論値及び RMSE 値を示す。平均 RMSE 値が 664 $\mu\text{m/s}$ であった。RMSE 値はサンプル数 N 、計測値 x_i 、理論値 X を用いて

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - X)^2} \quad (3.10)$$

と表すことができる。グラフに示すように平均速度分布が理論分布とかけ離れ、RMSE 値も実際の速度より大きくなった。このことから誤ベクトルの除去は必要といえる。

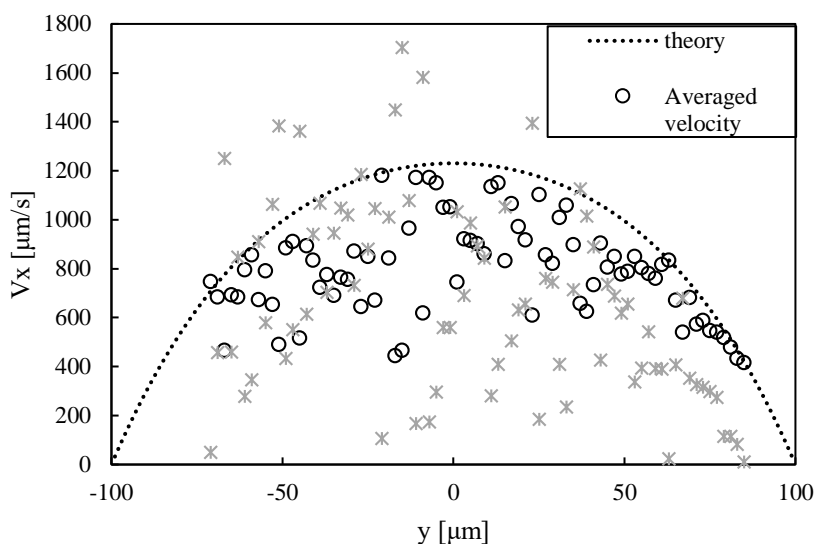


図 3.30 誤ベクトル無処理時の xy 平面 x 方向速度平均速度分布

端粒子の除去

端の粒子、特に流れ風下方向の端付近の粒子は 1 時刻目で撮影されても 2 時刻目で画面外に消えてしまう可能性が高い。1 時刻目粒子を基に粒子探索をするため画面外に消えた場合は別の粒子を探すことになり、誤ベクトルの発生につながる。そこで 1 時刻目で流れ風下方向端 30 μm にある粒子は追跡操作が入らないように除去することにした。この結果総ベクトル数が 17830 個となった。各粒子の速度プロットを図 3.31 に、平均速度分布を図 3.32 に示す。図 3.29 と比べて理論値から外れたベクトルが減り、平均速度も理論分布に近づき、RMSE 平均も 376 $\mu\text{m/s}$ と 4 割近く減少した。しかしそれでも理論速度分布には程遠く十分とはいえない。

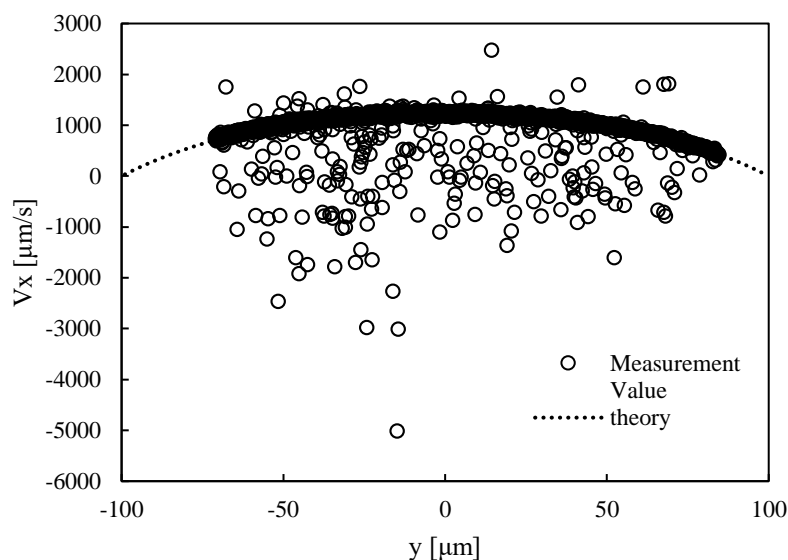


図 3.31 端 30 μm 領域中ベクトル除去処理後の速度プロット

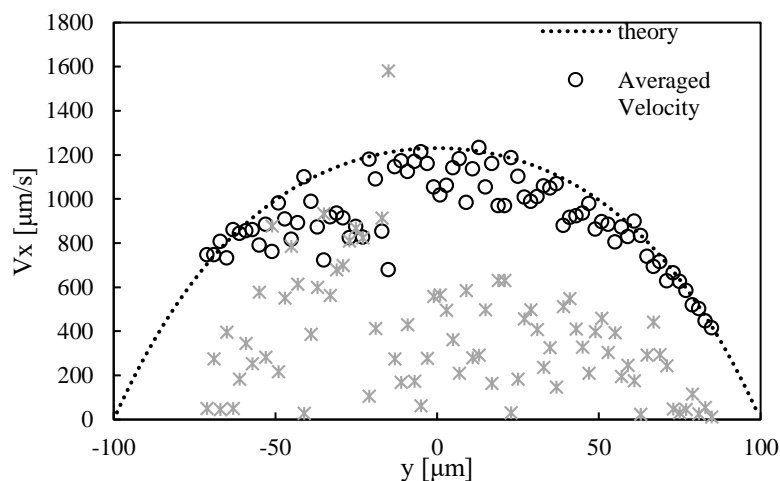


図 3.32 端 30 μm 領域中ベクトル除去処理後の平均速度分布

端粒子の除去+周囲ベクトルとの比較による誤ベクトル除去

端の粒子の除去に加えて周囲の速度ベクトルとの比較による誤ベクトル除去を行った。ベクトル除去アルゴリズムは4.2節で紹介したとおりである。この時誤ベクトル除去判定基準となる式 $M - \sigma p < velocity < M + \sigma p$ 中の p の値が定まっていない。 p 値は誤ベクトル判定の閾値を決めるもので、閾値が大きくなるほど誤ベクトルと判定されづらくなり、閾値が小さいと誤ベクトルと判定されやすくなる。このポアズイユ流れの結果に閾値を変えてベクトル算出プログラムを実施した。

閾値を 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 の 5 パターン変化させ、粒子追跡処理を行った。処理の結

果の RMSE 値および検出ベクトル数を図 3.33 にまとめる。また各粒子速度プロットを 図 3.34 に、平均速度分布を図 3.35 に示す。

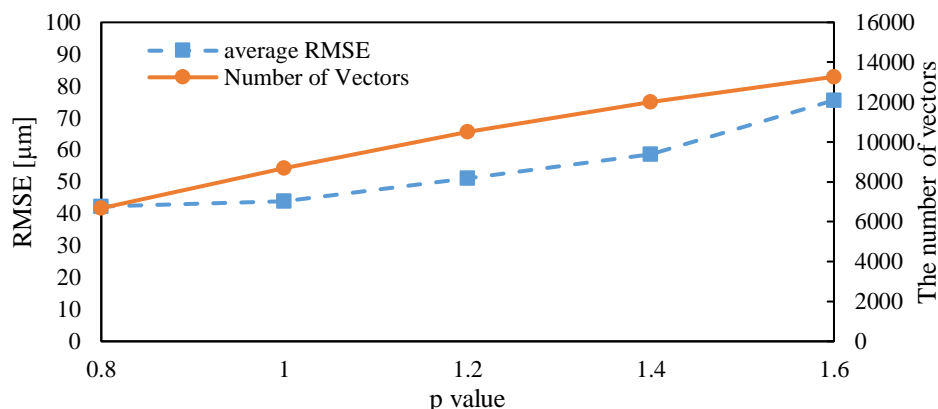


図 3.33 誤ベクトル値判定閾値と検出ベクトル数，平均 RMSE 値との関係

閾値が小さくなるにつれて判定が厳しくなるため検出されるベクトルの数は減少する。 $p=1.6$ のときと比べると $p=0.8$ では 50%ベクトル数が減った。また xy 平面での RMSE 値も閾値とともに減少した。これは誤ベクトルが減少したことを示す。閾値が減ると誤ベクトルも減るが、同時に正しいベクトルも多く減ってしまい空間解像度が大幅に減ってしまう。正ベクトルと誤ベクトルとを見分けられないのは粒子濃度が十分ではなく周囲のベクトルを適切に評価できていない為と考えられる。本実験の粒子濃度は粒子が均等に配置された場合、平均粒子間距離が $43\mu\text{m}$ と大きい。誤ベクトル除去プログラムでは周囲のベクトルとの比較で誤ベクトル判定を行なうため、粒子間距離が遠いと正確な誤ベクトル判定ができない可能性がある。

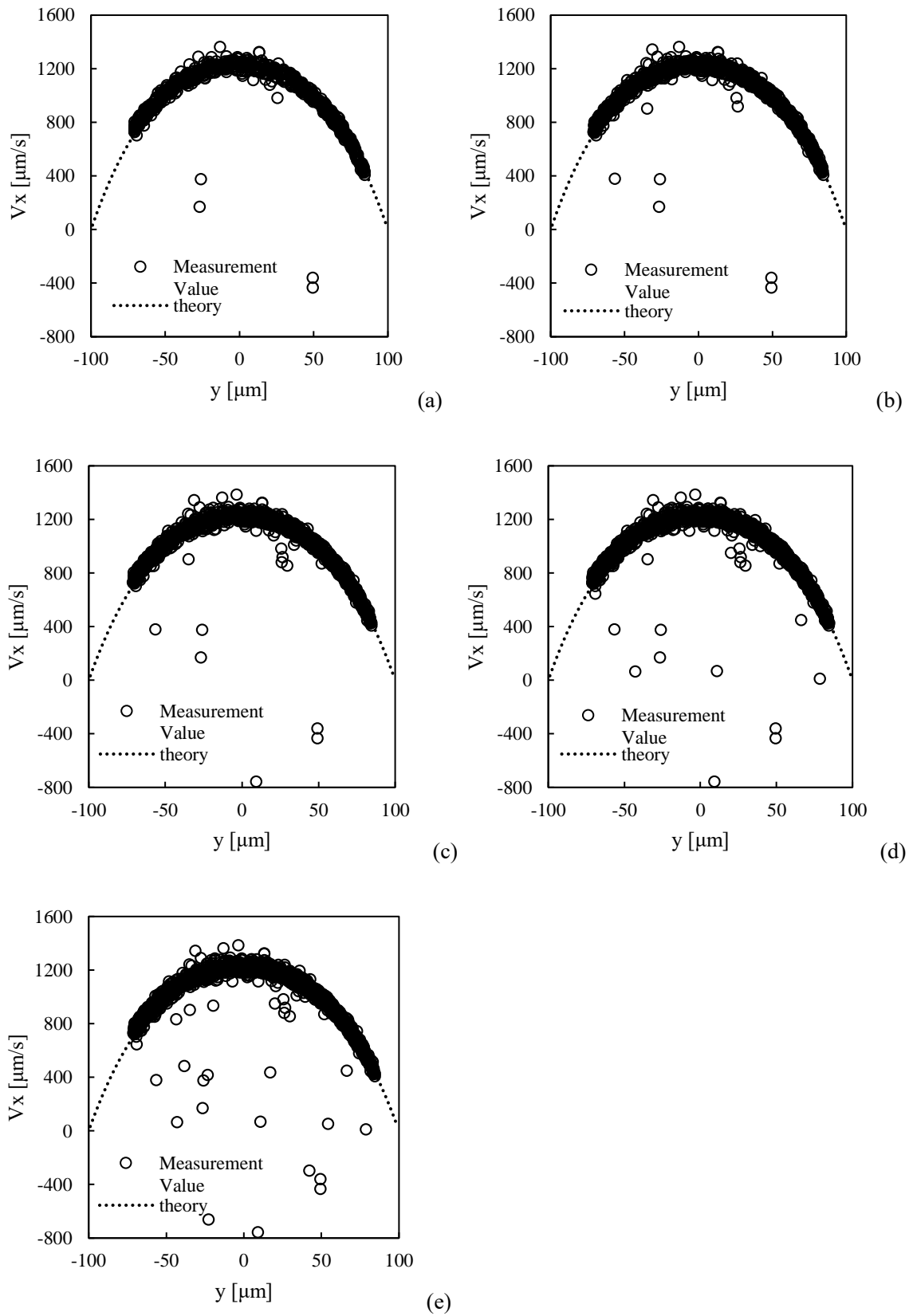


図 3.34 誤判定閾値による速度分布 (a) $p = 0.8$, (b) $p = 1.0$, (c) $p = 1.2$, (d) $p = 1.4$, (e) $p = 1.6$

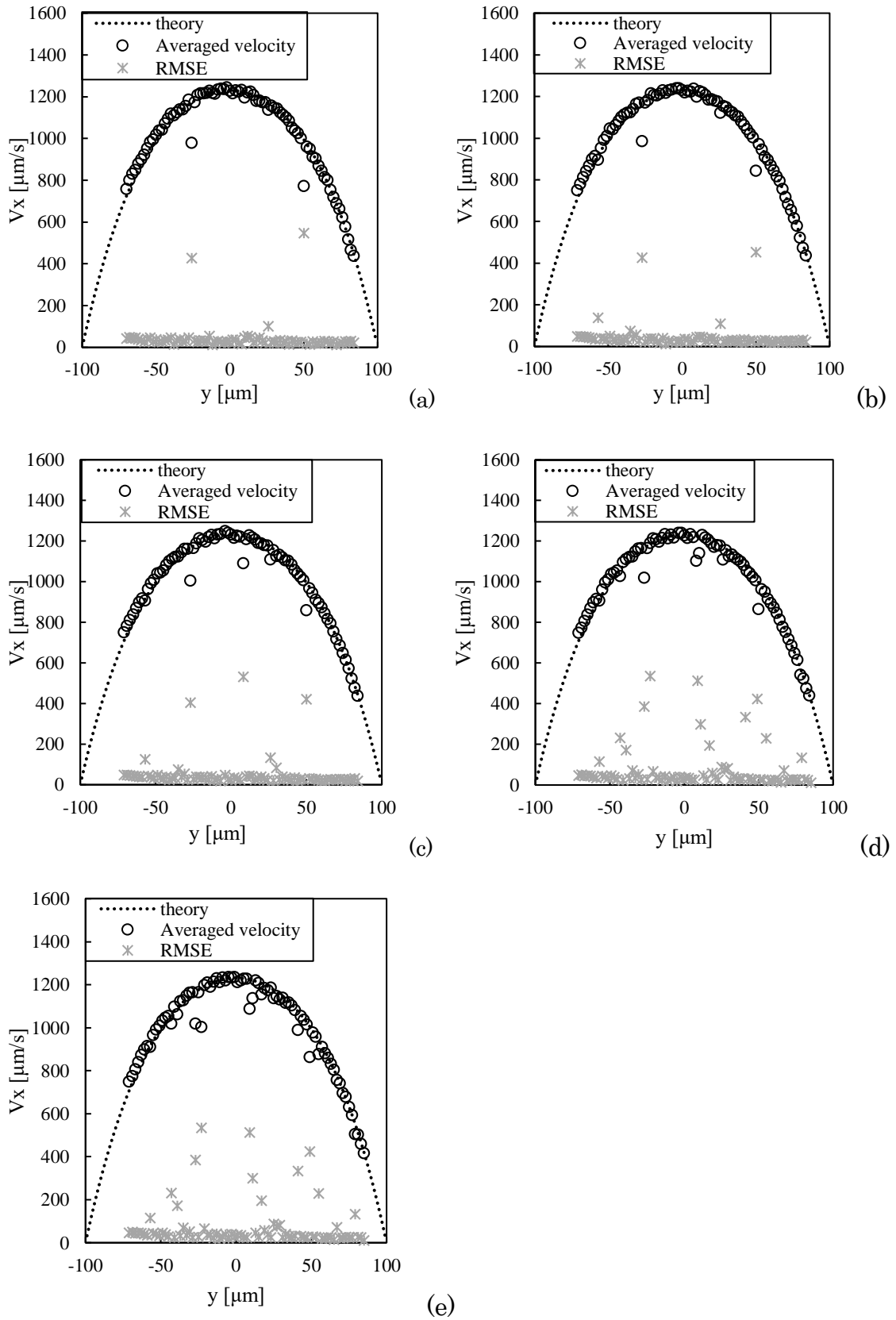


図 3.35 誤判定閾値による平均速度分布(a) $p = 0.8$, (b) $p = 1.0$, (c) $p = 1.2$, (d) $p = 1.4$, (e) $p = 1.6$

表 3.4 に今回の 7 パターンの解析条件と結果をまとめる．誤ベクトル除去を全くしない解析 1 に比べて解析 7 では RMSE 平均が 94%も減少した．2 時刻粒子追跡では誤ベクトル処理が必須といえる．一方ベクトル数は 1/3 程度まで減少している．誤ベクトル除去は周囲のベクトルとの比較により実施される．より正確に行うためには粒子濃度がより高い流れで検証が必要である．

表 3.4 誤ベクトル除去結果まとめ

	1	2	3	4	5	6	7
周囲ベクトル比較	×	×	○	○	○	○	○
端粒子除去	×	○	○	○	○	○	○
閾値 p			1.6	1.4	1.2	1.0	0.8
ベクトル数	19654	17830	13271	11999	10514	8690	6678
RMSE 平均[$\mu\text{m/s}$]	664	376	75.6	58.7	51.1	43.8	42.3

3.2.7 粒子変位三次元計測結果

表 3.4 の条件 7 の計測データを用いてポアズイユ流れ結果の三次元成分を詳細に考察する．大まかに速度ベクトル場を確認するため，に 10 時刻ペア分の粒子追跡結果のベクトル図を示す．xy, yz, xz 面での図と三次元俯瞰図を載せる．163 個のベクトルを得た．壁付近に比べて中央部分の速度が大きいことが視覚的にも分かる．xy 面図が流れ方向に対してベクトル方向が平行であるのに対し，xz 面図では多くのベクトルが平行でなく z 方向にベクトルが傾いている．yz 面図でも y 方向に比べて z 方向にランダムにベクトルが向いている．ポアズイユ流れでは y, z 方向の速度は 0 のため z 方向に大きな誤差がでており，これは粒子検出の時点で z 方向の誤差が大きく出ているためと考えられる．ベクトルの z 成分の方向は一様でないため流路の傾きが原因ではない．図 3.37 に yz 断面 $5 \times 5 \mu\text{m}$ エリア毎の平均ベクトル分布を示す．各エリアでのベクトル数の平均は 5.94 個だった．全体的にはポアズイユ流れの分布を示しているが，壁付近のベクトルは x 方向速度が小さく，z 方向速度が支配的になった．

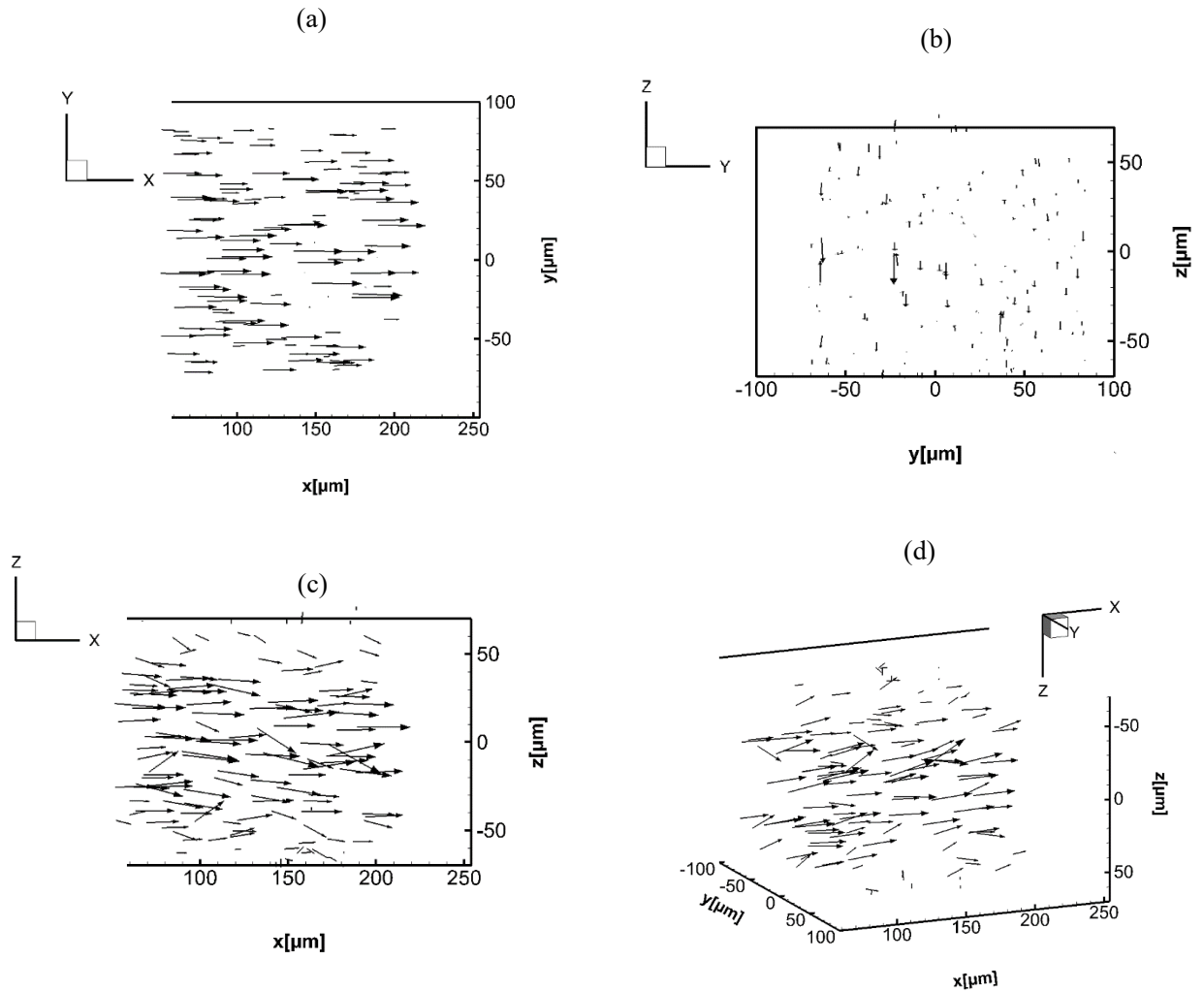


図 3.36 最近法による 10 時刻分流速ベクトル分布

x 方向の速度について

図 3.38 に 400 時刻分 6677 個のベクトルを yz 座標で $5 \times 5 \mu\text{m}$ エリア毎に x 方向の速さ V_x を平均した値をコンター表示した。周囲に比べて大きく速度が外れている点があるがこれは誤った対応付けによる誤ベクトルの影響と思われる。図 3.39 に xy 平面及び xz 平面での平均主流方向速度分布と理論値との RMSE 値を示す。それぞれ $z=0$, および $y=0$ から $\pm 10 \mu\text{m}$ 以内のベクトルの平均を取った。閾値は 0.8 とし、数箇所の点を除き y 方向, z 方向ともに理論放物線とよい一致を示しており, RMSE 値の平均は y, z 方向分布でそれぞれ 42.48, $61.12 \mu\text{m/s}$ となった。

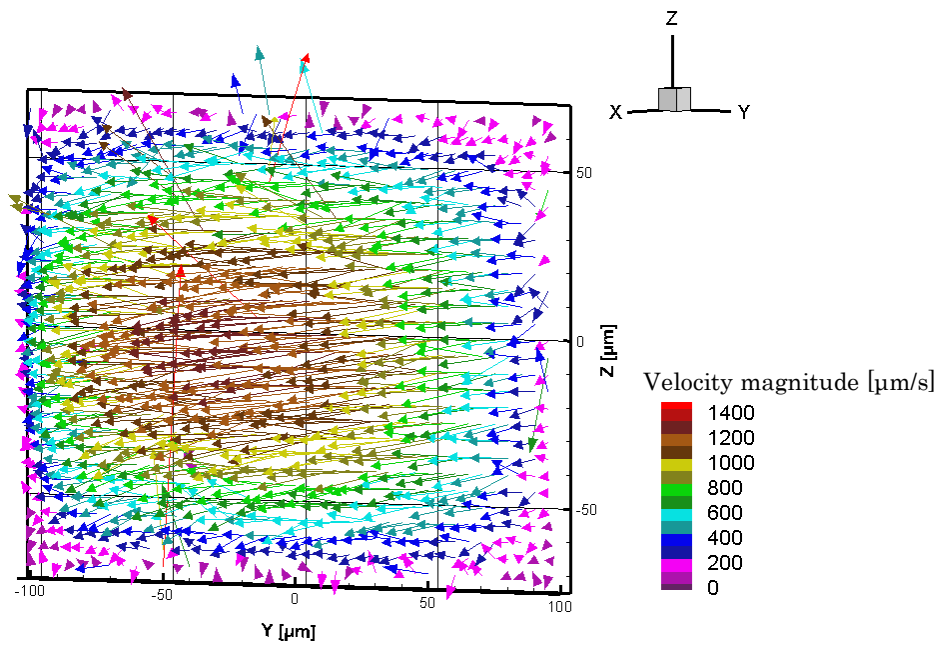


図 3.37 yz 平面中の平均速度ベクトル分布

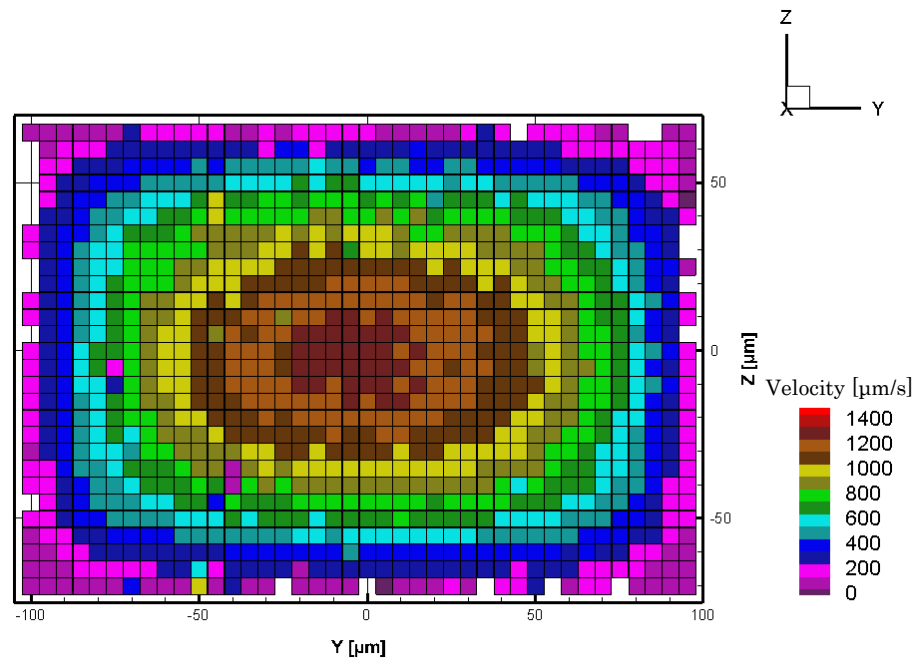


図 3.38 yz 平面 x 流れ主方向速度分布

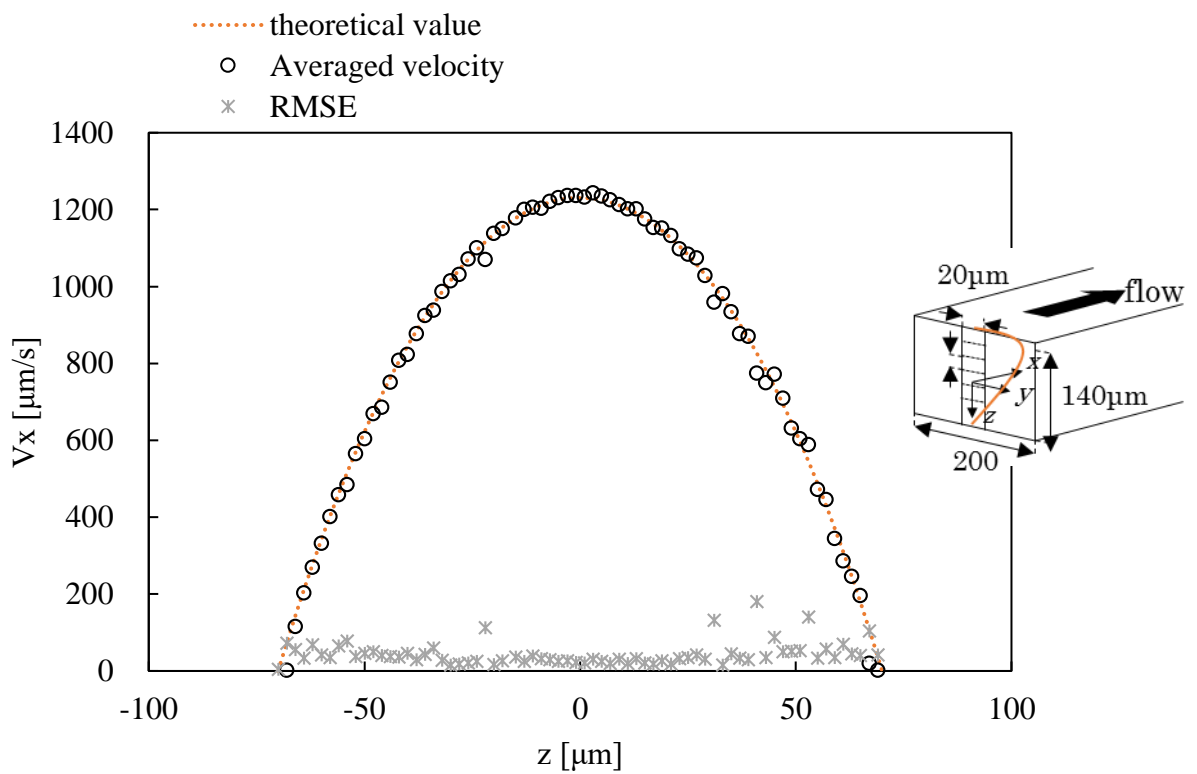
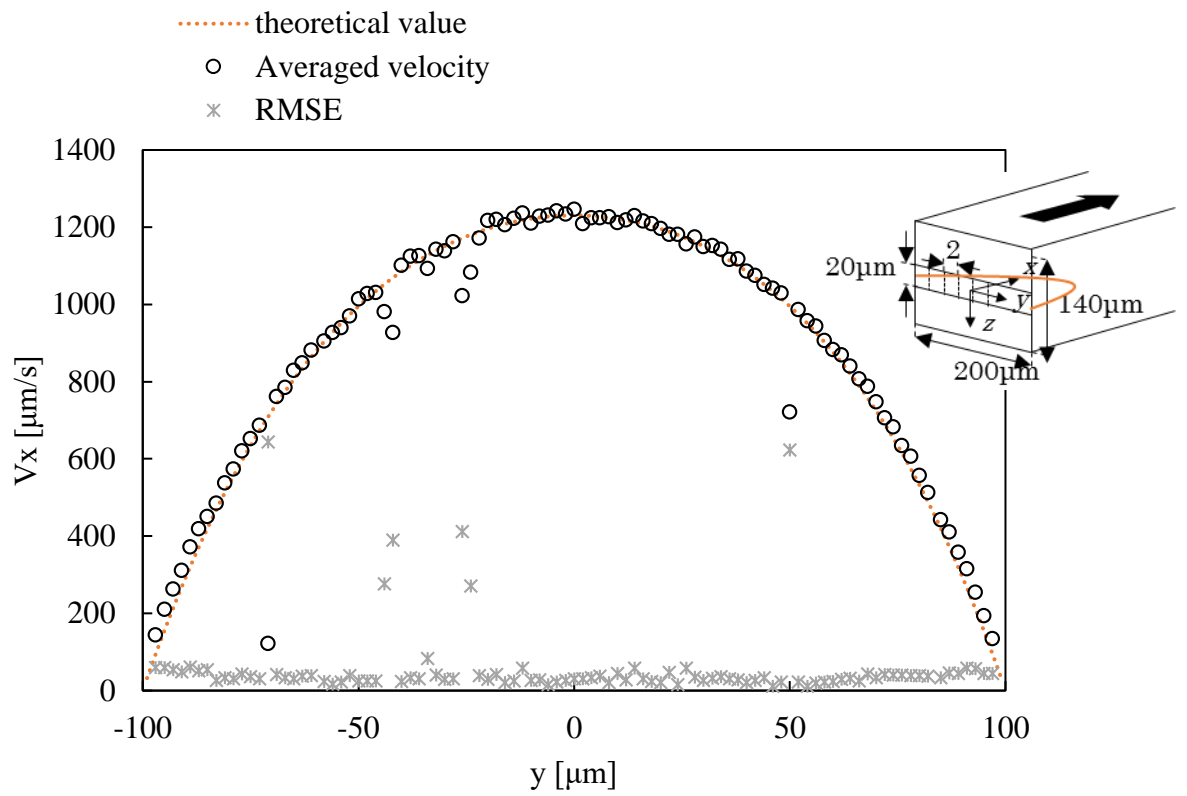


図 3.39 x 軸方向平均速度分布 (a) xy 平面, (b) xz 平面

y 方向, z 方向の速度について

ポアズイユ流れは理想的には y, z 方向の速度は 0 である。しかし速さの平均は y, z 方向に 13.2, 110 $\mu\text{m/s}$ と z 方向に比較的大きな速さが出ていることが分かった。これは 2 時刻で平均 y, z 方向に 0.13, 1.1 μm 移動していることになる。移動量の標準偏差は y, z 方向にそれぞれ 1.31, 1.68 μm である。

z 方向の移動について考察する。z 方向の速さ平均は 110 $\mu\text{m/s}$ と平均主流速度の理論断面平均 593 $\mu\text{m/s}$ の 19% も占める。前節でのグリセリン水中静止粒子では標準偏差 σ は 0.28 μm でこれは $6\sigma = 1.68\mu\text{m}$ 内に 99.7% 分布することを示すが、ポアズイユ流れ中の粒子では図 3.45 に示すように 2 時刻での z 移動量で 2 μm 以上のベクトルが多く発生していることがわかる。従って粒子検出以外の誤差要因があると考えられる。他の誤差要因として流路の位置により微量な壁の差から背景ノイズの影響で位相像が変化することが挙げられる。図 3.40 - 図 3.43 に xy, 及び yz 平面で通過する全てのベクトル始点をプロットし, y, z 方向の速度 V_y, V_z , で色分けした。上下方向に一樣に粒子が検出できている。z 方向速度は本来 0 であるはずだが, 100 $\mu\text{m/s}$ 以上の大きな速度を持つ粒子が散在しており, 流路位置によらず誤差が出ていることが分かる。

y 方向の移動に関しては図 3.44 に示すようにほとんどの粒子で移動量が 0.25 μm 以下と 1px 以下に抑えることが出来ており, 変位を計測するためには十分な精度を有している。

x 方向の誤差との比較のために, 流路中央高さ断面から $z = \pm 10\mu\text{m}$ 以内のベクトルで y, z 方向速度の RMSE 値を求めた。理論値を 0 $\mu\text{m/s}$ とするとそれぞれ 20.0, 160 $\mu\text{m/s}$ となった。x 方向 RMSE 値は 42.3 $\mu\text{m/s}$ である。y 方向の RMSE 値が x 方向と比べて小さくなったのは, $z = \pm 10\mu\text{m}$ の粒子は z 位置により x 方向速度に差があるが, y 方向の速度ベクトルは常に 0 であるため誤差がでにくいためと考えられる。また z 方向の RMSE 値が x 方向に比べて 4 倍程度大きくなった。静止粒子でも偶然誤差が z 方向の方が 4 倍程度 x 方向より大きかったことから, 粒子検出での誤差が粒子追跡の誤差に大きく影響していると考えられる。

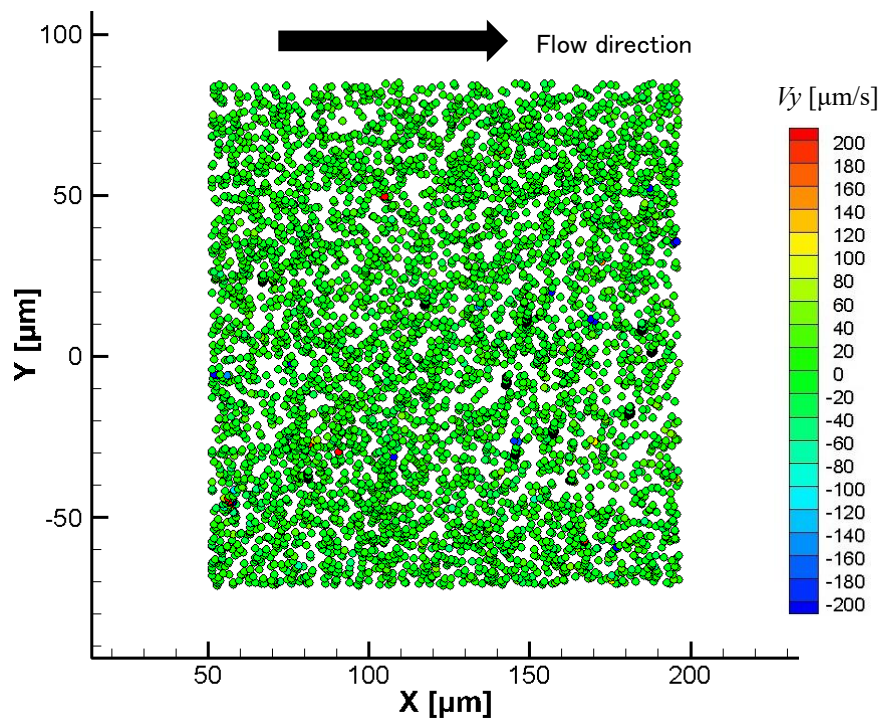


図 3.40 xy 平面の粒子 y 方向速度プロット

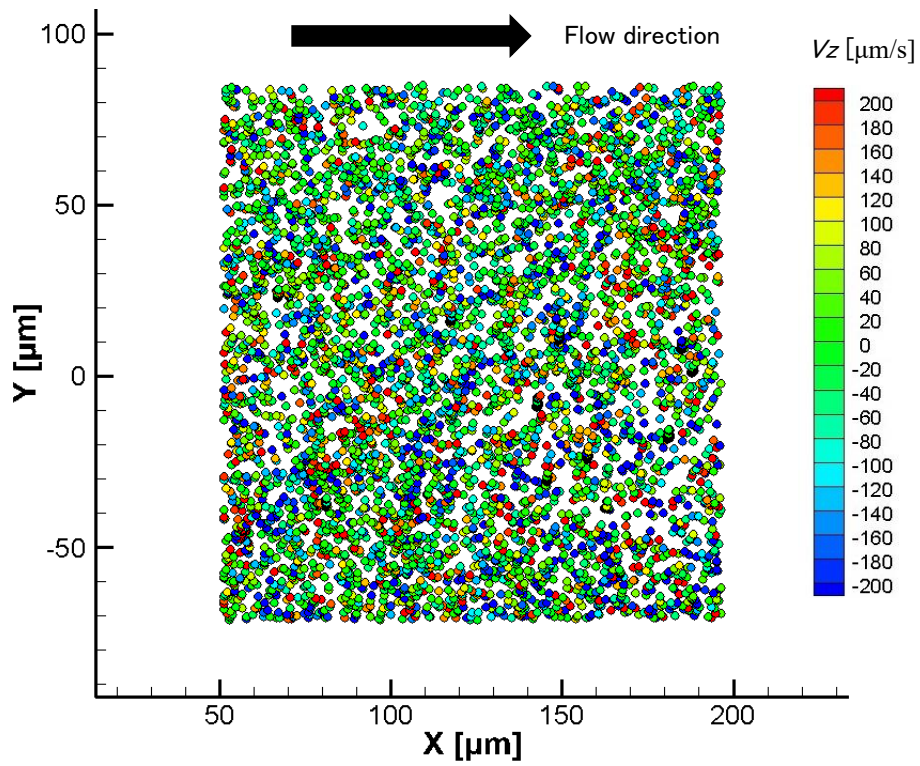


図 3.41 xy 平面の粒子 z 方向速度プロット

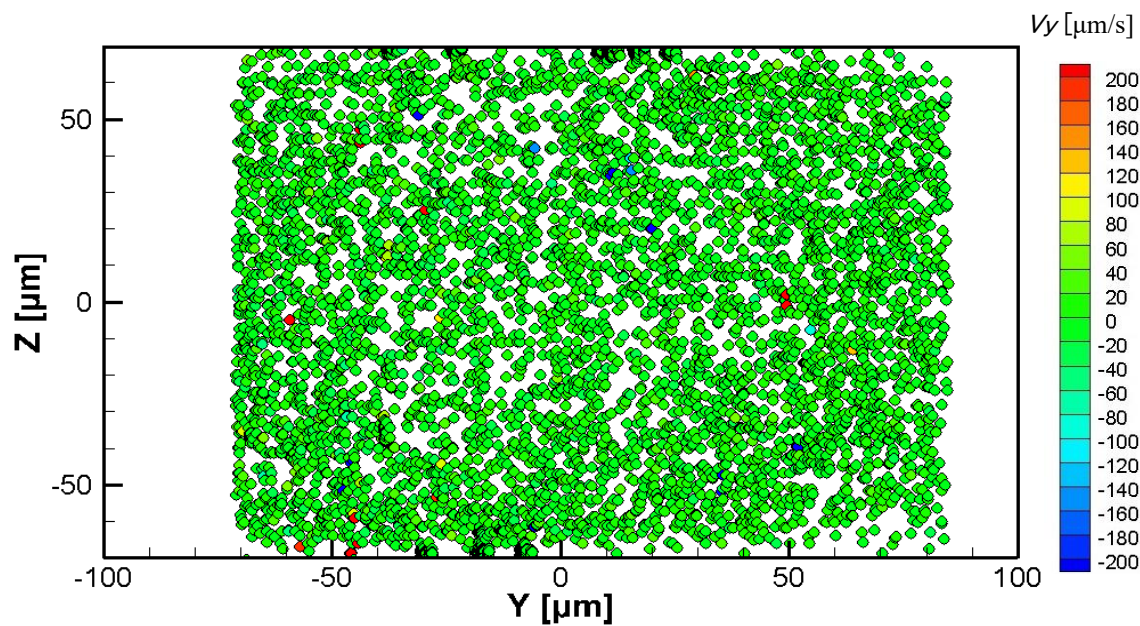


図 3.42 yz 平面 y 方向粒子速度プロット

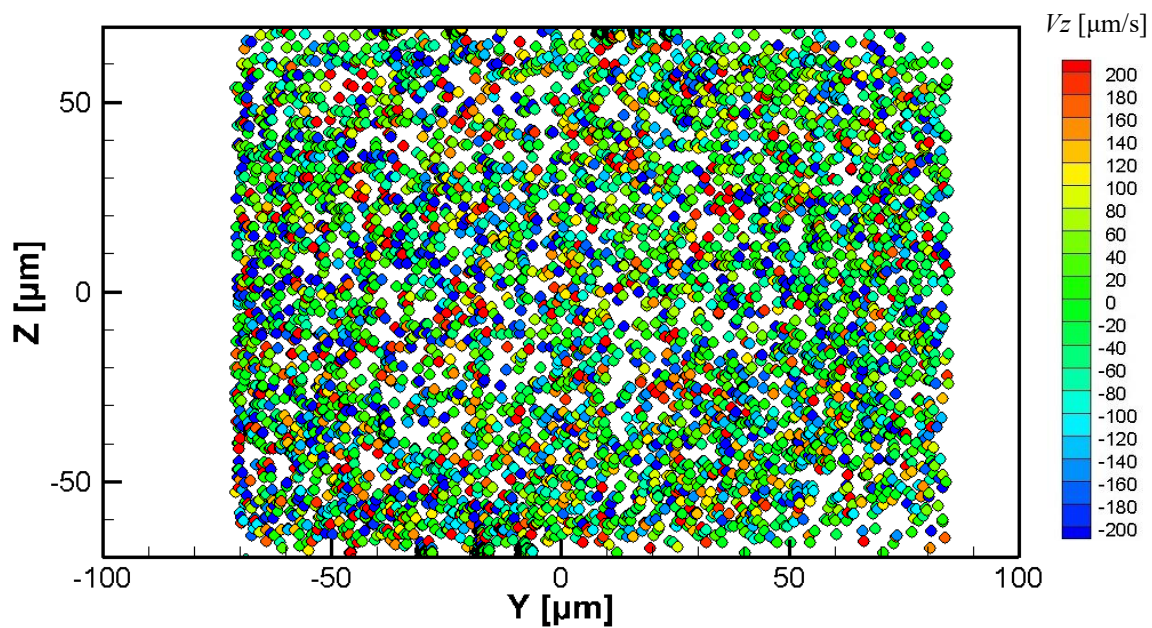


図 3.43 yz 平面 z 方向粒子速度プロット

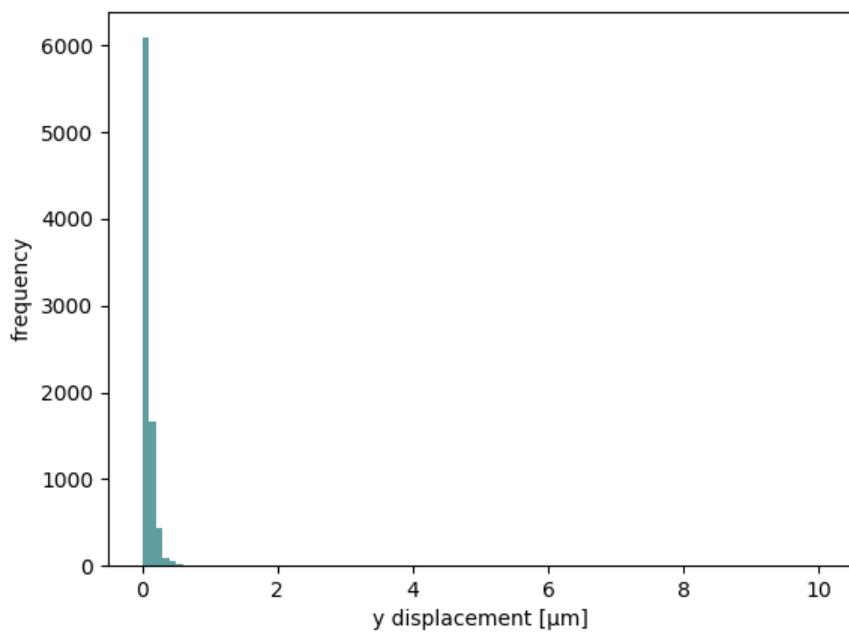


図 3.44 y 方向変位の頻度分布

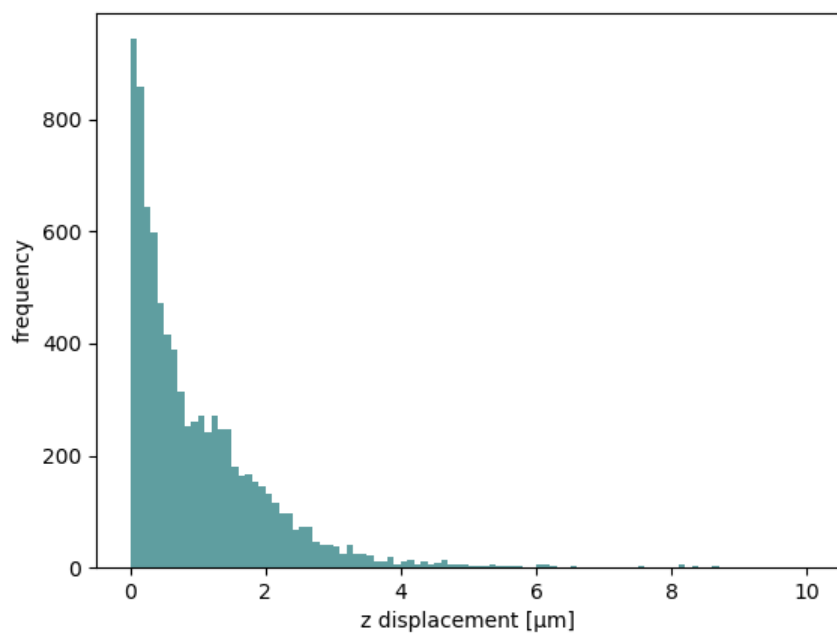


図 3.45 z 方向変位の頻度分布

3.2.8 二次元テンプレート計測結果まとめ

本節では理論的に算出された理論粒子位相波面をテンプレートとし粒子を検出し、誤ベ

クトル処理を加えた最近法により変位を計測した。その結果面内方向には標準偏差で $1\mu\text{m}$ 以下の精度で計測できたが、奥行方向には $2\mu\text{m}$ 以上の誤差が散見された。さらに本解析では粒子検出数が 1 再生像当たり平均 17 個と少なく、領域全体の情報を得るためには、より多くの粒子が必要である。粒子を増やすと粒子波面同士が干渉し、さらに追跡精度が落ちることが予想される。そこで次節では各粒子像の実際の三次元再生位相像でテンプレートマッチングし、より精度が高い粒子追跡手法を実施検討する。

3.3 三次元テンプレートによる粒子追跡精度

前節では二次元テンプレートによる粒子の初期位置検出および追跡精度を検証した。しながら、理論的に算出された二次元テンプレートのみによる粒子検出・追跡では特に奥行方向の粒子追跡精度が不十分であった。そこで図 2.5 で示すように、次のステップとして、まず理論的に算出された波面により検出された初期位置から三次元テンプレートを再度生成し、次時刻の粒子位置を追跡する。粒子手法の詳細および奥行方向の精度検証を実施し、本研究の目的であるマイクロ高分子ゲルの膨潤収縮運動の計測に十分な精度を持ち合わせているかを評価する。

3.3.1 粒子追跡アルゴリズム

図 3.46 に本手法における粒子追跡アルゴリズムのイメージを示す。前節では理論波面によって粒子の位置を検出したが、理論位相波面と実際の粒子位相波面とは完全に一致しているわけではなく、後述するように運動粒子では追跡の精度が大幅に落ちてしまう。そこで本手法では理論波面ではなく実際の位相像をクロッピングした情報をもとに、テンプレートマッチングを実施し次時刻の粒子を追跡する。さらに、二次元テンプレートではなく三次元にすることで、単純半球形状よりも、特徴量を増やし、より精度がよい粒子追跡を目指す。

粒子の波面は計測領域によって微小に異なるため (Gire et al., 2008), 各々の粒子において三次元テンプレートを生成する。テンプレートサイズは $8 \times 8 \times 27 \text{ px}$, マッチング関数は ZSAD を使用した。追跡精度より向上させるため、テンプレートマッチング範囲を各粒子位置から $20 \times 20 \times 41 \text{ px}$ に設定した。三次元テンプレートを用いた粒子検出では先行研究として, Ooms ら (2006) や Hesseling (2018) らが三次元理論テンプレートを用いた粒子検出手法を提案し、特に, Hesseling らは粒子追跡による精度評価を行っている。しかしながら Hesseling らの DH はインライン型であり、粒子画像が鮮明でなく、最終的な調整として多時刻の粒子位置情報から参照して追跡位置の調整を実施していた。本手法では、オフアクシ

ス型の DHM を用いており直接の比較は難しいが鮮明な粒子画像が得られるため、二時刻のみで十分な粒子追跡精度が出る手法を目指す。

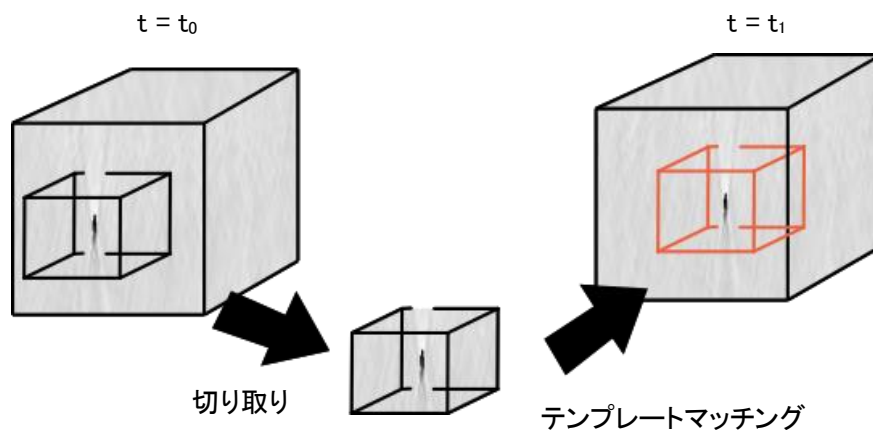


図 3.46 三次元実画像粒子追跡イメージ

3.3.2 粒子追跡計測条件

粒子追跡精度を評価するために、マイクロチャネル中の層流中のトレーサ粒子を撮影、追跡した。粒子検出時と同様に、断面 $2000 \times 100 \mu\text{m}^2$ (幅 \times 深さ) のガラスチャネル、径 $2 \mu\text{m}$ の粒子を用いた。粒子濃度は $0.001 \text{ vol}\%$ 、シリンジポンプにより $250 \mu\text{l}$ (1725RN, HAMILTON 社) のシリンジを駆動させた。溶液は比重を粒子合わせるため、グリセリン水溶液を使用した。流れ場を高速カメラ (Fastcam SA-Z, Photron) で露光時間 $100 \mu\text{s}$ 、フレームレート 250 fps で撮影した。光源には 532 nm のレーザー (J150GS JUNO 532 nm ・SOC 社) を用いた。

3.3.3 粒子追跡結果

2 枚ペアで計 20 枚のホログラムから 210 個の運動する粒子を検出、追跡した。2 時刻間は 20 ms である。流れ方向は図 3.1 に示すように x 方向が主方向であり、 y, z 方向には流れていない。各ホログラムセットで粒子を追跡し、 y, z 方向の粒子の変位を計測した。実位相像による三次元テンプレートマッチング変位のばらつき、偶然誤差は平面 y 方向に $0.42 \mu\text{m}$ 、奥行 z 方向に $0.83 \mu\text{m}$ であった。静止粒子検出時の精度と比べてばらつきが大きくなった理由として、粒子が移動することで、背景像が変化し、粒子像の歪みが変わることによって検出位置に誤差が生じたと考えられる。

三次元で実画像を用いたテンプレートマッチングの優位性を検証するため、二次元かつ実画像を用いたテンプレート、二次元かつ理論的に導出されたテンプレート、三次元かつ理

論的に導出されたテンプレートを用いて同じ運動粒子を追跡した。追跡した粒子の二時刻間の変位から奥行方向の偶然誤差を表 3.5 に示す。

表 3.5 テンプレートマッチング手法による粒子追跡精度の違い

テンプレートマッチング手法	偶然誤差(奥行方向) [μm]
3D(実位相像テンプレート)	0.83
2D(実位相像テンプレート)	1.33
2D(理論テンプレート)	1.90
3D(理論テンプレート)	1.92

実位相像による三次元、二次元、そして理論的に算出された二次元、三次元テンプレートによる奥行方向の偶然誤差はそれぞれ、0.83, 1.33, 1.90, 1.92 μm であった。まず、二次元テンプレートにおいて実位相像が理論テンプレートよりもばらつきが少なく追跡できた。この理由として、理論によるテンプレートと実際の粒子像には外乱などの影響があり相違があること、粒子による像の差異を考慮できていないことが考えられる。また三次元実位相像と二次元実位相像では三次元テンプレートの精度が 50%程度よく粒子追跡できた。奥行方向に情報を増やすことで、三次元テンプレートは二次元テンプレートよりも精度が上昇した。一方で理論テンプレートを三次元に拡張しても、実粒子との差異は埋められず検出精度の向上にはいたらなかった。

さらに、この三次元実位相像による粒子追跡手法を DHM による他の従来の粒子検出手法の幾つかと比較する。従来手法のうち focusing function である Graduation (GRA), Laplacian (LAP), Variance (VAR) 法と比較する。これらの手法においては図 3.47 のように各 z 断面において、focusing value を位相に対して式(2.14)~(2.16)で算出し、z 方向のピーク値を検出することで粒子位置を決定した。

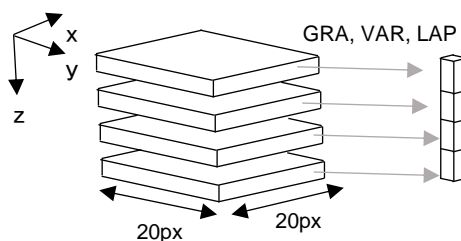


図 3.47 focusing function による粒子検出イメージ

表 3.6 に focusing function による粒子追跡奥行方向の精度を示す。GRA, LAP, VAR 法でそれぞれ標準偏差は 2.06, 2.09, 3.04 μm であった。いずれも偶然誤差が 2 μm 以上であり、テンプレートマッチングによる粒子検出手法よりも 2.4 倍もばらつきが大きくなった。focusing function ではいずれも平面方向の値の比較によるものであり、奥行方向に変化が少ない DHM の粒子検出では精度が落ちてしまうと考察できる。

表 3.6 focusing function による奥行方向粒子追跡結精度

	GRA	LAP	VAR
偶然誤差 (奥行方向) [μm]	2.06	2.09	3.04

3.4 DHM による粒子検出・追跡手法まとめ

本章で提案した「二次元理論像による粒子検出」と「三次元実画像による粒子追跡」の組み合わせによる変位計測手法では、奥行方向にもサブミクロンの精度を実現することができ、従来の focusing function を用いた手法よりも 2.4 倍よい精度でマイクロ粒子を追跡することができた。本研究の計測対象である自律振動ゲルは数 μm ~数十 μm で振動することが知られている (Chen et al., 2011)。本粒子計測手法は偶然誤差をサブミクロンオーダーに抑えており、ゲルの計測には十分な精度であるといえる。最終的なマイクロ粒子位置計測システム仕様を以下の表 3.7 にまとめる。

表 3.7 DHM 粒子検出・追跡システム仕様

対物レンズ	倍率	20 倍
	NA	0.42
カメラ	型式	SA-Z
	画素数	1024 \times 1024 pix
	フレームレート	250fps
	露光時間	0.1 ms
照明	型式	J150GS
	波長	532 nm
ホログラフィ	形式	オフアクシス型
トレーサ粒子	材質	ポリスチレン

	直径	2 μm
	屈折率	1.59
計測対象	流路 (ガラス)	矩形
	大きさ	20×0.1×100 mm (W×D×H)
	溶媒屈折率	1.36
撮影条件	計測領域	206×206×120 μm
	サンプリング間隔	0.25 μm / pix
解析条件	理論テンプレートサイズ	8×8 pix
	実画像テンプレートサイズ	8×8×21 pix
	再生ピッチ	0.5 μm / pitch
粒子追跡偶然誤差	面内方向	0.42 μm
	奥行方向	0.83 μm

第4章 自律振動ゲルの蠕動運動計測

DHM 粒子三次元検出・追跡システムを活用して BZ 反応による自律振動ゲル内部の挙動をリアルタイムで計測する。本章ではまず、自律振動ゲルが駆動する源となる BZ 反応の原理について述べ、自律振動ゲルの駆動原理、先行研究を詳しく解説する。そしてゲル表面および内部の三次元動態計測のための手法および計測結果を示す。

4.1 Belousov-Zhabotinsky (BZ) 反応

BZ 反応は非平衡、非線形系な挙動を示す典型的な反応であり、物質の濃度が周期的に変化する化学振動を示す。歴史的には 1951 年に Belousov によってこの現象が発見されたが長くの間、公には認められてこなかった。Zhabotinsky ら (1970) による発表により、ようやく広く知られることとなった。BZ 反応は酸化剤、還元剤、金属触媒によって反応が進行する。代表的には金属触媒として $Ce^{3+, 4+}$ によって臭素酸ナトリウムがマロン酸を酸化する反応である。金属触媒の酸化還元電位が変化する事で色が鮮やかに変化することが知られている。本研究では Ru を金属触媒として用いる。

4.2 反応原理

BZ 反応は非常に多くの過程を経る反応であり、少なくとも 80 以上の素反応からなると予想されている。反応の基本的なメカニズムは図 4.1 そして次式に示される (Field et al., 1972; Field et al., 1974; Gao and Försterling, 1995)。

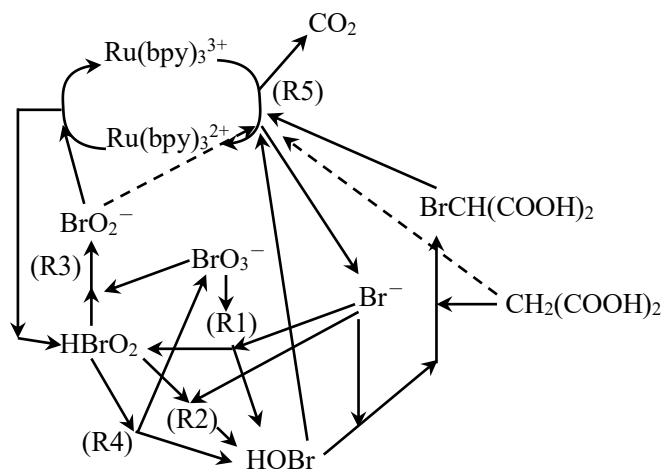


図 4.1 BZ 反応ネットワーク

プロセス A



プロセス B



プロセス C



ここで $X = \text{HBrO}_2$, $Y = \text{Br}^-$, $Z = \text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, $P = \text{HOBr}$, $A = \text{BrO}_3^-$ を示す. プロセス A では臭素イオン Y が消費され, ある値よりも小さくなるとプロセス B に移る. プロセス B では HBrO_2 : X が自己触媒として生成されると共に, 触媒の金属イオンが酸化される. 酸化された金属イオン Z が増える. この間, プロセス C が進み金属イオンが還元され, 再び臭素イオン Y が生成される. ここで, f は反応素過程の省略のための因子である. 臭素イオン Y は自己触媒の生成を妨げ, プロセス A が開始する. このように 3 つの経路を循環する化学振動が起きている. このように, 循環的な反応のサイクルには, 臭素イオンが重要な役割を果たしている.

BZ 反応は非攪拌状態の溶液中では反応の振動位相が空間的に伝搬する化学反応波が進行する. この反応-拡散系の化学振動では色変化が生じるため, 容易に, 周期的な同心円状や螺旋状の空間パターン進展の視覚的な観測が可能である. 金属触媒がセリウム ($\text{Ce}^{3+/4+}$) なら黄色と無色, ルテニウム ($\text{Ru}^{2+/3+}$) なら黄褐色と淡緑色に交互に色に変化することが知られている.

4.3 BZ 反応による自律振動ゲルの構成, 先行研究

1 章では温度, pH 変化や電気刺激により応答し体積変化する高分子ゲルについて紹介した. 本研究では化学反応, 特に BZ 反応によって膨潤・収縮を繰り返す自律振動ゲルを対象とする. このゲルは高分子ゲル中に金属触媒であるルテニウムトリスビピリジン錯体 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3$) を共重合させることで, ゲル内部で BZ 反応が起き, 拡散する (Yoshida et al., 1996).

今回用いる自律振動ゲルの構造は poly (NIPAAm-co-[Ru]-co-AMPS) と表されるように、温度応答性を持つ N-イソプロピルアクリルアミドゲルにルテニウムの錯イオンと 2-Acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid (AMPS) が重合したものである。図 4.2 に詳細な構造式を示す。臭素酸ナトリウム、マロン酸、硝酸を混合した BZ 反応基質溶液中、Ru のイオンの価数が 2 価～3 価に振動する。このとき疎水的な性質を示す Ru(bpy)₃²⁺から親水的な状態の Ru(bpy)₃³⁺に酸化還元されることで、周囲の溶媒を吸収・吐き出す、すなわち、膨潤、収縮が自律的に繰り返される。制御装置、外部刺激なしに独立した系内でのこうした振動運動はきわめて特異的である。

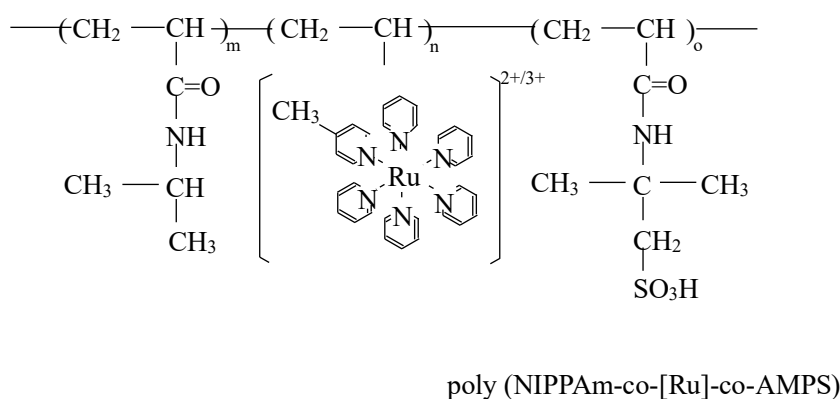


図 4.2 自律振動ゲル構造式

ゲルの大きさがある程度小さい場合、ゲル全体の色が振動し、膨潤収縮が起きる。一方、BZ 反応が化学波を起こすように、化学波の波長以上の大きさを持つ自律振動ゲルでは酸化・還元の色が生じ伝搬していく。このとき酸化還元電位の変化に伴う色と共に、膨潤領域と収縮領域の力学的な波が伝搬する蠕動運動が起きる。面領域では同心円状に波が広がるが、一軸方向に伸びた系だと長軸方向に一定速度で伝搬する様子が観察されている (Miyakawa et al., 2000)。

自律振動ゲルによる膨潤・収縮の現象は 1996 年、吉田らによって発見されて以降、非常に多くの研究がなされてきた。吉田らはさらに、ゲル長さの振動周期と色変化の周期がおおよそ同期しており (Yoshida et al., 2000)、BZ 溶液のマロン酸などの濃度の違いにより振動量や周期が異なることを示した (Yoshida et al., 2003)。また、Sakamoto ら (2003) は異なるゲル間で化学波の伝播が同期すること、Yuan ら (2013) が形状によって伝播のパターンが変化することを示した。Yashin らは BZ 反応とゲルの振動の数理モデルを構築した (Yashin et al., 2006, 2007)。化学波の伝搬による形状的な蠕動運動計測に関しては、田端ら (2002) が、ピ

ラーを有するゲルを作成, 反応させることでバルクゲルの BZ 反応の伝搬による繊毛運動を計測した.

竹岡ら (2003) が構造色により体積変化でゲル表面の色が変わることを利用して, 変位を見積もる研究を行ったが, 伝播によるゲルの変位計測はその変位の小ささから直接的な計測ができていなかった. ゲルはマイクロドメイン構造を有する多孔質のマイクロ相分離状態にすることで膨張幅が大きくなる. 前田ら (2008) はマイクロ相分離状態で 2-Acrylamide-2-methylpropane sulfonic acid (AMPS) を共重合させることで膨潤量を増大させ膨潤領域の伝搬時の変位を定量的に光学顕微鏡で計測した. 力学的な計測に関しては Sasaki ら (2003) が振動する円柱自律振動ゲルの長軸方向の力を計測した.

自律振動ゲルのアクチュエータとしての応用の研究も行われている. 前田ら (2007) はガラスとテフロン板に挟んで重合させることでゲル組成に偏りを生成し, 非対称な運動をするゲルを作成し, ラチェット上で前進する機構を作成した. Kuksenok (2011) らは架橋密度の違いから曲げ伸ばしが起きるゲルの計算モデルを構築した. ゲルの伝播を利用して溶液表面上の自律振動ゲルを往復運動させる研究もなされている (Nakata et al., 2014; Yoshii et al., 2016). 蠕動運動の応用例としては Murase (2009) らは自律振動ゲル上の円柱ゲルを蠕動運動によって移動させた. Shiraki (2012) らは化学波の伝播に伴う力学応答による膨潤収縮を利用して円環内の CO₂ バブルをシリンジポンプによる流れがある状態で, 数 100 μm 移動させることに成功した.

4.4 本計測の目的

本研究では化学波の伝播に伴う力学応答による膨潤収縮に注目して, DHM を用いてゲルの三次元蠕動運動を定量的に計測する. これまでの研究では比較的変位が大きい多孔質性を持つマイクロ相分離状態のゲルを光学顕微鏡を用いて二次元で計測するのが限界であった. 本研究では計測するのが困難であったマイクロ相分離状態でないゲルの変形を三次元で計測し, 検証評価する. さらにカラーカメラとの同時計測により酸化還元電位の変化による色変化を検出し, 化学反応とそれに伴う力学応答による膨潤収縮との関係を明らかにする.

4.5 自律振動ゲル作成手順

本研究の計測対象であるマイクロ相分離状態ではない自律振動ゲルの作成法を記す. poly(NIPPAM-co-[Ru]-co-AMPS)ゲルの作成のために NIPPAm (n-イソプロピルアクリルアミド), AMPS (2-acrylamide-2methylpropane sulfonic acid), Ru(bpy)₃, 架橋剤に MBAA (N,N'-

Methylene-bis-acrylamide), 重合開始剤に AIBN (azobisisobutyronitrile)を使用する.

1. 試薬作成

水, メタノールを窒素でバブリングした後, MBAA: 1.7mg, ルテニウムモノマー: 15.2mg, NIPPAm: 122mg, AIBN: 1.8mg をメタノール 0.72ml に溶かす. 十分に攪拌した後, AMPS: 3.9mg を溶かした水 0.07mL と先ほど混ぜたメタノールを混合させ再度十分攪拌する. 試薬と量を表 4.1 にまとめる.

表 4.1 自律振動ゲルモノマー組成

試薬	量
N,N'-Methylene-bis-acrylamide (MBAA)	1.7 mg
Ru(bpy) ₃	15.2mg
2-acrylamide-2methylpropane sulfonic acid (AMPS)	3.9 mg
N-Isopropylacrylamide (NIPPAm)	122 mg
azobisisobutyronitrile (AIBN)	1.8 mg
メタノール	0.72 ml
水	0.07 ml

2. 重合

大きさや薄さに応じてシート型と柱形状のゲルを作成する. シート型はシリコン板の厚みを調整することで比較的容易にゲルの厚みを変えることができるのに対し, 柱状ゲルは流路の断面の大きさに依存する. ただしシート型は取り出す際に表面をきれいな状態に取り出すことが困難である.

シート型ゲル: 調合したモノマー溶液をシリコンシートで型を作成し, 両面をガラスで挟み込み, 溶液が漏れないように十分に固定する.

柱状ゲル: ガラス管に溶液を封入し, 両端にパテ密封する.

型に入れたモノマー溶液をオーブンで 60°C に保った状態で 20 時間置いて重合させる.

3. 取り出し, 透析

シート型ゲル: 重合させたゲルを取り出し片面のガラスをゆっくり外す. ゲルが付着したガラス板を短時間硝酸につけ, へらを用いて慎重に外す.

柱状ゲル: ガラス管を適切な長さに折り, 水中に短時間漬け, 注射器を用いて押し出す.

取り出したゲルは水中に1日以上浸漬させ、透析により未反応なモノマーを取り除く。

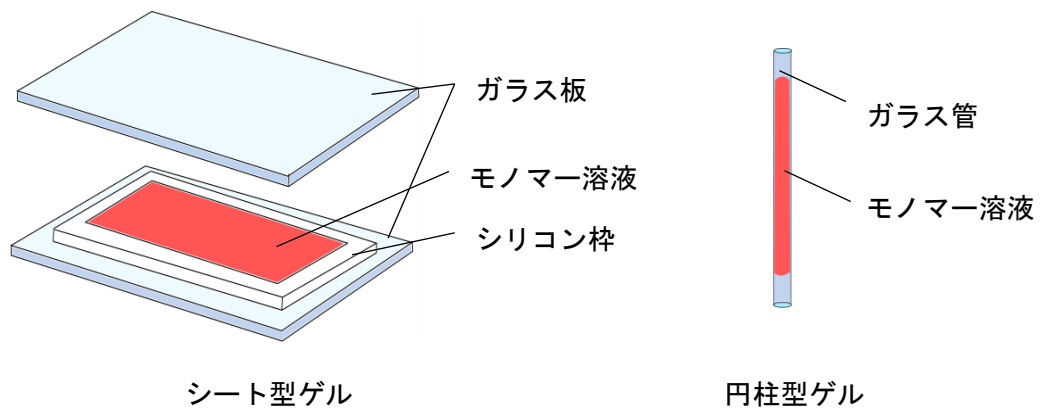


図 4.3 シート・柱状型ゲル作成手法

4.6 節-4.11 節は公表できないため除外した。

第5章 結論

本研究では自律振動ゲルの三次元計測のための DHM 粒子三次元検出・追跡システムを構築し、カラーカメラとの組み合わせにより、自律振動ゲルの化学反応と力学振動の伝播運動の解明を試みた。以下に本研究により得られた結論を述べる。

DHM によるマイクロ三次元計測システムの開発

- 1) DHM によって得られた三次元位相像から、粒子位置を三次元で検出・追跡するシステムを構築した。「二次元理論像による粒子検出」と「三次元実ボリューム像による粒子追跡」を組み合わせることで、マイクロトレーサ粒子を三次元で追跡可能な計測システムの開発に成功した。
- 2) DHM による粒子三次元検出・追跡システムの偶然誤差は面内方向 $0.42\mu\text{m}$ 、奥行方向 $0.83\mu\text{m}$ であった。従来の focusing function を用いた粒子追跡アルゴリズムよりも精度よく追跡できた。自律振動ゲルは数 μm ～数十 μm で振動することから、定量的に自律振動ゲルの三次元動態を計測できる精度をもつ計測システムを構築することができた。

DHM による自律振動ゲルの動態計測

- 3) DHM による粒子検出・追跡システムを用いて自律振動ゲル全体の運動測定に成功した。シート状のゲル表面上粒子、そしてロッド状ゲル内部の粒子を追跡して、化学波の伝播とそれに伴う力学応答によるゲルの変形を定量的に計測できた。さらにカラーカメラとの組み合わせにより酸化還元反応による色変化と化学波の伝播に伴う力学応答による膨潤収縮とを同時計測可能なシステムを構築した。
- 4) シート状のゲル表面上の変位を計測した。ゲルの変形は化学波伝播方向に対して垂直な奥行方向だけではなく、面内方向にも生じていることが分かった。化学波の伝播とそれに伴う力学応答による膨潤領域の伝播方向には相関があり、二次元平面では反応開始点を中心に同心円状に化学波と膨潤波が進行することが分かった。
- 5) ロッド状のゲル内部の変位を計測し、ゲル全体の挙動を明らかにした。計測領域内のスパン方向の変形においてゲル中央部と上下端面付近で位相が反転していること

が確認できた。ゲルは複雑で三次元的な運動をしていることが計測により明らかになった。化学波の伝播とそれに伴う力学応答による膨潤収縮との関連性を明らかにした。微小領域では化学波の伝播による酸化と膨潤開始の位相は一致し、同周期で膨潤収縮を繰り返すことを示した。

第6章 謝辞

本論文は筆者が在籍中に行なった研究をまとめたものでございます。研究は決してひとりで成し遂げられるものではなく、非常に多くの方のご支援、ご助力をいただいた結果であります。ここに深く感謝の意を示すと共に厚く御礼申し上げたいと存じます。

東京大学生産技術研究所教授大島まり先生には多大なる感謝を申し上げます。本研究の機会をいただけたほか、研究の短期的かつ長期的展望、論文や発表に関して数々のご助言やご指導をいただきました。実験装置や計算機など充実した環境を用意していただけたことは一学生として大変喜ばしいことでありました。厚く御礼申し上げます。

ウシオ電機株式会社、松尾司氏、世良英之氏には本研究の中心となる DHM のプロトタイプ機を提供していただいた上、毎月ご多忙の中、ミーティングを開いていただき、光学的な側面からアルゴリズムや計測、計算の高速化など多岐にわたって様々なアドバイスをいただきました。ここに深く感謝いたします。

芝浦工業大学機械機能工学科准教授前田真吾先生には本研究の計測対象である自律振動ゲル作成のための環境をいただいたほか、実際の作成、評価に関しまして様々なご助言をいただきました。綿密なご指導をいただけ、視野を広く研究に取り組めたことに対して大いに感謝申し上げます。

芝浦工業大学機械機能工学科吉村恭輔氏、奥瀧貴嗣氏には自律振動ゲル作成方法をご教授いただきました。高技術な操作を難なくこなす姿には大変驚嘆いたしました。私は完全に会得することはできませんでしたが一歩高みに近づいた気を持っております。深く感謝いたします。

東京大学生産技術研究所藤井研究室特任助教木下晴之先生には月一度のミーティングの時間を割いていただいたうえ、貴重な計測機器をお貸しいただきました。計測結果や手法に関しまして的確な指摘やご助言をいただき、研究の方向性を定めることができました。ここに謝意を記します。

論文審査におきまして、東京大学工学系研究科教授鈴木雄二先生、東京大学工学系研究科教授高木周先生、東京大学工学系研究科准教授小穴英廣先生に謹んで謝意を表します。的確なご指摘をいただき、研究者としての不熟さを実感いたしました。

研究室内では、技術職員大石正道氏には実験をするにあたり様々な機器や用具の使用方を教えていただき、快適な実験環境を備えていただきました。種々様々の実験器具を自由自在に操る姿にはいつも驚かされました。実験のみならず研究を進めるにあたり多くのア

ドバイスを頂き、手取り足取りサポートしていただきました。大学院生先輩の張浩氏には研究のテーマは異なりましたが、研究に対する感情を共有していただきました。同大学院先輩である原田篤氏、山口景平氏には私が修士課程の際、お世話になりました。状況に対する取舍選択や効率的な事象の取り組みに対して感銘を受けました。同大学院生後輩の夏川理央氏、鈴木裕二氏、尹彰永氏、陳琰氏、岡田耕氏、佐藤利彦氏、余雪柯氏、三木智裕氏には後輩として研究室内の運営に関しましてお手数をおかけしました。夏川理央氏の物事に対する極めてエネルギッシュな姿勢は私の研究には足りていないものばかりであり、非常に参考になりました。鈴木裕二氏とは分野は違いましたが研究について意見交換していただきました。普段の日常生活におきましても大変お世話になりました。尹彰永氏の環境に頼らずハイレベルな研究を推進し課題に取り組む姿勢は大変刺激になりました。陳琰氏には日々の生活、特に餐に関する考え方に唸られました。岡田耕氏には物事に対する感受や認識、対応に関しまして非常に勉強になりました。佐藤利彦氏には幅広い知識や情報を共有していただき有意義な研究生生活を過ごすことが出来ました。余雪柯氏には英語論文の執筆にあたりまして多くのご助言をいただきました。三木智裕氏には経済活動において多大にお世話になりました。彼らと大学院生として楽しく研究生生活を過ごすことができたことに御礼申し上げます。

最後に私の学生生活を援助くださった両親に深く感謝申し上げます。

第7章 参考文献

- Achilleos, E. C., Prud'homme, R. K., Christodoulou, K. N., Gee, K. R. & Kevrekidis, I. G. Dynamic deformation visualization in swelling of polymer gels. *Chem. Eng. Sci.* **55**, 3335–3340 (2000).
- Asundi, A. *Digital Holography for MEMS and Microsystem Metrology. Digital Holography for MEMS and Microsystem Metrology* (Wiley, 2011).
- Attwood, T. K., Nelmes, B. J. & Sellen, D. B. Electron microscopy of beaded agarose gels. *Biopolymers* **27**, 201–212 (1988).
- Bhushan, B. Biomimetics: lessons from nature--an overview. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **367**, 1445–86 (2009).
- Chen, I. C., Kuksenok, O., Yashin, V. V., Balazs, A. C. & Van Vliet, K. J. Mechanical resuscitation of chemical oscillations in Belousov-Zhabotinsky gels. *Adv. Funct. Mater.* **22**, 2535–2541 (2012).
- Chen, I. C. *et al.* Shape- and size-dependent patterns in self-oscillating polymer gels. *Soft Matter* **7**, 3141 (2011).
- Chen, W., Quan, C. & Tay, C. J. Extended depth of focus in a particle field measurement using a single-shot digital hologram. *Appl. Phys. Lett.* **95**, 201103 (2009).
- Choi, Y. S. & Lee, S. J. Three-dimensional volumetric measurement of red blood cell motion using digital holographic microscopy. *Appl. Opt.* **48**, 2983 (2009).
- Cuche, E., Marquet, P. & Depeursinge, C. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Appl. Opt.* **38**, 6994 (1999).

- Einstein, A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann. Phys.* **322**, 549–560 (1905).
- Elsinga, G. E., Westerweel, J., Scarano, F. & Novara, M. On the velocity of ghost particles and the bias errors in Tomographic-PIV. *Exp. Fluids* **50**, 825–838 (2011).
- Erkan, N., Shinohara, K., Someya, S. & Okamoto, K. Three-component velocity measurement in microscale flows using time-resolved PIV. *Meas. Sci. Technol.* **19**, 057003 (2008).
- Field, R. J., Koros, E. & Noyes, R. M. Oscillations in chemical systems. II. Thorough analysis of temporal oscillation in the bromate-cerium-malonic acid system. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 8649–8664 (1972).
- Field, R. J. & Noyes, R. M. Oscillations in chemical systems. IV. Limit cycle behavior in a model of a real chemical reaction. *J. Chem. Phys.* **60**, 1877–1884 (1974).
- Flory, P. J. Fundamental Principles of Condensation Polymerization. *Chem. Rev.* **39**, 137–197 (1946).
- Fukushima, T., Asaka, K., Kosaka, A. & Aida, T. Fully Plastic Actuator through Layer-by-Layer Casting with Ionic-Liquid-Based Bucky Gel. *Angew. Chemie Int. Ed.* **44**, 2410–2413 (2005).
- Gabor, D. A New Microscopic Principle. *Nature* **161**, 777–778 (1948).
- Gao, Y. & Foersterling, H.-D. Oscillations in the Bromomalonic Acid/Bromate System Catalyzed by [Ru(bipy)₃]²⁺. *J. Phys. Chem.* **99**, 8638–8644 (1995).
- Gire, J. *et al.* Digital holography of particles: benefits of the ‘inverse problem’ approach. *Meas. Sci. Technol.* **19**, 074005 (2008).

- Griess, G. A., Guiseley, K. B. & Serwer, P. The relationship of agarose gel structure to the sieving of spheres during agarose gel electrophoresis. *Biophys. J.* **65**, 138–48 (1993).
- Guildenbecher, D. R., Gao, J., Reu, P. L. & Chen, J. Digital holography simulations and experiments to quantify the accuracy of 3D particle location and 2D sizing using a proposed hybrid method. *Appl. Opt.* **52**, 3790 (2013).
- Gyorgyi, L., Turanyi, T. & Field, R. J. Mechanistic details of the oscillatory Belousov-Zhabotinskii reaction. *J. Phys. Chem.* **94**, 7162–7170 (1990).
- Hara, Y. & Yoshida, R. Self-Oscillating Polymer Fueled by Organic Acid. *J. Phys. Chem. B* **112**, 8427–8429 (2008).
- Hesseling, C., Peinke, J. & Gülker, G. Adaptation of reference volumes for correlation-based digital holographic particle tracking. *Meas. Sci. Technol.* **29**, 045207 (2018).
- Hirokawa, Y., Jinnai, H., Nishikawa, Y., Okamoto, T. & Hashimoto, T. Direct Observation of Internal Structures in Poly(N-isopropylacrylamide) Chemical Gels. (1999).
- Hirokawa, Y. & Tanaka, T. Volume phase transition in a nonionic gel. *J. Chem. Phys.* **81**, 6379–6380 (1984).
- Ihara, H. & Mori, K. Autonomous Decentralized Computer Control Systems. *Computer (Long. Beach. Calif.)* **17**, 57–66 (1984).
- Kao, H. P. & Verkman, A. S. Tracking of single fluorescent particles in three dimensions: use of cylindrical optics to encode particle position. *Biophys. J.* **67**, 1291–300 (1994).
- Kim, M. K. *Digital holographic microscopy : principles, techniques, and applications.* (Springer, 2011).

- Kofod, G., Wirges, W., Paajanen, M. & Bauer, S. Energy minimization for self-organized structure formation and actuation. *Appl. Phys. Lett.* **90**, 081916 (2007).
- Kuksenok, O. *et al.* Exploiting gradients in cross-link density to control the bending and self-propelled motion of active gels. *J. Mater. Chem.* **21**, 8360 (2011).
- Langehanenberg, P., Kemper, B., Dirksen, D. & von Bally, G. Autofocusing in digital holographic phase contrast microscopy on pure phase objects for live cell imaging. *Appl. Opt.* **47**, D176-82 (2008).
- Lawson, N. D. & Weinstein, B. M. In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish. *Dev. Biol.* **248**, 307–318 (2002).
- Lee, S. J., Seo, K. W., Choi, Y. S. & Sohn, M. H. Three-dimensional motion measurements of free-swimming microorganisms using digital holographic microscopy. *Meas. Sci. Technol.* **22**, 064004 (2011).
- Li, J., Rozen, I. & Wang, J. Rocket Science at the Nanoscale. *ACS Nano* **10**, 5619–5634 (2016).
- Lima, R., Wada, S., Tsubota, K. & Yamaguchi, T. Confocal micro-PIV measurements of three-dimensional profiles of cell suspension flow in a square microchannel. *Meas. Sci. Technol.* **17**, 797–808 (2006).
- Liu, R., Dey, D. K., Boss, D., Marquet, P. & Javidi, B. Recognition and classification of red blood cells using digital holographic microscopy and data clustering with discriminant analysis. *J. Opt. Soc. Am. A* **28**, 1204 (2011).
- Lum, G. Z. *et al.* Shape-programmable magnetic soft matter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E6007–E6015 (2016).
- Maeda, S., Hara, Y., Sakai, T., Yoshida, R. & Hashimoto, S. Self-Walking Gel. *Adv. Mater.* **19**, 3480–3484 (2007).

- Maeda, S., Hara, Y., Yoshida, R. & Hashimoto, S. Peristaltic Motion of Polymer Gels. *Angew. Chemie Int. Ed.* **47**, 6690–6693 (2008).
- Meinhart, C. D., Wereley, S. T. & Gray, M. H. B. Volume illumination for two-dimensional particle image velocimetry. *Meas. Sci. Technol.* **11**, 809–814 (2000).
- Minsky, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* **10**, 128–138 (1988).
- Miyakawa, K., Sakamoto, F., Yoshida, R., Kokufuta, E. & Yamaguchi, T. Chemical waves in self-oscillating gels. *Phys. Rev. E* **62**, 793–798 (2000).
- Mohammed, S. K., Bouamama, L., Bahloul, D. & Picart, P. Quality assessment of refocus criteria for particle imaging in digital off-axis holography. *Appl. Opt.* **56**, F158 (2017).
- Murase, Y., Maeda, S., Hashimoto, S. & Yoshida, R. Design of a Mass Transport Surface Utilizing Peristaltic Motion of a Self-Oscillating Gel. *Langmuir* **25**, 483–489 (2009).
- Murata, S. & Yasuda, N. Potential of digital holography in particle measurement. *Opt. Laser Technol.* **32**, 567–574 (2000).
- Nakata, S., Yoshii, M., Suzuki, S. & Yoshida, R. Periodic Reciprocating Motion of a Polymer Gel on an Aqueous Phase Synchronized with the Belousov–Zhabotinsky Reaction. *Langmuir* **30**, 517–521 (2014).
- Ooms, T., Koek, W., Braat, J. & Westerweel, J. Optimizing Fourier filtering for digital holographic particle image velocimetry. *Meas. Sci. Technol.* **17**, 304–312 (2006).
- Pan, G. & Meng, H. Digital holography of particle fields: reconstruction by use of complex amplitude. *Appl. Opt.* **42**, 827 (2003).

- Patel, M., Leggett, S. E., Landauer, A. K., Wong, I. Y. & Franck, C. Rapid, topology-based particle tracking for high-resolution measurements of large complex 3D motion fields. *Sci. Rep.* **8**, 5581 (2018).
- Pitkäaho, T., Niemelä, M. & Pitkäkangas, V. Partially coherent digital in-line holographic microscopy in characterization of a microscopic target. *Appl. Opt.* **53**, 3233 (2014).
- Purcell, E. M. Life at low Reynolds number. *Am. J. Phys.* **45**, 3–11 (1977).
- Rajadhyaksha, M., Grossman, M., Esterowitz, D., Webb, R. H. & Anderson, R. R. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 946–52 (1995).
- Ren, Z., Chen, N. & Lam, E. Y. Extended focused imaging and depth map reconstruction in optical scanning holography. *Appl. Opt.* **55**, 1040 (2016).
- Sakamoto, F. & Miyakawa, K. Synchronization of Chemical Waves in Diffusively Coupled Self-Oscillating Gels. *J. Phys. Soc. Japan* **72**, 2173–2176 (2003).
- Satake, S., Kunugi, T., Sato, K., Ito, T. & Taniguchi, J. Three-Dimensional Flow Tracking in a Micro Channel with High Time Resolution Using Micro Digital-Holographic Particle-Tracking Velocimetry. *Opt. Rev.* **12**, 442–444 (2005).
- Sato, O. Dimensional Metrology on Micro-and Meso-Scale. *J. Japan Soc. Precis. Eng.* **74**, 217–221 (2008).
- Schmitt, J. M. OCT elastography: imaging microscopic deformation and strain of tissue. *Opt. Express* **3**, 199 (1998).
- Schnars, U. & Jüptner, W. *Digital Holography*. (Springer, 2005).

- Seo, K. W. & Lee, S. J. High-accuracy measurement of depth-displacement using a focus function and its cross-correlation in holographic PTV. *Opt. Express* **22**, 15542 (2014).
- Seok, S. *et al.* Meshworm: A Peristaltic Soft Robot With Antagonistic Nickel Titanium Coil Actuators. *IEEE/ASME Trans. Mechatronics* **18**, 1485–1497 (2013).
- Sheng, J., Malkiel, E. & Katz, J. Digital holographic microscope for measuring three-dimensional particle distributions and motions. *Appl. Opt.* **45**, 3893 (2006).
- Shigeo, S., Shogo, K., Ryo, Y. & Yamaguch, T. Mechanical Oscillation Coupled with the Belousov–Zhabotinsky Reaction in Gel. (2003).
- Shiraki, Y. & Yoshida, R. Autonomous Intestine-Like Motion of Tubular Self-Oscillating Gel. *Angew. Chemie Int. Ed.* **51**, 6112–6116 (2012).
- Stockmayer, W. H. Theory of Molecular Size Distribution and Gel Formation in Branched - Chain Polymers. *J. Chem. Phys.* **11**, 45–55 (1943).
- Suzuki, S., Nozaki, Y. & Kimura, H. High-speed holographic microscopy for fast-propagating cracks in transparent materials. *Appl. Opt.* **36**, 7224 (1997).
- Tabata, O., Hirasawa, H., Aoki, S., Yoshida, R. & Kokufuta E. Ciliary motion actuator using self-oscillating gel. *Sensors and Actuators A: Physical.* **95**, 234-238 (2002).
- Takeda, M., Ina, H. & Kobayashi, S. Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry. *J. Opt. Soc. Am.* **72**, 156 (1982).
- Takeoka, Y., Watanabe, M. & Yoshida, R. Self-Sustaining Peristaltic Motion on the Surface of a Porous Gel. (2003).
- Tanaka, T. Collapse of Gels and the Critical Endpoint. *Phys. Rev. Lett.* **40**, 820–823 (1978).

- Tien, W.-H., Kartes, P., Yamasaki, T. & Dabiri, D. A color-coded backlighted defocusing digital particle image velocimetry system. *Exp. Fluids* **44**, 1015–1026 (2008).
- Toy, M. F. *et al.* Enhanced robustness digital holographic microscopy for demanding environment of space biology. *Biomed. Opt. Express* **3**, 313 (2012).
- Verpillat, F., Joud, F., Desbiolles, P. & Gross, M. Dark-field digital holographic microscopy for 3D-tracking of gold nanoparticles. *Opt. Express* **19**, 26044 (2011).
- Villangca, M. J., Palima, D., Bañas, A. R. & Glückstad, J. Light-driven micro-tool equipped with a syringe function. *Light Sci. Appl.* **5**, e16148–e16148 (2016).
- Wever, R. A. *The circadian system of man : results of experiments under temporal isolation.* (Springer-Verlag, 1979).
- Xu, W., Jericho, M. H., Meinertzhagen, I. A. & Kreuzer, H. J. Digital in-line holography of microspheres. *Appl. Opt.* **41**, 5367 (2002).
- Yang, W., Kostinski, A. B. & Shaw, R. A. Depth-of-focus reduction for digital in-line holography of particle fields. *Opt. Lett.* **30**, 1303 (2005).
- Yang, Y. & Kang, B. Enhanced measurement capability of a digital particle holographic system for flow field measurements. *Flow Meas. Instrum.* **22**, 461–468 (2011).
- Yashin, V. V. & Balazs, A. C. Theoretical and computational modeling of self-oscillating polymer gels. *J. Chem. Phys.* **126**, 124707 (2007).
- Yashin, V. V. & Balazs, A. C. Pattern formation and shape changes in self-oscillating polymer gels. *Science* **314**, 798–801 (2006).
- Yoon, S. Y. & Kim, K. C. 3D particle position and 3D velocity field measurement in a microvolume via the defocusing concept. *Meas. Sci. Technol.* **17**, 2897–2905 (2006).

- Yoshida, R., Keigo, T. & Yamaguchi, T. Self-Beating Motion of Gels and Modulation of Oscillation Rhythm Synchronized with Organic Acid. (2003).
- Yoshida, R., Takahashi, T., Yamaguchi, T. & Ichijo, H. Self-oscillating gel. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5134–5135 (1996).
- Yoshida, R., Tanaka, M., Onodera, S., Yamaguchi, T. & Kokufuta, E. In-Phase Synchronization of Chemical and Mechanical Oscillations in Self-Oscillating Gels. (2000).
- Yuan, P. *et al.* UV patternable thin film chemistry for shape and functionally versatile self-oscillating gels. *Soft Matter* **9**, 1231–1243 (2013).
- ZAIKIN, A. N. & ZHABOTINSKY, A. M. Concentration Wave Propagation in Two-dimensional Liquid-phase Self-oscillating System. *Nature* **225**, 535–537 (1970).
- Zaikin, A. N. & Zhabotinsky, A. M. Concentration wave propagation in two-dimensional liquid-phase self-oscillating system. *Nature* **225**, 535–537 (1970).
- 可視化情報学会. *PIV* ハンドブック. (森北出版, 2002).